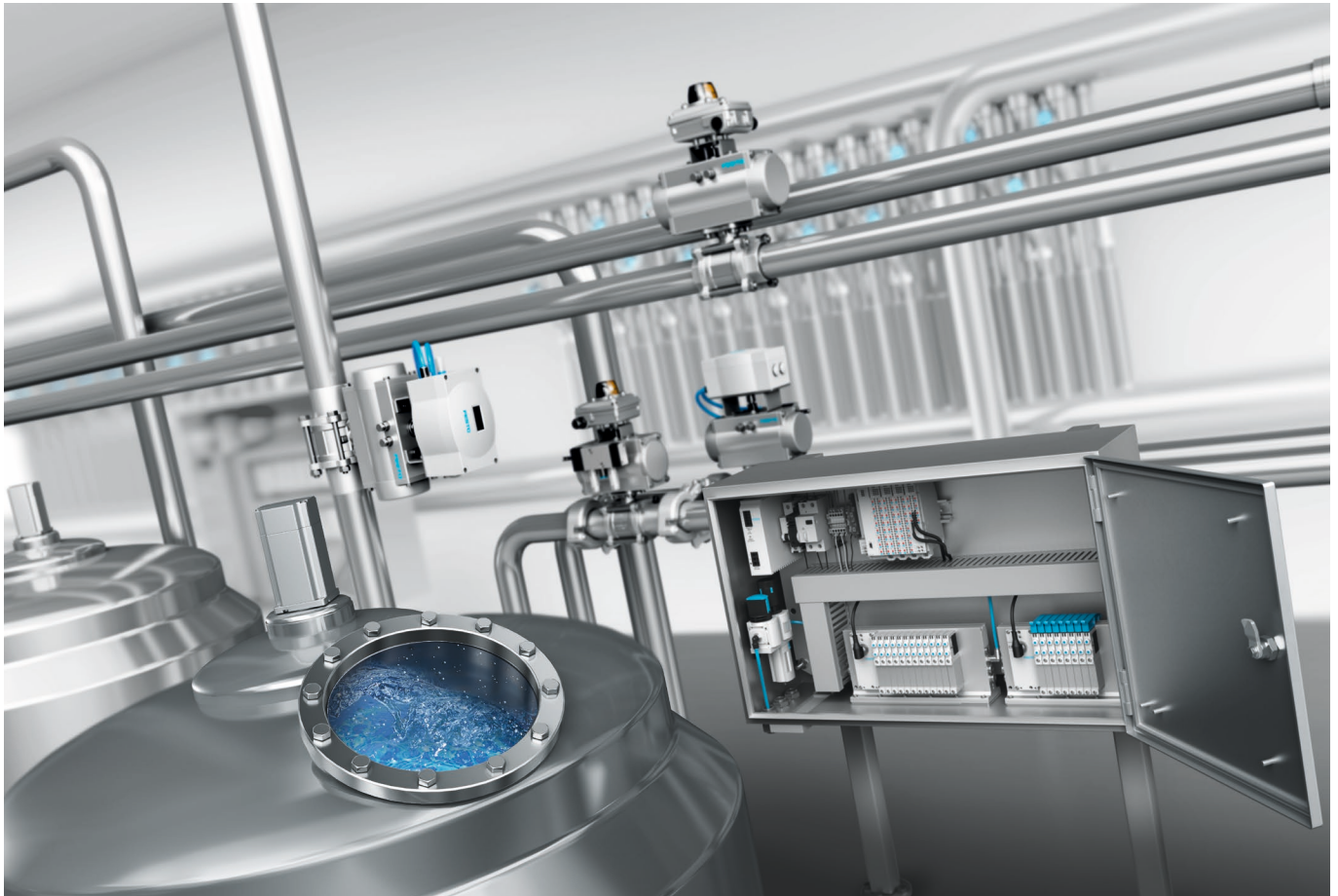


BioMaRe: Biomasserechner

Für eine transparente und effiziente Kultivierung von Mikroorganismen

FESTO



Dieses White Paper behandelt folgende Themen:

- Warum ist das Bestimmen der Biomasse so wichtig aber auch so schwierig?
- Wie kann Biomassezuwachs aus ohnehin vorhandenen Informationen ermittelt werden?
- Biomasseschätzung am Beispiel eines Softsensors von Festo

Executive Summary

In der Biotechnologie ist der Gehalt und der Zuwachs an Biomasse eine wichtige Prozessgröße. Es gibt verschiedene Möglichkeiten dies direkt im Reaktor zu quantifizieren. Derzeit verwendete Methoden haben Vor- und Nachteile hinsichtlich der optimalen Prozesssteuerung und der Kosten. Im Folgenden wird gezeigt, wie durch Softsensorik unter Einbindung von bereits vorhandenen Messsignalen Biomassekonzentration und Wachstum in biotechnologischen Prozessen errechnet werden kann.

Die Prozesse von morgen laufen biochemisch ab

Biochemische Prozesse werden mehr und mehr zur Konkurrenz zur rein chemischen Produktion. Neben Vorteilen, wie der Nutzung nachwachsender Rohstoffe und der Vermeidung umweltschädlicher Nebenprodukte, hat die biochemische Produktion jedoch einen entschiedenen Nachteil, ihre Komplexität und den damit verbundenen höheren Produktionskosten. Viele Reaktionen laufen gleichzeitig ab und beeinflussen einander, zahlreiche Faktoren spielen eine Rolle, nicht alle sind einfach und direkt bestimmbar. Um langfristig auch ökonomisch wettbewerbsfähig zu werden, gilt es die Produktionszeit zu reduzieren sowie die Ausbringung pro Zeiteinheit und absolut zu erhöhen.

Die Automatisierung leistet dazu einen wichtigen Beitrag. Um die Prozesse zu optimieren und fit für die Zukunft zu machen, bedarf es einer ausgeklügelten Sensorik sowie einer fortschrittlichen Prozesssteuerung und -überwachung in Echtzeit.

In biochemischen Prozessen spielen die lebenden Mikroorganismen die zentrale Rolle. Im Reaktor müssen Bedingungen geschaffen werden, die ein optimales Wachstum und die Katalyse des Zielproduktes garantieren. Neben den chemisch-physikalischen Größen wie Temperatur, pH-Wert, Sauerstoff- und Nährstoffkonzentrationen, sind auch Informationen zur vorliegenden Biomasse und der Wachstumsrate wichtige Größen. Sie sind wichtig, um Aussagen über den derzeitigen Prozessverlauf und den Entwicklungsstatus der Kultur zu erhalten. Damit lassen sich die Nähr- und Sauerstoffzugabe und andere Prozessereignisse besser und schneller vorhersagen und der Prozess als Ganzes präziser regeln.

1 — Die direkte Messung der Biomasse

Für das Bestimmen der Biomassekonzentration gibt es mehrere Ansätze. Neben den bewährten Methoden, die auf der Analyse physisch entnommener Proben basieren und den Nachteil eines hohen Zeitverzugs bedingen, geht das Bestreben stark in Richtung der Entwicklung von Echtzeitsensoren. Diese können die Zielinformation ohne manuellen Analyseaufwand unterbrechungsfrei und in Echtzeit zur Verfügung stellen. Dadurch wird es möglich zeitnah auf Prozessereignisse zu reagieren und regelnd einzugreifen.

Optische Methoden beruhen dabei auf Streuung und Absorption der Zellpartikel, die mit steigender Konzentration zunimmt. Der große Nachteil dieser relativ kostengünstigen Sensorik ist jedoch, dass die angestrebten, hohen Biomassekonzentrationen bei Industrieprozessen den sensitiven Messbereich der optischen Sensoren meist übersteigen und das Messsignal somit schnell übersättigt ist. Außerdem erfassen Sie auch abgestorbene Zellpartikel und verfälschen damit das Ergebnis.

Modernere Dielektrizitätsmessungen messen das kapazitive Potential von lebenden Zellen. Durch das erhaltene Signal kann eine Aussage über die Gesamtmenge an lebenden Zellen getroffen werden. Da das kapazitive Potential der Zellen nur sehr klein ist, ist das Signal stör- und rauschanfällig. Außerdem ist die Signalgüte stark abhängig von Einbauport und -lage, was eine Interpretation und die Transferierbarkeit erschweren. Zudem sind direkte Messsonden mit hohen Investitionskosten und einem ebensolchen Wartungs- und Kalibrierungsaufwand verbunden.

2 — Biomasse aus Sekundärmessungen mittels Softsensorik errechnen

Eine Alternative zur direkten Biomassemessung bilden Softsensoren. Diese basieren auf sekundären und meist bereits vorhandenen Messsignalen. Dazu zählen jene Messungen, die von der Biomasse direkt oder indirekt beeinflusst werden. Aus ihnen kann die Information über den wahrscheinlichen Biomassegehalt und dessen Wachstumsverhalten abgeleitet werden. Wie in Tabelle 1 gegenübergestellt, können dadurch mit geringen Anschaffungs- und Wartungskosten gute Ergebnisse erzielt werden.

Messprinzip	Zeitlicher Verzug	Genauigkeit*	Anschaffungskosten	Betriebskosten über Laufzeit	Kalibrierungskosten über Laufzeit
Trocknung	~ 2 Tage	+++	niedrig	hoch	niedrig
Feuchtebestimmungswaage	~ 30 min	++	mittel	hoch	niedrig
OD / Streuung	0	+	mittel	niedrig	hoch
Permittivität	0	++	hoch	niedrig	hoch
Softsensorik	0	++	niedrig	niedrig	mittel

* + > 10 %, ++ < 10 %, +++ < 5 % relativer Fehler

Tabelle 1: Gegenüberstellung verschiedener Biomasse-Messprinzipien

3 — Der Biomasserechner (BioMaRe) von Festo

Komponenten, Software und Digitalisierungslösungen von Festo ermöglichen es neben den genannten direkten Sensoren auch Softsensoren in der Prozessindustrie einzusetzen. Im Folgenden werden das Prinzip und die Einbindung eines Biomasse-Softsensors für biotechnologische Prozesse beschrieben:

a) Das Messprinzip

Der BioMaRe versteht Biomassewachstum als rigorose, chemische Reaktion, wie wir es auch aus der Atmung kennen. Hierbei wird eine Kohlenstoffquelle (z.B. Zucker) unter Sauerstoffverbrauch zu Biomasse und Kohlendioxid umgewandelt, wie schematisch in Bild 1 dargestellt. Bei einer Messung von drei der vier Komponenten kann auf die unbekannte Komponente geschlossen werden, da auch für Bioreaktionen das Prinzip der Massenerhaltung gilt. Werden die Komponenten in ihrer elementaren Zusammensetzung betrachtet, so ist das System überbestimmt (Kohlenstoffbilanz und Bilanz der Reduktionsäquivalente). Ein Datenabgleich und eine kontinuierliche Validierung der Grundannahme können aufgrund dieser Redundanz erfolgen.

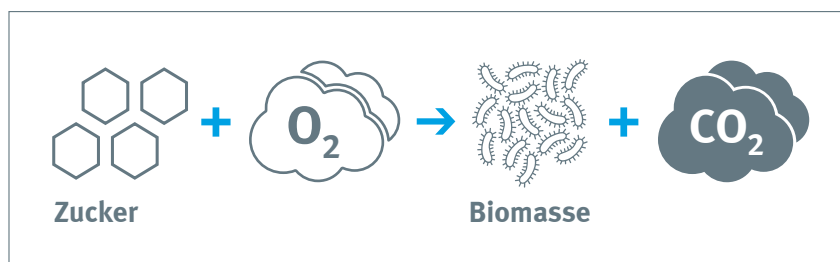


Bild 1: Schematisches Prinzip der indirekten Biomassebestimmung

b) Die Rahmenbedingungen

Zum Betrieb des Biomasserechners werden Information der Zuckerzugabe, sowie des Sauerstoffverbrauchs und der CO₂-Bildung benötigt. Diese Größen werden in biotechnologischen Anlagen in der Regel mittels Massendurchflussmessung sowie der Analyse des Abluftstroms erhoben. Neben diesen zeitabhängigen Messsignalen und der Substratkonzentration im Zulaufstrom wird vor allem die molekulare Zusammensetzung der Biomasse und des Substrates benötigt, um die Elementarbilanzen lösen zu können. Eine Auflistung aller Parameter und deren Herkunft, sowie Standardwerte finden sich in Tabelle 2.

Name	Einheit	Herkunft	Std. Wert	Typ
Nährstoffzulauf	l/h	Durchflussmessung/ Waage	-	zeitabhängig
Gaszulauf	l/h	Durchflussmessung	-	zeitabhängig
Abgasstrom	l/h	Durchflussmessung	-	zeitabhängig
O ₂ im Abgas	%	Abgasanalysator	-	zeitabhängig
CO ₂ im Abgas	%	Abgasanalysator	-	zeitabhängig
Füllvolumen	L	Volumenbilanz	-	zeitabhängig
Substratkonzentration im Zulauf	g/l	Medienrezept	10 - 600	konstant
Sauerstoffgehalt feuchter Reaktorluft	%	O ₂ Gehalt im Abgas bei Betriebsbedingungen ohne Zellen	20,7	konstant (Reaktorabhängig)
O ₂ Gehalt von Luft	%	Luftzusammensetzung	21,0	konstant
CO ₂ Gehalt von Luft	%	Luftzusammensetzung	0,0039	konstant
C-mol Gewicht des Substrats	g/C-mol	Chemische Formel	30 (Glukose)	konstant
C-mol Gewicht der Biomasse	g/C-mol	Bestimmung des C-Anteils	~ 26	konstant
Y _s	-	Reduktionsäquivalent Substrat	4 (Glukose)	konstant
Y _{o₂}	-	Reduktionsäquivalent Sauerstoff	-4	konstant
Y _x	-	Reduktionsäquivalent Biomasse	~ 4,13	konstant

Tabelle 2: Erforderliche zeitabhängige und konstante Eingangsgrößen, die für die Berechnung der Biomasse mittels Softsensor notwendig sind.

Im Zulaufverfahren (Fed-batch), bei dem die Substratlösung kontinuierlich zugefüttert wird, und unter der Annahme, dass kein Restsubstrat (Kohlenstoffquelle) im Reaktor akkumuliert, kann die Biomassebildung aus den vorhandenen Messungen errechnet werden.

c) Die Softsensor-Implementierung

Zur Implementierung eines Biomasse-Softsensors müssen die dazu nötigen Prozessgrößen in Echtzeit abgegriffen werden, um im Algorithmus verarbeitet werden zu können. Idealerweise ist der Softsensor direkt auf der speicherprogrammierbaren Steuerung (SPS) implementiert, die den gesamten Bioreaktor regelt. Das heißt hier werden alle Sensorsignale des Bioprozesses empfangen und verarbeitet, so dass die Feldgeräte optimal angesteuert werden können. Dadurch sind die benötigten Sensorinformationen für den Softsensor direkt zugänglich und die Interaktion mit dem Softsensor kann direkt über den vorhandenen Bedienbildschirm erfolgen. Es ist aber auch möglich den Softsensor auf einer separaten Recheneinheit, wie einem PC oder einer separaten SPS, wie in unserem konkreten Beispiel, zu betreiben. Die Erfassung der Sensorinformationen ist dann gesondert, z.B. über ein OPC UA Netzwerk, einzurichten.

Bild 2 zeigt schematisch die Einbindung des BioMaRe an einem Bioreaktor mit dargestelltem Massen- und Informationsfluss sowie die nötige Echtzeit-Sensorik.

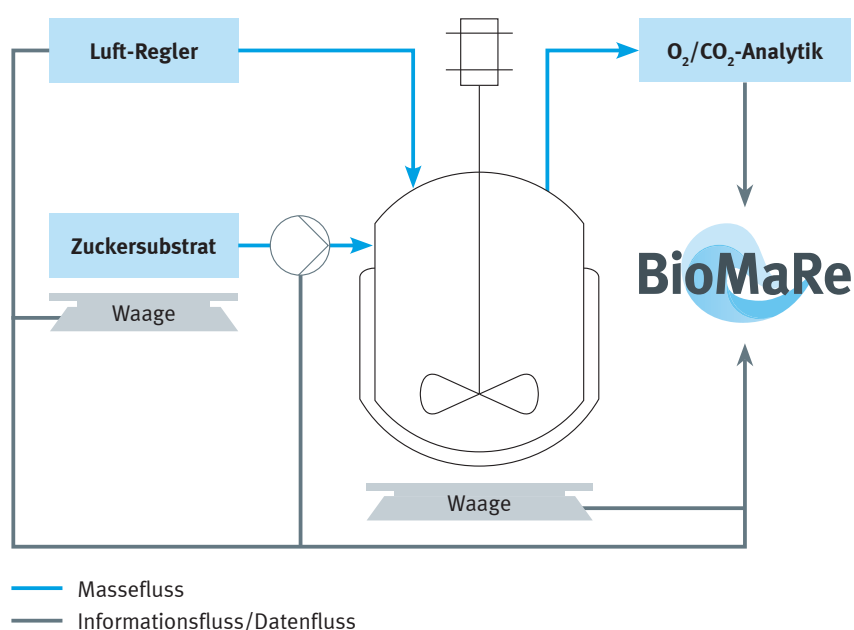


Bild 2: Implementierungsschema eines Biomasse-Softsensors

4 — Anwendung des BioMaRe

Der BioMaRe wurde in einem Fallbeispiel angewendet, um das Wachstum eines industrierelevanten, rekombinanten E. coli während eines Bioprozesses zu schätzen. Der Versuchsaufbau im Labormaßstab ist in Bild 3 zu sehen.

Eine für die Biopharmaindustrie typische Prozessführung wurde hierzu gewählt. Nach einem initialen Batch-Prozess, mit einer geringen Zuckermenge als Vorlage, wurde zu einem Zulaufverfahren (Fed-batch) übergegangen. Nach Erreichen einer ausreichenden Biomassekonzentration wurde die Produktion durch Zugabe einer Induktionslösung gestartet und die Substratzugaberate verringert.



Bild 3: Versuchsaufbau und Testing des BioMaRe im Labormaßstab

Über die gemessenen Massenflüsse (Waage für das Substrat, Durchflussmessung für Gase) sowie die Analyse der Abgaszusammensetzung konnten, wie in Bild 4 zu sehen, die CO_2 Bildungsrate (CER), die Sauerstoffaufnahme (OUR) sowie die Substratzugabe bestimmt werden. Daraus wurde über die Bilanzierung die spezifische Wachstumsrate (μ) errechnet. Das in Echtzeit berechnete Signal (μ BioMaRe) stimmt sehr gut mit dem gemessenen μ überein. Lediglich am Ende des Prozesses wird das Wachstum überschätzt, da Zelltod und Zell-Lyse in den verwendeten Berechnungsalgorithmen nicht berücksichtigt werden.

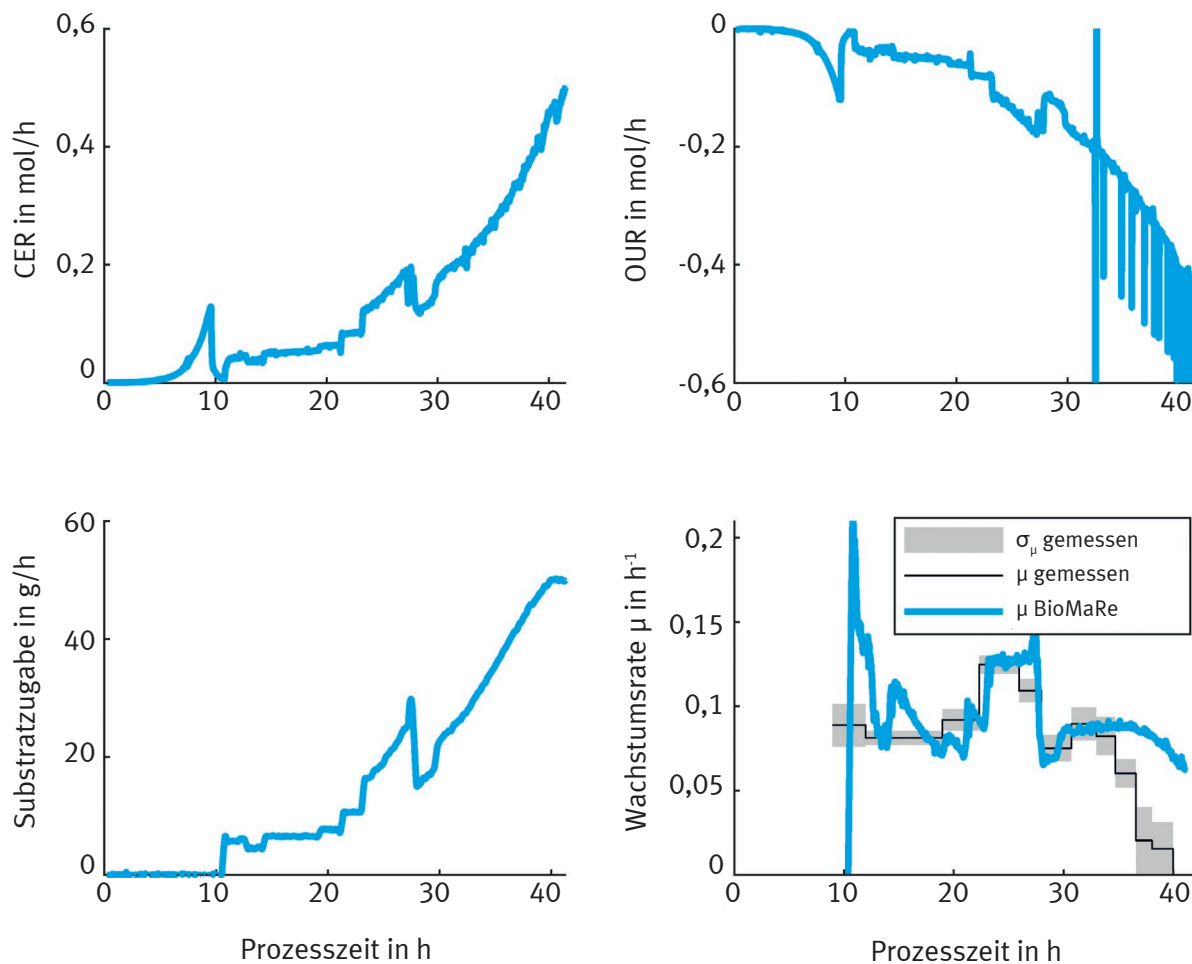


Bild 4: Gemessene CO_2 Bildungsrate (CER), Sauerstoffaufnahme (OUR), sowie Substratzugabe und daraus resultierende spezifische Wachstumsrate (μ BioMaRe). Mittels Referenzmessung (Trocknung von Offline-Proben) wurde der spezifische Biomasse-Zuwachs als Vergleich (μ gemessen) dargestellt, sowie dessen Unsicherheit basierend auf einer Dreifachmessung (σ_μ gemessen).

Der Biomasserechner liefert nützliche Informationen über die derzeitige Biomassekonzentration und das spezifische Wachstum. Dies ohne manuellen Analyseaufwand und Zeitverzug. Dadurch können zeitnah Entscheidungen zur Prozessregelung getroffen werden, die eine stabilere, optimierte und kürzere Prozessführung erlauben. So konnte beispielsweise die Biomassekonzentration ganz einfach über das Anzeigemenü, wie in Bild 5 dargestellt, abgelesen werden und die Produktionsphase nach Erreichen der Zielbiomassekonzentration (30 g/L) ohne Zeitverzug gestartet werden.

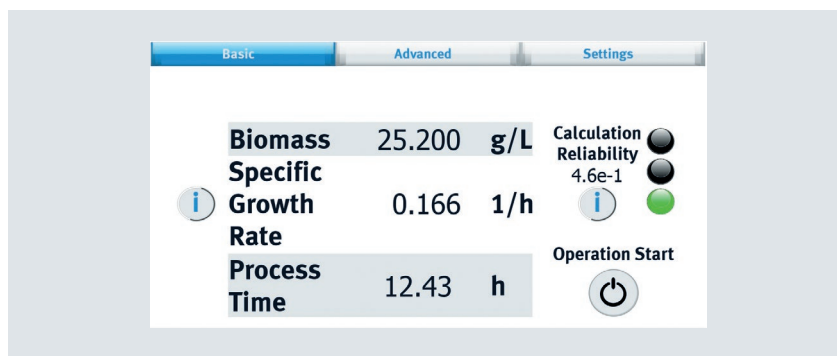


Bild 5: Benutzeroberfläche und einfaches Anzeigemenü des BioMaRe. Information über Biomassekonzentration, spezifische Wachstumsrate sowie der Berechnungszuverlässigkeit (Calculation Reliability) als Ampelsystem ablesbar.

Im Bild 6 ist der Verlauf der Biomassekonzentration zu sehen. Im Vergleich zu der Referenzmessung (Trocknung von Offline-Proben) zeigt der Softsensor in der Wachstumsphase und im ersten Teil der Produktionsphase eine sehr hohe Übereinstimmung (1,3 % relativ, mittlerer quadratischer Fehler). In den letzten Stunden der Produktionsphase erhöht sich zunehmend die Diskrepanz zwischen dem errechneten Biomasse-Signal und der Messung. Dies lässt sich auf ein Verhalten zurückführen, das im Algorithmus des BioMaRe derzeit noch nicht abgebildet wird: Durch den erhöhten Zell-Stress während der Produktbildung kommt es vermehrt zur Auflösung von Zellen und damit zur Abnahme lebender Biomasse.

Die daneben dargestellte Messung mittels Permittivität kann zwar gut den Zelltod beschreiben, zeigt jedoch während der ersten Prozessphasen starke Schwankungen, womit der Gesamtfehler bei vergleichbaren 6 % liegt.

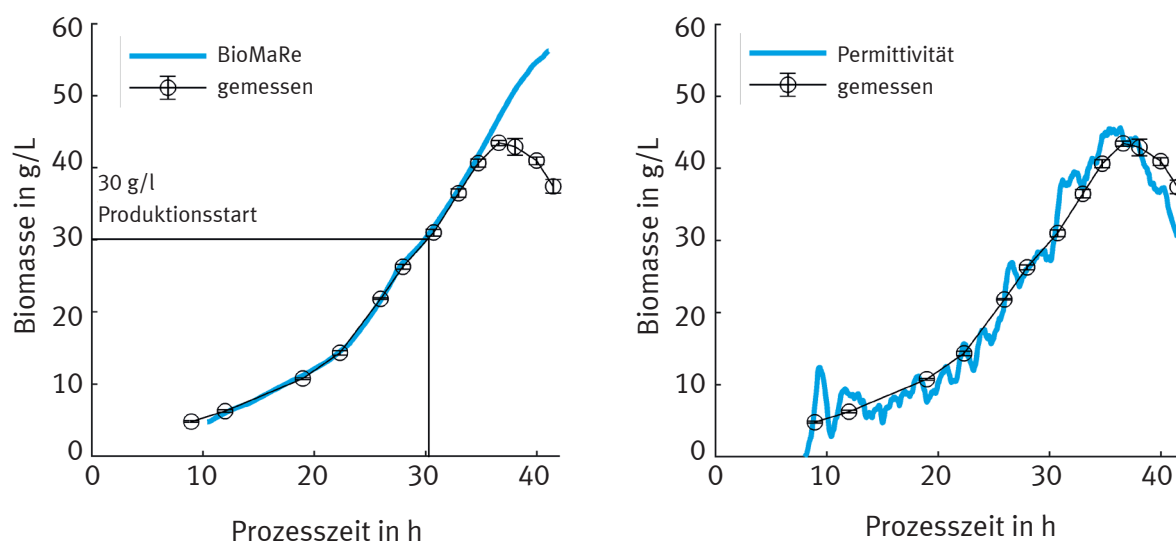


Bild 6: Berechnete Biomasse (BioMaRe) links und Permittivität rechts im Vergleich zur gemessenen Biomasse durch Trocknung von Offline-Proben. Bis zum Zeitpunkt mit significantem Zelltod gibt es mit dem BioMaRe eine mittlere Abweichung von nur 1,3 % und auf den Gesamtprozess gesehen liegt die Abweichung bei 5,6 %. Die Messung über die Permittivität kann den Zelltod besser erfassen, das Signal ist aber nicht so stabil und liegt insgesamt bei vergleichbaren 6 % Abweichung.

Fazit

Die Einbindung von Softsensorik ermöglicht es durch Nutzung von bereits vorhanden Messsignalen auf wichtige, aber schwierig messbare Zustände im Prozess zu schließen. In der Biotechnologie können unter bestimmten Voraussetzungen mittels Softsensor die Biomassekonzentration sowie die Wachstumsgeschwindigkeit bestimmt werden. Im Vergleich zu anderen Messprinzipien, müssen keine Messsonden direkt in den Bioreaktor eingebaut werden, was das Kontaminationsrisiko und die Investitionskosten senkt. Der wartungsarme Betrieb und die Nutzung allgemein gültiger Elementarbilanzen ergeben eine robuste und transferierbare Messung, die eine mit modernen Online-Messgeräten vergleichbare Genauigkeit erreicht. Eine vollständige Automatisierung der Prozessabläufe ohne manuelle Probenahme führt zu robusteren und verkürzten Prozessen sowie einer Steigerung der spezifischen Produktionsleistung. Dadurch werden die Anlagenauslastung gesteigert und die Produktionskosten gesenkt.

Diese Forschungsarbeit entstand in Zusammenarbeit mit der TU Wien und der Innovationsallianz Funktionsoptimierte Biotenside, gefördert vom Bundesministerium für Bildung und Forschung. Bei Fragen oder weiterem Interesse, wenden Sie sich gerne direkt an unseren nebenstehenden Ansprechpartner Dr. Daniel Wibbing.

Herausgeber/Autor:

Festo SE & Co. KG
Dr. Daniel Wibbing
E-Mail: daniel.wibbing@festo.com

Weitere Information zu Automatisierungslösungen
für Biotech- und Pharmaindustrie finden Sie im Web:
→ www.festo.com/biotech