

**Analytik und Regelung
von biotechnischen Prozessen**

Vom Fachbereich Chemie
der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Chem. Adnan Jens Ritzka
geboren am 1.12.1970 in Lehrte

Hannover 1999

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Bernd Hitzmann

Tag der Promotion: 24.6.1999

Datum der Veröffentlichung: September 1999

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Juli 1996 bis Februar 1999 am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper durchgeführt. Ihm danke ich für die gebotenen Arbeitsbedingungen und für die Freiräume bei der selbständigen Bearbeitung des Themas.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Bernd Hitzmann danke ich für die Übernahme des Korreferats. Es war immer eine Freude, mit ihm die Abgründe mathematischen Formalismus zu überwinden. Seine Ideen und Hilfestellungen im Bereich der Programmentwicklung und sein Optimismus förderten die Arbeit in großem Maße.

Herrn Dr. Roland Ulber möchte ich für die praktische Unterstützung und Aufmunterung im täglichen Laboralltag danken. Seine Erfahrung in der Bioanalytik half bei vielen Problemen.

Die vorliegende Arbeit wäre ohne die Hilfsbereitschaft der Mitarbeiter des Instituts nicht möglich gewesen. Besonders möchte ich mich bei

Herrn Dipl.-Chem. Olaf Broxtermann (Kultivierungen und Regelung)

Frau Dr. Mariya Farooqi und Herrn Prof. Dr. Mohammed Saleemuddin (Bioaffinity layering)

Herrn Dr. Ivo Havlic (Software)

Herrn Dr. Markus Hesse und Herrn Dipl.-Biochem. Stefan Marose (Kultivierungen)

Herrn Dr. Edgar Pundsack (CW Unterstützung)

Herrn Dr. Jong-Il Rhee (Ammoniummessungen)

Herrn Dr. Karsten Schöngarth (Fast-FIA)

Herrn Dipl.-Chem. Peter Sosnitza (FET-Labor-Insasse, Glucosemessungen)

Herrn Dipl.-Chem. Dirk Steuber (FIA-Analytik)

Frau Martina Weiß (technische Unterstützung)

für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Für die Unterstützung bei meinem Forschungsaufenthalt in Argentinien bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Juan Carlos Diaz Ricci, Herrn Prof. Dr. Carlos German Nunez und meinen vielen Freunden vom Institut für Biochemie der medizinischen Fakultät der Nationalen Universität von Tucuman. Herzlichen Dank auch an alle Mitarbeiter des Instituts für Bioingenieurwissenschaften in Tucuman. Finanziert wurde der Aufenthalt durch den

Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD) und der argentinischen Antorchas-Stiftung, denen ich für die Bereitstellung der Mittel sehr herzlich danke. Sie gaben mir die Möglichkeit, meine Dissertation im Ausland zu vervollständigen und gleichzeitig ein neues Land kennenzulernen.

Abschließend danke ich meiner Frau Margit, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung	1
1.1 Bioanalytik	2
1.2 Bioprozeßregelung	3
1.3 Aufgabenstellung und Vorgehensweise.....	5
2 Charakterisierung des Probenahmemoduls	6
2.1 Auswirkung der Verzögerungszeit auf Regelungen	13
3 Entwicklung der Online-Analytik	17
3.1 Fließinjektionsanalysen-Systeme	17
3.2 Modifiziertes FIA-System	19
3.3 Air Segmented Continuous Flow-System.....	22
3.4 Fließinjektionsanalytik ohne Probenahmemodul	23
4 Analytik mit Chemo- und Biosensoren	25
4.1 Ammoniumanalytik	25
4.1.1 Ammoniakelektrode	25
4.1.2 Gasdiffusionszelle/ pH-FET.....	26
4.1.3 Photometrische Analytik mit einer Gasdiffusionszelle	29
4.2 Glucoseanalytik	32
4.2.1 Enzymkartusche/ Sauerstoffelektrode.....	33
4.2.2 Enzymatisch modifizierte Feldeffekttransistoren	34
4.3 Analytik von Penicillin G-Acylase.....	36
4.3.1 Darstellung von 6-APA.....	36
4.3.2 Verwendete Enzymsysteme	37
4.3.3 Produktion von Penicillin G-Acylase.....	38
4.3.4 Batch-Kultivierung von Bacillus licheniformis	44
4.3.5 Einfluß von Glucose auf die Acylaseproduktion	47
4.3.6 Einfluß der Phosphatkonzentration auf die Acylase-Produktion	47
4.3.7 Acylase-Screening verschiedener Bakterienstämme	48
4.3.8 Batch-Kultivierung von Bacillus megaterium	49
4.3.9 Zusammenfassung der Ergebnisse der Kultivierungsexperimente	51
5 Reversible und automatisierte Immobilisierung von Enzymen auf pH-FET	53
5.1 Das Lektin Concanavalin A.....	53
5.2 Bioaffinity Layering von Glycoenzymen auf pH-FET.....	55
5.3 Bioaffinity Layering von Glycoenzymen auf pH-FET mit einer Stärke-Grundmembran	59

6 Bioprozeßregelung mit Chemo- und Biosensoren	63
6.1 Digitale Regelung	64
6.2 Definition der Güte einer Regelung	64
6.3 Simulationswerkzeuge zur Bestimmung der Regelungsparameter	66
6.4 Die Probleme konventioneller Regelung.....	68
6.5 Durchführung von Bioprozeßregelungen	69
7 Zweipunktregelungen bei biotechnischen Prozessen.....	71
7.1 Zweipunktregelungen zur gezielten Produktion von Biomasse	71
7.2 Zweipunktregelung zur Bestimmung der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit	74
8 PID-Regelungen bei zeitdiskreten Messungen.....	83
8.1 PID-Regelungen der Glucosekonzentration	85
8.2 PID-Regelungen von Ammonium.....	92
9 Neuronale Netze zur Bioprozeßregelung	99
9.1 Netzwerkarchitektur.....	101
9.2 Vergleich zwischen PID-Regler und einem neuronalen Netz.....	103
9.3 Einsatz von neuronalen Netzen zur Bioprozeßregelung	110
10 Schlußbetrachtung.....	114
11 Anhang	120
11.1 Abkürzungsverzeichnis	120
11.2 Formelverzeichnis.....	121
11.3 Aktivitätstests	122
11.3.1 Glucoseoxidase.....	122
11.3.2 Urease	122
11.4 Bestimmung von Offline-Proben	122
11.4.1 Proteinnachweis mit Bicinchoninsäure	122
11.4.2 Glucosebestimmung I	123
11.4.3 Glucosebestimmung II	123
11.4.4 Glucosebestimmung III.....	123
11.4.5 Ammoniumbestimmung.....	123
11.4.6 Indikatorlösung zur photometrischen Bestimmung von Ammonium.....	124
11.5 Pufferlösungen.....	124
11.5.1 Aktivierungspuffer für Concanavalin A / Carbonatpuffer.....	124
11.5.2 Pufferlösung für EnFET-FIA-Systeme	124

11.5.3 Pufferlösung für GOD-Kartuschen-FIA-Systeme.....	124
11.6 Enzyme und Feinchemikalien.....	125
11.6.1 Enzyme.....	125
11.6.2 Feinchemikalien.....	125
11.7 Geräte.....	125
11.8 Medienzusammensetzungen.....	126
11.8.1 Synthetisches Medium zur Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	126
11.8.2 Synthetisches Medium M1 (Glucose).....	126
11.8.3 Synthetisches Medium M2 (Glucose).....	127
11.8.4 Synthetisches Medium M3 (Glycerin).....	127
11.8.5 Komplexmedium M4.....	127
11.8.6 Synthetisches Medium M5 mit hoher Phosphatkonzentration.....	127
11.8.7 Komplexmedium M6 mit hoher Phosphatkonzentration.....	128
11.8.8 Bouillon-Medium M7.....	128
11.8.9 Synthetisches Medium M8 zum Acylase-Screening.....	128
12 Literatur.....	129

Abstract

Ritzka, Adnan Jens

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung von Regelsystemen für die Substratkonzentrationen bei biotechnischen Prozessen. Nach der Charakterisierung geeigneter Probenahmemodule werden die Eigenschaften von einigen Online-Meßsystemen beschrieben und die Analytik anhand von Prozessen getestet und optimiert. Zum Einsatz kommen Chemo- und Biosensoren zur Messung von Ammonium- und Glucosekonzentrationen und zur Bestimmung der Penicillin G-Acylaseaktivität in Bakterienkultivierungen. Die Meßsysteme werden den Anforderungen einer Bioprozeßregelung angepaßt. Der Einfluß von Tot- und Verzögerungszeiten, der Meßfrequenz und der Meßgenauigkeit auf die Regelung wird beschrieben.

Es wird eine neue Immobilisationsmethode von Glycoenzymen unter Verwendung von Concanavalin A vorgestellt. Diese erlaubt eine automatisierte und reversible Immobilisierung von Glycoenzymen durch ein „Bioaffinity Layering“.

Aufbauend auf den optimierten Meßsystemen werden Regelungen der Substratkonzentrationen durchgeführt. Die Regelungsalgorithmen werden komplexer von simplen Zweipunktreglern über PID-Reglern zu Regelalgorithmen, die auf neuronalen Netzen basieren. Die verwendeten Regelalgorithmen werden miteinander verglichen. Mit Hilfe eines Softwareprogramms wird der Einsatz eines Regelalgorithmus vor einem Experiment erprobt. Die Leistungsfähigkeit und die Grenzen der jeweiligen Regelalgorithmen werden in der Praxis anhand von Kultivierungen getestet und beurteilt.

Zur Verbesserung der Regelalgorithmen werden überschaubare Modelle für biologische Systeme erstellt, die das tatsächliche Verhalten der Mikroorganismen stark vereinfacht darstellen. Die Modelle sind nur eingeschränkt gültig und übertragbar. Um eine höhere Unabhängigkeit vom vorliegenden Prozeß zu erreichen, werden Systeme erprobt, die mit möglichst wenig *a priori*-Wissen auskommen. Die Leistungsfähigkeit und Störanfälligkeit solcher Systeme wird behandelt.

Schlagwörter: Bioprozeßregelung, Biosensor, neuronale Netze

Abstract

Ritzka, Adnan Jens

In this work, the development of controlling systems for substrate concentrations in biotechnological processes is described. After characterization of suitable sampling devices, the properties of online analytical systems are presented, tested and optimized for biotechnological applications. Chemo- and biosensors for measuring ammonia and glucose concentration and for determination of penicillin G-acylase activity in bacteria cultures are used. These analytical systems are adjusted to bioprocess control demands. The influence of dead times, delay times, frequency and accuracy on control is described.

A new method to immobilize glyco enzymes using concanavalin A is introduced. This allows an automatic and reversible immobilization of glyco enzymes through "bioaffinity layering". Based on optimized analytical devices, control of substrate concentrations are accomplished. The complexity of controlling algorithms are increasing from simple on-off-controllers to PID controllers to artificial neural networks. These methods are compared and tested within software simulations. Efficiency of these controlling algorithms are tested and assessed within bioprocesses.

In order to improve the controlling algorithms, overviewable mathematical models for biological systems are made representing the behaviour of micro-organisms. These models are only with limitation valid and transferable. To obtain an increasing independence of the based process, systems are tested which use a minimal quantity of *a priori* knowledge. Efficiency and robustness of these systems are presented.

Keywords: bioprocess control, biosensor, neural networks

1 Einleitung

Die Biotechnologie ist eine Schlüsseltechnologie des nächsten Jahrtausends. Zahlreiche Firmengründungen, insbesondere in den USA, die durch Risikokapital-Beteiligungen stark gefördert werden, belegen dies [1]. Mehrere Initiativen des früheren Bundesministeriums für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (heute Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie BMWI und Bundesministerium für Bildung und Forschung BMBF) innerhalb der letzten fünf Jahre zeigten, daß dieser Trend auch in Deutschland erkannt wurde. Der 1995 ausgeschriebene BioRegio-Wettbewerb förderte gezielt die Bildung neuer biotechnologischer Zentren in Deutschland und erhöhte gleichzeitig die gesellschaftliche Akzeptanz der Biotechnologie. Auch lange nach dem BioRegio-Wettbewerb wird weiterhin unter den Teilnehmern um die ersten Plätze in der Bio- und Gentechnik gerungen.

Nach Angaben des BMWI werden die rechtlichen Rahmenbedingungen weiterhin verbessert sowie die Unterstützung technologieorientierter Unternehmen fortgeführt. Im Januar 1999 wurde angekündigt, daß allein in diesem Jahr eine Milliarde DM in Form von Ausfallbürgschaften und stillen Beteiligungen für junge, innovative Unternehmen bereitstehen wird. Bereits 1996 wurden auf diese Art 800 Mio. DM mobilisiert. Das BMWI rechnet für 1999 mit etwa 1000 Unternehmen, die davon profitieren werden. Die Förderung von jungen Unternehmen ist ein wichtiges Mittel zur Herabsetzung der Arbeitslosigkeit. Die 4000 Ausgründungen der amerikanischen Universität MIT sind ein eindrucksvolles Beispiel dafür, wie durch finanzielle Unterstützung über 1,1 Mio. Arbeitsplätze geschaffen wurden [1].

Die Entwicklung der Biotechnologie im gesamteuropäischen Maßstab manifestiert sich in dem Ende 1998 verabschiedeten fünften Rahmenprogramm für Forschung und technologische Entwicklung. Von der Gesamtsumme von ca. 15 Mrd. Euro entfallen auf die sogenannten „Life Sciences“ 2,4 Mrd. Euro. Das sind 29 % mehr als im vierten Rahmenprogramm, wobei die Gesamtausgaben nur um einige Prozent stiegen [1].

Die intensive Vernetzung von Molekularbiologie, Naturstoff- und Pharmaforschung, Elektronik und Mikrosystemtechnik spielt dabei eine immer größer werdende Rolle. So ist z.B. der Technologiepark in Jena nach Erhalt eines Sondervotums im BioRegio-Wettbewerb auf dem Weg zum „BioInstrumentation Valley“. Es zeigt sich, daß durch interdisziplinäres Arbeiten neben der Entwicklung neuer Produkte oder Produktklassen auch bereits etablierte Verfahren vorangetrieben werden können. Ein erstaunliches Beispiel ist dabei die bereits seit über 8000 Jahren bekannte Nutzung von Mikroorganismen zur Herstellung von Bier, Wein oder Brot. Daß es heute immer noch möglich ist, diese Verfahren zu verbessern, ist einer nicht

mehr einseitigen, sondern fächerübergreifenden Sichtweise des Problems und dem Einsatz von Elektronik und Regelungstechnik zu verdanken. Das Verhalten der einzelnen Fachgebiete untereinander ist zudem ambivalent. Durch biosensorische Analyseverfahren ist es möglich, die Steuerung und Regelung von biotechnischen Prozessen – ein Teilgebiet der Prozeßtechnik – weiter zu entwickeln. Die Prozeßtechnik kann wiederum zu einer Verbesserung der Analytik eingesetzt werden, wodurch sich eine gegenseitige Beeinflussung ergibt. Die vorliegende Arbeit beschreibt diesen engen Zusammenhang zwischen Bioanalytik und Bioprozeßregelung und versucht, durch eine intensivere Kombination beider Teilgebiete die Steuerungs- und Regelungsmethoden von biotechnologischen Verfahren zu verbessern.

1.1 Bioanalytik

Die biochemischen Abläufe, die in Kultivierungen auftreten, sind vielfältig und trotz immenser Erfolge in der Molekularbiologie und Biochemie immer noch nicht vollständig erfaßbar. Die Optimierungsversuche stützen sich daher nur auf Modellannahmen oder sind nach wie vor empirischer Natur. Eine Aufgabe der Biotechnologie ist es, die kommerzielle Gewinnung von Naturstoffen aus Mikroorganismen zu optimieren. Bis in die 90er Jahre beruhte die Erhöhung der Ausbeute fast ausschließlich auf gewöhnlichen Selektionstechniken. Erst mit der Gentechnologie und der damit möglichen Manipulation des Erbguts der Zelle können ausgewählte Stämme dahingehend verändert werden, daß sie die gewünschten Produkte in exzessiver Menge bilden. Die Optimierung des Reaktionsmediums dieser Zellen beruht aber immer noch auf empirischen Untersuchungen.

Mikroorganismen verlangen für optimales Wachstum nach einer strikten Einhaltung der optimalen Umgebungsparameter. Die Kontrolle (Bioprocess Monitoring) der Umgebungsbedingungen beschränkt sich in den meisten Fällen auf die Parameter Temperatur, pH-Wert, Rührerdrehzahl, Gelöstsauerstoffkonzentration und Kohlendioxid- und Sauerstoffpartialdruck im Abgas. Die Messung geringer Gelöstsauerstoffkonzentrationen ist dabei ein Problem, die Regelung der Temperatur, des pH-Werts und der Rührerdrehzahl ist dagegen Stand der Technik. Obwohl das Wissen um die Biochemie der Organismen in den letzten Jahren sprunghaft angestiegen ist, bleibt das aktive Eingreifen in die intrazellulären Prozesse meist auf die genannten Faktoren beschränkt. Die Zellphysiologie liefert uns die Auswirkungen der wichtigsten Umgebungsparameter auf den Zellmetabolismus. Mit der Entwicklung der Biosensorik bietet sich die Möglichkeit, auch die biochemisch relevanten Substanzen wie Kohlenstoff- oder Stickstoffquellen, Primär- und Sekundärmetabolite zu bestimmen. Ebenso

interessant und wahrscheinlich die treibende Kraft der Entwicklung der Biosensorik ist die Messung des gewünschten Zielproduktes, etwa eines bestimmten Proteins oder Antibiotikums. Ungeachtet einer Kombination mit Regelalgorithmen ist die Biosensorik bereits eine Verknüpfung von Mikroelektronik und biologischen Erkennungsmechanismen mit hoher Selektivität und Sensitivität. Insbesondere in den Bereichen Umweltanalytik und Qualitätssicherung sind im zunehmenden Maße mehr Meßgrößen in immer kürzer werdenden Zeitabständen bereitzustellen und auszuwerten [2]. In einem Teil dieser Arbeit wird demzufolge auch die Optimierung etablierter bioanalytischer Meßverfahren hinsichtlich einer höheren Meßfrequenz und eines höheren Automatisierungsgrads, einer einfacheren Handhabbarkeit und besserer Reproduzierbarkeit beschrieben.

Die Voraussetzung jeglicher Regelungsverfahren sind die Meßsysteme, die in diskreten Zeitabständen neue Informationen über den Istzustand der Regelgröße liefern. Die Verbesserung der industriellen Prozeßregelung ist nicht nur eine Folge der immer leistungsfähigeren Prozeßrechner, sondern auch der Entwicklung neuer Sensoren. Die konsequente Weiterentwicklung herkömmlicher Verfahren wie der High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC) zur Online-HPLC führt zu Analyseraten von 2-10 h⁻¹, die in der Qualitätskontrolle eine große Rolle spielen; allerdings sind die Meßzyklen noch zu lang, um darauf eine Prozeßregelung aufzubauen. In Ausnahmefällen ist der Einsatz einer Online-HPLC zur Regelung möglich [3]. Die Forderung nach einem schnellen Analysesystem wird allerdings durch die Kopplung von Chemo- und Biosensoren mit der Fließinjektionsanalyse (FIA) erfüllt. Als naßchemische Durchflußmethode wird sie kontinuierlich, automatisiert und online betrieben [4-7]. Die Fließinjektionsanalytik mit Biosensoren ist heutzutage die am weitesten verbreitete Methode, um aktuelle Informationen über größere Moleküle mit Analyseraten über 60 h⁻¹ zu erhalten.

1.2 Bioprozeßregelung

Es zeigt sich, daß eine Veränderung der äußeren Bedingungen ein verändertes Wachstum oder eine Umstellung des Stoffwechsels (z. B. von aerob auf anaerob) der Mikroorganismen zur Folge haben kann. Die Reaktionswege, die in der Natur die hohe Anpassungsfähigkeit von Mikroorganismen bedingen, sind auch im Reaktor latent vertreten. Zur Steigerung der Produktivität wird oft eine Regelung wichtiger Einflußgrößen durchgeführt.

Mit der Bioprozeßregelung läßt sich eine gewünschte Substratkonzentration einstellen, wodurch sich zu niedrige oder zu hohe Substratkonzentrationen vermeiden lassen.

Stand der Technik ist hier die beobachtergestützte Bioprozeßregelung, die auf der Messung von Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdruck im Reaktor und im Abgas beruht [8-12]. Die zugrunde gelegten biologischen Modelle sind allerdings nur mit hohem Aufwand zu gewinnen und nur in einem eingeschränkten Bereich gültig. Sie beschreiben meist nicht den Gesamtprozeß und sind nur grobe Näherungen. Die direkte Messung der Substratkonzentration ist hingegen eine Methode, eine Regelung mit wenigen oder keinen Basisinformationen durchzuführen [3]. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es, neue modellunabhängige Regelsysteme zu entwickeln und zu optimieren.

Möglich wird die Generierung neuer Regelungsalgorithmen durch die erhebliche Kostenreduzierung und Leistungssteigerung von Rechnern sowie durch ein verbessertes Softwareangebot. Die Prozeßautomatisierung ist dennoch in anderen Bereichen weiter fortgeschritten als in der Bioprozeßtechnik [13]. Die Hauptgründe hierfür sind die Nichtlinearitäten der komplexen biologischen Systeme und deren Zeitvarianz. Die Messung relevanter Einflußgrößen ist nur in einigen Fällen gelungen (siehe Kapitel 1.1). Oft wird nur auf qualitativ formulierte Beziehungen zurückgegriffen. Zum Einsatz kommen aus diesem Grund nichtlineare, robuste und unscharf formulierte Regler [14]. Die Alternativen zu rein mathematischen Modellbildungen sind die Anwendungen von neuronalen Netzen, der Fuzzy-Logik und Expertensystemen. Neben exakt faßbaren online oder offline gemessenen Prozeßparametern können hierbei auch das Erfahrungswissen des Benutzers und theoretische Erkenntnisse eingesetzt werden. Die genannten Algorithmen haben nicht nur bei der Regelung zu Fortschritten geführt, sondern auch zur Modellbildung und damit zum Verständnis des Bioprozesses beigetragen [15-29].

Bei der Online-Analyse bei Kultivierungsbrühen gilt es, die meßtechnischen Besonderheiten wie die Probenahme und daraus resultierende Verzögerungszeiten zu berücksichtigen. Auch die im Vergleich zu Temperatur- oder Rührerdrehzahlregelungen sehr hohen Zeitdifferenzen zwischen zwei aufeinander folgenden Meßwerten im Bereich von einigen Minuten statt Millisekunden fordern problemangepaßte regelungstechnische Verfahren.

1.3 Aufgabenstellung und Vorgehensweise

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung von Regelsystemen für die Substratkonzentrationen bei biotechnischen Prozessen. Die Systeme sollen dabei so flexibel wie möglich gehalten werden, um leicht an spezifische Anforderungen angepaßt werden zu können. Nach der Charakterisierung geeigneter Probenahmemodule in Kapitel 2 werden die Eigenschaften von Meßsystemen in den Kapiteln 3-5 beschrieben und die Analytik anhand von Prozessen getestet und optimiert. Dabei wird auf die Automatisierbarkeit und einfache Handhabung der Analysensysteme großer Wert gelegt, um industriellen Ansprüchen zu genügen und die Anforderungen an den Prozeßbetrieb zu erfüllen.

Aufbauend auf den optimierten Meßsystemen werden Regelungen der Substratkonzentrationen durchgeführt. Die Beschreibung findet sich in den Kapiteln 6-9. Die Regelungsalgorithmen werden komplexer von simplen Zweipunktreglern über PID-Reglern zu Regelalgorithmen, die auf neuronalen Netzen basieren. Die Leistungsfähigkeit und die Grenzen der jeweiligen Regelalgorithmen werden anhand von Kultivierungen getestet und beurteilt. Dieses setzt voraus, daß auch erkannt wird, welche Methode für das Regelungsproblem optimal geeignet ist. Die Entwicklung einer Simulationsoberfläche ist demnach ein weiteres Ziel.

Zur Verbesserung der Regelalgorithmen werden überschaubare Modelle für biologische Systeme erstellt, die das tatsächliche Verhalten der Mikroorganismen stark vereinfacht darstellen. Die Modelle sind nur eingeschränkt gültig und übertragbar. Um eine höhere Unabhängigkeit vom vorliegenden Prozeß zu erreichen, werden Systeme erprobt, die mit möglichst wenig *a priori*-Wissen auskommen. Die Leistungsfähigkeit und Störanfälligkeit solcher Systeme wird behandelt.

Die Hauptgliederung der vorliegenden Arbeit besteht aus den drei Teilgebieten:

- Probenvorbereitung
- Bioprozeß Monitoring
- Bioprozeßregelung

2 Charakterisierung des Probenahmemoduls

Die Analyse chemischer Reaktionsparameter in Bioreaktoren geschieht heutzutage entweder durch direkte Online- und In-situ-Verfahren wie die In-situ-Fluorometrie und durch konventionelle Sensoren zur Sauerstoff-, Temperatur- und pH-Messung oder durch indirekte Messung anhand von Kultivierungsproben aus dem Reaktor. Elegante Verfahren wie die In-situ-Mikroskopie liefern zudem Informationen über den Status und die Vitalität von Zellen; die chemische Zusammensetzung des Kultivierungsmediums bleibt allerdings unbekannt. Bypass-Messungen werden vielfach durchgeführt, sind aber immer dann nicht empfehlenswert, wenn scherstreßempfindliche Pilze, Tierzellkulturen oder immobilisierte Zellen untersucht werden. Außerdem ist die Kontaminationsgefahr größer als bei einfachen Reaktorsystemen. Besonders von den stark belasteten Pumpschläuchen geht ein nicht unerhebliches Infektionsrisiko aus.

Setzt man Biosensoren zur Ex-situ-Analyse ein, so wird oft aufgrund der fehlenden Sterilisierbarkeit des Biosensors ein Probenahmemodul verwendet [30-35]. Die genaue Kenntnis der Verzögerungs- und Totzeit dieses Probenahmemoduls ist für die Bioprozeßregelung sehr wichtig. Da die Regelparameter direkt davon abhängen, wird eine Charakterisierung durchgeführt. Das sterilisierte Probenahmemodul befindet sich im Innern des Bioreaktors oder innerhalb eines Bypasses. In den letzten Jahren wurden verschiedene Systeme erprobt, z.B. die Anwendung von Dialysemodulen [36], Mikrodialysemodulen [37] und Koaxialkathetern [38]. Eine Übersicht findet sich in der Literatur [39]. Zwei Modultypen haben sich in der Praxis durchgesetzt, zum einen die Tangentialstromfiltration [39], zum anderen die Verwendung einer porösen Filtrationsmembran für Rührkessel [30,40]. Letztere wird in dieser Arbeit wegen ihrer einfachen Handhabbarkeit und des relativ geringen Totvolumens eingesetzt. Die Vor- und Nachteile der Filtrationsmembran (und teilweise der anderen In-situ-Probenahmesysteme) sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tab. 1: Vor- und Nachteile einer In-situ-Filtrationsmembran

Vorteile	Nachteile
Zellfreie Messungen sind möglich	Relativ hohe Tot- und Verzögerungszeit
Sehr einfache Handhabung	Auswechseln des Moduls während des Betriebs nicht möglich
Sterilisierbarkeit	Gefahr der Porenverstopfung
Direkter Einsatz im Reaktor (ohne den Umweg über einen Bypass)	

Als Totzeit t_{tot} wird in dieser Arbeit die Zeit definiert, um die eine Ausgangsgröße eines Systems gegenüber der Eingangsgröße verzögert wird. Die Verzögerungszeit (auch Ansprechzeit) beschreibt die Zeit, die die Sprungantwort eines Systems benötigt, um 99 % der Differenz zwischen dem stationären Anfangs- und Endwert zu erreichen.

Verwendet wird das kommerziell erhältliche Probenahmemodul ESIP-Lab 5442 (Eppendorf Sterile In-line Probenahmesonde, Eppendorf Hamburg) mit einem schlauchförmigen Rohrmembran-Filter aus Polypropylen (Enka AG, Wuppertal) als Sterilbarriere. Vor dem ersten Einsatz wird sie mit 70 % Isopropanol hydrophilisiert.



Abb. 1: ESIP-Lab Probenahmemodul 5442 (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg) [41]

Die technischen Daten des Probenahmemoduls sind:

Tab. 2: Technische Daten des ESIP-Lab Probenahmemoduls 5442 [41]

Filtrationstechnik	In line-Permeations-Filtration, steril
Membran-Modul	Tubuläre Polypropylen-Membran, einseitig geschlossen
Einbaulänge	Ca. 180 mm
Länge Filtermembran	Ca. 125 mm
Filterfläche	Ca. 30 cm ² [41]
Porengröße	0,2 - 0,6 µm [41]
Maximaler Filtratfluß	1,5 ml/min
Hydrodynamische Verweilzeit (bei maximalem Filtratfluß)	1,1 min
Membrandichtung	PTFE-Ferrule
Eigenvolumen	Ca. 1,6 ml (Filtratwege Ø 1 mm)

Mit einem relativ hohen Eigenvolumen von 1,6 ml und den bei FIA-Systemen üblichen Filtratflüssen von 0,2 bis 0,5 ml/min ergeben sich mittlere hydrodynamische Verweilzeiten τ im Bereich von 3 bis 8 min, d. h. erst nach 3 bis 8 min hat sich der Inhalt der Sonde einmal ausgetauscht. Zu der realen Messung kommen Dispersionseffekte und systemimmanente Verzögerungen durch Schläuche. Bei der hier verwendeten Probenahmesonde handelt es sich außerdem um eine relativ kurze Sonde, die für Reaktoren im Bereich von 1-3 Litern Fassungsvermögen geeignet ist. Erhältlich sind bis zu dreimal längere Sonden; die ein bis zu dreimal höheres Eigenvolumen aufweisen (bis ca. 4,8 ml). Bei maximalem Filtratfluß von 1,5 ml/min ergibt sich eine mittlere hydrodynamische Verweilzeit von 3,2 min. Dies wirkt sich immer dann aus, wenn relativ schnelle Bioprozesse betrachtet werden, etwa während der exponentiellen Wachstumsphase der Mikroorganismen. Für kontinuierlich durchgeführte oder langsam verlaufende Kultivierungen (z. B. Tierzellkultivierungen über mehrere Wochen) sind diese Größenordnungen der Verweilzeit annehmbar.

Zur Charakterisierung des Probenahmemoduls ist es notwendig, die Verweilzeitsummenfunktion $F(t)$ und daraus die Verweilzeitverteilungsfunktion $E(t)$ des strömenden Fluids zu bestimmen. Dazu wird der Glucosegehalt eines das Probenahmemodul durchströmenden Filtratflusses mit einer FIA und Glucoseoxidase-Kartusche (Beschreibung

der Glucoseanalytik in Kapitel 4.2.1) gemessen. Zunächst strömt glucosefreier KPP-Puffer (siehe Anhang) aus einem mit 100 ml Puffer gefüllten Rührkesselreaktor (CSTR) durch das Probenahme- und das FIA-System. Zum Zeitpunkt t_0 wird der Pufferstrom durch eine Lösung von 2 g/l Glucose in KPP-Puffer (pH 6,5) ersetzt. Als Testsignal liegt somit ein Konzentrationsprung vor. Alle drei Minuten wird mit dem FIA-System die Glucosekonzentration im Reaktor bestimmt. Das Experiment wird bei zwei verschiedenen Volumenströmen \dot{V}_1 und \dot{V}_2 durchgeführt. Die Abbildung 2 zeigt den Versuchsaufbau.

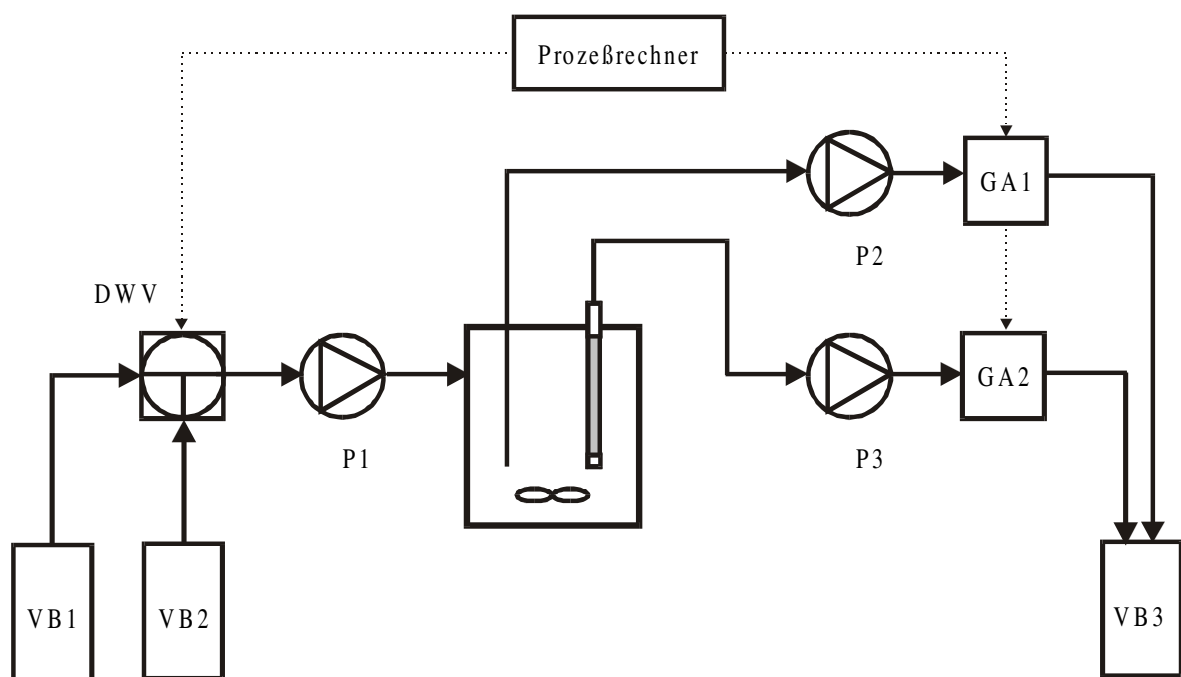


Abb. 2: Aufbau des Meßsystems zur Bestimmung der Verzögerungs- und Totzeiten durch das Probenahmemodul und die FIA

VB1, VB2 Vorratsbehälter mit Puffer und mit 2 g/l Glucoselösung, P1-P3 Pumpen, DWV Dreiwegeventil, GA1, GA2 Glucoseanalytik, VB3 Sammelbehälter

Aus den $F(t)$ -Funktionen werden durch Ableitung nach der Zeit t die $E(t)$ -Funktionen errechnet und letztere durch symmetrische Gauss-Funktionen angenähert. Die Verläufe zeigen die Abbildungen 3 und 4.

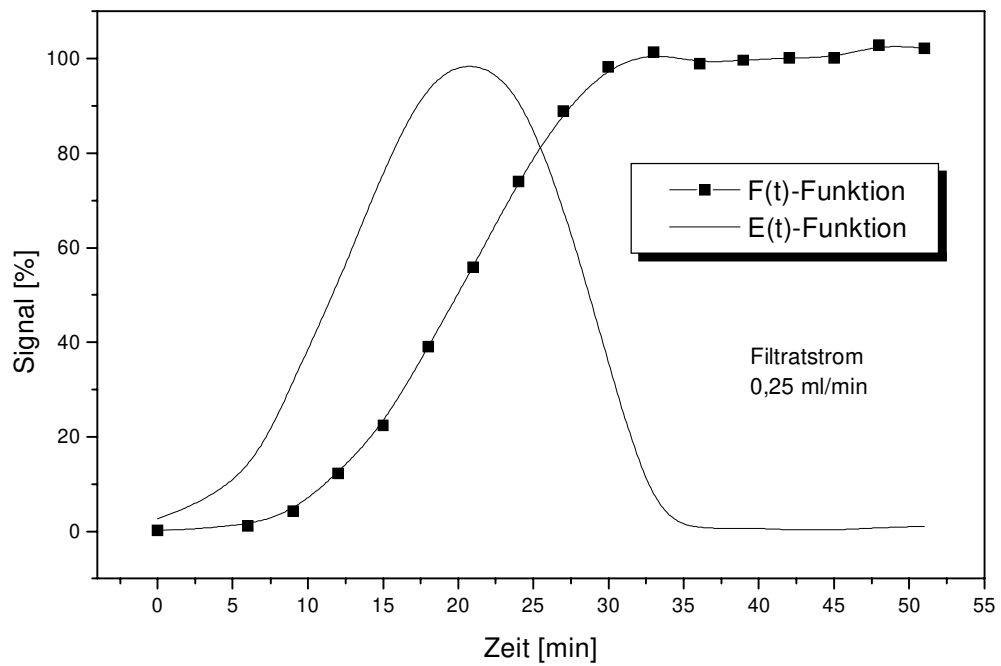


Abb. 3: F(t)- und daraus berechnete E(t)-Funktion für das Analysesystem aus Probenahme-
modul und FIA bei einem Filtratstrom von 0,25 ml/min

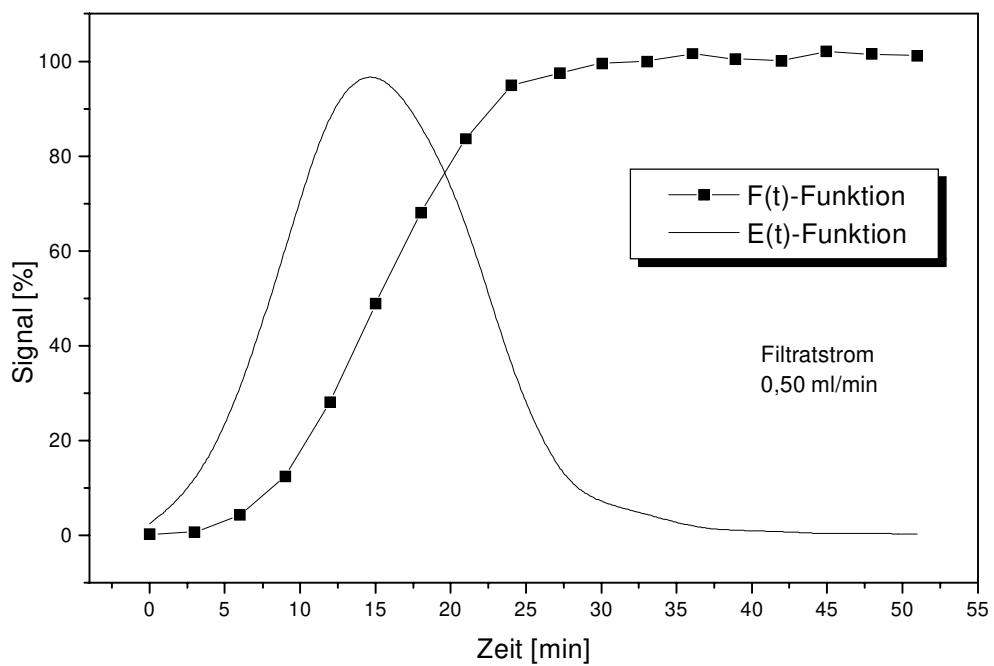


Abb. 4: F(t)- und daraus berechnete E(t)-Funktion für das Analysesystem aus Probenahme-
modul und FIA bei einem Filtratstrom von 0,50 ml/min

Durch graphische Auswertung der $F(t)$ -Kurven lassen sich die Totzeiten ermitteln. Dazu wird die Tangente durch den Wendepunkt der jeweiligen $F(t)$ -Funktion bestimmt und der Schnittpunkt mit der Zeitachse ermittelt. Es ergibt sich eine Totzeit von 11 min bei einer Flußrate von 0,25 ml/min und eine Totzeit von 6 min bei einer Flußrate von 0,5 ml/min.

Diese gewählten Flußraten liegen weit unterhalb der maximalen Flußrate. Obwohl laut Hersteller Pumpraten bis 1,5 ml/min zulässig sind, muß in der Praxis bei kleinen Reaktorvolumina mit viel kleineren Pumpraten im Bereich von 0,25 bis 0,5 ml/min gearbeitet werden, um den Verlust an Reaktormedium zu minimieren. In den verwendeten Systemen mit 2 bis 3 Liter Fassungsvermögen würde eine Pumprate von 1,5 ml/min bereits nach einer Kultivierungsdauer von 10 h zu einem Verlust von fast einem Liter führen. Bei geringen Probenströmen ergeben sich allerdings hohe Totzeiten von 6 min bei 0,5 ml/min und von 11 min bei 0,25 ml/min. In der folgenden Tabelle 3 sieht man die aus den Abbildungen 3 und 4 erhältlichen Kennwerte und einen Vergleich mit Literaturdaten [42]. Die Literaturwerte stammen aus einer konduktometrischen Messung. Es hat sich in Vorversuchen gezeigt, daß eine Glucosemessung und eine konduktometrische Messung zu den selben Ergebnissen führen. Nur für hochmolekulare Mediumkomponenten (z. B. Antikörper und Proteine) sind Abweichungen vorhanden [43].

Tab. 3: Verweilzeitverhalten des ESIP Probenahmemoduls bei verschiedenen Pumpraten; die Werte bei einem Volumenstrom von 1,47 ml/min wurden in einer konduktometrischen Messung ermittelt [42]

Volumenstrom	0,25 ml/min	0,50 ml/min	1,47 ml/min (aus [42])
Totzeit t_{tot}	11 min	6 min	1,5 min
90 % des Signals nach:	27 min	22 min	5 min
99 % des Signals nach:	30 min	27 min	8 min

Große Auswirkungen auf das Verweilzeitverhalten der Probenahmemodule hat auch das Alter der Membranen. Die bislang ermittelten Werte beziehen sich auf neue und frisch mit 70 % Isopropanol hydrophilisierte Membranen. Ein Wiedereinsatz einer Membran nach zwölfstündiger Kultivierungszeit ist nur nach Reinigung mit 0,5 M NaOH und nur maximal drei- bis fünfmal möglich [41]. Hier werden vor allem Proteine entfernt, die die Poren verstopfen könnten. Zum Vergleich alter und neuer Membranen wird eine Glucosemessung durch eine frisch hydrophilisierte neue Membran und anschließend durch eine zehnmal

eingesetzte und gereinigte Membran (insgesamt ca. 120 h in Hefekultivierungen) durchgeführt.

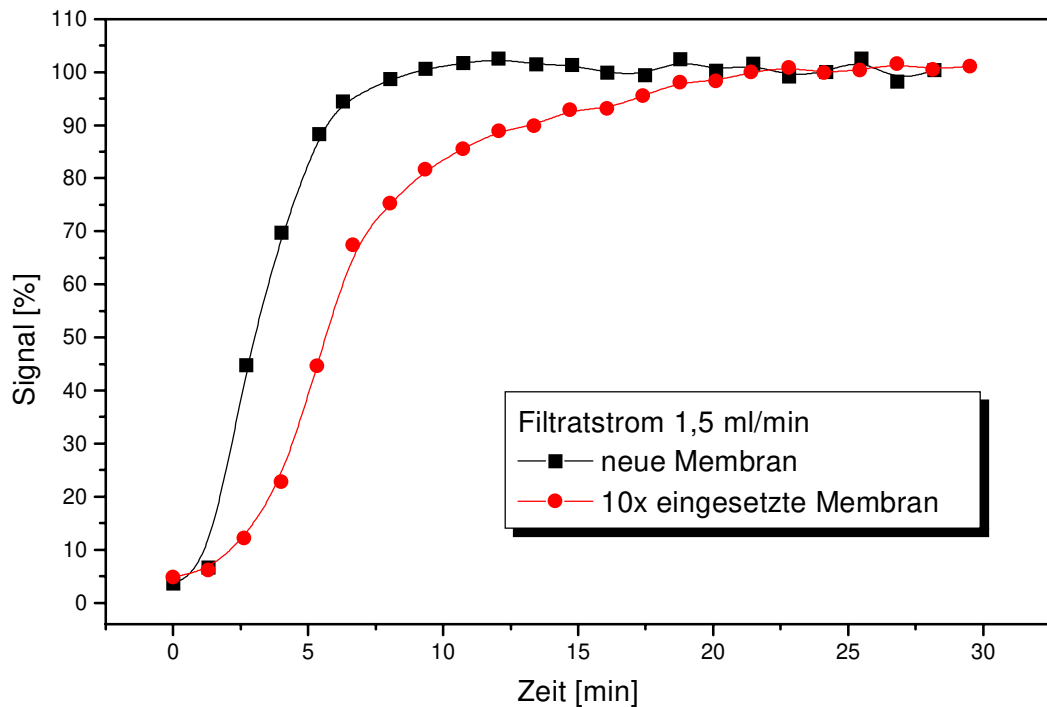


Abb. 5: Bestimmung der $F(t)$ -Funktion mit einer neuen Polypropylen-Membran und einer zehnmal in Kultivierungen genutzten Membran

Die Auswertung der in der Abbildung 5 gezeigten Graphen ergeben Totzeiten von 1,5 min bzw. 2 min und Verzögerungszeiten von 8 min bzw. 20 min. Die Verzögerungszeit der neuen Membran entspricht dem in der Literatur [42] angegebenen Wert. Eine Erhöhung der Verzögerungs- und Totzeit wird in kleinerem Maße auch im Verlauf einer Regelung eintreten. Um die Regelung dennoch stabil zu halten, wird die Robustheit der Regelparameter eine wichtige Rolle spielen (siehe Kapitel 6).

Für den erfolgreichen Einsatz des Probenahmemoduls ist auch die Platzierung im Reaktor sehr wichtig. Kann das Medium ungehindert an der Membran vorbeiströmen, spült es sie frei und verhindert eine Verstopfung der Poren [44].

Zwischen der aktuellen Konzentration im Reaktor und den Meßwerten besteht also je nach eingestelltem Filtrationsfluß, der Platzierung des Probenahmemoduls und Lebensdauer der Polypropylen-Membran eine erhebliche Diskrepanz. In der Literatur [45] wird von fünf Minuten als minimaler Verzögerungszeit moderner Probenahmemodule gesprochen. In der

exponentiellen Wachstumsphase von Hefe-Batchkultivierungen kann eine Verstoffwechslung der Glucose nach wenigen Minuten beendet sein, wohingegen noch immer die Glucose-Ausgangskonzentration gemessen wird. Das Wissen um die jeweiligen Verzögerungszeiten und das Verweilzeitverhalten der Probenahmemodule ist notwendig, um die Meßwerte einzuschätzen und eine höhere Regelgüte zu erzielen. In den eigenen Versuchen wird mit Membranen gearbeitet, die maximal dreimal regeneriert wurden. Außerdem wird bei einem Filtrationsstrom von 0,25 ml/min von einer Verzögerungszeit von 30 min und einer Totzeit von 11 min ausgegangen. Es werden in den Kapiteln 3.2 und 3.4 alternative Entwicklungen zu herkömmlichen FIA-Systemen beschrieben, die geringere Verzögerungszeiten aufweisen.

2.1 Auswirkung der Verzögerungszeit auf Regelungen

Die Simulation einer PID-Regelung der Substratkonzentration bei einem Verdünnungsexperiment zeigt, welche Auswirkung eine zu niedrige Einschätzung der Verzögerungszeit haben kann. Den Aufbau des Reaktors zeigt die Abbildung 6, die Parameter sind in der Tabelle 4 angegeben.

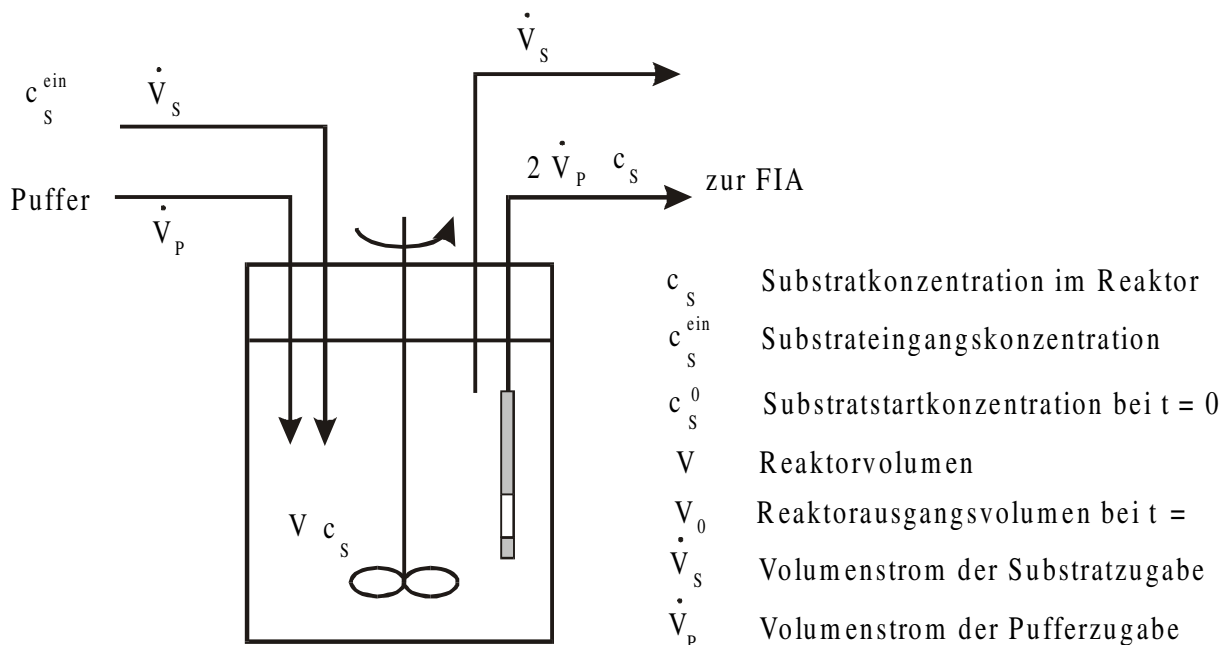


Abb. 6: Gerätebild eines Rührkesselreaktors zur Simulation einer PID-Regelung der Substratkonzentration; Parameter in Tabelle 4

Tab. 4: Parameter zur Simulation einer PID-Regelung der Substratkonzentration innerhalb eines Rührkesselreaktors

Konzentrationen	$c_S, c_S^0 = 0, c_S^{\text{ein}} = 16 \text{ g/l}$
Volumenströme	$\dot{V}_P = 1 \text{ ml/min}, \text{ Regelgröße } \dot{V}_S$
Reaktorvolumen	$V \text{ variabel}, V_0 = 400 \text{ ml}$
Meßzyklusdauer	5 min
Verzögerungszeit	5 min (Simulation 1), 30 min (Simulation 2)

Der Versuchsaufbau besteht aus einem CSTR mit substratfreiem KPP-Puffer. Es wird mit dem Volumenstrom \dot{V}_P kontinuierlich Puffer zugeführt. Zusätzlich kann eine Substratlösung von 16 g/l Substrat zugegeben werden. Die Pumprate wird dabei von einem PID-Regler eingestellt. Das Reaktorvolumen V ist zeitlich variabel. Die allgemeine Gleichung für die Änderung der Substratkonzentration im Reaktor kann wie folgt hergeleitet werden:

$$\frac{d(c_S V)}{dt} = c_S \frac{dV}{dt} + V \frac{dc_S}{dt} \quad (1)$$

$$\frac{d(c_S V)}{dt} = \dot{V}_S c_S^{\text{ein}} \frac{V}{V_0} - \left(2\dot{V}_P + \dot{V}_S \frac{V}{V_0} \right) c_S = c_S \frac{dV}{dt} + V \frac{dc_S}{dt} \quad (2)$$

$$\Rightarrow \frac{dc_S}{dt} = \frac{1}{V} \left[\dot{V}_S c_S^{\text{ein}} \frac{V}{V_0} - \left(2\dot{V}_P + \dot{V}_S \frac{V}{V_0} \right) c_S \right] - \frac{c_S}{V} \frac{dV}{dt} \quad (3)$$

Die Änderung des Volumens läßt sich berechnen, wenn man eine Addition aller Volumenströme durchführt:

$$\frac{dV}{dt} = \left(\dot{V}_P + \dot{V}_S \right) - \left(2\dot{V}_P + \dot{V}_S \right) \quad (4)$$

$$\Rightarrow \frac{dV}{dt} = -\dot{V}_P \quad (5)$$

Die Lösung der Differentialgleichungen (3) und (5) für den Fall eines unregulierten Systems mit den Anfangsbedingungen $V(t=0) = V_0$ und $c_S(t=0) = c_S^0$ lautet:

$$\frac{dc_S}{dt} = \frac{1}{V} \left[-2 \dot{V}_P c_S \right] - \frac{c_S}{V} \frac{dV}{dt} \quad (6)$$

$$\frac{dc_S}{dt} = \frac{1}{V} \left[-2 \dot{V}_P c_S \right] + \frac{c_S}{V} \dot{V}_P = -\frac{1}{V} \dot{V}_P c_S \quad (7)$$

Mit $V(t) = V_0 - \dot{V}_P t$ ergibt sich nach Trennung der Variablen und Integration:

$$\int_{c_S^0}^{c_S} \frac{dc_S}{c_S} = - \int_0^t \frac{\dot{V}_P}{V_0 - \dot{V}_P t} dt \quad (8)$$

$$\Rightarrow c_S = c_S^0 \left(1 - \frac{\dot{V}_P}{V_0} t \right) \quad (9)$$

Im unregulierten Fall nimmt die Substratkonzentration linear mit der Zeit ab. Im Fall einer Regelung läßt sich die Gleichung (3) nicht mehr allgemein lösen.

Zur Regelung wird alle fünf Minuten die Substratkonzentration bestimmt. Es wird eine Verzögerungszeit von fünf Minuten angenommen und die Regelparameter auf diesen Wert optimiert. Verschiedene Regelungen auf mehrere Sollwerte werden simuliert. Bereits nach 25 min wird der Sollwert erreicht und die maximale Schwankung beträgt 0,1 g/l (siehe Abbildung 7). Die Abbildung 8 zeigt die Simulation mit einer Verzögerungszeit von 30 min. Die für das erste Experiment optimierten PID-Parameter führen zu Überschwingungen bis zu 0,6 g/l über dem Sollwert und langen Einschwingzeiten. Obwohl die aktuelle Konzentration im Reaktor bereits genügend hoch ist, wird dieser Wert erst nach der Verzögerungszeit gemessen. Erst dann wird die Zufütterung gestoppt.

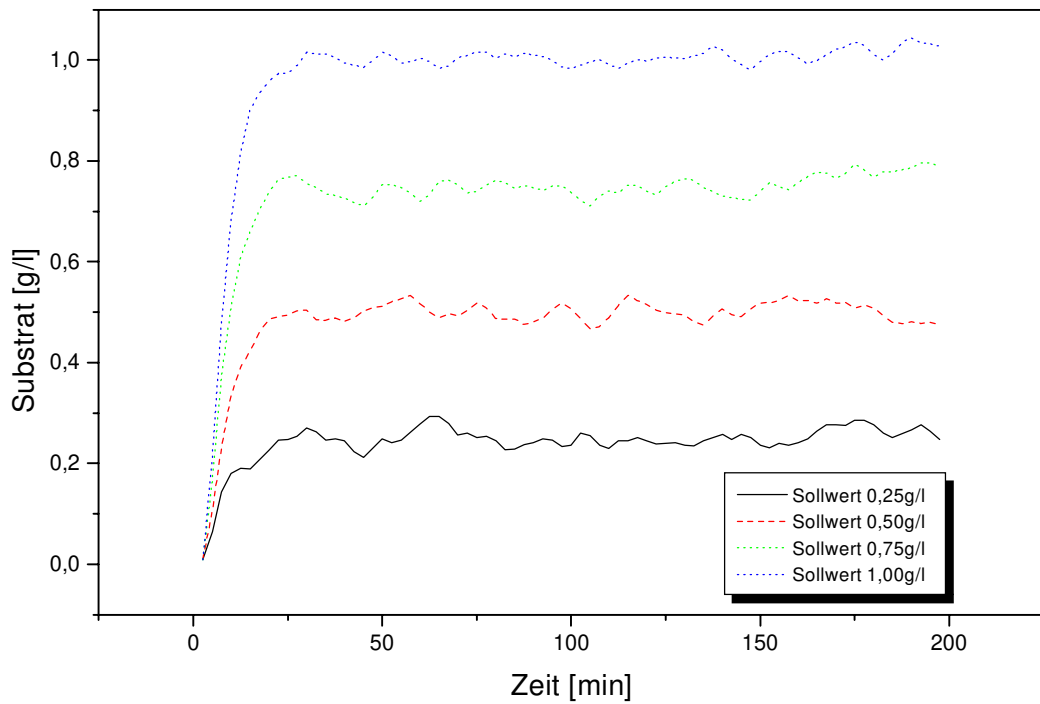


Abb. 7: Vier simulierte Regelungen auf 0,25 bis 1,00 g/l Substrat mit einem für dieses Regelungsproblem optimierten PID-Regler (Verzögerungszeit 5 min)

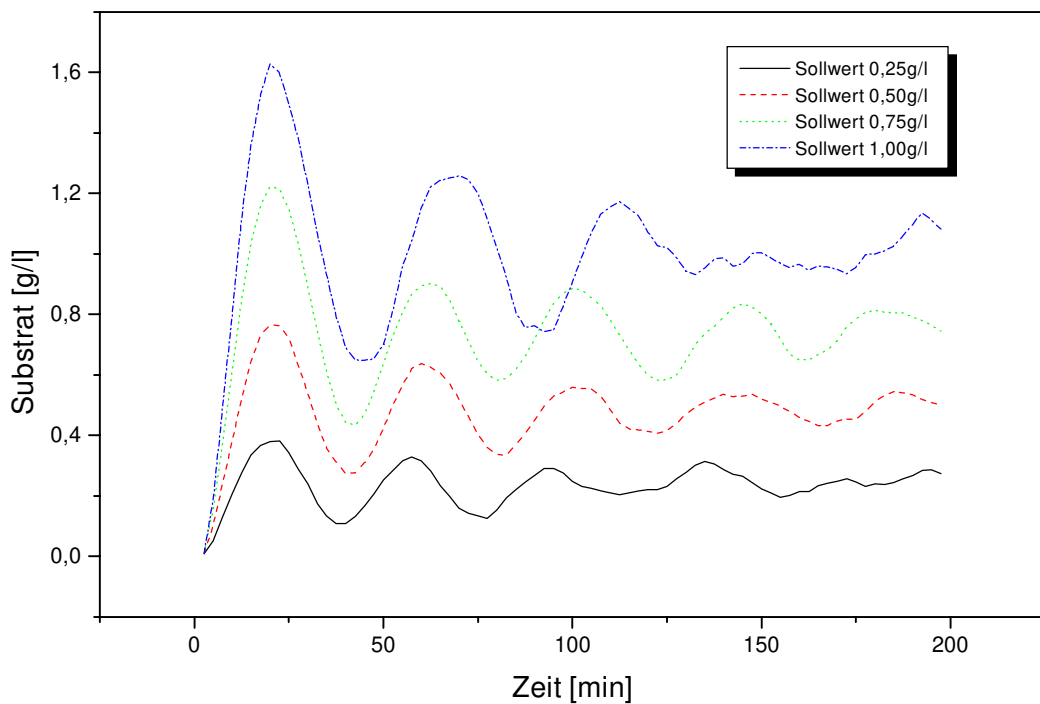


Abb. 8: Vier simulierte Regelungen auf 0,25 bis 1,00 g/l Substrat mit dem oben genannten PID-Regler (Verzögerungszeit 30 min)

3 Entwicklung der Online-Analytik

Bisher wurde die Regelung von Kultivierungen nur als Simulation durchgeführt. Die Aufgabe ist nun, zeitlich wiederkehrende aktuelle Informationen über reale Systeme zu erlangen. In Verbindung mit Probenahmemodulen ist eine Online-Analytik von Bioprozessen möglich. Es werden im folgenden die Fließinjektionsanalyse (FIA) und die Air Segmented Continuous Flow-Analytik (ASCF-Analytik) in Kombination mit Bio- und Chemosensoren vorgestellt. Diese Verfahren wurden einer heute möglichen Online-HPLC-Analytik [3] vorgezogen, da sie einfacher handhabbar sind und höhere Analysenfrequenzen ermöglichen.

Im Hinblick auf eine Bioprozeßregelung müssen die Sensoren eine hohe Stabilität und Robustheit über Zeiträume von Stunden oder Tagen aufweisen. Es ist neben der Verwendung von Biosensoren auch der Einsatz von relativ stabileren Chemosensoren möglich (z.B. zur Messung von Ammonium). Hohe Analysenfrequenzen und geringe Querempfindlichkeiten sind weitere wichtige Auswahlkriterien bei der Wahl von Sensorsystem zur Bioprozeßkontrolle. Für industrielle Anwendungen sind ebenfalls die Analysekosten zur Entscheidung heranzuziehen, weswegen auf teure Reagenzien (z.B. Cofaktoren für Enzyme) verzichtet wurde.

3.1 Fließinjektionsanalysen-Systeme

Die Fließinjektionsanalyse (FIA) hat im Prinzip ein hohes Potential, die Standardmethode für die Überwachung und Regelung von Bioprozessen zu werden [30]. Ihre Hauptvorteile sind die Automatisierbarkeit, der einfache Aufbau und die kurzen Analysenzeiten (bis zu 240 h^{-1}). Die Probenvolumina liegen im Bereich von 20-200 μl . Das einfachste denkbare FIA-System besteht aus einer Pumpe, die kontinuierlich einen Trägerstrom durch einen Detektor transportiert, und einer Injektionseinheit, die ein bestimmtes Volumen der Probenlösung zu definierten Zeiten in den Trägerstrom injiziert [5]. Der Trägerstrom transportiert somit das Probensegment zum Detektor. Die Abbildung 9 zeigt den Aufbau eines FIA-Systems.

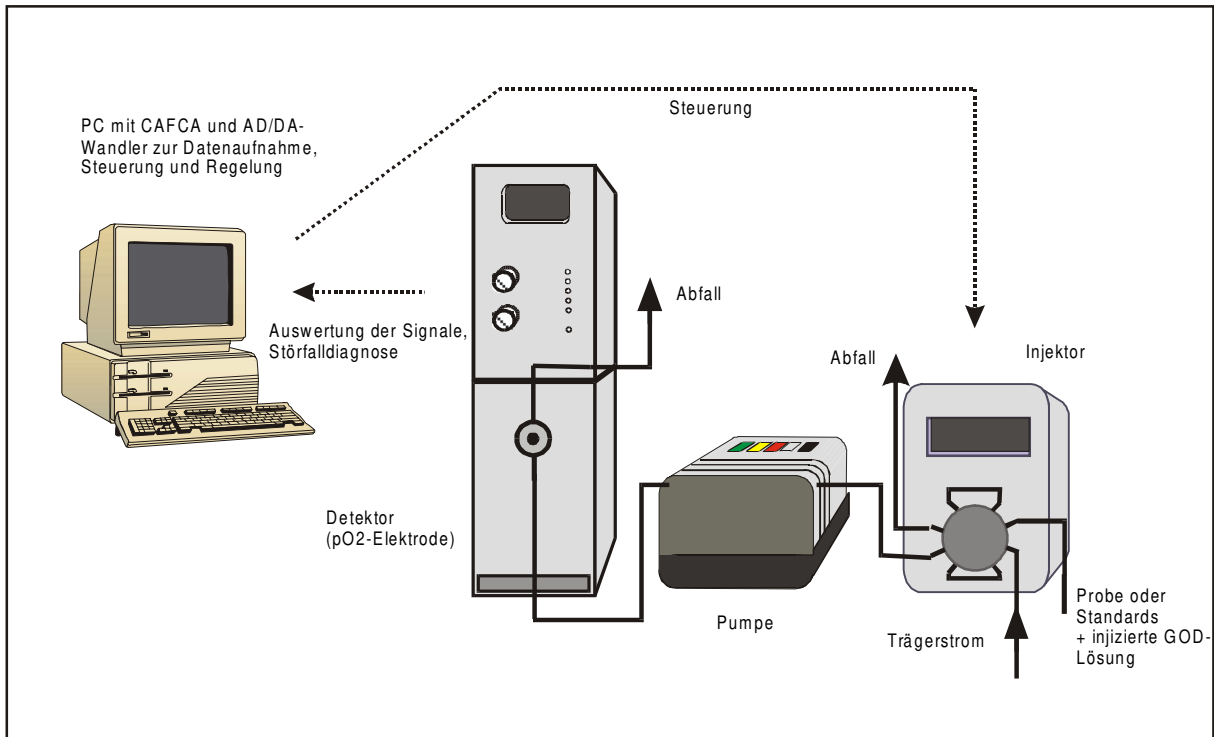


Abb. 9: Aufbau einer FIA-Anlage

In Verbindung mit Probenahmemodulen (siehe Kapitel 2) ist somit eine Online-Analytik möglich, die Voraussetzung für eine Bioprozeßregelung ist. Jedoch wurde bis zur Mitte der 90er Jahre die FIA nur in wenigen Fällen tatsächlich zur Regelung eingesetzt [30]. Es gab zwei Hauptgründe für diese langsame Entwicklung. Zum einen die (vermeintlich) fehlende Verlässlichkeit eines FIA-Systems [46] und zum anderen die damals noch bestehende schwierige Automatisierbarkeit. Dies änderte sich, nachdem mehrere Automatisierungs- und Auswertungsprogramme [47-49] und eigene Programmiersprachen wie LabVIEW (National Instruments, USA) erhältlich waren. Das von Hitzmann et al. entwickelte Steuerungsprogramm CAFCA (Computer Assisted Flow Control & Analysis) erlaubt die Steuerung und Automatisierung von FIA-Modulen und besitzt desweiteren ein Expertensystem zur Auswertung der Meßsignale und zur Fehlererkennung [50-51]. Verschiedene Regelalgorithmen wurden im Laufe dieser Arbeit implementiert. Damit sind die Voraussetzungen für eine automatisierte Prozeßregelung gegeben. Im folgenden sind die Materialien und Komponenten, die zum Aufbau der verschiedenen FIA-Anlagen verwendet wurden, aufgelistet (siehe Tabelle 5):

Tab. 5: Materialien und Komponenten der verwendeten FIA-Systeme

Trägerstrompumpen:	Ismatec IPS-4 und IPS-8
Probenpumpen:	Ismatec IPN-4 EVA Pumpe, Eppendorf, Netheler & Hinz GmbH, Hamburg
Injektoren:	EVA Injektor, Eppendorf, Netheler & Hinz GmbH, Hamburg Knauer Injektionsmodul
Selektoren:	EVA 8-Kanal-Selektor, Eppendorf, Netheler & Hinz GmbH, Hamburg Knauer 6-Kanal-Selektormodul
Probeschläuche:	Teflonschläuche mit 0,5 mm Innendurchmesser
Komplett-FIA:	Trace Analysensysteme GmbH, Braunschweig
Ansteuerung:	CAFCA 3.0 über TTL-Impulse (PCL-818) oder Relaissteuerung (PCL-725)
Datenerfassung:	
AD-Wandler:	PCL-818
Rechner:	PC mit 486 DX2-66 CPU
Software:	CAFCA 3.0

3.2 Modifiziertes FIA-System

Ein Nachteil der in Kapitel 3.1 beschriebenen FIA-Systeme sind die weiten Distanzen zwischen Reaktor und Detektor und die damit verbundene beträchtliche Erhöhung der Totzeit. Im Hinblick auf eine Bioprozeßregelung ist eine möglichst hohe Aktualität der Analysenwerte zu erreichen. Wie bereits beschrieben wird bei einem Probenstrom von 0,25 ml/min von einer Totzeit von 11 min und einer Verzögerungszeit von 30 min durch das Probenahmesystem ausgegangen. Je nach Bauart der FIA und verwendeten Schlauchdurchmessern und Flußraten ist mit einer weiteren Erhöhung der Totzeit um bis zu 3 min und einer Erhöhung der Verzögerungszeit um 7 min zu rechnen. Ebenso steigt mit zunehmender Schlauchlänge und -durchmesser die Dispersion und die Sensitivität nimmt ab. Zur Bioprozeßregelung wäre es von Vorteil, ein FIA-System möglichst nahe am Reaktor zu plazieren, um die Aktualität der Meßwerte zu gewährleisten. Ein direktes Einsetzen des FIA-Systems in den Bioreaktor ist wegen einer schlecht zu realisierenden Sterilisierung und mangelnder Wartungsmöglichkeiten

nicht möglich. Es wurde statt dessen versucht, die Wege zwischen Probenahmemodul und Detektor so kurz wie möglich zu halten.

Die Tabelle 6 zeigt die verwendeten Komponenten des modifizierten FIA-Systems:

Tab. 6: Materialien und Komponenten des modifizierten FIA-Systems

Pumpe:	EVA Pumpe mit Kupplung, Eppendorf, Netheler & Hinz GmbH, Hamburg
Injektoren:	zwei Dreiwege-Ventile, Lee Hydraulische Miniaturkomponenten GmbH Frankfurt, internes Volumen 100 μ l
Detektor:	Enzymkartusche/ Sauerstoffelektrode (Anasyscon, Hannover)
Probeschläuche:	Teflonschläuche mit 0,5 mm Innendurchmesser
Ansteuerung:	CAFCA 3.0 über TTL-Impulse (EVA-Pumpe) und PCL-725-Relaissteuerung (Lee-Ventile)
Datenerfassung:	
AD-Wandler:	PCL-818
Rechner:	PC mit 486 DX2-66 CPU
Software:	CAFCA 3.0

Den prinzipiellen Aufbau des modifizierten FIA-Systems zeigt die folgende Abbildung 10:

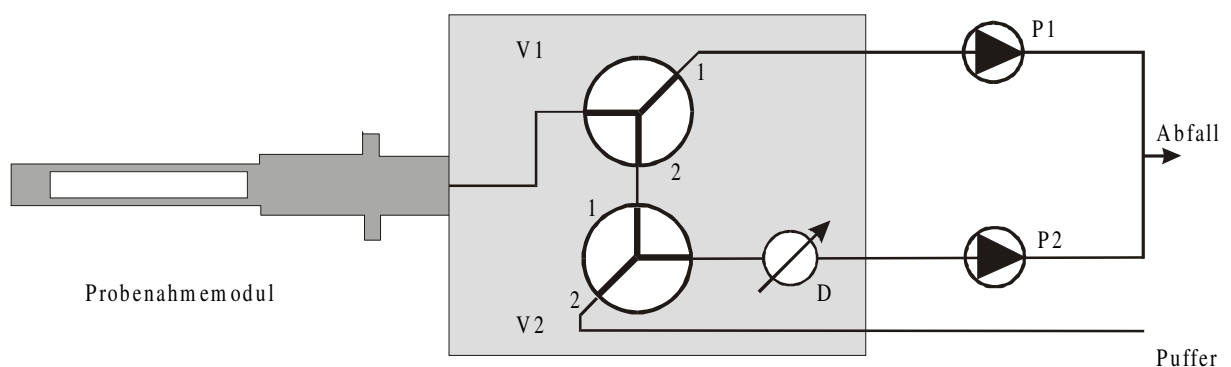


Abb. 10: Prinzipieller Aufbau des modifizierten FIA-Systems; Pumpen P1 und P2, Lee-Ventile V1 und V2 (mit Schaltstellungen 1 und 2), Detektor D (Kartusche/ Sauerstoffelektrode); Injektion: V1 in Stellung 2, V2 in Stellung 1; Spülen: V1 in Stellung 1, V2 in Stellung 2



Abb. 11: Kombination aus ESIP Probenahmemodul und dem modifizierten FIA-System zum Einbau in einen Braun Biostat M Bioreaktor; Gesamtlänge ca. 40 cm

Mit dem modifizierten System ist es möglich, bei einer Flußrate von 0,25 ml/min die Totzeit der FIA (ohne Probenahmemodul) auf unter 1 min (bisher 3 min) und die Verzögerungszeit auf 2 min (bisher 7 min) zu senken. Das modifizierte FIA-System ist im Vergleich zu herkömmlichen FIA-Anlagen preislich günstiger, da der Injektor durch Lee-Ventile ersetzt wurde. Zwar bieten die Lee-Ventile eine Lebensdauer von 200 Millionen Schaltzyklen [52], aber eine gründliche Reinigung ist bereits nach 20 h Kultivierungszeit notwendig. Es müssen weiterhin gut hydrophilisierte PE-Membranen verwendet werden, da sonst der Druckabfall hinter dem Probenahmemodul die Funktionsfähigkeit der Lee-Ventile beeinträchtigt und Leckagen auftreten können. Die ausführbaren Probenströme liegen im Bereich von 0,1 bis 0,7 ml/min; höhere Flußraten führen zu einer verstärkten Belegung des Probenahmemoduls und zu ungünstigen Druckverhältnissen in den Lee-Ventilen. Bei nicht kontinuierlich durchströmten Ventilen ist weiterhin für eine Kühlung (z.B. durch Kühlrippen) zu sorgen, da die Ventile sich bis zu 35 °C erwärmen können. Im Versuchsaufbau wurde auf kontinuierliche Durchströmung geachtet, wodurch keine Temperatursprünge auftraten.

Die folgende Abbildung 12 demonstriert die Einsatzfähigkeit des Systems über 60 h. Es wurden zur Bestimmung des Fehlerbereichs vier verschiedene Glucosestandards vermessen

(Detektion über Enzymkartusche und Sauerstoffelektrode, siehe Kapitel 4.2.1). Die Standardabweichungen liegen im für FIA-Anlagen typischen Bereich von 2,8 - 4,6 %.

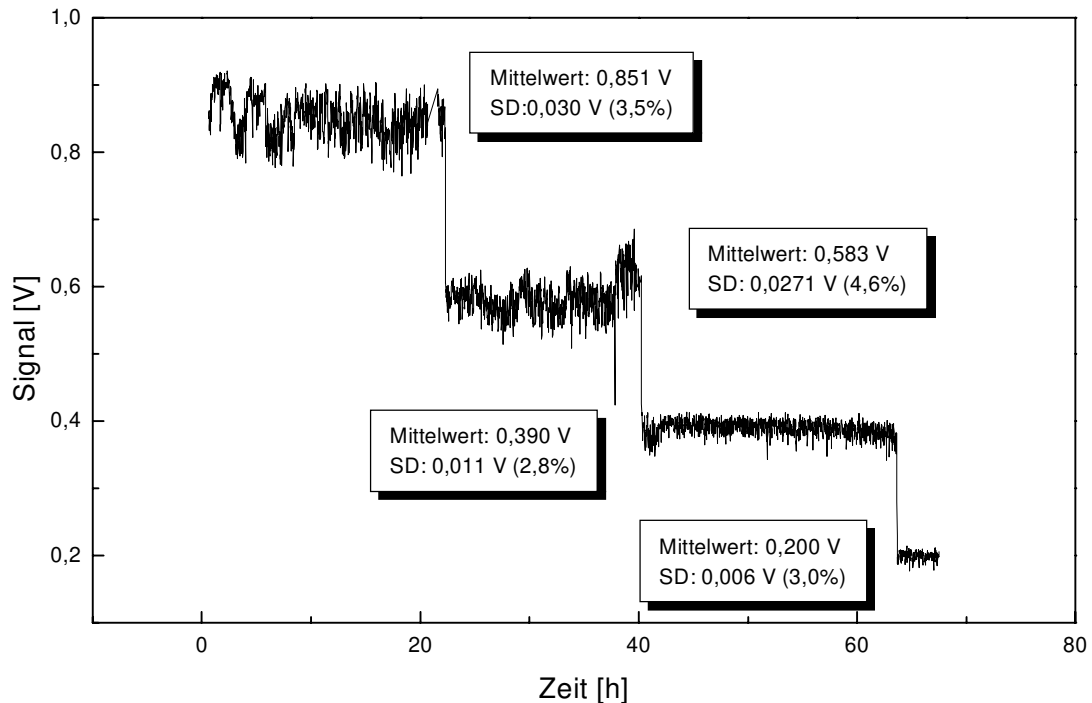


Abb. 12: Messung von Glucosestandards (0,8 g/l; 0,6 g/l; 0,4 g/l; 0,2 g/l) mit dem modifizierten FIA-System; Detektion mit Enzymkartusche/ Sauerstoffelektrode (siehe Kapitel 4.2.1), Injektionszeit 7 s, Analysenfrequenz 60 h⁻¹

Das modifizierte FIA-System ist im Hinblick auf eine Bioprozeßregelung gut anwendbar, da die Regelanforderungen durch die geringen Tot- und Verzögerungszeiten relativ gering gehalten werden. Es bietet durch die platzsparende, kompakte Bauweise und den einfachen Aufbau eine Alternative zu herkömmlichen FIA-Anlagen.

3.3 Air Segmented Continuous Flow-System

Die Air Segmented Continuous Flow-Methode (ASCF) ist ein Verfahren, bei dem die Probe und Reagenzien dem Detektor kontinuierlich zugesetzt werden. Die Mischung und Umsetzung erfolgt in langen dünnen Spiralen (Manifolds). Durch Begasung ergeben sich alternierende Segmente von Flüssigkeit und Gas. Die Luftsegmente haben die Aufgabe, die Vermischung der Reagenzien und der Probe innerhalb eines Segments zu verbessern und die Schläuche vor Ablagerungen zu schützen. Außerdem verhindern sie die Rückvermischung der

einzelnen Flüssigkeitssegmente untereinander. Zur Detektion eignen sich alle druckunabhängigen Meßgeräte wie z.B. optische Sensoren.

Der Aufbau des ASCF-Systems wird anhand eines Beispiels in Kapitel 4.3 beschrieben.

3.4 Fließinjektionsanalytik ohne Probenahmemodul

Eine Möglichkeit, die hohen Tot- und Verzögerungszeiten der Probenahmemodule zu umgehen, ist die Verwendung eines FIA-Systems ohne Probenahmemodul [45]. Sie ist zur Glucosebestimmung einsetzbar, wobei GOD-Lösung in den Trägerstrom injiziert und mit der Probe vermischt wird. Der verbrauchte Sauerstoff bei der Reaktion mit Glucose wird über eine Clark-Elektrode detektiert (siehe Kapitel 4.2.1). Im Gegensatz zu einer zellfreien Messung sind die Proben weiterhin mit lebenden Zellen versetzt. Die durch die Zellen verursachte Sauerstoffabnahme wird zyklisch gemessen und bei der Quantifizierung der Glucosekonzentration mit berücksichtigt.

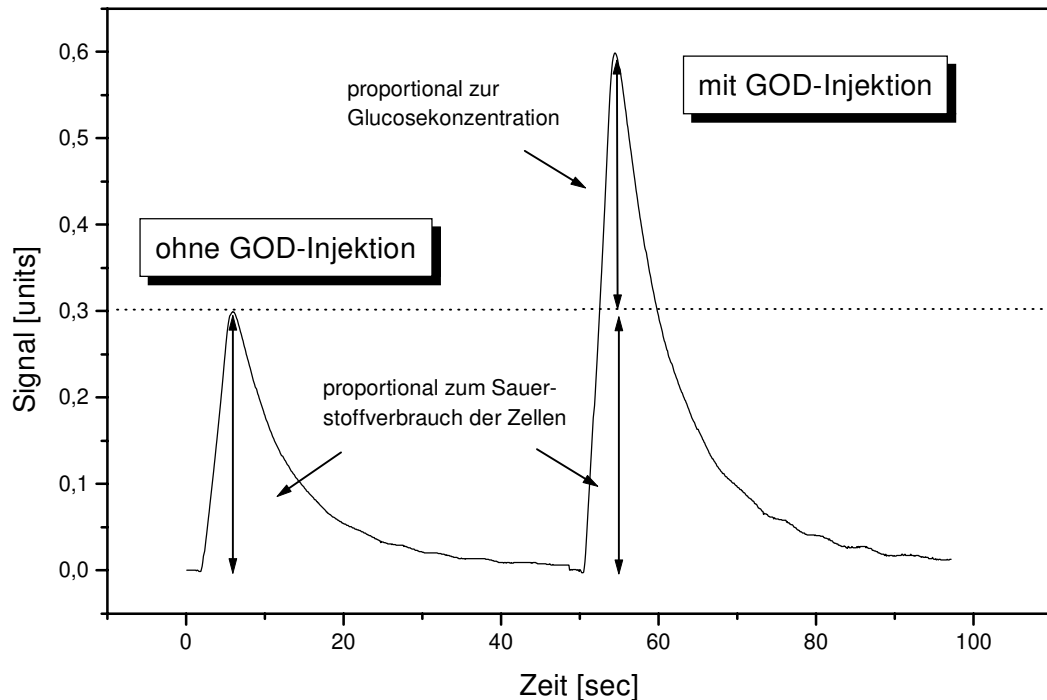


Abb. 13: Zwei Beispiele von FIA-Signalen mit und ohne Injektion von GOD-Lösung [45]

Die Verzögerungszeit dieses Meßsystems beträgt nur 47 Sekunden [45]. Ein Meßzyklus dauert 45-60 Sekunden. Auf diese Weise können somit in kurzer Zeit aktuelle Informationen über die Glucosekonzentration gewonnen werden.

4 Analytik mit Chemo- und Biosensoren

Die in Kapitel 3 besprochenen Online-Analyseverfahren können mit geeigneten Chemo- und Biosensoren zur Messung der Kohlenstoff- und Stickstoffquellen in Kultivierungen eingesetzt werden. Im folgenden werden die Sensoren zur Messung der Substratkonzentrationen von Glucose und Ammonium vorgestellt.

4.1 Ammoniumanalytik

4.1.1 Ammoniak elektrode

Als primäre Stickstoffquelle in Kultivierungen werden Ammoniumverbindungen eingesetzt. Stand der Technik ist die Messung von Ammonium/Ammoniak mit Ammoniak elektroden. Dabei diffundiert Ammoniak durch gaspermeable Membranen in einen Bezugselektrolyten. Dessen pH-Erhöhung wird mit einer pH-Elektrode erfaßt. Zum Einsatz einer solchen Elektrode in einem FIA-System wurde eine Durchflußzelle konzipiert [53]. Als Detektor dient eine gassensitive Ammoniak elektrode von Orion (NH₃ 9512 mit pH 531-Meßgerät [54]). Die Trägerflüssigkeit im FIA-System bildet 0,1 M NaOH, das in einer Reaktionsstrecke mit der injizierten Probe vermischt wird. Das Gleichgewicht NH₄⁺/NH₃ wird dabei auf die Seite des Ammoniaks verschoben, wodurch die Sensitivität erhöht wird.



Abb. 14: Orion 9512 Ammoniak-
elektrode in einer Durchflußzelle
[53]

Mit der Ammoniak elektrode lassen sich auch geringe Konzentrationen bis 10^{-6} M NH₄⁺ messen, doch ist dieses System im Hinblick auf eine schnelle Analytik wenig geeignet. Bedingt durch das große Volumen des Bezugselektrolyten innerhalb der pH-Elektrode treten

Ansprechzeiten von 5 min und Regenerationszeiten von 5 - 10 min auf. Außerdem wurde in früheren Arbeiten festgestellt, daß die Ansprech- und Regenerationszeiten konzentrationsabhängig sind [53]. In den zu betrachtenden Kultivierungen liegen relativ hohe Konzentrationen um 1 bis 2 g/l NH_4^+ (um 10^{-1} M NH_4^+) vor. Um hohe Analysenfrequenzen zu erhalten, sind die Messungen nur mit vorhergehender Verdünnung möglich. Dadurch entstehen Schwankungen der Meßwerte um bis zu 21 %, weswegen das System für eine Bioprozeßregelung nicht anwendbar ist.

4.1.2 Gasdiffusionszelle/ pH-FET

Um das relativ hohe Eigenvolumen einer pH-Elektrode zu umgehen und gleichzeitig eine Miniaturisierung des Sensors zu erreichen, wurden bereits 1990 von Alegret et al. gaspermeable Membranen in Kombination mit pH-sensitiven Feldeffekttransistoren (pH-FET) anstelle von pH-Elektroden eingesetzt [55]. Der zu der Gruppe der ionensensitiven Feldeffekttransistoren gehörende pH-FET wurde 1970 zum erstenmal von Bergveld [56] erwähnt und ist in der Lage, auf pH-Schwankungen zu reagieren. Seither wurden eine große Anzahl von Biosensoren auf der Basis von enzymatisch modifizierten pH-FET (EnFET) entwickelt. In Kapitel 4.2.2 wird darauf näher eingegangen.

In dem von Alegret entwickelten und von Ulber [57] modifizierten System wird die Probe in einem FIA-System mit 2 M NaOH vermischt und durch eine Gasdiffusionszelle geleitet. Ammonium wird dabei nahezu vollständig in Ammoniak überführt, der durch die gaspermeable Membran diffundiert. Im Gegenstromverfahren wird ein Akzeptorstrom durch

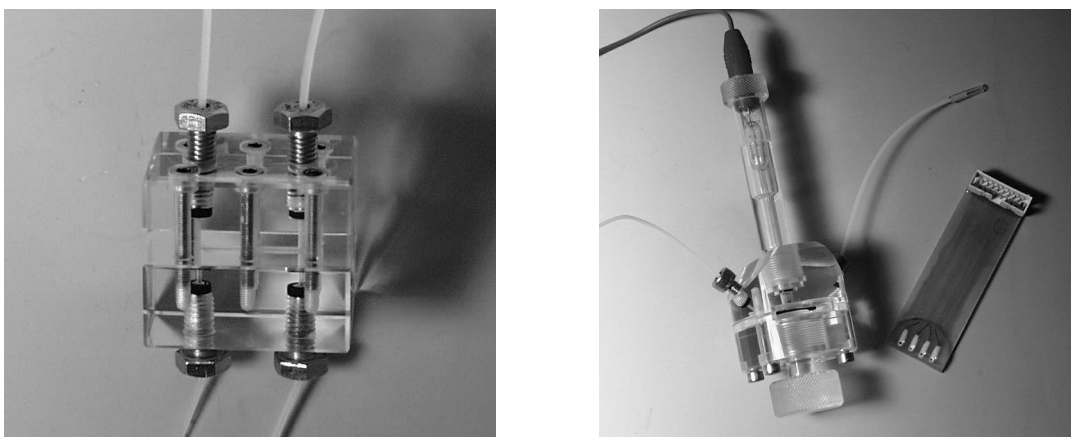


Abb. 15: Gasdiffusionszelle (links) und Durchflußmeßzelle mit ausgebautem 4-Kanal-pH-FET (rechts)

die Gasdiffusionszelle geleitet, der den entstehenden Ammoniak löst und zu einem pH-FET transportiert. Die durch die Lösung von Ammoniak im Akzeptorstrom entstehende pH-Änderung wird detektiert.

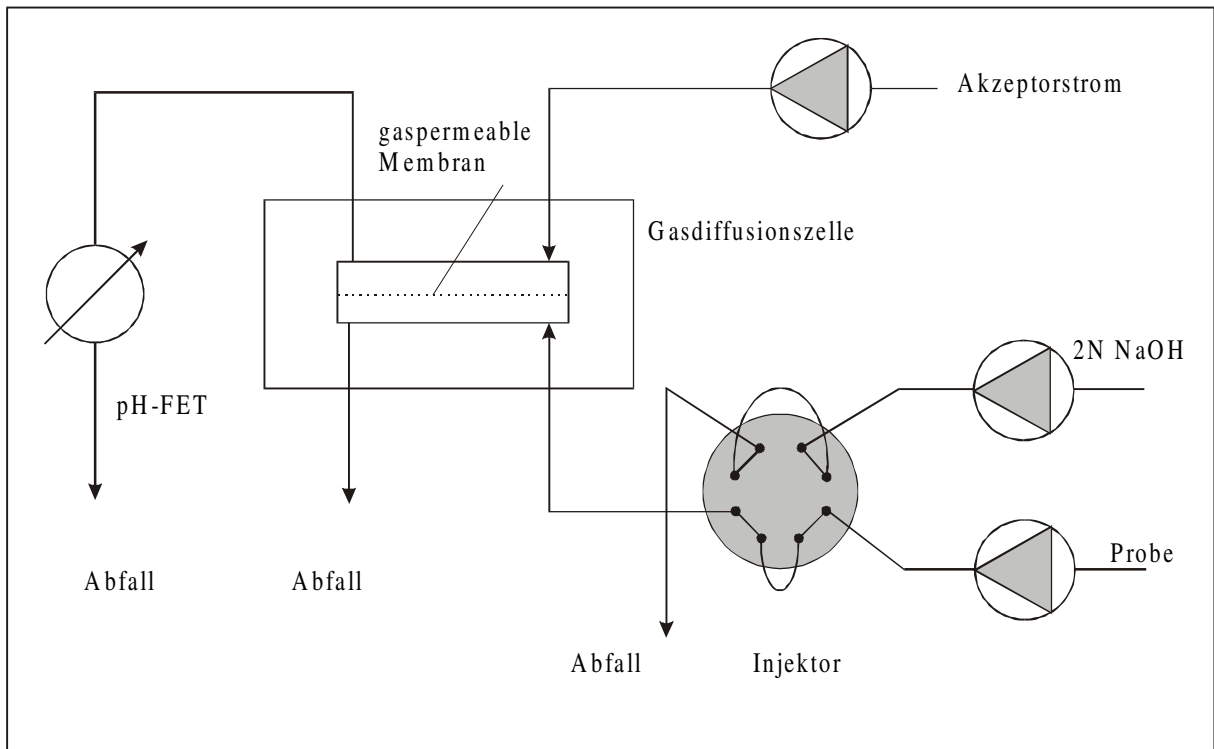


Abb. 16: FIA-System zur Online-Messung von Ammonium (Gasdiffusionszelle/ pH-FET) [57]

Die in der Literatur [57-58] beschriebenen Versuchsbedingungen wurden im Hinblick auf eine Regelung so verändert, daß eine möglichst hohe Analysenfrequenz im Meßbereich von 1 bis 2 g/l NH_4^+ erzielt wird. Die Tabelle 7 zeigt die Meßbedingungen und die Veränderungen zum ursprünglichen System [58]:

Tab. 7: Vergleich zwischen einem in der Literatur beschriebenen FIA-System [57][58] und dem modifizierten FIA-System

	Ursprüngliches FIA-System [57][58]	Modifiziertes FIA-System
Gaspermeable Membran	Polypropylen-Membran mit einem Ausschlußvolumen von 0,1 µm	Polypropylen-Membran mit einem Ausschlußvolumen von 0,1 µm
Injizierte Natronlauge	35 µl 2 M NaOH	35 µl 0,1 M NaOH
Linearer Meßbereich	0,005 bis 0,500 g/l NH ₄ ⁺	0,500 bis 1,500 g/l NH ₄ ⁺
Akzeptorstrom	1 mM Kaliumphosphatpuffer; 0,25 M NaCl; pH 7,5; Volumenstrom = 0,95 ml/min	1 mM Kaliumphosphatpuffer; 0,25 M NaCl; pH 7,5; Volumenstrom = 1,50 ml/min
Fließrichtung Akzeptorstrom/ Probenstrom	Gegenstromverfahren	Gegenstromverfahren
Ansprechzeit des Sensors	35 s	30 s
Analysenzyklus	180 s	120 s
Analysenfrequenz	20 h ⁻¹	30 h ⁻¹
Rel. Standardabweichung	2,1 %	5,3 %

Durch die geringere Konzentration an NaOH und die höhere Flußrate des Akzeptorstroms verschiebt sich der lineare Meßbereich zu höheren Ammoniumkonzentrationen. Die Sensitivität des modifizierten Meßsystems liegt deutlich unter der des ursprünglichen Systems. Durch die geringere Signalthöhe ist es allerdings gelungen, die Ansprech- und Spülzeiten zu reduzieren, so daß eine Erhöhung der Analysenfrequenz um 50 % möglich war. Die Meßgenauigkeit des modifizierten FIA-Systems ist geringer. Die Standardabweichung beträgt 5,3 % (vorher 2,1 %). Für eine Bioprozeßregelung von Ammonium im Bereich von 1-2 g/l NH₄⁺ ist die höhere Analysenrate entscheidend. Eine Probenverdünnung ist für die modifizierte FIA nicht notwendig, hingegen würde eine Verdünnung von 3:1 bei dem ursprünglichen System die Standardabweichung deutlich erhöhen.

4.1.3 Photometrische Analytik mit einer Gasdiffusionszelle

Eine Alternative zu dem in Kapitel 4.1.2 vorgestellten Aufbau mit einem pH-FET ist die Kombination einer photometrischen Detektion der pH-Änderung mit einer Gasdiffusionszelle. Die Probe wird dabei mit 0,1 M NaOH vermischt und durch eine Gasdiffusionszelle geleitet. Ein Akzeptorstrom fließt im Gleichstromverfahren parallel zum Probenstrom und nimmt den durch die gaspermeable Membran diffundierenden Ammoniak auf. Der Akzeptorstrom besteht aus einer hellroten schwach alkalischen Lösung von 0,02 g/l Bromcresolviolett (die Herstellung der Lösung ist im Anhang beschrieben), dessen Farbumschlag nach blau in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 540 nm detektiert wird. Der Aufbau ist in der Abbildung 17 dargestellt:

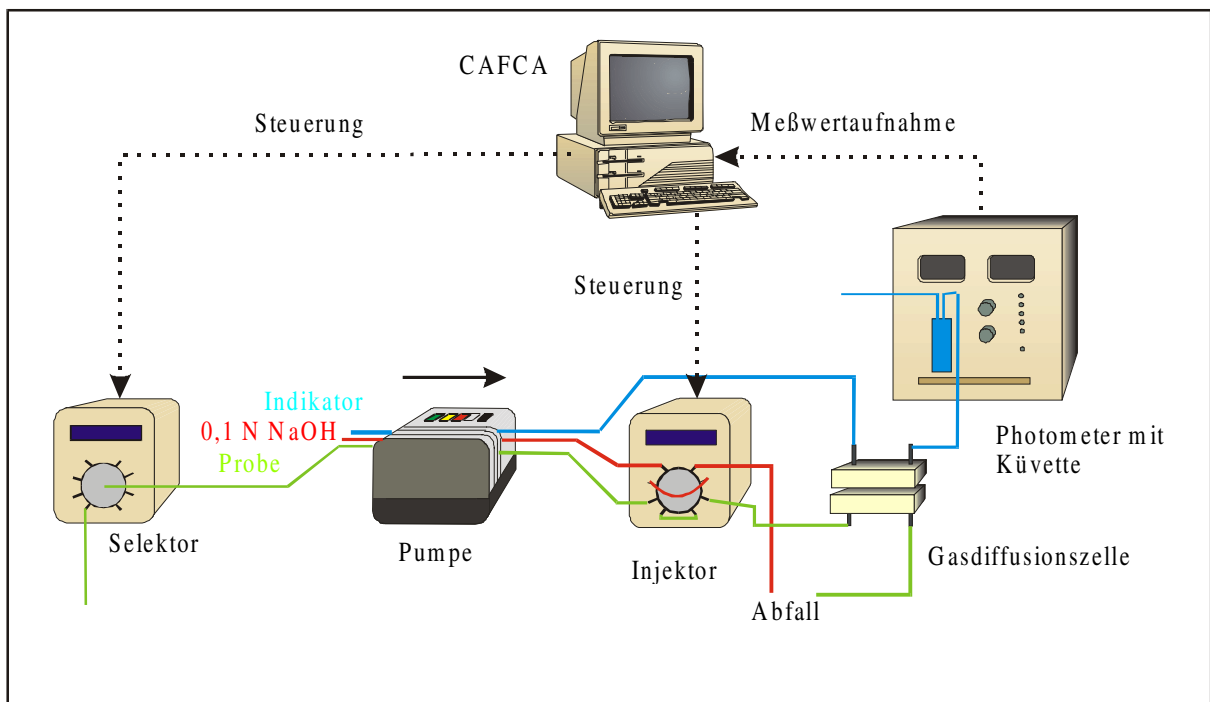


Abb. 17: Prinzipieller Aufbau eines FIA-Systems mit Gasdiffusionszelle zur photometrischen Detektion von Ammonium; als Indikator dient Bromcresolviolett, Detektion bei 540 nm

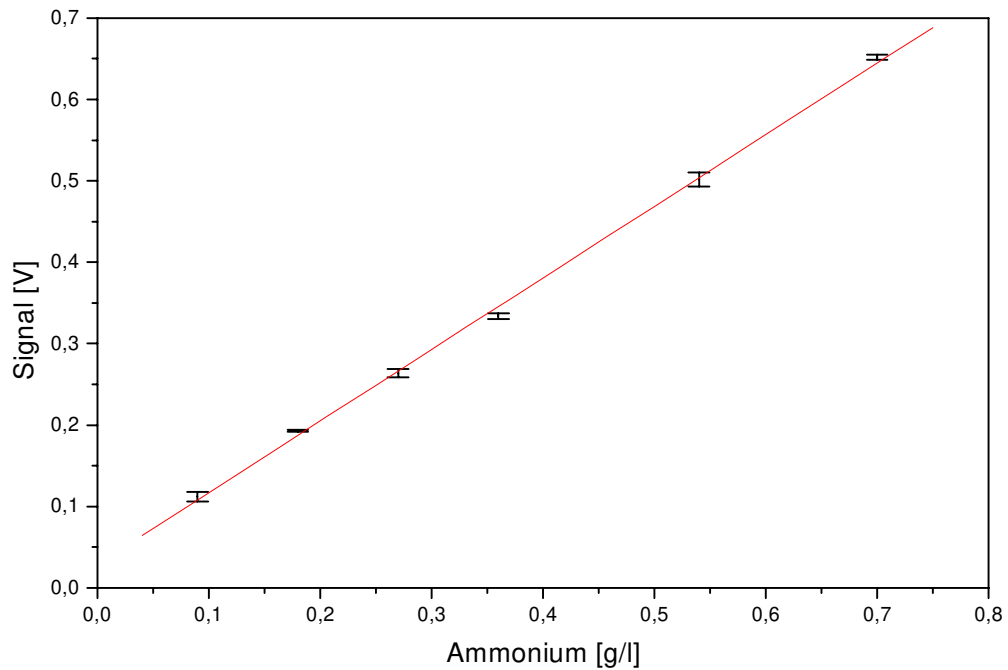


Abb. 18: Kalibration des FIA-Systems mit photometrischer Detektion im Bereich von 0 bis 0,8 g/l NH_4^+ mit fünf Standards (je Fünffachbestimmung); Regressionskoeffizient 0,99939, Standardabweichung 1,1 %, Meßbedingungen in Tabelle 7

Die Kalibration zwischen 0,1 und 0,8 g/l Ammonium zeigt lineares Verhalten, welches ab einer Konzentration von 1,0 g/l in eine Sättigung übergeht. Die Standardabweichung ist im Vergleich zu den bisher vorgestellten Verfahren mit 1,1 % wesentlich niedriger. Wie die Tabelle 8 zeigt, ist außerdem die Analysenfrequenz sehr viel höher:

Tab. 8: Photometrische Detektion von Ammonium

Gaspermeable Membran	Polypropylen-Membran mit einem Ausschlußvolumen von 0,1 μm
Injizierte Natronlauge	20 μl 0,1 N NaOH
Linearer Meßbereich	0 bis 1,00 g/l NH_4^+
Akzeptorstrom	Schwach alkalische Lösung von 0,02 g/l Bromcresolviolett (siehe Anhang); Volumenstrom = 1,0 ml/min
Fließrichtung Akzeptorstrom/ Probenstrom	Gleichstromverfahren
Ansprechzeit des Sensors	< 5 s
Analysenzyklus	60 s
Analysenfrequenz	60 h^{-1}
Rel. Standardabweichung	1,3 %

Zur Demonstration der Brauchbarkeit des Meßsystems wird der enzymatische Abbau von Harnstoff durch Urease (aus *Canavalia ensiformis*, Jack Beans, 17-34 U/mg, Sigma) zu Ammoniak und Wasser verfolgt. In einen 500 ml-Rührkesselreaktor mit 400 ml Harnstofflösung (10 g/l Harnstoff, KPP-Puffer, pH 7,0; 20 °C, siehe Anhang) werden 2 mg native Urease (60 U, die Bestimmung der Aktivität ist im Anhang beschrieben) zugegeben. Alle 3 min bestimmt das FIA-System einen Meßwert. Um die Volumenabnahme gering zu halten, wird nicht kontinuierlich eine Probe zum Injektor gepumpt. Jeweils 20 Sekunden vor bis 20 Sekunden nach der Injektion wird eine Probe mit einer Flußrate von 0,5 ml/min dem Injektor zugeführt. Im übrigen Zeitraum wird die Pumpe gestoppt. Die Injektionszeit beträgt 15 Sekunden. Das Meßsystem detektiert einen konstanten Anstieg der Ammoniumkonzentration im Reaktor (siehe Abbildung 19). Der theoretische Umsatz an Harnstoff errechnet sich zu 0,03 mmol/min; nach 300 Minuten sollte eine Ammoniumkonzentration von 0,81 g/l vorliegen. Im Versuch wird nach 300 min eine Ammoniumkonzentration von 0,75 g/l erreicht. Dies sind 7,4 % weniger.

Wie die Abbildung 19 zeigt, ergibt sich eine gute Übereinstimmung der Meßwerte mit der Ammonium-Referenzanalytik (siehe Anhang).

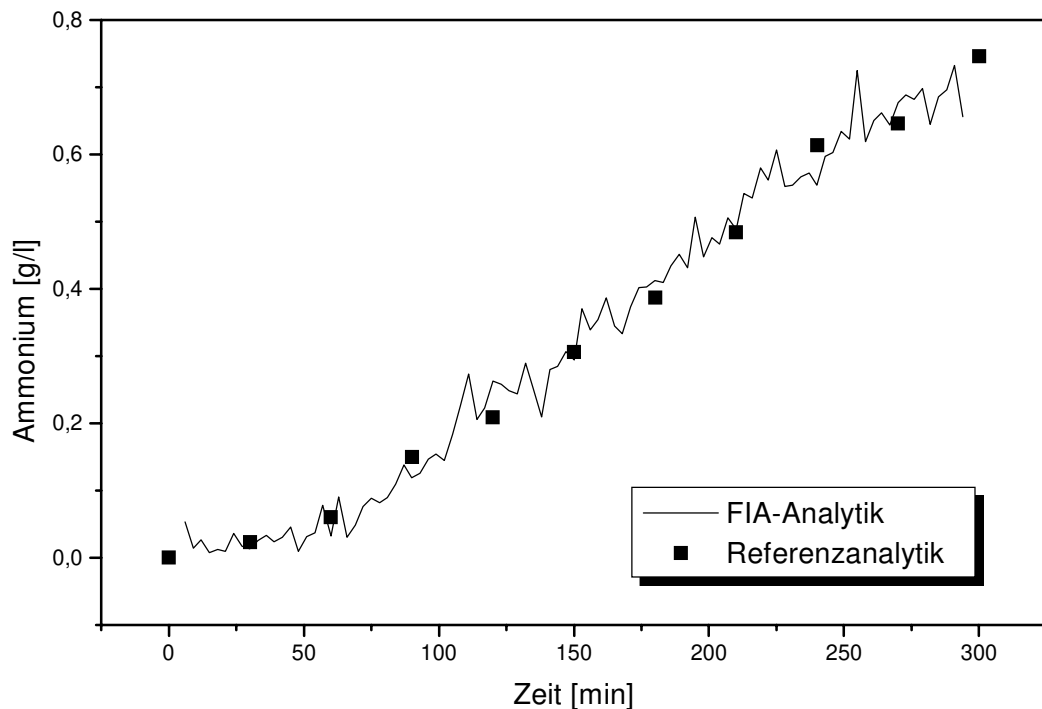


Abb. 19: Messung der enzymatischen Freisetzung von Ammonium aus Harnstoff mit Hilfe des in Abbildung 17 gezeigten FIA-Systems; die Referenzanalytik ist im Anhang beschrieben

Sofern man relativ klare Kultivierungsmedien zu analysieren hat, bietet die photometrische Detektion mit Hilfe einer Gasdiffusionszelle eine höhere Genauigkeit und einen höheren Durchsatz an Proben, was die Bioprozeßregelung deutlich vereinfacht. Liegen gefärbte oder trübe Probelösungen (auch nach einem vorgeschalteten Probenahmemodul) vor, wird die photometrische Detektion stark gestört und es muß auf die von der Trübung unabhängige pH-Detektion mit einem pH-FET zurückgegriffen werden. Demzufolge finden in der Praxis beide Systeme ihre Einsatzgebiete. Eine auf diesen Meßsystemen basierende Bioprozeßregelung wird in Kapitel 8 beschrieben.

4.2 Glucoseanalytik

Von den zahlreichen Online-Analyseverfahren für Glucose werden zwei ausgewählte Meßsysteme besprochen, die sich aufgrund der hohen Analysenfrequenz zur Bioprozeßregelung eignen. Beide Methoden beruhen auf der enzymatischen Umsetzung von β -Glucose durch Glucoseoxidase (GOD, EC 1.1.3.4). GOD ist ein Flavoprotein aus dem

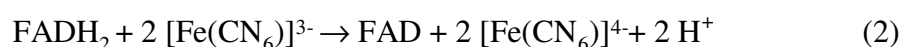
Tab. 9: Amperometrische Detektion von Glucose

Detektor:	Sauerstoffelektrode (ANASYSCON, Hannover)
Kartusche:	1 ml Mobitec Cartridge
Injiziertes Volumen:	35 µl
Trägerstrom:	KPP-Puffer pH 6,75 (siehe Anhang)
Linearer Meßbereich:	0 bis 0,50 g/l
Analysenzyklus:	120 s
Analysenfrequenz:	30 h ⁻¹
Standardabweichung:	4,0 % (ohne Verdünnung)

Bedingt durch die relativ hohe Dispersion der Enzymkartusche entstehen Analysenzeiten von ca. 2 min pro Analyse. Die Meßmethode ist temperaturabhängig, da der Sauerstoffgehalt der Probe mit steigender Temperatur abnimmt [60]. Ebenso nimmt die Sauerstofflöslichkeit mit steigendem Salzgehalt ab [61]. Für eine Regelung müssen diese beiden Parameter konstant bleiben. Das System ist relativ störanfällig gegenüber Luftblasen im Detektor.

4.2.2 Enzymatisch modifizierte Feldeffekttransistoren

Um den Nachteil der Druckabhängigkeit von Clark-Elektroden zu umgehen und gleichzeitig eine kompaktere Bauweise zu erreichen, ist es möglich, das Enzym direkt auf der Oberfläche eines pH-FET zu immobilisieren. Dieses ist bereits in einer Vielzahl von Veröffentlichungen beschrieben worden [62-68]. Bei der Glucoseanalytik wird die bei der Umsetzung von Glucose mit GOD entstehende Gluconsäure detektiert. Die pH-Änderung wird verstärkt, wenn nicht Sauerstoff, sondern Kaliumhexacyanoferrat(III) als Cosubstrat verwendet wird. Die reduzierte Form der prosthetischen Gruppe FADH₂ reagiert nun bevorzugt mit dem Hexacyanoferrat(III)-Anion, wobei noch zwei zusätzliche Protonen pro Oxidation eines Moleküls FADH₂ entstehen [62]:



Das Enzym reagiert spezifisch auf β-D-Glucose; α-D-Glucose wird bei 20°C etwa 150 mal langsamer umgesetzt [69]. Um den GOD-Sensor zu stabilisieren, wird GOD in dieser Arbeit

stets mit Peroxidase (POD) immobilisiert. Die verwendete Peroxidase (EC 1.11.1.7, SIGMA, aus Meerrettich) dient zum Abfang des Wasserstoffperoxids, das GOD deaktiviert.

Zur Immobilisierung werden 1 bis 2,5 mg GOD (Aktivität 180 U/mg, SIGMA) in 10 μ l KPP-Puffer (20 mM KPP, 0,5 M NaCl, pH 7,0) gelöst und 2 μ l Humanes Serum Albumin (HSA) zugefügt. Zu einer Hälfte dieses Ansatzes gibt man 1 μ l 25 % Glutardialdehyd-Lösung. Nach der Zugabe muß dieses Gemisch schnell (innerhalb von 30 s) auf die Oberfläche des pH-FET aufgetragen werden, da man bereits nach kurzer Zeit eine gelartige Membran erhält. Nach intensivem Spülen mit KPP-Puffer ist der EnFET einsatzbereit oder kann bei 4 bis 6 °C gelagert werden.

Die Kopplung ist kovalent und irreversibel, der Kopplungsmechanismus ist noch nicht vollständig geklärt [70-71].

Zur Glucosemessung wird der EnFET in einer Durchflußmeßzelle in einem FIA-System integriert (siehe Abbildung 9). Die Daten des Meßsystems in Ergänzung zur Tabelle 9 finden sich in Tabelle 10:

Tab. 10: Detektion von Glucose mit einem GOD-FET

Detektor:	pH-FET (abc, Puchheim), vier bzw. acht pH-FET sind auf einem Träger kombiniert
Kartusche:	1 ml Mobitec Cartridge
Injektion:	25 μ l bei volumengesteuerter Injektion, 10-30 s Injektionszeit bei zeitgesteuerter Injektion
Trägerstrom:	20 mM KPP-Puffer, 0,5 M NaCl, pH 7,0
Linearer Meßbereich:	0 - 10 g/l Glucose
Analysenzyklus:	120 - 240 s
Analysenfrequenz:	15 - 30 h ⁻¹
Standardabweichung:	3 - 5 %

Die Ansprechzeiten und die Meßfrequenzen des Biosensors variieren sehr stark, da keine definierten Schichtdicken auf den FET-Oberflächen vorliegen, und die Immobilisierung von der Erfahrung des Experimentators abhängt und schwierig reproduzierbar ist. Mit steigender Schichtdicke steigt gemäß dem Thiele-Modul die Ansprechzeit und die Spülzeiten müssen

erhöht werden. Ein Ziel der Verfahrensoptimierung muß es sein, die Immobilisierung zu automatisieren. Die Vorteile dieses Systems sind der relativ große lineare Meßbereich und die Druckunabhängigkeit des Biosensors. Die Handhabung einer Enzymkartusche ist hingegen einfacher, weswegen wiederum beide Systeme in der Praxis eingesetzt werden.

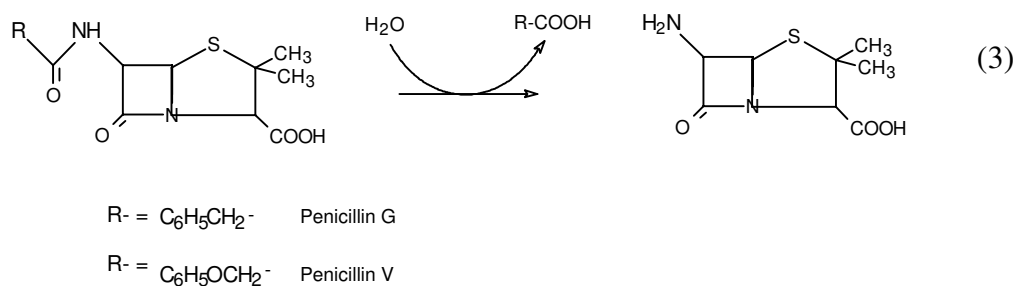
4.3 Analytik von Penicillin G-Acylase

In der pharmazeutischen Industrie werden viele chemische Transformationen durch Biokatalysatoren durchgeführt. Es werden entweder die gereinigten Enzyme oder ganze Zellen zur Reaktion eingesetzt. Die Produkte dieser Biotransformationen sind zum Beispiel die Antibiotika in der Gruppe der Penicilline oder Cephalosporine.

Die in dieser Arbeit verwendeten analytischen Online-Analyseverfahren werden im folgenden anhand von Beispielen aus diesem Bereich vorgestellt. Das Ziel war die Verfolgung der Biosynthese eines Enzyms, der Penicillin G-Acylase, das in der Lage ist, aus Penicillin G (Pen G) die wichtige 6-Aminopenicillansäure (6-Aminopenicillanic acid, 6-APA) darzustellen. Penicillin G wird großtechnisch durch Kultivierungen produziert. 6-APA ist ein Zwischenprodukt für die Produktion von semisynthetischen Penicillinen. Die antibiotische Aktivität des Penicillinmoleküls hängt von dem Seitenkettensubstituenten der 6-Aminogruppe ab. Durch Substitution der Seitenkette an Pen G lassen sich neue Derivate mit höherer Aktivität darstellen. Heutzutage finden semisynthetische Penicilline wie Ampicillin oder Amoxycillin steigende Anwendung.

4.3.1 Darstellung von 6-APA

Die katalysierte Reaktion besteht in der Abspaltung der Seitenkette des Pen G (einer Benzylgruppe) zum 6-APA.

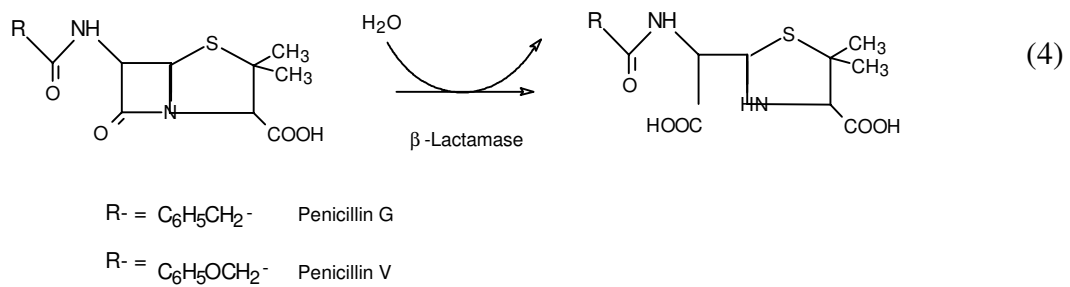


Für diese Reaktion sind ein chemischer und ein enzymatischer Prozeß verfügbar. Wirtschaftliche und technische Vorteile haben aber in den letzten Jahren dazu geführt, daß der Großteil der 6-APA-Produktion auf enzymatischem Wege durchgeführt wird. Die Acylase wird zu dem Zweck in gereinigter Form auf Trägermaterialien immobilisiert, durch die dann Pen G-Lösung strömt oder die Reaktion findet in Rührkesselreaktoren statt [72].

4.3.2 Verwendete Enzymsysteme

Das Enzym Penicillin-Acylase (oft auch Penicillin-Amidase oder Penicillin-Amidohydrolase, EC 3.5.1.11) katalysiert die Deacylierung von Pen G oder Pen V. Die optimalen Reaktionsbedingungen liegen bei $T = 37\text{ °C}$ und $\text{pH} = 7,8$ [73]. Für die Weltproduktion von 6-APA wurde nach dem Anstieg von 4200t (1985) auf 5250t (1990) ein Wert von 7000t für das Jahr 2000 geschätzt [74]. Dementsprechend wird auch die Nachfrage nach Penicillin-Acylase steigen. Von der Bildung von Acylase in Kultivierungen von Pilzen, Hefen und Bakterien wurde in umfassenden Screening-Tests berichtet [75-79]. Die Bildung erfolgt allerdings oft intrazellulär (z.B. bei *E. coli* [79]), so daß die Isolierung aus den Mikroorganismen noch folgen muß. Von einer argentinischen Arbeitsgruppe wurde in Vorversuchen ein Stamm bereitgestellt, der möglicherweise günstige Voraussetzungen bietet. Nach Angaben der Arbeitsgruppe ist ein Vorteil des in Screening-Tests isolierten Wildtyps von *Bacillus licheniformis* die direkte extrazelluläre Ausschleusung des Enzyms, so daß eine aufwendige Aufarbeitung entfällt. Der wichtigste Vorteil des Mikroorganismus sei aber, daß im Gegensatz zu den allermeisten anderen Bakterientypen neben der Penicillin-Acylase-Produktion keine oder nur geringe Mengen an β -Lactamase gebildet werden (β -Lactamase-negativ). Mit Hilfe des entwickelten Acylase-Meßverfahrens sollen nun diese Behauptungen überprüft werden.

Sowohl die Penicillin-Acylase als auch die β -Lactamase spalten Penicillin G, erstere die Seitenkette, letztere den β -Lactamring. Die Spaltung des Lactamrings ist aber nicht gewünscht, da das Produkt keinerlei antibiotische Wirkung mehr aufweist. Da auch 6-APA unter Öffnung des β -Lactamrings reagiert, ist somit für eine optimale Ausbeute an 6-APA eine β -Lactamase-freie Acylase notwendig. Der gefundene Wildtyp von *Bacillus licheniformis* bietet sich deswegen zur Produktion von Acylase an.



4.3.3 Produktion von Penicillin G-Acylase

Für die Produktion von Penicillin-Acylase ist die Kenntnis des Verhaltens von *Bacillus licheniformis* bei Änderungen der Betriebsbedingungen während der Kultivierung notwendig. Eine große Anzahl von Faktoren beeinflussen das Wachstum und die Produktion des Mikroorganismus. Alle Einflußgrößen sind nicht bekannt, aber *Bacillus licheniformis* verhält sich ähnlich wie das verwandte *Bacillus megaterium*, welches eingehender studiert wurde [80-82]. Teilweise wird auch das Verhalten von *E. coli* zugrundegelegt. So ist die Acylase-Produktion von *Bacillus megaterium* vor allem durch Glucose und Fructose, aber auch durch Lactose und Maltose katabolisch gehemmt. In geringerem Maße hemmen Glycerin und Acetat. Penicillin-Acylase wird auch nur dann produziert, wenn das Wachstum der Bakterien gering gehalten wird; daraus resultiert die Notwendigkeit einer relativ geringen Konzentration der Kohlenstoffquelle. Die Produktion an Enzym ist aber in der logarithmischen Wachstumsphase am größten.

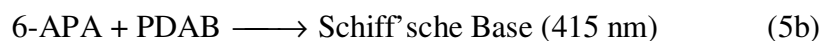
Desweiteren wirkt sich die Anwesenheit von einigen organischen Substanzen günstig oder ungünstig auf die Produktion aus: Citrat, Peptone, Caseinhydrolysat, Tryptophan und Anthranilsäure fördern die Acylase-Produktion, Essigsäure und Pyruvat bremsen sie. Phenyllessigsäure dient sogar als Starter für die Produktion von Penicillin-Acylase und erhöhte die Enzymausbeute in einigen Versuchsreihen auf das acht- bis zehnfache [83].

Auch die Begasungsrate wirkt sich stark auf die Acylase-Synthese aus. Im allgemeinen sind niedrige Begasungsraten zwischen 0,4 und 1 vvm günstig. Die optimale Begasungsrate muß allerdings für jeden Stamm individuell eingestellt werden. Als Orientierungshilfe wurden die optimalen Begasungsraten für *Bacillus megaterium* gewählt.

Schließlich ist die Temperatur als Betriebsgröße für den Kultivierungsprozeß zu nennen. Verwandte Bakterienstämme zeigen ein Produktionsmaximum bei 30 °C, diese Temperatur wird auch in der Kultivierung von *Bacillus licheniformis* eingehalten.

Insgesamt zeigt sich, daß ein Bioprozeßmonitoring sehr wichtig ist, um reproduzierbare und aussagekräftige Experimente durchführen zu können. Eine darüber hinaus gehende Regelung der Substratkonzentrationen könnte die Produktion an Acylase erhöhen und eine β -Lactamase-Aktivität nahezu ausschalten [85]. Die Basis der Überwachung und der Regelung ist eine stabile und schnelle Online-Analytik, die im folgenden beschrieben wird.

In dieser Arbeit wird ein ASCF-System zur Messung der Penicillin-Acylase-Aktivität eingesetzt. Da nicht eine Substratkonzentration, sondern eine Enzymkonzentration oder Enzymaktivität zu messen ist, kann die Bestimmung nur indirekt erfolgen. Im folgenden wird ausgenutzt, daß Penicillin-Acylase mit Penicillin G zu 6-APA reagiert, das photometrisch in einer Farbreaktion nachgewiesen werden kann.



Das Farbreagenz ist dabei p-Dimethylaminobenzaldehyd (PDAB). Diese Reaktion wird vor allem in der Offline-Analytik zur Bestimmung von 6-APA eingesetzt und wird hier für die Online-Analytik optimiert [87-88]. Um mehr Informationen zu gewinnen, wird neben der ASCF auch eine FIA eingesetzt. Dem ASCF-System steht dabei nur der in dem FIA-System ungenutzte Probenanteil zur Verfügung. Dieser Teil wird kontinuierlich mit Pen G versetzt, wobei die enzymatische Umsetzung in einer Reaktionsschleife stattfindet. Nach dem Zusatz von PDAB findet die nachgeschaltete Farbreaktion in einer zweiten Probenschleife bei 37 °C statt. Die Farbänderung wird bei 415 nm photometrisch detektiert.

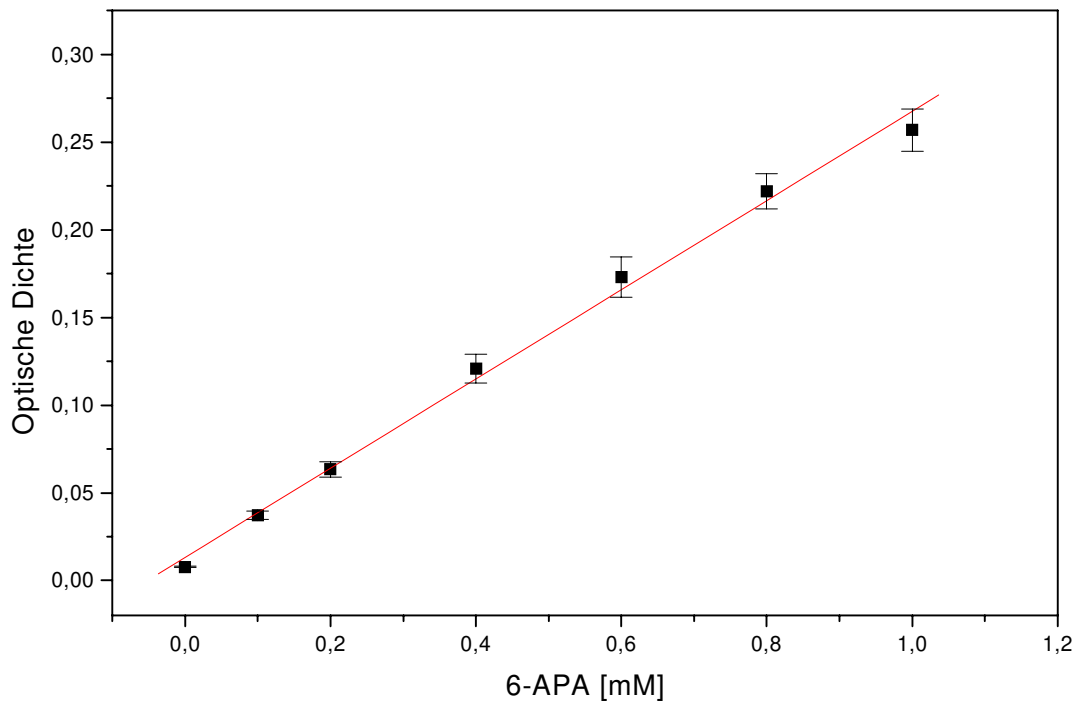


Abb. 20: Kalibration der 6-APA-Messung mit Standards an 6-APA; Bestimmung der 6-APA-Konzentration durch Umsetzung mit PDAB, photometrische Detektion bei 415 nm, Regressionskoeffizient 0,99761; Fünffachbestimmung

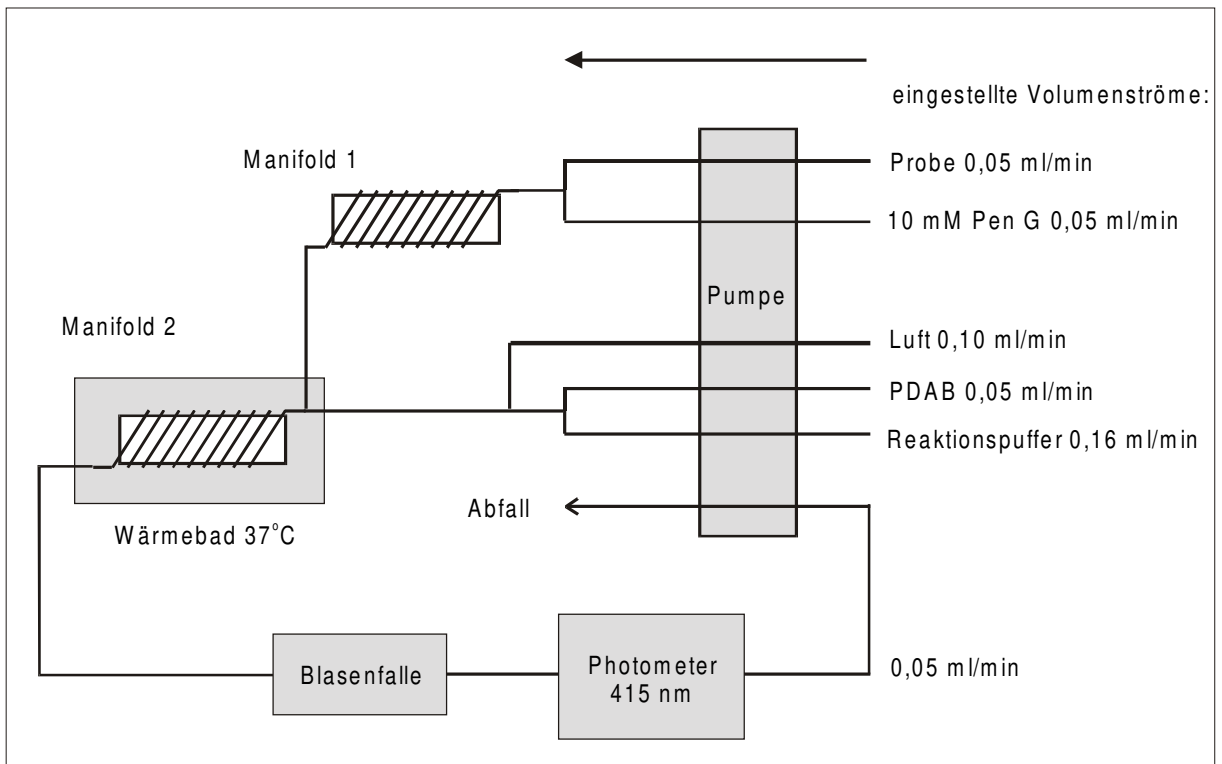


Abb. 21: Aufbau des ASCF-System zur Bestimmung der Acylase-Aktivität

Um zunächst den linearen Meßbereich des Analyseverfahrens zu bestimmen, werden Standards von 6-APA ohne Enzym- und Pen G-Zusatz vermessen. Der lineare Meßbereich liegt zwischen 0 und 1 mM 6-APA. Anschließend werden Acylase-Standards vorbereitet. Durch Zugabe einer 10 mM Pen G-Lösung wird nun die Empfindlichkeit des Systems getestet. Es zeigt sich, das bei einer Enzymaktivität von 1 U/ml ein vollständiger Umsatz von Pen G eintritt. Das Meßsystem ist in der Lage, Aktivitäten kleiner als 1 U/ml zu messen.

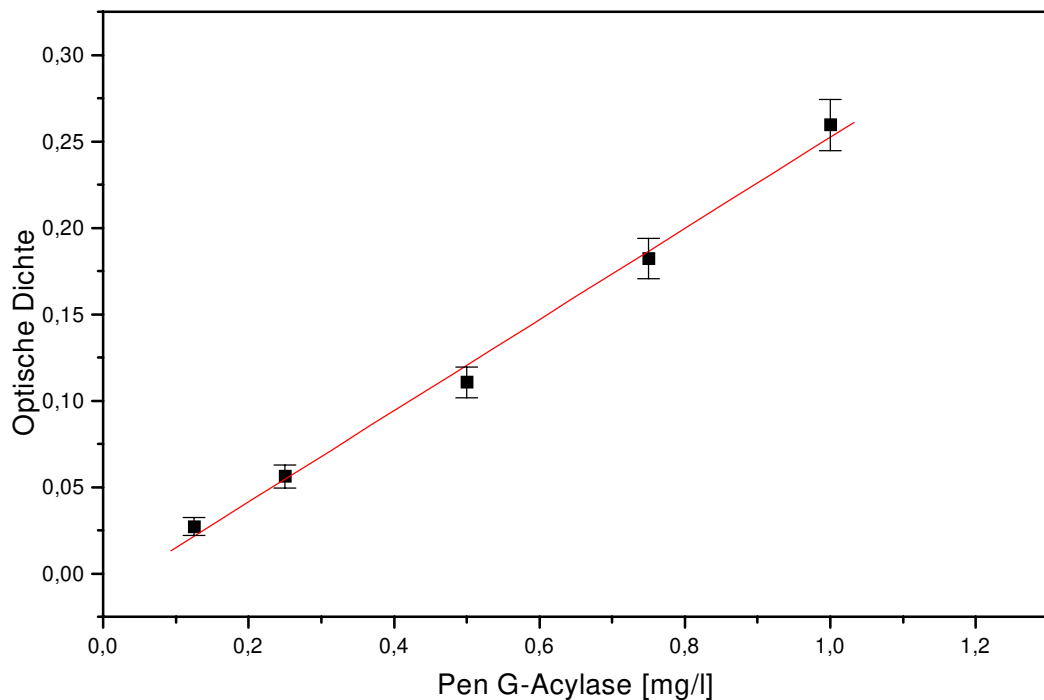


Abb. 22: Kalibration des ASCF-Systems mit Enzymstandards 0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1 mg/ml mit einer Aktivität von 1 U/mg; Regressionskoeffizient 0,99721; Fünffachbestimmung

Die nächsten Abbildungen zeigen die Meßsignale bei verschiedenen 6-APA-Konzentrationen (Abbildung 23) und bei verschiedenen Acylasekonzentrationen (Abbildung 24). Im letzteren Fall wird ebenfalls 6-APA detektiert, das aus der Umsetzung von 10 mM Pen G gebildet wird. Die Signale haben die Form einer Stufe; ausgewertet wird die Differenz zwischen dem unteren und dem oberen Niveau.

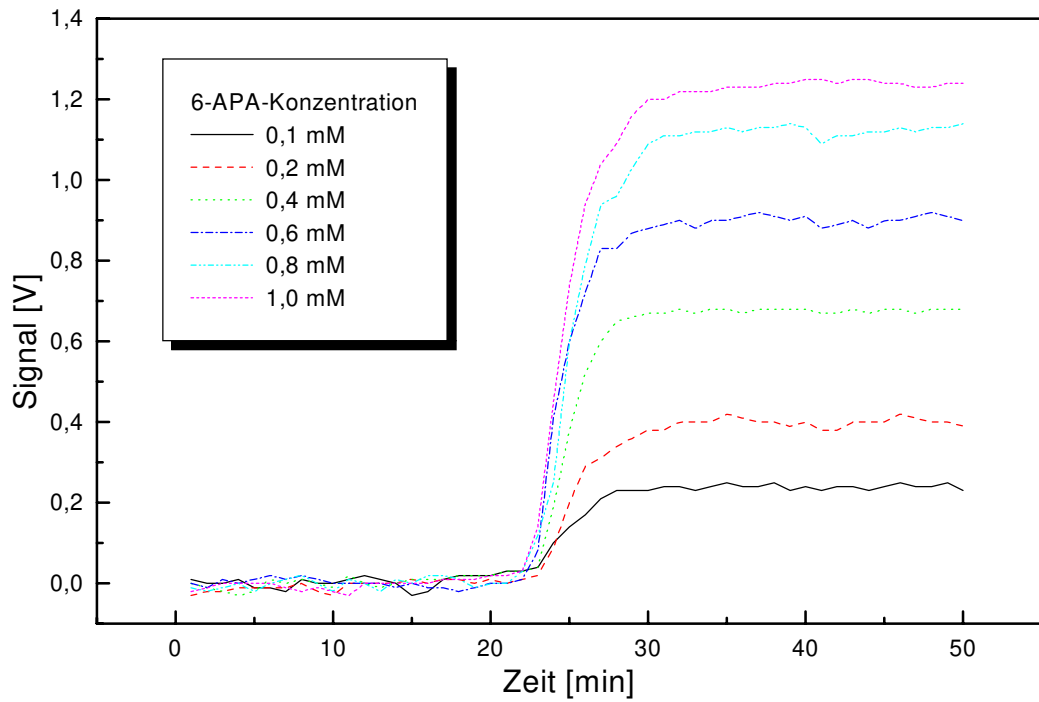


Abb. 23: Signale des ASCF-Systems mit verschiedenen 6-APA-Konzentrationen

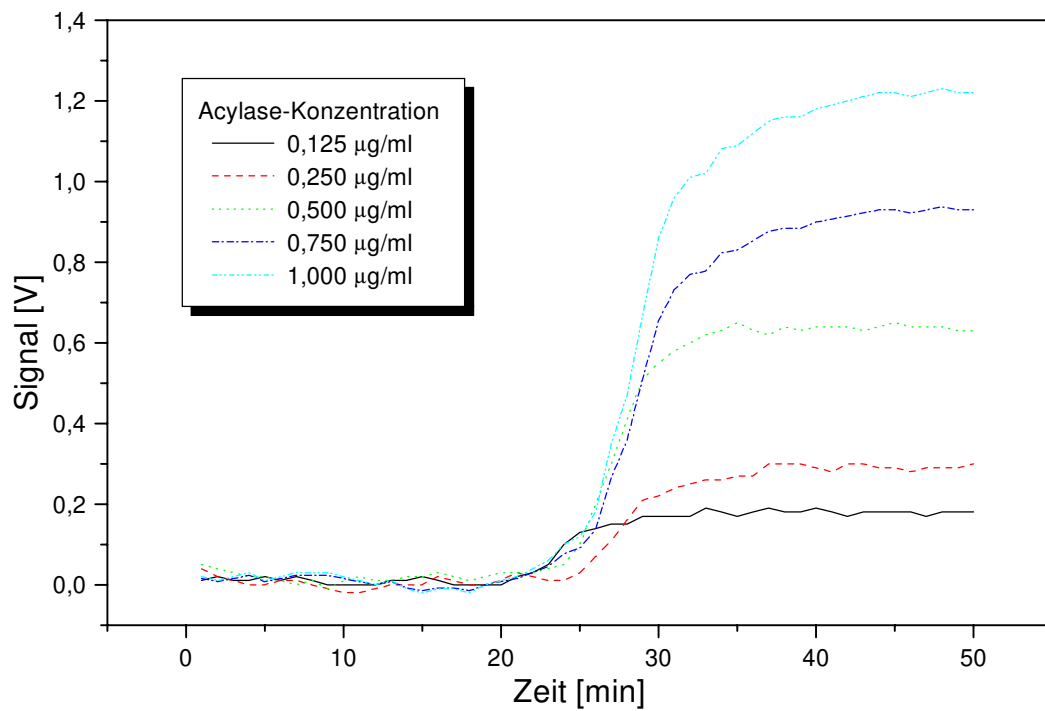


Abb. 24: Signale des ASCF-Systems mit verschiedenen Acylase-Konzentrationen; 6-APA wird aus 10 mM Pen G gebildet

Wie aus den Abbildungen 23 zu erkennen ist, beträgt die Totzeit des ASCF-Systems 22 min und die Verzögerungszeit 10 min. Die relativ große Totzeit entsteht durch die langen Strecken (Manifold 1 und 2), die die Reaktanden mit einer Flußrate von 0,05 ml/min durchlaufen. Bei der Auswertung der Graphen in Abbildung 24 ergibt sich ebenfalls eine Totzeit von 22 min. Die Verzögerungszeit ist mit 18 min deutlich größer. Zu berücksichtigen ist hierbei die relativ langsame Bildung durch 6-APA durch die enzymatische Umsetzung von Pen G.

Zur Offline-Bestimmung der Acylase-Aktivität wird die indirekte Methode der Bestimmung von 6-APA nach Balasingham (siehe Anhang [86]) verwendet. Dazu wird die Probe mit Pen G vermischt und entstehendes 6-APA anschließend mit PDAB in Puffer umgesetzt. Der von Balasingham vorgeschlagene Phosphat-Puffer (pH 7,4) wird durch Borat-Puffer (pH 8,7) ersetzt, wodurch eine deutliche Verbesserung der Empfindlichkeit der Analytik erreicht wird (siehe Abbildung 25). Gegenüber dem Phosphat-Puffer wird eine Steigerung von 14,1 % erreicht.

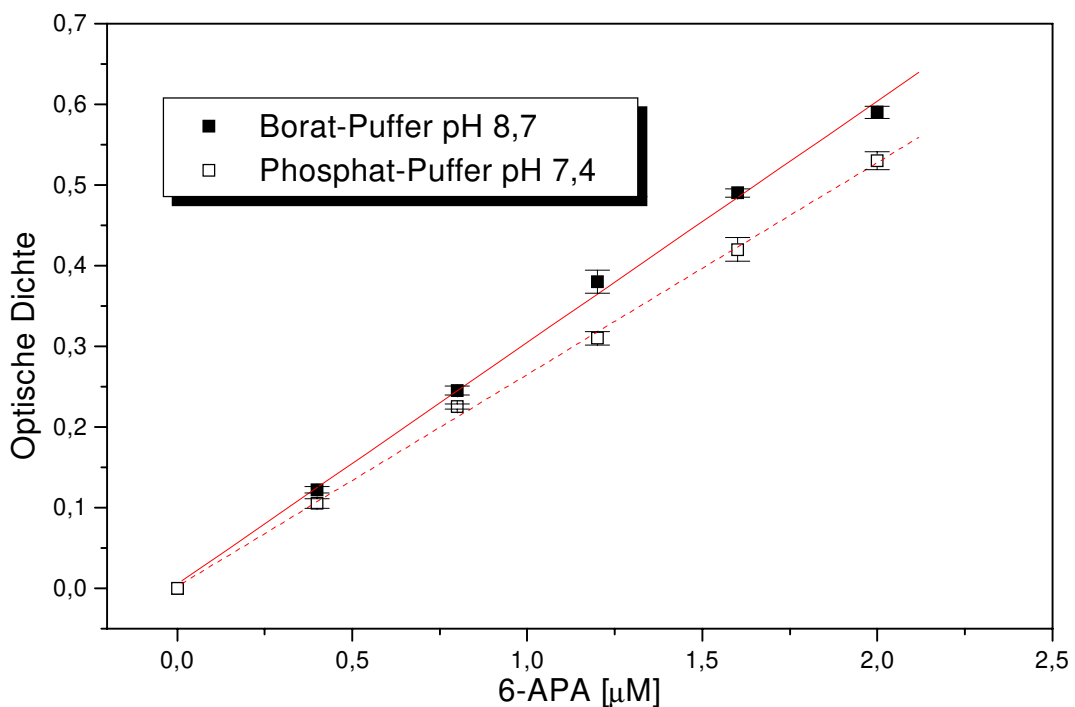


Abb. 25: Kalibrationsgeraden zur Berechnung der 6-APA-Konzentration aus der Umsetzung von Pen G mit Penicillin-Acylase. Die Umsetzung wird in Borat-Puffer und Phosphat-Puffer durchgeführt; Regressionskoeffizienten 0,99899 (Borat-Puffer) bzw. 0,99939 (Phosphat-Puffer)

4.3.4 Batch-Kultivierung von *Bacillus licheniformis*

Aufbauend auf den Vorversuchen der argentinischen Arbeitsgruppe werden eine Batch-Kultivierung von *Bacillus licheniformis* durchgeführt und die entwickelten Online- und Offline-Analysemethoden daran getestet. Online werden Glucose, die Acylase-Aktivität und der pH des Mediums gemessen, offline anschließend Glucose, die Acylase-Aktivität, Biotrockenmasse (BTM), Optische Dichte (OD) und Proteingehalt bestimmt (die Bestimmung der Offline-Werte ist im Anhang beschrieben). Zehn Stunden nach dem Animpfen wird zur Initiierung der Ausschleusung des Enzyms Phenyllessigsäure (PAA) zugegeben.

Tab. 11: Parameter einer Batch-Kultivierung von *Bacillus licheniformis*

Bakterium	Mutierter Wildtyp von <i>Bacillus licheniformis</i> , β -Lactamase-negativ
Vorkultur	24h
Kultivierungsbedingungen	1,3 l synthetisches Medium + 150 ml Inokulum, T = 30 °C, 500 rpm, Begasung mit Druckluft 1 VVM, pH 6,8
Medium	Synthetisches Medium M1 (siehe Anhang)
Probenahme	Zellfreie Probenahme über Eppendorf ESIP; 0,05 ml/min
FIA-System	zur Glucosemessung: Trägerstrom 1 ml/min (Puffer A), Probenstrom 0,05 ml/min, 3 sec Injektion, Injektionsvolumen 30 μ l, 5 min Spülzeit, Analysenfrequenz 10 h ⁻¹
ASCF-System	zur Acylase-Messung: siehe Abbildung 21
Offline-Proben	alle 2 Stunden

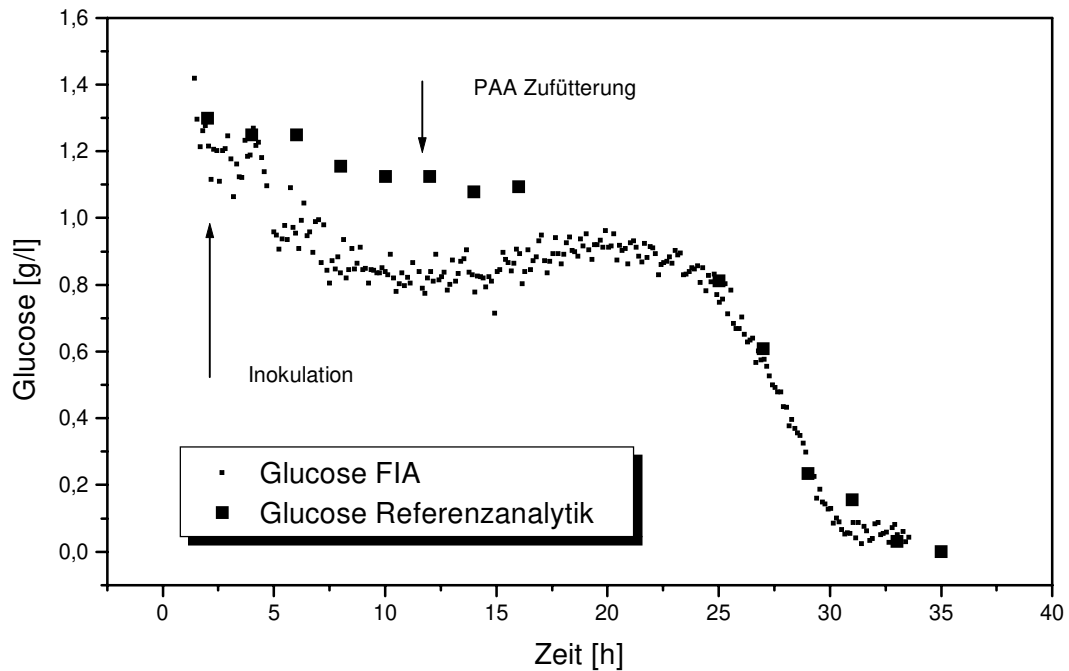


Abb. 26: Vergleich der Online- und der Offline-Messung der Glucosekonzentration in einer Batch-Kultivierung von *Bacillus licheniformis*, 10 h nach dem Animpfen erfolgt die Zugabe von 1,5 g Phenyllessigsäure (PAA)

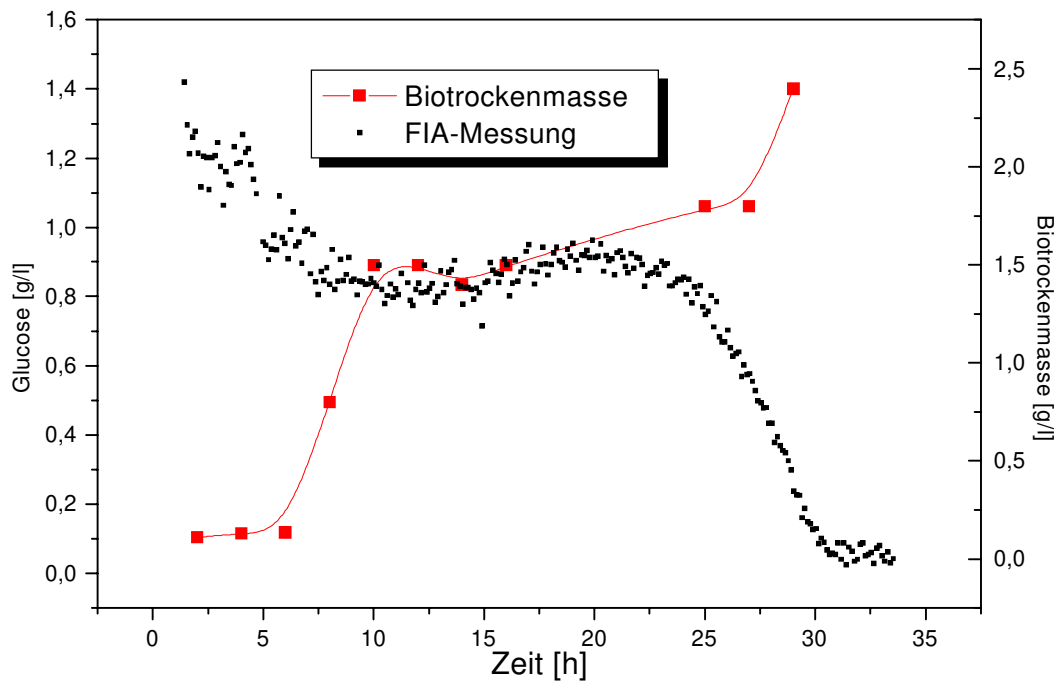


Abb. 27: Verlauf der Biotrockenmasse im Vergleich zu der Glucosekonzentration in einer Batch-Kultivierung von *Bacillus licheniformis*

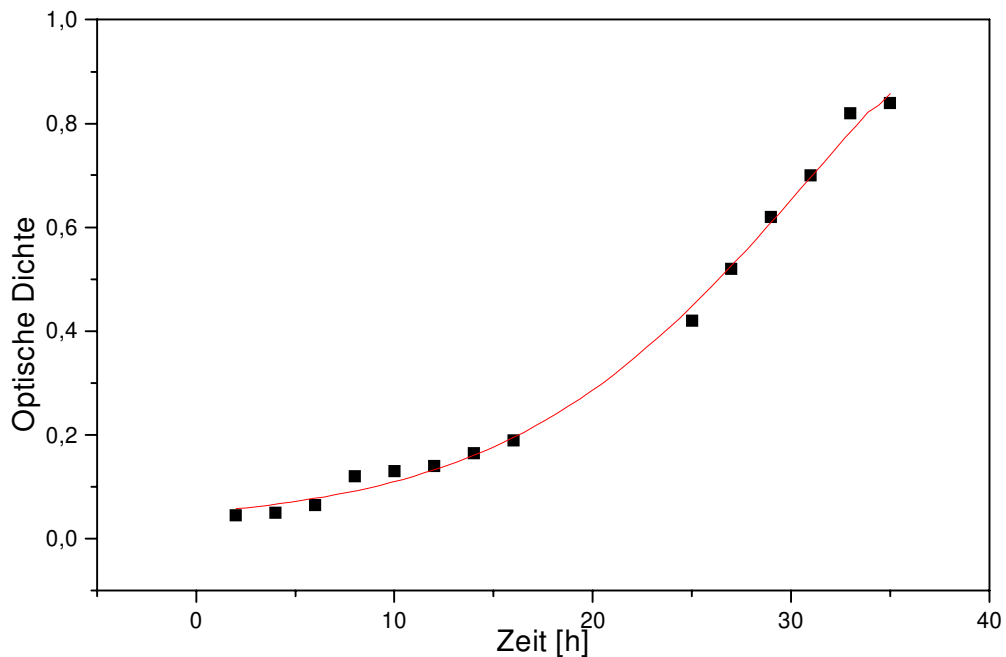


Abb. 28: Verlauf der optischen Dichte des Mediums in einer Batch-Kultivierung von *Bacillus licheniformis*

Die Abweichung der online gemessenen Glucosekonzentration mit der Referenz (siehe Abbildung 26) ergibt sich aus einer möglichen Deaktivierung der Kartusche durch das Kultivierungsmedium. Die anschließende Erhöhung der Spülzeit bewirkt eine höhere Regenerationszeit, so daß ab $t = 15$ h eine sehr gute Übereinstimmung mit den Referenzdaten erreicht wird. Die Verläufe der Glucosekonzentration und der optischen Dichte des Mediums zeigen eine unerwartet lange Lagphase von 20 h (siehe Abbildung 26 und 28). Dennoch spricht die Messung der BTM (siehe Abbildung 27) eher für ein bereits nach 6 h einsetzendes rasches Wachstum. Dieses wird allerdings zeitgleich mit der Zugabe des Initiators der Acylase-Produktion Phenyllessigsäure gestoppt. Auch andere Autoren erwähnen eine Hemmung des Wachstums durch PAA [83]. Erst 13 h nach der Zugabe von PAA setzt die exponentielle Wachstumsphase ein.

Die Konzentration an Acylase wird online gemessen. Es kann jedoch keine Acylase-Aktivität festgestellt werden. Sowohl die Online- als auch die Offline-Analytik zeigen, daß keine Produktion an Penicillin-Acylase stattgefunden hat. Auch nach einem Aufschluß der Zellen konnte keine Acylase-Aktivität festgestellt werden. Ein möglicher Grund ist eine katabolische Repression der Enzymproduktion durch Glucose. Der Aufbau der Acylase im vorliegenden Wildtyp von *Bacillus licheniformis* könnte also durch Glucose vollständig blockiert sein. Aus

diesem Grunde werden weitere Experimente durchgeführt, in denen getestet wird, ob das Medium, insbesondere Glucose, einen Einfluß auf die Acylaseproduktion hat.

4.3.5 Einfluß von Glucose auf die Acylaseproduktion

Um eine mögliche katabolische Repression der Enzymproduktion durch Glucose zu umgehen, wird *Bacillus licheniformis* nun in verschiedenen Medien kultiviert (ein synthetisches Medium mit Glycerin als C-Quelle und ein Komplexmedium mit Peptonen, Medien M3 und M4, siehe Anhang). Als Kontrollversuch wird eine Kultivierung innerhalb eines glucosehaltigen Mediums (M2) durchgeführt. Um einen besseren Vergleich zu ermöglichen, werden zwei weitere nach Angaben der argentinischen Gruppe β -lactamase-negative Bakterienstämme untersucht: beide sind mutierte Wildstämme von *Bacillus polymyxa* und *Bacillus circulans*. Um auch hier einen möglichen Effekt von Phenyllessigsäure auf die Ausschleusung von Acylase nachzuweisen, wird jeweils ein Experiment mit PAA und einer ohne PAA gestartet. Die Versuchsdurchführung besteht somit aus der Kultivierung von 18 verschiedenen Ansätzen in Schüttelkolben. Kultiviert wird mit jeweils 15 ml Medium bei 30 °C und pH 6,8 in 25 ml-Erlenmeyerkolben. Nach 10 h wird zu einer Hälfte der Ansätze 1,5 g/l PAA zugesetzt. Nach 36 h wird die Zellmasse abzentrifugiert und das Medium auf Protein und Pen G-Acylase untersucht.

Obwohl in allen Fällen eine Proteinproduktion im Bereich von 0,8 bis 1 g/l Protein stattgefunden hat, konnte in keiner der Proben Acylase nachgewiesen werden. Stichprobenweise wurde die Acylasemessung auch mit der Online-Methode zur Verifizierung der Ergebnisse durchgeführt. Auch hier konnte keine Acylase-Aktivität festgestellt werden. Daraus kann nicht geschlossen werden, daß keine Acylase-Produktion stattgefunden hat; es ist zu überprüfen, ob eine extrazelluläre Ausschleusung erfolgt ist. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die ursprüngliche Behauptung, die Bakterienstämme seien acylase-positiv, revidiert werden muß. Zunächst wird jedoch der Einfluß der Phosphatkonzentration auf die Ausschleusung der Acylase untersucht.

4.3.6 Einfluß der Phosphatkonzentration auf die Acylase-Produktion

Wie in der Literatur beschrieben ist [87], nimmt eine sehr hohe Phosphatkonzentration im Medium eine Schlüsselrolle in Bezug auf die Ausschleusung des Enzyms ein. Aus dieser Überlegung resultiert folgendes Medium:

Glycerin	5,0 g/l
KH ₂ PO ₄	22,5 g/l
Na ₂ HPO ₄	26,5 g/l
Histidin	2,0 g/l
Mineralsalzlösung	1,0 ml/l
pH	6,8

Tab. 12: Medienzusammensetzung M5

Die Phosphatkonzentration ist nun fünfmal höher als bei den ersten beiden Experimenten. Eine Kultivierung wird sowohl mit Medium M5 als auch mit einem Komplexmedium M6 (siehe Anhang) durchgeführt. Auf die Anwendung eines glucosehaltigen Mediums wird verzichtet, da angenommen wird, daß Glucose ein zu starker katabolischer Repressor der Enzymproduktion ist.

Als Modellstamm wird *Bacillus licheniformis* kultiviert. Die Kultivierungsbedingungen sind identisch mit denen aus der in Kapitel 4.3.5 beschriebenen Kultivierung, das Medium ist allerdings Medium M5. Nach 10 h wird zu einer Hälfte des Ansatzes 1,5 g/l PAA zugesetzt. Sowohl die Zellen als auch das Medium werden nach 24 h Kultivierung auf Acylase untersucht. Es kann keine Produktion festgestellt werden.

Es muß nun davon ausgegangen werden, daß die gelieferten Stämme nicht acylase-positiv sind. Mit Hilfe der Pen G-Acylaseanalytik konnten die ursprünglichen Behauptungen widerlegt werden. Um die Ergebnisse zu verifizieren, wird ein Screening mit fünf verschiedenen Stämmen durchgeführt, wovon ein Stamm (*Bacillus megaterium*) laut Literatur [89] Acylase produziert. Die Ergebnisse sind im folgenden Kapitel 4.3.7 dargestellt.

4.3.7 Acylase-Screening verschiedener Bakterienstämme

Fünf verschiedene Bakterienstämme werden wie in Kapitel 4.3.5 beschrieben innerhalb des synthetischen Mediums M7 kultiviert. Es folgt anschließend der photometrische Test auf den Grad der Acylase-Produktion.

Tab. 13: Acylase-Screening verschiedener Bakterienstämme; - = nicht nachweisbar, + bis +++++ = mäßige bis hohe Produktion an Acylase

Stamm	Grad der Acylase-Produktion
<i>Bacillus cereus</i>	++++
<i>Bacillus licheniformis</i>	++
<i>Bacillus licheniformis II</i>	+++
<i>Bacillus polymyxa</i>	-
<i>Bacillus circulans</i>	-
<i>Bacillus megaterium</i>	++++

Aufgrund der vorliegenden Tests wird in weiteren Arbeiten der Stamm *Bacillus megaterium* zur Produktion von Acylase verwendet.

4.3.8 Batch-Kultivierung von *Bacillus megaterium*

Ausgehend von den Ergebnissen in Kapitel 4.3.7 wird eine Kultivierung von *Bacillus megaterium* durchgeführt. Die Bedingungen entsprechen denen aus der vorherigen Kultivierungsreihe. Es wird die Acylaseaktivität online bestimmt. Desweiteren wird die Glycerinkonzentration mit einem pH-FET mit immobilisierter Glycerindehydrogenase in einer FIA online gemessen [68,90]. Offline werden zusätzlich Glycerin und die optische Dichte des Mediums (siehe Anhang) bestimmt.

Wie in der Abbildung 29 zu sehen ist, beginnt eine exponentielle Abnahme der Glycerinkonzentration nach 20 Stunden Kultivierungszeit. Die Offline-Messung der Glycerinkonzentration ist bedingt durch die niedrige Aktivität der Glycerindehydrogenase mit starken Streuungen behaftet. Dennoch lassen sich Aussagen über den prinzipiellen Verlauf angeben. In Korrespondenz mit der Abnahme der Glycerinkonzentration findet man in Abbildung 30 einen exponentiellen Anstieg der optischen Dichte und damit der Biomasse. Sehr wichtig zum Verständnis der extrazellulären Ausschleusung von Acylase ist die Messung der Acylase-Aktivität. Die Abbildung 30 zeigt eine ebenfalls exponentiell ansteigende Konzentration an Acylase; der Beginn ist allerdings um ca. fünf Stunden gegenüber dem Beginn der Logphase verschoben. Das deutet darauf hin, daß zwischen dem Zellwachstum und der Enzymexkretion keine Synchronität besteht. Es ist anzunehmen, daß

die beiden genannten Vorgänge nacheinander ausgeführt werden. Dementsprechend ist die größte Ausschleusung von Enzym kurz nach dem Ende der Logphase zu erwarten (bzw. kurz vor dem Beginn der stationären Phase), da hier der Anteil der teilenden Zellen relativ niedrig ist. Nach 35 h ergibt sich eine Acylaseaktivität von 0,11 U/ml. Ein Vergleich mit Literaturdaten verifiziert diesen Wert [82]. Dort wird ebenfalls die Aktivität von 0,11 U/ml nach 35 h angegeben. Auch die Verzögerung des Beginns der Exkretion um 5 Stunden gegenüber dem Beginn der Logphase wird bestätigt.

Die Kultivierung wird bis zur vollständigen Verstoffwechslung von Glycerin durchgeführt. Allerdings sollte für die folgenden Kultivierungen berücksichtigt werden, daß die Enzym-Ausschleusung um fünf Stunden verzögert ist. Es ist demnach sinnvoll, die Kultivierung einige Stunden im Bereich der stationären Phase weiterzuführen, um die Enzymexpression zu optimieren. In der Literatur [82] wird eine Aktivität von 0,16 U/ml nach 50 h angegeben (statt 0,11 U/ml nach 35 h => +31 %)

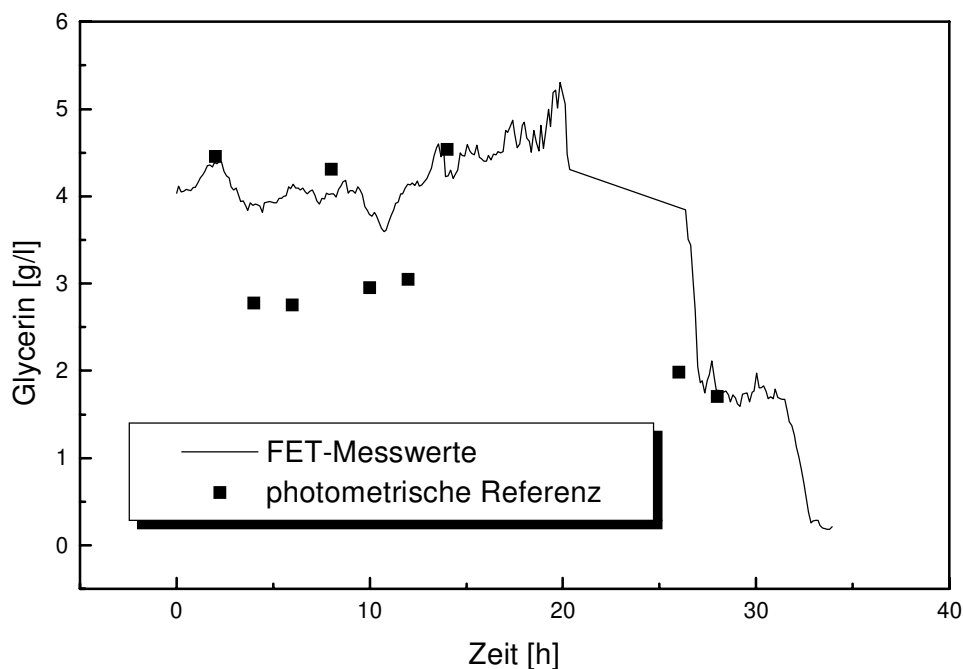


Abb. 29: Verlauf der Glycerinkonzentration während einer Kultivierung von *Bacillus megaterium*; die Online-Messung erfolgt mit einem pH-FET mit Glycerindehydrogenase [68,90], die Offline-Messung mit einem photometrischen Testkit (Boehringer, Deutschland)

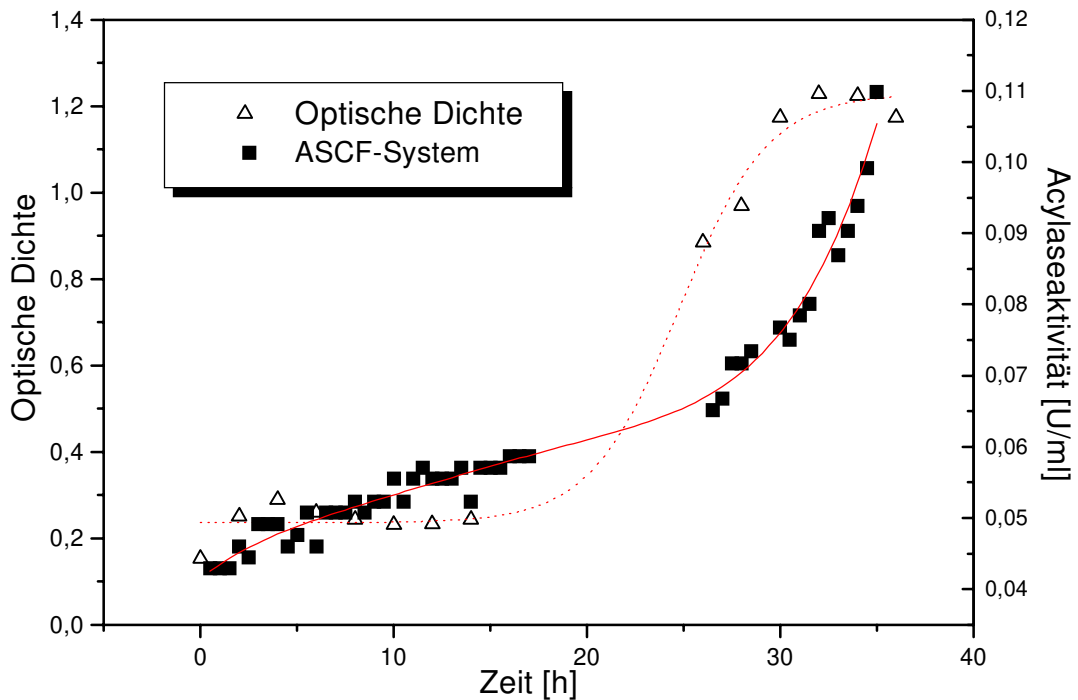


Abb. 30: Verlauf der optischen Dichte des Mediums und der Enzymaktivität in einer Kultivierung von *Bacillus megaterium*

4.3.9 Zusammenfassung der Ergebnisse der Kultivierungsexperimente

In diesem Kapitel wurde das Monitoring der Penicillin G-Acylase-Produktion innerhalb biotechnologischer Bakterienkultivierungen beschrieben. Es wurden Online-Meßmethoden entwickelt, die zu einem besseren Verständnis der Expressionsabläufe beitragen sollten. Es gelang mit Hilfe der ASCF-Technik eine photometrische Online-Analytik aufzubauen. Die Eigenschaften der Meßmethode sind:

- eine kontinuierliche Bestimmung der Acylaseaktivität ist möglich
- das Verfahren benötigt nur geringe Probenmengen
- der Chemikalienverbrauch ist gering
- die Messung ist durch Nutzung eines photometrischen Analysensystems relativ robust

Das ASCF-System wurde mit einem üblichen FIA-System gekoppelt, das zur Messung von Glucose oder Glycerin eingesetzt wurde. Die Bestimmung von Glucose erfolgte dabei über ein Meßsystem aus immobilisierter Glucoseoxidase und einer Sauerstoffelektrode. Es konnten

wichtige Informationen über den Wachstumsverlauf gewonnen werden. Beide Methoden sind hinreichend flexibel, um sie zur Detektion anderer Substrate einzusetzen. In Planung ist die Online-Messung der eingesetzten Stickstoffquelle Histidin. Anstelle von GOD würde das Enzym L-Aminosäureoxidase immobilisiert werden. Das Meßsystem würde somit den Verbrauch an Sauerstoff bei der Umsetzung von Histidin erfassen und eine Quantifizierung der N-Quelle ermöglichen.

Es war notwendig, das ASCF- und das FIA-System miteinander zu koppeln. Da die Kapazität des Reaktors auf ein Liter begrenzt war, mußte mit einem maximalen Probenstrom von 0,1 ml/min gearbeitet werden. Dieses wurde durch einen Injektor realisiert, der den Probenstrom aus dem Reaktor alternierend beiden Systemen zur Verfügung stellte.

Die Online-Meßsysteme wurden mit Hilfe der Analysen- und Steuerungssoftware CAFCA automatisiert. Prinzipiell besteht damit die Möglichkeit einer Prozeßregelung, da die Analysenfrequenz der Analytik für eine sinnvolle Regelung hoch genug ist. Eine Überprüfung der Ergebnisse wurde anhand von Offline-Messungen durchgeführt.

Mit den gemessenen Daten war es möglich, Verbesserungsvorschläge zu erarbeiten. Zum einen stellte sich der Stamm *Bacillus megaterium* in Bezug auf die Enzymproduktion als deutlich besser als *Bacillus species* oder *Bacillus licheniformis* heraus. Die ursprüngliche Annahme der Produktion von Acylase durch *Bacillus licheniformis* konnte widerlegt werden. Ein Problem könnte allerdings in der β -Lactamase-Produktion bestehen. In einer zur Zeit laufenden Optimierung der Reaktionsbedingungen wird insbesondere auf einen möglichst geringen Anteil an Lactamase geachtet.

Zum anderen erwies es sich als vorteilhaft, die Kultivierung für mindestens 10 Stunden nach der Logphase weiterzuführen. Das Online-Monitoring zeigte eine verzögerte Produktion oder Ausschleusung des Enzyms um fünf Stunden gegenüber der Zellproduktion. Durch das ASCF-System ist es nun ebenfalls möglich, das Reaktionsende genau zu erfassen.

Durch die Nutzung weiterer online gemessener Daten kann desweiteren das Monitoring noch verbessert werden. So ist geplant, eine zusätzliche Sauerstoff- und Kohlendioxid-Messung im Abgas vorzunehmen. Mit der Sauerstoffmessung kann eine verbesserte Regelung der Glucosekonzentration vorgenommen werden, da der Sauerstoffverbrauch und der Glucoseverbrauch synchron verlaufen. Die hierfür erforderlichen Arbeiten sind im Hause bereits angelaufen.

5 Reversible und automatisierte Immobilisierung von Enzymen auf pH-FET

Bislang wurden Biosensoren betrachtet, bei denen die biologische Komponente irreversibel und kovalent auf den Träger VA-Epoxy oder die Oberfläche eines pH-FET aufgebracht wurde. Die damit einhergehenden drastischen Änderungen der Konformation des Enzyms führen zu einer Abnahme der Enzymaktivität. Außerdem ist es nicht möglich, ein denaturiertes inaktives Enzym automatisch durch aktives zu ersetzen. Für biotechnische Regelsysteme, die gegebenenfalls über Wochen automatisiert arbeiten sollen, sind die bisher genannten Meßsensoren nur unzulänglich geeignet.

An ein über längere Zeiträume arbeitendes Regelsystem gelten die Anforderungen:

- Reversible Immobilisierung
- Geringe Konformationsänderungen des Enzyms, um eine hohe Aktivität zu gewährleisten
- Schneller Ersatz von deaktiviertem Enzym
- Automatisierung der Immobilisierung

5.1 Das Lektin Concanavalin A

Im Bereich der HPLC und Affinitätschromatographie [91-94] wird seit 1983 die Affinitätsbindung von Glycoproteinen an Lektine [95] zur Reinigung der Proteine ausgenutzt. Lektine haben die Eigenschaft, Zuckerreste reversibel zu binden. Da Glycoproteine wie z.B. Glucoseoxidase Zuckerreste besitzen, werden diese Proteine auch agglutiniert.

Das am besten untersuchte Lektin ist Concanavalin A (Con A) aus *Canavalia ensiformis* (Jack Beans). Es liegt in Lösung je nach pH-Wert und Temperatur als Dimer oder Tetramer vor, entsprechend einem Molekulargewicht von 55 bzw. 110 kDa. Die pH-Abhängigkeit des Aggregationsverhaltens und die Temperaturabhängigkeit sind in der Literatur [96-97] beschrieben. Die Änderung des pH-Werts ist eine Möglichkeit, die Bindungsverhältnisse zu ändern.

Entscheidend für die Bindung an Con A ist die Besetzung von zwei bestimmten Zentren im Molekül. Das eine Zentrum bindet vornehmlich Zn^{2+} , Mn^{2+} und Mg^{2+} , das andere bindet Ca^{2+} -Ionen. Die Veränderung der Ionenbesetzung und der polaren Eigenschaften führt zu Veränderungen in den Bindungseigenschaften an Zuckerreste [98]. Dies ist eine weitere Methode, die Bindungsverhältnisse zu beeinflussen.

Daneben wird oft die konkurrierende Verdrängung von stärker bindenden Zuckern ausgenutzt. Die Bindungsstärke nimmt dabei in der Reihenfolge α -D-Mannopyranosid, α -D-Glycopyranosid, D-Mannose, D-Glucose [98] ab. Glycoproteine verdrängen sich auch gegenseitig, was in der Affinitätschromatographie ausgenutzt wird.

In der Praxis wurden bereits reversible Immobilisierungen mit Con A auf Cyanbromid-aktivierter Sepharose [99] erfolgreich durchgeführt. Als Metallkationen werden Cu^{2+} -Ionen verwendet, die für eine hohe Stabilität zwischen Lektin und Glycoprotein sorgen. Das Ablösen des Enzyms geschieht dabei in der Regel durch einen pH-Shift auf pH 1, wobei aber auch das Lektin abgelöst wird. Mit der Verwendung des Redoxsystems $\text{Co}^{2+}/\text{Co}^{3+}$ ist es weiterhin möglich, gezielt nur die Bindung zwischen Con A und dem Glycoprotein durch einen pH-Shift auf pH 2 zu trennen [100].

Durch die tetramere Struktur von Con A ist es möglich, nicht nur eine einfache Bindung zwischen dem Glycoprotein und Con A zu erzeugen, sondern ein ganzes Netzwerk aufzubauen (Abbildung 31):

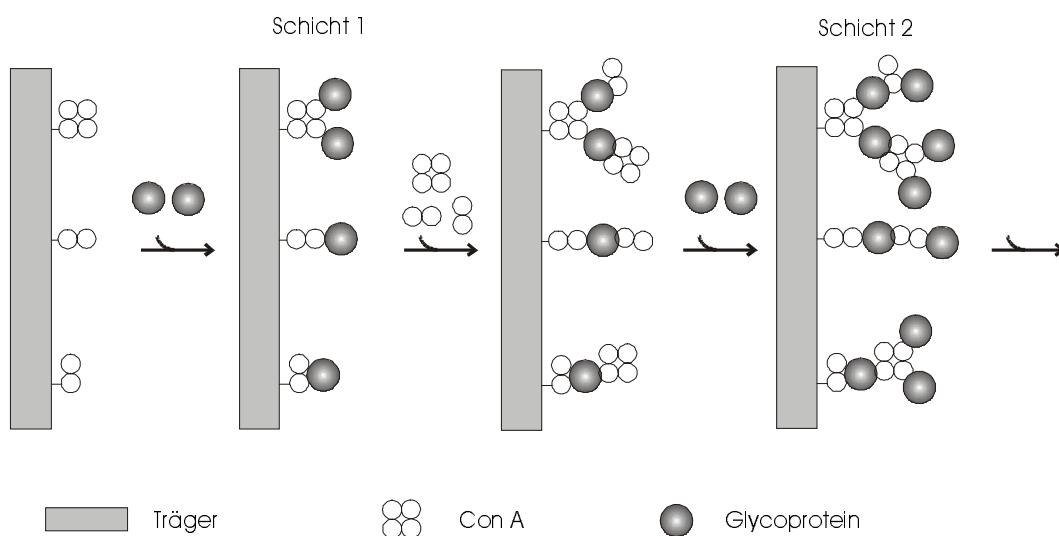


Abb. 31: Bioaffinity Layering auf einem Träger; es entsteht eine Schichtstruktur aus Con A- und Glycoprotein-Schichten [99]

Dieses Bioaffinity Layering wurde bereits auf Trägersubstanzen wie CNBr-aktivierter Sepharose und chelatisierender Sepharose durchgeführt [101]. Bei einigen Präparaten konnte die Enzymaktivität nach siebenmaliger Immobilisation auf das 250fache gesteigert werden [101]. Auch gelang es, reversible Biosensoren auf der Basis von fluoridsensitiven FET mit

Hilfe von Con A-Grundmembranen aufzubauen [102-103]. Eine Weiterentwicklung dieser beiden Verfahren, ein Bioaffinity Layering auf pH-FET, wird im folgenden Kapitel besprochen.

5.2 Bioaffinity Layering von Glycoenzymen auf pH-FET

Um eine Steigerung der Enzymaktivität auf pH-FET zu erzielen, wird zunächst versucht, drei gemäß der Immobilisierungsvorschrift in Kapitel 4.2.2 mit einer GOD-Membran präparierte pH-FET mit einer zusätzlichen Schicht aus Con A und GOD zu versehen. Dazu werden die EnFET in einem FIA-System mit einer Lösung aus 10 mg/ml Con A (pH 8,5, Carbonat-Puffer, Metallsalze, siehe Anhang) für eine Stunde im Kreisstrom gespült. Anschließend wird eine Lösung von 10 mg/ml GOD über die FET geleitet und man läßt für eine Stunde im Stop-Flow-Verfahren reagieren. Die Sensitivität vor und nach der Immobilisierung der zweiten Schicht GOD wird gemessen (siehe Abbildung 32).

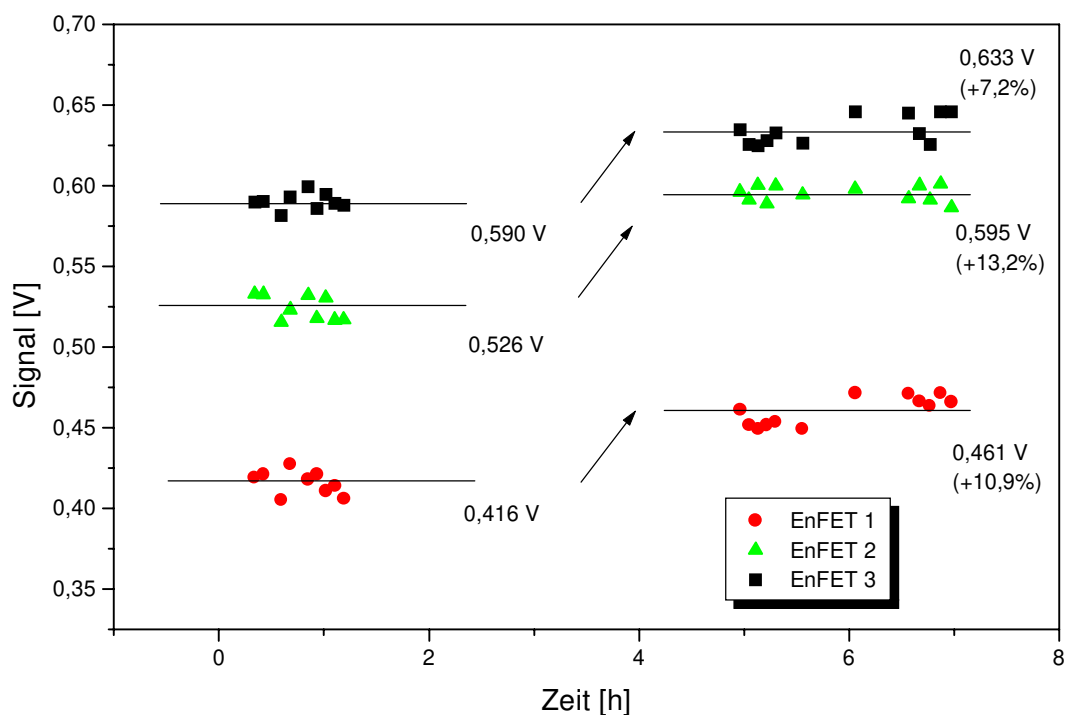


Abb. 32: automatisierte Immobilisierung einer zweiten Schicht Con A/ GOD auf drei verschiedenen GOD-FET; mittlere Erhöhung der Sensorsensitivität um 10,4 %; Messung mit 5 g/l Glucose

Trotz gleicher Immobilisierungsbedingungen weisen die präparierten EnFET die für die manuelle Herstellung üblichen Schwankungen in der Sensitivität auf. Es zeigt sich jedoch nach der automatischen Immobilisation der zweiten Schicht GOD eine annähernd konstante Erhöhung der Sensoraktivität um 10,4 %. Diese Aktivitätserhöhung entsteht durch die zugefügte Menge an GOD, und es kann davon ausgegangen werden, daß die Beladung durch den automatisierten Schritt in allen drei Fällen um denselben Betrag gestiegen ist.

Nach einer Optimierung der Immobilisierungszeiten konnte die Reaktionszeit für Con A und GOD auf jeweils 15 min gesenkt werden. Dazu wurde getestet, nach welcher Zeit 95 % der Maximalbeladung erreicht wird. In einer halben Stunde ist es nun möglich, eine neue Schicht zu generieren (vor der Optimierung zwei Stunden). Auch mit fünf Minuten Immobilisierungszeit werden neue Schichten erhalten, die Belegung ist allerdings nicht vollständig. Durch die Automatisierung in einem FIA-System läßt sich nun die gewünschte Sensitivität des GOD-FET und die Anzahl der Schichten einstellen. Innerhalb von 24 Stunden konnte ein EnFET mit je 25 Schichten aus Con A und GOD automatisiert hergestellt werden. Zwischen den einzelnen Immobilisierungsschritten wurde jeweils mit KPP-Puffer gewaschen und eine Kalibrierung mit vier Glucosestandards durchgeführt.

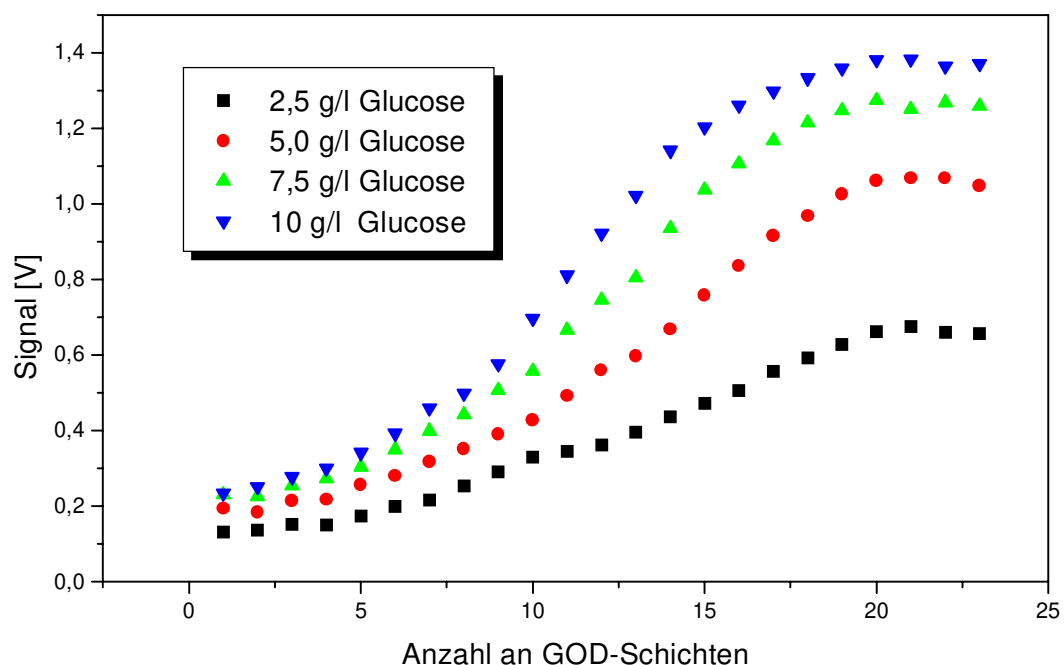


Abb. 33: Bioaffinity Layering auf einem GOD-FET; nach jeder neuen Schicht Con A/GOD wird mit vier Glucosestandards kalibriert

Die Abbildung 33 zeigt die zeitlich aufeinanderfolgenden Kalibrationen jeweils nach der Immobilisierung einer neuen Schicht Con A/GOD. Nach einem zunächst langsamen Anstieg der Sensitivität ergibt sich nach 10 bis 12 Schichten die höchste Steigerung. Nach 20 Schichten nimmt die Sensitivität nicht mehr zu. Es bilden sich jeweils sigmoide Verläufe der Sensitivität heraus.

Dies kann nicht mit einer gleichmäßigen Neubelegung von Schicht zu Schicht erklärt werden, denn danach würde zumindest für geringe Schichtdicken ein linearer Anstieg erwartet werden. Auch eine vollständige Umsetzung der Glucose kann ausgeschlossen werden, da ansonsten der Sättigungsbereich mit steigenden Glucosekonzentrationen später erreicht werden würde. Bedingt durch die tetramere Struktur von Con A muß von einem Netzwerk ausgegangen werden, das von Schicht zu Schicht dichter wird. Jedes Con A-Molekül kann mehr als ein Enzymmolekül binden, und auch umgekehrt kann sich mehr als ein GOD-Molekül an ein Con A-Molekül anlagern. Die Zahl der Bindungsplätze steigt demnach exponentiell, was mit der Messung bestätigt wird. Ein unendlicher Anstieg der Aktivität wird durch den verstärkten Platzbedarf der beiden Moleküle verhindert. Ab der 12. Schicht nimmt die Aktivität nur noch linear zu. Eine weitere Immobilisierung führt zu einer sterischen Abschirmung der unterliegenden Schichten, so daß ab der 20. Schicht keine Aktivitätserhöhung mehr eintritt. Eine Wegverlängerung der Diffusion von Protonen durch das Netzwerk spielt aufgrund der geringen Größe der Protonen wahrscheinlich keine Rolle. Die Darstellung der einzelnen Kalibrationsfunktionen verdeutlicht den Anstieg der Sensitivität (siehe Abbildung 34).

Mit dem vorgestellten, automatisierten System zur Darstellung von Multilayer-EnFET ist die gezielte Einstellung der Sensitivität möglich. Eine Messung mit einem 25-Schichten-Sensor im Meßbereich von 0 bis 1 g/l mit einer Standardabweichung von 3,8 % durchführbar (siehe Abbildung 35).

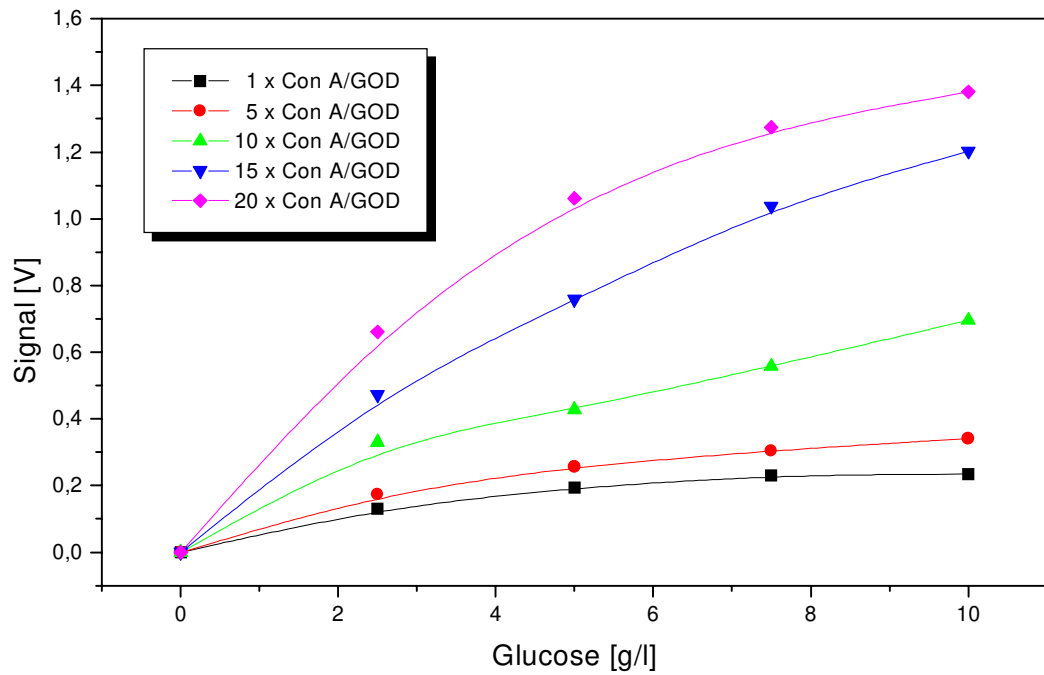


Abb. 34: Kalibrationsfunktionen des Con A/GOD-FET nach der 1. Schicht (= Grundschrift), 5., 10., 15. und 20. Schicht

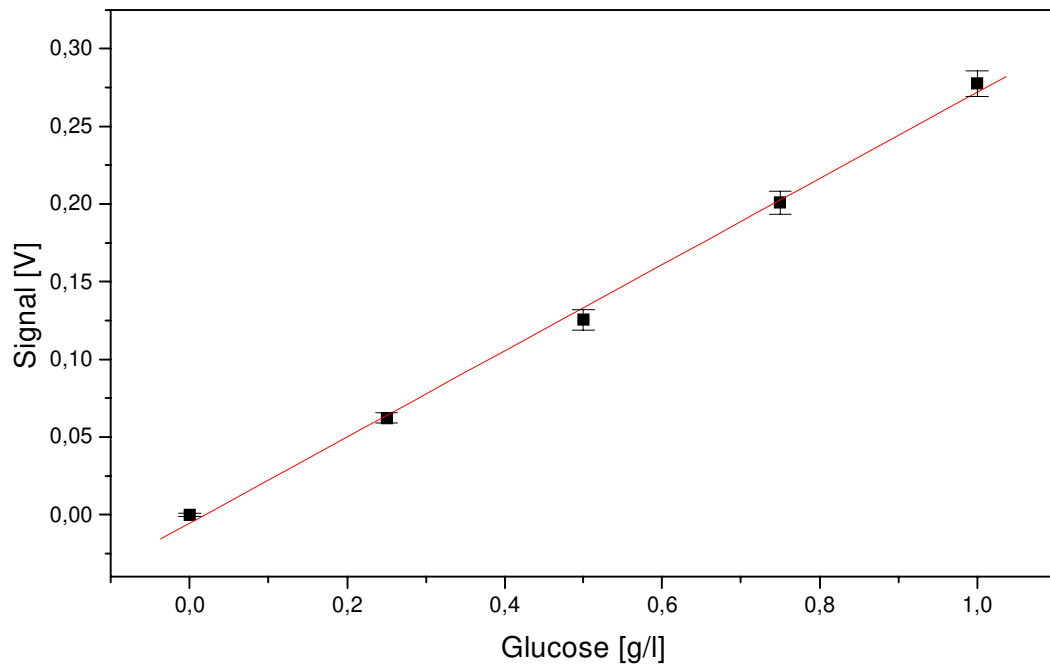


Abb. 35: Kalibrationsfunktion mit einem 25-schichtigen Con A/GOD-EnFET; Regressionskoeffizient 0,99867, Dreifachbestimmung

Es ist denkbar, bei einer Deaktivierung der Enzymschichten während eines Versuchs, weitere Schichten automatisch zu immobilisieren. Die Langzeitstabilität ist vergleichbar mit herkömmlichen GOD-FET.

5.3 Bioaffinity Layering von Glycoenzymen auf pH-FET mit einer Stärke-Grundmembran

Bislang wurden EnFET besprochen, bei denen die Grundmembran bereits aus einem Gemisch aus vernetztem HSA und Enzym bestand. Ein automatisierter Austausch der Grundmembran ist damit nicht möglich. Um eine automatische Enzymimmobilisierung zu erreichen, muß die erste Schicht enzymfrei sein. Diese wird bei jeder Neuimmobilisierung als Grundträger beibehalten. Eine direkte Immobilisierung von Con A auf pH-FET (mit HSA und Glutardialdehyd) führt nur zu sehr schnell ablösenden Membranen. Ein Ansatz ist es, die Bindungseigenschaften von Con A sowohl zu Zuckern als auch zu Glycoenzymen auszunutzen.

In einigen Vorversuchen wurden verschiedene Zucker und HSA mit Glutardialdehyd zu gelartigen Membranen verknüpft, die auf die pH-FET aufgebracht wurden (entsprechend einer Vernetzung eines Enzyms). Die hohe Löslichkeit der meisten einfachen und höheren Zucker führte jedoch zu sehr geringen Stabilitäten der Grundmembran. Günstige Eigenschaften besitzt dagegen Stärke in einer gering löslichen Form (75 % Amylopektin, 25 % Amylose, aus Kartoffeln, Sigma). Gemäß der Vorschrift zur Immobilisierung von GOD (siehe Kapitel 4.2.2) werden 10 µl einer Stärkesuspension in KPP-Puffer auf die Oberfläche der pH-FET aufgebracht. Die Trocknungszeit beträgt 5 min und es entstehen relativ feste Membranen. Unter dem Lichtmikroskop läßt sich die Kristallisation der Stärke beobachten. Es bilden sich Konglomerate zwischen den ungelösten und den auskristallisierenden Stärkemolekülen. Diese Vernetzung besitzt eine relativ hohe Resistenz gegen einfaches Auswaschen, so daß die Kristalle noch nach einstündigem Spülen in einem KPP-Pufferstrom sichtbar sind. Vermutlich bietet die rein mechanische Einbettung der Stärkepartikel in das HSA/ Glutardialdehyd-Gel genügend Stabilität.

Nach dem Spülen wird eine Lösung aus 10 mg/ml Con A (pH 8,5, Carbonat-Puffer, Metallsalze, siehe Anhang) im Kreisstrom langsam über die FET gepumpt. Nach einer Stunde wird wiederum mit KPP-Puffer gespült.

Diese so vorbereiteten, mit einer Stärke-Grundmembran ausgestattete FET können in die Durchflußmeßzelle einer FIA-Anlage eingebaut werden, wobei die Immobilisierung von

Enzym nun automatisch in einem Kreisstrom geschehen kann. Nach den Versuchen aus Kapitel 5.1 wird eine Immobilisierungszeit von 15 min getestet. Anschließend werden vier Glucosestandards gemessen. Der Sensor zeigt die erwartete geringe Sensitivität für Glucose im Bereich von 0 bis 10 g/l (siehe Abbildung 36). Nun wird demonstriert, daß die Enzymmembran mit einem pH-Shift auf pH 2,5 leicht von der Stärke-Grundmembran zu trennen ist. Glucose kann nicht mehr detektiert werden. Aufbauend auf den Versuchen aus Kapitel 5.1 wird nun ein Bioaffinity Layering auf der Stärke-Grundmembran durchgeführt. In einem Abstand von jeweils 15 min wird abwechselnd mit Con A- und GOD-Lösung gespült. Nach der siebten immobilisierten Schicht wird eine Kalibrationsfunktion ermittelt. Es zeigt sich eine siebenfach höhere Sensitivität gegenüber der ersten Kalibration. Auch diese Schichtstruktur läßt sich durch einen pH-Shift leicht vom FET trennen. Die Stärkemembran bleibt erhalten (siehe Abbildung 36).

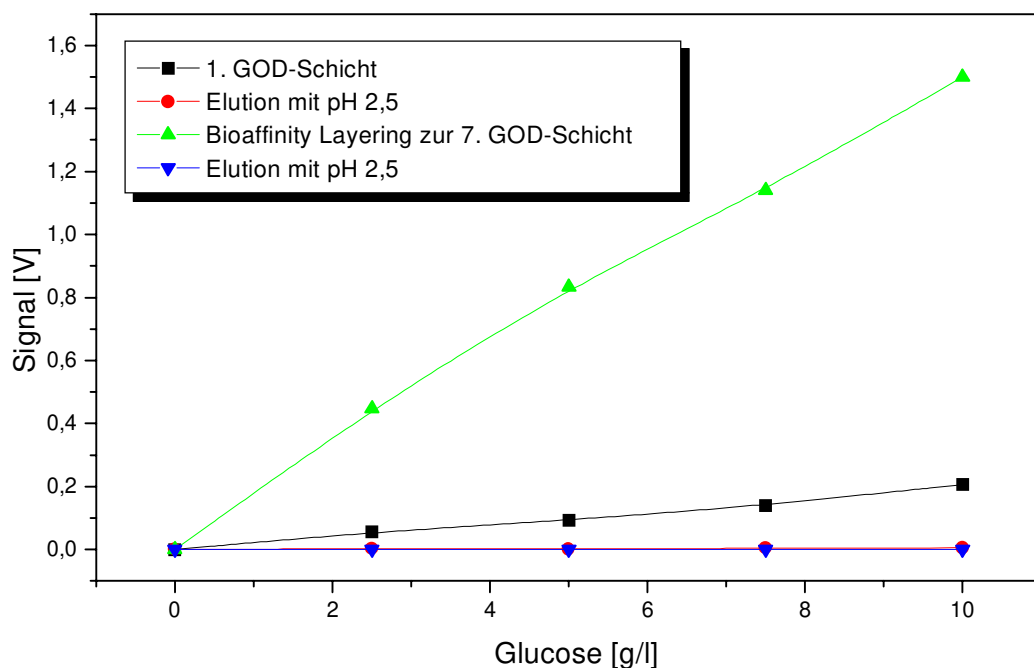


Abb. 36: Kalibration des GOD-FET mit Stärke-Grundmembran nach einmaligem und siebenmaligem Bioaffinity Layering; dazwischen Ablösen der GOD-Schicht durch einen pH-Shift auf pH 2,5

Der praktische Einsatz des Verfahrens wurde in einer Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* erprobt, wobei aufgrund des breiten Konzentrationsspektrums während der

Kultivierung (0- 30 g/l) ein dafür optimierter 6-Schichten-Sensor eingesetzt wurde. Es zeigt sich eine gute Übereinstimmung mit der Referenzanalytik (siehe Anhang).

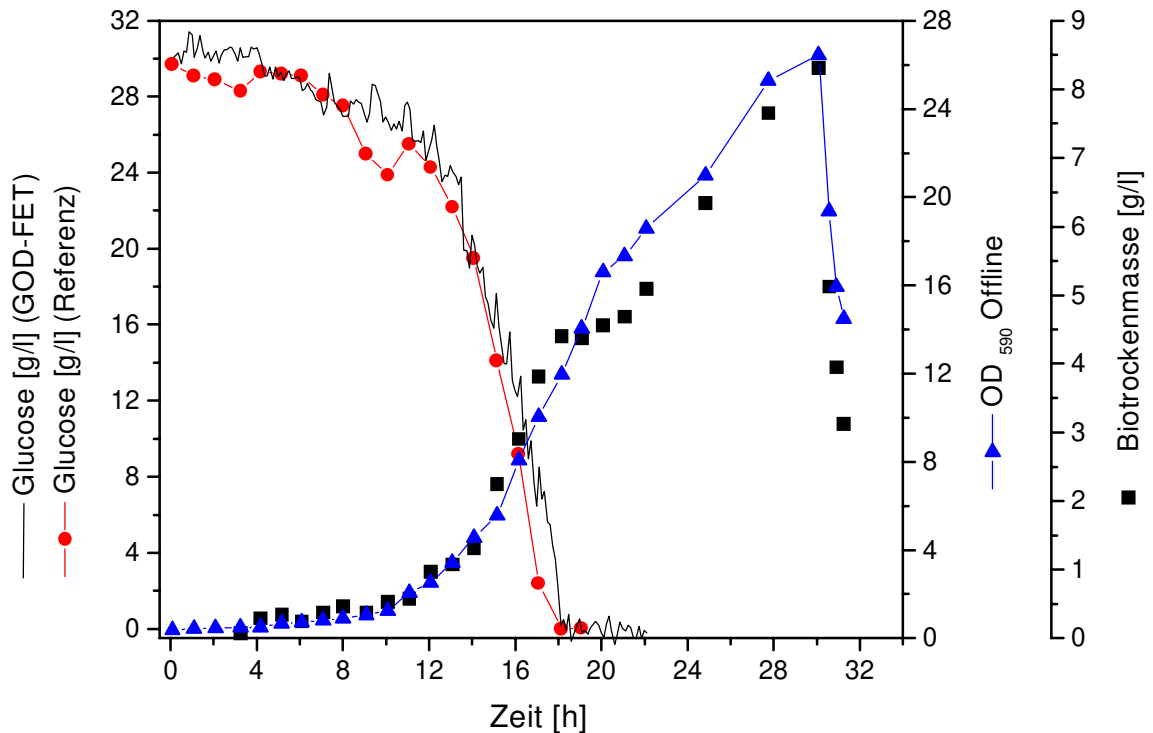


Abb. 37: Messung von Glucose in einer Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* mit einem 6-Schichten-Con A/GOD-FET auf Stärke, Kalibrationsstandards 8, 16, 24, 32 g/l; Injektionszeit 10 s, Analysenzeit 7,5 min; die Referenzanalytik ist im Anhang beschrieben

Ein anderes Glycoenzym ist Peroxidase POD (EC 1.11.1.7, Sigma, aus Meerrettich). Die entsprechenden Versuche unter Verwendung von GOD konnten nachvollzogen werden. Auf pH-FET mit Stärkemembranen konnten ebenfalls POD-Schichten gebunden werden. Allerdings sind die Aktivitätssteigerungen durch Bioaffinity Layering nicht so deutlich wie bei GOD. Die Abbildung 38 zeigt Kalibrationen mit 0 bis 1 mM H₂O₂ nach bis zu sieben Schichten Con A/POD. Es kann keine Erhöhung der Sensitivität festgestellt werden, die Steigungen der Kalibrationsgeraden sind annähernd identisch (0,393 V/mmol ± 4,7 %). Nach fünf Schichten wird auch keine Erhöhung der Aktivität gemessen. Der nach siebenfacher Immobilisierung erhaltene POD-FET zeigt in den ersten zwei Stunden einen Aktivitätsabfall von 15 % und ist danach für mindestens 48 Stunden stabil (Messung mit 1 mM H₂O₂). Eine Langzeitmessung über mehrere Tage ist in Planung.

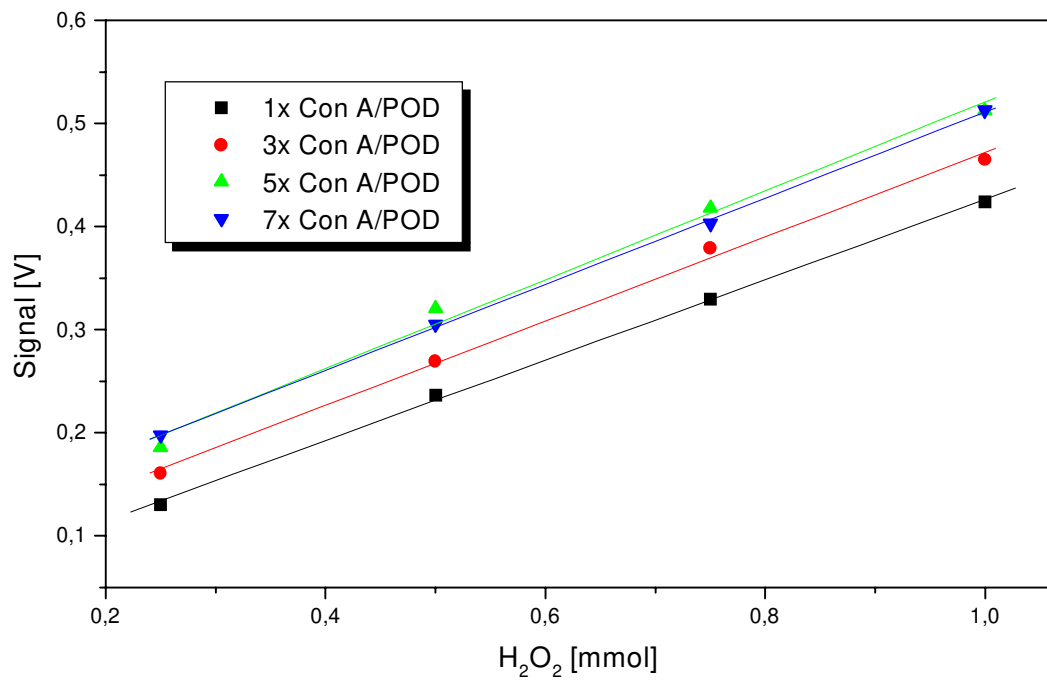


Abb. 38: Kalibration des POD-FET mit Stärke-Grundmembran nach ein-, drei-, fünf- und siebenmaligem Bioaffinity Layering

Alle Immobilisierungen außer der Stärke-Grundmembran wurden von dem mit CAFCA gesteuerten FIA-System automatisch durchgeführt. Neben der Anzahl an Immobilisierungsschritten ist auch die Art des zu immobilisierenden Enzyms (hier stellvertretend GOD oder POD) wählbar. Ein Austausch des Enzyms im Zuge einer Neuimmobilisierung oder gegen ein anderes ist durch das Ablösen der Enzymschicht mit einem pH-Shift leicht und ebenfalls automatisch möglich.

Nach dem Aufbau einer automatisierten und leistungsfähigen Online-Analytik wird in den folgenden Kapiteln mit deren Hilfe die Eignung zur Bioprozeßregelung getestet.

6 Bioprozeßregelung mit Chemo- und Biosensoren

In den vorangegangenen Kapiteln wurden Online-Analyseverfahren beschrieben, die eine mögliche Basis zur Bioprozeßregelung bilden. Die besprochenen Probleme der Meßverfahren wie der Verzögerungszeit, der Meßstörungen und Sensitivitäts- und Stabilitätsverluste konnten teilweise durch verbesserte Analysemethoden und Automatisierungsverfahren gelöst werden. In diesem und den folgenden Kapiteln wird nun gezeigt, daß der Einsatz verbesserter Regelungsalgorithmen weitere Vorteile mit sich bringt.

Die wichtigsten Regelungsmechanismen können in die folgenden Klassen eingeordnet werden können [108]:

1. Zweipunktregler
2. Proportional- Integral- Differential- Regler (PID-Regler)
3. PID-Regler mit einer Parameteradaption (Advanced PID)
4. Fuzzy-Controller, die mit heuristischen "Wenn-dann-Regeln" ausgestattet sind und die auf der Fuzzy-Logik basieren
5. Modellgestützte oder prädiktive Regler, Self-tuning-controller und Regler, die mit künstlichen neuronalen Netzen arbeiten (Advanced Control)

Moderne Verfahren der Regelungstechnik werden allerdings im Bereich der chemischen und verfahrenstechnischen Industrie nur zögernd eingesetzt. Die große Anzahl der Prozeßführungsprobleme wird immer noch mit konventionellen Verfahren, wie PID-, Kaskaden- oder Verhältnisregelungen gelöst. In einer japanischen Studie [104] wird festgestellt, daß höchstens 5 bis 8 % der Regelungsaufgaben den mit dem Einsatz moderner Methoden verbundenen Aufwand rechtfertigen. Gleichwohl sei dieser Anteil meist von strategischer Bedeutung, weil es hierin um die Lösung von Schlüsselproblemen bezüglich der Zielgrößen Produktqualität oder Herstellungskosten gehe. Eine deutsche Studie zeigt ähnliche Ergebnisse [105]. Es ist also nötig, die Attraktivität moderner Methoden dadurch zu erhöhen, daß die mit ihrer Anwendung verbundenen Kosten deutlich verringert werden. Ein Weg dorthin ist die Verkürzung der Planungsphase zur Erarbeitung von Konzepten mit höherer Regelungstechnik, beispielsweise durch Nutzen der Möglichkeiten eines regelungstechnisch orientierten Simulationswerkzeugs [106].

6.1 Digitale Regelung

Im Gegensatz zu analogen Regelungen, bei denen die Regeldifferenz kontinuierlich gebildet wird, liegt die Regeldifferenz bei der Verwendung der beschriebenen Meßverfahren nur zu bestimmten Zeitpunkten vor. Der Regler bildet aus den diskreten Informationen die Stellgröße, die somit zwischen zwei Abtastzeitpunkten konstant bleibt. Man spricht von einer digitalen Regelung. Digitale und analoge Regler haben folgende Aufgaben:

- Einhaltung eines Sollwerts
- Eliminierung der Einwirkung von Störgrößen auf den Prozeß
- Robustheit gegenüber Parameteränderungen des Prozesses
- Einhaltung eines zeitlich nicht ändernden Regelverhaltens nach einer Sollwertänderung

Die in dieser Arbeit durchgeführten Regelungen sind entweder Festwert- oder Folgeregelungen. Bei Festwertregelungen liegt ein konstanter Sollwert vor. Diese Art der Regelung kommt in der chemischen Verfahrenstechnik und Biotechnologie am häufigsten vor. Allerdings werden auch Folgeregelungen erprobt, bei denen der Sollwert zeitlich nicht konstant ist.

6.2 Definition der Güte einer Regelung

Um die verschiedenen Regelalgorithmen in ihrer Wirksamkeit zu unterscheiden, werden verschiedene Begriffe beschrieben, die zur Definition der Güte einer Regelung wichtig sind.

Dämpfung

Wie bei allen rückgekoppelten Systemen kann auch bei der Regelung eine ungünstige Parameterwahl zu einem instabilen Regelverhalten führen. Die Regelgröße oszilliert dann um den Sollwert, wobei es passieren kann, daß die Amplitude der Schwingung ständig steigt. Der Regler ist dem zu regelnden Prozeß anzupassen, damit man ein stabiles, gut gedämpftes Regelverhalten erhält.

Maximaler Überschwinger

Auch eine gut gedämpfte Schwingung kann ein starkes Überschwingen der Regelgröße aufweisen. Diese beiden Verhaltensweisen sind unabhängig voneinander. Unter Umständen

wird ein starkes Überschwingen erduldet, da dadurch die Schnelligkeit der Regelung erhöht wird (siehe Regeldynamik). Insbesondere bei biotechnischen Fed-Batch-Regelungen ist ein Substratmangel unerwünscht. Ein Überschwingung kann dagegen toleriert werden. In anderen Fällen ist eine Überschwingung unerwünscht; z.B. kann eine Überschwingung bei einer Temperaturregelung zu Denaturierungen führen.

Regeldynamik

Die Zeit, in der ein Sollwert erreicht wird, ist ein Maß für die Regeldynamik. Zu dynamische Regler können zu Überschwingungen oder Oszillationen neigen. Regler mit zu geringer Dynamik können den Sollwert unter Umständen nur nach einer großen Einregelzeit erreichen [107].

Robustheit

Ändert sich der Prozeß, so sind die Reglerparameter nicht mehr optimal eingestellt. Dies ist insbesondere bei biotechnischen Prozessen der Fall, bei denen man mit den Zeitvarianzen biologischer Systeme umgehen muß. Die Regelung darf in diesem Fall nicht instabil werden, so daß von vornherein dafür zu sorgen ist, daß die Parameter in einem bestimmten (je nach Problem mehr oder weniger großen) Bereich um den Nominalpunkt der Streckenkennwerte nicht zu Oszillationen führen. Die Robustheit einer Regelung steht vielfach im Gegensatz zur Regelgenauigkeit.

Regelgenauigkeit

Bleibende Regelabweichungen können mit einem I-Anteil (siehe PID-Regler) kompensiert werden. Bei Bioprozessen, in denen die biologische Aktivität höher oder niedriger als erwartet ausgefallen ist, kommt es oft zu solchen konstanten Regelabweichungen. Verstärkt man allerdings den I-Anteil, wird die Regeldynamik herabgesetzt.

Es zeigt sich, daß zur Wahl eines optimalen Reglers ein Kompromiß aus zum einen der Regelgenauigkeit und Regeldynamik, zum anderen der Regelgenauigkeit und Robustheit geschlossen werden muß. Gerade die Biotechnologie ist deswegen auf Simulationen angewiesen, die, wenn auch auf einfachen Modellen basierend, die Regelung erst ermöglichen.

6.3 Simulationswerkzeuge zur Bestimmung der Regelungsparameter

Zur Simulation geregelter Prozesse wird ein in Turbo-Pascal 7.0 [109] angefertigtes Softwareprogramm verwendet.

Der Test der Robustheit einer Regelung ist dabei eine der wichtigsten Aufgaben des Simulationsprogramms. Zum einen treten Meßfehler auf, die das Regelungsproblem erschweren, und sie müssen abgeschätzt und ins Simulationsprogramm einbezogen werden. Oft wird mit Modellsystemen gearbeitet, in denen solche Abweichungen vernachlässigt werden. Damit kann nicht ausgeschlossen werden, daß z.B. Oszillationen um den Sollwert auftreten, die in der Simulation nicht erfaßt worden sind.

Zum anderen ist es notwendig, die Parameter für jedes neue Regelungsproblem neu zu bestimmen. Bei PID-Regler sind nur drei Parameter zu optimieren. Bei neuronalen Netzen aber beliebig viele, je nach Komplexität des Problems und der Leistung des Rechners. In dieser Arbeit wurden acht Parameter für ausreichend erachtet (siehe Kapitel 9).

Das in Turbo-Pascal 7.0 angefertigte Softwareprogramm sieht nun folgendes vor:

- die Simulation eines Regelungsverlaufs mit einer bestimmten Regelungsmethode (hier Zweipunktregler, PID-Regler oder neuronales Netz)
- die Berücksichtigung von Tot- und Verzögerungszeiten
- die Simulation der Meßwerte und der tatsächlichen Konzentrationen im Reaktor
- die gleichzeitige Einbeziehung aller Meßfehler und Schwankungsbandbreiten; die Fehler werden dabei über eine Random-Prozedur erzeugt
- die Volumenzunahme und -abnahme des Reaktionsmediums durch Zufütterung bzw. Probenahme wird berücksichtigt; aufgrund der Simulation kann diejenige Konzentration der zugeführten Substratlösung vorherbestimmt werden, die eine minimale Änderung des Reaktorvolumens bewirkt (alle ein- und ausfließenden Volumenströme heben sich im Idealfall auf)
- die automatische und optimale Anpassung der Regelungsparameter über den Simplex-Algorithmus (siehe unten)
- eine graphische Darstellung des Regelungsverlaufs, der Pumprate und der Abweichung des Istwerts vom Sollwert
- die manuelle Einstellung von Regelungsparametern, um z.B. Oszillationen zu simulieren,
- die Berücksichtigung verschieden hoher Verzögerungszeiten
- die Verwendung bei der Wahl des geeignetsten Regelungstyps

Die Berechnung der Regelparameter erfolgt nun so, daß zunächst ein Parametersatz durch eine Random-Prozedur erzeugt wird. Basierend auf einem Prozeßmodell wird dann eine Regelung mit den erzeugten Parametern simuliert. Die Abweichung A des Istwerts vom Sollwert während der gesamten Simulationsdauer berechnet sich nach:

$$A_W = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_{W,i})^2 \quad (10)$$

n ist die Anzahl der Meßwerte, $x_{W,i}$ ist die Regelabweichung beim Meßwert i

Die Abweichung A wird nun registriert und dient als Gütemaß für die verwendeten Parameter. Mittels des Simplex-Algorithmus [110-112], der insbesondere im Bereich der Wirtschaft zur Lösung von Optimierungsproblemen eingesetzt wird, werden die Parameter nun sukzessiv so verändert, daß die Summe der Regelabweichungen verringert wird. Ein Abbruchkriterium (z.B. eine Abweichung $A_W < 5\%$) führt schließlich zur Ausgabe der Parameter. Die Abbildung 39 verdeutlicht diese Art der Parameteroptimierung.

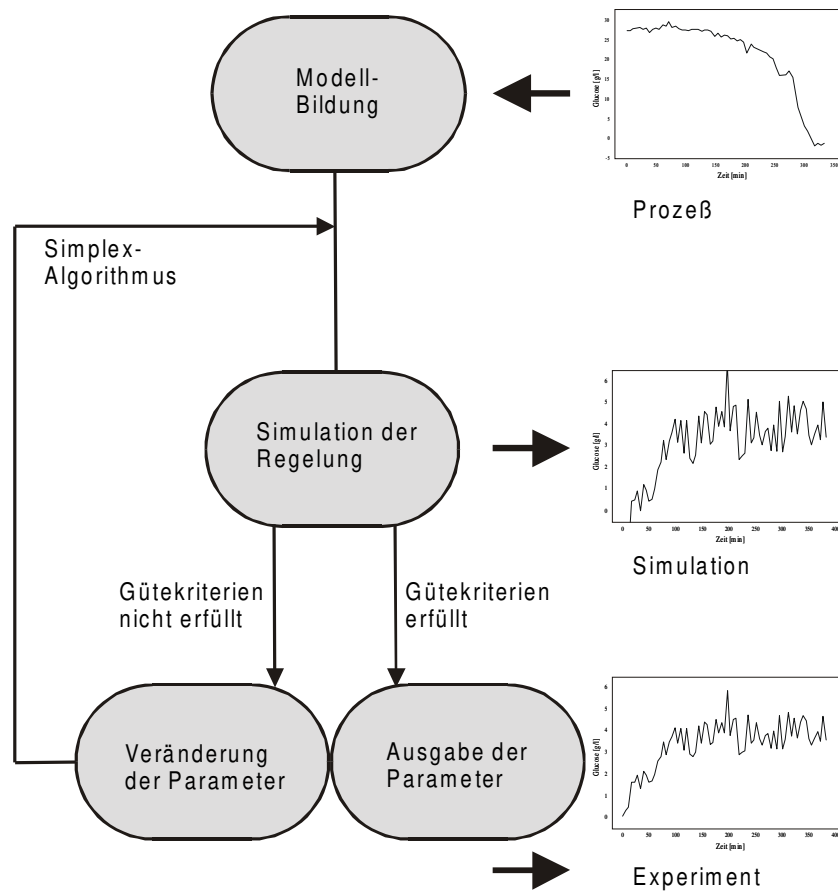


Abb. 39: Berechnung der Regelparameter durch eine Softwaresimulation; zur Modellbildung werden reale Prozeßdaten verwendet, nach einer Simulation läßt sich die Bioprozeßregelung durchführen

Bei den betrachteten Reaktionen liegen keine linearen, sondern hoch nichtlineare Optimierungsprobleme vor. In der Praxis weicht man zur Berechnung der Regelparameter auf Bestimmungsmethoden wie die Ziegler-Nichols- [113] oder die Cohen-Coon-Methode [114] aus. Andere Einstellregeln finden sich in der Literatur [115-120]. Der Großteil der Einstellregeln ist allerdings nur für lineare Regelungsprobleme entwickelt worden.

Die hier vorgestellte Art der Parameterbestimmung mittels des Simplex-Algorithmus und der Minimierung der Abweichung A wird im folgenden bei allen Regelalgorithmen verwendet. Prinzipiell sind noch grundsätzlich andere Optimierungsmethoden möglich; sie werden in Kapitel 10 besprochen.

Der rechnergestützte Simulation von Regelexperimenten hat folgende Vorteile:

- ein Test der Prozeßregelung mit verschiedenen Regelalgorithmen ist durchführbar
- weniger praktische Experimente sind notwendig
- Inbetriebnahmezeiten werden eingespart

6.4 Die Probleme konventioneller Regelung

Bioprozesse sind komplexe und hoch nichtlineare chemische Systeme. Für solche Systeme wurde eine Vielzahl von Theorien entwickelt. Der gewöhnliche kinetische Ansatz ist folgender: die Schlüsselvariablen werden identifiziert, die entsprechenden Gleichungen formuliert, und mit den gegebenen Ausgangsbedingungen werden mit einer geeigneten numerischen Methode die Gleichungen gelöst.

In vielen Fällen ist es nicht möglich, das System zu quantifizieren, da die Annahmen nicht ausreichen oder sogar inkorrekt sind. Selbst mit richtigen Annahmen bleibt die Schwierigkeit, die Gleichungen numerisch zu lösen. Mit steigendem Interesse an künstlichen neuronalen Netzen in chemischen Prozessen hofft man durch diese Methode, den komplexen Gleichungen auszuweichen und ein Black-Box-Modell generieren zu können. In den letzten Jahrzehnten wurde die Regelung von Kultivierungen eingehend studiert, bislang entweder mit konventioneller Regelungstechnik oder mit adaptiven Regelsystemen. Neuronale Netze wurden erst in den letzten Jahren vermehrt in der Prozeßregelung eingesetzt [121]. Die unzureichende Rechnerleistung war bislang ein Problem bei der Entwicklung größerer Netzwerke.

Adaptive Regler werden in Feedback-Regelsystemen verwendet, um die Regelungsparameter automatisch zu ändern, falls Änderungen im Prozeßverhalten auftreten. Für die adaptive Regelung gibt es hauptsächlich drei Designstrategien: die gesteuerte adaptive Regelung, die adaptive Regelung mit Referenzmodell und die Regelung mit Identifikationsmodell. Diese Methoden wurden in der Literatur beschrieben [107,122,124-125]. Im ersten Fall betrachtet man Hilfsvariablen. Um die Wachstumsgeschwindigkeit von Zellen konstant zu halten, wurden z.B. die Glucosekonzentration und der physiologische Status der Zellen gemessen [126]. Beides sind Hilfsvariablen, die zwar entscheidend für das Wachstum der Zellen sind, aber dennoch nur indirekt die Regelung der Wachstumsgeschwindigkeit ermöglichen. In diesem Beispiel war eine adaptive Regelung durchführbar. Oft aber sind die biochemischen Zusammenhänge unklar oder es fehlen die Hilfsvariablen. Im zweiten Fall der Regelung mit Referenzmodell sind wegen der vielen Freiheitsgrade bei der prinzipiellen Anordnung des einstellbaren Systems, der verschiedenen Filter und der großen Zahl der zu wählenden Parameter jeweils maßgeschneiderte Lösungen erforderlich. Im dritten Fall der adaptiven Regelung mit Identifikationsmodell oder selbstoptimierenden Reglern wurden solche Regler bereits 1981 in kontinuierlich durchgeführten Kultivierungen [123] (mit einem Kalman-Filter [127]) eingesetzt. Im Gegensatz zu Fed-Batch-Prozessen war hier die Wachstumsrate allerdings annähernd konstant, was das Regelungsproblem erheblich erleichterte.

Große Fortschritte verdankt die adaptive Regelung in den letzten Jahren dem Einsatz der Fuzzy-Logik [128-130]. Das liegt vor allem daran, daß die Stabilität von komplexeren Reglern durch heuristische Regeln stark erhöht wird. Die Fuzzy-Logik ermöglicht es, auf bequeme und sehr transparente Weise die Adaptionsregeln linguistisch zu formulieren. Jedoch wird die Einfachheit der Fuzzy-Regelung durch riesige, wenig einleuchtende Regelwerke (bis zu 150 Regeln) vielfach umgangen [131].

6.5 Durchführung von Bioprozeßregelungen

Mit den automatisierten Online-Meßverfahren und dem besprochenen Simulationswerkzeug mit integrierten Regelalgorithmen ist es nun möglich, eine Bioprozeßregelung durchzuführen. Die Anforderungen und die Art der zu regelnden Größe können dabei sehr unterschiedlich sein. Am häufigsten wird versucht, die Substratkonzentration (meist Glucose) im Reaktor konstant zu halten. Bezogen auf Hefe verursachen zu hohe Glucosekonzentrationen eine Produktion von Ethanol (siehe Kapitel 7), zu niedrige Glucosekonzentrationen können

dagegen wachstumslimitierend wirken. Die Glucosekonzentration hat direkten Einfluß auf die Biomassekonzentration, so daß es mit der Kenntnis der Zusammenhänge möglich ist, während der Wachstumsphase gezielt niedrige Biomassekonzentrationen einzustellen und während der Produktionsphase eine Hochzelldichte zu erreichen [153]. Außerdem wird durch Regelstrategien versucht, unerwünschte Sekundärmetaboliten wie Acetat gering zu halten, die die Ausbeute an Biomasse vermindern [154]. Es reicht vielfach aus, sehr einfache Regelalgorithmen zu verwenden. In den folgenden Kapiteln wird versucht, mit möglichst einfachen Regelalgorithmen eine Bioprozeßkontrolle zu verwirklichen. Mit steigender Komplexität des Regelungsproblems wird auch die des Reglers erhöht.

7 Zweipunktregelungen bei biotechnischen Prozessen

Sehr einfache Regelalgorithmen sind in der industriellen Anwendung immer noch am weitesten verbreitet. Das liegt vor allem an der Robustheit und der Anschaulichkeit des Regelalgorithmus. Insbesondere Zweipunktregler, bei denen eine Stellgröße nur zwei diskrete Ausgangssignale erzeugt, z. B. ein An- und Aussignal einer Pumpe. In technischen Serienfabrikaten sei hier auf einen Zweipunkt-Temperaturregler in Form eines Bimetallstreifens hingewiesen, der eine Heizung entweder an- oder ausschaltet. In der Bioprozeßregelung kann ein solcher Algorithmus immer dann eingesetzt werden, wenn nur geringe Anforderungen an die Regelgenauigkeit gestellt werden. Die folgenden Beispiele sollen das veranschaulichen.

7.1 Zweipunktregelungen zur gezielten Produktion von Biomasse

Batch-Prozesse hängen stark von den Ausgangsbedingungen ab. Experimente mit unterschiedlichen Startwerten an Glucose in Kultivierungen von *Klebsiella oxytoca* zeigen, daß eine höhere Glucosekonzentration auch eine höhere Biomasseproduktion bewirkt [126]. Gleiches gilt auch für Fed-Batch-Prozesse, in denen das Substrat kontinuierlich oder diskret zugegeben wird. Die Biomasseproduktion sollte hier nicht nur von der Ausgangskonzentration, sondern wird auch von der Zufütterung an Substrat abhängen. Um dies zu zeigen, werden zwei Fed-Batch-Experimente mit *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt. Geregelt wird bei gleichen Ausgangsbedingungen auf die Glucosekonzentrationen 5 g/l und 10 g/l. Die Bedingungen sind in der folgenden Tabelle 14 dargestellt:

Tab. 14: Bedingungen zweier Kultivierungen von *Saccharomyces cerevisiae* mit Zweipunktregler

Mikroorganismus	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Reaktor	2 l CSTR mit 1,3 l Schatzmann-Medium, $c_{\text{Gluc}}^0 = 2 \text{ g/l}$, $T = 34 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 5,1
Online-Analytik	FIA mit GOD-Kartusche/ Clark-Elektrode, ESIP Probenahme-modul, Analysenfrequenz 8 h^{-1} , Verdünnung 1:3 bzw. 1:10, Injektionsvolumen $30 \mu\text{l}$
Offline-Analytik	Glucose-Referenzanalytik mit YSI 2700; BTM (siehe Anhang)
Regelsystem	Zweipunktregler: $c_{u1} = 4,5 \text{ g/l}$, $c_{o1} = 5,5 \text{ g/l}$, $c_{u2} = 9,5 \text{ g/l}$, $c_{o2} = 10,5 \text{ g/l}$; zugefüttertes Medium: 20 g/l Glucose in Schatzmann-Medium; konstante Pumpraten von 0 (aus) bzw. 1,8 ml/min (an); Regelung auf 5 g/l bzw. 10 g/l Glucose
Dauer	10 h

Für ein solches Regelungsproblem, bei dem geringe zeitliche Schwankungen der Substratkonzentration nicht stören, bietet sich der Einsatz eines Zweipunktreglers an. Das Analysesystem detektiert dabei laufend die Glucosekonzentration. Sobald diese unter einen unteren Grenzwert c_u fällt, aktiviert der Regler eine Pumpe, die mit konstanter Pumprate solange pumpt, bis ein oberer Grenzwert c_o überschritten ist. Diverse Modifikationen sind prinzipiell möglich, z. B. die Einstellung von Zwischenniveaus, auf denen die Pumpe nur mit halber Geschwindigkeit arbeitet. Das System benötigt zudem keine Wachstumsmodelle.

Die Ergebnisse zeigen die Abbildungen 40 und 41:

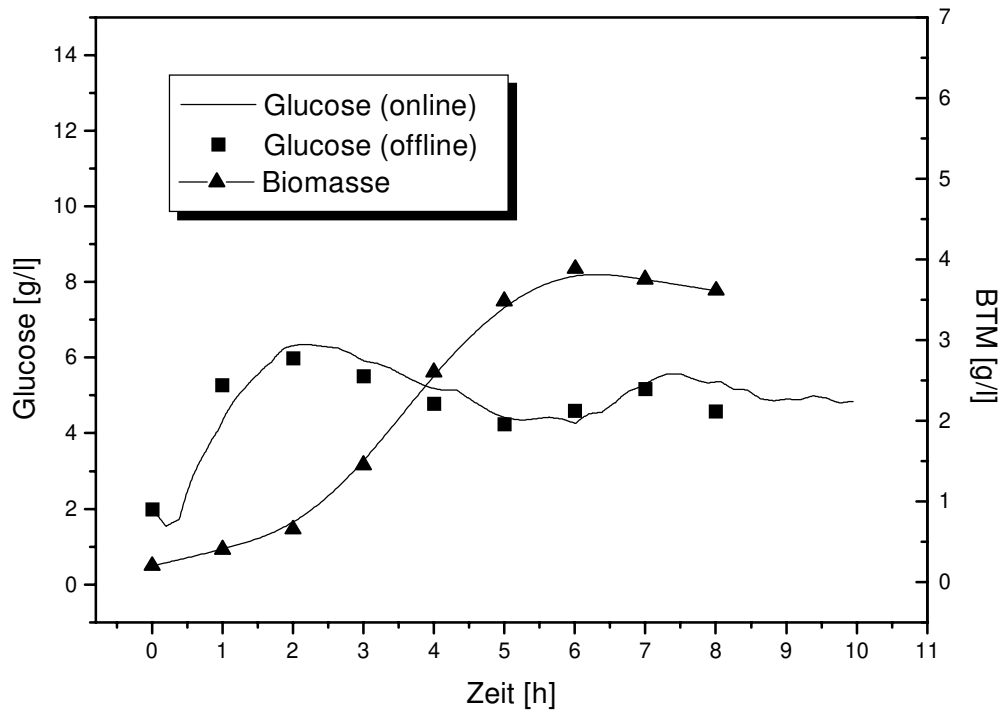


Abb. 40: Verlauf der Glucosekonzentration und der Biotrockenmasse in einer Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*; Regelung der Glucosekonzentration auf 5 g/l

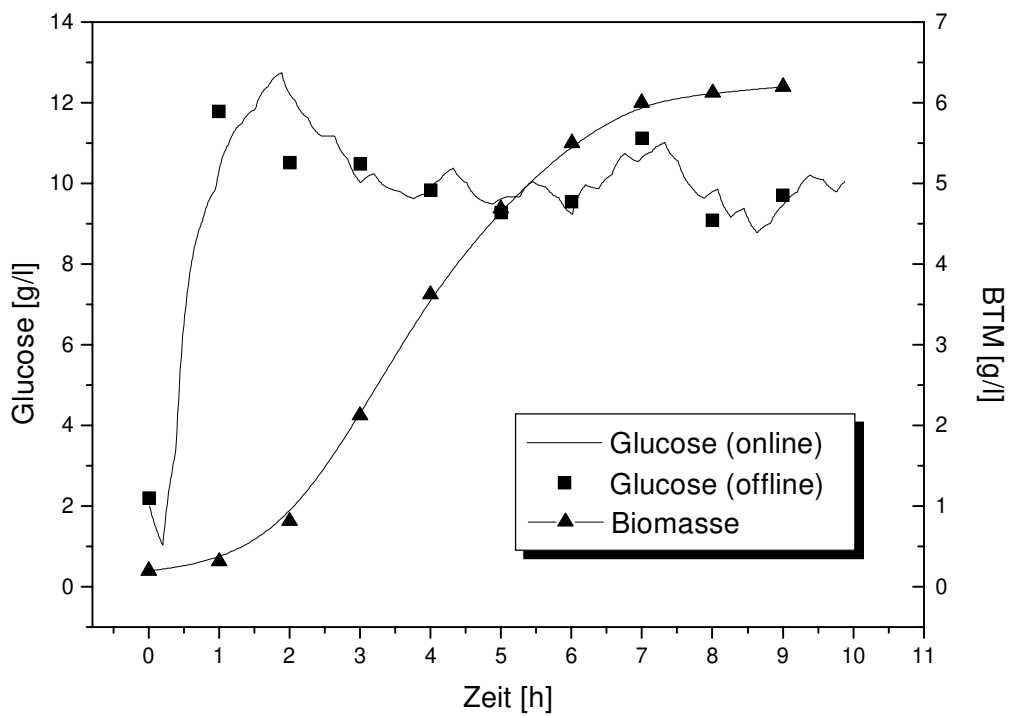


Abb. 41: Verlauf der Glucosekonzentration und der Biotrockenmasse in einer Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*; Regelung der Glucosekonzentration auf 10 g/l

In den Fed-Batch-Prozessen werden drei Phasen beobachtet: die Lag-Phase, die exponentielle (Log-) Phase und eine stationäre Phase, die möglicherweise durch Stoffwechselprodukte verursacht wird. Von Beginn der Kultivierung an wird glucosehaltiges Medium zugefüttert, bis der obere Grenzwert überschritten wird. Die Pumpe wird daraufhin gestoppt. Durch die Verzögerung des Probenahmemoduls steigt die gemessene Konzentration auf bis zu 6,4 g/l bzw. 12,9 g/l Glucose an. Hier zeigt sich der Nachteil des Zweipunktreglers. Die zwei Parameter „an“ oder „aus“ lassen keine Flexibilität des Reglers zu. Mit einer mittleren Abweichung von 0,6 g/l bzw. 0,5 g/l nach drei Stunden Kultivierungsdauer ist die Forderung nach Robustheit allerdings erfüllt worden. Die Biomasseproduktion ist in der zweiten Kultivierung deutlich höher als in der ersten (12 g/l BTM statt 8 g/l nach acht Stunden). Diese Beeinflussung der Prozeßparameter könnte durch die relativ einfache Zweipunktregelung der Substratkonzentration bewirkt worden sein.

Ähnliche Experimente wurden bereits mit reinen Batch-Kultivierungen ohne Regelung durchgeführt [126]. Es wurde versucht, die Korrelation zwischen den Ausgangsbedingungen (d. h. insbesondere der Ausgangsglucosekonzentration) und der zeitlichen Biomasseproduktion mit Hilfe von künstlichen neuronalen Netzen zu erlernen. Damit war es möglich, den Verlauf der Biomasseproduktion auch für noch nicht durchgeführte Kultivierungen vorherzusagen und die Startbedingungen zu optimieren. Ob sich dieses Verfahren auch auf Fed-Batch-Prozesse anwenden läßt, kann nur nach einer weitaus größeren Zahl an Experimenten gesagt werden. Dennoch zeigen diese beiden einfachen Experimente bereits, daß mit Hilfe von einfachen Regelalgorithmen das Wachstum von Hefezellen beeinflußt werden kann. Die Anwendung neuronaler Netze wird an entsprechender Stelle besprochen (siehe Kapitel 9).

7.2 Zweipunktregelung zur Bestimmung der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit

Wie man im vorangegangenen Kapitel 7.1 erkennen kann, neigt ein Zweipunktregler naturgemäß zu Oszillationen um den Sollwert. Diese können genutzt werden, um Prozeßvariable zu bestimmen. Damit wäre ein Weg offen, die in Kapitel 7.1 zum Training eines neuronalen Netzes geforderten Kultivierungsdaten (z. B. die Wachstumsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Substratkonzentration) mit erheblich weniger Aufwand zu ermitteln. Stellt man sich die eine geregelte Kultivierung aus mehreren Untereinheiten aufgebaut vor, so liegen jeweils zu Beginn einer Untereinheit definierte Bedingungen vor. Die Abbildung 42 veranschaulicht diese Grundidee.

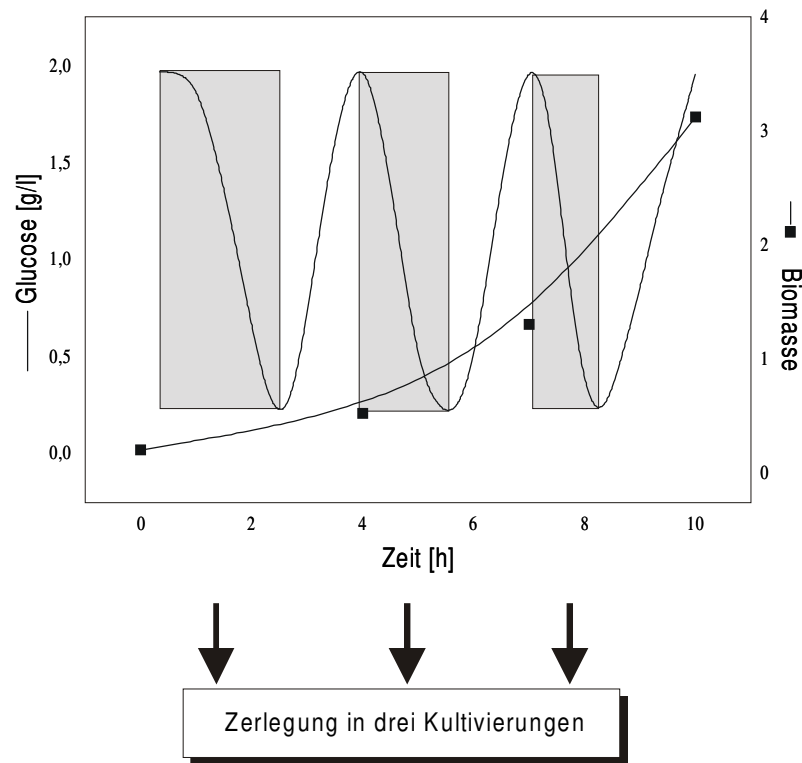


Abb. 42: Idealisierter Verlauf einer Zweipunktregelung auf 1,25 g/l Glucose; die Oszillationen kann man sich aus drei verschiedenen Kultivierungen aufgebaut denken

Jeweils zu den Schwingungsmaxima wird die Biomasse bestimmt. Die Glucosekonzentration erreicht zu diesen Zeitpunkten immer denselben Wert (2 g/l im Beispiel). Der Vorteil ist, dass eine Versuchsreihe mit mehreren Kultivierungen bei konstanter Ausgangskonzentration an Glucose und Variation der Biomasse durch ein Regelexperiment ersetzt werden kann. Aus den Verläufen der Glucosekonzentration und der Biomasse kann dann nicht nur auf die jeweilige spezifische Wachstumsgeschwindigkeit μ und deren zeitlichen Verlauf geschlossen werden. Vielmehr sollte sich eine direkte Abhängigkeit der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration bei geringen Glucosekonzentrationen erkennen lassen. Eine oft genutzte Beschreibung dieses Zusammenhangs ist das Monod-Modell:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{c_s}{c_s + K_S} \quad (11)$$

mit der maximalen spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit μ_{\max} , der Substratkonzentration c_s und der Monod-Konstanten K_S , die für Hefezellen im Bereich um 0,1 g/l liegt.

Meist reicht zur Beschreibung der Realität das Modell nicht aus. Die Gründe hierfür sind zum einen die hohen Ionenstärken (durch hohe Substratkonzentrationen), die eine Veränderung der Zelleigenschaften bewirken. Zum anderen werden durch hohe Zellmassenkonzentrationen Transportlimitierungen verursacht.

Um die Abhängigkeit $\mu = f(c_s)$ zu zeigen, sollte eine Messung der Glucosekonzentration im Bereich unterhalb von 0,5 g/l Glucose und die Bestimmung der Biomassekonzentration weiterhelfen. Ebenso kann auch der Anstieg der Glucosekonzentration durch die Zufuhr an Glucose zur Berechnung von μ herangezogen werden.

Gegenüber den Regelungsexperimenten in Kapitel 7.1 müssen die Regelparameter verändert werden. Das Ziel ist jetzt eine konstante maximale Amplitude der Überschwingung über den Sollwert. Dies kann erreicht werden, indem entweder die Zufütterungsrate erhöht wird oder das Konzentrationsintervall $[c_u, c_o]$ vergrößert wird. Letzteres wird durchgeführt, da dann mit geringeren Volumenströmen gearbeitet werden kann. Die Kultivierungsbedingungen sind in der Tabelle 15 aufgelistet. Als Online-Meßverfahren bietet sich die in Kapitel 3.4 beschriebene FIA ohne Probenahmemodul an, denn die Schwingungsfrequenz wird im Verlauf der Kultivierung so hoch, daß nur ein Meßsystem mit hoher Analysenfrequenz die Oszillationen verfolgen kann.

Tab. 15: Bedingungen einer Kultivierungen von *Saccharomyces cerevisiae* mit Zweipunktregler

Mikroorganismus	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Reaktor	5 l CSTR mit 4 l Schatzmann-Medium, $c_{\text{Gluc}}^0 = 2 \text{ g/l}$, $T = 34 \text{ °C}$, pH 5,1
Online-Analytik	Fast-FIA ohne Probenahmemodul, Analysenfrequenz 60 h^{-1} , Injektionsvolumen $30 \text{ }\mu\text{l}$
Offline-Analytik	Glucose-Referenzanalytik mit YSI 2700; BTM (siehe Anhang)
Regelsystem	Zweipunktregler: $c_u = 0,5 \text{ g/l}$, $c_o = 2 \text{ g/l}$; zugefüttertes Medium: 20 g/l Glucose in Schatzmann-Medium; konstante Pumprate von 0 (aus) bzw. 1,8 ml/min (an); Regelung auf 1,25 g/l Glucose
Dauer	12 h

Die nächsten Abbildungen zeigen die erhaltenen Verläufe der Biomassekonzentration und des Glucoseverbrauchs:

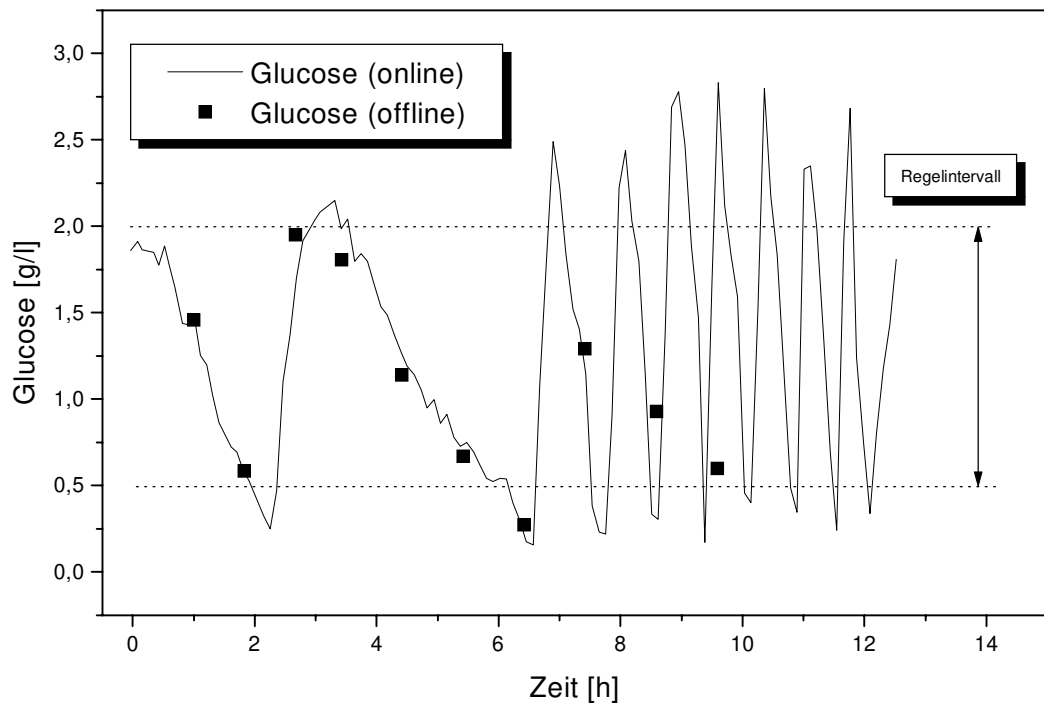


Abb. 43: Verlauf der Glucosekonzentration in einer Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* mit Zweipunktregler; $c_u = 0,5 \text{ g/l}$, $c_o = 2,0 \text{ g/l}$; Regelung auf $1,25 \text{ g/l}$ Glucose

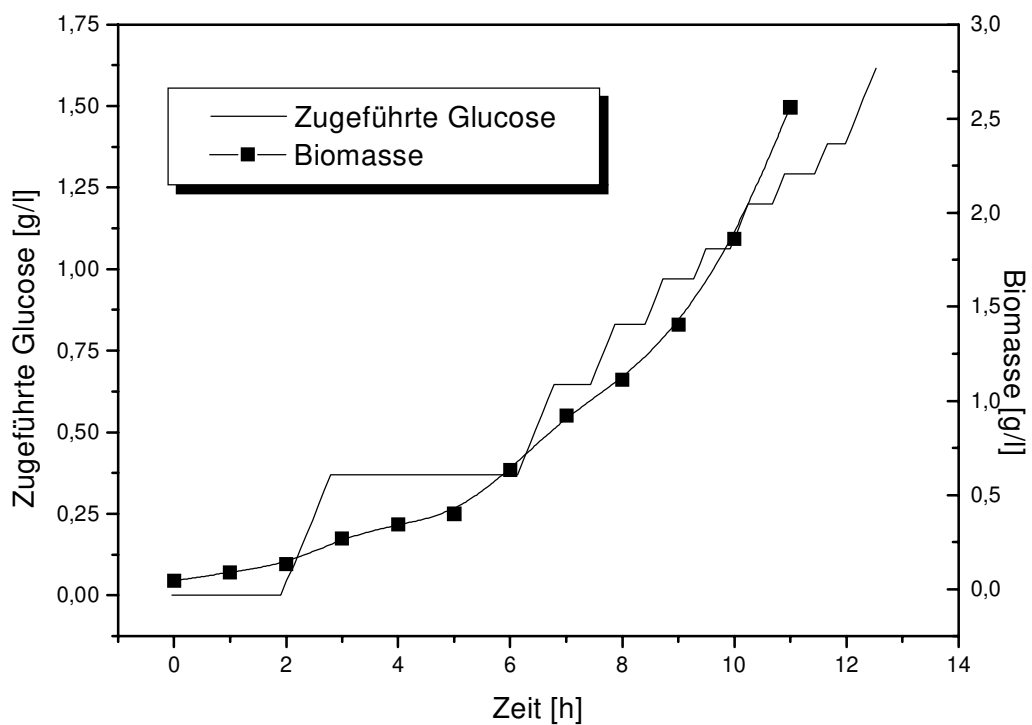


Abb. 44: Verlauf des Glucoseverbrauchs und der Biomasseproduktion in einer Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* mit Zweipunktregler (siehe Abbildung 43)

Der Glucoseverlauf läßt sich als eine Oszillation mit steigender Frequenz und annähernd konstanter Amplitude beschreiben (siehe Abbildung 41). Obwohl eine maximale Konzentration von 2 g/l Glucose gefordert war, bewirkt die Verzögerung durch das FIA-System eine Erhöhung auf 2,3 bis 2,8 g/l Glucose. Die Minima liegen bei 0,2 bis 0,4 g/l; eine Substratlimitierung liegt also nicht vor. Der Mittelwert ist 1,3 g/l Glucose. Die Oszillation läßt sich in 9 Untereinheiten zerlegen, wobei jede Einheit bekannte Ausgangswerte der Glucosekonzentration und der Biomasse besitzt. Die Referenzanalytik ist in dem entscheidenden Bereich der Regelung (ab 6 Stunden) nur schwer durchführbar. Durch die sehr schnellen Änderungen der Glucosekonzentration gelingt die Zuordnung der Offline-Werte zu den einzelnen Schwingungen nicht. Die folgenden Experimente werden deshalb mit einer herkömmlichen FIA mit GOD-Kartusche als Referenz ausgeführt.

Es ist möglich, aus den gesammelten Daten eine Modellierung des Zellwachstums durchzuführen, wie im folgenden gezeigt wird.

Die Glucosekonzentration hängt von der Verstoffwechslung, der Produktbildung und der Glucosezufütterung ab:

$$\frac{dc_{\text{Gluc}}}{dt} = -\frac{\mu X}{Y_{\text{XC}}} - mX - \frac{q_{\text{P}} X}{Y_{\text{PC}}} + \dot{V} c_{\text{Gluc}}^{\text{ein}} \quad (12)$$

c_{Gluc} ist die Glucosekonzentration, X die Biomasse, μ die spezifische Wachstumsrate, Y_{XC} der zelluläre Ausbeutekoeffizient, m der Maintenance-Koeffizient, q_{P} die spezifische Produktbildungsrate, Y_{PC} der Produktausbeutekoeffizient, \dot{V} der Volumenstrom und $c_{\text{Gluc}}^{\text{ein}}$ die Konzentration der zugeführten Glucoselösung. Wenn die Zellerhaltung und Produktbildung gegenüber dem Zellwachstum vernachlässigbar sind, kann (12) vereinfacht werden zu:

$$\frac{dc_{\text{Gluc}}}{dt} = -\frac{\mu X}{Y_{\text{XC}}} + \dot{V} c_{\text{Gluc}}^{\text{ein}} \quad (13)$$

Mit der Bilanzgleichung für Zellwachstum und Zelltod kann die Biomasseproduktion formuliert werden. Unter der Annahme, daß die Sterberate vernachlässigbar klein gegenüber der Wachstumsrate ist, ergibt sich:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (14)$$

Die Gleichungen (13) und (14) können gelöst werden, wenn die Anfangsbedingungen für die Zell- und Substratkonzentration bekannt sind. Diese sind aus dem Kultivierungsexperiment zugänglich. Die Modellierung ergibt für den betrachteten Zeitraum eine konstante spezifische Wachstumsrate von $0,15 \text{ h}^{-1}$. Auch nach dem Monod-Modell (11) ist eine konstante Wachstumsrate für $c_S \gg K_S$ zu erwarten.

In einem zweiten Experiment wird versucht, die Amplitude der Oszillation möglichst gering zu halten. Das Regelintervall wird auf eine obere Grenze von $c_o = 1,5 \text{ g/l}$ und eine untere Grenze von $c_u = 0,5 \text{ g/l}$ festgesetzt. Um den Crabtree-Effekt zu umgehen, müßte im Konzentrationsbereich von $0-0,5 \text{ g/l}$ Glucose gearbeitet werden. Ein für hohe Zellausbeuten idealer Konzentrationsbereich wäre $0,1$ bis $0,2 \text{ g/l}$.

Die Parameter der Kultivierung 4 sind in der Tabelle 16 aufgelistet. Die bereits angesprochene zusätzliche Referenzanalytik per FIA mit GOD-Kartusche/Sauerstoffelektrode hat dabei keinen Einfluß auf die Regelung und dient nur der Überprüfung der Fast-FIA-Messung.

Tab. 16 Bedingungen einer Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* mit Zweipunktregelung

Mikroorganismus	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Reaktor	5 l CSTR mit 4,0 l Schatzmann-Medium, $c_{\text{Gluc}}^0 = 2 \text{ g/l}$, $T = 34 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 5,1
Online-Analytik	1) Fast-FIA ohne Probenahmemodul, Analysenfrequenz 60 h^{-1} , Injektionsvolumen $30 \mu\text{l}$ 2) Zusätzliche Referenz mit einem FIA-System mit GOD-Kartusche, Analysenfrequenz 15 h^{-1} ; ESIP Probenahmemodul
Offline-Analytik	Glucose-Referenzanalytik mit YSI 2700; BTM (siehe Anhang)
Regelsystem	Zweipunktregler: $c_u = 0,5 \text{ g/l}$, $c_o = 1,5 \text{ g/l}$; zugefüttertes Medium: 20 g/l Glucose in Schatzmann-Medium; konstante Pumprate von 0 (aus) bzw. $1,8 \text{ ml/min}$ (an); Regelung auf $1,0 \text{ g/l}$ Glucose
Dauer	8 h

Die beiden Profile sind in der Abbildung 45 zusammen mit einer YSI-Referenz dargestellt:

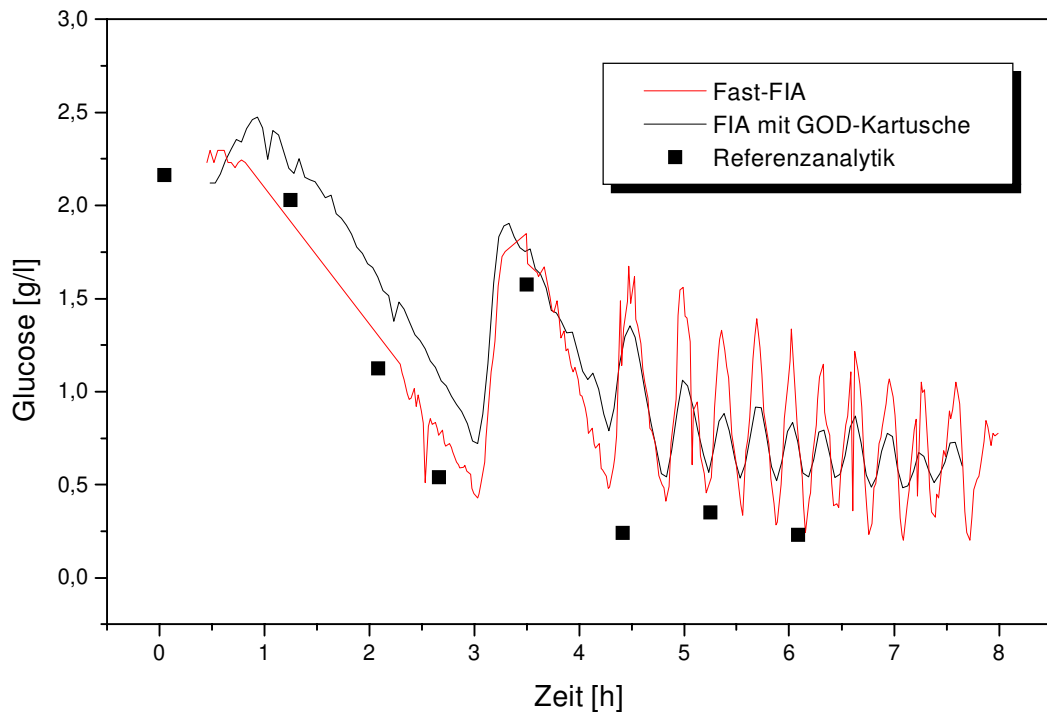


Abb. 45: Verlauf der Glucosekonzentration in einer Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* mit Zweipunktregler; $c_u = 0,5 \text{ g/l}$, $c_o = 1,5 \text{ g/l}$; Regelung auf $1,0 \text{ g/l}$ Glucose; FIA-Referenzmessung mit GOD-Kartusche/ O_2 -Elektrode und YSI-Referenz

Wie bereits in Abbildung 43 erkennt man eine deutliche Oszillation um den Sollwert $1,0 \text{ g/l}$. Die Amplitude ist allerdings wie gefordert geringer als in der vorhergehenden Kultivierung und ein Intervall von maximal $1,8 \text{ g/l}$ und minimal $0,3 \text{ g/l}$ Glucose wird eingehalten. Die Amplitude scheint im Verlauf der Kultivierung abzunehmen, doch könnte ein Grund darin liegen, daß aufgrund der schnellen Konzentrationsänderungen die lokalen Maxima nicht mehr erfaßt werden können. Die Messung des Glucoseverlaufs mit der herkömmlichen FIA spiegelt dieses Ergebnis wider, doch sind die Meßwerte aufgrund des vorgeschalteten Probenahmemoduls um durchschnittlich 25 min verschoben. Die Amplituden sind ebenfalls geringer, was mit dem hohen Eigenvolumen des Moduls und einer hohen Rückvermischung begründet werden kann. Wie theoretisch begründet werden kann, sind die Integrale der korrespondierenden Schwingungspeaks identisch. Zur Offline-Messung der Glucose wurden Proben direkt aus dem Reaktor entnommen; daraus resultiert eine geringfügige Verschiebung

gegenüber den Fast-FIA-Meßwerten. Im Bereich schneller Verstoffwechslung erwies sich die Offline-Probenahme als zu langsam. Die Zellen konnten im Zeitraum zwischen Entnahme und Deaktivierung weiterhin Glucose verstoffwechseln. Um hier eine genauere Referenz zu ermöglichen, ist ein direktes Einfrieren der Zellen oder die Behandlung mit Perchlorsäure effizienter.

Die Kultivierung läßt sich gedanklich in 12 Untereinheiten zerlegen. Trotz einer geringeren Kultivierungszeit gegenüber der vorherigen Messung konnte die Anzahl an Schwingungen von neun auf zwölf gesteigert werden.

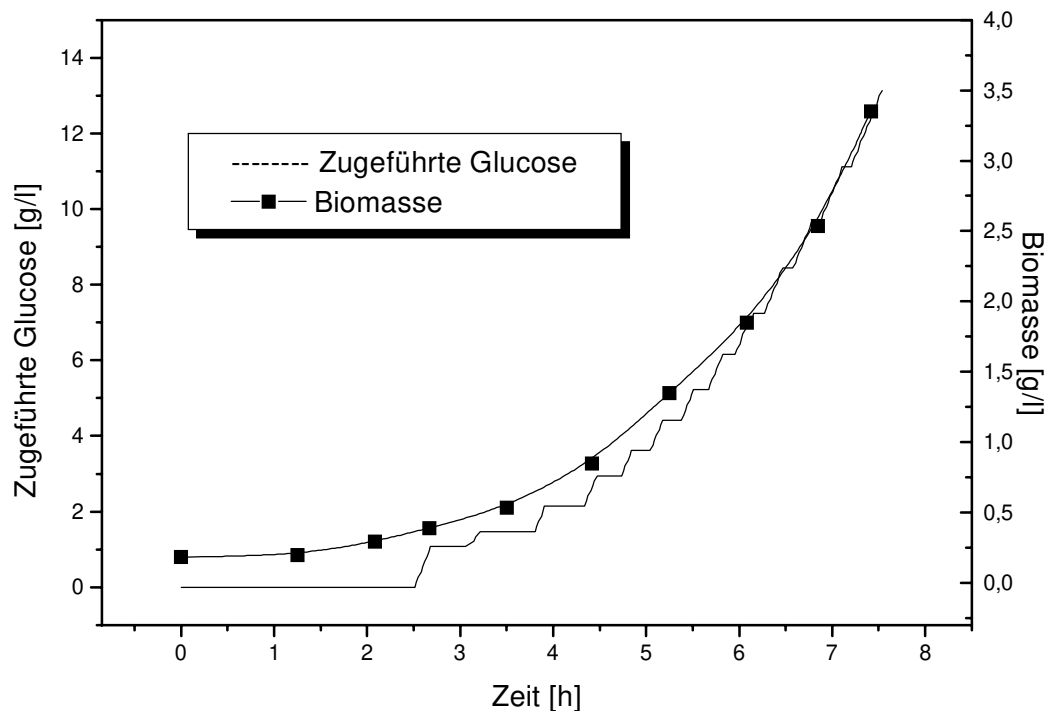


Abb. 46: Verlauf des Glucoseverbrauchs und der Biomasseproduktion in einer Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* mit Zweipunktregler (siehe Abbildung 45)

Auch in diesem Fall errechnet sich eine für den Zeitraum konstante spezifische Wachstumsgeschwindigkeit von $\mu = 0,184 \text{ h}^{-1}$. Gegenüber dem ersten Experiment hat die Absenkung des Sollwerts (und damit des absoluten Konzentrationsbereichs) um 20 % auch eine Erhöhung der Wachstumsgeschwindigkeit von $0,15 \text{ h}^{-1}$ auf $0,184 \text{ h}^{-1}$, d.h. ebenfalls um 20 % bewirkt. Während sich qualitativ die gleichen Aussagen wie im ersten Experiment

machen lassen, ist quantitativ eine deutliche Steigerung der Biomasse zu erkennen. Bereits nach 7,5 Stunden ergibt sich eine Biomasse von 3,5 g/l, während im ersten Experiment nur 1,0 g/l vorlagen.

Die experimentellen Ergebnisse decken sich mit den in der Literatur [132] gewonnenen Erkenntnissen. Dort wird der Zusammenhang zwischen der spezifischen Wachstumsrate μ , der Glucose- und der Ethanolkonzentration beschrieben. Sobald die kritische Glucosekonzentration von 0,082 g/l Glucose [134] (bzw. 0,15 g/l [135], 0,28 g/l [136]) überschritten wird, würde Ethanol von den Mikroorganismen nicht mehr aufgenommen werden. Die Wachstumsrate sei dann zeitlich konstant. Ebenfalls gelte dann eine Proportionalität zwischen der spezifischen Wachstumsrate μ und der spezifischen Glucoseaufnahmerate v . Dieses wird in den Abbildungen 44 und 46 bestätigt, wenn man berücksichtigt, daß der Glucoseverbrauch proportional zu der Glucoseaufnahmerate ist.

Das gezeigte Verfahren geht davon aus, daß die Substrat- und die Biomassekonzentration die beiden entscheidenden Größen für das Zellwachstum sind. Dennoch spielen sicher auch Sekundärmetaboliten wie Ethanol oder Acetat eine wichtige Rolle. Die Bestimmung dieser Größen würde die zugrunde gelegten Modelle verbessern. Das Ziel der Erfassung einer zeitlichen Änderung der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit konnte nicht erreicht werden. Diese blieb im gesamten betrachteten Zeitraum annähernd konstant. Erst bei geringeren Substratkonzentrationen sollte sich die Abhängigkeit der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit von der Glucosekonzentration zeigen. Dazu muß im Bereich von 0-0,5 g/l Glucose gemessen und geregelt werden. Insbesondere ließen sich dann die Auswirkungen des Crabtree-Effekts genauer studieren. Hierbei könnten auch Messungen mit einer kontinuierlichen Verfolgung der Optischen Dichte (OD ~ BTM) oder des physiologischen Status der Zellen mit Hilfe der In-situ-Mikroskopie vielversprechend sein.

Umfangreichere Analysen sind notwendig, aber sie sind nur dann sinnvoll, wenn eine höhere Regelgüte vorliegt, als mit einem Zweipunktregler erreicht werden kann. Die Startkonzentrationen variieren im Bereich von 2,0 bis 2,8 g/l Glucose und lassen sich nur in grober Näherung als konstant ansehen. Die folgenden Versuche beschäftigen sich also damit, die Regelgenauigkeit zu erhöhen. Dennoch kann gesagt werden, daß schon mit Hilfe eines einfachen Zweipunktreglers qualitative Aussagen über einen Bioprozeß gemacht werden können.

8 PID-Regelungen bei zeitdiskreten Messungen

Die Theorie des Proportional-Integral-Differential-Reglers (PID-Reglers) ist seit langem bekannt und soll nur kurz dargestellt werden. Der PID-Regler stellt eine Kombination des einfacheren Proportional-Reglers (P-Reglers) mit Integral- und Differentialanteilen dar. Das Steuer- oder Ausgangssignal u des P-Reglers ist dabei der Regelabweichung proportional:

$$u = u_0 + K_p x_w = u_0 + K_p (x - x_s) \quad (15)$$

mit dem Steuer- oder Ausgangssignal u , der Regelabweichung x_w , dem Steuer- oder Ausgangssignal u_0 für $x_w=0$, der Reglerverstärkung K_p , dem Istwert x und dem Sollwert x_s .

Die Reglerverstärkung ist einstellbar. Nach dem Zufügen von einem Integral- und einem Differentialterm zu dem Regelalgorithmus ergibt sich:

$$u = u_0 + K_p x_w + \frac{K_p}{T_I} \int_0^t x_w dt + K_p T_D \frac{dx_w}{dt} \quad (16)$$

mit der Integrierzeit T_I (oder Nachstellzeit) und der Differenzierzeit T_D (oder Vorhaltzeit). Die Konstanten K_p , T_I und T_D müssen während des Controller Tunings an den Regelprozeß angepaßt werden. Bei biotechnischen Prozessen liegen aufgrund der diskontinuierlichen Analysensysteme zeitdiskrete Meßwerte vor; aus diesem Grund wird die kontinuierliche Integration durch eine Trapezintegration und die Ableitung durch eine Differenz ersetzt.

$$u(k) = u_0 + K_p x_w(k) + \frac{T_0}{T_I} \left(\frac{x_w(0) + x_w(k)}{2} + \sum_{i=1}^{k-1} x_w(i) \right) + \frac{T_D}{T_0} (x_w(k) - x_w(k-1)) \quad (17)$$

mit den Laufindices $i, k \in \mathbb{N}$ und der Abtastzeit T_0 . Nach Subtraktion von (17) für $u(k-1)$ erhält man die rekursive Beziehung des PID-Regelalgorithmus, die im Simulationsprogramm verwendet wird:

$$u(k) = u(k-1) + q_0 x_w(k) + q_1 x_w(k-1) + q_2 x_w(k-2) \quad (18)$$

mit den drei Parametern

$$\begin{pmatrix} q_0 = K_p \left(1 + \frac{T_0}{2T_I} + \frac{T_D}{T_0} \right) \\ q_1 = -K_p \left(1 + \frac{2T_D}{T_0} - \frac{T_0}{2T_I} \right) \\ q_2 = K_p \frac{T_D}{T_0} \end{pmatrix} \quad (19)$$

Bei Angabe der Regelparameter werden im folgenden stets die Parameter q_0 , q_1 , und q_2 angegeben.

8.1 PID-Regelungen der Glucosekonzentration

Ebenso wie beim Zweipunktregler hängt auch die Regelgüte des PID-Algorithmus stark von der Analysenfrequenz ab. Die folgenden Regelungen werden in der Reihenfolge steigender Analysenfrequenzen behandelt. Zu erwarten ist dabei eine ansteigende Regelgenauigkeit. Zur Darstellung der Abhängigkeit der Regelgüte von der Meßfrequenz werden vier verschiedene Regelungen simuliert. In der Simulation wird ein Experiment mit einem Gradientenmischer angenommen. Das zugrundeliegende Modell wurde in Kapitel 2.1 (Gerätebild in Abbildung 6) besprochen. Die Parameter der Simulation sind in der Tabelle 17 aufgelistet:

Tab. 17: Parameter zur Simulation einer PID-Regelung der Substratkonzentration innerhalb eines Rührkesselreaktors (Gerätebild siehe Abbildung 6)

Konzentrationen	$c_S, c_S^0 = 0,2 \text{ g/l}, c_S^{\text{ein}} = 16 \text{ g/l}, c_{\text{Soll}} = 1 \text{ g/l}$
Volumenströme	$\dot{V}_P = 1 \text{ ml/min}, \text{ Regelgröße } \dot{V}_S$
Reaktorvolumen	V variabel, $V_0 = 400 \text{ ml}$
Meßzyklusdauer	2,5 min (Simulation 1); 5 min (Simulation 2); 10 min (Simulation 3); 20 min (Simulation 4); Optimierung der PID-Parameter auf eine Meßzyklusdauer von 2,5 min
Verzögerungszeit	5 min

Alle 2,5 Minuten wird ein Meßwert bestimmt. Es wird eine Verzögerungszeit von fünf Minuten angenommen und die Regelparameter werden für eine Meßzyklusdauer von 2,5 min optimiert. Erhöht man die Meßzeit auf 5 bzw. 10 min, so verschlechtert sich die Regelgenauigkeit und es kommt zu Überschwingungen. Die Robustheit des PID-Reglers führt dazu, daß die maximalen Regelabweichungen trotzdem unter 10 % bleiben. Erst mit einer Meßzeit von 20 min liegen starke Oszillationen vor (siehe Abbildung 47).

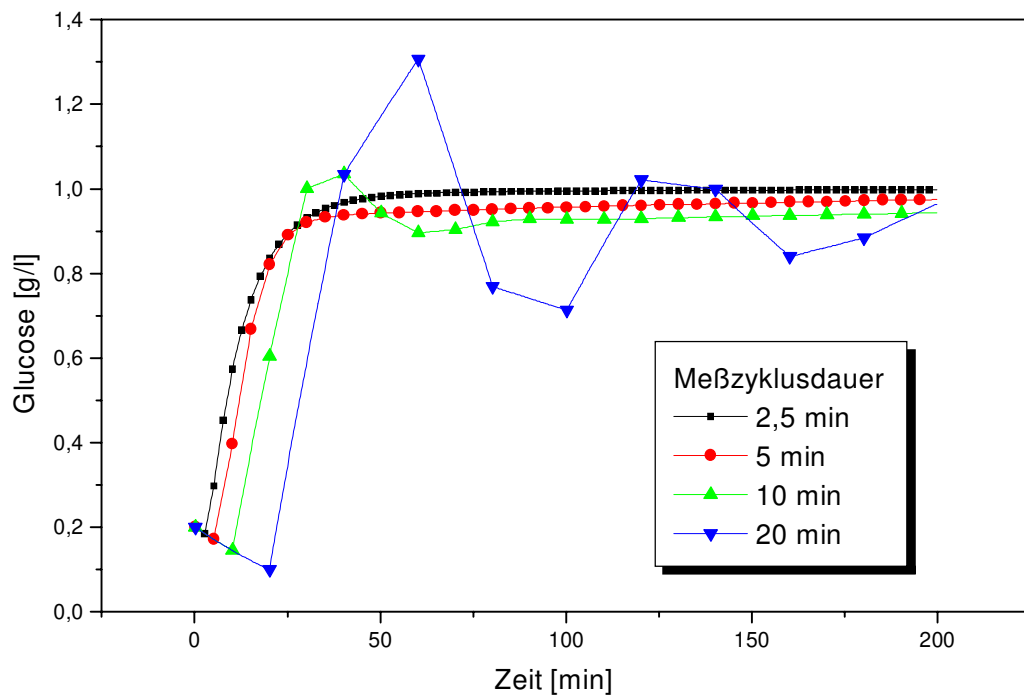


Abb. 47: Vier simulierte Regelungen auf 1,0 g/l Glucose mit einem auf die Meßzyklusdauer von 2,5 min optimierten PID-Regler, $c_s^0 = 10$ g/l, $V_0 = 400$ ml, $\dot{V}_P = 1$ ml/min, Regelgröße \dot{V}_S

Die in den Kapiteln 3 und 4.2 beschriebenen Meßsysteme sind prinzipiell alle zur Glucoseregulation geeignet sind, doch kann je nach Prozeß die eine oder andere Methode präferiert werden. In Experimenten mit einem Gradientenmischer wurde das zu analysierende Medium verdünnt und die Regelung auf einen konstanten Glucosewert durchgeführt. Die unterschiedlichen Meßmethoden konnten dabei unter gleichen definierten Bedingungen verglichen werden. Dabei wurde in allen Fällen ein Sollwert eingestellt, der im mittleren linearen Meßbereich des Analyseverfahrens lag. Das zugrundeliegende Modell wurde in Kapitel 2.1 (Gerätebild in Abbildung 6) besprochen. Die Parameter der Simulation sind in der Tabelle 18 aufgelistet:

Tab. 18: Parameter zur Simulation einer PID-Regelung der Substratkonzentration innerhalb eines Rührkesselreaktors (Gerätebild siehe Abbildung 6)

Konzentrationen	$c_S, c_S^0 = 0, c_S^{ein}, c_{Soll}$ abhängig vom betrachteten Analysensystem
Volumenströme	$\dot{V}_P = 1 \text{ ml/min}$, Regelgröße \dot{V}_S
Reaktorvolumen	V variabel, $V_0 = 400 \text{ ml}$
Meßzyklusdauer	Abhängig vom betrachteten Analysensystem (siehe Tabelle 19)
Verzögerungszeit	20 min (mit Probenahmemodul)

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 19 dargestellt:

Tab. 19: Kennwerte und Einsatzgebiete der vorgestellten Glucosemeßverfahren in Kombination mit einem PID-Regler aus einem Experiment mit einem Gradientenmischer

	Analysenfrequenz	Linearer Meßbereich	Standardabweichung	Regelabweichung	Einsatzgebiet
Enzymkartusche/ Sauerstoffelektrode (Kapitel 4.2.1)	30 h ⁻¹	0-0,5 g/l	4,0 %	7,7 %	Schnelle Prozesse mit geringen Glucosekonzentrationen
GOD-FET (Kapitel 4.2.2)	15-30 h ⁻¹	0-30 g/l	3-5 %	10,2 %	Langsame Prozesse mit hohen Glucosekonzentrationen
GOD-FET mit Stärkegrundmembran (Kapitel 5.2)	8-15 h ⁻¹	Einstellbar je nach Anzahl der Con A/GOD-Schichten	3-5 %	7,5 %	Langsame Prozesse; einsetzbar in allen Konzentrationsbereichen
Fast-FIA ohne Probenahmemodul (Kapitel 3.4)	60 h ⁻¹	0-1 g/l	2 %	4,8 %	Sehr schnelle Prozesse mit geringen Glucosekonzentrationen

Die Regelabweichung wird als die mittlere Abweichung vom Sollwert nach der Einschwingphase definiert und hängt von der Meßgenauigkeit des Systems ab. Wie erwartet führt eine höhere Analysenfrequenz zu einer geringeren Regelabweichung.

Die Messungen wurden ohne Probenverdünnung durchgeführt. Daher muß bei der Bewertung der Regelgenauigkeit der Konzentrationsbereich mit berücksichtigt werden. Während eine Meßanordnung mit einem GOD-FET als Sensor in einem relativ weiten Konzentrationsbereich eingesetzt werden kann, ist dieses mit einem Kartuschensystem ohne

Probenverdünnung nicht möglich. Vorversuche zeigten, daß eine Verdünnung um den Faktor 10 mindestens eine Verdopplung der Standardabweichung der Messungen der unverdünnten Proben herbeiführt. Die Regelabweichungen wären dementsprechend größer.

Zur Simulation der Glucoseregulungen von Kultivierungen von *Saccharomyces cerevisiae* lassen sich verschiedene Modelle anwenden. Nach einer Bestimmung der Wachstumsgrößen aus dem Batch-Prozeß kann die erwartete Zufütterungsrate im Fed-Batch-Prozeß berechnet werden nach [134]:

$$\frac{dc_{\text{Gluc}}}{dt} = c_{\text{Gluc}}^{\text{ein}} \dot{V} - c_{\text{Soll}} \dot{V} - \left(\frac{\mu}{Y_{\text{XC}}} + m \right) XV = 0 \quad (20)$$

$$\Rightarrow \dot{V} = \left(\frac{\mu}{Y_{\text{XC}}} + m \right) XV \frac{1}{c_{\text{Gluc}}^{\text{ein}} - c_{\text{Soll}}} \quad (21)$$

\dot{V} ist der Volumenstrom und $c_{\text{Gluc}}^{\text{ein}}$ die Konzentration der zugeführten Glucoselösung, c_{Soll} ist der Glucose-Sollwert, μ die spezifische Wachstumsrate, Y_{XC} der zelluläre Ausbeutekoeffizient, m der Maintenance-Koeffizient, X die Biomasse und V das Reaktorvolumen. Man geht davon aus, daß die aktuelle Glucosekonzentration annähernd dem Sollwert entspricht und sich zeitlich nicht ändert; aus diesem Grund geht c_{Gluc} nicht mit in die Gleichung (21) ein. Die Biomasse wird aus der Massenbilanz ermittelt [136-137]. Das Modell wird in Verbindung mit einem PI-Regler eingesetzt. Die Nachteile sind die Ungenauigkeit des mathematischen Modells und die Empfindlichkeit des Systems auf Änderungen der Kultivierungsbedingungen, insbesondere einer Abweichung der aktuellen Glucosekonzentration vom Sollwert.

Bestimmt man experimentell die spezifische Glucoseaufnahme v und die spezifische Wachstumsrate μ , so ist folgendes Modell anwendbar [132]:

$$\frac{dc_{\text{Gluc}}}{dt} = -vX + \frac{\dot{V} c_{\text{Gluc}}^{\text{ein}}}{V} - \frac{c_{\text{Gluc}}}{V} \frac{dV}{dt} \quad (22)$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - \frac{X}{V} \frac{dV}{dt} \quad (23)$$

Aus diesen Gleichungen wird das Modell abgeleitet, das zur Simulation und Berechnung der PID-Parameter dienen soll. Unter den Voraussetzungen von Volumenkonstanz und exponentiellem Wachstum vereinfachen sich die Gleichungen (22) und (23) zu:

$$\frac{dc_{\text{Gluc}}}{dt} = -vX + \frac{\dot{V}c_{\text{Gluc}}^{\text{ein}}}{V} \quad (24)$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \Rightarrow X = X_0 e^{\mu t} \quad (25)$$

mit der Biomasse X_0 zum Zeitpunkt t_0 . Die Integration von (24) mit der Anfangsbedingung $c_{\text{Gluc}}(t = 0) = c_{\text{Gluc}}^0$ ergibt:

$$c_{\text{Gluc}} = c_{\text{Gluc}}^0 + \frac{v}{\mu} X_0 - \frac{vX_0}{\mu} e^{\mu t} + \frac{\dot{V}c_{\text{Gluc}}^{\text{ein}}}{V} t \quad (26)$$

Die Konstanten werden zusammengefaßt und durch die Parameter p_0 , p_1 und p_2 ersetzt. Es ergeben sich:

$$c_{\text{Gluc}} = p_0 - p_1 e^{\mu t} - p_2 t \quad (27)$$

$$p_0 = c_{\text{Gluc}}^0 + \frac{v}{\mu} X_0 \quad (28a)$$

$$p_1 = \frac{vX_0}{\mu} \quad (28b)$$

$$p_2 = \frac{\dot{V}c_{\text{Gluc}}^{\text{ein}}}{V} \quad (28c)$$

mit der aktuellen Glucosekonzentration c_{Gluc} , der Glucosekonzentration $c_{\text{Gluc}}^{\text{ein}}$ des zugefütterten Mediums, der Ausgangskonzentration c_{Gluc}^0 , der Wachstumsrate μ und dem Reaktorvolumen V .

Die ideale Glucosekonzentration des zugefütterten Mediums wird durch Simulationen berechnet. Das Ziel ist dabei, durch den Volumenstrom des zugefütterten Mediums den Verbrauch an Medium während der FIA-Messung zu kompensieren und somit ein konstantes Reaktorvolumen einzuhalten. Die Anpassung von p_0 , p_1 und p_2 erfolgt durch Parameteroptimierung anhand des Verlaufs der Glucosekonzentration in der vorhergehenden unregelmäßigen Messung (siehe Abbildung 39).

Um die Parameteroptimierung an einem Beispiel anzuwenden, wird eine Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt (siehe Tabelle 20).

Tab. 20: Bedingungen einer Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* mit PID-Regelung

Mikroorganismus	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Reaktor	5 l CSTR mit 4,0 l Schatzmann-Medium, $c_{\text{Gluc}}^0 = 27 \text{ g/l}$, $T = 34 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 5,1
Online-Analytik	FIA-System mit GOD-Kartusche, Analysenfrequenz 20 h^{-1} ; ESIP Probenahmemodul
Modell	Siehe Gleichungen (27) und (28)
Regelsystem	PID-Regler: $q_0 = 4,2$; $q_1 = 2,1$; $q_2 = 1,4$; zugefüttertes Medium $c_{\text{Gluc}}^{\text{ein}} = 160 \text{ g/l}$ Glucose in Schatzmann-Medium; variable Pump-rate von 0 bis 9 ml/min; Regelung auf 5,0 g/l Glucose, Start ab 10 g/l, Verzögerungszeit 30 min, Totzeit 11 min
Dauer	18 h

Das Modell ist in den Gleichungen (27)-(28) beschrieben worden. Ausgehend von einer Glucosekonzentration von 27 g/l findet zunächst eine Batchphase statt, bis die gemessene Konzentration unter 5 g/l fällt. Die Regelung auf 5 g/l wird anschließend gestartet. Aufgrund der Verzögerungszeit von 17 min sinkt die Glucosekonzentration trotz der Zufütterung von Glucose auf 2 g/l. Die aktuelle Reaktorkonzentration ist zu diesem Zeitpunkt weit höher. Sie wird jedoch erst nach dem Verstreichen der Verzögerungszeit mit 10 g/l registriert. Hier zeigt sich die hohe Regeldynamik des gewählten PID-Reglers. Obwohl es möglich ist, eine Überschwingung zu unterbinden und im Gebiet des aperiodischen Grenzfalles zu arbeiten, ist dieses über den gesamten Versuch gesehen nicht sinnvoll. Stattdessen kann über eine relativ lange Kultivierungszeit mit ausreichender Regelgenauigkeit gemessen werden. Die mittlere Abweichung beträgt 1,1 g/l (22 % vom Sollwert). Nach 16 Stunden Kultivierungszeit ist die Biomasse und eine daraus folgende Verstopfung des Probenahmemoduls zu hoch, um eine konstante Probenahme zu gewährleisten. Zunächst tritt eine Verringerung der Meßwerte auf, um schließlich in eine Oszillation überzugehen (nicht mehr dargestellt).

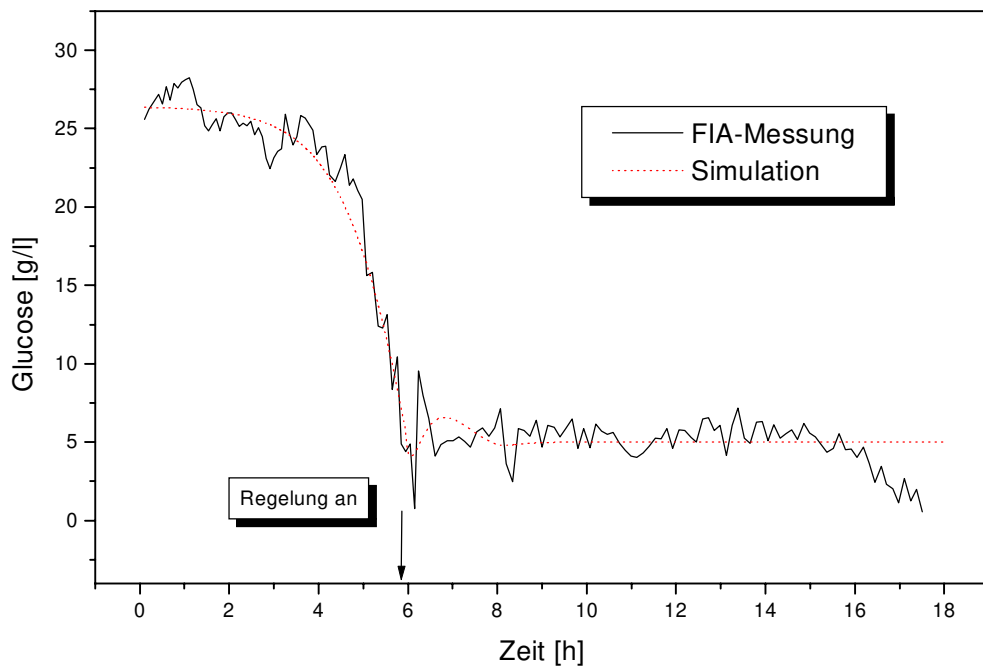


Abb. 48: Verlauf der Glucosekonzentration in einer Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* mit PID-Regelung auf 5 g/l, Bedingungen in Tabelle 20, gestrichelt ist die Simulation der FIA-Messung dargestellt.

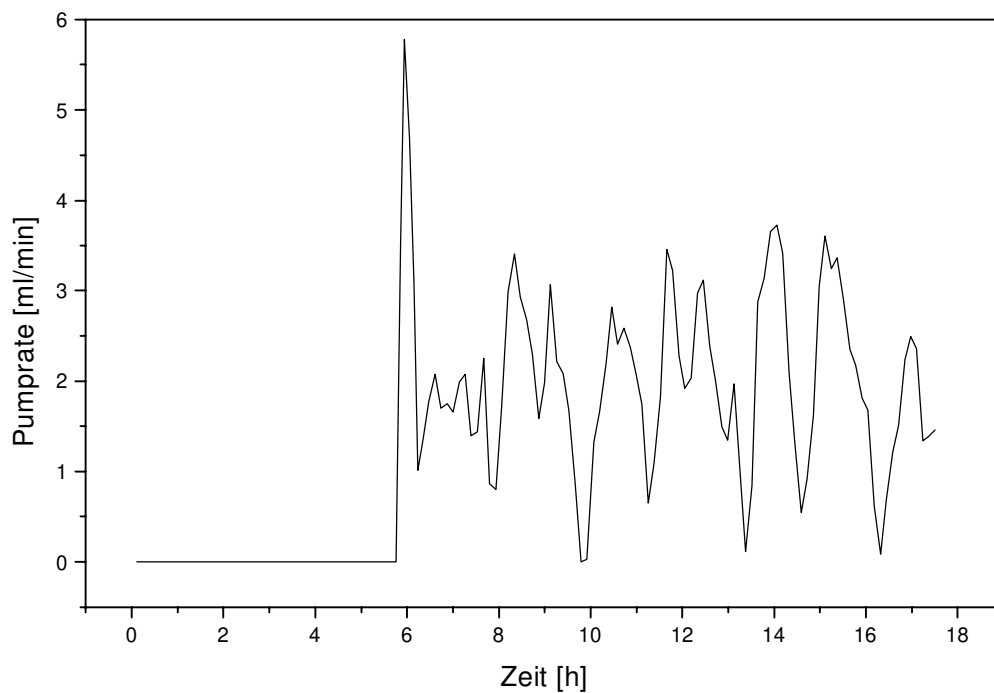


Abb. 49: Verlauf der Pumprate in einer Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* mit PID-Regelung auf 5 g/l; zugefüttertes Medium mit 160 g/l Glucose

8.2 PID-Regelungen von Ammonium

Ammonium dient in vielen Kultivierungen als Stickstoffquelle und wird den Reaktoren vielfach bereits zur pH-Regelung in Form von Ammoniak zugeführt. Auf viele Mikroorganismen hat das System Ammonium/Ammoniak aber auch einen wachstumsinhibierenden Effekt (z.B. auf *Mycobacterium chlorophenicum* [133]). Die Produktion des biologisch abbaubaren Kunststoffes Poly- β -hydroxybutyrat durch *Pseudomonas putida* ist ebenfalls stark von der Ammoniumkonzentration abhängig. Ammonium wirkt außerdem toxisch auf Säugetierzellen. Das Ziel ist es, durch eine Regelung die Substratversorgung auf einem niedrigen Ammoniumniveau zu gewährleisten. Die Genauigkeit der bereits vorgestellten Meßsysteme erlaubt es, eine Regelung ohne Modellunterstützung durchzuführen.

Unter Verwendung des in Kapitel 4.1.3 genannten Online-Analysesystems zur photometrischen Bestimmung der Ammoniumkonzentration wird ein Regelsystem mit einem PID-Regelalgorithmus aufgebaut. Mit einer hohen Analysenfrequenz und einer geringen Meßfehlerstreuung bietet das analytische Verfahren eine gute Voraussetzung für eine hohe Regelgenauigkeit. Es wird untersucht, ob das Regelsystem nicht nur in Modellreaktionen einsetzbar ist, sondern auch in Kultivierungen von *Saccharomyces cerevisiae*.

Um die Einsatzfähigkeit des Regelsystems zu testen, wird ein Experiment mit Gradientenverdünnung durchgeführt. Ein Rührkesselreaktor mit einer Ausgangskonzentration von 1,1 g/l Ammonium in KPP-Puffer wird kontinuierlich mit ammoniumfreiem Puffer versetzt. Das zugrundeliegende Modell wurde in Kapitel 2.1 (Gerätebild in Abbildung 6) besprochen. Die Parameter der Simulation sind in der Tabelle 21 aufgelistet:

Tab. 21: Parameter einer PID-Regelung der Substratkonzentration innerhalb eines Rührkesselreaktors (Gerätebild siehe Abbildung 6)

Konzentrationen	$c_S, c_S^0 = 0,2 \text{ g/l}, c_S^{\text{ein}} = 16 \text{ g/l}, c_{S\text{oll}} = 0,5 \text{ g/l}$
Volumenströme	$\dot{V}_P = 1 \text{ ml/min}, \text{ Regelgröße } \dot{V}_S$
Reaktorvolumen	V variabel, $V_0 = 400 \text{ ml}$
Meßzyklusdauer	2,5 min
Verzögerungszeit	5 min

Die FIA-Messung wird mit vorgeschaltetem ESIP Probenahmemodul durchgeführt, um die Bedingungen bei einem Bioprozeß einzuhalten.

In Abbildung 50 läßt sich der unregelmäßige Verlauf der Ammoniumkonzentration erkennen.

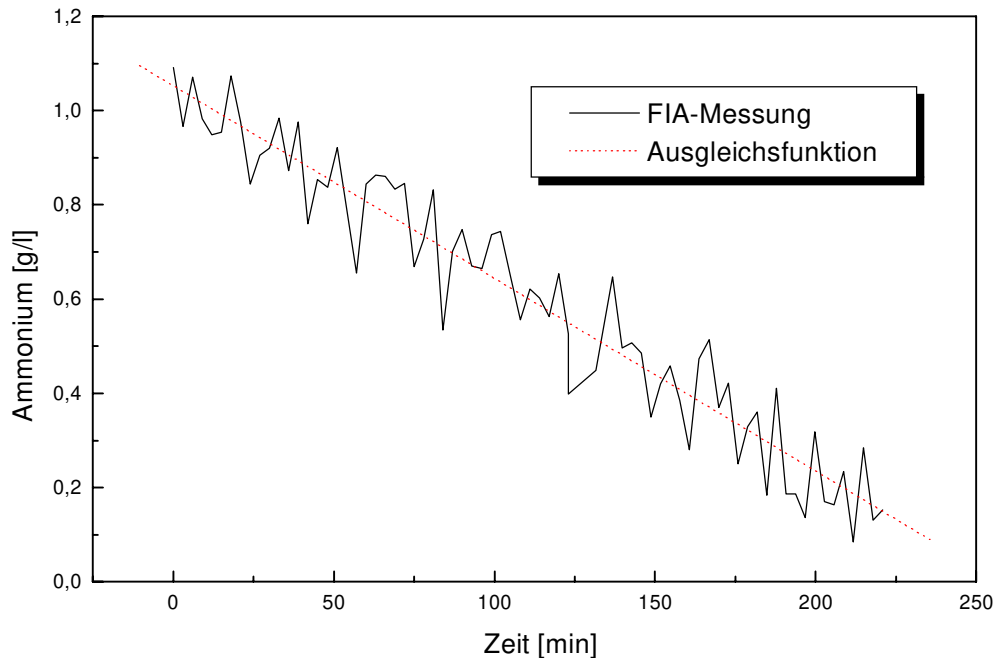


Abb. 50: Abnahme der Ammoniumkonzentration in einem CSTR mit Gradientenmischer und Approximation durch eine lineare Ausgleichsfunktion, $c_s^0 = 16 \text{ g/l}$, $V_0 = 400 \text{ ml}$, Volumenstrom der Pufferzugabe 1 ml/min

Das in Kapitel 2.1 beschriebene Modell des Gradientenmischers dient als Modell für die Optimierung der PID-Parameter. Die Regulationsanforderungen sind zwar gering, doch kann aus diesen Versuchen auf die Abhängigkeit der Regelgüte von der Meßwertschwankung geschlossen werden.

Sobald die Konzentration von $0,2 \text{ g/l}$ unterschritten wird, startet die Regelung auf $0,5 \text{ g/l}$ NH_4^+ . Die folgende Abbildung 51 zeigt den Verlauf der Ammoniumkonzentration in der Simulation und im Experiment. In der Simulation wurde ein Meßfehler von 5% berücksichtigt.

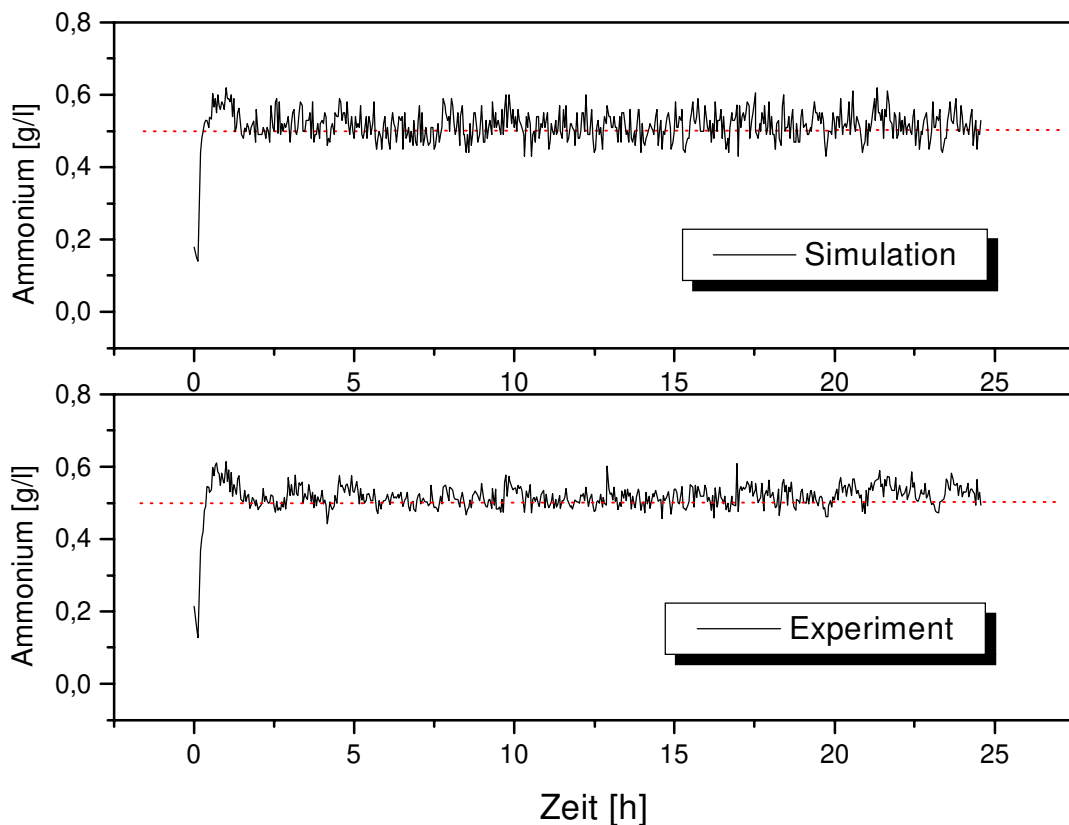


Abb. 51: PID-Regelung der Ammoniumkonzentration in einem CSTR auf $0,5 \text{ g/l NH}_4^+$; die gestrichelte Linie zeigt den Sollwert an, mittlere Konzentration: $0,52 \text{ g/l NH}_4^+$

Die Ammoniumkonzentration steigt nach Beginn der Regelung schnell auf $0,6 \text{ g/l}$ an. Der Sollwert wird mit einem Mittelwert von $0,52 \text{ g/l NH}_4^+$ relativ gut eingehalten und die mittlere Regelabweichung liegt bei $5,3 \%$. Die Simulation liefert eine nicht signifikant höhere Regelabweichungen ($5,6 \%$). Durch die Einbeziehung von Meßfehlern in die Simulation kommt es zu einer sehr guten Übereinstimmung zwischen der Simulation und dem Experiment.

Aus der Messung einzelner Standards wie auch aus dem Gradientenmischer-Experiment läßt sich eine relative Standardabweichung von ca. 5% berechnen. Diese ist nicht signifikant kleiner als die Regelabweichung während des Regelungsexperiments.

Um zu zeigen, zu welchen Ergebnissen eine Simulation ohne Meßfehlerberücksichtigung führt, werden drei weitere Experimente mit einem Gradientenmischer simuliert (s.o) und real durchgeführt. Derselbe PID-Parametersatz wird für alle drei Regelungen verwendet. Die Verläufe sind in der Abbildung 52 dargestellt.

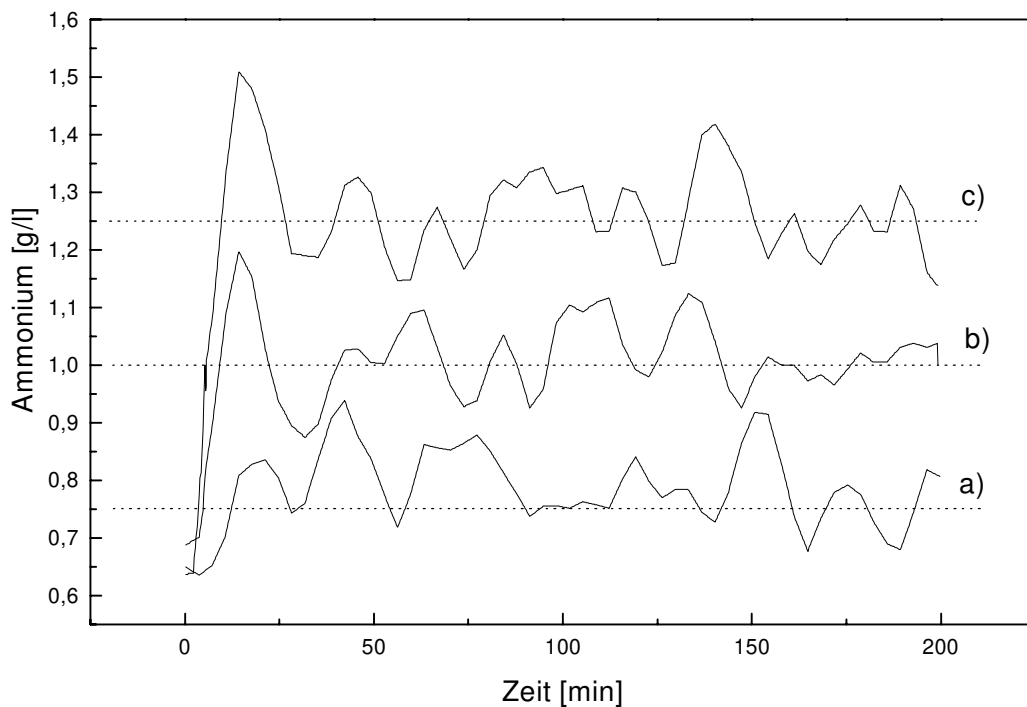


Abb. 52: Drei PID-Regelungen der Ammoniumkonzentration in einem CSTR auf a) 0,75 g/l, b) 1,00 g/l und c) 1,25 g/l NH_4^+ ; die gestrichelte Linie zeigt die Sollwerte an, Ausgangskonzentration 0,7 g/l NH_4^+ , Ergebnisse in Tabelle 22

Tab. 22: Vergleich der Simulation und der Ergebnisse aus den drei PID-Regelungen von Ammonium (siehe Abbildung 52)

Sollwert	Simulation		Experiment	
	Mittlere Konzentration	Rel. Regelabweichung	Mittlere Konzentration	Rel. Regelabweichung
a) 0,75 g/l	0,75 g/l	0,6 %	0,79 g/l	8,2 %
b) 1,00 g/l	1,02 g/l	0,8 %	1,01 g/l	8,0 %
c) 1,25 g/l	1,27 g/l	1,1 %	1,25 g/l	9,5 %

Es zeigt sich trotz einer sehr guten Übereinstimmung der mittleren Konzentrationen in der Simulation und im Experiment, daß die Regelabweichung in der Realität viel höher als

erwartet ist. Die Erhöhung der Regelabweichung ist auf die Meßfehler zurückzuführen und beträgt bei den drei Experimenten im Mittel 7,7 %.

Im folgenden Versuch wird ausgehend von einer Ammoniumkonzentration von 0,75 g/l eine Regelung auf 0,25 g/l durchgeführt. Das Modell wurde in Kapitel 2.1 beschrieben (Gerätebild in Abbildung 6). Die Parameter sind in der Tabelle 23 aufgelistet:

Tab. 23: Parameter zur Simulation einer PID-Regelung der Substratkonzentration innerhalb eines Rührkesselreaktors (Gerätebild siehe Abbildung 6)

Konzentrationen	$c_s, c_s^0 = 0,75 \text{ g/l}, c_s^{\text{ein}} = 16 \text{ g/l}, c_{\text{Soll}} = 0,25 \text{ g/l}$
Volumenströme	$\dot{V}_P = 1 \text{ ml/min}, \text{ Regelgröße } \dot{V}_S$
Reaktorvolumen	V variabel, $V_0 = 400 \text{ ml}$
Meßzyklusdauer	2,5 min
Verzögerungszeit	5 min

Die Berechnung der PID-Parameter und die Simulation der Regelung erfolgen unter Berücksichtigung einer angenommenen Meßwertschwankung von 5 %. Es zeigt sich die gute Übereinstimmung der erwarteten und der tatsächlichen Regelgüte. Trotz einer gegenüber der Simulation schwächer ausgeprägten Abnahme der Ammoniumkonzentration in den ersten 100 Minuten liegen die Regelgenauigkeiten nicht signifikant auseinander (erwartet: 10,0 %, gemessen: 8,6 %)

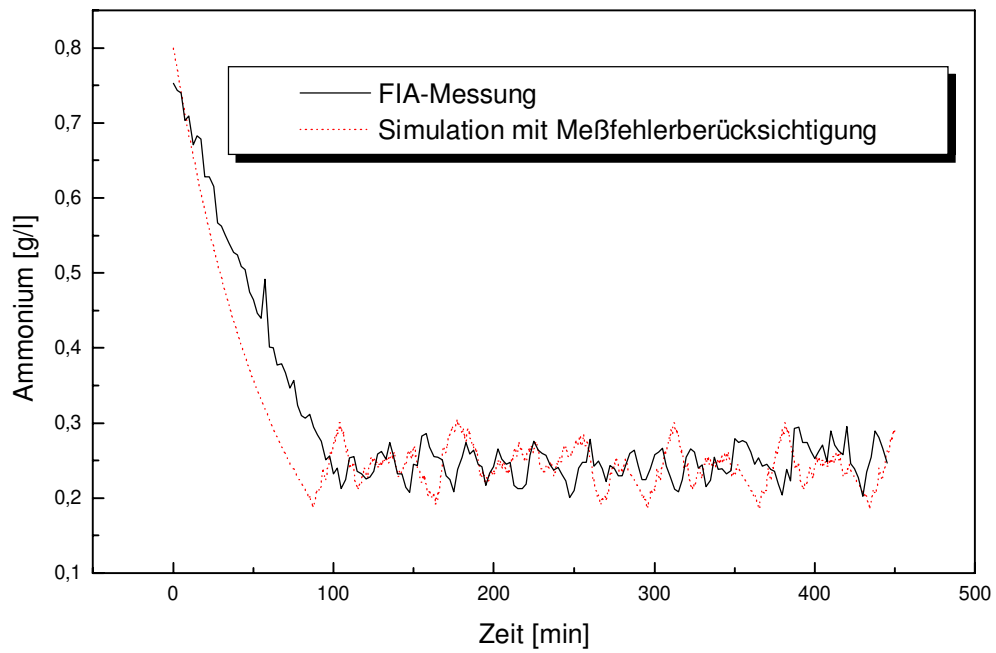


Abb. 53: PID-Regelung der Ammoniumkonzentration in einem CSTR auf $0,25 \text{ g/l NH}_4^+$;
1) Experiment: mittlere Konzentration: $0,25 \text{ g/l NH}_4^+$; $x_w = 8,6 \%$; 2) Simulation: mittlere
Konzentration: $0,24 \text{ g/l NH}_4^+$; $x_w = 10,0 \%$

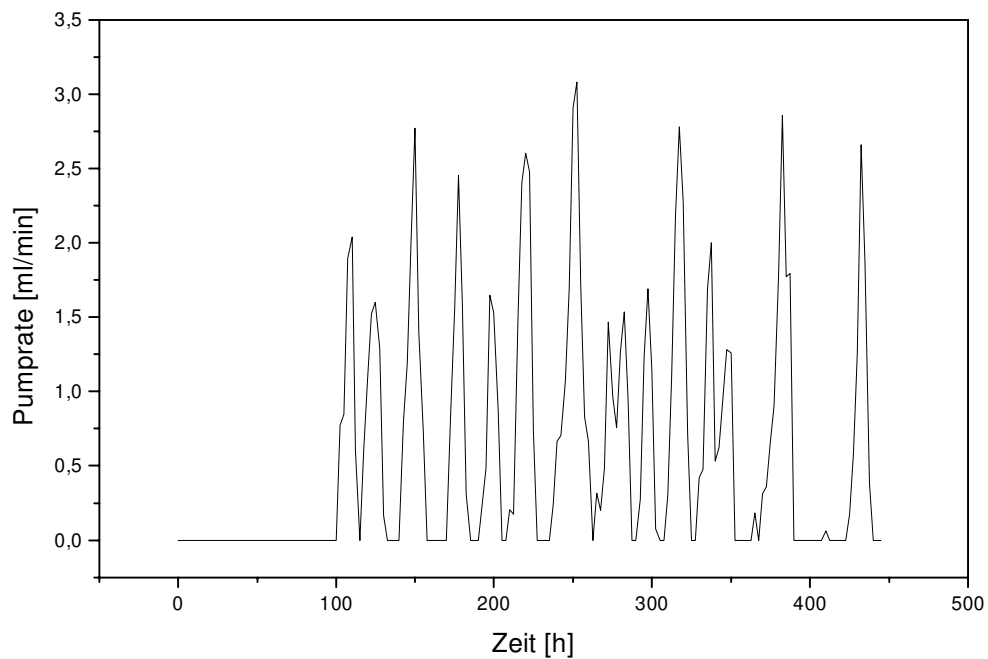


Abb. 54: Verlauf der Pumprate in einer PID-Regelung der Ammoniumkonzentration in einem
CSTR auf $0,25 \text{ g/l NH}_4^+$

Es läßt sich feststellen, daß die Meßwertschwankung einen großen Einfluß auf die Regelgüte bei PID-Regelungen ausüben. Trotz relativ niedriger Regelungsanforderungen bei der Durchführung von Verdünnungsexperimenten lagen Regelabweichungen im Bereich von 10 % vor. In Kultivierungen wurden Regelabweichungen von 22 % erhalten; hier ist vor allem die Nichtlinearität des Regelungsproblems für die relativ hohen Schwankungen verantwortlich. Die geringe Flexibilität des PID-Reglers äußert sich in der Anfälligkeit gegenüber Meßschwankungen. Die Robustheit eines Reglers ist ein wichtiges Kriterium, das im allgemeinen der statischen Genauigkeit vorgezogen werden sollte. Geringere Schwankungen der Meßwerte werden so leichter toleriert. Eine Alternative ist die Anwendung von Meßwertfiltern, so daß die Schwankungen bereits vom Meßsystem ausgeglichen werden können. Die Verwendung von Filtern bei sehr schnellen Bioprozessen (z.B. während der Logphase von Hefekultivierungen) ist jedoch nur eingeschränkt möglich. Die Forderung liegt nahe, bei der Regelung nicht nur den einzelnen aktuellen Meßwert, sondern auch deren Vorgänger zu berücksichtigen. Ein PID-Algorithmus verarbeitet aufgrund seiner Struktur bereits drei Meßwerte zu den Zeitpunkten t_i , t_{i-1} und t_{i-2} . Im folgenden wird ein komplexerer Regelalgorithmus betrachtet.

9 Neuronale Netze zur Bioprozeßregelung

Chemometrische Methoden werden immer dann angewendet, wenn es unmöglich oder nicht praktikabel ist, einen Prozeß mathematisch genau zu definieren. Der effektivste Weg zur Repräsentation biologischer Vorgänge wäre die Nutzung eines biochemischen Prozeßmodells, welches auf Massenbilanzen basiert. Mit einem bislang sehr eingeschränkten Wissen und einer Begrenzung auf wenige Parameter wurden bereits einige Modelle aufgestellt. Eine Alternative ist jedoch, die Prozeßcharakteristika als ganzes unabhängig von molekularen Abläufen vom Regelsystem erkennen und lernen zu lassen. Neuronale Netze arbeiten nun assoziativ, fehlertolerant und sind lern- und anpassungsfähig. Sie sind somit einfache mathematische Modelle des biologischen Gehirns.

In der Biotechnologie werden neuronale Netze zum einen bei Abwesenheit von verlässlichen Sensoren eingesetzt [138-139]. Mit verfügbaren Meßwerten werden somit nicht zugängliche Variablen abgeschätzt. Zum anderen werden Netzwerke zur Modellierung [140-146] und Regelung [147-154] von Bioprozessen verwendet. Zur Bioprozeßregelung werden neuronale Netze allerdings nicht direkt eingesetzt, sondern unterstützen durch Prozeßparameter-schätzung die konventionellen Regelalgorithmen [155].

Die häufigste Anwendung finden dabei Feedforward-Backpropagation-Netzwerke. Ihre Eigenschaft, beliebige Informationen (Muster) miteinander zu korrelieren oder deren Verknüpfung in Trainingsschritten zu lernen, machen sie zu einer Alternative bei der Modellierung und Regelung von Bioprozessen.

Das einfachste neuronale Netz dieser Art besteht aus zwei Schichten von Neuronen, wobei jedes Neuron eine Signalverbindung in Form von Wichtungsfaktoren (oder Gewichten) zu jedem aus der anderen Schicht hat. Die Wichtungsfaktoren werden im Widrow-Hoff-Algorithmus (oder Delta-Regel) so angepaßt, daß ein Eingabemuster in ein Ausgabemuster überführt wird. Dazu wählt man zunächst zufällige Gewichte zwischen den beiden Schichten. Das Ausgabemuster soll einem Zielmuster entsprechen. In iterativen Zyklen werden die Gewichte solange verändert, bis die Abweichungen zwischen Ausgabemuster und Zielmuster ein Abbruchkriterium erfüllen. Damit ist das Training des Netzes abgeschlossen.

Bei drei- oder mehrschichtigen Netzen ist die Delta-Regel nicht anwendbar, da man die Wichtungsfaktoren zwischen den inneren (versteckten) Schichten auf die genannte Weise nicht bestimmen kann. Nach Rumelhart, Hinton und Williams wird eine generalisierte Delta-

Regel. Eine Beschreibung findet sich in der Literatur [156]. Wichtig ist in diesem Zusammenhang die Verwendung einer logistischen Aktivierungsfunktion:

$$A = \frac{1}{1 + e^{-I}} \quad \text{mit Aktivierung } A \text{ und Input } I \quad (29)$$

Während die Berechnung des Ausgabemusters wie beschrieben durchgeführt wird (Feedforward), wird der erhaltene Fehler mit der Ableitung der Aktivierungsfunktion multipliziert, und man erhält einen neuen Delta-Wert zur Veränderung der Wichtungsfaktoren (Feedbackward).

Beim Lernen von Bioprozeßprofilen durch neuronalen Netze ist diese Trainingsweise allerdings nur unter Schwierigkeiten durchführbar. Es ist zwar das Eingabemuster in Form des Konzentrationsverlaufs bekannt, aber nicht das Ausgabemuster. Letzteres würde eine einzustellende Pumprate darstellen, doch kann die ideale Pumprate erst nach der Simulation eines gesamten Regelverlaufes bestimmt werden.

Während die beschriebene Netzwerkstruktur mit sigmoider Aktivierungsfunktion eingehalten wird, dient hier zur Anpassung der Wichtungsfaktoren nicht mehr die generalisierte Delta-Regel, sondern der Simplex-Algorithmus. Die Berechnung der Gewichte mit anderen iterativen Algorithmen ist eine Möglichkeit (z.B. dem genetischen Algorithmus). Die Leistungsfähigkeit des Simplex-Algorithmus ist begrenzt auf die Bestimmung weniger Parameter, weswegen versucht werden muß, die Netzwerkarchitektur möglichst einfach zu gestalten.

Es werden einige Netzwerkstrukturen mit maximal 15 Neuronen in den folgenden Simulationen erprobt. Dazu wird im Prinzip so vorgegangen, wie in der Abbildung 39 gezeigt wurde. Es liegen nun nicht mehr drei Parameter wie im Fall einer PID-Regelung vor, sondern je nach Größe des Netzes drei bis fünfzehn Gewichtungsfaktoren.

9.1 Netzwerkarchitektur

Die Anzahl der Neuronen und damit der Gewichtungsfaktoren muß an die Komplexität des Regelungsproblems angepaßt werden. Allgemein gilt, daß eine Erhöhung der Neuronenzahl ein verbessertes Lernen des Zusammenhangs zwischen Eingabe- und Ausgabemuster bewirkt. Die Gefahr eines Übertrainings steigt jedoch mit erhöhter Neuronenzahl. Die inneren Schichten eines Netzwerks beeinflussen die Lernfähigkeit eines Netzes besonders stark.

Die Eingabeneuronen werden in den folgenden Regelungen durch die Substratkonzentrationen zu den Zeitpunkten t_i , t_{i-1} und t_{i-2} gebildet. Das Ausgabeneuron dient zur Einstellung einer Pumprate zur Zufütterung des Substrates. Die Startwerte der Gewichte werden mit Hilfe einer Random-Prozedur erzeugt und liegen im Intervall $[-0,5;+0,5]$. Die Optimierung der Wichtungsfaktoren wird so lange durchgeführt, bis die Abweichung zwischen Sollwert und dem berechneten Istwert ein Abbruchkriterium erfüllt. Das Regelungsproblem wird noch sehr einfach gestaltet und besteht in der Einhaltung eines Sollwerts entgegen einer Abnahme der Substratkonzentration. Das Modell ist in Kapitel 2.1 beschrieben (Gerätebild in Abbildung 6). Die Parameter sind in der Tabelle 24 aufgelistet:

Tab. 24: Parameter zur Simulation einer NN-Regelung der Substratkonzentration innerhalb eines Rührkesselreaktors (Gerätebild siehe Abbildung 6)

Konzentrationen	$c_s, c_s^0 = 0 \text{ g/l}, c_s^{\text{ein}} = 16 \text{ g/l}, c_{\text{Soll}} = 0,5 \text{ g/l}$
Volumenströme	$\dot{V}_p = 1 \text{ ml/min}, \text{ Regelgröße } \dot{V}_s$
Reaktorvolumen	$V \text{ variabel}, V_0 = 400 \text{ ml}$
Meßzyklusdauer	2,5 min
Verzögerungszeit	5 min

Die Regelung erfolgt auf 0,5 g/l. Die Tabelle 25 zeigt einige gewählte Netzwerkarchitekturen:

Tab. 25: Verschiedene Netzwerkarchitekturen zur Regelung in einem Gradientenmischer (Simulation), Annahme von 5 % Meßfehlerschwankung

Netzwerkarchitektur	Anzahl der Parameter	Trainingszyklen (Simplex)	Regelabweichung (ohne Meßfehler)	Regelabweichung (mit Meßfehlern)
(3-1)	3	5000	3,0 %	8,3 %
(3-1-1)	4	1000	2,9 %	8,2 %
(3-2-1)	8	1000	0,9 %	6,2
(3-3-1)	12	5000	> 50 %	> 50 %
(3-3-2)	15	5000	> 50 %	> 50 %

Im letzten Beispiel wurde zudem versucht, die Konzentration zum Zeitpunkt t_{i+1} vorherzusagen. Es zeigt sich wie erwartet, daß die Anzahl der inneren Neuronen einen starken Einfluß auf die Lernfähigkeit ausübten. Ohne innere Neuronen liegen wie bei einem PID-Regler nur drei Parameter vor, wodurch ein dem PID-Regler ähnliches Regelverhalten erwartet wird. Durch Einführung eines inneren Neurons bzw. zweier innerer Neuronen steigt die Regelgüte. Die Regelabweichung unter Berücksichtigung von Meßfehlern liegt nur geringfügig höher als die mittlere Meßfehlerschwankung selbst.

Wählt man eine zu komplexe Netzwerkarchitektur, so ist das Auffinden eines geeigneten Parametersatzes sehr erschwert. Innerhalb von 5000 Trainingszyklen gelang es nicht, geeignete Wichtungsfaktoren zu bestimmen. Dazu kommt, daß die Zeit zur Berechnung der Wichtungsfaktoren mit einer Erhöhung der Neuronenzahl überproportional ansteigt. Eine Optimierung über mehrere Stunden (abhängig von der Rechnerleistung) ist für einen zeitnahen Einsatz in der Biotechnologie nicht praktikabel. Dieses bedeutet nicht, daß ein komplexeres Netz nicht in der Lage wäre, die Regelung durchzuführen. Wahrscheinlich wäre es sogar flexibler als ein Netz mit einer (3-2-1)-Netzwerkarchitektur, da mit erhöhter Neuronenzahl auch die Freiheitsgrade ansteigen. Die Vermeidung lokaler Minima bei der Verwendung des Simplex-Algorithmus wird jedoch mit steigender Komplexität des Netzwerks schwieriger. Aus diesem Grund resultierten Fehler größer als 50 % bei komplexeren Netzwerkarchitekturen. Es wird im folgenden untersucht, ob eine (3-2-1)-Struktur in der Praxis geeignet ist.

9.2 Vergleich zwischen PID-Regler und einem neuronalen Netz

Mit Hilfe eines Gradientenmisch-Verfahren, das in Kapitel 2.1 beschrieben wurde, wird das dreischichtige Netzwerk auf seine Verwendbarkeit geprüft. Die Anforderungen an die Regelung werden allerdings erhöht. Einerseits nimmt die Ammoniumkonzentration durch eine höhere Pumprate, andererseits ist die Analysenzyklusdauer verlängert worden (5,5 min pro Zyklus). Die Parameter sind in der Tabelle 26 aufgelistet:

Tab. 26: Parameter zur Simulation einer NN-Regelung der Substratkonzentration innerhalb eines Rührkesselreaktors (Gerätebild siehe Abbildung 6)

Konzentrationen	$c_s, c_s^0 = 0 \text{ g/l}, c_s^{\text{ein}} = 16 \text{ g/l}, c_{\text{Soll}} = 0,5 \text{ g/l}$
Volumenströme	$\dot{V}_p = 2 \text{ ml/min}, \text{ Regelgröße } \dot{V}_s$
Reaktorvolumen	V variabel, $V_0 = 400 \text{ ml}$
Meßzyklusdauer	5,5 min
Verzögerungszeit	5 min

Nach einer Modellierung der Ammoniumabnahme durch eine lineare Funktion wird ein neuronales Netz trainiert. Nach 150 Trainingszyklen ist das Abbruchkriterium (Abweichung $A_w < 1 \%$) erfüllt. Zum Vergleich werden die Parameter eines PID-Regler in ebenfalls 150 Trainingszyklen berechnet. In beiden Fällen wird ein Meßfehler von 5 % berücksichtigt.

Ausgehend von einer Ammoniumkonzentration von 1,0 g/l wird nach Start des Gradientenmischers eine Regelung auf 0,7 g/l Ammonium begonnen. Die Verläufe sind in den Abbildungen 55 und 56 dargestellt.

Die Regelungen sind aufgrund der hohen Reglerdynamik und der relativ geringen Meßfrequenz mit starken Schwankungen behaftet. Obwohl im Durchschnitt der Sollwert von 0,7 g/l gut eingehalten wird, sind die mittleren Regelabweichungen 30,3 % bzw. 17,5 %. Dieses ist ein signifikanter Unterschied, und trotz gleicher Information zu jedem Zeitpunkt während der Regelung ist das neuronale Netz besser in der Lage, den Sollwert einzuhalten.

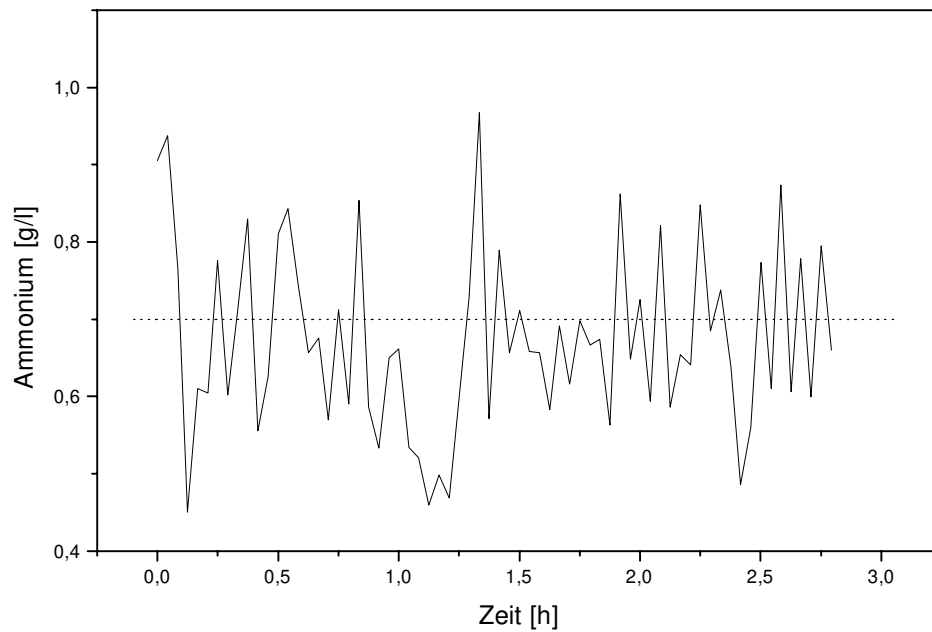


Abb. 55: PID-Regelung der Ammoniumkonzentration in einem CSTR auf $0,7 \text{ g/l NH}_4^+$; mittlere Konzentration $0,71 \text{ g/l NH}_4^+$; mittlere Regelabweichung 30,3 %

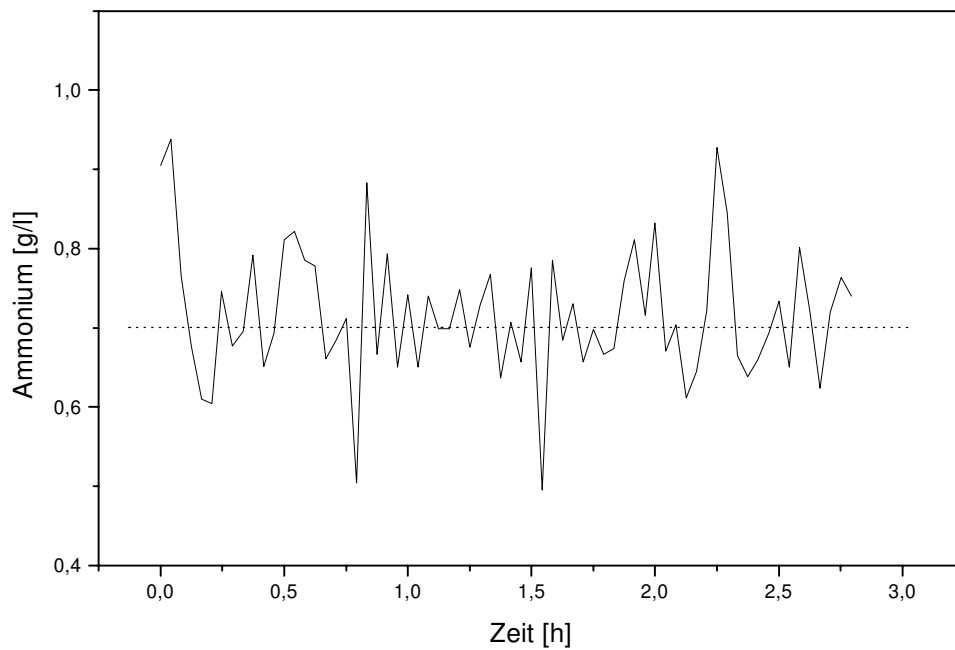


Abb. 56: Regelung der Ammoniumkonzentration mit einem NN auf $0,7 \text{ g/l NH}_4^+$; mittlere Konzentration $0,67 \text{ g/l NH}_4^+$; mittlere Regelabweichung 17,5 %

Hier zeigt sich das unterschiedliche Verhalten eines PID-Reglers und eines neuronalen Netzes aufgrund der unterschiedlichen Regelalgorithmen.

In dem nächsten Experiment mit einem Gradientenmischer werden die Wichtungsfaktoren eines neuronalen Netzes berechnet, wobei von einer Standardabweichung der Meßwerte von 5 % ausgegangen wird. Das Modell wurde in Kapitel 2.1 beschrieben. Die Bedingungen sind in der folgenden Tabelle 27 aufgelistet:

Tab. 27: Bedingungen einer NN-Regelung von Ammonium in einem Experiment mit einem Gradientenmischer

Reaktor	500 ml CSTR mit 400 ml KPP-Puffer, $c_{\text{NH}_3}^0 = 0,2 \text{ g/l}$, pH 6,8
Online-Analytik	Photometrische Ammoniumanalytik mit Probenahmemodul, Analysenfrequenz 60 h^{-1} , Injektionsvolumen $30 \mu\text{l}$
Offline-Analytik	Ammonium-Referenzanalytik (siehe Anhang)
Regelsystem	Dreischichtiges neuronales Netz (3-2-1)
Dauer	400 min

Konzentrationen	$c_s, c_s^0 = 0,2 \text{ g/l}$, $c_s^{\text{ein}} = 20 \text{ g/l}$, $c_{\text{Soll}} = 0,75 \text{ g/l}$
Volumenströme	$\dot{V}_P = 2 \text{ ml/min}$, Regelgröße \dot{V}_S
Reaktorvolumen	V variabel, $V_0 = 400 \text{ ml}$
Meßzyklusdauer	5,5 min
Verzögerungszeit	25 min

Die Simulation der Meßwertschwankung geschieht über eine Random-Prozedur. Um die Abhängigkeit der Regelgüte von der Meßfrequenz zu testen, werden die Bedingungen aus dem oben beschriebenen Experiment dahingehend verändert, daß alle 60 Sekunden ein aktueller Meßwert erstellt wird. In der Abbildung 57 ist der Verlauf der Ammoniumkonzentration dargestellt. Die FIA-Messung weist eine nicht signifikant höhere Regelabweichung auf als die Simulation mit Meßfehlerberücksichtigung (10,4 % bzw. 10,1 % mittlere Abweichung vom Sollwert). Die in der Simulation deutlich ausgeprägte Überschwingung nach 20 min tritt aufgrund der Rückvermischung im Probenahmemodul nicht im Experiment auf.

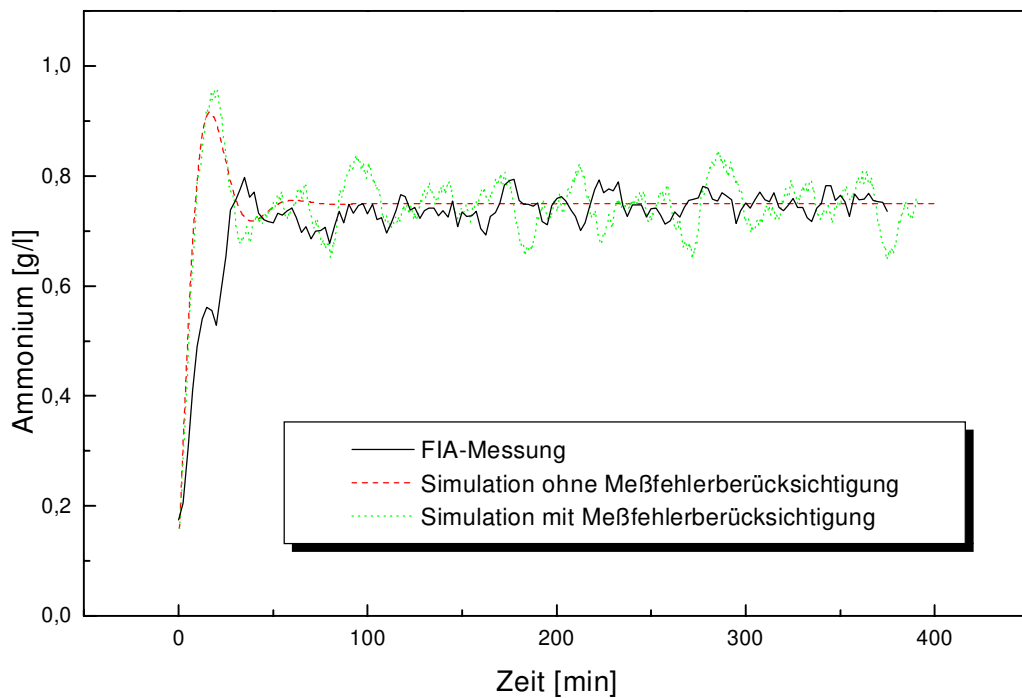


Abb. 57: Regelung der Ammoniumkonzentration mit einem NN auf 0,75 g/l NH_4^+ ; Simulation der FIA-Messung mit und ohne Meßfehlerberücksichtigung, Bedingungen in Tabelle 20

Das Regelverhalten in Bezug auf eine Erhöhung oder Erniedrigung der Analysenfrequenz unterscheidet sich prinzipiell nicht von dem eines PID-Reglers. Für diese einfachen Regelungsprobleme bieten sich folglich Zweipunktregler oder PID-Regler an, da der höhere zeitliche Aufwand des Trainings eines neuronalen Netzes vermieden wird.

Liegen hohe Tot- oder Verzögerungszeiten vor oder variieren diese Prozeßparameter während einer Kultivierung (z.B. durch eine Verstopfung des Probenahmemoduls), so zeigt sich der Regelalgorithmus eines neuronalen Netzes besser als ein PID-Regler geeignet, die neuen Bedingungen zu verarbeiten.

Die folgende Abbildung 58 zeigt zwei Simulationen einer Regelung auf 0,75 g/l Ammonium. Der Simulation liegen die Bedingungen aus Kapitel 2.1 zugrunde. Ein dreischichtiges Netz wurde trainiert. Dabei wurde eine Verzögerungszeit von 5 Minuten und eine Meßwert-schwankung von 5,0 % vorausgesetzt. Daraus ergibt sich eine mittlere Regelabweichung von 3,8 % nach der Einschwingphase. Ähnliche Regelabweichungen erhält man auch mit einem PID-Regler (siehe Abbildung 7). Mit den selben Wichtungsfaktoren wird die Simulation bei einer Verzögerungszeit von 30 min durchgeführt. Im Vergleich zu Abbildung 8 treten deutlich

geringere Überschwingungen auf. Die maximale Überschwingung beträgt 0,4 g/l im Gegensatz zu dem Verhalten eines PID-Reglers (maximal 0,55 g/l, siehe Abbildung 8).

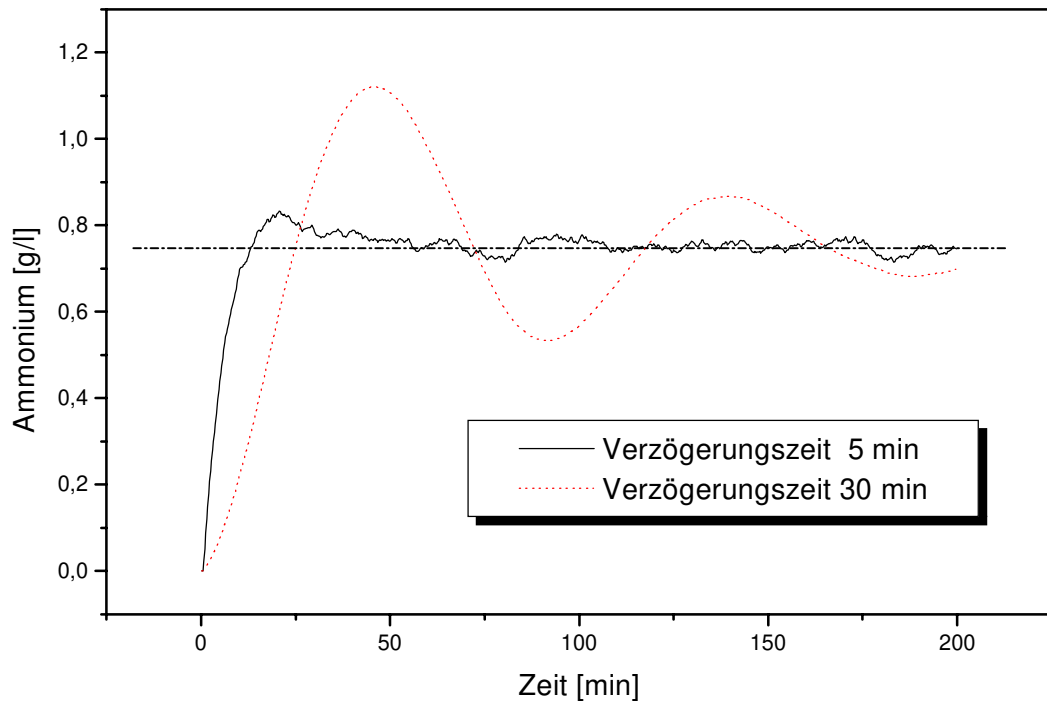


Abb. 58: Zwei simulierte Regelungen auf 0,75 g/l Ammonium mit einem dreischichtigen neuronalen Netz; Berechnung der Gewichte bei einer Verzögerungszeit von 5 min

Auch hier bedingt die stärkere Berücksichtigung aller drei Meßinformationen eine größere Robustheit des Systems.

Um die Regelanforderungen zu variieren, wird keine lineare, sondern eine exponentiell abnehmende Verdünnung des Mediums innerhalb des CSTR eingestellt. Es wird mit dem Volumenstrom \dot{V}_P kontinuierlich Puffer zugeführt. Zusätzlich kann eine Substratlösung von 20 g/l Substrat zugegeben werden. Die Pumprate wird dabei von einem dreischichtigen neuronalen Netz eingestellt. Das Gerätebild ist in der folgenden Abbildung 59 dargestellt. Die Summe der einfließenden Volumenströme ist dabei gleich der ausfließenden, so daß eine Volumenkonstanz gewährleistet ist.

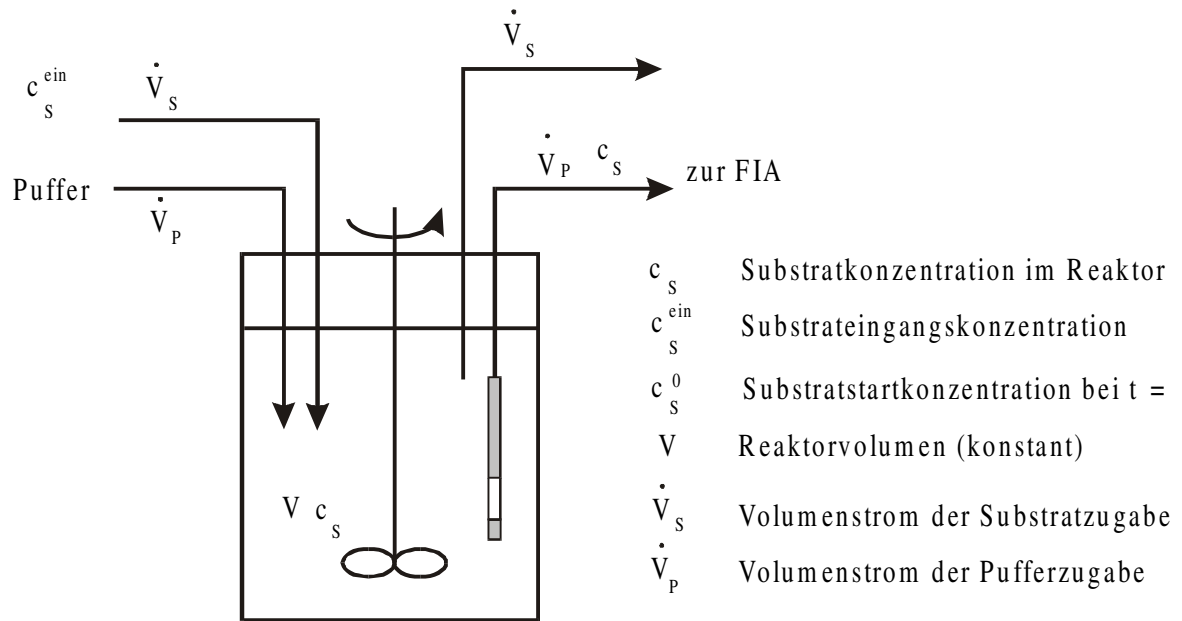


Abb. 59: Gerätebild eines Rührkesselreaktors zur Simulation einer NN-Regelung der Substratkonzentration; Parameter in Tabelle 28

Tab. 28: Parameter zur Simulation einer PID-Regelung der Substratkonzentration innerhalb eines Rührkesselreaktors

Konzentrationen	$c_S, c_S^0 = 0, c_S^{\text{ein}} = 5 \text{ g/l}$
Volumenströme	$\dot{V}_P = 3 \text{ ml/min}$, Regelgröße \dot{V}_S
Reaktorvolumen	$V = 400 \text{ ml}$
Meßzyklusdauer	5 min
Verzögerungszeit	5 min (Simulation 1), 30 min (Simulation 2)

Die allgemeine Gleichung für die Änderung der Substratkonzentration bei $dV/dt = 0$ lautet:

$$\frac{dc_S}{dt} = \frac{1}{V} \dot{V}_S c_S^{\text{ein}} - \frac{1}{V} \left(\dot{V}_P + \dot{V}_S \right) c_S \quad (30)$$

Die Lösung der Differentialgleichung (30) für den Fall eines unregulierten Systems mit der Anfangsbedingung $c_S(t=0) = c_S^0$ ergibt:

$$\frac{dc_S}{dt} = -\frac{1}{V} \dot{V}_P c_S \quad (31)$$

Nach Trennung der Variablen und Integration folgt daraus:

$$\int_{c_S^0}^{c_S} \frac{dc_S}{c_S} = -\frac{1}{V} \int_0^t \dot{V}_P dt \quad (32)$$

$$\Rightarrow c_S = c_S^0 e^{-\frac{\dot{V}_P t}{V}} \quad \text{bzw.} \quad c_S = c_S^0 e^{-t/\tau} \quad (33)$$

Im unregulierten Fall nimmt die Substratkonzentration exponentiell mit der Zeit ab. Im Fall einer Regelung läßt sich die Gleichung (30) nicht mehr allgemein lösen. Es läßt sich jedoch die theoretisch einzustellende Pumprate \dot{V}_{Soll} berechnen, die zur Einhalten des Sollwerts c_{Soll} führt. In diesem stationären Fall ist $dc_S/dt = 0$:

$$\frac{1}{V} \dot{V}_{\text{Soll}} c_S^{\text{ein}} - \frac{1}{V} \left(\dot{V}_P + \dot{V}_{\text{Soll}} \right) c_{\text{Soll}} = 0 \quad (34)$$

$$\Rightarrow \dot{V}_{\text{Soll}} = \frac{c_{\text{Soll}}}{c_S^{\text{ein}} - c_{\text{Soll}}} \dot{V}_P \quad (35)$$

Die Konzentration im Reaktor nimmt dabei nach folgendem Gesetz zu:

$$c_S = c_{\text{Soll}} \left(1 - e^{-\frac{\dot{V}_{\text{Soll}} t}{V}} \right) \quad (36)$$

In Abbildung 60 sind sowohl die Abnahme der Ammoniumkonzentration als auch die anschließende Regelung auf 0,5 g/l Ammonium zu erkennen. Sobald die Ammoniumkonzentration 0,01 g/l unterschreitet, beginnt die Regelung. Um das Verhalten des Netzes besser beurteilen zu können, wurde der Pumpratenverlauf mit in die Abbildung aufgenommen. Es zeigt sich ein sehr steiler Anstieg der Konzentration, wobei das Maximum der Pumprate erreicht wird. Der Sollwert wird sehr viel schneller erreicht, als es bei einer konstanten Zufütterung mit \dot{V}_{Soll} zu erwarten wäre. Danach würden 90 % des Sollwerts erst nach $\ln 10 \cdot \tau$ vorliegen. Sobald der Sollwert erreicht ist, ähnelt das Verhalten des Netzes mehr einem Zweipunktregler mit einem An- und Abschalten der Pumpe. Dieses ist ein Zeichen für

eine unzureichende Einstellung der Konzentration der Zufütterungslösung. Idealerweise sollte die Pumpe stets einen kontinuierlichen Strom an Ammonium in den Reaktor befördern, um eine Substratlimitierung zu vermeiden. Es bietet sich an, die Simulationsprogramme so zu verändern, daß ein An/Aus-Verhalten vermieden wird. In dem folgenden Kapitel werden Kultivierungen untersucht, bei denen diese Pumpratenoptimierung durchgeführt wurde.

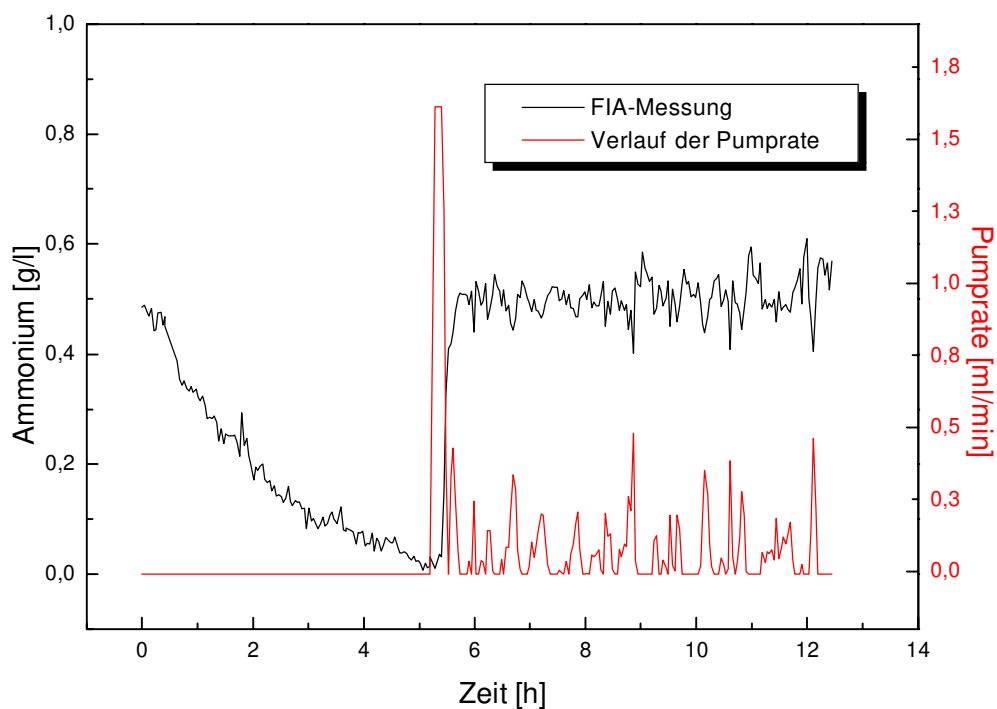


Abb. 60: Verlauf der Ammoniumkonzentration und der Zufütterungsrate in einem Gradientenmischer mit exponentiell abnehmender Konzentration; Regelung mit einem dreischichtigen neuronalen Netz auf 0,5 g/l

9.3 Einsatz von neuronalen Netzen zur Bioprozeßregelung

Die Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* stellt einen geeigneten Bioprozeß für die Erprobung einer Glucoseregung mit einem neuronalen Netz dar. Das Regelungsproblem ist ausreichend komplex, um den Einsatz eines Netzes gegenüber einem PID-Regler zu rechtfertigen. Es soll gezeigt werden, daß eine höhere Regelgüte als mit einem PID-Regler erreicht werden kann. In früheren Arbeiten [7] wurde bereits die Einsatzfähigkeit in Kultivierungen mit großem Konzentrationsbereich (0 bis 30 g/l) unter Beweis gestellt. Der Konzentrationsbereich wird gegenüber dem in Kapitel 8.1 beschriebenen Experiment stark

verringert. Die Aufgabe des neuronalen Netzes ist es, auch auf Konzentrationen unterhalb 1 g/l mit hoher Genauigkeit zu regeln und dabei einen Substratmangel zu vermeiden.

Tab. 29: Bedingungen des Regelungsexperiments mit einem neuronalen Netz während einer Fed-Batch-Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Mikroorganismus	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Reaktor	5 l CSTR mit 4,0 l Schatzmann-Medium, $c_{\text{Gluc}}^0 = 1,3 \text{ g/l}$, $T = 34 \text{ °C}$, pH 5,1
Online-Analytik	FIA-System mit GOD-Kartusche, Analysenfrequenz 20 h^{-1} ; ESIP Probenahmemodul
Regelsystem	Dreischichtiges neuronales Netz (3-2-1); variable Pumprate von 0 bis 9 ml/min, Start ab 0,8 g/l Verzögerungszeit 20 min (mit Probenahmemodul)
Dauer	12 h

Das Modell wurde in Kapitel 8.1 beschrieben. Die folgende Tabelle 30 zeigt die verwendeten Parameter:

Tab. 30 Parameter einer NN-Regelung der Substratkonzentration während einer Fed-Batch-Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Konzentrationen	$c_S, c_S^0 = 1,3 \text{ g/l}$, $c_S^{\text{ein}} = 15 \text{ g/l}$, $c_{\text{Soll}} = 0,8 \text{ g/l}$
Volumenströme	Regelgröße \dot{V}_S
Reaktorvolumen	$V = 4000 \text{ ml}$ (konstant)
Modell	$c_{\text{Gluc}} = p_0 - p_1 e^{\mu t} - p_2 t$ (siehe Gleichungen 27 und 28) $p_0 = 1,359 \text{ g/l}$; $p_1 = 0,059 \text{ g/l}$; $\mu = 0,51 \text{ h}^{-1}$; $p_2 = 0$ (ungeregelter Fall)

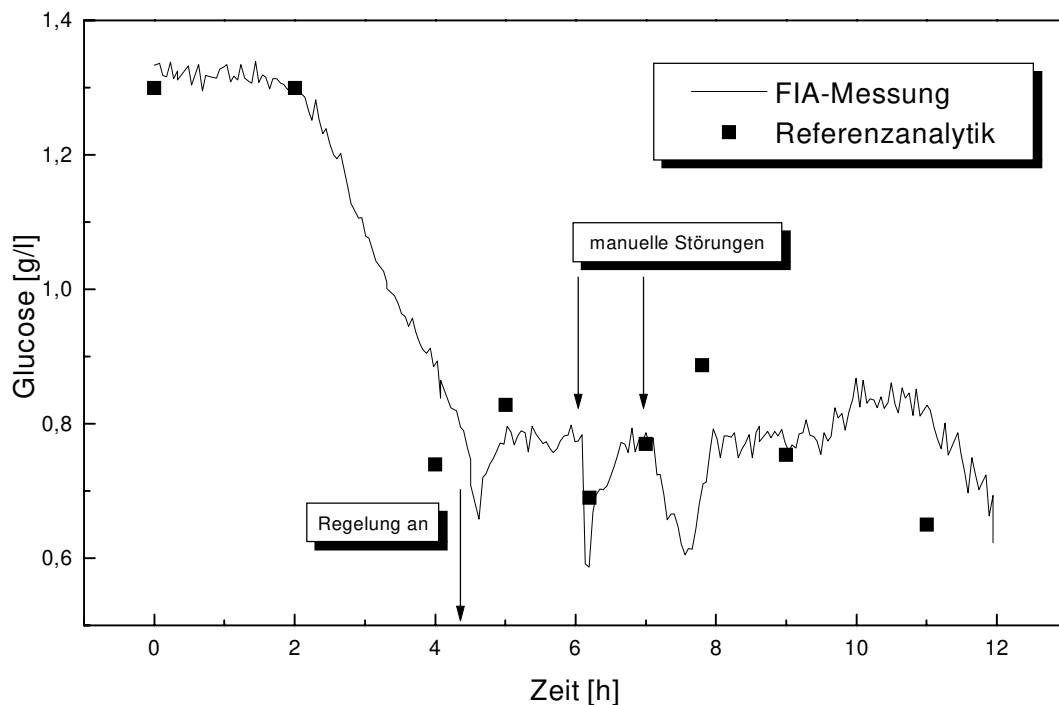


Abb. 61: Verlauf der Glucosekonzentration in einer Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* mit NN-Regelung auf 0,8 g/l, Bedingungen in Tabelle 29

Ausgehend von einer Glucosekonzentration von 1,3 g/l findet zunächst eine Batch-Phase statt, bis die gemessene Konzentration unter 0,8 g/l fällt. Anschließend wird auf 0,8 g/l Glucose geregelt. Durch die Verzögerungszeit von 20 Minuten fällt die gemessene Konzentration bis 0,65 g/l ab. Danach wird der Sollwert sehr gut eingehalten, die mittlere Regelabweichung beträgt 2,0 % und liegt im Bereich der Meßwertfehler. Um die Robustheit des Regelalgorithmus zu testen, wurde nach 6 h bzw. 7 h durch Wasserzugabe eine Senkung der Ammoniumkonzentration durchgeführt. Innerhalb von 30 bis 40 Minuten wird der Sollwert wieder erreicht; das System zeichnet sich durch eine hohe Stabilität aus.

Zum Ende der Kultivierung (10 bis 12 h) gelangen Luftblasen aus dem Probenahmemodul in den Detektor, was ein Zeichen für eine beginnende Verstopfung des Moduls ist. Dennoch ist die Regelgüte auch in diesem Bereich noch ausreichend. Zwischen den Offline-Proben und der Online-Messung gibt es Abweichungen von bis zu 0,1 g/l. Ein Grund ist die Verzögerungszeit zwischen Reaktor und Detektor, wodurch die Online-Meßwerte den Verhältnissen im Reaktor vor 20 Minuten entsprechen.

Wie im Kapitel 9.2 gefordert, wird hier auf eine möglichst gleichmäßige Zufütterung geachtet. Die folgende Abbildung 62 zeigt den Verlauf der Pumprate während der Kultivierung:

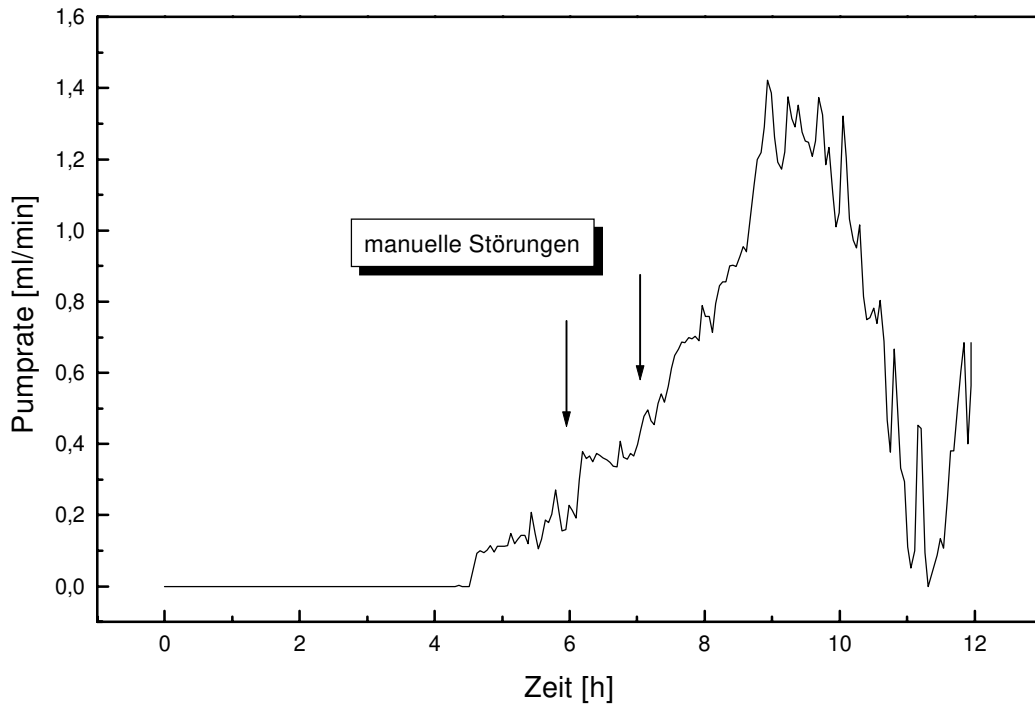


Abb. 62: Verlauf der Pumprate während der Regelung mit einem neuronalen Netz (siehe Tabelle 29 und Abbildung 61)

Man erkennt ein exponentielles Ansteigen der Pumprate. Das Verhalten des Reglers unterscheidet sich deutlich von dem nicht optimierten neuronalen Netz in Kapitel 9.2 (siehe Abbildung 60). Während dort nur durch ein An- und Abschalten der Pumpe geregelt werden kann, wird im vorliegenden Beispiel die Zufütterung langsam verstärkt. Dennoch reagiert der Regler flexibel auf äußere Störungen, wie durch die Senkung der Glucosekonzentration gezeigt wurde. Durch die Berücksichtigung der Pumprate und der idealen Zufütterungskonzentration gelang es, eine Regelung mit hoher Genauigkeit durchzuführen.

10 Schlußbetrachtung

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe von bioanalytischen Verfahren eine Regelung von Bioprozessen durchzuführen. Dazu war es notwendig, verschiedene Bereiche der Forschung und Technik miteinander zu verknüpfen. Eine einseitige Sichtweise der Teilgebiete, entweder der Prozeßtechnik oder der Sensorik half nicht weiter. Es wurde einerseits gezeigt, wie Modifikationen herkömmlicher Meßsysteme (s.u) zu einer Erhöhung von Meßgenauigkeit und Sensitivität eingesetzt werden konnten. Andererseits konnte durch eine Verbesserung der Sensorik auch eine höhere Regelgüte bei der Prozeßregelung erreicht werden. Der enge Zusammenhang zwischen Bioanalytik und Bioprozeßregelung wurde beschrieben.

Die Grundlage der Bioprozeßregelung ist eine funktionierende und verlässliche Online-Analytik. Zu diesem Thema wurden verschiedene Analyseverfahren genannt und auf ihre Eignung für eine Regelung getestet. Die Fließinjektionsanalyse bietet dafür eine hohe Flexibilität und gute Handhabbarkeit. Es zeigte sich, daß sich mit FIA-Systemen verlässliche Regelsysteme aufbauen lassen, deren Automatisierbarkeit dank einer Anzahl von Automatisierungs- und Auswertesoftware bereits sichergestellt ist. Mit dem Softwareprogramm CAFCA war eine Prozeßsteuerung und eine Prozeßregelung durchführbar. Die Verlässlichkeit von FIA-Anlagen kann desweiteren durch Expertensysteme zur Störfalldiagnose und Meßfehlererkennung vergrößert werden. Vorbehalte seitens der Industrie werden in Zukunft entfallen, wodurch sich die Einsatzmöglichkeiten der FIA-Systeme nicht nur auf dem Gebiet der Regelung erweitern werden.

Ein weiterhin bestehendes Problem bei Anlagen zur Online-Bioanalytik sind die hohen Tot- und Verzögerungszeiten. Es wurde gezeigt, wie sich Tot- und Verzögerungszeiten ungünstig auf eine Regelung auswirken. Eine Entwicklung während dieser Arbeit war die direkte Kombination eines miniaturisierten FIA-Systems mit einem Probenahmemodul (ESIP-Lab 5442, Eppendorf). Neben einer relativ einfachen Bauweise verringert dieses System die Tot- und Verzögerungszeiten und erleichtert eine darauf aufbauende Regelung. Mit Meßwertschwankungen von 2,8 bis 4,6 % weist das modifizierte FIA-System für FIA-Anlagen typische Fehler auf.

Diese bekannte Methode der ASCF wurde erfolgreich in Kombination mit einer FIA-Anlage bei Bioprozeßoptimierungen eingesetzt. Mit einem sehr geringen Probenstrom von 0,05 ml/min konnten beide Anlagen gleichzeitig betrieben werden. Der Vorteil des geringen

Probenverbrauchs dieser naßchemischen Verfahren konnte so optimal genutzt werden. Um die genannte Problematik des Probenahmemoduls zu umgehen, wurde ein neues Verfahren getestet und bei Regelungen eingesetzt. Diese Variante der FIA nutzt zellhaltige Proben und kommt somit ohne Probenahmemodul aus. Die Vorteile dieses Analyseverfahrens liegen in einer sehr geringen Tot- und Verzögerungszeit und in kurzen Meßzyklen. Das System ist ideal dafür geeignet, schnelle Änderungen des Analyten zu verfolgen. Ein Nachteil ist der hohe Verbrauch an teuren Enzymlösungen, weswegen das Verfahren zunächst nur mit GOD-Lösungen zur Messung von Glucose eingesetzt wurde.

Nicht nur die gezeigten Analysemethoden wurden im Hinblick auf eine Regelung optimiert, sondern auch die verwendeten Chemo- und Biosensoren. Es wurden Systeme zur Bestimmung der Stickstoffquelle Ammonium und der Kohlenstoffquelle Glucose betrachtet. Von vornherein konnten solche Detektoren ausgeschlossen werden, die entweder eine zu Regelungszwecken zu geringe Meßfrequenz oder eine zu hohe Störanfälligkeit aufwiesen. Dennoch gibt es kein für alle Zwecke ideales Meßverfahren. Je nach Konzentrationsbereich, Meßfrequenz, Störanfälligkeit oder Handhabbarkeit muß man sich für situationsangepaßte Detektoren entscheiden. Die Meßfrequenz eines Verfahrens spielt für Regelungen eine besondere Rolle. Auch komplexe Regelungsprobleme können bei genügend hoher Analysenfrequenz und moderaten Meßschwankungen gelöst werden.

Die Verbesserung der Sensorik war ein weiteres Ziel der Arbeit. Am Beispiel des Screenings und der Kultivierung acylase-ausschleusender Bakterienstämme wurde gezeigt, wie durch den Einsatz von Chemo- und Biosensoren die Produktion von Pen G-Acylase überwacht werden konnte. Die Kombination mit Offline-Daten förderte dabei das Verständnis für die biochemischen Zusammenhänge bei den dargestellten Kultivierungen. Aufbauend auf den Ergebnissen ist man nun in der Lage, mit gezielten Regelungsexperimenten eine Ausbeutesteigerung zu erreichen.

Es konnte am Beispiel der Messung von Ammonium mit einer Gasdiffusionszelle gezeigt werden, wie sich das Analyseverfahren sowie das Detektionssystem an das jeweilige Problem anpassen lassen. Wünschenswert wäre die automatische Anpassung des Sensors an das Meßproblem. Dazu wurde ein neues Verfahren zur reversiblen und automatisierten Immobilisierung von Glycoenzymen auf pH-FET entwickelt. Die Vorteile des auf Con A basierenden Verfahrens liegen dabei zum einen in längeren Standzeiten des Sensors, wodurch die Verlässlichkeit des Analyseverfahrens bei einer Bioprozeßregelung erhöht wird. Zum anderen kann die Umstellung von einem Analyten auf einen anderen automatisch erfolgen.

Mit dem Bioaffinity Layering auf pH-FET ist man in der Lage, die Sensitivität des Sensors gezielt auf die Erfordernisse des Prozesses auszurichten. Liegt beispielsweise ein großer Konzentrationsbereich vor, so ist eine geringere Sensitivität vorteilhaft, da eine Probenverdünnung entfällt. Arbeitet man dagegen mit Substratlimitierung, so ist eine hohe Sensitivität erforderlich. Durch automatisches Layering konnte die Sensitivität um den Faktor sieben verstärkt werden. Es ist möglich, in gewissen Grenzen die Sensitivität des Sensors vorherzusagen. Damit erreicht man eine bessere Anpassung an den Bioprozeß.

In dem genannten System ist es allerdings immer noch notwendig, die Grundschicht aus Enzym, Con A, HSA und GA manuell aufzutragen. Bei der Verwendung von Glycoenzymen gelang es jedoch, eine Grundmembran aus Stärke, HSA und GA darzustellen, auf der per Durchflußimmobilisierung Con A und Glycoenzym alternierend aufgebracht werden können. Dieses ist ein weiterer Schritt zu einer vollautomatischen Darstellung von Sensoren, die sich automatisch an den gewünschten Analyten und dessen Konzentrationsbereich anpassen.

Durch CAFCA läßt sich die Immobilisierung und das Ablösen der Enzymschichten steuern. Eine zu implementierende Unteroutine könnte, nachdem der gewünschte Analyt und dessen zu erwartende Konzentration mitgeteilt wurde, den Sensor herstellen und ihn mit einer gezielt auf den vorliegenden Konzentrationsbereich abgestimmten Sensitivität versehen. Ändert sich der Analyt, so würde das Meßsystem das Enzym eigenständig gegen ein neues austauschen. Es wurde gezeigt, daß diese Systeme vollständig reversibel sind. Die Verwendung in synthetischen Medien wurde anhand einer Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* demonstriert. Ein GOD-pH-FET konnte in seiner Sensitivität an die Prozeßbedingungen angepaßt werden.

Bislang sind die entwickelten Sensoren auf Glycoenzyme beschränkt. Gezeigt wurden Immobilisierungen von GOD und POD. Es wurden jedoch auch Versuche unternommen, Urease an die Grundmembran aus Stärke, HSA und GA adhäsiv zu binden (nicht gezeigt). Con A ist dabei nicht mehr notwendig, da kein Glycoenzym vorliegt. Diese Sensoren zeigen eine geringe Standzeit von wenigen Stunden, dennoch sind hier Versuche, die Enzyme an grobkörnigen Molekülen oder oberflächenaktiven Stoffen zu binden, sehr vielversprechend und könnten die Flexibilität von Biosensorsystemen erhöhen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß im ersten Teil der Arbeit die untersuchten bioanalytischen Verfahren besser an die Anforderungen einer Bioprozeßregelung angepaßt wurden. Die Meßverfahren zeichnen sich durch eine höhere Meßfrequenz (z.B. bei der Detektion von Ammonium über eine Gasdiffusionszelle) und durch einen höheren Grad der Automatisierung aus (siehe Kapitel 5). Dennoch wird eine Regelung durch die hohen Tot-

und Verzögerungszeiten des Probenahmemoduls stark erschwert. Es wurde nun versucht, die Meßsysteme durch Kopplung mit intelligenten Regelalgorithmen weiter zu verbessern.

Es wurde zunächst der Einfluß der Meßparameter wie der Analysenfrequenz, der Verzögerungszeit und der Meßwertschwankungen auf die Robustheit und die Genauigkeit der Regelung untersucht. Es zeigte sich dabei die Notwendigkeit einer abwägenden Betrachtung der Kriterien der Regelgüte. Zur Wahl eines optimalen Reglers mußte ein Kompromiß zwischen einerseits der Regelgenauigkeit und der Regeldynamik, und andererseits der Regelgenauigkeit und Robustheit geschlossen werden. Eine Optimierung der Regelgenauigkeit ohne die Berücksichtigung von Prozeß- und Meßstörungen würde nur in Simulationen zu guten Ergebnissen führen. Die biologischen Systeme zeichnen sich jedoch durch Unwägbarkeiten aus, die sich in der Variation der Wachstumsgeschwindigkeit äußern. Um die Akzeptanz moderner Regelalgorithmen in der chemischen und biotechnischen Industrie zu steigern, muß auf die Robustheit eines Reglers größter Wert gelegt werden. Zu diesem Zweck wurde ein Simulationsprogramm erstellt, das es ermöglicht, alle relevanten und erfaßbaren Parameter des Bioprozesses in die Optimierung des Reglers mit einfließen zu lassen. Eine Anzahl von Störungen, insbesondere Meßwertschwankungen wurden so in ihren Auswirkungen auf die Regelstabilität untersucht. Auch bei einer Abweichung des Experiments von der Simulation konnte somit die Robustheit des Reglers sichergestellt werden.

Die Grundlage der Simulationen und der Berechnung der Regelparameter waren einfache Modellierungen, die aus den Konzentrationsprofilen des unregulierten Prozesses zugänglich sind. Mit Hilfe des Simplex-Algorithmus konnte in allen Fällen ein Parametersatz gefunden werden, der eine ausreichende Regelgenauigkeit und hohe Robustheit garantiert. Ein Vergleich mit anderen Methoden der Parameterberechnung blieb dabei aus. Dieses wird in weiteren Arbeiten unternommen werden; die Verwendung von verschiedenen Optimierungsalgorithmen (z.B. dem genetischen Algorithmus) wird getestet werden.

Bioprozesse sind komplexe chemische Systeme. Mit einfachen Funktionen gelang es jedoch, die Konzentrationsprofile quantitativ zu beschreiben.

Mit den optimierten Meßsystemen und einer Modellierung war es nun möglich, eine verläßliche Bioprozeßregelung durchzuführen. Den Anfang bildeten einfache Zweipunktregler, die in der Industrie noch weit verbreitet sind. In der Tat sind solche Systeme unabhängig von Modellvorstellungen und reagieren sehr gut auf Störungen der Betriebsbedingungen. Abhängig von der Meßfrequenz und der Dynamik des Bioprozesses lassen sich starke Schwankungen der Substratkonzentration nicht vermeiden. Interessant ist hierbei die

Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit μ von der Substratkonzentration und der Zeit. In einigen Kultivierungen konnte so der Verlauf von μ angegeben werden. Es ergab sich jeweils eine konstante Wachstumsgeschwindigkeit; interessanter sind Kultivierungen, bei denen sich die Wachstumsgeschwindigkeit zeitlich ändert. Dazu sollten Regelungen im Bereich von 0-0,5 g/l Glucose vorgenommen werden um den Crabtree-Effekt zu umgehen. Es bietet sich an, solche Prozesse in Zukunft mit dem vorgestellten Verfahren der Oszillationszerlegung zu untersuchen.

Schrittweise wurde nun die Komplexität des Regelalgorithmus erhöht. Als nächstes wurden PID-Regler zur Bioprozeßregelung verwendet. Sie sind mit einer höheren Flexibilität als ein Zweipunktregler ausgestattet und in der Lage, einem Sollwert besser zu folgen. Es wurde gezeigt, daß eine Veränderung des Meßsystems (z.B. der Meßfrequenz oder der Verzögerungszeit) großen Einfluß auf die Stabilität des PID-Reglers ausübt. Mit der Unterstützung einfacher Modelle konnten PID-Parameter berechnet werden, die in einer Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* eine relativ hohe Regelgüte erzeugten. Es wurden Beispiele der Regelung von Glucose und Ammonium als wesentlicher Größen für das Zellwachstum dargestellt. Dabei wurde erkannt, daß die Einbeziehung von Meßwertschwankungen in die Simulation einer Regelung sehr wichtig bei der Generierung robuster Regler ist. Es ergaben sich keine signifikant anderen Regelgüten in Simulation und Experiment. Dieses zeigt die bereits vorhandene Leistungsfähigkeit des Regelalgorithmus. Bei Verwendung der gezeigten Regelalgorithmen ist eine Erhöhung der Regelgüte nur noch durch eine genauere oder schnellere Analytik zu bewerkstelligen. Eine Möglichkeit ist dabei die Einführung von Meßwertfiltern. Damit wäre es möglich, die Meßwertschwankungen zu reduzieren und eine Erhöhung der Regelgüte zu erreichen. CAFCA bietet dazu verschiedene Filter an. Die Verwendung bei schnellen biologischen Vorgängen ist allerdings fraglich.

Eine andere Methode, die Meßwertschwankungen als solche zu erkennen, bietet die Nutzung von neuronalen Netzen. Die Gewichte wurden mit Hilfe des vorgestellten Simplex-Algorithmus berechnet. Es ist möglich, bei relativ einfacher Netzwerkarchitektur einen Satz an Wichtungsfaktoren zu erzeugen, der zur Regelung geeignet ist. Unbekannt ist, ob komplexere Netzwerkstrukturen eine höhere Flexibilität besitzen als die eingesetzten dreischichtigen Netzwerke. Eine Berechnung der Wichtungsfaktoren bei vier- oder höherschichtigen Netzen ist mit einem Simplex-Algorithmus nicht möglich. Mit der Verwendung des genetischen Algorithmus bietet sich möglicherweise eine Alternative.

Die Unterschiede zwischen einem PID-Regler und einem neuronalen Netz wurden aufgezeigt. Der PID-Regler ist dabei sehr einfach zu überblicken und die Berechnung der PID-Parameter

benötigt nur wenig Zeit. Die Berechnung der Wichtungsfaktoren erstreckt sich hingegen über 1000 bis 5000 Trainingszyklen. Ein Vorteil des neuronalen Netzes ist eine geringere Anfälligkeit gegenüber Meßwertschwankungen. Aus dem gleichen Grund wird ein neuronales Netz von Variationen der Verzögerungszeit nicht so stark wie ein PID-Regler beeinflusst. Wie anhand von manuellen Störungen in einer Kultivierung gezeigt wurde, ist eine hohe Robustheit des NN-Reglers gewährleistet. Dabei wurde erkannt, daß eine gleichmäßige Erhöhung der Pumprate im Gegensatz zu einem An/Aus-Verhalten zu einer höheren Regelgüte führt.

Es steht zu hoffen, daß von Seiten der Industrie in der Zukunft mehr Interesse und Vertrauen in die Regelung biotechnischer Prozesse investiert wird, um die Bemühungen der Forschung umzusetzen.

11 Anhang

11.1 Abkürzungsverzeichnis

6-APA	6-Aminopenicillanic acid
ASCF	Air segmented continuous flow
BTM	Biotrockenmasse
CAFCA	Computer Assisted Flow Control & Analysis
Con A	Concanavalin A
CSTR	Rührkesselreaktor (continuously stirred tank reactor)
EC	Enzyme Classification
EnFET	Enzymatisch modifizierter Feldeffekttransistor
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
FET	Feldeffekttransistor
FIA	Fließinjektionsanalyse
GA	Glutardialdehyd
GC	Gaschromatographie
g/l	Gramm pro Liter
GOD	Glucoseoxidase
HSA	Humanes Serum Albumin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IsFET	Ionensensitiver Feldeffekttransistor
KPP	Kaliumphosphat
Mio.	Millionen
mM	Millimol
Mrd.	Milliarden
NN	neuronales Netz
OD	Optische Dichte
PAA	Phenylelessigsäure
PC	Personal Computer
PDAB	p-Dimethylaminobenzaldehyd
Pen G	Penicillin G
Pen V	Penicillin V
pH-FET	pH-sensitiver Feldeffekttransistor
PID-Regler	Proportional-Integral-Differential-Regler
POD	Peroxidase
PP	Polypropylen
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
t	Zeit
T	Temperatur
TTL-Impuls	Transistor-Transistor-Logik-Impuls
U	Units
YSI	Yellow Springs International
µm	Mikrometer
µmol	Mikromol

11.2 Formelverzeichnis

A	Aktivierung
A_W	mittlere Abweichung vom Sollwert
c	Konzentration
c_{Gluc}	Glucosekonzentration
$c^{\text{ein}}_{\text{Gluc}}$	Konzentration der zugeführten Glucoselösung
c_o	obere Konzentrationsgrenze des Zweipunktreglers
c_{Soll}	Sollwert der Glucosekonzentration
c_s	Substratkonzentration
c_s^0	Substratausgangskonzentration
c^{ein}_s	Konzentration der zugeführten Substratlösung
c_u	untere Konzentrationsgrenze des Zweipunktreglers
E	Verweilzeitverteilungsfunktion
F	Verweilzeitsummenfunktion
i	Laufindex
I	Input
k	Laufindex
K_P	Reglerverstärkung
K_S	Monod-Konstante
m	Maintenance-Koeffizient
p_i	Modellparameter
q_i	Regelparameter
q_P	spezifische Produktbildungsrate
t	Zeit
t_{tot}	Totzeit
T	Temperatur
T_0	Abtastzeit
T_D	Differenzierzeit (oder Nachstellzeit)
T_I	Integrierzeit (oder Vorhaltzeit)
u	Steuer- oder Ausgangssignal
u_0	Steuer- oder Ausgangssignal für $x_W = 0$
V	Reaktorvolumen
V_0	Reaktorausgangsvolumen
\dot{V}_P	Volumenstrom der Pufferzugabe
\dot{V}_S	Volumenstrom der Substratzugabe
\dot{V}_{Soll}	Volumenstrom zur Einhaltung eines Sollwerts
X	Biomasse
X_0	Ausgangskonzentration an Biomasse
x	Istwert
x_S	Sollwert
x_W	Regelabweichung
Y_{PC}	Produktausbeutekoeffizient
Y_{XC}	zelluläre Ausbeutekoeffizient
μ	spezifische Wachstumsrate
μ_{max}	maximale spezifische Wachstumsrate
v	spezifische Glucoseaufnahmerate
τ	mittlere hydrodynamische Verweilzeit

11.3 Aktivitätstests

11.3.1 Glucoseoxidase

1. 0,15 M Glucoselösung in bidest. Wasser herstellen (Lösung I)
2. 0,01 % Peroxidase und 0,01 % Dianisidinehydrochlorid in 0,05 M Natriumphosphat-Puffer (pH 6,1) lösen (Lösung II)
3. 1 ml der Lösung I wird mit 1,8 ml Lösung II vermischt und für 2 Minuten bei 37 °C zur Reaktion gebracht
4. 0,2 ml Probe zufügen und für 10 Minuten bei 37 °C reagieren lassen
5. Reaktion durch Zugabe von 1 ml Schwefelsäure abbrechen und Extinktion bei 550 nm messen

11.3.2 Urease

1. Lösung I: 23 ml Trispuffer (50 mM), pH 8; 0,1 ml α -Ketoglutarat (0,25 M); 0,6 ml Harnstofflösung (0,3 M); 0,3 ml Wasser
2. Lösung II: Glutamatdehydrogenase in Glycerin 10 mg/ml (SIGMA)

2,4 ml Lösung I, 0,05 ml Lösung II, 0,35 ml Wasser und 0,1 ml Probe werden zusammengegeben und gut durchmischt. Bei 25 °C wird die Zunahme der Extinktion bei 340 nm verfolgt. Der Bestimmung wird die Zunahme zwischen der dritten und der sechsten Minute zugrunde gelegt. Folgender Zusammenhang besteht zwischen der Ureaseaktivität und der zeitlichen Zunahme der Extinktion:

$$U/l = 2412 \Delta E/\Delta t$$

11.4 Bestimmung von Offline-Proben

11.4.1 Proteinnachweis mit Bicinchoninsäure

1. Lösung I: 1 % Bicinchoninsäure Dinatriumsalz, 2 % Soda, 0,16 % Dinatriumtartrat, 0,4 % NaOH, 0,95 % Natriumhydrogencarbonat
2. Lösung II: 4 % CuSO₄

Zum Nachweis werden 0,1 ml Probe mit 2 ml Arbeitsreagenz (50 Teile Lösung I: 1 Teil Lösung II) für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die optische Dichte der Proben bei 562 nm gegen Wasser bestimmt. Die Konzentration wird anhand einer 4-Punkte-Kalibrationskurve ermittelt (Meßbereich 0,01-1,2 mg/ml)

11.4.2 Glucosebestimmung I

Lösung: Glucosenachweiskit Nr. 16-UV (SIGMA)

Die Lösung wird mit 10 ml bidest. Wasser vermischt. Zum Nachweis werden 10 µl Probe mit 1 ml Reagenzlösung vermischt. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wird die Extinktion bei 340 nm gegen Wasser bestimmt. Folgender Zusammenhang besteht zwischen der Glucosekonzentration und der Extinktion:

$$c(\text{mg/l}) = 3428,5 \times E_{340}$$

11.4.3 Glucosebestimmung II

Lösung: Glucosenachweiskit Nr. 1113950 (Boehringer, Mannheim)

Funktionsprinzip wie in Kapitel 11.3.2

11.4.4 Glucosebestimmung III

Für die Bestimmung von Glucose wurde ein Glucose Analysator YSI 27 von Yellow Springs Instruments, Ohio verwendet. Der Analysator arbeitet mit einer Sauerstoffelektrode, auf der sich eine mit Glucoseoxidase immobilisierte Celluloseacetat-Membran befindet. Entstehendes Wasserstoffperoxid wird elektrochemisch detektiert.

11.4.5 Ammoniumbestimmung

Lösung: Glucosenachweiskit Nr. 542946 (Boehringer, Mannheim)

Ammoniak bzw. Ammonium setzt α -Ketoglutarat in Gegenwart von Glutamatdehydrogenase und NADH zu L-Glutamat um, wobei NADH verbraucht wird. Der NADH-Verbrauch wird bei 340 nm gemessen.

11.4.6 Indikatorlösung zur photometrischen Bestimmung von Ammonium

Zur Herstellung einer Stammlösung wird 1 g Bromcresolviolett mit 5 ml 0,1 N Natronlauge auf 250 ml mit bidest.Wasser aufgefüllt. Zur Herstellung einer Arbeitslösung wird 5 ml der Stammlösung auf 1 l bidest.Wasser aufgefüllt. Die Farbe wird auf helles Kirschrot eingestellt.

11.5 Pufferlösungen

11.5.1 Aktivierungspuffer für Concanavalin A / Carbonatpuffer

0,1 M	NaHCO ₃
0,05 M	NaCl
0,0001 M	MgCl ₂
0,0001 M	MnCl ₂
0,0001	CaCl ₂
	pH 8,5

11.5.2 Pufferlösung für EnFET-FIA-Systeme

20 mM	K ₂ HPO ₄
0,5 M	NaCl
pH-Wert mit NaOH bzw. HCl einstellen	

11.5.3 Pufferlösung für GOD-Kartuschen-FIA-Systeme

0,04 M	K ₂ HPO ₄
0,05 M	NaCl
0,025 M	EDTA
1 Tropfen Triton X pro Liter	
	pH 6,75

11.6 Enzyme und Feinchemikalien

11.6.1 Enzyme

Glucoseoxidase	Sigma G-2133
Pen G-Acylase	Sigma P-2341
Peroxidase	Sigma P-8250
Urease	Sigma U-2000

11.6.2 Feinchemikalien

Acetat (Natriumsalz)	Sigma S-8625
2-Aminoethanol	Sigma A-7177
6-Aminopenicillansäure	Sigma A-2317
Concanavalin A	Sigma C-2010
EDTA	Sigma ED
Glucose	Fluka Nr. 49159
Glutardialdehyd (25 %)	Sigma G-5882
Harnstoff	Merck
HSA	DRK, Springe
Isopropanol (70 %)	Fluka 59304
K ₂ HPO ₄	Merck Nr. 12034
Manganchlorid	Sigma M-3634
Magnesiumchlorid	Sigma M-2670
Phenyllessigsäure	Fluka 78490
Triton X 100	Serva Nr. 37240
VA-Epoxy 500	Riedel de Haen

11.7 Geräte

2-Kanalschreiber	SE 120 BBC Metrawatt
Probenahmemodul	ESIP-Lab 5442 (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH)
Rechner	486 DX/2-66
FIA-Anlage	EVA Line (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH)
pH-FET	abc, Puchheim
Ag/AgCl-Referenzelektrode	373-M3, Ingold
pH-Elektroden	U-402-M6, Ingold
Magnetrührer	Ikamag RCT
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH
Peristaltikpumpen	IPS 4, IPS 8, Ismatec
Mikroskop	Olympus SZW
Digitalmultimeter	Voltcraft M-3650CR
Thermostat	Haake K15, Haake DC 1
Schüttler	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH

11.8 Medienzusammensetzungen

11.8.1 Synthetisches Medium zur Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

30 g/l	Glucose
4,5 g/l	(NH ₄) ₂ SO ₄
1,9 g/l	(NH ₄) ₂ HPO ₄
0,9 g/l	KCl
0,34 g/l	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
0,42 g/l	CaCl ₂ x 2 H ₂ O
5,9 g/l	Na-citrat
1,0 ml/l	Mineralsalzlösung ^I
	pH 6,8

^IZusammensetzung

0,015 g/l	FeCl ₃ x 6 H ₂ O
0,0105 g/l	MnSO ₄ x H ₂ O
0,009 g/l	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O
0,0024 g/l	CuSO ₄ x 5 H ₂ O
0,06 g/l	m-Inosit
0,03 g/l	Ca-Pantothenat
0,006 g/l	Vitamin B ₁
0,0015 g/l	Vitamin B ₆
0,00003 g/l	Biotin

11.8.2 Synthetisches Medium M1 (Glucose)

1,5 g/l	Glucose
4,5 g/l	KH ₂ PO ₄
5,3 g/l	Na ₂ HPO ₄
2,0 g/l	Histidin
1,0 ml/l	Mineralsalzlösung ^{II}
	pH 6,8

^{II}Zusammensetzung

0,600 g/l	MgSO ₄ ·7 H ₂ O
0,028 g/l	CaCl ₂ ·2 H ₂ O
0,028 g/l	FeSO ₄ ·7 H ₂ O
0,140 g/l	ZnSO ₄ ·7 H ₂ O
0,025 g/l	CuSO ₄ ·5 H ₂ O

0,024 g/l	NaMoO ₄ ·2 H ₂ O
0,024 g/l	CoCl ₂ ·6 H ₂ O
0,048 g/l	MnSO ₄ ·1 H ₂ O

11.8.3 Synthetisches Medium M2 (Glucose)

1,4 g/l	Glucose
9,0 g/l	KH ₂ PO ₄
10,6 g/l	Na ₂ HPO ₄
1,5 g/l	Histidin
1,0 ml/l	Mineralsalzlösung ^{II}
	pH 6,8

11.8.4 Synthetisches Medium M3 (Glycerin)

5,0 g/l	Glycerin
4,5 g/l	KH ₂ PO ₄
5,3 g/l	Na ₂ HPO ₄
2,0 g/l	Histidin
1,0 ml/l	Mineralsalzlösung ^{II}
	pH 6,8

11.8.5 Komplexmedium M4

5,0 g/l	Peptone
3,0 g/l	Fleischextrakt
4,5 g/l	KH ₂ PO ₄
5,3 g/l	Na ₂ HPO ₄
0,1 ml/l	Mineralsalzlösung ^{II}
	pH 6,8

11.8.6 Synthetisches Medium M5 mit hoher Phosphatkonzentration

5,0 g/l	Glycerin
22,5 g/l	KH ₂ PO ₄
26,5 g/l	Na ₂ HPO ₄
2,0 g/l	Histidin
1,0 ml/l	Mineralsalzlösung ^{II}
	pH 6,8

11.8.7 Komplexmedium M6 mit hoher Phosphatkonzentration

5,0 g/l	Peptone
3,0 g/l	Fleischextrakt
22,5 g/l	KH_2PO_4
26,5 g/l	Na_2HPO_4
0,1 ml/l	Mineralsalzlösung ^{II}
	pH 6,8

11.8.8 Bouillon-Medium M7

1%	Hefeextrakt
1%	Peptone
0,5%	Fleischextrakt
0,25%	NaCl
	pH 7,3

11.8.9 Synthetisches Medium M8 zum Acylase-Screening

5 g/l	Glycerin
4,5 g/l	KH_2PO_4
5,3 g/l	Na_2HPO_4
2,0 g/l	Histidin
1,0 g/l	Phenyllessigsäure
0,009 g/l	Na_2SO_4
1,0 ml/l	Mineralsalzlösung ^{III}
	pH 6,8

^{III}Zusammensetzung

0,552 g/l	$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
0,028 g/l	$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
0,027 g/l	$\text{FeCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
0,069 g/l	ZnCl_2
0,017 g/l	$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
0,024 g/l	$\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
0,024 g/l	$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
0,099 g/l	$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$

12 Literatur

- [1] Transkript Nr. 1, 5. Jahrgang, Biocom AG (1999)
- [2] A. C. Heim, D. Steinmüller: On-Line-Analytik – Der Trend geht zum vollautomatischen System; GIT Fachz. Lab. (1990), 1328-1332
- [3] M. Höttecke: Regelung der Substratkonzentration in Bioreaktoren; Dissertation Universität-GH Paderborn (1996)
- [4] J. Möller: Flow Injection Analysis; Analytiker Taschenbuch, Springer Verlag Bd. 7 (1988) 199-275
- [5] J. Ruzicka: Flow Injection Analysis- A Survey of its Potential for Continuous Monitoring of Industrial Processes; Anal. Chim. Acta, **190** (1986) 155-163
- [6] J. Ruzicka, E. H. Jansen: Flow Injection Analysis 2“; Wiley, New York (1987)
- [7] A. J. Ritzka: Aufbau eines Fließinjektionsanalysensystems und Einsatz bei der Regelung Biotechnischer Prozesse; Diplomarbeit, Universität Hannover (1996)
- [8] G. Bastain, D. Dochain: Online Estimation and Adaptive Control of Bioreactors; Elsevier, Amsterdam (1990)
- [9] A. Johnson: Modelling and Control of Biotechnological Processes; Pergamon Press, New York (1985)
- [10] Y. C. Liu, W. -T. Wu, J. H. Tsao; Fed-Batch Culture for L-lysine Production Via Online State Estimation and Control; Bioprocess Engineering, **9** (1993) 135-139
- [11] G. Stephanopoulos, S. Park: Bioreactor State Estimation; In: H.-J. Rehm u. G. Reed (Ed.): Biotechnology- Vol. 4: Measuring, Modelling and Control, VCH, Weinheim (1991) 225-250
- [12] R. Unbehauen: Systemtheorie; 5. Auflage, Oldenbourg Verlag, München (1991)
- [13] H. C. Lim, K.-S. Lee: Control of Bioreactor Systems, In: H.-J. Rehm u. G. Reed (Ed.): Biotechnology- Vol. 4: Measuring, Modelling and Control, VCH, Weinheim (1991) 509-560
- [14] K. Schügerl et. al.: Engpässe auf dem Gebiet der Modellbildung und Regelung in der Biotechnologie; Unveröffentlichter Bericht des Ausschusses „Messen und Regeln in der Biotechnologie“ der DECHEMA, Frankfurt (1992)
- [15] C. G. Alfara, K. Miura, H. Shimizu, S. Shioya: Fuzzy Control of Ethanol Concentration and its Application to Maximum Glutathione Production in Yeast Fed-Batch Culture; Biotechnology and Bioengineering, **41** (1993) 493-501

-
- [16] M. Boll, M. Höttecke, F. Dörrscheidt, D. C. Hempel: Control of Bioreactors using Fuzzy Logic. In: H.-J. Zimmermann (Ed.): Second European Congree on Intelligent Techniques and Soft Computing; Proceedings Volume 2, Aachen (1994) 1039-1043
- [17] W. Brockmann: Wissensbasierte Echtzeitsysteme am Beispiel nicht-numerischer Regelungen; Dissertation, Universität-GH Paderborn (1992)
- [18] Q. Chen, S. Wang, J. Wang: Application of an Expert System to the Operation and Control of Industrial Antibiotic Fermentation Process. In: N. M. Fish, R. I. Fox u. N. F. Thornhill (Eds.): Computer Applications in Fermentation Technology: Modelling and Control of Biotechnical Processes. Elsevier, London (1988) 253-262
- [19] C. di Massimo-Peel, G. A. Montague, M. J. Willis, A. J. Morris, M. T. Tham: Enhanced Industrial Bioprocess Monitoring through Artificial Neural Networks. In: M. N. Karim u. G. Stephanopoulos (Eds.): Modeling and Control of Biotechnical Processes; Pergamon Press, Oxford (1992) 395-398
- [20] M. Farza, A. Cheruy: CAMBIO – A Knowledge based Software in Modelling and Estimation of Bioprocesses. In: M. N. Karim u. G. Stephanopoulos (Eds.): Modeling and Control of Biotechnical Processes; Pergamon Press, Oxford (1992) 399-402
- [21] A. Halme, N. Karim: Expert Systems for Biotechnology; In: H.-J. Rehm u. G. Reed (Ed.): Biotechnology- Vol. 4: Measuring, Modelling and Control, VCH, Weinheim (1991) 625-636
- [22] J.-I. Horiuchi, M. Kamasawa, H. Miyakawa, M. Kishimoto: Phase Control of Fed-Batch Culture for α -Amylase Production Based on Culture Phase Interference using Fuzzy Inference; Journal of Fermentation and Bioengineering, **76** (1993) 207-212
- [23] M. Hosobuchi, F. Fukui, T. Suzuki, H. Yoshikawa: Fuzzy Control in Microbial Production of ML-236B, a Precursor of Pravastatin Sodium; Journal of Fermentation and Bioengineering, **76** (1993) 482-486
- [24] A. Normandin, J. Thibault, B. P. A. Grandjean: Optimizing Control of a Continuous Stirred Tank Fermenter using a Neural Network; Bioprocess Engineering, **10** (1994) 109-113
- [25] V. G. Nyttle, M. Chidambaran: Fuzzy Logic Control of a Fed-Batch Fermenter; Bioprocess Engineering, **9** (1993) 115-118
- [26] J. Schubert, R. Simutis, M. Dors, I. Havlik, A. Lübbert: Bioprocess Optimization and Control: Application of Hybrid Modelling; Journal of Biotechnology, **35** (1994) 51-68
- [27] H. Shimizu, K. Miura, C. G. Alfara, S. Shioya, K. Suzuki: Fuzzy Control of Ethanol Concentration and ist Application to Maximum Glutathione Production in Yeast Fed-

- Batch Culture; In: M. N. Karim u. G. Stephanopoulos (Eds.): Modeling and Control of Biotechnical Processes; Pergamon Press, Oxford (1992) 433-436
- [28] J. Thibault, K. Najim: Optimization and Control of a Continuous Stirred Tank Fermenter using Learning System; Bioprocess Engineering **9** (1993) 107-113
- [29] W. Zhou, W.-S. Hu: On-Line Characterization of a Hybridoma Cell Culture Process; Biotechnology and Bioengineering, **44** (1994) 170-177
- [30] Pühler, P. Stadler eds.) Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo: VCH Verlagsgesellschaft mbh, (1991) 152-156
- [31] K. Schügerl: New Trends in Measurement and Control of Biotechnological Processes; Pure Appl. Chem., **64** (1992) 2, 205-212
- [32] T. Scheper, K. Reardon: In: Sensors-A Comprehensive Survey, vol. 3 (2). (W. Göpel, J. Hesse, J. N. Zemel, eds.) Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo: VCH Verlagsgesellschaft mbh, (1992) 1023-1046
- [33] T. Scheper: Sensoren zur Überwachung biotechnologischer Prozesse; Nachr. Chem. Tech. Lab, **43** (1995) 3, 328-329
- [34] K. Kroner, M. R. Kula: On-Line Measurement of Extracellular Enzymes during Fermentation by Using Membrane Techniques; Anal. Chim. Acta, **163** (1984) 3-15
- [35] K. Holzhauer-Rieger, W. Zhou, K. Schügerl: On-Line High-Performance Liquid Chromatography for the Determination of Cephalosporin C and By-Products in Complex Fermentation Broths; J. Chromatogr., **499** (1990) 609-615
- [36] C. F. Mandenius, B. Danielsson, B. Mattiasson: In situ Sampling Systems; Anal. Chim. Acta, **163** (1984) 135
- [37] G. Marko-Varga, T. Buttler, L. Gorton, C. Grönsterwall: Tangential flow filtration; Chromatographia, **35** (1993) 285
- [38] H. Hakanson, M. Nilsson, B. Mattiasson: In situ Sampling Systems for bioprocess monitoring; Anal. Chim. Acta, **249** (1991) 61
- [39] T. Buttler, L. Gorton, G. Marko-Varga: Characterization of a sampling unit based on tangential flow filtration for bioprocess monitoring; Anal. Chim. Acta **279** (1993) 27-37
- [40] L. H. Christensen, J. Nielsen, J. Villadsen: Membrane filtration; Anal. Chim. Acta **249** (1991) 123
- [41] Eppendorf ESIP-Lab 5442 Bedienungsanleitung, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH Hamburg (1996)
- [42] J.-M. Hilmer, T. Scheper: A New Version of an In situ Sampling System for Bioprocess Analysis; Acta Biotechnol., **16** (1996) 185-192

-
- [43] R. Freitag: Entwicklung und Automatisierung von immunchemischen Nachweisverfahren zur Online-Detektion hochmolekularer Medienkomponenten in Fermentationsprozessen; Dissertation, Universität Hannover (1990)
- [44] J. Niehoff: Online Analytik bei der Produktion von Penicillin V durch *Penicillium Chrysogenum*; Dissertation, Universität Hannover (1987)
- [45] K. Schöngarth, B. Hitzmann, K. Friehs: Ein FIA-System zur schnellen Glucosemessung bei Bioprozessen; *Chem. Ing. Tech.*, **70** (1998) 297-299
- [46] K. Schügerl: Which requirements do flow injection analyzer/ biosensor systems have to meet for controlling purposes? *J. Biotechnol.*, **31** (1993) 241-256
- [47] M. Busch, W. Höbel, J. Polster: Software FIACRE: Bioprocess monitoring on the basis of flow injection analysis using simultaneously a urea optode and a glucose luminescence sensor; *J. Biotechnol.*, **31** (1993) 327-343
- [48] U. Spohn, J. van der Pol, R. Eberhardt, B. Joks, Ch. Wandrey: An automated system for multichannel flow-injection analysis; *Anal. Chim. Acta*, **292** (1994) 281-295
- [49] B. Hitzmann, M. Reinecke, B. Schulze, T. Scheper: The automation of immun-FIA-systems; *Anal. Chim. Acta*, **313** (1995) 55-62
- [50] B. Hitzmann: Optimierung von FIA-Systemen für die Bioprozeßtechnik; Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft (1996)
- [51] B. Hitzmann, T. Kullick: The evaluation of pH-FET-measurement signals by neural network; *Anal. Chim. Acta*, **294** (1994) 243-249
- [52] Lee Reference Manual, 6. Auflage (1998); Lee Company USA
- [53] T. Dullau: Optimierung und Einsatz immobilisierter Enzymsysteme in der Flow-Injection-Analysis zur Online-Fermentationskontrolle; Dissertation, Universität Hannover (1990)
- [54] Ammonia electrode instruction manual; Model 95-12; Orion Research, Inc. (1997)
- [55] S. Alegret, J. Alonso, J. Bartroli, M. del Valle, N. Jaffrezic-Renault, Y. Duvault-Herrera; Flow-through pH-ISFET as detector in the determination of ammonia; *Anal. Chim. Acta.*, **23** (1990) 53-58
- [56] P. Bergveld; Development of an Ion-sensitive Solid State-device for Neurophysical Measurements; *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **17** (1970) 70
- [57] R. Ulber: Optimierung von Sensorsystemen für die Biotechnologie; Dissertation Universität Hannover; Cuvillier Verlag Göttingen (1996)
- [58] F. Irtel; Diplomarbeit Universität Hannover (1997)

-
- [59] P. Gemeiner: *Enzyme Engineering, Immobilized Systems*; Ellis Horwood New York (1992)
- [60] Produktinformationen Firma Ingold, Anleitung zur Sauerstoffelektrode
- [61] C. G. MacArthur; Solubility of oxygen in salt solutions; in IUPAC Solubility Data Series Vol. 7; Pergamon Press New York (1980)
- [62] A. A. Shul'ga: Glucose-sensitive enzyme field-effect transistor using potassium ferricyanide as an oxidizing substrate; *Anal. Chem.*, **66** (1994) 205-210
- [63] A. A. Shul'ga, T. D. Gibson; An alternative microbiosensor for hydrogen peroxide based on an enzyme field effect transistor with a fast response; *Anal. Chim. Acta*, **296** (1994) 163-170
- [64] P. Berveld, A. Sibbald: *Analytical and Biomedical Applications of Ion-Sensitive Field-Effect Transistors*; Vol. 23, Elsevier Amsterdam (1988)
- [65] T. Kullick; R. Ulber: Enzyme Modified Field-Effect-Transistors (EnFET) for Bioprocess Monitoring; in R. Freitag: *Biosensors in Analytical Biotechnology*; R. G. Landes, Austin Texas (1996)
- [66] T. Kullick, R. Ulber, H. H. Meyer, T. Scheper, K. Schügerl: Biosensors for enantioselective analysis; *Anal. Chim. Acta*, **293** (1994) 271-276
- [67] K. Schügerl, R. Ulber, T. Scheper: Development of biosensors for enantiomeric analysis; trends in analytical chemistry, **15** (1996) 56-62
- [68] A. Vakalopoulos; Entwicklung eines substratspezifischen Biosensors auf der Grundlage von pH-sensitiven Feldeffekttransistoren am Beispiel von Glycerin-Dehydrogenase; Protokoll zum Schwerpunktpraktikum, Universität Hannover (1995)
- [69] B. Reinhardt: Einsatz von Biosensoren auf der Basis von pH-sensitiven Feldeffekttransistoren zur Glucosebestimmung in biotechnologischen Prozessen; Dissertation, Universität Hannover (1991)
- [70] M. Reichlin: Use of Glutarialdehyd as a Coupling Agent for Proteins and Peptides; *Methodes Enzymol.*, **52** (1980) 159-165
- [71] E. H. Hansen, H. S. Mikkelsen: Enzyme-Immobilization by Glutaraldehyd Procedure; *Analytical Letters*, **24** (1991) 1419-1430
- [72] E. J. Vandamme, in M. Moo-Young (Ed.), *Bioreactor Immobilized Enzymes and Cells: Fundamental and Applications*, Elsevier Applied Science, **261** (1988) 523-530
- [73] Sigma Chemicals, Deisenhofen (1997)
- [74] SCRIP 1987, No. 1171, 28 (1987)

-
- [75] T.A. Savidge, in E.J. Vandamme (Ed.), *Biotechnology of Industrial Antibiotics* 1984, 171, Marcel Dekker Co, New York
- [76] V.K.Sudhakaran, P.S. Borkar: Resistance of *Escherichia coli* to Penicillins I; *Hind. Antibiot. Bull.*, **27** (1985) 44
- [77] V.K.Sudhakaran, P.S Borkar: Resistance of *Escherichia coli* to Penicillins II; *Hind. Antibiot. Bull.*, **27** (1985) 63
- [78] E.J. Vandamme: Penicillinase-negative Bacteria; *Adv. Appl. Microbiol.*, **21** (1977) 89
- [79] E.J. Vandamme, J.P. Vöts: Penicillinase activity of wild-type bacteria; *Adv. Appl. Microbiol.*, **17** (1974) 311
- [80] C. Chiang, R. Bennett: Purification and Properties of penicillin amidase from *Bacillus megaterium*, *J. Bacteriol.*, **93** (1988) 302-308
- [81] S. Murao, K. Sakaguchi, K. Kono: Process for preparing 6-APA by *Bacillus megaterium*, U.S. Patent 3.145.395
- [82] A. Illanes, R. Torres, O. Cartagena, A. Ruiz: Evaluation of penicillin acylase production by two strains of *Bacillus megaterium*, *Biol. Res.*, **26** (1993) 357-364
- [83] J.G. Shewale, H. Sivaraman: Penicillin Acylase: Enzyme Production and its Application in the Manufacture of 6-APA; *Proc. Biochem.* (1989) 146-154,
- [84] N. Maco, persönliche Mitteilung
- [85] J.J. van der Pol, B. Joksch, J. Gätgens, M. Biselli, C. D. Gooijer, J. Tramper, Ch. Wandrey: Online control of an immobilized hybridoma culture with multi-channel flow injection analysis; *J. Biotechnol.*, **43** (1995) 229-242
- [86] E. Balasingham: 6-APA Determination; *BBA*, **276** (1972) 250-256
- [87] J. Shewale, K. Kumar, G. Ambedkar: Evaluation of determination of 6-amino penicillanic acid by p-dimethylamino benzaldehyd; *Biotechnol Tech*, **1** (1987) 69-72
- [88] E.B. Lindström, K. Nordström: Automated Method for Determination of Penicillins, Cephalosporins, and Penicillinases; *Antimicrob. Ag. Chemother.*, **1** (1971) 100-106
- [89] F. Acevedo, C. L. Cooney: Penicillin Amidase by *Bacillus megaterium*; *Biotech. Bioeng.*; Vol. 15 (1973) 493-503
- [90] R. del Valle, persönliche Mitteilung
- [91] Z. E. Rassi, Y. Truei, Y.-F. Maa, C. Horvath: High-Performance Liquid Chromatography with Concanavalin A Immobilized by Metal Interactions on the Stationary Phase; *Anal Biochem.*, **169** (1988) 172-180
- [92] D. Mislovicova, M. Chudinova, P. Gemeiner, P. Docolomansky: Affinity chromatography of invertase on Concanavalin A-bead cellulose matrix: the case of an

- extraordinary strong binding glycoenzyme; *J. of Chromatography A*, **772** (1996) 143-149
- [93] D. Mislovicova, M. Chudinova, A. Vikartovska, P. Gemeiner: Lectin-glycoenzyme column chromatography monitored by enzyme flow microcalorimetry; *J. of Chromatography B*, **772** (1995) 145-153
- [94] J. Porath, B. Olin: Immobilized Metal Ion Affinity Adsorption and Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography of Biomaterials. Serum Protein Affinities for Gel-Immobilized Iron and Nickel Ions; *Biochemistry*, **22** (1983) 1621-1630
- [95] J. Montreuil, J. F. G. Vliegthart, H. Schachter (Editors): *Glycoproteins*; Elsevier Amsterdam (1995)
- [96] A. Surolia: Studies on the interaction of Concanavalin A with glycoproteins; *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol. 55, Concanavalin A, Plenum Press New York (1975)
- [97] I. J. Goldstein; Studies on the combining sites of Concanavalin A; *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol. 55, Concanavalin A, Plenum Press New York (1975)
- [98] H. Bittiger, H. P. Schnebli: *Concanavalin A as a Tool*, Wiley London New York (1976)
- [99] P. Sosnitza: *Amperometrische und potentiometrische Biosensoren*; Diplomarbeit Universität Hannover (1996)
- [100] M. Saleemuddin; Q. Husain: Concanavalin A: A useful ligand for glycoenzymes immobilization- a review; *Enzyme Micro. Technol.*, **13** (1991) 290-295
- [101] M. Farooqui, M. Saleemuddin, R. Ulber, P. Sosnitza, T. Scheper: Bioaffinity layering: A novel Strategy for the Immobilization of Large Quantities of Glycoenzymes; *J. Biotechnol.* (1998) 234-239
- [102] R. Köneke: *Biosensoren mit reversibel koppelbaren Enzymen*; Diplomarbeit Universität Hannover (1995)
- [103] R. Köneke, C. Menzel, R. Ulber, K. Schügerl, M. Saleemuddin, T. Scheper: Reversible coupling of glycoenzymes on fluorid-sensitive FET-biosensors based on lectin-glycoprotein binding; *Biosensors & Bioelectronics*; im Druck
- [104] S. Yamamoto, I. Hashimoto: Present Status and Future Needs: The View from Japanese Industry; *Fourth International Conference on Chemical Process Control*; South Padre Island (1991)
- [105] H. Schuler: Was behindert den praktischen Einsatz moderner regelungstechnischer Methoden in der chemischen Prozeßindustrie?; *atp*, 32 (3), (1992) 116-123

-
- [106] H. Schuler: Prozeßsimulation; VCH Weinheim (1995) 336-338
- [107] R. Isermann: Digitale Regelsysteme; 2. Aufl., Springer Verlag (1987)
- [108] J. Gißler, M. Schmid: Vom Prozeß zur Regelung, Siemens AG, Berlin, München (1990)
- [109] Handbuch Borland Pascal 7.0, Borland (1995)
- [110] J. Stoer: Einführung in die Numerische Mathematik I, 4. Aufl., Springer Verlag, Berlin (1983) 203-217
- [111] G. B. Dantzig: Linear programming and extensions, Princeton University Press (1963)
- [112] E. Blum, W. Oettli: Mathematische Optimierung, Springer Verlag, Berlin (1975)
- [113] J. G. Ziegler, N. B. Nichols: Optimum settings for automatic controller; Transactions ASME, **64** (1942) 759
- [114] I. J. Dunn, E. Heinzle, J. Ingham, J. E. Prenosil: Biological Reaction Engineering, VCH Weinheim (1992)
- [115] G. C. Newton, L. A. Gould, J. F. Kaiser: Analytical design of linear feedback controls; J. Wiley (1957)
- [116] R. F. Drenick: Die Optimierung linearer Regelsysteme; R. Oldenbourg Verlag, München (1967)
- [117] C. Keßler: Über die Vorausberechnung optimal abgestimmter Regelkreise, Teil III; Regelungstechnik 3 (1955) 40-49
- [118] E. Grünwald: Entwurf von Reglern und Rückführungen; Regelungstechnik 3 (1955) 147-152/ 172-180
- [119] C. Keßler: Das Symmetrische Optimum; Regelungstechnik 6 (1958) 395-400/ 432-436
- [120] W. Leonhard: Regelkreise mit symmetrischer Übertragungsfunktion; Regelungstechnik 13 (1965) 4-12
- [121] D. R. Baughman, Y. A. Liu: Neural Networks in Bioprocessing and Chemical Engineering, San Diego: Academic Press (1995) 5
- [122] K. J. Astrom: Adaptive Feedback Control; Proc. of the IEEE **122** (1975) 929
- [123] P. C. Parks: Stability and convergence of adaptive controllers - continuous systems; In: C. J. Harris, S. A. Billings (Eds): Self-tuning and adaptive control - theory and applications; London, P. Peregrinus (1981)
- [124] D. W. Clarke, P. J. Gwthrop: Self-tuning controller; Proc. of the IEEE **122** (1975) 929
- [125] K. J. Astrom, B. Wittenmark: On Self-tuning Regulators, Automatica **9** (1973) 185
- [126] V. Niswathan: Neural Network Modelling; Dissertation Universität Kalkutta (1997)

-
- [127] J. J. van der Pol, B. Joks, J. Gätgens, M. Biselli, C. D. de Gooijer, J. Tramper, C. Wandrey: On-line control of an immobilized hybridoma culture with multi-channel flow injection analysis; *J. Biotechnol.*, **43** (1995) 229-242
- [128] G. Conte, M. Bonfazi, L. Silvestri: Fuzzy Supervised PID Controllers; Proc. EUFIT 1994, Aachen (1994) 736-740
- [129] T. Kuhn, J. Wernstedt: SOFCO – Eine Strategie zum optimalen Entwurf von Fuzzy Regelungen; *at* **42** **3** (1994) 91-99
- [130] T. Kuhn, J. Wernstedt: Ein Beitrag zur Lösung von Adaptionsproblemen klassischer Regler mittels optimaler Fuzzy-Logik; *at* **44** **4** (1996) 160-170
- [131] M. Boll, M. Höttecke, F. Dörrscheidt: Kombination von konventionellen Reglern und Fuzzy-Komponenten; GMA-Aussprachetag Fuzzy Control, Langen (1994) VDI Bericht 113, 409-417
- [132] K. Dairaku, Y. Yamasaki, K. Kuki, S. Shioya, T. Takamatsu; *Biotechnol. Bioeng.* **23** (1981) 2069
- [133] C. Wittmann, A.-P. Zeng, W.-D. Deckwer: Growth inhibition by ammonia and use of a pH-controlled feeding strategy for the effective cultivation of *Mycobacterium chlorophenolicum*; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **44** (1995) 519-525
- [134] K. Shimizu, M. Morikawa, S. Mizutani, S. Iijima, M. Matsubara, T. Kobayashi: Comparison of control techniques for baker's yeast culture using an automatic glucose analyzer; *J. Chem. Eng. Jap.*, Vol. 21 (1988) 113-117
- [135] K. Toda, I. Yabe; *Biotechnol. Bioeng.*, **21** (1979) 487
- [136] W. Okada, H. Fukuda, H. Morikawa; *J. Ferment. Technol.*, **59** (1981) 103
- [137] H. Fukuda, T. Shiotani, W. Okada, H. Morikawa; *J. Ferment. Technol.*, **56** (1978) 361
- [138] M. N. Karim, S. L. Rivera: Artificial neural networks in bioprocess state estimation; *Advances in Biochemical Engineering*, **46** (1992) 1-33
- [139] B. Chaudhuri, J. M. Modak: Optimization of fed-batch bioreactor using neural network model; *Bioprocess Eng.*, **19** (1998) 71-79
- [140] J. Thibault, V. van Breusegem, A. Cheruy: On-line prediction of fermentation variables using neural networks; *Biotechnol. Bioeng.*, **36** (1990) 1041-1048
- [141] C. di Massimo, G. A. Montague, M. J. Willis, M. T. Tham, A. J. Morris: Towards improved penicillin fermentation via artificial neural networks; *Computers Chem. Engng.*, **16** (1992) 283-291
- [142] D. C. Psicos, L. H. Ungar: A hybrid neural network – First principles approach to process modelling, *AIChE J.*, **38** (1992) 1499-1511

-
- [143] M. J. Syu, G. T. Tsao: Neural network modeling of batch cell growth pattern; *Biotechnol. Bioeng.*, **42** (1993) 376-380
- [144] J. Glassey, G. A. Montague, A. C. Ward, B. V. Kara: Artificial neural network based experimental design procedures for enhancing fermentation development; *Biotechnol. Bioeng.*, **44** (1994) 397-405
- [145] E. Latrille, G. Corrieu, J. Thibault: Neural network models for final process time determination in fermented milk production; *Computers Chem. Engng.*, **18** (1994) 1171-1181
- [146] P. Lednicky, A. Meszaros: Neural network modeling in optimisation of continuous fermentation processes; *Bioprocess Eng.*, **18** (1998) 427-432
- [147] N. Bhat, T. McAvoy: Use of neural nets for dynamic modeling and control of chemical process systems; *Computers Chem. Engng.*, **14** (1990) 573-583
- [148] K. S. Narendra, K. Parthasarathy: Identification and control of dynamical systems using neural networks; *IEEE Trans. Neural Networks*, **1** (1990) 4-27
- [149] J. C. Hoskins, D. M. Himmelblau: Process control via artificial neural networks and reinforcement learning; *Computers Chem. Engng.*, **16** (1992) 241
- [150] M. Lee, S. Parks: A new scheme combining neural feedforward control with model-predictive control; *AIChE J.*, **38** (1992) 193-200
- [151] Z. Shi, K. Shimizu: Neuro-fuzzy control of bioreactor systems with pattern recognition; *J. Ferment. Bioeng.*, **74** (1992) 39-51
- [152] K. S. Yi, S. Yin, K. Shimizu: Fuzzy neural networks for the control of high density cell cultivation of recombinant *Escherichia coli*; *J. Ferment. Bioeng.*, **77** (1994) 663-669
- [153] S. Jin, K. Ye, K. Shimizu, J. Nikawa: Application of Artificial Neural Network and Fuzzy Control for Fed-Batch Cultivation of Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*; *J. Ferment. Bioeng.*, **81** (1996) 5, 412-421
- [154] S. S. Ozturk, J. C. Thrift, J. D. Blackie, D. Naveh: Real-Time Monitoring and Control of Glucose and Lactate Concentrations in a Mammalian Cell Perfusion Reactor; *Biotechnol. Bioeng.*, **53** (1997) 4, 372-378
- [155] G. Montague, J. Morris: Neural-network contributions in biotechnology; *Tibtech Vol. 12*, Elsevier (1994) 312-324
- [156] D. E. Rumelhart, G. E. Hinton, R. J. Williams: Learning internal representations by error propagation; *Foundations*, Vol. 1, The MIT Press Cambridge (1986)

Tabellarischer Lebenslauf

Name: Adnan Jens Ritzka

Geburtstag: 01.12.1970

Geburtsort: Lehrte

Familienstand: verheiratet

Schulbesuch: 1977-1979 Egestorff-Grundschule Hannover
1979-1981 Grundschule III Lehrte
1981-1983 Orientierungsstufe Lehrte-Mitte
1983-1990 Kurt-Hirschfeld-Gymnasium, Lehrte
05/90 Abitur

Wehrdienst: 07/90-06/91 Grundwehrdienst in Wesendorf

Studium: 10/91-06/96 Chemiestudium an der Universität Hannover
09/93 Diplom-Vorprüfung
12/95 Diplom-Hauptprüfung
12/95-06/96 Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie der
Universität Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. T.
Scheper mit dem Thema: *Aufbau eines Fließinjektions-*
analysensystems und Einsatz bei der Regelung
biotechnischer Prozesse
seit 07/96 Promotionsstudiengang Chemie an der Universität
Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. T. Scheper

Beruflicher

Werdegang: 07/96-12/96 Stipendiat der Max-Buchner-Forschungstiftung
seit 01/97 Koordinator des Graduiertenkollegs „*Chemische und*
technische Grundlagen der Naturstofftransformation“ an
der Universität Hannover