

Co-Application Story

ORM Messmethode

Sequip S + E GmbH

&

USEPAT

accurate measuring solutions

SIEMENS

Ingenuity for life

Inhalt

Co-Application Story.....	1
Überblick.....	2
Umsetzung der Anforderungen und die Sequip ORM Messmethode	2
Das Messprinzip	3
Inline Monitoring von Fermentationsprozessen.....	3
Fokussieren auf die Zellen.....	5
Ausblick.....	7

Überblick

Der Show-case demonstriert die Fähigkeit der **Sequip** 2D ORM PSD Partikelsonde fermentierende Hefezellen zu analysieren. In der anspruchsvollen Versuchsumgebung eines Bioreaktors mit stark begaster Fermentation unterstützt der Ultraschall des PAT add-ons „soniccatch by usePAT“ die Sonde in der Messung, da der störende Einfluss von Luftbläschen und die bedingt optimalen Einbaumodalität der Sonde das gewünschte Hefezellen-Signal verdecken.

Die von SIMATIC PCS 7 und SIMATIC SIPAT eingerichtete Online-Prozessüberwachung und -Steuerung bietet die Möglichkeit, die verbesserten Messwerte zu erfassen, zu speichern, zu modellieren und daraus direkte Maßnahmen für den laufenden Prozess abzuleiten und durchzuführen. Dies ermöglicht die direkte Überwachung der aktiven Fermentationskultur und deren Steuerung ohne den Umweg über die Messung mehrerer kritischer Prozessparameter in deren Umgebung. Die direkte Messung der Produktkonzentration ermöglicht eine effizientere Gesamtprozessleistung oder neue Erkenntnisse über den Prozess.

Umsetzung der Anforderungen und die **Sequip** ORM Messmethode

Das Analysesystem basiert auf einer **optischen Rückreflektionsmessung** (ORM).

Die **Hauptmerkmale** dieses ORM-Messprinzip sind:

1. **Inline In-Situ** mit einem Fokus vor dem Fenster im zu messenden Prozessmedium,
2. **Echtzeitmessung** direkt im Prozess – 24/7,
3. **Autofocus** bei den Sensoren,
4. **Sensoren** mit **unterschiedlicher** Fokustiefe,
5. Eine **hochstabilisierte** Laser-basierende Lichtquelle,
6. Eindeutige, hochauflösende Signalauswertung,
7. **Single-mode** Lichtwellenleiter zum Transport der Lichtsignale,
8. **Eindeutige** Erfassung und Größenbestimmung der **Einzelpartikel**, die den Fokus passieren

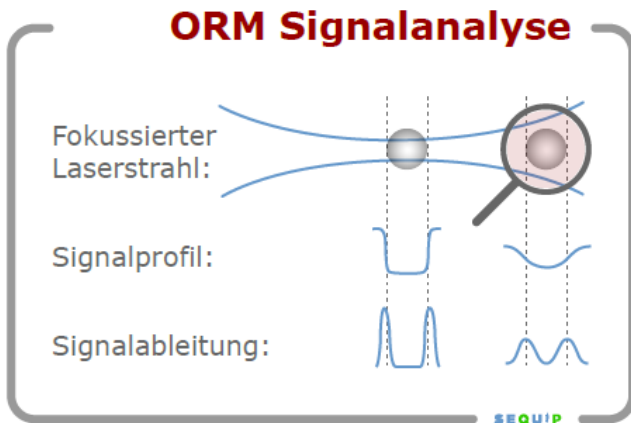
Bei der **Sequip** ORM Technologie werden die **Messergebnisse** ausschließlich aus den Daten der **einzelnen** Partikel gewonnen.

Jedes Partikel, das vor dem Fenster im Original-Prozessmedium die **Fokuszone** passiert, wird gezählt und der entsprechenden Fraktionsbreite zugeordnet.

Durch diese Fokuszone und die single-mode Technik lässt sich das sogenannte „Multiscattering“ signaltechnisch **eliminieren**.

Damit wird eine Darstellung der realen Verteilung der exakt fokussierten Partikelgrößen **ohne Zuhilfenahme** einer manipulierbaren Normverteilung gewonnen.

Die ORM Software **dokumentiert** die gewonnenen Daten. Dadurch wird eine **permanente** Darstellung des Prozessverlaufs möglich. Auf diese gewonnenen Daten kann auch zu einem späteren Zeitraum wieder zugegriffen werden.



Grafik 1: siehe Lupe (Partikel außerhalb der Fokuszzone)

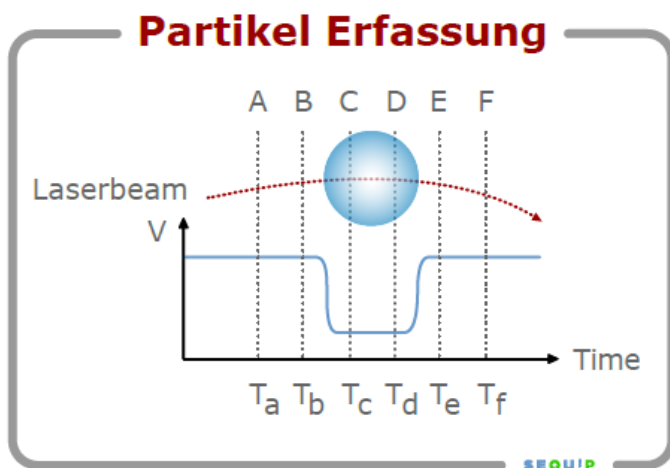
Das abgeleitete Signal dieser sich außerhalb der Fokuszzone befindlichen Partikel hat einen zu weichen und flachen Verlauf.

Derartige am Rande des Fokus eingekoppelte Partikel werden aufgrund ihres Signalbildes von der Auswerteelektronik als off-center Signal verworfen.

Mit der **Sequip** ORM Messmethode können alle Partikeldurchmesser gemessen werden, die einen **Unterschied** des Brechungsindizes zwischen dem zu messendem Objekt und der Trägerphase ausweisen.

Dies gilt für Messungen in flüssigen, trockenen, gasförmigen Medien sowie in Aerosolphasen.

Das Messprinzip



Grafik 2: Die in-situ **Sequip** ORM Systeme arbeiten auf der Grundlage der patentierten Technologie u. a. mit der **ToF** (Time of Fly) Methode.

Aus der Zeitspanne, die zum Überstreichen der **fokussierten** Partikel benötigt wird, ermittelt die Messsoftware deren Größe.

Die Summe der Messsignale ermöglicht eine statistisch **robuste** und reale Darstellung der Größenverteilung.

Die Form des selektiven Fokusraumes im **unverdünnten** Medium **direkt** im Prozess unter Zuhilfenahme des Rückreflexions-signals stellt das **besondere** Kennzeichen der **Sequip** ORM Technologie dar.

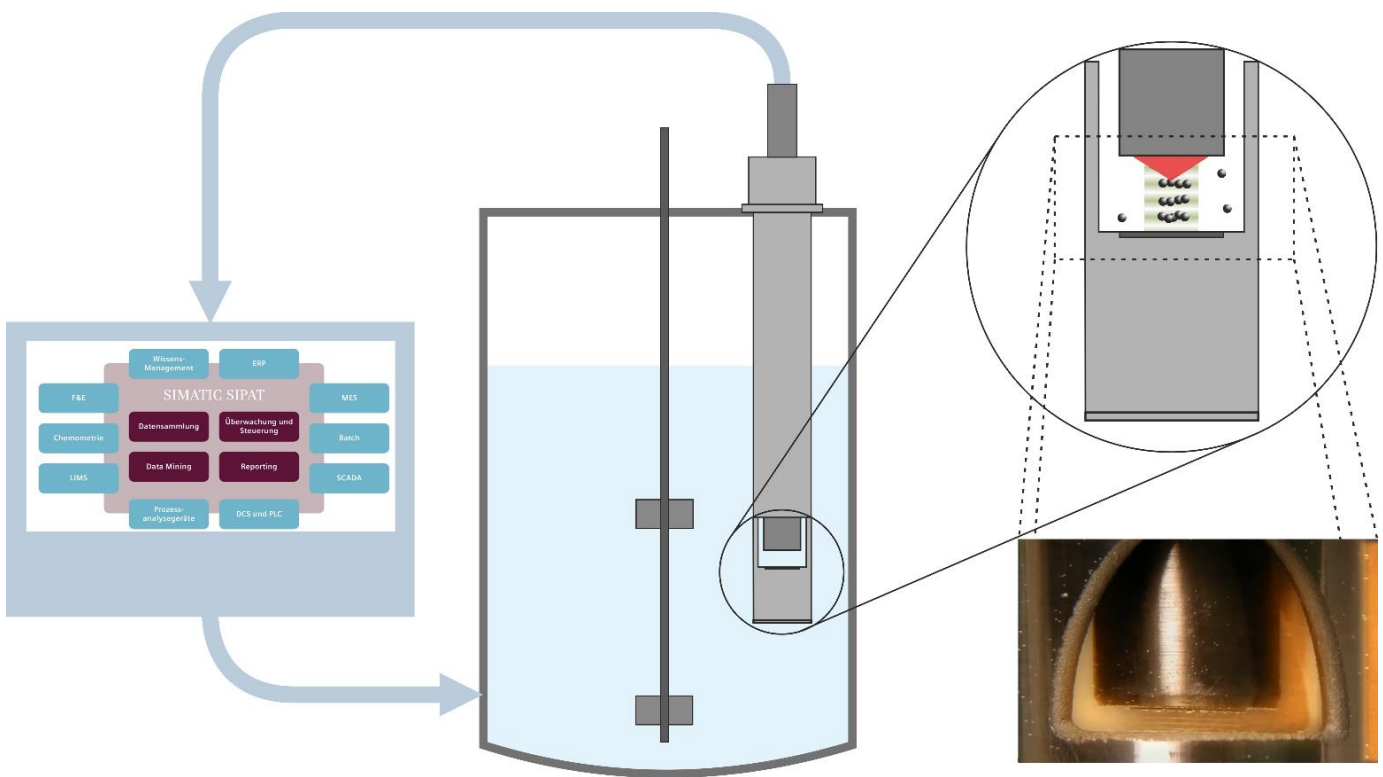
Inline Monitoring von Fermentationsprozessen

Der Use-case zusammen mit usePAT und Siemens zielte darauf ab, einzigartige und qualifizierte Daten aus dem Prozess heraus zu generieren, die selektive Informationen über das Medium, die Mikroorganismen und deren Produkte liefern.

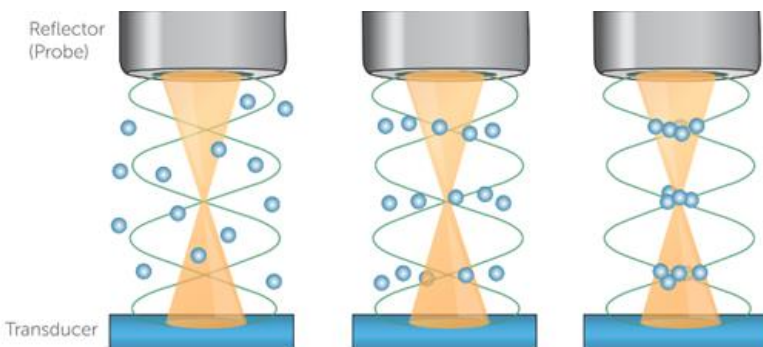
Mit Hilfe von Ultraschallfeldern werden Zellen direkt im Fokus einer PAT-Sonde eingefangen (**soniccatch**), wodurch es zu einer In-situ-Probenvorbereitung kommt und die empfindliche Messung der Mikroorganismen ermöglichen wird, ohne diese zu schädigen. usePAT nutzt seine Ultraschalltechnologie in den Produkten "**soniccatch**" und "**sonicwipe**", um einerseits exakte Messungen in industriellen Flüssigkeiten durch Verbesserung der Signalintensität zu liefern und sie andererseits kontinuierlich sauber zu halten.

Das Siemens LivingLab bietet die notwendige reale Umsetzung eines biotechnologischen Prozesses für diese Arbeit. Dort wird der Fermentationsprozess online und in Echtzeit mit Hilfe einer Reihe von Sensoren und Analytoren überwacht und gesteuert, die direkt mit einem Steuerungssystem (SIMATIC PCS 7) und einem Process Analytical Technology (PAT) Tool (SIMATIC SIPAT) verbunden sind. Alle Daten, univariate Daten und multivariate spektroskopische Daten werden gesammelt, kontextualisiert und bilden die Basis, um Advanced Process Control mit einem geeigneten Leitsystem, wie der im LivingLab verwendeten SIMATIC PCS 7, durchzuführen.

Speziell wurde eine Fermentation mit Hefe S-33 aerob im Reaktor unter 20facher Begasung aufgesetzt. Integriert in die Ultraschallfalle **soniccatch** by usePAT zur "Sortierung" der partikulären Anteile, wurde eine **Sequip** 2D ORM PSD Messung durch den Reaktordeckel in den Prozess eingeführt.



Grafik 3: Set-up des Use-cases im LivingLab. Die in-situ **Sequip ORM** Partikelsonde wurde zusammen mit der Ultraschallfalle **soniccatch** by usePAT im Reaktor eingebaut. Übergeordnet verwaltet SIPAT die Prozessdaten von dem SIMATIC PCS7 Prozessleitsystem.



Grafik 4: Schematisches Prinzip der stehenden Ultraschallwelle zwischen Piezo Ultraschallgeber des **soniccatch** und **Sequip ORM** Partikel-Sonde als Reflektor zum Einfangen der Partikel, um die Messung sensitiver zu ermöglichen.

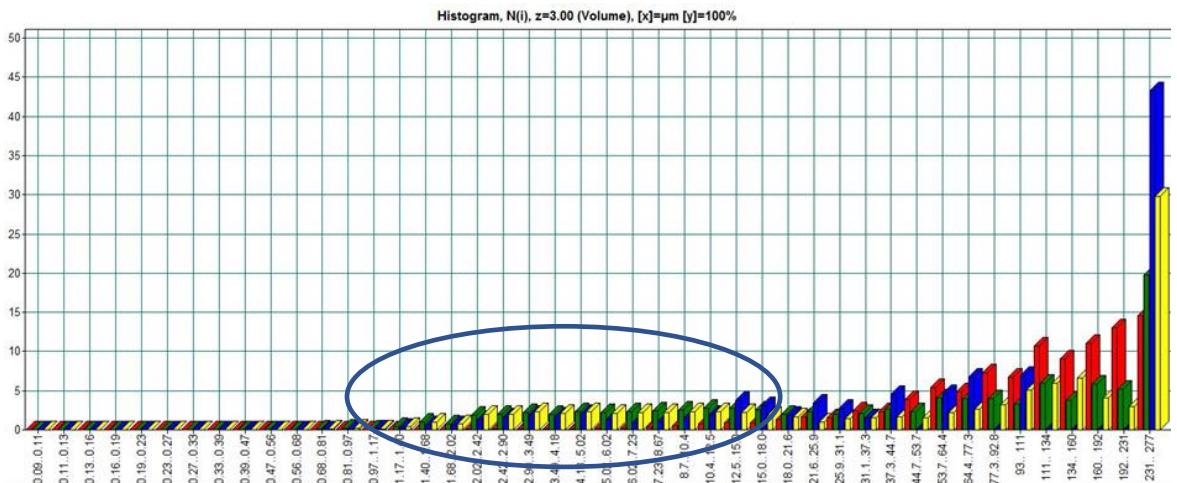
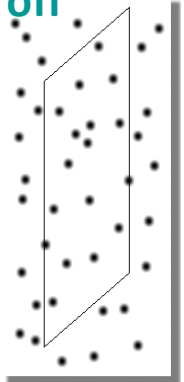
Fokussieren auf die Zellen

Bedingt durch die starke Begasung im Reaktor des LivingLabs Vienna und den bedingt optimalen senkrechten Einbau der Sonde wurde das Hefezellen-Signal zeitweise „durch Rauschen belastet“. Durch Aktivieren des Ultraschalls verstärkt sich das erfasste Spektrum der Hefezellen, sodass diese verbessert messbar werden. Gleichzeitig reduziert sich der Signalpegel durch die in vielen Applikationen vorhandenen Luftblasen und Ausgasungen, welche nun durch den Ultraschall mehr als deutlich strukturiert und vom Messbereich der Sonde ferngehalten werden. Somit wird das Rauchverhalten bei der Sequip Anwendung verbessert und bei guter Reproduzierbarkeit sogar noch weiter gesteigert.



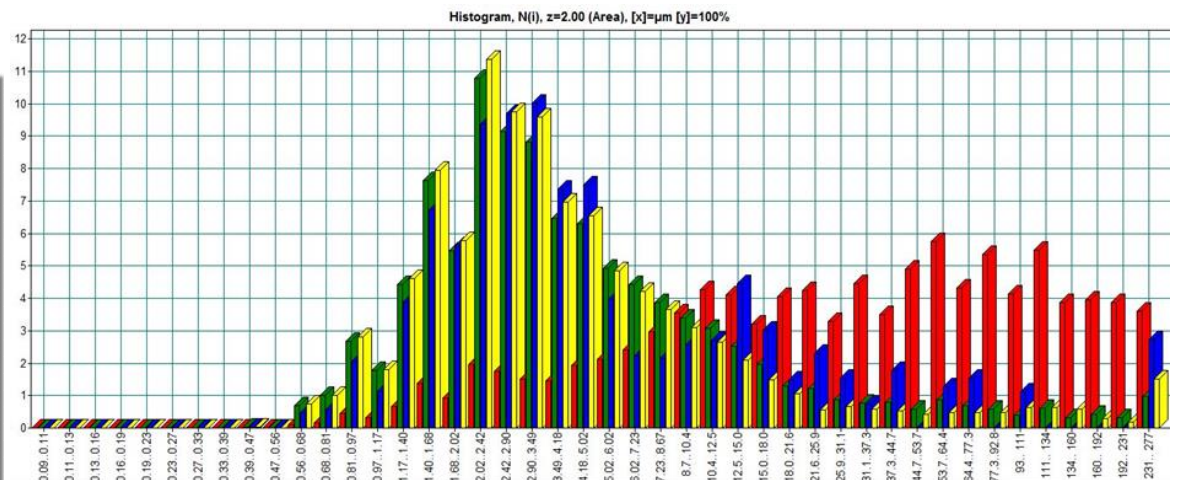
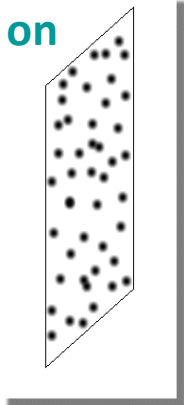
Living Lab Vienna

Sound off

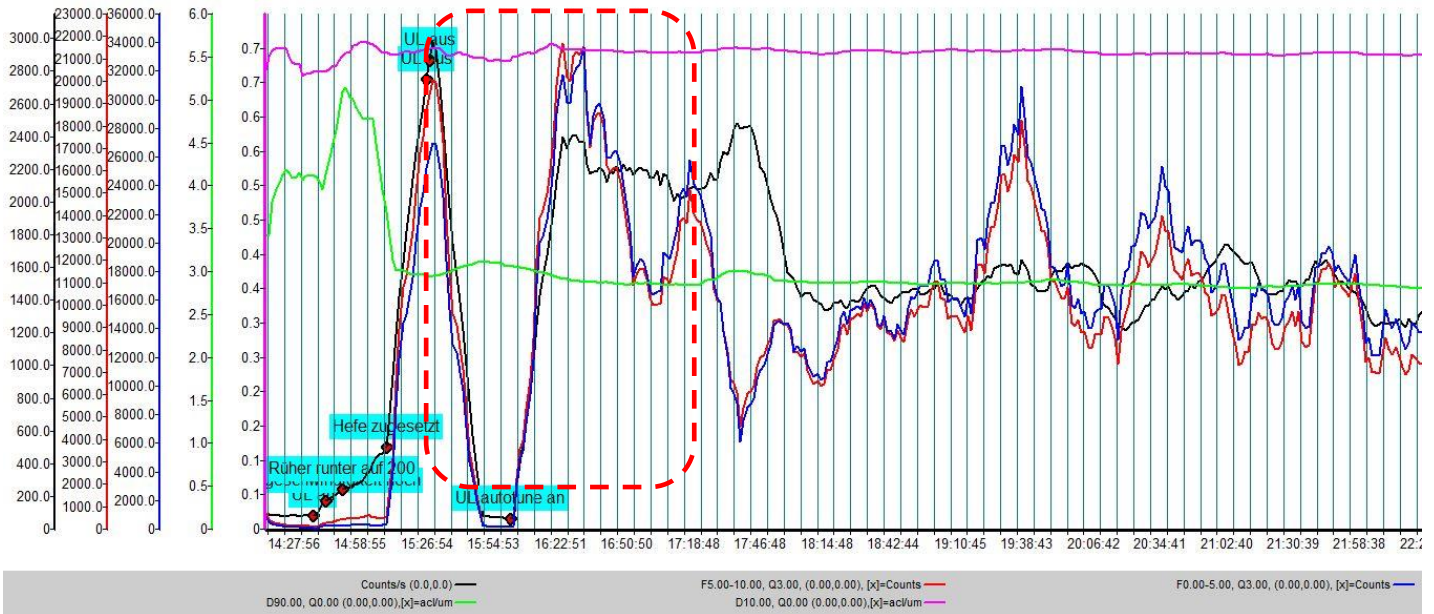


Grafik 5: Histogramm Volumenverteilung der Partikelgrößen - ohne Ultraschall verschwindet die Hefefraktion (blau markiert) hinter dem Blasen Teppich fast vollständig.

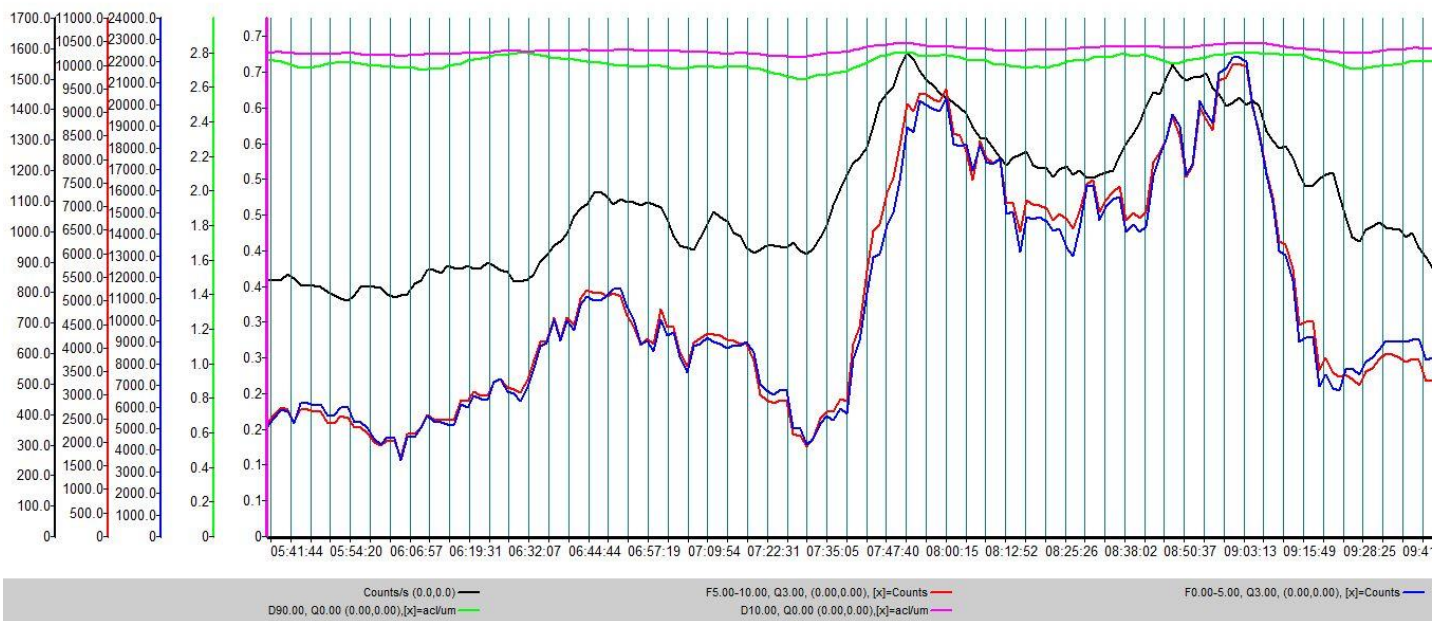
Sound on



Grafik 6: Im Histogramm in Längenverteilung zeigt sich, wie die Hefe unter Anregung durch Ultraschall am Blasen Teppich vorbei messbar wird.



Grafik 7: Anfängliche Parameter wie Rührgeschwindigkeit und Zugabe der Hefezellen sind im Signal ersichtlich (türkis). Der Ultraschall wird um etwa 14:40 eingeschaltet, wodurch der Signalanstieg beginnt. Durch Abschalten des Ultraschalls („UL aus“) gegen 15:30 ist ein folgender Signalabfall zu verzeichnen. Einschalten des Ultraschalls („UL autotune an“) lässt den Signalpegel wieder ansteigen und hebt den Effekt der Signalverbesserung deutlich hervor. Die Glucose Phase ist im Ausschnitt des Trends zwischen 16 – 18 Uhr (rot hervorgehoben) gezeigt.



Grafik 8: Da die für den Stoffwechsel benötigte primäre C-Quelle nicht mehr verfügbar ist, beginnt der Trend des Ethanol-Konsums der Zellen in der „respiration phase“, gegen 7 Uhr am Folgetag. Auch blieb die Feinpartikel-Rate während der gesamten Fermentationsdauer konstant, was die Aussage über eine zerstörungsfreie Anwendung des Ultraschalls in Kombination mit lebenden Zellen zulässt.

Ausblick

Der Einsatz von Partikelsonden in Fermentationsprozessen bietet eine Alternative zu spektroskopischen Sonden. Die Überwachung der „Viability“ der Zellen mittels Partikelgrößenverteilungs-Analytik erlaubt es, gezielt Aussagen über den Prozessstatus treffen zu können. Die Signalerhöhung der **Sequip** Partikel-Sonde durch das präzise Ultraschallfeld der PAT-Prozessarmatur **soniccatch** verbessert die Prozesskontrolle einer aktiven Fermentation. Dank der Einbindung beider PAT-Technologien in die übergeordnete Plattform SIMATIC SIPAT durch Siemens stellt dies eine innovative Lösung für Biotech-Anwendungen dar.

Anhang

Sequip Gründungspartner und ihre technischen Anforderungen

Die **Sequip S + E GmbH** wurde 1993, mit dem Ziel einer **kontinuierlichen Inlinemessung** von **partikulären** Systemen, gegründet.

Die **Sequip**, wurde unter anderem durch die Launching-Customer Bayer, BDF Beiersdorf, UNI Regensburg, Merck Darmstadt und Henkel unterstützt.

Bei der Gründung der **Sequip** war die Hauptanforderung des Marktes ein System zur Messung der Partikelgrößenverteilung zu entwickeln, die **basierend** auf einer **echten** Zählrate der Partikel, die den Fokus passieren und die **ohne** eine mathematisch manipulierbare Normverteilung zu entwickeln.

Die Entwicklung führte letztendlich zur **Sequip ORM** Messmethode.

Somit sollten die **Sequip** Sensoren folgende Bedingungen erfüllen:

1. Das System sollte eine robuste statistische Verteilung liefern, indem das einzelne Partikel direkt gezählt und deren Größe einzeln ausgewertet werden.
Die Marktanforderung war damals wie heute die **genaue** Bestimmung der Partikelanzahl und -größenverteilung, einschließlich der **gleichzeitigen** Anzeige von feinen und groben Partikeln, auch bei sich **verändernden** Partikelgrößensystemen,
2. **Genaue** und **robuste** Auswertung bei sich ändernden Verteilungen der Partikelgrößensystemen vom Becherglas bis zum Produktionsbehälter,
3. Erfassung von **Agglomeraten**,
4. **Inline** fähig mit **direktem** Einbau in Reaktoren und Rohrleitungen,
5. Direkt im Prozess und im **Original konzentriertem** Medium,
6. **Ohne** präparative Probenaufbereitung,
7. Autoklavierbarkeit,
8. Einsatz unter toxischen Bedingungen - Mitarbeiterschutz

Die Umsetzung dieser Anforderungen führte ab dem Jahr 2000 zur Markteinführung einer bahnbrechenden Technologie, die durch eine **Vielzahl** von Patenten gestützt wird.