

Eine schnelle Glucoseanalytik zur Regelung biotechnischer Prozesse

Vom Fachbereich Chemie
der
Universität Hannover

zur Erlangung des Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
– Dr. rer. nat. –

genehmigte Dissertation
von
Dipl.-Chem. MICHAEL ARNDT
geboren am 10.02.1968 in Hameln

2003

Referent: Priv.-Doz. Dr. BERND HITZMANN

Korreferent: Prof. Dr. THOMAS SCHEPER

Tag der Promotion: 15.07.2003

Gewidmet meiner Mutter INGE ARNDT †

Diese Arbeit wurde im Zeitraum von Juli 1999 bis Mai 2003 am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover im Arbeitskreis „Bioprozessautomation und Bioinformatik“ angefertigt.

Herrn Priv.-Doz. Dr. BERND HITZMANN danke ich für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Arbeit, für die wissenschaftliche Betreuung sowie seine stete Hilfsbereitschaft und Geduld.

Herrn Prof. Dr. THOMAS SCHEPER danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Allen Mitarbeitern des Arbeitskreises „Bioprozessautomation und Bioinformatik“ danke ich für die gute Zusammenarbeit, die Freundschaft und die tatkräftige Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. ERWIN FLASCHEL danke ich für die Möglichkeit der Durchführungen von Experimenten in der Arbeitsgruppe „Fermentationstechnik“ an der Universität Bielefeld.

Herrn Dr. KARL FRIEHS und Herrn Dr. GERD MIKSCH danke ich für ihre Unterstützung bei den Experimenten in Bielefeld und für viele interessante Diskussionen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. SOPHIA KLEIST für ihre Freundschaft und für ihre großartige Arbeit an vielen langen Tagen und Nächten im Labor.

Herrn Dipl.-Chem. HANS-F. PLACKE, Herrn Dr. ALEXANDER MEHLHOSE und Herrn Dipl.-Chem. STEFAN DE BUHR danke ich für ihre moralische Unterstützung, ihre Freundschaft und die vielen motivierenden Gespräche ganz besonderer Art.

Meinen Eltern INGE ARNDT † und ULRICH ARNDT gilt mein ganz besonderer Dank. Ohne ihre langjährige Unterstützung und Geduld wären sowohl mein Studium als auch die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Kurzfassung

In dieser Arbeit wird ein System zur Regelung der Glucosekonzentration bei Zulaufkultivierungen von Mikroorganismen vorgestellt. Es basiert auf direkter Messung der Glucosekonzentration und entsprechender Regelung der Zufütterung. Dieses System ermöglicht die Einhaltung eines konstanten Glucosesollwerts über einen längeren Zeitraum. So konnten konstante Glucosekonzentrationen von 0,1 g/l bei *E. coli* und 0,05 g/l bei *S. cerevisiae* über bis zu 12 Stunden realisiert werden. Die Standardabweichungen vom Sollwert betragen dabei 0,043 g/l bei *E. coli* bzw. 0,0093 g/l bei *S. cerevisiae*. Die Produktion unerwünschter Metabolite konnte dadurch verhindert werden. Das Messsystem basiert auf einer Fließinjektionsanalyse ohne Probenfiltration. Die Kulturbrühe wird zusammen mit einer Glucoseoxidaselösung direkt in das Fließsystem injiziert. Als Detektor dient eine Sauerstoffelektrode. Sie misst sowohl den Sauerstoffverbrauch der Enzymreaktion als auch die von den Zellen verbrauchte Sauerstoffmenge. Aus der Differenz der Summe beider Werte und des reinen Sauerstoffverbrauchs der Zellen lässt sich die Glucosekonzentration in der Kulturbrühe berechnen. Die Bestimmung eines Glucosemesswerts dauert je nach Auslegung des Systems zwischen 30 und 60 Sekunden. Somit ist die Messung sechs bis 12 mal schneller als bei Systemen mit Probenfiltration, jedoch ist auch das Messrauschen größer. Ein auf einem Bioprozessmodell basierender erweiterter Kalman-Filter wird zur Filterung der veräuschten Messwerte und zur kontinuierlichen Schätzung des Systemzustands der Kultivierung eingesetzt. Die Regelung des Prozesses erfolgt basierend auf der geschätzten Glucosekonzentration (Feedforward-Regelung) in Verbindung mit einem PI-Regler (Feedback-Regelung). Letzterer dient dabei zur Kompensation von Unzulänglichkeiten des Prozessmodells.

Schlüsselworte: Glucosemessung, FIA, Kalman-Filter, Schätzung, Bioprozessregelung

Abstract

A glucose control system is presented, which is able to control the glucose concentration during fed-batch-cultivations. It is based on a direct glucose measurement and a corresponding feeding control. This system provides the possibility to control constant glucose concentrations during longer time periods. Constant glucose concentrations of 0.1 g/l during cultivations of *E. coli* and 0,05 g/l during cultivations of *S. cerevisiae* were realised. The standard deviations from the setpoints were 0,043 g/l and 0,0093 g/l respectively. By this kind of control the production of harmful metabolites was suppressed completely. The measurement system is based on a flow injection analysis (FIA) without any sample filtration. The culture growth is injected directly into the flow system together with a solution of glucoseoxidase. An oxygen electrode is used as detector. It determines the oxygen consumption of the enzyme reaction and of the cells as well. The difference between both values corresponds to the glucose concentration in the culture growth. The determination of a single glucose measurement value takes between 30 and 60 seconds including sampling time, dependant on the geometry of the FIA-System. With this system the measurement are between 6 and 12 times faster than measurements taken by systems that use sample filtration, but the measurement noise is higher. A Kalman filter based on a process model is used to smooth the noisy measurements. It predicts the glucose concentration and other state variables of the cultivation process continuously. The glucose control is performed by using the estimated glucose concentration (feedforward control). Additionally a PI-controller is implemented in order to compensate inadequacies in the process model (feedback control).

Keywords: Glucose measurement, FIA, Kalman filter, estimation, bioprocess control

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung	3
2	Theoretische Grundlagen	5
2.1	Quantitative Detektion von Glucose	5
2.2	Stoffwechselwege von <i>Escherichia coli</i> und <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
2.3	Fließinjektionsanalyse	10
2.3.1	Prinzipien der Fließinjektionsanalyse	10
2.3.2	Glucose-FIA mit Enzymreaktor	11
2.3.3	Die schnelle Glucose-FIA	12
2.4	Regelung von Bioprocessen und Reglertypen	14
2.5	Das Bioprozessmodell	16
2.6	Der kontinuierlich-diskret erweiterte Kalman-Filter	18
3	Material und Methoden	21
3.1	Weitere mathematische Methoden	21
3.2	Aufbau und Charakterisierung des FIA-Systems	21
3.3	Die Kultivierungen	25
3.3.1	Die eingesetzten Mikroorganismen	25
3.3.2	Fermentationssysteme und Kultivierungsparameter	26
3.4	Implementation des Reglers	29
3.5	Die Online-Abgasanalytik	31
3.6	Die Offline-Analytik	32
3.6.1	Optische Dichte	32
3.6.2	Biotrockenmassekonzentration	32
3.6.3	Bestimmung der Glucosekonzentration	33
3.6.4	Quantitative Bestimmung von Ethanol	33
3.6.5	Quantitative Bestimmung von Acetat	33
3.6.6	Bestimmung der Phytaseaktivität bei <i>E. coli</i> BL21(DE3)pPhyt109	33

4	Ergebnisse	35
4.1	Messungen unter Verwendung von Mutarotase	35
4.2	Batch-Kultivierungen und Einfüsse auf die Blindwerte	36
4.3	Geregelte Fed-Batch-Kultivierung	39
4.3.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> MC4110	39
4.3.2	Kultivierungen von <i>S. cerevisiae</i> H620	44
4.3.3	Kultivierungen von <i>E. coli</i> BL21(DE3)pPhyt109	55
5	Zusammenfassung und Ausblick	65
	Literatur	68
A	Anhang	73
A.1	Der FIA-Puffer	73
A.2	Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien	73
A.2.1	Schatzmann-Medium für Hefe-Kultivierungen im Fermenter	73
A.2.2	Schatzmann-Medium für Hefe-Vorkulturen	74
A.2.3	Mineralmedium nach Riesenberg zur Kultivierung von <i>E. coli</i>	74
A.2.4	Zufütterlösung für Fed-Batch-Kultivierung von <i>E. coli</i> MC4110	75
A.2.5	Zufütterlösungen für Fed-Batch-Kultivierung von <i>E. coli</i> BL21(DE3)pPhyt109	75
A.2.6	Super-LB-Medium für die Vorkultur von <i>E. coli</i> MC4110	76
A.2.7	TB-Medium für die Vorkultur von <i>E. coli</i> BL21(DE3)pPhyt109	76
A.3	Häufig verwendete Abkürzungen und Symbole	76

1 Einleitung und Zielsetzung

Die Biotechnologie hat in den letzten Jahren sehr stark an Bedeutung gewonnen. Insbesondere für die Produktion komplexer Biochemika und Pharmazeutika sowie in der Umwelt- und Agrartechnik werden heute verstärkt Mikroorganismen wie Bakterien, Hefen, tierische Zellen oder auch Algen eingesetzt. Es sind sowohl Wildstämme als auch rekombinante Organismen im Einsatz. Bei der technischen Kultivierung solcher Organismen in Bioreaktoren ist es hinsichtlich eines schnellen Zellwachstums bei möglichst hoher Produktausbeute und -qualität unerlässlich, die Umweltbedingungen in der Kultur zu jedem Zeitpunkt möglichst optimal zu gestalten. Daraus resultiert die Notwendigkeit, prozessrelevante Größen ständig zu überwachen und ggf. zu korrigieren. Neben optimaler Prozessführung kommt auch der Automatisierung von Fermentationsprozessen immer größere Bedeutung zu.

In der industriellen Produktion viel beachtete Prozessgrößen sind z. B. der pH-Wert, die Gelöstsauerstoffkonzentration (Sauerstoffpartialdruck, pO_2) und natürlich die Temperatur. Die Online-Analytik und die Regler für diese Basisgrößen gehören inzwischen zur Standardaustattung moderner Fermenter, die Automatisierung der Prozessführung über diese Größen ist dadurch unproblematisch geworden. Anders ist es mit der Regelung der Substratzufütterung in Zulaufkultivierungen (Fed-Batch-Prozessen). Gerade diese ist jedoch besonders wichtig, da sie direkt das Zellwachstum oder die Produktion störender Metabolite beeinflusst. So produzieren beispielsweise Hefen Ethanol und *E. coli* Acetat als häufigste Stoffwechselnebenprodukte. Die Prozessführung mittels Regelung der Substratzufütterung basierend auf indirekten Messgrößen wie des pH, der Gelöstsauerstoffkonzentration oder der Abgaszusammensetzung wird in der Literatur beschrieben [27, 44]. Über eine Regelung, die auf der direkten Messung der Substratkonzentration beruht, wurde bisher jedoch nur wenig berichtet [26, 35]. Das liegt in erster Linie an den komplizierten Analytiken, welche für eine schnelle Onlinemessung meist nicht geeignet sind [10].

Bei technischen Fermentationsprozessen kommen unterschiedliche Substrate zum Einsatz. Am weitesten verbreitet ist sicherlich der Einsatz von Glucose als Kohlenstoffquelle. Glucose ist ein effizienter Energielieferant mit guter Verfügbarkeit. Ausserdem kann sie von den meisten Mikroorganismen direkt verstoffwechselt werden. Ein weiterer Vorteil der Verwendung von Glucose liegt darin, dass sie das am einfachsten zu detektierende Saccharid ist. In der Literatur wird eine Vielzahl unterschiedlicher Methoden zur Bestimmung von Glucose beschrieben.

Für eine Regelung hochdynamischer Prozesse, wie es Kultivierungen von Hefen und insbesondere von Bakterien nun einmal sind, reicht es nicht aus, die Substratkonzentration zuverlässig messen zu können. Vielmehr ist hier die Geschwindigkeit der Messung von großer Wichtigkeit. In den meisten Fällen entsteht die Zeitverzögerung bei der Online-Messung durch die Probenverarbeitung. Meist erfolgt eine Abtrennung der Zellen mittels Filtration oder Diffusion. Häufig werden auf Filtration basierende Probenahmemodule eingesetzt. Sie verursachen eine Zeitverzö-

gerung von drei bis sechs Minuten. Hinzu kommt die Zeit, welche die angeschlossene Analytik zur Messung benötigt. Das ist eine lange Zeitdauer, insbesondere wenn sehr kleine Glucose-sollwerte ($\leq 0,1$ g/l) in einer Kultur eingestellt werden sollen, oder wenn die Dynamik des Prozesses sehr groß ist, wie z. B. bei Hochzelldichtekultivierungen. Um die Zeitverzögerung der Probenahme deutlich zu verkürzen, bleibt im Grunde nur ein Verzicht auf die Filtration.

Die Fließinjektionsanalyse (FIA) hat sich in der enzymbasierten Saccharidanalytik und insbesondere als Online-Analytik bei Bioprozessen bereits vielfach bewährt [42, 57, 56]. Die Messung der Glucosekonzentration mittels FIA ist mittlerweile ein Standardverfahren. Bei diesen FIA-Systemen kommt das Enzym Glucoseoxidase (GOD) zum Einsatz. Üblicherweise ist die GOD an einer in einem Enzymreaktor befindlichen stationären Phase immobilisiert. Derartige FIA-Systeme eignen sich nicht für die Verwendung von unfiltrierter Fermentationsbrühe, sie würden binnen kürzester Zeit verstopfen.

In dieser Arbeit soll ein schnelles FIA-System entwickelt werden, das in der Lage ist, Glucose direkt in der unfiltrierten Fermentationsbrühe zu detektieren. Somit kann vollständig auf die zeitaufwendige Probenvorverarbeitung verzichtet werden. Die GOD wird in diesem FIA-System in gelöster Form direkt mit der Probe vermischt. Mit diesem System sind ausserdem vergleichsweise hohe Messfrequenzen möglich. Der Hauptnachteil dieses Systems liegt in seinem vergleichsweise großen Messrauschen, welches verschiedene Ursachen hat. Dadurch ist das System in Verbindung mit den üblichen Feedback-Reglern nur bedingt zur Regelung der Glucosezufütterung geeignet. Man benötigt vielmehr ein System, das in der Lage ist, die verrauschten Messwerte in einer adäquaten Weise zu filtern und damit eine Regelung durchzuführen. Ein solches System ist der aus der Kalmanschen Filtertheorie hervorgehende erweiterte Kalman-Filter (EKF). Er basiert auf einem Prozessmodell. Der EKF bietet die Möglichkeit, den Zustand eines dynamischen nichtlinearen Prozesses durch fortlaufendes Anpassen der Zustandsvariablen kontinuierlich zu schätzen. Die Anpassung geschieht im Abgleich mit den Messwerten, deshalb spricht man von einer Filterung. Bereits 1974 wurde in der Literatur der Einsatz eines Kalman-Filters zur modellbasierten Prozessüberwachung in der Biotechnologie erwähnt [52]. Über die Anwendung eines Kalman-Filters zur Regelung von Bioprozessen ist jedoch bislang nur wenig berichtet worden.

Die schnelle Glucose-FIA und der erweiterte Kalman-Filter sollen zu einem effizienten Glucose-Controller vereinigt und für den praktischen Einsatz experimentell optimiert werden. Dann sollen mit diesem Controller Fed-Batch-Kultivierungen von Hefen und unterschiedlichen Bakterienstämmen durchgeführt werden [1, 11], bei denen eine möglichst niedrige Glucosekonzentration über einen möglichst langen Zeitraum konstant gehalten wird. Die Produktion störender Metabolite soll dadurch unterbunden werden, ohne dass dabei eine das Zellwachstum hemmende Substratlimitierung auftritt.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Quantitative Detektion von Glucose

Die zuverlässige Bestimmung von Glucosekonzentrationen ist für sehr viele Anwendungsbereiche von großer Bedeutung. Das betrifft grundsätzlich die Lebensmitteltechnik, die Medizin (Blutzuckerbestimmung) sowie die Biotechnologie. Die sehr preiswerte Glucose ist sicherlich das am häufigsten verwendete Substrat bei technischen Bioprocessen. Das Glucosemolekül als das strukturell einfachste Saccharid stellt eine der primären Energiequellen lebender Organismen dar (Glycolyse) [51] und kann somit von den meisten Mikroorganismen direkt verwertet werden (vgl. 2.2). Aus diesen Gründen wurde bereits eine Vielzahl von Analytiken zur Bestimmung von Glucose entwickelt und in der Literatur beschrieben. Ebenso vielfältig wie ihre Einsatzbereiche sind auch die Funktionsprinzipien dieser Analysemethoden. Eine grobe Übersicht gibt Tabelle 1. In dieser Arbeit wird die enzymatische Umsetzung mittels Glucoseoxidase (GOD) zur Glucosebestimmung verwendet. GOD katalysiert dabei die Oxidation von β -Glucose zu Gluconolacton unter Abspaltung von Wasserstoffperoxid (Abbildung 1). In wässriger Lösung hydrolysiert das gebildete Gluconolacton spontan zu Gluconsäure.

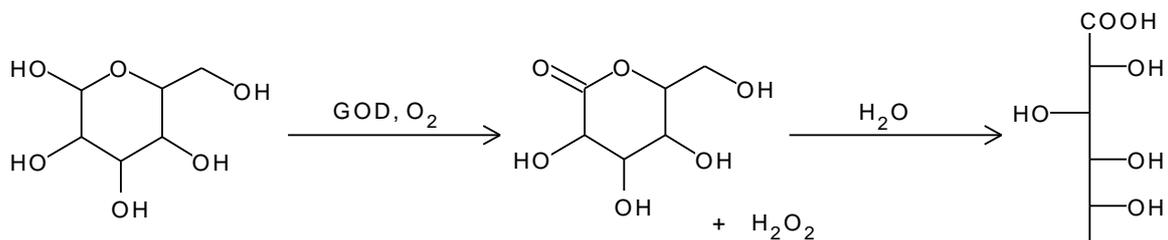
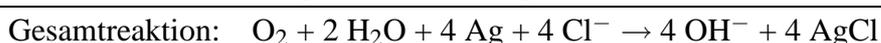
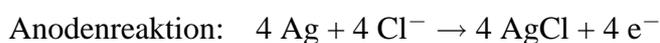
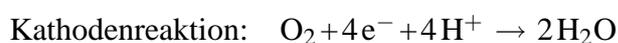


Abbildung 1: Umsetzung von Glucose mittels GOD und Sauerstoff zu Gluconolacton und Wasserstoffperoxid

Bei dieser Reaktion kann dann der Verbrauch des Edukts Sauerstoff sowie die Bildung des Produkts Wasserstoffperoxid gemessen werden (Tabelle 1). Am einfachsten ist die amperometrische Messung von Sauerstoff mittels einer Clark-Elektrode. Diese Elektrode besteht aus einer Platinkathode, die von einer zylinderförmigen Silberanode umgeben ist. Das Ganze taucht in eine Elektrolytlösung (4 M KCl) ein. Die Abtrennung vom umgebenden Medium erfolgt durch eine selektiv sauerstoffdurschlässige Membran. Sauerstoffmoleküle können so von außen her ins Elektrodeninnere diffundieren und dort gemäß folgendem Schema abreagieren:



Der bei der Reaktion fließende Strom (Elektronentransfer von Anode zu Kathode) wird gemessen. Die geringen Stromstärken (ca. 100 nA) werden dann mit einem Messverstärker in ein Spannungssignal umgewandelt. Das gleiche Messprinzip wird auch bei der In-Situ-Messung des pO_2 im Fermenter verwendet.

Tabelle 1: Methoden zur Bestimmung von Glucose

Messprinzip	Erläuterung und Literaturverweise
1) Reduktion / Oxidation	Zur Bestimmung von Glucose macht man sich hierbei deren reduzierende Eigenschaft zunutze. Die Oxidation von Glucose erfolgt nasschemisch [33] oder elektrokatalytisch [32, 37]. Auch die Anwendungen dieser Methode als Online-Analytik wurde beschrieben.
2) Spektroskopische Methoden	Glucose lässt sich mittels IR-Spektroskopie bestimmen. Diese nichtinvasive Methode ist sowohl für die Zellkulturtechnik als auch für die Medizin von Interesse [3, 6].
3) Enzymatische Methoden	Die wichtigste Methode zur Bestimmung von Glucose ist deren Oxidation mittels des Enzyms Glucoseoxidase (GOD) [14]. Detektiert wird in der Regel das bei der Enzymreaktion gebildete H_2O_2 oder der verbrauchte Sauerstoff. Dieses Verfahren ist in den meisten kommerziellen Glucoseanalyzern implementiert. Die Sauerstoffmessung erfolgt amperometrisch [56], Wasserstoffperoxid kann amperometrisch [16, 57] oder mittels diverser nasschemischer Reaktionen detektiert werden [21, 24, 42]. Fluoreszenzbasierte Messverfahren unter Verwendung entsprechend modifizierter GOD sind ebenfalls bekannt [7, 48]. Auch andere Enzyme wie Glucosedehydrogenase oder Glucose-6-phosphatdehydrogenase kommen zum Einsatz [8, 30, 31].
4) Sonstiges	Glucose kann auch über den Brechungsindex bestimmt werden, was jedoch erst nach Abtrennung anderer Substanzen sinnvoll ist. Insbesondere die HPLC eignet sich zur Abtrennung von Glucose. Zur anschließenden Detektion kommen meist eine der zuvor genannten Methoden zum Einsatz [49, 36]. Die HPLC ist aufgrund ihres Zeitbedarfs zum Monitoring von schnellen Prozessen nur bedingt einsetzbar.

2.2 Stoffwechselwege von *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae*

Das Stäbchenbakterium *Escherichia coli* gehört zur Gruppe der Enterobacteriaceae und ist u. A. ein wesentlicher Bestandteil der menschlichen und tierischen Darmflora. Bereits im Jahre 1922 wurde der Stamm *E. coli* K-12 aus dem menschlichen Darm isoliert und kultiviert. Daraus wurde bis heute eine Vielzahl rekombinanter Stämme abgeleitet. *E. coli* ist der am häufigsten verwendete Organismus zur Produktion rekombinanter Proteine. Ideale Wachstumsbedingungen findet der Organismus ausgehend von seinem natürlichen Vorkommen bei Körpertemperatur (37 °C) in neutralem Milieu. *E. coli* ist fakultativ anaerob, d. h. es kann beim Fehlen von Sauerstoff den Stoffwechsel umstellen und seine Energie durch Gärung (fermentativer Stoffwechsel) gewinnen. Bei ausreichender Sauerstoffversorgung verläuft der Stoffwechsel rein oxidativ.

E. coli kann neben Glucose eine ganze Reihe anderer kohlenstoffhaltiger Substrate verstoffwechseln. Dazu gehören z. B. diverse Disaccharide oder auch Glycerin. Sowohl Glucose als auch Glycerin werden über die Glycolyse zunächst zu Pyruvat umgesetzt, welches im folgenden Schritt, dem Citratzyklus, zu CO₂ und H₂O abgebaut wird [51, 13].

Die Glucose wird zunächst durch ein Phosphotransferasesystem (PTS) unter ATP-Verbrauch in die Zelle gebracht und dort zu Glucose-6-Phosphat phosphoryliert. Dieses wird dann glycolytisch zu Pyruvat abgebaut. Aus einem Molekül Glucose entstehen dabei neben zwei Molekülen Pyruvat je zwei Moleküle NADH und ATP. Das Pyruvat wird dann mittels oxidativer Decarboxylierung zu Acetyl-CoA und einem weiteren Molekül NADH abgebaut. Im Citratzyklus entstehen aus Acetyl-CoA NADH und FADH₂. Diese energiereichen Moleküle werden in der sogenannten Atmungskette ebenfalls zur ATP-Produktion herangezogen. In der Gesamtbilanz dieser Prozesse entstehen aus einem Molekül Glucose am Ende 22 Moleküle ATP.

Die Hälfte der zugeführten Substratmenge wird in Energie umgewandelt (Katabolismus). Die andere Hälfte dient zum Aufbau von Zellmasse (Anabolismus).

Bei unzureichender Sauerstoffzufuhr schlägt *E. coli* einen anaeroben Stoffwechsel ein, wobei durch Gärung Energie produziert wird. Eines der Hauptstoffwechselprodukte dabei ist Acetat [9]. Auch beim fermentativen Stoffwechsel wird Glucose zunächst zu Pyruvat abgebaut, der Pyruvat-Dehydrogenase-Multienzymkomplex ist jedoch gehemmt. Deshalb wird Pyruvat durch die Pyruvat-Formiat-Lyase zu Formiat und Acetyl-CoA abgebaut, welches dann zu Acetat umgesetzt wird. Gebildetes Acetat kann von *E. coli* zwar im Glyoxylat-Zyklus verstoffwechselt werden [13], in höheren Konzentrationen wirkt es sich jedoch wachstumshemmend aus [41]. Die hemmende Acetatmenge ist dabei stammspezifisch. Ausserdem beeinflusst Acetat auch die Produktbildung bei rekombinanten Stämmen.

Eine Acetatbildung kann auch unter streng aeroben Bedingungen erfolgen, wenn insbesondere bei hohen Wachstumsgeschwindigkeiten ein Substratüberschuss vorliegt. Die Aufnahme und der Fluß der Kohlenstoffquelle erfolgt in diesem Fall schneller als die Umsetzung in Biomasse und

Stoffwechselenergie. Die limitierenden Stoffwechselwege sind dabei der Citratzyklus und die Elektronentransportkette.

Saccharomyces cerevisiae ist ein Eukaryont der Klasse der Schlauchpilze (Ascomyceten). Die Vermehrung erfolgt in den in Kultivierungen vorherrschenden Bedingungen durch Sprossung. Tritt eine Substratlimitierung ein, so ist unter bestimmten Bedingungen auch eine sexuelle Vermehrung möglich, die dann zu haploiden Zellen mit geringerer Stoffwechselaktivität führt. Der Sprosszyklus gliedert sich in eine Reproduktions- und eine Wachstumsphase, in der die Zellkomponenten aufgebaut werden. Der Metabolismus der Zellen ist zeitvariant, da während der Wachstumsphase periodisch Enzyme und Speicherstoffe gebildet werden. Hieraus folgt eine Abhängigkeit des Wachstumsverhaltens aus der Altersverteilung der Zellen. Des Weiteren können bei aerobem Wachstum morphologisch unterschiedliche Zellen mit divergierenden Stoffwechsel- und Sprossungseigenschaften auftreten [29].

Für Hefekultivierungen wird in der Regel Glucose als Energie- und Kohlenstoffquelle eingesetzt. Auch bei *S. cerevisiae* unterscheidet man zwischen aerobem (oxidativem) und anaerobem (fermentativem) Stoffwechsel. Des Weiteren existiert ein oxidativ-fermentativer Stoffwechsel, der sich unter bestimmten Bedingungen einstellen kann. Auch hier dienen die verschiedenen Varianten des Metabolismus zur Adaption der Zellen an unterschiedliche Umweltbedingungen. Inhibierungen sind bei hohen Glucose- bzw. Ethanolkonzentration zu beobachten.

Oxidatives Wachstum kann auf Glucose und/oder Ethanol als Substrat erfolgen. Die Energiegewinnung aus Glucose erfolgt unter diesen Bedingungen unter Verbrauch von Sauerstoff ebenfalls auf dem Wege der bereits beschriebenen Glycolyse [51]. Die Biomasseausbeuten bezogen auf die Menge eingesetztem Substrats sind in diesem Fall hoch. Ein rein oxidatives Wachstum auf Glucose ist nur bis zur einer bestimmten kritischen Glucoseaufnahme rate $q_{S.krit}$ möglich [50], unterhalb dieses Grenzwertes kann parallel Ethanol verstoffwechselt werden. Bei Überschreitung der kritischen Glucoseaufnahme rate setzt oxidativ-fermentatives Wachstum (auch als fermentativ bezeichnet, obwohl rein fermentatives Wachstum nur unter streng anaeroben Bedingungen möglich ist) ein. Die Zellen sind jetzt trotz ausreichender Sauerstoffversorgung nicht mehr in der Lage, das gesamte angebotene Substrat oxidativ umzusetzen. Das Pyruvat wird nun nicht mehr überwiegend im Citratzyklus abgebaut, sondern teilweise über das Zwischenprodukt Acetaldehyd in Ethanol überführt. Die Produktion von Ethanol bei ausreichender Sauerstoffversorgung durch Überschreiten der kritischen Glucoseaufnahme rate bzw. einer bestimmten Glucosekonzentration bezeichnet man als Crabtree-Effekt. Die Veränderung im Stoffwechsel (von oxidativ zu oxidativ-fermentativ) ist mit einem deutlichen Anstieg der Glucoseaufnahme rate ($q > q_{S.krit}$) verbunden. Der Crabtree-Effekt wirkt sich auch auf die spezifische Sauerstoffaufnahme rate (q_{O_2}) aus, es wird das Verharren auf einem Maximalwert beobachtet. Im Vergleich zu den sich bei oxidativen Metabolismus einstellenden Werten für den Ausbeutekoeffizienten und die Wachstumsrate sind diese unter den Bedingungen des oxidativ-fermentativen Stoffwechsels klein, da der Citratzyklus als Energiequelle nicht mehr zur Verfügung steht und ein energiereiches Produkt (Ethanol) am

Ende des Stoffwechselweges steht. Der Mechanismus des Crabtree-Effektes und seine Ursachen sind noch nicht vollständig bekannt. In der Literatur werden mehrere Mechanismen diskutiert. In einigen Veröffentlichungen wird ein geschwindigkeitslimitierender Schritt im Mechanismus des oxidativen Metabolismus diskutiert, dessen Ursache in einer Stoffwechselregulation/-repression zu finden ist [4]. Andere gehen von einer begrenzten respiratorischen Kapazität der Zellen aus und postulieren daraus ableitend ein „Flaschenhalsprinzip“ für die Glucoseaufnahme der Zellen [50], d. h. die parallele Verstoffwechslung von Glucose und Ethanol kann nur erfolgen, solange die respiratorische Kapazität den kritischen Wert unterschreitet.

Oxidativ-fermentativer Stoffwechsel setzt ein, wenn wie oben erwähnt, die kritische Glucoseaufnahme überschritten wird. Die Höhe des Wertes $q_{S,krit}$ ist keine feste Größe, sondern hängt sowohl vom Stamm der Hefe als auch von Parametern wie Mediumszusammensetzung und Gelöstsauerstoffkonzentration ab. Verstoffwechseln die Zellen Glucose oxidativ-fermentativ, so sind sie bei Anwesenheit von Sauerstoff bestrebt, die Ethanolproduktion soweit wie möglich zu verringern (Pasteur-Effekt). Die Glucose gelangt durch zwei Transportmechanismen in die Zelle. Ist die Glucosekonzentrationen niedrig, erfolgt ein aktiver endergonischer Transport durch die Zellmembran, bei entsprechend hoher Konzentration tritt noch ein passiver diffusiver Transportterm hinzu [4].

Zusammenfassend kann als Kriterium für das Auftreten des oxidativ-fermentativen Stoffwechsels bei Hefen das Überschreiten einer für den Stamm und die Kultivierungsbedingungen charakteristischen Glucoseaufnahme angesehen werden. Die Ethanolbildung kann u. U. zwar erwünscht sein (alkoholische Gärung), höhere Konzentration von Ethanol haben jedoch ähnlich dem Acetat bei *E. coli* einen negativen Einfluss auf den Metabolismus der Hefezellen. Das kann zur Wachstumshemmung und sogar zum Absterben der Zellen führen.

In Zulaufkultivierungen (Fed-Batch-Kultivierungen) mit Glucose als Substrat besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Glucoseaufnahme und der Zufütterungsrate. Ist die Glucosekonzentration im Reaktor konstant, so kann man davon ausgehen, dass die Zufütterrate identisch mit der Glucoseaufnahme der Mikroorganismen ist. Die Umweltbedingungen in einer Fed-Batch-Kultivierung werden in der Regel so gewählt, dass ein optimales Wachstum ohne Produktion störender Metabolite (Acetat bzw. Ethanol) stattfinden kann. Insbesondere bei Hochzelldichtekultivierungen ist das u. U. nicht trivial. Zwar kann man durch optimierte Sauerstoffzufuhr und Verringerung der Temperatur insbesondere bei *E. coli* die Produktion von störenden Metaboliten deutlich einschränken [34], einer optimalen Regelung der Substratzufütterung kommt jedoch grundsätzlich die größte Bedeutung zu.

Neben einer Kohlenstoffquelle benötigen die Mikroorganismen noch eine Stickstoffquelle. Dafür kommen abhängig von den Kultivierungsbedingungen verschiedene Substanzklassen in Frage. Bewährt haben sich bei Kultivierungen sowohl von Hefen als auch von Bakterien in mineralischen Medien Ammoniak bzw. Ammoniumverbindungen. Unter anaeroben Bedingungen können *E. coli* jedoch auch Nitrate als Stickstoffquelle verwenden.

2.3 Fließinjektionsanalyse

2.3.1 Prinzipien der Fließinjektionsanalyse

Die Fließinjektionsanalyse (FIA) wurde bereits 1974 von Ruzicka und Hansen [46] vorgestellt und zeichnet sich insbesondere durch ihre vielfältigen Einsatzmöglichkeiten aus. Bei der Fließinjektionsanalyse wird eine Probe in einen kontinuierlich fließenden, nicht segmentierten Trägerstrom injiziert und über eine Vermischungs- und Reaktionsstrecke, dem Manifold, einem Detektor zugeführt. Dabei verbreitert sich die injizierte Probenzone durch Konvektions- und Dispersioneffekte. Die Probe kann z. B. mit anderen injizierten oder bereits im Trägerstrom enthaltenen Bestandteilen reagieren und dabei ein detektierbares Produkt bilden. Auch der Einsatz eines stationären Katalysators ist möglich. Die durch den chemischen Umsatz bedingten Konzentrationsänderungen einer oder mehrerer beteiligter Substanzen können an einem nachgeschalteten Detektor gemessen werden. Das so gewonnene Signal steht über die Stöchiometrie der Nachweisreaktion in direktem Zusammenhang mit der Konzentration der zu bestimmenden Substanz in der injizierten Probe.

Die FIA ist eine dynamische Analysemethode, d. h. weder die Vermischung der Probenzone mit dem Trägerstrom noch die gleichzeitig ablaufende chemische Reaktion erreichen einen Gleichgewichtszustand. Daher ist die exakte Konstanz aller Systemparameter sehr wichtig, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Das geschieht u. A. durch Einhaltung konstanter Transportstrecken und Strömungsgeschwindigkeiten (Verwendung pulsationsarmer Pumpen), sowie durch das Einbringen genau definierter Probensegmente in den Trägerstrom. Auch Umweltparameter wie z. B. die Temperatur spielen eine Rolle, da sie die ablaufende Reaktion beeinflussen können. Die Vorteile der FIA liegen neben ihrer instrumentellen Einfachheit im geringen Platzbedarf der Geräte, in der Verwendung sehr kleiner Probenvolumina (unter 100 μl) und der bereits erwähnten großen Flexibilität. Des Weiteren kann wegen der kurzen Reaktionsstrecken und geringen Kapillardurchmesser eine vergleichsweise hohe Probenfrequenz erreicht werden, was die FIA insbesondere für die Online-Analytik qualifiziert.

Die Prinzipien der FIA erinnern zunächst unweigerlich an einen Strömungsrohrreaktor (PFR). Aufgrund der sehr geringen Durchmesser der üblicherweise verwendeten Kapillaren (meist Teflon-Schläuche mit 0,5 - 1,0 mm Innendurchmesser) herrschen im System turbulente Strömungsbedingungen. Daraus resultiert das für die FIA typische Konzentrationsprofil der Probenzone, das im Gegensatz zum PFR nicht gaußförmig sondern asymmetrisch ausgebildet ist. Man spricht hierbei auch von „Tailing“. Die detektierten Messsignale sind somit peakförmig. Abbildung 2 zeigt einen typischen FIA-Peak. Zur Auswertung dieser Peaks können verschiedene Methoden herangezogen werden. Die Höhe und die Fläche des Signals sind jeweils proportional zur Analytkonzentration. Die Halbwertsbreite (Breite auf halber Peakhöhe) steht mit der Konzentration in einem logarithmischen Zusammenhang [20].

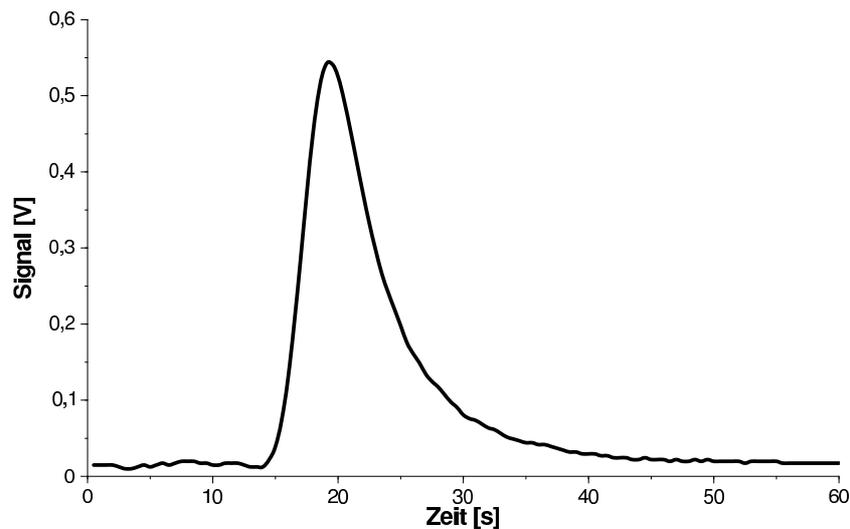


Abbildung 2: Typischer FIA-Peak

Der Informationsgehalt des Messsignals beschränkt sich jedoch nicht nur auf diese Größen. Bei einer ungestörten Messung ist jeder Messpunkt ausserhalb der Grundlinie für das FIA-Signal charakteristisch. Eine Auswertemethode, die die gesamte im Signal enthaltene Information berücksichtigt, ist das sogenannte projektive Referenz-Auswerteverfahren [2, 19]. Diese geht von einer vektoriellen Betrachtungsweise der FIA-Peaks aus. Ein Einheitsvektor (normierter Referenzpeak) wird auf den Messvektor (Messpeak) projiziert (skalare Multiplikation). Der Skalar ist proportional zur Analytkonzentration. Dieses Verfahren eignet sich auch zur Auswertung und Erkennung partiell gestörter Messsignale. Die Symmetrie (bzw. Asymmetrie) eines FIA-Peaks ist systemcharakteristisch und kann über das Tailingverhältnis (Quotient aus linker und rechter Peakhälfte) beschrieben werden. Treten bei einer Messung deutliche Abweichungen vom Tailingverhältnis vorhergehender Messungen auf, so liegt eine Störung vor [2].

2.3.2 Glucose-FIA mit Enzymreaktor

Ein Beispiel für eine Nachweisreaktion mit Hilfe einer in das Manifold eingebrachten stationären Phase stellt die Glucose-FIA mit Enzymreaktor dar [23]. Sie basiert auf der bereits in Kapitel 2.1 beschriebenen Umsetzung von Glucose mittels GOD. Das Enzym ist dabei auf kleinen Körnern eines Polymerträgers immobilisiert [15], welche sich in einer Durchflusskartusche befinden. Das Probensegment wird zunächst über einen Injektor in den Pufferstrom injiziert und passiert dann die Enzymkartusche. Der bei der dort stattfindenden katalytischen Umsetzung verbrauchte Sauerstoff wird dann am nachgeschalteten Sauerstoffsensoren (Clark-Elektrode, vgl. Kapitel 2.1) detektiert.

Diese Art von FIA-System zeichnet sich aufgrund des Enzymreaktors durch eine hohe Disper-

sion aus. Aus dem gleichen Grund herrscht im System ein Überdruck, da die Pumpe den Pufferstrom gegen den Widerstand der stationären Phase pumpen muss. Diese Umstände wirken sich zwar positiv auf das Umsatzverhalten (Empfindlichkeit) und das Messrauschen aus, sind aber für die Geschwindigkeit des Systems von Nachteil. Ausserdem ist bei einer Verwendung am Bioprozess eine vorherige Probenaufbereitung durch Filtration nötig, anderenfalls würde der Enzymreaktor verschmutzen und bereits nach kurzer Zeit den Dienst versagen. Bei der Verwendung gängiger Probenahmemodule führt das zu einer weiteren Zeitverzögerung von ca. 5 bis 10 Minuten [22].

2.3.3 Die schnelle Glucose-FIA

Diese Variante der FIA nutzt ebenfalls die GOD-katalysierte Umsetzung von Glucose als Nachweisreaktion. Detektiert wird ebenfalls der Sauerstoffverbrauch. Den schematischen Aufbau einer schnellen Glucose-FIA ohne Enzymkartusche zeigt Abbildung 3.

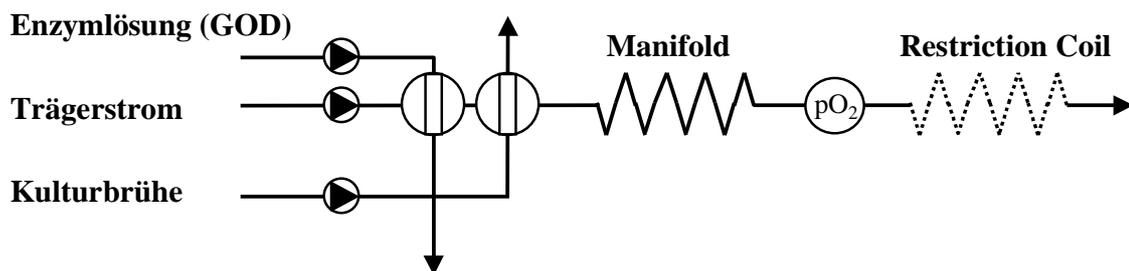


Abbildung 3: Schema der schnellen Glucose-FIA

Bei dieser Methode wird auf ein Probenahmemodul verzichtet, die mikroorganismenhaltige Kulturbrühe wird ungefiltert in das FIA-System injiziert. Die Zeitverzögerung bei der Messung resultiert hier lediglich aus der Verweilzeit der Probe im Manifold und der Distanz zwischen Injektor und Bioreaktor. Der Einsatz einer Enzymkartusche ist hierbei natürlich nicht mehr möglich, stattdessen wird eine Enzymlösung über einen zweiten Injektor injiziert. Probe und Enzym vermischen sich dann in einem nachgeschalteten Manifold (Dispersionsstrecke), wobei die Enzymreaktion stattfindet. Das GOD-Segment wird vor das Probesegment in den Pufferstrom injiziert, der Abstand zwischen beiden Injektorventilen muss auf die Fließgeschwindigkeit und die Innendurchmesser der Verbindungsschläuche abgestimmt werden. Die Länge des Manifold beeinflusst ebenfalls die Qualität der Messsignale. Eine längere Dispersionsstrecke verbessert die Durchmischung und somit den Umsatz der Enzymreaktion, verlängert aber die Analysendauer. Den Geschwindigkeitsvorteil der schnellen Glucose-FIA erkaufte man sich grundsätzlich durch

eine höhere Störanfälligkeit und ein stärkeres Messrauschen. Die Hauptstörquelle ist dabei die offene Probenahme. Die lebenden Mikroorganismen verbrauchen auf ihrem Weg durch das Manifold ebenfalls Sauerstoff aufgrund ihrer Atemaktivität. Deshalb werden an der Sauerstoffelektrode auch dann Messpeaks registriert, wenn gar keine Glucose mehr vorliegt. Der Sauerstoffverbrauch der Mikroorganismen muss also bei der Auswertung der Peaks mit berücksichtigt werden. Das geschieht durch Messung sogenannter Blindwerte. Dazu wird nur Kulturbrühe ohne Zugabe von GOD in das System injiziert, die Peakhöhe des Blindwerts wird dann von der Höhe des Messwerts subtrahiert. Die Differenz ist proportional zur realen Glucosekonzentration (Abbildung 4).

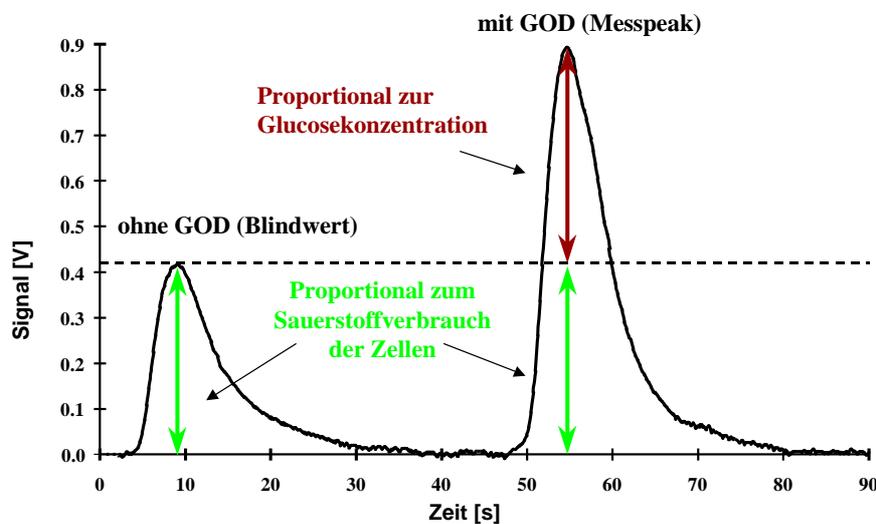


Abbildung 4: Signale der schnellen Glucose-FIA

In der Praxis ist es ausreichend, wenn jeder dritte bis vierte Messpeak einer Messreihe ein Blindwert ist. Bei kleinen Glucosekonzentrationen und hohen Zelldichten kann es vorkommen, dass der Blindwert im Verhältnis zur Glucosekonzentration sehr groß wird und somit auch eine große Fehlerquelle darstellt. Ebenfalls bedingt durch die offene Probenahme können Luftblasen aus dem Fermenter in den Probenstrom gelangen und in das FIA-System injiziert werden. Bei Verwendung einer Enzymkartusche wäre das tragisch, da die Luft sich in der Kartusche sammeln würde. Ein stetig anwachsender Messfehler wäre die Folge. Bei der schnellen Glucose-FIA können die Luftblasen das System ungehindert passieren. Sie verursachen so zwar keine dauerhaften Störungen, haben aber trotzdem einen störenden Einfluss auf die betroffenen Messsignale. Große Luftblasen können starke partielle Störungen des Peaks hervorrufen (z. B. in Form sogenannter Spikes), solche Peaks können aber als gestört erkannt werden und mittels geeigneter Methoden (Referenzpeakanpassung) evtl. noch ausgewertet werden. Problematischer sind kleinere Luftblasen. Sie führen zu einer Segmentierung des Reaktionsvolumens, welche die optimale Vermi-

schung von Probe und Enzymlösung verhindert. Die Luftblase wirkt dabei wie eine Barriere für die Dispersion gegen die Strömungsrichtung. Davon betroffene Peaks sind in der Regel nicht deutlich deformiert, sie geraten lediglich etwas zu klein. Einen solchen Peak als Fehlmessung zu erkennen ist sehr schwierig. Die Luftblasen tragen also zur Vergrößerung des Messrauschens bei. Verschiedene Faktoren haben einen Einfluss auf die Häufigkeit des Eindringens von Luftblasen in das FIA-System, dazu gehören u. a. die Viskosität der Fermentationsbrühe, die Durchmischung und die Begasung oder die Geschwindigkeit des Probenstromes. Durch geschicktes Platzieren der Probenahmestelle im Fermenter kann das Risiko von eingesaugten Luftblasen deutlich verringert werden.

Eine weitere Störquelle liegt in einer möglichen Verschmutzung des FIA-Systems. Durch die offene Probenahme dringen Zellen, deren Stoffwechselprodukte und evtl. auskristallisierte Medienkomponenten ins System. Besonders störanfällig sind die Ventile. Verstopfungen treten in der Regel dort auf. Die Zellen selbst sind dabei erfahrungsgemäß nicht das Hauptproblem. Vielmehr sammeln sich ausgeschleuste koagulierte Proteine klebstoffartig in den Ventilen. Durch optimale Auswahl der Ventiltypen und Schlauchverbindungen kann dieses Problem in der Praxis jedoch vollständig eliminiert werden.

2.4 Regelung von Bioprozessen und Reglertypen

Bei der Regelung eines Prozesses [54] wird die zu regelnde Ausgangsgröße (Regelgröße) mit einem vorgegebenen Sollwert (Führungsgröße) verglichen. Der Prozess wird durch die Regelung dahingehend beeinflusst, dass die Differenz von gewünschtem Sollwert zum Wert der Regelgröße (Sollwertabweichung) möglichst gleich Null wird. Das geschieht über die Veränderung einer Stellgröße, die durchaus auch indirekt mit der Führungsgröße zusammenhängen kann. So kann in einem Bioprozess z. B. die Gelöstsauerstoffkonzentration bei gleichbleibender Begasung und Rührerdrehzahl durch Veränderung der Substratzufütterung geregelt werden [25]. Ein weiteres Beispiel ist die Regelung der Zufütterung basierend auf kalorimetrischen Messdaten [43]. Die direkte Regelung der Substratzufütterung (Regelgröße = Führungsgröße) ist ebenfalls denkbar. Die Idee der Prozessführung mit einem limitierenden Substrat als Regelgröße ist nicht neu [12]. Aufgrund des hohen instrumentellen und regelungstechnischen Anspruchs finden sich in der Literatur bislang jedoch nur sehr wenige Beispiele dafür [26].

Der einfachste Reglertyp ist der Zweipunktregler. Er ist sehr einfach zu implementieren, aber trotzdem bereits für viele Regelaufgaben recht gut geeignet. Dieser Regler kennt nur zwei mögliche Stellwerte. Überschreitet die Sollwertabweichung einen bestimmten Betrag, dann schaltet der Regler. Ist sie wieder kleiner oder gleich Null, dann schaltet er zurück. Dieses Verhalten führt in der Praxis leicht zu einer Oszillation der Regelgröße, weshalb reine Zweipunktregler in industriellen Applikationen eher selten Verwendung finden. Die Regelqualität wird umso besser,

je höher die Abtastfrequenz bei der Ermittlung der Regelgröße ist. Wesentlich verbreiteter in der Technik ist dagegen der PID-Regler (proportional integral derivative). Sein Konzept ist analoger Natur und ermöglicht eine kontinuierliche Prozessregelung. Viele moderne Fermenter benutzen den PID-Regler z. B. zum Einstellen der Gelöstsauerstoffkonzentration über die Rührerdrehzahl. Der PID-Regler kann gemäß Gleichung 1 auch durch einen digitalen Algorithmus beschrieben werden, der sich bei genügend hoher Abtastfrequenz wie ein analoger verhält:

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

$u(k)$ ist dabei der Stellwert, $e(k)$ die Sollwertabweichung zum Zeitpunkt $t = kT_A$ (T_A : Abtastzeitintervall). Die Reglerparameter sind der Verstärkungsfaktor K , die Nachstellzeit T_I und die Vorschaltzeit T_D . Zur softwaremäßigen Implementierung des PID-Reglers verwendet man meist einen rekursiven Algorithmus (Gleichung 2):

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

Die Reglerparameter q_0 , q_1 und q_2 können dabei direkt als Gewichtung der P, I und D-Anteile des Reglers betrachtet werden. Je größer dabei z. B. der Proportionalanteil (q_0) ist, desto schneller und heftiger wird der Regler auf eine kleine Sollwertabweichung reagieren. Die Parameter q_0 bis q_2 können dabei auch aus den Parametern in Gleichung 1 abgeleitet werden:

$$\begin{aligned} q_0 &= K \left(1 + \frac{T_D}{T_A} \right) \\ q_1 &= -K \left(1 + 2 \frac{T_D}{T_A} - \frac{T_A}{T_I} \right) \\ q_2 &= K \frac{T_D}{T_A} \end{aligned} \quad (3)$$

Zur direkten Regelung der Glucosekonzentration im Reaktor wurden bereits beide Reglertypen eingesetzt [5, 47]. Die Regelqualität ist in beiden Fällen stark von der Geschwindigkeit der Messung und der Messgüte abhängig. Die schnelle Glucose-FIA als Analytik ist zwar sehr schnell, aufgrund ihres Messrauschen und ihrer etwas höheren Störanfälligkeit ist sie in Kombination mit den o. g. Reglern jedoch nur bedingt einsetzbar.

Einen möglichen Ausweg aus dieser Problematik stellt der Einsatz des weiter unten beschriebenen Kalman-Filters dar.

2.5 Das Bioprozessmodell

In einem Bioprozess wird das Zellwachstum im Wesentlichen durch die Prozessführung und durch kinetische Aspekte bestimmt. Wird der Prozess in einem idealen Rührkesselreaktor durchgeführt, in dem vollständige Durchmischung angenommen wird, sind keine örtlichen Temperatur- oder Konzentrationsgradienten vorhanden. Infolgedessen sind bei einer Massenbilanz lediglich die Änderungen durch die Volumenänderung und durch die Reaktionen zu betrachten. Die Massenbilanzen für einen Bioprozess im Rührkesselreaktor mit variablem Volumen und ohne Produktbildung sehen damit folgendermaßen aus:

$$\text{Biomasse: } \frac{dX}{dt} = r_X - X \frac{\dot{V}}{V} \quad (4)$$

$$\text{Substrat: } \frac{dS}{dt} = r_S + (S_0 - S) \cdot \frac{\dot{V}}{V} \quad (5)$$

$$\text{Volumen: } \frac{dV}{dt} = \dot{V} - \dot{V}_{Probe} \quad (6)$$

Dabei ist X die Biomassekonzentration in [g/l], S die Substratkonzentration in [g/l], r_X die Bildungsrate der Biomasse X in [$\text{gl}^{-1}\text{h}^{-1}$], r_S die Abbaurate des Substrats S in [$\text{gl}^{-1}\text{h}^{-1}$], \dot{V} der Volumenstrom des Zulaufs in [l/h], \dot{V}_{Probe} der Volumenstrom der Probenahme in [l/h], V das Reaktionsvolumen in [l] und S_0 die Substratkonzentration der Fütterlösung in [g/l].

In einem Bioprozess entstehen neue Mikroorganismen durch Zellteilung. Die allgemeinste Betrachtungsweise der Kinetik dieses Vorgangs ist, dass die Zunahmerate der Zellmasse proportional zur vorhandenen Zellmasse ist. Damit folgt für die Wachstumsgeschwindigkeit r_X [$\text{gl}^{-1}\text{h}^{-1}$] der Zellen (Gleichung 7):

$$r_X = \mu \cdot X \quad (7)$$

In Gleichung 7 ist μ [h^{-1}] die spezifische Wachstumsrate der Biomasse und X [g/l] die Biomassekonzentration. Dieses Modell ist eine stark vereinfachte Beschreibung der realen Abläufe, da die Aktivität der Zellen lediglich durch ihre Gesamtmasse charakterisiert wird und physiologische Details, wie z. B. die insbesondere bei Hochzelldichtekultivierungen auftretenden Größenunterschiede der Zellen, gänzlich vernachlässigt werden. Die spezifische Wachstumsrate μ ist abhängig von der Art der Organismen, Umweltparametern wie Temperatur und pH-Wert sowie von der chemischen Zusammensetzung der Nährlösung (Medium). Bei konstanten äusseren Bedingungen sowie einem Überschuss an Substraten im Medium wird μ maximal sein, es kann von einer typischen autokatalytischen Reaktion ausgegangen werden. Tritt nun der Fall ein, dass ein Substrat nicht mehr in ausreichender Menge zur Verfügung steht, verringert sich das Wachstum und die spezifische Wachstumsrate wird durch den empirischen Ansatz nach Monod in Abhängigkeit

vom limitierenden Substrat S folgendermaßen beschrieben:

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{S}{K_m + S} \quad (8)$$

K_m [g/l] ist die organismus- und substratspezifische Monod-Konstante und μ_{max} [h⁻¹] die maximale spezifische Wachstumsrate. K_m entspricht der Substratkonzentration bei der $\mu = \frac{1}{2}\mu_{max}$ ist. Ist K_m deutlich kleiner als die Substratkonzentration, kann man K_m im Nenner von Gleichung 8 vernachlässigen, und die spezifische Wachstumsrate ist gleich der maximalen Wachstumsrate μ_{max} . Die Monod-Konstante, auch Sättigungskonstante genannt, ist als Maß der Affinität des Organismus zum betreffenden Substrat zu interpretieren. Bei kleinen K_m -Werten können noch geringe Substratkonzentrationen ausgenutzt werden, während bei größeren K_m -Werten höhere Substratkonzentration herrschen müssen, um die gleiche Wachstumsrate zu erzielen.

Die Geschwindigkeit des Substratabbaus r_S ergibt sich aus dem Ausbeutekoeffizienten $Y_{X/S}$ und der Biomassebildungsrate r_X zu:

$$-r_S = \frac{r_X}{Y_{X/S}} \quad (9)$$

Setzt man nun die Gleichungen 7, 8 und 9 in die Massenbilanzen (Gleichungen 4, 5 und 6) ein, so kommt man zu den folgenden Modellgleichungen:

$$\frac{dX(t)}{dt} = \frac{\mu_{max} S(t)}{K_m + S(t)} \cdot X(t) - \frac{\dot{V}}{V(t)} \cdot X(t) \quad (10)$$

$$\frac{dS(t)}{dt} = -\frac{\mu_{max} S(t)}{K_m + S(t)} \cdot \frac{X(t)}{Y} + \frac{\dot{V}}{V(t)} \cdot (S_0 - S(t)) \quad (11)$$

$$\frac{dV(t)}{dt} = \dot{V} - \dot{V}_{Probe} \quad (12)$$

Damit steht ein Gleichungssystem zur Verfügung, das in der Lage ist, das Wachstum der Zellen in einem Fed-Batch-Prozess zu beschreiben. Bei Kenntnis der Startbedingungen können die Differentialgleichungen für jeden beliebigen Zeitraum mit einem Runge-Kutta-Verfahren vierter Ordnung numerisch integriert werden.

2.6 Der kontinuierlich-diskret erweiterte Kalman-Filter

Bei der Bestimmung der Zustandsgrößen eines Systems ist davon auszugehen, dass es bei der Messung der Ausgangsgrößen zu Ungenauigkeiten aufgrund von stochastischen Störungen und Messfehlern kommt. Die Berücksichtigung und Minimierung des Einflusses der Messfehler auf das System bezeichnet man als Filterung. Eine Methode, um die Filteraufgabe zu lösen, stellt der Kalman-Filter dar. Dieser bietet eine modellbasierte Abschätzung des Systemzustands im Abgleich mit diskreten Messwerten. Ein Kalman-Filter kann daher auch als „Zustandschätzer“ bezeichnet werden. Ein großer Vorteil dieses Filters ist, dass er zur Filterung nur den jeweils aktuellen Messwert benötigt und nicht wie andere Filteralgorithmen eine Zeitreihe von Messwerten. Ausserdem kann er je nach Auslegung auch eine Schätzung anderer Prozessgrößen als nur der gemessenen Größe liefern. Der Kalman-Filter basiert auf einem Modell des wahren Prozesses, in das stochastische Größen einfließen. Sind die Modellgleichungen nicht linear, so spricht man von einem erweiterten Kalman-Filter (EKF). Der hier diskutierte erweiterte Kalman-Filter verwendet eine kontinuierliche Prädiktion der Zustandsvariablen mit diskreter Filterung der eintreffenden Online-Messwerte auf Basis eines nichtlinearen Modells des Prozesses, wie in Abbildung 5 schematisch dargestellt.

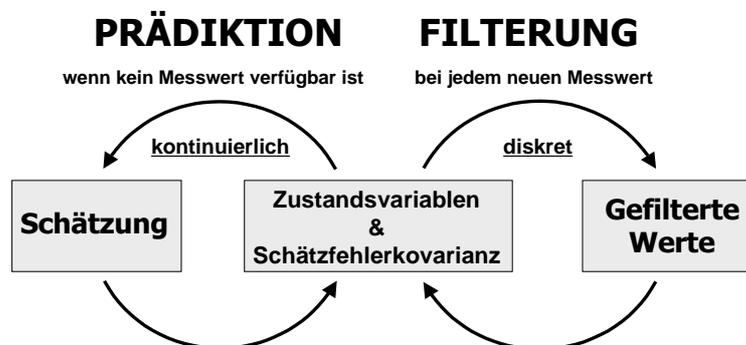


Abbildung 5: Prinzip des kontinuierlich-diskret erweiterten Kalmanfilters

Die kontinuierliche Zustandsgleichung für einen Prozess mit dem Zustandsvektor $x(t)$ und dem Prozessrauschen $z(t)$ für den allgemeinen Fall ist in Gleichung 13 dargestellt. Die Messung wird durch die diskrete Messgleichung 14 beschrieben, in der y_{t_i} der Messwert zum diskreten Zeitpunkt t_i , $h(x(t_i))$ der wahre Wert der Zustandsvariablen und $s(t_i)$ das Messrauschen ist.

$$\frac{dx(t)}{dt} = f(x(t), u(t), t) + z(t) \quad (13)$$

$$y_{t_i} = h(x(t_i)) + s(t_i) \quad (14)$$

Das Messrauschen sowie das Prozessrauschen werden dabei als weißes Rauschen aufgefasst, d. h. der Mittelwert ist Null, während die Varianz r größer als Null ist. Für die das Messrauschen beschreibende Messrauschkovarianzmatrix R bedeutet das:

$$R = E \{s(t_i) \cdot s^T(t_j)\} \quad (15)$$

Die Stärke des Prozessrauschens beschreibt die Prozessrauschleistungsmatrix Q gemäß Gleichung 16:

$$Q * \delta(\tau) = E \{z(t) \cdot z^T(t + \tau)\} \quad (16)$$

Die Messungen werden als unabhängig angesehen, die Messrauschkovarianzmatrix ist daher eine Diagonalmatrix. Durch die Vorgabe der Größe der Varianzen in R kann die Stärke des Messrauschens spezifiziert werden, wodurch Wissen über die Messgüte in das Modell einfließt. Die Prozessrauschleistungsmatrix Q ist ein Maß für die Güte des verwendeten Prozessmodells. Die Schätzfehlerkovarianzmatrix P gemäß Gleichung 17 beschreibt die aktuelle Ungenauigkeit der Schätzung des Zustandsvektors $x(t)$.

$$P_{ii}(t) = E \{(x_i(t) - \hat{x}_i(t))^2\} \quad (17)$$

Dabei ist $x_i(t)$ der wahre Wert und $\hat{x}_i(t)$ der Schätzwert des Systemzustands. Die Schätzfehlerkovarianzmatrix wird bis zum jeweiligen Eintreffen eines neuen Messwerts kontinuierlich gemäß Gleichung 18 berechnet.

$$\frac{dP(t)}{dt} = F(t) \cdot P(t) + P(t) \cdot F^T(t) + Q \quad (18)$$

$F(t)$ ist dabei die Jacobi-Matrix von $f(x(t), u(t), t)$. Sobald ein neuer Messwert zum Zeitpunkt t_i eintrifft, findet die diskrete Filterung statt, d. h. die Werte der Zustandsvariablen und die Schätzfehlerkovarianz werden zum Zeitpunkt t_i neu berechnet. Dabei wird zunächst die Kalman-Verstärkungsmatrix $K(t_i)$ gemäß Gleichung 19 bestimmt.

$$K(t_i) = P(t_i) \cdot H^T(t_i) \cdot [H(t_i) \cdot P(t_i) \cdot H^T(t_i) + R]^{-1} \quad (19)$$

Dabei ist $P(t_i)$ die Schätzfehlerkovarianzmatrix der letzten Prädiktion und $H(t_i)$ die Jakobi-Matrix von $h(x(t_i))$. Die Kalman-Verstärkungsmatrix wird dabei so berechnet, dass die Schätzfehlerkovarianz minimal wird. Mit der neu bestimmten Kalman-Verstärkungsmatrix wird nun der neue Schätzwert gemäß Gleichung 20 berechnet.

$$\hat{x}_{neu}(t_i) = \hat{x}(t_i) + K(t_i) \cdot [y(t_i) - h(\hat{x}(t_i), t_i)] \quad (20)$$

Die neue Schätzfehlerkovarianz folgt aus Gleichung 21 mit I als Einheitsmatrix.

$$P_{neu}(t_i) = [I - K(t_i) \cdot H(t_i)] \cdot P(t_i) [I - K(t_i) \cdot H(t_i)]^T + K(t_i) \cdot R \cdot K^T(t_i) \quad (21)$$

Die Berechnung des Zustandsvektors und der Schätzfehlerkovarianz geschieht nun wiederum kontinuierlich bis zum Eintreffen des nächsten Messwert usw. Die Vorhersage der Zustandsvariablen des Systems bis zum nächsten Messwert bei t_i lautet dabei gemäß Gleichung 22:

$$\frac{d\hat{x}(t)}{dt} = f(\hat{x}(t), u(t), t) \quad (22)$$

Für den speziellen Fall eines Fed-Batch-Prozesses mit einem einzigen limitierenden Substrat S und einem konstanten Probenstrom \dot{V}_{Probe} (siehe Kapitel 2.5) folgt für $f(x(t), u(t), t)$ und $z(t)$ durch Einsetzen der Differentialgleichungen des Bioprozessmodells in Gleichung 13 das Differentialgleichungssystem gemäß Gleichung 23.

$$\begin{bmatrix} \frac{dX(t)}{dt} \\ \frac{dS(t)}{dt} \\ \frac{d\mu_{max}(t)}{dt} \\ \frac{dV(t)}{dt} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \frac{\mu_{max}S(t)}{K_m+S(t)} \cdot X(t) - \frac{\dot{V}}{V(t)} \cdot X(t) \\ -\frac{\mu_{max}S(t)}{K_m+S(t)} \cdot \frac{X(t)}{Y} + \frac{\dot{V}}{V(t)} \cdot (S_0 - S(t)) \\ 0 \\ \dot{V} - \dot{V}_{Probe} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} z_X \\ z_S \\ z_\mu \\ z_V \end{bmatrix} \quad (23)$$

Die Differentialgleichungen des Prozessmodells sowie die Differentialgleichung zur Bestimmung der Schätzfehlerkovarianz können mit Hilfe eines Runge-Kutta-Verfahrens numerisch integriert werden.

Zusammengefasst liefert der diskret-kontinuierlich erweiterte Kalman-Filter also eine kontinuierliche Schätzung des Zustandsvektors des Systems. Liegt kein Messwert vor, so erfolgt die Prädiktion apriori. Beim Eintreffen eines Messwerts erfolgt eine sprunghafte Aktualisierung der Zustandsvariablen und der Schätzfehlerkovarianz. Danach wird mit einer Aposteriori-Schätzung basierend auf den aktualisierten Größen fortgefahren. Die Aposteriori-Schätzung des letzten Zustandsvektors ist somit gleichzeitig die Apriori-Schätzung für den folgenden Zustandsvektor.

3 Material und Methoden

3.1 Weitere mathematische Methoden

Zur Glättung verrauschter Werte kann ein rekursiver digitaler Tiefpassfilter verwendet werden. Die Filterung erfolgt gemäß Gleichung 24. Dabei ist w ($0 \leq w \leq 1$) die Gewichtung jedes aktuellen Werts. Je höher die Rauschamplitude, desto niedriger sollte w sein, um eine optimale Glättung zu erreichen. Bei sehr niedriger Gewichtung neuer Messwerte wird die Filterung träge, d. h. bei der Glättung von Messkurven mit großer Dynamik wird ein entsprechender Informationsverlust auftreten.

$$x_{gefiltert}(t_i) = w \cdot x(t_i) + (1 - w) \cdot x_{gefiltert}(t_{i-1}) \quad (24)$$

Der Respirationsquotient RQ der Mikroorganismen in einer Kultivierung ist der Quotient aus Kohlendioxidproduktionsrate und Sauerstoffaufnahme. Er errechnet sich gemäß Gleichung 25.

$$RQ = \frac{CPR}{OTR} = \frac{\left(\frac{Y_I \cdot Y_{CO_2}}{1 - Y_{O_2} - Y_{CO_2}} - Y_{CO_2}^0 \right)}{\left(Y_{O_2}^0 - \frac{Y_I \cdot Y_{O_2}}{1 - Y_{O_2} - Y_{CO_2}} \right)} \quad \text{mit} \quad (25)$$

CPR : Kohlendioxidproduktionsrate [$\frac{mol}{lh}$]
 OTR : Sauerstoffaufnahme [$\frac{mol}{lh}$]
 Y_I : Molenbruch d. Inertgases
 Y_G^0 : Molenbruch am Reaktoreingang
 Y_G : Molenbruch am Reaktorausgang
 mit $G = CO_2$ oder O_2

3.2 Aufbau und Charakterisierung des FIA-Systems

Das zur Onlinemessung der Glucose verwendete FIA-System entspricht in seiner Funktionsweise der bereits in 2.3.3 beschriebenen schnellen Glucose-FIA (vgl. auch Abbildungen 3 und 4). Die Hardware basiert auf einem handelsüblichen FIA-System (ANASYS CON Instrumentelle Analysetechnik GmbH, Hannover), welches für die Applikation der schnellen Glucosemessung modifiziert wurde. Das System besteht aus folgenden Komponenten:

- ein Messverstärker und eine in einem Acrylgehäuse integrierte Clark-Elektrode (ANASYS CON Instrumentelle Analysetechnik GmbH, Hannover)
- ein Selektorventil (K-6 Ventiltrieb mit 7 Port /1 Kanal Schaltventil, KNAUER, Berlin) zum Umschalten zwischen den verschiedenen Standardlösungen bei der Kalibration bzw. dem Probenstrom bei der Messung
- zwei Injektorventile (K-6 Ventiltrieb mit 6 Port /3 Kanal Injektionsventil, KNAUER, Berlin) jeweils zur Injektion der GOD-Lösung und der Probe in den Pufferstrom

- zwei Peristaltikpumpen (ACCU CP10, SciLog, USA mit Pumpenkopf Masterflex, Cole-Parmer Instrument Co., Illinois) zur Förderung des GOD- und Probenstroms bzw. des Pufferstroms

Die Probenzufuhr erfolgte durch einen Teflonschlauch, der über eine Einstechnadel direkt mit dem Reaktorinnenraum verbunden war. Alle Schlauchverbindung im FIA-System sowie das Manifold bestanden aus Teflon-Schläuchen mit Innendurchmessern 0,8 mm. Am Auslauf des Systems hinter der Sauerstoffelektrode befand sich ein Teflonschlauch mit Innendurchmesser 0,5 mm von ca. 100 cm Länge. Dieser diente zur Druckerhöhung im System (sog. Restriction coil), wodurch sich die Störanfälligkeit verringert und die durch die Pumpen verursachte Pulsation im Pufferstrom gedämpft wird. Die Fließgeschwindigkeit des Pufferstroms betrug 1,8 ml/min. Abbildung 6 zeigt den Aufbau des FIA-Systems.



Abbildung 6: Das FIA-System

Das Manifold hat die Form eines sogenannten Serpentinreaktors, d. h. der Schlauch ist in engen serpentinförmigen Kurven um zwei Metallstifte gewickelt. Das dient zur Verbesserung der Dispersion, was sich positiv auf die Genauigkeit und die Empfindlichkeit des Systems auswirkt. Die Länge des Manifold betrug 80 cm bzw. 50 cm. Zur Herstellung der GOD-Lösung wurde handelsübliche GOD von *Aspergillus niger* (Fluka, Deutschland) in FIA-Puffer gelöst. Für die durchgeführten Versuche wurden Lösungen mit Enzymaktivitäten zwischen 100000 u/l und 450000 u/l verwendet. Zur Zusammensetzung des FIA-Puffers siehe Anhang A.1.

Zur Charakterisierung des Messfehlers unter Idealbedingungen wurden mit diesem System verschiedene Messungen an Glucose-Standardlösungen bei Raumtemperatur (22 °C) vorgenommen. Die Konzentration der GOD-Lösung betrug 350000 u/l. Es wurden 10 Messreihen von

je 5 Messungen pro Standard aufgenommen. Daraus ergaben sich 50 Messungen pro Standard, darüber wurden die Standardabweichungen und die relativen Fehler für jede Konzentration bestimmt. Das Ergebnis zeigt Tabelle 2. Die Standardkonzentrationen als auch die Konzentration der GOD-Lösung lagen im Bereich der durchgeführten Kultivierungsexperimente und sind somit für diese charakteristisch.

Tabelle 2: Standardabweichung und relativer Fehler bei FIA-Messungen an Glucosestandards

Konzentration	0,05 g/l	0,1 g/l	0,15 g/l	0,2 g/l
Mittelwert [V]	0,1981	0,3557	0,4937	0,6544
Standardabweichung [V]	0,01028	0,00948	0,01061	0,01172
rel. Fehler [%]	5,1909	2,6677	2,1510	1,7913
mittlere Standardabweichung: 0,01053 V \Rightarrow mittlerer relativer Fehler: 2,95 %				

Lediglich für die in 4.3.2 beschriebene Hefekultivierung mit einem Sollwert von 0,5 g/l wurde die GOD-Konzentration auf 450000 u/l erhöht.

Der vordere Injektor des FIA-Systems war während der Kultivierungen direkt mit dem Bioreaktor verbunden, der Selektor wurde nach erfolgter Kalibration entfernt. Dieses Prinzip wurde bei allen Kultivierungsexperimenten angewandt. Dadurch wurde die Zeitverzögerung bei der Probenahme deutlich verringert und das Risiko einer Verstopfung im Selektorventil ausgeschlossen. Bei den unter 4.3 beschriebenen Hefekultivierungen wurde zur Probenahme aus dem Fermenter ein Schlauch mit 0,5 mm Innendurchmesser verwendet, bei den Bakterienkultivierungen betrug dessen Durchmesser 0,8 mm. Der Grund dafür lag in der erhöhten Verstopfungsanfälligkeit des Systems bei Kultivierungen von *E. coli*. Hefezellen sind zwar größer als Bakterien, verursachen jedoch keine derartigen Probleme. Das könnte u. a. daran liegen, dass einige Bakterienstämme unter den verwendeten Kultivierungsbedingungen Proteine ausschleusen, die das Fließsystem und die Ventile verkleben können (vgl. 4.3.3). Die Untersuchung dieses Phänomens ist jedoch nicht Ziel dieser Arbeit. Wichtiger ist das Verhindern von Verstopfungen durch Optimierung der FIA-Hardware. Das Verwenden eines Schlauchinnendurchmessers von 0,8 mm im gesamten System und einer Rotordichtung mit größerem Kanaldurchmesser im Injektorventil der Probenschleife lieferten die besten Ergebnisse. Es traten keinerlei Verstopfungen mehr auf. Die durch das größere Volumen der Probenschleife zwischen Reaktor und Injektor bedingte Zeitverzögerung konnte bei den in 4.3.3 aufgeführten Kultivierungen teilweise durch Vergrößerung des Probenahmenvolumenstroms kompensiert werden, da hier ein ausreichend großes Reaktionsvolumen zur Verfügung stand. Um die Tauglichkeit des Systems bei hohen Zelldichten zu überprüfen, wurde handelsübliche Bäckerhefe entsprechend einer Biotrockenmassekonzentration von 60 g/l in 1,5 l Schatzmannmedium gelöst. Dieser Ansatz wurde nach Zugabe von 12 g Glucose im

Batch-Verfahren kultiviert und die Glucosekonzentration mit dem FIA-System online gemessen. Dabei traten keinerlei Störungen auf.

Zur Ansteuerung der Ventile im FIA-System sowie zur Datenaufnahme und Auswertung diente die eigens für diesen Zweck entwickelte Software CAFCA (Computer Assisted Flow Control and Analysis). CAFCA wurde von Dr. B. Hitzmann am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover entwickelt und von der Firma ANASYSCON vertrieben. CAFCA läuft auf herkömmlichen PCs mit einer DA-Karte (hier ACL-8112 der Firma Adlink, Taiwan) unter DOS. Das Programm enthält Routinen zur automatischen Kalibration, zur Glättung der Messsignale sowie zur automatischen Auswertung verschiedener Messmethoden, wie z. B. der Berücksichtigung der Blindwerte bei der Ermittlung der Konzentration. Abbildung 7 zeigt den Bildschirm von CAFCA während einer Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3)pPhyt109.

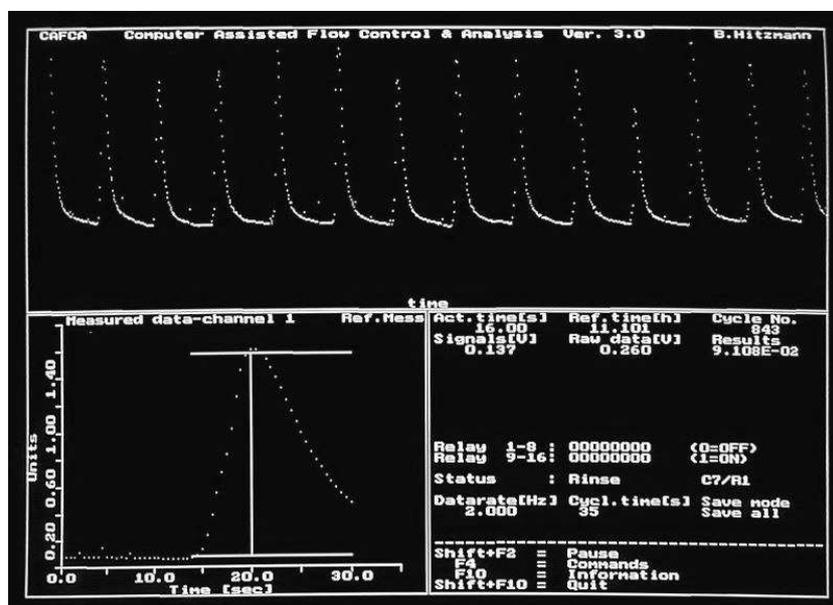


Abbildung 7: Bildschirm von CAFCA während einer Messung mit der schnellen Glucose-FIA

3.3 Die Kultivierungen

3.3.1 Die eingesetzten Mikroorganismen

Für die Hefekultivierungen wurden sowohl handelsübliche Bäckerhefe (4.2) als auch der Wildstamm *S. cerevisiae* H620 (4.3.2) verwendet. Die Stammhaltung von *S. cerevisiae* H620 erfolgte auf sterilem Schrägagar bei 7 °C im Kühlschrank.

Der in 4.3.1 und 4.2 verwendete Stamm *E. coli* MC4110 enthält ein Gen zur Produktion von grün fluoreszierendem Protein. Die Expression erfolgt nach Induktion mit IPTG. Das ist für diese Arbeit jedoch nicht von Bedeutung, da dieser Stamm lediglich als Modellorganismus stellvertretend für *E. coli* im Allgemeinen verwendet wurde. *E. coli* MC4110 ist resistent gegen die Antibiotika Ampicillin und Chloramphenicol.

Der für die Kultivierungen in 4.3.3 eingesetzte Bakterienstamm *E. coli* BL21(DE3)pPhyt109 enthält ein Plasmid (pPhyt109) mit einem Gen zur Produktion bakterieller Phytase. Für die Expression der Phytase ist ein Stationärphasenpromotor zuständig. Auf demselben Plasmid ist ein Sekretionsmechanismus lokalisiert [25, 38], welcher die direkte Sekretion der produzierten Phytase ins umgebende Medium steuert. Mit diesem Organismus ist es möglich, Phytase in einer technischen Bakterienkultivierung ohne Induktion direkt aus dem Kultivierungsmedium zu gewinnen [39]. Der Mikroorganismus ist resistent gegen das Antibiotikum Kanamycin.

Phytasen sind Enzyme aus der Gruppe der Phosphatasen. Sie spalten Phosphatgruppen von Phytinsäure ab, aber auch von anderen phosphorylierten organischen Verbindungen. Phytinsäure ist in vielen Pflanzen enthalten (z. B. Hülsenfrüchte, Getreide) und somit ein Bestandteil der Nahrung von Monogastriern (z. B. Schweine). Da Monogastrier jedoch keine eigene Phytase produzieren, können sie Phytinsäure bzw. Phytate nicht vollständig verdauen und den darin enthaltenen Phosphor nicht für den Organismus zugänglich machen. Daher muss den Futtermitteln anorganisches Phosphat beigemengt werden. Des Weiteren haben die in der Nahrung vorhandenen unverdaulichen Phytate noch einige weitere nutritische Negativwirkungen [25]. Ausserdem stellen sie in Gebieten mit intensiver Tierhaltung ein nicht zu unterschätzendes ökologisches Problem dar. Da sie unverdaut wieder ausgeschieden werden, führen sie zu einer Phosphatanreicherung in Boden und Grundwasser. Einen Ausweg aus dieser Problematik stellt die Beimengung von Phytase zum Futtermittel dar. Da die bakterielle Phytase eine wesentlich höhere Aktivität aufweist als pflanzliche Phytase, wäre ein Mikroorganismus für deren preiswerte und zuverlässige Produktion von großer technischer und ökonomischer Bedeutung.

Die Antibiotikaresistenzen der beiden beschriebenen *E. coli*-Stämme wurden zum Schutz der Kultivierungen und Vorkulturen gegen Infektionen ausgenutzt, indem die betreffenden Antibiotika dem Kulturmedium beigemengt wurden. Die Stammhaltung beider Stämme erfolgte in einer Glycerinkultur bei -80 °C.

3.3.2 Fermentationssysteme und Kultivierungsparameter

Da die Prozessführung basierend auf der schnellen Glucose-FIA zentrales Thema dieser Arbeit ist, wird bei allen Kultivierungen natürlich auch Glucose als Substrat eingesetzt.

Die Kultivierungen von *E. coli* BL21(DE3)pPhyt109 (4.3.3) wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Fermentationstechnik der Universität Bielefeld durchgeführt. Als Fermenter diente dabei ein 7 Liter-Rührkesselreaktor (MBR) mit einem doppelwandigen Stahlunterteil mit den Ansatzstutzen für die Messsonden und einem Glaszylinder als Oberteil. Der Reaktor hatte ausserdem einen Edelstahldeckel mit weiteren Anschlussstutzen. Die Rührerwelle war über eine Magnetkupplung mit dem Antriebsmotor verbunden. Zur Agitation dienten zwei Sechsstab-Scheibenrührer. Ausserdem waren vier seitliche Stromstörer montiert. Zur Sterilisation war eine Heißdampfzuleitung installiert. Die Temperierung des Bioreaktors erfolgte über den Doppelmantel im Unterteil durch Einblasen von Heissdampf bzw. Einleiten von Kühlwasser. Die Begasung erfolgte über einen Begasungsring. Der Reaktor war mit einer Reihe verschiedener Messinstrumente ausgerüstet. Zur Temperaturmessung diente ein PT100-Widerstandsthermometer, die Überwachung des pH-Wertes erfolgte mit einer sterilisierbaren Einstabmesskette der Firma Mettler Toledo (Deutschland). Die Messung der gelösten Sauerstoffkonzentration (pO_2) erfolgte mit einer sterilisierbaren Sauerstoffelektrode (Clark-Prinzip) vom Typ InPro (Mettler Toledo, Deutschland). Ausserdem verfügte das System über einen Drucksensor und ein Nadelventil zur Druckregelung im Abluftstrom. Die Steuerung des Systems erfolgte mit einer digitalen Steuereinheit (direct digital control unit, DDC) in Verbindung mit einem VME-Bus-Prozessrechner. Über diese Einheit wurden die Temperatur, der Innendruck, der pO_2 mittels der Rührerdrehzahl sowie der pH-Wert geregelt. Abbildung 8 zeigt den Aufbau des Fermentationssystems mit angeschlossenem FIA-System. *E. coli* BL21(DE3)pPhyt109 wurde bei einer Temperatur von 37 °C kultiviert. Der pH-Wert wurde durch automatische Dosierung von 10 %iger Phosphorsäure und 4 N Natronlauge auf einem Wert von 6,9 konstant gehalten. Die Begasung erfolgte mit einem konstanten Volumenstrom von 600 l/h Luft. Der pO_2 wurde mittels automatischer Erhöhung der Rührerdrehzahl auf 30 % konstant gehalten. Gestartet wurde mit einer Drehzahl von 150 U/min, die maximale Drehzahl war durch die Hardware vorgegeben und betrug 2000 U/min. Als Kultivierungsmedium diente das aus der Literatur bekannte Mineralsalzmedium nach Riesenberg, welches sich bereits vielfach insbesondere bei Hochzell-dichtekultivierungen von *E. coli* bewährt hat [45, 28]. Zur Zusammensetzung des Mediums siehe Anhang A.2. Zur Herstellung der Inokulationskultur wurden 200 ml TB-Medium (Anhang A.2) im Schüttelkolben direkt aus einer aufgetauten Glycinkultur angeimpft. Diese Kultur wurde über Nacht bei 37 °C auf einem Rotationsschüttler (150 U/min) bis zu einer optischen Dichte von ca. 25 inkubiert. Zur Zufütterung im Fed-Batch-Betrieb wurden zwei getrennte Lösungen gleichzeitig zugepumpt. Eine Lösung enthielt die Glucose zusammen mit Spurenelementen und Magnesiumsulfat, die andere Lösung enthielt einen Ammoniumphosphatpuffer und diente zur

Stickstoffversorgung (Anhang A.2) der Zellen. Bei den verwendeten Konzentrationen von Magnesiumsulfat und Ammoniumphosphat würde es beim direkten Vermischen der Lösungen zur Ausfällung von Magnesiumphosphat kommen.



Abbildung 8: Der MBR-Fermenter in Bielefeld mit angeschlossenem FIA-System

Für alle anderen Kultivierungen wurde ein 2 Liter-Bioreaktor der Firma Bioengineering AG (Schweiz) verwendet. Der Reaktor bestand aus einem Glaszylinder, als Deckel und Boden diente je eine Edelstahlplatte mit verschiedenen Ansatzstutzen für Messsonden und Probenahme. Die Rührerwelle wurde in einem gedichteten Stutzen durch den Boden des Fermenters geführt und von einem unter dem Reaktor montierten Motor direkt angetrieben. Zur Durchmischung der Kulturbrühe waren je ein großer und ein kleiner Sechsblasscheibenrührer sowie vier seitliche Stromstörer montiert. Die Temperierung des Reaktorinhalts erfolgte über ein elektrisches Heizelement bzw. ein wasserdurchströmtes stabförmiges Kühlelement. Der Reaktor ist für die In-situ-Sterilisation über das installierte Heizelement ausgelegt. Die Begasung des Reaktors erfolgte von oben über ein verjüngtes Einlassrohr direkt unter das untere Rührerblatt. Zur Temperaturmessung war der Reaktor mit einem PT100-Widerstandsthermometer ausgestattet. Die Messung des pH-Wertes erfolgte mittels einer sterilisierbaren Einstabmesskette der Firma Mettler Toledo. Eine sterilisierbare Sauerstoffelektrode vom Typ InPro (Mettler Toledo, Deutschland) zur Detektion des pO_2 war ebenfalls vorhanden. Abbildung 9 zeigt den kompletten Aufbau des Fermentationsystems bei einer Hefekultivierung. Des Weiteren besitzt der Fermenter eine Steuereinheit zur Ansteuerung des Rührers, zur Temperaturregelung sowie zur Regelung des pH-Werts. Auf eine

automatische Regelung des pO_2 auf einen festen Wert durch Variation der Rührerdrehzahl wurde bei den mit diesem System gemachten Versuchen verzichtet. Die Mikroorganismen vom Typ *E. coli* MC4110 wurden bei einer Temperatur von 35 °C kultiviert. Der pH-Wert wurde durch automatische Dosierung von 10 %iger Salzsäure und konz. Ammoniaklösung auf einem Wert von 6,9 konstant gehalten. Die Begasung erfolgte mit einem konstanten Volumenstrom von 275 l/h Luft. Die Rührerdrehzahl betrug 800 U/min. Als Kultivierungsmedium kam auch hier das bereits erwähnte Mineralmedium nach Riesenberg zum Einsatz. Zur Herstellung der Inokulationskultur wurden 50 ml Super-LB-Medium (Anhang A.2) im Schüttelkolben direkt aus einer aufgetauten Glycinkultur angeimpft. Der Ansatz wurde 14 Stunden lang bei 35 °C auf einem Rotationschüttler (120 U/min) inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde dann das im Fermenter vorgelegte Medium (1,5 l) angeimpft. In der Fed-Batch-Phase wurde im Gegensatz zu den Versuchen mit *E. coli* BL21(DE3)pPhyt109 lediglich eine Zufütterlösung gemäß Anhang A.2 hinzugepumpt, da die Stickstoffversorgung der Zellen durch das zum pH-Ausgleich verwendete NH_3 sichergestellt war.

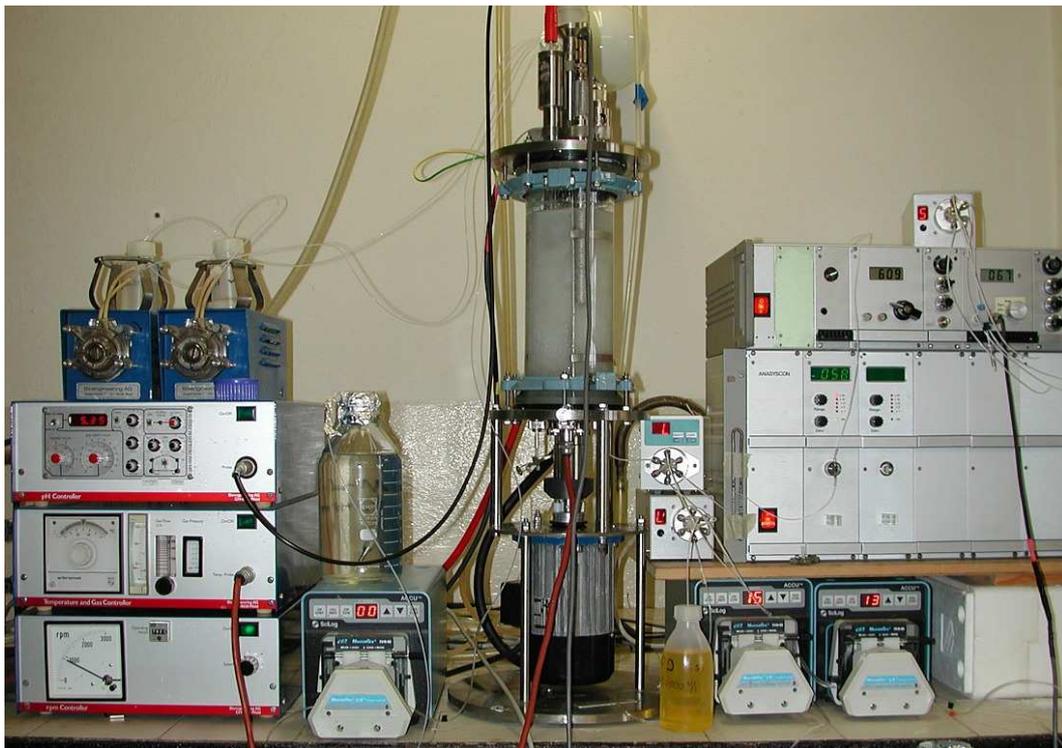


Abbildung 9: Bioengineering Bioreaktor mit Kontrolleinheit, FIA-System und Zufütterung

Alle Kultivierung von *S. cerevisiae* wurden bei einer Temperatur von 30 °C in Schatzmann-Medium durchgeführt. Der pH-Wert wurde durch automatische Dosierung von 10 %iger Salzsäure und 4 N Kalilauge auf einen konstanten Wert von 5,4 geregelt. Die Begasung erfolgte mit einem konstanten Volumenstrom von 275 l/h Luft, die Rührerdrehzahl betrug auch hier stets

800 U/min. Bei den Versuchen mit gewöhnlicher Bäckerhefe wurden keine Vorkulturen angelegt. Die Hefe wurde einfach in etwas sterilem Schatzmann-Medium suspendiert und dann in den Fermenter gegeben. Für die Kultivierungen von *S. cerevisiae* H620 wurden Inokulationskulturen in glucosehaltigem Schatzmannmedium gemäß Anhang A.2 angefertigt. Dazu wurden jeweils drei Schüttelkolben mit je 50 ml Medium mit Hilfe einer Animpfnadel inokuliert. Diese Kulturen wurden 18 Stunden lang bei 30 °C auf einem Rotationsschüttler (120 U/min) inkubiert. Zur Inokulation des Fermenters wurde dann der gesamte Inhalt aller drei Schüttelkolben in 1,5 l vorgelegtes Medium überführt. Daraus resultierte dann eine Startbiomassekonzentration von 0,66 g/l. Dieser Wert wurde aus den Versuchen empirisch ermittelt und erwies sich als gut reproduzierbar. Die Zufütterung im Fed-Batch-Betrieb erfolgte mit in Schatzmann-Medium gelöster Glucose (100 g/l).

3.4 Implementation des Reglers

Der Regler besteht im wesentlichen aus zwei Komponenten: Dem bereits in Kapitel 2.6 erläuterten diskret-kontinuierlich erweiterten Kalman-Filter zur Schätzung des Systemzustands und zur Glättung der Messwerte sowie einer Regelgleichung zur Berechnung der Pumprate der Zufütterung. Setzt man ein zutreffendes Prozessmodell voraus und hat die Startparameter für den Kalman-Filter sorgfältig bestimmt, so kann die kontinuierliche Prädiktion des Systemzustands direkt zur Berechnung der Zufütterungsrate verwendet werden. Dabei handelt es sich um eine reine „feedforward“-Regelung. Da das Wachstum von Mikroorganismen jedoch sehr vielen schwer abschätzbaren Einflüssen unterworfen ist, entwickelt es mitunter eine recht komplexe Eigendynamik. Diese ist durch ein vereinfachte Modell wie der Monod-Kinetik nur im Idealfall korrekt zu beschreiben. Um die durch Unzulänglichkeiten des Modells auftretenden Ungenauigkeiten der Vorhersage zu kompensieren, wurde die Regelgleichung durch einen „feedback“-Term ergänzt. Er enthält einen einfachen rekursiven PI-Regler. Auf diese Weise ergibt sich ein feedforward/feedback-Regler wie er in Gleichung 26 beschrieben ist:

$$\text{Pumprate} = \text{modellbasierte Regelung} + \text{diskrete PI – Regelung}$$

$$\quad \quad \quad (\text{feedforward}) \quad \quad \quad (\text{feedback}) \quad \quad \quad (26)$$

$$\dot{V}_{sub}(t_i) = \hat{V}(t) \frac{\hat{\mu}_{max} \cdot \hat{S}(t_i) \cdot \hat{X}(t_i)}{Y(K_m + \hat{S}(t_i)) \cdot (S_0 - \hat{S}(t_i))} + \dot{V}_{PI}(t_i)$$

Der Volumenstromanteil $\dot{V}_{PI}(t_i)$ der diskreten PI-Regelung errechnet sich dabei gemäß Gleichung 27:

$$\dot{V}_{PI}(t_i) = \dot{V}_{PI}(t_{i-1}) + q_0 \cdot (S_{SP} - \hat{S}(t_i)) + q_1 \cdot (S_{SP} - \hat{S}(t_{i-1})) \quad (27)$$

Kalman-Filter und Regelsystem wurden mit Borland Pascal 7.0 (Inprise Corp., USA) als Programm für PCs unter DOS-Betriebssystemen implementiert. Die Software läuft auf einem separaten Rechner (i486-PC) welcher mit zwei seriellen Schnittstellen ausgestattet ist. Eine Schnittstelle ist mit dem Messrechner (CAFCA) verbunden. Immer wenn ein neuer Messwert vorliegt, wird dieser vom Programm eingelesen und der diskreten Filterung unterzogen. Danach wird die kontinuierliche Prädiktion basierend auf den durch die Filterung angepassten Zustandsvariablen fortgesetzt, bis der nächste Messwert eintrifft. Die Integration der Differentialgleichungen wurde mit einem Runge-Kutta-Verfahren vierter Ordnung durchgeführt. Die zweite Schnittstelle ist mit der Zufütterungspumpe (ACCU CP10, SciLog, USA mit Pumpenkopf Masterflex, Cole-Parmer Instrument Co., Illinois) verbunden. Über sie werden kontinuierlich die mittels der Regelgleichung berechneten Volumenströme übermittelt. Dies Werte werden dabei mittels einer zuvor ermittelten Kalibrationsfunktion (abhängig vom Durchmesser des verwendeten Pumpenschlauchs) in eine prozentuale Pumpendrehzahl umgerechnet. Da der Pumpenmotor jedoch erst bei einer Drehzahlstufe von 5 % startet, werden kleinere Werte durch das Programm mittels Intervallschaltung zwischen 0 % und 5 % realisiert. Die Startwerte der Zustandsvariablen, die kinetischen Parameter des Prozessmodells, die PID-Parameter sowie die Werte der filterinternen Größen bezieht das Programm aus Konfigurationsdateien. Die PID-Parameter betragen für alle durchgeführten Fed-Batch-Kultivierungen $q_0 = 1,4 \frac{l^2}{gh}$ und $q_1 = -1,1 \frac{l^2}{gh}$. Die filterinternen Größen sind die Prozessrauschleistungsmatrix Q , die Schätzfehlerkovarianzmatrix P und die Messrauschkovarianzmatrix R . Da als einzige Messgröße die Glucosekonzentration in die Filterung einfließt, vereinfacht sich die Matrix R in diesem Fall zu einem Skalar. Der eingestellte Wert betrug bei allen aufgeführten Fed-Batch-Kultivierungen $R = 0,0025 \frac{g^2}{l^2}$. Dieser Wert hatte sich in verschiedenen Vorversuchen mit dem verwendete FIA-System und Simulationen als sehr praxisgerecht herausgestellt. Für alle Kultivierungen betragen die Werte der Prozessrauschleistungsmatrix:

$$Q = \begin{bmatrix} 0,001 \frac{g^2}{l^2 h} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0,001 \frac{g^2}{l^2 h} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0,05 \frac{l}{h^3} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \frac{l^2}{h} \end{bmatrix} = const$$

Die Startwerte für die Schätzfehlerkovarianzmatrix in allen Experimenten waren:

$$P(t_0) = \begin{bmatrix} 0,1 \frac{g^2}{l^2} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0,02 \frac{g^2}{l^2} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0,2 \frac{1}{h^2} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0l^2 \end{bmatrix} = f(t)$$

Die Werte von Q und R sind Konstanten, während P kontinuierlich neu berechnet wird und sich somit zeitlich ändert.

Die Startwerte für P , Q und R wurden im Vorfeld der Experimente durch Simulationen bestimmt [17]. Dazu wurde der Rechner mit dem Regelsystem über die seriellen Schnittstellen mit einem zweiten PC verbunden, auf dem ein Programm den Prozess und die Pumpe simulierte. Auf diese Weise konnte das Verhalten des Kalman-Filters bei unterschiedlichen kinetischen Parametern getestet werden.

In Abbildung 10 findet sich eine schematische Darstellung des geschlossenen Regelkreises mit allen enthaltenen Komponenten.

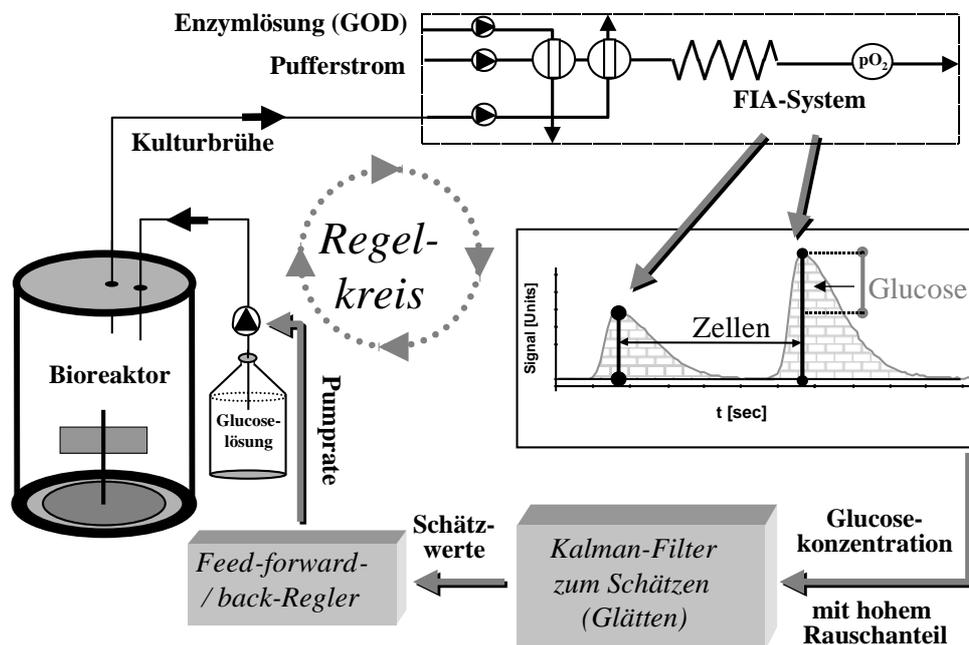


Abbildung 10: Der geschlossene Regelkreis

3.5 Die Online-Abgasanalytik

Neben der beschriebenen Glucoseanalytik und der bereits erwähnten Messung von pH und pO_2 wurde bei den Fed-Batch-Kultivierung noch eine Online-Abgasanalyse durchgeführt. Gemessen wurden die Konzentration von Sauerstoff und Kohlendioxid. Bei den Kultivierungen von *E. coli* BL21(DE3)pPhyt109 erfolgte die Bestimmung von Kohlendioxid und Sauerstoff in der Abluft mit Hilfe des Abgasanalytensystems URAS 10E (Hartmann und Braun, Deutschland). Dieses Gerät misst die Kohlendioxidkonzentration mittels IR-Adsorptions-Spektroskopie, die Sauerstoffmessung erfolgt über die paramagnetischen Eigenschaften des Moleküls. Die Datenaufnahme erfolgte ebenfalls über die angeschlossene digitale Steuereinheit (DCC).

Bei allen anderen Kultivierungen wurde zur Bestimmung von Kohlendioxid das Gerät Binos 1

(Leybold-Heraeus, Deutschland) benutzt, das Messprinzip ist auch hier die IR-Spektroskopie. Der Sauerstoffgehalt der Abluft wurde mit einem Oxinos 1C (Leybold AG, Deutschland) bestimmt. Die Datenaufnahme erfolgte hier mittels CAFCA. CAFCA unterstützt das synchrone Einlesen von Daten aus bis zu 16 Kanälen. Für alle Kultivierungen mit dem Bioengineering-Reaktor wurde mit CAFCA auf 4 Kanälen gemessen. Ein Kanal war für die Glucosemessung (FIA), einer für pO_2 , sowie jeweils einer für Kohlendioxid- und Sauerstoffgehalt der Abluft.

3.6 Die Offline-Analytik

Bei allen durchgeführten Kultivierungen wurden in festen Zeitabständen Proben der Fermentationsbrühe aus dem Bioreaktor entnommen. Die Probenahmen erfolgten in gekühlten Probengefäßen, um den Stoffwechsel der Zellen schnell auf ein Minimum zu reduzieren. Das ist insbesondere bei hohen Zelldichten wichtig, da sonst aussagekräftige Offline-Messungen nicht mehr möglich sind. Die Zellen würden z. B. im Probevolumen vorhandenes Substrat verstoffwechseln, bevor die Weiterverarbeitung der Probe stattfindet. Alle entnommenen Proben wurden einer umfassenden Offline-Analytik unterzogen, um einen besseren Überblick über den Prozessverlauf zu erhalten.

3.6.1 Optische Dichte

Die optische Dichte der Fermentationsbrühe wurde bei allen Kultivierungen von *E. coli* bei einer Wellenlänge von 600 nm und bei *S. cerevisiae* bei 540 nm gemessen. Bei höheren Zelldichten wurden die Kulturproben entsprechend verdünnt, um im linearen Messbereich der verwendeten Photometer zu liegen. Bei den in Bielefeld durchgeführten Kultivierungen von *E. coli* BL21(DE3)pPhyt109 wurde ein Photometer vom Typ Biochrom 4060 der Firma Pharmacia verwendet. Bei allen anderen Versuchen wurden die Messungen mit einem Photometer Model 25 der Firma Beckman (USA) durchgeführt.

3.6.2 Biotrockenmassekonzentration

Die Bestimmung der Biotrockenmasse erfolgte gravimetrisch durch Differenzwägung. Als Probengefäße dienten Mikroreaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg) mit 2 ml oder 1,5 ml Volumen. Die Gefäße wurden zunächst bis zur Gewichtskonstanz im Trockenschrank bei 110 °C getempert und danach im Exsikkator auf Raumtemperatur abgekühlt und bis zur Verwendung gelagert. Zur Probenaufbereitung wurden je Probe zweimal 1,0 ml in je ein Gefäß pipettiert. Danach wurden die Proben bei 10000 U/min 5 Minuten (*S. cerevisiae*) bzw. 10 Minuten (*E. coli*) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgetrennt und für die folgenden Untersuchungen eingefroren. Die Pellets werden im Trockenschrank bei 110 °C 24 Stunden lang getrocknet.

3.6.3 Bestimmung der Glucosekonzentration

Für die quantitative Offlinebestimmung der Glucose wurden zwei unterschiedliche Verfahren verwendet. Für die in Bielefeld durchgeführte Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3)pPhyt109 mit einem Glucosesollwert von 0,1 g/l wurde ein enzymatischer Test der Firma Sigma Diagnostics[©] (INFINITY[™]GLUCOSE REAGENT) nach Vorschrift des Herstellers angewandt. Die bei diesem Test resultierende rotviolette Einfärbung ist proportional zur Glucosekonzentration und wird photometrisch gemessen. Bei allen anderen Kultivierungen wurde ein YSI 2700 Select Analytator (Yellow Springs Instruments, England) zur Glucosemessung verwendet. Diesem Verfahren liegen die enzymatische Oxidation von Glucose mittels GOD und die amperometrische Messung des bei der Enzymreaktion gebildeten Wasserstoffperoxid zugrunde. Das Enzym ist auf einer Membran immobilisiert. Das Wasserstoffperoxid wird an einer Platinelektrode elektrochemisch zu Sauerstoff oxidiert. Die Stromstärke des resultierenden Stromflusses ist proportional zur Analytkonzentration.

3.6.4 Quantitative Bestimmung von Ethanol

Bei den durchgeführten Hefekultivierungen wurde der Ethanolgehalt der Fermentationsbrühe aus den Offline-Proben gaschromatographisch ermittelt. Für die Messungen wurde ein Gaschromatograph vom Typ GC-14B (Shimadzu) verwendet. Die Auswertung erfolgte mit der zugehörigen Software CLASS-VP 4.2. Die Kalibration wurde mit zwei Standards der Konzentration 1 g/l und 2,5 g/l durchgeführt. Die Standards und die zu vermessenden Proben wurden mit einem internen Standard (5 g/l n-Butanol) versetzt. Das injizierte Probenvolumen betrug jeweils 1,0 μ l. Als Trägergas wurde Stickstoff verwendet, als Brenngase Wasserstoff und Sauerstoff.

3.6.5 Quantitative Bestimmung von Acetat

Bei allen Kultivierungen von *E. coli* wurde Acetat quantitativ aus den Offlineproben bestimmt. Der Nachweis erfolgte über einen enzymatischen Test (Boehringer-Mannheim, Enzymatische BioAnalytik / Lebensmittelanalytik, UV-Test) der Firma R-Biopharm GmbH, Darmstadt, nach Vorschrift des Herstellers.

3.6.6 Bestimmung der Phytaseaktivität bei *E. coli* BL21(DE3)pPhyt109

Die Bestimmung der Phytaseaktivität basiert auf einer Farbreaktion und wurde bei den Kultivierungen von *E. coli* BL21(DE3)pPhyt109 durchgeführt. Das Messprinzip basiert auf der Reaktion von Ammoniummolybdat mit freiem Phosphat zu Ammoniummolybdophosphat, welches unter reduktiven Bedingungen in einen wasserlöslichen tiefblauen Komplex (Phosphormolybdänblau) umgewandelt wird (Heteropolyblaureaktion) [53].

Die Probelösung wurde zunächst mit einem Acetatpuffer (pH 5,5) und dann mit einer Natriumphytat-Lösung versetzt. Jeweils nach 5 und 35 Minuten Inkubation wurde ein Teil der Lösung abgetrennt, mit Schwefelsäure angesäuert, sowie mit einer Molybdatlösung und einer sulfithaltigen Reducerlösung versetzt. Die Blaufärbung der Lösungen wurde photometrisch gemessen, die Färbung der nach 5 Minuten Inkubationszeit gemessenen Probe dient als Nullwert der Absorption. Aus der Farbintensität der zweiten Probe (35 Minuten Inkubation) läßt sich dann die im Zeitraum von 30 Minuten abgespaltene Phosphatmenge und somit die Aktivität der enthaltenen Phytase bestimmen. Eine Einheit (unit) entspricht der Menge an Enzym, die 1 μmol anorganisches Phosphat von der Pytinsäure innerhalb einer Minute abspaltet.

Diese Untersuchung wurde sowohl mit dem abzentrifugierten Überstand als auch der bakterienhaltigen Probe nach Zellaufschluss mittels Ultraschall durchgeführt. Auf diese Weise ließen sich Extrazellulär-, Intrazellulär- und Gesamthytaseaktivität bestimmen.

Weitere Einzelheiten zu diesem Phytasenachweis und anderen bei den Kultivierungen von *E. coli* BL21(DE3)pPhyt109 durchgeführten Analysen (Proteine, Gesamtstickstoff, etc.) finden sich in der Literatur [25].

4 Ergebnisse

4.1 Messungen unter Verwendung von Mutarotase

Wie bereits in 2.1 beschrieben, lässt sich mittels GOD zunächst nur β -Glucose oxidieren. In wässriger Lösung liegt diese im Gleichgewicht mit α -Glucose vor (Mutarotationsgleichgewicht). Das Enzym Mutarotase katalysiert die Umwandlung von α -Glucose zu β -Glucose und verschiebt so das Gleichgewicht in der Lösung auf die Seite der β -Glucose (Mutarotation). Unter Einsatz einer Mischung aus GOD und Mutarotase (Roche) sollte es also möglich sein, die Glucosekonzentration in ihrer Gesamtheit zu erfassen und somit auch die Empfindlichkeit des Messsystems zu steigern. Für den Einsatz eines Enzymreaktors mit immobilisierten Enzymen in einem FIA-System wurde diese Methode bereits erfolgreich angewandt [55]. Frisch angesetzte Glucose-Lösung enthält zunächst nur α -Glucose, das Gleichgewicht mit β -Glucose stellt sich abhängig von der Temperatur im Laufe einiger Stunden ein. Abbildung 11 zeigt den Verlauf einer Messung an einer frisch angesetzten Glucose-Lösung (1 g/l) mit einer reinen GOD-Lösung (100000 u/l) und einer Mischung (100000 u/l + 100000 u/l) aus GOD und Mutarotase bei 20 °C. Nach 2,5 Stunden produzieren die Messungen beider Enzymlösungen gleich hohe Signale, das Gleichgewicht ist erreicht.

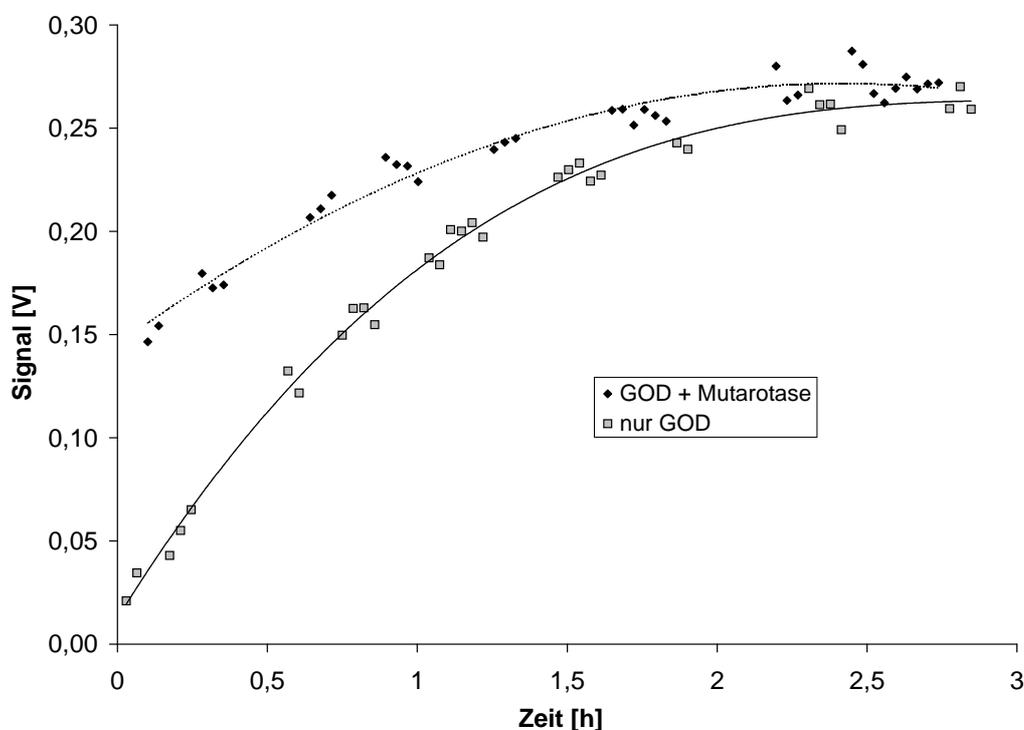


Abbildung 11: Signalhöhen bei Messungen an einer frisch angesetzten Glucoselösung unter Verwendung von Mutarotase

Eine weitere Verschiebung dieses Gleichgewichts auf die Seite von β -Glucose und somit eine Sensitivitätssteigerung konnte in diesem Versuch nicht beobachtet werden. Auch ein Versuch mit verdoppelter Mutarotasekonzentration (100000 u/l GOD + 200000 u/l Mutarotase) brachte keine signifikante Verbesserung, so wie sie im Falle immobilisierter Enzyme [55] beschrieben wurde. Möglicherweise bringt eine deutliche Erhöhung der Mutarotasekonzentration den gewünschten Erfolg, aufgrund des verhältnismäßig hohen Preises des Enzyms erscheint diese Maßnahme jedoch nicht sinnvoll. Für eine explizite Detektion von α -Glucose ist die schnelle Glucose-FIA demnach ebenfalls ungeeignet. Eine Steigerung der Sensitivität kann einfacher und billiger durch die Erhöhung der GOD-Konzentration erreicht werden. Dadurch wird lediglich der Messbereich verkleinert, da es bei hohen Glucosekonzentrationen zu einer Sauerstofflimitierung kommen kann.

4.2 Batch-Kultivierungen und Einfüsse auf die Blindwerte

Dass die Blindwerte einen großen Einfluss auf die Messung haben, wurde bereits in Kapitel 2.3 erwähnt. Bereits bei den ersten Glucosemessungen mit der schnellen FIA an realen Bioprozessen zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Höhe der Blindwerte und der Gelöstsauerstoffkonzentration im Reaktor. In Abbildung 12 wird die Reaktion auf einen Glucosepuls bei einer Kultivierung von handelsüblicher Bäckerhefe verdeutlicht.

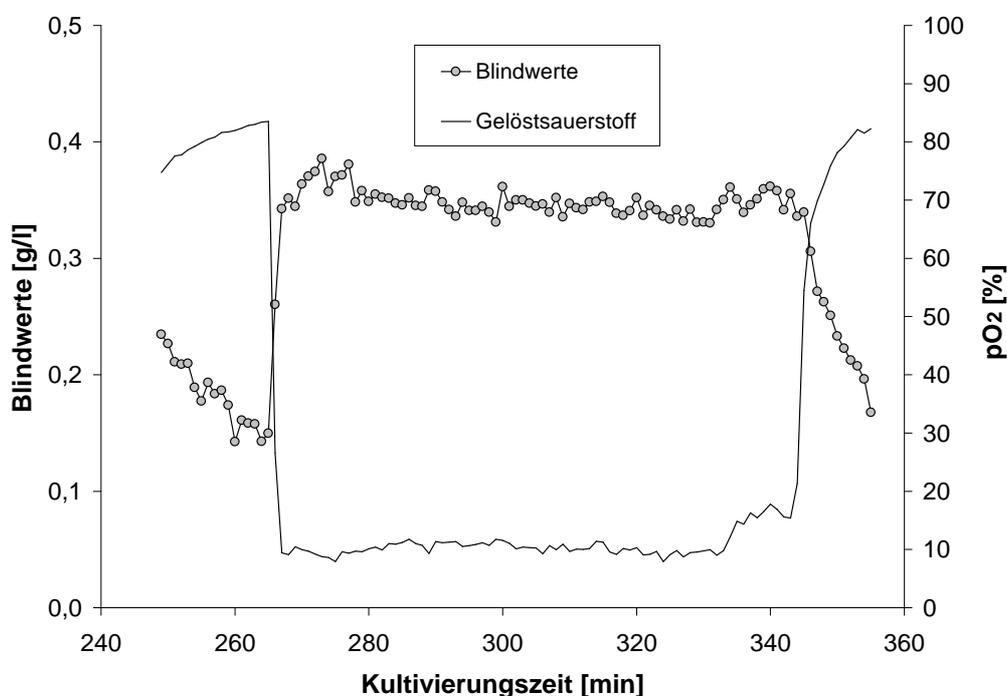


Abbildung 12: Blindwerte und pO₂ bei einem Glucosepuls in einer Kultivierung von handelsüblicher Bäckerhefe

Zum Zeitpunkt des Impulses (Konzentrationsprung auf 8 g/l Glucose) befand sich eine Bio-trockenmassekonzentration von 54 g/l Hefe im Reaktor. Die Rührerdrehzahl betrug konstant 950 U/min, die Begasung 275 l/h. Der Sauerstoffeintrag war somit konstant. Aufgrund der hohen Zelldichte im Reaktor sank der Sauerstoffpartialdruck schlagartig von 80 % auf unter 10 % ab. Parallel dazu stiegen die Blindwerte sprunghaft auf mehr als das Doppelte ihrer vorherigen Höhe an. Nachdem die eingebrachte Glucose verstoffwechselt war, fielen die Höhen der Blindwerte binnen weniger Minuten wieder ab.

Um den Einfluss der im Reaktor herrschenden Verhältnisse auf die Blindwerte noch näher zu untersuchen wurde eine Kultivierung von *E. coli* MC 4110 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 13 und 14 aufgetragen. Gestartet wurde mit einer Batchphase von 3 g/l Glucose. Ca. eine Stunde nach deren Ende wurde eine zweite Batchphase mit nochmals 3 g/l Glucose angehängt. In Abbildung 13 ist deutlich zu erkennen, dass die Höhen der Blindwerte spiegelbildlich zum pO_2 verlaufen.

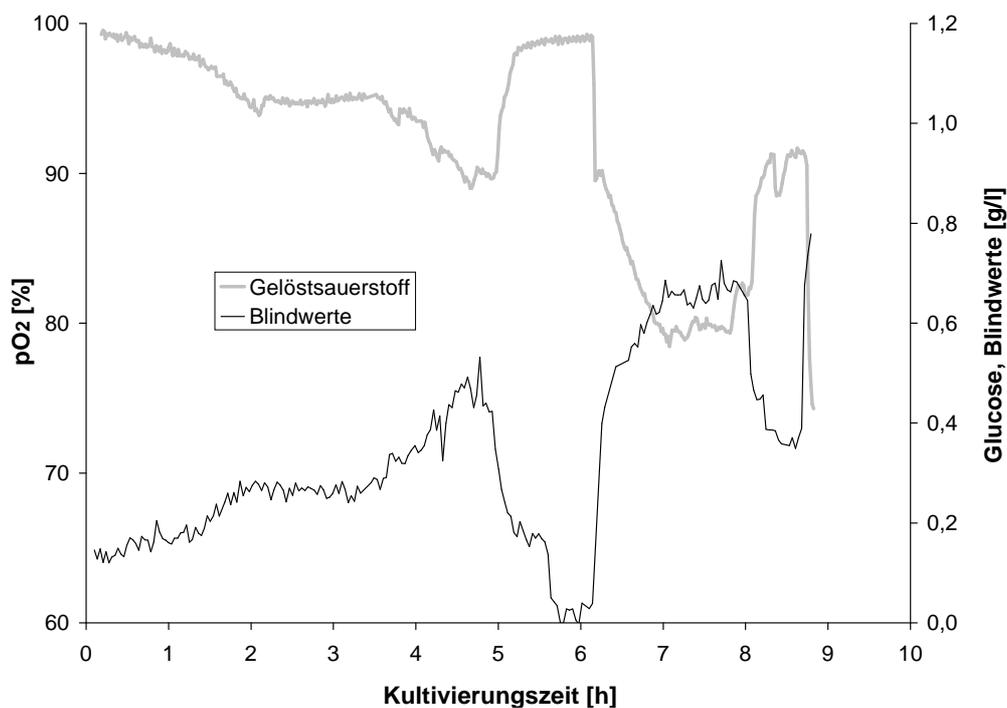


Abbildung 13: Blindwerte und pO_2 bei einer Kultivierung von *E. coli* MC4110

Aus Abbildung 14 ist ersichtlich, dass sich der Verlauf gut mit der Kurve der CO_2 -Konzentration im Abgas zur Deckung bringen lässt. Die Blindwerte reflektieren also ähnlich wie CO_2 -Konzentration im Abgas und pO_2 die metabolische (respiratorische) Aktivität der Mikroorganismen.

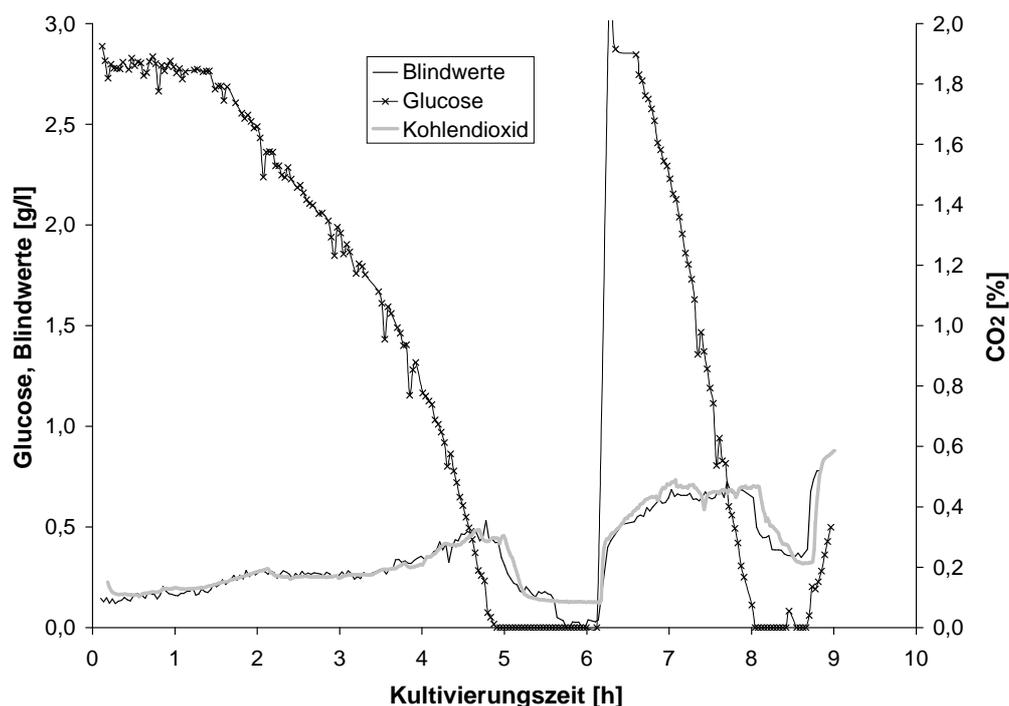


Abbildung 14: Glucosekonzentration und Blindwerte im Vergleich mit CO₂ bei einer Kultivierung von *E. coli* MC4110

Mit dem Probensegment wird praktisch eine stark verkleinerte Version des Bioreaktors in das FIA-System injiziert. Passiert dieses Segment nun die Sauerstoffelektrode, so wirkt diese wie eine Inline-Elektrode im Fermenter. In verschiedenen Kultivierungsexperimenten wurde sowohl während der Substratzufütterung als auch in der Batchphase die Rührerdrehzahl herabgesetzt, um den Sauerstoffeintrag in die Kulturbrühe herabzusetzen. Erwartungsgemäß wurde dabei jedesmal ein Absinken der gelösten Sauerstoffkonzentration im Reaktor registriert. Auf die Blindwerte hatte das jedoch keinen signifikanten Einfluss, da die Sauerstoffversorgung der Zellen im Probensegment über den Puffer sichergestellt wird. Dieses Verhalten wurde bereits in früheren Versuchen mit einem ähnlichen FIA-System [47] beobachtet.

In einem anderen Versuch wurde anstelle der Kulturbrühe sauerstofffreies (mit Stickstoff gesättigtes) Wasser in das FIA-System injiziert. Bei den in den Kultivierungsexperimenten üblichen Probenmengen (24 - 32 μ l) konnten keine Peaks detektiert werden, sie gehen im Rauschen des Detektors unter. Der entstehende Fehler ist vernachlässigbar gegenüber dem Sauerstoffverbrauch der Zellen. Sicherlich könnten bei der Verwendung entsprechend großer Probevolumina (systemabhängig) Peaks detektiert werden, für die Praxis ist das jedoch irrelevant. Die Höhe der Blindwerte ist bei dem für die im Folgenden diskutierten Kultivierungen verwendeten FIA-System also ausschließlich von der Menge und der Atemaktivität der Mikroorganismen im Probensegment abhängig.

4.3 Geregelte Fed-Batch-Kultivierung

Nach den Messungen an Batch-Kultivierungen wurde das FIA-System zur Online-Glucosemessung an Fed-Batch-Kultivierungen mit verschiedenen Mikroorganismen und zu deren Regelung in Verbindung mit dem EKF eingesetzt. Stellvertretend für alle durchgeführten Experimente werden im Folgenden die Ergebnisse von 5 Kultivierungen diskutiert.

4.3.1 Kultivierung von *E. coli* MC4110

Bei dieser Kultivierung wurde ein Glucosesollwert von $S_{SP} = 0,1$ g/l für die Fed-Batch-Phase vorgegeben. Die Überwachung durch das Regelsystem wurde noch während der Batch-Phase gestartet, und zwar bei einer Glucosekonzentration von 0,8 g/l im Reaktor. Die Startwerte des EKF sowie der kinetischen Parameter sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: EKF-Parameter für Kultivierung von *E. coli* MC4110

Parameter	Wert
t_0	6,68 h
$X(t_0)$	1,25 g/l
$S(t_0)$	0,8 g/l
S_{SP}	0,1 g/l
S_0	100 g/l
$V(t_0)$	1,35 l
$\mu_{max}(t_0)$	$0,55 \text{ h}^{-1}$
K_m	0,01 g/l
$Y_{X/S}$	0,5 g/g
R	$0,0025 \text{ g}^2/\text{l}^2$

Die Startwerte der Schätzfehlerkovarianz P und der Prozessrauschleistungsmatrix Q sind entsprechend Kapitel 3.4 gesetzt. Nach dem Start der Regelung bei $t_0 = 6,68$ h fällt die Glucosekonzentration innerhalb 0,75 h auf den Sollwert von 0,1 g/l. Die Regelung setzt sofort bei Unterschreiten dieses Setpoints ein und startet die Pumpe für die Fütterlösung (Anhang A.2), so dass die Glucosekonzentration nicht nennenswert unter den eingestellten Setpoint abfällt. Abbildung 15 zeigt den Verlauf der gemessenen und geschätzten Glucosekonzentrationen sowie der Biomasse. Zur besseren Übersicht wurde nur der Bereich ab 6 h Kultivierungsdauer dargestellt. Die Offline-Messwerte der Glucosekonzentration liegen allesamt etwas unterhalb der Online-Messwerte bzw. der Prädiktion. Das liegt wahrscheinlich daran, dass ein Teil der Glucose von den Mikroorganismen während der Probenaufarbeiten verbraucht wurde. Viel wichtiger

ist jedoch, dass die Offline-Werte der Glucosekonzentration nicht deutlich oberhalb der Online-Messwerte liegen. Das wäre ein Indiz für eine nicht optimale Funktion des Mess/Regel-Systems.

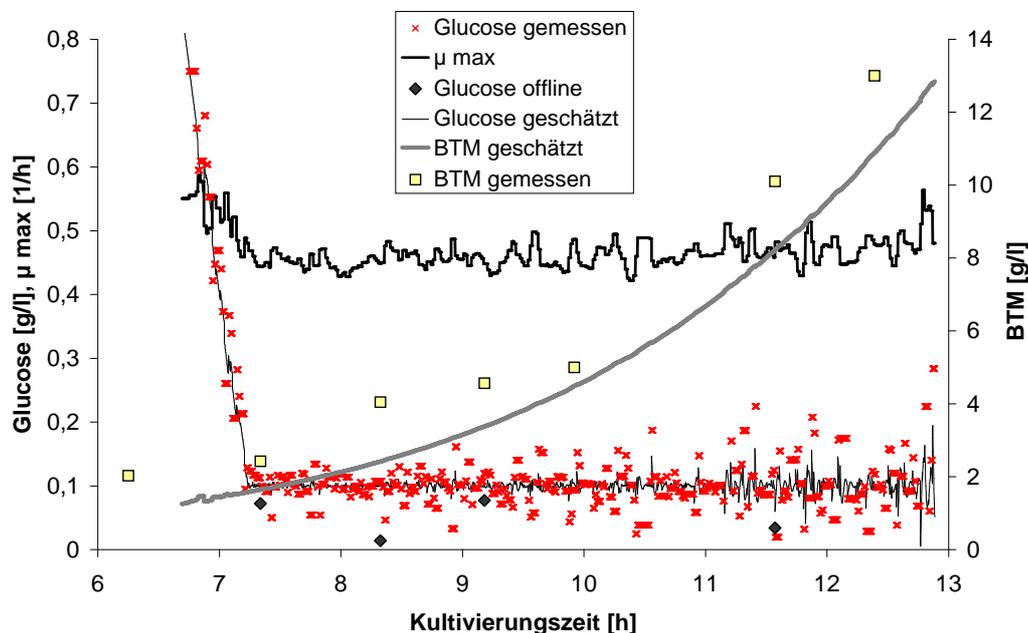


Abbildung 15: Glucosekonzentration, Biotrockenmasse und geschätztes μ_{max} bei einer Kultivierung von *E. coli* MC4110

Der Mittelwert der gemessenen Glucosekonzentration während der Fed-Batch-Phase beträgt 0,099 g/l und trifft damit den Sollwert sehr gut. Die Standardabweichung beträgt 0,043 g/l mit einer Varianz von 0,0019 g²/l². Diese liegt in der Größenordnung der eingestellten Messfehlerkovarianz R des EKF. Die Offline-Messwerte der Biotrockenmassekonzentration liegen während der gesamten Kultivierung etwas oberhalb der Prädiktion. Das mag z. T. daran liegen, dass der Vorgabewert des Ausbeutekoeffizienten mit 0,5 g/g etwas knapp bemessen ist, wahrscheinlicher ist jedoch eine Verfälschung der Wägung durch ausgefallenes Magnesiumphosphat aufgrund geringfügiger pH-Schwankungen. Ist das Magnesiumphosphat einmal ausgefallen, läßt es sich nicht mehr ohne Weiteres in Lösung bringen. Die Gelöstsauerstoffkonzentration erreicht nach etwa 11 h Kultivierungsdauer einen Wert von 30 % (vgl. Abbildung 17). Um einer Sauerstofflimitierung vorzubeugen, wurde danach die Rührerdrehzahl in Schritten von 100 U/min erhöht, der pO_2 wurde so in diesem Bereich gehalten. Die Stufe in der pO_2 -Kurve in Abbildung 17 bei ca. 10 h ist auf das Festsetzen von Luftblasen an der Elektrode aufgrund vermehrter Schaumbildung zurückzuführen. Nach erneuter Zugabe von Antischaummittel normalisierte sich der Wert sofort wieder. Wie aus Abbildung 15 ersichtlich ist, korrigiert der EKF beim Übergang aus der Batch-Phase in die Regelphase die vorgegebene maximale Wachstumsrate von 0,55 h⁻¹ auf ca. 0,45 h⁻¹. Beim Erreichen des Sollwerts und im weiteren Verlauf bleibt dieser Wert in

etwa konstant. Man beobachtet lediglich ein Schwanken um den Mittelwert der geschätzten maximalen spezifischen Wachstumsrate von $0,46 \text{ h}^{-1}$. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass die gewählten Startparameter und das Modell das Wachstumsverhalten des beobachteten Organismus ziemlich treffend beschreiben. Die Abgaswerte bestätigen diese Annahme ebenfalls. Abbildung 16 zeigt die Kurven für den Anteil von Sauerstoff und Kohlendioxid im Abgas.

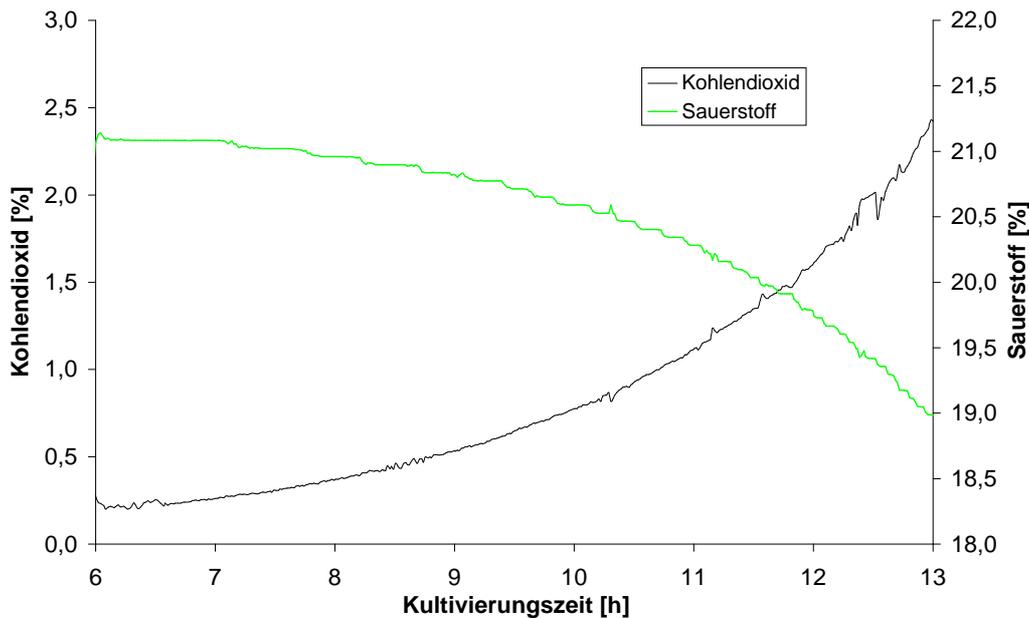


Abbildung 16: Kohlendioxid und Sauerstoff im Abgas bei *E. coli* MC4110

Der exponentielle Verlauf der CO_2 -Kurve deutet ein Wachstum ohne jegliche Limitierung an. Durch Verschiebung lassen sich die Kurven der CO_2 -Messung und der Biomassenprädiktion qualitativ zur Deckung bringen, was diese Annahme bekräftigt und ein weiteres Indiz dafür ist, dass die weiter oben beschriebene Abweichung der Offline-Werte der BTM tatsächlich nicht auf einen zu gering gewählten Ausbeutekoeffizienten zurückzuführen ist.

Die Abbildung 15 zeigt aber auch, dass das Messrauschen der Glucosemessung mit fortschreitender Prozessdauer erheblich größer wird. Durch die recht sensible Einstellung des EKF mit einer Messrauschkovarianz von $R = 0,0025 \text{ g}^2/\text{l}^2$ kommt die Fehlervergrößerung in allen geschätzten Werten zum Ausdruck. Die Abweichung der Glucosevorhersage vom Sollwert steigt somit in gleicher Weise an, beträgt aber nie mehr als $0,06 \text{ g/l}$, was immer noch relativ gering ist. Der wachsende Fehler der Glucosemessung resultiert in erster Linie aus der Zunahme der Biomassekonzentration und der damit verbundenen Verringerung des Glucoseanteils an der Gesamthöhe des Messpeaks (sehr großer Blindwert, vgl. 2.3.3).

Die Abbildung 17 zeigt eine Gegenüberstellung der Blindwerte und der Messwerte. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich das Verhältnis der beiden Anteile zueinander auf die Seite der Blindwerte verschiebt. In der letzten Phase der Kultivierung ist der durch die Atemaktivität der Zellen verursachte Sauerstoffverbrauch ungefähr sechsmal größer als der durch die Oxidation der Glucose bedingte.

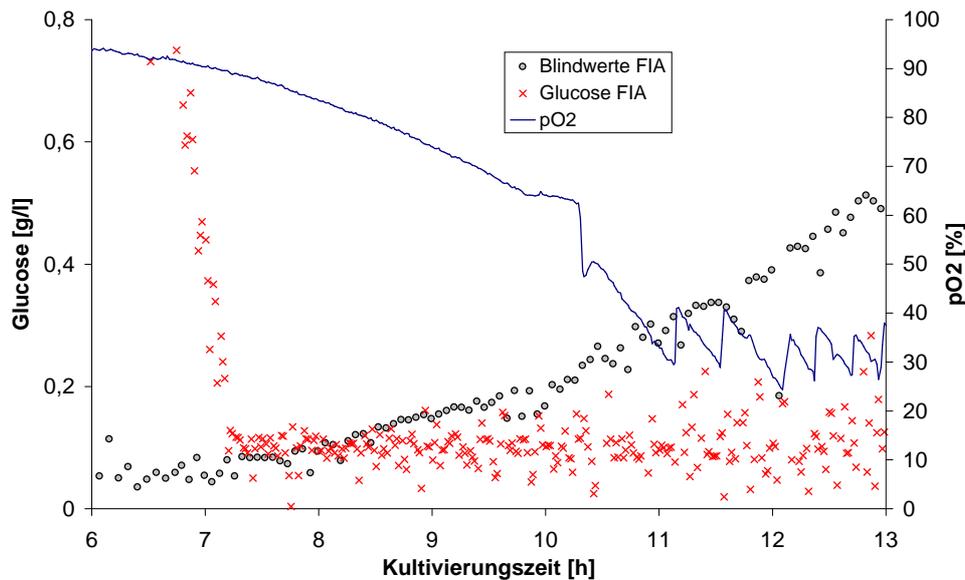


Abbildung 17: Blindwerte, Glucosekonzentration und pO_2 bei *E. coli* MC4110

Abbildung 18 zeigt die Pumprate und den Verlauf der geschätzten BTM. Betrachtet man die Pumprate, so wird klar, dass der Kalman-Filter ab ca. 11 h Kultivierungsdauer das erhöhte Messrauschen nicht mehr ausreichend kompensiert. Dazu wäre ein höherer Vorgabewert für die Messrauschkovarianz R notwendig. Trotzdem war die Qualität der Regelung ausreichend, um die Kultivierung noch für weitere zwei Stunden fortzusetzen. Erst danach wurde das System zu instabil. Alles in allem folgt der Mittelwert der Pumprate dem Kurvenverlauf der Biomassenprädiktion.

Beim Abpumpen der Probe aus dem Reaktor verbrauchen die Zellen auf dem Weg zum Detektor weiterhin Glucose, das heißt die gemessene Glucosekonzentration ist um genau diesen Betrag geringer als die real im Reaktor vorhandene. Die Fließgeschwindigkeit des Probenstroms betrug $\dot{V} = 0,75$ ml/min. Die Zeitverzögerung zwischen der Probenahme und der Auswertung des Messsignals wurde für diesen Versuchsaufbau mit $\Delta t = 45$ s bestimmt, die während dieser Zeit verbrauchte Glucosemenge ist hinsichtlich des niedrigen Sollwerts nicht vernachlässigbar. Zur Kompensation dieses Effekts kann die geschätzte Glucosekonzentration gemäß folgender Gleichung korrigiert werden:

$$S_{kor}(t) = \hat{S}(t) + \frac{\bar{\mu} \cdot \hat{X}(t)}{Y} \cdot \Delta t$$

Dabei wird für $\bar{\mu}$ der Mittelwert der geschätzten maximalen spezifischen Wachstumsrate von $\mu_{max} = 0,46\text{h}^{-1}$ eingesetzt. Abbildung 19 zeigt den Verlauf der korrigierten Glucosekonzentration im Verhältnis zur Prädiktion.

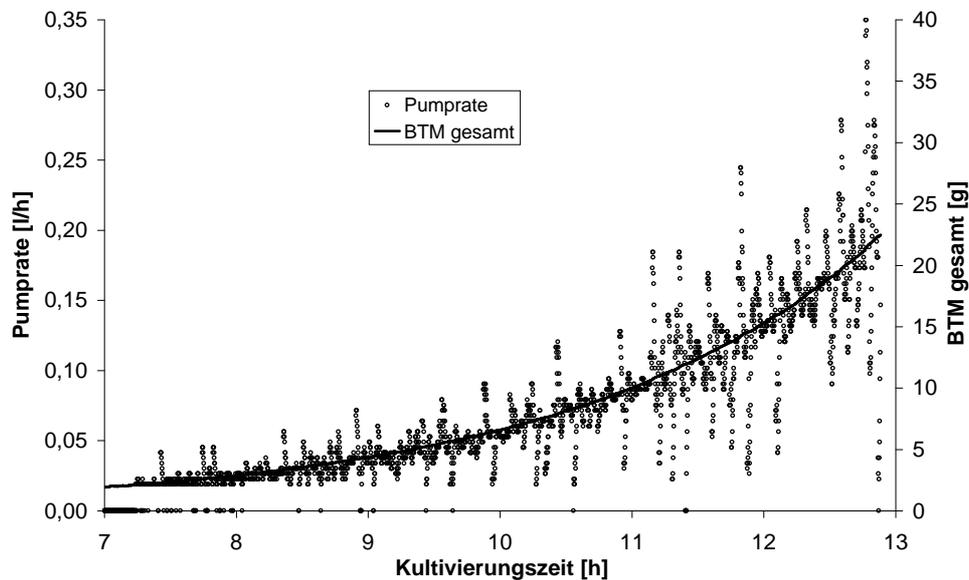


Abbildung 18: Pumprate und geschätzte Biomasse bei *E. coli* MC4110

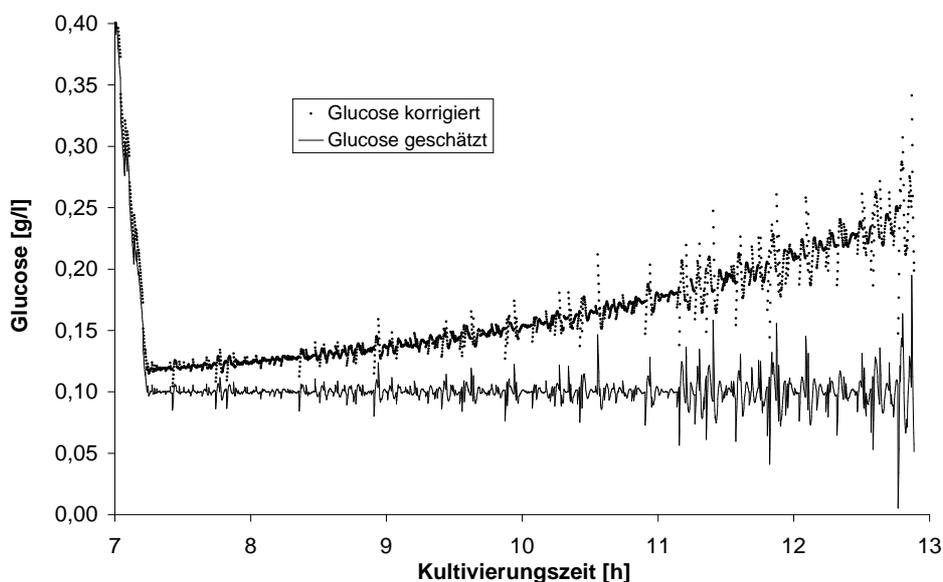


Abbildung 19: Geschätzte und korrigierte Glucosekonzentration bei *E. coli* MC4110

Aus den berechneten Werten ist jedoch ersichtlich, dass selbst die korrigierte Glucosekonzentration einen Wert von 0,25 g/l lediglich ganz am Ende der Kultivierung überschreitet. Dort war der Fehler der Messung jedoch bereits wesentlich höher als diese Abweichung.

Die höchste aus den Offline-Proben bestimmte Acetatkonzentration während der gesamten Kultivierung lag bei 0,1 g/l. Das ist bei Weitem nicht genug, um den Zellmetabolismus oder das Wachstum zu beeinflussen, ausserdem liegt dieser Wert im Bereich der Nachweisgrenze. Man kann also davon ausgehen, dass es trotz der berechneten Abweichung zwischen gemessener und realer Glucosekonzentration zu keiner deutlichen Acetatproduktion gekommen ist. Bei einem Sollwert von $S_{SP} = 0,1$ g/l ist es mit diesem Mess/Regel-System möglich, ein unlimitiertes und voll oxidatives Zellwachstum zu gewährleisten.

4.3.2 Kultivierungen von *S. cerevisiae* H620

An dieser Stelle sollen zwei Kultivierungen von *S. cerevisiae* H620 mit einem Glucosesollwert von 0,08 g/l bzw. 0,05 g/l diskutiert werden. Mit den niedrigen Sollwerten der Glucosekonzentration sollte verhindert werden, dass es zur Ethanolproduktion kommt. Die Zellen sollten nach Möglichkeit während der gesamten Kultivierung einen aeroben Stoffwechsel haben. Die Startwerte der Schätzfehlerkovarianz P und der Prozessrauschleistungsmatrix Q sind für beide Experimente entsprechend Kapitel 3.4 gesetzt. Eine Übersicht der Startwerte des EKF sowie der kinetischen Parameter enthält Tabelle 4. Der Probenstrom der FIA betrug bei beiden Kultivierungen $\dot{V} = 0,5$ ml/min.

Tabelle 4: EKF-Parameter für die Kultivierungen von *S. cerevisiae* H620

Parameter	Wert bei 0,08 g/l	Wert bei 0,05 g/l
t_0	0,0 h	0,0 h
$X(t_0)$	1,0 g/l	0,66 g/l
$S(t_0)$	0,5 g/l	0,5 g/l
S_{SP}	0,08 g/l	0,05 g/l
S_0	100 g/l	100 g/l
$V(t_0)$	1,5 l	1,5 l
$\mu_{max}(t_0)$	0,01 h ⁻¹	0,01 h ⁻¹
K_m	0,01 g/l	0,01 g/l
$Y_{X/S}$	0,25 g/g	0,3 g/g
R	0,0025 g ² /l ²	0,0025 g ² /l ²

Die Kultivierung mit einem Setpoint von 0,08 g/l wurde mit einer Batchphase von 0,5 g/l gestartet. Nach 1,46 h Kultivierungsdauer begann der Regler mit dem Zupumpen der Fütterlösung. Abbildung 20 zeigt die Glucosekonzentration, die BTM und das geschätzte μ_{max} während

des Kultivierungsverlaufs. Die gemessene Substratkonzentration ist während der gesamten Fed-Batch-Phase annähernd konstant bei 0,08 g/l, der Mittelwert beträgt 0,079 g/l. Die Standardabweichung weist einen Wert von 0,0074 g/l auf, was bezogen auf den Setpoint einem relativen Fehler von 9,3 % entspricht. Dies ist eine sehr gute Übereinstimmung mit dem Sollwert. Ähnlich wie bei der *E. coli*-Kultivierung im vorherigen Kapitel liegen die Offline-Messwerte der Glucose allesamt etwas unterhalb der Online-Messung. Der Grund dafür ist auch hier die Zeitverzögerung bei der Probenaufarbeitung.

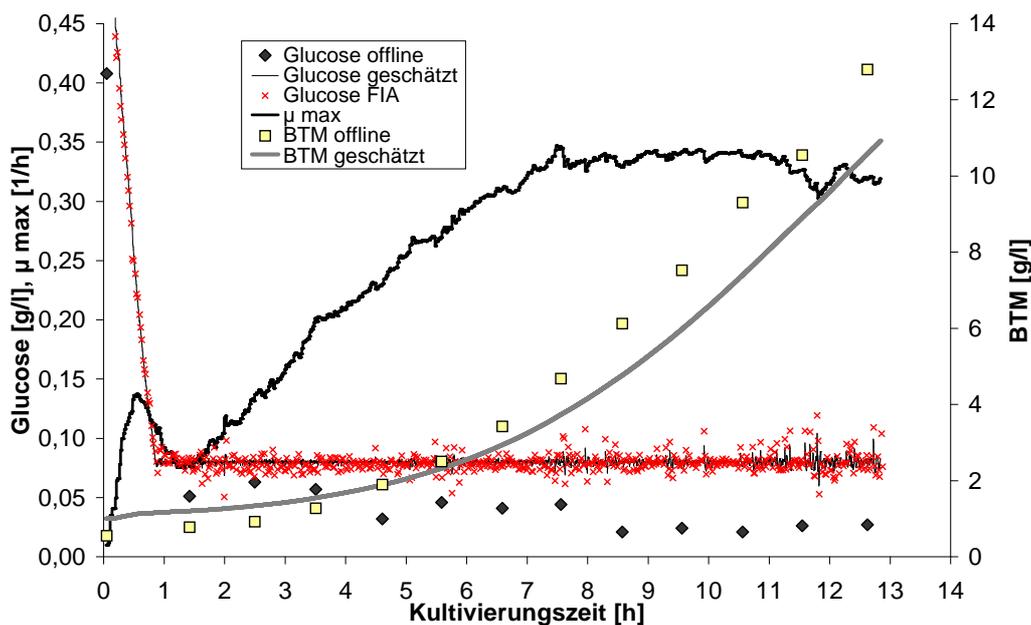


Abbildung 20: Glucosekonzentration, BTM und geschätztes μ_{max} bei einem Setpoint von 0,08 g/l Glucose

Die maximale Substratkonzentration beträgt 0,12 g/l bei 12,4 h Kultivierungszeit. In Abbildung 20 ist zu erkennen, dass zu diesem Zeitpunkt auch der Glucoseschätzwert seinen maximalen Wert mit 0,103 g/l erreicht. Der Regler reagiert mit einem kurzfristigen Abfall der Pumprate (Abbildung 21). Hier deutet sich bereits an, dass der EKF kritische Situationen schnell erkennt und gut reagiert. Vergleicht man die gemessene Biomassekonzentration mit der durch den EKF geschätzten, so fällt auf, dass der EKF zu Beginn der Kultivierung von einer höheren Konzentration ausgeht, als sie real vorhanden ist. Der Grund hierfür liegt in einer Fehleinschätzung des Startwertes der Biomasse von 1,0 g/l. Die spätere Messung ergab einen Wert von nur 0,65 g/l. Im weiteren Verlauf nimmt die reale Konzentration stärker zu als die geschätzte, so dass ab ca. 6 h real mehr Biomasse vorhanden ist, als vom EKF geschätzt. Das legt nahe, dass der Ausbeutekoeffizient mit 0,25 g/g ebenfalls etwas zu niedrig angesetzt ist. Die Biotrockenmassekonzentration betrug am Ende der Kultivierung 13 g/l. In Abbildung 21 ist die Pumprate während

der Fed-Batch-Phase dargestellt. Besonders in der Anfangsphase des Zufütterns ist eine deutliche Diskretisierung der Pumprate erkennbar. Während der ersten 4 h wechselt die Pumprate ständig zwischen 0 % und 5 % (vgl. Kapitel 3.4), danach steigert sie sich in exponentiell. Insgesamt ist die Pumprate Ausdruck für die vergleichsweise geringe Dynamik einer Hefe-Kultivierung. In der Literatur [40] finden sich Werte von 0,3 1/h bis 0,45 1/h für die maximale spezifische Wachstumsrate der Hefe. Für *E. coli* dagegen sind es abhängig vom Stamm Werte zwischen $0,5 \text{ h}^{-1}$ und $0,9 \text{ h}^{-1}$.

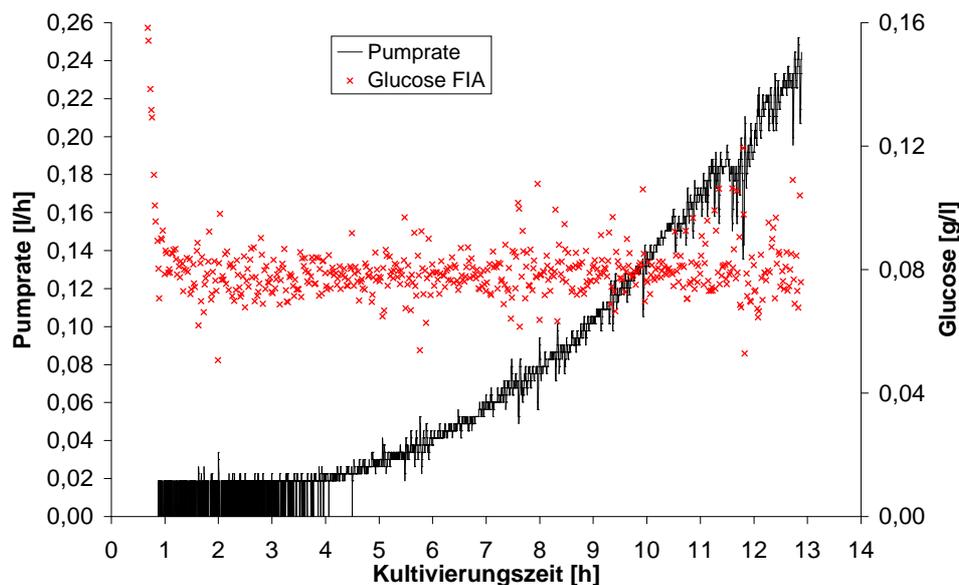


Abbildung 21: Pumprate und gemessene Glucosekonzentration bei einem Setpoint von 0,08 g/l Glucose

Im Gegensatz zu der Bakterienkultivierung in 4.3.1 wurde bei diesem Prozess der Startwert der maximalen spezifischen Wachstumsrate mit $0,01 \text{ h}^{-1}$ relativ niedrig gewählt. Dabei wurde davon ausgegangen, dass die Zellen aus der Vorkultur zunächst eine Lag-Phase durchlaufen, in der erfahrungsgemäß nur ein sehr geringes Wachstum der Zellen zu beobachten ist. Der Verlauf der geschätzten maximalen spezifischen Wachstumsrate in Abbildung 20 zeigt jedoch, dass dies nicht der Fall ist. Denn gleich zu Beginn des Prozesses ist ein schneller Anstieg auf $0,13 \text{ h}^{-1}$ zu beobachten, dem ein Abfall auf $0,08 \text{ h}^{-1}$ beim Übergang in die Regelphase folgt. In den nächsten sechs Stunden steigt die geschätzte spezifische maximale Wachstumsrate kontinuierlich an, um sich dann auf einen konstanten Verlauf einzupendeln. Während der Phase mit konstanter Wachstumsrate beträgt der Mittelwert der geschätzten maximale spezifische Wachstumsrate $\mu_{max} = 0,34 \text{ h}^{-1}$. Der anfängliche starke Anstieg des geschätzten μ_{max} auf $0,13 \text{ h}^{-1}$ resultiert aus der Fehleinschätzung des Startwertes und kann damit auf die Parameterkorrektur durch den EKF zurückgeführt werden. Die erwartete Lag-Phase direkt nach dem Animpfen der Kultur blieb also

aus. Vielmehr trat erst beim Eintritt in die Regelphase eine deutliche Wachstumsverlangsamung auf. Das könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Zellen sich nur langsam an die veränderte Umwelt anpassen. Das Zellwachstum in der Vorkultur fand unter deutlich anaeroben Bedingungen statt. Nach dem Animpfen konnte der anaerobe Metabolismus durch die Zellen noch kurze Zeit aufrecht erhalten werden, da zunächst ein leichter Glucoseüberschuss vorlag. Ein weiteres Indiz dafür ist der Verlauf der offline gemessenen Ethanolkonzentration (Abbildung 22). Am Ende der Batchphase ist zunächst noch Ethanol in der Kultur vorhanden. Es stammt aus der Vorkultur bzw. wurde während der Batch-Phase gebildet. Nach einer Stunde Regelung ist kein Ethanol mehr vorhanden, die Umstellung des Stoffwechsels findet statt.

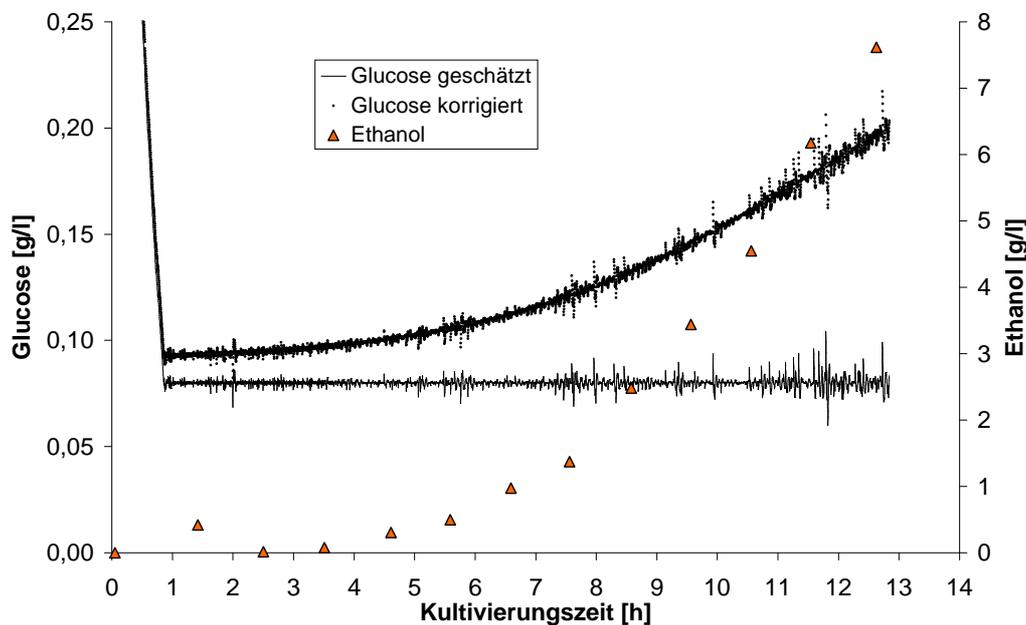


Abbildung 22: Ethanolkonzentration sowie geschätzte und korrigierte Glucosekonzentration bei einem Setpoint von 0,08 g/l Glucose

Auch bei diesem Prozess ist die Zeitverzögerung bei der Glucosemessung von 60 s und die zunehmende Biomasse im Probenstrom zu berücksichtigen. Der daraus resultierende Konzentrationsverlauf der korrigierten Glucosewerte gemäß $S_{kor}(t) = \hat{S}(t) + \frac{\bar{\mu} \cdot \hat{X}(t)}{Y} \cdot \Delta t$ (vgl. 4.3.1) mit $\bar{\mu} = 0,34 \text{ h}^{-1}$ ist in Abbildung 22 zusammen mit der Ethanolkonzentration aufgetragen. Die korrigierten Messwerte der Glucosekonzentration liegen zu Beginn der Fed-Batch-Phase schon leicht über dem Sollwert. Die korrigierte Konzentration wächst im Laufe der Prozessdauer auf 0,21 g/l Glucose im Reaktor an. Das ist eine Abweichung von 0,13 g/l gegenüber dem Sollwert. Die real im Reaktor herrschende höhere Konzentration der Glucose ist der Grund für die Ethanolproduktion während des Prozesses. Aus anderen Versuchen mit diesem Hefestamm [5, 18], die unter ähnlichen Bedingungen durchgeführt wurden, lässt sich ableiten, dass eine Glucosekonzentration

tration von ca. 0,1 g/l eine kritische Grenze für den Übergang zum anaeroben Stoffwechsel und damit natürlich auch für die Bildung von Ethanol ist. Zwischen 3 und 4 h Kultivierungsdauer überschreitet die korrigierte Glucosekonzentration diesen Grenzwert. Dort beginnt die Ethanolkonzentration tatsächlich wieder anzusteigen. Obwohl die Ethanolkonzentration im Laufe der Kultivierung ähnlich exponentiell anstieg wie die Biomasse, lag sie am Ende doch deutlich unter der BTM. Der Stamm *S. cerevisiae* H620 produziert üblicherweise ca. doppelt soviel Ethanol wie Biomasse, wenn ein deutlicher Glucoseüberschuss vorliegt ($> 0,5$ g/l). Das zeigt, dass während der gesamten Kultivierung ein vollständig fermentativer Stoffwechsel nie erreicht wurde. Die Zellen befanden sich vielmehr in einem gleitenden Übergang vom aeroben in den anaeroben Metabolismus (vgl. 2.2, Crabtree- und Pasteur-Effekt).

Aufgrund der Tatsache, dass bei einem Setpoint von 0,08 g/l Glucose noch eine deutliche Produktion von Ethanol stattfand, wurde eine weitere Kultivierung unter optimierten Bedingungen durchgeführt. Ermutigt durch den erstaunlich niedrigen Messfehler des FIA-Systems im vorherigen Versuch, wurde der Setpoint auf 0,05 g/l verringert. Des Weiteren wurde das Fließsystem, welches bislang in allen Kultivierungen gleich war, verändert. Zur Reduzierung der Zeitverzögerung der Messung wurde die Länge des Manifold von bislang 800 mm auf 500 mm verkürzt. Um die dadurch zu erwartende Vergrößerung des Messfehlers zu kompensieren, wurde die Konzentration der verwendeten GOD-Lösung auf 450000 u/l angehoben. Alle anderen Kultivierungen dieser Arbeit wurden mit einer Konzentration von 350000 u/l durchgeführt. Ausserdem konnte durch Verkürzung der Strecke zwischen Reaktor und Injektorventil sowie Verwendung eines Schlauchinnendurchmessers von 0,5 mm die Zeitverzögerung der Probenahme nochmals verringert werden. Die Pumprate der Probenahme blieb unverändert. Am Ende konnte die Gesamtzeitverzögerung gegenüber dem vorherigen Versuch halbiert werden ($\Delta t = 30$ s). Auch diese Kultivierung wurde mit einer Batchphase von 0,5 g/l Glucose gestartet.

Nach 0,8 h Kultivierungsdauer begann der Regler langsam mit dem Zupumpen der Fütterlösung. Abbildung 23 zeigt die Glucosekonzentration, die BTM und das geschätzte μ_{max} während des Kultivierungsverlaufs. Der Übergang in die Fed-Batch-Phase erfolgt hier etwas sanfter als bei der vorhergehenden Kultivierung. Die gemessene Substratkonzentration liegt während der gesamten Fed-Batch-Phase annähernd konstant beim Sollwert, der Mittelwert beträgt tatsächlich genau 0,05 g/l. Die Standardabweichung weist einen Wert von 0,0093 g/l auf, das ist etwas mehr als im Vorversuch. Bis ca. 11 h Kultivierungsdauer liegt die Messwertestreuung im Bereich der vorherigen Kultivierung, erst danach steigt sie etwas an. Auch hier beeinflusst dieser Anstieg der Streuung die Prädiktion. Sie wird zum Ende der Kultivierung zunehmend ungenauer. Bezogen auf den Setpoint beträgt der relative Fehler der Regelung 18,6 %. Bei ca. 4,4 h produzierte die FIA einen negativen Messwert aufgrund einer großen Luftblase im Fließsystem. Der Regler reagierte darauf mit einer kurzzeitigen Heraufsetzung der geschätzten Wachstumsrate, worauf ein kurzzeitiger Sprung in der Pumprate der Zufütterung folgte (vgl. auch Abbildung 24).

Daraus resultierte dann natürlich eine Überhöhung der Glucosekonzentration, welche durch den EKF jedoch schnell wieder geglättet wurde. Verantwortlich für diesen Effekt ist auch hier die hohe Empfindlichkeit des Reglers ($R = 0,0025 \text{ g}^2/\text{l}^2$). Die Offline-Werte der Glucosekonzentration decken sich auffällig gut mit der Online-Messung und der Prädiktion, die Genauigkeit der Offline-Messung ist bei dieser niedrigen Konzentration jedoch fraglich.

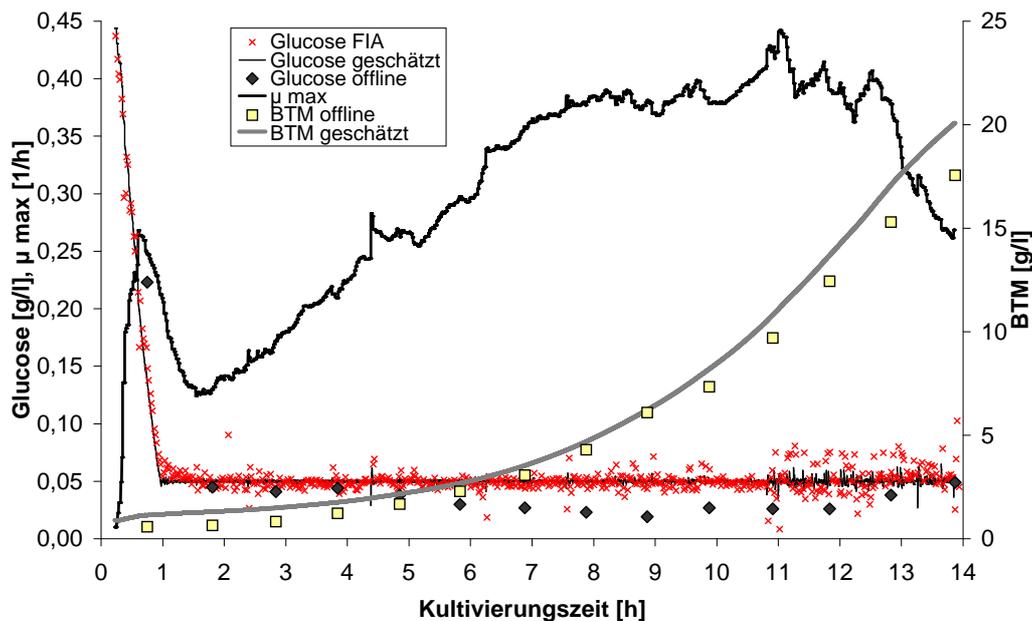


Abbildung 23: Glucosekonzentration, BTM und geschätztes μ_{max} bei einem Setpoint von 0,05 g/l Glucose

Auffällig bei dieser Kultivierung ist die gute Übereinstimmung der geschätzten BTM mit den gemessenen Werten. Die kinetischen Parameter sowie die Startwerte wurden hier deutlich besser getroffen als bei der ersten Hefekultivierung (Tabelle 4). Der Verlauf der geschätzten spezifischen Wachstumsrate entspricht qualitativ dem der Kultivierung mit dem Sollwert von 0,08 g/l. Nach einem schnellen Anstieg direkt nach der Inokulation auf $0,26 \text{ h}^{-1}$ folgt ein Abfall auf $0,12 \text{ h}^{-1}$ beim Übergang in die Regelphase. Danach steigt der Wert ebenfalls über einen Zeitraum von ca. 6 h auf ein Maximum an, das er abgesehen von einigen temporären Störungen ebenfalls für weitere 6 Stunden hält. Der Mittelwert der geschätzten maximalen spezifischen Wachstumsrate in diesem Zeitfenster liegt mit $\mu_{max} = 0,38 \text{ h}^{-1}$ allerdings etwas höher. Abbildung 24 zeigt die Pumpraten zusammen mit den Messwerten der Glucose-FIA. Hier wird der bereits erwähnte Anstieg des Fehlers gegen Ende der Kultivierung nochmals sehr deutlich. Nach einer Phase deutlicher Diskretisierung am Anfang steigt die Pumprate exponentiell an. Nach ca. 12,5 h fällt sie dann jedoch wieder ab. Dieser Effekt ist auch im Verlauf des μ_{max} zu erkennen. Auch die Kurve der BTM flacht gegen Ende wieder ab. Offensichtlich fand hier eine Störung des Wachstums der

Zellen statt, worauf der EKF mit verringerter Zufütterung reagierte. Der Grund dafür war wahrscheinlich die Limitierung anderer essentieller Substanzen wie z. B. Stickstoff, Magnesium oder einiger Spurenelemente. Auch die CO_2 -Konzentration im Abgas (Abbildung 25) spiegelt diesen Abfall der Stoffwechselaktivität wieder. Während dieser Phase wurde jedoch weiter Biomasse gebildet, wenn auch deutlich langsamer. Die BTM betrug am Ende der Kultivierung 18 g/l.

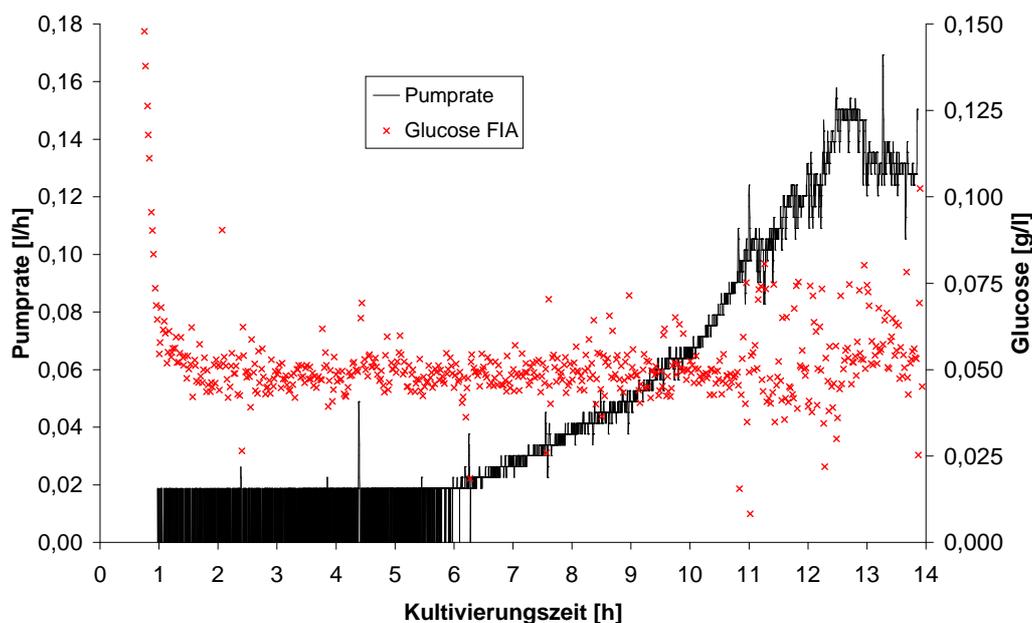


Abbildung 24: Pumpraten und gemessene Glucosekonzentration bei einem Setpoint von 0,05 g/l Glucose

In Abbildung 25 sind die Messwerte der Abgasanalytik beider Kultivierungen gegenübergestellt. Bei Setpoint 0,05 g/l ist ein stärkerer Abfall des Sauerstoffgehalts gegenüber eines geringeren Anstiegs der Kohlendioxidkonzentration verglichen mit Setpoint 0,08 g/l zu erkennen. Bei der Kultivierung mit Sollwert 0,05 g/l standen nach 10,5 h bedingt durch einen Defekt des Messgerätes leider keine Sauerstoffmesswerte mehr zur Verfügung. Aus den gemessenen Werten des Sauerstoff- und des Kohlendioxidgehalts im Abgas läßt sich der Respirationsquotient RQ berechnen (3.1). Der RQ ist das Verhältnis von Kohlendioxidproduktionsrate zu Sauerstoffaufnahme. Mit Hilfe des RQ läßt sich erkennen, ob der Stoffwechsel der Zellen konstant ist (RQ ist konstant), oder ob er Änderungen unterliegt. Abbildung 26 zeigt den Verlauf der Respirationsquotienten beider Kultivierungen im Vergleich mit den Ethanolkonzentrationen. Für den Glucosesollwert von 0,05 g/l liegt der RQ bis 11 h Kultivierungsdauer ziemlich konstant bei 1,0. Das heißt der Stoffwechsel der Zellen unterliegt in diesem Zeitraum keinerlei Veränderung. Der Wert von 1,0 für den Respirationsquotienten bedeutet jedoch noch etwas anderes: Der gesamte eingeatmete Sauerstoff findet sich im gebildeten Kohlendioxid wieder. Eine Produktion von

Ethanol ist also auszuschließen, denn dabei würde der RQ größer als 1,0 werden.

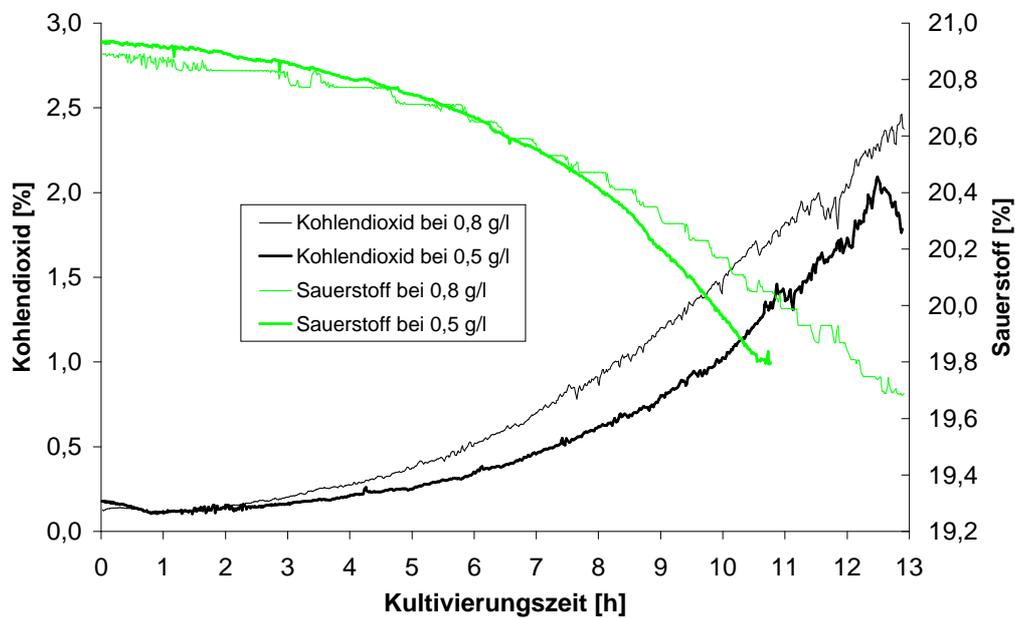


Abbildung 25: Sauerstoff- und CO₂-Gehalt der Abluft beider Hefekultivierungen im Vergleich

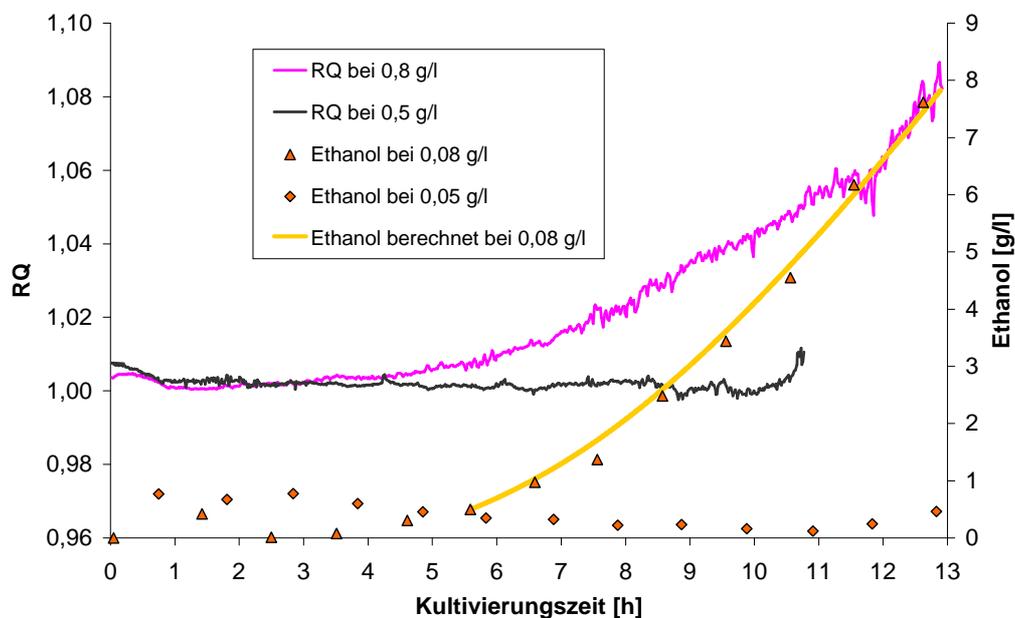


Abbildung 26: Respirationsquotient und Ethanolproduktion beider Hefekultivierungen im Vergleich mit der berechneten Ethanolkonzentration bei Sollwert 0,08 g/l

Bei 0,05 g/l Glucose befinden sich die Zellen also im rein oxidativen Stoffwechsel. Die Ethanolmesswerte in Abbildung 26 bestätigen das. Auch hier ist am Anfang noch eine geringe Menge Ethanol aus der Vorkultur vorhanden, die Konzentration geht während der Fed-Batch-Phase aber gegen Null. Das ist wahrscheinlich auf Verdünnungseffekte zurückzuführen, da die Zellen unter rein aeroben Bedingungen ohne Glucoselimitierung kein Ethanol verstoffwechseln. Bei Setpoint 0,08 g/l dagegen beginnt der RQ bei 4 h anzusteigen. Auch die Ethanolproduktion steigt an dieser Stelle an. Das bestätigt das bereits aus Abbildung 22 abgeleitete langsame Abdriften in den fermentativen Stoffwechsel. Berechnet man für die Kultivierung mit dem Sollwert von 0,05 g/l Glucose die reale Glucosekonzentration unter Berücksichtigung der Zeitverzögerung des Messsystems gemäß $S_{kor}(t) = \hat{S}(t) + \frac{\bar{\mu} \cdot \hat{X}(t)}{Y} \cdot \Delta t$, so ergibt sich der in Abbildung 27 dargestellte Verlauf. Dabei betragen $\bar{\mu} = 0,35 \text{ h}^{-1}$ und $\Delta t = 30 \text{ s}$. Beim Vergleich der korrigierten Glucosekonzentration mit der Ethanolproduktion und dem Respirationsquotienten deutete sich bei der Kultivierung mit einem Setpoint von 0,08 g/l Glucose eine kritische Glucosekonzentration von 0,1 g/l für den Übergang in den fermentativen Stoffwechsel an. Dieser Wert wird bei der Kultivierung mit dem Sollwert von 0,05 g/l erst nach 11 h Kultivierungsdauer überschritten. Wie bereits erwähnt, ist der RQ bis zu diesem Zeitpunkt konstant 1,0 und es findet keine Ethanolproduktion statt. Die zuvor gemachte Annahme des kritischen Wertes von 0,1 g/l Glucose scheint sich somit zu bestätigen.

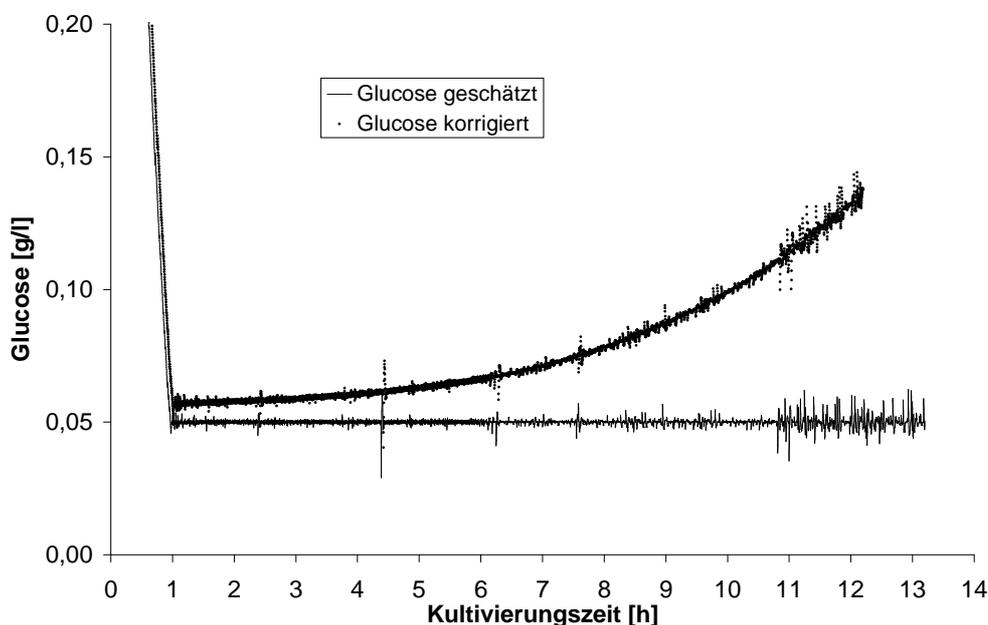


Abbildung 27: Geschätzte und korrigierte Glucosekonzentration bei einem Setpoint von 0,05 g/l

Für beide Kultivierungen wurde aus der Zufütterungsrate und der Gesamtbiotrockenmasse die spezifische Glucoseaufnahme q_S gemäß folgender Gleichung berechnet:

$$q_S = \frac{\dot{V}_f(t) (S_0 - S_{SP})}{X(t) V(t)}$$

Die Werte der Pumprate $\dot{V}_f(t)$ wurden dafür zuvor mit einem rekursiven digitalen Tiefpassfilter (3.1) mit einer Gewichtung von 0,11 geglättet. Die reale Biomasse wurde aus einem an die offline gemessenen BTM-Werte angepassten Polynom 5. Ordnung ermittelt. Abbildung 28 zeigt die berechneten Glucoseaufnahmeleistungen beider Kultivierungen im Vergleich.

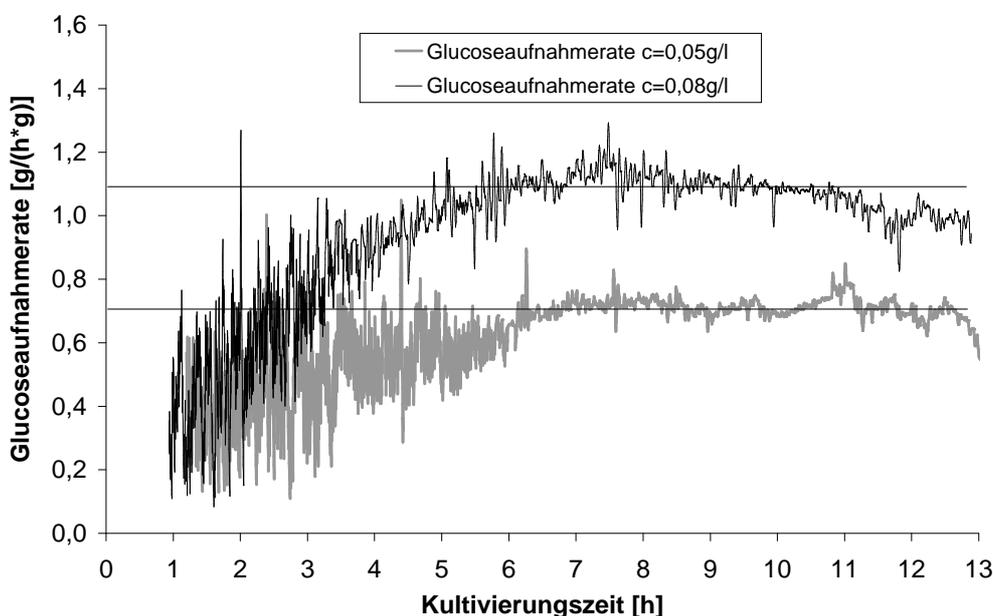


Abbildung 28: Glucoseaufnahmeleistungen beider Hefekultivierungen im Vergleich

Die starke Schwankung der Pumpraten am Anfang der Experimente ließ sich auch durch die Filterung nicht vollständig glätten und spiegelt sich in den Glucoseaufnahmeleistungen wieder. Zwischen 6 und 12 h Kultivierungsdauer waren die Glucoseaufnahmeleistungen bei beiden Kultivierungen annähernd konstant, es herrschten konstante Wachstumsbedingungen. Die Mittelwerte der Glucoseaufnahmeleistung in diesem Zeitraum betrugen 1,038 g/(gh) bzw. 0,676 g/(gh) für einen Setpoint von 0,08 g/l bzw. 0,05 g/l.

Bei der Kultivierung mit einem Glucosesollwert von 0,08 g/l wird nach ca. 4 h Kultivierungsdauer eine Glucoseaufnahmerate von 0,8 g/(gh) überschritten. Das war genau der Zeitpunkt, zu dem auch der RQ und die Ethanolkonzentration anstiegen (Abbildungen 26 und 22). Es könnte sich bei diesem Wert also um die bereits in Kapitel 2.2 erwähnte kritische Glucoseaufnahmerate $q_{S,krit}$ für den Hefestamm H620 unter den gegebenen Kultivierungsbedingungen handeln.

Geht man davon aus, dass 0,05 g/l die höchstmögliche Glucosekonzentration für rein oxidatives Zellwachstum ist, so spiegelt die Differenz der beiden spezifischen Glucoseaufnahmeraten die Menge an Kohlenstoff wieder, welche in Ethanol gebunden und nicht zur Produktion von Biomasse genutzt wird. Unter anaeroben Bedingungen entstehen aus einem Molekül Glucose zwei Moleküle Ethanol. Unter Berücksichtigung des Molmassenverhältnisses von Ethanol und Glucose kann man so aus der Differenz der Glucoseaufnahmeraten eine spezifische Ethanolproduktionsrate EPR berechnen:

$$EPR = (q_{S,0,08} - q_{S,0,05}) \cdot \frac{2 \cdot 46 \text{ gEmol}^{-1}}{180 \text{ gGmol}^{-1}} = 0,185 \frac{\text{gE}}{\text{gXh}}$$

In Abbildung 26 ist die theoretische Ethanolkonzentration dargestellt, welche sich aus dieser spezifischen Ethanolproduktionsrate mittels numerischer Integration berechnen läßt. Gestartet wurde dabei mit dem Ethanolmesswert bei 5,6 h Kultivierungsdauer, da eine Beeinflussung des Stoffwechsels aufgrund der Diskretisierung der Zufütterung bis zu diesem Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden kann. Wie in Abbildung 26 zu sehen ist, deckt sich der so berechnete Verlauf der Ethanolkonzentration gut mit den gemessenen Werten.

4.3.3 Kultivierungen von *E. coli* BL21(DE3)pPhyt109

Die Kultivierungen des phytaseproduzierenden Organismus *E. coli* BL21(DE3)pPhyt109 wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Fermentationstechnik der Universität Bielefeld durchgeführt. An dieser Stelle sollen die Ergebnisse zweier Fed-Batch-Kultivierung mit einem Sollwert von je 0,2 g/l und 0,1 g/l Glucose diskutiert werden. Einen Überblick über die Startwerte des EKF sowie die kinetischen Parameter beider Versuche enthält Tabelle 5. Beide Kultivierungen begannen mit einer Batchphase von 6 g/l Glucose. Zusammen mit der Biomasse aus der Inokulationskultur ergab sich so am Ende der Batch-Phase immer eine BTM von 3,2 g/l im Reaktor. Dieser Wert war zuvor genauso wie der entsprechende Ausbeutekoeffizient empirisch bestimmt worden. Die Startwerte für P und Q blieben auch hier unverändert. Die Startbiomasse wurde deshalb so hoch gewählt, um die aus den Kapiteln 4.3.1 und 4.3.2 bekannte Schwankung der Pumprate zu Beginn der Regelphase weitestgehend zu vermeiden, denn die Glucosekonzentration der zugepumpten Fütterlösung betrug hier 500 g/l. Bei diesen Versuchen war es nicht möglich, das FIA-System so nah am Fermenter zu plazieren, wie es bei den Kultivierungen mit dem Bioengineering-Reaktor der Fall war. Um die Zeitverzögerung dennoch nicht zu groß werden zu lassen, wurde deshalb der Volumenstrom der Probenahme auf $\dot{V}_{Probe} = 1,4$ ml/min erhöht. Das war hier möglich, da aufgrund des größeren Reaktionsvolumens nicht die Gefahr eines unbeabsichtigten Leerpumpens des Reaktors bestand. Die Zeitverzögerung der Online-Glucosemessung betrug $\Delta t = 45$ s.

Tabelle 5: Parameter für zwei Kultivierungen von *E.coli* BL21(DE3)pPhyt109 mit Setpoint 0,2 g/l bzw. 0,1 g/l

Parameter	Wert bei $S_{SP}=0,2$ g/l	Wert bei $S_{SP}=0,1$ g/l
t_0	4,3 h	3,1 h
$X(t_0)$	3,2 g/l	3,2 g/l
$S(t_0)$	0,78 g/l	0,5 g/l
S_{SP}	0,2 g/l	0,1 g/l
S_0	500 g/l	500 g/l
$V(t_0)$	2,7 l	2,7 l
$\mu_{max}(t_0)$	$0,35 \text{ h}^{-1}$	$0,35 \text{ h}^{-1}$
K_m	0,01 g/l	0,01 g/l
$Y_{X/S}$	0,42 g/g	0,42 g/g
R	$0,0025 \text{ g}^2/\text{l}^2$	$0,0025 \text{ g}^2/\text{l}^2$

Abbildung 29 zeigt den Verlauf einer Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3)pPhyt109 mit einem Sollwert von 0,2 g/l Glucose. Dargestellt sind das geschätzte μ_{max} im Vergleich zur Glucosekonzentration und zur Biomassekonzentration. Nach dem Start des EKF bei $t_0 = 4,3$ h fällt die

Glucosekonzentration innerhalb weniger Minuten auf den Sollwert von 0,2 g/l ab. Die Regelung setzt sofort beim Erreichen des Setpoints ein und startet die Zufütterung (Anhang A.2). Abbildung 30 zeigt den Verlauf der gemessenen und geschätzten Glucosekonzentrationen im Vergleich mit den Offline-Messwerten. Zur besseren Übersicht wurde dabei nur der Bereich der Regelphase dargestellt. Die Offline-Messwerte der Glucosekonzentration liegen zunächst unterhalb und später genau innerhalb des Bereichs der Online-Messwerte bzw. der Prädiktion. Selbst durch Kühlung der Probengefäße ließ sich während der Phase maximalen Stoffwechsels der Glucoseverbrauch durch die Mikroorganismen nicht vollständig stoppen. Der Mittelwert der gemessenen Glucosekonzentration während der Fed-Batch-Phase beträgt 0,208 g/l und liegt damit gut im Bereich des Sollwert. Die Standardabweichung beträgt dabei über die gesamte Fed-Batch-Phase 0,066 g/l, das entspricht einem relativen Fehler von 31 % bezogen auf den Sollwert.

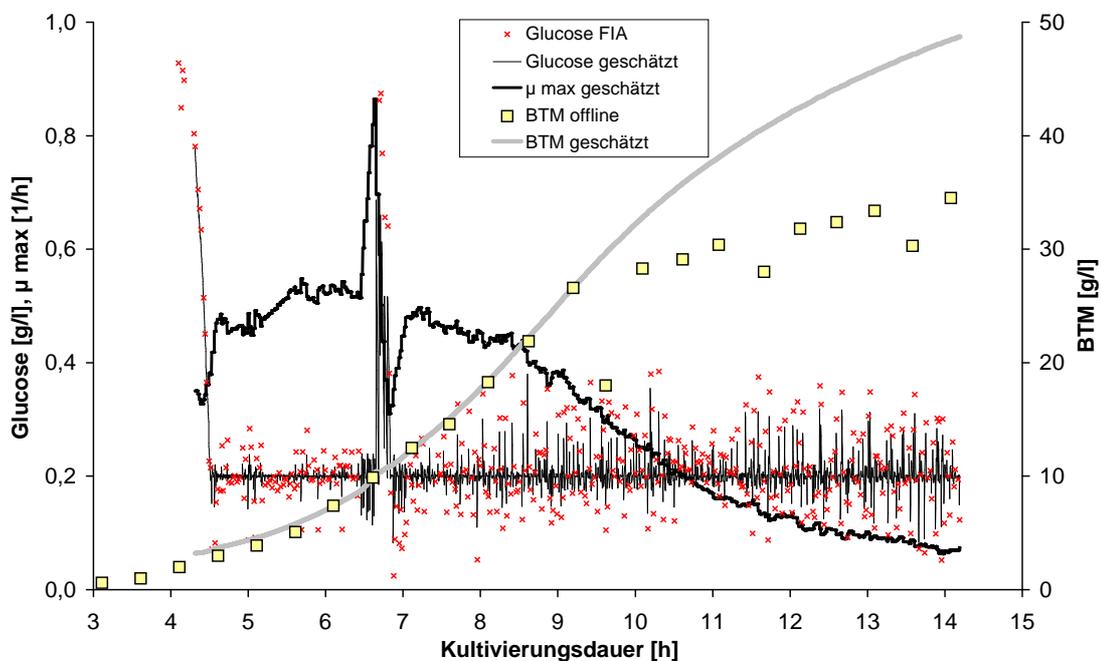


Abbildung 29: Verlauf von Glucosekonzentration, Biotrockenmassekonzentration und μ_{max} bei einem Setpoint 0,2 g/l Glucose

Sehr auffällig bei dieser Kultivierung ist zunächst der kurze sprunghafte Anstieg der Glucosekonzentration auf 0,9 g/l nach 6,7 h, welcher durch den genau an dieser Stelle aufgenommenen Offline-Messwert bestätigt wird (Abbildung 30). Hierbei handelte es sich um eine temporäre Verstopfung in der zur Probenahme verwendeten Kanüle. Diese Art von Fehler tritt bei diesem System normalerweise nicht auf. Wie sich herausstellte, hatte ein im Reaktor befindlicher Fremdkörper vorübergehend die Probenahmekanüle verstopft. Das Messsystem konnte so für einige Minuten keine Glucose mehr detektieren, d. h. die gemessene Konzentration war gleich

Null. Der Regler reagierte darauf natürlich mit verstärkter Zufütterung. Nach Beseitigung dieser Störung trafen wieder korrekte Messwerte ein. Der EKF schaltete die Zufütterung vorübergehend ab, bis die Glucosekonzentration wieder im Bereich des Sollwert lag. In Abbildung 29 wird deutlich, wie der Kalman-Filter auf diese Störung reagiert hat. Die fehlerhaften Messwerte stellten sich für den EKF als Erhöhung der Glucoseaufnahme dar, dadurch stieg das geschätzte μ_{max} stark an. Die schnelle Reaktion auf den Fehler sowie dessen Behebung ist auf die auch hier mit $R = 0,0025 \text{ g}^2/\text{l}^2$ recht niedrig angesetzte Messrauschkovarianz zurückzuführen. Bei Bestimmung der o. g. Standardabweichung wurden die gestörten Messwerte zwischen 6,5 h und 7 h nicht mit einbezogen. Der zu niedrige BTM-Messwert bei 9,5 h resultiert aus einer Fehlmessung.

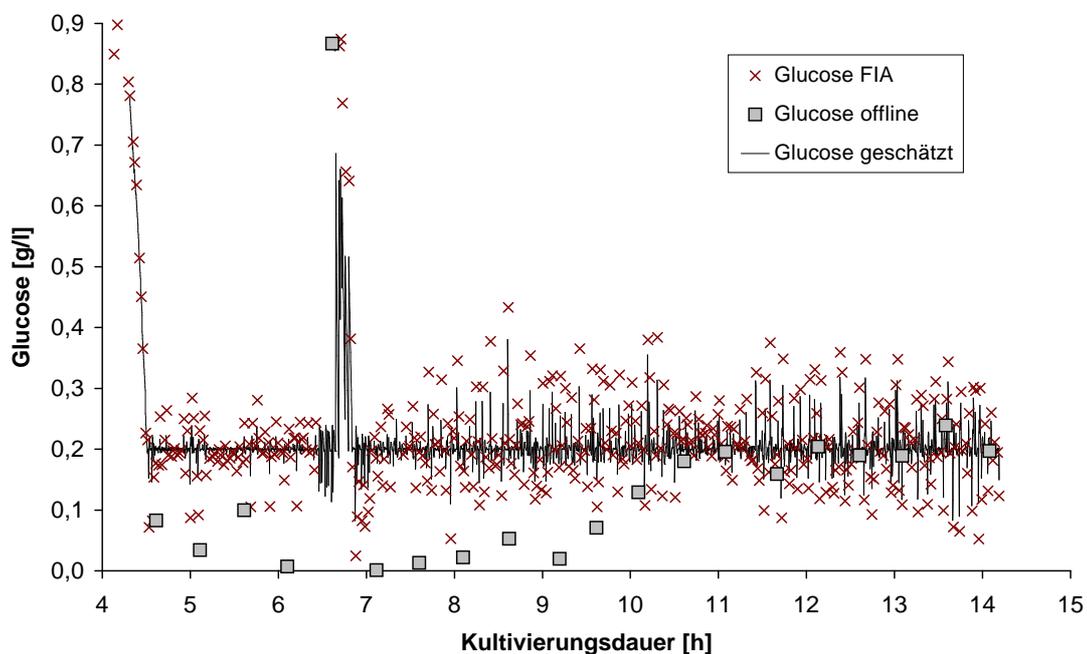


Abbildung 30: Offline- und Online-Messwerte und Prädiktion der Glucosekonzentration bei Setpoint 0,2 g/l

Die geschätzte und die gemessene Biotrockenmassekonzentration in Abbildung 29 verlaufen bis ca. 8,5 h Kultivierungsdauer in sehr guter Übereinstimmung. Das ist ein Indiz dafür, dass die Startwerte der kinetischen Parameter sehr gut gewählt wurden. Der Kurvenverlauf deutet bis zu diesem Zeitpunkt auf ein exponentielles Zellwachstum hin. Die geschätzte maximale spezifische Wachstumsrate μ_{max} bewegt sich bis zu diesem Zeitpunkt relativ konstant im Bereich zwischen $0,41 \text{ h}^{-1}$ und $0,5 \text{ h}^{-1}$. Der mit $\mu_{max} = 0,35 \text{ h}^{-1}$ etwas niedriger gewählte Startwert stieg bereits mit den ersten Messwerten auf diese Größe an. Nach Übergang in die Fed-Batch-Phase gab es keinerlei Absinken zu verzeichnen, so wie es schon in Kapitel 4.3.1 der Fall war. Danach trat eine deutliche Änderung in der Wachstumskinetik der Mikroorganismen auf, die sich auf nahezu alle

Prozessgrößen auswirkt. Die Zellen nehmen plötzlich weniger Glucose auf, die geschätzte spezifische Wachstumsrate nimmt innerhalb von zwei Stunden um die Hälfte ab. Dementsprechend steigt auch die geschätzte Biotrockenmassekonzentration nicht mehr exponentiell an. Noch drastischer zeigt sich die Verringerung der Biomassenproduktion in den Offline-Messwerten. Am Ende der Fed-Batch-Phase bei 14,2 h betrug die gemessene BTM mit 36 g/l nur etwa 60 % der geschätzten Biomassekonzentration von 49 g/l. Es hat sich also nicht nur das Zellwachstum, sondern auch der spezifische Ausbeutekoeffizient verringert (um etwa ein Drittel). Die reale BTM ist also geringer als sie es ausgehend von der Glucosaaufnahme sein müsste.

Abbildung 31 zeigt den Verlauf der Kohlendioxidkonzentration im Abgas im Vergleich zu den Offline-Messwerten von Acetat und Produktkonzentration (Phytaseaktivität).

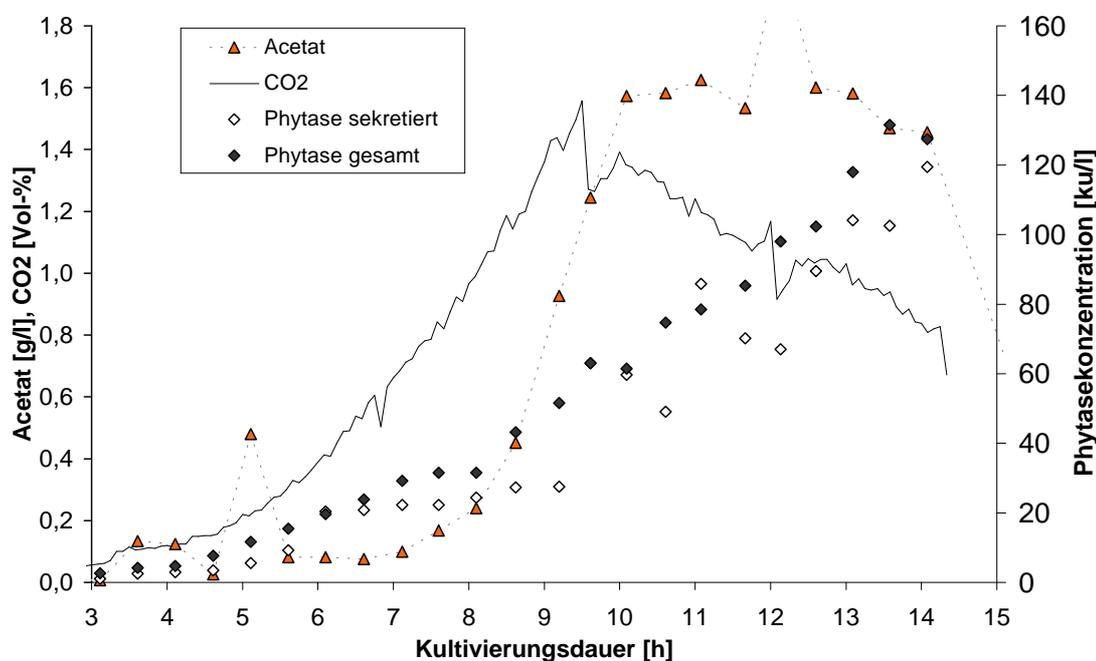


Abbildung 31: CO₂-Konzentration im Abgas sowie Verlauf von Acetatkonzentration und Phytaseaktivität bei einem Setpoint von 0,2 g/l

Auch in diesen Werten spiegelt sich die Änderung im Stoffwechsel der Mikroorganismen wieder. Die Kohlendioxidproduktion verlangsamt sich nicht nur, sie fällt nach ca. 9 h plötzlich ab, obwohl die Gesamtbiomasse – wenn auch verlangsamt – noch weiter ansteigt. Während der Kultivierung wurden deutliche Mengen an Acetat gebildet. Nach zunächst exponentiellem Anstieg bleibt die Acetatkonzentration nach der Stoffwechseländerung bei etwa 1,6 g/l konstant. Ähnlich der Biomasse wird zwar weiterhin Acetat produziert (sonst würde die Konzentration aufgrund der Verdünnung durch die Zufütterung absinken), jedoch erheblich weniger als vorher. Die Acetatbildung kann jedoch nicht die Ursache für die Änderung der Wachstumskinetik sein.

Eine Acetatkonzentration von 1,6 g/l wirkt sich noch nicht derartig inhibierend auf das Wachstum von *E. coli* aus. Betrachtet man den Verlauf der Produktkonzentration in Abbildung 31, so fällt auf, dass sie im Gegensatz zur Biomassenproduktion nach 8,5 h Kultivierungsdauer stärker ansteigt als vorher. Bis zum Ende der Fed-Batch-Phase findet beinahe eine Vervierfachung der Produktkonzentration statt. Die Phytase ist dabei nur eins von sehr vielen ausgeschleusten Proteinen (vgl. [25]). Die verstärkte Produktion und Sekretion von Proteinen während der Phase verringerten Zellwachstums könnte eine Erklärung für die Diskrepanz in der Glucoseaufnahme sein. Auffällig ist in diesem Zusammenhang noch der nahezu deckungsgleiche Verlauf der Aktivitäten von ins Medium sekretierter Phytase und Gesamtphytase (Summe aus extrazellulärer und intrazellulärer Phytase). Der normalerweise durch Substratlimitierung aktivierte Sekretionsmechanismus [25, 38] der Zellen ist bei diesem Versuch also von Anfang an aktiviert. Eine weitere Interpretation dieses Effekts ist jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit.

In Abbildung 32 ist die spezifische Glucoseaufnahmerate im Vergleich mit der Gesamtbiotrockenmasse und der Glucosezufüherungsrate aufgetragen. Die Kurve der Glucosezufuhr wurde aus den Werten der Pumpraten abgeleitet, welche zuvor mit einem rekursiven digitalen Tiefpassfilter (3.1) mit einer Gewichtung von 0,1 geglättet wurden. Die Kurve der Gesamtbiotrockenmasse wurde durch Anpassung eines Polynoms 5. Grades an die Offline-Messwerte und anschließende Integration über das Volumen ermittelt.

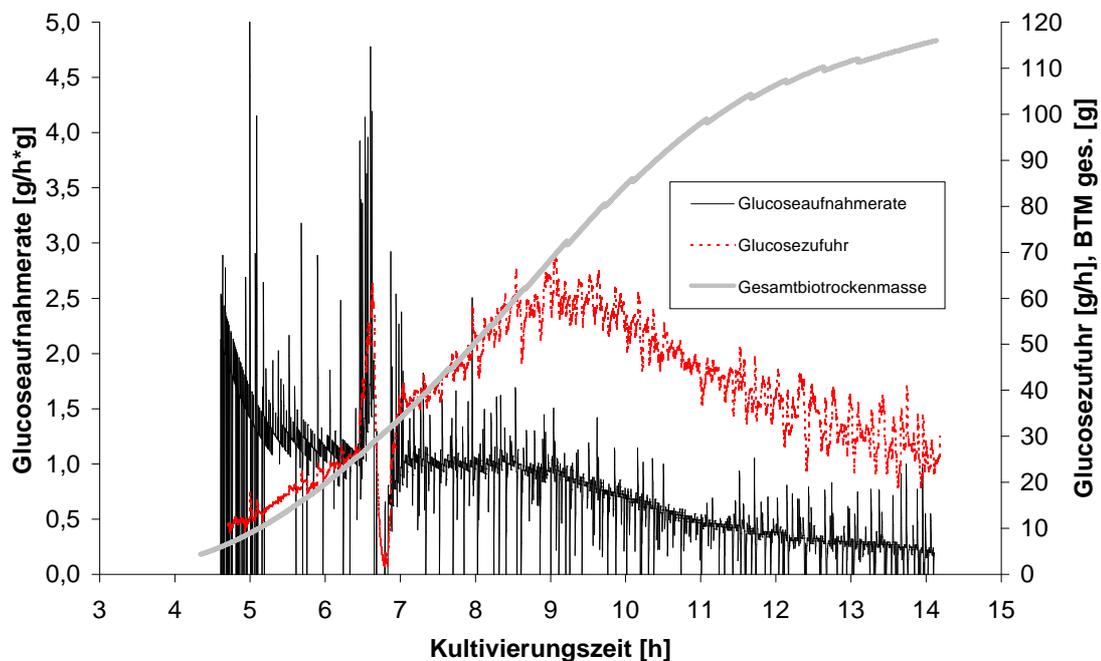


Abbildung 32: Glucoseaufnahmerate, Gesamtbiotrockenmasse und Glucosezufüherung bei einem Setpoint von 0,2 g/l

Am Anfang der Fed-Batch-Phase fällt die Glucoseaufnahme­rate zunächst etwas ab, bis ca. 8,5 h Kultivierungsdauer beträgt sie dann in etwa konstant 1,0 g/(hg). Die Kurve der Gesamtbio­tro­cken­masse folgt also dem Verlauf der Kurve der Zufütterungsrate. Danach fiel die Glucoseauf­nahme­rate langsam gegen Null. Am Ende der Kultivierung betrug sie nur noch 0,2 g/(hg). Am Ende der Kultivierung der Fed-Batch-Phase befand sich eine Gesamtbio­tro­cken­masse von 116 g im Fer­meter.

Zur Verifizierung der Ergebnisse aus dem Versuch mit einem Sollwert von 0,2 g/l Glucose wurde eine weitere Fed-Batch-Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3)pPhyt109 mit Setpoint 0,1 g/l durchgeführt. Abbildung 33 zeigt den Verlauf der Kultivierung. Dargestellt sind das geschätzte μ_{max} im Vergleich mit Glucosekonzentration und Biomassekonzentration.

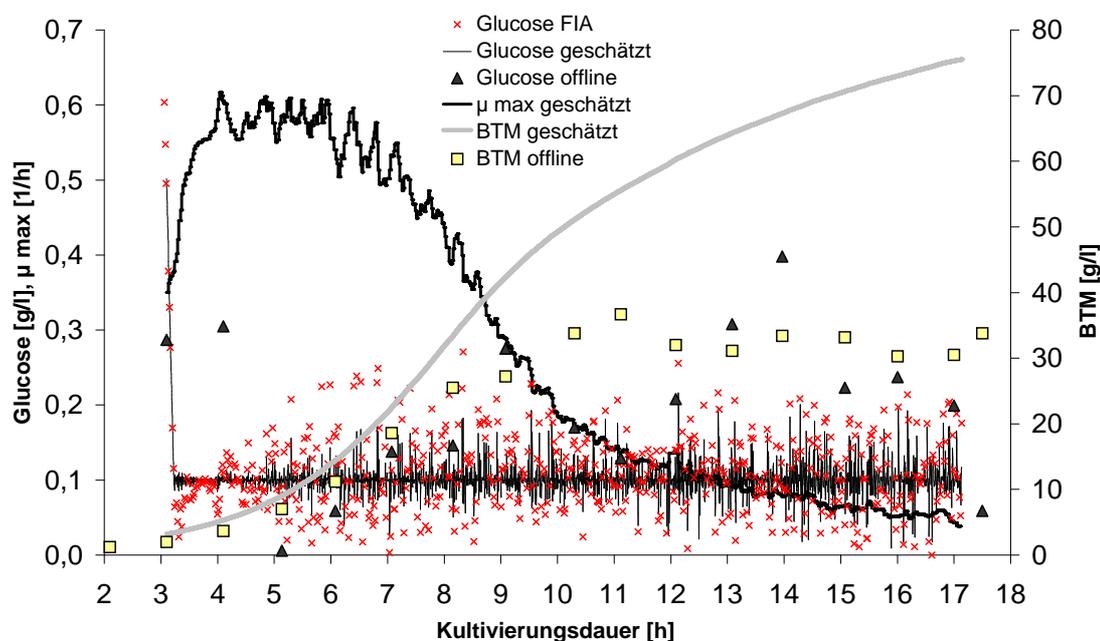


Abbildung 33: Verlauf von Glucosekonzentration, Biotrockenmassekonzentration und geschätztem μ_{max} bei einem Setpoint von 0,1 g/l

Nach dem Start des EKF bei $t_0 = 3,1$ h mit einer Substratkonzentration von 0,5 g/l fällt die Glucosekonzentration innerhalb weniger Minuten auf den Sollwert ab. Die Regelung setzt beim Erreichen des Setpoints sofort ein und startet die Zufütterung (Anhang A.2). Der Mittelwert der gemessenen Glucosekonzentration während der Fed-Batch-Phase beträgt 0,106 g/l und trifft den Sollwert somit sehr gut. Die Standardabweichung beträgt dabei über die gesamte Fed-Batch-Phase 0,051 g/l. Das ist weniger als bei der Kultivierung mit dem Glucosesollwert $S_{SP} = 0,2$ g/l, entspricht aufgrund des niedrigeren Sollwerts jedoch einem relativen Fehler von 51 %. Abbildung 33 zeigt ausserdem den Verlauf der offline gemessenen Glucosekonzentration. Auffällig ist

hier die starke Streuung dieser Messwerte. Das ist vermutlich auf Fehlmessungen zurückzuführen. Die spezifische Wachstumsrate pendelt sich wenige Minuten nach Beginn der Zufütterung auf einen Wert von $\mu_{max} = 0,56 \text{ h}^{-1}$ ein. Bis etwa 7,5 h Kultivierungsdauer zeigt sich auch in diesem Versuch ein exponentielles Zellwachstum mit annähernd konstantem μ_{max} . Dann tritt auch hier die bereits beim vorherigen Versuch beschriebene Änderung der Wachstumskinetik ein. Auch hier ist die zuvor beschriebene Diskrepanz von geschätzter und gemessener BTM zu sehen. Am Ende der Fed-Batch-Phase bei 17,1 h betrug die gemessene BTM 35 g/l, die geschätzte Biomassekonzentration dagegen betrug mit 73 g/l mehr als das Doppelte.

Die Zufütterung wurde in diesem Experiment nahezu bis zum Stillstand des Zellwachstums aufrechterhalten. Nach 14 h Fed-Batch-Betrieb sank das geschätzte μ_{max} auf unter $0,05 \text{ h}^{-1}$ ab.

Abbildung 34 zeigt den Verlauf der Kohlendioxidkonzentration im Abgas im Vergleich mit den Offline-Messwerten von Acetat und Produktkonzentration (Phytaseaktivität) für die Kultivierung mit Sollwert 0,1 g/l. Die Kurve der CO_2 -Konzentration im Abgas ist im Bereich des Maximums und auch etwas danach gestört, Ursache dafür war eine Verstopfung des Druckausgleichventils. Trotzdem ist ersichtlich, dass sie qualitativ insgesamt dem Verlauf der Kohlendioxidkurve der vorhergehenden Kultivierung entspricht.

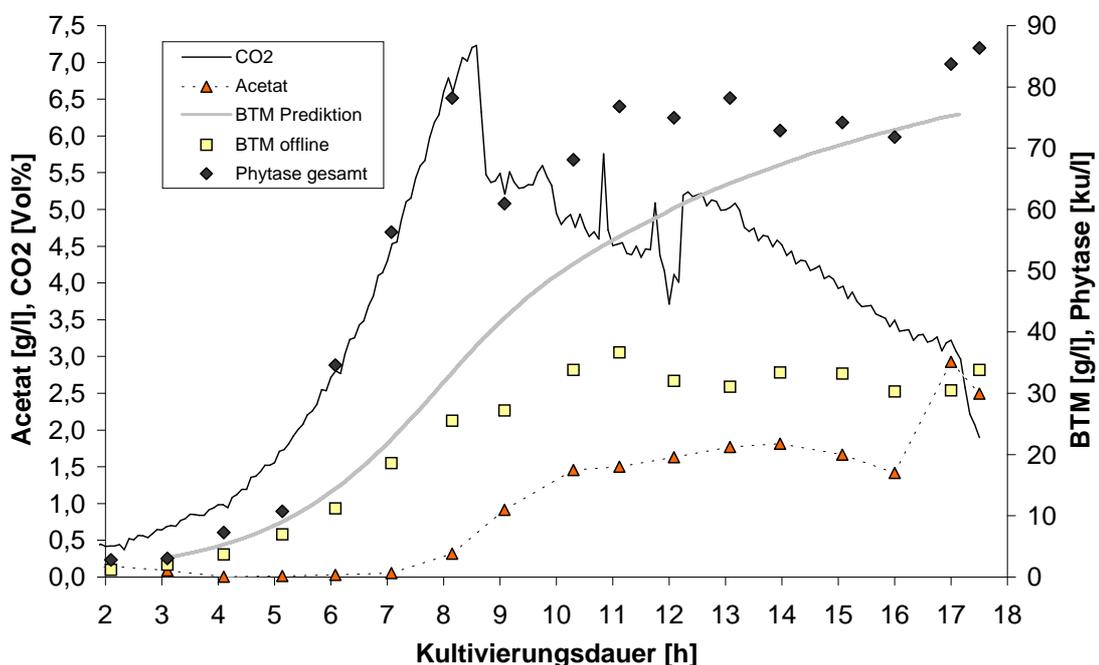


Abbildung 34: CO_2 -Konzentration im Abgas sowie Verlauf von Acetatkonzentration und Phytaseaktivität bei einem Setpoint von 0,1 g/l

Die Acetatkonzentration steigt wie schon im vorherigen Versuch auf ca. 1,6 g/l an und bleibt dann bis zum Ende in etwa konstant. Bei der Entwicklung der Phytaseaktivität über den Kultivierungs-

verlauf gibt es jedoch einen Unterschied zum vorherigen Experiment. Die Phytaseaktivität steigt hier innerhalb der exponentiellen Phase deutlich an, flacht dann im Bereich der Stoffwechsellumstellung aber ab. Abbildung 35 zeigt die spezifische Glucoseaufnahme rate zusammen mit der Glucosezufü terungsrate und der über das Volumen integrierten Gesamtbio trock enmasse. Auch hier wurde ein rekursiver digitaler Tiefpassfilter (Kapitel 3.1) mit einer Gewichtung von 0,1 zur Glättung der Werte benutzt. Während der exponentiellen Wachstumsphase bis 7,5 h beträgt die Glucoseaufnahme rate hier konstant 1,35 g/(hg). Am Ende der Kultivierung waren es nur noch 0,2 g/(hg).

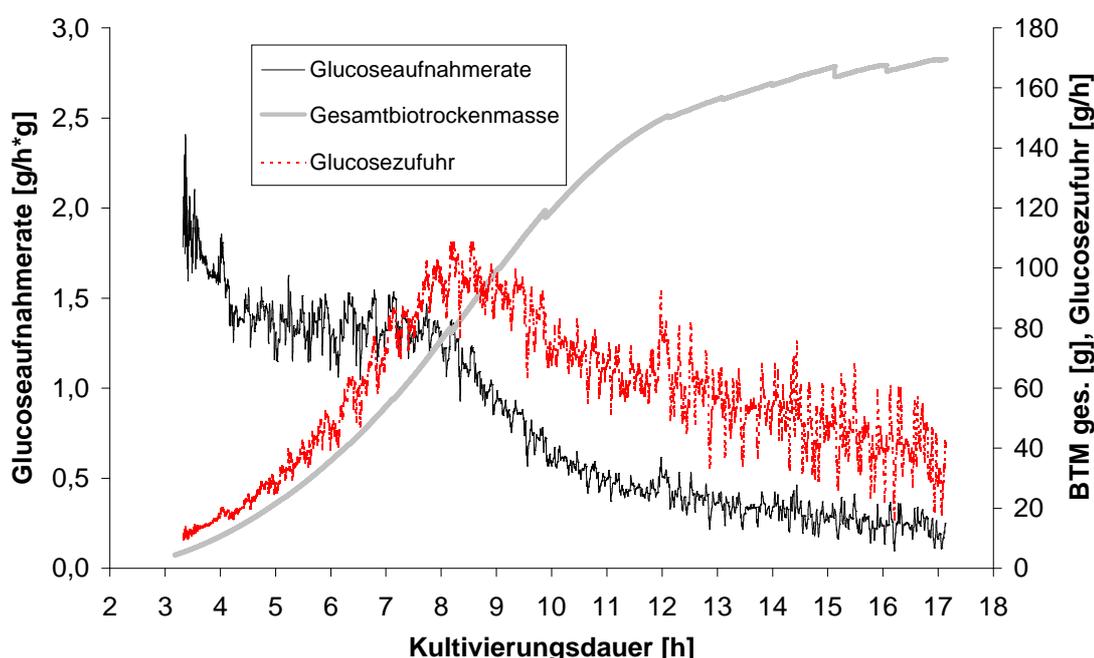


Abbildung 35: Glucosezufü terungsrate, spezifische Glucoseaufnahme rate und Gesamtbio trock enmasse der Kultivierung mit einem Setpoint von 0,1 g/l

Bei beiden Kultivierungen trat nach etwa 4,5 h Zufü terung die Stoffwechsellumstellung der Mikroorganismen auf. Dieser Effekt wurde auch bei anderen durchgefö hrt en Zulaufkultivierungen von *E. coli* BL21(DE3)pPhyt109 beobachtet, obwohl dabei gnaz unterschiedliche Kultivierungsstrategien zum Einsatz kamen [25]. Der Hauptunterschied zwischen beiden Kultivierungen liegt in der grö ß eren Glucoseaufnahme und der höheren spezifischen Wachstumsrate der Zellen während der exponentiellen Phase bei einem Sollwert von $S_{SP} = 0,1$ g/l. Aufgrund der dadurch bedingten stärkeren Zufü terung ergibt sich auch eine stärkere Verdü nnung der Fermentationsbrü he, insbesondere da bei diesen Experimenten zwei Fütterlösungen synchron zugepumpt werden. Um die beiden Kultivierungen besser miteinander vergleichen zu können, ist deshalb eine Integration der betreffenden Größen über das Volumen nötig. So befanden sich nach 10 h Zufü terung bei der

Kultivierung mit dem Setpoint von 0,1 g/l etwa 158 g Biomasse im Reaktor, bei der Kultivierung mit dem Setpoint von 0,2 g/l waren es dagegen nur 116 g. Die gesamte produzierte Phytasemenge zu diesem Zeitpunkt betrug 346 ku bei $S_{SP} = 0,1$ g/l bzw. 430 ku bei $S_{SP} = 0,2$ g/l. Beim niedrigeren Sollwert ergibt sich demnach ein höherer Ausbeutekoeffizient bezogen auf die Biomasse. Beim höheren Sollwert dagegen wird insgesamt mehr Phytase produziert.

Bei den beiden Kultivierungen von *E. coli* BL21(DE3)pPhyt109 ist das Rauschen sowohl der Mess- als auch der Schätzwerte der Glucosekonzentration größer als bei der Kultivierung von *E. coli* MC4110 in Kapitel 4.3.1. Auch die Blindwerte unterliegen einer deutlichen Streuung, wie es in Abbildung 36 dargestellt ist.

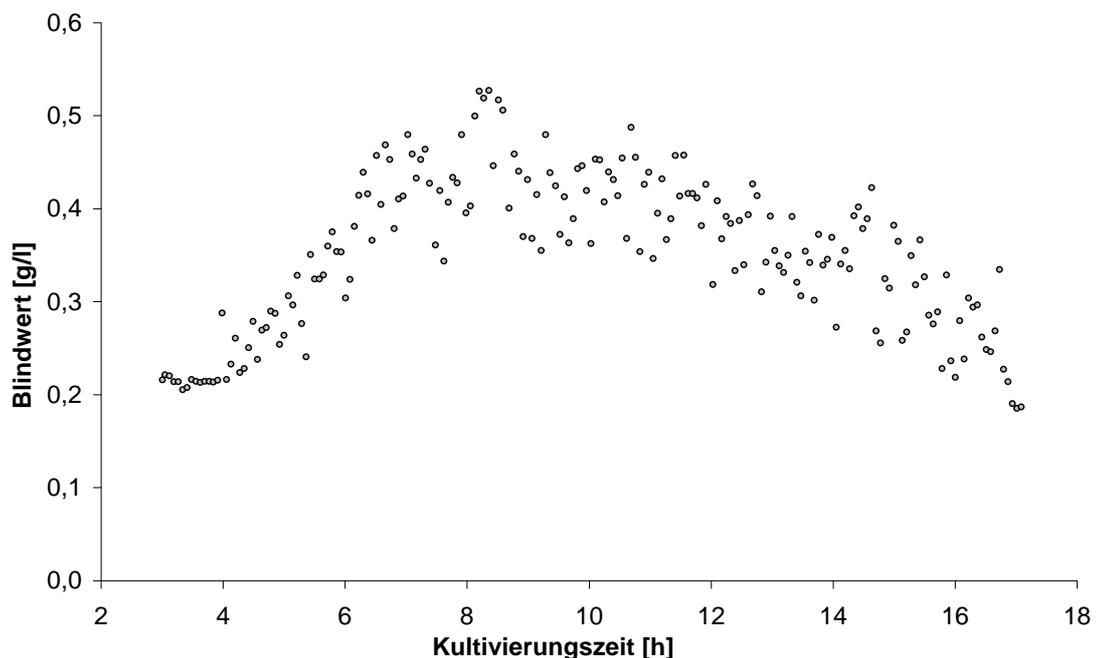


Abbildung 36: Durch Sauerstoffverbrauch der Zellen bedingter Anteil an der scheinbaren Glucosekonzentration (Blindwerte) während der Kultivierung mit Setpoint 0,1 g/l

Der Grund dafür ist die von Anfang an wesentlich größere Dynamik dieser Kultivierungen. Zu Beginn der Zufütterung lagen jeweils schon 3,2 g/l BTM im Reaktor vor. Dieser Wert wurde bei der Kultivierung von *E. coli* MC4110 erst ca. 2,5 h später erreicht. Kleine Pulse in der Pumprate führen sofort zu einem temporären Anstieg der Blindwerte, was wiederum die Genauigkeit der folgenden Messwerte beeinflusst, welche wiederum in die Prädiktion einfließen usw. Hinzu kommt die im Verhältnis zur realen Glucosekonzentration hohe scheinbare Glucosekonzentration (große Blindwerte) von bis zu 0,5 g/l, wodurch sich das Rauschen noch verstärkt. Durch Heraufsetzen des Wertes für R ließe sich das System beruhigen, die Regelung wäre dadurch jedoch stärker modellbasiert. Dem EKF wäre es nicht mehr möglich, der Änderung der Kinetik

und dem Abfall der Wachstumsrate so schnell zu folgen. Das könnte zu einer Überfütterung während dieser Kultivierungsphase führen. Ein weiterer Grund für das verstärkte Messrauschen sind Luftblasen, die mit der Probe aus dem Fermenter ins Fließsystem injiziert wurden. Da bei diesem Versuchsaufbau die Kanüle zur Probenahme von schräg oben in den Fermenter eingeführt wird und auch der Volumenstrom der Probenahme höher ist, verstärkt sich dieser Effekt hier gegenüber den anderen zuvor beschriebenen Kultivierungen. Die Luftblasen führen, wie bereits in Kapitel 2.3.3 erwähnt, zu einer Verringerung der Peakhöhen und verfälschen somit die gemessene Glucosekonzentration.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Systems zur Regelung der Glucosekonzentration bei Fed-Batch-Kultivierungen basierend auf einer schnellen Glucose-FIA und einem erweiterten Kalman-Filter.

Es konnte gezeigt werden, dass sich die Kombination aus schneller Glucose-FIA und EKF sehr gut zur Regelung von Bakterienkultivierungen und insbesondere von Hefekultivierungen eignet. Im Gegensatz zu anderen Arbeiten [18, 26] ist es mit diesem Controller erstmals gelungen, Glucosesollwerte von 0,1 g/l oder weniger über einen längeren Zeitraum in Fed-Batch-Kultivierungen konstant zu halten. Dadurch ließ sich die Bildung störender Metabolite erheblich einschränken, ohne dabei das Zellwachstum durch Substratmangel zu limitieren. Es wurden mehrere Fed-Batch-Kultivierungen von *S. cerevisiae* und *E. coli* durchgeführt. Bei *S. cerevisiae* H620 konnten Sollwerte von 0,08 bzw. 0,05 g/l Glucose ca. 13 Stunden lang eingehalten werden. Die Bildung von Ethanol wurde dabei dank dieser Regelung erheblich reduziert bzw. vollständig unterbunden. Bei der Kultivierung mit einem Setpoint von 0,05 g/l betrug die Standardabweichung um den Setpoint 0,0093 g/l, was einem relativen Fehler von 18,6 % entspricht. Der Respirationsquotient RQ hatte dabei während der Zufütterungsphase einen Wert von konstant 1,0. Das bedeutet, dass die gesamte aufgenommene Glucose oxidativ verstoffwechselt und zur Produktion von Biomasse verwendet wurde. Ähnliches gilt für den Organismus *E. coli* MC4110. Hier wurde eine Glucosekonzentration von 0,1 g/l über 6 Stunden konstant gehalten. Das Wachstum der Mikroorganismen fand dabei ohne Produktion von Acetat statt. Auch der Einsatz des Systems zur Regelung von Kultivierungen des Organismus *E. coli* BL21(DE3)pPhyt109 war erfolgreich. Es konnten Glucosekonzentrationen von 0,2 und 0,1 g/l über 10 bzw. 14 Stunden konstant gehalten werden, obwohl die Prozesse mit Biotrockenmassekonzentrationen von über 30 g/l und spezifischen Wachstumsraten von z. T. über $0,55 \text{ h}^{-1}$ eine erhebliche Dynamik aufwiesen. Die Produktausbeute (Phytase) bei diesen Experimenten unterschied sich allerdings nicht wesentlich von Versuchen mit anderen Zufütterungsstrategien [11, 25]. Der Grund dafür ist jedoch nicht die Qualität der Regelung, sondern die metabolischen Eigenheiten des Organismus, die ein Wachstum über einen bestimmten Punkt hinaus unmöglich zu machen scheinen (Kapitel 4.3.3). Das Ziel, einen effizienten Glucosecontroller für Fed-Batch-Kultivierungen von verschiedenen Mikroorganismen zu implementieren, ist somit erreicht worden.

Aufgrund der schnellen Analytik ist der Controller grundsätzlich in der Lage, auf Störungen im Prozessverlauf zu reagieren. Der EKF kann das Messrauschen der Analytik weitgehend kompensieren. Der Einsatz des Kalman-Filters bietet zusätzlich den Vorteil der Prädiktion anderer Prozessgrößen als nur der Substratkonzentration. Sind die Startparameter gut gewählt, so ist zu jedem Zeitpunkt der Kultivierung der aktuelle Prozesszustand ersichtlich.

Selbstverständlich bietet der Contoller nach wie vor reichlich Spielraum für weitere Optimierungen. Zentraler Ansatzpunkt dafür ist sicherlich das FIA-System. So vorteilhaft die hohe Geschwindigkeit der schnellen Glucose-FIA ist, so eindeutig sind jedoch auch ihre Nachteile. Die Hardware des Systems ist in ihrer jetzigen Form sicherlich ausreichend robust. Die Sensitivität des System ist ausreichend, kann jedoch durch Heraufsetzen der GOD-Konzentration noch weiter erhöht werden. Der Einsatz von Mutarotase zur Empfindlichkeitssteigerung bzw. zur Detektion von α -Glucose erscheint nicht sinnvoll (Kapitel 4.1). Darüber hinaus würden sich die Betriebskosten dadurch erheblich vergrößern. Die Sauerstoffaufnahme der Mikroorganismen im Probensegment und die dadurch bedingten Blindwerte stellen bei der schnellen Glucose-FIA sicherlich die Hauptfehlerquelle dar. Eine Möglichkeit zur Eliminierung dieses Problems wäre ein Verzicht auf die Sauerstoffmessung zugunsten einer Detektion des bei der Enzymreaktion gebildeten H_2O_2 . Wasserstoffperoxid könnte dabei ebenfalls amperometrisch detektiert werden (Kapitel 2.1). Das würde die Messung von Blindwerten vollkommen überflüssig machen und den Messfehler deutlich herabsetzen. Dazu muss lediglich sichergestellt werden, dass es im FIA-System nicht zu einer Sauerstofflimitierung kommt. Dieses Problem ist jedoch bislang bei keiner Kultivierung aufgetreten.

Ein weiteres Problem ist das Eintreten von Luftblasen in das FIA-System. Eine geschickte Platzierung der Probenahme im Reaktor kann diesen Effekt zwar verringern, aber nicht vollständig beseitigen. Denkbar wäre jedoch die Entwicklung einer speziellen Probenahmesonde oder das Einbringen einer Blasenfalle in den Probenstrom.

Bei höheren Zelldichten führt der Glucoseverbrauch der Zellen auf dem Weg durchs Messsystem zu Abweichungen zwischen der gemessenen und der realen Glucosekonzentration (Kapitel 4.3). Gerade für sehr niedrige Glucosesollwerte bei hoher Zelldichte und großer spezifischer Wachstumsrate ist die Abweichung erheblich. Zwar könnte man diesen Effekt bei der Implementation des Reglers berücksichtigen, jedoch würden die Messwerte im Verlauf der Kultivierung immer kleiner. Es ist fraglich, ob eine halbwegs zuverlässige Messung insbesondere bei Hochzelldichten noch möglich wäre. Eine Vergrößerung des Volumenstroms der Probenahme könnte hier zumindest beim Einsatz an größeren Bioreaktoren eine Verbesserung bringen. Zur vollständigen Eliminierung des Problems müsste man wieder auf eine Probenfiltration zurückgreifen. Die dadurch entstehende Zeitverzögerung könnte mittels einer geeigneten Implementation des EKF bei der Prädiktion des aktuellen Systemzustands berücksichtigt werden. Dieser Ansatz ist u. a. Gegenstand aktueller Arbeiten [22]. Für einen Einsatz bei Hochzelldichtekultivierungen wäre allerdings auch dieses System nicht geeignet, da die gängigen Probenahmemodule bei größeren Zelldichten verstopfen. Ausserdem hätte ein solches System evtl. Schwierigkeiten, auf unvorhergesehene Störungen im Prozess auf adäquate Weise zu reagieren.

Auch der Kalman-Filter selbst bietet Möglichkeiten zur Weiterentwicklung. Um dem Anstieg des Messrauschens mit zunehmender Zelldichte und Dynamik im Laufe einer Kultivierung gerecht

zu werden, könnte man z. B. die Messrauschkovarianzmatrix als zeitabhängige Funktion implementieren. Des Weiteren könnte man das Prozessmodell um andere Zustandsgrößen, wie z. B. die Abgaszusammensetzung (Respirationsquotient), erweitern. Nicht nur eine Prädiktion wäre möglich, man könnte auch die Online-Messwerte des Sauerstoff- und Kohlendioxidgehalts im Abgas bzw. des pO_2 oder der Trübung der Fermentationsbrühe (als Maß für die BTM) mit in die Filterung einfließen lassen. Der Gelöstsauerstoff könnte dabei ebenfalls als limitierendes Substrat angesehen werden. Durch die zusätzlichen Zustandsgrößen würde sich die Dimensionalität der Matrizen P , Q und R entsprechend erhöhen.

Literatur

- [1] ARNDT, M. ; HITZMANN, B.: Eine schnelle Glucoseanalytik für die Regelung biotechnischer Prozesse. In: *BIOforum* 24 (2001), Nr. 10, S. 658 – 661
- [2] ARNDT, Michael: *Implementierung eines Moduls zur Fehlererkennung in ein On-line-Automatisierungssystem*, Universität Hannover, Diplomarbeit, 1995
- [3] ARNOLD, Mark A.: Non-invasive glucose monitoring. In: *Curr. Opinion Biotechnol.* 7 (1996), S. 46 – 49
- [4] BELLGARDT, K.-H.: *Modellbildung des Wachstums von Saccharomyces cervisiae in Rührkesselreaktoren*, Universität Hannover, Dissertation, 1983
- [5] BROXTERMANN, O. *Laufende Dissertation, Universität Hannover.* 2002
- [6] CHUNG et al.: Simultaneous measurement of glucose and glutamine in aqueous solution by near infrared spectroscopy. In: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 50 (1995), S. 109 –126
- [7] D'AURIA, Sabato ; LAKOWICZ, Joseph R.: Enzyme fluorescence as a sensing tool: new perspectives in biotechnology. In: *Curr. Opinion Biotechnol.* 12 (2001), S. 99 – 104
- [8] D' COSTA, E. J. ; HIGGINS, I. J. ; TURNER, A. P. F.: Quinoprotein glucose dehydrogenase and its application in an amperometric glucose sensor. In: *Biosensors* 2 (1986), S. 71 – 87
- [9] DIAZ-RICCI, J. C. ; REGAN, L. ; BAILEY, J. E.: effect of alteration of the acetic acid synthesis pathway on the fermentation pattern of Escherichia coli. In: *Biotechnol. Bioengineering* 38 (1991), S. 1381 – 1324
- [10] DOCHAIN, D. ; PERRIER, M.: Dynamical modelling, analysis, monitoring and control design for nonlinear bioprocesses. In: *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology* 56 (1997), Nr. 147 - 197
- [11] FRIEHS, K. ; FLASCHEL, E. ; MIKSCH, G. ; KLEIST, S. ; HITZMANN, B. ; ARNDT, M.: Sekretion rekombinanter Phytase bei Escherichia coli. In: *BIOforum* 4 (2003), S. 208 – 209
- [12] FULD, G.J. ; DUNN, C.G.: In: *Industrial and engineering Chemistry* 49 (1957), S. 1215
- [13] GOTTSCHALK, G.: *Bacterial metabolism.* 2. Auflage. Springer-Verlag, 1988
- [14] GUILBAULT, G. G. ; LUBRANO, G. J.: An enzyme electrode for the amperometric determination of Glucose. In: *Anal. Chim. Acta* 64 (1973), S. 439 – 455

-
- [15] HARTMEIER, W.: *Immobilisierte Biokatalysatoren*. Springer Verlag, 1986
- [16] HELLER, Adam: Amperometric Biosensors. In: *Curr. Opinion Biotechnol.* 7 (1996), S. 50 – 54
- [17] HIPPEKE, Jörg: *Simulation von Bioprozessen zur Parameteroptimierung eines Regelsystems*, Universität Hannover, Diplomarbeit, 2000
- [18] HITZMANN, B. ; BROXTERMANN, O. ; CHA, Y.-L. ; SOBIEH, O. ; STÄRK, E. ; SCHEPER, T.: The control of glucose concentration during yeast fed batch cultivation using a fast measurement complemented by an extended Kalman filter. In: *Bioprocess Engineering* 23 (2000), S. 337 – 341
- [19] HITZMANN, B. ; LÖHN, A. ; ARNDT, M. ; ULBER, R. ; MÜLLER, C.: A new evaluation technique for FIA measurements: projective referenze evaluation. In: *Anal. Chim. Acta* 384 (1997), S. 161 – 166
- [20] HITZMANN, Bernd: *Optimierung von FIA-Systemen für die Bioprozeßtechnik*. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, 1996
- [21] HUANG et al.: On-line determination of glucose concentration throughout animal cell cultures based on chemiluminescent detection of hydrogen peroxide coupled with flow injection analysis. In: *Journal of Biotechnology* 18 (1991), S. 161 – 172
- [22] HÜLL, Dirk: *Kompensation der Zeitverzögerung von Glucosemessungen bei der Regelung von Kultivierungen basierend auf einem Kalman-Filter*, Universität Hannover, Diplomarbeit, 2002
- [23] JÜRGENS, Heike: Fließinjektionsanalyse mit immobilisierten Enzymen. In: *BIOforum* 11 (1991), S. 415 – 417
- [24] KATSUMATA et al.: A new flow-injection determination of glucose based on the redox reaction of hydroquinone with iron(III) in the presence of 1,10-phenanthroline. In: *Talanta* 51 (2000), S. 1197 – 1204
- [25] KLEIST, Sophia: *Optimierung eines fermentativen Verfahrens zur Herstellung einer bakteriellen Phytase*, Universität Bielefeld, Dissertation, August 2002
- [26] KLEMAN, Gary L. ; CHALMERS, Jeffrey J. ; LULI, Gregory W. ; STROHL, William R.: A Predictive and Feedback Control Algorithm Maintains a Constant Glucose Concentration in Fed-Batch Fermentations. In: *Appl. Env. Microbiol.* 57 (1991), Nr. 4, S. 910 – 917
-

- [27] KONSTANTINOV, K. ; KISHIMOTO, M. ; SEKI, T. ; YOSHIDA, T.: A balanced DO-Stat and Its Application to the Control of Acetic Acid Excretion by Recombinant *Escherichia coli*. In: *Biotechnol. Bioengineering* 36 (1990), S. 750 – 758
- [28] KORZ, D. J. ; RINAS, U. ; HELLMUTH, K. ; SANDERS, E. A. ; DECKWER, W.-D.: Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. In: *J. of biotechnology* 39 (1995), S. 59 – 65
- [29] KÜENZI, M.: *Über den Reservekohlenhydratstoffwechsel von Saccharomyces cerevisiae*, ETH-Zürich, Dissertation, 1970
- [30] KULLICK, T. ; BOCK, U. ; SCHUBERT, J. ; SCHEPER, T. ; SCHÜGERL, K.: Application of enzyme-field effect transistor sensor arrays as detectors in a flow-injection analysis system for simultaneous monitoring of medium components. Part II. Monitoring of cultivation processes. In: *Anal. Chim. Acta* 300 (1994), S. 25 – 31
- [31] KUNST, Albert ; DRAEGER, Brigitte ; ZIEGENHORN, Joachim: UV-methods with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. In: *Methods of enzymatic analysis* Bd. 6. 3rd Edition. Verlag Chemie, 1984, S. 163 – 172
- [32] LACOURSE, W. R. ; JOHNSON, D.C.: Optimization of waveforms for pulsed amperometric detection of carbohydrates based on pulsed voltametry. In: *Analytical Chemistry* 65 (1993), S. 50 – 55
- [33] LAU, Oi-Wah ; SHAO, Bing: Determination of glucose using a piezoelectric quartz crystal and the silver mirror reaction. In: *Anal. Chim. Acta* 407 (2000), S. 17 – 21
- [34] LEE, Sang Y.: High cell-density culture of *Escherichia coli*. In: *Trends in Biotechnology* 14 (1996), Nr. 3, S. 98 – 105
- [35] LULI, Gregory W. ; STEYEN, M. ; ORDAZ, Donald E. ; MASON, Marc ; STROHL, William R.: An automatic, on-line glucose analyzer for feed-back control of fed-batch growth of *Escherichia coli*. In: *Biotechnol. Techniques* 1 (1987), Nr. 4, S. 225 – 230
- [36] MARIOLI et al.: Nickel-chromium alloy electrode as a carbohydrate detector for liquid chromatography. In: *Anal. Chim. Acta* 282 (1993), S. 571 – 580
- [37] MATSUBARA et al.: Copper oxide based flow-through detector for glucose determination. In: *Anal. Chim. Acta* 405 (2000), S. 87 – 92
- [38] MIKSCH, G. ; FIEDLER, E. ; DOBROWOLSKI, P. ; FRIEHS, K.: The *kil* gene of the ColE1 plasmid of *Escherichia coli* controlled by a growth-phase-dependent promoter mediates the secretion of a heterologous periplasmic protein during the stationary phase. In: *Arch. Microbiol.* 167 (1997), S. 143 – 150

-
- [39] MIKSCH, G. ; KLEIST, S. ; FRIEHS, K. ; FLASCHEL, E.: Biotechnologische Produktion der E.coli-Phytase. In: *Sensorik, Sonderausgabe der DBU in Koop. m. BIOSpektrum Akad. Verl.* (2001), S. 60 – 62
- [40] MUTTZALL, K.: *Einführung in die Fermentationstechnik.* Behrs Verlag, 1993
- [41] NAKANO, K. ; RISCHKE, B. ; SATO, S. ; MÄRKEL, H.: Influence of acetic acid on the growth of Escherichia coli K12 during high-cell-density cultivation in a dialysis reactor. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48 (1997), S. 597 – 602
- [42] NANDAKAMUR, M. P. ; SAPRE, A. ; LALI, A. ; MATTIASSON, B.: Monitoring of low glucose concentrations in fermentation growth. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52 (1999), S. 502 – 507
- [43] RANDOLPH, T. W. ; MARISON, I. W. ; MARTENS, D. E. ; STOCKAR, U. von: Calorimetric Control of Fed-Batch Fermentations. In: *Biotechnology and Bioengineering* 36 (1990), S. 678 – 684
- [44] RANI, K. Y. ; RAO, V. S. R.: Control of fermenters - a review. In: *Bioprocess Engineering* 21 (1999), S. 77 – 88
- [45] RIESENBERG, D. ; SCHULZ, V. ; KNORRE, W. A. ; POHL, H.-D. ; KORZ, D. ; SANDERS, E. A. ; ROSS, A. ; DECKWER, W.-D.: High cell density cultivation of Escherichia coli at controlled specific growth rate. In: *J. of Biotechnology* 20 (1991), S. 17 – 28
- [46] RUZICKA, J. ; HANSEN, E.H.: *Flow Injection Analysis.* Wiley & Sons, New York, 1988
- [47] SCHÖNGARTH, Karsten: *Neue FIA-Verfahren und ihre Anwendung in der Biotechnik,* Universität Hannover, Dissertation, 1997
- [48] SIERRA et al.: Fluorimetric-enzymatic determination of glucose based on labelled glucose oxidase. In: *Anal. Chim. Acta* 368 (1998), S. 97 – 104
- [49] SNYDER, L. R. ; KIRKLAND, J. J.: *Introduction to Modern Liquid Chromatography.* 2nd Edition. Wiley, New York, 1979
- [50] SONNLEITNER, B. ; KÄPPELI, O.: Growth of Saccharomyces cerevisiae Is Controlled by Its Limited Respiratory Capacity: Formulation and Verification of a Hypothesis. In: *Biotechnology and Bioengineering* 28 (1986), Juni, S. 927–937
- [51] STRYER, Lubert: *Biochemie.* 3. Auflage. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, 1985
- [52] SVRCEK, W. Y. ; ELLIOTT, R. F. ; ZAJIC, J. E.: The extended Kalman filter applied to continuous culture model. In: *Biotechnol. Bioengineering* 16 (1974), S. 827 – 846

- [53] UMLAND, Fritz: *Charakteristische Reaktionen anorganischer Stoffe*. Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt am Main, 1975
- [54] UNBEHAUEN, Heinz: *Regelungstechnik I - III*. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig, 1994
- [55] WEIGEL, B.: *Entwicklung von Enzym-Kartuschen und FIA-Methoden zur On-line-Analytik in Biomedien*, Universität Hannover, Dissertation, 1995
- [56] WEIGEL, B. ; HITZMANN, B. ; KRETZMER, G. ; SCHÜGERL, K. ; HUWIG, A. ; GIFFHORN, F.: Analysis of various sugars by means of immobilized enzyme coupled flow injection analysis. In: *Journal of Biotechnology* 50 (1996), S. 93 – 106
- [57] WHITE, S. F. ; TOTHILL, I. E. ; NEWMAN, J. D. ; TURNER, A. P. F.: Development of a mass-producible glucose biosensor and flow injection analysis system suitable for on-line monitoring during fermentations. In: *Anal. Chim. Acta* 321 (1996), S. 165 – 172

A Anhang

A.1 Der FIA-Puffer

Zusammensetzung des FIA-Puffers (pH 6,8):

Substanz	Konzentration
K_2HPO_4	4,3 g/l
$NaH_2PO_4 \cdot 2 H_2O$	2,2 g/l
NaCl	3,0 g/l
EDTA	1,5 g/l
NaN_3	0,065 g/l

A.2 Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien

A.2.1 Schatzmann-Medium für Hefe-Kultivierungen im Fermenter

Substanz	Konzentration
$(NH_4)_2SO_4$	4,5 g/l
$(NH_4)_2HPO_4$	1,9 g/l
KCl	0,9 g/l
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,34 g/l
$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	0,42 g/l
$FeCl_3 \cdot 6 H_2O$	$1,5 \cdot 10^{-2}$ g/l
$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	$0,9 \cdot 10^{-2}$ g/l
$MnSO_4 \cdot 2 H_2O$	$1,05 \cdot 10^{-2}$ g/l
$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$	$0,24 \cdot 10^{-2}$ g/l
m-Insoit	$6,0 \cdot 10^{-2}$ g/l
Thiamin · HCl	$3,0 \cdot 10^{-2}$ g/l
Pyridoxol · HCl	$0,6 \cdot 10^{-2}$ g/l

A.2.2 Schatzmann-Medium für Hefe-Vorkulturen

Substanz	Konzentration
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4,5 g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	1,9 g/l
KCl	0,9 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,34 g/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,42 g/l
$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	$0,24 \cdot 10^{-2}$ g/l
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	$0,9 \cdot 10^{-2}$ g/l
$\text{MnSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	$1,05 \cdot 10^{-2}$ g/l
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	$0,24 \cdot 10^{-2}$ g/l
m-Insoit	$6,0 \cdot 10^{-2}$ g/l
Thiamin · HCl	$3,0 \cdot 10^{-2}$ g/l
Pyridoxol · HCl	$0,6 \cdot 10^{-2}$ g/l
Glucose	30,0 g/l
Na-Citrat	0,58 g/l

A.2.3 Mineralmedium nach Riesenberg zur Kultivierung von *E. coli*

Substanz	Konzentration
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	4,0 g/l
KH_2PO_4	16,6 g/l
Citronensäure	2,1 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	6,0 g/l
Eisen(III)citrat-Monohydrat	75,0 mg/l
H_3BO_3	3,8 mg/l
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	18,8 mg/l
EDTA · 2 H ₂ O	10,5 mg/l
$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1,9 mg/l
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	3,1 mg/l
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	3,1 mg/l
$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	10,0 mg/l

A.2.4 Zufütterlösung für Fed-Batch-Kultivierung von *E. coli* MC4110

Substanz	Konzentration
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	10,0 g/l
Eisen(III)citrat-Monohydrat	75,0 mg/l
H ₃ BO ₃	3,8 mg/l
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	18,8 mg/l
EDTA · 2 H ₂ O	10,5 mg/l
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	1,9 mg/l
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	3,1 mg/l
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	3,1 mg/l
Zn(CH ₃ COO) ₂ · 2 H ₂ O	10,0 mg/l
Glucose	100 g/l

A.2.5 Zufütterlösungen für Fed-Batch-Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3)pPhyt109

1) Substratlösung

Substanz	Konzentration
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	19,8 g/l
Eisen(III)citrat-Monohydrat	75,0 mg/l
H ₃ BO ₃	3,8 mg/l
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	18,8 mg/l
EDTA · 2 H ₂ O	10,5 mg/l
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	1,9 mg/l
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	3,1 mg/l
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	3,1 mg/l
Zn(CH ₃ COO) ₂ · 2 H ₂ O	10,0 mg/l
Glucose	500 g/l

2) Ammoniumphosphatlösung

Substanz	Konzentration
(NH ₄) ₂ HPO ₄	227,0 g/l
(NH ₄)H ₂ PO ₄	196,5 g/l

A.2.6 Super-LB-Medium für die Vorkultur von *E. coli* MC4110

Substanz	Konzentration
Trypton	25,0 g/l
Hefeextrakt	15,0 g/l
NaCl	5,0 g/l

A.2.7 TB-Medium für die Vorkultur von *E. coli* BL21(DE3)pPhyt109

Substanz	Konzentration
Caseinpepton	12,0 g/l
Hefeextrakt	24,0 g/l
Glycerin	4,0 g/l
KH ₂ PO ₄	2,4 g/l
K ₂ HPO ₄	12,5 g/l

A.3 Häufig verwendete Abkürzungen und Symbole

BTM: Biotrockenmassekonzentration

BTM ges. : Gesamtbiotrockenmasse

CAFCA: Computer Assisted Flow Control & Analysis

CPR: Kohlendioxidproduktionsrate

DCC: Digital Control Component

EKF: Erweiterter Kalmanfilter

EPR: Ethanolproduktionsrate

$E\{\}$: Erwartungswert von $\{\}$

$F(t)$: Jacobimatrix von $f()$

FIA : Fließinjektionsanalyse

GOD: Glucoseoxidase

$H(t)$: Jacobimatrix von $h()$

$h(x(t_i))$: Wahrer Wert von $x(t)$:

I : Einheitsmatrix

$K(t_i)$: Kalman-Verstärkungsmatrix

K_m : Monodsche Sättigungskonstante

OTR: Sauerstoffaufnahme

P : Schätzfehlerkovarianzmatrix

pO_2 : Gelöstsauerstoffkonzentration

Q : Prozessrauschleistungsmatrix

q_S : spezifische Glucoseaufnahme

R : Messrauschkovarianzmatrix

RQ: Respirationsquotient

r_S : Substratabbaurate

r_X : Biomassebildungsrate

S_{SP} : Sollwertkonzentration des Substrats

t_0 : Startzeitpunkt der Regelung durch den EKF

S_0 : Substratkonzentration der Zufütterlösung

$S(t)$: Substratkonzentration zum Zeitpunkt t

$X(t)$: Biotrockenmassekonzentration zum Zeitpunkt t

u bzw. ku: Units bzw. Kilounits (Einheiten der Enzymaktivität)

$V(t)$: Volumen des Reaktorinhalts zum Zeitpunkt t

$\dot{V}_f(t)$: Volumenstrom der Zufütterung zum Zeitpunkt t

\dot{V}_{Probe} : Volumenstrom der Probenahme

$Y_{X/S}$: spezifischer Ausbeutekoeffizient (Biomasse/Substrat)

μ : spezifische Wachstumsrate

μ_{max} : maximale spezifische Wachstumsrate

$\hat{\cdot}$: Schätzwert