

**Analyse von 2D-Fluoreszenzspektren
durch multivariate Auswerteverfahren
zur Regelung von Bioprocessen**

**Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover**

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

DISSERTATION

**von
Dipl.-Chem. Marco Kollecker
geboren am 03. Februar 1973 in Rotenburg/Wümme**

2006

Referent Prof. Dr. Bernd Hitzmann
Institut für Technische Chemie
Universität Hannover

Korreferent Prof. Dr. Thomas Scheper
Institut für Technische Chemie
Universität Hannover

Tag der Promotion 30. August 2006

Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel, sowie eventuell zur Hilfeleistung herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe. Ich versichere ferner, dass die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Hannover, im Mai 2006

Gewidmet meinem Großvater

Hinrich Poort †

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2001 bis Mai 2005 am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. Bernd Hitzmann angefertigt. Ihm danke ich besonders für die gebotenen Arbeitsmöglichkeiten und die freundliche Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Für die gute Zusammenarbeit an diesem Projekt danke ich Burkhardt Ernst von der Technischen Universität Hamburg-Harburg, insbesondere für die Unterstützung bei der Behebung der Probleme bei den letzten *E.-coli*-Kultivierungen und den prompten Chemikalien-Lieferungen.

Bei Kirsten Hantelmann möchte ich mich für die Zusammenarbeit im Rahmen des DFG-Projektes und besonders für die Unterstützung bei der praktischen Durchführung zahlreicher Kultivierungen bedanken.

Patrick Felix Oliver Lindner danke ich für die Unterstützung bei der MATLAB[®]-Programmierung sowie Dörte Solle für die Einführung in den Unscrambler[®] und in SIMULINK[®].

Guido Erbach möchte ich für die Zusammenarbeit im Rahmen seiner Diplomarbeit danken.

Für das Korrekturlesen danke ich Patrick Felix Oliver Lindner, Jens Wieckhorst, Cornelia Repenning, und Christine Klockow.

Mein Dank geht an die Arbeitskreise Hitzmann und Hesse für die Unterstützung und das hervorragende Arbeitsklima.

Dirk Hüll danke ich für die lange Zusammenarbeit, insbesondere bei den letzten Kultivierungen und für die Durchführung der FIA-Messungen, sowie für die aufbauenden Gespräche, wenn die Moral mal wieder einen Tiefpunkt erreicht hatte.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, meinem Bruder Stephan und seiner Frau Anja sowie meinem Neffen Daniel für die jahrelange Unterstützung, ohne die mein Studium und diese Arbeit niemals möglich gewesen wären.

Abstract

Marco Kollecker

Analyse von 2D-Fluoreszenzspektren durch multivariate Auswerteverfahren zur Regelung von Bioprocessen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein multivariates Fluoreszenzspektrometer zur Beobachtung von Fedbatch-Kultivierungen eingesetzt, um prozessrelevante Informationen über den aktuellen biologischen Kulturzustand zu gewinnen. Zur Extraktion der Informationen aus den großen Datenmengen wurden die Hauptkomponentenanalyse und die Partial Least Squares-Regression angewendet.

Bei aeroben Kultivierungen von *S. cerevisiae* setzt oberhalb einer kritischen Glucoseaufnahme rate aufgrund des Crabtree-Effektes die Produktion von Ethanol ein, wodurch die Ausbeute an produzierter Biomasse aus der zugefütterten Substratmenge erheblich absinkt. Zur Vermeidung dieses Effektes wurde ein Regelsystem auf der Basis von 2D-Fluoreszenzmessungen etabliert. Dazu wurde durch die Auswertung einer Kultivierung mit FIA-basierter Regelung, in der durch die Einstellung verschiedener Setpoints gezielt oxidativer als auch oxidoreduktiver Stoffwechsel der Zellen eingestellt wurde, ein Modell zur Detektion der Stoffwechsellumstellung erstellt. In Verbindung mit einem Zustandsmodell zur Berechnung der benötigten Substratzufuhr konnte eine Glucosekonzentration im Reaktor eingestellt werden, die zu einer Glucoseaufnahme rate minimal unterhalb des kritischen Wertes führte, bei der eine Ethanolproduktion der Zellen einsetzt. Die Regelstrategie konnte erfolgreich bei verschiedenen Kultivierungen angewendet werden.

Um den Einsatz des Regelsystems bei Fedbatch-Kultivierungen von *E. coli* zu untersuchen wurden Glucosepuls experimente durchgeführt. Aufgrund der erheblichen Unterschiede der beiden Mikroorganismen im Fluoreszenzverhalten erwies sich der Einsatz der 2D-Fluoreszenzspektroskopie zur schnellen Identifizierung von sich ändernden Stoffwechselzuständen bei der Kultivierung von *E. coli* als schwierig.

Mit Hilfe von PLS-Modellen konnten aus den Spektren wichtige Größen wie die Biotrockenmasse vorhergesagt werden. Weiterhin konnten Bereiche in den Spektren identifiziert werden, die aufgrund ihres hohen Informationsgehaltes besonders für die Berechnungen von chemometrischen Modellen geeignet sind.

Stichworte: 2D-Fluoreszenzspektroskopie, Regelung, *S. cerevisiae*, *E. coli*, PCA, PLS

Abstract

Marco Kollecker

Analysis of 2D fluorescence spectra with multivariate data analysis for the automation of bioprocess control

In this thesis a multivariate fluorescence spectrometer was used to gain relevant information about important biological process values from fedbatch-cultivations. The extraction of the information from the large data sets was carried out by using Principal Component Analysis and Partial Least Squares Regressions.

Due to the Crabtree effect *S. cerevisiae* produces ethanol even under fully aerobic conditions. Above a critical glucose uptake rate glucose is consumed oxidoreductively, whereby the yield of produced biomass from the substrate drops substantially. To maintain purely oxidative metabolism a process control for fedbatch cultivations based on 2D fluorescence spectroscopy has been developed and established.

By analyzing fedbatch cultivations with FIA based regulation, in which by adjusting different setpoints oxidative and oxidoreductive metabolism of the cells was set up, a model was developed for the detection of the metabolic conversion.

In connection with a condition model used for calculating the needed substrate feeding rate a glucose concentration could be set up in the reactor that led to a glucose uptake rate just below the critical value with which an ethanol production of the cells begins. The model used for the process control could be transferred to similar fedbatch cultivations accordingly.

In order to evaluate the probability of transferring the process model to cultivations of other microorganisms glucose pulse experiments with *E. coli* were performed. Due to the substantial differences of the fluorescence behavior of the two microorganisms the use of the 2D fluorescence spectroscopy for the quick identification of changing metabolic conditions during cultivations of *E. coli* proved to be difficult.

By building PLS models variables such as biomass could be predicted from the spectra. In addition, parts of the spectra were identified which are particularly suitable for the computation of chemometric models due to their high content of information.

Keywords: 2D fluorescence spectroscopy, PCA, PLS, *S. cerevisiae*, *E. coli*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung	1
2	Grundlagen	3
2.1	2D-Fluoreszenzspektroskopie	3
2.2	Chemometrische Auswertungen.....	5
2.2.1	Hauptkomponentenanalyse.....	6
2.2.2	Methoden der Regression	8
2.3	Die verwendeten Organismen	10
2.3.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> H620	10
2.3.2	<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3).....	14
2.4	Regeltechnik	15
2.5	Fließinjektionsanalyse	17
3	Material und Methoden	19
3.1	Fluoreszenzspektrometer	19
3.1.1	Hitachi F-4500.....	19
3.1.2	Bioview.....	20
3.2	Versuchsaufbau der Fedbatch-Kultivierungen	21
3.3	Durchführung der Vorkulturen.....	23
3.3.1	<i>E. coli</i>	23
3.3.2	<i>S. cerevisiae</i>	23
3.4	MATLAB®-Software	23
3.5	Chemometrische Modelle.....	24
3.5.1	Preprocessing.....	24
3.5.2	The Unscrambler®	25
3.6	Onlineanalytik	26
3.6.1	Fließinjektionsanalyse	26
3.6.2	Abgas (Sauerstoff und Kohlendioxid).....	27
3.6.3	pH-Wert.....	28
3.6.4	pO ₂ -Wert.....	28
3.7	Offlineanalytik.....	28
3.7.1	BTM	28
3.7.2	Acetat.....	28
3.7.3	Ethanol.....	29
3.7.4	Glucose	29
3.7.5	Optische Dichte	30
4	Fedbatch-Kultivierungen von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	31
4.1	Durchführung der Kultivierungen	32
4.2	Kultivierung mit FIA-basierter Regelung zur Datengewinnung.....	33

4.3	Hauptkomponentenanalyse der Kultivierung FB1	35
4.4	Durchführung der Modellbildung.....	37
4.5	Das Regelmodell	39
4.6	Das Regelprogramm „MB-Wert“	41
4.7	Fluoreszenzbasierte Regelung von <i>S. cerevisiae</i>	43
4.8	Optimierung der Regelstrategie und der Parameter	45
4.8.1	Regelstrategie	45
4.8.2	Parameter	48
4.9	Kultivierung mit dem optimierten Modell	49
4.10	Kultivierung mit erhöhter Biomasse.....	51
4.11	Kultivierung mit Sauerstofflimitierung	53
4.12	Zusammenfassung	56
5	Fedbatch-Kultivierungen von <i>Echerichia coli</i> BL21(DE3).....	58
5.1	Durchführung der Kultivierungen	58
5.2	Fedbatch-Kultivierung EC1	59
5.3	Fedbatch-Kultivierung EC2.....	65
5.4	Zusammenfassung	68
6	Vorhersage von Prozessgrößen	70
6.1	Vorhersagen bei <i>S.-cerevisiae</i> -Kultivierungen.....	70
6.2	Vorhersagen bei <i>E.-coli</i> -Kultivierungen	71
6.3	Zusammenfassung	73
7	Informationsgehalt von Spektren	74
7.1	Der Informationsgehalt.....	74
7.2	Informationsgehalt der Spektren bei Kultivierungen	74
7.3	Zusammenfassung	78
8	Sensitivitätsanalyse von 2D-Fluoreszenzspektren	79
8.1	Reduzierte Spektren.....	79
8.2	Chemometrische Sensitivitätsanalyse	81
8.3	Zusammenfassung	83
9	Zusammenfassung und Ausblick	84
10	Literatur	87
11	Anhang.....	95
11.1	Abkürzungen und Symbole	95
11.2	Einstellungen des Bioview	98
11.3	Medien für <i>S.-cerevisiae</i> -Kultivierungen [nach Schatzmann, 1975]	99
11.4	Medien für <i>E.-coli</i> -Kultivierungen [Ernst, 2006]	101
11.4.1	Vorkulturen.....	101

11.4.2	Stocklösungen.....	101
11.4.3	Hauptkulturen.....	102
11.4.4	Feed	103
11.5	FIA-Puffer	104
11.6	Sensitivitätsanalyse.....	105
11.7	Simulationen mit MATLAB [®] und SIMULINK [®]	106

1 Einleitung und Zielsetzung

In den letzten Jahren hat die Biotechnologie erheblich an Bedeutung zugenommen. Eine immer größere Anzahl an Produkten wird mit Hilfe von Enzymen oder durch Mikroorganismen produziert. So wird heute schon jedes zweite neu auf den Markt gebrachte Medikament auf diesem Weg hergestellt [Hoppenheidt et al., 2004]. Bis zum Jahr 2010 soll sich laut Expertenmeinung das gesamte Umsatzvolumen der Biotechnologie verzehnfachen und bis zu 20 % des Umsatzes der gesamten chemischen Industrie betragen [Bachmann et al., 2000; Festel et al., 2004].

Zu den ersten Mikroorganismen, die vom Menschen kultiviert wurden, gehört die Bäcker- und Brauhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Sie wurde schon vor Jahrtausenden beim Brotbacken und zum Bierbrauen und Weinkeltern verwendet. Während die Produktion von Ethanol bei diesen Prozessen häufig erwünscht ist, stellt Ethanol bei zahlreichen modernen Anwendungen ein unerwünschtes Nebenprodukt dar.

Hefen produzieren unter aeroben Bedingungen Ethanol, sobald eine kritische Glucoseaufnahme rate überschritten wird. Diese tritt bei Glucosekonzentrationen zwischen 0,04 und 0,08 g/L auf [Pham et al., 1998]. Dieses Phänomen wird gemeinhin als Crabtree-Effekt bezeichnet [De Deken, 1966; Sonnleitner und Käppeli, 1986]. Da durch die Ethanolproduktion die Ausbeute an Biomasse erheblich absinkt muss die Glucose-Feedrate derart angepasst werden, dass die Ethanolproduktion minimiert und die Biomasseproduktion maximiert wird. Dies ist der Fall, wenn die Glucoseaufnahme rate minimal unter der kritischen Glucoseaufnahme rate liegt.

Die meisten Bioprozesse sind hoch dynamisch und nur schwer zu kontrollieren, der interne Zustand der Zelle lässt sich nur unzureichend durch Manipulation der externen Zellumgebung beeinflussen. Das Einstellen der Glucoseaufnahme rate ist mit erheblichen Problemen verbunden. Sie hängt nicht nur vom verwendeten Organismus ab, sondern auch von den Parametern der einzelnen Kultivierungen wie Temperatur, pH-Wert, Glucosekonzentration und Altersverteilung der verwendeten Zellen.

In dieser Arbeit soll ein Regelsystem etabliert werden, das die Prozessführung von Fedbatch-Kultivierungen bei einer optimalen Biomasseproduktion unter Vermeidung einer Ethanolproduktion ermöglicht. Zur Prozessbeobachtung wird ein 2D-Fluoreszenzspektrometer verwendet. Diese Analysenmethode ermöglicht es, nicht-invasiv, online und in-vitro Informationen über die Kultivierung zu sammeln und eine Stoffwechsellumstellung rechtzeitig zu erkennen und somit durch ein Herabsetzen der Feedrate eine Ethanolproduktion zu verhindern.

Durch die Aufnahme einer großen Anzahl von Messpunkten, die ein 2D-Fluoreszenzspektrum enthält, entsteht im Verlauf einer Kultivierung eine sehr große Datenmenge. Die Interpretation dieser Daten ist sehr schwierig, da es häufig zu Überlagerungen und Interferenzen der enthaltenen Informationen kommt. Zur Auswertung werden daher sogenannte Softwaresensoren eingesetzt. Mit Hilfe chemometrischer, multivariater Auswerteverfahren können so auch latente Informationen aus den Spektren extrahiert und in vivo Prozessgrößen bestimmt werden, die ansonsten durch Offlineanalysen zeitaufwändig gemessen werden müssten.

Ein weiterer, in der Industrie häufig zur Produktion von Proteinen eingesetzter Mikroorganismus ist *Escherichia coli*. Darum soll in Kooperation mit der technischen Universität Hamburg-Harburg untersucht werden, ob ein Transfer der Regelungsstrategie auf Kultivierungen von *Escherichia coli* BL21(DE3) möglich und eine Erhöhung der Ausbeute des von diesem Stamm produzierten Fusionsproteins möglich ist.

Abschließend soll der Informationsgehalt der 2D-Fluoreszenzspektren sowie der Einfluss des Wellenlängenabstandes zwischen den einzelnen Messpunkten untersucht werden.

2 Grundlagen

2.1 2D-Fluoreszenzspektroskopie

Für die Beobachtung und Regelung biotechnischer Prozesse ist die Messung der biologischen Größen erforderlich. Als nicht-invasive bioanalytische Systeme bieten sich auf Fluoreszenzmessungen basierende optische Systeme an. Als Fluoreszenz bezeichnet man eine spezielle Form der Lumineszenz, bei der ein Molekül photochemisch angeregt wird und durch Relaxation Licht emittiert. Geeignete Moleküle besitzen in der Regel leicht anregbare π -Elektronen. Für die Beobachtung eignen sich vor allem aromatische Aminosäuren, Co-Enzyme wie Flavinmononucleotid (FMN) und Flavinadenindinucleotid (FAD) sowie das reduzierte Nicotinamid-Adenindinucleotid-(phosphat). Als intrinsische Fluorophore können sie direkt in den lebenden Zellen detektiert werden. Ein Fluoreszenzsensor kann über einen Lichtwellenleiter direkt an den Fermenter angekoppelt werden und erlaubt so Onlinemessungen, die in-time, in-situ und sogar in-vivo Analysen ermöglicht [Bang, 1981; Lindemann, 1998]. Für umfassende Beobachtung ist es vorteilhaft, Fluoreszenzspektrometer zu verwenden, die einen breiten Spektralbereich für Exzitation und Emission abdecken. Dadurch ist es möglich, eine große Anzahl an biogenen Fluorophoren simultan zu detektieren.

In Abbildung 2.1 ist exemplarisch ein 2D-Fluoreszenzspektrum einer Fedbatch-Kultivierung von *S. cerevisiae* dargestellt.

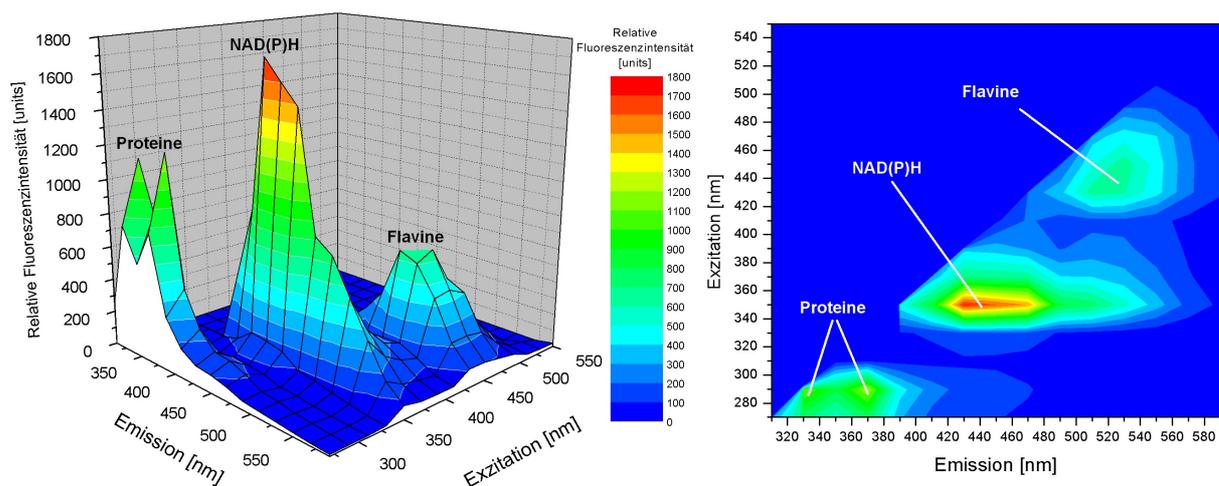


Abbildung 2.1 2D-Fluoreszenzspektrum der *S.-cerevisiae*-Fedbatch-Kultivierung FB3 des Bioview als 3D-Plot (links) und als Konturplot (rechts). Kultivierungszeit = 28,5 h, Biotrockenmasse = 12 g/L.

Im Spektrum sind drei große Bereiche zu erkennen: Der Proteinbereich (λ_{ex} 270-310 nm, λ_{em} 310-390 nm) sowie im Bereich der Vitamine und Cofaktoren NAD(P)H (λ_{ex} 310-390 nm, λ_{em} 390-550 nm) und die Flavine (λ_{ex} 410-490 nm, λ_{em} 490-570 nm). In Tabelle 2.1 sind die wichtigsten biogenen Fluorophore und ihre Emissions- und Exzitationsmaxima aufgeführt.

Tabelle 2.1: Biogene Fluorophore mit Exzitations- und Emissionsmaxima

Fluorophor	Emission-/Exzitationswellenlänge [nm/nm]	Quelle
Tryptophan	287/348	[Wolfbeis, 1985]
Tyrosin	280/300	[Schulmann, 1985]
Pyridoxin	324/390	[Fasmann, 1976]
NAD(P)H	340/450	[Guilbault, 1973]
FMN	450/530	[Wolfbeis, 1985]
FAD	365/520	[Wolfbeis, 1985]

Durch die Auswertung der Fluoreszenzdaten ist es möglich, die komplexen Vorgänge biotechnischer Prozesse zu beobachten und Kultivierungsparameter zu bestimmen. Als erste Anwendung wurde die Bestimmung der Biomasse durch die Detektion der NAD(P)H-Fluoreszenz etabliert [Meyer et al., 1984; Boyer und Humphrey, 1988]). Die Entwicklung der 2D-Fluoreszenzspektroskopie und die damit zur Verfügung stehende große Datenmenge machte den Einsatz komplexerer Auswerteverfahren erforderlich, um die Daten analysieren und interpretieren zu können. Die Intensität der Fluoreszenz ist in erster Linie von der Konzentration des Fluorophors abhängig, jedoch spielen auch äußere und innere Einflüsse wie Biomasse, Medienzusammensetzung, Größe und Anzahl der Gasblasen im Medium, Streulicht, Inner-Filter-Effekte und Fluoreszenzlöschung eine wichtige Rolle [Marose, 1999]. Häufig verwendete Methoden zur Auswertung sind die Hauptkomponentenanalyse und der Einsatz neuronaler Netze. In der Literatur ist die multivariate Auswertung von 2D-Fluoreszenzspektren zur Prozessbeobachtung und -kontrolle mehrfach beschrieben [Mukherjee et al., 1999; Solle, 2003; Böhl et al., 2003].

2.2 Chemometrische Auswertungen

Die Chemometrie ist eine Teildisziplin der Chemie. Sie nutzt statistische und mathematische Methoden, um aus Messdaten ein Maximum an problembezogenen Informationen zu gewinnen und die Durchführung und Auswertung von Verfahren und Experimenten zu optimieren. Ziele der Chemometrie sind vor allem die Planung von Synthesen, statistische Versuchsplanung in Bezug auf die Vorbereitung von Experimenten sowie die Optimierung bereits etablierter Verfahren. Mit Hilfe geeigneter chemometrischer Modelle können aus 2D-Fluoreszenzspektren Informationen gewonnen werden, die auf den ersten Blick nicht mit der Fluoreszenz in Verbindung stehen, z. B. die Konzentration nicht fluoreszierender Substrate und Produkte. Eines der am häufigsten verwendeten Verfahren ist die multilineare Regression (MLR).

Das Ziel einer Regressionsanalyse ist es, ein Modell für das Verhältnis zwischen den Messwerten (die unabhängigen Variablen x) und den Prozessvariablen (den abhängigen Variablen y) zu finden. Liegen unabhängige Messwerte vor und sind ihre Messfehler normalverteilt, kann eine Funktion nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate (Least-Squares-Verfahren) an die Messwerte angepasst werden. Für eine Messgröße x (eine Wellenlängenkombination) und eine Prozessvariable y ergibt sich

$$y = b \cdot x + e \quad (2.1)$$

b ist der Regressionskoeffizient und e der Fehler. Bei der 2D-Fluoreszenzspektroskopie liegt jedoch nicht nur eine Messgröße vor, sondern jede Wellenlängenkombination (WLK) wird als eigene Messgröße betrachtet. Bei der Verwendung von m WLK ergibt sich somit für die MLK

$$y = \sum_{j=1}^m b_j \cdot x_j + e \quad (2.2)$$

Gleichung (2.2) beschreibt die multilineare Abhängigkeit zwischen den WLK und der Prozessvariable für ein Spektrum. Erweitert man nun Gleichung (2.2) auf n Spektren, so werden y und e zu Spaltenvektoren mit n Zeilen. x_j ändert seine Dimension von einem Zeilenvektor zur Matrix X während b seine Dimension nicht ändert und als Vektor erhalten bleibt.

$$\vec{y} = \vec{b} \cdot X + \vec{e} \quad (2.3)$$

Die Matrix X enthält in jeder der n Zeilen die Daten eines Spektrums und in jeder der m Spalten die Messwerte einer WLK. Für eine Lösung nach dem Least-Squares-Verfahren ergibt sich für den Vektor \vec{b}

$$\vec{b} = (X'X)^{-1} X'\vec{y} \quad (2.4)$$

Bei der Lösung von Gleichung (2.4) ergibt sich ein Problem. Existiert zwischen x -Variablen eine Kollinearität existiert die inverse Matrix zu $X'X$ nicht. In 2D-Fluoreszenzspektren korrelieren die WLK teilweise erheblich. Die Anzahl der x -Variablen ist somit größer als die reale Dimension der Datenmatrix. Um dennoch einen Zusammenhang zwischen den abhängigen und unabhängigen Variablen herstellen zu können wird eine Hauptkomponentenanalyse (PCA, Principle Component Analysis) durchgeführt.

2.2.1 Hauptkomponentenanalyse

Durch die PCA werden die Daten in ein Koordinatensystem niedrigerer Dimension überführt. Bevor sie jedoch durchgeführt wird, ist eine Zentrierung der x -Variablen gemäß den Gleichungen (2.5) und (2.6) erforderlich.

$$x_{ij}^{cent} = x_{ij} - \bar{x}_j \quad (2.5)$$

$$\bar{x}_j = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_{ij} \quad (2.6)$$

i ist der Index der n Spektren und j ist der Index der m WLK.

Bei der PCA werden die Variablen der Datenmatrix durch eine geringere Anzahl von untereinander unabhängigen Hauptkomponenten (PC) dargestellt. Die Informationen der ursprünglichen Variablen soll weitestgehend erhalten bleiben. Dazu erfolgt eine sukzessive varianzmaximierende orthogonale Rotationstransformation der Originaldaten in ein neues Koordinatensystem der Hauptkomponenten.

In der PCA wird die Matrix X mit dem Rang m als Summe von m Matrizen mit dem Rang 1 dargestellt. Der Rang beschreibt die Anzahl der linear unabhängigen Spaltenvektoren. Ihre Anzahl ist gleich Anzahl der unabhängigen Zeilenvektoren.

$$X = M_1 + M_2 + M_3 + \dots + M_m \quad (2.7)$$

Diese Matrizen lassen sich als Produkt des Scorevektors \vec{t} und des Loadingvektors \vec{p}' schreiben. Fasst man nun die Loadingvektoren zeilenweise und die Scorevektoren spaltenweise zusammen ergibt sich für die Datenmatrix X

$$X = \vec{t}_1 \cdot \vec{p}'_1 + \vec{t}_2 \cdot \vec{p}'_2 + \dots + \vec{t}_m \cdot \vec{p}'_m = T \cdot P' \quad (2.8)$$

Im Datenraum der x-Variablen ist die erste Hauptkomponente die Gerade, die die Daten mit der kleinsten Fehlersumme über alle Dimensionen wiedergibt. In Abbildung 2.2 ist die erste Hauptkomponente in einem Datenraum aus drei Variablen mit unzentrierten Daten dargestellt.

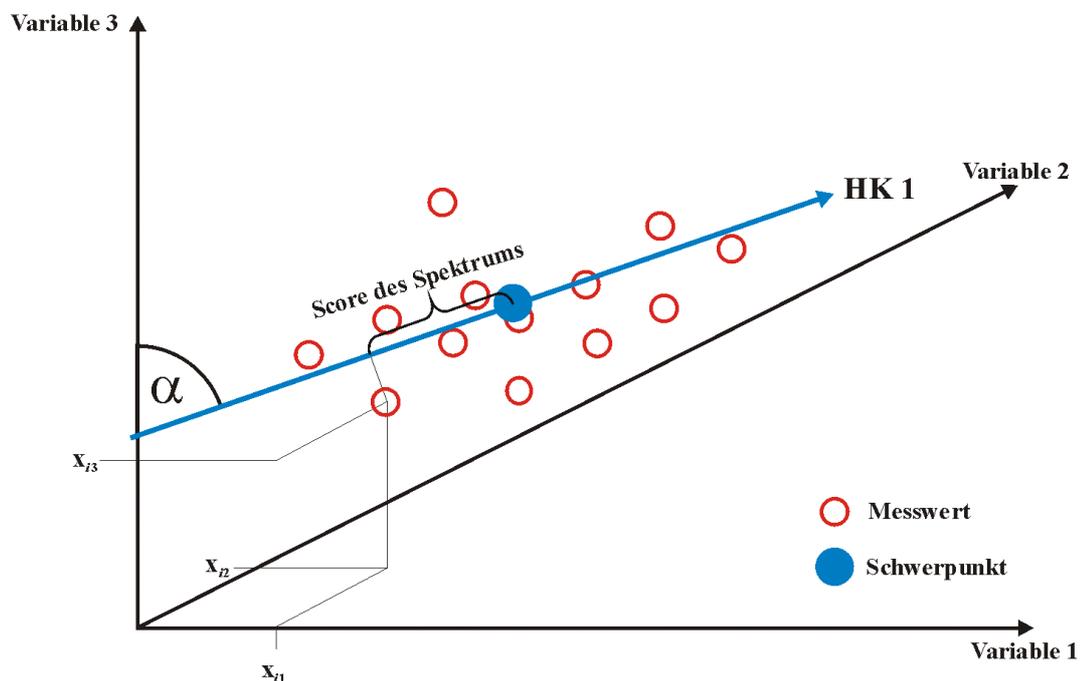


Abbildung 2.2: Darstellung der 1. Hauptkomponente im 3-dimensionalen Raum einer Datenmatrix X

Die Scores geben die Koordinaten der Spektren bezüglich der Hauptkomponenten an. Die Anzahl der Komponenten eines Scorevektors entspricht der Anzahl der durchgeführten Messungen. Der Scorevektor stellt die neue unabhängige Variable dar, mit der die Regression durchgeführt wird.

Der Loadingvektor legt die Rotation des neuen Koordinatensystems im ursprünglichen Raum fest. Es beschreibt den Winkel α zwischen den Achsen im ursprünglichen Raum und der Hauptkomponente. Die Anzahl der Komponenten des Loadingvektors entspricht der Anzahl der x-Variablen.

Die Berechnung der Hauptkomponenten erfolgt sukzessiv. Das bekannteste Verfahren hierfür ist der NIPALS-Algorithmus [Otto, 1997]. Dieser Algorithmus legt die Hauptkomponenten

durch Iteration so fest, dass die erste Hauptkomponente die größte in den Daten enthaltene Varianz beschreibt. Als zusätzliche Bedingung gilt, dass die berechnete Hauptkomponente orthogonal zu allen vorher berechneten Hauptkomponenten sein muss. Nach der Berechnung der ersten PC wird die Matrix $\vec{t}_1 \cdot \vec{p}_1'$ von der ursprünglichen Datenmatrix subtrahiert. Mit dieser neuen Matrix wird die zweite PC berechnet.

Jede Hauptkomponente beschreibt den größten Teil der Informationen, die die verbleibende Datenmatrix enthält. Nach wenigen Iterationsschritten enthält die Matrix nur noch Informationen über Messrauschen. Bei der PCA der mit dem Bioview aufgenommenen Daten ist eine Verwendung von bis zu zehn Hauptkomponenten ausreichend, um eine Regression mit einem hinreichend geringen Fehler durchführen zu können [Hantelmann, 2005; Stärk, 2002].

2.2.2 Methoden der Regression

Für eine Regression mit den abhängigen y-Variablen wie Biomasse, Produktkonzentration etc., stehen nun mit den Hauptkomponenten linear unabhängige x-Variablen zur Verfügung. Bei der Hauptkomponentenregression (PCR, Principal Component Regression) wird eine lineare Regression zwischen der Scorematrix der Hauptkomponenten und den y-Variablen durchgeführt. Dazu wird in der Regel das Least-Square-Verfahren zur Bestimmung des Parametervektors nach Gleichung (2.4) angewendet.

Erheblich bessere Ergebnisse lassen sich mit der Partial Least Square Regression (PLS) erzielen. Die PLS wurde von Wold 1975 entwickelt. Sie unterscheidet sich von der PCR dahingehend, dass bei der PLS nicht nur die Varianz der x-Variablen berücksichtigt wird sondern ebenfalls die Varianz der y-Variablen [Wold, 1975]. Durch dieses Verfahren werden die Einflüsse derjenigen x-Variablen minimiert, die zwar eine große Varianz besitzen, aber hinsichtlich des Kalibrationsmodells nur eine geringe Bedeutung haben.

Analog zur PCA werden die Daten zunächst zentriert. Anschließend werden die Gewichte der X-Matrix über die Maximierung der Kovarianz zwischen der Linearkombination der Matrizen X und Y bestimmt. Anschließend werden die X- und Y-Matrizen gemäß der Gleichungen (2.9) und (2.10) zerlegt.

$$X = T \cdot W (P^T \cdot W)^{-1} + E \quad (2.9)$$

$$Y = T \cdot Q^T + F \quad (2.10)$$

Dabei ist T die Scorematrix der X - und Y -Matrix, W die Loading-weight-Matrix, P und Q sind die Loadingmatritzen und E und F die Restmatritzen. Für die Regressionskoeffizientenmatrix B ergibt sich aus den Gleichungen (2.9) und (2.10)

$$B = W (P^T \cdot W)^{-1} Q^T \quad (2.11)$$

Der Vorteil der PLS-Methode liegt darin, dass auch Korrelationen bei sehr komplexen Daten hergestellt werden können. Besonders PLS-1-Modelle eignen sich hierfür. Bei dieser Methode wird für jede Y -Variable ein eigenes Modell berechnet, das auf die Vorhersage dieser Variable optimiert wird. Bei einem PLS-2-Modell wird hingegen für alle y -Variablen insgesamt nur ein Modell erstellt, der Fehler ist größer als bei einem PLS-1-Modell. Dies macht sich besonders bei y -Variablen bemerkbar, die einen sehr unterschiedlichen Verlauf haben. Der Vorteil des PLS-2-Modells ist der weitaus geringere Zeitaufwand für die Berechnung des Modells.

Ein essentielles Problem ist die Bestimmung der Anzahl der relevanten Hauptkomponenten. Hierzu können verschiedene Methoden verwendet werden. Ein Kriterium ist die durch die Anzahl der Hauptkomponenten beschriebene Gesamtvarianz. Häufig wird auch die Methode der Kreuzvalidierung verwendet. Dazu wird im einfachsten Fall für jede hinzukommende Hauptkomponente jeder Datensatz einer Messung (eines 2D-Fluoreszenzspektrums) aus den Gesamtdaten entfernt und mit den restlichen Daten ein PLS-Modell berechnet. Das erstellte Modell wird zur Vorhersage der ausgelassenen Daten verwendet und es wird der Fehler zwischen den ursprünglichen und den vorhergesagten Werten berechnet. Als Fehler wird die Summe der Fehlerquadrate zwischen den beobachteten und den vorhergesagten Werten $PRESS$ (Predictive Residual Sum of Squares) gemäß Gleichung (2.12) oder der $RMSEP$ (Root Mean Square Error of Prediction) gemäß Gleichung (2.13) verwendet.

$$PRESS = \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2 \quad (2.12)$$

$$RMSEP = \sqrt{\frac{PRESS}{n}} \quad (2.13)$$

Hierbei ist y_i die gemessene und \hat{y}_i die vorhergesagte y -Variable, n ist die Anzahl der durchgeführten Messungen (Spektren). Die Angabe des $PRESS$ erfolgt in der quadratischen Dimension der y -Variable, der $RMSEP$ wird in der Dimension von y selber angegeben. Um die Fehler verschiedener Prozessvariablen vergleichen zu können, erfolgt die Angabe meist

als Quotient aus dem Fehler und der maximalen Größe der jeweiligen Prozessvariablen. Die Anzahl der signifikanten Hauptkomponenten ergibt sich im Minimum dieses Fehlers. Bei sehr großen Datensätzen kann man die Kreuzvalidierung auch mit Gruppen aus mehreren Messungen durchführen.

2.3 Die verwendeten Organismen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Kultivierungen mit zwei unterschiedlichen Organismen durchgeführt. Zum Aufbau der Regelstrategie wurden Kultivierungen mit der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* H620 durchgeführt. Zur Untersuchung der Übertragung der Regelstrategie auf andere Organismen wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli* BL21(DE3) eingesetzt.

2.3.1 *Saccharomyces cerevisiae* H620

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wird von den Menschen schon seit Jahrtausenden als Bäcker- und Bierhefe verwendet. In der Biotechnologie wird dieser Organismus häufig zu Testzwecken verwendet. Der Metabolismus dieses eukaryontischen Schlauchpilzes ist gut erforscht und beschrieben [Locher et al., 1993].

Unter den verwendeten Kultivierungsbedingungen erfolgt die Vermehrung der Hefen durch Sprossung, eine sexuelle Vermehrung tritt lediglich bei starker Substratlimitierung auf. Die daraus entstehenden haploiden Tochterzellen zeichnen sich durch eine stark reduzierte Stoffwechselaktivität aus. Das Wachstumsverhalten der Zellen ist somit abhängig von der Altersverteilung.

Bei aerobem Wachstum können morphologisch unterschiedliche Zellen auftreten. Die Sprossungs- und Stoffwechseleigenschaften können sich z. T. erheblich unterscheiden.

Die Produktion von Hefe kann in Batch-, Fedbatch- oder kontinuierlichen Kultivierungen erfolgen. Durch Änderungen der Kultivierungsbedingungen, z. B. der Temperatur, des pO_2 -Gehalts der Kulturbrühe oder des Substratangebots, kann der Stoffwechsel und somit auch die Produktion von Biomasse und Nebenprodukten, hier ist vor allem Ethanol zu nennen, beeinflusst werden. *S. cerevisiae* ist in der Lage verschiedene Kohlenstoffquellen zu verstoffwechseln. Das von den Zellen bevorzugte Substrat ist Glucose. Grundsätzlich unterscheidet man dabei zwischen oxidativem (aeroben) und reduktivem (anaerob) Stoffwechsel. Eine dritte Möglichkeit ist ein oxidoreduktiver Stoffwechsel, der auch als oxidativ-fermentativ bezeichnet wird. Er stellt sich trotz ausreichender Sauerstoffversorgung bei einem hohen Substratan-

gebot ein. Hierbei treten signifikante Merkmale der beiden erstgenannten Stoffwechselwege parallel auf.

Rein oxidativer Stoffwechsel kann sowohl auf der Basis von Glucose als auch Ethanol als Substrat erfolgen. Grundvoraussetzung ist eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Sauerstoff. Die Glucose wird zunächst unter ATP-Verbrauch zu Glucose-6-Phosphat phosphoryliert und anschließend glycolytisch zu Pyruvat abgebaut. Dabei entstehen aus einem Molekül Glucose je zwei Moleküle Pyruvat und ATP. Unter die Reduktion von zwei Molekülen NAD(P)^+ zu NAD(P)H . Das Pyruvat wird anschließend über die Zwischenstufe Acetyl-CoA in den Citratcyclus eingeschleust und vollständig zu CO_2 und Wasser abgebaut. Dabei entsteht aus NAD(P)^+ weiteres NAD(P)H sowie FADH_2 , die in der Atmungskette der Zelle zur weiteren ATP-Produktion verwendet und reoxidiert werden. In Tabelle 2.2 ist die NADH-Bilanz dargestellt. Es sind nur die Teilschritte dargestellt, an denen NAD^+/NADH beteiligt ist.

Tabelle 2.2: NADH-Bilanz des rein oxidativen Stoffwechsels.

Reaktionsschritt		Bilanz
Glycerinaldehyd-3-phosphat	→ 1,3-Bisphosphoglycerat	+ 1 NADH
Pyruvat	→ Acetyl-Coenzym A	+ 1 NADH
Isocitrat	→ α -Ketoglutarat + CO_2	+ 1 NADH
α -Ketoglutarat + CoA-SH	→ Succinyl-CoA	+ 1 NADH
Malat	→ Oxalacetat	+ 1 NADH
Gesamt		+ 5 NADH

Da aus einem Molekül Glucose in mehreren Teilreaktionen zwei Moleküle Glycerinaldehyd-3-phosphat gebildet werden, entstehen je Glucose-Molekül zehn Moleküle NADH.

Rund die Hälfte der aufgenommenen Substratmenge wird in Energie umgewandelt (Katabolismus), der Rest wird zum Aufbau der Zellmasse verwendet (Anabolismus). Die Ausbeute $Y_{X/S}$ an Biotrockenmasse (BTM) bezogen auf die eingesetzte Substratmenge liegt mit rund 0,5 g BTM je g Glucose sehr hoch.

Der fermentative Stoffwechsel setzt eine unzureichende Sauerstoffversorgung voraus. Dabei wird Glucose zunächst ebenfalls in Pyruvat umgesetzt. Das Pyruvat wird jedoch nicht in den Citratcyclus eingeschleust, sondern über Acetaldehyd zu Ethanol umgesetzt. Die in Tabelle

2.3 dargestellte NADH-Bilanz zeigt, dass das im ersten Reaktionsschritt aus NAD^+ gebildete NADH zur Bildung des Ethanol wieder verbraucht wird. Die Gesamtbilanz dieser Reaktion ist ausgeglichen.

Tabelle 2.3: NADH-Bilanz des rein fermentativen Stoffwechsels.

Reaktionsschritt	Bilanz
Glycerinaldehyd-3-phosphat \rightarrow 1,3-Bisphosphoglycerat	+ 1 NADH
Acetaldehyd \rightarrow Ethanol	- 1 NADH
Gesamt	± 0 NADH

Die Ausbeute $Y_{X/S}$ des fermentativen Stoffwechsels liegt mit einem Wert von unter 0,15 erheblich niedriger als beim oxidativen Stoffwechsel [Woehrer und Roehr, 1981]. Gebildetes Ethanol kann von *S. cerevisiae* wieder aufgenommen und über den Citratzyklus verstoffwechselt werden. Es wirkt sich in höheren Konzentrationen inhibierend aus.

Beim oxidoreduktiven Stoffwechsel setzt trotz ausreichender Sauerstoffversorgung die Ethanolproduktion ein. Der Übergang vom oxidativen zum oxidoreduktiven Stoffwechsel findet bei Überschreiten einer kritischen Glucoseaufnahme rate $q_{s,krit}$ statt. Die Zellen sind dann trotz ausreichender Sauerstoffversorgung nicht mehr in der Lage, die gesamte Glucose oxidativ abzubauen. Analog zum fermentativen Stoffwechsel wird ein Teil des Pyruvats über Acetaldehyd zu Ethanol umgesetzt. Der Citratzyklus steht für einen Teil des Pyruvates nicht mehr zur Verfügung und es wird mit Ethanol ein energiereiches Endprodukt aus der Zelle ausgeschleust. Die Werte für den Ausbeutekoeffizienten und die Wachstumsrate sinken erheblich ab. Dieses Phänomen bezeichnet man als Crabtree-Effekt [De Deken, 1966]. Sowohl die Ursache als auch der Mechanismus des Crabtree-Effektes sind nicht vollständig bekannt. In der Literatur werden verschiedene Mechanismen diskutiert. Bellgardt sieht die Ursache in einem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im Mechanismus des oxidativen Metabolismus [Bellgardt, 1983]. Sonnleitner und Käppli machen die begrenzte respiratorische Kapazität der Zellen für den Crabtree-Effekt verantwortlich [Sonnleitner und Käppli, 1986]. Eine parallele Verstoffwechslung von Glucose und anderen Kohlenstoffquellen wie Ethanol ist nur möglich, wenn die respiratorischen Kapazitäten den kritischen Wert unterschreiten.

Die Höhe des Wertes $q_{s,krit}$ ist keine absolute Größe. Sie hängt genauso vom verwendeten Stamm wie von den Kultivierungsparametern wie Medienzusammensetzung und Gelöstsau-

erstoffkonzentration ab. Die Hefezellen sind dabei bestrebt, die Menge des produzierten Ethanols möglichst gering zu halten (Pasteur-Prinzip).

Um eine optimale Ausbeute und Wachstumsgeschwindigkeit von *S. cerevisiae* zu erzielen, ist es erforderlich, die Glucoseaufnahme unterhalb von $q_{s,krit}$ zu halten. Dazu ist es erforderlich, das Erreichen dieses Wertes erkennen zu können. Bei der Umstellung auf einen oxidoreduktiven Stoffwechsel überträgt NAD(P)H die Elektronen auf Acetaldehyd, wodurch letztlich Ethanol gebildet wird. Der Gehalt reduzierter Redoxäquivalente wie NAD(P)H, aber auch FMNH₂ und FADH₂ steigt dabei in der Zelle stark an [Schügerl und Käppeli, 1993]. Diese Veränderungen in der Zelle lassen sich fluoreszenzspektroskopisch messen. Abbildung 2.3 zeigt ein Differenzspektrum der Umstellung von oxidativem auf oxidoreduktiven Stoffwechsel.

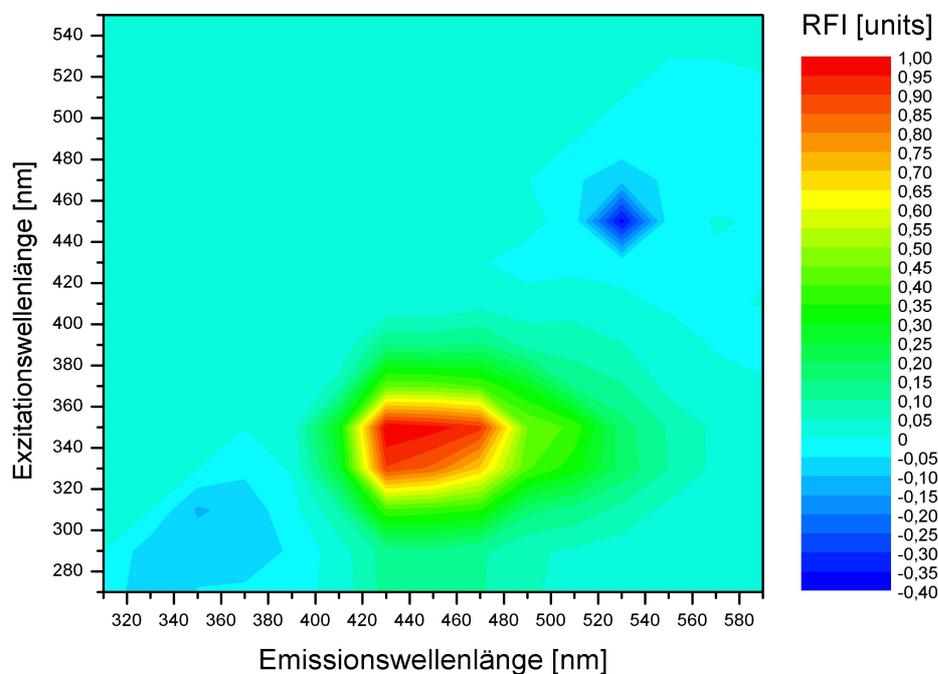


Abbildung 2.3: Änderungen im normierten 2D-Fluoreszenzspektrum beim Übergang vom oxidativen zum oxidoreduktiven Stoffwechsel (Crabtree-Effekt) während der *S.-cerevisiae*-Fed-batch-Kultivierung FB1, $\Delta t = 6$ min, Biotrockenmasse = 10 g/L.

Die größte Änderung ist im Bereich der NAD(P)H-abhängigen Fluoreszenz bei λ_{Ex} 330-370 nm/ λ_{Em} 430-470 nm und λ_{Ex} 290 nm/ λ_{Em} 430-470 nm erkennbar. Dagegen nimmt die RFI im Bereich um den Messpunkt λ_{Ex} 310 nm/ λ_{Em} 350 nm und im flavinabhängigen Fluoreszenzbereichen (λ_{Ex} 450-490 nm/ λ_{Em} 510-550 nm) stark ab.

In der Literatur wird die Ursache für den Anstieg der NADH-Fluoreszenz nicht beschrieben. Eine mögliche Erklärung ergibt sich aus der Theorie von Sonnleitner und Käppeli. Bei niedri-

gen Glucoseaufnahmearten wird das Pyruvat über den Citratzyklus abgebaut. Das dabei in großen Mengen anfallende NADH wird in der Atmungskette vollständig wieder zu NAD⁺ oxidiert. Steigt die Glucoseaufnahmeart an, müssen immer größere Mengen NADH wieder zu NAD⁺ umgesetzt werden. Übersteigt die Glucoseaufnahmeart den kritischen Wert, reicht die respiratorische Kapazität der Zellen nicht aus, um das produzierte NADH umzusetzen. Folglich steigt die NADH-Konzentration innerhalb kurzer Zeit stark an. Folglich müsste der Stoffwechsel aufgrund von NAD⁺-Mangel zum Erliegen kommen. Um dies zu verhindern, werden die Elektronen des NADH für die Reaktion von Pyruvat über Acetaldehyd zu Ethanol verwendet. Die Ethanolproduktion setzt erst dann wieder aus, wenn die respiratorische Kapazität ausreicht, das gesamte produzierte NADH über die Atmungskette abzubauen. Dabei sinkt die NADH-Konzentration in der Zelle wieder drastisch ab.

2.3.2 *Escherichia coli* BL21(DE3)

Escherichia coli ist ein Stäbchenbakterium und gehört zur Gruppe der Enterobacteriaceae. 1922 konnte der *E.-coli*-Stamm K12 erstmals aus dem menschlichen Darm isoliert und erfolgreich kultiviert werden. Heute ist seine Genetik und Physiologie gut untersucht. Umfangreiche Verwendung finden die verschiedensten Stämme bei der Produktion von rekombinanten Proteinen. Der in dieser Arbeit verwendete *E.-coli*-Stamm BL21(DE3) wird zur Produktion von Penicillin Amidase eingesetzt. Die für die Kultivierungen verwendeten Medien und sowie die Kultivierungsbedingungen wurden hinsichtlich der Ausbeute an Penicillin Amidase optimiert [Ernst, 2006]. So wurde z. B. die Kultivierungstemperatur von 37°C, entsprechend dem natürlichen Vorkommen von *E. coli*, auf 30°C reduziert, um die Proteinsyntheserate zu optimieren [Strandberg und Enfors, 1991].

Die Kultivierungen müssen substratlimitiert durchgeführt werden, da bei hohen Glucosekonzentration wie bei Hefen die Produktion von unerwünschten Nebenprodukten in erheblichem Maße einsetzt. Der Grund dafür liegt analog zu den Hefen in einer begrenzten respiratorischen Kapazität der rekombinanten Bakterien. Überschüssige Glucose führt in einer aeroben Kultivierung zur Produktion von Acetat. Dies führt nicht nur zu Wachstumsinhibierung, auch die Produktion rekombinanter Proteine wird erheblich gestört [Nakano et al., 1997].

Die meisten Proteine rekombinanter *E. coli* werden intrazellulär akkumuliert. Somit ist die Produktivität proportional zur erreichten Zelldichte. Deshalb werden häufig die verschiedensten Hochzelldichte-Techniken angewandt. Kultivierungen mit Biomassen von 120 g/L und mehr sind in der Literatur mehrfach beschrieben [Korz et al., 1995; Horn et al., 1996].

2.4 Regeltechnik

Um bei der Kultivierung von Mikroorganismen optimale Wachstumsraten erzielen zu können müssen viele Prozessvariablen einen definierten optimalen Zustand einhalten. Viele Prozessgrößen dürfen aufgrund der Sensitivität der Mikroorganismen nur geringfügig variieren. Die Folgen der Abweichung einer Prozessgröße reichen von geringerer Wachstums- bzw. Produktbildungsgeschwindigkeit bei Temperatur- und pH-Wertänderungen bis zur Bildung von unerwünschten Nebenprodukten (z.B. Crabtree-Effekt bei erhöhter Substratkonzentration, siehe Kapitel 2.3), die sich wiederum inhibierend auf das Zellwachstum auswirken können.

Die meisten Bioprozesse sind hoch dynamisch und nur schwer zu kontrollieren, der interne Zustand der Zelle lässt sich nur unzureichend durch Manipulation der externen Zellumgebung beeinflussen. Hierfür gibt es verschiedene Gründe. Die Dynamik der Mikroorganismen ist von sich aus nicht-linear und präzise Prozessmodelle sind aufgrund der komplexen biochemischen Vorgänge in den Zellen nur selten verfügbar. Bei vorhandenen Modellen sind viele Parameter nur unzureichend bekannt und müssen in zum Teil zeitaufwendigen Simulationen bestimmt werden, da verlässliche Biosensoren zur Messung intrazellulärer Aktivitäten nur in Ausnahmefällen existieren. Insgesamt gesehen lässt sich der Prozesszustand nur sehr schwer charakterisieren, wodurch die Regelung von Prozessgrößen erschwert wird.

Die Regelung von Prozessgrößen wie Temperatur, pH-Wert oder Gelöstsauerstoffgehalt gehört heutzutage zum Stand der Technik. Für diese Größen stehen geeignete Messverfahren mit einer hohen Messfrequenz zur Verfügung, so dass eine Regelung mit Hilfe einfacher Algorithmen erfolgen kann. Der einfachste Reglertyp ist der Zweipunktregler. Er ist sehr einfach zu implementieren, aber trotzdem bereits für viele Regelaufgaben recht gut geeignet. Dieser Regler kennt nur zwei mögliche Stellwerte. Überschreitet die Sollwertabweichung einen bestimmten Betrag, dann schaltet der Regler. Ist sie wieder kleiner oder gleich Null, dann schaltet er zurück. Je höher die Abtastfrequenz bei der Ermittlung der Regelgröße ist desto besser ist die Regelqualität. Ein großer Nachteil dieses Reglers ist, dass es in der Praxis leicht zu einer Oszillation der Regelgröße kommt. Daher ist dieser Reglertyp nur sehr bedingt für industrielle Anwendungen geeignet. Wesentlich robuster ist der PID-Regler. Sein Konzept ist analoger Natur und ermöglicht eine kontinuierliche Prozessregelung. Viele kommerziell erhältliche Fermenter benutzen heutzutage den PID-Regler z. B. zum Einstellen der Gelöstsauerstoffkonzentration über die Rührerdrehzahl. Der PID-Regler kann gemäß Gleichung (2.14) auch durch einen digitalen Algorithmus beschrieben werden, der sich bei genügend hoher Abtastfrequenz wie ein analoger verhält:

$$u(k) = K \left(e(k) + \frac{T_0}{T_I} \sum_{i=0}^{k-1} e(i) + \frac{T_D}{T_0} e(k) - e(k-1) \right) \quad (2.14)$$

$u(k)$ ist der Stellwert, $e(k)$ die Sollwertabweichung zum Zeitpunkt $t = k \cdot T_0$, T_0 ist das Abtastzeitintervall, K der Verstärkungsfaktor, T_I die Nachstellzeit und T_D die Vorschaltzeit.

Weitaus problematischer erweist sich die Regelung anderer Prozessgrößen wie der Substratkonzentration in der Kulturbrühe. Die direkte Bestimmung der Substratkonzentration ist mit einer Probenahme aus dem Reaktor und einer anschließenden Aufarbeitung der Probe verbunden. Möglichkeiten bieten hier die Fließinjektionsanalyse [Hüll, 2006; Arndt, 2003] oder die HPLC [Lenas et al., 1997]. Nachteilig bei beiden Systemen ist die geringe Messfrequenz und der z. T. erhebliche Zeitaufwand von bis zu 10 min für die Aufarbeitung und Durchführung der Analyse. Die Messwerte stehen für einen Regelkreis erst mit einer zeitlichen Verzögerung zur Verfügung. Zur Durchführung der Regelung sind erheblich komplexere Algorithmen erforderlich. Verwendet werden im allgemeinen verschiedene Zustandsbeobachter/schätzer, die mit Hilfe eines geeigneten Modells und den Messwerten auf den Prozesszustand zu reagieren. Hüll und Arndt verwenden dafür bei der Kultivierung von *E. coli* bzw. *S. cerevisiae* das kontinuierlich-diskrete erweiterte Kalman-Filter mit einem auf der Monod-Kinetik basierenden Zustandsmodell [D. Hüll, 2006; Arndt, 2003]. Basierend auf den Schätzungen der Prozessgrößen Biomasse, Glucosekonzentration, Volumen sowie maximaler Wachstumsrate wurde ein Feedforward-Feedback-Regler zur Regelung der Glucosekonzentration etabliert. Andere Verfahren basieren auf der Verwendung eines adaptiven Fuzzy-Kontrollers [Lenas et al., 1997; Miśkiewics und Kasperski, 2000] oder verwenden neuronale Netze [Mjalli und Al-Sheh, 2005]. Die Regelgüte hängt stark vom Modell und den verwendeten Parametern ab. Eine Übertragung auf einen anderen Mikroorganismus ist nur nach einer detaillierten Anpassung möglich.

Einen anderen Ansatz bietet die Etablierung eines Regelsystems auf der Basis indirekter Messung. In diesem Falle wird nicht die Substratkonzentration selbst gemessen. Die Regelung basiert auf der Bestimmung anderer Prozessgrößen, die online zugänglich sind. Ein in der Literatur mehrfach beschriebenes Verfahren ist die Prozessregelung über die Messung des Gelöstsauerstoffgehaltes ([Åkesson et al., 1999], [de Mare et al., 2003]). Beide verwenden als Regelstrategie das sogenannte Probing. Dazu wird das Verhalten des Gelöstsauerstoffgehaltes

bei kurzen, pulsartigen Änderungen der Feedrate untersucht. In Abbildung 2.4 sind die grundlegenden Überlegungen des Probings dargestellt.

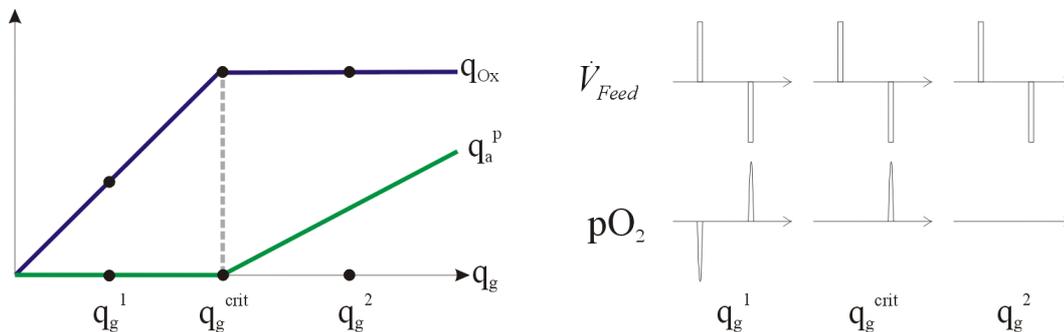


Abbildung 2.4: Beziehungen zwischen der Glucoseaufnahme q_g , der Sauerstoffaufnahme q_{ox} , und der Actetatproduktion q_a^p (links) sowie die idealen Antworten im Verhalten des gelöstsauerstoffs pO_2 bei Glucosepulsen in der Feedrate \dot{V}_{Feed} bei Glucoseaufnahme-raten unter- und oberhalb von q_g^{crit} sowie genau bei q_g^{crit} (rechts).

Bei einer sehr niedrigen Feedrate liegt die Glucoseaufnahme q_g^1 unter q_g^{crit} und die Sauerstoffaufnahme q_{ox} unterhalb des Maximalwertes. Wird die Feedrate kurzfristig erhöht sinkt der pO_2 -Wert, bei einer Erniedrigung steigt er. Liegt die Glucoseaufnahme genau bei q_g^{crit} kein zusätzlicher Sauerstoff mehr aufgenommen. Lediglich bei der Reduzierung der Feedrate zeigt das System eine Änderung des pO_2 -Wertes. Keinerlei Reaktion ist zu erwarten, wenn die Glucoseaufnahme q_g^2 größer als q_g^{crit} ist. Je nach der vom System gezeigten Antwort wird nun die Feedrate falls erforderlich um einen definierten Betrag geändert. Zwischen zwei Pulsen wird der pO_2 -Wert mit einem PID-Regler durch Änderung der Rührerdrehzahl konstant gehalten. Der große Vorteil dieses Systems ist, dass es keine organismusspezifischen Größen und Parameter verwendet und somit universell einsetzbar ist.

2.5 Fließinjektionsanalyse

Eine Möglichkeit zur Onlinemessung der Glucosekonzentration im Fermenter bietet die Fließinjektionsanalyse (FIA). Diese Art der Analyse wurde erstmals 1974 von Ruzicka und Hansen vorgestellt. Sie kann zur quantitativen Analyse einer großen Anzahl von Substanzen verwendet werden, z. B. zur Bestimmung des Nitratgehaltes in Milchprodukten oder zur SO_2 -Analyse in Weinen. Bei der Fließinjektionsanalyse wird ein definiertes Volumen der Probe in einen kontinuierlich fließenden, nicht segmentierten Trägerstrom injiziert und über ein Manifold, der Vermischungs- und Reaktionsstrecke, dem Detektor zugeführt. Die Probe kann dabei mit anderen injizierten oder bereits im Trägerstrom enthaltenen Substanzen reagieren und das

detektierbare Produkt bilden. Eine oftmals angewendete Methode ist die Reaktion mit Hilfe eines stationären Katalysators. Hierzu eignen sich vor allem Enzyme, die auf einem Trägermaterial in einer Kartusche immobilisiert sind. Durch die bekannte Stöchiometrie der Nachweisreaktion lässt sich mittels geeigneter Auswerteverfahren die Konzentration des Analyten berechnen.

Zur Bestimmung der Glucose-Konzentration in der Probe wird als Reaktion die Dehydrierung von Glucose durch das Enzym Glucoseoxidase (GOD) verwendet (siehe Abbildung 2.5). Dabei erfolgt selektiv die Reaktion von Sauerstoff mit β -D-Glucose zu β -D-Glucono- δ -lacton und Wasserstoffperoxid. Durch Hydrolyse entsteht abschließend D-Gluconsäure.

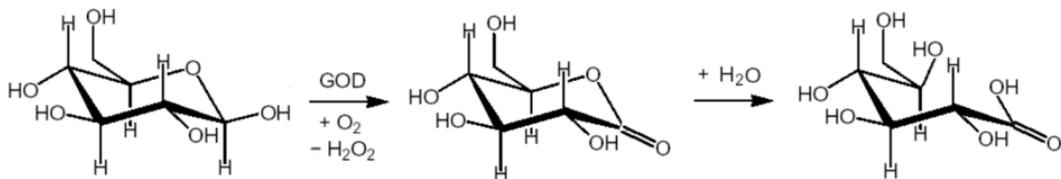
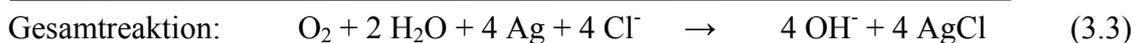


Abbildung 2.5: Umsetzung von Glucose durch GOD zu Gluconsäure

Als Detektionsgröße wird der zur Glucosekonzentration proportionale Sauerstoffverbrauch gemessen. Dies geschieht amperometrisch mit einer Clark-Elektrode. Diese besteht aus einer zylinderförmigen Silberanode, in dessen Mitte sich eine Platinkathode befindet. Als Elektrolytlösung wird viermolare KCl-Lösung verwendet. Durch eine selektiv sauerstoffdurchlässige Membran werden Anode, Kathode und Elektrolyt vom umgebenden Trägerstrom getrennt. Von Außen her können Sauerstoffmoleküle ins Innere der Clark-Elektrode diffundieren. Durch eine zwischen Anode und Kathode angelegte Polarisierungsspannung läuft die folgende Reaktion ab:



Bei der FIA erreichen weder die Vermischung der Probenzone noch die Reaktion in der Regel einen Gleichgewichtszustand. Dies macht das System anfällig für Änderungen von Systemparametern wie Enzymaktivität, Strömungsgeschwindigkeit des Trägerstromes oder Temperaturschwankungen. Durch eine Automation lassen sich diese Fehler jedoch minimieren.

3 Material und Methoden

3.1 Fluoreszenzspektrometer

In dieser Arbeit werden zwei 2D-Fluoreszenzspektrometer verwendet. Mit dem F-4500 der Fa. Hitachi, Japan, werden Küvettenmessungen mit Lösungen von Fluoreszenzfarbstoffen durchgeführt. Bei Fedbatch-Kultivierungen von *S. cerevisiae* und *E. coli* wird ein Bioview der Fa. Delta Danish Electronics Light & Acoustic, Dänemark, zur Beobachtung und Regelung eingesetzt.

3.1.1 Hitachi F-4500

Das F-4500 verwendet als Lichtquelle eine 150 W Xenon-Lampe, die eine hohe Lebensdauer und eine hohe Lichtausbeute besitzt. Zur Kompensation von Intensitätsschwankungen der Lampe bei unterschiedlichen Wellenlängen wird ein Teil des Anregungslichtes auf einen Referenzphotomultiplier gelenkt und mit einem Shutter eine konstante Lichtintensität eingestellt. Die Selektion der Emissions- und Exzitationswellenlängen erfolgt durch Gittermonochromatoren. Hierzu werden Konkavgitter mit 900 Linien/mm verwendet. Die Probelösung wird in eine 10 mm Standardküvette eingebracht. Abbildung 3.1 zeigt den schematischen Aufbau des Gerätes.

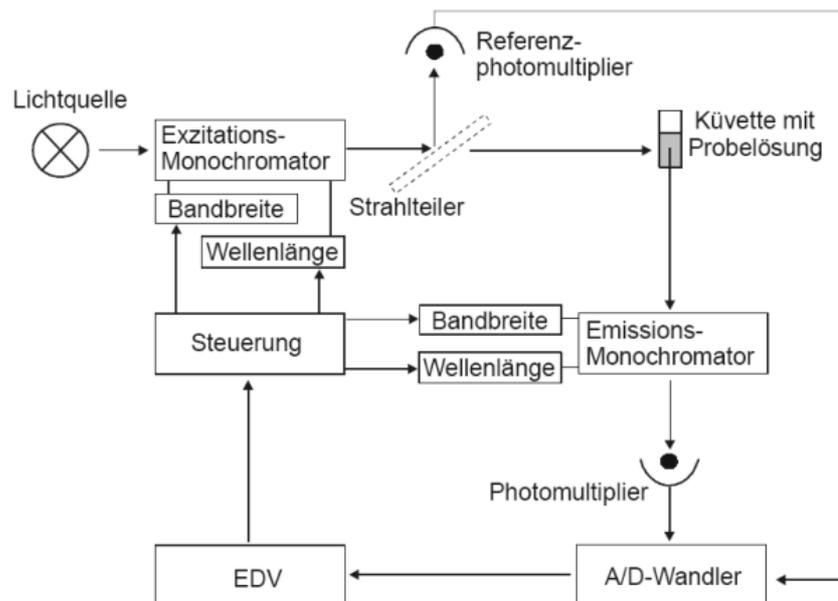


Abbildung 3.1: Schematischer Aufbau des F-4500 [Hitachi, Japan].

Durch die Verwendung des Gittermonochromators lassen sich die zu messenden Wellenlängenabstände beliebig einstellen, durch die Geräte-Software ist diese jedoch auf einen minimalen Abstand von 5 nm festgelegt. Die Spaltbreite der Gittermonochromatoren kann auf 2,5 nm, 5 nm, 10 nm und 20 nm eingestellt werden. Die Angabe der Fluoreszenzintensitäten erfolgt in RFI (Relativen Fluoreszenzintensitäten) mit Beträgen zwischen 0 und 10.000.

3.1.2 *Bioview*

Der Bioview wurde im Rahmen eines EU-BriteEuram-Projektes entwickelt [Marose, 1998; Lindemann, 1998]. Er ist speziell für den Einsatz zur Onlineanalyse in der Industrie konzipiert. In Abbildung 3.2 ist der Aufbau schematisch dargestellt.

Als Lichtquelle dient wie beim F-4500 eine Xenon-Lampe. Um die Lebensdauer zu erhöhen wird diese jedoch gepulst. Zur Auswahl der für die Messung benötigten Exzitations- und Emissionswellenlängenbereiche werden zwei unabhängig voneinander steuerbare, rotierende Filterräder mit jeweils 16 verschiedenen Filtern verwendet. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Bioview (Serien-Nr. 9, Baujahr 09/1998) wurden Filter im Abstand von 20 nm und einer Bandbreite von 20 nm verwendet. In Tabelle 11.1 im Anhang sind die aus den verwendeten Filtern resultierenden Messpunkte dargestellt.

Der Bioview ist über einen Flüssiglichtleiter an einen 25mm-Standardport mit dem Reaktor verbunden. Dazu wird ein Adapter verwendet, der durch eine Quarzglas-Scheibe nicht-invasive Fluoreszenzmessungen in-situ ermöglicht. Die Messung erfolgt im Open-end-Prinzip.

Zur Steuerung ist der Bioview über eine serielle Schnittstelle mit einem PC (Modell 1300, Fa. Transtec, Hannover) mit einer Pentium III 800 EB CPU (Intel, USA), 256 MB SDRAM Hauptspeicher, Windows ME (Microsoft, USA) verbunden, als Steuerungssoftware wird BioView 3.3.19 (Fa. Delta Danish Electronics Light & Acoustic, Dänemark) verwendet. Die Software ermöglicht für jede Wellenlängenkombination eine individuelle Einstellung des Photomultiplier-Gain, um somit die Intensität des gemessenen Fluoreszenzlichtes zu steuern. Dabei werden die Einstellungen so gewählt, dass die zu erwartenden Intensitäten innerhalb des Messbereichs (0 bis 4096) liegen. Für *S.-cerevisiae*- und *E.-coli*-Kultivierungen werden jeweils unterschiedliche Einstellungen verwendet. Diese sind im Anhang in Tabelle 11.2 zusammengefasst. Um das Messrauschen zu kompensieren werden alle Messungen als Dreifachbestimmung durchgeführt und als Mittelwert ausgegeben.

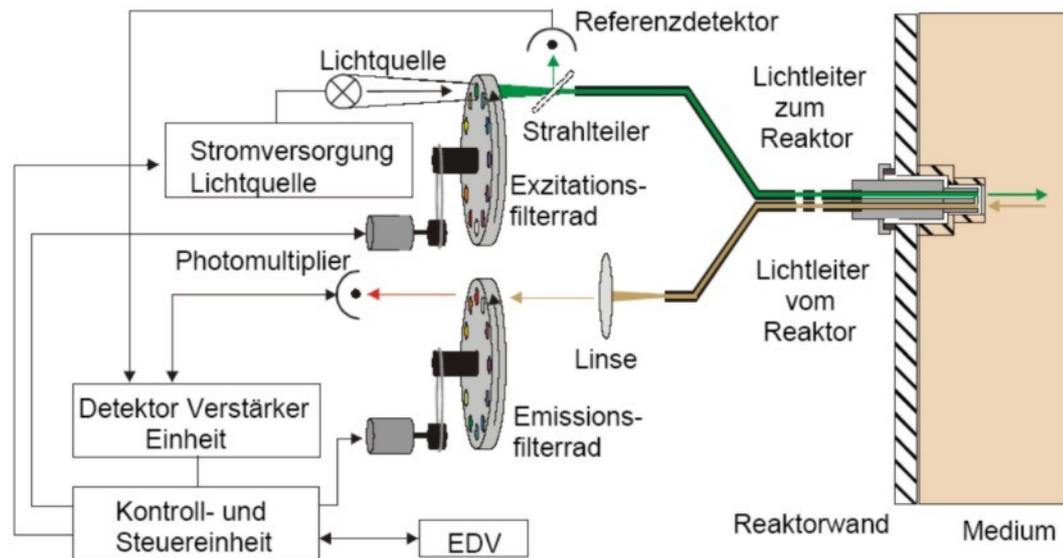


Abbildung 3.2: Schematischer Aufbau des Bioview (Delta Light & Optics, Dänemark) [Lindemann, 1998]

Der Vorteil des Bioview gegenüber dem F-4500 ist seine Unempfindlichkeit gegenüber Umwelteinflüssen. Das Gehäuse ist aus Edelstahl gefertigt und schützt vor mechanischer Beanspruchung und Feuchtigkeit. Zur Kommunikation zwischen Bioview und Steuerungs-PC kann ein Lichtwellenleiter verwendet werden, so dass die Datenübertragung gegen elektromagnetische Einflüsse geschützt ist und über große Strecken erfolgen kann. Der PC kann in einer Leitwarte aufgestellt werden und ist nicht den Bedingungen der Produktionshallen ausgesetzt. Nachteilig ist gegenüber dem F-4500 seine geringe Auflösung.

3.2 Versuchsaufbau der Fedbatch-Kultivierungen

Bei allen Fedbatch-Kultivierungen wird ein identischer Versuchsaufbau verwendet (siehe Abbildung 3.3). Im Verlauf der Versuchsreihen wurden lediglich einzelne Komponenten ausgetauscht. In Tabelle 3.1 sind die verwendeten Komponenten zusammengefasst.

Als Reaktor dient ein Edelstahlreaktor (Feinmechanikwerkstatt Institut für Technische Chemie, Universität Hannover) mit Mantelkühlung und einem Reaktorvolumen von 2 L bzw. 2,5 L. Im Deckel des Reaktors sind jeweils ein Thermoelement (Pt-100, Fa. Braun Biotech, Melsungen), eine Sauerstoffelektrode (INPRO 6000, Fa. Mettler-Toledo, USA), eine pH-Elektrode (FermProbe T635, Fa. Boadley & James, USA) sowie bei mehreren Kultivierungen ein Probenahmemodul (FISP E19-01, Flownamics Analytical Instruments Inc., USA) installiert. Das Probenahmemodul ist mit einer Glucose-FIA [ANASYSCON Instrumentelle Analystechnik, Hannover] verbunden.

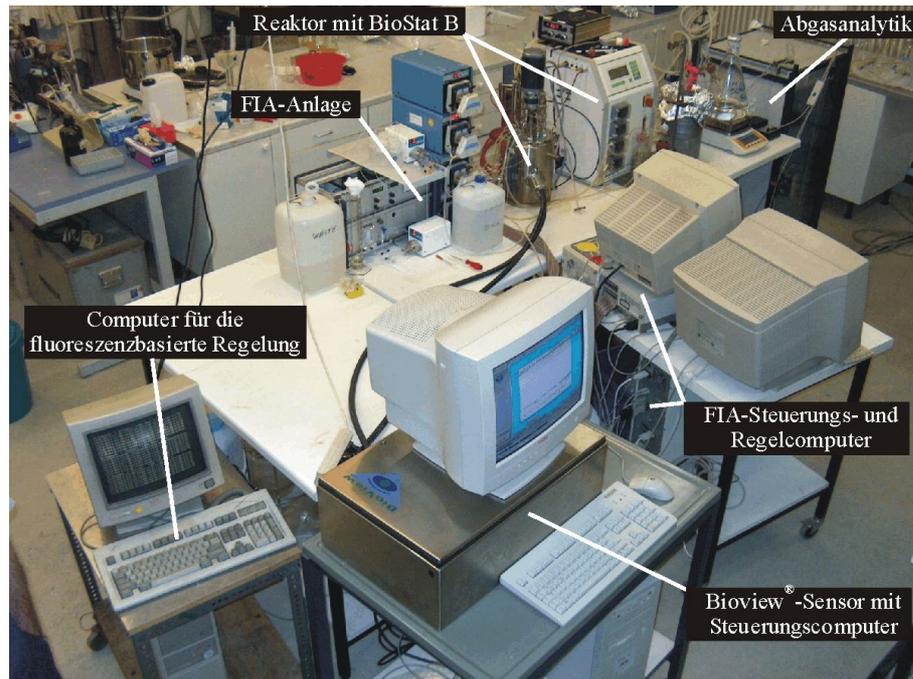


Abbildung 3.3: Der Versuchsaufbau der *S.-cerevisiae*-Kultivierungen

Des Weiteren befinden sich Anschlüsse für die Zu- und Abluft, Säure und Base, Offlineprobenahme, Glucosezugabe sowie ein Septum für die Zugabe von Lösungen im Reaktordeckel. In der Reaktorwand befinden sich neben einem Sichtfenster noch ein 25 mm-Standardport, an den der Sensorkopf des Bioview angeschlossen ist. Überwacht und geregelt wird die Kultivierung von einer Biostat-B-Einheit (Fa. B. Braun Biotech, Melsungen). Der gekühlte Abluftstrom ist mit einer Abgasanalytik verbunden. Hier wurde zunächst ein EGAS 2 der Firma Hartmann & Braun, Frankfurt a. M., verwendet, später ein S710-System der Firma Sick Maihak, Düsseldorf. Zur Berechnung der zugeführten Glucosemenge steht das Glucose-Vorratsgefäß auf einer digitalen Waage (CP 8201, Sartorius, Göttingen).

Die Regelung des pH-Werts erfolgt bei den *S.-cerevisiae*-Kultivierungen mit 10-%-iger Natronlauge und viermolarer Salzsäure, bei den *E.-coli*-Kultivierungen mit 25-%-iger Ammoniaklösung und 10-%-iger Schwefelsäure. Die Aufzeichnung und Visualisierung der Online-daten des Biostat B, der Waage und der Abgasanalytik im laufenden Versuch erfolgt durch die Software RISP (Realtime Integrating Software Platform, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover) auf einer Vax-Workstation. Die durchgeführten Online- und Offline-analytik ist in den Kapiteln 3.6 und 3.7 beschrieben.

Tabelle 3.1: Komponenten des Versuchsaufbaus der Kultivierungen FB1 bis FB6 und EC1 bis EC4

Kultivierung	FB1	FB2	FB3	FB4	FB5	FB6	EC1	EC2	EC3	EC4
Reaktorvolumen [L]	2,0		2,5			2,0				
Abgasanalytik	EGAS 2		S710			EGAS 2				
Probenahmemodul und FIA	ja		nein	ja		nein				

3.3 Durchführung der Vorkulturen

3.3.1 *E. coli*

In einem 500 mL Erlenmeyerkolben mit Schikanen werden 100 mL LB-Medium autoklaviert und mit 80 μ L einer Lösung von Chloramphenicol in Ethanol (Konzentration 34 g/L) versetzt. Zum Animpfen wird das Medium mit einem Aliquot einer bei -80 °C gelagerten Glycerinkultur versetzt. Die Vorkultur wird anschließend bei 37 °C und 175 rpm in einem Schüttelschrank bis zu einer optischen Dichte von ca. 1 inkubiert und der Reaktor mit 40 mL der Vorkultur angeimpft.

3.3.2 *S. cerevisiae*

In einem 300 mL Erlenmeyerkolben mit Schikanen und Animpfnadel werden 350 mg Natriumcitrat in 50 mL Schatzmannmedium für Vorkulturen gelöst. Nach dem Autoklavieren werden die Glucose und die Vitamine in 10 mL zweifach demineralisiertem Wasser gelöst und mit einer Spritze über einen Sterilfilter unter einer Cleanbench hinzugegeben. Anschließend wird mit einer bei auf Schrägagar gehaltenen Kultur angeimpft. In einem Schüttelschrank wird die Kultur bei 30 °C und 120 rpm durchgeführt nach ca. 24 h Inkubationszeit wird der Reaktor mit dem gesamten Medium angeimpft.

3.4 MATLAB[®]-Software

MATLAB[®] (Abkürzung für Matrix Laboratory) ist ein numerisches Berechnungs- und Simulationswerkzeug, das von der Fa. The MathWorks, Inc., USA, entwickelt wurde. Zur Lösung spezieller Problemfelder können diverse Funktionsbibliotheken, sogenannte Toolboxen, geladen werden. In dieser Arbeit wird MATLAB[®] in der Version 6.5.0 Release 13 zur Simulation von Fedbatch-Kultivierungen (Kapitel 4.5) und zur Interpolation von Messwerten (Kapitel 8)

verwendet. Als Plattform dient ein PC [TFC, Hannover] mit einer AMD Athlon 1200C CPU und 512 MB SDRAM Hauptspeicher. Als Betriebssystem wird Windows XP Professional [Microsoft, USA] verwendet.

Ziel der Simulationen ist die Anpassung der Startparameter sowie die Bestimmung der benötigten Volumenströme der Feedpumpe und der Glucose-Konzentration in der Feed-Lösung bei den Kultivierungen FB2 bis FB6 werden mit MATLAB[®] unter Verwendung der Toolbox SIMULINK[®] 4.0 Simulationen der Kultivierung durchgeführt. Dazu wurde das Zustandsmodell des Regelprogramms (siehe Kapitel 4.5) nach SIMULINK[®] exportiert und ein Unterprogramm zur Berücksichtigung der Pumpenparameter erweitert. Ebenso wurde die Probenahme für die Offlineanalytik berücksichtigt. Die Anfangsparameter werden so gewählt, dass eine Kultivierungszeit von mindestens 10 h erwartet werden kann. Das SIMULINK[®]-Modell ist in Kapitel 11.6 dargestellt.

Zur Berechnung von Messwerten durch Interpolation werden drei in MATLAB bereits implementierte Methoden verwendet. In Tabelle 3.2 sind diese Methoden zusammengefasst. Dazu wurden zunächst die Excel-Tabellen von MATLAB eingelesen und die Anzahl der Messwerte auf die gewünschte Anzahl reduziert. Anschließend wurden die fehlenden Messwerte jeweils durch Interpolation berechnet.

Tabelle 3.2: Verwendete Methoden des Programms MATLAB zur Interpolation

Methode	Beschreibung
linear	Schrittweise lineare Interpolation basierend auf den benachbarten zwei Messwerten.
spline	Interpolation durch schrittweise Berechnung eines Polynoms zwischen acht Messwerten.
cubic	Schrittweise kubische Interpolation basierend auf den benachbarten 64 Messwerten.

3.5 Chemometrische Modelle

3.5.1 Preprocessing

Für die Erstellung der chemometrischen Modelle müssen die Daten der 2D-Fluoreszenzspektrometer zunächst in die erforderliche Datenstruktur gebracht werden. Jede Messung

liefert als Ergebnis eine Datenmatrix. Für mehrere Messungen erhält man eine Hypermatrix mit 3 Indices, die man sich als Datenquader vorstellen kann. Für die Hauptkomponentenanalyse und für die Erstellen der Modelle müssen diese Daten entfaltet werden. Dazu werden alle Intensitäten einer Messung einfach hintereinander in einer Zeile geschrieben. Alle Messungen werden anschließend untereinander geschrieben (siehe Abbildung 3.4). Dadurch erhält man die Datenmatrix X , die in den Zeilen jeweils die Daten einer Messung und in den Spalten die Intensitäten einer Wellenlängenkombination enthält. Die Prozessvariablen liegen als Y -Matrix vor. Jede Spalte enthält eine Prozessvariable, jede Zeile eine Messung. Die Zeitpunkte der Messungen der y -Variablen muss denen der x -Variablen entsprechen. Da dies nicht bei allen Prozessvariablen möglich war, wurden die Werte für die Biomasse und die optische Dichte aus den Werten der Offlineproben durch einen Polynomen interpoliert.

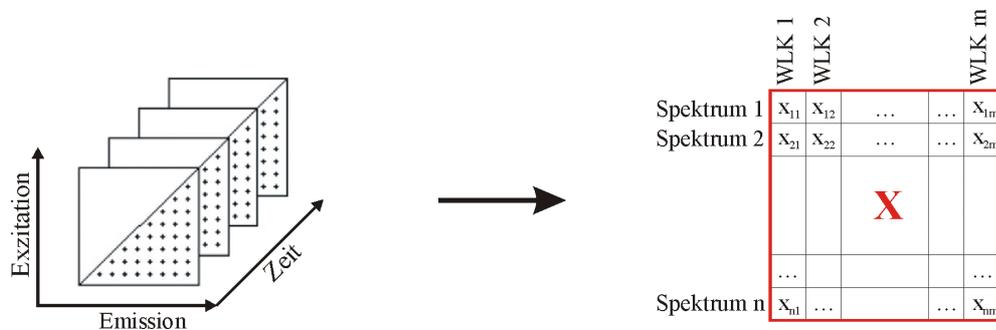


Abbildung 3.4: Die für die Modellbildung benötigten Daten als Hypermatrix (links) und als Variablenmatrix X (rechts)

3.5.2 *The Unscrambler*[®]

Die Berechnung der Modelle erfolgt mit der Software *The Unscrambler*[®], Version 7.6, von der Firma CAMO ASA, Norwegen. Mit dieser Software ist eine einfache Auswahl der gewünschten Berechnungen aus den zur Verfügung stehenden Verfahren möglich. Die verschiedenen Darstellungsmöglichkeiten der Ergebnisse, die dieses Programm zur Verfügung stellt, ermöglichen eine schnelle Interpretation der Modelle und Beurteilung der Modellgüte.

Zur Analyse der Struktur der Messdaten wird zunächst eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt. Die Ergebnisse der PCA geben Aufschluss über die Variationen innerhalb eines Prozesses. Die Anzahl der Hauptkomponenten wird über den minimalen RMSEC der Validierung und über die Analyse der Gesamtvarianz bestimmt. Die interne Validität wird über eine Kreuzvalidierung bestimmt, die externe über die Berechnung des RMSEC. Die Modelle werden generell als PLS1-Modelle berechnet.

Für die Onlineanwendung werden die Mittelwerte und die Regressionskoeffizienten exportiert und in einer Datei gespeichert. Diese Datei wird vom Regelungsprogramm *MB-Wert* (siehe Kapitel 4.6) eingelesen und zur Vorhersage verwendet.

3.6 Onlineanalytik

3.6.1 Fließinjektionsanalyse

In Abbildung 3.5 ist das verwendete FIA-System (ANASYSCON Instrumentelle Analystechnik, Hannover) schematisch dargestellt.

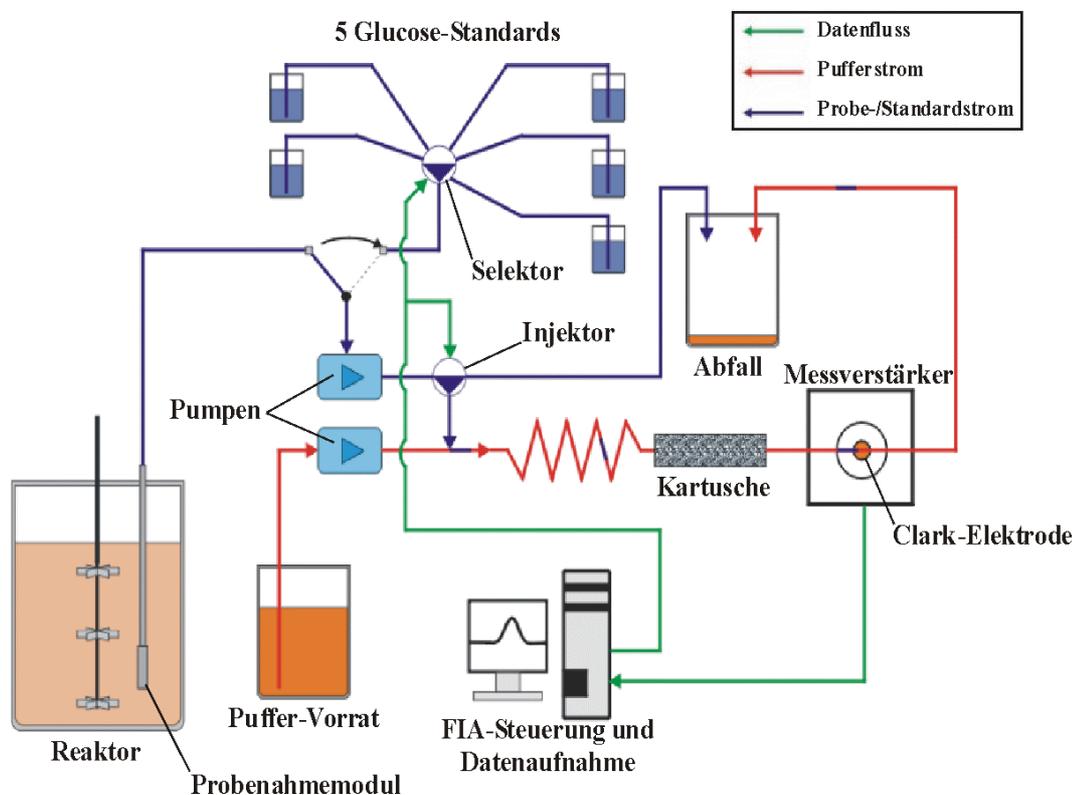


Abbildung 3.5: Schematischer Aufbau des verwendeten FIA-Systems

Durch ein Probenahmemodul (Modell FISP E-1901, Flownamics Analytical Instruments, Inc., USA) wird durch eine Peristaltikpumpe (ACCU CP10, SciLog, USA; Pumpkopf: Masterflex, Cole-Palmer Instrument Co., Illinois) kontinuierlich 41 mL/h zellfreie Probe aus dem Reaktor gezogen. Parallel dazu fördert eine weitere Pumpe gleicher Bauart einen konstanten Trägerstrom mit FIA-Puffer (siehe Kapitel 11.5). Durch ein Injektionsventil (K-6 Ventilantrieb mit 6 Port/3 Kanal, Knauer, Berlin) werden je Messung 10 mL Probe in den Puffer-Strom injiziert. Die Reaktion von Glucose erfolgt in einer Enzymkartusche, in der auf einem Polymerträger

100 Units GOD immobilisiert sind. Als Detektor dient eine Clark-Elektrode mit Messverstärker. Zur Steuerung der FIA und zur Datenaufzeichnung wird ein PC (Compaq Proliea 590, Pentium I CPU mit 90 MHz, 24 MB EDO Hauptspeicher, Betriebssystem MS-DOS 6.00, Microsoft, USA) verwendet, der über eine AD/DA-Wandlerkarte (AX-5210, Axiom, Taiwan) mit der FIA verbunden ist.

Als Software wird das von der Fa. ANASYSCON Instrumentelle Analysetechnik, Hannover, vertriebene Programm CAFCA (Computer Assisted Flow Control & Analysis) verwendet. Als Auswertekriterium dient die Höhe des FIA-Peaks relativ zur Grundlinie, die im Messbereich linear proportional zur Glucose-Konzentration ist.

Die Kalibration erfolgt mit 5 Glucose-Standards mit Konzentrationen von 0 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L, 75 mg/L und 100 mg/L Glucose in FIA-Puffer. Die Glucosestandards werden über einen Selektor (K-6 Ventiltrieb, 7 Port/1 Kanal Schaltventil, Knauer, Berlin) alternativ zum Probestrom in das Fließsystem eingekoppelt. Die Kalibration erfolgt als Dreifachbestimmung. Die FIA-Messungen wurden von *Hüll* durchgeführt [Hüll, 2006].

3.6.2 Abgas (Sauerstoff und Kohlendioxid)

Im Abgas werden die Volumenkonzentrationen von Sauerstoff und Kohlendioxid gemessen. Bei den *S.-cerevisiae*-Kultivierungen FB1 bis FB3 und FB6 sowie bei allen *E.-coli*-Kultivierungen erfolgt die Messung mit einem EGAS 2 [Fa. Hartmann & Braun, Frankfurt a.M], bei den Kultivierungen FB4 und FB5 wird ein S710-System mit UNOR und OXOR [Sick Maihak, Düsseldorf] verwendet. Beide Systeme verfügen über den gleichen schematischen Aufbau und unterscheiden sich nur im Prinzip der Sauerstoffmessung. Zunächst erfolgt durch einen Messgaskühler die Trocknung des Messgases. Durch eine Pumpe wird ein konstanter Volumenstrom des Abgases den Analysegeräten zugeführt. Die quantitative Bestimmung des Kohlendioxidgehaltes erfolgt in beiden Meßsystemen durch die Messung der IR-Absorption bei charakteristischen Wellenlängen. Zur Messung des Sauerstoffgehaltes verwendet das EGAS 2 eine elektrochemische Zelle, die einen mit Yttriumoxid dotierten Zirkondioxid-Festelektrolyten enthält. Dieser Elektrolyt enthält Sauerstoffleerstellen und durch Anlegen einer Spannung von 0,4 – 1,0 V wird ein von der Sauerstoffionenkonzentration des Gases abhängiger Gleichstrom erzeugt. Das S710-System verwendet ein paramagnetisches Messprinzip.

3.6.3 pH-Wert

Die Messung des pH-Wert wird mit einer autoklavierbaren Gelelektrode (FermProbe T635, Fa. Broadley & James, USA) durchgeführt. Die Kalibration der Elektrode erfolgt bei jeder Kultivierung vor dem Einbau in den Reaktordeckel mit zwei Pufferlösungen (pH 4,0 und pH 7,0, Fa. Mettler-Toledo, USA). Die pH-Elektrode ist mit der Regeleinheit des Biostat B verbunden.

3.6.4 pO₂-Wert

Der Gelöstsauerstoff wird als Sauerstoffpartialdruck amperometrisch mit Hilfe einer autoklavierbaren Elektrode (Inpro 6000, Fa. Mettler-Toledo, USA) gemessen. Die Kalibration der Elektrode erfolgt nach dem Autoklavieren im Fermenter. Zuvor lässt man die Elektrode über einen Zeitraum von mindestens 6 h polarisieren. Bei der Kalibration wird zunächst durch Begasung mit reinem Stickstoff der 0%-Wert eingestellt. Durch Begasung mit Druckluft unter Kultivierungsanfangsbedingungen wird anschließend der 100%-Wert eingestellt. Durch eine Erhöhung der Sauerstoffkonzentration in der Zuluft im Verlauf einer Kultivierung sind pO₂-Werte von über 100 % möglich.

3.7 Offlineanalytik

Für die Offlineanalytik werden jeweils 10 mL Vorlauf und 10 mL Probe der Kulturbrühe aus dem Reaktor gezogen. Von jeder Probe werden je Analyse zwei Bestimmungen durchgeführt, bei der Messung der optischen Dichte (OD) drei.

3.7.1 BTM

Die Bestimmung der Biotrockenmasse erfolgt gravimetrisch. Dazu werden jeweils 1,6 mL der Probe in ausgeheizte und ausgewogene 2-mL Mikroreaktionsgefäße gefüllt und mit einer Zentrifuge (Typ 5415 D, Fa. Eppendor, Hamburg) 2 min bei 10 kU/min abzentrifugiert. Der Überstand wird für die Ethanol-, Acetat- und Glucose-Analysen bei -18°C eingefroren. Die Zellpellets werden für mindestens 24 h bei 100 °C in einem Trockenschrank getrocknet. Nach dem Abkühlen in einem Exsikkator werden die Mikroreaktionsgefäße erneut ausgewogen.

3.7.2 Acetat

Die Bestimmung von Acetat erfolgt photometrisch mit dem UV-Test Essigsäure (Acetat) der Firma Boehringer Mannheim/R-biopharm, Darmstadt. Durch eine enzymkatalysierte Reaktion

wird in diesem Test das Acetat zunächst zu Acetyl-Coenzym-A und anschließend mit Oxalacetat zu Citrat und Coenzym A umgesetzt. Zur Bildung des für die Reaktion benötigten Oxalacetats aus L-Malat wird NAD^+ zu NADH reduziert. Die Acetatkonzentration lässt sich durch die Messung der Extinktion des NADH bei 340 nm mit einem UV/VIS-Spektrometer (Cary 50 Bio UV/VIS Spektrometer, Fa. VARIAN, Darmstadt) bestimmen. Da das Testkit für einen Messbereich von 0,03 bis 0,15 g/L Acetat ausgelegt ist muss die Probe gegebenenfalls mit Wasser verdünnt werden.

3.7.3 Ethanol

Der Ethanolgehalt wird gaschromatographisch aus dem Überstand der abzentrifugierten Probe bestimmt. Dazu wird ein GC14-B Gaschromatograph der Fa. Shimadzu, Japan unter Verwendung der Class VP 4.2-Software verwendet. Die Kalibration erfolgt durch eine Zwei-Punkt-Kalibration mit 0,05 g/L und 0,50 g/L Ethanol. Als interner Standard wird 8,00 g/L n-Propanol verwendet.

Tabelle 3.3: Verwendete Gase

Gas	Verwendung	Druck [kPa]
Stickstoff	Trägergas P	500
	Trägergas M	330
Wasserstoff	Brenngas	65
Luft	Brenngas	50

Tabelle 3.4: Parameter des Temperaturprogramms, Laufzeit = 10 min

	Temperatur [°C]	Typ
Injektor	275	
Säule	70 – 190	Chromosorb 101, 80/100, 6' x 18
Detektor	250	Flammenionisationsdetektor

3.7.4 Glucose

Zur Offlineanalyse von Glucose stehen zwei Methoden zur Verfügung. Bei Konzentrationen bis 0,1 g/L wird der Reflectoquant[®]-Glucosetest der Fa. Merck, Darmstadt, verwendet, bei höheren Konzentrationen findet der YSI Analysator Modell 2700 Select der Fa. Yellow Springs Instruments, USA, Anwendung.

3.7.4.1 *Reflectoquant*[®]-Glucosetest

Dieser Test der Fa. Merck, Darmstadt, verwendet das Reflektometer RQflex plus[®] und Teststreifen, auf denen das Enzym Glucoseoxidase fixiert ist. Das Reaktionsprinzip der Glucoseoxidase mit der Glucose ist in Kapitel 3.6.1 dargestellt. Das bei der Reaktion gebildete Wasserstoffperoxid reagiert mit dem Farbstoff des Teststreifens. Die Farbintensität wird als Maß der Glucosekonzentration gemessen. Die Angabe erfolgt in g/L.

3.7.4.2 *YSI Analytator Modell 2700 Select*

Im YSI Analytator wird die Glucose durch Glucoseoxidase umgesetzt, die auf einer Membran fixiert ist. Das bei der Reaktion entstehende Wasserstoffperoxid wird an einer Platinelektrode elektrochemisch zu Sauerstoff umgesetzt. Die daraus resultierende Stromstärke ist proportional zur Glucosekonzentration. Die Kalibration des Gerätes erfolgt automatisch mit einem 2 g/L-Glucosestandard.

3.7.5 *Optische Dichte*

Die optische Dichte wird als Extinktion mit einem Zweistrahl-Spektralphotometer (Uvicon 940, Fa. Konton, Neufarn) gemessen. Zur Vermeidung von Verdünnungsfehlern werden jeweils drei Parallelbestimmungen durchgeführt.

3.7.5.1 *S. cerevisiae*

Die optische Dichte der Kulturbrühe wird bei einer Wellenlänge von 590 nm gegen eine 0,9-%-ige NaCl-Lösung gemessen. Bei einer Extinktion von mehr als 0,7 liegt die Messung außerhalb des linearen Bereichs des Photometers und die Probe wird mit 0,9-%-iger NaCl-Lösung verdünnt und die Messung erneut durchgeführt.

3.7.5.2 *E. coli*

Die optische Dichte der Kulturbrühe wird bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen demin. Wasser gemessen. Bei einer Extinktion von mehr als 0,3 liegt die Messung außerhalb des linearen Bereichs des Photometers und die Probe wird mit demin. Wasser verdünnt und die Messung erneut durchgeführt.

4 Fedbatch-Kultivierungen von *Saccharomyces cerevisiae*

In der industriellen Produktion werden Kultivierungen von *S. cerevisiae* in der Regel im Fedbatch-Verfahren durchgeführt. Zunächst wird dabei ein exponentielles Feedprofil gefahren. Dabei stellt sich oxidatives Wachstum mit einer Wachstumsrate gemäß dem Exponenten ein. Aufgrund des Crabtree-Effektes kann es dabei zur Produktion von Ethanol kommen. In einer anschließenden Phase mit einer konstanten Feedrate wird das produzierte Ethanol wieder abgebaut. Die spezifische Wachstumsrate sinkt erheblich ab [Pham et al., 1998]. Durch die Ethanolproduktion verringert sich die Ausbeute an Biomasse bezogen auf die Menge des eingesetzten Substrates. In der Industrie ist die Menge des eingesetzten Substrates ein erheblicher Kostenfaktor. Daher werden in der Regel stark glucose-limitierte Fedbatch-Kultivierungen durchgeführt. Bei diesen Kultivierungen wird ein einfaches Modell mit exponentiellem Wachstum verwendet. Die Wachstumsrate wird dabei so gewählt, dass die kritische Glucoseaufnahme, bei der der Crabtree-Effekt einsetzt, nicht überschritten und somit eine Ethanolproduktion vermieden wird. Dabei darf die Wachstumsrate wiederum nicht zu klein gewählt werden, da ansonsten das Wachstum der Zellen durch das begrenzte Substratangebot nur unnötig langsam verlaufen würde. Optimal ist eine Wachstumsrate des Modells, bei der die kritische Glucoseaufnahme gerade erreicht aber nicht überschritten wird. Da sich dieser Wert jedoch im Verlauf einer Kultivierung ändern kann, ist ein dynamisches System erforderlich, das den Glucosefeed an den Bedarf der Zellen anpasst, um eine maximale Raum-Zeit-Ausbeute bei minimaler Ethanol-Produktion zu erreichen. In diesem Kapitel soll unter Verwendung der 2D-Fluoreszenzspektroskopie ein solches Regelsystem für Fedbatch-Kultivierungen von *S. cerevisiae* vorgestellt werden. Wie in Kapitel 2.3.1 gezeigt wurde führen die Stoffwechselübergänge zu signifikanten Änderungen in den 2D-Fluoreszenzspektren. Durch eine geeignete Auswertung der Spektren kann eine beginnende Ethanolproduktion zeitnah erkannt und eine Anpassung der Feedrate ermöglicht werden.

Dazu wurden zunächst Fedbatch-Kultivierungen durchgeführt, bei denen mit Hilfe einer Glucose-FIA eine konstante Glucosekonzentration im Reaktor eingestellt wird. Durch eine geeignete Wahl des Setpoints des Systems konnte wahlweise ein oxidativer oder oxidoreduktiver Stoffwechsel eingestellt werden. Die kritische Glucosekonzentration, oberhalb derer der Crabtree-Effekt einsetzt, liegt in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen zwischen 0,04 g/L und 0,08 g/L [Pham et al., 1998].

Darauf aufbauend wurde ein Modell zur fluoreszenzbasierten Regelung entwickelt und in Zusammenarbeit mit *K. Hantelmann* bei einer Fedbatch-Kultivierung angewendet. Anschließend wurde das Modell optimiert und bei zwei weiteren Kultivierungen eingesetzt. Abschließende Untersuchungen sollten zeigen, ob das Modell in der Lage ist, die Umstellung des Stoffwechsels von oxidativ auf reduktiv durch eine limitierte Sauerstoffversorgung der Zellen im Reaktor zu erkennen und auch hier eine Ethanolproduktion zu verhindern.

4.1 Durchführung der Kultivierungen

Für die Kultivierungen zur Modellbildung als auch für Kultivierungen mit fluoreszenzbasierter Regelung wurde ein identischer Versuchsaufbau verwendet. In Abbildung 4.1 ist der Aufbau der Mess- und Regelapparatur schematisch dargestellt. Eine detaillierte Beschreibung des Aufbaues befindet sich in Kapitel 3.2.

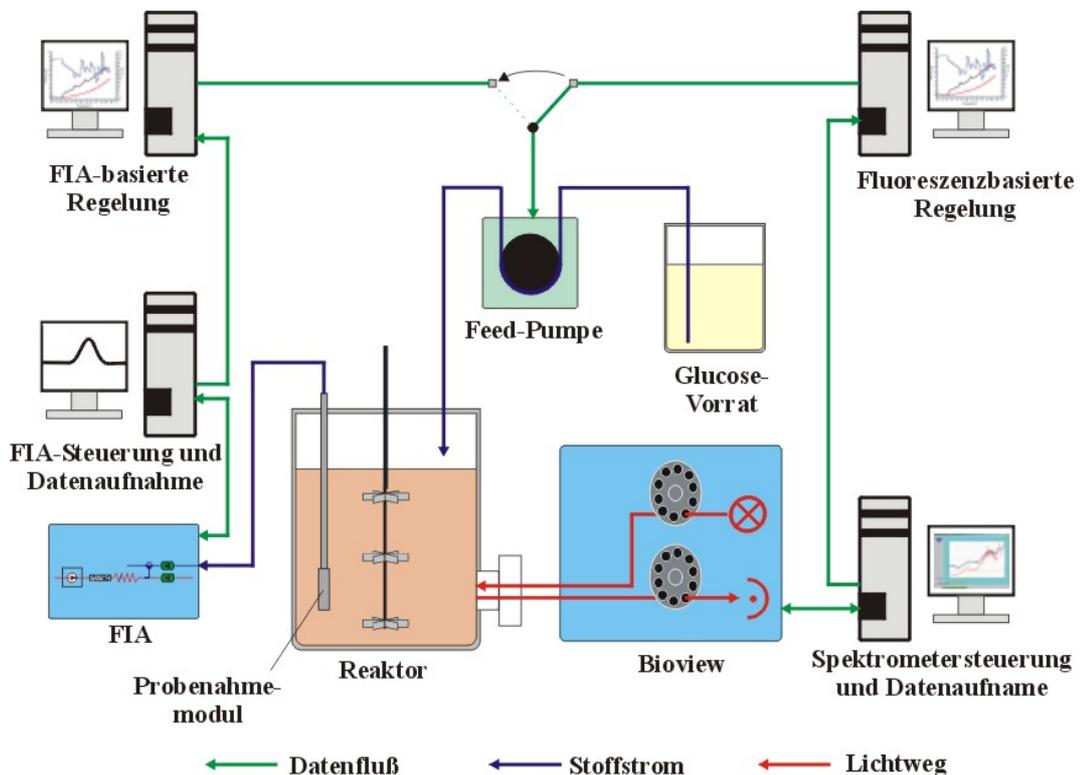


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des Mess- und Regelaufbaus der Kultivierungen von *S. cerevisiae*

Aus dem Reaktor wurde mit dem Probenahmemodul kontinuierlich eine zellfreie Probe entnommen, und mit der FIA online die Glucosekonzentration gemessen. Mit dem Bioview wurden kontinuierlich alle 90 s komplette 2D-Fluoreszenzspektren aufgenommen. Die Steuerungsrechner des Bioview und der FIA waren über serielle Schnittstellen jeweils mit einem

Prozessleitreechner verbunden. Bei der Kultivierung FB1, die zur Modellbildung herangezogen wird, wurde die Feedpumpe mit dem Prozessleitreechner der FIA verbunden, bei den fluoreszenzbasierten Regelungen FB2 bis FB6 mit dem Prozessleitreechner des Bioview.

Nach der Kultivierung FB2 erfolgte eine Analyse der beobachteten Probleme und eine Optimierung des Modells und der Regelung. Mit diesem neuen Regelsystem wurde die Kultivierungen FB3 durchgeführt. Bei den Kultivierungen FB4 und FB5 wurde abschließend das Verhalten der Regelung bei hohen Biomassen und bei limitierter Sauerstoffversorgung untersucht. Dazu musste in der Begasung die reine Pressluft durch ein Pressluft-Sauerstoff-Gemisch ersetzt werden. In Tabelle 4.1 sind die wichtigsten Parameter der Kultivierungen zusammengefasst.

Tabelle 4.1: Parameter der *S.-cerevisiae*-Fedbatch-Kultivierungen FB1 bis FB6

Kultivierung	FB1	FB2	FB3	FB4	FB5	FB6
Regelsystem	FIA	2D-Fluoreszenz				
Reaktorstartvolumen [L]	1,2	1,0	1,7	1,7	1,7	1,7
pH-Wert	5,5					
Rührerdrehzahl [rpm]	1200					
Begasung	Pressluft			Pressluft/Sauerstoff		Pressluft
Volumenstrom Begasung [L/min]	5					
Glucosekonzentration Feed [g/L]	75	50	50	100	100	50
FIA-Glucose-Messung	ja	ja	nein	ja	ja	ja
Bioview-Messintervall [s]	90					

4.2 Kultivierung mit FIA-basierter Regelung zur Datengewinnung

Die Durchführung der FIA-basierten Regelung erfolgte mit einem Programm in Delphi 6 [Hüll, 2006]. Ziel des Programms war das Einstellen einer konstanten Glucosekonzentration im Reaktor. Das Programm erlaubt eine manuelle Änderung des Setpoints. Mit Hilfe des Prozessleitrechners wurden verschiedene Glucosekonzentrationen im Reaktor eingestellt. Dabei wechselten sich rein oxidativer Stoffwechsel und oxidoreduktiver Stoffwechsel ab.

Zur Produktion von ausreichend Biomasse wurde zunächst eine Batch-Kultivierung mit einer Glucosestartkonzentration von 15 g/L durchgeführt. Nach dem die Glucose und das Ethanol verbraucht war wurde eine zweistündige Hungerphase zur Einstellung definierter Startbedin-

Im Verlauf der Fedbatch-Phase wurde der Glucose-Setpoint insgesamt neunmal auf Werte zwischen 0,05 bis 0,09 g/L geändert. Dabei änderten die Hefezellen viermal den Stoffwechsel von rein oxidativ auf oxidoreduktiv. Die Sollwerte wurden zum Teil erst verspätet in der Kulturbrühe erreicht bzw. zum Teil erheblich überschritten. Dies beruhte auf dem noch suboptimalen Kontroll-Algorithmus des Regelprogramms. Das System zeigte jedoch die erwarteten Reaktionen auf die real online gemessenen Glucosekonzentrationen. Bei 20,5 h, 23,5 h, 25,5 h und 28,4 h änderte sich der Stoffwechsel von oxidativ auf oxidoreduktiv. Zeitgleich war ein erheblicher Anstieg der CO₂-Konzentration und der NADH-Fluoreszenz zu beobachten, während die Fluoreszenz im Bereich der Flavine absank. Abbildung 4.2 zeigt die relevanten Größen. Die verstärkte Ethanolproduktion ab 28,5 h wurde trotz der geringen Glucosekonzentration von 0,044 bis 0,049 g/L durch die limitierte Sauerstoffversorgung induziert (pO₂ < 10 %).

Die Zeitpunkte der Stoffwechselumstellungen sind eindeutig in den 2D-Fluoreszenzspektren zu erkennen. Die Kultivierung wurde noch zweimal mit variablen Setpoints wiederholt.

4.3 Hauptkomponentenanalyse der Kultivierung FB1

Mit 532 Spektren der Kultivierung FB1 erfolgte eine Hauptkomponentenanalyse mit einer vollständigen Kreuzvalidierung. Die ersten drei Hauptkomponenten beschreiben insgesamt 99,7 % der Gesamtvarianz, dabei entfallen 94,4 % auf die erste, 4,1 % auf die zweite und 1,2 % auf die dritte Hauptkomponente. Im Scoreplot in Abbildung 4.3 sind die ersten beiden Hauptkomponenten dargestellt. Deutlich ist der Unterschied zwischen rein oxidativen und oxidoreduktiven Stoffwechsel zu erkennen. Die Spektren mit dem oxidativen Stoffwechsel liegen im grün umrandet dargestellten Bereich. Der Abstand zwischen den einzelnen Spektren ist nur sehr gering. Ändert sich der Stoffwechsel von oxidativ zu oxidoreduktiv, so vergrößert sich der Abstand zwischen den Spektren erheblich und der grüne Bereich wird verlassen. Ist die Stoffwechseländerung abgeschlossen, so liegen die Spektren im blauen Bereich. Durch eine Zuordnung der Spektren zu den einzelnen Bereichen ist somit eine Identifizierung des Stoffwechsels möglich.

Die Größe der Loadings gibt den Einfluss einer Wellenlängenkombinationen auf die Hauptkomponenten an. In Abbildung 4.4 sind die Loadings der ersten drei Hauptkomponenten dargestellt.

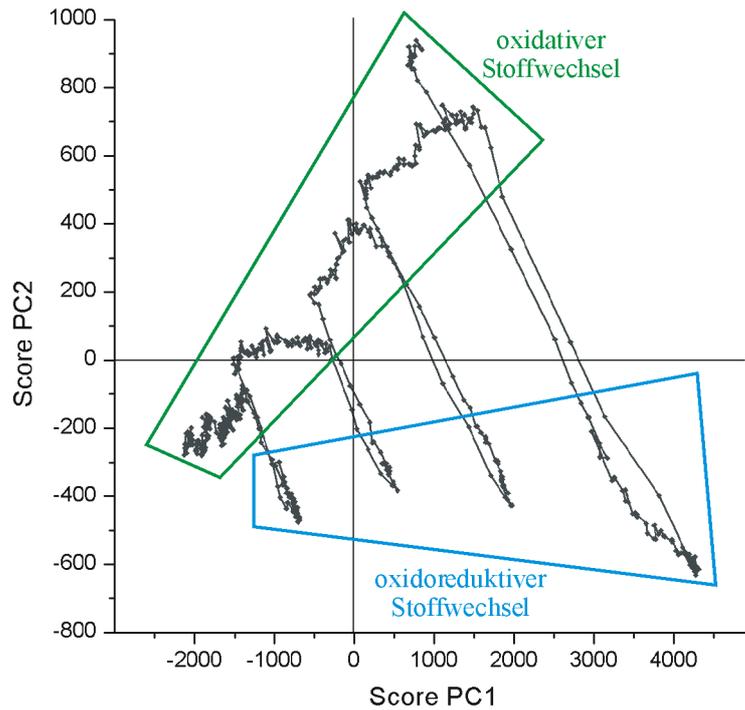


Abbildung 4.3: Plot des ersten gegen den zweiten Score der Hauptkomponentenanalyse von 532 Spektren der Kultivierung FB1

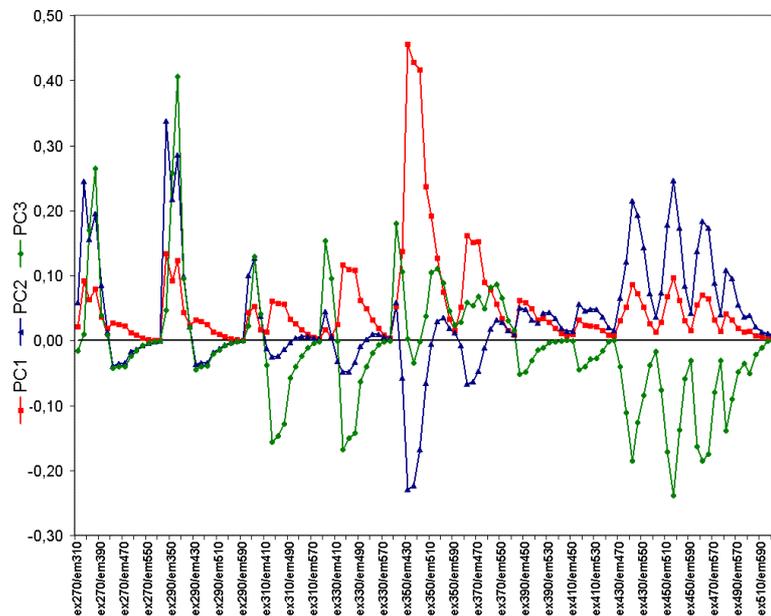


Abbildung 4.4: Loadings der ersten drei Hauptkomponenten, berechnet aus 532 Spektren der Kultivierung FB1

Die erste Hauptkomponente wird hauptsächlich von der NADH-Fluoreszenz bestimmt. Die Protein- und Flavin-Fluoreszenz sind von geringerer Bedeutung. Diese bestimmen hauptsächlich die zweite Hauptkomponente. Die NADH-Fluoreszenz besitzt hier einen negativen Ein-

fluss. Die dritte Hauptkomponente schließlich wird positiv von der Protein- und negativ von der NADH- und Flavinfluoreszenz bestimmt.

4.4 Durchführung der Modellbildung

Zunächst wurde ein hypothetischer Ethanolproduktionswert (EP-Wert) definiert. Dieser EP-Wert nimmt den Wert 0 an, wenn ein rein oxidativer Stoffwechsel vorliegt und den Wert 1 bei einem oxidoreduktiven Stoffwechsel. Die ersten Berechnungen des Modells erfolgten anhand von 745 Spektren aus zwei Kultivierungen. Dabei änderte sich achtmal der Stoffwechsel der Zellen oxidativ zu oxidoreduktiver und zurück.

Mit Hilfe der Software The Unscrambler[®] wurde nun ein PLS-Modell erstellt, das eine Korrelation zwischen den RFI der Messpunkte der 2D-Fluoreszenzspektren und den jeweils zugeordneten EP-Werten durchführt. Ein minimaler Fehler ergab sich bei der Verwendung von drei Hauptkomponenten. Bei jedem Wechsel vom oxidativen zum reduktiven Stoffwechsel stieg der EP-Wert von einem Wert von ca. 0,2 bis auf 0,5 bis 0,9 stark an. Bereits zwei Spektren später erreichte er wieder den Ausgangswert, obwohl der Stoffwechsel für einen Zeitraum von mindestens 20 Minuten noch oxidoreduktiv war (siehe Abbildung 4.5).

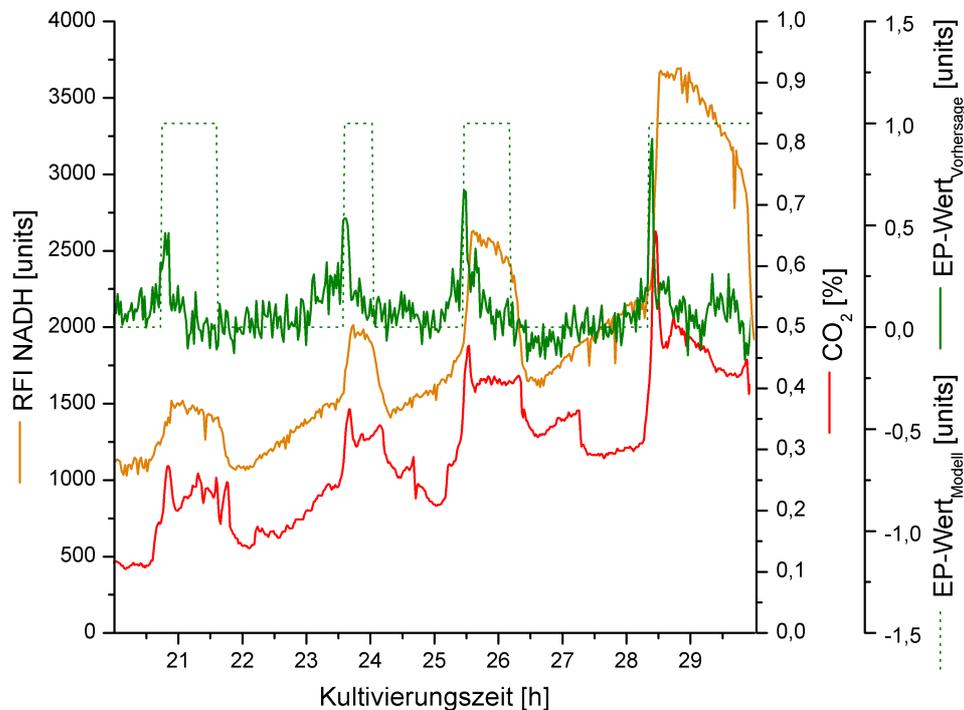


Abbildung 4.5: Verläufe der NADH-Fluoreszenz, der CO₂-Konzentration sowie der postulierten und vorhergesagten EP-Werte der *S.-cerevisiae*-Fedbatch-Kultivierung FB1

Damit ist eine Identifizierung des Stoffwechsels, ob rein oxidativ oder oxidoreduktiv, nicht möglich, jedoch lässt sich eindeutig der Übergang vom oxidativen zum oxidoreduktiven Stoffwechsel durch den plötzlichen Anstieg in der Vorhersage des EP-Wertes erkennen.

Die Vorhersage des EP-Wertes ermöglicht eine Voraussage des Stoffwechsellustands bei weiteren Fedbatch-Kultivierungen von *S. cerevisiae*. Den größten Einfluss auf die Vorhersage des EP-Wertes hat dabei die Fluoreszenz im NADH-Bereich, gefolgt von der Flavin-Fluoreszenz.

Der EP-Wert ließ sich jedoch nicht als Kontrollgröße für einen Regelkreis verwenden. Ein Problem bildeten hierbei die Bedingungen der jeweiligen Kultivierung. Wenn auch bei allen Kultivierungen jeweils bei der Stoffwechsellumstellung ein starker Anstieg des EP-Wertes verzeichnet werden konnte, so war doch die Basislinie von den jeweiligen Startbedingungen abhängig. Um den Einfluss der Kultivierungsbedingungen zu eliminieren wurde nicht der EP-Wert selbst sondern dessen Ableitung EP' verwendet. Die Berechnung erfolgte mit einem Savitzky-Golay-Filter gemäß Gleichung (4.1).

$$EP'_n = \frac{-2EP_{n-4} - EP_{n-3} + EP_{n-1} + 2EP_n}{10\Delta t} + \frac{4EP_{n-4} - 2EP_{n-3} - 4EP_{n-2} - 2EP_{n-1} + 4EP_n}{7\Delta t} \quad (4.1)$$

n ist der Index der Messung und Δt ist der zeitliche Abstand zwischen zwei Bioview-Messungen. Δt wurde für den Verlauf einer Kultivierung als konstant betrachtet. Der Wert wurde unabhängig von allen weiteren Kultivierungen auf den Wert von 0,027 h festgelegt. Die daraus resultierenden Werte weisen ein erhebliches Rauschen auf. Zur Reduzierung wurde ein rekursiver Filter mit nachlassenden Gedächtnis nachgeschaltet. Damit wurde nach Gleichung (4.2) ein *Metabolischer Faktor* (MB-Wert) berechnet.

$$MB_n = EP'_n \cdot A + EP'_{n-1} \cdot (1 - A) \quad (4.2)$$

Für den Filterfaktor A wurde ein Wert von 0,25 als optimal ermittelt. In Abbildung 4.6 sind die berechneten MB-Werte und die NADH-Fluoreszenz dargestellt. Übersteigt der MB-Wert die empirisch festgelegte Schwelle von 2 so liegt bei einer steigenden Anzahl von Hefezellen aufgrund einer erhöhten Glucoseaufnahme eine oxidoreduktive Stoffwechsellumstellung vor. Somit ist eine Überwachung des oxidativen Stoffwechsels und eine optimale Regelung möglich.

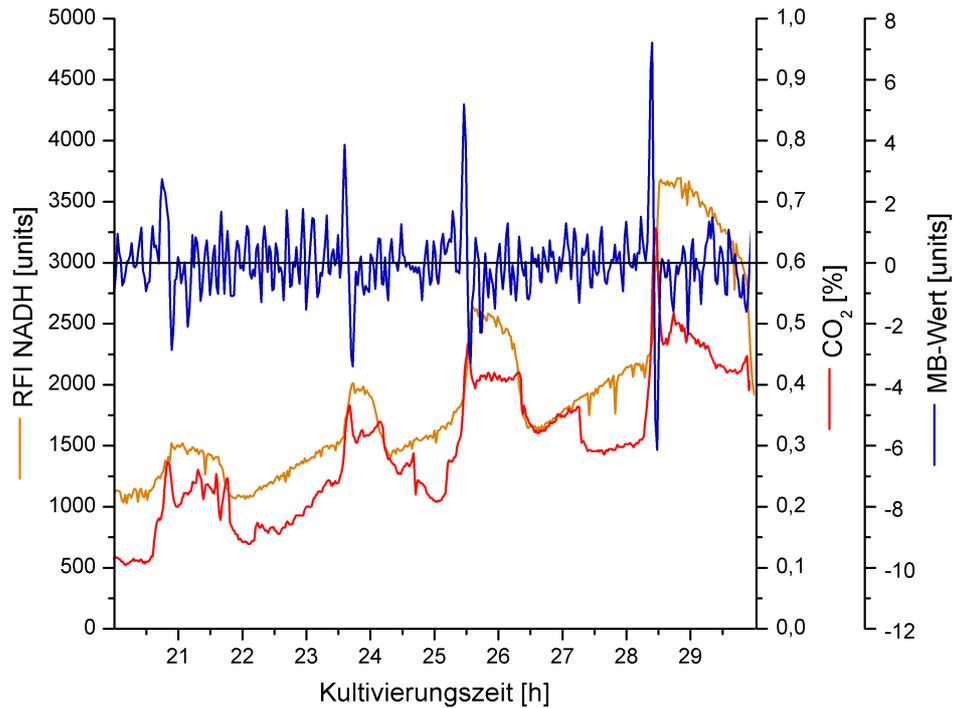


Abbildung 4.6: Verläufe der NADH-Fluoreszenz, der CO_2 -Konzentration und der berechneten MB-Werte der *S.-cerevisiae*-Fedbatch-Kultivierung FB1

4.5 Das Regelmodell

Zur Durchführung der fluoreszenzbasierten Regelung wurde ein Zustandsmodell mit vier Zustandsvariablen genutzt. Diese Zustandsvariablen wurden durch die Differenzialgleichungen (4.3) bis (4.6) definiert.

$$\frac{dBTM}{dt} = \mu_{\text{Modell}} \cdot BTM(t) - (\dot{V}_{\text{Feed}}(t) - \dot{V}_{\text{Probe}}) \cdot \frac{BTM(t)}{V(t)} \quad (4.3)$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{\mu_{\text{Modell}} \cdot BTM(t)}{Y_{X/S}} + \frac{\dot{V}_{\text{Feed}}(t)}{V(t)} \cdot (S_0 - S(t)) \quad (4.4)$$

$$\frac{d\mu_{\text{Modell}}}{dt} = 0 \quad (4.5)$$

$$\frac{dV}{dt} = \dot{V}_{\text{Feed}}(t) - \dot{V}_{\text{Probe}} \quad (4.6)$$

In diesen Gleichungen ist $BTM(t)$ die Biotrockenmasse des Modells, μ_{Modell} die spezifische Wachstumsrate des Modells, $Y_{X/S}$ die Ausbeute an Biotrockenmasse bezogen auf die Glucose,

$\dot{V}_{Feed}(t)$ der vom Modell berechnete Volumenstrom der Feedpumpe, \dot{V}_{Probe} der Volumenstrom der zellfreien Probenahme, $V(t)$ das Reaktorvolumen, $S(t)$ die Glucosekonzentration in der Kulturbrühe, S_0 die Glucosekonzentration in der Feed-Lösung und t die Zeit.

Eine besondere Bedeutung fällt in diesem Modell der spezifischen Wachstumsrate μ zu. Die spezifische Wachstumsrate μ_{Modell} des Modells muss größer sein als die reale spezifische Wachstumsrate μ_{Hefe} der Hefezellen in der Kulturbrühe. Dadurch berechnet das Modell einen zu hohen Glucoseverbrauch. Durch die Zufütterung wird mehr Glucose verabreicht als durch die Hefezellen umgesetzt wird. Das Resultat ist ein langsamer Anstieg der Glucosekonzentration in der Kulturbrühe.

Durch den Anstieg der Glucosekonzentration im Reaktor wird im Laufe der Kultivierung die Schwellenkonzentration erreicht, bei der die kritische Glucoseaufnahme überschritten wird und der oxidoreduktive Stoffwechsel einsetzt. Durch die Auswertung der 2D-Fluoreszenzspektren wird dies vom Regelsystem erkannt und es erfolgt ein Eingriff in das exponentielle Fütterungsprofil. Zunächst wird die Pumprate drastisch reduziert und in den nächsten 0,15 h ein besonderes Feedprofil gefahren, um den Abbau der im Reaktor vorhandenen Glucose zu ermöglichen. Die Pumprate des Feedprofils wird gemäß Gleichung (4.7) berechnet.

$$\dot{V}_{Feed}(t) = \dot{V}_{Feed,0} \cdot e^{\mu_{Modell} \cdot (t-t_0)} \cdot (a + b \cdot (t-t_0)) \quad (4.7)$$

$\dot{V}_{Feed,0}$ ist die Pumprate zum Zeitpunkt der MB-Wertüberschreitung, t_0 der Zeitpunkt der MB-Wertüberschreitung. Für den Parameter a wurde ein Wert von 0,79 und für den Parameter b ein Wert von $1,28 \text{ h}^{-1}$ festgelegt. In Abbildung 4.7 ist der schematische Verlauf der Pumprate dargestellt.

Zusätzlich zum Fahren des Feedprofils wird die Biomasse des Modells bei t_0 um 5 % reduziert. Ab $t_0 + 0,15 \text{ h}$ wird die automatische Zufütterung fortgesetzt. Im Zeitintervall $t_0 \leq t \leq t_0 + 0,15 \text{ h}$ wird die Regelung ausgesetzt, da sich das System erst an die neuen Bedingungen anpassen muss.

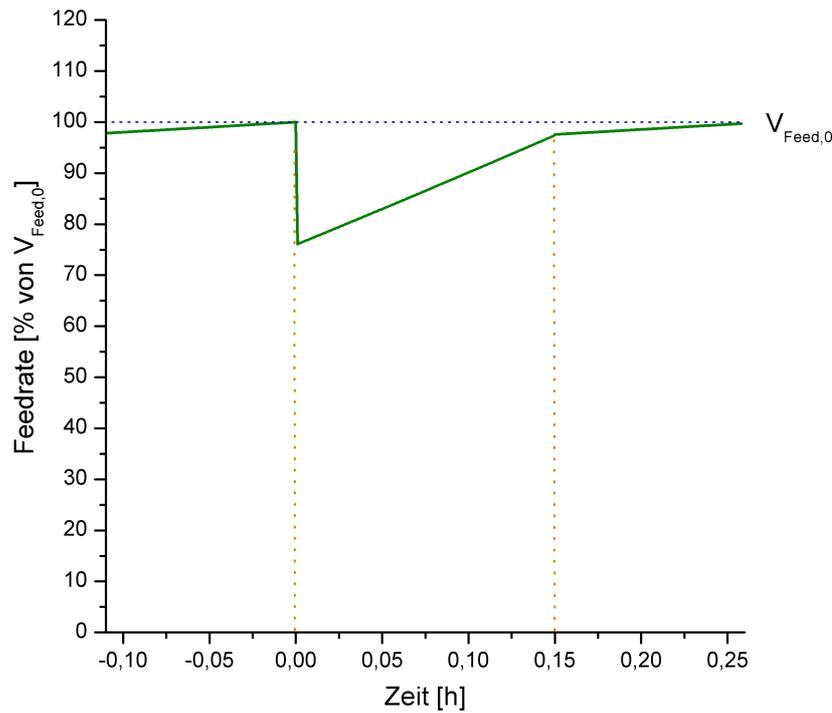


Abbildung 4.7: Schematischer Verlauf des Feedprofils bei Überschreitung des MB-Wertes bei $t_0 = 0$ h.

4.6 Das Regelprogramm „MB-Wert“

Für die Anwendung des in Kapitel 4.5 entwickelten Regelsystems wurde das Programm *MB-Wert* realisiert. Es wurde in Borland Pascal 7.0 (Inprise Corporation, Scotts Valley, USA) entwickelt. Als Hardwareplattform diente ein PC (386 DX CPU mit 25 MHz Taktfrequenz und 24 MB RAM) mit MS-DOS 5.0 (Microsoft, Redmond, USA). Dieser PC war mit zwei seriellen Schnittstellen COM1 und COM2 ausgerüstet. Über COM1 erfolgte die Kommunikation mit dem Steuerungscomputer des Bioview, über COM2 wurde die berechnete Pump-rate an die Feedpumpe (ACCU CP10, SciLog, USA; Pumpkopf: Masterflex, Cole-Palmer Instrument Co., Illinois) übertragen.

Die Differentialgleichungen des Modells wurden vom Programm mit einem Runge-Kutta-Verfahren vierter Ordnung numerisch gelöst. Die Berechnungen erfolgen im Abstand $\Delta t = 1/1000 \text{ h} = 3,6 \text{ s}$. Die Berechnung des erforderlichen Volumenstromes der Feedpumpe erfolgten mit einem Feedforward-/Feedback-Regler gemäß den Gleichungen (4.8) bis (4.10).

$$\dot{V}_{Feed,t_i} = \dot{V}_{Feed,t_i}^{Forward} + \dot{V}_{Feed,t_i}^{Back} \quad (4.8)$$

$$\dot{V}_{Feed,t_i}^{Forward} = \frac{V(t) \cdot S(t) \cdot BTM(t)}{Y_{X/S} \cdot (S_0 - S(t))} \quad (4.9)$$

$$\dot{V}_{Feed,t_i}^{Back} = \dot{V}_{Feed,t_{i-1}}^{Back} + p_1 \cdot (S_{SP} - S_i) + p_2 \cdot (S_{SP} - S_{i-1}) \quad (4.10)$$

S_{SP} ist der Glucose-Setpoint und t_i der Zeitindex. Die Parameter p_1 und p_2 hatten die folgenden Werte: $p_1 = 1,4 \text{ g/h}$, $p_2 = -1,1 \text{ g/h}$.

Der Glucose-Setpoint S_{SP} wurde auf den Wert von $0,04 \text{ g/L}$ festgelegt. Sein absoluter Wert hatte für das Modell keine Bedeutung, er diente lediglich zur Berechnung der Abweichung vom Sollwert. Die Feedrate \dot{V}_{Feed,t_i} wurde mit einer linearen Kalibrierfunktion in %-Pumpleistung umgerechnet.

Die Messergebnisse des Bioview wurden als Abfolge von einem Startzeichen und 256 Zahlen mit einem Leezeichen als Trennzeichen über die Serielle Schnittstelle übertragen. Bei einer nicht durchgeführten Messung einer Wellenlängenkombination wurde ein Wert von 0 übertragen. Mit dem Hilfsprogramm *bioview.com* wurden die Messwerte eines Spektrums in der Datei *bioview.spe* im Arbeitsverzeichnis auf der Festplatte des Regelungs-PC gespeichert. Die Software *MB-Wert* durchsuchte bei jedem Zeitindex t_i das Arbeitsverzeichnis nach dieser Datei. War diese vorhanden werden die Messwerte $X_{n,jk}$ des Spektrums ausgelesen. Daraus wurde zunächst mit den Regressionskoeffizienten der EP-Wert EP_n berechnet und mit den Gleichungen (4.1) und (4.2) erfolgte die Berechnung des MB-Wertes MB_n . War MB_n größer als der definierte Schwellenwert $MB_{Schwelle}$ wurde das in Kapitel 4.5 definierte Feedprofil gefahren. Da für die korrekte Berechnung des MB-Wertes dem Programm mindestens fünf Spektren vorliegen müssen, wurde die Regelung erst aktiviert, nachdem das fünfte Spektrum ausgewertet worden war.

Um die Funktion der Software zu testen, wurden Simulationen durchgeführt. Dazu wurde ein PC (PC-Spezialist, Pentium I 90 MHz CPU, 64 MB RAM, Betriebssystem Windows 98SE, Microsoft, Redmont, USA) verwendet. In einem DOS-Fenster wurde das Programm *MB-Wert* gestartet. Die Bioview-Messung wurde dabei mit einem Visual-Basic-Programm [Microsoft, Redmont, USA] simuliert. Dieses Programm las alle 90 s ein Fluoreszenzspektrum aus einer Excel-Datenbank aus und speicherte es in der Datei *bioview.spe* ab. Die Excel-Datenbank enthielt in Abhängigkeit des zu testenden Teils des *MB-Wert*-Programms speziell zusammengestellte Fluoreszenzspektren aus bereits durchgeführten Kultivierungen.

Zur Auswahl des benötigten Pumpenschlauchs, der Startbiomasse und der zu wählenden Glucosekonzentration der Feedlösung wurden mit SIMULINK Simulationen der Kultivierung durchgeführt. Das verwendete Simulink-Modell ist in Kapitel 11.6 dargestellt.

4.7 *Fluoreszenzbasierte Regelung von S. cerevisiae*

Bei der Kultivierung FB2 wurden alle 90 s ein 2D-Fluoreszenzspektrum aufgenommen. Diese Spektren wurden durch das Programm MB-Wert ausgewertet und der metabolische Wert berechnet. Als Grenzwert für den Übergang vom oxidativen zum oxidoreduktiven Stoffwechsel wurde ein Wert von 0,9 festgelegt. Die Dauer der Fedbatch-Phase dieser Kultivierung betrug 6 h. In Abbildung 4.8 sind die Verläufe der wichtigsten Kultivierungsgrößen dargestellt.

Innerhalb dieser 6 h wurde der kritische MB-Wert sechs mal überschritten und das Feedprofil zur Reduzierung der Substratkonzentration im Reaktor gefahren. Beim ersten Regeleingriff des Programms konnte die Produktion einer geringen Menge Ethanol nicht verhindert werden. Die Ethanolkonzentration blieb über den Verlauf der restlichen Kultivierung relativ konstant, es wurde kein weiteres Ethanol produziert. Dass das Ethanol in der Kulturbrühe nicht abgebaut wurde zeigt, dass die Glucoseaufnahmerate der Zellen immer nur geringfügig unterhalb der kritischen Aufnahmerate ist und somit eine maximale Glucoseaufnahmerate für rein oxidativen Stoffwechsel vorliegt.

Im Verlauf der Fedbatch-Phase stieg die Biomassekonzentration im Reaktor von 7,1 g/L auf 15,7 g/L. Im gleichen Zeitraum wurden 16,5 g Glucose zugefüttert. Unter Berücksichtigung der durch die Offlineproben aus dem Reaktor entnommenen Biomasse lag die Ausbeute $Y_{x/s}$ bei 0,53 g BTM/g Glucose. Dies deutet auf einen rein oxidativen Stoffwechsel hin. Bei oxidoreduktivem Stoffwechsel liegt die Ausbeute mit rund 0,3 BTM/g Glucose deutlich niedriger.

Die beginnenden Stoffwechsellumstellungen korrelierten nicht immer mit dem Verlauf des CO_2 -Gehaltes im Abgas und der NADH-Fluoreszenz. Dies war insbesondere zwischen 24,5 h und 26,3 h der Fall. Die Daten deuten darauf hin, dass hier eine Fehlinterpretation der Spektren vorlag. Im Bereich der Flavine war der charakteristische Abfall der Intensität erheblich geringer als bei der Kultivierung FB1. Er wurde durch das starke Messrauschen überlagert.

Die Messwerte der Glucose-FIA lagen im gesamten Verlauf der Kultivierung zwischen 0,04 und 0,06 g/L. Die zugefütterte Glucose wurde sofort verstoffwechselt. Zu allen Zeitpunkten des Überschreitens des MB-Grenzwertes sank die Glucosekonzentration aufgrund der reduzierten Pumprate jeweils kurzfristig ab.

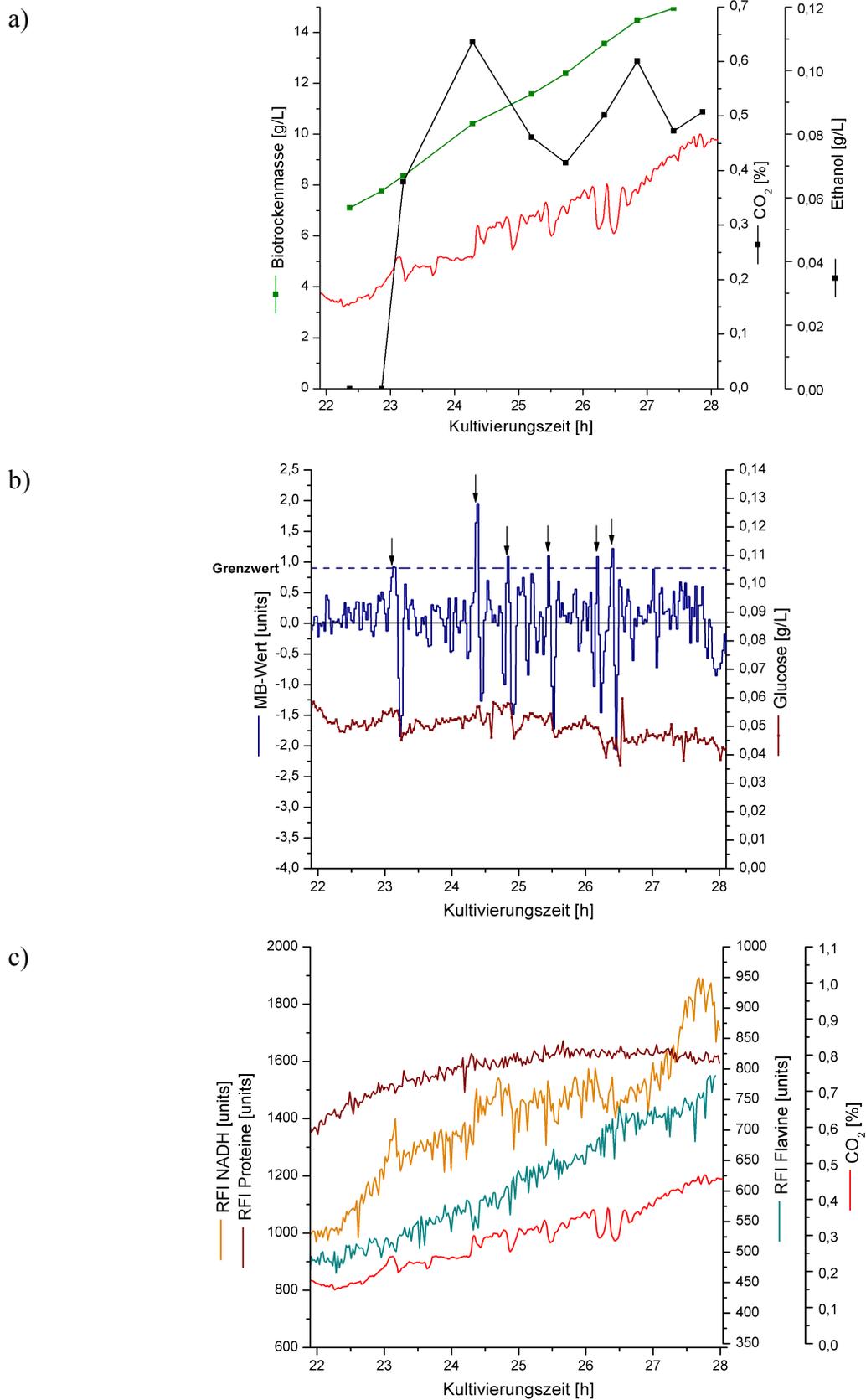


Abbildung 4.8: a) Verläufe der CO₂-Konzentration, Biotrockenmasse und Ethanolkonzentration; b) MB-Wert (erfolgte Regeleingriffe sind durch Pfeile gekennzeichnet) und Glucosekonzentration; c) NADH-, Protein- und Flavin-RFI der Kultivierung FB2

Die Ergebnisse der Kultivierung FB2 zeigen, dass mit Hilfe des Zustandsmodells und der darauf aufbauenden Prozessregelung die Überwachung des Stoffwechsels der Hefezellen möglich war und eine rein oxidative Prozessführung realisiert wurde. Mit dem verwendeten Modell kam es gelegentlich zu Fehlinterpretationen, die die Raum-Zeit-Ausbeute der Fedbatch-Kultivierungen unnötig herabsetzten. Vor den folgenden Kultivierungen musste dieses Problem durch Änderungen im Modell behoben werden.

4.8 Optimierung der Regelstrategie und der Parameter

Zu Beginn der Kultivierung FB 2 konnte eine Ethanolproduktion nicht verhindert werden. Des weiteren kam es mehrfach zu einer fehlerhaften Interpretation der 2D-Fluoreszenzspektren. In diesem Kapitel werden sowohl die Regelstrategie als auch die Parameter des Modells optimiert.

4.8.1 Regelstrategie

Zu Beginn der Fedbatch-Phase einer jeden Kultivierung, die mit dem in Kapitel 4.5 vorgestellten Regelmodell durchgeführt wurden, fand eine Ethanolproduktion statt, die einen manuellen Eingriff in die Fütterung erforderte. Die Fedbatch-Phase wurde unterbrochen und nach einer Hungerphase mit einer geringeren Biomasse im Modell erneut gestartet. Dieses Phänomen basiert auf dem grundlegenden Problem, dass die Zellen nach einer Hungerphase im Anschluss an die Batch-Phase nicht sofort exponentiell wachsen, sondern eine kurze „lag“-Phase durchlaufen. Dadurch wurde Glucose akkumuliert, und es traten Glucosekonzentrationen von bis zu 250 mg/L auf, die zu einer erheblichen Ethanolproduktion führten.

In Abbildung 4.9 sind exemplarisch die Messwerte der Glucose-FIA zu Beginn eines solchen Startversuchs dargestellt. Deutlich ist der Anstieg der Glucose-Konzentration direkt nach Beginn der Fedbatch-Phase bei 17,5 h zu erkennen. Bei einer Glucose-Konzentration von 0,178 g/L wurde die Pumpe deaktiviert, bis die Konzentration wieder auf einen Wert von unter 0,010 g/L absank. Zur Kontrolle der FIA wurde dreimal ein Glucosestandard von 0,05 g/L vermessen, die Werte lagen mit 0,047, 0,050 und 0,049 g/L im Rahmen der Messgenauigkeit der FIA [Hüll, 2006].

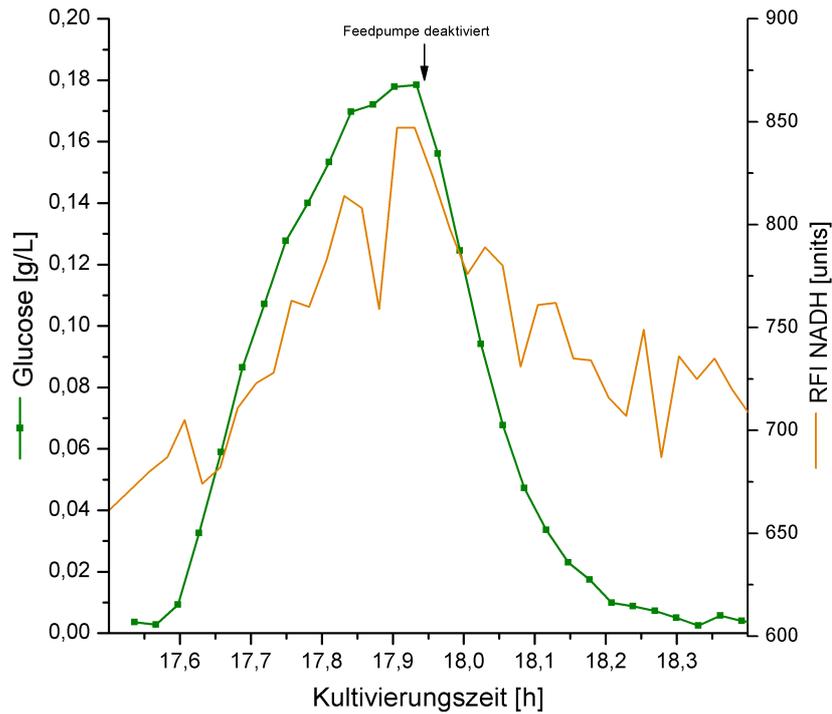


Abbildung 4.9: Messwerte der Glucose-FIA und Verlauf der NADH-Fluoreszenz in der Anfahrphase des ersten Startversuches der Fedbatch-Phase der Kultivierung FB2

Um dieses reproduzierbare Phänomen zu eliminieren wurde ein Anfahrprofil entwickelt. Dazu wurde die angenommene Wachstumsrate μ_{Modell} neu definiert:

$$0 \leq t \leq t_A \quad \rightarrow \quad \mu_{Modell}(t) = \mu_A \quad (4.11)$$

$$t_A < t \leq t_B \quad \rightarrow \quad \mu_{Modell}(t) = \mu_A + \frac{(\mu_B - \mu_A) \cdot (t - t_A)}{t_B} \quad (4.12)$$

$$t > t_B \quad \rightarrow \quad \mu_{Modell}(t) = \mu_B \quad (4.13)$$

μ_A ist die Wachstumsrate zu Versuchsbeginn, μ_B die angestrebte Wachstumsrate, t_A der Beginn der Steigerung der Wachstumsrate und t_B der geschätzte Endzeitpunkt der Anfahrphase.

Detektiert das Regelsystem zum Zeitpunkt t_E im Zeitintervall $t_A \leq t_E \leq t_B$ eine beginnende Stoffwechselumstellung der Hefezellen, so gilt

$$t > t_E \quad \rightarrow \quad \mu_{Modell}(t) = \mu_{Modell}(t_E) \quad (4.14)$$

Durch den langsamen Anstieg der Wachstumsrate μ_{Modell} zu Beginn der Fedbatch-Phase wurde den Hefezellen Zeit gegeben, sich den verändernden Bedingungen anzupassen. Des Weiteren berücksichtigt diese Vorgehensweise etwaige Unterschiede in den Aktivitäten der verwendeten Hefezellen. Die für den Hauptteil der Fedbatch-Kultivierung verwendete Wachstumsrate richtet sich allein nach den im Reaktor befindlichen Zellen und ihren tatsächlichen Eigenschaften. Sind die zum Animpfen verwendeten Zellen durch die Lagerung geschädigt, wird sich die Glucose im Reaktor schneller akkumulieren und somit zu einer früheren Stoffwechselumstellung führen als bei nicht geschädigten Zellen, was wiederum zu einer geringeren Wachstumsrate im Zufütterungsmodell führt. In Vorversuchen wurde die Dauer der Startphase sowie μ_A und μ_B bestimmt. Hier zeigte sich, dass ein zu schneller Anstieg der Wachstumsrate des Modell zu einer schnellen Akkumulation der Glucose im Reaktor führte. Eine zu lange Startphase verlängerte die Kultivierung nur unnötig. In Tabelle 4.2 sind die bei den Kultivierungen FB3 bis FB6 verwendeten Konstanten dargestellt.

Tabelle 4.2: Konstanten der Anfahrphase der Kultivierungen FB3 bis FB6

Konstante	Wert
μ_A	0,050 1/h
μ_B	0,225 1/h
t_A	0,2 h
t_B	2,0 h

In Abbildung 4.10 sind die Messwerte der Glucose-FIA der ersten zwei Stunden der Fedbatch-Phase der Kultivierung FB5 dargestellt. In der Anfangsphase stieg die Glucosekonzentration bis auf einen Wert von 0,085 g/L bei 43,4 h. Zu diesem Zeitpunkt erkannte das Regelprogramm eine Stoffwechseländerung und beendete die Anfahrphase, so dass folglich ein Feedprofil zur Reduzierung der Glucosekonzentration gefahren wurde. Bei 44,0 h wurde eine erneute Stoffwechseländerung detektiert.

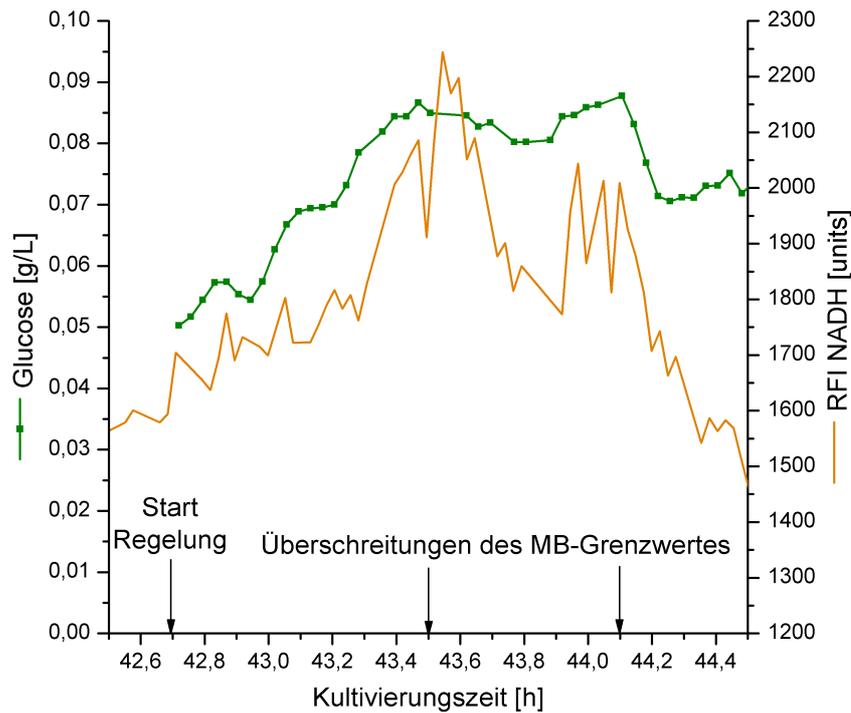


Abbildung 4.10: Messwerte der Glucose-FIA und Verlauf der NADH-Fluoreszenz in der Anfahrphase des Fedbatch-Teiles der Kultivierung FB5

4.8.2 Parameter

Wie in Kapitel 4.7 gesehen, kam es im Verlauf der Kultivierung FB2 zu Fehlinterpretationen der 2D-Fluoreszenzspektren durch das Modell. Es wurde eine Stoffwechsellumstellung vorhergesagt, obwohl weder in den CO_2 - und pO_2 -Werten noch in den Fluoreszenzdaten Hinweise darauf zu finden waren. Durch die daraufhin durchgeführte Reduzierung der Biomasse im Modell zur Berechnung der Feedrate kam es zu einer unnötigen Absenkung der Raum-Zeit-Ausbeute bei der BTM-Produktion. Dieses Problem trat besonders bei geringen Biomassen auf, da die Änderungen der Fluoreszenzintensitäten weitaus geringer waren als bei hohen Biomassen. Um diesen Fehler zu eliminieren, wurden mehrere Änderungen bei der Berechnung des MB-Wertes durchgeführt.

Zur Verbesserung des Modells wurde zunächst die zur Kalibration des Modells verwendete Datenbasis vergrößert. Für die ersten Modelle wurden die Spektren von zwei Kultivierungen verwendet. Durch das Hinzufügen der Daten zweier weiterer Kultivierungen konnte nur eine geringe Verbesserung der Vorhersagegüte erzielt werden. Eine erhebliche Verbesserung trat erst auf als die bei hohen Biomassen durchgeführten Stoffwechseländerungen nicht mehr zur Kalibration verwendet wurden. Insgesamt wurden die verwendeten Daten von 745 Spektren mit acht Stoffwechseländerungen auf 1059 Spektren mit zwölf Änderungen erweitert.

Parallel zur Optimierung des Vorhersagemodells wurden auch Änderungen an den Einstellungen des verwendeten rekursiven Filters untersucht. In der Gleichung (4.2) des rekursiven Filters wurde der Wert für den Parameter A von 0,25 auf 0,22 geändert. Mit den geänderten Parametern wurden mehrere Kultivierungen durchgeführt.

4.9 Kultivierung mit dem optimierten Modell

Für die Kultivierung FB3 musste in Folge des optimierten Modells der MB-Grenzwert geändert werden. Als Grenzwert für den Stoffwechselübergang wurde ein MB-Wert von 0,4 festgelegt.

Die Fedbatch-Phase wurde über einen Zeitraum von acht Stunden durchgeführt. Innerhalb dieses Zeitraums wurde viermal die kritische Glucoseaufnahmerate erreicht. Dabei erfolgte jeweils automatisch ein Regeleingriffe des Systems. In Abbildung 4.11 sind die relevanten Prozessgrößen dargestellt.

Über den gesamten Verlauf der Fedbatch-Phase hindurch konnte eine Ethanolproduktion erfolgreich vermieden werden. Alle Ethanolmesswerte der Offlineproben lagen unterhalb der Messgrenze des Gaschromatographen (ca. 0,025 g/L). Die erste MB-Wert-Überschreitung erfolgte bei 22,8 h bei einer Wachstumsrate von 0,210 1/h. Damit wurde die angestrebte Wachstumsrate von 0,225 1/h fast erreicht.

Zu den Zeitpunkten des Überschreitens des MB-Grenzwertes sind im Verlauf des CO₂-Gehaltes im Abgas sowie der NADH-Fluoreszenz deutliche Peaks zu erkennen, während die Flavin-Fluoreszenz geringfügig absinkt bzw. für den Zeitraum der erhöhten NADH-Fluoreszenz konstant bleibt. Da hingegen ist der anschließende Anstieg um so deutlicher zu erkennen. Der Verlauf der Protein-Fluoreszenz lässt sich mit der Biotrockenmasse sehr gut korrelieren. Der BTM-Gehalt konnte von 4,9 g/L auf 12,4 g/L mehr als verdoppelt werden.

Die Reduktion der Biomasse des Modells um 5 % bei einer Stoffwechselumstellung führte zu einer guten Übereinstimmung im Vergleich der Biomasse des Modells zur Berechnung der Feedrate mit den offline gemessenen Werten. Der Startwert des Modells lag mit 5,0 g/L etwas oberhalb des realen Wertes von 4,9 g/L. Der vom Modell geschätzte Wert am Ende der Kultivierung betrug 12,0 g/L. Dies ergibt eine Abweichung von rund 2,5 % zu dem offline gemessenen Wert von 12,3 g/L. Im Verlauf der Kultivierung wurden insgesamt 47,0 g Glucose zugefüttert und 23,4 g Biotrockenmasse produziert. Daraus ergab sich eine Ausbeute von 0,50 g BTM / g Glucose. Die Ausbeute bei oxidoreduktivem Stoffwechsel liegt mit 0,15 g BTM / g Glucose erheblich darunter [Woehrer und Roehr, 1981].

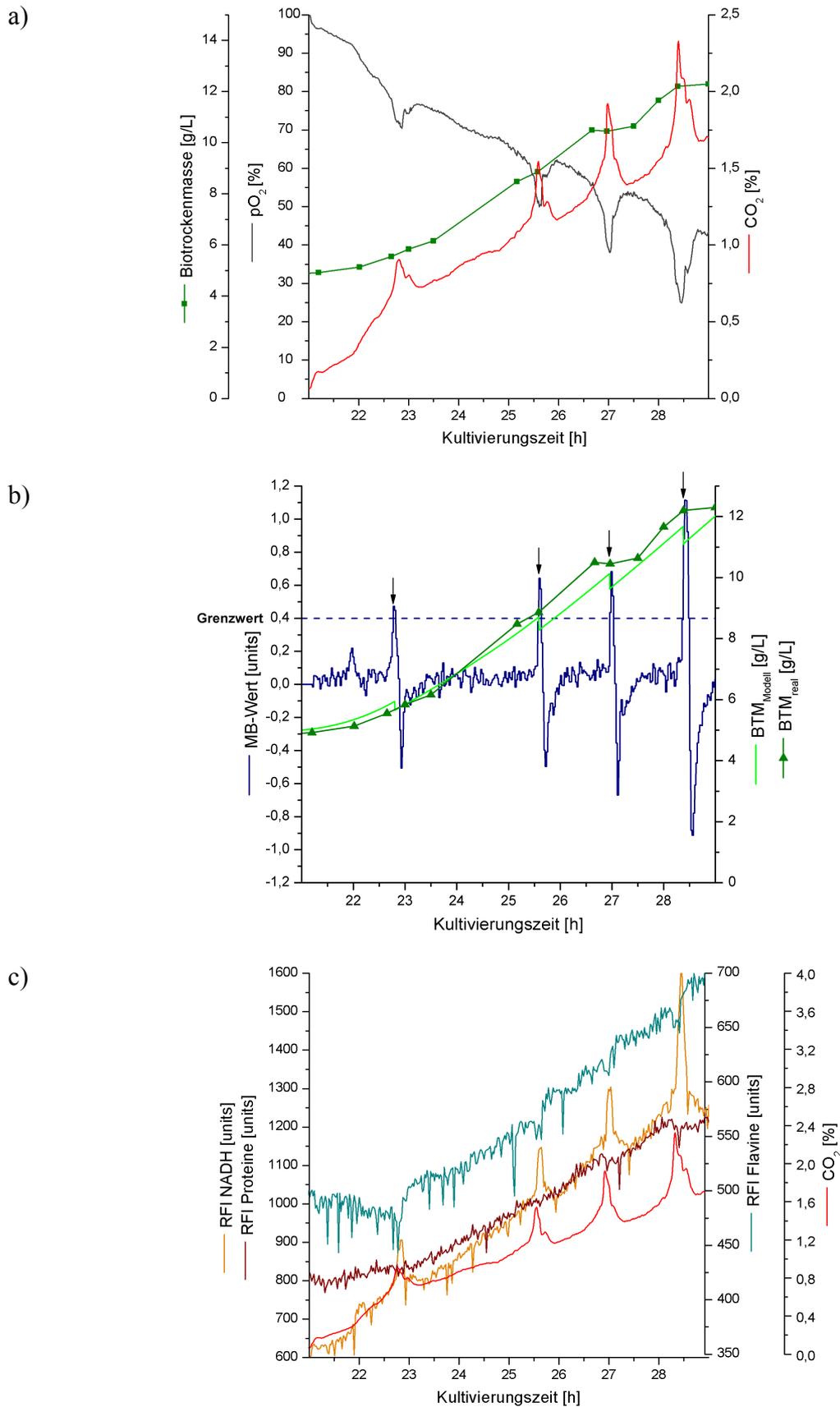


Abbildung 4.11: a) Verläufe der CO_2 -, BTM- und Ethanolkonzentration; b) MB-Wert (Regeleingriffe sind durch Pfeile markiert) und CO_2 -Konzentration; c) NADH-, Protein- und Flavin-Fluoreszenz der Kultivierung FB3

4.10 Kultivierung mit erhöhter Biomasse

Zur Untersuchung des Verhaltens des Regelmodells bei höheren Biomassen wurde eine Kultivierung mit einer Startbiomasse von 23,7 g/L durchgeführt. Die Glucosekonzentration der Feedlösung wurde auf 100 g/L verdoppelt.

Bei dem verwendeten Reaktor tritt bei der Verwendung von Pressluft zur Begasung bei BTM-Werten von mehr als ca. 15 g/L eine Sauerstofflimitierung in der Kulturbrühe auf, der pO_2 sinkt auf unter 10 %. Um dies zu verhindern, wurde der Pressluft Sauerstoff beigemischt, um den pO_2 auf einen Wert von mehr als 30 % zu halten. Die Begasungsrate wurde konstant gehalten. Die Regelparameter wurden von der Kultivierung FB3 übernommen.

Die Fedbatch-Phase der Kultivierung FB4 wurde über einen Zeitraum von 7 h durchgeführt. Über den gesamten Kultivierungsverlauf betrug der gelöstsauerstoffgehalt mehr als 60 %, so dass eine Ethanolproduktion aufgrund anaerober Bedingungen ausgeschlossen werden konnte. Die Verläufe der wichtigsten Kultivierungsparameter sind in Abbildung 4.12 dargestellt.

Der MB-Grenzwert wurde insgesamt sieben mal überschritten und eine beginnende Ethanolproduktion vorhergesagt. Dabei wurden innerhalb kurzer Zeit mehrfache Grenzwertüberschreitungen detektiert. Zunächst wurde die Anfahrphase bei 43,1 h beendet, der MB-Wert steigt auf bis zu 2,1 und die Glucosekonzentration im Reaktor auf bis zu 0,073 g/L an. Der MB-Wert sank jedoch anschließend nur bei einem 2D-Spektrum wieder unter die Schwelle von 0,4 und stieg anschließend wieder auf 0,7 an. Dadurch wurde schon 0,25 h später die nächste Ethanolproduktion erkannt. Die Glucosekonzentration zeigte einen analogen Verlauf. Sie sank aufgrund der reduzierten Pumprate kurzfristig auf 0,057 g/L ab, stieg jedoch unmittelbar danach wieder auf 0,072 g/L an. In den 2D-Fluoreszenzspektren war nur ein Anstieg im Verlauf der NADH-Fluoreszenz um ca. 300 RFI bei 43,1 h zu erkennen, wodurch eindeutig eine Stoffwechsellumstellung erkannt wurde. Wie die Offlineanalyse zeigte, wurde eine geringe Menge Ethanol produziert, die bis zur nächsten Offlineprobe wieder verstoffwechselt wurde. Durch die doppelte Reduzierung der Pumprate wird die Stoffwechselkapazität der Hefezellen kurzfristig nicht voll ausgelastet.

Ca. 60 min später, bei 44,0 h, erreichte die Glucosekonzentration wieder den Wert von 0,073 g/L, bei der zum ersten Mal eine Stoffwechseländerung detektiert wurde. Im 2D-Fluoreszenzspektrum ist jedoch kein Hinweis auf eine erneute Änderung zu erkennen.

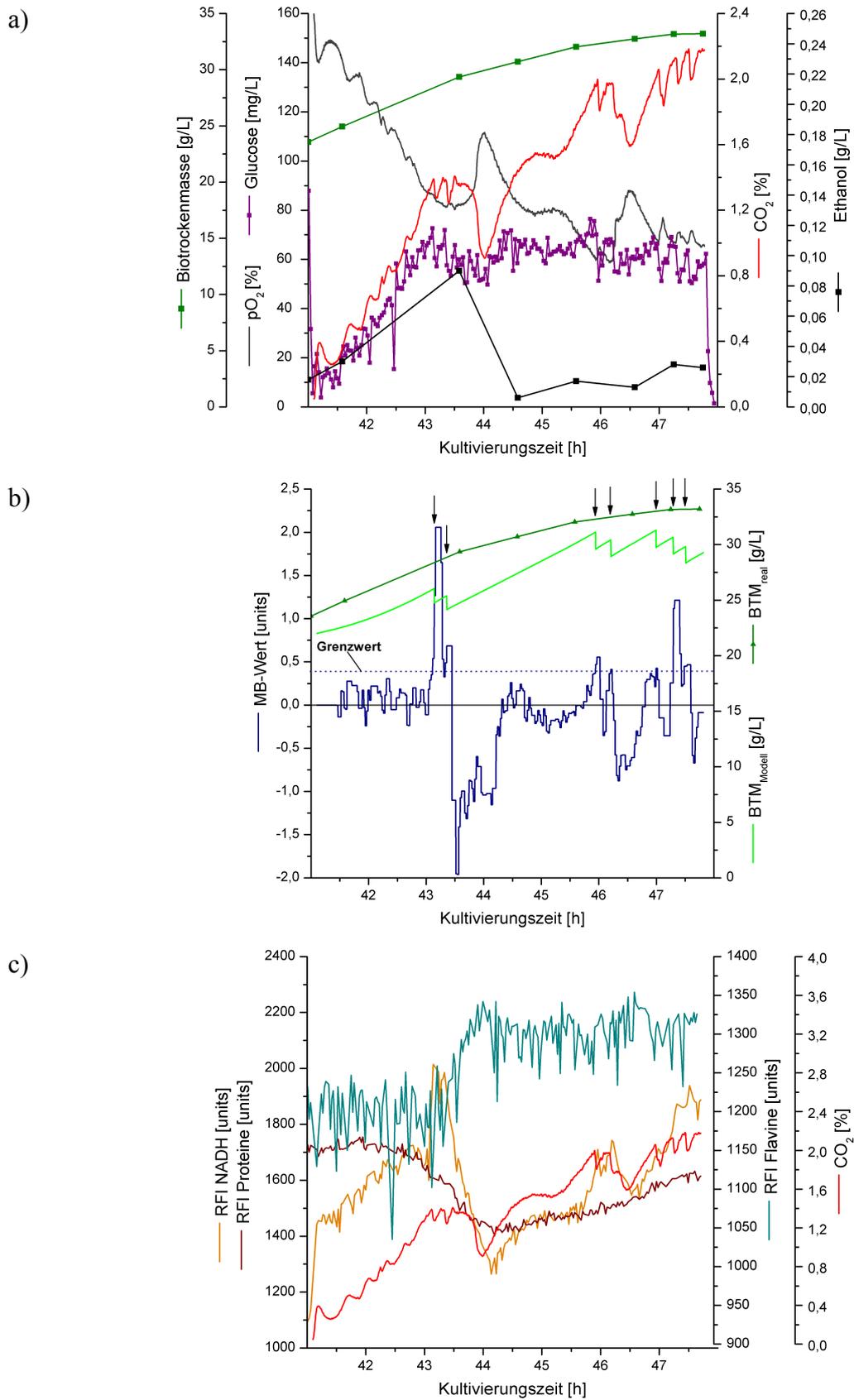


Abbildung 4.12: a) Verläufe des Gelöstsauerstoffgehalts, der BTM-, CO₂- und Ethanolkonzentration; b) MB-Wert (Regeleingriffe sind durch Pfeile markiert), BTM des Modells sowie reale BTM; c) NADH-, Protein- und Flavin-Fluoreszenz und CO₂-Konzentration der Kultivierung FB4

Bei 46,0 h und 46,2 h werden erneut Stoffwechselumstellungen innerhalb kurzer Zeit vom System erkannt. Zu beiden Zeitpunkten war dies ebenfalls im Verlauf der NADH-Fluoreszenz, des CO₂-Gehaltes und der Glucose zu erkennen.

Gegen Ende der Kultivierung überschritt der MB-Wert zwischen 47,0 h und 47,7 h drei Mal den Schwellenwert. Hierbei fällt sofort auf, dass der Anstieg der NADH-Fluoreszenz weitaus geringer war als bei den vorangegangenen Stoffwechseländerungen. Die Reduzierungen der Pumpraten hatten keinen Einfluss auf die Fluoreszenz, jedoch sank der MB-Wert wieder auf einen Wert von -0,7 ab, und lag damit unterhalb des definierten Schwellenwertes von 0,4. Die Offlineproben zeigen nur eine minimale Ethanolproduktion.

Im Verlauf der Kultivierung wurden 92,4 g Glucose zugefüttert und 39,7 g Biomasse produziert. Dies ergab eine Ausbeute von 0,43 g BTM je g Glucose. Damit lag sie unter den Werten der Kultivierungen FB2 und FB3, jedoch noch oberhalb den Werten für einen anaeroben Stoffwechsel (siehe Kapitel 2.3.1). Der Grund hierfür lag in der erheblich höheren Biomasse. Sie führte zu einem erhöhten Stress der Zellen und einem erhöhten Erhaltungstoffwechsel.

Wie diese Kultivierung zeigt, konnte die Regelung auch bei höheren Biomassen mit einer ausreichenden Sauerstoffversorgung erfolgreich angewendet werden. Allerdings war eine einmalige Reduzierung der Biomasse des Modells um 5 % nicht ausreichend, um eine Ethanolproduktion zu verhindern. Dies wurde vom Regelsystem durch eine mehrfache Reduzierung innerhalb kurzer Zeit kompensiert.

4.11 Kultivierung mit Sauerstofflimitierung

Bei der Kultivierung FB5 sollte abschließend das Verhalten des Regelmodells bei einer Limitierung des Gelöstsauerstoffgehaltes in der Kulturbrühe untersucht werden. Die Parameter wurden von der Kultivierung FB4 übernommen.

Die Fedbatch-Phase der Kultivierung FB5 wurde über 10 Stunden durchgeführt. Während des Prozesses wurde die Pumprate acht mal automatisch reduziert. Während der ersten zwei Reduzierungen wurde die kritische Glucoseaufnahme überschritten. Die beginnende Stoffwechselumstellung ist sowohl im Verlauf des CO₂-Gehaltes im Abgas und in der NADH-Fluoreszenz zu erkennen (siehe Abbildung 4.13). Dabei wurden die für die Anfangsphase erwarteten Glucosekonzentration von bis zu 0,085 g/L erreicht. Anschließend sank die Konzentration bis 46,6 h auf 0,045 g/L ab und stieg bis 50,7 h auf einen Wert von 0,071 g/L an.

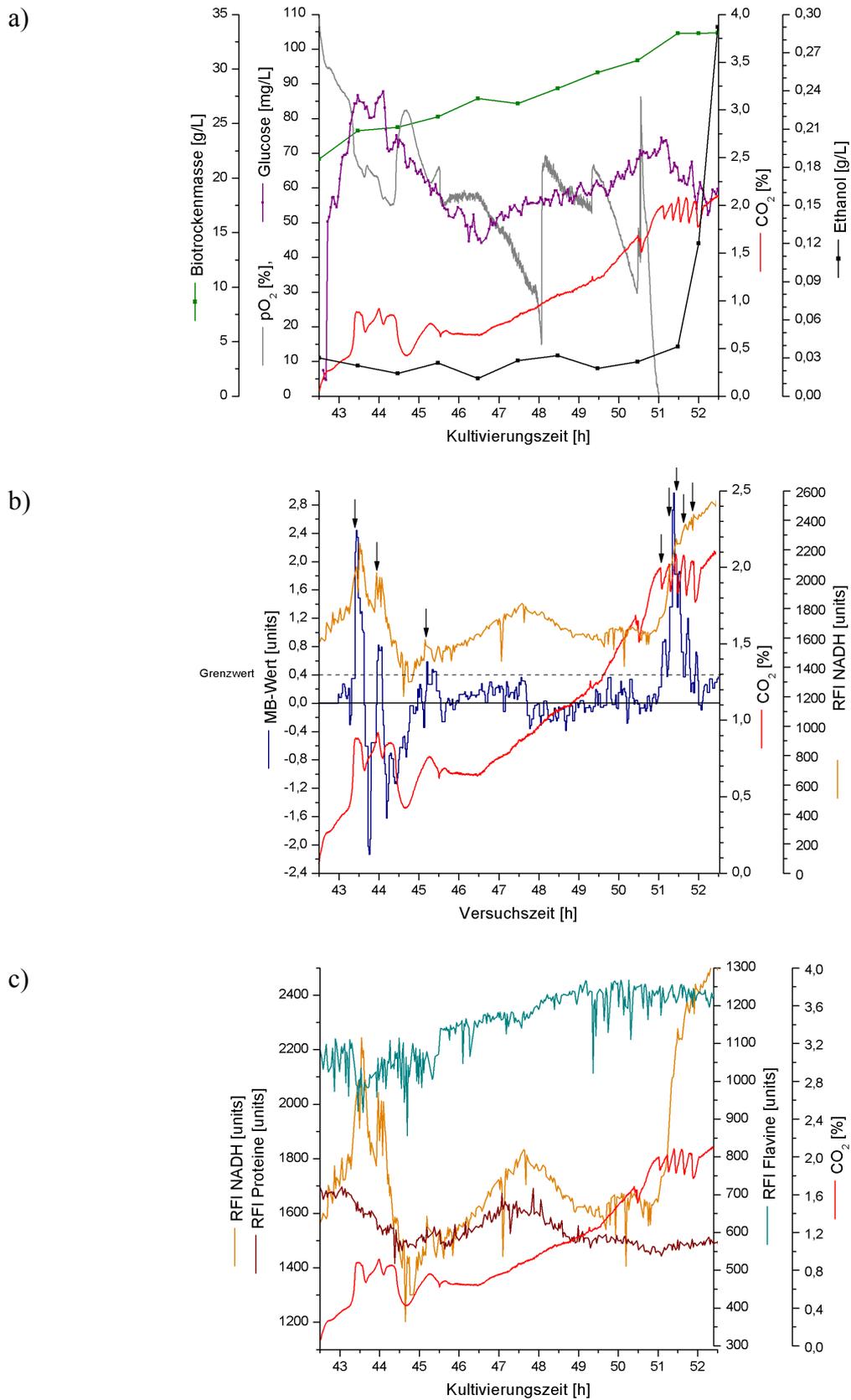


Abbildung 4.13: a) Verläufe der BTM, des Gelöstsauerstoffgehalts, der CO₂- und Ethanolkonzentration;
 b) MB-Wert (Regeleingriffe sind durch Pfeile markiert) und NADH-Fluoreszenz;
 c) NADH-, Protein- und Flavinfloureszenz während der Kultivierung FB5

Bedingt durch den hohen Sauerstoffbedarf wurde nach 50,5 h die Begasung auf reinen Sauerstoff umgestellt. Trotzdem erreicht der pO_2 nach 51 h einen Wert von 0 %. Erwartungsgemäß kam es zu einer Umstellung des Stoffwechsel. Die NADH-Fluoreszenz stieg innerhalb kurzer Zeit von 1600 Einheiten um mehr als 50 % auf über 2500 Einheiten an. Der MB-Wert stieg dabei auf bis zu 3,0 an. Infolge der Schwellenwertüberschreitung erfolgten innerhalb von einer Stunde fünf Eingriffe in die Pumprate. Da die Regelung in Zeitraum von 0,2 h nach einer Überschreitung des MB-Schwellenwertes ausgesetzt wurde, war dies die größtmögliche Reduktionsrate. Die Glucosekonzentration sank dabei von 0,075 g/L auf 0,058 g/L ab. Die Biomasse des zur Berechnung verwendeten Modells sank dabei von 33,8 g/L um 16 % auf 28,6 g/L. Nach 51,5 h setzte eine merkliche Ethanolproduktion ein. Im 2D-Fluoreszenzspektrum ist dies durch den hohen Wert der NADH-Fluoreszenz zu erkennen. Die Ausbeute lag mit $Y_{x/s} = 0,40$ g BTM / g Glucose aufgrund der Ethanolproduktion unterhalb des Wertes der Kultivierung FB4.

Das Regelsystem war nicht in der Lage, die durch die limitierte Sauerstoffversorgung verursachte Ethanolproduktion zu verhindern. Eine Reduktion der Biotrockenmasse um 5 % war nicht ausreichend. Um das System auch für eine Sauerstoffmangelversorgung verwendbar zu machen, ist eine Fallunterscheidung zwischen der Ethanolproduktion durch erhöhte Glucoseaufnahmeraten und einer Ethanolproduktion durch eine limitierte Sauerstoffversorgung notwendig. Bei einer Betrachtung der Änderungen im 2D-Fluoreszenzspektrum der beiden Fälle ist ein deutlicher Unterschied ersichtlich. In Abbildung 4.14 sind die auf 1 normierten Differenzspektren dargestellt.

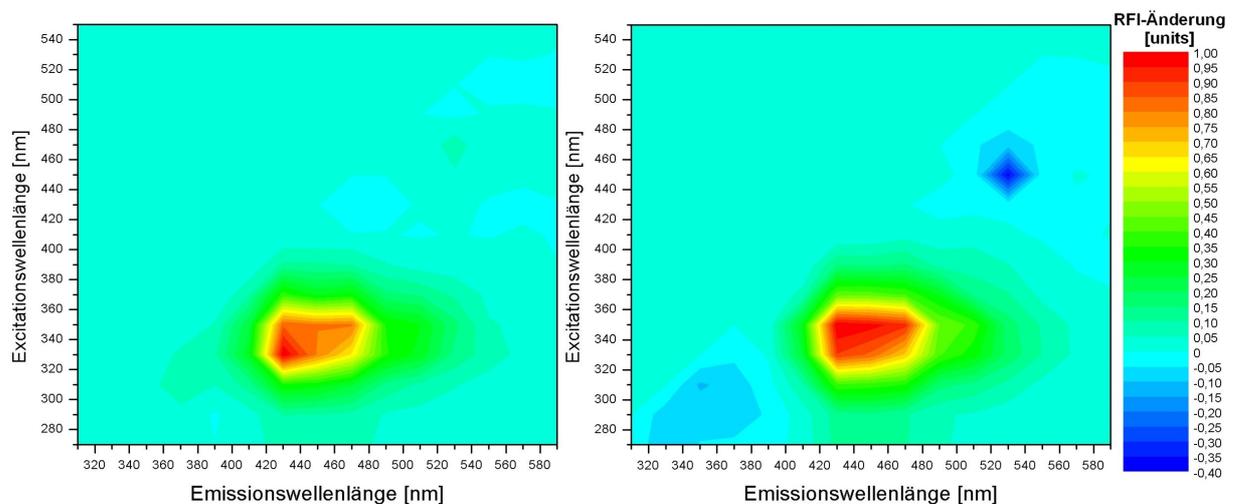


Abbildung 4.14: Auf einen Maximalwert von 1 normierte 2D-Fluoreszenzdifferenzspektren bei beginnender Ethanolproduktion, $\Delta t = 6$ min. Links: Bedingt durch eine limitierte Sauerstoffversorgung. Rechts: Bedingt durch eine hohe Glucoseaufnahmerate.

Liegt die Ursache der Ethanolproduktion in einer zu hohen Glucoseaufnahme, so sinkt die Fluoreszenz im Bereich des FMN (Ex. 450 nm / Em. 530 nm) die Fluoreszenz um 0,35 ab, im Bereich des Tryptophan (Ex. 290 nm / Em. 350 nm) um 0,1. Bei einer limitierten Sauerstoffversorgung steigt die Fluoreszenz jedoch in beiden Bereichen minimal an.

4.12 Zusammenfassung

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Regelung der Glucosezufuhr bei Fedbatch-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 auf 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.

In Vorversuchen, bei denen definierte Glucoseprofile gefahren wurden, konnte mit Hilfe der registrierten 2D-Fluoreszenzspektren ein PLS-Modell erstellt werden, das die Berechnung eines metabolischen Faktors erlaubt. Dieser Faktor gibt Auskunft über den metabolischen Zellzustand einer *S.-cerevisiae*-Kultur. Durch die Verwendung der geglätteten Steigung des metabolischen Faktors konnte das Modell auf andere Kultivierungen übertragen werden. Durch eine Optimierung der Parameter und der Regelstrategie konnte die Vorhersagegüte des Modells erheblich gesteigert und die Anzahl der Fehlinterpretationen von 2D-Fluoreszenzspektren reduziert werden. Ausbeuten von 0,50 bis 0,53 g BTM je g Glucose zeigen, dass die Kultivierungen bei einem oxidativen Stoffwechsel verliefen und die Ethanolproduktion vermieden werden konnte.

In den Versuchen zeigte sich, dass die Glucosekonzentration in der Kulturbrühe, bei der die Stoffwechsellumstellungen detektiert wurden, von Kultivierung zu Kultivierung variierten.

Während bei der Kultivierung FB2 die Umstellung bei Konzentrationen von 0,046 bis 0,058 g/L eintraten, wurden bei den Kultivierungen FB4 und FB5 Werte von 0,068 bis 0,086 g/L gemessen. Insgesamt konnte beobachtet werden, dass bei höheren Startbiomassen die Stoffwechsellumstellungen bei höheren Glucosekonzentrationen detektiert wurde.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Regelsystem auch bei höheren Biomassen anwendbar ist. Wenn auch die Ausbeute geringfügig kleiner ist, so kann doch eine Akkumulation von Ethanol verhindert werden. Voraussetzung hierfür ist eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Hefezellen. Tritt eine Stoffwechselumstellung aufgrund von Sauerstoffmangel ein, so gerät das Regelsystem an seine Grenzen und eine Ethanolproduktion kann nicht verhindert werden. Hier besteht noch weiterer Optimierungsbedarf.

5 Fedbatch-Kultivierungen von *Echerichia coli* BL21(DE3)

Wie in Kapitel 4 dargestellt wurde, stellt die 2D-Fluoreszenzspektroskopie eine ausgezeichnete Methode zur Regelung von Fedbatch-Kultivierungen von *Saccharomyces cerevisiae* dar. Die Produktion des unerwünschten Nebenproduktes Ethanol konnte bei einer ausreichenden Sauerstoffversorgung unterdrückt werden. Durch eine Reihe von Experimenten wurde untersucht, ob ein Transfer der fluoreszenzbasierten Regelstrategie auf Kultivierungen von *E. coli* möglich ist. Ziel war eine maximale Wachstumsgeschwindigkeit μ der Zellen in Verbindung mit einem optimalen Ausbeutekoeffizienten Y_{XS} . Dazu wurden glucoselimitierte Fedbatch-Kultivierungen mit einer Glucoseaufnahmerate knapp unterhalb des kritischen Grenzwertes durchgeführt. Durch das Setzen von Glucosepulsen wurde eine Stoffwechseländerung erzwungen und die Acetatproduktion induziert. Dazu wurden in Zusammenarbeit mit *K. Hantelmann* eine Anzahl an Fedbatch-Kultivierungen durchgeführt.

5.1 Durchführung der Kultivierungen

Es wurden zwei Fedbatch-Kultivierungen mit *E. coli* BL21(DE3) durchgeführt. Bei der Kultivierung EC1 wurde ein exponentielles Feedprofil gefahren, bei der Kultivierung EC2 wurde eine konstante Feedrate eingestellt.

Um eine Fedbatch-Kultivierung nahe der kritischen Aufnahmerate durchführen zu können, mussten zunächst die maximale Wachstumsrate μ bei optimaler Nährstoffversorgung sowie der Ausbeutekoeffiziente Y_{XS} bestimmt werden. Bei zu geringen Parametern wird die respiratorische Kapazität der Zellen nicht ausgeschöpft, und es findet trotz der Glucosepulse keine Acetatproduktion statt. In Vorversuchen zeigte sich, dass die Werte für diese Parameter gegenüber den an der TU Hamburg-Harburg durchgeführten Kultivierungen heraufgesetzt werden mussten.

Die Medienzusammensetzung für Vorkultur, Hauptkultur und Feedlösung sind im Anhang im Kapitel 11.4 zusammengefasst. Die Begasung erfolgte mit einem Sauerstoff-Pressluft-Gemisch mit einem konstanten Volumenstrom. Durch die Variation des Sauerstoffanteils im Gasgemisch wurde ein pO_2 -Wert im Reaktor von mindestens 40 % eingestellt. Die Regelung des pH-Werts erfolgte mit 25-%-iger Ammoniaklösung und 10-%-iger Schwefelsäure. Zum Erreichen einer ausreichend hohen Startbiomasse wurde eine Batch-Kultivierung vorgeschaltet.

Tabelle 5.1: Parameter der *E.-coli-Kultivierungen* EC1 und EC2

Kultivierung	EC1	EC2
Glucose in der Batch [g/L]	11	30
Startbiomasse in der Fedbatch [g/L]	4,4	11,6
Reaktorstartvolumen [L]	1,5	
pH-Wert	7,0	
Rührerdrehzahl [rpm]	1000	
Temperatur [°C]	28	
Begasung	Pressluft-Sauerstoffgemisch	
Volumenstrom der Begasung [L/h]	60	
Glucosekonzentration im Feed [g/L]	636	
Feedrate [L/h]	s. Gl. (4.15)	0,023
Bioview-Messintervall [s]	73	

5.2 Fedbatch-Kultivierung EC1

Die Berechnung der Feedrate während der Fedbatch-Phase dieser Kultivierung erfolgte gemäß der Gleichung (4.15).

$$\dot{V}_{Feed} = \frac{V}{Y_{X/S} \cdot S_0} \mu_{Set} \cdot x_0 \cdot e^{\mu_{Set} \cdot t} \quad (4.15)$$

V ist das Reaktorvolumen, $Y_{X/S}$ der Ausbeutekoeffizient an Biotrockenmasse bezogen auf die Glucose, S_0 ist die Substratkonzentration in der Feedlösung, μ_{Set} die angestrebte Wachstumsrate, x_0 die Biotrockenmasse zu Beginn der Fedbatch-Phase und t die Zeit.

Die verwendeten Parameterwerte sind in Tabelle 5.2 dargestellt. Die Steuerung der Feedpumpe erfolgte durch ein Programm in Visual Basic [Ernst, 2006] auf einem Prozessleitreechner (PC-Spezialist, Pentium I 90 MHz CPU, 64 MB RAM, Betriebssystem Windows 98SE, Microsoft, Redmont, USA).

Tabelle 5.2: Parameterwerte des Modells zur Berechnung der Feedrate der Kultivierung EC1

Parameter	Wert
V [L]	1,5
$Y_{X/S}$ [g/g]	0,43
S_0 [g/L]	636
μ_{Set} [1/h]	0,225
x_0 [g/L]	4,4

Die Fedbatch-Phase wurde über 10 Stunden durchgeführt. Zu vier Zeitpunkten wurden Glucosepulse direkt in den Reaktor injiziert (1 g Glucose bei 22,5 h, 1,5 g Glucose bei 24,5 h, 26,8 h und 28,5 h, in Abbildung 5.1 durch graue Linien dargestellt). Dazu wurde eine sterile Glucosestammlösung mit 636 g/L Glucose verwendet. Dadurch wurden Konzentrationen von ca. 0,7 bis 1,0 g/L in der Kulturbrühe eingestellt. Um eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Zellen zu gewährleisten musste der Sauerstoffanteil in der Zuluft mehrmals erhöht werden. In Abbildung 5.1 sind die Zeitpunkte durch Pfeile markiert.

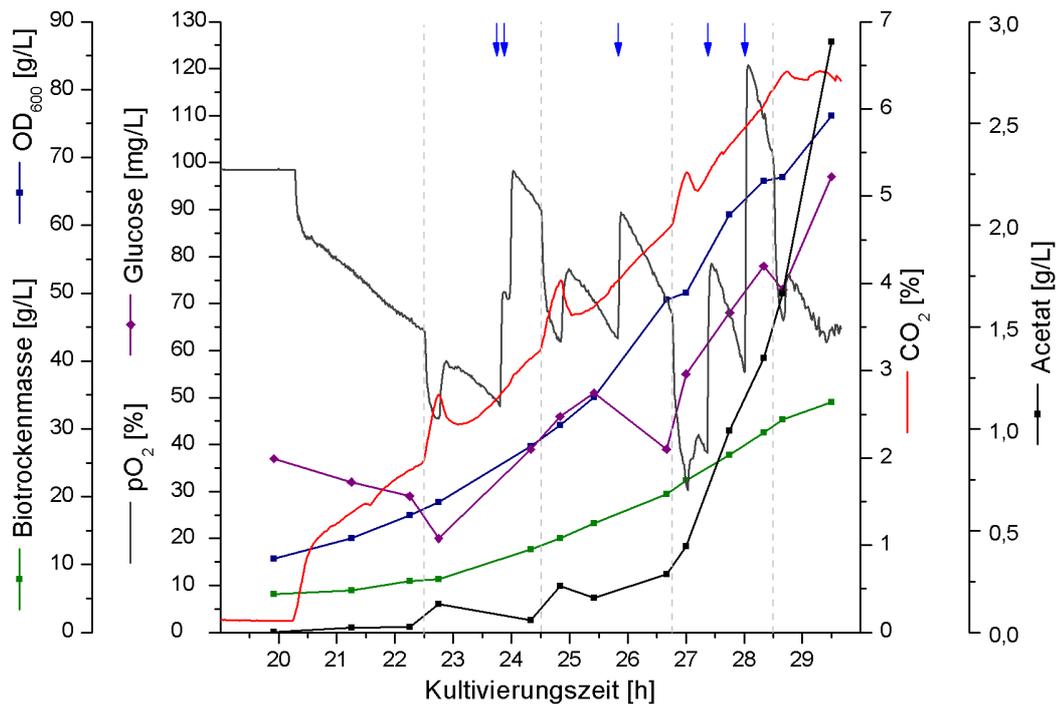


Abbildung 5.1: Verläufe der CO₂-Konzentration, pO₂-Wert, Biotrockenmasse, Glucose- und Acetatkonzentration der Kultivierung EC1 sowie die durch Pfeile markierten Zeitpunkte der Erhöhung des Sauerstoffanteils in der Zuluft

Jeder Puls hatte unmittelbar ein Ansteigen der CO₂-Konzentration und ein Absinken des pO₂-Gehaltes zur Folge, Zeichen für eine gesteigerte Stoffwechselaktivität. Die ersten beiden Pulse führten zu einer geringen Acetatproduktion. Die zusätzliche Glucose wurde schnell verbraucht, ein Nachweis in den Offlineproben war nicht möglich. Ab dem dritten Glucosepuls stieg die Glucosekonzentration merklich an. Das produzierte Acetat wurde ab diesem Zeitpunkt nicht mehr verstoffwechselt.

Ab 27 h zeigten die Biotrockenmasse und die optische Dichte ein vermindertes Wachstum an. Die erreichte optische Dichte von 80 nach 29,5 h liegt im Bereich des maximal möglichen Wert von 80 bis 100 [Ernst, 2006].

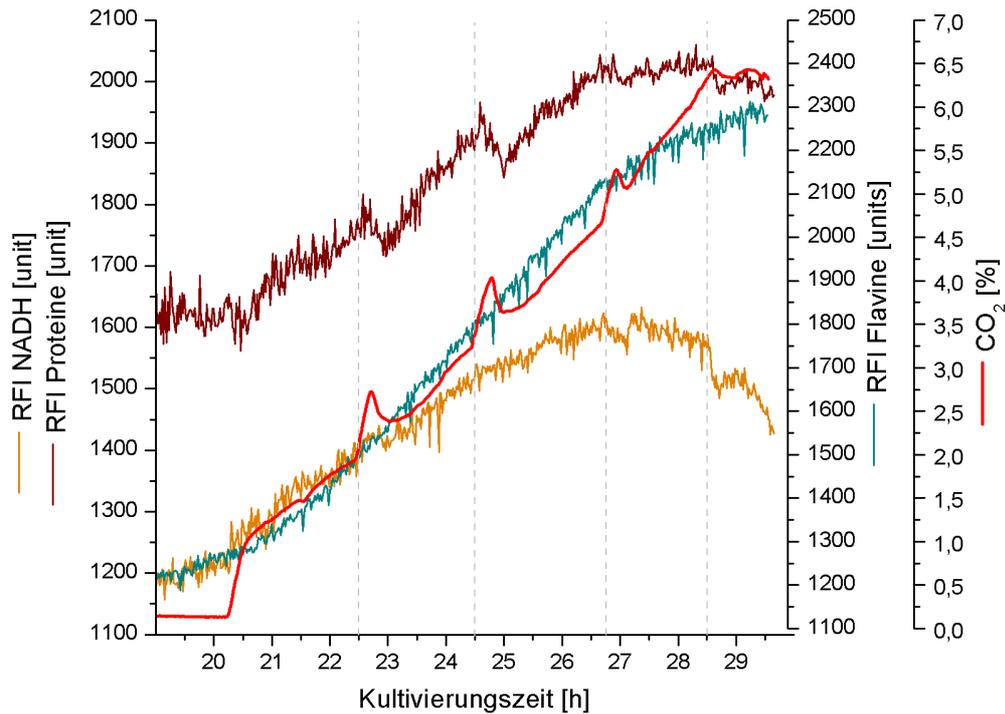


Abbildung 5.2: Verläufe der relativen Fluoreszenzintensitäten von NADH, Proteinen und Flavinen sowie die CO_2 -Konzentration der Kultivierung EC1

In Abbildung 5.2 ist der Verlauf der relativen Fluoreszenzintensitäten über den gesamten Kultivierungsverlauf dargestellt. Die Glucosepulse hatten keinen Einfluss auf die RFI der Flavine, lediglich im Bereich des NADH und der Proteine ist eine geringe Abnahme der Intensität zu erkennen. In Abbildung 5.3 sind die RFI-Verläufe während des zweiten und dritten Glucosepulses vergrößert dargestellt.

Bei beiden Pulsen nahm die RFI der Proteine zunächst langsam ab. Sie stieg wieder an, sobald der Peak in der CO_2 -Konzentration vorbei war. Der NADH-Verlauf zeigte indifferentes Verhalten. Beim zweiten Glucosepeak war keine Änderung im RFI-Verlauf zu erkennen. Während des dritten Glucosepeaks sank die Intensität langsam ab, um am Ende des CO_2 -Peaks innerhalb von drei Minuten wieder den Ausgangswert zu erreichen.

Abschließend lässt sich festhalten, dass bei der Stoffwechseländerung von rein oxidativen zu oxidoreduktivem Stoffwechsel bei *E. coli* keine signifikante Änderungen im 2D-Fluoreszenzspektrum auftritt, wie dies bei *S. cerevisiae* der Fall ist. Es treten nur geringe Abnahmen im Bereich der NADH-Fluoreszenz und etwas größere im Bereich der Protein-Fluoreszenz auf,

die jedoch nur langsam eintreten und durch das starke Messrauschen des Bioview häufig erst bei einer nachträglichen Betrachtung der Messwerte erkennbar sind.

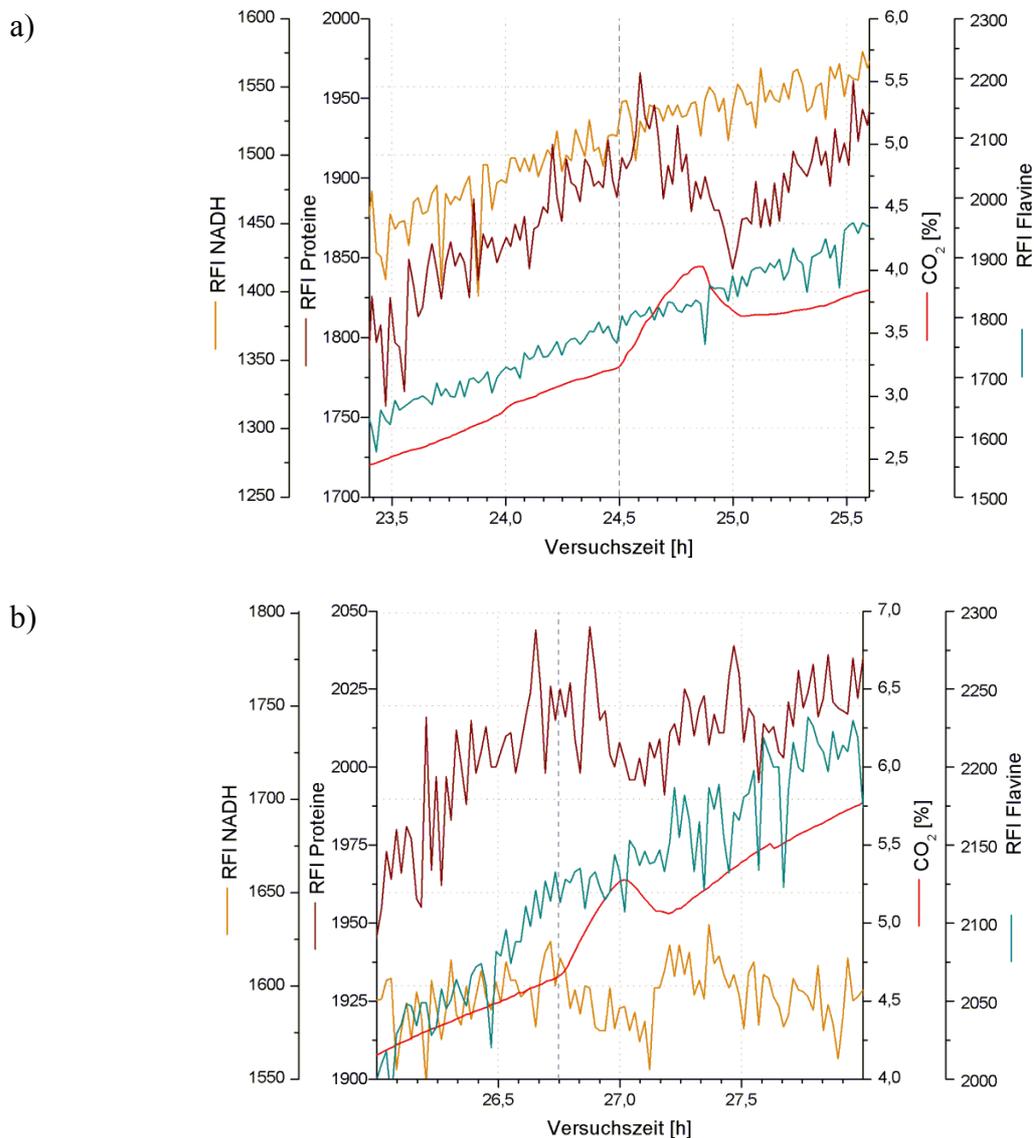


Abbildung 5.3: Verläufe der relativen Fluoreszenzintensitäten von NADH, Proteinen und Flavinen sowie die CO_2 -Konzentration während a) des zweiten und b) dritten Glucosepulses der Kultivierung EC1

Mit 459 Spektren der Kultivierung wurde eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt. Mit den beiden ersten Hauptkomponenten konnten 99,4 % der gesamten Varianz der Daten beschrieben werden. Dabei entfielen 98,0 % auf die erste und 1,4 % auf die zweite Hauptkomponente. In Abbildung 5.4 ist der Scoreplot der ersten beiden Hauptkomponenten dargestellt.

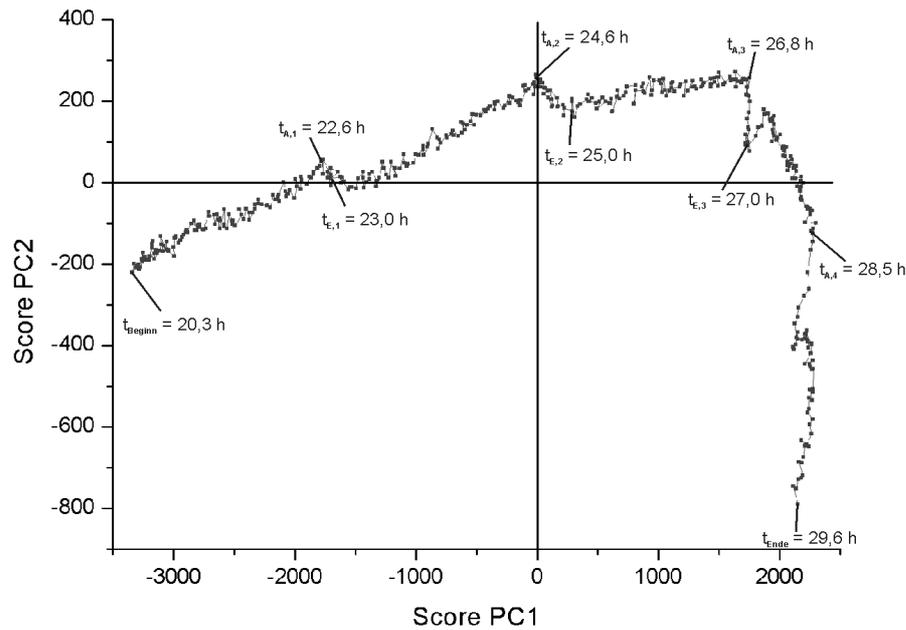


Abbildung 5.4: Plot des ersten gegen den zweiten Score der Hauptkomponentenanalyse von 532 Spektren der Kultivierung EC1. t_{Beginn} und t_{Ende} kennzeichnen den Beginn bzw. das Ende des Fedbatch-Teils der Kultivierung, $t_{A,n}$ ist der Beginn und $t_{E,n}$ das Ende des n -ten Glucosepeaks.

Die Score-Werte zeigen einen kontinuierlichen Verlauf. Die Stoffwechsellumstellungen, sowohl von oxidativ zu oxidoreduktiv als auch von oxidoreduktiv zu oxidativ, sind nur undeutlich als Änderung des Verlaufs der Werte im Plot zu erkennen. Die Änderungen von einem Spektrum zum nächsten sind jedoch minimal und werden erst nach einer zeitlichen Verzögerung ersichtlich. Im Verlauf der Kultivierung wurden die Änderungen mit zunehmender Biomasse stärker. Im Vergleich mit der Hauptkomponentenanalyse der *S.-cerevisiae*-Kultivierung FB1 (siehe Abbildung 4.3) konnten die Spektren nicht in stoffwechselabhängige Gebiete im Plot eingeteilt werden.

Durch die Pulse wurde eine Glucosekonzentration von rund 1 g/L in der Kulturbrühe eingestellt. Dies entspricht der mehr als 10 bis 30fachen Konzentration während der glucoselimitierten Phasen des Versuchs (siehe Abbildung 5.1). Bei dieser drastischen Änderung sollte die Änderung der RFI in den Fluoreszenzspektren gegenüber einer nur geringfügigen Überschreitung des kritischen Wertes besonders deutlich erkennbar sein. Diese sind jedoch nur gering und erst mit einer großen zeitlichen Verzögerung zu erkennen. Es ist zu erwarten, dass bei einer nur geringfügigen Überschreitung der kritischen Glucosekonzentration die RFI-Änderungen noch geringer ausfallen und somit eine Detektion der Stoffwechsellumstellung sehr schwierig sein wird.

Die Änderungen der Score-Werte basierten überwiegend auf Änderungen im Flavin-Bereich der 2D-Fluoreszenzspektren, die auch den größten Einfluss auf die erste Hauptkomponente zeigen (siehe Abbildung 5.5). Die NADH- und Protein-Fluoreszenz lieferte ebenfalls dem größten Beitrag für die zweite Hauptkomponente.

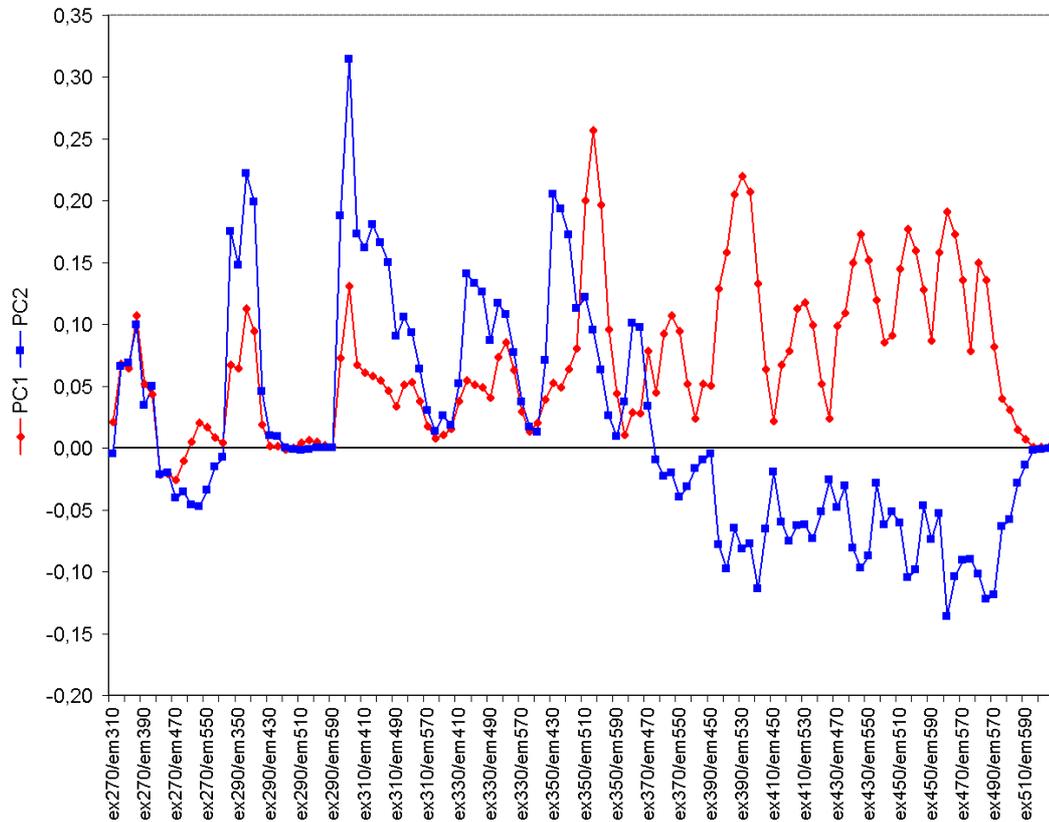


Abbildung 5.5: Loadings der ersten beiden Hauptkomponenten, berechnet aus 459 Spektren der Kultivierung EC1

Aufgrund der geringen Änderungen in den Hauptkomponenten erscheint eine eindeutige Identifizierung der Stoffwechsellage schwer möglich zu sein. Mit Hilfe eines geeigneten Modells soll jedoch versucht werden, diese vorherzusagen. Mit den bei der Hauptkomponentenanalyse verwendeten 459 Spektren wurde ein PLS-Modell zur Berechnung eines Acetatproduktions-Wertes erstellt, analog zum Ethanolproduktions-Wert der *S.-cerevisiae*-Kultivierungen. Bei einer Acetatproduktion der Zellen nimmt dieser den Wert 1 an, wenn kein Acetat produziert wird ist der Wert 0. In Abbildung 5.6 sind die berechneten AP-Werte dargestellt. Hier ist lediglich bei der Stoffwechsellage bei 24,5 h eine signifikante Änderung zu erkennen.

Zur Verifizierung dieses Ergebnisses wurden weitere Kultivierungen mit einem exponentiellen Fütterungsprofil durchgeführt. Die Vorhersage der Stoffwechseländerungen in diesen

Kultivierungen führen zu dem gleichen Ergebnis. Für diese Kultivierungen ließ sich kein Grenzwert zur Identifizierung des Beginns der Acetatproduktion festlegen. Eine verbindliche Aussage, ob rein oxidativer oder oxidoreduktiver Stoffwechszustand der *E.-coli*-Zellen vorlag war online nicht möglich.

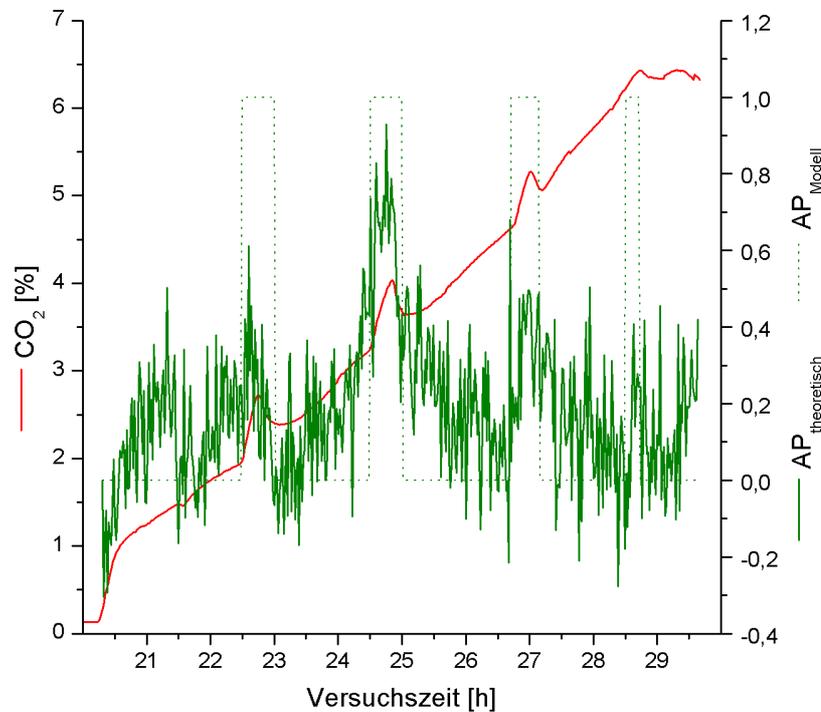


Abbildung 5.6: Verläufe der CO_2 -Konzentration, des für die Kalibration des PLS-Modells verwendeten AP-Wertes sowie der vorhergesagte AP-Wert der Kultivierung EC1

5.3 Fedbatch-Kultivierung EC2

Bei der Fedbatch-Kultivierung EC2 wurde anstelle eines exponentiellen Fütterungsprofils eine konstante Fütterungsrate eingestellt. Im Verhältnis zur Kultivierung EC1 wurde die Batch-Phase mit erheblich mehr Glucose durchgeführt, um eine größere Startbiomasse zu erhalten. Im Anschluss an die einstündige Hungerphase nach der Batch-Phase wurde eine konstante Feedrate von 0,023 l/h eingestellt. Im Verlauf der Kultivierungen wurden vier Glucosepulse in den Reaktor injiziert. Zunächst zweimal je 1 g Glucose bei 25,8 h und 27,3 h, 2 g bei 28,2 h und 1,5 g bei 29,4 h. Der Verlauf der Kultivierung ist in Abbildung 5.7 dargestellt.

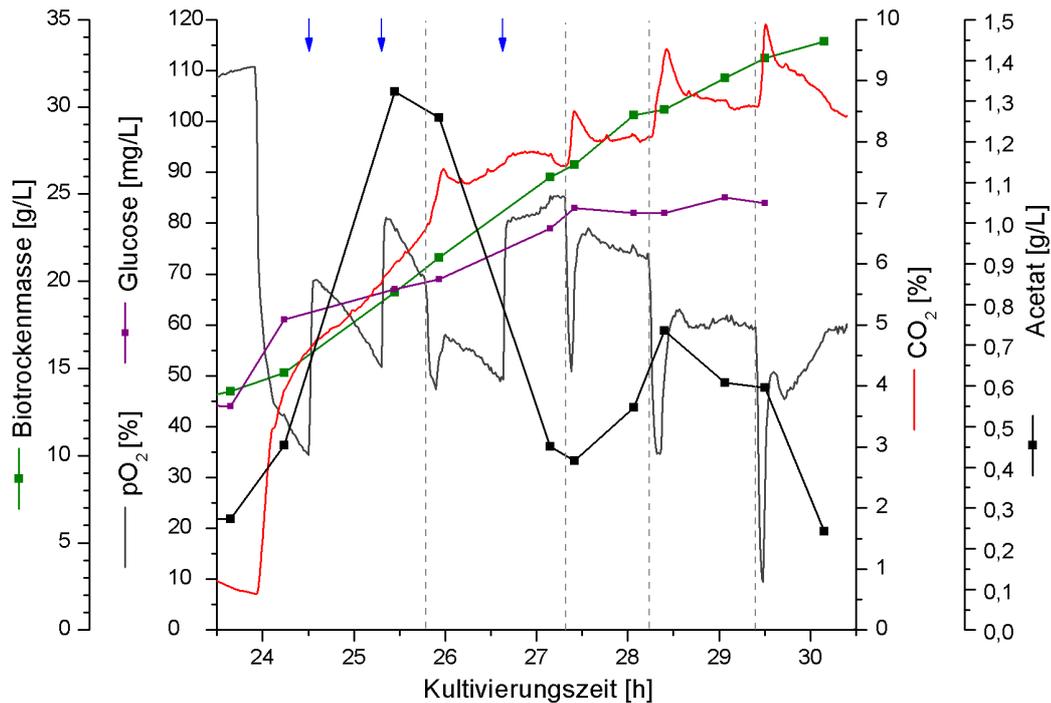


Abbildung 5.7: Verläufe der CO_2 -Konzentration, pO_2 -Wert, Biotrockenmasse, Glucose- und Acetatkonzentration der Kultivierung EC2 sowie die durch Pfeile markierten Zeitpunkte der Erhöhung des Sauerstoffanteils in der Zuluft

Zu Beginn der Fedbatch-Phase stieg die Acetatkonzentration stark an. Dies lässt auf einen oxidoreduktiven Stoffwechsel schließen. Der Grund hierfür war die erheblich höhere Glucosezufuhr. Sie lag bei Fütterungsbeginn mit 1,55 g Glucose je g BTM und Stunde erheblich höher als bei der Kultivierung EC1. Dort lag sie bei 0,45 g Glucose je g BTM und Stunde. Für einen über weite Strecken oxidoreduktiven Stoffwechsel spricht auch die geringe Ausbeute von 0,30 g BTM je g Glucose (durch die Zufuhr von 109 g Glucose wurden insgesamt 32,8 g BTM produziert). Nach dem zweiten Glucosepeak ist kein weiterer Anstieg der Acetatkonzentration zu beobachten. Erst durch den dritten Puls wird eine erneute Acetatproduktion induziert, während der vierte zu keinem erkennbaren Anstieg der Acetatkonzentration führt. Es ist anzunehmen, dass das produzierte Acetat bis zur Probenahme der Offlineprobe bereits wieder von den Zellen verstoffwechselt wurde.

In den 2D-Fluoreszenzspektren waren im Bereich der Flavin- und Protein-Fluoreszenz keine Hinweise auf die Glucosepeaks zu erkennen (siehe Abbildung 5.8). Lediglich bei der NADH-Fluoreszenz war ein geringer Abfall bei der Umstellung vom oxidoreduktiven zum oxidativen Stoffwechsel zu erkennen.

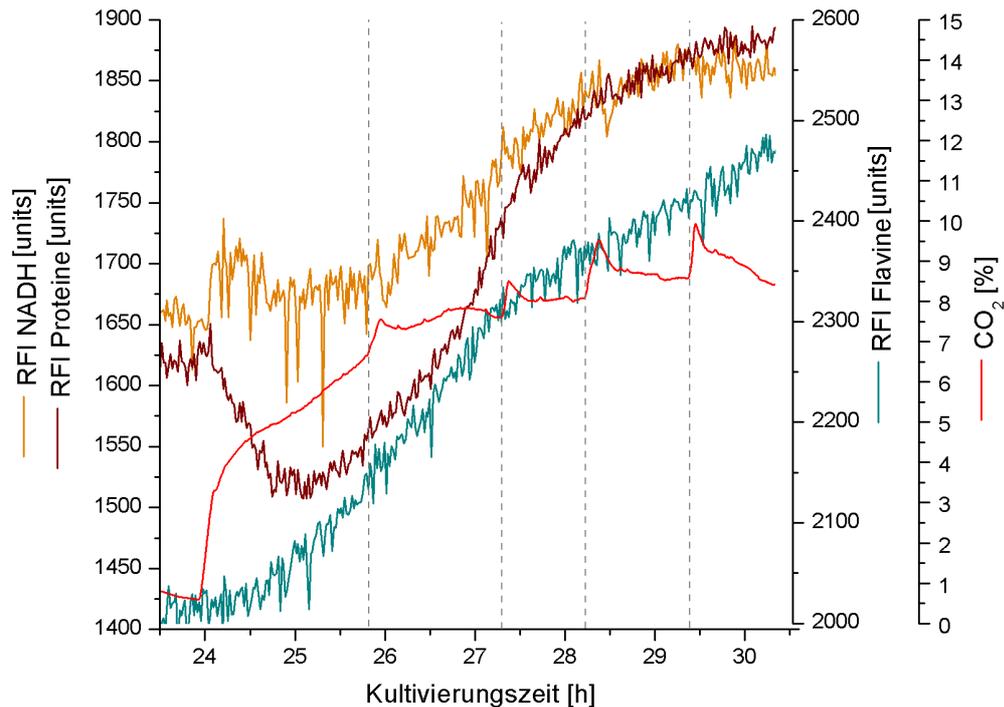


Abbildung 5.8: Verläufe der relativen Fluoreszenzintensitäten von NADH, Proteinen und Flavinen sowie die CO_2 -Konzentration der Kultivierung EC1

Mit 324 Spektren der Kultivierung wurde eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt. Auf dem in Abbildung 5.9 dargestellten Scoreplot sind für die ersten drei Glucosepeaks keinerlei Anzeichen zu erkennen. Durch die zusätzliche Glucose wurde keine Änderung des Stoffwechsels bewirkt, die Auswirkungen auf das System waren minimal. Erst der vierte Glucosepeak bei 29,4 h ist als Änderung des Verlaufs der Werte im Plot zu erkennen. Durch die im Verlauf der Kultivierung gestiegene Biomasse sank die Glucoseaufnahme der Zellen ab, so dass erst bei der Unterschreitung der kritischen Aufnahmezeit eine Stoffwechseländerung eintrat.

Im Vergleich mit der Kultivierung EC 1 zeigt der Scoreplot einen anderen Verlauf. Dies ist auf die stark unterschiedliche Prozessführung zurückzuführen. Während bei EC1 durch das exponentielle Fütterungsprofil ein rein oxidativer Stoffwechsel vorliegt, der sich durch die Glucosepulse zeitweilig zu oxidoreduktiven Stoffwechsel ändert, liegt bei EC2 bereits zu Beginn der Fedbatch-Phase ein reduktiver Stoffwechsel vor. Erst mit zunehmender Biomasse stellt sich oxidativer Stoffwechsel ein.

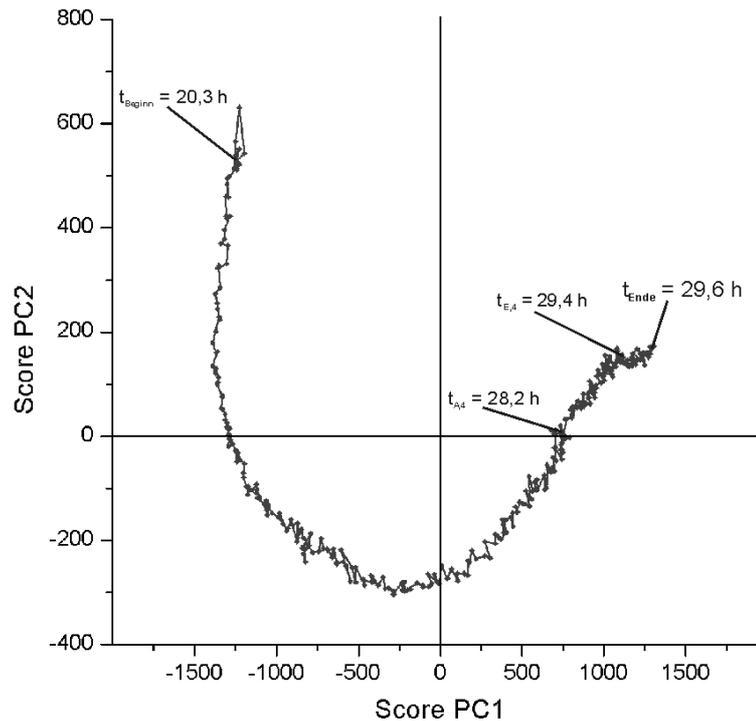


Abbildung 5.9: Plot des ersten gegen den zweiten Score der Hauptkomponentenanalyse von 324 Spektren der Kultivierung EC2. t_{Beginn} und t_{Ende} kennzeichnen den Beginn bzw. das Ende des Fedbatch-Teils der Kultivierung, $t_{A,4}$ ist der Beginn und $t_{E,4}$ das Ende des vierten Glucosepeaks.

5.4 Zusammenfassung

Bei Fedbatch-Kultivierungen von *E. coli* BL21(DE3) konnte durch das Setzen von Glucosepulsen bei aeroben Bedingungen die Acetatproduktion gezielt eingeleitet werden. In den Spektren machte sich dies durch ein geringes Absinken der RFI im Bereich der Proteine und des NADH bemerkbar. Die Änderungen traten jedoch nicht sofort bei der Stoffwechseländerung ein, sondern erst mit einer zeitlichen Verzögerung. Des Weiteren trat die RFI-Abnahme über einen längeren Zeitraum zu Tage. Das erhebliche Messrauschen des Bioview erschwerte die Identifizierung erheblich.

Die Durchführung einer Hauptkomponentenanalyse bei der Kultivierung EC1 zeigte, dass 99,4 % der gesamten Varianz durch die ersten beiden Hauptkomponenten beschrieben wurden. Im Scoreplot waren alle Stoffwechselumstellungen deutlich zu erkennen. Eine Unterteilung der Spektren nach dem herrschenden Stoffwechselzustand war jedoch nicht möglich. Der Versuch zur Vorhersage eines zum EP-Wert der *S. cerevisiae* analogen AP-Wertes lieferte keine befriedigenden Ergebnisse, es konnte kein Grenzwert festgelegt werden. Eine Vorher-

sage des Stoffwechselzustandes bzw. eine Umstellung vom oxidativen zum oxidoreduktiven Stoffwechsel ist nicht möglich.

Da sich die Stoffwechseländerungen nicht vorhersagen lassen ist die Entwicklung einer Regelstrategie zum rein oxidativen Wachstum von *E. coli* BL21(DE3) auf der Basis von 2D-Fluoreszenzmessungen nur schwer möglich.

6 Vorhersage von Prozessgrößen

In diesem Kapitel wird eine Vorhersage von Prozessgrößen aus den 2D-Fluoreszenzspektren vorgestellt, die mit Hilfe geeigneter chemometrischer Modelle erzielt wurden. Dazu erfolgte zunächst mit Hilfe mehrerer Kultivierungen eine Kalibration des Modells, um bei anderen Kultivierung online eine Bestimmung dieser Prozessgrößen durchführen zu können. Die Ergebnisse der Vorhersagen werden am Beispiel einer *S.-cerevisiae*- und einer *E.-coli*-Kultivierung dargestellt.

6.1 Vorhersagen bei *S.-cerevisiae*-Kultivierungen

Zur Vorhersage der Biotrockenmasse und der optischen Dichte wurden PLS1-Modelle erstellt. Zur Kalibration wurden die Fedbatch-Phasen der Kultivierungen FB1, FB2 und FB6 verwendet. Um die Menge der zur Verfügung stehenden Daten zu vergrößern, wurden die BTM und OD für die Spektren, zu denen keine Offlinedaten verfügbar waren, durch einen Polynomen interpoliert. Dadurch standen 1339 Spektren mit Offlinewerten zur Verfügung. Die Validierung des Modells erfolgte durch eine zufällige Kreuzvalidierung. In Abbildung 6.1 ist der absolute und relative RMSEC des Modells dargestellt.

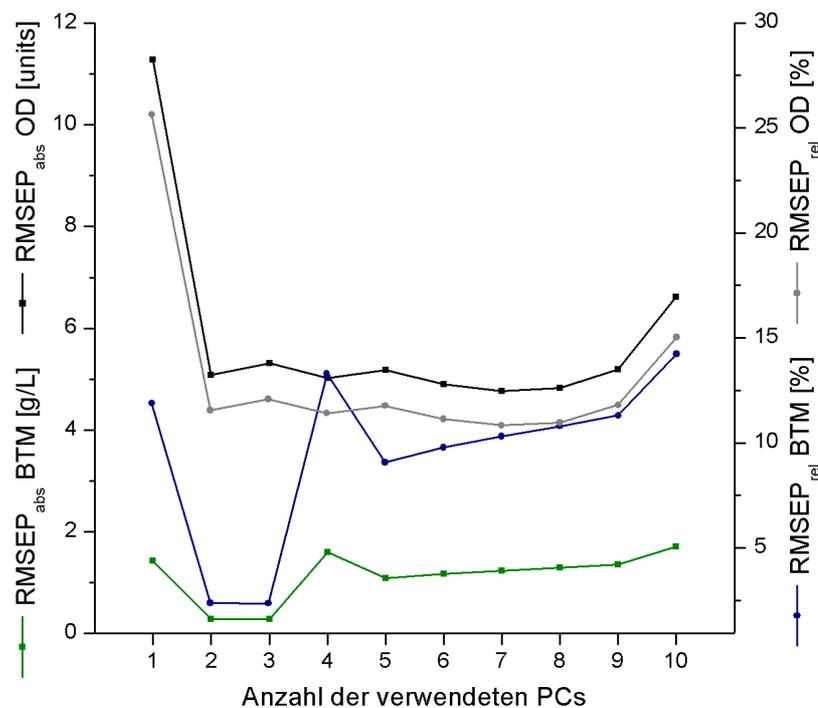


Abbildung 6.1: Absoluter und relativer RMSEC der Vorhersage von BTM und OD des Modells aus den Kultivierungen FB1, FB2 und FB6 in Abhängigkeit von der Anzahl der verwendeten PCs.

Die Vorhersage der Biotrockenmasse erreichte bereits bei der Verwendung von lediglich zwei PCs einen relativen RMSEC von 2,38 %. Die beste Vorhersage wurde mit drei PCs erzielt, der Fehler lag mit 2,35 % geringfügig niedriger. Mit einer steigenden Anzahl an PCs wurde der Fehler der Vorhersage wieder größer. Die Vorhersage der optischen Dichte war mit einem erheblich größeren Fehler behaftet. Er lag bei 10,8 % unter Verwendung von 7 PCs.

In Abbildung 6.2 sind die Offlinewerte der Kultivierung FB3 sowie die Vorhersagen unter Verwendung von 3 PCs für die BTM-Werte und 7 PCs für die OD-Werte dargestellt. Für die Biotrockenmasse ist eine sehr gute Übereinstimmung festzustellen. Der Fehler der Vorhersage beträgt 2,6 %. Die Offlinewerte der optischen Dichte wurden durch die Vorhersage nur unzureichend beschrieben. Der Anstieg der OD wird zu niedrig vorhergesagt. Mit 6,7 % ist der Fehler der Vorhersage wesentlich größer als bei der Biotrockenmasse.

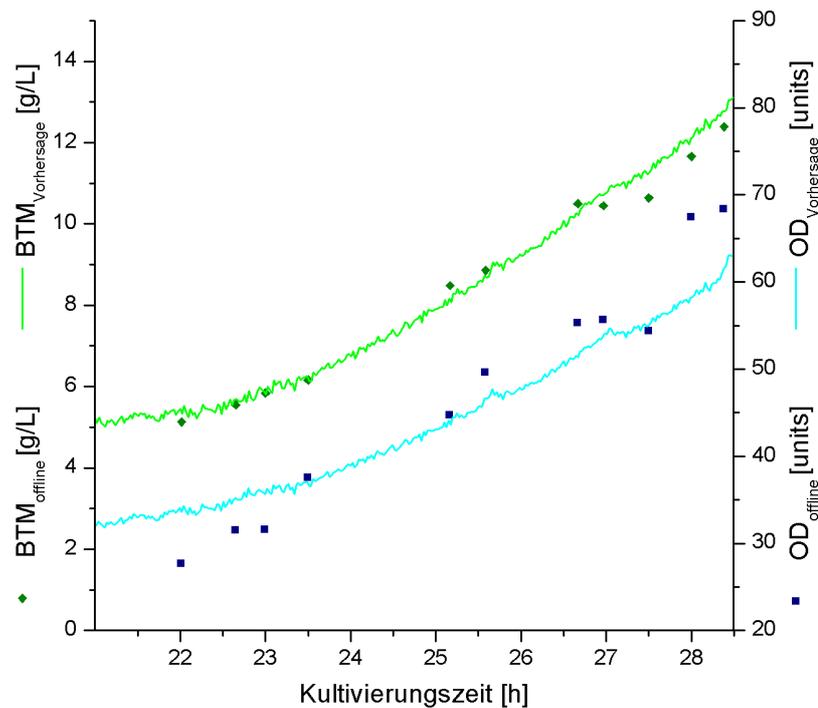


Abbildung 6.2: Offline- und vorhergesagte Werte der Kultivierung FB3. Für die Biotrockenmassevorhersage wurden 3 PCs, für die Vorhersage der optischen Dichte 7 PCs verwendet.

6.2 Vorhersagen bei *E.-coli*-Kultivierungen

Wie auch bei den Hefekultivierungen in Kapitel 6.1 sollte für die Fedbatch-Phase der *E.-coli*-Kultivierung EC1 die Biotrockenmasse und die optische Dichte mit PLS1-Modellen vorhergesagt werden. Zur Kalibration der Modelle wurden die Kultivierungen EC3 und EC4 verwendet, die analog zur Kultivierung EC1 durchgeführt wurden (siehe Kapitel 5.1). Fehlende

Offlinewerte wurden durch Polynome interpoliert. Insgesamt standen 1479 Datensätze zur Verfügung. Die Validierung des Modells erfolgte durch eine zufällige Kreuzvalidierung. In Abbildung 6.1 ist der absolute und der relative RMSEC der Vorhersage dargestellt.

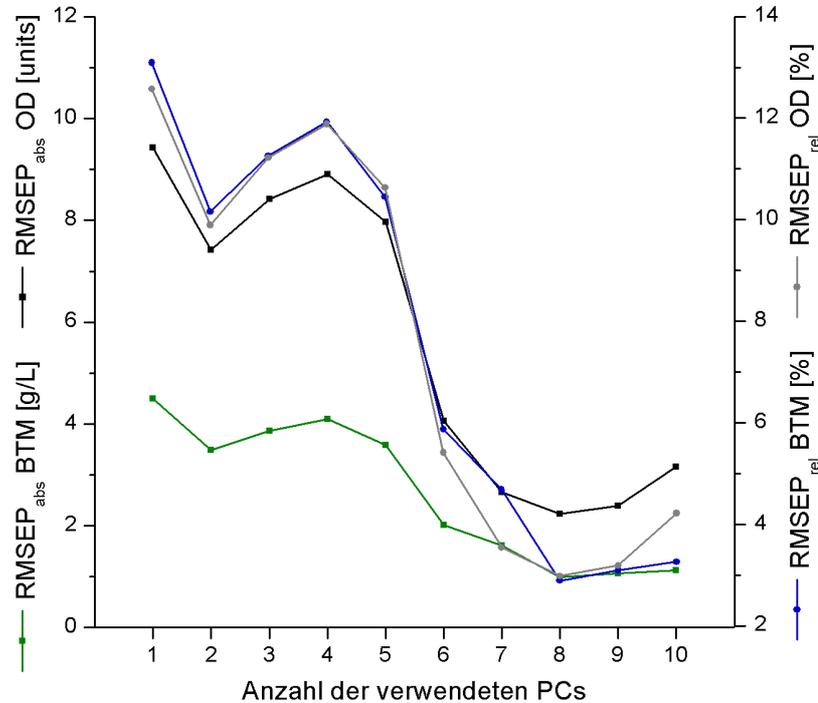


Abbildung 6.3: Absoluter und relativer RMSEC der Vorhersage von Biotrockenmasse und optischer Dichte des Modells aus den Kultivierungen EC3 und EC4 in Abhängigkeit von der Anzahl der verwendeten PCs.

Die Vorhersagen für beide Prozessgrößen zeigte für den relativen RMSEC einen fast identischen Verlauf. Der Grund hierfür liegt im annähernd linearen Zusammenhang zwischen den beiden Prozessgrößen. Die Offlinewerte der optischen Dichte lassen sich mit einem akzeptablen Fehler durch Multiplikation mit dem Faktor 2,2 aus der Biotrockenmasse berechnen. Bei den Hefekultivierungen in Kapitel 6.1 war eine solche einfache Berechnung der optischen Dichte nicht möglich, da der Zusammenhang zwischen beiden Größen komplexer war.

Mit zunehmender Anzahl an PCs nimmt der RMSEC ab, erreicht bei 8 PCs ein Minimum und steigt anschließend wieder an. Der RMSEC betrug bei der Verwendung von 8 PCs 2,8 % bei der Biotrockenmasse und 3,0 % bei der optischen Dichte. In Abbildung 6.4 ist der Verlauf der Vorhersagen bei der Verwendung von 8 PCs dargestellt. Die Offlinewerte beider Prozessgrößen konnten durch die Vorhersagen sehr gut beschrieben werden. Der Fehler der Vorhersage liegt bei 3,2 % für die Biotrockenmasse und bei 4,1 % für die optische Dichte.

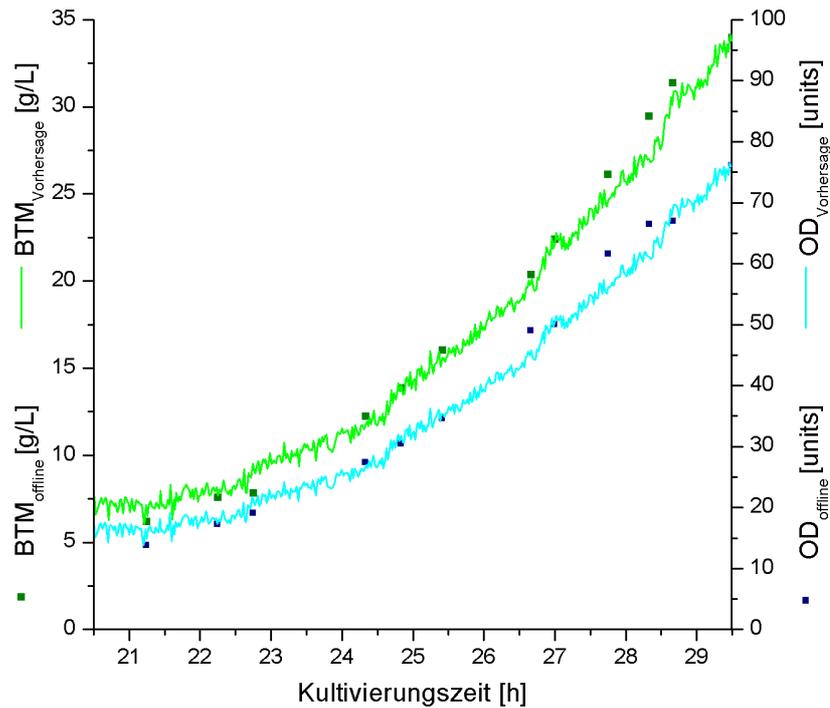


Abbildung 6.4: Offline- und vorhergesagte Werte der Kultivierung EC1 unter Verwendung von 8 PCs.

6.3 Zusammenfassung

Sowohl für die Hefe- als auch für die *E.-coli*-Kultivierungen konnten PLS1-Modelle erstellt werden, die eine Vorhersage der Biotrockenmasse mit einem akzeptablen Fehler bei weiteren Kultivierungen ermöglichten. Dadurch ist eine Verwendung dieser Größen bei der Prozessregelung möglich. So kann z. B. durch die Onlinebestimmung der BTM der optimale Zeitpunkt zur Induktion der Penicillin-Amidase-Produktion bei der Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3) bestimmt werden.

7 Informationsgehalt von Spektren

7.1 Der Informationsgehalt

Wie die vorangegangenen Kapitel gezeigt haben ist die 2D-Fluoreszenzspektroskopie ein geeignetes Mittel zur Prozessbeobachtung. Abschließend soll am Beispiel der Kultivierungen FB3 und EC1 die in den Spektren enthaltene Information analysiert werden. Dazu betrachtet man zunächst die Wahrscheinlichkeit $P_{ex/em}$, dass die Intensität der Messung einer Wellenlängenkombination in einem Intervall ΔRFI anzutreffen ist.

$$P_{ex/em} = \frac{\text{Anzahl Messpunkte im Intervall } \Delta RFI}{\text{Anzahl der Messungen}} \quad (5.1)$$

Die Information $I_{ex/em}$ einer WLK eines Spektrums wird gemäß Gleichung (5.2) berechnet. Die insgesamt in einem Spektrum enthaltene Information I ist die Summe der Informationen aller Wellenlängenkombinationen (Gleichung (5.3)).

$$I_{ex/em} = -\log_2(P_{ex/em}) \quad (5.2)$$

$$I = \sum_{WLK} I_{ex/em} \quad (5.3)$$

Die Größe des Intervalls ΔRFI wurde für jede Wellenlängenkombination individuell festgelegt. Dazu wurden für jede WLK mit Hilfe eines Savitzky-Golay Filters ein Polynom zweiter Ordnung mit einer Fensterbreite von 51 Messwerten durch den zeitlichen Intensitätsverlauf einer Kultivierung berechnet. Die Intervallbreite ΔRFI wurde als zweifache Reststandardabweichung festgelegt.

7.2 Informationsgehalt der Spektren bei Kultivierungen

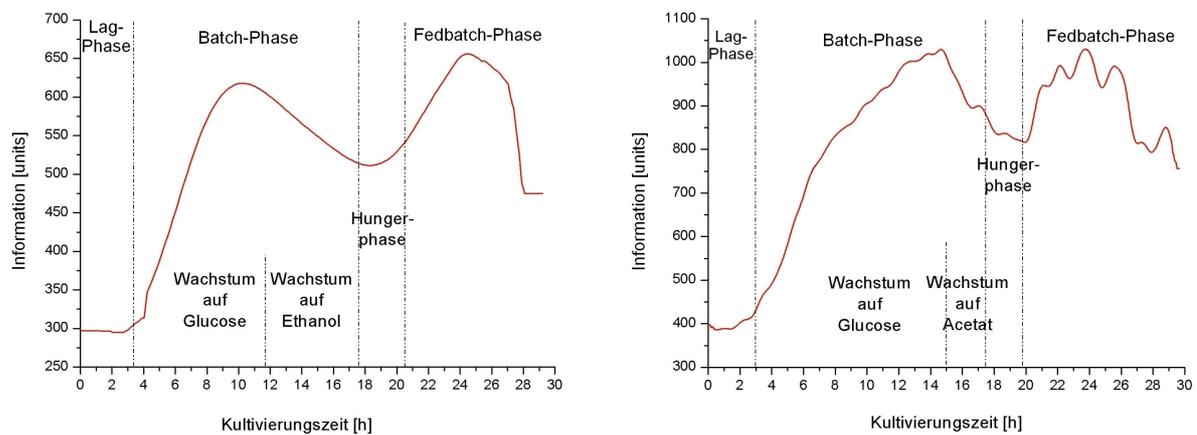
Der Informationsgehalt von 2D-Fluoreszenzspektren wurde am Beispiel der Kultivierungen FB3 (*S. cerevisiae*) und EC1 (*E. coli*) untersucht. Dazu wurden sowohl die Spektren der Batch- als auch der Fedbatch-Phasen verwendet. In Tabelle 7.1 sind die einzelnen Phasen der beiden Kultivierungen zusammengefasst.

Tabelle 7.1: Die Phasen der Kultivierungen FB3 (*S. cerevisiae*) und EC1 (*E. coli*)

Phase	FB3	EC1
Batch gesamt	0,0 – ca. 19,0 h	0,0 – ca. 18,8 h
davon Wachstum auf Glucose	0,0 – ca. 10,7 h	0,0 – ca. 15,2 h
davon Wachstum auf Ethanol/Acetat	ca. 10,7 – ca. 19,0 h	ca. 15,2 – ca. 18,8 h
Hungerphase	ca. 19,0 – 21,0 h	ca. 18,8 – ca. 20,4 h
Fedbatch	ab 21,0 h	ab 20,4 h

Für die Berechnung des Informationsgehalts müssen die Spektren in einem konstanten Messintervall aufgenommen worden sein. Da bei den *S.-cerevisiae*-Kultivierungen während der Batch- und der Hunger-Phase das Messintervall erheblich länger war als während der Fedbatch-Phase, wurde nur jedes dritte Spektrum verwendet. Insgesamt wurden 217 Spektren der Kultivierung FB3 und 1479 Spektren der Kultivierung EC1 für die Untersuchung genutzt.

In Abbildung 7.1 sind die zeitlichen Verläufe der Information für beide Kultivierungen dargestellt. Sie zeigen entsprechend der ähnlichen Durchführung der Kultivierungen ein ähnliches Verhalten, in denen die einzelnen Phasen der Prozessführung erkennbar sind.

Abbildung 7.1: Verlauf der Information I der Kultivierungen FB3 (links) und EC1 (rechts)

Zu Beginn der Batch-Phasen blieb der Wert der Information annähernd konstant. In dieser Lag-Phase fand aufgrund der sehr geringen Biomasse im Reaktor nur eine minimale Stoffwechselaktivität statt. Anschließend stieg der Wert kontinuierlich an, bis er zum Zeitpunkt der Umstellung des Substrates von Glucose auf Ethanol bzw. Acetat ein Maximum erreichte. Anschließend sank der Informationsgehalt wieder ab. Während der Hunger-Phase zwischen

Batch- und Fedbatch-Phase erreichte der Wert ein Minimum und stieg mit Beginn der Zufütterung wieder an. Beide Kurven weisen während der Fedbatch-Phase ein weiteres Maximum auf. Bei der Hefekultivierung, ließ sich darüber hinaus eine leichte Erhöhung der Informationswerte während Fedbatch-Phase erkennen, dies war für die betrachtete *E.-coli*-Kultivierung nicht der Fall.

In Abbildung 7.2 ist die Information der einzelnen WLK während der Batch-, der Hunger- und der Fedbatch-Phase dargestellt. In den Spektren der Kultivierung FB3 war während der Batch-Phase die größte Information im Bereich der Proteine (λ_{ex} 270-290 nm, λ_{em} 310-410 nm) sowie im Bereich λ_{ex} 350-470 nm, λ_{em} 500-590 nm enthalten. Mit Beginn der Hungerphase sank die Information im Bereich der Proteine erheblich ab. Während der Fedbatch-Phase war der Wert wieder sehr hoch. Die höchste Information während der Fedbatch-Phase war jedoch im Bereich λ_{ex} 330-390 nm, λ_{em} 410-590 nm zu finden. Hier befindet sich auch die NADH-Fluoreszenz.

Die *E.-coli*-Kultivierung EC1 zeigt gegenüber der Kultivierung FB3 ein abweichendes Verhalten. Während der Batch-Phase war die Information in den Spektren im Bereich λ_{ex} 270-290 nm, λ_{em} 310-530 nm, in dem unter anderem die Proteine liegen, am höchsten. Weiterhin war im Bereich des NADH bei λ_{ex} 330-390 nm, λ_{em} 430-470 nm ein deutlicher Peak zu erkennen, dessen Höhe jedoch deutlich unter der der Peaks im Protein-Bereich liegt.

Wie auch bei der Hefekultivierung verschob sich mit Beginn der Hunger-Phase die größten Informations-Werte in den Bereich höherer Emissionswellenlänge (λ_{ex} 330-510 nm, λ_{em} 500-590 nm). Mit Beginn der Zufütterung von Glucose steigt der Informations-Wert im gesamten Spektrum an, lediglich im Bereich λ_{ex} 270-290 nm, λ_{em} 270-390 nm bleibt der Wert niedrig.

Die Information in den einzelnen Wellenlängenkombinationen unterlagen in ihrem zeitlichen Verlauf sowie von WLK zu WLK relativ starken Schwankungen. Der Informationsgehalt einer WLK an einem Zeitpunkt t ist durch die Phase des Bioprozesses bedingt. Zur Identifizierungen der für den Informationsgehalt einer Kultivierung relevanten Wellenlängenkombinationen wurde die Information $I_{\text{ex/em}}$ der einzelnen WLK jeweils über die gesamte Kultivierung aufsummiert und in Abbildung 7.3 dargestellt. WLK mit einem geringen Informationsgehalt brauchen bei zukünftigen Kultivierungen nicht mitgemessen zu werden. Durch die Reduzierung der Anzahl der Messpunkte kann die Messfrequenz erhöht werden.

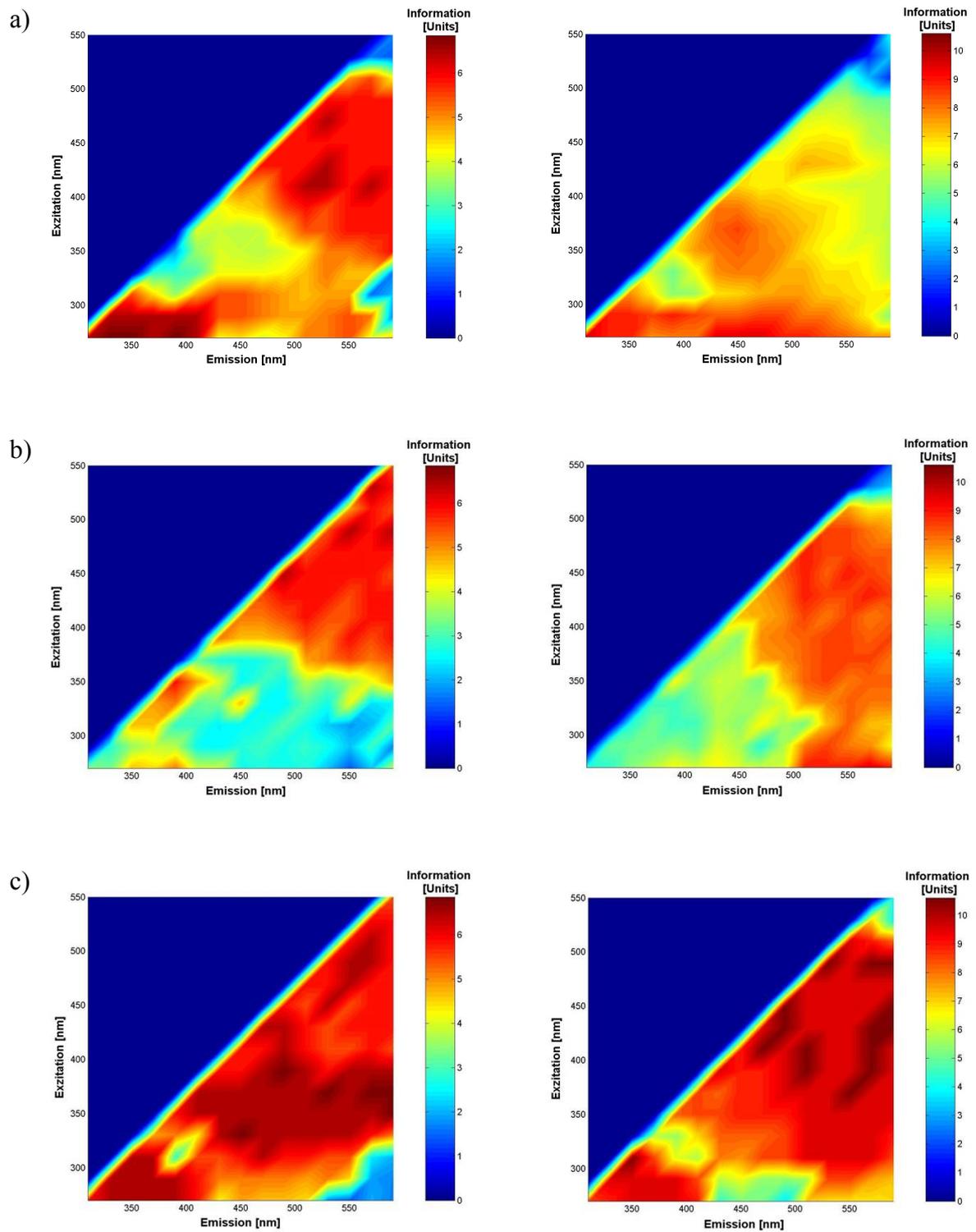


Abbildung 7.2: Information in allen WLK eines Spektrums. a) In der Batch-Phase bei 8,0 h. b) In der Hunger-Phase bei 18,0 h. c) In der Fedbatch-Phase bei 23,5 h.

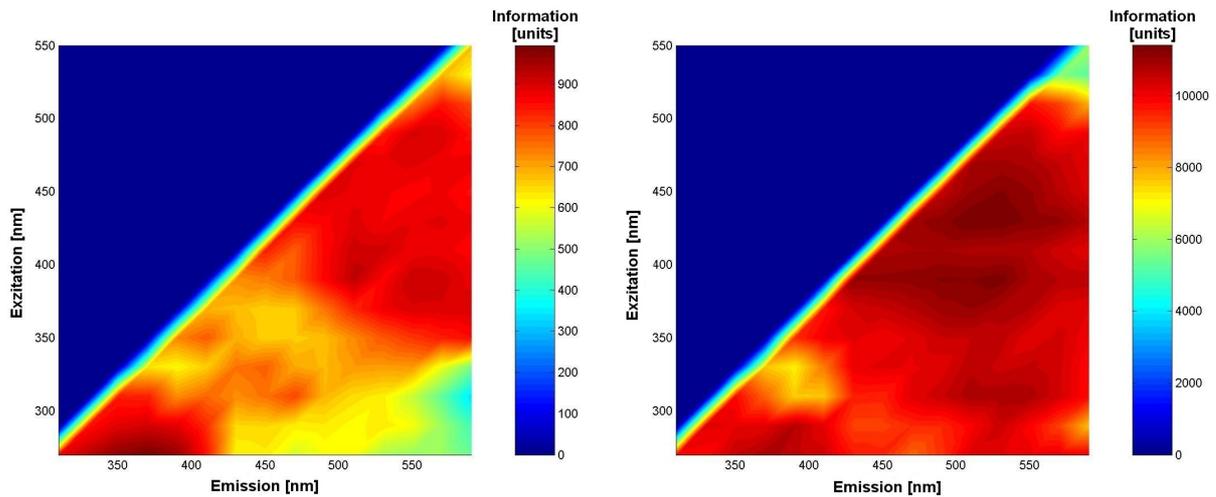


Abbildung 7.3: Summe der Information $I_{\text{ex/em}}$ über alle Spektren der Kultivierungen. Links: FB3. Rechts: EC1

Bei der Hefekultivierung FB3 lagen die größten Werte im Bereich der Proteine (λ_{ex} 270-290 nm, λ_{em} 310-400 nm) sowie im Bereich λ_{ex} 350-470 nm, λ_{em} 500-590 nm, zu dem auch die Flavine gehören. Der Bereich der NADH-Fluoreszenz (λ_{ex} 330-350 nm, λ_{em} 430-450 nm) zeigte einen erheblich geringeren Informationsgehalt. Die *E.-coli*-Kultivierung EC1 zeigt ein anderes Verhalten. Obwohl hier der Informationsgehalt im Bereich der Protein-Fluoreszenz sehr hoch ist, so wird diese noch von den Werten im Bereich der Flavine übertroffen (λ_{ex} 370-470 nm, λ_{em} 430-530 nm).

7.3 Zusammenfassung

Die Information in den einzelnen Wellenlängenkombinationen unterliegt in ihrem zeitlichen Verlauf sowie von WLK zu WLK relativ starken Schwankungen. Dabei konnten Bereiche in den Spektren identifiziert werden, die aufgrund ihres hohen Informationsgehaltes besonders für die Berechnungen von chemometrischen Modellen geeignet sind. Neben dem Bereich der Protein-Fluoreszenz war dies bei den Hefen insbesondere der Bereich λ_{ex} 350-470 nm, λ_{em} 500-590 nm sowie bei der *E.-coli*-Kultivierung der Bereich der Flavine.

8 Sensitivitätsanalyse von 2D-Fluoreszenzspektren

Die optischen Filter des Bioview sind so gewählt worden, dass zwischen den einzelnen Transmissionsmaxima der Messpunkte des 2D-Fluoreszenzspektrums ein Wellenlängenabstand $\Delta\lambda_{\text{ex/em}}$ von 20 nm liegt. In diesem Kapitel soll untersucht werden, inwieweit Informationen verloren gehen und ob ein kleinerer Abstand notwendig ist oder ob die Abstände erhöht werden können.

Für die Sensitivitätsanalyse wurden in Zusammenarbeit mit *K. Hantelmann* Lösungen von acht Fluoreszenzfarbstoffen mit dem F-4500 Fluoreszenzspektrometer (Hitachi, Japan) bei einem Wellenlängenabstand $\Delta\lambda_{\text{ex/em}}$ von 5 nm vermessen. In Tabelle 11.15 im Anhang sind die verwendeten Farbstoffe aufgeführt. Neben den Lösungen der einzelnen Farbstoffe wurden auch drei Farbstoffgemische untersucht. Im Anhang sind in Tabelle 11.16 die Konzentration der Farbstoffe in den 11 Lösungen zusammengefasst, in Tabelle 11.17 sind die Einstellungen des F-4500 dargestellt.

8.1 Reduzierte Spektren

Mit einem MATLAB-Programm werden durch Auslassung der entsprechenden Messwerte reduzierte Spektren mit einem Wellenlängenabstand $\Delta\lambda_{\text{ex/em}}$ von 10, 15, 20, 25 und 30 nm generiert. In Abbildung 8.1 ist das Originalspektrum einer Farbstoffmischung sowie das daraus generierte Spektrum mit $\Delta\lambda_{\text{ex/em}} = 30$ nm dargestellt. Deutlich sind Unterschiede zwischen beiden Spektren zu erkennen. Am gravierendsten sind die Unterschiede beim größten Peak des Spektrums. Während er im Originalspektrum bei $\lambda_{\text{ex/em}} 500/520$ nm liegt, verschiebt sich der Peak beim reduzierten Spektrum nach $\lambda_{\text{ex/em}} 480/520$ nm. Die Intensität nimmt dabei von 6353 units um 27,3 % auf 4616 units ab. Durch die geringere Auflösung gehen wichtige Informationen über das Peakmaximum und über die Peak-Umgebung verloren.

Um diesen Informationsverlust zu quantifizieren, wurde durch Interpolation ein Spektrum mit $\Delta\lambda_{\text{ex/em}} = 5$ nm berechnet. Für die Interpolation wurden die drei in MATLAB bereits implementierte Verfahren *linear*, *spline* und *cubic* verwendet. In Tabelle 8.1 sind die mittleren absoluten und relativen Fehler der neu berechneten Spektren in Bezug auf das Originalspektrum angegeben.

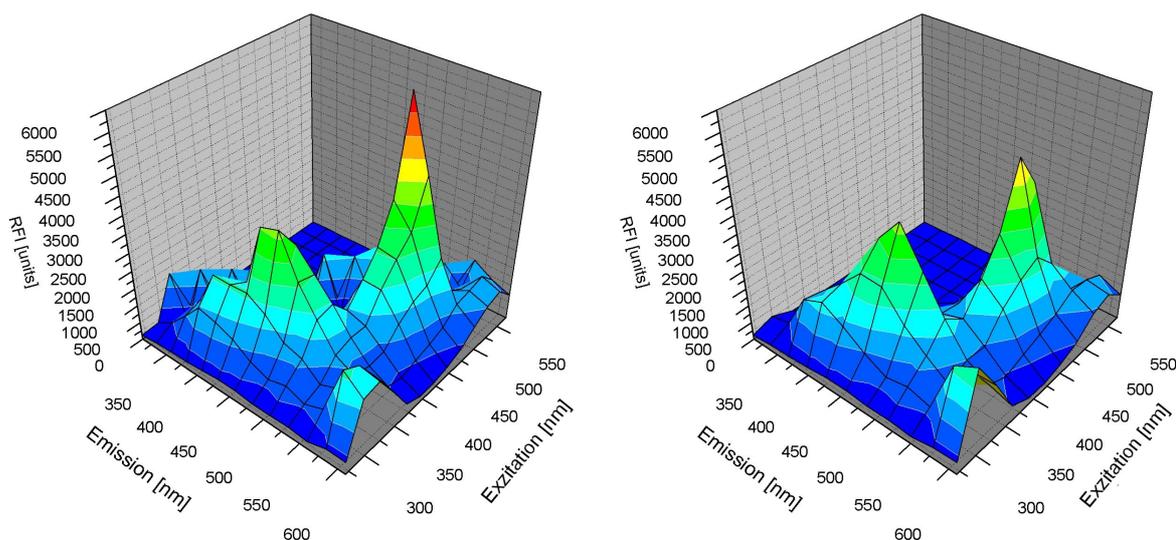


Abbildung 8.1: Fluoreszenzspektren der Lösung aus den Farbstoffen Alexa Fluor 430, Hoechst 33342, 4-Methyl-umbelliferryl-phosphat, FITC, Propidiumiodid, Rhodamin, und Sytox Green, aufgenommen mit dem F-4500 Fluoreszenzspektrometer. Links: $\Delta\lambda_{\text{ex/em}} = 5$ nm. Rechts: $\Delta\lambda_{\text{ex/em}} = 30$ nm.

Tabelle 8.1: Relative und absolute Fehler der aus den reduzierten Spektren neu berechneten Spektren in Bezug auf das Originalspektrum ($\Delta\lambda_{\text{ex/em}} = 5$ nm)

		Interpolationsmethode					
		linear		spline		cubic	
		relativ [%]	absolut [nm]	relativ [%]	absolut [nm]	relativ [%]	absolut [nm]
Wellenlängenabstand $\Delta\lambda_{\text{ex/em}}$ [nm]	10	2,7 %	187	1,5 %	104	1,9 %	129
	15	4,1 %	283	3,5 %	242	3,4 %	232
	20	5,8 %	396	5,7 %	391	5,2 %	357
	25	7,7 %	532	7,5 %	515	7,1 %	490
	30	10,4 %	716	10,1 %	694	9,7 %	667

Der mittlere Fehler nimmt mit steigendem $\Delta\lambda_{\text{ex/em}}$ zu. Dabei liefert die Cubic-Methode die besten Ergebnisse, lediglich bei einem Wellenlängenabstand von 10 nm ist der Fehler der

Spline-Methode um 0,4 % besser. Mit der linearen Interpolation ergaben sich jeweils die größten Fehler. Bei dem vom Bioview verwendeten Wellenlängenabstand von 20 nm beträgt der Fehler zwischen 5,2 % und 5,8 %.

Der Wellenlängenabstand hat einen weitaus größeren Einfluss auf den Fehler als die für die Interpolation verwendete Methode. Für die Frage nach dem zu verwendenden Wellenlängenabstand reicht die Betrachtung des Fehlers alleine nicht aus. Es muss noch berücksichtigt werden, in wie weit zwei nebeneinander liegende Peaks aufgelöst werden. In Abbildung 8.2 ist als Beispiel eine Ausschnittsvergrößerung der Spektren aus Abbildung 8.1 dargestellt.

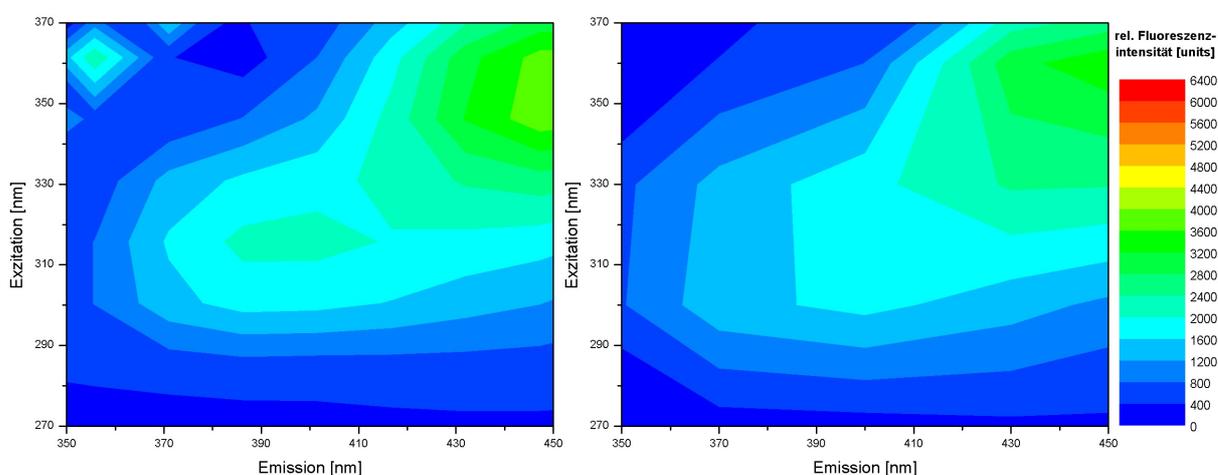


Abbildung 8.2: Vergrößerung eines Ausschnitts von Abbildung 8.1. Links: $\Delta\lambda_{\text{ex/em}} = 5 \text{ nm}$.

Rechts: $\Delta\lambda_{\text{ex/em}} = 30 \text{ nm}$.

Während bei einem Wellenlängenabstand von 5 nm der Peak bei $\lambda_{\text{ex/em}} 320/390 \text{ nm}$ deutlich zu erkennen ist, ist er bei einem Wellenlängenabstand von 30 nm nicht mehr als solcher erkennbar. Bei einem Wellenlängenabstand von 20 nm sind alle Peaks der aufgenommenen Spektren noch eindeutig erkennbar, während bei 25 nm und 30 nm einzelne Peaks wie oben gesehen nicht erkennbar sind.

8.2 Chemometrische Sensitivitätsanalyse

Zur Auswertung der gesamten in einem Spektrum enthaltenen Informationen wurde eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt. Um eine ausreichende Anzahl an Spektren zu erhalten, wurden die in Tabelle 11.16 beschriebenen Farbstofflösungen im Verhältnis 1:1 und 1:3 verdünnt und ebenfalls vermessen. Somit standen für die Hauptkomponentenanalyse

33 Spektren zur Verfügung. Aus diesen Spektren wurden wieder die reduzierten Spektren mit Wellenlängenabständen von 5, 10, 15, 20, 25 und 30 nm generiert. Für jeden Wellenlängenabstand wurde mit dem *Unscrambler* eine separate Hauptkomponentenanalyse durchgeführt. In Abbildung 8.3 sind die Score-Werte der ersten PC der reduzierten Spektren gegen die Score-Werte der Originalspektren mit einem $\Delta\lambda_{\text{ex/em}}$ von 5 nm sowie die lineare Regression der Messpunkte dargestellt.

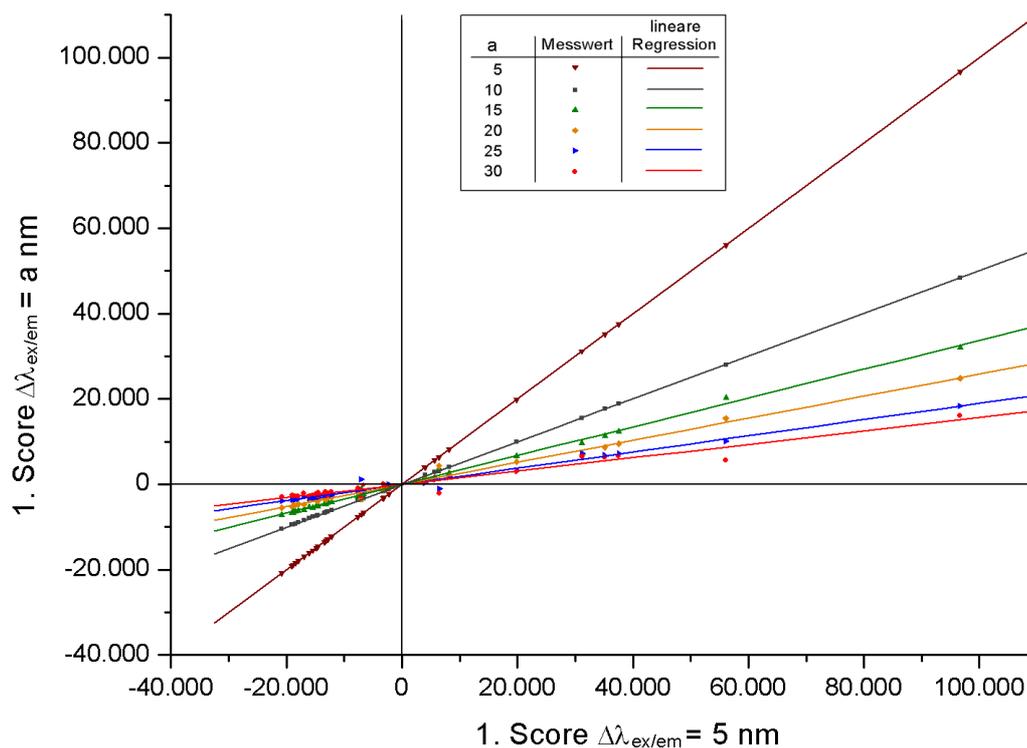


Abbildung 8.3: Auftragung des Score-Werte der ersten Hauptkomponente mit $\Delta\lambda_{\text{ex/em}} = 5, 10, 15, 20, 25$ und 30 nm gegen die Score-Werte der ersten Hauptkomponente mit $\Delta\lambda_{\text{ex/em}} = 5$ nm inklusive linearer Regression

Mit steigendem $\Delta\lambda_{\text{ex/em}}$ nimmt die Steigung der Geraden der linearen Regression ab. Ebenso sinkt das Bestimmtheitsmaß r^2 der linearen Regression von 0,9999 bei $\Delta\lambda_{\text{ex/em}} = 10$ nm bis auf 0,9815 bei $\Delta\lambda_{\text{ex/em}} = 30$ nm. Die Abweichung der reduzierten Spektren von den Originalspektren nimmt zu, die Sensitivität der Spektren nimmt dabei ab.

Durch eine Multiplikation mit einem konstanten Faktor a_{Δ} ist es möglich, die Score-Werte der Originalspektren aus den Score-Werten der reduzierten Spektren zu berechnen. Der Faktor a_{Δ} erhöht sich dabei mit steigendem $\Delta\lambda_{\text{ex/em}}$ von 2,00 bei $\Delta\lambda_{\text{ex/em}} = 10$ nm bis auf 6,14 bei $\Delta\lambda_{\text{ex/em}} = 30$ nm. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass sich dabei auch der Fehler, der durch das Rauschen verursacht wird, um den gleichen Faktor erhöht.

8.3 Zusammenfassung

Die Sensitivitätsanalyse hat gezeigt, dass die Sensitivität der 2D-Fluoreszenzspektren mit steigendem Wellenlängenabstand abnimmt. Durch die Generierung reduzierter Spektren und anschließender Rückberechnung der Originalspektren konnte der Verlust an Information quantifiziert werden. Dabei hat sich gezeigt, dass der Fehler der Berechnung in erster Linie vom Wellenlängenabstand abhängt während die verwendete Methode der Interpolation eine untergeordnete Rolle spielt. Die chemometrische Sensitivitätsanalyse zeigt, dass die Sensitivität mit steigendem Wellenlängenabstand abnimmt.

Bei einem Wellenlängenabstand von 20 nm lassen sich alle Peaks der Farbstoffmischungen noch auflösen, der Informationsgehalt ist somit noch ausreichend.

9 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war der Einsatz der 2D-Fluoreszenzspektroskopie zum Aufbau eines Regelsystems bei Fedbatch-Kultivierungen von *Saccharomyces cerevisiae*. Dadurch sollte eine oxidative Prozessführung zur maximalen Biomasseproduktion erreicht werden. Des Weiteren sollten die Möglichkeit untersucht werden, die Regelstrategie auf *E.-coli*-Kultivierungen zu übertragen. Abschließend wurde der Informationsgehalt der 2D-Fluoreszenzspektren untersucht.

Bei der Änderung des Stoffwechsels der Hefen von oxidativ zu oxidoreduktiv treten im Bereich des NADH und der Flavine im 2D-Fluoreszenzspektrum signifikante Änderungen ein. Durch die Berechnung eines metabolischen Wertes wurde eine Größe etabliert, die eine Aussage über den Stoffwechselzustand der Zellen ermöglicht. Durch die Festlegung eines Grenzwertes wurde die Detektion des Übergangs vom oxidativen zum oxidoreduktiven Stoffwechsel möglich. In Verbindung mit einem Zustandsmodell konnten Fedbatch-Kultivierungen rein oxidativ gefahren und die Bildung störender Metabolite erheblich reduziert werden, ohne das Zellwachstum der Hefen durch Substratmangel zu limitieren. In der Kultivierung FB2 wurde über einen Zeitraum von 6 h ein rein oxidativer Stoffwechsel eingestellt. Die Ausbeute von 0,53 g BTM/g Glucose schließt eine bedeutende Ethanolbildung aus. Lediglich am Anfang der Kultivierung wurde in Folge der Lag-Phase zu Beginn der Kultivierung eine geringe Menge Ethanol produziert. Die im Verlauf der Kultivierung konstant bleibende Ethanolkonzentration deutet darauf hin, dass die Kultivierung nicht glucoselimitiert durchgeführt wurde. Im Verlauf der Kultivierung kam es zu Fehlinterpretationen der Spektren. Es wurden Stoffwechsellumstellungen detektiert, obwohl in den anderen Messgrößen wie Gelöstsauerstoffgehalt und Kohlendioxidgehalt im Abgas keine Hinweise darauf zu erkennen sind.

Zur Optimierung des Regelsystems wurde ein Anfahrprofil entwickelt, um die Ethanolproduktion zu Beginn der Kultivierungen aufgrund der Lag-Phase der Hefezellen zu vermeiden. Dieses Anfahrprofil bietet noch den Vorteil, dass die Einstellung der Wachstumsrate des Modells direkt von den Eigenschaften der Zellen im Reaktor abhängt.

Weiterhin wurde die Güte der Erkennung einer Stoffwechsellumstellung durch Änderungen im Modell gesteigert. Dabei wurde die Anzahl der zur Kalibration verwendeten Spektren erhöht. Es wurden vor allem Daten von Kultivierungen mit niedrigen Biomassen verwendet.

Die mit dem optimierten Modell durchgeführte Fedbatch-Kultivierung FB3 lief über einen Zeitraum von 8 h. Dabei wurde viermal der MB-Grenzwert überschritten und somit eine beginnende Stoffwechselumstellung festgestellt. Die Ethanolkonzentration lag bei allen Offlineproben unterhalb der Nachweisgrenze des verwendeten Messsystems von ca. 0,025 g/L. Der Verlauf der Biomasse des Modells beschreibt den Verlauf der Biomasse im Reaktor recht gut. Der Unterschied erhöht sich von 2 % zu Beginn lediglich auf 2,5 % bis zum Ende der Kultivierung.

Bei der Kultivierung FB4 wurde die Startbiomasse auf 23 g/L mehr als verdreifacht und die Fedbatch-Phase über einen Zeitraum von 7 h durchgeführt. Bei einer Stoffwechseländerung wurden jeweils innerhalb kurzer Zeit zwei oder drei MB-Wertüberschreitungen detektiert. Dies bedeutet, dass bei Biomassen von mehr als 20 g/L eine Reduktion der Biomasse des Modells von 5,0 % nicht ausreicht, um eine Ethanolproduktion zu verhindern. Durch die mehrfache Reduktion wurde die Biomasse um insgesamt 9,8 % bzw. 14,2 % reduziert. Die Ausbeute liegt mit 0,43 g BTM/g Glucose unter den Werten der Kultivierungen FB2 und FB3. Aufgrund der hohen Biomasse von 23 g/L bis 33 g/L wurde eine beträchtliche Menge Glucose für den Erhaltungsstoffwechsel der Zellen verbraucht. In Verbindung mit den niedrigen Ethanolwerten kann man von einem fast ausschließlich oxidativen Stoffwechsel ausgehen.

In der Kultivierung FB5 wurde insbesondere das Verhalten des Regelsystems bei einer eintretenden Sauerstofflimitierung untersucht. Hier zeigt die Kultivierung zunächst das gleiche Verhalten wie bei der Kultivierung FB4, innerhalb kurzer Zeit erfolgt eine mehrfache Überschreitung des MB-Wertes und somit eine Reduzierung der Biomasse. Bei Eintreten der Sauerstofflimitierung tritt jeweils im Mindestabstand von 0,2 h insgesamt 5 mal direkt hintereinander eine Überschreitung des MB-Wertes auf, jedoch wird eine nicht unerhebliche Menge an Ethanol produziert. Offensichtlich ist das System nicht dazu in der Lage, die durch den reduktiven Stoffwechsel verursachte Ethanolproduktion zu verhindern. Hierzu wäre eine Reduktion der Biomasse um mehr als 5 % erforderlich. Bei einem Vergleich der Differenzspektren der Umstellung zwischen oxidativem und oxidoreduktiven Stoffwechsel einerseits sowie oxidativem und reduktiven Stoffwechsel andererseits lassen sich erhebliche Unterschiede feststellen. Dadurch sollte es möglich sein, in Zukunft durch eine Fallunterscheidung auf das etwaige Eintreten eines reduktiven Stoffwechsel zu reagieren.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass mit Hilfe des vorgestellten Regelsystems eine rein oxidative Fedbatch-Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* unter aeroben Bedingungen möglich ist. Bei ersten Anwendungen dieser Regelstrategie waren noch manuelle Eingriffe in das

Regelsystem erforderlich, da eine Ethanolproduktion nicht verhindert werden konnte. Ebenso konnte durch Optimierung der Auswertung im Rahmen dieser Arbeit die Anzahl der verwendeten Hauptkomponenten von acht auf drei reduziert werden.

Die verwendeten Mikroorganismen selbst stellen einen wichtigen Faktor bei der Anwendung der Regelung dar. Das Regelsystem konnte nur bei *Saccharomyces cerevisiae* erfolgreich angewendet werden. *Escherichia coli* zeigt ein komplett anderes Fluoreszenzverhalten. Hier fehlt der entscheidende Anstieg im Bereich der NADH-Fluoreszenz, wenn sich der Stoffwechsel von oxidativ zu oxidoreduktiv ändert. Im Scoreplot der Hauptkomponentenanalyse ist eine eindeutige Identifizierung des jeweiligen Spektrums zum herrschenden Stoffwechsel allein durch die räumliche Zuordnung im Scoreplot nicht möglich. Die Stoffwechselumstellung macht sich lediglich durch eine Änderung im Verlauf des Scoreplots bemerkbar. Hier ist die Entwicklung einer neuen Auswertestrategie erforderlich.

Durch die Erstellung geeigneter Modelle konnten die bisher in Offlineverfahren bestimmten Prozessgrößen Biotrockenmasse und optische Dichte während einer Kultivierung aus den Spektren online bestimmt werden. Dies konnte sowohl bei Hefe- als auch bei *E.-coli*-Kultivierungen realisiert werden. Dadurch stehen diese Größen auch online zur Verfügung und können zur Prozessführung genutzt werden, z. B. zur Bestimmung des optimalen Zeitpunkts zur Induktion der Penicillin-Amidase-Produktion bei der Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3).

Die Auswertung der 2D-Fluoreszenzspektren zeigte, dass der Informationsgehalt der Spektren durch die jeweilige Prozessphase bestimmt wird. Dabei konnten Wellenlängenkombinationen mit hohem und niedrigem Informationsgehalt identifiziert werden, so dass eine Reduktion der Anzahl der Messpunkte auf jene mit einem hohen Informationsgehalt möglich ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein Abstand von 20 nm zwischen den einzelnen Wellenlängenkombinationen zur Erfassung der relevanten Informationen ausreicht, ein geringerer Abstand jedoch in Bereichen mit hoher Informationsdichte vorteilhaft ist.

10 Literatur

- ADAMS M. J. (1995), *Chemometrics in Analytical Spectroscopy*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1995
- ÅKESSON M., HAGANDER P., AXELSSON J. P. (1999), A probing strategy for *Escherichia coli* cultures, *Biotechnology Techniques* 13, 523-528
- ÅKESSON M., HAGANDER P., AXELSSON J. P. (2000), Avoiding Acetate Accumulation in *Escherichia coli* Cultures Using Feedback Control of Glucose Feeding, *Biotechnology and Bioengineering* 73 (3), 223-230
- ANDERSEN K., VON MEYENBURG K. (1980), Are Growth rates of *Escherichia coli* in batch cultures limited by respiration?, *J Bacteriology* 144, 114-123
- AUSTIN G. D., SANKHE S. K., TSAO G. T. (1992), Monitoring and control of methanol concentration during polysaccharide fermentation using an on-line methanol sensor, *Bioprocess Engineering* 7, 241-247
- ARNDT M. (2003), Eine schnelle Glucoseanalytik zur Regelung biotechnischer Prozesse, Dissertation, Hannover, 2003
- ARNDT M., KLEIST S., MIKSCH G., FRIES K., FLASCHEL E., TRIERWEILER J., HITZMANN B. (2005), A feedforward-feedback controller based on a Kalman filter for a Fedbatch cultivation of *Escherichia coli* producing phytase, *Computers and Chemical Engineering* 29, 1113-1120
- BANG W.-G. (1981), Untersuchungen zur L-Tryptophan-Bildung mit freien und immobilisierten *Escherichia coli* W 3100-Zellen, Dissertation, TU Braunschweig, 1981
- BELLGARDT K. H. (1983), Modellbildung des Wachstums von *Sacharomyces cerevisiae* on Rührkesselreaktoren, Dissertation, Universität Hannover, 1983
- BELLGARDT K. H. (1991), Cell Models, Bd. 4, Measuring, Modelling and Control der Reihe Biotechnology, A Multi-Volume Comprehensive Treatise, VCH-Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 2. Aufl., 1991
- BELLGARDT K. H. (2003), Modellierung von Bioprozessen, Script zum Modul LS8001 des Studienganges Life Science, Universität Hannover, 2003
- BEYELER W., GSCHWEND K., FIECHTER, A. (1983), In-situ Fluorometrie: Eine neue Methode zur Charakterisierung von Bioreaktoren, *Chem. Ing. Tech.* 55 (5), 869-871
- BÖHL D., SOLLE D., TOUSSANINT H.-J., LINDEMANN C., HITZMANN B., SCHEPER T. (2001), Anwendung der Fluoreszenzspektroskopie zur Beobachtung von Bierbrauprozessen, *GIT-Laborzeitschrift*, 5, 2001
- BÖHL D., SOLLE D., HITZMANN B., SCHEPER T. (2003), Chemometric modelling with two-dimensional fluorescence data for *Claviceps purpurea* bioprocess Characterization, *J Biotechnology* 105, 179-188

- BOYER P. M., HUMPHREY A. E. (1988), *Biotechnol Letter* 2 (3), 193-198
- BROCKHINKE A., PLESSOW R., DITTRICH P., KOHSE-HOINGHAUS K. (2000), Analysis of the local conformation of proteins with two-dimensional fluorescence techniques, *Applied Physics B-Lasers and Optics* 71 (5), 755-763
- CANGHAI L., ALBANO C. R., BENTLEY W. E., RAO G. (2002), Different Rates of Gene Expression Monitored by Green Fluorescent Protein, *Biotechnol Bioeng* 79 (4), 429-437
- CHENINA R. (1993), Ein Fluoreszenzspektrometer zur Online-Verfolgung von Fermentationsprozessen, Dissertation, Universität Kaiserslautern 1993
- COMTE A., KOHLS O., SCHEPER T. (1995), Faseroptische Chemo- und Biosensoren, *CLB Chemie in Labor und Biotechnik* 46, 18-22
- DOWD J. E., WEBER I., RODRIGUEZ B., PIRET J. M., KWOK K. E. (1998), Predictive Control of Hollow-Fiber Bioreactors for the Production of Monoclonal Antibodies, *Biotechnology and Bioengineering* 83 (4), 484-492
- DANZER K., HOBERT H., FISCHBACHER C., JAGEMANN K. U. (2001), Chemometrik - Grundlagen und Anwendungen, Springer Verlag, 2001
- DE DEKEN, R.H. 1966, The Crabtree effect: A regulatory system in yeast, *J. Gen. Microbiol.* 44, 149-156
- DUYSENS L. M. N., AMESZ J. (1957), Fluorescence spectroscopy of reduced phosphopyridine nucleotide in intact cells in the near-ultraviolet and visible region, *Biochim Biophys Acta* 24, 19-26
- ERBACH G. (2006), laufende Diplomarbeit, Universität Hannover, 2006
- ERNST & YOUNG (2004), *Per Aspera Ad Astra*, Deutscher Biotechnologie-Report 2004
- ERNST B. (2006), Fütterungskonzepte zur rekombinanten Produktion von Penicillinamidase in *E. coli*, Dissertation, Technische Universität Hamburg-Harburg, 2006
- 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 2000
- FASMANN G. D. (1976), Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, 3rd ed., vol. 2, CRC Press, Cleveland, 1976
- FESTEL G., KNÖLL J., GÖTZ H., ZINKE H. (2004), Der Einfluss der Biotechnologie auf Produktionsverfahren in der Chemieindustrie, *CIT* 76 (3), 307-312
- FIECHTER A., FUHRMANN G. F., KÄPPELI O. (1981), Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells, *Adv Microbial Physiol* 22, 123-183
- FRANK I. E., Friedman J. H. (1993), A statistical view of some chemometrics Regression Tools, *Technometrics* Vol 35 No 2, 109-135 (1993), American statistical association and the american society for quality control

- GANCEDO J. M. (1998), Yeast Carbon Catabolite Repression, *Microbiol. Mol Bio Rev* 62 (2), 334-361
- GEISSLER D. , SOLLE D., STÄRK E., SCHEPER T., MÄRKEL H, HITZMANN B. (2002), Berechnung chemometrischer Modelle basierend auf theoretischen Modellen und 2D-Fluoreszenzspektren, *Chemie Ingenieur Technik* 74 (8)
- GERIGK M. R., MAASS D., KREUTZER A., SPRENGER G., BONGAERTS J., WUBBOLTS M., TAKORS R. (2002), Enhanced pilot-scale Fedbatch L-phenylalanine production with recombinant *Escherichia coli* by fully integrated reactive extraction, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 25, 43-52
- GUILBAULT G. G. (1973), Practical Fluorescence: Theory, Methods and Techniques, Dekker, New York, 1973
- HANTELMANN K. (2005), Nicht-invasive Analysemethoden und multivariate Datenauswertung zur automatisierten Beobachtung und Regelung von Bioprocessen, Dissertation, Universität Hannover, 2005
- HARMS P., KOSTOV Y., RAO G. (2002), Bioprocess Monitoring, *Curr Opin Biotechnol* 13, 124-127
- HARRISON D. E. F., CHANCE B. (1970) Fluorimetric Technique for Monitoring Changes in the Level of Reduced Nicotinamide Nucleotides in Continuous Cultures of Microorganisms, *Applied Microbiology* 19 (3), 446-450
- HARTUNG J., ELPELT B. (1999), Multivariate Statistik, 6. Aufl., Verlag Oldenburg, München, Wien, 1999
- HISBULLAH, HUSSAIN M. A., RAMACHANDRAN K. B. (2002), Comparative evaluation of various control schemes for Fedbatch fermentation, *Bioprocess Biosyst Eng.* 24, 309-318
- HITZMANN B., PEKELER T., LINDEMANN C., MAROSE S., SCHEPER T. (1998), Chemometric Models for the On-Line estimation of Bioprocess variables from 2D-Fluorescence spectra, *Computer Applications in Biotechnology – CAB7*, Osaka, 1998
- HITZMANN B., MAROSE S., LINDEMANN C., SCHEPER T. (1998), New Sensor Application in european Industries for detailed Bioprocess monitoring, *Computer Applications in Biotechnology – CAB7*, Osaka, 1998
- HITZMANN B., BROXTERMANN O., CHA Y.-L. SOBIEH O., STÄRK E., SCHEPER T. (2000), The control of glucose concentration during yeast Fedbatch cultivation using a fast measurement complemented by an extended Kalman filter, *Bioprocess Engineering* 23, 337-341
- HOPPENHEIDT K., PECHE R., TRONECKER D., ROTH U., HOTTENROTH S. (2004), Entlastungseffekte für die Umwelt durch Substitution konventioneller chemisch-technischer Prozesse und Produkte durch biotechnische Verfahren - vergleichende Analyse. Beitrag zum Tagungsband des 2. Reisensburger Umweltbiotechnologie-Tages, 23.06.2004, Reisensburg

- HORN U., STRITTMAIER 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 optimized expression vector and high-cell-density fermentation under non-limited growth conditions, *Appl Microbiol Biotechnol* 46, 524-532
- HÜLL D. (2002), Kompensation der Zeitverzögerung von Glucosemessungen bei der Regelung von Kultivierungsprozessen basierend auf einem Kalman-Filter, Diplomarbeit, Universität Hannover, 2002
- HÜLL D. (2006), laufende Dissertation, Universität Hannover, 2006
- IGNATOVA Z., HÖRNLE C., NURK A., KASCHE V. (2003), Improvement of posttranslational bottlenecks in the production of penicillin amidase in recombinant *Escherichia coli* strains, *Appl Env Microbiol* 69, 1237-1245
- ISERMANN R. (1987), Digitale Regelsysteme, Band I: Grundlagen Deterministische Regelungen, Springer Verlag, Berlin, 1987
- JOHNSTON W., CORD-RUWISCH R., COONEY M. J. (2002), Industrial Control of recombinant *E. coli* Fedbatch culture: new perspectives on traditional controlled variables, *Bioprocess Biosyst Eng.* 25, 111-120
- JOLIFFE I. T. (1986), Principal Component Analysis, Springer Verlag, New York, 1986
- JONES A., YOUNG D., TAYLOR J., KELL D. B., ROWLAND J. J. (1998), Quantification of Microbial Productivity via Multi-Angle Light Scattering and Supervised Learning, *Biotechnol Bioeng* 59 (2), 131-142
- JONES K. D., KOMPALA D. S. (1999), Cybernetic model of the growth dynamics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch and continuous cultures, *J Biotechnology* 71, 105-131
- JUNG B., LEE S., YANG I. H., GOOD T., COTE G. L. (2002), Automated On-Line Noninvasive Optical Glucose Monitoring in a Cell Culture System, *Appl Spectroscopy* 56 (1), 51-57
- KASCHE V., HAUFLER U., MARKOWSKY D., MELNYK S., ZEICH A. G. GALUNSKY B. (1997), Penicillin Amidase from *E. coli*: Enzyme heterogeneity and stability, *Ann N. Y. Acad Sci* 501, 97-102
- KASCHE V., IGNATOVA Z., MÄRKL H., PLATE W., PUNCKT N., SCHMIDT D., WIEGAND K., ERNST B. (2004), Ca^{2+} is a cofactor required for membrane transport and maturation and is a yield determining factor in high cell density penicillin amidase production, submitted to *Biotechnol Progress*
- KASCHE V., LUMMER K., NURK A., PIOTREASCHKE E., RIEKS A., STOEVA S., VOELTER V. (1999), Intramolecular proteolysis initiates the maturation of penicillin amidase from *Escherichia coli*, *Biochim Biophys Acta* 1433, 76-86
- KELLERHALS M. B., KESSLER B., WITHOLT B. (1999), Closed Loop Control of Bacterial High-Cell-Density Fedbatch Cultures: Production of mcl-PHAs by *Pseudomonas putida* KT2442 Under Single-Substrate and Cofeeding Conditions, *Biotechnology and Bioengineering* 65 (3), 306-315,

- KOLLECKER M. (1999), Auswertung von 2D-Fluoreszenzspektren zur Vorhersage von Prozeßgrößen, Diplomarbeit, Universität Hannover, 1999
- KONG D., GENTZ R., ZHANG J. (1998), Development of a versatile computer integrated control system for bioprocess controls, *Cytotechnology* 26, 227-236
- KONSTANTINOV K., KISHIMOTO M., SEKI T., YOSHIDA T. (1990), A balanced DO-stat and its application to the control of acetic acid excretion by recombinat *Escherichia coli*, *Biotechnol Bioeng* 36, 750-758
- KORZ D. J., RINAS U., HELLMUTH K., SANDERS E. A., DECKWER W.-D. (1995), Simple Fedbatch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*; *J Biotechnology* 39, 59-65
- KÜENZI M. (1970), Über den Reservekohlenhydratstoffwechsel von *Saccharomyces cerevisiae*, ETH-Zürich, Dissertation, 1970
- KUHLMANN C., BOGLE D., CHALABI Z. (1997), On the controllability of continous fermentation processes, *Bioprocess Engineering* 17, 367-374
- LENAS P., KITADE T., TWATANABE H., HONDA H., KOBAYASHI T. (1997), Adaptive Fuzzy control of nutrients concentration in Fedbatch culture of mammalian cells, *Cytotechnology* 25, 9-15
- LEVISAUSKAS D. (2001), Inferential control of the specific growth rate in Fedbatch cultivation processes, *Biotechnology Letters* 23, 1189-1195
- LI J. K., ASALI E. C., HUMPHREY A. E., HORVATH J. J. (1991), Monitoring cell concentration and activity by multiple Exzitation fluorometry, *Biotechnol Prog* 7, 21-27
- LINDEMANN C. (1998), Anwendung der 2D-Fluoreszenzspektroskopie zur Bioprozessbeobachtung, Dissertation, Universität Hannover, 1998
- LINDNER P. F. O. (2006), laufende Dissertation, Universität Hannover, 2006
- 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
- MADIGAN M., MARTINKO, J., PARKER J. (2000), Brock Mikrobiologie, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, 2000
- DE MARE L., ANDERSSON L., HAGANDER P. (2003), Probing control of glucose feeding in *Vibrio cholerae* cultivations, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 25, 221-228
- MAROSE S. (1999), Bioprozessanalytik mit zweidimensionaler Fluoreszenzspektroskopie, Dissertation, Universität Hannover, 1999
- MARTENS H., NAES T., : Multivariate Calibration, John Wiley & Sons, Chichester
- MATTHEWS T. M., WEBB C. (1991) Culture Systems, in: TUIITE M. F., OLIVER S. G. (eds): *Saccharomyces, Biotechnology Handbooks* Vol. 4, Plenum Press, London, New York, 1991

- MCGOVERN A. C., BROADHURST D., TAYLOR J., KADERBHAI N., WINSON M. K., SMALL D. A., ROWLAND J. J., KELL D. B., GOODACRE R. (2002), Monitoring of Complex Industrial Bioprocesses for Metabolite Concentrations Using Modern Spectroscopes and Machine Learning: Application to Gibberellic Acid Production, *Biotechnol Bioeng* 78 (5), 527-538
- MEYER H. P., BEYERLE W., FIECHTER A. (1984) Experiences with the on-line measurement of culture fluorescence during cultivations of *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Sporotrichum thermophile*, *J Biotechnology* 1, 341-349
- MISKIEWICZ T., KASPERSKI A. (2000), A fuzzy controller to control nutrient dosage in a Fedbatch baker's yeast process, *Biotechnology Letters* 22, 1685-1691
- MJALLI F. S., AI-SHEH S. (2005), Neural-Network-Based Linearization versus Model Predictive Control of Continuous Alcoholic Fermentation Process, *Chem. Eng. Technol.* 28, 1191-1200
- MUKHERJEE J., LINDEMANN C., SCHEPER T.: Fluorescence monitoring during cultivation of *Enterobacter aerogens* at different oxygen levels, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52, 484-494, 1999
- MUNK L. (1989) Fluorescence analysis in foods, John Wiley & Sons Inc., New York, 1989
- NILSSON A., TAHERZADEH M. J., LIDEN G. (2002), On-line Estimation of sugar concentration for control of Fedbatch fermentation of lignocellulosic hydromlyzates by *Saccharomyces cerevisiae*, *Bioprocess Biosyst Eng.* 25, 183-191
- NAKANO K., RISCHKE M., SATO S., MÄRKL H. (1997), Influence of acetic acid in the growth of *Escherichia coli* K12 during a high cell density cultivation in a dialysis reactor, *Appl Microbiol Biotechnol* 48, 597-6013
- OTTO M. (1997), Chemometrie: Statistik und Computereinsatz in der Analytik, VCH Weinheim, 1997
- PAALME T., TISMA K., KAHRU A., VANATALU K., VILU R. (1990), Glucose-limited Fedbatch cultivation of *Escherichia coli* with computer-controlled fixed growth rate, *Biotechnol Bioeng* 35, 312-319
- PATNAIK P. R. (2003), Effect of fluid dispersion on cybernetic control of microbial growth on substitutable substrates, *Bioprocess Biosyst Eng* 25, 315-321
- PHAM H. T., LARSSON G., ENFORS S. O. (1998), Growth and Energy Metabolism in Aerobic Fedbatch Cultures of *Saccharomyces cerevisiae*: Simulation and Model verification, *Biotechnol Bioeng* 60 (4), 474-482
- PICO-MARCO E., PICO J., DE BATTISTA H. (2005), Sliding mode scheme for adaptive specific growth rate control in biotechnological Fedbatch processes, *International Journal of control* 78 (2), 128-141
- RICHARD P. (2003), The rhythm of yeast, *FEMS Microbiol Rev* 27, 547-557
- RIESENBERG D., GUTHKE R. (1999), High-cell-density cultivation of microorganisms, *Appl Microbiol Biotechnol* 51, 422-430

- RUZICKA J., HANSEN E. (1988), Flow-Injection Analysis, 2nd Ed., John Wiley & Sons, New York, 1988
- SCHANNE O. F., CERETTI E. R. P. (1978), Impedance Measurements in Biological Cells, John Wiley & Sons, New York, 1978
- SCHATZMANN H. (1975), Anaerobes Wachstum von *Saccharomyces cerevisiae*, Dissertation, ETH Zürich No. 5504
- SCHEPER T., SCHÜGERL K. (1986), Culture fluorescence studies on aerobic continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl Mikrobiol Biotechnol* 23, 440-444
- SCHNEIDER R. (1999), Untersuchung eines adaptiven prädikativen Regelungsverfahrens zur Optimierung von bioverfahrenstechnischen Prozessen, Fortschritt Berichte VDI Reihe 8 Nr. 755, VDI Verlag, Düsseldorf, 1999
- SCHÜGERL K., BELLGARDT, K. H., KRETZMER G., HITZMANN B., SCHEPER T. (1993), In-situ- und Online-Überwachung und Regelung biotechnologischer Prozesse, *CIT* 65 (12), 1447-1456
- SCHULMANN S. G. (1985), Molecular luminescence spectroscopy methods and applications – Part 1, Chem. Anal. Vol. 77, John Wiley and Sons, New York
- SCHWEDER O. (2001), Einsatzmöglichkeiten der 2D-Fluoreszenzspektroskopie zur Online-Analytik von Hefezellkulturen, Diplomarbeit, Universität Hannover, 2001
- SHAW A. D., KADERBHAI N., WOODWARD A. M., GOODACRE R., ROWLAND J. J., KELL D. B. (1999), Noninvasive, on-Line monitoring of the biotransformation by yeast of glucose to ethanol using dispersive Raman spectroscopy and chemometrics, *Appl Spectroscopy* 53 (11), 1419-1428
- SKIBSTEDT E., LINDEMANN C., ROCA C., OLSSON L. (2001), On-line bioprocess monitoring with a multi-wavelength fluorescence sensor using multivariate calibration, *J Biotechnology* 88, 47-57
- 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., KÄPPELI O. (1986), Regulation of sugar metabolism in *Saccharomyces*-type yeast: Experimentell and conceptual considerations. *CRC Critical Reviews in Biotechnology*, 4(3): 299-325
- STÄRK E. (2002), Bioprozessanalytik durch Online-Vorhersage von Bioprozessgrößen mittels 2D-Fluoreszenzspektroskopie und multivariater Auswerteverfahren, Dissertation, Universität Hannover 2002
- STRANDBERG L., ENFORS S. O. (1991), Factors influencing inclusion body formation in the production of a fused protein in *Escherichia coli*, *Appl Environ Microbiol* 57, 1669-1674

- TEUSING B., PASSARGE J., REIJENGA C. A., ESGALHADO E., VAN DER WEIJDEN C. C., SCHEPPER M. (2000), Can yeast glycolysis be understood in terms of in vitro kinetics of the constituent enzymes? Testing biochemistry, *Eur J Biochem* 267, 5313-5329
- ULBER R., HITZMANN B., SCHEPER T.(2001), Innovative Bioprozessanalytik - Neue Wege zum besseren Verständnis biotechnologischer Prozesse, *Chemie Ingenieur Technik* 73, 19-26
- VAN HOEK P., DE HULSTER E. VAN DIJKEN J. P., PRONK J. T. (1999), Fermentative capacity in high-cell-density Fedbatch cultures of baker's yeast, *Biotechnol Bioeng* 68 (5), 517-523
- VANDEGINSTE B. G. M., MASSART D. L., BUYDENS L. M. C., DE JONG S., LEWI P. J., SMEYERS-VERBEKE J. (1998), Handbook of Chemometrics and Qualimetrics – Part B, Elsevier Science, Amsterdam
- VANKOVA R., KUNCOVA G., OPATRNA J., SUSSENBKOVA H., GAUDINOVA A., VANEK T. (2001), Two-dimensional fluorescence spectroscopy – a new tool for the determination of plant cell viability, *Plant Cell Reports* 20 (1), 41-47
- WEIGEL B. (1995), Entwicklung von Enzym-Kartuschen und FIA-Methoden zur Online-Analytik in Biomedien, Dissertation, Universität Hannover, 1995
- WOEHRER W., ROEHR M. (1981), Regulatory aspects of baker's yeast metabolism in aerobic Fedbatch cultures, *Biotechnol Bioeng* 23, 567-581
- WOLD H. (1975), Modeling by latent variables: the non-linear iterative partial least squares approach, in J. GANI (ed.): Perspectives in probability and statistics, Academic Press, London, 1975
- WOLFBEIS O. S. (1985), Fluorescence of organic natural products, in: Molecular luminescence spectroscopy methods and applications – Part 1, Hrsg.: SCHULMANN S. G., *Chemical Analysis*, Vol. 77, John Wiley and Sons, New York, 1985
- YAMUNA RANI K., RAMACHANDRA RAO V. S. (1999), Control of fermenters – a review, *Bioprocess Engineering* 21, 77-88
- YEE L., BLANCH H. W. (1992), Recombinant protein expression in high cell density Fedbatch-cultures of *Escherichia coli*, *Biotechnology* 10, 1550-1556
- YOON S. K., KANG W. K., PARK T. H. (1994) Fedbatch operations of *Echerichia coli* containing trp promoter with controlled specific growth rate, *Biotechnol Bioeng* 43, 995-999
- ZABRISKIE D. W., HUMPHREY A. E. (1978), Estimation of fermentation biomass concentration by measuring culture fluorescence, *Applied European Microbiology* 35 (2), 337-343

11 Anhang

11.1 Abkürzungen und Symbole

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
A	Filterfaktor
ATP	Adenosintriphosphat
b	Regressionskoeffizient
B	Regressionskoeffizientenmatrix
BTM	Biotrockenmasse
°C	Grad Celsius
e	Fehler
E	Restmatrix
em	Emission
EP	Ethanolproduktionswert
ex	Exzitation
ex/em	Exzitations-/Emissionwellenlänge einer Wellenlängenkombination
F	Restmatrix
FAD	Flavinadenindinucleotid in der oxidierten Form
FADH ₂	Flavinadenindinucleotid in der reduzierten Form
FIA	Fließinjektionsanalyse
FMN	Flavinmononucleotid
g/kg	Gramm pro Kilogramm
g/L	Gramm pro Liter
GC	Gaschromatograph
GOD	Glucoseoxidase
h	Stunde
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
i	Laufvariable für die Messung
I	Information
j	Laufvariable für die Messgröße
K	Verstärkungsfaktor
kPA	Kilopascal

kU/min	Kiloumdrehungen pro Minute
λ	Wellenlänge
L	Liter
L/h	Liter pro Stunde
L/min	Liter pro Minute
m	Anzahl der Messgrößen
M	Matrix mit dem Rang 1
μ	Wachstumsrate
MB	Metabolischer Wert
mg/L	Milligramm pro Liter
min	Minute
mL	Milliliter
μL	Mikroliter
MLR	Multilineare Regression
mm	Millimeter
n	Anzahl der Messungen
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinucleotid in der oxidierten Form
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid in der reduzierten Form
ND	Neutraldichte
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
\vec{p}	Loadingvektor
P	Loadingmatrix
P	Wahrscheinlichkeit des Eintretens eines Ereignisses
PC/s	Hauptkomponente/n (principal component/s)
PCA	Hauptkomponentenanalyse (principal component analysis)
PID	Proportional-integral-differential
PLS	Partial least Squares
pO ₂	Gelöstsauerstoffgehalt
PRESS	Predictive Residual Sum of Squares
Q	Loadingmatrix
q _{s,krit}	Kritische Glucoseaufnahme
r ²	Bestimmtheitsmaß der Regression
RFI	Relative Fluoreszenzintensität

RISP	Realtime Integrating Software Platform
RMSEC	Root Mean square error of calibration
RMSEP	Root Mean square error of prediction
rpm	Umdrehungen pro Minute (Rounds per minute)
S	Substratkonzentration
S ₀	Substratkonzentration in der Feedlösung
s	Sekunde
t	Zeit
\vec{i}	Scorevektor
T	Scorematrix
T ₀	Abtastzeitintervall
T _D	Vorschaltzeit
T _I	Nachstellzeit
u	Stellwert
UV	Ultraviolett
V	Reaktorvolumen
V	Volt
\dot{V}_{Feed}	Feedrate
\dot{V}_{Probe}	Volumenstrom der zellfreien Probenahme
VIS	Für das menschliche Auge sichtbares Licht
W	Loading-weight-Matrix
W	Watt
WLK	Wellenlängenkombination
x	Unabhängige Variable
\bar{x}	Mittelwert der Variablen x
X	Matrix der unabhängigen Variablen
X'	Transponierte der Matrix X
y	Abhängige Variable
Y	Matrix der abhängigen Variablen
Y	Ausbeute
Y _{x/s}	Ausbeute an Biotrockenmasse pro Glucose

11.2 Einstellungen des Bioview

Tabelle 11.1: Messpunkte des verwendeten Bioview®

		Exzitationswellenlänge [nm]															
		270	290	310	330	350	370	390	410	430	450	470	490	510	530	550	exND ¹
Emissionswellenlänge [nm]	310	X															X
	330	X	X														X
	350	X	X	X													X
	370	X	X	X	X												X
	390	X	X	X	X	X											X
	410	X	X	X	X	X	X										X
	430	X	X	X	X	X	X	X									X
	450	X	X	X	X	X	X	X	X								X
	470	X	X	X	X	X	X	X	X	X							X
	490	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X						X
	510	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					X
	530	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X
	550	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X
	570	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X
590	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
emND ¹	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	

X = Messpunkt

¹ emND und exND : Transmission oberhalb 450 nm

Tabelle 11.2: Gain-Einstellung

Exzitation [nm]	Emission [nm]	Anzahl der Filterkombinationen	Photomultiplier-Einstellungen	
			<i>S.-cerevisiae</i> -Kultivierungen	<i>E.-coli</i> -Kultivierungen
270	310-390	4	1100	1150
270	410-590	11	1100	1300
290	330-590	14	1000	1000
310	350-590	13	1200	1200
330	370-590	12	1100	1000
350	390-590	11	1100	1000
370	410-470	4	1000	900
370	490-590	6	1000	800
390	430-590	9	1000	850
410	450-590	8	1000	800
430	470-590	7	1000	800
450	490-590	6	1000	800
470	510-590	5	1000	800
490	530-590	4	1000	800
510	550-590	3	1000	800
530	570-590	2	1000	800
550	590	1	1000	800
exND	270-590	15	800	800
270-590	emND	15	800	800

11.3 Medien für *S.-cerevisiae*-Kultivierungen [nach Schatzmann, 1975]

Das Schatzmann-Medium wurde sowohl für die Vor- als auch für die Hauptkultur und den Feed verwendet. In Tabelle 11.3 sind die in allen Medien identischen Komponenten aufgelistet, Tabelle 11.4 enthält die Komponenten, deren Konzentration in Abhängigkeit von Medium und Versuch variiert wurde. Die Mineralsalz- und Vitaminlösungen wurden mit 1000facher Konzentration in zweifach demineralisiertem Wasser angesetzt und bei 4 bis 6°C gelagert.

Beim Ansetzen der Medien für die Haupt- und Vorkultur wurden zunächst 70% des benötigten demin. Wasser vorgelegt und mit konz. Schwefelsäure ein pH-Wert von 2 eingestellt. Anschließend wurden die Puffersalze gelöst, die Mineralsalzlösung zugegeben und mit dem restlichen Wasser aufgefüllt. Mit viermolarer Salzsäure wurde anschließend ein pH-Wert von 5,5 eingestellt und für die Hauptkultur Desmophen hinzugefügt. Die Glucose wurde separat autoklaviert und erst nach dem Abkühlen in den Reaktor gegeben. Kurz vor dem Animpfen wurde die Vitaminlösung über einen Sterilfilter direkt in den Reaktor injiziert.

Die Feed-Medien wurden analog zum Hauptmedium ohne Desmophen angesetzt, mit Antibiotika versetzt und anschließend sterilfiltriert. Bei den Kultivierungen FB1 bis FB3 und FB6 wurden zwei hintereinander geschaltete Sterilfilterkartuschen (1,2 mm Sartopure® PP2 und 0,45/0,2 mm Sartobran® P, Sartorius AG, Göttingen) verwendet, bei den Kultivierungen FB4 und FB5 wurde ein Sterilfilter (Sartobran® 150, Sartorius AG, Göttingen) verwendet.

Tabelle 11.3: In allen Medien identische Komponenten des Schatzmann-Mediums

	Substanz	Konzentration [g/L]
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	4,2·10 ⁻¹
	KCl	9,0·10 ⁻¹
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	3,4·10 ⁻¹
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	1,9·10 ⁰
Mineralsalzlösung	CuSO ₄ ·5H ₂ O	2,4·10 ⁻³
	FeCl ₃ ·6H ₂ O	1,5·10 ⁻²
	MnSO ₄ ·2H ₂ O	1,1·10 ⁻²
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	9,0·10 ⁻³
Vitaminlösung	Biotin	3,0·10 ⁻⁵
	m-Inosit	6,0·10 ⁻²
	Ca-Panthothenat	3,0·10 ⁻²
	Pyridoxol-HCl	1,5·10 ⁻⁴
	Thiamin-HCl	6,0·10 ⁻³

Tabelle 11.4: Komponenten mit variierten Konzentrationen in den Medien

Medium	Konzentration [g/L]					
	Glucose	Desmophen	(NH ₄) ₂ SO ₄	Antibiotika		
				Chloramphenicol	Tetracyclin	Ampicillin
Vor- und Hauptkulturen	30	0	4,5	0	0	0
Feed FB1	35	0,21	4,5	3·10 ⁻⁵	2·10 ⁻⁵	5·10 ⁻⁵
Feed FB2	50	0,21	4,5	3·10 ⁻⁵	2·10 ⁻⁵	5·10 ⁻⁵
Feed FB3	50	0,21	4,5	3·10 ⁻⁵	2·10 ⁻⁵	5·10 ⁻⁵
Feed FB4	100	0,21	22,0	0	0	0
Feed FB5	100	0,21	22,0	0	0	0
Feed FB6	50	0,21	4,5	3·10 ⁻⁵	2·10 ⁻⁵	5·10 ⁻⁵

11.4 Medien für E.-coli-Kultivierungen [Ernst, 2006]

Für die Vorkulturen wurde ein LB-Medium verwendet. Die Basis für die Medien der Hauptkultur und des Feeds bildeten wässrige Stocklösungen, die mit demin. Wasser auf Vorrat angesetzt und bei RT gelagert wurden. Dies vereinfachte das Ansetzen der Medien erheblich.

11.4.1 Vorkulturen

Tabelle 11.5: LB-Medium der Vorkultur

Substanz	Konzentration [g/L]
Hefeextrakt	5,0
Trypton	10,0
NaCl	10,0
Chloramphenicol	$2,5 \cdot 10^{-2}$

11.4.2 Stocklösungen

Tabelle 11.6: Stock Grund

Substanz	Konzentration [g/kg]
Na ₂ HPO ₄	24,0
KH ₂ PO ₄	12,0
NaCl	2,0
NH ₄ Cl	4,0

Tabelle 11.7: Stock Eisen

Substanz	Konzentration [g/kg]
FeSO ₄ ·7H ₂ O	10,0

Tabelle 11.8: Stock Magnesium

Substanz	Konzentration [g/kg]
MgCl ₂ ·6H ₂ O	246,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	203,3

Tabelle 11.9: Stock Sulfat

Substanz	Konzentration [g/kg]
Na ₂ SO ₄ ·2H ₂ O	142,0

Tabelle 11.10: Stock Spuren

Substanz	Konzentration [g/kg]
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·5H ₂ O	0,11
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1,00
H ₃ BO ₄	0,15
HCL, 37%	493,0
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,35
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2,25

Tabelle 11.11: Stock Calcium

Substanz	Konzentration [g/kg]
CaCl ₂ ·2H ₂ O	26,0

11.4.3 Hauptkulturen

Beim Ansetzen des Mediums wurden im Reaktor zunächst Stock Grund und Eisen vorgelegt, mit Wasser aufgefüllt und mit 0,25 ml/L Desmophen als Anti-Schaummittel versetzt. Das Glucosemonohydrat wurde in Wasser gelöst und in einer separaten, über einen Schlauch mit dem Reaktor verbundenen Vorratsflasche zusammen mit diesem autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden Stock Magnesium, Calcium, Sulfat und Spuren sowie das Thiamin über einen Sterilfilter in den Reaktor injiziert und die Glucose-Lösung durch den Schlauch in den Reaktor überführt. Die Konzentrationen der einzelnen Substanzen im fertigen Medium sind in Tabelle 11.12 aufgeführt.

Tabelle 11.12: Medium für die Hauptkulturen

Substanz	Konzentration [g/kg]
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$1,4 \cdot 10^{-6}$
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$1,5 \cdot 10^{-1}$
Chloramphenicol	$2,5 \cdot 10^{-2}$
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$1,3 \cdot 10^{-5}$
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$5,0 \cdot 10^{-2}$
Glucose	$1,1 \cdot 10^1$
H_3BO_4	$2,0 \cdot 10^{-6}$
KH_2PO_4	$3,0 \cdot 10^0$
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$6,0 \cdot 10^{-2}$
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$7,0 \cdot 10^{-2}$
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$4,5 \cdot 10^{-6}$
Na_2HPO_4	$6,0 \cdot 10^0$
Na_2SO_4	$2,0 \cdot 10^{-2}$
NaCl	$5,0 \cdot 10^{-1}$
NH_4Cl	$1,0 \cdot 10^0$
Thiamin-HCl	$5,0 \cdot 10^{-3}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$3,0 \cdot 10^{-5}$

11.4.4 Feed

Für das Feed-Medium wurde Glucose-Monohydrat in Wasser aufgelöst und autoklaviert. Anschließend wurden die Stocklösungen über Sterilfilter zugegeben. Die Konzentrationen der einzelnen Substanzen im Feed-Medium sind in Tabelle 11.13 angegeben.

Tabelle 11.13: Feed-Medium

Substanz	Konzentration [g/kg]
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$1,4 \cdot 10^{-6}$
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$1,5 \cdot 10^{-1}$
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$1,3 \cdot 10^{-5}$
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$5,0 \cdot 10^{-2}$
Glucose	$6,4 \cdot 10^2$
H_3BO_4	$2,0 \cdot 10^{-6}$
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$6,0 \cdot 10^{-2}$
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$7,0 \cdot 10^{-2}$
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$4,5 \cdot 10^{-6}$
Na_2SO_4	$2,0 \cdot 10^{-2}$
Thiamin · HCl	$5,0 \cdot 10^{-3}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$3,0 \cdot 10^{-5}$

11.5 FIA-Puffer

Tabelle 11.14: FIA-Puffer

Substanz	Konzentration [g/L]
EDTA	1,5
K_2HPO_4	4,3
NaCl	3,0
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2,2
NaN_3	$6,5 \cdot 10^{-2}$

11.6 Sensitivitätsanalyse

Tabelle 11.15: Die verwendeten Farbstoffe

Bezeichnung	Name	Fluoreszenzmaximum
A	Alexa Fluor 430	ex 430 nm/em 520 nm
B	BodiPy FL	ex 490 nm / em505 nm
C	FITC	ex 500 nm / em520 nm
D	Hoechst 33342	ex 355 nm / em465 nm
E	4-Methyl-umbelliferyyl-phosphat	ex 320 nm / em380 nm
F	Propidiumiodid	ex 540 nm / em590 nm
G	Rhodamin	ex 560 nm/ ex 575 nm
H	Sytox Green	ex 505 nm / em 520 nm

Tabelle 11.16: Konzentrationen der Farbstoffe in den vermessenen Farbstoffmischungen

		Farbstoff							
		A [g/L]	B [g/L]	C [g/L]	D [g/L]	E [g/L]	F [g/L]	G [g/L]	H [mol/L]
Nr. der Lösung	1	$5,0 \cdot 10^{-4}$							
	2		$4 \cdot 10^{-5}$						
	3				$5,0 \cdot 10^{-6}$		$5,0 \cdot 10^{-3}$		$1,0 \cdot 10^{-3}$
	4			$2,5 \cdot 10^{-5}$					
	5	$2,5 \cdot 10^{-5}$		$1,3 \cdot 10^{-6}$	$2,5 \cdot 10^{-6}$	$5,0 \cdot 10^{-6}$	$2,5 \cdot 10^{-3}$	$2,5 \cdot 10^{-6}$	$5,0 \cdot 10^{-5}$
	6				$1,0 \cdot 10^{-4}$				
	7					$1,0 \cdot 10^{-4}$			
	8						$5,0 \cdot 10^{-3}$		
	9	$5,0 \cdot 10^{-5}$		$2,5 \cdot 10^{-5}$		$1,0 \cdot 10^{-5}$		$5,0 \cdot 10^{-6}$	
	10							$5,0 \cdot 10^{-5}$	
	11								$1,0 \cdot 10^{-5}$

Tabelle 11.17: Die Einstellungen des F-4500

Parameter	
Wellenlängenbereich Exzitation [nm]	270 – 590
Wellenlängenbereich Emission [nm]	310 – 630
Wellenlängenabstand Exzitation [nm]	5
Wellenlängenabstand Emission [nm]	5
Bandbreite [nm]	10

11.7 Simulationen mit MATLAB® und SIMULINK®

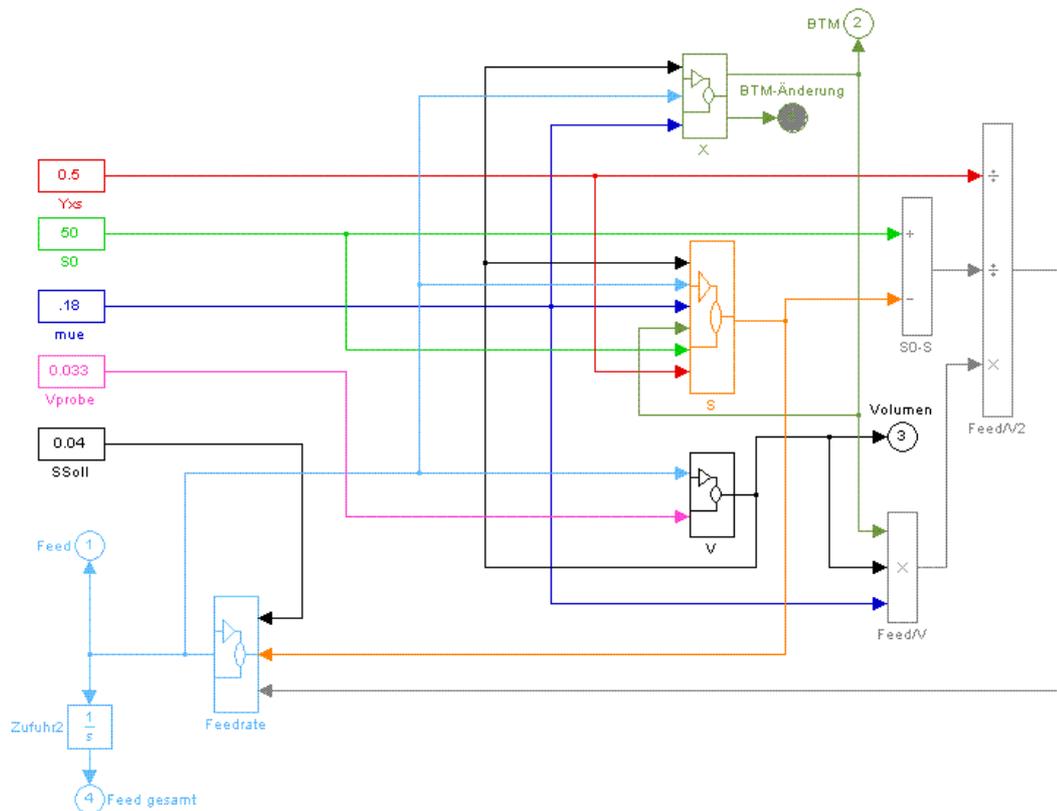


Abbildung 11.1: Das SIMULINK-Modell: Grundstruktur.

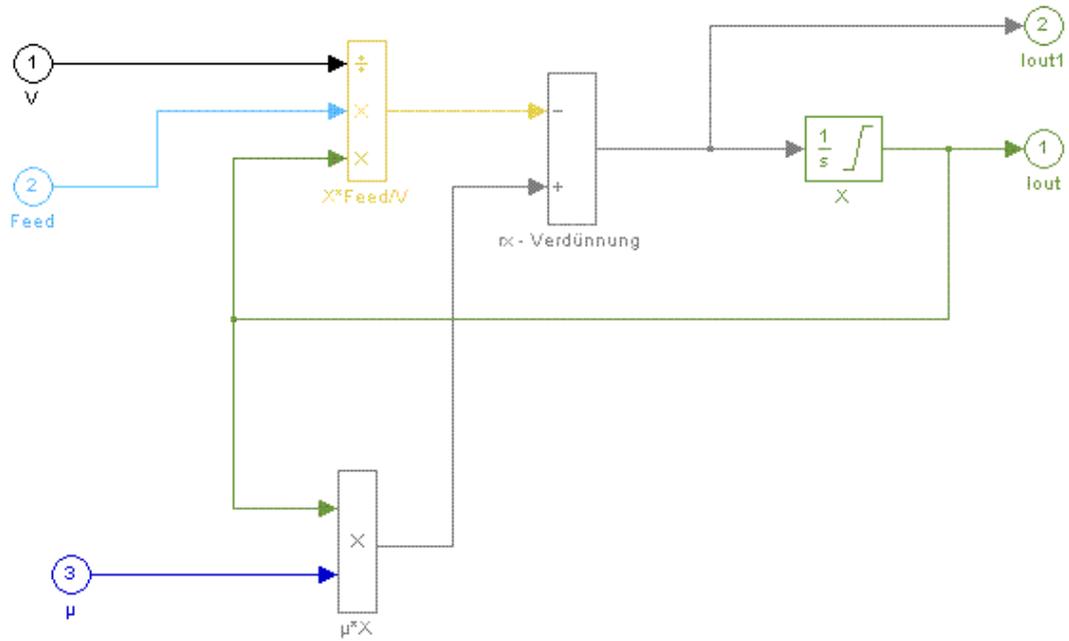


Abbildung 11.2: Das SIMULINK-Modell: Untermodell zur Berechnung der Biomasse.

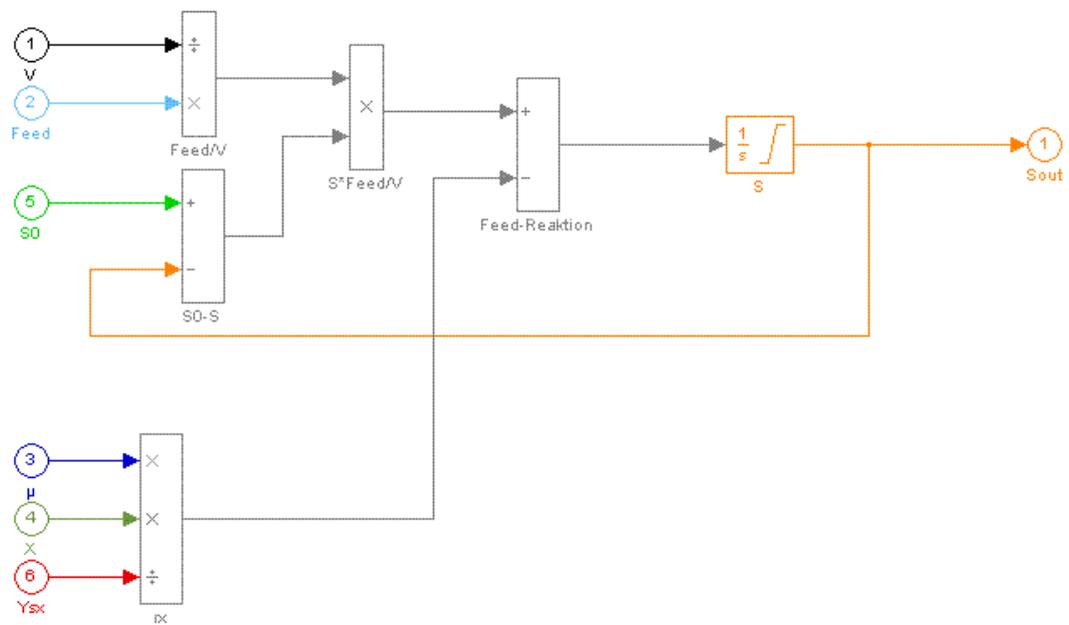


Abbildung 11.3: Das SIMULINK-Modell: Untermodell zur Berechnung der Glucosekonzentration.

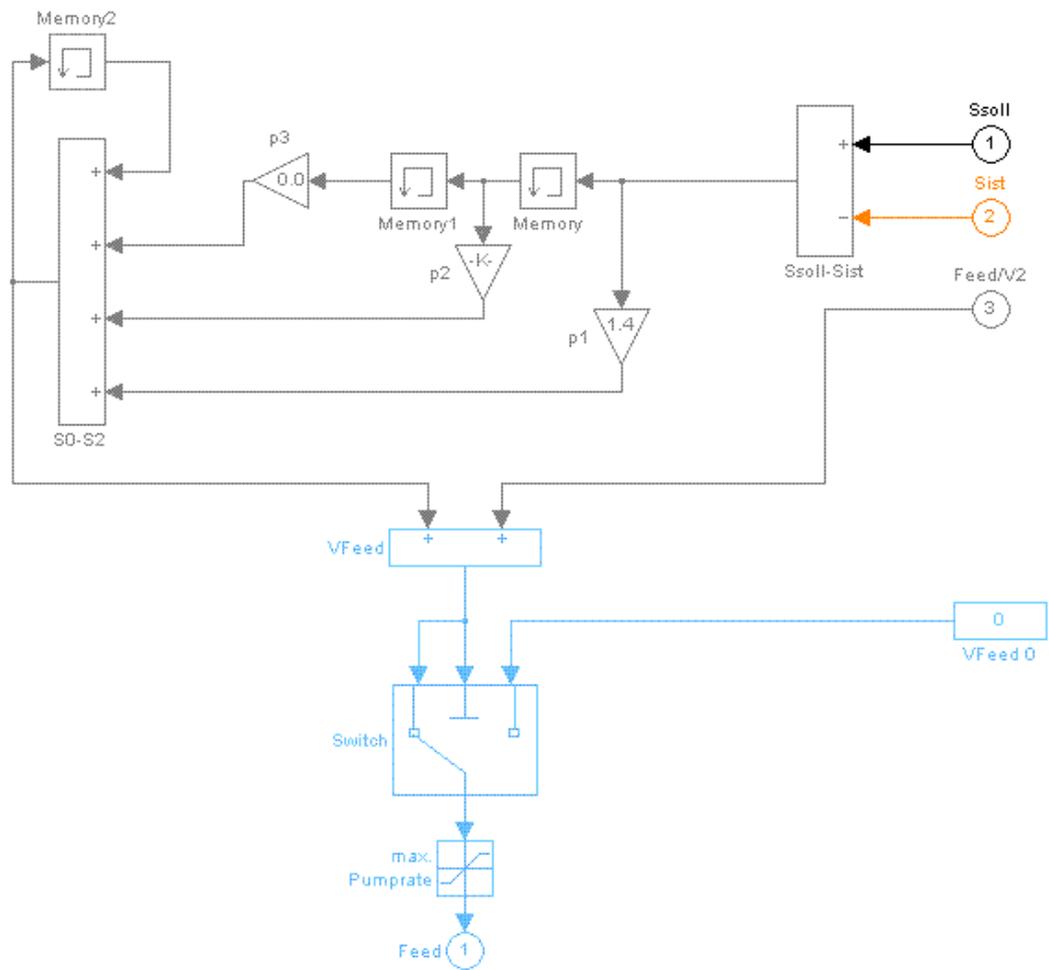


Abbildung 11.4: Das SIMULINK-Modell: Untermodell zur Berechnung der Feedrate.

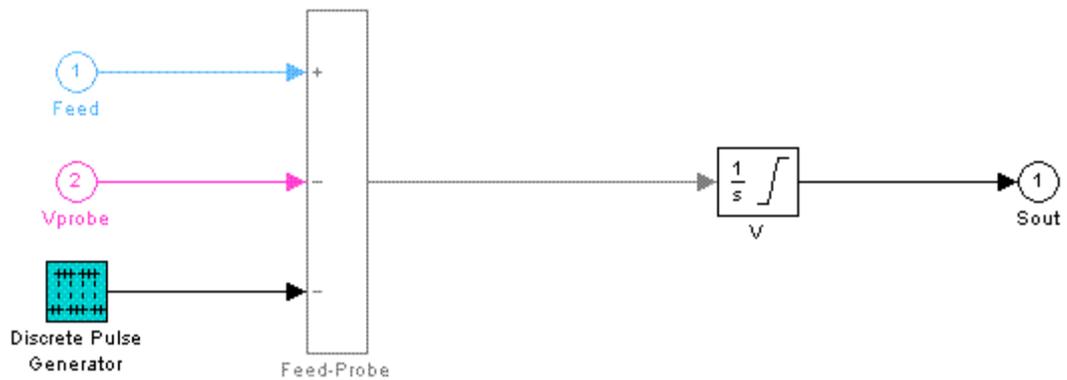


Abbildung 11.5: Das SIMULINK-Modell: Untermodell zur Berechnung des Arbeitsvolumens.

Lebenslauf

Name: Marco Kolleyer
Geburtstag: 03. Februar 1973
Geburtsort: Rotenburg/Wümme
Familienstand: ledig

Schulbildung

Aug. 1979 – Juli 1983 Grundschule Sittensen
Aug. 1984 – Juli 1986 Orientierungsstufe der Haupt- und Realschule Sittensen
Aug. 1986 – Juni 1992 St.-Viti-Gymnasium Zeven
Juni 1992 Abitur

Bundeswehrdienst

Juli 1992 – Juni 1993 Grundwehrdienst bei der Luftwaffe

Studium

Okt. 1993 – Okt. 1995 Grundstudium (Chemie) an der Universität Hannover
Okt. 1995 Vordiplom Chemie
Nov. 1995 – Nov. 1998 Hauptstudium Chemie (Diplom) an der Universität Hannover
Nov. 1998 Mündliche Diplomprüfung
Dez. 1998 – Juni 1999 Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover mit dem Thema „Auswertung von 2D-Fluoreszenzspektren zur Vorhersage von Prozeßgrößen" unter der Leitung von Privatdozent Dr. Bernd Hitzmann
Mai 2001 – Mai 2005 Doktorand am Institut für Technische Chemie unter der Leitung von Prof. Dr. Bernd Hitzmann

Hannover, im Mai 2006