

## Deux déterminations pratiques de $K_L a$

### 1. Par méthode par désoxygénation réoxygénation, en absences de microorganismes

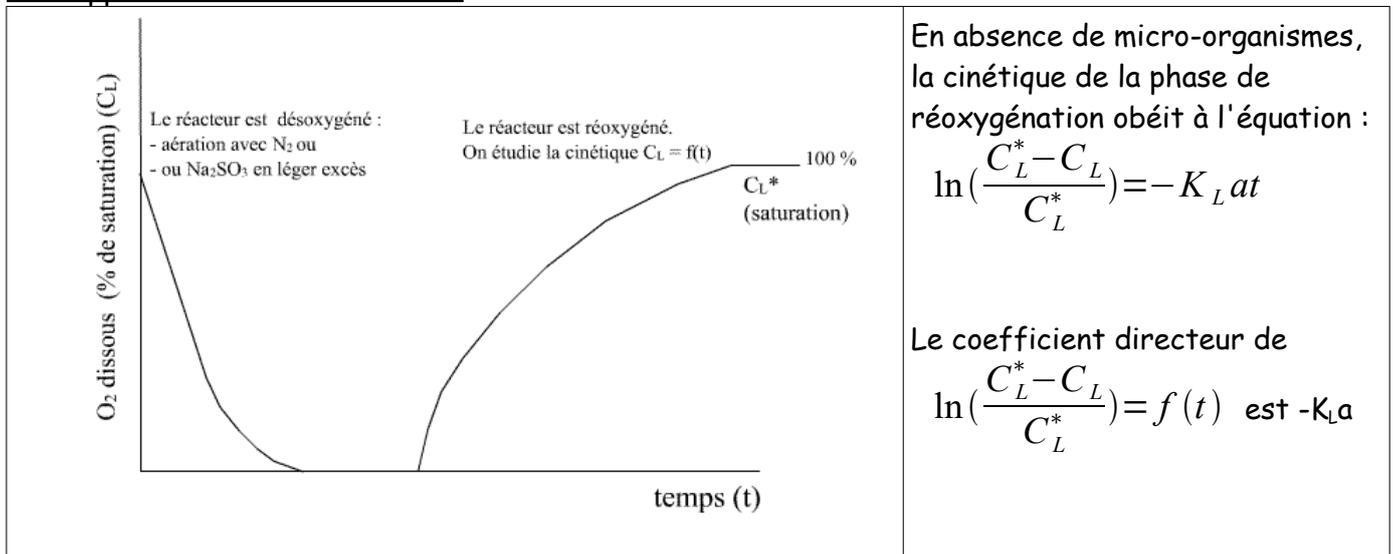
#### 1.1 Préalable : Etalonnage du capteur à dioxygène et évaluation de son temps de réponse

La technique proposée dans la suite fait appel à un capteur à dioxygène et à des mesures cinétiques d'évolution de dioxygène dissous dans le bioréacteur lors de phases de réoxygénation. Les mesures n'auront un sens évident que si le temps de réaction du capteur est rapide devant la cinétique du phénomène à étudier. En pratique, il suffit que le temps de réponse du capteur soit suffisamment bref. (Si ce n'est pas le cas, les calculs de  $K_L a$  sont réalisés en tenant compte des caractéristiques dynamiques du capteur à dioxygène. La résolution des équations complexes obtenues n'est pas envisageable au niveau BTS). Etalonner le capteur à dioxygène disponible (sonde de Clark ou sonde optoélectronique à fluorescence).

#### Mesurer le temps de réponse du capteur (si non donné par le fabricant) :

- Placer le capteur dans de l'eau distillée saturée en diazote sous agitation magnétique (0 %  $O_2$ )
- Le transférer de façon instantanée dans une solution saturée de dioxygène (100%  $O_2$ )
- Suivre la cinétique d'évolution du capteur vers le 100%  $O_2$  ; tracer la fonction obtenue.
- Déterminer le temps de réponse du capteur défini par son coefficient de temps, en seconde, à l'aide d'une modélisation exponentielle (c'est en fait la durée nécessaire pour obtenir 63% de la réponse, c'est à dire 63% de dioxygène dissous).

#### 1.2 Rappel concernant la méthode



#### 1.3 Mode opératoire

- Préparer le bioréacteur (par exemple de l'eau distillée ou du milieu LB). Tester les dispositifs de réglage d'aération : vitesse de rotation des turbines (rpm, rotations par minutes), débit d'aération (vvm, volumes par volume de milieu par minute). Vérifier le réglage de 100% du capteur à dioxygène. Travailler à température constante.
- La désoxygénation est réalisable de 2 façons :
  - aération avec du diazote ;
  - ou ajout d'un léger excès d'un réactif de réduction du dioxygène présent. Pour 1 litre de milieu : 1,15 mL de  $Na_2SO_3$  1 mol/L (préparation extemporanée, le réducteur) plus 0,75 mL de  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  0,01 mol/L (catalyseur de la redox).
- Suivre l'évolution de  $C_L$  lors de l'étape de réoxygénation afin de tracer

$$\ln\left(\frac{C_L^* - C_L}{C_L^*}\right) = f(t) \text{ qui donne une droite de pente } -K_L a. \text{ Travailler en \% d}'O_2.$$

(Remarque : si on réalise l'étape de désoxygénation avec  $Na_2SO_3 + CoCl_2$ , il faut attendre l'oxydation du reliquat (excès) de  $Na_2SO_3$  introduit au départ avant de commencer à observer une remontée en dioxygène dissous lors de l'étape de réoxygénation.)

## 2.4 Travail à réaliser

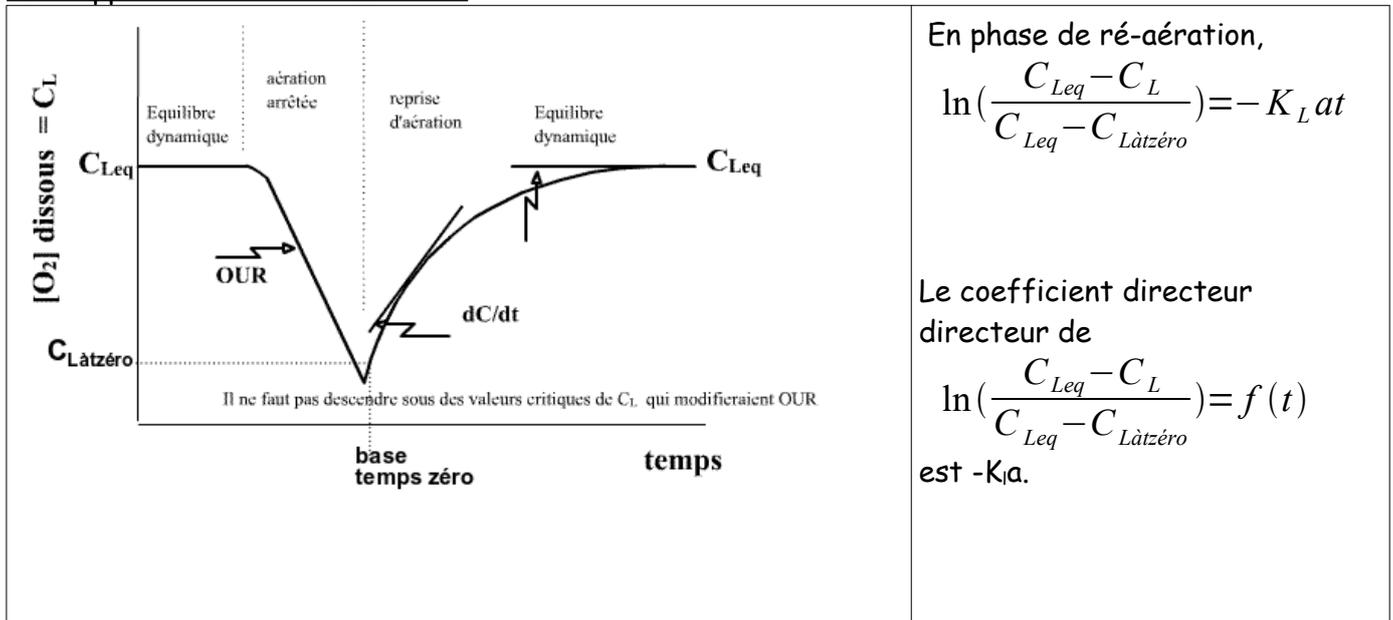
Travailler à 35°C. Déterminer  $K_L a$  pour le bioréacteur avec 1,5 litre d'eau distillée ou de milieu LB pour un débit d'aération de 0,4 VVm (volume d'air par volume de milieu par minute) et une vitesse de turbine de 200 rpm. Réaliser la même expérience mais avec une vitesse de turbine de 400 rpm. Rendre compte des résultats obtenus. Conclure.

## 3. Méthode de détermination dynamique en présence de microorganismes

### 3.1 Préalable : Etalonnage du capteur à dioxygène et évaluation de son temps de réponse

Voir paragraphe 2.1. Idem.

### 3.2 Rappel concernant la méthode



### Mode opératoire et travail à réaliser (avec le matériel disponible)

- Préparer le bioréacteur avec 1,5 L de milieu LB. Travailler à 35°C. Régler l'aération à 0,5 VVm et la rotation de la turbine à 200 rpm. Inoculer à 5% (V/V) avec la souche *E. coli* fournie (culture aérée, agitée de la nuit en milieu LB). Laisser la culture s'acclimater et l'équilibre dynamique du dioxygène s'instaurer vers 50 % de  $pO_2$ . Noter alors la valeur d'équilibre dynamique du dioxygène au départ de l'expérience ( $C_{Leq}$ ).
- Couper l'aération, déclencher au même instant le chronomètre et suivre  $C_L = f(t)$ . On obtient  $r_{O_2}$ .
- Lorsque le dioxygène tombe vers 10%, remettre l'aération, notez le temps (nouveau temps zéro) et suivre l'évolution de  $C_L$  afin de tracer  $\ln\left(\frac{C_{Leq} - C_L}{C_{Leq} - C_{Làtzéro}}\right) = f(t)$  qui donne une droite de pente  $-K_L a$ .
- Travailler en % d' $O_2$ .
- Compte-rendu et conclusion.

### Bibliographie

- Garcia-Ochoa, Gomez, *Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes : an overview, Biotechnology Advances, 2009 27:153-176*
- Ben Hassan, Ghali, Mansour, *A microcomputer-based oxygen measurement and control system for fermentation processes, Applied Biochem. And Biotech., 1991:30:247-263*
- Norme NF X 42-103 de décembre 1989. Détermination du coefficient de transfert volumétrique de l'oxygène par la méthode de Cooper