



Prozessparameter simultan optimieren

Design of Experiments in der Bioprozess-Entwicklung

Ulrike Becken

In Bioprocessen bestimmt ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Einflussgrößen den Prozessverlauf und die Bildung des gewünschten Produkts. Um möglichst effiziente und robuste Prozesse zu entwickeln müssen Bioprocessingenieure diese Zusammenhänge verstehen. Gelingen kann dies mit „*Design of Experiments*“, einer Methode, die komplexe Zusammenhänge aufdecken kann und gleichzeitig hilft Ressourcen zu sparen.

Bioprocesse ähneln einer Gleichung: Auf der linken Seite der Gleichung stehen die Prozessparameter - die Temperatur, der pH-Wert des Mediums, die Konzentration von Nährstoffen und Nebenprodukten und andere - die auf eine bestimmte Art und Weise zusammenspielen. Auf der rechten Seite steht das Prozessergebnis. Dies ist durch Faktoren wie die Menge an Biomasse, Produktkonzentration, Produktqualität und das Auftreten von Unreinheiten definiert (Abb. 1). Ein Verständnis dieser Gleichung erlaubt dem Bioprocessingenieur den Prozess gezielt zu optimieren, ohne auf das Prinzip „Versuch und Irrtum“ vertrauen zu müssen. Drei Fragen sind besonders wichtig: Welche Prozessparameter beeinflussen das Ergebnis? Was sind die optimalen Sollwerte? Wie spielen die Prozessparameter zusammen? Es gibt verschiedene experimentelle Strategien um Antworten auf diese Frage zu erhalten. Klassischerweise wird pro Experiment ge-

nau ein Faktor geändert (*One Factor a Time*, OFAT). Beispielsweise werden verschiedene Temperatursollwerte getestet, während alle anderen Parameter konstant gehalten werden (Abb. 2A). Dieser Ansatz hat allerdings wesentliche Nachteile. Zum einen sind sehr viele Experimente nötig um optimale Sollwerte zu finden. Zum anderen liefern die Ergebnisse keine Hinweise auf Interaktionen zwischen den Prozessparametern. Ein Beispiel: Nehmen wir an, in einem OFAT-Ansatz werden Temperaturen zwischen 30°C und 37°C getestet; das Medium hat immer einen pH-Wert von 7,0 und enthält 2 g/L Glucose. Nehmen wir weiter an, bei einem Temperatursollwert von 35°C ist die Produktkonzentration am höchsten. Das

Problem: Es ist nicht gesagt, dass ein echtes Optimum erreicht wurde. Vielleicht wäre das Ergebnis bei 32°C noch besser, wenn gleichzeitig der pH-Wert auf 6.8 und die Glukosekonzentration zu 4 g/L geändert würde. Klassische OFAT-Ansätze liefern keine Information über solche Zusammenhänge.

Kritische Parameter ermitteln und Zusammenhänge erkennen

Diese Limitierungen umgeht ein „*Design of Experiments*“ Ansatz. Hier werden in einem Versuchslauf mehrere Faktoren gleichzeitig geändert. Das klingt zunächst ungewöhnlich, erlaubt bei richtiger Durchführung aber einen größeren Parameterbereich abzudecken, Interaktionen aufzulösen und gibt Hinweise auf sinnvolle Folgeexperimente. Ein großer Vorteil eines DoE-Ansatzes ist, dass nur wirklich benötigte Experimente durchgeführt werden, und so Ressourcen geschont werden. Abbildung 2B illustriert schematisch ein DoE Design zur Untersuchung des Einflusses von Temperatur, pH und der Glukosekonzentration auf das Prozessergebnis. Für jeden Parameter werden zwei Sollwerte getestet, je ein niedriger und ein hoher Wert. Hohe und niedrige Werte werden kombiniert. Im ersten Experiment werden die niedrigen Sollwerte für pH, Temperatur und Glukosekonzentration gewählt. Im nächsten Ver-

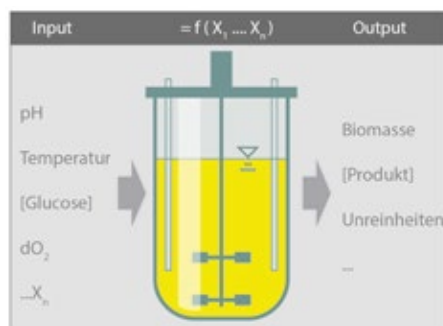


Abb. 1: Viele Parameter beeinflussen das Prozessergebnis. Diese Zusammenhänge zu verstehen ist für die Optimierung von Bioprocessen elementar.

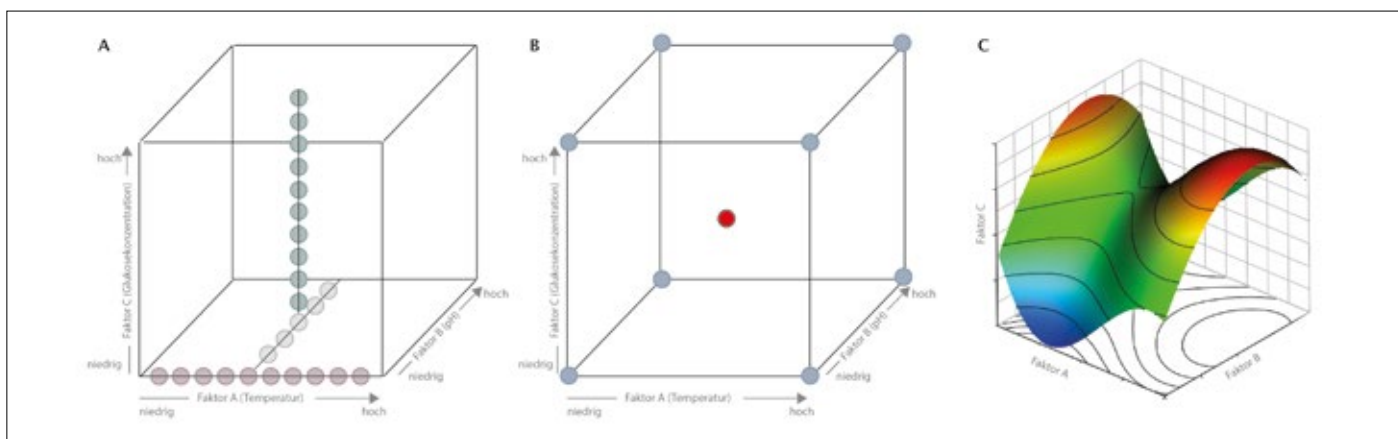


Abb. 2: Versuchsplanung und Auswertung. A: OFAT-Ansatz. Jeder Kreis repräsentiert ein Experiment. In jedem Experiment wird ein Faktor variiert, die anderen konstant gehalten. Erkenntnisgewinn nur auf jeweils einer Achse. B: DoE-Studie. Jeder Kreis repräsentiert ein Experiment. In jedem Experiment werden drei Faktoren (pH, Temperatur, Glukosekonzentration) variiert. Im Vergleich zum OFAT-Ansatz wird mit weniger Experimenten ein größerer Parameterbereich abgedeckt. Durch die Beschreibung der Zusammenhänge mit Hilfe von mathematischen Modellen erfolgt ein Erkenntnisgewinn innerhalb des Kubus. C: Der Surface Response Plot ist eine Möglichkeit zur Visualisierung der Ergebnisse einer DoE Studie. Es wird ersichtlich, welche Kombination von Sollwerten bessere (rot) oder schlechtere (blau) Ergebnisse liefert (Bild: CAMO Software AS).

sich sind pH und Temperatur niedrig, aber die Glukosekonzentration hoch. Nach diesem Schema werden alle möglichen Kombinationen aus hohen und niedrigen Sollwerten getestet – ihre Zahl entspricht 2^k , wobei k die Anzahl der zu testenden Parameter ist. Zusätzlich werden häufig mehrere Experimente am Center Point (Abb. 2B, rot) durchgeführt, um die Leistung des Designs abzuschätzen und Standardabweichungen zu ermitteln. Dies ist ein „Full-Factorial Design“. Je nach Fragestellung kann es Sinn machen, dieses Design abzuwandeln oder zu erweitern, beispielsweise indem zusätzliche Sollwerte getestet werden. In unserem Beispiel werden pro Experiment also nicht nur ein, sondern gleich drei Prozessparameter variiert. Woher weiß der Wissenschaftler, welcher Sollwertbereich geeignet ist? Eine erste Idee liefern Erfahrungswerte und Literaturrecherchen. Eine große Stärke von DoE-Studien ist, dass sie Rückschlüsse auf sinnvolle Anpassungen zulassen. Liefert beispielsweise die Kombination pH hoch/Temperatur hoch die besten Ergebnisse, werden in einer Folgestudie sinnvollerweise die Sollwertbereiche nach oben verschoben. Die Daten aus der DoE-Studie werden statistisch analysiert. So lassen sich Interaktionen zwischen verschiedenen Prozesspara-

metern aufdecken, bestimmen, welche Parameter den größten Einfluss auf das Ergebnis haben, und ein Sollwertbereich definieren, innerhalb dessen das Prozessergebnis zufriedenstellend ist. Anschaulich darstellen lassen sich die Ergebnisse zum Beispiel in einem Surface Response Plot, der eine Art Landkarte des Prozesses liefert (Abb. 2C).

Spezialisierte Softwareprodukte erleichtern die Arbeit

DoE-Design und statistische Analyse erfolgen üblicherweise mittels spezialisierter Software. Besonders nutzerfreundlich sind Produkte, die nahtlos zusammenarbeiten und einen problemlosen Transfer von Daten zwischen der Bioprocess-Kontrollsoftware und der Software für DoE-Design und Analyse zulassen. Ein weiteres nützliches Hilfsmittel sind parallele Bioreaktorsysteme. Diese erlauben, viele Experimente gleichzeitig durchzuführen und so Zeit zu sparen. Mit DoE Studien lässt sich mit minimiertem experimentellem Aufwand ein umfassendes Prozessverständnis entwickeln. Dies hilft wichtige Prozessparameter zu ermitteln, Prozesse zu optimieren, und vorauszusehen, welchen Einfluss die Änderung eines Parameters auf das Ergebnis haben wird.

KONTAKT |

Dr. Ulrike Becken
Eppendorf AG
Bioprocess Center
Jülich, Deutschland
becken.u@eppendorf.com

Weitere Beiträge zum Thema: <http://bit.ly/GIT-DoE>

