



---

# Raman- und MIR-Spektroskopie für die Verfolgung technischer Bioprozesse

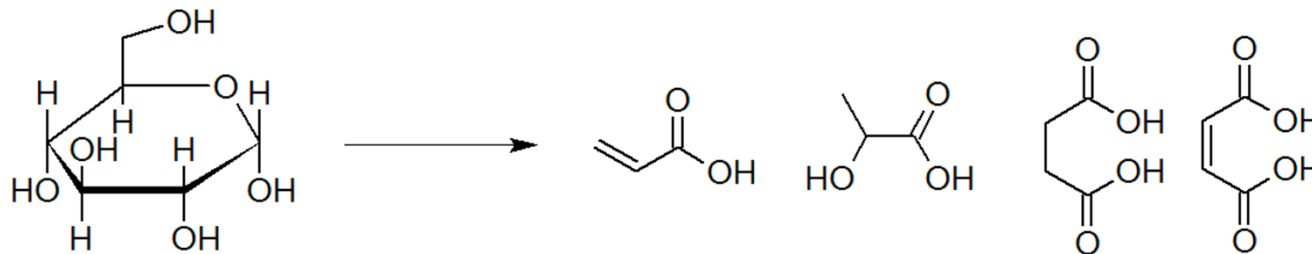
Arbeitskreis-Kolloquium Prozessanalysetechnik  
Berlin, 3. Dezember 2012

Clemens Minnich, Dirk Engel  
S•PACT GmbH, Aachen

# Fragestellung: Fermentationsprozess



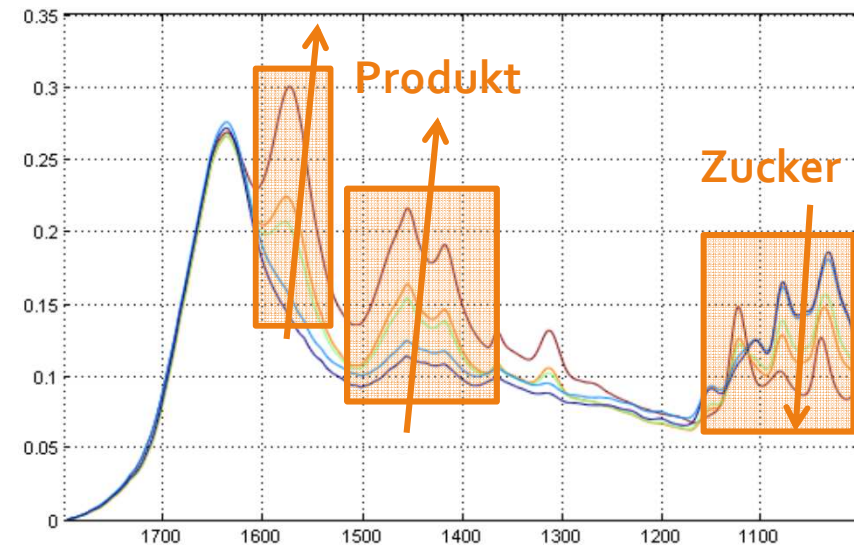
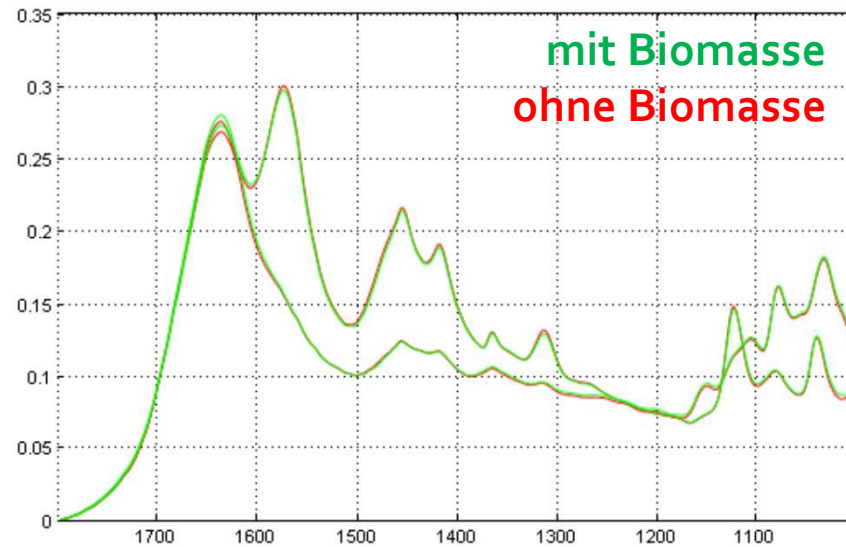
- Umwandlung von **Zuckern in funktionalisierte Säuren**
  - Typische Substrate: Zuckermischungen (Sirup), Stärke, Cellulose



- Typische Zielprodukte: **Acryl-, Milch-, Bernstein-, Maleinsäure**
  - Building blocks für Bio-Polymere:
    - Polyacrylsäure, Polymilchsäure (PLA)
    - Polyester, Polylactone
- Mikroorganismen benötigen gepufferte wässrige Medien:
  - bei physiologischem pH (~ 6-8): **Anionen** (keine freien Säuren)
  - **Proteinquelle** als Nährstoff benötigt

# Fragestellung: Machbarkeit

- relevante Prozessgrößen:
  - Restzuckergehalt, Produktgehalt
  - pH-Wert
  - Biomassegehalt / Viabilität
- Kriterien:
  - Störung durch Biomasse
  - Sensitivität auf Zucker- und Produktgehalte in wässrigem Medium





# Inline-Messungen im Mittelinfrarot (MIR)

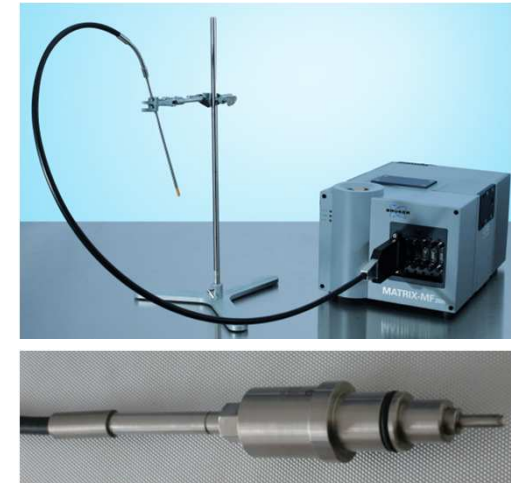
Mit freundlicher Unterstützung von



---

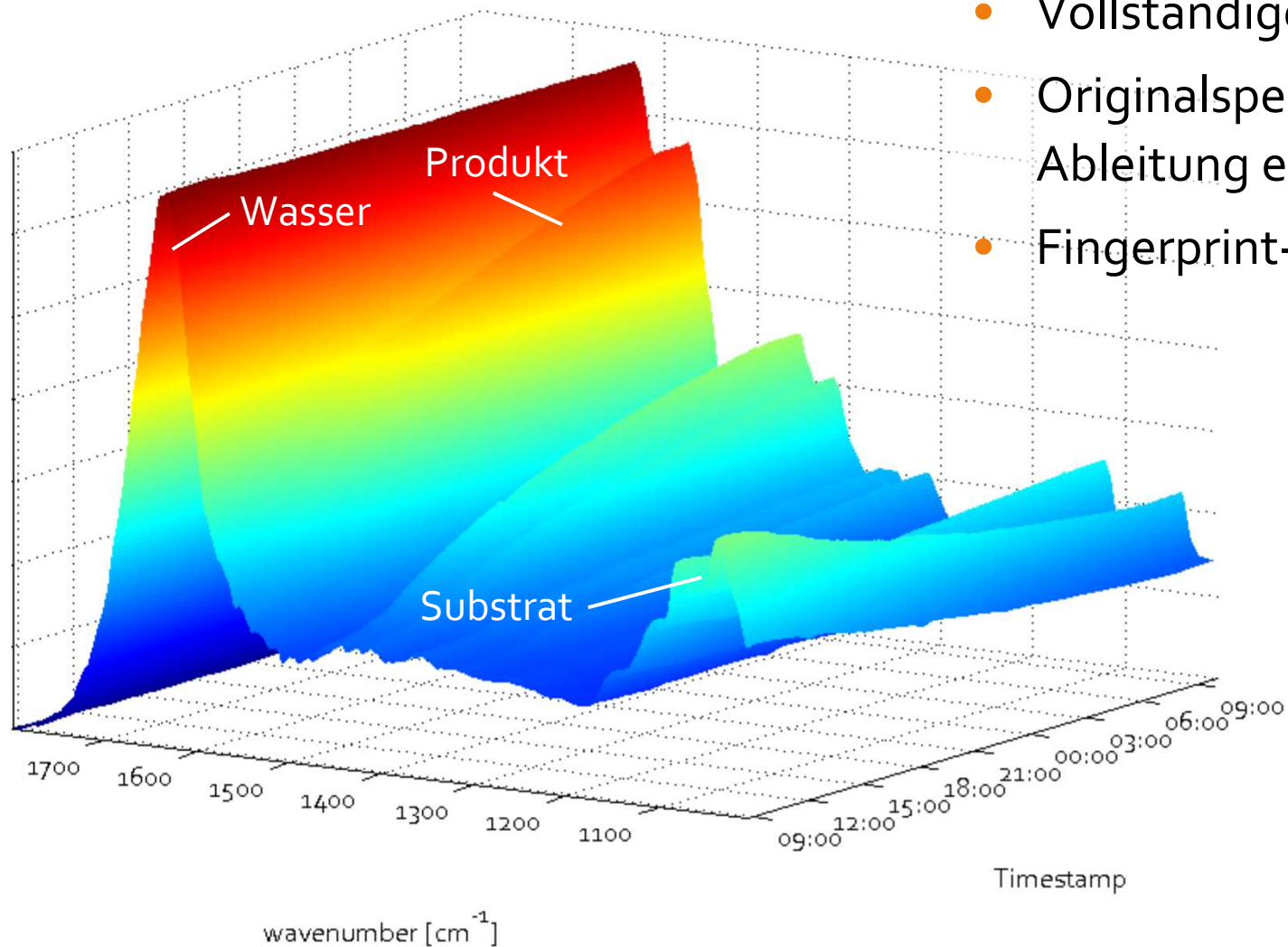
Solutions for **P**rocess **A**nalYTics & **C**ontrol **T**echnology

- Batch-Fermenter, 90 L
  - Prozessspektrometer Bruker MATRIX-MF
  - faseroptische MIR-Sonde IN-350T
    - Diamant-ATR, 6mm OD
  - Einbringung im unteren Armaturenkranz
  - Automatisierte Endlosmessung



	MIR-Spektroskopie
zeitliche Auflösung	~1 min (100 Scans)
Gesamtzahl Spektren	bis zu 2000 pro batch
Besonderheiten	Kühlung notwendig (liq. N <sub>2</sub> )

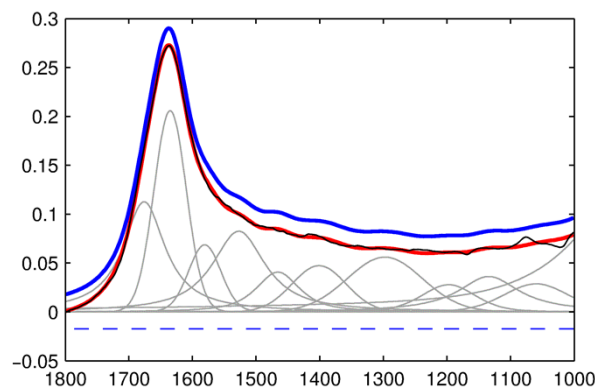
- **keine Störung durch Biomasse erkennbar!**
- regelmäßige Probenahme für die HPLC (ca. 20 Proben pro batch)



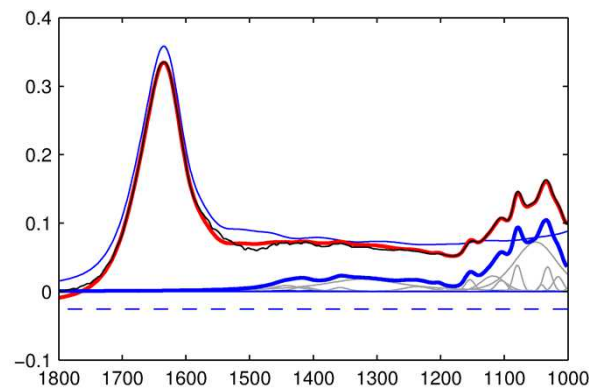
- Vollständiger batch-Verlauf
- Originalspektren, keine Ableitung erforderlich
- Fingerprint-Bereich

# Kalibrierung: Indirect Hard Modeling

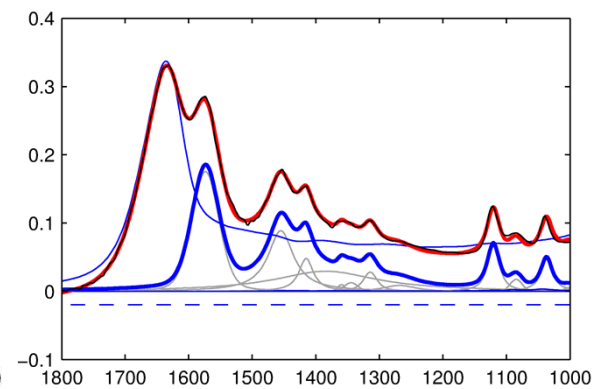
- Referenzdaten
  - 13 **Prozessproben** (eigtl. für die HPLC)
  - zeitgleich zur Probenahme gemessene Spektren
- Methode: Indirect Hard Modeling (IHM) in **PEXACT**



**Wässriges Medium**



**Zucker**  
(in wässrigem Medium)

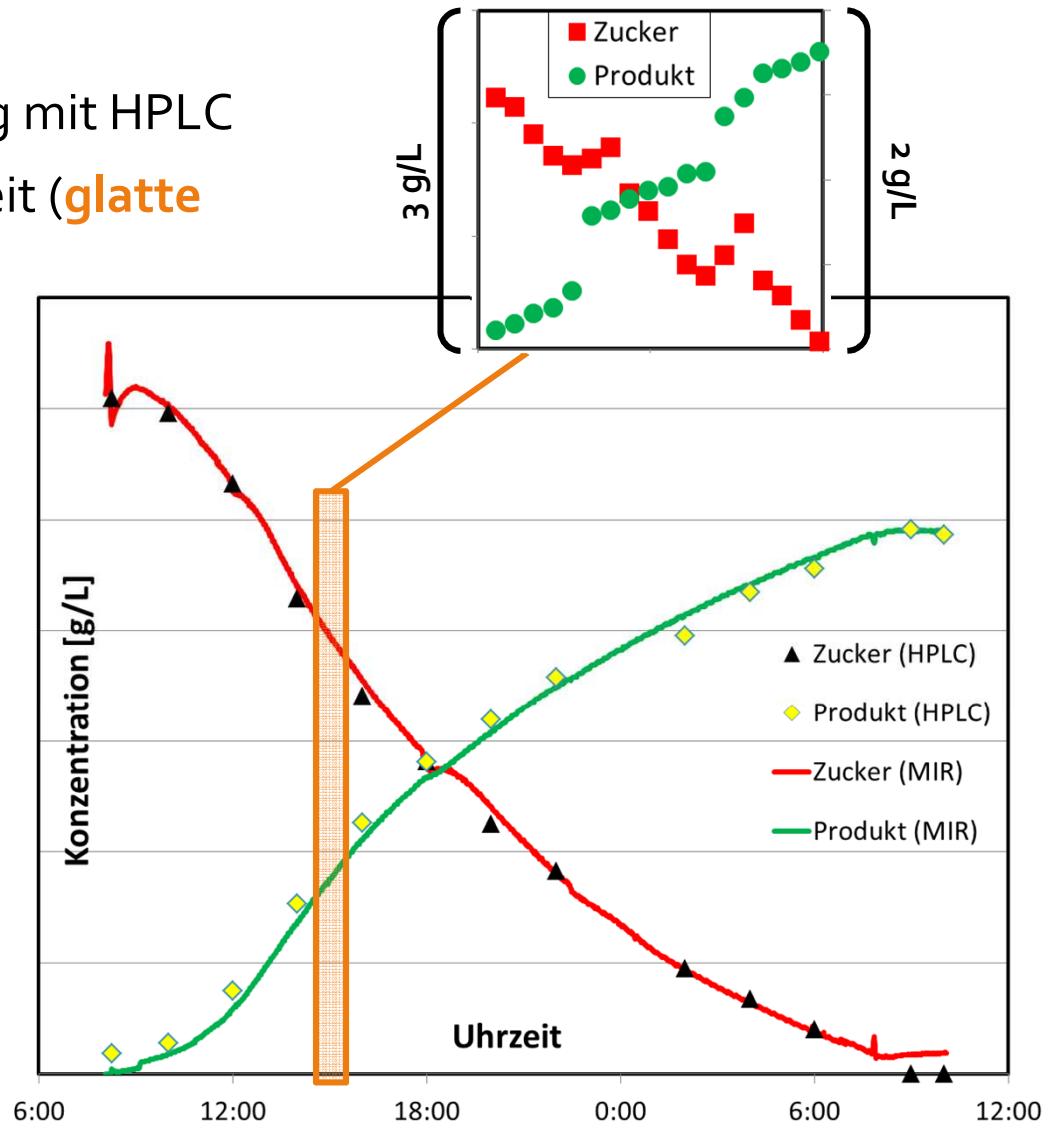


**Säureanion**  
(in wässrigem Medium)

- Kalibrierung
  - Kalibrierfehler (RMSECV): **~2%** des Gesamtbereichs
  - Bestimmtheitsmaß:  **$R^2 = 0.997$**

# Vorhersagen

- plausible Verläufe
  - gute Übereinstimmung mit HPLC
  - gute Reproduzierbarkeit (**glatte Verläufe**)
  - Messintervall ~1 min





- **Mittelinfrarot (MIR)** für Prozessverfolgung geeignet
  - keine Störung durch die Biomasse (Trübung)
  - gute Performance **im wässrigen Medium!**
  - kein Biofouling beobachtet!
- Konzentrationsvorhersage
  - Kalibrierung mit **Prozessproben** und **HPLC**-Werten
  - formaler **Kalibrierfehler im Bereich von 2 %**
    - Fehler der HPLC **etwa 2-3 %**
  - IHM-Modellierung erlaubt flexible Berücksichtigung des Wasserspektrums



# Inline Raman-Messungen

In Zusammenarbeit mit



Solutions for **P**rocess **A**nalYTics & **C**ontrol **T**echnology

# Messbedingungen

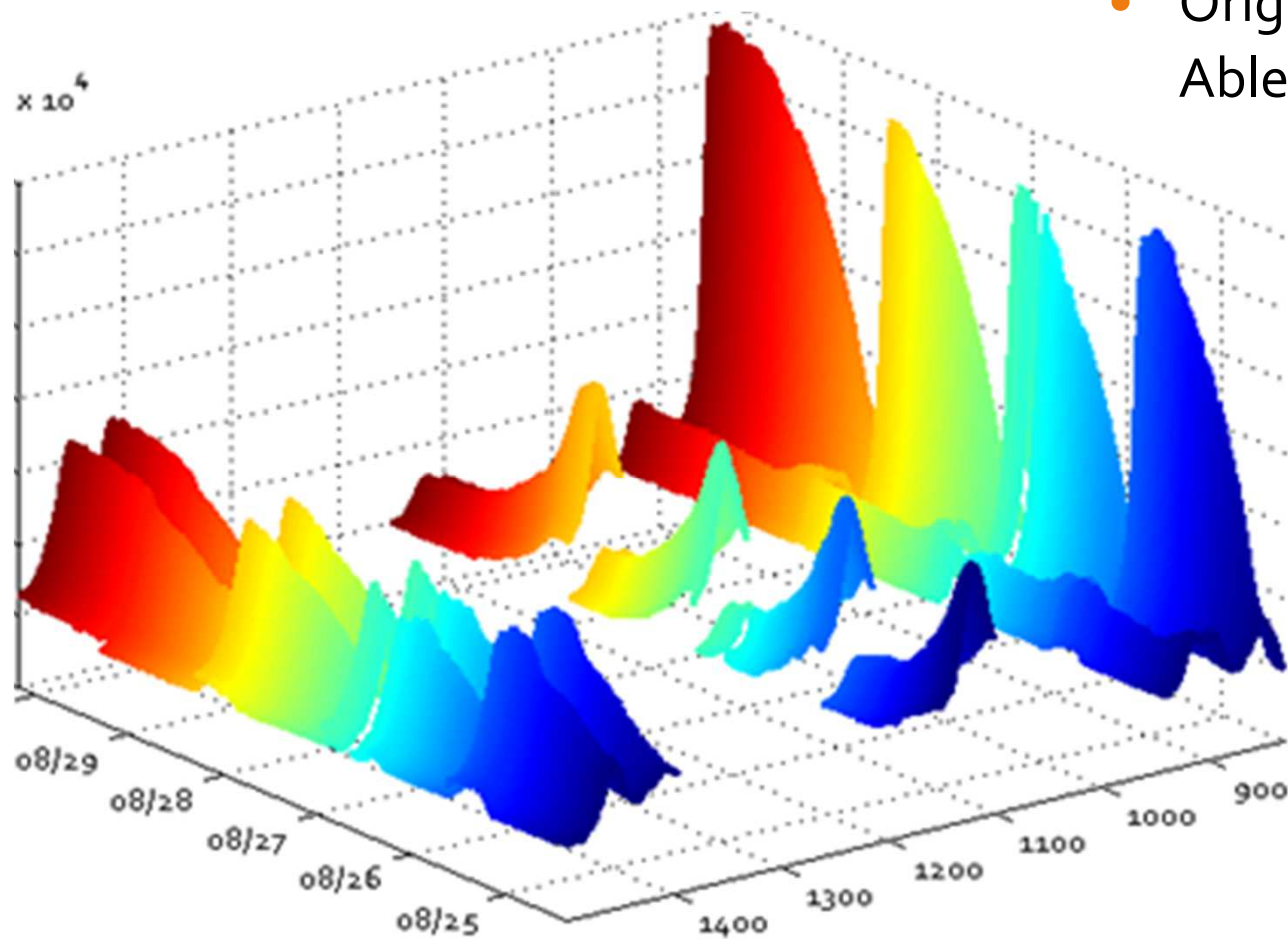
- Batch-Fermenter, 90 L
  - **RAMANRXN2 1000** Prozessspektrometer
  - Faseroptische WetHead™ Tauchsonde
    - 1" OD, Saphir-Spitze
  - Einbringung im unteren Armaturenkrans
  - Automatisierte Endlosmessung



	Raman-Spektroskopie
zeitliche Auflösung	~4 min (6 Scans)
Gesamtzahl Spektren	~200 pro batch
Besonderheiten	keine Fluoreszenz wegen Einsatz von 1000 nm-Laser

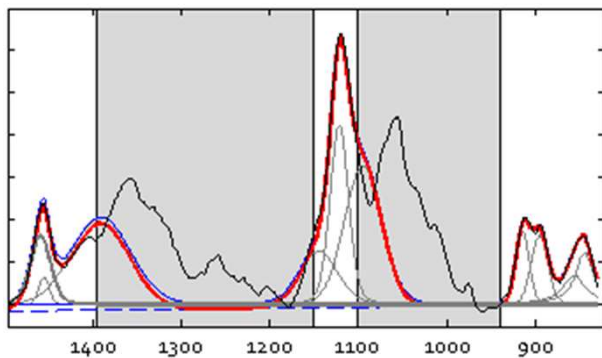
- **keine Störung durch Biomasse erkennbar!**
- regelmäßige Probenahme für die HPLC

- 4 repetitive batches
- Originalspektren, keine Ableitung erforderlich

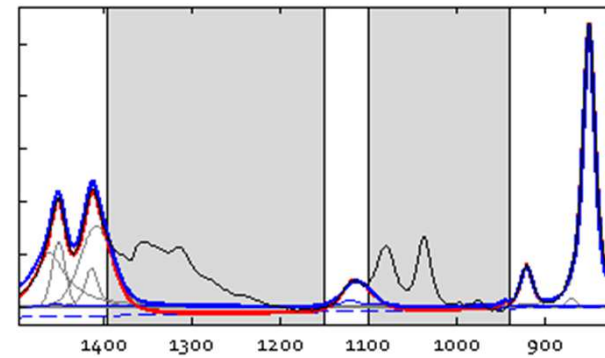


# Kalibrierung: Indirect Hard Modeling

- Referenzdaten
  - 44 **Prozessproben** (HPLC): 2 training batches, 2 test batches
  - zeitgleich zur Probenahme gemessene Spektren
- Methode: Indirect Hard Modeling (IHM) in **PEXACT**



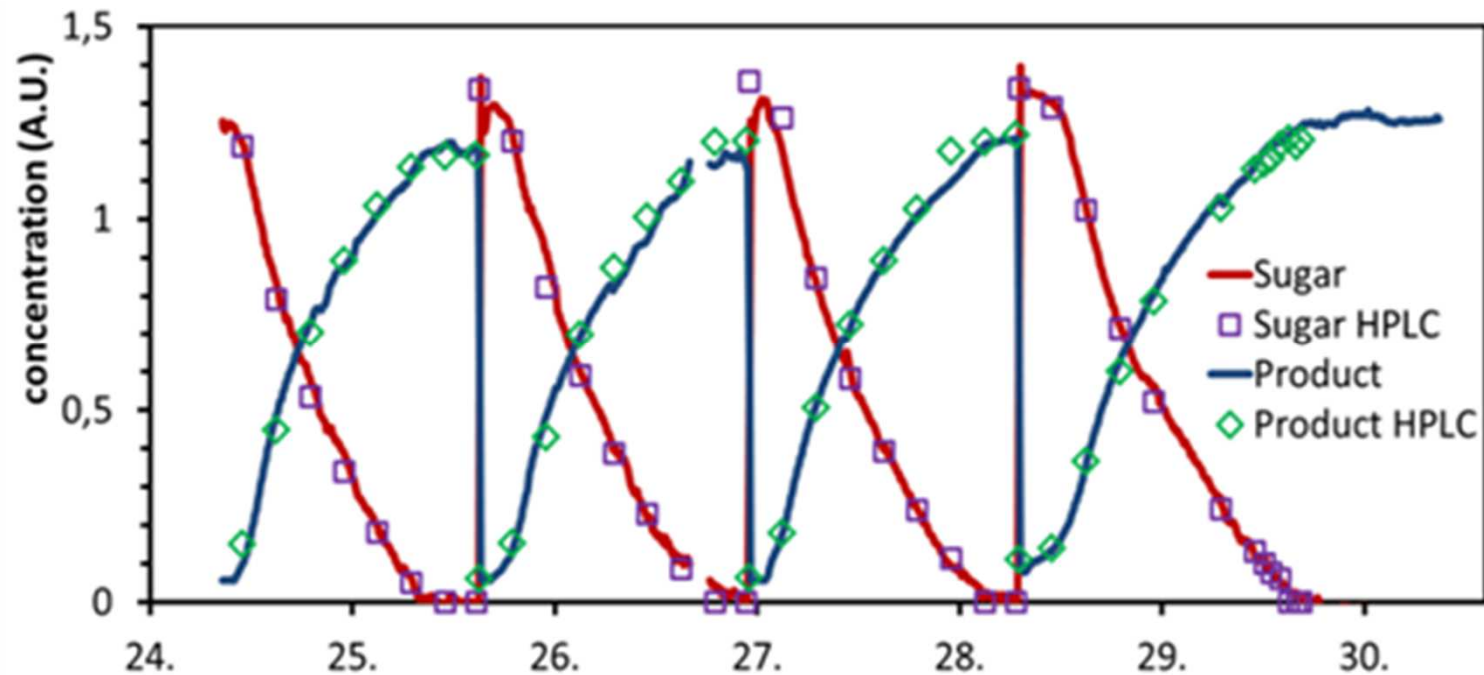
**Zucker**  
(in wässrigem Medium)



**Säureanion**  
(in wässrigem Medium)

- Kalibrierung
  - Kalibrierfehler (RMSECV): **~3%** des Gesamtbereichs
  - Bestimmtheitsmaß:  **$R^2 > 0.99$**

- plausible Verläufe
  - gute Übereinstimmung mit HPLC
  - gute Reproduzierbarkeit (**glatte Verläufe**)
  - Gute Übertragbarkeit von Batch zu Batch



- **Raman** für Prozessverfolgung geeignet
  - Anregung mit 980 nm unterdrückt Fluoreszenz
  - kein Biofouling beobachtet!
  - prozesserprobtes und robustes Messsystem
- Konzentrationsvorhersage
  - Kalibrierung mit **Prozessproben** und **HPLC**-Werten
  - formaler **Kalibrierfehler im Bereich von 3 %**
    - Fehler der HPLC **etwa 2-3 %**
  - IHM-Modellierung erlaubt flexible Berücksichtigung des Wasserspektrums

- Mit Raman und MIR sind **zwei leistungsfähige Techniken** zur Verfolgung technischer Bioprozesse verfügbar
  - Vorteile Raman:
    - prozessertprobt
    - apparative Vorteile (keine LN<sub>2</sub>-Kühlung, Faserlängen)
  - Vorteil MIR:
    - keine Störung durch Fluoreszenz
    - häufig leichtere Spektrenanalyse
- bei technisch relevanten Substrat-/Produktkonzentrationen ist **Wasser kein grundsätzliches Problem** für die MIR-Messung!
  - Hard Modeling erlaubt die explizite Berücksichtigung des Wassers



# Danksagung



- ThyssenKrupp Uhde GmbH, Biotechnology
  - Sh. Ghanegaonkar, H. Walter, I. Waengler, H. Driouch, Dr. J. Schulze



- Kaiser Optical Systems S.A.R.L.
  - Dr. C. Uerpmann



- Bruker Optik GmbH
  - W. Hartmann, Dr. H. Lutz





## S•PACT in Kürze

---

Solutions for **P**rocess **A**nalytics & **C**ontrol **T**echnology

## Hardware-Lösungen:

- prozesstaugliche Spektroskopie
- faseroptische Tauchsonden
- in Kooperation mit etablierten Herstellern



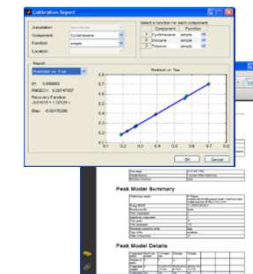
## Software-Lösungen:

- Innovative Hard-Modeling-Methoden für die quantitative Datenanalyse
- Datenanalyse-Software



## Service-Lösungen:

- Applikationsservice
- Kalibrier- und Analyse-Service
- Schulungen (auch online)



# Kontakt zu S•PACT



[www.s-pact.de](http://www.s-pact.de)



## ***Head Office und Produktentwicklung:***

Dirk Engel

+49 - 241 - 95 69 9812

[dirk.engel@s-pact.de](mailto:dirk.engel@s-pact.de)



## ***Branch Office und Applikationsservice:***

Clemens Minnich

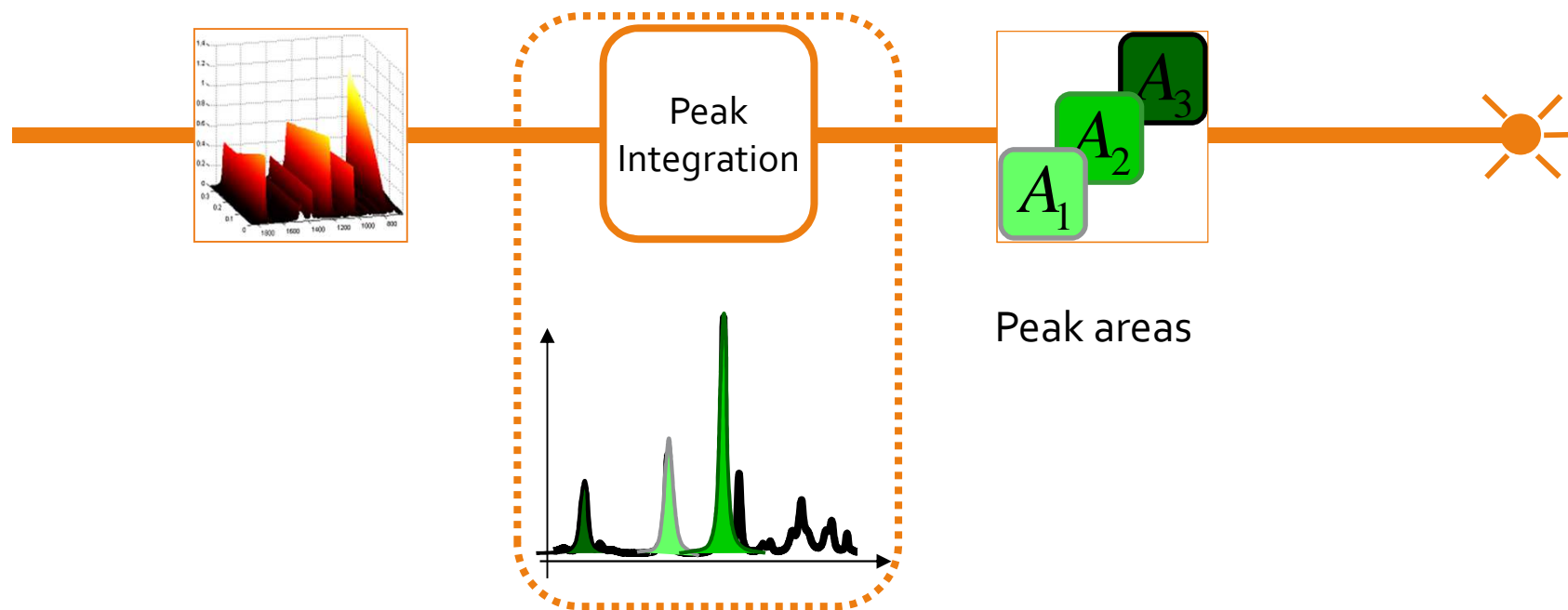
+49 - 6221 - 727 8615

[clemens.minnich@s-pact.de](mailto:clemens.minnich@s-pact.de)



# Indirect Hard Modeling (IHM) in a nutshell

# Analysis Method: Peak Integration



Data modeling based on characteristic peaks → Integration Model

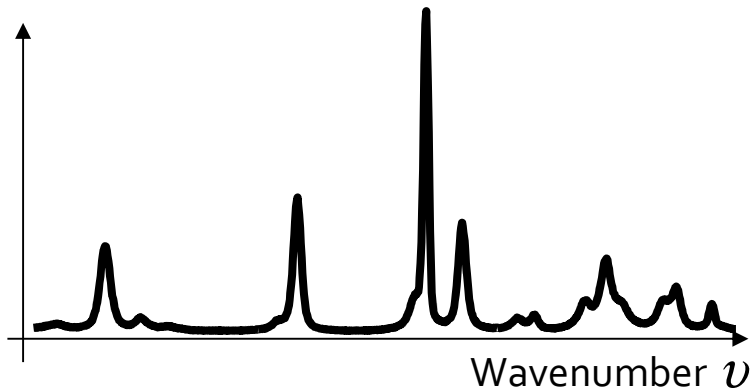
- ✓ very simple  
one peak per component
- ✗ selectivity problem  
challenging or impossible for overlapping peaks

# About Indirect Hard Modeling (IHM)

Data modeling based on physical knowledge

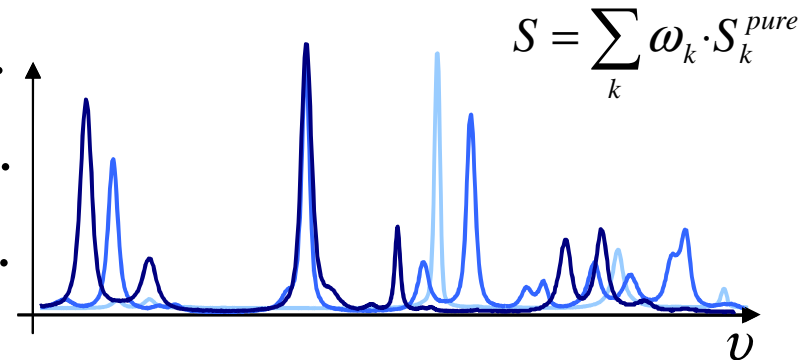
➔ **Hard Model**

Mixture spectrum

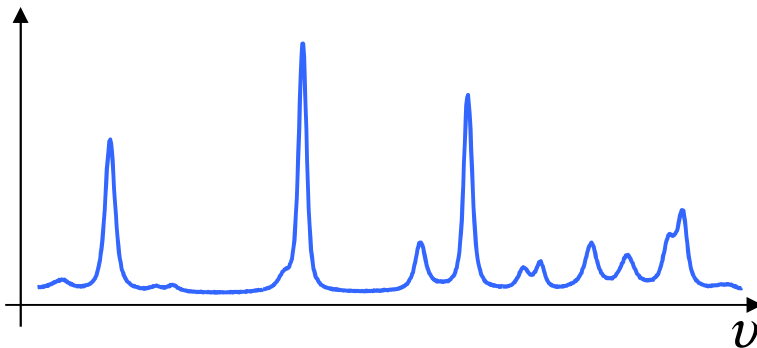


Linear combination of pure spectra

$$\begin{aligned} &= \omega_1 \cdot \\ &+ \omega_2 \cdot \\ &+ \omega_3 \cdot \end{aligned}$$

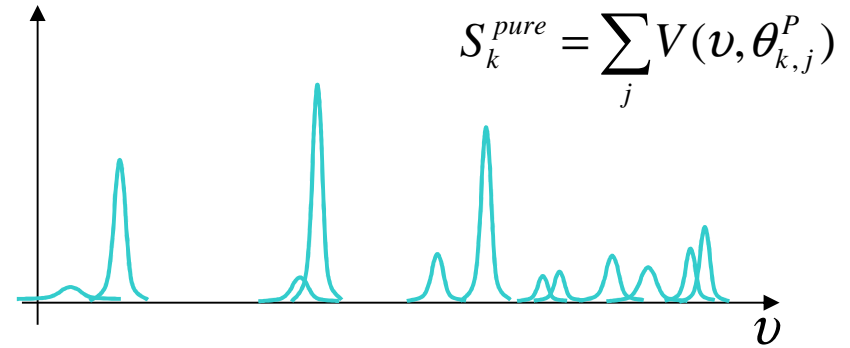


Each pure spectrum



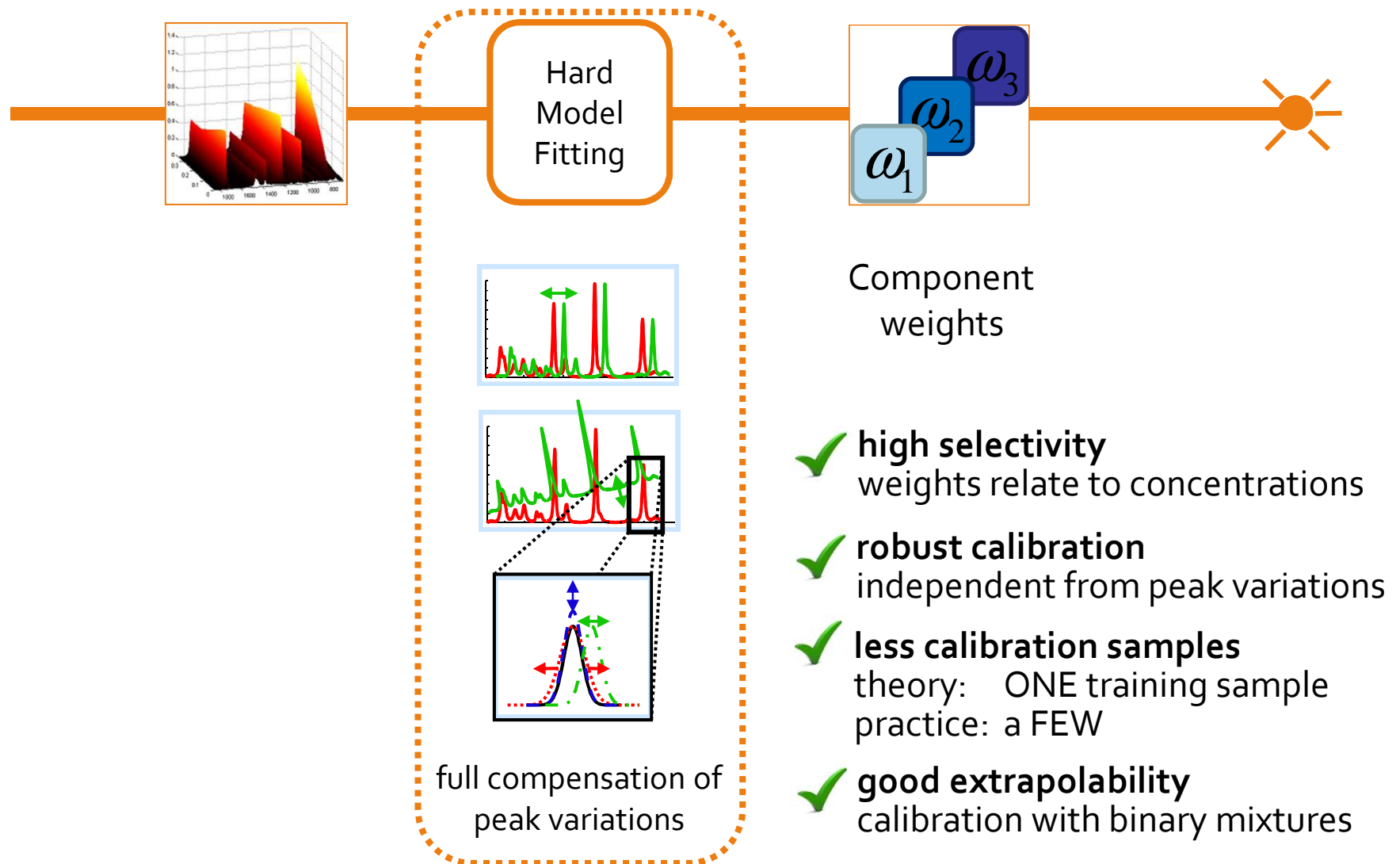
Sum of peaks

=



The hard model is a **mathematical representation** of a spectrum.  
Indirect Hard Modeling = building the mixture hard model from pure component hard models.

# Analysis Method: Indirect Hard Modeling





# IHM operating conditions

---



- IHM was developed for **MIR and Raman**; others may work, too.
- A mixture hard model represents the full spectrum; **all components** must be modelled!
- Component weights correspond to **concentrations**; using other properties for calibration is physically unreasonable!
- Hard models could have lots of parameters; parameter fitting (model fitting) needs time (0.5 - 5 seconds per sample)!
- IHM works well with **5 components or less**; more may work, too.
- Modelling of trace components may be problematic.
- IHM is an **advanced method** for advanced users.