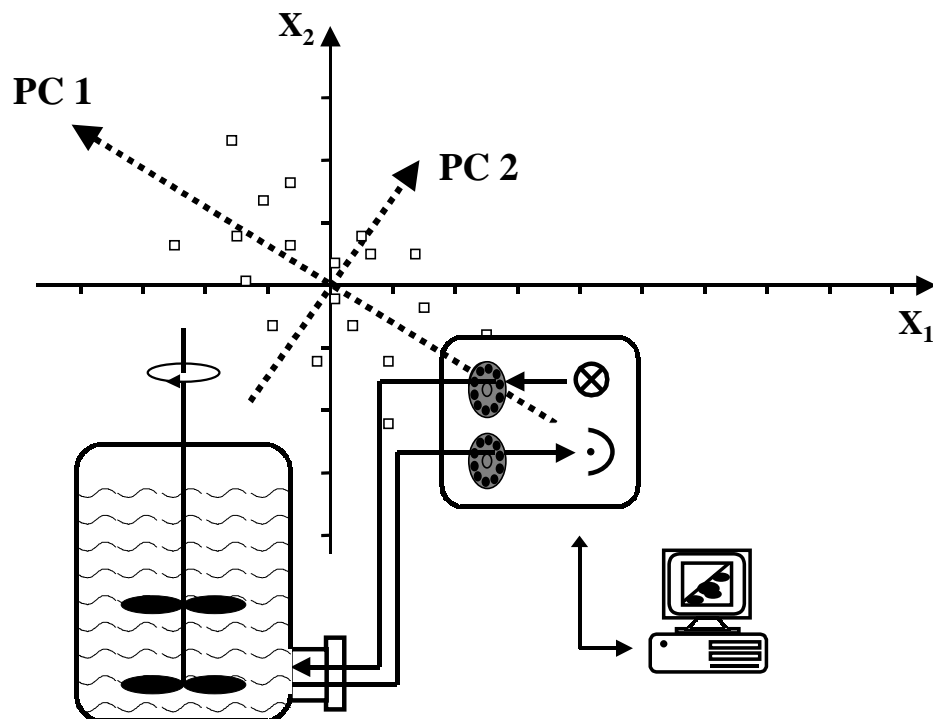


Bioprozessanalytik durch Online-Vorhersage von Bioprozessgrößen mittels 2D-Fluoreszenzspektroskopie und multivariater Auswerteverfahren



**Bioprozessanalytik durch
Online-Vorhersage von Bioprozessgrößen
mittels 2D-Fluoreszenzspektroskopie und
multivariater Auswerteverfahren**

**Vom Fachbereich Chemie
der Universität Hannover**

**zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -**

genehmigte Dissertation

von

**Dipl.-Chem. Egbert Stärk
geboren am 12. August 1970 in Friesoythe**

Hannover, 2002

Referent:

Prof. Dr. T. Scheper

Korreferent:

Prof. Dr. H. Märkl

Tag der Promotion:

13.05.2002

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Januar 1998 bis März 2002 im Institut für Technische Chemie der Universität Hannover unter der Leitung von Professor Dr. Thomas Scheper angefertigt. Ihm danke ich besonders für die Möglichkeiten, die er mir im Verlauf meiner Promotion eröffnet hat. Für die Betreuung und seine Unterstützung möchte ich mich herzlich bedanken.

Professor H. Märkl danke ich für die Übernahme des Korreferats.

PD Dr. Bernd Hitzmann danke ich für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung sowie für die vielen Ideen und interessanten Diskussionen.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Technische Chemie danke ich für die lockere Atmosphäre und stetige Hilfsbereitschaft. Besonders den Mitarbeitern im Neubau möchte ich für das angenehme Arbeitsklima danken.

Für die gute Zusammenarbeit danke ich allen Mitarbeitern und Partnern im „Opus-Projekt“. Diese Arbeit wurde im Rahmen eines europäischen Projektes unterstützt.

Speziell bedanke ich mich bei:

Christian Harbeck und Karl Kreij für die Zusammenarbeit im Rahmen ihrer Diplomarbeiten und darüber hinaus,

Carola Fuchs und Dirk Köster für die Durchführungen der Hochzelldichte-Kultivierungen von *E. coli*,

Marco Rieseberg für die Durchführung der Durchflusscytometrie zur Klärung des Zellzyklus von *Saccharomyces cerevisiae*,

Dr. Osama Sobieh und Prof. Ashok für die Zusammenarbeit bei verschiedenen Kultivierungen von *S. cerevisiae* und den interessanten Austausch,

Marco Kolleyer und Olaf Broxtermann für die Zusammenarbeit bei den Kultivierungsexperimenten zur Glucoseregulation bei den Fed-Batch-Kultivierungen von *S. cerevisiae*,

meinem Freund Stefan Marose für die gute Unterstützung zu Beginn meiner Promotion und weit darüber hinaus.

Meinen Eltern danke ich besonders für ihre Geduld und Unterstützung in vielfältiger Weise.

Katrin Tomsche danke ich für ihre liebenswerte Art und Zuneigung.

Abstract

Egbert Stärk

Bioprozessanalytik durch Online-Vorhersage von Bioprozessgrößen mittels 2D-Fluoreszenzspektroskopie und multivariater Auswerteverfahren

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur multivariaten In-situ-Fluoreszenzmessung ein leistungsfähiges Fluoreszenzspektrophotometer (BioView, Delta Light & Optics, Dänemark) an verschiedenen biologischen Systemen eingesetzt, um zusätzliche Informationen über relevante Bioprozessgrößen sowie den aktuellen biologischen Kulturzustand zu gewinnen. Die Auswertung der Fluoreszenzdaten erfolgte mit Hilfe sogenannter Softwaresensoren (Hauptkomponentenanalyse, PLS-Regression (Partial Least Squares)), um die Informationen in den multivariaten Fluoreszenzdaten zur Online-Vorhersage von verschiedenen Bioprozessgrößen nutzen zu können. Dazu wurde die Auswertesoftware Unscrambler 7.5 der Firma CAMO ASA (Norwegen) eingesetzt.

Die multivariate Auswertung der Fluoreszenzdaten von *Saccharomyces cerevisiae*-Batch-Kultivierungen erlaubte eine Einteilung in sieben Prozessphasen und führte so zu einem verbesserten Einblick in den Prozessverlauf. Darüber hinaus konnten Prozessgrößen direkt aus den Fluoreszenzdaten mit Hilfe von PLS-Modellen berechnet werden. Die Übertragung der PLS-Modelle auf weitere Batch-Kultivierungen zur Vorhersage dieser Größen wurde genauer untersucht.

An synchron wachsenden *S. cerevisiae*-Kulturen im Chemostat wurde der Einsatz der In-situ-Fluoreszenzmessung und die Leistungsfähigkeit der PLS-Modellvorhersagen getestet. Der Verlauf der Biotrockenmasse- und Ethanolkonzentration sowie durchflusscytometrischer Daten während des synchronen Wachstums wurde durch Vorhersage mit Hilfe von PLS-Modellen bei unterschiedlichen Verdünnungsraten verfolgt.

Bei Fed-Batch-Kultivierungen von *S. cerevisiae* wurde eine Überwachung des oxidativen Hefewachstums mit Hilfe der In-situ-Fluoreszenzmessung und durch Vorhersage eines metabolischen Faktors, der den aktuellen biologischen Kulturzustand beschreibt, erreicht. Eine Glucoseregelung, die weitgehend zu einer optimalen Ausbeute der Biotrockenmasse geführt hat, konnte so bei einer weiteren Fed-Batch-Kultivierung durchgeführt werden.

Bei Hochzelldichte-Kultivierungen mit *Escherichia coli* wurden mittels In-situ-Fluoreszenzmessungen zusätzliche Informationen über den Prozessverlauf und den aktuellen Zellstoffwechsel gewonnen. Durch die Vorhersage der Biotrockenmassekonzentration konnte darüber hinaus der Zeitpunkt für den Dialysestart und die Induktion genauer festgelegt werden.

Stichworte: 2D-Fluoreszenzspektroskopie, Online-Bioprozessanalytik, Hauptkomponentenanalyse, PLS-Modellvorhersage, Optischer Sensor

Abstract

Egbert Stärk

Bioprocess monitoring through online prediction of bioprocess variables by two-dimensional fluorescence spectroscopy and multivariate evaluation methods

In this thesis, an efficient fluorescence spectrophotometer (BioView, Delta Light & Optics, Denmark) was used for multivariate in-situ fluorescence measurements on different biological systems to get additional information about relevant bioprocess variables and the topical biological state of the cultures. The evaluation of the fluorescence data was performed by so-called software sensors (principal component analysis, partial least squares regression (PLS)) to use the information from the multivariate fluorescence data for online prediction of different bioprocess variables. For this purpose the evaluation software Unscrambler 7.5 of the company CAMO ASA (Norway) was used.

The multivariate evaluation of the fluorescence data, detected during *Saccharomyces cerevisiae* batch cultures, permitted a division into seven process phases and led to a detailed insight into the process run. With the help of PLS models different bioprocess variables could be estimated directly from fluorescence data. The transfer of the PLS models to further batch cultures to predict bioprocess variables was investigated.

The employment of the in-situ fluorescence measurements and the efficiency of PLS models were tested on synchronous growth of *S. cerevisiae* in chemostat. PLS models allow the prediction of biomass and ethanol concentration as well as flux cytometric data in a good correlation during synchronous growth in different dilution rates.

A control of the oxidative growth of *S. cerevisiae* during fed-batch cultivation was reached using in-situ fluorescence measurements and the prediction of a metabolic factor, who described the actual biological state of the culture. A control of the glucose feeding was performed by a further fed-batch culture resulting in an optimal yield of biomass.

During high-cell-density culture of *Escherichia coli* the in-situ fluorescence technique improved information about the process run and the cell metabolic. More over the prediction of the biomass concentration was permitted, to decide the exact moment for dialysis start and induction.

Key words: two-dimensional fluorescence spectroscopy, online bioprocess monitoring, principal component analysis, partial least squares regression models, optical sensor

1	Einleitung und Zielsetzung.....	1
2	Grundlagen.....	2
2.1	Optische Sensoren in der Biotechnologie.....	2
2.2	Einflüsse auf die Fluoreszenz.....	4
2.3	Modellrechnungen in der Biotechnologie - Softwaresensoren.....	5
2.3.1	Hauptkomponentenanalyse.....	6
2.3.2	PLS-Regression.....	10
2.4	Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
2.5	Hochzelldichte-Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	14
3	Material und Methode.....	18
3.1	BioView Sensor.....	18
3.2	Fluorosensor.....	19
3.3	Multivariate Datenauswertung.....	20
3.4	Berechnung von Größen zur Beurteilung der Regression.....	20
3.5	Induktion von synchronem Hefewachstum.....	22
3.6	Durchflusscytometrie.....	23
3.7	FIA-System zur Online-Glucosemessung.....	23
3.8	Glucose-Regelungssysteme.....	24
3.8.1	FIA-System.....	24
3.8.2	Glucoseregulation basierend auf der 2D-Fluoreszenzspektroskopie.....	24
3.9	Respiatorischer Quotient (RQ).....	25
4	Überblick über die Experimente.....	26
5	Batch-Kultivierungen von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	27
5.1	Ziele der Batch-Kultivierungsexperimente.....	27
5.2	Kultivierungsbedingungen der Batch-Kultivierungen.....	27
5.3	Grundlegende Einteilung des Batch-Kultivierungsverlaufes in Prozessphasen.....	28
5.4	Beschreibung der <i>S. cerevisiae</i> -Batch-Kultivierung K-1.....	30
5.5	Bioprozessbeobachtung mittels 2D-Fluoreszenzspektroskopie.....	33
5.5.1	2D-Fluoreszenzdifferenzspektren.....	33
5.5.2	Korrelation verschiedener Fluoreszenzintensitäten mit der BTM-Konzentration und der OUR von Batch-Kultivierung K-1.....	37
5.6	Online-Vorhersage am Beispiel der Biotrockenmasse.....	38
5.7	Chemometrische Datenauswertung mittels Hauptkomponentenanalyse.....	42

5.7.1	Score-Darstellung von Batch-Kultivierung K-1	42
5.7.2	Score-Darstellung von Batch-Kultivierung K-3	45
5.7.3	Darstellung der Loadings von Batch-Kultivierung K-1	46
5.8	Multilineare Regression zur Vorhersage von Prozessgrößen	48
5.8.1	Entwicklung eines PLS-Modells	48
5.8.2	Modellanwendungen zur Schätzung von Bioprozessgrößen bei Batch-Kultivierung K-1	51
5.8.3	Validierung der PLS-Modelle an weiteren Batch-Kultivierungen	53
5.9	Datenauswertung mehrerer Hefe-Batch-Kultivierungen und Verbesserung der PLS-Modellvorhersagen	54
5.10	Zusammenfassung	57
6	Chemostat-Kultivierungen von <i>Saccharomyces</i>	59
6.1	Ziele der Chemostat-Kultivierungsexperimente	59
6.2	Kultivierungsbedingungen	59
6.3	Beschreibung einzelner Zellzyklusphasen	60
6.4	Chemometrische Datenauswertung mittels Hauptkomponentenanalyse	64
6.5	Entwicklung von PLS-Modellen zur Vorhersage der BTM- und Ethanolkonzentration	67
6.6	Modellanwendung bei unterschiedlichen Verdünnungsraten	68
6.6.1	Einfluss der Verdünnungsrate auf die RFI	68
6.6.2	Validierung der PLS-Modelle	71
6.7	Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie	72
6.7.1	Berechnung der Zellzyklusphasen mittels PLS-Modelle	72
6.7.2	Vorhersage der Zellzyklusphasen mittels PLS-Modelle	74
6.8	Zusammenfassung	75
7	Fed-Batch-Kultivierungen von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	77
7.1	Ziele der Fed-Batch-Kultivierungsexperimente	77
7.2	Kultivierungsbedingungen	77
7.3	Regelungsansatz	78
7.4	Fed-Batch-Kultivierung F-1	79
7.5	Berechnung eines metabolischen Faktors	82
7.6	Modellgeführte Glucoseregulation mittels 2D-Fluoreszenzspektroskopie bei der Fed-Batch-Kultivierung F-2	85
7.7	Zusammenfassung	88
8	Hochzelldichte-Kultivierungen von <i>Escherichia coli</i> im Dialyseverfahren	90
8.1	Ziele der Hochzelldichte-Kultivierungen	90
8.2	Kultivierungsbedingungen	90

8.3	Hochzelldichte-Kultivierung im 300 L Fermenter.....	91
8.3.1	Beschreibung der Hochzelldichte-Kultivierung E-1.....	91
8.3.2	Fluoreszenzspektroskopische Beschreibung der Hochzelldichte-Kultivierung E-1.....	94
8.3.3	Beschreibung der Hochzelldichte-Kultivierung E-1 mittels 2D-Fluoreszenz- differenzspektren	95
8.4	Berechnung der BTM-Konzentration mittels linearer Regression.....	97
8.5	Datenauswertung und Modellkalibration.....	98
8.5.1	Darstellung der Score- und Leverage-Werte.....	98
8.5.2	PLS-Modelle zur Schätzung von Bioprozessgrößen	101
8.6	Vorhersage von Bioprozessgrößen bei Hochzelldichte-Kultivierung E-2	103
8.6.1	Anwendung des PLS-Modells zur Berechnung der BTM-Konzentration	103
8.6.2	Überprüfung der linearen Regression	105
8.7	Vergleich der Hochzelldichte-Kultivierung E-1 und E-2 im 300 L Fermenter	106
8.7.1	Vergleich der SFI-Verläufe	106
8.7.2	Online-Prozesskontrolle mittels Fluoreszenzmessungen.....	108
8.8	Induktionsexperimente im 30 L Fermenter.....	109
8.8.1	2D-Fluoreszenzdifferenzspektren.....	109
8.8.2	Vergleich von Hochzelldichte-Kultivierung E-3 und E-4 im 30 L Fermenter.....	110
8.9	Zusammenfassung	112
9	Zusammenfassung und Ausblick	114
10	Literatur.....	120
11	Anhang.....	126
11.1	Abkürzung und Symbolverzeichnis.....	126
11.2	Analytik.....	127
11.2.1	Abgasanalytik (Abgassauerstoff und -kohlendioxid)	127
11.2.2	Biotrockenmasse (BTM)	128
11.2.3	Ethanolbestimmung	128
11.2.4	Optische Dichte (OD)	128
11.2.5	pH-Wert.....	129
11.2.6	pO ₂ -Wert (Gelöstsauerstoff).....	129
11.2.7	Glucoseanalytik mit dem Glucoseanalysator	129
11.3	Medium (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	130

1 Einleitung und Zielsetzung

In der Bioprozessanalytik werden zunehmend multivariate Messsysteme, wie z.B. Spektrophotometer, eingesetzt. Das Potential dieser Messtechniken wird jedoch ohne geeignete und leistungsstarke Auswerteverfahren (z.B. Hauptkomponentenanalyse, multilineare Regression, Neuronale Netze) nicht effizient ausgenutzt.

Biotechnologische Prozesse sind in der Regel hoch komplexe Systeme. Der Einsatz von multivariaten Messsystemen ist daher sinnvoll, weil sie Informationen simultan von einer Vielzahl von biologischen, chemischen und physikalischen Prozessgrößen liefern. Durch kontinuierliche Messungen während der Online-Bioprozessbeobachtung und -kontrolle fallen fortdauernd große Mengen komplexer Daten an. Die Auswertung dieser Datenmengen erfordert den Einsatz von chemometrischen Auswerteverfahren, um die vielschichtigen Wechselwirkungen erkennen und zur Online-Vorhersage von relevanten Prozessdaten ausnutzen zu können. Die Akzeptanz ist sowohl für multivariate Messsysteme als auch für chemometrische Auswerteverfahren zur Online-Routineanalytik industrieller Bioprozesse gering und maßgeblich davon abhängig, in wieweit anwenderfreundliche Auswertesoftware zur Verfügung steht.

Zur optimalen Bioprozessführung ist eine genaue Kenntnis des aktuellen biologischen Zellzustands (z.B. Metabolismus, Vitalität und Wachstum der Zellen) notwendig, um reproduzierbar Produkte in hoher Konzentration und Qualität erzeugen zu können. Optische Sensoren, wie z.B. die auf der 2D-Fluoreszenzspektroskopie basierenden Sensoren, erlauben zeitnahe nicht-invasive und spezifische In-vivo-Messungen. Für eine effektive Bioprozessregelung ist dies eine grundlegende Voraussetzung. Mit Hilfe sogenannter Softwaresensoren (Kalman-Filter, neuronale Netze, Hauptkomponentenanalyse) werden indirekt auch Prozessgrößen (z.B. DNA-Gehalt, Produktkonzentration) online zugänglich, deren Analyseaufwand ansonsten personell und zeitlich erheblich ist.

In dieser Arbeit soll ein leistungsfähiges 2D-Fluoreszenzspektrometer an verschiedenen biologischen Systemen eingesetzt werden. Die Fluoreszenzdaten sollen zunächst mit herkömmlichen Ansätzen (einfache Korrelationen) ausgewertet werden. Mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse soll eine genauere Interpretation der Fluoreszenzdaten erfolgen. Zum Einsatz kommt dabei die Auswertesoftware Unscrambler 7.5 von der Firma CAMO ASA (Norwegen), die speziell für die chemometrische Routineinterpretation komplexer multivariater Daten entwickelt wurde. Ein Schwerpunkt ist die Online-Vorhersage von verschiedenen Prozessgrößen, wie z.B. Biomasse-, Edukt- und Produktkonzentrationen sowie Zellzyklusphasen, direkt aus den 2D-Fluoreszenzspektren mit Hilfe von PLS-Regressionsmodellen (Partial Least Squares). Der Einsatz der Online-Analytik und die Leistungsfähigkeit der PLS-Modellvorhersagen sollen an synchron wachsenden Hefe-Kulturen getestet werden. Die Erkenntnisse sollen für die Entwicklung einer Online-Glucoseregulation bei Hefe-Fed-Batch-Kultivierungen sowie zur Prozessoptimierung von *E. coli* Hochzelldichte-Kultivierungen genutzt werden.

2 Grundlagen

2.1 Optische Sensoren in der Biotechnologie

Optische Sensoren finden zunehmend Anwendung in verschiedenen Bereichen der Biotechnologie. Das auf Wechselwirkung von Materie und Licht beruhende Messprinzip erlaubt gewöhnlich nicht-invasive und kontinuierliche Messungen. Die Ansprechzeiten dieser Sensoren sind gemäß der Natur des Lichtes im allgemeinen sehr kurz, so dass Informationen über einen Prozess in Echtzeit zur Verfügung stehen. Dies ist für eine direkte Bioprozesskontrolle und Prozessregelung eine wichtige Voraussetzung [ULBER et al., 2001]. Durch Verwendung von Lichtwellenleiter können optische Sensoren direkt an verschiedene Bioprozesse angeschlossen werden, ohne deren Verlauf zu beeinträchtigen. Eine große Anzahl von optischen Sensoren werden in der Literatur für diverse Anwendungen in der Biotechnologie beschrieben [WOLFBEIS 1993] [BITTNER et al., 1998] [SCHEPER et al., 1999].

Zur Bestimmung der Biomasse können beispielsweise Trübungssonden eingesetzt werden. Die Abnahme der Transmission im Medium wird dabei in der Regel durch das Zellwachstum und die Zunahme der Biomassekonzentration verursacht. Die Trübung hängt jedoch auch von der Konzentration und der Größe der Luftblasen und von suspentierten Partikeln ab. Eine Differenzierung zwischen biologischen, chemischen und physikalischen Ursachen ist nicht möglich. Diese In-situ-Messgeräte werden dennoch zur Online-Bestimmung der Biomassekonzentration am häufigsten eingesetzt [KONSTANTINOV et al., 1994]. Durch die Verwendung von neuronalen Netzen kann eine Verbesserung der Messsignalauswertung erreicht werden [NAIMIMOHASSES et al., 1995] [HITZMANN, 1996] [SCHÜGERL, 2001].

Das Messprinzip von nicht-invasiven faseroptischen Sensoren beruht auf der Veränderung der optischen Eigenschaften chemischer Indikatoren (Fluoreszenzfarbstoffe). Diese Indikatoren, die durch Licht angeregt werden, sind an der Spitze faseroptischer Lichtleiter angebracht. Die Fluoreszenzeigenschaft der Indikatoren ist von der Konzentration des Analyten (z.B. pO_2 oder Ionen) abhängig. Ein Verbrauch des Analyten findet nicht statt. Faseroptische Sensoren ermöglichen aufgrund ihrer Bauart Messungen selbst in kleinsten Volumina. Bekannt sind Sauerstoff-, Kohlendioxid-, pH-, Ethanol- und Chloridionensensoren [COMTE et al., 1995] [MAROSE et al., 1999].

Im Fall von optischen Biosensoren sind am Ende des faseroptischen Lichtleiters geeignete biologische Komponenten, wie z.B. Enzyme, immobilisiert. Diese Sensoren können jedoch nicht sterilisiert und daher für die Online-Messung im Fermenter eingesetzt werden. Trotz der Probleme mit Enzymstabilität, Rekalibrierungen und Zellbewuchs nimmt der Einsatz von Biosensoren weiter zu [SCHÜGERL et al., 1996].

Die Infrarot-Spektroskopie gewinnt ebenso als eine nicht-invasive und sehr spezifische Analyse zunehmend an Bedeutung. Einzelne organische Verbindungen, wie z.B. Glucose, Ethanol oder Glutamin, sind selbst in komplexen Medien simultan detektierbar [CHUNG et al., 1995/1996].

Das Messprinzip beruht dabei auf der Lichtabsorption von biologisch relevanten Molekülbindungen. Aliphatische (C-H) und aromatische (C=H) Bindungen sowie Amino- (N-H) und Hydroxylgruppen (O-H) zeigen im nahen Infrarotbereich charakteristische Absorptionsbanden. Starke Interferenzen in den Absorptionsbanden machen den Einsatz leistungsfähiger chemometrischer Auswerteverfahren (z.B. Hauptkomponentenanalyse, neuronale Netze) zur Datenauswertung notwendig, um die relevanten Informationen aus den Spektren extrahieren zu können [CAVINATO et al., 1990] [RILEY et al., 1997].

In-situ-Fluoreszenzsensoren haben sich bereits sowohl in der Forschung und Entwicklung als auch in der industriellen Anwendung bewährt [MAROSE et al., 1999] [SCHÜGERL, 2001]. Unterschiedliche Prozessgrößen sowie Aktivität, Metabolismus und Wachstum von Mikroorganismen werden durch dieses nicht-invasive Messprinzip online zugänglich. Bei ersten kommerziell erhältlichen Fluoreszenzsensoren (z.B. INGOLD Fluorosensor) war die Nutzung auf die Detektion des reduzierten Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid(phosphat)s (NAD(P)H) beschränkt [BEYERLE et al., 1983]. Weiterentwicklungen führten zu Fluoreszenzsensoren mit mehreren Anregungs- und Emissionswellenlängen, da die Fluoreszenz anderer biogener Fluorophore (z.B. Tryptophan, Flavin) als die von NAD(P)H oftmals eine bessere Korrelationen zur Zellmasse zeigten [LI et al., 1991 und 1992] [HORVATH et al., 1993].

Mehr Informationen liefern multivariate Messsysteme, wie beispielsweise Fluoreszenzspektrophotometer, die über einen weiten Spektralbereich die Exzitation variieren und die Emission messen. Diese sogenannten 2D-Prozessfluorometer erlauben die simultane Detektion einer Vielzahl von Einzelgrößen, wie z.B. Proteine, Vitamine oder Coenzyme. Ein 2D-Prozessfluorometer kann dabei mit Hilfe eines Flüssiglichtleiters direkt an den Fermenter angekoppelt werden und erlaubt so Online- und In-situ-Fluoreszenzmessungen. Mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie wurden für mehrere Kultivierungen mit unterschiedlichen Organismen (z.B. *E. coli*, *E. aerogenes*, *S. cerevisiae*, *A. crysogenum*) die Kulturfluoreszenz bestimmt und Korrelationen zu Biomasse-, Substrat- und Produktkonzentrationen gefunden [TARTAKOVSKY, et al., 1996] [HILMER, 1996] [LINDEMANN, 1998] [MAROSE, 1999]. Komplexe Wechselwirkungen und Überlagerungen von Fluoreszenzintensitäten stören oftmals die Interpretation von 2D-Fluoreszenzspektren. Eine genaue Bestimmung von Prozessgrößen ist dann sehr schwierig, so dass zunehmend multivariate Auswerteverfahren eingesetzt werden müssen [TARTAKOVSKY, et al., 1997] [PEKELER, et al., 1998] [KREIJ, 2000].

Ein Fluoreszenzspektrometer (BioView Sensor), das speziell für den industriellen Einsatz in der biotechnologischen Produktion entwickelt wurde, hat die Firma Delta Light and Optics 1999 kommerzialisiert. Die Einstellungen der verschiedenen Anregungs- und Emissionswellenlängen erfolgt über Filterräder (Kap. 3.1). Der BioView Sensor verfügt über ein Softwarepaket zur multivariaten Auswertung der Fluoreszenzdaten und Online-Vorhersage von Bioprozessgrößen [MAROSE et al., 1998] [SKIPSTED et al., 2001]. Der Einsatz des BioView Sensors eignet sich sowohl bei industriellen Fermentationsprozessen als auch bei chromatographischen Downstream-Prozessen zur Online-Vorhersage wichtiger Prozessgrößen [HARBECK, 1999] [STÄRK et al., 1999] [STÄRK et al., 2002].

2.2 Einflüsse auf die Fluoreszenz

Bei der In-situ-Fluoreszenzmessung werden Fluorophore von vielfältigen Wechselwirkungen mit ihrer Umgebung beeinflusst (Tab. 2.1). Dies führt zu Veränderungen in den messbaren relativen Fluoreszenzintensitäten (RFI). Haben die RFI-Veränderungen einen biologischen Ursprung, können biologische Prozessgrößen mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie erfasst werden. Konzentrationsänderungen biogener Fluorophore (z.B. Proteine, Vitamine, Coenzyme) in den Zellen geben Aufschluss über Zellzahl und Zellwachstum sowie über den metabolischen Zellzustand.

Tab. 2.1: Einflüsse auf die Fluoreszenz

Art der Beeinflussung	Einflussgrößen
<i>biologisch</i>	Zellkonzentration Metabolischer Zellzustand Morphologischer Zellzustand
<i>chemisch</i>	pH-Wert Lösungsmittel
<i>physikalisch</i>	Temperatur Begasung, Rührerdrehzahl Fluoreszenzlöschung Trübung „Inner-filter“-Effekt Kaskadeneffekt Viskosität, Dichte des Mediums

Durch Änderung der Zellmorphologie kann sich die Eindringtiefe des Lichtes in die Zelle oder die Absorptions- und Reflektionseigenschaft der Zelle verändern, was zu Intensitätsveränderungen der Fluoreszenz führen kann. Darüber hinaus nehmen chemische und physikalische Größen Einfluss auf die Fluoreszenz, die sich in einem komplexen System wie der Fermentationsbrühe überlagern und gegenseitig beeinflussen können.

Die Fluoreszenzspektren verschiedener biogener Fluorophore (z.B. Pyridoxin) zeigen eine starke pH-Abhängigkeit. Durch Protonierung verändert sich die Ladungsverteilung im Molekül und damit die Fluoreszenzeigenschaft, wie z.B. die Intensität oder die Lage der Fluoreszenzpeaks [ZANDER, 1981] [LI und HUMPREY, 1992]. Lösungsmittelleffekte können auf eine Reihe von gelösten Fluorophoren wirken. Durch Polarisierung infolge der Polarität der Lösungsmittelmoleküle kann es zu spektralen Verschiebungen kommen. Ausserdem können protische Lösungsmittel die Fluoreszenzeigenschaft durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen beeinflussen [SCHWEDT, 1981].

Bei ansteigender Temperatur nimmt im allgemeinen die Fluoreszenzintensität ab, da die Wahrscheinlichkeit von desaktivierenden Stößen mit andern Molekülen wächst. Mit zunehmender Viskosität des Mediums steigt in der Regel die Fluoreszenzintensität an, da die Zahl der inaktivierenden Molekülstöße abnimmt. Die Trübung wird unter anderem auch durch die Konzentration und Größe der Luftblasen bestimmt, wodurch optische Messungen beeinflusst werden. Die Begasung und Rührerdrehzahl haben daher Einfluss auf die Fluoreszenz [LI und HUMPREY, 1992]. Fluoreszenzlöschung kann durch Energieübertragung infolge von Kollisionsprozessen von verschiedenen Molekülen (z.B. Sauerstoff) stattfinden. Statische Fluoreszenzlöschung erfolgt durch die Bildung nichtfluoreszierender Komplexe aus Fluorophore und verschiedenen Ionen beispielsweise Iodide, Nitrate, Fe^{3+} und Cu^{2+} .

Durch das Wachstum von Zellen vergrößert sich die Trübung und das Streulicht nimmt zu. Mit zunehmender Trübung verringert sich die Eindringtiefe des Anregungslichtes und damit die mittlere freie Weglänge des Streulichts, so dass, trotz weiter zunehmender Trübung, oberhalb eines Sättigungsbereiches eine Abnahme der Streulichtintensität beobachtet wird.

Bei sehr hohen Fluorophorkonzentrationen kommt es oberhalb eines Sättigungsbereiches zu einer Verringerung des Anregungslichts und/oder Emissionslichts. Grund sind starke Absorptionen durch die Fluorophore und Farbstoffe. Fluorophormoleküle in größerem Abstand vom Sensor werden nicht mehr angeregt. Die bei hoher Fluorophorkonzentration durch Absorption auftretende Konzentrations-Fluoreszenzlöschung wird als „Inner-filter“-Effekt bezeichnet und hat einen großen Einfluss auf die Fluoreszenzspektren [LI und HUMPREY, 1992] [SLAVIK, 1994].

Im Fluorophorgemisch kann die Fluoreszenz eines Fluorophores zur Anregung eines zweiten Fluorophores dienen. Die messbare Fluoreszenzintensität der ersten Substanz ist dann wesentlich von der Konzentration des zweiten Fluorophors abhängig. Diese Reabsorption von Fluoreszenz wird als Kaskadeneffekt bezeichnet.

2.3 Modellrechnungen in der Biotechnologie - Softwaresensoren

Einfache kinetische Modelle (Monod-Kinetik) benötigen zur Simulation von biotechnologischen Prozessverläufen und zur Vorhersage von Prozessgrößen neben der Kenntnis verschiedener Bioprozessgrößen (z.B. Wachstumsrate, Verbrauchs- und Produktionsraten) auch ein Verständnis von intrazellulären Kontrollmechanismen [SONNLEITNER und KÄPPELI, 1986]. Unterschiedliche Modellansätze sind bislang entwickelt worden. So können beispielsweise kybernetische Modelle auf der Hypothese basieren, dass Mikroorganismen den Verbrauch verfügbarer Substrate so optimieren, dass ihre Wachstumsrate zu jeder Zeit maximal ist [RAMKRISHNA et al., 1987]. Die Entwicklung von theoretischen Modellen ist jedoch sehr aufwendig, da eine Vielzahl von Modellparameter (z.B. spezifische Wachstumsrate, Ausbeutekoeffizienten) genutzt bzw. berücksichtigt werden muß. Diese Modellparameter sind oftmals nur sehr schwer und mittels aufwendiger Messsysteme zugänglich oder können nur näherungsweise festgelegt werden [JONES et al., 1999].

Biotechnologische Prozesse sind von einer Vielzahl von Prozessgrößen (z.B. Produkt- und Substratkonzentrationen) sowie vom biologischen Zellzustand abhängig und deren gegenseitiger Beeinflussung und Überlagerung. Zur Bioprozessbeobachtung sind daher multivariate Messsysteme, wie z.B. Spektrophotometer, sinnvoll, da sie die simultane Detektion einer Vielzahl von Bioprozessgrößen erlauben. Eine eingehende Auswertung dieser komplexen Daten ist ohne geeignete Auswerteverfahren nicht möglich. Mit Hilfe multivariater Auswerteverfahren können z.B. aus einem 2D-Fluoreszenzspektrum mehrere verschiedene Prozessgrößen berechnet werden, auch solche, die mittels der 2D-Fluoreszenzspektroskopie nicht direkt erfasst werden können, wie z.B. die Glucose- oder die Ethanolkonzentration. Durch den Einsatz dieser sogenannten Softwaresensoren lassen sich indirekt wichtige, aber auch latente Größen aus den Prozessdaten extrahieren und vorhersagen.

Das am häufigsten genutzte multivariate Auswerteverfahren ist die multilineare Regression (MLR). Diese Methode hat jedoch den Nachteil, dass sie nicht anwendbar ist, wenn die Variablen (Messwerte) im X-Datensatz eine Kolinearität besitzen. Aufgrund von umfangreichen Beeinflussungen und Überlagerungen können beispielsweise die RFI-Verläufe in benachbarten Bereichen im 2D-Fluoreszenzspektrum eine gegenseitige lineare Abhängigkeit (Kolinearität) beinhalten. Das bedeutet, dass einige RFI-Verläufe eine ähnliche Abhängigkeit von einer bestimmten Bioprozessgröße (z.B. Biomassekonzentration) aufweisen. Um Fluoreszenzdaten für eine multivariate Kalibration zu nutzen, werden Verfahren der Datenkompression angewendet. Dabei werden die Messdaten unter bestimmten Optimierungskriterien in neue voneinander unabhängige Größen transformiert. Die Information, die in den Variablen verteilt ist, wird dabei auf eine geringe Anzahl von Variablen (Hauptkomponenten) konzentriert. Durch dieses Auswerteverfahren wird, anstatt der Verwendung einzelner unabhängiger RFI-Verläufe aus bestimmten Fluoreszenzbereichen, die Nutzung des gesamten 2D-Fluoreszenzspektrums möglich. Mit Hilfe der neuen Variablen (Hauptkomponenten) stehen darüber hinaus nützliche und leistungsfähige Diagnosehilfsmittel zur Verfügung, mit denen Ausreisser und Interferenzen in den Messungen und Variablen erkannt werden können [MCAVOY et al., 1992] [HITZMANN, 1996] [ESBENSEN, 2000]. Im weiteren sollen die Hauptkomponentenanalyse (principal component analysis (PCA)) und die PLS-Regression (partial least squares regression) näher beschrieben werden.

2.3.1 Hauptkomponentenanalyse

Die Hauptkomponentenanalyse (PCA) wird für die Analyse von Spektraldaten zunehmend genutzt [COSCIONE et al., 2000] [MELOUN et al., 2000]. Dieses multivariate Auswerteverfahren wurde zur Auswertung von chemischen Daten erstmals von KANKARE verwendet [KANKARE, 1970]. Für eine PCA werden alle Daten in einer X-Matrix (oder Datenmatrix) angeordnet. Die Abbildung 2.1 zeigt eine Datenmatrix am Beispiel von 2D-Fluoreszenzspektren, in der jede Zeile ein Spektrum (eine Messung) und jede Spalte eine Wellenlängenkombination (Variable) darstellt. Die X-Variablen sind die detektierten relativen Fluoreszenzintensitäten bei den entsprechenden Wellenlängenkombinationen (WLK). Bei 150 WLK bzw. Filterkombina-

tionen ergeben sich somit 150 X-Variablen. X_{np} ist demnach die gemessene relative Fluoreszenzintensität (RFI) der p-ten WLK im n-ten 2D-Fluoreszenzspektrum (Messung).

<u>Objekte</u>	WLK-1		WLK-2		<u>X-Variablen</u>	
Spektrum der Messung 1	X_{11}	X_{12}	X_{1p}	
Spektrum der Messung 2	X_{21}	X_{22}		
Spektrum der Messung 3						
.....						
	X					
...						
Spektrum der n-ten Messung	X_{n1}	X_{np}	

Abb. 2.1: Matrix-Darstellung (Datenmatrix) von 2D-Fluoreszenzspektren. Jede Zeile stellt ein Spektrum und jede Spalte eine Wellenlängenkombination (Variable) dar.

Bei der Hauptkomponentenanalyse werden alle Messwerte (Originaldaten) aus der Datenmatrix in ein neues Koordinatensystem transformiert. Bei der Verwendung von nur zwei Variablen (WLK) entsteht z.B. ein zweidimensionales Koordinatensystem, wie in Abbildung 2.2 schematisch dargestellt ist.

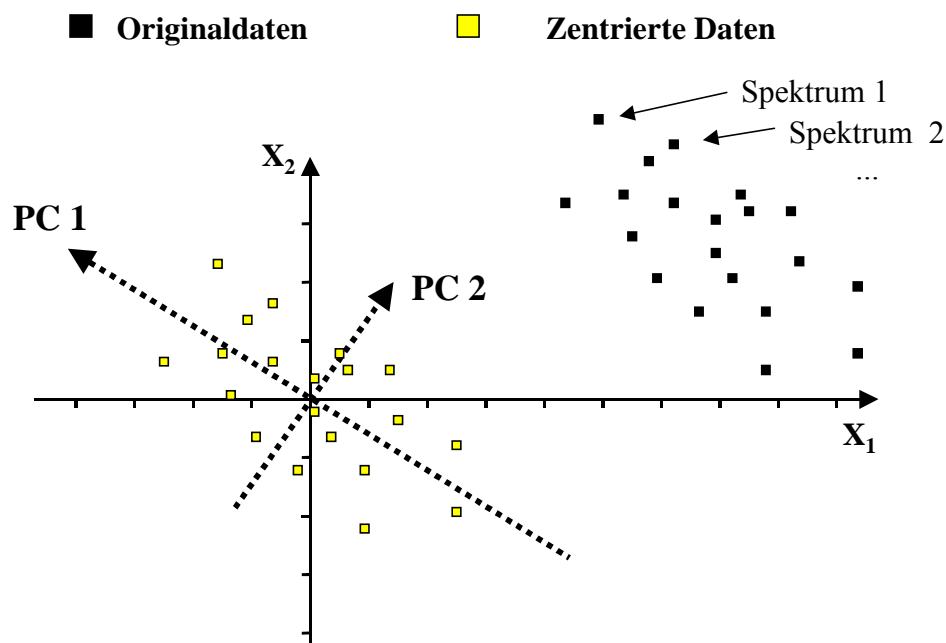


Abb. 2.2: Zentrierung der Fluoreszenzdaten und Lage der ersten zwei Hauptkomponenten im zentrierten Koordinatensystem

In dem mehrdimensionalen Datenraum von 2D-Fluoreszenzspektren ist auf der Achse X_p die RFI der p -ten WLK aufgetragen. Bei Verwendung von 150 WLK entsteht ein Koordinatensystem (Raum) aus 150 Dimensionen. Jedes im Koordinatensystem dargestellte Spektrum (Objekt) entspricht einem 2D-Fluoreszenzspektrum. Für die PCA werden zunächst die Werte der Originaldaten zentriert, um den Ordinatenabschnitt zu eliminieren. Dazu wird der Mittelwert \bar{X}_j von allen Werten der Originaldaten X_{ij} subtrahiert. Der Mittelwert \bar{X}_j der j -ten WLK wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$\bar{X}_j = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_{ij} \quad (1)$$

Die Informationen der zentrierten Daten werden bei der PCA unter bestimmten Optimierungskriterien in neue, voneinander unabhängige Größen (Hauptkomponenten) transformiert. Als Optimierungskriterien wird bei der PCA nur die Maximierung der Varianz der Messdaten (X-Matrix) verwendet. Die Achsen der Hauptkomponenten (PCs) sind orthogonal, ihr Ursprung ist durch den Mittelpunkt der Daten bestimmt. Das heisst, die Lage der ersten Hauptkomponente (PC1) wird so festgelegt, dass die Varianz der entsprechenden Werte maximal ist. Alle folgenden Hauptkomponenten berechnen sich nacheinander so, dass sie die verbleibende Varianz maximal beschreiben [HITZMANN, 1996]. Dieses Verfahren stellt eine sukzessive varianzmaximierende, orthogonale Rotationstransformation dar. Die Anzahl der Hauptkomponenten ist begrenzt durch die Anzahl der Variablen (WLK) bzw. der Messungen (Spektren). Bei einer 200×150 -dimensionalen Datenmatrix (200 Spektren mit je 150 WLK) ist beispielsweise die Anzahl der potentiellen Hauptkomponenten auf 150 begrenzt. Da in der Regel drei bis vier Hauptkomponenten bereits über 99% der Varianz der Daten beschreiben, erfolgt durch die Beschränkung auf diese Hauptkomponenten eine massive Datenreduktion durch die PCA. Durch die Beschränkung auf diese Hauptkomponenten wird die X-Matrix in zwei Teile, bestehend aus Information (Score- und Loading-Vektoren) und Messrauschen (Restmatrix E), zerlegt. Die Score- und Loading-Vektoren lassen sich zur Score-Matrix T und Loading-Matrix P zusammenfassen. Das Produkt der Score- und Loading-Matrix ergibt die zentrierte X-Matrix (Abb. 2.1), so dass die PCA formal wie folgt beschrieben werden kann:

$$X = T P^T + E \quad (2)$$

Eine der wichtigsten Diagnosehilfsmittel in der PCA stellt die Score-Darstellung dar. Für jede Messung i (2D-Fluoreszenzspektrum) ergibt sich für die a -te Hauptkomponente eine Zahl t_{ia} (Score). Die Auftragung der Scores von zwei Hauptkomponenten in einem Diagramm führt zur Score-Darstellung. Diese Darstellung gibt einen umfassenden Überblick über alle Messungen (2D-Fluoreszenzspektren). Datenausreisser, Gruppen von Daten sowie Trends im Prozessverlauf lassen sich in der Score-Darstellung einfach identifizieren.

Mit dem Loading-Vektor p_a wird der a -te Score-Vektor aus der Datenmatrix X berechnet. Die Anzahl der Komponenten eines Loading-Vektors ist identisch mit der Anzahl der Variablen (z.B. WLK). Die Darstellung der Loadings in sogenannte Loading-Spektren ermöglicht es, die Beziehungen der Variablen untereinander zu interpretieren und den Einfluss jeder Variablen auf die Modellbildung zu beurteilen. Die Loadings geben an, wie groß der Einfluss der einzelnen Variablen ist bzw. welche Variablen den größten Einfluss für die Modellbildung besitzen. Je größer der Betrag eines Loadings einer Variablen ist, um so größer ist die Varianz bzw. Information dieser Variablen im Vergleich zu Variablen, die den selben Wert haben. Die Werte der Loadings sind zwischen +1 und -1 normiert.

Ein weiteres Diagnosehilfsmittel bei der PCA ist die Leverage-Darstellung. Der Leverage-Wert kann als Distanz zwischen einem Objekt und dem Mittelwert \bar{X}_j im zentrierten Koordinatensystem interpretiert werden (Abb. 2.2). Leverage-Werte sind immer zwischen Null und eins skaliert. Je größer ein Leverage-Wert für ein Objekt (2D-Fluoreszenzspektrum) ist, um so größer ist auch die Distanz zum Mittelwert \bar{X}_j . Ausreisser und Störungen lassen sich mit Hilfe der Leverage-Darstellung einfach erkennen.

Die PCA zerlegt die zentrierten Daten, wie bereits beschrieben, in zwei Teile. Einen Informationsteil aus den Score- und Loading-Vektoren und der Restmatrix E , bestehend aus Messrauschen. Die Restmatrix ist jedoch kein Bestandteil der multilineareren Regression (siehe auch Kap 2.3.2), hierfür wird nur T verwendet. Der NIPALS-Algorithmus (Non-linear Iterative Projections by Alternating Least-Squares) ist die Grundlage für die Berechnung der PCs, die nacheinander bestimmt werden [ESBENSEN, 2000]. Das Ergebnis ist in Gleichung (3) dargestellt.

$$X = t_1 p_1^T + t_2 p_2^T + \dots + t_a p_a^T + E \quad (3)$$

Jede X -Matrix vom Rang a lässt sich so als Summe von a Matrizen mit dem Rang 1 darstellen. Diese Matrizen setzen sich aus den Produkten der Score- und Loading-Vektoren zusammen, wie in Abbildung 2.3 graphisch dargestellt ist.

Abb. 2.3: Graphische Darstellung der Gleichung (3) als Summe von Score- und Loading-Vektorprodukten mehrerer Hauptkomponenten und Restmatrix

Mit Hilfe der verwendeten Auswertesoftware Unscrambler 7.5 (CAMO ASA, Norwegen) werden die PCs automatisch berechnet. Die optimale Anzahl an PCs wird nach bestimmten Kriterien vorgegeben.

2.3.2 PLS-Regression

Das multivariate Auswerteverfahren der PCA nutzt als Optimierungskriterium zur Berechnung der Score-Matrix T lediglich die Varianzmaximierung der X-Matrix (z.B. Fluoreszenzdaten). Die PLS-Regression berechnet dagegen die Score-Matrix T aus der Varianz der X-Matrix und der Varianz der abhängigen Variablen (z.B. Offline-Daten), um die innere Beziehung zwischen den abhängigen und unabhängigen Variablen mit zu berücksichtigen.

Mittels multivariater Regression wird eine empirische Beziehung (PLS-Modell) zwischen der X_{cal} -Matrix (z.B. Fluoreszenzdaten) und der Y_{cal} -Matrix (z.B. offline gemessene Prozessgrößen) hergestellt. Diese Beziehung ist in Abbildung 2.4a schematisch dargestellt. Es ist dabei unwesentlich, ob der Y-Datensatz von einer oder mehreren Variablen der X-Matrix abhängig ist [ESBENSEN, 2000].

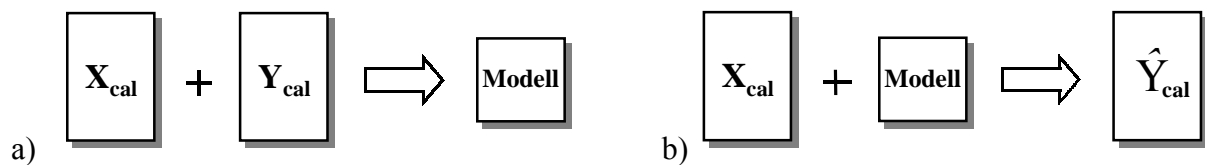


Abb. 2.4: Graphische Darstellung der Entwicklung eines PLS-Regressionsmodells

- a) Kalibrierung eines PLS-Modells aus einer X- und Y-Matrix
- b) Berechnung der Y-Matrix bei Verwendung des PLS-Modells

Die PLS-Regression kann als eine in zwei Schritten erfolgende Regression verstanden werden. Der erste Schritt beinhaltet die jeweilige Zerlegung der X- und Y-Matrix in eine Informations- (Score- und Loading-Matrix) und Restmatrix analog der PCA (Kap. 2.3.1), die nach folgenden Gleichungen zusammengefasst werden kann:

$$X = T P^T + E \quad (2)$$

$$Y = U Q^T + F \quad (4)$$

Dabei sind T und U die Score-Matrizen, P und Q die Loading-Matrizen und E und F die Restmatrizen vom X- bzw. Y-Datensatz.

Der zweite Schritt ist eine Verknüpfung beider Datensätze durch eine multilineare Regression der Score-Matrizen T und U :

$$U = B T \quad (5)$$

In dieser Gleichung ist B der Regressionskoeffizient. Die Eliminierung der Score-Matrix U in Gleichung (4) ergibt:

$$Y = B T Q^T + F \quad (6)$$

Wird die Score-Matrix T in dieser Gleichung mit Hilfe von Gleichung (2) eliminiert, so ergibt dies Gleichung (7), in der G die Restmatrizen zusammenfasst. Durch Zusammenfassung der Koeffizienten $B(P^T)^{-1}Q^T$ folgt Gleichung (8). Diese Gleichung ist ähnlich einer Geradengleichung und zeigt deutlich, dass PLS-Modelle ein multilineares Modell darstellen.

$$Y = B X (P^T)^{-1} Q^T + G \quad (7)$$

$$Y = X C + G \quad (8)$$

Zur Beschreibung der Y-Matrix mit Hilfe der X-Matrix passt sich die Score-Matrix T in Gleichungen (2), (4) und (5) so an, dass eine optimale Beschreibung der Y-Matrix durch das PLS-Modell erreicht wird. Dabei nehmen die Restmatrizen E , F und G niedrige Werte an [COSCIONE et al., 2000].

Ein PLS-Modell erlaubt aus der X_{cal} -Matrix die Berechnung der Schätzwerte \hat{Y}_{cal} -Daten (Abb. 2.4b). Der Vorhersagefehler der Kalibration errechnet sich dabei aus der Differenz zwischen den Y_{cal} -Daten, die zur Kalibration verwendet wurden, und den berechneten Schätzwerten \hat{Y}_{cal} -Daten.

In dieser Arbeit wurde zur multilinearen Regression von Fluoreszenzdaten und Offline-Daten die PLS-1 Methode verwendet, eine Variante der PLS Methode. Anstatt eines Y-Vektors wird nur eine Y-Variable zur Modellberechnung verwendet. Dies erfordert jedoch die Entwicklung eines PLS-Modells für jede einzelne Y-Variable (Prozessgröße).

Ziel der PLS-Regression ist es, unbekannte Y-Daten aus korrespondierenden X_{val} -Daten von neuen Messungen zu berechnen. Mit Hilfe solcher PLS-Modelle können beispielsweise Prozessgrößen, die nicht zeitnah bestimmt werden können, indirekt aus leicht zugänglichen X-Daten (z.B. 2D-Fluoreszenzdaten) online vorhergesagt werden [MCAVOY et al., 1992]. Diese mathematischen Modelle werden auch als Softwaresensoren bezeichnet. Durch Kombination multivariater Messsysteme (Hardwaresensoren) und mathematischer Auswerteverfahren (Softwaresensoren) können Daten vorangegangener Prozesse genutzt werden, um einen aktuellen Prozess zu beurteilen und zu regeln.

2.4 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Backhefe *Saccharomyces cerevisiae* H620 wird bevorzugt als Testorganismus eingesetzt, weil die Anforderungen und Reaktionen dieses eukaryontischen Sprosspilzes unter definierten Bedingungen gut erforscht und beschrieben sind [LOCHER, 1993]. Die Vermehrung der Hefe *S. cerevisiae* erfolgt vorwiegend durch Sprossung. Dabei durchläuft die sprossende Zelle einen Zellzyklus, der sich in verschiedene Abschnitte unterteilen lässt (Abb. 2.5). In der G_1 -Phase (gap_1), auch als Wachstumsphase bezeichnet, nimmt vor allem das Zellvolumen zu. Die Dauer der G_1 -Phase ist abhängig vom Substratangebot und kann innerhalb des Zyklus variieren. Sie

nimmt mit abnehmender Wachstumsrate zu. Die Geschwindigkeit des Teilungsvorganges (S- und M-Phase) bleibt dagegen unabhängig von der Wachstumsrate konstant.



Abb. 2.5 Zellzyklus von *Saccharomyces cerevisiae* [ALBERTS et al., 1997]

In der S-Phase (*synthesis*) erhöht sich die Sprossungsaktivität der Zelle deutlich [DUBOC et al., 1996]. Während sich die Spindelapparate und die DNA duplizieren, bildet sich bereits an der Mutterzelle eine Knospe aus. In der folgenden G₂-Phase ist die DNA Duplikation beendet und die Zellkernteilung beginnt einzusetzen. Am Übergang zur M-Phase (*mitosis*) wird das Genom gleichmäßig auf Mutter- und Tochterzelle aufgeteilt. Am Ende der M-Phase erfolgt die Teilung des Zellkerns und Trennung in Mutter- und Tochterzelle. Eine ruhende Zelle befindet sich in der G₀-Phase.

Die Restriktionspunkte sind zentrale Kontrolleinrichtungen in der Zelle, die jeden Vorgang während der Proliferation prüfen und den Zellzyklus auch an diesen Punkten stoppen können [ALBERTS et al., 1997]. Erst wenn eine Zellzyklusphase vollständig abgeschlossen ist, wird die nächste Phase eingeleitet. Das Passieren eines Restriktionspunktes ist immer mit einer Stoffwechselumstellung verbunden.

Die Produktion der Hefe kann in Batch-, Fed-Batch oder kontinuierlichen Kultivierungen erfolgen. Hefe-Kulturen reagieren dabei oft sehr empfindlich gegenüber ihrer extrazellulären Umgebung [LOCHER, 1993]. Durch Änderung der Kultivierungsbedingungen, z.B. Temperatur, pO₂, pH-Wert sowie des Substratangebots (Verdünnungsrate), kann die Produktion von Biomasse und Nebenprodukten (z.B. Ethanol, Acetat) sowie der Stoffwechsel in unterschiedliche Richtungen gelenkt werden. Die Hefezellen können verschiedene Zucker und Alkohole als Kohlenstoffquelle oxidativ assimilieren, bevorzugen aber von allen Substraten Glucose [LOCHER, 1993]. Die Zuckerumsetzung kann auf zwei Arten erfolgen. Bei oxidativem Stoffwechsel entsteht mit hoher Ausbeute ($Y_{BTM} > 0,5$ g-BTM/g-Glucose) Zellmasse und äquimolar zum aufgenommenen Sauerstoff auch CO₂. Bei oxidoreduktivem Stoffwechsel wird die Glucose zu Ethanol und CO₂ abgebaut und in geringerer Ausbeute ($Y_{BTM} < 0,3$ g-BTM/g-Glucose) Zellmasse gebildet [DAIRAKU et al., 1982]. Das Verhältnis dieser zwei Stoffwechselwege hängt unter aeroben Bedingungen sowohl vom Glucose- und Sauerstoffangebot als auch von der begrenzten Atmungskapazität der Hefezellen ab, die den Engpass der Energiegewinnung darstellt [SONNLEITNER und KÄPPELI, 1986].

Bei geringer Glucosekonzentration bis ca. 0,04 g/L in der Kulturbrühe [PHAM et al., 1998] und unterhalb einer kritischen Glucoseaufnahmerate, die die Atmungskapazität der Zellen nicht ausschöpft, wird Glucose oxidativ verstoffwechselt. Die restliche Atmungskapazität kann zum Wachstum auf Ethanol genutzt werden, wenn dieses vorhanden ist. Die kritische Glucosekonzentration bzw. -aufnahmerate kennzeichnet den Umschaltpunkt des Stoffwechsels von oxidativ zu oxidoreduktiv, bei dem kein Ethanol mehr zum Wachstum verwertet werden kann. Der Glucoseanteil, der bei hoher Konzentration der kritischen Glucoseaufnahmerate entspricht, wird oxidativ verstoffwechselt. Die überschüssige Glucose wird reduktiv abgebaut und in Ethanol und CO₂ umgesetzt. Hefezellen produzieren trotz aerober Bedingungen aufgrund des sogenannten Crabtree-Effekts Ethanol [DE DEKEN, 1966] [FICHTER et al., 1981]. Dieses Regulationsphänomen wird in der Literatur alternativ auch als „overflow metabolism“ [SONNLEITNER und KÄPPELI, 1986] und „glucose sensitive“ [FIECHTER et al., 1992] bezeichnet. Die Atmungskapazität der Zellen und damit die kritische Glucoseaufnahmerate hängt nicht nur vom Regulationszustand der Atmungskette, sondern auch von der Sauerstoffversorgung ab. Unter anaeroben Bedingungen kann die Glucose nur reduktiv verstoffwechselt werden. Ethanol wird nicht verbraucht. Mit steigendem Gelöstsauerstoffgehalt im Kultivierungsmedium steigt auch die Atmungsaktivität der Zellen bis zum Erreichen eines zelleigenen Maximalwertes an und mit ihr der Glucoseanteil der oxidativ verstoffwechselt werden kann [SCHÜGERL, 1993]. Bei der Backhefeherstellung ist es wünschenswert, dass sich schnell viel Zellmasse, aber kein Ethanol bildet. Ideal ist daher ein Produktionsprozess, der bei der kritischen Glucoseaufnahmerate durchgeführt wird.

Eine genaue Untersuchung des Crabtree-Effekts unter konstanten Kultivierungsbedingungen ist bei kontinuierlichen Hefe-Kultivierungen möglich. Im Chemostat stellt sich gewöhnlich ein stationärer Zustand ein, bei dem ein Zellwachstum unter konstanten Bedingungen erreicht wird. Bei niedrigen Verdünnungsraten ist der Metabolismus von *S. cerevisiae* bei gleichzeitig hoher BTM-Ausbeute vollständig oxidativ. Es wird kein Ethanol gebildet. Oberhalb einer kritischen Verdünnungsrate von $D_k \approx 0,28 \text{ h}^{-1}$ übersteigt das Glucoseangebot einem Wert, der der kritischen Glucoseaufnahmerate der Zellen entspricht, so dass ein Teil der zugeführten Glucose reduktiv zu Ethanol abgebaut wird [VAN HOEK et al., 1998]. Nach dem Wechsel vom oxidativen zum oxidoreduktiven Stoffwechsel reichert sich Ethanol in der Kultivierungsbrühe an. Die BTM-Ausbeute ist deutlich geringer.

Ein spezieller Fall des kontinuierlichen Wachstums von Mikroorganismen ist das synchrone Zellwachstum, bei dem ein Großteil der Zellen die Proliferation gleichzeitig durchlaufen. Ohne äusseren Eingriff ändern sich dabei nahezu sämtliche Kultivierungsgrößen in stabilen Oszillationen. Deutliche Veränderungen werden z.B. in biologischen (z.B. Biomasse), chemischen (z.B. pH) und physikalischen (z.B. pO₂, Trübung) Prozessgrößen sowie im biologischen Zellzustand sichtbar [DUBOC et al., 1996]. Synchrones Wachstum von *S. cerevisiae* wird nur in einem bestimmten Bereich des pO₂- und pH-Wertes sowie der Verdünnungsrate beobachtet [MARTEGANI et al., 1990]. Die Periodenlänge synchron wachsender Hefezellen ist

direkt abhängig von der Verdünnungsrate. Bei geringer Verdünnungsrate nimmt die Periodenlänge zu. Die Induktion von synchronem Wachstum kann bei *S. cerevisiae* am Ende einer Batch-Kultivierung nach einstündiger Hungerphase [BEUSE, 1998], kurzzeitigem Begasungswechsel auf anaerobe Bedingungen [SCHEPER und SCHÜGERL, 1986], Substratshift- oder Substratpulsversuche [MARTEGANI et al., 1990] erfolgen.

Während des synchronen Wachstums teilen sich die Hefezellen von *Saccharomyces cerevisiae* asymmetrisch durch Sprossung in Mutter- und Tochterzelle (Abb. 2.6). Um die nächste Zellteilung zu initiieren ist eine kritische Zellgröße notwendig. Aus diesem Grund haben die größeren Mutterzellen, die bereits eine und mehr Zellteilungen absolviert haben, eine kürzere Zellzyklusdauer als die kleineren Tochterzellen. Die Wachstumsphase (G₁-Phase) der Tochterzellen ist deutlich länger als die der Mutterzellen. Die Teilungsphase (S- und M-Phase) ist dagegen bei beiden Zelltypen gleich lang. Die Zykluslängen von Mutter- und Tochterzellen unterscheiden sich infolge der längeren Wachstumsphase der Tochterzellen genau durch ganzzahlige Vielfache der Periodenlängen [SONNLEITNER, 1991] [BELLGARDT, 1994] [BEUSE et al., 1998]. Das Verhältnis der Zellzykluszeiten von Mutter- und Tochterzellen wird als Wachstumsmodus bezeichnet. Bei einem Wachstumsmodus 1.2 teilen sich die größeren Mutterzellen nach jeder Periode, während sich die kleineren Tochterzellen erstmalig nach der zweiten Oszillationsperiode teilen. Eine synchrone Hefe-Kultur besteht folglich aus zwei unterschiedlichen Populationen von teilungsaktiven und nicht teilungsaktiven Hefezellen. Bei einem Wachstumsmodus 1.2 beträgt der Anteil sich teilender Zellen von der Gesamtkultur maximal 61,8% [BEUSE et al., 1998]. Je höher der Wachstumsmodus (z.B. Wachstumsmodus 1.3, Wachstumsmodus 1.4), um so geringer wird der Anteil teilungsaktiver und synchron wachsender Zellen in einer synchron wachsenden Kultur.

2.5 Hochzelldichte-Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Effizienz verschiedener Kulturverfahren konnte in den letzten Jahrzehnten sowohl für mikrobielle als auch für Säugetier-Zellen erheblich gesteigert werden. Eine Voraussetzung für hohe Raum-Zeit-Ausbeuten und eine gesteigerte Produktivität ist das Erreichen hoher Zelldichten, da die Produktausbeute oftmals von der Zelldichte abhängt. Die am häufigsten angewendete Fermentationstechnik für die Kultivierung zu hohen Zelldichten ist die Fed-Batch-Kultivierung [YEE und BLANCH, 1992]. Hochzelldichte-Kultivierungen (HZD-Kultivierung, HZDK) wurden zuerst bei Hefen genutzt, um höhere Biomasse- und Ethanolkonzentration zu erreichen. Für andere Mikroorganismen (z.B. *Streptomyces laurentii*, *Escherichia coli*) wurde diese Fermentationstechnik anschließend weiterentwickelt, um auch die Ausbeute anderer Produkte (z.B. Antibiotika) durch die Anwendung von HZDK steigern zu können [SUZUKI et al., 1987]. Aufgrund seiner gut erforschten Genetik und Physiologie wurde *Escherichia coli* als bevorzugter Organismus in großem Umfang für die Produktion rekombinanter Proteine

genutzt [RIESENBERG, 1991] [KLEMAN und STROHL, 1992]. Bei sehr hohen Zelldichten ergeben sich jedoch beim Kultivierungsprozess verschiedene Schwierigkeiten, wie z.B.:

- schlechte Löslichkeit von festen und gasförmigen Substanzen im wässrigen Medium
- Limitierung durch Substrat- und/oder Produkthemmung
- Anreicherung toxischer Nebenprodukte
- hohe Wärmeentwicklung und CO₂-Produktionsraten
- Sauerstofflimitierung und eine sehr hohe Viskosität

Um diese Probleme zu umgehen, wurden verschiedene Reaktortypen und Regelstrategien entwickelt. Die Nutzung von definierten Medien und einfachen Fütterungsstrategien führte z.B. zu einer deutlich verminderten Akkumulierung bestimmter Stoffwechselprodukte. Trotz aerober Kultivierungsbedingungen bildet *E. coli* im Glucosemedium metabolische Nebenprodukte (z.B. Acetat), die in höheren Konzentrationen inhibierend auf das Zellwachstum wirken. Die Bildung von Nebenprodukten ist gewöhnlich nicht die Konsequenz eines Sauerstoffmangels, sondern vielmehr das Resultat einer gesättigten Elektronentransportkette im Stoffwechsel [MAJEWSKI et al., 1990]. Bei hohen Glucosekonzentrationen bildet *E. coli* hauptsächlich Acetat als Nebenprodukt, das ab einer Konzentration von ca. 10 g/L das Zellwachstum hemmt [RIESENBERG, 1991]. Die Acetatproduktion von *E. coli* bei hohen Glucosekonzentrationen wird auch als „bacterial Crabtree effect“ bezeichnet [LISCHKE et al., 1993].

Für die Produktion von rekombinanten Proteinen mit *E. coli* ist eine kontrollierte Substratzufuhr für die Produktausbeute wichtig, um eine unerwünschte Acetatbildung zu vermeiden. Durch Regelung der Substratkonzentration in der Fermentationsbrühe auf ein sehr geringes Niveau kann bei *E. coli* die Acetatbildung vermieden werden [NAKANO et al., 1997]. Bei Hochzell-dichte-Kultivierungen wurden optimierte Feedprofile bestimmt, bei denen die Zugabe der Kohlenstoffquelle limitiert war. Diese einfache Substratfütterung führt jedoch zu einer reduzierten Wachstumsrate [GREGORY et al., 1993]. Durch weitere Optimierungen des Fed-Batch-Verfahrens konnten bei *E. coli*-Kultivierungen Zelldichten mit BTM-Konzentrationen von bis zu 150 g/L erreicht werden [KORZ et al., 1995] [HORN et al., 1996].

Das Zellwachstum lässt sich weiter steigern, wenn inhibitorische und toxische Stoffe aus der Fermentationsbrühe entfernt werden. Dazu werden Ultra- und Mikrofiltrationstechniken eingesetzt [LEE und CHANG, 1990]. Der bei diesem Verfahren erforderliche hydraulische Fluss durch die Membran führt jedoch gerade bei hohen Zelldichten häufig zu einer Verstopfung der Membranporen und somit zu einer Verminderung der Austauschkapazität. Mit Hilfe von Dialysemembranen, die hydraulisch nicht durchströmt werden, können niedermolekulare Stoffwechselabbauprodukte sehr effektiv durch Diffusion, aufgrund eines Konzentrationsgradienten zwischen Kulturraum und Dialysatvorlage, entfernt werden (Abb. 2.6). Gleichzeitig können zusätzliche Nährstoffe, Salze und Vitamine vom Dialysemedium (Dialysat) in die Fermentationsbrühe übergehen [PÖRTNER und MÄRKEL, 1998].

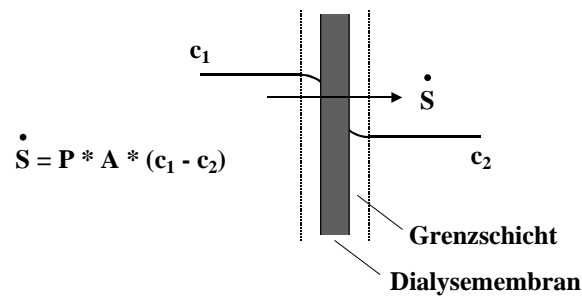


Abb. 2.6: Prinzip der Dialyse. A Membranfläche, c_1 , c_2 Konzentration auf beiden Seiten der Dialysemembran, P Permeabilitätskoeffizient, S Transport durch die Membran [MOSER, 1985]

Um kontinuierlich toxische, niedermolekulare Nebenprodukte aus der Fermentationsbrühe zu entfernen, wurde von Märkl ein Membran-Dialysereaktor entwickelt (Abb. 2.7). Der Fermenter besteht aus zwei ineinander liegenden zylindrischen Reaktoren, einem Fermentationsraum (1,2 L) und einem Aussenraum (5 L) mit Dialysemedium, die durch eine Membran getrennt sind [MÄRKL et al., 1990] [PÖRTNER und MÄRKL, 1998]. Ein kontinuierlicher diffusiver Stoffaustausch zwischen Fermentations- und Aussenraum wird so während der Fermentation gewährleistet, ohne den Bioprozess zu stören. Die Kulturbrühe wird dabei gleichzeitig mit zusätzlichen Nährsalzen und Vitaminen versorgt. In diesem Membran-Dialysereaktor konnten mit *E. coli* K12 sehr hohe Zelldichten erreicht werden, mit Biotrockenmassekonzentrationen von bis zu 190 g/L [NAKANO et al., 1997].

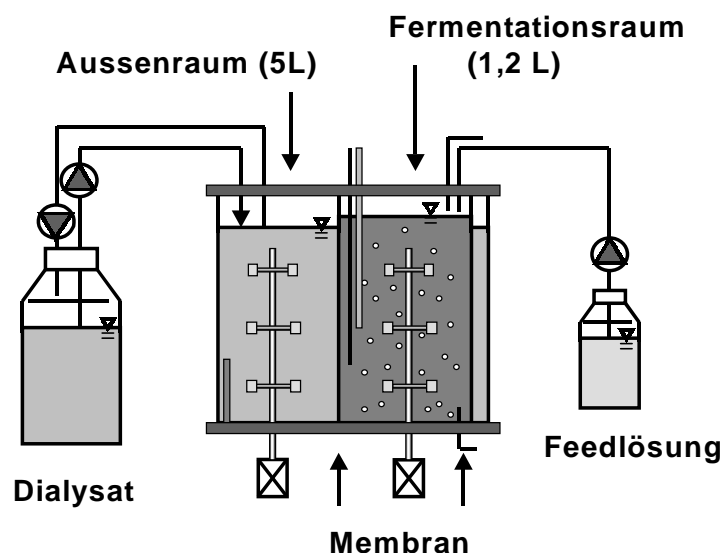


Abb. 2.7: Membran-Dialysereaktor [MÄRKL et al., 1990]

Um Substratverluste über das Dialysat zu reduzieren, entwickelten Ogbonna und Märkl die sogenannte „Nutrient-split feeding strategy“ [OGBONNA und MÄRKL, 1993]. Hierbei wird die

übliche Substratlösung in zwei Fraktionen aufgeteilt, von denen die eine aus der Kohlenstoffquelle (z.B. Glucose) und die andere aus Nährsalzen besteht. Die Kohlenstoffquelle wird als hochkonzentrierte Lösung während des Fed-Batch-Betriebs direkt in den Fermentationsraum zugegeben. Die Substratkonzentration in der Fermentationsbrühe sollte dabei möglichst auf einen geringen Wert geregelt werden. Der Substratverlust durch Diffusion über die Membran ins Dialysat kann dadurch erheblich verringert werden. Ausserdem führt eine zu hohe Glucosekonzentration bei *E. coli* zu einer erhöhten Produktion unerwünschter Nebenprodukte, wie z.B. Acetat. Eine optimale Substratregelung und Prozessführung erweist sich jedoch als sehr anspruchsvoll. Verschiedene Online-Glucosemessverfahren (z.B. mittels Fließdiffusionsverfahren) und modellgestützte Regelstrategien werden dazu noch erarbeitet.

Ein Scale-up für die technische Anwendung des Dialyseverfahrens kann mit Hilfe eines extern angeordneten Dialysekreislaufs realisiert werden (Abb. 2.8). Das Dialysat eines temperierten Dialysebehälters und die Fermentationsbrühe fließen dabei im Gegenstrom durch extern angeordnete Dialysemodule. Eine ausreichende Membranfläche zum Fermentationsvolumen muss dabei installiert werden. Die Entwicklung und Optimierung des Fermentationsverfahrens mit extern angeordneten Dialysemodulen wird von FUCHS detailliert beschrieben [FUCHS, 2002] [FUCHS et al., 2002]. Für die Hochzelldichte-Kultivierung von suspendierten Zellen sind Standard-Bioreaktoren als Fermenter einsetzbar. Für die industrielle Anwendung der Hochzelldichte-Kultivierung stellen Reaktorvolumina von bis zu 1000 L eine geeignete Größe dar [PÖRTNER und MÄRKEL, 1998].

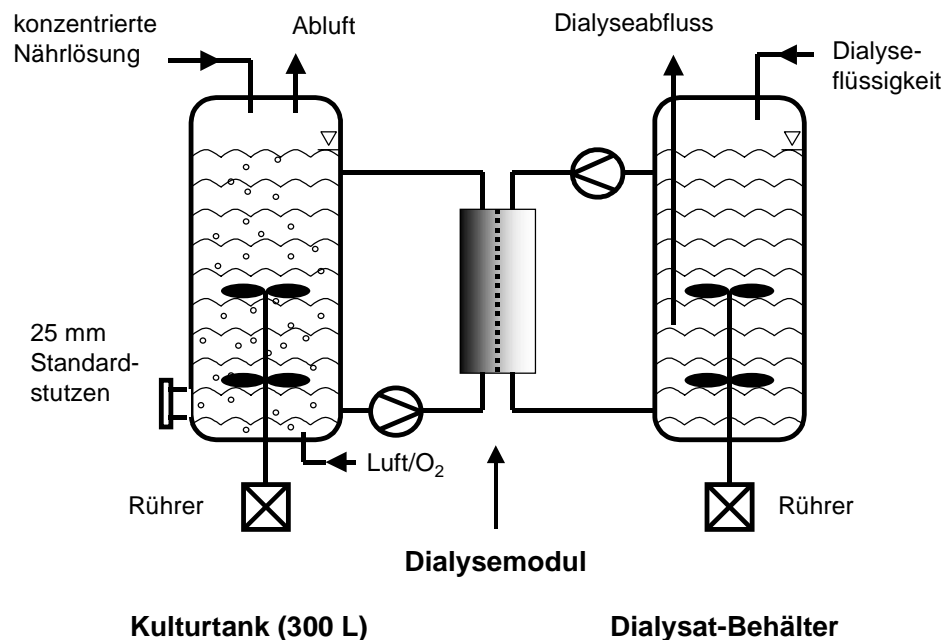


Abb. 2.8: Zwei-Behälter-Anordnung für Hochzelldichte-Kultivierungen im Membran-Dialyseverfahren mit extern angeordneten Dialysemodulen [FUCHS, 2002] [FUCHS et al., 2002]

3 Material und Methode

3.1 BioView Sensor

Der BioView Sensor wurde im Rahmen eines EU-BriteEuram-Projektes speziell für die industrielle Anwendung von In-situ-Fluoreszenzmessungen entwickelt [MAROSE, 1998]. Eine Edelstahlbox schützt den BioView Sensor vor Temperatureinflüssen, Feuchtigkeit und mechanischer Belastung. Durch optische Datenübertragung wird der BioView Sensor gegenüber elektromagnetischen Störungen abgeschirmt. Eine Datenübertragung von einigen hundert Metern ist möglich.

Der BioView Sensor verwendet zwei unabhängig rotierende Filterräder mit je 16 verschiedenen Filtern für das Exzitations- und Emissionslicht. Durch Variation der Exzitation (270-550 nm) und Messung der Emission (310-590 nm) bei verschiedenen Wellenlängen wird ein weiter Spektralbereich detektiert und so mehrere Analyte simultan durch die Aufnahme eines 2D-Fluoreszenzspektrums erfasst. Zusätzlich werden Neutraldichte-Filter (ND-Filter) mit einer Transmission oberhalb von 450 nm zur Exzitation (ExND) und Messung (NDEm) des wellenlängenabhängigen Streulichts verwendet (Tab. 3.1). Die Messzeit eines aus 150 Filterkombinationen bestehenden 2D-Fluoreszenzspektrums beträgt ca. 1 min. Um den angegebenen Messbereich voll auszunutzen, wurden die Schmalband-Interferenzfilter mit 20 nm Bandbreite so gewählt, daß alle 20 nm eine Messung möglich ist. Die Filter können individuell dem Prozess angepasst werden. Bis zu 16 Mehrfachmessungen sind in jeder Filtereinstellung möglich [LINDEMANN, 1998]. Für die Kultivierungsexperimente mit *S. cerevisiae* und *E. coli* wurden pro Filtereinstellung drei Messungen ausgeführt. Um eine hohe Lichtintensität bei langer Lebensdauer der Lampe zu gewährleisten wird die Xenon-Blitzlichtlampe (Hamamatsu, Japan) gepulst.

Tab. 3.1: Einstellungen des BioView Sensors

Exzitationswellenlängenbereiche	270-550 nm
Emissionswellenlängenbereiche	310-590 nm
Neutraldichte-Filter Exzitation / Emission	270-590 nm
Schrittweite Exzitation / Emission	20 nm / 20 nm
Bandbreite Exzitation / Emission	20 nm
Mögliche Mehrfachmessungen pro Filtereinstellung	1-16
Photomultiplier-Einstellung	(siehe Tab. 3.2)
Messungen pro Filtereinstellung	3

Die Photomultiplier-Einstellung wurde aufgrund der unterschiedlichen Transmissionen der Exzitations- und Emissionsfilter so gewählt, dass im Verlauf einer Kultivierung bei allen Filterkombinationen hohe RFI erreicht werden. Eine Übersicht über die Photomultiplier-Einstellung gibt Tabelle 3.2.

Tab. 3.2: Photomultiplier-Einstellung des BioView Sensors

Exzitation [nm]	Emission [nm]	Anzahl der Filterkombinationen	Photomultiplier-Einstellung	
			<i>S. cerevisiae</i> -Kultivierungen	<i>E. coli</i> -Kultivierungen
270	310-590	15	1100	1100
290	330-590	14	1000	1000
310	350-590	13	1200	1100
330	370-590	12	1100	900
350	390-590	11	1100	900
370	410-590	10	1100	800
390	430-590	9	1100	800
410	450-590	8	1100	700
430	470-590	7	1000	700
450	490-590	6	1000	700
470	510-590	5	1000	700
490	530-590	4	1000	800
510	550-590	3	1100	800
530	570-590	2	1100	900
550	590	1	1100	900
ExND	270-590	15	800	800
270-590	NDEm	15	800	800

Die Fluoreszenzmessungen erfolgten mit dem BioView Sensor automatisiert direkt im Kulturmedium (*in-situ*) und ohne den Stoffwechsel der betrachteten Organismen zu beeinträchtigen (*nicht-invasiv*). Der BioView Sensor ist dabei mit einem Flüssiglichtleiter direkt mit dem Bioreaktor verbunden (Abb. 3.1). Die Online-Messungen des Fluoreszenzlichts erfolgten immer nach dem „Open-end“-Prinzip (im Winkel von 180° zum Anregungslicht). Durch Anregung der Oberfläche vor dem Sensorkopf wirken sich Veränderungen in der Eindringtiefe des Anregungslichts und der „Inner-filter“-Effekt weniger stark aus.

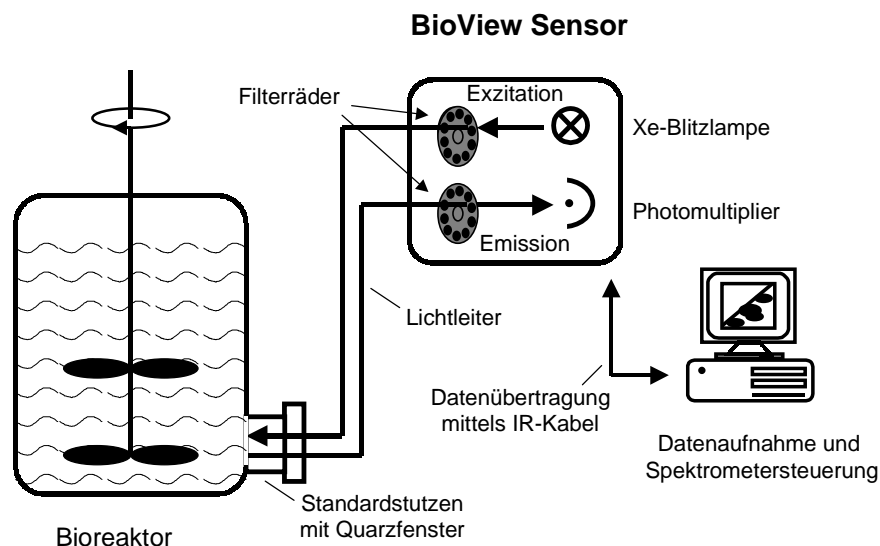


Abb. 3.1: Messaufbau für In-situ-Fluoreszenzmessungen mit dem BioView Sensor

3.2 Fluorosensor

Der Fluorosensor nutzt zur Exzitation das von einer Niederdruck-Quecksilberlampe gelieferte Licht mit hohem UV-Anteil, dass durch einen Filter mit enger Bandbreite auf ein Maximum bei

360 nm eingegrenzt wird. Das Fluoreszenzlicht passiert einen Filter mit einem Durchlassbereich von 440-460 nm, bevor es auf den Photomultiplier trifft. Der Fluorosensor ist auf den Fluoreszenzbereich des NAD(P)H beschränkt. Im Gerät werden Quarzlichtwellenleiter verwendet. Die Fluoreszenzsignale werden mit dem Photomultiplier verstärkt, und die Datenaufnahme erfolgt nach Umwandlung in einem Analog/Digital-Wandler (A/D-Wandler) über das Prozessleitsystem. Der Sensorkopf, der die gesamte Optik enthält, wurde direkt im 19 mm Standardstutzen des Bioreaktors befestigt [LINDEMANN, 1994]. Der im Sensorkopf integrierte kurze Lichtleiter minimiert Kosten und Transmissionsverluste.

3.3 Multivariate Datenauswertung

Für die multivariate Datenauswertung wurde die Auswertesoftware Unscrambler 7.5 (CAMO ASA, Norwegen) verwendet. Als multivariates Auswerteverfahren wurden die Hauptkomponentenanalyse und die PLS-Regression zur Auswertung der Prozessdaten genutzt.

Für die Hauptkomponentenanalyse wurden die Fluoreszenzdaten in einer Datenmatrix (X-Matrix, analog Abb. 2.1) angeordnet. Die PCA wurde mit der Unscrambler-Software durchgeführt und erfolgte immer mit einer internen Kreuzvalidierung. Dabei wurden die Fluoreszenzdaten aller Wellenlängenkombinationen nicht zwischen Null und Eins normiert. Für die PLS-Regression werden die Fluoreszenzdaten als Vorhersagevariablen (X-Matrix) und die Offline-Größen als abhängige Antwortgrößen (Y-Daten) verwendet. Die Varianz der Fluoreszenzdaten wurde skaliert. Die PLS-Regression wurde mit der Unscrambler-Software durchgeführt und erfolgte ebenfalls immer mit einer internen Kreuzvalidierung. Der Regressionskoeffizient sowie der Schätz- und der Vorhersagefehler werden automatisch nach jeder Berechnung angegeben.

3.4 Berechnung von Größen zur Beurteilung der Regression

Der Vorhersagefehler bei der PLS-Regression errechnet sich aus dem PLS-Modellfehler, der Differenz zwischen berechneten und offline gemessenen Prozessgrößen. Die Berechnung eines PLS-Modells kann vereinfacht dargestellt werden als:

$$X_{cal} + Y_{cal} \Rightarrow PLS\text{-Modell} \quad (9)$$

Wobei X_{cal} die X-Matrix (2D-Fluoreszenzspektren) und Y_{cal} die Y-Daten (z.B. Offline-Daten) sind, die zur Berechnung des PLS-Modells genutzt werden. Zur ersten Überprüfung des PLS-Modells werden die theoretischen Werte (Schätzwerte) durch Verwendung des berechneten PLS-Modells für die Y-Daten aus der X-Matrix bestimmt:

$$X_{cal} + PLS\text{-Modell} \Rightarrow \hat{Y}_{cal} \quad (10)$$

Wobei \hat{Y}_{cal} die theoretischen Werte sind, die zu den entsprechenden Y-Daten gehören. Der Modellfehler berechnet sich aus der Differenz zwischen den theoretischen Werten und offline gemessenen Prozessgröße:

$$Y_{cal} - \hat{Y}_{cal} = \text{Modellfehler} \quad (11)$$

Die Summe aller quadratischen Abweichungen, gemittelt durch die Anzahl n der Y-Daten ergibt die Stichprobenvarianz var :

$$var = \frac{\sum (\hat{Y}_{cal} - Y_{cal})^2}{n} \quad (12)$$

Der *RMSEC* (root means square error of calibration) einer Schätzung wird aus der Wurzel der Stichprobenvarianz berechnet:

$$RMSEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{Y}_{i, cal} - Y_{i, cal})^2}{n}} \quad (13)$$

Die berechneten PLS-Modelle werden bei vergleichbaren Bioprozessen zur Validierung eingesetzt und zur Vorhersage von Prozessgrößen genutzt. Der *RMSEP* (root means square error of prediction) einer Validierung berechnet sich aus der Wurzel der Stichprobenvarianz der vorhergesagten und offline gemessenen Werten:

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{Y}_{i, val} - Y_{i, val})^2}{n}} \quad (14)$$

Wobei $\hat{Y}_{i, val}$ die vorhergesagten und $Y_{i, val}$ die offline gemessenen Größen einer Validierungskultivierung sind. Das PLS-Modell wurde dabei nicht aus den Offline-Größen $Y_{i, val}$ berechnet. Eng verknüpft mit der *RMSEP* einer Vorhersage sind die zwei statistischen Angaben *Bias* (engl., Neigung) und *SEP* (standard error of prediction). Die Angabe *Bias* wird gewöhnlich genutzt, um die Genauigkeit der Modellvorhersage anzugeben. Wenn kein systematischer Unterschied zwischen den mittleren Werten der gemessenen und vorhergesagten Prozessgrößen besteht, geht *Bias* gegen Null.

$$Bias = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{Y}_{i, val} - Y_{i, val})}{n} \quad (15)$$

SEP (standard error of prediction) gibt die Vorhersagegenauigkeit über mehrere Spektren korrigiert durch *Bias* an:

$$SEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{Y}_{i, val} - Y_{i, val} - Bias)^2}{n-1}} \quad (16)$$

Die Beziehung zwischen $RMSEP$, SEP und $Bias$ kann näherungsweise wie folgt dargestellt werden:

$$RMSEP^2 \approx SEP^2 + Bias^2 \quad (17)$$

Bei hinreichend genauen PLS-Modellen geht $Bias$ gegen Null und $RMSEP \approx SEP$. Bei einem sehr hohen $RMSEP$ ist entweder das Modell sehr unspezifisch oder die Validierungsdaten beinhalten einen sehr großen systematischen Fehler. In diesem Fall nimmt $Bias$ große Werte an.

3.5 Induktion von synchronem Hefewachstum

Experimente zu synchronem Wachstum von *Saccharomyces cerevisiae* wurden in einem 1,5 L Stahlfermenter durchgeführt. Die Induktion von synchronem Wachstum erfolgte am Ende einer Hefe-Batch-Kultivierung nach einer halbstündigen Phase, in der den Zellen keine Kohlenstoffquelle zur Verfügung gestellt wurde. Dabei wurde die kontinuierliche Zufütterung zuerst mit der Verdünnungsrate $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$ gestartet. Nach zwei bis drei Stunden erfolgte eine Erhöhung der Verdünnungsrate auf zunächst $D = 0,07 \text{ h}^{-1}$. Nach weiteren drei bis vier Stunden wurde die Verdünnungsrate auf den gewünschten Wert erhöht (z.B. $D = 0,13 \text{ h}^{-1}$). Dies führte automatisch zu einem synchronen Wachstum der Hefe-Kultur, wie in Abbildung 3.2 zu erkennen ist. Stabile Oszillationen wurden bei Verwendung eines 3% Glucosemediums nur bei Verdünnungsraten von $0,10 \text{ h}^{-1}$ bis $0,16 \text{ h}^{-1}$ beobachtet.

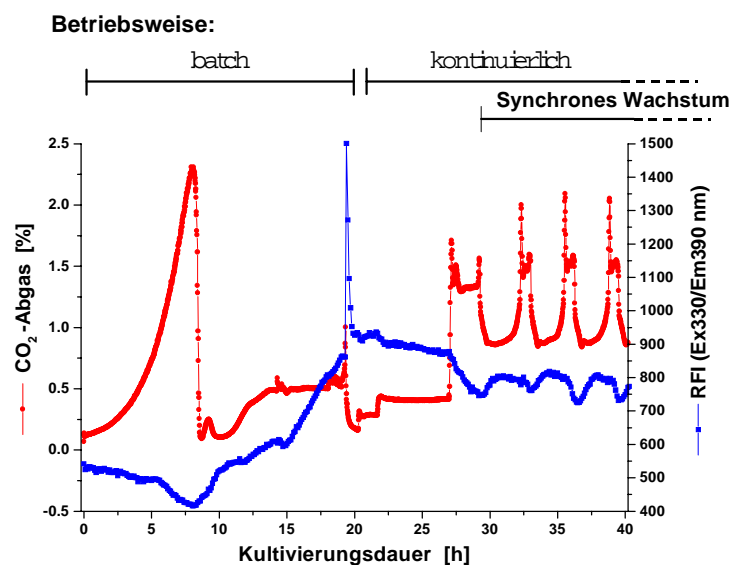


Abb.3.2: Verlauf der CO_2 -Konzentration im Abgas und der pyridoxinabhängigen RFI bei Ex330/Em390 nm beim Übergang von einer Batch- zu einer kontinuierlichen und synchron wachsenden Kultur von *S. cerevisiae*

3.6 Durchflusscytometrie

Die Durchflusscytometrie ist ein optisches Messsystem, das die Größe, die Größenverteilung und Morphologie sowie den DNA-Gehalt von Mikroorganismen simultan bestimmen kann. Die durchflusscytometrischen Messungen wurden mit dem Durchflusscytometer Coulter Epics XL (Coulter Corporation, USA) durchgeführt [RIESEBERG, 2000]. Für die Messungen werden Zellen mit Hochdruck in einen Hüllstrom aus Pufferlösung in eine Fließzelle gepresst und hydrodynamisch fokussiert. Dadurch passieren die Zellen in einer Kapillare einzeln einen fokussierten Laserstrahl. Streulicht und Fluoreszenzlicht werden von einem Photomultiplier detektiert.

Bei Routinemessungen werden bis zu 50.000 Zellen/Probe mit einer Geschwindigkeit von etwa 4.000 Zellen pro Sekunde erfasst. Durch eine selektive Anfärbung der Zellen mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen kann der DNA- bzw. RNA-Gehalt in den Zellen bestimmt werden. Für die Bestimmung des DNA-Gehalts werden Zellen aus Offline-Proben zuvor mit 70% Ethanol fixiert. Während einer Inkubationszeit von 12 Stunden entfernt zugesetzte RNase die für die Messung störende RNA. Die Zellmembran wird anschließend durch Tween 20-Lösung permeabilisiert, damit Fluoreszenzfarbstoffe in die Zelle eindringen können. Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoff SYTOX Green, der in wässriger Lösung mit allen Basen der DNA reagiert, wird die DNA der Zellen gefärbt. Die Verteilung des DNA-Gehalts in den einzelnen Zellen wird anschließend durchflusscytometrisch erfasst und in Histogrammen dargestellt. Die prozentuale Zusammensetzung der Zellzyklusphasen in einer Kultur kann mit Hilfe mathematischer Modelle bestimmt werden [RIESEBERG, 2000].

3.7 FIA-System zur Online-Glucosemessung

Zur Online-Glucosemessung bei Hefe-Fed-Batch-Kultivierungen wurde ein spezielles Fließinjektionsanalyse-System (FIA-System) verwendet, das eine Glucoseoxidase-Lösung (Fluka, Deutschland) (100.000 U/L) anstatt immobilisierter Enzyme nutzt. Mit Hilfe zweier Pumpen (ACCU FM40, SciLog, USA) wurde ein Trägerstrom mit einer Flussrate von 1,7 mL/min und die Kulturbrühe mit einer Flussrate von 1,0 mL/min direkt in das FIA-System befördert. Die Kulturbrühe (18 μ L) und die Glucoseoxidase (35 μ L) wurden nacheinander in den Trägerstrom injiziert und der Sauerstoffverbrauch mit einer Sauerstoffelektrode (ANASYSCON, Deutschland) gemessen. Als Referenz wurde der Sauerstoffverbrauch der Zellen im Trägerstrom gemessen, wenn keine Glucoseoxidase zugegeben wurde. Die Differenz gibt Aufschluss über die aktuelle Glucosekonzentration in der Kulturbrühe. Die Steuerung des FIA-Systems und die Messdatenerfassung wurden mit dem Automationssystem CAFCA (Computer Assisted Flow Control & Analysis) (ANASYSCON, Deutschland) durchgeführt. Mittels dieser Methode konnten Glucosekonzentrationen alle 60 Sekunden online während Hefe-Fed-Batch-Kultivierungen bestimmt werden [HITZMANN et al., 2000].

3.8 Glucose-Regelungssysteme

3.8.1 FIA-System

Über eine serielle Schnittstelle wurden die online gemessenen Glucosekonzentrationen des FIA-Systems (Kap. 3.7) zu einem weiteren Computer geschickt, auf dem Algorithmen eines erweiterten Kalman-Filters ausgeführt wurden. Mit Hilfe des erweiterten Kalman-Filters erfolgte eine Glättung der Glucosemessdaten sowie die Detektion von Datenausreißern. Das Kalman-Filter nutzte ein dynamisches Zustandsmodell nach Monod, in dem die Biotrockenmassekonzentration, die maximale Wachstumsrate (μ_{\max}), die Glucosekonzentration sowie das Reaktorvolumen als Zustandsvariablen dienen. Dazu wurden folgende Differenzialgleichungen mit Hilfe eines Runge-Kutta-Verfahrens 4. Ordnung numerisch gelöst:

$$\frac{\mu_{\max} S(t)}{K_m + S(t)} = \mu \quad (18)$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (19)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{\mu X}{Y} + \frac{\dot{V}(S_0 - S(t))}{V(t)} \quad (20)$$

$$\frac{dV}{dt} = \dot{V} \quad (21)$$

$$\frac{d\mu_{\max}}{dt} = 0 \quad (22)$$

mit $X(t)$ = Biotrockenmassekonzentration, $S(t)$ = Glucosekonzentration, $\mu_{\max}(t)$ = maximale spezifische Wachstumsrate, K_m als Monod-Parameter ($K_m = 0,05$ g/L), \dot{V} = Pumprate, Y = Ausbeutekoeffizient ($Y = 0,5$ g BTM/g Glucose), V = Reaktorvolumen und S_0 = Glucosekonzentration der Feedlösung (50g/L).

Die Pumprate wird modellbasiert sowie mit einem PI-Regler berechnet. Der Sollwert der Glucosekonzentration in der Kulturbrühe lag bei 0,04 g/L [HITZMANN et al., 2000].

3.8.2 Glucoseregulation basierend auf der 2D-Fluoreszenzspektroskopie

Die Abbildung 3.3 zeigt schematisch den Messaufbau während einer Fed-Batch-Kultivierung von *S. cerevisiae* zur Online-Glucoseregulation mittels 2D-Fluoreszenzspektroskopie. Dazu wurden alle 90 Sekunden 2D-Fluoreszenzspektren detektiert, aus denen mit Hilfe eines PLS-Modells (Kap. 7.5) ein metabolischer Faktor berechnet wurde. Beim Übergang vom oxidativen zum oxidoreduktiven Metabolismus steigt der Wert dieses metabolischen Faktors von Null auf Eins und zeigt damit den Beginn der Ethanolproduktion an. Überschreitet die Steigung des metabolischen Faktors einen aus Voruntersuchungen ermittelten Schwellwert, so deutet das auf

den Übergang zu dem unerwünschten oxidoreduktiven Metabolismus der Hefekultur hin. Die Pumpe für die Glucosezufuhr wird dann für eine Minute automatisch gestoppt. Anschließend startet die Zufütterung selbständig mit einer um 5% reduzierten Pumprate. Dazu wird die im dynamischen Zustandsmodell (Kap. 3.8.1) geschätzte Biomasse um 5% reduziert.

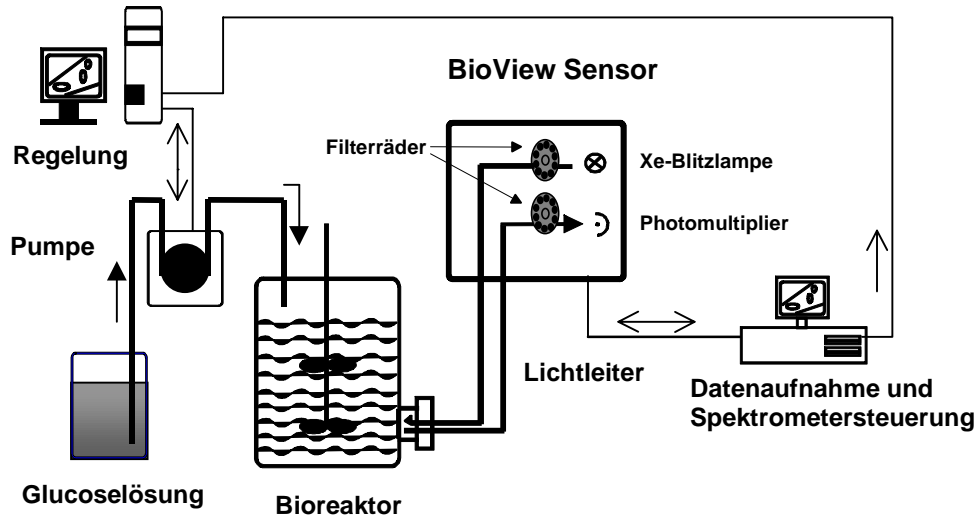


Abb. 3.3: Messaufbau für eine auf der 2D-Fluoreszenzspektroskopie basierende Glucoseregulung während einer Fed-Batch-Kultivierung von *S. cerevisiae*

3.9 Respiratorischer Quotient (RQ)

Das Verhältnis von Kohlendioxidbildungs- (CPR) und Sauerstoffaufnahme (OUR) wird als respiratorischer Quotient (RQ) bezeichnet.

$$\text{OUR} = \frac{f_E}{V_M \cdot V_R} \left\{ x_{\text{O}_2}^E - \frac{1 - x_{\text{O}_2}^E - x_{\text{CO}_2}^E}{1 - x_{\text{O}_2}^A - x_{\text{CO}_2}^A} \cdot x_{\text{O}_2}^A \right\} \quad (23)$$

$$\text{CPR} = \frac{f_E}{V_M \cdot V_R} \left\{ x_{\text{CO}_2}^A \cdot \frac{1 - x_{\text{O}_2}^E - x_{\text{CO}_2}^E}{1 - x_{\text{O}_2}^A - x_{\text{CO}_2}^A} - x_{\text{CO}_2}^E \right\} \quad (24)$$

$$\text{RQ} = \frac{\text{CPR}}{\text{OUR}} \quad (25)$$

Bezeichnet wurden mit	f_E :	Volumenstrom des eintretenden Gases [L/h]
	V_M :	Molvolumen des idealen Gases 22,41 L/mol
	V_R :	Arbeitsvolumen [L]
	$x_{\text{O}_2}^E$:	Molenbruch des Sauerstoffs im Gaseintritt
	$x_{\text{O}_2}^A$:	Molenbruch des Sauerstoffs im Gasaustritt
	$x_{\text{CO}_2}^E$:	Molenbruch des Kohlendioxids im Gaseintritt
	$x_{\text{CO}_2}^A$:	Molenbruch des Kohlendioxids im Gasaustritt

4 Überblick über die Experimente

In dieser Arbeit soll die Leistungsfähigkeit eines weiterentwickelten 2D-Fluoreszenzspektrometers (BioView Sensor) an vier praktischen Beispielen demonstriert werden: Batch-Kultivierungen mit *Saccharomyces cerevisiae*, synchron wachsenden *S. cerevisiae*-Kulturen im Chemostat, Fed-Batch-Kultivierungen mit *S. cerevisiae* und Hochzelldichte-Kultivierungen zur Produktion eines rekombinanten Proteins mit *Escherichia coli*.

- Batch-Kultivierung mit *Saccharomyces cerevisiae*:

Es wurden vier Batch-Kultivierungen (K-1 bis 4) durchgeführt. Die Kultivierungen K-1, K-2 und K-3 erfolgten unter identischen Kultivierungsbedingungen, die Kultivierung K-4 wurde bei einer höheren Rührerdrehzahl durchgeführt. Exemplarisch soll die Batch-Kultivierung K-1 genauer beschrieben und die Fluoreszenzdaten mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse interpretiert werden. Für die Vorhersage von Prozessgrößen sollen einfache Korrelationen zwischen Offline- und Fluoreszenzdaten gefunden sowie PLS-Modelle entwickelt werden. Deren Validierung soll bei den Batch-Kultivierungen K-2, K-3 und K-4 erfolgen und diskutiert werden.

- Chemostat-Kultivierungen mit *Saccharomyces cerevisiae*:

Synchrones Wachstum wurde bei drei Verdünnungsraten ($D = 0,13 \text{ h}^{-1}$, $D = 0,14 \text{ h}^{-1}$ und $D = 0,15 \text{ h}^{-1}$) untersucht. Die Fluoreszenzdaten der synchron wachsenden Kultur mit einer Verdünnungsrate von $D = 0,15 \text{ h}^{-1}$ sollen exemplarisch genauer beschrieben und mittels Hauptkomponentenanalyse interpretiert werden. Darüber hinaus sollen PLS-Modelle entwickelt werden, die eine Berechnung von Offline-Größen aus den Fluoreszenzdaten erlauben. Die Validierung der PLS-Modelle soll an der synchron wachsenden Kultur mit einer Verdünnungsrate von $D = 0,13 \text{ h}^{-1}$ diskutiert werden. Zur Vorhersage von durchfluscytometrischen Daten werden die Fluoreszenzdaten der synchron wachsenden Kultur mit einer Verdünnungsrate von $D = 0,14 \text{ h}^{-1}$ verwendet.

- Fed-Batch-Kultivierung mit *Saccharomyces cerevisiae*:

Es werden zwei Fed-Batch-Kultivierungen (F-1 und F-2) beschrieben. Bei Fed-Batch-Kultivierung F-1 wurde mit Hilfe eines speziellen Fließinjektionsanalyse-Systems (FIA-System) eine Online-Glucosemessung durchgeführt, um die Glucose auf einen Sollwert von $0,04 \text{ g/L}$ zu regeln. Aus den Fluoreszenzdaten soll ein PLS-Modell erstellt werden, das den metabolischen Zellzustand vorhersagen kann. Die Erkenntnisse der Voruntersuchungen sollen bei Fed-Batch-Kultivierung F-2 genutzt werden, um eine geregelte Glucose-Zufütterung mittels Online-Fluoreszenzmessungen zu erreichen.

- Hochzelldichte-Kultivierung mit *Escherichia coli*:

Es wurden zwei Hochzelldichte-Kultivierungen (HZDK) (E-1 und E-2) im 300 L Fermenter untersucht. Die Fluoreszenzdaten der HZDK E-1 sollen genauer ausgewertet und zur Entwicklung von PLS-Modellen genutzt werden. Die Validierung der PLS-Modelle soll an HZDK E-2 erfolgen und diskutiert werden. Für grundlegende Untersuchungen wurden im 30 L Fermenter zwei HZDK mit Induktion (E-3) und ohne Induktion (E-4) der Proteinexpression durchgeführt.

5 Batch-Kultivierungen von *Saccharomyces cerevisiae*

5.1 Ziele der Batch-Kultivierungsexperimente

Exemplarisch soll die Batch-Kultivierung K-1 mit Hilfe offline und online gemessener Prozessgrößen sowie der aufgenommenen Fluoreszenzdaten genau beschrieben werden. Darüber hinaus sollen einfache Korrelationen zwischen verschiedenen Verläufen der skalierten Fluoreszenzintensitäten (SFI) und dem Konzentrationsverlauf der Biotrockenmasse (BTM) erstellt werden. Die ermittelten Korrelationsgleichungen sollen zur Schätzung der BTM-Konzentration aus den Fluoreszenzdaten von Batch-Kultivierung K-1 genutzt werden. Eine Validierung der Korrelationsgleichungen soll durch Vorhersage der BTM-Konzentrationen bei den Batch-Kultivierungen K-2, K-3 und K-4 erfolgen.

Mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse sollen die Fluoreszenzdaten der Batch-Kultivierung K-1 vor allem in den Score-Darstellungen und Loading-Spektren (Kap. 2.3.1) genauer analysiert und mit Batch-Kultivierungen K-3 verglichen werden. Des Weiteren sollen mit den 2D-Fluoreszenzspektren und verschiedenen Offline-Größen (z.B. BTM-, Glucose-, und Ethanolkonzentration) von Batch-Kultivierung K-1 PLS-Regressionsmodelle erstellt werden, die eine präzise Schätzung dieser Offline-Größen aus jedem 2D-Fluoreszenzspektrum erlauben. Die Validierung dieser PLS-Regressionsmodelle soll ebenfalls mit den Prozessdaten der Batch-Kultivierungen K-2, K-3 und K-4 erfolgen und diskutiert werden.

5.2 Kultivierungsbedingungen der Batch-Kultivierungen

Die Kultivierungsbedingungen für die vier *Saccharomyces cerevisiae*-Batch-Kultivierungen, die für grundlegende Untersuchungen durchgeführt wurden, sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst.

Zum Beimpfen der Batch-Kultivierungen wurden jeweils 50 mL Vorkultur (siehe Anhang) verwendet, die $18,5 \pm 0,5$ h in einem 300 mL Schüttelkolben mit Schikanen bei 30°C und 120 UpM kultiviert wurden.

Für die Online-Detektion der NAD(P)H-abhängigen Kulturfluoreszenz wurde zusätzlich der Fluorosensor (Kap. 3.2) eingesetzt.

Tab. 5.1: Kultivierungsbedingungen

Batch-Kultivierung	K-1, K-2,	K-3	K-4
Organismus	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> H620		
Betriebsweise	Batch		
Kultivierungsanlage	Biostat B System (B. Braun Biotech International, Melsungen)		
Fermenter	1,5 L Stahlfermenter (Werkstatt TCI)		
Arbeitsvolumen	1,5 L		
Messdatenerfassung	RISP-System (Real Time Integration Software Platform, TCI)		
Medium (Kap. 11.3)	Schatzmann-Medium mit 30 g/L Glucose [SCHATZMANN, 1975]		
Temperatur	30 ± 0,05°C		
pH	5,0 ± 0,04		
Rührerdrehzahl	800± 1 UpM	800± 1 UpM	1000± 1 UpM
Begasungsrate	1,5 vvm (2,25 L/min) mit Druckluft		
Regelung des pH-Wertes	4% HCl und 10% NaOH		
Antischaummittel	Wacker-Silikon (Wacker Chemie GmbH, München) Konzentration 1:5000 (300 µL/1,5 L)		
Abgasanalytik	EGAS 2 (Hartmann & Braun, Frankfurt a. M.)		
Aufnahmeintervall des BioView Sensors	6 min	3 min	3 min

5.3 Grundlegende Einteilung des Batch-Kultivierungsverlaufes in Prozessphasen

Beim Einsatz von Glucose als einziger C-Quelle zeigt das Zellwachstum von *S. cerevisiae* ein Zweiphasen-Wachstum (Diauxie). In der ersten Wachstumsphase wird Glucose oxidoreduktiv verbraucht und zu Biomasse und Ethanol umgewandelt. Die zweite Phase ist überwiegend durch einen oxidativen Stoffwechsel und Verbrauch des zuvor gebildeten Ethanols gekennzeichnet [FRANCO et al., 1984]. Verschiedene Metabolite (Acetat, Pyruvat) werden darüber hinaus während der Batch-Kultivierung gebildet und wieder verbraucht. Durch fortlaufende Bildung und Verbrauch dieser Metabolite wird die chemische Zellumgebung permanent verändert. Die Konzentrationsänderungen der Edukte und Metabolite wirken sich direkt auf die biologische Aktivität und den Stoffwechsel der Zellen aus. Dies führt im Prozessverlauf zu mehreren Wachstumsphasen der Hefezellen.

Im folgenden werden sieben Prozessphasen beschrieben, die LOCHER et.al. (1993) für den Verlauf von *S. cerevisiae*-Batch-Kultivierungen vorgeschlagen hat. Zu dieser Einteilung wird keine klassische Lag-Phase nach dem Beimpfen gezählt. LOCHER et.al. (1993) nehmen an, dass die geringen Veränderungen in dieser sogenannten Lag-Phase keine biologischen Ursachen

haben und nur deshalb beobachtet werden, weil die verwendeten Messinstrumente eine unzureichende Sensitivität aufweisen. In Abbildung 5.1 ist der CO₂-Abgasverlauf einer typischen *S. cerevisiae*-Batch-Kultivierungen zu erkennen. Dieser ist in sieben Prozessphasen eingeteilt worden [LOCHER et al., 1993]. Die Prozessphasen werden wie folgt charakterisiert:

- Die erste Prozessphase ist durch eine große Aktivität und ein exponentielles Wachstum der Zellen geprägt. Ohne Limitierung oder Inhibierung wird die Glucose schnell oxidoreduktiv verbraucht. Aufgrund der begrenzten respiratorischen Kapazität nutzen die Zellen verschiedene metabolische Stoffwechselwege [SONNLEITNER und KÄPPELI, 1986]. Dies führt zur Bildung verschiedener Sekundärmetabolite, wie z.B. Ethanol, Acetat, Glycerol und in geringeren Konzentrationen Propionsäure und Pyruvat.
- In der zweiten Prozessphase ist das Wachstum der Hefezellen nicht mehr exponentiell. Dies wird beispielsweise an der linearen Zunahme des CO₂-Abgasgehaltes erkennbar. Diese Beobachtung wird jedoch nicht gemacht, wenn dem Kulturmedium Hefeextrakt zugegeben wird. Im synthetischen Medium fehlt den Hefezellen offensichtlich ein bestimmtes Substrat. Das Ersetzen dieses Substrat durch die Zellen ist in dieser Phase der limitierende Faktor [LOCHER et al., 1993].
- Zu Beginn der dritten Bioprozessphase ist Glucose vollständig verbraucht. Der CO₂-Gehalt im Abgas fällt von einem Maximum stark ab. Die Hefezellen stellen ihren Stoffwechsel um und beginnen nun akkumuliertes Pyruvat zu verbrauchen, erkennbar an einem kurzzeitigen Anstieg im CO₂-Abgasverlauf.
- Die vierte Phase ist vor allem gekennzeichnet durch den Verbrauch von Acetat. In geringerem Maße werden auch Ethanol und Glycerol verstoffwechselt. Der Übergang in die fünfte Prozessphase ist durch eine kurzfristige Abnahme der CO₂-Konzentration im Abgas erkennbar.
- In der fünften Prozessphase ist Acetat weitgehend verbraucht. Die Zellen verstoffwechseln Ethanol und Glycerol oxidativ. Eine Unterteilung der fünften und sechsten Phase erfolgt vor allem aufgrund eines kurzen schwachen Anstiegs im CO₂-Abgasverlauf.
- In der sechsten Phase wird Ethanol und Glycerol als wichtigste C-Quelle genutzt. Gleichzeitig reichert sich wieder Acetat in der Fermentationsbrühe an. Dies steht offensichtlich im Widerspruch zur vierten Prozessphase, in der Acetat dem Ethanol bevorzugt verbraucht wird.

Dieser scheinbare Widerspruch kann durch eine verminderte respiratorische Kapazität der Hefezellen, verursacht durch hohe Ethanolkonzentrationen, erklärt werden. Je höher die Ethanolkonzentration in der Fermentationsbrühe, um so geringer wird die Nutzungskapazität der Zellen gegenüber höher reduzierten Kohlenstoffquellen, wie etwa Ethanol. Nimmt die Ethanolkonzentration zum Prozessende hin ab, so erhöht sich die respiratorische Kapazität der Hefezellen und erlaubt zunehmend die effektivere oxidative Phosphorylierung [LOCHER et al., 1993]. Dies erklärt, warum Acetat als höher oxidierte Kohlenstoffquelle während der

vierten Prozessphase von den Zellen bevorzugt verbraucht wird und sich in der sechsten Prozessphase wieder als Nebenprodukt während des oxidativen Ethanolabbaus anreichert.

- Die siebte Prozessphase ist charakterisiert durch eine drastische Stoffwechseländerung nachdem Ethanol und Glycerol vollständig verbraucht sind. Acetat und verbleibende restliche organische Säuren werden als letzte C-Quellen verbraucht. Dabei steigt die CO₂-Konzentration im Abgas kurzfristig an bevor sie auf ein niedriges Niveau steil abfällt. Die Zellen gehen anschließend in einen stationären Zustand über, in dem nur noch lebenserhaltende Stoffwechselfunktionen der Zellen aufrecht erhalten werden.

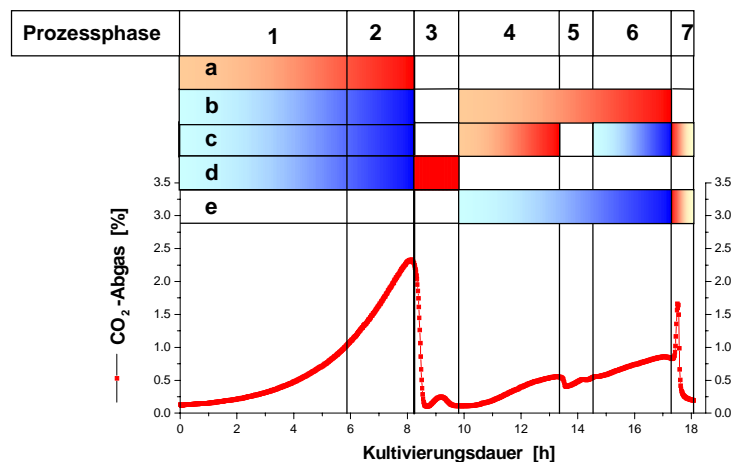


Abb. 5.1: Verlauf der CO₂-Konzentration im Abgas während einer typischen Batch-Kultivierung von *S. cerevisiae*. Die Einteilung in sieben Prozessphasen erfolgt nach metabolischen Zuständen, die während des Prozesses von den Hefezellen durchlaufen werden. Die Zellzustände sind gekennzeichnet durch Verbrauch (rot) von Substrat und Bildung (blau) sowie Verbrauch verschiedener Metabolite. **a:** Glucose, **b:** Ethanol und Glycerol, **c:** Acetat und Propionsäure, **d:** Pyruvat, **e:** organische Säuren [LOCHER et al., 1993]

Die verschiedenen biologischen Zustände der Hefezellen, die während des Kultivierungsprozesses durchlaufen werden, sind vor allem abhängig von der Anwesenheit und Konzentration verschiedener Metabolite. Zwischen der Hefezelle und der chemischen und physikalischen Zellumgebung ist eine direkte Wechselbeziehungen vorhanden, von der die Zellaktivität und der metabolische Zellzustand abhängig sind.

5.4 Beschreibung der *S. cerevisiae*-Batch-Kultivierung K-1

Die Batch-Kultivierung K-1 ist in sieben Prozessphasen eingeteilt worden, wie in Abbildung 5.2 zu sehen ist. Die Einteilung der Prozessphasen wurde vor allem anhand signifikanter Veränderungen im Abgas-CO₂-Verlauf vorgenommen, analog den Beschreibungen in Kapitel 5.3. Die Verläufe der online und offline gemessenen Prozessgrößen der Batch-Kultivierung K-1 werden im folgenden genauer beschrieben.

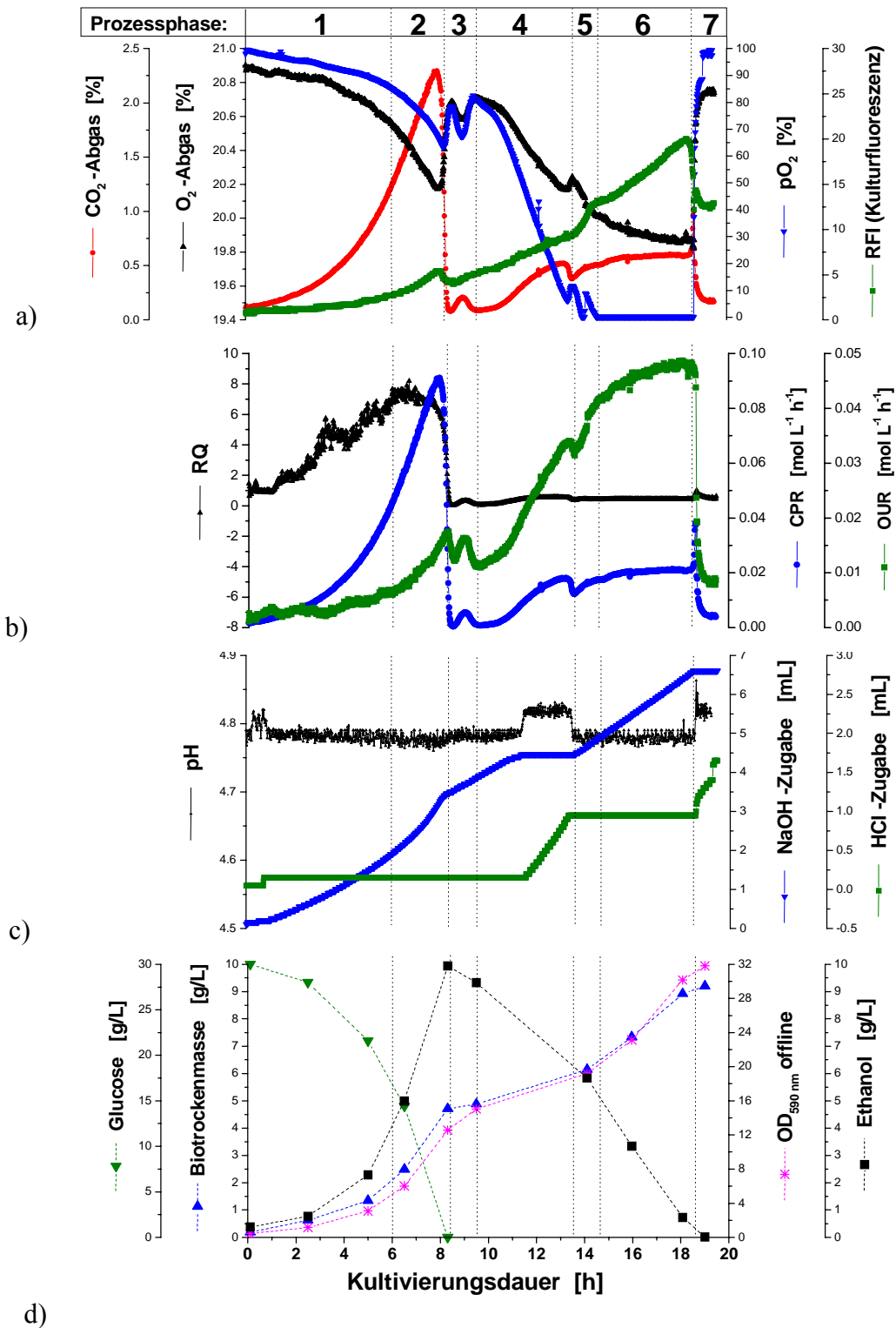


Abb. 5.2: Verlauf der online und offline gemessenen Prozessgrößen der *S. cerevisiae*-Batch-Kultivierung K-1 und Einteilung in Prozessphasen

- CO₂- und O₂-Gehalt im Abgas, Gelöstsauerstoffgehalt, Kulturfluoreszenz
- CO₂-Produktionsrate (CPR) und Sauerstoffverbrauchsrate (OUR), respiratorischer Quotient (RQ)
- pH-Wert, NaOH- und HCl-Zugabe
- Glucose-, Ethanol- und Biotrockenmassekonzentration sowie OD-offline

- In der ersten und zweiten Prozessphase (0 h – 8,4 h) nimmt bei Batch-Kultivierung K-1 der Abgas-CO₂-Gehalt exponentiell zu. Auch andere Prozessgrößen, wie die CO₂-Produktionsrate (CPR), die Sauerstoffaufnahme (OUR), die Kulturfluoreszenz, die NaOH-Zugabe, die OD-offline sowie die Biotrockenmasse- (BTM) und Ethanolkonzentration zeigen eine exponentielle Zunahme (Abb. 5.2). Gegenläufig dazu sind die Verläufe des gelösten Sauerstoffgehaltes (pO₂) im Medium und der O₂-Abgasgehalt. Eine Limitierung des Zellwachstums in der zweiten Prozessphase ist aus diesen Prozessgrößen nicht erkennbar. Lediglich der RQ-Wert, der zunächst kontinuierlich zunimmt, zeigt nach ungefähr 6 h eine langsame Abnahme.
- Nach 8,4 h ist die Glucose vollständig verbraucht, die maximale Ethanolkonzentration beträgt ca. 9,9 g/L. Der CO₂-Gehalt im Abgas, sowie CPR, OUR und die Kulturfluoreszenz fallen von einem Maximum stark ab. Der RQ fällt gleichzeitig unter eins ab, was auf eine Änderung des Zellstoffwechsels von oxidoreduktiv zu oxidativ hinweist. Der kurzfristige Anstieg im CO₂-Gehalt, CPR und OUR zwischen 8,4 h und 9,5 h deuten auf die Verstoffwechslung von Pyruvat hin. Die NaOH-Zugabe verlangsamt sich in dieser Phase deutlich (Abb. 5.2c).
- In der vierten Prozessphase (9,5 h – 13,5 h) wird neben Ethanol vor allem Acetat verbraucht. Dies ist bei Batch-Kultivierung K-1 besonders gut an der Säure-Zugabe zwischen 11,5 h – 13,5 h zu erkennen (Abb. 5.2c). Die NaOH-Zugabe zwischen 9,5 h – 11,5 h deutet darauf hin, dass wahrscheinlich zu Beginn dieser Phase noch kein Acetat verbraucht wird, sondern andere Metabolite (z.B. Ethanol). Eine Unterteilung der vierten Prozessphase wäre demnach sinnvoll. Die CPR und besonders die OUR nehmen in der vierten Prozessphase wieder zu. Der pO₂-Gehalt nimmt dagegen sehr stark von 80% (9,5 h) auf unter 10% (13,5 h) ab. Die BTM-Konzentration und OD steigen nur relativ gering an. Am Ende dieser Phase fällt der CO₂-Gehalt, CPR und OUR (13,5 h) kurzzeitig ab. Acetat ist nun weitgehend verbraucht.
- Zu Beginn der fünften Prozessphase nimmt vor allem die OUR stark zu. Es erfolgt wieder eine NaOH-Zugabe. Ein signifikanter Anstieg ist in der Kulturfluoreszenz zwischen 13,5 h – 14,5 h zu erkennen (Abb. 5.2a). Am Ende der fünften Prozessphase ist in der Kulturfluoreszenz ein Plateau erkennbar.
- In der sechsten Prozessphase (14,5 h – 18,4 h) nehmen die BTM-Konzentration und die OD-offline wieder deutlich zu. Mit Beginn einer limitierten Sauerstoffversorgung (pO₂ = 0%) nach 15 h wird die RFI-Zunahme der Kulturfluoreszenz wieder größer, da sich das Gleichgewicht zwischen NAD(P)H / NAD(P)⁺ aufgrund des begrenzten Sauerstoffangebotes zur reduzierten und fluoreszierenden Form NAD(P)H verschiebt. Der CO₂-Gehalt, die CPR und die OUR gehen aufgrund des begrenzten Sauerstoffangebots gegen einen Sättigungswert.
- Zu Beginn der siebten Prozessphase nach 18,4 h ist EtOH vollständig verbraucht. Die CO₂-Konzentration im Abgas steigt daraufhin kurzfristig steil an. Anschließend fallen der CO₂-Gehalt im Abgas, die CPR und die OUR sowie die Kulturfluoreszenz auf ein niedriges Niveau steil ab. Die Säure-Zugabe zeigt den Verbrauch restlicher Säuren durch die Zellen an. Die Hefezellen gehen in den Erhaltungsstoffwechsel über.

5.5 Bioprozessbeobachtung mittels 2D-Fluoreszenzspektroskopie

5.5.1 2D-Fluoreszenzdifferenzspektren

Die Abbildung 5.3 zeigt ein 2D-Fluoreszenzspektrum von der *S. cerevisiae*-Batch-Kultivierung K-1 nach 18,0 h. In dem Spektrum sind verschiedene Fluoreszenzbereiche eingezeichnet, in denen sich die relative Fluoreszenzintensität während des Prozessverlaufes signifikant verändert hat. Den ausgewählten Fluoreszenzbereichen können verschiedene biogene Fluorophore zugeordnet werden, die in diesen Bereichen des 2D-Fluoreszenzspektrums fluoreszieren. In Tabelle 5.2 sind die Wellenlängenkombinationen aus den gekennzeichneten Bereichen, die zugeordneten biogenen Fluorophore und die Bezeichnung dieser Fluoreszenzbereiche aufgelistet.

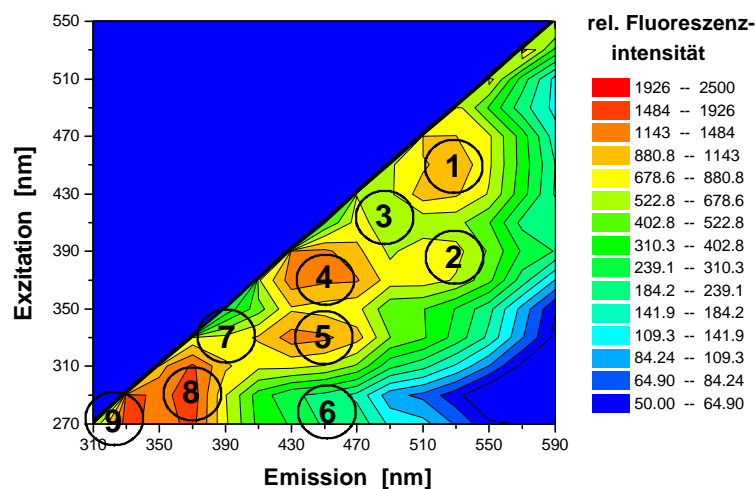


Abb. 5.3: 2D-Fluoreszenzspektrum nach 18,0 h von der *S. cerevisiae*-Batch-Kultivierung K-1 und Lage verschiedener Fluoreszenzbereiche

Tab. 5.2: Bezeichnung und Lage von ausgewählten Fluoreszenzbereiche

Fluoreszenzbereich	RFI-Peak Ex / Em [nm]	zugeordnete biogene Fluorophore	Literaturwert * Ex / Em [nm]	Bezeichnung der Fluoreszenz- bereiche
1	450/530	Riboflavin, FMN, FAD	450/530	Flavin-1
2	370/530	Riboflavin	365/520	Flavin-2
3	410/470	-	-	Pyridoxalphosphat
4	370/450	NAD(P)H	340/460	NAD(P)H-1
5	330/450	-	-	NAD(P)H-2
6	270/450	NAD(P)H	260/460	NAD(P)H-3
7	330/390	Pyridoxin	320/390	Pyridoxin
8	290/370	Tryptophan	290/350	Tryptophan
9	270/310	Tyrosin	280/300	Tyrosin

*[SCHULMANN, 1985]

In der Literatur wird das Fluoreszenzmaximum von NAD(P)H bei Ex340/Em460 nm angegeben [SCHULMANN, 1985]. Da im 2D-Fluoreszenzspektrum (Abb. 5.3) zwei Fluoreszenzmaxima zu beobachten sind, und zwar bei höherer (Ex370/Em450 nm) und niedrigerer Anregungswellenlängen (Ex330/Em450 nm), wurde der NAD(P)H-Bereich in NAD(P)H-1 und NAD(P)H-2 unterteilt. Bei Ex260/Em460 nm hat NAD(P)H ein zweites Fluoreszenzmaximum [SCHULMANN, 1985]. Der Fluoreszenzbereich Ex270/Em450 nm wird daher als NAD(P)H-3 bezeichnet. Die tyrosin- und tryptophanabhängigen RFI-Bereiche werden oftmals auch als Proteinbereich zusammengefasst. Konzentrationsänderungen der biogenen Fluorophore können mittels Fluoreszenzmessungen detektiert werden. Die ausgewählten Fluoreszenzbereiche entsprechen dabei den Fluoreszenzdaten der angegebenen Substanzen. Es ist jedoch generell nicht möglich von den Fluoreszenzdaten allein auf diese Komponenten zurück zu schließen, da die Fluoreszenzen von verschiedenen Faktoren beeinflusst werden (Kap. 2.2).

Zur fluoreszenzspektroskopischen Charakterisierung der sieben Prozessphasen von der Batch-Kultivierung K-1 werden 2D-Fluoreszenzdifferenzspektren genutzt. Die Abbildung 5.4 zeigt in den 2D-Fluoreszenzdifferenzspektren die RFI-Veränderungen in einem Zeitintervall von einer Stunde während des Durchlaufens der sieben Prozessphasen. Alle Differenzspektren sind gleich skaliert mit Ausnahme des Spektrums aus der siebten Prozessphase (Abb. 5.4g), da die RFI-Veränderungen am Prozessende sehr groß sind.

Im Differenzspektrum aus der ersten Prozessphase (Abb. 5.4a) ist ein intensiver RFI-Anstieg im Fluoreszenzbereich Tyrosin und Tryptophan (Proteinbereich) zu erkennen. Dies ist vor allem durch die exponentielle Zunahme der Biomasse in der ersten Phase zu erklären. Die RFI in den Bereichen Flavin, Pyridoxalphosphat und NAD(P)H nehmen ebenfalls zu. Im Fluoreszenzbereich Pyridoxin nimmt die RFI in dieser Prozessphase deutlich ab. Dies könnte auf einen Verbrauch von Vitamin B₆ hindeuten, das in diesem Bereich fluoresziert. Im Differenzspektrum der zweiten Prozessphase (Abb. 5.4b) sind die RFI-Zunahmen in den genannten Bereichen wesentlich größer. Im Pyridoxinbereich nimmt die RFI dagegen weniger stark ab.

Beim Übergang von der zweiten in die dritte Prozessphase nach 8,4 h (Abb. 5.4c) nehmen die RFI in den Bereichen NAD(P)H-1, NAD(P)H-2 und NAD(P)H-3 stark ab und im Fluoreszenzbereich Flavin-1 stark zu. Hier wird die Stoffwechselumstellung der Zellen nach dem Glucoseverbrauch deutlich sichtbar. Die RFI in den Fluoreszenzbereichen Tyrosin und Tryptophan nehmen auch in dieser Phase weiter zu.

Im Differenzspektrum der vierten Prozessphase (Abb. 5.4d) sind die RFI-Zunahmen deutlich geringer. Auch in den anderen Bereichen sind mit Ausnahme von NAD(P)H-1 nur geringe RFI-Veränderungen zu erkennen. Die fünfte Prozessphase ist vor allem durch einen sehr starken RFI-Anstieg in den Fluoreszenzbereichen NAD(P)H-1, NAD(P)H-2 und Flavin-2 gekennzeichnet. In den Bereichen Flavin-1, Pyridoxalphosphat und Pyridoxin ist im Gegensatz zur vierten Prozessphase (Abb. 5.4e) wieder ein Anstieg der RFI zu beobachten.

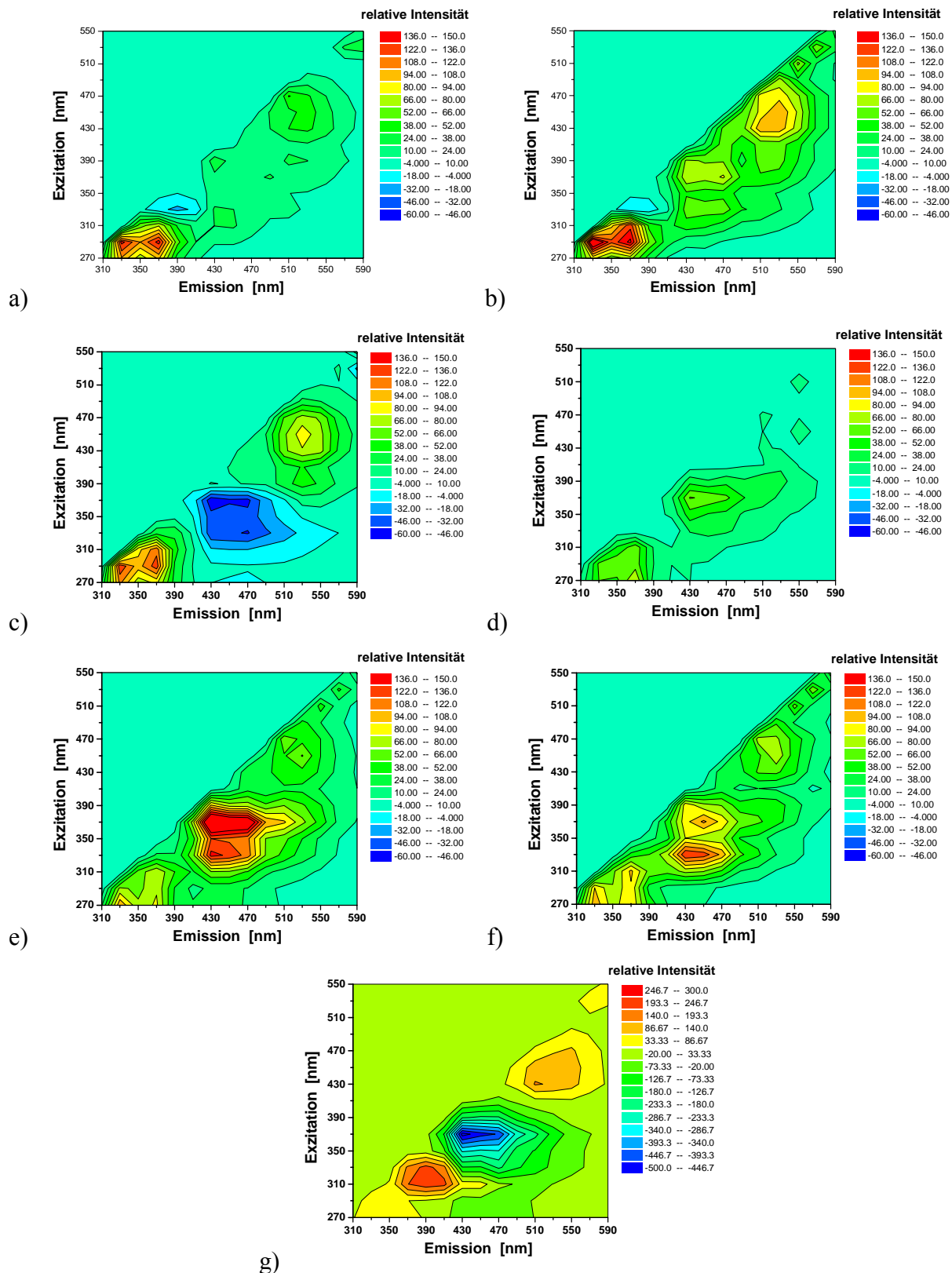


Abb. 5.4: 2D-Fluoreszenzdifferenzspektren aus den verschiedenen Prozessphasen während der Batch-Kultivierung K-1 von *Saccharomyces cerevisiae*:

a) erste Phase	5,5 h-4,5 h,	e) fünfte Phase	14,5 h-13,5 h,
b) zweite Phase	7,5 h-6,5 h,	f) sechste Phase	17,0 h-16,0 h,
c) dritte Phase	9,0 h-8,0 h,	g) siebte Phase	19,0 h-18,0 h
d) vierte Phase	12,0 h-11,0 h,		

Die sechste Prozessphase ist vor allem durch den oxidativen Ethanolverbrauch und eine große BTM-Zunahme sowie durch einen limitierten Gelöstsauerstoffgehalt (Abb. 5.2a) geprägt. In dieser Phase nehmen die RFI in allen Fluoreszenzbereichen stark zu. Im Fluoreszenzbereich NAD(P)H-2 ist der größte RFI-Anstieg zu erkennen (Abb. 5.4f).

Am Kultivierungsende nimmt die RFI im Fluoreszenzbereich NAD(P)H-1 sehr stark ab. In den Bereichen Flavin-1 und Pyridoxin dagegen ist eine RFI-Zunahme erkennbar, wie in Abb. 5.4g zu sehen ist. Das Gleichgewicht $FAD^{2+}/FADH_2$ verschiebt sich am Prozessende aufgrund der unterbrochenen Reduktion zu Gunsten der oxidierten Form. Die oxidierte und fluoreszierende Form FAD^{2+} reichert sich an und die RFI im flavinabhängigen Bereich nimmt daher zu. Die Zellen verringern bedingt durch den Nährstoffmangel ihre Stoffwechselaktivität und stellen ihren Stoffwechsel auf Erhaltungsstoffwechsel um.

Die RFI-Veränderungen in den Fluoreszenzbereichen NAD(P)H-1 und NAD(P)H-2 zeigen während der Kultivierung unabhängige Veränderungen. Während der vierten Prozessphase, in der vorwiegend Acetat verbraucht wird, ist eine RFI-Zunahme hauptsächlich im Bereich NAD(P)H-1 zu erkennen (Abb. 5.4d). Dagegen ist während der sechsten Prozessphase, in der vorwiegend Ethanol oxidativ abgebaut wird, die größte RFI-Zunahme im Bereich NAD(P)H-2 zu sehen (Abb. 5.4f). Es handelt sich offensichtlich um zwei unabhängige Fluoreszenzbereiche, die eine Unterteilung des NAD(P)H-Bereiches sinnvoll machen. Die Fluoreszenzbereiche NAD(P)H-1 und der NAD(P)H-2 enthalten bei *Saccharomyces cerevisiae* offensichtlich unterschiedliche Informationen. Ähnlichkeiten in den RFI-Verläufen resultieren wahrscheinlich von Überlagerungen der Fluoreszenzen. In den Fluoreszenzdifferenzspektren sind in allen Prozessphasen signifikante Veränderungen in den RFI zu erkennen, die charakteristisch für den Prozessverlauf sind. Mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie ist eine genaue Einteilung des Kultivierungsverlaufes in verschiedene Prozessphasen möglich.

Für einen Vergleich der 2D-Fluoreszenzspektren mehrerer Kultivierungen ist die Wahl eines Bezugspunktes sinnvoll, da es sich bei den Fluoreszenzdaten um relative Einheiten handelt. Darüber hinaus zeigt die Hintergrundfluoreszenz (Mediumfluoreszenz) oftmals erhebliche Unterschiede bei verschiedenen Kultivierungen trotz identischer Versuchsvorbereitungen. Durch den thermischen Sterilisationsprozess erhält das Medium oft eine leicht gelbbraune Färbung, die durch Karamelisierung eines Teils der Glucose entsteht. Die Absorptionseigenschaften des Medium können sich dadurch unterschiedlich stark verändern. Aus diesen Gründen wurde von jedem 2D-Fluoreszenzspektrum das Mediumspektrum subtrahiert, das vor Kultivierungsstart unter Kultivierungsbedingungen vom zellfreien Medium detektiert wurde. Dadurch werden die Anfangsbedingungen so skaliert, dass die Fluoreszenzen für alle Wellenlängenkombinationen zum Kultivierungsstart Null betragen. Negative Werte werden im Bereich abnehmender Fluoreszenzintensität während des Kultivierungsverlaufs aus diesem Grunde auch erreicht. Für die weitere Betrachtung der Fluoreszenzintensitätsverläufe werden im folgenden sowohl für

Batch-Kultivierung K-1 als auch für die anderen Batch-Kultivierungsbeispiele (K-2, K-3, K-4) nur die skalierten Fluoreszenzintensitäten (SFI) verwendet.

5.5.2 Korrelation verschiedener Fluoreszenzintensitäten mit der BTM-Konzentration und der OUR von Batch-Kultivierung K-1

Die Verläufe der SFI aus den Fluoreszenzbereichen Tryptophan und Flavin-1 zeigen eine gute Übereinstimmung mit dem Verlauf der BTM-Konzentration, wie in Abbildung 5.5a zu sehen ist. Die tryptophanabhängige SFI bei Ex290/Em350 nm nimmt jedoch sowohl in der fermentativen als auch in der oxidativen Wachstumsphase fast linear zu, obwohl die Zunahme der BTM-Konzentration in beiden Wachstumsphasen exponentiell zunimmt. Eine Überlagerung intra- und extrazellulärer Fluoreszenzen ist wahrscheinlich der Grund.

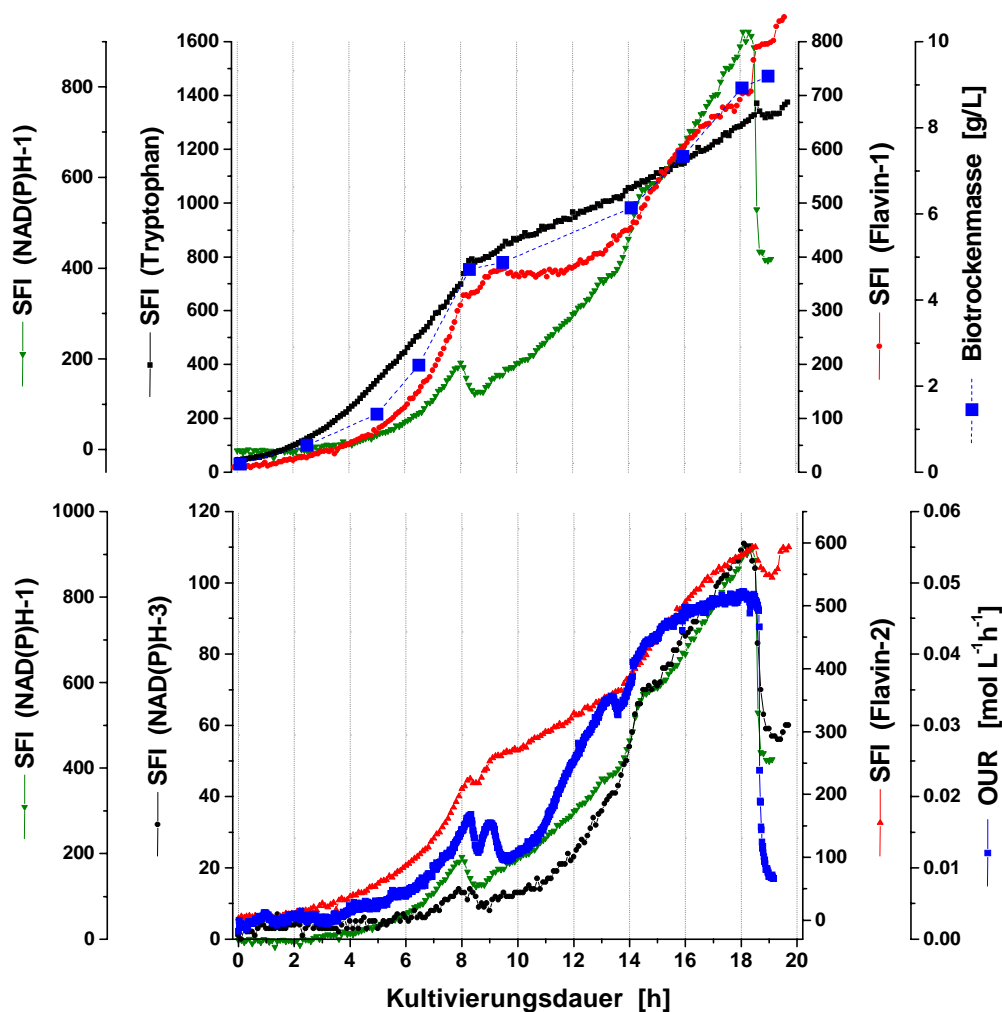


Abb. 5.5: Korrelation der SFI in den Bereichen Tryptophan, Flavin-1 und NAD(P)H-1 mit der BTM-Konzentration (a) sowie der SFI in den Bereichen NAD(P)H-1, NAD(P)H-3 und Flavin-2 mit der OUR (b) während der Batch-Kultivierung K-1

Der SFI-Verlauf aus dem Bereich NAD(P)H-1 weicht jedoch erheblich vom Verlauf der BTM-Konzentration ab. Stoffwechseländerungen, wie z.B. nach 8,4 h oder am Prozessende nach

18,6 h stören eine genaue Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration. Auffällig ist der sehr starke Abfall der SFI von NAD(P)H-1 am Prozessende nach 18,4 h. Alle Substrate sind aufgebraucht, wodurch die Reduktion von NAD(P)⁺ weitgehend unterbrochen ist. Aus diesem Grund nimmt die Konzentration an fluoreszierenden NAD(P)H stark ab.

Dagegen zeigen die SFI-Verläufe der NAD(P)H-1- und NAD(P)H-3-abhängigen Bereiche mit dem Verlauf der Sauerstoffverbrauchsrate (OUR) eine sehr gute, der SFI-Verlauf vom Flavin-2 eine weniger gute Übereinstimmung (Abb. 5.5b). Wenn Glucose nach 8,4 h bzw. alle Substrate nach 18,4 h verbraucht sind, nimmt die NAD(P)H-Konzentration in den Zellen deutlich ab (Abb. 5.5). Dadurch verringert sich gleichzeitig der Bedarf an Sauerstoff, der vor allem zur Oxidation des NAD(P)H genutzt wird. Die OUR nimmt stark ab.

Die oxidierten Redoxäquivalente reichern sich bei einem Substratmangel an. Da bei den Flavinderivaten (FMN, FAD) nur die oxidierten Formen fluoreszieren, steigt deren SFI in den Bereichen Flavin-1 nach 8,4 h und 18,4 h deutlich an, wie in Abb. 5.5a zu sehen ist.

5.6 Online-Vorhersage am Beispiel der Biotrockenmasse

Für viele Fermentationsprozesse ist die Biomassekonzentration eine Schlüsselgröße. Zur Bestimmung von Wachstums- und Produktionsraten sowie zur Aufstellung von Massenbilanzen ist deren genaue Kenntnis notwendig. Darüber hinaus gilt die Biomassekonzentration als relevante Zustandsgröße für verschiedene Kontrollstrategien bei Fed-Batch- und kontinuierlichen Kulturen. Die Konzentration der Mikroorganismen in der Kulturbrühe kann jedoch verschiedenartig beschrieben werden. Eine Charakterisierung kann bezüglich ihrer Konzentration, Trockenmasse, Zahl, ihres Volumens, ihrem physiologischen Zustand oder ihrer metabolischen Aktivität erfolgen. Auch eine Einteilung in Lebend- und Gesamtzellzahl ist sinnvoll. Zur Bestimmung all dieser definierten Biomassekonzentrationen gibt es sowohl offline als auch online eine Vielzahl verschiedener Messmethoden [SONNLEITNER et al., 1992] [KONSTANTINOV et al., 1994]. Zur Online-Bestimmung der Biomassekonzentrationen werden zunehmend optische Messmethoden, wie etwa die 2D-Fluoreszenzspektroskopie, verwendet.

Für die Batch-Kultivierung K-1 von *S. cerevisiae* wurden gute lineare Korrelationen zwischen der Konzentration der Biotrockenmasse und den Fluoreszenzverläufen in den Fluoreszenzbereichen Tryptophan (Ex290/Em350 nm), Pyridoxalphosphat (Ex410/Em490 nm) und Flavin (Ex450/Em530 nm) gefunden. Die Abb. 5.6a zeigt den Verlauf der SFI im Pyridoxalphosphatbereich bei Ex410/Em490 nm im Vergleich zur offline gemessenen Biotrockenmasse. Werden die Biotrockenmasse- und Fluoreszenzdaten gegeneinander aufgetragen (Abb. 5.6b), so lässt sich der Zusammenhang mittels linearer Regression mit einer Geradengleichung (Formel in Abb. 5.6b) beschreiben. Dabei sind Y die SFI und X die Biotrockenmasse [g/L]. Der lineare Regressionskoeffizient beträgt $r = 0,9965$.

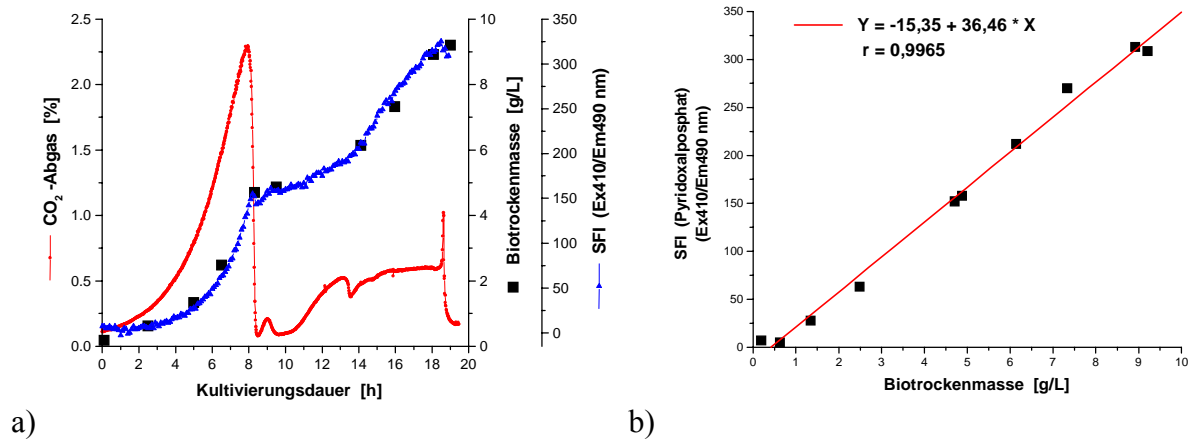


Abb. 5.6: Korrelation zwischen Biotrockenmasse und skaliertes Fluoreszenzintensität bei Ex410/Em490 nm und Verlauf der CO₂-Konzentration im Abgas während der Batch-Kultivierung K-1 von *S. cerevisiae* (a), lineare Regressionsgerade (b)

Die Konzentration der Biotrockenmasse (BTM) lässt sich mit der Geradengleichung (26) direkt aus dem SFI-Wert bei Ex410/Em490 nm schätzen.

$$BTM [g / L] = \frac{SFI + 15,35 [g / L]}{36,46} \quad (26)$$

Auch für die SFI in den Bereichen Tryptophan (Ex290/Em350 nm), und Flavin-1 (Ex450/Em530 nm) lassen sich so Geradengleichungen berechnen. Der RMSEC für die Schätzung der Biotrockenmassekonzentration bei Batch-Kultivierung K-1 ist in Tabelle 5.3 für die drei genannten Wellenlängenkombinationen aufgelistet.

Tab. 5.3 RMSEC für die Schätzung der BTM-Konzentration und relativer Fehler bezogen auf die BTM-Endkonzentration (9,2 g/L) für die tryptophan-, pyridoxalphosphat- und flavin-1-abhängigen Fluoreszenzbereiche der Batch-Kultivierung K-1

Batch-Kultivierung K-1	Tryptophan (Ex290/Em350 nm)	Pyridoxalphosphat (Ex410/Em490 nm)	Flavin-1 (Ex450/Em530 nm)
Regressions- koeffizient	0,9911	0,9965	0,9951
RMSEC	0,426 [g/L]	0,266 [g/L]	0,313 [g/L]
relativer Fehler	4,6 %	2,9 %	3,4 %

Die beste lineare Korrelation wurde für die SFI im pyridoxalphosphatabhängigen Bereich bei Ex410/Em490 nm gefunden. Die RMSEC ist mit 0,266 g/L am geringsten und weist einen relativen Fehler von nur 2,9% bezogen auf die maximal erreichte BTM-Konzentration (9,2 g/L) auf. Auch für die Fluoreszenzverläufe in den Bereichen Tryptophan (Ex290/Em350 nm), und

Flavin-1 (Ex450/Em530 nm) ergeben sich bei Batch-Kultivierung K-1 nur geringe RMSEC für die Schätzungen.

Die Geradengleichungen dieser drei Wellenlängenkombinationen wurden bei den Batch-Kultivierungen K-2, K-3 und K-4 genutzt, um die BTM-Konzentration aus deren SFI vorherzusagen. Der RMSEP für die BTM-Vorhersagen ist in Tabelle 5.4 zu sehen. Der niedrigste Vorhersagefehler wird für Batch-Kultivierungen K-2, K-3 und K-4 auch im Pyridoxalphosphatbereich gefunden.

Tab. 5.4 RMSEP für die BTM-Vorhersage und relativer Vorhersagefehler bezogen auf die BTM-Endkonzentrationen für die tryptophan-, pyridoxalphosphat- und flavin-1-abhängigen Fluoreszenzbereiche der Batch-Kultivierungen K-2, K-3 und K-4

Batch-Kultivierung	Tryptophan (Ex290/Em350 nm)	Pyridoxalphosphat (Ex410/Em490 nm)	Flavin-1 (Ex450/Em530 nm)
K-2: RMSEP relativer Fehler	0,477 [g/L] 4,9 %	0,445 [g/L] 4,5 %	0,468 [g/L] 4,8 %
K-3: RMSEP relativer Fehler	0,570 [g/L] 6,1 %	0,296 [g/L] 3,1 %	0,420 [g/L] 5,0 %
K-4: RMSEP relativer Fehler	0,618 [g/L] 6,4 %	0,436 [g/L] 4,5 %	0,984 [g/L] 10,1 %

Der Vorhersagefehler für Batch-Kultivierung K-4 ist im Tryptophan- (Ex290/Em350 nm) und Flavinbereich (Ex450/Em530 nm) am größten (Tab. 5.4). In den tryptophan- und flavin-1-abhängigen Bereichen wirkt sich offenbar die Rührerdrehzahlerhöhung auf die beobachtete Fluoreszenzintensität deutlicher aus, als auf die SFI im Pyridoxalphosphatbereich. Der RMSEP für die BTM-Vorhersage aus den SFI im Pyridoxalphosphatbereich beträgt trotz veränderter Rührerdrehzahl nur 0,436 g/L. Das entspricht einem relativen Vorhersagefehler von 4,5% bezogen auf die BTM-Endkonzentration (9,7 g/L).

Für Hefe-Batch-Kultivierungen lässt sich die Konzentration der Biotrockenmasse mit hoher Genauigkeit direkt aus der SFI im Pyridoxalphosphatbereich vorhersagen, weil offensichtlich zwischen diesem SFI-Verlauf und der Biotrockenmasse im diskutierten Konzentrationsbereich ein linearer Zusammenhang besteht. Dies gilt jedoch nur, wenn Kalibrations- und Validierungskultivierungen mit gleichen oder annähernd gleichen Kultivierungsbedingungen durchgeführt werden.

Zwischen dem Verlauf der BTM-Konzentration und der Fluoreszenzintensitäten, wie z.B. der SFI im tryptophanabhängigen Bereich, wird oftmals kein linearer Zusammenhang beobachtet (Abb. 5.7a). Eine Schätzung der Biomasse mit diesen Fluoreszenzverläufen kann mit einem geringen Vorhersagefehler mit Hilfe einer doppelten quadratischen Auftragung der SFI und BTM-Konzentration erreicht werden. Eine weitere Möglichkeit stellt die Methode von Zabriskie dar [ZABRISKIE, 1979]. Am Beispiel der Batch-Kultivierung K-1 soll die Methode von Zabriskie

genauer vorgestellt werden. Nach Logarithmierung der SFI- und BTM-Werte von Abbildung 5.7a wird die Abbildung 5.7b durch doppelt logarithmierte Auftragung erhältlich.

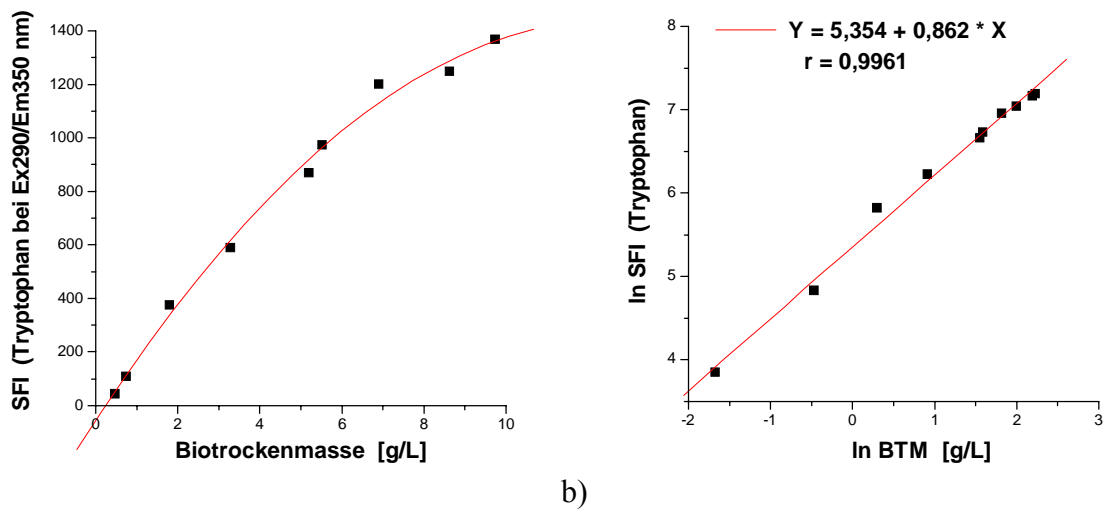


Abb. 5.7: Auftragung von Biotrockenmasse gegen skalierte Fluoreszenzintensität (SFI) im Tryptophanbereich von der *S. cerevisiae*-Batch-Kultivierung K-1 (a), lineare Regressionsgerade der doppelt logarithmierten Auftragung (b)

Die Kurve lässt sich dann mit folgender Gleichung beschreiben:

$$X = (e^{-B} \cdot Y)^{\frac{1}{A}} \quad (27)$$

Dabei sind X die Biotrockenmasse [g/L], Y die skalierte Fluoreszenzintensität, A die Steigung [g/L] und B der Achsenabschnitt der doppelt logarithmierten Auftragung. Durch Verwendung der Gleichung (27) wird die Berechnung der BTM-Konzentration direkt aus den SFI erreicht. Für die pyridoxalphosphat- und flavin-1-abhängigen Bereiche wurden auf diese Weise ebenfalls die Parameter A und B berechnet, die für die Schätzung der BTM-Konzentration aus den SFI genutzt wurden. Der RMSEC für die Schätzungen sind in Tabelle 5.5 aufgelistet.

Tab. 5.5 RMSEC für die Schätzung der BTM-Konzentration und relativer Fehler bezogen auf die BTM-Endkonzentration (9,2 g/L) für die tryptophan-, pyridoxalphosphat- und flavin-1-abhängigen Fluoreszenzbereiche der Batch-Kultivierung K-1

Batch-Kultivierung	Tryptophan (Ex290/Em350)	Pyridoxalphosphat (Ex410/Em490)	Flavin-1 (Ex450/Em530)
K-1			
Regressionskoeffizient	0,9961	0,9623	0,9991
RMSEC	0,381 [g/L]	0,434 [g/L]	0,215 [g/L]
relativer Fehler	4,1 %	4,7 %	2,3 %

Für die SFI in den Bereichen Tryptophan und Flavin-1 verringert sich mit dieser Methode der Schätzfehler geringfügig gegenüber der linearen Regression (Tab. 5.3).

Der RMSEP für die BTM-Vorhersagen der Batch-Kultivierungen K-2, K-3 und K-4 ist in Tabelle 5.6 aufgelistet. Für die BTM-Vorhersagen ergeben sich teilweise geringere Vorhersagefehler sowohl für den tryptophan- als auch für den flavin-1-abhängigen Bereich. Dagegen nehmen die Vorhersagefehler gegenüber der linearen Regression für den Pyridoxalphosphatbereich deutlich zu.

Tab. 5.6 RMSEP für die BTM-Vorhersage und relativer Vorhersagefehler bezogen auf die BTM-Endkonzentrationen für die tryptophan-, pyridoxalphosphat- und flavin-1-abhängigen Fluoreszenzbereiche der Batch-Kultivierungen K-2, K-3 und K-4

Batch-Kultivierung	Tryptophan (Ex290/Em350)	Pyridoxalphosphat (Ex410/Em490)	Flavin-1 (Ex450/Em530)
K-2: RMSEP relativer Fehler	0,367 [g/L] 3,7 %	0,703 [g/L] 7,2, %	0,491 [g/L] 5,0 %
K-3: RMSEP relativer Fehler	0,635 [g/L] 6,8 %	0,443 [g/L] 4,7 %	0,350 [g/L] 3,6 %
K-4: RMSEP relativer Fehler	0,497 [g/L] 5,1 %	0,625 [g/L] 6,4 %	0,734[g/L] 7,6 %

5.7 Chemometrische Datenauswertung mittels Hauptkomponentenanalyse

2D-Fluoreszenzspektren, die in hoher Messfrequenz kontinuierlich aufgenommen werden, liefern während des Prozessverlaufes eine Vielzahl von spektroskopischen Prozessdaten. Für eine schnelle und qualitative Beurteilung des Prozessverlaufes können multivariate Auswerteverfahren, wie z.B. die Hauptkomponentenanalyse, genutzt werden. Am Beispiel der Batch-Kultivierung K-1 sollen die 2D-Fluoreszenzdaten mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse durch Darstellung der Scores und Loadings (Kap 2.3.1) genauer ausgewertet werden. Für die multivariate Datenauswertung wurde die Auswertesoftware Unscrambler 7.5 (CAMO ASA, Norwegen) genutzt (Kap 3.4).

5.7.1 Score-Darstellung von Batch-Kultivierung K-1

Mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse können aus 2D-Fluoreszenzspektren weitere charakteristische Prozessmerkmale ermittelt und mit Hilfe der Scores genauer ausgewertet werden (Kap 2.3.1). Die Auftragung der Scores von zwei Hauptkomponenten führt zur Score-Darstellung, die eine der wichtigsten Diagnosehilfsmittel der PCA ist.

Die Abbildung 5.8 zeigt die Scores der ersten und zweiten Hauptkomponente, die von den 2D-Fluoreszenzspektren der Batch-Kultivierung K-1 mittels Hauptkomponentenanalyse berechnet

wurden. Die Score-Darstellung gibt eine Übersicht über die wesentlichen Merkmale der 2D-Fluoreszenzspektren von Batch-Kultivierung K-1, die aus 28.050 Messpunkten (Produkt aus 187 Spektren und 150 WLK) berechnet wurde. Jedes Objekt in der Darstellung entspricht einem 2D-Fluoreszenzspektrum. Die Veränderungen im Score-Verlauf geben Auskunft über mögliche Datenausreisser, Gruppen von Daten sowie Trends im Prozessverlauf.

In Abbildung 5.8 ist zu erkennen, dass die Werte der Scores entlang der ersten Hauptkomponente (PC1) von Kultivierungsbeginn bis zum Prozessende kontinuierlich zunehmen. PC1 beschreibt offensichtlich Größen in den einzelnen Spektren, die mit zunehmendem Zeitverlauf fast kontinuierlich zunehmen, wie etwa die optische Dichte oder die Biomassekonzentration. Dagegen nehmen die Werte der Scores entlang der zweiten Hauptkomponente während des fermentativen Stoffwechsels (0–8,4 h) zu und während des oxidativen Stoffwechsel (8,4–18,4 h) bis zum Prozessende kontinuierlich ab. Hier wird das Zweiphasen-Wachstum von Hefe-Batch-Kultivierungen deutlich sichtbar.

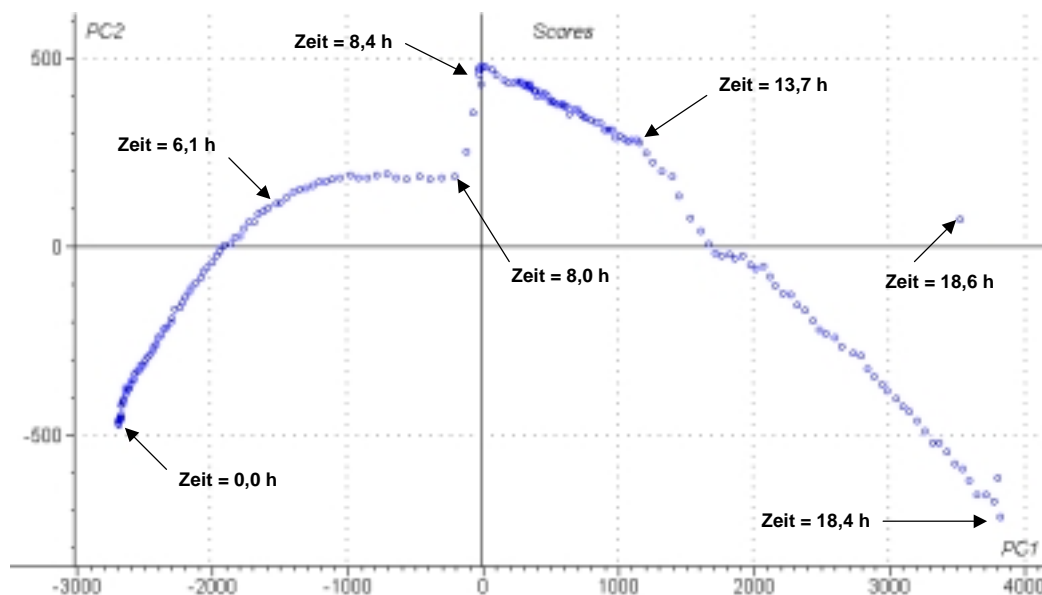


Abb. 5.8: Scores der ersten und zweiten Hauptkomponente berechnet aus den 2D-Fluoreszenzspektren von der Batch-Kultivierung K-1 mittels Hauptkomponentenanalyse

Der zunehmende Abstand der Scores nach Prozessbeginn in Abbildung 5.8 deutet auf ein zunehmendes exponentielles Wachstum hin. Die Veränderungen in den Spektren nehmen entsprechend zu. Zwischen 6,1 h und 8,0 h erreichen die Werte der Scores der PC2 eine Sättigung. Wahrscheinlich ist in dieser Prozessphase die maximale Wachstumsrate oder eine Limitierung erreicht. Nach 8,4 h ist Glucose weitgehend verbraucht. Die Stoffwechseländerung der Zellen ist deutlich im Score-Verlauf zu sehen. Die fünfte Prozessphase (13,5–14,5 h) und der Übergang der Hefezellen in den Erhaltungsstoffwechsel nach etwa 18,4 h sind ebenfalls deutlich im Score-Verlauf zu erkennen.

Die erste Hauptkomponente beschreibt mit ca. 97% die größte Varianz in den Fluoreszenzdaten und gibt damit die wichtigsten Charakteristika in den untersuchten 2D-Fluoreszenzspektren

wieder. Die erste und zweite Hauptkomponente beschreiben zusammen bereits über 99% der Varianz in den Fluoreszenzdaten. Dennoch kann die Score-Darstellung der PC1 und PC3, wie in Abbildung 5.9 dargestellt ist, weitere Informationen enthalten.

Der Score-Verlauf entlang der dritten Hauptkomponente enthält offensichtlich Informationen über Veränderungen im Spektrum beim Durchlaufen der Prozessphasen. Alle sieben Prozessphasen, die für Hefe-Batch-Kultivierungen unter Abschnitt 5.4 beschrieben wurden, werden hier sofort ersichtlich.

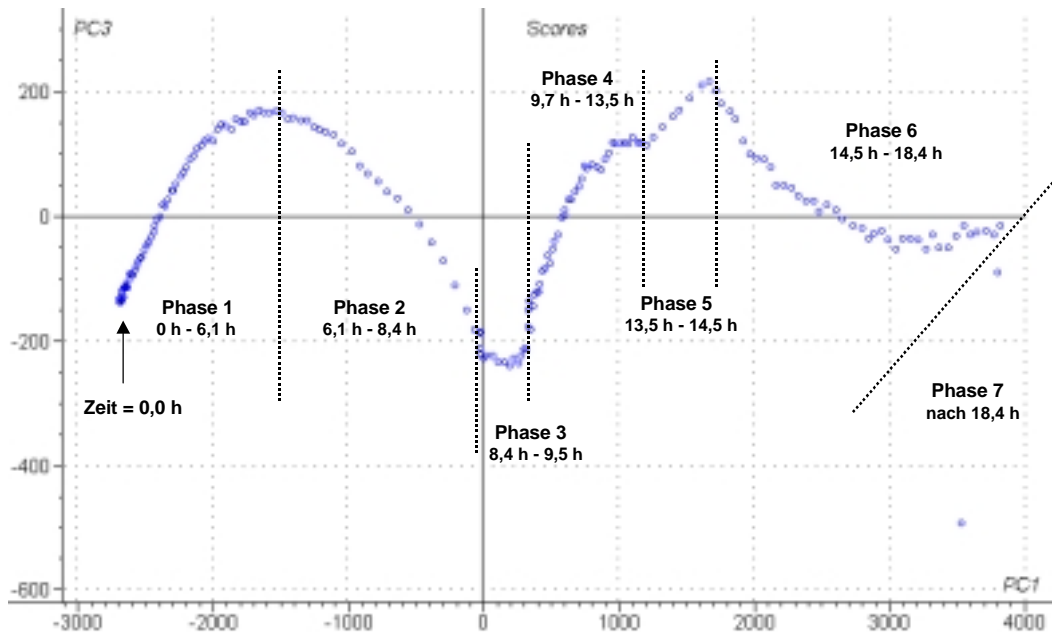


Abb. 5.9: Scores der ersten und dritten Hauptkomponente berechnet aus den 2D-Fluoreszenzspektren von der Batch-Kultivierung K-1 mittels Hauptkomponentenanalyse

In der ersten Phase nimmt der Score-Abstand aufgrund der exponentiellen Wachstumsphase schnell zu. Die Scores entlang der dritten Hauptkomponente durchlaufen ein Maximum und nehmen anschließend wieder ab. Die zweite Prozessphase wird hier deutlich. Die dritte Prozessphase, in der die Zellen nach Stoffwechselumstellung vor allem akkumuliertes Pyruvat verbrauchen, ist in Abbildung 5.9 eindeutig durch ein Plateau von ca. zwölf Messungen nach etwa 8,4 h identifizierbar. Anschließend ist ein Anstieg der Score-Werte zu erkennen, wodurch die vierte Prozessphase gekennzeichnet ist. Auch die fünfte Prozessphase (13,5 – 14,5 h) wird in dieser Darstellung zweifellos erfasst und lässt erkennen, dass im Übergang von vierter und fünfter Prozessphase wesentlich komplexere Zusammenhänge bestehen müssen, als in den online und offline gemessenen Rohdaten erkennbar ist. Die sechste Prozessphase ist am erneuten Abfall der Score-Werte entlang der dritten Hauptkomponente zu erkennen. Die Score-Werte nach 18,4 h könnten leicht als Ausreißer identifiziert werden. Diese Messungen deuten jedoch auf die extremen Veränderungen in den Spektren beim Übergang in den Erhaltungstoffwechsel (siebte Prozessphase) hin.

5.7.2 Score-Darstellung von Batch-Kultivierung K-3

Am Score-Verlauf lassen sich die verschiedenen Prozessphasen, die Hefezellen während der Batch-Kultivierung durchlaufen, eindeutig erkennen. Die Batch-Kultivierung K-3 soll zum Vergleich mit Batch-Kultivierung K-1 ebenfalls mit Hilfe der Score-Werte in Prozessphasen eingeteilt werden.

Während der Batch-Kultivierung K-3 wurden 378 2D-Fluoreszenzspektren aufgenommen. Insgesamt werden 56.700 Messwerte (378 Spektren \times 150 WLK) während des Kultivierungsverlaufes detektiert. Die aus den Messwerten berechneten Scores der ersten und zweiten Hauptkomponente sind in Abbildung 5.10 dargestellt.

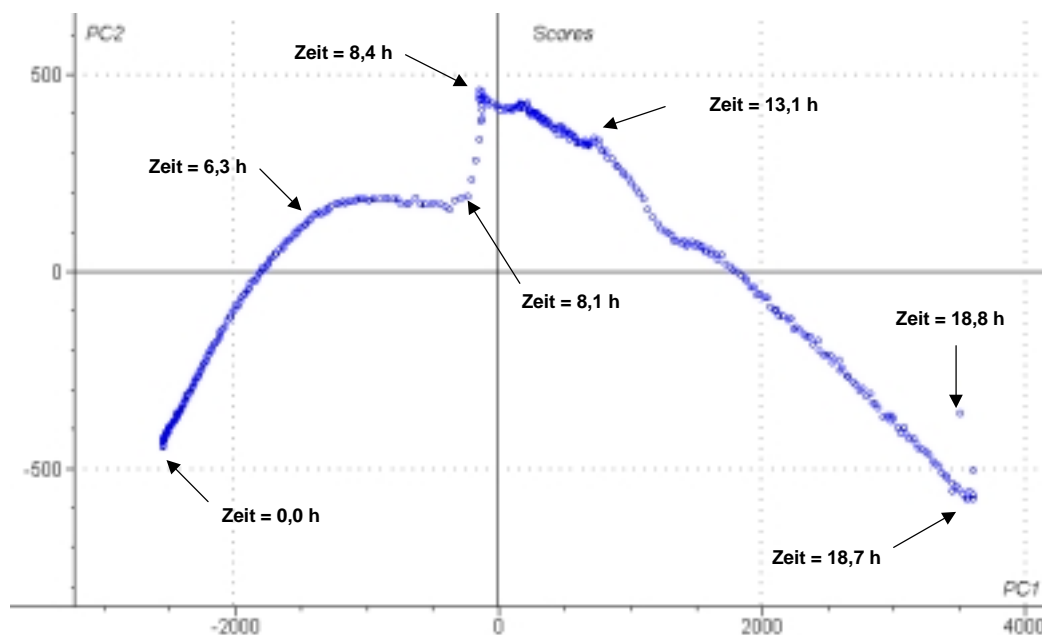


Abb. 5.10: Scores der ersten und zweiten Hauptkomponente berechnet aus den 2D-Fluoreszenzspektren von der Batch-Kultivierung K-3 mittels Hauptkomponentenanalyse

Im Score-Verlauf der Batch-Kultivierung K-3 ist das Zweiphasen-Wachstum eindeutig zu sehen. Die Stoffwechseländerung nach 8,1 h sowie das Prozessende nach 18,7 h sind ebenfalls im Score-Verlauf erkennbar. Auch den Übergang in die zweite Prozessphase nach 6,1 h bzw. in die fünften Prozessphase nach 13,1 h können genau identifiziert werden. Die Scores in Abbildung 5.10 zeigen einen ähnlichen charakteristischen Verlauf wie die Scores von Batch-Kultivierung K-1 in Abbildung 5.8. Das zeigt ein vergleichbares Zellwachstum und einen analogen Prozessverlauf beider Batch-Kultivierungen.

Die Abbildung 5.11 zeigt die Scores der ersten und dritten Hauptkomponente von Batch-Kultivierung K-3. Mit Hilfe des Score-Verlaufes sind ebenfalls sieben Prozessphasen im Kultivierungsprozess erkennbar. Eine Kontrolle der Prozessabläufe sowie eine detaillierte Prozessdokumentation sind anhand der charakteristischen Score-Verläufe möglich.

Die Darstellung der Scores kann darüber hinaus genutzt werden, um geeignete Daten für eine Modellentwicklung (z.B. PLS-Modelle) zu ermitteln. Messungen, die stark vom charak-

teristischen Score-Verlauf abweichen, können durch diese Voruntersuchungen erkannt und für die Modellentwicklung ausgesondert werden.

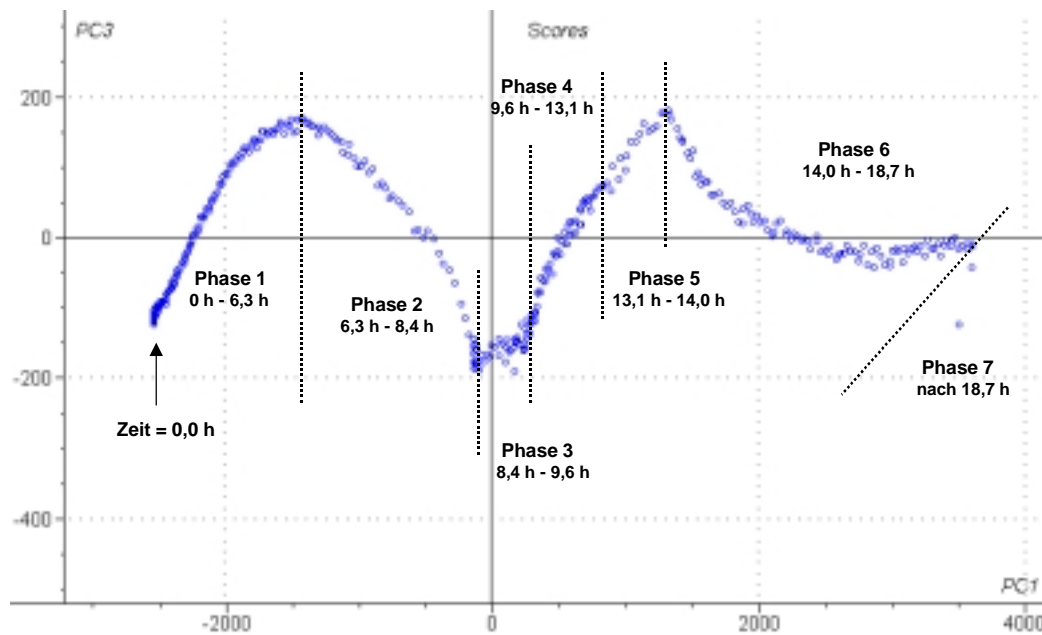


Abb. 5.11: Scores der ersten und dritten Hauptkomponente berechnet aus den 2D-Fluoreszenzspektren von der Batch-Kultivierung K-3 mittels Hauptkomponentenanalyse

5.7.3 Darstellung der Loadings von Batch-Kultivierung K-1

Die Loadings ermöglichen eine Untersuchung der einzelnen Variablen (Wellenlängenkombinationen) und geben einen Hinweis, wie groß die Varianz der einzelnen Variablen ist bzw. welche Variablen den größten Einfluss auf die Darstellung der Hauptkomponenten besitzen. Je größer der Betrag einer Loading-Komponente für eine Variable ist, um so größer ist die Varianz bzw. die Information in dieser Variablen. Die Werte der Loadings sind gewöhnlich zwischen +1 und -1 normiert.

Die eindimensionale Darstellung der Loadings wird auch als Loading-Spektrum bezeichnet, weil es Ähnlichkeiten mit typischen Spektren hat. Loading-Spektren werden vor allem verwendet, wenn mehrere hundert Variablen genutzt und interpretiert werden sollen. In Abbildung 5.12 ist das Loading-Spektrum der ersten drei Hauptkomponenten dargestellt, das aus den Fluoreszenzdaten der Batch-Kultivierung K-1 mittels PCA berechnet wurde.

Die Loadings der ersten Hauptkomponente (blaue Linie) in Abbildung 5.12 haben die größten Beträge vor allem in den proteinabhängigen Fluoreszenzbereichen bei Ex270/Em330-370 nm, Ex290/Em330-370 nm und Ex310/Em350-370 nm. Das deutet darauf hin, dass die SFI-Zunahmen in diesen Fluoreszenzbereichen besonders ausschlaggebend für die Darstellung der ersten Hauptkomponente sind. Alle Loading-Komponenten der PC1 sind positiv. Offensichtlich beinhaltet die PC1 hauptsächlich Informationen, die nur mit der SFI-Zunahme in den Fluoreszenzbereichen zusammenhängen. Vor allem die Proteinfluoreszenz nimmt kontinuierlich

zu (Abb. 5.5a) und ist daher besonders ausschlaggebend für die Darstellung der ersten Hauptkomponente.

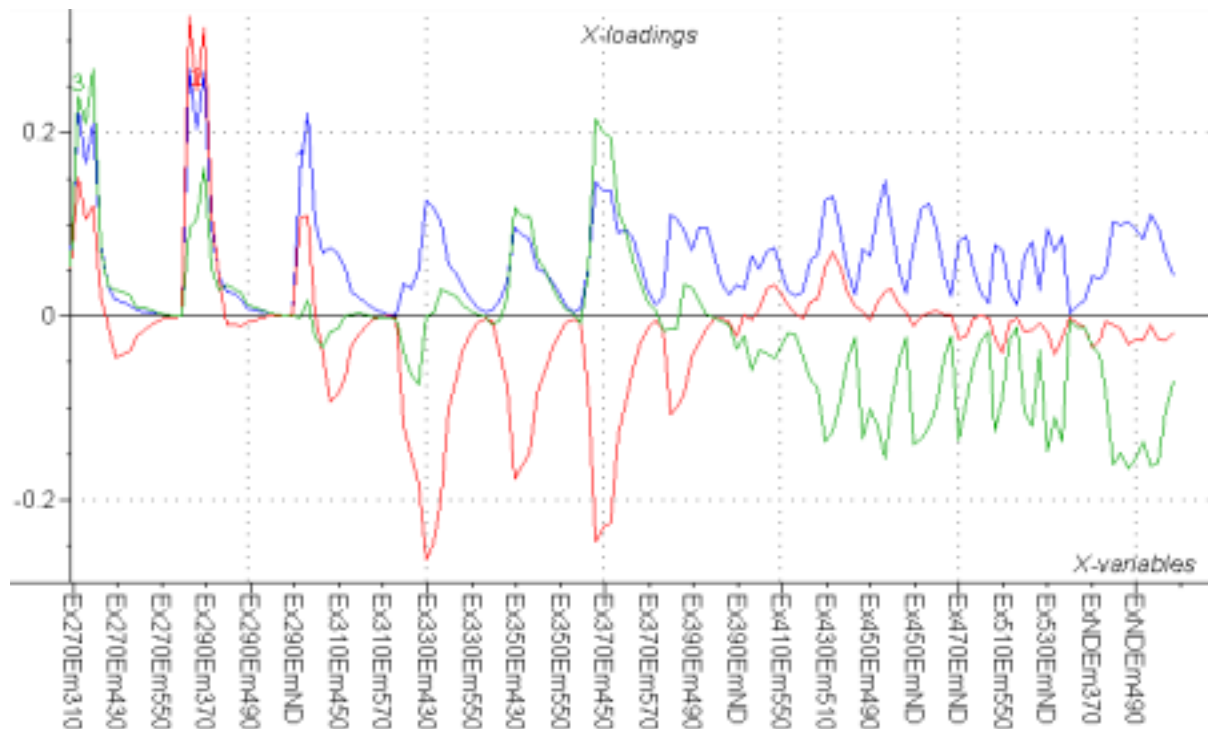


Abb. 5.12: Loadings der ersten (blaue Linie), zweiten (rote Linie) und dritten Hauptkomponente (grüne Linie), berechnet aus den 2D-Fluoreszenzspektren von der Batch-Kultivierung K-1 mittels Hauptkomponentenanalyse

Die Loading-Werte der zweiten Hauptkomponente (rote Linie) haben neben den proteinabhängigen Fluoreszenzbereichen vor allem in den NAD(P)H-abhängigen Bereichen bei Ex330/Em430-450 nm und Ex370/Em430-470 nm die größten Beträge. Die zweite Hauptkomponente differenziert jedoch zwischen den Informationen im Protein- bzw. Flavinbereich (positive Loading-Werte) und in den NAD(P)H-Bereichen (negative Loading-Werte). Die NAD(P)H-abhängige SFI nimmt mit zunehmender Zellkonzentration zu, ist jedoch auch vom metabolischen Zellzustand abhängig (Abb. 5.5). Aus diesem Grund ist das Zweiphasen-Wachstum der Hefezellen auch im Score-Verlauf der zweiten Hauptkomponente in Abbildung 5.8 eindeutig erkennbar.

Mit Hilfe der ersten und dritten Hauptkomponente ist eine genaue Beschreibung der Prozessphasen möglich (Abb. 5.9). Wie im Loading-Verlauf der dritten Hauptkomponente (grüne Linie) zu erkennen ist, sind diese Informationen in den SFI-Veränderungen der pyridoxin- und flavinabhängigen Fluoreszenzbereiche (negative Loading-Werte) und der protein- und NAD(P)H-abhängigen Bereiche (positive Loading-Werte) beinhaltet. Den geringsten Einfluss haben alle Bereiche, in denen die Loading-Werte einen Betrag von annähernd Null aufweisen. Dies sind vor allem Wellenlängenkombinationen (WLK) mit hohen Emissionswellenlängen und das mittels Neutraldichte-Filter (ND-Filter) gemessene Streulicht bei Ex270-550/EmND.

Die Loading-Werte geben einen Hinweis darauf, wie wichtig jede einzelne Variable (WLK) für jede Hauptkomponente ist. Dadurch kann ermittelt werden, welche Variablen für die Beschreibung des Prozesses tatsächlich notwendig sind. Die Variablen, die für alle verwendeten Hauptkomponenten Loading-Werte mit Beträgen von annähernd Null aufweisen, brauchen bei nachfolgenden Messungen nicht genutzt werden, da der Informationsgehalt zu vernachlässigen ist. Die Anzahl der WLK für einen bestimmten Prozess kann dadurch reduziert werden. Dies macht besonders bei sehr dynamischen Prozessen Sinn, um so die Messfrequenz entsprechend erhöhen zu können.

Die Voruntersuchungen mit Hilfe der PCA erlauben durch die Darstellung der Scores und Loadings einen besseren Einblick in die Zusammenhänge zwischen den einzelnen Messungen (Spektralen) und Variablen (WLK). Für die Erstellung von chemometrischen PLS-Modellen lassen sich so geeignete Daten für die Kalibrierung finden.

5.8 Multilineare Regression zur Vorhersage von Prozessgrößen

Die Bestimmung der Biotrockenmasse-, der Glucose- und der Ethanolkonzentration sowie der optischen Dichte ist durch Probeziehung, -vorbereitung und eigentlicher Analyse ein zeitaufwendiger Vorgang. Diese Bioprozessgrößen sind für die Beurteilung des aktuellen Prozesszustands von großer Wichtigkeit, so dass eine exakte Online-Vorhersage dieser Größen in Echtzeit für die Bioprozessbeobachtung oder gar Prozessführung äusserst wichtig ist. Für die Glucose ist beispielsweise die Konzentrationsangabe durch die konventionelle Offline-Analyse frühestens nach 15 Minuten erhältlich. Diese Information kann aufgrund des schnellen Prozessverlaufes allenfalls nur noch zur Prozessdokumentation dienen, weniger zur optimalen Prozessführung dynamischer Prozesse. Am Beispiel der Glucosekonzentration soll die Vorgehensweise bei der Entwicklung von PLS-Modellen erläutert werden. Ziel ist eine Online-Vorhersage der Glucosekonzentration sowie verschiedener Prozessgrößen im Verlauf weiterer Hefe-Batch-Kultivierungen.

5.8.1 Entwicklung eines PLS-Modells

Die Hauptkomponentenanalyse erlaubt Voruntersuchungen an den Prozessdaten (analog Kap. 5.7) und eine Auswahl geeigneter Fluoreszenzdaten zur Entwicklung chemometrischer Modelle. Datenausreisser sowie signifikante Messfehler werden so schon im Vorfeld erkannt und können eliminiert werden. Zur Berechnung der chemometrischen Modelle wurden als geeignete Kalibrierungsdaten die Offline-Größen aus Abbildung 5.2d von der Batch-Kultivierung K-1 und die entsprechenden 2D-Fluoreszenzspektren ausgewählt. Die Berechnung der PLS-Modelle zur Auswertung der Fluoreszenzdaten mit den offline gemessenen Prozessgrößen erfolgte im Rahmen dieser Arbeit immer mit einer internen Kreuzvalidierung. Dabei werden die Offline-Daten sowohl zur Kalibrierung als auch zur internen Validierung genutzt und durchlaufen dabei mehrmals den Kalibrationsvorgang. Die genaue mathematische Beschreibung

des Auswerteverfahrens ist in Kapitel 2.3.1-2 erläutert. Die Abbildung 5.13 zeigt das Ausgabefenster der Unscrambler-Software nach Berechnung des PLS-Modells für Glucose. Es wurde aus fünf offline ermittelten Glucosewerten (Abb. 5.2d) und den entsprechenden fünf 2D-Fluoreszenzspektren der Batch-Kultivierung K-1 erstellt. Mit Hilfe dieser Übersicht ist eine Analyse und Interpretation des berechneten PLS-Modells einfach möglich.

In Abbildung 5.13a sind die Scores der ersten und zweiten Hauptkomponente von den fünf 2D-Fluoreszenzspektren zu erkennen. Die Werte der Scores entlang der ersten Hauptkomponente nehmen mit zunehmender Prozessdauer immer schneller ab. Hier wird der exponentielle Glucoseverbrauch während der exponentiellen Wachstumsphase deutlich.

Im Loading-Spektrum (Abb. 5.13 b) ist zu erkennen, dass das PLS-Modell für die Glucosevorhersage (Glucosemodell) überwiegend die Informationen aus den proteinabhängigen Fluoreszenzbereichen bei Ex270/Em330-370 nm, Ex290/Em330-370 nm und Ex310/Em350-370 nm nutzt. Die Loading-Werte haben in diesen Bereichen die größten Beträge. Im geringeren Maße werden auch die Informationen in den flavinabhängigen Fluoreszenzbereichen bei Ex430/Em510-570 nm, Ex450/Em510-570 nm und Ex470/Em510-570 nm verwendet. Die NAD(P)H-abhängigen Bereiche bei Ex330/Em430-470 nm, Ex350/Em430-470 nm und Ex370/Em430-470 nm zeigen dagegen einen sehr geringen Einfluss auf die Bildung des Glucosemodells. Die Informationen für die Abnahme der Glucosekonzentration ist demnach vorwiegend von der Zunahme des Gesamtproteingehalts abhängig. Obwohl Glucose nicht fluoresziert, wird so eine Berechnung der Glucosekonzentration aus den Fluoreszenzspektren möglich. Das Loading-Spektrum (Abb. 5.13b) zeigt ähnlich einer Sensitivitätsanalyse die Anzahl der notwendigen WLK für ein PLS-Modell an. Für das Glucosemodell sind lediglich WLK aus den protein- und flavinabhängigen Fluoreszenzbereichen erforderlich, so dass eine Reduzierung der WLK (Variablen) eine weitere Erhöhung der Messfrequenz ermöglichen würde. Eine Rekalkulation des PLS-Modells lässt sich nach Entfernung ausgewählter Spektren oder WLK beliebig oft wiederholen. Die Qualitätskontrolle des PLS-Modells wird dabei mit den Abbildungen 5.13c und 5.13d erreicht. Die Abbildung 5.13c zeigt den RMSEP der internen Validierung, die automatisch von der Unscrambler-Software für jede genutzte Hauptkomponente berechnet wird. Mit zunehmender Hauptkomponentenanzahl nimmt gewöhnlich der Modellfehler kontinuierlich ab, wie in Abbildung 5.13c zu erkennen ist (blau Linie). Der statistische Unsicherheitsfehler nimmt jedoch mit jeder weiteren PC entsprechend zu. Der RMSEP gibt die Summe zwischen beiden Fehlern an. Den geringsten Vorhersagefehler (RMSEP = 0,55547 g/L) hat das Glucosemodell bei Verwendung von zwei Hauptkomponenten (Abb. 5.13c). Dies ist somit die optimale Hauptkomponentenanzahl. Bei Verwendung von drei Hauptkomponenten erhöht sich der Vorhersagefehler wieder deutlich (RMSEP > 1,1 g/L). Eine Erhöhung der nutzbaren Hauptkomponentenanzahl führt daher zu keiner weiteren Verbesserung des Glucosemodells.

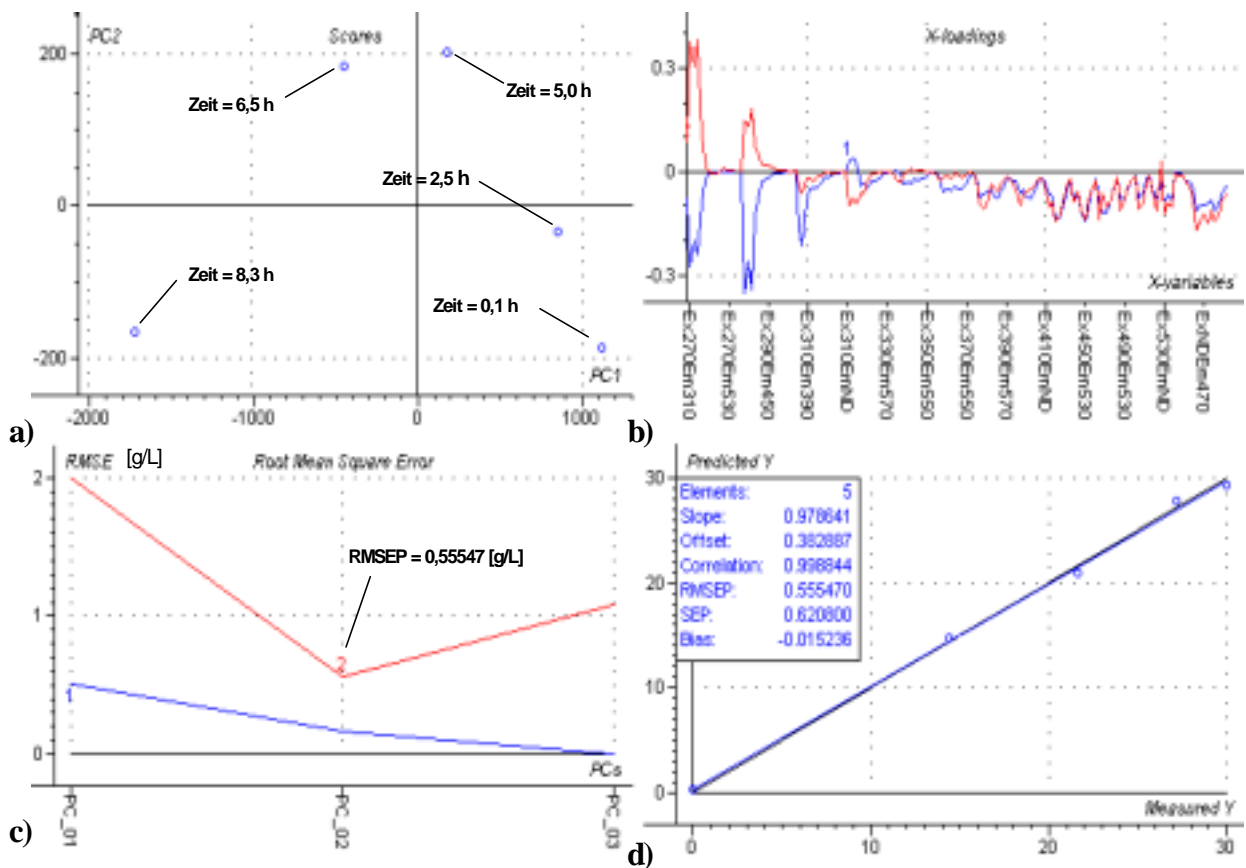


Abb. 5.13: Ausgabefenster der Unscrambler-Software für das PLS-Modell zur Berechnung der Glucosekonzentration. Das Glucosemodell ist aus fünf 2D-Fluoreszenzspektren und fünf offline gemessenen Glucosewerten der *S. cerevisiae*-Batch-Kultivierung K-1 erstellt worden.

Eine weitere Qualitätskontrolle ermöglicht die Abbildung 5.13d. Die fünf Offline-Glucosewerte sind gegen die fünf vom PLS-Modell berechneten Schätzwerte aufgetragen. Die statistischen Angaben in der Abbildung 5.13d geben Auskunft über die Vorhersagegenauigkeit des Glucosemodells. Der Regressionskoeffizient von über $r = 0,9988$, die Steigung (Slope) von annähernd eins (0,9786) sowie der geringe Achsenabschnitt (Offset) von 0,3829 [g/L] zeigen eine sehr gute Übereinstimmung zwischen Offline- und berechneten Daten. Der Fehler (RMSEP) bei der Modellanwendung zur Berechnung der Modellwerte bezogen auf die fünf offline gemessenen Glucosewerte beträgt 0,55547 g/L. Bezogen auf die Anfangskonzentration von 30 g/L Glucose ergibt dies einen relativen Fehler von nur 1,85%.

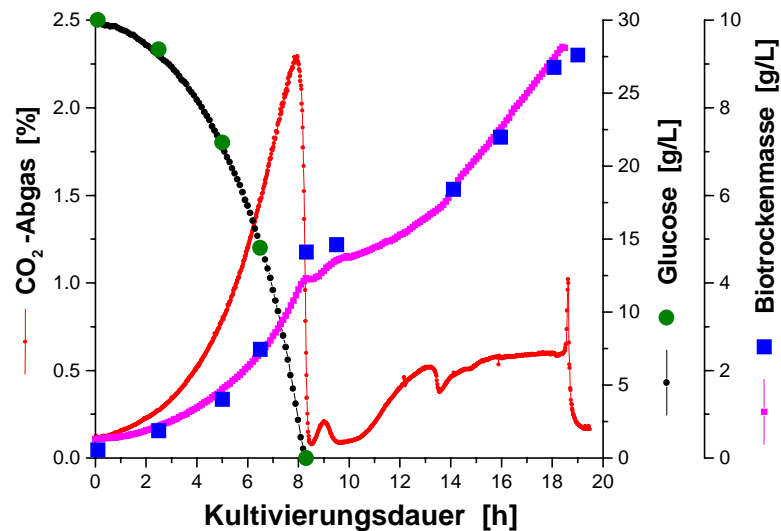
Die statistischen Angaben *Bias* und *SEP* geben darüber hinaus Auskunft über systematische Fehler der Validierungsdaten bzw. über die Vorhersagegenauigkeit des PLS-Modells (Kap. 3.4). Ist kein systematischer Fehler in den Validierungsdaten, so geht der *Bias* gegen Null. Der *SEP* entspricht dann annähernd dem *RMSEP*. Beide Angaben zeigen, dass das Glucosemodell eine hinreichend gute Schätzung liefert.

5.8.2 Modellanwendungen zur Schätzung von Bioprozessgrößen bei Batch-Kultivierung K-1

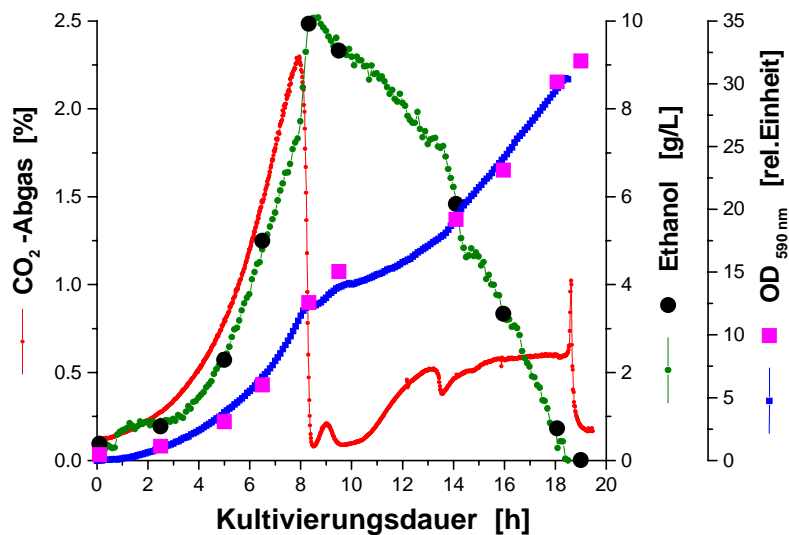
Mit Hilfe des PLS-Modells zur Berechnung der Glucosekonzentration kann für alle 2D-Fluoreszenzspektren, die während der Kultivierung K-1 aufgenommen wurden, ein Glucosewert geschätzt werden. Die Abb. 5.14a zeigt den Verlauf der offline gemessenen und der geschätzten Glucosewerte in sehr guter Übereinstimmung. Die Schätzung der Glucosekonzentration wird abgebrochen, wenn negative Werte erreicht werden.

Für die BTM- und Ethanolkonzentration sowie die optische Dichte wurden analog Kapitel 5.8.1 ebenfalls PLS-Modelle entwickelt. Die Anwendung dieser PLS-Modelle zur Schätzung der entsprechenden Bioprozessgrößen führt auch zu einer guten Korrelation zwischen offline und berechneten Prozessgrößen (Abb. 5.14). Eine Übersicht über den RMSEC der Schätzung ist in Tabelle 5.7 gegeben. Die Regressionskoeffizienten aller PLS-Modelle liegen deutlich über $r = 0,99$. Das PLS-Modell für die Glucose nutzte zwei Hauptkomponenten und erreichte eine sehr gute Vorhersagegenauigkeit mit einem RMSEC von 0,262 g/L. Bezogen auf die maximale Ausgangskonzentration von 30 g/L ist dies ein relativer Fehler von lediglich 0,87%. Auch die anderen PLS-Modelle haben niedrige relative Fehler bezogen auf den maximal erreichten Wert (Tab. 5.7).

Für die Schätzung der BTM-Konzentration und der optischen Dichte ist die Verwendung von nur einer Hauptkomponente ausreichend. Eine Erhöhung der Hauptkomponentenanzahl führt zu keiner Verbesserung der Vorhersagen (siehe auch Kap. 5.8.1). Dennoch ist der RMSEC und der sich daraus ergebene relative Fehler von 3,1% für die BTM-Vorhersage relativ hoch. Dieser hohe relative Fehler ergibt sich jedoch vor allem aus dem Unterschied zwischen den offline ermittelten BTM-Konzentrationen zur 8,3 h und 9,5 h (Abb. 5.14a) und den stark abweichenden Schätzwerten. Diese Abweichung muss jedoch nicht an der unpräzisen Schätzung des PLS-Modells liegen, sondern begründet sich wahrscheinlich viel mehr an einem sehr hohen Messfehler bei der Offline-Bestimmung dieser Prozessgröße. Das heisst, dass die Schätzung in diesem Fall tatsächlich genauer sein kann als dies der relative Fehler angibt. Obwohl dieses PLS-Modell mit den gleichen Offline-Werten erstellt worden ist, lässt das PLS-Modell große Messfehler durch die interne Validierung teilweise unberücksichtigt. Analoges gilt auch für die optische Dichte.



a)



b)

Abb.5.14: Verlauf der offline ermittelten und mittels PLS-Modellen geschätzten Bioprozessgrößen sowie der Verlauf der CO₂-Konzentration im Abgas während der Batch-Kultivierung K-1 von *S. cerevisiae*

a) Glucose-, BTM-Konzentration, b) Ethanolkonzentration, optische Dichte

Tab. 5.7 RMSEC der Schätzung und relative Fehler bezogen auf die Maximalwerte bei Verwendung der PLS-Modelle zur Schätzung von Bioprozessgrößen bei Batch-Kultivierungen K-1

Bioprozessgrößen	RMSEC	Regressionskoeffizient	Hauptkomponentenanzahl	relativer Fehler
BTM	0,285 [g/L]	0,9952	1	3,10%
Glucose	0,262 [g/L]	0,9997	2	0,87%
OD	0,675 [relative Einheit]	0,9977	1	2,12%
EtOH	0,106 [g/L]	0,9995	4	1,07%

Die Berechnung der Ethanolkonzentration erfordert ein deutlich komplexeres Modell. Hier ist die Verwendung von vier Hauptkomponenten für eine hinreichend genaue Berechnung der Ethanolkonzentration nötig. Die höhere Anzahl der genutzten Hauptkomponenten bewirkt jedoch ein zunehmendes Rauschen im Verlauf der berechneten Ethanolwerte (Abb. 5.14b).

5.8.3 Validierung der PLS-Modelle an weiteren Batch-Kultivierungen

Zur Überprüfung der PLS-Modelle, die mit den Daten der Batch-Kultivierungen K-1 entwickelt wurden, wurden bei den Batch-Kultivierungen K-2, K-3 und K-4 Vorhersagen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser externen Validierung zeigt die Tabelle 5.8. Für die Batch-Kultivierung K-2 und K-3 konnten sowohl für die BTM- und Glucosekonzentration als auch für die optische Dichte Vorhersagen mit sehr hoher Genauigkeit erreicht werden. Die relativen Fehler bezogen auf die Maximalwerte dieser Bioprozessgrößen liegen zwischen 2,3% und 7,4%. Der Fehler der Kalibration von der BTM-Konzentration (Tab. 5.7) ist dabei höher als der Vorhersagefehler der BTM-Konzentration der Kultivierung K-2 und K-4 (Tab. 5.8). Dies deutet offensichtlich auf große Messfehler der BTM-Konzentration im Kalibrationsset hin. Hohe Messfehler bei der Offline-Bestimmung der Prozessgrößen der Validierungskultivierungen wirken sich wahrscheinlich ebenfalls negativ auf die Vorhersagegenauigkeit aus.

Tab. 5.8: RMSEP und relative Fehler bezogen auf die Maximalwerte bei Verwendung der PLS-Modelle zur Vorhersage von Bioprozessgrößen bei Batch-Kultivierungen K-2, K-3 und K-4

Batch-Kultivierung	BTM	Glucose	OD	EtOH
K-2: RMSEP	0,216 [g/L]	1,563 [g/L]	0,708 [rel. E.]	2,243 [g/L]
relativer Fehler	2,42%	5,21%	2,31%	23,8%
K-3: RMSEP	0,488 [g/L]	1,890 [g/L]	2,284 [rel. E.]	1,525 [g/L]
relativer Fehler	5,18%	6,30%	7,36%	17,3%
K-4: RMSEP	0,276 [g/L]	3,355 [g/L]	2,101 [rel. E.]	3,099 [g/L]
relativer Fehler	2,84%	11,18%	6,26%	28,9%

(rel. E. = relative Einheit)

Ein Vergleich des RMSEP für die BTM-Konzentration (Tab. 5.7 bzw. Tab. 5.8) mit den RMSEP für die berechneten Konzentrationen aus den skalierten Fluoreszenzintensitäten einzelner Wellenlängenkombinationen in Tabelle 5.3-6 zeigt, dass die Kalibrations- und Validierungsergebnisse der PLS-Modelle eine tendenziell bessere Vorhersagegenauigkeit aufweisen. Dies deutet auf die Vorteile der multilinearen Regressionsmethode gegenüber einfachen Korrelationen hin. Auch eine zeitaufwendige Suche nach geeigneten Wellenlängenkombinationen zur Korrelation mit Bioprozessgrößen entfällt durch die Nutzung des gesamten Fluoreszenzspektrums.

Die PLS-Modellvorhersage für die Ethanolkonzentration erweist sich als deutlich schwieriger, wie der hohe RMSEP von den Batch-Kultivierungen K-2, K-3 und K-4 zeigt (Tab. 5.8). Das PLS-Modell muss sowohl die Ethanolproduktion als auch den Ethanolverbrauch beschreiben. Dies verlangt jedoch ein komplexeres PLS-Modell und die Verwendung von vier Hauptkomponenten. Dadurch werden scheinbar vorhandene Abhängigkeiten für die Modellbildung verwendet und das PLS-Modell wird anfälliger gegenüber variierenden Eigenschaften der Kulturbrühe. Da die Batch-Kultivierung K-4 (Rührerdrehzahl = 1000 UpM) mit veränderten Kultivierungsbedingungen gegenüber der Kalibrationskultivierung K-1 (Rührerdrehzahl = 800 UpM) durchgeführt wurde, zeigt sich auch hier für die Ethanolvorhersage der größte Vorhersagefehler (Tab. 5.8). Veränderungen der biologischen, chemischen und physikalischen Eigenschaften der Kulturbrühe wirken sich mit zunehmender Hauptkomponentenanzahl intensiver auf die Vorhersagegenauigkeit der PLS-Modelle aus.

5.9 Datenauswertung mehrerer Hefe-Batch-Kultivierungen und Verbesserung der PLS-Modellvorhersagen

Für die Erstellung von PLS-Modellen ist es sinnvoll, geeignete Daten von mehreren Prozessen zur Kalibrierung heranzuziehen, weil Messfehler dadurch einen geringeren Einfluss auf die Vorhersagegenauigkeit haben.

Für die Auswahl von geeigneten Prozessdaten ist ein Vergleich der Fluoreszenzdaten notwendig. Mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse lassen sich einfach eine Vielzahl von Messdaten mehrerer Batch-Kultivierungen auswerten. In Abbildung 5.15 sind die Scores der ersten und zweiten Hauptkomponenten der Batch-Kultivierungen K-1, K-2 K-3 und K-4 dargestellt, die aus insgesamt 1.102 skalierten 2D-Fluoreszenzspektren mit 150 WLK berechnet worden sind. Insgesamt wurde die Score-Darstellung aus 165.300 Messpunkten berechnet.

Die Scores der Batch-Kultivierung K-1 und K-2 zeigen ähnliche Verläufe, die sich lediglich ein wenig entlang der ersten Hauptkomponente (PC1) verschieben. Von diesen Verläufen weichen jedoch die Scores der Kultivierung K-4 und besonders die der Kultivierung K-3 ab. Bei der Vorhersage der Bioprozessgrößen mit den PLS-Modellen von Kultivierung K-1 ergeben sich daher auch die größten Vorhersagefehler für die Kultivierungen K-3 und K-4, wie in Tabelle 5.8 zu sehen ist. Kultivierung K-2 zeigt dagegen eine gute Übereinstimmung zwischen offline gemessenen und mit den PLS-Modellen von Kultivierung K-1 vorhergesagten Offline-Größen. Die Vorhersagen weichen offenbar um so mehr von den gemessenen Werten ab, je größer die Unterschiede zwischen der Validierungs- und Kalibrierungskultivierung sind.

Der unterschiedliche Score-Verlauf der Kultivierung K-3 gegenüber den Kultivierungen K-1 und K-2 wird wahrscheinlich durch eine niedrigere Fluoreszenzintensität im Anregungswellenlängenbereich bei Ex310 nm verursacht. Der Unterschied beträgt auch nach Skalierung bis Prozessende teilweise 30%. Ein Fehler in der Messeinstellung oder Versuchsdurchführung konnte ausgeschlossen werden. Auch ein Unterschied im BTM-Verlauf ist nicht zu beobachten.

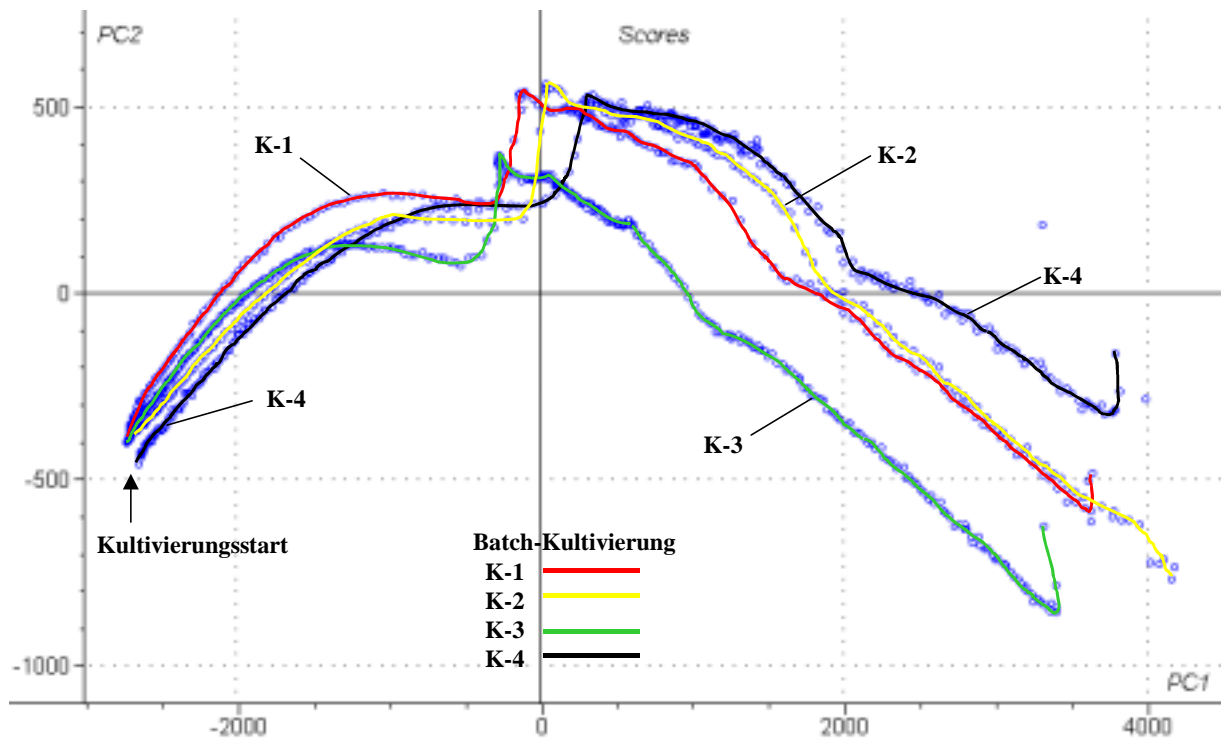


Abb. 5.15: Scores der ersten und zweiten Hauptkomponenten berechnet mittels Hauptkomponentenanalyse aus den 2D-Fluoreszenzspektren von den *S. cerevisiae* Batch-Kultivierungen K-1, K-2, K-3 und K-4

Zu Kultivierungsbeginn haben alle drei Kultivierungen den gleichen Ausgangspunkt im Score-Verlauf, was auf die Skalierung der Spektren zurückzuführen ist. Ohne Berücksichtigung der Mediumspektren ergeben sich schon zu Beginn offensichtliche Differenzen in den Score-Werten. Bei Batch-Kultivierung K-4 ist der Ausgangspunkt (Kultivierungsstart) der Score-Werte deutlich versetzt. Dies ist auf die veränderten Kultivierungsbedingungen (höhere Rührerdrehzahl) zurückzuführen, wodurch sich die optische Eigenschaft der Kulturbrühe verändert. Ausserdem wurde bei Kultivierung K-4 in den letzten Kultivierungsstunden keine Limitierung des Gelöstsauerstoffgehalts ($pO_2 \approx 0\%$) beobachtet. Zu Prozessende führt dies bei Kultivierung K-4 zu einem veränderten Score-Verlauf.

Bei der Erstellung der PLS-Modelle ist es sinnvoll, diese Unterschiede mit zu erfassen. Komplexe Zusammenhänge und Abhängigkeiten werden dadurch kombiniert und die PLS-Modelle werden flexibler. Die Daten der Batch-Kultivierungen K-3 und K-4 wurden deshalb zur Erstellung neuer PLS-Modelle (PLS-Modelle-3/4) verwendet, weil sie in der Score-Darstellung (Abb. 5.15) die größten Unterschiede aufweisen. Zur Überprüfung der PLS-Modelle wurden die Offline-Daten der Kultivierungen K-3 und K-4 mit den PLS-Modellen-3/4 geschätzt. Der RMSEC und relative Fehler bezogen auf die Maximalwerte der Schätzungen sind in Tabelle 5.9 zusammengefasst. Die PLS-Modelle-3/4 erlauben eine hinreichend genaue Beschreibung der Offline-Größen beider Kultivierungen trotz Unterschiede. So beträgt beispielsweise der relative Fehler für die Schätzung der Glucosekonzentration beider Kultivierungen weniger als 3%. Für diese Schätzung ist jedoch nun aufgrund komplexer Zusammenhänge die Verwendung von drei

Hauptkomponenten notwendig. Für die Ethanol-schätzung erhöht sich die Hauptkomponentenanzahl auf fünf.

Tab. 5.9 RMSEC und relative Fehler bezogen auf die Maximalwerte bei Verwendung der PLS-Modelle-3/4 zur Schätzung von Bioprozessgrößen bei Batch-Kultivierungen K-3 und K-4

Bioprozessgrößen	RMSEC K-3	relativer Fehler	RMSEC K-4	relativer Fehler	Hauptkomponentenanzahl
BTM	0,415 [g/L]	4,41%	0,323 [g/L]	3,32%	1
Glucose	0,882 [g/L]	2,94%	0,849 [g/L]	2,83%	3
OD	1,540 [rel. E.]	4,34%	1,930 [rel. E.]	2,94%	1
EtOH	0,797 [g/L]	9,04%	0,665 [g/L]	6,21%	5

(rel. E. = relative Einheit)

Zur Validierung wurden die Prozessdaten der Kultivierungen K-1 und K-2 mit den PLS-Modellen-3/4 vorhergesagt (Tab. 5.10). Es ist ersichtlich, dass die Vorhersagefehler bis auf die Ethanolvorhersage relativ gering sind.

Abb. 5.10 RMSEP und relative Fehler bezogen auf die Maximalwerte bei Verwendung der PLS-Modelle-3/4 zur Vorhersage von Bioprozessgrößen bei Batch-Kultivierungen K-1 und K-2

Bioprozessgrößen	RMSEP K-1	relativer Fehler	RMSEP K-2	relativer Fehler
BTM	0,318 [g/L]	3,46%	0,403 [g/L]	4,11%
Glucose	1,785 [g/L]	5,95%	0,864 [g/L]	2,88%
OD	1,400 [rel. E.]	4,40%	1,621 [rel. E.]	4,93%
EtOH	1,528 [g/L]	15,37%	1,475 [g/L]	15,05%

(rel. E. = relative Einheit)

Die Vorhersagegenauigkeit des PLS-Modell-3/4 für Ethanol hat sich mit einem relativen Fehler von etwa 15% ebenfalls verbessert. Eine weitere Verbesserung der Vorhersagegenauigkeit kann darüber hinaus erreicht werden, wenn für Ethanol zwei PLS-Modelle erstellt werden, eines für die Ethanolproduktion und ein weiteres für den Ethanolverbrauch. Ein PLS-Modell-3/4 wurde daher nur zur Vorhersage der Ethanolproduktion berechnet. Die Vorhersage der zunehmenden Ethanolkonzentration ergab so für die Batch-Kultivierungen K-1 und K-2 eine deutliche Verbesserung. Der RMSEP beträgt dann lediglich 0,282 g/L (2,84%) für die Batch-Kultivierung K-1 und 0,162 g/L (1,65%) für die Batch-Kultivierung K-2. Auch die Vorhersagegenauigkeit für den Ethanolverbrauch konnte so deutlich verbessert werden.

5.10 Zusammenfassung

Mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie ist es möglich, die Wechselbeziehung der Zellphysiologie mit ihrer chemischen und physikalischen Umgebung online zu erfassen. Dies ist für grundlegende Untersuchungen an Bioprocessen sowie für eine Bioprocessführung notwendig. Durch die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen an Hefe-Batch-Kultivierungen konnte folgendes gezeigt werden:

- In den 2D-Fluoreszenzdifferenzspektren sind signifikante Veränderungen in den RFI zu erkennen, die charakteristisch für den Verlauf der Batch-Kultivierung sind und eine Einteilung in sieben Prozessphasen erlauben. Dabei werden mindestens neun verschiedene biogene Fluoreszenzbereiche erkannt (Tab. 5.2), deren RFI sich abhängig vom biologischen Zustand der Hefezellen verändern. Benachbarte Wellenlängenbereiche haben oftmals durch Überlagerungen der Fluoreszenzen ähnliche Intensitätsverläufe. Sie können trotzdem zusätzliche Informationen beinhalten.
- Es lässt sich eine sehr gute Korrelation zwischen der Biotrockenmasse und der SFI in den tryptophan-, pyridoxalphosphat- und flavinabhängigen Fluoreszenzbereichen herstellen. Der SFI-Verlauf bei Ex410/Em490 nm ergab mit einer linearen Regression die beste Korrelation mit dem Verlauf der BTM-Konzentration. Der RMSEC betrug bei der Schätzung lediglich 0,266 g/L, was einem relativen Fehler von 2,9% bezogen auf die erreichte BTM-Endkonzentration entspricht. Die Verwendung von skalierten Spektren führt dabei zu einer deutlich verbesserten Vorhersagegenauigkeit bei weiteren Batch-Kultivierungen. Der relative Vorhersagefehler konnte auf diese Weise für den SFI-Verlauf bei Ex410/Em490 nm auf unter 4,5% verringert werden. Im Tryptophan- und Flavinebereich konnte mit Hilfe der Zabriskie-Methode eine Verbesserung der BTM-Vorhersage gegenüber der linearen Regression erreicht werden.
- Mit Hilfe der Uncrambler-Software lassen sich mit der Hauptkomponentenanalyse schnell und einfach große Datenmengen auswerten und beurteilen. Dabei erfolgt eine massive Datenreduktion und Konzentration von 99% der Informationen auf zwei bis drei Hauptkomponenten. Die Scores zeigen für Hefe-Batch-Kultivierungen charakteristische Verläufe, die eine eindeutige Zuordnung unterschiedlicher Prozessphasen erlauben. Die Loadings (Abb. 5.12) zeigen, dass hauptsächlich die Varianzen der neun Fluoreszenzbereiche zur Darstellung der entsprechenden Hauptkomponenten beitragen. Dabei besitzt vor allem die protein- und NAD(P)H-abhängige Fluoreszenz den größten Einfluss auf die Modellbildung. Geeignete WLK und Spektren lassen sich mit Hilfe der Scores und Loadings für die Erstellung von PLS-Modellen einfach finden.
- Die PLS-Regression ist ein leistungsstarkes Auswerteverfahren, das die Nutzung des gesamten 2D-Fluoreszenzspektrums erlaubt. Zur Vorhersage der BTM-, Glucose- und Ethanolkonzentration sowie der optischen Dichte wurden PLS-Modelle erstellt, die auch für nicht fluoreszierende Substanzen, wie Glucose oder Ethanol, sehr hohe Vorhersage-

genauigkeiten erreichen. Dazu wurden die Daten der Kultivierung K-1 verwendet. Diese PLS-Modelle wurden zur Vorhersage bei weiteren Prozessen (K-2, K-3 und K-4) genutzt. Der relative Fehler für die Vorhersagegenauigkeit der Validierung betrug mit Ausnahme für Ethanol in der Regel deutlich unter 7%. Für die Vorhersage der Ethanolkonzentration sind komplexere Modelle nötig. Die Verwendung von zwei Modellen, eines für die Ethanolproduktion und eines für den Ethanolverbrauch, konnte die Vorhersagegenauigkeit erheblich verbessern.

- Eine Datenauswertung mit Hilfe der Unscrambler-Software ermöglicht einen einfachen Vergleich von Fluoreszenzdaten mehrerer Kultivierungen mit Hilfe der Score-Darstellung. Mehrere tausend 2D-Fluoreszenzspektren lassen sich durch die Score-Darstellung einfach vergleichen und interpretieren. Unterschiede oder Störungen in den Kultivierungsverläufen werden sofort sichtbar. Eine Übersicht über die Fluoreszenzdaten der verschiedenen Kultivierungen hilft, geeignete Daten für die Berechnung von PLS-Modellen auszuwählen. Modelle, die aus den Daten mehrerer Kultivierungen berechnet wurden, können auch die Variationen erfassen, die bei Kultivierungen häufig zu beobachten sind. Sie erlauben trotz Unterschiede in den Kultivierungsverläufen eine deutlich verbesserte Vorhersagegenauigkeit von Bioprozessgrößen.

6 Chemostat-Kultivierungen von *Saccharomyces cerevisiae*

6.1 Ziele der Chemostat-Kultivierungsexperimente

Synchron wachsende *S. cerevisiae*-Kulturen sind aufgrund ihrer dynamischen Veränderungen in zahlreichen biologischen, chemischen und physikalischen Prozessgrößen interessant, um das Messprinzip der 2D-Fluoreszenzspektroskopie auf seine Vielseitigkeit und Verlässlichkeit hin zu untersuchen. Mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie sollen verschiedene Fluoreszenzverläufe genutzt werden, um eine Vielzahl von Einzelgrößen (z.B. Biotrockenmasse-, Ethanolkonzentration) sowie den biologischen Zellzustand zu bestimmen. Die Fluoreszenzintensitäten wurden dabei nicht skaliert.

Synchrones Wachstum wurde bei drei Verdünnungsraten ($D = 0,13 \text{ h}^{-1}$, $D = 0,14 \text{ h}^{-1}$ und $D = 0,15 \text{ h}^{-1}$) genauer untersucht. Die Fluoreszenzdaten der synchron wachsenden Kultur mit einer Verdünnungsrate von $D = 0,15 \text{ h}^{-1}$ sollen zunächst exemplarisch genauer beschrieben und mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse interpretiert werden. Darüber hinaus sollen PLS-Modelle entwickelt werden, die eine Schätzung von Offline-Größen aus den Fluoreszenzdaten erlauben. Die Validierung der PLS-Modelle soll bei synchron wachsenden *S. cerevisiae*-Kulturen an weiteren Zellzyklen mit gleicher ($D = 0,15 \text{ h}^{-1}$) sowie mit veränderter Verdünnungsrate ($D = 0,13 \text{ h}^{-1}$) erfolgen und diskutiert werden. Zur Vorhersage von durchflusscytometrischen Daten, die Auskunft über den Zellzyklusphasenzustand der synchron wachsenden Kultur geben, werden die Fluoreszenzdaten der Kultur mit einer Verdünnungsrate von $D = 0,14 \text{ h}^{-1}$ verwendet.

6.2 Kultivierungsbedingungen

Der Betrieb der Kultivierungsanlage im kontinuierlichen Betrieb erfolgte analog der Beschreibung im Kapitel 5.2. Davon abweichende Kultivierungsbedingungen sind in Tabelle 6.1 aufgelistet. Synchrones Wachstum wurden bei drei Verdünnungsraten ($D = 0,13 \text{ h}^{-1}$, $D = 0,14 \text{ h}^{-1}$, $D = 0,15 \text{ h}^{-1}$) untersucht.

Tab. 6.1: Kultivierungsbedingungen

Verdünnungsraten	$D = 0,13 \text{ h}^{-1}$	$D = 0,14 \text{ h}^{-1}$	$D = 0,15 \text{ h}^{-1}$
Betriebsweise	kontinuierlich		
pH	$5,5 \pm 0,04$		
Rührerdrehzahl	$1200 \pm 1 \text{ UpM}$		
Aufnahmeintervall des BioView Sensors	3 min	3 min bzw. 72 s	3 min

Die Induktion der Synchronkulturen ist in Kapitel 3.5 beschrieben. Für den kontinuierlichen Betrieb wurde das Schatzmann-Medium einschließlich Glucose und Vitaminen mit Hilfe eines 0,2 µm Cellulose-Nitrat-Filters (Sartorius AG, Deutschland) steril filtriert und in einem sterilen 22 L Vorratsbehälter aufbewahrt. Die Verdünnungsrate wurde über eine Pumpe (Watson Marlow 501 U) eingestellt und durch kontinuierliches Wiegen des Vorratsbehälters aufgezeichnet (RISP-System). Die Offline-Probenahme erfolgte an der Erntevorrichtung hinter der Bakterienfalle direkt in ein gekühltes Probenahmegefäß.

6.3 Beschreibung einzelner Zellzyklusphasen

Ein Großteil der Zellen durchläuft während des synchronen Wachstums gleichzeitig die Phasen des Zellzyklus. Während des Durchlaufens eines Zellzykluses finden extreme Veränderungen in der Zelle statt. Da ein Großteil der Zellen den gleichen biologischen Zustand haben und in enger Wechselwirkung mit der chemischen und physikalischen Umgebung stehen, erlaubt die Messung verschiedener Bioprozessgrößen einen Einblick in den Zellzyklus.

In Abbildung 6.1 ist der Verlauf der CO₂-Konzentration im Abgas und der vom BioView Sensor gemessene tryptophanabhängige RFI bei Ex290/Em350 nm von drei gleichmäßigen Oszillationen dargestellt. Die eingestellte Verdünnungsrate betrug $D = 0,15 \text{ h}^{-1}$, aus der eine konstante Periodendauer von ca. 3,0 h resultierte. Mit Hilfe durchflussscytometrischer Daten (Kap. 6.8) und Literaturdaten [DUBOC et al., 1996] [BEUSE et al., 1998] wurden die drei Perioden in Zellzyklusphasen eingeteilt. In den entsprechenden Einteilungen durchläuft ein Großteil der Zellen gleichzeitig den Zellzyklus, was zu signifikanten Veränderungen in verschiedenen Bioprozessgrößen führt:

G₁-Phase: In dieser Phase nehmen die Zellen vor allem an Größe zu. Sie wird als Wachstumsphase bezeichnet. Die zugeführte Glucose wird dabei oxidativ metabolisiert [SATROUDINOV et al., 1992]. Darauf deutet auch der RQ-Wert, der unter 1 liegt (Abb. 6.2), hin. Der CO₂-Gehalt im Abgas und die Kulturfluoreszenz (NAD(P)H) (Abb. 6.2) steigen von einem niedrigen Niveau langsam an. Dagegen fällt die O₂-Konzentration im Abgas und die pO₂-Konzentration von ihren maximalen Werten langsam ab (Abb. 6.2). Die NaOH-Zugaberate ist konstant und steigt zum Ende der G₁-Phase langsam an.

Der plötzlich steil ansteigende CO₂-Verlauf im Abgas resultiert vor allem aus dem hohen Energiebedarf während der DNA-Synthese und deutet auf den Übergang in die S-Phase hin. Dabei ändert sich der Zellstoffwechsel. Die Glucose wird kurzzeitig oxidoreduktiv metabolisiert [SATROUDINOV et al., 1992][SONNLEITNER und KÄPPEL, 1986]. Der RQ steigt dabei deutlich über 1,5 an. EtOH reichert sich in der Kulturbrühe an.

S-Phase: Innerhalb dieser Phase nimmt die Sprossungsaktivität der Zellen stark zu [DUBOC et al., 1996]. Dabei ist ein drastischer Sauerstoffbedarf zu erkennen, der sich in einem

geringen pO_2 -Gehalt und einer niedrigen O_2 -Konzentration im Abgas bemerkbar macht (Abb. 6.2). Die Zellen nutzen kurzzeitig einen oxidoreduktiven Metabolismus. Der CO_2 -Gehalt im Abgas fällt anschließend auf ein Plateau ab. Die NaOH-Zugaberate bleibt nach kurzzeitigem starken Anstieg zunächst erhöht (Abb. 6.2). Diese erhöhte NaOH-Zugaberate deutet auf einen Ethanolverbrauch hin, wodurch der pH-Wert durch die entstehenden Säuren (vornehmlich Acetat) konstant gehalten wird. Der Ethanolverbrauch ist auch am RQ erkennbar, der deutlich unter eins abfällt. Anschließend steigt der RQ wieder auf eins, wobei gleichzeitig die NaOH-Zugaberate wieder niedrige Werte erreicht. Die Zellen verbrauchen angereichertes Acetat [BEUSE et al., 1998]. Die relative Intensität der Kulturfluoreszenz (Abb. 6.2) und der tryptophanabhängigen Fluoreszenz (Abb. 6.1) nehmen in der S-Phase kontinuierlich ab.

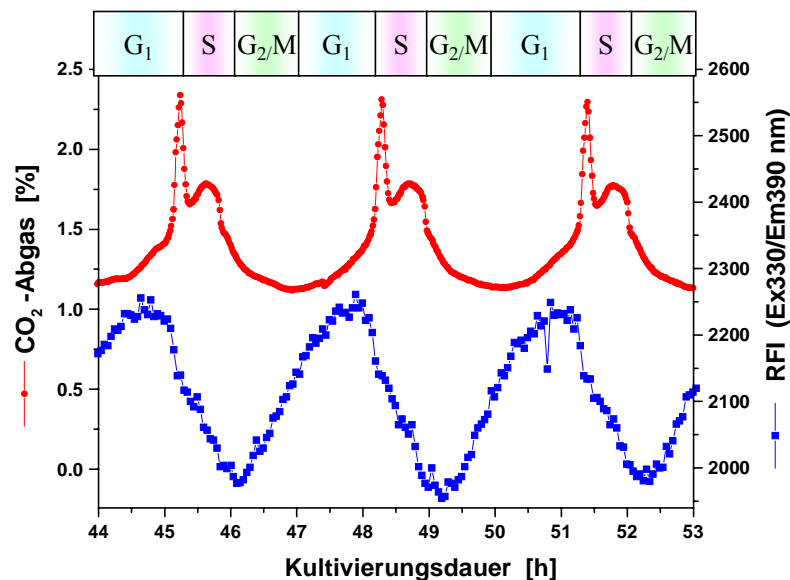


Abb. 6.1: Einteilung von drei Perioden einer synchron wachsenden Kultur von *S. cerevisiae* ($D = 0,15 \text{ h}^{-1}$) in Zellzyklusphasen am Beispiel der CO_2 -Konzentration im Abgas und am Verlauf der tryptophanabhängigen RFI bei Ex290/Em350 nm

G₂/M-Phase: Beim Übergang in die Teilungsphase nimmt der Sauerstoffbedarf der Zellen wieder stark ab. Dies führt zu einem Anstieg des pO_2 -Gehaltes in der Kulturbrühe, sowie im O_2 -Abgas. Der CO_2 -Gehalt im Abgas fällt dagegen wieder auf ein Minimum ab (Abb. 6.2). Dabei erhöht sich die NaOH-Zugaberate kurzzeitig, bevor wieder ein konstanter Wert erreicht wird. Ein RQ um eins deutet dabei wieder auf einen oxidativen Zellstoffwechsel hin. Die relative Intensität der Kulturfluoreszenz (Abb. 6.2) und der tryptophanabhängigen Fluoreszenz (Abb. 6.1) durchlaufen in dieser Phase ihr Minimum.

Eine ruhende Zelle befindet sich in der G_0 -Phase (Kap. 2.4). Während der Periode eines Zellzyklus zeigen synchron wachsende Hefe-Kulturen in einer kontinuierlichen Kultur deutliche Veränderungen in den biologischen (z.B. Biomasse), chemischen (z.B. pH) und physikalischen

(z.B. Gelöstsauerstoffgehalt, OD) Prozessgrößen sowie im biologischen Zustand der Mikroorganismen (z.B. Metabolismus) [STRÄSSLE, et al., 1989] [DUBOC et al., 1996]. Der pO_2 -Gehalt in der Kulturbrühe beispielsweise schwankt bei einer Verdünnungsrate von $D = 0,15 \text{ h}^{-1}$ während der Oszillationen zwischen 5-35%. Die CO_2 -Konzentration im Abgas erhöht sich während eines Zellzyklus sogar um mehr als 100%.

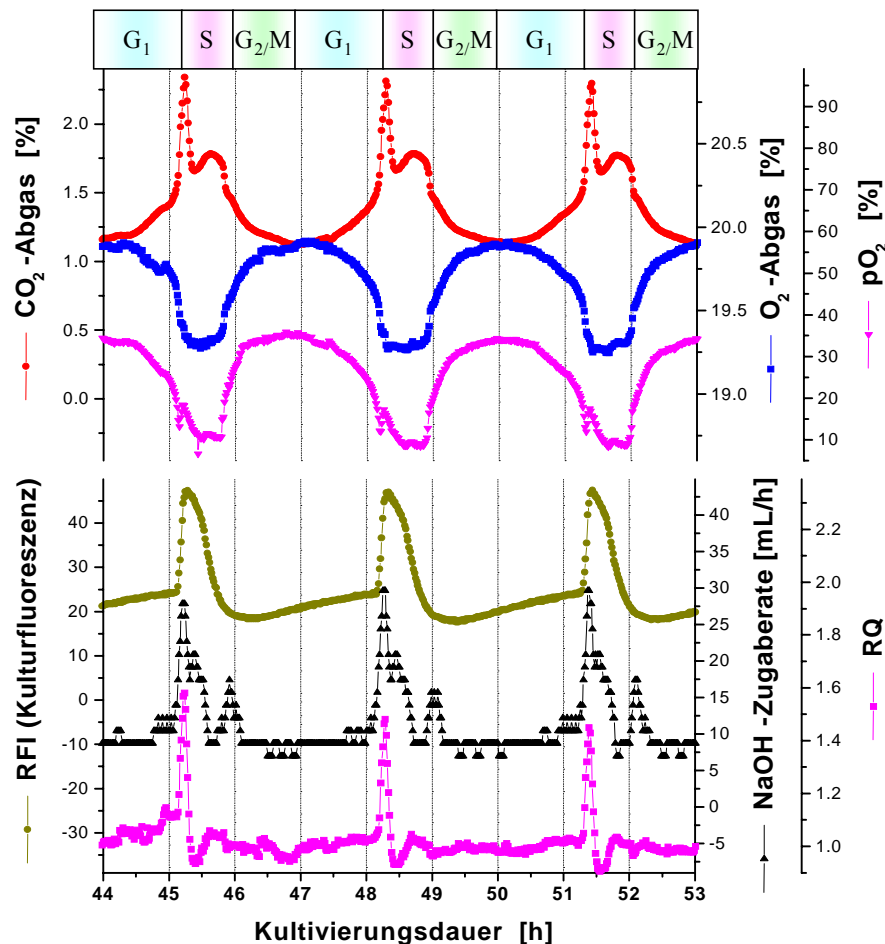


Abb. 6.2: Typische Oszillationen während drei Perioden einer synchron wachsenden *S. cerevisiae*-Kultur ($D = 0,15 \text{ h}^{-1}$) in den Verläufen der CO_2 -, O_2 -Konzentration im Abgas, der pO_2 -Konzentration, der Kulturfluoreszenz, der NaOH-Zugaberate und des RQ

In dem betrachteten Zeitabschnitt zwischen der 46. und 49. Kultivierungsstunde durchläuft der Großteil der Zellen zunächst die G_2/M -Phase und geht anschließend über in die Wachstumsphase (G_1 -Phase) und in die S-Phase (Abb. 6.1). Beim Eintritt in die G_2/M -Phase haben die tryptophan- und tyrosinabhängigen RFI bereits ihre Minima erreicht und nehmen fast linear zu (Abb. 6.1 bzw. Abb. 6.3). Mit dem Übergang in die G_1 -Phase (47 h) gehen die Verläufe bis zur 48. h in eine Sättigungskurve über. Die tryptophan- und tyrosinabhängigen RFI fallen anschließend von einem Maximum nach 48 h sehr steil ab (bis 49 h). Der dreistündige Zellzyklus wiederholt sich hiernach von neuem. Auffällig ist, dass die Tyrosin-RFI schon vor dem Anstieg der NAD(P)H-RFI abfällt (Abb. 6.3). Der unmittelbare Übergang der Zellen in die S-Phase wird dadurch schon

vor den signifikanten Anstiegen der NAD(P)H-RFI und der CO_2 -Konzentration im Abgas angezeigt. Die pyridoxin- und flavinabhängige RFI (Abb. 6.3) zeigt ebenfalls signifikante Fluktuationen beim Durchlaufen der Zellzyklusphasen. Im Gegensatz zur NAD(P)H-abhängigen RFI nimmt die flavinabhängige RFI mit Eintritt in die S-Phase kurzzeitig stark ab und steigt in der G_2/M - und G_1 -Phase wieder kontinuierlich an.

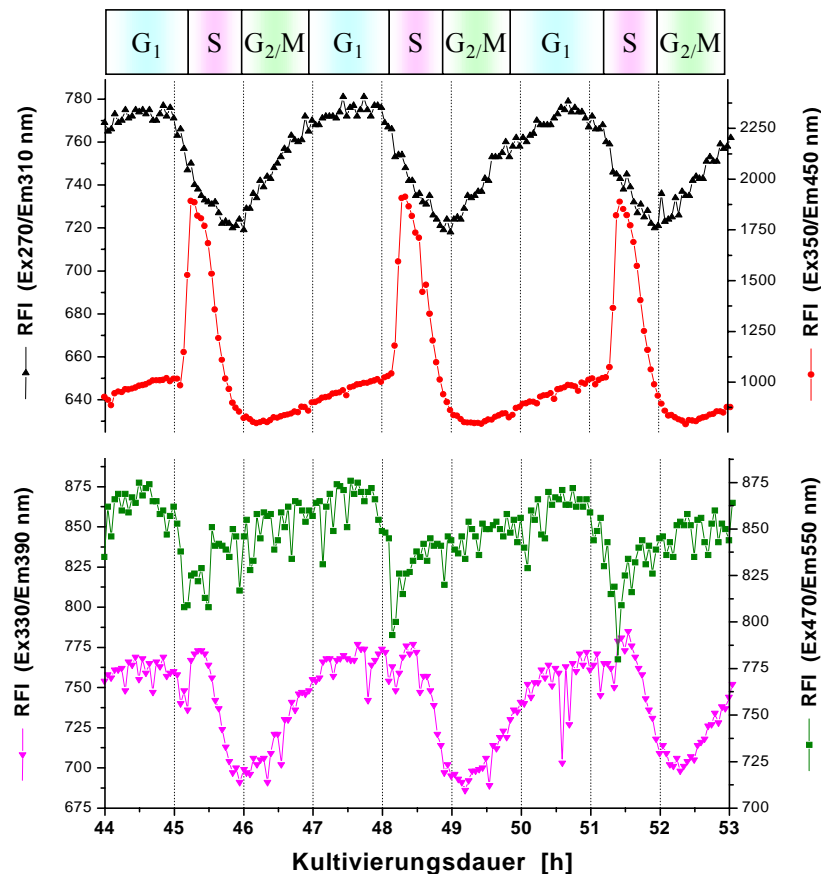


Abb. 6.3: Oszillationen von RFI-Verläufen während drei Perioden einer synchronen *S. cerevisiae*-Kultur ($D = 0,15 \text{ h}^{-1}$) im Bereich der biogenen Fluorophore Tyrosin (Ex270/Em310 nm), NAD(P)H (Ex350/Em450 nm), Pyridoxin (Ex330/Em390 nm) und Flavin (Ex470/Em550 nm)

RFI-Verläufe enthalten wichtige Informationen über Zellwachstum, Metabolismus und Zellzyklusphasen. Eine genaue Bestimmung des biologischen Kulturzustandes ist aufgrund der Komplexität der RFI-Verläufe oftmals nicht möglich. Mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse sollen die Fluoreszenzdaten genauer ausgewertet werden.

6.4 Chemometrische Datenauswertung mittels Hauptkomponentenanalyse

Zur Untersuchung der dynamischen Proliferationsvorgänge synchron wachsender Hefezellen ist eine nicht-invasive schnelle Online-Analytik notwendig. Darüber hinaus helfen chemometrische Auswerteverfahren, um latente Informationen in den Messdaten zu erkennen sowie Trends und Datengruppen zu identifizieren und zu interpretieren. Während der drei Oszillationen zwischen der 44. und 53. Kultivierungsstunde ($D = 0,15 \text{ h}^{-1}$) (Abb. 6.1-3) wurden insgesamt 180 vollständige 2D-Fluoreszenzspektren aufgenommen.

Zur genauen Datenauswertung der 180 2D-Fluoreszenzspektren wurde mittels der Unscrambler-Software eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt. Die Abbildung 6.4 zeigt die Scores der ersten und zweiten Hauptkomponente berechnet aus den Fluoreszenzdaten der drei Oszillationen. Diese Score-Darstellung gibt eine Übersicht über die charakteristischen Merkmale von 27.000 Messpunkten (150 Variablen \times 180 Spektren) beim synchronen Durchlaufen der Zellzyklen.

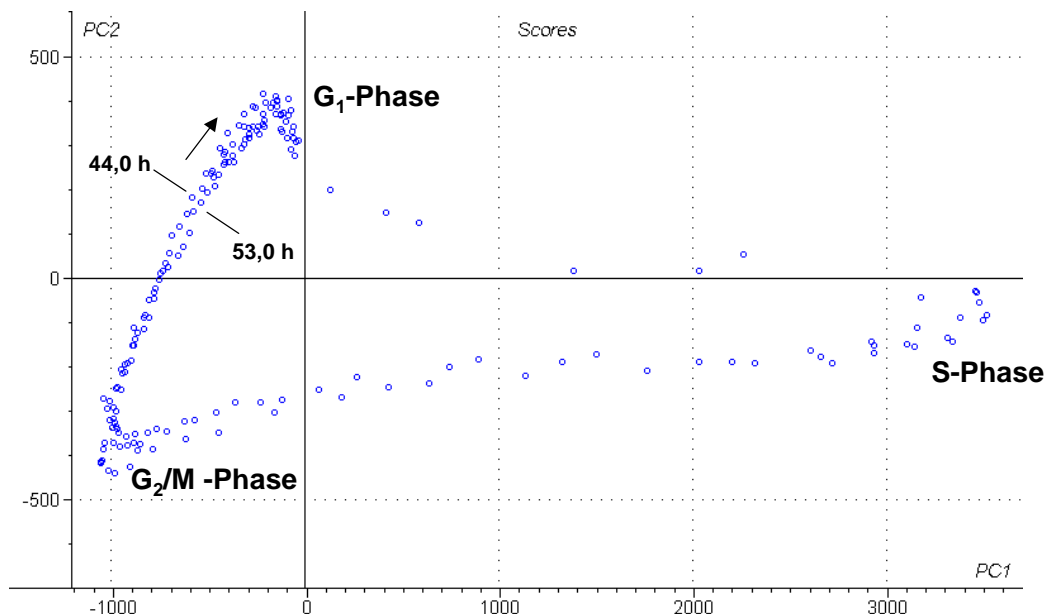


Abb. 6.4: Score-Werte der ersten und zweiten Hauptkomponenten berechnet mittels Hauptkomponentenanalyse aus 2D-Fluoreszenzspektren einer synchron wachsenden *S. cerevisiae*-Kultur ($D = 0,15 \text{ h}^{-1}$)

Die Auftragung der Score-Werte der ersten und zweiten Hauptkomponenten zeigt einen zyklischen Verlauf (Abb. 6.4). Während der drei Oszillationen durchlaufen die Scores den Zyklus im Uhrzeigersinn genau dreimal beginnend mit dem Spektrum, das zur 44. Kultivierungsstunde detektiert wurde. Die Lage der Scores in der Abbildung 6.4 gibt Auskunft, in welcher Zellzyklusphase (G_1 -, S- oder G_2/M -Phase) sich der Großteil der Zellen zum Detektionszeitpunkt befindet. Der Abstand der Scores ist dabei in der S-Phase am größten. Die Zellen durchlaufen die S-Phase sehr schnell. Der zyklische Verlauf der Score-Werte zeigt stabile Oszillationen in diesem Zeitintervall an. Ein 2D-Fluoreszenzspektrum, das von einer synchron wachsenden Hefe-

Kultur bei gleicher Verdünnungsrate aufgenommen wurde, lässt sich durch Vergleich mit Hilfe der Score-Darstellung den entsprechenden Zellzyklusphasen zu ordnen.

Die Loadings in Abbildung 6.5 zeigen, dass hauptsächlich die Varianz der NAD(P)H-abhängigen Bereiche entscheidend für die Darstellung der ersten Hauptkomponente ist. Die zweite Hauptkomponente ist dagegen vor allem von den tyrosin-, tryptophan- und pyridoxin-abhängigen Bereichen abhängig.

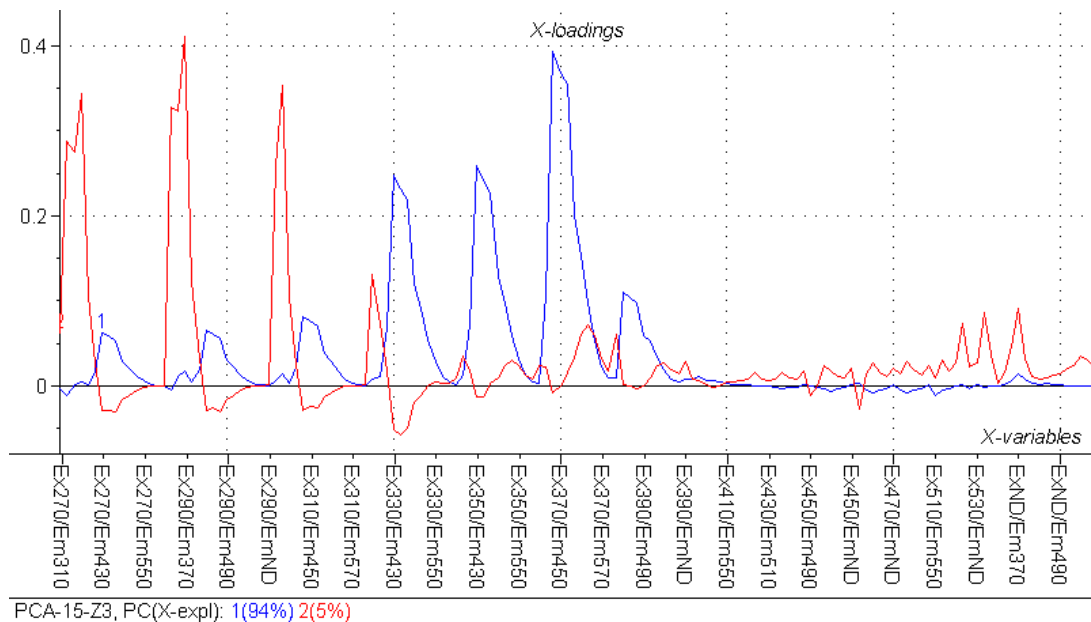


Abb. 6.5: Loadings der ersten und zweiten Hauptkomponenten berechnet mittels Hauptkomponentenanalyse aus 2D-Fluoreszenzspektren einer synchron wachsenden *S. cerevisiae*-Kultur ($D = 0,15 \text{ h}^{-1}$)

Die flavinabhängigen Bereiche sowie das wellenlängenabhängige Streulicht haben aufgrund ihrer geringen Varianz nur einen sehr kleinen Anteil an der Darstellung der ersten zwei Hauptkomponenten. So beträgt die Intensitätsfluktuation der relativen Fluoreszenzen in den Flavinbereichen weniger als 5%. In den tyrosin-, tryptophan- und pyridoxinabhängigen Fluoreszenzbereichen ergeben sich Änderungen um ca. 15-20% und in den NAD(P)H-Bereichen sogar über 120%. Die RFI in den NAD(P)H-Bereichen zeigen bei synchron wachsenden Hefezellen die größte Varianz, im Gegensatz zu den Batch-Kultivierungen (Abb. 5.12). Bei den Batch-Kultivierungen zeigen die Loadings vor allem in den tyrosin-, tryptophan- und pyridoxin-abhängigen Fluoreszenzbereichen aufgrund der starken Zunahme der Biomasse die größten Beträge.

Ein detaillierter Vergleich einzelner Zellzyklen ist auch mit der Darstellung der Leverage-Werte möglich. Dabei werden einzelne Fluoreszenzspektren mit der Gesamtheit aller Spektren verglichen (Kap. 2.3.1). Je größer die Leverage-Werte für ein Spektrum sind, um so mehr unter-

scheidet sich dieses Spektrum von den anderen Spektren. Stoffwechsellumstellungen, aber auch Ausreisser und Störungen, lassen sich so leicht erkennen.

In Abbildung 6.6 sind die Leverage-Werte der ersten drei Hauptkomponenten von den 180 2D-Fluoreszenzspektren dargestellt, die während der drei Oszillationen (Abb. 6.1-3) detektiert wurden. Die Leverage-Werte der ersten Hauptkomponente zeigen für alle drei Zellzyklen einen identischen Verlauf. Dabei resultiert der steile Anstieg nach der 24., 84. und 147. Messung (Samples) aus dem sprunghaften RFI-Anstieg in den NAD(P)H-abhängigen Bereichen beim Übergang in die S-Phase.

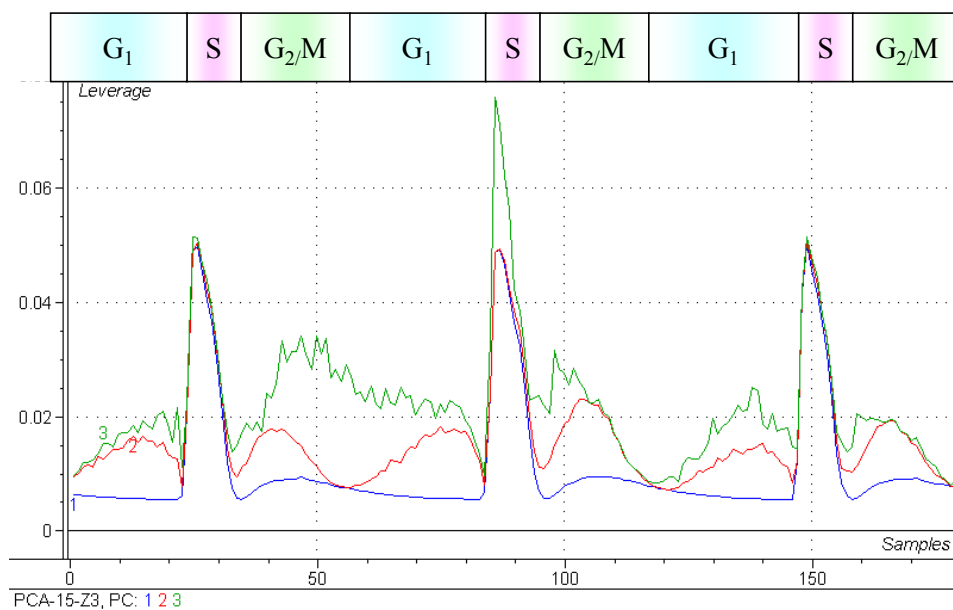


Abb. 6.6: Leverage-Darstellung der ersten drei Hauptkomponenten berechnet mittels Hauptkomponentenanalyse aus 2D-Fluoreszenzspektren einer synchron wachsenden *S. cerevisiae*-Kultur ($D = 0,15 \text{ h}^{-1}$)

Der Leverage-Verlauf der zweiten Hauptkomponente gestattet eine Zuordnung der Zellzyklusphasen. Ein Minimum nach 24 Messungen zeigt beispielsweise den Übergang von der G_1 -Phase in die S-Phase. Der Übergang von der S-Phase in die G_2/M -Phase wird durch ein Minimum nach 34 Messungen und der Übergang von der G_2/M -Phase in die G_1 -Phase durch ein Minimum nach 56 Messungen gezeigt. Zwischen den entsprechenden Minima befindet sich der Großteil der Zellen in den entsprechenden Zellzyklusphasen. Ein genauer Vergleich der einzelnen Zellzyklen zeigt jedoch Unterschiede in den Leverage-Werten, besonders im Leverage-Verlauf der dritten Hauptkomponente. Diese Beobachtung zeigt, dass die drei Zellzyklen nicht genau identisch verlaufen, obwohl die online und offline gemessenen Rohdaten sowie die Fluoreszenzspektren (Abb. 6.3) auf weitgehend stabile synchrone Oszillationen hindeuteten.

Die Betrachtung der Scores (Abb. 6.4) und der Leverage-Werte (Abb. 6.6) zeigt, dass die Informationen über den biologischen Zellzustand (z.B. Zellzyklusphasen) in den Fluoreszenzdaten enthalten sind. Mit Hilfe chemometrischer Modelle lassen sich diese Informationen extrahieren und für eine Online-Vorhersage nutzen.

6.5 Entwicklung von PLS-Modellen zur Vorhersage der BTM- und Ethanolkonzentration

Bisher ist es kaum möglich, bei sehr schnellen Prozessen mehrere wichtige Größen im Minutentakt online zur Verfügung zu stellen, um eine lückenlose Prozesskontrolle und Prozessdokumentation zu erreichen. Am Beispiel von synchron wachsenden *S. cerevisiae*-Kulturen wird das Potential der 2D-Fluoreszenzspektroskopie als eine schnelle, nicht-invasive Online-Analytik dargestellt. Die Biotrockenmasse- und Ethanolkonzentration sind für eine Beurteilung des aktuellen Prozesszustands synchron wachsender Hefezellen wichtige Prozessgrößen, so dass eine exakte Online-Vorhersage dieser Größen in Echtzeit für die Bioprozessbeobachtung interessant ist.

Zwei PLS-Modelle wurden aus zehn offline gemessenen BTM- bzw. Ethanolwerten (Abb. 6.7) und den entsprechenden 2D-Fluoreszenzspektren analog den Beschreibungen in Kapitel 5.8.1 erstellt. Aufgrund hoher Messfehler bei der Offline-Bestimmung der BTM- und Ethanolkonzentrationen wurden mittels Literaturdatenvergleich [BEUSE,1998] einige offensichtliche Ausreisser bei der Berechnung der PLS-Modelle nicht berücksichtigt. So wurden beispielsweise offline gemessene Ethanolwerte zur 46,9 h und 49,5 h für die Erstellung des PLS-Modells nicht verwendet.

Die Verläufe der offline gemessenen und geschätzten BTM- und Ethanolwerte sind für den Kalibrationszyklus in Abbildung 6.8 zusammen mit dem Konzentrationsverlauf des CO₂-Abgas zu sehen. Für den Zyklus zwischen der 47. bis 50. Kultivierungsstunde ist eine gute Übereinstimmung zwischen den offline gemessenen Konzentrationen und den mit den PLS-Modellen berechneten Werten erkennbar. Der relative Fehler bezogen auf die Amplitude beträgt für die BTM-Schätzung lediglich 5,6% und für die Ethanol-Schätzung 3,3%. Während der dreistündigen Periode der synchron wachsenden Hefe-Kultur stehen durch die Schätzung der PLS-Modelle insgesamt 60 präzise Konzentrationswerte für die Biotrockenmasse und für Ethanol zur Verfügung. Dem stehen im gleichen Zeitraum nur zehn offline gemessene Konzentrationsangaben gegenüber.

Bei einer stabil oszillierenden Kultur mit gleicher Verdünnungsrate ($D = 0,15 \text{ h}^{-1}$) ist eine Übertragung der PLS-Modelle zur Vorhersage bei weiteren Oszillationszyklen einfach möglich. Die Vorhersagen für sechs weitere Zellzyklen sind ebenfalls in Abbildung 6.7 zu sehen. Die vorhergesagten BTM- und Ethanolkonzentrationen zeigen einen analogen Verlauf zum Kalibrationszyklus. Mit Hilfe dieser PLS-Modelle werden die Prozessdaten für alle sieben Oszillationsperioden fast lückenlos erhältlich. Wichtige Prozessgrößen können so selbst bei sehr dynamischen Prozessen in Echtzeit und mit hoher Auflösung präzise berechnet werden, ohne dass in den empfindlichen Bioprozess eingegriffen wird.

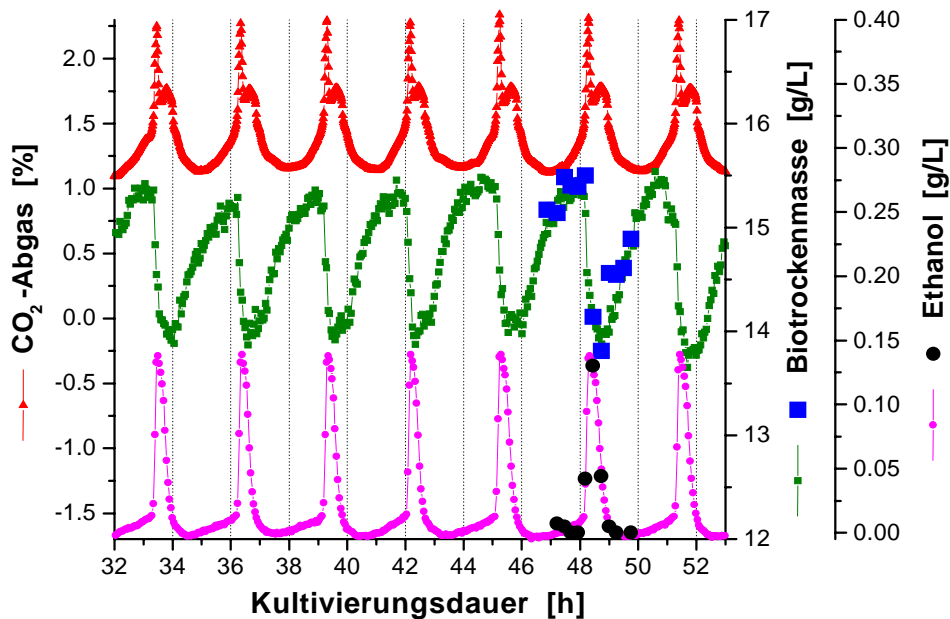


Abb. 6.7: Verlauf der CO_2 -Konzentration im Abgas sowie die offline gemessenen und geschätzten BTM- und Ethanolkonzentrationen während einer synchron wachsenden *S. cerevisiae*-Kultur ($D = 0,15 \text{ h}^{-1}$)

6.6 Modellanwendung bei unterschiedlichen Verdünnungsraten

Im Chemostat, in dem ein Zellwachstum unter konstanten Bedingungen ermöglicht wird, stellt sich gewöhnlich nach einem bestimmten Zeitraum ein stationärer Zustand ein. Im Fall synchron wachsender Hefezellen wird ein „stationärer“ Zustand mit dem Erreichen gleichmäßiger und stabiler Oszillationen erlangt. Eine veränderte Verdünnungsrate führt zu einem neuen „stationären“ Zustand. Das veränderte Substratangebot wirkt sich dabei auf den biologischen Zellzustand aus. Als charakteristisches Merkmal nimmt die Periodenlänge synchron wachsender Hefezellen zu, wenn die Verdünnungsrate verringert wird und umgekehrt.

6.6.1 Einfluss der Verdünnungsrate auf die RFI

In Abbildung 6.8 sind die RFI-Verläufe verschiedener Fluoreszenzbereiche (Tab. 5.2) bei zwei Verdünnungsraten dargestellt. In einem Zeitraum von 86 Stunden wurden vom BioView Sensor 21 Oszillationsperioden beobachtet und dabei insgesamt 1.691 2D-Fluoreszenzspektren automatisch und störungsfrei aufgenommen. Zwischen der 30. und 53. Kultivierungsstunde ist ein „stationäre“ Zustand mit stabilen Oszillationen und gleichmäßiger Periodenlänge von ca. 3,05 h zu beobachten. Die Verdünnungsrate beträgt $D = 0,15 \text{ h}^{-1}$. Gleichmäßige, periodische Fluktuationen in den verschiedenen RFI-Verläufen bestätigen hier den „stationären“ Zustand der synchron wachsenden Kultur. Nach 53 h wurde die Verdünnungsrate von $D = 0,15 \text{ h}^{-1}$ auf $D = 0,13 \text{ h}^{-1}$ reduziert. Dies führt bei den drei folgenden Oszillationen zu einer Verlängerung der Periodendauer auf ca. 4 h, wie auch im Verlauf des CO_2 -Gehalts im Abgas zu erkennen ist.

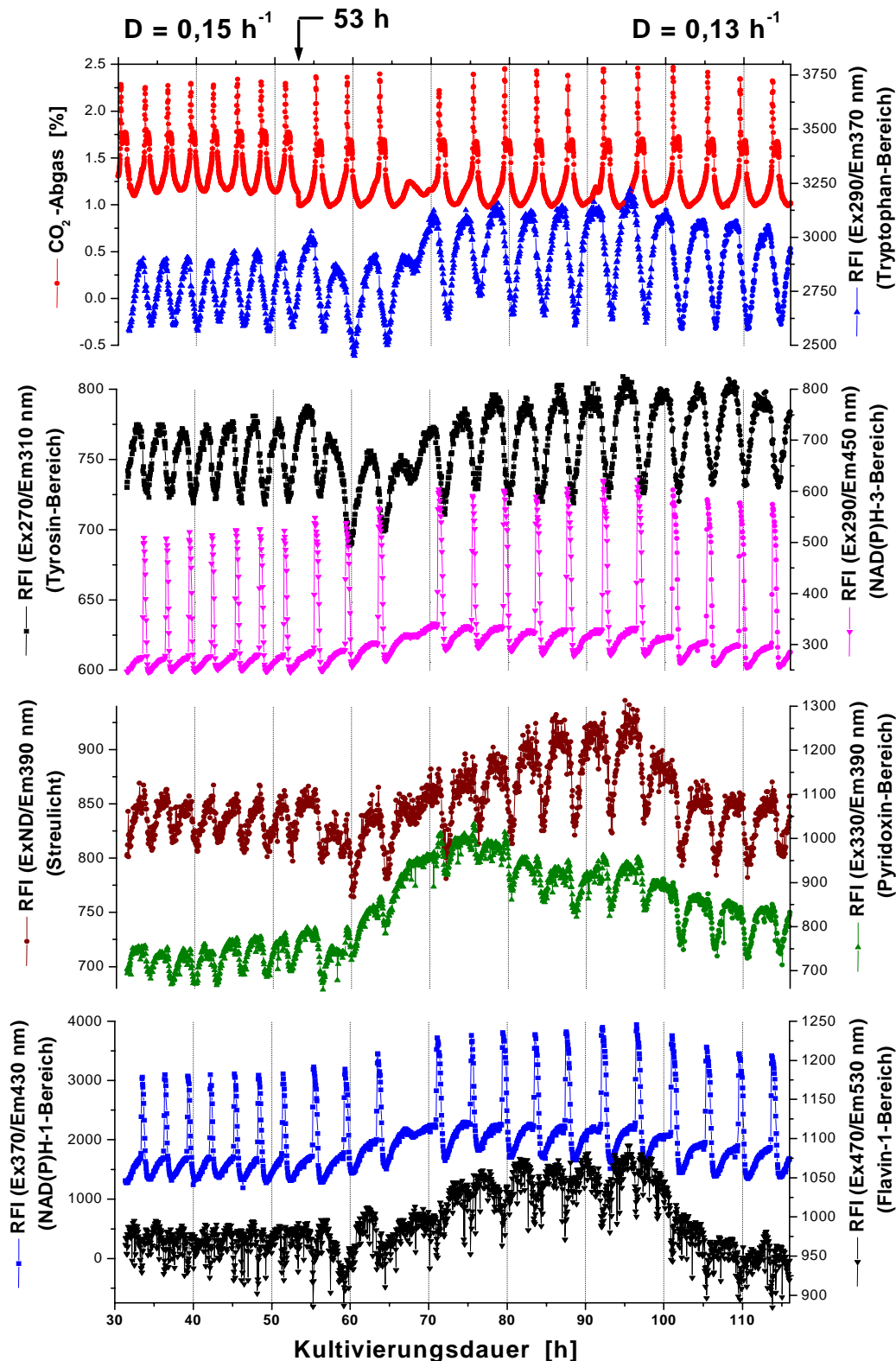


Abb. 6.8: Verläufe der CO_2 -Abgaskonzentration und verschiedener RFI einer synchron wachsenden *S. cerevisiae*-Kultur bei unterschiedlichen Verdünnungsraten ($D = 0,15 \text{ h}^{-1}$ bis 53 h und $D = 0,13 \text{ h}^{-1}$ ab 53 h) im tryptophan- (Ex290/Em370 nm), tyrosin- (Ex270/Em310 nm), NAD(P)H-3- (Ex290/Em450 nm), streulicht- (ExND/Em390 nm), pyridoxin- (Ex330/Em390 nm), NAD(P)H-1- (Ex370/Em430 nm) und flavinabhängigen (Ex470/Em530 nm) RFI-Bereich

Nach 67 h ist die Oszillation ohne äusseren Einfluss ausgeblieben. Bei allen folgenden Perioden schwankt die Periodendauer zwischen 4,0 und 4,5 h. Der Verlauf der CO₂-Konzentration im Abgas deutet nach 75 h im Gegensatz zu den Fluoreszenzverläufen auf einen annähernd „stationären“ Zustand hin.

Die Reduzierung der Verdünnungsrate nach 53 h führt im Verlauf der tryptophan- und tyrosin-abhängigen RFI allgemein zu einer Erhöhung der Amplituden (Abb. 6.8). Auffällig ist jedoch, dass das Niveau der Amplituden nach 53 h zunächst deutlich abnimmt und sich nach der ausgebliebenen Oszillation nach 68 h auf einem höheren Niveau einpendelt. Die tryptophan-abhängige RFI bei Ex290/Em370 nm zeigt ausserdem bei $D = 0,13 \text{ h}^{-1}$ im Vergleich zu $D = 0,15 \text{ h}^{-1}$ einen steileren RFI-Anstieg. Der RFI-Verlauf geht darüber hinaus am Ende jeder G₁-Phase in eine Sättigungskurve über.

Die Verläufe der NAD(P)H-abhängigen RFI zeigen schon gleich nach 53 h einen Anstieg des RFI-Niveaus bis zur 71. Kultivierungsstunde, die anschließend wieder kontinuierlich abfallen. Der NAD(P)H-abhängige RFI-Verlauf bei Ex370/Em430 nm geht bei $D = 0,13 \text{ h}^{-1}$ ebenfalls in eine Sättigungskurve über, bevor er zu Beginn der S-Phase plötzlich stark ansteigt.

Besonders stark nimmt das RFI-Niveau im Pyridoxinbereich nach Veränderung der Verdünnungsrate zu. Nach 74 h fällt die pyridoxinabhängige RFI wieder kontinuierlich ab. Im Streulicht und in der flavinabhängigen RFI ist dagegen nach einem kontinuierlichen Anstieg ein sehr starker Abfall des RFI-Niveaus nach ca. 100 h zu beobachten. Die Amplitude der flavin-abhängigen RFI nimmt bei geringerer Verdünnungsrate zu.

Die Reduzierung der Verdünnungsrate nach 53 h hat, wie die Abbildung 6.8 zeigt, zu unterschiedlichen Veränderungen in den RFI-Signalen geführt. Das Ausbleiben der Oszillation nach 67 h kann im instabilen Kulturzustand begründet sein. Beim Zyklus zwischen der 65. und 70. Stunde tritt der Großteil der Zellen nicht in die S-Phase ein, was ansonsten zu einem signifikanten Anstieg in der CO₂-Konzentration im Abgas sowie in der NAD(P)H-abhängigen RFI geführt hätte. Der Großteil der Zellen setzt diesen Zyklus aus und geht anschließend wieder direkt in die Wachstumsphase über. Dies führt zu einem größeren Anstieg in der tryptophan-, tyrosin- und pyridoxinabhängigen RFI. Wahrscheinlich verursacht ein Wechsel des Wachstumsmodus diese Veränderungen in den RFI-Verläufen.

Neben biologischen Ursachen nehmen auch physikalische Größen (z.B. OD) Einfluss auf die RFI. Trotz allgemein höherer RFI nach 75 h hat die optische Dichte im Vergleich nach 48 h abgenommen (Daten nicht dargestellt). Die veränderte optische Eigenschaft der Kulturbrühe könnte zu einer veränderten Eindringtiefe des Anregungslichtes geführt haben. Diese Beobachtungen zeigen, dass die Veränderungen in den Fluoreszenzsignalen durch Änderung der Verdünnungsrate bei synchron wachsenden *S. cerevisiae*-Kulturen höchst komplex sind.

6.6.2 Validierung der PLS-Modelle

In Abbildung 6.9 sind der Verlauf der CO_2 -Konzentration im Abgas sowie der offline gemessenen und berechneten BTM-Konzentration von zwei Verdünnungsraten dargestellt. Für die Berechnung der BTM-Konzentration wurden zwei PLS-Modelle entwickelt. PLS-Modell-1 wurde lediglich mit den Offline-Werten der Verdünnungsrate $D = 0,15 \text{ h}^{-1}$ erstellt. Die Schätzung zeigt eine sehr gute Übereinstimmung bei gleicher Verdünnungsrate. Bei einer Verdünnungsrate von $D = 0,13 \text{ h}^{-1}$ weichen die vorhergesagten BTM-Werte jedoch deutlich von den offline gemessenen Daten ab. Der RMSEP beträgt $1,18 \text{ g/L}$.

Das PLS-Modell-2 dagegen wurde aus den Offline-Werten beider Verdünnungsraten erstellt und zeigt für beide Verdünnungsraten eine sehr gute Übereinstimmung mit einem RMSEP von nur noch $0,08 \text{ g/L}$. Dazu nutzt das PLS-Modell-2 sieben Hauptkomponenten und damit drei mehr als das PLS-Modell-1.

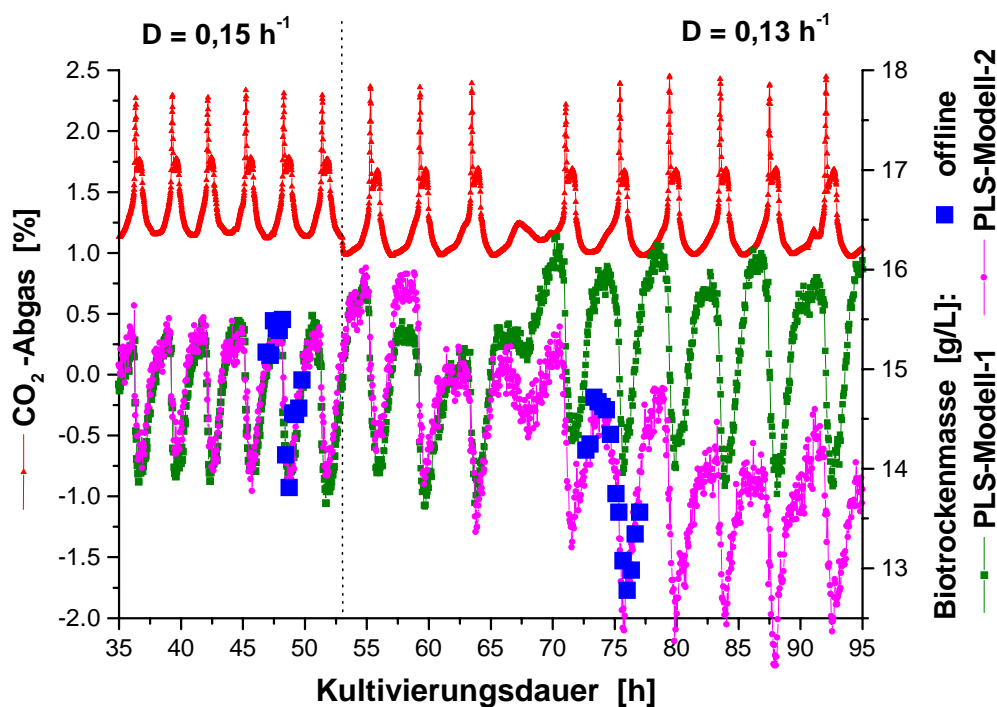


Abb. 6.9: Verlauf der CO_2 -Konzentration im Abgas sowie der offline gemessenen und vorhergesagten BTM-Konzentration von zwei Verdünnungsraten einer synchron wachsenden *S. cerevisiae*-Kultur

Um die komplexen Zusammenhänge bei veränderter Verdünnungsrate mit Hilfe der Fluoreszenzdaten beschreiben zu wollen, sind komplexere PLS-Modelle notwendig, die aus mehreren Offline-Daten unterschiedlicher Verdünnungsraten erstellt werden müssen. Im Bereich dieser Verdünnungsraten lässt sich der Verlauf der BTM-Konzentration dann sehr gut beschreiben. Im Zeitraum zwischen der 35. und 95. Kultivierungsstunde lassen sich mit Hilfe des PLS-Modells-2 ca. 1200 BTM-Konzentrationswerte berechnen. Die dynamischen Vorgänge beim synchronen Wachstum lassen sich so mit hoher Auflösung untersuchen.

6.7 Zellzyklusanalyse mittels Durchflusscytometrie

Mit Hilfe der Durchflusscytometrie wurde bei einer synchron wachsenden *S. cerevisiae*-Kultur ($D = 0,14 \text{ h}^{-1}$) der DNA-Gehalt von Einzelzellen untersucht, um von der Gesamtkultur den prozentualen Anteil der Zellen zu bestimmen, die gleichzeitig die G_1 -, S- und G_2/M -Phase durchlaufen [SCHEPER et al., 1987] [RIESEBERG, 2000].

6.7.1 Berechnung der Zellzyklusphasen mittels PLS-Modelle

Für die durchflusscytometrischen Messungen wurden von zwei Zellzyklen nach der 93. Kultivierungsstunde alle 20 min Offline-Proben entnommen (Abb. 6.10). Gleichzeitig wurden alle 72 Sekunden kontinuierlich 2D-Fluoreszenzspektren aufgenommen, die aus 121 Wellenlängenkombinationen bestehen. Bereiche im Spektrum mit geringerer Varianz wurden dabei nicht gemessen (Vergleich Abb. 6.5), um eine höhere Messfrequenz erreichen zu können. Die Spektren vor der 93. Kultivierungsstunde wurden in Zeitintervallen von 3 min detektiert. Um den prozentualen Anteil der Zellen in den gleichen Zellzyklusphasen direkt aus den Fluoreszenzdaten berechnen zu können, wurden analog Kapitel 5.8.1 PLS-Modelle erstellt. Die offline gemessenen und mittels PLS-Modellen geschätzten Werte der Kalibration sind zusammen mit der Kulturfluoreszenz des Fluorosensors in Abbildung 6.10 dargestellt. Um den prozentualen Anteil der Zellen, die gleichzeitig die G_1 -, S- und G_2/M -Phasen durchlaufen, von der Gesamtkultur zu berechnen, nutzen die PLS-Modelle jeweils fünf Hauptkomponenten. Die geschätzten Werte zeigen dabei eine sehr gute Übereinstimmung mit den offline ermittelten Daten. Der RMSEC beträgt weniger als 1% für alle drei PLS-Modelle.

Zwischen der 95. und 96. Kultivierungsstunde erhöht sich der Anteil der Zellen in der G_1 -Phase von 55% auf 65%. Nach 96 h, etwa 20 Minuten nach dem Maximum der Kulturfluoreszenz, fällt der Anteil der Zellen in der G_1 -Phase von ca. 65% auf ca. 35% schnell ab (bis 97 h). Der Anteil der Zellen in der S-Phase erhöht sich nach 95,7 h genau zum Zeitpunkt des sprunghaften Anstiegs der Kulturfluoreszenz von ca. 5% auf ein Maximum von ca. 35% (96,3 h). Von diesem Zeitpunkt an nimmt der Anteil der Zellen in der G_2/M -Phase von 20% auf bis zu 50% zu (97,2 h). Noch bevor der Anteil der Zellen in der G_2/M -Phase seinen Maximalwert erreicht hat, nimmt die Kulturfluoreszenz und der Anteil der Zellen in der G_1 -Phase bereits wieder zu. Der Anteil der Zellen in der S-Phase beträgt zu diesem Zeitpunkt nur noch 10%.

Die Summe der Zellen in den drei verschiedenen Phasen beträgt dabei zu jedem Zeitpunkt ca. 100%. So beträgt z.B. der Anteil der Zellen nach der 99. Kultivierungsstunde in der G_1 -Phase ca. 65%, in der S-Phase ca. 10% und in der G_2/M -Phase ca. 25% und erfasst damit die gesamte Population. Obwohl in diesem Zeitintervall keine Offline-Referenzdaten vorliegen, bestätigt die Summe von ca. 100% die Genauigkeit der modellbasierenden Berechnungen für die drei verschiedenen Zellzyklusphasen.

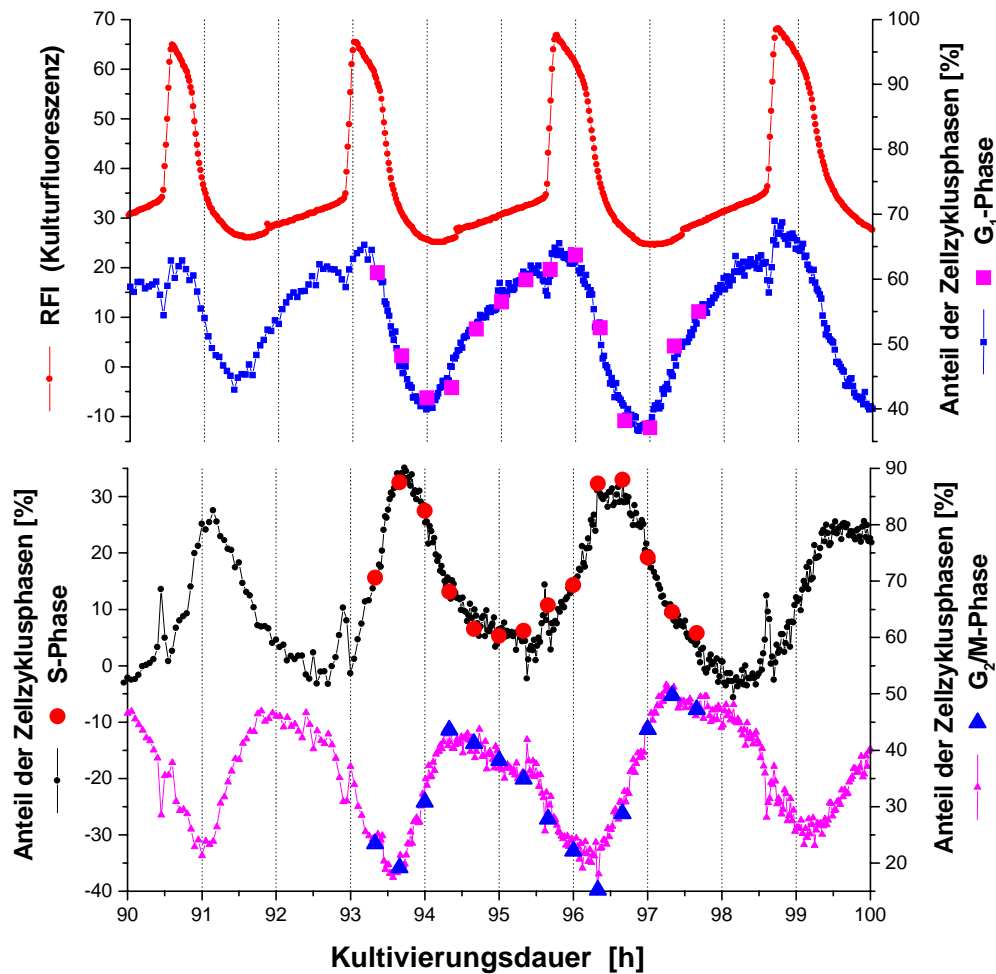


Abb. 6.10: Verläufe der Kulturfluoreszenz (Fluorosensor), der durchflusscytometrisch gemessenen und geschätzten prozentualen Anteile der Zellen von der Gesamtkultur, die sich in gleicher Zellzyklusphase befinden, während einer synchron wachsenden *S. cerevisiae*-Kultur ($D = 0,14 \text{ h}^{-1}$)

In Abbildung 6.10 ist zu sehen, dass der Anteil der Zellen in der S-Phase erst genau dann stark ansteigt, wenn die NAD(P)H-abhängige Kulturfluoreszenz sprunghaft ansteigt. Zu diesen Zeitpunkten wird wahrscheinlich ein Restriktionspunkt überschritten. Die hohe Stoffwechselaktivität der Zellen ermöglicht nun den Übergang in die S-Phase und stellt den Energiebedarf für die DNA-Synthese bereit. Ein weiterer Restriktionspunkt wird wahrscheinlich überschritten, wenn der Anteil der Zellen in der G_2/M -Phase sprunghaft ansteigt. Der Anteil der Zellen in der S-Phase hat dann ein Maximum erreicht. Nach erfolgreicher Duplikation der Spindelapparate und der DNA-Replikation in der S-Phase erfolgt der Übergang in die G_2/M -Phase. Hier findet die gleichmäßige Aufteilung des Genoms auf Mutter- und Tochterzelle sowie die Teilung des Zellkerns statt. Nach der Zellteilung gehen die Zellen direkt in die Wachstumsphase (G_1 -Phase) über. Der Anteil der Zellen in der G_1 -Phase nimmt schon zu, bevor der Anteil der Zellen in der G_2/M -Phase ein Maximum erreicht. Die Amplituden der drei Zellzyklusphasen (Abb. 6.10) betragen für die vier Perioden ca. 25-30% von der Gesamtkultur. Dies entspricht wahrscheinlich genau dem Anteil der Zellen von der Gesamtkultur, die den Zellzyklus synchron durchlaufen.

6.7.2 Vorhersage der Zellzyklusphasen mittels PLS-Modelle

Zur Untersuchung weiterer Perioden wurden die PLS-Modelle von Kapitel 6.7.1 zur Vorhersage der Zellzyklusphasen bei weiteren Oszillationen genutzt. In Abbildung 6.11 sind neben den bereits in Abbildung 6.10 gezeigten vier Oszillationen weitere 14 Perioden dargestellt, bei denen der Anteil der Zellen berechnet wurde, der sich in der gleichen Zellzyklusphase befindet. Die Validierung der PLS-Modelle zeigt trotz instabiler Oszillationen eine qualitativ hinreichend gute Vorhersagegenauigkeit. Der RMSEP für die G_1 -, S- und G_2/M -Phasen beträgt zwischen 3,5% und 5,8%. Die Summe der vorhergesagten Anteile beträgt zu jedem Zeitpunkt ca. 100%. So beträgt der Anteil der Gesamtkultur nach 65 h in der G_1 -Phase ca. 55%, in der S-Phase ca. 12% und in der G_2/M -Phase ca. 33%. Die gesamte Population wird somit erfasst. Eine Verbesserung der Vorhersagegenauigkeit konnte erreicht werden, wenn zur Erstellung der PLS-Modelle die Offline-Daten aus beiden Zeiträumen (68 h - 72 h und 93 h - 98 h) genutzt werden. Die RMSEC der Schätzungen reduzieren sich dann auf unter 2,5% (nicht dargestellt).

Aufgrund der hohen Dynamik synchron wachsender Hefe-Kulturen ist eine detaillierte Untersuchung der Proliferation im Cytometer über längere Zeiträume sehr arbeits- und zeitaufwendig. Während der 18 Zellzyklen (Abb. 6.11) wurden 940 2D-Fluoreszenzspektren mit insgesamt 113.740 Messpunkten online und automatisiert aufgenommen, ohne dass die empfindliche Zellkultur beeinflusst oder gestört wurde. Mit Hilfe der PLS-Modelle ist es möglich, durchflusscytometrische Prozessdaten aus online gemessenen In-situ-Fluoreszenzdaten vorherzusagen. Die Prozessdaten hängen dabei gleichzeitig von den RFI-Verläufen mehrerer WLK ab. Komplexe PLS-Modelle berücksichtigen auch deren Wechselbeziehungen untereinander. Die Vorhersage von Prozessdaten wird in bestimmten Bereichen (z.B. Verdünnungsrate) trotz dynamischer Veränderungen möglich.

Am Verlauf des CO_2 -Gehaltes im Abgas (Abb. 6.11) ist zu erkennen, dass die Oszillationen nicht stabil sind. Ohne äusseren Eingriff nimmt die Periodenlänge von ca. 3,1 h nach 60 h kontinuierlich auf 1,9 h ab (75 h). Anschließend ist wieder eine Zunahme der Periodenlängen auf 3,1 h (97 h) erkennbar. Die äusseren Kultivierungsbedingungen waren zu jedem Zeitpunkt konstant. Die Änderung der Periodenlänge sind wohl biologischen Ursprungs. Offensichtlich hat die Zellkultur ihren Wachstumsmodus spontan geändert.

Ohne äusseren Eingriff oder erkennbare Ursache variiert der Wachstumsmodus der Zellkultur zwischen dem Wachstumsmodus 1.2 und Wachstumsmodus 1.4 (Kap. 2.4). Diese Änderung führt dazu, dass eine gesprossete Tochterzelle bei einer Periodenlänge von ca. 3,1 h sich erst nach zwei Perioden und bei einer Periodenlänge von ca. 1,9 h sich erst nach der vierten Periode erstmalig teilt [BEUSE et al., 1998]. Der Anteil synchron wachsender Zellen vermindert sich dadurch deutlich, wie auch in den vorhergesagten Werten in Abbildung 6.11 zu erkennen ist. So nimmt die Amplitude der berechneten Werte in den G_1 -, S- und G_2/M -Phasen deutlich mit der Periodenlänge ab. Während die Amplituden der berechneten Werte zur 60. und 95. Kultivierungsstunde ca. 25-30% betragen, verringert sich dieser Wert zur 75. Kultivierungsstunde mit einer Periodenlänge von 1,9 h auf ca. 15-20%. Diese Beobachtung bestätigt auch ein Vergleich

der Amplituden der offline gemessenen durchflussscytometrischen Daten, die nach der 68. und 93. Kultivierungsstunde bestimmt wurden.

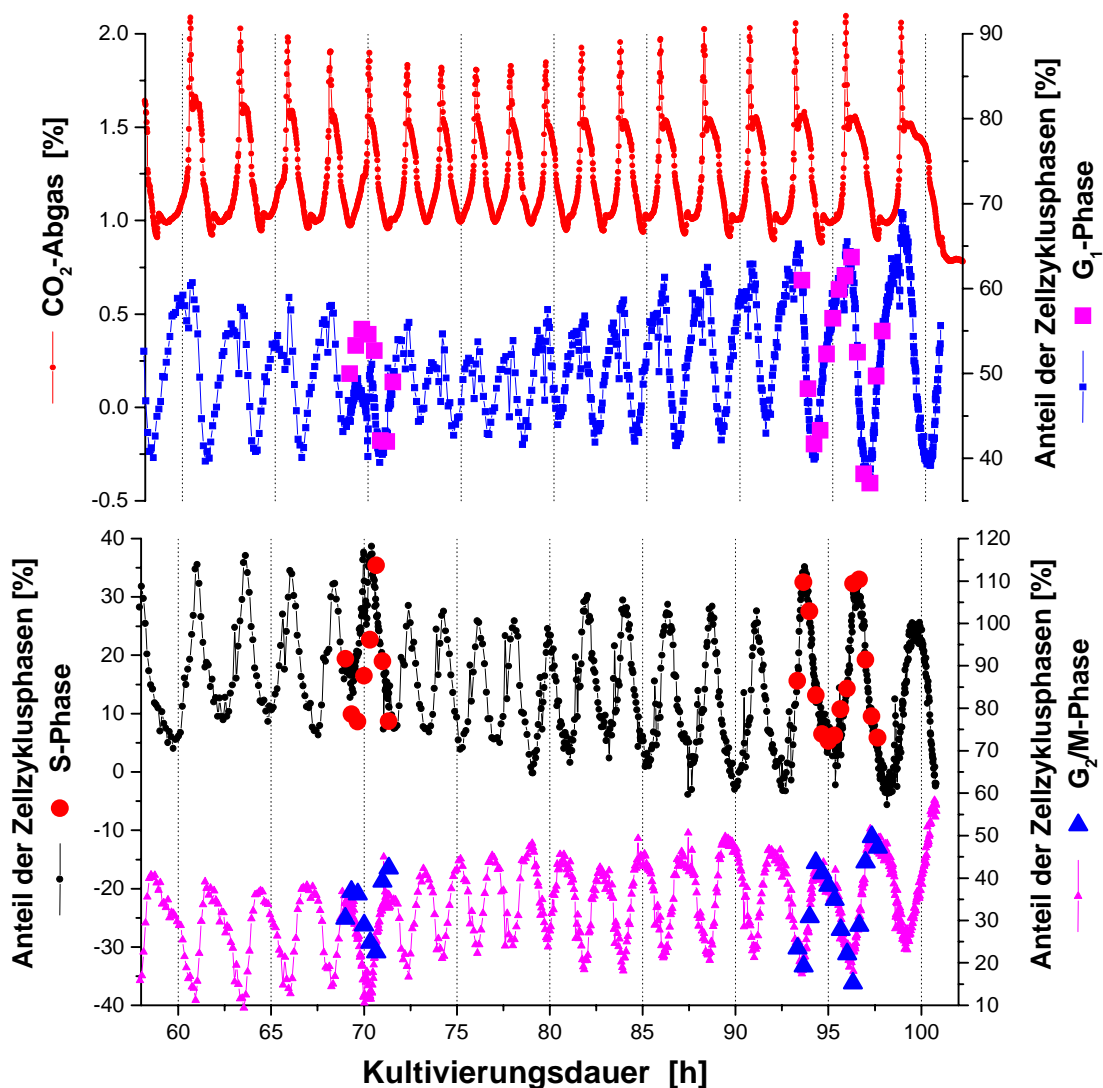


Abb. 6.11: Verläufe der CO_2 -Konzentration im Abgas und der durchflussscytometrisch gemessenen und berechneten Anteile der Zellen, die gleichzeitig die Zellzyklusphasen durchlaufen, während einer instabil oszillierenden *S. cerevisiae*-Kultur ($D = 0,14 \text{ h}^{-1}$)

6.8 Zusammenfassung

Synchron wachsende *S. cerevisiae*-Kulturen zeigen dynamische und komplexe Veränderungen in einer Vielzahl von Einzelgrößen. Biologische, chemische und physikalische Prozessgrößen stehen dabei miteinander in einer vielschichtigen Wechselbeziehung. Daraus ergibt sich ein interessantes und empfindliches System, dass zur Erprobung moderner und anspruchsvoller Messsysteme sehr gut geeignet ist. Die Anwendung der 2D-Fluoreszenzspektroskopie an synchron wachsenden *S. cerevisiae*-Kulturen hat folgendes gezeigt:

- Die dynamischen Veränderungen während des synchronen Hefewachstums konnten mit hoher Messfrequenz über einen langen Zeitraum (über 100 h) genau beobachtet werden. Die 2D-Fluoreszenzspektren wurden automatisch und störungsfrei detektiert. Während der Verdünnungsrate $D = 0,15 \text{ h}^{-1}$ wurden stabile Oszillationen beobachtet. Mit Hilfe der PCA wurden drei Oszillationen genauer ausgewertet. Die Darstellung der Scores (Abb. 6.4) zeigt einen zyklischen Verlauf. Die Lage der Scores gibt dabei qualitativ Auskunft, in welcher Zellzyklusphase (G_1 -, S- oder G_2/M -Phase) sich der Großteil der Zellen zum Detektionszeitpunkt befindet. Die größte Varianz im Spektrum haben bei synchron wachsenden *S. cerevisiae*-Kulturen vor allem die NAD(P)H- und proteinabhängigen Bereiche (Abb. 6.5). Darüber hinaus konnten im Verlauf dieser Oszillationen geringe Unterschiede mit Hilfe der Leverage-Darstellung (Abb. 6.6) erkannt werden.
- PLS-Modelle erlauben die genaue Berechnung von Schätzwerten der periodischen Verläufe der BTM- und Ethanolkonzentration für eine Oszillation (Abb. 6.7). Der relative Fehler der Kalibrationsschätzung beträgt bezogen auf die Amplitude für die BTM 5,6% und für Ethanol 3,3%. Bei gleicher Verdünnungsrate ($D = 0,15 \text{ h}^{-1}$) konnten diese Offline-Größen für weitere Zyklen berechnet werden. Dadurch wurde eine präzise Prozessbeschreibung mit hoher Auflösung erreicht.
- Durch Änderung der Verdünnungsrate auf $D = 0,13 \text{ h}^{-1}$ wurden komplexe Veränderungen in den meisten RFI-Verläufen beobachtet (Abb. 6.8). Die Berechnung der BTM-Konzentration für zwei Verdünnungsraten war nur mit Hilfe eines komplexeren PLS-Modells möglich, das aus den Daten beider Verdünnungsraten erstellt worden ist. Der Verlauf der BTM-Konzentration wurde so über 15 Perioden genau geschätzt.
- Darüber hinaus konnte der Anteil der Zellen von der Gesamtkultur ($D = 0,14 \text{ h}^{-1}$), die gleichzeitig die G_1 -, S- und G_2/M -Phasen durchlaufen, aus den 2D-Fluoreszenzspektren berechnet werden (Abb. 6.10). Die Bestimmung des biologischen Zellzustands erfolgt gewöhnlich durch eine zeitaufwendige Analyse. Mit Hilfe von PLS-Modellen wurden diese biologischen Informationen indirekt aus den schnell messbaren Fluoreszenzdaten bestimmt. Alle 72 Sekunden wurde ein Spektrum detektiert, aus dem der prozentuale Anteil der Zellzyklusphasen (G_1 -, S- und G_2/M -Phase) berechnet wurde. Die Validierung der PLS-Modelle ergab für weitere Oszillationen eine hinreichend genaue Übereinstimmung mit den offline gemessenen Daten, trotz instabiler Oszillationen (Abb. 6.11). Die Summe der vorhergesagten Anteile der Zellzyklusphasen beträgt dabei zu jedem Zeitpunkt ca. 100%.
Der Anteil synchron wachsender Zellen von der Gesamtkultur verändert sich während der instabilen Oszillationen, wie an den Amplituden der Zellzyklusphasen zu erkennen ist. Der Anteil synchron wachsender Hefezellen schwankt zwischen 25-30% (95 h) und 15-20% (70 h), wie in Abbildung 6.11 zu sehen ist.

7 Fed-Batch-Kultivierungen von *Saccharomyces cerevisiae*

7.1 Ziele der Fed-Batch-Kultivierungsexperimente

Fed-Batch-Kultivierungen mit einer geregelten Substratzufütterung werden oftmals bei der industriellen Produktion von Hefen angewendet. Bei dieser Produktionsweise werden bei vergleichsweise niedrigem technischen Aufwand relativ hohe Zelldichten erreicht. Zur Optimierung von Fed-Batch-Prozessen werden zur Zeit hauptsächlich physikalische und chemische Prozessgrößen kontrolliert. Dazu wurden verschiedene Analysemethoden (z.B. Biosensoren, FIA, IR, kalometrische Messungen) entwickelt, um Glucose-, Ethanol-, Biomasse- und Produktkonzentrationen sowie CO₂- und O₂-Abgaswerte online zu bestimmen [MULCHANDANI et al., 1995]. Deren spezifische Raten (z.B. Wachstumsrate, Verbrauchs- und Produktionsrate sowie OUR und CPR) erlauben lediglich indirekte und oft nur unzureichende Aussagen über die Zellaktivität und den aktuellen metabolischen Kulturzustand zu geben. Zeitverzögerungen bei der Detektion dieser Prozessgrößen stehen einer optimalen Prozessregelung entgegen. Industrielle Fed-Batch-Prozesse werden daher oftmals mit einem glucoselimitierten Zufütterungsprofil durchgeführt [VAN HOEK et al., 1998].

Eine moderne Online-Analytik ermöglicht sowohl den aktuellen Zellzustand als auch Änderungen im Zellstoffwechsel zeitnah zu erkennen. Die 2D-Fluoreszenzspektroskopie soll für eine Glucoseregulation am Beispiel von *S. cerevisiae* Fed-Batch-Kultivierungen genutzt werden. Ziel ist es, eine maximale BTM-Ausbeute bei gleichzeitig minimaler Ethanolproduktion zu erreichen. Bei *S. cerevisiae* Fed-Batch-Kultivierung F-1 sollen zunächst schnelle Online-Glucosemessungen mittels eines speziellen Fließinjektionsanalyse-Systems (FIA-System) durchgeführt werden, um die Glucosekonzentration in der Fermentationsbrühe auf einen Sollwert von etwa 0,04 g/L zu regeln (Kap. 3.7). Die dabei detektierten 2D-Fluoreszenzspektren sollen im weiteren dazu genutzt werden, um bei der Fed-Batch-Kultivierung F-2 eine möglichst optimale Regelung der Glucosezufütterung durch Vorhersage des metabolischen Kulturzustandes zu erreichen.

7.2 Kultivierungsbedingungen

Die Kultivierungsbedingungen der Fed-Batch-Kultivierungen erfolgten analog den Beschreibungen in Kapitel 5.2. Davon abweichende Kultivierungsbedingungen sind in Tabelle 6.1 aufgelistet. Das Reaktorstartvolumen betrug 1,0 L eines Schatzmann-Mediums mit 10 g/L Glucose. Nach einer kurzen Batch-Phase und anschließend einstündiger Phase, in der den Zellen keine Kohlenstoffquelle zur Verfügung stand, wurde die Fed-Batch-Kultivierung mit einem BTM-Gehalt von ca. 3 g gestartet. Die Zufuhr der sterilfiltrierten Feedlösung mit einer Glucosekonzentration von 50 g/L wurde durch kontinuierliches Wiegen kontrolliert. Zur Offline-Bestimmung der Glucose-, Ethanol- und BTM-Konzentration wurden jeweils 10 mL Probe direkt in ein

mit Eiswasser gekühltes Probenahmegefäß überführt und umgehend zentrifugiert. Bei den Berechnungen des BTM-Gesamtgehalts und der Ausbeute wurde die Volumenänderung durch Zufütterung und Probenahme berücksichtigt.

Tab. 7.1: Kultivierungsbedingungen

Fed-Batch-Kultivierung	F-1	F-2
Prozesskontrolle	FIA-System	2D-Fluoreszenzspektroskopie
Startvolumen	1,0 L	
Medium	Schatzmann-Medium mit 10 g/L Glucose	
pH	5,5 ± 0,04	
Rührerdrehzahl	800± 1 UpM	
zugefütterte Glucoselösung	50 g/L	
Aufnahmeintervall des BioView Sensors	5 min	90 s

7.3 Regelungsansatz

Bei der Produktion von möglichst viel Zellmasse in kurzer Zeit soll der Prozess zwar bei möglichst hoher Glucosekonzentration aber unterhalb der kritischen Glucoseaufnahmerate (Crabtree-Effekt) durchgeführt werden. Eine Voraussetzung dafür ist eine gute Sauerstoffversorgung, um die Bildung von Ethanol zu vermeiden. Der Sauerstoffeintrag wird bei hoher Biomassekonzentration durch den maximalen volumenbezogenen Stoffübergangskoeffizienten limitiert. Die obere Grenze der kritischen Glucoseaufnahmerate ist damit durch die Kultivierungsbedingungen und Reaktoreigenschaften festgelegt. Bei optimaler Prozessführung wird der Bioprozess genau bei dieser maximal kritischen Glucoseaufnahmerate durchgeführt, ohne sie zu überschreiten. Oberhalb dieser kritischen Glucoseaufnahmerate setzt die Ethanolbildung (Crabtree-Effekt) ein. Der Metabolismus der Hefezellen ändert sich dadurch von einem oxidativen zu einem oxidoreduktiven Stoffwechsel.

Beim Abbau der Glucose erfolgt gleichzeitig die Reduktion von NAD(P)^+ zu NAD(P)H . Während des oxidativen Stoffwechsel wird NAD(P)H in der Atmungskette als Elektronendonator mit Sauerstoff in NAD(P)^+ und H_2O reoxidiert. Bei der Umstellung auf einen oxidoreduktiven Stoffwechsel überträgt NAD(P)H die Elektronen auf reduzierbare Intermediate (z.B. Acetaldehyd), wobei Ethanol gebildet wird. Der Gehalt reduzierter Redoxäquivalente wie NAD(P)H , aber auch FMNH_2 und FADH_2 steigt dabei in der Zelle stark an [SCHÜGERL et al., 1993]. Diese Veränderungen in der Zelle lassen sich fluoreszenzspektroskopisch messen.

Die Abbildung 7.1 zeigt die RFI-Veränderungen in einem 2D-Fluoreszenzdifferenzspektrum beim Übergang der Hefezellen vom oxidativen zum oxidoreduktiven Stoffwechsel (Crabtree-Effekt). Eine Überschreitung der kritischen Glucoseaufnahmerate führt zu diesen signifikanten

RFI-Änderungen. Vor allem in den NAD(P)H-abhängigen Fluoreszenzbereichen bei Ex330-370/Em430-470 nm und Ex290/Em430-470 nm ist eine sehr starke RFI-Zunahme erkennbar. Dagegen nimmt die RFI in den pyridoxin- (Ex330/Em350-390 nm) und flavinabhängigen Fluoreszenzbereichen (Ex430-490/Em510-550 nm) stark ab. Die Überschreitung der kritischen Glucoseaufnahme- und die damit verbundene Stoffwechseländerung sind bei Hefezellen im 2D-Fluoreszenzspektrum in verschiedenen Fluoreszenzbereichen deutlich erkennbar und können zur Überwachung des oxidativen Zellwachstums genutzt werden.

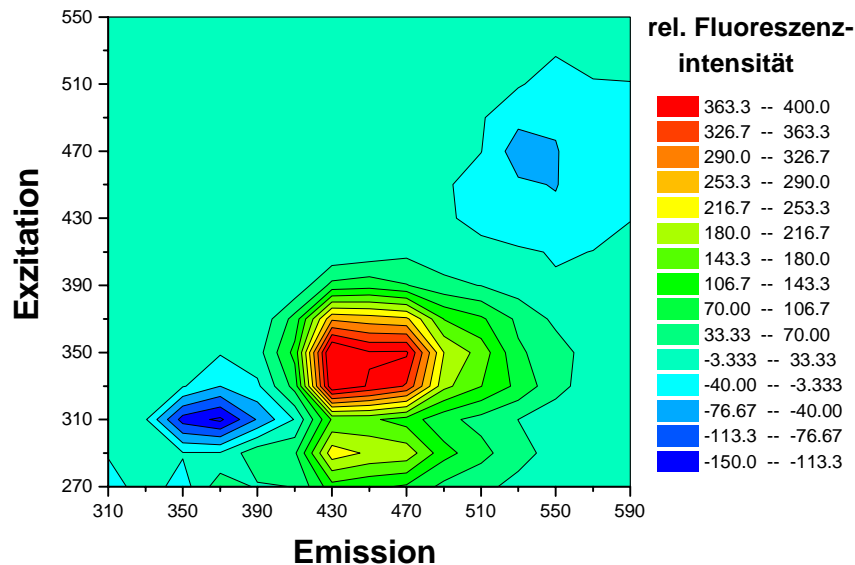


Abb. 7.1: RFI-Veränderungen im 2D-Fluoreszenzdifferenzspektrum beim Übergang vom oxidativen zum oxidoreduktiven Stoffwechsel (Crabtree-Effekt) während einer *S. cerevisiae* Fed-Batch-Kultivierung

7.4 Fed-Batch-Kultivierung F-1

Die Prozesskontrolle bei Fed-Batch-Kultivierung F-1 ist mit Hilfe eines speziellen Fließinjektionsanalyse-Systems [HITZMANN et al., 2000] durchgeführt worden (Kap. 3.7). Die Glucosekonzentration in der Kulturbrühe ist während der Fed-Batch-Kultivierung F-1 konstant auf 0,04 g/L ($dS/dt \approx 0$) geregelt worden.

In Abbildung 7.2b ist der Verlauf der CO_2 - und O_2 -Konzentration im Abgas sowie der daraus berechnete RQ während der Fed-Batch-Kultivierung F-1 dargestellt. Ein RQ-Wert von etwa eins deutet während der Kultivierung auf einen rein oxidativen Stoffwechsel hin. Eine Ethanolbildung konnte, wie in Abbildung 7.2a zu sehen ist, nicht festgestellt werden. Der exponentielle Verlauf der Glucosezufuhr in Abbildung 7.2a deutet bis zur 35. Kultivierungsstunde auf ein annähernd exponentielles Zellwachstum hin. Während der Fed-Batch-Kultivierung F-1 ist die kritische Glucoseaufnahme- und die damit verbundene Stoffwechseländerung aufgrund einer zu hohen Glucosekonzentration in der Fermentationsbrühe mehrmals überschritten worden. Ein RQ-Wert deutlich über eins bestätigt die

daraus resultierende Stoffwechseländerung zu einem oxidoreduktiven Stoffwechsel. Dies ist auch am starken Anstieg des CO₂-Gehalts im Abgas nach 28,8 h, 31,4 h, 32,5 h und 34,4 h erkennbar (Abb. 7.2).

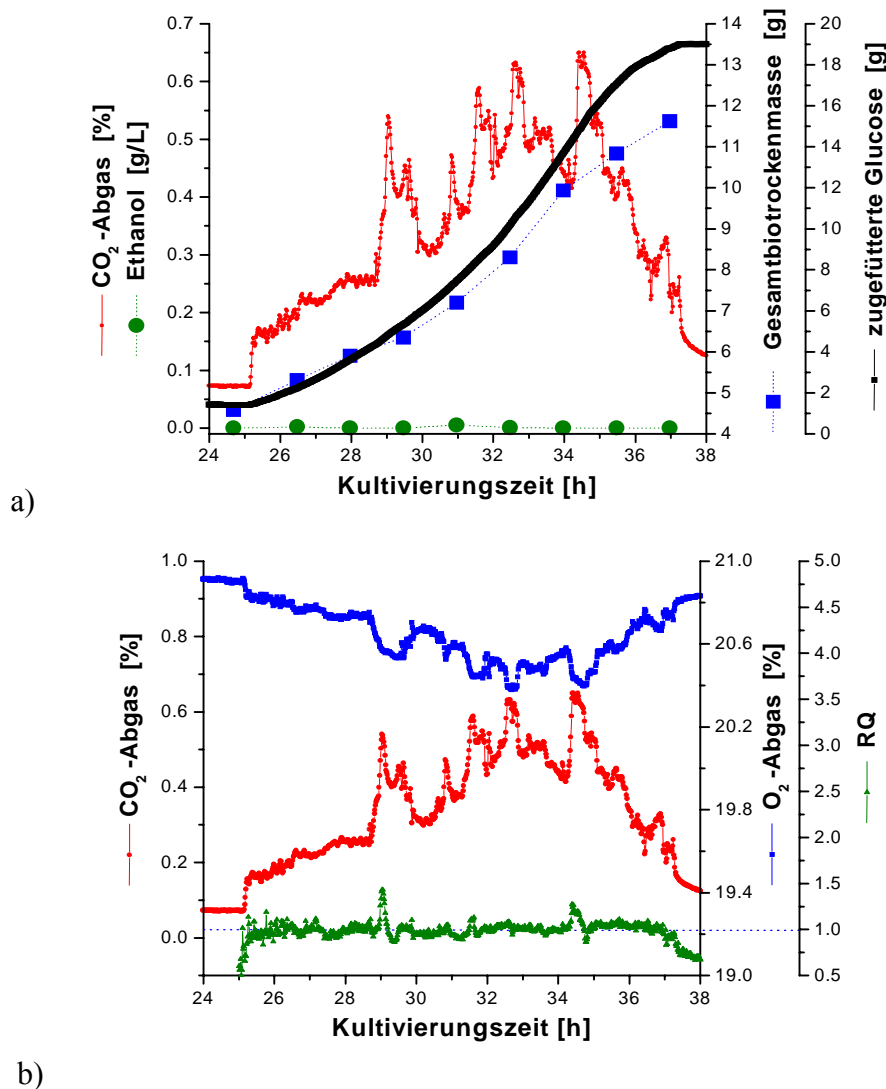


Abb. 7.2: Online-Glucosemessung mit Hilfe eines modifizierten FIA-Systems zur geregelten Glucosefütterung während der *S. cerevisiae* Fed-Batch-Kultivierung F-1

- Verlauf der CO₂-Konzentration im Abgas, Ethanolkonzentration und Gesamtbio-trockenmasse sowie die zugefütterte Glucosemenge
- Verlauf der CO₂-, O₂-Konzentration im Abgas und des RQ

Durch Reduzierung der Pumprate wurde nach kurzer Zeit wieder ein oxidativer Zellstoffwechsel erreicht, der auch an der abnehmenden CO₂-Konzentration im Abgas erkennbar ist. Die Gesamtausbeute der BTM beträgt $Y = 0,405$ g-BTM/g-Glucose. In den ersten neun Stunden beträgt die BTM-Ausbeute sogar $0,436$ g-BTM/g-Glucose. Durch die Prozessphasen mit oxidoreduktivem Zellstoffwechsel hat sich die Gesamtausbeute wahrscheinlich verringert, da die Ausbeute bei diesem Stoffwechsel deutlich unter $0,3$ g-BTM/g-Glucose liegt. Aus nicht geklärten Gründen nimmt die Zellaktivität nach 35 h deutlich ab, erkennbar auch am abnehmen-

den Glucoseverbrauch und an der Abnahme der CO_2 -Konzentration im Abgas. Das verminderte Zellwachstum nach 35 h wirkt sich ebenfalls negativ auf die Gesamtausbeute aus. Die Fed-Batch-Kultivierung F-1 wurde nach 37,3 h beendet.

Für eine Glucoseregulation, die auf der 2D-Fluoreszenzspektroskopie basiert, wurden während der Fed-Batch-Kultivierung F-1 alle 5 Minuten vollständige 2D-Fluoreszenzspektren detektiert. Die Übergänge des Zellstoffwechsels im Verlauf der Kultivierung vom oxidativen zum oxidoreduktiven Stoffwechsel werden besonders im Verlauf der NAD(P)H-abhängigen RFI deutlich (Abb. 7.3a).

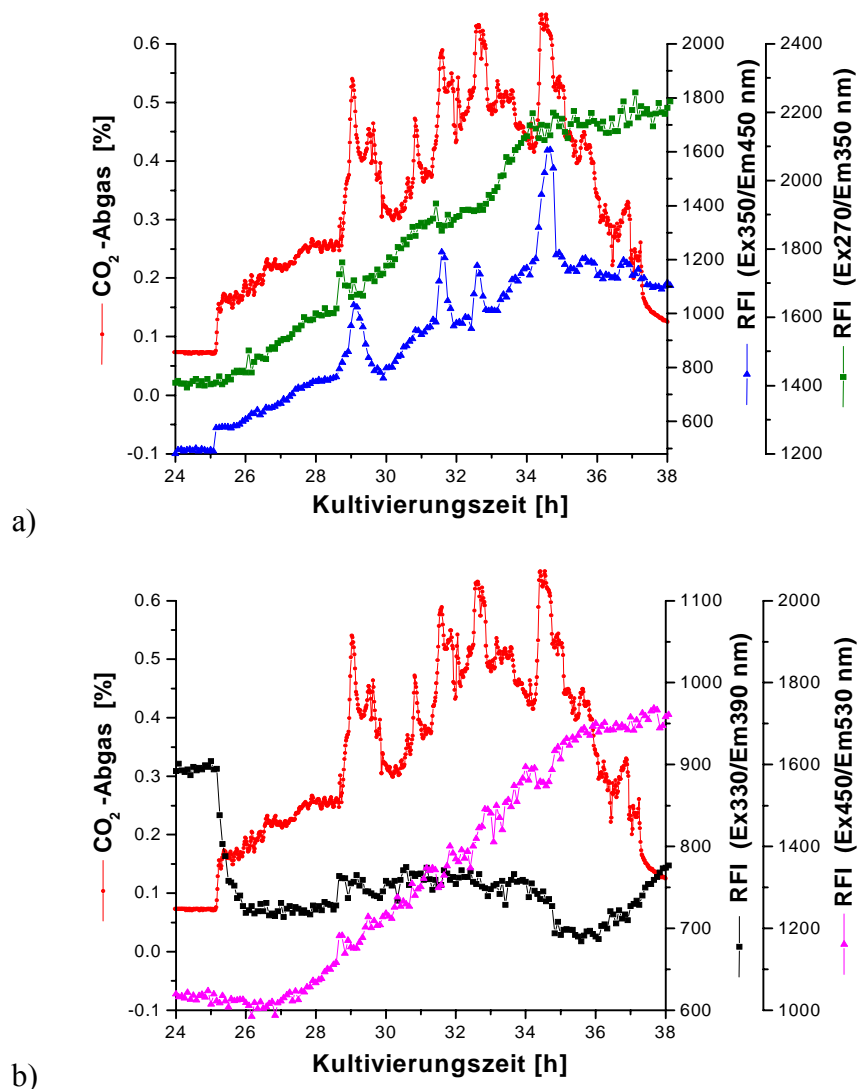


Abb. 7.3: Verlauf des CO_2 -Gehalts im Abgas während der Fed-Batch-Kultivierung F-1 von *S. cerevisiae* a) Verlauf der NAD(P)H- und proteinabhängigen RFI
b) Verlauf der pyridoxin- und flavinabhängigen RFI

Insgesamt nimmt die NAD(P)H-abhängige RFI bei Ex350/Em450 nm viermal nach 28,8 h, 31,4 h, 32,5 h und 34,4 h sehr stark zu und verdeutlicht die kurzzeitigen Stoffwechseländerungen während der Fed-Batch-Kultivierung F-1. Die kontinuierliche Zunahme der protein-

abhängigen RFI bei Ex270/Em350 nm beschreibt die Zunahme der Biomasse (Kap. 5.6). In den Zeiträumen, in denen die Zellen kurzzeitig einen oxidoreduktiven Stoffwechsel nutzen, ist im Verlauf der Protein-RFI ein Plateau zu beobachten. Dieser Verlauf wird wahrscheinlich durch eine geringere BTM-Zunahme in diesen Zeiträumen und durch einen zunehmenden Kaskadeneffekt bei zunehmender RFI in den NAD(P)H-abhängigen Fluoreszenzbereichen verursacht. Die flavinabhängige RFI bei Ex450/Em530 nm nimmt erst zwei Stunden nach dem Start der Fed-Batch-Kultivierung F-1 zu, wie in Abbildung 7.3b zu sehen ist. Zwischen der 27. und 36. Kultivierungsstunde ist die Flavin-RFI kontinuierlich um ca. 700 relative Einheiten gestiegen. Die Stoffwechseländerungen sind in der flavinabhängigen RFI durch geringe RFI-Abnahmen erkennbar. Die pyridoxinabhängigen RFI bei Ex330/Em390 nm nimmt bereits nach Kultivierungsstart (25 h) innerhalb von 30 Minuten sehr stark ab. Offensichtlich dauert es eine gewisse Zeit bis sich die Hefezellen auf die neuen Bedingungen eingestellt haben. Am Prozessende nach 36 h nimmt die pyridoxinabhängige RFI wieder kontinuierlich zu.

In den Fluoreszenzdaten sind Informationen über verschiedene Bioprozessgrößen, wie z.B. Zellwachstum, sowie über den aktuellen Zellstoffwechsel enthalten. Chemometrische Modelle sollen daher verwendet werden, um aus den 2D-Fluoreszenzspektren den aktuellen biologischen Kulturzustand zu berechnen und für eine Glucoseregulation zu nutzen.

7.5 Berechnung eines metabolischen Faktors

Der biologische Kulturzustand einer *S. cerevisiae*-Kultur soll direkt aus 2D-Fluoreszenzspektren ermittelt werden. Dazu wurde ein PLS-Modell entwickelt, das in der Lage ist, einen metabolischen Faktor (MB-Faktor) zu berechnen. Dieser metabolische Faktor nimmt den Wert Null an, wenn die Zellen den gewünschten oxidativen Metabolismus nutzen, und er steigt auf den Wert eins, wenn die Zellen einen oxidoreduktiven Metabolismus nutzen. Zur Erstellung des PLS-Modells wurden den 2D-Fluoreszenzspektren der Fed-Batch-Kultivierung F-1 entsprechend dem aktuellen Stoffwechsel die Werte Null oder eins zugeordnet. Die Beurteilung des genutzten Stoffwechsels zum Zeitpunkt der Detektion der Spektren erfolgte hauptsächlich nach dem Verlauf der NAD(P)H-abhängigen RFI (Abb. 7.3a). Das entwickelte PLS-Modell (MB-Faktor-Modell) nutzt für die Berechnung des metabolischen Faktors acht Hauptkomponenten, auf denen die wesentlichen Informationen des gesamten 2D-Fluoreszenzspektrums reduziert sind. Für die Fed-Batch-Kultivierung F-1 ist der Verlauf des geschätzten metabolischen Faktors sowie das RFI-Verhältnis NAD(P)H-/Protein-RFI in Abbildung 7.4 dargestellt.

Während der Fed-Batch-Kultivierung F-1 nutzen die Hefezellen vornehmlich den oxidativen Stoffwechsel, erkennbar am Wert des metabolischen Faktors, der um Null schwankt. Viermal nimmt der Wert des MB-Faktors im Verlauf der Fed-Batch-Kultivierung F-1 deutlich zu und signalisiert, dass eine zunehmende Anzahl Zellen einen oxidoreduktiven Stoffwechsel nutzen. Die Verwendung der NAD(P)H-abhängigen RFI in Abbildung 7.3a ist für eine Überwachung des oxidativen Wachstums auch möglich. Die Information im NAD(P)H-abhängigen RFI-Verlauf ist

jedoch komplex, da die Konzentration der Coenzyme NAD(P)H auch mit der Zunahme der Biomasse zunimmt. Das RFI-Verhältnis NAD(P)H-/Protein-RFI in Abbildung 7.4 sollte dagegen die BTM-Zunahme berücksichtigen und die Konzentrationsänderung von NAD(P)H in der Zelle angeben. Eine genaue Überwachung des oxidativen Wachstums ist jedoch auch hier schwierig, da das Verhältnis keine absoluten Werte liefert und auch mit zunehmender Prozessdauer zunimmt.

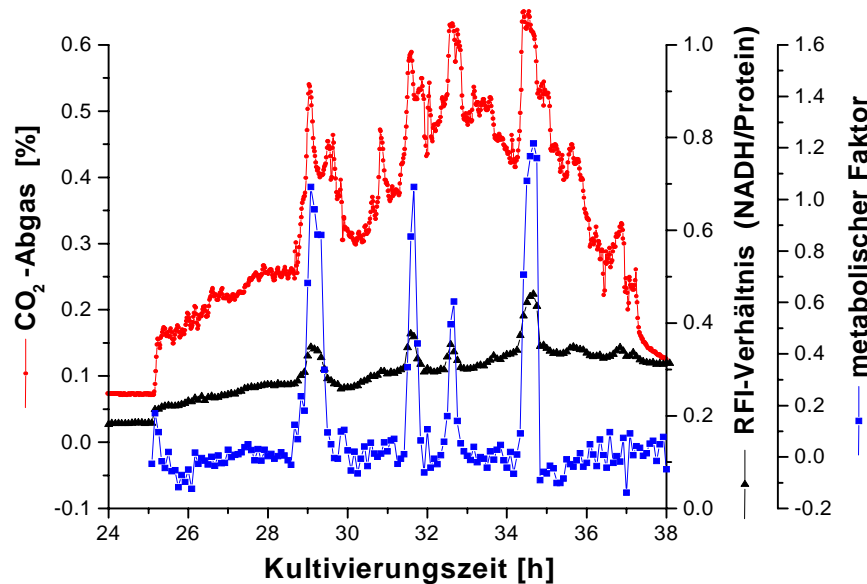


Abb. 7.4: Verlauf des CO₂-Gehalts im Abgas, des RFI-Verhältnisses (NAD(P)H/Protein) und des geschätzten metabolischen Faktors während der Fed-Batch-Kultivierung F-1 von *S. cerevisiae*

Mit Hilfe des MB-Faktor-Modells kann der aktuelle Zellstoffwechsel aus jedem 2D-Fluoreszenzspektrum, das während einer Hefe-Kultur aufgenommen wird, berechnet und zur Überwachung des oxidativen Wachstums genutzt werden. Zur externen Validierung des MB-Faktor-Modells wurde der metabolische Faktor aus den 2D-Fluoreszenzspektren, die während einer synchron wachsenden *S. cerevisiae*-Kultur detektiert wurden, berechnet. Die Abbildung 7.5 zeigt den Verlauf des metabolischen Faktors und des CO₂-Gehalts im Abgas während mehrerer Perioden dieser synchron wachsenden Hefe-Kultur ($D = 0,15 \text{ h}^{-1}$). Werte des metabolischen Faktors, die zwischen $-0,5$ und $-0,25$ liegen, deuten auf einen oxidativen Stoffwechsel während der G₁- und G₂/M-Phase hin. Mit Beginn der S-Phase steigen die Werte des metabolischen Faktors deutlich über eins an und zeigen, dass der Großteil der Zellen in dieser Zellzyklusphase kurzzeitig einen oxidoreduktiven Stoffwechsel nutzen (vergleiche Kapitel 6.3).

Die Grundlinie und die Amplitude des metabolischen Faktors weichen jedoch im Verlauf deutlich von den Definitionswerten (Null für einen oxidativen Stoffwechsel und eins für einen oxidoreduktiven Stoffwechsel) ab. Für die Überwachung des oxidativen Wachstums bei weiteren *S. cerevisiae*-Kulturen ist daher ein Schwellwert nötig, der angibt, wann eine Stoffwechseländerung erfolgt.

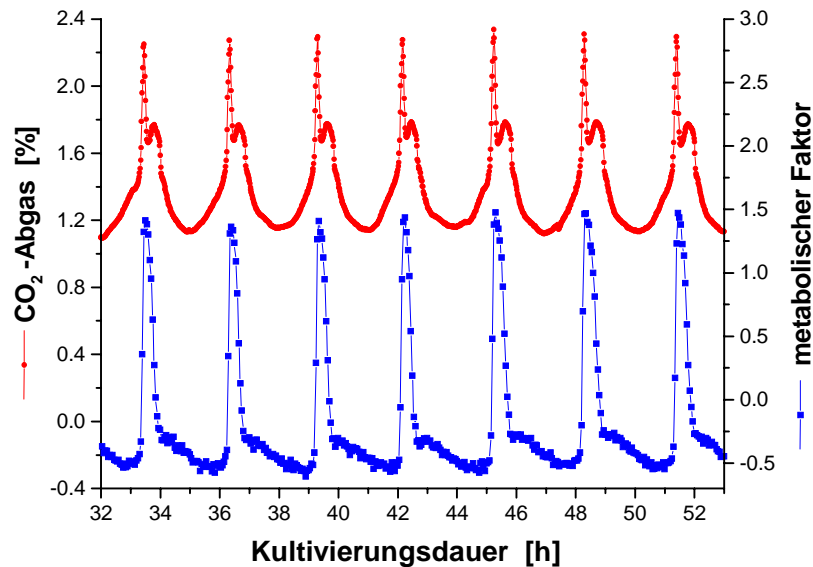


Abb. 7.5: Verlauf des CO_2 -Gehalts im Abgas und des berechneten metabolischen Faktors während einer synchron wachsenden *S. cerevisiae*-Kultur. Ein metabolischer Faktor unter Null deutet auf einen oxidativen und ein Faktor über 1 auf einen oxidoreduktiven Zellstoffwechsel hin.

Da das MB-Faktor-Modell nur relative Werte liefert, wurde mit Hilfe eines Savitzky-Golay-Filters die Ableitung bestimmt. Ein quadratisches Modell nutzte dabei fünf Messpunkte als Bandbreite nach folgender Gleichung:

$$M_x = \frac{-2y_{x-4} - y_{x-3} + y_{x-1} + 2y_x}{10\Delta t} + \frac{4y_{x-4} - 2y_{x-3} - 4y_{x-2} - 2y_{x-1} + 4y_x}{7\Delta t} \quad (26)$$

wobei M = Ableitung, x = Messpunkt, y = metabolischer Faktor und Δt = Messzeit des BioView Sensors (0,027 h) ist. Mit einem rekursiven Mittelwert-Filter mit nachlassendem Gedächtnis werden diese Werte nochmals geglättet. Die Mittelwertberechnung ist dabei so eingestellt, dass 75% des zuvor berechneten Wertes ($1-F = 0,75$) durch folgende Gleichung in den Mittelwert mit eingeht:

$$M'_x = F \cdot M_x + (1-F) \cdot M'_{x-1} \quad (27)$$

Mit dieser Methode ist es möglich, den aktuellen biologischen Kulturzustand aus 2D-Fluoreszenzspektren weiterer Hefe-Kultivierungen zu berechnen. Die geglättete Steigung des metabolischen Faktors gibt Auskunft über den verwendeten Stoffwechsel der *S. cerevisiae*-Kultur.

In Abbildung 7.6 ist die geglättete Steigung des metabolischen Faktors von der Fed-Batch-Kultivierung F-1 dargestellt. Steigt die Steigung des metabolischen Faktors über einen Schwellwert, der mit 0,3 empirisch festgelegt wurde, so nutzt eine zunehmende Zellzahl einen oxidoreduktiven Stoffwechsel. Eine Überwachung des oxidativen Wachstum wird so durch In-situ-Fluoreszenzmessungen online möglich.

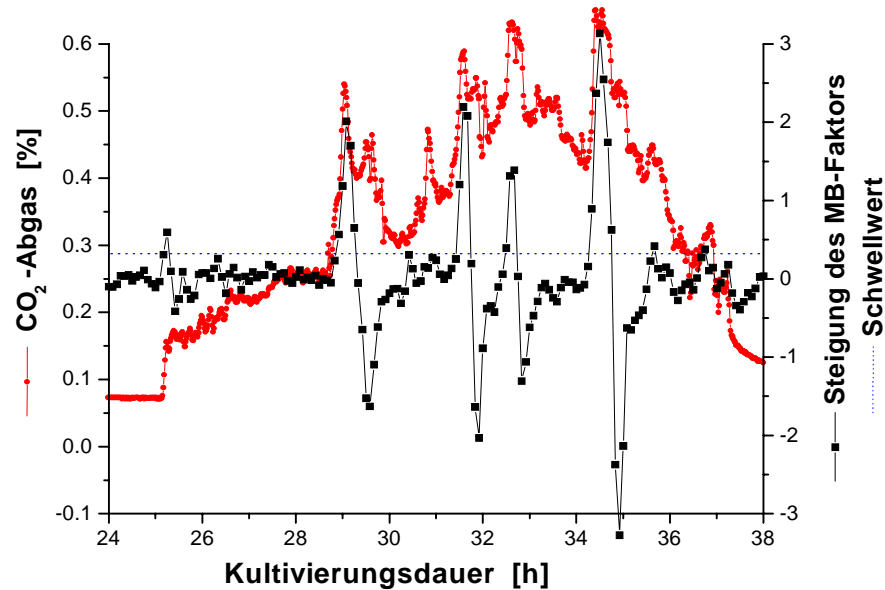


Abb. 7.6: Verlauf des CO_2 -Gehalts im Abgas und der mit Hilfe eines Savitzky-Golay-Filters berechneten geglätteten Steigung des metabolischen Faktors während der Fed-Batch-Kultivierung F-1 von *S. cerevisiae*

7.6 Modellgeführte Glucoseregulation mittels 2D-Fluoreszenzspektroskopie bei der Fed-Batch-Kultivierung F-2

Bei der *S. cerevisiae* Fed-Batch-Kultivierung F-2 wurde der metabolische Faktor sowie dessen Steigung online aus jedem 2D-Fluoreszenzspektrum berechnet. Die Überwachung des metabolischen Kulturzustandes soll zu einer geregelten Glucosekonzentration mit maximaler BTM-Ausbeute führen. Der Messaufbau der Glucoseregulation ist in Abbildung 3.3 schematisch dargestellt. Die Regelung der Glucosekonzentration ist in Kapitel 3.8 beschrieben.

Während der Fed-Batch-Kultivierung F-2 wurden kontinuierlich alle 90 Sekunden vollständige 2D-Fluoreszenzspektren detektiert. Aus jedem 2D-Fluoreszenzspektrum wurde mit Hilfe des PLS-Modells umgehend der metabolische Faktor berechnet und über eine serielle Schnittstelle zum MS-DOS-PC geschickt. Hier wurde die geglättete Steigung des metabolischen Faktors sowie die Pumprate berechnet. Überstieg die Steigung den empirisch festgelegten Schwellwert von 0,3, so deutete dies darauf hin, dass die kritische Glucoseaufnahme der Hefezellen überschritten wurde. In diesem Fall stoppte die Pumpe für eine Minute, um eine Stoffwechseländerung vom oxidativen zum oxidoreduktiven Metabolismus abzuwenden. Im Anschluss darauf startete die Zufütterung wieder automatisch, jedoch mit einer um 5% reduzierten Pumprate. Dazu wurde die im dynamischen Zustandsmodell geschätzte Biomasse um 5% reduziert. In den darauf folgenden 15 Minuten erfolgte unabhängig von der Steigung des metabolischen Faktors keine weitere Regelung. Dies war notwendig, damit sich die *S. cerevisiae*-Kultur an die neuen Bedingungen adaptieren konnte.

Das Ergebnis dieser Glucoseregulung für die Fed-Batch-Kultivierung F-2 ist in Abbildung 7.7 zu erkennen. Während des Prozesses wurde die Pumprate etwa 14 mal automatisch reduziert, weil eine Überschreitung der kritischen Glucoseaufnahme drohte. Die Regeleingriffe sind im Verlauf des CO₂-Gehalts im Abgas zu sehen. Der CO₂-Gehalt nimmt beispielsweise zwischen 1,5 h und 2,5 h sowie zwischen 4 h und 4,8 h jeweils dreimal und nach 6,0 h, 7,2 h und 8,0 h jeweils einmal kurzzeitig deutlich ab. Zu diesen Zeitpunkten wurde die Pumpe für die Glucosezufuhr gestoppt und nach einer Minute Pause mit einer um 5% reduzierten Pumprate erneut automatisch gestartet.

Die signifikanten Zunahmen im Abgas CO₂-Gehalt nach 2,8 h und 8,8 h zeigen eine deutlich Stoffwechsellumstellung der Hefezellen. Offensichtlich ist die kritische Glucoseaufnahme zu diesen Zeitpunkten deutlich überschritten worden. Die Stoffwechsellumstellung nach 2,8 h und 8,8 h war möglich, weil die Messungen des BioView Sensors mit einer zu geringen Frequenz durchgeführt worden sind. Alle 90 Sekunden wurde ein 2D-Fluoreszenzspektrum detektiert, was für eine zeitnahe Überwachung des biologischen Zellzustandes offensichtlich nicht ausreichend ist. Ein oxidativer Zellstoffwechsel wurde wieder durch Reduzierung der Pumprate erreicht. Nach der zehnten Kultivierungsstunde wurde die Fed-Batch-Kultivierung F-2 beendet.

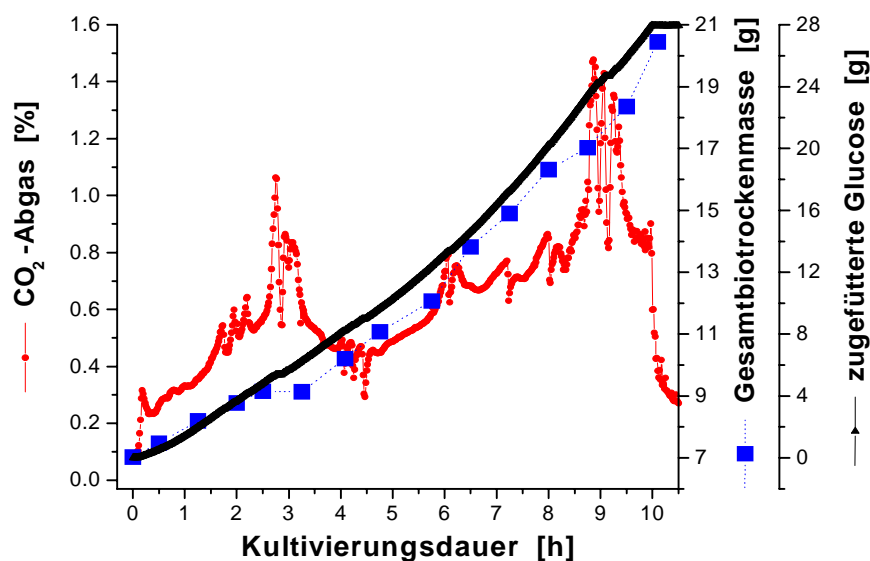


Abb. 7.7: Verlauf des CO₂-Gehalts im Abgas, der Gesamtbiotrockenmasse und der zugeführten Glucose während der Fed-Batch-Kultivierung F-2 von *S. cerevisiae*

Während der Fed-Batch-Kultivierung F-2 wurde ca. 27,9 g Glucose zugefüttert, die zu 13,4 g BTM umgesetzt wurde. Dies entspricht einer Gesamtausbeute von $Y = 0,481$ g-BTM/g-Glucose. Die BTM-Konzentration beträgt am Kultivierungsende ca. 16,8 g/L. Die Gesamtausbeute wird vor allem durch die Prozessphasen vermindert, in denen die kritische Glucoseaufnahme überschritten wurde (2,8 h und 8,8 h). Darüber hinaus musste die Fütterungsrate in der ersten Kultivierungsstunde zunächst langsam an die kritische Glucoseaufnahme herangefahren werden, so dass zu Kultivierungsbeginn noch keine optimale Zufütterung erreicht wurde.

Die Ausbeute zwischen 3,4 h - 10,0 h beträgt daher sogar $Y = 0,522 \text{ g-BTM/g-Glucose}$, so dass in diesem Zeitabschnitt eine annähernd optimale Glucosezufütterung erreicht wurde.

Während der Fed-Batch-Kultivierung F-2 wurde kaum Ethanol produziert, wie in Abbildung 7.8 zu sehen ist. Die Glucosekonzentration in der Fermentationsbrühe war fast immer unterhalb der kritischen Glucosekonzentration, die in der Literatur mit $0,04 \text{ g/L}$ angegeben wird [PHAM et al., 1998]. Der RQ-Wert schwankt während der Fed-Batch-Kultivierung F-2 meist zwischen 1,0 und 1,05 und deutet damit auf einen oxidativen Stoffwechsel der Hefezellen hin. Zu den Zeitpunkten, bei denen die Pumprate reduziert wurde, überschreitet der RQ-Wert kurzzeitig den Wert 1,1. Besonders nach 2,8 h und 8,8 h nimmt der RQ auch für einen längeren Zeitraum höhere Werte an. Während der ersten Stunde liegt der RQ-Wert deutlich unter eins, weil die optimale Pumprate noch nicht erreicht worden ist. Die exponentielle Pumprate näherte sich jedoch bis zum ersten Regeleingriff nach 1,7 h der kritischen Glucoseaufnahme an.

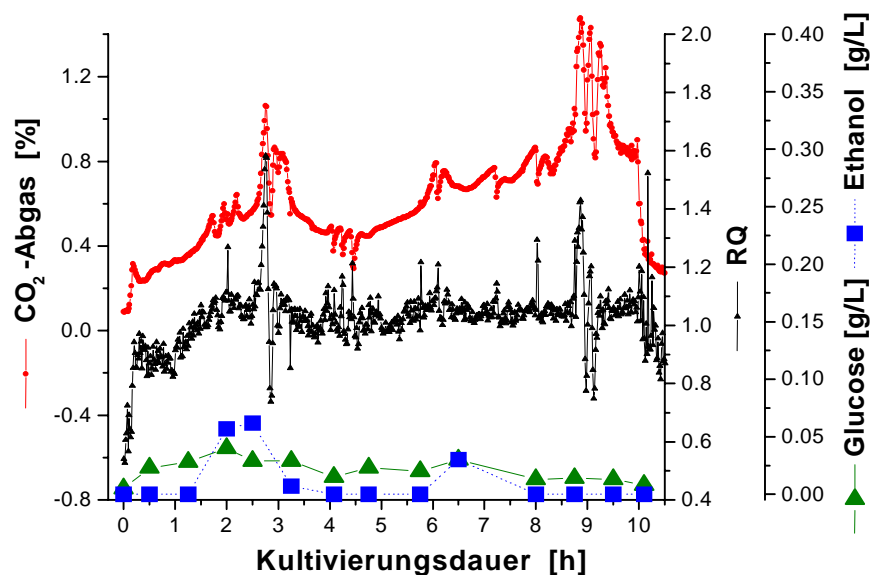


Abb. 7.8: Verlauf des CO_2 -Gehalts im Abgas, des RQ sowie der Ethanol- und Glucosekonzentration während der Fed-Batch-Kultivierung F-2 von *S. cerevisiae*

Die Stoffwechselumstellungen sind analog der Fed-Batch-Kultivierung F-1 auch bei Fed-Batch-Kultivierung F-2 deutlich im NAD(P)H-abhängigen RFI-Verlauf erkennbar (Abb. 7.9) Beim Übergang zum oxidoreduktiven Zellstoffwechsel nach 2,8 h und 8,8 h steigt die NAD(P)H-abhängige RFI deutlich an. Daran anschließend fällt die NAD(P)H-abhängige RFI wieder auf ein deutlich niedrigeres Niveau ab. Während des oxidativen Wachstums ist der Verlauf der NAD(P)H-abhängigen RFI bei Ex350/Em450 nm trotz Zunahme der Biomasse relativ konstant. Überlagerungen von biologischen mit chemischen und physikalischen Einflüssen beeinflussen die RFI offensichtlich in komplexer Weise.

Die pyridoxalphosphatabhängige RFI zeigt bei *S. cerevisiae*-Kulturen eine sehr gute Korrelation zur Biomasse (Kap. 5.6). Die BTM-Konzentration und die pyridoxalphosphatabhängige RFI korrelieren auch bei der Fed-Batch-Kultivierung F-2 sehr gut (Abb. 7.9), so dass die aktuelle

BTM-Konzentration aus den Spektren vorhergesagt werden kann, anstatt abgeschätzt zu werden. Die Volumenzunahme der Fermentationsbrühe von über 50% während der Fed-Batch-Kultivierung F-2 führte wahrscheinlich dazu, dass die pyridoxalphosphatabhängige RFI trotz exponentiellen Zellwachstums, nur linear zunimmt. Die pyridoxinabhängige RFI bei Ex330/Em390 nm (Abb. 7.9) zeigt analog Fed-Batch-Kultivierung F-1 einen abnehmenden Verlauf.

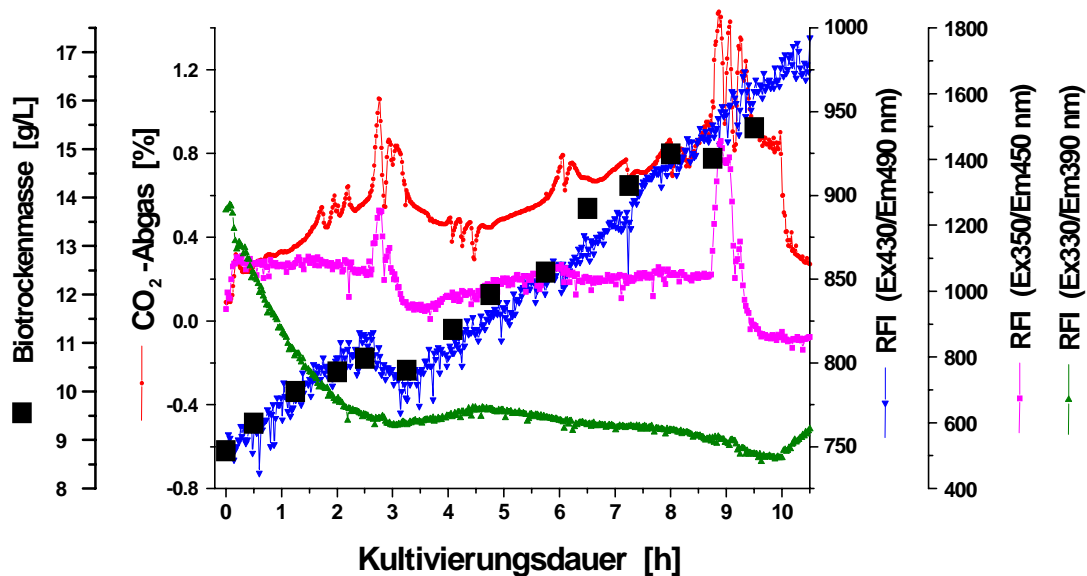


Abb. 7.9: Verlauf der BTM-Konzentration, des CO₂-Gehalts im Abgas, der pyridoxalphosphat- (Ex430/Em490 nm), der NAD(P)H- (Ex350/Em450 nm) und pyridoxinabhängigen RFI (Ex330/Em390 nm) während der Fed-Batch-Kultivierung F-2 von *S. cerevisiae*

7.7 Zusammenfassung

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Regelung der Glucosezufuhr bei Fed-Batch-Kultivierungen von *S. cerevisiae* mittels 2D-Fluoreszenzspektroskopie möglich ist. Die geregelte Zufütterung dieser Regelstrategie orientiert sich direkt am aktuellen biologischen Zellzustand. Eine annähernd optimale Glucosezufütterung konnte realisiert werden.

- Durch Überschreitung einer kritischen Glucosekonzentration erfolgt bei Hefezellen eine Stoffwechsellumstellung (Crabtree-Effekt). Dabei wird der Zellmetabolismus von oxidativ zu oxidoreduktiv umgestellt. Das Gleichgewicht der Elektronenüberträger in den Zellen verschiebt sich dann zu den reduzierten Coenzymen NAD(P)H, FMN(H₂) und FAD(H₂). In den 2D-Fluoreszenzspektren führt dies zum signifikanten RFI-Anstieg in den NAD(P)H-abhängigen sowie zu Abnahmen in den pyridoxin- und flavinabhängigen Fluoreszenzbereichen. Zur Überwachung des oxidativen Hefewachstums ist die Nutzung des gesamten 2D-Fluoreszenzspektrums sinnvoll.
- Bei der Fed-Batch-Kultivierung F-1 wurde zunächst mit Hilfe eines modifizierten FIA-Systems eine Online-Glucosebestimmung durchgeführt, um die Glucosekonzentration in der

Kulturbrühe auf einen Sollwert von 0,04 g/L zu regeln. Durch diese indirekte Methode wurde in den ersten neun Stunden eine BTM-Ausbeute von $Y = 0,436$ g-BTM/g-Glucose erzielt. Mit Hilfe der registrierten 2D-Fluoreszenzspektren wurde ein PLS-Modell erstellt, das die Berechnung eines metabolischen Faktors erlaubt. Dieser Faktor gibt Auskunft über den metabolischen Zellzustand einer *S. cerevisiae*-Kultur. An einer synchron wachsenden Hefe-Kultur konnte die Vorhersage des metabolischen Kulturzustands durch das PLS-Modell überprüft werden. Dem metabolischen Faktor fehlte jedoch ein genauer Bezugspunkt.

- Durch Verwendung der geglätteten Steigung des metabolischen Faktors konnte das Modell auf andere Kultivierungen übertragen werden. Bei der Fed-Batch-Kultivierung F-2 konnte so eine automatisierte Glucoseregulation realisiert werden. Die Ausbeute bei der Fed-Batch-Kultivierung F-2 beträgt zwischen 3,4-10,0 h $Y = 0,522$ g-BTM/g-Glucose. Dabei wurde während der gesamten Kultivierungszeit kaum Ethanol gebildet. Etwa 14 Regeleingriffe wurde automatisch durchgeführt. Der Prozess wurde dadurch knapp unterhalb der kritischen Glucoseaufnahme rate geführt.
- Während der Fed-Batch-Kultivierung F-2 wurde die kritische Glucoseaufnahme rate zweimal sichtbar überschritten. Dies führte zu einem oxidoreduktiven Metabolismus und zu einem deutlichen RFI-Anstieg vor allem in den NAD(P)H-abhängigen Fluoreszenzbereichen. Die Messungen mit dem BioView Sensors wurden offensichtlich mit einer noch zu geringen Frequenz durchgeführt. Der Verlauf der pyridoxalphosphatabhängigen RFI zeigt darüber hinaus auch bei der Fed-Batch-Kultivierung F-2 eine sehr gute Korrelation zum Verlauf der BTM-Konzentration (Abb. 7.9).

8 Hochzelldichte-Kultivierungen von *Escherichia coli* im Dialyseverfahren

8.1 Ziele der Hochzelldichte-Kultivierungen

In Kooperation mit der Technischen Universität Hamburg-Harburg (Biotechnologie I) wurden Hochzelldichte-Kultivierungen im 300 L und 30 L Stahlfermenter mit einem rekombinanten *Escherichia coli* Stamm durchgeführt. Die Hochzelldichte-Kultivierungen (HZD-Kultivierungen, HZDK) wurden fluoreszenzspektroskopisch überwacht, um Erkenntnisse über den physiologischen Zustand der Kultur zu erhalten. Speziell sollte getestet werden, ob Fluoreszenzintensitätsveränderungen biogener Fluorophore auch bei extrem hohen optischen Dichten und BTM-Konzentrationen (über 100 g/L) detektiert werden können und damit gleichzeitig biologische Prozessgrößen, wie z.B. das Zellwachstum, sowie Änderungen im Stoffwechsel erfasst werden können. Ziel ist es, für eine verbesserte Prozessführung zusätzliche Informationen über den biologischen Zustand der Kultur zu erhalten. Die Auswertung der Fluoreszenzdaten soll mit Hilfe mathematischer Auswerteverfahren zur Vorhersage von Prozessgrößen (z.B. Biotrockenmasse- und Produktkonzentration) eingesetzt werden. Darüber hinaus sollen wichtige Prozessschritte, wie z.B. der Start des externen Dialysekreislaufs und der Induktionszeitpunkt, bestimmt werden. Im 30 L Fermenter sollen die Auswirkungen der Induktion auf die Fluoreszenzintensitätsverläufe untersucht werden. Die Experimente sollen zeigen, wie sich die Induktion auf das Zellwachstum und den Stoffwechsel der Zellen auswirken. Dazu werden HZD-Kultivierungen mit und ohne Induktion durchgeführt. Die Erkenntnisse sollen hinsichtlich einer verbesserten Datenauswertung und Prozessführung diskutiert werden.

8.2 Kultivierungsbedingungen

Die Hochzelldichte-Kultivierungen wurden von FUCHS und KÖSTER im Technikum der Technischen Universität Hamburg-Harburg (Biotechnologie I) durchgeführt [FUCHS, 2002] [KÖSTER, 2002]. Verwendet wurde ein 300 L bzw. 30 L Stahlfermenter (Bioengineering AG, Wald, CH), der über einen extern angeordneten Dialysekreislauf an ein temperiertes Dialysatgefäß gekoppelt war (Abb. 2.8). Die Dialysemodule Lundia Alpha 600 (Gambro Medizintechnik GmbH, München) hatten eine Cuprophan Dialysemembran (8 μm , molekulare Trenngrenze 4 kDa) und eine Austauschfläche von 1,3 m^2 . Die Kultivierungsanlage wurde mit einem Prozessleitsystem der Firma PCS (Process Control System, Schweiz) betrieben. Die Kultivierungsbedingungen der Hochzelldichte-Kultivierungen sind in Tabelle 8.1 aufgelistet.

Die Konzentration des gelösten Sauerstoffs $p\text{O}_2$ wurde durch kaskadierte Regelung von Rührerdrehzahl und Zusammensetzung des Begasungsgemisches aus Luft und Sauerstoff auf $80 \pm 5 \%$

Luftsättigung eingestellt. Dabei wurde zuerst die Rührerdrehzahl gesteigert bevor der Sauerstoffanteil im Luft-/Sauerstoffgemisch erhöht wurde. Die Begasungsrate blieb unverändert.

Tab. 8.1: Kultivierungsbedingungen der HZD-Kultivierungen E-1, E-2, E-3 und E-4

HZD-Kultivierung	E-1, E-2	E-3, E-4
Organismus	rekombinanter <i>Escherichia coli</i> Stamm	
Betriebsweise	Fed-Batch	
Kultivierungsanlage	Stahlfermenter (Bioengineering AG, Wald, CH)	
Reaktorvolumen	300 L	30 L
Kulturvolumen	100 L	13 L
Dialysemodule	4	1
Membranfläche	52 m ² /m ³	100 m ² /m ³
Dialysemenge (V _D /V _R)	1 : 1	3,8 : 1
Medium [FUCHS et al. 2002]	Minimalmedium mit 2 g/L Glucose	
Temperatur	35°C	
pH	7,1	
Rührerdrehzahl	200-750 UpM	200-1500 UpM
Begasungsrate	2,0 vvm	1,0 vvm
pO ₂	80% ± 5%	
Regelung des pH-Wertes	25% NH ₃ -Lösung	
zugeführte Glucoselösung	636 g/L	
Aufnahmeintervall des BioView Sensors	3 min	

Der Startzeitpunkt der Dialyse erfolgte bei den Hochzelldichte-Kultivierungen in der Regel bei einer OD_{540 nm} von ca. 25 relativen Einheiten und die Induktion bei einer OD_{540 nm} von ca. 100 relativen Einheiten. Die Entwicklung und Optimierung des Fermentationsverfahrens mit externer Dialyse wird von FUCHS detailliert beschrieben [FUCHS, 2002] [FUCHS et al., 2002].

8.3 Hochzelldichte-Kultivierung im 300 L Fermenter

8.3.1 Beschreibung der Hochzelldichte-Kultivierung E-1

Die Abbildung 8.1 zeigt die online und offline ermittelten Prozessdaten, die während der HZD-Kultivierung E-1 im 300 L Fermenter aufgenommen wurden. Nach Beimpfung des Fermenters mit 300 mL Vorkultur adaptieren sich die *E. coli*-Zellen zunächst an die neuen Kultivierungsbedingungen. Aufgrund des geringen Beimpfungsvolumens (300 mL) im Vergleich zum anfänglichen Reaktorvolumen (100 L) wird die exponentielle Zunahme der BTM-Konzentration (Abb. 8.1a) und optischen Dichte (Abb. 8.1c) erst nach 13 h sichtbar.

Die CO_2 -Konzentration im Abgas und die Zufütterungsrate der Glucoselösung (Abb. 8.1b) nehmen bis zu diesem Zeitpunkt ebenfalls nur langsam zu. Nach 14,6 h wurde bei einer $\text{OD}_{540 \text{ nm}}$ von ca. 16 relativen Einheiten die Dialyse gestartet. Im Folgenden ist eine exponentielle Zunahme in den meisten Prozessgrößen erkennbar, wie z.B. in der BTM-Konzentration, $\text{OD}_{540 \text{ nm}}$ und in der Zufütterungsrate. Nach 18 h ($\text{OD}_{540 \text{ nm}} \approx 100$ relative Einheiten) erfolgte die Induktion durch Zugabe einer Isopropyl β -D-Thiogalactopyranosid-Lösung (IPTG), die zur Expression eines heterologen Proteins in den Bakterienzellen führt.

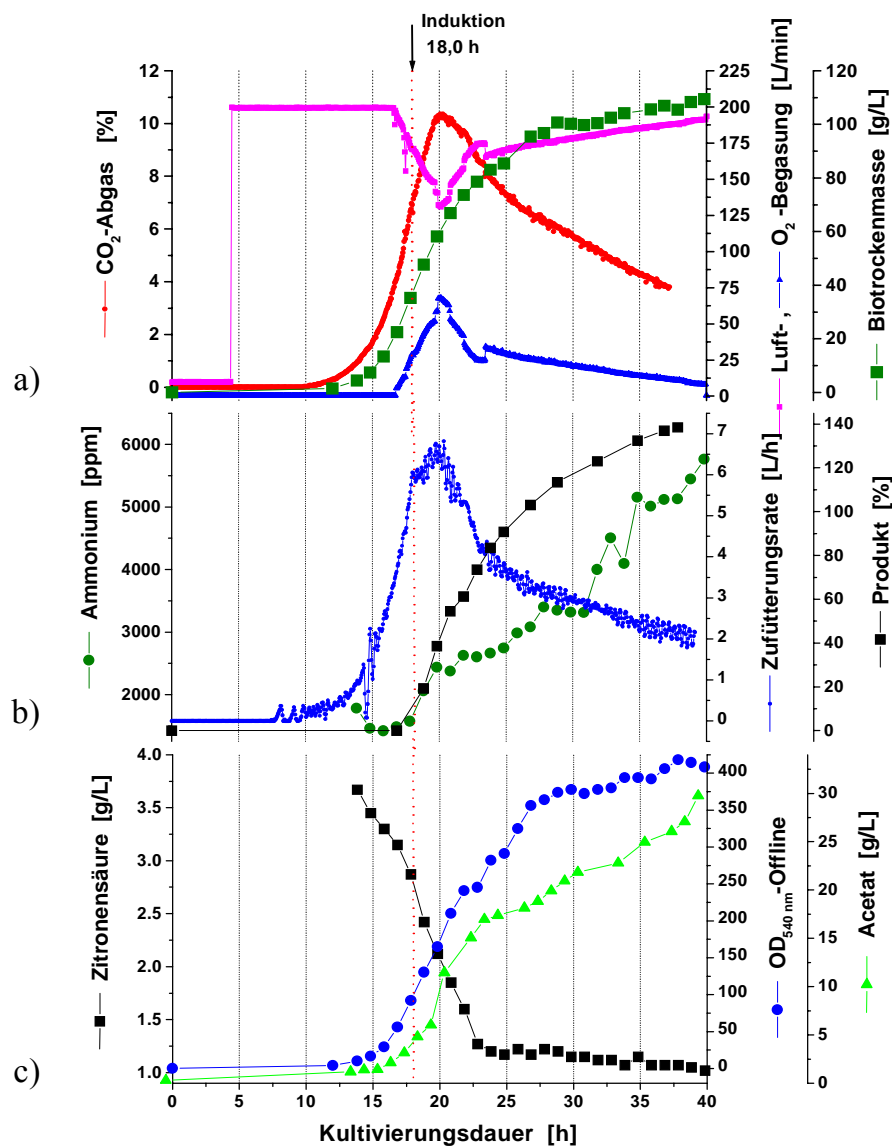


Abb. 8.1: Verlauf von online und offline ermittelten Prozessgrößen während der HZD-Kultivierung E-1 von *E. coli* im 300 L Fermenter

- CO_2 -Konzentration im Abgas, BTM-Konzentration, Luft- und O_2 -Begasung
- Ammoniumkonzentration, Zufütterungsrate und Produktkonzentration
- Zitronensäurekonzentration, optische Dichte und Acetatkonzentration

Um eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Bakterienzellen zu gewährleisten, wurde dem Reaktor Luft mit einer konstanten Begasungsrate von 200 L/min (2 vvm) (ab 4,5 h) zugeführt. Nach 12,5 h wurde durch den pO_2 -Regler die Rührerdrehzahl aufgrund des zunehmenden Sauerstoffbedarfs der Zellen kontinuierlich von 200 UpM auf maximal 750 UpM (16,6 h) erhöht (nicht dargestellt). Anschließend wurde der Sauerstoffanteil im Luft/Sauerstoff-Gemisch automatisch bis auf maximal 34% (68,1 L/min) gesteigert (Abb. 8.1a), um eine konstante Konzentration von gelöstem Sauerstoff von ca. 80% in der Fermentationsbrühe aufrecht zu erhalten.

Nach der Induktion nimmt die Produktkonzentration in der Fermentationsbrühe zunächst exponentiell zu und geht zum Prozessende hin gegen eine Sättigungskurve. Nach der 21. Kultivierungsstunde hat der CO_2 -Gehalt im Abgas ein Maximum mit 10,3% erreicht und nimmt im Anschluss wieder kontinuierlich bis auf 3,3% (39 h) ab. Die Zunahme der BTM- und der Produktkonzentration ist nicht mehr exponentiell. Am Prozessende nach 39 h wird eine BTM-Konzentration von ca. 110 g/L und eine Produktkonzentration von ca. 145% gegenüber einer Referenz-Kultivierung erreicht (Abb. 8.1). Bis zum Kultivierungsende wurden insgesamt 88,4 L Glucoselösung zugefüttert. Aufgrund der Dialyse beträgt das Fermentationsvolumen zum Prozessende ca. 120 L. Die maximal erreichte $OD_{540\text{ nm}}$ beträgt zum Prozessende 418 relative Einheiten (Abb. 8.1c).

Während der HZD-Kultivierung E-1 reicherte sich Acetat in der Fermentationsbrühe an. Die Acetatproduktion bei *Escherichia coli* wird trotz Substratminimierung in der Regel durch eine zu hohe Glucosekonzentration in der Fermentationsbrühe verursacht und wird auch als „bacterial Crabtree“-Effekt bezeichnet. Die Bildung von Nebenprodukten ist gewöhnlich neben der Sauerstofflimitierung vor allem die Folge einer gesättigten Elektronentransportkette [MAJEWSKI, 1990]. Besonders während der exponentiellen Produktionsphase nach der Induktion (18 – 23 h) nimmt die Konzentration von Acetat sehr stark zu. Am Ende der Kultivierung beträgt die maximal angereicherte Acetatkonzentration 29,8 g/L (Abb. 8.1c). Zur Regelung des pH-Wertes wurde Ammoniumlösung zugegeben, so dass sich Ammonium im Prozessverlauf kontinuierlich in der Fermentationsbrühe anreichert (Abb. 8.1b). Der Verlauf der Zitronensäure zeigt eine starke lineare Konzentrationsabnahme zwischen 13 h und 22,8 h. Nach 23 h nimmt der Zitronensäuregehalt nur noch sehr gering ab (Abb. 8.1c). Die Zitronensäure ist vor allem als Komplexbildner Bestandteil des Mediums, damit keine Salze und Mineralien, wie z.B. Ca^{2+} und Mg^{2+} auskristallisieren. Die Konzentrationsabnahme wird von verschiedenen Faktoren verursacht, wie z.B. durch die Volumenzunahme der Fermentationsbrühe während des Fed-Batch-Betriebs. Auch eine Verstoffwechslung der Zitronensäure ist möglich. Die Beschreibungen der online und offline gemessenen Prozessgrößen zeigen, dass der Kultivierungsverlauf der HZD-Kultivierung E-1 in vier Prozessphasen eingeteilt werden kann:

1. Adaption- und exponentielle Wachstumsphase bis zum Dialysestart
2. exponentielle Wachstumsphase bis zur Induktion
3. Produktionsphase nach der Induktion (18-23 h)
4. verzögerte Wachstums- und Produktionsphase

Mit Hilfe der gemessenen Fluoreszenzdaten soll der Prozessverlauf der HZD-Kultivierung E-1 auf relevante Prozessphasen hin untersucht werden.

8.3.2 Fluoreszenzspektroskopische Beschreibung der Hochzelldichte-Kultivierung E-1

Während der HZD-Kultivierung E-1 wurden 800 vollständige 2D-Fluoreszenzspektren detektiert. In der Abbildung 8.2 sind die skalierten Fluoreszenzverläufe aus verschiedenen Fluoreszenzbereichen (Tab. 5.2) dargestellt.

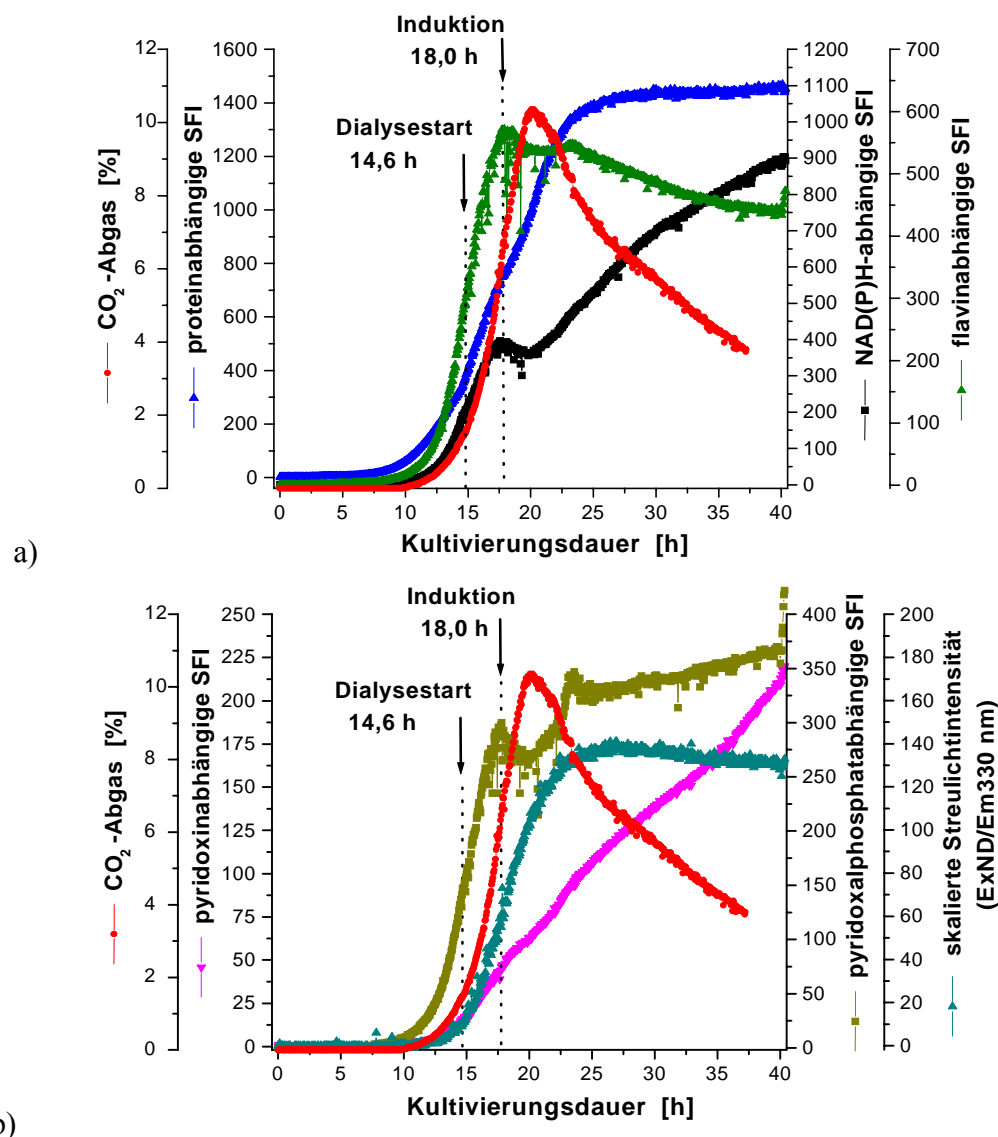


Abb. 8.2: Verlauf der CO₂-Konzentration im Abgas und der SFI verschiedener Fluoreszenzbereiche während der Hochzelldichte-Kultivierung E-1 von *E. coli* im 300 L Fermenter

a) protein- (Ex290/Em370 nm), NAD(P)H- (Ex350/Em450 nm), und flavinabhängige SFI (Ex450/Em530 nm)

b) pyridoxin- (Ex330/Em390 nm) und pyridoxalphosphatabhängige SFI (Ex430/Em490 nm) sowie die Streulichtintensität bei ExND/Em350 nm

Die Skalierung der Fluoreszenzspektren erfolgte analog Kapitel 5.5.1 durch Subtraktion des Mediumspektrums. In den ersten zehn Kultivierungsstunden ist in allen Verläufen aufgrund der geringen Zelldichte kaum eine SFI-Zunahme zu erkennen. Die proteinabhängige SFI (Abb. 8.2a) nimmt nach 8 h exponentiell zu. Nach 23 h folgt der Verlauf, trotz einer weiteren Zunahme der Biomasse, einer Sättigungskurve. Wahrscheinlich wird im Proteinbereich eine weitere SFI-Zunahme durch den „Inner-filter“-Effekt verhindert. Dagegen nimmt die NAD(P)H-abhängige SFI kontinuierlich bis zum Prozessende zu, obwohl eine optische Dichte von über 400 relativen Einheiten und eine BTM-Konzentration von ca. 110 g/L erreicht werden. Die Zugabe von IPTG nach 18 h führt zur Expression des heterologen Proteins. Dies ist gleichzeitig mit einer Stoffwechsellumstellung der Zellen verbunden, die im weiteren Verlauf bei der NAD(P)H-abhängigen SFI zu einer Abnahme führt (Abb. 8.2a). Nach etwa 20 h nimmt die NAD(P)H-SFI kontinuierlich bis zum Prozessende wieder zu. Die CO₂-Konzentration im Abgas nimmt dagegen nach 20 h von einem Maximum wahrscheinlich aufgrund abnehmender Zellaktivität kontinuierlich ab. Der Produktionsstart nach der IPTG-Zugabe ist in der flavinabhängigen SFI ebenfalls deutlich durch Abnahme der SFI zu erkennen (Abb. 8.2a). Folgende drei Prozessphasen werden im flavinabhängigen SFI-Verlauf deutlich. Zwischen 0 h und 10 h (Adaptionsphase) ist die SFI-Zunahme sehr gering. Die exponentielle Wachstumsphase (10-18 h) zeigt eine sehr steile SFI-Zunahme und zwischen 18 h und 40 h (Produktionsphase) ist eine abnehmende SFI zu erkennen.

Bis zur Induktion zeigt die SFI im pyridoxalphosphatabhängigen Fluoreszenzbereich (Abb. 8.2b) einen qualitativ ähnlichen Verlauf wie die Flavinfluoreszenz. Zwischen der 18. und 23. Kultivierungsstunde ist jedoch ein Minimum zeitgleich mit dem Maximum des Abgas CO₂-Gehalts (20 h) zu sehen. Im Folgenden ist eine geringe kontinuierliche SFI-Zunahme bis zum Prozessende zu beobachten. Die pyridoxinabhängige SFI zeigt dagegen nach 10 h einen fast linear verlaufenden SFI-Anstieg bis zum Kultivierungsende. Stoffwechseländerungen werden im pyridoxinabhängigen SFI-Verlauf nicht sichtbar.

Mit Hilfe von 2D-Fluoreszenzdifferenzspektren lassen sich Fluoreszenzintensitätsveränderungen in den verschiedenen Fluoreszenzbereichen während der vier Prozessphasen (Kap. 8.3.1) untersuchen. Relevante Fluoreszenzbereiche, die Informationen über das Zellwachstum sowie den Zellstoffwechsel beinhalten, können so erkannt werden.

8.3.3 Beschreibung der Hochzelldichte-Kultivierung E-1 mittels 2D-Fluoreszenzdifferenzspektren

In den Abbildungen 8.3a-d sind 2D-Fluoreszenzdifferenzspektren zu sehen, die RFI-Veränderungen in einem Zeitintervall von zwei Stunden zeigen. Alle Differenzspektren sind gleich skaliert. Während des exponentiellen Wachstums zwischen der 13. und 15. Kultivierungsstunde (Abb. 8.3a) sind in den Fluoreszenzbereichen der biogenen Fluorophore (Tab. 5.2) RFI-Zunahmen zu beobachten. Besonders in den flavin-1-, flavin-2- und den proteinabhängigen Fluoreszenzbereichen sind große RFI-Zunahmen zu erkennen. Offensichtlich wirkt sich die BTM-Zunahme aufgrund des exponentiellen Wachstums in diesen Bereichen besonders aus.

Ein Differenzspektrum zwischen 5. und 7. Kultivierungsstunde zeigt dagegen kaum RFI-Veränderungen (nicht dargestellt). Ein weiterer Fluoreszenzbereich mit hoher RFI-Zunahme ist bei Ex490/Em530 nm zu sehen, der als Flavin-3-Bereich bezeichnet wird.

Die Stoffwechselumstellung, die nach der Induktion durch IPTG-Zugabe (18 h) erfolgt, ist im Differenzspektrum (Abb. 8.3b) deutlich zu erkennen. In den Bereichen der NAD(P)H-1-, pyridoxalphosphat- und flavin-1-abhängigen Fluoreszenzbereiche sind signifikante RFI-Abnahmen zu beobachten. Dagegen nimmt die RFI im Flavin-2-, Pyridoxin- und vor allem im Proteinbereich nach der Induktion weiterhin zu. Diese Fluoreszenzbereiche sind wahrscheinlich überwiegend von der Zunahme der Zelldichte abhängig und weniger von Stoffwechseländerungen der Bakterienzellen. Im weiteren Verlauf der Produktionsphase (18-40 h) nehmen die RFI in den NAD(P)H-abhängigen Bereichen wieder deutlich zu (Abb. 8.3c). In den gesamten flavinabhängigen Fluoreszenzbereichen ist dagegen eine RFI-Abnahme zu sehen. Am Ende der HZD-Kultivierung E-1 werden die RFI-Veränderungen zunehmend geringer (Abb. 8.3d). Wahrscheinlich kommt es sowohl zu einer verminderten metabolischen Aktivität der Zellen als auch zu Konzentrations-Fluoreszenzlöschung („Inner-filter“-Effekt) aufgrund der hohen Zelldichte. Dies führt dazu, dass keine weitere Zunahme der Fluoreszenzintensität beobachtet werden kann.

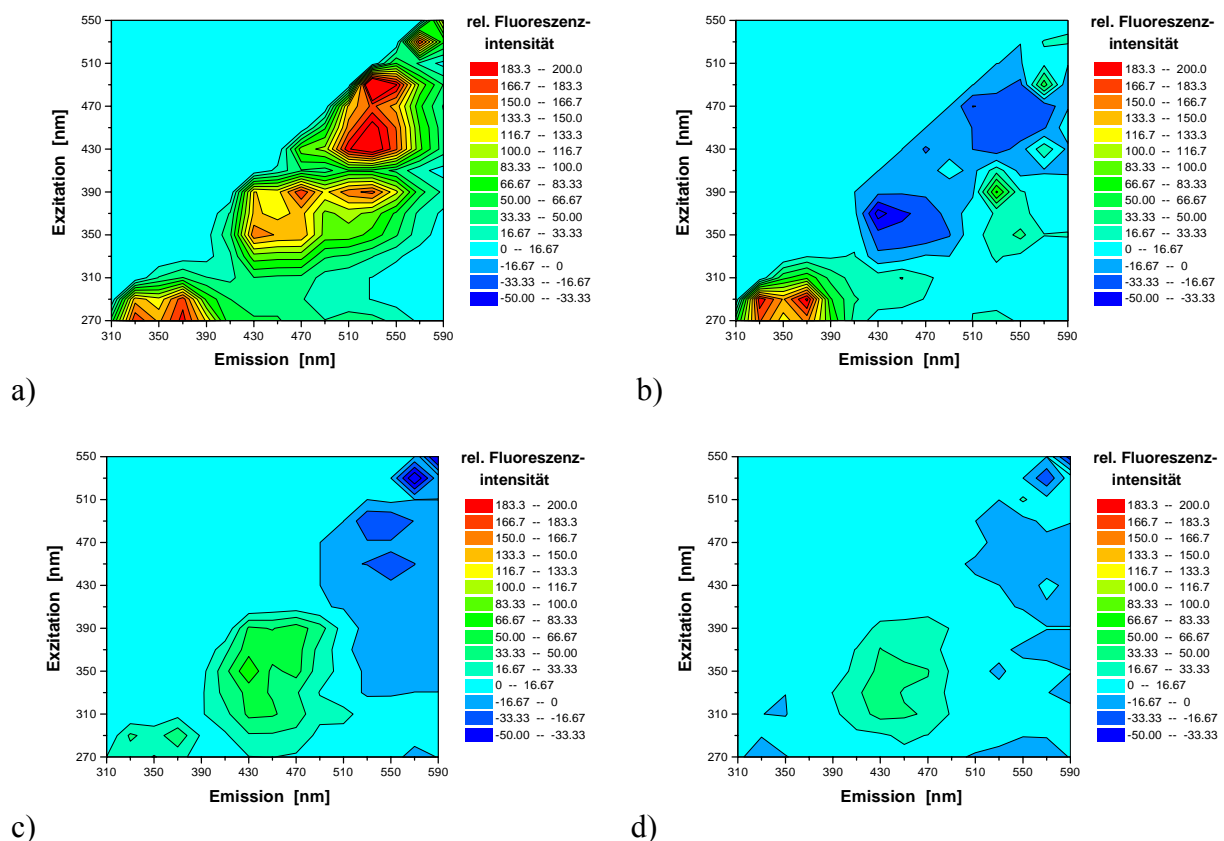


Abb. 8.3: 2D-Fluoreszenzdifferenzspektren von verschiedenen Prozessphasen während der Hochzelldichte-Kultivierung E-1 von *E. coli* im 300 L Fermenter

- a) Spektrum (15 h) minus Spektrum (13 h), (15 h – 13 h); b) 20 h – 18 h;
c) 27 h – 25 h und d) 38 h – 36 h

8.4 Berechnung der BTM-Konzentration mittels linearer Regression

Eine direkte Korrelation der BTM-Konzentration mit dem SFI-Verlauf einer Wellenlängenkombination aus dem protein- oder flavinabhängigen Fluoreszenzbereich führt zu keiner hinreichend genauen Übereinstimmung, wie etwa bei der Hefe-Batch-Kultivierung (Kap 5.6). In Abbildung 8.4a sind die Verläufe der skalierten Streulichtintensität (SI) bei Ex330/EmND und der BTM-Konzentration sowie die proteinabhängige SFI bei Ex290/Em370 nm dargestellt. Die Skalierung der Streulichtintensität erfolgte analog Kapitel 5.5.1 durch Subtraktion des Mediumspektrums. Das wellenlängenabhängige Streulicht im nahen UV-Bereich zeigt bis zur 25. Kultivierungsstunde eine sehr gute Übereinstimmung mit dem Verlauf der BTM-Konzentration. Eine Intensitätszunahme nach 25 h ist weder beim Streulicht, noch bei der Proteinfluoreszenz zu beobachten.

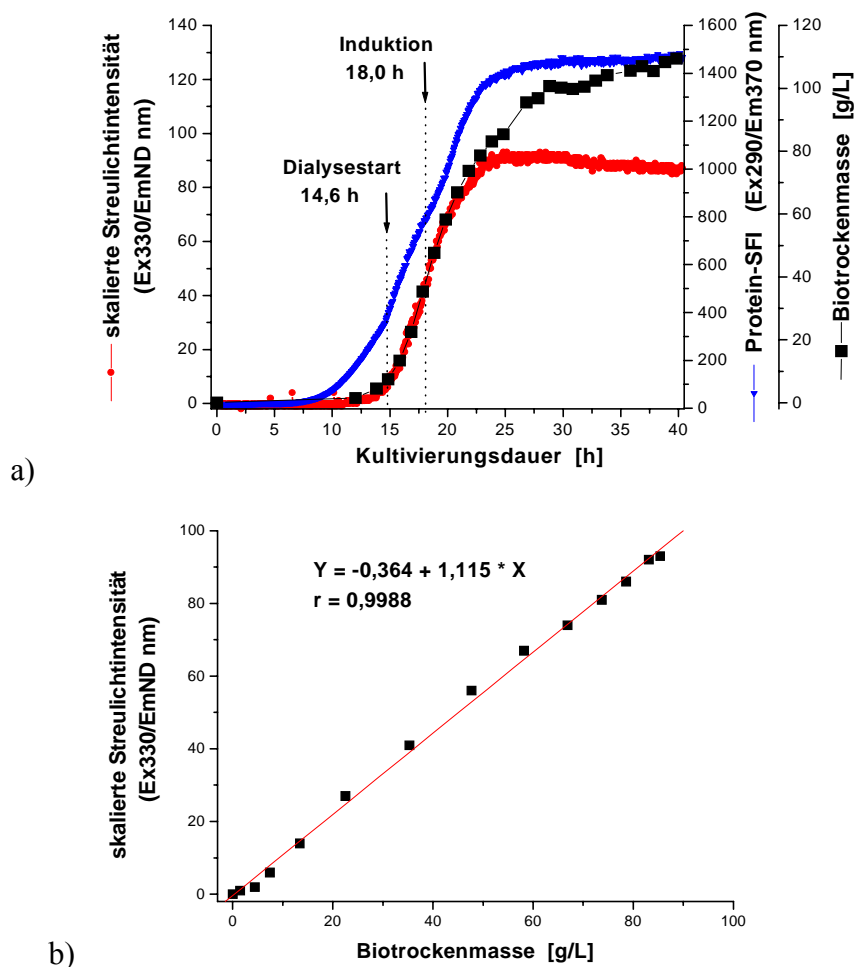


Abb. 8.4: Korrelation zwischen Biotrockenmasse, proteinabhängiger SFI und skaliertes Streulichtintensität (SI) während der HZD-Kultivierung E-1 von *E. coli* im 300 L Fermenter (a), Lineare Regressionsgerade (b)

Die proteinabhängige SFI nimmt im Gegensatz zum Verlauf der BTM-Konzentration bereits nach 8 h deutlich zu. Dies deutet vermutlich auf extrazelluläre Proteine hin, die sich bereits vor

der exponentiellen BTM-Zunahme in der Fermentationsbrühe anreichern. Die skalierte Intensität des wellenlängenabhängigen Streulichts bei Ex330/EmND nm nimmt dagegen zeitgleich mit dem Anstieg der BTM-Konzentration erst nach 13 h zu. Eine lineare Regression der skalierten SI mit der BTM-Konzentration ergibt bis zur 25. Kultivierungsstunde eine sehr gute Korrelation mit einem Regressionskoeffizienten von $r = 0,9988$ (Abb. 8.4b). Die Konzentration der Biotrockenmasse lässt sich aus nachfolgender Gleichung direkt aus der skalierten Streulichtintensität (SI) bei Ex330/EmND berechnen.

$$BTM [g / L] = \frac{SI + 0,364 [g / L]}{1,115} \quad (28)$$

Der RMSEC der Schätzung der BTM-Konzentration mit Gleichung (28) beträgt für die ersten 25 h lediglich 1,8 g/L. Das entspricht einem relativen Fehler von nur 2,1% bezogen auf die erreichte BTM-Konzentration nach der 25. Kultivierungsstunde (ca. 85 g/L).

Das Streulicht nimmt mit zunehmender Trübung zu, verursacht durch das Zellwachstum. Bei hoher Trübung verringert sich die Eindringtiefe des Anregungslichtes und damit die mittlere freie Weglänge des Streulichts, so dass die Trübung nicht mehr proportional zur beobachteten Streulichtintensität ist. Aus diesem Grund wird die Intensität des Streulichts nach der 25. Kultivierungsstunde offenbar trotz zunehmender BTM-Konzentration limitiert und der Verlauf geht in eine Sättigungskurve über. Die Information, dass die BTM-Konzentration bis zum Prozessende weiterhin zunimmt, ist dennoch in den Fluoreszenzdaten enthalten, wie z.B. NAD(P)H- und pyridoxinabhängige SFI, die bis zum Prozessende zunehmen. Die Beschreibung der BTM-Zunahme bis zum Prozessende kann daher durch Auswertung des Gesamtspektrums mittels mathematischer Auswerteverfahren erreicht werden.

8.5 Datenauswertung und Modellkalibration

8.5.1 Darstellung der Score- und Leverage-Werte

Die Abbildung 8.5 zeigt die Scores der ersten und zweiten Hauptkomponenten, die aus den Fluoreszenzdaten der HZD-Kultivierung E-1 mittels Hauptkomponentenanalyse berechnet wurden (analog Kap. 5.7.1). Der Verlauf der Score-Werte zeigt vier Prozessphasen. In den ersten 11 Kultivierungsstunden sind die Veränderungen im Score-Verlauf aufgrund der geringen SFI-Zunahmen zum Prozessbeginn gering. Zwischen der 11. und 18. Kultivierungsstunde ist das exponentielle Zellwachstum auch im Score-Verlauf sichtbar. Die Score-Werte nehmen entlang der ersten Hauptkomponente schnell zu und entlang der zweiten Hauptkomponente schnell ab. Nach der Induktion (18 h) nehmen die Score-Werte entlang der zweiten Hauptkomponente wieder zu und deuten auf die Produktionsphase hin. Nach 22,7 h wird der Anstieg der Score-Werte wesentlich steiler. Die Bakterienzellen befinden sich nun in einer verzögerten Produktions- und Wachstumsphase.

Deutlicher ist der Übergang in die vierte Prozessphase in Abbildung 8.6 zu erkennen. Die Score-Werte entlang der dritten Hauptkomponente nehmen bis zu einem Maximum zu (22,7 h) und fallen anschließend wieder stark ab. Der Score-Verlauf zeigt ganz deutlich eine Veränderung in den Fluoreszenzdaten nach etwa 22,7 h. Diese Veränderungen resultieren wahrscheinlich aus verschiedenen Einflussgrößen. Biologische Einflüsse, wie z.B. eine einsetzende Inhibierung der Zellaktivität durch eine zunehmende Acetatkonzentration und die Produktakkumulation, aber auch physikalische Größen, wie z.B. ein zunehmender „Inner-filter“-Effekt, der zu einer Limitierung der gemessenen SFI führt, können die Ursache für die Veränderungen in den Fluoreszenzverläufen sein.

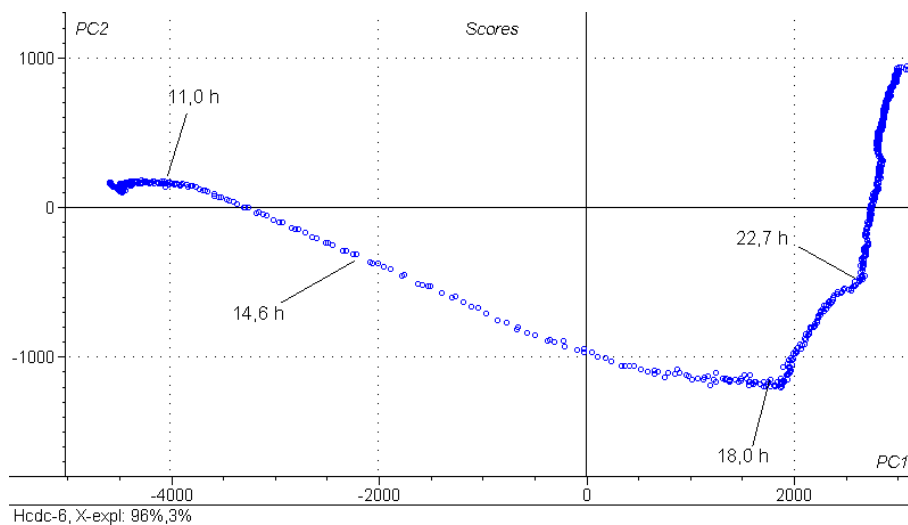


Abb. 8.5: Scores der ersten und zweiten Hauptkomponente berechnet aus den 2D-Fluoreszenzspektren von der *E. coli* Hochzelldichte-Kultivierung E-1 mittels Hauptkomponentenanalyse

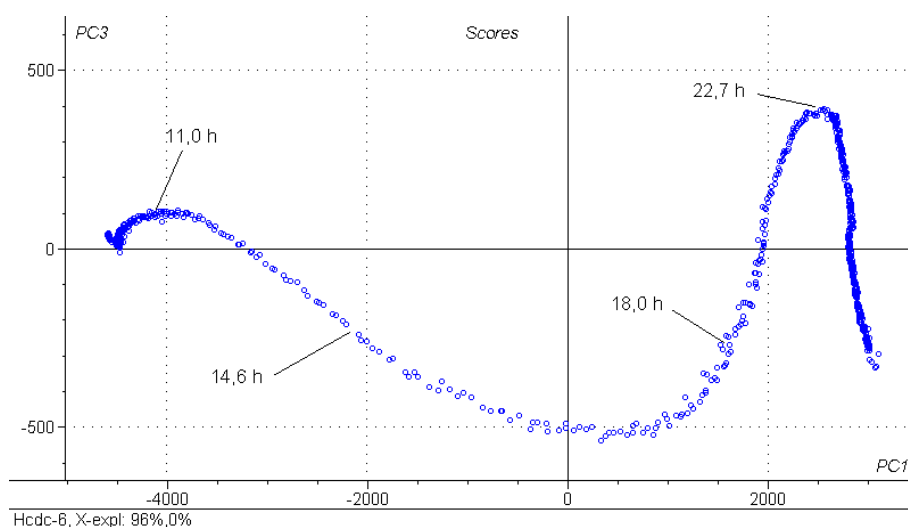


Abb. 8.6: Scores der ersten und dritten Hauptkomponente berechnet aus den 2D-Fluoreszenzspektren von der *E. coli* Hochzelldichte-Kultivierung E-1 mittels Hauptkomponentenanalyse

Der Induktionszeitpunkt nach 18 h ist im Score-Verlauf in Abbildung 8.6 nicht deutlich erkennbar. Der Grund dafür ist, dass die Hauptkomponenten unterschiedliche Abhängigkeiten im Kultivierungsverlauf beschreiben. Die erste Hauptkomponente beschreibt vor allem die Veränderung der Zellzahl bzw. BTM-Konzentration. So nehmen die Score-Werte entlang der ersten Hauptkomponente analog der BTM-Konzentration zunächst bis zur 11. Kultivierungsstunde nur gering zu. In der exponentiellen Wachstumsphase nach der 11. Kultivierungsstunde nehmen die Werte deutlich zu, während sie in der Produktionsphase langsamer zunehmen. Die zweite Hauptkomponente charakterisiert vor allem die Prozessphasen und Stoffwechseländerungen, die sich z.B. nach der Induktion ergeben (Abb. 8.5). Eine Einteilung des Kultivierungsprozesses in eine exponentielle Wachstumsphase und eine Produktionsphase ist mit dem Verlauf der Scores der zweiten Hauptkomponente leicht möglich. Im Verlauf der dritten Hauptkomponente ist der Zeitpunkt der beginnenden Fluoreszenzlimitierung besonders gut zu erkennen.

In der Darstellung der Leverage-Werte in Abbildung 8.7 sind zu verschiedenen Zeitpunkten signifikante Veränderungen im Verlauf der Werte zu erkennen. Der Dialysestart (14,6 h) führt zu einem Anstieg und die Induktion (18 h) zu einer Abnahme im Verlauf der Leverage-Werte der zweiten Hauptkomponente. Eingriffe in den Bioprozess werden in dieser Darstellung genau dokumentiert.

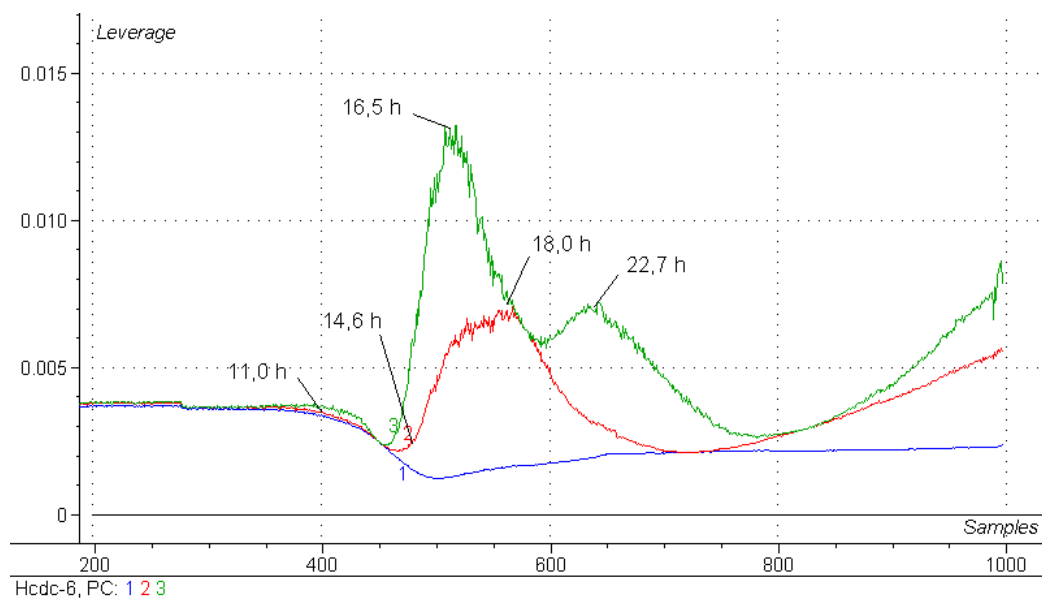


Abb. 8.7: Darstellung der Leverage-Werte der ersten drei Hauptkomponenten berechnet aus den 2D-Fluoreszenzspektren der *E. coli*-HZD-Kultivierung E-1 mittels Hauptkomponentenanalyse

Der Leverage-Verlauf der dritten Hauptkomponente zeigt mit dem Maximum nach 22,7 h den Beginn der Fluoreszenzlimitierung in den SFI-Verläufen an. Darüber hinaus ist im Leverage-Verlauf der dritten Hauptkomponente nach 16,5 h ein weiterer signifikanter Zeitpunkt zu erkennen. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich die Bakterienzellen in der exponentielle Wachstumsphase. Die SFI-Veränderungen sind zu diesem Zeitpunkt am größten.

8.5.2 PLS-Modelle zur Schätzung von Bioprozessgrößen

Um die Informationen der 2D-Fluoreszenzspektren für eine Online-Vorhersage von wichtigen Bioprozessgrößen, wie z.B. die BTM- und Acetatkonzentration oder die optische Dichte, direkt nutzen zu können, wurden PLS-Modelle entwickelt. Der optimale Zeitpunkt für den Dialysestart ($OD_{540\text{ nm}} \approx 25$ relative Einheiten) und für die Induktion ($OD_{540\text{ nm}} \approx 100$ relative Einheiten) lassen sich so genau vorhersagen, anstatt diese Zeitpunkte zwischen Offline-Proben abzuschätzen.

Die Entwicklung der PLS-Modelle erfolgte analog den Beschreibungen in Kapitel 5.7.1 mit den Offline-Daten (Abb. 8.1 a-c) und den Fluoreszenzdaten der Hochzelldichte-Kultivierung E-1. Die Varianz der SFI von allen WLK wurde zwischen eins und Null normiert. Die Abbildung 8.8 zeigt die Kalibrationsgerade von 34 offline gemessenen und mit dem BTM-Modell-1 geschätzten BTM-Konzentrationswerte. Der RMSEC der Schätzung beträgt 1,85 g/L. Das entspricht einem relativen Fehler von 1,7% bezogen auf die Endkonzentration von 110 g/L.

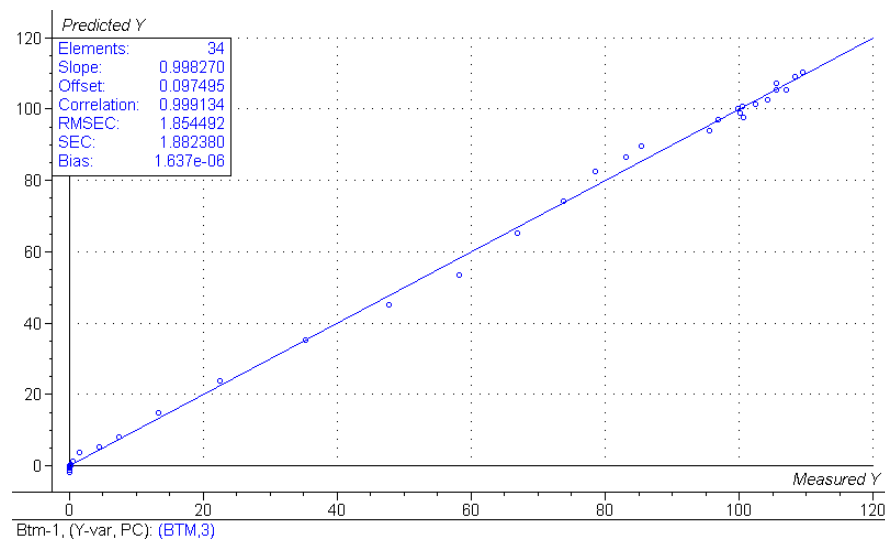


Abb. 8.8: Kalibrationsgerade der vom BTM-Modell-1 geschätzten und offline gemessenen BTM-Konzentration der Hochzelldichte-Kultivierung E-1 im 300 L Fermenter

Das BTM-Modell-1 erlaubt eine genaue Berechnung der BTM-Konzentration aus jedem 2D-Fluoreszenzspektrum, wie in Abbildung 8.9 zu sehen ist. Eine Konzentrationsangabe wird so alle drei Minuten erreicht. Das ergibt während des gesamten Kultivierungsprozesses 800 Konzentrationswerte gegenüber 34 Offline-Proben. Für die Berechnung nutzt das BTM-Modell-1 die Informationen aus dem Gesamtspektrum. Eine Online-Vorhersage der BTM-Konzentration bei weiteren Hochzelldichte-Kultivierungen bietet entsprechend die Möglichkeit, den Induktionszeitpunkt auf die Minute genau zu bestimmen. Eine Automatisierung des Induktionsstartes bei etablierten industriellen Prozessen wäre dadurch erreichbar.

Die Produktkonzentration (Abb. 8.9) sowie die Essig- und Zitronensäurekonzentration (Abb. 8.10) konnten ebenfalls mit großer Genauigkeit mit Hilfe von PLS-Modellen geschätzt werden. Eine genaue Dokumentation des Kultivierungsprozesses kann in dieser Weise mit hoher

analytischer Auflösung erzielt werden. Der Verlauf der CO_2 -Konzentration im Abgas ist in den Graphen zur Orientierung des Prozessverlaufes mit angegeben.

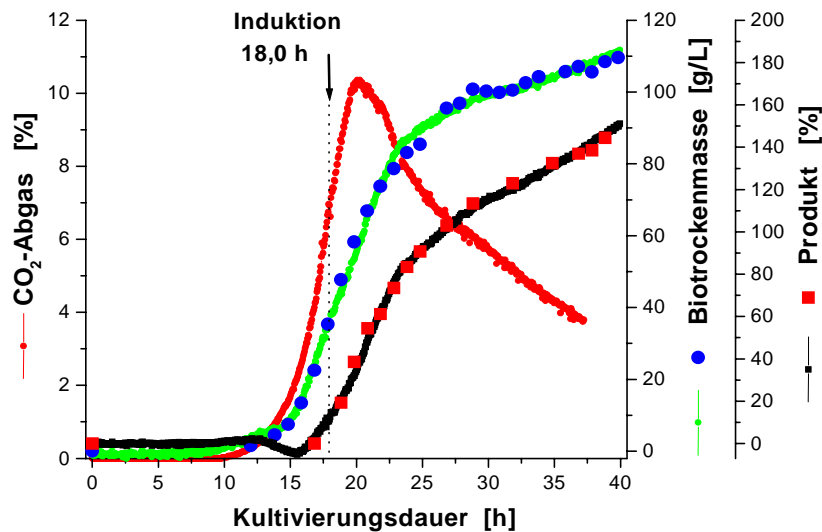


Abb. 8.9: Verlauf des Abgas CO_2 -Gehalts sowie der geschätzten und offline gemessenen BTM- und Produktkonzentration während der HZD-Kultivierung E-1 von *E. coli* im 300 L Fermenter

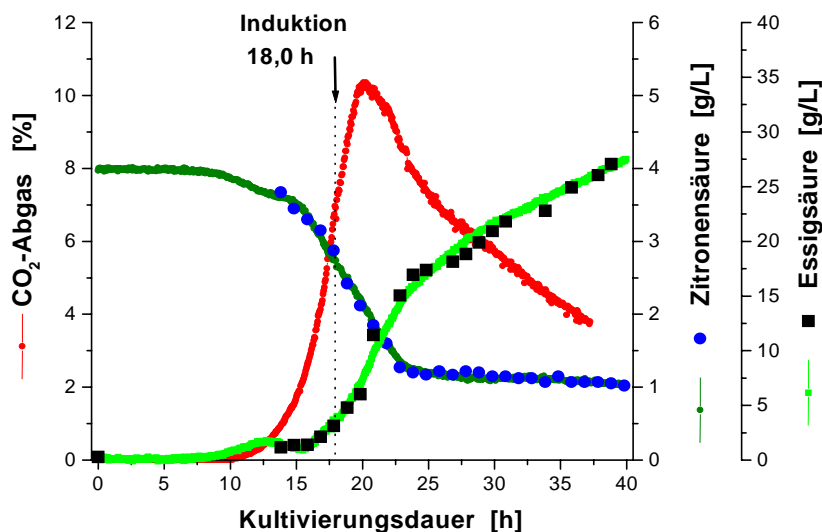


Abb. 8.10: Verlauf des Abgas CO_2 -Gehalts sowie der geschätzten und offline gemessenen Essig- und Zitronensäurekonzentration während der HZD-Kultivierung E-1 von *E. coli* im 300 L Fermenter

Die Tabelle 8.1 zeigt den RMSEC der Schätzungen und relativen Vorhersagefehler bezogen auf die maximale BTM-, Produkt-, Acetat- und Zitronensäurekonzentration (Abb. 8.9, Abb. 8.10). Die PLS-Modelle nutzen jeweils drei Hauptkomponenten (PCs). Der RMSEC beträgt beispielsweise für die Berechnung der Acetatkonzentration 0,89 g/L, aus dem sich ein relativer

Vorhersagefehler bezogen auf die Maximalkonzentration von nur 2,9% errechnet. Die Vorhersagefehler für alle entwickelten PLS-Modelle betragen weniger als drei Prozent. Diese niedrigen relativen Fehler deuten auf eine gute Brauchbarkeit der PLS-Modelle für eine Online-Vorhersage bei vergleichbaren Hochzelldichte-Kultivierungen hin.

Tab. 8.1 RMSEC für die Schätzungen der PLS-Modelle und relative Vorhersagefehler bezogen auf die Maximalkonzentration von verschiedenen Bioprozessgrößen der *E. coli*-Hochzell-dichte-Kultivierung E-1 im 300 L Fermenter

	BTM	Produkt	Acetat	Zitronensäure
PCs	3	3	3	3
Korrelation	0,999	0,998	0,996	0,998
RMSEC	1,85 g/L	2,95 %	0,89 g/L	0,055 g/L
relativer Fehler	1,7 %	2,1 %	2,9 %	1,4 %

8.6 Vorhersage von Bioprozessgrößen bei Hochzelldichte-Kultivierung E-2

8.6.1 Anwendung des PLS-Modells zur Berechnung der BTM-Konzentration

Die in Kapitel 8.5.2 beschriebenen PLS-Modelle wurde bei der HZD-Kultivierung E-2 überprüft. Die Abbildung 8.11 zeigt das Ergebnis der externen Validierung für das PLS-Modell zur Vorhersage der BTM-Konzentration (BTM-Modell-1). Zur Orientierung ist in der Abbildung 8.11 der Verlauf der NAD(P)H-abhängigen SFI von HZD-Kultivierung E-2 dargestellt, an dem Änderungen im biologischen Zellzustand durch den Dialysestart und die Induktion sichtbar werden. Die Vorhersage der BTM-Konzentration aus den 2D-Fluoreszenzspektren zeigt bis zur 24. Kultivierungsstunde eine sehr gute Übereinstimmung mit den offline ermittelten Konzentrationswerten. Der RMSEP beträgt bis zu diesem Zeitpunkt nur 2,5 g/L, was einem relativen Vorhersagefehler von nur 3,7% bezogen auf die bis zur 24. Kultivierungsstunde erreichten BTM-Konzentration entspricht. Nach der 24. Kultivierungsstunde weicht die Vorhersage jedoch zunehmend von den Offline-Werten ab. Während das BTM-Modell-1 nach 40 h eine Konzentration von ca. 94 g/L vorhersagt, wird tatsächlich jedoch nur eine BTM-Konzentration von etwa 68 g/L erreicht. Der RMSEP für die gesamte HZD-Kultivierung E-2 beträgt 13,5 g/L, was einem relativen Vorhersagefehler von etwa 19,7% entspricht.

PLS-Modelle, die analog Kapitel 5.9 aus den Daten mehrerer Kultivierungen entwickelt werden, sind in der Lage, auch komplexere Zusammenhänge zu beschreiben. Aus diesem Grund wurde ein PLS-Modell aus den Offline-Daten von HZD-Kultivierungen E-1 und E-2 entwickelt. Dieses sogenannte BTM-Modell-1/2 erlaubt die Berechnung der BTM-Konzentration beider HZD-Kultivierungen, wie in Abbildung 8.12 zu sehen ist.

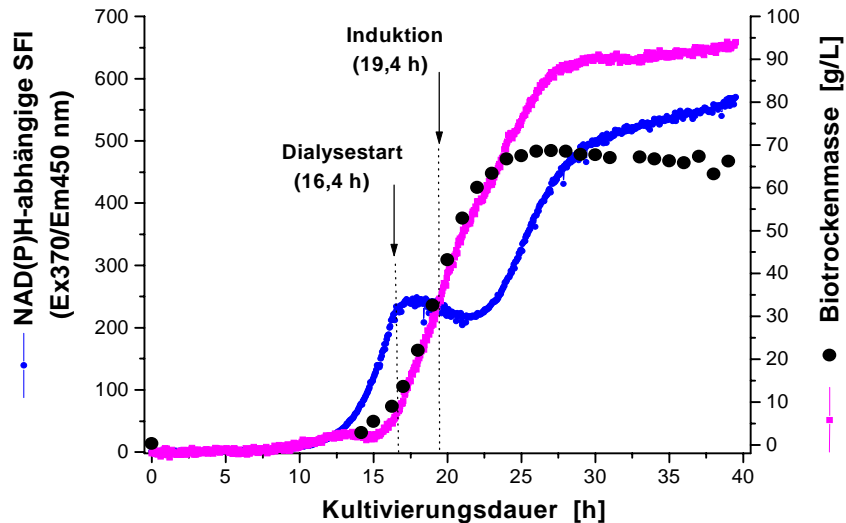


Abb. 8.11: Verlauf der NAD(P)H-abhängigen SFI sowie der vorhergesagten und offline gemessenen BTM-Konzentration bei Verwendung des BTM-Modell-1 während der *E. coli*-HZD-Kultivierung E-2 im 300 L Fermenter

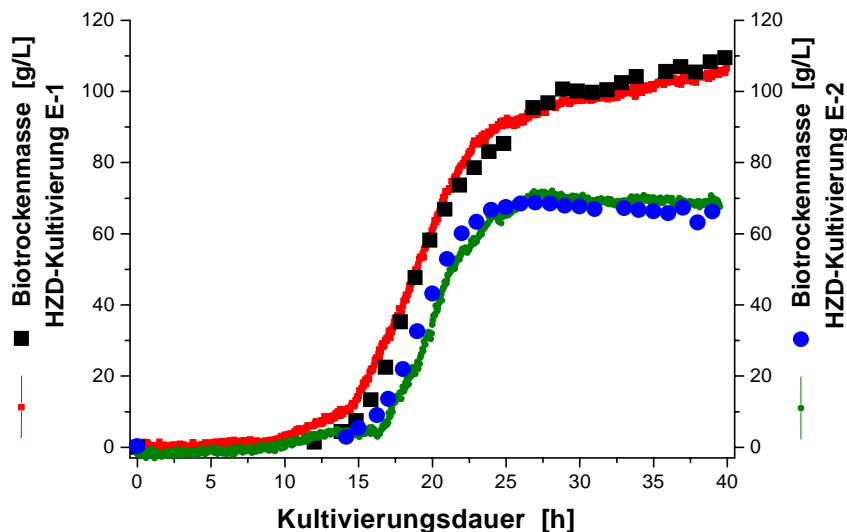


Abb. 8.12: Verlauf der geschätzten und offline gemessenen BTM-Konzentrationen bei Verwendung von BTM-Modell-1/2 während der *E. coli*-Hochzelldichte-Kultivierung E-1 und E-2 im 300 L Fermenter

Trotz unterschiedlicher Prozessverläufe erlaubt das BTM-Modell-1/2 für beide HZD-Kultivierungen eine hinreichend genaue Beschreibung des BTM-Konzentrationsverlaufes. Das PLS-Modell nutzt dabei für die Schätzung drei Hauptkomponenten. Der RMSEC der Schätzung beträgt für die Kultivierung E-1 ca. 3,9 g/L und für die Kultivierung E-2 ca. 3,6 g/L. Daraus errechnet sich ein relativer Vorhersagefehler von 3,6% bzw. 5,2% bezogen auf die maximal erreichten Konzentrationen. Durch die Verwendung zweier unterschiedlicher Kalibrationskultivierungen ist das BTM-Modell-1/2 wesentlich flexibler.

8.6.2 Überprüfung der linearen Regression

Die Korrelation der skalierten Streulichtintensität bei Ex330/EmND ergibt bei Hochzelldichte-Kultivierung E-1 eine sehr gute Übereinstimmung mit der BTM-Konzentration bis zur 25. Kultivierungsstunde (Kap. 8.4). Die Streulichtintensität bei Ex330/EmND von Kultivierung E-2 zeigt dagegen eine sehr gute Übereinstimmung mit dem Verlauf der BTM-Konzentration über die gesamte Prozessdauer, wie in Abbildung 8.13 zu sehen ist. Die Abbildung 8.13 ist analog skaliert wie die Abbildung 8.4a. Eine Limitierung der messbaren Streulichtintensität ist bei Kultivierung E-2 nicht zu beobachten. Die erreichte maximale BTM-Konzentration beträgt bei Kultivierung E-2 ca. 68 g/L. Offensichtlich wird die messbare Streulichtintensität bei zunehmender Trübung und damit verbundenen abnehmenden Eindringtiefe des Anregungslichtes erst oberhalb einer kritischen BTM-Konzentration limitiert. Diese kritischen BTM-Konzentration liegt wahrscheinlich bei ca. 80 g/L, wie in Abbildung 8.4a zu erkennen ist (Kap. 8.4). Eine BTM-Konzentration von ca. 80 g/L entspricht etwa einer $OD_{540\text{ nm}}$ von 270 relativen Einheiten.

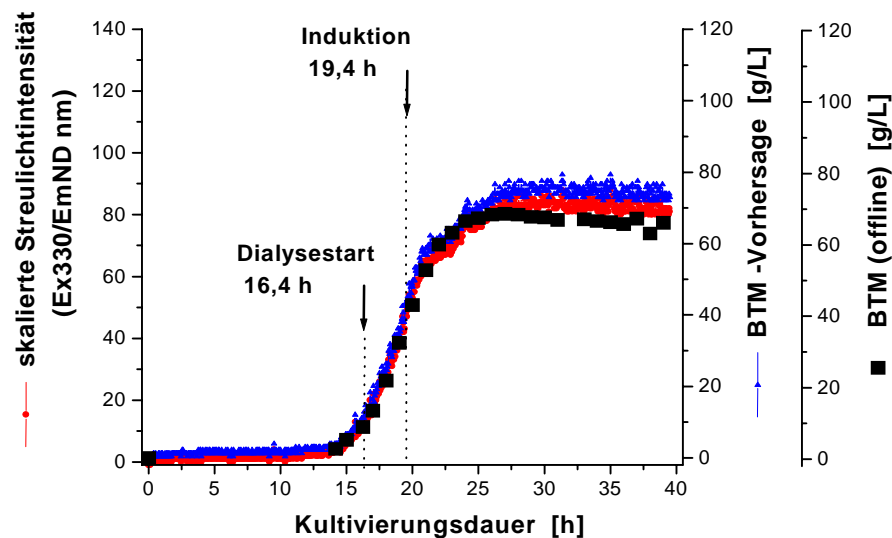


Abb. 8.13: Verlauf der skalierten Streulichtintensität bei Ex330/EmND, der offline gemessenen und mit Gleichung (28) in Kapitel 8.4 vorhergesagten BTM-Konzentration während der *E. coli*-Hochzelldichte-Kultivierung E-2

Die Vorhersage der BTM-Konzentration aus der skalierten wellenlängenabhängigen Streulichtintensität bei Ex330/EmND mit der Regressionsgleichung (28) (Kap. 8.4) ergibt ebenfalls eine sehr gute Beschreibung des BTM-Verlaufs von HZD-Kultivierung E-2 (Abb. 8.13). Der RMSEP beträgt 3,7 g/L, woraus sich ein relativer Fehler von 5,4% berechnet. Eine einfache Berechnung der BTM-Konzentration direkt aus der skalierten Streulichtintensität bei Ex330/EmND ist unterhalb einer kritischen Trübung bzw. BTM-Konzentration mit großer Genauigkeit möglich, wie die Validierung der Gleichung (28) zeigt. Oberhalb einer kritischen Trübung bzw. BTM-Konzentration geht die messbare Streulichtintensität gegen einen Sättigungswert und eine weitere Zunahme der BTM-Konzentration lässt sich nicht mehr allein aus der Streulichtintensität

vorhersagen. Dann wird die Nutzung des Gesamtspektrums erforderlich, die mit Hilfe multivariater Auswerteverfahren (Kap. 8.5.2) erreicht werden kann.

Eine Einteilung des Prozessverlaufes in Bereiche ohne und mit Limitierung der messbaren Streulichtintensität ist wahrscheinlich auch bei der Erstellung von PLS-Modellen sinnvoll. Bis zur kritischen BTM-Konzentration könnten einfachere PLS-Modelle die Vorhersage der Bioprozessgrößen erreichen. Komplexere Modelle sind dann für die Vorhersage bei höheren BTM-Konzentrationen erforderlich.

8.7 Vergleich der Hochzelldichte-Kultivierung E-1 und E-2 im 300 L Fermenter

8.7.1 Vergleich der SFI-Verläufe

Die Abbildung 8.14 zeigt den Verlauf der BTM-Konzentration von HZD-Kultivierung E-1 und E-2 im Vergleich zur protein- und flavinabhängigen SFI. Die protein- und flavinabhängigen SFI zeigen bei beiden HZD-Kultivierungen annähernd identische Verläufe, obwohl die BTM-Konzentration nach der 22. Kultivierungsstunde deutlich voneinander abweichen.

Der Verlauf der Proteinfluoreszenz geht bei beiden Kultivierungen ab einem SFI-Wert von ca. 1400 in eine Sättigungskurve über. Die SFI nimmt bei Kultivierung E-1 danach bis zum Prozessende kaum noch zu, obwohl die BTM-Konzentration noch deutlich weiter ansteigt (Abb. 8.14a). Der „Inner-filter“-Effekt führt bei Kultivierung E-1 offensichtlich oberhalb einer BTM-Konzentration von ca. 80 g/L zu einer Limitierung der messbaren Fluoreszenzintensität.

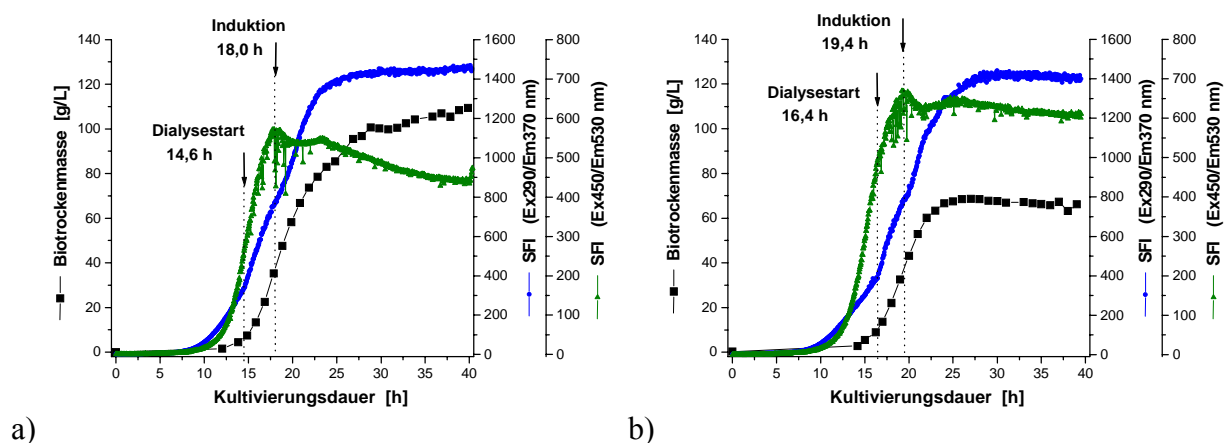


Abb. 8.14: Verlauf der offline gemessenen BTM-Konzentration und der protein- (Ex290/Em370 nm) und flavinabhängigen SFI (Ex450/Em530 nm) während der *E. coli*-Hochzelldichte-Kultivierung E-1 (a) und E-2 (b)

Die flavinabhängige SFI bei Ex450/Em530 nm erreicht bei Kultivierung E-2 bis zur Induktion eine um 16% höhere SFI als bei Kultivierung E-1 (Abb. 8.14b), trotz gleicher BTM-Konzen-

tration von ca. 37 g/L. Nach der Induktion nimmt die SFI bei HZD-Kultivierung E-2 bis zum Prozessende nur gering ab (8%), während sich die Intensität der Flavinfluoreszenz bei Kultivierung E-1 bis zum Prozessende um 24% verringert. Diese stärkere SFI-Abnahme bei Kultivierung E-1 begründet sich wahrscheinlich ebenfalls durch eine starke Konzentrations-Fluoreszenzlöschung durch den „Inner-filter“-Effekt. Durch eine hohe Fluorophorkonzentration am Prozessende wird das Anregungslicht so stark absorbiert, dass es von den Fluorophoren herausgefiltert und an einem tieferen Eindringen gehindert wird. Vermutlich überlagern sich hier biologische (z.B. Zellwachstum) und physikalischen Einflussgrößen (z.B. „Inner-filter“-Effekt). Signifikante Unterschiede im Prozessverlauf der HZD-Kultivierung E-1 und E-2 sind vor allem in den Verläufen der NAD(P)H-abhängigen SFI zu erkennen (Abb. 8.15). Bei HZD-Kultivierung E-2 nimmt die NAD(P)H-abhängige SFI nach der 28. Kultivierungsstunde nur noch gering zu (Abb. 8.15b). Es handelt sich hier wahrscheinlich nicht um eine Limitierung der Fluoreszenzintensität durch den „Inner-filter“-Effekt, da bei Kultivierung E-1 die NAD(P)H-abhängige SFI trotz steigender BTM- und Produktkonzentration weiter zu nimmt (Abb. 8.15a).

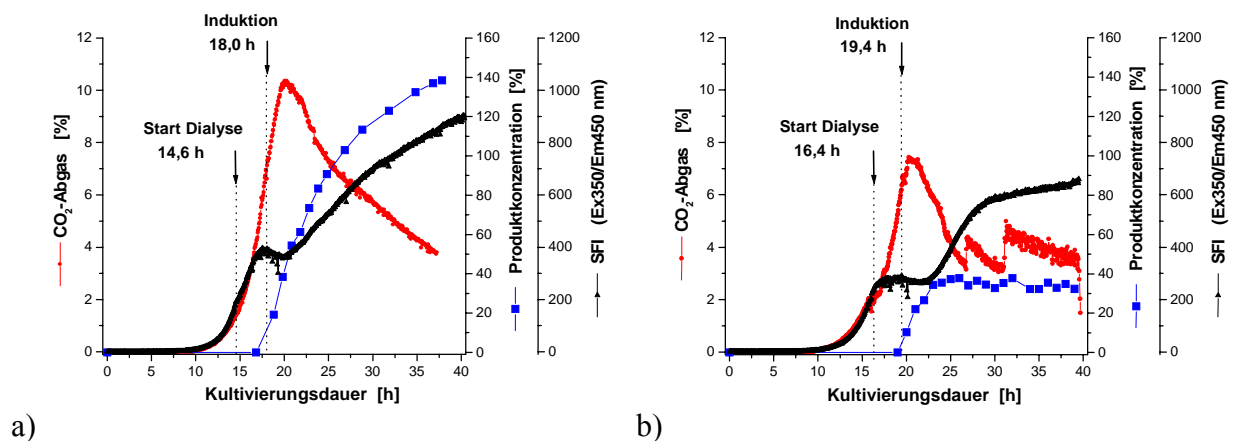


Abb. 8.15: Verlauf des Abgas CO₂-Gehalts, der offline gemessenen Produktkonzentration und der NAD(P)H-abhängigen SFI (Ex350/Em450 nm) während der *E. coli*-Hochzelldichte-Kultivierung E-1 (a) und E-2 (b)

Die meisten offline und online gemessenen Daten von den HZD-Kultivierungen E-1 und E-2 verlaufen jedoch bis zur Induktion annähernd identisch. Die Induktion erfolgt bei beiden Kultivierungen bei einer OD_{540 nm} von ca. 100 relativen Einheiten, die BTM-Konzentration beträgt jeweils ca. 37 g/L. Nach der Induktion wird jedoch der Unterschied im Zellwachstum und in der Produktbildung auch im Abgas CO₂-Gehalt deutlich (Abb. 8.15). Der CO₂-Gehalt im Abgas erreicht bei Kultivierung E-1 nach der 20. Kultivierungsstunde ein Maximum von ca. 10,4%. Bei Kultivierung E-2 dagegen wird nur ein Maximum von ca. 7,5% (20 h) erreicht, was auf eine deutlich geringere Zellaktivität hinweist (Abb. 8.15b).

8.7.2 Online-Prozesskontrolle mittels Fluoreszenzmessungen

Eine frühzeitige Erkennung des unterschiedlichen Zellwachstums von HZD-Kultivierung E-1 und E-2 ist in der NAD(P)H-abhängigen SFI zu erkennen (Abb. 8.16). Der Dialysestart bei Kultivierung E-1 erfolgte bei einer $OD_{540\text{ nm}}$ von ca. 16 relativen Einheiten. Die NAD(P)H-abhängige SFI hat zu diesem Zeitpunkt einen Wert von ca. 200 Einheiten erreicht und steigt im Anschluss bis zur Induktion ($OD_{540\text{ nm}} \approx 100$ relative Einheiten) auf über 400 Einheiten an (Abb. 8.16a). Bei Kultivierung E-2 wird die Dialyse dagegen bei einer $OD_{540\text{ nm}}$ von ca. 25 relativen Einheiten gestartet. Die NAD(P)H-abhängige SFI hat hier bereits einen Wert von ca. 250 Einheiten erreicht, und steigt im weiteren Verlauf bis zur Induktion kaum noch an (Abb. 8.16b).

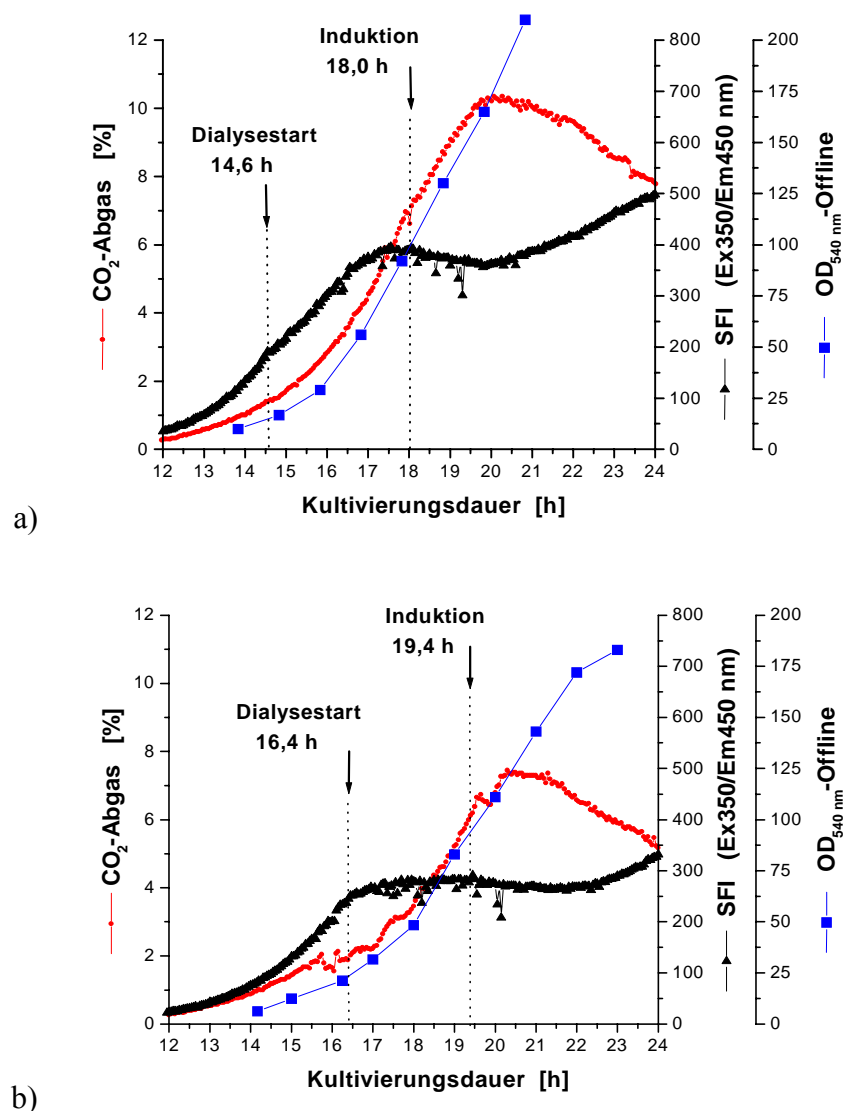


Abb. 8.16: Verlauf der CO_2 -Konzentration im Abgas, der NAD(P)H-abhängigen SFI (Ex350/Em450 nm) und der $OD_{540\text{ nm}}$ während der *E. coli*-Hochzelldichte-Kultivierung E-1 (a) und E-2 (b)

Im Fluoreszenzverlauf wird bereits frühzeitig in der NAD(P)H-abhängigen SFI ein unterschiedlicher Bioprozessverlauf angezeigt. Bereits kurz nach dem Dialysestart geht der NAD(P)H-abhängige SFI-Verlauf bei HZD-Kultivierung E-2 gegen einen Sättigungswert und deutet im Vergleich zu HZD-Kultivierung E-1 schon frühzeitig auf einen veränderten biologischen Kulturzustand hin. Zum Zeitpunkt der Induktion haben beide HZD-Kultivierungen eine $OD_{540\text{ nm}}$ von ca. 100 relativen Einheiten bzw. eine BTM-Konzentration von ca. 37 g/L erreicht, weisen aber stark unterschiedliche NAD(P)H-abhängige SFI-Werte auf. Bei HZD-Kultivierung E-1 wird ein SFI-Wert von ca. 390 Einheiten und bei HZD-Kultivierung E-2 lediglich ein SFI-Wert von ca. 280 Einheiten erreicht. Vermutlich deutet diese Beobachtung bereits frühzeitig auf eine verminderte Zellaktivität bei HZD-Kultivierung E-2 hin, die letztlich zu einer verminderten BTM- und Produktbildung führte. Eine Online-Kontrolle von HZD-Kultivierungen mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie ist somit denkbar, weil sie zeitnah auch Informationen über den biologischen Kulturzustand liefert.

8.8 Induktionsexperimente im 30 L Fermenter

Kapitel 8.7.1 hat gezeigt, dass die SFI-Verläufe während der Hochzelldichte-Kultivierungen von einer Vielzahl von Prozessgrößen sowie vom biologischen Zellzustand abhängen. Die IPTG-Zugabe führt bei *E. coli*-Zellen zu einer Veränderung des Zellstoffwechsels. Die Auswirkung der Stoffwechseländerung auf die Fluoreszenz soll daher genauer untersucht werden. Dazu wurden zwei Hochzelldichte-Kultivierungen (E-3, E-4) im 30 L Fermenter durchgeführt.

8.8.1 2D-Fluoreszenzdifferenzspektren

Die Abbildung 8.17 zeigt 2D-Fluoreszenzdifferenzspektren von den HZD-Kultivierungen E-3 und E-4, in denen die Veränderungen in einem Zeitintervall von zwei Stunden nach Erreichen einer $OD_{540\text{ nm}}$ von ca. 100 relativen Einheiten zu sehen sind. Bei HZD-Kultivierung E-3 erfolgte zur 17. Kultivierungsstunde die Induktion durch Zugabe von IPTG. Die HZD-Kultivierung E-4 hat eine $OD_{540\text{ nm}}$ von ca. 100 relativen Einheiten nach 17,1 h erreicht. Hier erfolgte keine Induktion.

Die größten Unterschiede in den Fluoreszenzdifferenzspektren (Abb. 8.17) sind in den flavin-abhängigen RFI-Bereichen zu sehen. Während bei HZD-Kultivierung E-3 nach der Induktion eine starke RFI-Abnahme im Flavinbereich zu erkennen ist (Abb. 8.17a), nimmt die RFI bei Kultivierung E-4 bei Ex490/Em530 nm (Flavin-3) stark zu (Abb. 8.17b). In den pyridoxal-phosphat- und NAD(P)H-1-abhängigen Fluoreszenzbereichen ist sowohl mit als auch ohne Induktion eine Abnahme der RFI zu sehen. Die Stoffwechseländerung aufgrund der Expression wirkt sich in diesen Bereichen offenbar nicht so stark auf die RFI aus. Dagegen sind Intensitätsunterschiede in den NAD(P)H-2- und NAD(P)H-3-abhängigen RFI-Bereich zu erkennen. Besonders im Proteinbereich nimmt die RFI ohne Induktion (HZD-Kultivierung E-4) stark zu (Abb. 8.17b). Das Zellwachstum ist ohne Induktion weiterhin exponentiell. Dagegen ist die RFI-

Zunahme im Proteinbereich bei HZD-Kultivierung E-3 nach IPTG-Zugabe deutlich geringer. Ein Vergleich des Differenzspektrums der HZD-Kultivierung E-3 (Abb. 8.17a) mit dem Differenzspektrum von der HZD-Kultivierung E-1 im 300 L Fermenter (Abb. 8.3b) zeigt vergleichbare RFI-Veränderungen durch die Induktion.

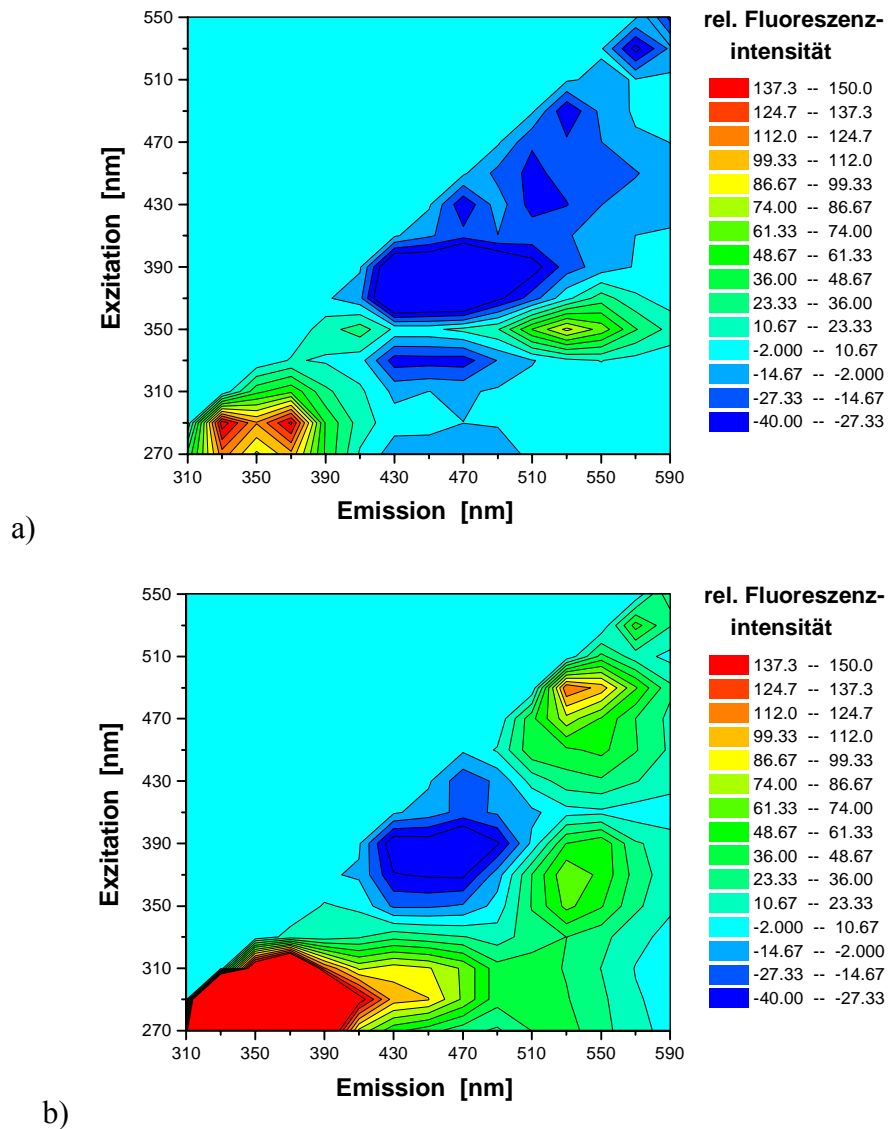


Abb. 8.17: 2D-Fluoreszenzdifferenzspektren der *E. coli*-Hochzelldichte-Kultivierungen im 30 L Fermenter nach Erreichen einer $OD_{540\text{ nm}}$ von ca. 100 relativen Einheiten

a): HZD-Kultivierung E-3 mit IPTG-Zugabe (19,0 h minus 17,0 h)

b): HZD-Kultivierung E-4 ohne IPTG-Zugabe (19,1 h minus 17,1 h)

8.8.2 Vergleich von Hochzelldichte-Kultivierung E-3 und E-4 im 30 L Fermenter

In Abbildung 8.18 sind verschiedene SFI-Verläufe biogener Fluorophore von HZD-Kultivierung E-3 und E-4 zu sehen. Bei HZD-Kultivierung E-3 erfolgte 2,9 h nach dem Dialysestart (14,1 h) die Induktion (17 h). Die BTM-Konzentration beträgt zu diesem Zeitpunkt etwa 40 g/L. Analog der HZD-Kultivierung E-1 im 300 L Fermenter (Abb. 8.2a) ist nach der Induktion in der

flavinabhängigen SFI eine Abnahme zu erkennen. Die proteinabhängige SFI nimmt nach etwa 22,5 h trotz weiter steigender Zellzahl nicht mehr zu. Die BTM-Konzentration beträgt zu diesem Zeitpunkt bereits ca. 90 g/L. Wahrscheinlich ist aufgrund des „Inner-filter“-Effekts keine weitere Zunahme in der proteinabhängigen SFI zu beobachten.

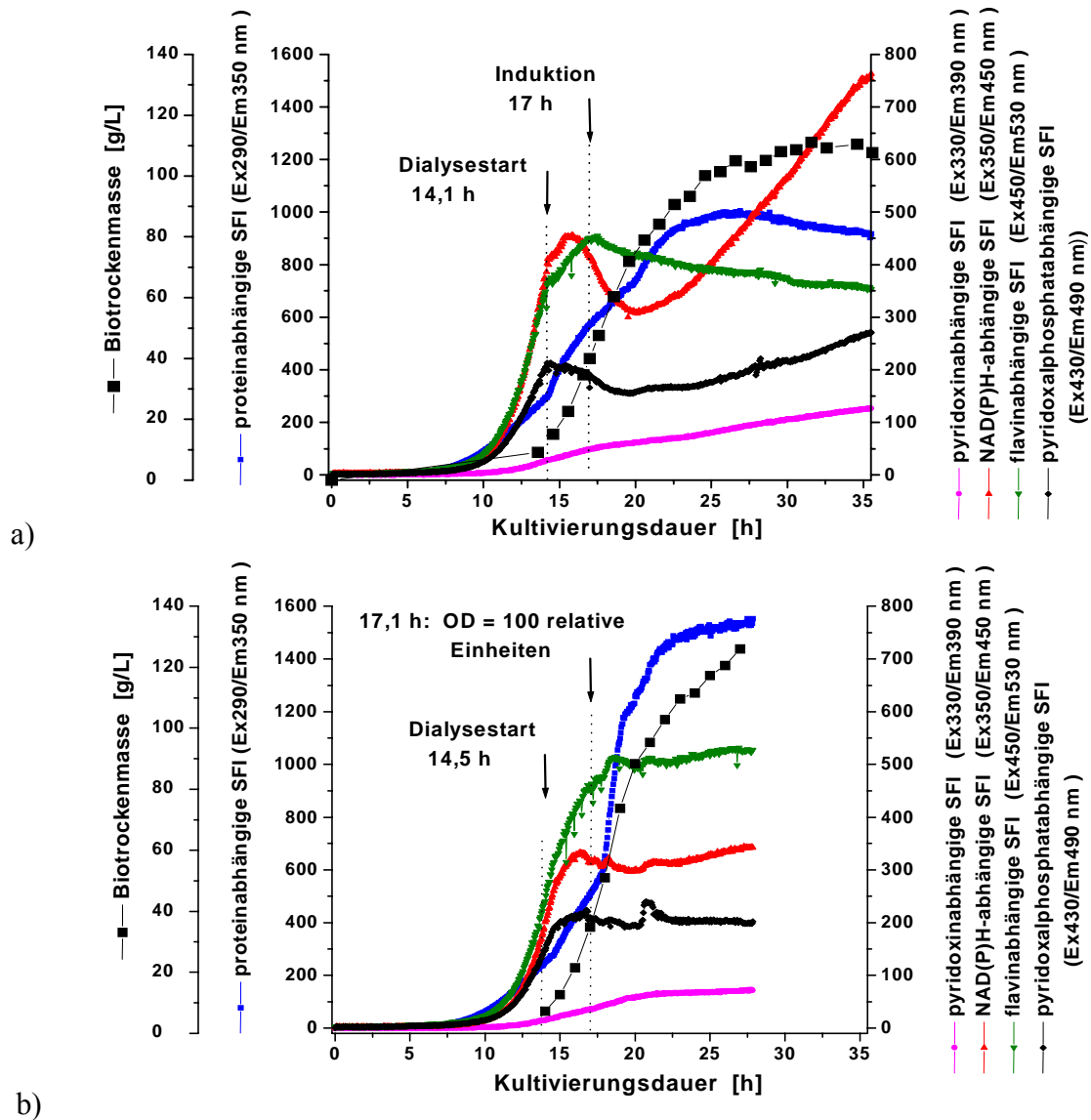


Abb. 8.18: SFI-Verläufe aus verschiedenen Fluoreszenzbereichen und Verlauf der BTM-Konzentration während der *E. coli*-HZD-Kultivierung im 30 L Fermenter

a) Hochzelldichte-Kultivierung E-3 mit induzierter Proteinexpression

b) Hochzelldichte-Kultivierung E-4 ohne Induktion

Die SFI-Verläufe der HZD-Kultivierungen E-3 und E-4 sind bis zur 17. Kultivierungsstunde mit Ausnahme der NAD(P)H-abhängige SFI annähernd identisch. Ohne Induktion steigt die Proteinfluoreszenz bei HZD-Kultivierung E-4 sehr stark an (Abb. 8.18b). Bei einer BTM-Konzentration von 115 g/L (24,5 h) wird eine SFI im proteinabhängigen Bereich von 1520 Einheiten erreicht. Die Proteinfluoreszenz erreicht damit eine um 50% höhere Intensität gegenüber der

HZD-Kultivierung E-3, obwohl sich die BTM-Konzentrationen zu diesem Zeitpunkt nur um etwa 15% unterscheiden. Wahrscheinlich steigt die Konzentration extrazellulärer Proteine bei HZD-Kultivierung E-4 ohne Induktion aufgrund eines höheren Wachstums sehr stark an.

Die NAD(P)H-abhängige SFI erreicht bei beiden HZD-Kultivierungen bereits vor der Induktion bzw. dem Erreichen einer $OD_{540\text{ nm}}$ von ca. 100 relativen Einheiten ein Maximum (Abb. 8.18). Ohne Induktion sind in der NAD(P)H-abhängigen SFI nur noch geringe Intensitätsveränderungen zu beobachten. Dagegen nimmt die NAD(P)H-abhängige SFI bei Kultivierung E-3 nach der Induktion bis zu einem Minimum nach etwa 20 h stark ab und steigt anschließend kontinuierlich bis zum Prozessende an. Die Stoffwechseländerung infolge der IPTG-Zugabe beeinflusst auch die NAD(P)H-abhängige SFI. Auch die pyridoxin- und pyridoxalphosphat-abhängige SFI werden durch einen unterschiedlichen Stoffwechsel beeinflusst (Abb. 8.18).

Der Dialysestart bei Kultivierung E-3 und E-4 ist sehr deutlich in den Verläufen der flavin-, pyridoxalphosphat- und NAD(P)H-abhängigen SFI erkennbar (Abb. 8.18). Dagegen ist der Dialysestart bei Kultivierung E-1 im 300 L Fermenter (Abb. 8.2) in den SFI-Verläufen kaum zu erkennen. Der Grund ist vermutlich die deutlich höhere Dialyseleistung bei den HZD-Kultivierungen E-3 und E-4. Das Verhältnis zwischen Dialysevolumen und Reaktorvolumen (V_D/V_R -Verhältnis) ist bei Kultivierung E-3 mit 3,8:1 wesentlich höher als bei Kultivierung E-1 (V_D/V_R -Verhältnis 1:1). Durch dieses Verhältnis wird ein höherer Konzentrationsgradient aufgebaut, der zu einem größeren diffusiven Stoffstrom niedermolekularer Nebenprodukte und Farbstoffe ins Dialysat führt. Ausserdem war die Membranfläche bei HZD-Kultivierungen E-3 und E-4 mit $100\text{ m}^2/\text{m}^3$ fast doppelt so groß wie bei HZD-Kultivierungen E-1 ($52\text{ m}^2/\text{m}^3$). Nach dem Dialysestart werden dadurch aus der Fermentationsbrühe stärker Farbstoffe und extrazelluläre Fluorophore entfernt, so dass der SFI-Anstieg in den flavin-, pyridoxalphosphat- und NAD(P)H-abhängigen Bereichen geringer ist. Das V_D/V_R -Verhältnis nimmt offensichtlich Einfluss auf die SFI-Verläufe. Eine Kontrolle des optimalen Dialysebedarfs ist mit Hilfe der SFI-Verläufe wahrscheinlich möglich.

8.9 Zusammenfassung

Hochzelldichte-Kultivierungen wurden im 300 L und 30 L Fermenter mittels Dialyseverfahren durchgeführt. Die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen haben im Hinblick auf eine verbesserte Prozessführung folgendes gezeigt:

- Die unterschiedlichen Prozessphasen (z.B. Adaptions- und exponentielle Wachstumsphase bis zur Dialyse, exponentielle Wachstumsphase bis zur Induktion, Produktions- und verzögerte Produktionsphase) sind in den SFI-Verläufen erkennbar. Die Induktion durch Zugabe von IPTG führt zu einer Stoffwechselumstellung, die in den flavin-, pyridoxalphosphat- und NAD(P)H-abhängigen SFI-Verläufen sowie bei Ex490/Em530 nm (Flavin-3) zu sehen ist. Die SFI in den NAD(P)H- und pyridoxinabhängigen Bereichen werden trotz einer optischen

Dichte von über 400 relativen Einheiten und einer BTM-Konzentration von ca. 110 g/L nicht durch eine Konzentrations-Fluoreszenzlöschung („Inner-filter“-Effekt) limitiert. Dagegen tritt besonders bei der Proteinfluoreszenz oberhalb einer kritischen BTM-Konzentration von etwa 80 g/L eine starke Konzentrations-Fluoreszenzlöschung ein. Die skalierte Streulichtintensität im nahen UV-Bereich (Ex330/EmND nm) nimmt oberhalb eines Sättigungsbereiches aufgrund der hohen Trübung ebenfalls nicht weiter zu.

- Unterhalb dieses Sättigungsbereiches, der unterhalb einer kritischen BTM-Konzentration von ca. 80 g/L liegt, kann die BTM-Konzentration mittels linearer Regression aus dem Streulicht im nahen UV-Bereich berechnet werden. Die lineare Regression ergab bei HZD-Kultivierung E-1 in den ersten 25 h einen RMSEC von 1,8 g/L (relativer Fehler 2,2%). Die Übertragung der linearen Regressionsgleichung (28) erlaubt bei Kultivierung E-2 eine präzise Vorhersage der BTM-Konzentration über den gesamten Prozessverlauf, da die kritische BTM-Konzentration nicht erreicht wurde.
- Im Score- und Leverage-Verlauf werden vier Prozessphasen und verschiedene Prozessschritte (Dialysestart, Induktion) sowie der Beginn der Konzentrations-Fluoreszenzlöschung sichtbar. Trotz des einsetzenden „Inner-filter“-Effekts erlauben PLS-Modelle bei HZD-Kultivierung E-1 eine Schätzung der BTM-, Produkt-, Zitronensäure- und Acetatkonzentrationen aus den 2D-Fluoreszenzspektren mit hinreichender Genauigkeit. Die relativen Fehler der Schätzungen bezogen auf die Maximalkonzentrationen betragen weniger als 3%. Die Validierung des BTM-Modell-1 erreicht bei HZD-Kultivierung E-2 bis zur 24. Kultivierungsstunde eine gute Vorhersagegenauigkeit. Der Dialysestart und der Induktionszeitpunkt lassen sich so zeitnah vorhersagen. Ein komplexeres BTM-Modell (Abb. 8.12) erlaubt die Schätzung der BTM-Konzentration sowohl für HZD-Kultivierung E-1 als auch für HZD-Kultivierung E-2, trotz großer Unterschiede. Ein vermindertes Zellwachstum konnte bei HZD-Kultivierung E-2 schon frühzeitig im Verlauf der NAD(P)H-abhängige SFI erkannt werden.
- Die Induktionsexperimente im 30 L Fermenter haben gezeigt, dass die Stoffwechseländerung infolge der Induktion vor allem in den flavin-1- und flavin-3-abhängigen Fluoreszenzbereichen zu erkennen ist. Ohne Induktion ist ein höheres Zellwachstum zu beobachten. Dies wird vor allem im proteinabhängigen Fluoreszenzbereich durch eine große SFI-Zunahme sichtbar. Die Induktion ist mittels In-situ-Fluoreszenzmessungen kontrollierbar. Auch die Dialyseleistung nimmt Einfluss auf die Fluoreszenzintensitätsverläufe. Bei einem höheren V_D/V_R -Verhältnis verringert sich nach dem Dialysestart der SFI-Anstieg vor allem in der flavin- und pyridoxalphosphatabhängigen SFI deutlich (Abb. 8.18). Eine Kontrolle der Dialyseleistung ist daher denkbar.

9 Zusammenfassung und Ausblick

Biotechnologische Prozesse sind gewöhnlich hoch komplex. Für eine möglichst optimale Prozessführung sind Kenntnisse sowohl über den aktuellen biologischen Zustand als auch über Wechselwirkungen zwischen den Mikroorganismen und der Zellumgebung notwendig. Zur Bioprozessbeobachtung sind daher multivariate Messsysteme, wie der auf der 2D-Fluoreszenzspektroskopie basierende BioView Sensor, sinnvoll, da sie eine Vielzahl von biologischen, chemischen und physikalischen Bioprozessgrößen simultan detektieren.

Aufgrund der vielfältigen Abhängigkeiten der Fluoreszenz von Prozessgrößen (z.B. pH-Wert, Temperatur, Produkt- und Substratkonzentration) sind die Fluoreszenzdaten oftmals sehr komplex, besitzen aber auch einen hohen Informationsgehalt. Einzelne Fluoreszenzintensitätsverläufe lassen sich oftmals nicht mit den Verläufen von Offline-Größen (z.B. Zellzahl, Bio-trockenmasse- und Produktkonzentration) korrelieren. Die Information kann aber auf mehrere Bereiche im Spektrum verteilt sein. Anstatt die Fluoreszenzintensitäten einzelner Wellenlängenpaare aus bestimmten Bereichen auszuwerten, nutzen multivariate Auswerteverfahren wie die Hauptkomponentenanalyse und die PLS-Regression zur Auswertung das gesamte 2D-Fluoreszenzspektrum. Verschiedene Prozessgrößen lassen sich gleichzeitig aus einem 2D-Fluoreszenzspektrum berechnen, auch von Substanzen (z.B. Glucose- und Ethanolkonzentration), die selbst nicht fluoreszieren. Darüber hinaus lassen sich durch den Einsatz dieser sogenannten Software-sensoren frühzeitig Störungen im Prozessverlauf erkennen sowie wichtige Prozesszustände bestimmen, wie z.B. den optimalen Dialysestart und den optimalen Induktionszeitpunkt bei Hochzell-dichte-Kultivierungen mit *Escherichia coli*.

Durch kontinuierliche In-situ-Fluoreszenzmessungen, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurden, werden im Verlauf von Kultivierungsprozessen extrem große Datenmengen erzeugt. Mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse und der PLS-Regression wird die in der Datenmatrix enthaltene Information durch die Nutzung weniger Hauptkomponenten stark komprimiert, ohne dass wesentliche Informationen dabei verloren gehen. Die auf mehrere Variable verteilte Information wird dabei auf eine geringe Anzahl von neuen Variablen (Hauptkomponenten und Score-Vektoren) transformiert. Diese neuen unabhängigen Variablen haben jedoch ihren Bezug zu den Messgrößen nicht verloren, so dass die Spektren und Variablen (Wellenlängen-kombination) sowie deren Einflüsse untereinander weiterhin mit Hilfe der Scores und Loadings analysiert werden können. Ein Loading-Spektrum zeigt beispielsweise, dass die Information über den Abbau der nicht fluoreszierenden Glucose bei Hefe-Batch-Kultivierungen vor allem in den tyrosin- und tryptophanabhängigen sowie in geringerem Maße auch in den flavinabhängigen Fluoreszenzbereichen enthalten ist. Die für eine Prozessgröße relevanten Variablen (Wellenlängen-kombinationen) können so einfach bestimmt werden.

In dieser Arbeit wurde die Leistungsfähigkeit und Vielseitigkeit eines weiterentwickelten 2D-Fluoreszenzspektrometers (BioView Sensor), der sich durch ein hohes Signal-Rausch-Verhältnis auszeichnet, an vier praktischen Beispielen demonstriert. Die Auswertung der

multivariaten Fluoreszenzdaten erfolgte mit Hilfe sogenannter Softwaresensoren (Hauptkomponentenanalyse, PLS-Regression) und hat im Hinblick auf eine verbesserte Bioprozessbeobachtung folgendes gezeigt:

- Batch-Kultivierung mit *Saccharomyces cerevisiae*:

Bei den Hefe-Batch-Kultivierungen konnten aufgrund der hohen Sensitivität des BioView Sensors neun verschiedene Fluoreszenzbereiche in den 2D-Fluoreszenzspektren erkannt werden (Tab. 5.2). Während der Batch-Kultivierung durchlaufen die Hefezellen verschiedene Prozessphasen, die durch signifikante Veränderungen der skalierten Fluoreszenzintensität online deutlich werden. Der aktuelle biologische Kulturzustand wird in den 2D-Fluoreszenzdifferenzspektren sichtbar (Abb. 5.4). Die pyridoxalphosphatabhängige skalierte Fluoreszenzintensität bei Ex410/Em490 nm korreliert am besten mit dem Verlauf der Biotrockenmassekonzentration. Eine einfache direkte Bestimmung der aktuellen Biotrockenmassekonzentration ist in dieser Weise möglich. Die lineare Regressionsgleichung (26) erlaubt die Vorhersage der Biotrockenmassekonzentration bei weiteren Batch-Kultivierungen (K-2, K-3 und K-4). Die relativen Fehler der Vorhersage bezogen auf die Maximalkonzentration betragen dabei weniger als 4,5%. Eine direkte Korrelation der Biotrockenmassekonzentration mit den Verläufen der tryptophan- und flavinabhängigen Fluoreszenzintensität wird durch die Zabriskie-Methode verbessert.

Im der Score-Darstellung sind alle sieben Prozessphasen eindeutig erkennbar. Ein besseres Verständnis vom Prozessverlauf und ein besserer Einblick in das biologische System wird mit Hilfe dieser Darstellung erreicht. Mit Hilfe von PLS-Modellen konnten verschiedene Offline-Größen, wie z.B. die Biotrockenmasse-, Ethanol- und Glucosekonzentration, aus den 2D-Fluoreszenzspektren gut berechnet werden. Die Anwendung dieser PLS-Modelle auf vergleichbare Batch-Kultivierungen führt mit Ausnahme von Ethanol zu guten Vorhersagen dieser Prozessgrößen (Tab. 5.8). PLS-Modelle, die aus den Daten mehrerer Kultivierungen berechnet werden, erfassen auch Variationen, die bei Kultivierungen häufig beobachtet werden, und verbessern so die Vorhersagegenauigkeit. Für die Ethanolkonzentration konnte die Vorhersagegenauigkeit durch Verwendung von zwei PLS-Modellen, eines für die Ethanolproduktion und eines für den Ethanolverbrauch, deutlich gesteigert werden.

- Chemostat-Kultivierungen mit *Saccharomyces cerevisiae*:

Während der kontinuierlichen Kultivierungen hat der BioView Sensor über hundert Stunden automatisch und störungsfrei 2D-Fluoreszenzspektren detektiert. Die dynamischen Veränderungen während des synchronen Wachstums konnten über diesen langen Zeitraum durch die hohe Messfrequenz genau verfolgt werden. Mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse ließen sich mehrere Oszillationszyklen genau vergleichen. Die Leistungsfähigkeit der PLS-Modelle konnte durch die gute Vorhersage der Biotrockenmasse- und Ethanolkonzentration von mehreren Zyklen der gleichen Verdünnungsrate ($D = 0,15 \text{ h}^{-1}$) gezeigt werden (Abb. 6.7). Durch Änderung der Verdünnungsrate wurden komplexe Veränderungen in den meisten Fluoreszenzintensitätsverläufen beobachtet (Abb. 6.8). Die Berechnung von Offline-Größen für zwei Verdünnungs-

raten erfordert daher komplexere PLS-Modelle, deren Parameter aus den Daten beider Verdünnungsraten berechnet worden sind. Darüber hinaus wurde die indirekte Bestimmung der Anteile der Zellzyklusphasen (G_1 -, S-, G_2 /M-Phase) aus den 2D-Fluoreszenzspektren erreicht (Abb. 6.11). Eine zeitnahe Online-Vorhersage selbst biologischer Prozessgrößen ist so möglich.

- Fed-Batch-Kultivierung mit *Saccharomyces cerevisiae*:

Eine Überwachung des oxidativen Hefewachstums konnte mit Hilfe der In-situ-Fluoreszenzmessung erzielt werden. Die Überschreitung der kritischen Glucoseaufnahmerate, die bei Hefezellen zu einer Ethanolproduktion trotz Sauerstoffanwesenheit führt (Crabtree-Effekt), ist im 2D-Fluoreszenzdifferenzspektrum vor allem im NAD(P)H-, aber auch im pyridoxin- und flavin-abhängigen Fluoreszenzbereich erkennbar. Ein metabolischer Faktor, der den aktuellen biologischen Kulturzustand beschreibt, lässt sich direkt aus 2D-Fluoreszenzspektren bestimmen. Darauf basierend konnte eine Glucoseregulation realisiert werden, die zeitweilig zu einer optimalen Ausbeute der Biotrockenmasse von $Y = 0,522$ g-BTM/g-Glucose geführt hat (Abb. 7.7). Eine direkte Erkennung der kritischen Glucoseaufnahmerate mit Hilfe der In-situ-Fluoreszenzmessung ist nützlich, da die Glucoseaufnahmerate von verschiedenen Faktoren (z.B. Zellaktivität, Kultivierungsbedingungen, Reaktorparameter) abhängt. Eine Übertragung der Regelstrategie auf vergleichbare Hefe-Fed-Batch-Kultivierungen ist daher möglich. Aus den 2D-Fluoreszenzspektren kann gleichzeitig die aktuelle Biotrockenmassekonzentration online bestimmt werden, die in das dynamische Zustandsmodell mit eingehen könnte.

- Hochzelldichte-Kultivierung mit *Escherichia coli*:

Durch die 2D-Fluoreszenzmessungen konnten weitere Informationen über den Prozessverlauf (z.B. Prozessphasen) und den biologischen Zellzustand (z.B. Stoffwechseländerung) erkannt werden. Die Stoffwechseländerung infolge der Induktion ist vor allem in den flavin-1- und flavin-3-abhängigen Fluoreszenzbereichen erkennbar (Abb. 8.17). Eine Kontrolle der Induktion ist durch die In-situ-Fluoreszenzmessungen erreichbar. Oberhalb einer kritischen Biotrockenmassekonzentration von ca. 80 g/L führt der „Inner-filter“-Effekt durch Konzentrations-Fluoreszenzlöschung vor allem im proteinabhängigen Fluoreszenzbereich zu einer Limitierung der gemessenen Fluoreszenzintensität. Die Biotrockenmassekonzentration kann mit Hilfe der skalierten Streulichtintensität im nahen UV-Bereich bis zur kritischen Biotrockenmassekonzentration direkt bestimmt werden. Oberhalb dieser kritischen Biotrockenmassekonzentration wird ausserdem die Streulichtintensität im nahen UV-Bereich aufgrund der hohen Trübung limitiert. Der optimale Dialysestart und der optimale Induktionszeitpunkt lassen sich durch eine gute Berechnung der Biotrockenmassekonzentration vorhersagen.

Im NAD(P)H- und Pyridoxinbereich ist keine Limitierung in den Fluoreszenzintensitätsverläufen zu beobachten, hier nimmt die Fluoreszenzintensität bis zum Prozessende zu (Abb. 8.2), obwohl eine Biotrockenmassekonzentration von über 110 g/L erreicht wird. Durch Nutzung des Gesamtspektrums erreichen PLS-Modelle eine präzise Berechnung der verschiedenen Prozessgrößen, wie z.B. die Biotrockenmasse-, Produkt-, Zitronensäure- und Acetatkonzentration, aus den

Fluoreszenzdaten. Eine frühzeitige Störung im Zellwachstum konnte bei der Hochzelldichte-Kultivierung E-2 im Verlauf der NAD(P)H-abhängigen Fluoreszenzintensität erkannt werden. Die Dialyseleistung nimmt ebenfalls Einfluss auf die Verläufe der Fluoreszenzintensitäten, so dass eine Kontrolle des Dialysebedarfs möglich ist.

Die Auswertung komplexer Fluoreszenzdaten mit Hilfe multivariater Auswerteverfahren hat verschiedene Vorteile. Sie erlaubt einen detaillierteren Einblick in biotechnologische Prozesse, weil wesentliche Informationen aus großen Datenmengen zusammengefasst werden. Dadurch wird ein Vergleich mehrerer Prozesse einfach möglich (Abb. 5.15). Prozesse können ausserdem im Hinblick auf die Qualitätssicherung ausführlicher dokumentiert werden.

Eine Auswahl geeigneter Daten für die Erstellung von PLS-Modellen ist mit Hilfe der Score- und Loading-Darstellung einfach möglich. Das gesamte 2D-Fluoreszenzspektrum wird in der Regel zur Berechnung von verschiedenen Prozessgrößen genutzt. Substanzen (z.B. Glucose- und Ethanolkonzentration), die selbst nicht fluoreszieren, können indirekt bestimmt werden, weil Informationen von diesen Prozessgrößen aufgrund verschiedener Wechselwirkungen in den Fluoreszenzdaten enthalten sind. Die Übertragung der PLS-Modelle von einem Prozess auf vergleichbare ist jedoch oftmals noch schwierig. Durch die Verwendung von skalierten Fluoreszenzintensitäten sowie die gleichzeitige Verwendung von Datensätzen mehrerer Kultivierungen konnte die Vorhersagegenauigkeit bei weiteren Prozessen deutlich gesteigert werden. Für eine verbesserte Online-Vorhersage lassen sich PLS-Modelle durch folgende Maßnahmen weiter verbessern:

- Die varianzmaximierende Methode der Hauptkomponentenanalyse sucht vor allem in den Bereichen mit den größten Fluoreszenzintensitätsveränderungen die prozessrelevanten Informationen. Durch Normierung der Varianz der Fluoreszenzintensitäten aller Wellenlängenkombinationen zwischen eins und Null wird die Varianz in allen Fluoreszenzbereichen gleich stark berücksichtigt.
- Aufgrund unterschiedlicher Transmissionen der Exzitations- und Emissionsfilter ist eine angepasste Photomultiplier-Einstellung des BioView Sensors sinnvoll, um die Messbereiche besser auszunutzen. Dadurch werden geringe Fluoreszenzintensitätsveränderungen auch bei Wellenlängenkombinationen erkennbar, deren Filter eine geringe Transmission aufweisen.
- Darüber hinaus können Zusatzinformationen die Übertragung von PLS-Modellen deutlich verbessern. So könnte die Online-Vorhersage zu Beginn eines Prozesses mit den bekannten Anfangskonzentrationen von Prozessgrößen beginnen. Bei Hefe-Batch-Kultivierungen betrug beispielsweise die Glucoseanfangskonzentration stets 30 g/L und die Anfangskonzentration der Biotrockenmasse ca. 0,2 g/L. Bei der Vorhersage sollten diese Werte mit berücksichtigt werden.
- Die Unterteilung des Prozessverlaufes, in denen unterschiedliche PLS-Modelle eine bestimmte Prozessgröße berechnen erscheint ebenfalls als sinnvoll. So sollte die Ethanolproduktion und der Ethanolverbrauch bei Hefe-Batch-Kultivierungen von zwei unterschied-

lichen PLS-Modellen berechnet werden. Analog könnten zwei Modelle die Biotrockenmassekonzentration bei *E. coli* Hochzelldichte-Kultivierungen vor und nach einsetzender Fluoreszenzlöschung bestimmen.

- Bei der quadratischen Hauptkomponentenanalyse werden zusätzlich quadratische Terme der Messgrößen oder Faktoren zur Berechnung der Kalibrationsmodelle berücksichtigt. Durch die Erweiterung der X-Datenmatrix (z.B. durch das Quadrat oder die Steigung der Fluoreszenzintensitäten) werden mehr Informationen erhältlich und nicht-lineare Zusammenhänge können besser beschrieben werden. Die Anzahl der Variablen vervielfacht sich dadurch.
- PLS-Modelle könnten neben den Fluoreszenzdaten weitere Prozessdaten zur Online-Vorhersage nutzen, die online zur Verfügung stehen, wie z.B. Abgaswerte, Temperatur- und pH-Regelung. Auch die Kombination mit weiteren multivariaten Messsystemen wie z.B. die IR-Spektroskopie, ist sinnvoll.

Fazit:

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass die Kombination der 2D-Fluoreszenzspektroskopie mit leistungsstarken Auswerteverfahren zu einer verlässlichen und zeitnahen Online-Vorhersage wichtiger Prozessgrößen beiträgt. Bei zukünftigen Einsätzen wird dies zu einer verbesserten Bioprozesskontrolle und -regelung führen.

Synchron wachsende Hefezellen stellen ein interessantes und empfindliches System dar, an dem verschiedene multivariate Messsysteme getestet werden können. Die Auswertung dieser Messdaten und das Potential von mathematischen Auswerteverfahren kann hier eingehend erprobt werden, da die biologischen, chemischen und physikalischen Prozessgrößen dynamische Veränderungen und vielschichtige Wechselbeziehungen zeigen. Durch Shiftexperimente könnten Modellvorhersagen überprüft und weiter verbessert werden.

Bei Hefe-Fed-Batch-Kultivierungen erfolgte die Glucoseregulung durch Detektion des aktuellen biologischen Kulturzustandes. Eine maximale Glucosezufuhr im rein oxidativen Betrieb konnte zeitweise erreicht werden. Durch eine Erhöhung der Messfrequenz und eine verbesserte Modellvorhersage könnte ein eventueller Übergang zum oxidoreduktiven Glucoseabbau schneller erkannt bzw. vorhergesagt werden. Dadurch könnte die kurze Unterbrechung der Zufütterung von einer Minute, wie sie bei der geregelten Fed-Batch-Kultivierung F-2 durchgeführt wurde (Kap. 7.6), entfallen. Nach jeder Überschreitung der kritischen Glucoseaufnahmerate wurde die Zufütterungsrate um 5% reduziert, um den Prozess sicher unterhalb der kritischen Glucoseaufnahmerate durchzuführen. Diese Reduzierung der Zufütterungsrate ließe sich bei höherer Messfrequenz ebenfalls verringern.

Mit Hilfe der In-situ-Fluoreszenzmessungen wird die kritische Glucoseaufnahmerate von Hefezellen schnell und einfach erkannt, unabhängig von den Kultivierungsbedingungen und Reaktorparameter. Eine Übertragung der Regelstrategie auf industrielle Prozesse ist daher möglich. In großen industriellen Reaktoren treten jedoch lokale Änderungen im Gelöstsauerstoffgehalt und

somit auch in der kritischen Glucoseaufnahme auf. Neben einer zeitlichen wäre hier auch eine örtliche Auflösung der Fluoreszenzmessungen über dem Reaktorsystem sinnvoll.

Bei den Hochzelldichte-Kultivierungen im Dialyseverfahren wären Fluoreszenzmessungen an mehreren Orten im Bioreaktor ebenfalls nützlich. Eine simultane Detektion von 2D-Fluoreszenzspektren von der Fermentationsbrühe und vom Dialysat würde weitere wichtige Informationen über den Prozessverlauf liefern. Diese könnte auch zu einer Kontrolle und Optimierung des Dialysebedarfs führen. Die Spektren vom Dialysat erfassen dabei hauptsächlich die chemische und physikalische Zellumgebung, während die Spektren von der Fermentationsbrühe die Informationen vom Gesamtsystem beinhalten. Ein Vergleich dieser Spektren ist jedoch komplex, da stark unterschiedliche optische Eigenschaften vorliegen. Die zusätzlichen Informationen könnten aber zu einem besseren Verständnis vom Prozessverlauf führen.

Interferenzfilter des Spektrometers sollten darüber hinaus dem Prozess individuell angepasst werden. Dadurch würde der Informationsgehalt von 2D-Fluoreszenzspektren weiter gesteigert werden. Mit Hilfe einer chemometrischen Sensitivitätsanalyse kann die Fluoreszenzmatrix so eingerichtet werden, dass relevante Bereiche im Spektrum mit hoher spektroskopischer Auflösung (5 nm) und relativ unwichtige Bereiche mit geringerer Auflösung (20 – 25 nm) bestimmt werden. Die Messfrequenz kann gleichzeitig durch eine Reduzierung auf die relevanten Wellenlängenkombinationen gesteigert werden.

Optische Sonden lassen sich gewöhnlich einfach mit Hilfe von Lichtleitern direkt an Bioreaktoren anschließen. Eine Online-Bioprozessbeobachtung von industriellen Prozessen ist daher einfach möglich. Eine zeitnahe Online-Vorhersage von wichtigen Prozessgrößen kann bereits nach wenigen Kalibrierungsprozessen mittels PLS-Modellen erreicht werden. Diese zusätzlichen Informationen könnten dann auch in bestehende Kontrollsysteme mit eingebunden werden. Auch Aufarbeitungsprozesse, wie z.B. chromatographische Trennverfahren, sind weitere interessante Anwendungsbereiche für die In-situ-Fluoreszenzmessungen, da hier eine sehr schnelle, nicht-invasive Online-Analytik notwendig ist.

Die Kombination von multivariaten Messsystemen und leistungsstarken Auswerteverfahren wird in Zukunft an Bedeutung gewinnen. Die Hauptkomponentenanalyse und PLS-Regression erweisen sich als nützliche Methoden. Weitere Auswerteverfahren, wie z.B. neuronale Netze und Expertensysteme, werden ebenfalls zunehmend zum Einsatz kommen. Beim zukünftigen Einsatz der 2D-Fluoreszenzspektroskopie werden chemometrische Auswerteverfahren zunehmend Berücksichtigung finden, da sie einen großen Anteil an einer praktischen Anwendung und Optimierung dieser optischen Online-Analytik besitzen. Die Möglichkeit, multivariate und komplexe Daten schnell und zuverlässig auswerten zu können, wird die Nutzung von multivariaten Messsystemen, wie z.B. die 2D-Fluoreszenzspektroskopie, entscheidend fördern.

10 Literatur

- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D. 1997, Molekularbiologie der Zelle, 3. Auflage, Weinheim, New York, Basel, Cambridge Tokyo, VCH
- BELLEGARDT, K.-H. 1994, Analysis of synchronous growth of baker's yeast, *J. Biotechnol.* 35, 19-49
- BEUSE, M., BARTLING, R., KOPMANN, A., DIEKMANN, H., THOMA, M. 1998, Effect of the dilution rate on the mode of oscillation in continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biotechnol.* 61, 15-31
- BEYELER, W., GSCHWEND, K., FIECHTER, A. 1983, In-situ Fluorometrie: Eine neue Methode zur Charakterisierung von Bioreaktoren, *Chem. Ing. Tech.* 55 (5), 869-871
- BITTNER, C., WEHNERT, G., SCHEPER, T. 1998, *Biotechnol. Bioeng.* 60 (1), 23-35
- CAVINATO, G., MAYES, D.M., GE, Z., CALLIS, J.B. 1990, Non-invasive methode for monitoring ethanol in fermentation processes using fiber-optic near-infrared spectroscopy, *Anal. Chem.* 62, 1977-1982
- COMTE, A., KOHLS, O., SCHEPER, T. 1995, Faseroptische Chemo- und Biosensoren, *CLB Chemie in Labor und Biotechnik* 46, 18-22
- CHUNG, H., ARNOLD, M.A., RHIEL, M., MURHAMMER, D.W. 1995, Simultaneous measurements of glucose, glutamine, ammonia, lactate and glutamate in aqueous solutions by near-infrared spectroscopy, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 50 (2), 109-125
- CHUNG, H., ARNOLD, M.A., RHIEL, M., MURHAMMER, D.W. 1996, Simultaneous measurements of glucose and glutamine in insect cell culture media by near-infrared spectroscopy, *Appl. Spectrosc.* 50, 270-276
- COSCIONE, A.R., de Andrade, J.C., Poppi, R.J., Mello, C., van Raij, B., de Abreu, M.F. 2000, Multivariate calibration applied to a highly interfering chemical system. The simultaneous spectrophotometric determination of aluminium and iron in plants using Xylenol orange and partial least-squares regression, *Anal. Chim. Acta* 423 (1), 31-40
- DAIRAKU K., YAMASAKI Y., MORIKAWA H., SHIOYA S., TAKAMATSU T. 1982, Experimental study of time-optimal control in fed-batch culture of baker's yeast, *J. Ferment. Technol.* 60 (1), 67-75
- DE DEKEN, R.H. 1966, The Crabtree effect: A regulatory system in yeast, *J. Gen. Microbiol.* 44, 149-156
- DUBOC, P., MARISON, I., STOCKAR, U. 1996, Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* during cell cycle oscillations, *J. Biotechnol.* 51, 57-72
- ESBENSEN, K.H., GUYOT, D., WESTAD, F. 2000, Multivariate data analysis – In practice, an introduction to multivariate data analysis and experimental design, HiT/TF, 4th Edition, CAMO ASA, Oslo, Norway

-
- FIECHTER, A., FUHRMANN, G., KÄPPELI, O. 1981, Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells, *Adv. Microb. Physiol.* 2, 123-183
- FRANKO, C.M.M., SMITH, J.E; BERRY, D.R. 1984, Changes in intermediate levels during batch cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol. Lett.* 6 (12), 803-808
- FUCHS, C. 2002, Einsatz einer Dialysemembran bei der Fermentation von *E. coli*, eingereichte Dissertation, Technische Universität Hamburg-Harburg
- FUCHS, C., KÖSTER, D., WIEBUSCH, S., MAHR, K., EISBRENNER, G., MÄRKL, H. 2002, Scale-up of dialysis fermentation for high cell density cultivation of *E. coli*, *J. Biotechnol.* 93, 243-251
- GREGORY, M.E., TURNER 1993, Open-loop control of specific growth rate in fed-batch cultures of recombinant *E. coli*, *Biotechnol. Techniques* 7, 889-894
- HARBECK, C. 1999, Grundlegende spektroskopische Methoden bei industriellen Downstream-Prozessen am Beispiel der Melassenaufarbeitung, Diplomarbeit, Universität Hannover
- HILMER, J.-M. 1996, In-situ-Bioprozesskontrolle am Beispiel der In-vivo-Biolumineszenz und der 2D-Fluoreszenzspektroskopie, Fortschr.-Ber. VDI Reihe 17 Nr. 150
- HITZMANN, B. 1996, Optimierung von FIA-Systemen für die Bioprosesstechnik, Vieweg, Analytische Chemie, Verlags GmbH Braunschweig/Wiesbaden
- HITZMANN, B., BROXTERMANN, O., CHA, Y.-L., SOBIEH, O., STÄRK, E., SCHEPER, T. 2000, The control of glucose concentration during yeast fed-batch cultivation using a fast measurement complemented by an extended Kalman filter, *Bioprocess Eng.* 23, 337-341
- VAN HOEK P., VAN DIJKEN J.P., PRONK J.T. 1998, Effect of specific growth rate on fermentative capacity of baker's yeast, *Applied and Environmental Microbiol.* Nov., 4226-4233
- HORN, U., STRITTMATTER, W., KREBBER, A., KNÜPFER, U., KUJAU, M., WENDEROTH, R., MÜLLER, K., MATZKU, S., PLÜCKTHUN, A., RIESENBERG, D. 1996, High volumetric yields of functional dimeric miniantibodies in *Escherichia coli*, using an optimised expression vector and high-cell-density fermentation under non-limited growth conditions, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46, 524-532
- HORVATH, J.J., GLAZIER, S.A., SPANGLER, C.J. 1993, In situ fluorescence cell mass measurements of *Saccharomyces cerevisiae* using cellular tryptophan, *Biotechnol. Prog.* 9, 666-670
- JONES, K.D., Kompala, D.S. 1999, Cybernetic model of the growth dynamics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch and continuous cultures, *J. Biotechnol.* 71, 105-131
- KANKARE, J.J. 1970, *Anal. Chem.* 42, 1322

-
- KLEMAN, G.L., STROHL, W.R. 1994, Developments in high cell density and high productivity microbial fermentation, *Curr. Opin. Biotechnol.* 5, 180-186
- KONSTANTINOV, K., CHUPPA, S., SAJAN, E., TSAI, Y., YOON, S., GOLINI, F. 1994, Real-time biomass-concentration monitoring in animal-cell cultures, *Trends in Biotechnol.* 12, 324-333
- KORZ, D.J., RINAS, U., HELLMUTH, K., SANDERS, E.A., DECKWER W.-D. 1995, Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*; *J. Biotechnol.* 39, 59-65
- KÖSTER, D. 2002, Proteinexpression in dichten Kulturen von *E. coli*. eingereichte Dissertation, Technische Universität Hamburg-Harburg
- KREIJ, K. 2000, Monitoring and prediction of bioprocess variables in *Saccharomyces cerevisiae* cultivations using 2-D fluorescence spectroscopy and multivariate methods, Diplomarbeit, Universität Hannover
- LEE, Y.L., CHANG, H.N. 1990, High cell density culture of a recombinant *Escherichia coli* producing penicillin acylase in a membrane cell recycle fermenter, *Biotechnol. Bioeng.* 36, 330-337
- LEE, S.Y. 1996, High cell density culture of *Escherichia coli*, *Trends Biotechnol.* 14, 98-105
- LI, J.-K., HUMPHREY, A.E. 1992, Factors affecting culture fluorescence when monitoring bioreactors, *J. Ferm. Bioeng.* 74 (2), 104-111
- LI, J.-K., ASALI, E.C., HUMPHREY, A.E. 1991, Monitoring cell concentration and activity by multiple excitation fluorometry, *Biotechnol. Prog.* 7, 21-27
- LINDEMANN, C. 1998, Anwendungen der 2D-Fluoreszenzspektroskopie zur Bioprozessbeobachtung, Fortschr.-Ber. VDI Reihe 17 Nr. 171
- LINDEMANN, C., STÄRK, E. 1999, Einsatz von Online 2D-Fluoreszenzsensoren in der Biotechnologie, *Laborfachzeitschrift GIT* 43, 881-883
- LISCHKE, H. H., BRANDES, L., XIAOAN, W., SCHÜGERL, K. 1993, Influence of acetate on the growth of recombinant *Escherichia coli* JM103 and product formation, *Bioprocess Eng.* 9, 155-157
- LOCHER, G., HAHNEMANN, U., SONNLEITNER, B., FIECHTER, A. 1993, Automatic bioprocess control. 4. A prototype of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biotechnol.* 29 (1/2), 57-74
- MAJEWSKI, R.A., DOMACH, M.M. 1990, Simple constrained-optimization view of acetate overflow in *E. coli*, *Biotechnol. Bioeng.* 35, 732-738
- MÄRKL, H., LECHNER, M., GÖTZ, F. 1990, A new dialysis fermenter for the production of high concentrations of extracellular enzymes, *J. Ferment. Bioeng.* 69 (4), 244-249

- MAROSE, S. 1995, Untersuchungen zur Anwendung eines Prozessspektralfluorometers für die On-line-Bioprozessbeobachtung, Diplomarbeit, Universität Hannover
- MAROSE, S., LINDEMANN, C., SCHEPER, T. 1998, Two-dimensional fluorescence spectroscopy: A new tool for on-line bioprocess monitoring, *Biotechnol. Prog.* 14 (1), 63-74
- MAROSE, S., LINDEMANN, C., ULBER, R., SCHEPER, T. 1999, Optical sensor systems for bioprocess monitoring, *Trends in Biotechnol.* 17, 30-34
- MAROSE, S. 1999, Bioprozessanalytik mit zweidimensionaler Fluoreszenzspektroskopie, Dissertation, Universität Hannover
- MCAVOY, T.J., SU, H.T., WANG, N.S., HE, M., HORVATH, J., SEMERJIAN, H. 1992, A comparison of neural networks and partial least squares for deconvoluting fluorescence spectra, *Biotechnol. Bioeng.* 40, 53-62
- MEYER C., BEYELER W. 1984, Control strategies for continuous bioprocesses based on biological activities, *Biotechnol. Bioeng.* 16, 916-925
- MOSER, A. 1985, Special cultivation techniques, Rehm HJ, Reed G (eds) *Biotechnol.* Vol. 2, VHC, Weinheim, 311-347
- MULCHANDANI A., BASSI A.S. 1995, Principles and applications of biosensors for bioprocess monitoring and control, *Crit Rev. Biotechnol.* 15 (2), 105-124
- NAIMIMOHASSES, R., BARNETT, D.M., GREEN, D.A., SMITH, P.R. 1995, Sensor optimisation using neural network sensitivity measures, *Meas. Sci. Technol.* 6, 1291-1300
- NAKANO, N., RISCHKE, M., SATO, S., MÄRKL, H. 1997, Influence of acetic acid on the growth of *Escherichia coli* K12 during high-cell-density cultivation in a dialysis reactor, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48, 597-601
- OGBONNA, J.CH., MÄRKL, H. 1993, Nutrient-split feeding strategy for dialysis cultivation of *E. coli*, *Biotechnol. Bioeng.* 41, 1092-1100.
- PAN, J.G., RHEE, J.S., LEBEAULT, J.M. 1987, Physiological constraints in increasing biomass concentration of *Escherichia coli* in fed-batch culture, *Biotechnol. Lett.* 2, 89-94
- PHAM, H.T.B., LARSON, G., ENFORS, S.-O. 1998, Growth and energy metabolism in aerobic fed-batch cultures of *Saccharomyces cerevisiae*: simulation and model verification, *Biotechnol. Bioeng.* 60 (4), 474-483
- PÖRTNER, R., MÄRKL, H. 1998, Dialyse-Kulturen, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50, 403-414
- RATLEDGE, C. 1991, Yeast physiology – a micro-synopsis, *Bioproc. Eng.* 6, 195-203

-
- RAMKRISHNA, D., Kompala, D.S., Tsao, G.T. 1987, Are microbes optimal strategists, *Biotech. Prog.* 3, 121-126
- RIESENBERG, D. 1991, High-cell-density cultivation of *Escherichia coli*, *Urr. Opin. Biotechnol.* 2, 380-384
- RIESENBERG, D., GUTHKE, R. 1999, High-cell-density cultivation of microorganisms, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 422-430
- RIESEBERG, M. 2000, Durchflusscytometrische Analytik: Ein Weg zur Optimierung biotechnologischer Prozesse, Dissertation, Universität Hannover
- RILEY, M.R., RHIEL, M., ZHOU, X., ARNOLD, M.A., MURHAMMER, D.W. 1997, *Biotechnol. Bioeng.* 55, 11-15
- SATROUDINOV, A.D., KURIYAMA, H., KOBAYASHI, H. 1992, Oscillatory metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in continuous culture, *FEMS Microbiol. Lett.* 98,261-268
- SCHATZMANN, H. 1975, Anaerobes Wachstum von *Saccharomyces cerevisiae*, Dissertation, ETH Zürich No. 5504
- SCHEPER, T., SCHÜGERL, K. 1986, Characterisation of bioreactors by in-situ-fluorometry, *J. Biotechnol.* 3, 221-229
- SCHEPER, T., HITZMANN, B., STÄRK, E., ULBER, R., FAURIE, R., SOSNITZA, P., REARDON, K. 1999, Bioanalytics: detailed insight into bioprocesses, *Anal. Chim. Acta* 400, 121-143
- SCHEPER, T., HOFFMANN, H., SCHÜGERL, K. 1987, Flow cytometric studies during culture of *Saccharomyces cerevisiae*, *Enzyme Microb. Technol.*, Vol. 9, July, 399-405
- SCHÜGERL, K., BELLGARDT, K.-H., KRETZMER, G., HITZMANN, B., SCHEPER, T. 1993, In-situ- und On-line-Überwachung und Regelung biotechnologischer Prozesse, *Chem.-Ing.-Tech.* 65 (12), 1447-1456
- SCHÜGERL, K., HITZMANN, B., JURGENS, H., KULLICK, T., ULBER, R., WEIGAL, B. 1996, Challenges in integrating biosensors and FIA for online monitoring and control, *Trends in Biotechnol.* 14, 21-31
- SCHÜGERL, K. 2001, Progress in monitoring, modelling and control of bioprocesses during the last 20 years, *J. Biotechnol.* 85 (2), 149-173
- SCHULMANN, S.G. 1985, Molecular luminescence spectroscopy methods and applications – Part 1, *Chem. Anal.* Vol. 77, John Wiley and Sons, New York
- SCHWEDT, G. 1981, Fluorimetrische Analyse, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, Basel

- SKIPSTED, E., LINDEMANN, C., ROCA, C., OLSSON, L. 2001, On-line bioprocess monitoring with a multi-wavelength fluorescence sensor using multivariate calibration, *J. Biotechnol.* 88 (1), 47-54
- SONNLEITNER, B., KÄPPELI, O. 1986, Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiratory capacity: Formulation and verification of a hypothesis, *Biotechnol. Bioeng.* 28, 927-937
- SONNLEITNER, B. 1991, Dynamics of yeast metabolism and regulation, *Bioprocess Eng.* 6, 187-193
- SONNLEITNER, B., LOCHER, G., FIECHTER, A. 1992, Biomass determination, *J. Biotechnol.* 25, 5-22
- STÄRK, E., HARBECK, C., FAURIE, R., LINDEMANN, C., SCHEPER, T. 1999, Two-dimensional fluorescence spectroscopy for online-monitoring of chromatographic separation of molasses, *Proceedings of SPIE*, 19-22 Sep. 1999, Boston Massachusetts USA, pp 42-48
- STÄRK, E., HITZMANN, B., SCHÜGERL, K., SCHEPER, T., FUCHS, C., KÖSTER, D., MÄRKL, H. 2002, In-situ-fluorescence-probes: a useful tool for non-invasive bioprocess monitoring, *Advances in Biochem. Eng./Biotechnol.* 74, 21-38
- STRÄSSLE, B., SONNLEITNER, B., FIECHTER, A. 1989, A predictive model for the spontaneous synchronisation of *Saccharomyces cerevisiae* grown in continuous culture. II. Experimental verification, *J. Biotechnol.* 9 (2), 191-208
- SUZUKI, T., YAMANE, T., SHIMIZU, S. 1987, Mass production of thioestrepton by fed-batch culture of *Streptomyces laurentii* with pH-state modal feeding of multi-substrate, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25, 526-531
- TARTAKOVSKY, B., SHEINTUCH, M., HILMER, J.-M., SCHEPER, T. 1996, Application of scanning fluorometry for monitoring of a fermentation process, *Biotechnol. Prog.* 12, 126-131
- TARTAKOVSKY, B., SHEINTUCH, M., HILMER, J.-M., SCHEPER, T. 1997, Modelling of *E. coli* fermentations: comparison of multicompartiment and variable structure models, *Bioprocess Eng.* 16, 3233-329
- ULBER, R., HITZMANN, B., SCHEPER, T. 2001, Innovative Bioprozessanalytik – Neue Wege zum besseren Verständnis biotechnologischer Prozesse, *Chemie Ingenieur Technik* 73 (1-2), 19-26
- WOLFBEIS, O.S. 1993, Fiber optic chemical sensors and biosensors, Vol. 1 and 2, *RS Press, Boca Raton*
- YEE, L., BLANCH, H.W. 1992, Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli*, *Bio./Technol.* 10, 1550-1556
- ZABRISKIE, D. W. 1979, Use of culture fluorescence for monitoring of fermentation systems, *Biotechnol. Bioeng.* 9, 117-123
- ZANDER, M. 1981, Fluorimetrie, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

11 Anhang

11.1 Abkürzung und Symbolverzeichnis

2D	zweidimensional
Abb.	Abbildung
BTM	Biotrockenmasse
CAFCA	Computer Assisted Flow Control & Analysis
CPR	Kohlendioxidbildungsrate
D	Verdünnungsrate [h^{-1}]
D_k	kritische Verdünnungsrate [h^{-1}]
DNA	Desoxyribonucleinsäure
Ex / Em	Wellenlängenkombination Exzitationswellenlänge/Emissionswellenlänge
FAD	Flavinadenindinucleotid (oxidierte Form)
FADH_2	Flavinadenindinucleotid (reduzierte Form)
FIA	Fließinjektionsanalyse
FMN	Flavinmononucleotid (oxidierte Form)
FMNH_2	Flavinmononucleotid (reduzierte Form)
g	Gramm
h	Stunde (Kultivierungsstunde)
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie
HZDK	Hochzelldichte-Kultivierung(en)
Kap.	Kapitel
L	Liter
M	molar
min	Minute
MLR	multilinerare Regression
mL	Milliliter
mm	Millimeter
NAD^+	Nicotinamidadenindinucleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid (reduzierte Form)
NADP^+	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (reduzierte Form)
ND	Neutraldichtefilter
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
OUR	Sauerstoffaufnahme
PC(s)	Hauptkomponente(n) (principal component)
PCA	Hauptkomponentenanalyse (principal component analysis)

PLS	Partial least squares
pO ₂	Gelöstsauerstoffgehalt [%]
r	Korrelationskoeffizient
RNA	Ribonucleinsäure
RQ	respiratorischer Quotient
RFI	relative Fluoreszenzintensität(en)
RISP	Realtime Integrating Software Platform
RMSEC	Root means square error of calibration
RMSEP	Root means square error of prediction
s	Sekunde
SEP	Standard error of prediction
SFI	skalierte Fluoreszenzintensität(en)
SI	skalierte (Streulicht-)Intensität(en)
Tab.	Tabelle
TCI	Institut für Technische Chemie, Universität Hannover
UpM	Umdrehungen pro Minute (Rührerdrehzahl)
var	Stichprobenvarianz
V _D	Dialysevolumen
V _R	Reaktorvolumen
vvm	Volumen Gaszufuhr pro Volumen Kulturlösung und Minute
WLK	Wellenlängenkombination(en)
Y _{BTM}	Ausbeute (Biotrockenmasse)
μ	spezifische Wachstumsrate
μL	Mikroliter

11.2 Analytik

Die Beschreibung der Analytik von Kultivierungsprozessen sind den standard operation procedures (SOP) des TCI entnommen worden (Intranet TCI).

11.2.1 Abgasanalytik (Abgassauerstoff und -kohlendioxid)

Die Abgasanalyse wird mit dem EGAS 2 der Firma Hartmann & Braun (Frankfurt a. M.) durchgeführt. Der Sauerstoffgehalt wird mit Hilfe einer paramagnetischen Waage bestimmt. Ein auf Kohlendioxid sensibilisiertes, einstrahliges IR-Photometer nutzt die IR-Aktivität des Kohlendioxids für dessen quantitative Bestimmung durch Messung der IR-Absorption bei charakteristischen Wellenlängen. Die Kalibrierung der Analysegeräte erfolgt automatisch oder manuell mit Eichgas der Zusammensetzung 1,98 % CO₂, 19,0 % O₂, Rest N₂.

11.2.2 Biotrockenmasse (BTM)

Die Bestimmung der Biotrockenmasse erfolgt gravimetrisch. Dazu werden je Probe zwei sogenannte Eppendorf-Gefäße (2 ml, Eppendorf) mit bekanntem Leergewicht mit zweimal nach einander 1,6 mL Kulturlösung gefüllt und in einer Zentrifuge (Fa. Beckmann, Modell J2-21, Rotor JA-14) 5 min bei 12000 UpM abzentrifugiert. Der Überstand wird für die Ethanol- und Glucosebestimmung bei -20°C eingefroren. Nach Trocknung des Zell-Pellets im Trockenschrank bei 90°C bis zur Gewichtskonstanz (24 h) wird das Eppendorf-Gefäß erneut ausgewogen. Die Biotrockenmasse ergibt sich aus der Massendifferenz zwischen dem gefüllten und dem leeren Eppendorf-Gefäß.

11.2.3 Ethanolbestimmung

Die Ethanolkonzentration wird in einem Bereich von 0-15 g/L mit einem Shimadzu 14B Gaschromatographen bestimmt. Als interner Standard wird n-Propanol zugegeben. Die Alkohole werden über eine Chromosorb 101-Säule getrennt und mit einem Flammenionisationsdetektor detektiert. Die Daten werden mit der Class-VP-Software von Shimadzu auf einem Rechner aufgenommen und ausgewertet. Es wird mit zwei Standards (5 g/L und 10 g/L) kalibriert. Die Auswertung der Proben erfolgt über eine Kalibration mit dem internen Standard.

Gaschromatograph:	Shimadzu Gas-Chromatograph GC-14B
Datenaufnahme und -auswertung:	ClassVP 4.2
Trägergas:	Stickstoff (Carrier Flow 38 mL/min, 220 kPa)
Brenngas:	Wasserstoff (65kPa), synth. Luft (50 kPa)
Säule:	Chromosorb 101, 80/100, Edelstahlsäule 6' x 1/8"
T _{säule} :	160°C
T _{injektor} :	180 °C
T _{detektor} :	220 °C
Probenvolumen:	1 µL
Interner Standard:	n-Propanol (8g/L)
Probenvorbereitung:	450µL Probe (abzentrifugiert) + 50µL Standard

11.2.4 Optische Dichte (OD)

Die optische Dichte (OD_{590 nm}) der Kulturlösung wird offline mit einem Zweikanal-Spektrophotometer Uvicon 922 (Kontron, Instruments S.p.A., Italien) durchgeführt. Eine 0,9%ige NaCl-Lösung wird als Referenz verwendet. Die Messung der Extinktion erfolgt in 0,5 mL Mikroküvetten (Ratiolab GmbH, Dreieich) bei einer Wellenlänge von 590 nm und wird in relativen Einheiten angegeben. Bei einer Extinktion oberhalb von 0,7 relativen Einheiten wird die Kulturbrühe mit einer 0,9%ige NaCl-Lösung entsprechend verdünnt. Zur Bestimmung der OD wird die gemessene Extinktion mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

11.2.5 pH-Wert

Zur Messung des pH-Wertes wird eine sterilisierbare Einstabmesskette (Fa. Mettler-Toledo) verwendet, die mit der Steuereinheit eines Biostaten (B. Braun Biotech International, Melsungen) verbunden ist. In dieser befinden sich eine Glas- und eine Vergleichselektrode, die zusammen eine galvanische Kette bilden. Die eigentliche Messgröße ist die Spannung (Summe der Grenzflächenpotentiale in der Lösung), die mit einem hochohmigen Voltmeter gemessen wird. Der Zusammenhang zwischen der Spannung und dem pH-Wert ist über die Nernst'sche Gleichung gegeben. Die Kalibration der pH-Elektrode erfolgt vor dem Autoklavieren mit zwei Pufferlösungen (pH 4,0 und pH 7,0). Zwischen den Messungen wird die Elektrode in 3M Kaliumchloridlösung gelagert. Die Reinigung erfolgt in Pepsin-Lösung.

11.2.6 pO₂-Wert (Gelöstsauerstoff)

Der Gelöstsauerstoff wird mit Hilfe einer autoklavierbaren Elektrode (Mettler-Toledo, Schweiz) als Sauerstoffpartialdruck nach dem polarographischen Prinzip (Clark-Prinzip) gemessen. Dabei diffundiert der Sauerstoff aus der Lösung durch eine gasdurchlässige Teflonmembran, die die Messlösung von der Ag-Anode und Pt-Kathode trennt, und wird an der Kathode reduziert. An der Anode wird Silber oxidiert.

Die Elektrode wird nach dem Autoklavieren im Fermentersystem kalibriert (Zwei-Punkt-Kalibration). Dabei wird zunächst durch Begasung mit Stickstoff der 0%-Wert für pO₂ festgelegt. Der 100%-Wert wird durch Begasung mit Druckluft unter den jeweiligen Kultivierungsbedingungen (Rührerdrehzahl und Begasungsrate) eingestellt. Die während der Fermentation gemessenen Werte geben die relative Sauerstoffsättigung (%-relativer Sättigung) an und werden in dieser Arbeit als Gelöstsauerstoffgehalt (pO₂) [%] bezeichnet.

11.2.7 Glucoseanalytik mit dem Glucoseanalysator

Die Bestimmung der D-Glucosekonzentration erfolgt mit dem YSI Analysator Modell 2700 Select (Yellow Springs Instruments, USA). Der Analyt wird durch das auf einer Membran immobilisierte Enzym Glucoseoxidase umgesetzt, wobei in stöchiometrischer Menge Wasserstoffperoxid (H₂O₂) entsteht. Dieses wird an einer Platinelektrode elektrochemisch zu Sauerstoff oxidiert. Die Stromstärke des resultierenden Stromflusses ist proportional zur Analytkonzentration. Interferenzen durch andere oxidierbare Substanzen werden durch eine Zelluloseacetat-Membran vor der Elektrode verhindert. Die Kalibrierung des Analysators erfolgt mit Hilfe einer Standardlösung der Glucosekonzentration 2 g/L.

11.3 Medium (*Saccharomyces cerevisiae*)

Tab. 11.1 Schatzmann-Medium [SCHATZMANN, 1975]

	Substanz	Massenkonzentration [g/L]
Komponenten	Glucose	30,0
	(NH ₄) ₂ SO ₄	4,5
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	1,9
	KCl	0,9
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,34
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,42
Mineralsalzlösung	FeCl ₃ · 6H ₂ O	1,5 · 10 ⁻²
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,9 · 10 ⁻²
	MnSO ₄ · 2H ₂ O	1,05 · 10 ⁻²
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,24 · 10 ⁻²
	Vitaminlösung	m-Inosit
	Ca-Pantothenat	3,0 · 10 ⁻²
	Thiamin · HCl	0,6 · 10 ⁻²
	Pyridoxol · HCl	0,15 · 10 ⁻²
	Biotin	0,3 · 10 ⁻⁴

Eine Mineralsalzlösung und eine Vitaminlösung wurden mit der jeweils 1000-fachen Konzentration in destilliertem Wasser angesetzt und bei 4°C gelagert. Zur Herstellung des Schatzmann-Mediums wurde Leitungswasser mit konzentrierter H₂SO₄ auf pH 2 eingestellt. Darin wurden MgSO₄ · 7H₂O und CaCl₂ · 2H₂O gelöst, bevor die Mineralsalzlösung und die übrigen Komponenten ausser der Glucose zugegeben wurden. Der pH-Wert wurde mit konzentrierter H₂SO₄ auf den gewünschten Wert eingestellt. Die Glucose wurde extra autoklaviert und vor dem Beimpfen direkt in den Fermenter gegeben. Die Vitaminlösung wurde vor dem Beimpfen direkt in den Fermenter steril injiziert.

Dem Medium (Schatzmann-Medium) der Vorkultur (50 mL) wurde zusätzlich Na-Citrat in einer Konzentration von 5,8 g/L zugegeben. Die Vorkultur wurde 18,5 ± 0,5 h in einem 300 mL Schüttelkolben mit Schikanen bei 30°C und 120 UpM kultiviert.

Für den kontinuierlichen Betrieb wurde das Schatzmann-Medium einschließlich Glucose und Vitaminen mit Hilfe eines 0,2 µm Cellulose-Nitrat-Filters (Sartorius AG, Deutschland) steril filtriert und in einem sterilen 22 L Vorratsbehälter aufbewahrt.

Lebenslauf

Name: Egbert Stärk
Geburtsdatum: 12.08.1970
Geburtsort: Friesoythe

Schulausbildung

1977 - 1981 Grundschole Bösel
1981 - 1983 Orientierungsstufe Bösel
1983 - 1990 Albertus-Magnus-Gymnasium in Friesoythe
05/1990 Abitur

Grundwehrdienst

10/1990 – 10/1991 Nachschubbataillon in Delmenhost

Studium

10/1991 Beginn des Studiums Chemie (Diplom) an der Universität Hannover

06/1994 Diplom-Vorprüfung

04/1997 Diplom-Hauptprüfung

05/1997 – 11/1997 Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover über das Thema: „Allgemeine Untersuchungen zur 2D-Fluoreszenzspektroskopie für die Online-Bioprozessbeobachtung und deren Ergänzung durch Fluorophorzusatz“ unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper

11/1997 Abschluss: Diplom-Chemiker

Promotion

01/1998 – 05/2002 Doktorand und wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper

13.05.2002 Promotionsprüfung

Egbert Stärk