

# Entwicklung eines Biotechnologischen Referenzsystemes

Dem Fachbereich Chemie  
der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

Genehmigte

Dissertation

von

Dipl.-Chem. Dieter Borvitz

Geboren am 11. April 1965 in Hannover

1998

Referent:	Prof. Dr. Dr. h.c. K. Schügerl
Korreferent:	Prof. Dr. A. Lübbert
Tag der Promotion:	13. Juli 1998
Datum der Veröffentlichung:	Dezember 1998

Danksagung

Danksagung

Die praktischen Arbeiten der vorliegenden Promotion wurden in der Zeit von Oktober 1993 bis Juli 1996 am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. A. Lübbert angefertigt, dem ich für die Ermöglichung und Unterstützung dieser Arbeit danke.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. h.c. K. Schügerl danke ich für die Betreuung und die Übernahme des Referates.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. R. Simutis für die sehr gute Zusammenarbeit, vielfältigen Diskussionen und Anregungen für den Fortgang der Arbeit.

Herrn R. Oliveira danke ich für die stetige Diskussionsbereitschaft bei allen Modellierungsfragen.

Weiterhin sei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die Unterstützung und Hilfe bei der Bewältigung aller anfallenden Probleme, sowie interessanter Diskussionen gedankt: Dr. M. Dors, Dr. I. Havlik, Dr. M. Manikowski, Dr. S. Klusmann, Dr. A. Lapin, Dr. J. Schwippel, Dr. D. Gerlach, Dr. D. Levisauskas, T. Paaschen, W. Claas.

Den Mitarbeitern und Kollegen des Instituts für Technische Chemie, die den Fortgang der Arbeit durch Diskussionen und Hilfen unterstützt haben, sei gedankt.

Für die finanzielle Unterstützung sei der AiF und Boehringer Mannheim, sowie meinen Eltern gedankt.

Für die Geduld bei meinen vielen Nachtschichten im Institut sei Andrea gedankt, die es verstand mich bei Zweifeln aufzubauen und bei Tiefpunkten zu motivieren.

**Für Sophia**

Hier mein Geheimnis.

Es ist ganz einfach:

man sieht nur mit dem Herzen gut.

Das Wesentliche ist für die Augen unsichtbar

( Der kleine Prinz)

## Inhaltsverzeichnis

### Inhaltsverzeichnis

Danksagung .....	III
Inhaltsverzeichnis .....	V
Abstract .....	VII
1. Einleitung .....	1
2. Zielsetzung der Arbeit .....	4
2.1. Realisierung der Zielsetzung.....	5
3. Entwicklung des Referenzsystemes.....	8
3.1. Referenzsystemkomponenten .....	8
3.1.1. Fermentationsanlage .....	8
3.1.2. Prozeßmanagementsystem .....	9
3.1.3. Mikroorganismus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	10
3.1.4. Kultivierungsbedingungen.....	12
3.2. Prozeßführung .....	13
3.2.1. Einleitung .....	13
3.2.2. Prozeßmodell .....	14
3.2.3. Anwendung des Prozeßmodells .....	17
3.2.3.1. Zustandsschätzung .....	17
3.2.3.2. Zustandsregelung .....	22
3.3. Vorgehensweise bei der Einstellung von Testbedingungen.....	27
3.3.1. Einstellung vorgegebener Prozeßzustände.....	27
3.3.2. Gezielte Veränderungen der Prozeßzustände .....	32
3.3.3. Erweiterung des Arbeitsbereiches .....	38
3.3.3.1. Zielstellung .....	38
3.3.3.2. Vergleich verschiedener Impellersysteme.....	45
3.3.3.3. Auswahl eines verbesserten Impellersystems.....	48
4. Anwendungsbeispiele.....	51
4.1. Implementierung und Vergleich von Meßgeräten.....	51
4.1.1. Indirekte Meßgrößen .....	52
4.1.1.1. Biomasse.....	52

4.1.1.2. Glucose.....	53
4.1.2. Direkte Meßgrößen .....	55
4.1.2.1. Ethanol .....	55
4.1.2.2. Gelöstsauerstoff .....	61
4.1.2.3. Kohlendioxid.....	63
4.2. Physiologisches Verhalten der Hefe auf dynamische Änderungen.....	64
5. Zusammenfassung und Ausblick .....	74
6. Anhang.....	77
6.1. Abkürzungs- und Symbolverzeichnis .....	77
6.2. Nährmedien und Puffer .....	78
6.3. Geräteverzeichnis.....	79
6.4. Fuzzy-Expertensystem .....	80
6.5. pO <sub>2</sub> -Kontrollroutine .....	82
7. Literaturverzeichnis .....	84
8. Lebenslauf.....	90

Abstract

## Abstract

Borvitz, Dieter

### **Entwicklung eines biotechnologischen Referenzsystemes**

In der vorliegenden Arbeit wird ein Bioreaktorsystem beschrieben, das primär als ein Referenzsystem im Sinne eines Bezugssystems für den Test von Meßgeräten konzipiert war. Bezugssysteme in diesem Sinne müssen die Meßwerte der Größen, die mit den zu testenden Meßgeräten gemessen werden, genauer und sicherer zur Verfügung stellen können als das von dem zu testenden Gerät erwartet werden kann.

Das Testsystem wurde aus Standardkomponenten zusammengesetzt, die in Forschung und Industrie verwendet werden. Die einzelnen Bestandteile sind Standard-Rührkessel mit 10 l Arbeitsvolumen, *Saccharomyces cerevisiae* als Mikroorganismus und Fed-Batch Betrieb als häufig eingesetztes Verfahren in der Biotechnologie. Die Ausstattung des Reaktors mit einer guten Grundausrüstung an Meßtechnik dient zur genauen Einstellung und gezielten Veränderung von relevanten Prozeßzuständen.

Die mit besten Meßgeräten erzielten Meßwerte genügen aber allein nicht den Anforderungen, die man an einen Standard stellt. Daher wurden die Genauigkeiten, mit denen die Werte für die Zustandsgrößen zur Verfügung gestellt werden, durch die Methoden der modellgestützten Messung erhöht.

Mit Hilfe zusätzlicher Informationen über den Prozeß aus dem Bereich der Erfahrungen mit dem genannten und vergleichbaren Prozessen sowie unter Zuhilfenahme umfangreicher Daten aus dem konkreten Prozeß war es möglich, das verfügbare a priori Wissen und die nutzbaren a priori Informationen über den Referenzprozeß signifikant zu erhöhen und damit die Genauigkeit seiner numerischen Beschreibung im Prozeßmodell signifikant zu verbessern.

Das somit verbesserte Wissen über den Prozeß konnte weiterhin genutzt werden, um den Prozeß sehr viel präziser zu steuern und zu regeln als das mit gewöhnlichen im Labor durchgeführten Prozessen möglich ist, nämlich auch modellgestützt. Damit war es möglich, gezielt bestimmte Zustände des Prozesses anzufahren, über längere Zeiträume zu halten und schnelle gezielte Veränderungen zwischen verschiedenen Zuständen zu realisieren was für den Test von Meßgeräten von besonderem Interesse ist.

Das Prozeßmodell wurde durch die ständige Rückkopplung von Zustandsgrößen, Zustandsbeschreibung und Vorhersage mittels Fuzzy-Expertensystem ergänzt. Dies gewährleistete ein reproduzierbares, gezieltes Einstellen gewünschter Prozeßzustände (durch die Wachstumsrate  $\mu$  repräsentiert) und erhöhte durch die verkürzte Reaktionszeit bei Abweichungen die Prozeßsicherheit.

Kriterien zur Sensorbeurteilung sind die Empfindlichkeit, die Querempfindlichkeit gegenüber anderen Größen, die Genauigkeit der Meßwerte sowie das dynamische Verhalten. Verschiedene Meßverfahren wurden untersucht und unter dem Gesichtspunkt einer optimalen Kontrolle und Steuerung eines Prozesses anhand des unterschiedlichen Informationsgehaltes der Meßsignale miteinander verglichen. Dabei wurde auf die Abhängigkeit der verschiedenen Meßsignale zu den Prozeßbedingungen eingegangen und qualitativ für die Verbesserung einer Prozeßsteuerung beurteilt.

## Abstract

Borvitz, Dieter

### **Development of a biotechnological reference system**

The present paper/work describes a bioreactor system, which was primarily designed as a reference system for the test of measuring instruments. These types of reference systems are to make available measured values of variables, which are measured by the instruments to be tested, more exactly and safer than this can be expected from the instrument to be tested.

The test system was composed of standard components used in research and industry. The individual components are the 10 l standard stirring reactor, the micro-organism *Saccharomyces cerevisiae* and the fed-batch operation as a frequently applied method in biotechnology. The good basic equipment of the reactor concerning measuring techniques serves for the exact setting and defined changes of relevant process states.

The values measured with the best instruments alone do, however, not satisfy the requirements a standard has to comply with. Thus the exactness of the values available for the state variables was increased by the methods of the model based measurement.

Additional information on the process gained from experience with the process stated and comparable processes and with having recourse to comprehensive data from the process in question made it possible to significantly increase the available a priori knowledge and the usable a priori information regarding the reference process. Thus the exactness of its numerical description in the process model was significantly improved.

The better knowledge concerning the process could furthermore be used to control and regulate the process very much more precisely than this would be possible with processes usually carried out in a laboratory. Thus it was possible, to set defined states of the process, to keep them for longer time periods and to rapidly realise defined changes between different states, which is of special interest for the instrument testing.

The process model was completed by the constant feedback of state variables, description of the process and forecasts via fuzzy expert system. This guaranteed a reproducible, defined setting of desired process states (represented by the growth rate  $\mu$ ) and increased the process safety through the shorter reaction time in cases of deviation.

The sensitivity of the sensor, the sensitivity with regard to other variables, the exactness of the values measured, as well as the dynamic behaviour are criteria to judge the sensor. Different measuring methods were investigated and compared with one another in view of an optimised control and regulation of the process on the basis of the different information content of the measurement signal. The dependence of the different measurement signals of the process conditions were taken into consideration and qualitatively evaluated to improve the process control.



## Schlagworte

Biotechnologisches Referenzsystem

*Saccharomyces cerevisiae*

Neuronale Netze

biotechnological reference system

*Saccharomyces cerevisiae*

neuronal network

## 1. Einleitung

Ein Referenzsystem soll ein, bis in möglichst alle Einzelheiten bekanntes System sein, das sich durch seinen realitätsbezogenen Modellcharakter hervorhebt und als Grundlage und Bezugspunkt für weitergehende Entwicklungen dient. Je komplizierter die Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Komponenten sind, desto schwieriger und umfassender wird eine Beschreibung der Zusammenhänge.

In den Naturwissenschaften sind die Wechselwirkungen untereinander so vielfältig, daß man sich häufig auf die Beschreibung von Einzelphänomenen beschränken muß. Man bewegt sich im Spannungsfeld zwischen Reaktor und Organismus einerseits, sowie Sensor und Meßtechnik andererseits, deren gemeinsamer Bezugspunkt der biotechnologische Prozeß ist.

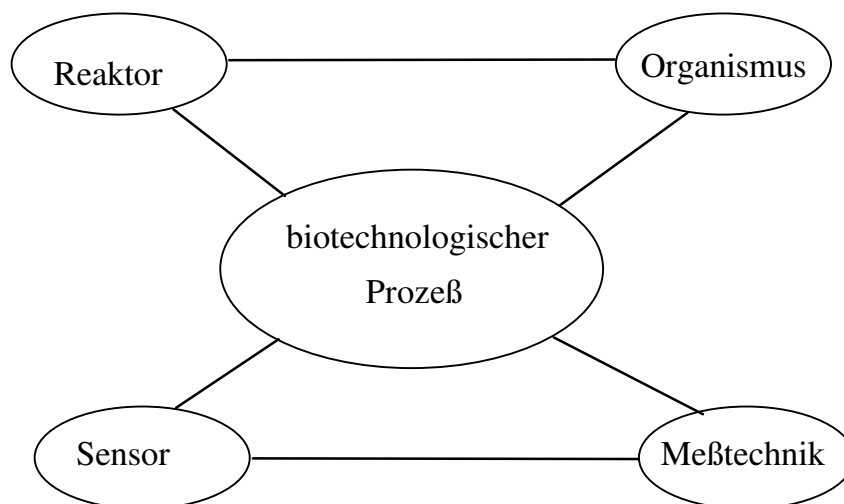


Abbildung 1: Spannungsfeld biotechnologischer Prozesse

In diesem Spannungsfeld besteht eine Schwierigkeit bei der Beurteilung von Daten darin, inwieweit biologische und technische Effekte vermischt sind. Häufig werden solche Phänomene als rein biologisch interpretiert und Reaktoreinflüsse nicht herausgearbeitet. Meßdaten müssen jedoch immer in Zusammenhang mit anderen Messungen gesehen werden [25].

In der Biotechnologie (einer vergleichsweise jungen Wissenschaft) gibt es viele Arbeiten über das Wachstum und die Entwicklung der drei Mikroorganismengruppen (Zellkulturen, Bakterien, Hefen) und deren Varianten, die sich mit Hilfe der Gentechnik schnell potenziert haben. Oft gibt es ähnliche Ergebnisse von Forschern, die

reproduzierbar sind, sich aber nicht in Beziehung setzen lassen, weil sich grundlegende Bedingungen unterscheiden. Dabei beschränkt sich die Zahl der, in der Biotechnologie eingesetzten Verfahrensweisen auf zwei hauptsächlich verwendete (Batch, Fed-Batch). Eine weitere (Kontinuierlich) wird nur in wenigen Fällen industriell eingesetzt, da Probleme wie Zellalterung oder Immobilisierung von Zellen schwierig zu lösen sind. Dazu kommt eine sehr begrenzte Zahl unterschiedlicher Reaktoren. Der am häufigsten eingesetzte Reaktor ist der Rührkessel.

Ein standardisiertes Verfahren (Referenz) könnte möglicherweise die Teilergebnisse miteinander verbinden, und somit Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Komponenten des Systems erkennbar und beschreibbar machen. Jedes Ergebnis welches sich mit dem Referenzsystem in Beziehung setzen läßt, wäre ein weiterer Baustein auf dem Weg zu einer vollständigen Systembeschreibung.

Das Referenzverfahren würde neben einer effektiveren Ausnutzung der finanziellen Mittel, auch eine höhere Effizienz der Forschung bedeuten, da die Kompatibilität der Einzeluntersuchungen sich verbessern, und die Entwicklung insgesamt zielstrebig sein könnte. Vor allem bei der Meßgeräteentwicklung fehlt häufig der praxisnahe und aussagekräftige Test, da entweder die Einflüsse realer Medien und Betriebsbedingungen in Modellsystemen nicht berücksichtigt werden können oder die nötige verlässliche Bezugsgröße fehlt. Hier kann ein zuverlässiges Modell zur Zustandsberechnung anhand der vorhandenen Prozeßgrößen, mit den nötigen theoretischen Kenntnissen gepaart, ein wichtiges Hilfsmittel sein.

Zur Charakterisierung von Systemen ist es erforderlich, gezielt Prozeßzustände in dichter Abfolge einstellen zu können, so daß äußere Einflüsse sich nicht negativ bemerkbar machen bzw. unterscheidbar sind (makroskopische Umweltbedingungen, Rauschen). Dabei muß eine Prozeßkontrolle ein Erreichen der gewählten Zustände gewährleisten, sowie die Möglichkeit einer weitestgehenden Reproduktion des Prozesses bieten.

Interessierende Parameter bei einer Prozeßkontrolle sind meistens entweder die Produktmenge oder die gebildete Zellmasse anhand der Wachstumsrate  $\mu$ . Beide Größen sind in vielen Fällen nur indirekt oder analytisch mit gewisser Zeitverzögerung zu ermitteln, so daß die Modellberechnung anhand von Wechselwirkungen dieser Größen mit direkt meßbaren Prozeßgrößen eine immense Bedeutung für die Steuerung und Kontrolle biotechnologischer Prozesse gewonnen hat.

Die Annäherung an die vollständige Systembeschreibung erfolgt aus verschiedenen Richtungen wie der Gensequenzierung (zum Verständnis der molekularen Abläufe und Zusammenhänge), der Verfahrenstechnik (zum optimalen Nutzen der Ressourcen), der Hydrodynamik (zum Beschreiben der Vermischung innerhalb des Reaktors), der physikalischen Chemie (zur Beschreibung der Phasengrenzflächen und Stoffübergänge) und der Modellierung (zur Verarbeitung aller Informationen, sowie zur Analyse der vorhandenen Daten auf bisher nicht beschreibbare Zusammenhänge und Abhängigkeiten). Das Ergebnis aller Beiträge sollte die Möglichkeit einer umfassenden Prozeßkontrolle und Steuerung sein., die aufgrund der Gemeinsamkeiten der Komponenten aller Untersuchungen auch Mikroorganismusübergreifend gestaltet sein könnte.

## 2. Zielsetzung der Arbeit

Die Zielsetzung dieser Arbeit war, im Rahmen eines Projektes der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungseinrichtungen e.V. (AiF), Testmethoden und -systeme für die Prozeßanalytik in der Biotechnologie zu entwickeln. Dazu mußte ein Testsystem als Referenz definiert werden, daß den vielfältigen Anforderungen gerecht wird.

Das Wort Referenz kann man in diesem Zusammenhang auf zwei Weisen verstehen:

1. Im Sinne eines Systems von dem man vertrauensvolle Auskünfte bekommt, die man als Empfehlung vorweisen kann
2. Im Sinne eines Systems, das als Bezugssystem verwendet werden kann, als eine Vergleichsbasis.

In der vorliegenden Arbeit wird ein Bioreaktorsystem beschrieben, das primär als ein Referenzsystem im zweiten Sinne für den Test von Meßgeräten konzipiert war. Der erste ist die unmittelbare Konsequenz des zweiten.

Bezugssysteme in diesem Sinne müssen die Meßwerte der Größen, die mit den zu testenden Meßgeräten gemessen werden, genauer und sicherer zur Verfügung stellen können als das von dem zu testenden Gerät erwartet werden kann. Die Werte dieser Größen müssen nach Möglichkeit eingestellt und dynamisch verändert werden können.

Das wird durch die Ausstattung des Reaktors mit einer guten Grundausrüstung an Meßtechnik erreicht, so daß sein Zustand sehr genau eingestellt und gezielt verändert werden kann. Das heißt gleichzeitig, daß die wichtigsten Prozeßgrößen genauer als in ähnlichen Bioreaktoren bestimmt und verändert werden können.

Die mit besten Meßgeräten erzielten Meßwerte genügen aber allein nicht den Anforderungen, die man an einen Standard stellt. Daher mußten die Genauigkeiten, mit denen die Werte für die Zustandsgrößen zur Verfügung gestellt werden, durch zusätzliche Maßnahmen erhöht werden. Das erfolgte mit den Methoden der modellgestützten Messung.

Diese Methode setzt leistungsfähige Prozeßmodelle voraus. Die Genauigkeit der klassischen Prozeßmodelle, die üblicherweise verwendet werden, reicht dazu nicht aus. Mit Hilfe zusätzlicher Informationen über den Prozeß aus dem Bereich der Erfahrungen

mit dem genannten und vergleichbaren Prozessen sowie unter Zuhilfenahme umfangreicher Daten aus dem konkreten Prozeß war es möglich, das verfügbare a priori Wissen und die nutzbaren a priori Informationen über den Referenzprozeß signifikant zu erhöhen und damit die Genauigkeit seiner numerischen Beschreibung im Prozeßrechner signifikant zu verbessern. Die höhere Genauigkeit der Modelle führt zu einer höheren Genauigkeit bei der indirekten Bestimmung der Zustandsgrößen und aller weiteren, die mit ihnen in einem konkreten Zusammenhang stehen.

Das somit verbesserte Wissen über den Prozeß konnte weiterhin genutzt werden, um den Prozeß sehr viel präziser zu steuern und zu regeln als das mit gewöhnlichen im Labor durchgeführten Prozessen möglich ist, nämlich auch modellgestützt. Damit war es möglich, gezielt bestimmte Zustände des Prozesses anzufahren und über längere Zeiträume zu halten.

Das gezielte Einstellen von Prozeßzuständen, das Halten derselben, sowie schnelle gezielte Veränderungen zwischen verschiedenen Zuständen ist für den Test von Meßgeräten von besonderem Interesse.

Als Basis für das Referenzsystem wurde ein Standard-Labor-Bioreaktor gewählt, der, wie sein Name sagt, in ähnlicher Form überall in der Forschung und Entwicklung verwendet wird. In diesem Reaktor wurde ein weit verbreitetes und als Referenzsystem bereits empfohlenes biologisches System verwendet. Der Grund dafür war, ein System zu etablieren, in dem Bedingungen realisiert werden können, die gleich den üblichen Bedingungen in der Forschung und Entwicklung oder denen sehr ähnlich sind.

## **2.1. Realisierung der Zielsetzung**

Die Komponentenauswahl des Mikroorganismus und der Verfahrensweise fiel auf die Backhefeproduktion im Fed-Batch Betrieb.

Diese Auswahl fand unter dem Gesichtspunkt statt, daß es sich bei der Bäckerhefe um einen gut untersuchten, interessanten Schlauchpilz handelt. Gut untersucht, weil es viele Arbeiten mit und um die Eigenschaften von *Saccharomyces cerevisiae* gibt, und interessant, da es sich um einen Standardorganismus der Gentechnik handelt [13]. Der häufige Einsatz dieser eukaryontischen Zellen mit hochentwickelten Zellorganellen und widerstandsfähiger Zellwand rührt von der genauen Kenntnis der Physiologie der Hefen her. Trotz der großen Bedeutung von *Saccharomyces cerevisiae* fehlen immer noch

Informationen über den genauen Zusammenhang des komplexen Metabolismus. Die komplette Entschlüsselung des Hefegenoms 1996 [4] legte die Kodierung des Aminosäurebauplanes offen, beantwortete aber nicht vollständig die Frage nach dem Verhalten bei verschiedenen inneren und äußeren Einflüssen und deren Wechselwirkungen.

Die Wahl des Fed-Batch Betriebes erfolgte zum einen wegen der wirtschaftlichen Bedeutung (häufig in der Industrie eingesetztes Verfahren) und zum anderen wegen möglicher Rückschlüsse auf die anderen Verfahrensweisen (Batchphase zu Beginn, kontinuierliche Medienzugabe zum Ende jeder Kultivierung). Die verwendete Zufütterung wurde in der Form abgewandelt, daß das optimale Profil der Zufütterung in voreingestellte Schritte (pulsartige Zugabe des Substrates) unterteilt werden kann. Das Ergebnis sollte ein zyklischer Verlauf der Substratkonzentration im Kulturmedium sein, wodurch der Metabolismus der Organismen einem stetigen Wechsel zwischen limitiert und exzessiv vorliegendem Substrat unterworfen wird [47]. Dies bietet die Möglichkeit, physiologische Effekte der Zellen zu untersuchen, die sich in makroskopischen Größen niederschlagen, sowie Meßgeräte in einem breiten Anwendungsspektrum (Antwortzeit, Erfassung von realen Werten, Wiedergabe des Verlaufes) zu überprüfen und zu beurteilen.

Die Maßnahmen zum Ausbau dieses Standardsystems zu einem Referenzsystem sind die folgenden:

1. Ausbau der meßtechnischen Ausrüstung auf einen relativ hochwertigen Stand durch Umstellung der Abgasanalytik auf on-line Meßgeräte (Sauerstoff, Kohlendioxid, Ethanol), Verbesserung der Bestimmung des Reaktorgewichts durch on-line Wägung und Einsatz schneller Fluoreszenz-Meßverfahren zur Ermittlung des Gelöstsauerstoffgehaltes im Medium
2. Entwicklung besonders leistungsfähiger Prozeßmodelle für die Zustandsschätzung sowie für die Prozeßregelung
3. Ausführliche Validierung der Zustandsschätzungs- und der Regelungseigenschaften.

Die Prozeßmodelle stellen einen wesentlichen Engpaß bei der Optimierung biotechnischer Prozesse dar, da umfassende mechanistische mathematische Modelle, wenn überhaupt, nur mit erheblichem Zeitaufwand zu erstellen sind. Eine Alternative ist der Einsatz von Modellen, die sowohl das mechanistische als auch das heuristische a

priori Wissen über den Prozeß, sowie die Informationen, die in den Meßdaten verborgen sind, einbeziehen [44]. Dabei wurde auf die Kontrolle durch Rückkopplung vom Prozeß besonderer Wert gelegt, um Abweichungen so früh wie möglich entgegenzusteuern. Denn aus diesen unvorhergesehenen Entwicklungen und Ereignissen resultiert häufig eine eingeschränkte Produktivität, d.h. eine nicht optimale (wirtschaftliche) Ausnutzung der Ressourcen. Nicht direkt zugängliche Prozeßgrößen können mit Hilfe eines derartigen Modells anhand der Startwerte und Rahmenbedingungen berechnet und vorhergesagt werden und damit eine Vergleichsgröße zur Beurteilung eines Meßgerätes liefern.

Das Prozeßmodell wurde durch die ständige Rückkopplung von Zustandsgrößen, Zustandsbeschreibung und Vorhersage mittels Fuzzy-Expertensystem ergänzt. Dies gewährleistete ein reproduzierbares, gezieltes Einstellen gewünschter Prozeßzustände (durch die Wachstumsrate  $\mu$  repräsentiert) und erhöhte durch die verkürzte Reaktionszeit bei Abweichungen die Prozeßsicherheit.

Mit dem Prozeß ist man dann in der Lage, Meßgeräte zu testen. Dabei gibt es zwei Schwerpunkte:

1. Statischer Betrieb der Meßgeräte, folglich muß ein vorgegebener Zustand durch die Regelung des Prozesses über einen hinreichend langen Zeitraum gehalten werden können.
2. Verhalten der Meßgeräte bei dynamischen Veränderungen der Meßgröße. Dabei muß die Prozeßgröße dynamisch verändert werden.

Als Einsatzbeispiel wurde modellhaft ein Meßgerätevergleich zur optimalen Kontrolle und Steuerung eines Prozesses anhand des unterschiedlichen Informationsgehaltes der Meßsignale durchgeführt. Dabei wurde auf die Abhängigkeit der verschiedenen Meßsignale zu den Prozeßbedingungen eingegangen und qualitativ für die Verbesserung einer Prozeßsteuerung beurteilt.

Abschließend werden sämtliche Ergebnisse zusammengefaßt und ein Ausblick auf die Bedeutung der Weiterentwicklung von Referenzsystemen gegeben.



## **3. Entwicklung des Referenzsystemes**

### **3.1. Referenzsystemkomponenten**

Das Referenzsystem besteht aus den Komponenten Fermentationsanlage (Reaktor und Meßtechnik), Prozeßmanagementsystem, Mikroorganismus und Kultivierungsbedingungen. Bei der Zusammenstellung wurde auf die Auswahl von Standardkomponenten geachtet, wie sie in ähnlicher Form überall in der Forschung und Entwicklung verwendet werden. Damit ist der Rahmen für das Zusammenwirken der einzelnen Bausteine festgelegt.

#### **3.1.1. Fermentationsanlage**

Für die Durchführung der Kultivierungen wurde ein Standard-Biostat ED (Höhe 553 mm, Durchmesser 188 mm) mit einem Gesamtvolumen von 15 l (Arbeitsvolumen 10 l), der als Standard-Rührkessel (Dechema-Norm) mit drei 6-Blatt-Schreibenrührern (Rushton-Turbinen, s. Kap. 3.3..2.2.) und 4 Stromstörern (Breite 12 mm) ausgestattet ist, gewählt. Die Versorgung des Reaktors wird über eine Antriebs-/Versorgungseinheit mit integrierter Elektroheizung gewährleistet, die eine in-situ Sterilisation des Reaktors, sowie der Zu- und Abluftleitungen, ermöglicht, ohne auf einen externen Dampfanschluß angewiesen zu sein. Kontrolliert und gesteuert wird die Anlage über eine digitale Meß- und Regeleinheit DCU (Digital Control Unit). Das Kulturgefäß ES 10 ist ein Ganzstahlgefäß mit außenliegendem Doppelmantel zur Temperierung. Neben den zweckgebundenen Normstutzen für den Abluftkühler, die Begasung, das Überdruck- oder Sicherheitsventil sind sieben weitere 19 mm Normstutzen im Deckel angebracht, die für verschiedene Anschlüsse verwendet werden:

- Schaum- und Füllstandssensor
- Innendruckaufnehmer
- Dreifachanstechnadel für Säure, Lauge und Antischaummittel
- höhenverstellbares Zulaufrohr für die Substratzufütterung
- off-line Probenahme
- Gasentnahmestutzen für die Abgasanalytik (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, Ethanol)

Im unteren Bereich des Reaktors befinden sich fünf weitere Normstutzen (zwei 25 mm und drei 19 mm), die der Aufnahme von Temperatur-, pH-, Redox-, Gelöstsauerstoff- und Fluoreszenzsonde dienen. Im Kesselboden befindet sich ein Ablaßventil.

Die sterile Begasung des Reaktors kann stufenlos mit Druckluft erfolgen, die durch einen Begaserring (Durchmesser 95 mm) mit 22 kleinen Öffnungen unterhalb des ersten Impellers in das Gefäß und durch den Abluftkühler wieder aus dem Gefäß geleitet wird.

Die DCU ist ein digitales Meß- und Regelsystem, bei dem die Signalaufnahme und Übertragung mit Hilfe eines VMEbus 16 bit Mikroprozessor 68000 von Motorola erfolgt. Die standardmäßig integrierte Software bietet neben der Meßwerterfassung und Ausgabe weitere Funktionen:

- Kalibrierung der Sonden und Pumpen
- Sollwertprofile für Regler
- Timerfunktionen für unstete Stellglieder
- Alarmüberwachung
- Dosierzähler
- Automatische Sterilisation
- Meßwertverstärker für Temperatur-, pH- und Redox-Messung.

Die digitale Meß- und Regeleinheit fungiert als Front-End Gerät, das über eine serielle Schnittstelle (RS 432) an den Rechner (VAX-Station 4000/60) angeschlossen wurde, d.h. die Meßgrößen (Temperatur, Rührerdrehzahl, pH-Wert, Redoxpotential, Begasungsrate, Gelöstsauerstoff, Schaumbildung) werden über einen Softwaretreiber an den Rechner übergeben und die DCU erhält auf umgekehrtem Wege Einstellungen der Prozeßparameter (Temperatur, Rührerdrehzahl, pH-Wert, Begasungsrate, Menge des zuzufütternden Substrates). Zusätzlich können die Werte weiterer Meßgeräte, z.B. Abgas- und Ethanolmeßgeräte, Kulturfluoreszenz, usw. über ein Frontendsystem an den Rechner übergeben werden.

### **3.1.2. Prozeßmanagementsystem**

Die normalen Routineaufgaben wie Datenaufnahme, -verwaltung, -speicherung und Prozeßvisualisierung kann mit jedem leistungsfähigen handelsüblichen Prozeßmanagementsystem erfolgen.

In diesem Referenzsystem wurde das Prozeßmanagementsystem RISP (Realtime Integration Software Platform) als Prozeßleitsystem für die Einbindung von Prozeßwissen in die automatische Prozeßführung verwandt und ist als Leitsystem für Kultivierungen aufgrund der jahrelanger Erfahrung und steter Verbesserungen gut geeignet. Die Software läuft auf VAX-Rechnern mit einem VMS-Betriebssystem ab Version 5.4, als Benutzeroberfläche kommt die X-Windows kompatible DECwindows 2.0 zum Einsatz. Der modulare Aufbau des Systems erlaubt eine große Flexibilität, was sowohl der Ankopplung vielfältiger Prozeßperipherie als auch von Programmen und Programmsystemen zugute kommt.

Über eine Konfigurationsoberfläche ist es möglich, während des Prozesses neue Meßgeräte anzukoppeln, Formeln zur Berechnung abgeleiteter Größen einzugeben oder zu verändern und gegebenenfalls Meßgeräte in notwendigen Fällen bzw. Intervallen nachzukalibrieren.

Die on-line Prozeßübersicht gibt dem Anwender zu jeder Zeit einen Überblick über alle relevanten Variablen. Dazu gehören neben den direkten auch die abgeleiteten, berechneten oder vom Modell geschätzten Größen (z.B.: RQ-Wert, spezif. Wachstumsrate  $\mu$ , u.a.). Der graphische Darstellungszeitraum der Variablen ist wählbar und kann den Anwenderbedürfnissen entsprechend angepaßt werden. Die Möglichkeit der Eingabe von off-line Werten ist im laufenden Prozeß möglich. Eine ausführliche Beschreibung findet sich bei Behrendt [3].

### **3.1.3. Mikroorganismus *Saccharomyces cerevisiae***

Als Mikroorganismus wurde die Hefe *Saccaromyces cerevisiae*, Stamm DSM 2155 eingesetzt. Sie wird allgemein als Bäckerhefe bezeichnet, da sie identisch mit dem Hefestamm VdH2, der in den meisten deutschen Backhefebetrieben zur Produktion von Backhefe verwendet wird. Dieser Stamm wird als Referenzstamm für Vergleichstests empfohlen [7]. Dieser Hefe-Stamm ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen, weil er neben der langen Backhefe-Tradition auch einer der Wirtsorganismen ist, die mittels der Gentechnik zur Produktion von Medikamenten und Biochemikalien eingesetzt werden.

*Saccaromyces cerevisiae* gehört zu den Sproßpilzen, besitzt eine eukaryontische Zelle mit hochentwickelten Zellorganellen und widerstandsfähiger Zellwand. Die kugeligen bis langgestreckten Schlauchpilze lagern sich häufig zu Zellverbänden zusammen [48] und

vermehren sich vorwiegend durch Sprossung (ungeschlechtliche Vermehrung [23, 9]). Der Transport von Substraten durch die nicht frei permeable Lipidmembran erfolgt in der Regel unter Beteiligung spezifischer Träger. Erst dann kann das Substrat durch die bekannten Abbauewege der Glykolyse, des Zitronensäurezyklus und der Atmungskette metabolisiert werden.

Sonnleitner und Käppeli haben ein Modell für die verschiedenen Zustände wachsender Hefepilze entwickelt welches das bisherige von Crabtree- und Pasteureffekt unter ausschließlich oxidativen bzw. fermentativen Bedingungen ablöste. Das Modell geht von Organismusabhängigen maximalen Zellkapazitäten bezüglich Atmung, Transport und Wachstum aus, die sich gegenseitig beeinflussen können.

Der Substratabbau unter aeroben Bedingungen erfolgt sowohl oxidativ wie auch reduktiv gleichzeitig, nur die Anteile zueinander verändern sich je nach Ausnutzung der katabolischen Kapazität. Diese bildet den „Flaschenhals“, bei dem oxidativen Substratabbau [15]. Liegt eine exzessive Substratkonzentration im Medium vor und schöpft die Zelle die momentan zur Verfügung stehende respiratorische Kapazität bereits aus, so wird ein Teil der Glucose zum Ethanol reduziert. Dieser Zustand bleibt erhalten, bis die Glucosekonzentration nicht mehr ausreicht, um den Energiebedarf der Zelle vollständig abzudecken. Dann wird das Ethanol in der Zelle verbraucht. Dieser Zustand wird durch oxidoreduktiven Stoffwechsel beschrieben.

Die möglichen Verhältnisse im Metabolismus von Hefen nach dem Modell von Sonnleitner und Käppeli zeigt Abbildung 2.

Dieses Modell kann jedoch nicht alle auftretenden Zustände in einer Kultur erklären, z.B. die Dauer der lag-Phase zwischen dem Wachstum auf Glucose und dem anschließenden Wachstum mit gebildetem Ethanol als Substrat bei Batch-Prozessen [30]. Dies zeigt das Fehlen eines umfassenden Modells aller Zustandsbedingungen des Systems und verdeutlicht die Bedeutung weiterer Untersuchungen auf kinetischem Gebiet [45].

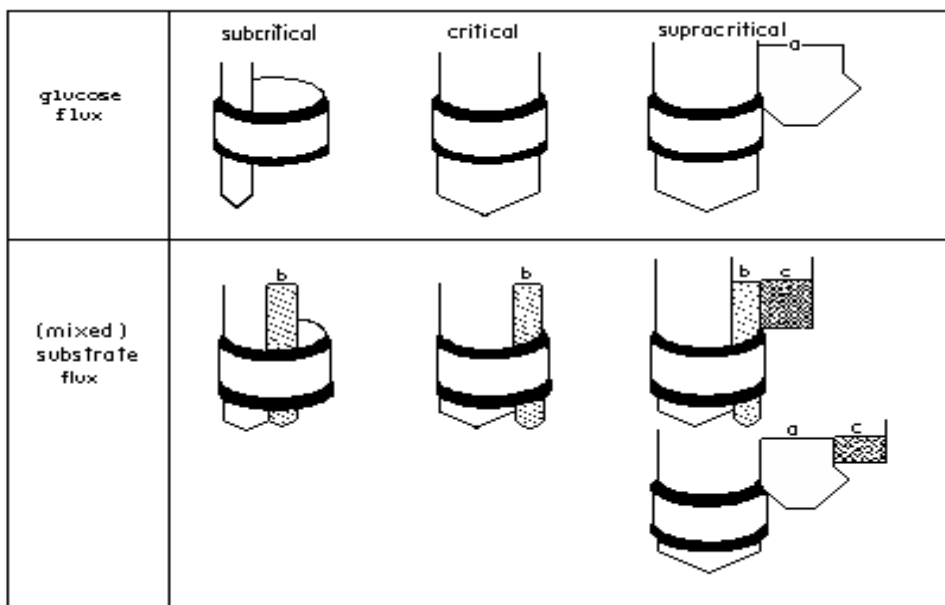


Abbildung 2: Wachstumsmodell mit der Atmungsbeschränkung [46]

### 3.1.4. Kultivierungsbedingungen

Die Stammhaltung der Hefen erfolgte auf Schrägagar-Röhrchen, die alle 6 Wochen überimpft wurden. Um definierte Bedingungen für das Modellsystem zu gewährleisten, wurde ein vollsynthetisches Medium verwendet (D-Medium, von Kuhlmann modifiziert [18], s. Kap. 6.2.).

Für die Vorkultur wurde in einem 5 l Erlenmeyerkolben 1 l Medium angesetzt und autoklaviert. Danach wurde die Vitaminlösung dazu steriltfiltriert und das getrennt autoklavierte Substrat (Glucoselösung) unter der Clean Bench hinzugefügt. Nach dem Animpfen wurde 24 h auf einem Rundschtüttler bei  $120 \text{ min}^{-1}$  und  $30 \text{ °C}$  inkubiert. Dieser Vorgang wurde für alle Kultivierungen reproduziert und wird vergleichbar in der Forschung und Entwicklung eingesetzt.

Für die Fed-Batch Kultivierungen wurden direkt vor dem Animpfen 9 l fertige Nährlösung bereitet, indem zu der in-situ sterilisierten Salzlösung steriltfiltrierte Vitamine und getrennt autoklavierte Glucoselösung gegeben wurde. Die Kultivierungsbedingungen im Einzelnen:

Tabelle 1: Standardkultivierungsbedingungen

Inoculum	1 l (10% des Arbeitsvolumens)
Temperatur	$30 \text{ °C}$
pH-Wert	4,1

Drehzahl	500-750 min <sup>-1</sup>
Begasungsrate	0,7-0,8 vvm
Startglucosekonzentration	1 g/l
Glucosekonzentration im zugefütterten Substrat	272 g/l

Die Startbedingungen entsprechen Standardbedingungen für vergleichbare übliche Prozesse. Die Batch-Phase zu Beginn jeder Kultivierung umfaßt das Anwachsen der Mikroorganismen bis zum Erreichen der gewünschten Betriebsbedingungen und damit dem Start der Zufütterung von gelöstem Substrat (häufig Glucose).

Die Fed-Batch Phase wurde unter der Prämisse einer maximalen Biomassebildung innerhalb einer genau definierten Zeitspanne (16,5 h) als realitätsnahes Kriterium gewählt [38]. Eine bei einer hohen Wachstumsrate nicht völlig vermeidbare Ethanolbildung wurde bis zur Grenze eines limitierenden Einflusses zugelassen.

Dieses Grundprinzip entspricht üblichen Fed-Batch Prozessen, so daß relevante Testverhältnisse für die Untersuchung von Meßgeräten gegeben sind.

## **3.2. Prozeßführung**

### **3.2.1. Einleitung**

Um das beschriebene Standard-Reaktorsystem mit Standardmikroorganismus und Standard-Fed-Batch Prozeßführung als ein Referenzsystem anzusehen, muß auf die Unterscheidungsmerkmale besonderer Wert gelegt werden.

Dazu ist es erforderlich, die Werte der wichtigsten Prozeßgrößen sehr genau verfolgen zu können und damit den Zustand des Systems exakter zu beschreiben. Neben den direkt meßbaren Prozeßgrößen gibt es zahlreiche, die nur indirekt oder nach zeitaufwendigen Analyseverfahren zu bestimmen sind und sich daher für eine Prozeßkontrolle und Steuerung nur sehr eingeschränkt eignen. Gleichwohl sind dies häufig die im Prozeß wichtigsten wie Biomasse, Wachstumsrate, Verbrauchs- und Bildungsgeschwindigkeiten von Substraten und Produkten. Um diese Größen zu ermitteln, können bekannte Abhängigkeiten in Form von mathematischen Gleichungen, Heuristiken in Modelle eingebunden oder vorhandene Prozeßdaten auf Zusammenhänge analysiert werden [13].

Dies wiederum ist die Voraussetzung, um bestimmte vorgegebene Zustände anzufahren und den Prozeß dort beliebig lange halten zu können.

Aus der zahlreichen Instrumentierung werden viele Einzelinformationen über den Prozeßzustand erhalten, eine Bewertung unter Einbeziehung des vorhandenen heuristischen Wissens sowie aus der umfangreichen Datenbasis früherer Prozesse, wird durch modellgestützte Maßnahmen erzielt. Das Modell betrifft sowohl Messung wie auch die Regelung des Prozesses und führt zu einer genaueren Beschreibung und Einstellung der jeweiligen Zustände.

Dies verdeutlicht die besondere Bedeutung eines umfangreichen Prozeßmodells, daß auf die interessierenden Aufgaben zugeschnitten werden muß. Im Falle des betrachteten Referenzsystemes werden diese Aufgaben durch die Zustandsschätzung und die Zustandsreglung repräsentiert.

### **3.2.2. Prozeßmodell**

Prozeßmodelle setzen sich aus unterschiedlichen Teilen von Informationen aller Abstraktionsebenen von Prozeßwissen zusammen [39]. Dazu gehört in erster Linie die Verarbeitung von Prozeßgrößen und der Abgleich mit sonstigem, dem Modell zur Verfügung stehendem Wissen über den Prozeß. Dies können Daten aus vorangegangenen Kultivierungen, mathematische Zusammenhänge sowie heuristisches Wissen über den Prozeß und die Zusammenhänge bestimmter Prozeßgrößen sein.

Diese Prozeßmodelle leisten als ersten Schritt die Berechnung der, einer Messung nicht direkt zugänglicher Größen und erhöhen so das Wissen über den Zustand des Prozesses. Im zweiten Schritt wird das Prozeßmodell mit allen gemessenen und berechneten Größen zur Kontrolle des laufenden Prozesses eingesetzt und kann durch den Vergleich mit gespeicherten, bekannten Verläufen Abweichungen vom „Normalverlauf“ erkennen. Der dritte Schritt bezieht sich auf die Prozeßregelung durch das Modell anhand des ständigen Abgleichs zwischen vorhergesagten (vom Modell als Erwartungswert berechneten) und den gemessenen bzw. indirekt gemessenen Werten. Eine Übersicht findet sich bei [27].

Von diesem Punkt ausgehend können dann gezielt Soll-Prozeßzustände vorgewählt und eingestellt werden, immer unter der Voraussetzung von weitgehend reproduzierten und reproduzierbaren äusseren Bedingungen.

Die Schwierigkeit bei der Einbeziehung von Informationen unterschiedlicher Qualität liegt in der optimalen Gewichtung von Modellteilen des Hybridmodelles. Die Anpassung der Gewichtungsfaktoren wird mit realen Prozeßdaten durchgeführt. Die Gewichtung einzelner Faktoren kann sich von Prozeß zu Prozeß sowie auch innerhalb kürzester Zeitperioden eines Prozesses ändern. Hier muß das Modell ein Entscheidungskriterium besitzen, welches die Abschätzung des wahrscheinlichsten Zustandes trifft [21]. Bei der Kombination von heuristischem Wissen aus der Prozeßdatenanalyse früherer Kultivierungen mittels Clusteranalyse, mit der Zustandsschätzung des künstlichen neuronalen Netzes innerhalb des Prozeßmodells wird häufig das Extrapolationsmeßverfahren (EM) eingesetzt [43].

Für das Referenzsystem wurde ein Prozeßmodell gewählt, daß das Wissen aus allen Abstraktionsebenen einbezieht und folgende Struktur besitzt:

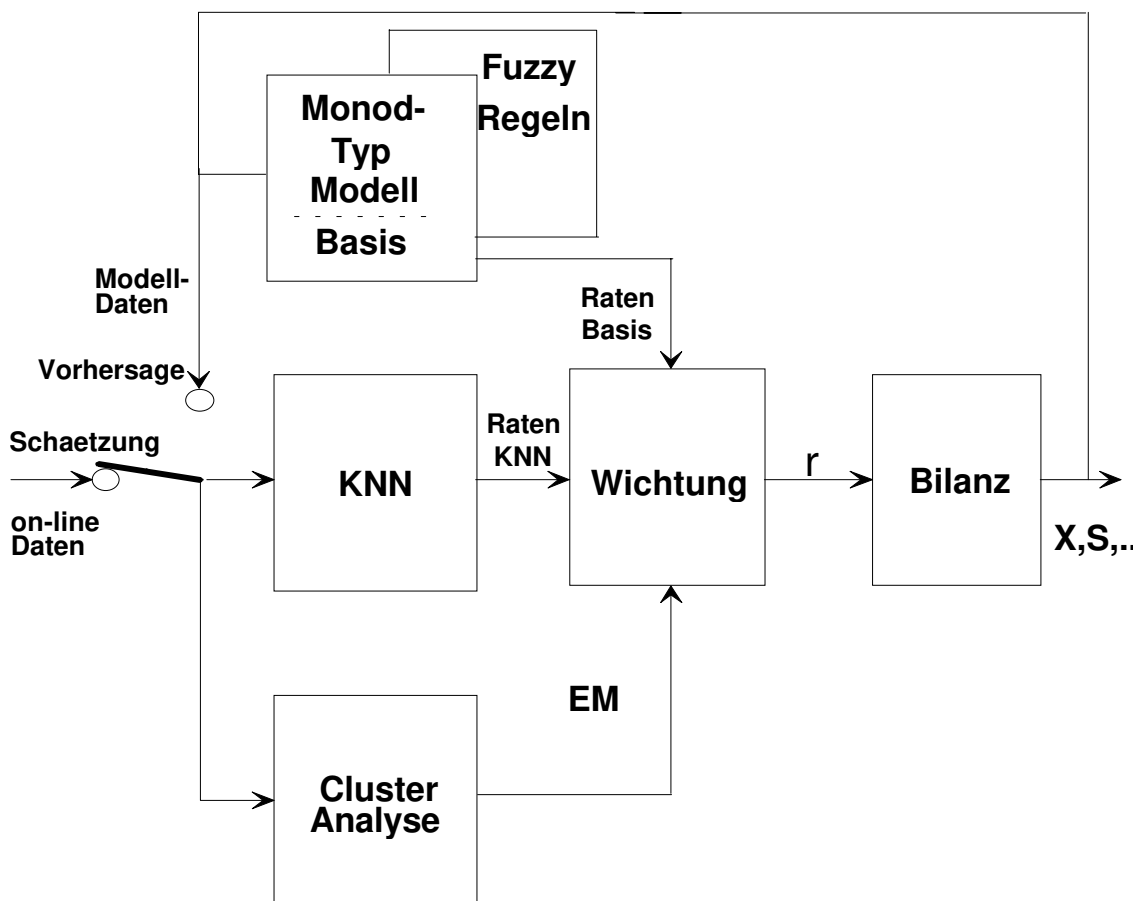


Abbildung 3: Aufbau des Hybridmodells mit Wichtung

Das Hybrid-Modell in Abbildung 3 ist aus dem Konzept entstanden, sämtliches verfügbares Wissen über einen Prozeß und seiner Zusammenhänge für die Modellierung/Zustandsberechnung zugänglich zu machen. Dazu zählen Daten aus



früheren Kultivierungen und der Literatur, physikalisch-mathematische Beziehungen von einzelnen Größen, und heuristischem Wissen (in der Form von Erfahrungswerten) [13]. Die Einbeziehung solcher qualitativen Werte liegt im einfachsten Fall in der Beschreibung des kinetischen Verhaltens mittels eines Monod-Ansatzes, der in Abbildung 3 durch das „Basis“-Modell repräsentiert wird. Dieser setzt sich aus den bekannten mathematischen Gleichungen und Abhängigkeiten zusammen (Monod-Typ Modell) und kann durch qualitative Beschreibung mathematisch nicht exakt zu ermittelnder Zusammenhänge ergänzt werden (Fuzzy Regeln). Zur Implementierung der Einzelaspekte in das Gesamtmodell sei als Beispiel auf die Bestimmung des Zufütterungszeitpunktes bei der dynamischen Fed-Batch Kultivierung verwiesen (s. Kap. 3.3.3.) [42]. Eine Übersicht über die verwendete Konzeption gibt Schubert [38].

Fehlen Grundlagen für eine mathematische Beschreibung des Verhaltens einer Variable, kann das Wissen um die qualitativen Zusammenhänge durch künstliche neuronale Netze in Beziehung zu einer oder mehreren Prozeßgrößen gesetzt werden [26]. Voraussetzung ist eine ausreichende Datenbasis.

Als Beispiel wie eine Darstellung, der durch das Modell beschriebenen Zusammenhänge aussieht, wurde die Abhängigkeit der spezifischen Wachstumsrate von der Konzentration des Haupt- und Zweitsubstrates (Glucose, Ethanol) ausgewählt. Diese Größen sind in der Produktion sehr wichtige Parameter, da sie über die Ausbeute die Wirtschaftlichkeit von Prozessen mitbestimmen.

In der Abbildung 4 erkennt man die abnehmende spezifische Wachstumsrate  $\mu$  mit zunehmender Ethanolkonzentration, sowie einen Bereich mit hoher Wachstumsrate bei geringen Ethanolkonzentrationen ( $< 2$  g/l) und Glucosekonzentration ( $\approx 0,2$  g/l). Dies ist allgemein aus der Literatur über Hefen bekannt. Die zwei Erhebungen der Fläche kennzeichnen Konstellationen von mittleren Glucosekonzentrationen (0,4 bzw. 0,6 g/l) und kleinen Ethanolkonzentrationen (2-3 g/l) bei denen der Prozeß mit sehr großer spezifischer Wachstumsrate und beherrschbarer Ethanolentwicklung verläuft. Beherrschbar meint, daß der Prozeß nicht unkontrollierbar wird. Für die Zielsetzung einer hohen Biomassekonzentration bedeutet das die Vermeidung einer Unterdrückung des Wachstums, die durch eine hohe Ethanolkonzentration ausgelöst wird.

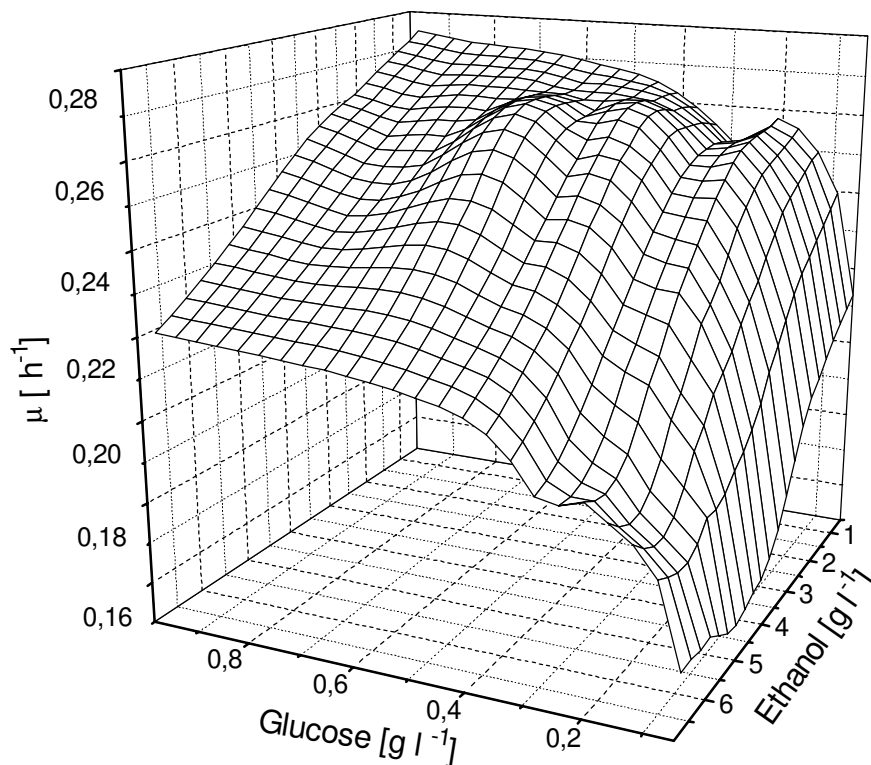


Abbildung 4: 3-D-Fläche der spezif. Wachstumsrate  $\mu$  mittels Hybrid-Modell

Prozeßmodelle stellen aufgrund der darin repräsentierten Kenntnisse über den Prozeß und seinen momentanen Zustand eine Hilfe zur Regelung innerhalb der vorgegebenen Ziele dar. Über die Rückkopplung vom Prozeß wird dem Modell eine „Selbstkontrolle,“ ermöglicht.

### 3.2.3. Anwendung des Prozeßmodells

#### 3.2.3.1. Zustandsschätzung

Der aktuelle Zustand eines Prozesses kann nur teilweise über hinreichend viele Meßgeräte bestimmt werden. Dies läßt jedoch direkte Rückschlüsse auf die indirekten Zielgrößen wie Biomasse, Wachstumsrate oder die Zusammenhänge zwischen Meßgrößen nur mit großer zeitlicher Verzögerung zu. Eine Regelung des Prozesses innerhalb einer vorgegebenen Zielsetzung unmöglich.

Durch den Einsatz einer modellgestützten Zustandsschätzung können sämtliche relevanten Informationen über den Prozeß einbezogen werden. Es werden nicht nur die Informationen aus einem Meßgerät geschöpft, sondern auch die Informationen

berücksichtigt, die in den übrigen Daten, die mit der betrachteten Meßgröße in Zusammenhang stehen, enthalten sind.

Die Vorgehensweise bei der Anpassung des Modells an die Signale der interessierenden Größe ist folgende: Zuerst wird die Gewichtung der einzelnen Module des Hybridmodelles an die vorhandenen Daten angepaßt und die betreffende Größe mit dem Modell berechnet und den realen Werten verglichen. Dieser Optimierungsprozeß wird durch die Minimierung der Werte für die mittlere quadratische Standardabweichung bestimmt und die Gewichtungsfaktoren durch verschiedene Optimierungsalgorithmen angepaßt [34]. Diese Anpassung kann auch als Lernvorgang interpretiert werden [10]. Dieser Wert der Zustandsschätzung kann später mit den Werten aus zu testenden Meßgeräten verglichen werden.

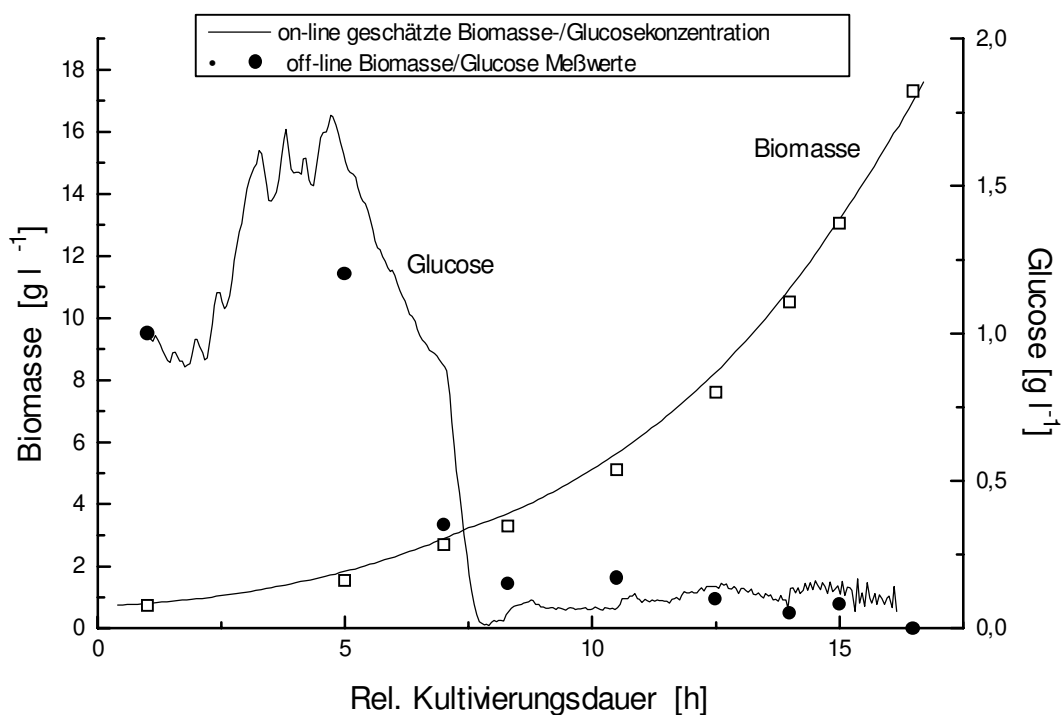


Abbildung 5: Vergleich gemessener mit, durch modellgestützte Zustandsschätzung erhaltenen Werten bei voreingestelltem Wechsel von hoher zu niedriger Wachstumsrate  $\mu$  nach 7,5 h

Das Hybridmodell unterstützt die Kontrolle des Prozesses durch die on-line Zustandsschätzung von Glucose und Biomassekonzentrationen anhand sämtlicher vorhandener Meßgrößen und dem Vergleich mit seinen Erfahrungswerten. Das

vorhandene System ist somit in der Lage, kontinuierlich Schätzwerte für die Meßgrößen zu liefern (s. Abbildung 5).

Die Wirkung des Hybrid-Modelles (s. Abbildung 3) kann auch zur Vorhersage bei der Festlegung verschiedener Zustände durch die vorgewählte spezifischen Wachstumsrate  $\mu$  dienen. Gleichzeitig werden Biomasse, Substratbedarf (umgerechnet anhand der Konzentration auf die Zufütmungsmenge als Steuergröße) und Ethanol zu jedem Zeitpunkt vorhergesagt.

In der Abbildung 6 wird ein Prozeßverlauf vom Modell anhand der eingestellten spezifischen Wachstumsrate  $\mu$  vorherberechnet.

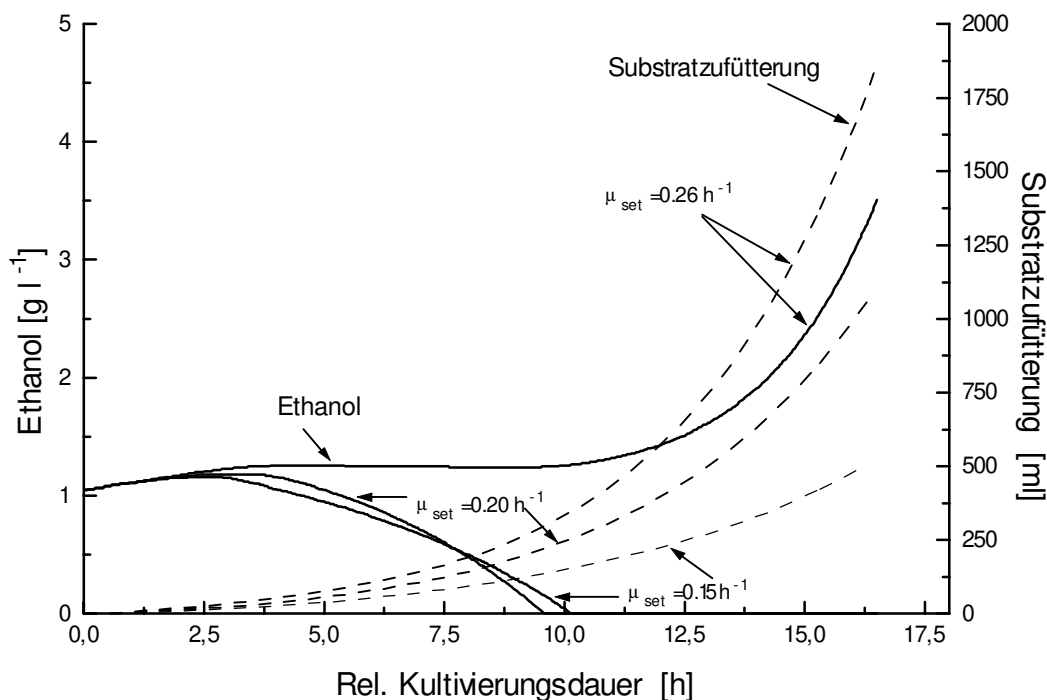


Abbildung 6: Einfluß verschiedener vorgewählter Wachstumsraten  $\mu$  auf die Ethanolkonzentration im Medium

Dargestellt ist die Gesamtmenge an zugefüttertem Substrat, und die Ethanolkonzentration im Reaktor für verschiedene Wachstumsraten. Die Ethanolkonzentration wird vom Hybridmodell mit Hilfe der Biomasse (ebenfalls vom Modell berechnet aus zahlreichen Parametern wie z.B. Gelöstsauerstoff, Sauerstoffeintrag, Abgas, usw.) und der Substratkonzentration im Medium bestimmt. So

können im Vorfeld eines Experimentes, je nach Zielsetzung, optimale Zufütterungsprofile abgeschätzt werden.

Die Zustandsschätzung einer Prozeßvariable muß im laufenden Betrieb zuverlässig unvorhersehbare Schwankungen aller Art erkennen. Dazu zählen ein zeitweiser Ausfall oder Störungen von Modelleingangswerten (z. B. Zustandsgrößen) oder auch natürliche Veränderungen der Konzentrationen von Medienbestandteilen. Zur Überprüfung der Qualität des verwendeten Prozeßmodelles kann neben einem Vergleich zu off-line Werten auch das Verhalten des Hybrid-Modelles auf erzwungene Schwankungen innerhalb einer Zustandsgröße herangezogen werden. Bei der gewählten Fed-Batch Prozeßführung ist die Zufütterung von Substrat eine der wesentlichen Komponenten. Durch sie wird der Prozeß innerhalb vorgegebener Ziele gesteuert (z.B. maximale Biomasse) und die Bildung von Nebenprodukten, sofern sie von der Substratkonzentration abhängen, beeinflußt. Die Handhabung eines Prozesses hängt sehr stark von der Einhaltung der Grenzen ab (Menge und Konzentration des Substrates), dabei ist die Menge des zur maximalen Ausbeute erforderlichen Substrates von dessen Rohstoffqualität und Zusammensetzung abhängig. Bei der behandelten Kultivierung von Hefen war das Substrat, wie bei vielen Bioprozessen, das Naturprodukt Glucose. Trotz genauer Einwaagen bei der Ansetzung von hochkonzentrierten Nährlösungen ist der Wasseranteil in der Glucose variabel und die Zusammensetzung ändert sich durch das erforderliche Sterilisieren mit schwankendem Flüssigkeitsverlust und Karamelisieren von geringen Mengen Substrat. Die genaue Glucosekonzentration in der Lösung ist mit einem Meßverfahren zu ermitteln, jedoch führen die erforderlichen Verdünnungen zu einer Varianz, innerhalb derer die genaue Konzentration liegt. Beim Einhalten von kleinen Substratkonzentrationen (z.B.  $< 0,2$  g/l), führen bereits geringste Abweichungen entweder zur Bildung von Nebenprodukten (Ethanolbildung bei Hefen, inhibierender Einfluß des Ethanol im Medium auf das Wachstum ab etwa 4 g/l [6], nicht optimale Ausbeute) oder zur Limitierung der Hauptsubstratquelle, verbunden mit nicht optimaler Ausnutzung der technischen Ressourcen (Reaktorbetriebszeit).

Um die durch das Hybridmodell berechnete Glucosekonzentration zu prüfen, wurde die Konzentration in der Nährlösung um 10 % in beide Richtungen geändert. Die verschiedenen Glucoselösungen wurden danach gleich behandelt (sterilisiert), um die beeinflussenden Faktoren identisch zu halten. Der Kultivierungsstart verlief mit der üblichen, dem Modell bekannten, mittleren Konzentration. Nach 8 h wurde auf die

Zufütterung höher konzentrierter, nach 12 h auf die geringer konzentrierte Nährlösung umgeschaltet und der Einfluß der Modellberechnung auf die Vorhersage der Glucosekonzentration im Reaktor, und als Folgegröße der Änderung der zugefütterten Substratmenge untersucht.

Trotz höherer bzw. niedrigerer Substratkonzentration im Medium bleibt die Vorhersage der Ethanolbildung und der geschätzten Biotrockenmasse realistisch wie der Vergleich mit den off-line Werten in Abbildung 7 zeigt. Die Veränderungen der Substratkonzentrationen im Zulauf wurde dem Hybridmodell nicht eingegeben (Modellparameter über die gesamte Prozeßdauer gleich), sondern das Modell sollte auf diesen äusseren Einfluß reagieren.

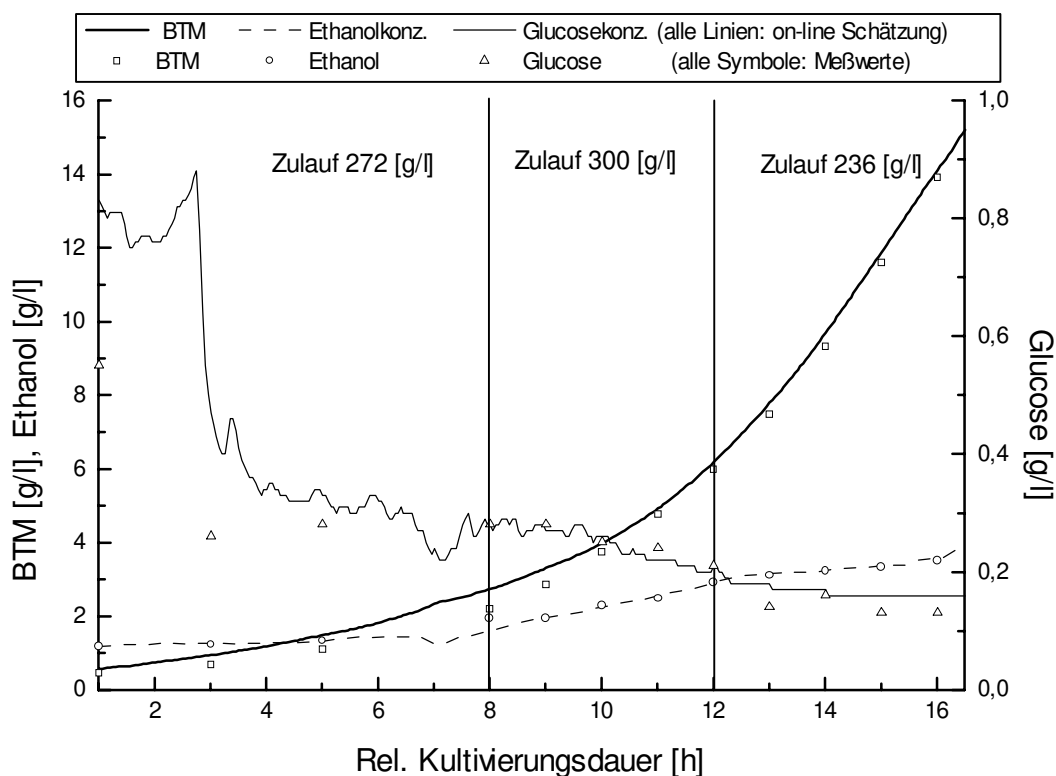


Abbildung 7: Einfluß der schwankenden Glucosekonzentration auf die Qualität der Modellberechnung

Die modellgestützte Zustandsschätzung bietet durch die Einbeziehung möglichst vieler unabhängiger Informationen eine große Genauigkeit sowie einen hohen Zuverlässigkeitsgrad bei der adäquaten Prozeßbeschreibung.

### 3.2.3.2. Zustandsregelung

Die modellgestützte Zustandsschätzung ist aus verschiedenen Gründen eine unabdingbare Voraussetzung für den Einsatz einer entsprechenden Regelung des Referenzprozesses. Dazu muß der Prozeßzustand und die Zusammenhänge seiner Zustandgrößen sehr genau bekannt sein, um durch eine Regelung den gewünschten Zustand zu erreichen oder zu halten. Dies war eine der Hauptaufgaben bei der Entwicklung des Referenzsystemes.

Bei der modellgestützten Regelung wird dem Hybridmodell, aufgrund seiner gesammelten Informationen und Erfahrungen früherer Kultivierungen, die Möglichkeit gegeben, den Prozeß bei Abweichungen zwischen, vom Modell geschätzten Werten und gemessenen Werten, über Korrekturterme so anzupassen, bis der gemessene dem gewünschten, vorgegebenen Zustand entspricht. Der Einbau von qualitativ erkannten Abhängigkeiten zwischen Prozeßzustand und dynamischer Reaktion des Prozesses auf Veränderungen kann zum Beispiel mit Fuzzy-Logik realisiert werden.

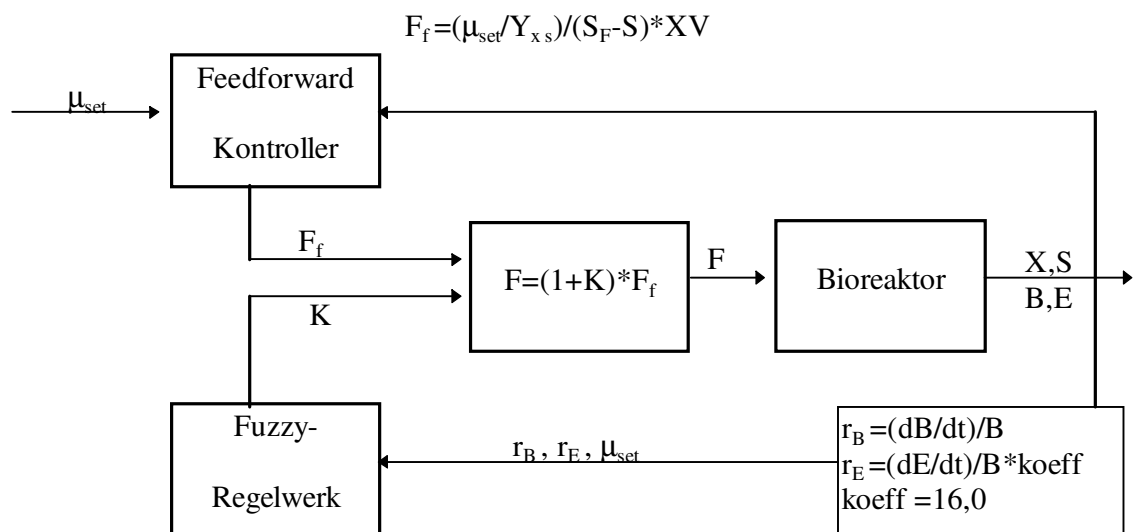


Abbildung 8: Einbau des Fuzzy-Expertensystemes in das Hybridmodell zur Prozeßregelung

Fuzzy-Logik in der Regelungstechnik kann sinnvoll dort eingesetzt werden wo die Beschreibung von Abhängigkeiten und Zusammenhängen mathematisch nicht eindeutig bekannt ist. Als Beispiel soll der Einbau heuristischem Wissens in das vorhandene Prozeßmodell gezeigt werden. Das Grundscheema zur gegliederten Beschreibung besitzt folgende Struktur:

Wenn                      Prämisse 1

(+ Prämisse 2, 3,...)

dann                   Schlußfolgerung

zu beschreiben [38]. Der Vorteil ist die Umsetzung von Expertenwissen über das Ein-/Ausgabeverhalten einer Regelgröße, für die kein mathematisches Modell vorhanden ist oder formuliert werden kann, zur besseren Kontrolle des Prozesses. Man beschreibt die Möglichkeit des Eintretens eines Ereignisses (z.B. starke Ethanolentwicklung) aufgrund einer Änderung einer zweiten Größe (z.B. Zufütterung großer Substratmengen) unter bestimmten Voraussetzungen (wenig Biomasse oder kleine Wachstumsrate). Durch Wiederholung dieses Ablaufes erhält man eine Zugehörigkeitsfunktion um einen Mittelwert und umgekehrt die anteilige Zugehörigkeit (0-1) eines Wertes zu einem Ereignis. Formal kann diese Funktion zum Beispiel durch eine Gauß-Funktion oder eine Dreiecksfunktion beschrieben werden. Können innerhalb einer Eingangsgröße verschiedene Bereiche abgegrenzt werden, so gruppieren sich mehrere Funktionen um die möglichen Werte in dem jeweiligen Bereich. Dabei können sich die Funktionen überlappen, müssen es aber nicht unbedingt.

Im Falle des eingesetzten Fuzzy-Expertensystemes wurden drei Eingangsgrößen (spezif. Baseverbrauch  $r_B$ , spezif. Ethanolbildung/-verbrauch  $r_E$ , Sollwert der Wachstumsrate  $\mu_{set}$ ) in dieser Form von Zugehörigkeitsfunktionen beschrieben. Für eine Variable sei in Abbildung 9 die Anordnung und das Aussehen der vier verschiedenen Bereiche (klein, wenig, mittel, groß) dargestellt.

Bei einem spezifischen Baseverbrauch  $r_B$  von 1,5 besitzt dieser Wert einen Zugehörigkeitsgrad von 0,1 zum Ereignis „klein“ und von 0,75 zum Ereignis „wenig“, d.h. durch das Fuzzy-Expertensystem kann eine „unscharfe“ Zuordnung des Wertes zu mehreren Teilbereichen getroffen werden. Dieser drückt die Möglichkeit der Zugehörigkeit zu einem der möglichen Bereiche aus. Die Addition der Zugehörigkeitsgrade kann von Eins verschiedene Zahlen ergeben, die für jede Berechnung normiert werden müssen.



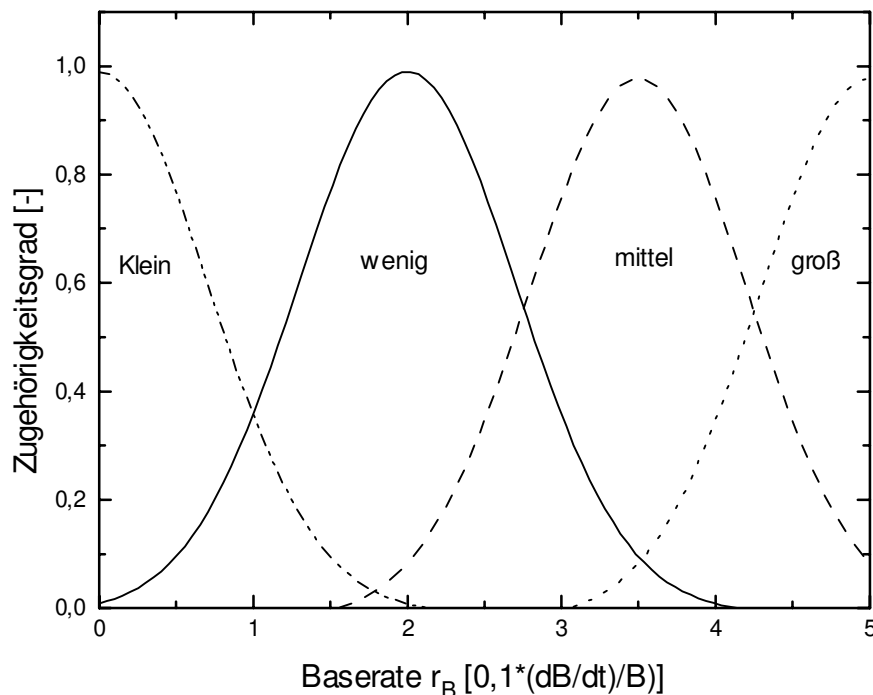


Abbildung 9: Zugehörigkeitsfunktionen des Fuzzy-Expertensystems für die Eingangsgröße Baseverbrauch

Als Ausgangsgröße des Regelwerkes wurde der Korrekturterm  $K$  (Verschiebung des Zeitpunktes der Zufütterung: negativ, null, positiv) gewählt, da so eine Feedback-Überprüfung der vom Modell berechneten Feedforward-Zufütterungszeitpunkte realisiert werden konnte. Eine positive Verschiebung bedeutet dabei die Verkürzung der Zufütterungsschritte, eine negative eine entsprechende Verlängerung. Formuliert wurde diese Ausgabevariable auch im Sinne der Fuzzy-Logik mit entsprechenden Zugehörigkeitsgraden, so daß eine abgestufte Einflußnahme möglich ist. Das gesamte Regelwerk umfaßt 64 linguistische Regeln, die entsprechend der allgemeinen Form formuliert sind, z. B.:

Wenn

	Baseverbrauch	klein	ist,
und	Ethanolbildung/-verbrauch	klein	ist,
und	Wachstumsrate (voreingestellt)	klein	ist,

dann

Korrektur $K$	positiv.
---------------	----------

Die Einflußnahme besteht in diesem Beispiel in der positiven Verschiebung des Substratzufütterungszeitpunktes (Verkürzung der Schritte), nach dem realem Verhältnis

im Medium. Diese beeinflusst andere Prozeßgrößen wie z.B. die weitere Bildung von Ethanol und die maximal erreichbare Biomasse. Eine Übersicht über alle verwendeten Regeln findet sich in Kap. 6.4.

Als weitere Regler können klassische PID-Regler mit verschiedenen Einstellungen eingesetzt werden [51]. Diese sind einfach zu installieren und regeln den Prozeß anhand eines vorgegebenen Profils für die betreffende Variable, zum Beispiel Ethanol. Bei Abweichungen zwischen der gemessenen und der festgelegten Konzentration, verändert der Regler die Zufütterungsrate als Steuergröße. Die geringere Substratkonzentration im Medium führt neben einer geringeren Ethanolbildung aber auch zu kleineren Wachstumsraten und damit über die Prozeßdauer zu einem kontraproduktiven Effekt. Denn die verringerte Biomassebildung führt wiederum zu einem schwächeren Ethanolabbau und der Regler wird über die restliche Kultivierungszeit diese Entwicklung vorantreiben [38].

Der Prozeß kann durch eine sich stark ändernde Dynamik, während der Laufzeit einer Kultivierung gekennzeichnet sein. Dies hat zur Folge, daß die Einstellungen des klassischen PID-Reglers nicht zu jedem Zeitpunkt gültig oder optimal für das gewünschte Ziel sind. Als mögliche Alternativen können entweder modellgestützte Regler, auf der Basis eines künstlichen neuronalen Netzes oder adaptive PID-Regler als Zwischenstufe des Aufwands zur Verbesserung eingesetzt werden.

Eine Anwendung eines adaptiven Reglers für die Zufütterungssteuerung eines Prozesses wurde im Referenzsystem bei einer Kultivierung mit *Escherichia coli* realisiert. Die Adaption des Reglers orientierte sich an einer Zustandsgröße (Sauerstofftransferrate), die aus dem on-line meßbaren Sauerstoffgehalt der Abluft in Verbindung mit dem Sauerstoffeintrag über die Reaktorbegasung berechnet wurde. Ein mathematisches Gleichungssystem beschreibt die Abhängigkeiten zwischen Regelgröße und rückgekoppelter Zustandsgröße [22].

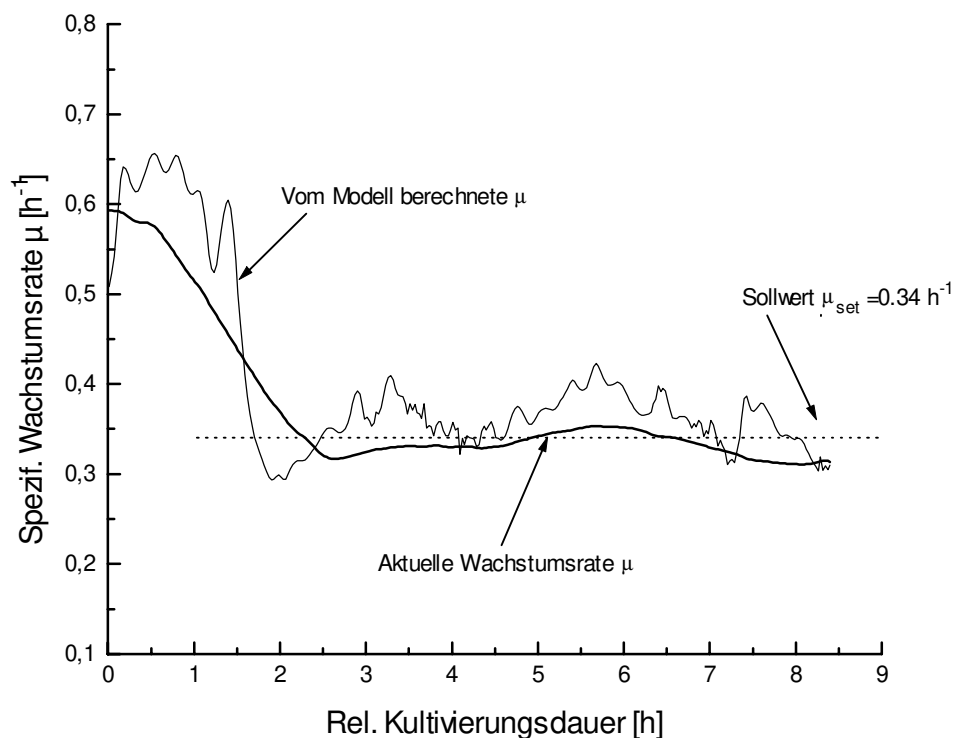


Abbildung 10: Ergebnis eines typischen Experimentes bei dem die Wachstumsrate mit Hilfe eines adaptiven PID-Reglers auf einen konstanten Wert  $\mu=0,34 \text{ h}^{-1}$  gebracht wird. Gegenüberstellung der on-line vom Hybridmodell geschätzten und aus den Biomasse-Meßdaten später ermittelten aktuellen spezifischen Wachstumsrate

Der adaptive Regler wurde erst nach der Anfangsphase, etwa nach einer Stunde, aktiviert. Nach etwa einer weiteren Stunde ist der gewünschte Wachstumsraten-Sollwert  $\mu_{\text{set}}$  erreicht und wird ab diesem Zeitpunkt gehalten. Zur späteren Bestimmung der Wachstumsrate aus den Daten der Biotrockenmasse wurden Proben im Abstand von 30 Minuten genommen. Die ermittelten Rohdaten wurden mit Hilfe von Spline-Funktionen geglättet und daraus die spezifische Wachstumsrate errechnet.

Die Entwicklung der Sauerstoffverbrauchsrate sowie die vom adaptiven Regler eingestellte Zufütterung für diese Kultivierung zeigt die Abbildung 11:

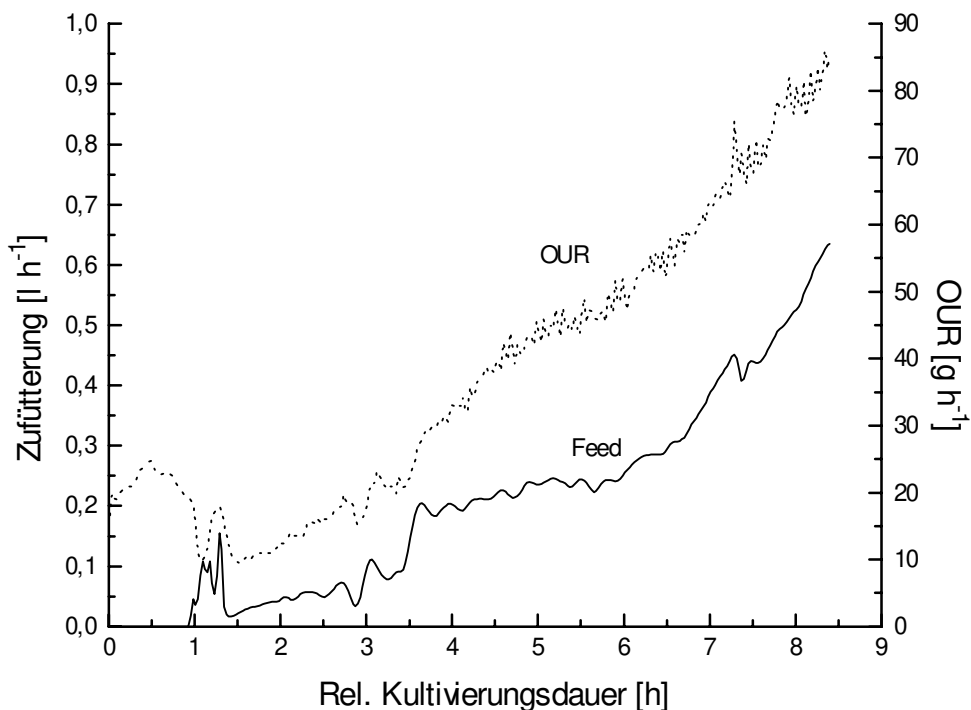


Abbildung 11: Typischer Verlauf der Sauerstoffverbrauchsrate und der Zufütterung bei der Verwendung des adaptiven PID-Reglers für die Zufütterung. Die Daten entstammen der Kultivierung in der Abbildung 10

Können einfache oder adaptive PID-Regler nicht den Prozeß innerhalb der gewünschten Zustände halten oder sind die Abhängigkeiten nicht eindeutig beschreibbar, so können auch modellgestützte Regler auf der Basis neuronaler Netze eingesetzt werden. Das Prinzip dieser Regler beruht auf der Internal-Model-Technik [29] und die Vorbereitung des Reglers für die Prozeßsteuerung findet sich bei [40]. Innerhalb des Referenzsystemes wurde diese Regler-Form getestet, aber nicht eingesetzt, da zum einen der höhere Aufwand ein Kriterium war und zum anderen Stabilitätsprobleme des Netzes einen zuverlässigen Betrieb nicht gewährleisteten. Zukünftige Entwicklungen auf diesem Gebiet können zu einer weiteren Alternative der Prozeßregelung führen.

### 3.3. Vorgehensweise bei der Einstellung von Testbedingungen

#### 3.3.1. Einstellung vorgegebener Prozeßzustände

Die Einstellung vorgegebener Prozeßzustände ist für eine Unterscheidung von genauem Meßwert und äusseren Einflüssen (Rauschen, Drift) immens wichtig. Dies erfordert eine

Prozeßregelung, die in der Lage ist, gewünschte Zustände sicher zu erreichen und dann über längere Zeiträume zu halten, so daß ein vorgegebenes Meßgerät sicher bei konstantem Wert der betrachteten Variable getestet werden kann.

Für den Prozeßzustand einer hohen Wachstumsrate wird gezeigt, daß die modellgestützte Regelung des Prozesses die voreingestellte Wachstumsrate zuverlässig erreicht.

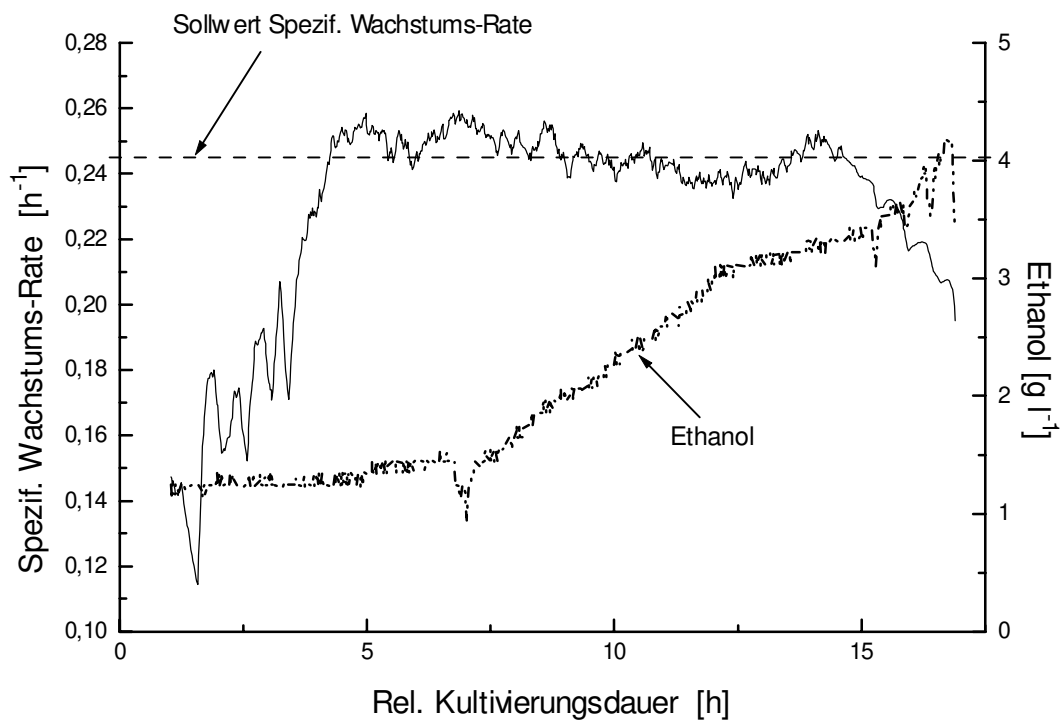


Abbildung 12: Prozeßverlauf bei voreingestellter hoher Wachstumsrate  $\mu$

In Abbildung 12 ist für den Sollwert einer großen Wachstumsrate ( $\mu = 0,245$ ) gezeigt, daß nach der lag-Phase des Prozesses ( $\approx 3,5$  h) die Wachstumsrate im gewählten Bereich verläuft und kontrolliert wird. Die einsetzende Ethanolentwicklung ist typisch für solche Prozesse und erst am Ende der Kultivierung (15 h) finden sich Einflüsse der hohen Zelldichte in Form lokaler Sauerstoff- und Substratlimitierungen wieder.

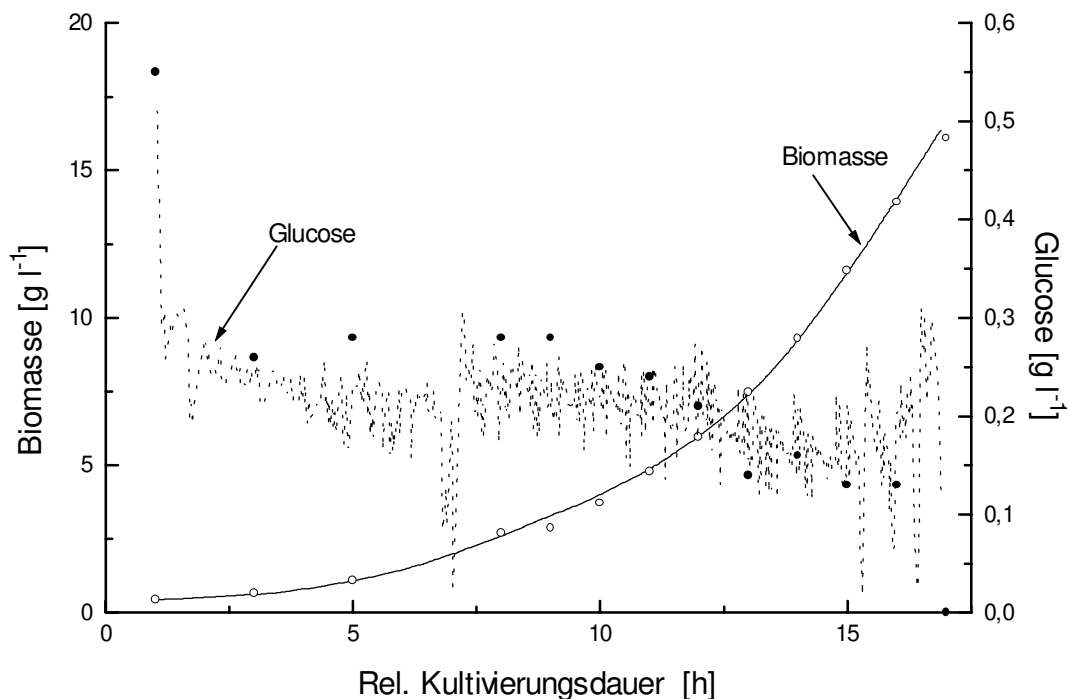


Abbildung 13: Vergleich gemessener (Symbole) mit vom Modell berechneten Werten bei voreingestellter hoher Wachstumsrate  $\mu$

Abbildung 13 zeigt die Funktion des eingesetzten Prozeßmodelles, indem die jeweils vom Hybridmodell berechneten Werte für die Substrat- und Biomassekonzentration im Medium als Liniengraph und die Symbole der zugehörigen off-line Analysewerte gegenübergestellt werden. Der Verlauf der Substratkonzentration im Medium kann durch die Einzelmeßwerte (s. Kap. 3.3.2.) nur grob gerastert wiedergegeben werden. Die Zustandschätzung durch das Hybridmodell im Vergleich ermöglicht eine Aussage über den momentanen Verlauf der Substratkonzentration und kann somit als wichtige Größe für die Steuerung der Zufütterung dienen. Die on-line Berechnung führt zu einer frühzeitigen Störungserkennung und damit zu Korrekturmöglichkeiten, die als Ziel die Minimierung der Abweichung haben. Daneben spiegelt sich im Signalverlauf die Schwäche der Pumpensteuerung wider, die die Vorgabewerte in Ansprech- und Totzeiten der Steuerung aufteilt. Dadurch wird zwar über das Mittel die gewünschte Substratmenge zugefüttert, aber nicht abgestuft kontinuierlich wie es für den gleichmäßigen Konzentrationsverlauf innerhalb kürzester Zeitspannen erforderlich wäre. Für den Vergleich der Biomassekonzentrationen muß erwähnt werden, daß die off-line Meßwerte nur verzögert (in der Regel nach dem Ende der Kultivierung) vorliegen und so zur Prozeßlaufzeit keine Informationen über den Verlauf vorliegt. Die

Zustandsschätzung der Biomassekonzentration kann so zusätzliche Informationen für eine Zufütterungssteuerung geben.

Über die gesamte Kultivierungsdauer ergibt sich die Möglichkeit einer gezielten Kontrolle und Regelung des Prozesses, so daß selbst bei etwaigen kurzfristigen Abweichungen sich über die gesamte Kultivierungsdauer nur geringe Abweichungen bezüglich der gesetzten Ziele ergeben.

Der interessierende Prozeßzustand kann für jedes Meßgerät und jede Untersuchung unterschiedlich sein, so daß auch die Realisierung anderer Bereiche von nicht minderer Bedeutung ist. Als zweites Beispiel sei deshalb die Realisierung des anderen Extrembereiches, einer kleinen voreingestellten Wachstumsrate  $\mu$  gezeigt:

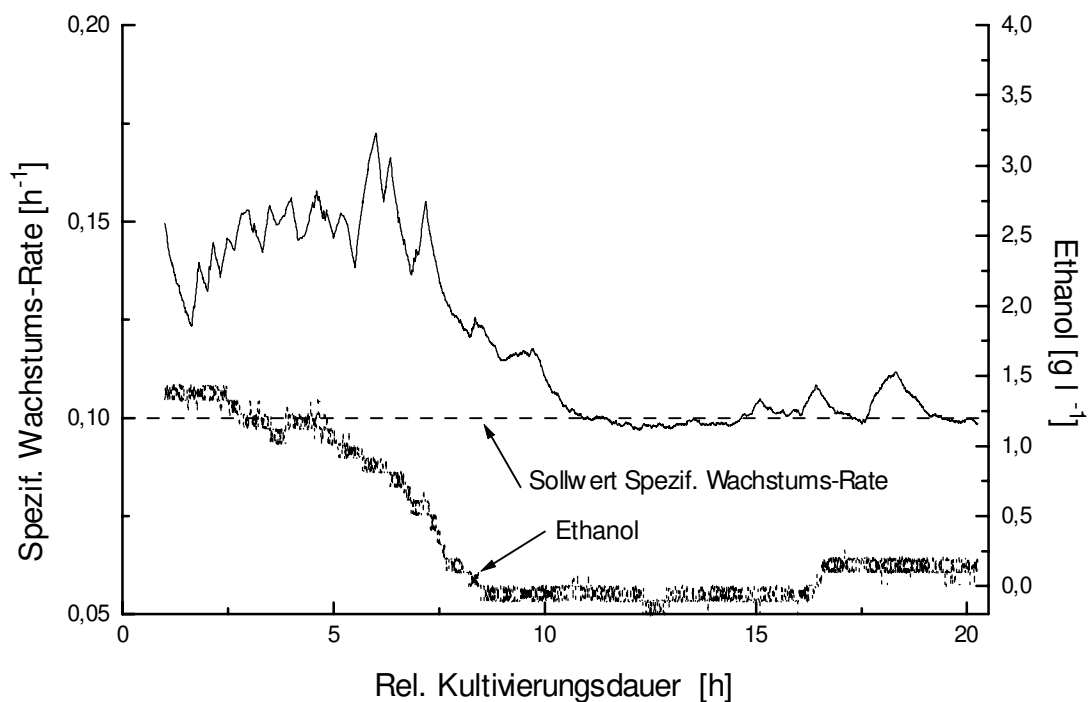


Abbildung 14: Prozeßverlauf bei voreingestellter niedriger Wachstumsrate  $\mu$

Für voreingestellte kleine Wachstumsraten ( $\mu = 0,10$ ) dauert das Erreichen des Sollwertes etwas länger ( $\approx 7,5$  h), jedoch kann dieser Zustand über den betrachteten Zeitraum hinaus gewährleistet werden, da Limitierungseffekte keine Rolle spielen. Der dargestellte Ethanolverbrauch bei geringen Substratkonzentrationen im Medium ist aus der Literatur erwartet worden. Interessant ist dagegen, daß die geringe Wachstumsrate erst bei sehr kleinen Ethanolkonzentrationen ( $< 0,1$  g/l) erreicht werden kann. Hieraus

läßt sich schließen, daß bei meßbarer Anwesenheit des Zweitsubstrates Ethanol, neben geringen Mengen Glucose (0,1 g/l), eine, dem Erhaltungsstoffwechsel nahe kommende Wachstumsrate nicht realisierbar ist.

Problematisch für die Einstellung dieses Prozeßzustandes war die Kontrolle zur Aufrechterhaltung sehr geringer Mengen Glucose (< 0,1 g/l), die bei vielen Analysatoren durch die Fehlerbreite nur ungenau zu ermitteln sind. Hier wird nochmals die Qualität des Hybridmodelles für die Regelung und Kontrolle in Grenzbereichen deutlich, da aufgrund weiterer Prozeßdaten, wie z. B. Gelöstsauerstoff oder Abgaszusammensetzung, eine Entscheidung über eine Substratlimitierung einfacher zu treffen ist. Zumal Erfahrungen aus früheren Kultivierungszuständen über Vergleiche in die Berechnung und Bewertung von Grenzsituationen einfließen (s. Abbildung 32).

Die geordnete Überführung einer Kultivierung von einem Prozeßzustand in einen anderen, zum Beispiel in Form variiertes Wachstumsraten, ist realisierbar. Dies ist häufig bei der Produktexpression gentechnisch veränderter Mikroorganismen von Bedeutung, da mit der Induktion der intrazelluläre Metabolismus umgestellt wird und sich in einer veränderten Wachstumsrate dokumentiert.

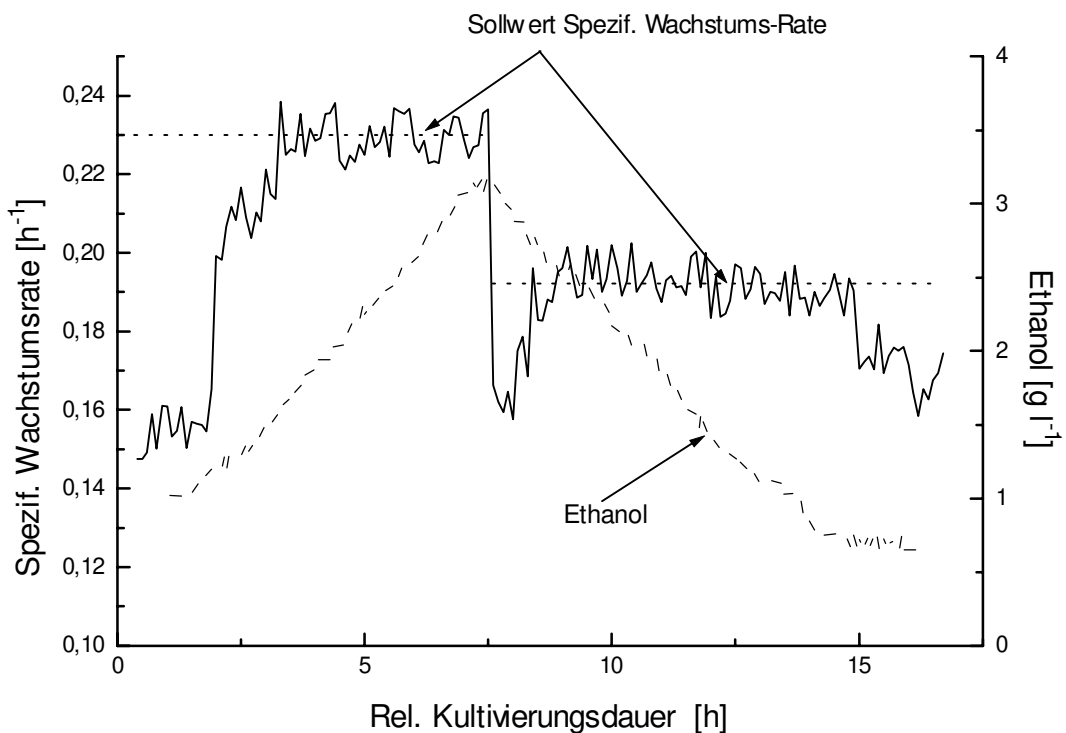


Abbildung 15: Prozeßverlauf bei voreingestelltem Wechsel von hoher zu niedriger Wachstumsrate  $\mu$  nach 7,5 h



Zu Beginn wurde eine hohe Wachstumsrate ( $\mu = 0,23$ ) vorgegeben und dieser Zustand nach der lag-Phase ( $\approx 2,5$  h) für etwa 5 h aufrechterhalten. Nach 7,5 h wurde auf eine kleinere Wachstumsrate ( $\mu = 0,19$ ) umgestellt. Nach einer Adaptionsphase an die geänderten Bedingungen ( $< 1$  h) konnte der Prozeß unter der neuen voreingestellten Wachstumsrate weitergeführt werden. Der Verlauf der Ethanolkonzentration entspricht dabei dem erwarteten aus den vorangehenden Beispielen von hoher und niedriger Wachstumsrate. Der Wechsel muß sich in der Substratkonzentration im Medium wiederfinden. Deutlich wirkt sich das Umschalten auf die durchschnittliche Konzentration aus, von etwa 1,1 g/l auf 0,1 g/l. Die geringe Wachstumsrate läßt sich nur schwer in einer leicht verringerten Zunahmegeschwindigkeit der Biomassekonzentration erkennen, ist aber gleichwohl vorhanden (s. Abbildung 5).

### **3.3.2. Gezielte Veränderungen der Prozeßzustände**

Zum Testen von Meßgeräten ist es notwendig, neben dem statischen Verhalten (Langzeitstabilität des Meßwertes) auch das dynamische Verhalten für die vollständige Meßgerätecharakteristik zu erfassen und zu bewerten.

Das Referenzsystem ist für diese Aufgabe so konzipiert, daß zum Beispiel Variationen der Substratkonzentration gezielt realisierbar sind, um das dynamische Verhalten des Testmeßgerätes zu verfolgen. Bei der Untersuchung der Dynamik von Meßgeräten kann dies zum Beispiel die Frage sein, wie schnell ein Meßgerät Veränderungen im System verfolgen kann. Zur Beurteilung eines Geräts muß die Geschwindigkeit der Systemveränderung genau bekannt sein, um die verschiedenen Einflüsse trennen zu können.

Am Beispiel einer Hefekultivierung sollen die Auswirkungen der Konzentrationsänderungen des Substrates Glucose untersucht werden. Es handelt sich um die diskrete Zufütterung von Glucose bei einem Fed-Batch Prozeß wobei die Glucosekonzentration mit der Zustandsschätzung bestimmt wird. Unterschreitet die geschätzte Glucosekonzentration einen Schwellwert (hier: 0,2 g/l) im Medium, so wird eine konstante vorgegebene Menge  $\Delta S$  (hier: 50 ml) an Glucoselösung mit der Konzentration 270 g/l zugefüttert. Da sich die Biomassekonzentration  $X$  mit der Zeit ständig erhöht, wird die zugeführte Menge an Substrat immer schneller verbraucht. Infolgedessen erhält man eine Kurve der integral zugefütterten Substratmenge wie in Abbildung 16

dargestellt. Dabei wird neben der insgesamt zugeführten Substratmenge als Funktion der Zeit, die mit dem Modell geschätzte Biomasse aufgetragen. Die zugegebene Substratmenge ergibt sich aus der Pumpdauer mit einer, vor jeder Kultivierung durchgeführten Kalibration der Pumprate. Jeder Anstieg in der Abbildung 16 entspricht einer Zugabe von 60 ml Glucose.

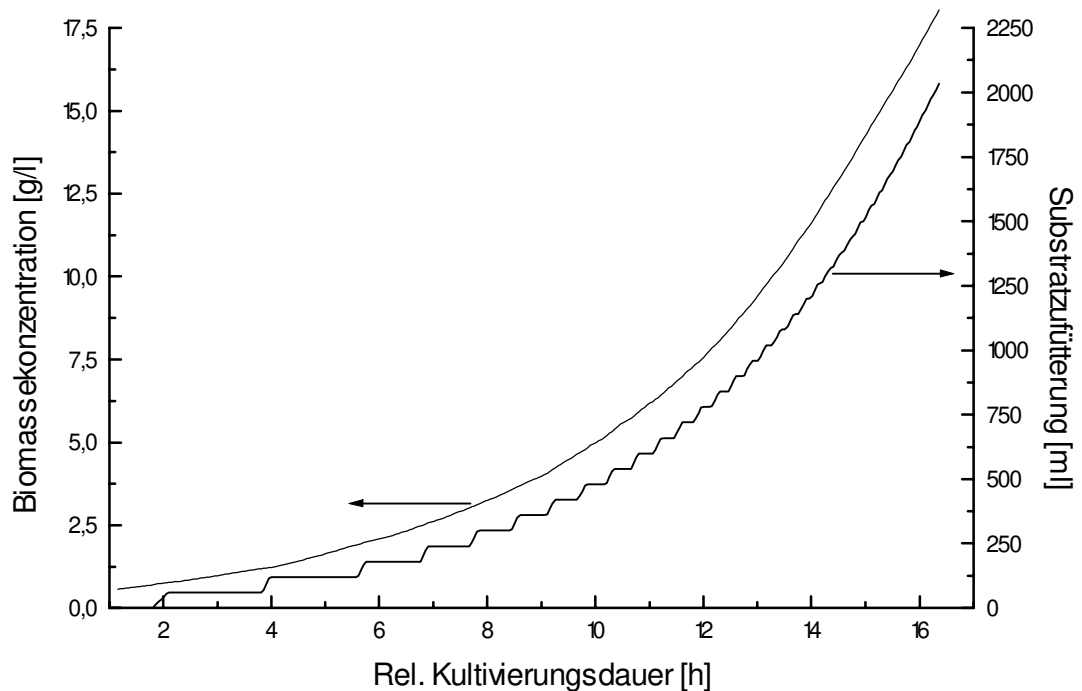


Abbildung 16: Profil der Zufütterung mit 60 ml Substratpulsen im Verlauf einer Kultivierung

Die Glucosekonzentration im Medium unterliegt aufgrund der diskreten Substratzugabe starken Veränderungen für die einzelnen Zellen [28]. Über den Reaktor gesehen, ergibt sich ein zeitliches Glucosekonzentrationsprofil mit einer Sägezahnstruktur, bei der die Perioden immer kürzer werden. Um die Schwankungsbreite zu erfassen wurde die Glucosekonzentration off-line gemessen. Dazu erfolgte eine Probenahme (10 ml) mit einem dem Verbrauch angepassten Zeitraster, und sofortiger Analyse in einem, auf enzymatischer Basis arbeitendem Glucoseanalysator (YSI, Modell 27).

Einen typischen Verlauf der Substratkonzentration im Medium zeigt Abbildung 17:

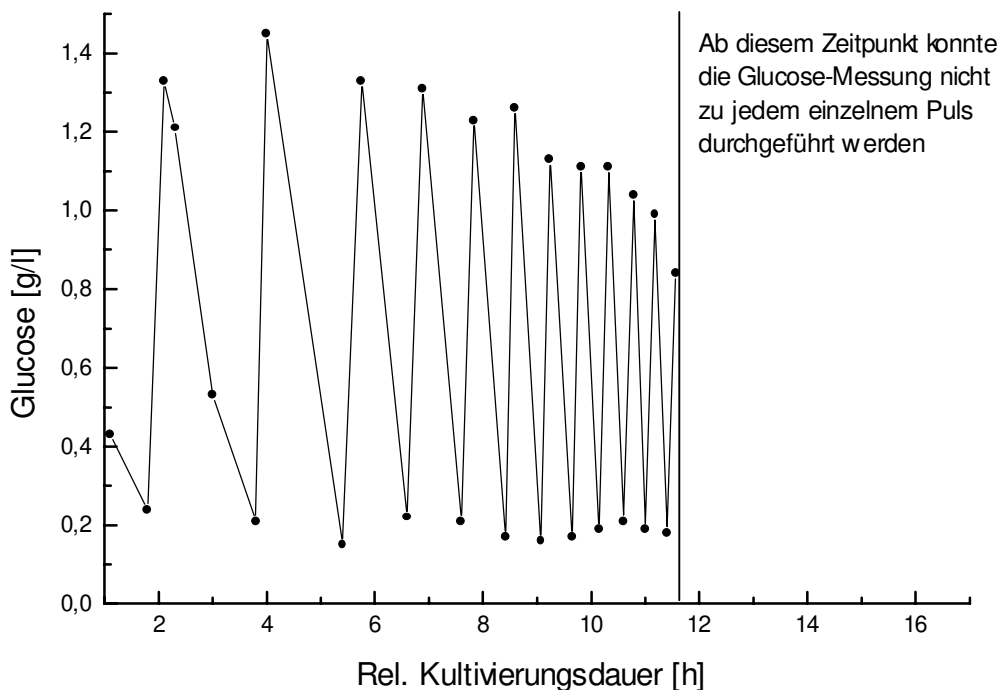


Abbildung 17: Off-line Analytik (Symbole, YSI Modell 27) einer Kultivierung mit pulsartiger Substratzugabe; Verbindungslinie zeigt erwarteten Verlauf der Glucosekonzentration zur Verdeutlichung

Der Abfall der Maximalwerte der Glucosekonzentration über die Dauer der Kultivierung rührt von einer Volumenzunahme innerhalb des Reaktors her, da sich die diskrete Substratmengenzugabe und die erforderliche Probennahme für die Analytik sich nicht zu jedem Zeitpunkt der Kultivierung neutral verhalten. Nach etwa 11,5 h ist bei dieser Kultivierung keine genügend genaue off-line Messung mehr möglich. Um auch schnellere Glucosekonzentrationsänderungen verfolgen zu können, sind andere Meßmethoden erforderlich. Dazu dient die Ergänzung der meßtechnischen Möglichkeiten mit modellgestützten Verfahren, die im eingesetzten Prozeßmodell integriert sind.

Solche indirekten Verfahren basieren aber in jedem Fall auf Messungen. Man braucht Meßgrößen, deren Werte mit der Glucosekonzentration in einem eindeutigen Zusammenhang stehen und die mit einer hohen Zeitauflösung zu messen sind.

Eine mögliche Variable dafür wäre die Kohlendioxidkonzentration im Abgas. Diese wird üblicherweise mit Infrarot (IR)-Techniken gemessen. Daneben findet man in der Literatur auch Messungen mit Gaschromatographen (GC).

Im Referenzsystem wurde zum Test in der drucklosen Abluftleitung des Reaktors zum einen ein Dräger IR CO<sub>2</sub> im Durchflußmeßbetrieb und zum anderen ein Gaschromatograph Shimadzu mit automatischem Magneteinlaßventil und angeschlossener Auswerteeinheit, ebenfalls Shimadzu, installiert.

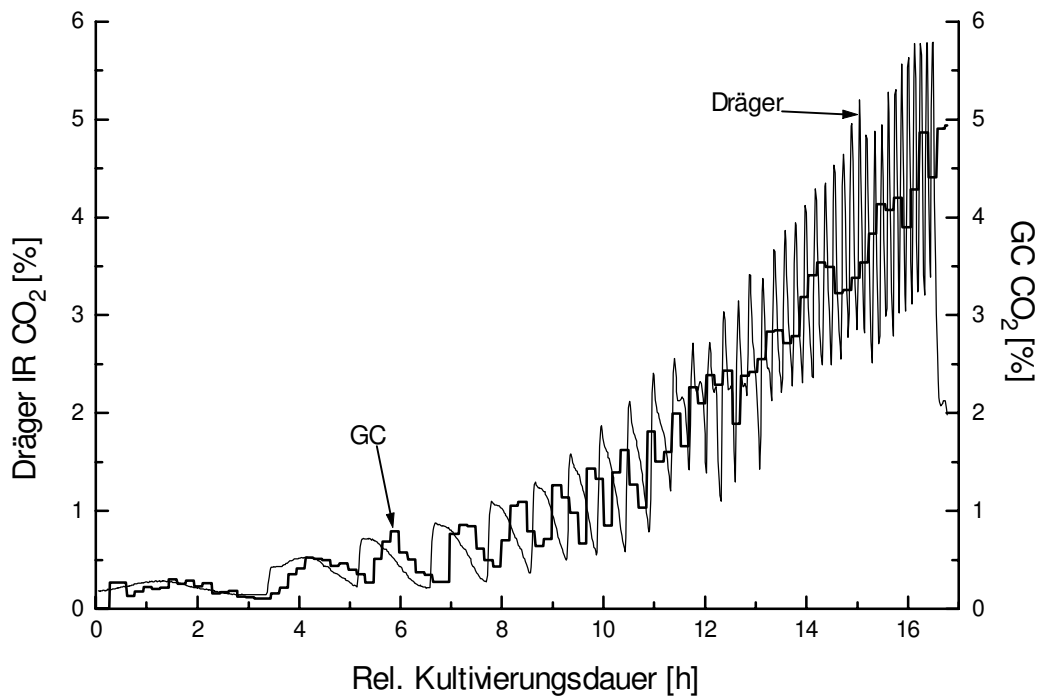


Abbildung 18: Vergleich zeitlicher Auflösung der Abgassignale von GC und Dräger IR CO<sub>2</sub> im Verlaufe einer Kultivierung

Die Abbildung 18 zeigt die Unterschiede der beiden Meßverfahren (Gaschromatographie und optisches Infrarotmeßprinzip) zueinander. Jeder GC-Meßwert ist durch eine Stufe im dargestellten GC-Signal charakterisiert, der nicht verändert wird, bis ein aktuellerer Wert vorliegt. Die Messung mit dem gaschromatographischen Verfahren beinhaltet bereits zu Beginn der Kultivierung eine Phasenverschiebung gegenüber der schnelleren IR-Meßmethode. Das GC-Signal folgt wie die manuelle Glucose-Messung dem Verlauf über etwa dieselbe Zeitdauer, die Werte beider Meßverfahren bei höheren Frequenzen stimmen nur ungefähr überein und das verschafft keinen weiteren Vorteil für die indirekte Bestimmung der Glucosekonzentration. Die einzige Verwendung des GC's liegt in der Verwendung als statische Eichmöglichkeit für das IR-Meßgerät.

Das Dräger-Meßgerät mißt die Kohlendioxidkonzentrationen im durchfließenden Abgasstrom on-line auf optischer Basis (Infrarot) und kann die höherfrequenten

Reaktionen gegen Ende des Prozesses noch abbilden. Bei der genaueren Betrachtung des IR-Signals bei einer höheren zeitlichen Auflösung der Meßwerte zeigt sich in einem bestimmten Bereich der Kultivierung eine veränderte Struktur. Zur Klärung der Frage ob diese Anomalie Prozeß- oder Meßgerätebedingt ist, wird in Abbildung 19 ein Bereich mit ausgeprägtem Kurvenverlauf herausgegriffen:

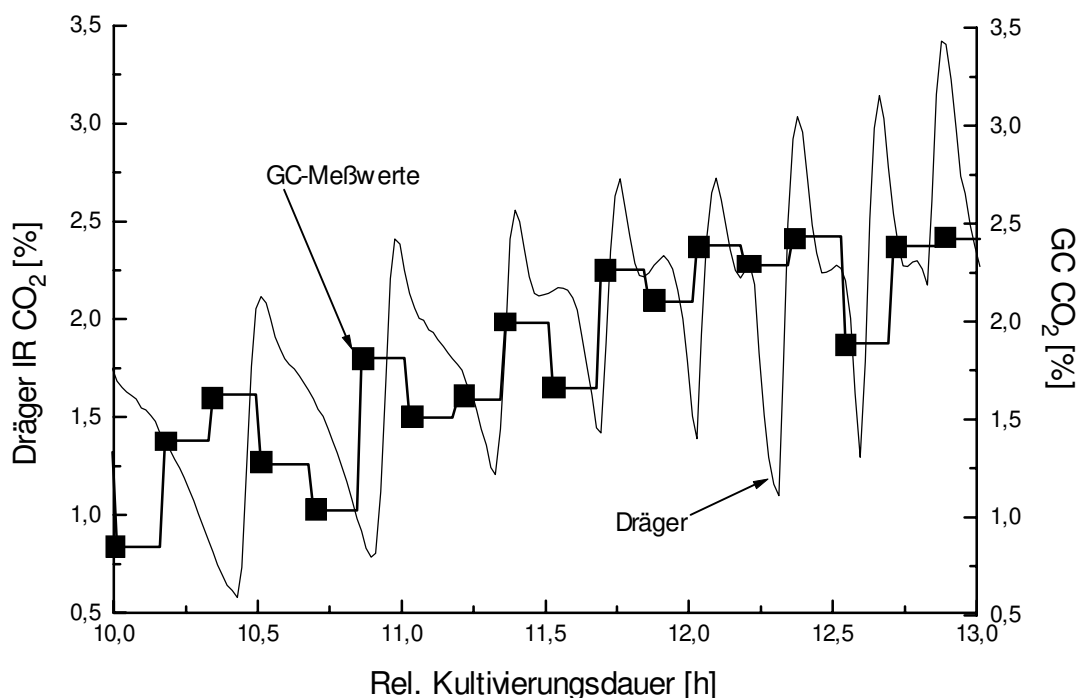


Abbildung 19: Qualitätsvergleich der Abgassignale von GC und Dräger IR CO<sub>2</sub> innerhalb eines kurzen Zeitausschnittes

Abbildung 19 zeigt die Veränderung der Kohlendioxidkonzentration im Abgas deutlich. Während der ersten 10 h und nach 13 h Kultivierungsdauer setzen sich die Verläufe aus einem Anstieg und einem nachfolgenden Abfall zusammen. In dem zeitlich dazwischenliegenden Bereich wird der Abfall durch eine mehr oder weniger ausgeprägte Schulter (Verzögerung des Abfalls und teilweise sogar erneuter Anstieg) unterbrochen. Zur Beurteilung worauf dieser Effekt zurückzuführen ist, wurde das Signal mit anderen unabhängigen Meßgrößen verglichen. Dazu kam als weitere on-line Meßgröße der Gelöstsauerstoff in Frage, da diese Größe den Vorteil bietet, direkt im Zellmedium zu messen und mögliche Verfälschungen durch den ausgleichenden Effekt des Reaktorkopfraumes einerseits und dem Einfluß der Abluftführung andererseits auszuschliessen.

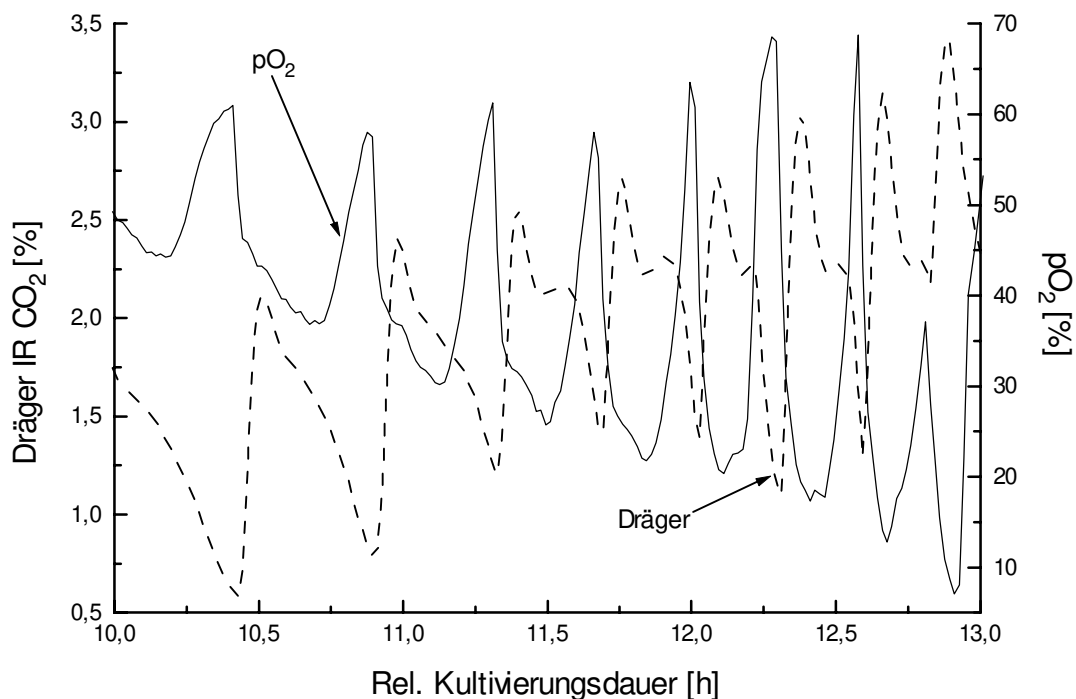


Abbildung 20: Vergleich der Kohlendioxidkonzentration im Abgas mit der Gelöstsauerstoffkonzentration im Medium

Die Abbildung 20 bestätigt den im Abgas gemessenen Verlauf der Kohlendioxidkonzentration. Beim Beginn des Substratpulses benötigen die Zellen grössere Mengen an Sauerstoff (Gelöstsauerstoffkonzentration sinkt) und parallel steigt die Kohlendioxidproduktion durch den verstärkt einsetzenden Metabolismus an. Mit dem Erreichen der maximalen Kohlendioxidkonzentration verändert sich der Sauerstoffbedarf der Zellen, und die Gelöstsauerstoffkonzentration sinkt mit anderer Geschwindigkeit weiter. Das Minimum der Konzentration des Gelöstsauerstoffes fällt mit einer veränderten Steigung der Kohlendioxidkonzentration zusammen (s. Verlauf bei 11,5 h und 12 h). Eine sich verringernde Kohlendioxidproduktion aufgrund der Substratlimitierung macht sich erst im Signalverlauf bemerkbar, nachdem der Gelöstsauerstoff über einen längeren Zeitraum (4-6 Minuten) ansteigt. Da sich beide Konzentrationsverläufe zu Beginn eines Substratpulses zeitlich unmittelbar reziprok verhalten, muß bei der beginnenden Limitierung ein metabolischer Einfluß die unmittelbare Reaktion der Kohlendioxidkonzentration hinauszögern. Diese Unterschiede zeigen sich wiederholbar in einem schmalen Zeitabschnitt unter bestimmten Bedingungen einer Kultivierung, aber da dieser Effekt von unterschiedlichen Systemen erfaßt wird, ist von keiner Meßgerätee anomalie auszugehen. Eine mögliche Erklärung für diesen

metabolisch variierenden Sauerstoffbedarf der Zellen wird in Kapitel 4.2. in Zusammenhang mit weiteren Sensorsignalen gegeben. Dort findet sich ebenfalls eine Betrachtung warum nicht zu jedem Zeitpunkt der Kultivierung dieser Signalverlauf in der Kohlendioxidkonzentration im Abgas sowie anderen Sensoren zu beobachten ist.

Das Problem einer vergleichenden Beurteilung durch die modellgestützte Messung, setzt immer ein Meßverfahren voraus, das die erforderlichen relevanten Meßdaten aus dem Prozeß quasi verzögerungsfrei gewinnt und auch schnell genug verarbeiten kann. Für dynamische Prozesse gibt es die Möglichkeit, strukturierte Modelle einzusetzen, die auf der Messung zahlreicher intra- und extrazellulärer Größen (RNA, Enzyme, ATP, stöchiometrische Zellzusammensetzung, usw.) basieren, die für eine dynamische Prozeßführung mit entsprechenden metabolischen Anpassungen der Hefen nicht mit ausreichender Genauigkeit zu messen sind [24].

Für die Analyse der Zustände des Referenzsystemes wurde als die Gelöstsauerstoffmessung mittels Elektrode im Reaktormedium ausgewählt. Zur Bestätigung der Richtigkeit dieser getroffenen Wahl wurde die Sauerstoffelektrode mit einem faseroptischen Meßverfahren zur Bestimmung der gleichen Veränderung im Medium herangezogen (s. Kap. 4.1.2.2.). Die amperometrische Sauerstoffmessung gestattet eine Zustandsschätzung mit einem Zeitinkrement von 2 s, was zur dynamischen Messung der betrachteten biologischen Vorgänge in Kultivierungen ausreicht. Folglich kann man Abstraten bei Meßgeräten im Sekundenbereich untersuchen. Bei etwaigen Untersuchungen in kleineren Zeitinkrementen erlaubt das faseroptische Verfahren Abstraten bis zum Kilohertz-Bereich. Dies dürfte jedoch aufgrund des hohen Kostenaufwandes für die meisten Untersuchungen unwirtschaftlich sein, um es als Referenzmeßverfahren zu implementieren.

### **3.3.3. Erweiterung des Arbeitsbereiches**

#### **3.3.3.1. Zielstellung**

Die Leistungsfähigkeit der Fermenter ist normalerweise durch ihre Sauerstoffeintrags- und ihre Wärmeabfuhrkapazität begrenzt. Um mit dem Referenzsystem einen möglichst großen Bereich bezüglich der Sauerstofftransferrate (OTR) abdecken zu können, wurde die Leistungsfähigkeit des Reaktors bezüglich des Stoffübergangs erhöht.

Üblicherweise werden Laborfermenter (mit 10 L Arbeitsvolumen) mit drei Scheibenrührerelementen, die auf einer gemeinsamen Welle angebracht sind, ausgerüstet. Bei höheren Lufteintragsraten neigen Scheibenrührer dazu geflutet zu werden, d.h. sie sind nicht mehr in der Lage das zugeführte Gas hinreichend gut zu dispergieren.

Die Sauerstofftransferate wird durch die Gleichung

$$\text{OTR} = k_L a (C^* - C_L) \quad (1)$$

beschrieben. Die geringe Sauerstofflöslichkeit  $C^*$  in Kulturmedien (ca.  $7 \text{ mg L}^{-1}$ ) [20] führt, wie man aus dieser bekannten Gleichung leicht erkennt, zu einer geringen treibenden Kraft für den Stoffübergang. Für Systeme mit hohen Zelldichten und folglich hohem Sauerstoffbedarf kann es daher zu Problemen bei der Sauerstoffversorgung kommen.

Der integrale Stoffübergangskoeffizient  $k_L a$  setzt sich aus der spezifischen Phasengrenzfläche  $a$  zwischen Gas- und Flüssigphase und dem Stoffübergangskoeffizienten  $k_L$  zusammen. Das Produkt  $k_L a$  kann als reziproker Wert des Widerstandes für den Sauerstofftransfer aufgefaßt werden. Da die Messung der Einzelgrößen schwierig ist, wird das Produkt  $k_L a$  zum volumenbezogenen Stoffübergangskoeffizienten kombiniert. Mit dem maximal realisierbaren  $k_L a$ -Wert charakterisiert man die Leistungsfähigkeit des Reaktors bezüglich des Sauerstoffeintrags.

Für die Bestimmung des volumenbezogenen Stoffübergangskoeffizienten stehen verschiedene Meßverfahren zur Verfügung.

Es gibt stationäre Meßmethoden, die das Modellsystem unter Gleichgewichtsbedingungen betrachten. Gemessen wird dann die Sauerstoffeintragsrate OTR die die Rate OUR, mit der der Sauerstoff verbraucht wird ausgleicht. Ist der Sauerstoffeintrag gleich dem -verbrauch ( $dC_L/dt = 0$ ), so befindet sich das System im dynamischen Gleichgewicht. Im Gleichgewicht gilt dann:

$$k_L a (C^* - C_L) = \text{OUR} \quad (2)$$

Bei dynamischen Methoden wird eine Änderung der Gelöstsauerstoffkonzentration  $C_L$  ausgelöst und das Antwortsignal mit einer Sauerstoffelektrode erfaßt. Die Änderung kann nach der Entgasung mit Inertgas (Stickstoff) durch die Umschaltung auf Luft oder Sauerstoff erfolgen (Desorptionsmethode). Aus dem zeitlichen Verlauf von  $C_L$  kann  $k_L a$



berechnet werden. Der Einfluß des Sauerstoffverbrauchs an der Sauerstoffelektrode kann durch diese Methode einfach eliminiert werden [41]. Eine Bewertung der Anwendung dynamischer Methoden findet sich bei Linek et al. [24].

Eine dynamische Messung des  $k_L a$ -Werts stellt bestimmte Anforderungen an den Sauerstoffsensor und an die Geräte, mit denen das von ihm produzierte Signal aufgezeichnet wird.

Um die Anforderungen an das dynamische Antwortverhalten des Sauerstoffsensors und das Datenaufzeichnungsgerät abzuschätzen, kann man den erwarteten Verlauf des gelösten Sauerstoffes bei verschiedenen  $k_L a$ -Werten als direkte Meßgröße unter idealen Bedingungen berechnen. Wenn man annimmt, daß sich der  $k_L a$ -Werte im Bereich von 100 bis 800 [1/h] befindet, kann man die Gleichung für den Sauerstoffeintrag mit einem PC lösen. Eine Schar von Lösungskurven für den Übergang von einem Zustand mit verschwindender Konzentration an gelöstem Sauerstoff zur Sauerstoffsättigung (100% des löslichen Sauerstoffs) ist in Abbildung 21 dargestellt:

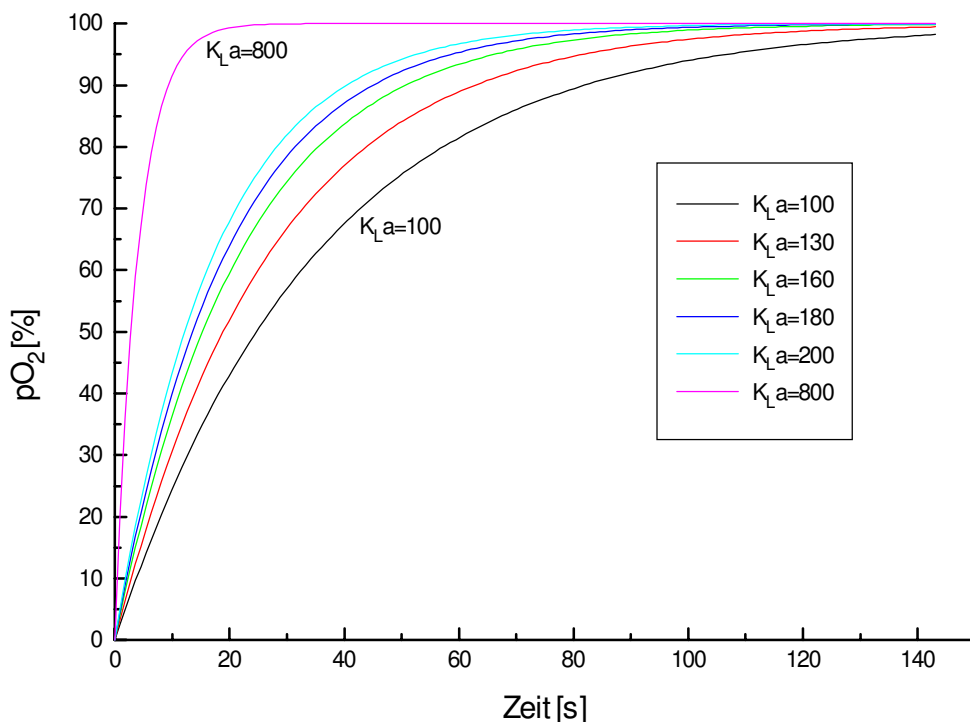


Abbildung 21: Modellrechnung von  $k_L a$  –Experimenten

Man erkennt, daß bei großen  $k_L a$ -Werten von 800 [1/h] die Sättigung innerhalb von 10 s erreicht wird. Um den Anstieg des Signal genau messen zu können müssen die Meßwerte

mindestens im Sekundenbereich erfaßt werden können. Die Sauerstoffelektrode muß dann entsprechend schnell reagieren können [36].

Die Experimente wurden im beschriebenen Standardreaktor (s. Kap. 3.1.1. und 3.1.2.) mit der Desorptionsmethode durchgeführt. Als Modellsystem wurde bei einem konstanten Füllstand von 10 L Wasser der Anstieg des Gelöstsauerstoffes nach der Umschaltung über ein Ventil von Stickstoff auf Luft mit einer Sauerstoffelektrode verfolgt. Die Begasungsrate wurde bei der Untersuchung der Standardreaktorkonfiguration mit 3 Rushton-Turbinen im 3:1 Größenverhältnis von Reaktor- zu Turbinendurchmesser sowie den vergleichenden Experimenten variiert. Nach der Begasung des Reaktors mit Stickstoff bis zum sauerstofffreien Medium wurde auf die Begasung mit Luft umgestellt und kurz vorher die Datenaufnahme im 1 s-Takt gestartet.

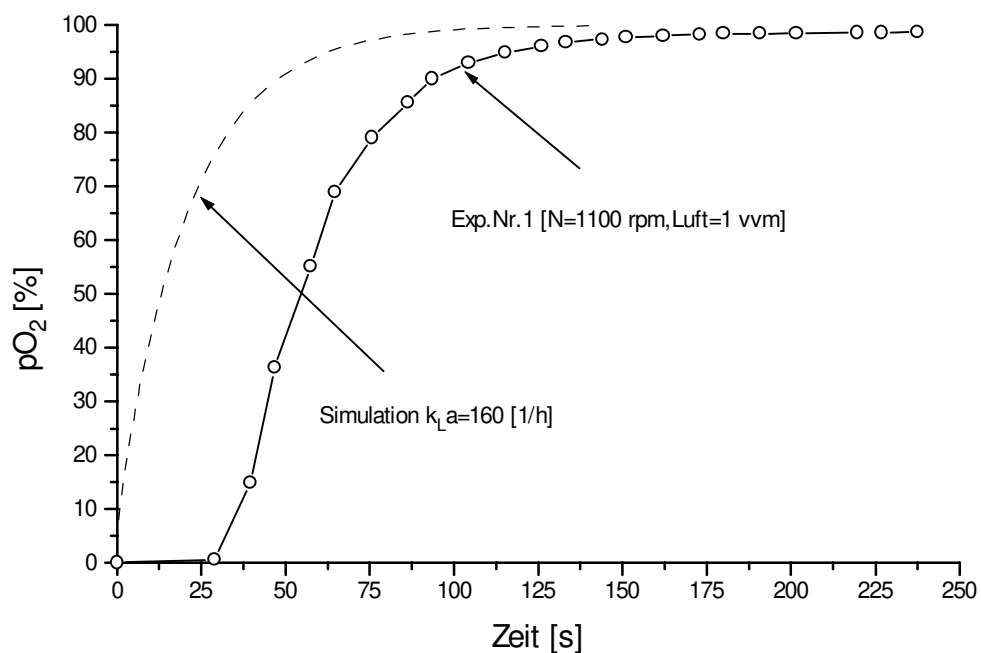


Abbildung 22: Qualitativer Vergleich zwischen Modellrechnung und Experiment

Der Vergleich von idealem und realem Verlauf zeigt mehrere verschiedene Einflüsse. Am Anfang des Experimentes liegt eine Zeitverschiebung bis zur Sensorreaktion von knapp 30 s vor (Meßwerte zur Auswertung im 10 s-Takt gerastert; der zweite und dritte Wert ist in Abbildung 22 nicht dargestellt, da keine Änderung im Gelöstsauerstoff). Dies deutet auf nicht-ideale Mischungseffekte in der Lösung, sowie Mischungseinflüsse beim

Umschalten hin, bis sich der Verlauf (größte Steigung) ab dem mittleren Bereich, von einer zeitlichen Parallelverschiebung abgesehen, dem idealtypischen annähert.

Den Anstieg im mittleren Bereich, nach der Eliminierung aller zeitlichen Einflüsse bis zum idealen Verlauf (hier:  $dT = 38$  s), zeigt Abbildung 23. Zusätzlich werden die simulierten Verläufe zweier  $k_{La}$ -Werte (100, 200 [1/h]) zum Vergleich dargestellt. Dadurch wird deutlich, daß ab diesem Zeitpunkt Anfangseffekte keine Rolle spielen und eine Auswertung erst ab diesem Zeitpunkt erfolgen sollte sowie eine sinnvolle Bewertung zuläßt.

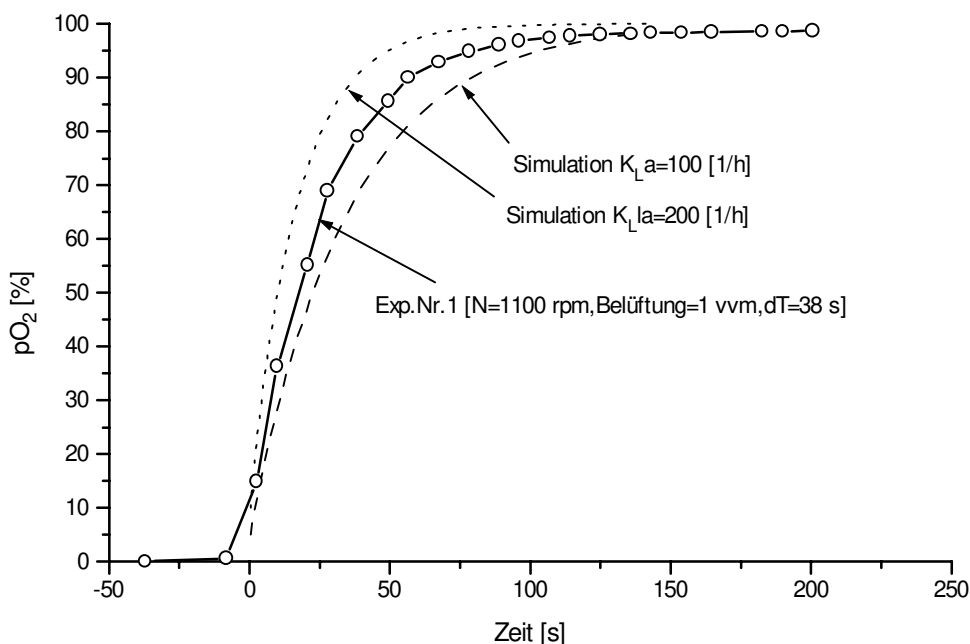


Abbildung 23: Eliminierung der Zeitverzögerung

Um den Einfluß des nicht-idealen Verhaltens für die Bestimmung von  $k_{La}$  zu minimieren, wurde mit Hilfe einer Simulation der Einfluß der Sensor-Zeit-Konstante (Ansprechverhalten des Sensors bis zum Erreichen des realen Wertes, also die nicht-idealer Einflüsse) und der System-Zeit-Konstante (Dauer der Einstellung der gewünschten Sauerstoffsättigung in Abhängigkeit der Taktrate der Datenaufnahme) betrachtet. Die zeitliche Parallelverschiebung bis zur Wiedergabe der Veränderungen im Medium durch den Sensor wird in dem Modell als konstant angesehen und vor dem Modul „Sensor-Zeit Konstante“ pauschal berücksichtigt.

Dieses Modell dient gleichzeitig zur einheitlichen Auswertung der erhaltenen Meßergebnisse. Dabei werden die äußeren Einflüsse analysiert und mathematisch eliminiert. Als integrale Stoffübergangskoeffizienten ergeben sich Werte, die einen Vergleich der verschiedenen Konfigurationen und Turbinen relativ zueinander zulassen.

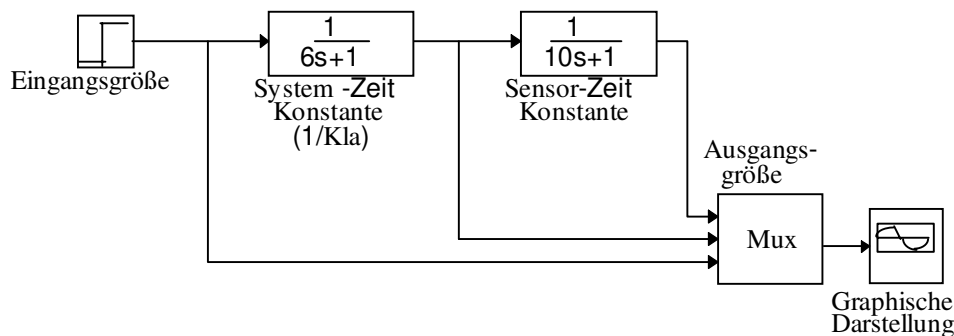


Abbildung 24: Modelldarstellung zur Einflußnahme von Zeitkonstanten auf die  $k_{La}$ -Berechnung (Software: Matlab-Simulink)

Mit Hilfe dieser Modellrechnung können Probleme von Experimenten in zu erwartenden Bereichen abgeschätzt und aus den aufgenommenen Daten analysiert und eliminiert werden. Der zeitliche Einfluß der verwendeten Sauerstoffelektrode liegt im Bereich von kleiner 10 s. Nimmt man für die Modellrechnung eine grössere Sensorzeitkonstante von 20 s, und eine Systemzeitkonstante von 6 s an und führt im Bereich von  $k_{La} = 1200$  [1/h] vergleichende Experimente durch, so erhält man ohne entsprechende Korrektur nur die Systemzeitkonstante als Meßergebnis. In der Modelldarstellung wird aus den verschiedenen Beeinflussungsfaktoren in einem Modul „Ausgangsgröße Mux“, eine Darstellung über den gesamten Bereich berechnet.

In Abbildung 25 ist eine Berechnung mit Hilfe des Modells dargestellt. Im Vergleich zum idealen Verlauf des Stoffübergangs bei idealem Mischungsverhalten, wird durch die Annahme einer Systemzeitkonstante von 6 s, bei gleichzeitiger Vernachlässigung der Sensorzeitkonstanten, der Verlauf bei  $k_{La}$ -Werten von 600 [1/h] wiedergegeben. Wird zusätzlich die Sensorzeitkonstante berücksichtigt, so zeigt der berechnete Verlauf des Gelöstsauerstoffes bereits ein realitätsnahes Profil für einen  $k_{La}$ -Wert von 225 [1/h]. Eine Verdopplung der angenommenen Sensorzeitkonstanten auf 20 s führt zu einer weiteren Verzögerung des dargestellten Anstiegs des Gelöstsauerstoffs im Medium, was einem Verlauf bei einem  $k_{La}$ -Wert von etwa 140 [1/h] entspricht. Halbiert man die Systemzeitkonstante beispielsweise auf 3 Sekunden, d.h. die Vermischungseinflüsse innerhalb

des Reaktors sind kleiner, so entfernt sich das zu erwartende Meßergebnis vom ideal zu erreichenden Ergebnis und der Einfluß der Korrekturglieder der Modellrechnung muß stark zunehmen.

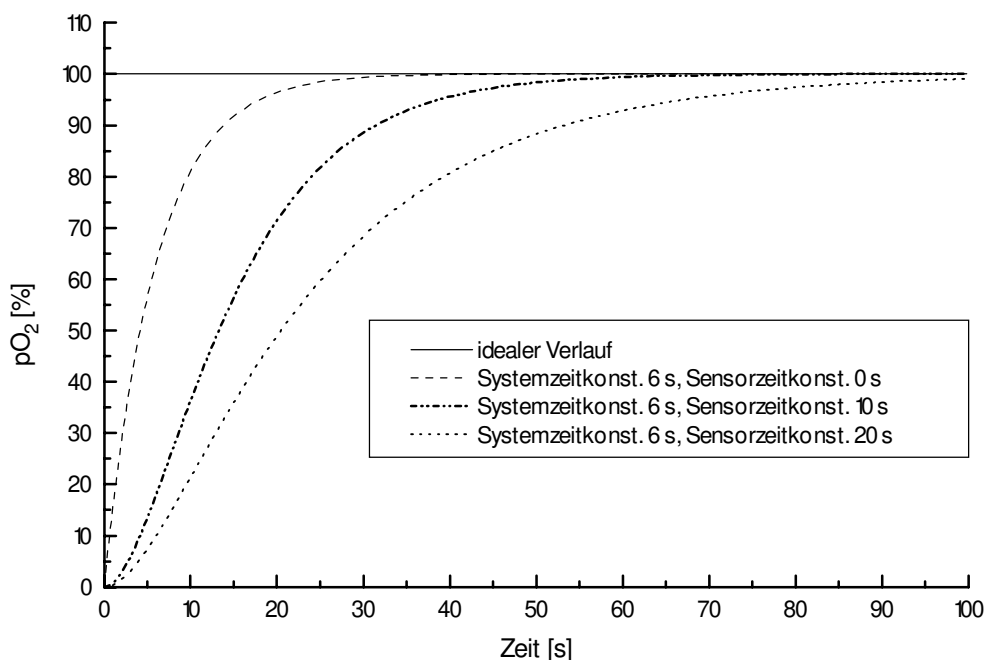


Abbildung 25: Modellsimulation zur Darstellung der Einflüsse von Sensor- und Systemzeitkonstanten

Das Modell berücksichtigt die Einflüsse auf die Messung des Anstieges des gelösten Sauerstoffgehaltes im Medium. Die eigentliche Bestimmung des  $k_{La}$  erfolgt durch die Integration der Gleichung (1):

$$\ln(C^* - C_L) = \ln(C^* - C_0) - k_{La} \cdot t \quad (3)$$

$C_0$  ist der gelöste Sauerstoff zur Zeit  $t=0$  (nach völliger Entgasung mit Stickstoff),  $C^*$  ist die Sättigungskonzentration. Trägt man  $\ln(C^* - C_L)$  gegen die Zeit auf, so ergibt sich als Steigung  $k_{La}$ .

Im Standardrührkessel mit drei Rushton-Turbinen werden in Wasser meist Werte für  $k_{La}$  zwischen 100 [1/h] und 200 [1/h] gemessen [38]. Kulturmedien entsprechen aufgrund ihres Nährstoff- und Salzgehaltes Elektrolytlösungen für die der  $k_{La}$  bis zu sechsmal höher liegen kann [33].

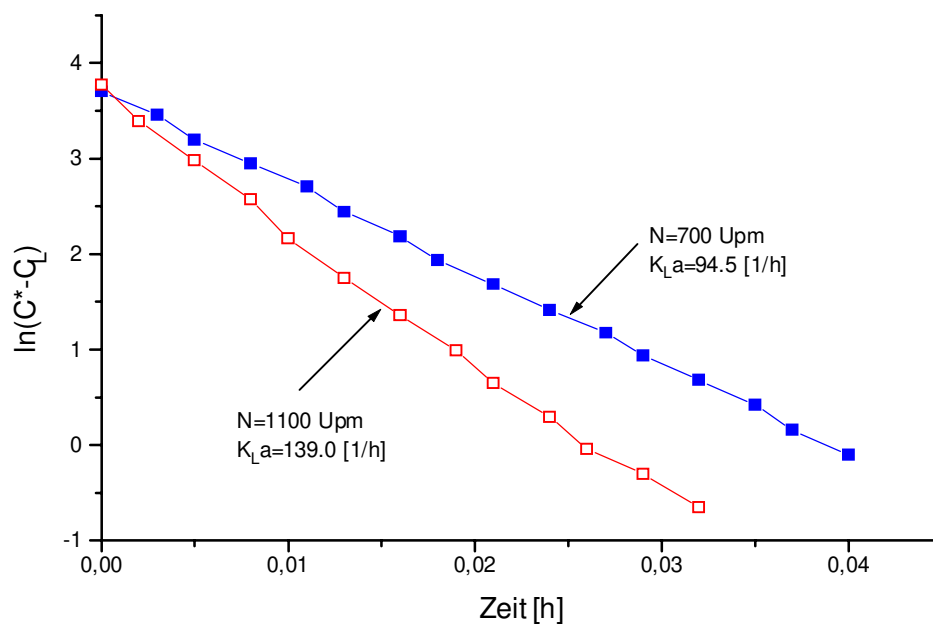


Abbildung 26: Graphische Darstellung experimenteller Daten zur Ermittlung des Stoffübergangskoeffizienten  $k_{L,a}$  bei verschiedenen Drehzahlen im Modellmedium Wasser/Luft (Füllstand 10 l, Begasung 1 vvm,  $T=22^{\circ}\text{C}$ )

Mit der Standardkonfiguration und unter Kultivierungs-ähnlichen Bedingungen (700 Upm; Begasung 1 vvm;  $22^{\circ}\text{C}$ ; Volumen 10 l) lag der  $k_{L,a}$  des verwendeten Standardreaktors bei einem Wert kleiner 100 [1/h]. Auch eine Erhöhung der Rührerdrehzahl auf 1100 Upm verbessert den Stoffübergang nur auf einen Wert von 139 [1/h]. Dies entspricht im Medium einer Erhöhung des Gelöstsauerstoffes um maximal 10 %. Eine weitere Erhöhung der Begasungsrate und/oder Drehzahl führt zu einer Flutung der Impeller.

Eine signifikante Erweiterung des Arbeitsbereiches durch die Verbesserung des Stoffüberganges konnte nur über den Einsatz geänderter Impellersysteme in den Standardreaktor erfolgen.

### 3.3.3.2. Vergleich verschiedener Impellersysteme

Zur Verbesserung der Sauerstoffeintragskapazität wurden neue Turbinensätze mit geänderten Größenverhältnissen von Reaktor- zu Turbinendurchmesser gefertigt und

miteinander verglichen. Eine Übersicht über die eingesetzten Typen und Maße gibt Tabelle 2.

Tabelle 2 : Maße der verwendeten Impeller

	Rushton-Turbinen (Standard- Konfiguration)	Vergrößerte Rushton-Turbinen	Hohlblatt Turbinen
Anzahl	3	1 und 2	1 und 2
Durchmesser	72 mm	105 mm	105 mm
Höhe der Blätter	15 mm	20 mm	20 mm
Anzahl der Blätter	6	6	6
Länge der Blätter	23 mm	26 mm	26 mm
Verhältnis Reaktor-/ Turbinen Durchmesser	3:1	2:1	2:1

Die Hohlblatt Turbinen, die in ähnlicher Form von verschiedenen Firmen, zum Beispiel von Scaba, hergestellt werden, zeichnen sich durch den Einsatz von Schaufel-ähnlichen anstelle der vertikalen Blätter aus. Diese bewirken eine gleichmäßigere Verteilung der stärker dispergierten Gasblasen aufgrund einer kaum feststellbaren Blasenschlepe. Daneben wurde dieser Rührertyp bei einem Vergleich verschiedener Impellersysteme als dasjenige charakterisiert welches sich durch einen nur geringen Leistungseintragsabfall mit zunehmender Begasung auszeichnet [12]. Die optimale Anordnung von Turbinen gleichen Typs innerhalb des Reaktors wurde empirisch ermittelt. Alle Experimente wurden mit einem Füllstand von 10 l im Modellsystem Wasser/Luft mit der Desorptionmethode durchgeführt.

Interessant in Abbildung 27 ist, daß der Stoffübergang durch den Einbau einer zusätzlichen Turbine nicht unbedingt verbessert wird. Es bilden sich im Reaktor Mischungseffekte aus, die zu einer Verringerung des Gasgehaltes insgesamt führen können [49]. Durch Veränderung des Abstandes der Turbinen zueinander werden diese Effekte durch Minimierung von, zum Beispiel Bypass-Strömungen gestört, so daß sich der Gasgehalt erhöht. Strömungsmechanisch werden sich kleinere Wirbel im Medium ausbilden, die sich gegenseitig nicht ergänzen oder sogar stören. Eine Bewertung mehrstufiger Impellersysteme findet sich bei [35].

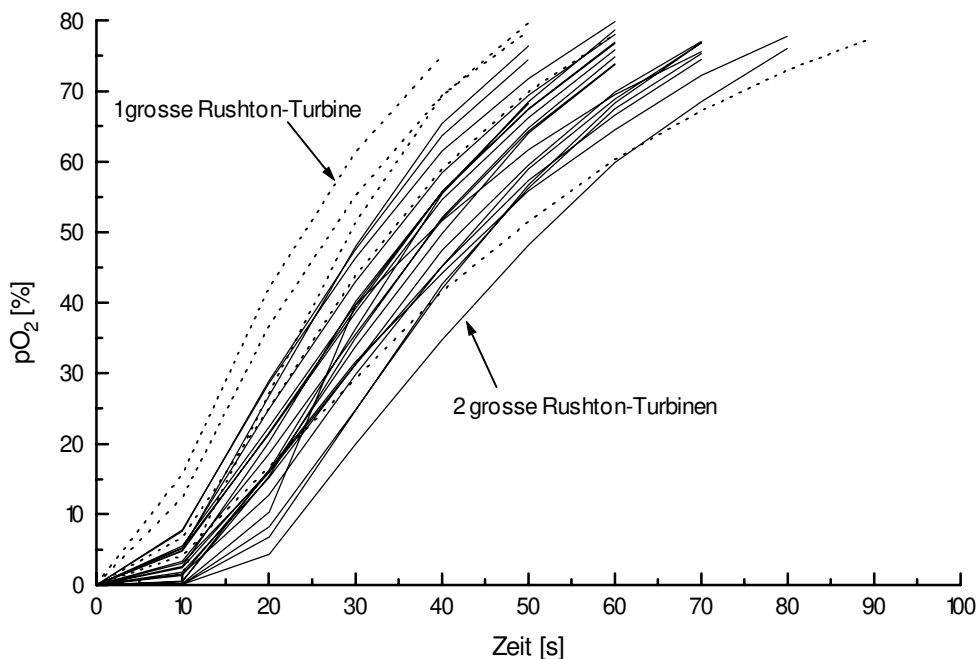


Abbildung 27: Vergleich der durchgeführten Versuche zur Bestimmung von  $k_{La}$  mit gleichem Turbinentyp, unterschiedlichen Drehzahlen und Begasungsraten

Die Abbildung 28 zeigt diesen Fall am Beispiel der Hohlblatt-Turbinen:

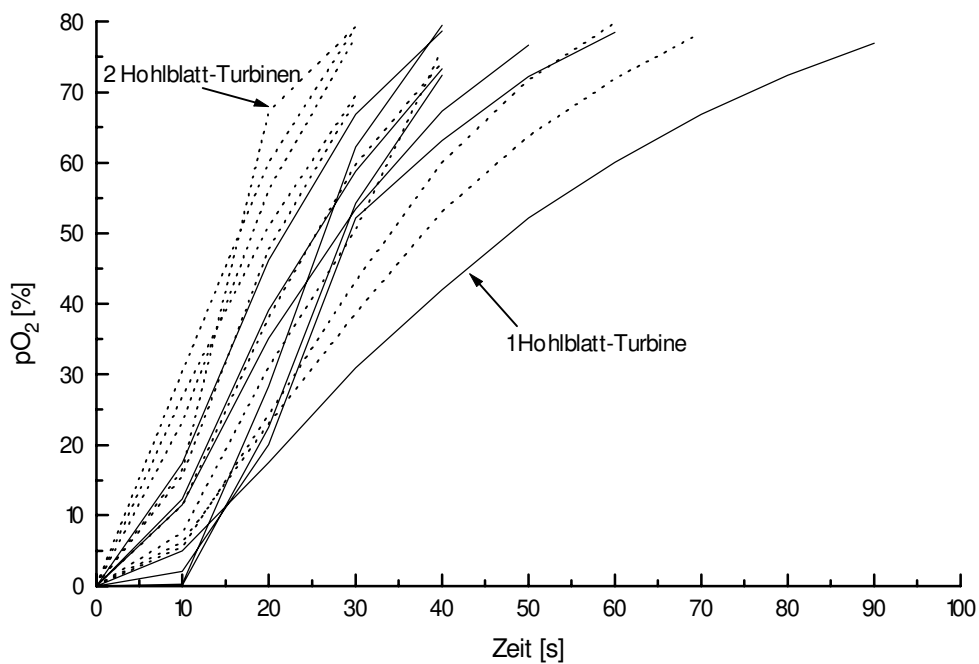


Abbildung 28: Vergleich der durchgeführten Versuche zur Bestimmung von  $k_{La}$  mit Hohlblatt-Turbinen, unterschiedlichen Drehzahlen und Begasungsraten



Die Experimente im gleichen System wie in Abbildung 27 führten durch den Einbau einer zweiten Scaba-Turbine zu einer Verbesserung des Stoffüberganges. Der ideale Abstand beider Turbine zueinander und die Höhe vom Reaktorboden wurde durch zahlreiche Versuche ermittelt. Diese Konfiguration führte zu einer relativ homogenen Verteilung von Kleinblasen über den gesamten Reaktorinhalt, d.h. zu einer möglichst großen Grenzfläche zwischen Gas- und Flüssigphase sowie einem erhöhten Gasgehalt.

### 3.3.3.3. Auswahl eines verbesserten Impellersystems

Das Ergebnis der Untersuchungen zur Verbesserung des Stoffüberganges kann mit der Standardreaktorkonfiguration von 3 Rushton-Turbinen direkt verglichen werden.

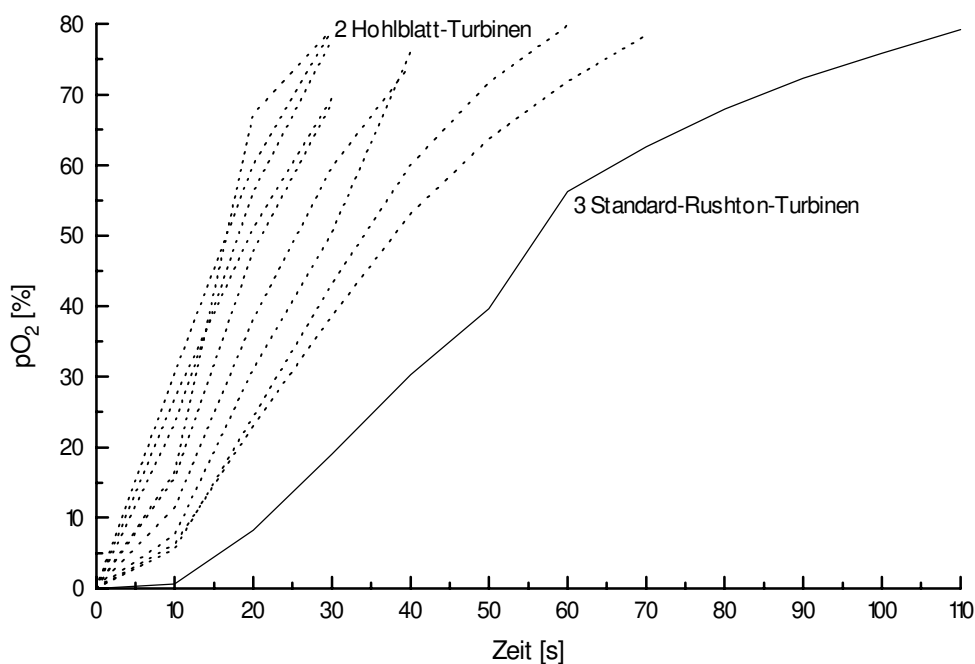


Abbildung 29: Vergleich der Standardreaktorkonfiguration gegenüber der verbesserten mit 2 Hohlblatt-Turbinen

Die Abbildung 29 zeigt die Verbesserung im Stoffübergang anhand des gelösten Sauerstoffs im Medium deutlich. Bei allen untersuchten Drehzahlen und Begasungsraten mit 2 Hohlblatt-Impellern ist gegenüber der Standardausrüstung des Reaktors ein höherer Sauerstoffgehalt im Medium gemessen worden. Bei dynamischen Veränderungen kann dadurch eine ausreichende Versorgung der Mikroorganismen länger aufrecht erhalten werden.

Der Vergleich des Gelöstsauerstoffs mit beiden Konfigurationen ist anhand von *Escherichia coli* Kultivierungen durchgeführt worden, die unter reproduzierten Bedingungen durchgeführt wurden. Gleichzeitig ist in der Abbildung 30 die jeweils erreichte Biomasse aufgetragen.

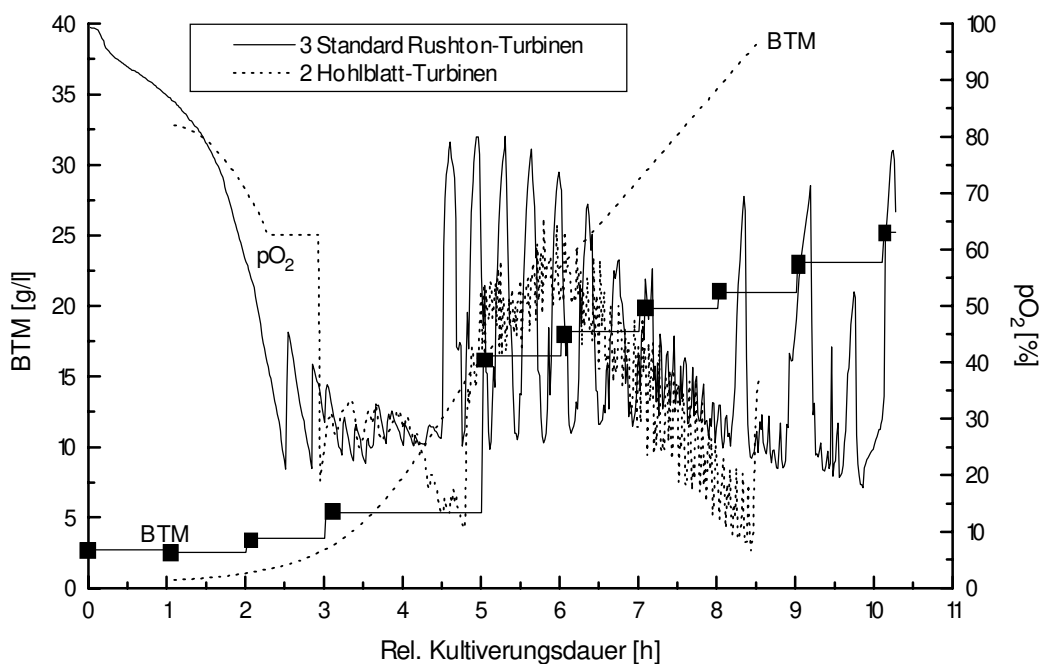


Abbildung 30: Gelöstsauerstoff und Biomasse zweier *Escherichia coli* Kultivierungen bei unterschiedlichen  $k_{La}$ -Werten

Der Gelöstsauerstoff scheint auf den ersten Blick vergleichbar zu sein. Die Werte mit der Standardkonfiguration streuen nach etwa 4,5 Stunden sehr stark. Dies wird durch die Erhöhung der Drehzahl sowie verstärkten Belüftung des Reaktors hervorgerufen. Die Entwicklung der Biotrockenmasse bei dieser Kultivierung wurde durch off-line Proben verfolgt und weist deswegen einen gestuften Verlauf (jeweils neue Meßwerte nach der Probennahme und Bestimmung). Trotz verbessertem Stoffübergang mit der neuen Konfiguration sank der Gelöstsauerstoff gegen Ende dieser etwas kürzeren Kultivierung auf Werte knapp unter 10 % ab, d.h. die Mikroorganismen sind in dieser Phase Sauerstoff- und damit verbunden auch Wachstumslimitierungen unterworfen. Berücksichtigt man die gebildete Biomasse der Kultivierung, so treten diese Einflüsse bei einer mehr als doppelt so hohen Biomassekonzentration im Reaktor auf (Berechnung durch das Hybridmodell). Diese Verbesserung bedeutet eine erhöhte

Kapazitätsausnutzung von Reaktorbetriebszeit und Substratausbeute als eingesetzten Ressourcen.

Zur Gewährleistung eines ausreichenden Sauerstoffeintrages wurde ein Gelöstsauerstoffkontrollers (s. Kap. 6.5.) entwickelt. Der Controller besitzt die Aufgabe, durch die Erhöhung der Rührerdrehzahl (bis zur Belastungsgrenze des Motors) sowie der verstärkten Belüftung im Bereich von 4 - 13,5 l/min Luft eine Sauerstofflimitierung ( $< 20\%$ ) zu vermeiden. Er greift dabei heuristisch vorausschauend bereits bei Unterschreiten eines Wertes von 30 % Gelöstsauerstoff im Kulturmedium ein und erhöht wahlweise die beiden Steuerparameter in kleinen Schritten. Eine Zeitperiode lang wird die Entwicklung des Sauerstoffgehaltes verfolgt, um dann anhand der erhaltenen Reaktion (Anreicherung des Mediums mit Sauerstoff oder nicht), eine weitere Veränderung der Parameter einzuleiten oder ein erneutes Unterschreiten des festgelegten Grenzwertes abzuwarten.

## 4. Anwendungsbeispiele

### 4.1. Implementierung und Vergleich von Meßgeräten

Die Möglichkeiten des Referenzsystemes sind Konzentrationen im Reaktor vorzugegeben, gezielt zu verändern und diesen Prozeß bei verschiedenen Betriebsbedingungen durchzuführen. Um mit diesem Testsystem das Verhalten unbekannter Meßgeräte bei der Kultivierung von Mikroorganismen, d.h. unter realistischen Bedingungen, zu untersuchen, muß zwischen indirekt und direkt meßbaren Größen unterschieden werden. Bei der Untersuchung von Zustandsgrößen, reicht ein Vergleich zwischen eingesetzten und unbekanntem Meßgerät, da eine genauere Messung sich auch in der Prozeßmodellqualität anteilig niederschlägt. Bei der Implementierung von Meßgeräten, die eine Aussage über indirekte Meßgrößen versprechen, ist ein Vergleich zur, vom Prozeßmodell geschätzten Größe erforderlich, da nur so ein gemeinsamer Bezugspunkt zur Beurteilung gegeben ist.

Die Strategie dynamisch wechselnder Bedingungen im Reaktor bietet den Vorteil, bei einer Meßgeräteimplementierung zuverlässig den Informationsgehalt während verschiedener Phasen einer Kultivierung vom Rauschen des Signals unterscheiden zu können. Daraus ergibt sich eine verbesserte Einschätzung über die Einsetzbarkeit bei verschiedenen Prozeßzuständen im Gegensatz zu Messungen in Modellmedien.

Der Verlauf dynamischer Prozesse ist problematisch zu erfassen, da nur wenige Sensoren den Anforderungen genügen. Für eine optimale Kontrolle eines Prozesses ist es erforderlich, eine Kombination von Sensoren zu finden, die den gesamten Prozeß erfassen kann.

Eine Bewertung von Meßgeräten, die nicht auf direkten Wege mit anderen verglichen werden können, bezüglich der Aussagekraft auf die Modellberechnung einer Zielgröße oder der Vorhersage einer Prozeßgröße, findet sich bei [10].

## 4.1.1. Indirekte Meßgrößen

### 4.1.1.1. Biomasse

Eine der in Kultivierungen wichtigen Größen ist die Gesamtbiomasse im Reaktor, da sie entweder selbst Zielgröße ist oder Rückschlüsse auf die intrazelluläre Produktbildung zuläßt. Die on-line Bestimmung der Biomassekonzentration kann meist nur indirekt über Korrelationen zu meßbaren Zustandsgrößen gelöst werden. Dazu zählen Fluoreszenzmessungen und die Bestimmung der optischen Dichte über Trübungssonden. Beide Meßverfahren sind gegenüber Störungen anfällig und daher nicht allgemein einsetzbar. Die Fluoreszenzverfahren werden in der Empfindlichkeit durch komplexe Medien, wie bei den Hefekultivierungen verwendet, herabgesetzt und durch die ständige Veränderung der Störgröße bei der Fed-Batch Kultivierung ist die Bestimmung einer gültigen Korrelation für die Kultivierungsdauer ohne Verwendung weiterer Informationen schwierig (s. Abbildung 31). Das Trübungsmeßverfahren ist in komplexen Medien ebenfalls mit Einschränkungen aus den genannten Gründen verbunden.

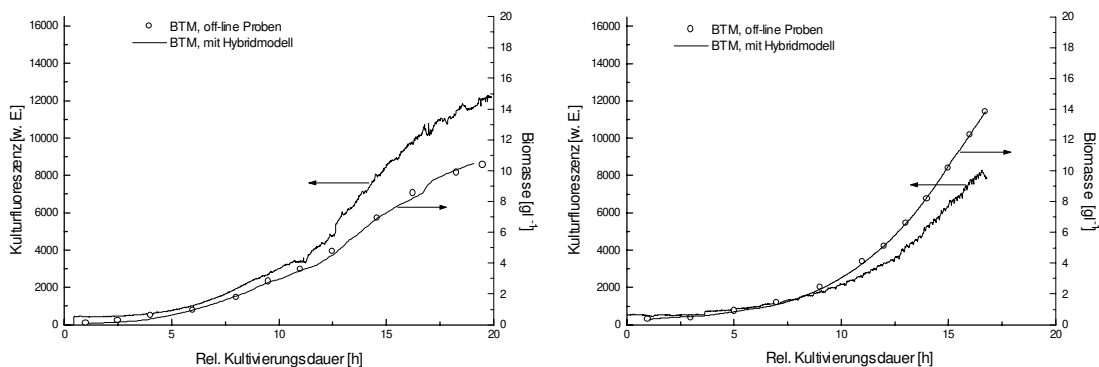


Abbildung 31: Abweichungen bei der möglichen Bestimmung der Biomasse durch on-line Messung der Kulturfluoreszenz, im Vergleich zu off-line Proben und der modellgestützten Zustandsschätzung bei zwei Hefekultivierungen

In der Praxis wird die Biomassekonzentration häufig aus off-line Proben bestimmt, je nach Bedeutung und erforderlicher Genauigkeit als Biotrocken- oder Biofeuchtmasse ausgewogen. Beide Möglichkeiten sind mit einigem Zeitaufwand verbunden und zur Prozeßüberwachung und -regelung nur bei langandauernden oder sehr langsamen Kultivierungen möglich (s. Kap 3.2.3.). Ein Vergleich von off-line gemessenen Biomassekonzentrationen zu modellgestützten Schätzwerten wurde bereits in Abbildung 13 und Abbildung 7 dargestellt. Ein weiteres Beispiel zeigt Abbildung 32 im folgenden

Kapitel, im Zusammenhang mit der off-line Messung und modellgestützten Schätzung von Substratkonzentrationen im Medium.

#### **4.1.1.2. Glucose**

Die Bestimmung der Substratkonzentration im Medium bei dynamischen Prozessen ist problematisch, da keine bisher bekannte Methode schnell genug ist, den exakten Verlauf innerhalb der Oszillationen erfassen zu können. Diese Größe ist, wie die Biomassekonzentration, für eine Prozeßsteuerung eine wichtige Meßgröße und ihre Kenntnis könnte zu einer verbesserten Zustandsbeschreibung beitragen. Eine genauere Kenntnis der verschiedenen Prozeßzustände und des Prozeßverlaufes wäre das Ergebnis.

Die Substratkonzentration im Medium wurde über off-line Probenahme mit direkt anschließender Analytik im Glucoseanalysator YSI ermittelt und teilweise der Verlauf verfolgt (s. Kap. 3.3.2., Abbildung 17). Die Bestimmung erreicht mit zunehmender Frequenz der Substratpulse bald die Grenze der originalen Wiedergabe (Zeit der Bestimmung übersteigt die Zeit der Änderung im Medium), so daß diese Methode nur zur Verfolgung des Zustandes geeignet ist, aber nicht für die Regelung des Prozesses. Der Vergleich von off-line Messung und modellgestützter Schätzung der Glucose- und Biomassekonzentration wird in Abbildung 32 dargestellt.

Für die gezielte Prozeßführung ist eine genaue Kenntnis der Substratmenge als Regelungsgröße der Kultivierung unbedingt erforderlich. Je niedriger das gewünschte Niveau liegt, desto schwieriger ist die Einhaltung des schmalen Bereiches zwischen Glucoselimitierung und -überschuß, so daß als Konsequenz der Prozeß ökonomisch nicht optimal abläuft.

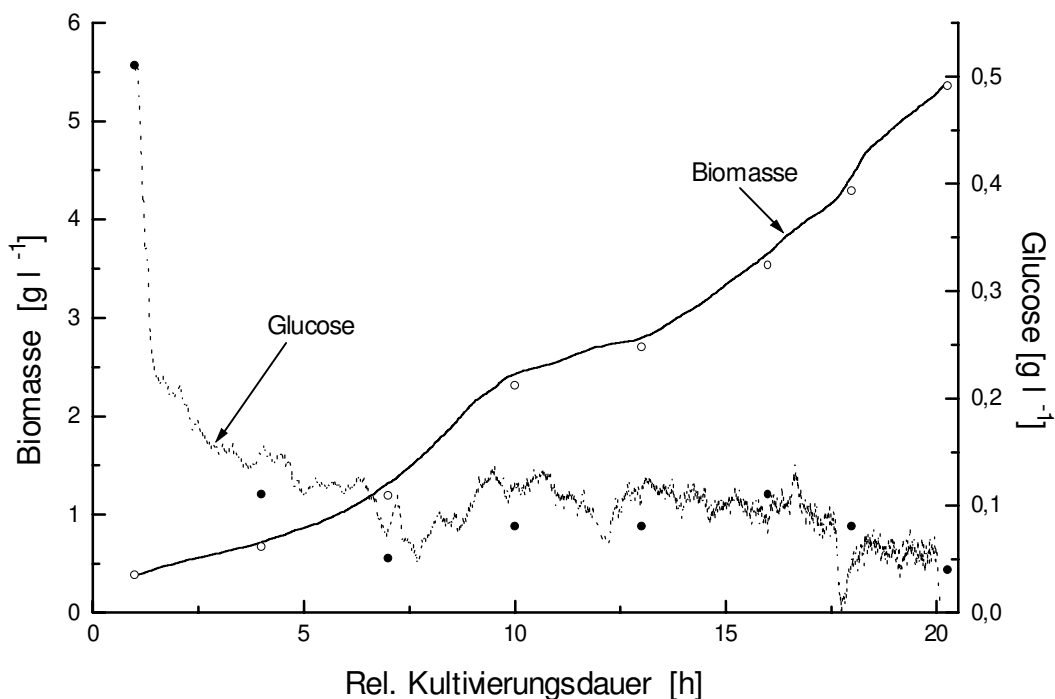


Abbildung 32: Vergleich gemessener (Symbole) mit vom Modell berechneten Werten bei voreingestellter niedriger Wachstumsrate  $\mu$

Beim Einsatz von on-line Systemen, z.B. Feldeffekttransistoren (FET), die mit GOD-Enzymen reversibel beschichtet sind, tritt ein ähnlicher Effekt auf. Bei der Messung sind aufgrund des kleinen Meßbereiches (analog zu FIA-Systemen) Verdünnungs- bzw. Spülschritte nötig, so daß maximal alle 5-7 Minuten eine Konzentration ermittelt werden kann. Bereits in Kap. 3.3.2. wurde anhand des Parameters Abgas gezeigt, daß diese Frequenz zur ständigen Beschreibung der Fed-Batch Hefekultivierung nicht ausreicht, aber durchaus die Genauigkeit und Qualität der Modellberechnung in Teilbereichen ergänzen kann [17]:

Als Vergleich zu den on-line Meßwerten mittels FET-Sensor zeigt die Abbildung 33 den vom Hybridmodell on-line geschätzten Verlauf. In diese Zustandsschätzung gehen alle zur Verfügung stehenden Prozeßgrößen in unterschiedlicher Gewichtung ein. Die zeitliche Verschiebung beider Konzentrationskurven zueinander soll in diesem Fall nur nachgeordnet interessieren, da auf das Entstehen und die Auswirkungen bereits mehrfach eingegangen wurde. Der Verlauf der beiden Signale zeigt, daß der Sensor nicht für die Messung in beiden schnell wechselnden Konzentrationsbereichen geeignet ist. Er ermittelt die Konzentration der Glucosemaxima gut, entsprechend der eingestellten

Verdünnung. Diese Methode ist bei der Erfassung sehr kleiner Konzentrationen aufgrund des Verdünnungsfehlers nur bedingt geeignet. Der Informationsgewinn über den Konzentrationsverlauf innerhalb eines Substratpulses ist für den Einsatz dieses Meßverfahrens als Prozeßregelgröße nicht ausreichend.

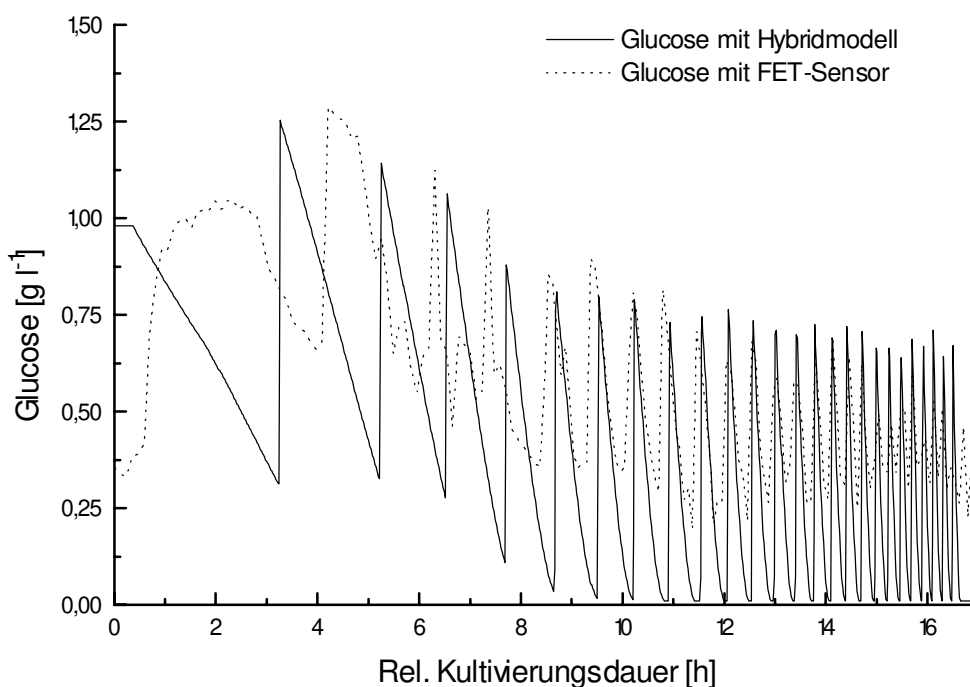


Abbildung 33: Glucosekonzentration im Medium mit FET-Sensor (---) gemessen, bzw. vom Hybridmodell berechnet (—)

Der Vergleich von modellgestützten, geschätzten Zustandsgrößen zu off-line Werten wurde bereits früher am Beispiel von Glucose und Biotrockenmasse gezeigt [38].

## 4.1.2. Direkte Meßgrößen

### 4.1.2.1. Ethanol

Eine wichtige Größe für die Prozeßregelung ist die Bildung von Nebenprodukten, bei der Hefe ist dies in erster Linie Ethanol. Eine on-line Messung des Alkohols im Abgas wurde durch ein, auf einem IR-Meßprinzip basierendes, Gerät Polytron IR EX (Drägerwerk AG) vorgenommen. Ein Qualitätsvergleich zu einer off-line Analyse mittels Gaschromatograph wurde bei Schubert [38] durchgeführt. Dort findet sich auch eine



Kalibration bezüglich des Gleichgewichtszustandes Flüssig-/Gasphase. Als Vergleich wurde eine modellgestützte Zustandsschätzung für die Ethanolkonzentration herangezogen.

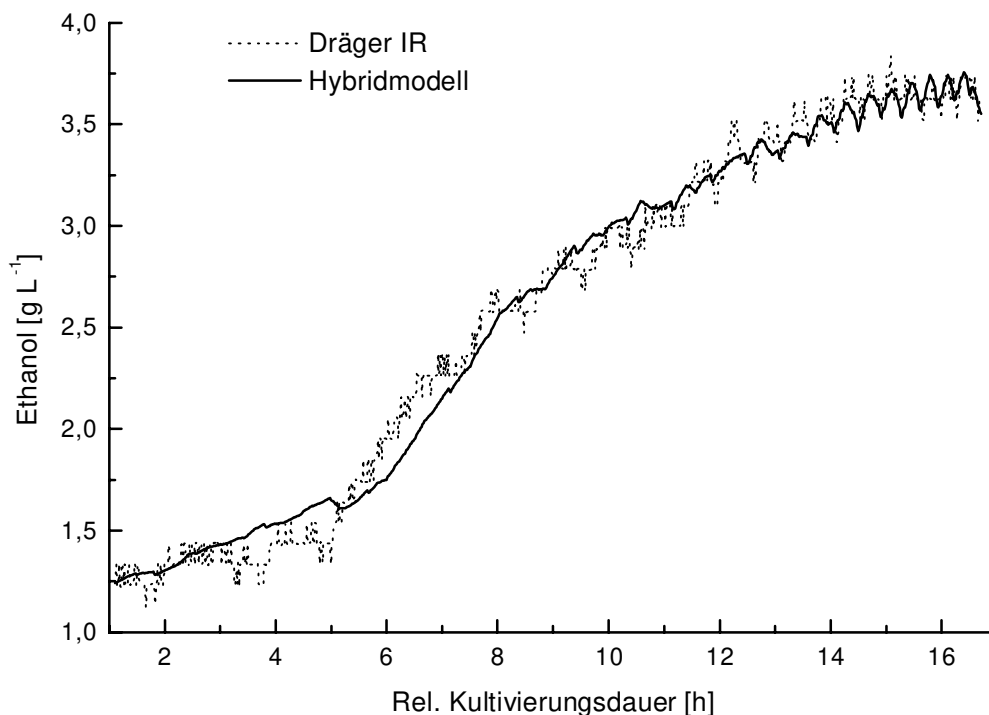


Abbildung 34: Vergleich des Ethanolensors Dräger IR im Abgas mit der modellgestützten Zustandsschätzung für Ethanol (Kultivierung 27044)

In der Abbildung 34 erkennt man, daß sich über die gesamte Kultivierungsdauer nur geringe Abweichungen zwischen beiden Signalen ergeben. Im problematischen Bereich häufiger Substratpulse gegen Ende der Kultivierung hingegen, gibt die geringe Auflösung des Dräger-Meßgerätes keine Konzentrationsverläufe innerhalb der Pulse wieder. Hier zeigt die modellgestützte Zustandsschätzung durch die Verwendung weiterer Informationen einen dynamischen Verlauf im Ethanolkonzentrationsprofil. Beim Vergleich eines kurzen Zeitabschnittes (13-16 Stunden) dieser Kultivierung werden die Unterschiede beider Signalverläufe in Abbildung 35 deutlich.

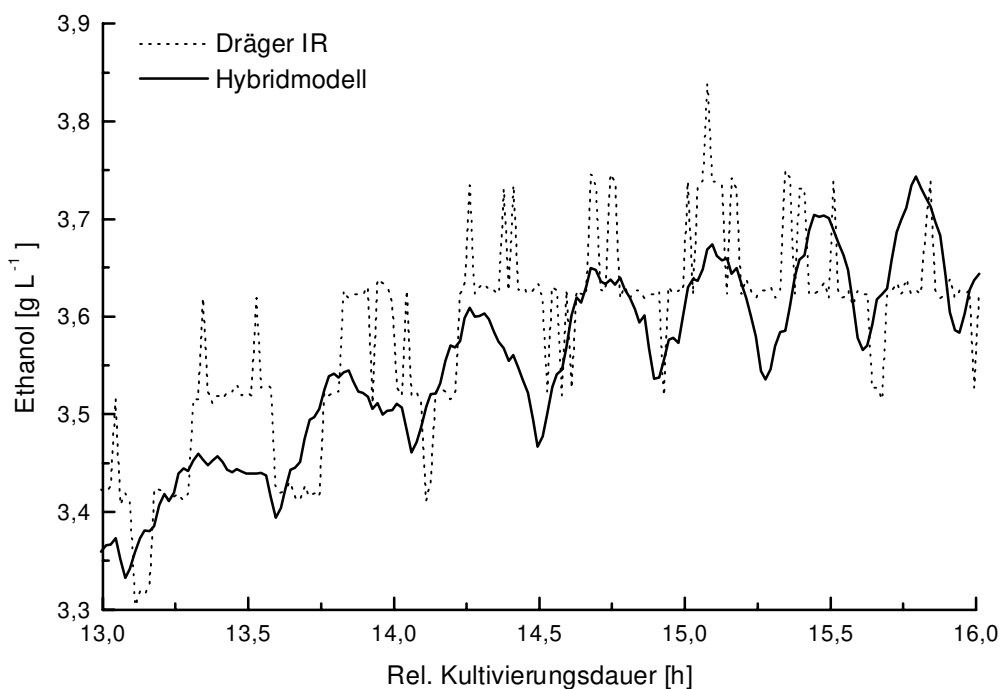


Abbildung 35: Vergleich des Ethanolsensors Dräger IR im Abgas mit der modellgestützten Zustandsschätzung für Ethanol im Zeitabschnitt 13-16h relativer Kultivierungsdauer (27044)

Das Dräger IR-Meßgerät verfolgt die Ethanolkonzentrationsprofile angenähert. Wegen seiner geringen Auflösung springt das Signal zwischen mehreren Konzentrationswerten. Durch eine Mittelwertbildung über ein 10 Einzelwerte umfassendes „Fenster“ glättet das Datenmanagementsystem RISP die Meßkurve. Durch diese Rechenoperation sind in der Abbildung 35 auch Zwischenwerte dargestellt, die das Dräger-Meßgerät in dieser Genauigkeit nicht messen kann. Eine weitergehende Meßwertbearbeitung führt zu einer Glättung der Dynamik innerhalb der Substratpulse und damit zur Verfälschung der Meßgröße. Die modellgestützte Zustandsschätzung kann innerhalb sämtlicher zur Verfügung stehender Informationen zu unterschiedlichen Kultivierungszeiten auf verschiedene Quellen zur optimierten Vorhersage zurückgreifen.

Als zweites Vergleichsgerät wurde ein Figaro-Halbleitersensor TGS 822 zur Messung flüchtiger oxidierbarer Kohlenwasserstoffverbindungen ausgewählt und ebenfalls in der Gasphase eingesetzt. Der Figaro-Sensor setzt sich aus dem Sensorelement und einer Heizung zusammen. Der Gassensor besteht aus gesintertem Zinndioxid und wird durch die Heizung auf 400°C erwärmt. Unter diesen Bedingungen können sich die Elektronen durch die Halbleiterschicht annähernd widerstandsfrei bewegen. Kommt die Oberfläche

mit Sauerstoff aus organischen Verbindungen in Kontakt, so baut sich eine Potentialbarriere auf und der elektrische Widerstand steigt. Umgekehrt verringert sich diese Barriere bei Adsorption von reduzierten Gasen am Sensorelement [14]. Die abweichenden Potentiale werden über Brückenschaltungen ausgeglichen und der resultierende Strom gemessen.

Halbleitersensoren werden häufig für Gaswarngeräte eingesetzt, sind weitgehend wartungsfrei und kostengünstig.

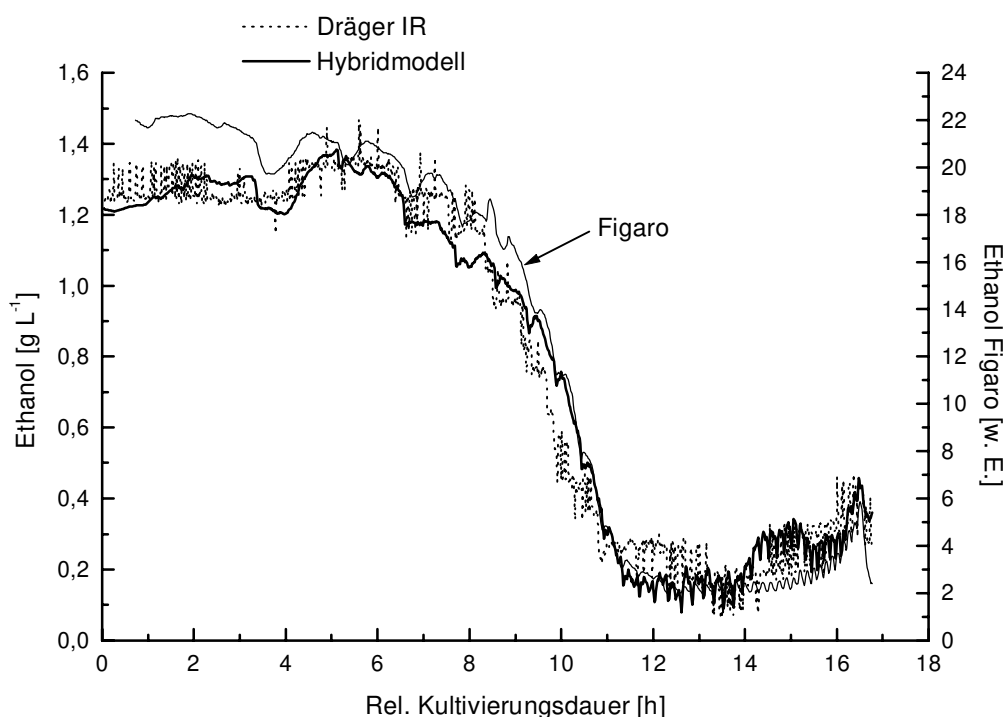


Abbildung 36: Vergleich zweier Ethanolsensoren Dräger / Figaro, die auf verschiedenen Meßverfahren basieren, im Verlauf einer Kultivierung (18015) und zur modellgestützten Zustandsschätzung

Es zeigt sich in Abbildung 36, daß beide Sensoren über die nötige Langzeitstabilität verfügen und der Verlauf nicht wesentlich unterschiedlich ist. Beide sind im Abgasstrom des Reaktors installiert und daher unempfindlich gegen Störungen im Vergleich zu Sensoren direkt im Medium, die durch die wiederholten Temperaturwechsel bei der in-situ Sterilisation des Reaktors eine verkürzte Lebensdauer aufweisen. Der systematische Fehler, der bei sehr dynamischen Konzentrationsschwankungen durch ein kurzzeitig verschobenes Gleichgewicht zwischen Gas- und Flüssigphase auftreten kann, ist für beide Meßanordnungen gleich.

Vergleicht man die Signalverläufe beider Sensoren zu der modellgestützten Zustandsschätzung, so ergibt sich ein differenzierteres Bild. Zu Beginn der Kultivierung liegt der Meßwert des Drägersensors näher am Schätzwert, der Verlauf wird jedoch besser durch das Halbleiterelement erfaßt. Im Bereich der hohen Substratpulsfrequenz ist eine Beurteilung erst bei ausschnittsweiser Betrachtung möglich.

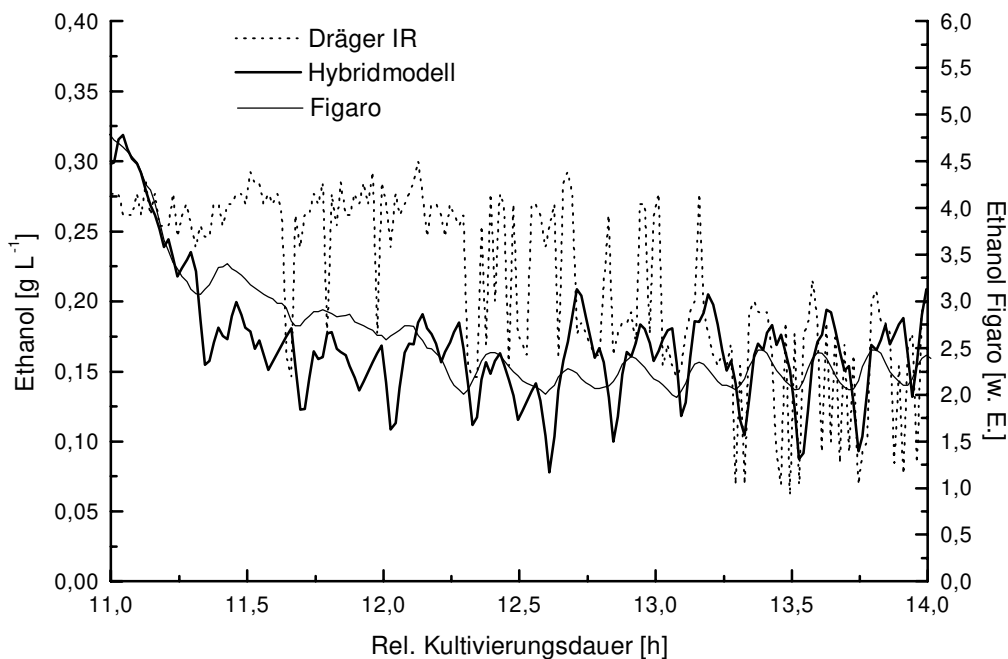


Abbildung 37: Vergleich zweier Ethanolsensoren Dräger / Figaro im Zeitabschnitt 11-14h relativer Kultivierungsdauer (18015) und zur modellgestützten Zustandsschätzung

Bei höherer zeitlicher Auflösung wird der Unterschied der Meßgerätesignale deutlich, wobei der Halbleitersensor Figaro den höheren Informationsgehalt und damit bessere Wiedergabequalität des Ethanolkonzentrationsverlaufes aufweist. Die Meßwerte des Dräger IR-Gerätes folgen nicht mehr einzelnen Pulsen, sondern wechseln schnell zwischen den, durch seine Auflösung bedingten und durch die Meßwertverarbeitung abgemilderten Niveaus. Eine Unterscheidung zu Störeinflüssen in diesen dynamischen Verhältnissen ist anhand der Meßwerte nicht mehr zu treffen. Der Halbleitersensor Figaro kann auf eine solche mögliche Fehlerquelle (Glättung oder Meßwertbearbeitung) verzichten, da die Verläufe der Ethanolkonzentration durch die höhere Auflösung zu verfolgen sind.

Daneben kann der Sensor z.B. auch unter bestimmten Voraussetzungen zur Analytik anderer, on-line nur schwer erfassbarer Stoffe dienen. Als Beispiel wird eine Kultivierung eines *Escherichia coli* Typs gezeigt, bei der Alkohol als Nebenprodukt nicht festgestellt werden kann. Beim Metabolismus von *Escherichia coli* ist Essigsäure ein häufiges Nebenprodukt und von der Bedeutung für eine Prozeßoptimierung wie Ethanol bei *Saccharomyces cerevisiae* einzuordnen.

Die Abwesenheit von Ethanol und anderen Stoffen mit hohem Dampfdruck ist entscheidend, da zum Beispiel Ethanol unter den Kultivierungsbedingungen von Mikroorganismen einen etwa dreifach höheren Dampfdruck aufweist als Essigsäure [11]. Eine Querempfindlichkeit durch Ethanol konnte durch das parallel installierte Dräger-Ethanolmeßgerät mit Infrarotmeßprinzip und geringerer Querempfindlichkeit sowie durch off-line Analytik auf Ethanol ausgeschlossen werden.

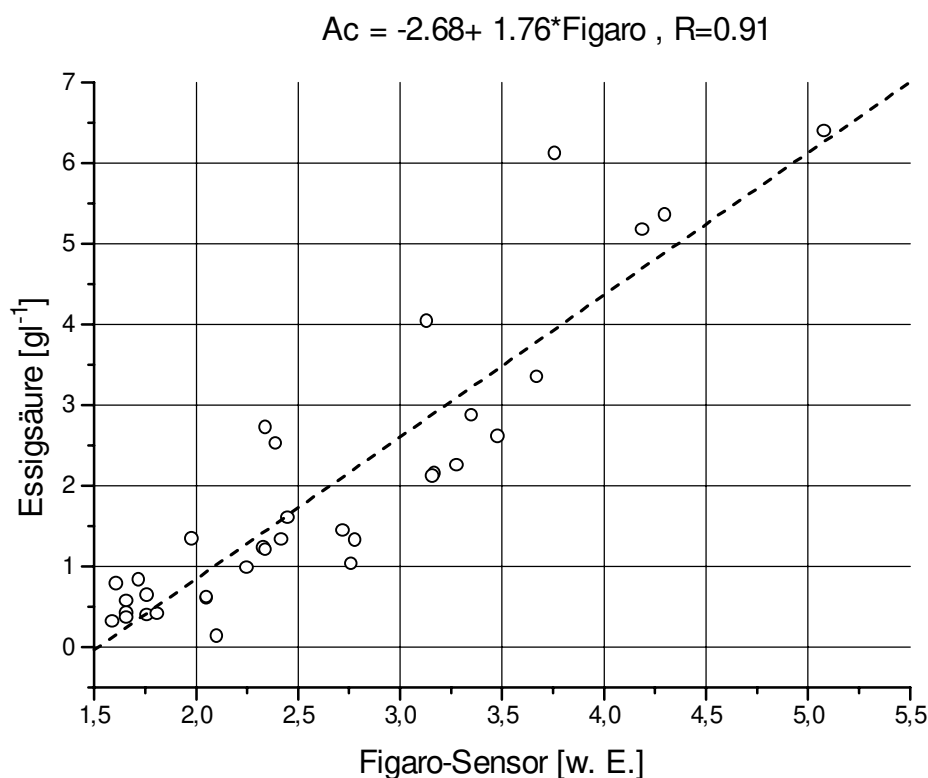


Abbildung 38: Korrelation zwischen der Essigsäurekonzentration im Fermenter und dem Signal des Halbleitersensors Figaro

Die Abbildung 38 zeigt die Korrelation der im Abgas gemessenen Signale des Sensors und der Essigsäurekonzentration, die im Medium durch Gaschromatographie aus off-line Proben ermittelt wurde. Auch diese Korrelation könnte als Basis für einen

Zufütterungsregler bei *Escherichia coli* verwendet werden. Die Zufütterung kann dabei so geregelt werden, daß bei größtmöglicher Wachstumsrate eine erhöhte Bildung von Essigsäure gerade noch vermieden wird.

Eine Vorauswahl der geeigneten Sensoren für ein bestimmtes Ziel durch die Voruntersuchung mit diesem Referenzsystem kann somit zu einer Verringerung der benötigten Rechenkapazität und zu einer Minimierung der Kosten führen.

#### **4.1.2.2. Gelöstsauerstoff**

Als Referenzgröße zur Beurteilung der Antwortzeiten implementierter Meßgeräte wurde als ein Beispiel eine Methode zur schnellen Bestimmung von Gelöstsauerstoff mittels Fluoreszenzfarbstoff ausgewählt. Dabei wird das Kulturmedium mit einem Farbstoff (Tris{1,10-phenanthroline}-ruthenium{II}-chloridhexahydrat) in, für die Hefezellen physiologisch unbedenklicher Konzentration (0,3 g/l) versetzt und mittels Anregung durch eine Halogenlampe über Lichtwellenleiter die Rückwärtsstreuung von Farbstoff-Fluoreszenz mit einem Photomultiplier detektiert. Dieses Meßprinzip erlaubt einen zeitlichen Meßabstand von bis zu 1 kHz und ist deutlich schneller als die mikrobiologischen Vorgänge innerhalb des Reaktors. Das Verfahren erfordert eine homogene Verteilung des Farbstoffes und wird im Reaktor durch die, in der Begasung, vorhandenen Gasblasen empfindlich gestört. Diese Störung wurde zum einen mit Hilfe eines Drahtnetzes zur Blasenableitung sowie einer Mittelung über einen Meßintervall von 1 s verringert. Der Blasenableiters bewirkt eine geringe Zeitverzögerung von Änderungen im Reaktor, die Mittelwertbildung führt zu einer Minimierung der extremen Werte. Der Einfluß beider Faktoren wurde untersucht und führte zu keiner nennenswerten Verfälschung des Meßergebnisses [37].

Der Vergleich dieser Methode zu der amperometrischen (Standard-) Clark-Elektrode, die in den meisten Reaktoren biotechnologischer Verfahren eingesetzt wird, zeigt eine Verzögerung des Elektrodensignals bei schwankendem Gelöstsauerstoffgehalt des Kulturmediums. Es wurden Zeiten zwischen 2 und 8 s gemessen (s. Abbildung 39), die abhängig von der Kultivierungsphase unterschiedlich sind. NADH-Messungen über die Glucoseaufnahme von hungernden *Saccharomyces cerevisiae* Zellen, die einem Glucosepuls von 100 mg/l ausgesetzt werden, ergaben eine Antwortzeit von 4,4 s [8].

Trotz dieser Verzögerung ist dieses Meßverfahren noch in der Lage, schnelle Änderungen dieser wichtigen biologischen Größe wiederzugeben.

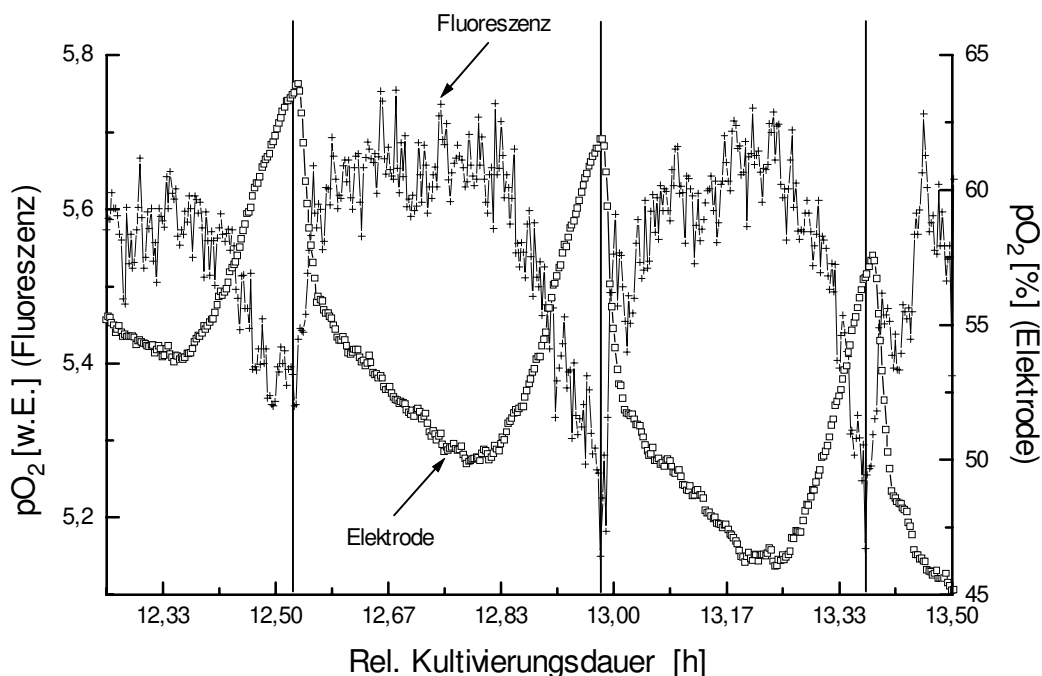


Abbildung 39: Vergleich der beiden Meßwerte während einer Kultivierung, Elektrode ( o ) und Fluoreszenz (+)

Die Abbildung 39 zeigt einen direkten Vergleich beider Meßverfahren, wobei die Fluoreszenzmethode den reziproken Verlauf erfaßt. Die Meßwerte sind im 2 s-Takt aufgezeichnet und Linien an den Startzeitpunkten der Zufütterung eingefügt. Das Fluoreszenzsignal ist trotz Mittelung relativ unruhig was vermutlich auf die Störungen durch Blasen zurückzuführen ist. Die hohe Empfindlichkeit des Meßsignals wird durch die gleichzeitige Zunahme an Störeinflüssen teilweise kompensiert, wobei eine Anpassung jeweils im Einzelfall unter Abwägung der Erfordernisse nötig ist. Die Elektrode zeigt entsprechend der Verzögerung ein stetiges Signal, da sich kurzfristige Störungen nicht direkt auf den einzelnen Meßwert auswirken.

Um die Vorteile des Fluoreszenzverfahrens mit einer Prozeßsicherheit und Dauerhaltbarkeit zu verbinden, wurde versucht den Farbstoff auf der Optode zu immobilisieren. Diese Möglichkeit ist aber mit einer Diffusionskonstante behaftet, die die Vorteile des schnellen Signals aufhebt. Diese rührt von der Silikonbeschichtung über dem

Farbstoff her, der ein Ablösen während der in-situ Sterilisation verhindern soll. Als Resultat ist eine Verbesserung zur Standardelektrode kaum feststellbar [16].

Eine abrupte Verringerung des gemessenen Gelöstsauerstoffes wurde bei allen Kultivierungen als Start der Änderungen im Reaktormilieu durch den Substratpuls angenommen.

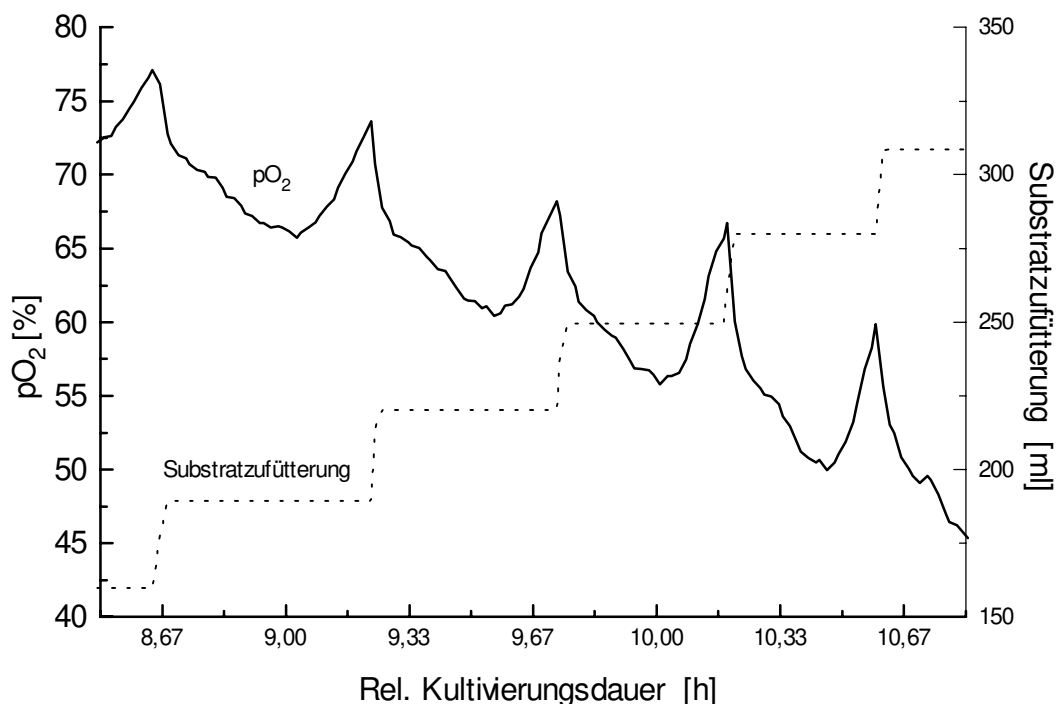


Abbildung 40: Gegenüberstellung von Zufütterungszeitpunkt und Veränderung des Gelöstsauerstoffes (Clark-Elektrode) im Kulturmedium

Abbildung 40 zeigt die direkte Abhängigkeit der beiden Signale für ein Zeitintervall einer Kultivierung deutlich. Mit Beginn der Substratzugabe sinkt der Sauerstoffgehalt im Medium durch die sofort beginnende Veratmung der Zellen.

Die Verzögerung ist bei allen durchgeführten Untersuchungen mit der Gelöstsauerstoffelektrode tolerierbar.

#### 4.1.2.3. Kohlendioxid

Bei verschiedenen Geräten mit ähnlichem Meßprinzip (IR) und ähnlicher Auflösung des Meßsignals kann es trotz gleicher Betriebsbedingungen durch eine unterschiedliche Verarbeitung des Signals zu einer zeitlichen Verzögerung sowie einer Nivellierung



(Glättung) der Meßwerte kommen. Als Beispiel sollen der Unor 610 (Maihak) und der Meßkopf IR CO<sup>2</sup> (Drägerwerk AG) dienen. Die Abgasentnahme aus dem Kopfraum des Reaktors wurde für beide Geräte gleich gestaltet und die Signale wurden in RISP mit jeweils einer Berechnungsroutine (Faktoren einer vorangegangenen Kalibration) in Volumenanteile umgerechnet.

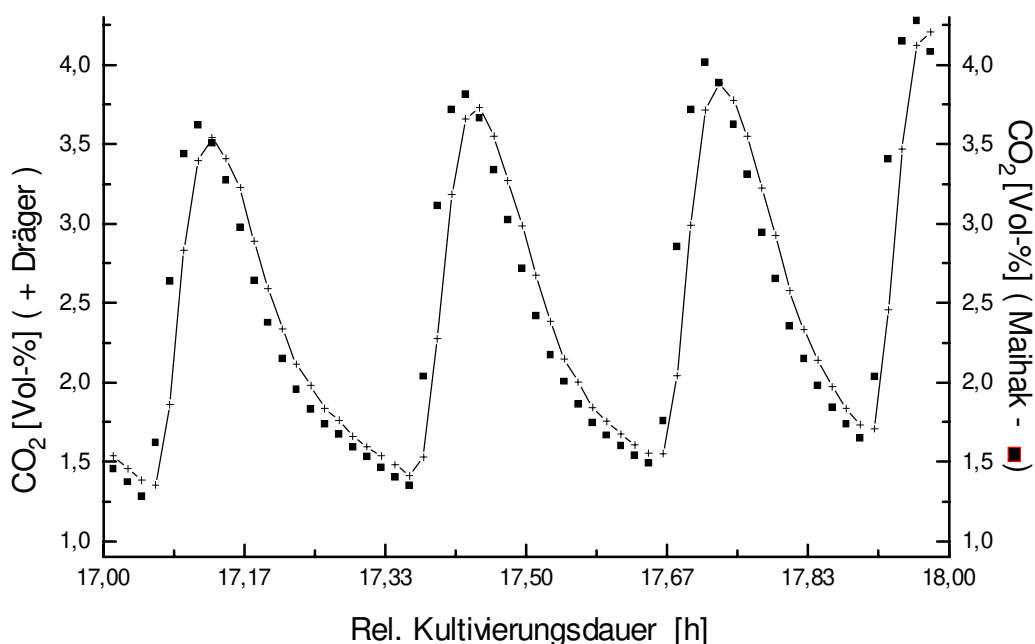


Abbildung 41: Vergleich zweier Kohlendioxidmeßgeräte mit gleichem Meßverfahren

Abbildung 41 zeigt die geringere Zeitkonstante des Signals sowie einen ausgeprägteren Konzentrationsunterschied innerhalb der Substratpulse durch das Maihak-Meßgerät. Die Geräteausstattung läßt zusätzlich eine interne Kalibration sowie eine Berechnung der Absolutwerte zu, die über eine serielle Schnittstelle (mittels eines entsprechenden Softwareprogrammes) direkt an RISP übergeben werden können. Dies vermindert die Belastung des Prozeßmanagementsystemes und erhöht die Leistungsreserve bei eventuellen Eingriffen zur Steuerung des Prozesses.

## 4.2. Physiologisches Verhalten der Hefe auf dynamische Änderungen

Das Referenzsystem kann auch für kinetische Untersuchungen des verwendeten Organismus eingesetzt werden. Als Beispiel sei die Ermittlung der Zeitkonstante für die

Umschaltung der Hefen zwischen den verschiedenen metabolischen Zuständen angeführt (s. Kap. 3.1.3.). Durch die Wahl der Pulsgröße (20-60 ml zugefütterte Substratlösung, entsprechend einer maximalen Glucosekonzentration im Reaktormedium von 0,5-1,5 g/l) konnte anhand der Meßsignale auf makroskopische Reaktionen der Organismen zurückgeschlossen werden. Aus der Literatur wird als Grenzkonzentration für das Einsetzen einer Ethanolbildung ein Wert von 0,145 g/l Glucose für kontinuierliche Kulturen angegeben [5]. Bei Fed-Batch Prozessen gibt es weit weniger Untersuchungen und werden meist sehr ähnliche oder kleinere Grenzkonzentrationen als bei den kontinuierlichen Kulturen genannt [6, 31], d.h. es sind bei jeder der o.g. Pulsgrößen Verhältnisse im Reaktor mit deutlicher Ethanolbildung zu erwarten. Die experimentellen Ergebnisse widerlegen zwar nicht generell diese Annahmen, jedoch müßte für eine verbesserte Beschreibung eine weitere Differenzierung nach der durchschnittlichen Substratkonzentration über einen bestimmten Zeitraum erfolgen. Ein negativer Effekt durch die periodisch schwankende Sauerstoffkonzentration im Medium auf die Hefen kann ausgeschlossen werden [1].

Als Beispiel für das Verhalten von *Saccharomyces cerevisiae* bei großen Substratkonzentrationsschwankungen im Medium wurden zwei Kultivierungen ausgewählt, bei denen die Glucosezugabe in großen Pulsen (60 ml entsprechend einer maximalen Glucosekonzentration im Medium von 1,5 g/l) über einen Zeitraum von 7,5 Minuten erfolgte. Die Tabelle 3 gibt einen Überblick über die Dauer [h], Ausbeute an Biomasse aus dem Substrat Glucose [g/g], benötigte Menge an Glucoselösung [ml], erreichte Ethanol- und Biomassekonzentration [g/l] am Ende der Kultivierung und das verwendete Modell zur Prozeßsteuerung.

Tabelle 3: Übersicht der beschriebenen Kultivierungen

Kultivierung	Dauer [h]	Ethanol [g/l] t=16,7 h	BTM [g/l] t=16,7 h	Zugefütterte Substratmenge [ml]	Ausbeute $Y_{xs}$ [g/g]	Steuerung mit Hilfe
20044	16,7	4,16	14,69	2140	0,287	Hybridmodell o. FES
27044	16,7	3,65	11,15	1190	0,35	Hybridmodell o. FES

Obwohl bei der Kultivierungen die gleiche Zeitdauer zur Verfügung stand und die gleiche Prozeßsteuerung eingesetzt wurde, verhielten sich die Zellen etwas unterschiedlich. Die erwarteten großen Ethanolkonzentrationen konnten nicht festgestellt

werden. Bei der Kultivierung 20044 wurde am Ende eine höhere Biomasse erreicht und eine stärkere Ethanolbildung beobachtet, was zu einer kleineren Ausbeute führt. Die Berechnung der Ausbeute bezieht sich auf das Substrat Glucose [g Biomasse /g Glucose], unabhängig von einer teilweisen Umwandlung zu Ethanol. Eine höhere Ausbeute wie in der Kultivierung 27044 bedeutet eine verbesserte Ausnutzung des Substrats Glucose. Dies wird an der geringen benötigten Substratmenge deutlich und hat zum einen eine geringe Ethanolkonzentration im Medium wie aber auch eine kleinere Biomassekonzentration am Ende zur Folge. Eine mögliche Erklärung ist die nicht optimale Ausnutzung der maximalen Zellkapazitäten, da sehr große Wachstumsraten nur mit einer gewissen Ethanolproduktion zu erzielen sind.

Die Analyse der metabolischen Reaktion auf die großen Substratschwankungen im Medium durch pulsartige Zugabe wird anhand des Verlaufes der typischen Prozeßgrößen Gelöstsauerstoff und Ethanolkonzentration in Abbildung 42 gezeigt.

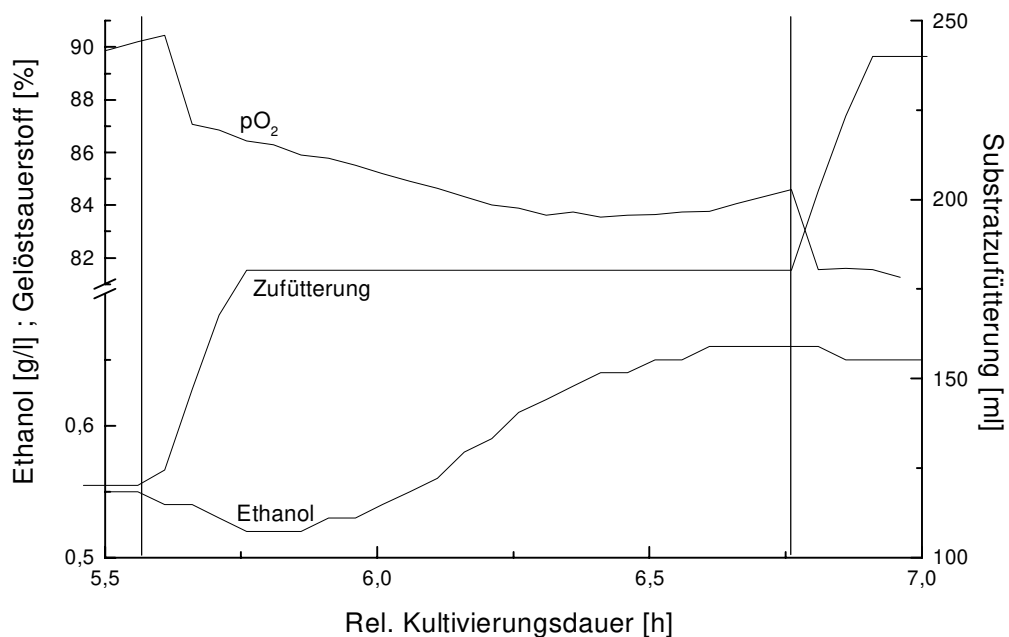


Abbildung 42: Typischer Verlauf des Gelöstsauerstoffes und der Ethanolkonzentration zu Beginn der Kultivierung 20044 nach einem 60 ml Puls

Bei geringen Zelldichten zu Beginn der Kultivierung sind die metabolischen Reaktionen auf äussere Veränderungen noch über einen großen Zeitraum verteilt. Mit Beginn der Substratzugabe synthetisieren die Zellen die notwendigen Enzyme, um die nicht

ausgeschöpfte metabolische Kapazität unter Sauerstoffbedarf durch Umsetzung von steigenden Glucosemengen oder -anteilen zu decken. Parallel dazu steigt auch der Ethanolverbrauch an, dessen Enzyme bereits vor dem Puls im Zustand der Glucoselimitierung aktiviert worden waren. Über eine Zeitdauer von 15 Minuten nimmt der Ethanolgehalt im Medium ab, aber bereits kurz nach Erreichen der maximalen Glucosekonzentration setzt eine erneute Ethanolbildung ein. Dieser Effekt kann mit dem stetigen Anstieg des Glucosemetabolismus erklärt werden, der die Zellkapazität eine Viertelstunde nach Beginn des Pulses vollständig ausfüllt und im weiteren den Überschuß zum Ethanol reduziert. Dieser Zustand dauert in dieser Kultivierungsphase etwa 45 Minuten. Mit sinkender Glucosekonzentration im Medium, entsprechend sich verringernden Anteilen des Metabolismus werden immer geringere Anteile reduziert. Anschließend dient der Alkohol als Zweitsubstrat, um die Zellkapazität möglichst vollständig auszunutzen.

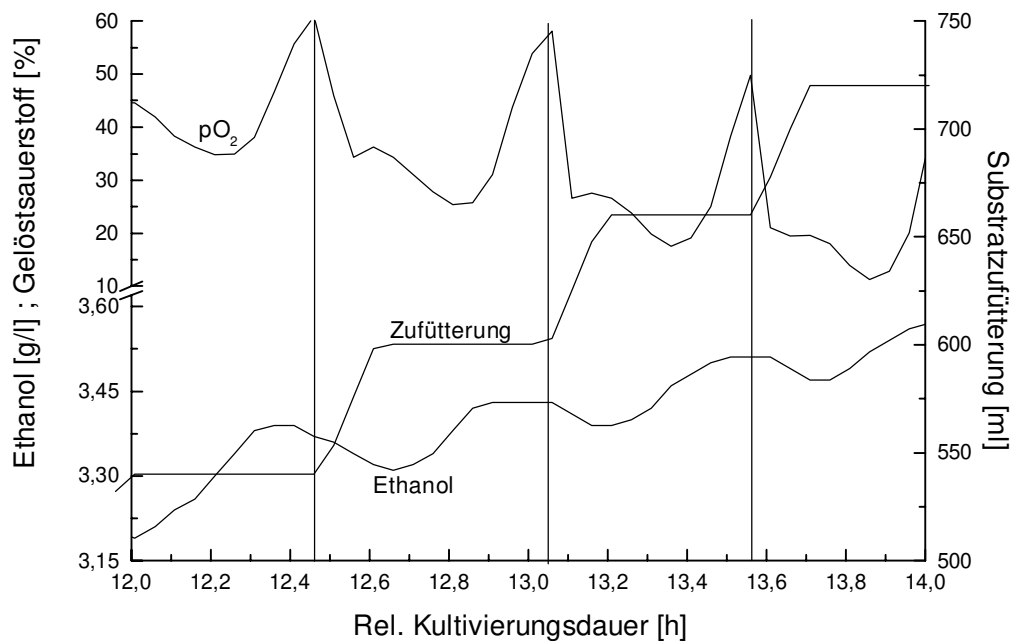


Abbildung 43: Typischer Verlauf des Gelöstsauerstoffes und der Ethanolkonzentration gegen Ende der Kultivierung 27044 mit mehreren 60 ml Pulsen

Die Pulsdichte ist abhängig von der vorhandenen Zellkonzentration im Reaktor und wird vom Hybridmodell berechnet. Der Verlauf der Prozeßgrößen gegen Ende der Kultivierung 27044 zeigt auf den ersten Blick denselben Verlauf, bei anderen Konzentrationsverhältnissen als zu Beginn, auf den zweiten Blick kann man einen kleinen

Anstieg im Gelöstsauerstoff gegen Ende der Substratzugabe erkennen, der mit dem Zeitpunkt gleichbleibender Ethanolkonzentration (Gleichgewicht zwischen Bildung und Verbrauch) zusammenfällt.

Die Erklärung für den geringeren Sauerstoffbedarf bei reinem Glucosemetabolismus gegenüber einem gemischtem bzw. Ethanol-produzierendem trotz gleichbleibender Stoffwechsellkapazität ist der höhere Reduktionsgrad von Ethanol. Das meßbare Auftreten dieses Effektes in einem bestimmten Abschnitt der Kultivierung könnte zum einen in einer erforderlichen Mindestbiomassekonzentration begründet sein, die das Auftreten solcher Synchronisationseffekte begünstigt, oder zum anderen durch eine zu große Zelldichte von anderen Effekten überlagert werden.

Über die Dauer einer gesamten Kultivierung ist die Gelöstsauerstoffkonzentration ein empfindlicher Indikator für metabolische Veränderungen. Dies wird in Abbildung 44 deutlich:

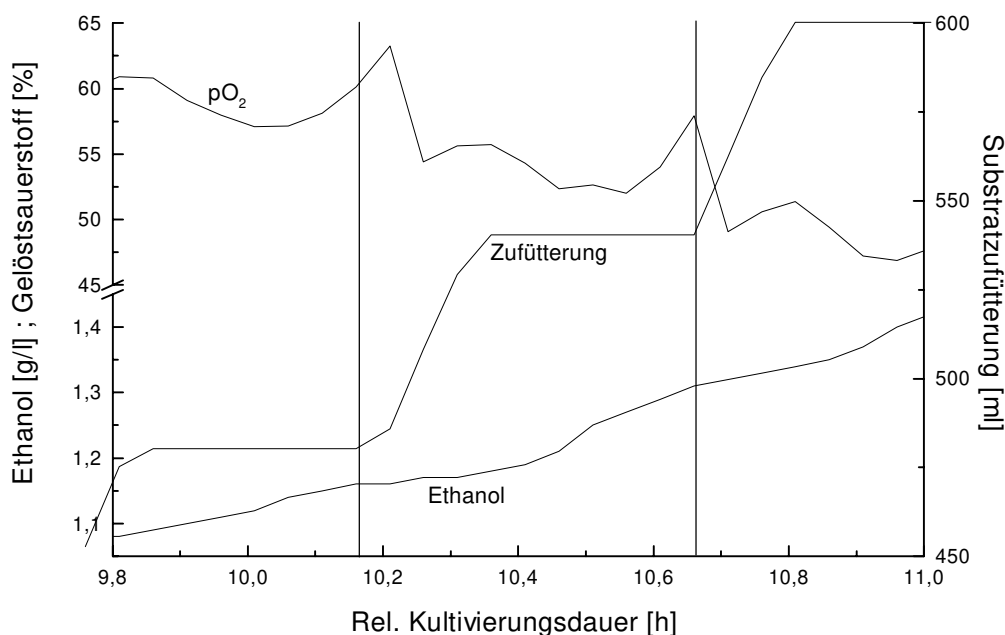


Abbildung 44: Differenzierter Verlauf der Konzentrationen (Kultivierung 20044)

Eine Umstellung im Metabolismus zeigt sich in der bereits beschriebenen Veränderung im Sauerstoffbedarf der Hefen. Der Anstieg der Ethanolkonzentration im Medium ist zwar unterschiedlich stark, aber kontinuierlich. Daraus kann abgeleitet werden, daß Sensoren in der Reaktorabluft viel stärker Durchschnittswerte erfassen, die sich aufgrund

der Gleichgewichtsverteilung zwischen den Phasen ausbilden können. Der Gelöstsauerstoffsensoren reagiert wie alle in-situ Meßgeräte nur auf Änderungen, die im lokalen Bereich um den Sensor stattfinden. Man kann bei langsamen Veränderungen, wie zu Beginn der Kultivierung, Aussagen über den Reaktormittelwert treffen, bei dynamischen Wechseln, gerade in Grenzbereichen, läßt dies nur eine begrenzte Aussage über den Allgemeinzustand aller Zellen im Reaktor zu. In diesen Fällen ist es sinnvoll beide Meßsignale (in-situ, Abluft) zu vergleichen, um eine genaue Abschätzung des allgemeinen Zellzustandes zu erhalten.

Eine Zeitdauer für die Rückumstellung ist nicht exakt festzustellen, da der Zeitpunkt für das einsetzende Unterschreiten der ausschließlichen Glucosemetabolisierung aufgrund fehlender bzw. nicht schnell genug zu erfassender Parameter schwierig ist.

Der zweite Schritt zur weiteren Untersuchung der metabolischen Umstellprozesse von *Saccharomyces cerevisiae* bestand in einer Verringerung der Pulsgrößen und damit kleineren Schwankungsbreiten der Substratkonzentration im Medium.

In Tabelle 4 ist eine Übersicht über die ausgewählten Kultivierungen gegeben, die zum besseren Vergleich analog der vorhergehenden Tabelle 3 aufgebaut ist.

Tabelle 4: Übersicht über die Kultivierungen mit verbesserter Steuerung

Kultivierung	Dauer [h]	Ethanol [g/l] t=16,7 h	BTM [g/l] t=16,7 h	Zugefütterte Substratmenge [ml]	Ausbeute $Y_{xs}$ [g/g]	Steuerung mit Hilfe
16084	16,7	2,46	11,83	1040	0,464	Hybridmodell m. FES
06104	16,7	1,66	13,84	1300	0,441	Hybridmodell m. FES
27104	16,7	0,7	15,38	1405	0,464	Hybridmodell m. FES

Durch den Einsatz des erweiterten Hybridmodelles (mit Fuzzy-Expertensystem) konnten durch die Variation der Pulsgröße in Richtung kleinerer Substratpulse weitere Effekte untersucht werden und die Ausbeute  $Y_{xs}$  deutlich gesteigert werden. Die kleineren Substratgaben führen zu geringeren Maximalkonzentrationen von Substrat und dadurch zu kürzeren Verweilzeiten der Mikroorganismen unter den Bedingungen exzessiv vorliegender Glucose. Ein ausgewogenes Verhältnis zwischen Ethanolbildung und dessen Abbau beeinflußt die gebildete Biomassekonzentration erheblich.

Trotz ähnlicher Ausbeute und gleicher Kultivierungsdauer ist es von entscheidender Bedeutung wie gut die Prozeßsteuerung den optimalen Verlauf berechnet und beherrscht. Geringfügig größere Mengen Substrat können in Verbindung mit der Reduzierung unnötiger, oder auf ein erforderliches Mindestmaß beschränkter Nebenprodukte zu einer deutlich höheren Biomassekonzentration ( $> 3,5 \text{ g/l}$ ) führen. Dies konnte durch den Einsatz des Fuzzy-Expertensystemes innerhalb des Hybridmodelles und damit verbundener genaueren Regelung des Prozesses in den Grenzbereichen sehr geringer Substratkonzentration gewährleistet werden.

Bei der Kultivierung 16084 wurde die zugeführte Substratmenge pro Puls auf ein Drittel reduziert (maximale Glucosekonzentration  $0,5 \text{ g/l}$ ) und schneller zugeführt (45 s). In der Abbildung 45 kann dies nicht exakt dargestellt werden, da ein größeres Zeitraster zur Darstellung verwendet wurde.

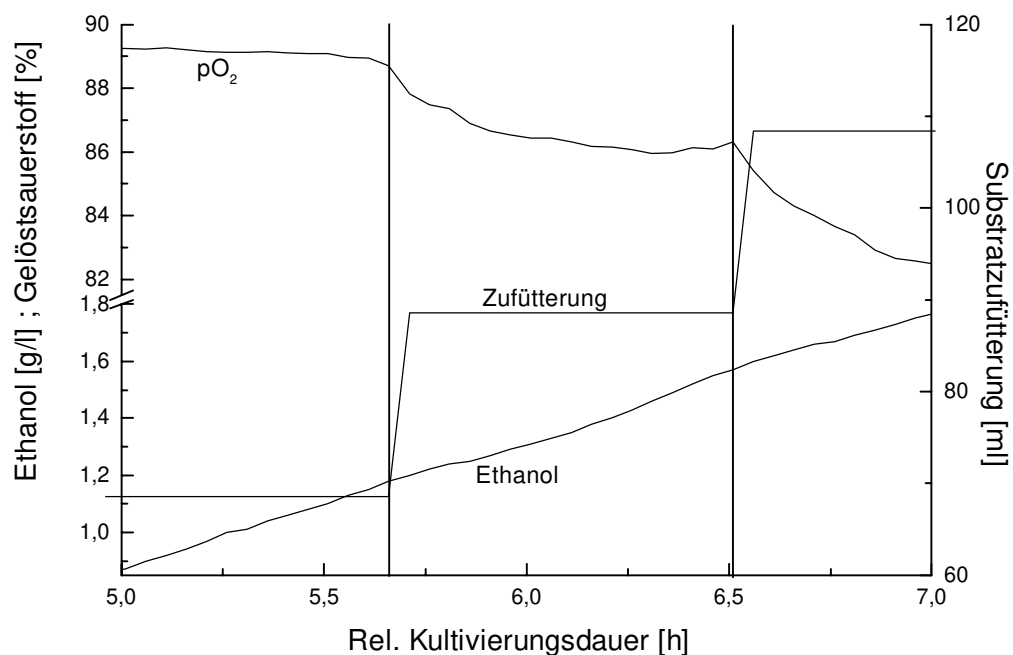


Abbildung 45: Zugabe von 20 ml Pulsen (Kultivierung 16084)

Zu Beginn der Kultivierung 16084 bei kleineren Pulsen wird der Hefemetabolismus einheitlicher, d.h. die geringeren Konzentrationsschwankungen lösen keine feststellbaren Umstellungen aus, sondern sind eher einer durchschnittlichen, ethanolbildenden Substratkonzentration vergleichbar. Im weiteren Kultivierungsverlauf ist der Sauerstoffbedarf der Hefen differenzierter auf die Pulse (Verlauf ähnlich zu den beiden

o.g. Kultivierungen 20044 und 27044). Es treten aber keine signifikanten Unterschiede in der Ethanolbildungs-/verbrauchsgeschwindigkeit auf.

Daher wurden Pulsgrößen gewählt, die sich zwischen 20 ml und 60 ml befinden, da in diesem Bereich die Grenze der metabolischen Reaktion auf die Konzentrationsdifferenzen innerhalb eines Substratpulses erwartet wurde. Bei der Kultivierung 06104 wurde Glucose in 30 ml Pulsen (0,75 g/l) und bei der Kultivierung 27104 in 40 ml Pulsen (1 g/l) zugegeben.

Daneben wurde die Meßwertaufnahmefrequenz erhöht (jede 10 s) und die Zuführung des Substrates innerhalb von 1 min bzw. 1min 20 s realisiert, um die Effekte noch genauer erfassen zu können.

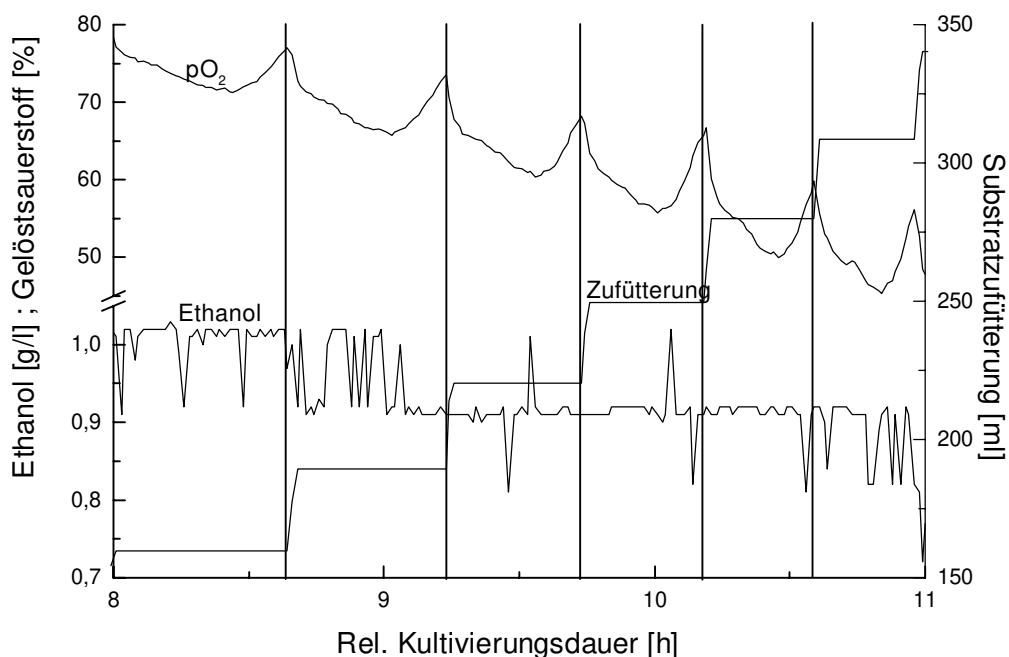


Abbildung 46: Zugabe von 30 ml Pulsen (Kultivierung 06104)

Eine direkte Zuordnung von wechselnder Substratkonzentration im Medium zu verändertem Metabolismus innerhalb der Zellen, konnte auch bei der Kultivierung 06104 mit 30 ml Pulsen nicht eindeutig festgestellt werden. Dies wird auch in Abbildung 46 deutlich. Der Verlauf der Gelöstsauerstoffkonzentration bietet nur wenige Ansatzpunkte, die auf Umstellungsprozesse schließen lassen. Die Ethanolkonzentration in der Abluft nimmt über die dargestellte Kultivierungszeit im Mittel ab, ein Verlauf innerhalb der Pulse ist trotz der häufigeren Meßwerte nicht eindeutig erkennbar. Die Bildung oder



Metabolisierung von Ethanol hängt von der erreichten Wachstumsrate sowie der Zellmorphologie/Umweltbedingungen und den Anzuchtbedingungen ab [45].

Die weitere Erhöhung der Konzentrationsschwankungen im Medium durch Vergrößerung der Pulse auf 40 ml (Kultivierung 27104) zeigt den Verlauf aus Abbildung 43. Es zeigen sich klarere Konzentrationsschwankungen als bei 20 bzw. 30 ml Pulsen, jedoch ist der Verlauf nicht so ausgeprägt wie bei größeren Glucosekonzentrationsänderungen im Medium (60 ml Pulse).

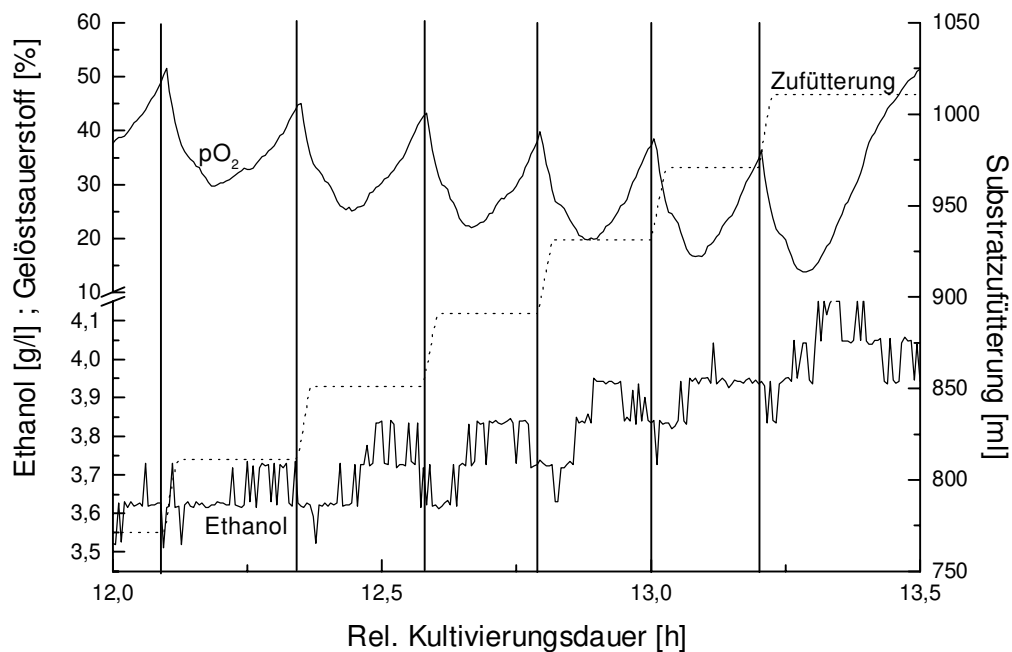


Abbildung 47: Bei Zugabe von 40 ml Pulsen (Kultivierung 27104)

Der Sauerstoffbedarf der Hefen bei der impulsweisen Zugabe von 40 ml Substrat ist schwächer differenziert, entsprechend der geringeren Konzentrationsschwankung von Glucose im Medium (im Vergleich zu 60 ml Pulsen). Die biologische Umschaltkonstante ist nach 13,2 h um eine Periode verschoben, so daß die Ethanolbildung zu Beginn des letzten dargestellten Pulses noch von der Umstellung des vorangehenden zu sehen ist. Ab diesem Zeitpunkt kann der Ethanolsensor, aufgrund der Dynamik der Änderungen, nur noch durchschnittliche Verläufe wiedergeben (analog Kap. 3.3.2., Abbildung 19). Der starke Anstieg im Gelöstsauerstoff am Ende des letzten, in der Abbildung 47 dargestellten Substratpulses, ist der Einfluß einer Drehzahlerhöhung, um

Sauerstofflimitierungen zu vermeiden. Der Erfolg einer solchen Vermeidungsstrategie ist durch die technische Ausrüstung und Betriebsbedingungen vorgegeben.

Die kritische Grenzkonzentration von Glucose im Medium könnte mit der dargestellten Methode, bei entsprechend schneller Analytik im dynamischen Prozeß erfaßt und auch andere biologische/kinetische Parameter untersucht werden. Die verschiedenen metabolischen Zustände schlagen sich neben den dargestellten (Gelöstsauerstoff, Ethanol) auch in Reaktionen anderer Sensoren mit unterschiedlichem Antwortverhalten nieder:

- Redoxpotential (teilweise durch die veränderte Medienzusammensetzung beeinflusst)
- Baseverbrauch zur Neutralisierung des pH-Wertes im Kultivierungsmedium (wichtiger Steuerparameter für Fuzzy-Expertensystem)
- Kulturfluoreszenz (intrazelluläre Änderungen) [2]
- Temperatur im Thermostatenkreislauf (Quantifizierung kalorimetrischer Effekte bei Verwendung von Chemostaten) [19, 32, 50].

Die Verzögerung setzt dem Einsatz dieser Sensoren bei der Analyse dynamischer Vorgänge eine Grenze, sie dienen gleichwohl als Ergänzung zur Beherrschung des Prozesses in Teilbereichen oder Grenzfällen. Daneben erhöhen sie die Informationsdichte und -vielfalt über den Prozeß allgemein und können je nach Zielsetzung und auch eventuell in Kombination zueinander, zu wichtigen Aussagen über den Prozeßzustand beitragen.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

In der Biotechnologie sind die Beziehungen von Ursache und Wirkung sehr komplex. Selbst bei Standardorganismen kann nur schwer zwischen biologischen und technischen Effekten unterschieden werden. Eine Vielzahl von Untersuchungen berichtet über Einzelphänomene unter speziellen Bedingungen, ohne Einflüsse zu berücksichtigen, die sich aus den Versuchsanordnungen und/oder Meßgeräten ergeben.

Die Entwicklung von biotechnologischen Referenzsystemen soll die Festlegung von Standardbedingungen durch das Setzen eines anerkannten Bezugspunktes voranbringen. Dabei müssen Erkenntnisse aller wissenschaftlichen Bereiche einfließen und eine Bewertung der Ergebnisse vornehmen, um die Zusammenhänge herauszuarbeiten. Analog könnten andere Erkenntnisse über den gemeinsamen Bezugspunkt in die Beschreibung verwandter Systeme einfließen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein biotechnologisches Referenzsystem an einem Standardorganismus *Saccharomyces cerevisiae* entwickelt. Dieser besitzt große ökonomische Bedeutung und wird als Wirtsorganismus in der Gentechnik häufig eingesetzt. Das System wurde aus Standardkomponenten aufgebaut, um als allgemeiner Bezugspunkt gelten zu können und umfaßt die Fermentationsanlage, das Prozeßmanagementsystem und die Kultivierungsbedingungen. Der ausgewählte Reaktormaßstab (10 L) ist eine Standardgröße, die beim Einsatz modifizierter Mikroorganismen für das notwendige Genehmigungsverfahren als Forschungsreaktor anzusehen. Sie bietet ausreichend Raum für eine, den Bedürfnissen des Prozesses/der Aufgabenstellung angepaßte, Instrumentierung. Die Zulauf-Satz-Kultivierung ist eine häufig angewandte Verfahrensweise in der biotechnologischen Industrie. Sie bietet darüber hinaus Informationen über Teilbereiche der zwei konkurrierenden Verfahrenswege (Batch, kontinuierlich) und ist somit für einen weiten Bereich aussagefähig. Die Anforderungen an die Genauigkeit der Meßwerte des Referenzsystemes liegen höher als mit diesen Standardkomponenten erreichbar ist.

Zur Messung von erforderlichen Vergleichsmeßwerte für Testgeräte wurde die Genauigkeit der Meßwerte durch modellgestützte Messung erhöht.. Die modellgestützte Messung ermöglicht reproduzierbar die genaue Einstellung und das Halten von Prozeßzuständen über längere Zeiträume sowie die gezielte Veränderung zwischen

verschiedenen Zuständen zum Test von Meßgeräten. Dabei erfolgt die Sensorbeurteilung nach Empfindlichkeit, Querempfindlichkeit und Genauigkeit der Meßwerte. Die Untersuchung verschiedener Meßverfahren und Sensoren wurde in Abhängigkeit zu unterschiedlichen Prozeßbedingungen vorgenommen und als mögliche Verbesserung des Prozeßmodells bewertet. Als Prozeßmodell wurde ein Hybridmodell eingesetzt, um sämtliches vorhandenes a priori Prozeßwissen und Informationen aller Abstraktionsebenen einbinden und nutzen zu können. Dabei wurde auf große Flexibilität geachtet, um eine Adaption an spezielle Aufgabenstellungen einfach, schnell und effektiv ausführen zu können.

Die Entwicklung des Fuzzy-Expertensystemes ermöglicht die Sicherstellung des voreingestellten, gewünschten Zustandes durch Rückkopplung von Zustandsgrößen, Beschreibung und Vorhersage, Das führt zu einer Prozeßstandardisierung und einer Minimierung der zur Steuerung notwendigen Instrumentierung. Die modulare Modellkonstruktion unterstützt die Wahl vieler verschiedener Größen als Prozeßleitvariable, und gewährleistet eine minimierte Anzahl von notwendigen Kultivierungen durch die umfassende Dokumentation von Daten sowie eine intelligente Prozeßsteuerung und Regelung.

Der wichtigste Parameter zur Steuerung eines biotechnologischen Prozesses ist in der Regel die spezifische Wachstumsrate  $\mu$ . Diese wird bei einfachen Prozessen direkt die Produktbildung wiedergeben und die Ausbeute eines Produktes bestimmen. Die Wachstumsrate als Zustandsgröße ist nicht direkt on-line zur Laufzeit des Prozesses meßbar, sondern nur über Informationen verschiedener Sensoren vom Modell zu berechnen. Da die Prozeßführung über Substratzugabe erfolgt, berechnet das Hybridmodell zu welchem Zeitpunkt der Kultivierung welche Substratmenge wieviel Biomasse ergibt. Schwankungen (+/- 10 %) können problemlos ausgeglichen werden.

Die Dynamisierung der Zufütterung erlaubt die Beurteilung der Informationsqualität und des dynamischen Verhaltens von Sensoren und Meßtechnik bezüglich interessierender Fragestellungen wie zum Beispiel die Eignung im realen biotechnologischen Prozeß, unter Berücksichtigung verschiedener Prozeßzustände. Es wurden Untersuchungen verschiedener Meßgeräte und -verfahren im Referenzsystem durchgeführt, die Antwortzeiten verschiedener Sensoren bezüglich der Erfassung biologischer Veränderungen, unter Definierung eines zeitlichen Referenzsignales klassifiziert, und die

Meßwertauflösung unterschiedlicher Meßgeräte für den Informationsgewinn des Prozeßmodelles bewertet. Das Ergebnis ist, daß zur Bestimmung indirekter Größen (Biomasse, Substratkonzentration) keines der untersuchten Meßverfahren einen Informationsgewinn zur Prozeßregelung bietet. Hauptproblem dabei ist die zeitliche Verzögerung der Probenanalyse oder die Beeinträchtigung der Meßgenauigkeit durch die gewählten Referenzbedingungen. Für die Messung von Zustandsgrößen kann der Vergleich zu den modellgestützten Meßwerten schnell die Genauigkeit des Verfahrens zeigen. Da das Prozeßmodell bei der Zustandsschätzung von der genauen Messung einiger wichtiger Zustandsgrößen abhängt, führt eine verbesserte Bestimmung dieser Größen zu einem genaueren, vollständigerem Prozeßmodell und Zustandsbeschreibung.

Dadurch können in diesem Bereich Weiterentwicklungsimpulse ausgelöst sowie eine verlässliche Aussage über den Zustand und Verlauf bei konkreten Prozessen gegeben werden. Daneben kann die dynamische Zufütterung zur Einschätzung von physiologischen Einflüssen auf das Reaktorsystem verwendet werden. Eine Überprüfung von Hypothesen bezüglich des Zellmetabolismus kann durch die leichtere Trennung unterschiedlicher Effekte zu schnelleren und aussagefähigeren Ergebnissen führen.

Die Untersuchung der Grenzsubstratkonzentrationen im Medium für die Ethanolbildung ergab, daß die maximale Glucosekonzentration unter den ständig wechselnden Verhältnissen in Bereichen liegt ( $< 1,5$  g/L), in denen bei statischer Substratzuführung metabolische Veränderungen nachgewiesen wurden. Der Übergang kann durch eine Substratkonzentration pro Zeiteinheit genauer charakterisiert werden.

Bei den Untersuchungen von Hefe-Kultivierungen in Grenzbereichen ergab sich die Anforderung, den Arbeitsbereich des Referenzsystemes zu erweitern. Bei Hochzell-dichtekultivierungen ist die maximale Ausbeute oft direkt vom maximalen Sauerstoffeintrag abhängig, d.h. daß jede Verbesserung über die normale Reaktorkonfiguration und die Betriebsbedingungen hinaus, bedeutet eine Steigerung der Produktivität. Durch den Einbau von Hohlblatt-Turbinensätzen (Verhältnis Turbinen- zu Reaktordurchmesser 2:1) wurde der Stoffübergang gegenüber der Standardkonfiguration verbessert und zu der gewünschten Erweiterung des Arbeits- und Einsatzbereiches des Referenzsystemes.

## 6. Anhang

### 6.1. Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

Ac	Essigsäurekonzentration im Fermenter
Ac <sub>0</sub>	Anfangswert der Essigsäurekonzentration im Fermenter
B	Basevolumen zur Neutralisation
BTM	Biotrockenmasse
C*	Sauerstoffkonzentration in der Gasphase
C <sub>0</sub>	Gelöstsauerstoffkonzentration zur Zeit t=0
C <sub>L</sub>	Gelöstsauerstoffkonzentration
CPR	Kohlendioxid-Produktionsrate
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
E, Et	Ethanolkonzentration
F	Zulaufmenge gesamt
F <sub>f</sub>	Zulaufmenge Zufütterung
FIA	Fließ-Injektions-Analyse
GC	Gaschromatograph
h	Stunde
IR	Infrarot
K	Korrekturterm
kHz	Kilohertz
k <sub>L</sub> a	integraler volumenbezogener Stoffübergangskoeffizient
(K)NN	(Künstliches) Neuronales Netz
koef	Koeffizient
l, L	Liter
M <sub>i</sub>	absolute Mengenangabe
min	Minute
OD	Optische Dichte
OTR	Sauerstofftransferrate
OUR	Sauerstoffverbrauchsrate
pO <sub>2</sub>	Gelöstsauerstoffkonzentration
Δ r	Differenzielle Änderungen der Reaktionsgeschwindigkeit
r <sub>i</sub>	Reaktionsgeschwindigkeit des Stoffes i

RQ	Respirationsquotient
Upm	Rührerdrehzahl pro Minute
S	Substratkonzentration im Fermenter
s	Sekunde
S <sub>0</sub>	Anfangswert der Substratkonzentration im Fermenter
S <sub>F</sub>	Substratkonzentration in der Zufütterungslösung
TCI	Institut für Technische Chemie Universität Hannover
V	Fermentervolumen
vvm	auf das Flüssigkeitsvolumen bezogene Begasungsrate pro Minute
w.E.	willkürliche Einheiten
X	Zelldichte
X <sub>0</sub>	Anfangswert Zelldichte
Y <sub>X/O</sub>	Ausbeutekoeffizient Sauerstoff - Zellmasse
Y <sub>X/S</sub>	Ausbeutekoeffizient Substrat - Zellmasse
μ	spezifische Rate der Biomasseproduktion
μ <sub>Set</sub>	Sollwert für spezifische Wachstumsrate
γ	Variable

## 6.2. Nährmedien und Puffer

Agarmedium für die Stammhaltung von *Saccharomyces cerevisiae*:

Hefeextrakt	4	g
Malzextrakt	10	g
Glucose	4	g
Agar	15	g

ad. 1000 ml dest. Wasser

Vollsynthetisches Kulturmedium für *Saccharomyces cerevisiae*

(Medienzusammensetzung je Gramm / L Glucose):

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	150	mg/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	480	mg/L
KCl	18	mg/L
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	15	mg/L
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	14	mg/L
FeCl <sub>3</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	0,5	mg/L

ZnSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,3 mg/L
MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	0,35 mg/L
CuSO <sub>4</sub> * 5 H <sub>2</sub> O	0,08 mg/L
m-Inosit	2 mg/L
Ca-Panthenon	1 mg/L
Vitamin B 1	0,2 mg/L
Vitamin B 6	0,05 mg/L
Biotin	0,001 mg/L

### 6.3. Geräteverzeichnis

Rundschüttler Vorkultur:	Labshaker ETI, Adolf Kühnar AG
Reaktor:	Biostat ED mit Kulturgefäß ES 10, B. Braun Diessel Biotech GmbH, Melsungen
Temperaturmessung:	PT 100 Widerstandsthermometer
pH-Wert:	Sterilisierbare Einstabmeßkette mit einer Ag/AgCl- Elektrode, Ingold Meßtechnik GmbH
Gelöstsauerstoffmessung:	Sterilisierbare, polarographische Elektrode (Ag-Anode, Pt- Kathode) mit gasdurchlässiger Membran (Clark-Prinzip), Ingold Meßtechnik GmbH
Redoxpotential:	Sterilisierbare Einstabmeßkette Ag/AgCl, Ingold Meßtechnik GmbH
Kulturfluoreszenz:	Fluorometer mit Glasfaseroptik, Ingold Meßtechnik GmbH
Abgasanalytik:	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Sauerstoff- und Kohlendioxidkonzentrationen: Gaschromatograph Shimadzu GC 9AM, Säule CTR)</li> <li>2. Sauerstoff- und Kohlendioxidkonzentrationen: Oxor 610 und Unor 610, Maihak AG</li> <li>3. Kohlendioxidkonzentrationen: Polytron IR CO<sub>2</sub>, Drägerwerk AG</li> <li>4. Ethanolkonzentrationen: Polytron IR EX, Drägerwerk AG</li> <li>5. Ethanolkonzentrationen: Halbleitersensor Figaro TGS 822 auf Basis der katalytischen Verbrennung, Figaro Engineering Inc., Osaka, Japan</li> </ol>



Glucosegehalt: Glucose-Analysator Modell 27, Yellow Springs  
Instruments  
Acetatkonzentration: GC Sigma 3b mit FID, Sigma 15 Integrator

## 6.4. Fuzzy-Expertensystem

### Linguistische Variablen:

Linguistische Variable 1: Name.  $r_B = (dB/dt)/B$   
 Min. Wert: 0,0000 Max. Wert: 0,5000

Term	Klein	Wenig	Mittel	Groß
Maximum der Gaussverteilung	0,0000	0,2000	0,3500	0,5000
Breite der Gaussverteilung	0,1000	0,1000	0,1500	0,1500
Laufende Var.-Nummer	1	2	3	4

Linguistische Variable 2: Name.  $r_E = (dE/dt)/B \cdot \text{koeff}$  koeff=16,0  
 Min. Wert: -0,3000 Max. Wert: 0,3000

Term	Klein	Wenig	Mittel	Groß
Maximum der Gaussverteilung	-0,3000	0,0500	0,1000	0,3000
Breite der Gaussverteilung	0,2000	0,0500	0,0500	0,2000
Laufende Var.-Nummer	5	6	7	8

Linguistische Variable 3: Name.  $\mu_{\text{set}}$   
 Min. Wert: 0,1000 Max. Wert: 0,2750

Term	Klein	Wenig	Mittel	Groß
Maximum der Gaussverteilung	0,1000	0,1500	0,2250	0,2750
Breite der Gaussverteilung	0,0500	0,0500	0,0500	0,0500
Laufende Var.-Nummer	9	10	11	12

Linguistische Variable 4 (Ausgabewert): Name. K  
 Min. Wert: -0,5000 Max. Wert: 0,5000

Term	Negativ	Null	Positiv
Maximum der Gaussverteilung	-0,5000	0,0000	0,5000
Breite der Gaussverteilung	0,5000	0,2500	0,5000
Laufende Var.-Nummer	A-1	A-2	A-3

### Fuzzy-Regelwerk

	WENN $r_B$	und WENN $r_E$	und WENN $\mu_{\text{set}}$	DANN K
Regel 1	1	5	9	A-3
Regel 2	1	6	9	A-2
Regel 3	1	7	9	A-1
Regel 4	1	8	9	A-1
Regel 5	2	5	9	A-3
Regel 6	2	6	9	A-2
Regel 7	2	7	9	A-1

Regel 8	2	8	9	A-1
Regel 9	3	5	9	A-2
Regel 10	3	6	9	A-1
Regel 11	3	7	9	A-1
Regel 12	3	8	9	A-1
Regel 13	4	5	9	A-2
Regel 14	4	6	9	A-1
Regel 15	4	7	9	A-1
Regel 16	4	8	9	A-1
Regel 17	1	5	10	A-3
Regel 18	1	6	10	A-2
Regel 19	1	7	10	A-1
Regel 20	1	8	10	A-1
Regel 21	2	5	10	A-3
Regel 22	2	6	10	A-2
Regel 23	2	7	10	A-1
Regel 24	2	8	10	A-1
Regel 25	3	5	10	A-2
Regel 26	3	6	10	A-1
Regel 27	3	7	10	A-1
Regel 28	3	8	10	A-1
Regel 29	4	5	10	A-2
Regel 30	4	6	10	A-1
Regel 31	4	7	10	A-1
Regel 32	4	8	10	A-1
Regel 33	1	5	11	A-3
Regel 34	1	6	11	A-2
Regel 35	1	7	11	A-1
Regel 36	1	8	11	A-1
Regel 37	2	5	11	A-3
Regel 38	2	6	11	A-2
Regel 39	2	7	11	A-1
Regel 40	2	8	11	A-1
Regel 41	3	5	11	A-3
Regel 42	3	6	11	A-2
Regel 43	3	7	11	A-1
Regel 44	3	8	11	A-1
Regel 45	4	5	11	A-3
Regel 46	4	6	11	A-2
Regel 47	4	7	11	A-1
Regel 48	4	8	11	A-1
Regel 49	1	5	12	A-3
Regel 50	1	6	12	A-3
Regel 51	1	7	12	A-1
Regel 52	1	8	12	A-1
Regel 53	2	5	12	A-3
Regel 54	2	6	12	A-3
Regel 55	2	7	12	A-3
Regel 56	2	8	12	A-2
Regel 57	3	5	12	A-3
Regel 58	3	6	12	A-3
Regel 59	3	7	12	A-3
Regel 60	3	8	12	A-2
Regel 61	4	5	12	A-3
Regel 62	4	6	12	A-3
Regel 63	4	7	12	A-3
Regel 64	4	8	12	A-2

## 6.5. pO<sub>2</sub>-Kontrollroutine

Programmkode der Regelungsroutine (in Fortran):

```

Subroutine po2_control0(t,po2f,mot_pow,stirr,air)
c   Regelung von pO2 mit Hilfe von Rührerdrehzahl und Begasungsrate
c   Variablendeklaration
  implicit none
  real t,po2a,po2_soll,mot_pow,stirr,air,stirr_max,air_max
  real rt,dt,ta,a,mot_max,ra,po2f,dair,otr,delta,istirr
  integer iflag
c   Obergrenzen der Regelung
  stirr_max=900
  air_max=15.0
  mot_max=92
  istirr=0.25
  dair=0.0050
  rt=0.01500
  po2_soll=20.0
c   Maßnahme zur Vermeidung von Problemen bei der Motordauerleistung
  if(mot_pow.gt.97.5) stirr=stirr-10.0
c   Startbedingungen
  if(t.lt.8.5) then
    air=4.0
    stirr=350.0
    ta=t
    po2a=po2f
    iflag=1
    return
  end if
  dt=t-ta
  if(dt.lt.0.0) dt=0.0
c   pO2 Niedrigfrequenz-Filter
c   (zur Vermeidung von Überreaktionen bei verzögerter Anpassung der
c   Reaktorbedingungen)
  ta=t
  a=dt/rt
  if(a.gt.1.0) a=1.0
  po2f=a*po2f+(1-a)*po2a
  po2a=po2f
c   Regelungsteil
  if(po2f.lt.(po2_soll+5.0)) then
    if(iflag.eq.1) then
      iflag=2
      if(mot_pow.lt.mot_max) then
        delta=istirr+istirr*.01*((po2_soll+5.0)-po2f)**2
        if(delta.gt.15) delta=15
        stirr=stirr+delta
        if(stirr.gt.stirr_max) stirr=stirr_max
      end if
    else

```

```

        iflag=1
        if(air.lt.air_max) then
            delta=dair+dair*0.01*((po2_soll+5.0)-po2f)**2
            if(delta.gt.0.25) delta=0.25
            air=air+delta
            if(air.gt.air_max) air=air_max
        end if
    end if
end if
791  continue
    return
end

```

Diese Subroutine (subroutine po2\_control0) wird von einem Arbeitskontrollblock des Prozeßmanagementsystems RISP aus aufgerufen. Der Programmcode des AKB sieht folgendermaßen aus:

```

c      Inputwerte besorgen
      rtime=fertim()
      rpo2=gaval('PO2_____')
      rmotpow=gaval('MOTPOW__')
      rstirr=gaout('STIRR___')
      rairfl=gaout('AIRFL___')
c      Controller aufrufen
      call po2_control0(rtime,rpo2,rmotpow,rstirr,rairfl)
      lacalc=rstirr
      laout=rairfl

```

## 7. Literaturverzeichnis

- [1] Abel, C.; Hübner, U.; Schügerl, K.: Transient behaviour of baker's yeast during enforced periodical variation of dissolved oxygen concentration. *Journal of Biotechnology*, 32, 1994, 45-57
- [2] Abel, C.; Linz, F.; Scheper, T.; Schügerl, K.: Transient behaviour of baker's yeast during enforced periodical variation of dissolved oxygen concentration and glucose concentrations. *Journal of Biotechnology*, 33, 1994, 183-193
- [3] Behrendt, J.: Aufbau und Einsatz des datenorientierten Prozeßmanagementsystems CIF. *Fortschritt-Berichte VDI Reihe 20, Nr. 64*, Düsseldorf: VDI-Verlag 1992
- [4] Bericht: Die Gene der Hefe liegen offen da. *Standort Chemie* 9, 1996, 16
- [5] Chen, C.I.; McDonald, K.A.: Oscillatory Behavior of *Saccharomyces cerevisiae* in Continuous Culture: I) Effects of pH and Nitrogen Levels; II) Analysis of Cell Synchronisation and Metabolism. *Biotechnology and Bioengineering*, 36, 1990, 19-38, John Wiley & Sons, Inc.
- [6] Coppella; S.J.; Dhurjati; P.: A Detailed Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Growth Kinetics in Batch, Fed.Batch, and Hollow-fiber Bioreactors. *Chemical Engineering Journal*, 41, 1989, B27-B35
- [7] Dechema: Studien zur Forschung und Entwicklung: Arbeitsmethoden für die Biotechnologie. Referenz-Bioreaktoren - Vergleichstests für Fermentationen - Sichere Biotechnologie, Frankfurt 1982
- [8] Einsele, A.; Ristroph, D. L.; Humphrey, A. E.: Mixing times and glucose uptake measured with a fluorometer. *Biotechnology Bioengineering*, 20, 1978, 1487-1492
- [9] Elliot, S.G.; McLaughlin, C.S.: The Yeast Cell Cycle: Coordination of Growth and Division Rates. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 28, 143-176, 1983

- [10] Gerlach, D.: Zur Beurteilung von Meßgeräten in biotechnologischen Prozessen. Dissertation Universität Hannover, 1996
- [11] Handbook of chemistry and physics. Weast 56th Edition, 1975-76, CRC-Press, Cleveland-Ohio
- [12] Harnby, N.; Edwards, M. F.; Nienow, A. W.: Mixing in the process industries. Butterworth-Heinemann, 1992, ISBN 0 7506 3760 9
- [13] Hay, J. D.: Novel yeast products from fermentation processes. Journal of Chemical Technology Biotechnology, 58, 1993, 203-205
- [14] <http://www.esb.ucp.pt/~bungah/contin/ethanols.htm> in 8/97.
- [15] Käppeli, O.; Sonnleitner, B.: Regulation of sugar metabolism in *Saccharomyces*-type yeast: Experimental and conceptual considerations. Crit. Rev. Biotechnol. 4 (1986), 3 ,299-326
- [16] Kohls, O.: Optische Sauerstoffsensoren. Dissertation Universität Hannover, 1995
- [17] Könneke, R.: Biosensoren mit reversibel und koppelbaren Enzymen. Diplomarbeit Universität Hannover, 1995
- [18] Kuhlmann, W.: Untersuchungen zur On-line-Prozeßlenkung der satzweisen und kontinuierlichen Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation Universität Hannover, 1983
- [19] Larsson, C.; Lidén, G.; Niklasson, C.; Gustafsson, L.: Calorimetric control of fed-batch cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. Bioprocess Engineering, 7, 1991, 151-155
- [20] Lehmann, J.; Nothnagel, J.; Piehl, H.; Schultze, R.; Steven, W.: Measurement of the solubility of oxygen during fermentations. Adv. Biotechnol. (Proc.Int.Ferment.Symp.) 6th, 1980, 1, 453-455
- [21] Leonard, J.A.; Kramer, M. A.; Ungar, L. H.: A neural network architecture that computes its own reliability. Comp. Chemical Engineering, 16, 1992, 819-835

- [22] Levisauskas, D.; Simutis, R.; Borvitz, D.; Lübbert, A.: Automatic control of the specific growth rate in fed-batch cultivation processes based on an exhaust gas analysis. *Bioprocess engineering*, 15, 1996, 145-150
- [23] Lievens, J.C.: An Investigation of the Aerobic, Glucose-limited Growth and Dynamics of *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation Purdue University, USA 1984
- [24] Linek, V.; Vacek, V.; Benes, P.: A critical review and experimental verification of the correct use of the dynamic method for the determination of oxygen transfer in aerated agitated vessels to water, electrolyte solutions and viscous liquids. *Chem. Eng. J.* 34, 1987, 11-34
- [25] Locher, G.; Hahnemann, U.; Sonnleitner, B.; Fiechter, A.: Automatic bioprocess control. 5. Biologically and technically caused effects during cultivation. *Journal of Biotechnology*, 29, 1993, 75-89
- [26] Lübbert, A.; Simutis, R.: Adequate use of measuring data in bioprocess modelling and control. *Trends in biotechnology*, 12, 1994, 304-311
- [27] Lübbert, A.; Simutis, R.: Using measurement data in bioprocess modelling and control. *Tibtech*, 12, 1994, 304-311
- [28] Münch, T.; Sonnleitner, B.; Fiechter, A.: New insights into the synchronization mechanism with forced synchronous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*, 24, 1992, 299-314
- [29] Nahas, E. P.; Henson, M. A.; Seborg, D.E.: Nonlinear internal model control strategy for neuronal network models. *Comp. Chemical Engineering*, 16, 1992, 1039-1057
- [30] Nielsen, J.; Villadsen, J.: *Bioreaction Engineering Principles*. Plenum Publishing Corporation, New York + London, 1994
- [31] Pons, M.-N.; Rajab, A.; Engasser J.-M.: Influence of acetate on growth kinetics and production of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose and ethanol. *Applied Microbial Biotechnology*, 24, 1986, 193-198

- [32] Randolph, T. W.; Marison, I. W.; Martens, D. E.; von Stockar, U.: Calorimetric control of fed-batch fermentations. *Biotechnology Bioengineering*, 36, 1990, 678-684
- [33] Robinson, C. W.; Wilke, C. R.: Oxygen absorption in stirred tanks: A correlation for ionic strength effects. *Biotechnology and Bioengineering*, 15, 1973, 755-782
- [34] Rumelhart, D. E.; Hinton, G. E.; Williams, R. J.: Learning internal representations by error propagation - Parallel Distributed Processing - Exploration in the Microstructure of cognition. MIT press, Cambridge MA, 1986
- [35] Schlüter, V.; Deckwer, W.-D.: Power input, mixing and mass transfer in bioreactors with single and multiple stirrers. *Bioreactor and bioprocess fluid dynamics*, 1993, 117-133, ISBN 0 7506 1110 3
- [36] Schmidt, J.; Anders, K.D.; Scheper, T.; Lübbert, A.: Dynamics of local oxygen absorption in an airlift-loop reactor. *Chem.-Ing. Techn.* 64, 1992, 6, 568-569
- [37] Schmidt, J.; Detaillierte Untersuchung der lokalen Vermischung in Blasenströmungen. *Fortschritt-Berichte VDI Reihe 3, Nr. 362*, Düsseldorf: VDI-Verlag 1994
- [38] Schubert, J.: Verbesserung der Schaumbeherrschung bei der Hefekultivierung durch Umrüstung eines Norm-Bioreaktors und modellgestützte Optimierung seiner Prozeßführung. *Fortschritt-Berichte VDI Reihe 3, Nr. 367*, Düsseldorf: VDI-Verlag 1994
- [39] Schubert, J.; Simutis, R.; Dors, M.; Havlik, I.; Lübbert, A.: Hybrid modelling of yeast production processes - Combination of a priori knowledge on different levels of sophistication. *Chemical Engineering Technology*, 17, 1994, 10-20
- [40] Schubert, J.; Simutis, R.; Dors, M.; Havlik, I.; Lübbert, A.: Bioprocess optimization and control. *Journal of biotechnology*, 35, 1994, 51-68
- [41] Schumpe, A.: Zur Ermittlung von Stoffübergangszahlen auf der Basis von Gelöstsauerstoff-Messungen. *Chem.-Ing.-Techn.* 57, 1985, 6, 501-507



- [42] Simutis, R.; Havlik, I.; Lübbert, A.: Distributed modelling for the process state estimation and prediction during a production scale beer fermentation using fuzzy aided extended Kalman Filters and Neuronal Networks. Modelling and control of biotechnical processes, Karim, M.N., Stephanopoulos, G., eds., Pergamon Press, Oxford, 1992, 95-100
- [43] Simutis, R.; Havlik, I.; Schneider, F.; Dors, M.; Lübbert, A.: Artificial neural networks of improved reliability for industrial process supervision. Proceedings of the 6th International Conference of Computer Application in Biotechnology, in: Munack, A.; Schügerl, K.; eds.; IFAC, EFB, VDI, Dechema; Frankfurt, 1995, 59-65
- [44] Simutis, R.; Oliveira, R.; Manikowski, M.; Feyerherm, S.; Lübbert, A.: How to increase the performance of models for process optimization and control. Journal of Biotechnology, 59, 1997, 73-89
- [45] Sonnleitner, B.; Hahnemann, U.: Dynamics of the respiratory Bottleneck of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biotechnology, 38, 1994, 63-79
- [46] Sonnleitner, B.; Käppli, O.: Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is Controlled by its Limited Respiratory Capacity: Formulation and Verification of a Hypothesis. Biotechnology and Bioengineering, 28, 1986, 927-937
- [47] Sweere, A. P. J.; Matla, Y. A.; Zanvliet, J.; Luyben, K. Ch. A. M.; Kossen, N. W. F.: Experimental simulation of glucose fluctuations. Application Microbiology Biotechnology, 28, 1988, 109- 115
- [48] Tybussek, R.: Untersuchungen zum Flotationsverhalten von *Saccharomyces cerevisiae* . Dissertation Universität Hannover, 1990
- [49] Venus, J.; Wolf, K.-H.: Zum Stoffaustausch Gas/Flüssigkeit in Reaktoren mit mehretagigem Rührsystem. Chem.-Ing.-Tech., 63, 1991, Nr. 2, 168-169
- [50] von Stockar, U.; Birou, B.: The heat generated by yeast cultures with a mixed metabolism in the transition between respiration and fermentation. Biotechnology Bioengineering, 34, 1989, 86-101

- [51] Ziegler, J. G.; Nichols, N. B.: Optimum settings for automatic controllers. Trans. ASME, 64, 1942, 759-768

## 8. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name                      Borvitz  
 Vorname                 Dieter  
 Geburtsdatum         11.04.1965 in Hannover

### Schulausbildung

08/ 71 - 07/ 75         Grundschule in Hannover  
 08/ 75 - 06/ 84         Lutherschule in Hannover, Abschluß Abitur

### Wehrdienst

07/ 84 - 10/ 85         15-monatiger Grundwehrdienst in Hannover

### Berufsausbildung

10/ 85 - 04/ 93         Chemiestudium an der Universität Hannover  
 04/ 89                    Vordiplom  
 10/ 92                    Hauptdiplom  
 11/ 92 - 04/ 93         Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie  
 10/ 93                    Beginn der Promotion am Institut für Technische Chemie  
 09/ 96                    Fortbildungslehrgang „Gentechnische Sicherheit“  
 11/ 96 - 11/ 97         Fortbildungslehrgang „Technisches Projektmanagement“ am  
                               Berufsbildungszentrum für informationsverarbeitende Berufe

### Berufserfahrung

10/ 88 - 03/ 89         Praktikumsbetreuung in der MHH  
 02/ 94 - 11/ 94 ; 07/ 95 - 11/ 95 ; 03/ 96 - 05/ 96  
                               Wissenschaftl. Mitarbeiter am Institut für Techn. Chemie  
 09/97 - 01/98         Praktikum bei ContiTech Antriebssysteme GmbH, Hannover  
 Seit    02/98            Mitarbeiter bei ContiTech Antriebssysteme GmbH, Hannover