



Doctoral Thesis

## **Nicht-invasive Stoffwechselstudien mit on-line Analytik von Substraten und Metaboliten an *Bacillus subtilis***

**Author(s):**

Filippini, Claudio

**Publication Date:**

1992

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000669583> →

**Rights / License:**

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

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

30. Nov. 1992

# Nicht-invasive Stoffwechselstudien mit on-line Analytik von Substraten und Metaboliten an *Bacillus subtilis*

Abhandlung  
zur Erlangung des Titels  
Doktor der Naturwissenschaften  
der  
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE  
ZÜRICH

vorgelegt von

CLAUDIO FILIPPINI  
Dipl. Natw. ETH  
geboren am 28. Juni 1965  
von Airolo TI und Luzern LU

Angenommen auf Antrag von

Prof. Dr. A. Fiechter, Referent  
Prof. Dr. H.M. Widmer, Korreferent  
PD Dr. B. Sonnleitner, Korreferent

Eidg. Techn. Hochschule  
Institut für Biotechnologie  
ETH Hönggerberg 8571  
CH-8093 Zürich  
30.11.1992

Prof. Dr. A. Fiechte

ADAG Administration & Druck AG

Zürich 1992

## 5. Zusammenfassung

Die Etablierung nicht-invasiver on-line analytischer Methoden in der biotechnologischen Prozesstechnik ist zusammen mit der Prozessautomation und der Optimierung der kultivationstechnischen Ausrüstung die Voraussetzung, um Bioprozesse effizient und rasch zu entwickeln, bezüglich Ausbeute und Produktivität zu optimieren und eine kontrollierte, sichere Produktion mit gleichbleibender Qualität zu gewährleisten. Die on-line Messung einfacher Grössen wie pH, Temperatur, Redoxpotential und  $pO_2$  ist übliche Praxis. Bei der on-line Erfassung der eigentlich prozessrelevanten Grössen, der Substrate und Metaboliten, bestehen aber erhebliche Lücken.

Diese Arbeit zeigt die Möglichkeiten und Grenzen von on-line Systemen zur Analyse von Substraten und Metaboliten in Bioprozessen und demonstriert exemplarisch die nutzbringende Anwendung solcher Systeme für die Untersuchung des Stoffwechsels von *Bacillus subtilis*, die Prozessentwicklung und die Prozesskontrolle. *B. subtilis* stellt aufgrund seiner hohen Umsatzgeschwindigkeiten besonders hohe Anforderungen an die Analytik.

Verschiedene analytische Methoden (Massenspektrometrie, Gaschromatographie, Fliessinjektionsanalyse und eine *in situ* Elektrode) wurden am Bioprocess eingesetzt. Da Systeme für die spezifisch biotechnologischen Bedürfnisse nicht käuflich sind, mussten Anpassungen insbesondere im Bereich der Kopplung an den Bioprocess und im Bereich der Automation vorgenommen werden. Besonderes Gewicht wurde auf die Qualitäten Langzeitstabilität, Präzision und Messfrequenz gelegt.

Das neuentwickelte System zur on-line Kapillar-Gaschromatographie flüssig-wässriger Proben erlaubt erstmals die hochfrequente Quantifizierung gelöster flüchtiger Metaboliten. Es wird eine Lösung präsentiert, wie die durch Membranpermeabilitätsänderungen bedingten Inkonsistenzen bei der Massenspektrometrie durch Kalibration mit Hilfe von on-line Gaschromatographie kompensiert werden können.

Konzepte zur 'intelligenten' Automation von komplexen Analysenanlagen in Form von autonomen, modularen analytischen Subsystemen werden vorgestellt und deren Realisation am Beispiel des Fliessinjektionsanalytensystems demonstriert. Eine neue Technik zur Immobilisation von Enzymen auf Membranen führt zu einer erhöhten Langzeitstabilität.

Mit Hilfe der obgenannten analytischen Systeme konnte gezeigt werden, dass die Ausscheidung von Intermediärprodukten bei *B. subtilis* vermutlich die

Folge einer limitierten respiratorischen Kapazität ist. Die Bildung der Produkte erfolgt in einer Kaskade von katabolischen Ueberlaufreaktionen. In einer ersten Stufe wird Acetat ausgeschieden. Da hohe Konzentrationen an Acetat toxisch wirken, erfolgt nach Ueberschreitung eines Schwellwertes die Auslösung einer zweiten Ueberlaufreaktion, die zur Bildung von Acetoin und 2,3-Butandiol führt. Die im Zusammenhang mit der Bildung von Intermediärprodukten beobachteten hochfrequenten Oszillation im Redoxpotential und in der Sauerstoffaufnahme demonstrieren mustergültig, wie schnell biologische Prozesse sein können.

Weitere Anwendungen von on-line Analysensystemen von Substraten und Metaboliten im Bereich der Prozessentwicklung und der Prozesskontrolle werden anhand von Beispielen vorgeführt: Parameteroptimierung für maximale Bildung von Acetoin/2,3-Butandiol und kontinuierliche Produktion durch geregelte Zudosierung des Cosubstrates Acetat.

## 6. SUMMARY

The application of non-invasive on-line analytical methods in biotechnology is together with the process automation and the improvement of the cultivation equipment the main presupposition allowing fast and efficient development of bioprocesses, optimization of yield and productivity and guaranteeing a reliable production with constant quality. The on-line measurement of simple parameters as pH, redoxpotential, temperature and  $pO_2$  is usual practice. In the field of on-line analysis of the really relevant parameters, namely the substrate and metabolite concentrations, there is still an important lack of established techniques.

This work demonstrates the possibilities and limits of on-line systems for the analysis of substrates and metabolites in bioprocesses and the resulting profit of the application of these systems for metabolic studies of *Bacillus subtilis*, process development and process control. Because of its high processing rates *B. subtilis* impose especially high analytical requirements.

Different analytical techniques (mass spectrometry, gaschromatography, flow injection analysis and *in situ* electrode) have been applied. Since systems for the specific requirements of biotechnological processes are not commercially available, adaptations especially for process interface and automation have been necessary. Special emphasis has been paid to the qualities long term stability, precision and measuring frequency.

With the newly developed system for on-line capillary-gas chromatography of liquid samples dissolved volatiles can be monitored the first time quantitatively in high frequency. A solution is presented to overcome the inconsistencies of mass spectrometry due to changing membrane permeabilities with permanent calibration through on-line gaschromatography. Concepts for 'intelligent' automation of complex analytical systems as autonomous, modular subsystems are presented and realized for a flow injection analysis system paradigmatically. A new technique for the immobilization of enzymes on membranes lead to a higher long term stability.

Exploiting the above mentioned analytical systems it could be shown that the secretion of intermediates by *B. subtilis* is probably due to a limited respiratory capacity. The formation of the products occurs in a cascade of catabolic superflow reactions. Acetate is secreted in a first step. Since high concentrations of acetic acid are cytotoxic, a second superflow reaction producing acetoin and 2,3- butanediol is started, after the concentration exceeds

a certain limit. The high-frequency oscillations in redox potential and oxygen uptake appearing during the formation of these products demonstrates excellently the high velocity of biological processes.

Further applications of on-line analytical systems for substrates and metabolites in process development and process control are shown by examples: parameter optimization for maximal formation of acetoin/2,3-butanediol and continuous production by regulated addition of the cosubstrate acetate.