

# **NIR-Spectroscopy for Bioprocess Monitoring & Control**

*M. Sandor<sup>1</sup>; F. Rüdinger<sup>1</sup>; D. Solle<sup>1</sup>; R. Bienert<sup>2</sup>; C. Grimm<sup>2</sup>; T. Scheper<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover,  
Callinstraße 5, D-30167 Hannover*

*<sup>2</sup>Sartorius Stedim Biotech GmbH, August-Spindler-Straße 11, D-37079  
Göttingen*

## **Introduction**

The QbD/PAT approach is now on the cusp to a stronger influence on biopharmaceutical applications. However, some critical process parameters (CPP) like glucose concentration, cell count or viability a robust online prediction is in many applications not yet possible. With the help of NIR spectroscopy this gap can be closed. Beside quantitative predictions, multivariate statistical process control (MSPC) provides an online good-bad estimation of the current batch. Recent improvements allow the adaptation of state of the art free beam NIR spectrometer to standard Ingold port of any fermenter.

## **Material & Methods**

CHO-K01 cells were cultivated in a Biostat C plus bioreactor (Sartorius) with 7.5 L working volume. In total eight batch cultivations runs were performed with an average duration of 5 days. Sampling was performed each 3 to 6 hours and reference analytics of the critical process parameters like glucose, total cell count, viability and others were measured in the laboratory. NIR spectra were measured online throughout the whole cultivation time (SX-Suite, Sartorius) with a BioPAT Spectro® free beam NIR process analyzer (Sartorius) in the range of 1050 to 1650 nm. The NIR spectrometer was adapted via a 25 mm standard Ingold port standing CIP/SIP cycles. Multivariate data analysis of NIR spectra was performed for CPP prediction with SX-Plus (Sartorius). MSPC data evaluation was carried out with SIMCA13 (Umetrics).

## **Results**

For quantitative analysis PLS algorithm was used in order to predict CPP concentrations trained by laboratory reference measurements. All PLS calibrations are tested with a validation set consisting of complete batches which have not been used for calibration. Excellent models could be obtained for total cell count with a standard error of prediction (SEP) of 0.48 in a range of 0 - 17  $10^6$  cells/mL. Viability can be predicted with a SEP of 4.2 in a range of 28 - 100 %. Also glucose can be predicted in a range of 0-8 g/L with a SEP of 0.49. Correlations to other analytes have been reduced by glucose spiking and feeding strategies within both calibration and validation batches. Predictions for other analytes like glutamine or ammonia are also possible but are highly related to correlations with strong signal analytes like cell count. Models based on correlations are not recommended for process control since the models show a lack of robustness and sensitivity to those analytes. Beside single analytes promising predictions for sum-signals like over all metabolite concentrations could be obtained. This provides useful information about the metabolic stage of a process which leads to a more accurate estimation of stage transitions.

Multivariate statistical process control models were generated using Simca13. Solely based on the spectral data batch trajectories were generated using a subset of batches. This yields a golden batch trajectory (optimal performance of the process) as well as process borders calculated from the standard deviation from each individual time point. For model validation unseen batches were compared to the model. Statistically relevant deviations from the optimal behavior will be recognized when a validation batch crosses the process borders. We obtained a few batches leaving the process borders. After cause analysis we found several explanations like contamination, early glucose limitation or deviations in the aeration strategy. Major trends in cell growth, metabolite accumulation or viability could be directly extracted from the trajectories without the need of offline sampling.

## **Summary**

Robust free beam NIR process analyzers are indispensable tools within the PAT/QbD framework for real time process control. They enable multiparametric, non-invasive measurements of substrates, products and process trajectories in real-time. Moreover, sophisticated data analysis both quantitative and MSPC yields directly to a far better process understanding. Easy to interpret online data allows the operator to make fast and reasonable decisions while the batch is running which finally leads to stable processes and a better performance.

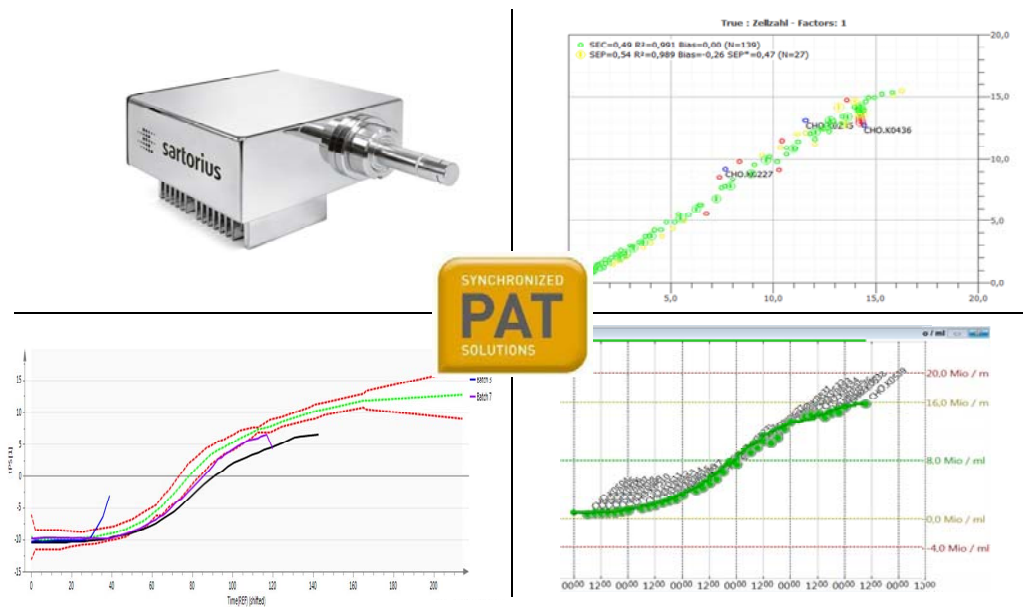


Figure 1: Free Beam NIR spectrometer for ingold port adaption. NIR prediction plot for total cell count. Online prediction of total cell count for current batch. Multivariate statistical process control (MSPC) via batch trajectories.

# Innovatives MIR-Transmissionsspektroskopie Verfahren für die Überwachung und Charakterisierung von Bioprozessen

J. Hofmann<sup>1,2</sup>, R. Masuch<sup>2</sup>, A. Wolf<sup>2</sup>, R. Biener<sup>1</sup>

<sup>1</sup>University of Applied Sciences Esslingen, Esslingen/Germany

<sup>2</sup>micro-biolytics GmbH, Esslingen/Germany

In der Bioprozesstechnik besteht der zunehmende Bedarf an geeigneten Messverfahren, die zeitnah und präzise Informationen über verschiedene prozessrelevante Größen liefern. Die AquaSpec<sup>TM</sup> Messtechnik ist eine neue, automatisierte Schnittstellentechnologie auf Basis von Mittelinfrarot Transmissionsspektroskopie (spektraler Bereich 4000 cm<sup>-1</sup> bis 400 cm<sup>-1</sup>) und multivariaten Analysenmethoden. Gegenüber bisherigen IR-spektroskopischen Ansätzen (NIR, ATR) zeichnet sich die AquaSpec Messtechnik durch eine Nachweisgrenze im unteren mg/L-Bereich aus.

Die Messtechnik bietet durch die direkte und schnelle Erfassung von Substanzen - bis in den ppm Bereich - ein großes Potential im Up- und Downstreamprocessing. Da nahezu alle Komponenten eines Nährmediums infrarot aktiv sind, besitzen die Spektren einen sehr hohen Informationsgehalt. Dies ermöglicht nicht nur die Quantifizierung von einzelnen Substanzen sondern auch das Erfassen von latenten, qualitätsrelevanten Prozessgrößen. Diese Punkte sind eine wesentliche Voraussetzung für moderne Quality-by-Design Ansätze, die ein tieferes Verständnis des gesamten Prozesses erfordern.

In dieser Arbeit sollen die mittels AquaSpec Messtechnik und dem Einsatz unterschiedlicher chemometrischer Auswerteverfahren erzielten Ergebnisse in Fermentationsprozessen vorgestellt werden. Für die quantitative Analyse von Prozessparametern (unter anderem: Glukose, Acetat, Ammonium, Phosphat) wurden sowohl PLS-R Modelle als auch eigens entwickelte kalibrationsfreie Vorhersagealgorithmen verwendet. Zur Überprüfung der Methode werden die Analyseergebnisse mit Referenzmessungen verglichen. Für qualitative Analysen sowie zur Überwachung des Design Spaces wurde eine Hauptkomponenten Analyse (PCA) verwendet. Hiermit ließ sich unter anderem aufzeigen, dass Prozessänderungen abseits der quantifizierten Messgrößen erfasst werden können.

Für die hier vorgestellten Ergebnisse wurde *E.coli* als Modellorganismus verwendet. Je nach Versuchsaufbau wurden die Kultivierungen im einem 30 L bzw. 1,5 L Bioreaktor durchgeführt. Die erreichten Biotrockenmassen reichten hierbei bis zu 120 g/L. Die Online-Probennahme während den Kultivierungen erfolgte über eine insitu Filtrationssonde. Die so gewonnenen Proben wurden sowohl für die AquaSpec Messungen als auch für die Referenzanalytik verwendet.

# **Spektroskopische Sensoren zur Beobachtung von Tierzellkultivierungen**

*Dörte Solle<sup>1</sup>, Roland Biener<sup>2</sup>, Christian Grimm<sup>2</sup>, Thomas Scheper<sup>1</sup>,*

*<sup>1</sup>Leibniz Universität Hannover, Hannover;*

*<sup>2</sup>Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen*

Industrielle Bioprozesse müssen für die verlässliche Produktion von Produkten hoher Wertschöpfung umfassend beobachtet werden. Hierfür können nicht-invasive spektroskopische Methoden, wie die UV/VIS-, Infrarot-, Raman- oder Fluoreszenzspektroskopie und die Insitu-Mikroskopie eingesetzt werden.

Der Einsatz chemometrischer Methoden und Bildverarbeitungsalgorithmen zur Auswertung dieser Daten ist aufgrund der Messung im wässrigen Medium und zur Differenzierung der einzelnen Analyten unerlässlich. Aus den spektroskopischen Daten können so qualitative und quantitative Informationen über den Verlauf der Kultivierung und den aktuellen Prozesszustand gewonnen werden. Von besonderem Interesse bei der Kultivierung von Tierzellen sind Substrat-, Metabolit- und Produktkonzentrationen, aber auch die Menge und Vitalität der Zellen.

Die Grenzen und Möglichkeiten der verschiedenen spektroskopischen Messmethoden werden am Beispiel von CHO-Zell-Kultivierungen vorgestellt und die Anforderungen an ein spektroskopisches Prozessbeobachtungssystem identifiziert, welches zum Aufbau einer Regelung genutzt werden kann.

# **NIR und PLS – Diskriminanzanalyse zur Vorhersage des Prozessverhaltens bei Rohstoffvarianzen**

*D. Krause, C. Holz, M. Gastl, M. A. Hussein, T. Becker*  
TU München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan

Daniel Krause

TU München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan, Arbeitsgruppe für (Bio-) Prozesstechnik und Prozessanalyse

Weihenstephaner Steig 20, 85354 Freising

Telefon: +49 8161 71 2627, Telefax: +49 8161 71 3883, [d.krause@wzw.tum.de](mailto:d.krause@wzw.tum.de)

Rohstoffvarianzen spielen bei einer Vielzahl an biotechnologischen Prozessen eine entscheidende Rolle bezüglich der finalen Quali- und Quantität der Produkte sowie der Produktion. Häufig wird selbst über eine Vielzahl an Einzel- Laboranalysen keine ausreichend hohe Vorhersagegenauigkeit bezüglich der Verarbeitbarkeit einzelner Rohstoffe erreicht. Die Läuterung stellt einen kritischen zeitlichen Prozess bei der Herstellung von Bierwürze dar, dessen Fortschritt unter anderem von der Qualität des Rohstoffes Malz abhängt. Am Beispiel dieses Filtrationsschritts im Sudhaus von Brauereien, bei welcher die unlöslichen Bestandteile der Maische von der Bierwürze getrennt werden, soll ein neuer Ansatz über Nah-Infrarot (NIR)-Spektren als Fingerprint von Malzkörner in Kombination mit multivariater Statistik in der Direktvorhersage der Läuterbarkeit vorgestellt werden, um diesen Herausforderungen gerecht zu werden.

Die vorgestellte Klassifikation basiert auf den Wellenlängen der Spektren verschiedener Malzchargen, welche als die Variablen der Datenmatrix X, die über Partial Least Squares – Diskriminanzanalyse (PLS-DA) unter Verwendung einer Klassenmatrix Y analysiert werden. Herausforderungen bei der Verwendung solcher Verfahren sind auf der einen Seite die Vorverarbeitungsschritte von Daten (Variablenauswahl aufgrund der Wichtigkeit und dem Signalrauschen sowie Basislinienkorrekturen und Lichtstreuungseinflüssen) und auf der anderen Seite die Vordefinition der Klasseneinteilung und der Auswahl der geeigneten Analysemethoden.

Die vorgestellte Arbeit beschreibt zum einen die verschiedenen Möglichkeiten der Datenvorverarbeitung und die Auswahl der geeigneten Methoden inklusive der Modellerstellung mittels PLS-DA. Zum anderen wird eine automatische Methode zur Klassifizierung der Qualität industrieller Prozesse basierend auf multivariater statistischer Prozesskontrolle (MSPC) im Vergleich zur Bewertung der Läufe über Experten präsentiert.

Die erzielten Ergebnisse basieren auf insgesamt 54 Brauprozessen im Pilotmaßstab und 92 Brauprozessen im Industriemaßstab. Bei der Diskriminanzanalyse wurde eine Vorhersagegenauigkeit von 90.6% in drei Klassen (gut, mittel und schlecht läuterbar) im Pilot- und von 76.6% im Industriemaßstab erreicht. Dabei wurden die Spektren mittels „Multivariate Scatter Correction“ (MSC), der ersten Ableitung über Savitzky-Golay-Filter und „Variable Scaling“ (VAST) nacheinander vorverarbeitet. Bei dem Vergleich der Bewertung der Prozessverläufe zwischen Expertenmeinung und MSPC konnte eine 85%ige Übereinstimmung erzielt werden. Diese ersten Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine Fingerprint-Analyse von Rohstoffen über NIR die Möglichkeit der Qualitätsvorhersage erfüllen kann.

# Data Mining zur Optimierung spektroskopischer Analyseverfahren

O. Paquet-Durand, A. Hitzemann, C. Ranzan, B. Grote, B. Hitzmann

Fachgebiet für Prozessanalytik und Getreidetechnologie, Institut für Lebensmittelwissenschaften und Biotechnologie, Universität Hohenheim, Garbenstr. 23, 70599 Stuttgart

## Abstract:

*Chemometrische bzw. datengetriebene Modelle zur Bestimmung wichtiger Prozessgrößen mittels spektroskopischer Methoden haben bei all ihren Vorteilen zwei große Nachteile. Zum einen müssen sie mit aufwendigen Offlinemessungen „kalibriert“ werden und zum anderen fallen mitunter große Datenmengen an. Insbesondere bei 2D-Fluoreszenzspektroskopie mit hoher Auflösung ist eine Echtzeitfähigkeit manchmal nicht gegeben, weil allein die Aufnahme eines gesamten Spektrums viel Zeit beansprucht. Im Rahmen des Vortrags werden für diese beiden Problemfälle Lösungsverfahren vorgestellt.*

*Wenn mit einem Datensatz ein chemometrisches Modell erstellt werden kann, ist die Information über die gesuchten Offlineprozessvariablen schon in den spektroskopischen Daten vorhanden, sie muss jedoch „extrahiert“ werden. Die normalerweise aufwendigen Offlinemessungen können durch Simulationen des Prozesses ersetzt werden. Dabei können sowohl die unbekannt kinetischen Parameter der Simulation als auch das chemometrische Modell selbst durch einen geeigneten Optimierungsalgorithmus berechnet werden. Ist Prozesswissen in Form eines dynamischen Modells verfügbar, kann somit ein chemometrisches Modell ohne eine einzige Offlinemessung erstellt werden. Dieses Verfahren wird am Beispiel einer Hefekultivierung diskutiert.*

*Chemometrische Modelle aus spektroskopischen Daten zeichnen sich häufig dadurch aus, dass nur ein Bruchteil der Daten zur Vorhersage von Prozessparametern erforderlich ist. Der große Rest ist im Wesentlichen irrelevant, wird aber zumeist mit gemessen. Um die Datenmenge und vor allem den Messaufwand bei spektroskopischen Messungen zu reduzieren, ist es erforderlich, den relevanten Teil der spektroskopischen Daten zu identifizieren. Im Vortrag wird ein modifizierter Ameisenkolonialgorithmus vorgestellt, welcher eine optimale Reduktion der spektroskopischen Kanäle ermöglicht und dabei die Qualität der resultierenden Modelle häufig nicht verschlechtert und in einigen Fällen sogar verbessert. Dies Verfahren wird am Beispiel einer Sauerteigfermentation erläutert.*