



À l'aube d'une nouvelle ère – La technique analytique COT en biotechnologie – L'établissement du bilan carbone des processus de fermentation avec le multi N/C® 2100S

Auteur : Bernd Bletzinger, Analytik Jena AG, Konrad-Zuse-Str. 1, 07745 Jena

Contact France : Analytik Jena AG - **Tel. :** +33 (0)9 72 39 02 33 - **Fax :** +33 (0)9 72 39 02 32

www.analytik-jena.fr - info@analytik-jena.fr

Introduction

En plus de leur domaine d'application principal, la surveillance de l'environnement (eau potable, eau de surface, nappe phréatique, eaux usées), les analyseurs COT sont de plus en plus utilisés dans d'autres secteurs d'application tels que la validation des processus de nettoyage pharmaceutiques, le contrôle de l'eau d'alimentation des chaudières dans les centrales électriques et comme décrit dans cet exemple dans le secteur de la biotechnologie.

L'établissement du bilan carbone forme la base de l'optimisation des processus biotechnologiques dans les réacteurs batch. Un bilan C exact et fixe est en effet déterminant pour développer avec succès les bioprocédés et optimiser les souches bactériennes, les rendements des produits et les taux de rendement.

Mais quel type de bilan est correct ? Quels procédés de mesure sont fiables et comment est-il possible d'exclure ou d'éviter les fâcheuses lacunes au niveau de l'établissement du bilan ? Ces différents

points ont été examinés en détail dans le cadre d'un mémoire élaboré au sein du groupe de travail du Professeur Tabors à l'Institut des bioprocédés de l'université.⁽¹⁾

Pour toute réaction (bio)chimique, la loi de la conservation de la masse d'Antoine Laurent de Lavoisier (1789) s'applique par principe. Cela signifie que la masse C des éduits est identique à la masse C des produits

Du côté des éduits, le carbone est amené au bioréacteur sous forme de substrat (par

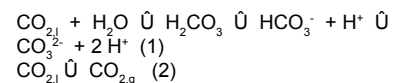
ex. glucose) et à l'inoculum pour inoculer le fermenteur. Pendant le processus de fermentation, les produits qui se forment avec un mode opératoire aérobique sont la biomasse croissante et les produits extracellulaires, comme le produit de métabolisation souhaité, les produits dérivés et le produit respiratoire CO₂ avec ses composés survenant dans une solution aqueuse.

Pour l'établissement du bilan carbone des processus de fermentation, l'utilisation d'un analyseur COT est particulièrement importante, en effet, cette technique de mesure permet de manière idéale la différenciation des composés carbonés existants dans les espèces à composés organiques et inorganiques. Est privilégiée ici l'utilisation d'un appareil qui présente une bonne mobilité des particules, qui garantit une technique d'analyse fiable avec de très petites quantités d'échantillons et qui tolère des teneurs en sel élevées dans l'échantillon. Ces critères sont satisfaits pour le mieux par des appareils COT avec une technique d'injection directe (voir fig. 1).

Analyse

Dans les solutions aqueuses, telles qu'elles existent dans les bioréacteurs, les aspects décisifs sont l'équilibre en gaz carbonique dépendant du pH dans la solution, la solubilité élevée de dioxyde de carbone dans l'eau, le changement d'état du CO₂ formé en phase gazeuse et son rejet avec l'air vicié du réacteur.

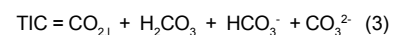
Les équilibres suivants existent :



CO_{2,l} : CO₂ dissous en phase liquide
CO_{2,g} : CO₂ en phase gazeuse

Généralement, un établissement du bilan carbone peut être établi à l'aide de la quantité C utilisée sur le substrat et de la comparaison avec des mesures de teneur C en phase liquide par rapport à la biomasse et aux produits ainsi qu'entre l'air vicié et la teneur en O₂. Toutefois, la part du carbone inorganique dissous (TIC) n'est pas prise en compte, ce qui peut entraîner un résultat de bilan défectueux.

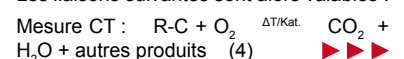
Pour le TIC, la formule suivante s'applique :



La mesure TIC dans la phase liquide du réacteur permet en conséquence de saisir correctement la part du carbone inorganique dissous et d'en déduire l'établissement du bilan C, indépendamment des mesures de CO₂ supplémentaires dans l'air vicié du réacteur.

À l'aide d'un analyseur COT qui fonctionne selon le principe de la combustion à haute température catalytique (DT/cat.), cette détermination peut être réalisée de manière automatisée en même temps que la mesure COT et CT en se servant de la méthode dit des différences (CT = carbone total, COT = carbone organique total).

Les liaisons suivantes sont alors valables :



Accélérez vos préparations d'échantillons : évoluez vers la technologie micro-ondes !

Une technologie adaptée à tous les domaines :

- ✓ Environnement
- ✓ Agroalimentaire
- ✓ Pharmacie
- ✓ Cosmétique
- ✓ Biotechnologie
- ✓ Chimie & Pétrochimie
- ✓ Nanotechnologie
- ✓ Recherche académique
- ✓ Produits consommation
- ✓ Métallurgie
- ✓ Industrie nucléaire
- ✓ Polymères & Plastiques
- ...

Gain de temps,
gain d'argent...

Sur simple demande,
recevez notre dossier
de présentation de la
technologie micro-ondes
en laboratoire et ses
avantages.

Tél. 01 69 35 57 83
info.fr@cem.com



CEM pWaves S.A.S
4, rue René Razel
91892 Orsay Cedex
+33 (0)1 69 35 57 80
info.fr@cem.com
www.cem.com



Mesure CIT: $\text{H}_2\text{CO}_3 / \text{HCO}_3^- / \text{CO}_3^{2-} + \text{H}^+$
 $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ (5)

Le CO_2 formé est envoyé vers le détecteur NDIR lors des deux déterminations par le biais du gaz porteur utilisé (oxygène pur ou air synthétique) en passant à travers différents niveaux de nettoyage du gaz et y est ensuite détecté et quantifié de manière sélective.

$\text{TOC} = \text{TC} - \text{TIC}$ (6)

Dans le cadre de l'étude effectuée à l'université de Stuttgart, 1 ml d'échantillon a été prélevé toutes les 2 heures pendant 10 heures puis a été transféré dans un piston de 20 ml avec une solution d'hydroxyde de potassium diluée préparée afin d'empêcher le dégazage de CO_2 .

Sur le multi N/C® 2100S de la société Analytik Jena AG (voir fig. 2), l'expérience a été réalisée selon la méthode différentielle avec un volume d'injection de 100 µl et des déterminations triples ou quadruples pour les valeurs CT/CIT à partir de fioles de 2 ml. L'oxydation de toutes les liaisons à teneur en C s'est effectuée dans le tube de combustion rempli avec le catalyseur Pt à 750°C afin de maintenir à un niveau bas l'usure en cas de matrice à forte teneur en sel.

L'analyseur COT a été calibré au préalable avec des solutions standard de carbonate de sodium pour CIT de 0 à 500 mg/l et avec des solutions standard d'hydrogénéphthalate de potassium pour CT de 0 à 1000 mg/l.

Dans le cadre de l'étude mentionnée ici, deux fermentations de type batch représentatives ont été étudiées avec différentes souches bactériennes de C. glutamicum. Pour cela, 2 bases parallèles de 25 l avec au minimum du CGXII ont été fermentées dans des réacteurs en acier inoxydable de 100 l. Les réacteurs ont été alimentés à 1,5 bar avec un débit d'air de 0,2 l/min et une saturation d'oxygène de $p\text{O}_2 \geq 20\%$ a été réglée. La teneur en oxygène et dioxyde de carbone a été surveillée dans l'air vicié du réacteur par mesure infrarouge.

Les concentrations en acides aminés, acides organiques et glucose ont été déterminées au moyen de la chromatographie HPLC. La part de biomasse a été déterminée comme masse sèche cellulaire de manière gravimétrique. Ce faisant, la part C de la biomasse a été déterminée à partir d'échantillons de 2 ml obtenus après la centrifugation, 2 étapes de lavage avec de l'eau distillée et une nouvelle mise en suspension dans de l'eau pure à l'aide de la mesure CT sur le multi N/C® 2100 S.

3 bases différentes ont été suivies pour l'établissement du bilan carbone :

A) En se basant sur la consommation du substrat de glucose (mesure HPLC), les fractions C molaires de la biomasse, du CIT dissous (mesure à l'aide du multi N/C® 2100 S), des acides aminés formés (ou L-Lysine) (mesure HPLC) et le CO_2 de l'air vicié disparaissent.

B) En se basant sur la teneur en carbone totale lors du démarrage de la réaction (mesure à l'aide du multi N/C® 2100 S), les valeurs de mesure du CO_2 de l'air vicié et les valeurs de mesure COT + CIT de la phase liquide (mesure à l'aide du multi N/C® 2100 S) disparaissent.

C) En se basant sur la teneur en carbone totale de l'échantillon liquide individuel lors du prélèvement de l'échantillon

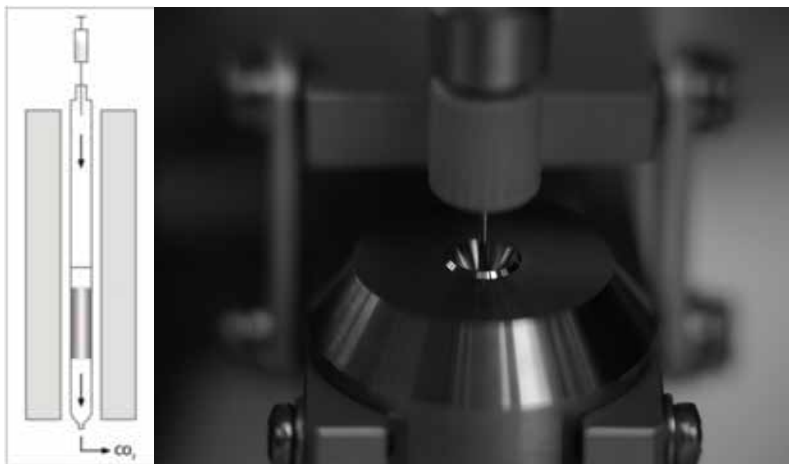


Figure 1 : principe de l'injection directe d'un échantillon à l'aide d'une seringue microlitre dans le tube à combustion rempli dans le catalyseur pour l'analyse COT/ CT

(mesure à l'aide du multi N/C® 2100 S), les fractions C de la biomasse, du substrat et des produits dérivés (pour les deux cas, mesures HPLC) et du CIT (mesure à l'aide du multi N/C® 2100 S) disparaissent. La teneur de CO_2 de l'air vicié n'est pas prise en compte.

Résultats

Au travers d'un grand nombre de mesures, il a été possible de déterminer pour le C glutamicum WT une biomasse avec une teneur C spécifique de 51,4%. Cette grandeur de référence importante est indiquée dans les ouvrages de référence avec un écart type de 15% au sein de la plage 40,8 à 41,6%, ce qui entraînerait ainsi pour cette étude une erreur importante d'établissement de bilan (sous-estimation de la part de biomasse).

Dans la base A, une récupération C de 91-94% a pu être comptabilisée. En utilisant la mesure CIT dans la phase liquide, il a été possible de montrer que la part de $\text{CO}_{2,1}$ dissous contribue à 16-24% du CT au cours de 6 premières heures de culture. À la fin du processus, le $\text{CO}_{2,9}$ gazeux domine par contre de nouveau. Malgré l'amélioration de l'établissement de bilan C conventionnel pour la détection CIT, 6% restent libres dans le bilan. Sans détermination CIT, on pourrait déjà enregistrer plus de 11 % d'erreurs d'établissement de bilan en raison de la part de $\text{CO}_{2,1}$ dissous.

La base B en tant qu'établissement de bilan CT pur (CIT, $\text{CO}_{2,9}$) de la phase liquide et gazeuse atteint le taux de récupération C le plus élevé avec 99%. Cela souligne l'intégration correcte des données, la détection complète du carbone total dans le système ainsi que le fonctionnement correct de la mesure du gaz vicié et de l'analyse COT de la phase liquide.

La base C de phase liquide avait pour but d'éliminer la mesure parfois inexacte du CO_2 du gaz vicié. De bons taux de récupération C de 98 à 100% ont été déterminés au cours des 6 premières heures. La base C a servi de preuve supplémentaire pour montrer que l'analyseur COT peut être un très bon instrument de contrôle des techniques de mesure conventionnelles de chromatographie HPLC, gravimétrie et de mesure du CO_2 du gaz vicié.

En résumé

Grâce à l'utilisation de la détermination COT/CIT dans la phase liquide des

processus de fermentation, il est possible d'en déduire des bilans carbone et d'éliminer des erreurs, et de représenter en conséquence encore plus exactement les processus de fermentation. L'analyse CIT et COT ne dépend pas des techniques de mesure traditionnelles de détermination de la biomasse, du substrat et des produits dérivés ; c'est donc un outil précieux afin d'améliorer le procédé classique de détermination des bilans C et afin de compléter et de contrôler ces résultats.

Optimisez également vos processus de fermentation en utilisant le bon processus d'établissement de bilan C et la bonne technique de mesure COT. Les



Figure 2 : technique d'injection directe sur le multi N/C® 2100S avec le passeur d'échantillons automatique AS 60

analyseurs COT de la société Analytik Jena AG avec une technique d'injection directe fournissent des résultats fiables avec de très petites quantités d'échantillons disponibles et vous aident à optimiser vos bioprocessus.

(1) Jens Buchholz, Michaela Graf, Bastian Blombach, Ralf Takors, „Improving the carbon balance of fermentations by total carbon analysis“, Biochemical Engineering Journal 90 (2014) 162-169

20 ans ça se fête !

B PL
chr O matographie
io N ique
k A r l fischer
io N ométrie
N IR
t I trage
V oltammétrie
él E ctrodes
R aman
S pectroscopie
r A ncimat
appl I cations
fo R mation
s E rvice

à La Gazette

Metrohm
France SAS
info@metrohm.fr - 01 64 86 97 00