

Analyse von Fermentierungsabgasen mit dem VG Prima δ B

Schlüsselbegriffe

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

Thermo Industrial Solutions - Anwendungshinweis

Einführung

Die Biotechnologie hat zur Entwicklung von neuen Therapiemitteln, verbesserten landwirtschaftlichen Produkten, weiteren erneuerbaren Energiequellen sowie innovativen biologisch abbaubaren Materialien geführt. Fortschritte in der Zell- und Molekularbiologie haben Heilverfahren für Bereiche ermöglicht, für die es zuvor keine effektiven Behandlungsmethoden gab.

Auf dem Gebiet 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 stellt eine energieeffiziente Produktion von Plastik unter Einsparung begrenzter fossiler Brennstoffe in Aussicht.

Einer der wichtigsten biotechnologischen Prozesse ist

die Fermentierung. Diese Applikation beschreibt den Einsatz des Prozess-Massenspektrometers VG 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. Beim Produkt selbst kann es sich entweder um die Zelle selbst (Biomassenproduktion), das Metabolit von Mikroorganismen oder ein Fremdprodukt handeln. 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 Varianten der Fermentierung. Bei der Batch-Fermentierung wird eine sterilisierte Nährstofflösung im Fermenter mit Mikroorganismen geimpft und die daraufhin



VG Prima δ B Sektorfeld-
Prozessmassenspektrometer

einsetzende Inkubation überwacht. Während der Fermentierung werden Sauerstoff (bei aeroben Mikroorganismen) und Säuren oder Laugen hinzugefügt, um den pH-Wert zu steuern. Die Komposition des Kulturmediums, die Biomassen- und Metabolitkonzentration sind aufgrund der Zellaktivität fortlaufend im Begriff sich zu verändern. Eine Verbesserung des geschlossenen Batch-Prozesses stellt die Fedbatch-Fermentierung dar, bei der in inkrementellen 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 konvertierter Nährlösung mit Mikroorganismen aus dem System entnommen. *Abb. 1.* zeigt eine schematische Darstellung eines typischen Fermenters. Eine mikrobische Fermentierung teilt sich in 3 Phasen ein, d. h. die

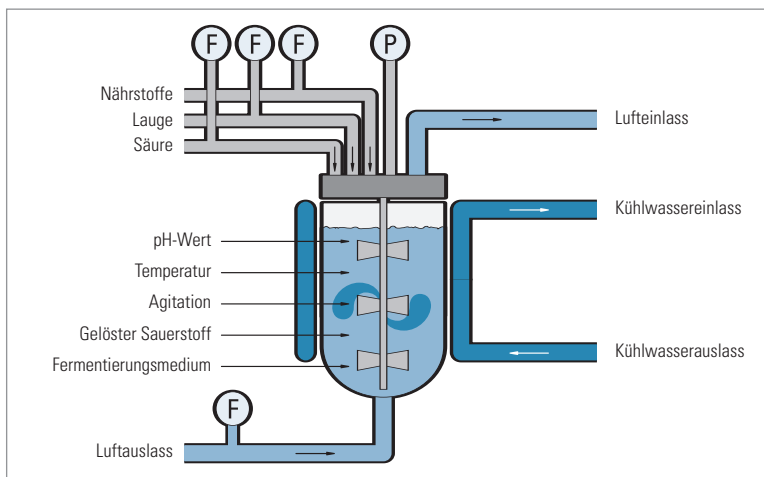


Abb. 1 – Typischer Fermenter — Diagramm

Reaktionen zwischen Flüssigkeit und Feststoff, Gas und Feststoff sowie Gas und Flüssigkeit.

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 O₂ bzw. die Entnahme von CO₂.

Notwendigkeit der Gasanalyse

Bei jeder Fermentierung ist es unabdinglich, den Zustand der Kultur zu überwachen, da ihre Gesundheit die Konvertierungsrate 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 zu einer Charakterisierung 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 bei der Unterbrechung des Prozesses ein optimaler Ertrag erzielt werden kann.

Warum werden Prozess-Massenspektrometer verwendet?

Viele Fermentierungen weisen in den kritischen Phasen kleinere

$$CER (CO_2 \text{ Entwicklungsrate}) = \% CO_2 \text{ Auslassvolumen} \times \text{Abfluss} - \% CO_2 \text{ Einlassvolumen} \times \text{Zufluss}$$

$$OUR (O_2 \text{ Aufnahmerate}) = \% O_2 \text{ Auslassvolumen} \times \text{Zufluss} - \% O_2 \text{ Einlassvolumen} \times \text{Abfluss}$$

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

Tabelle 1 – Fermentierungsabgasanalyse und Respirationsquotient

Veränderungen in der Sauerstoff- bzw. Kohlenstoffkonzentration auf, zum Beispiel während der Latenzzeit, in der Mikroorganismen und Nährstoffe im Gleichgewicht miteinander existieren.

Es ist daher ungemein wichtig, dass die verwendete Abgas-Messmethode eine schnelle und präzise Analyse zulässt. Dank seiner schnellen Ergebnisse eignet sich ein Massenspektrometer bestens für diese Applikation. Außerdem macht die hohe Präzision des Sektorfeld-MS im VG Prima δB ihn zum führenden Prozessanalysator für Fermentierungsabgase.

Respirationsquotient

Unter Respiration versteht man den Prozess, mithilfe dessen ein Organismus Nahrung zur Erzeugung von Energie oxidiert. Ein wichtiger Steuerparameter im Fermentierungsprozess ist der Respirationsquotient (RQ). Es handelt sich dabei um das Verhältnis zwischen Kohlendioxidentwicklung (CER—carbon dioxide evolution rate) und

Sauerstoffaufnahme (OUR—oxygen uptake rate). Eine vollständige Berechnung des RQ sehen Sie in *Tabelle 1*. Für eine akkurate Bestimmung des RQ sind ebenso akkurate Flussraten 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 wird 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 VG GasWorks Software berechnet den RQ als standardmäßige Funktion für die Fermentierungsapplikation. Die Ergebnisse einer über 6 Stunden mit dem VG Prima δB überwachten E. coli Fermentierung sind in *Abb. 2* dargestellt.

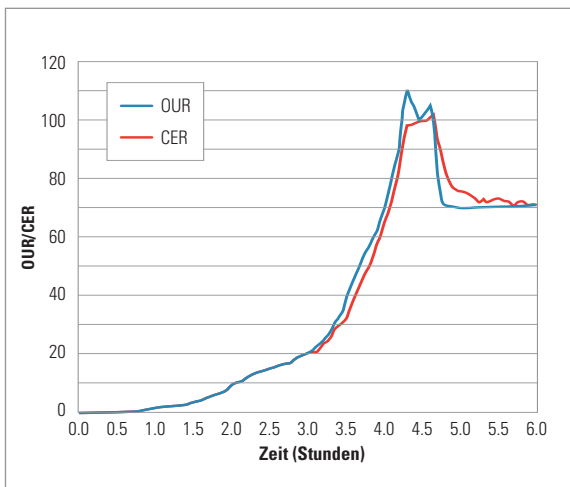


Abb. 2 – Sauerstoffaufnahme (OUR) und Kohlendioxidentwicklung (CER) für E. Coli Fermentierung mit VG Prima δB

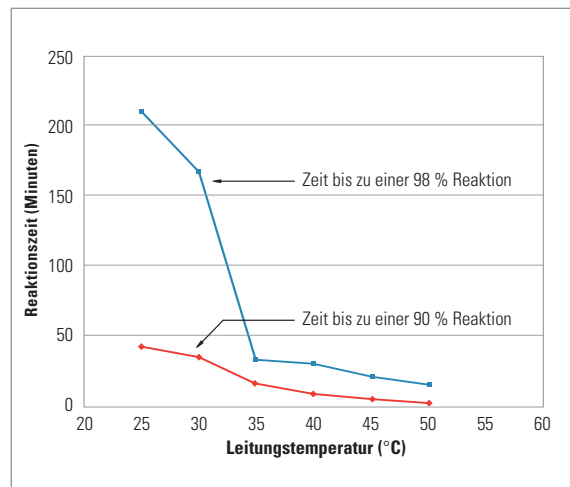


Abb. 3 – Auswirkungen der Probenlinientemperatur bei Reaktion auf Äthanol. Datenquelle: Smith Kline Beechams

Analyse der flüchtigen Stoffe

Die Respirationsgase sind nicht die einzigen im Abgas vorhandenen interessanten Gasformen. Im Gasraum kommen außerdem flüchtige organische Stoffe wie Methanol, Äthanol, Ethylacetat und Diacetyl ppm-Konzentration vor. Ihre Analyse kann wichtige Informationen zum Zustand der Fermentierung erbringen. Auf der anderen Seite wirft ihre Analyse gewisse technische Probleme auf, die zunächst gelöst werden müssen, um verwertbare analytische Daten zu erhalten. Diese Probleme werden im Folgenden beschrieben.

Beschreibung des Analysators

Für das Sektorfeld-Massenspektrometer VG Prima δB wird eine Technologie verwendet, die sich über Jahre hinweg bei einer breiten Vielfalt an Industrieanwendungen in Bereichen wie Biotechnologie, Petrochemie sowie Eisen und Stahl bewährt hat. Die Analysenmethode wird mit Hilfe folgender Komponenten realisiert.

Probeneinlasssystem

Das Einlasssystem besteht aus einem rotierenden RMS (rapid multi stream sampler). 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 einen Lebenszyklus von 5 Millionen Operationen besitzt. Auf diese Weise kann ein einzelnes VG-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 Temperatur 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

Im Allgemeinen spricht man von zwei Typen von Massenspektrometern für die kontinuierliche Gasanalyse. Thermo Electron bietet beide MS-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. Die Gasmoleküle werden 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. Eine alternative Technik 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. Diese Methode 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 sind daher nicht geeignet, den RQ mit der benötigten Präzision und Stabilität zu messen. Die Signalintensität auf einem Magnetsektoranalysator bei einer bestimmten Massenposition, erscheint als „flat top peak“ (abgeflachte Spitze). Dies 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 VG Prima δB finden Sie in *Tabelle 2*. Die Präzision zeigt die Standardabweichung über einen Zeitraum von 24 Stunden. Beachten Sie die extrem hohe Präzision — 0,05 % relativ über 24 Stunden für Sauerstoff.

	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 VG Prima

Probenvorbereitung

Ein typisches Probenvorbereitungssystem sehen Sie in *Abb. 4*. Der VG Prima δB erfordert einen Probenfluss von 0,1-1 l/min bei Umgebungsdruck, der durch ein Rotameter zu prüfen ist. Um den Analysator vor Verstopfungen durch Flüssigkeiten und Partikeln zu schützen, empfiehlt sich der Einsatz eines Systems mit 2 Filtern. Dabei handelt es sich normalerweise um einen Balston Filter gefolgt von einem Membranfilter (z. B. Genie Membranfilter Modell 101 hoher Durchfluss). Falls notwendig, kann ein Schaumabscheider eingesetzt werden.

Zusammenfassung

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

Thermo Electron Corporation

Die Thermo Electron Corporation ist ein weltweit führender Anbieter von Analytikgeräten. Mit unseren Lösungen unterstützen wir unsere Kunden dabei, die Welt gesünder, sauberer und sicherer zu gestalten. Der Thermo-Geschäftsbereich „Life and Laboratory Sciences“ bietet Instrumente für Analytik und Wissenschaft sowie Dienste und Softwarelösungen für Labore in den Forschungsgebieten Life Science, Medikamentenentwicklung, Klinik, Umwelt und Industrie. Der Thermo-Geschäftsbereich „Measurement and Control“ bietet Analytikinstrumente für unterschiedlichste Produktionsprozesse und praxisbezogene Anwendungen, darunter auch Anwendungen für die nationale Sicherheit. Die in der Nähe von Boston, Massachusetts, ansässige

Thermo Electron Corporation erzielt einen Umsatzerlös von mehr als 2 Milliarden US-Dollar und beschäftigt weltweit etwa 10.000 Mitarbeiter in 30 Ländern. Weitere Informationen finden Sie unter www.thermo.com

Weitere Informationen

Thermo Electron Corporation
Process Instruments
North American Office
9303 W. Sam Houston Pkwy. S.
Houston, TX 77099 USA
(713) 272-0404

Thermo Electron Corporation
Process Instruments
European Office
Ion Path, Road Three
Winsford, Cheshire CW7 3GA
United Kingdom
+44 (0) 1606 548700

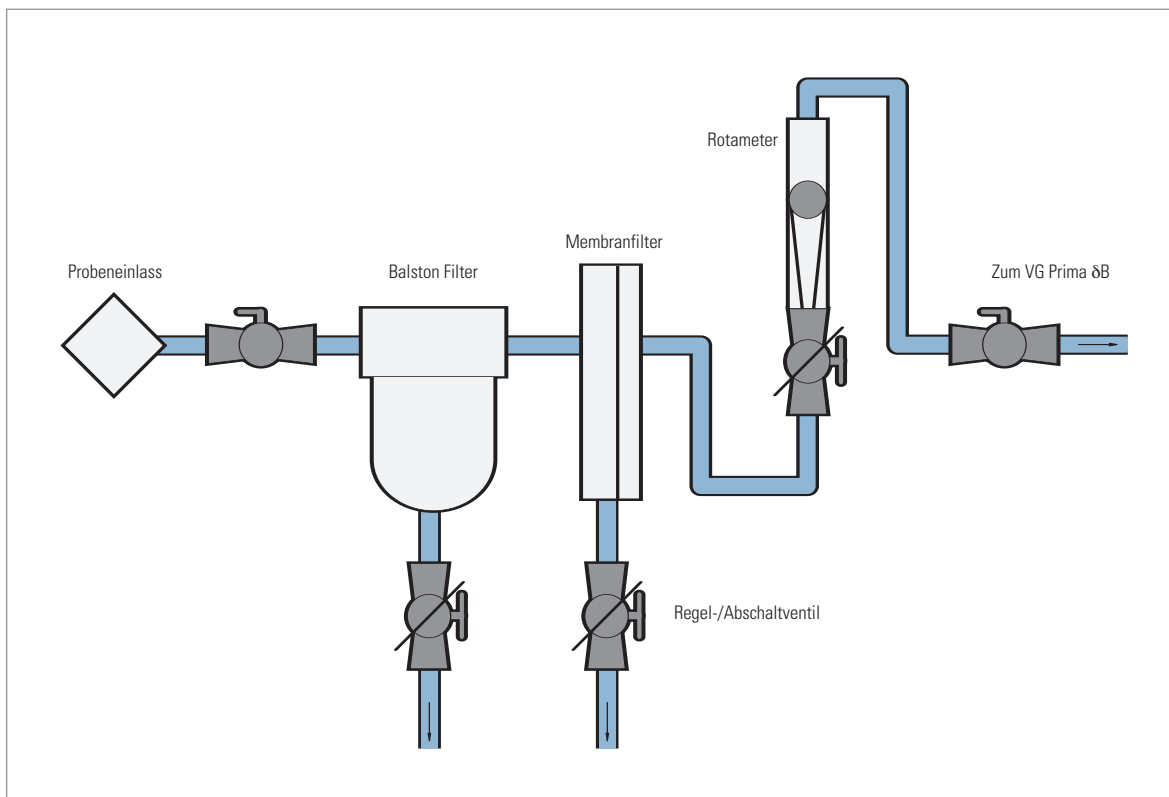


Abb. 4 - Typische Probenvorbereitung für die Analyse von Fermentierungsabgasen