

Analyse von Fermentierungsabgasen mit dem Prima δ B

Schlüsselbegriffe

- Massenspektrometrie
- Fermentierung
- Respirationsquotient
- Flüchtige organische Stoffe
- Abgasanalyse
- Biotechnologie
- Pharmazie

Einführung

Die Biotechnologie hat zur Entwicklung neuer Therapiemittel, verbesserter landwirtschaftlicher Produkte, weiterer erneuerbarer Energiequellen sowie innovativer biologisch abbaubarer Materialien geführt. Fortschritte in der Zell- und Molekularbiologie haben Heilverfahren für Bereiche ermöglicht, in denen es zuvor keine effektiven Behandlungsmethoden gab.

In der biologischen Landwirtschaft haben Experten bestätigt, dass sich der Ernteertrag mit Hilfe biotechnologischer Innovationen ohne Vergrößerung des Ackerlandes verdreifachen lässt, womit wertvolle Regenwälder und Lebensräume von Tieren geschont werden. Die neue Biomaterialindustrie verspricht eine energieeffiziente Produktion von Kunststoffen unter Einsparung begrenzter fossiler Brennstoffe.

Einer der wichtigsten biotechnologischen Prozesse ist die Fermentierung. Dieser Anwendungshinweis beschreibt den Einsatz des Prozess-Massenspektrometers Prima δ B zur Überwachung der Gasräume in Fermentern und Bioreaktoren.

Fermentierung

Mit diesem Begriff beschreiben Mikrobiologen die Herstellung eines Produktes durch Massenkultivierung von Mikroorganismen. Das Produkt selbst kann es entweder die Zelle selbst (Biomassenproduktion), das Metabolit von Mikroorganismen oder ein Fremdprodukt sein. Mikroorganismen, die ihren Stoffwechsel unter Zuhilfenahme von Sauerstoff abwickeln, nennt man aerobe Mikroorganismen. Manche Mikroorganismen setzen statt Sauerstoff Nitrate oder Sulfate ein und können so auch ohne Sauerstoff wachsen. Diese nennt man anaerobe Mikroorganismen.

Es gibt drei Fermentierungsvarianten. Bei der Batch-Fermentierung wird eine sterilisierte Nährstofflösung im Fermenter mit Mikroorganismen geimpft und die daraufhin einsetzende Inkubation überwacht. Zur Steuerung des pH-Werts werden im Verlauf der Fermentierung Sauerstoff (bei aeroben Mikroorganismen) und Säuren bzw. Laugen hinzugefügt. Die Zusammensetzung des Kulturmediums, die Biomassen und die Metabolitkonzentration ändern sich aufgrund der Zellaktivität ständig. Eine Verbesserung des



Sektorfeld-Massenspektrometer Prima δ B

geschlossenen Batch-Prozesses stellt die Fedbatch-Fermentierung dar, bei der in regelmäßigen Abständen Substrate zugeführt werden.

Bei der kontinuierlichen Fermentierung wird ein offenes System eingerichtet und dem Bioreaktor kontinuierlich eine sterile Nährlösung hinzugefügt. Gleichzeitig wird eine äquivalente Menge umgesetzter Nährlösung mit Mikroorganismen aus dem System entnommen.

Abb. 1 zeigt eine schematische Darstellung eines typischen Fermenters. Eine mikrobielle Fermentierung besteht aus 3 Phasen, die die Reaktionen zwischen Flüssigkeit und Feststoff, Gas und Feststoff sowie Gas und Flüssigkeit umfassen.

Die liquide Phase enthält gelöste Nährstoffe, Substrate und Metabolite.

Die Feststoffphase besteht aus individuellen Zellen, Granulaten, unlöslichen Substraten oder gefällten metabolischen Produkten.

Die Gasphase bietet ein Reservoir für die Zuführung von O_2 bzw. die Entnahme von CO_2 .

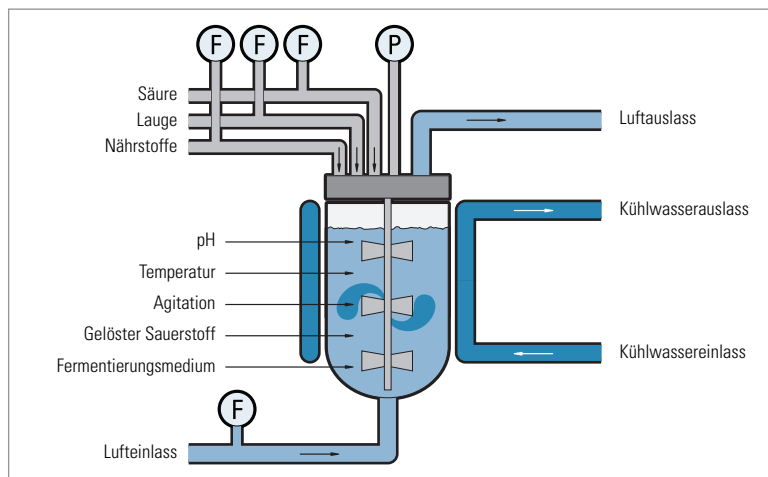


Abb. 1 – Schematische Darstellung eines typischen Fermenters

Notwendigkeit der Gasanalyse

Bei jeder Fermentierung muss der Zustand der Kultur kontinuierlich überwacht werden, da ihre Gesundheit die Umsetzungsrate der Nährstoffe, die Bildung unerwünschter Abfallprodukte und - im schlimmsten Fall - eine beginnende Vergiftung bestimmt. Die Analyse der zum Fermenter hinzugefügten bzw. daraus abgeleiteten Respirationsgase eignet sich bestens zur Beurteilung der Fermentierung. Diese nicht invasive Methode ermöglicht die Überwachung des physiologischen Zustands der Fermentierung, inklusive Wachstumskinetik und Substratverbrauch. Mit ihr lässt sich außerdem der beste Zeitpunkt bestimmen, bei dem mithilfe einer Prozessunterbrechung ein optimaler Ertrag erzielt werden kann.

Nutzen von Prozess-Massenspektrometern

Viele Fermentierungen weisen in den kritischen Phasen kleinere Veränderungen in der Sauerstoff- bzw. Kohlenstoffkonzentration auf. Dies ist beispielsweise während der Latenzzeit der Fall, in der sich Mikroorganismen und Nährstoffe miteinander im Gleichgewicht befinden.

Es ist daher ungemein wichtig, dass die verwendete Abgasmessmethode eine schnelle und präzise Analyse zulässt. Dank seiner schnellen Ergebnisse eignet sich ein Massenspektrometer bestens für solche Anwendungsfälle. Die hohe Präzision des Sektorfeld-Massenspektrometers Prima δB

$$\text{CER (CO}_2\text{-Entwicklungsrate)} = \text{\%CO}_2\text{-Auslassvolumen} \times \text{Abfluss} - \text{\%CO}_2\text{-Einlassvolumen} \times \text{Zufluss}$$

$$\text{OUR (O}_2\text{-Aufnahmerate)} = \text{\%O}_2\text{-Einlassvolumen} \times \text{Zufluss} - \text{\%O}_2\text{-Auslassvolumen} \times \text{Abfluss}$$

$$\text{RQ (Respirationsquotient)} = \text{CER}/\text{OUR}$$

Tabelle 1 – Fermentierungsabgasanalyse und Respirationsquotient

macht es außerdem zum führenden Prozessanalysator für Fermentierungsabgase.

Respirationsquotient

Unter Respiration versteht man einen Prozess, mit dem ein Organismus Nahrung zur Erzeugung von Energie oxidiert. Ein wichtiger Steuerparameter im Fermentierungsprozess ist der Respirationsquotient (RQ). Darunter versteht man das Verhältnis zwischen Kohlendioxidentwicklung (CER - carbon dioxide evolution rate) und Sauerstoffaufnahme (OUR - oxygen uptake rate). Eine vollständige Berechnung des Respirationsquotienten finden Sie in Tabelle 1. Für eine präzise Bestimmung des Respirationsquotienten sind ebenso präzise Flussratenmessungen am Ein- und Auslass des Fermenters notwendig.

Dieses Verhältnis lässt sich mit Hilfe eines Massenspektrometers auf einfachste Weise bestimmen, da außer O₂ und CO₂ auch N₂ und Ar gemessen werden können. Mindestens eines dieser Gase muss im Prozess inert sein, damit es effektiv für die Korrektur der Änderung der

Luftfeuchtigkeit verwendet werden kann, die bei der Zufuhr von Trockenluftgas in der Fermentierungsflüssigkeit auftritt. Ohne diese Korrektur käme es aufgrund der Lösung durch den zusätzlichen Wasserdampf zu fehlerhaften Daten für den Gasraum.

Die GasWorks Software berechnet den Respirationsquotienten als standardmäßige Funktion für die Fermentierungsapplikation.

Die Ergebnisse einer über 6 Stunden mit dem Prima δB überwachten E. coli-Fermentierung sind in Abb. 2 dargestellt.

Analyse der flüchtigen Stoffe

Respirationsgase sind nicht die einzigen im Abgas vorhandenen interessanten Gasformen. Im Gasraum kommen außerdem flüchtige organische Stoffe wie Methanol, Äthanol, Ethylacetat und Diacetyl in ppm-Konzentration vor. Ihre Analyse kann wichtige Informationen zum Fermentierungszustand erbringen. Auf der anderen Seite wirft ihre Analyse gewisse technische Probleme auf, die zunächst gelöst

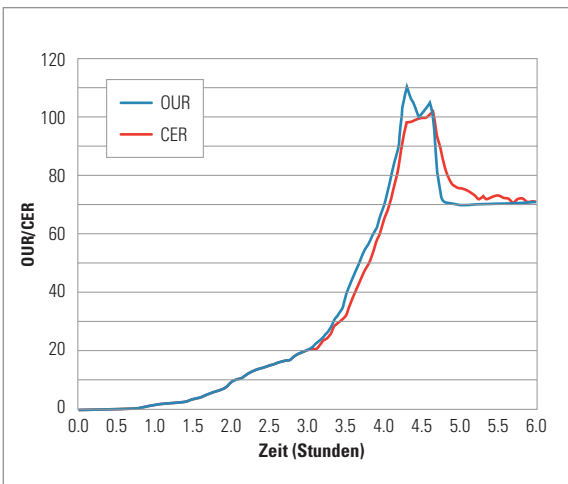


Abb. 2 – Sauerstoffaufnahme (OUR) und Kohlendioxidentwicklung (CER) für die E. coli-Fermentierung mit dem Prima δB

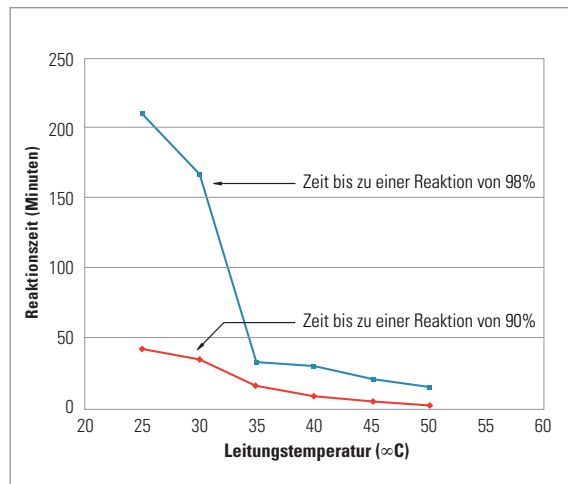


Abb. 3 – Auswirkungen der Probenlinientemperatur auf Äthanol. Datenquelle: Smith Kline Beechams

werden müssen, um verwertbare analytische Daten zu erhalten. Diese Probleme werden im Folgenden beschrieben.

Beschreibung des Analysators

Für das Sektorfeld-Massenspektrometer Prima δ B wird eine Technologie verwendet, die sich über Jahre hinweg bei einer breiten Vielfalt an Anwendungsfeldern in Bereichen wie Biotechnologie, Petrochemie sowie in der Eisen- und Stahlindustrie bewährt hat. Das Analyseverfahren wird mithilfe der folgenden Komponenten realisiert.

Probeneinlasssystem

Das Einlasssystem besteht aus einem rotierenden schnellen Mehrstromanalysator (rapid multi stream sampler, RMS). Durch den Probendauerfluss und das Null-Totvolumen werden lange Probenspülzeiten hinfällig. Das konstante Einlasspositionsfeedback und die kontinuierliche Überwachung der Gasflussrate ermöglichen eine ultimative Probenintegrität. Die einzige Verbrauchskomponente ist die Dichtung des RMS, die eine Lebensdauer von ca. 5 Mill. Operationen besitzt. Auf diese Weise kann ein einzelnes System für bis zu 60 Fermenter verwendet werden.

Um eine erfolgreiche Analyse der flüchtigen Stoffe zu gewährleisten, müssen die Probenleitungen und die Einlasssysteme beheizt sein. Nur dadurch werden unerwünscht lange Reaktionszeiten vermieden. Abb. 3 zeigt die Auswirkungen der PTFE-Probenleitungen auf die Reaktionszeit bei Äthanol. Der RMS kann auf bis zu 120°C erhitzt werden, um selbst bei den „klebrigsten“ flüchtigen Stoffen eine schnelle Reaktionszeit zu gewährleisten.

Analysator

Für die kontinuierliche Gasanalyse gibt es zwei Massenspektrometertypen. Thermo Fisher Scientific bietet beide Systeme an. Die Sektorfeldmethode hat sich aufgrund ihrer Stabilität und den geringen Wartungsanforderungen als die erfolgreichste für die Analyse von Fermentierungsabgasen erwiesen.

Die Gaskomponenten werden dabei gemäß ihres individuellen Molekulargewichts voneinander getrennt und Gasmoleküle in einem

Hochvakuum durch Elektronenstoß ionisiert. Der Druck der Probe wird in einem zweiphasigen Prozess, d. h. ein Probentiegel gefolgt von einem molekularen Leck in der Ionenquelle, auf die erwünschte Stufe reduziert. Dies ermöglicht einen exzellenten dynamischen Messbereich (ppm- bis Prozent-Konzentrationen lassen sich auf einfachste Weise analysieren). Außerdem sind Probentiegel und der Einlass innen mit einer Glasschicht versehen und beheizt, um eine schnelle Reaktion auf flüchtige Stoffe wie Alkohol zu gewährleisten.

Die in der Ionenquelle gebildeten positiven Ionen werden dann über ein Magnetfeld beschleunigt. Die Stärke des Magnetfelds ist variabel, wodurch man das Instrument auf verschiedene Gasarten einstellen kann. Die entstehenden hochstabilen Gasspektren können dann zur Bestimmung des Gasgemisches gemessen werden. Als Messgerät wird ein Faraday-Käfig zusammen mit einem Verstärker mit festem Verstärkungsgrad verwendet. Durch die häufige elektronische Nullpunktückstellung wird ein Abdriften des Impulsbodens verhindert und die Kalibrierungsfrequenz verringert.

Ein alternatives Verfahren ist die Quadrupol-Massenspektrometrie, bei der Massen gemäß ihrer Massenzahl getrennt werden. Dies geschieht durch Beschleunigung der positiven Ionen zwischen vier Stäben mit einem RF/DC-Potenzial unterschiedlicher Stärke. Dieses Verfahren birgt im Vergleich zum Magnetsektor-Analysator allerdings erhebliche Nachteile.

Quadrupol-Analysatoren werden normalerweise mit einer Ionenenergie von 5 Volt betrieben. Dies kann Ioneninteraktionen innerhalb der Quelle auslösen, die keine langfristige Präzision zulassen. Quadrupol-Analysatoren eignen sich daher nicht zur Messung des Respirationsquotienten mit der benötigten Präzision und Stabilität.

Die Signalintensität auf einem Magnetsektoranalysator bei einer bestimmten Massenposition erscheint als sog. „flat top peak“ (abgeflachte Spitze). Das bedeutet, dass eine kleine Abweichung im Massenmaßstab nicht zu einer Änderung der Signalintensität führt. Dies gilt nicht für Quadrupol-Massenspektrometer, die runde, geformte Peaks aufweisen.

Die standardmäßigen Leistungsdaten des Prima δ B finden Sie in Tabelle 2. Die Präzision zeigt die Standardabweichung über einen Zeitraum von 24 Stunden. Beachten Sie die extrem hohe Genauigkeit — 0,05 % relativ über 24 Stunden für Sauerstoff.

Probenvorbehandlung

Abb. 4 zeigt ein typisches Probenvorbehandlungssystem. Der Prima δ B erfordert einen Probenfluss von 0,1-1 l/min bei Umgebungsdruck, der durch ein Rotameter zu prüfen ist. Zum Schutz des Analysators vor Verstopfungen durch Flüssigkeiten und Partikeln empfiehlt sich der Einsatz eines Systems mit zwei Filtern.

Dabei handelt es sich normalerweise um einen Balston-Filter gefolgt von einem Membranfilter (z. B. Genie Membranfilter Modell 101 mit hohem Durchfluss). Bei Bedarf kann ein Schaumabscheider eingesetzt werden.

	Probegas (% Molarkonz.)	Präzision % Absolut
N ₂	79	0.008
O ₂	15	0.008
Argon	1	0.002
CO ₂	5	0.005
Methanol	0.004	0.001
Äthanol	0.004	0.001

Tabelle 2 – Standardmäßige Leistungsdaten des Prima δ B

Zusammenfassung

Sektorfeld-Massenspektrometer der Prima δ B-Serie werden schon seit Jahren von vielen weltweit führenden Biotechnologie- und Pharmafirmen bevorzugt als Analysator für Fermentierungsabgase eingesetzt. Sie bieten schnelle Ergebnisse und eine exzellente Stabilität und sind daher ideal für anspruchsvolle Anwendungen geeignet.

Der Thermo Scientific Prima δ B wird von einem robusten Gehäuse nach Industriestandard geschützt und ist mit dem einzigartigen RMS-Einlasssystem (Rapid Multi Stream), der Windows®-basierten GasWorks Software für höchste Flexibilität und Benutzerfreundlichkeit sowie einer Vielzahl von Fabrikschnittstellentechnologien ausgestattet.

Informationen zu Thermo Fisher Scientific

Thermo Fisher Scientific Inc. (NYSE: TMO) ist der weltweit führende Partner der Wissenschaft. Wir versetzen unsere Kunden in die Lage, die Welt gesünder, sauberer und sicherer zu machen. Mit einem Jahresumsatz von über 9 Mrd. \$ und 30.000 Beschäftigten beliefern wir mehr als 250.000 Kunden mit Produkten, die in der Pharma- und Biotech-Industrie, in klinischen und diagnostischen Einrichtungen, Hochschulen und Forschungslabors, in Behörden, der Umweltanalytik

und bei der Steuerung von industriellen Prozessen zum Einsatz kommen. Über unsere beiden Hauptmarken Thermo Scientific und Fisher Scientific erstellen wir Lösungen für laboranalytische Herausforderungen, vom Routine-Test bis zu komplexen Untersuchungen und Forschungszwecken. Thermo Scientific ist auf Highend-Analysegeräte, Laborausrüstungen, Software, Dienstleistungen, Zubehör und Reagenzien spezialisiert und bietet Komplettlösungen für integrierten Workflow. Fisher Scientific verfügt über ein breit

gefächertes Portfolio an Laborausrüstungen, Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Dienstleistungen für das Gesundheitswesen, die wissenschaftliche Forschung und Ausbildung. Damit sind wir in der Lage, unseren Kunden die jeweils günstigsten Konditionen zu bieten. Kontinuierlich arbeiten wir an der Weiterentwicklung unserer Technologien für einen schnelleren Fortschritt in der wissenschaftlichen Forschung, Mehrwertschöpfung für unsere Kunden und Wachstum für unsere Aktionäre und Mitarbeiter. Besuchen Sie www.thermofisher.com.

Zusätzlich zu diesen Niederlassungen unterhält Thermo Fisher Scientific ein Netzwerk autorisierter Vertretungsorganisationen auf der ganzen Welt.

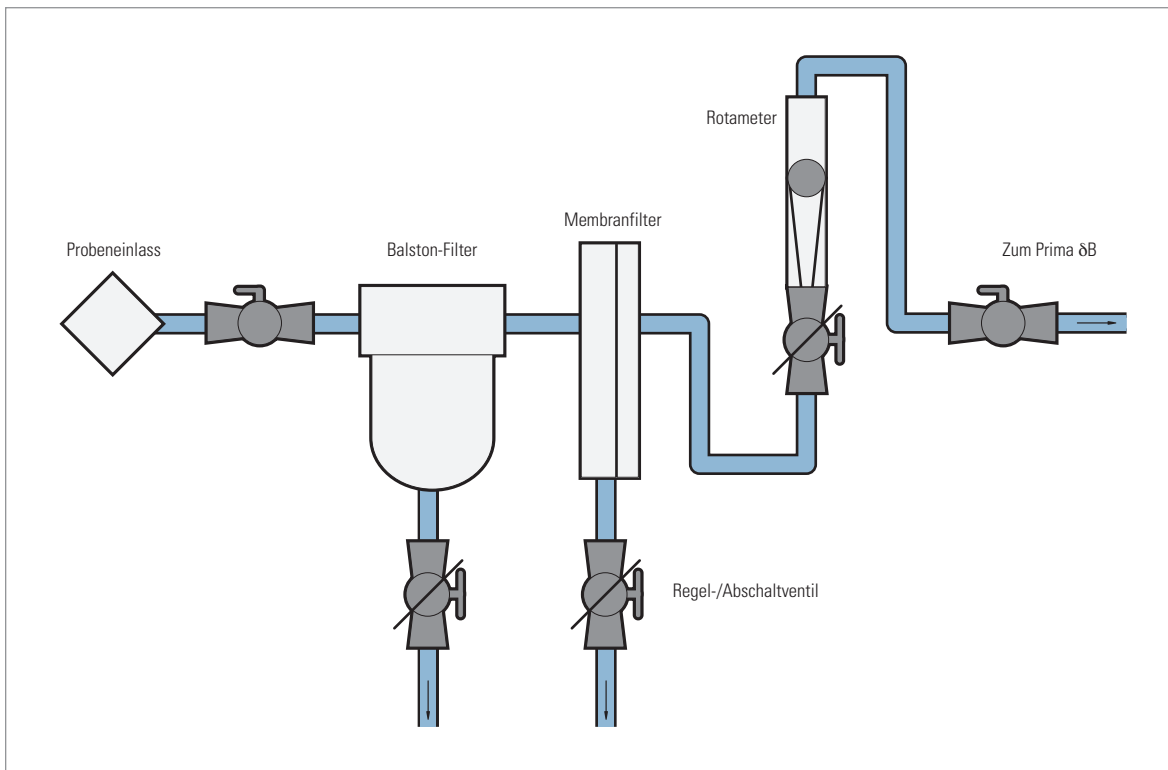


Abb. 4 – Typische Probenvorbehandlung für die Analyse von Fermentierungsabgasen

China
+86 (10) 5850 3588
+86 (10) 6621 0847 fax

Indien
+91 (20) 6601 1245
+91 (20) 2612 5739 fax

Großbritannien
+44 (0) 1606 548700
+44 (0) 1606 548711 fax

USA
+1 (800) 437-7979
+1 (713) 272-4573 fax

www.thermofisher.com

© 2008 Thermo Fisher Scientific Inc. Alle Rechte vorbehalten. Windows ist eine eingetragene Marke der Microsoft Corporation in den USA und anderen Ländern. Alle anderen Warenzeichen sind Eigentum von Thermo Fisher Scientific Inc. und ihrer Tochtergesellschaften.

Änderungen der technischen Daten, Bedingungen und Preise vorbehalten. Nicht alle Produkte sind in allen Ländern erhältlich. Näheres erfahren Sie bei Ihrem örtlichen Vertriebsmitarbeiter.