

**Regelung von Kultivierungsprozessen bei kleinen
Glucose-Sollwerten basierend auf einem erweiterten
Kalman-Filter zur Zustandsschätzung und zur
Kompensation der messtechnisch bedingten
Zeitverzögerung**

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. Dirk Hüll

geboren am 29.05.1964 in Hannover

2007

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

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

Tag der Promotion 26. März 2007

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 Oktober 2006

Gewidmet meinem Vater

Günter Hüll †

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2002 bis Mai 2005 am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. Bernd Hitzmann angefertigt. Ihm danke ich besonders für die gebotenen Arbeitsmöglichkeiten, die gute Betreuung, die interessanten Diskussionen und die freundliche Unterstützung.

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

Frau Karin Lubach-Kaselitz gebührt an dieser Stelle mein besonderer Dank. Ohne ihre Unterstützung, ihr Verständnis und ihre Geduld wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Den Mitarbeitern der Feinmechanikwerkstatt und der Elektronikwerkstatt sowie Frau Martina Weiß danke ich für die schnelle und unkomplizierte Hilfe bei allen kleineren und größeren Problemen, die am besten vorgestern schon gelöst sein mussten.

Frau Kirsten Hantelmann danke ich für die entspannte und gute Zusammenarbeit und ihre Geduld mit mir und dem FIA-System („...die FIA kalibriert noch...“).

Für das Korrekturlesen danke ich Frau Bianca Grote und Herrn David Geissler.

Herrn David Geissler gebührt darüber hinaus mein Dank für die Hilfe bei der Lösung diverser Programmierprobleme.

Frau Dörte Solle gilt mein Dank für die erfrischenden Dispute während unserer „Rauchpausen“, wenn Phänomenologie und Logik mal wieder aufeinander prallten.

Frau Christine Klockow danke ich für die nicht immer ganz einfache, aber dennoch fruchtbare Zusammenarbeit.

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

Herrn Marco Kollecker danke ich für die jahrelange sehr gute und freundschaftliche Zusammenarbeit, die fachlichen Gespräche und Anregungen sowie die tiefgreifenden Diskussionen im KK.

Frau Shorty Bartl danke ich für die Farbe und die Sonne in meinem Leben, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meinen Eltern Gisela Hüll und Günter Hüll † gilt mein ganz besonderer Dank für ihre Ausdauer und Geduld. Ohne ihre langjährige Unterstützung wären mein Studium und diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Abstract

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Regelsystem zur nutristatischen Prozessführung entwickelt, welches in der Lage ist, die apparativ bedingte Zeitverzögerung zwischen der Probenahme und dem Vorliegen des Analysenergebnisses zu kompensieren. Das System basiert auf einem kontinuierlich-diskret erweiterten Kalman-Filter (EKF) zur Prädiktion der Zustandsvariablen und der Kompensation der Zeitverzögerung sowie einem Feed-forward-/Feed-back-Regler.

Zunächst wurden die optimalen Parameter für das EKF und den Feed-forward-/Feed-back-Regler in Simulationen ermittelt. Mit den so bestimmten Parametern wurden im Technikums-Maßstab erfolgreich mehrere Fedbatch-Kultivierungen des Organismus *Saccharomyces cerevisiae* bei verschiedenen Sollwerten der Glucosekonzentration durchgeführt. Die Messung der Glucosekonzentration erfolgte mit einem handelsüblichen FIA-System unter Verwendung eines Probenahmemoduls zur Abtrennung der Zellen.

Die eingestellten Sollwerte zwischen $0,05 \text{ g L}^{-1}$ und $0,1 \text{ g L}^{-1}$ wurden von dem implementierten Feed-forward-/Feed-back-Regler basierend auf den Glucoseschätzwerten mit hohen Regelgüten realisiert. Das System ist in der Lage, auf verschiedene typische auftretende Probleme adäquat zu reagieren. So verschlechtert sich die Regelgüte bei einem kurzzeitigen Ausfall des Messsystems oder einer Veränderung der Wachstumsdynamik während der Kultivierung nicht signifikant. Eine Veränderung des Sollwertes im Verlauf einer Kultivierung ist derzeit noch nicht befriedigend realisierbar.

Das Kalman-Filter ist in der Lage, die Dynamik des Bioprozesses gut zu beschreiben und die Verzögerungszeit zu kompensieren. Mit dem Regelsystem können hohe Regelgüten bei langen Regeldauern erzielt werden. Da hierdurch die Produktion unerwünschter Metabolite, wie z.B. Ethanol, unterbunden wird, sind somit höhere Ausbeuten realisierbar.

Stichworte: Fedbatch, *S. cerevisiae*, Regelung, Kalman Filter, Verzögerungszeit, FIA

Abstract

In this thesis a system for process control was developed based on the measurement of the substrate. The system is able to compensate the occurring time delay due to sample taking and analyzing. Therefore a continuous discrete extended Kalman filter (EKF) for the prediction of the state variables and a feed-forward/feed-back controller were implemented.

First the optimal parameters for the EKF and the feed-forward/feed-back controller were determined in simulations. With these parameters fedbatch cultivations with the organism *Saccharomyces cerevisiae* were successfully accomplished at different setpoints for the glucose concentration. The measurement of the glucose concentration was done using a commercial FIA system and a special sampling module for the separation of the cells.

Various setpoints between $0,05 \text{ gL}^{-1}$ and $0,1 \text{ gL}^{-1}$ were maintained with high accuracy. The system was able to react adequately to different problems typically arising during a cultivation. For example it can deal with a temporally breakdown of the measurement system or a change of the growth dynamic during the cultivation. Only a change of the desired setpoint is not realizable in a satisfying manner at present.

The Kalman filter is able to describe the dynamic of a bioprocess in a good manner and is also able to compensate the occurring time delay satisfactorily. By this a cultivation can be controlled with high performance over a long time. Thus the production of unwanted metabolites, e.g. ethanol, can be prevented in order to obtain higher yields.

Keyword: Fedbatch, *S. cerevisiae*, control, Kalman Filter, time delay, FIA

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Tabellenverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	3
1 Einleitung und Zielsetzung	6
2 Theoretische Grundlagen	8
2.1 Bioprozessmodelle	8
2.1.1 Beschreibung von Bioprozessen durch Modelle	9
2.1.2 Das Monod-Modell	12
2.1.3 Das Monod-Modell für den Fedbatch-Prozess im CSTR	13
2.2 Grundzüge der Regelungstechnik	15
2.2.1 Reglergrundtypen	17
2.3 Das Kalman-Filter	20
2.3.1 Grundlagen des Kalman-Filters	20
2.3.2 Einsatz von erweiterten Kalman-Filtern in Bioprozessen	22
2.4 Der Stoffwechsel von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
2.5 Die Prinzipien der Fließinjektionsanalyse	30
2.6 Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie	33
2.7 Das Verfahren der Hauptkomponentenanalyse	34
3 Material und Methoden	37
3.1 Hydrodynamische Charakterisierung des verwendeten Probenahmemoduls .	37
3.1.1 Die Bestimmung der t_{90} -Zeit	38
3.2 Implementation des Kalman-Filters und des Regelsystems	39
3.2.1 Das Verfahren zur Kompensation der Zeitverzögerung	42
3.2.2 Die Funktionsweise des implementierten Feed-forward-/Feed-back-Reglers	43
3.3 Simulationen zur Parameteridentifikation des Kalman-Filters und des PI-Reglers	44
3.4 Die Software <i>The Unscrambler</i>	44
3.5 Die Kultivierungen	45
3.5.1 Der Bioreaktor und die Steuereinheit	45

3.5.2	Durchführung der Vorkulturen	47
3.5.3	Allgemeine Parameter der Kultivierungsprozesse	48
3.6	Die Prozessanalytik	50
3.6.1	Die Online-Analytik	50
3.6.2	Die Offline-Analytik	56
3.7	Weitere Berechnungen	58
4	Auswertung und Diskussion der Ergebnisse	60
4.1	Simulationen zur Parameteridentifikation des Kalman-Filters und des PI-Reglers	60
4.2	Die Kultivierungen	61
4.2.1	Die Kultivierung fb1	62
4.2.2	Die Kultivierung fb2	73
4.2.3	Die Kultivierung fb3	84
4.2.4	Vergleichende Betrachtung und Schlussfolgerungen	96
5	Zusammenfassung und Ausblick	97
	Literaturverzeichnis	99
A	Symbol- und Abkürzungsverzeichnis	108
B	Die Parameter des <i>BioView</i>	110
C	Lebenslauf	111
D	Veröffentlichungen	113

Tabellenverzeichnis

1	Einsatz von Kalman-Filtern in Bioprozessen	26
2	Biogene Fluorophore und ihre Exzitations- und Emissionsmaxima	34
3	Zusammensetzung des Schatzmann-Mediums für $S_0 = 35 \text{ g L}^{-1}$	48
4	Zusammensetzung des Schatzmann-Mediums für $S_0 = 100 \text{ g L}^{-1}$	49
5	Bedingungen der <i>S. cerevisiae</i> - Kultivierungen	49
6	Zusammensetzung des FIA-Puffers	53
7	Parametrierung des Gaschromatographen	57
8	Erläuterung der Symbole	58
9	Ergebnisse der Parameteridentifikation	60
10	Mittelwerte der Regelabweichungen der Kultivierung fb1	64
11	Maxima und Minima der Regelabweichungen der Kultivierung fb1	64
12	Mittelwerte der spezifischen Sauerstoffaufnahme- und der spezifischen Kohlendioxidproduktionsraten	69
13	Spezifische Glucoseaufnahmeraten	71
15	Vermessene Exzitations- und Emissionswellenlängenkombinationen	110
16	Die verwendeten Verstärkungsfaktoren	110

Abbildungsverzeichnis

1	Klassifizierung von Zellmodellen nach Tsuchiya und Frederickson (aus [19])	10
2	Blockschaltbild eines Regelkreises (aus [78])	16
3	Kenngrößen zur Charakterisierung der Regelgüte (aus [78])	16
4	Darstellung eines FIA-Systems mit Manifold und Enzymkartusche	31
5	Umsetzung von Glucose durch GOD zu Gluconsäure	31
6	2D-Fluoreszenzspektrum als 3D-Plot und als Konturplot	33
7	Die Funktionsweise des Probenahmemoduls (modifiziert, aus [29])	37
8	Antwortsignal zur Ermittlung der t_{90} -Zeit bei einem Volumenstrom von $0,42 \text{ ml min}^{-1}$	39
9	Die Oberfläche des Programms <i>delay-EKF</i>	42
10	Prinzip der Kompensation der Zeitverzögerung	43
11	Schematischer Aufbau des Systems aus EKF und Regelung	44
12	Der Reaktor mit Steuer- und Regeleinheit	46
13	Aufbau der Fermentationseinheit und des Regelsystems (aus [81])	47

14	Aufbau des eingesetzten FIA-Systems	52
15	Das FIA-System	52
16	Screenshot der Software <i>CAFCA</i>	54
17	Schematischer Aufbau des <i>BioViews</i> (aus [54])	56
18	Auftragung des Sollwertes sowie der Mess- und der Schätzwerte der Glucosekonzentration im Verlauf der Kultivierung fb1	62
19	Verlauf der Regelabweichung in $g L^{-1}$ während der Kultivierung fb1	65
20	Regelabweichung in Prozent im Verlauf der Kultivierung fb1	65
21	Auftragung des Scores der zweiten gegen den Score der ersten Hauptkomponente der Fluoreszenzspektren der Kultivierung fb1	66
22	Grafische Darstellung der Fluoreszenzintensität, der Glucose-, CO_2 - und Ethanolkonzentrationen für die Kultivierung fb1	67
23	Auftragung der Glucosekonzentration, der Abluftzusammensetzung sowie der spez. Sauerstoffaufnahme- und Kohlendioxidproduktionsrate im Verlauf der Kultivierung fb1	68
24	Verlauf der Feed-Rate, der spezifischen Glucoseaufnahmerate und der maximalen Wachstumsrate der Kultivierung fb1	70
25	Darstellung der Messwerte und der Schätzwerte der Biotrockenmassekonzentration der Kultivierung fb1	72
26	Grafische Darstellung der Fluoreszenzintensität, der Glucose-, CO_2 - und Ethanolkonzentrationen der Kultivierung fb2	74
27	Auftragung der Glucosekonzentration und der Abluftzusammensetzung während der Regelphase der Kultivierung fb2	75
28	Darstellung der spezifischen Kohlendioxidproduktionsrate und der spezifischen Sauerstoffaufnahme- und Kohlendioxidproduktionsrate während der Regelphase der Kultivierung fb2	76
29	Verlauf der Feed-Rate, der spezifischen Glucoseaufnahmerate und der maximalen Wachstumsrate im Verlauf der Kultivierung fb2	77
30	Auftragung des Scores der zweiten gegen den Score der ersten Hauptkomponente der während der Kultivierung fb2 aufgezeichneten Fluoreszenzspektren	78
31	Auftragung des Sollwertes, der Mess- und der Schätzwerte der Glucosekonzentration während der Regelphase der Kultivierung fb2	79
32	Verlauf der Regelabweichung in $g L^{-1}$ im Verlauf der Kultivierung fb2	81
33	Grafische Darstellung der Regelabweichung in Prozent im Verlauf der Kultivierung fb2	82

34	Darstellung der Messwerte und der Schätzwerte der Biotrockenmassekonzentration während der Kultivierung fb2	83
35	Auftragung des Sollwertes, der Mess- und der Schätzwerte der Glucosekonzentration während der Regelphase der Kultivierung fb3	85
36	Grafische Darstellung der Fluoreszenzintensität, der Glucose-, CO ₂ - und Ethanolkonzentrationen im Verlauf der Kultivierung fb3	86
37	Auftragung des Scores der zweiten gegen den Score der ersten der Hauptkomponente der während der Kultivierung fb3 aufgezeichneten Fluoreszenzspektren	87
38	Auftragung des Verlaufs der Glucosekonzentration und der Abluftzusammensetzung während der Kultivierung fb3	88
39	Verlauf der Feed-Rate, der spezifischen Glucoseaufnahme, der maximalen und der spezifischen Wachstumsrate der Kultivierung fb3	89
40	Darstellung der Messwerte und der Schätzwerte der Biotrockenmassekonzentration im Verlauf der Kultivierung fb3	90
41	Verlauf der Regelabweichung in $g L^{-1}$ während der Kultivierung fb3	91
42	Grafische Darstellung der Regelabweichung in Prozent im Verlauf der Kultivierung fb3	92
43	Vergleich der simulierten Biotrockenmasse- und Glucosekonzentration mit den entsprechenden Messwerten.	94
44	Vergleich der simulierten Biotrockenmasse- und Glucosekonzentration mit den entsprechenden Messwerten.	95

1 Einleitung und Zielsetzung

Die Bedeutung der Biotechnologie für die industrielle Produktion hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Eine stetig wachsende Anzahl von Produkten wird unter Verwendung von Enzymen oder Mikroorganismen hergestellt. In der Pharmaindustrie werden bereits 50 % der neuen Medikamente mittels biotechnologischer Verfahren produziert und laut Expertenmeinung wird die Bedeutung der Biotechnologie gemessen am Umsatzvolumen in Zukunft weiter deutlich steigen.

Der erste von Menschen genutzte Mikroorganismus war die Bäcker- bzw. Brauhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Sie wurde schon vor Jahrtausenden zur Herstellung von Brot, Bier und Wein verwendet. Allerdings bilden die Mikroorganismen häufig in der industriellen Produktion unerwünschte Metabolite, die zu einem Absinken der Ausbeute führen oder das Produkt verunreinigen. Im Falle des Organismus *S. cerevisiae* ist dies Ethanol. In den heutigen Produktionsprozessen ist es notwendig, die Bildung dieser Metabolite zu unterbinden, um eine ökonomische Produktion gewährleisten zu können. Dies erfordert eine optimale Führung der Prozesse, um die für den speziellen Anwendungsfall optimalen Umweltparameter der Zellen einstellen zu können.

Die meisten Bioprozesse sind jedoch hoch dynamisch und daher schwer zu kontrollieren bzw. zu regeln. Die Anforderungen an ein Regelssystem sind somit sehr hoch, da dieses in der Lage sein muss, sich der Dynamik des Bioprozesses anzupassen.

Im Rahmen dieser Arbeit soll ein Regelssystem entwickelt und im Technikums-Maßstab eingesetzt werden, das die Regelung eines Bioprozesses unter Nutzung eines limitierenden Substrats als Regelgröße ermöglicht. Ziel ist die Realisierung einer nutristatischen Prozessführung bei niedrigen Glucosekonzentrationen mit hohen Regelgüten. Die Konzentration des limitierenden Substrats wird mittels eines FIA-Systems gemessen. Zur Abtrennung der Mikroorganismen aus dem Probenahmestrom des FIA-Systems wird ein Probenahmemodul mit Keramikmembran eingesetzt. Sowohl die im Probenahmemodul stattfindende Rückvermischung als auch die Messung selbst verursachen eine nicht zu vernachlässigende Zeitverzögerung, die vom Regelssystem kompensiert werden muss. Die Realisierung erfolgt mit einer adaptiven Regelung und einem parameteradaptiven kontinuierlich-diskret erweiterten Kalman-Filter, in dem neben dem Monod-Modell zur Prädiktion ein Mechanismus zur Kompensation der Zeitverzögerung implementiert ist. Die Kompensation der Verzögerungszeit ist für das Regelssystem von entscheidender Bedeutung, da die Messwerte nicht den aktuellen Systemzustand beschreiben, sondern einen um die Größe der Verzögerungszeit zurückliegenden. Dies muss bei der Berechnung der Stellgröße berücksichtigt werden.

Obwohl die Substratkonzentration eine der einflussreichsten Prozessvariablen ist und ihre Verwendung als Regelgröße schon sehr früh vorgeschlagen [32] wurde, werden Regelsysteme, die auf ihrer direkten Messung beruhen, nur wenig beschrieben. Steht eine nutristatische Regelung zur Verfügung, kann das Wachstum der Mikroorganismen direkt beeinflusst werden, sofern die Konzentration des Substrates in der Größenordnung der Monod-Konstante liegt. Allerdings wird die nutristatische Prozessführung/Regelung bisher wegen fehlender zuverlässiger Onlineanalytiken selten eingesetzt. Von einigen Autoren wird der routinemäßige Einsatz solcher Systeme sogar negiert [19], da dies regelungstechnisch und analytisch eine anspruchsvolle Aufgabe darstellt. Häufig hat man sich mit der Regelung entlang einer Trajektorie beholfen, da die Etablierung eines Regelkreises für das limitierende Substrat als die optimale Lösung bisher nicht realisierbar war. Es existieren bereits FIA-basierte Regelungen auf der Basis digitaler Regler [79], [16] und [2]. Sie weisen jedoch alle spezifische Probleme auf. Die von Arndt [2] entwickelte, ohne Probenahmemodul arbeitende „Schnelle Glucose-FIA“ ist zwar schnell, aber auf Grund ihres Aufbaus, des hohen Messrauschens und ihrer Störanfälligkeit nur bedingt geeignet. Zudem gestattet sie nicht das Arbeiten mit gentechnisch modifizierten Mikroorganismen, da der Probenahmestrom nicht zellfrei ist und somit Zellen freigesetzt werden. Diese Schwierigkeiten werden mit dem in dieser Arbeit entwickelten Regelsystem umgangen. Es zeichnet sich durch eine geringe Störanfälligkeit, hohe Regelgüten und ein geringes Messrauschen aus, zudem ist es robust gegen kurzzeitige Ausfälle der Analytik.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Bioprozessmodelle

Zur modellbasierten Beschreibung von Bioprozessen ist die Kenntnis der Formalkinetik Voraussetzung. Sie beschreibt den Prozess in seiner Gesamtheit und kann als Summe von Mikro- und reaktorspezifischer Makrokinetik aufgefasst werden. Die Mikrokinetik beschreibt das Zellwachstum und bei Bedarf weitere Eigenschaften der Mikroorganismen. Die durch den Reaktortyp, die Reaktionsführung, Transporterscheinungen und Durchmischungsphänomene bedingten Terme werden durch die Makrokinetik erfasst.

In einem Bioprozess sind wechselwirkende Systeme involviert. Die biotische Phase, die von den Zellen gebildet wird, und das Medium, welches die abiotische Phase bildet. Das Zellwachstum ist verbunden mit der Aufnahme von Substraten aus dem Medium und der Ausschleusung von Substanzen in das Medium durch die Zelle sowie die Produktion von Biomasse. Diese Stofftransporte verursachen Änderungen der Zustandgrößen (Temperatur, Druck, Viskosität), sofern diese nicht durch geeignete Maßnahmen (z.B. eine Regelung) konstant gehalten werden. Darüber hinaus haben noch weitere Prozeßgrößen wie die Medienzusammensetzung, die Geometrie des Reaktors, die Form der Rührer und weiterer Kultivierungsbedingungen Einfluss. Die Modellierung und Durchführung von Bioprozessen ist bedingt durch die Summe der vorgenannten Einflussfaktoren und die Komplexität der Mikroorganismen sehr schwierig. Heutige Modelle werden aufgrund vereinfachter Vorstellungen über die Mikroorganismen gebildet, und die Reaktoren werden als ideal betrachtet.

Zur Beschreibung des Zellwachstums benötigt man Kinetiken, deren Komplexität vom Anwendungszweck und den zu berücksichtigenden Zustandsvariablen determiniert ist. Abhängig von dem betrachteten Mikroorganismus bedeutet Wachstum Zellteilung (sog. Populationswachstum) oder Größenzunahme der Zellen (Zellwachstum). Die Modelle basieren auf Vorstellungen über den Aufbau und die Funktionsweise der Zellen sowie die intrazellulären Reaktionen. Ein Modell zur Beschreibung der Zellen kann ein sehr grobes makroskopisches Modell sein oder Stoffwechsel- und Transportvorgänge der Zellen berücksichtigen.

Die mathematische Beschreibung der Formalkinetik kann demzufolge auf verschiedenen Ebenen erfolgen:

- auf molekularer Ebene erfolgt die Betrachtung der einzelnen Schritte des Zellstoffwechsels

- auf zellulärer Ebene erfolgt eine mikrokinetische Beschreibung des Zellmetabolismus als Gesamtheit
- auf Populationsebene, durch Betrachtung der Zellen als einheitliche Population
- auf makrokinetischer Ebene, durch die formalkinetische Beschreibung signifikanter (makroskopischer) Variablen des Zellmetabolismus

2.1.1 Beschreibung von Bioprozessen durch Modelle

Die Zelle ist ein sehr komplexes Multikomponentensystem, in dem eine Vielzahl von Reaktionen parallel ablaufen. Eine Zelle stellt, wie die gesamte Population, eine heterogene Masse dar. Die Inhomogenität der Zellpopulation beruht auf der Altersverteilung der Zellen sowie den unterschiedlichen Stadien des Zellzyklus. Da es in den wenigsten Fällen praktikabel ist, alle Faktoren zu berücksichtigen, das Zellmodell würde sonst extrem komplex werden, sind Simplifizierungen und Approximationen erforderlich. Die Umgebungsbedingungen werden als konstant oder deren Änderungen als nicht signifikant angenommen. Für das Medium wird angenommen, alle Komponenten, bis auf ein limitierendes Substrat, seien in genügend hoher, praktisch konstanter, nicht inhibierender Konzentration vorhanden.

Eine Klassifizierung der Modelle kann an Hand der Quantität der Komponenten, die zur Beschreibung der Zellen genutzt werden, und an Hand des im Modell implementierten Wissens erfolgen. Je nach dem werden die Zellen als einheitliches homogenes Gebilde betrachtet oder als heterogene Masse mit der zuvor erwähnten Komplexität. Es werden zunächst unstrukturierte und strukturierte Modelle unterschieden, innerhalb dieser Gruppen wird dann zwischen unsegregierten und segregierten Modellen differenziert. Diese Klassifizierung geht auf Tsuchiya [89] und Frederickson [30] zurück. Abbildung 1 illustriert die Abgrenzung der einzelnen Modelle voneinander.

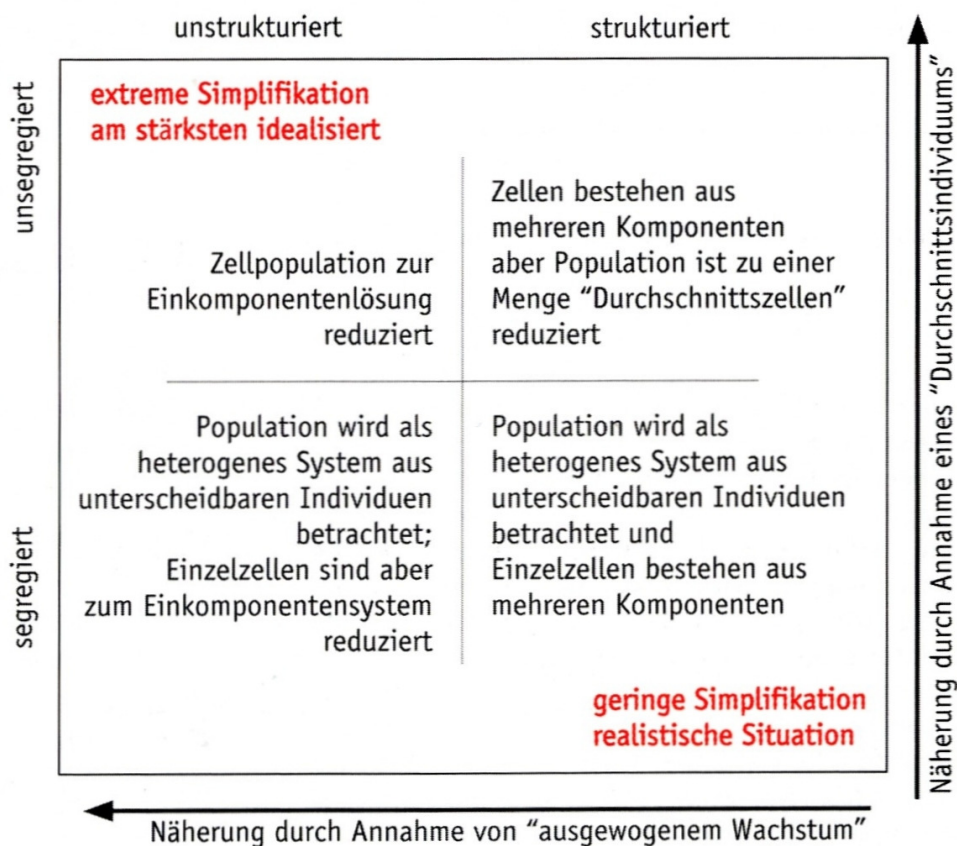


Abbildung 1: Klassifizierung von Zellmodellen nach Tsuchiya und Frederickson (aus [19])

Die unstrukturierten, unsegregierten Modelle weisen den höchsten Grad an Vereinfachung und Abstraktion auf. Sie nutzen zur Beschreibung makroskopische Zustandsvariablen. Die Zellen werden als „black box“, basierend auf Massengleichgewichten und kinetischen Gleichungen, betrachtet. Das Wachstum der Zellen ist als Zunahme der Biomasse definiert, deren Eigenschaften zeitinvariant sind. Der Stoffwechsel wird als invariant bezüglich der Bildung von Stoffwechselprodukten angenommen. Der Zellzyklus wird nicht betrachtet. Das Vorgehen, die Zelleigenschaften trotz der Heterogenität der Population als mittlere Eigenschaften zu definieren, ist statthaft, da die Anzahl der Zellen sehr groß ist und somit die individuellen Eigenschaften makroskopisch eliminiert werden.

Strukturierte Modelle betrachten die Zelle als Multikomponentensystem, das mit Hilfe von Bilanzen beschrieben wird. Die Zelleigenschaften und der Stoffwechsel werden als zeitinvariant betrachtet. Es wird von einer homogenen Zellpopulation ausgegangen. In den strukturierten Modellen sind die Mikroorganismen und deren Stoffwechsel betreffende Details implementiert, dies setzt Wissen über

- den Stamm der Mikroorganismen,

- die Physiologie,
- die Historie,
- die Morphologie und
- den Metabolismus/Katabolismus voraus.

Unsegregierte Modelle negieren die Heterogenität der Zellen bzw. der Zellpopulation. Segregierte Modelle berücksichtigen die Inhomogenität der Zelleigenschaften und teilen die Zellen in mehrere, in sich homogene Klassen verschiedener Eigenschaften ein.

Der Realität entspricht der strukturierte, segregierte Fall. Besitzt die Heterogenität der Zellen bzw. der Zellpopulation keinen signifikanten Einfluss auf die Kinetik, kann von segregierten zu unsegregierten Modellen übergegangen werden. Liegt sog. balanciertes Wachstum vor, die mittlere Zusammensetzung der Zellen wird nicht durch das Wachstum beeinflusst, sind unstrukturierte Modelle zur Beschreibung völlig ausreichend.

Trotz aller Approximationen und Simplifizierungen sind die unstrukturierten, unsegregierten Modelle zur Prozessregelung, -optimierung und -simulation effektiv und sinnvoll nutzbar.

Die Wachstumsgeschwindigkeit r_X wird modellunabhängig mit Hilfe der Größen X (Biotrockenmassekonzentration) und μ (spezifische Wachstumsrate) durch folgende Differentialgleichung beschrieben:

$$r_X = \frac{dX(t)}{dt} = \mu X \quad (1)$$

Für die Geschwindigkeit des Verbrauchs an Substrat $-r_S$ gilt unter Einführung des Ausbeutekoeffizienten $Y_{X/S}$, soweit kein oder nur wenig Produkt gebildet wird:

$$-r_S = \frac{1}{Y_{X/S}} r_X \quad (2)$$

Da die strukturierten Modelle häufig sehr komplex sind, ist ihre Eignung für die Konzeption eines Regelsystems im Einzelfall zu prüfen. Beschreibt ein unstrukturiertes, unsegregiertes Modell das Verhalten der Mikroorganismen unter den gegebenen Bedingungen mit ausreichender Präzision, ist der Einsatz eines solchen praktikabler, da der Aufwand für benötigte Rechenleistung und Analytik gering gehalten werden kann. Dies bedeutet in der Praxis eine Kostenersparnis auf Grund des minimalen Wartungsbedarfs.

2.1.2 Das Monod-Modell

Dieses Modell geht auf den französischen Mikrobiologen und Biochemiker J. Monod zurück. Es ist ein unstrukturiertes, makrokinetisches Modell auf der Basis einer Sättigungskinetik. Die Konzentrationen aller Substrate, bis auf eines, liegen im Bereich ihrer Sättigungskonzentrationen, so dass für sie Gleichung 3 gilt.

$$S \gg K_m \quad (3)$$

Die Basis des Modells bildet die Michaelis-Menten-Kinetik [60]. Die dort für Enzyme hergeleitete Kinetik wird auf Zellen übertragen. Die ganze Zelle wird als Summe ihrer Enzyme betrachtet. Das Wachstum ist das Resultat aller in der Zelle ablaufenden enzymatischen Reaktionen, die die makroskopische Wachstumsgeschwindigkeit bestimmen.

Der Ansatz beschreibt die spezifische Wachstumsrate μ als Funktion des limitierenden Substrats S (Gleichung 4). Die kinetischen Parameter des Modells sind die maximale Wachstumsrate μ_{max} und die Monod-(Sättigungs)-Konstante K_m .

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_m + S} \quad (4)$$

μ_{max} ist eine von den jeweiligen Kultivierungsbedingungen (Art des Substrates, pH-Wert, Temperatur) und dem Organismus abhängige Größe. Es ist die maximale Wachstumsrate, die bei hohen Substratkonzentrationen ($S \gg K_m$) erreicht werden kann. K_m ist eine für den Mikroorganismus spezifische Konstante mit der Dimension einer Konzentration. Ihr Wert entspricht der Konzentration, bei welcher $\mu = \frac{\mu_{max}}{2}$ gilt. Je kleiner der Wert von K_m ist, desto größer ist die Affinität des Organismus zum Substrat. Für die Wachstumsgeschwindigkeit folgt mit Gleichung 4

$$r_X = \frac{dX(t)}{dt} = \mu X = \mu_{max} \frac{S}{K_m + S} X \quad (5)$$

Zwischen der Wachstumsrate und der Biotrockenmassekonzentration (BTM) herrscht nach Gleichung 5 direkte Proportionalität. Es liegt demnach eine autokatalytische Reaktion vor.

Die Auftragung von μ gegen S zeigt einen asymptotischen Verlauf mit Sättigungscharakter analog einer Langmuir-Isotherme. Aus einer, als Lineweaver-Burk-Diagramm bezeichneten, Auftragung von μ^{-1} gegen S^{-1} lassen sich μ_{max} und K_m bestimmen (Ordnatenabschnitt: μ_{max}^{-1} , Steigung: $\frac{K_m}{\mu_{max}}$). Es existieren zwei Grenzfälle:

1. μ und somit auch r_X ist unabhängig von der Konzentration des Substrates, wenn Gleichung 3 erfüllt ist. Die Reaktion ist formal nullter Ordnung, da folgende Annahme zulässig ist $\mu \approx \mu_{max}$.

2. Die Vereinfachung $\mu \approx \mu_{max} \frac{S}{K_m}$ ist zulässig, wenn

$$S \ll K_m \quad (6)$$

In diesem Fall erhält man ein Geschwindigkeitsgesetz 1. Ordnung,

Da K_m häufig relativ klein ist, ist die Abhängigkeit des Modells von K_m nur bei niedrigen Substratkonzentrationen gegeben.

2.1.3 Das Monod-Modell für den Fedbatch-Prozess im CSTR

Die aus der chemischen Reaktionstechnik bekannten Grundlagen zur Reaktorauslegung lassen sich nur bedingt auf biologische Stoffsysteme übertragen. Dennoch wird zur Modellbildung der klassische Ansatz über die Kopplung von Stöchiometrie, Kinetik und Thermodynamik an die Bilanzgleichungen für Stoff und Energie (Wärme) verfolgt. Aufgrund der zuvor beschriebenen Problematiken ist in der Regel nur eine makrokinetische Beschreibung möglich. Diese muss jedoch an den Anwendungszweck adaptiert sein und sollte die experimentelle Bestimmung der Modellparameter ermöglichen. Für die Erstellung eines Bioprozessmodells ist dieser Ansatz oftmals ausreichend, da in der Regel nur makroskopische Prozessvariablen in den Bilanzgleichungen auftreten. Da der Einfluss dieser Prozessvariablen nicht berücksichtigt wird, ist das aufgestellte Modell nur gültig, wenn sie konstant sind oder den Prozess nicht beeinflussen. Am häufigsten findet zur Beschreibung mikrobiellen Wachstums das Monod-Modell Anwendung.

Zur Aufstellung des Bioprozessmodells muss dieses Modell mit den Stoff- und Wärmebilanzen verknüpft werden, um die Konzentrations- und Temperaturverläufe beschreiben zu können. Im Folgenden wird jedoch bei der Aufstellung des Bioprozessmodells nur die Stoffbilanz betrachtet, da der verwendete Reaktor thermostatiert und die Reaktionsführung somit isotherm ist. Durch Bilanzierung über ein differentielles Volumenelement (lokale Bilanzierung) erhält man für ein einphasiges System den folgenden Ausdruck (Gleichung 7).

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} = -div(c_i \vec{v}) + div(D_i grad(c_i)) + \sum_j r_{ij} \quad (7)$$

Dabei ist c_i die Konzentration der Komponente i , \vec{v} der Vektor der Strömungsgeschwindigkeit, D_i der Dispersionskoeffizienten und r_{ij} die Reaktionsgeschwindigkeit der Komponente i in der Reaktion j . Abhängig vom Typ des Reaktors können, sofern der Reaktor als ideal angesehen wird, bestimmte Terme gleich Null gesetzt werden. Für den im Rahmen dieser Arbeit betrachteten Fedbatch-Reaktor, der gut durchmischt ist, kann der Dispersionsterm vernachlässigt werden. Es ist neben dem Reaktionsterm also lediglich die

Volumenänderung durch Probenahme (zellfrei) und Zufütterung zu berücksichtigen. Der Reaktionsterm beschränkt sich auf die Geschwindigkeit des Biomassezuwachses r_X bzw. auf die Geschwindigkeit des Glucoseverbrauches r_S . Dies führt zu folgendem Differentialgleichungssystem.

$$\frac{dX(t)}{dt} = r_X - \frac{\dot{V}(t)_{feed}}{V(t)} \cdot X(t) + \frac{\dot{V}_{Probe}}{V(t)} \cdot X(t) \quad (8)$$

$$\frac{dS(t)}{dt} = -r_S + (S_0 - S(t)) \cdot \frac{\dot{V}(t)_{feed}}{V(t)} \quad (9)$$

$$\frac{dV(t)}{dt} = \dot{V}(t)_{feed} - \dot{V}_{Probe} \quad (10)$$

Folgende Symbolik wurde verwendet:

r_X	Geschwindigkeit des Biomassezuwachses	[g L ⁻¹ h ⁻¹]
$X(t)$	Biotrockenmassekonzentration zum Zeitpunkt t	[g L ⁻¹]
$\dot{V}(t)_{feed}$	Volumenstrom im Zulauf (Feed-Rate) zum Zeitpunkt t	[L h ⁻¹]
$V(t)$	Reaktorvolumen zum Zeitpunkt t	[L]
$-r_{S(t)}$	Geschwindigkeit des Substratverbrauches zum Zeitpunkt t	[g L ⁻¹ h ⁻¹]
S_0	Konzentration der Feed-Lösung	[g L ⁻¹]
$S(t)$	Substratkonzentration zum Zeitpunkt t	[g L ⁻¹]
\dot{V}_{Probe}	Volumenstrom der Onlineprobenahme	[L h ⁻¹]

Da nur die Bildung von Biomasse betrachtet wird, ist die Geschwindigkeit des Biomassezuwachses proportional zur bereits vorhandenen Biomasse. Der Proportionalitätsfaktor ist die bereits oben eingeführte spezifische Wachstumsrate μ der Monod-Kinetik. Die Geschwindigkeit des Biomassezuwachses wird daher durch Gleichung 11 beschrieben, wobei dieser Ansatz stark vereinfachend. Dies stellt insofern ein Problem dar, als dass die spezifische Wachstumsrate eine Funktion vieler Umweltparameter ist.

$$r_X = \mu \cdot X(t) \quad (11)$$

Die Geschwindigkeit des Substratverbrauches (Gleichung 12) ist proportional zu der Geschwindigkeit des Biomassezuwachses und umgekehrt proportional zum Ausbeutekoeffizienten $Y_{X/S}$, welcher das Verhältnis zwischen verbrauchter Masse Substrat und daraus gebildeter Masse Biomasse wiedergibt.

$$r_S = \mu \cdot \frac{X(t)}{Y_{X/S}} \quad (12)$$

Setzt man die Gleichungen 11, 12 und 4 in die Bilanzgleichungen 8 und 9 ein, so erhält man die folgenden Modellgleichungen.

$$\frac{dX(t)}{dt} = \mu_{max} \frac{S(t)}{K_m + S(t)} \cdot X(t) - \frac{\dot{V}(t)_{feed}}{V(t)} \cdot X(t) + \frac{\dot{V}_{Probe}}{V(t)} \cdot X(t) \quad (13)$$

$$\frac{dS(t)}{dt} = -\mu_{max} \frac{S(t)}{K_m + S(t)} \cdot \frac{X(t)}{Y_{X/S}} + (S_0 - S(t)) \cdot \frac{\dot{V}(t)_{feed}}{V(t)} \quad (14)$$

$$\frac{dV(t)}{dt} = \dot{V}(t)_{feed} - \dot{V}_{Probe} \quad (15)$$

$$\frac{d\mu_{max}(t)}{dt} = 0 \quad (16)$$

Somit steht ein Differentialgleichungssystem zur Beschreibung des Zellwachstums in einem Fedbatch-Reaktor zur Verfügung. Dieses System von Gleichungen ist in den kontinuierlich-diskreten erweiterten Kalman-Filter als Prozessmodell implementiert.

2.2 Grundzüge der Regelungstechnik

Die Regelung ist ein Vorgang, bei dem die Regelgröße (Istwert) $x(t)$ kontinuierlich erfasst und mit der Führungsgröße (Sollwert) $w(t)$ verglichen wird. Basierend auf der Differenz dieser beiden Größen berechnet der Regler die Stellgröße $y(t)$ mit dem Ziel, die Differenz zwischen Regelgröße und Führungsgröße zu minimieren. Die Differenz zwischen dem Soll- und dem Istwert wird als Regelabweichung (Gleichung 17) bezeichnet, ihr negativer Wert als Regeldifferenz (Gleichung 18).

$$x_w(t) = x(t) - w(t) \quad (17)$$

$$e(t) = w(t) - x(t) \quad (18)$$

Eine Regelung stellt im Unterschied zu einer Steuerung einen geschlossenen Wirkkreislauf, auch als Regelkreis bezeichnet, dar. Die Elemente eines Regelkreises sind die Regelstrecke (der zu regelnde Prozess), die Stelleinrichtung und der Regler selbst. In Abbildung 2 ist ein Regelkreis exemplarisch als Blockschaltbild dargestellt.

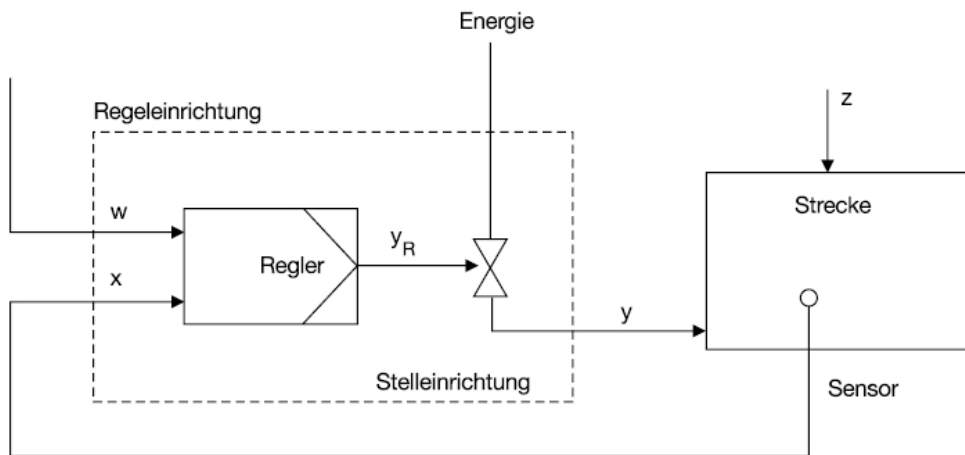


Abbildung 2: Blockschaltbild eines Regelkreises (aus [78])

Kriterien für die Regelgüte sind die bleibende Regelabweichung $x_{w\infty}$, die möglichst klein sein sollte, so wie das Verhalten des Regelkreises bei Störungen oder Änderungen der Führungsgröße. Bei Variation der Führungsgröße sind geringe Überschwingweiten x_{max} bei kurzer Ausregelzeit T_a wünschenswert. Dies gilt auch für die Anregelzeit T_{an} zu Beginn des Prozesses. Die Größen sind in Abbildung 3 veranschaulicht.

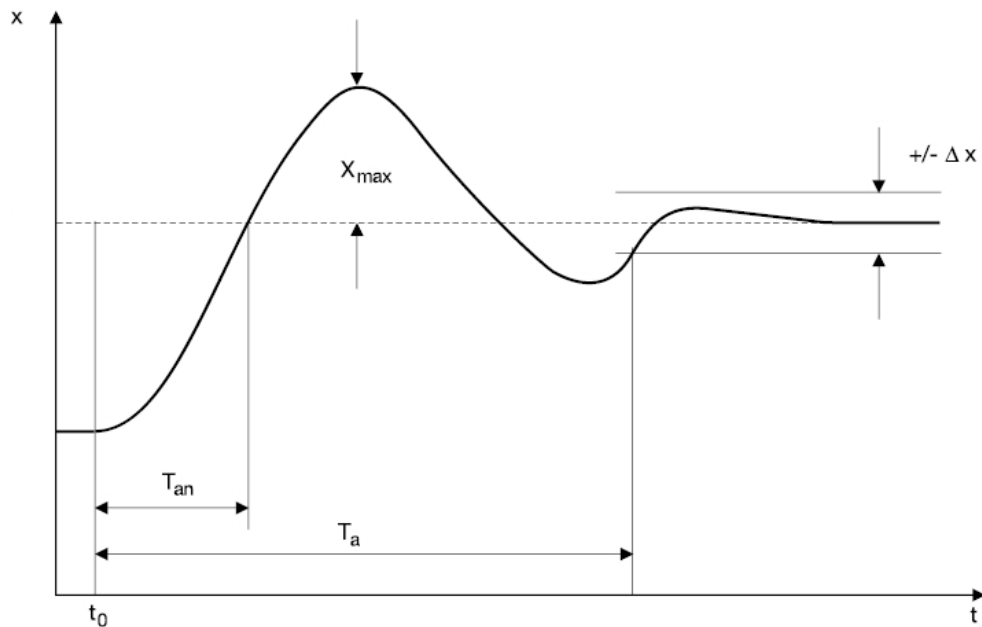


Abbildung 3: Kenngrößen zur Charakterisierung der Regelgüte (aus [78])

2.2.1 Reglergrundtypen

Ein **Proportionalregler (P-Regler)** stellt die Stellgröße $y(t)$ proportional zur Regeldifferenz $e(t)$ ein. Die Proportionalitätskonstante K_P wird als Proportionalbeiwert bezeichnet. Sie gibt den Faktor an, um den die Regeldifferenz verstärkt wird. Die Reglergleichung lautet:

$$y(t) = K_P e(t) = K_P (w(t) - x(t)) \quad (19)$$

Bei einem **Integrierenden Regler (I-Regler)** herrscht zwischen Stellgröße und dem Integral der Regelabweichung über die Zeit Proportionalität. Die Integrationskonstante $T_N = K_I^{-1}$ wird als Nachstellzeit bezeichnet. Der Regler wird durch folgende Reglergleichung beschrieben:

$$y(t) = \frac{1}{T_N} \int_0^t e(t) dt = \frac{1}{T_N} \int_0^t (w(t) - x(t)) dt \quad (20)$$

Der **Proportional-Integral-Differential-Regler (PID-Regler)** wird durch eine Parallelschaltung eines P-Reglers, eines I-Reglers und eines D-Gliedes konstruiert. Die vom D-Glied berechnete Stellgröße ist proportional der Änderungsgeschwindigkeit der Regelgröße. Der PID-Regler gehorcht folgender Reglergleichung:

$$y(t) = K_R \left(\underbrace{e(t)}_{P\text{-Anteil}} + \underbrace{\frac{1}{T_N} \int_0^t e(t) dt}_{I\text{-Anteil}} + \underbrace{T_V \frac{de}{dt}}_{D\text{-Anteil}} \right) \quad (21)$$

Die genannten Reglergleichungen (Gleichungen 19 bis 21) gelten für analoge Regler. Die Regler lassen sich auch durch digitale Algorithmen beschreiben. Für den PID-Regler erhält man Gleichung 22.

$$u(k) = K \left[\underbrace{e(k)}_{P\text{-Anteil}} + \underbrace{\frac{T_A}{T_I} \sum_{i=0}^{k-1} e(i)}_{I\text{-Anteil}} + \underbrace{T_D \frac{e(k) - e(k-1)}{T_A}}_{D\text{-Anteil}} \right] \quad (22)$$

$u(k)$ ist dabei die Stellgröße, $e(k)$ die Regeldifferenz zum Zeitpunkt $t = kT_A$ (T_A : Abtastzeit). Die freien Parameter des Reglers sind der Verstärkungsfaktor K , die Nachstellzeit T_I und die Vorhaltezeit T_D . Die Implementierung des PID-Reglers in eine Regelsoftware geschieht durch Verwendung eines rekursiven Algorithmus (Gleichung 23):

$$\Delta u = u(k) - u(k-1) = q_0 e(k) + q_1 e(k-1) + q_2 e(k-2) \quad (23)$$

Die Parameter q_0 , q_1 und q_2 in Gleichung 23 repräsentieren die Gewichtung der P-, I- und D-Anteile des Reglers und können dabei aus Gleichung 23 abgeleitet werden.

$$q_0 = K \left(1 + \frac{T_D}{T_A} \right) \quad (24)$$

$$q_1 = -K \left(1 + 2\frac{T_D}{T_A} - \frac{T_A}{T_i} \right) \quad (25)$$

$$q_2 = K \frac{T_D}{T_A} \quad (26)$$

Die Qualität des Reglers steigt mit der Abtastfrequenz (steigt mit sinkender Abtastrate). Ist die Abtastfrequenz hoch genug, verhalten sich digitale Regler wie analoge. Das Abtasttheorem besagt, dass ein kontinuierliches Signal mit einer Maximalfrequenz f_{max} mit einer Frequenz größer als $2 f_{max}$ abgetastet werden muss, damit man aus dem so erhaltenen zeitdiskreten Signal das Ursprungssignal praktisch ohne Informationsverlust approximieren kann. In der Praxis kann man von einem quasikontinuierlichen Verhalten ausgehen, wenn die Abtastzeit kleiner ist als 20 % der Summe der Zeitkonstanten [50].

Der wirtschaftliche Druck erfordert eine Steigerung der Effizienz von Bioprozessen und eine Erhöhung des Grades der Prozessautomation. Daraus resultiert ein immer größer werdender Bedarf an Überwachungs-, Steuerungs- und Regelsystemen. Zur ökonomisch und ökologisch optimalen Produktion ist der Einsatz von Regelsystemen zwingend erforderlich. Zur Erzielung bestmöglichen Wachstums der Mikroorganismen müssen die Umweltparameter optimal auf diese abgestimmt sein und konstant gehalten werden. Bei der Entwicklung von Regelsystemen für die Biotechnologie tritt neben der hohen Prozessdynamik, die in der Regel ein nicht-lineares Verhalten aufweist, und der mangelnden Verfügbarkeit präziser Prozessmodelle (siehe Kapitel 2.1) das Problem der Wahrung der Sterilität auf. Daher sind derartige Systeme äußerst komplex. Erschwerend kommt hinzu, dass wichtige Prozessgrößen oftmals nur schwer, indirekt oder gar nicht messbar sind. Hier bietet sich der Einsatz sog. Zustandsbeobachter/-schätzer an, wie das in dieser Arbeit verwendete kontinuierlich-diskrete erweiterte Kalman-Filter, um kostenintensive Sensoren einsparen zu können bzw. Prozessvariablen schätzen zu können [10]. Hierdurch ist dann die Möglichkeit gegeben, auf den momentanen Prozesszustand reagieren zu können. Für viele Prozessgrößen wie pH-Wert, Temperatur und Gelöstsauerstoffkonzentration stehen heute zuverlässige Regelsysteme zur Verfügung. Diese Systeme sind für eine optimale Prozessführung unabdingbar. Wünschenswert ist jedoch, Regelsysteme für weitere wichtige Prozessvariablen zur Verfügung stellen zu können. Die Regelung der Feedrate auf der Basis von kalorimetrischen Messungen wird von Randolph beschrieben [73], Kollecker [49] entwickelte eine Methodik unter Verwendung der 2D-Fluoreszenzspektroskopie. Ei-

ne Regelung der Gelöstsauerstoffkonzentration auf Basis der Substratzufuhr wurde von Kleist [47] realisiert. Eine Substratregelung auf Basis von sog. Probing bei der Messung der Gelöstsauerstoffkonzentration ist in [1] und [57] beschrieben. Beim Probing wird das Verhalten der Gelöstsauerstoffkonzentration bei pulsartigen Änderungen der Feedrate untersucht.

Die Nutzung der Konzentration des limitierenden Substrates als Führungs- und Regelgröße wurde schon sehr früh vorgeschlagen [32]. In der Literatur finden sich, auf Grund des hohen regelungstechnischen Anspruchs dieser Aufgabe, bisher nur sehr wenige Realisierungen [2] und [48]. Lenas et al. [51] nutzen zur Regelung der Glucose und Glutaminkonzentration bei der Kultivierung von Säugerzellen eine HPLC. Hier ist aber der Anspruch an den Regelalgorithmus auf Grund der geringen Prozessdynamik nicht vergleichbar. Weitere in der Literatur beschriebene Verfahren bedienen sich eines adaptiven Fuzzy Controllers [61] oder verwenden neuronale Netze [62].

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Regelsystem basiert auf der direkten Messung der Konzentration des limitierenden Substrates, grenzt sich aber durch seine Spezifikation deutlich von den erwähnten Systemen ab.

2.3 Das Kalman-Filter

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Regelsystem für einen Bioprozess entwickelt und evaluiert, welches die Konzentration des limitierenden Substrats als Regel- und Führungsgröße nutzt. Da die Messwerte prinzipbedingt nur zeitdiskret und verzögerungszeitbehaftet zur Verfügung stehen, werden an den erforderlichen Regelalgorithmus besondere Anforderungen gestellt. Er muss neben der Berücksichtigung bzw. Egalisierung der Verzögerungszeiten ein Prozessmodell enthalten, welches durch Simulation eine zuverlässige Prädiktion der Zustandsvariablen im Zeitraum zwischen zwei Messwerten gewährleistet. Zur Lösung bieten sich bei derartigen Problemstellungen Zustandsschätzer an. Die nutristatische Regelung mit zeitdiskreter Analytik für einen Bioprozess stellt weitere (mathematische) Anforderungen an das Regelsystem, da der Prozess selbst nichtlinear ist. Ein geeignetes Werkzeug stellt das kontinuierlich-diskrete erweiterte Kalman-Filter (EKF) dar. Mit dem EKF kann eine modellgestützte Prozessregelung realisiert werden, die sich durch Robustheit auszeichnet.

2.3.1 Grundlagen des Kalman-Filters

Die Ermittlung der Zustandsgrößen eines Systems ist immer mit Ungenauigkeiten behaftet, da die Messung der Ausgangsgrößen mit Messfehlern und stochastischen Störungen behaftet ist. Die Einflüsse der Messfehler auf das System lassen sich durch Filterung minimieren. Ein häufig dazu verwendeter Algorithmus ist der Kalmansche Filteralgorithmus.

Das Kalman-Filter (KF) und das erweiterte Kalman-Filter (EKF) werden als Filter, Zustandsschätzer oder Zustandsbeobachter bezeichnet, da sie den aktuellen Systemzustand schätzen, mit diskreten Messwerten abgleichen und die Messdaten glätten. Ihr großer Vorteil gegenüber anderen Filterverfahren besteht darin, dass sie zur Filterung nur den aktuellen Messwert und nicht wie andere Verfahren Zeitreihen benötigen. Das KF beruht auf einem linearen Modell des wahren Prozesses, in das stochastische Größen einfließen. Sind die Modellgleichungen nicht linear, so wird das Filter als EKF bezeichnet. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Bezeichnung „kontinuierlich-diskretes erweitertes Kalman-Filter“ hat ihre Ursache in der Kontinuität der verwendeten Zustandsgleichungen (kontinuierliche Prädiktion) (Gleichung 27) und der zeitdiskreten Messgleichung (Gleichung 28).

$$\frac{dx(t)}{dt} = f(x(t), u(t), t) + z(t) \quad (27)$$

$$y(t_i) = h(x(t_i)) + s(t_i) \quad (28)$$

Dabei ist $x(t)$ der Zustandsvektor, $z(t)$ das Prozessrauschen, $y(t_i)$ der Messvektor zu diskreten Zeitpunkten, $h(x(t_i))$ der wahre Wert der Messgrößen und $s(t_i)$ das Messrauschen. Das Prozess- und das Messrauschen werden als weißes Rauschen angenommen, d.h. der Mittelwert ist Null, die Varianz von Null verschieden. Die Stärke des Rauschens wird durch die Prozessrauschleistungsmatrix Q (Gleichung 29) bzw. durch die Messrauschkovarianzmatrix R (Gleichung 30) beschrieben.

$$Q * \delta(\tau) = E \{z(t) \cdot z^T(t + \tau)\} \quad (29)$$

$$R = E \{s(t_i) \cdot s^T(t_j)\} \quad (30)$$

Da die Messungen unabhängig voneinander sind, ist die Messrauschkovarianzmatrix eine Diagonalmatrix mit den Varianzen des Messrauschens. Die Größe der Varianzen in R spezifiziert die Stärke des Messrauschens. Die Güte der Messung kann darüber in das Modell einfließen. Die Prozessrauschleistungsmatrix Q ist ein Maß für die Güte des Modells und drückt mittels der Varianzen aus, inwieweit dem Modell Vertrauen geschenkt werden soll. Die Schätzfehlerkovarianzmatrix P (Gleichung 31) beschreibt die aktuelle Unschärfe der Schätzung des Zustandsvektors $x(t)$,

$$P_{ii}(t) = E \{(x_i(t) - \hat{x}_i(t))^2\} \quad (31)$$

wobei $x_j(t)$ den wahren Wert und $\hat{x}_j(t)$ den Schätzwert des Zustandsvektors bedeuten. Die Schätzfehlerkovarianz wird bis zum Eintreffen eines neuen Messwertes kontinuierlich gemäß Gleichung 32 berechnet.

$$\frac{dP(t)}{dt} = F(t) \cdot P(t) + P(t) \cdot F^T(t) + Q \quad (32)$$

Dabei ist $F(t)$ die Jacobi-Matrix von $f(x(t), u(t), t)$. Sobald ein neuer Messwert eintrifft, wird dieser gefiltert, d.h. es werden die Zustandsvariablen und die Schätzfehlerkovarianz an der Stelle t_i neu berechnet. Hierbei wird zunächst die Kalman-Verstärkungsmatrix $K(t_i)$ (Gleichung 33) mit der Schätzfehlerkovarianzmatrix der letzten Prädiktion bestimmt, wobei $H(t_i)$ die Jacobi-Matrix von $h(x(t_i))$ ist.

$$K(t_i) = P(t_i) \cdot H^T(t_i) \cdot [H(t_i) \cdot P(t_i) \cdot H^T(t_i) + R]^{-1} \quad (33)$$

Das EKF berechnet die Verstärkungsmatrix so, dass die Kovarianz des Schätzfehlers minimal wird. Die Schätzfehlerkovarianzmatrix und die Messrauschkovarianz beeinflussen den Wert von $K(t_i)$ derart, dass bei kleinem Messrauschen, bezogen auf das Prozessrauschen, die Zustandsschätzung stärker an den Messwerten orientiert wird. Sind die Verhältnisse umgekehrt, folgt die aktuelle Schätzung stärker der vorherigen Prädiktion. Mit der neu

bestimmten Kalman-Verstärkungsmatrix wird nun der neue Schätzwert gemäß Gleichung 34 berechnet.

$$\hat{x}_{neu}(t_i) = \hat{x}(t_i) + K(t_i) \cdot [y(t_i) - h(\hat{x}(t_i), t_i)] \quad (34)$$

Die neue Schätzfehlerkovarianz folgt aus Gleichung 35 mit I als Einheitsmatrix.

$$P_{neu}(t_i) = [I - K(t_i) \cdot H(t_i)] \cdot P(t_i) [I - K(t_i) \cdot H(t_i)]^T + K(t_i) \cdot R \cdot K^T(t_i) \quad (35)$$

Die Zustandsgleichungen für die hier betrachteten Kultivierungen sind durch das Differentialgleichungssystem (Gleichung 36) gegeben. Die numerische Lösung erfolgt mittels eines Runge-Kutta-Verfahrens vierter Ordnung.

$$f(x(t), u(t), t) + z(t) = \begin{bmatrix} \mu_{max} \frac{S(t)}{K_m + S(t)} \cdot X(t) - \frac{\dot{V}(t)_{feed}}{V(t)} \cdot X(t) + \frac{\dot{V}_{Probe}}{V(t)} \cdot X(t) \\ -\mu_{max} \frac{S(t)}{K_m + S(t)} \cdot \frac{X(t)}{Y_{X/S}} + (S_0 - S(t)) \cdot \frac{\dot{V}(t)_{feed}}{V(t)} \\ 0 \\ \dot{V}(t)_{feed} - \dot{V}_{Probe} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} z_X \\ z_S \\ z_\mu \\ z_V \end{bmatrix} \quad (36)$$

Das diskret-kontinuierliche erweiterte Kalman-Filter liefert also eine kontinuierliche Schätzung des Zustandsvektors des Systems. Zwischen den Messungen erfolgt die Prädiktion apriori. Beim Eintreffen eines Messwerts werden die Zustandsvariablen und die Schätzfehlerkovarianz sprunghaft aktualisiert. Auf der Basis der aktualisierten Größen wird nun mit der Aposteriori-Schätzung fortgefahren. Die Aposteriori-Schätzung des letzten Zustandsvektors ist die Apriori-Schätzung für den folgenden Zustandsvektor.

Die Besonderheit des hier eingesetzten EKFs ist der Sachverhalt, dass die Messwerte mit einer Verzögerungszeit behaftet sind. Bedingt durch die t_{90} -Zeit des in Kapitel 3.1 charakterisierten Probenahmemoduls und den Strömungsweg vom Reaktor bis zum Detektor, beschreiben die eintreffenden Messwerte den Zustand im Reaktor zum Zeitpunkt $t_i - t_{90}$. Dies muss bei der Zustandsschätzung berücksichtigt werden. Die Vorgehensweise ist in Kapitel 3.2.1 auf Seite 42 beschrieben.

Ausführliche Erläuterungen des mathematischen Algorithmus, ohne Berücksichtigung der Zeitverzögerung, finden sich in folgender Literatur [8, 15, 34, 44, 59, 68, 90, 93].

2.3.2 Einsatz von erweiterten Kalman-Filtern in Bioprozessen

Kalman-Filter sind auf Grund ihrer Fähigkeiten ein häufig eingesetztes Werkzeug zur Prädiktion von Zustandsvariablen dynamischer Systeme. Sie dienen in diesem Zusammenhang oftmals als sog. Soft-Sensoren, die den Zugang zu nicht direkt messbaren Prozessgrößen

ermöglichen. Im folgenden Abschnitt wird ein kurzer Überblick über die bisherigen Veröffentlichungen zum Einsatz von erweiterten Kalman-Filtern zur Prädiktion und Regelung von Bioprozessen gegeben.

Der Einsatz eines EKF in einem Bioprozess wird erstmal von Svrcek *et al.* [88] erwähnt. Er setzt das EKF in Simulationen zur Regelung der Biomasse über die gezielte Variation der Verdünnungsrate ein.

Ramirez [72] beschreibt den Einsatz des EKF zur Regelung während einer Bier-Fermentation. Mess- und Regelgröße ist in diesem Fall die Temperatur.

Dubach und Märkl [24] berichten über eine EKF-basierte pO_2 -Regelung während einer Fedbatch-Kultivierung von *E. coli*. Die Regelung des pO_2 -Gehaltes erfolgt durch gezielte Variation der Feedrate.

Van der Pol *et al.* [69] berichten über die Verwendung eines EKF zur Regelung der Substratkonzentration in Fedbatch-Kultivierungen von Hybridoma Zellen beim Wachstum auf Glucose bzw. auf Glutamin.

Kelle *et al.* [45] beschreiben eine EKF-basierte Regelung der Glucosekonzentration während einer Fedbatch-Kultivierung von *Corynebacterium glutamicum*. Die Messwerte liegen zeitverzögert vor. Die Konzentration betrug $\approx 3,6 \text{ g L}^{-1}$.

Weuster-Botz *et al.* [95] realisierten eine Regelung der Glucosekonzentration in einer Fedbatch-Kultivierung von *Corynebacterium glutamicum*. Die Glucosemesswerte lagen zeitverzögert vor, die Konzentration betrug $\approx 9 \text{ g L}^{-1}$.

Ghudi *et al.* [38] beschreiben eine Regelung bei einer Simulation einer Fedbatch-Kultivierung eines Stammes von *Streptomyces*. Die Messung der CPR erfolgt dabei online, Substrat- und Biomassekonzentration werden offline ermittelt und zeitverzögert an das EKF weitergegeben.

Léonard *et al.* [52] beschreiben die Anwendung eines EKF zur Regelung der Feedrate bei einer Fedbatch-Kultivierung von *Ralstonia eutropha*. Die Regelung erfolgt auf der Basis eines spektroskopisch detektierten Farbumschlages.

Zigova *et al.* [97] berichten über die Regelung bei Fedbatch-Kultivierungen von *S. cerevisiae* auf einen Glucosesollwert von ca. $0,5 \text{ g L}^{-1}$. Als Messgröße dient der RQ bzw. die Glucosekonzentration.

Broxtermann *et al.* [17] beschreiben den Einsatz eines EKF zur Regelung von Fedbatch-Kultivierungen des Organismus *S. cerevisiae* bei einem Glucosesollwert von $0,5 \text{ g L}^{-1}$. Zur Messung der Glucosekonzentration, als Einganggröße für das EKF und als Regelgröße, nutzen sie ein spezielles FIA-System.

Arndt und Hitzmann [4, 5] beschreiben den Einsatz eines EKF zur Regelung von

Fedbatch-Prozessen des Organismus *S. cerevisiae* unter Verwendung der in Abschnitt 2.5 auf Seite 30 beschriebenen „Schnellen Glucose-FIA“ bei Glucosesollwerten von 0,08 und 0,05 g L⁻¹.

Lucena *et al.* [56] berichten über den Einsatz eines EKF in einer Fedbatch-Kultivierung von *S. cerevisiae* bei einem Glucosesollwert von 0,07 g L⁻¹.

Arndt *et al.* [6] setzen das EKF zur Regelung von Fedbatch-Kultivierungen eines Phytase produzierenden *E. coli* ein. Unter Verwendung der „Schnellen Glucose-FIA“ realisieren sie einen Glucosesollwert von 0,2 g L⁻¹. Dieser Wert wurde im Hinblick auf die Maximierung der Phytase-Ausbeute bei optimaler Wachstumsgeschwindigkeit gewählt.

Jenzsch *et al.* [43] beschreiben eine Fedbatch-Kultivierung von *E. coli*, in der ein EKF zur Regelung genutzt wurde. Regelgröße war die Wachstumsrate, welche entlang einer vorgegebenen Trajektorie geführt wurde. Als Messgröße dient dem EKF die Kulturmasse.

Stephanopoulos und San veröffentlichten eine viel beachtete und zitierte Abhandlung. Zunächst erfolgt eine theoretische Betrachtung [85] zur Zustandsschätzung. Im zweiten Teil [86] stellen sie Ergebnisse aus Simulationen und Kultivierungen vor. Sie setzen das EKF zur Prädiktion von Zustandsgrößen auf der Basis von Messungen des *RQ* und der zur pH-Regelung zudosierten NH₃-Menge ein.

Bellgardt *et al.* [13, 14] nutzten das EKF in einer Batch-Kultivierung von *S. cerevisiae* auf Glucose und Ethanol. Als Messgrößen dienten die Konzentrationen der Substrate und die Abluftzusammensetzung (O₂ und CO₂).

Náhlík und Burianec [64] nutzten das EKF zur Prädiktion der Zustandsvariablen während der kontinuierlichen Kultivierung von *Candida utilis* auf Ethanol. Eingangsgrößen für das Filter sind hier die Verdünnungsrate und die Ethanolkonzentration im Reaktor.

Ghoul [35] kultiviert OKT Hybridoma Zellen im Batch- und Fedbatch-Modus. Das EKF nutzt zur Prädiktion die Glucose- und Ammoniakkonzentration.

Hilaly, Karim und Linden [40] führten eine Fedbatch- Kultivierung von *E. coli* auf Xylol durch. Das EKF nutzte zur Prädiktion den Gesamtverbrauch an Natronlauge und die CO₂-Konzentration der Abluft.

Ghudi,Shah und Gray [37] verwenden das EKF zur Prädiktion in Fedbatch-Kultivierungen von *Streptomyces clavuligerus*. Die Messwerte CPR und Biomasse liegen dabei mit unterschiedlichen Zeitabständen und zeitverzögert vor. Eine Methodik zu deren Kompensation wird nicht beschrieben.

Sargantanis und Karim [76] setzen das EKF bei einer Solid Substrate Kultivierung (SSF) von *Rhizopus oligosporus* ein. Die Schätzung fußt auf der Messung der Biomasse und der Kohlendioxidproduktionsrate.

Große-Uhlmann und Bley [36] setzen ein EKF zur Prädiktion in Fedbatch-Kultivierungen von *Methylobacterium rhodesianum* auf Methanol ein. Als Messgröße dient die Biomasse, die als optische Dichte gemessen wurde.

Neeleemann und van Boxtel [65] verwenden das EKF zur Prädiktion in Batch- und Fedbatch-Kultivierungen der Organismen *Bordetella pertussis* und *Neisseria meningitidis* auf verschiedenen Substraten. Messgröße ist die Biomasse.

Li, Xu, Su [53] nutzen ein EKF zur Prädiktion der Zustandsvariablen einer Photobio-reaktor-Kultivierung. Neben dem pO_2 messen sie die Lichtintensität.

In Tabelle 1 auf der nächsten Seite findet sich eine zusammenfassende Darstellung mit ergänzenden Angaben.

Tabelle 1: Einsatz von Kalman-Filtern in Bioprozessen

Autoren/Datum	Anwendung	Prozess	Regelgröße	Messgröße	Organismus/Substrat	Besonderheiten
Svrcek <i>et al.</i> [88]	Regelung	Simulation	D	Biomasse	<i>Aerobacter aerogenes</i>	
Stephanopoulos, San [85, 86]	Prädiktion	Simulation und Kultivierungen	Feedrate	RQ und NH ₃	<i>S. cerevisiae</i> Glucose	
Bellgardt <i>et al.</i> [14]	Prädiktion	Kultivierung		O ₂ CO ₂ Glucose und Ethanol	<i>S. cerevisiae</i>	
Ramirez [72]	Prädiktion	Batch	Temperatur	Temperatur	Hefe	3 Substrate parallel
Náhlík, Burianec [64]	Prädiktion	kontinuierliche Kultivierung		Substrat und D	<i>Candida utilis</i> Ethanol	
Ghoul [35]	Prädiktion	Batch und Fedbatch		Glucose bzw. Ammoniak	OKT3 Hybrdoma	
Dubach, Märkl [24]	Regelung	Fedbatch	pO ₂	pO ₂	<i>E. coli</i> Glycerin	
Hilaly, Karim, Linden [40]	Prädiktion	Fedbatch		CO ₂ und Volumen NaOH	<i>E. coli</i> Xylol	
Ghudi, Shah, Gray [37]	Prädiktion	Fedbatch		Biomasse CPR	<i>Streptomyces clavuligerus</i> Maltose	2 Messfrequenzen Zeitverzögerung
Sargantanis, Karim [76]	Prädiktion SSF	Simulation		Biomasse und CPR	<i>Rhizopus oligosporus</i> Maisgries	
Pol van der <i>et al.</i> [69]	Regelung	Fedbatch	Substrat	Glucose Glutamin	Hybridoma Zellen Glucose und Glutamin	
Kelle <i>et al.</i> [45]	Regelung	Fedbatch	Glucose	Glucose	<i>Corynebacterium glutamicum</i> Glucose	Zeitverzögerung 5 Minuten Glucosekonzentration ca. 3,6 gL ⁻¹
Weuster-Botz <i>et al.</i> [95]	Regelung	Fedbatch	Glucose	Glucose	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Zeitverzögerung 15 Minuten Glucosekonzentration ca. 9 gL ⁻¹
Ghudi <i>et al.</i> [38]	Regelung	Simulation Fedbatch	Feedrate Substrat	CPR (online), Biomasse und Substrat offl.	<i>Streptomyces</i>	offline Messungen zeitverzögert und unregelmäßig
Léonard <i>et al.</i> [52]	Regelung	Fedbatch	Substrat	Spektrometer (Farbumschlag)	<i>Ralstonia eutropha</i> Phenol	
Zigova <i>et al.</i> [97]	Regelung	Fedbatch	Substrat	RQ bzw. Glucose	<i>S. cerevisiae</i> Glucose	
Große-Uhlmann, Bley [36]	Prädiktion	Fedbatch		Biomasse	<i>Methylobacterium rhodesianum</i> Methanol	

Fortsetzung auf der nächste Seite

Fortsetzung der vorherigen Seite							
Autoren/Datum	Anwendung	Prozess	Regelgröße	Messgröße	Organismus/Substrat	Besonderheiten	
Broxtermann, <i>et al.</i> [17]	Regelung	Fedbatch	Glucose	Glucose	<i>S. cerevisiae</i> Glucose	FIA ohne Probenahmemodul	
Neeleemann, Boxtel van [65]	Prädiktion	Batch und Fedbatch		Biomasse	<i>Bordetella pertussis</i> Glutamat und Lactat <i>Neisseria meningitidis</i>		
Arndt, Hitzmann [4]	Regelung	Fedbatch	Glucose	Glucose	<i>S. cerevisiae</i> Glucose	FIA ohne Probenahmemodul	
Lucena <i>et al.</i> [56]	Regelung	Fedbatch	Glucose	Glucose	<i>S. cerevisiae</i> Glucose		
Li, Xu, Su [53]	Prädiktion	Batch		pO ₂ Lichtintensität	<i>Dunaliella salina</i> CO ₂		
Arndt, Hitzmann [5]	Regelung	Fedbatch	Glucose	Glucose	<i>S. cerevisiae</i> Glucose	FIA ohne Probenahmemodul	
Arndt, <i>et al.</i> [6]	Regelung	Fedbatch	Glucose	Glucose	<i>E. coli</i> Glucose	FIA ohne Probenahmemodul	
Jenzsch, Simutis [43] Simutis [43]	Regelung	Fedbatch	μ entlang einer Tajektorie	Zellmasse	<i>E. coli</i> Glucose		

2.4 Der Stoffwechsel von *Saccharomyces cerevisiae*

Der Mikroorganismus *Saccharomyces cerevisiae* wird von den Menschen schon seit Jahrtausenden als Bäcker- und Bierhefe genutzt. In der Biotechnologie wird dieser Eukaryont der Klasse der Ascomyceten (Schlauchpilze) oft als Modellorganismus genutzt, da sein Metabolismus sehr gut untersucht ist [55]. Unter den in den Kultivierungen vorherrschenden Bedingungen erfolgt die Vermehrung durch Sprossung, eine sexuelle Vermehrung kann bei einer Substratlimitierung unter bestimmten Bedingungen eintreten. Die Mutter- und Tochterzellen weisen unterschiedliche Struktur und Eigenschaften auf. Der Sprosszyklus gliedert sich in eine Reproduktions- und eine Wachstumsphase, daher ist der Metabolismus der Zellen zeitvariant. Das Wachstumsverhalten der Zellen hängt folglich von der Altersverteilung ab. Bei aerobem Wachstum können morphologisch unterschiedliche Zellen mit divergierenden Stoffwechsel- und Sprossungseigenschaften auftreten [46].

Die Kultivierung von Hefen kann in Batch-, Fedbatch- oder kontinuierlichen Prozessen durchgeführt werden. Die Kultivierungsbedingungen haben Einfluss auf den Stoffwechsel und somit auch auf die etwaige Bildung von gewünschten oder unerwünschten Produkten. *S. cerevisiae* kann verschiedene Kohlenstoffquellen metabolisieren. In der überwiegenden Zahl der biotechnologischen Prozesse wird bevorzugt Glucose eingesetzt.

S. cerevisiae ist ein fakultativer Organismus, somit stehen grundsätzlich zwei Stoffwechselwege offen. Neben dem oxidativen (aeroben) und dem reduktiven (anaeroben) existiert noch eine Mischform, bei der die charakteristischen Merkmale der oben genannten Stoffwechselwege parallel auftreten. Dieser als oxidoreduktiv oder auch als oxidativ-fermentativ bezeichnete Stoffwechselzustand tritt bei hohem Substratangebot trotz ausreichender Sauerstoffversorgung auf. Die verschiedenen Varianten des Metabolismus sind eine Adaption der Zellen an die vorherrschenden Umweltbedingungen. Inhibierungen treten bei hohen Glucose- bzw. Ethanolkonzentrationen auf. Ethanol wirkt ab einer bestimmten Konzentration als Zellgift.

Oxidatives Wachstum kann bei ausreichender Sauerstoffversorgung auf Glucose oder Ethanol oder auf beiden Substraten parallel erfolgen. Glucose wird unter ATP-Verbrauch zu Glucose-6-Phosphat phosphoryliert und in der Glycolyse [87] zu Pyruvat umgesetzt. Aus einem Molekül Glucose werden unter Reduktion von NAD(P)^+ zu NADH je zwei Moleküle ATP und Pyruvat gebildet. Das Pyruvat wird anschließend zu Acetyl-CoA umgesetzt, in den Citratzyklus eingeschleust und dort zu CO_2 und H_2O abgebaut. Die Ausbeute bezogen auf das Verhältnis Biomasse zu eingesetztem Substrat ist bei rein oxidativem Stoffwechsel hoch ($Y_{X/S} \geq 0,5 \text{ g g}^{-1}$). Ein rein oxidatives Wachstum auf Glucose ist nur bis zur einer bestimmten kritischen Glucoseaufnahme rate ($q_{S,krit}$) möglich [84], unterhalb

dieses Grenzwertes kann parallel Ethanol verstoffwechselt werden.

Reduktiver Stoffwechsel tritt bei einer Unterversorgung der Zellen mit Sauerstoff auf. Auch hier wird Glucose zunächst zu Pyruvat umgesetzt. Das Pyruvat wird jedoch nicht in den Citratzyklus eingeschleust, sondern über das Zwischenprodukt Acetaldehyd zu Ethanol umgesetzt. Der Ausbeutekoeffizient $Y_{X/S}$ ist erheblich niedriger als bei einem rein oxidativen Abbau des Substrates.

Bei der Überschreitung der kritischen Glucoseaufnahmerate stellen die Zellen ihren Stoffwechsel auf oxidoreduktives Wachstum um. Die Zellen sind trotz ausreichender Sauerstoffversorgung nicht in der Lage, das gesamte Substrat oxidativ zu metabolisieren. Der Ausbeutekoeffizient und die Wachstumsrate sinken gegenüber dem rein oxidativen Weg deutlich ab ($Y_{X/S} \leq 0,3 \text{ g g}^{-1}$). Ein Teil des Substrates wird über den reduktiven Stoffwechselweg über Acetaldehyd zu Ethanol umgesetzt. Dieses Phänomen wird als Crabtree-Effekt bezeichnet [22, 33]. Man versteht darunter das Auftreten der Produktion von Ethanol trotz ausreichender Sauerstoffversorgung. Die Veränderung im Stoffwechsel zeigt sich auch in einem deutlichen Anstieg der Glucoseaufnahmerate ($q_S > q_{S,krit}$).

Der Mechanismus des Crabtree-Effektes ist nicht vollständig aufgeklärt. In der Literatur werden mehrere Mechanismen diskutiert. Bellgardt [11] hält einen geschwindigkeitslimitierenden Schritt im Mechanismus des oxidativen Metabolismus für die Ursache. Sonnleitner und Käppeli gehen von einer begrenzten respiratorischen Kapazität der Zellen aus und postulieren daraus ableitend ein „bottleneck-Prinzip“ für die Glucoseaufnahmerate der Zellen [83, 84]. Gancedo [33] diskutiert eine Katabolitrepression. Die Größe der kritischen Glucoseaufnahmerate $q_{S,krit}$ ist keine Konstante, sondern hängt sowohl vom Stamm der Hefe als auch von den Kultivierungsbedingungen ab.

Beschreiten die Zellen den oxidoreduktiven Stoffwechselweg, sind sie bei Anwesenheit von Sauerstoff bestrebt, die Ethanolproduktion so niedrig wie möglich zu halten. Dieses Phänomen wird als Pasteur-Effekt bezeichnet. Er beruht auf der Hemmung der Phosphofruktokinase durch ATP und Citrat.

Zusammenfassend kann als Kriterium für das Auftreten des oxidoreduktiven Stoffwechsels das Überschreiten einer für den Hefestamm und die Kultivierungsparameter charakteristischen Glucoseaufnahmerate angesehen werden. Die Höhe des kritischen Wertes hängt primär von der spezifischen Sauerstoffaufnahmerate ab, welche auch abhängig von der Gelöstsauerstoffkonzentration ist. Die respiratorische Kapazität der Zellen stellt folglich den „Flaschenhals“ dar. Die Veränderung im Metabolismus ist also von einer dynamischen Größe abhängig.

In Fedbatch-Kultivierungen besteht ein enger Zusammenhang zwischen der Glucose-

aufnahmerate und der Feed-Rate. Ist die Glucosekonzentration im Reaktor konstant, so ist die Feed-Rate identisch mit der Glucoseaufnahmerate. Somit steht ein probates Mittel zur Regelung und Bestimmung der Glucoseaufnahmerate zur Verfügung, sofern ein adäquates Regelsystem vorhanden ist steht.

2.5 Die Prinzipien der Fließinjektionsanalyse

Die Entwicklung der Fließinjektionsanalyse (FIA) begann 1974 und geht auf Hansen und Ruzicka [74] zurück. Diese Analysenmethode zeichnet sich durch vielseitige Einsatzmöglichkeiten aus und ermöglicht die quantitative Bestimmung vieler Substanzen. Die in der FIA eingesetzten Methoden zur Bestimmung des Analyten sind meist nasschemische Verfahren. Da die Dispersion zwischen Probensegment und Trägerstrom nicht vollständig ist und die Nachweisreaktion in der Regel nicht bis zum Gleichgewicht bzw. nicht vollständig abläuft, ist sie eine dynamische Analysenmethode. Da das System ein Nicht-Gleichgewichtssystem darstellt, erfordern gute und reproduzierbare Messergebnisse eine Konstanz der apparativen und der äußeren Parameter.

Handelsübliche FIA-Systeme bestehen in der Regel aus den folgenden Komponenten

- der Pumpe(n), zur Förderung von Träger- und Probemedium,
- dem Injektionsventil, zur Injektion des Probesegmentes,
- dem Manifold, die Reaktions- und Dispersionsstrecke des Fließsystems zwischen Injektor und Detektor und
- dem Detektor zur Messung der physikalischen Größe, die der Konzentration des Analyten proportional ist.

In der Praxis wird ein definiertes Probevolumen (μl) aus der Probeschleife eines Injektionsventils in den kontinuierlich pulsationsarm strömenden, nicht segmentierten Trägerstrom injiziert. Das für die FIA charakteristische Konzentrationsprofil bildet sich auf Grund von Dispersionsvorgängen im Strömungsweg, da durch sie das pfropfenförmig injizierte Probensegment seine ursprüngliche Geometrie verliert. Ursachen für die Dispersion sind Störungen der konvektiven Strömung durch Turbulenzen im System. Maßgeblich die Form der Peaks beeinflussende Größen sind die Strömungsgeschwindigkeit, das Probevolumen, die Geometrie des Manifold und des Fließsystems sowie gegebenenfalls die hydrodynamischen Eigenschaften eines Füllkörperreaktors. Diese Vorgänge sind für das peakförmige und asymmetrische Erscheinungsbild der Messsignale ursächlich. Die Signale weisen in der Regel ein ausgeprägtes Tailing auf und sind nicht gaußförmig.

Zur Bestimmung der Konzentration des Analyten wird ein Zusammenhang zwischen dieser und einem Merkmal des Peaks, oftmals der Höhe, der Fläche oder der Halbwertsbreite, genutzt. Die Signalhöhe und -fläche sind proportional zur Analytkonzentration, zwischen Halbwertsbreite und Analytkonzentration besteht eine logarithmische Beziehung [41, 74]. Ab einem systemspezifischen Grenzwert treten jedoch Sättigungseffekte auf.

Die für die Nachweisreaktion benötigten Reagenzien können entweder im Trägerstrom enthalten sein oder nachträglich zugegeben werden. Eine weitere Möglichkeit bietet der Einbau kleiner Füllkörperreaktoren (sog. Kartuschen) zwischen Injektor und Detektor. Die Kartusche enthält ein Trägermaterial, auf dem das Reagenz oder ein Katalysator (hier GOD) fixiert/immobilisiert ist. Ein FIA-System mit Füllkörperreaktor ist in Abbildung 4 dargestellt.

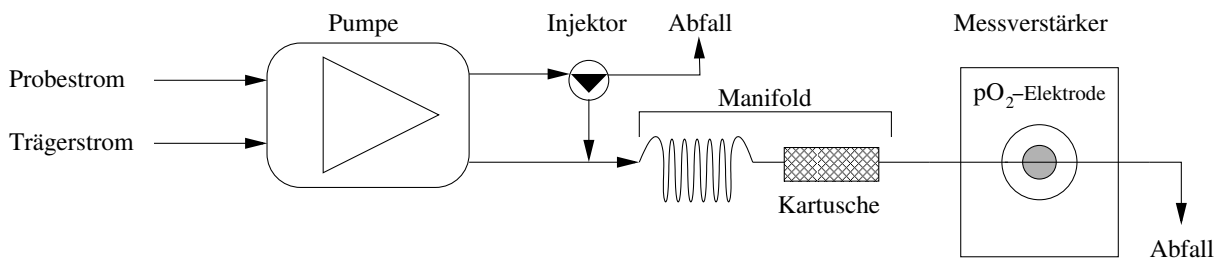


Abbildung 4: Darstellung eines FIA-Systems mit Manifold und Enzymkartusche

Die quantitative Bestimmung von Glucose erfolgt durch Umsetzung der Glucose mit dem Enzym Glucoseoxidase (GOD). GOD setzt unter Sauerstoffverbrauch β -D-Glucose gemäß der in Abbildung 5 wiedergegebenen Reaktionsgleichung spezifisch zu β -D-Glucono- δ -lacton um. Das gebildete Lacton wird spontan zu D-Gluconsäure hydrolysiert. Die GOD befand sich, auf einem Polymerträger immobilisiert, in einem Füllkörperreaktor.

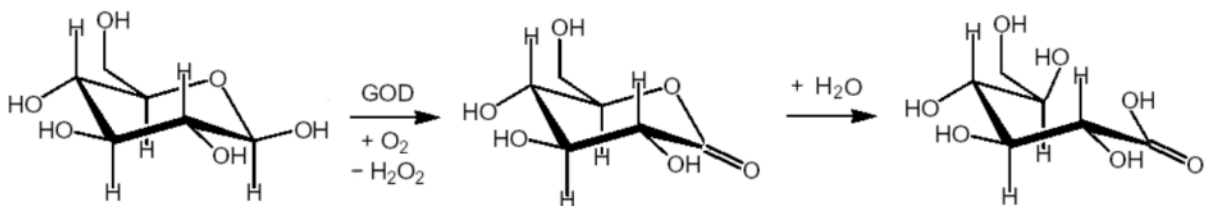
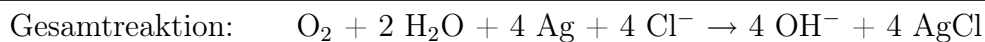
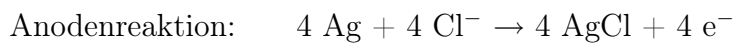
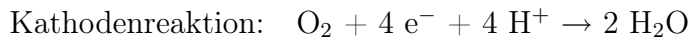


Abbildung 5: Umsetzung von Glucose durch GOD zu Gluconsäure

Der Sauerstoffverbrauch der Reaktion ist proportional zur Glucosekonzentration und wird mit einer amperometrischen Messung unter Verwendung einer Clark-Elektrode detektiert. Eine Clark-Elektrode besteht aus einer Ag-Anode und einer Pt-Kathode. Die

Anode ist zylinderförmig von der Messkathode umgeben. Kathode und Anode sind von einer KCl-Elektrolytlösung umgeben und sind durch eine Teflonmembran, durch die die Diffusion des Sauerstoffs erfolgt, vom Trägerstrom getrennt. Zwischen den Elektroden wird eine Polarisationsspannung angelegt, da die Elektrodenreaktionen nicht freiwillig ablaufen. Der bei der Reaktion fließende Strom ist der Glucosekonzentration proportional. Die Elektrodenreaktionen sind unten dargestellt.



Die hier beschriebene FIA zeichnet sich durch ein geringes Messrauschen und eine hohe Empfindlichkeit aus, da eine hohe, durch den Festkörperreaktor bedingte, Dispersion vorliegt. Prinzipbedingt ist eine Konditionierung des Probestromes durch Abtrennung der Zellen notwendig. Dies erfordert die Verwendung einer Filtrationseinheit. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das in Abschnitt 3.1 beschriebene Probenahmemodul verwendet. Dessen Nutzung verursacht eine Verzögerungszeit, die nicht vernachlässigbar ist, aber mit dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Regelsystem kompensiert werden kann.

Das von Arndt [2] entwickelte System der sog. „Schnellen Glucose-FIA“ nutzt einen anderen Ansatz. Arndt verzichtet auf den Einsatz eines Probenahmemoduls zu Gunsten einer sehr geringen Verzögerungszeit, nimmt dadurch aber eine Reihe anderer Nachteile in Kauf. Dieses System kann prinzipbedingt keinen Festkörperreaktor nutzen, über einen zweiten Injektor wird in einem definierten Zeitabstand eine definierte Menge GOD-Lösung in den Trägerstrom injiziert. Diese Vorgehensweise führt zu einer erhöhten Störanfälligkeit und einem deutlich stärkeren Messrauschen. Zudem verbrauchen die Zellen auf dem Weg vom Reaktor zum Detektor Sauerstoff und erzeugen so eine scheinbar existierende Glucosekonzentration. Der Sauerstoffverbrauch der Zellen muss folglich bei der Auswertung der Peaks berücksichtigt werden. Dies geschieht durch Blindmessungen und Differenzbildung. Durch diese Blindmessungen geht alle 3 bis 4 Glucosemessungen ein Messwert verloren. Bei erhöhten Zelldichten ist der Blindwert im Verhältnis zur Glucosekonzentration sehr groß, dies beeinflusst die Genauigkeit der Messung maßgeblich. Ein weiteres Problem stellen Luftblasen dar, welche eine Segmentierung des Probenahme- und des Trägerstromes verursachen können und somit zu falschen Messergebnissen führen. Verstopfungen des Fließsystems durch die Zellen und/oder Stoffwechselprodukte stellen weitere nicht unerhebliche Störquellen dar. Der Vorteil, praktisch verzögerungsfrei zu messen, wird also durch eine Reihe von Nachteilen erkauft.

2.6 Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie

Die zweidimensionale Fluoreszenzspektroskopie ist eine relativ junge Anwendung in der Bioanalytik bzw. Bioprozessbeobachtung. Dieses optische nicht-invasive Verfahren ermöglicht in-time, in-situ, teilweise auch in-vivo Analysen in Bioprozessen [9], [54] und so die Messung biologischer Größen. Eine einfache Ankopplung an den Bioprozess ohne Kontaminationsrisiko ist mit Hilfe von Lichtleitern realisierbar.

Die Fluoreszenz ist eine spezielle Form der Lumineszenz, bei der ein photochemisch angeregtes Molekül durch Relaxation in den Grundzustand zurückkehrt und dabei Strahlung emittiert. Die Moleküle besitzen leicht anregbare π -Elektronen. Nach der Anregung erfolgt ein strahlungsloser Übergang vom angeregten Schwingungszustand in den Schwingungsgrundzustand des elektronisch angeregten Zustandes. Dieser Abklingvorgang ist Ursache für die Rotverschiebung gegenüber der Absorption.

Als besonders geeignet für die Beobachtung von Bioprozessen erweisen sich aromatische Aminosäuren, Co-Enzyme (Folavinmononucleotid (FMN), Flavinadeninucleotid (FAD)) und das reduzierte Nicotinamid-Adeninucleotid-(phosphat) (NAD(P)H). Diese Substanzen sind intrinsische Fluorophore und werden daher direkt innerhalb der Zellen detektiert und erlauben somit einen direkten Einblick in Teile der lebenden Zelle.

Moderne 2D-Fluoreszenzspektrometer sind in der Lage, einen großen Spektralbereich von Exzitations- und Emissionswellenlängen abzudecken, somit ermöglichen sie die simultane Messung diverser biogener Fluorophore. Das Spektrum wird als Datenmatrix bestehend aus Exzitations- und Emissionswellenlänge und Intensität erhalten. In Abbildung 6 ist exemplarisch ein, im Verlauf einer Fedbatch-Kultivierung von *S. cerevisiae* aufgenommenes Spektrum als 3D-Plot und als Konturplot dargestellt.

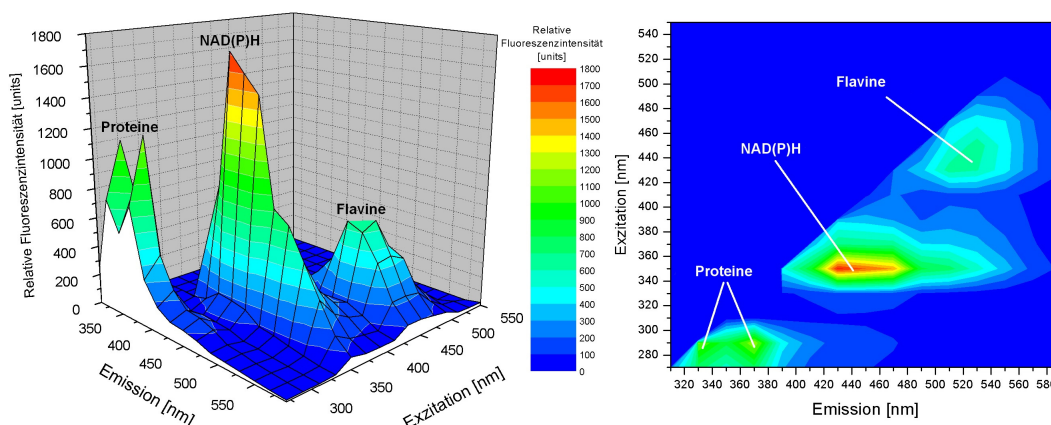


Abbildung 6: 2D-Fluoreszenzspektrum als 3D-Plot und als Konturplot

Betrachtet man das in Abbildung 6 dargestellte Spektrum, so zeichnen sich drei Bereiche charakteristischer Fluoreszenzen ab. Die typischen Emissions- und Exzitationswellenlängenbereiche der Proteine befinden sich zwischen $\lambda_{ex} = 270 - 310$ nm und $\lambda_{em} = 310 - 390$ nm, die der Vitamine und Co-Faktoren im Bereich $\lambda_{ex} = 310 - 390$ nm und $\lambda_{em} = 390 - 550$ nm und der Falvinbereich findet sich zwischen $\lambda_{ex} = 410 - 490$ nm und $\lambda_{em} = 490 - 570$ nm. In Tabelle 2 sind die elementaren biogenen Fluorophore und die zugehörigen Emissions- und Exzitationsmaxima aufgeführt.

Tabelle 2: Biogene Fluorophore und ihre Exzitations- und Emissionsmaxima

Fluorophor	Emissions-/Exzitationswellenlänge [nm]	Quelle
Tryptophan	287/348	[96]
Tyrosin	280/300	[80]
Pyridoxin	324/390	[26]
NAD(P)H	340/450	[39]
FMN	450/530	[96]
FAD	365/520	[96]

Die Auswertung der Fluoreszenzspektren ermöglicht einen Einblick in die Stoffwechselfvorgänge in den Zellen und trägt so zur Gewinnung wertvoller Informationen über den Bioprozess bei. Die Menge der zur Verfügung stehenden Daten erfordert jedoch komplexe chemometrische Auswerteverfahren, um die in den Spektren enthaltenen Informationen effektiv zu nutzen. Die relative Fluoreszenzintensität (RFI) ist primär eine Funktion der Konzentration des entsprechenden Fluorophors. Darüber hinaus wird sie durch Effekte der biotischen und abiotischen Phase beeinflusst. Diese Einflüsse lassen sich durch die Auswertung von Differenzspektren minimieren. Zur Auswertung bedient man sich häufig multivariater Methoden [82], [49] wie der Hauptkomponentenanalyse (PCA).

2.7 Das Verfahren der Hauptkomponentenanalyse

Chemometrische Verfahren nutzen statistische und mathematische Methodiken zur Datenverarbeitung bzw. -aufbereitung. Moderne Analysengeräte produzieren große Mengen an Rohdaten, deren Informationen ohne die von der Chemometrie zur Verfügung gestellten Verfahren nur schwer, gar nicht oder nicht mit vollem Informationsgehalt zugänglich wären. Zu diesen Methoden zählen u. a. uni- und multivariate Regressionsverfahren,

Hauptkomponenten- und Faktorenanalyse, die Mustererkennung, Klassifizierungsalgorithmen (Cluster-Analysen, neuronale Netzwerke) und kombinatorische Verfahren wie z.B. genetische Algorithmen.

In der analytischen Spektroskopie wird oft das Verfahren der Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis, PCA) angewendet. Als eine Methode des unüberwachten Lernens gestattet sie das Erkennen von Gruppierungen innerhalb eines Datenkollektivs. Die Daten werden durch die PCA in ein Koordinatensystem niedrigerer Dimension überführt. Ziel ist es, so wenig neue Variablen wie möglich zu erhalten, ohne dabei essentielle Informationen zu verlieren. Die Datenmenge wird somit reduziert und dadurch überschaubarer. Der wesentliche Schritt ist eine Transformation des Koordinatensystems. Durch Rotation wird das Koordinatensystem so im Raum ausgerichtet, dass die erste Koordinate die maximale Varianz beschreibt. Darüber hinaus können latente Informationen gewonnen werden, welche in den Spektren direkt nicht verfügbar sind. Des Weiteren kann das Messrauschen von den Messwerten separiert werden, da das Messrauschen eine sehr kleine Varianz aufweist.

Mathematisch bedeutet dies, dass die Datenmatrix \mathbf{X} durch eine Score-Matrix \mathbf{T} und eine Loading-Matrix \mathbf{L} mit jeweils niedrigerer Dimension angenähert wird.

$$\mathbf{X} = \mathbf{T}\mathbf{L}^T \quad (37)$$

Die Datenmatrix enthält in ihren n Zeilen die einzelnen Objekte (je ein Spektrum), in den p Spalten die Merkmale (Messergebnisse, hier die RFI pro Wellenlängenkombination). Die Spalten der Score-Matrix repräsentieren die Vektoren des jeweiligen Scores. Die Anzahl der Komponenten eines Vektors entspricht der Anzahl der durchgeführten Messungen. Die Spalten der Loading-Matrix sind die sog. Loading-Vektoren. Die Anzahl der Komponenten eines Vektors entspricht der Anzahl der x -Variablen (hier RFI pro Wellenlängenkombination). Als Kriterium bei der Berechnung der Hauptkomponenten dient die Varianz. Jede Hauptkomponente beschreibt das Maximum an Varianz, welches durch die vorher berechneten Hauptkomponenten noch nicht erfasst wurde. Die erste Hauptkomponente beschreibt folglich die größte Varianz des Datenkollektivs.

Sie ist die Gerade im Raum, die die Daten mit der kleinsten Fehlerquadratsumme beschreibt. Alle Hauptkomponenten sind orthogonal und somit unabhängig voneinander. Als Abbruchkriterium bzw. Kriterium zur Bestimmung der Anzahl der Hauptkomponenten dient im Wesentlichen die verbleibende Varianz. Bei Unterschreitung eines bestimmten Wertes werden keine weiteren Hauptkomponenten mehr bestimmt.

Stellt man Gleichung 37 nach den Scores um, führt dies zu Gleichung 38. Die Hauptkomponenten können hiernach als Projektion der ursprünglichen Matrix \mathbf{X} auf die Score-

Matrix \mathbf{T} betrachtet werden.

$$\mathbf{T} = \mathbf{X}\mathbf{L} \quad (38)$$

Die durch die PCA erhaltenen neuen Koordinaten sind eine Linearkombination der Ausgangsvariablen. Für die Hauptkomponenten gilt.

$$\begin{aligned} t_{11} &= x_{11}l_{11} + x_{12}l_{21} + x_{1p}l_{p1} \\ t_{21} &= x_{21}l_{11} + x_{22}l_{21} + x_{2p}l_{p1} \\ &\vdots \\ t_{n1} &= x_{n1}l_{11} + x_{n2}l_{21} + x_{np}l_{p1} \end{aligned} \quad (39)$$

Ein häufig verwendetes Verfahren zur Durchführung einer Hauptkomponentenanalyse ist der iterative NIPALS-Algorithmus (Nonlinear Iterative Partial Least Squares). Dieser ist in [67] näher beschrieben. Vor der Durchführung der PCA ist eine Zentrierung der Messwerte (x) gemäß den Gleichungen 40 und 41 notwendig.

$$\bar{x}_p = \frac{1}{n} \sum_{n=1}^n x_{np} \quad (40)$$

$$x_{np}^{cent} = x_{np} - \bar{x}_p \quad (41)$$

Zur (grafischen) Interpretation der Resultate werden sowohl die Scores als auch Loadings gegeneinander aufgetragen. Im Scoreplot ist die Projektion der Objekte (hier der Spektren) dargestellt. Diese Projektion ermöglicht die Gruppierung der Daten in verschiedene Gruppen, sofern signifikante Unterschiede im Datenkollektiv vorhanden sind bzw. eine Unterscheidung von Stoffwechselzuständen wie bei *S. cerevisiae* möglich ist.

Der Loadingplot ist die Projektion der Variablen (RFI) auf die Hauptkomponenten. Anhand der Darstellung können Aussagen über das Maß der Korrelation der Merkmale getroffen werden. Der Cosinus des Winkels zwischen zwei Loadingvektoren gibt die Stärke der Korrelation wieder. Ein spitzer Winkel bedeutet hohe Korrelation, ein stumpfer geringe. Aus der Lage der Loadings bezogen auf den Koordinatenursprung lassen sich Aussagen über die Relevanz der Loadings für die jeweilige Hauptkomponente ableiten. Je näher das Loading dem Koordinatenursprung ist, desto geringer ist ihre Relevanz.

3 Material und Methoden

3.1 Hydrodynamische Charakterisierung des verwendeten Probenahmemoduls

Zur Versorgung des FIA-Systems mit einem zellfreien Probestrom wurde ein Probenahmemodul *FISP E19-01* (Flownamics Analytical Instruments Inc., Madison, USA) eingesetzt. Das *FISP* wurde im 19 mm Top-Port des Reaktors vor dem Autoklavieren installiert. Es ist aus rostfreiem Edelstahl gefertigt. Am unteren Ende befindet sich eine zylinderförmige aus Hohlfasern gefertigte Keramikmembran mit einer Porengröße von $0,2\ \mu\text{m}$. Nachdem die Kulturbrühe die Membran passiert hat, gelangt sie über Nuten in die zentrale zylindrische Bohrung des Trägers, um dann der FIA mittels einer Peristaltikpumpe zugeführt zu werden. Die Funktionsweise des Probenahmemoduls ist in Abbildung 7 dargestellt.

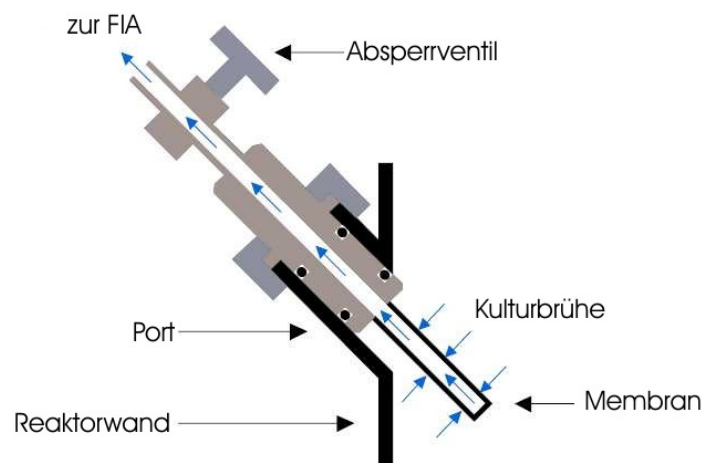


Abbildung 7: Die Funktionsweise des Probenahmemoduls (modifiziert, aus [29])

Bedingt durch die Keramikmembran, das Totvolumen, die Rückvermischung und die Strecke vom Probenahmemodul bis zum Detektor der FIA entsteht eine Verzögerung. Die Messwerte des FIA-Systems sind nicht aktuell, sondern um die Größe dieses Zeitintervalls historisch. Die Messung beschreibt also einen veralteten Systemzustand. Dies stellt für die Regelung eine besondere Herausforderung dar. Zur Charakterisierung des Verzögerungsverhaltens wurde dieses Zeitintervall als t_{90} -Zeit bestimmt. Ihr kommt eine maßgebliche Bedeutung zu, da sie als Parameter in das zur Schätzung von Prozessvariablen eingesetzte kontinuierlich-diskrete erweiterte Kalman-Filter (siehe Kapitel 3.2 auf Seite 39) einfließt und somit die Regelgüte beeinflusst.

3.1.1 Die Bestimmung der t_{90} -Zeit

Die Bestimmung der t_{90} -Zeit erfolgte durch Messung der Konduktivität. In einem als ideal durchmischt angenommenen und mit dem Probenahmemodul bestückten Batch-Reaktor wurden ca. 200 mL destilliertes Wasser vorgelegt. Nachdem sich das Nullpunktsignal der Leitfähigkeitsmesszelle (Biorad, München Model EG-1 Econo Gradient Monitor) stabilisiert hatte, wurden 20 ml einer ca. 2 molaren KCl-Lösung diracförmig injiziert. Bedingt durch die ideale Durchmischung und die Art der Traceraufgabe entstehen keine zusätzlichen Verzögerungszeiten. Die durch die Injektion hervorgerufene Veränderung der Leitfähigkeit im Probenahmestrom wurde detektiert. Die Spannungssignale des *EG-1* wurden mit einer Abtastrate von 2 Hz unter Verwendung einer AD/DA-Wandlerkarte (*AX-5210*, Axiom, Taiwan) auf einem PC (Compaq *Prolinea 590*, Pentium I CPU mit 90 MHz Taktfrequenz, Betriebssystem MS-DOS 6.00) unter Verwendung des Programms CAFCA (ANASYSCON Instrumentelle Analysetechnik, Hannover, Deutschland) aufgezeichnet.

Zur Förderung des Fluids wurde eine Peristaltikpumpe (ACCU CP10, SciLog, USA; Pumpkopf: Masterflex, Cole-Parmer Instrument Co., Illinois) eingesetzt. Die Volumenströme betragen je nach Kultivierung $0,27 \text{ ml min}^{-1}$ bis $0,42 \text{ ml min}^{-1}$. Daraus resultierten t_{90} -Zeiten von 0,113 h bis 0,170 h. Die Messungen erfolgten als Mehrfachbestimmung. Als Parameter für das EKF diente der Mittelwert.

3.1.1.1 Auswertung Die Signale waren durch elektronische Störungen verrauscht. Eine direkte Auswertung hätte suboptimale Resultate zur Folge gehabt. Zur Bestimmung der t_{90} -Zeiten wurden sie durch sigmoide Funktionen angenähert. Der Funktionswert, für den gilt $\kappa(t) = 0,9 \cdot \kappa_{max}$ war die zu bestimmende Zeit. In Abbildung 8 ist der Signalverlauf einer Messung exemplarisch dargestellt.

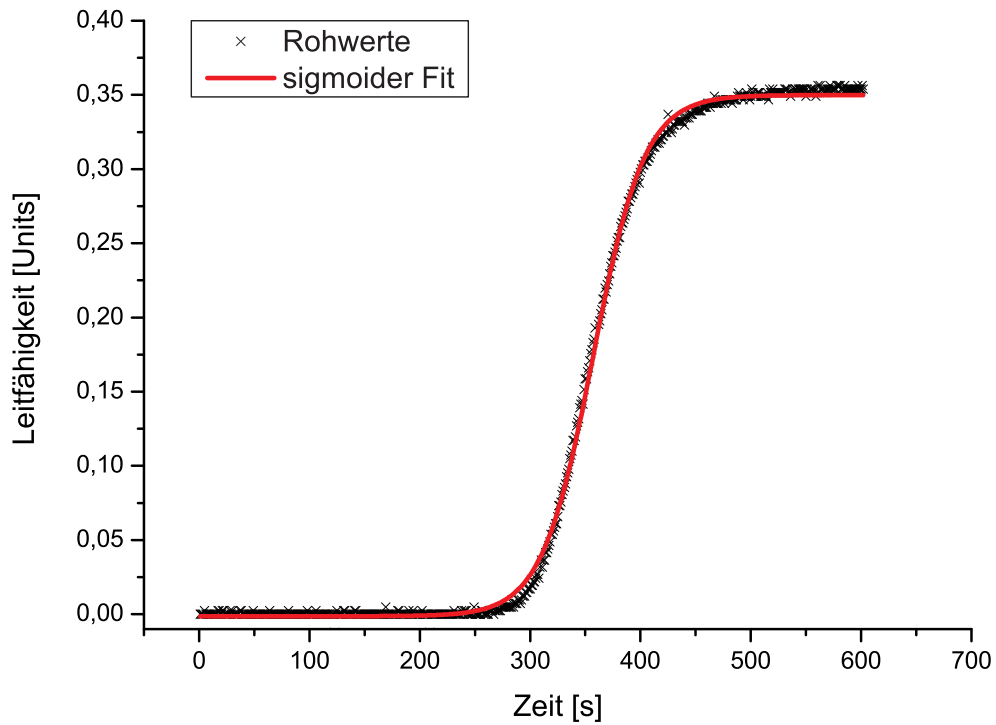


Abbildung 8: Antwortsignal zur Ermittlung der t_{90} -Zeit bei einem Volumenstrom von $0,42 \text{ ml min}^{-1}$

3.2 Implementation des Kalman-Filters und des Regelsystems

Das zur Kompensation der Zeitverzögerung eingesetzte kontinuierlich-diskrete erweiterte Kalman-Filter (EKF) nutzt das in den Gleichungen 13 bis 16 auf Seite 15 dargestellte kontinuierliche nicht lineare, auf dem Monod-Ansatz basierende Zustandsmodell zur Prädiktion des Prozessverlaufs. Zusätzlich zu der Schätzung der Zustandsvariablen (Biotrockenmassekonzentration, maximale Wachstumsrate, momentane Glucosekonzentration und Volumen) erfolgt die Kompensation des Messrauschens der zur Regelung des Prozesses genutzten Messung der Glucosekonzentration.

Ergänzend zu dieser Datenglättung ist ein sog. Varianzfilter implementiert. Dieses Filter dient der Erkennung und Eliminierung von Ausreißern. Auf der Basis der letzten 20 Messwerte werden der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Liegt ein Messwert außerhalb des Intervalls $S_{meas} = f_{tol} \cdot \sigma \pm \bar{S}_{meas}$, gilt er als Ausreißer und wird verworfen. Folgen zwei Ausreißer unmittelbar hintereinander, wird der zweite Wert nicht als Fehlmessung gewertet. Dieses gilt auch, wenn zwei aufeinander folgende Werte in verschiedenen Richtungen außerhalb des zulässigen Intervalls liegen. Der Wert des Toleranzfaktors des Varianzfilters f_{tol} ist frei wählbar und kann somit den Kultivierungs-

bedingungen und der aktuellen Messunsicherheit der Glucosemessung angepasst werden. Typischerweise wurde der Wert 2 gewählt.

Auf der Basis der geglätteten und gegebenenfalls gefilterten Werte berechnet der implementierte Regelalgorithmus den benötigten Volumenstrom der Feed-Lösung. Der Feed-forward-/Feed-back-Regler steuert die zur Förderung eingesetzten Pumpen an. Zur Zeit ist die Ansteuerung von zwei Pumpen unterschiedlicher Förderleistung realisiert. Dies ermöglicht eine feinere Anpassung der Zufütterungsrate an die momentanen Bedingungen im Reaktor. Die Umschaltung erfolgt automatisch in Abhängigkeit einer zuvor festgelegten Feed-Rate. Diese betrug 60 % der maximalen Pumpleistung der Pumpe mit der geringeren Förderleistung, da Differenzen zwischen berechnetem und realem Volumenstrom beginnend bei Pumpraten ab 70 % auftraten. Ein Zurückschalten von der Pumpe größerer Förderleistung auf die mit geringerer erfolgte bei einer Pumprate von 5 %. Bei den verwendeten Pumpen tritt das Problem der Diskretisierung der Pumprate bei kleinen Volumenströmen auf. Die minimale Pumpleistung beträgt 5 %, entsprechend einem minimalen Volumenstrom von ca. 20 ml h⁻¹. Volumenströme unterhalb dieses Grenzwertes sind mit einem zeitweiligen Stillstand der Pumpen verbunden.

Die Software *delay-EKF* wurde in Borland Delphi 4.0 (Inprise Corporation, Scotts Valley, USA) entwickelt [B. Hitzmann, D. Hüll, Leibniz Universität Hannover]. Die in Kapitel 2.1.3 eingeführten Modellgleichungen werden numerisch mit einem Runge-Kutta Verfahren vierter Ordnung gelöst. Die Hardwareplattform bestand aus einem Compaq *Prolinea 590* PC (Pentium I CPU mit 90 MHz Taktfrequenz, 64 MB Hauptspeicher). Als Betriebssystem wurde *Windows 95* (Microsoft, Redmond, USA) eingesetzt. Der Computer ist mit drei seriellen Schnittstellen zum Datenaustausch und zur Ansteuerung der Pumpen ausgerüstet. Über die erste Verbindung empfängt dieser die aktuellen Glucosemesswerte vom Messrechner (siehe 3.6.1.3). Die beiden weiteren Kanäle dienen der Übermittlung der durch den Regler errechneten Pumprate an die jeweilige zur Förderung der Feed-Lösung eingesetzte Pumpe (beide Pumpen: ACCU CP10, SciLog, USA; Pumpkopf: Masterflex, Cole-Parmer Instrument Co., Illinois).

Die von dem Programm *delay-EKF* angezeigten Parameter

- seit Regelbeginn verstrichene Zeit,
- aktuelle Pumprate,
- Mittelwert der letzten 10 Pumpraten,
- Sollwert der Glucosekonzentration,

- Messwert der Glucosekonzentration und
- geschätzte Zustandsvariablen (Biotrockenmassekonzentration (BTM), maximale Wachstumsrate, momentane Glucosekonzentration und Volumen)

werden alle 10 Sekunden aktualisiert. Die Zustandsvariablen, die Pumprate sowie die Messwerte werden ergänzend grafisch dargestellt, dabei werden gültige Messwerte und Ausreißer farblich unterschieden. Der Button *Probenehmen* dient der Korrektur des Reaktorvolumens nach der Entnahme einer Offline-Probe. Im Fensterbereich „Varianzfilter“ werden der Mittelwert der letzten 20 Glucosemessungen, deren Standardabweichung sowie der Toleranzfaktor angezeigt. Hier kann auch dessen Wert geändert und das Filter aktiviert bzw. deaktiviert werden. Im laufenden Betrieb können die Parameter Zeitverzögerung, Messfehlerkovarianz und Sollwert variiert werden. Die Möglichkeit der Veränderung der Zeitverzögerung kann sich als Vorteil erweisen, wenn während der Kultivierung Veränderungen am Fließsystem selbst oder an seinem Verhalten auftreten. Eingriffsmöglichkeiten in die Messfehlerkovarianz sind sinnvoll, um die unterschiedliche Güte der Messwerte in verschiedenen Experimenten oder bei Instabilitäten des FIA-Systems berücksichtigen zu können. Die Möglichkeit, den Sollwert zu variieren, gestattet eine gezielte Einflussnahme auf den Metabolismus der kultivierten Mikroorganismen. Die Programmoberfläche ist in Abbildung 9 dargestellt.



Abbildung 9: Die Oberfläche des Programms *delay-EKF*

3.2.1 Das Verfahren zur Kompensation der Zeitverzögerung

Die Kompensation der Zeitverzögerung erfordert eine Zuordnung des aktuell eintreffenden Messwertes zu der korrekten (historischen) Prozesszeit und den zu diesem Zeitpunkt gültigen Zustandsvariablen und Prozessparametern. Bei dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Ansatz werden dazu die vom EKF geschätzten Zustandsvariablen, die berechneten Volumenströme der Feed-Lösung und die Schätzfehlerkovarianzen mit den zugehörigen Zeiten temporär in einem Ringspeicher abgelegt. Zwischen dem Eintreffen zweier Messwerte liegt ein Zeitraum von ca. 2 Minuten, in denen das EKF den Systemzustand durch Simulation schätzt (Prädiktion). Trifft ein neuer Messwert ein, erfolgt ein Rücksprung auf der Zeitskala um den Wert der Zeitverzögerung. Ausgehend von diesem Zeitpunkt berechnet das EKF alle Zustandsvariablen, die Kalman-Verstärkungsmatrix und die Schätzfehlerkovarianzen bis zur aktuellen Zeit neu. Dieses Vorgehen ermöglicht eine verbesserte Schätzung des aktuellen Systemzustandes. Die aus der Prädiktion stammenden Daten werden nach der Aktualisierung der Kalman-Verstärkungsmatrix und der Zustandsvariablen verworfen. Das System berechnet quasi rückwirkend ab Zeitpunkt $t_i - t_{90}$ die aktuellen Werte für $K(t_i), P(t_i)$ und die Zustandsvariablen. Das Prinzip ist in Abbildung 10 auf der nächsten Seite illustriert.

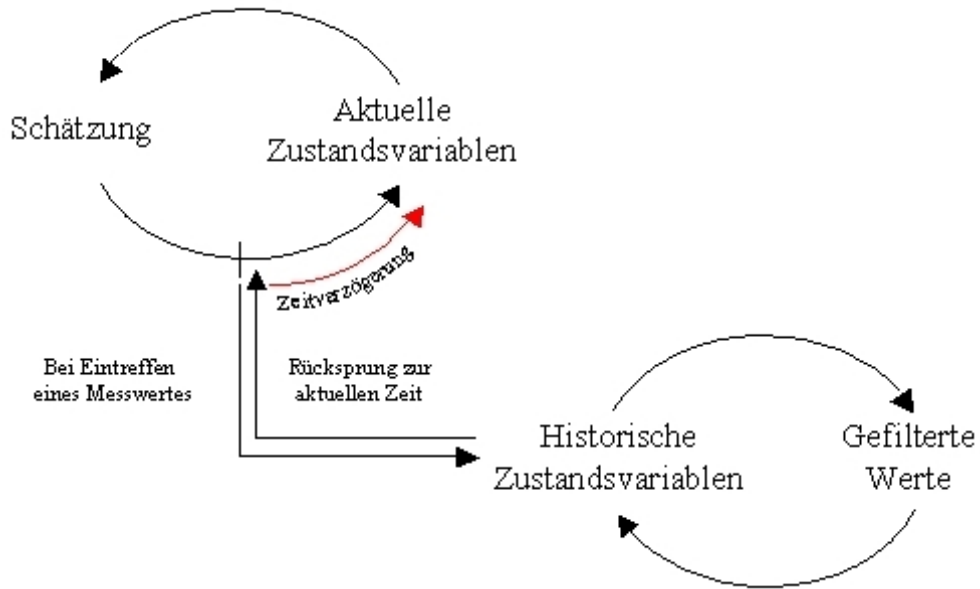


Abbildung 10: Prinzip der Kompensation der Zeitverzögerung

3.2.2 Die Funktionsweise des implementierten Feed-forward-/Feed-back-Reglers

Basierend auf den vom EKF geschätzten Zustandsvariablen (BTM , S , μ_{max} und V_R) berechnet der implementierte Feed-forward-/Feed-back-Regler unter Berücksichtigung des Sollwertes und der Konzentration der Feed-Lösung den aktuell benötigten Volumenstrom gemäß Gleichung 42. Der dort berechnete Volumenstrom wird mittels einer Kalibrierfunktion in %-Pumpleistung umgerechnet. Der Feed-forward-Term der Regelgleichung stützt sich auf die kinetischen Parameter und die Schätzwerte. Der Feed-back-Term ist als diskreter PI-Regler ausgelegt. Der Feed-back-Term fungiert als Korrekturglied für den Feed-forward-Term, indem er die auf Modellabweichungen zurückzuführende Regelabweichung kompensiert. Dies erfolgt durch die Bestimmung des Volumenstroms $\dot{V}_{t_i}^{PI}$ aus der Regelabweichung unter Berücksichtigung der Regelparameter q_0 und q_1

$$\dot{V}_{t_i} = \underbrace{\hat{V}_t \frac{\hat{\mu}_{max} \cdot \hat{S}_t \cdot \hat{X}_t}{Y(K_m + \hat{S}_t) \cdot (S_0 - \hat{S}_t)}}_{\text{Feed-forward-Term}} + \underbrace{\dot{V}_{t_{i-1}}^{PI} + q_0 \cdot (S_{SP} - \hat{S}_{t_i}) + q_1 \cdot (S_{SP} - \hat{S}_{t_{i-1}})}_{\text{Feed-back-Term} = \dot{V}_{t_i}^{PI}} \quad (42)$$

Das Zusammenwirken aller beschriebenen Komponenten ist in Abbildung 11 veranschaulicht.

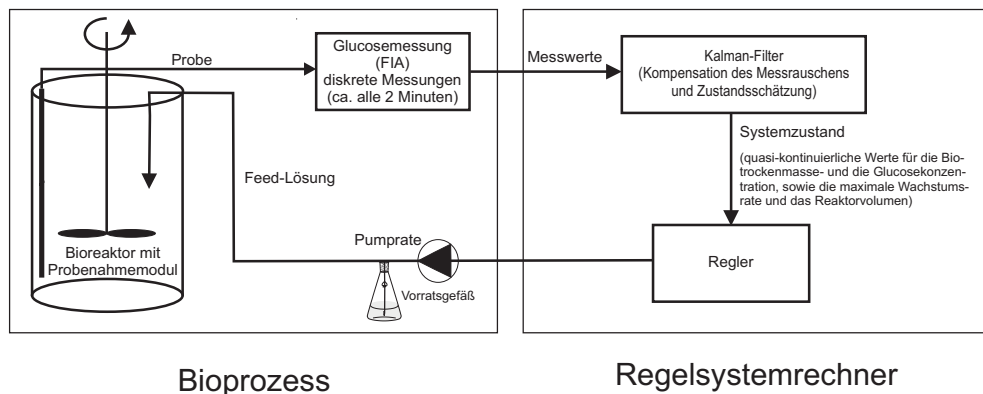


Abbildung 11: Schematischer Aufbau des Systems aus EKF und Regelung

3.3 Simulationen zur Parameteridentifikation des Kalman-Filters und des PI-Reglers

Zur Identifikation der Parameter, Messrauschkovarianz R und Prozessrauschleistungsmatrix Q und der Regelparameter q_0 und q_1 des PI-Reglers wurden Simulationen durchgeführt. Das System bestand aus zwei PC's (beide Compaq *Prolinea 590*, Pentium I CPU mit 90 MHz Taktfrequenz, 64 MB Hauptspeicher; Betriebssystem *Windows 95*, Microsoft, Redmond, USA). Die Simulationen wurden mit den Programmen *delay-EKF* (siehe Kapitel 3.2 auf Seite 39) und *simdelay* durchgeführt. *simdelay* wurde in Borland Pascal 7.0 (Inprise Corporation, Scotts Valley, USA) entwickelt [B. Hitzmann, D. Hüll, Leibniz Universität Hannover]. Es simuliert den Bioprozess auf der Basis des in Kapitel 2.1.3 beschriebenen Modells sowie die FIA. Die Simulation der FIA erfolgt durch einen Zufallsgenerator, der den vorgegebenen Sollwert verrauscht. Die Programme kommunizieren über zwei serielle Schnittstellen. Eine der Schnittstellen sendet die von *simdelay* generierten Glucosemesswerte an den „Regelrechner“. Auf der zweiten Schnittstelle empfängt *simdelay* die vom „Regelrechner“ berechnete aktuelle Feed-Rate.

3.4 Die Software *The Unscrambler*

Die Software *The Unscrambler* (Version 7.6, CAMO ASA, Oslo, Norwegen) ist eine Software zur multivariaten Datenanalyse. Sie stellt eine Reihe von Methoden zur Berechnung chemometrischer Modelle zur Verfügung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde sie zur Auswertung der während der Kultivierungen aufgezeichneten 2D-Fluoreszenzspektren mittels Hauptkomponentenanalyse (PCA) eingesetzt. Das Programm verwendet zur PCA den NIPALS-Algorithmus [67]. Die Spek-

tren wurden nach Überführung in eine für den *Unscrambler* geeignete Form einer PCA unterworfen, um Informationen über den Stoffwechszustand der Mikroorganismen zu gewinnen.

3.5 Die Kultivierungen

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Kultivierungen wurden mit dem Modellorganismen *Saccharomyces cerevisiae* H 620 durchgeführt. Der Reaktor sowie die Parameter der Kultivierungen werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

3.5.1 Der Bioreaktor und die Steuereinheit

Alle durchgeführten Fedbatch-Kultivierungen wurden in einem aus Edelstahl gefertigten Doppelmantel-Rührkesselreaktor (ca. 2,5 L Arbeitsvolumen, Sonderanfertigung der Werkstatt des Instituts für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover) durchgeführt. Dieser ist mit einem 25 mm Side-Port zur Aufnahme des Lichtleiters für den *BioView* (siehe Kapitel 3.6.1.5 auf Seite 55) ausgerüstet.

Zur Überwachung und Regelung der Prozessgrößen diente eine *BIOSTAT B-DCU* (B. Braun Biotech, Melsungen). Die DCU wurde für die Messung und Kontrolle der Parameter pH-Wert, pO_2 -Gehalt, Rührerdrehzahl und Temperatur (Widerstandsthermomter, Pt100) eingesetzt. Die Messungen des pH-Wertes und des pO_2 -Gehaltes werden in Kapitel 3.6.1 beschrieben. Der Reaktor mit der Steuer- und Regeleinheit ist in Abbildung 12 dargestellt.

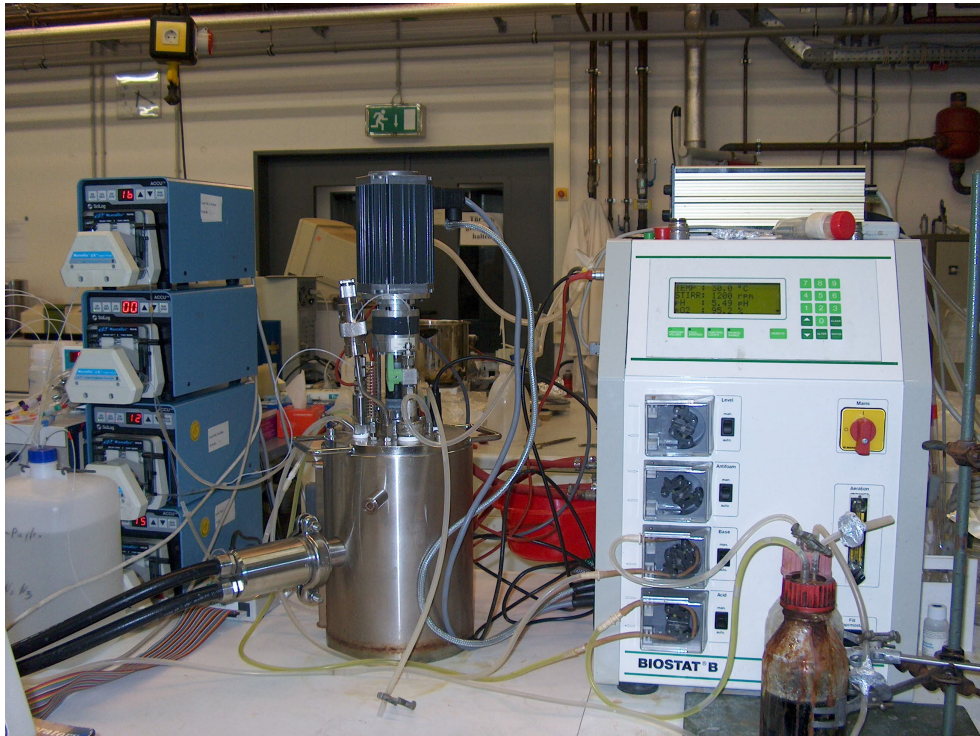
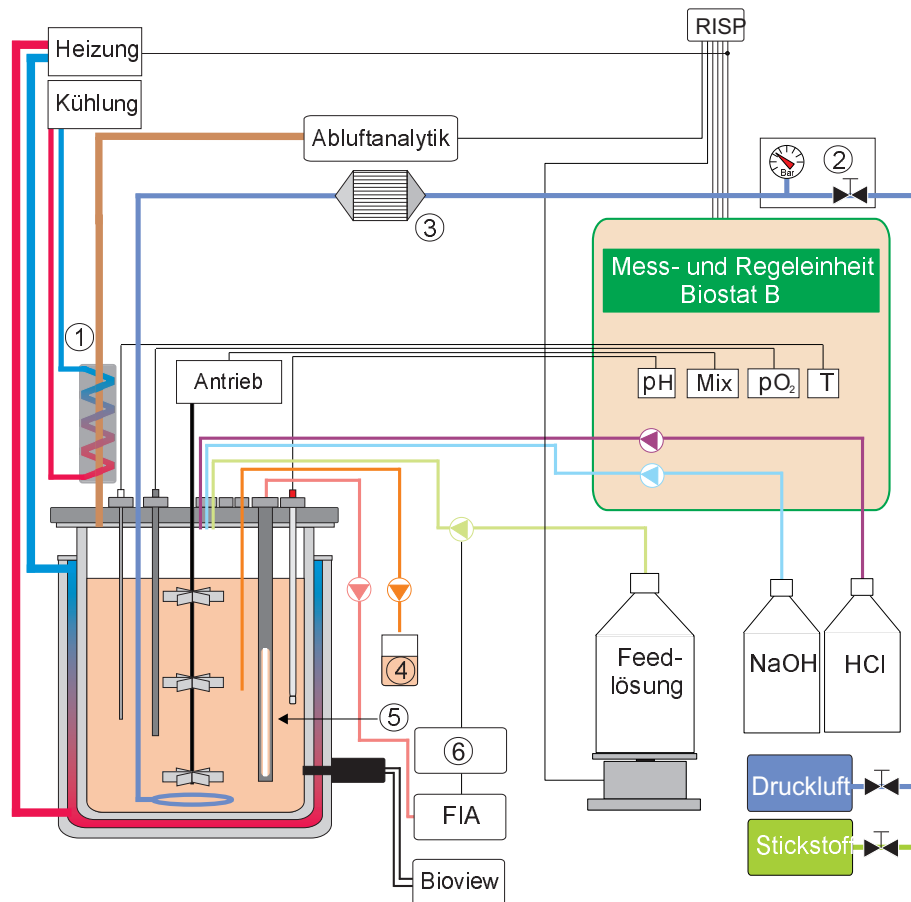


Abbildung 12: Der Reaktor mit Steuer- und Regeleinheit

Die Begasung erfolgte mit Druckluft. Die Begasungsrate wurde mit einem Massendurchflussmesser (Brook Mass Flow Meter 5851 mit Steuereinheit Modell 5876, Brooks Instruments, Veenendaal, Holland) geregelt. Um die Sterilität des Reaktorinhaltes zu gewährleisten, erfolgte vor dem Eintritt der Luft in den Reaktor eine Sterilfiltration.

Zur Versorgung des FIA-Systems mit einem kontinuierlichen zellfreien Probestrom war der Reaktor mit dem unter 3.1 auf Seite 37 beschriebenen Probenahmemodul versehen. Des Weiteren waren Zu- und Abläufe für Säure und Base, die Feed-Lösung und die Offline-Probenahme installiert. Ein Schema des Reaktors mit allen peripheren Geräten und Versorgungssystemen ist in Abbildung 13 wiedergegeben.



Legende: ① Abluftkühler ② Begasung ③ Sterilfilter ④ Offlineprobenahme
 ⑤ Probenahmemodul ⑥ EKF, Regelung und Feed-Pumpe

Abbildung 13: Aufbau der Fermentationseinheit und des Regelsystems (aus [81])

3.5.2 Durchführung der Vorkulturen

In den Kultivierungen wurden Organismen des Wildstammes H 620 der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* verwendet.

Die Stammhaltung erfolgt in Reagenzgläsern auf Schrägagar bei einer Temperatur von ca. 2 °C. Zur Darstellung des Inokulums werden die Zellen mit einer Impföse entnommen und in einen 50 mL Schatzmann-Medium enthaltenden Animpfkolben mit Schikanen transferiert. Das verwendete Schatzmann-Medium enthielt 3 g L⁻¹ Glucose sowie 5,8 g L⁻¹ Natriumcitrat.

Die Vorkultur wurde 24 Stunden im Schüttelschrank (Certomat S mit Inkubationshaube HK, B. Braun Biotech, Melsungen) bei 30 °C und einer Schüttelfrequenz von 120 min⁻¹ inkubiert. Die Überführung des Inokulums in den Reaktor erfolgt mit einer Animpfnadel durch ein Septum im Deckel des Reaktors.

3.5.3 Allgemeine Parameter der Kultivierungsprozesse

Die Experimente wurden mit dem in Kapitel 3.5.1 beschriebenen System bestehend aus einem Edelstahlreaktor und einer *BIOSTAT B*-Steuereinheit (B. Braun Biotech, Messungen) durchgeführt. Die Messung der Gelöstsauerstoffkonzentration, der Temperatur, des pH-Wertes und der Abluftzusammensetzung erfolgte kontinuierlich. Während der Fedbatch-Phase wurde zusätzlich durch kontinuierliche Wägung (Competence CP 8201, Sartorius, Göttingen) die Masse der zugefütterten Feed-Lösung überwacht. Die vorgeannten Messwerte wurden mit der Software *RISP* (Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover) aufgezeichnet. Über den Zeitraum der Fedbatch-Kultivierung wurden in konstanten Zeitintervallen Offlineproben entnommen. Zusätzlich erfolgte eine Onlineglucosemessung mit dem zur Regelung eingesetzten FIA-System.

3.5.3.1 Die Kultivierungsbedingungen

Vor dem Animpfen wurde der Reaktor (siehe Kapitel 3.5.1) mit der entsprechenden Menge Medium (ohne Glucose- und Vitaminlösung) befüllt und 20 min bei 121 °C autoklaviert. Das Startvolumen betrug nach dem Autoklavieren je nach Kultivierung ca. 1,7 bis 2,0 L. Die Zugabe der Glucose- und der Vitaminlösung zum im Reaktor vorgelegten Schatzmann-Medium erfolgte nach dem Autoklavieren und Temperieren auf Kultivierungsbedingungen. Die Zusammensetzung des Mediums ist in den Tabellen 3 und 4 wiedergegeben. Die Zusammensetzung variiert abhängig von der Glucosekonzentration in der Feed-Lösung (S_0), da bei einer Glucosekonzentration von 100 g L⁻¹ eine Limitierung mit dem Medium nach Tabelle 3 auftrat.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Schatzmann-Mediums für $S_0 = 35 \text{ g L}^{-1}$

Substanz	Konzentration [g L ⁻¹]	Substanz	Konzentration [g L ⁻¹]
Glucose *	15,0	FeCl ₃ · 6 H ₂ O	1,5 · 10 ⁻²
Glucose **	35,0	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,9 · 10 ⁻²
(NH ₄) ₂ SO ₄	4,5	MnSO ₄ · 2 H ₂ O	1,05 · 10 ⁻²
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1,9	CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,24 · 10 ⁻²
KCl	0,9	m-Inosit	6,0 · 10 ⁻²
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,34	Thiamin · HCl	3,0 · 10 ⁻²
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,42	Pyridoxol · HCl	0,6 · 10 ⁻²

Tabelle 4: Zusammensetzung des Schatzmann-Mediums für $S_0 = 100 \text{ g L}^{-1}$

Substanz	Konzentration [g L^{-1}]	Substanz	Konzentration [g L^{-1}]
Glucose *	22,0	$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	$1,5 \cdot 10^{-2}$
Glucose **	100,0	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	$0,9 \cdot 10^{-2}$
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4^*$	4,5	$\text{MnSO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	$1,05 \cdot 10^{-2}$
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4^{**}$	22,0	$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$	$0,24 \cdot 10^{-2}$
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	14,7	m-Inosit	$6,0 \cdot 10^{-2}$
KCl	0,9	Thiamin · HCl	$3,0 \cdot 10^{-2}$
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,34	Pyridoxol · HCl	$0,6 \cdot 10^{-2}$
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,42		

* Batch-Medium ** Fedbatch-Medium

Nach dem Animpfen des Reaktors mit dem Inokulum wurden die Kultivierungsbedingungen wie pH-Wert, Temperatur, Begasungsrate und Rührerdrehzahl eingestellt. Die Werte sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Bedingungen der *S. cerevisiae*- Kultivierungen

Parameter	Wert
pH-Wert	5,5
Temperatur	30 °C
Begasungsrate	5 Lmin^{-1}
Rührerdrehzahl	1200 min^{-1}
Korrekturmittel	10%ige NaOH 4 molare HCl

3.6 Die Prozessanalytik

3.6.1 Die Online-Analytik

3.6.1.1 Die Messung des pH-Wertes

Zur Messung des pH-Wertes wurde eine sterilisierbare pH-Elektrode (POLYCLAVE 225, HAMILTON Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz) verwendet. Sie ist aus einer Glas- und einer Vergleichselektrode aufgebaut. Als Messgröße dient die Spannung zwischen den Elektroden, welche mit einem hochohmigen Voltmeter gemessen wird. Der Zusammenhang zwischen der Spannung und dem pH-Wert ist durch die Nernst'sche Gleichung (Gleichung 43) gegeben.

$$E = E_0 + \frac{RT}{zF} \ln \frac{c_{Ox}}{c_{Red}} = E_0 + \frac{0,059mV}{z} \log \frac{c_{Ox}}{c_{Red}} \quad (43)$$

Folgende Symbolik wurde verwendet:

E	Gleichgewichtszellpotential	[V]
E_0	Standardzellpotential	[V]
R	allgemeine Gaskonstante	[J K ⁻¹] mol ⁻¹]
T	absolute Temperatur	[K]
z	Ladungszahl	dimensionslos
F	Faraday-Konstante	[C mol ⁻¹]
c_{ox}	Konzentration der oxidierten Form	[mol L ⁻¹]
c_{red}	Konzentration der reduzierten Form	[mol L ⁻¹]

Setzt man für c_{Ox} die H^{\oplus} -Konzentration der Messlösung und für c_{Red} die H^{\oplus} -Konzentration der Elektrolytlösung in der Elektrode an und berücksichtigt, dass diese als konstant betrachtet werden kann, erhält man Gleichung 44 zur Bestimmung des pH-Wertes aus der Zellspannung.

$$E(Glas, H^{\oplus}, 25^{\circ}C) = E_{(const)} - 59,16mV \cdot pH \quad (44)$$

Die Kalibration der Elektrode erfolgt vor dem Autoklavieren mit zwei Pufferlösungen (pH 4,01 und pH 7,0).

3.6.1.2 Die Messung der Gelöstsauerstoffkonzentration

Die Gelöstsauerstoffkonzentration wurde mit einer autoklavierbaren Elektrode (inpro 6000, Mettler-Toledo, Giessen) als Sauerstoffpartialdruck gemessen. Das amperometrische Messverfahren basiert auf der Diffusion von Sauerstoff aus der zu messenden Lösung (hier das Kulturmedium) durch eine gasdurchlässige Teflonmembran an die von einer Elektrolytlösung umgebenen Elektroden (Clark-Prinzip). Der Sauerstoff wird an der Kathode (Pt)

reduziert. An der Anode wird Silber oxidiert. Der durch die Reaktion hervorgerufene Stromfluss zwischen Anode und Kathode ist der Gelöstsauerstoffkonzentration proportional.

Nach dem Autoklavieren des Reaktors wurde die Elektrode mindestens 6 Stunden polarisiert und anschließend kalibriert. Die Kalibration erfolgte durch Begasung des Reaktors mit Stickstoff 5.0 (Linde Gas AG, Höllriegelskreuth). Die Gelöstsauerstoffkonzentration sank somit auf 0 %. Der Sättigungswert (100 %) wurde durch Begasung mit Druckluft unter Kultivierungsbedingungen (Rührerdrehzahl, Temperatur, pH-Wert und Begasungsrate) eingestellt.

3.6.1.3 Die Glucose-Analytik

Die Online-Messung der Glucosekonzentration, als Eingangsgröße für das EKF wurde mit einem FIA-System (ANASYSCON Instrumentelle Analysentechnik, Hannover) durchgeführt (zum Messprinzip siehe Kapitel 2.5). Der Aufbau des Systems ist in Abbildung 14 skizziert. Das System bestand aus den folgenden Komponenten:

- dem Messverstärker mit der Clark-Elektrode und dem Manifold, bestehend aus einer Dispersionsstrecke mit einer Blasenfalle, sowie der Enzymkartusche mit auf einem Polymerträger immobilisierter Glucoseoxidase (ANASYSCON Instrumentelle Analysentechnik, Hannover)
- dem Injektions- (K-6 Ventilantrieb mit 6 Port/3 Kanal Injektionsventil) und dem Selektionsventil (K-6 Ventilantrieb, 7 Port/1 Kanal Schaltventil) (KNAUER, Berlin) zur Injektion der Probe in den Trägerstrom und zur Umschaltung zwischen den Standards verschiedener Konzentrationen während der Kalibrierung
- zwei Peristaltikpumpen (ACCU CP10, SciLog, USA; Pumpkopf: Masterflex, Cole-Parmer Instrument Co., Illinois) zur Förderung des Träger- und des Probestroms

Im Auslauf des Systems befand sich hinter der Clark-Elektrode ein sog. Restriction Coil. Es handelt sich dabei um eine Spule aus Teflonschlauch mit einem Innendurchmesser des Schlauches von 0,5 mm und einer Länge von ca. 1,5 m. Diese Konstruktion führt zu einer Druckerhöhung im Fließsystem. Dies verringert die Störanfälligkeit bezüglich Luftblasen und die durch die Pumpen verursachte Pulsation des Pufferstromes. In Abbildung 15 ist die Gesamtanlage fotografisch dargestellt.

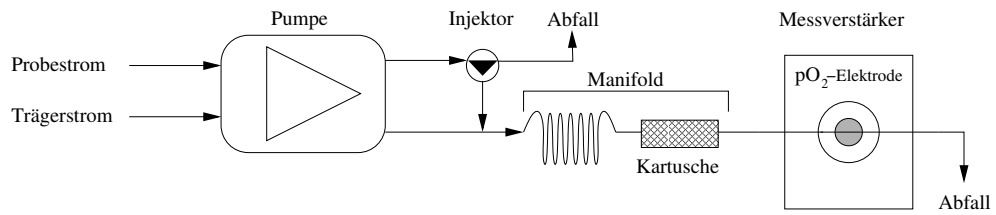


Abbildung 14: Aufbau des eingesetzten FIA-Systems



Abbildung 15: Das FIA-System

Die Probe wurde über das unter 3.1 beschriebene Probenahmemodul zellfrei zugeführt. Die Kalibration erfolgte mit 5 Glucosestandards der Konzentrationen 0 mg L^{-1} , 25 mg L^{-1} , 50 mg L^{-1} , 75 mg L^{-1} und 100 mg L^{-1} . Die Standards wurden in dem als Trägermedium verwendeten Puffer, dessen Zusammensetzung in Tabelle 6 wiedergegeben ist, angesetzt. Die Kalibration erfolgte als Dreifachbestimmung.

Tabelle 6: Zusammensetzung des FIA-Puffers

Substanz	Konzentration [g L ⁻¹]
K ₂ HPO ₄	4,3
NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O	2,2
NaCl	3,0
EDTA	1,5
NaN ₃	0,065

Zur Steuerung der Ventile und zur Messdatenerfassung und -auswertung wurde die Software *CAFCA* (Computer Assisted Flow Control & Analysis, Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover) genutzt. *CAFCA* ist modular aufgebaut. Die Software enthält Routinen zur automatisierten Kalibrierung, zu verschiedenen Auswertemethoden und zur Steuerung der FIA.

Das Programm lief auf einem mit einer AD/DA-Wandlerkarte (AX-5210, Axiom, Taiwan) ausgestatteten Computer (Compaq Prolinea 590, Pentium I CPU mit 90 MHz Taktfrequenz, 24 MB Hauptspeicher; Betriebssystem MS-DOS 6.00, Microsoft, Redmond, USA) und übertrug die Messwerte unter Nutzung der seriellen Schnittstelle an den Regelrechner (siehe 3.2). Abbildung 16 zeigt den Bildschirm während einer laufenden Kultivierung.

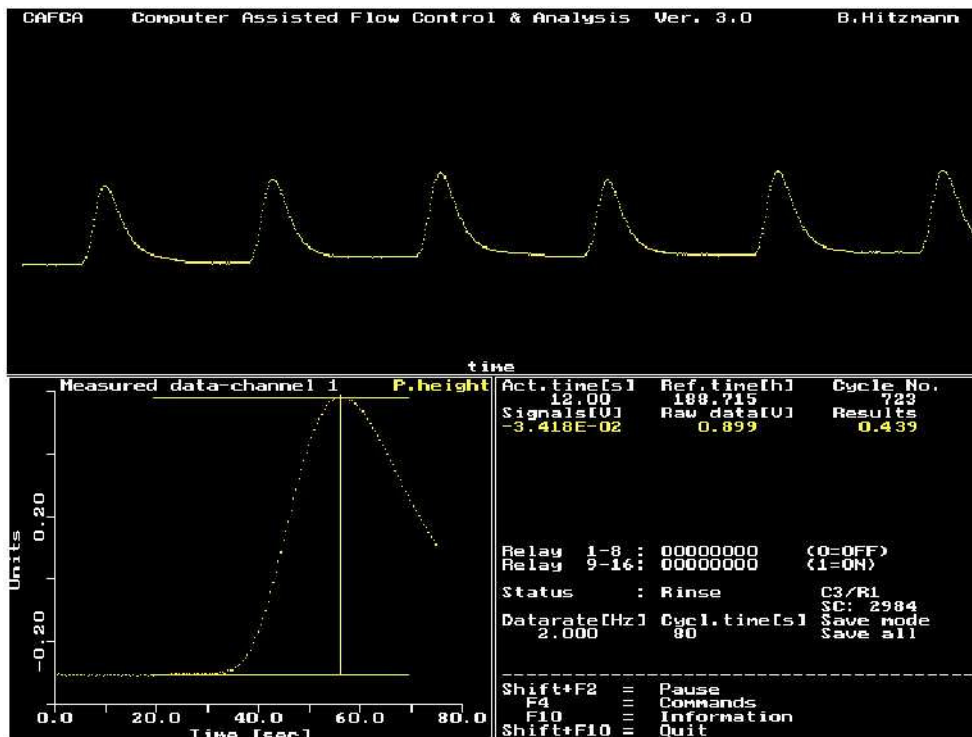


Abbildung 16: Screenshot der Software *CAECA*

3.6.1.4 Die Abgas-Analytik

Die Messung der Abluftzusammensetzung erfolgte mit einem MKAS LAB Analysensystem der SICK MAIHAK GmbH (Hamburg, Deutschland). Das System besteht aus dem *Modular System S 700* (Bauform S710) mit den Analysatormodulen *OXOR-P* und *UNOR*. Die Konditionierung und Förderung des Messgases erfolgt durch einen Intensivkühler mit nachgeschaltetem Aerosolfilter, Membranpumpen und Kondensatbehältern.

Das Modul *UNOR* dient der Messung der CO_2 -Konzentration. Es arbeitet nach dem NDIR-Verfahren (Nicht Dispersive Infrarot-Absorption) mit einem pneumatischen Detektor. Das Verfahren basiert auf der Resonanzabsorption von Schwingungsrotationsbanden im mittleren Infrarotspektrum (2^{-6} m und 12^{-6} m). Das Photometer besteht aus einem thermischen Strahler, dessen Strahlung durch ein Chopperrad moduliert wird, einer Messküvette und dem Detektor. Die zylindrische Messküvette ist durch einen Einbau in Längsrichtung in Referenz- und Messstrahlengang unterteilt. Auf Grund ihres Dipolmomentes treten die Gasmoleküle mit der IR-Strahlung in Wechselwirkung. Als Messgröße dient eine von der Chopperfrequenz abhängige Druckschwankung, die durch einen Membrankondensator detektiert und in ein elektrisches Signal gewandelt wird.

Die Messung der Sauerstoffkonzentration erfolgt mit dem nach dem paramagnetischen

Messverfahren arbeitenden Modul *OXOR-P*. Dieses Verfahren nutzt die paramagnetische Eigenschaft des Sauerstoffs aus.

In einem Magnetfeld ist eine diamagnetische Hantel drehbar gelagert. Eine optoelektronische Kompensationseinrichtung hält die Hantel immer in Ruheposition. Wird die Messzelle vom Messgas durchströmt, verursacht der Sauerstoff eine Auslenkung der Hantel. Die erforderliche Änderung des Drehmomentes der Kompensationseinrichtung zur Wiederherstellung der Ruhelage ist der Sauerstoffkonzentration proportional.

Die Kalibration der Abgasanalytik erfolgte mit einem Nullgas und einem Endgas (Nullgas: Stickstoff 5.0 ; Endgas: Mischgas: 2 Vol.-% CO₂, 19 Vol.-% O₂, zertifiziert, beide: Linde Gas AG, Höllriegelskreuth).

3.6.1.5 Das 2D-Fluoreszenzspektrometer

Das von der Firma *DELTA Light and Optics* (Lyngby, Dänemark) vertriebene 2D-Fluoreszenzspektrometer *BioView* wurde während der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Kultivierungen zur Prozessbeobachtung eingesetzt. Man nutzt hier den Effekt, dass die biogenen Fluorophore in den Fluoreszenzspektren bei charakteristischen Wellenlängenkombinationen auftreten. Es wurde im Rahmen eines EU-BriteEuram-Projektes [54] [58] speziell für die industrielle Applikation der nicht-invasiven in-situ 2D-Fluoreszenzspektrometrie entwickelt. Die elektronischen und optischen Komponenten befinden sich in einem Spritzwasser geschützten Stahlgehäuse.

Zur Aufnahme der Spektren verfügt der *BioView* über zwei rotierende Filterräder zur Selektion der Exzitations- und Emissionswellenlängen. Als Lichtquelle dient eine gepulste Xenon-Lampe. Die Wellenlängen des Exzitationslichtes reichen von 270 bis 550 nm, die des Emissionslichtes von 310 bis 590 nm. Die Bandbreite der Filter beträgt typischerweise 20 nm. Hieraus resultieren 150 mögliche Wellenlängenpaare, die innerhalb ca. einer Minute aufgezeichnet werden. Zur Kompensation des Messrauschens erfolgt jede Messung als Dreifachbestimmung, das Spektrum liegt dann als Mittelwert vor.

Der Anschluss an den Reaktor erfolgt über einen 25 mm-Standardport, der mit einem Adapter mit Quarzfenster versehen ist. An diesen Adapter wird ein Lichtleiterkabel gekoppelt. Dieses enthält je einen Lichtleiter für die Exzitation und einen zur Registrierung des Emissionslichtes. Der schematische Aufbau ist in Abbildung 17 (aus [54]) dargestellt.

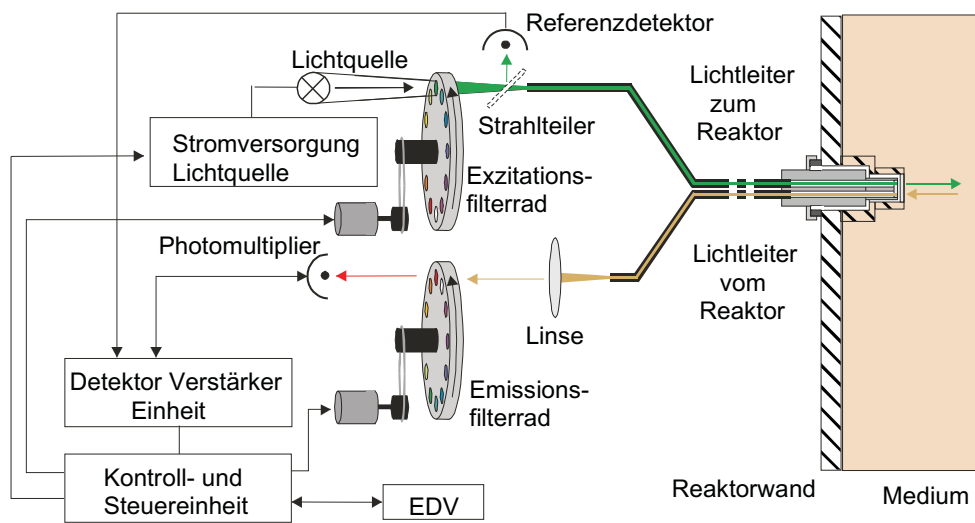


Abbildung 17: Schematischer Aufbau des *BioViews* (aus [54])

Die Steuerung des *BioViews* und die Aufzeichnung der Spektren erfolgt mit der Software *BioView* (Version 3.3.19, DELTA Light and Optics, Lyngby, Dänemark). Diese ist auf einem handelsüblichen PC installiert und kommuniziert über die serielle Schnittstelle und einen Umsetzer per Datenlichtleiter mit dem Spektrometer. Die Software ermöglicht neben der Festlegung der zu messenden Wellenlängenkombinationen die Einstellung des Photomultiplier-Verstärkungsfaktors für jede ausgewählte Kombination von Exzitations- und Emissionswellenlänge. Dies ermöglicht die gezielte Anpassung der Sensitivität, um einerseits möglichst hohe Intensitäten zu erhalten, andererseits aber nicht den Messbereichsendwert zu überschreiten. Die für die Kultivierungen gewählten Einstellungen sind in Anhang B dargestellt.

3.6.2 Die Offline-Analytik

Zur Gewinnung der Proben für die Offline-Analytik wurden dem Reaktor 2*10 mL Kulturbrühe unter Verwendung einer Peristaltikpumpe entnommen und in einer gekühlten Vorlage aufgefangen. 10 mL der Kulturbrühe wurden als sog. Vorlauf verworfen.

3.6.2.1 Die Bestimmung der Biotrockenmasse

Die Bestimmung der Biotrockenmasse erfolgte gravimetrisch durch Differenzwägung. Die Probengefäße (Microreaktionsgefäße (2 mL), BRAND GMBH + CO KG, Wertheim) wurden bis zur Gewichtskonstanz (ca. 24 Stunden) im Trockenschrank bei einer Temperatur von 110 °C ausgeheizt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur in einem Exsikkator erfolgte die Wägung der Gefäße zur Bestimmung des Leergewichtes.

Zur Gewinnung der Proben wurden jeweils zweimal 1,8 mL Kulturbrühe in die vorbereiteten Probengefäße gegeben. Nach jeder Zugabe wurden die Proben 2 Minuten bei 10.000 min^{-1} zentrifugiert (Centrifuge 5415 D, Eppendorf, Hamburg). Der Überstand wurde dekantiert und für weitere Offlinemessungen bei -20 °C tiefgekühlt. Die Zellpellets verblieben mindestens 24 Stunden bei einer Temperatur von 110 °C im Trockenschrank. Zur Abkühlung auf Raumtemperatur wurden die Proben in einem Exsikkator gelagert und anschließend gewogen.

3.6.2.2 Die quantitative Bestimmung von Ethanol

Die Bestimmung der Ethanolkonzentration erfolgte gaschromatographisch (Gaschromatograph GC-14B, Shimadzu, Duisburg) aus dem Überstand der Proben für die Biotrockenmassebestimmung. Die Trennung des Gemisches auf der *Chromosorb101*-Säule (Edelstahlsäule, 80/100) erfolgte unter Verwendung eines Temperaturprogramms, welches die Temperatur in einem Zeitraum von ca. 10 Minuten von 70 auf 160 °C erhöht. Als Detektor kam ein Flammenionisationsdetektor zum Einsatz. Zur Auswertung der Daten wurde die zugehörige Software CLASS-VP 4.2 (Shimadzu, Duisburg) verwendet. Die Kalibration wurde mit 2 den erwarteten Konzentrationen angepassten Standards durchgeführt. Die Standards und die zu vermessenden Proben werden mit einem internen Standard versetzt (n-Propanol, 8 g L^{-1}). Das injizierte Probevolumen beträgt $0,5 \text{ }\mu\text{L}$. Die weiteren Parameter sind in Tabelle 7 zusammengestellt. Als Trägergas wird Stickstoff verwendet, als Brenngase Luft und Wasserstoff.

Tabelle 7: Parametrierung des Gaschromatographen

Parameter	Wert
Druck Wasserstoff	65 kPa
Druck synth. Luft	50 kPa
Druck Trägergas P	220 kPa
Temperatur Injektor	180 °C
Temperatur Säule	70 - 160 °C
Temperatur Detektor	220 °C

3.6.2.3 Die Glucose-Analytik

Die Bestimmung der Glucosekonzentration erfolgte aus dem Überstand der Proben für die Biotrockenmassebestimmung. Zur Offlinemessung der Glucosekonzentration wurde ein *YSI 2700 Select* Analysator (Yellow Springs Instruments, Farnborough, England) eingesetzt. Das Verfahren basiert auf der amperometrischen Detektion von Wasserstoffperoxid. Auf einer Membran immobilisierte GOD setzt die Glucose unter Bildung von Wasserstoffperoxid um, welches an einer Platinelektrode elektrochemisch zu Sauerstoff oxidiert wird. Die Stromstärke des resultierenden Stromflusses ist proportional zur Glucosekonzentration. Die Kalibration des Gerätes erfolgt automatisch in unregelmäßigen Zeitabständen durch Messung einer Standardlösung mit einer Glucosekonzentration von 2 g L^{-1} .

3.7 Weitere Berechnungen

Die Sauerstoffaufnahme beschreibt den momentanen Sauerstoffbedarf der Zellen. Die Berechnung erfolgt mit Hilfe von Gleichung 45.

$$OUR = \frac{\dot{V}_i}{V_m \cdot V_R} \left(x_{O_2}^i - \frac{(1 - x_{O_2}^i - x_{CO_2}^i)}{(1 - x_{O_2}^o - x_{CO_2}^o)} \cdot x_{O_2}^o \right) \quad (45)$$

Die Kohlendioxidproduktionsrate dient als Maß für die Produktion von Kohlendioxid durch die Mikroorganismen. Sie wird gemäß Gleichung 46 berechnet.

$$CPR = \frac{\dot{V}_i}{V_m \cdot V_R} \left(x_{CO_2}^o \cdot \frac{(1 - x_{O_2}^i - x_{CO_2}^i)}{(1 - x_{O_2}^o - x_{CO_2}^o)} - x_{CO_2}^i \right) \quad (46)$$

Die verwendeten Symbole sind in Tabelle 8 erläutert.

Tabelle 8: Erläuterung der Symbole

x_I	Molenbruch des Inertgases	dimensionslos
x_i^i	Molenbruch des Gases i am Reaktoreingang	dimensionslos
x_i^o	Molenbruch des Gases i am Reaktorausgang	dimensionslos
\dot{V}	Volumenstrom des eintretenden Gases	$[\text{L h}^{-1}]$
V_m	Molvolumen eines idealen Gases	$[\text{L mol}^{-1}]$
V_R	Arbeitsvolumen	$[\text{L}]$

Die Glucoseaufnahme Q_S der Zellen wurde mit Gleichung 47 berechnet, sie ist ein Maß für den aktuellen Substratverbrauch der Zellen.

$$Q_S = \frac{\dot{V}(t)_{feed} \cdot (S_0 - S(t))}{V_R} = \frac{\dot{V}(t)_{feed}}{V_R} \cdot S_0 \cdot \left(1 - \frac{S(t)}{S_0}\right) \quad (47)$$

Die spezifische Sauerstoffaufnahme q_{O_2} ist der Quotient aus der Sauerstoffaufnahme und der momentanen Biotrockenmasse. Durch Berechnung der spezifischen Sauerstoffaufnahme können Veränderungen der OUR, die auf Biomassezuwachs beruhen, kompensiert werden.

$$q_{O_2} = \frac{OUR}{V_R \cdot X(t)} \quad (48)$$

Die spezifische Kohlendioxidproduktionsrate q_{CO_2} ist der Quotient aus der Kohlendioxidproduktionsrate und der momentanen Biotrockenmasse. Durch Berechnung der spezifischen Kohlendioxidproduktionsrate können Veränderungen der CPR, die auf Biomassezuwachs beruhen, kompensiert werden.

$$q_{CO_2} = \frac{CPR}{V_R \cdot X(t)} \quad (49)$$

Die spezifische Glucoseaufnahme q_S ist der Quotient aus der Glucoseaufnahme und der momentanen Biotrockenmasse. Diese Beziehung ist in Gleichung 50 dargestellt.

$$q_S = \frac{\dot{V}(t)_{feed} \cdot (S_0 - S(t))}{V_R \cdot X(t)} = \frac{\dot{V}(t)_{feed}}{V_R \cdot X(t)} \cdot S_0 \cdot \left(1 - \frac{S(t)}{S_0}\right) \quad (50)$$

Der Ausbeutekoeffizient spiegelt das Verhältnis zwischen eingesetzter Masse Glucose und der daraus gebildeten Biomasse im Zeitraum zwischen den Zeitpunkten t_1 und t_2 wieder und wird wie folgt bestimmt.

$$Y_{X/S} = \frac{\int_{t_1}^{t_2} \dot{V}(t)_{feed} \cdot S_0 dt}{V_R \cdot (X(t_2) - X(t_1))} \quad (51)$$

4 Auswertung und Diskussion der Ergebnisse

4.1 Simulationen zur Parameteridentifikation des Kalman-Filters und des PI-Reglers

Zur Identifikation optimaler Parameter für das EKF und den Feed-forward-/Feed-back-Regler wurden zahlreiche Simulationen durchgeführt. Die Wahl der in den Kultivierungen genutzten Parameter erfolgte an Hand der Regelgüte.

Als Kriterien für die Regelgüte dienten die Regeldifferenzen, ihre absoluten und ihre relativen Werte, die Anregelzeit und die Überschwingweite sowie die Differenzen der Feed-Rate. Hierzu wurden die Differenzen aus unmittelbar aufeinander folgenden Werten der Feed-Rate gebildet und ihre Beträge addiert. Diese Summe wurde normiert, indem durch die Anzahl n der Werte dividiert wurde. Je kleiner dieser Wert ist, umso besser ist die Regelgüte. Beginnend mit folgendem Satz gewählter Parameter

$$\begin{aligned}
 R &= 0,02 \, g^2 L^{-2} \\
 q_0 &= 0,45 \, L^2 g^{-1} h^{-1} \\
 q_1 &= -0,36 \, L^2 g^{-1} h^{-1}
 \end{aligned}
 \quad
 Q = \begin{pmatrix}
 0,001 \frac{g^2}{L^2 \cdot h} & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0,003 \frac{g^2}{L^2 \cdot h} & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0,175 \frac{1}{h^3} & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0,0 \frac{L^2}{h}
 \end{pmatrix} \quad (52)$$

wurde zunächst nur die Messrauschkovarianzmatrix R im Wertebereich zwischen $R = 0,00002 \, g^2 L^{-2}$ und $R = 0,2 \, g^2 L^{-2}$ variiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Variation der Regelparameter q_0 und q_1 unter Verwendung der zuvor ermittelten Messrauschkovarianzmatrix. Es wurden 6 verschiedene Parameterkombinationen untersucht. Im Anschluss an die Identifikation der Regelparameter wurde die Prozessrauschleistungsmatrix Q variiert. Der als optimal bestimmte Parametersatz ist in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Ergebnisse der Parameteridentifikation

Parameter	Wert
R	$0,002 \, g^2 L^{-2}$
q_0	$0,9 \, L^2 g^{-1} h^{-1}$
q_1	$-0,72 \, L^2 g^{-1} h^{-1}$
Q	$ \begin{pmatrix} 0,001 \frac{g^2}{L^2 \cdot h} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0,001 \frac{g^2}{L^2 \cdot h} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0,05 \frac{1}{h^3} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0,0 \frac{L^2}{h} \end{pmatrix} $

4.2 Die Kultivierungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere erfolgreiche Fedbatch-Kultivierungen mit dem Mikroorganismus *S. cerevisiae* bei Sollwerten von $0,05 \text{ g L}^{-1}$ bis $0,1 \text{ g L}^{-1}$ für die Glucosekonzentration durchgeführt. Im Folgenden werden drei repräsentative Kultivierungen (fb1, fb2 und fb3) ausführlich diskutiert. Die Wahl fiel auf diese Experimente, da einerseits die Probleme bzw. Störungen, die in den Kultivierungen fb1 und fb2 auftraten, nicht ungewöhnlich sind und andererseits die Resultate das Potential des Regelsystems unterstreichen. Den jeweiligen Fedbatch-Phasen ging eine Batch-Kultivierung voraus. Zwischen dem Start der Fedbatch-Kultivierung und dem Ende der Batch-Phase lag eine Ruhephase ohne Nährstoffzufuhr von 4 Stunden.

Im Verlauf der Kultivierung (fb1) war das FIA-System mehrfach über längere Zeiträume gestört, somit standen keine Messwerte für das EKF zur Verfügung. Gegen Ende wurde eine Sollwertänderung initiiert. Während der Kultivierung fb2 trat eine Stickstofflimitierung auf, dies führte zu einer Änderung der Prozessdynamik, auf die das Regelsystem entsprechend reagieren musste. Das Experiment fb3 verlief ohne signifikante Störungen.

Auf Grund apparativer Probleme war es nicht möglich, bei jedem Experiment die Glucosekonzentration offline zu ermitteln. Die Kultivierungen, bei denen eine Offlineanalyse möglich war, bestätigten die Messwerte des FIA-System innerhalb der messtechnisch bedingten Toleranzen, zudem wurden mehrfach die Messungen durch die parallele Verwendung eines zweiten FIA-Systems verifiziert.

Die zur Förderung der Feedlösung eingesetzten Pumpen weisen das Problem der Diskretisierung der Pumprate auf. Die Pumpen beginnen erst ab einer Pumpleistung von 5 % zu fördern und sind nur in 1 %-Schritten variierbar. Dieser Mangel einer stufenlosen Einstellbarkeit des Volumenstromes hat einen negativen Einfluss auf die erzielbare Regelgüte.

Die verwendeten Startwerte der Schätzfehlerkovarianz P , der Prozessrauschleistungsmatrix Q der Messfehlerkovarianz und die Parameter des PI-Terms des Feed-forward-/Feed-back-Reglers sind in Tabelle 9 auf der vorherigen Seite bereits dargestellt worden.

Ein Problem ist die Wahl der kinetischen Parameter und der Startwerte des EKF. Die kinetischen Parameter entstammen der Literatur ([5] und [3]) bzw. sind experimentell ermittelt. Der Startwert der maximalen Wachstumsrate wurde auf Grund von experimenteller Erfahrung auf einen Wert von $\mu_{max} = 0,08 \text{ h}^{-1}$ gesetzt, um das in der Anfangsphase der Kultivierung langsamere Wachstum der Zellen zu berücksichtigen. Für die Monod-Konstante K_m wurde ein Wert von $0,05 \text{ g L}^{-1}$ gewählt. Der Wert des Ausbeutekoeffizienten $Y_{X/S}$ betrug $0,53 \text{ g g}^{-1}$.

4.2.1 Die Kultivierung fb1

Zunächst wird die Kultivierung fb1 diskutiert, in deren Verlauf mehrfach Störungen des FIA-Systems auftraten und somit innerhalb gewisser Zeiträume keine Messwerte zur Verfügung standen. In diesen Zeiträumen erfolgte die Regelung lediglich auf der Basis der Prädiktion durch das EKF. Der Sollwert der Glucosekonzentration wurde nach 5 Stunden Kultivierungsdauer von $0,055 \text{ g L}^{-1}$ auf $0,065 \text{ g L}^{-1}$ erhöht. Die Glucosekonzentration in der Feed-Lösung betrug 35 g L^{-1} , die Zeitverzögerung $0,161 \text{ h}$ bei einem Volumenstrom der Probenahme von $0,029 \text{ L h}^{-1}$.

In Abbildung 18 sind sowohl die Schätzwerte als auch die Online- und Offline-Messwerte der Glucosekonzentration dargestellt.

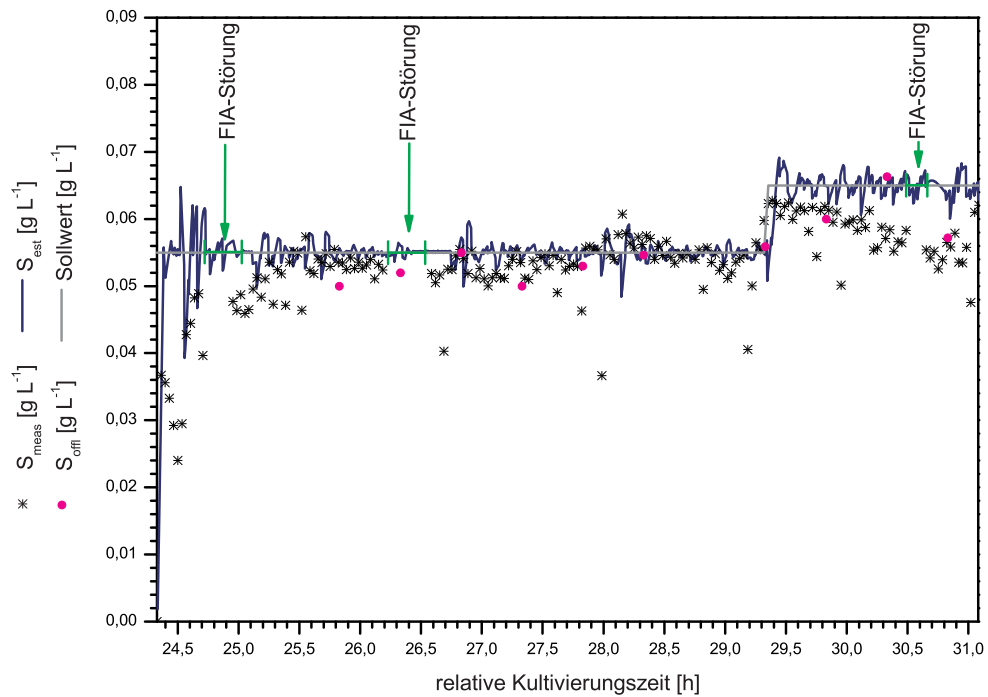


Abbildung 18: Auftragung des Sollwertes sowie der Mess- und der Schätzwerte der Glucosekonzentration im Verlauf der Kultivierung fb1

Unmittelbar nach dem Beginn der Zufütterung schwingen die Schätzwerte kurzfristig über. Die Messwerte nähern sich sukzessive dem Sollwert, bis kurz vor dessen Erreichen eine Störung des FIA-Systems eintritt. Dennoch erfolgt die Einstellung des Sollwertes zeitnah zum Start der Regelung. Die Online- und Offline-Messwerte stimmen im Rahmen der Messgenauigkeit sehr gut überein. Über den gesamten Verlauf der Kultivierung zeigten sich keine länger andauernden signifikanten Abweichungen vom vorgegebenen Sollwert.

Der Mittelwert der Glucosemesswerte lag während des Zeitraumes, in dem der Sollwert auf $0,055 \text{ g L}^{-1}$ geregelt werden sollte, bei $0,053 \text{ g L}^{-1}$. Der absolute Fehler betrug $0,002 \text{ g L}^{-1}$, entsprechend einem relativen Fehler von $4,1 \%$. Die entsprechenden Werte für den Sollwert von $0,065 \text{ g L}^{-1}$ sind geringfügig schlechter. Der Mittelwert der Glucosekonzentration besitzt einen Wert von $0,058 \text{ g L}^{-1}$. Der absolute Fehler der Messung weist eine Höhe von $0,003 \text{ g L}^{-1}$ auf, dies ist ein relativer Fehler von $4,5 \%$. Die Standardabweichung beträgt $0,003 \text{ g L}^{-1}$.

In den Zeiträumen $t = 24,7 \text{ h} - 25,1 \text{ h}$, $t = 26,2 \text{ h} - 26,6 \text{ h}$ und $t = 30,5 \text{ h} - 30,8 \text{ h}$ fiel das FIA-System aus. Diese Störungen über eine Dauer von zweimal 20 bzw. einmal 24 Minuten werden praktisch ohne Verschlechterung der Regelgüte toleriert. Die Regelabweichungen vor und nach der Störung differieren nur geringfügig. Die Werte der signifikanten Indikatoren CO_2 - und O_2 -Konzentration sowie die Fluoreszenzintensität weisen während der Zeiträume der FIA-Ausfälle keine signifikanten Änderungen auf. Dieses Verhalten belegt, dass die Regelabweichung durch den Ausfall des Messsystems nicht signifikant beeinflusst wurde. Das Regelsystem ist in der Lage, einen Ausfall der Messeinrichtung zu kompensieren. Dies unterstreicht das Potential des Systems.

Die zum Zeitpunkt $t = 29,3 \text{ h}$ initiierte Sollwertänderung wird nur unzureichend vollzogen. Der vorgegebene Sollwert kann nicht über einen längeren Zeitraum gehalten werden. Die Regelabweichung ist größer als bei dem Sollwert von $0,055 \text{ g L}^{-1}$. Das Regelsystem ist also nur bedingt in der Lage, Sollwertänderungen zu realisieren. Nach der Änderung ist die Regelgüte suboptimal. Die Dynamik des Prozesses steigt durch die erhöhte Glucosekonzentration sprunghaft. Das EKF kann die erforderliche Anpassung des Parameters μ_{max} nicht mit der erforderlichen Schnelligkeit umsetzen.

Die Dauer der Anregelzeit von 18 Minuten ist akzeptabel. In die Berechnung der Regelabweichungen wurden nur die Werte ab dem Ende der Anregelzeit einbezogen. Die Regeldauer betrug 6,8 Stunden. Die Regelgüte war bei den beiden realisierten Sollwerten unterschiedlich. In Tabelle 10 auf der nächsten Seite sind die Regelabweichungen als Mittelwert für den jeweiligen Sollwert in g L^{-1} und in Prozent zusammen mit den Standardabweichungen angegeben. Die Betrachtung der Werte zeigt deutlich, dass die Regelung bei $0,055 \text{ g L}^{-1}$ trotz der Ausfälle des Messsystems zufriedenstellend arbeitete, jedoch nach der Sollwertänderung nur noch suboptimale Resultate lieferte.

Tabelle 10: Mittelwerte der Regelabweichungen der Kultivierung fb1

Sollwert [g L ⁻¹]	$\bar{x}_w(t)$ [g L ⁻¹]	$\sigma_{\bar{x}_w(t)}$ [g L ⁻¹]	$\bar{x}_w(t)$ [%]	$\sigma_{\bar{x}_w(t)}$ [%]
0,055	0,003	0,003	4,9	5,4
0,065	0,006	0,003	9,9	5,2

Die maximalen und minimalen Regelabweichungen sind in Tabelle 11 dargestellt. Die angegebenen Werte wurden nicht von Ausreißern bereinigt. Die maximal auftretenden absoluten Regelabweichungen unterscheiden sich nicht. Die Unterschiedlichkeit der Werte der minimalen Regelabweichung zeigt eine Verschlechterung nach der Sollwertänderung. Die Auftragung der Regelabweichungen gegen die Zeit in den Abbildungen 19 und 20 auf der nächsten Seite zeigt gleichfalls eine Abnahme der Regelgüte nach der Sollwertänderung.

Tabelle 11: Maxima und Minima der Regelabweichungen der Kultivierung fb1

Sollwert [g L ⁻¹]	$x_w(t)_{\max}$ [g L ⁻¹]	$x_w(t)_{\min}$ [g L ⁻¹]	$x_w(t)_{\max}$ [%]	$x_w(t)_{\min}$ [%]
0,055	0,018	< 0,001	33,3	0,2
0,065	0,018	0,002	26,9	3,4

In den Abbildungen 19 und 20 auf der nächsten Seite sind die Regelabweichungen detailliert dargestellt. Bei der Betrachtung des Kurvenverlaufs in Abbildung 19 wird sofort die deutlich häufigere Unterschreitung des Sollwertes augenscheinlich. Unmittelbar vor und nach dem Auftreten der FIA-Ausfälle sind die Regelabweichungen nicht signifikant unterschiedlich. Nach Behebung der Störung beginnen sie zu sinken. Nachdem das System die Regelabweichung minimiert hat, tritt erneut eine Störung auf. Dieses Wechselspiel zwischen Phasen mit messwertbasierter und rein auf Prädiktion basierender Regelung könnte Ursache für die systematische Unterschreitung des Sollwertes sein, die ein Charakteristikum dieser Kultivierung ist. Die Resultate der Regelung sind aber bis zum Sollwertsprung zufriedenstellend. In beiden Abbildungen ist deutlich eine Verschlechterung der Regelgüte zu erkennen. Die Häufigkeit der Regelabweichung ist bei einem Sollwert von 0,055 g L⁻¹ unterhalb von 3 % am grössten, bei dem Sollwert von 0,065 g L⁻¹ unterhalb von 6 %.

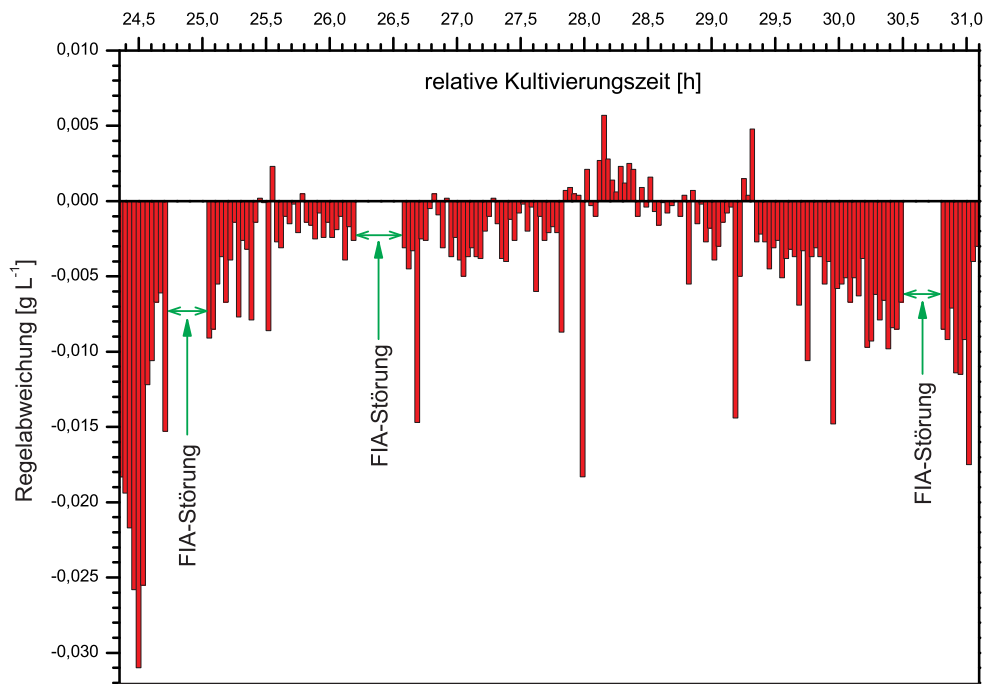


Abbildung 19: Verlauf der Regelabweichung in g L^{-1} während der Kultivierung fb1

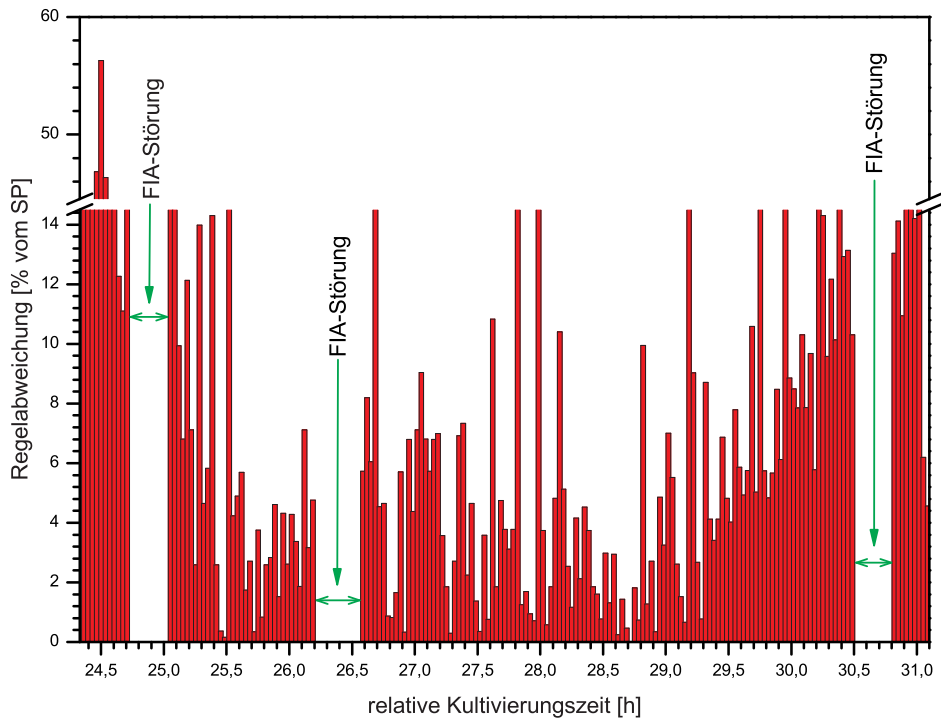


Abbildung 20: Regelabweichung in Prozent im Verlauf der Kultivierung fb1

Mit den während der Kultivierung aufgezeichneten Fluoreszenzspektren wurde eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 als Score-Plot dargestellt.

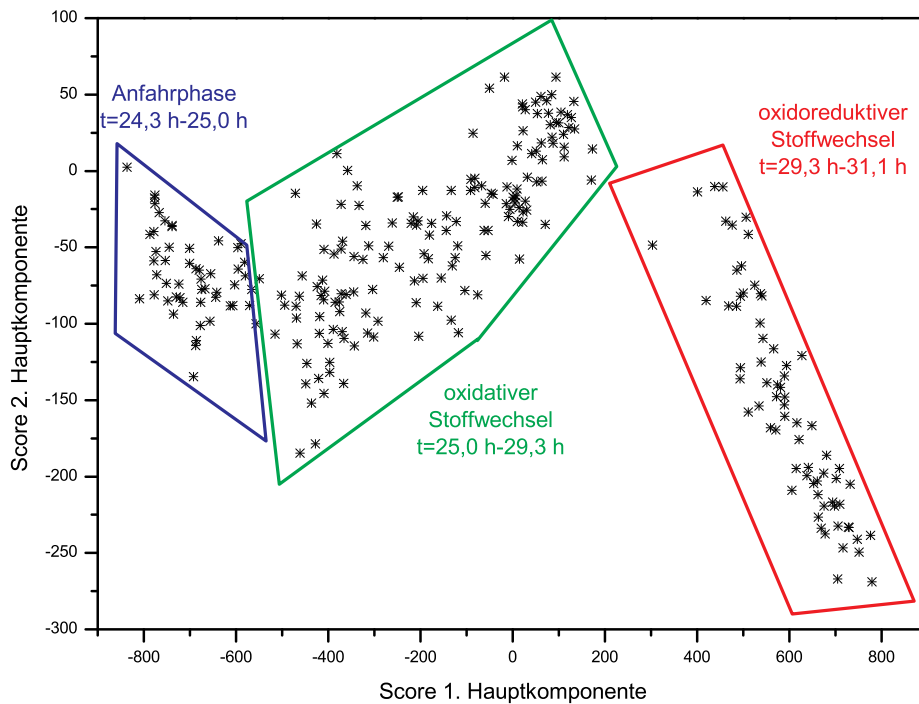


Abbildung 21: Auftragung des Scores der zweiten gegen den Score der ersten Hauptkomponente der Fluoreszenzspektren der Kultivierung fb1

Drei differenzierbare Bereiche sind erkennbar. Die Anfahrphase befindet sich im Zeitraum von $t = 24,3$ h bis $t = 25,0$ h. Der Zeitraum rein oxidativen Wachstums liegt zwischen $t = 25,0$ h und $t = 29,3$ h und der Bereich oxidoreduktiven Stoffwechsels im Zeitraum von $t = 29,3$ h bis $t = 31,1$ h. Die Anfahrphase zeichnet sich durch einen noch nicht stabilen Stoffwechselzustand der Zellen aus. Dieser zeigt sich im Score-Plot durch eine Abweichung von dem durch die Zunahme der Biomasse und der Zellaktivität bedingten Steigung. Der mit „oxidativer Stoffwechsel“ gekennzeichnete Bereich entspricht genau dem Zeitraum, in dem der Sollwert auf einen Wert von $0,055 \text{ g L}^{-1}$ geregelt wurde. Gleichzeitig mit der Sollwertänderung zum Zeitpunkt $t = 29,3$ h ändert sich die Steigung im Score-Plot signifikant. Dies ist ein eindeutiger Hinweis auf eine Änderung des Stoffwechsels. Die durchgeführte Sollwertänderung ist im Score-Plot also deutlich an einer Stoffwechseländerung erkennbar.

Die im Score-Plot differenzierbaren Bereiche werden durch die in Abbildung 22 dar-

gestellten Verläufe der Fluoreszenzintensität, der CO₂- und der Ethanol-Konzentration bestätigt. Ergänzend sind die Mess- und Schätzwerte der Glucosekonzentration dargestellt.

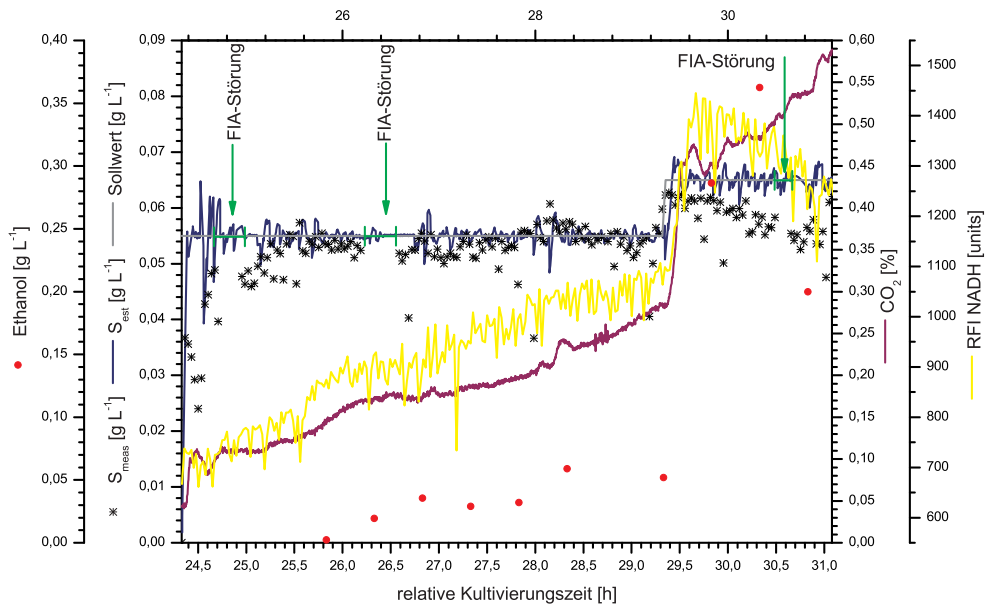


Abbildung 22: Grafische Darstellung der Fluoreszenzintensität, der Glucose-, CO₂- und Ethanolkonzentrationen für die Kultivierung fb1

Zu Beginn der Kultivierung streut die relative Fluoreszenzintensität (RFI) deutlich. Dies ist einerseits auf den noch nicht stabilen Stoffwechselzustand der Zellen zurückzuführen, andererseits auf die durch das Anfahren bedingten Schwankungen der Glucosekonzentration. Dieser Zeitraum ist im Score-Plot als Anfahrphase gekennzeichnet. Die CO₂-Konzentration zeigt am Anfang der Regelphase einen deutlich ausgeprägten Peak und im weiteren Verlauf eine kleinere Störung, die auf eine temporäre Erhöhung der Glucosekonzentration zurückzuführen ist. Die Zunahme der Fluoreszenzintensität im weiteren Verlauf ist auf die zunehmende Biotrockenmassekonzentration zurückzuführen. Der Ausreißer der RFI zum Zeitpunkt $t = 27,2$ h ist sehr wahrscheinlich auf eine kurzzeitige Störung der Messung durch eine Luftblase im Lichtweg zurückzuführen. Die plötzlichen Anstiege der Fluoreszenzintensität und der CO₂-Konzentration zum Zeitpunkt $t = 29,4$ h korrespondieren mit der durch die Sollwertänderung um $t = 29,3$ h bedingten Änderung des Stoffwechselzustandes.

Die Ethanolkonzentration steigt zu diesem Zeitpunkt gleichfalls signifikant an. Im Zeitraum vor der Änderung des Sollwertes findet keine signifikante Ethanolproduktion statt. Die Konzentration ist bis zum Zeitpunkt $t = 27,8$ h kleiner als $0,040 \text{ g L}^{-1}$. Nach einer

Kultivierungsdauer von $t = 28,3$ h tritt, bedingt durch die zu diesem Zeitpunkt leicht erhöhte Glucosekonzentration, eine geringfügig erhöhte Konzentration von $0,059 \text{ g L}^{-1}$ auf. Bis zur Durchführung der Sollwertänderung ist die Konzentration praktisch unverändert. Nach der Sollwertänderung tritt deutliche Ethanolbildung auf. Die maximale Konzentration beträgt $0,363 \text{ g L}^{-1}$. Ab $t = 30,2$ h sinkt die Glucosekonzentration langsam, da das EKF nicht auf die Ethanolbildung und den sich damit ändernden Stoffwechsel reagieren kann. Etwas zeitversetzt zur Abnahme der Glucosekonzentration sinkt die Ethanolkonzentration.

Innerhalb der Zeiträume der FIA-Störungen treten keine signifikanten Änderungen der hier dargestellten Größen auf. Das Regelsystem kompensiert den Ausfall des FIA-Systems ohne größere Schwierigkeiten.

In Abbildung 23 sind neben der O_2 - und der CO_2 -Konzentration in der Abluft noch die entsprechende spezifische Aufnahme- bzw. Produktionsrate dargestellt. Die O_2 - und die CO_2 -Konzentration stellen wichtige Parameter einer Kultivierung dar, da sie Indikatoren für den Zustand der Zellen sind.

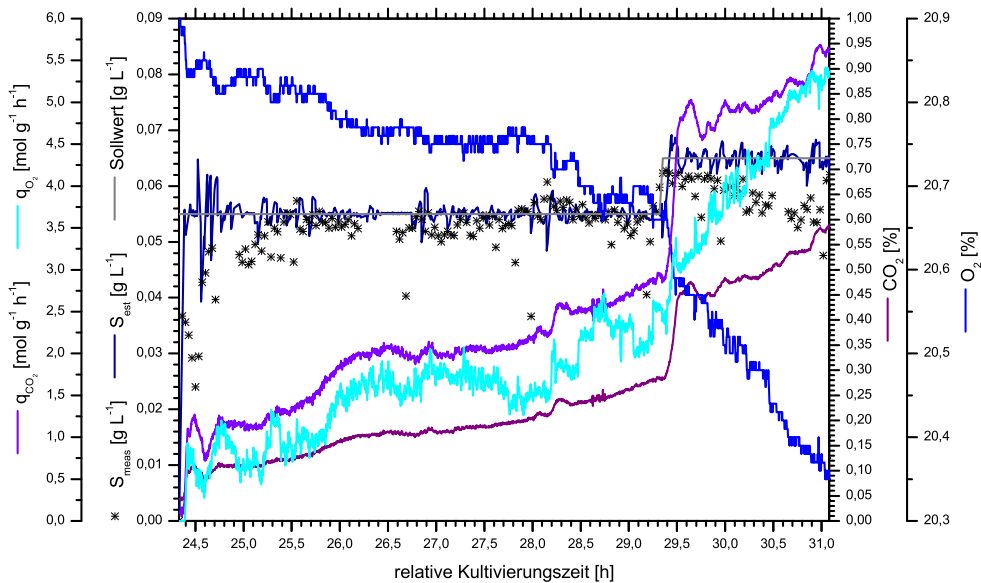


Abbildung 23: Auftragung der Glucosekonzentration, der Abluftzusammensetzung sowie der spez. Sauerstoffaufnahme- und Kohlendioxidproduktionsrate im Verlauf der Kultivierung fb1

Insgesamt ist der Verlauf beider Kurven erwartungsgemäß. Die CO_2 -Konzentration steigt kontinuierlich an, während die O_2 -Konzentration geringer wird. Die Peaks bzw. kleineren Störungen, die beide Kurven zeigen, treten zeitgleich auf und können entspre-

chenden Veränderungen der Glucosekonzentration zugeschrieben werden. Zu Beginn der Regelphase weisen alle Kurven ein deutliches Überschwingen auf. Dies ist durch das Anfahren des Prozesses und die damit verbundenen Instabilitäten bedingt.

Der Verlauf der spezifischen Sauerstoffaufnahme (q_{O_2}) und der spezifischen Kohlendioxidproduktionsrate (q_{CO_2}) ist synchron zu dem der Konzentration der entsprechenden Gase in der Abluft. q_{O_2} und q_{CO_2} verlaufen bis zum Zeitpunkt der Sollwertänderung steigend, dann zeigen beide Werte einen deutlichen Sprung. Nach der Sollwertänderung verlaufen beide Kurven deutlich steiler.

Die Höhe der Werte der q_{O_2} und der q_{CO_2} ist für die Phase vor und nach der Sollwertänderung deutlich verschieden. Die Änderung des Wachstumsverhaltens der Zellen zeigt sich also auch in diesen beiden Parametern deutlich. In Tabelle 12 sind die Mittelwerte dargestellt.

Tabelle 12: Mittelwerte der spezifischen Sauerstoffaufnahme- und der spezifischen Kohlendioxidproduktionsraten

Sollwert [g L ⁻¹]	q_{O_2} [mol g ⁻¹ h ⁻¹]	q_{CO_2} [mol g ⁻¹ h ⁻¹]
0,055	1,49	1,91
0,065	4,12	4,88

Im nächsten Diagramm (Abbildung 24) sind die Feed-Rate, die spezifische Glucoseaufnahme (q_S) und die vom EKF geschätzte maximale Wachstumsrate (μ_{max}) dargestellt. Bedingt durch die Instabilitäten beim Anfahren des Prozesses schwingen diese Größen zunächst über, stabilisieren sich aber nach kurzer Zeit.

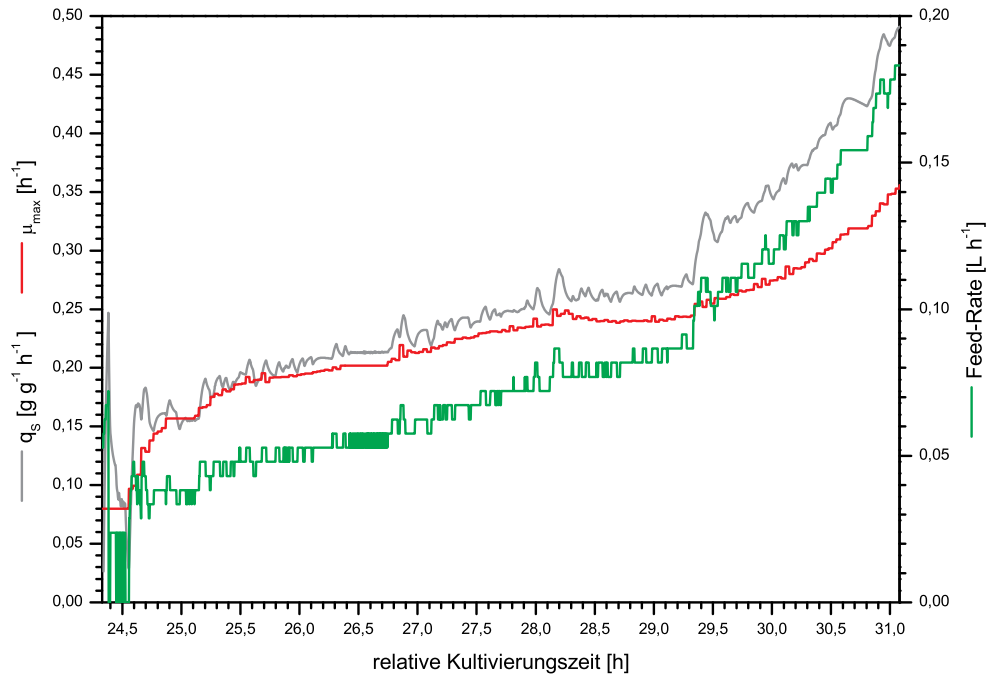


Abbildung 24: Verlauf der Feed-Rate, der spezifischen Glucoseaufnahme- und der maximalen Wachstumsrate der Kultivierung fb1

Die Feed-Rate zeigt vom Start der Regelung bis $t = 24,6$ h eine deutliche Diskretisierung. Diese ist durch die Bauart der Pumpen bedingt und tritt hier besonders deutlich in Erscheinung, da die Start-Biotrockenmassekonzentration (BTM) niedrig war. Im weiteren Verlauf steigt die Feed-Rate abgesehen von den drei Spikes bei $t = 24,7$ h, $t = 26,9$ h und $t = 28,2$ h mit zunehmender BTM an. Das Auftreten der Spikes tritt zeitgleich mit entsprechenden Änderungen der Glucosekonzentration auf (siehe Abbildung 18 auf Seite 62). Zum Zeitpunkt der Sollwertänderung $t = 29,3$ h steigt die Feed-Rate sprunghaft, und der Kurvenverlauf ist deutlich steiler.

Die maximale Wachstumsrate (μ_{max}) ist anfangs konstant. Nach Stabilisierung der Feed-Rate weist sie einen sprunghaften Verlauf auf. Ab $t = 25,6$ h beginnt die Kurve abzuflachen. Die kleine sprunghafte Änderung zum Zeitpunkt $t = 28,1$ h korrespondiert mit der Änderung der Feed-Rate. Zum Zeitpunkt der Sollwertänderung ($t = 29,3$ h) zeigt sich kein deutlicher Versatz. Der Verlauf der Kurve wird lediglich mit geringem Zeitversatz steiler.

Die spezifische Glucoseaufnahme- und die Feed-Rate zeigen erwartungsgemäß einen analogen Verlauf. Die Spikes zu den Zeitpunkten $t = 24,7$ h, $t = 26,6$ h und $t = 28,2$ h finden sich in der Feed-Rate wieder. Dies spiegelt sich auch in der Glucosekonzentration wieder. Die Mittelwerte der spezifischen Glucoseaufnahme- und der Feed-Rate sind in Tabelle 13 für die

beiden Sollwerte dargestellt.

Tabelle 13: Spezifische Glucoseaufnahmeraten

Sollwert [g L ⁻¹]	q _s [g g ⁻¹ h ⁻¹]
0,055	0,22
0,065	0,38

Auffällig ist die Stagnation aller hier dargestellten Prozessvariablen zwischen $t = 30,6$ h und $t = 30,8$ h. Dies entspricht ungefähr dem Zeitraum des letzten FIA-Ausfalls. Dies ist die einzige Stelle, an der eine FIA-Störung im Verlauf der Prozessvariablen erkennbar ist.

In Abbildung 25 auf der nächsten Seite sind die Mess- und die Schätzwerte der Biotrockenmassekonzentration (BTM) aufgetragen. Die Übereinstimmung der Werte ist bis zum Zeitpunkt der Sollwertänderung bei $t = 29,3$ h sehr gut. Nach der Sollwertänderung wird die Differenz zwischen Messung und Schätzung stetig größer. Bedingt durch die erhöhte Glucosekonzentration beginnen die Zellen Ethanol zu produzieren. Diese Umstellung des Stoffwechsels führt zu einem Absinken des Ausbeutekoeffizienten. Diese Änderung wird durch das EKF nicht erfasst und führt somit zu einer fehlerhaften Prädiktion dieser Zustandsgröße.

Zu Beginn der Regelung betrug die Biotrockenmassekonzentration $4,8$ g L⁻¹. Dies entsprach $7,4$ g. Bei Beendigung der Kultivierung war die BTM auf $7,6$ g L⁻¹ bzw. $13,1$ g angewachsen. Im Verlauf der Kultivierung wurden, unter Berücksichtigung der entnommenen Biomasse der Offline-Proben $11,1$ g Biomasse erzeugt. Die Ausbeutekoeffizienten verändern sich als Funktion des Sollwertes signifikant. Für den Zeitraum des Sollwertes von $0,055$ g L⁻¹ betrug der Ausbeutekoeffizient $Y_{X/S} = 0,45$ g g⁻¹, während des Sollwertes von $0,065$ g L⁻¹ war er mit $Y_{X/S} = 0,27$ g g⁻¹ deutlich kleiner. Die Umstellung des Stoffwechsels, die sich hier im Verlauf der BTM zeigt, korrespondiert mit den Veränderungen im Score-Plot (Abbildung 21), der Fluoreszenzintensität, und der CO₂-Konzentration (Abbildung 22) sowie dem Verlauf der spezifischen Glucoseaufnahmerate (Abbildung 24)

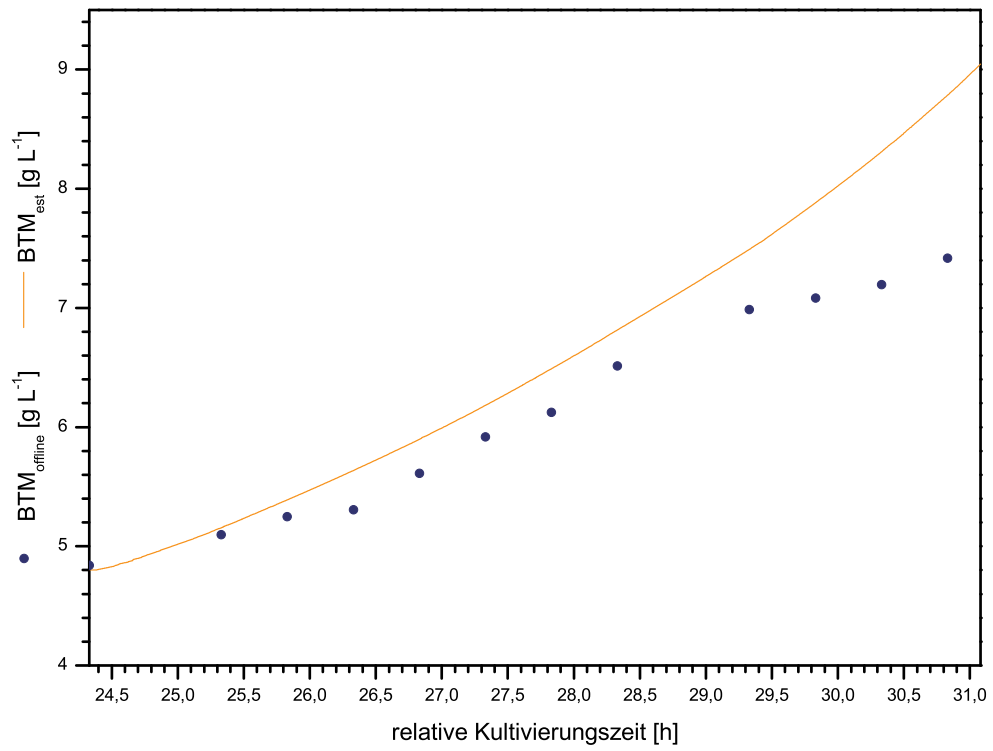


Abbildung 25: Darstellung der Messwerte und der Schätzwerte der Biotrockenmassekonzentration der Kultivierung fb1

4.2.2 Die Kultivierung fb2

Im Folgenden wird die Kultivierung fb2 diskutiert, in deren Verlauf eine Stickstofflimitierung auftrat, die zu einer Änderung der Prozessdynamik führte. Der Sollwert der Glucosekonzentration wurde auf $0,07 \text{ g L}^{-1}$ geregelt. Die Feed-Lösung enthielt 100 g L^{-1} Glucose. Die Zeitverzögerung betrug $0,122 \text{ h}$. Für den Volumenstrom der Probenahme wurde ein Wert von $0,039 \text{ L h}^{-1}$ ermittelt. Zunächst werden in den Abbildungen 26 bis 29 die relevanten Bioprozessgrößen diskutiert, die Hinweise auf das Wachstumsverhalten und somit auch auf die Limitierung geben. Im Anschluss daran erfolgt dann die Diskussion der Regelgüte.

Abbildung 26 auf der nächsten Seite illustriert neben den Glucosemess- und Schätzwerten die gemessenen Konzentrationen von Kohlendioxid und Ethanol und den Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität des NADH. Für die RFI stehen nur Werte bis zum Zeitpunkt $t = 29,0 \text{ h}$ zur Verfügung, da das Quarzglasfenster für den Lichtleiter auf Grund der durch die Limitierung bedingten niedrigen Feed-Rate nicht mehr mit Kulturbrühe bedeckt war. Unmittelbar nach dem Start der Regelphase zwischen $t = 21,6 \text{ h}$ und $t = 22,5 \text{ h}$ schwankt die Intensität stark. Dies steht in Übereinstimmung mit dem in Abbildung 30 auf Seite 78 identifizierten Zeitraum der Anfahrphase der Kultivierung, während der der Stoffwechsel der Zellen noch nicht stabil ist. Im weiteren Verlauf nimmt die Fluoreszenzintensität synchron zum Biomassezuwachs zu. Der weitere Verlauf weist keine Besonderheiten auf.

Der Verlauf der CO_2 -Konzentration weist kurz nach dem Anfahren des Prozesses im gleichen Zeitraum wie die RFI Schwankungen auf. Diese sind gleichfalls auf die Instabilitäten während der Anfahrphase zurückzuführen. Ab dem Zeitpunkt $t = 22,5 \text{ h}$, also nach dem Ende der Anfahrphase, wird die Streuung der Werte geringer. Die CO_2 -Konzentration steigt zunächst mit gleichbleibender Steigung bis zum Zeitpunkt $t = 23,4 \text{ h}$, und flacht dann kurzfristig auf Grund der leicht sinkenden Glucosekonzentration ab. Ab dem Zeitpunkt $t = 24,4 \text{ h}$ wird die Steigung wieder größer und erreicht den selben Wert wie zuvor. Zum Zeitpunkt $t = 27,8 \text{ h}$ bricht die CO_2 -Kurve ein und besitzt eine negative Steigung. Dieser Wechsel der Richtung der Steigung wiederholt sich mehrfach. Zunächst war die Ursache dieses Verhaltens unklar. Die Gabe eines $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Pulses zum Zeitpunkt $t = 31,5 \text{ h}$ zeigte, dass die Ursache eine Stickstofflimitierung war. Alle Wachstumsparemeter zeigten unmittelbar nach diesem Puls eine starke Änderung, die auf ein wieder einsetzendes Wachstum hindeuten. Der beschriebene alternierende Verlauf der CO_2 -Konzentration hat also seine Ursache in der sich verändernden Stickstoffkonzentration in der Kulturbrühe. Bei abklingendem Wachstum wird vermutlich Stickstoff in der wäs-

serigen Phase akkumuliert. Sobald eine bestimmte minimale Konzentration an Stickstoff überschritten ist, wachsen die Zellen nicht limitiert, verbrauchen den Stickstoff und verursachen somit eine erneute Limitierung. Unmittelbar nach der Gabe des Pulses schnell die CO_2 -Konzentration nach oben und sinkt dann unter das vorherige Niveau ab. Zu diesem Zeitpunkt sinkt die Glucosekonzentration drastisch. Dies ist ein weiteres Indiz für plötzlich wieder einsetzendes Wachstum. Nachdem sich die Glucosekonzentration stabilisiert hat, setzt sich der alternierende Verlauf der CO_2 -Konzentration mit geringerer Amplitude, aber weiterhin geringer Steigung fort. Zum Zeitpunkt $t = 33,0$ h tritt ein Spike auf. Entsprechend niedrige Glucosekonzentrationen, die dafür verantwortlich sein könnten, liegen zeitlich vor bzw. nach seinem Auftreten und kommen somit als Ursache nicht in Betracht.

Während der gesamten Kultivierung erfolgte keine Bildung von Ethanol. Der Messwert zum Zeitpunkt $t = 25,6$ h ist eine Fehlmessung. Weder in den RFI, noch im Verlauf der CO_2 -Konzentration, noch im Score-Plot (Abbildung 30 auf Seite 78) finden sich Hinweise auf Ethanolproduktion.

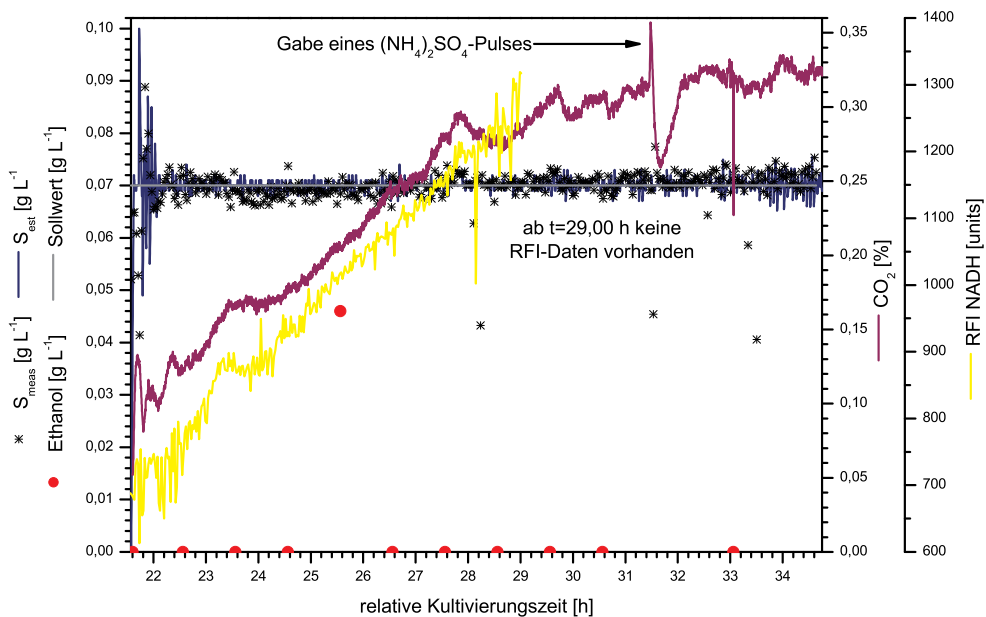


Abbildung 26: Grafische Darstellung der Fluoreszenzintensität, der Glucose-, CO_2 - und Ethanolkonzentrationen der Kultivierung fb2

Die Verläufe der O_2 - und der CO_2 -Konzentration in der Abluft sind wichtige Kriterien zur Beurteilung einer Kultivierung. Sie geben Hinweise auf das Wachstum der Zellen. In Abbildung 27 auf der nächsten Seite sind beide Kurven dargestellt. Der Verlauf der CO_2 -Konzentration wurde schon im Zusammenhang mit der Limitierung bzw. als Indikator für das Vorliegen einer Limitierung diskutiert. Unter den während der Kultivierung

vorherrschenden Bedingungen ist der Verlauf der CO_2 -Konzentration erwartungsgemäß. Die Steigung der Kurve ändert sich auf Grund der Limitierung, die Konzentration in der Abluft steigt insgesamt gesehen, da die Biotrockenmassekonzentration zunimmt. Die O_2 -Konzentration nimmt über den gesamten Zeitraum der Kultivierung entsprechend der Biomassezunahme ab. Sie zeigt in der Zeit des nicht limitierten Wachstums bis zum Zeitpunkt $t = 27,8 \text{ h}$ eine größere Steigung als in der Phase der Limitierung. Bedingt durch das etwas höhere Messrauschen im Vergleich zur CO_2 -Konzentration erscheinen die Amplituden geringer. Insgesamt ist der Verlauf beider Kurven erwartungsgemäß und korrespondiert. Jedes Absinken der O_2 -Konzentration findet sich in der CO_2 -Konzentration als Anstieg wieder. Zu Beginn der Regelphase weisen alle Kurven ein deutliches Überschwingen auf. Dies ist durch das Anfahren des Prozesses und die damit verbundenen Instabilitäten bedingt.

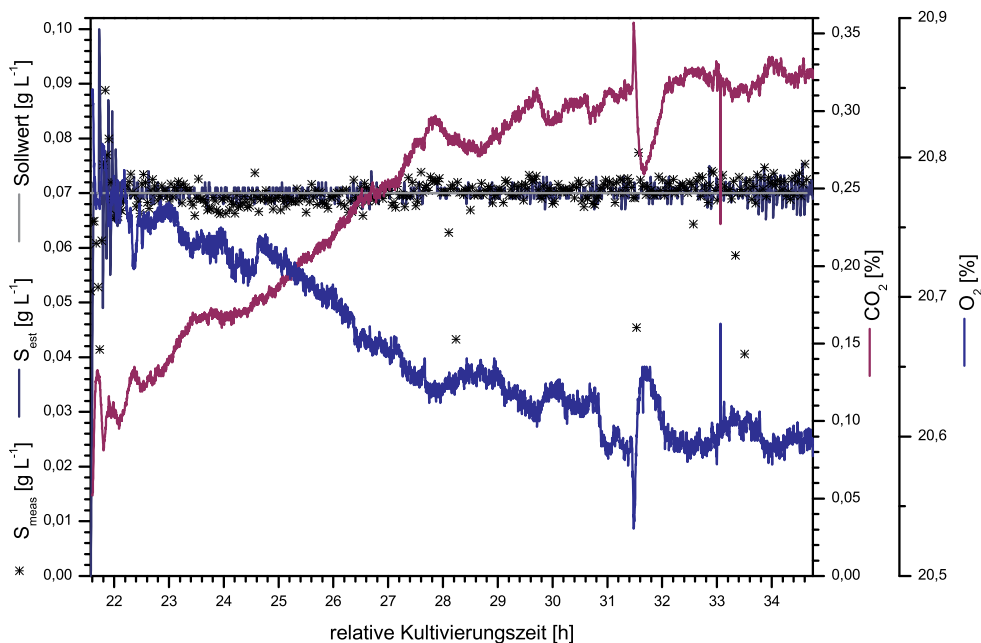


Abbildung 27: Auftragung der Glucosekonzentration und der Abluftzusammensetzung während der Regelphase der Kultivierung fb2

Nach der Diskussion des Verhaltens der Abluftzusammensetzung werden nun kurz die Verläufe der in Abbildung 28 dargestellten, spezifischen Kohlendioxidproduktionsrate und der Sauerstoffaufnahme rate (q_{O_2}) und der spezifischen Kohlendioxidproduktionsrate (q_{CO_2}) ist synchron zu dem der Konzentration der entsprechenden Gase in der Abluft. Beide Zustandsvariablen zeigen somit das erwartete Verhalten. q_{O_2} und q_{CO_2} verlaufen bis zum Zeitpunkt der eintreten-

den Limitierung steigend. Zu Beginn der Regelphase zeigen sich auch hier die durch das Anfahrverhalten bedingten Streuungen. In der Phase des nicht limitierten Wachstums bis zum Zeitpunkt $t = 27,8$ h steigen sowohl die Werte der q_{O_2} als auch die der q_{CO_2} an. Ab dem Zeitpunkt der Limitierung zeigen auch die Verläufe dieser beiden Kurven die weiter oben diskutierten Schwankungen. Insgesamt zeigen die Werte eine sinkende Tendenz. Dies ist ein weiteres Indiz für die abnehmende Stoffwechselaktivität. Zum Zeitpunkt der Gabe des $(NH_4)_2SO_4$ -Pulses ($t = 31,5$ h) zeigen beide Kurven erwartungsgemäß einen Spike. Bedingt durch das schnell einsetzende Wachstum sinkt die Glucosekonzentration plötzlich stark ab und führt so zu den kurzzeitig deutlich niedrigeren Werten der spezifischen Sauerstoffaufnahme und der Kohlendioxidproduktionsrate.

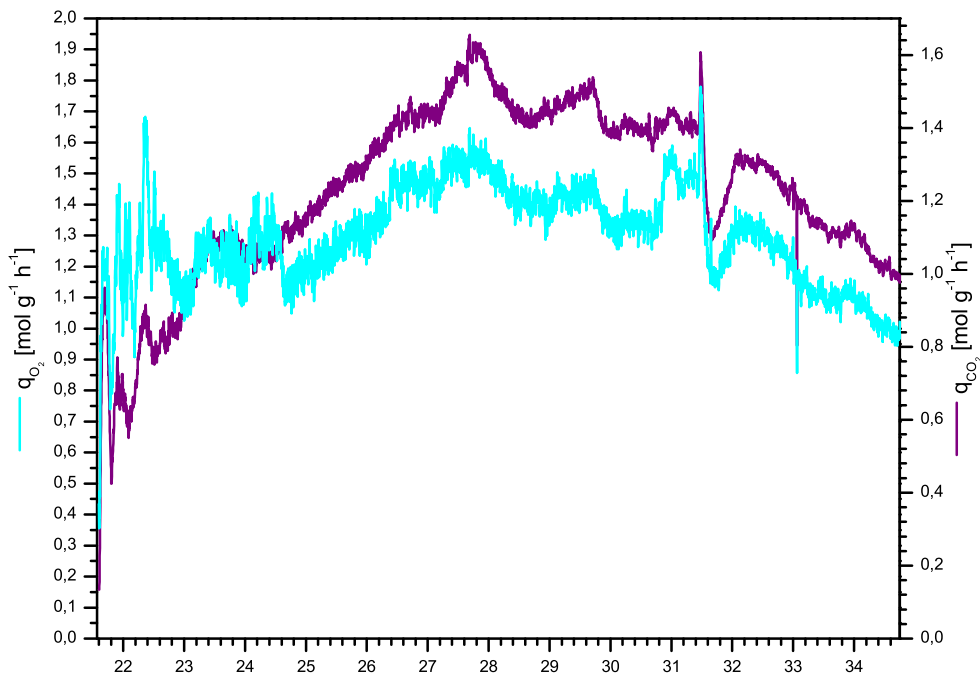


Abbildung 28: Darstellung der spezifischen Kohlendioxidproduktionsrate und der spezifischen Sauerstoffaufnahme während der Regelphase der Kultivierung fb2

Abbildung 29 auf der nächsten Seite illustriert die Verläufe der Feed-Rate, der spezifischen Glucoseaufnahme und der maximalen Wachstumsrate über den Zeitraum der Kultivierung. Alle dargestellten Größen zeigen zunächst ein Überschwingen, welches auf die Anfahrphase und die Schwankungen der Feed-Rate zurückzuführen ist. Zwischen den Zeitpunkten $t = 22,1$ h und $t = 23,7$ h ist die Feed-Rate praktisch konstant, die maxima-

le Wachstumsrate und die spezifische Glucoseaufnahme sinken leicht ab. Hier zeigen sich erneut die Besonderheiten der Anfangsphase, in der der Stoffwechsel der Zellen noch nicht stabil ist. Dies zeigt sich unter anderem in einem langsameren Wachstum, welches zu Schwankungen in der Feed-Rate und somit auch in den anderen Prozessgrößen führt. Dieses Verhalten findet sich auch im Score-Plot wieder (Abbildung 30 auf der nächsten Seite). Im sich anschließenden Zeitraum bis zum Eintreten der Limitierung steigen alle gezeigten Größen an. Mit Eintreten der Limitierung zeigen sie ein unterschiedliches Verhalten. Die Feed-Rate ist bis zum Ende der Kultivierung konstant. Die spezifische Glucoseaufnahme sinkt als Folge der Limitierung und des daraus resultierenden langsameren Wachstums. Der Parameter μ_{max} wird vom EKF geschätzt. Er beeinflusst über das implementierte kinetische Modell die Wachstumsgeschwindigkeit und somit die Feed-Rate. Die Fähigkeit des EKF, diesen Parameter richtig und zeitnah anzupassen, hat demzufolge signifikanten Einfluss auf die Regelgüte. Die Anpassung dieses Parameters an die sich verändernde Prozessdynamik gelingt hier sehr gut. Das EKF kann adäquat reagieren, und die Regelabweichungen bleiben somit klein.

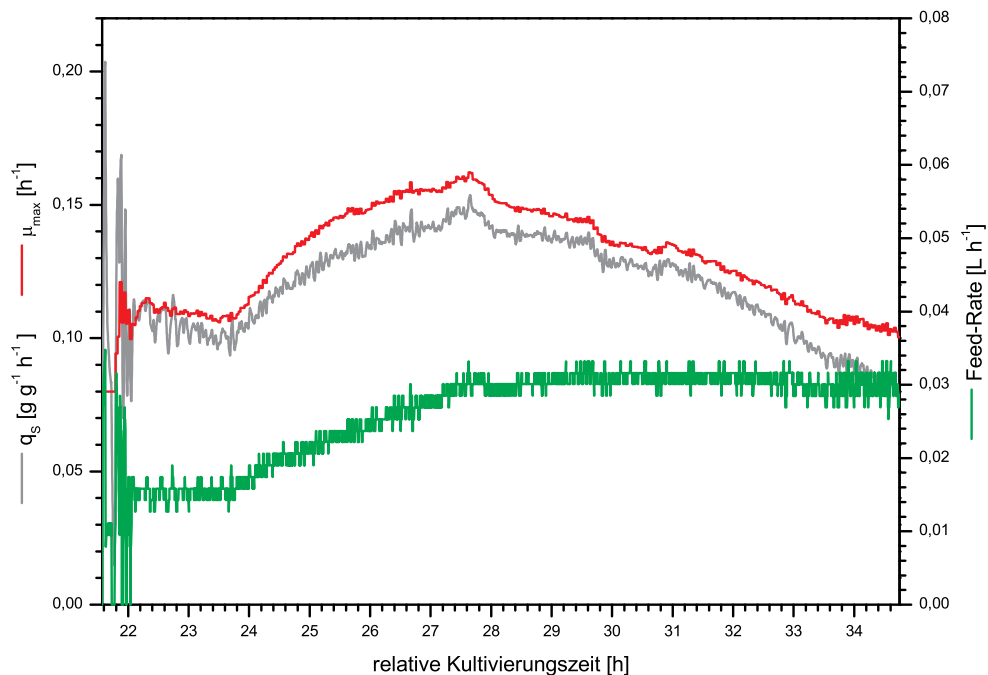


Abbildung 29: Verlauf der Feed-Rate, der spezifischen Glucoseaufnahme und der maximalen Wachstumsrate im Verlauf der Kultivierung fb2

In Abbildung 30 sind die Ergebnisse einer Hauptkomponentenanalyse als Score-Plot dargestellt. Während der Kultivierung wurden Fluoreszenzspektren aufgezeichnet, um einerseits den Prozess online zu beobachten und andererseits offline aus den gewonnenen Spektren weitere Informationen zu erhalten. Es treten, bis zum Abbruch der Aufzeichnung um $t = 29,0$ h, zwei deutlich abgegrenzte Bereiche auf. Zunächst findet sich der als Anfahrphase bezeichnete Bereich im Zeitraum von $t = 21,6$ h bis $t = 22,5$ h, der sich durch einen noch nicht stabilen Zustand der Zellen und somit auch der Prozessgrößen auszeichnet. Oxidativer Stoffwechsel liegt zwischen $t = 22,5$ h und $t = 29,0$ h vor. Die Steigung im Score-Plot ist durch den Biomassezuwachs bedingt. Signifikante plötzliche Änderungen der Steigung, die Indikatoren für eine Stoffwechseländerung sind, treten im Score-Plot nicht auf. Dies steht in Übereinstimmung mit dem weiter oben diskutierten Verlauf der CO_2 -Konzentration und den offline ermittelten Ethanolkonzentrationen. Die im Score-Plot differenzierbaren Bereiche stimmen mit den in Zusammenhang mit Abbildung 26 auf Seite 74 diskutierten Eigenschaften der CO_2 - und Ethanolkonzentration überein.

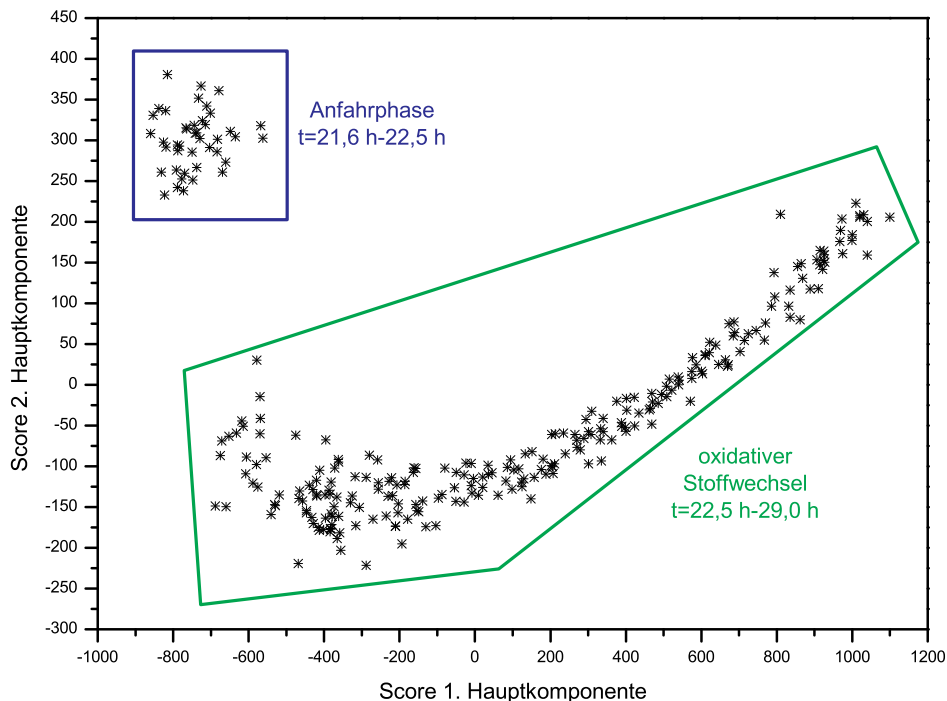


Abbildung 30: Auftragung des Scores der zweiten gegen den Score der ersten Hauptkomponente der während der Kultivierung fb2 aufgezeichneten Fluoreszenzspektren

In Abbildung 31 sind die Schätzwerte und die Online-Messwerte der Glucosekonzentration während der Kultivierung dargestellt. Über den gesamten Zeitraum der Kultivierung zeigten sich, abgesehen von der Anregelzeit, keine signifikanten Abweichungen vom vorgegebenen Sollwert. Lediglich zu den Zeitpunkten $t = 28,1 \text{ h}$, $t = 28,2 \text{ h}$, $t = 31,5 \text{ h}$, $t = 32,6 \text{ h}$, $t = 33,3 \text{ h}$ und $t = 33,5 \text{ h}$ zeigen sich Ausreißer. Diese treten etwas zeitversetzt zu den Phasen erhöhten Wachstums während des Zeitraums der Limitierung auf. Das Regelsystem ist offensichtlich in der Lage, auf diese sehr plötzliche Änderung der Dynamik adäquat zu reagieren, da die Zeiträume mit erhöhter Abweichung vom Sollwert nur sehr kurz sind. Die Schätz- und Messwerte zeigen unmittelbar nach dem Start der Regelung ein Überschwingen, wobei das der Schätzwerte stärker ausgeprägt ist. Das Annähern der Glucoseschätz- und Messwerte erfolgt sehr zeitnah zum Beginn der Regelphase. Die Glucosemesswerte nähern sich während der Anregelzeit sukzessive von niedrigeren Konzentrationen aus dem Sollwert an, schwingen bis auf einen Wert von ca. $0,09 \text{ g L}^{-1}$ über und nähern sich dann dem Sollwert wieder an. Nach Ablauf der Anregelzeit zum Zeitpunkt $t = 21,9 \text{ h}$ treten abgesehen von den oben erwähnten Ausreißern keine signifikanten Abweichungen vom Sollwert auf. Eine systematische Über- oder Unterschreitung der vorgegebenen Konzentration liegt nicht vor.

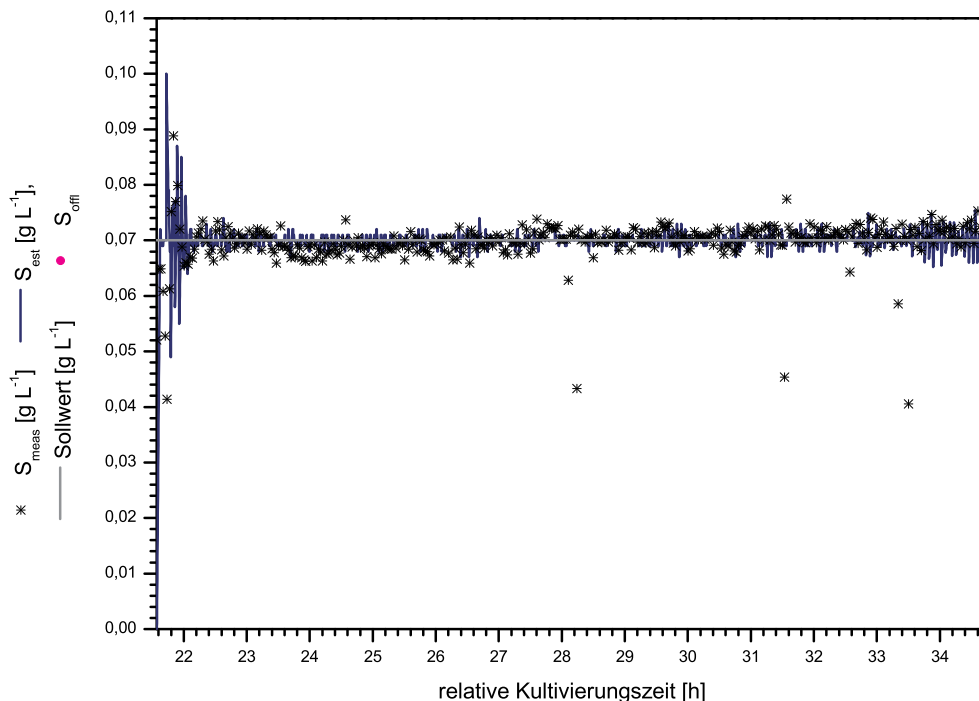


Abbildung 31: Auftragung des Sollwertes, der Mess- und der Schätzwerte der Glucosekonzentration während der Regelphase der Kultivierung fb2

Der Mittelwert der Glucosemesswerte betrug $0,070 \text{ g L}^{-1}$, die Standardabweichung $0,003 \text{ g L}^{-1}$. Der für diese FIA typische Wert einer Standardabweichung von 10 % wird hier deutlich unterschritten. Der Fehler der Messung war mit 2,5 % gleichfalls sehr gering. Dieser prozentuale Fehler entspricht einem absoluten Fehler von nur $0,002 \text{ g L}^{-1}$. Die maximale Differenz zwischen Soll- und Messwert beträgt $0,010 \text{ g L}^{-1}$, wenn die oben genannten Ausreißer bei der Berechnung nicht berücksichtigt werden. Werden sie berücksichtigt, steigt die maximale Differenz auf $0,029 \text{ g L}^{-1}$ an. Diese Werte sind Beleg für die Qualität des Regelsystems. Das System wurde im Rahmen dieser Kultivierung erfolgreich eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass das System auf Änderungen der Prozessdynamik, hier sowohl eine langsame Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit als auch kurzzeitige Erhöhungen der Dynamik, adäquat reagieren kann.

Eine detaillierte Darstellung der Regelabweichung findet sich in den Abbildungen 32 und 33. Dort sind die Regelabweichungen im Verlauf der gesamten Kultivierung mit einer Regeldauer von 13,2 Stunden in g L^{-1} und in Prozent dargestellt. Die Anregelzeit war mit 18 Minuten genauso groß wie bei der zuvor diskutierten Kultivierung *fb1*. Die berechneten mittleren Regelabweichungen beziehen sich auf den Zeitraum ab dem Ende der Anregelzeit zum Zeitpunkt $t = 21,9 \text{ h}$. Die mittlere Regelabweichung $\bar{x}_w(t)$ ist mit $0,002 \text{ g L}^{-1}$ bzw. 2,5 % ausgesprochen niedrig. Die Standardabweichung $\sigma_{\bar{x}_w}(t)$ beträgt $0,003 \text{ g L}^{-1}$ bzw. 3,9 % und ist gleichfalls sehr klein. Die minimale auftretende Regelabweichung ist kleiner als $0,001 \text{ g L}^{-1}$, der Maximalwert beträgt $0,029 \text{ g L}^{-1}$ mit Ausreißern bzw. $0,010 \text{ g L}^{-1}$ ohne Ausreißer. Werden Messwerte außerhalb des Intervalls $S_{meas} = \bar{S}_{meas} \pm 2 \cdot \sigma_{S_{meas}}$ als Ausreißer gewertet, beträgt die mittlere Regelabweichung $\bar{x}_w(t) = 0,001 \text{ g L}^{-1}$ bzw. 2,1 %. Die Werte der Standardabweichung sinken dann auf $\sigma_{\bar{x}_w}(t) = 0,001 \text{ g L}^{-1}$ bzw. 1,6 %. Das Überschwingen zum Zeitpunkt des Beginns der Regelung ist bei den ersten zwei Messwerten mit einem Maximum von 41 %, entsprechend $0,029 \text{ g L}^{-1}$, sehr ausgeprägt. Die Überschwingweite verringert sich aber sehr schnell, und die Regelabweichung sinkt auf Werte unter 5 % bzw. $0,07 \text{ g L}^{-1}$. Während der ersten Hälfte der Regelphase treten Unterschreitungen des Sollwertes häufiger auf als Überschreitungen, in der zweiten Hälfte kehren sich die Verhältnisse um. Die Regelabweichung weist während des gesamten Verlaufes praktisch die gleiche Größenordnung auf. Signifikante Ausreißer oder Störungen sind abgesehen von den im Rahmen der Diskussion des Verlaufs der Glucosekonzentration erwähnten nicht vorhanden. Diese kurzfristig erhöhten Werte resultieren aus dem kurzzeitigen nicht limitierten Wachstum nach der Akkumulation von Stickstoff in der Kulturbrühe. Die Mehrzahl der Regelabweichungen ist kleiner als 3 %. Dies ist im Bereich der Messgenauigkeit des FIA-Systems.

Der Sollwert konnte über 13,2 Stunden mit minimalen Regelabweichungen konstant gehalten werden. Das Regelsystem war in der Lage, auf die aufgetretenen Änderungen der Prozessdynamik zu reagieren. Während der Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit verändert sich die Regelabweichung nicht. Die kurzzeitigen Dynamikänderungen während der Limitierung führen zwar zu einer Erhöhung der Regelabweichung, werden vom Regelsystem aber sehr schnell korrigiert. Dieses Verhalten bestätigt erneut das Potential des Regelsystems. Es kann, wie zuvor im Rahmen der Diskussion der Kultivierung *fb1* erläutert, einen Ausfall des Messsystems kompensieren und wie hier gezeigt auf Änderungen der Dynamik entsprechend reagieren.

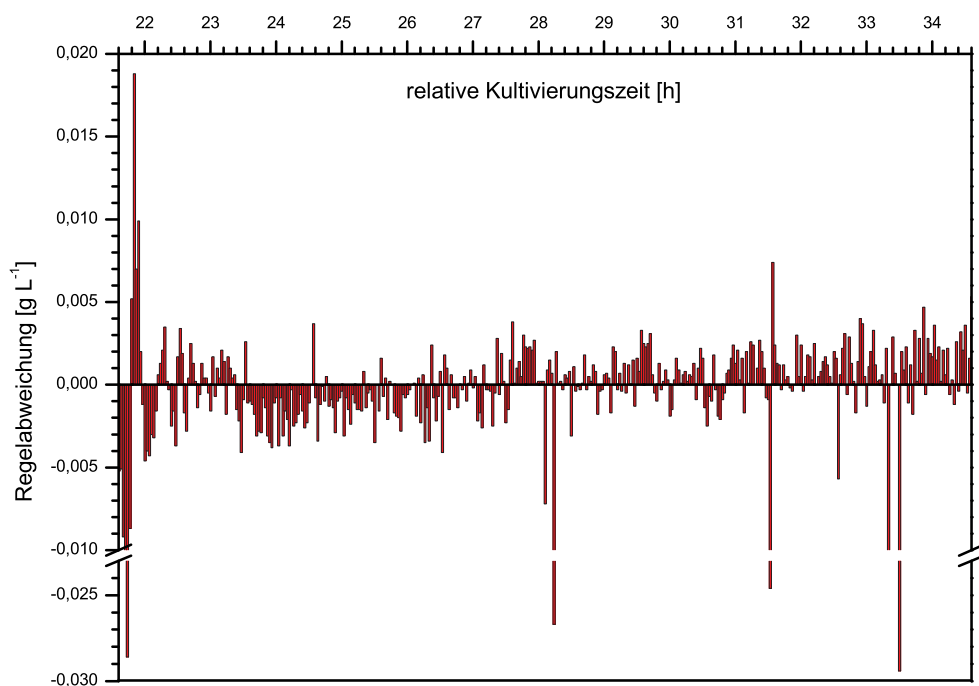


Abbildung 32: Verlauf der Regelabweichung in $g L^{-1}$ im Verlauf der Kultivierung fb2

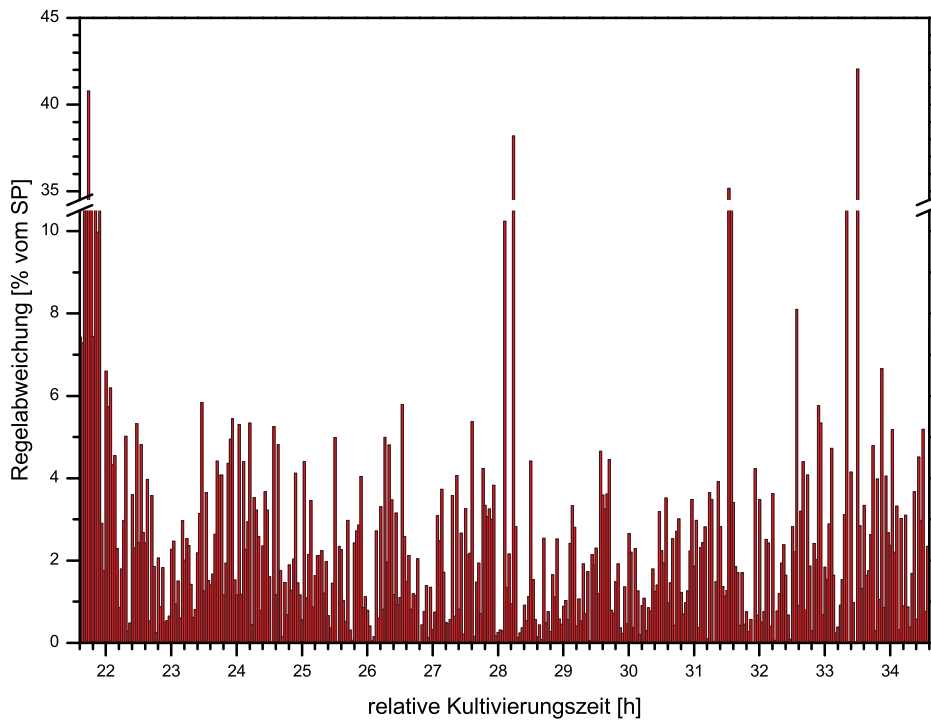


Abbildung 33: Grafische Darstellung der Regelabweichung in Prozent im Verlauf der Kultivierung fb2

In Abbildung 34 auf der nächsten Seite sind die Mess- und die Schätzwerte der Biotrockenmassekonzentration dargestellt. Die Übereinstimmung der Werte ist suboptimal. Lediglich der Startwert zeigt eine befriedigende Übereinstimmung von Mess- und Schätzwerten. Die steigende Tendenz ist zwar in beiden Verläufen gleich, jedoch wird der Offset zwischen Mess- und Schätzwerten mit fortschreitender Dauer der Kultivierung größer. Zudem streuen die Werte unsystematisch. Dies sind eindeutige Hinweise auf Fehler bei der Offline-Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration. Die Biotrockenmassekonzentration betrug $7,2 \text{ g L}^{-1}$ bzw. $12,5 \text{ g}$ bei Start der Regelung. Bis zum Zeitpunkt der letzten Offline-Probenahme zum Zeitpunkt $t = 33,1 \text{ h}$ stieg die BTM auf auf $22,6 \text{ g L}^{-1}$. Dies entspricht einer Masse von $30,3 \text{ g}$. Unter Berücksichtigung der entnommenen Biomasse der Offline-Proben wurden $20,6 \text{ g}$ Biomasse erzeugt. Auf die Ermittlung des Ausbeutekoeffizienten wurde auf Grund der fehlerbehafteten Biotrockenmassebestimmung verzichtet.

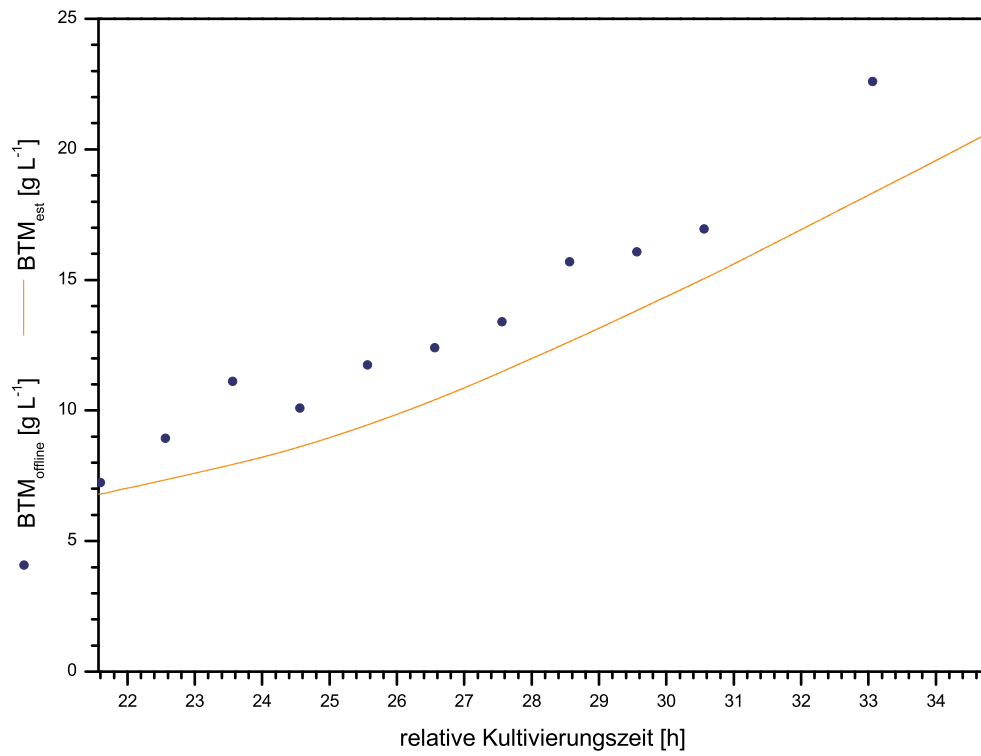


Abbildung 34: Darstellung der Messwerte und der Schätzwerte der Biotrockenmassekonzentration während der Kultivierung fb2

4.2.3 Die Kultivierung fb3

Zum Abschluss wird die Kultivierung fb3 diskutiert, deren Verlauf praktisch störungsfrei war. Als Sollwert der Glucosekonzentration wurde $0,07 \text{ g L}^{-1}$ gewählt. Die Glucosekonzentration in der Feed-Lösung betrug 100 g L^{-1} . Für die Zeitverzögerung wurde bei einem Volumenstrom der Probenahme von $0,039 \text{ L h}^{-1}$ ein Wert von $0,122 \text{ h}$ bestimmt.

In Abbildung 35 auf der nächsten Seite sind sowohl die Schätzwerte als auch die Online-Messwerte der Glucosekonzentration dargestellt. Über den gesamten Zeitraum der Kultivierung zeigten sich keine signifikanten Abweichungen vom vorgegebenen Sollwert. Lediglich zu den Zeiten $t = 27,5 \text{ h}$, $t = 31,5 \text{ h}$ und $t = 34,9 \text{ h}$ treten kurzfristig etwas stärkere Abweichungen zwischen den Schätz- und Messwerten sowie dem Sollwert auf. Der Messwert zum Zeitpunkt $t = 31,3 \text{ h}$ ist als Ausreißer zu werten. Unmittelbar nach dem Beginn der Zufütterung schwingen Schätz- und Messwerte kurzfristig über, wobei das Überschwingen der Schätzwerte ausgeprägter ist. Die Annäherung der Glucosemess- und Schätzwerte an den Sollwert erfolgt auch hier wieder sehr zeitnah zum Beginn der Regelphase.

Der Mittelwert der Glucosemesswerte betrug $0,070 \text{ g L}^{-1}$ bei einer Standardabweichung von $0,005 \text{ g L}^{-1}$. Die Standardabweichung ist somit deutlich kleiner als der für diese FIA typische Wert von 10% . Der Fehler der Messung war mit $4,6 \%$ sehr klein, dies entspricht einem absoluten Fehler von lediglich $0,003 \text{ g L}^{-1}$. Die maximale Differenz zwischen Soll- und Messwert weist eine Größe von $0,015 \text{ g L}^{-1}$ auf. Das Regelsystem konnte also auch im Rahmen dieser Kultivierung erfolgreich eingesetzt werden. Eine detaillierte Darstellung der Regelabweichung findet sich in den Abbildungen 41 und 42.

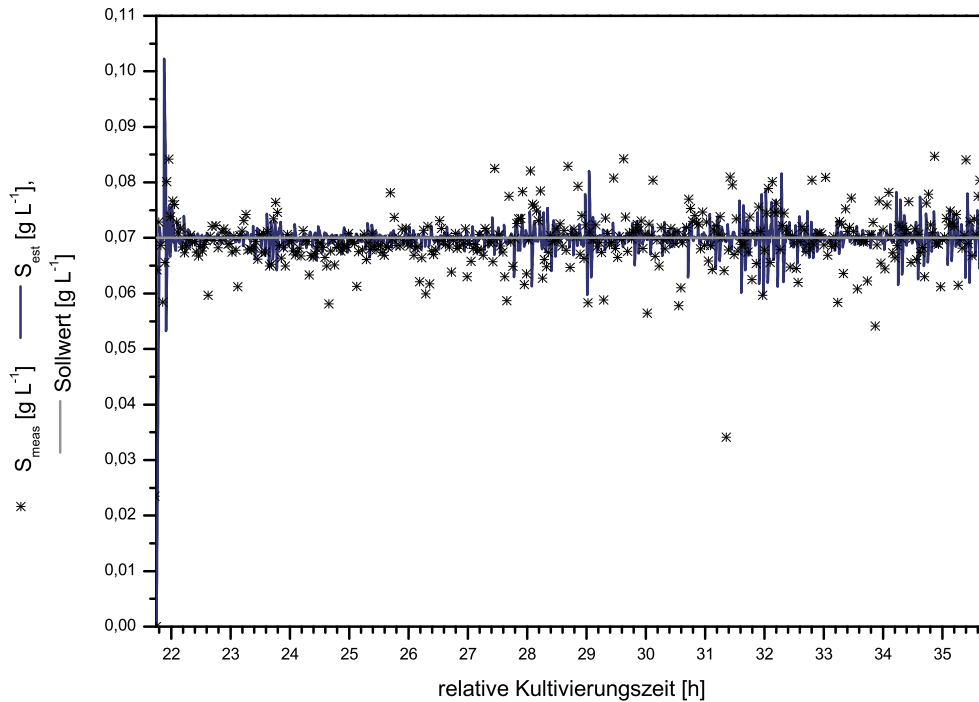


Abbildung 35: Auftragung des Sollwertes, der Mess- und der Schätzwerte der Glucosekonzentration während der Regelphase der Kultivierung fb3

Abbildung 36 auf der nächsten Seite illustriert den Verlauf der CO_2 -Konzentration in der Abluft und die relative Fluoreszenzintensität von NADH im Zusammenhang mit der Glucose- und der Ethanolkonzentration. Zu Beginn der Kultivierung ist der Verlauf der Fluoreszenzintensität sehr unruhig. Der Zeitraum entspricht genau dem Bereich, der in Abbildung 37 auf Seite 87 mit „Anfahrphase“ bezeichnet ist, also dem Zeitraum, bis zu dessen Ende die Zellen einen stabilen Stoffwechselzustand erreicht haben. Ab $t = 23,8$ h wird die Streuung geringer. Die nun erfolgende Zunahme der Fluoreszenzintensität ist auf die steigende Biomassekonzentration zurückzuführen. Beginnend ab dem Zeitpunkt $t = 30,9$ h wird der Verlauf wieder unruhiger, dies könnte eine Auswirkung der kurzzeitigen minimalen Ethanolbildung zum Zeitpunkt $t = 27,9$ h sein. Im weiteren Verlauf ist der oxidoreduktive Stoffwechsel zwischen $t = 32,1$ h und $t = 32,4$ h verantwortlich für die Form der Kurve. Ab $t = 32,4$ h treten immer mehr Spikes auf, die auf das Schwanken zwischen oxidativem und oxidoreduktivem Stoffwechsel zurückzuführen sind. Die Ursachen für die starke Abnahme der Intensität bei $t = 31,2$ h und $t = 34,0$ h sind unklar. Die instantanen Änderungen der Steigung zu den Zeitpunkten $t = 23,8$ h, $t = 27,9$ h und $t = 32,0$ h deuten auf eine Veränderung im Stoffwechsel hin. Zu diesen Zeiten weist auch die CO_2 -Kurve Peaks auf. Diese Hinweise auf Ethanolproduktion werden durch die

Offline-Messungen der Ethanolkonzentration zu den Zeitpunkten $t = 23,8$ h, $t = 28,8$ h und $t = 33,8$ h bestätigt. Da die Phasen der Ethanolproduktion nur sehr kurz waren, erfolgt dessen Bildung nur in sehr geringem Umfang (Maximalwert $0,030 \text{ g L}^{-1}$). Die zum Zeitpunkt $t = 33,8$ h gemessene Ethanolkonzentration ist kleiner als $0,010 \text{ g L}^{-1}$ und resultiert aus der erhöhten Glucosekonzentration zum Zeitpunkt $t = 33,4$ h. Für den CO_2 -Peak zum Zeitpunkt $t = 35,2$ h findet sich kein entsprechender Wert der Ethanolkonzentration. Das Auftreten der geringen Menge Ethanol zum Zeitpunkt $t = 22,8$ h resultiert aus dem Überspringen während des Anfahrens. Im Verlauf der Kultivierung trat folglich keine signifikante Ethanolproduktion auf.

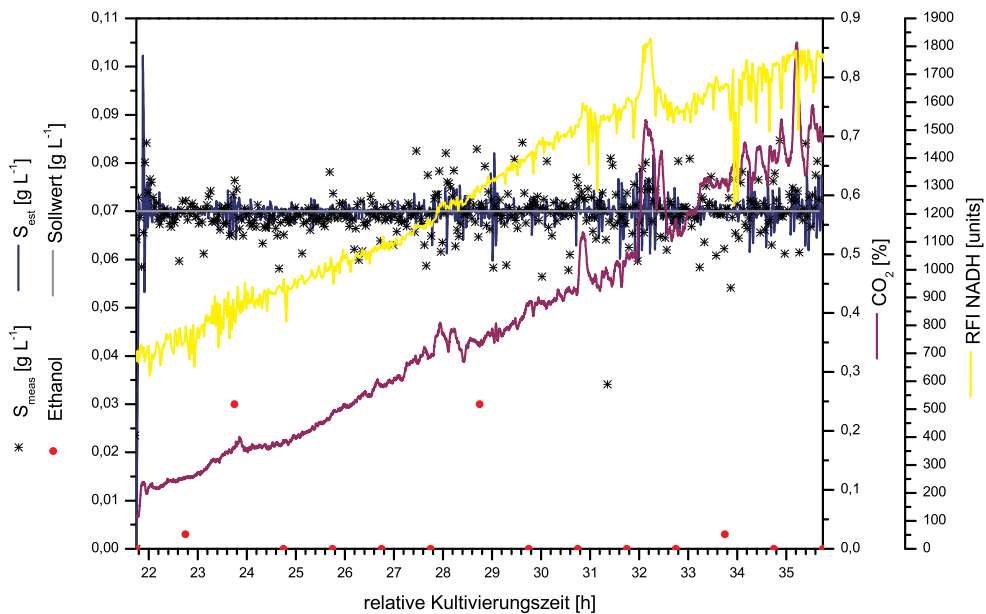


Abbildung 36: Grafische Darstellung der Fluoreszenzintensität, der Glucose-, CO_2 - und Ethanolkonzentrationen im Verlauf der Kultivierung fb3

In Abbildung 37 auf der nächsten Seite sind die Ergebnisse einer, mit den während der Kultivierung aufgenommenen Fluoreszenzspektren durchgeführten Hauptkomponentenanalyse als Score-Plot dargestellt. Es sind deutlich vier differenzierbare Bereiche erkennbar, und zwar die Anfahrphase im Zeitraum von $t = 21,8$ h bis $t = 23,8$ h, der Zeitraum rein oxidativen Wachstums zwischen $t = 23,8$ h und $t = 32,1$ h, der kurzfristige oxidoreduktive Stoffwechsel ($t = 32,1$ h – $32,4$ h) während der geringfügig erhöhten Glucosekonzentration im Zeitraum um $t = 32,0$ h und der mit „oxidativer und oxidoreduktiver Stoffwechsel“ gekennzeichnete Bereich von $t = 32,4$ h bis $t = 35,8$ h. Zur Abgrenzung der beiden zuletzt genannten Bereiche voneinander wurde Wissen aus dem Prozess herangezogen, um die Grenze zwischen ihnen genauer festlegen zu können. In

diesem führen schon sehr geringe Schwankungen der Glucosekonzentration zu einer Umstellung des Stoffwechsels von oxidativ auf oxidoreduktiv und umgekehrt. Offensichtlich ist unter den herrschenden Bedingungen gerade der kritische Wert der Glucoseaufnahme, ab welchem eine Stoffwechselumstellung erfolgt, erreicht. Die im Score-Plot differenzierbaren Bereiche stimmen sehr gut mit den zuvor in Zusammenhang mit Abbildung 36 auf der vorherigen Seite diskutierten Verläufen der CO_2 - und Ethanolkonzentration sowie der Fluoreszenzintensität des NADH überein. Die dort diskutierten Fakten werden im Score-Plot bestätigt und treten noch deutlicher hervor. Die horizontale Veränderung im Score-Plot ist durch den Biomassezuwachs bedingt.

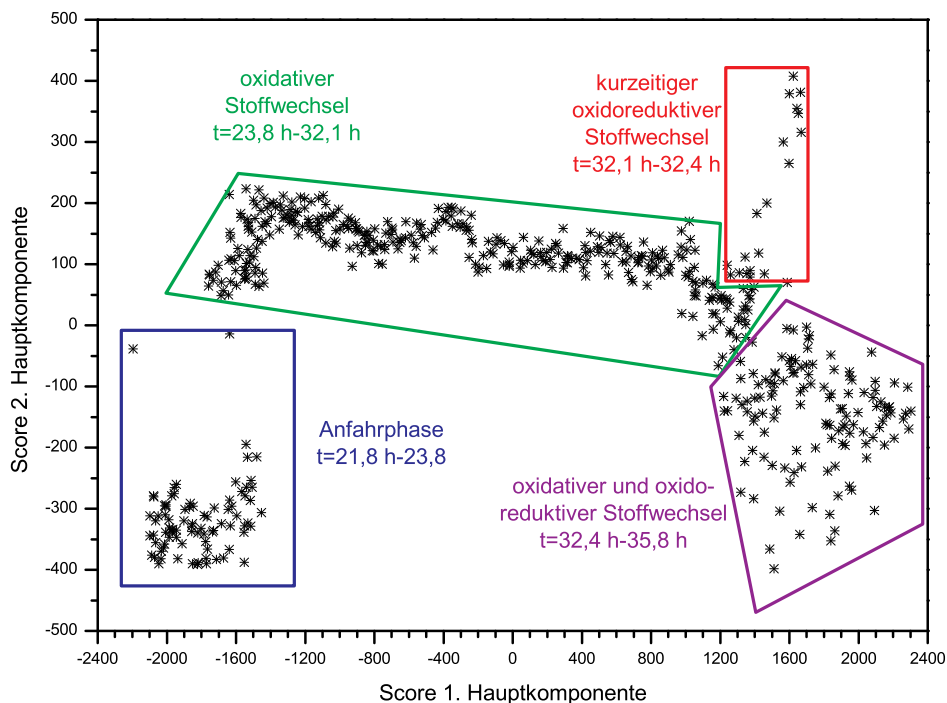


Abbildung 37: Auftragung des Scores der zweiten gegen den Score der ersten der Hauptkomponente der während der Kultivierung fb3 aufgezeichneten Fluoreszenzspektren

Die O_2 - und die CO_2 -Konzentration in der Abluft sind wichtige Kriterien zur Beurteilung einer Kultivierung, da sie als Indikatoren für die Stabilität des Zustandes, des Wachstums und auch des Stoffwechsels dienen. In Abbildung 38 auf der nächsten Seite sind ihre Verläufe zusammen mit der Glucosekonzentration wiedergegeben. Der Gang der CO_2 -Kurve wurde oben schon bezüglich ihres Verhaltens beim Vorliegen der etwas erhöhten Regelabweichungen diskutiert. Insgesamt ist ihr Verlauf erwartungsgemäß, und die

CO₂-Konzentration steigt mit fortschreitender Kultivierungsdauer kontinuierlich an. Die O₂-Konzentration sinkt stetig und zeigt somit die erwartete Tendenz. Die auftretenden Peaks korrespondieren mit denen der CO₂-Konzentration.

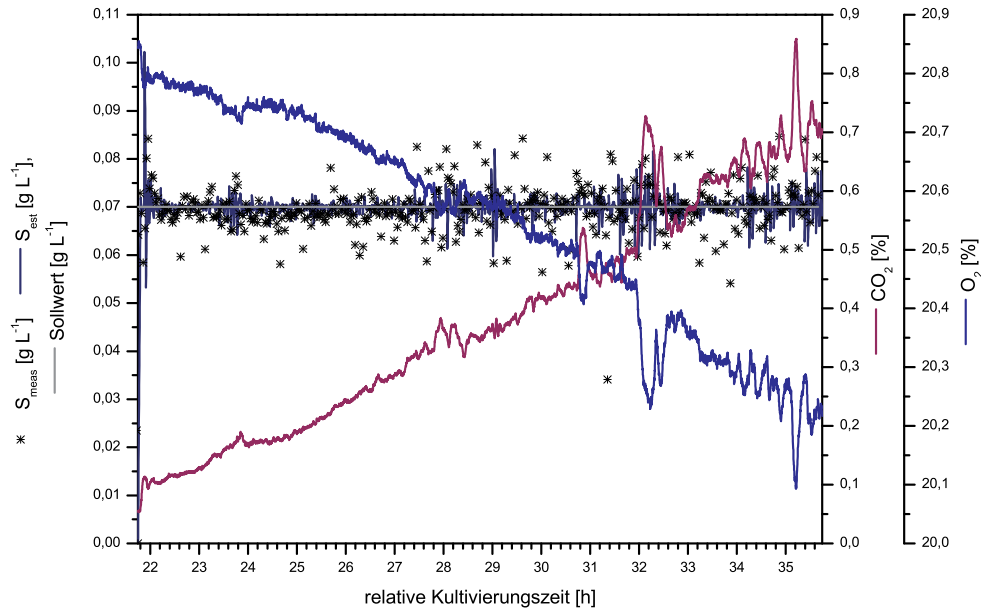


Abbildung 38: Auftragung des Verlaufs der Glucosekonzentration und der Abluftzusammensetzung während der Kultivierung fb3

Auf eine grafische Darstellung der spezifischen Kohlendioxidproduktionsrate und der spezifischen Sauerstoffaufnahme wird verzichtet, da keine Besonderheiten auftraten. Der Mittelwert der spezifischen Kohlendioxidproduktionsrate betrug $1,7 \text{ h}^{-1} \text{ L}^{-1}$, der der spezifischen Sauerstoffaufnahme $1,5 \text{ h}^{-1} \text{ L}^{-1}$.

In Abbildung 39 auf der nächsten Seite sind die Feed-Rate, die spezifische Wachstums-, spezifische Glucoseaufnahme- und die maximale Wachstumsrate dargestellt. Die maximale Wachstumsrate wird vom EKF geschätzt und den momentanen Kultivierungsbedingungen angepasst. μ_{max} zeigt am Beginn der Kultivierung einen deutlichen Sprung und geht dann in einen konstanten Anstieg über. Ab $t = 27,8 \text{ h}$ wird ein praktisch konstanter Wert erreicht. Die auftretenden kleineren Störungen stimmen zeitlich mit lokalen Spitzen der Feed-Rate überein. Die Feed-Rate zeigt unmittelbar nach dem Start der Zufütterung ein Überschwingen. Ab $t = 22,0 \text{ h}$ steigt die Feed-Rate korrespondierend zum Biomassezuwachs an. Die kleineren Unstetigkeiten im weiteren Verlauf sind Ursache für die weiter oben diskutierten geringfügig erhöhten Regelabweichungen, die sich auch in den Kurven der anderen hier dargestellten Größen zeigen. Erkennbar ist die Diskretisierung der Feed-Rate bedingt durch die Bauart der Pumpen. Bei genauerer Betrachtung erkennt man ein

permanentes minimales Schwanken der Feed-Rate um einen Mittelwert herum.

Auffällig ist das Verhalten der spezifischen Glucoseaufnahme, der spezifischen sowie der maximalen Wachstumsrate und der Feed-Rate während der ersten Phase der Fedbatch-Kultivierung. Die genannten Größen zeigen anfangs ein Überschwingen. q_s , $\dot{V}(t)_{feed}$ und μ_{max} bleiben bis $t = 23,8$ h praktisch konstant, während μ zu diesem Zeitpunkt die Steigung ändert. Dies entspricht genau dem im Score-Plot erkennbaren Zeitraum der Anfahrphase. Ab $t = 27,9$ h beginnt der Wert der spezifischen Wachstumsrate langsam und stetig zu sinken, obwohl die spezifische Glucoseaufnahme und die maximale Wachstumsrate annähernd konstant sind. Dies ist ein Hinweis auf einen erhöhten Glucosebedarf der Zellen für ihren Erhaltungsstoffwechsel. Das EKF kann modellbedingt den erhöhten Glucosebedarf nicht als erhöhte Maintenance erkennen.

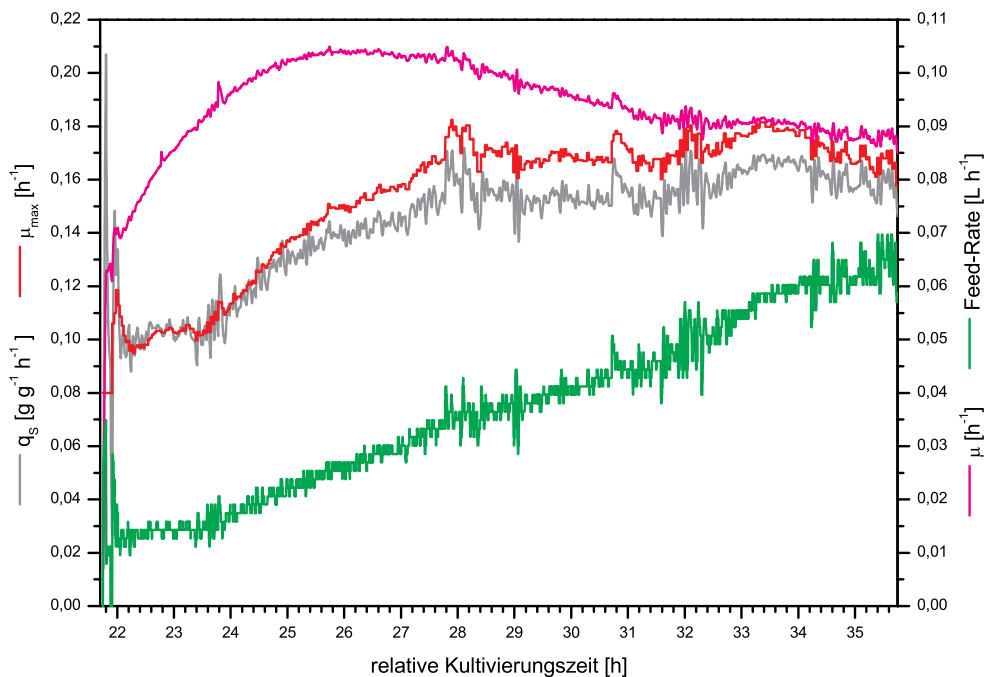


Abbildung 39: Verlauf der Feed-Rate, der spezifischen Glucoseaufnahme, der maximalen und der spezifischen Wachstumsrate der Kultivierung fb3

Die BTM zu Beginn der Fedbatch-Phase betrug $7,3 \text{ g L}^{-1}$ (entsprechend $12,8 \text{ g}$), am Ende der Kultivierung $25,4 \text{ g L}^{-1}$ (entsprechend $41,1 \text{ g}$). Im Verlauf der Kultivierung wurden 33 g Biomasse, unter Berücksichtigung der Biomasse der Offline-Proben, erzeugt. Dies entspricht einer guten Verdreifachung der ursprünglichen Masse. Der Wert des Ausbeutekoeffizienten betrug $Y_{XS} = 0,67 \text{ g g}^{-1}$. Da der Ausbeutekoeffizient ungewöhnlich hoch erschien, wurde er durch die im Abschnitt 4.2.3.1 auf Seite 93 beschriebene Simulation ve-

rifiziert. Die in Abbildung 40 dargestellten BTM-Schätzwerte und die offline gemessenen Werte zeigen keine gute Übereinstimmung. Die Ursachen liegen neben der um $0,5 \text{ g L}^{-1}$ zu niedrig eingeschätzten Startbiomasse in dem unerwartet hohen Ausbeutekoeffizienten. Die Tendenz ist bei den Mess- und den Schätzwerten jedoch synchron, der Offset zwischen beiden Kurven vergrößert sich bis zum Zeitpunkt $t = 30,8 \text{ h}$, danach verringert er sich. Als Ursachen für dieses Verhalten kommen der Zellstress und erhöhte Maintenance in Betracht, die sich auf den Ausbeutekoeffizienten auswirken. Zudem ist ab $t = 30,8 \text{ h}$ der Stoffwechselzustand der Zellen, wie den Abbildungen 36 und 37 zu entnehmen ist, metastabil.

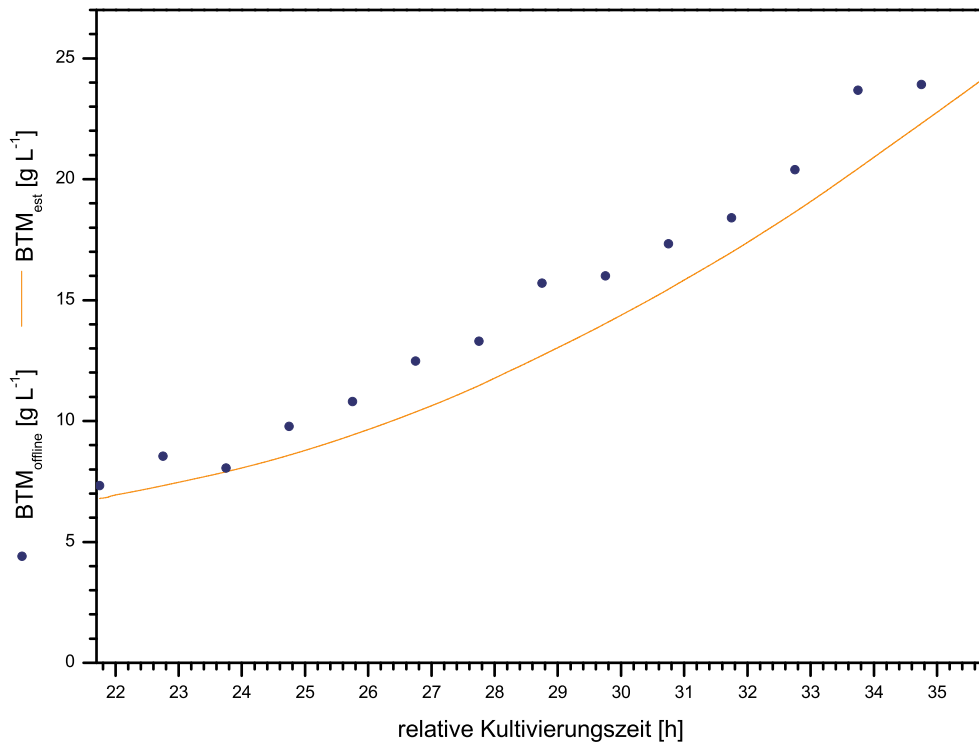


Abbildung 40: Darstellung der Messwerte und der Schätzwerte der Biotrockenmassekonzentration im Verlauf der Kultivierung fb3

In Abbildung 41 und Abbildung 42 auf Seite 92 sind die Regelabweichungen im Verlauf der Kultivierung in g L^{-1} und in Prozent dargestellt. Die Regelabweichung wurde ab Ende der Anregelzeit zum Zeitpunkt $t = 21,8 \text{ h}$ berechnet. Die Anregelzeit ist mit ca. 2,5 Minuten sehr kurz. Die mittlere Regelabweichung $\bar{x}_w(t)$ beträgt $0,003 \text{ g L}^{-1}$ bzw. 4,6 %. Die Standardabweichung $\sigma_{\bar{x}_w(t)}$ ist mit Werten von $0,004 \text{ g L}^{-1}$ bzw. 5,1 % gleichfalls sehr niedrig. Die minimale auftretende Regelabweichung ist kleiner als $0,001 \text{ g L}^{-1}$, der Maximalwert betrug $0,015 \text{ g L}^{-1}$. Betrachtet man die Messwerte, die außerhalb des Intervalls

$S_{meas} = \bar{S}_{meas} \pm 2 \cdot \sigma_{S_{meas}}$ liegen, als Ausreißer oder Fehlmessungen ist die Regelabweichung nur 3,8 % groß. Die Standardabweichung beträgt $\sigma_{\bar{x}_w(t)} = 0,002 \text{ g L}^{-1}$ bzw. 3,1 %.

Das Überschwingen während der Anfahrphase ist mit einer Höhe von $0,014 \text{ g L}^{-1}$ bzw. 20,3 % zwar auffällig, aber nicht übermäßig stark ausgeprägt. Zu Beginn der Zufütterungsphase sind Unterschreitungen des Sollwertes häufiger als Überschreitungen, dennoch tritt während der Kultivierung keine systematische Unter- noch Überschreitung des Sollwertes auf. Gegen Ende der Kultivierung ist eine leichte Zunahme der Größe der Regelabweichung zu beobachten, der Verlauf wird etwas unruhiger. Ursache sind die Änderungen des Stoffwechselzustandes, die vom EKF nicht erkannt werden können. Die Größe der Regelabweichungen und ihr Vorzeichen wechseln im Verlauf der Kultivierung, signifikante Ausreißer oder Störungen sind nicht vorhanden. Die meisten Werte der Regelabweichung liegen unterhalb von 5 % und somit im Bereich der Messgenauigkeit des Analysensystems. Der Sollwert konnte über 14 Stunden mit sehr kleinen Regelabweichungen konstant gehalten werden. Dies bestätigt erneut die Fähigkeiten des Regelsystems.

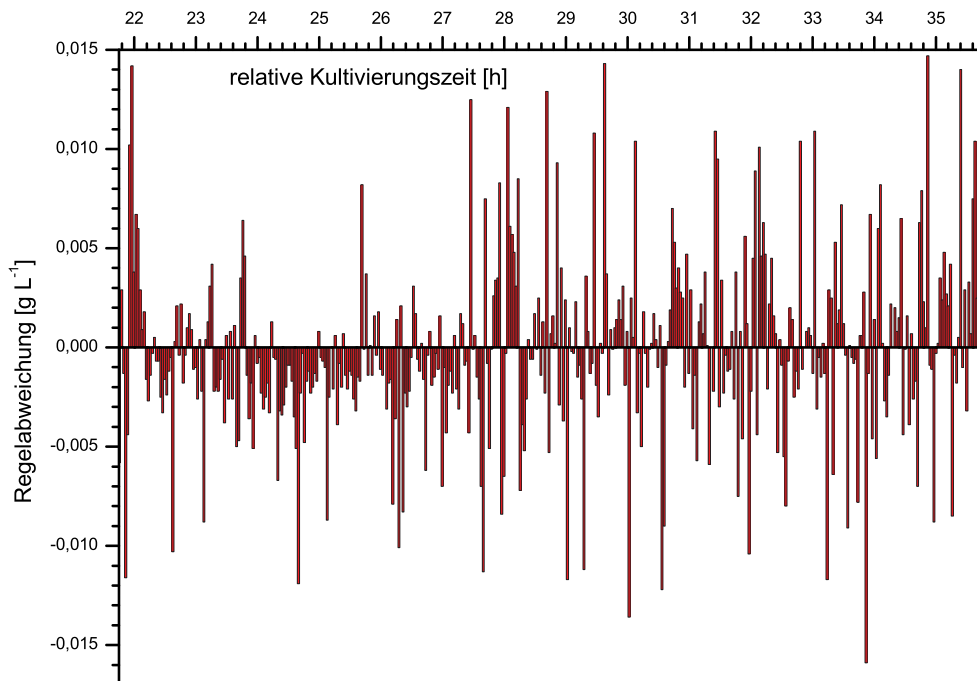


Abbildung 41: Verlauf der Regelabweichung in g L^{-1} während der Kultivierung fb3

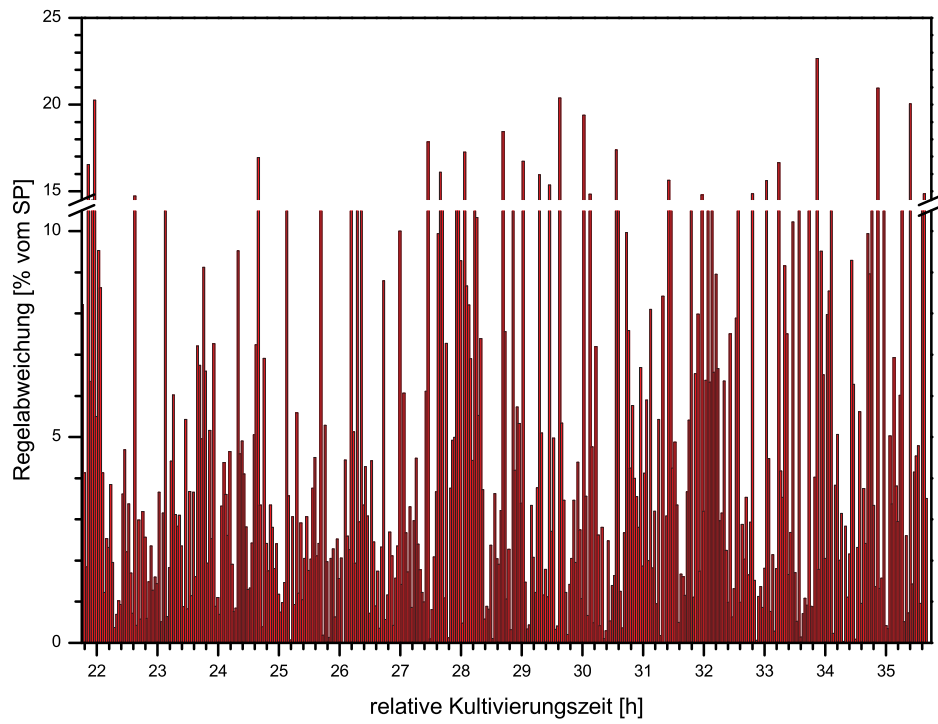


Abbildung 42: Grafische Darstellung der Regelabweichung in Prozent im Verlauf der Kultivierung fb3

4.2.3.1 Verifikation des Ausbeutekoeffizienten durch Simulation

Da der experimentell bestimmte Ausbeutekoeffizient ungewöhnlich hoch erschien, wurde er durch Simulation verifiziert. Die Vorgehensweise und Ergebnisse werden in diesem Abschnitt beschrieben. In der Simulation diente das aus den Gleichungen 53 bis 55 gebildete Differentialgleichungssystem als Prozessmodell.

$$\frac{dX(t)}{dt} = \mu_{sim}X(t) - \dot{V}(t)_{feed} \cdot \frac{X(t)}{V(t)} + \dot{V}_{Probe} \cdot \frac{X(t)}{V(t)} \quad (53)$$

$$\frac{dS(t)}{dt} = -\mu_{sim} \cdot \frac{X(t)}{Y_{X/S}} + \dot{V}(t)_{feed} \cdot \frac{S_0 - S(t)}{V(t)} - mX(t) \quad (54)$$

$$\frac{dV(t)}{dt} = \dot{V}(t)_{feed} - \dot{V}_{Probe} - V_{offl} \quad (55)$$

Als experimentell ermittelte Eingangsgrößen dienten die stündlich ermittelte Biotrockenmassekonzentration, die Glucosemesswerte des FIA-Systems, die Feed-Rate und das Volumen der Kulturbrühe im Reaktor zu Beginn der Regelphase. Der Maintenance-Koeffizient von $m = 0,0114 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ wurde der Literatur entnommen [25]. Die Simulation erfolgte durch lösen des og. Differentialgleichungssystems über den Zeitraum der Regelphase. Der Algorithmus nähert μ durch 28 Geradengleichungen stückweise an. Alle 30 Minuten werden die Steigung und das absolute Glied neu berechnet. Als freie Parameter stehen dem System neben dem gesuchten Ausbeutekoeffizienten die Parameter der Geradengleichungen zur Verfügung. Als Abbruchkriterium diente die Summe der Fehlerquadratsummen der BTM und der Glucosekonzentration, die minimal werden sollte. Der durch Simulation, also mit dem Modell angepasste, Ausbeutekoeffizient besitzt einen Wert von $Y_{X/S} = 0,65 \text{ g g}^{-1}$. Dies steht in sehr guter Übereinstimmung mit gemäß Gleichung 51 aus der gebildeten Biomasse und der benötigten Masse Glucose ermittelten Wert von $Y_{X/S} = 0,67 \text{ g g}^{-1}$. Der ungewöhnlich hohe experimentell bestimmte Werte wurde in der Simulation bestätigt.

Die Ergebnisse der Simulation sind in den Abbildungen 43 und 44 dargestellt. Die Differenzen zwischen den simulierten und den gemessenen Konzentrationen sind nicht signifikant. Sowohl die Werte der Glucosekonzentration als auch die der BTM zeigen einen analogen Verlauf. Während der Simulationen zeigte sich, dass die Werte der simulierten Glucosekonzentration sehr sensitiv auf die Veränderung der Parameter reagierten. Dies ist als Ursache für den unruhigen Verlauf dieser Kurve zu sehen. Die Abweichung zwischen gemessener und simulierter Glucosekonzentration liegt im Mittel bei $0,007 \text{ g L}^{-1}$. Die Übereinstimmung der simulierten mit den gemessenen Konzentrationen ist somit als gut anzusehen. Das Überschwingen der Glucosekonzentration in der Simulation hat seine Ursache in der Unstetigkeit der Zustandsvariablen zu Beginn der Regelphase.

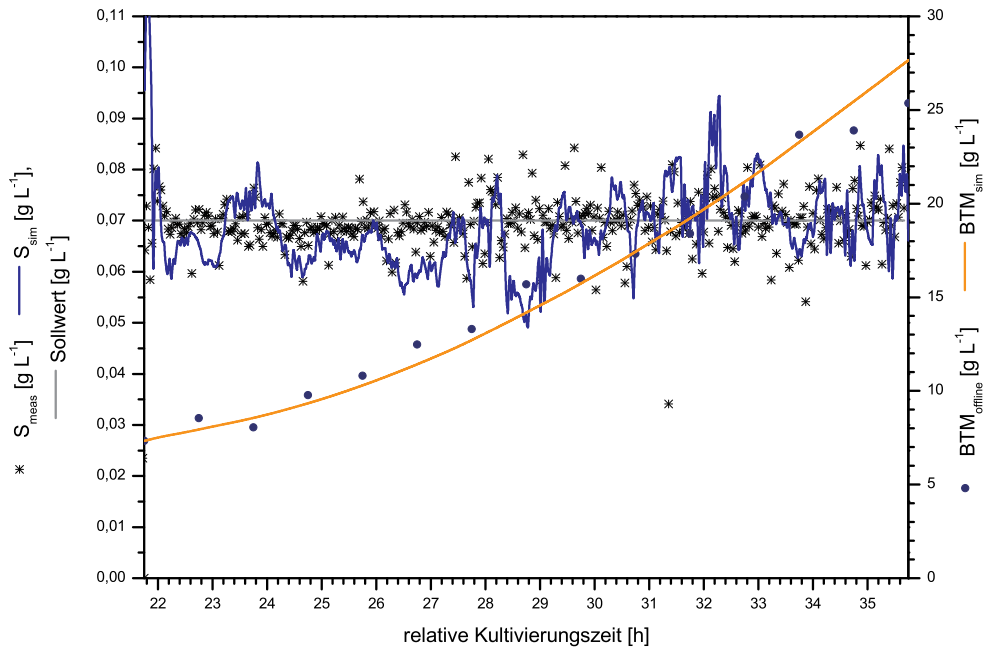


Abbildung 43: Vergleich der simulierten Biotrockenmasse- und Glucosekonzentration mit den entsprechenden Messwerten.

In Abbildung 44 sind die mit dem Modell angepassten Verläufe der spezifischen Glucoseaufnahme- und der spezifischen Wachstumsrate dargestellt. Die Tendenzen im Verlauf der Kurve sowie die Größenordnung der durch Simulation bestimmten und der unmittelbar aus den experimentellen Daten berechneten spezifischen Glucoseaufnahme- und Wachstumsraten differieren bis zum Zeitpunkt $t = 23,4 \text{ h}$ deutlich, die Größenordnung ist jedoch auch hier gleich. Die Ursache für diese Abweichungen liegt in dem oben genannten Algorithmus zur Näherung von μ .

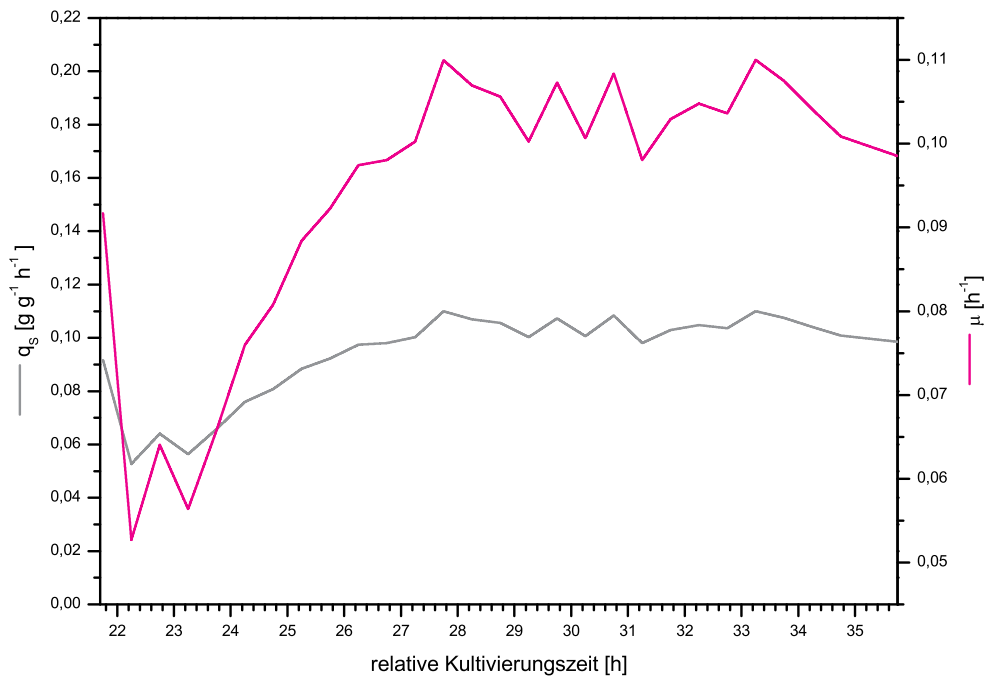


Abbildung 44: Vergleich der simulierten Biotrockenmasse- und Glucosekonzentration mit den entsprechenden Messwerten.

4.2.4 Vergleichende Betrachtung und Schlussfolgerungen

Anhand der diskutierten Kultivierungen konnte gezeigt werden, dass mit dem entwickelten Regelsystem hohe Regelgüten, lange Regeldauern und hohe Ausbeuten realisierbar sind. Ein Vergleich der Ausbeutekoeffizienten von Kultivierungen mit unterschiedlichen Sollwerten zeigt neben der Abhängigkeit des Ausbeutekoeffizienten von der Glucosekonzentration, dass Ausbeuten bis zu $Y_{XS} = 0,67 \text{ g g}^{-1}$ erzielt werden können. Die verwendete FIA weist ein geringes Messrauschen, geringe Störanfälligkeit und eine hohe Empfindlichkeit auf. Die durch die Verwendung eines gleichzeitig als Sterilbarriere wirkenden Probenahmemoduls verursachte Verzögerungszeit wird durch das eingesetzte kontinuierlich-diskrete erweiterte Kalman-Filter kompensiert. Verschiedene für Kultivierungen typische Komplikationen, wie eine Limitierung oder der temporäre Ausfall des Analysensystems, haben keinen signifikanten Einfluss auf die Regelgüte. Die Vorteile und Möglichkeiten des Systems werden durch seine Komplexität erkauft, die einen industriellen Einsatz verhindert.

Die von Arndt [2] und Kollecker [49] entwickelten Regelsysteme sind im Vergleich deutlich weniger komplex und erfordern einen geringeren experimentellen Aufwand.

Das von Arndt [2] entwickelte System der sog. „Schnellen Glucose-FIA“ verzichtet auf den Einsatz eines Probenahmemoduls, um die Verzögerungszeit zu vermeiden. Prinzipbedingt kann bei dieser Vorgehensweise kein Festkörperreaktor genutzt werden, da er durch die Zellen sehr schnell verstopft werden würde. Daher wird über einen zweiten Injektor eine definierte Menge GOD-Lösung in den Trägerstrom injiziert. Dies führt zu einer erhöhten Störanfälligkeit und einem deutlich stärkeren Messrauschen. Weiterhin wird eine Scheinglucosekonzentration durch den Sauerstoffverbrauch der Zellen auf dem Weg vom Reaktor zum Detektor hervorgerufen. Dies muss durch Blindmessungen und Differenzbildung berücksichtigt werden und hat negativen Einfluss auf die Genauigkeit der Messungen. Weitere nicht unerhebliche Störquellen sind die Segmentierung der Fluidströme und die Gefahr von Verstopfungen des Fließsystems. Bedingt durch das Freisetzen von Zellen kann dieses System nicht für gentechnisch modifizierte Mikroorganismen eingesetzt werden.

Der von Kollecker [49] verfolgte Ansatz der Regelung mit Hilfe der 2D-Fluoreszenz setzt eine sehr robuste, für den industriellen Einsatz geeignete Analytik ein. Es sind gleichfalls hohe Ausbeuten unter Vermeidung der Produktion unerwünschter Nebenprodukte möglich. Entscheidender Nachteil dieses Systems ist, dass prinzipbedingt die Vorgabe eines konkreten Sollwertes nicht möglich ist.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es, ein Regelsystem für die nutristatische Prozessführung von Bioprocessen zu entwickeln. Als Modellorganismus diente *Saccharomyces cerevisiae*. Mittels des Regelsystems sollte die Glucosekonzentration bei Fedbatch-Kultivierungen geregelt werden. Die Messung der Glucosekonzentration erfolgte mit einem handelsüblichen FIA-System, dem ein zellfreier Probestrom durch die Verwendung eines Probenahmemoduls zu Verfügung gestellt wurde. Die durch das Probenahmemodul bedingte Verzögerungszeit konnte erfolgreich durch das eingesetzte kontinuierlich-diskrete erweiterte Kalman-Filter kompensiert werden. Der Mechanismus zur Kompensation der Zeitverzögerung basiert auf der Speicherung der Zustandsvariablen, der Glucosemesswerte und der Parameter des EKF und deren Neuberechnung und Aktualisierung beim Eintreffen eines neuen Messwertes, der dann seiner korrekten historischen Zeit zugeordnet wird. Das EKF nutzt zur Simulation des Bioprozesses die Monod-Kinetik und das Modell eines idealen Rührkesselreaktors. Vor der Durchführung der Kultivierungen wurden in Simulationen die Parameter des EKF sowie die des PI-Reglers identifiziert. Die Glucosekonzentration wurde mit dem implementierten Feed-forward-/Feed-back-Regler basierend auf den Glucoseschätzwerten auf Glucosesollwerte zwischen $0,05$ und $0,1 \text{ g L}^{-1}$ geregelt. Die erzielten Regelgüten waren hoch. Ausführlich diskutiert wurden die Kultivierungen *fb1*, *fb2* und *fb3*, da anhand ihrer Charakteristika das Potential des Regelsystems demonstriert werden kann. Im Verlauf der Kultivierung *fb1* fiel das Messsystem mehrfach aus, die Auswirkungen auf die Regelabweichung waren sehr gering. Eine initiierte Sollwertänderung verlief suboptimal. Eine Verbesserung des Verhaltens bezüglich der Sollwertänderung könnte durch die Identifikation neuer Parameter nur für diesen Anwendungsfall erreicht werden. Auf die Änderungen der Wachstumsdynamik während der Kultivierung *fb2* konnte das Regelsystem adäquat reagieren. Die auftretenden größeren Regelabweichungen wurden schnell korrigiert. Mit der Kultivierung *fb3* wurde ein Experiment präsentiert, das praktisch optimal lief. Es konnten mit diesen ausgewählten Kultivierungen die Möglichkeiten und derzeitigen Grenzen des entwickelten Systems aufgezeigt werden. Das Kalman-Filter passt die Zustandsgrößen so an, dass die Dynamik des Prozesses gut beschrieben wird. Somit ermöglicht das entwickelte Regelsystem, hohe Regelgüten, lange Regeldauern und hohe Ausbeuten bei Vermeidung der Produktion unerwünschter Metabolite, wie z.B. Ethanol, zu realisieren.

Die Anwendungsmöglichkeiten des Systems sind vielfältig. Es lassen sich gezielt durch die Vorgabe des Sollwertes Stoffwechselzustände einstellen. Durch Verbesserung des Verhaltens der Regelung bei Sollwertänderungen eröffnen sich weitere Möglichkeiten.

Die Bestimmung von Glucoseaufnahmeraten ist mit dem hier entwickelten System, insbesondere bei niedrigen Glucosekonzentrationen ohne Gabe von Glucosepulsen, reproduzierbar möglich. Mit Hilfe von DNA-Chips können Beiträge zur Klärung der Mechanismen der Glucoseaufnahme des Modellorganismus unter verschiedenen Bedingungen gewonnen werden.

In allen Experimenten hatte die Diskretisierung der Feed-Rate, die durch die Pumpen bedingt ist, einen negativen Einfluss auf die erzielbare Regelgüte. Trotz dieses apparativen Problems waren die erzielten Regelgüten respektabel. Die Verwendung anderer Pumpen würde die Regelgüte nochmals steigern. Weitere apparative Verbesserungen bieten sich im Bereich der verwendeten Analytik an, da FIA-Systeme sehr störanfällig und personalintensiv sind. Als Alternativen bieten sich z.B. der von Kollerker [49] verfolgte Ansatz der Regelung mit Hilfe der 2D-Fluoreszenz an oder die Messung der Abgaszusammensetzung.

Zur Optimierung des FIA-basierten Systems wäre die Messung weiterer Zustandsgrößen ein vielversprechender Ansatz. So würde die Messung der Biomassekonzentration die Zustandsschätzung verbessern. Auch die Fehler bei der Bestimmung der Startbiomasse wären geringer. Dies würde zu einer weiteren Erhöhung der Regelgüte führen. Anstelle der BTM böte sich auch die Messung der Zellvitalität an.

Auch Erweiterungen des verwendeten Bioprozessmodells würden den Einsatzbereich des entwickelten Regelsystems erweitern. Es wäre zu prüfen, ob die Bildung und Verstoffwechslung unerwünschter Metabolite, Inhibierungen, die Sterberate und/oder ein Maintenance-Term in das Modell einfließen sollten.

Es konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass das entwickelte Regelsystem ein großes Potential besitzt und in der Lage ist, auf verschiedene typische Probleme, die während einer Kultivierung auftreten, adäquat zu reagieren. Es ist möglich, über lange Zeiträume Kultivierungen bei verschiedenen Sollwerten mit geringer Regelabweichung und hohen Ausbeuten zu fahren. Die genannten Optimierungen bieten die Möglichkeit, den Anwendungsbereich des Systems zu erweitern und die erzielbaren Regelgüten weiter zu verbessern.

Literaturverzeichnis

- [1] AKESSON, M., P. HAGANDER und J. P. AXELSSON: *A probing strategy for Escherichia coli cultures*. Biotechnology Techniques, 13:523 – 528, 1999.
- [2] ARNDT, M.: *Eine schnelle Glucoseanalytik zur Regelung biotechnischer Prozesse*. Doktorarbeit, Universität Hannover, 2003.
- [3] ARNDT, M. und B. HITZMANN: *Feedforward feedback control of glucose concentration during cultivation of escherichia coli*. 2000.
- [4] ARNDT, M. und B. HITZMANN: *Eine schnelle Glucoseanalytik für die Regelung biotechnischer Prozesse*. BIOforum, S. 658–661, 10 2001.
- [5] ARNDT, M. und B. HITZMANN: *Kalman Filter Based Glucose control at Small Set Points during fed-batch Cultivation of S. cerevisiae*. Biotechnology Progress, 20:377–383, 2004.
- [6] ARNDT, M., S. KLEIST, G. KIKSCH, K. FRIEHS, E. FLASCHEL, J. TRIEWEILER und B. HITZMANN: *A feedforward-feedback substrate controller based on a Kalman filter for a fed-batch cultivation of E. coli producing phytase*. Computers & Chemical Engineering, 29:1113–1120, 2005.
- [7] ASSIS, A. J. DE und R. F. FILHO: *Soft sensors development for on-line bioreactor state estimation*. Computers & Chemical Engineering, 24:1099–1103, 2000.
- [8] BALAKRISHNAN, A. V.: *Kalman filtering theory*. Series in Communication and Control Systems. Optimization Software, Inc., New York, 1987.
- [9] BANG, W.-G.: *Untersuchungen zur L-Tryptophan-Bildung mit freien und immobilisierten Escherichia coli W 3100-Zellen*. Doktorarbeit, Universität Braunschweig, 1981.
- [10] BASTIN, G. und D. DOCHAIN: *On-line Estimation and Adaptive Control of Bioreactors*. Process Measurement and Control. Elsevier Science Publishers B.V., 1990.
- [11] BELLGARDT, K.-H.: *Modellbildung des Wachstums von Saccharomyces cervisiae in Rührkesselreaktoren*. Doktorarbeit, Universität Hannover, 1983.
- [12] BELLGARDT, K.-H.: *Cell Models*, Bd. 4, Measuring, Modelling and Control d. Reihe *Biotechnology, A Multi-Volume Comprehensive Treatise*, Kap. 3, S. 267–298. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, 2. Aufl., 1991.

- [13] BELLGARDT, K. H., H. D. MEYER, K. SCHÜGERL und M. THOMA: *Online estimation of biomass and fermentation parameters by a Kalman-filter during a cultivation of Saccharomyces cerevisiae*. III. European Congress on Biotechnology, 2:607–615, 1984.
- [14] BELLGART, K. H., W. I. KUHLMANN, H. D. MEYER, K. SCHÜGERL und M. THOMA: *Application of an extended Kalman filter for state estimation of a yeast fermentation*. IEEE, 133(5):226–234, 1986.
- [15] BRAMMER, K. und G. STIFFLING: *Kalman-Bucy-Filter: deterministische Beobachtung und stochastische Filterung*. Methoden der Regelungstechnik. Oldenbourg Verlag, München, Wien, 3. verb. Aufl., 1989.
- [16] BROXTERMANN, O.: *Multivariate Verfahren zur Auswertung von FIA-Messsignalen und deren praktische Anwendung*. Doktorarbeit, Universität Hannover, 2003.
- [17] BROXTERMANN, O., Y.-L. CHA, O. SOBIEH, E. STÄRK, B. HITZMANN und T. SCHEPER: *The control of glucose concentration during yeast fed-batch cultivation using a fast measurement complemented by an extended Kalman filter*. Bioprocess Engineering, 23:337–341, 2000.
- [18] CHATTAWAY, T. und G. STEPHANOPOULOS: *Adaptive Estimation of Bioreactors: Monitoring Plasmid Instability*. Chemical Engineering Science, 44(1):41–48, 1989.
- [19] CHMIEL, H. et al.: *Bioprozeßtechnik: Einführung in die Bioverfahrenstechnik*. Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag, München, 2. Aufl., 2006.
- [20] COPELLA, S. J. und P. DHURJATI: *A Mathematical Description of Recombinant Yeast*. Biotechnology and Bioengineering, 35:356–374, 1990.
- [21] DANZER, K., H. HOBER, C. FISCHBACHER und K.-U. JAGEMANN: *Chemometrik: Grundlagen und Anwendungen*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2001.
- [22] DEKEN DE, R. H.: *The Crabtree effect: A regulatory system in yeast*. J. Gen. Microbiol., 44:149–156, 1966.
- [23] DIAZ-RICCI, J. C., L. REGAN und J. E. BAILEY: *effect of alteration of the acetic acid synthesis pathway on fermentation pattern of Escherichia coli*. Biotechnol. Bioengineering, 38:1381 – 1384, 1991.

- [24] DUBACH, A. C. und H. MÄRKL: *Application of an Extended Kalman Filter Method for Monitoring High Density Cultivation of Escherichia coli*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 73(5):396–402, 1992.
- [25] EJIOFOR, A. O., B. O. SOLOMON, C. POSTEN und W.-D. DECKWER: *Analysis of the respiro-fermentative growth of Saccharomyces cerevisiae on glucose in a fed-batch fermentation strategy for accurate parameter estimation*. Applied Microbiology and Biotechnology, 41(6):664–669, 1994.
- [26] FASMANN, G. D.: *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*. CRC Press, Cleveland, 3. Aufl., 1976.
- [27] FERREIRA, L. S., J. O. TRIERWEILER, M. B. DE SOUZA JR. und R. O. M. FOLLY: *A lactose fia-biosensor system for monitoring and process control*. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 21(2), 2004.
- [28] FITZER, E., W. FRITZ und G. EMIG: *Technische Chemie, Einführung in die chemische Reaktionstechnik*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 4. Aufl., 1995.
- [29] FLOWNAMICS: *FISP Sales Literature*.
- [30] FREDERICKSON, A. G., R. D. MEGGEE und H. TSUCHIYA: *Mathematical Models for Fermentation Processes*. Adv. Appl. Microbiol., 23:419, 1970.
- [31] FRENZEL, W.: *Fließinjektionsanalyse Prinzipien - Techniken - Anwendungen*. Berlin, 1993.
- [32] FULD, G. und C. DUNN. *Industrial and engineering Chemistry*, 49:1215, 1957.
- [33] GANCEDO, J. M.: *Yeast Carbon Catabolite Repression*. Microbiol. Mol Bio Rev, 62(2):334 – 361, 1998.
- [34] GELB, A. et al.: *Applied Optimal Estimation*. The MIT Press, Cambridge (MA), London, 16. Aufl., 2001.
- [35] GHOUL, M., M. DARDENNE, C. FONTEIX und A. MARC: *Extended Kalman Filtering Technique for the On-Line control of Okt3 Hybridoma Cultures*. Biotechnology Techniques, 5(5):367–370, 1991.

- [36] GROSSE-UHLMANN, R. und T. BLEY: *A modular approach to situation identification of the dynamics of bacterial populations synthesizing poly-b-hydroxybutyrate*. Bioprocess Engineering, 21:191–200, 1999.
- [37] GUDI, R. D., S. L. SHAH und M. R. GRAY: *Multirate State and Parameter Estimation in an Antibiotic Fermentation with Delayed Measurements*. Biotechnology and Bioengineering, 44:1271–1278, 1994.
- [38] GUDI, R. D., S. L. SHAH, M. R. GRAY und P. K. YEGNESWARAN: *Adaptive Multirate Estimation and Control of Nutrient Levels in a Fed-Batch Fermentation Using Off-line and On-line Measurements*. The Canadian Journal of Chemical Engineering, 75:562–573, 1997.
- [39] GUILBAUT, G. G.: *Practical Fluorescence: Theory, Methods and Techniques*. Decker, New York, 1973.
- [40] HILALY, A. K., M. N. KARIM und J. C. LINDEN: *Use of an Extended Kalman Filter and development of an automated system for xylose fermentation by a recombinant Escherichia coli*. Journal of Industrial Microbiology, 13:83–89, 1994.
- [41] HITZMANN, B.: *Optimierung von FIA - Systemen für die Bioprozeßtechnik*. Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig/Wiesbaden, 1996.
- [42] JAKUBITH, M.: *Chemische Verfahrenstechnik, Einführung in Reaktionstechnik und Grundoperationen*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, 1991.
- [43] JENZSCH, M., R. SIMUTIS und A. LUEBBERT: *generic model control of the specific growth rate in recombinant E. coli cultivations*. Journal of Biotechnology, 122:483–493, 2005.
- [44] KALMAN, R. E.: *A New Approach to Linear Filtering and Prediction Problems*. Journal of Basic Engineering, 82:35–45, 1960.
- [45] KELLE, R., T. HERMANN, D. WEUSTER-BOTZ, L. EGGELING, R. KRÄMER und C. WANDREY: *Glucose-controlled L-isoleucine fed-batch production with recombinant strains of Corynebacterium glutamicum*. Journal of Biotechnology, 50:123–136, 1996.
- [46] KÜENZI, M.: *Über den Reservekohlenhydratstoffwechsel von Saccharomyces cerevisiae*. Doktorarbeit, ETH-Zürich, 1970.

- [47] KLEIST, S.: *Optimierung eines fermentativen Verfahrens zur Herstellung einer bakteriellen Phytase*. Doktorarbeit, Universität Bielefeld, 2002.
- [48] KLEMAN, G. L., J. J. CHALMERS, L. G. W. und W. R. STROHL: *A Predictive and Feedback Control Algorithm Maintains a Constant Glucose Concentration in Fed-Batch Fermentations*. Appl. Env. Microbiol., 57(4):910 – 917, 1991.
- [49] KOLLECKER, M.: *Analyse von 2D-Fluoreszenzspektren durch multivariate Auswertungsverfahren zur Regelung von Bioprozessen*. Doktorarbeit, Universität Hannover, 2006.
- [50] LATZEL, W.: *Einstellregeln für kontinuierliche und Abtastregler nach der Methode der Betragsanpassung*. Automatisierungstechnik, 5:170 – 178, 1988.
- [51] LENAS, P., T. KITADE, H. WATANABE, H. HONDA und T. KOBAYASHI: *Adaptive Fuzzy Control of nutrient concentrations in Fedbatch culture of mammalian cells*. Cytotechnology, 25:9 – 15, 1997.
- [52] LEONARD, D., C. B. YOUSSEF, C. DESTRUHAUT, N. D. LINDLEY und I. QUEINNEC: *Phenol Degradation by Ralstonia eutropha: Colorimetric Determination of 2-Hydroxymuconate Semialdehyde Accumulation to Control Feed Strategy in Fed-Batch Fermentations*. Biotechnology and Bioengineering, 65(4):407–415, 1999.
- [53] LI, J., N. S. XU und W. W. SU: *Online estimation of stirred tank microalgal photobioreactor cultures based on dissolved oxygen measurement*. Biochemical Engineering Journal, 14:51–65, 2003.
- [54] LINDEMANN, C.: *Anwendung der 2D-Fluoreszenzspektroskopie zur Bioprozessbeobachtung*. Doktorarbeit, Universität Hannover, 1998.
- [55] LOCHER, G., U. HAHNEMANN, B. SONNLEITNER und A. FIECHTER: *Automatic bioprocess control. 4. A prototype of Saccharomyces cerevisiae*. J. Biotechnol, 29:57–74, 1993.
- [56] LUCENA, S., A. M. SOUTO MAJOR, C. FONTEIX, I. MARC und J. P. CORRIOU: *Application of nonlinear control on a fermentation process: Production of S. cerevisiae*. Latin American Applied Research, 31:235–240, 2001.
- [57] MARE DE, L., L. ANDERSSON und P. HAGANDER: *Probing control of glucose feeding in Vibrio cholerae cultivations*. Bioprocess Biosyst. Eng., 25:221 – 228, 2003.

- [58] MAROSE, S.: *Bioprozessanalytik mit zweidimensionaler Fluoreszenzspektroskopie*. Doktorarbeit, Universität Hannover, 1998.
- [59] MAYBECK, P. S.: *Stochastic models, estimation and control*, Bd. 1. ACADEMIC PRESS, New York, San Francisco, London, 1979.
- [60] MICHAELIS, L. und M. L. MENTEN: *Die Kinetik der Invertinwirkung*. Biochemische Zeitschrift, 49:333–369, 1913.
- [61] MISKIEWICZ, T. und A. KASPERSKI: *A fuzzy controller to control nutrient dosage in a Fedbatch baker's yeast process*. Biotechnology Letters, 22:1685 – 1691, 2000.
- [62] MJALLI, F. S. und S. AL-SHEH: *Neural-Network-Based Linearization versus Model Predictive Control of Continuous Alcoholic Fermentation Process*. Chem. Eng. Technol., 28:1191 – 1200, 2005.
- [63] MUTTZALL, K.: *Einführung in die Fermentationstechnik*. Behrs Verlag, 1993.
- [64] NÁHLÍK, J. und Z. BURIANEC: *On-line parameter and state estimation of continuous cultivation by extended Kalman filter*. Applied Microbiology and Biotechnology, 28:128–134, 1988.
- [65] NEELEMAN, R. und A. J. B. VAN BOXTEL: *Estimation of specific growth rate from cell density measurements*. Bioprocess and Biosystems Engineering, 24:179–185, 2001.
- [66] OTTO, M.: *Analytische Chemie*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, 1995.
- [67] OTTO, M.: *Chemometrie: Statistik und Computereinsatz in der Chemie*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1997.
- [68] PLESSIS DU, R. M.: *Poor Man's Explanation of Kalman Filtering or How I Stopped Worrying and Learned to Love Matrix Inversions*. Taygeta Scientific Incorporated, Monterey, 2. Aufl., 2000.
- [69] POL, J. J. VAN DER, B. JOKSCH, J. GÄTGENS, M. BISELLI, C. D. DE GOOLJER, J. TRAMPER und C. WANDREY: *On-Line control of an immobilized hybridoma culture with multi-channel flow injection analysis*. Journal of Biotechnology, 43:229–242, 1995.

- [70] POPOVA, S. und T. PATARINSKA: *Biomass estimation on the basis of yeast cultivation model with morphophysiological parameters*. Bioprocess Engineering, 19:313–315, 1998.
- [71] POSTEN, C. H. und C. L. COONEY: *Growth of Microorganisms*, Bd. 1, Biological Fundamentals d. Reihe *Biotechnology, A Multi-Volume Comprehensive Treatise*, Kap. 3, S. 113–162. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, 2. Aufl., 1993.
- [72] RAMIREZ, W. F.: *Optimal state and parameter identification. An application to batch fermentation*. Chemical Engineering Science, 42(11):2749–2756, 1987.
- [73] RANDOLPH, T., I. MARISON, D. MARTENS und U. v. STOCKAR: *Calorimetric Control of Fed-Batch Fermentations*. Biotechnology and Bioengineering, 36:678 – 684, 1990.
- [74] RUZICKA, J. und E. HANSEN: *Flow Injection Analysis*. Wiley & Sons, New York, 1988.
- [75] SAMAL, E.: *Grundriß der praktischen Regelungstechnik*. R. Oldenbourg Verlag GmbH, München, Wien, 15. verb. Aufl., 1987.
- [76] SARGANTANIS, J. G. und M. N. KARIM: *Multivariable Iterative Extended Kalman Filter Based Adaptive Control: Case Study of Solid Substrate Fermentation*. Ind. Eng. Chem. Res., 33:878–888, 1994.
- [77] SCHÜGERL, K.: *Which requirements do flow injection analyzer / biosensor have to meet for controlling the bioprocess?*. Journal of Biotechnology, 31:241–256, 1993.
- [78] SCHLEICHER, M. und F. BLASINGER: *Regelungstechnik, Ein Leitfaden für Einsteiger*. M.K. JUCHHEIM GmbH & Co, Fulda, 2000.
- [79] SCHÖNGARTH, K.: *Neue FIA-Verfahren und ihre Anwendung in der Biotechnik*. Doktorarbeit, Universität Hannover, 1997.
- [80] SCHULMANN, S. G.: *Molecular luminescence spectroscopy methods and application - Part 1*, Bd. 77 d. Reihe *Chemical Analysis*. John Wiley & Sons, New York, 1985.
- [81] SCHWEDER, O.: *Einsatzmöglichkeiten der 2D-Fluoreszenzspektroskopie zur Online-Analytik von Hefezellkulturen*. Diplomarbeit, Universität Hannover, 2001.

- [82] SOLLE, D.: *Analyse und Optimierung eines industriellen Biotransformationsprozesses zur Herstellung von Tryptophan*. Doktorarbeit, Universität Hannover, 2003.
- [83] SONNLEITNER, B. und O. KÄPPELI: *Regulation of sugar metabolism in Saccharomyces-type yeast: Experimentell and conceptual considerations*. CRC Critical Reviews in Biotechnology, 4(3):299–325.
- [84] SONNLEITNER, B. und O. KÄPPELI: *Growth of Saccharomyces cerevisiae Is Controlled by Its Limited Respiratory Capacity: Formulation and Verification of a Hypothesis*. Biotechnology and Bioengineering, 28:927–937, Juni 1986.
- [85] STEPHANOPOULOS, G. und K.-Y. SAN: *Studies on On-Line Bioreactor Identification. I. Theory*. Biotechnology and Bioengineering, 26:1176–1188, 1984.
- [86] STEPHANOPOULOS, G. und K.-Y. SAN: *Studies on On-Line Bioreactor Identification. II. Numerical and Experimental Results*. Biotechnology and Bioengineering, 26:1189–1197, 1984.
- [87] STRYER, L., J. M. BERG und T. J. L.: *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 5. Aufl., 2003.
- [88] SVRCEK, W. Y., R. F. ELLIOTT und J. E. ZAJIC: *The Extended Kalman Filter Applied to a Continuous Culture Model*. Biotechnology and Bioengineering, 16:827–846, 1974.
- [89] TSUCHIYA, H., A. G. FREDERICKSON und R. ARIS: *Dynamics of Microbial Cell Populations*. Adv. Chem. Eng., 6:125, 1966.
- [90] VANDEGINSTE, B. G. M., D. L. MASSART, L. M. C. BUYDENS, S. JONG DE und J. LEWI, P. J. AMD SMEYERS-VERBEKE. In: VANDEGINSTE, B. G. M. und S. C. RUTAN (Hrsg.): *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B, DATA HANDLING IN SCIENCE AND TECHNOLOGY*. Elsevier Science B.V., Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Singapore, Tokyo, 1998.
- [91] WARTENBERG, A.: *Einführung in die Biotechnologie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1989.
- [92] WEIGEL, B.: *Entwicklung von Enzym-Kartuschen und FIA-Methoden zur On-line-Analytik in Biomedien*. Doktorarbeit, Universität Hannover, 1995.

- [93] WELCH, G. und G. BISHOP: *An Introduction to the Kalman Filter*. Techn. Ber. TR95-041, Department of Computer Science, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC, Februar 2001.
- [94] WEUSTER-BOTZ, D.: *Die Rolle der Reaktionstechnik in der mikrobiellen Verfahrensentwicklung*. Forschungszentrum Jülich GmbH, Institut für Biotechnologie, Zentralbibliothek, Jülich, 1999.
- [95] WEUSTER-BOTZ, D., R. KELLE, M. FRANTZEN und C. WANDREY: *Substrate Controlled Fed-Batch Production of L-Lysine with Corynebacterium glutamicum*. Biotechnology Progress, 13:387–393, 1997.
- [96] WOLFBEIS, O. S.: *Fluorescence of organic natural products*. In: SCHULMANN, S. G., C. A. (Hrsg.): *Molecular luminescence spectroscopy methods and application - Part 1*, Bd. 77 d. Reihe *Chemical Analysis*. John Wiley & Sons, New York, 1985.
- [97] ZIGOVA, J., M. MAHLE, H. PASCHOLD, M. MALISSARD, E. G. BERGER und D. WEUSTER-BOTZ: *Fed-batch production of a soluble b-1,4-galactosyltransferase with S. cerevisiae*. Enzyme an Microbial Technology, 25:201–207, 1999.

A Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

$\hat{}$	Schätzwert
κ	Leitfähigkeit
a_i	Aktivität der Substanz i
BTM_{est}	Schätzwert der Biotrockenmassekonzentration
BTM_{offl}	Offlinemesswert der Biotrockenmassekonzentration
CAFCA:	Computer Assisted Flow Control & Analysis
CPR:	CO ₂ -Produktionsrate
DCU:	Digital-Control-Unit
E_0	Standarzellpotential
$E\{\}$	Erwartungswert von $\{\}$
E	Zellpotential
$e(t)$	Regeldifferenz
f_{tol}	Toleranzfaktor des Varianzfilters
$F(t)$	Jacobimatrix von $f()$
FIA:	Fließinjektionsanalyse
GOD:	Glucoseoxidase
$H(t)$	Jacobimatrix von $h()$
$h(x(t_i))$	wahrer Wert von $x()$
I	Einheitsmatrix
$K(t_i)$	Kalman-Verstärkungsmatrix
K_m	Monod Sättigungskonstante
m	Maintenance-Koeffizient
μ	spezifische Wachstumsrate
μ_{max}	maximale spezifische Wachstumsrate
μ_{sim}	durch Simulation ermittelte Wachstumsrate
OUR:	O ₂ -Aufnahmerate
Ox	oxidierte Form der Substanz
P	Schätzfehlerkovarianzmatrix
PCA:	Principal Component Analysis (Hauptkomponentenanalyse)
pO_2	Gelöstsauerstoffanteil
Q	Prozessrauschleistungsmatrix
Q_S	Glucoseaufnahmerate
q_0, q_1	Koeffizienten des PI-Reglers

qCO_2 :	spezifische Kohlendioxidproduktionsrate
qO_2 :	spezifische Sauerstoffaufnahme
q_S :	spezifische Glucoseaufnahme
R :	Messrauschkovarianzmatrix
R :	allgemeine Gaskonstante
RFI:	relative Fluoreszenzintensität
RISP:	Realtime Integrating Software Plattform
$-r_S$:	Geschwindigkeit des Substratabbaus
r_X :	Biomassebildungsrate
Red :	reduzierte Form der Substanz
$S(t)$:	Substratkonzentration zum Zeitpunkt t
S_{est} :	Schätzwert der Substratkonzentration
S_{meas} :	Onlinemesswert der Substratkonzentration
S_{offl} :	Offlinemesswert der Substratkonzentration
S_{sim} :	simulierter Messwert der Substratkonzentration
σ_i :	Standardabweichung der Größe i
S_0 :	Substratkonzentration in der Feed-Lösung
$s(t_i)$:	Messrauschen
T :	Temperatur
$V(t)_R$:	Reaktorvolumen zum Zeitpunkt t
$\dot{V}(t)_{feed}$:	Volumenstrom der Feed-Lösung zum Zeitpunkt t
\dot{V}_{Probe} :	Volumenstrom der Probenahme
V_{offl} :	Volumen der Offline-Probe
$w(t)$:	Führungsgröße (Sollwert)
$X(t)$:	Biotrockenmassekonzentration zum Zeitpunkt t
$x(t)$:	Zustandsvektor
$x(t)$:	Regelgröße (Istwert)
$x_w(t)$:	Regelabweichung
$Y_{X/S}$:	Ausbeutekoeffizient (Biomasse/Substrat)
$y(t)$:	Stellgröße
$y(t_i)$:	Messwert
z :	Ladungszahl

B Die Parameter des *BioView*

Tabelle 15: Vermessene Exzitations- und Emissionswellenlängenkombinationen

		Exzitationswellenlänge [nm]														ExND	
		270	290	310	330	350	370	390	410	430	450	470	490	510	530		550
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
NDEm	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	

Tabelle 16: Die verwendeten Verstärkungsfaktoren

Exzitation [nm]	Emission [nm]	Anzahl der Filterkombinationen	Photomultiplier-Einstellungen
270	310-390	4	1100
270	410-590	11	1100
290	330-590	14	1000
310	350-590	13	1200
330	370-590	12	1100
350	390-590	11	1100
370	410-470	4	1000
370	490-590	6	1000
390	430-590	9	1000
410	450-590	8	1000
430	470-590	7	1000
450	490-590	6	1000
470	510-590	5	1000
490	530-590	4	1000
510	550-590	3	1000
530	570-590	2	1000
550	590	1	1000
exND	270-590	15	800
270-590	emND	15	800

C Lebenslauf

Lebenslauf

Persönliche Daten

Dirk Hüll
Parkstr. 4A
31303 Burgdorf

Tel.: (0 50 85) 15 47

E-Mail: huell@iftc.uni-hannover.de

geboren am 29.05.1964 in Hannover

Familienstand: ledig, keine Kinder

Staatsangehörigkeit: österreichisch

Schulbildung

09.1971–07.1972 Kreuzriede-Grundschule Hannover
08.1972–06.1975 Freiherr-vom-Stein-Grundschule Hannover
08.1975–06.1981 Sekundarstufe I der IGS Hannover-Mühlenberg
06.1981 Erweiterter Sekundarabschluss I
08.1981–06.1984 gymnasiale Oberstufe an der IGS Hannover-Mühlenberg
06.1984 Allgemeine Hochschulreife

Studium

10.1984 Aufnahme des Studiums (Chemie, Dipl.) an der Universität Hannover
07.2002–01.2002 Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover
Titel: „Kompensation der Zeitverzögerung von Glucosemessungen bei der Regelung von Kultivierungsprozessen basierend auf einem Kalman-Filter“

02.2002–05.2005 Doktorand am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover

Berufserfahrung

02.1992–03.2005 Tätigkeit beim TÜV Nord in Hannover, als Proband im Bereich Olfaktometrie und als Umweltschutztechniker im Bereich Umweltmesstechnik

02.2002–05.2002 Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter bei der Firma TEXYS GmbH

02.2002–03.2005 Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover

seit 04.2005 Tätigkeit als Messingenieur/Sachverständiger im Bereich Umweltmesstechnik bei der TÜV Nord Umweltschutz GmbH & Co. KG

Zusatzqualifikationen

07.1999 Vorlesung „Betrieblicher Umweltschutz“

05.2002 Vorlesung „Qualitätssicherung in der chemischen Industrie“

01.2004 Marketing-Seminar

01.2005 Tagung „Forum Emissionsüberwachung - Teil 7: Rechts- und Verwaltungsvorschriften“

Fremdsprachen

Englisch

Französisch (Schulkenntnisse)

EDV-Kenntnisse

MS Office, Origin, Matlab (Grundkenntnisse), The Unscrambler (Grundkenntnisse), Linux/Unix

Hannover, 28. März 2007

D Veröffentlichungen

HÜLL,D. und HITZMANN, B.: *Verwendung eines Kalman-Filters zur Regelung von Bioprozessen*. 20. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, Wiesbaden (Poster), 2002

HÜLL,D. und HITZMANN, B.: *Bestimmung von Glucoseaufnahmeraten bei geregelten Fed-batch-Kultivierungen mit niedrigen Glucosesollwerten*. 21. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, Garching bei München (Poster), 2003

HÜLL,D., GROTE, B. und HITZMANN, B.: *Kompensation der messtechnisch bedingten Zeitverzögerung bei der Regelung von Bioprozessen durch Einsatz eines Kalman-Filters*, BioPerspectives 2004, Wiesbaden (Poster), 2004

PENCHEVA, T., HRISTOZOV, I., HÜLL,D., HITZMANN, B. und TZONKOV, S.: *Modelling of Functional States during Saccharomyces cerevisiae Fed-batch Cultivation*. Bioautomation, S. 8-16, 2005

HRISTOZOV, I.,PENCHEVA, T., HÜLL,D., KLOCKOW, C., HITZMANN, B. und TZONKOV, S.: *Implementation of Sliding Mode Controller with Boundary Layer for Saccharomyces cerevisiae Fed-batch Cultivation*. Bioautomation, S. 49-53, 2005

HANTELMANN,K., KOLLECKER, M., HÜLL, D., HITZMANN, B. und SCHEPER, T. *Two-dimensional fluorescence spectroscopy: A novel approach for controlling fed-batch cultivations*. Journal of Biotechnology 121:S. 410-417, 2006