



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>

94 INPL 002 N

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

THÈSE

BIU NANCY
Service Commun de Documentation
INPL
2, avenue de la Forêt de Haye - B.P. 3
54501 VANDOEUVRE Cédex FRANCE

Présentée
pour l'obtention du diplôme de
DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE
Génie des Procédés
par

Eric DREVETON

sujet de la thèse :

**LE GELLANE : INFLUENCE DE L'HYDRODYNAMIQUE DU FERMENTEUR
SUR SA PRODUCTION, SES CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES ET
SES POSSIBILITÉS D'APPLICATION DANS LES FLUIDES DE FORAGE.**

Soutenue le 13 janvier 1994 devant la Commission d'Examen composée de :

MM.	J. M. ENGASSER	Président
	G. GOMA	Rapporteur
	M. MOAN	Rapporteur
	L. HOPLIN	Examineur
	D. DECROOCQ	Examineur
	F. MONOT	Examineur



D 136 001359 8

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

[M] 1994 DREVETON, E.

BIU NANCY
Service Commun de Documentation
INPL
2, avenue de la Forêt de Haye - B.P. 3
54501 VANDOEUVRE Cédex FRANCE

THÈSE

Présentée
pour l'obtention du diplôme de
DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE
Génie des Procédés

par

Eric DREVETON

sujet de la thèse :

**LE GELLANE : INFLUENCE DE L'HYDRODYNAMIQUE DU FERMENTEUR
SUR SA PRODUCTION, SES CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES ET
SES POSSIBILITÉS D'APPLICATION DANS LES FLUIDES DE FORAGE.**

Soutenue le 13 janvier 1994 devant la Commission d'Examen composée de :

MM.	J. M. ENGASSER	Président
	G. GOMA	Rapporteur
	M. MOAN	Rapporteur
	L. CHOPLIN	Examineur
	D. DECROOCQ	Examineur
	F. MONOT	Examineur

A l'issue de cette thèse qui m'a permis d'arpenter le monde passionnant des polymères, j'aimerais en premier lieu remercier le quadriumvirat qui m'a suivi, conseillé, encouragé et guidé tout au long de ce périple : Madame J. Lecourtier, Messieurs D. Ballerini et F. Monot de l'Institut Français du Pétrole ainsi que Monsieur L. Choplin du GEMICO de l'ENSIC de Nancy.

J'exprime ensuite toute ma gratitude à Monsieur J.-M Engasser pour m'avoir fait l'honneur de présider la commission d'examen de cette thèse, et à Messieurs G. Goma et M. Moan pour avoir accepté d'en être les rapporteurs.

L'aventure du gellane m'ayant conduit dans de nombreux laboratoires, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et ma sympathie aux personnes suivantes :

- Monsieur B. Brahimi ainsi que l'ensemble du personnel du Département de Génie Chimique de l'Université Laval de Québec pour m'avoir offert leur hospitalité et le goût d'aimer leur Belle Province,*

- Monsieur Ph. Renault qui m'a accueilli dans la division de Recherche "Biotechnologie et Environnement" de l'Institut Français du Pétrole ainsi que l'ensemble du personnel de cette division pour leur aide et leur accueil quotidien. Que soit à ce stade particulièrement remercié Monsieur Y. Benoit pour son soutien sans faille,*

- Monsieur G. Muller et sa très sympathique équipe de l'URA 500 de l'Université de Rouen qui m'ont fait découvrir le monde impitoyable de la physico-chimie des polymères et sans qui ces travaux ne seraient pas ce qu'ils sont,*

- et finalement le personnel de la Division de Recherche "Matériaux, Polymères, Chimie appliquée" de l'Institut Français du Pétrole, et en particulier Madame A. Audibert-Hayet ainsi que Messieurs J.F. Argillier, G. Courbin, G. Duriez, Ph. Leminter et A. Rivereau, pour leur disponibilité, leurs conseils et leur accueil sans égal.*

Permettez-moi d'adresser une mention spéciale à ma compagne, Mademoiselle E. Baudet pour son soutien quotidien, ses conseils avisés et pour m'avoir supporté dans les moments les plus difficiles...

Finalement, je me dois de remercier l'Ecole Nationale Supérieure des Pétroles et Moteurs ainsi que le groupement d'industriels du GEMICO (Elf-Atochem, Lafarge-Coppée, Michelin, Rhône-Poulenc Industrialisation et Total) pour leur soutien financier.

C'est une illusion commune de croire que ce que nous connaissons aujourd'hui représente tout ce que nous ne pourrons jamais connaître. Rien n'est plus vulnérable qu'une théorie scientifique, car elle n'est qu'une tentative éphémère pour expliquer des faits, et non une vérité éternelle en soi.

C.G. Jung

Résumé

Cette étude porte sur les potentialités d'application d'un nouveau polysaccharide bactérien, le gellane, dans un secteur demandeur d'agents viscosifiants non polluants, les fluides de forage à base d'eau.

Les connaissances sur la production bactérienne du gellane étant limitées, nous avons étudié en premier lieu cette biosynthèse et l'importance de certains paramètres sur la production et les caractéristiques physico-chimiques de ce polymère. Parmi ceux-ci, les conditions hydrodynamiques de fermentation ont été particulièrement étudiées car la production d'un exopolysaccharique provoque une forte augmentation de la viscosité du moût de culture et l'apparition d'effets rhéofluidifiants prononcés.

*Des fermentations réalisées avec des modules d'agitation différents (ruban hélicoïdal, turbines Rushton et centripète), avec une limitation en azote ou avec un apport supplémentaire d'oxygène ont montré que le transfert d'oxygène est un paramètre clef de la production de gellane. De plus, ces expériences ont permis d'acquérir de nombreuses connaissances sur la physiologie de la bactérie productrice *Auromonas elodea* et sur les cinétiques de production.*

Parallèlement, les résultats montrent que les conditions hydrodynamiques d'agitation les plus homogènes conduisent à l'obtention d'un polymère de masse molaire plus élevée. En outre, le transfert d'oxygène n'influe pas sur la masse molaire du produit mais les fermentations les plus limitées ont donné des polymères plus substitués.

Finalement, le gellane natif s'avère être très intéressant en tant que réducteur de filtrat et agent thixotrope pour les applications en fluide de forage. Il présente des potentialités analogues à celles des produits semi-synthétiques couramment utilisés, mais il est moins sensible aux ions divalents et apporte aux fluides un caractère thixotrope très recherché.

Table des matières

	Page
1. INTRODUCTION	10
2. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	14
2.1. Les polysaccharides	14
2.1.1. Les polysaccharides microbiens exocellulaires	14
2.1.2. Biosynthèse	16
2.2. Rhéologie	18
2.2.1. Définitions de base de la rhéologie	19
2.2.1.1. Vitesse de cisaillement	19
2.2.1.2. Viscosité des liquides	19
2.2.1.3. Viscosité intrinsèque	19
2.2.1.4. Notion de régimes dilué et semi-dilué	22
2.2.2. Principaux types d'écoulement	22
2.2.3. Viscoélasticité linéaire	26
2.2.3.1. Corps viscoélastiques linéaires	26
2.2.3.2. Solutions et gels de polymère	27
2.3.1. La souche	31
2.3.2. Croissance cellulaire et production	31
2.3.3. Phénomènes de transfert dans un fermenteur	33
2.3.3.1. L'agitation	33
2.3.3.2. L'apport en oxygène	36
2.3.3.3. Influence des conditions de transfert	37
2.3.3.4. Viscosité de procédé du moût de fermentation	40
2.3.4. Extraction du polysaccharide	44
2.4. Le gellane	44
2.4.1. Production du gellane	46
2.4.2. Caractérisation de la molécule	50
2.4.2.1. Transition conformationnelle	50
2.4.2.2. Caractéristiques physico-chimiques	54
2.4.2.3. Liaisons en conformation ordonnée	56
2.4.2.4. Effet des substituants de la chaîne hydrocarbonée	57
2.4.3. Propriétés rhéologiques	58
2.4.3.1. Solubilisation et gélification	58
2.4.3.2. Solutions de gellane	59

2.4.3.3. Gels de gellane	60
2.5. Les fluides de forage	64
2.5.1. Fonction.....	64
2.5.2. Composition	66
3. MATÉRIEL ET MÉTHODES	69
3.1. Souche bactérienne	69
3.2. Installation de fermentation	70
3.3. Conditions de fermentation	77
3.4. Suivi de la fermentation	78
3.5. Extraction du polysaccharide	81
3.6. Caractérisation du polysaccharide	82
3.6.1. Composition	82
3.6.2. Rhéologie en régime dilué.....	83
3.6.3. Diffusion de lumière.....	83
3.6.4. Chromatographie de perméation de gel.....	86
3.6.5. Pouvoir rotatoire	87
3.7. Fluides de forage	87
3.7.1. Préparation.....	87
3.7.2. Rhéologie.....	88
3.7.3. Filtration	88
4. INFLUENCE DE L'HYDRODYNAMIQUE DU FERMENTEUR SUR LA PRODUCTION DE GELLANE	90
4.1. Fermentations avec le ruban hélicoïdal.....	91
4.1.1. Analyse de la fermentation RH250	91
4.1.1.1. Suivi de la fermentation	91
4.1.1.2. Croissance bactérienne et production de gellane	93
4.1.1.3. Propriétés rhéologiques du moût	93
4.1.1.4. Hydrodynamique du fermenteur	96
4.1.1.5. Conclusions.....	98
4.1.2. Autres fermentations avec le ruban hélicoïdal	100
4.1.2.1. Influence de la vitesse d'agitation : RH125	103
4.1.2.3. Influence de la nature de la source d'azote	105
4.1.2.3.1 RH250N	105
4.1.2.3.2 Essais en fioles de Fernbach	107
4.2. Influence du système d'agitation	110

4.3. Discussion et comparaison des fermentations	115
4.3.1. Qualité de l'agitation et du transfert d'oxygène.....	115
4.3.2. Production de cellules et de polysaccharide.....	117
4.3.2.1. Production de cellules	117
4.3.2.2. Production de polysaccharide.....	120
5. CARACTÉRISATION DES GELLANES SYNTHÉTISÉS	131
5.1. Composition des gellanes bruts.....	131
5.2. Caractérisation physico-chimique des gellanes natifs	132
5.2.1. Mise au point de la clarification	132
5.2.2. Clarification des solutions	135
5.2.3. Degré d'estérification du polymère.....	136
5.2.4. Spectres en infrarouge	137
5.2.5. Viscosités intrinsèques	141
5.2.5.1. Viscosités intrinsèques des solutions dialysées.....	141
5.2.5.2. Influence de la purification.....	143
5.2.5.3. Influence de l'introduction de sels	143
5.2.6. Masses molaires obtenues par diffusion de lumière.....	144
5.2.7. Profils de masse par chromatographie de perméation de gel	144
5.2.8. Conclusion.....	146
5.3. Caractéristiques physico-chimiques des gellanes désestérifiés	147
5.3.1. Viscosités intrinsèques et masses molaires par diffusion de lumière	147
5.3.2. Profils de masse par chromatographie de perméation de gel	151
5.4. Conclusion	151
6. POTENTIALITÉS DU GELLANE DANS LES FLUIDES DE FORAGE	154
6.1. Conditions d'analyse	155
6.2. Optimisation de l'homogénéisation	156
6.3. Influence des concentrations en gellane et en électrolytes sur les caractéristiques des fluides.....	157
6.4. Comparaison avec la CMC	161
6.5. Influence de la température.....	163
6.6. Influence des conditions de production	165
6.7. Conclusion	168

7. CONCLUSION ET PERPECTIVES	171
7.1. Production de gellane	171
7.2. Influence de l'hydrodynamique sur les caractéristiques du gellane.	173
7.3. Intérêt du gellane dans les boues de forage.....	174
7.4. Perspectives.....	175
8. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	178
CHAPITRE 9 : ANNEXE	187
9. ANNEXE	188

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1. Introduction

Le forage est une opération déterminante pour la prospection et l'exploitation des gisements d'hydrocarbures. Le fluide de forage utilisé, bien qu'il ne représente que 7 à 10% des coûts totaux de l'opération, est un facteur clef du succès technique et économique d'un forage.

Pour assurer les fonctions essentielles qui leur sont demandées, les fluides de forage doivent présenter des caractéristiques rhéologiques et physico-chimiques bien définies. Ainsi, le fluide doit assurer une pression hydrostatique pour prévenir les éruptions, avoir une viscosité suffisante pour rendre possible la remontée des déblais forés à la surface et présenter un caractère thixotrope permettant le maintien des déblais en suspension lors des arrêts de circulation. Il doit encore limiter l'invasion des formations forées par la création d'un cake faiblement perméable sur les parois du puits et en assurer la stabilité.

Les fluides de forage utilisés sont à base d'eau ou à base d'huile, ces derniers étant des émulsions inverses dont la phase dispersante est généralement constituée de gazole. Ce type de fluide est principalement employé pour les forages profonds où la température de fond rend impossible l'utilisation des fluides à base d'eau traditionnels ou encore pour le forage des zones argileuses. Néanmoins, dans un souci croissant de protection de l'environnement, la législation tend à limiter l'emploi des fluides à base d'huile et il est désormais nécessaire de développer des formulations non polluantes à base d'eau. Celles-ci sont principalement constituées d'argile, à des concentrations de 30 à 60 g/l, à laquelle sont ajoutés des additifs et des électrolytes qui permettent au fluide de remplir ses différentes fonctions en conditions de puits (haute température, forte salinité, argiles).

Les additifs généralement utilisés sont des macromolécules d'origines diverses :

- les polymères synthétiques, comme les polyacrylamides, ou semi-synthétiques, comme les polymères dérivés de la cellulose, sont couramment employés dans ces formulations. Cependant, les performances de ces composés peuvent être variables d'un lot à l'autre et leur emploi n'est pas recommandé dans des conditions de forte salinité et en particulier en présence de calcium,
- les polymères d'origine naturelle comme l'amidon ou la gomme de guar sont parfois utilisés, mais ils sont peu stables à des températures supérieures à 100°C et leur qualité est encore moins constante que celle des polymères synthétiques,
- enfin, des polysaccharides d'origine bactérienne ou fongique sont souvent employés car ils constituent une alternative simple et prometteuse aux problèmes précédemment exposés. En effet, la structure ordonnée qu'ils adoptent leur confère de bonnes stabilités thermique et mécanique, et ils conservent généralement leurs propriétés rhéologiques même

en milieux de salinité élevée et en présence d'ions divalents. Par ailleurs, leurs caractéristiques sont sensées être contrôlées du moment que leur biosynthèse est maîtrisée, et surtout ils ne posent aucun problème vis-à-vis de l'environnement.

Malgré tout, l'usage de ces polysaccharides microbiens dans les fluides de forage est actuellement restreint. Le xanthane est un bon viscosifiant mais ses capacités en tant qu'agent thixotrope et réducteur de filtrat, c'est-à-dire la capacité à réduire l'invasion des formations, sont limitées. Le sclérogucane, qui est en cours de développement, présente des propriétés rhéologiques et de stabilité thermique très intéressantes mais son coût est actuellement trop élevé pour pouvoir envisager une utilisation à grande échelle. De nouveaux polymères microbiens capables de pallier les lacunes des polysaccharides existants sont actuellement à l'étude. C'est dans ce contexte que se situent nos travaux qui ont consisté à évaluer les potentialités d'application en forage d'un polysaccharide récemment développé, le gellane.

Le gellane est un polysaccharide bactérien découvert en 1979 qui est utilisé pour des applications principalement alimentaires. Il est actuellement en phase de développement et plus de 100 brevets concernant son utilisation comme agent gélifiant et stabilisant ont déjà été déposés. Ce polymère, dont le coût de revient devrait être faible en production à grande échelle, présente des capacités de gélification importantes et surtout une stabilité thermique en présence de calcium qui le rendent très intéressant pour les applications en forage.

Avant d'envisager ces applications, il est toutefois nécessaire de maîtriser la biosynthèse du polymère par fermentation car ses caractéristiques peuvent être dépendantes des conditions de production. Parmi celles-ci, l'agitation joue un rôle prédominant. En effet, le gellane étant exocellulaire, sa présence dans le milieu de fermentation provoque une augmentation très importante de la viscosité qui peut aboutir à la gélification du moût. Les problèmes liés aux transferts d'énergie et de matière durant la biosynthèse sont donc primordiaux et peuvent influencer non seulement le niveau de production atteint, mais également les caractéristiques physico-chimiques du polymère.

Nous avons choisi d'étudier l'influence de l'hydrodynamique du fermenteur sur la production et les caractéristiques physico-chimiques du gellane de façon à déterminer les conditions de production les plus favorables à l'obtention d'un bon additif pour fluide de forage.

Ainsi, l'influence de l'hydrodynamique du fermenteur a été étudiée lors de fermentations réalisées dans des conditions parfaitement contrôlées, de la préparation de l'inoculum à l'extraction du polysaccharide. Pour cela, trois systèmes d'agitation générant des écoulements différents ont été utilisés : un ruban hélicoïdal de diamètre voisin de celui du fermenteur qui permet d'obtenir de bonnes conditions de macromélange, des turbines

Rushton engendrant un écoulement principalement radial, et un système comportant des turbines créant un écoulement axial-radial. L'importance de la vitesse d'agitation et de l'aération a également été abordée. Les caractéristiques physico-chimiques des différents produits obtenus et les relations existant avec les conditions de synthèse ont ensuite été étudiées. Finalement, les potentialités du gellane en tant qu'additif pour les fluides de forage à base d'eau ont été évaluées dans diverses conditions de salinité et de température.

Dans la première partie de ce mémoire, une revue bibliographique sur les polymères bactériens et leur production est complétée par un bref rappel de rhéologie et une présentation détaillée du gellane. Après avoir défini les conditions opératoires, les résultats des fermentations et des analyses physico-chimiques des produits synthétisés sont décrits. Le dernier chapitre porte sur l'évaluation des fluides de forage formulés avec les différents produits synthétisés.

CHAPITRE 2 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

2. Etude bibliographique

2.1. Les polysaccharides

Les polysaccharides sont des macromolécules composées essentiellement de sucres liés par des liaisons glycosidiques. Les polysaccharides sont largement répandus dans la nature puisqu'on les trouve dans les végétaux supérieurs et les algues où ils peuvent représenter jusqu'à 75% du poids sec, mais aussi chez les animaux et les microorganismes. Les polysaccharides les plus connus et les plus employés sont l'amidon et la cellulose. L'industrie utilise également des gommés naturelles comme la gomme arabique, des extraits de plantes supérieures et d'algues tels que la pectine, les carraghénanes et les alginates, et des polysaccharides d'origine microbienne comme le xanthane, le dextrane, le scléroglycane et le gellane.

Les polysaccharides peuvent être des homopolymères composés de la répétition régulière d'un sucre ou des hétéropolymères si leur structure comporte plusieurs composés, des ramifications ou des substituants de nature saccharidique ou autre tels que des acétates, pyruvates ou glycérate (figure 2.1). Les polysaccharides sont obtenus par condensation des oses par une liaison glycosidique mettant en jeu une extrémité réductrice. Ces liaisons sont représentées par une flèche partant du groupe réducteur considéré. Les plus courantes pour les polysaccharides sont de type 1→4, mais elles peuvent être de type 1→3 ou 1→6. Les sucres ne comportant qu'un groupement réducteur, les associations entre polysaccharides ne peuvent être glycosidiques et font intervenir d'autres types de liaisons.

2.1.1. Les polysaccharides microbiens exocellulaires

Les polysaccharides microbiens sont produits par des bactéries ou des champignons. A la différence des polysaccharides pariétaux qui sont intracellulaires, les polysaccharides exocellulaires sont excrétés par les microorganismes. Ils peuvent alors soit rester liés à la cellule pour former une capsule, soit former un agglomérat muqueux ("slime") emprisonnant les microorganismes, soit être totalement libres dans le milieu extérieur. Les exopolysaccharides se rencontrent fréquemment parmi les procaryotes saprophytes des humains, animaux ou végétaux. Leur fonction biologique n'est pas toujours clairement élucidée. Ils semblent remplir un rôle dans la reconnaissance des cellules-hôtes et constituent souvent un support de croissance et une défense mise en place contre des agressions venant de l'environnement extérieur : microorganismes prédateurs, virus, pH très acide ou très basique, dessiccation, température élevée ou encore composés toxiques. Dans leur environnement naturel en présence de matériau solide, les polysaccharides se présentent sous forme de biofilms dans lesquels le matériel cellulaire est emprisonné. Les relations entre la structure du polysaccharide et les conditions physiologiques de production

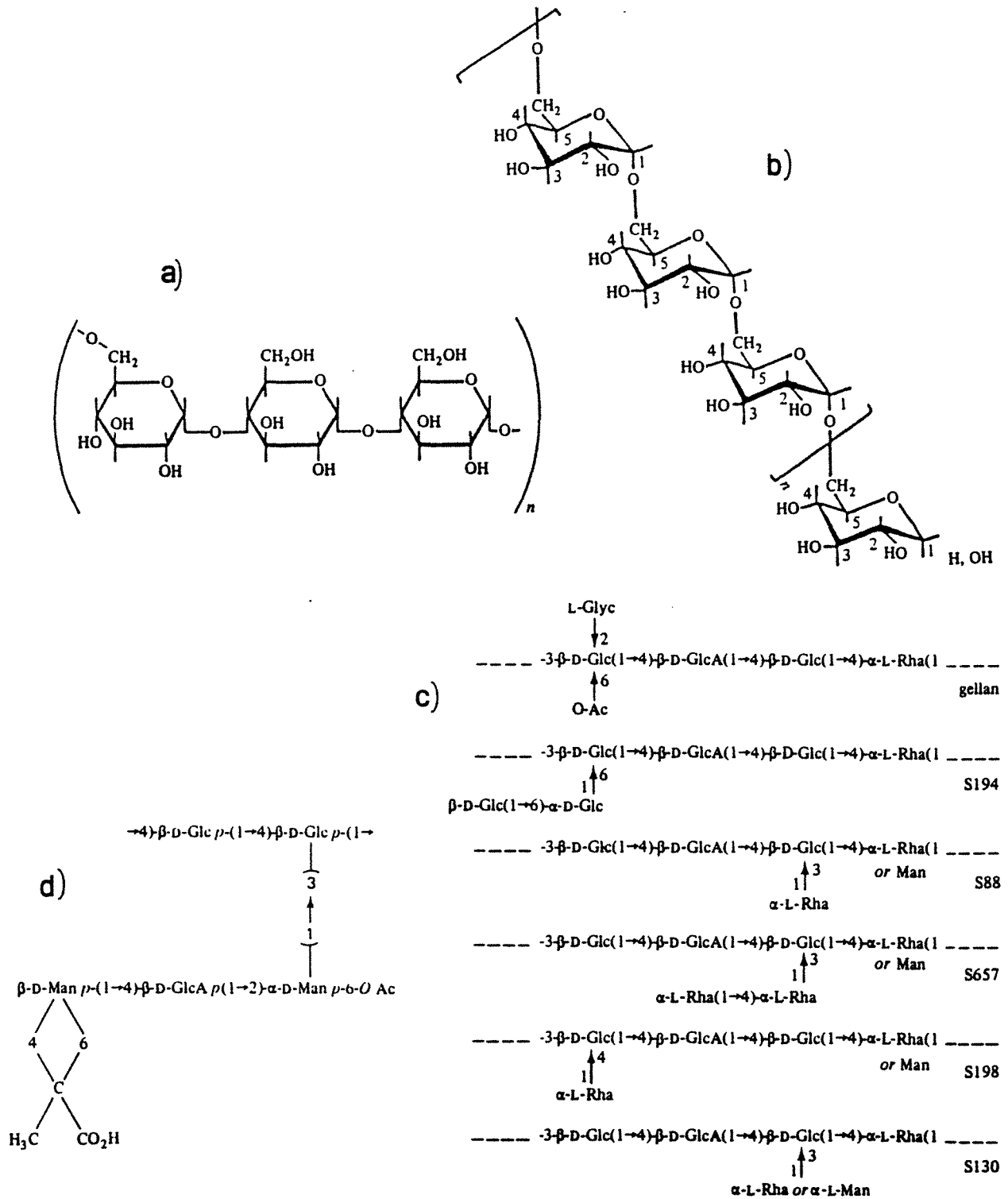


FIGURE 2.1 : Structure primaire de différents polysaccharide microbiens : a) le pullulane, b), le dextrane, c) le gellane et ses dérivés et d) le xanthane.

sont rarement connues et tout changement de l'environnement des microorganismes peut modifier la composition et les propriétés physiques du polymère synthétisé ainsi que l'organisation du polysaccharide à la surface de la bactérie (Sutherland 1990).

2.1.2. Biosynthèse

La voie de synthèse des polysaccharides exocellulaires ressemble beaucoup à celle des polymères de la paroi bactérienne, peptidoglycanes et lipopolysaccharides. La production des précurseurs des polysaccharides se déroule dans le cytoplasme bactérien. Ces composés sont des monosaccharides activés sous forme de sucres nucléotidiques, tel l'uridine diphosphate glucose (UDP-glucose), riches en énergie et convertibles en autres sucres précurseurs. Des précurseurs activés sont nécessaires à la synthèse de tous les substituants du polymère, un substituant acylé comme l'acétate étant transféré à partir d'acétyl coenzyme A (acétyl-CoA). Les mécanismes de régulation orientant les précurseurs vers la production de tel ou tel polysaccharide restent méconnus mais dépendent des conditions physiologiques de culture cellulaire.

Les exopolysaccharides sont ensuite synthétisés au niveau de la membrane cytoplasmique et exportés. Un accepteur intermédiaire lipidique, le bactoprénol (figure 2.2), nécessaire à la synthèse des polymères pariétaux intervient également lors de l'élaboration des monomères constitutifs des polysaccharides. La voie métabolique de synthèse des exopolysaccharides est identique chez *Xanthomonas campestris*, *Klebsiella* et d'autres bactéries. Elle est représentée sur la figure 2.3 dans le cas de la production de xanthane (Ielpi *et al.* 1981 et 1983). La première étape de synthèse est l'ajout d'un D-glucose sur le bactoprénol à partir d'un UDP-glucose, un second glucose est ensuite ajouté, puis un acétate à partir de l'acétyl-CoA et ainsi de suite jusqu'à ce que le motif, pentasaccharidique dans le cas du xanthane, soit entièrement formé. La polymérisation des pentasaccharides se déroulerait également au niveau de la membrane cytoplasmique par ajout d'un polypentasaccharide sur un pentasaccharide lié au bactoprénol. La chaîne s'allongeant, l'intermédiaire polysaccharidique devient de plus en plus hydrophile et réagirait avec la bicouche lipoprotéique de la membrane avant de se séparer du bactoprénol. Il serait ensuite, dans le cas des bactéries Gram négatives, transporté à travers la membrane externe par des pores formés de protéines (Sutherland 1990).

L'énergie nécessaire à la production d'un exopolysaccharide étant supérieure à celle requise pour la croissance cellulaire, cette production doit présenter certains avantages pour la bactérie. Selon Linton (1990), la production de polysaccharide a lieu lorsque la bactérie a besoin de consommer rapidement de l'énergie intracellulaire (l'ATP) et du substrat carboné quand ce dernier arrive dans la cellule à un flux supérieur à celui requis pour la seule croissance cellulaire, ou plus simplement quand la croissance bactérienne est rendue impossible en raison d'une limitation autre qu'en substrat carboné. Il en résulte que les flux

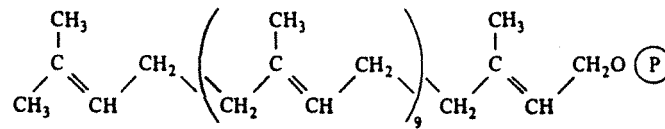


FIGURE 2.2 : Structure du bactoprenol.

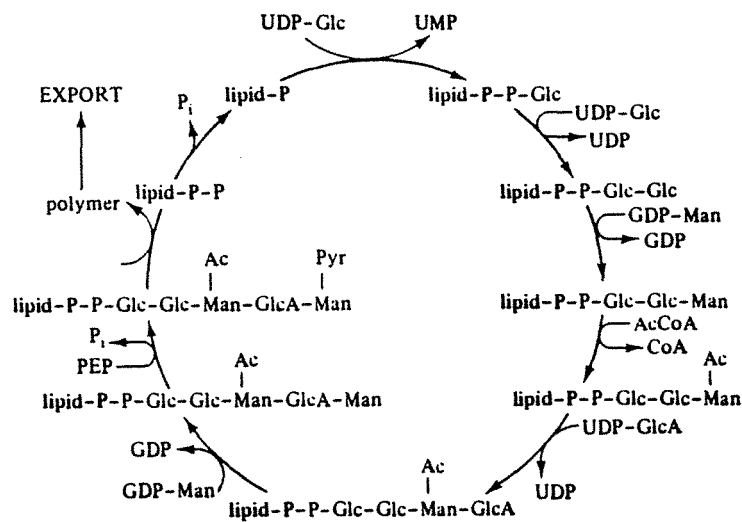


FIGURE 2.3 : Schéma métabolique de la synthèse du xanthane (Ielpi *et al* 1981 et 1983).

de carbone et d'énergie d'une part, et la production d'exopolysaccharide d'autre part, sont des phénomènes interdépendants et que toute altération de cet équilibre peut avoir des conséquences importantes sur la production d'exopolysaccharide (Linton 1990, Sutherland 1990).

La structure du polysaccharide est indépendante de la source de carbone utilisée, mais le degré de substitution de la chaîne principale varie avec le substrat carboné (Sutherland 1990). La productivité en exopolysaccharide est généralement inversement proportionnelle à la vitesse de croissance cellulaire ; les plus fortes productivités sont en effet observées lors de croissances très faibles (Linton 1990). Il n'est donc pas souhaitable durant la production de polysaccharide d'avoir une concentration cellulaire élevée. Cette faible concentration est obtenue la plupart du temps par une limitation en azote. Des milieux de culture avec 0,1 à 0,2% d'azote ammoniacal pour 2 à 3% de glucose, sont classiquement utilisés. Une autre limitation nutritive, par exemple en phosphate, sulfate ou magnésium peut être utilisée mais la qualité et le degré de substitution du polysaccharide seront différents (Sutherland 1990). En ce qui concerne l'apport en oxygène, la plupart des microorganismes produisant des exopolysaccharides sont aérobies ou anaérobies facultatifs. Pour ces derniers, la production de polysaccharide intervient généralement quand ils sont cultivés en aérobiose (Sutherland 1990). L'aération du milieu de culture est un paramètre important pour la production de polysaccharide mais tous les microorganismes ne nécessitent pas des conditions d'aération maximales pour présenter de bonnes performances de synthèse de polysaccharide (Sutherland 1990).

2.2. Rhéologie

Les polysaccharides sont des molécules aptes à conférer, à faible concentration, des propriétés rhéologiques particulières aux solutions aqueuses. Les principales utilisations de ces molécules sont liées à cette aptitude qui conditionne leurs potentialités d'application. La rhéologie permet d'accéder aussi bien à des paramètres macroscopiques tels que la viscosité d'une solution ou l'élasticité d'un gel, qu'à des paramètres moléculaires comme la viscosité intrinsèque d'un soluté (volume hydrodynamique), ou encore, à des paramètres d'interaction comme la constante de Huggins fonction des interactions soluté-solvant et soluté-soluté.

Les solutions de polysaccharides peuvent être sous forme de solution "réelle", de gel ou de dispersion. Une solution "réelle" de macromolécules est obtenue lorsque les brins du polymère sont individualisés et entourés de molécules d'eau. Les gels macromoléculaires correspondent au contraire à un réseau tridimensionnel gélifié qui s'est formé par l'établissement de liaisons fortes entre les macromolécules en solution. Finalement, les dispersions sont des systèmes pour lesquels la dissolution macromoléculaire est imparfaite. Entre ces trois états, toutes les situations intermédiaires sont possibles.

2.2.1. Définitions de base de la rhéologie

La rhéologie est la science qui étudie l'écoulement et les déformations de la matière sous l'action de contraintes. Le principe de toute méthode d'analyse rhéologique est d'appliquer dans des conditions rigoureusement définies une déformation à un matériau et de mesurer la contrainte qui en résulte ou inversement.

2.2.1.1. Vitesse de cisaillement

Lorsqu'un matériau est soumis à une contrainte de cisaillement τ (exprimée en Pascal), il en résulte une déformation de cisaillement γ . Par définition, la vitesse de cisaillement $\dot{\gamma}$ est la dérivée, par rapport au temps, de la déformation de cisaillement γ . $\dot{\gamma}$ s'exprime en s^{-1} .

2.2.1.2. Viscosité des liquides

Un liquide est une phase condensée qui, sous des conditions expérimentales normales, répond à une contrainte de cisaillement τ par un écoulement. La viscosité η d'un liquide est définie par la relation :

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad (1)$$

Son unité est le Pa.s. La viscosité est fonction non seulement de la température T du fluide et de la pression extérieure P , mais aussi en général de la vitesse de cisaillement appliquée. Un fluide qui présente une viscosité indépendante de la vitesse de cisaillement qui lui est appliquée est appelé newtonien.

2.2.1.3. Viscosité intrinsèque

Une approche très utile pour caractériser un soluté et plus particulièrement un polymère est de déterminer sa viscosité intrinsèque $[\eta]$ qui est caractéristique du volume hydrodynamique du soluté dans un solvant et à une température donnés. Les développements limités de Huggins et de Kraemer sont utilisés pour déterminer la viscosité intrinsèque $[\eta]$:

$$\text{Huggins : } \frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + k' [\eta]^2 c + k'_2 [\eta]^3 c^2 + \dots \quad (2)$$

$$\text{Kramer : } \frac{\ln(\eta_{rel})}{c} = [\eta] - k'' [\eta]^2 c - k''_2 [\eta]^3 c^2 - \dots \quad (3)$$

où : - k' , k'_2 , k'' et k''_2 sont les constantes de Huggins et de Kraemer qui dépendent du solvant utilisé.

- c est la concentration de la solution.

- η_{sp} et η_{rel} sont respectivement les viscosités spécifique et relative déterminées en régime dilué définies comme suit :

$$\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_{solvant}} \quad \text{et} \quad \eta_{spe} = \frac{\eta - \eta_{solvant}}{\eta_{solvant}} = \eta_{rel} - 1 \quad (4) \text{ et } (5)$$

$[\eta]$ s'exprime comme l'inverse d'une concentration. Le régime dilué signifie que la

concentration en soluté est suffisamment faible pour que les molécules de soluté soient indépendantes et n'interagissent pas entre elles. Pratiquement, la viscosité intrinsèque peut être déterminée graphiquement de la façon suivante (Huggins 1942, Kraemer 1938) :

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{c} : \text{formule de Huggins} \quad (6)$$

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\ln(\eta_{rel})}{c} : \text{formule de Kraemer} \quad (7)$$

Généralement, seuls les termes du premier ordre sont pris en compte et les deux méthodes donnent la même valeur qui correspond à l'extrapolation à concentration nulle en polymère des droites de pente $k'[\eta]^2$ et $(-k''[\eta]^2)$. Cependant, il est possible que les deux méthodes ne conduisent pas à la même valeur de $[\eta]$. La linéarité des équations doit alors être remise en cause et les termes de second ordre doivent être considérés. Ce comportement peut être dû soit à des répulsions électrostatiques de chaîne quand la force ionique du solvant est trop faible, soit à des phénomènes d'agrégation des macromolécules en solution (Torres *et al.* 1993, Wolff *et al.* 1979).

k' et k'' sont tous deux fonctions de la qualité du solvant mais leur signification physique n'est pas très claire. k' est plus précisément fonction des interactions hydrodynamiques des molécules de soluté entre elles et de la qualité du solvant (Wolff *et al.* 1979). Dans le cas des polymères, la valeur théorique de k' pour des macromolécules strictement répulsives est de 0,4. Une valeur expérimentale obtenue largement supérieure à 0,5 est le reflet d'une agrégation des macromolécules ou d'une mauvaise qualité du solvant (Torres *et al.* 1993, Wolff *et al.* 1979). Finalement, de par les équations, la somme de k' et de k'' est égale à 0,5.

La viscosité intrinsèque $[\eta]$ est fonction de la taille et de la forme de la molécule dans son solvant, ou plus généralement, de son volume hydrodynamique. La viscosité intrinsèque est donc fonction de la masse molaire, de la conformation et de la structure de la molécule. Einstein (1911) fut le premier à relier la viscosité intrinsèque d'un soluté à son volume hydrodynamique. Il a proposé pour les particules sphériques la relation :

$$[\eta] = 0,025 v_s \quad (8)$$

où v_s est le volume spécifique du composé. Pour une molécule de haute masse molaire en pelote, c'est-à-dire dans un état désordonné d'arrangement statistique, la relation suivante peut être déduite de l'équation (8) :

$$[\eta] = 0,025 \frac{\Omega}{M} \quad (9)$$

où Ω est le volume hydrodynamique de la molécule et M sa masse molaire. Flory (1953) a proposé l'équation suivante pour les polymères flexibles en solution diluée :

$$[\eta] = \frac{\Phi R_G^3}{M} \quad (10)$$

où R_G est le rayon de giration de la molécule et Φ une constante égale à $19,94 \cdot 10^{24}$ selon Debye-Beuche, $6,13 \cdot 10^{24}$ selon Kirkwood-Riseman-Zimm ou $5,32 \cdot 10^{24}$ selon Flory (1953). Le rayon de giration est par ailleurs fonction de la masse molaire (Flory 1953) :

$$R_G = \left(\frac{l^2 M}{6 M_0} \right)^{0,5} \quad (11)$$

où l et M_0 sont la longueur et la masse molaire d'une séquence répétitive. Il est donc possible de donner une expression de la viscosité intrinsèque en fonction de la masse molaire moyenne du composé M et théoriquement $[\eta]$ est fonction de $M^{0,5}$. Pratiquement, une expression semi-empirique proposée par Mark (1940) est utilisée :

$$[\eta] = K' M^a \quad (12)$$

où a est un coefficient à déterminer compris entre 0,5 et 2, et K' un coefficient à déterminer. K' et a sont fonctions du triplet polymère-solvant-température. Par exemple, les valeurs de a et K' sont, dans l'eau, de 0,82 et $1,3 \cdot 10^{-2}$ pour l'amylose selon Burchard (1963), de 0,66 et $1,05 \cdot 10^{-1}$ pour la cellulose d'après Harland (1959), et l'exposant a est de l'ordre de 1 pour le xanthane selon Lecourtier et Chauveteau (1984). De façon générale, a est de l'ordre de 0,5 pour une molécule en pelote dans un mauvais solvant, de 0,8 pour une pelote de haute masse molaire dans un bon solvant, de 1,0 pour une molécule de faible masse molaire dans un bon solvant, et de 1,7 à 2,0 pour une molécule cylindrique rigide (bâtonnet).

Dans certaines conditions de faible salinité, les polyélectrolytes — polymères portant des groupements chargés, ce qui est souvent le cas des polysaccharides microbiens — peuvent présenter des viscosités intrinsèques beaucoup plus importantes que les polymères neutres équivalents comme l'amidon. La forte rigidité des chaînes liée aux répulsions électrostatiques entre les groupements chargés, des effets de volume exclu plus importants et une forte dispersion d'énergie due au couplage polyélectrolyte-contre ion sont responsables de ce comportement (Colonna et Thibault 1986). Par contre, contrairement aux polymères neutres, la viscosité intrinsèque des polyélectrolytes est largement dépendante de la force ionique du solvant. Les ions ajoutés écrantent les charges du polymère et réduisent les répulsions entre les groupements chargés du polyélectrolyte (Lecourtier et Degouy 1991). Ce masquage entraîne une diminution du volume hydrodynamique de la macromolécule et donc de sa viscosité intrinsèque. Cette diminution est observée jusqu'à ce que le polymère ait atteint sa dimension minimale correspondant à des conditions de solvant θ . Expérimentalement, la viscosité intrinsèque d'un polyélectrolyte est liée à la force ionique du solvant pour des ions monovalents par la relation :

$$[\eta]_I = [\eta]_{\infty} + A I^{-0,5} \quad (13)$$

où $[\eta]_I$ est la viscosité intrinsèque du polyélectrolyte à la force ionique I , $[\eta]_{\infty}$ la viscosité intrinsèque à force ionique infinie déterminée par extrapolation, A une constante et I la force ionique du solvant.

2.2.1.4. Notion de régimes dilué et semi-dilué

En régime dilué, les brins de polymères sont isolés. La concentration critique C^* est définie comme étant la concentration en polymère à partir de laquelle les pelotes de polymère commencent à être en contact les unes avec les autres (figure 2.4). Lorsque la concentration en polymère est supérieure à C^* , une contraction des chaînes est observée. A partir d'une certaine concentration de polymère C^{**} , les chaînes ne peuvent plus se contracter car elles ont atteint leur dimension minimale θ et leur degré d'enchevêtrement est important : on atteint alors le régime semi-dilué (figure 2.4). Une détermination simple de C^* et de C^{**} est basée sur l'équation (Morris *et al.* 1981) :

$$\eta_{sp} = Cte (c [\eta])^B \quad (14)$$

où B est une constante. Pratiquement, il faut tracer l'évolution en coordonnées logarithmiques de la viscosité spécifique en fonction de la concentration en polymère c . C^* et C^{**} correspondent à l'intersection des différentes droites de pente B correspondant aux différents régimes. Les données de la littérature montrent que B est compris entre 1,2 et 1,6 en régime dilué, 2,0 et 2,5 entre C^* et C^{**} , et entre 3,3 et 4 en régime semi-dilué (Morris *et al.* 1981, Doublier 1986). Finalement, il est intéressant de remarquer que plus la viscosité intrinsèque du polymère est élevée, plus C^* est faible.

2.2.2. Principaux types d'écoulement

Pour un liquide newtonien, "la résistance du fluide au glissement est, toutes choses égales par ailleurs, proportionnelle à la vitesse avec laquelle les parties du fluide s'écartent les unes des autres" (Newton 1687). En d'autres termes, la viscosité η est indépendante de la vitesse de cisaillement imposée et du temps, mais dépend de la température et de la pression du fluide (figure 2.5). Pour les liquides non newtoniens, la viscosité η est en plus fonction de la vitesse de cisaillement appliquée. Ces fluides peuvent être rhéofluidifiants ou rhéoépaississants selon que leur viscosité diminue ou augmente avec la vitesse de cisaillement. Une autre distinction peut également être effectuée avec la présence ou non d'un seuil d'écoulement. Certains comportements caractéristiques sont à noter :

- les liquides plastiques dits de Bingham qui ne s'écoulent qu'à partir d'un certain seuil de contrainte τ_0 (figure 2.5). Au-delà de ce seuil, ils s'écoulent comme un liquide newtonien. L'équation rhéologique de ces fluides est :

$$\tau = \tau_0 + \eta \dot{\gamma} \quad (15)$$

L'origine de ce seuil de contrainte s'explique par l'existence, au niveau de la microstructure, d'un réseau de liaisons entre les éléments constitutifs du matériau. Ces liaisons peuvent être des forces de friction, des forces intermoléculaires de Van der Waals ou des liaisons ioniques. Le seuil de contrainte représente la contrainte minimale à appliquer pour briser le réseau et amorcer le cisaillement,

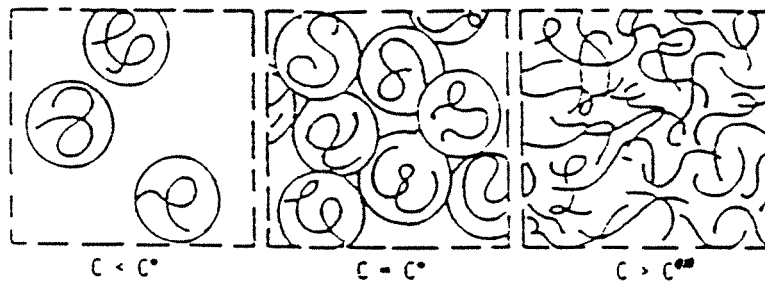


FIGURE 2.4 : Représentation schématique des régimes dilué et semi-dilué.

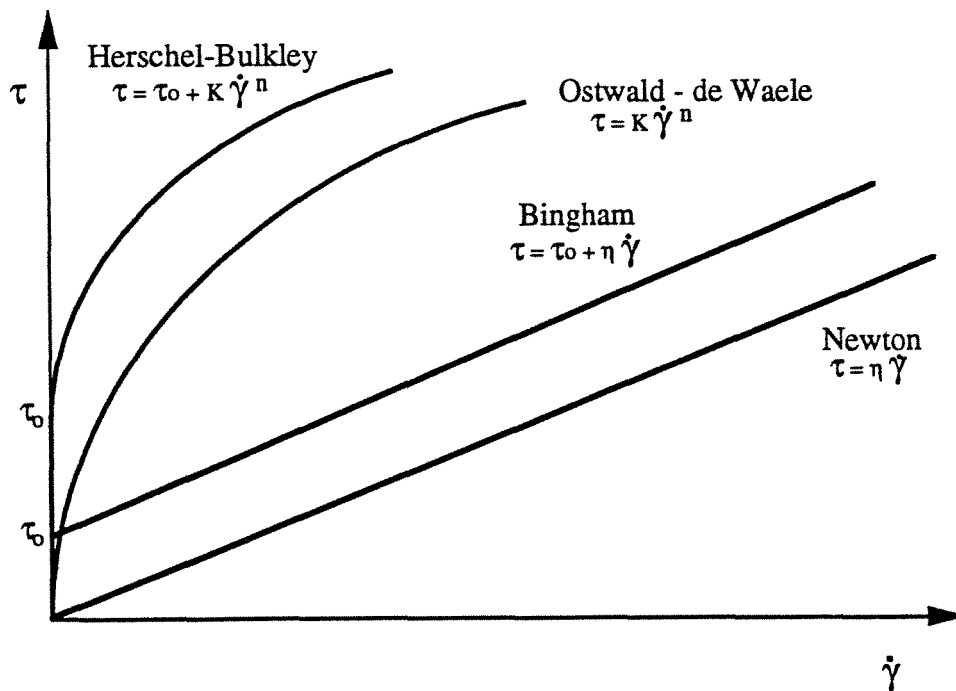


FIGURE 2.5 : Principaux types d'écoulement.

- les fluides pseudoplastiques ou rhéofluidifiants qui ne présentent pas de seuil d'écoulement et pour lesquels la viscosité diminue avec la vitesse de cisaillement (figure 2.5). La loi empirique de puissance est une bonne approximation de ce comportement. Elle a été proposée par Ostwald-de Waele et a pour expression :

$$\tau = K \dot{\gamma}^n \quad \text{soit} \quad \eta = K \dot{\gamma}^{(n-1)} \quad (16)$$

où n est l'indice de comportement pseudoplastique (ou rhéofluidifiant) toujours inférieur à 1 — n est égal à 1 pour un fluide newtonien et décroît vers 0 lorsque le comportement rhéofluidifiant augmente — et K l'indice de consistance qui s'exprime en (Pa.s^n) . La loi de puissance permet d'écrire $\log \eta = \log K + (n-1) \log \dot{\gamma}$. La droite expérimentale obtenue après cette transformation permet d'accéder directement à l'exposant n qui est égal à la pente et à l'indice K qui est égal à la valeur de la viscosité pour une vitesse de cisaillement de 1 s^{-1} ,

- les fluides dits d'Herschel-Bulkley qui sont des corps rhéofluidifiants présentant également un seuil d'écoulement τ_0 (figure 2.5). Leur équation caractéristique est :

$$\begin{aligned} \text{si } \tau < \tau_0 \quad \dot{\gamma} &= 0 \\ \text{si } \tau > \tau_0 \quad \tau &= \tau_0 + K \dot{\gamma}^n \quad \text{soit} \quad \eta = \frac{\tau_0}{\dot{\gamma}} + K \dot{\gamma}^{(n-1)} \end{aligned} \quad (17)$$

Ces modèles de comportement sont simples et faciles à utiliser mais ne sont généralement valables que sur une gamme de vitesse de cisaillement restreinte. Par exemple, les solutions de polymères présentent souvent un comportement rhéofluidifiant pour des vitesses de cisaillement allant de 1 à 200 s^{-1} , mais sur une gamme de vitesse de cisaillement plus étendue, un rhéogramme plus complexe comme celui de la figure 2.6 est généralement obtenu. Quatre zones sont généralement observées : un plateau newtonien où la viscosité est constante aux plus faibles valeurs de vitesse de cisaillement, puis une zone de transition vers une gamme de vitesse de cisaillement pour lesquelles le fluide a un comportement rhéofluidifiant en raison de l'orientation des chaînes de polymère dans le sens de l'écoulement, et finalement une zone où la viscosité tend vers une valeur limite lorsque l'orientation des chaînes est maximale et complète. Ce comportement global est pris en compte dans des modèles plus complexes comme celui de Carreau (Carreau 1968) qui sont cependant plus difficiles à appliquer.

Remarquons que les déterminations de la viscosité intrinsèque et du C^* sont réalisées sur le plateau newtonien car les viscosités obtenues sont indépendantes de la vitesse de cisaillement appliquée.

La viscosité de certaines solutions — dont de nombreuses solutions de polymère — n'est pas uniquement fonction de la déformation qui est directement appliquée mais aussi du temps. L'originalité de ce comportement est due à l'existence d'un réseau d'interactions entre

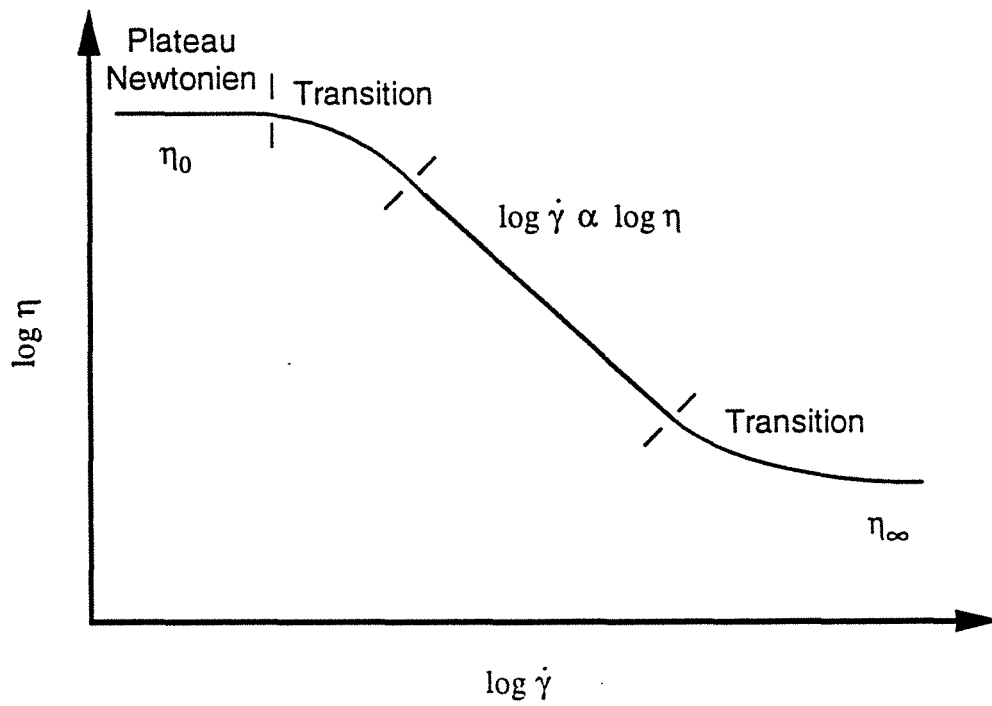


FIGURE 2.6 : Comportement rhéologique d'une solution de polymère sur une large gamme de vitesse de cisaillement.

les particules en solution. Durant un écoulement, ce réseau se détruit plus ou moins rapidement pour permettre le mouvement, et il se reforme plus ou moins lentement après l'arrêt de l'écoulement. En conséquence, la contrainte nécessaire pour obtenir une vitesse de cisaillement décroît ou augmente durant le cisaillement suivant que les interactions s'établissent ou se détruisent. En particulier, les faibles contraintes engendrent des écoulements instables qui conduisent soit à l'arrêt du mouvement, soit à un cisaillement rapide. Les corps qui ont ainsi la capacité de se transformer réversiblement et graduellement d'un état structuré à un état de solution déstructurée sont appelés thixotropes.

2.2.3. Viscoélasticité linéaire

Il s'agit dans ce cas de déterminer pour un matériau à la fois ses caractéristiques visqueuses, liées à une dissipation d'énergie, et ses caractéristiques élastiques, liées à la conservation de l'énergie. La détermination de ces caractéristiques ne peut se faire que dans un domaine de "viscoélasticité linéaire" où les matériaux ont un comportement linéaire. Par définition, un matériau a un comportement linéaire si, soumis à une contrainte somme de contraintes τ_i , il subit une déformation égale à la somme des déformations γ_i qu'il subirait s'il était soumis isolément à chaque contrainte τ_i . Ce comportement linéaire est évidemment lié à l'aptitude du matériau à supporter des déformations sans modification de sa structure microscopique. L'étude des propriétés viscoélastiques linéaires en régime harmonique permet de caractériser la structure "au repos" d'un matériau. Tous les matériaux présentent un comportement linéaire, à condition que les contraintes et les déformations auxquelles ils sont soumis demeurent suffisamment faibles.

2.2.3.1. Corps viscoélastiques linéaires

Le comportement d'un corps viscoélastique linéaire est intermédiaire entre le comportement d'un solide élastique parfait, et celui d'un liquide visqueux newtonien. L'équation rhéologique de base d'un solide élastique parfait, la loi de Hooke, a pour expression $\tau(t) = G \gamma(t)$ où G est le module de rigidité, ou module de cisaillement, fonction de la nature du matériau. La déformation élastique parfaite est dite instantanée et récupérable. Contrairement au liquide de Newton, un solide élastique parfait "se souvient" des contraintes qui lui ont été imposées dans le passé.

En régime harmonique, un échantillon est soumis à une déformation de cisaillement oscillatoire sinusoïdale de fréquence et d'amplitude déterminées. La contrainte de cisaillement correspondante est elle-même sinusoïdale mais présente un certain décalage de phase. On pose :

$$\gamma(t) = \gamma_0 \cos(\omega t) \quad (18)$$

$$\tau(t) = \tau_0 \cos(\omega t + \varphi) \quad (19)$$

où τ_0 et γ_0 sont les amplitudes maximales de la contrainte et de la déformation et ω

la fréquence. Selon la valeur du décalage φ , on distinguera les systèmes élastiques ($\varphi = 0$), visqueux ($\varphi = \pi/2$) et viscoélastiques ($0 < \varphi < \pi/2$). En utilisant les nombres complexes, les grandeurs complexes suivantes sont définies:

$$\gamma^*(t) = \gamma_0 e^{(i \omega t)} \quad (20)$$

$$\tau^*(t) = \tau_0 e^{(i \omega t + \varphi)} \quad (21)$$

Donc :

$$\tau^*(t) = G^*(\omega) \gamma^*(t) \quad (22)$$

où $G^*(\omega)$, le module de rigidité complexe, est une fonction algébrique de la pulsation ω mais indépendante du temps. $G^*(\omega)$ se décompose en une partie réelle et une partie imaginaire :

$$G^*(\omega) = G'(\omega) + i G''(\omega) \quad (23)$$

où G' est le module de conservation et représente l'énergie élastique emmagasinée, et G'' le module de perte qui représente l'énergie dissipée par frottement visqueux. Il est également possible de définir la tangente de perte $\tan(\delta)$ qui est le rapport de G'' sur G' et la viscosité complexe η^* qui se décompose en une partie imaginaire et une partie complexe.

2.2.3.2. Solutions et gels de polymère

Pour les solutions diluées de polymères — c'est-à-dire sans interactions hydrodynamiques entre les chaînes — les évolutions de η et de η^* en fonction respectivement de la vitesse de cisaillement $\dot{\gamma}$ et de la fréquence ω sont confondues si $\dot{\gamma}$ égale ω (Cox et Merz 1958). Le module de perte G'' est supérieur à G' aux faibles concentrations en polymère mais ce comportement s'inverse quand la concentration en polymère augmente et que le régime semi-dilué est atteint (Doublier 1986) (figure 2.7). La solution évolue alors vers un état ordonné et peut présenter les caractéristiques d'un gel avec η^* supérieur à η . Les interactions macromoléculaires restent cependant trop faibles pour qu'un réseau tridimensionnel s'établisse et cet état est appelé pseudogel (Doublier 1986).

Dans le cas de gels de biopolymères, lorsqu'un balayage en fréquence est réalisé dans la zone de viscoélasticité linéaire, G' et G'' sont peu dépendants de la fréquence. Pour les gels "fermes" (figure 2.8), G' est nettement supérieur à G'' , et bien qu'ils augmentent légèrement aux hautes fréquences, G' et G'' sont globalement indépendants de la fréquence (Clark et Ross-Murphy 1987, Doublier 1986). Il est possible, dans le cas de gels fermes, que G'' passe par un léger minimum avant de réaugmenter (Clark et Ross-Murphy 1987). Pour les gels moins rigides (figure 2.9), G' et G'' augmentent avec la fréquence et sont du même ordre de grandeur. Les gels faibles ont en fait des propriétés se rapprochant de celles des solutions macromoléculaires concentrées mais il est possible de les différencier aux faibles fréquences (figure 2.10).

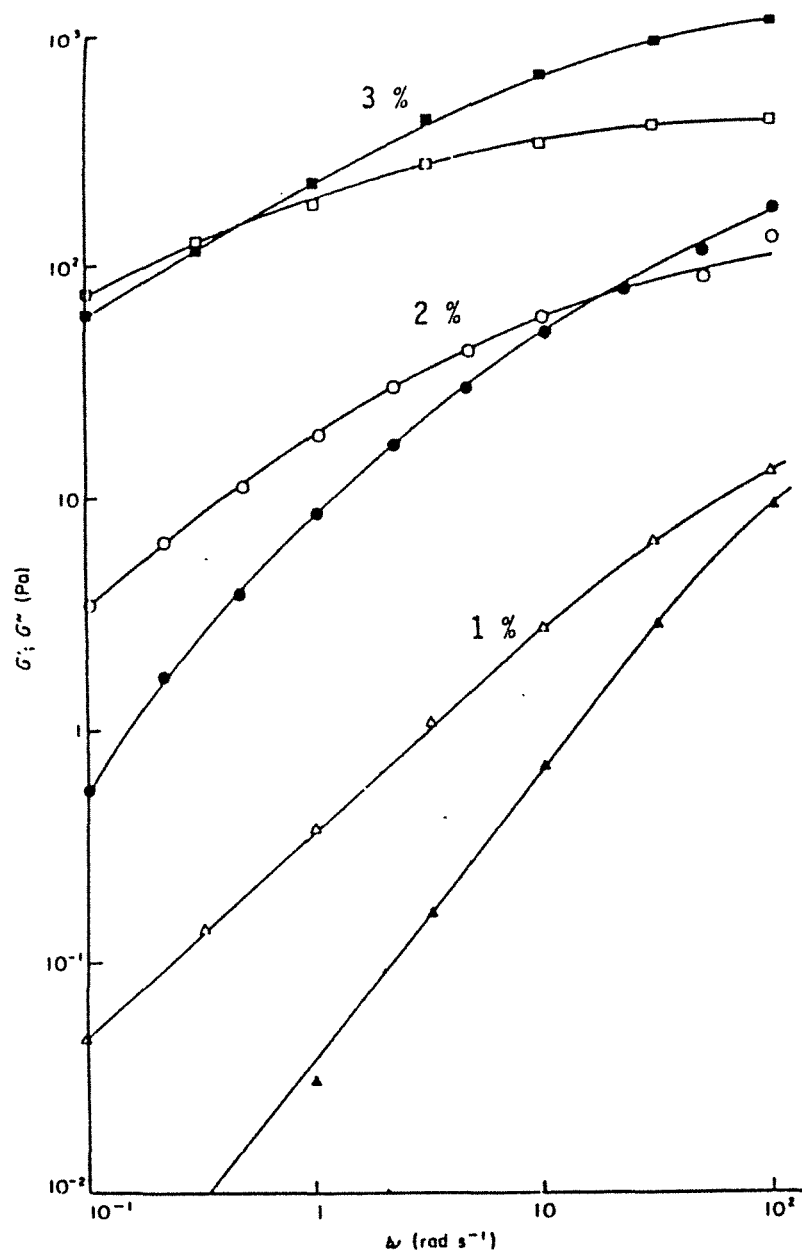


FIGURE 27 : Comportement viscoélastique en régime harmonique de solutions de gomme de guar à différentes concentrations (Doublier 1986).

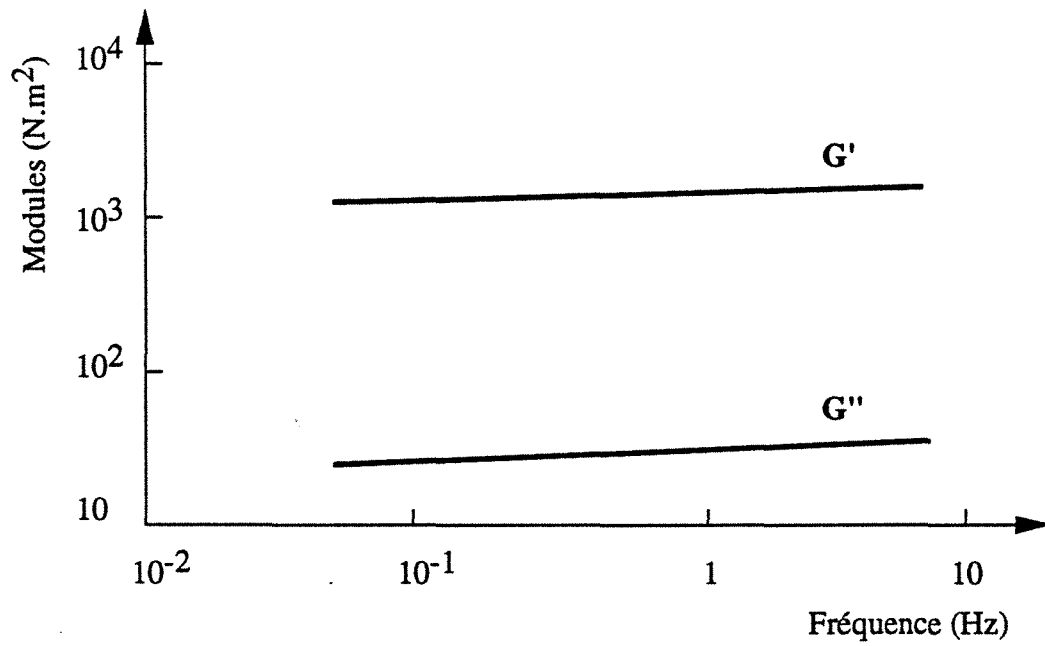


FIGURE 28 : Comportement en régime harmonique d'un gel d'alginate à 23°C (Doublier 1986).

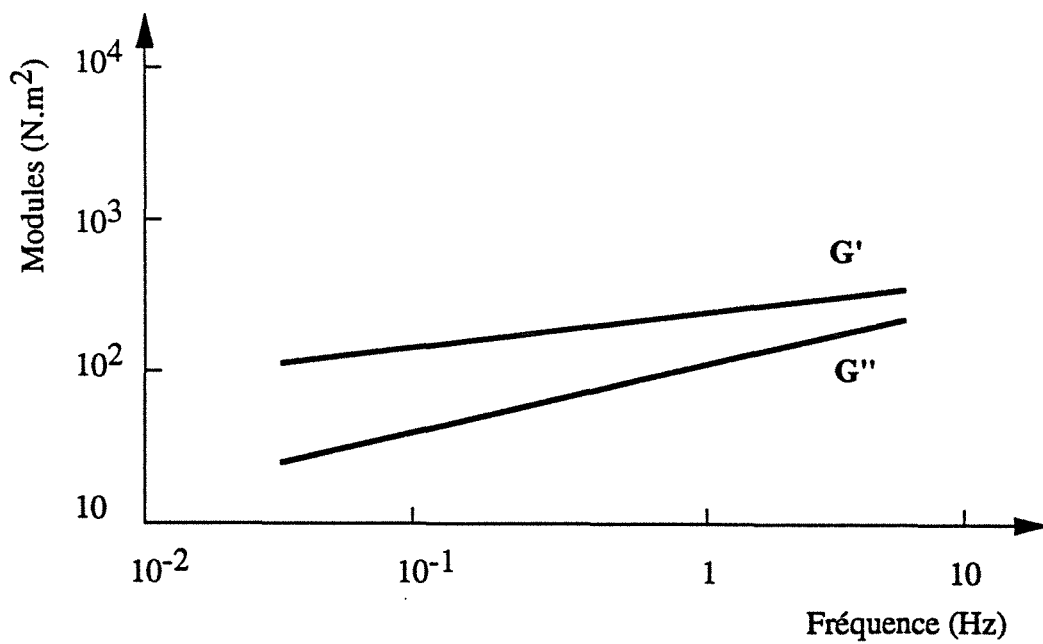


FIGURE 29 : Comportement en régime harmonique d'un gel faible de 1-carraghénane à 0,7% (Doublier 1986).

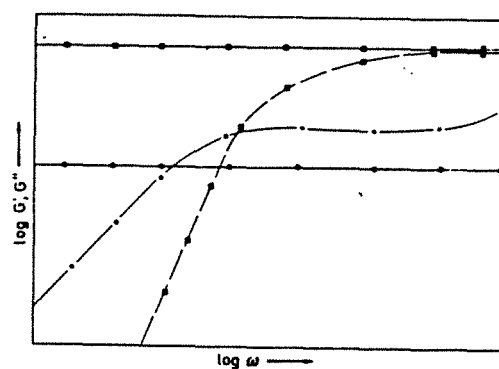


FIGURE 2.10 : Comportement en régime harmonique d'un gel typique (lignes pleines), et d'une solution de macromolécules enchevêtrées (lignes pointillées). $\square$: G' , $\circ$: G'' (Clark et Ross-Murphy 1987).

2.3. Production de polysaccharide par fermentation

2.3.1. La souche

Avant de produire un polysaccharide microbien à grande échelle, il est nécessaire de sélectionner un microorganisme stable au cours du temps et produisant le minimum de sous-produits. Il est en effet fréquent que des souches synthétisent leur polysaccharide à des taux de plus en plus faibles lors de cultures en continu ou de repiquages répétés sur milieu solide. Cette diminution est due à l'émergence de microorganismes ne pouvant plus synthétiser de polysaccharide, cette incapacité résultant souvent de la perte de la possibilité de synthétiser des enzymes de la biosynthèse du polymère (Darzins *et al.* 1985). De plus, il est intéressant de sélectionner des souches produisant le minimum de sous-produits, car d'une part, l'étape de purification du polysaccharide est facilitée, et d'autre part, le rendement de conversion du substrat en produit et la productivité en polysaccharide sont augmentés puisque le microorganisme ne dissipe plus son énergie dans des réactions "parasites". Très peu de souches ne produisent en effet que le polymère ciblé en grande quantité et il est fréquent que des composés de stockage intracellulaires comme le poly- β -hydroxybutyrate (PHB) ou le glycogène soient en plus synthétisés. Les *Pseudomonas* sont par exemple réputés pour convertir beaucoup de substrat en PHB.

2.3.2. Croissance cellulaire et production

Le rapport existant entre la production de polysaccharide et la croissance cellulaire n'est pas univoque et dépend du microorganisme utilisé. Par exemple, le xanthane est produit durant les phases de croissance linéaire et stationnaire de *X. campestris* alors que *Pseudomonas aeruginosa* synthétise son polysaccharide principalement durant la phase exponentielle de croissance et que d'autres souches de *Pseudomonas* produisent le polysaccharide seulement à partir de la fin de la phase exponentielle et surtout durant la phase stationnaire (Sutherland 1990).

La production bactérienne de polysaccharide s'effectue généralement en fermentation discontinue monoétagée. Le moût final comprend un mélange de molécules formées lors des différentes phases de la croissance cellulaire. Pour le xanthane, des différences au niveau du degré d'acylation et de la viscosité intrinsèque du polymère formé ont été enregistrées au cours de la fermentation. Par exemple, Suh *et al.* (1990) ont montré que la masse molaire moyenne du xanthane dans des conditions de transfert en oxygène non limitantes augmente de $7,2 \cdot 10^6$ daltons après 30 heures de culture à $8,9 \cdot 10^6$ daltons en fin de fermentation (154 heures) (figure 2.11). Ces différences sont certainement dues à l'indisponibilité de certains précurseurs, en particulier l'acétyl-CoA, durant certaines phases de la culture (Sutherland 1990). Il est également possible que les ressources en bactoprénol soient limitées. Le bactoprénol étant impliqué dans d'autres synthèses, la cellule favoriserait

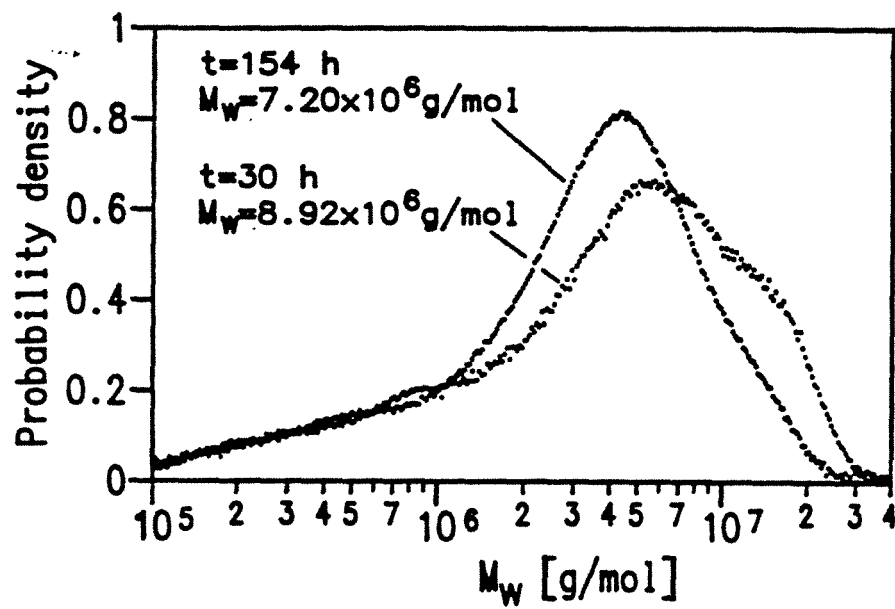


FIGURE 2.11 : Distribution de masse molaire en fin de croissance bactérienne et en fin de culture pour la production de xanthane (Suh *et al.* 1990).

certaines voies métaboliques au détriment de la production de polysaccharide, et les polysaccharides produits seraient alors de masse molaire plus faible (Sutherland 1990).

2.3.3. Phénomènes de transfert dans un fermenteur

Réaliser une fermentation bactérienne consiste à créer artificiellement autour d'un microorganisme un environnement adéquat à son développement ou à la synthèse du produit souhaité. Ainsi, le pH et la température, la composition du milieu de culture, l'inoculum, le taux d'aération et l'agitation sont des paramètres fondamentaux. Dans le cas de la production de polysaccharide exocellulaire, l'accumulation du produit de fermentation entraîne une augmentation importante de la viscosité du moût et l'apparition d'un caractère rhéofluidifiant prononcé. Il en résulte une évolution importante de l'hydrodynamique du système et un ralentissement des transferts de matière et d'énergie, ce qui peut aboutir à des limitations diffusionnelles. Un facteur important en relation avec l'hydrodynamique du fermenteur est l'agitation.

2.3.3.1. L'agitation

La qualité du mélange obtenue dans un réacteur dépend notamment du type d'agitateur utilisé et de la vitesse d'agitation. Un agitateur a pour mission d'une part de fragmenter et de disperser les bulles de gaz injectées dans le fermenteur pour augmenter la surface d'échange entre le gaz et le milieu de culture et d'autre part d'homogénéiser le milieu pour minimiser les limitations diffusionnelles.

Certains auteurs utilisent des turbines à pales droites classiques dites de Rushton pour l'agitation des milieux évolutifs. Ces turbines se caractérisent par une forte capacité de dispersion des gaz pour les milieux de faible viscosité, mais avec les milieux visqueux et surtout rhéofluidifiants, des "cavernes d'agitation" se forment. L'intérieur de ces cavernes est une zone de micromélange où l'agitation est violente, les cisaillements importants et le fluide peu visqueux. En s'éloignant des agitateurs, les cisaillements deviennent plus faibles, les mouvements plus lents et le fluide plus visqueux. Finalement, des zones de stagnation du fluide peuvent se former aux abords des parois et à la surface du liquide. Dans la cavité, les flux de matière prédominants sont latéraux et la cavité peut être assimilée à un cylindre de hauteur égale à 40% de son diamètre. En utilisant cette estimation, Nienow et Elson (1988) ont relié, pour un fluide non aéré, le diamètre de la cavité au diamètre de la turbine, à la vitesse d'agitation, et au seuil d'écoulement du fluide (figure 2.12). Ils ont ainsi démontré que pour un fluide en régime laminaire présentant un fort pouvoir rhéofluidifiant, comme une solution de xanthane à 1,5%, il est nécessaire d'utiliser un agitateur de diamètre égal à celui du fermenteur du réacteur pour ne pas avoir formation de cavité. Dans le cas de fluides aérés, la taille des cavernes est inférieure à celle obtenue sans aération car le passage de l'air réduit l'efficacité des agitateurs. Cette efficacité est d'autant plus affectée que les bulles sont moins dispersées et transitent préférentiellement par une cheminée centrée sur l'axe des agitateurs, zone du fermenteur où la viscosité du fluide est la plus

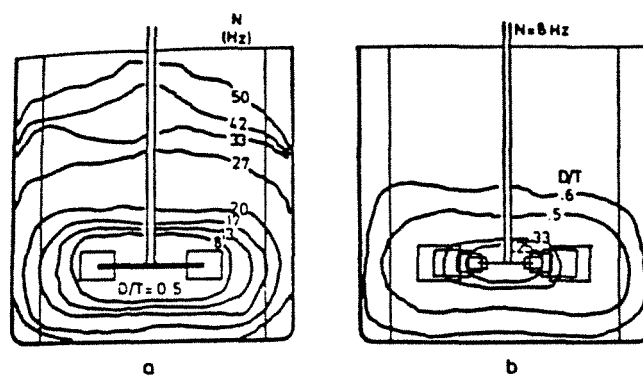


FIGURE 2.12 : Effet de la vitesse d'agitation (a) et du rapport D/T ($\phi_{\text{turbine}}/\phi_{\text{cuve}}$) (b) sur la taille des cavernes formées par une turbine Rushton (Nienow et Elson 1988). Fluides : (a) xanthane 3%, (b) xanthane 1,5%.

faible. Cette aération locale importante peut conduire à la cavitation des agitateurs, c'est-à-dire que les agitateurs tournent dans le vide, ce qui réduit encore leur efficacité. L'ajout de contre-pales, ou chicanes, est déconseillé pour le mélange de ces fluides car l'apparition de zones de stagnation entre les contre-pales accentue l'hétérogénéité d'agitation. (Hoogendoorn et Den Hartog 1967).

Des mobiles de diamètre presque de la même dimension que celui du fermenteur, appelés mobiles de proximité ont été développés pour éviter cette compartimentation. Dans le cas de fluides très complexes, des mobiles en forme d'ancre marine sont parfois employés mais ils provoquent plus un mouvement d'ensemble du fluide qu'une réelle agitation. Pour ces milieux, l'emploi de rubans hélicoïdaux ou d'une combinaison d'un ruban hélicoïdal et d'une vis d'Archimède est préconisé par de nombreux auteurs (Nagata 1975, Tatterson 1991). Du fait de la géométrie de ces agitateurs, les zones stagnantes proches des parois sont inexistantes. Pour des vitesses d'agitation suffisantes, la recirculation axiale permet d'obtenir une bonne homogénéisation du fluide et de limiter l'apparition de zones mortes centrales. Par contre, leur capacité de dispersion des gaz est moins importante que celle des turbines de type Rushton et l'on peut globalement observer une zone de macromélange dans le fermenteur (Hoogendoorn et Den Hartog 1967). L'utilisation d'un ruban d'un diamètre très proche de celui du fermenteur ou de plusieurs rubans permet d'obtenir des mobiles plus efficaces dans l'agitation des fluides visqueux (Novak *et al.* 1986).

Des turbines permettant d'obtenir une recirculation axiale-radiale ainsi qu'une bonne dispersion des bulles d'air ont également été développées. Ces agitateurs de géométrie particulière, comme la turbine centripète (Rayneri, Montreuil, France) ou la turbine Intermig (EKATO, Allemagne), sont peu étudiés mais permettent d'obtenir une bonne dispersion des bulles d'air et de conserver un macromélange de bonne qualité si leur géométrie et la vitesse d'agitation sont adaptées à la fermentation.

A même vitesse d'agitation, la puissance consommée par les rubans hélicoïdaux est plus importante que celle consommée par des turbines, mais les vitesses d'agitation employées, qui sont inférieures à 250 tr/min pour ce type d'agitateur, sont inférieures à celles requises pour les turbines (> 500 tr/min). L'agitation industrielle requiert généralement une puissance comprise entre 1 et 4 kW par mètre cube de milieu de fermentation (Moo-Young et Blanch 1981). Un fermenteur industriel ayant un volume habituellement compris entre 40 et 160 m³, la puissance consommée est un paramètre économique important. Outre les problèmes de cavitation cités plus haut, la puissance consommée à même vitesse d'agitation est plus faible dans les milieux aérés que dans les milieux non aérés car l'aération diminue la densité et la viscosité du milieu. Pour les fluides newtoniens, cette diminution de puissance peut atteindre jusqu'à 2/3 de la puissance consommée sans aération.

2.3.3.2. L'apport en oxygène

Lors d'une fermentation, il est nécessaire d'apporter à un organisme aérobie de l'oxygène dissous dans le liquide en quantité suffisante. La solubilité de l'oxygène dans un milieu aqueux est faible, de l'ordre de 10 mg/l, et elle dépend de la pression de la phase gazeuse, de la température et de la composition du milieu. Le transfert d'oxygène dans un fermenteur fait intervenir des phénomènes de transport dans les phases gazeuse et liquide, et de transfert aux interfaces gaz/liquide et liquide/microorganisme. Dans un fermenteur fortement agité, la limitation de transfert se situe au niveau de la couche limite liquide de l'interface gaz/liquide. Parmi les facteurs influençant le transfert d'oxygène, les plus importants sont la concentration en oxygène dans la phase gazeuse, la température et la pression de la phase gazeuse, et les conditions hydrodynamiques d'agitation qui déterminent entre autres la surface d'échange gaz-liquide. Les capacités de transfert d'oxygène d'un réacteur sont estimées par la valeur de $K_L a$ qui est un coefficient volumétrique de transfert de matière. De nombreuses méthodes d'évaluation de ce coefficient de transfert existent et ont fait l'objet de synthèses bibliographiques (Tecante 1991). Elles sont regroupées en deux grands groupes : les méthodes en régime transitoire et les méthodes en régime permanent. Seules deux méthodes peuvent être raisonnablement utilisées lors de réactions biologiques : il s'agit de la méthode dynamique et de celle des bilans gazeux. La méthode dynamique qui nécessite un dégazage à l'azote est difficilement applicable au type de fermentation étudié car elle entraîne une perturbation de la culture et surtout nécessite un taux d'oxygène dissous non nul ou moment du dégazage. Donc, seule la méthode des bilans gazeux, qui ne nécessite ni intervention ni taux d'oxygène dissous non nul, est applicable tout au long de nos fermentations. Cette méthode est fondée sur un bilan global en oxygène sur le fermenteur. Elle repose sur l'équation de bilan suivante :

$$\frac{dC}{dt} = K_L a (C^* - C) - QO \quad (24)$$

où C est la concentration en oxygène dissous dans le liquide, C^* la solubilité de l'oxygène dissous dans la phase liquide en équilibre avec la phase gazeuse et QO la vitesse de consommation volumique d'oxygène des microorganismes définie de la façon suivante:

$$QO = \frac{(\%O_{2e} d_e - \%O_{2s} d_s)}{V} \quad (25)$$

où $\%O_{2e}$ et $\%O_{2s}$ sont les pourcentages en oxygène dans les gaz en entrée et en sortie du fermenteur, d_e et d_s sont les débits d'air entrant et sortant du fermenteur et V le volume du fermenteur.

En régime permanent, dC/dt est nul et $K_L a$ est obtenu par l'équation :

$$K_L a = \frac{QO}{(C^* - C)} \quad (26)$$

QO et C étant directement accessibles, seule la solubilité de l'oxygène à l'équilibre C^* reste inconnue. Cette solubilité est fonction de la composition du milieu mais elle évolue peu lors

d'une production de polysaccharide exocellulaire (Reuß 1983). Généralement, la valeur de C^* est prise entre 0,23 et 0,27 mole/m³ pour un milieu de culture classique (Pons *et al.* 1989, Herbst *et al.* 1990).

Lors de la production de polysaccharide, le passage d'un milieu de fermentation newtonien et très peu visqueux à un milieu de plus en plus rhéofluidifiant et visqueux modifie l'efficacité de l'aération et du transfert dans le fermenteur. L'homogénéisation du milieu est en effet plus lente, des zones de stagnation apparaissent, les bulles de gaz sont moins dispersées, et de grosses bulles remontent rapidement à la surface. Herbst *et al.* (1987) ont ainsi observé que pour la production de xanthane dans un fermenteur muni de turbines, $K_L a$ est fonction de la viscosité moyenne du fluide à la puissance - 0,7.

2.3.3.3. Influence des conditions de transfert

Bien que de multiples études aient été menées sur l'hydrodynamique des bioréacteurs contenant des fluides modèles complexes, les travaux liés à l'influence des conditions hydrodynamiques de fermentation sur la production de polysaccharides bactériens sont peu nombreux. De plus, les relations entre les phénomènes hydrodynamiques, rhéologiques et biologiques mis en jeu pour la production de polysaccharide ont rarement été étudiées. On entend par paramètres hydrodynamiques : la capacité d'aération du fermenteur, la puissance consommée par l'agitation et la géométrie de l'écoulement générée par l'agitateur.

Sur le plan des limitations de production, l'apport en oxygène est souvent un paramètre clef et les meilleures productions et productivités sont généralement observées pour les conditions de transfert en oxygène les moins limitantes. Ainsi, avec *X. Campestris* (Peters *et al.* 1989), comme avec *Klebsiella* (Coté 1992), les meilleures productions de polysaccharide sont observées pour des vitesses d'agitation élevées qui correspondent aux capacités de transfert les plus importantes (figure 2.13, tableau 2.1). Dans le cas du xanthane, Peters *et al.* (1988) ont en effet démontré qu'en phase stationnaire de croissance et dans des conditions de concentration en oxygène dissous limitantes, la vitesse spécifique de production de polysaccharide est liée directement à la vitesse spécifique de consommation d'oxygène. Peters *et al.* (1989) ont également montré que les différences de production entre faible et forte vitesse d'agitation en fermenteur ne sont pas dues à une limitation diffusionnelle causée par une couche de polysaccharide entourant le microorganisme qui existerait à faible vitesse et qui serait détruite lorsque l'agitation est violente. Leurs observations au microscope électronique ont en effet montré que cette couche, visible pour des cellules cultivées sur milieu gélosé, n'existe pas pour des cellules cultivées en fermenteur même faiblement agité (figure 2.14). Par contre, ces auteurs ont démontré que seul le transfert d'oxygène limite la vitesse de production du xanthane puisque le niveau de production obtenu est identique dans de bonnes conditions d'agitation à 800 tr/min, et dans de mauvaises conditions à 400 tr/min mais avec un apport d'oxygène

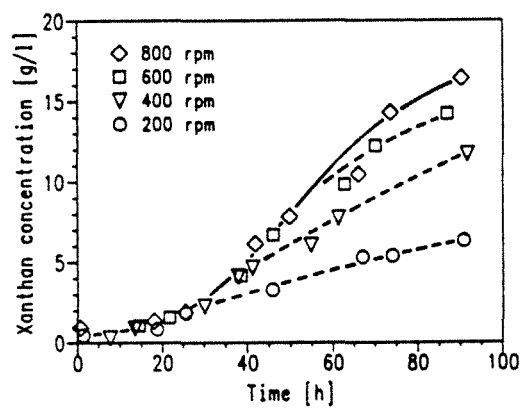


FIGURE 2.13 : Evolution de la concentration en xanthane pour des fermentations à diverses vitesses d'agitation (Peters *et al.* 1989).

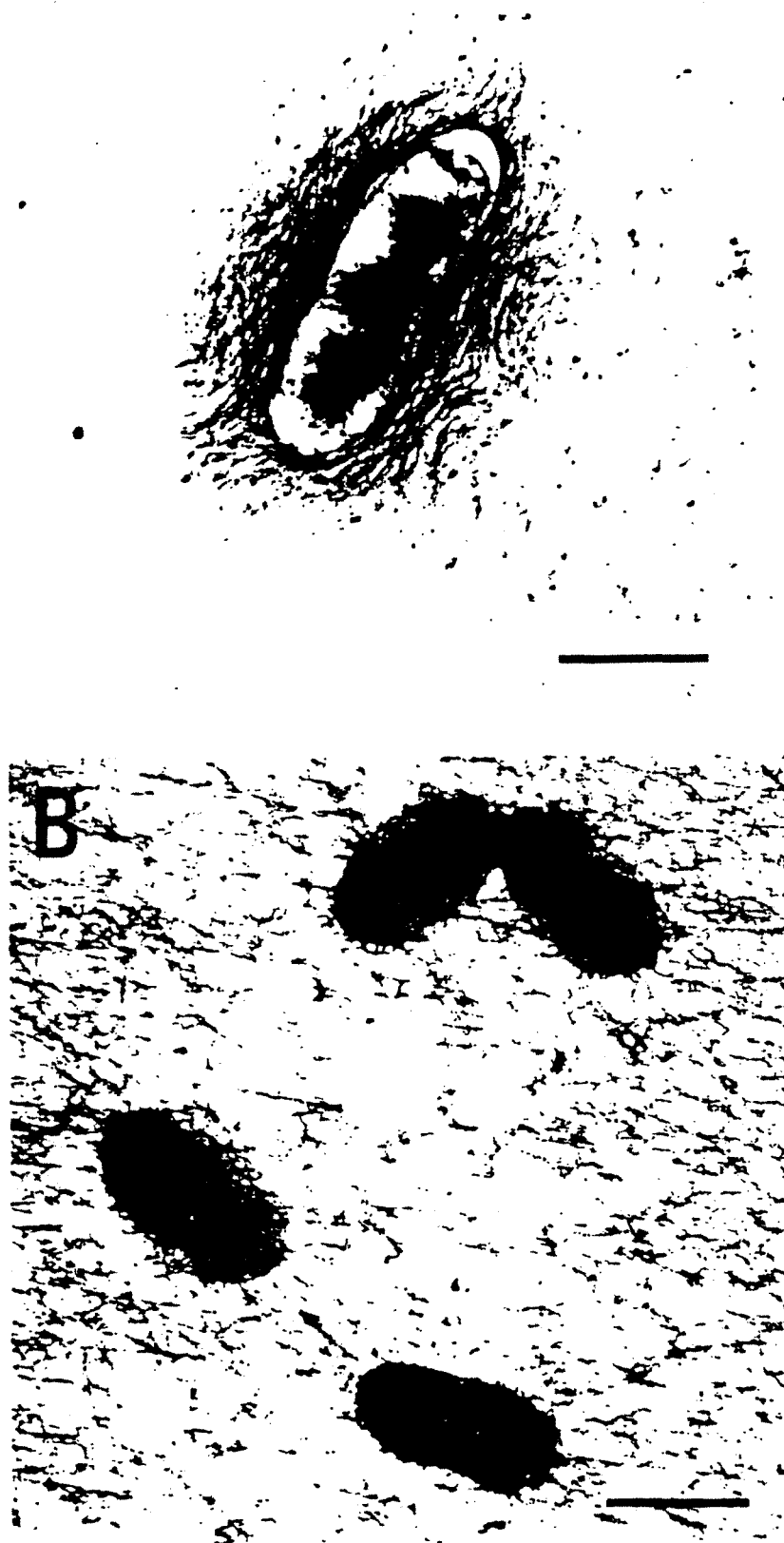


FIGURE 2.14 : Clichés au microscope électronique de *X. campestris* (Peters *et al.* 1989). a) accumulation de polysaccharide autour de la bactérie après culture sur milieu solide, b) bactéries cultivées en fermenteur à 400 tr/min. Longueur de la barre : 1 µm.

supplémentaire par le biais d'air enrichi (figure 2.15, tableau 2.1). Le fermenteur utilisé comportait 4 turbines ($\varnothing_{\text{agitateur}}/\varnothing_{\text{cuve}} = 0,63$) pour un volume utile de 15 litres.

TABLEAU 2.1 : Influence de la vitesse d'agitation sur les masses molaires et concentrations finales de xanthane (Peters *et al.* 1989).

Vitesse d'agitation (tr/min)	Masse molaire moyenne $\times 10^6$ (dalton)	Concentration finale en xanthane (g/l)
200	6,9	6,3
400	7,5	11,8
600	8,3	14,2
800	8,8	16,4
400 + O ₂ *	8,6	17,6

* air enrichi en oxygène

Selon le microorganisme étudié, les caractéristiques du produit formé peuvent également fluctuer avec les conditions de transfert durant la biosynthèse. Peters *et al.* (1989) et Suh *et al.* (1990) ont ainsi trouvé que la masse molaire du xanthane varie avec la limitation en oxygène imposée au microorganisme (tableau 2.1, figure 2.16). Par contre pour *Klebsiella*, à partir de la comparaison rhéologique des moûts, Coté (1992) n'a pas observé de différences importantes dans les produits formés lors de fermentations réalisées dans des conditions de transfert limitantes ou non. Seul le produit issu d'une fermentation à faible vitesse d'agitation avec un ruban hélicoïdal muni d'une vis centrale est légèrement plus visqueux que celui obtenu à haute vitesse. La masse molaire moyenne du produit obtenu est un paramètre important puisque la viscosité d'une solution est fonction de la masse molaire du polymère.

Contrairement au transfert d'oxygène, l'hydrodynamique du fermenteur, au sens géométrie d'écoulement, ne semble pas avoir d'influence sur les caractéristiques du xanthane et du polysaccharide de *Klebsiella* dès lors que les transferts de matière ne sont plus limitants. En effet, lorsque *X. campestris* n'est pas limité en oxygène, la masse molaire du xanthane est indépendante de l'hydrodynamique du fermenteur : la même masse est obtenue avec un fermenteur équipé de turbines Rushton ou Intermig (800 tr/min ou 400 tr/min + O₂), un fermenteur agité muni d'un tube de guidage ("draft tube"), ou une colonne à bulles (Deckwer et Schumpe 1989). De même, Coté (1992) n'a pas observé pour *Klebsiella* de différences dans les propriétés rhéologiques du moût final entre des fermentations réalisées dans des conditions non limitantes en oxygène avec un ruban hélicoïdal équipé d'une vis centrale ou avec des turbines Rushton.

2.3.3.4. Viscosité de procédé du moût de fermentation

Lors de la production d'un exopolysaccharide, il est intéressant de connaître la

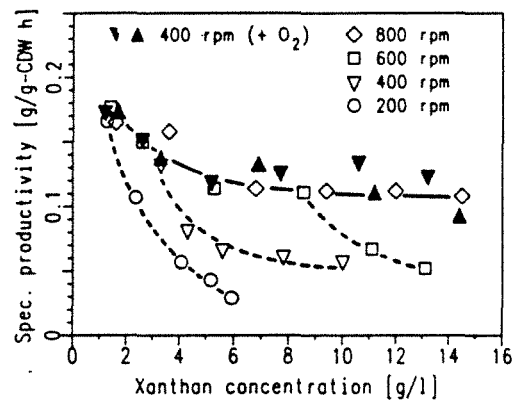


FIGURE 2.15 : Evolution de la vitesse spécifique de production de xanthane pour des fermentations à diverses vitesses d'agitation (Peters *et al.* 1989). 400 tr/min + O₂ : avec de l'air enrichi en oxygène.

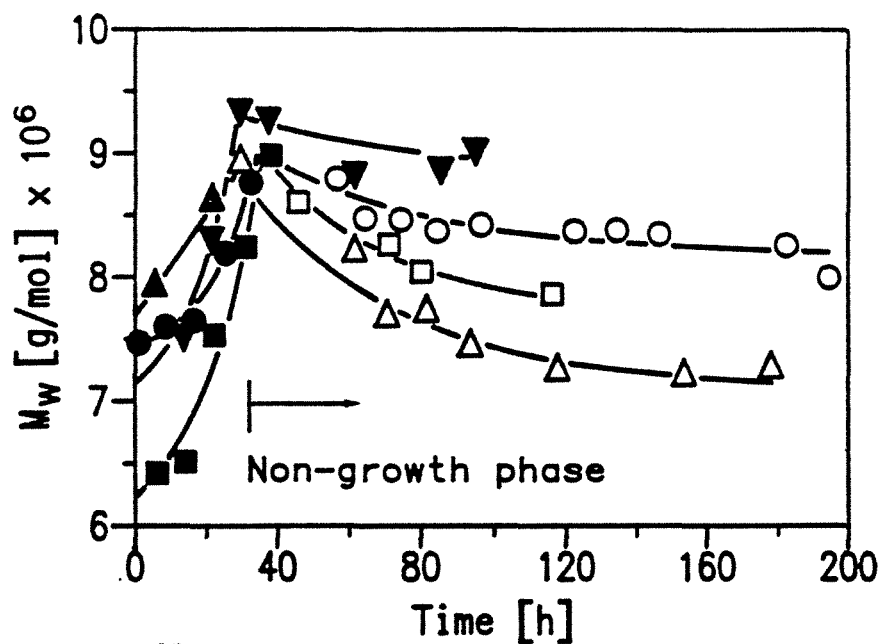


FIGURE 2.16 : Evolution de la masse molaire du xanthane lors de fermentations réalisées à différents taux d'aération dans une colonne à bulles (Suh *et al.* 1990). Taux d'aération : ▲ 0,05 ; ■ 0,10 ; ● 0,17 et ▼ 0,36 m/s. Symboles évidés : limitation en oxygène.

viscosité moyenne du moût dans le fermenteur car cela permet en particulier d'obtenir des renseignements sur l'écoulement généré par l'agitation. Cependant, la viscosité n'est pas uniforme dans le fermenteur car le moût est non newtonien et le cisaillement engendré par les agitateurs n'est pas homogène. Il est cependant possible d'avoir accès à une viscosité moyenne appelée "viscosité de procédé" à partir de la connaissance des caractéristiques rhéologiques du moût et d'une estimation de la vitesse de cisaillement moyenne dans le fermenteur. Pour cela, Metzner et Otto (1957) ont proposé la relation suivante en régime laminaire :

$$\dot{\gamma}_{\text{moy}} = k_s N \quad (27)$$

où N est la vitesse de rotation de l'agitateur (tr/s) et k_s un facteur de proportionnalité caractéristique du système agitateur/réacteur utilisé qui peut éventuellement être fonction du caractère rhéofluidifiant du fluide. La connaissance de k_s suffit donc pour déterminer la viscosité de procédé en régime laminaire. Metzner et Otto (1957) ont proposé une méthode expérimentale de détermination de k_s mais de nombreuses expressions empiriques prenant en compte l'indice de comportement rhéofluidifiant n du fluide et la géométrie des agitateurs ont été proposées. Pour les agitateurs à ruban hélicoïdal en régime laminaire, Brito (1992) a proposé la relation :

$$k_s = 38.3 \left(\frac{w}{d} \right)^{-0.024} \left(\frac{s}{d} \right)^{-0.135} (0.814)^{\frac{1}{n}} \quad (28)$$

où w est la largeur du ruban, d le diamètre de l'agitateur et s le pas du ruban hélicoïdal.

La connaissance de la viscosité de procédé, $\eta_{\text{procédé}}$, dans le fermenteur permet de calculer le nombre de Reynolds associé à l'écoulement qui représente un rapport entre les forces d'inertie et les forces visqueuses. La viscosité dans le fermenteur n'étant pas constante, il est nécessaire de définir un nombre de Reynolds modifié Re' :

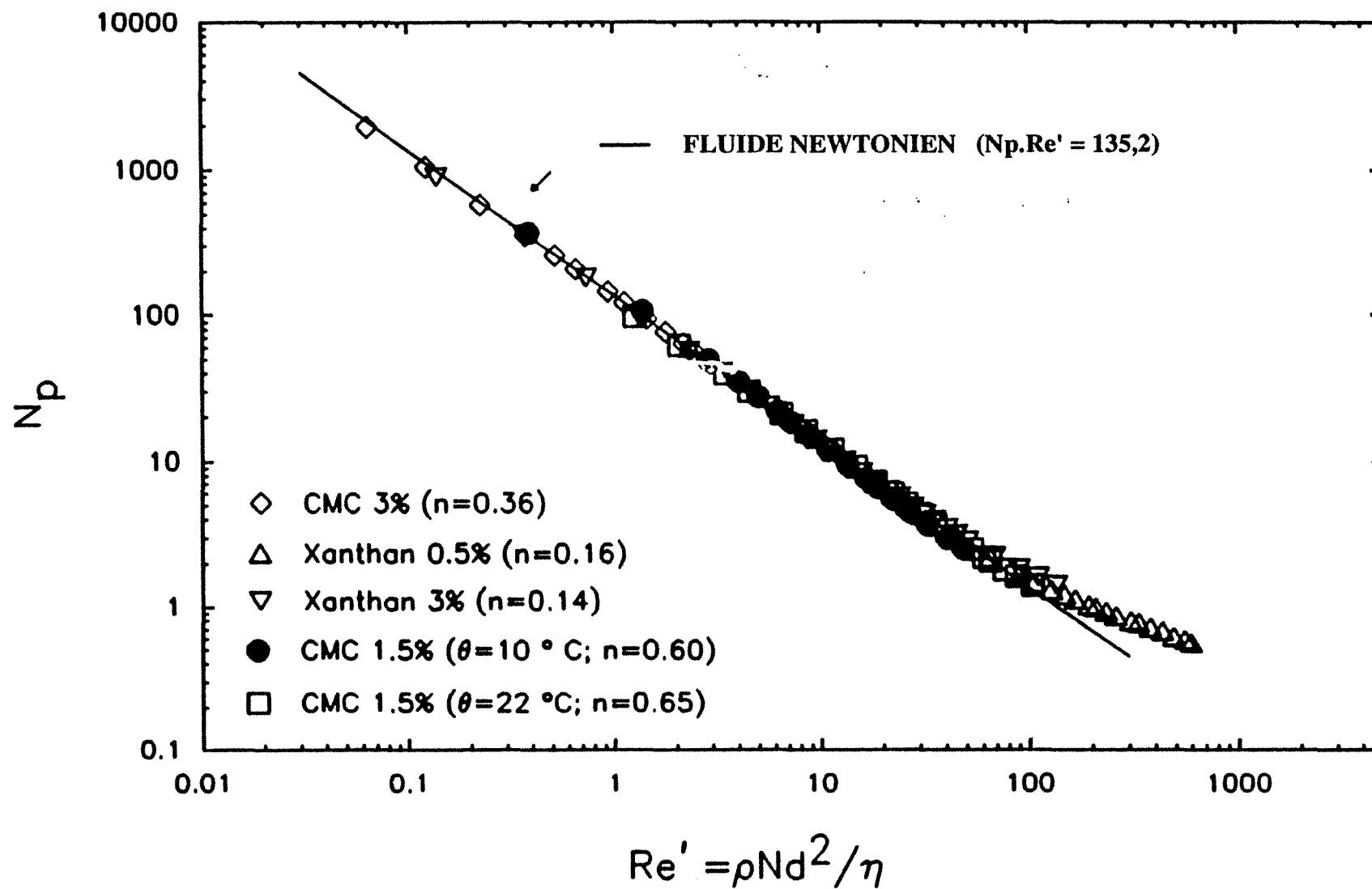
$$Re' = \frac{d^2 N \rho}{\eta_{\text{procédé}}} \quad (29)$$

où d est le diamètre de l'agitateur et ρ la masse volumique du fluide (kg/m^3). Il est également possible de définir le nombre de puissance Np :

$$Np = \frac{P}{\rho N^3 d^5} \quad (30)$$

où P est la puissance injectée dans le fermenteur qui est égale à $2 \pi N C$, C étant le couple sur l'arbre d'agitation. Np est un facteur de friction. La connaissance de ces deux nombres adimensionnels permet de construire une courbe Np en fonction de Re' (figure 2.17). Différents comportements sont observés suivant le régime d'écoulement. En régime laminaire, le produit $Re' \cdot Np$ est constant, ce qui signifie que la puissance injectée et la viscosité du fluide sont directement inversement proportionnelles. Lorsque l'on s'éloigne du régime laminaire, la linéarité est perdue et Np devient indépendant de Re' , ce qui signifie que la puissance consommée devient indépendante de la viscosité du fluide.

FIGURE 2.17 : Evolution du nombre de puissance N_p en fonction du nombre de Reynolds modifié Re' pour un ruban hélicoïdal (Brito 1992)



L'établissement de cette relation est très intéressant puisque le nombre de Reynolds, donc la viscosité de procédé, peut ainsi être facilement estimé à partir de la puissance injectée.

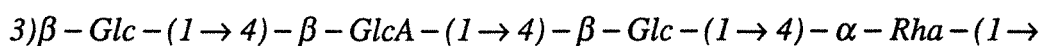
Dans le cas de turbines Rushton, le régime d'écoulement laminaire prend fin pour un nombre de Reynolds modifié de l'ordre de 10. Pour les rubans hélicoïdaux, le régime laminaire est conservé jusqu'à des nombres de Reynolds modifiés de l'ordre de 100 (Brito *et al.* 1992). L'évolution du nombre de puissance en fonction du nombre de Reynolds est reportée sur la figure 2.17 dans le cas d'un ruban hélicoïdal ayant un rapport ($\frac{\phi_{\text{agitateur}}}{\phi_{\text{réacteur}}}$) de 0,88. Il est intéressant de remarquer sur cette courbe que contrairement à ce que l'on peut observer pour une turbine Rushton, la courbe ne passe pas par un minimum en amont du plateau turbulent. Pour un ruban hélicoïdal à une vitesse d'agitation constante, chaque augmentation du nombre de puissance correspond donc à une diminution du nombre de Reynolds modifié due à une augmentation de la viscosité de procédé.

2.3.4. Extraction du polysaccharide

La méthode d'extraction classiquement utilisée comporte une pasteurisation suivie d'une élimination des cellules par filtration ou centrifugation puis une précipitation du polysaccharide avec un solvant tel que l'isopropanol. La précipitation résulte de phénomènes complexes dont les effets peuvent être assimilés à une augmentation des interactions entre les chaînes provoquée par la diminution de la constante diélectrique du solvant (Smith et Pace 1982). De nouvelles méthodes de purification sont à l'étude : en effet, la précipitation est une technique lourde à mettre en œuvre car elle nécessite de grandes quantités de solvant, un chauffage ou une dilution du moût avant l'ajout du solvant et provoque en outre une aggrégation du polymère. Johns et Noor (1991) ont démontré l'efficacité d'un procédé de microfiltration à courants croisés sur un moût de xanthane. Cette méthode permet de concentrer le moût de fermentation tout en éliminant les molécules de petite taille (eau, sels, pigments, ...), le polysaccharide étant ensuite précipité par une quantité de solvant inférieure à celle nécessaire en précipitation directe.

2.4. Le gellane

Le gellane est un polysaccharide composé de D-glucose (Glc), L-rhamnose (Rha) et d'acide D-glucuronique (GlcA) (Kang *et al.* 1982). La structure primaire du gellane consiste en une séquence répétée de l'unité tétrasaccharidique (O'Neill *et al.* 1983, Janson et Lindberg 1983) :



Le polysaccharide natif représenté sur la figure 2.18 est estérifié par un L-glycérate en C2 du premier glucose et par un acétate en C6 du même glucose une séquence tétrasaccharide sur deux (Kang *et al.* 1982, Kuo *et al.* 1986). Ces substituants estérifiés non ioniques

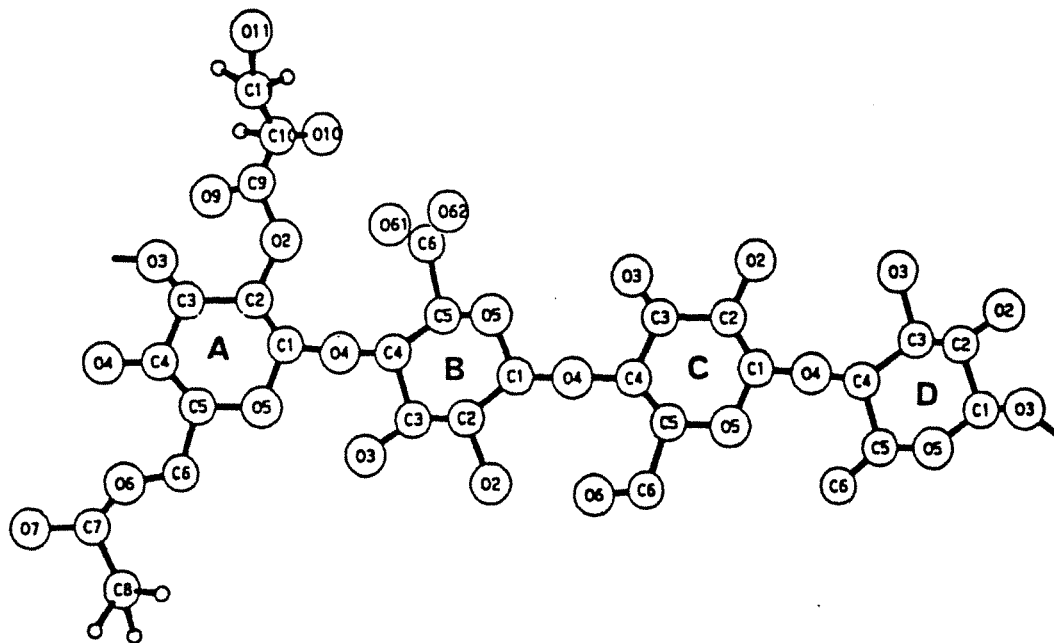


FIGURE 2.18 : Représentation de l'unité tétrasaccharide du gellane natif (Chandrasekaran *et al.* 1988b). A et C : D-glucose, B : acide D-glucuronique, D : L-rhamnose.

n'apportent pas de charges anioniques au polysaccharide mais influent sur le caractère hydrophobe de certaines parties du polymère (Sutherland 1990).

2.4.1. Production du gellane

Le gellane est un polysaccharide exocellulaire produit par la bactérie *Auromonas elodea* (ATCC 31461) précédemment classifiée comme *Pseudomonas elodea* (Kang *et al.* 1982, Moorhouse 1987). Cette bactérie a été isolée de tissus de plantes (*elodea*) collectés en Pennsylvanie par Kaneko et Kang (1979) et elle a été caractérisée par Kang *et al.* (1982). Elle est Gram négative, de couleur jaune mais non fluorescente, et non capsulée. Elle se présente, dans des conditions de croissance favorables, sous forme de bâtonnets arrondis de 2 à 3 μm de long par 0,6 à 0,8 μm de large, et elle devient polymorphe dans des conditions limitantes. Par ailleurs, cette souche n'est pas auxotrophe.

Le gellane est produit par fermentation aérobie. De nombreux hydrates de carbone, dont le glucose, le fructose, le maltose, le saccharose, le xylose et le mannitol peuvent être utilisés comme source de carbone à une concentration initiale allant jusqu'à 4%. La température optimale de production du polysaccharide est comprise entre 28 et 32°C et le pH optimal entre 6 et 8. La bactérie ne produit des gaz que lorsque la source de carbone est un polyalcool. A partir de 3% de glucose, la production de gellane natif, c'est-à-dire débris cellulaires inclus, est de l'ordre de 1,5% en 50 heures de culture (Kang et Verder 1982b).

La présence de poly- β -hydroxybutyrate (PHB) et de granules de polyphosphate a été observée dans des conditions de limitation en azote (Giammatteo *et al.* 1990). Le PHB peut représenter de 20 à 35% de la masse de gellane brut (Baird et Cleary 1991). Aucune trace de ce produit n'est retrouvée dans les produits commerciaux clarifiés et désestérifiés (Giammatteo *et al.* 1990). Récemment, la société Kelco a isolé une souche mutante d'*Auromonas elodea* (ATCC 53 967) ne produisant pas de PHB (Baird et Cleary 1991), mais le brevet ne mentionne pas le niveau de production de polysaccharide atteint.

Lobas *et al.* (1992) ont isolé récemment une autre souche productrice de gellane à partir d'une culture d'*A. elodea* fournie par l'ATCC. Cette nouvelle souche, *Sphingomonas paucimobilis* E2 (DSM 6314), a été isolée sur un milieu solide contenant du gellane comme agent gélifiant. Après incubation, deux types de colonies ont été observés : des colonies se développant à la surface du gel, *S. paucimobilis* E2, et d'autres, E1, pénétrant à l'intérieur de la matrice. *S. paucimobilis* E2, contrairement à E1, est une bonne productrice de gellane. La comparaison des phénotypes des souches a révélé certaines différences entre ces deux souches et *A. elodea*. Selon Lobas *et al.* (1992), *S. paucimobilis* donnerait lieu à une production de gellane quatre fois supérieure à celle obtenue avec *A. elodea*. Néanmoins, la production de 0,8% obtenue avec cette nouvelle souche est du même ordre de grandeur que les 1,5% contenant 50% de gellane obtenus avec *A. elodea* par Kang *et al.* (1982).

Un schéma métabolique pour la biosynthèse du gellane par *A. elodea* (figure 2.19) a été proposé par Martins et Sa-Correia (1991). Ce schéma a été échafaudé à partir de l'analyse des enzymes présumées responsables de la production des précurseurs nucléotidiques issus de cellules sauvages productrices de polysaccharide (gel⁺) et de cellules mutantes non productrices (gel⁻). Ces précurseurs sont l'UDP-glucose, le thymidine diphosphate rhamnose (TDP-rhamnose) et l'UDP-acide glucuronique. Dans des conditions de production favorables à la synthèse de gellane, deux enzymes présentes à un taux deux fois plus faible pour la lignée gel⁻ que pour la lignée gel⁺ ont été isolées. Il s'agit de l'UDP-glucose pyrophosphorylase et de la TDP-glucose pyrophosphorylase. Ces enzymes semblent être régulées par un système de rétro-inhibition par les sucres nucléotides diphosphates. En effet, ces enzymes sont présentes à des taux dix à quinze fois plus faibles quand les cellules sont cultivées dans des conditions défavorisant la production de polysaccharide, par exemple en présence d'un milieu riche en azote, et de plus aucune des enzymes isolées n'est à la fois absente de la lignée gel⁻ et présente pour la lignée gel⁺. Il est néanmoins possible que d'autres enzymes non isolées soient mises en jeu pour la biosynthèse de gellane.

Trois principales qualités de gellane sont accessibles et une seule est actuellement commercialisée. Les différences entre ces produits sont dues à la nature du traitement post-fermentaire effectué. Les caractéristiques de ces produits sont reportées dans le tableau 2.2.

TABLEAU 2.2 : Composition des différents types de gellane (Kang et Veeder 1983)

Qualité de gellane	natif	désestérifié	désestérifié et clarifié
Acide glucuronique (%)	11	11-13	22
Acétyl (%)	3	0	0
Sucres neutres : (% relatifs)			
- glucose	(60)	(60)	(60)
- rhamnose	(40)	(40)	(40)
Protéines (%)	10-15	17	<2
Cendres (%)	7,0	8,0	9,5

NB: Les pourcentages sont ramenés à la masse totale de gellane (débris cellulaires inclus)

Le gellane natif est directement obtenu à partir du moût de fermentation par précipitation à l'alcool. Pour réaliser cette opération, étant donnée la forte viscosité du milieu de fermentation, il est nécessaire de le chauffer préalablement jusqu'à 95°C pour l'homogénéiser et le fluidifier avant d'ajouter deux volumes d'isopropanol chaud. Le polysaccharide est ensuite séché sous un courant d'air à 55°C durant une heure (Kang et Veeder 1983). Le second produit dit désestérifié subit un traitement alcalin (Kang et Veeder 1983). Le protocole d'extraction du polysaccharide est identique au précédent, mais lorsque le moût de fermentation est à 95°C, le pH est amené à 10 avec de la soude ou de la potasse

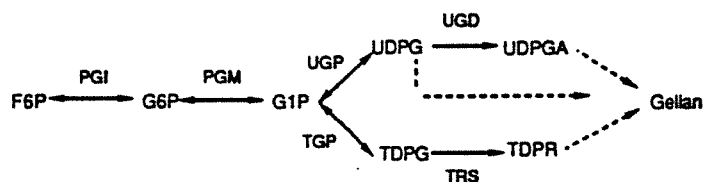


FIGURE 2.19 : Voie de biosynthèse du gellane (Martins et Sa-Correia 1991). F6P : fructose 6-phosphate, G1P : glucose 1-phosphate, UDPG : uridine 5'-diphosphate glucose, TDPG : thymidine 5'-diphosphate glucose, UDGPA : uridine 5'-diphosphate acide glucuronique, TDPR : thymidine 5'-diphosphate rhamnose, PGI : phosphoglucose isomérase, PGM : phosphoglucose mutase, UGP : UDP-glucose pyrophosphorylase, TGP : TDP-glucose pyrophosphorylase, UGD : UDP-glucose déshydrogénase, TRS : TDP-rhamnose synthétase.

et maintenu à cette valeur durant 10 minutes. La solution est ensuite neutralisée par de l'acide sulfurique, puis le produit est précipité. Ce traitement provoque la rupture des liaisons esters des substituants. Le dernier produit, commercialisé sous le nom de Gelrite et de Kelcogel, est le gellane dit désestérifié et clarifié (Kang et Veeder 1983). Alors que le gellane non clarifié est composé de près de 50% de matériel insoluble, ces débris sont dans ce cas éliminés du produit désestérifié par une centrifugation ou une filtration à 70°C. Le polysaccharide est ensuite précipité selon le même protocole que précédemment.

Carroll *et al.* (1983) proposent un autre procédé de désestérification et de clarification. Pour cela, le polysaccharide brut est dissous à 1% dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO) dans lequel la viscosité de la solution est faible. Les débris cellulaires sont éliminés par une centrifugation à 76 000 g de 3 heures. Le polysaccharide est ensuite récupéré par précipitation à l'éthanol et le précipité est lavé à l'alcool et lyophilisé. Pour la désestérification, une solution de gellane clarifié est traitée à pH 12 durant une nuit à 4°C. La solution est ensuite neutralisée à l'acide chlorhydrique, le polymère est précipité à l'alcool après dialyse, et le précipité est lavé à l'éthanol et lyophilisé.

Il est possible d'obtenir toute une gamme de degrés de substitution du polysaccharide en agissant sur la température, le temps de traitement alcalin, ou sur la concentration en base utilisée (Baird et Shim 1985). Par exemple, un produit désestérifié à 50% est obtenu en traitant le moût de fermentation durant trois heures à 40°C avec de la soude 1N (Baird et Shim 1985). Il est également possible, en modifiant les conditions de désestérification, d'éliminer sélectivement les acétates et de conserver les glycérate pour obtenir un produit formant des gels moins fragiles (Chang et Kobzeff 1992). Ces conditions sont par exemple un traitement de 18 heures à 25°C en présence de 0,12 g de potasse par gramme de gellane (Chang et Kobzeff 1992).

Les trois "qualités" de gellane possèdent des propriétés gélifiantes différentes qui sont reportées dans le tableau 2.3.

TABLEAU 2.3 : Principales différences entre les gels de gellane (Moorhouse *et al.* 1981)

Gellane	Nature du gel	T°C de fusion	T°C de prise	Hystérésis
natif	élastique	65-70°	65-70°	aucune
désestérifié sous				
- forme K ⁺	fragile	90° ~75°	31-46°	45-60°
- forme Ca ⁺⁺	fragile	90°	45-50°	45-50°

Le produit désestérifié et clarifié et le produit seulement désestérifié ne présentent pas de différences notoires. Par contre, de nombreuses différences existent entre le gellane

natif et le gellane désestérifié. Le polysaccharide natif forme ainsi un gel élastique et mou alors que le polysaccharide désestérifié forme un gel fragile et ferme. De plus, le gellane natif comportant des chaînes latérales est plus facile à solubiliser que le gellane désestérifié. Finalement, le gellane natif ne présente pas d'hystérésis par rapport à la température, c'est-à-dire que les propriétés rhéologiques du gel sont identiques, à même température, lors de sa prise ou de sa fusion (Moorhouse *et al.* 1981). La température à laquelle le gel se forme est appelée température de prise, la température à laquelle le gel fond, température de fusion.

2.4.2. Caractérisation de la molécule

Pour le gellane natif comme pour le gellane désestérifié, une conformation plus ou moins ordonnée est observée en solution diluée. Une transition conformationnelle d'un état désordonné en pelote statistique vers un état ordonné de plus basse énergie, en hélice, est observée lorsque la concentration en polymère augmente, ou lorsque des sels sont ajoutés en quantité suffisante, ou encore lorsque la température de la solution est abaissée (Dentini *et al.* 1988). Cette transition est adiabatique, très rapide et très coopérative, c'est-à-dire que la structuration en double hélice se propage rapidement sur toute la chaîne dès qu'elle est amorcée (Crescenzi *et al.* 1991). L'état ordonné se traduit par une association intermoléculaire pouvant provoquer la gélification (Gransdalen et Smidsrød 1987).

2.4.2.1. Transition conformationnelle

L'étude de la structure cristalline du polysaccharide désestérifié sous forme de sel de calcium, lithium, sodium, rubidium, tétraméthylammonium (TMA) et potassium a confirmé l'existence, en conformation ordonnée, d'une structure tertiaire en double hélice et, en conformation désordonnée, d'une structure de pelote statistique simple brin. Les brins de la double hélice sont décalés d'un demi motif, antiparallèles, lévogyres et repliés trois fois dans un pas d'hélice de 2,84 nm. (Chandrasekaran *et al.* 1988a et 1988b, Chandrasekaran et Thailambal 1990). L'avance axiale, par séquence répétitive, est de 0,94 nm (Chandrasekaran *et al.* 1988a).

Gransdalen et Smidsrød (1987) ont étudié ces transitions conformationnelles en suivant l'évolution de la viscosité intrinsèque du gellane désestérifié lorsque la concentration en TMA⁺ est augmentée. Le TMA⁺ est choisi car c'est un cation inhibiteur de gélification qui limite, en raison de son volume important, les possibilités d'agrégation des doubles hélices. On peut alors observer successivement sur la figure 2.20, des contractions électrostatiques de chaîne sans transition conformationnelle (zone I : [TMA⁺] < 0,005 M), un passage de la simple chaîne en conformation ordonnée de simple hélice (zone II : 0,005 M < [TMA⁺] < 0,05 M) et des associations de chaînes qui mènent à la formation d'agrégats (zone III). Une faible force ionique est donc nécessaire au passage en conformation ordonnée de simple hélice qui est lié à la répartition de charges le long de la chaîne. La transition en simple hélice et l'association des chaînes qui mène à la formation

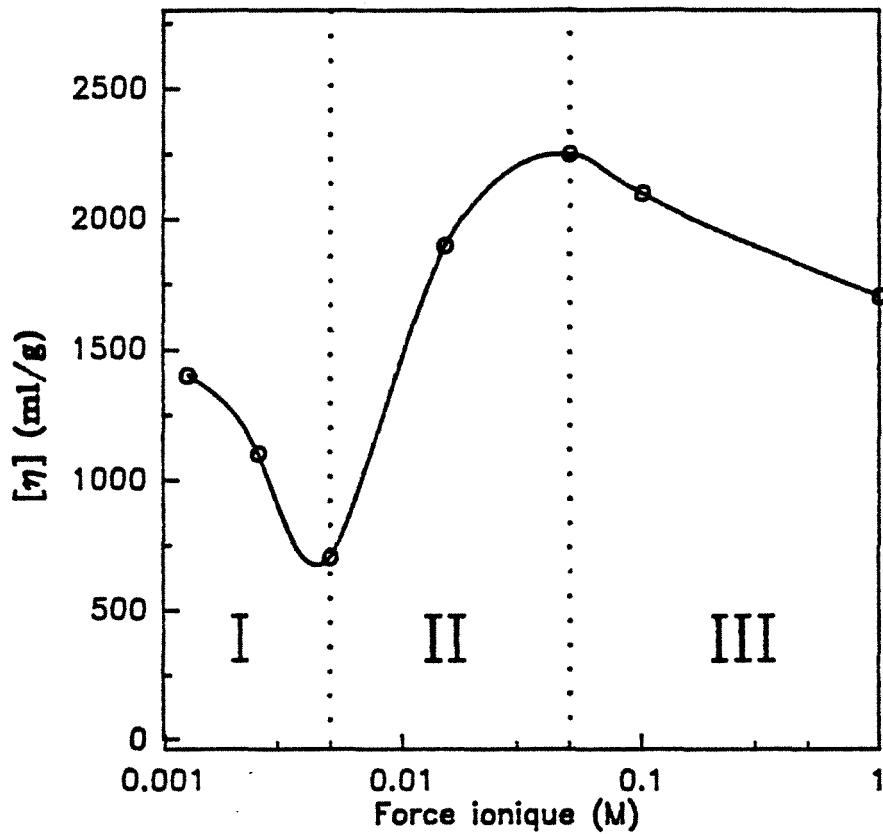


FIGURE 2.20 : Evolution de la viscosité intrinsèque à 25°C du gellane désestérifié en fonction de la force ionique en TMACl (Gransdalen et Smidsrød 1987).

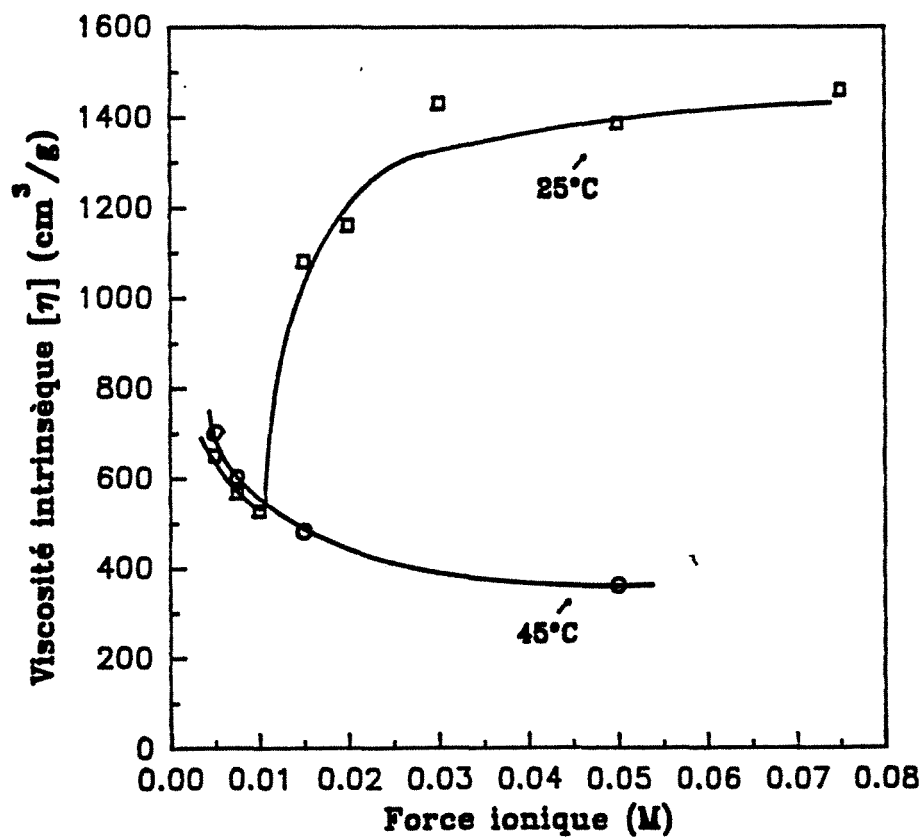


FIGURE 2.21 : Evolution de la viscosité intrinsèque à 25°C et à 45°C du gellane désestérifié en fonction de la force ionique en TMACl (Crescenzi *et al.* 1987).

de la double hélice sont deux processus différents qui apparaissent simultanément en présence de cations promoteurs de gel. L'agrégation est causée par l'association latérale de doubles brins.

La transition conformationnelle peut également être mise en évidence par la comparaison des évolutions à 25°C et 45°C de la viscosité intrinsèque d'une solution de gellane désestérifié en fonction de la force ionique en TMACl (figure 2.21) (Crescenzi *et al.* 1987). A 25°C, la viscosité intrinsèque évolue d'une façon sensiblement identique à ce qui a été décrit par Gransdalen et Smidsrød (1987), alors qu'à 45°C, aucune transition conformationnelle n'est observée. Les propriétés hydrodynamiques des solutions dans l'état désordonné à 25°C lorsque la force ionique de la solution est inférieure à 0,01 M, sont identiques à celles du polymère dans l'état désordonné à 45°C et attestent bien de l'absence de conformation ordonnée dans cette gamme de salinité.

La transition conformationnelle peut aussi être observée en l'absence de sel mais en modulant la concentration en gellane (Crescenzi *et al.* 1991). A température ambiante et pour une concentration en gellane faible, 0,1%, le polysaccharide est dans un état essentiellement désordonné. Pour une concentration en gellane supérieure, 0,4%, le gellane s'ordonne sans gélification dans de l'eau déionisée à une température inférieure à 10°C, et une transition conformationnelle sans hystérésis peut être observée lorsque la température augmente. Par ailleurs, si cette solution est diluée jusqu'à une concentration en polysaccharide de 0,1%, une transition "de dilution" est observée. Dans les mêmes conditions, une concentration en gellane beaucoup plus importante, de l'ordre de 1%, est nécessaire pour obtenir une gélification.

Des études par diffusion de lumière ont confirmé l'existence de la transition. Ainsi, Milas *et al.* (1990) ont démontré qu'entre la double hélice et la pelote statistique, la masse molaire moyenne du gellane désestérifié diminue d'un facteur deux (tableau 2.5).

Robinson *et al.* (1991) ont observé la transition thermoréversible du gellane désestérifié dans des conditions agrégeantes et non agrégeantes. Dans des conditions agrégeantes, c'est-à-dire en présence de cations promoteurs de gel, la transition présente une hystérésis et la température moyenne de transition augmente avec la force ionique de la solution. Par contre, aucune hystérésis n'est observée si la concentration en cations est trop faible ou si un inhibiteur de gélification comme le TMACl est ajouté. La figure 2.22 représente un schéma général qui correspond à ces observations. A haute température, le gellane est sous forme de pelotes désordonnées. Quand la température est abaissée dans des conditions non agrégeantes, les molécules s'ordonnent en doubles hélices qui ont été observées en diffraction aux rayons X. Des associations faibles entre les hélices de type liaisons de Van der Waals donnent à la solution des propriétés de gel faible. Quand ce gel est chauffé, il se désagrége en une seule étape à la même température que lors de la prise du

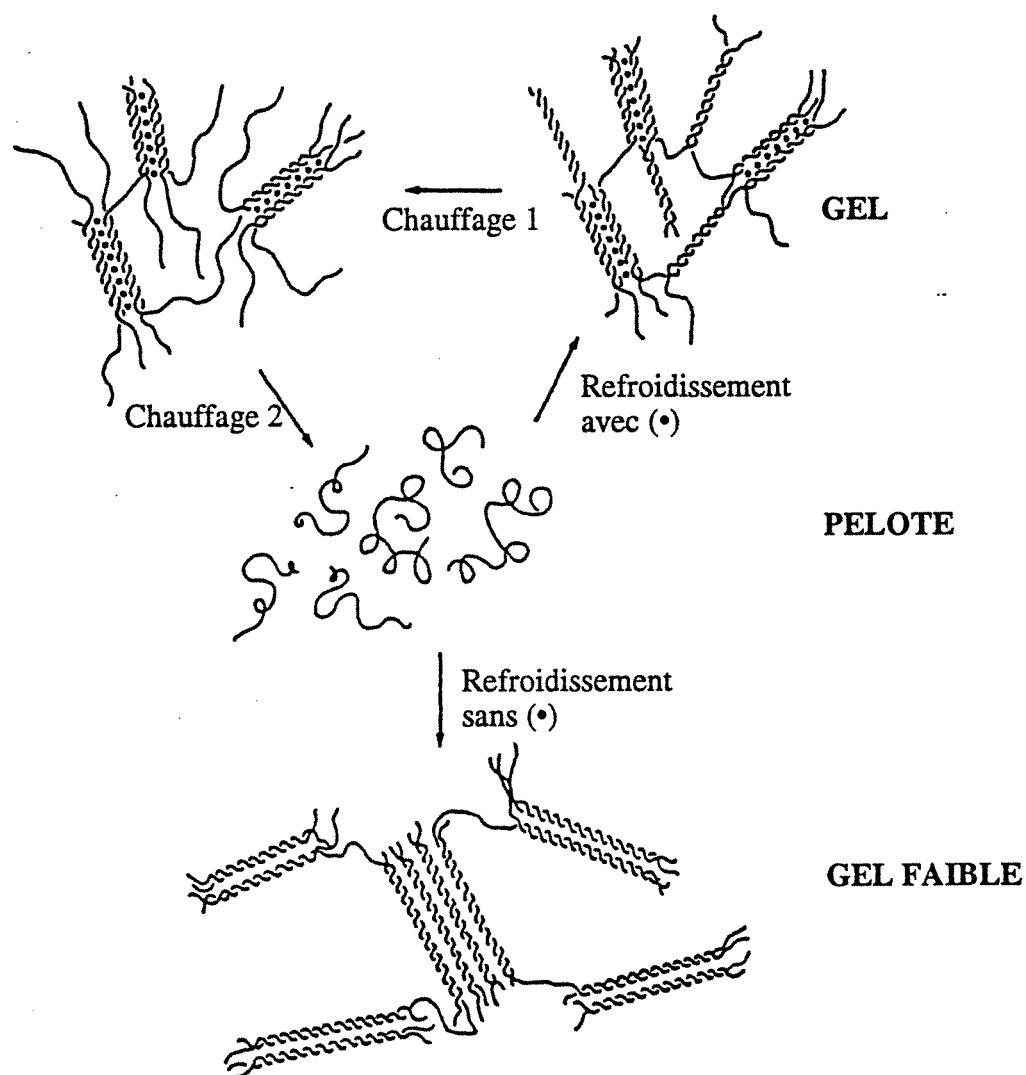


FIGURE 2.22 : Modèle proposé pour l'évolution de la conformation et les interactions du gellane désestérifié en fonction de la température et de la force ionique du solvant (Robinson *et al.* 1991). (•) : cation promoteur de gel.

gel. Par contre, lors du refroidissement en présence de cations promoteurs de gel, les doubles hélices sont capables de s'associer dans des liaisons latérales mettant en jeu des cations médiateurs. Ces liaisons permettent l'agrégation des doubles hélices et la formation d'un gel. La proportion des hélices agrégées augmente avec la force ionique de la solution. Quand ce gel est chauffé, les hélices non agrégées se désordonnent tout d'abord, à la température à laquelle elles se sont formées lors du refroidissement, et les agrégats sont détruits à une température plus élevée, ce qui explique l'hystérésis observable entre la prise et la fusion de ces gels.

2.4.2.2. Caractéristiques physico-chimiques

Le pK_a à 25°C du gellane désestérifié en l'absence de sel est de 3,06 (Milas *et al.* 1990).

La viscosité intrinsèque $[\eta]$ du gellane désestérifié est fonction de sa conformation et donc de la température d'analyse et de la force ionique de la solution (tableau 2.4).

TABLEAU 2.4 : Influence de la nature du sel et de la température sur les viscosités intrinsèques et constantes de Huggins (Milas et Shi 1988). [sel] : 0,025 M.

Température(°C)	Viscosité intrinsèque (ml/g)			Constante de Huggins k'		
	TMA ⁺	Na ⁺	K ⁺	TMA ⁺	Na ⁺	K ⁺
20	3500	2850	1500	0,4	1,5	8,0
40	580	600	600	0,4	0,4	0,4

Au-dessus de la température de transition, par exemple à 40°C, $[\eta]$ est faible et indépendante du sel monovalent utilisé. La valeur de la constante de Huggins k' est de 0,4 et correspond à des chaînes de polymères répulsives (Milas et Shi 1988). En dessous de la température de transition, par exemple à 20°C, l'addition de sodium et surtout de potassium donnent des valeurs de k' plus élevées qu'avec le TMA⁺, ce qui atteste d'une tendance à l'agrégation du polymère dans ces conditions. Ce phénomène est lié à l'état d'hydratation du polymère. Le polyélectrolyte a en effet plus tendance à s'agréger en présence de potassium que de sodium car le potassium étant moins hydraté que le sodium, il déshydrate donc plus le polysaccharide. Les solutions de TMA⁺ constituent un bon solvant pour la détermination de viscosité intrinsèque car elles permettent de travailler avec des solutions diluées au-dessus et au-dessous de la température de transition. Les valeurs de viscosité intrinsèque obtenues à 20°C ne sont pas commentées par Milas et Shi (1988). Ces viscosités intrinsèques sont plus élevées pour les conditions de salinité les moins agrégeantes. L'agrégation du polymère se traduit donc par une diminution de la viscosité intrinsèque car le volume hydrodynamique d'un agrégat est plus faible que celui des brins de polymère individualisés.

L'étude en diffusion de lumière d'un polysaccharide permet de déterminer un grand

nombre de caractéristiques physico-chimiques qui dépendent de la conformation dans laquelle se trouve la molécule. L'étude du gellane est difficile en raison du caractère rhéofluidifiant et gélifiant des solutions en présence de sel même à faible concentration en polymère. Pour pallier ce problème, Browsey *et al.* (1984) ont utilisé le DMSO car c'est un solvant dans lequel les liaisons hydrogènes ne peuvent pas se former. Les solutions de gellane présentent donc une viscosité très faible dans ce solvant. La masse molaire moyenne en masse, $\overline{M}_w$, du gellane natif obtenue dans ces conditions est de $2,2 \cdot 10^6$ daltons. Le gellane désestérifié n'étant pas soluble dans le DMSO pur, un mélange DMSO/H₂O (90/10) a été utilisé. Dans ces conditions, la masse molaire moyenne en masse du gellane natif est de $1,6 \cdot 10^6$ daltons et celle du gellane désestérifié est de $0,9 \cdot 10^6$ daltons. Une des raisons invoquées pour expliquer la différence entre la masse obtenue pour le gellane natif dans le DMSO pur et le mélange est l'indice de réfraction du gellane qui a été estimé pour le solvant pur et déduit de cette estimation pour le mélange. Browsey *et al.* (1984) en concluent que le traitement alcalin de désestérification a une incidence sur la masse molaire du polysaccharide. Il est néanmoins important de noter que les solutions utilisées n'ont pas été filtrées.

L'emploi du TMA⁺ permet d'obtenir la masse molaire du gellane désestérifié en solution aqueuse. Les résultats de caractérisation obtenus pour différentes études sont reportés dans le tableau 2.5. Le second coefficient de viriel A_2 , qui est obtenu par des analyses en diffusion de lumière, est fonction des interactions entre les molécules et traduit donc la qualité du solvant. Les valeurs de A_2 indiquées dans le tableau 2.5 correspondent à un solvant de bonne qualité. La masse molaire du gellane reste incertaine car les valeurs obtenues sont peu homogènes. Gunning et Morris (1990) ont par ailleurs montré que les valeurs de masse molaire obtenues varient avec la porosité des filtres utilisés pour préparer les solutions. Ainsi, cette valeur évolue de $0,1 \cdot 10^6$ daltons pour une solution filtrée sur $0,45 \mu\text{m}$ à $4,5 \cdot 10^6$ daltons pour une solution filtrée sur $3 \mu\text{m}$. L'absence de perte de polysaccharide lors des filtrations suggère que les pores du filtre ne retiennent pas les agrégats de polysaccharide, mais que sous l'effet du cisaillement, ceux-ci sont détruits. Le graphe de Holtzer obtenu pour la solution filtrée sur $3 \mu\text{m}$ indique que la solution est polydisperse et qu'elle est constituée de pelotes rigides formées de fibrilles de gellane jointes bout à bout. Pour la solution filtrée sur $0,45 \mu\text{m}$, le graphe de Holtzer suggère que la solution est polydisperse et qu'elle est constituée de petits bâtonnets rigides. Ce résultat est très intéressant mais il n'est toujours pas possible de donner une masse molaire pour le gellane car les résultats obtenus par Gunning et Morris (1990) sont eux mêmes différents de ceux généralement obtenus avec des solutions filtrées sur des filtres de même porosité. Il est possible que la grande diversité des méthodes de clarification utilisées soit en partie responsable de la disparité des résultats obtenus. Ainsi, Dentini *et al.* (1988) reprennent le schéma de purification décrit par Carroll *et al.* (1983) avec du gellane commercial déjà désestérifié et clarifié pour obtenir un produit tout à fait exempt de débris cellulaires.

Gransdalen et Smidsrød (1987) font, pour leur part, subir aux échantillons désestérifiés sous forme de sel de TMA⁺ une ultra-centrifugation de 2 heures à 200 000 g puis une filtration à travers un filtre de 0,4 µm, la teneur en contre-ion étant auparavant contrôlée par dialyse. Milas *et al.* (1988) contrôlent la purification et la teneur en contre-ion du polymère par deux précipitations à l'isopropanol en présence d'un excès de sel et Gunning et Morris (1990) purifient le polysaccharide en le précipitant par l'ajout d'acide, le gel étant ensuite lavé à l'eau distillée et à l'éthanol, puis redissous dans une solution aqueuse d'hydroxyde de TMA⁺.

TABLEAU 2.5 : Caractéristiques physico-chimiques obtenues pour le gellane désestérifié.

Référence	Gran.	Den.	Chapman		Milas		Gunning	
Température (°C)	23	25	Amb	Amb	24	36	25	25
État conformationnel de la molécule	DH	DH	Pel.	DH	DH	Pel.	DH	DH
$\overline{M}_w$ (10 ⁶ dalton)	0,45	0,43	2,1	2,0	0,49	0,25	0,11	4,5
Rayon de giration (nm)	100	159	125	142	127	70	72	159
A ₂ (10 ⁻⁴ cm ³ mole g ⁻²)	30	22	--	--	--	--	8,6	0,6
Porosité du filtre (µm)	0,4	0,45	3	3	0,45	0,45	0,45	3,0
[TMACI] (10 ⁻² M)	2,5	7,5	0	50	2,5	2,5	7,5	7,5
[η] (ml/g)	2800	--	--	--	3500	580	--	--

Gran. : Gransdalen et Smidsrød 1987

Den : Dentini *et al.* 1988

Cha. : Chapman *et al.* 1988

Milas : Milas et Shi 1988

Gunning : Gunning et Morris 1990

DH : double hélice

pel. : pelote statistique

amb. : température ambiante

A₂ : second coefficient de viriel

M_w : masse molaire moyenne

2.4.2.3. Liaisons en conformation ordonnée

Pour le gellane en conformation ordonnée, les associations sont d'une part intramoléculaires, c'est-à-dire à l'intérieur d'un brin de gellane, et d'autre part intermoléculaires en ce qui concerne la double hélice elle-même et les interactions entre les doubles hélices. Des liaisons hydrogènes sont mises en jeu dans toutes ces associations et des interactions ioniques entrent en jeu à la fois pour stabiliser la double hélice et pour agréger les doubles hélices (Gunning et Morris 1990). A ce niveau, alors que les liaisons formées avec des ions monovalents nécessitent deux ions et une molécule d'eau (Chandrasekaran *et al.* 1988a) :



les liaisons formées avec des ions divalents ne nécessitent qu'un ion et aucune molécule

d'eau (Chandrasekaran *et al.* 1988c) :

Double hélice - ion⁺⁺ - Double hélice.

La concentration en ion divalent nécessaire à la gélification est par conséquent inférieure à celle requise pour un ion monovalent et les liaisons formées avec les ions divalents sont beaucoup plus stables que celles formées avec les ions monovalents (Chandrasekaran *et al.* 1988c). Ainsi, en présence de potassium, des transitions de conformation sont observées à 20°C et 50°C et les gels de gellane fondent à partir de 50°C alors qu'en présence de calcium, les molécules conservent leur structure tridimensionnelle et les gels leurs propriétés jusqu'à 80°C (Tako *et al.* 1989, Chandrasekaran et Thailambal 1990). Si le gellane désestérifié est mis en présence d'ions monovalents et divalents, les ions monovalents contrôlent les interactions ioniques pour un rapport divalent/monovalent inférieur à 0,02 alors que les ions divalents contrôlent l'association pour un rapport supérieur à 0,15 (Milas *et al.* 1990).

Le gellane désestérifié en conformation désordonnée ou ordonnée ne présente pas de sélectivité ionique pour les ions monovalents (Gransdalen et Smidsrød. 1987, Milas *et al.* 1990). En revanche, des mesures directes d'affinité pour les ions divalents indiquent que la sélectivité du gellane désestérifié, ordonné ou non, évolue ainsi : Mg^{2+} , Ca^{2+} , Si^{2+} < Zn^{2+} < Cu^{2+} < Pb^{2+} (Gransdalen et Smidsrød 1987).

2.4.2.4. Effet des substituants de la chaîne hydrocarbonée

Dans le cas du gellane natif, bien que des groupements acétates et L-glycérates soient greffés sur le squelette glycosidique, la molécule adopte une structure tertiaire similaire à celle du gellane désestérifié (Upstill *et al.* 1986, Chandrasekaran et Thailambal 1990). Le groupement acétate, situé à l'extérieur de la double hélice du gellane natif, ne gêne pas l'association entre les deux brins car il ne constitue pas une barrière à la formation des liaisons ioniques (Chandrasekaran et Thailambal 1990, Chandrasekaran *et al.* 1992). Par contre, le L-glycérate situé à l'intérieur de la double hélice a des effets substantiels sur les associations intermoléculaires du gellane natif (Chandrasekaran et Thailambal 1990, Chandrasekaran *et al.* 1992). En effet, alors que les liaisons intramoléculaires sont renforcées par des liaisons hydrogènes supplémentaires, le L-glycérate empêche l'établissement de certaines liaisons ioniques et hydrogènes à l'intérieur et entre les doubles hélices (Chandrasekaran *et al.* 1992). Le gellane natif présente donc des capacités d'agrégation moins importantes que son homologue désestérifié et il en résulte un affaiblissement des gels. Il est intéressant de remarquer que d'après les travaux de Chang et Kobzeff (1992), les groupements acétates pourraient tout de même avoir une influence sur le comportement du gellane natif car leur hydrolyse sélective conduit à des gels moins fragiles.

L'effet des substituants sur la chaîne hydrocarbonée a également été étudiée grâce à

deux des polysaccharides de la famille du gellane : le S-130 ou wellane produit par *Alcaligenes* ATCC 31 555 et le S-194 ou rhamsane produit par *Alcaligenes* ATCC 31 961. Ces polysaccharides possèdent le même squelette que le gellane mais présentent des substituants saccharidiques non ioniques (O'Neil *et al.* 1986, Janson *et al.* 1986) (voir figure 2.1). Ils adoptent en conformation ordonnée une structure en double hélice similaire à celle du gellane, mais les substituants écrantent les charges de l'acide glucuronique et empêchent la formation de gel en diminuant les possibilités d'agrégation (Cairns *et al.* 1991, Campana *et al.* 1992). Ainsi, ces polymères présentent un caractère ionique faible qui confère à leur conformation ordonnée une meilleure stabilité vis-à-vis des fortes salinités et températures (Crescenzi *et al.* 1992). Ces biopolymères ne permettent donc pas l'obtention de gel mais forment des solutions thixotropes et très visqueuses dont la viscosité est stable jusqu'à 100°C pour le rhamsane et 150°C pour le wellane (Moorhouse 1987, Robinson *et al.* 1991, Campana *et al.* 1992). La comparaison des propriétés du rhamsane, du gellane et du wellane permet de conclure que l'encombrement stérique et la localisation de la chaîne latérale sont importantes : plus cette chaîne peut masquer l'acide carboxylique de l'acide glucuronique, plus la double hélice est stable par rapport à la température (Campana *et al.* 1992, Crescenzi *et al.* 1992). Le rhamsane présente, à force ionique infinie en NaCl, la viscosité intrinsèque la plus élevée jamais mesurée pour un polysaccharide, soit 13 500 ml.g⁻¹. Le wellane, dans les mêmes conditions, présente une viscosité intrinsèque de l'ordre de 3 500 ml.g⁻¹ (Robinson *et al.* 1991). Crescenzi *et al.* (1987) ont obtenu avec un cation tel que le TMA⁺ des viscosités intrinsèques pour le rhamsane et le wellane respectivement de 800 et 2000 ml.g⁻¹ à force ionique infinie. Dans ces conditions, la viscosité intrinsèque est indépendante de la force ionique pour le wellane, ce qui n'est pas le cas pour le rhamsane.

L'ensemble de ces résultats est en accord avec les propriétés générales des polysaccharides puisque les chaînes latérales sont connues comme étant des inhibiteurs de gélification empêchant la formation de zones d'agrégation (Hwang et Kokini 1991). Ces chaînes ont une influence sur la solubilité, la gélification, la fusion des gels, la formation de film et les propriétés rhéologiques des solutions de polysaccharide. En ce qui concerne la solubilité, les chaînes latérales empêchent l'agrégation des squelettes et les molécules d'eau peuvent hydrater plus facilement les chaînes de polysaccharide, améliorant ainsi leur solubilité.

2.4.3. Propriétés rhéologiques

2.4.3.1. Solubilisation et gélification

Les solutions de gellane gélifient lorsque les molécules ne sont plus complètement hydratées. Les conditions qui favorisent la gélification ne favorisent donc pas l'hydratation, c'est-à-dire la dissolution. Ainsi, en présence d'ions induisant des associations de chaînes, le gellane s'hydrate difficilement à partir d'une certaine force ionique dans de l'eau froide

(Moorhouse *et al.* 1981, Sanderson *et al.* 1989). Par contre, le gellane est plus soluble à des températures supérieures à 50°C, car l'hydratation des chaînes est ainsi favorisée par la destruction des liaisons hydrogènes des brins de polymère. Néanmoins, la température requise pour l'hydratation du polymère croît lorsque la force ionique de la solution augmente et cette température est supérieure à 100°C dans le cas de certaines solutions d'ion divalents (tableau 2.6). Une fois le polymère hydraté, un gel se forme lorsque la solution est refroidie si les concentrations en sel et en polysaccharide sont suffisantes.

TABLEAU 2.6 : Solubilité du gellane désestérifié à 0,25% et caractéristiques des gels obtenus pour diverses forces ioniques (Sanderson *et al.* 1989) :

Ca ²⁺ (mM)	Na ⁺ (mM)	T°C d'hydratation	Dureté du gel (N/cm ²)	Remarque
1	--	88	0,72	soluble
2	--	> 100	très mou	pas totalement soluble
4	--	> 100	très mou	très peu soluble
5	--	> 100	pas de gel	insoluble
--	40	52	0,32	soluble
--	120	70	1,36	soluble
--	200	89	1,90	soluble

Il est utile dans le cas des systèmes thermosensibles, de pouvoir obtenir sans chauffage des solutions de gellane concentrées ou des gels. Ceci a été réalisé à l'aide de séquestrants comme l'éthylène diamine tétraammonium (EDTA), le citrate de sodium ou l'hexamétaphosphate de sodium (Calgon). Pour former un gel, il suffit de rajouter après dissolution du polysaccharide le sel désiré en quantité supérieure à celle que peut piéger le séquestrant (Baird et Shim 1985, Sanderson *et al.* 1989, Choplin 1991). Les gels ainsi obtenus peuvent être, en ajustant la concentration d'ion à utiliser, de qualité équivalente à ceux réalisés avec chauffage (Sanderson *et al.* 1989).

2.4.3.2. Solutions de gellane

Le comportement d'une solution de polysaccharide est directement fonction de l'état conformationnel des chaînes de polymère. Les caractéristiques rhéologiques d'une solution de gellane sont donc fortement dépendantes de la température de la solution et des concentrations en sel et en polysaccharide.

Pour le gellane désestérifié, à faible concentration en sel et polysaccharide, un comportement newtonien, caractéristique de l'état en pelotes dispersées, a été observé par Tako *et al.* (1989). Avec l'augmentation d'une des concentrations, Tako *et al.* (1989) ont observé un comportement rhéofluidifiant, puis un comportement plastique. Dans la gamme de contraintes où l'effet rhéofluidifiant n'est plus significatif, c'est-à-dire pour une vitesse de

cisaillement comprise entre 100 et 200 s⁻¹ dans ce cas, la viscosité est de 9, 66 et 248 Pa.s pour des solutions à 1, 2 et 3% de gellane respectivement (Deasy et Quigley 1991). L'augmentation de viscosité n'est pas linéaire par rapport à la concentration, ce qui indique que les interactions interchaînes augmentent en même temps que la concentration en polysaccharide. Ces caractéristiques sont données à titre d'exemple et dépendent fortement des conditions de préparation des solutions. Les solutions de gellane désestérifié présentent un caractère thixotrope marqué (Deasy et Quigley 1991).

Les solutions de gellane natif présentent, à partir d'une certaine concentration en polysaccharide, un comportement rhéofluidifiant. Celui-ci résulte d'associations faibles entre les doubles hélices dans un réseau "pseudo-gel" transitoire. Cette hypothèse suggère la présence de chaînes rigides, d'agrégats de bâtonnets, ou de micro-gels (Carroll *et al.* 1983). A 25°C, les solutions de gellane natif à 0,1 et 0,5 % présentent pour une vitesse de cisaillement de 60 s⁻¹, une viscosité de 0,04 à 0,08 Pa.s et de 1 à 2 Pa.s respectivement (Moorhouse *et al.* 1981). La viscosité d'une solution de gellane natif à 0,5% est stable entre 20 et 70°C, puis chute brutalement et de façon réversible pour des températures supérieures à 70°C, la force ionique de la solution n'étant pas mentionnée (Moorhouse *et al.* 1981).

Pour une solution de gellane désestérifié faiblement concentrée (2 à 4 g/l), l'augmentation du pH de 7 à 10 par l'addition de soude n'entraîne aucun changement notable de viscosité (Quintal 1990). Par contre, pour les solutions concentrées (7,5 et 10 g/l), l'augmentation du pH de 7 à 10 provoque une augmentation de la viscosité relative et la formation d'agrégats (Quintal 1990). Selon une autre étude, la viscosité des solutions de gellane natif et de gellane désestérifié en présence de sel serait constante de pH 3 à pH 11, mais, au delà de ces limites, la viscosité chuterait rapidement (Kwon *et al.* 1987, Moorhouse *et al.* 1981). Les conditions opératoires n'étant pas clairement mentionnées pour ces études, il est difficile de comparer les résultats.

2.4.3.3. Gels de gellane

Un gel est un système biphasique constitué par un réseau macromoléculaire tridimensionnel solide retenant entre ses mailles la phase liquide. Cette définition introduit la notion d'ordre par opposition au désordre d'une solution. La formation d'un gel nécessite donc l'association de chaînes et cette association ne peut avoir lieu qu'après une dispersion préalable des macromolécules dans le solvant. Le gellane natif permet d'obtenir des gels "mous" alors que le gellane désestérifié conduit à des gels "fermes" mais fragiles. Pratiquement, les gels classiques de gellane désestérifié peuvent être obtenus soit par un traitement de 20 min à 90°C, soit par autoclavage pendant 15 min à 120°C. Les caractéristiques des gels de gellane dépendent de la concentration en polymère, de la concentration en sel, et de la nature du sel utilisé (Kang *et al.* 1982, Baird *et al.* 1983). Les études suivantes ont été réalisées avec le polysaccharide désestérifié qui présente de nombreuses applications industrielles.

La dureté, la rigidité et l'élasticité du gel augmentent avec la concentration en polysaccharide alors que le gel devient plus fragile (Moorhouse 1987, Sanderson *et al.* 1988, Moritaka *et al.* 1991). Lorsque la force ionique est augmentée, le gel devient plus fragile et son élasticité, sa rigidité et sa dureté augmentent puis diminuent à partir d'une certaine concentration en sel (Moorhouse 1987, Sanderson *et al.* 1988, Moritaka *et al.* 1991). Les sels favorisent donc les interactions fortes entre les hélices dans un premier temps, alors qu'ensuite un changement de conformation est induit par une trop forte concentration en sel (Moritaka *et al.* 1991). La gélification est beaucoup plus efficace avec des ions divalents qu'avec des ions monovalents. En effet, pour obtenir les mêmes duretés de gel, les concentrations en ions divalents sont de dix à quarante fois plus faibles que celles requises pour les ions monovalents (Moorhouse 1987, Deasy et Quigley 1991). La plupart des ions peuvent être utilisées, excepté le borate qui réagit avec le rhamnose et empêche la gélification (Colegrove 1983). Pour une concentration en sel de 0,1 M, la dureté du gel évolue de la façon suivante (Gransdalen et Smidsrød 1987) :

TMA⁺ < Li⁺ < Na⁺ < K⁺ < Cs⁺ < H⁺ pour les cations monovalents
et Mg²⁺, Ca²⁺, Si²⁺, Ba²⁺ < Zn²⁺ < Cu²⁺ < Pb²⁺ pour les cations divalents.

Pour les ions monovalents, cette différence pourrait s'expliquer, selon Gransdalen et Smidsrød (1987), par la taille du cation, les gros cations comme le TMA⁺ limitant les possibilités d'agrégation, ou par le degré d'hydratation des ions, les ions très hydratés comme Li⁺ donnant moins de possibilités d'agrégation que les ions moins hydratés. Pour les ions divalents, la dureté des gels, donc l'efficacité d'agrégation du polysaccharide, évolue de façon identique à la sélectivité ionique. Il est possible que la dureté des gels soit reliée à la charge du brin de polymère, les chaînes les moins chargées donnant plus de possibilités d'agrégation (Gransdalen et Smidsrød 1987).

La température de prise des gels de gellane est affectée par la force ionique de la solution et la concentration en polysaccharide utilisée (Moorhouse *et al.* 1981, Moritaka *et al.* 1991 et 1992). En l'absence de sels, la température de prise de gel, déterminée par des mesures rhéologiques en régime harmonique, passe de 30°C pour une concentration en polymère de 1% à 50°C pour une concentration de 1,5% (Moritaka *et al.* 1991). Pour une concentration fixée en polymère, la température de transition sol-gel augmente avec la concentration en sel. Elle est de 35-40°C aux faibles concentrations (0,2% d'ions monovalents ou 0,06% d'ions divalents) et de 50 à 60°C pour les concentrations plus élevées (0,8% d'ions monovalents ou 0,3% d'ions divalents) (Moritaka *et al.* 1991). Les températures de gélification sont plus élevées en présence de potassium qu'en présence de sodium, ce qui reflète une nouvelle fois la différence de capacité d'agrégation existant entre les deux ions (Moritaka *et al.* 1991 et 1992). La température de prise de gel mesurée est influencée par la méthode utilisée puisque des mesures équivalentes réalisées par les mêmes auteurs en calorimétrie donnent des valeurs plus faibles (Moritaka *et al.* 1992).

De même, la température de fusion d'un gel de gellane désestérifié est fonction de la concentration en polymère et de la concentration et du type d'ion utilisé (Sanderson *et al.* 1989, Tako *et al.* 1989, Moritaka *et al.* 1991 et 1992). En l'absence de sel, un gel de gellane à 0,8% présente une température de fusion de gel, mesurée par le déplacement d'une bille dans un gel, de 75°C alors qu'un gel à 1,5% présente une température de fusion de 95°C (Moritaka *et al.* 1991). Dans le cas de la gélatine, une équation a été proposée par Eldridge et Ferry (1954) pour calculer la température de fusion :

$$\log C = - \frac{\Delta H}{2,303 R T_f} + Cte \quad (31)$$

où est C est la concentration en polymère, T_f la température de fusion de gel, ΔH la chaleur de réaction (kJ/mol) et R la constante des gaz parfaits. Cette équation est applicable dans le cas du gellane. La chaleur de réaction obtenue par Moritaka *et al.* (1991) est de 38 kJ/mol. Cette valeur est faible par rapport à celles enregistrées pour l'agarose (220 kJ/mol) et la gélatine (150 kJ/mol). Les gels de gellane présenteraient donc des zones de jonction moins stables que ceux d'agarose et de gélatine. Des mesures analogues réalisées par calorimétrie donnent une nouvelle fois des valeurs plus faibles mais les mêmes tendances sont observées ; la chaleur de cristallisation obtenue à l'aide de cette méthode est de 99 kJ/mol (Moritaka *et al.* 1992). Pour une concentration de 0,4% en gellane, lorsque la concentration en KCl passe de 25 mM à 110 mM, la température de fusion augmente linéairement de 65 à 85°C (Moritaka *et al.* 1991). L'introduction de cations augmente le nombre de zones de jonction et rend la structure plus rigide, ce qui se traduit en outre par une meilleure thermostabilité. Les gels formés avec des ions monovalents, et dans une moindre mesure avec du magnésium, sont moins thermorésistants que ceux formés avec du calcium (Tako *et al.* 1989). Il est possible, en utilisant du calcium, d'obtenir des gels ayant un point de fusion supérieur à 100°C (Moritaka *et al.* 1991) et même 120°C dans le cas de gels à 0,2% de Gelrite en présence de 7 mM de Ca^{2+} (Sanderson *et al.* 1989) ou d'un gel à 0,5% de Gelrite et 2,5 mM de Ca^{2+} (Deasy et Quigley 1991).

Pour les gels de gellane désestérifié, des modules de rigidité importants sont observés à pH acide en présence de HCl 100 mM et à pH basique avec $Ca(OH)_2$ 100 mM (figure 2.23). Si la base utilisée est de la potasse, le module augmente avec le pH mais décroît rapidement après pH 11,7. Par contre, si de la soude est utilisée, le module diminue avec le pH puis augmente à partir de pH 10 (Tako *et al.* 1989).

Les gels de gellane désestérifié présentent une bonne stabilité thermique après plusieurs autoclavages de 15 minutes à 120°C. En effet, si 13% de la dureté initiale du gel disparaît au premier cycle, "seulement" 50% est perdu après cinq cycles (Kang *et al.* 1982). De même, un traitement de 16 heures à 90°C n'altère pas une solution de gellane désestérifié ou partiellement désestérifié (Quintal 1990). Par contre, un traitement de 18 heures à 130°C entraîne une dégradation totale du polymère (Quintal 1990).

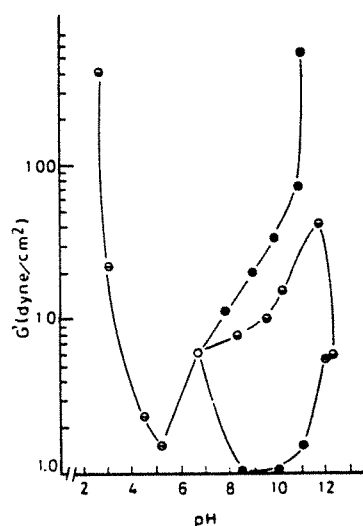


FIGURE 2.23 : Effet du pH sur le module G' mesuré à 3,77 rad/s d'une solution à 0°C et à 0,4% de gellane désacétylé. pH ajusté avec : ● KOH 0,1M, ◐ NaOH 0,1M, ● $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 0,1 M, ○ HCl 0,1M, ○ gellane seul.

Des agents hydrophiles, comme le saccharose ou l'hydrochlorure de guanidine, stabilisent la forme ordonnée du polysaccharide et permettent d'abaisser la concentration en ion nécessaire pour obtenir un gel. L'urée agit par contre comme un agent dénaturant en favorisant l'état "en pelote" du gellane par rupture des liaisons hydrogènes (Moorhouse 1987, Crescenzi et Dentini 1988).

Quand un gel de gellane est soumis à une contrainte, il exsude une quantité d'eau qui peut représenter jusqu'à 35% de la masse initiale (Nussinovitch *et al.* 1990). Plus la concentration en gellane est importante, c'est-à-dire plus le gel est rigide, et plus la quantité d'eau exsudée est faible.

Un mélange de gellane natif et de gellane désestérifié permet d'obtenir toute une gamme de gels ayant des caractéristiques intermédiaires entre celles des gels obtenus à partir de ces deux produits (Sanderson *et al.* 1988). Par contre, le mélange de gellane désestérifié et d'autres polymères non gélifiants, tels que la gomme de guar, le xanthane, la carboxyméthylcellulose ou la gomme de tamaride, ne donne pas de produits moins fragiles que ceux obtenus avec le polysaccharide désestérifié (Sanderson *et al.* 1988).

2.5. Les fluides de forage

2.5.1. Fonction

Le succès technique et économique d'un forage dépend en grande part du fluide de forage utilisé, non pas pour le coût qu'il représente, mais parce qu'il permet de réduire le temps d'opération et d'améliorer la réussite du forage. Ainsi, l'optimisation du fluide permet d'augmenter la vitesse de coupe et surtout d'éviter les arrêts toujours très coûteux du forage, arrêts liés par exemple à un coincement de la garniture ou à un bourrage de l'outil par les terrains forés.

La figure 2.24 représente le cycle du fluide lors du forage : le fluide est préparé et stocké dans des bacs à boues, il est injecté à l'intérieur des tiges jusqu'à l'outil, il remonte à la surface dans l'annulaire chargé des déblais formés au front de taille et il est finalement recyclé. A la sortie du puits, il subit différents traitements (tamisage, dilution, ajout de produits) de façon à éliminer les déblais transportés et à réajuster ses caractéristiques physico-chimiques à leurs valeurs initiales.

Les fonctions principales d'un fluide de forage sont :

- nettoyer le fond du puits et remonter les déblais jusqu'à la surface pour éviter les problèmes de coincement de la tige et le bourrage de l'outil,
- maintenir les parois du puits par sa pression hydrostatique,
- maintenir les déblais en suspension durant les arrêts de circulation, pour éviter les

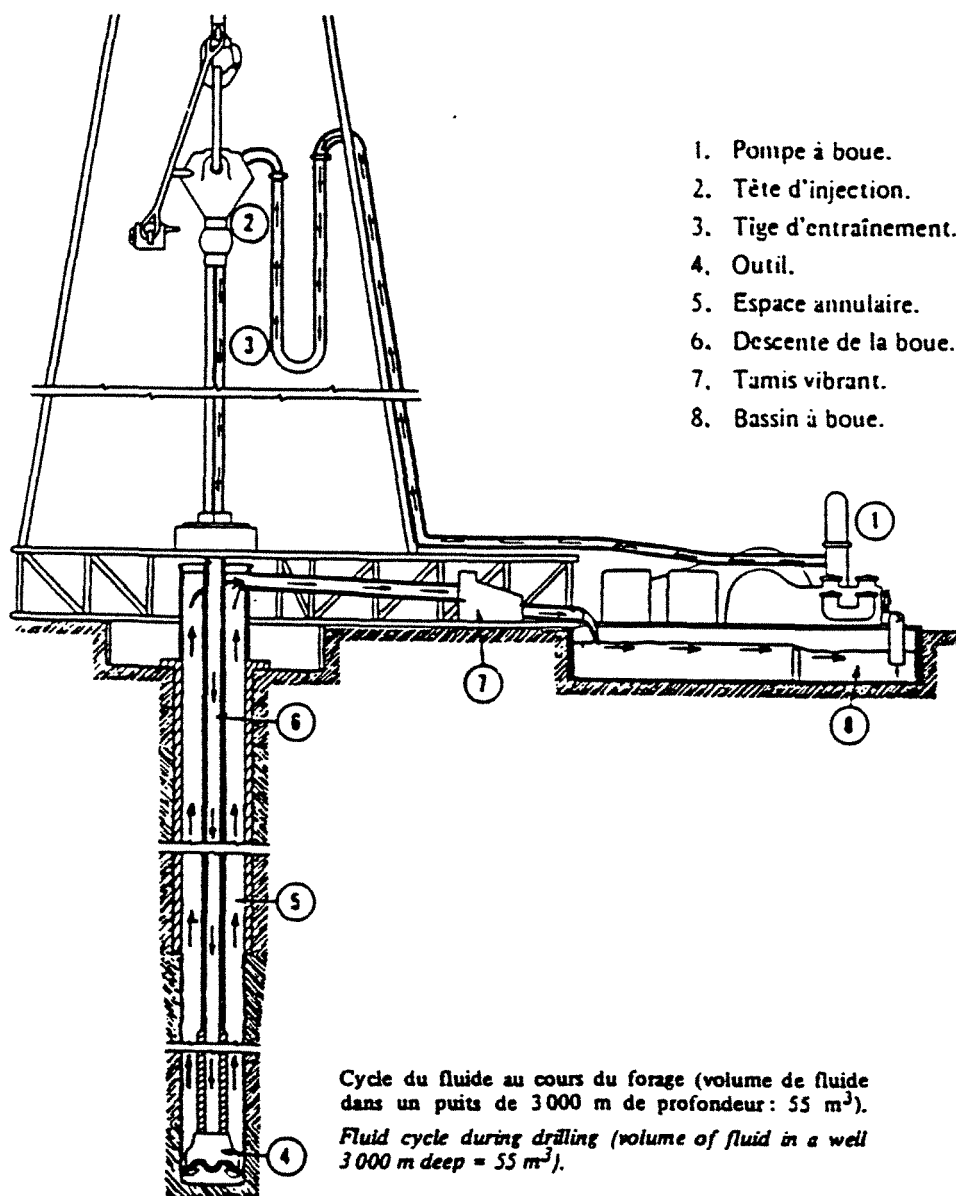


FIGURE 2.24 : Cycle du fluide lors du forage.

problèmes de coincement au redémarrage,

- stabiliser la zone forée et limiter les transferts de matière vers la formation forée,
- refroidir l'outil et lubrifier le train de tiges,
- remonter les informations géologiques sur les formations traversées.

Le fluide doit donc présenter un certain nombre de propriétés incontournables. Il doit tout d'abord avoir une certaine viscosité pour permettre le nettoyage du puits et remonter les déblais. Il doit également présenter un caractère thixotrope pour maintenir les déblais lors de l'arrêt de circulation du fluide. Sa densité doit être suffisante pour équilibrer la pression de la formation de façon à maintenir les parois du puits. Finalement, il doit être capable de former une barrière limitant les transferts de fluide vers la zone forée en déposant par filtration un gâteau de filtration, appelé "cake", mince et de faible perméabilité.

2.5.2. Composition

Les fluides de forage, souvent appelés boues dans le jargon pétrolier en raison de leur aspect, peuvent être à base d'huile ou à base d'eau. Durant de nombreuses années, les fluides à base d'huile ont été très utilisés dans les zones difficiles, notamment pour le forage des argiles et pour le forage des zones à haute température. Ce type de forage représentait par exemple 75% des forages en Mer du Nord. Cependant, dans un souci de protection de l'environnement, la législation sur le rejet des boues à base d'huile devient de plus en plus stricte et les pétroliers se doivent d'élaborer des fluides à base d'eau non polluants. Ces fluides contiennent généralement de l'argile, de 30 à 60 g/l, à laquelle sont ajoutés des dispersants (polyacrylates ou polymères sulfonés), des alourdisants (barityne ou carbonate de calcium), des viscosifiants (xanthane, scléroglycane, hydroxyéthylcellulose (HEC), polyacrylamide (PAM)), des réducteurs de filtrat (cellulose polyanionique (PAC), carboxyméthylcellulose (CMC), amidon, polymères synthétiques sulfonés) et des électrolytes. La nature des électrolytes et leur concentration sont choisies en prenant en compte les caractéristiques de la formation forée. Une force ionique égale à celle de l'eau présente dans l'argile de la formation permet d'éviter les échanges qui pourraient provoquer le gonflement de l'argile et la déstabilisation du puits ou une déstabilisation des parois par "cracking".

Les argiles sont utilisées dans les boues à l'eau car ce sont d'excellents viscosifiants capables de former des gels. L'argile la plus utilisée pour les forages est la bentonite qui est une montmorillonite. Sa structure cristalline se présente sous la forme d'empilements de feuillets. L'hydratation des montmorillonites par pénétration des molécules d'eau entre les feuillets produit un gonflement de l'argile qui est contrôlé par la nature des cations compensateurs de charges présents à la surface des feuillets. Ce gonflement est à l'origine des propriétés viscosifiantes et thixotropes de ces dispersions.

Les fluides de forage à base d'eau nécessitent l'emploi de polymères hydrosolubles qui permettent de maîtriser la rhéologie et la filtration. Ils doivent également empêcher la dispersion des argiles du terrain, stabiliser les suspensions d'argile et les protéger de la floculation qui peut être provoquée par certains sels en provenance des formations forées. Les critères d'utilisation de ces polymères dépendent essentiellement de leur stabilité mécanique, thermique et chimique à des pH et des salinités élevés. Par exemple, les polymères cellulosiques (PAC, CMC, HEC) sont des polysaccharides qui résistent jusqu'à 100°C pour l'HEC et 140°C pour la CMC mais qui sont très sensibles aux conditions de salinité élevée, en particulier à la présence de cations divalents comme le calcium ou le magnésium. Les polymères polyacryliques permettent de travailler jusqu'à 300°C mais ils perdent leur efficacité en présence de Ca^{2+} . Des polymères microbiens sont également utilisés car ils sont généralement peu sensibles aux ions divalents et thermiquement stables. Le polymère bactérien le plus utilisé est le xanthane qui est peu sensible aux ions et stable jusqu'à 110°C, mais qui présente des capacités limitées en tant que réducteur de filtrat et agent thixotrope. Les applications et les limitations de certains polymères couramment utilisés sont résumées dans le tableau 2.7 publié par la société Kelco qui est un des principaux producteurs du xanthane et du wellane (Best et Baird 1989).

Tableau 2.7 : Applications et potentialités de certains polymères en forage (Best et Baird 1989).

Polymère	Fonction principale	Fonction secondaire	Performances par rapport à :			
			T°	$\dot{\gamma}$	pH	Salinité
CMC	Filtrat	Viscosité	4	3	3	2
Guar	Viscosité	--	2	2	3	3
Xanthane	Viscosité	Filtrat	5	5	4	5
Wellane	Viscosité	Filtrat	5	5	4	4
PAC/PAM	Filtrat	--	5	1	5	1
Amidon	Filtrat	--	3	4	3	5

1 : mauvaise performance; 5 : bonne performance, $\dot{\gamma}$: cisaillement

De plus amples renseignements peuvent être trouvés dans une revue détaillée des applications et potentialités des polymères en forage (Chatterji et Borchardt 1980). Il faut ajouter à cette liste un autre polysaccharide microbien, le scléroglycane, qui présente des potentialités intéressantes en tant qu'agent viscosifiant et réducteur de filtrat (Lecourtier 1989). Il est de plus, grâce à sa structure ordonnée en triple hélice, résistant aux dégradations mécaniques et plus stable thermiquement que le xanthane. L'utilisation de ce polymère est cependant limitée en raison de son coût de revient trop important.

CHAPITRE 3 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

3. Matériel et Méthodes

3.1. Souche bactérienne

La souche utilisée pour cette étude est issue d'une culture d'*Auromonas elodea* fournie par l'ATCC (Rockville, M.D., U.S.A.) sous la référence ATCC 31 461. Des clichés au microscope électronique de cette bactérie sont présentés en annexe. Cette souche est dénommée IFP 1001 car elle présente des caractéristiques différentes de la souche de collection et des souches qui en sont dérivées, *S. paucimobilis* et *A. elodea* E2, qui sont respectivement une bonne et une mauvaise productrice de gellane (Lobas *et al.* 1992). Ces différences sont reportées dans le tableau 3.1. Cette caractérisation est effectuée en utilisant des galeries API de type "50 CH" contenant des substrats très variés et parfois peu usuels facilitant ainsi les distinctions entre les espèces bactériennes. Le caractère "pénétrant" mentionné dans le tableau se réfère à la pénétration des colonies dans un gel contenant du Gelrite comme agent gélifiant.

TABLEAU 3.1 : Différences de phénotype entre les souches productrices de gellane.

Phénotype	<i>S. paucimobilis</i> *	<i>A. elodea</i>		
		E2*	ATCC 31 461*	IFP 1001
Colonie "pénétrante"	-	+	+ /-	+/-
Croissance à 37°C	+	+	-	+
Production d'acide à partir de :				
fucose	-	+	-	+
mélezitose	+	+	-	-
Croissance sur :				
L- arabinose	+	+	Faible	+
2-cétogluconate	-	-	+	-

* : d'après Lobas *et al.* (1992)

Pour pallier les problèmes de dégénérescence de la souche observés lors de repiquages successifs sur milieu gélosé, une réserve de lyophilisats identiques est constituée. Pour cela, le lyophilisat de la souche de l'ATCC réhydraté dans du bouillon nutritif (Difco, Detroit, MI., U.S.A.) est mis en culture. Après 48 heures d'incubation à 30°C, cette culture est utilisée pour inoculer des fioles de 250 ml contenant 25 ml de bouillon nutritif. Le contenu de ces fioles après incubation est réparti dans des tubes à lyophiliser stériles Criovials (Beloeil, Québec, Canada) de 5 ml à raison de 0,5 ml par tube.

Ces tubes sont ensuite congelés dans de l'azote liquide, lyophilisés et conservés à 4°C.

3.2. Installation de fermentation

Une photographie du montage expérimental et une schématisation sont présentées sur les figures 3.1 et 3.2.

Le fermenteur utilisé est constitué d'une cuve en verre Magnaferm de 14 litres (New Brunswick Scientific Co., N.J., U.S.A.), de 0,21 m de diamètre intérieur et de 0,425 m de hauteur. Cette cuve est fermée par deux platines en acier inoxydable.

La platine inférieure, représentée sur la figure 3.3, est équipée d'un aérateur soit "grand modèle" de 0,155 m de diamètre percé de 46 trous, soit "petit modèle" de 0,060 m de diamètre percé de 13 trous suivant l'agitateur utilisé. Ces aérateurs sont placés à 2 cm de la platine inférieure et les trous sont orientés vers le fond de la cuve.

La platine supérieure est équipée de (figure 3.3):

- deux cannes de prélèvement de 0,010 m de diamètre intérieur. La première est proche de la paroi et elle est longue de 0,320 m. La seconde canne se trouve à 0,050 m du centre de la platine et sa longueur est de 0,220 m,
- deux orifices permettant l'ajout stérile de l'inoculum et de la solution concentrée de glucose stérile,
- un septum permettant l'ajout stérile de la base, de l'acide, de l'anti-mousse et le passage de la sonde anti-mousse,
- une sonde pH (modèle L-29041-52, Cole-Palmer Instrument Co., Chicago, IL., U.S.A.) et une sonde à oxygène dissous (Ingold, référence P/N 40179-02) reliée à un amplificateur (modèle 170) du même fabricant,
- un condenseur, refroidi par l'eau du réseau, par où sont évacués les gaz.

Le pH est contrôlé par un régulateur "automatic pH controller" modèle pH40 (New Brunswick) relié à une sonde pH stérilisable de 0,25 m. Deux pompes péristaltiques (Cole-Palmer) commandées par le régulateur de pH permettent l'ajout de la solution de potasse 3,5 N et de la solution d'acide orthophosphorique 4,5 N. La vitesse de rotation de chaque pompe est contrôlée par un rhéostat et un court-circuit est installé sur chaque tête de pompe pour permettre une régulation précise du débit. Le débit d'air injecté dans le fermenteur est régulé par un rotamètre étalonné avec un compteur à gaz. L'air est stérilisé par passage à travers un filtre cylindrique de 0,150 m de long et 0,025 m de diamètre contenant du coton cardé et par un second filtre plan de 0,047 m (Gelman Sciences Inc., Ann Harbor, M.I., U.S.A.) muni d'une membrane en fibres de verre (Figure 3.4). L'air stérile est ensuite humidifié par barbotage dans une fiole à vide de deux litres contenant 1,8 litres d'eau stérile. L'excès d'eau est ensuite éliminé par passage dans une seconde fiole. La régulation de la

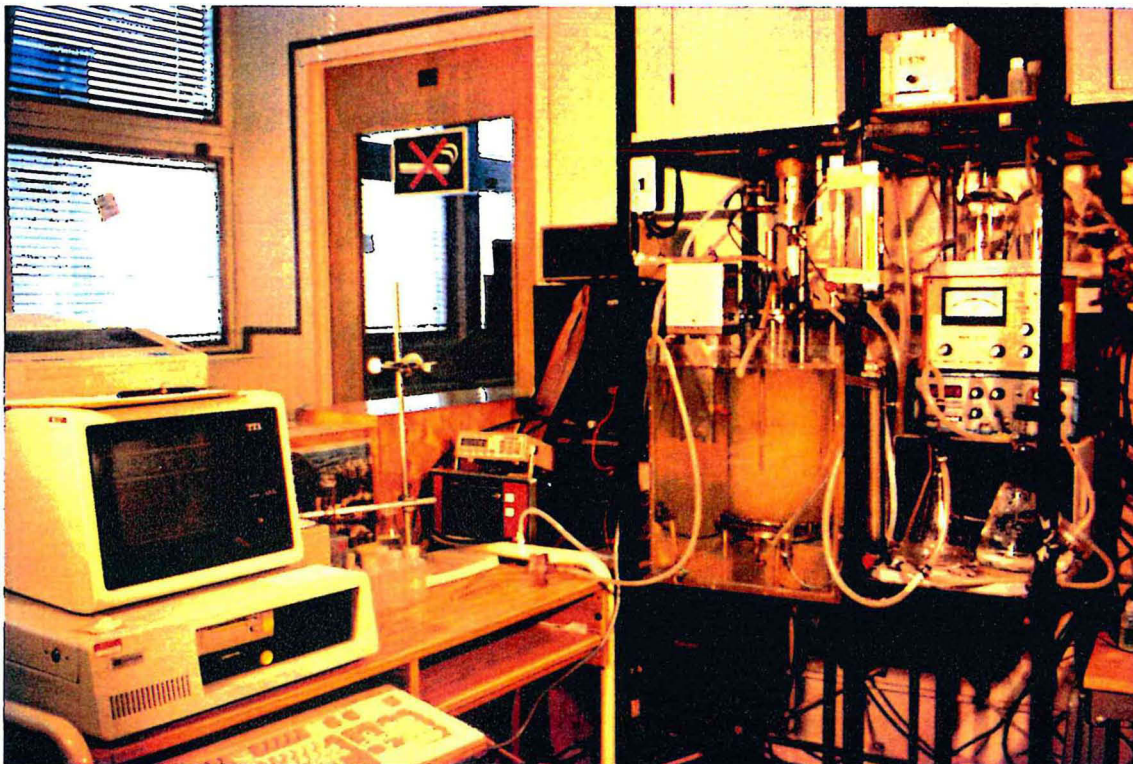


FIGURE 3.1 : L'installation de fermentation.

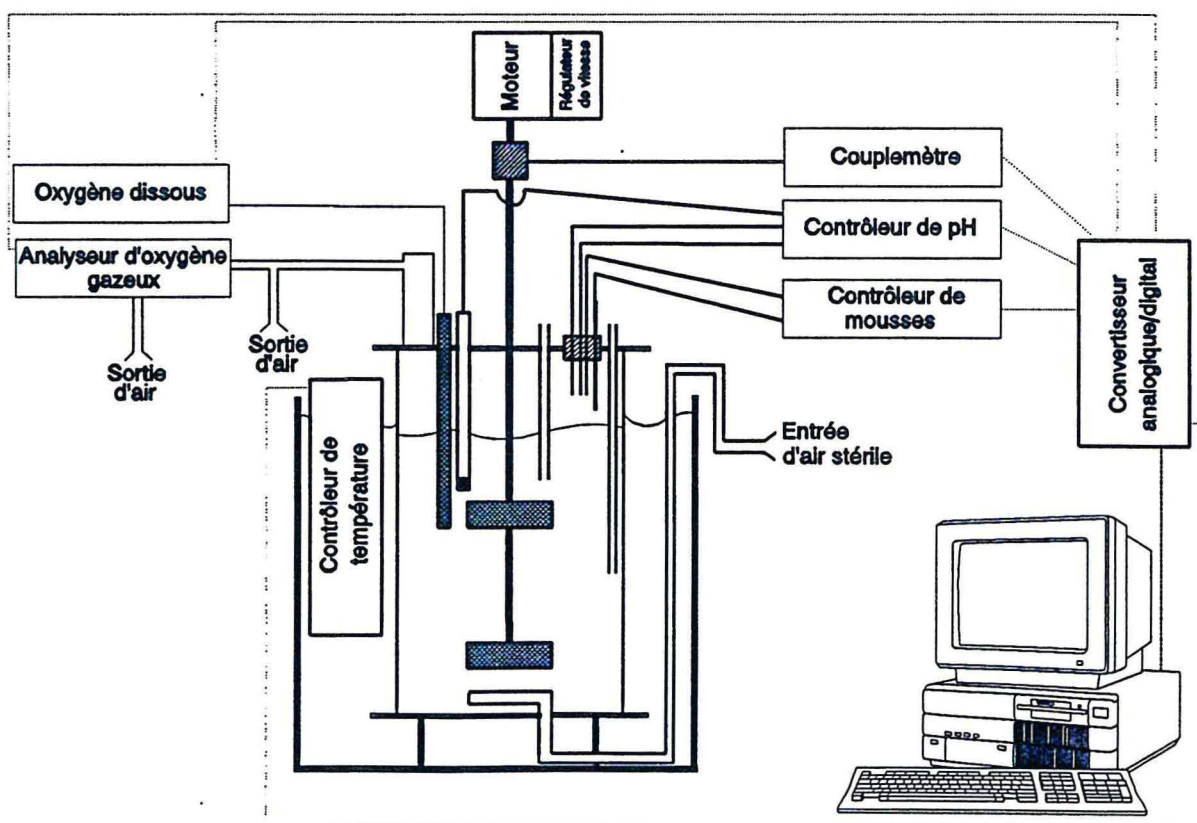


FIGURE 3.2 : Représentation schématique de l'installation de fermentation.

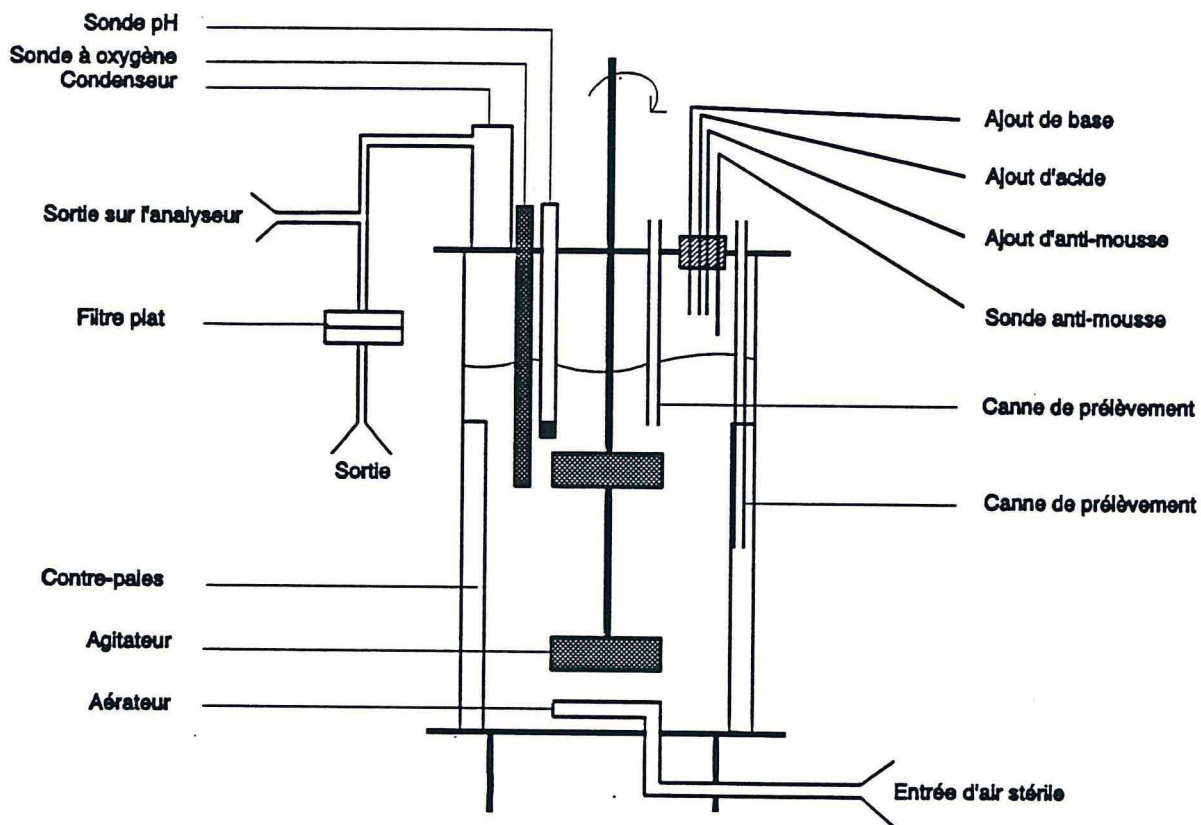


FIGURE 3.3 : Le fermenteur.

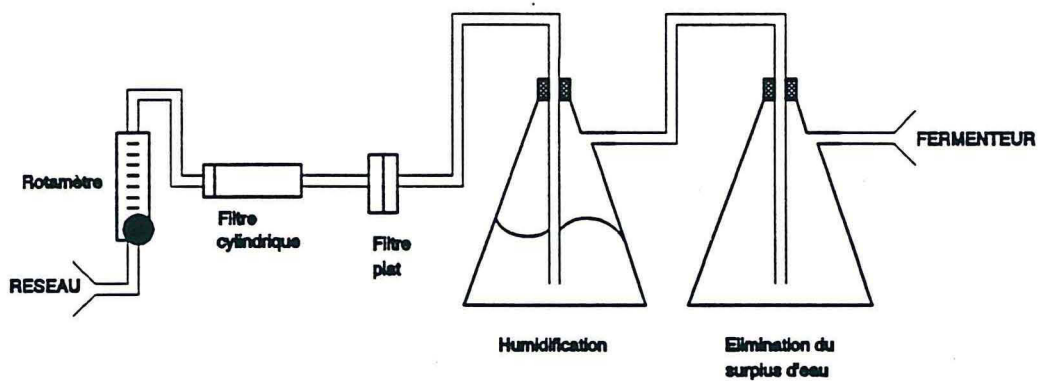


FIGURE 3.4 : Installation de stérilisation de l'air à l'entrée du fermenteur.

température de culture est réalisée par immersion du fermenteur dans un bain thermostaté par un bloc chauffant Haake E3 (Haake, Berlin, Allemagne). La température du bain est mesurée avec un thermomètre électronique Omega modèle 5831A (Omega Engineering Inc, Stamford, C.T., U.S.A.). La quantité de mousse dans le fermenteur est régulée par un système antimousse (New Brunswick) comprenant une sonde introduite dans le fermenteur à travers le septum, une masse plongée dans le bain thermostaté et une pompe péristaltique. L'antimousse utilisé est du "Dow-Corning FG-10 Emulsion" dilué 10 fois. L'air en sortie du fermenteur est réparti entre un filtre stérile et l'analyseur d'oxygène gazeux. Le filtre stérile est un filtre plan identique à celui présent à l'entrée du fermenteur. L'analyseur à infrarouge IR-2200 (Infrared Industries Inc, Santa Barbara, CA., U.S.A.) permet de mesurer le pourcentage en oxygène dans les gaz en sortie du fermenteur. Ce pourcentage est appelé taux d'oxygène gazeux. Par analogie, le pourcentage en oxygène dissous par rapport à la saturation est appelé taux d'oxygène dissous. Le débit d'air à l'entrée de l'analyseur est régulé par une pompe IR-741 (Infrared Industries) équipée d'un système éliminant l'humidité et les particules solides présentes dans le gaz. L'entraînement de l'agitateur est mécanique car la forte viscosité du moût de fermentation ne permet pas l'utilisation d'un système magnétique. La stérilité est assurée par une surpression constante dans le fermenteur. Le moteur utilisé a une puissance de 190 W et sa vitesse est contrôlée par un variateur mécanique. La vitesse d'agitation et le couple d'agitation sur l'arbre sont connus grâce à un couplemètre MCRT 25-02T 25-0 (S. Himmelstein and Co., Allemagne). Les gammes de lecture de cet appareil sont comprises entre 0 et 2,82 Nm pour le couple et entre 0 et 15 000 tr/min pour la vitesse. La précision de la mesure est égale à $\pm 0,1\%$ de la pleine échelle pour les deux paramètres.

Trois systèmes d'agitation sont utilisés, le ruban hélicoïdal RH, un système TR avec deux turbines Rushton et un système TC avec une turbine à pales inclinées et une turbine centripète (Rayneri, Montreuil, France) (figures 3.5 et 3.6). Pour les deux systèmes à turbine, la première turbine est placée à 0,08 m du fond du fermenteur et la seconde turbine est placée 0,12 m plus haut. Pour les trois systèmes d'agitation, une turbine Rushton supplémentaire jouant un rôle de brise-mousse est rajoutée à 0,05 m au dessus du niveau initial du liquide. Les dimensions des agitateurs utilisés sont :

- ruban hélicoïdal : diamètre = 0,185 m, pas de l'hélice = 0,185 m, largeur du ruban = 0,030 m, $\emptyset_{RH} = 0,88 \emptyset_{\text{fermenteur}}$.
- turbine Rushton : diamètre = 0,070 m, hauteur des pales = 0,025 m, largeur des pales = 0,019 m, nombre de pales = 6, $\emptyset_{\text{turbine}} = 1/3 \emptyset_{\text{fermenteur}}$.
- turbine à pales inclinées : diamètre = 0,070 m, hauteur des pales = 0,025 m, largeur des pales = 0,019 m, nombre de pales = 6, inclinaison des pales = 45° , $\emptyset_{\text{turbine}} = 1/3 \emptyset_{\text{fermenteur}}$.
- turbine centripète : diamètre = 0,080 m, hauteur = 0,045 m, $\emptyset_{\text{turbine}} = 1/3 \emptyset_{\text{fermenteur}}$.

L'aérateur "grand modèle" est utilisé avec le ruban hélicoïdal et l'aérateur "petit

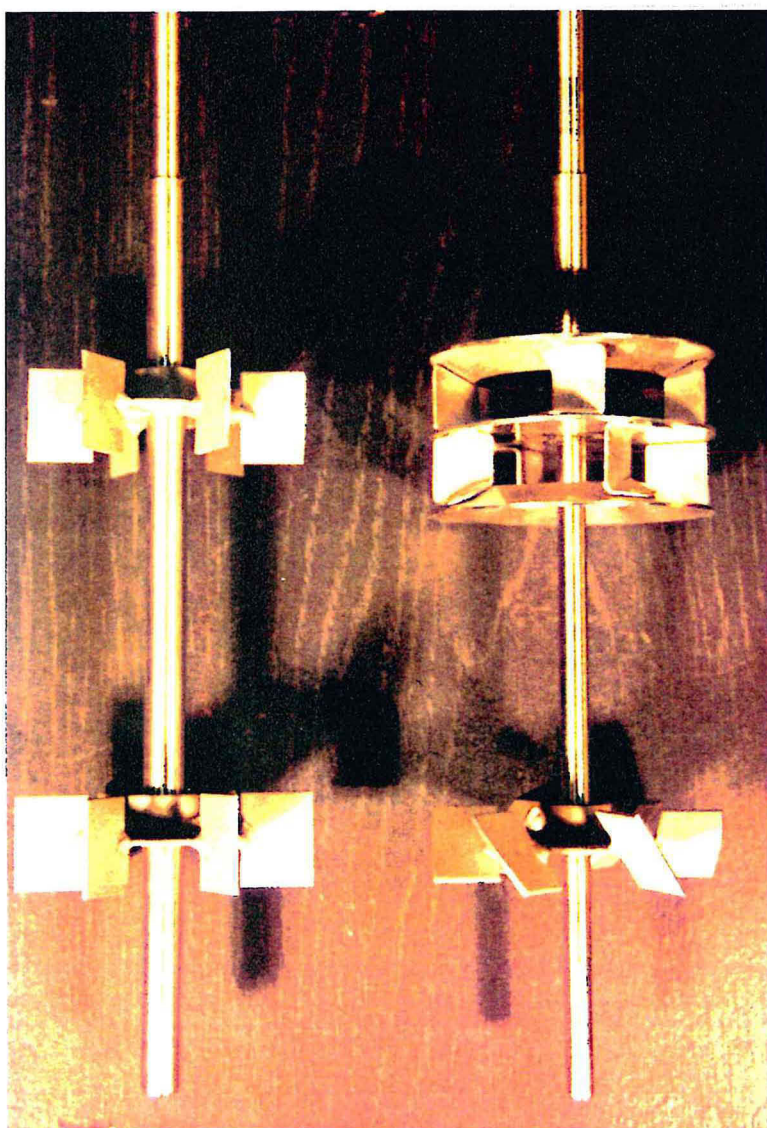


FIGURE 35 : Système d'agitation TR (à gauche) et TC (à droite).

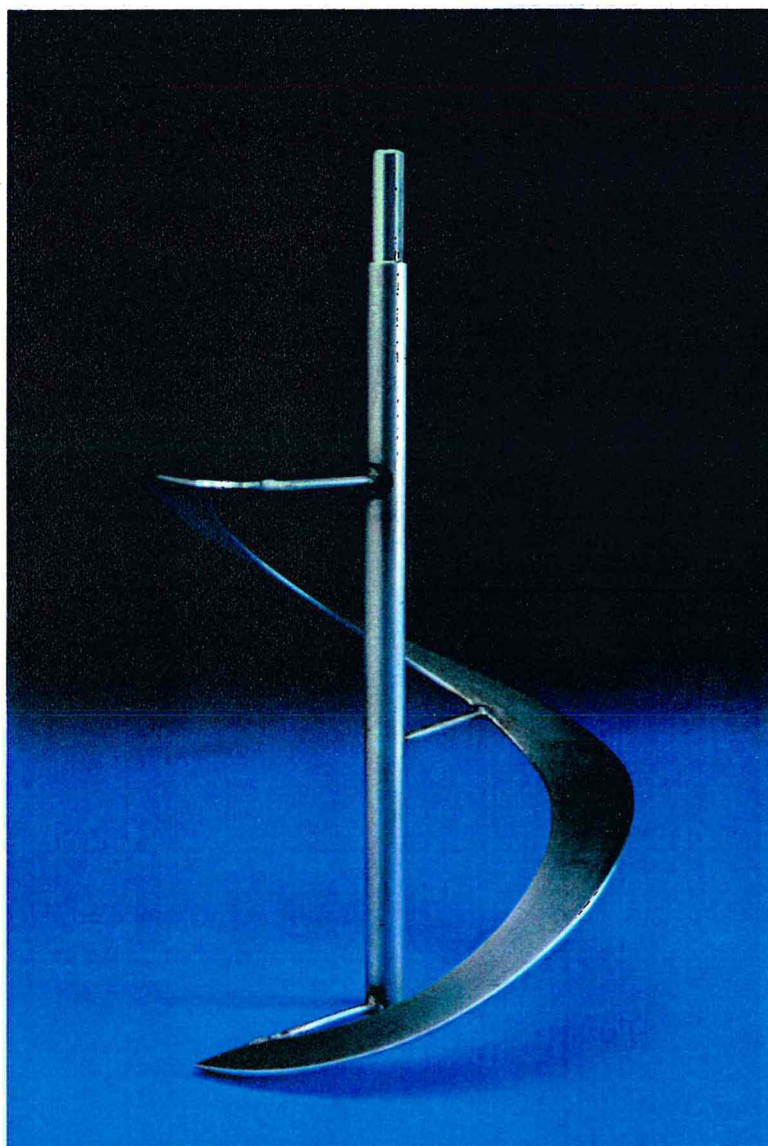


FIGURE 3.6 : Ruban hélicoïdal.

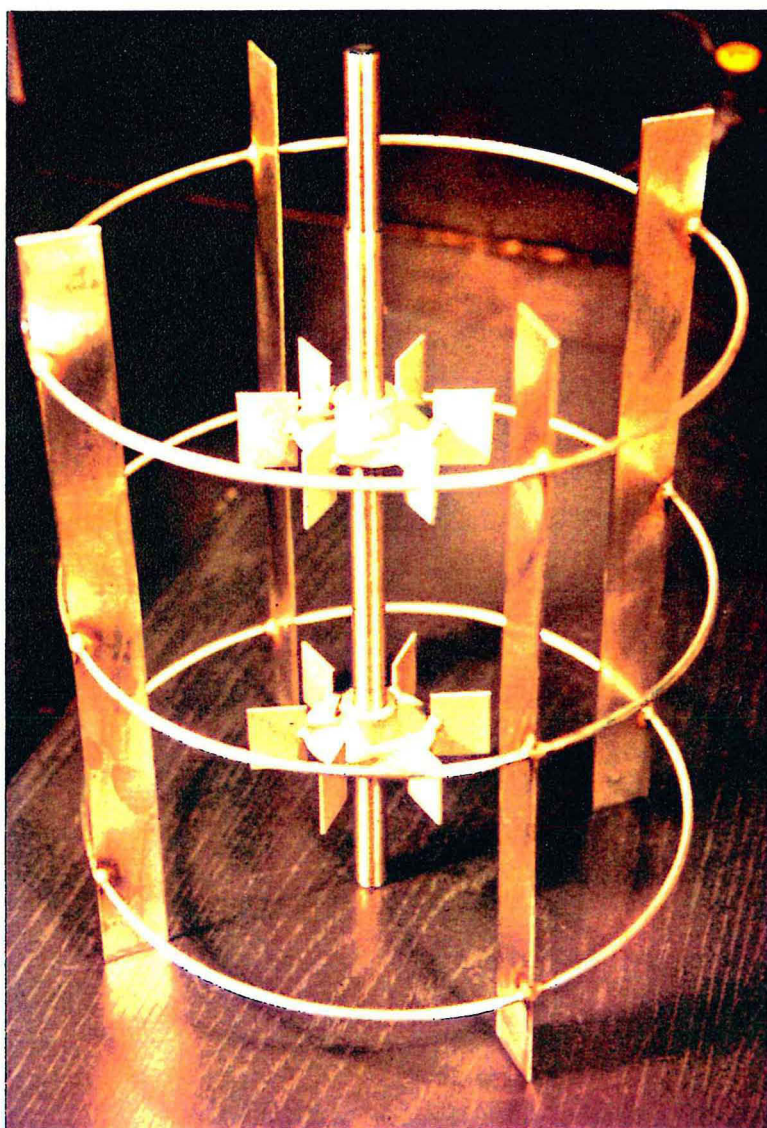


FIGURE 3.7 : Système d'agitation TR et les contre pales.

modèle'' est utilisé avec les systèmes d'agitation à turbines. Des contres-pales sont utilisées avec le système TR. Elles sont placées au fond de la cuve et sont constituées de 4 pales de 0,26 m de hauteur et de 0,02 m de large (figure 3.7).

3.3. Conditions de fermentation

Le fermenteur est stérilisé avec son milieu, sans le glucose, par un autoclavage de 15 min à 120°C. Le glucose est stérilisé à part et rajouté stérilement. Les étalonnages du 100% d'oxygène dissous et du 20,98% de l'oxygène gazeux sont réalisés avant l'inoculation. Le pH du milieu est vérifié avant l'inoculation.

Les compositions des milieux de préculture et de fermentation sont reportées dans le tableau 3.2. Le milieu de fermentation est identique à celui de Kang et Veeder (1982a), seule la peptone papaïque de soja (Biomérieux, Charbonnière-les-bains, France) est différente. La croissance cellulaire est favorisée pour le milieu de préculture par des concentrations en azote et en tampon phosphate plus importantes. Le pH de ce milieu est ajusté à 6,9 alors que celui du milieu de fermentation est amené à 6,5.

TABEAU 3.2 : Composition du milieu de fermentation et du milieu d'inoculation.

Composants	Milieu de fermentation	Milieu de préculture
Glucose (g/l)	30	20
K ₂ HPO ₄ (g/l)	0,5	1
MgSO ₄ , 7H ₂ O (g/l)	0,1	0,1
NH ₄ NO ₃ (g/l)	0,9	0,9
Peptone papaïque de soja (g/l)	0,5	1
Liqueur de maïs (g/l)	2,0	2,0
Solution de sel (ml/l)	1	1
Eau déionisée	q.s.p.	q.s.p.

La liqueur de soja est du Corn Steep Liquor (Sigma).

La solution de sels comporte : - 1,8 g/l de MnCl₂, 4(H₂O)

- 2,485 g/l de FeSO₄, 7(H₂O)

- 0,285 g/l de H₃BO₃

- 0,027 g/l de CuCl₂

- 0,021 g/l de ZnCl₂,

- 0,074 g/l de CoCl₂, 6(H₂O)

- 0,010 g/l de MgSO₄, 2(H₂O)

- 0,010 g/l de (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 4(H₂O)₄

- 2,1 g/l de tartrate de sodium.

La température de culture est régulée à 30°C et le pH à 6,5, le volume initial de milieu de culture est de 9,85 l, l'apport d'air est de 17,3 l/min ce qui représente 1,75 vvm (volume_{gaz}/volume_{liquide}/minute).

La préparation de l'inoculum est reportée sur la figure 3.8. Chaque expérimentation débute par la réhydratation d'un lyophilisat d'*A. elodea* IFP 1001 dans du bouillon nutritif. Une boîte de Pétri contenant de l'agar nutritif à 23 g/l (Difco) estensemencée et incubée durant 48 heures à 30°C. Deux fioles d'Erlenmeyer de 250 ml contenant 25 ml de bouillon nutritif à 8 g/l sont ensuiteensemencées par des colonies prélevées sur les boîtes. Après 36 heures d'incubation à 30°C sur une table d'agitation rotative à 100 tr/min, ces cultures sont utilisées pour ensemencer deux fioles d'Erlenmeyer de 2 litres contenant 400 ml de milieu de préculture. Ces cultures sont incubées 24 heures dans les mêmes conditions et sont utilisées pour ensemencer le fermenteur. Le taux d'ensemencement est de 8,6%.

Les milieux utilisés pour les cultures en fioles de Fernbach sont identiques au milieu de préculture sauf en ce qui concerne les sources d'azote et la concentration en tampon phosphate. Ces différences sont reportées dans le tableau 3.3 pour les deux séries de culture.

TABLEAU 3.3 : Composition en azote et en tampon phosphate des milieux des culture en fioles de Fernbach.

Culture	Témoin		Azote organique		NH ₄ NO ₃		NH ₄ Cl		NaNO ₃	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Série										
K ₂ HPO ₄	1	2,5	--	2,5	1	2,5	1	2,5	1	2,5
Na ₂ HPO ₄	0	10	--	10	0	10	0	10	0	10
Peptones	0,5	0,5	--	0,5	--	--	--	--	--	--
Liqueur de maïs	2	2	--	2	--	--	--	--	--	--
NH ₄ NO ₃	0,9	0,9	--	--	0,9	0,9	--	--	--	--
NH ₄ Cl	--	--	--	--	--	--	1,2	1,2	--	--
NaNO ₃	--	--	--	--	--	--	--	--	1,9	1,9

Les cultures en fioles de Fernbach sont incubées à 30°C sur une table d'agitation alternative. Les fioles sont directementensemencées par des colonies prélevées sur des cultures solides pour éviter l'introduction de sources d'azote indésirables.

3.4. Suivi de la fermentation

Le pHmètre, l'amplificateur du signal de la sonde à oxygène dissous, le couplemètre, l'analyseur d'oxygène gazeux et le thermomètre sont reliés à un microordinateur et un programme réalisé en Quick Basic (V4.5, Microsoft Corporation) permet la mise en mémoire toutes les cinq minutes du pH, de la température du bain, du taux d'oxygène dissous, du taux d'oxygène gazeux, de la vitesse de rotation de l'agitateur, et du couple sur l'arbre. Le programme permet également le calcul de la vitesse QO de consommation d'oxygène, de K_{ja} et de la puissance volumique injectée dans le fermenteur. Les valeurs de

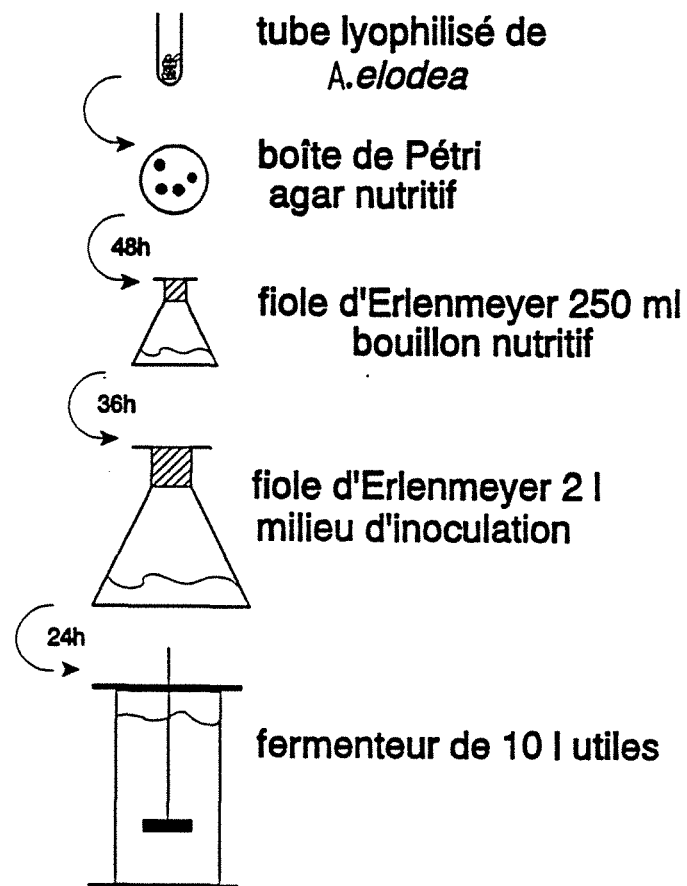


FIGURE 3.8 : Schéma récapitulatif de la conduite de l'inoculum.

K_{1a} sont calculées par la méthode des bilans gazeux (§ 2.3.3.2). Chaque paramètre enregistré correspond à la moyenne de dix valeurs lues successivement. A ces valeurs, viennent s'ajouter certains paramètres qui sont enregistrés mais non acquis tels que le volume du fermenteur et le débit d'air. Une acquisition forcée peut être réalisée par l'opérateur quand il le désire, par exemple au moment de faire un prélèvement.

Les échantillons prélevés au cours de la fermentation sont stockés à 4°C. En raison de la forte viscosité des échantillons, toutes les dilutions sont réalisées par pesée en estimant que la densité du fluide est constante et égale à 1 tout au long des manipulations. Une partie aliquote est utilisée pour la lecture de l'absorbance à 620 nm (spectrophotomètre Coleman LC-55, Perkin-Elmer, Oakbrook, IL., U.S.A.). La mesure est réalisée à une dilution suffisante pour avoir une lecture inférieure à 0,5 pour un trajet optique de 0,01 m. Une autre partie aliquote est diluée dix fois et centrifugée. Le surnageant est utilisé pour la détermination de la concentration résiduelle en glucose qui est effectuée à l'aide d'un kit enzymatique Sigma N°510. Cette méthode spécifique fait appel à un mélange de glucose oxydase et de peroxydase. Chaque mesure est répétée trois fois. La marge d'erreur est inférieure à 2,5%.

La concentration en matière sèche totale, appelée matière sèche totale, est déterminée en précipitant un volume connu de moût chauffé dans un bain à 95°C par deux volumes d'isopropanol chaud. Le précipité est récupéré et lavé à l'isopropanol sur un filtre de porosité 0,45 µm de type HA (Millipore Corp., Bedford, MA., U.S.A.) préalablement séché à 105°C durant 2 heures et pesé. Les filtres sont ensuite séchés à 105°C et pesés. La matière sèche totale est calculée par différence de poids. Chaque expérience est répétée au moins trois fois pour obtenir une erreur inférieure à 3%. Des expériences préliminaires ont montré qu'un chauffage direct sur plaque chauffante ne permet pas d'obtenir des valeurs de poids sec fiables car le polysaccharide coagule.

En ce qui concerne la concentration cellulaire, des expériences préliminaires ont montré qu'il est très difficile de séparer les cellules du polysaccharide par filtration ou centrifugation même après une forte dilution du moût. Les difficultés qui ont ensuite été rencontrées lors de la clarification du gellane natif illustrent ce problème. L'estimation du poids sec de cellules est donc réalisée à l'aide d'une corrélation par rapport à la turbidité à 620 nm du moût. Pour l'établissement de cette corrélation, des échantillons de moût sont dilués 20 fois, puis centrifugés après une longue agitation. Les culots sont ensuite remis en solution dans le même volume d'eau déionisée puis filtrés à chaud. Les résultats obtenus sont confirmés par des centrifugations réalisées sur des solutions de moût dilué dans 10 volumes de DMSO. La corrélation obtenue est : $[\text{cellules}] = 0,26 \text{ Absorbance}_{620 \text{ nm}}$. La marge d'erreur sur la détermination du poids sec est de 5% en raison des problèmes de dilution du moût. La concentration en gellane est calculée par différence entre la matière

sèche totale et le poids sec de cellules. La marge d'erreur sur cette concentration est donc de 8%.

Les caractéristiques rhéologiques des échantillons de faible viscosité sont évaluées sur un rhéomètre à cylindres coaxiaux "Low Shear 30" (Mettler, Zürich, Suisse) muni d'un équipement LS 1-1. Les autres mesures sont réalisées sur un rhéomètre "Carri-med Controlled stress rheometer" (Mitech Corp., Willoughby, Ohio, U.S.A.) équipé d'un cône (1.58° , $\varnothing = 0,040$ m) et d'un plan. Des vitesses de cisaillement décroissantes sont utilisées pour ces mesures de viscosité. Le Carri-med est également utilisé pour estimer le seuil de contrainte τ_0 des moûts. Ce seuil est déterminé en appliquant des valeurs croissantes de contrainte sur un échantillon préalablement laissé 3 minutes au repos après avoir été déstructuré par agitation. Il correspond à la première valeur de contrainte pour laquelle un cisaillement est enregistré. Des mesures en régime oscillatoire sont également réalisées sur un rhéomètre "Rheometrics System 4" (Rheometrics Inc., Piscataway, N.J., U.S.A.) équipé d'un cône (2° , $\varnothing = 0,050$ m) et d'un plan. Toutes ces mesures sont effectuées à la température de fermentation.

Pour les cultures en fioles de Fernbach, les concentrations en azote ammoniacal et nitrate du milieu de fermentation sont déterminées à l'aide de kits enzymatiques Boehringer (références : 1 112 732 et 905 658). Le dosage du nitrate est basé sur l'emploi de la nitrate réductase et le dosage des ions ammoniums sur l'emploi de la glutamate deshydrogénase. Ces dosages sont effectués sur des surnageants de centrifugation de moûts dilués. La composition en sucres et en acides de ces surnageants est étudiée par chromatographie liquide haute performance (CLHP). La colonne Biorad Aminex HPX-87H est utilisée avec comme éluant H_2SO_4 0,005 M. La détection est réalisée grâce à un réfractomètre différentiel.

3.5. Extraction du polysaccharide

Les gellanes natif et déestérifié à pH10 sont obtenus conformément à la méthode de Kang et Veeder (1983) détaillée dans la bibliographie. Après la précipitation, les échantillons sont congelés à -30°C et lyophilisés.

Les caractéristiques des produits bruts sont déterminées sur des produits ayant subi une seconde purification. Le gellane est dissous à 1% dans de l'eau déionisée. La solution est agitée mécaniquement jusqu'à ce qu'elle devienne homogène, puis chauffée à 95°C . Après l'ajout de KCl en quantité suffisante pour avoir une concentration de 1%, le polysaccharide est précipité par deux volumes d'isopropanol puis lavé avec le même solvant. Les fibres obtenues sont ensuite congelées et lyophilisées. Il est nécessaire d'ajouter du sel en quantité importante sinon le précipité obtenu ne forme pas de fibres rigides, ce qui est indispensable pour l'élimination d'un maximum de résidu de fermentation et de solvant avant la lyophilisation.

La clarification du polysaccharide natif fait l'objet d'un paragraphe dans le chapitre 5 car elle a nécessité une importante mise au point. La clarification du polysaccharide désestérifié brut est par contre beaucoup simple. La poudre de gellane désestérifié brut est remise en solution à 1 g/l par agitation dans de l'eau déionisée. Les cellules sont ensuite éliminées par une centrifugation à température ambiante de 30 minutes à 13 000 g.

Les solutions de gellane natif et désestérifié sont dialysées avant les analyses physico-chimiques. Les dialyses sont effectuées dans des membranes de seuil de coupure 8000 daltons. Un bactéricide, de l'azoture de sodium, est ajouté à 40 mg/l dans la solution de dialyse.

3.6. Caractérisation du polysaccharide

3.6.1. Composition

La concentration en gellane dans les solutions est déterminée soit par dosage des sucres totaux par la méthode à l'anthrone qui comprend une hydrolyse (Morse 1947), soit par détermination de la concentration en carbone organique pour les solutions dialysées. Pour la méthode à l'anthrone, l'étalon que nous avons utilisé est composé de glucose, rhamnose et d'acide glucuronique dans le rapport molaire 2/1/1, car ces sucres ne présentent pas le même facteur de réponse. Des tests ont permis de vérifier que le temps de réaction standard permet l'hydrolyse de tout le polysaccharide, que la marge d'erreur sur les résultats est inférieure à 5%, et que ce dosage peut être utilisé pour les solutions de polysaccharide brut. Des mesures de carbone organique total (COT) sont effectuées sur les solutions dialysées car d'une part la présence de l'azoture parasite le dosage à l'anthrone et d'autre part cette méthode est plus précise. L'étalon utilisé est du phtalate de potassium et les mesures sont réalisées sur analyseur de carbone Dorhman/Xertex DC80. La concentration en gellane est calculée à l'aide de la formule développée du gellane.

La teneur en protéines des solutions de gellane brut est déterminée par la méthode de Biuret décrite par Oser (1965) basée sur la réaction du sulfate de cuivre avec les liaisons peptidiques en milieu alcalin. Le protocole utilisé comporte un traitement thermique alcalin supplémentaire pour la libération des protéines intracellulaires. L'étalon utilisé pour ce dosage est de l'albumine de sérum bovin (Sigma).

Le dosage du PHB est réalisé à l'aide de la méthode de Law et Spelecky (1961). Cette méthode est basée sur l'hydrolyse du PHB en acide crotonique qui absorbe à 235 nm. Les solutions de polysaccharide brut sont auparavant traitées à l'hypochlorite de sodium. Le PHB est extrait du gellane brut par une extraction au chloroforme bouillant dans des conditions de reflux total durant 8 heures.

L'hydrolyse du gellane a été tout d'abord réalisée par un traitement à 105°C durant

16 heures en présence d'acide sulfurique 1 N. De façon à concentrer les solutions hydrolysées, un traitement de 3 heures à 107°C en présence d'acide chlorhydrique 0,25 N est ensuite utilisé car cet acide peut être éliminé par lyophilisation. Par ailleurs, de l'acide glucuronique a été hydrolysé dans les conditions données par Kuo *et al.* (1986), c'est-à-dire un traitement de 1 heure à 100°C en présence de d'acide trifluoroacétique 2 N. Les analyses de composition sont réalisées en CLHP suivant les conditions précédemment définies.

Le dosage du degré d'estérification global est réalisé par la méthode d'Hestrin (1949) basée sur la réactivité des esters en présence d'hydroxylamine, un composé formé présentant un maximum d'absorbance à 540 nm. L'étalon utilisé pour ce dosage est de l'acétylcholine. Le degré d'estérification par l'acétate est déterminé par un dosage enzymatique Boehringer (référence 148 261) qui fait appel à l'acétyl-CoA synthétase. Ce dosage est réalisé sur des solutions de gellane hydrolysé à l'acide sulfurique qui sont neutralisées avant dosage. L'ester méthylique de glycérate analysé en infrarouge est obtenu par un traitement de 1 heure à 100°C d'une solution à 5 g/l d'acide glycérique dans du méthanol en présence de 1% d'acide sulfurique.

Les analyses en infrarouge sont réalisées sur un spectrophotomètre à transformée de Fourier (Bio-Rad digilab division FTS-60). Les mesures sont effectuées sur des pastilles composées de 95% de bromure de potassium et de 5 % de polysaccharide ou directement sur des films de polysaccharide.

Les clichés au microscope électronique sont réalisés sur un microscope à balayage JEAL, JSM-6300F. Les échantillons sont lyophilisés et métallisés au platine.

3.6.2. Rhéologie en régime dilué

Les mesures rhéologiques en régime dilué sont réalisées avec le Low shear 30 à 25°C. Pour la détermination de la viscosité intrinsèque, chaque mesure est répétée 3 fois et au minimum cinq solutions en régime dilué sont analysées. Les dilutions sont réalisées par poids pour éviter les erreurs de dilution.

L'ultrafiltration est réalisée avec une membrane Amicon de seuil de coupure 50 000 daltons. La teneur en carbone dans l'ultrafiltrat est contrôlée par mesure de COT et l'opération est menée jusqu'à ce que la valeur du COT de l'éluant en sortie de cellule soit égale à celle de l'éluant en amont de la cellule.

3.6.3. Diffusion de lumière

Une macromolécule en solution soumise à un rayonnement diffuse dans tout l'espace. La mesure de l'intensité du faisceau diffusée $I(\theta, r)$ à angle θ et à une distance r de la source, permet la détermination de la masse moléculaire moyenne en poids M_w , du second coefficient de viriel A_2 qui est fonction des interactions entre les molécules, et du

rayon de giration R_{gz} du polymère.

Grâce à la théorie des fluctuations reliant l'intensité diffusée aux propriétés thermodynamiques de la solution, la relation suivante est obtenue dans le cas de molécules pour lesquelles les sites diffusants ne sont pas négligeables par rapport à la longueur d'onde utilisée :

$$\frac{K C (1 + \cos^2 \theta)}{\Delta R_\theta} = \frac{I}{M_w} + \left(\frac{16 \pi^2 n_0^2 R_g^2}{3 \lambda_0^2 M_w} \sin^2 \frac{\theta}{2} \right) + 2 A_2 C + 3 A_3 C^2 + \dots \quad (32)$$

où : • $K = \frac{2 \pi^2 n_0^2}{\lambda_0 N_a} \left(\frac{dn}{dc} \right)^2$

- n_0 l'indice de réfraction du solvant,
- λ_0 la longueur d'onde du faisceau incident,
- N_a le nombre d'Avogadro,
- dn/dc l'incrément d'indice de réfraction du polymère,
- ΔR_θ le rapport de Rayleigh défini de la façon suivante :

$$\Delta R_\theta = \frac{\Delta I(\theta, r) \cdot r^2}{I_0} \quad (33)$$

où $\Delta I(\theta, r)$ est la différence d'intensité entre le solution et le solvant à l'angle θ et la distance r , et I_0 l'intensité initiale,

- C la concentration en polymère,
- A_2 et A_3 les second et troisième coefficients de viriel.

Ainsi, le tracé du diagramme de Zimm (figure 3.9):

$$\frac{K C (1 + \cos^2 \theta)}{\Delta R_\theta} = fct \left(\sin^2 \frac{\theta}{2} + k C \right) \quad (34)$$

avec k comme constante arbitraire, permet de déterminer les paramètres M_w , A_2 et R_{gz} par une double extrapolation à concentration et angle nuls.

Le photogoniomètre Macrotron (Amtec) permet le tracé du diagramme de Zimm complet. La couverture du domaine d'angle est de 20 à 150 degrés. La source lumineuse est un laser He/Ne de longueur d'onde monochromatique 632,8 nm. La détermination des caractéristiques de la molécule est effectuée à l'aide du tracé :

$$\frac{C}{(I - I_0) \sin \theta} = fct \left(\sin^2 \frac{\theta}{2} + K C \right) \quad (35)$$

Les paramètres M_w , A_2 et R_{gz} sont obtenus à partir des formules suivantes :

$$\frac{I}{M_w} = 0,79 \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 I_B \left(\frac{C}{(I - I_0) \sin \theta} \right)_{\theta=0}^{c=0} \quad (36)$$

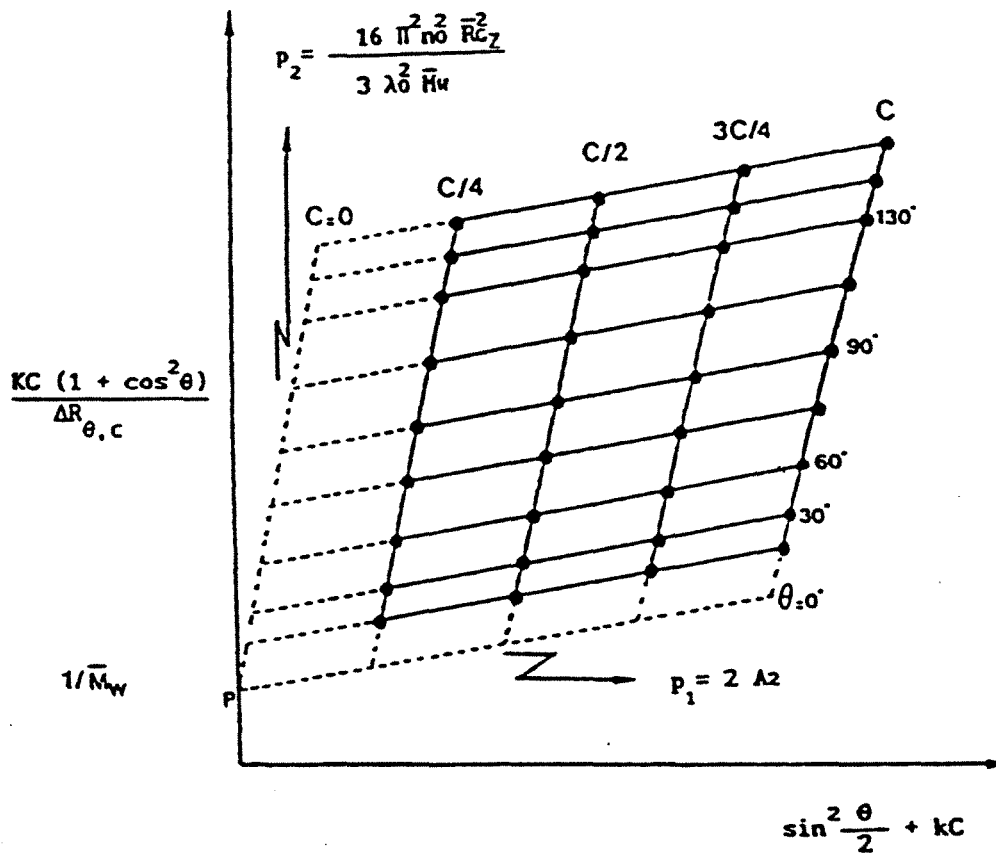


FIGURE 3.9 : Diagramme de Zimm.

$$A_2 = \left(\frac{p_1}{p_2} \right) \frac{1}{2 M_w} \quad (37)$$

$$Rg_z = \frac{\sqrt{3} \lambda_0}{4 \pi n_0} \sqrt{\left(\frac{p_1}{p} \right)} \quad (38)$$

où p_1 et p_2 sont les pentes des droites extrapolées à angle et concentration nuls, p l'ordonnée du point d'intersection des droites extrapolées à angle et concentration nuls, et I_B l'intensité du benzène à 90 degrés.

Les mesures sur cette appareil sont réalisées à température ambiante sur des solutions filtrées sur un filtre de porosité 3 μm . L'incrément d'indice de réfraction utilisé est de 0,136 (Chapman *et al.* 1988)

Le photomètre KMX-6 (Chromatix) permet de travailler à un angle fixe de 4,88 degrés. Il est équipé d'un laser identique à celui du Macrotron. Le Zimm plot complet ne peut pas être tracé avec cet appareil, mais il permet d'accéder facilement à la masse molaire du polymère et à son second coefficient de viriel.

Les caractéristiques du polymère sont obtenues en traçant :

$$\frac{K'C}{\Delta R_\theta} = fct(C) \quad (39)$$

avec :

$$K' = \frac{2\pi^2 n_0^2}{\lambda_0^4 N_a} \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 (1 + \cos^2 \theta) = 408.10^8 n_0 \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 \quad (40)$$

$$\Delta R_\theta = \left(\frac{G_\theta^{\text{solution}} - G_\theta^{\text{solvant}}}{G_0} \right) \frac{D}{\sigma' l'} \quad (41)$$

où G_0 , $G_\theta^{\text{solvant}}$ et $G_\theta^{\text{solution}}$ sont les valeurs du signal d'intensité incidente et de diffusion du solvant et du soluté, D le coefficient de transmission des atténuateurs engagés lors de la mesure de G_0 , σ' l'angle solide du photomultiplicateur et l' le chemin optique de la cellule.

La droite obtenue a pour origine $1/M_w$ et sa pente correspond à $2 A_2$.

Les analyses sont réalisées à température ambiante avec des concentrations croissantes en polymère. Les solutions sont filtrées en continu sur un filtre de porosité 0,22 μm . L'incrément d'indice de réfraction utilisé pour tous les échantillons est de 0,136 (Chapman *et al.* 1988)

3.6.4. Chromatographie de perméation de gel

La chromatographie par perméation de gel est basée sur la capacité des molécules à pénétrer dans les pores d'une phase stationnaire. Plus les molécules sont petites, plus le chemin qu'elles parcourent dans le gel est important. Plus précisément, un échantillon de polymère est fractionné suivant le volume hydrodynamique des molécules. D'un point de vue analytique le produit de la viscosité intrinsèque et de la masse molaire d'un polymère

est proportionnel au logarithme du volume d'élution.

Le montage utilisé comporte deux colonnes (TohoHaas) de 60 cm en série. Les références de ces colonnes sont TSK-GEL G3000PW et TSK-GEL G6000PW. Le débit d'éluant est de 0,7 ml/min. Les solvants utilisés sont dégazés et filtrés sur 0,22 µm. Les analyses sont réalisées à température ambiante. La détection du polysaccharide est effectuée par réfractométrie différentielle.

3.6.5. Pouvoir rotatoire

L'évolution du pouvoir rotatoire d'une solution de polymère en fonction de la température est réalisée sur un polarimètre Perkin Elmer 241 MC. Un bain chauffant permet de thermostatier la cellule du polarimètre.

3.7. Fluides de forage

3.7.1. Préparation

Le mode de préparation des fluides modèles, c'est à dire le mélange eau, argile, électrolyte et polymère, a une influence considérable sur leur stabilité dans le temps et leur comportement rhéologique. Il importe que le même mode de préparation soit utilisé pour tous les essais afin d'obtenir des fluides reproductibles. Si de la poudre de montmorillonite est ajoutée à de l'eau salée, une décantation de la suspension est instantanément observée car l'argile gonfle peu. Par contre, si les électrolytes sont ajoutés après le gonflement de l'argile dans de l'eau distillée, aucune sédimentation n'est observée. Nous avons donc choisi la seconde méthode de mise en suspension de l'argile. La même procédure a été utilisée avec les polymères.

Les fluides de forage sont préparés à température ambiante. Les solutions de polymère et d'argiles sont donc préparées séparément en double concentration dans de l'eau déionisée et agitées mécaniquement durant 24 heures. Le polymère est auparavant mis à gonfler 16 heures pour permettre une meilleure hydratation. Les deux solutions sont ensuite homogénéisées par une agitation de 5 min à l'agitateur Hamilton Beach à petite vitesse puis 15 min à grande vitesse, et finalement par une agitation de 24 heures dans des fioles d'Erlenmeyer à baffles. Les conditions d'homogénéisation à l'Hamilton Beach correspondent à la norme "API section 11 OCMA grade bentonite" datée de 1970. Les électrolytes sont rajoutés lors de l'agitation à l'Hamilton Beach. Un bactéricide, l'azoture de sodium, est également ajouté à une concentration de 400 mg/l lors de l'homogénéisation. Les concentrations initiales des solutions d'argile et de polymère tiennent compte de la dilution due à l'ajout des sels et du bactéricide.

L'argile utilisée est de la Greenbond (CKS). C'est une montmorillonite

principalement sodique (Loeber 1992). La CMC utilisée a pour référence R110 (Aqualon). Le gellane utilisé pour les boues est le produit brut lyophilisé directement issu de la fermentation par précipitation.

3.7.2. Rhéologie

Les mesures de viscosité sont réalisées avec un rhéomètre à cylindres coaxiaux Haake. Le comportement rhéologique des fluides est étudié sur une gamme de vitesse de cisaillement allant de 1000 s^{-1} à 1 s^{-1} . Les mesures sont réalisées par paliers avec des vitesses de cisaillement décroissantes. Le temps de mesure à chaque palier est de 5 min. Les résultats obtenus montrent que ce temps d'attente est suffisant pour obtenir une valeur de viscosité stable. Ces mesures ont été réalisées à 30°C .

Les mesures de “gel 0” et “gel 10” sont réalisées avec un viscosimètre à cylindres coaxiaux Fann dans les conditions préconisées par l'API. Le rotor est mis en rotation durant 10 secondes à 600 tr/min. La rotation est ensuite arrêtée. 10 secondes après l'arrêt du rotor, la vitesse de 3 tr/min est appliquée et la valeur de gel 0 correspond à la valeur maximale de contrainte lue sur le cadran qui est exprimée en livre par 100 pieds carrés. Le rotor est à nouveau mis en rotation à la vitesse maximale durant 10 secondes, puis le fluide est laissé au repos durant 10 min avant d'effectuer la lecture de gel 10 à la vitesse de rotation de 3 tr/min.

3.7.3. Filtration

Dans une formation, la filtration se produit sous l'effet d'une pression différentielle lorsque le fluide se trouve en contact d'une paroi poreuse et perméable. Expérimentalement, on utilise un filtre presse suivant les normes API pour caractériser les propriétés de filtration du fluide. La pression différentielle appliquée sur la solution est de 7 bar pour les essais à température ambiante, et de 35 bar pour les essais en température. Pour ceux-ci, il est nécessaire d'appliquer une contre-pression à la sortie de la cellule. Les mesures en température sont réalisées après 30 min d'attente à la température de filtration. Les filtres utilisés sont des filtres Whatman 50 pour les filtrations sous 7 bar et des filtres Baroïd pour les filtrations sous 35 bar. Les surfaces utiles des filtres Whatman et Baroïd sont de 48 cm^2 et de 23 cm^2 respectivement. Les filtrations sous 7 bar de pression ont été réalisées suivant le norme “API RP 13 B1 section 3 filtration” datée de juin 1990. Le filtrat est récolté dans une éprouvette et l'évolution du volume filtré est suivie au cours du temps. La filtration est interrompue après 30 min de filtration conformément aux normes API. Le fluide résiduel est ensuite éliminé et l'épaisseur du cake est mesurée après lavage.

CHAPITRE 4 : INFLUENCE DE L'HYDRODYNAMIQUE DU FERMENTEUR SUR LA PRODUCTION DE GELLANE

4. Influence de l'hydrodynamique du fermenteur sur la production de gellane

Les mises au point du montage expérimental, du déroulement de la culture et de leur suivi ont été réalisées en utilisant le ruban hélicoïdal comme module d'agitation. Les premières expériences ont montré qu'une vitesse d'agitation et un taux d'aération importants sont nécessaires à l'obtention d'une forte production de gellane. Le procédé a donc été optimisé avec une vitesse d'agitation de 250 tr/min, vitesse importante pour un agitateur de proximité. La fermentation RH250 a été réalisée dans ces conditions. Une fois le processus maîtrisé et la reproductibilité des analyses vérifiée, nous avons alors fait varier un seul paramètre à la fois pour étudier son influence. Des expériences ont ainsi été réalisées avec le ruban hélicoïdal, à une vitesse d'agitation de 125 tr/min pour RH125, avec un apport supplémentaire d'oxygène pour RH250Ox et avec un milieu de culture moins riche en azote pour RH250N. L'importance de la géométrie d'écoulement générée par l'agitateur a ensuite été étudiée en utilisant tout d'abord le système d'agitation TR comprenant deux turbines Rushton pour TR475 et TR600, puis le système d'agitation TC comprenant une turbine à pales inclinées et une turbine centripète pour TC800. Les principales conditions expérimentales de l'ensemble des fermentations sont résumées dans le tableau 4.1.

TABLEAU 4.1: Récapitulatif des conditions de fermentation

Fermentation	Système d'agitation	Vitesse d'agitation (tr/min)	Commentaire
RH250	ruban hélicoïdal	250	--
RH250'	ruban hélicoïdal	250	--
RH125	ruban hélicoïdal	125	--
RH250Ox	ruban hélicoïdal	250	apport d'oxygène supplémentaire
RH250N	ruban hélicoïdal	250	milieu sans azote organique
TR475	turbines Rushton	475	temps de culture x 5
TR600	turbines Rushton	600	--
TC800	turbine centripète	800	--

En ce qui concerne la présentation des résultats, le déroulement de la fermentation est décrit et analysé en détail pour la fermentation RH250. Seules les différences importantes par rapport à cette culture sont ensuite présentées et la comparaison des fermentations fait l'objet d'une discussion finale. De façon à faciliter cette discussion, les résultats des fermentations autres que RH250 sont présentés paramètre par paramètre et non

fermentation par fermentation. Le but de cette étude étant d'évaluer l'influence des paramètres gouvernant l'hydrodynamique sur la production et les caractéristiques du gellane, les méthodes d'analyses ont été développées de façon à perturber le moins possible l'hydrodynamique du fermenteur par des interventions extérieures, des prélèvements fréquents ou de volume important. Il n'a donc pas été possible d'étudier l'évolution de paramètres microbiologiques tels que le taux de croissance ou le taux de production spécifique de polysaccharide.

4.1. Fermentations avec le ruban hélicoïdal

4.1.1. Analyse de la fermentation RH250

4.1.1.1. Suivi de la fermentation

Les évolutions du taux d'oxygène dissous dans le milieu de fermentation, du taux d'oxygène dans les gaz en sortie du fermenteur, de la puissance volumique injectée et de K_{ja} sont tracées sur la figure 4.1. Aucune phase de latence importante n'est observée en début de culture. Le taux d'oxygène dissous diminue durant les 7 premières heures de culture (phase I), cette diminution étant rapide. Une remontée rapide jusqu'à 65% de la valeur à saturation (limitation I) marque la fin de la phase I. Ce pourcentage redescend en 1 heure jusqu'à 2%, (phase II), puis décroît ensuite lentement en 9 heures de 2 à 0% (phase III), et reste nul (phase IV) jusqu'à l'arrêt de la culture après 32 heures.

L'évolution du taux d'oxygène gazeux est similaire à celle du taux d'oxygène dissous durant les phases I et II et la limitation I. Par contre, ce taux d'oxygène gazeux commence à réaugmenter dès le début de la phase III et atteint des valeurs proches du taux d'oxygène à l'entrée du fermenteur en fin de culture. La valeur minimale observée correspond à 98,9 % de la valeur maximale. Les variations de taux d'oxygène gazeux restent faibles, car le volume d'air injecté par volume de liquide est élevé. L'appareil permettant cette mesure étant très sensible aux changements de température et d'humidité ambiantes, de nombreuses calibrations ont été nécessaires en cours de fermentation, ce qui explique la discontinuité des valeurs indiquées. Les valeurs de K_{ja} reportées sur la figure 4.1 sont calculées à partir d'une différence de pourcentage d'oxygène au moins égale à 0,05%. K_{la} est globalement constant autour de 90 h^{-1} durant la phase I. La valeur de K_{ja} diminue ensuite rapidement après la limitation I, puis plus lentement pour finir à une valeur nulle en fin de fermentation. Les valeurs de K_{ja} sont à considérer avec prudence en raison de la faible consommation d'oxygène. En tenant compte de cette restriction ainsi que du fait que la solubilité de l'oxygène dans le milieu peut évoluer, la marge d'erreur sur la valeur de ce paramètre est estimée à 20%.

La puissance volumique injectée reste constante et même diminue légèrement durant

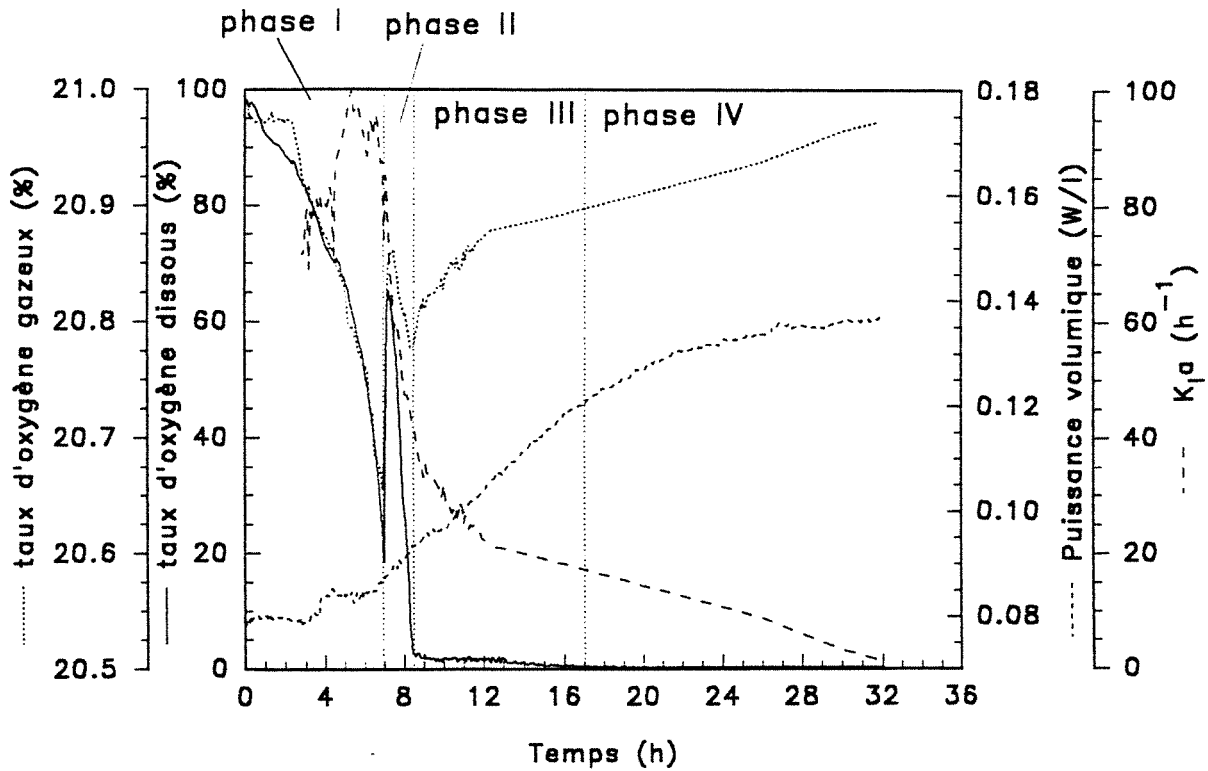


FIGURE 4.1 : Evolution des taux d'oxygène dissous et gazeux, de K_{La} et de la puissance volumique injectée lors de la fermentation RH250.

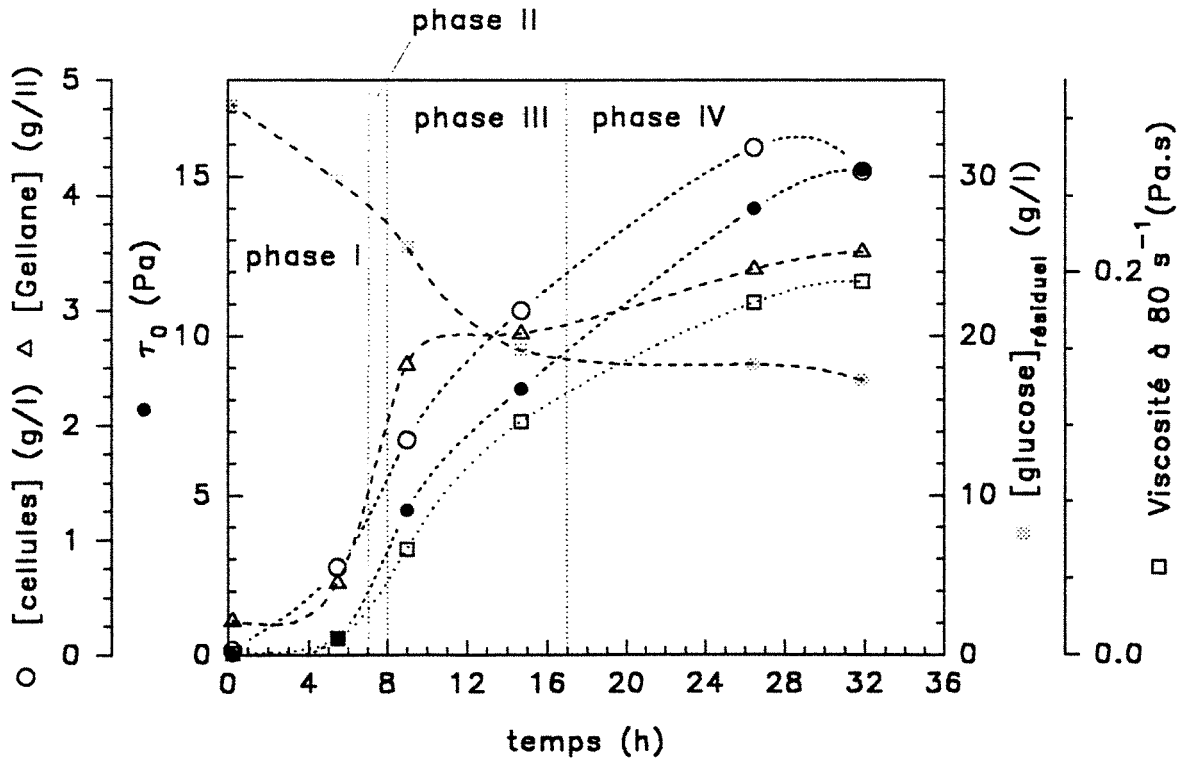


FIGURE 4.2 : Evolution des concentrations en cellules, gellane et glucose résiduel, et du seuil de contrainte et de la viscosité de procédé du moût lors de la fermentation RH250.

les premières heures de fermentation, la variation initiale étant due à un ajustement de la vitesse d'agitation. La puissance commence à augmenter avant la limitation I, et elle augmente de plus en plus rapidement jusqu'à la fin de la phase II. Durant toute la phase III, la vitesse d'augmentation de la puissance est constante, puis elle commence à décroître dès le début de la phase IV pour finalement devenir nulle après 28 à 30 heures de culture. L'énergie volumique injectée dans le fermenteur est de 3,6 W.h/l.

4.1.1.2. Croissance bactérienne et production de gellane

L'évolution de ces concentrations est reportée sur la figure 4.2. Les productions de cellules et gellane sont importantes durant les 9 premières heures de fermentation puis ralentissent brusquement durant la phase III. Les concentrations finales en cellules et en gellane sont respectivement égales à 4,2 g/l et 3,5 g/l. La production de matière sèche totale est de 7,7 g/l. La production spécifique en gellane est égale à 0,83 $\text{g}_{\text{gellane}}/\text{g}_{\text{cellule}}$. Le rapport de poids sec de cellules sur la matière sèche totale évolue entre 45 et 57% tout au long de la culture.

Durant les phases I et II, la concentration résiduelle en glucose suit un profil correspondant à une consommation exponentielle. A partir de la phase III, la vitesse de consommation de glucose diminue et se stabilise. Le rendement de conversion du glucose en matière sèche totale est de 0,45 $\text{g}_{\text{matière sèche}}/\text{g}_{\text{glucose}}$, ce qui est du même ordre de grandeur que les 0,5 $\text{g}_{\text{matière sèche}}/\text{g}_{\text{glucose}}$ rencontrés dans la littérature pour la production de gellane (Kang *et al.* 1982, Lobas *et al.* 1992).

4.1.1.3. Propriétés rhéologiques du moût

Le comportement rhéologique du milieu de culture évolue rapidement d'un comportement quasi newtonien vers un comportement rhéofluidifiant marqué. Les analyses rhéologiques en régime continu permettent de mettre en évidence un comportement de gel aux faibles contraintes de cisaillement. Le rhéogramme obtenu avec un échantillon en fin de fermentation est reporté sur la figure 4.3. Dans la zone 1, lorsque la contrainte de cisaillement augmente progressivement, aucun mouvement n'est tout d'abord observé ; le fluide est structuré et la contrainte imposée ne suffit pas pour briser cette structure. Lorsque la contrainte dépasse une certaine valeur appelée seuil de contrainte, le fluide se déstructure et la vitesse de cisaillement augmente brusquement (zone 2). La déstructuration est totale lorsque l'on atteint la zone 3. Si la contrainte diminue ensuite progressivement, la vitesse de cisaillement diminue également graduellement (zone 4) ; ce comportement rhéologique correspond à celui du fluide déstructuré. En dessous d'une contrainte critique, les forces de structuration du fluide deviennent plus importantes que la contrainte de cisaillement imposée et le milieu se structure (zone 5), l'évolution lors de cette dernière phase étant fortement dépendante du temps de mesure.

Le comportement rhéologique du moût est tout d'abord étudié en zone 4 et les

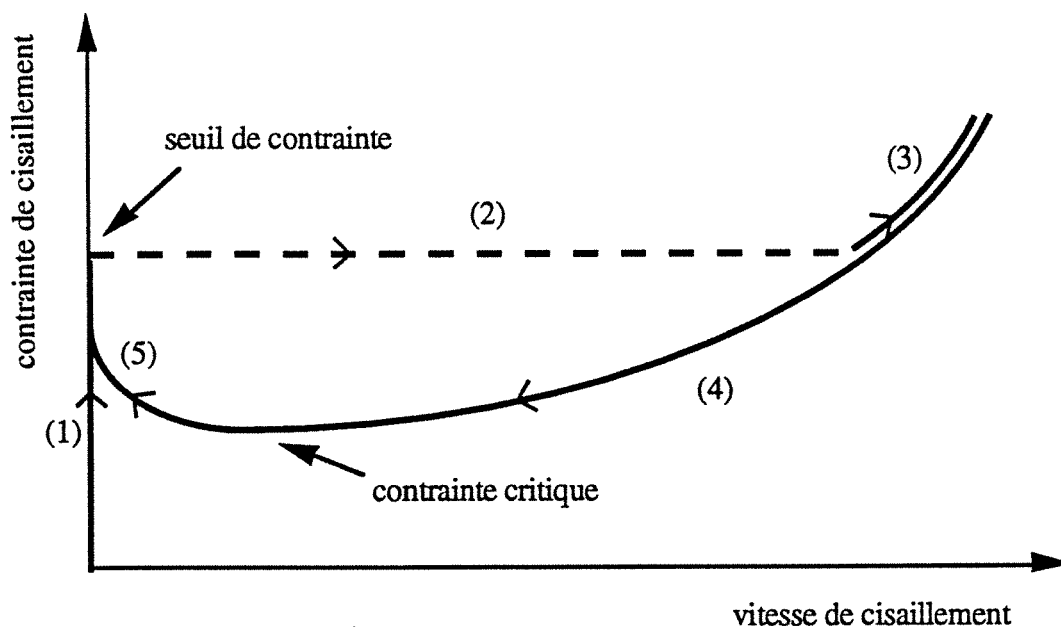


FIGURE 4.3 : Rhéogramme du moût en fin de fermentation

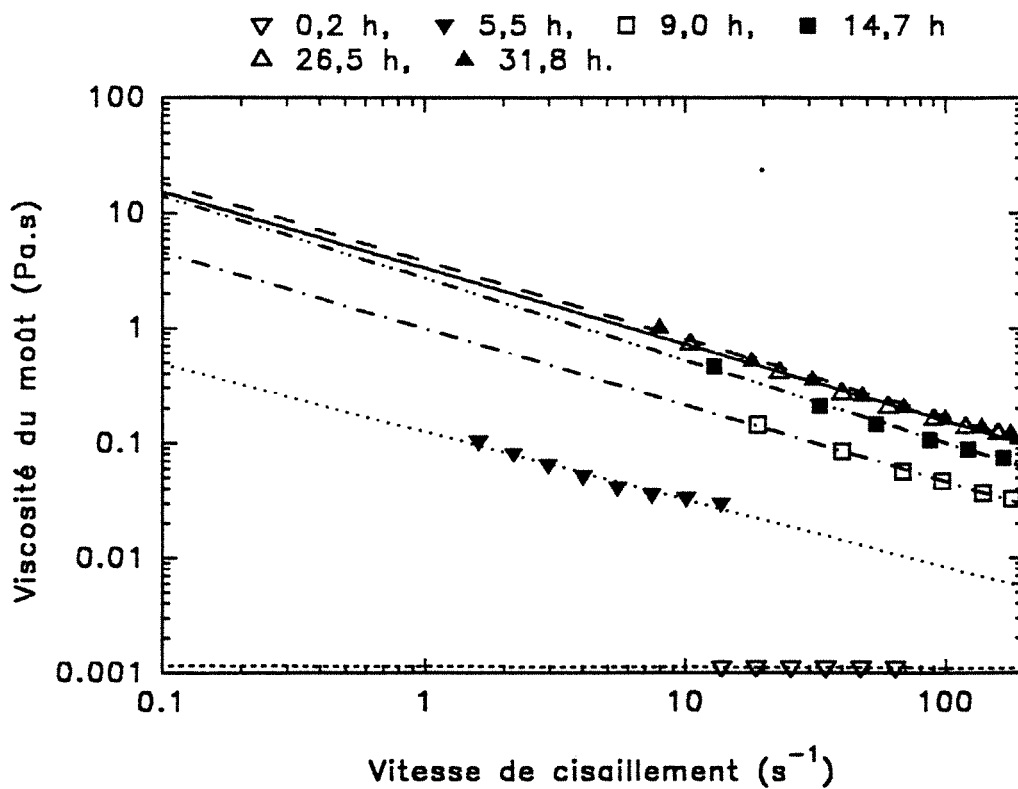


FIGURE 4.4 : Evolution du comportement rhéologique du moût lors de la fermentation RH250.

mesures sont réalisées avec des contraintes de cisaillement décroissantes. Ces mesures sont réalisées sur des fluides non structurés, ce qui est également l'état du fluide dans le fermenteur. La loi de puissance décrite par l'équation 15 est adoptée pour traduire le comportement du fluide dans ces conditions d'analyse.

L'évolution du comportement rhéologique du moût au cours de la fermentation est reportée sur la figure 4.4 et les principales caractéristiques rhéologiques sont regroupées dans le tableau 4.2.

TABLEAU 4.2 : Evolution des caractéristiques rhéologiques du moût, et de paramètres hydrodynamiques lors de la fermentation RH250

Temps de culture (h)	n	K (Pa.s ⁿ)	$\dot{\gamma}_{\text{moy.}}$	$\eta_{\text{procédé}}$	Re'	Np
0,2	0,99	0,001	--	0,001	143 000	0,54
5,5	0,41	0,125	--	--	--	0,57
9,0	0,34	1,00	--	--	--	0,64
14,7	0,29	2,73	9	0,57	250	0,77
26,5	0,34	3,32	9	0,79	180	0,91
31,8	0,32	3,83	10	0,79	180	0,91

n = indice de rhéofluidisance

K = indice de consistance

$\dot{\gamma}$ = vitesse de cisaillement moyen dans le fermenteur

Re' = nombre de Reynolds modifié

Le moût de fermentation initial est hétérogène et il est composé d'un liquide newtonien très peu visqueux contenant de petits agglomérats de cellules emprisonnées par du polysaccharide. L'indice n de comportement rhéofluidifiant de ce fluide est de l'ordre de 1. Le moût évolue rapidement puisqu'il est presque homogène après 5,5 heures de culture, la fraction volumique des petits agglomérats étant devenue très importante. La détermination des caractéristiques rhéologiques de ce fluide hétérogène est difficile mais permet de constater que le milieu est non-newtonien et qu'il présente un indice de rhéofluidisance de l'ordre de 0,4 (figure 4.4). Cet indice n'est probablement pas représentatif de l'ensemble du fluide en raison du faible entrefer du Low-shear 30. A partir de 9 heures de culture, le moût de fermentation est homogène et le comportement rhéofluidifiant se stabilise avec un indice n de l'ordre de 0,3. Dès lors, les augmentations de la concentration en polysaccharide se traduisent surtout par une augmentation de l'indice de consistance K. Le moût de fermentation final présente un indice n de rhéofluidisance de 0,32 et un indice de consistance de 3,8 Pa.sⁿ.

De façon à caractériser le comportement de gel du moût, des tests rhéologiques sont réalisés à l'aide du Carri-med en appliquant des valeurs croissantes de contrainte sur un échantillon laissé trois minutes au repos après déstructuration. Le seuil de contrainte τ_0 est la première valeur de contrainte associée à une vitesse de cisaillement non nulle (figure

4.3). Ce seuil est une image du niveau de structuration du moût : plus il sera structuré, plus la contrainte nécessaire pour obtenir un écoulement sera importante. Ce seuil est très faible pour les échantillons prélevés après 0,2 et 5,5 heures de culture puisque la contrainte initiale suffit pour enregistrer un écoulement (figure 4.2). Ce résultat n'est pas surprenant puisque l'échantillon prélevé après 5,5 heures présente encore l'aspect d'une dispersion d'agglomérats. A partir du prélèvement suivant, le milieu est homogène et se structure. Le seuil τ_0 évolue alors de façon parallèle à la concentration en polysaccharide et atteint 15,2 Pa en fin de culture.

Toujours en ce qui concerne la structuration du moût, des études sont ensuite réalisées en régime oscillatoire sur certains échantillons. Après 9 heures de culture, le seuil de viscoélasticité linéaire du moût est important puisqu'il est égal à 50% de la déformation. Les analyses montrent que G' et G'' sont peu dépendants de la fréquence d'oscillation et que le rapport G' sur G'' , approximativement égal à 10, est important (figure 4.5). Ces trois résultats confirment que le moût présente les caractéristiques d'un gel.

Un autre test concernant cette fois les capacités de restructuration du fluide est réalisé en régime harmonique. Un échantillon structuré subit successivement une déformation non destructurante, c'est-à-dire à l'intérieur de la gamme de viscoélasticité linéaire, une déformation destructurante à l'extérieur de cette gamme, cet enchaînement étant répété ensuite 2 fois (figure 4.6). Les valeurs de G' avant et après les déformations destructurantes nous renseignent sur le niveau et la vitesse de restructuration du fluide. Ces valeurs étant identiques, on peut en conclure qu'une déformation destructurante n'entraîne pas de dégradation irréversible du milieu et que le fluide retrouve quasi instantanément sa structure initiale. Il est par contre intéressant de noter que la destruction observée lors de la première déformation destructurante n'est pas instantanée, alors que cette même destruction est instantanée lors de sa seconde application. Après la première destruction, le milieu a donc perdu une certaine capacité à résister à une telle déformation sans perdre la capacité de se restructurer à un même niveau de structure apparente.

4.1.1.4. Hydrodynamique du fermenteur

Le macromélange et la dispersion des bulles d'air dans le fermenteur sont deux paramètres observés qualitativement. En début de culture, l'agitation du milieu est de bonne qualité. La présence des sondes provoque des phénomènes de turbulence. Du fait de l'aérateur multi-trous, les bulles sont nombreuses et de l'ordre du millimètre. Le schéma global d'écoulement correspond à une remontée des bulles et du moût au niveau des rubans et à une recirculation de la surface vers le fond du fermenteur par un important tourbillon qui se forme autour de l'axe d'agitation. Dans le fond de la cuve, une zone morte conique est observée. Ce cône repose sur l'aérateur, sa hauteur est de 10 cm et son sommet est orienté vers la surface du fluide.

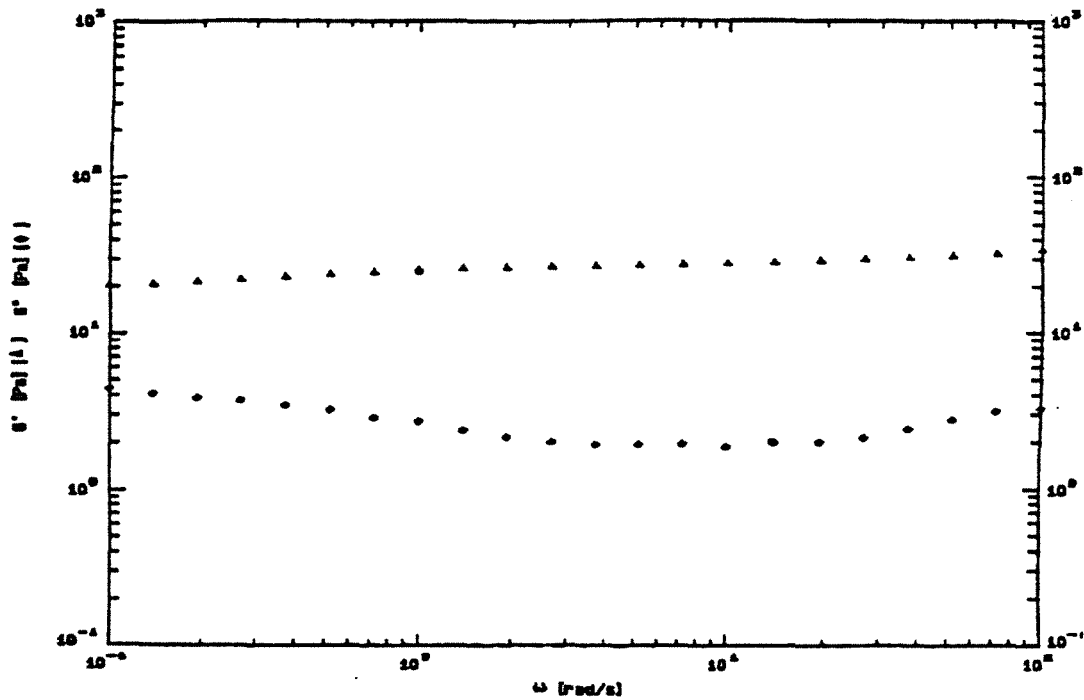


FIGURE 4.5 : Comportement rhéologique en régime oscillatoire d'un échantillon de moût prélevé après 9 heures de culture lors de la fermentation RH250. Pourcentage de déformation : 20%.

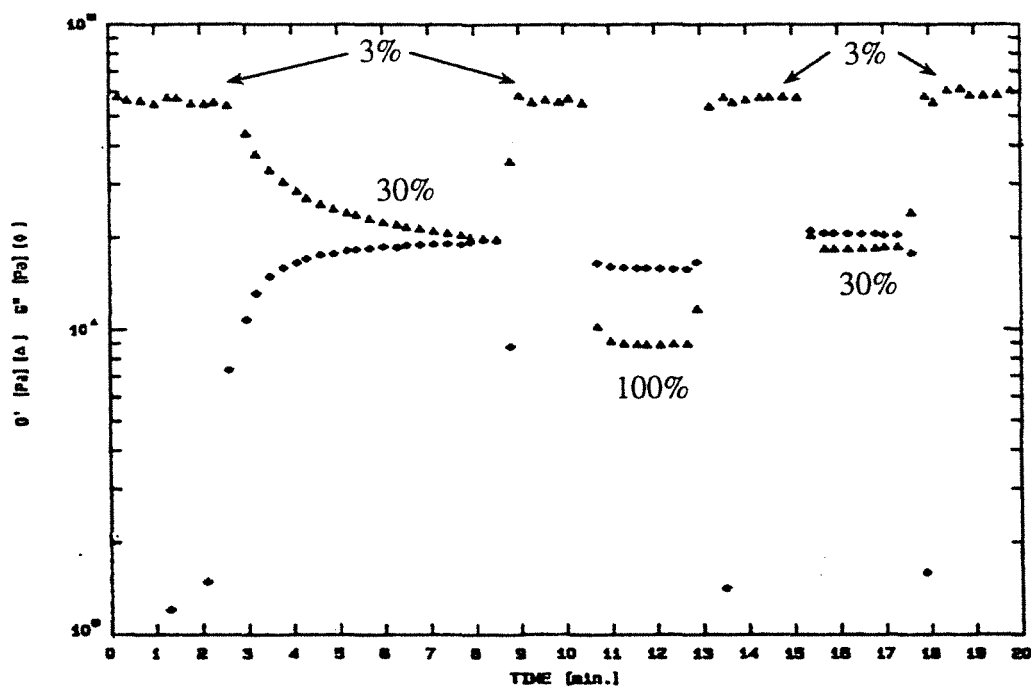


FIGURE 4.6 : Effet de déstructuration sur le moût final de la fermentation RH250. Déformations imposées : 3%, 30%, 3%, 100%, 3%, 30% et 3%. Fréquence d'oscillation : 20 rad/s.

Lorsque le milieu devient visqueux, la taille des bulles contre la paroi augmente. Le tourbillon devient moins puissant et la circulation au niveau du ruban est moins importante et plus lente. Les micro-bulles coalescent à leur sortie de l'aérateur et de nombreuses bulles de grosse taille (1 à 2 cm) remontent directement autour de l'axe d'agitation alors que d'autres remontent le long de la paroi. Le tourbillon permet tout de même de conserver une très bonne qualité d'homogénéisation. Aucune nouvelle zone de stagnation n'est observée.

Le nombre de Reynolds modifié Re' peut être calculé en début de culture car la viscosité du fluide est indépendante de la vitesse de cisaillement. L'écoulement est fortement turbulent car Re' est alors égal à 143 000 (tableau 4.2). Par la suite, il n'est pas possible d'utiliser les corrélations de Brito (équation 28) et de Metzner et Otto (équation 27) pour estimer la viscosité de procédé car l'écoulement ne devient jamais laminaire. Seule la courbe N_p en fonction de Re' obtenue pour un système agitateur-cuve similaire permet d'obtenir la valeur de Re' (figure 2.17). L'erreur commise sur la mesure est importante tant que l'écoulement n'est pas laminaire car une faible variation de N_p entraîne une forte variation de Re' , mais il est ainsi possible d'estimer le nombre de Reynolds modifié. Seules les valeurs obtenues en fin de fermentation où l'on est proche du régime laminaire sont reportées dans le tableau 4.2. Après 9 heures de culture, le nombre de Reynolds modifié est de l'ordre de 400 et il est de 180 en fin de fermentation. Pour le calcul de la viscosité de procédé à partir de Re' , la diminution de masse volumique due à l'aération n'est pas prise en compte car l'augmentation de volume due à l'aération est faible. La masse volumique est prise égale à 1000 kg/m^3 pour l'ensemble des cultures.

4.1.1.5. Conclusions

Cette fermentation a permis la production en 32 heures de 7,7 g/l de matière sèche contenant 3,5 g/l d'un polysaccharide, les productions de cellules et de polysaccharide étant concomitantes.

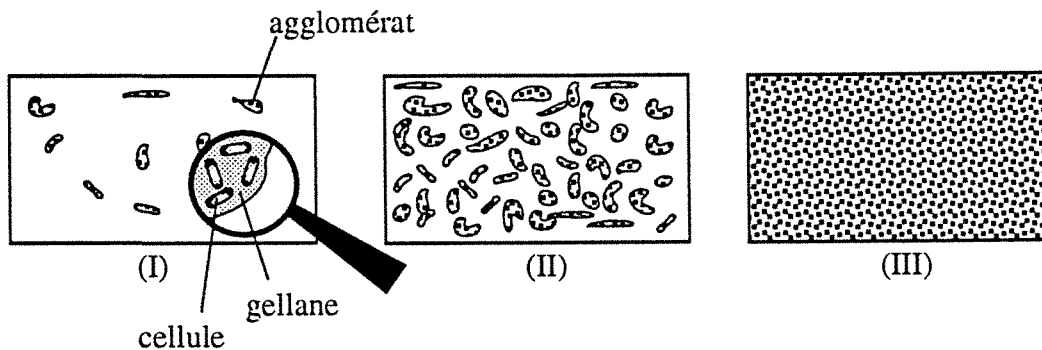
Au niveau des transferts dans le fermenteur, bien que la vitesse d'agitation choisie soit élevée pour ce type d'agitateur et que l'aération soit importante (1,75 vvm), les capacités de transfert obtenues avec le ruban hélicoïdal ne sont pas suffisantes pour éviter l'établissement d'une limitation en oxygène. L'utilisation de cet agitateur permet néanmoins de conserver un macromélange de bonne qualité du début à la fin de la culture et limite l'apparition de zones stagnantes.

La fermentation peut être séparée en une période sans limitation en oxygène durant les huit premières heures de culture, et une période avec limitation en oxygène pour le reste de la culture. La première période correspond à deux phases de production importante de matière sèche. Ces deux phases sont séparées par une limitation de croissance qui n'est pas causée par un manque de substrat carboné. Le taux d'oxygène dissous ne remonte pas alors jusqu'à 100 %. Ce phénomène s'explique soit par une diminution des capacités de

solubilisation de l'oxygène dans le milieu de fermentation résultant d'une évolution de la rhéologie du milieu, soit par une reprise rapide de l'activité métabolique cellulaire. Durant la seconde période, la vitesse de production de matière sèche diminue rapidement. La quantité de matière sèche produite durant cette période représente tout de même 40% de la production totale. L'augmentation du taux d'oxygène gazeux dès le début de la phase 3 permet de penser que la consommation d'oxygène diminue dès que l'oxygène dissous devient limitant. Cette diminution reflète une diminution de l'activité cellulaire et peut être due soit à une détérioration physiologique des cellules, soit à une réduction des capacités de transfert du fermenteur provoquée par l'augmentation de viscosité du moût.

Le comportement rhéologique du moût est étroitement lié à l'évolution de son homogénéité (figures 4.7a et 4.7b). Durant les premières heures de culture, le moût ne présente pas l'aspect d'un milieu de fermentation homogène classique mais celui d'un milieu hétérogène composé d'une phase liquide et d'agglomérats de cellules emprisonnées dans un réseau de gellane (figure 4.7a, schéma I et figure 4.7b).

FIGURE 4.7a : Evolution de l'aspect du moût de fermentation.



La phase liquide est newtonienne, très peu visqueuse, limpide et stérile puisqu'aucune croissance n'a été observée sur un milieu gélosé inoculé par ce liquide. La fraction volumique des agglomérats étant faible, ce milieu hétérogène est très peu visqueux. Au cours de la production de polysaccharide, la fraction volumique des agglomérats augmente et le milieu de fermentation devient constitué d'un ensemble d'agglomérats muqueux entourés d'une fraction liquide de moins en moins importante (schéma II). La viscosité de ce milieu augmente avec la fraction volumique des agglomérats mais elle reste faible jusqu'à ce que le fluide "percole", c'est-à-dire jusqu'à ce que la fraction volumique des agglomérats devienne suffisamment importante pour qu'un réseau continu d'agglomérats se forme. Le moût devient alors très visqueux et rhéofluidifiant, et un seuil d'écoulement apparaît. Finalement, le milieu s'homogénéise (schéma III), il présente les caractéristiques d'un gel et son caractère rhéofluidifiant se stabilise. Les augmentations de concentration en polysaccharide se traduisent ensuite par une augmentation de la contrainte seuil et de l'indice de consistance du fluide.

D'après les travaux de Brito *et al.* (1992) réalisés avec les mêmes types d'agitateur et de fermenteur, la limite supérieure de la zone d'écoulement laminaire est atteinte pour un Re' de l'ordre de 100. Les estimations du nombre de Reynolds modifié montrent que l'écoulement évolue rapidement vers le régime intermédiaire se situant entre le turbulent et le laminaire. Le patron d'écoulement pour le régime intermédiaire est non homogène et comporte des zones de turbulence, certainement au niveau du ruban, et des zones d'écoulement laminaire au centre du fermenteur. En fin de fermentation, l'écoulement se situe juste au-dessus du régime laminaire et la viscosité de procédé est de l'ordre de 0,8 Pa.s. Les valeurs de vitesse de cisaillement moyenne calculées à partir de la viscosité de procédé (reportées dans le tableau 4.2) doivent être considérées avec prudence car le comportement rhéologique du fluide non aéré est utilisé pour ce calcul.

Pour ce type d'agitateur, chaque augmentation du nombre de puissance correspondant à une diminution du nombre de Reynolds modifié, chaque augmentation de la puissance volumique injectée est donc provoquée par une augmentation de la viscosité de procédé donc de la concentration en gellane. Le suivi de la puissance volumique injectée permet donc d'estimer instantanément l'état d'avancement de la production de polysaccharide.

Dès lors, il peut sembler étonnant que la puissance volumique injectée ne commence pas à augmenter dès le début de la culture puisque les productions de gellane et de cellules sont couplées. Deux phénomènes limitent en fait cette augmentation. Tout d'abord, le milieu étant hétérogène en début de culture, sa viscosité augmente peu avec la production de polysaccharide. Les augmentations de viscosité sont alors seulement dues aux perturbations de l'écoulement du fluide porteur provoquées par la présence des agglomérats. De plus, la viscosité du moût demeurant faible du fait de son hétérogénéité, l'écoulement reste très turbulent et les faibles augmentations de viscosité n'ont pas de répercussion sur le niveau de la puissance consommée. Cette puissance ne commence à augmenter que lorsque le régime d'écoulement entre dans la zone intermédiaire. Il faut pour cela que la viscosité du moût augmente fortement, ce qui se produit lorsque la fraction volumique des agglomérats devient suffisamment importante pour que ceux-ci établissent un réseau.

4.1.2. Autres fermentations avec le ruban hélicoïdal

Les principaux résultats de ces fermentations sont regroupés dans le tableau 4.3. Les évolutions des taux d'oxygène dissous et gazeux sont reportées sur les figures 4.8 et 4.9. L'évolution de la puissance volumique injectée dans le fermenteur est reportée sur la figure 4.10.

TABLEAU 4.3 : Principaux résultats obtenus en fin de culture pour les fermentations avec le ruban hélicoïdal.

Fermentation	RH250	RH250'	RH125	RH250Ox	RH250N
temps de culture (h)	32	32	80	32	49
[cellules] (g/l)	4,2	4,1	3,4 (2,3)*	5,7 (6,0)**	2,8 (3,2)**
[gellane] (g/l)	3,5	3,3	3,3 (2,9)*	7,5	7,2
[cellules]/matière sèche totale	0,57	0,56	0,50	0,43	0,28
[gellane]/[cellules]	0,83	0,80	1,00	1,32	2,52
glucose consommé (g/l)	17,3	16,7	14,7	25,5	21
matière sèche/glucose	0,45	0,44	0,46	0,52	0,48
gellane/glucose	0,20	0,20	0,22	0,29	0,34
seuil τ_0 (Pa)	15,2	10,5	3,1	59,7	27,1
indice n	0,32	0,30	0,33	0,40	0,53
indice K (Pa.s ⁿ)	3,8	4,0	2,3	16,7	7,0
$\dot{\gamma}_{\text{moyen}}$ (s ⁻¹)	10	10	3,4	33	17
$\eta_{\text{procédé}}$ (Pa.s)	0,80	0,80	1,0	2,0	1,7
viscosité à 80 s ⁻¹ (Pa.s)	0,19	0,19	0,12	1,18	0,89
nombre de Reynolds	180	180	70 (90)*	70	80
énergie vol. injectée (W.h/l)	3,6	3,5	2,2	5,9	9,8
énergie vol. injectée/[gellane]	1,03	1,06	0,64	0,79	1,36

* : après 32 heures de culture. ** : après 24 heures de culture.

Les fermentations RH250 et RH250' réalisées dans les mêmes conditions opératoires donnent des résultats comparables. Les problèmes de mise en œuvre des cultures semblent donc maîtrisés.

Deux fermentations menées dans des conditions de cultures similaires jusqu'à consommation totale du glucose observée après 140 heures de culture nous apportent quelques renseignements complémentaires. Au delà de 32 heures de culture, l'accumulation de polysaccharide est limitée puisque la puissance volumique injectée n'augmente plus que très faiblement. Par contre, la consommation de glucose se poursuit, mais ne se traduit par aucune production importante de matière sèche précipitable par des solvants. Finalement, le moût qui était d'un jaune vif devient de plus en plus terne, il est de plus en plus difficile à diluer et à précipiter en raison de la formation de paillettes insolubles, et ses propriétés rhéologiques se dégradent. Le changement de couleur est à mettre en parallèle avec l'évolution de la couleur des colonies d'*A. elodea* observée par Kang *et al.* (1982b) pour des cultures sur milieu solide. Les colonies présentent en effet une couleur jaune vif après 1 à 2 jours de croissance et une couleur plus terne après 4 à 5 jours de culture. Notons

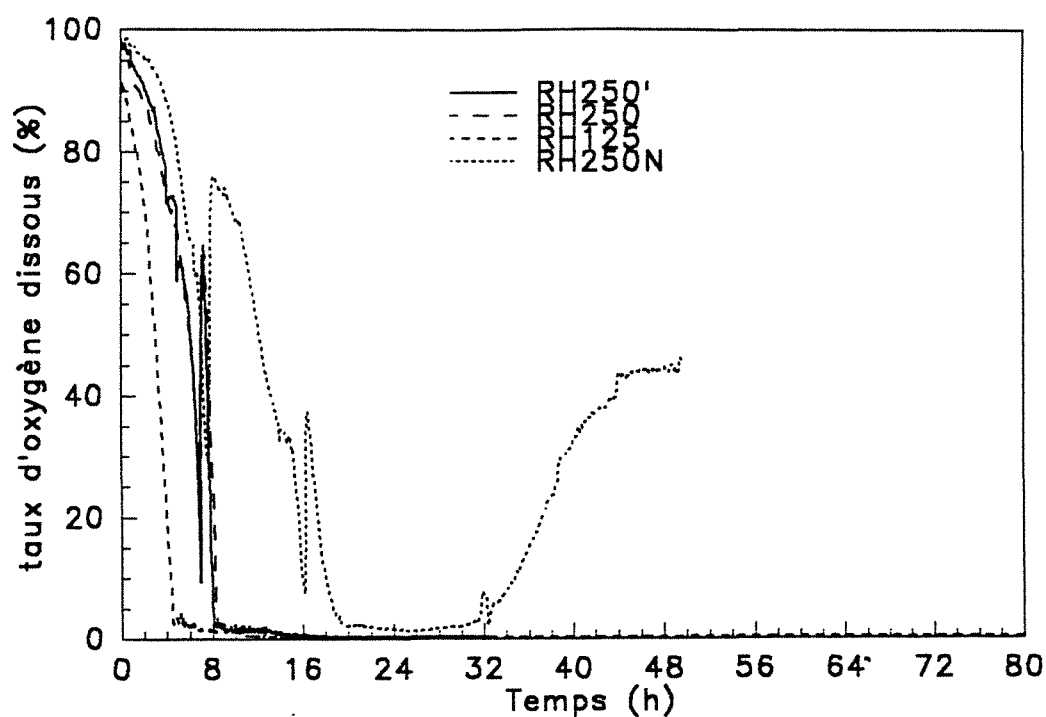


FIGURE 4.8 : Evolution du taux d'oxygène dissous pour les fermentations avec le ruban hélicoïdal.

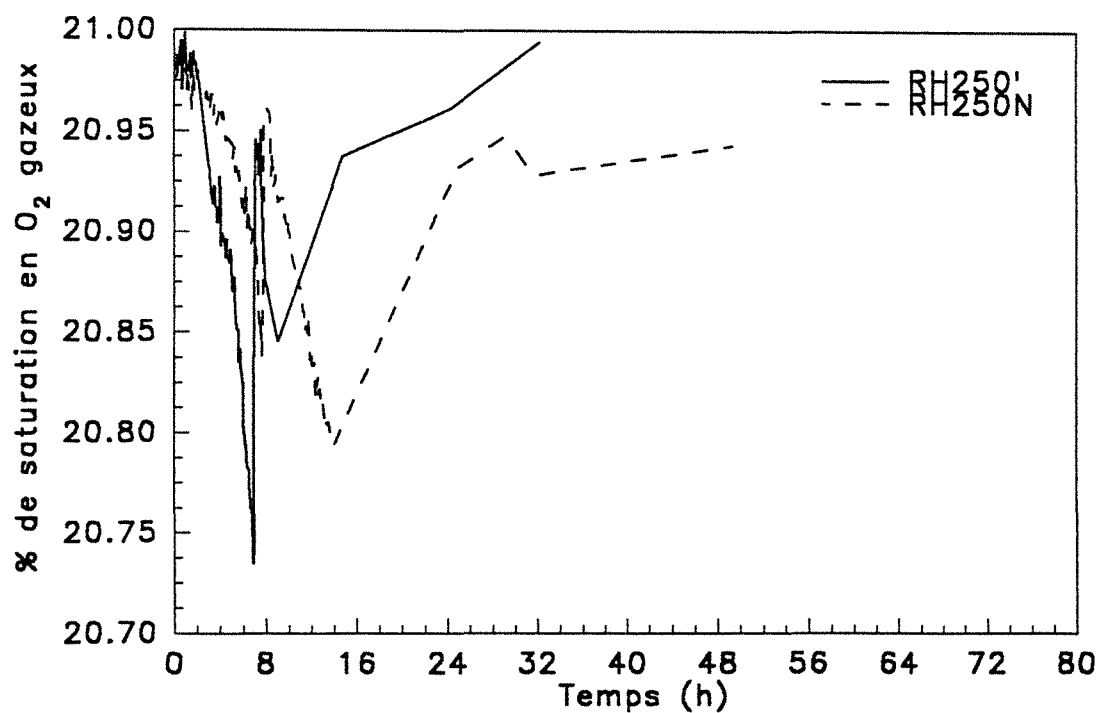


FIGURE 4.9 : Evolution du taux d'oxygène gazeux pour les fermentations avec le ruban hélicoïdal.

cependant que ces deux fermentations ont été réalisées avec une souche d'*A. elodea* provenant d'une autre culture et avec un système d'humidification de l'air non complet.

4.1.2.1. Influence de la vitesse d'agitation : RH125

Pour cette fermentation, la vitesse de rotation du ruban hélicoïdal est divisée par deux. Les autres paramètres de fermentation sont identiques à ceux de RH250. La fermentation a été interrompue après 80 heures de culture. L'agitateur étant identique, la géométrie de l'écoulement est similaire mais les capacités de transfert du fermenteur sont moins importantes.

Ainsi, le taux d'oxygène dissous décroît rapidement et la limitation en oxygène s'installe plus tôt que lors de la fermentation RH250 (figure 4.8) : le taux d'oxygène dissous devient inférieur à 2 % après 4,5 heures de culture, il est nul à partir de 10 heures et le reste jusqu'à la fin de la fermentation. La limitation I n'est donc pas observée pour cette fermentation. K_{la} est de l'ordre de 20 h^{-1} durant la phase I. A partir de 9 heures de fermentation, la matière sèche totale augmente moins rapidement que lors de la fermentation RH250. Après 32 heures de culture, elle n'est que de 5,2 g/l, c'est-à-dire 1/3 de moins que pour RH250, et les concentrations en cellules et gellane sont de 2,3 et 2,9 g/l respectivement, soit 45 et 17% de moins que pour RH250 (tableau 4.3). Néanmoins, les productions de cellules et de gellane se poursuivent et atteignent respectivement 3,4 et 3,3 g/l après 80 heures, soit 20% et 5% de moins que pour la fermentation RH250.

Pour une concentration finale en polysaccharide équivalente, le moût final de RH125 est moins visqueux et moins structuré que celui de la fermentation RH250 : l'indice de consistance K est plus faible de 40 % et le seuil de contrainte τ_0 est trois fois plus faible. Pour une vitesse de cisaillement de 80 s^{-1} , la viscosité de ce moût est de 0,12 Pa.s. Le nombre de Reynolds modifié en début de culture est de 71 300. L'écoulement devient laminaire lorsque Re' devient égal à 100, ce qui correspond à une puissance volumique injectée de 0,025 W/l. Cette valeur est atteinte après 32 heures de culture. Dès lors, le nombre de Reynolds modifié peut être directement calculé par la formule $Re'.N_p = 135,2$ (Brito 1992, figure 2.17). En fin de culture, Re' est égal à 70, ce qui donne une viscosité de procédé de 1,0 Pa.s. Ces valeurs indiquent que l'agitation est moins turbulente que celle obtenue à 250 tr/min et elles confirment les observations macroscopiques. En effet, au début de la culture, le macromélange est de moins bonne qualité que pour la fermentation RH250 : les bulles d'air sont plus grosses, aucun tourbillon n'est observé à la surface du milieu et la recirculation du fluide est plus lente. En fin de fermentation, le ruban permet toujours d'assurer une bonne homogénéisation, mais les mouvements dans le fermenteur sont très lents. Les bulles d'air ne sont plus dispersées et elles coalescent pour former de grosses bulles qui remontent rapidement autour de l'axe d'agitation.

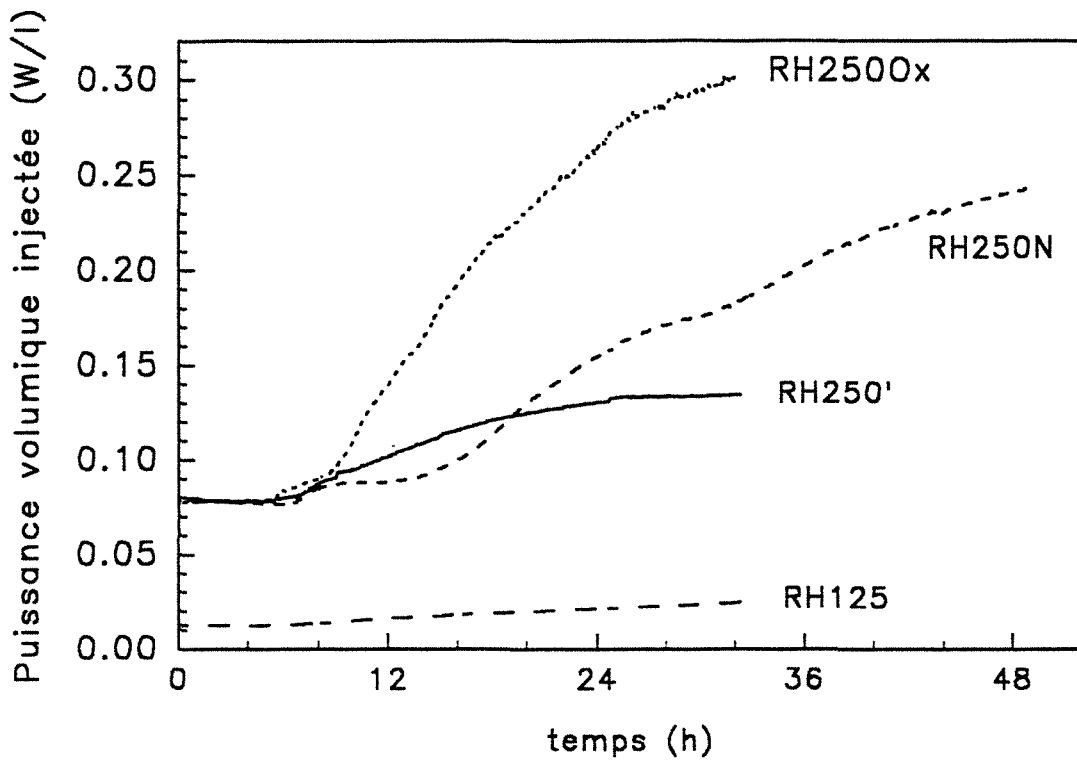


FIGURE 4.10 : Evolution de la puissance volumique injectée pour les fermentations avec le ruban hélicoïdal.

4.1.2.2. Effet d'un enrichissement en oxygène : RH250Ox

La fermentation RH250Ox est réalisée pour étudier l'influence d'un apport massif d'oxygène sur la production de polysaccharide tout en conservant les conditions d'agitation de RH250. Le pourcentage en oxygène dans les gaz à l'entrée du fermenteur est modulé au cours de la culture de façon à éviter l'établissement d'une limitation en oxygène. Pratiquement, ce pourcentage est augmenté à chaque fois que le taux d'oxygène dissous devient inférieur à 10%. La fermentation est arrêtée après 32 heures de culture.

L'évolution des divers paramètres est similaire à celle observée pour RH250 jusqu'au moment où l'enrichissement en oxygène a commencé. Ensuite, l'augmentation de la puissance est beaucoup plus importante pour RH250Ox qu'elle ne l'a été pour la fermentation RH250 (figure 4.10). Cette augmentation ralentit à partir de 18 heures de culture et la puissance volumique se stabilise après 30 heures. 5,7 g/l de cellules et 7,5 g/l de gellane sont produits en 32 heures de culture, ce qui correspond respectivement à 40 et 127% de plus que pour la fermentation RH250. La concentration cellulaire est maximale après 24 heures de culture à 6,0 g/l. La production spécifique de gellane est de 1,32 $\text{g}_{\text{gellane}}/\text{g}_{\text{cellules}}$, c'est-à-dire 65 % de plus que pour la fermentation RH250. Le rendement de conversion du glucose en matière sèche est de 0,52 $\text{g}_{\text{matière sèche}}/\text{g}_{\text{glucose}}$.

Du fait de la concentration en polysaccharide élevée, le moût final est très visqueux : l'indice de consistance est de 16,7 Pa.sⁿ et le seuil de contrainte de 59,7 Pa, soit 4 fois plus que pour la fermentation RH250. Par contre, le caractère rhéofluidifiant de ce fluide est moins marqué et l'indice n est de l'ordre de 0,40 contre 0,32 pour RH250 après avoir été de l'ordre de 0,33 pour une concentration en gellane de l'ordre de 4 g/l. L'écoulement devient laminaire lorsque la puissance volumique injectée devient supérieure à 0,20 W/l, valeur qui est atteinte après 17 heures de culture. En fin de fermentation, le nombre de Reynolds modifié est de 70, ce qui donne une viscosité de procédé de 2,0 Pa.s. La qualité du mélange est similaire à celle obtenue pour la fermentation RH250 mais la tendance à la coalescence des bulles est plus marquée et la recirculation est plus lente. Le macromélange en fin de fermentation est tout de même de bonne qualité et aucun problème de régulation n'est observé. Le moût étant très visqueux, la puissance volumique injectée en fin de fermentation est de 0,3 W/l, c'est-à-dire beaucoup plus que la valeur de 0,135 W/l observée pour RH250 en fin de culture (figure 4.10). L'énergie volumique consommée est de 5,9 W.h/l au lieu de 3,6 W.h/l pour RH250.

4.1.2.3. Influence de la nature de la source d'azote

4.1.2.3.1 RH250N

Les objectifs de la fermentation RH250N sont les suivants : réduire l'impact de la limitation en oxygène en diminuant la demande globale en oxygène par le biais d'une réduction de la concentration cellulaire obtenue par une limitation en azote, et tenter

d'éclaircir le problème d'assimilation des différentes sources d'azote. Les conditions de la fermentation RH250N sont identiques à celles de la fermentation RH250 à l'exception de la suppression des sources d'azote organique. Suite à un problème au niveau de l'aération, la fermentation RH250N a été interrompue après 49 heures de culture, mais l'augmentation de la puissance était alors faible.

L'évolution du taux d'oxygène dissous est très intéressante : la phase I dure une heure de plus que pour la fermentation RH250, et la phase II de décroissance qui était d'une heure, se prolonge pendant 8 heures (figure 4.8). Avant que l'oxygène ne devienne limitant, cette phase se termine par l'apparition d'une seconde limitation de croissance (limitation II), et le taux d'oxygène dissous augmente jusqu'à 40 % avant de décroître à nouveau pour atteindre 2% 3 heures plus tard. Le pourcentage reste stable à 2% durant 16 heures et finit par réaugmenter et se stabiliser à une valeur proche de 50 % jusqu'à l'arrêt de la fermentation. L'évolution du taux d'oxygène gazeux est similaire à celle observée pour la fermentation RH250 (figure 4.9). Ce pourcentage suit la longue diminution du taux d'oxygène dissous lors de la phase II et ne commence à réaugmenter qu'après la limitation II. K_{La} est de l'ordre de 40 h⁻¹ durant la phase I et de 60 h⁻¹ durant la phase II. Il diminue ensuite en suivant l'évolution de l'oxygène dissous.

2,8 g/l de cellules et 7,2 g/l de gellane sont obtenus en 49 heures de fermentation. La concentration cellulaire maximale obtenue après 24 heures de culture est plus faible de 2,8 g/l par rapport à la fermentation RH250Ox, mais la production de polysaccharide est tout de même très importante. Le rendement de conversion du glucose en matière sèche est de 0,48 g_{matière sèche}/g_{glucose}, et la production spécifique de gellane est égale à 2,52 g_{gellane}/g_{cellules}, soit 91% de plus que pour RH250Ox.

L'évolution de la puissance volumique injectée montre que l'augmentation de la viscosité du moût de fermentation est retardée par rapport aux fermentations précédentes. Pour une concentration finale en polysaccharide similaire à celle de RH250Ox, l'indice de rhéofluidisance n est de 0,53, l'indice de consistance K n'est que de 7,3 Pa.s ^{n} et le seuil de contrainte τ_0 n'est que de 27,1 Pa. L'écoulement devient laminaire après 38 heures de culture. La qualité du mélange obtenu en fin de fermentation est tout à fait similaire à celle obtenue pour la fermentation RH250Ox et le nombre de Reynolds modifié est de 80, ce qui donne une viscosité de procédé de 1,7 Pa.s. La puissance volumique injectée suit durant la phase I une évolution classique, puis cesse d'augmenter tout au long de la phase II alors qu'elle croît fortement pour la fermentation RH250 (figure 4.10). Elle commence ensuite à augmenter un peu avant la limitation II et croît ensuite fortement durant douze heures, puis de plus en plus lentement jusqu'à la fin de la fermentation pour atteindre une valeur finale de 0,26 W/l. L'énergie volumique injectée est de 9,8 W.h/l. Cette valeur est importante car la fermentation a été suivie durant 49 heures.

4.1.2.3.2 Essais en fioles de Fernbach

Des cultures sont réalisées en fioles de Fernbach pour tenter de comprendre les phénomènes d'assimilation des différentes sources d'azote et des limitations de croissance observées en fermenteur.

Une première série de cultures est réalisée avec le même milieu que pour les inoculums à l'exception des sources d'azote. Parallèlement à une culture témoin sur le milieu complet contenant l'azote organique et du nitrate d'ammonium, des cultures sont menées sans azote organique et avec comme source d'azote minéral, soit des ions ammoniums sous forme de NH_4Cl , soit des ions nitrates sous forme de NaNO_3 , soit un mélange de ces deux formes NH_4NO_3 . 16 heures après l'ensemencement, la croissance est importante dans la fiole témoin ainsi que pour les cultures sur NH_4NO_3 et NH_4Cl . Cependant, l'acidification du milieu due à la croissance des microorganismes empêche alors tout développement bactérien. La chute de pH est plus rapide pour la culture sur NH_4Cl et une croissance plus faible que pour les deux autres cultures est observée. Pour la culture sur NaNO_3 , c'est seulement après 24 heures qu'une croissance est observée. Dans ce cas, le développement bactérien ne provoque pas une forte acidification du milieu, ce qui permet d'obtenir une croissance 2 à 3 fois plus importante que dans les autres cas (tableau 4.4).

TABLEAU 4.4 : Influence de la nature de la source d'azote sur la consommation d'azote (première série de cultures en fioles de Fernbach).

Culture	Temps (h)	Azote ammoniacal (g/l)	Azote nitrate (g/l)	Gluc. consommé (g/l)
Témoin	0	0,11	0,15	--
	137	0,03	0,16	6,1
NH_4NO_3	0	0,12	0,17	--
	137	0,04	0,18	2,8
NH_4Cl	0	0,25	--	--
	137	0,17	--	1,5
NaNO_3	0	--	0,35	--
	137	--	0,00	15,7

Après 40 heures de culture, la turbidité de la culture est égale à 11, ce qui correspond approximativement à 6 g/l de matière sèche. Les différences de croissance se retrouvent au niveau de la consommation totale en glucose (tableau 4.4). Les concentrations initiales et finales en azote ammoniacal et nitrate sont reportées dans le tableau 4.4. La comparaison entre la fiole témoin et les fioles sans azote organique indique que les sources d'azote dites complexes utilisées dans le milieu de fermentation n'apportent ni nitrate, ni ammonium. La concentration plus faible observée pour la fiole témoin provient de l'eau

introduite pour l'ajout de la liqueur de maïs.

L'assimilation de l'azote ammoniacal entraîne une forte acidification du milieu de culture et pour toutes les cultures contenant du NH_4^+ , la croissance bactérienne est stoppée pour la même consommation d'azote sous forme NH_4^+ de 0,08 g/l. Par contre, l'assimilation du nitrate n'entraîne pas d'acidification importante du milieu et tout l'azote nitrate (0,35 g/l) a été consommé pour la culture sur NaNO_3 , mais après un temps de latence important. Cette phase de latence est certainement due à une adaptation de la souche qui est auparavant cultivée sur un milieu riche. L'arrêt précoce de la croissance sur NH_4NO_3 permet de mettre en évidence que l'azote ammoniacal est assimilé avant l'azote nitrate. Cette diauxie est également observée en fermenteur puisque seule la première phase de croissance est associée à une acidification du milieu de culture.

Une seconde série de cultures est réalisée sur des milieux fortement tamponnés comportant 2,5 g/l de K_2HPO_4 et 10 g/l de Na_2HPO_4 . Na_2HPO_4 est utilisé comme tampon principal car un essai préliminaire avec 15 g/l de K_2HPO_4 n'a pas donné de croissance. Abstraction faite de ces apports en phosphate, les compositions des milieux sont les mêmes que lors de la première série. Une fiole ne comportant que de l'azote organique en concentration égale à celle du milieu témoin est ajoutée.

Excepté pour la culture sur NH_4Cl pour laquelle le pH est de l'ordre de 5,8 en fin de culture, la force du tampon est suffisante pour maintenir la neutralité du milieu. En ce qui concerne la croissance bactérienne, la force ionique élevée due aux ions phosphates augmente la latence initiale de façon importante (figure 4.11).

La culture sur azote organique est celle où la croissance bactérienne débute le plus tôt, suivie de la culture témoin et de la culture sur NH_4Cl . Une phase de latence importante est une nouvelle fois constatée pour la culture sur NaNO_3 . Pour la culture sur azote organique, la croissance s'interrompt rapidement, le milieu devient peu visqueux et reste hétérogène. Pour les autres cultures, la croissance s'arrête après l'assimilation de tout l'azote minéral ce qui correspond à une turbidité maximale de l'ordre de 10-11. La turbidité de toutes les cultures diminue lentement après avoir atteint sa valeur maximale, sauf pour le nitrate.

Les évolutions de la concentration en azote ammoniacal et nitrate sont reportées dans les figures 4.12a et 4.12b. L'azote minéral est complètement consommé dans tous les cas. Ces évolutions confirment la diauxie observée lors de la première série de cultures. En effet, la consommation de l'azote nitrate commence lorsque tout l'azote ammoniacal est consommé dans le cas des cultures sur milieu contenant NH_4NO_3 . De plus, la consommation de l'azote est rapide pour la culture sur NH_4Cl , alors qu'une phase de latence importante est observée dans le cas de la culture sur NaNO_3 .

La culture sur azote organique mise à part, il est possible de comparer le

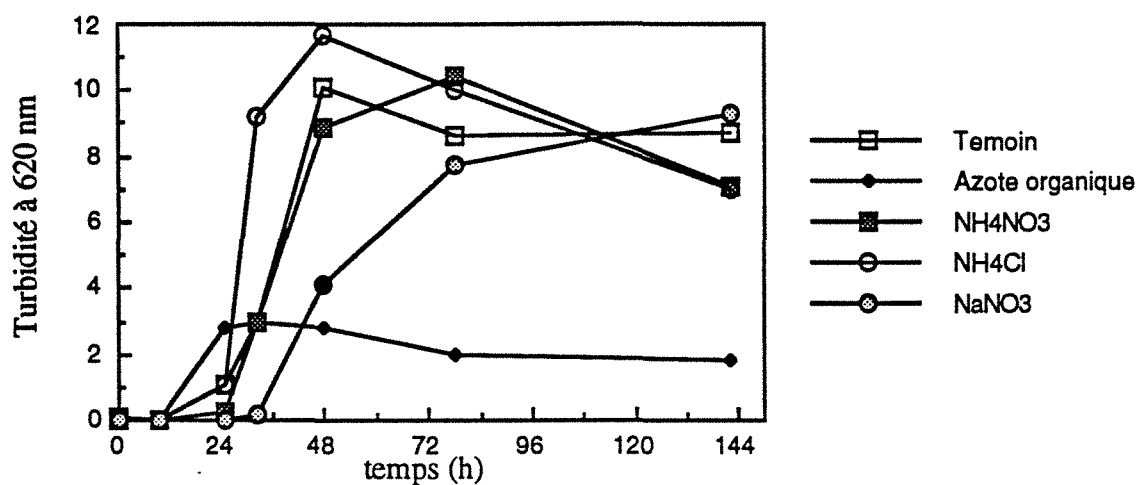
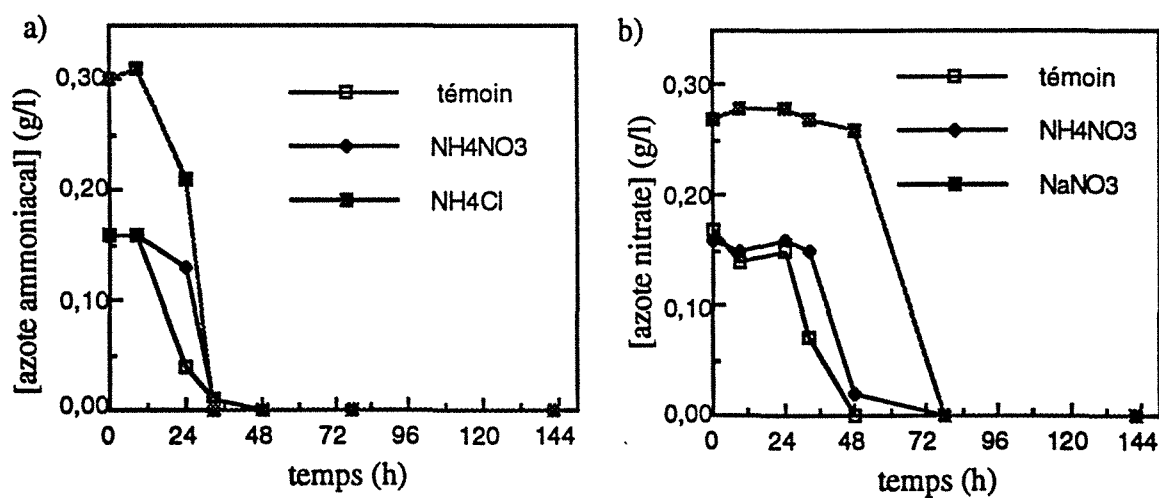


FIGURE 4.11 : Evolution de la turbidité de cultures sur différentes sources d'azote (seconde série de cultures en fioles de Fernbach).



FIGURES 4.12a et 4.12b : Evolution des concentrations en azote ammoniacal et nitrate (seconde série de cultures en fioles de Fernbach).

comportement rhéofluidifiant des moûts obtenus en fin de fermentation car les productions de matière sèche sont comprises entre 7,4 et 8,4 g/l dans tous les cas. Les moûts les plus rhéofluidifiants sont obtenus pour les cultures sur le milieu témoin et sur le milieu à base de NH_4Cl ($n = 0,34$), puis pour celle sur NH_4NO_3 ($n = 0,41$), et finalement pour celle sur NaNO_3 ($n = 0,47$).

La consommation de glucose ne s'interrompt pas une fois l'azote épuisé, mais la vitesse d'assimilation diminue fortement. La composition en acides et sucres du milieu débarrassé des cellules a été analysée par CLHP tout au long de la culture. Les composés identifiés sont : le glucose, le rhamnose qui est initialement à 1 g/l dans le milieu puis assimilé, l'acide pyruvique qui est présent sous forme de traces tout au long de la culture, les acides acétique et formique qui restent à des concentrations inférieures à 0,2 g/l tout au long des cultures, et l'acide lactique. Ce dernier est présent initialement dans tous les cas à des taux allant jusqu'à 0,25 g/l pour les milieux contenant de l'azote organique. Il est par la suite assimilé pour les cultures sur NH_4Cl et sur azote organique, mais au contraire produit pour les autres cultures jusqu'à 1,4 g/l pour le témoin, 0,6 g/l pour NH_4NO_3 , et 0,8 g/l pour NO_3 . Il est donc possible que l'assimilation du nitrate provoque la production d'acide lactique ou que certaines cultures soient contaminées.

4.2. Influence du système d'agitation

L'influence du macromélange sur la production de polysaccharide est étudiée en testant le système TR associé à des contre pales et le système TC sans les contre pales. Les vitesses d'agitation testées sont égales à 475 et 600 tr/min pour le système TR et à 800 tr/min pour le système TC. La vitesse d'agitation de TC800 est fixée à 800 tr/min car à 600 tr/min, le mélange est macroscopiquement moins bon que celui obtenu lors de la fermentation précédente TR600. Les fermentations TR600 et TC800 sont suivies pendant 32 heures et la fermentation TR475 pendant 176 heures. Les principaux résultats de ces fermentations sont reportés dans le tableau 4.5. Les évolutions des taux d'oxygène dissous et gazeux sont reportées sur les figures 4.13 et 4.14. Les évolutions de la puissance volumique injectée et de K_{La} sont reportées sur la figure 4.15.

L'évolution du taux d'oxygène dissous, reflet de l'importance des capacités de transfert, est similaire pour les fermentations TR600 et TC800 (figure 4.13). Alors que les phases I ont la même durée que lors de RH250, la phase II de croissance dure 3 heures pour TC800 et 4 heures pour TR600. Les cultures sont ensuite limitées en oxygène pendant une heure pour TR600 et 1,5 heures pour TC800 avant l'apparition d'une autre limitation de croissance qui se traduit par une remontée du taux d'oxygène dissous jusqu'à 40%. Par la suite, ce pourcentage stagne puis diminue pour devenir nul en fin de culture pour TR600 alors qu'il se stabilise autour de 20 % pour TC800. Le taux d'oxygène gazeux évolue de façon tout à fait semblable à ce qui est observé pour la fermentation RH250, la forte

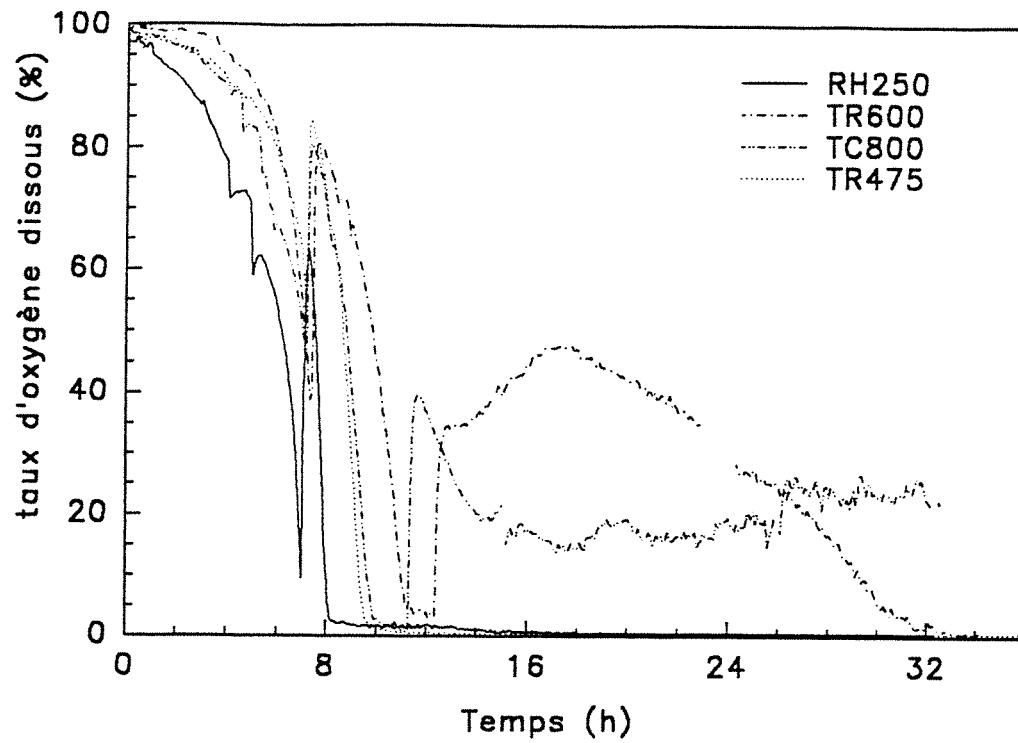


FIGURE 4.13 : Evolution du taux d'oxygène dissous pour les fermentations avec les systèmes d'agitation à turbines.

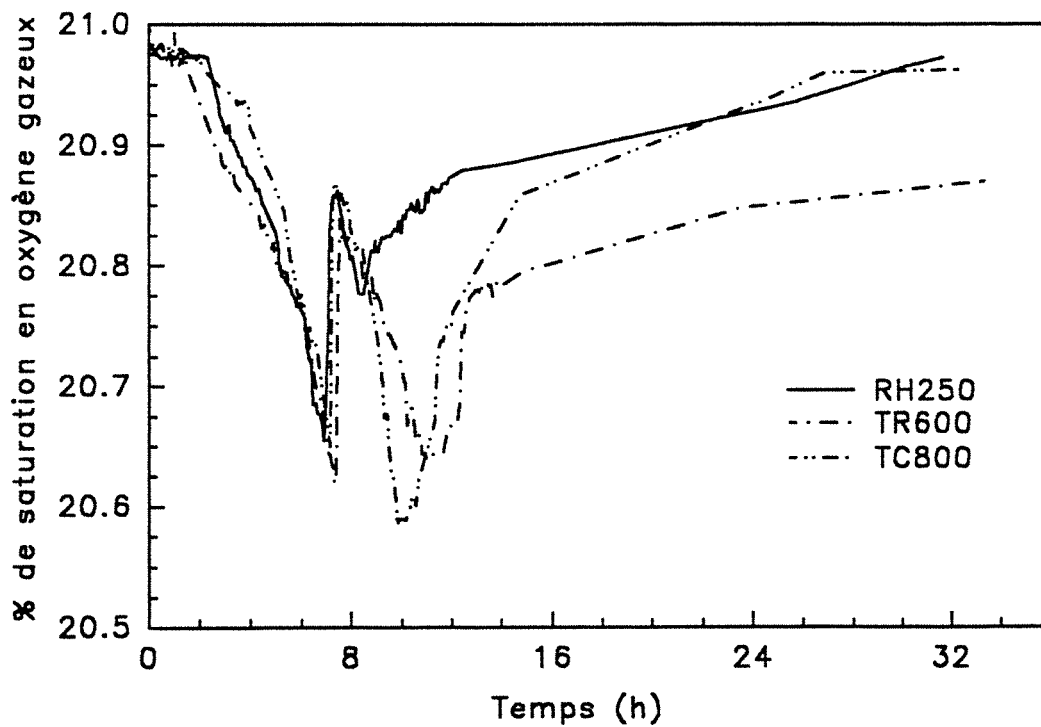


FIGURE 4.14 : Evolution du taux d'oxygène gazeux pour les fermentations avec les systèmes d'agitation à turbines.

croissance cellulaire se traduisant par une consommation d'oxygène plus importante (figure 4.14). La seule différence se situe au niveau de la remontée du taux d'oxygène gazeux après l'installation de la limitation en oxygène qui est rapide pour TC800 alors qu'elle est beaucoup plus nuancée pour TR600. Durant la première phase de croissance (phase I), les valeurs de K_{ja} sont importantes : elles évoluent de 800 h^{-1} à 200 h^{-1} pour TR600 durant la phase I et elle est de 120 h^{-1} pour TC800, cette valeur étant par contre stable (figure 4.15).

TABEAU 4.5 : Principaux résultats obtenus en fin de culture pour les fermentations avec les turbines.

Fermentation	TR475	TR600	TC800
temps de culture (h)	168	33	32
[cellules] (g/l)	3,4 (4,2)*	5,1	5,2
[gellane] (g/l)	3,8 (3,0)*	7,3	7,3
[cellules]/matière sèche totale	0,47	0,41	0,42
[gellane]/[cellules]	1,12	1,40	1,40
glucose consommé (g/l)	34,9 (17,9)*	21,7	22,8
matière sèche/glucose consommé	0,21	0,56	0,55
gellane/glucose consommé	0,11	0,34	0,32
seuil τ_0 (Pa)	7,6 (14,4)*	17,2	47,5
indice n	0,22	0,20	0,31
indice K (Pa.s^n)	8,6	15,5	20,8
viscosité à 80 s^{-1} (Pa.s)	0,28	0,46	1,00
énergie vol. injectée (W.h/l)	18,1	7,3	7,6
énergie vol. injectée/[gellane]	4,76	1,00	1,04

* : après 28 heures de culture

Le macromélange est de très bonne qualité en début de culture pour les deux cultures et une émulsion est même observée pour TR600. Cette émulsion est responsable de la très forte valeur de K_{ja} pour TR600 en début de culture car les valeurs de taux d'oxygène dissous sont surestimées. Cette émulsion se déstabilise rapidement, ce qui provoque la diminution de K_{ja} . Après 24 heures de fermentation, le macromélange est très hétérogène pour les deux cultures. Plus aucun mouvement n'est observé aux abords de la paroi du fermenteur dans les deux cas. La surface du moût est stagnante pour TR600 et le système de régulation du pH a dû être déconnecté. Pour la fermentation TC800, l'hétérogénéité du milieu se développe plus lentement et la surface reste en mouvement grâce à l'aspiration provoquée par la turbine centripète. Le système de régulation du pH a pu être, dans ce cas, conservé jusqu'à la fin de la culture. Cette différence dans la qualité du macromélange se retrouve au niveau de l'évolution de la puissance : alors que la puissance diminue pour

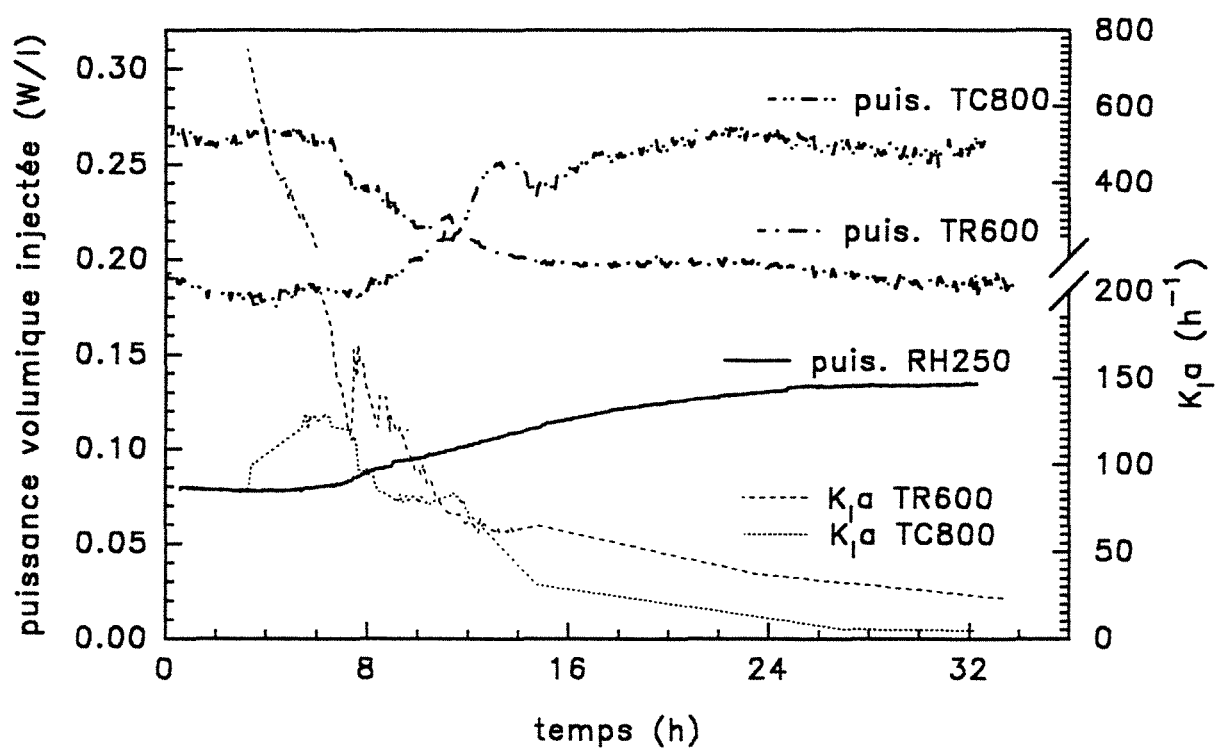


FIGURE 4.15 : Evolution de $K_L a$ et de la puissance volumique injectée pour les fermentations avec les systèmes d'agitation à turbines.

TR600, ce qui est caractéristique d'une cavitation des agitateurs, elle augmente légèrement avec la viscosité du milieu pour TC800 (figure 4.15). L'importance de la cavitation est donc réduite pour TC800 grâce à la recirculation axiale-radiale engendrée par la turbine centripète.

Bien que le macromélange se soit rapidement dégradé pour les deux fermentations, les systèmes à turbine ont permis l'obtention, pour TR600 et TC800 respectivement, de 5,1 et 5,2 g/l de cellules et de 7,3 g/l de gellane dans les deux cas. Pour les deux fermentations, la production spécifique des cellules est de $1,40 \text{ g}_{\text{gellane}}/\text{g}_{\text{cellules}}$ et le rapport de conversion du glucose en matière sèche est de l'ordre de $0,55 \text{ g}_{\text{matière sèche}}/\text{g}_{\text{glucose}}$.

Bien que les concentrations en cellules et en produit soient similaires, les propriétés rhéologiques des deux moûts finaux sont différentes. Le moût de TR600 est très rhéofluidifiant et présente un indice n de 0,20 alors que celui de TC800 est de 0,31. Le moût de TC800 est par contre plus consistant que celui de TR600, l'indice de consistance K étant de $20,8 \text{ Pa.s}^n$ alors qu'il est égal à $15,5 \text{ Pa.s}^n$ pour TR600. Ces comportements expliquent que la viscosité du moût de TR600, calculée à 80 s^{-1} , soit beaucoup plus faible que celle du moût de TC800. Cette différence de comportement se retrouve au niveau de la structuration du moût, le moût de TR600 présentant un seuil de contrainte de 17,2 Pa alors qu'il est égal à 47,5 Pa pour TC800.

Pour TR475, l'hydrodynamique du système évolue de façon similaire à ce qui a été décrit pour les deux fermentations précédentes. Les capacités de transfert du fermenteur sont par contre plus faibles et la réaugmentation du taux d'oxygène dissous après la phase de limitation en oxygène n'est pas observée. Les productions de cellules et de polysaccharide sont, en 178 heures de culture, de 3,4 et 3,8 g/l respectivement. La concentration cellulaire maximale, obtenue après 28 heures de culture, est de 4,2 g/l. La concentration en polysaccharide maximale, obtenue après 55 heures, est de 4,1 g/l. Les deux concentrations diminuent après être passées par leur maximum. Le moût final présente un indice de comportement rhéofluidifiant de 0,22, ce qui est similaire à celui obtenu lors de TR600. L'évolution des propriétés rhéologiques du moût met en évidence une dégradation, l'indice de consistance diminuant en fin de fermentation après avoir été à son maximum après 24 heures de culture, l'indice de rhéofluidisance étant par contre constant. Une différence entre les zones bien agitées et les zones stagnantes est constatée *de visu* après l'arrêt de la fermentation : les zones qui étaient très agitées sont en effet d'une couleur jaune vif alors que les zones qui étaient stagnantes sont d'un jaune beaucoup plus terne. A ce propos, notons cependant que TR475 n'a pas été réalisée avec une souche issue de la même culture que l'ensemble des fermentations.

4.3. Discussion et comparaison des fermentations

Dans ce chapitre, les fermentations sont comparées paramètre par paramètre. Les résultats obtenus étant en grande partie fonction de l'évolution du macromélange, l'hydrodynamique du fermenteur est commentée en premier lieu. Les différents niveaux de production et les rapports existant entre la croissance cellulaire et la production de polysaccharide sont ensuite abordés. Finalement, les propriétés rhéologiques des moûts de fermentation sont comparées.

4.3.1. Qualité de l'agitation et du transfert d'oxygène

L'utilisation du ruban hélicoïdal a comme principal avantage de limiter l'apparition de zones de stagnation dans le fermenteur même pour des fluides très visqueux et rhéofluidifiants comme ceux obtenus en fin de fermentation. Par contre, alors que les capacités de transfert du fermenteur sont importantes durant la croissance initiale, l'augmentation de viscosité du moût provoque une rapide diminution de K_{La} . Cette diminution des capacités de transfert peut être observée sur la figure 4.1 au niveau de la consommation d'oxygène après l'installation de la limitation en oxygène dissous intervenant après 9 heures de culture pour RH250. En effet, si K_{La} restait constant après l'installation de cette limitation, le développement bactérien, même limité, conduirait à une augmentation de la consommation d'oxygène et donc une baisse du taux d'oxygène gazeux. Dans notre cas, la quantité d'oxygène transféré diminue puisque le taux d'oxygène gazeux remonte alors que l'oxygène dissous reste limitant. Par conséquent, cette diminution est principalement causée par la dégradation des capacités de transfert du fermenteur engendrée par l'augmentation de la viscosité du moût importante à ce stade de la culture.

L'évolution de l'écoulement dans le réacteur est mise en évidence par la diminution du nombre de Reynolds modifié Re' qui lui est associé. En début d'expérimentation, Re' est de 140.10^3 pour une vitesse d'agitation de 250 tr/min, ce qui correspond à un écoulement turbulent. Re' diminue ensuite de façon importante en raison de l'augmentation de la viscosité du moût due à l'accumulation du polysaccharide. Brito *et al.* (1992) ayant estimé que l'écoulement est laminaire pour un nombre de Reynolds inférieur à 100 pour ce type d'agitateur, l'écoulement dans le fermenteur est laminaire en fin de culture pour toutes les fermentations avec le ruban hélicoïdal excepté pour RH250 et RH250'. Re' est de 70 en fin de culture pour RH125 et RH250Ox et de 85 pour RH250N. En régime laminaire, il serait possible de calculer le nombre de Reynolds modifié à partir de l'estimation de la viscosité de procédé basée sur l'emploi des corrélations de Metzner et Otto (équation 27) et de Brito (équation 28). Mais le calcul du facteur de proportionnalité k_s tout comme l'estimation de la vitesse de cisaillement moyenne dans le fermenteur ne prennent pas en compte l'aération. De plus, le comportement rhéologique du moût qui est utilisé pour la détermination de la

viscosité de procédé à partir de la vitesse de cisaillement moyenne est celui du fluide non aéré. Avec ces corrélations, la viscosité de procédé pour RH250Ox est de 1,0 Pa.s et le nombre de Reynolds modifié de 140, c'est à dire le double de ce qui est obtenu avec l'extrapolation.

Les turbines permettent d'obtenir en début de fermentation une meilleure dispersion des bulles d'air, qui crée, dans le cas de TR600, une émulsion d'air dans le milieu. Durant la première phase de croissance (phase I), la valeur de K_{Ja} la plus élevée est obtenue avec les turbines Rushton (entre 800 et 200 h^{-1}) à 600 tr/min alors que la valeur de K_{Ja} est de 120 h^{-1} à 800 tr/min avec le système muni de la turbine centripète, et de 85 h^{-1} à 250 tr/min avec le ruban hélicoïdal.

Les différences de capacité de transfert d'oxygène entre les divers systèmes d'agitation se retrouvent au niveau de l'évolution du taux d'oxygène dissous : plus ces capacités sont faibles, plus le taux d'oxygène dissous diminue rapidement (figures 4.8 et 4.13). Néanmoins, excepté pour RH125, le transfert est suffisant pour permettre aux bactéries de se développer à leur vitesse optimale durant cette première phase de croissance car la limitation I survient pratiquement au même moment dans tous les cas. Par la suite, les écarts entre les agitateurs sont plus prononcés lorsque le moût devient visqueux et que la demande en oxygène augmente. Ainsi, alors que pour la fermentation RH250 le taux d'oxygène dissous devient nul en 1 heure, cette durée est triplée avec la turbine centripète et quadruplée avec les turbines Rushton.

Il est néanmoins nécessaire de tenir compte de la qualité du macromélange dans le fermenteur. En effet, pour les fermentations avec turbines, l'agitation devient de plus en plus hétérogène lorsque le caractère rhéofluidifiant du moût est plus marqué et la valeur du taux d'oxygène dissous peut alors être surestimée. En effet, des zones de micromélange appelées "cavernes d'agitation" se forment autour des agitateurs et de larges zones de stagnation apparaissent aux abords des parois, au fond du fermenteur et à la surface du moût. De façon concomitante, le cisaillement devenant très hétérogène, la zone proche des agitateurs, où la viscosité du fluide est la plus faible, devient un chemin préférentiel pour les bulles d'air. Il se forme ainsi une "cheminée" d'aération autour de l'axe d'agitation et le débit d'air au niveau des agitateurs augmente avec le caractère rhéofluidifiant du moût. Cette macroaération provoque la cavitation des agitateurs qui ont alors une efficacité réduite. Dès lors, la sonde à oxygène étant placée à proximité de l'agitateur supérieur, le taux d'oxygène dissous est surestimé et il n'est donc plus représentatif de la totalité du moût. Le calcul de K_{Ja} n'est alors plus valable. Il serait nécessaire de placer d'autres sondes pour avoir une représentation moins localisée du taux d'oxygène dissous.

Le suivi de la puissance injectée dans le fermenteur permet de rendre compte du phénomène de cavitation, car la macroaération au niveau des agitateurs restreint la fraction

volumique de moût qui est en contact avec les mobiles et l'énergie dépensée pour l'agitation diminue. Ce suivi permet de mettre en évidence une forte cavitation pour le système avec les turbines Rushton car la diminution de la puissance est importante (figure 4.15). Par contre, la cavitation est beaucoup plus faible pour le système avec la turbine centripète car la consommation d'énergie augmente légèrement avec l'accumulation de gellane. De plus, les zones de stagnation sont moins importantes avec ce système d'agitation et la surface du moût reste en agitation alors qu'elle est stagnante avec les turbines Rushton. Pour les fermentations avec les turbines, il n'est pas possible d'estimer la valeur du nombre de Reynolds modifié car l'agitation devient hétérogène rapidement.

Le caractère biphasique du moût observé en début de fermentation, décrit en détail en 4.1.1.5, permet d'expliquer la constance en début d'expérimentation non seulement de la puissance volumique injectée pour l'ensemble des fermentations, mais aussi de K_{ja} pour toutes les fermentations, hormis TR600. Généralement, pour la production d'un polysaccharide réellement exocellulaire comme le xanthane, l'accumulation de polymère provoque dès le début de sa synthèse une augmentation de la viscosité du moût qui induit une diminution de K_{ja} . Cette diminution est importante puisque Herbst *et al.* (1987) ont montré que la valeur de K_{ja} est fonction de la viscosité moyenne du fluide à la puissance (-0,7). Dans notre cas, la viscosité du fluide évoluant très peu en début de culture, le transfert d'oxygène n'est pas affecté par l'accumulation de polysaccharide et c'est pourquoi le K_{ja} reste constant. Par contre, dès que le milieu commence à "percoler", ce qui se traduit par l'augmentation de la puissance volumique injectée, le transfert de matière diminue rapidement. L'évolution de K_{ja} en fonction de la puissance volumique injectée est reportée sur la figure 4.16 pour la fermentation RH250.

4.3.2. Production de cellules et de polysaccharide

Bien que la vitesse d'agitation de 250 tr/min utilisée avec le ruban hélicoïdal soit élevée pour ce type d'agitateur de proximité, cet agitateur ne permet pas de transférer tout l'oxygène nécessaire à la croissance et à la production de gellane. Par contre, si ce problème est contourné par un apport supplémentaire d'oxygène (RH250Ox), ou par une réduction des besoins en oxygène de la culture (RH250N), de bonnes productions sont obtenues dans des conditions de macromélange excellentes. Pour les fermentations avec les turbines à forte vitesse d'agitation (TC800 et TR600), les productions sont également importantes bien que l'agitation devienne rapidement hétérogène. Toujours avec un système à turbines, si la vitesse d'agitation est trop faible, les capacités de transfert du fermenteur se dégradent trop rapidement et la fermentation est rapidement limitée en oxygène (TR475).

4.3.2.1. Production de cellules

Le milieu de culture contient de nombreuses sources d'azote mais en faibles quantités : 0,16 g/l d'azote ammoniacal et 0,16 g/l d'azote nitrate apportés par la source

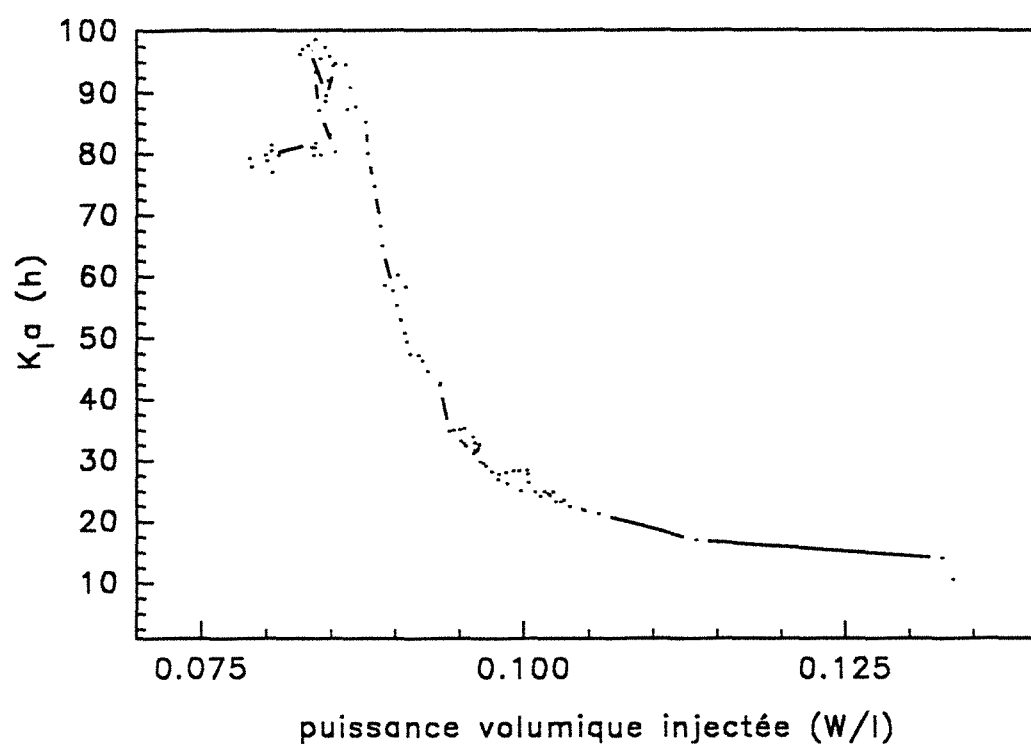


FIGURE 4.16 : Evolution de $K_L a$ en fonction de la puissance volumique injectée pour la fermentation RH250.

minérale NH_4NO_3 , et 0,25 g/l d'azote organique apporté théoriquement par la liqueur de maïs et la peptone papaique de soja. En se basant sur un taux cellulaire d'azote de l'ordre de 10%, 1,6 g/l de cellules peuvent être obtenus à partir de chaque source d'azote minérale, et 2,5 g/l de cellules à partir des sources d'azote organique. La quantité maximale de cellules qui peut être produite est donc de l'ordre de 6 g/l avec le milieu complet. Cette production maximale n'a été obtenue que pour RH250Ox après 24 heures de culture (figure 4.17). Plus l'agitation diminue l'impact de la limitation en oxygène ($\text{RH250Ox} > \text{TR600}$ et $\text{TC800} > \text{RH250}$ et $\text{RH250}' > \text{RH125}$), plus la quantité de cellules produite est importante. La consommation d'azote est également totale pour la fermentation sans azote organique RH250N. La concentration cellulaire maximale est alors de 3,2 g/l. Pour cette fermentation ainsi que pour RH250Ox et les cultures en fioles de Fernbach, la concentration cellulaire diminue après le maximum. Cette diminution, déjà observée par Lobas *et al* (1992), nous informe sur la viabilité cellulaire limitée d'*A. elodea* en phase stationnaire.

La comparaison des fermentations et les cultures réalisées en fioles de Fernbach tend à montrer, en accord avec Lobas *et al.* (1992), que l'azote ammoniacal est la première source d'azote consommée et que son épuisement correspond à la limitation I. La comparaison entre RH250N et la fermentation RH250 pourrait suggérer que l'azote organique est ensuite assimilé et que son absence provoque l'apparition de la phase de latence observée pour RH250N. Cependant, la comparaison de RH250N, RH250Ox et des cultures tamponnées en fioles de Fernbach sur le milieu complet et le milieu NH_4NO_3 sans azote organique permet d'affirmer que c'est l'azote nitrate qui est assimilé après l'azote ammoniacal. En effet, la même turbidité maximale, donc la même croissance cellulaire, est obtenue après la même consommation d'ammoniaque et de nitrate pour les cultures sur le milieu complet et sur NH_4NO_3 . L'arrêt de croissance dans le cas de la culture témoin est certainement causé par une limitation en oxygène due à la forte viscosité du moût et il n'est pas donc dû à une limitation en azote puisque le même milieu a donné lieu à une croissance beaucoup plus importante dans le cas de RH250Ox. Le nitrate est donc la seconde source d'azote assimilée et la consommation d'azote organique ne commence qu'après l'épuisement du nitrate. Les sources d'azote organique permettent, par l'intermédiaire de facteurs de croissance ou de peptides, de supprimer la phase de latence observée pour RH250N avant l'assimilation du nitrate, et d'accélérer les croissances sur azote ammoniacal et nitrate puisque ces croissances sont ralenties pour RH250N. La seconde limitation observée pour RH250N, TR600 et TC800 correspond donc à l'épuisement du nitrate. Pour RH250N, la diminution du taux d'oxygène dissous observée après cette limitation est probablement liée à une dégradation des capacités de transfert du fermenteur causée par la forte augmentation de la viscosité du moût à ce stade de la fermentation. La réaugmentation finale du taux d'oxygène dissous observée pour ces fermentations correspondrait à une diminution de consommation d'oxygène certainement due à une réduction de l'activité cellulaire. Dans le cas de TR600 et TC800, les bactéries se développent sur azote organique

après la limitation en nitrate. Cette croissance n'est pas associée à une augmentation de la consommation d'oxygène. Les besoins en oxygène pour la croissance sont en effet moins importants lorsque des sources d'azote complexes sont assimilées. Il est finalement intéressant de remarquer que l'assimilation de l'ammoniaque entraîne une forte acidification du milieu, alors que la consommation de nitrate ne génère pas d'acidité importante.

4.3.2.2. Production de polysaccharide

La production de polysaccharide est importante pour les fermentations où la limitation en oxygène est réduite. Elle est de 7,5 g/l pour RH250Ox, 7,2 g/l pour RH250N, et 7,3 g/l pour TR600 et TC800 (figure 4.18). Ces productions sont tout à fait comparables aux résultats de Kang et Veeder (1983) avec la même souche et de Lobas *et al.* (1992) avec *S. paucimobilis*. Avec le ruban hélicoïdal à 250 tr/min sans apport supplémentaire en oxygène et avec le milieu complet, la production de gellane brut n'est que de 3,5 g/l dans le même temps de culture, soit 53% de moins que pour RH250Ox. Pour une vitesse d'agitation de 125 tr/min dans le même temps de culture de 32 heures, cette production n'est que de 2,9 g/l et il est nécessaire de multiplier le temps de culture par 2,5 pour obtenir une concentration de gellane de 3,4 g/l (RH125). De même, avec le système à turbines Rushton, la réduction de la vitesse d'agitation de 600 à 475 tr/min diminue la production de polysaccharide à 4,2 g/l (TR475).

Sur milieu complet, la production spécifique de gellane la plus élevée est observée dans le cas des fermentations peu limitées en oxygène (tableaux 4.3 et 4.5). Pour la fermentation RH250N, une concentration cellulaire deux fois plus faible que celle obtenue pour RH250Ox donne une production de polysaccharide comparable. L'absence des sources d'azote organique réduit la vitesse de croissance cellulaire, ce qui diminue les besoins en oxygène. La culture est donc moins limitée en oxygène et la production de polysaccharide a pu se poursuivre après la fin de la croissance bactérienne. La comparaison de RH250N et de RH250, réalisée dans les mêmes conditions hydrodynamiques mais avec les sources d'azote complexes, montre qu'une bonne production de gellane nécessite une adéquation entre les besoins en oxygène de la culture et les capacités de transfert du fermenteur.

Contrairement à certains polysaccharides pour lesquels la phase de croissance et la phase de production sont décalées dans le temps, la synthèse de gellane est couplée à la croissance bactérienne. Ce couplage n'est cependant pas total car, lors de RH250Ox et RH250N par exemple, la production de gellane continue après la fin de la croissance cellulaire (figures 4.17 et 4.18), ce qui se traduit par une diminution du rapport cellules sur matière sèche totale en fin de culture (figure 4.19). Ce rapport diminue également pour les fermentations TR600 et TC800 en fin de fermentation. Néanmoins, la vitesse d'accumulation de polysaccharide diminue après l'arrêt de la croissance cellulaire, que cet arrêt soit dû à une limitation en oxygène ou à une limitation en azote. Il est possible

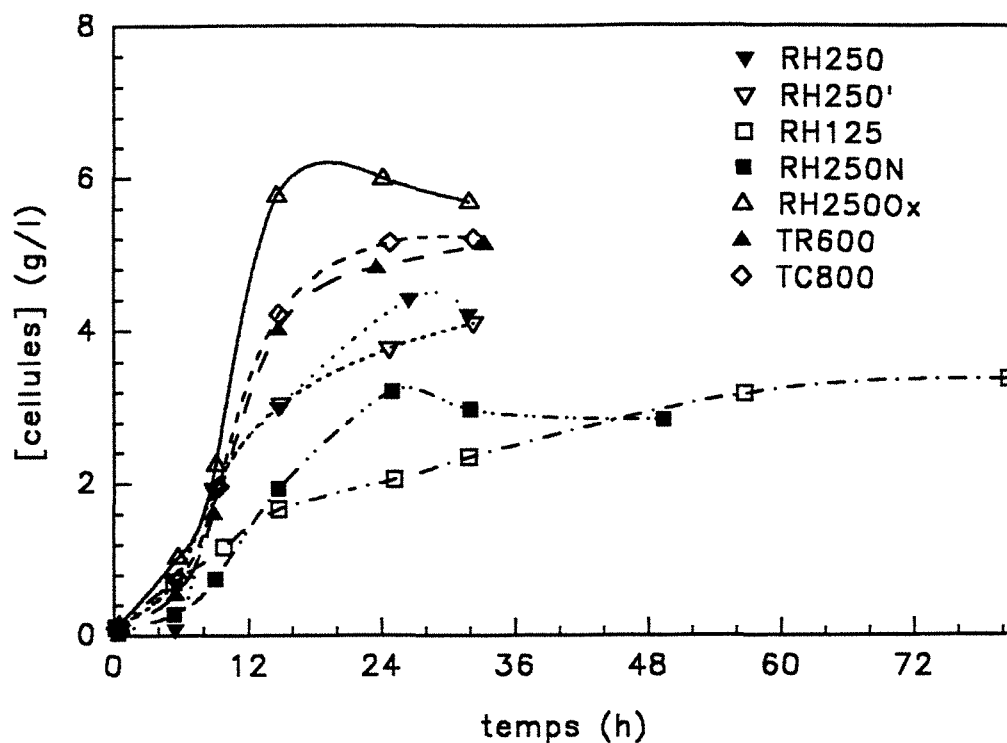


FIGURE 417 : Evolution de la concentration en cellules pour l'ensemble des fermentations.

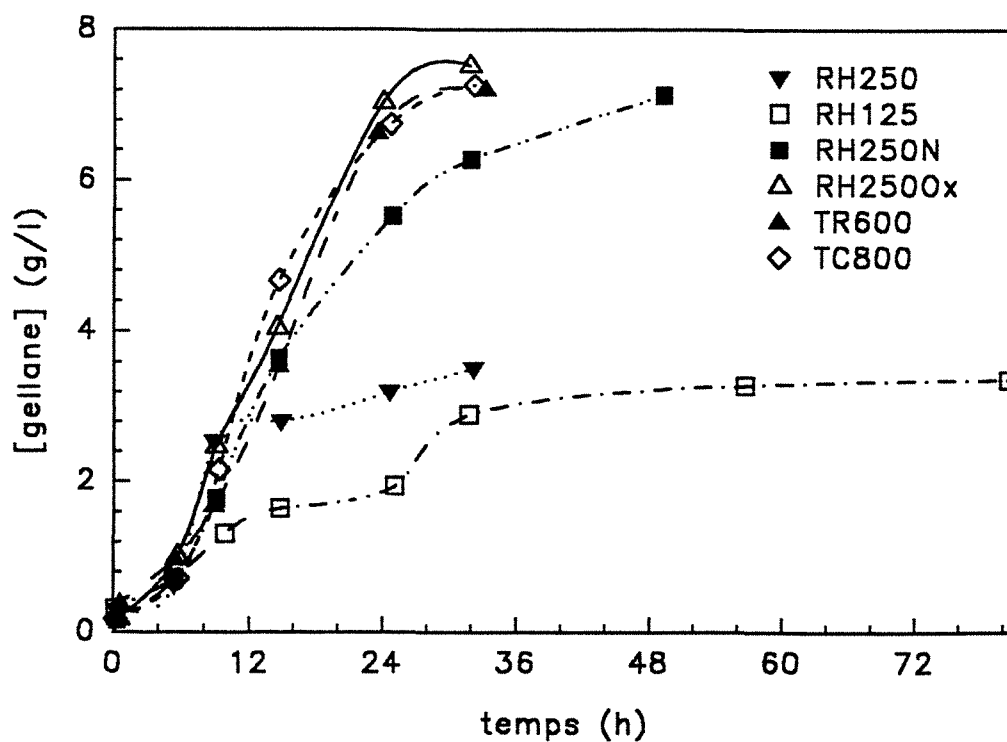


FIGURE 418 : Evolution de la concentration en gellane pour l'ensemble des fermentations.

d'attribuer ce ralentissement à la faible viabilité cellulaire en phase stationnaire précédemment mise en évidence. Lors de la fermentation RH250N, l'arrêt de croissance après la première limitation, observée après 8 heures de culture, permet d'observer le couplage croissance-production (figures 4.8 et 4.10). En effet, la puissance volumique injectée cesse rapidement de croître après cette limitation, et n'augmente à nouveau que lorsque la croissance cellulaire recommence. A ce sujet, il est intéressant de remarquer que la production de polysaccharide s'arrête rapidement après l'épuisement de l'azote ammoniacal alors qu'elle continue plus longtemps après l'épuisement du nitrate. Finalement, en raison du caractère hétérogène du moût de fermentation en début de culture, on ne peut pas savoir si le couplage observé est dû à la physiologie cellulaire ou à des limitations diffusionnelles dues aux agrégats. En effet, bien qu'il n'y ait aucune limitation potentielle en un quelconque substrat du milieu de culture, il est probable que les cellules à l'intérieur des agglomérats muqueux subissent des limitations diffusionnelles internes.

Le ralentissement de la production après la fin de la croissance bactérienne est peut être lié à ce rapport particulier entre les cellules et le polysaccharide. En effet, les cellules étant peu mobiles dans le réseau de polysaccharide, elles se retrouvent rapidement emprisonnées dans leur production et les diffusions des substrats et du polysaccharide à travers cette masse de polysaccharide peuvent s'en trouver affectées. La synthèse de gellane comme le développement bactérien seraient alors ralentis bien qu'il n'y ait pas forcément de limitation au niveau du fermenteur. Si les bactéries sont en développement, la concentration de polysaccharide augmente car les nouvelles cellules peuvent produire leur polysaccharide sans limitation tant que l'accumulation externe de gellane est peu importante, alors que les anciennes bactéries se retrouvent peu à peu limitées. S'il n'y a plus de développement bactérien, la production de polysaccharide s'arrête alors rapidement. D'après les observations au microscope électronique de Lobas *et al.* (1992) dont les clichés ne sont pas publiés, il n'existerait pas de couche de polysaccharide à l'extérieur de *S. paucimobilis*.

Le ralentissement de production de gellane observé pour la culture RH250Ox est peut-être plus simplement dû à une limitation en oxygène. En effet, bien que la sonde donne en fin de fermentation une valeur de taux d'oxygène dissous importante, il est possible que cette valeur surestime le taux réel dans le fermenteur car une forte proportion de bulles d'air remonte directement à la surface autour de l'axe des agitateurs, c'est-à-dire là où se trouve la sonde.

Par ailleurs, la production de gellane nécessite de l'oxygène. En effet, lors de RH250Ox, la demande en oxygène est toujours importante même après la fin de la croissance. De plus, lorsque la vitesse de production de gellane ralentit, les besoins en oxygène sont moindres. De même, pour RH250N, le début de la phase de limitation en oxygène après 20 heures de culture correspond à une inflexion négative sur la courbe de l'évolution de la puissance volumique injectée, cette inflexion traduisant un ralentissement

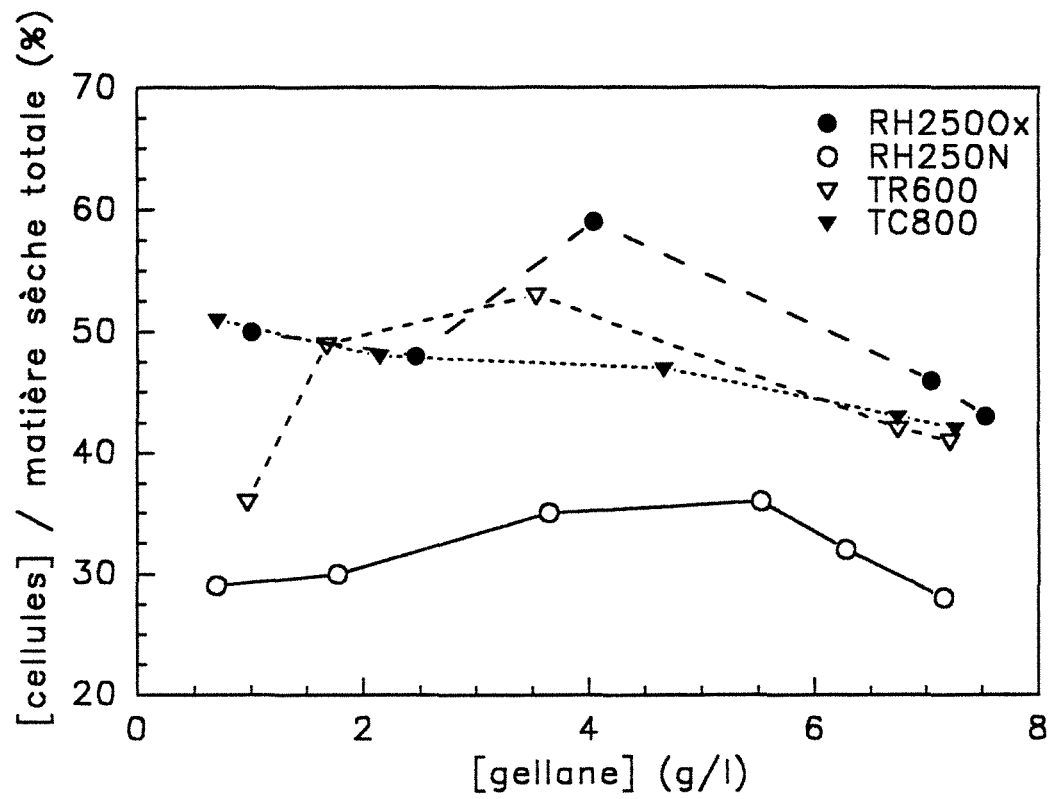


FIGURE 4.19 : Evolution du rapport cellules/matière sèche totale pour les cultures RH2500x, RH250N, TR600 et TC800.

de la vitesse de production de polysaccharide (figures 4.8 et 4.10). Ce phénomène est indépendant de la croissance cellulaire car dès que l'oxygène n'est plus limitant, la courbe de la puissance s'infléchit à nouveau mais positivement, traduisant bien une réaugmentation de la vitesse de production de gellane. Enfin, lors de RH250, la vitesse d'augmentation de la puissance cesse de croître dès le début de la limitation en oxygène (phase III) et diminue dès que le taux d'oxygène dissous devient nul (figure 4.1).

En ce qui concerne la transformation du glucose en matière sèche, le rendement de conversion est de l'ordre de 0,5 pour toutes les cultures excepté pour TR475 qui a été prolongée après l'arrêt de production de polysaccharide jusqu'à consommation totale du glucose. Ce rendement est légèrement supérieur pour les cultures qui ont donné les meilleures productions spécifiques de polysaccharide (tableaux 4.3 et 4.5). Le rendement de conversion du glucose en gellane est plus élevé pour les fermentations ayant donné un rapport cellules sur matière sèche faible. Ce rendement est de 0,32 - 0,34 pour RH250N, TR600 et TC800, de 0,29 pour RH250Ox et de 0,20 pour RH250. Quand les productions de polysaccharide et la croissance cessent, la consommation de glucose continue sans qu'il y ait production d'un composé précipitable à l'isopropanol. Le suivi de la composition du surnageant du moût pour les cultures en fioles de Fernbach a permis de mettre en évidence une production d'acide lactique après croissance sur nitrate. Il est cependant nécessaire de confirmer cette observation en fermenteur car il est possible que cette production soit due à un contaminant. La production d'acide acétique reportée par Lobas *et al.* (1992) n'est détectée qu'en quantité minime lors de nos cultures.

En ce qui concerne l'énergie consommée par l'agitation pour la production de gellane, il est intéressant de comparer les consommations par gramme de polysaccharide synthétisé. La valeur la plus faible, 0,79 W.h/l.g_{gellane}, est obtenue pour RH250Ox. Les valeurs sont ensuite de 1,01 W.h/l.g_{gellane} pour TR600 et 1,04 W.h/l.g_{gellane} pour TC800, fermentations réalisées avec les turbines, de 1,03 W.h/l.g_{gellane} pour la fermentation RH250, et finalement de 1,26 W.h/l.g_{gellane} pour la fermentation RH250N. Dans le cas de RH250N, la consommation est importante car le temps de culture est plus long. Elle est également importante pour TC800 et TR600 car la vitesse d'agitation est élevée dès le début de la culture. Il serait cependant possible de réduire cette consommation en optimisant la vitesse d'agitation par rapport aux besoins en oxygène du fermenteur.

Nous avons établi, pour les fermentations réalisées avec le ruban hélicoïdal, une relation entre la puissance volumique injectée et la concentration en gellane (figure 4.20). Cette relation, (puissance vol. = 0,039 [gellane]) n'est valable qu'à partir d'une concentration en polysaccharide de 2,5 g/l, c'est-à-dire après que le moût soit devenu tout à fait homogène. Une relation différente, (puissance vol. = 0,041 [gellane] - 0,062) est nécessaire pour la fermentation RH250N.

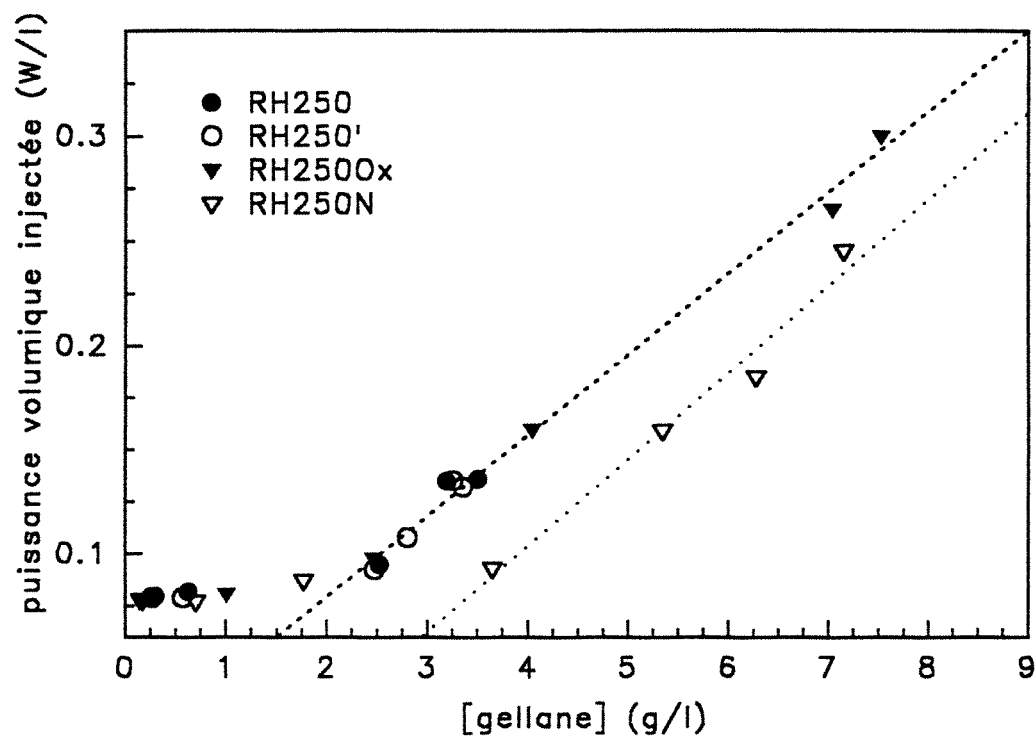


FIGURE 4.20 : Evolution de la puissance volumique injectée en fonction de la concentration en gellane pour les fermentations avec le ruban hélicoïdal à 250 tr/min.

4.3.3. Propriétés rhéologiques des moûts

Afin de comparer l'évolution de la viscosité des moûts pour l'ensemble des fermentations, celle-ci est calculée pour une vitesse de cisaillement de 80 s^{-1} (figure 4.21). Ces évolutions reflètent les différences de concentration en polysaccharide entre les fermentations fortement limitées en oxygène, RH250, RH250' et RH125, et les fermentations peu limitées en oxygène, RH250N, RH250Ox, TR600 et TC800. La comparaison des viscosités obtenues pour les fermentations RH250Ox, TC800 et TR600, pour lesquelles l'évolution de la concentration en polysaccharide est similaire, montre également que le moût de TR600 est beaucoup moins visqueux que les deux autres.

Ces différences sont observées plus en détail sur les moûts en fin de fermentation. Pour RH250Ox, TR600 et TC800, bien que les concentrations finales en polysaccharide soient équivalentes et que l'énergie consommée pour l'agitation soit du même ordre de grandeur, les propriétés rhéologiques de ces moûts sont différentes. En fait, les meilleures conditions de macromélange durant la fermentation ont donné les moûts les moins rhéofluidifiants. Ainsi, l'indice n de comportement rhéofluidifiant est égal à 0,20 pour TR600, 0,31 pour TC800 et 0,40 pour RH250Ox. L'indice de consistance K varie également. Il est du même ordre de grandeur ($\approx 16 \text{ Pa.s}^n$) pour TR600 et RH250Ox mais est plus important de 25% pour TC800. Ces différences sont difficiles à commenter car les valeurs de K dépendent de l'indice de comportement rhéofluidifiant des fluides.

Le milieu de fermentation de RH250N ne contenant pas d'azote organique, les propriétés rhéologiques du moût ne peuvent être directement comparées avec celles des autres fermentations car la présence des sources complexes d'azote peut avoir un effet important sur l'état d'agrégation du polymère. De plus, la concentration cellulaire en fin de culture est très différente de celle obtenue pour les trois fermentations précédentes. Pour cette culture, l'indice n est de 0,53 et l'indice K de $7,0 \text{ Pa.s}^n$.

Pour les fermentations "limitées", les propriétés rhéologiques des moûts en fin de culture sont également différentes pour des concentrations finales en gellane équivalentes. L'indice de consistance K du moût final est en effet égal à $2,3 \text{ Pa.s}^n$ pour RH125, et il est de $4,0 \text{ Pa.s}^n$ pour la fermentation RH250, l'indice n étant identique pour les deux cultures. La viscosité du moût de RH125 est donc plus faible que celle du moût de la fermentation RH250 à même concentration en polysaccharide et c'est peut-être pourquoi la production de polysaccharide se poursuit pour RH125 malgré la limitation en oxygène.

La valeur de l'indice n de rhéofluidisance varie avec la concentration en polysaccharide. Cet indice diminue dans un premier temps avec l'accumulation de polysaccharide et un minimum est observé pour une concentration en gellane de l'ordre de 2 à 3 g/l selon les conditions d'agitation (figure 4.22). Il augmente ensuite avec la concentration en gellane de façon plus ou moins importante suivant le système d'agitation

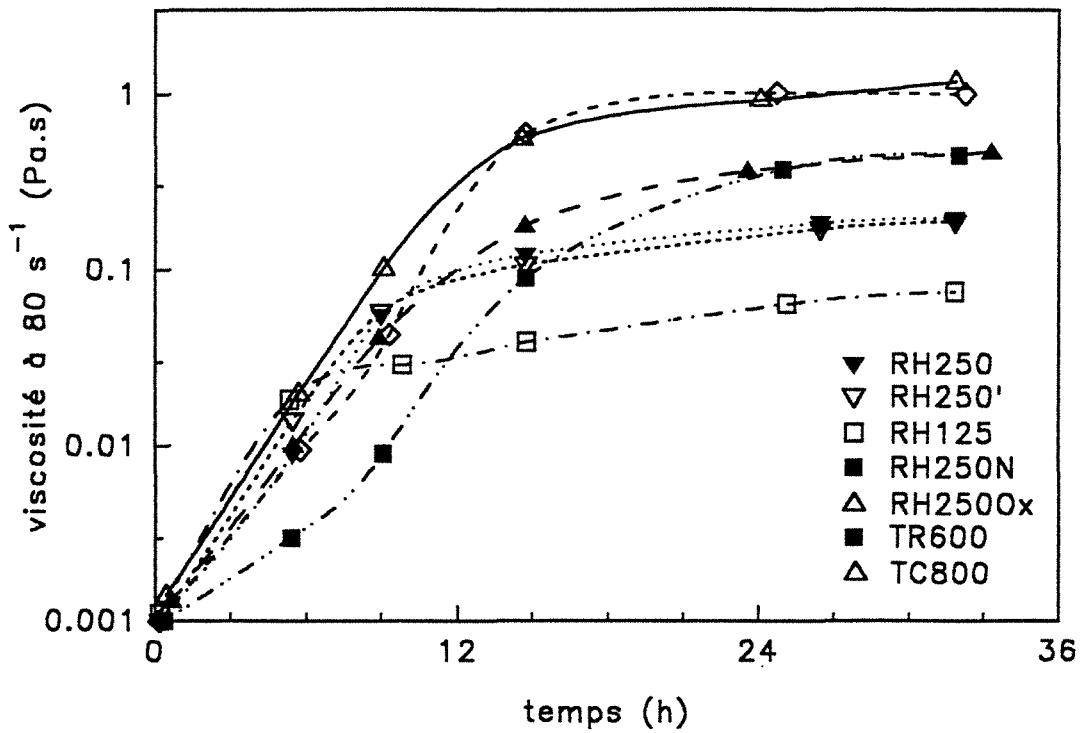


FIGURE 421 : Evolution de la viscosité du moût à 80 s^{-1} pour l'ensemble des fermentations.

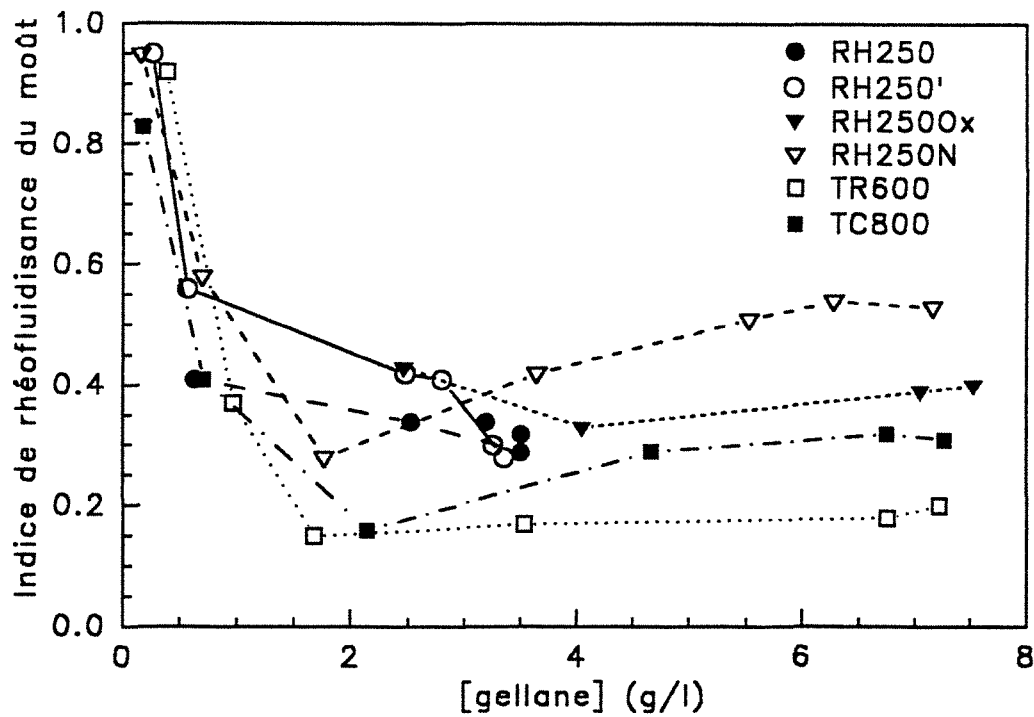


FIGURE 422 : Evolution du comportement rhéofluidifiant du moût pour les fermentations RH2500x, RH250N, TR600 et TC800.

utilisé. Une dégradation du polysaccharide ne peut être responsable de cette augmentation car pour la fermentation longue TR475, l'indice n est globalement constant à partir de 28 heures de culture jusqu'à la fin de la culture alors que la concentration en polysaccharide ne varie plus de façon importante.

En ce qui concerne le caractère gel du moût évalué par le seuil de contrainte, des différences sont observées entre les fermentations. La racine carrée du seuil de contrainte τ_0 peut être reliée à la concentration en gellane à l'aide d'une relation linéaire (figure 4.23). Des différences de capacité de structuration du moût sont ainsi mises en évidence puisque la même droite ($\tau_0 = 1,01 [\text{gellane}] - 0,28$) peut être utilisée pour les moûts de la fermentation RH250, la fermentation RH250Ox et la fermentation TC800, alors que deux autres relations sont nécessaires pour TR600 ($\tau_0 = 0,54 [\text{gellane}] + 0,06$) et RH250N ($\tau_0 = 0,57 [\text{gellane}] - 0,13$). La même relation n'est pas utilisée pour ces deux cultures en raison de la différence de composition du milieu. La relation entre le seuil de contrainte et la concentration en polysaccharide dépend donc des conditions de production, et elle permet d'estimer facilement, dans des conditions de fermentations données, la concentration en polysaccharide dans le moût de fermentation sans passer par l'étape de précipitation. Il reste à déterminer si les différences observées sont dues aux caractéristiques propres du polysaccharide produit ou à des facteurs d'agrégation présents dans les différents moûts. Remarquons que la contrainte seuil évolue avec le carré de la concentration en polysaccharide, ce qui signifie que le moût présente une forte capacité d'agrégation, cette agrégation étant due à une association coopérative des brins de polymère.

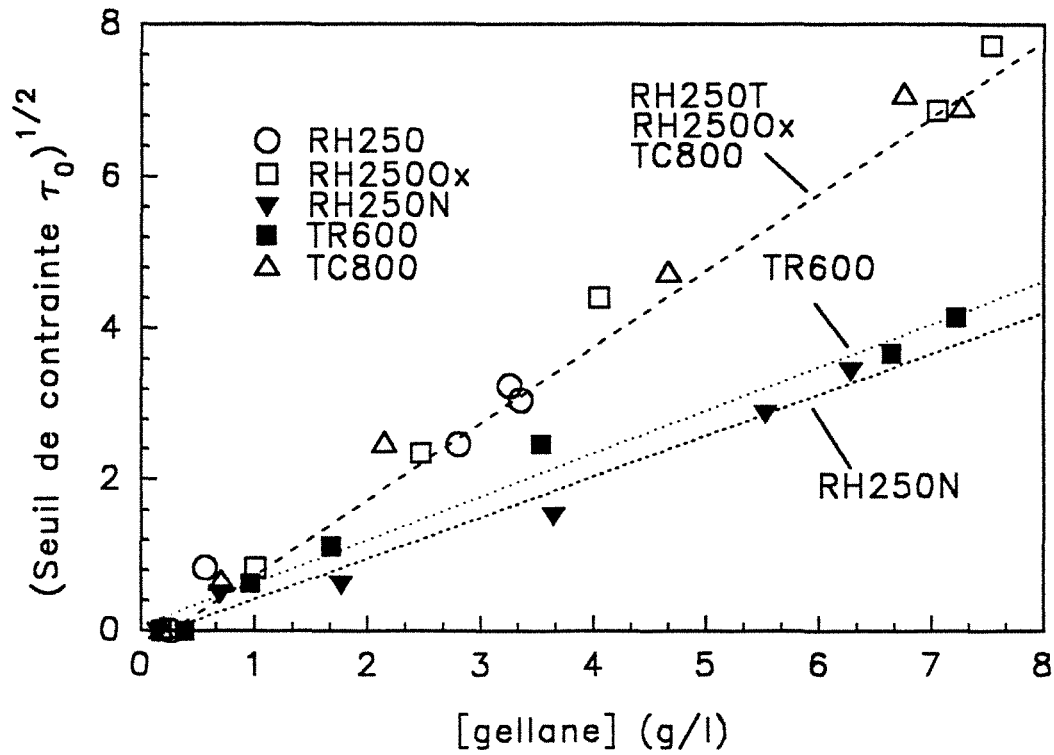


FIGURE 4.23 : Evolution de la racine carrée du seuil de contrainte en fonction de la concentration en gellane.

CHAPITRE 5 : CARACTÉRISATION DES GELLANES SYNTHÉTISÉS

5. Caractérisation des gellanes synthétisés

La composition chimique des gellanes obtenus en fermentation est étudiée en premier lieu sur les produits bruts extraits des moûts de fermentation car ceux-ci seront utilisés dans les fluides de forage. Les caractéristiques physico-chimiques du polysaccharide sont ensuite déterminées à partir de solutions clarifiées. Cette étude est menée sur le polysaccharide natif et sur le polysaccharide désestérifié. Le terme gellane natif s'applique au polysaccharide non désestérifié. Les dénominations attribuées aux différents produits correspondent aux désignations précédemment utilisées pour les fermentations.

5.1. Composition des gellanes bruts

Le gellane brut est composé des débris cellulaires et du polysaccharide. Le produit utilisé pour ces analyses a subi une seconde précipitation de façon à éliminer le maximum de résidus de fermentation. La remise en solution de la poudre obtenue est effectuée dans de l'eau déionisée par une agitation mécanique de 16 heures à 40°C. Une concentration en gellane brut de 1 g/l est choisie car elle permet de travailler avec une quantité importante de polymère sans que la solution soit trop visqueuse. Les solutions obtenues dans ces conditions sont homogènes. La concentration en gellane natif dans cette solution est déterminée par dosage des sucres totaux à l'anthrone. La turbidité ainsi que les concentrations en gellane, protéines et PHB des solutions de gellane brut sont reportées dans le tableau 5.1. La marge d'erreur sur ces mesures est au maximum de 5%.

TABLEAU 5.1 : Turbidité et composition des solutions à 1 g/l des différents gellanes bruts.

Gellane	Turbidité _{620 nm}	[gellane] (g/l)	[protéines] (g/l)	[PHB] (g/l)
RH250	1,68	0,30	0,23	0,24
RH250'	1,65	0,31	0,23	0,24
RH125	1,85	0,32	0,28	0,28
RH250Ox	1,39	0,47	0,14	0,21
RH250N	1,02	0,53	0,14	0,23
TR600	1,51	0,41	0,18	0,22
TC800	1,58	0,42	0,19	0,24

Les concentrations obtenues ne peuvent pas être strictement comparées entre elles car d'une part les teneurs en humidité des poudres de gellane brut sont différentes, et d'autre part la qualité de la précipitation a une influence importante sur leur teneur en sel.

Il est intéressant de remarquer sur la figure 5.1 que la concentration en protéines et

la turbidité des solutions sont reliées, exceptée pour la solution de gellane RH250N, par une relation linéaire qui peut permettre de déterminer rapidement la teneur en protéines pour une solution de gellane brut à 1 g/l. La turbidité des solutions est donc due aux débris cellulaires dont la teneur en protéines est constante.

Les teneurs en PHB obtenues sont importantes pour tous les produits. Il est intéressant de connaître les rapports PHB/protéines, qui sont reportés dans le tableau 5.2, car le PHB, comme les protéines, est un composé intracellulaire. RH250N mise à part, les rapports PHB/protéines sont plus élevés pour les fermentations ayant donné de fortes productions de cellules. Il est possible que la production de PHB soit plus importante lorsque les cellules se développent sur l'azote organique, qui est la dernière source d'azote assimilée, que lorsqu'elles se développent sur l'azote minéral qui a été complètement consommé pour toutes ces fermentations. Ce résultat est en contradiction avec le résultat obtenu pour RH250N puisque cette fermentation donne le plus fort rapport observé alors que le milieu de fermentation ne contient pas d'azote organique. Cependant, deux facteurs peuvent être responsables de cette production importante : la réduction de la vitesse de croissance cellulaire due à l'absence des sources d'azote complexes, et le temps de culture plus long. Finalement, le rapport PHB/protéines est plus important pour les produits issus des fermentations ayant donné les plus fortes productions spécifiques de gellane, mais aucun lien direct n'a pu être établi. Les productions de PHB et de gellane suivent donc des processus différents.

Des clichés au microscope électronique d'une solution lyophilisée sont présentés en annexe. On observe un réseau de polymère dont la formation est probablement due à la lyophilisation. Sur l'agrandissement x 30 000, on constate que l'intégrité des cellules est affectée par les opérations d'extraction.

TABLEAU 5.2 : Rapport PHB/protéines des solutions initiales à 1 g/l.

Produit	RH250	RH250'	RH125	RH250Ox	RH250N	TR600	TC800
PHB/protéines	1,07	1,03	0,98	1,42	1,64	1,20	1,21

5.2. Caractérisation physico-chimique des gellanes natifs

L'étude des caractéristiques physico-chimiques du polymère nécessite une étape de purification, appelée clarification, qui a pour but d'éliminer le maximum de résidus de fermentation.

5.2.1. Mise au point de la clarification

Les méthodes de clarification du gellane citées dans la littérature sont basées sur une centrifugation ou une filtration lorsque la viscosité de la solution est faible, c'est-à-dire

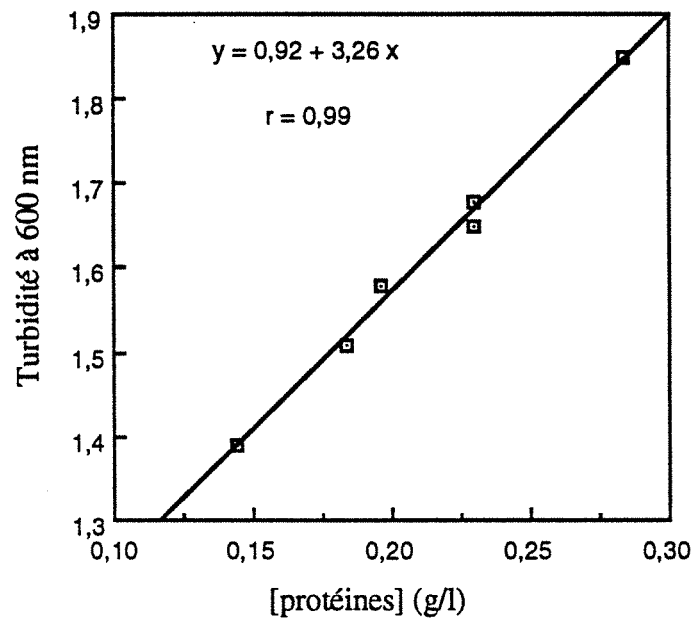


FIGURE 5.1 : Evolution de la turbidité à 600 nm des solutions de gellane à 1 g/l en fonction de la teneur en protéines.

lorsque le gellane est en conformation désordonnée. Ainsi, Carroll *et al.* (1983) dissolvent le gellane brut dans du DMSO et clarifient facilement la solution car le polysaccharide est en conformation désordonnée dans ce solvant. Kang et Veeder. (1983) clarifient pour leur part des solutions aqueuses de gellane désestérifié par filtration à chaud. Cette dernière méthode est difficile à mettre en œuvre pour le gellane natif car sa température de transition sol-gel est de 65-70°C alors que celle du gellane désestérifié est de l'ordre de 40°C (tableau 2.4). Le but de nos travaux étant de mettre en évidence les différences pouvant exister entre les produits obtenus par fermentation, il est nécessaire de développer une méthode de clarification permettant d'extraire le maximum de polysaccharide natif dans les meilleures conditions possibles. Cette méthode ne peut donc faire appel ni à une désestérification, ni à l'emploi du DMSO qui est susceptible de dégrader le polymère. Il est d'ailleurs probable que la méthode de clarification au DMSO conduise à un fort taux de contamination du polysaccharide par des protéines. En effet, le DMSO détruisant les cellules, les protéines intracellulaires se retrouvent en solution avec le gellane et il est alors difficile de les éliminer. Il est par ailleurs essentiel de développer une méthode de clarification permettant de minimiser les pertes de polysaccharide car il est difficile de savoir si une fraction perdue lors d'une étape de purification est représentative de la globalité du polysaccharide.

La principale difficulté rencontrée lors de la clarification est due au fait que le polysaccharide et les cellules ne sont complètement dissociés que lorsque le polysaccharide est en conformation désordonnée. En effet, même pour une solution de gellane brut à 1 g/l, il n'est pas possible, comme c'est le cas pour le xanthane par exemple, de séparer de façon efficace le polymère des cellules par centrifugation ou filtration. Une "vraie" solution est obtenue si elle est chauffée jusqu'à 85 - 90°C, et la séparation peut alors être envisagée à une température supérieure à la température de gélification qui est de l'ordre de 65 à 70°C. La centrifugation à haute température est préférée à la filtration pour des raisons d'ordre pratique et pour éviter les problèmes de colmatage. Les paramètres que nous avons étudiés pour optimiser l'extraction du gellane sont : le temps et la température de préchauffage des solutions avant la clarification, la salinité de la solution et le temps de centrifugation. Les clarifications sont menées sur des solutions préparées à 1 g/l. La centrifugation est réalisée à 13 000 g et à une température comprise entre 35 et 40°C. Les solutions sont donc préchauffées à une température supérieure à 70°C pour que la centrifugation s'effectue au-dessus de la température de gélification. La qualité de la clarification est appréciée par la lecture de la turbidité à 620 nm du surnageant de centrifugation.

Une première série d'essais montre que l'absence de prétraitement à chaud ne permet pas de récupérer plus de 20% du polysaccharide. Paradoxalement, la présence d'un inhibiteur de gélification comme le TMACl à une concentration de 10^{-3} à 10^{-1} M diminue le taux de récupération. De même, après un prétraitement de 20 min à 95°C, les meilleurs taux de récupération sont obtenus en absence de sel, la présence de 10^{-1} M de TMACl

conduisant même à une gélification de la solution. En fait, dans le cas du gellane désestérifié, la température de prise de gel du gellane natif doit probablement croître lorsque la force ionique de la solution est augmentée, ce qui expliquerait l'effet des sels sur l'efficacité de la centrifugation. Des essais complémentaires réalisés avec ou sans chauffage avec des séquestrants comme l'EDTA et le citrate de sodium ne permettent pas d'obtenir un meilleur taux de récupération.

Une seconde série d'essais montre qu'un temps de préchauffage de 20 min permet d'obtenir une meilleure récupération du polysaccharide et que le taux de récupération de polysaccharide augmente avec la température de préchauffage (tableau 5.3). Il est par contre déconseillé de chauffer la solution de polysaccharide au-delà de 95°C car le surnageant de centrifugation est alors moins limpide, la destruction des cellules entraînant certainement la libération du PHB. Un temps de centrifugation de 30 min permet d'obtenir une bonne séparation.

TABLEAU 5.3 : Influence de la température de prétraitement sur la récupération du gellane.

Température (°C)	65	75	85	90	95	99
Taux de récupération (%)	55	60	75	78	76	89

Les opérations de clarification consistent finalement en : une remise en solution du polysaccharide à 1 g/l dans de l'eau déionisée par une agitation mécanique de 16 h à 40°C, suivie d'un préchauffage de 30 min à 90°C dans le bol de centrifugation, lui-même immédiatement suivi d'une centrifugation de 30 min à 40°C et à 13 000 g. Les impuretés résiduelles dans le surnageant sont éliminées par une filtration à 90°C environ sur un filtre en nitrocellulose de 0,8 µm de porosité.

5.2.2. Clarification des solutions

Le protocole de clarification mis au point est utilisé pour tous les produits de fermentation. La turbidité à 620 nm des solutions centrifugées et filtrées, le taux de récupération du polysaccharide lors de l'étape de centrifugation ainsi que les concentrations en gellane et en protéines des solutions filtrées sont reportés dans le tableau 5.4. La marge d'erreur sur la concentration en gellane est inférieure à 2%.

On constate que la clarification permet, excepté dans le cas du gellane de RH250', de conserver une bonne proportion du polysaccharide initialement présent. Les teneurs en protéines des solutions filtrées sont très faibles et ces solutions sont exemptes de PHB et de cellules puisque leur turbidité à 620 nm est nulle.

Un cliché, reporté en annexe, pris en microscopie électronique d'une solution clarifiée montre un réseau de fibres de gellane. L'agrandissement d'un facteur 30 000 d'une

fibre de gellane est également présenté.

TABLEAU 5.4 : Turbidité des surnageants de centrifugation avant et après filtration, taux de récupération après centrifugation et concentrations en gellane et en protéines dans les solutions filtrées.

Gellane	Turbidité _{620 nm}		[gellane] (g/l)	Tx de récupération. (%)	[protéines] (g/l)
	Surnageant	Filtrat			
RH250	0,01	0,00	0,19	91	0,02
RH250'	0,00	0,00	0,22	70	0,01
RH125	0,01	0,00	0,31	97	0,03
RH250Ox	0,30	0,00	0,46	97	0,01
RH250N	0,00	0,00	0,42	80	0,01
TR600	0,02	0,00	0,36	90	0,02
TC800	0,03	0,00	0,36	84	0,01

5.2.3. Degré d'estérification du polymère

Le degré d'estérification des différents polysaccharides est étudié car c'est un paramètre qui varie en fonction des conditions de production pour de nombreux polysaccharides, et qui peut avoir une influence notable sur le comportement du polysaccharide en solution. Les concentrations en ester et en acétate, déterminées à partir des solutions de gellane filtrées, sont reportées dans le tableau 5.5. Les concentrations en glycérate sont déduites par différence. Les taux d'estérification du gellane, c'est-à-dire les rapports molaires d'ester par séquence de tétrasaccharide sont calculés à partir de ces valeurs et regroupés dans le tableau 5.5. La marge d'erreur sur les concentrations en ester et acétate est inférieure à 3%.

TABLEAU 5.5 : Concentrations en ester et en acétate dans les solutions filtrées de gellane natif, taux d'estérification par l'acétate et par le glycérate.

Gellane	[ester]	[acétate]	acétate/gellane	[glycérate]	glycérate/gellane
	(mol/l) 10 ⁻³	(mol/l) 10 ⁻³	(%)	(mol/l) 10 ⁻³	(%)
RH250	0,33	0,21	74	0,12	41
RH250'	0,28	0,19	76	0,09	36
RH125	0,50	0,35	86	0,15	41
RH250Ox	0,40	0,29	47	0,11	18
RH250N	0,35	0,28	50	0,07	13
TR600	0,37	0,23	49	0,14	28
TC800	0,33	0,23	48	0,10	20

Il ressort de ces analyses que les gellanes produits dans les conditions limitantes en oxygène, c'est-à-dire RH250, RH250' et RH125, sont fortement estérifiés, en particulier le gellane RH125 qui a été produit dans les conditions les plus limitantes. Pour les autres gellanes, le degré d'estérification par l'acétate est de l'ordre de 50 % et correspond à ce qui a été obtenu par Kuo *et al.* (1986). Le degré d'estérification par le glycérate est également plus élevé pour les produits obtenus dans des conditions de fermentation limitantes en oxygène. Ces taux sont beaucoup plus faibles que la valeur de 100% citée par Kuo *et al.* (1986) et Chang et Kobzeff (1992) pour le gellane natif produit par Kelco.

Il est possible que notre dosage du degré d'estérification par la méthode d'Hestrin étalonné par rapport à l'acétylcholine ne prenne pas en compte tout le glycérate présent. Nous avons tenté de vérifier la validité de notre mesure par une analyse en CLHP pour quantifier spécifiquement le glycérate libéré par hydrolyse à l'acide sulfurique ou chlorhydrique du gellane. Cette méthode n'a pas pu lever l'indétermination car un produit de décomposition de l'acide glucuronique présente un temps de rétention pratiquement identique à celui de l'acide glycérique sur la colonne que nous avons utilisée. Nous nous sommes alors placés dans les conditions d'hydrolyse de Kuo *et al.* (1986) qui mettent en jeu de l'acide trifluoroacétique. Cette hydrolyse a également donné un composé qui présente en CLHP un temps de rétention très proche de l'acide glycérique.

5.2.4. Spectres en infrarouge

Des analyses en infrarouge sont réalisées pour tenter de mettre en évidence les différences de degré d'estérification entre les produits et pour vérifier l'efficacité des purifications.

Dans un premier temps, nous avons comparé du gellane commercial avec un polysaccharide désestérifié et clarifié issu de nos fermentations. Le gellane commercial analysé a subi le même processus de clarification que nos produits. Les spectres reportés sur la figure 5.2 ne montrent aucune différence importante entre ces deux produits. La clarification de nos produits désestérifiés semble donc efficace.

La comparaison des spectres obtenus pour les polysaccharides clarifiés natif et désestérifié met en évidence la présence de deux bandes autour de $1720\text{-}1740\text{ cm}^{-1}$ et de bandes plus intenses autour de $1200\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ (figure 5.3). Les bandes situées autour de $1720\text{-}1740\text{ cm}^{-1}$ correspondent selon les tables aux liaisons esters. Des spectres sont analysés pour un ester d'acétate (l'acétylcholine), et un ester méthylique de glycérate. L'ester de glycérate présente deux bandes à 1738 et 1720 cm^{-1} et l'acétylcholine une seule bande à 1738 cm^{-1} (figure 5.4). Les pics des deux esters se chevauchant, il n'est donc pas possible de quantifier l'estérification du gellane. Néanmoins, ces études ont permis de confirmer la présence des deux esters. L'agrandissement de la zone $1600\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ est reportée sur la figure 5.5 pour le gellane RH250.

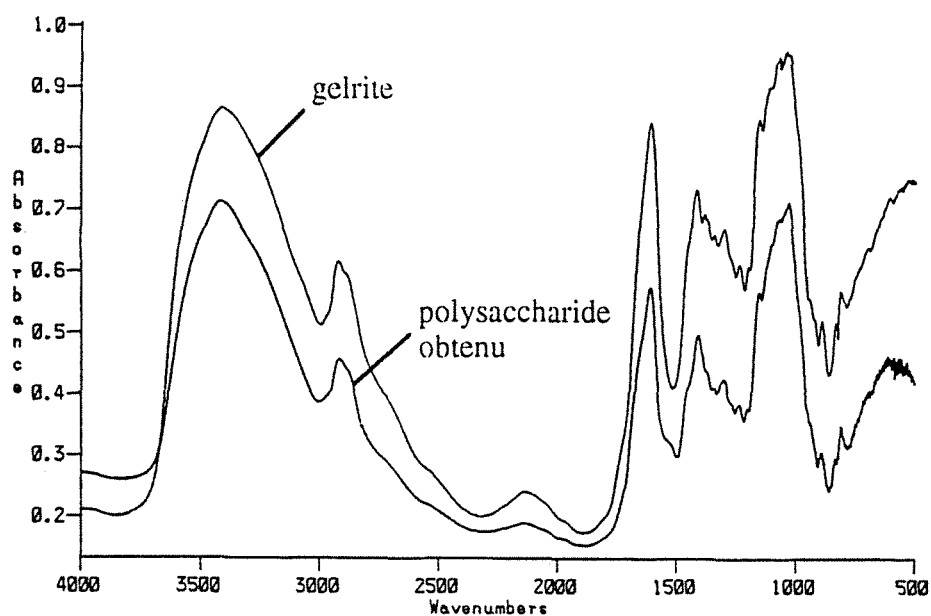


FIGURE 5.2 : Spectres infrarouge du Gelrite et du polysaccharide déstérifié et clarifié obtenu lors de cette étude.

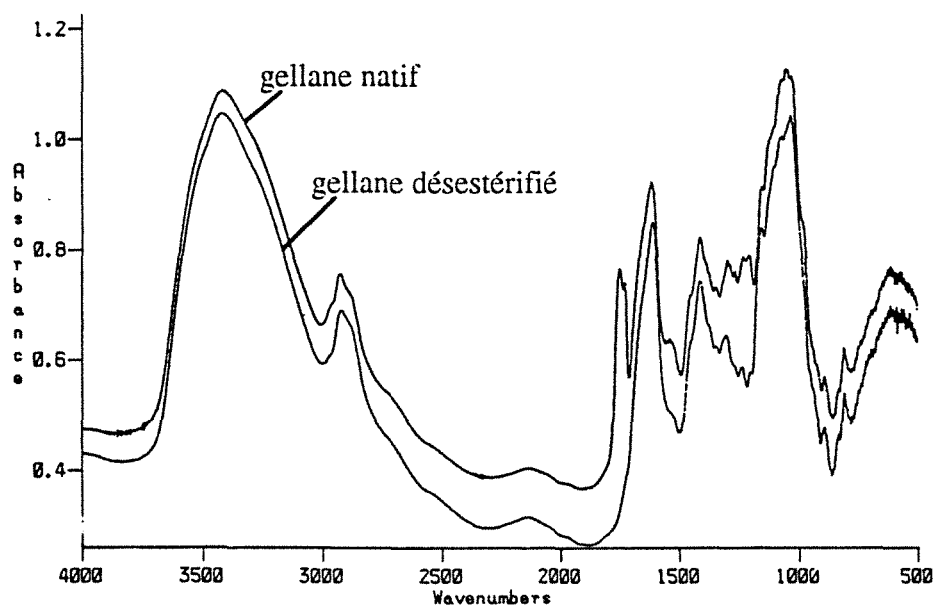


FIGURE 5.3 : Spectres infrarouge du gellane natif clarifié et du gellane déstérifié clarifié.

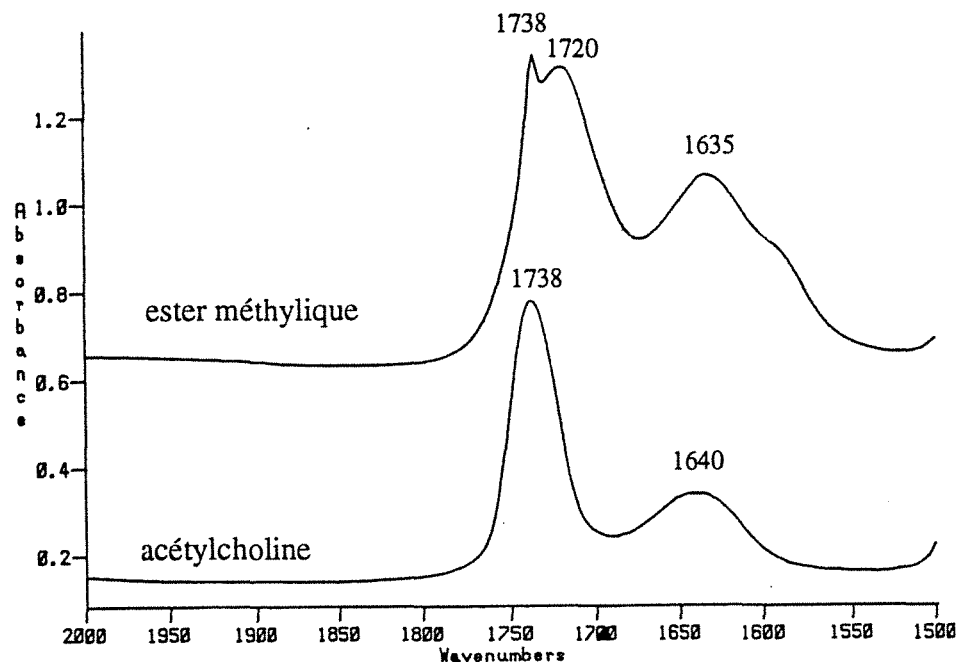


FIGURE 5.4 : Agrandissement des spectres infrarouge de l'acétylcholine et d'un ester méthylique de l'acide glycérique.

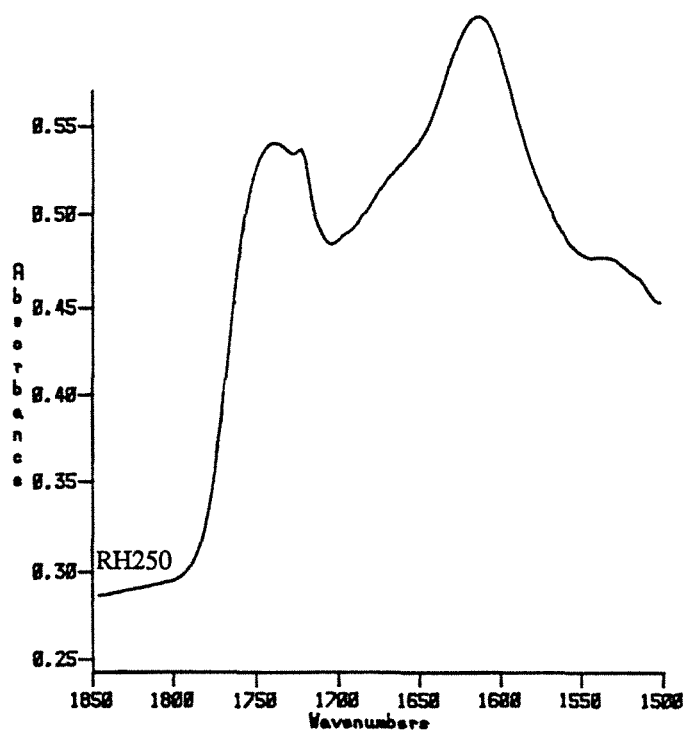


FIGURE 5.5 : Agrandissement du spectre du gellane RH250 natif et clarifié.

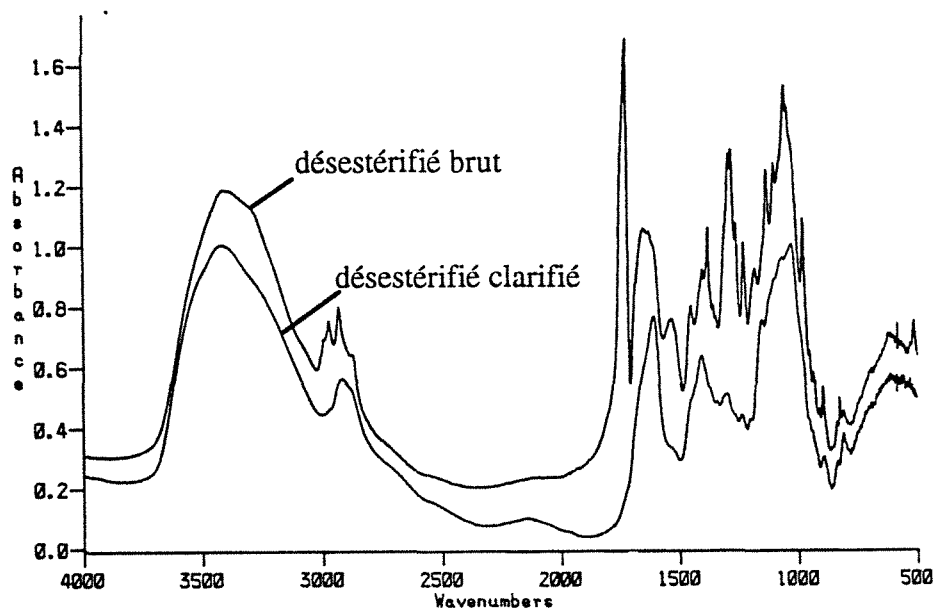


FIGURE 5.6 : Spectres infrarouge des gellanes désestérifiés brut et clarifié.

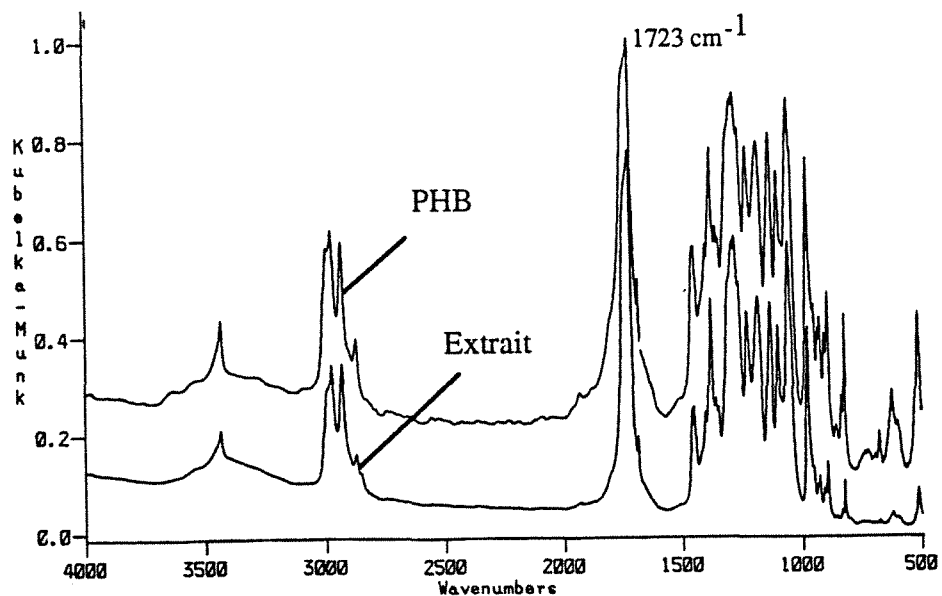


FIGURE 5.7 : Spectres infrarouge d'un PHB commercial et du produit extrait au chloroforme d'un gellane brut.

Les polysaccharides non clarifiés présentent des bandes supplémentaires autour de 3000 cm^{-1} et une bande importante à 1720 cm^{-1} (figure 5.6). Ces bandes correspondent au PHB présent dans les gellanes bruts. Une extraction au chloroforme a en effet permis d'isoler un composé qui présente un spectre identique au PHB (figure 5.7). Les gellanes clarifiés ne contiennent donc pas de PHB car leurs spectres ne comportent pas les pics supplémentaires autour de 3000 cm^{-1} .

5.2.5. Viscosités intrinsèques

5.2.5.1. Viscosités intrinsèques des solutions dialysées

L'étape suivante de cette étude est la caractérisation physico-chimique proprement dite du gellane natif. Cette étude nécessitant un contrôle précis de la salinité des solutions, les solutions filtrées sont diluées et dialysées contre une solution de KCl 0,1M contenant également 40 mg/l d'un antibactérien, l'azoture de sodium (NaN_3). La connaissance des concentrations en carbone total et minéral permet de connaître la concentration en gellane après dialyse. La force ionique choisie est de 0,1 M en KCl. Un exemple de courbe utilisée pour la détermination graphique de la viscosité intrinsèque est présenté sur la figure 5.8 dans le cas du gellane RH250Ox. Les viscosités intrinsèques d'après la formule de Huggins et les constantes de Huggins obtenues pour les différents gellanes sont regroupées dans le tableau 5.6.

TABLEAU 5.6 : Viscosité intrinsèque, constante de Huggins et pente en régime dilué pour les différents gellanes. Solvant : KCl 0,1M.

Produit	RH250	RH250'	RH125	RH250Ox	RH250N	TR600	TC800
$[\eta]$ (ml/g)	7 300	7 600	7 700	8 600	5 300	8 500	8 400
K'	1,1	0,9	0,9	0,7	1,8	1,8	1,1
pente *	1,3	1,2	1,3	1,2	1,3	1,3	1,3

* : pente de courbe représentant le $\log(\eta_{sp})$ en fonction du $\log([\text{gellane}])$ en régime dilué.

Les valeurs de viscosité intrinsèque obtenues sont importantes pour un polysaccharide qui est *a priori* de faible masse molaire. Seul le produit RH250N, qui est obtenu avec un milieu de culture sans azote organique, présente une viscosité intrinsèque notablement différente de celle des autres gellanes. Les viscosités intrinsèques des gellanes obtenus dans des conditions de fermentation limitantes en oxygène sont légèrement plus faibles que celles obtenues dans des conditions moins limitantes. Les constantes de Huggins indiquent que la tendance à l'agrégation du polymère est importante. Le gellane RH250N mis à part, cette tendance est la plus forte pour le gellane de TR600 qui est, par rapport aux produits présentant un faible taux d'acétate, le polysaccharide le plus estérifié par le glycérate. Il est possible que l'acétate diminue la tendance à l'agrégation du polymère et que le glycérate l'augmente, mais les différences obtenues sont trop faibles pour pouvoir en tirer

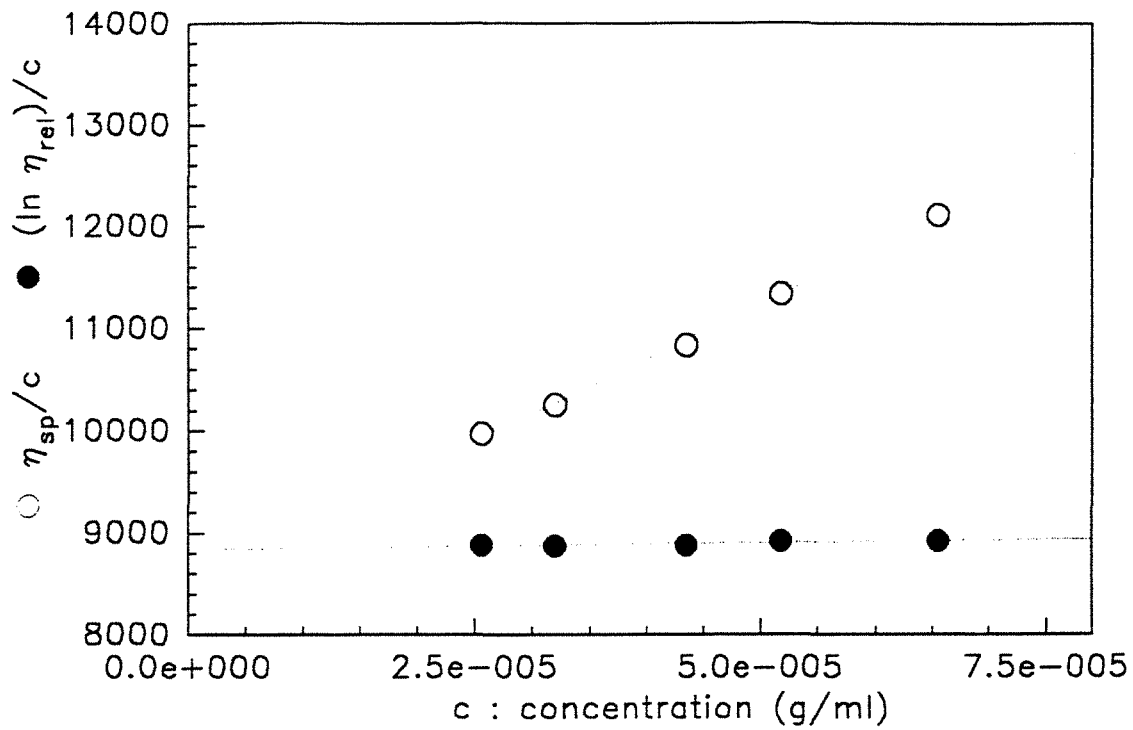


FIGURE 5.8 : Détermination de la viscosité intrinsèque du gellane RH250Ox. Solvant : KCl 0,1 M

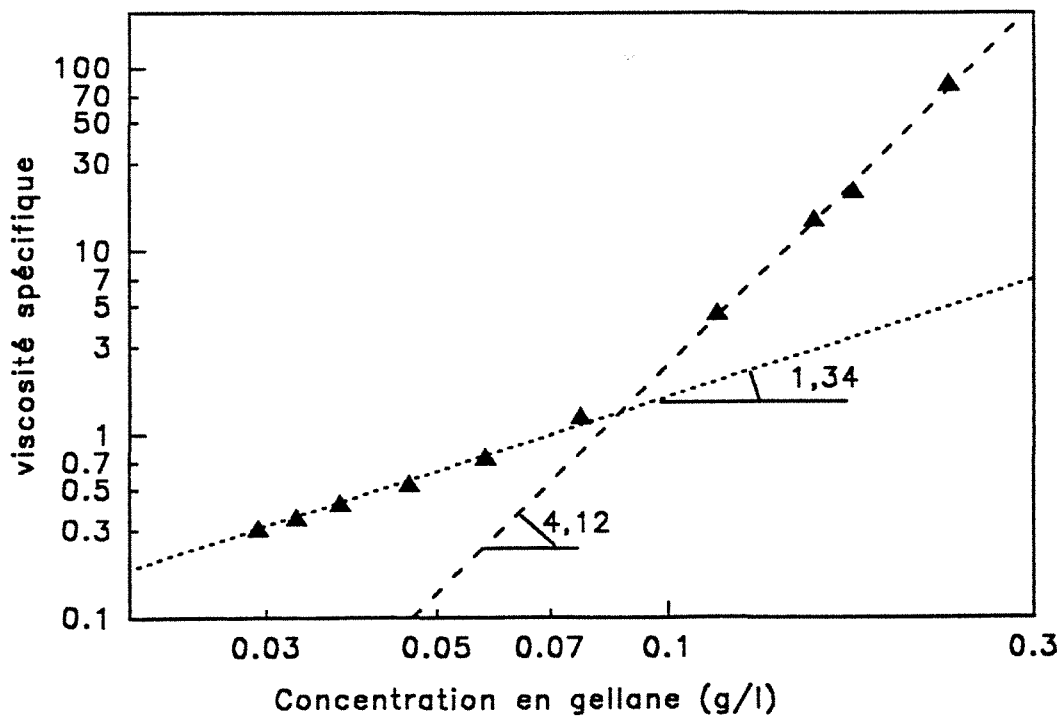


FIGURE 5.9 : Détermination de c^* pour le gellane RH250. Solvant KCl 0,1M

des conclusions.

La représentation graphique qui permet de déterminer C^* , la concentration limite du régime dilué, est reportée sur la figure 5.9 pour le gellane RH250. C^* est de l'ordre de 90 à 100 mg/l pour tous les produits. Cette concentration critique est très faible et reflète la forte tendance à l'agrégation du gellane dans ce solvant. Le produit de la viscosité intrinsèque par C^* est de l'ordre de 0,75-0,85, ce qui est plus faible que la valeur de l'ordre de 1,4 observée pour le xanthane (Cuvelier, 1988) ou certains galactomannanes (Pezron, 1988). La pente de la droite en régime dilué est comprise entre 1,2 et 1,3 pour les divers échantillons (tableau 5.6). Ces valeurs correspondent à ce qui est habituellement observé pour des solutions de chaînes souples. La pente au dessus de C^* est difficile à déterminer car aucun plateau newtonien n'est observé. Les pentes calculées avec les viscosités obtenues pour les vitesses de cisaillement les plus faibles possibles sont comprises entre 3,8 et 5,8. Ces valeurs correspondent à un régime semi-dilué.

5.2.5.2. Influence de la purification

Ces essais sont réalisés pour connaître l'influence de la présence éventuelle d'agrégats. La viscosité intrinsèque est déterminée pour le produit RH250' après filtration sur un filtre de porosité 0,8 μm et pour le produit RH250 après une ultrafiltration par une solution de KCl 0,1M. La présence d'un film gélifié sur la membrane d'ultrafiltration est observée. Plusieurs membranes ont dû être utilisées pour la filtration car la solution colmate rapidement les pores du filtre. La viscosité intrinsèque de la solution filtrée est de 3 700 ml/g pour un K' de 1,9 et celle de la solution ultrafiltrée est de 4 000 ml/g pour un K' de 1,6. Ces résultats sont intéressants mais il n'est pas possible de savoir si les différences observées sont dues à l'état d'agrégation du gellane ou à la perte d'une fraction de polymère de forte masse molaire durant l'étape de purification supplémentaire.

5.2.5.3. Influence de l'introduction de sels

La viscosité intrinsèque du gellane RH250Ox est également déterminée sur une solution dialysée contre de l'eau déionisée à laquelle une solution de KCl est ajoutée *a posteriori* pour obtenir une concentration finale en KCl de 0,001, 0,01, 0,1 et 0,5 M. Le même protocole est suivi pour obtenir une force ionique de 0,025 M en TMACl. Ces résultats sont reportés dans le tableau 5.7. Aucune valeur de viscosité n'a pu être mesurée pour la solution à 0,5 M de KCl en raison de la présence constatée *de visu* de "microgels" dans la solution. Les résultats pour les autres salinités sont reportés dans le tableau 5.7.

TABLEAU 5.7 : Influence de la salinité sur la viscosité intrinsèque et la constante de Huggins du gellane RH250Ox.

Salinité	KCl 0,001 M	KCl 0,01 M	KCl 0,1 M	TMACl 0,025 M
$[\eta]$ (ml/g)	8 950	5 800	3 700	3 500
K'	1,12	3,67	6,90	8,00

Dans ces conditions, les viscosités intrinsèques diminuent et les K' croissent lorsque la force ionique de la solution augmente. Les résultats obtenus à 0,1 M de KCl dans ces conditions de préparation sont très différents de ceux obtenus pour la solution dialysée à même force ionique. Ces différences soulignent l'importance du mode d'ajout du sel dans la solution de polysaccharide, un apport massif provoquant la formation d'agréats qui sont visibles pour une concentration en sel de 0,5 M. La diminution de la viscosité intrinsèque observée lorsque la force ionique de la solution augmente peut être due à une contraction des chaînes qui peut aller jusqu'à la précipitation d'une fraction du polysaccharide.

Finalement, une solution de gellane RH250Ox dialysée contre de l'eau déionisée est chauffée pendant 3 heures à 90°C en présence d'urée 4 M pour empêcher la formation des liaisons hydrogène à la température d'analyse. La viscosité intrinsèque obtenue dans ces conditions est de 500 ml/g et la constante de Huggins est de 0,94. Des essais similaires avec du LiCl à la place de l'urée ne permettent pas de faire des mesures de viscosité en raison de la précipitation du polymère.

5.2.6. Masses molaires obtenues par diffusion de lumière

La détermination de masse molaire par diffusion aux petits angles ne peut pas être réalisée car le filtre en nitrocellulose de 0,45 μm placé à l'entrée de l'appareil est rapidement colmaté par le polysaccharide même à des concentrations en polymère très faibles. Il n'est pas possible de supprimer ce filtre ou d'augmenter sa porosité car cette analyse est très sensible aux impuretés présentes dans la solution. Les analyses en diffusion de lumière multi angles étant moins sensibles aux impuretés de la solution que les précédentes, la masse molaire du gellane natif TC800 peut être obtenue pour une solution filtrée sur une membrane de porosité 3 μm . Le diagramme de Zimm est reporté sur la figure 5.10. La masse molaire obtenue est de $1,1 \cdot 10^6$ daltons, le second coefficient de viriel de $-2,3 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^3 \cdot \text{mol} \cdot \text{g}^{-2}$ et le rayon de giration de 270 nm. La valeur négative du second coefficient de viriel indique que le solvant est de mauvaise qualité. La masse molaire et le rayon de giration sont deux fois plus élevés que les valeurs mentionnées dans la littérature pour le gellane désestérifié qui sont regroupées dans le tableau 2.5.

5.2.7. Profils de masse par chromatographie de perméation de gel

Les différents gellanes sont également analysés en chromatographie de perméation de gel. Les produits analysés sont filtrés sur un filtre en verre fritté de 0,5 μm présent dans le circuit d'analyse avant les colonnes. Tous les gellanes sont élués au volume mort de la colonne alors qu'un xanthane de masse $5 \cdot 10^6$ daltons sort après ce volume mort (figure 5.11). Ce volume mort est déterminé à l'aide d'un polyacrylamide partiellement hydrolysé ayant une masse molaire très importante de l'ordre de $12 \cdot 10^6$ daltons. Le profil de masse obtenu avec un échantillon de gellane commercial désestérifié, le Gelrite, est très différent de celui de nos gellanes natifs (figure 5.11). Aucun des deux pics obtenus avec le

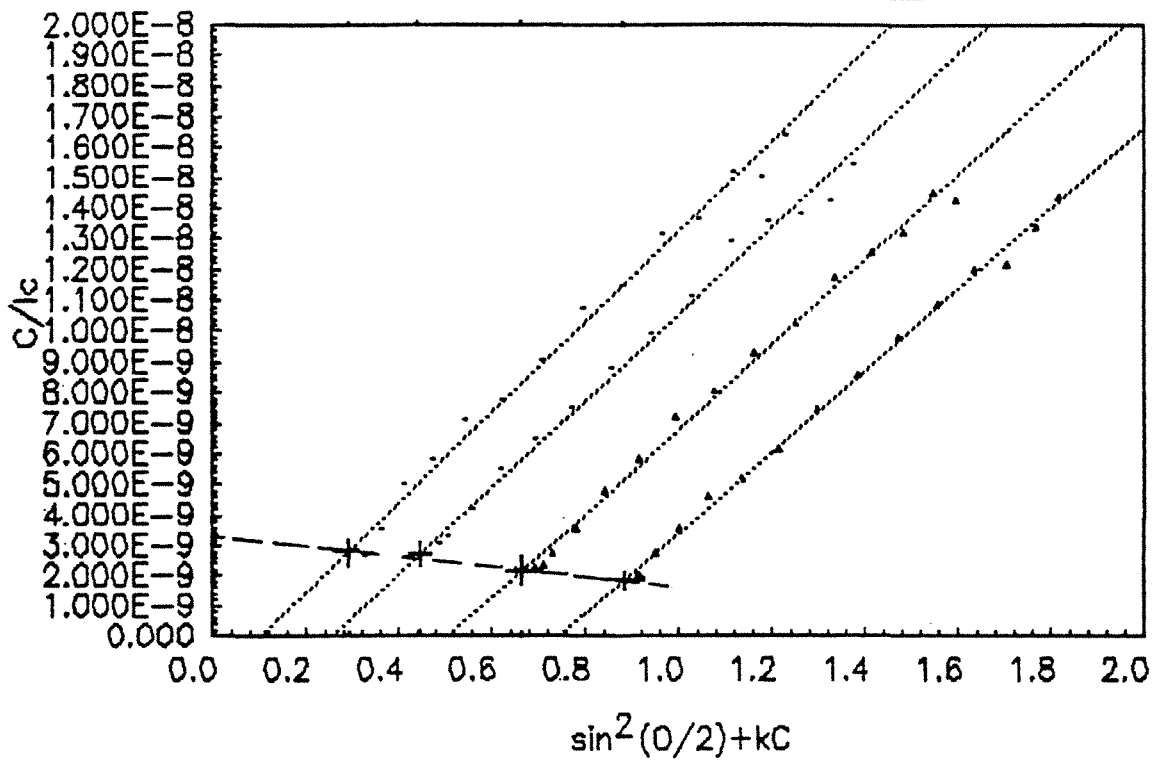


FIGURE 5.10 : Diagramme de Zimm pour le gellane natif TC800

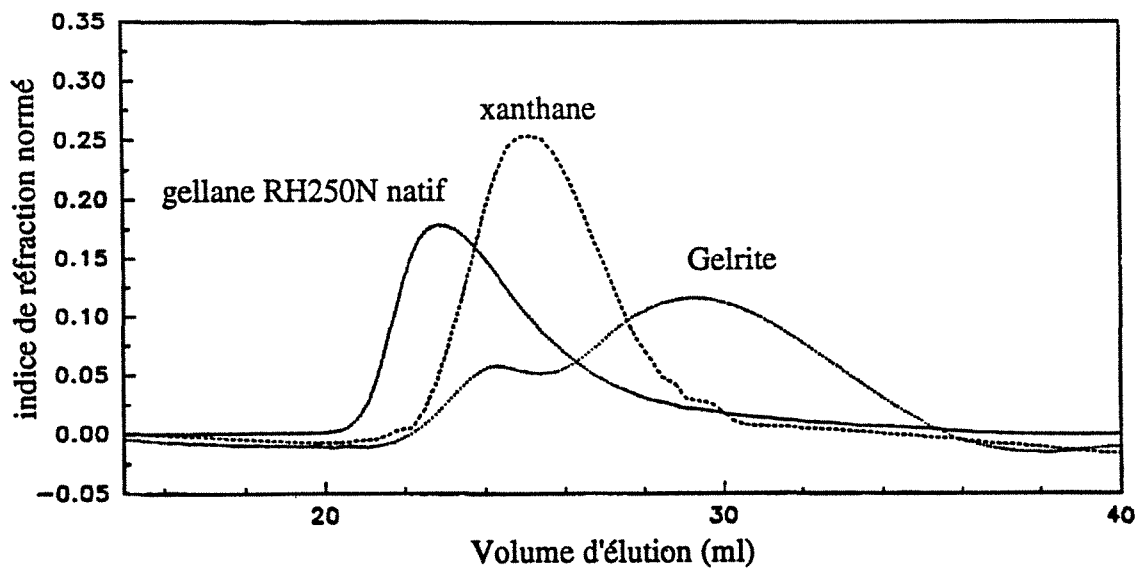


FIGURE 5.11 : Chromatogrammes obtenus en perméation de gel pour du xanthane, du Gelrite et du gellane natif RH250N. Eluant : KCl 0,1 M.

Gelrite ne se trouve au volume mort de la colonne. L'existence de ces deux pics est due soit à une hétérogénéité de masse très importante, soit à l'existence d'une fraction de polysaccharide agrégée, cette fraction ne sortant pas, de toute façon, au volume mort de la colonne. D'autre part, nous avons chromatographié une solution de gellane natif ayant subi une filtration sur un filtre en nitrocellulose de porosité 0,45 μm . Cette filtration entraîne une perte de près de 65% de polysaccharide, mais le pic obtenu sort toujours au volume mort de la colonne.

5.2.8. Conclusion

Nos résultats de chromatographie de perméation de gel, de viscosité intrinsèque, et de diffusion de lumière semblent indiquer que le gellane natif est un polysaccharide de forte masse molaire alors que d'après la littérature, le gellane désestérifié présente une masse molaire de l'ordre de 500 000 daltons. Deux interprétations sont possibles : soit la masse molaire du gellane natif est beaucoup plus importante que celle de son homologue désestérifié, soit nous sommes confrontés à des problèmes d'agrégation. Cette dernière hypothèse semble la plus probable. Le gellane est en effet connu pour ses capacités d'agrégation importantes résultant d'une forte tendance à former des liaisons hydrogènes ou ioniques entre les brins. L'établissement de ces liaisons est de plus facilité lorsque la force ionique de la solution augmente du fait de l'écrantage des répulsions entre les fragments chargés. Il est donc fortement probable que les mesures de viscosité intrinsèque réalisées en présence de KCl 0,1 M ne soient pas représentatives du polymère en tant que tel mais d'agrégats. Néanmoins, ces mesures permettent de comparer le gellane à d'autres polymères du même type tels que l'HEC, la CMC ou des polymères bactériens (tableau 5.8) à une salinité équivalente.

TABLEAU 5.8 : Viscosité intrinsèque de différents polymères utilisés comme additifs de fluide de forage.

polymère	gellane natif	HPAM	PAM	xanthane	scléroglycane
salinité	KCl 7,5 g/l	NaCl 5 g/l	NaCl 20 g/l	NaCl 5 g/l	NaCl 5 g/l
$[\eta]$ (ml/g)	≈ 8000	7000	3500	7500	8000

L'hypothèse de l'agrégation est confortée par la détermination de viscosité intrinsèque réalisée sur une solution traitée à l'urée 4 M. Dans ces conditions, le polysaccharide est obligatoirement sous forme de simple brin car l'urée 4M empêche la formation des liaisons hydrogènes. Cette viscosité intrinsèque est beaucoup plus faible que celle obtenue auparavant, et elle est du même ordre de grandeur que celle déterminée par Milas et Shi (1988) pour le gellane désestérifié dans une solution de TMACl 0,025 M à une température de 40°C, conditions dans lesquelles le polysaccharide est sous forme de simple brin.

La nature des agrégats de gellane natif semble être différente entre les échantillons obtenus par dialyse et ceux obtenus par ajout de sel dans la solution de polysaccharide. Dans le cas de l'ajout de sel *a posteriori*, le polymère précipite car les viscosités intrinsèques diminuent lorsque la force ionique augmente. Pour les solutions dialysées, les viscosités intrinsèques étant très importantes à force ionique élevée, il est possible d'émettre l'hypothèse, en accord avec Gunning et Morris (1990), que les brins s'associent bout à bout pour former de longues chaînes qui s'organisent en pelotes. Ces associations sont rompues lors des filtrations.

On pourrait probablement s'affranchir de ce problème d'agrégation en travaillant au-dessus de la température de transition du gellane. La courbe représentant l'évolution du pouvoir rotatoire du gellane natif en solution dans KCl 0,1 M montre que cette transition se produit à des températures voisines de 50°C (figure 5.12). Les analyses en conformation désordonnée devraient donc être réalisées à une température de l'ordre de 60°C, ce qui n'est pas techniquement envisageable avec le rhéomètre à cylindres coaxiaux utilisé. De plus, l'évolution du pouvoir rotatoire au-dessus de la température de transition semble montrer que toutes les transitions ne se produisent pas à la même température. Cette observation rejoint l'hypothèse de Robinson *et al.* (1991) selon laquelle la transition conformationnelle des doubles hélices agrégées se produit pour une température supérieure à celle requise pour les hélices non agrégées.

5.3. Caractéristiques physico-chimiques des gellanes désestérifiés

La détermination de la masse molaire du gellane natif étant très difficile, nous avons choisi de désestérifier les gellanes de façon à les caractériser dans les mêmes conditions que ce qui a été fait pour le gellane commercial. L'absence de bandes correspondant aux esters sur les spectres infrarouges des gellanes indique que la désestérification est totale. La force ionique choisie pour les analyses est de 0,025 M en TMACl. Le contrôle de la force ionique est réalisé par des dialyses successives.

5.3.1. Viscosités intrinsèques et masses molaires par diffusion de lumière

Les résultats de viscosité intrinsèque obtenus pour les différents gellanes et le gellane commercial sont reportés dans le tableau 5.9.

TABLEAU 5.9 : Viscosités intrinsèques et constantes de Huggins des différents gellanes désestérifiés. Solvant : TMACl 0,025 M.

Produit	RH250	RH250Ox	RH250N	TR600	TC800	Gelrite
$[\eta]$ (ml/g)	2 690	2 630	630	1 390	1 940	1 510
K'	1,48	0,88	0,92	1,10	1,00	1,04

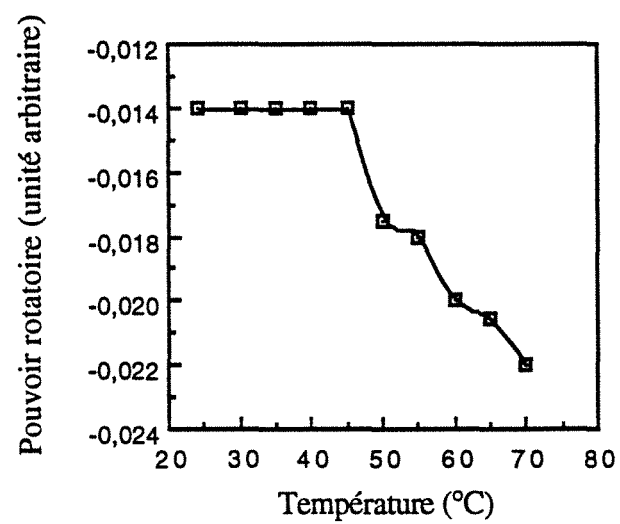


FIGURE 5.12 : Evolution du pouvoir rotatoire du gellane natif dans une solution de KCl 0,1M

Les valeurs de viscosité intrinsèque obtenues sont en accord avec les données de la littérature regroupées dans le tableau 2.5. Dans ces conditions, le régime dilué s'étend jusqu'à des concentrations en polymère de l'ordre de 500 mg/l, la valeur de C^* est donc beaucoup plus importante que celle observée pour le gellane natif.

Aux faibles concentrations en gellane, les solutions de polysaccharide sont filtrées sur 0,22 μm sans problème de colmatage. Il est donc possible de déterminer la masse du polymère par des mesures de diffusion de lumière aux petits angles. Le tracé de $K'c/\Delta R(\theta)$ en fonction de la concentration en gellane permet de confirmer l'absence d'agrégats en dessous d'une concentration critique de l'ordre de 150 mg/l, valeur à partir de laquelle $K'c/\Delta R(\theta)$ diminue fortement. Cette forte diminution indique qu'une fraction de polysaccharide est retenue sur le filtre. Les valeurs de masse molaire et des seconds coefficients de viriel sont rassemblés dans le tableau 5.10.

TABLEAU 5.10 : Masse molaire $\overline{M}_w$ et second coefficient de viriel A_2 pour les gellanes désestérifiés.

Produit	RH250	RH250Ox	RH250N	TR600	TC800	Gelrite
$\overline{M}_w$ (dalton) $\times 10^5$	6,2	5,7	1,3	2,8	4,7	3,1
A_2 (cm ³ .M.g ⁻²) $\times 10^{-3}$	1,3	4,9	-0,2	3,4	4,5	2,8

Les incertitudes sur les valeurs de masse molaire et de second coefficient de viriel sont de $\pm 0,2.10^5$ et de $\pm 0,2.10^{-3}$ respectivement. Les masses molaires sont du même ordre de grandeur que celles données dans la littérature et mentionnées dans le tableau 2.5. Les plus fortes masses molaires sont obtenues pour les produits RH250 et RH250Ox. Les masses molaires des gellanes TC800 et TR600 et du Gelrite sont plus faibles, les valeurs déterminées pour ces deux derniers produits étant égales à la moitié de celle obtenue pour RH250Ox. Le produit présentant la masse molaire la plus faible est le gellane RH250N. Les valeurs de second coefficient de viriel correspondent à un solvant de bonne qualité, excepté pour le produit RH250N.

Il peut sembler étonnant que du gellane soit retenu sur le filtre pour des concentrations supérieures à 150 mg/l alors que la valeur de C^* déterminée en viscosimétrie est de l'ordre de 500 mg/l. Il est possible que cette différence soit due à la filtration qui semble être un procédé favorisant l'agrégation du polymère.

Les déterminations de masse molaire et de viscosité intrinsèque ayant été effectuées dans les mêmes conditions, il est possible de calculer les coefficients de l'équation de Mark-Houwink reliant ces deux grandeurs (équation 12). La courbe représentant la relation entre ces deux paramètres est reportée sur la figure 5.13.

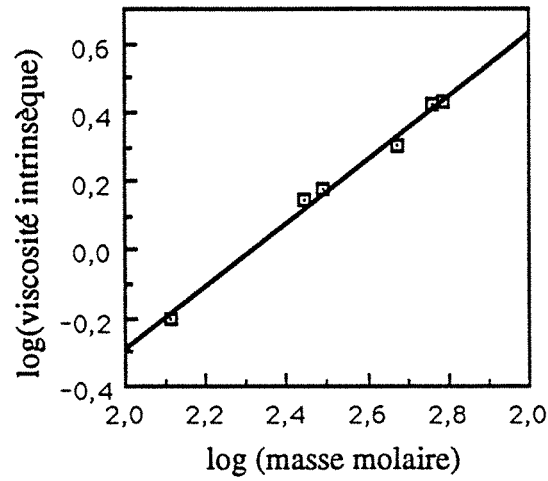


FIGURE 5.13 : Détermination des coefficients de l'équation de Mark.

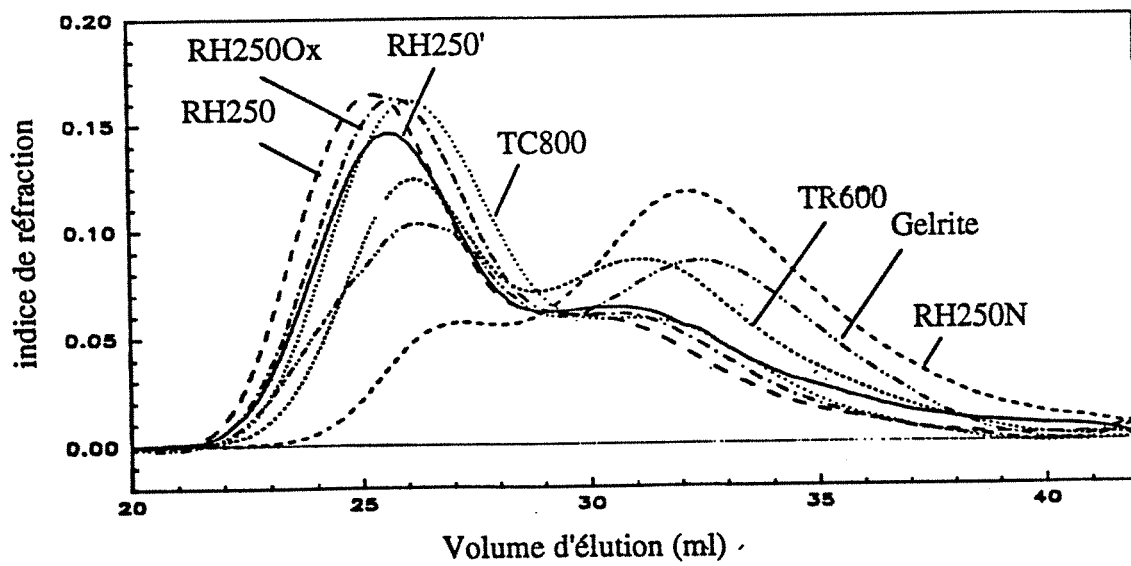


FIGURE 5.14 : Chromatogrammes obtenus en perméation de gel avec les différents gélanes obtenus et le gelrite. Eluant TMACl 0,025 M.

L'équation de Mark a donc pour expression, pour le gellane désestérifié :

$$[\eta] = 7,48 \cdot 10^{-3} \overline{M}^{0,91}$$

avec la viscosité intrinsèque en kg/m³. Cette courbe permet la détermination à partir de la viscosité intrinsèque dans TMACl 0,025 M de la masse molaire du gellane désestérifié. L'exposant de 0,91 signifie que le polymère présente des rigidités locales importantes, ce qui correspond bien avec la structure en double hélice du gellane obtenue dans ces conditions de température et de salinité.

5.3.2. Profils de masse par chromatographie de perméation de gel

Les résultats obtenus en perméation de gel avec ces différents gellanes ne permettent pas d'estimer la masse molaire et la polymolécularité de ces produits. Deux pics sont à nouveau observés pour le gellane commercial désestérifié mais également pour tous les gellanes analysés (figure 5.14). Ces deux pics ne sortent pas au volume mort de la colonne. Le second pic, observé pour un volume de rétention de 32 à 33 ml, est plus important dans le cas des polymères de faible masse molaire. Il n'est pas possible de calculer la masse molaire des deux fractions de polymère car la viscosité intrinsèque de chaque espèce est inconnue. Ces résultats de perméation de gel tendent à montrer que le gellane n'est pas homogène et qu'il présente une distribution de masse molaire bimodale, mais nous ne pouvons pas préciser s'il s'agit d'une hétérogénéité de masse molaire ou de composition, une fraction du polysaccharide pouvant être par exemple liée à des protéines.

5.4. Conclusion

En ce qui concerne le gellane natif, les degrés d'estérification obtenus diffèrent suivant le mode de production du polysaccharide. Les plus forts taux sont obtenus pour des produits synthétisés dans des conditions de fermentations limitantes en oxygène. Il est possible que ces différences soient directement liées aux conditions de transfert d'oxygène, mais il est également possible que la nature de la source d'azote sur laquelle les bactéries se développent ait une influence sur le degré d'estérification. Les fermentations les plus limitées sont en effet les cultures pour lesquelles la consommation d'azote organique a été plus faible.

Le polymère à l'état natif présente une forte tendance à l'agrégation, et les mesures de masse molaire sont difficiles à réaliser. La désestérification du gellane entraîne une diminution de la tendance à l'agrégation du produit. Il est alors possible d'obtenir de "vraies" solutions de polymère, du moins en présence d'une faible force ionique en TMACl. Les mesures de masse molaire sont donc, dans ces conditions, représentatives du polysaccharide et non des agrégats comme c'est le cas pour le gellane natif.

Les résultats de diffusion de lumière et de rhéologie en régime dilué nous permettent

de constater des différences importantes au niveau de la masse molaire des produits obtenus dans des conditions de mélange et de milieu de culture différentes. Les plus fortes masses molaires sont obtenues pour les gellanes synthétisés dans les meilleures conditions de macromélange, c'est-à-dire avec le ruban hélicoïdal. Dans ces conditions, la même masse molaire a été observée pour le gellane issu de la fermentation fortement limitée en oxygène RH250 et pour celui issu de la fermentation RH250Ox réalisée dans des conditions faiblement limitantes en oxygène. Les masses molaires des produits sont ensuite d'autant plus faibles que le mélange dans le fermenteur fut hétérogène, une forte hétérogénéité d'agitation se traduisant par des conditions locales de cisaillement importantes. La masse molaire du gellane TC800 est ainsi intermédiaire entre celle du gellane TR600 et celles des gellanes obtenus avec le ruban hélicoïdal. Par ailleurs, la masse molaire du Gelrite est faible et elle correspond à celle du produit que nous avons obtenu avec les turbines Rushton. Deux phénomènes peuvent être à l'origine de ces différences, soit l'agitation dégrade le polymère, soit la perturbation provoquée par une agitation violente sur les bactéries entraîne la production d'un polysaccharide de masse molaire plus faible. En outre, la composition en azote du milieu de fermentation a également une grande importance sur le produit puisque le gellane RH250N présente une masse molaire beaucoup plus faible que le gellane RH250Ox obtenu dans les mêmes conditions de mélange.

L'ensemble de ces résultats diffère de ceux traitant de la production de xanthane par *X. campestris*. En effet, pour ce dernier, la masse molaire varie avec la limitation en oxygène qui lui est imposée mais elle est indépendante de l'hydrodynamique du fermenteur dans des conditions non limitantes en oxygène. Il est possible que cette différence entre les deux polysaccharides soit reliée à leur capacité de structuration différente. En effet, contrairement à ce qui est observé lors de la production de gellane où les cellules sont piégées dans un réseau de polysaccharide, le xanthane, qui ne peut pas dans ces conditions former des gels, est librement excrété dans le milieu. Dans le cas du gellane, une agitation violente peut avoir des répercussions importantes sur la stabilité des agglomérats gélifiés et conduire à la production d'un polysaccharide de masse molaire plus faible.

CHAPITRE 6 : POTENTIALITÉS DU GELLANE DANS LES FLUIDES DE FORAGE

6. Potentialités du gellane dans les fluides de forage

L'intérêt du gellane en tant que composant des fluides de forage est estimé à l'aide de mesures normalisées de rhéologie et de filtration.

L'évaluation des propriétés rhéologiques des fluides de forage est essentielle pour la sélection et le dosage de leurs constituants. En effet, les pertes de charge dans l'annulaire, la remontée des déblais ou leur maintien en suspension lors d'un arrêt du forage sont directement dépendants de ces propriétés. Les caractéristiques rhéologiques d'un fluide de forage sont traditionnellement déterminées à l'aide d'un viscosimètre Fann à cylindres coaxiaux. Ce viscosimètre, standardisé par l'API, est bien adapté aux conditions de chantier et il permet la mesure de la viscosité du fluide à six vitesses de cisaillement. Ce rhéomètre est également utilisé pour caractériser le comportement non newtonien du fluide par les mesures de "gel" qui permettent une évaluation de la thixotropie du fluide. Lors de cette étude, les mesures de rhéologie ont également été réalisées à l'aide d'un rhéomètre à cylindres coaxiaux de laboratoire plus précis que le Fann.

La filtration du fluide de forage se produit sous l'effet de la pression différentielle qui existe entre la pression du fluide et la pression de la formation, lorsque le fluide se trouve au contact d'une paroi poreuse et perméable. La pression de circulation de la boue dans le puits étant supérieure à la pression de la formation, une certaine quantité de liquide pénètre dans la formation tandis que les solides présents dans la boue se déposent sur la paroi du puits et forment un gâteau de filtration appelé "cake". Deux sortes de filtration peuvent se produire pendant le forage : la filtration statique durant les arrêts de circulation du fluide et la filtration dynamique au cours de la circulation du fluide, cette filtration entraînant l'érosion du cake formé. Le volume de filtrat est fonction :

- de la nature de la formation,
- du temps,
- de la pression différentielle,
- de la viscosité du fluide,
- de la température,
- de l'état de dispersion des particules dans la suspension.

Les propriétés de filtration des fluides de forage sont évaluées et contrôlées par des tests API. Ceux-ci sont effectués en régime statique avec un filtre-presse normalisé. La procédure de ces tests est détaillée dans le chapitre "Matériel et Méthodes".

La compréhension des phénomènes physiques mis en jeu lors des filtrations reste empirique. La loi de Darcy appliquée à l'écoulement d'un fluide laminaire, et en supposant le cake formé incompressible, est une représentation acceptable des résultats obtenus avec

les suspensions d'argile. Selon la loi de Darcy, la vitesse de filtration à travers un cake de filtration est donnée par (Von Engelhardt 1953) :

$$\frac{dQ}{dt} = k \frac{P A}{\eta L_t} \quad (42)$$

où P est la pression (bar), A la surface du filtre (cm²), η la viscosité du fluide (mPa.s), Q le volume filtré, L_t l'épaisseur du cake après un temps t et k la perméabilité du cake. Cette perméabilité est exprimée en darcy, un darcy étant équivalent à un μm^2 .

En introduisant le paramètre b qui donne le volume spécifique de cake formé par cm³ de filtrat et en le supposant constant, l'intégration de cette formule donne le volume filtré Q_t et l'épaisseur du cake au temps t:

$$Q_t = \left(\frac{2 P A^2 k}{\eta b} t \right)^{\frac{1}{2}} \quad (43)$$

$$L_t = \left(\frac{2 P}{\eta} k b t \right)^{\frac{1}{2}} \quad (44)$$

Si la perméabilité du cake reste constante au cours de la filtration, le volume filtré et l'épaisseur du cake, incompressible par hypothèse, augmentent proportionnellement avec la racine carrée du temps.

Au cours de cette étude, après avoir optimisé l'homogénéisation des solutions d'argile et de gellane, nous avons étudié les influences de la concentration en gellane, de l'ajout d'électrolytes et de la température sur les propriétés rhéologiques et sur la filtration de fluides de forage contenant du gellane. Ces résultats sont ensuite comparés avec ceux obtenus avec de la CMC utilisée de façon classique dans les fluides à base d'eau. Finalement, les capacités des différents gellanes synthétisés sont évaluées.

6.1. Conditions d'analyse

Les essais de filtration et les analyses rhéologiques sont réalisés avec des formulations modèles contenant 30 g/l d'argile et diverses concentrations en gellane et en sels. Le gellane brut issu de la fermentation RH250Ox est utilisé pour l'ensemble de ces tests.

Les essais de filtration à température ambiante sont réalisés dans les conditions API. Les essais de filtration en température sont effectués dans des cellules de filtration haute pression haute température (HPHT) pour lesquelles la surface du filtre utile est deux fois plus faible que celle des filtres des cellules API. L'évolution du volume de filtrat en fonction de la racine carrée du temps étant linéaire dans tous les cas, les résultats sont présentés sous cette forme. La linéarité obtenue indique que la perméabilité des cakes peut être considérée comme constante tout au long du processus de filtration. Les pentes des droites obtenues,

qui sont directement reliées à la perméabilité des cakes, sont divisées par la surface utile des filtres pour pouvoir comparer les résultats obtenus avec les deux types de cellules.

6.2. Optimisation de l'homogénéisation

L'homogénéisation des solutions d'argile et de polymère, qui sont préparées séparément, est réalisée de trois façons différentes : une agitation de 24 heures avec un barreau magnétique, une agitation de 24 heures dans des fioles d'Erlenmeyer à baffles sur une table rotative, et une homogénéisation de 2, 5 et 20 min au mélangeur "Hamilton Beach" suivie d'une agitation de 24 heures sur la table rotative. Les mélangeurs "Hamilton Beach" correspondent aux agitateurs préconisés par l'API et génèrent des cisaillements importants qui sont susceptibles de dégrader les polymères.

Les fluides utilisés contiennent 1,5 g/l de gellane RH250Ox, 30 g/l d'argile et 10 g/l de NaCl. Les résultats de filtration sont reportés dans le tableau 6.1.

TABLEAU 6.1 : Influence de l'homogénéisation des fluides sur le volume filtré et la thixotropie des fluides.

Conditions	volume filtré ml.min ^{-0,5} .cm ⁻²	filtrat (ml)*		gel	
		7,5 min	30 min	0	10
table rotative	0,066	7,3	15,4	8	16
agitateur magnétique	0,071	7,6	16,9	9	15
Hamilton Beach 2 min	0,065	7,3	15,4	10	18
Hamilton Beach 5 min	0,064	7,2	15,2	10	19
Hamilton Beach 20 mn	0,062	7,0	14,7	11	19

* volume de filtrat après 7,5 et 30 min

L'écart entre les valeurs de gel 0 et de gel 10 indiquent que ces fluides présentent un caractère thixotrope marqué. Les volumes filtrés sont faibles. Les solutions qui n'ont pas été mélangées avec l'Hamilton Beach présentent des agrégats et donnent les volumes de filtrat les plus importants.

Bien que les cisaillements générés par l'agitateur Hamilton Beach soient importants, ils ne dégradent pas le polymère car la viscosité des fluides n'est pas influencée par l'augmentation du temps d'homogénéisation. Cette agitation permet en fait de détruire les agrégats de gellane et d'obtenir une meilleure homogénéisation des fluides qui se traduit par ailleurs par une réduction du volume de filtrat.

Les conditions d'homogénéisation choisies pour les autres essais comportent une agitation de 5 min à l'Hamilton Beach à petite vitesse suivie d'une agitation de 15 min à grande vitesse, ce qui correspond aux normes API, suivie de 24 heures d'agitation sur table rotative.

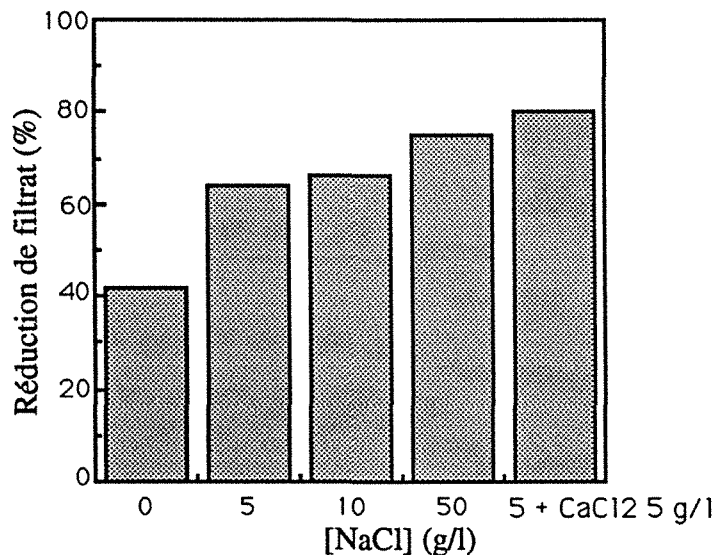
6.3. Influence des concentrations en gellane et en électrolytes sur les caractéristiques des fluides

Les influences des concentrations en polymère et en sel sont étudiées pour des concentrations en gellane de 0 à 6 g/l, en présence de 0 à 50 g/l de NaCl et de 1 à 5 g/l de CaCl_2 . Tous les fluides contiennent 30 g/l d'argile. Les résultats de filtration sont regroupés dans les figures 6.1 et 6.2.

Les boues obtenues sont toutes homogènes et stables même après plusieurs semaines de repos à température ambiante. La comparaison des volumes de filtrat obtenus pour les fluides avec et sans gellane montre que ce polymère a un pouvoir réducteur de filtrat important. Plus la concentration en polysaccharide augmente, plus le volume filtré est faible.

En ce qui concerne l'effet des sels sur la filtration, pour des concentrations en NaCl inférieures à 10 g/l ou pour une concentration en CaCl_2 de 1 g/l, le filtrat est constant. Par contre, le filtrat augmente aux fortes concentrations en sel mais de façon toutefois peu importante en comparaison des formulations sans polymère. Les réductions de filtrat amenées par l'ajout de 3 g/l de gellane dans un fluide contenant différentes concentrations en sel sont regroupées sur la figure 6.3.

FIGURE 6.3 : Influence de la salinité sur le gain de volume filtré avec une formulation contenant 3 g/l de gellane. Réductions de filtrat exprimées par rapport au fluide sans polymère.



L'augmentation du filtrat observée pour les solutions d'argile (sans polymère) en présence de sel, et plus spécialement en présence de calcium, est due à une augmentation de l'aggrégation des particules d'argile. Les particules étant moins dispersées, les sédiments sont moins homogènes et plus poreux, et le volume de filtrat augmente. La présence de polysaccharide permet de réduire le volume de filtrat et le cake formé est plus mince. Deux

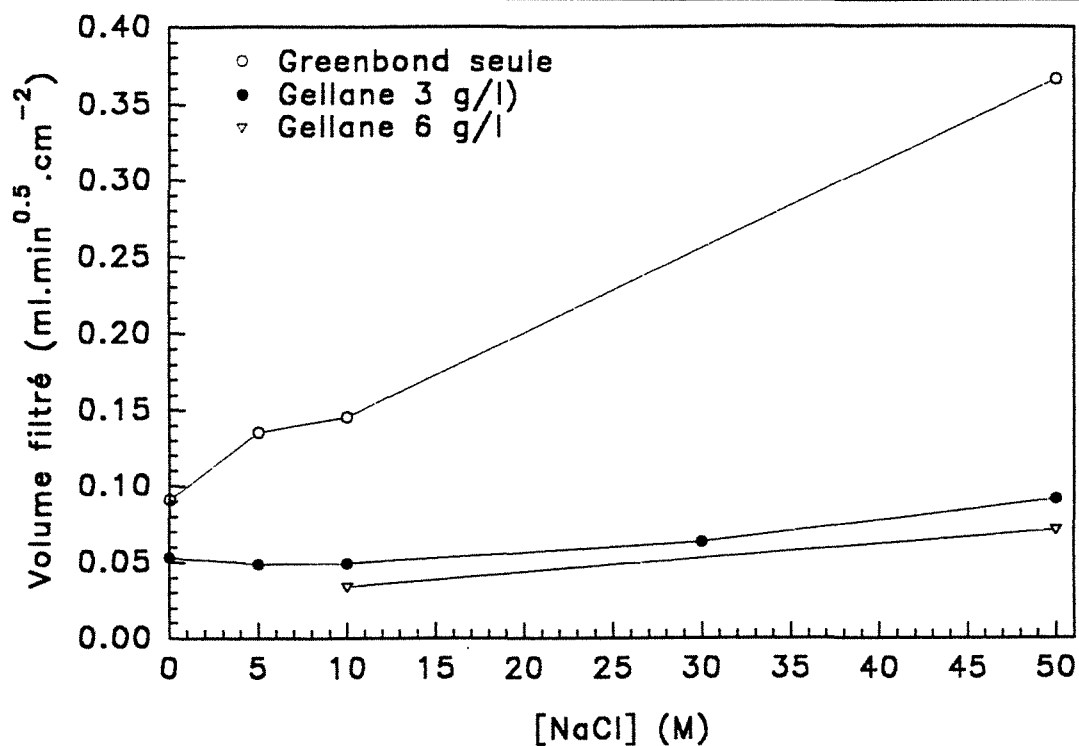


FIGURE 6.1 : Influence des concentrations en gellane et en NaCl sur le volume filtré.

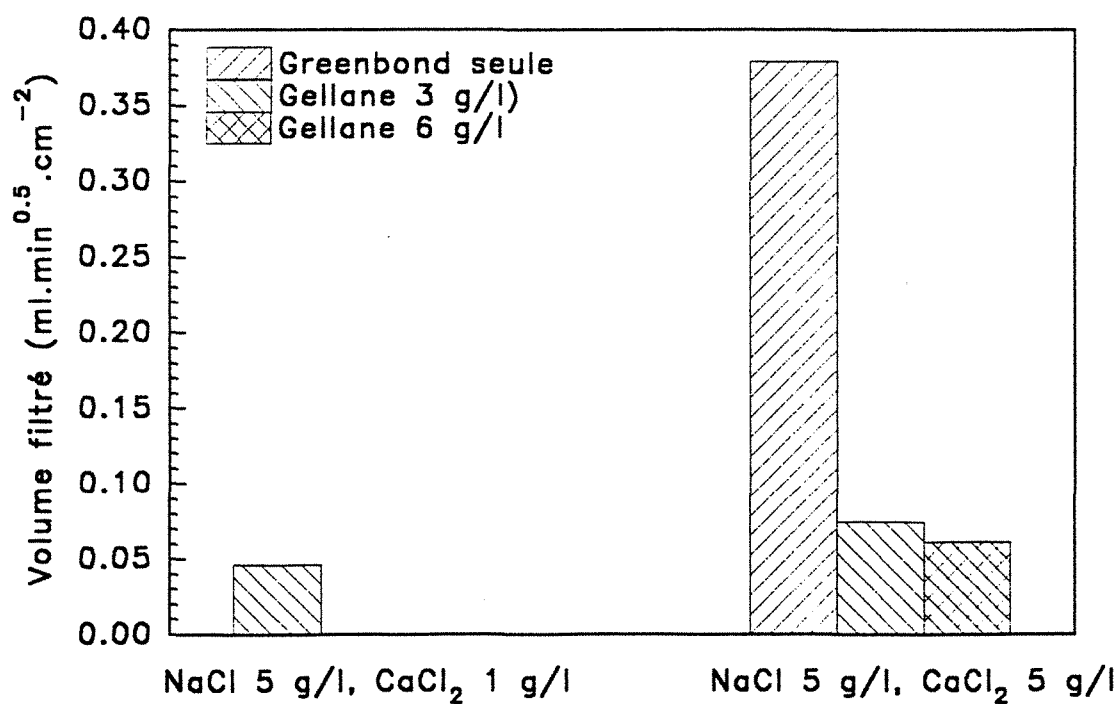


FIGURE 6.2 : Influence des concentrations en gellane et en CaCl₂ sur le volume filtré.

processus conduisent à une réduction du filtrat en présence de polymère :

- l'adsorption du polymère chargé négativement sur les particules d'argile engendre une augmentation des répulsions dans le système qui conduit à une meilleure dispersion de l'argile. Cette meilleure dispersion est confirmée par les travaux de Loeber (1992) qui a démontré, par observation microscopique, que l'ajout de xanthane ou de PAC à une solution d'argile en présence d'électrolyte permet d'obtenir la formation d'un cake de porosité plus régulière.

- le polymère non adsorbé sur l'argile colmate les pores du cake et contrôle ainsi la filtration.

Par conséquent, deux phénomènes sont responsables de l'augmentation du filtrat observé aux fortes forces ioniques :

- l'effet dispersant du polymère disparaît lorsque les charges du polymère sont écrantées par ce sel, ce qui entraîne une agrégation des particules d'argile,
- l'écrantage des charges du polymère provoque une diminution de viscosité du fluide, ce qui réduit les capacités du fluide à colmater les pores du cake.

Les rhéogrammes des différents fluides et les valeurs de gel obtenues sont reportés sur les figures 6.4 et 6.5 et le tableau 6.2. L'ajout de polysaccharide augmente la viscosité et la thixotropie des fluides. Les fluides ont un caractère rhéofluidifiant plus marqué en présence de sel. Aux faibles forces ioniques, la viscosité des fluides avec polymère augmente avec la concentration en sel. Par contre, au-delà d'une certaine force ionique ou en présence de 5 g/l de CaCl_2 , cette viscosité diminue. Le caractère thixotrope des fluides varie de la même façon. La viscosité des dispersions d'argile sans polymère augmente également en présence de sel. Ce phénomène peut être attribué à une agrégation progressive des particules d'argile. En présence de CaCl_2 , la viscosité de ces dispersions diminue car les agrégats deviennent très compacts. Cette agrégation est certainement responsable de l'augmentation du volume filtré, observée aux fortes forces ioniques.

TABLEAU 6.2 : Influence de la salinité et de la concentration en gellane Rh250Ox sur la thixotropie des formulations.

[gellane] (g/l)	0		0,5		1,5		3		6,3	
	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10
[NaCl] 0 g/l	3	3	1,5	2,5	6	11	12	24	--	--
[NaCl] 5 g/l	2,5	2,5	6	10	8	13	23	37	--	--
[NaCl] 10 g/l	2,5	8	7	13	10	12	25	34	47	49
[NaCl] 30 g/l	--	--	--	--	--	--	14	16	--	--
[NaCl] 50 g/l	4	7	--	--	--	--	11	13	21	21
[NaCl] 5 + [CaCl ₂] 1 g/l	--	--	--	--	--	--	18	25	--	--
[NaCl] 5 + [CaCl ₂] 5 g/l	3,5	3,5	--	--	--	--	11	14	31	31

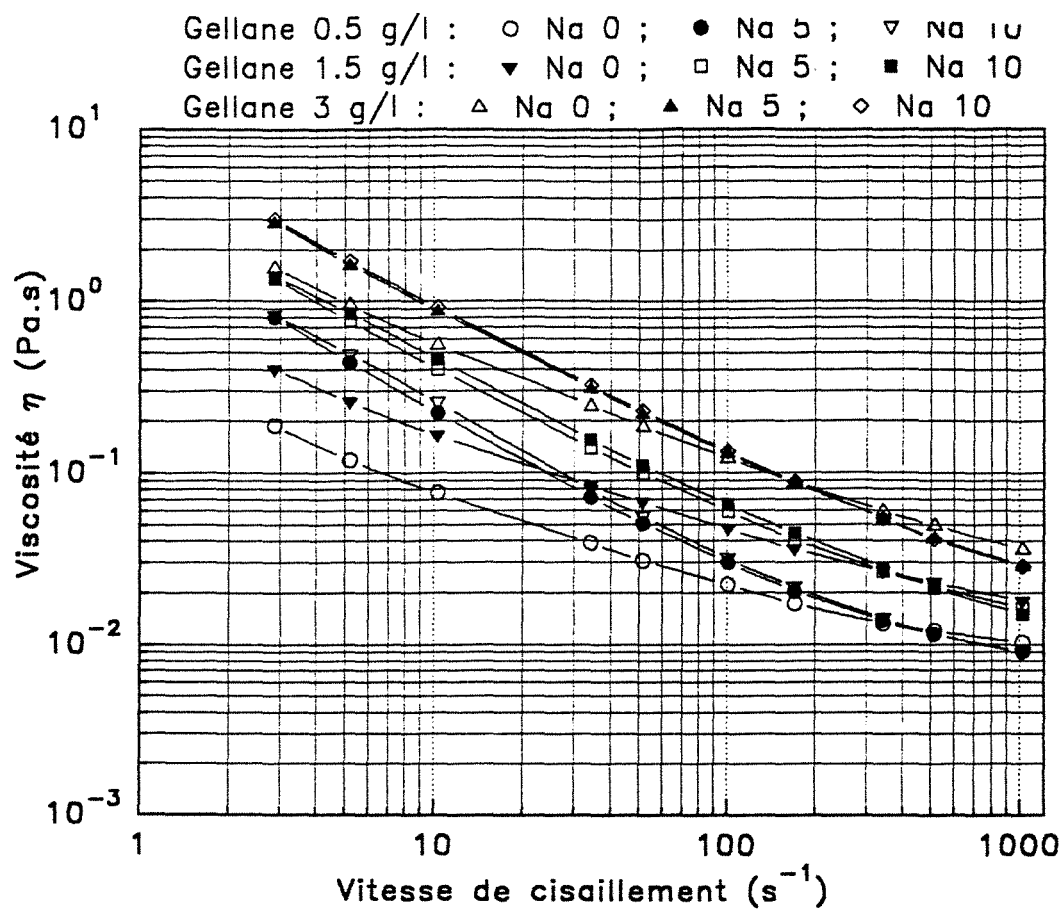


FIGURE 6.4 : Influence des concentrations en sel et en gellane sur le comportement rhéologique des fluides de forage.

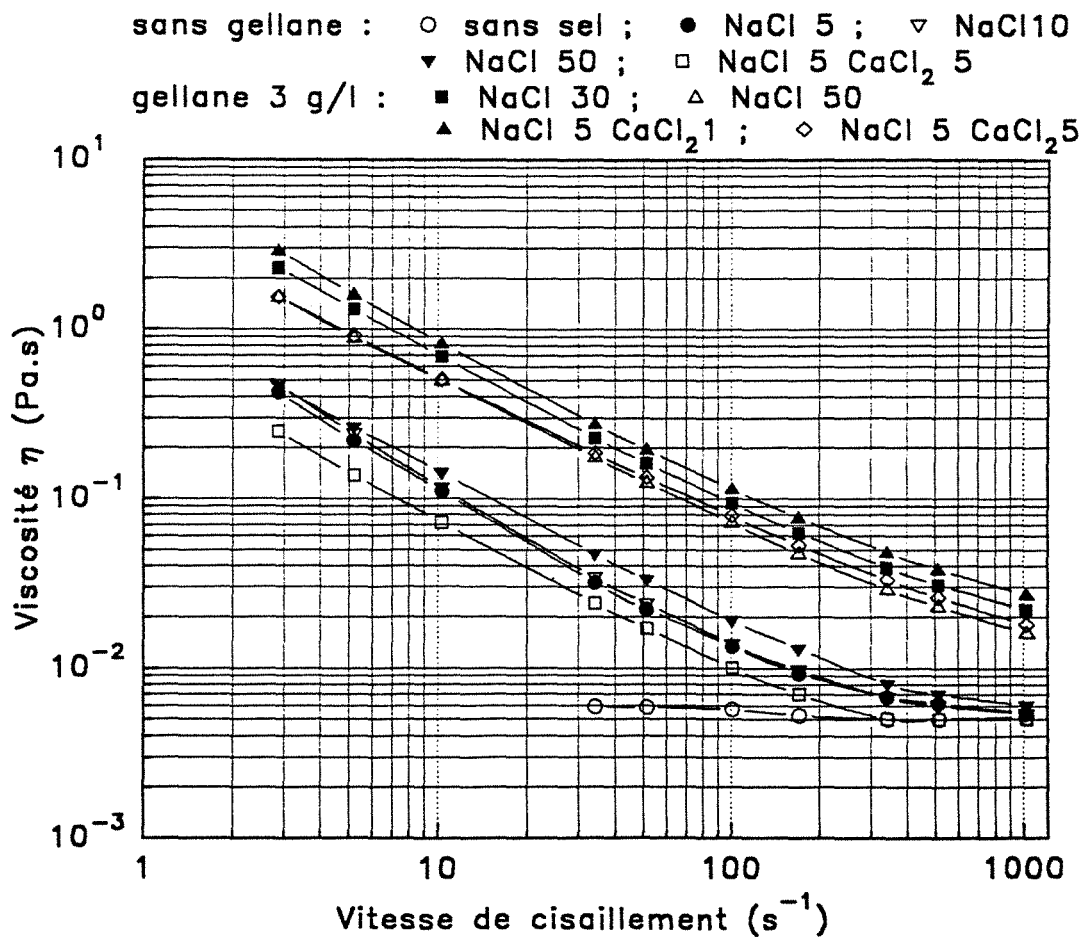
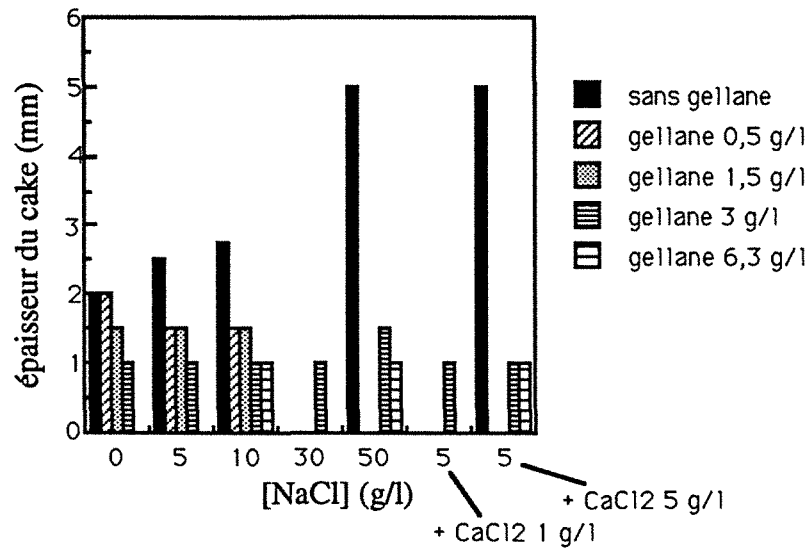


FIGURE 6.5 : Influence des concentrations en sel et en gellane sur le comportement rhéologique des fluides de forage.

Les épaisseurs des cakes formés après 30 minutes de filtration sont rassemblées sur la figure 6.6. L'épaisseur du cake formé est un paramètre important pour le forage et des cakes fins et élastiques sont recherchés. En présence de gellane, l'épaisseur du cake diminue lorsque la concentration en polysaccharide croît. Les résultats obtenus avec 3 et 6,3 g/l de gellane sont intéressants puisque les cakes formés sont fins, de l'ordre du millimètre, et ne sont pas fragiles. Par ailleurs, l'épaisseur du cake n'est pas fonction de la force ionique des fluides.

FIGURE 6.6 : Epaisseur des cakes formés après 30 minutes de filtration.



6.4. Comparaison avec la CMC

Des formulations ont été réalisées avec de la CMC car c'est le polymère le plus utilisé en forage en tant que réducteur de filtrat. Les résultats obtenus avec de la CMC à 3 g/l sont reportés dans le tableau 6.3 et la figure 6.7. Les filtrations obtenues sont comparées avec celles des fluides contenant 3 et 6,3 g/l de gellane brut sur la figure 6.8.

TABLEAU 6.3 : Influence de la salinité pour des fluides contenant 3 g/l de CMC.

Salinité	NaCl 0	NaCl 5	NaCl 10	NaCl 50	NaCl 5 CaCl ₂ 5
gel 0	2	2,5	2	6	11
gel 10	2	6	7	12	14
cake (mm)	1	1	1,5	2	3

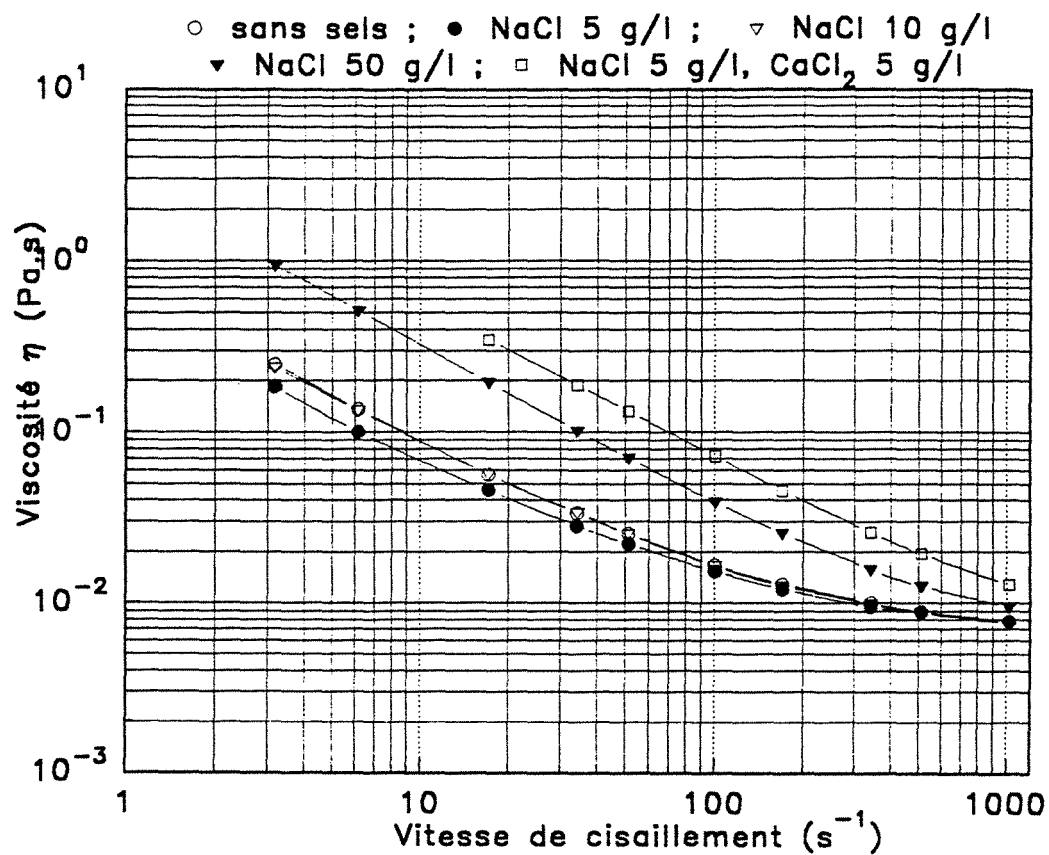
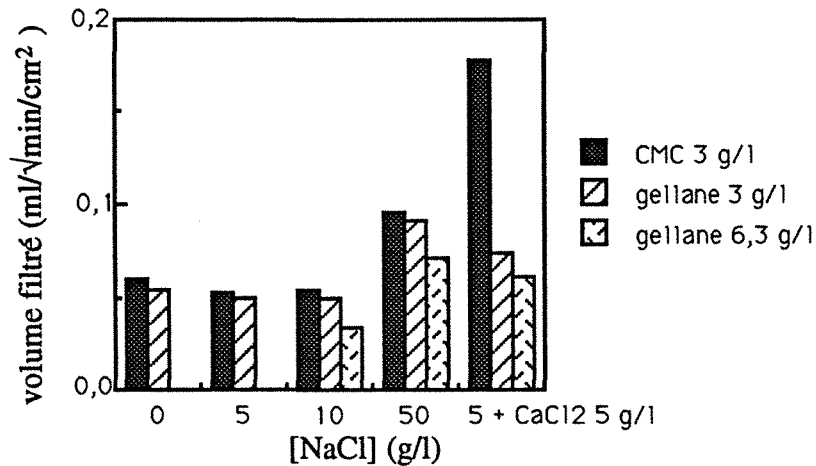


FIGURE 6.7 : Influence des concentrations en sel sur le comportement rhéologique des fluides de forage contenant 3 g/l de CMC.

FIGURE 6.8 : Volume filtré obtenu pour des fluides contenant 3 g/l de CMC et 3 et 6,3 g/l de gellane brut.



Les volumes de filtrat obtenus avec le gellane brut et la CMC à même concentration sont similaires, excepté en présence de 5 g/l de CaCl_2 . A cette salinité, la filtration obtenue avec le gellane est en effet inférieure de 58% à celle obtenue avec la CMC. Les polymères flexibles comme la CMC sont connus pour être sensibles aux ions divalents qui provoquent une aggrégation des chaînes.

Les fluides contenant de la CMC présentent des viscosités largement inférieures à ce qui est obtenu avec le gellane. Le caractère thixotrope de ces fluides est par ailleurs beaucoup plus faible.

A faible force ionique, les cakes formés avec la CMC présentent la même épaisseur que ceux obtenus avec le gellane, mais cette épaisseur augmente pour les fortes concentrations en sel.

Les résultats obtenus avec 6,3 g/l de gellane brut, c'est-à-dire une concentration nette en matière active de 3 g/l, sont supérieurs à ceux obtenus avec 3 g/l de CMC. Le meilleur comportement du gellane en tant que réducteur de filtrat est probablement dû à une capacité à former des gels beaucoup plus importante que la CMC et donc à son aptitude à "colmater" les pores du cake formé par filtration.

6.5. Influence de la température

L'influence de la température sur la filtration est étudiée sur des fluides contenant 3 g/l de gellane, 10 g/l de NaCl et 30 g/l d'argile. Les résultats de filtration sont reportés sur la figure 6.9.

Le volume filtré obtenu à 30°C sous 35 bar est équivalent à celui obtenu sous 7 bar à 25°C dans les cellules API. Lorsque la température augmente, la filtration augmente

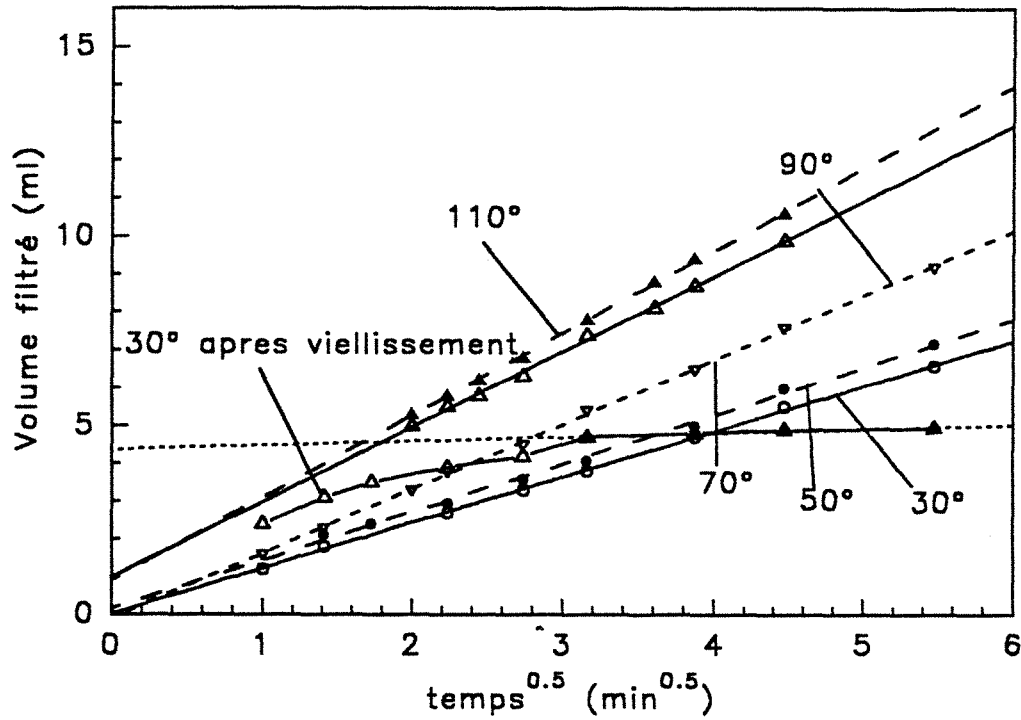


FIGURE 6.9 : Influence de la température sur le volume filtré pour un fluide contenant 3 g/l de gellane et 10 g/l de NaCl.

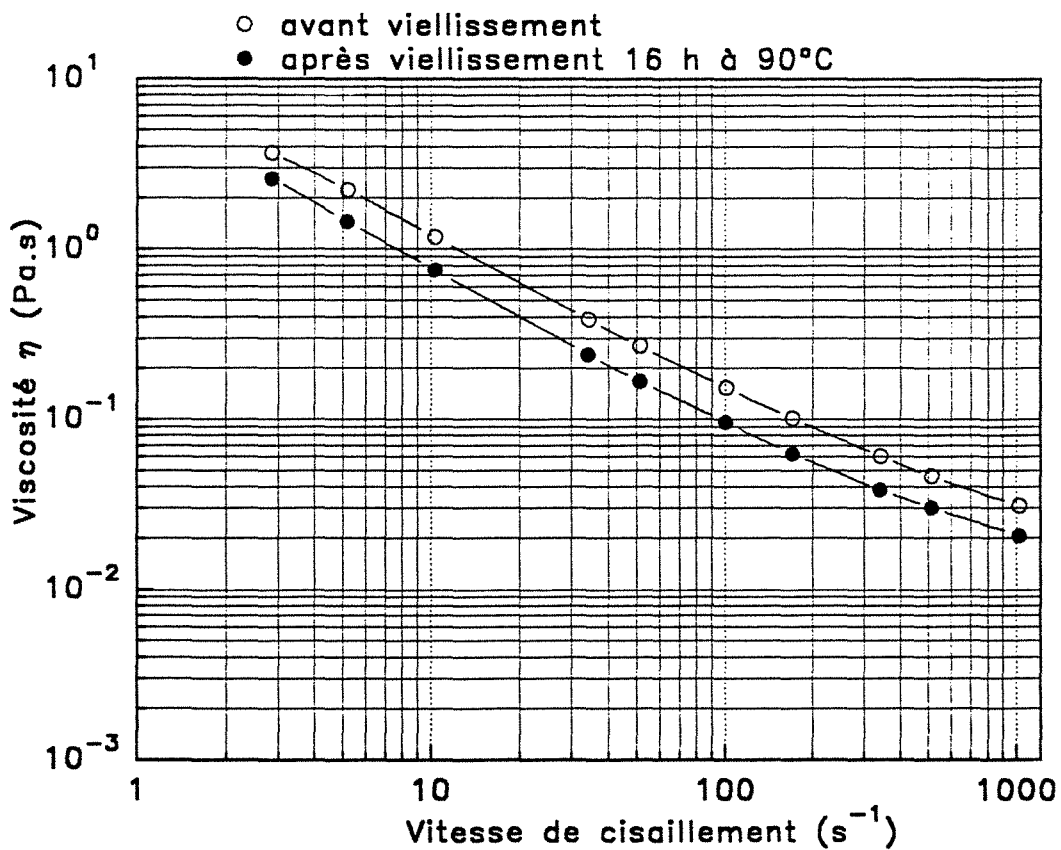


FIGURE 6.10 : Comportement rhéologique à 30°C d'un fluide contenant 3 g/l de gellane et 10 g/l de NaCl avant et après traitement thermique.

lentement. Entre 30 et 110°C, le volume de filtrat croît de 94%. L'épaisseur du cake ne varie pas jusqu'à 110°C. Il est intéressant de remarquer que la filtration obtenue sous 35 bar est identique à celle obtenue sous 7 bar, ce qui signifie que le cake est compressible.

Trois raisons peuvent expliquer l'augmentation du volume de filtrat avec la température :

- la viscosité du filtrat diminue et selon la loi de Darcy, le volume filtré augmente,
- l'équilibre électrochimique de la suspension peut subir des transformations. Une floculation ou une agrégation de la suspension s'établit et la taille des particules change,
- les composants organiques sont très sensibles à une augmentation de la température. Ils peuvent se dégrader chimiquement et ne plus permettre de contrôler la perméabilité du cake.

Dans notre cas il est peu probable que le polymère soit dégradé chimiquement. Par contre, une étude préliminaire ayant démontré que la viscosité du gellane en solution et en présence d'ions monovalents diminue avec la température, l'hypothèse de la diminution de viscosité est tout à fait envisageable. Par ailleurs, cette étude a également montré que la viscosité d'une solution de gellane en présence de CaCl_2 est insensible à la température, du moins jusqu'à 70°C. Il serait donc très intéressant de renouveler cette série d'expériences en présence d'un ion divalent.

Une boue vieillie 16 heures à 90°C présente un aspect faiblement gélifié après retour à température ambiante. Ce fluide est testé après une homogénéisation de 5 minutes au mélangeur. La viscosité de ce fluide vieilli est plus faible (figure 6.10), mais en filtration, un cake imperméable se forme après le passage de quelques millilitres de filtrat (figure 6.9). Cette déviation par rapport à la courbe d'évolution du filtrat durant les premières minutes de la filtration est couramment appelée "spurt loss".

6.6. Influence des conditions de production

Des essais sont réalisés avec des concentrations équivalentes en gellane brut de 3 g/l et des concentrations en matière active de 1,45 g/l en utilisant les produits issus des fermentations précédemment décrites. La salinité des fluides est de 10 g/l en NaCl et la concentration en argile utilisée est de 30 g/l. Les résultats sont reportés sur les figures 6.11 à 6.14 et le tableau 6.4.

Les résultats de filtration obtenus ne laissent pas apparaître d'importantes différences entre les gellanes.

A même concentration en poudre, les meilleurs résultats de filtration sont obtenus avec le gellane RH250Ox (figure 6.12). Ce produit présente la plus forte teneur en matière active parmi les polysaccharides obtenus avec le même milieu de culture. Le gellane

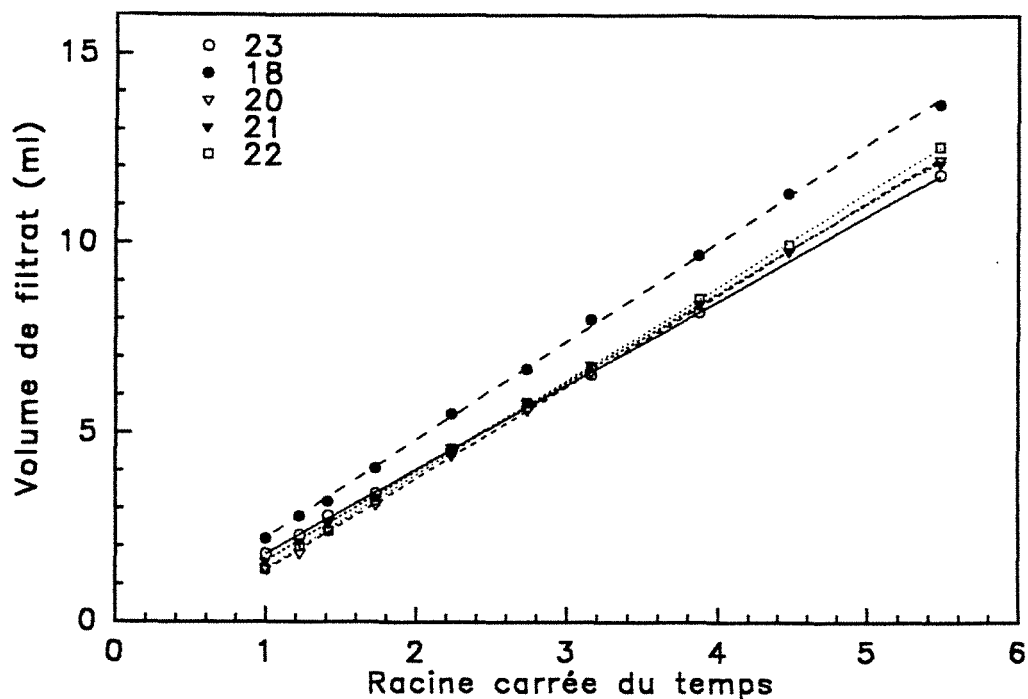


FIGURE 6.11 : Volume filtré pour des fluides contenant 10 g/l de NaCl et 3 g/l des différents gellanes obtenus lors des fermentations.

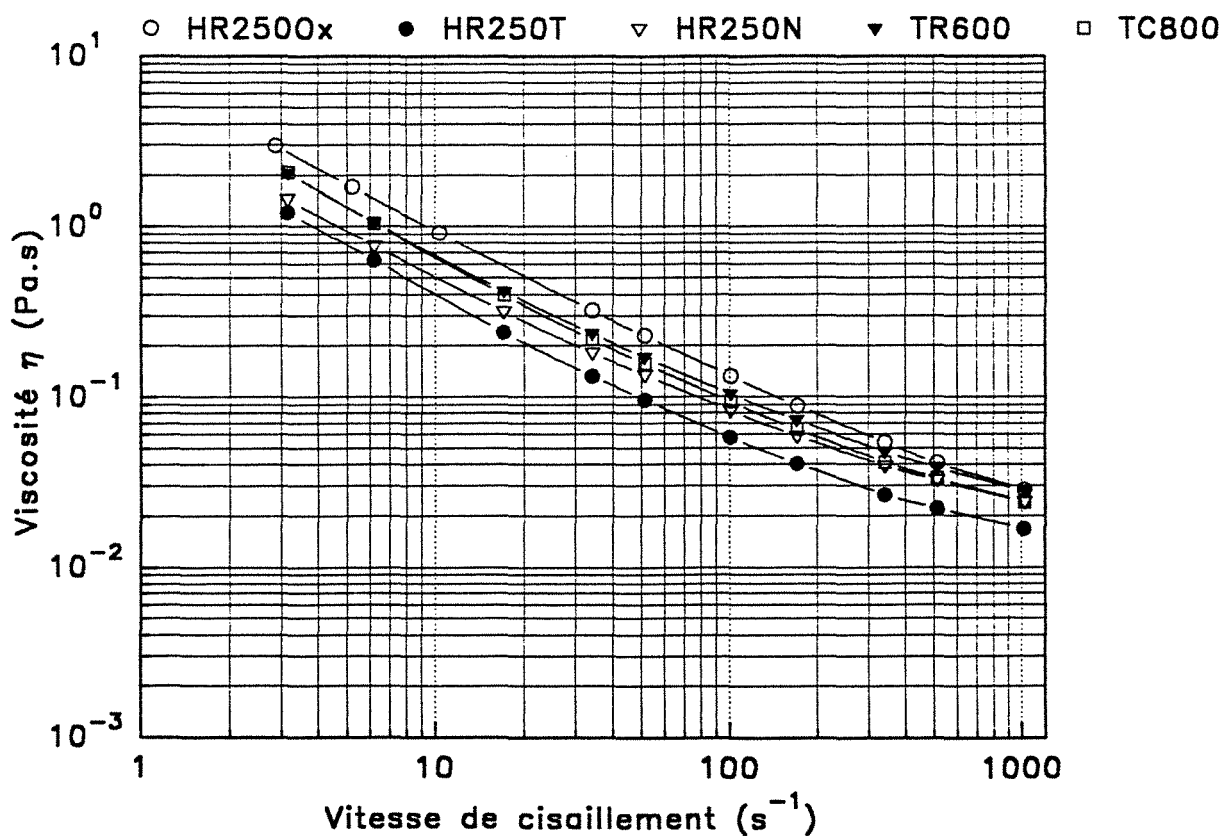


FIGURE 6.12 : Comportement rhéologique de fluides contenant 10 g/l de NaCl et 3 g/l des différents gellanes obtenus lors des fermentations.

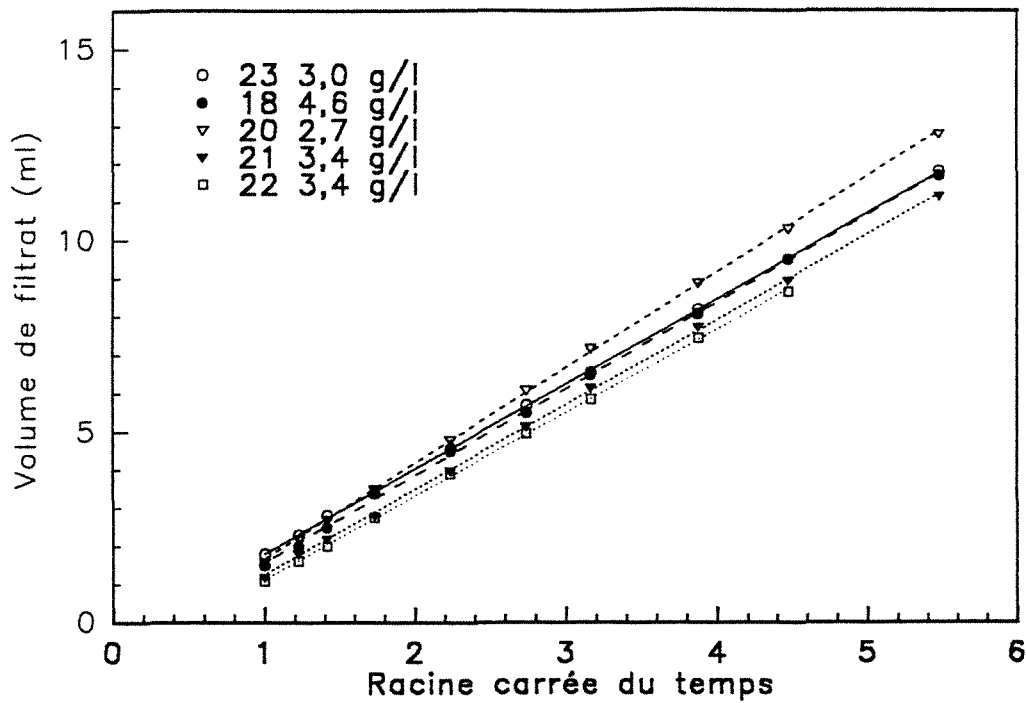


FIGURE 6.13 : Volume filtré pour des fluides contenant 10 g/l de NaCl et la même concentration en matière active.

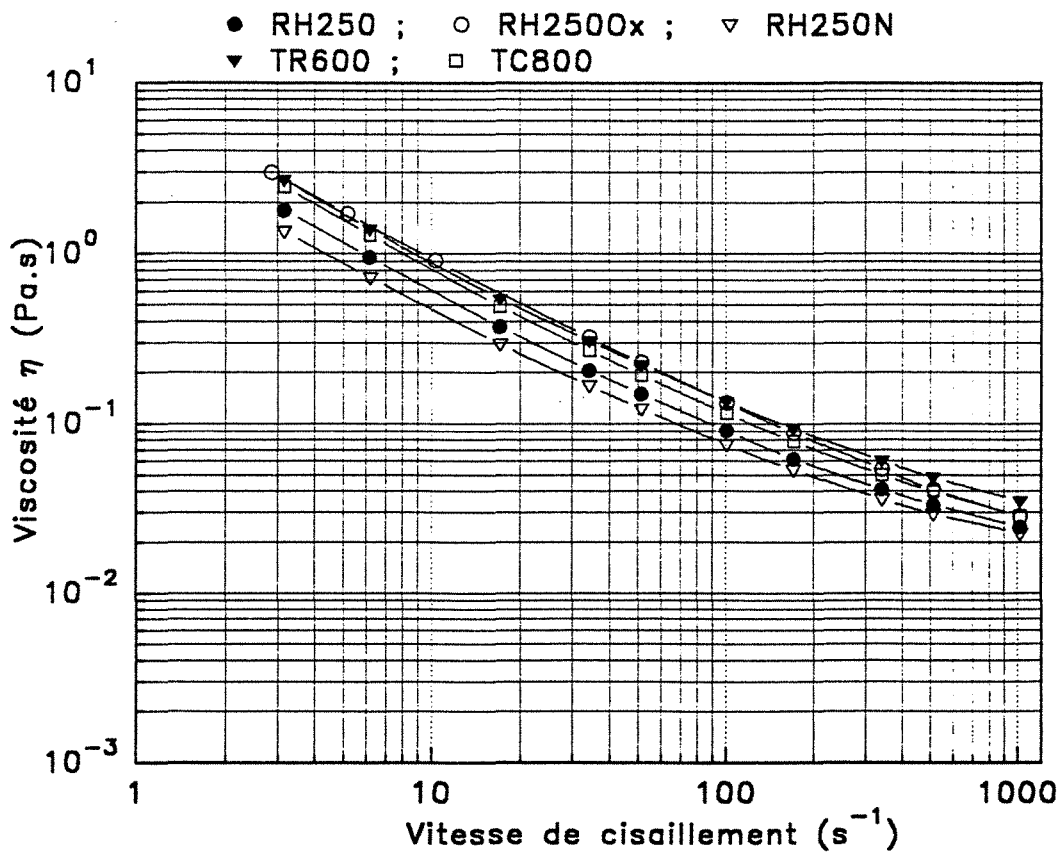


FIGURE 6.14 : Comportement rhéologique des fluides contenant 10 g/l de NaCl et la même concentration en matière active.

RH250, obtenu dans les conditions de culture les plus limitantes en oxygène présente la plus forte filtration et un caractère thixotrope plus faible. Le fluide contenant le gellane RH250Ox présente quant à lui la viscosité la plus importante (figure 6.13). Les fluides les moins visqueux sont obtenus pour les gellanes RH250 et RH250N.

TABLEAU 6.4 : Valeurs de gel obtenues pour les différents gellanes à même concentration en poudre et à même concentration en matière active.

fermentation	RH250		RH250N		RH250Ox		TR600		TC800	
[gellane] (g/l)	3	4,6	3	2,7	3	3	3	3,4	3	3,4
gel 0	10	12	11	9	25	25	13	15	13	14
gel 10	14	19	19	18	34	34	22	23	20	23
cake (mm)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

A même concentration en matière active, les filtrations obtenues sont similaires pour tous les produits excepté pour le gellane RH250N (figure 6.13). Ce produit donne un fluide de viscosité plus faible (figure 6.14). Le gellane RH250 conduit également à l'obtention d'un fluide de faible viscosité.

6.7. Conclusion

Le potentiel du gellane en tant qu'additif pour fluide de forage à base d'eau est très intéressant. A faible concentration, le gellane apporte de la thixotropie et de la viscosité aux solutions d'argiles. Le gellane est également un réducteur de filtrat efficace à faible concentration et son action est peu sensible à la température, du moins jusqu'à 110°C, et à la présence d'ions mono- et divalents.

Étant donné le fort caractère agrégeant du gellane en présence d'électrolyte, il est probable que ses capacités en tant que réducteur de filtrat soient plus dues au colmatage des pores du cake par le polymère qu'à une meilleure dispersion des particules d'argile.

En comparaison avec la CMC, les fluides contenant du gellane sont plus thixotropes, plus visqueux et sont moins sensibles aux ions divalents.

Peu de différences ont pu être mises en évidence entre les gellanes synthétisés dans des conditions différentes. A même concentration en poudre de gellane brut ajouté, les meilleurs résultats sont obtenus avec les produits présentant les plus fortes teneurs en polysaccharide, excepté le gellane RH250N. Ce polysaccharide produit à partir d'un milieu de culture pauvre en azote donne en effet de moins bons résultats bien que sa teneur en polysaccharide soit élevée. Par ailleurs, la viscosité des fluides formulés avec le produit RH250, qui contient une plus forte proportion de débris cellulaires, est plus faible que celle obtenue pour les autres gellanes à concentration en polysaccharide équivalente.

Il est intéressant de comparer les résultats obtenus avec les gellanes issus des fermentations avec ceux du Gelrite, c'est-à-dire un gellane commercial désestérifié et clarifié. Pour une formulation contenant 20 g/l d'argile et 2 g/l de Gelrite, ce qui correspond dans notre cas à 4,2 g/l de gellane brut, le volume de filtrat est faible dans de l'eau douce (15 ml en 30 min). Ce résultat correspond à ce que nous avons obtenu avec le gellane brut. Par contre le Gelrite est beaucoup plus sensible aux sels. Par exemple, la viscosité d'une solution à 4 g/l de Gelrite est équivalente à celle de l'eau pour une concentration en KCl supérieure à 5 g/l. Cette diminution de viscosité provoque une augmentation des volumes filtrés pour des fluides en milieu très salé. Le filtrat obtenu est par exemple de 275 ml en 30 min pour une formulation à base d'eau de mer. Par ailleurs, la présence d'électrolytes rajoutés par le fabricant dans le Gelrite pour obtenir des gels fermes rend impossible la remise en solution de ce polymère dans les conditions utilisées pour le gellane brut. Il est nécessaire dans ce cas d'utiliser des séquestrants pour éviter de recourir à un chauffage. La conclusion de cette rapide comparaison est que le gellane brut utilisé lors de cette étude est beaucoup mieux adapté à l'application fluide de forage que le gellane commercial désestérifié et clarifié.

CHAPITRE 7 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES

7. Conclusion et perspectives

Cette étude a permis de dégager plusieurs points essentiels concernant la production de gellane et ouvre de nouvelles perspectives d'application, dont les publications existantes et traitant essentiellement de la caractérisation et de l'utilisation du gellane dans le domaine alimentaire ne se sont pas fait écho. Nous avons ainsi pu combler certaines lacunes ayant trait à la physiologie d'*A. elodea* et surtout améliorer la connaissance de l'influence de l'hydrodynamique du fermenteur sur la production proprement dite et sur les propriétés et caractéristiques du gellane. Ce dernier point est crucial, étant donné les possibilités de structuration de ce polysaccharide en cours de fermentation. Enfin et surtout, nous avons mis en évidence l'intérêt du gellane pour de nouvelles applications dans le domaine pétrolier, son utilisation en tant qu'additif pour fluides de forage semblant prometteuse. Ce sont tous ces aspects que nous allons résumer maintenant en concluant par les nouvelles perspectives qui découlent du présent travail.

7.1. Production de gellane

L'ensemble des fermentations a permis d'acquérir un certain nombre de connaissances sur la physiologie d'*A. elodea* IFP 1001.

Nous avons mis en évidence une diauxie au niveau de l'assimilation de l'azote. En présence de sources d'azote minérales et organiques, les composés minéraux sont assimilés en premier lieu. Si ceux-ci sont constitués d'ions ammonium et nitrate, l'azote ammoniacal est tout d'abord consommé et la croissance sur nitrate ne débute qu'après épuisement des ions ammoniums. La croissance sur azote organique est associée à une consommation moins importante d'oxygène. Cependant, l'adjonction d'azote organique aux sources d'azote minéral conduit à des croissances plus rapides que sur azote minéral, certainement en raison de l'apport de facteurs de croissance qui restent à identifier. Par ailleurs, l'absence d'azote organique provoque l'apparition d'une phase de latence importante avant l'assimilation des ions nitrates.

Les résultats obtenus montrent également que la croissance cellulaire et la production de gellane sont deux mécanismes concomitants chez *A. elodea*. Toutefois, le couplage n'est pas total puisque la biosynthèse de polysaccharide continue après l'arrêt de la croissance cellulaire, la vitesse de production diminuant cependant rapidement. Le couplage de la croissance et de la production peut se visualiser par l'aspect de la culture durant les premières heures de fermentation. En effet, le moût ne présente pas l'aspect d'une culture bactérienne homogène, mais d'une suspension d'agglomérats muqueux. Ces agglomérats sont portés par un fluide limpide et de très faible viscosité et c'est en leur sein que se

développent les bactéries. Ce type de croissance est proche de celui d'un biofilm, les microorganismes étant ici piégés dans un réseau de gellane qui s'étend au cours de la culture jusqu'à formation d'un milieu homogène.

La croissance d'*A. elodea* nécessite une quantité importante d'oxygène. Le transfert en oxygène doit être d'autant plus efficace que les capacités de transfert du fermenteur diminuent avec l'accumulation du polysaccharide. La synthèse du polymère requiert également de l'oxygène mais en quantité moins importante que la croissance cellulaire.

En ce qui concerne le suivi de la fermentation, des méthodes d'estimation rapides de la concentration en gellane ont été mises au point. Pour l'ensemble des cultures, la concentration en biopolymère peut être évaluée à l'aide de corrélations développées entre le seuil d'écoulement des mouls et la concentration en gellane, ces relations étant fonction des conditions hydrodynamiques de culture. Pour les cultures avec le ruban hélicoïdal, l'évolution de la puissance volumique injectée permet de suivre l'avancement de la production de polysaccharide. De plus, une corrélation a été établie entre la puissance volumique injectée dans le fermenteur et la concentration en gellane pour des concentrations supérieures à 2,5 g/l. Dans le cas des fermentations réalisées avec les turbines, le suivi de la puissance volumique injectée ne donne pas de renseignements précis sur la production de gellane, mais permet d'estimer l'importance des phénomènes de cavitation des agitateurs.

Par ailleurs, il est important de souligner que le procédé de fermentation est maîtrisé puisque les cultures réalisées dans des conditions identiques ont donné des résultats équivalents. Il a alors été possible d'étudier l'influence de l'hydrodynamique du fermenteur.

Le principal avantage du ruban hélicoïdal est de conserver d'excellentes conditions de macromélange jusqu'à la fin des fermentations, mais ce module d'agitation ne transfère que des quantités limitées d'oxygène, même pour une vitesse d'agitation importante (RH250). Par contre, un apport supplémentaire en oxygène par l'enrichissement de l'air injecté améliore d'un facteur deux la production de gellane (RH250Ox). En outre, une réduction des besoins en oxygène de la culture, par le biais d'une suppression des sources d'azote organique, conduit également à une bonne production de gellane (RH250N). Dans ce cas, la production de gellane est du même ordre de grandeur, mais la concentration cellulaire est deux fois plus faible et le temps de culture plus long.

Les systèmes d'agitation à turbine génèrent l'apparition d'hétérogénéités très importantes et de grandes zones de stagnation dans le fermenteur. Cependant, une vitesse d'agitation suffisante conduit à une très bonne production de polysaccharide. On peut remarquer que la cavitation des agitateurs est moins importante pour le système d'agitation

comprenant la turbine centripète (TC800) qui crée une recirculation axiale radiale, qu'avec les turbines Rushton (TR600).

Finalement, les productions de gellane brut les plus importantes sont de l'ordre de 13 g/l contenant environ 7,5 g/l de polysaccharide natif. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Kang et Veeder (1982a) avec la souche *A. elodea* de l'ATCC et à ceux obtenus par Lobas *et al.* (1992) avec *S. paucimobilis*.

Pour les fermentations ayant donné de bonnes productions de gellane avec le milieu de fermentation complet, la productivité en gellane est de 0,23 g/l/h. La productivité spécifique maximale, 0,052 g_{gellane}/g_{cellules}/h, est obtenue pour la fermentation RH250N pour laquelle la concentration cellulaire a été faible. Pour les autres cultures, cette productivité spécifique tombe à 0,040 g_{gellane}/g_{cellules}/h. Le meilleur rendement de conversion de glucose en gellane natif est de 0,34 g_{gellane}/g_{glucose}.

7.2. Influence de l'hydrodynamique sur les caractéristiques du gellane.

L'étude du comportement rhéologique des moûts pour les cultures ayant donné une production de polysaccharide comparable est intéressante et permet d'effectuer une approche macroscopique des différences. En effet, ces comportements sont très différents et plus le macromélange est homogène (TR600 < TC800 < RH250Ox) moins le mout est rhéofluidifiant. Les différences les plus significatives s'observent au niveau de la viscosité des moûts, celui de TR600 étant par exemple beaucoup moins visqueux et structuré que celui de RH250Ox. Par contre, dans des conditions de macromélange identiques, la viscosité des moûts obtenus peut être différente. Ainsi, le mout de RH250N est moins visqueux que celui de RH250Ox.

Ces disparités sont le reflet de différences au niveau des caractéristiques des polysaccharides formés. Ainsi, leur masse molaire varie avec les conditions hydrodynamiques de biosynthèse et plus exactement elle augmente avec l'homogénéité du macromélange lors de la biosynthèse. Le polysaccharide issu de la fermentation avec le ruban hélicoïdal RH250Ox présente ainsi une masse molaire deux fois plus élevée que celui obtenu avec la turbine Rushton et que le Gelrite, et le gellane issu de la fermentation TC800 présente une masse molaire intermédiaire. Il est également intéressant de remarquer que le gellane issu de la fermentation RH250N présente une masse molaire beaucoup plus faible que les autres produits, ce qui confirme les observations rhéologiques. Par ailleurs, la limitation en oxygène imposée aux bactéries lors de la biosynthèse a peu d'influence sur la masse molaire du produit. Le gellane issu de la fermentation RH250 pour laquelle la limitation en oxygène a été importante présente une masse molaire similaire à celle du produit obtenu dans les mêmes conditions de mélange mais avec un apport d'oxygène supplémentaire.

Un autre résultat intéressant est obtenu en chromatographie de perméation de gel. Les profils de masse montrent en effet une distribution de masse molaire bimodale. Il est toujours possible que cette observation soit due à une agrégation des molécules de polymère, mais la régularité des résultats obtenus, aussi bien avec les gellanes issus de nos fermentations qu'avec le gellane commercial permet de penser qu'il s'agit véritablement de deux espèces. Il serait intéressant de séparer ces deux fractions de façon à les analyser.

Le dosage des degrés d'estérification du polymère donne également des résultats intéressants. En effet, les analyses ont montré que les degrés d'estérification obtenus sont plus forts pour les productions interrompues prématurément, ces différences pouvant être dues à des variations de la physiologie de la cellule. Le taux d'acétylation de 50% observé par de nombreux auteurs a également été mesuré pour les gellanes issus des fermentations qui ont donné de bonnes productions. Par contre, les taux d'estérification par le glycérate que nous avons obtenus sont largement inférieurs à ceux observés par Kuo *et al.* (1986) et par Chang et Kobzeff (1992).

7.3. Intérêt du gellane dans les boues de forage

Le gellane présente un potentiel d'applications très intéressant en tant que réducteur de filtrat et agent thixotrope pour les boues de forage non polluantes à base d'eau. Par rapport à la CMC qui est le réducteur de filtrat le plus couramment utilisé, le gellane a des propriétés équivalentes de réducteur de filtrat en présence d'ions monovalents, et il présente une meilleure stabilité par rapport aux ions divalents. De plus, il apporte de la viscosité aux fluides et un caractère thixotrope très recherché et qui est faible pour les solutions de CMC. Les résultats obtenus à haute température ont montré une bonne tenue du caractère réducteur de filtrat, du moins jusqu'à 110°C en présence d'ions monovalents.

Il serait intéressant de compléter cette étude par une série d'essais à plus haute température en présence d'ions monovalents et surtout d'ions divalents. En effet, l'efficacité d'action du gellane en tant que réducteur de filtrat étant certainement due à sa capacité à former des gels, on peut penser que le pouvoir réducteur de filtrat sera conservé à plus haute température en présence d'ions divalents car les gels de gellane conservent leur stabilité à plus haute température en présence de ces électrolytes. En outre, il serait nécessaire de compléter ce travail par une étude de stabilité thermique en présence d'ions divalents afin d'estimer les limites d'utilisation du gellane.

Les fluides de forage formulés avec les différents gellanes synthétisés ne présentent pas de différences importantes. Ce résultat s'explique par le fait que ce sont plus les propriétés agrégeantes du polymère que ses propriétés visqueuses qui sont alors mises en jeu. On peut cependant noter que les produits obtenus avec un milieu de culture fortement limité en azote ou dans des conditions de transfert très limitantes en oxygène ont donné des

résultats relativement plus faibles que les autres.

Le produit que nous avons utilisé est brut, c'est-à-dire qu'il n'a subi aucune purification, ce qui est économiquement avantageux pour les applications en forage. Les résultats obtenus avec le produit commercial qui est clarifié et désestérifié (et donc plus cher) sont moins intéressants car celui-ci présente une sensibilité aux sels accrue. Par ailleurs, les traitements post-fermentaires étant très coûteux, il serait intéressant d'étudier l'importance et l'influence de ces opérations sur les propriétés du gellane dans les fluides de forage afin d'obtenir le compromis le plus favorable entre le coût de production du biopolymère et ses potentialités d'application. L'utilisation du moût de fermentation brut serait, dans cette optique, une perspective très économique.

Finalement, on peut penser que le gellane peut trouver d'autres applications en forage, par exemple en tant que fluide de complétion ou de fracturation où ses capacités gélifiantes pourraient être mises à profit.

7.4. Perspectives

Le développement du gellane en tant qu'additif pour fluides de forage sera d'autant plus important que le prix de revient de ce polysaccharide sera faible. Il est donc nécessaire d'optimiser la biosynthèse du gellane pour arriver à un niveau de production supérieur. En premier lieu, il est nécessaire d'identifier les limitations. L'arrêt de production est certainement dû à deux phénomènes : la faible viabilité cellulaire d'*A. elodea* en phase stationnaire de croissance qui peut être minimisée par la sélection de souches plus stables, et la limitation en oxygène qui découle de la forte dégradation des capacités de transfert du fermenteur due à l'augmentation importante de la viscosité du moût. Plusieurs démarches peuvent être envisagées pour réduire l'impact des limitations.

Du point de vue microbiologique, les résultats concernant l'assimilation des sources d'azote permettent de penser que les vitesses de consommation d'oxygène pourraient être réduites par le biais d'une optimisation de la composition en azote du milieu initial. Il serait par exemple intéressant de réaliser des fermentations avec seulement du nitrate comme source d'azote, ou de diminuer l'apport en azote minéral en le compensant par un apport en azote organique, ou encore de réaliser un "fed batch" en contrôlant la croissance cellulaire par une limitation en azote.

La température de fermentation est également un paramètre sur lequel on pourrait agir. En effet, une réduction de la température de culture durant la phase de croissance cellulaire devrait réduire la vitesse de croissance bactérienne abaissant ainsi la demande en oxygène dans le fermenteur. Par contre, une augmentation de la température permettrait de diminuer la viscosité du moût. Il serait donc envisageable de réaliser un découplage en température en imposant une faible température durant la phase de croissance cellulaire et

en l'augmentant dès que cette croissance est terminée.

Dans le but de réduire les limitations diffusionnelles à l'intérieur des agglomérats, on peut penser qu'une réduction de la force ionique du milieu permettrait d'obtenir un biopolymère moins agrégé. L'utilisation de l'azote ammoniacal serait alors à éviter car l'assimilation de ce composé entraîne une forte acidification du milieu de culture qui nécessite un ajout de solution basique important.

Pour améliorer les transferts dans le fermenteur, on peut penser qu'un double agitateur comprenant une turbine centrale pour la dispersion des bulles d'air et un agitateur de proximité pour assurer l'homogénéisation du moût donnerait une combinaison intéressante. La création d'une émulsion serait également une parade efficace aux problèmes de viscosité et de transfert d'oxygène. L'ajout de tensio-actif pourrait être une méthode intéressante mais il est souvent difficile d'éliminer ces composés lors de l'extraction du produit. L'utilisation d'une émulsion à base d'huiles peut par contre être envisagée, les huiles étant généralement facilement éliminées par partage de phase.

Finalement, il serait également intéressant dans le cadre de l'optimisation de la production de déterminer précisément les paramètres cinétiques tels que les vitesses spécifiques de croissance ou de production.

CHAPITRE 8 : RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

8. Références bibliographiques

- Baird, J.K., Sandford, P.A. and Cottrell, I.W. (1983) Industrial applications of some new microbial polysaccharides, *Biotechnology*, 15, 778.
- Baird, J.K. and Shim, J.L. (1985) Non-heated gellan gum gels, *Eur. Pat.* 130 689.
- Baird, J.K. and Cleary, J.M. (1991) PHB-free gellan gum broth, *Eur. Pat.* 473 222.
- Best, G.H. and Baird, J. (1989) Tests identify oil-field polymers, *Oil Gas J.*, 2, 83.
- Brito - de la Fuente, E., Leuliet, J.C., Choplin, L. and Tanguy, P.A. (1992) On the effect of shear-thinning behaviour on mixing with an helical ribbon impeller, in "Process mixing : chemical and biochemical applications", Tatterson, G.B. and Calabrese, R.V. (eds), *A.I.Ch.E. Symp. Series.*, 286, pp 28-32.
- Brito - de la Fuente, E. (1992) Thèse de Doctorat, Université Laval, Québec, Canada.
- Browsey, G.J., Chilvers, G.R., Anson, K.I. and Morris, V.J. (1984) Some observations (or problems) on the characterization of gellan gum solutions, *Int. J. Biol. Macromol.*, 6, 211.
- Burchard, W. (1963) Das viskositätsverhalten von amylose in verschiedenen lösungsmitteln, *Macromol. Chem.*, 64, 110.
- Cairns, P., Miles, M.J. and Morris, V.J. (1991) X-ray fibre diffraction studies of the gellan family of polysaccharides, *Carbohydr. Polym.*, 14, 367.
- Campana, S., Ganter, J., Milas, M. and Rinaudo, M. (1992) On the solution properties of bacterial polysaccharides of the gellan family, *Carbohydr. Res.*, 231, 31.
- Carreau, J.P. (1968) Ph.D Thesis, University of Wisconsin, Madison, WI, USA.
- Carroll, V., Chilvers, G.R., Franklin, D., Miles, M.J., Morris, V.J. and Ring, S.G. (1983) Rheology and microstructure of solutions of the microbial polysaccharide from *Pseudomonas elodea*, *Carbohydr. Res.*, 114, 181.
- Chandrasekaran, R., Puigianer, L.C., Joyce, K.L. and Arnott, S. (1988a) Cation interactions in gellan: X-ray study of the potassium salt, *Carbohydr. Res.*, 181, 23.

- Chandrasekaran, R., Millane, R.P. and Arnott, S. (1988b) Molecular structures of gellan and other industrially important gel forming polysaccharides, in "Gums and stabilisers for the food industry 4", Phillips, G.O., Williams, P.A. and Wedlock, D.J. (eds.), IRL Press, Washington D.C., USA. pp 183-191.
- Chandrasekaran, R., Millane, R.P., Arnott, S. and Atkins, E.D.T. (1988c) The crystal structure of gellan, Carbohydr. Res., 175, 1.
- Chandrasekaran, R. and Thailambal, V.G. (1990) The influence of calcium ions, acetate and L-glycerate groups on the gellan double-helix, Carbohydr. Polym., 12, 431.
- Chandrasekaran, R., Radha, A. and Thailambal, V.G. (1992) Roles of potassium ions, acetyl and L-glyceryl groups in native gellan double helix: X-ray study, Carbohydr. Res., 224, 1.
- Chang, H.C. and Kobzeff, J.M. (1992) Gellan gum for non-brittle gels, Eur.Pat. 526 926.
- Chapman, H.D., Chilvers, G.R., Miles, M.J. and Morris, V.J. (1988) Studies on the gelation of the microbial polysaccharides XM6 and gellan gum, in "Gums and stabilisers for the food industry 4", Phillips, G.O., Williams, P.A. and Wedlock, D.J. (eds.), IRL Press, Washington D.C., USA., pp 147-155.
- Chatterji, J. and Borchardt (1980) Application of water-soluble polymers in the oilfield, Soc. Pet. Eng., 9288, 1.
- Choplin, L. (1991) Communication personnelle
- Clark, A.H. and Ross-Murphy, S. B.(1987) Structural and mechanical properties of biopolymer gels, Adv. Polym. Sci., 83, 57.
- Colegrove, G.T. (1983) Agricultural applications of microbial polysaccharides, Ind. Eng. Chem. Res. Dev., 22, 456.
- Colonna, P. and Thibault, J.F. (1986) Généralité sur les oses & Propriétés physicochimiques des polysaccharides, dans "Propriétés fonctionnelles des polysaccharides", Colonna, P. et Thibaud, J.F. (eds.), APRIA, Paris, pp 19-46.
- Coté, D (1992) Influence du paramètre d'agitation sur la production d'un polysaccharide microbien contenant du fucose, Mémoire de Maîtrise, Université Laval, Québec, Canada.
- Cox, W.P. and Merz, E.H. (1958) Correlation of dynamic and steady flow viscosities, J. Polym. Sci., 28, 619.

- Crescenzi, V., Dentini, M. and Dea, I.C.M. (1987) The influence of side-chains on the dilute-solution properties of three structurally related, bacterial anionic polysaccharides, *Carbohyd. Res.*, 160, 283.
- Crescenzi, V. and Dentini, M. (1988) Solution conformations of polysaccharide gellan, in "Gums and stabilisers for the food industry 4", Phillips, G.O., Williams, P.A. and Wedlock, D.J. (eds.), IRL Press, Washington D.C., USA., pp 63-69.
- Crescenzi, V., Dentini, M. and Coviello, T. (1991) Solution and gelling properties of microbial polysaccharides of industrial interest : the case of gellan, in "Novel biodegradable microbial polymers", E.A. Dawes (ed.), Kluwer Academic Publishers, pp 277-284.
- Crescenzi, V., Dentini, M. and Coviello, T. (1992) Conformation dependent solution properties of microbial polysaccharides, *Frontier Carbohydr. Res.*, 2, 100.
- Cuvelier, G. (1988) Propriétés fonctionnelles de la gomme xanthane : propriétés rhéologiques des solutions aqueuses et interactions avec la gomme de caroube, Thèse de Doctorat, ENSIA Paris XI.
- Darzins, A., Wang, S.K., Vanags, R.I. and Chakrabarty, A.M. (1985) Clustering of mutations affecting alginic acid biosynthesis in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, *J. of Bact.*, 164, 516.
- Deasy, P.B. and Quigley, K.J. (1991) Rheological evaluation of deacetyled gellan gum (Gelrite) for pharmaceutical use, *Int. J. Pharm.*, 73, 117.
- Deckwer, W.-D. and Schumpe, A. (1989) Effects of hydrodynamics and mass transfer on xanthan production. Conference abstract, Bio-technica, Hanover, Germany, 10/89.
- Dentini, D., Coviello, T., Burchard, W. and Crescenzi, V. (1988) Solution properties of exocellular microbial polysaccharides. Light scattering from gellan and from the exocellular polysaccharide of *Rhizobium trifolii* (strain TA-1) in the ordered state, *Macromol.*, 21, 3312.
- Doublier, J.L. (1986) Caractérisation expérimentale des propriétés fonctionnelles des polysaccharides par des méthodes rhéologiques, dans "Propriétés fonctionnelles des polysaccharides", Colonna, P. et Thibaud, J.F. (eds.), APRIA, Paris, pp 47-76.
- Einstein, A. (1911) Berichtigung zu meiner arbeit : "Eine neue bestimmung der molekül-dimensionnen, *Ann. Physik*, 34, 591.

- Eldridge, J.E. and Ferry, J.D. (1954) Studies of the cross-linking process in gelatin gels, *J. Physic. Chem.*, 58, 992.
- Flory, P.J. (1953) "Principles of polymer chemistry", Cornell Univ. Press, Ithaca, New York.
- Giammatteo, P.J., Stipanovic, A.J., Nero, V.P. and Robinson, P.D. (1990) Evidence for microbial polysaccharide preparations containing polyester substituents, *Int. J. Biol. Macromol.*, 12, 311.
- Gransdalen, H. and Smidsrød, O. (1987) Gelation of gellan gum, *Carbohydr. Polym.*, 7, 371.
- Gunning, A.P. and Morris, V.J. (1990) Light scattering of tetramethyl ammonium gellan, *Int. J. Biol. Macromol.*, 12, 338.
- Harland, W.G. (1959) "Recent advances in chemistry of cellulose and starch", O. Honeyman ed., Wiley (interscience), New York, pp 265.
- Herbst, H., Peters, H.U., Suh, I.S., Schumpe, A. and Deckwer, W.D. (1987) Oxygen transfer during xanthan fermentation, A.I.Ch.E. Annual Meeting and Conference on Biotechnology, New York, 15-20 nov. 1987.
- Herbst, H., Schumpe, A. and Deckwer, W.D. (1990) Communication personnelle.
- Hestrin, S. (1949) The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine and the analytical application, *J. Biol. Chem.*, 180, 249.
- Hoogendoorn, C.J. and Den Hartog, A.P. (1967) Model studies on mixers in the viscous flow region, *Chem. Eng. Sci.*, 22, 1689.
- Huggins, M.L. (1942) The viscosity of dilute solutions of long-chain molecules, *J. Amer. Chem. Soc.*, 64, 2716.
- Hwang, J. and Kokini, J.L. (1991) Structure and rheological function of side branches of carbohydrate polymers, *J. Texture Studies*, 22, 123.
- Ielpi, L., Couso, R., and Dankert, M. (1981) Pyruvic residues are transferred from phosphoenolpyruvate to the pentasaccharide-P-P-lipid, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 102, 400.
- Ielpi, L., Couso, R., and Dankert, M. (1983) Xanthan gum biosynthesis: acetylation occurs at the prenyl-phosphate sugar stage, *Biochem. Int.*, 6, 323.

- Janson, P. and Lindberg, B. (1983) Structural studies of gellan gum, an extracellular polysaccharide elaborated by *Pseudomonas elodea*, Carbohydr. Res., 124, 135.
- Janson, P.-E., Lindberg, B., Lindberg, J., Mackawa, E. and Sandford, P.A. (1986) Structural studies of a polysaccharide (S-194) elaborated by *Alcaligenes* ATCC 31961, Carbohydr. Res., 156, 157.
- Johns, M.R. and Noor, R. (1991) Recovery and purification of polysaccharides from microbial broth, Austri. J. Biotechnol., 5, 73.
- Kaneko, T. and Kang, K.S. (1979) Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol., 137, 170.
- Kang, K.S., Veeder, G.T., Mirrasoul, P.J., Kaneko, T. and Cottrell, I.W. (1982) Agar-like polysaccharide produced by a *Pseudomonas* species: production and basic properties, Appl. Environm. Microbiol., 43, 1086.
- Kang, K.S., Veeder, G.T. (1982a) Deacetyled polysaccharide S-60, US. Patent 4 326 052.
- Kang, K.S., Veeder, G.T. (1982b) Polysaccharide S-60 and bacterial fermentation process for its preparation, US. Patent 4 326 053.
- Kang, K.S., Veeder, G.T. (1983) Fermentation process for its preparation of polysaccharide S-60, US. Patent 4 377 636.
- Kraemer, E.O. (1938) Molecular weight of cellulose, Ind. Eng. Chem., 30, 1200.
- Kuo, M., Mort, A.J. and Dell, A. (1986) Identification and location of L-glycerate, an unusual acyl substitution in gellan gum, Carbohydr. Res., 156, 173.
- Kwon, B., Foss, P.A. and Rha, C. (1987) Rheological characterization of high viscosity polysaccharides, in "Industrial polysaccharides : Genetic structure/property relations and application", Yalpani, M. (ed.), Elsevier science publishers B.V., Amsterdam, pp. 253-266.
- Law, J.H. and Slepecky, R.A. (1961) Assay of poly- β -hydroxybutyric acid, J.Bacteriol., 82, 33.
- Lecourtier, J and Chauveteau, G. (1984) Xanthan fractionation by surface exclusion chromatography, Macromol., 17, 1340.
- Lecourtier, J. (1989) Formulation rationnelle des fluides de forage, Rapport IFP 37 009.

- Lecourtier J. and Degouy D (1991) Relations between structure and efficiency of polymeric additives for drilling fluids, in "65th Colloids and surface Sci. Symp." Amer. Chem. Soc. Norman meeting, june.
- Linton, J.D. (1990) Physiology of exopolysaccharide production, in "Novel biodegradable microbial polymers", E.A. Dawes (ed.), Kluwer Academic Publishers, pp 311-330.
- Lobas, D., Schumpe, S and Deckwer, W.-D. (1992) The production of gellan exopolysaccharide with *Sphingomonas paucimobilis* E2 (DSM 6314), Appl. Microbiol. Biotechnol., 37, 411.
- Loeber, L. (1992) Etude de la structure des cakes d'argile formés sur les parois des puits au cours du forage, Thèse de Doctorat à l'Université d'Orléans.
- Mark, H. (1940) "Physical chemistry of high polymeric systems", vol 2, Wiley, New York, pp 289.
- Martins, L. O. and Sa-Correia, I (1991) Gellan gum biosynthetic enzymes in producing and nonproducing variants of *Pseudomonas elodea*, Biotechnol. Appl. Biochem., 14, 357.
- Metzner, A.B. and Otto, R.E. (1957) Agitation of non-newtonian fluids, A.I.Ch.E. Journal, 3, 3.
- Milas, M. and Shi, X. (1988) Behavior of gellan in aqueous solution, in "Biomedical and biotechnological advances in industrial polysaccharides, Crescenzi, V., Dea, I.C.M., Paoletti, S., Stivala, S.S. and Sutherland, I.W. (eds), Gordon and Breach Science Publishers, New York, pp 259-265.
- Milas, M., Rinaudo, M. and Shi, X. (1990) Role of counterions on gellan properties, in "Novel biodegradable microbial polymers", E.A. Dawes (ed.), Kluwer Academic Publishers, pp 463-464.
- Moorhouse, R., Colegrove, G.T., Sandford, P.A., Baird, J.K. and Kang, K.S. (1981) PS-60: a new gel-forming polysaccharide, in "solution properties of polysaccharides", D. A. Brant (ed.), American Chemical Society Symposium series n°150, Washington D.C., pp 111-123.
- Moorhouse, R., (1987) Structure/property relationships of a family of microbial polysaccharides, in "industrial polysaccharides : Genetic structure/property relations and application", Yalpani, M. (ed.), Elsevier science publishers B.V., Amsterdam, pp 187-206.

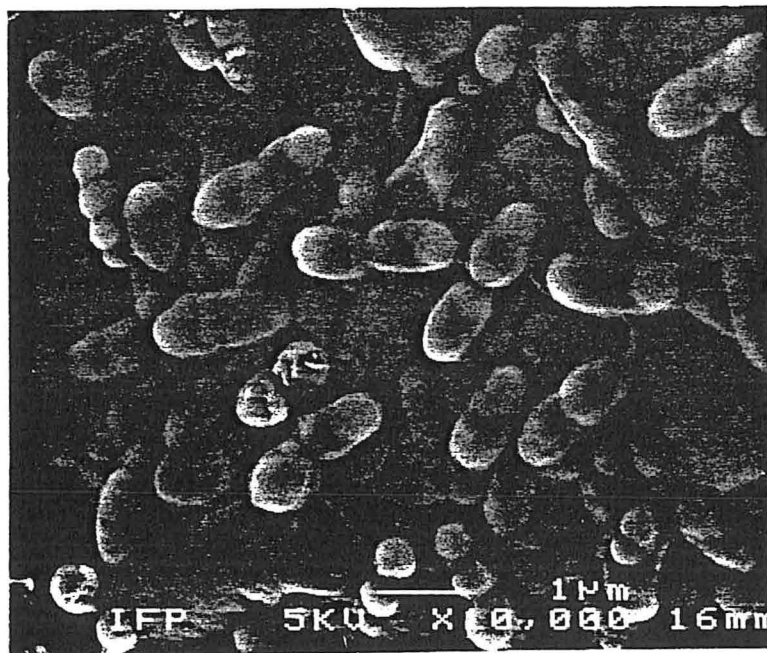
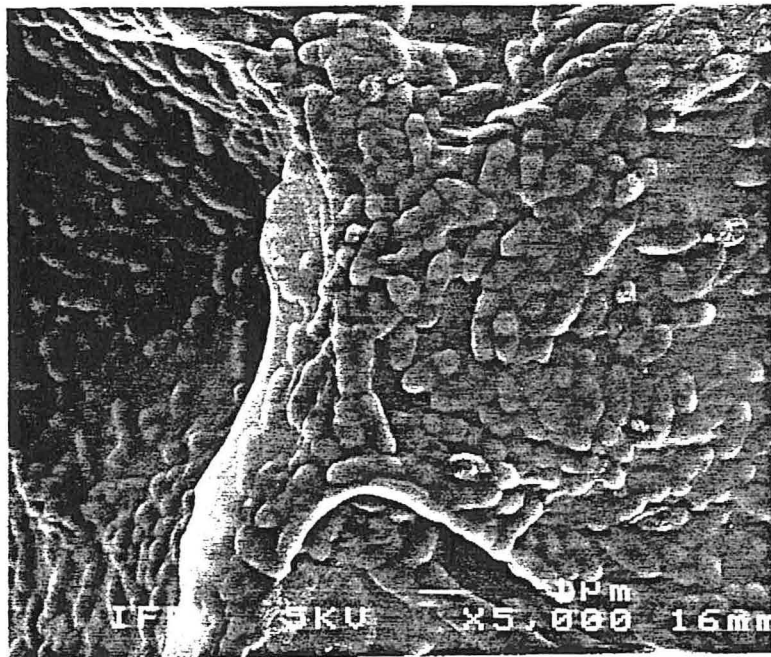
- Moo-Young, M. and Blanch, H.W. (1981) Design of biochemical reactors : mass transfer criteria for simple and complex systems, Adv. Biochem. Eng., 19.
- Moritaka, H., Fukuba, H., Kumeno, K., Nakahama, N. and Nishinari, K. (1991) Effect of monovalent and divalent cations on the rheological properties of gellane gels, Food Hydrocolloids, 4, 495.
- Moritaka, H., Nishinari, K., Nakahama, N. and Fukuba, H. (1992) Effects of potassium chloride and sodium chloride on the thermal properties of gellan gum gels, Biosci. Biotech. Biochem., 56, 595.
- Morris, E.R., Cutler, A.N., Ross-Murphy, S.B. and Rees, D.A. (1981) Concentration and shear rate dependence of viscosity in random coil polysaccharide solutions, Carbohydr. Polym., 1, 5.
- Morse, E.E. (1947) Anthrone in estimating low concentration of sucrose, Anal. Chem., 19, 1012.
- Nagata, S. (1975) "Mixing, principles and applications", Halsted Press ed., New York.
- Newton, I. (1687) "*Principia mathematica philosophiae naturalis*", Londres.
- Nienow, A.W. and Elson, T.P. (1988) Aspect of mixing in rheologically complex fluids, Chem. Eng. Res. Des., 66, 4.
- Novak, V., Rieger, F. and Havelkova, D. (1986) Homogeneization efficiency of helical ribbon agitators, Chemic. Eng. J., 33, 143.
- Nussinovitch, A., Ak, M.M., Normand, M.D. and Peleg, M. (1990) Characterization of gellan gels by uniaxial compression, stress relaxation and creep, J. Texture Studies, 21, 37.
- O'Neill, M.A., Selvendran, R.R. and Morris, V.J. (1983) Structure of the acidic extracellular gelling polysaccharide produced by *Pseudomonas elodea*, Carbohydr. Res., 124, 133.
- O'Neill, M.A., Selvendran, R.R., Morris, E.R. and Eagles, J. (1986) Structure of the extracellular polysaccharide produced by the bacterium *Alcaligenes* (ATCC 31555) species, Carbohydr. Res., 147, 123.
- Oser (1965) "Hawk's physiological chemistry", Mac Graw-Hill Ed., Ney York, pp 179-181.

- Peters, H.U., Herbst, H., Suh, I.-S., Schumpe, A. and Deckwer, W.D. (1988) The influence of fermentor hydrodynamics on xanthan production by *X. Campestris*, in "Biomedical and biotechnological advances in industrial polysaccharides", Crescenzi, V., Dea, I.C.M., Paoletti, S., Stivala, S.S. and Sutherland, I.W. (eds), Gordon and Breach Science publishers, New York, pp 275-281.
- Peters, H.U., Herbst, H. Hesselink, G.M., Lündsdorf, H. Schumpe, A. and Deckwer, W.D. (1989) The influence of agitation rate on xanthan production by *X. Campestris*, Biotechnol. Bioeng., 34, 1393.
- Pezron, E. (1988) Influence de la complexation d'ions sur les propriétés physico-chimiques de solutions de polymères, Thèse de doctorat, Paris VI.
- Pons, A., Dussap, C.G. and Gros, J.B. (1989) Modelling *X. Campestris* batch fermentations in a bubble column, Biotechnol. Bioeng., 33, 394.
- Quintal, P. (1990) Propriétés physico-chimiques du gellane, Rapport I.F.P. 38535.
- Reuß, M (1983) Mathematical model of coupled oxygen transfer and microbial kinetics in bioreactors, Modell. Control. Biotech. Processes, Proc. IFAC Workshop 1982, 43.
- Robinson, G., Manning, C.E. and Morris, E.R. (1991) Conformation and physical properties of the bacterial polysaccharides gellan, welan and rhamnan, Spec. Publ. - Roy. Soc. Chem., 82, 22.
- Sanderson, G.R., Bell, V.L., Burgum, D.R. and Ortega, D. (1988) Gellan gum in combination with other hydrocolloids, in "Gums and stabilisers for the food industry 4", Phillips, G.O., Williams, P.A. and Wedlock, D.J. (ed.), IRL Press, Washington D.C., USA., pp. 301-308.
- Sanderson, G.R., Bell, V.L. and Ortega, D. (1989) A comparison of gellan gum, agar, K-Carragenate, and alginate, Cereal Food World, 34, 991.
- Smith, I.H. and Pace, G.W. (1982) Recovery of microbial polysaccharides, J. Chem. Tech. Biotechnol., 32, 119.
- Suh, I.S., Herbst, H., Schumpe, A. and Deckwer, W.D. (1990) The molecular weight of xanthan polysaccharide produced under oxygen limitation, Biotechnol. Lett., 12, 201.
- Sutherland, I. W. (1990) "Biotechnology of microbial polysaccharides", Cambridge University press ed., Cambridge (RU).

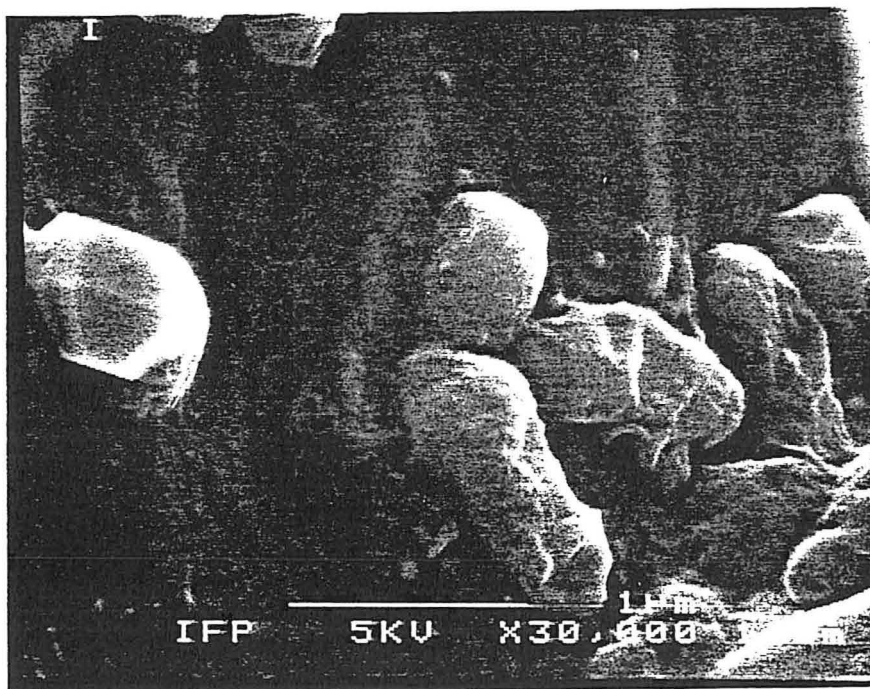
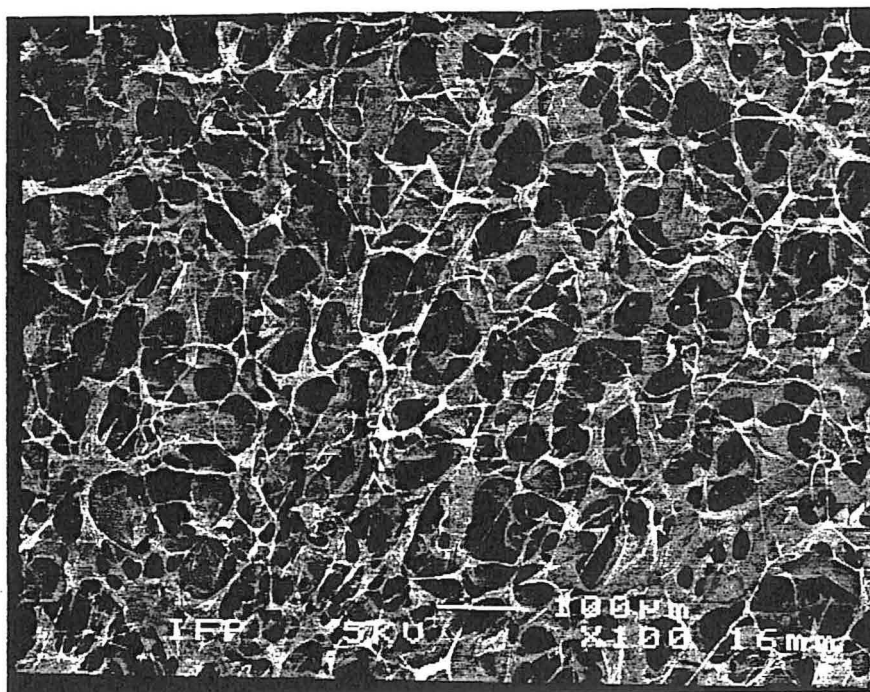
- Tako, M., Sakae, A., and Nakamura, S., (1989) Rheological properties of gellan gum in aqueous media, *Agri. Biol. Chem.*, 53, 771.
- Tatterson, G.B. (1991) "Fluid mixing and gas dispersion in agitated tanks", Mc Graw Hill ed., New York.
- Tecante, A. (1991) Mass transfer in rheologically complex fluids in helical ribbon screw-agitated and aerated tank, Thèse de Doctorat, Université Laval, Québec, Canada.
- Torres, L.G., Brito, E., Galindo, E. and Choplin, L. (1993) Viscous behaviour of xanthane aqueous solutions from a variant strain of *Xanthomonas campestris*, *J. Ferm. Bioeng.*, 75, 58.
- Upstill, C., Atkins, S.D.T. and Attwood, P.T. (1986) Helical conformations of gellan gum, *Int. J. Biol. Macromol.*, 8, 275.
- Wolff, C., Silberberg, A., Priel, Z., and Layec-Raphalen, M. N. (1979) Influence of the association of macromolecules in dilute solution on their reduced viscosity, *Polymer*, 20, 281.
- Von Engelhardt, W. (1953) Filtration of clay suspensions, *Erdöl und Kohle*, 5.

CHAPITRE 9 : ANNEXE

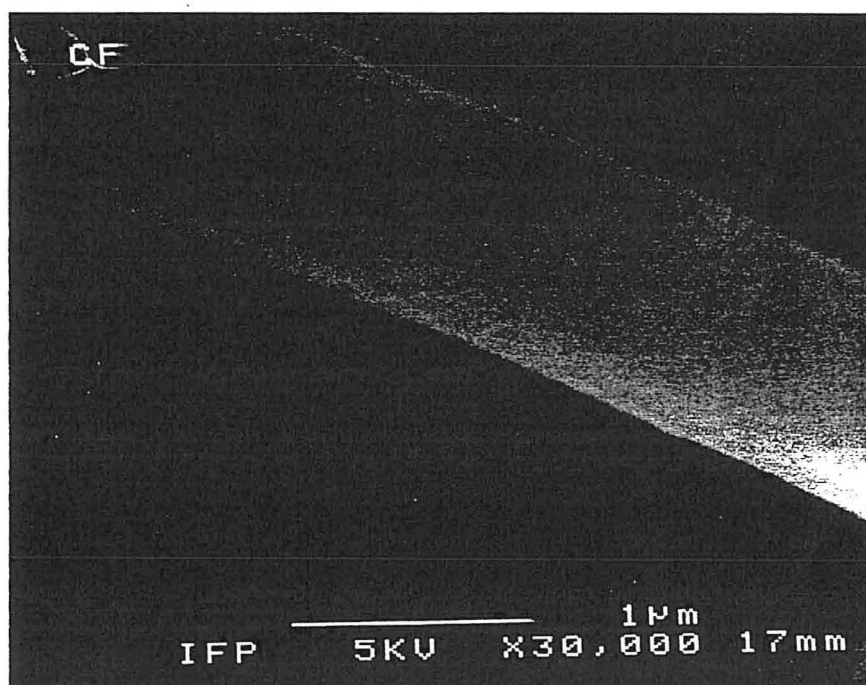
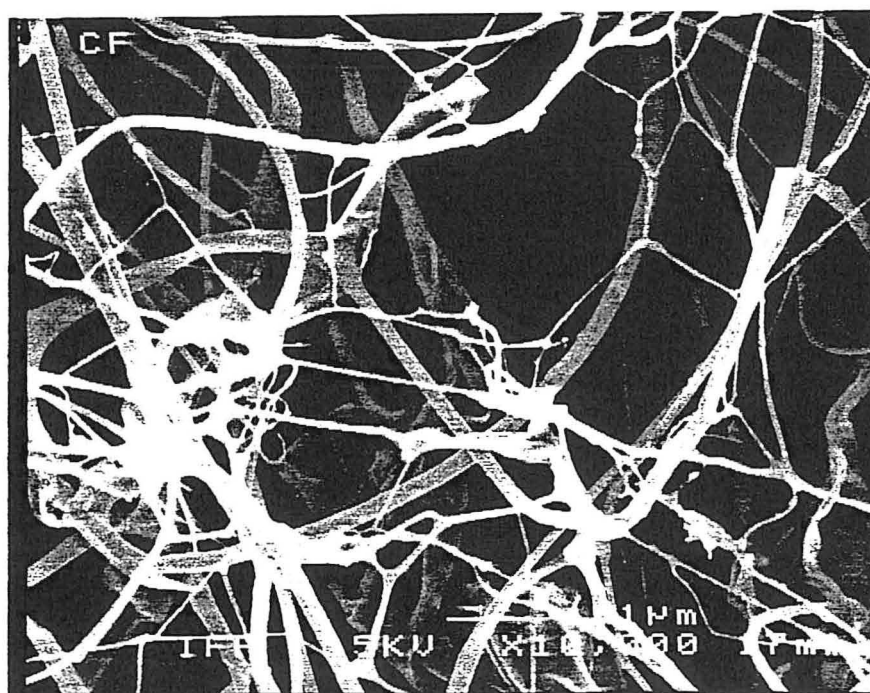
9. Annexe



Clichés au microscope électronique d'une culture d'*A. elodea* sur milieu gélosé.
Agrandissement x 5 000 et x 10 000.



Clichés au microscope électronique d'une solution lyophilisée de gellane brut.
Agrandissement x 100 et x 30 000.



**Clichés au microscope électronique d'une solution clarifiée de gellane lyophilisée.
Agrandissement x 10 000 et x 30 000.**

**AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE**

ooo

BIU NANCY
Service Commun de Documentation
INPL
2, avenue de la Forêt de Haye - B.P. 3
54501 VANDOEUVRE Cédex FRANCE

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur GOMA, Professeur, INSA de Toulouse,

Monsieur MOAN Michel, Professeur IUP de Brest.



Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur DEVRETON Eric

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 5 4 5 0 1
VANDŒUVRE CEDEX

à soutenir devant l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Le Gellane : un nouvel additif pour fluides de forage. Influence de
l'hydrodynamique du fermenteur sur sa production et ses propriétés
physico-chimiques"**

en vue de l'obtention du titre de :

**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE
LORRAINE**

Spécialité : **"GENIE DES PROCEDES"**

Fait à Vandoeuvre le, **29 Décembre 1993**

Le Président de l'I.N.P.L.,

M. LUC



