

On-Line Ueberwachung von biologischen Prozessen mittels Quadrupol-Massenspektrometrie

Doctoral Thesis

Author(s):

Oeggerli, Andreas Arnold

Publication date:

1992

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000667156>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

Diss. ETH Nr. 9816

**ON-LINE ÜBERWACHUNG VON
BIOLOGISCHEN PROZESSEN MITTELS
QUADRUPOL-MASSENSPEKTROMETRIE**

Abhandlung

zur Erlangung des Titels eines
Doktors der Technischen Wissenschaften
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH

vorgelegt von

ANDREAS ARNOLD OEGGERLI

Dipl. Chem.-Ing. ETH
geboren am 23. August 1964
von Neuendorf SO

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. J.R. Bourne, Referent
Prof. Dr. W. Schaufelberger, Korreferent
Dr. E. Heinzle, Korreferent

Zürich 1992
Zentralstelle der Studentenschaft

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden **Abgasanalysen** während verschiedenen Fermentationen durchgeführt und die **Resultate zur on-line Prozesscharakterisierung** benutzt. Es gelangte ein Prozess-Massenspektrometer des Typs Balzers PGM 407 zum Einsatz. Dieses genügte den Genauigkeitsanforderungen, welche zur Minimierung von Fehlerfortpflanzungen in anschließenden Zustandsschätzungen erforderlich sind. Es erwies sich als sehr zuverlässig im Betrieb und zeigte mit dem SEV-Detektor (Sekundärelektronenvervielfacher) höchste Empfindlichkeit. Dank seiner reproduzierbaren und genauen Messergebnisse erscheint dieses Quadrupol-Instrument zur Überwachung von praktisch allen Bioprozessen sehr geeignet. Das Gerät war in ein kommerziell erhältliches Prozessleitsystem integriert.

In einem ersten Schritt wurde ein Ventilschaltzyklus entwickelt, welcher erlaubt, innert kurzer Zeit mehrere Gasströme genau zu analysieren. Typischerweise kann damit der **Sauerstoffmolanteil** eines Gases innerhalb von **45 s genauer als 0.4 % relativ** bestimmt werden.

In einer *Escherichia coli* Fermentation wurde anschliessend gezeigt, wie einfach Gasanalyse durchzuführen ist und wie die daraus berechneten Sauerstoffaufnahme- (OUR) und Kohlendioxidproduktionsraten (CPR) zur **on-line Charakterisierung der verschiedenen Phasen** eines Batch-Prozesses benutzt werden können.

Mit Hilfe einer *Alcaligenes latus* Kultur konnte verifiziert werden, dass die mit Kalibriergas gefundene **Genauigkeit im realen Betrieb** auch wirklich erreicht wird. Weil die Stöchiometrie dieses Prozesses gut bekannt ist und sich die Biomassenzusammensetzung während der Kultivierung kaum ändert, konnte die Methode der Elementbilanzen erfolgreich angewendet werden. Die Kombination der Gasanalyse (OUR, CPR) mit der Laugenaufnahme ermöglichte die on-line Rekonstruktion des Substratverbrauchs (Glucose), des Biomassenwachstums und der Produktbildung (Poly- β -Hydroxybuttersäure). Dank der genauen Bestimmung des O₂ - Molanteils im Zu- und Ablaufgasstrom, stimmte die **on-line Rekonstruktion** mit den **off-line Analysen sehr gut überein**.

Die Analyse von flüchtigen Stoffen wurde mit Bäckerhefe (Ethanol, Sdp. 78 °C) und mit einer *Bacillus subtilis* Kultur (Acetoin, Sdp. 140 °C und Butandiol, Sdp. 180 °C) untersucht. Die Bestimmung der Konzentration in der flüssigen Phase ist über die Abgasanalyse möglich, falls die Substanz einen minimalen Dampfdruck ($\sim 1 \mu\text{bar}$ bei 0.1 g L^{-1} und 30 °C) besitzt. Für Ethanol und Acetoin war dies erfüllt; Butandiol hingegen ist zu wenig flüchtig (~ 75 mal weniger gegenüber Acetoin bei 4 g L^{-1}). Aufgrund des Salzeffektes müssen die **Kalibriervorgänge sorgfältig** durchgeführt werden. Es wurde gefunden, dass über einen weiten Bereich von Betriebsbedingungen (Rührergeschwindigkeit 100 - 800 rpm, Begasung 0.3 - 1.0 vvm) während der on-line Analyse eines Prozesses mit einem **konstanten Kalibrierfaktor** gearbeitet werden kann. Dies deutet darauf hin, dass als stationärer Zustand jeweils der Gleichgewichtszustand zwischen der flüssigen Phase und der Gasphase erreicht wird. Die Butandiolanalyse ist auch mit einer Siliconmembransonde in der flüssigen Phase, welche mit Trägergas hinterspült wurde, nicht möglich.

Abgasanalysen wurden auch während der Kultivierung von tierischen Zellen (*Hybridoma*) durchgeführt. Diese Analysen waren schwieriger durchzuführen, weil solche Kulturen einerseits bedeutend niedrigere Sauerstoffaufnahmeleistungen als Bakterien und Pilze zeigen und andererseits die Zellen mittels Oberflächenbegasung mit Sauerstoff versorgt wurden. Diese Prozessführung bedingte einen relativ hohen Gesamtgasfluss. Zusätzlich änderte die Gaszusammensetzung aufgrund zweier Regler (pH und O_2) ständig relativ stark. Bei Anwendung einer reinen Gasphasenbilanz zur OUR und CPR Berechnung wurden deshalb sehr grosse Vertrauensintervalle gefunden ($\sim 30 \%$ relativ von der maximal erwarteten Rate). Die Anwendung einer **Bilanz über die flüssige Phase** liefert ~ 150 mal kleinere Werte und ist in diesem Fall **vorzuziehen**. Dabei muss aber von einem konstanten K_{La} - Wert ausgegangen werden. Um dennoch eine reine Gasphasenbilanz einsetzen zu können, müsste bei diesen sehr niedrigen Gasumsetzungsraten zu einer **Blasenbegasung** mit entsprechend kleinerem Gasfluss gewechselt werden.

Der *Hybridoma* Prozess war der einzige, bei welchem die Gelöstsauerstoffkonzentration geregelt war. Dies war nötig, weil tierische Zellen bedeutend engere Toleranzgrenzen bezüglich der Betriebsbedingungen aufweisen. Die **O_2 - Regelung** wurde als diskreter **Zustandsregler** mit dem Sauerstoffmolekülanteil in der Gasphase (y_{O_2}) als Eingang, der relativen Luft-Sättigungs-

konzentration (DO) als Ausgang und der Gelöstsauerstoffkonzentration ($C_{O_2 L}$) als Zustand ausgeführt ($C_{O_2 L}$ ist DO proportional). Für die **pH - Regelung** wurde in diesem Prozess ein diskreter **PID - Regler** in der Geschwindigkeitsform mit dem Kohlendioxidmolanteil in der Gasphase (y_{CO_2}) als Eingang benützt.

Abstract

This study is concerned with fast and **accurate gas analysis** in fermentations leading to **on-line state estimation**. A high quality mass spectrometer (Balzers PGM 407) was applied to inlet and outlet gas analysis of different batch fermentation processes. The results of the instrument were very accurate. Consequently, error propagation in the calculation of unmeasurable concentrations remained minimal. In conjunction with a secondary electron multiplier (SEM), it showed a very high sensitivity. Due to the high reproducibility and the observed reliability, this quadrupole device is well qualified for the application in bioprocess supervision. The instrument was integrated in a commercially available process supervision and control system.

First, an optimal switching cycle was developed in order to change from one gas stream to another within minimal time. The final performance guaranteed an **accuracy** of the oxygen mole fraction measurement better than **0.4 % relative within 45 s**.

An *Escherichia coli* culture was used to demonstrate how easy gas analysis can be made and how gas reaction rates, e.g. oxygen uptake rate (OUR) or carbon dioxide production rate (CPR), are **related to the activity** of the culture. **Different phases** during a batch cultivation could be identified.

An elemental balance state estimator was applied to the gas reaction rates (OUR, CPR) of an *Alcaligenes latus* culture. Since the overall stoichiometry for the growth of this process is well known and the composition of the biomass formed remains constant, this culture was suitable to **test the accuracy** of the mass spectrometer. If the gas analysis results were not accurate enough, a large error propagation would be obtained by this direct reconstruction method. In this example however, a **very good agreement** between **on-line calculated quantities** (biomass-, substrate- and product concentrations) and **off-line measured** ones was observed.

The analysis of volatile compounds was investigated using bakers yeast (ethanol, bp. 78 °C) and a *Bacillus subtilis* culture (acetoin, bp. 140 °C, butanediol, bp. 180 °C). If a compound shows a minimal partial pressure (**-1 µbar at 0.1 g L⁻¹ and 30 °C**), the liquid concentration can be determined

by analyzing the exhaust gas. This was possible with ethanol and acetoin, but not with butanediol: its partial pressure is too low (~75 times lower than acetoin at 4 g L^{-1}). Because a salt effect occurred, the **calibration procedure** has to be done **carefully**. It was found, that a **constant calibration factor** could be used throughout the on-line analysis over a wide range of operating conditions (stirrer speed 100 - 800 rpm and gas flow rate 0.3 - 1.0 vvm). Hence equilibrium between the gas and liquid phases was reached. Applying a membrane probe in the liquid phase flushed with carrier gas, butanediol was again not detectable.

Additionally, exhaust gas analysis was also carried out during an animal cell culture cultivation (*Hybridoma*). This was more difficult, since these cultures consume much less oxygen than bacteria or fungi and were surface-aerated in that case. This operation required a relatively high gas flow rate. Furthermore, due to two controllers (pH and O_2), the gas composition always changed. Hence, a wide confidence interval for the calculated OUR and CPR was found (~30 % relative of the maximum rate), when a gas phase balance was applied. Assuming a constant $K_{L,a}$ value, a **liquid phase balance** yielded much smaller (~factor 150) confidence intervals of these gas reaction rates and was **preferred** in this case. In order to get reliable results in a gas phase balance, the aeration should be done with a much smaller gas flow rate by sparging bubbles into the liquid phase.

Dissolved oxygen concentration was controlled only during the *Hybridoma* cultivation. This was necessary, because the growth of animal cells is very sensitive to operating conditions and is best only in a small interval of the oxygen liquid phase concentration ($\text{C}_{\text{O}_2 \text{ L}}$) and pH. A **model based controller** with the oxygen mole fraction in the gas phase (y_{O_2}) as input, the oxygen liquid phase concentration ($\text{C}_{\text{O}_2 \text{ L}}$) as the state variable and the dissolved oxygen concentration (DO in % air-saturation) as output was used to **maintain O_2 - concentration**. pH was kept constant using a **PID - controller** in its discrete velocity form using the carbon dioxide mole fraction in the gas phase (y_{CO_2}) as input.