



L'INTEGRATOR de LAMBDA remplace les mesures de densité optique (DO)

Fréquemment les scientifiques veulent connaître la croissance de leur culture ou l'activité métabolique durant la bioconversion. Pour cette raison ils recherchent des instruments permettant de mesurer la densité optique (DO) de leur culture.

La densité optique est une fonction logarithmique. Une augmentation d'absorption de la lumière d'une unité correspond à une diminution de l'intensité lumineuse passant à travers l'échantillon d'un facteur 10. Une densité optique de 4 seulement correspond donc à une diminution de l'intensité lumineuse d'un facteur 10 000. C'est une tâche exigeante pour l'électronique de mesurer un signal aussi faible avec précision. Et que dire d'une densité optique de 20 ou 100 ? Même si de nombreux appareils pour la mesure de la densité optique dans les milieux de culture ont été développés, aucun n'est vraiment satisfaisant.

Il y a aussi de nombreuses perturbations affectant une telle mesure. La première, la plus difficile à résoudre, est que les cellules mortes sont aussi mesurées. Si de nombreuses cellules mortes sont présentes dans la culture, l'activité métabolique résultante sera quand même faible. Les bulles d'air provenant de l'aération sont aussi mesurées et comptabilisées comme des cellules vivantes! Les bulles d'air microscopiques, en particulier dans les cultures denses, peuvent être très nombreuses. Inutile de dire que tout précipité ou coloration formée au cours de la culture viendront aussi fausser l'estimation de l'activité métabolique de la culture mesurée par cette méthode.

Détermination de la croissance cellulaire

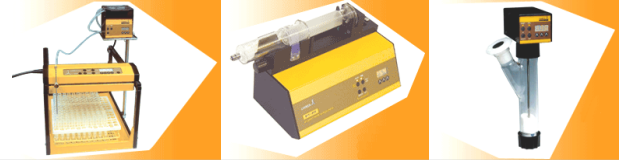
La mesure de la croissance des cellules se fait généralement en prélevant des échantillons à différents instants selon différentes méthodes:

1. Coloration et comptage des cellules mortes et vivantes (microscope) dans le cas des cellules de mammifères
2. Densité cellulaire totale (cellules mortes et vivantes) par DO à 600-650 nm à l'aide d'un photomètre pour les bactéries / levures ou la densité totale de cellules (mortes et vivantes) par comptage dans un cellule de comptage de Neubauer
3. Comptage des cellules vivantes par dilution de l'échantillon, puis incubation de 0.1 ou 1 ml sur une plaque de gélose pendant 1-3 jours à la température de croissance dans un incubateur, dans le cas de bactéries / levures
4. Par un "coulter counter" ou un autre système de compteur de particules

Mesures in situ

LAMBDA propose une nouvelle approche pour d'accéder à la cinétique de croissance des cellules en mesurant et en enregistrant des quantités d'acide ou de base nécessaires pour maintenir un pH constant dans la culture.

La croissance de la culture est globalement considérée comme un ensemble complexe de



réactions chimiques ou biochimiques, qui utilisent des substrats transformés en différents produits et en biomasse.

La croissance cellulaire produit toujours du CO₂ et pour maintenir le pH constant, cet acide (qui s'échappe partiellement) doit être compensé par l'addition d'un autre acide par un régulateur de pH avec une pompe à acide. (La formation d'acides métaboliques et de bases autres que le CO₂ sont bien sûr également pris en compte globalement par cette régulation).

En phase de croissance normale, la production de CO₂ et l'ajout d'acide pour la correction du pH sont proportionnels à la croissance (somme de tous les processus métaboliques de la cellule). Par conséquent, la quantité de base ou d'acide ajoutée pour corriger le pH est une indication précise de la vitesse de croissance de la culture. L'addition contrôlée d'acide est équivalente en principe à une titration et donc très précise.

La méthode de LAMBDA utilisant un INTEGRATOR est strictement reliée à l'activité métabolique

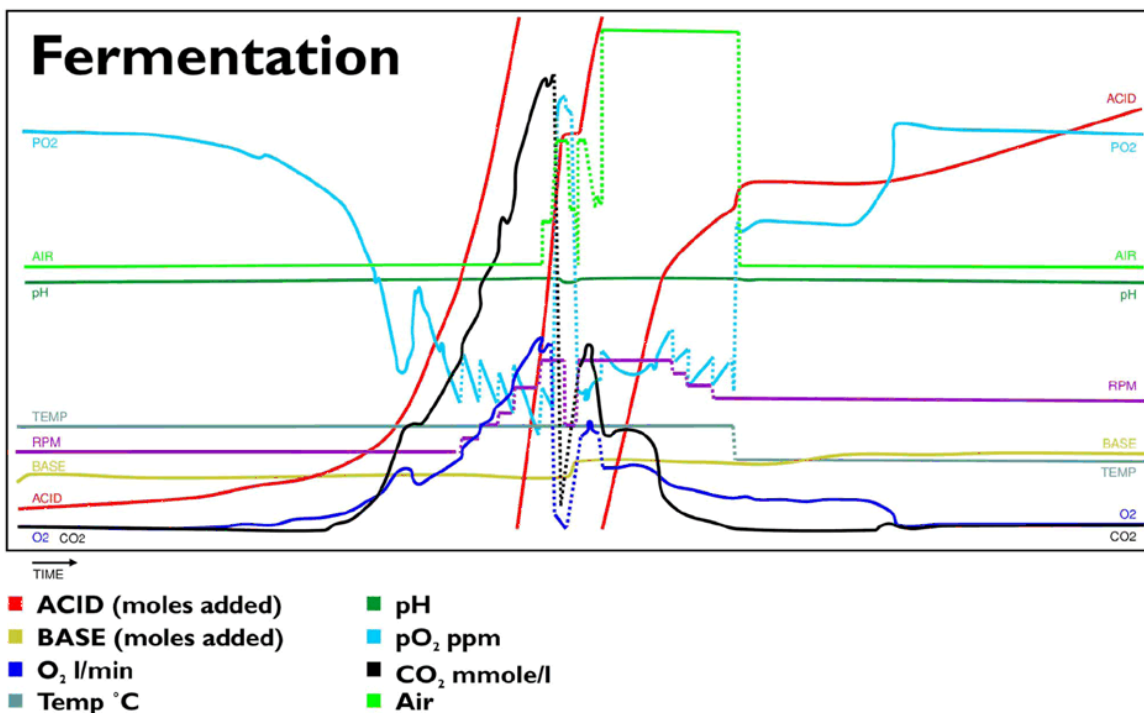
L'INTEGRATOR LAMBDA PUMP-FLOW transforme les impulsions de commande du moteur des pompes en une tension qui peut être visualisée sur un enregistreur ou affichée sur un écran par un PC en utilisant le logiciel de fermentation (FNet ou SIAM).

La quantification du signal de l'INTEGRATOR peut être facilement obtenue en connaissant la concentration en acide et le débit de la pompe. Il est ensuite facile de corréliser ce signal à la mesure de la croissance déterminée dans un premier temps par une méthode classique. Par la suite, le simple signal de l'INTEGRATOR POMPE-FLOW permet de connaître la cinétique de croissance en temps réel de façon précise avec une méthode à faible coût. Ce n'est pas le cas pour de nombreuses méthodes très coûteuses de mesure de la vitesse de croissance, par exemple par la mesure de la densité optique (DO) de la culture. Une telle mesure n'est pas précise, car les cellules mortes, les bulles d'air, des précipités, des modifications coloration ou l'apparition d'un trouble s'ajoutent à la concentration réelle en cellules.

L'évolution de la valeur obtenu par l'intégrateur au cours du temps donne également une information sur les problèmes de croissance ou de contamination et sur l'évolution de la bioconversion. Il s'agit d'un paramètre intéressant lors de la comparaison de séries de cultures. Il serait dommage pour un scientifique de ne pas utiliser ce système simple et précis d'étude de la croissance cellulaire pour les cultures eucaryotes ou procaryotes.

La courbe de pH obtenu par la majorité des bioréacteurs concurrents se résume presque toujours une ligne droite qui ne donne aucune information concernant la culture. Cependant la quantité requise d'acide ou de base pour maintenir le pH constant pendant toute la croissance de la culture est une information précieuse pour le scientifique, disponible grâce à l'INTEGRATOR.

Un exemple de mesure de l'activité de la pompe acide par l'INTEGRATOR durant une bioconversion est présenté ci-dessous (tracé rouge avec 2 remises à zéro). La tracé rouge est le seul qui soit clairement exponentiel, comme on pourrait l'attendre pour une courbe de croissance. En totalisant la consommation d'acide, il est possible de déterminer l'étendue de la transformation et l'état de la culture. De telles informations peuvent être fondamentales pour le contrôle et la reproductibilité des différentes cultures.



Addition of acid or base necessary to keep the pH constant would not appear without **PRECIFLOW** and integrator

Certains clients de LAMBDA sont tellement convaincus de l'utilité de l'INTEGRATOR, qu'ils l'utilisent pour d'autres paramètres régulés. Ceci n'est pas surprenant car les cellules sont si complexes que toute information supplémentaire ne peut qu'être bénéfique pour leur connaissance

LAMBDA ne fournit pas de sonde d'OD ou de biomasse pour les raisons exposées précédemment. Cependant, l'utilisateur peut ajouter lui-même ces sondes à tout moment s'il le désire. Leur sortie peut être connectée à l'entrée analogique "X" ou un autre module et être visualisée sur le logiciel SIAM. La cuve du fermenteur MINIFOR dispose de 6 à 8 cols latéraux qui permettant de rajouter des sondes supplémentaires. Toutefois de telles méthodes de mesure (les sondes et les transmetteurs correspondants) sont en général très coûteuses.