

Dipl.-Wirtsch.-Ing. Eduard Peter

Modellbasierte prädiktive
Bestimmung des Zeitpunktes
maximaler Säuerungsaktivität von
Streptococcus thermophilus in
einer frühen Phase der
Fermentation als Starterkultur

**Modellbasierte prädiktive
Bestimmung des Zeitpunktes
maximaler Säuerungsaktivität von
Streptococcus thermophilus in
einer frühen Phase der
Fermentation als Starterkultur**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Ingenieurwissenschaften

(Dr.-Ing.)

der Technischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Dipl.-Wirtsch.-Ing. Eduard Peter

Kiel

2016

- | | |
|-------------------------------|--------------------------------------|
| 1. Gutachter: | Prof. Dr.-Ing. Helmut Röck |
| 2. Gutachter: | Prof. Dr.-Ing. habil. Thomas Meurer |
| 3. Gutachter: | Prof. Dr.-Ing. habil. Kerstin Thurow |
| Datum der mündlichen Prüfung: | 28. Oktober 2016 |

Kurzfassung

Im industriellen Fermentationsprozess zur Herstellung des Bakteriums *Streptococcus thermophilus* als Starterkultur der Milchverarbeitenden Industrie hängt der Prozess-erfolg im entscheidenden Maße vom richtigen Zeitpunkt der Biomassenernte ab. Als Kriterium wird der Prozesszeitpunkt gewählt, zu dem die Säuerungsaktivität der Zellpopulation maximal ist.

Unterschiedliche qualitative Eigenschaften der verwendeten Vorkulturen führen oft zu abweichenden Entwicklungen der Folgekulturen während der Fermentation, wodurch der betrachtete Erntezeitpunkt nicht reproduzierbar wird. Deshalb muss dieser Parameter für jeden Fermentationslauf individuell und zeitnah detektiert werden.

Ein größeres Potential zur Prozessoptimierung, aber auch zur Prozessentwicklung eröffnet sich, wenn dieser prozesskritische Parameter frühzeitig und zuverlässig vorherbestimmt werden kann. Aus diesem Grund soll in dieser Arbeit ein modellgestütztes Verfahren entwickelt werden, mit dem es möglich ist, den gefragten Zeitpunkt in einer frühen Phase der Fermentation prädiktiv bestimmen zu können.

Ein dynamisches Prozessmodell, das die Systemzustände Keimzahl, Konzentration des Produkts Milchsäure sowie des Substrats Lactose beschreibt, wird als Simulator eingesetzt, um über die Simulation der Milchsäurebildungsgeschwindigkeit den Verlauf der bakteriellen Säuerungsaktivität vorherbestimmen zu können. Das Modell wird mit Hilfe einer optimierungsbasierten Methodik über die Messwerte der pH-Wert-Absenkung in der Anfangsphase der Kultivierung auf den laufenden Prozess eingestellt und der Prozessverlauf im Anschluss simuliert.

Der Kurvenverlauf der pH-Wert-Absenkung ist ein online zugängliches Kriterium im Prozess, das hilft, Abweichungen der Säuerungsaktivität schon früh in einer Fermentation zu erkennen. Dabei gelingt es, aus dem pH-Wert-Verlauf über das Prozessmodell in Verbindung mit einem Messmodell, das die pH-Eigenschaften der Kulturlösung approximiert, eine Anfangskeimzahl zu bestimmen, die für die betrachtete Fermentation repräsentativ ist und aus deren Unsicherheit sich Schwankungen des gesuchten Zeitpunktes erklären. Auf diese Weise lässt sich der kultivierungsabhängige Anfangszustand der Bakterienkultur im Prozessmodell berücksichtigen.

Die Ergebnisse der Erprobung des Verfahrens mit Daten aus experimentellen Fermentationen von *Streptococcus thermophilus* zeigen seine hohe Vorhersagegüte. Es gelingt weiter, die Methodik auf den industriellen Fermentationsprozess des gleichen Stammes sowie von zwei weiteren Stämmen des Bakteriums erfolgreich zu übertragen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Motivation	1
1.2	Lösungsansatz	3
1.3	Zielsetzung	6
1.4	Gliederung	8
2	Grundlagen	11
2.1	Mikroorganismen für die Lebensmittelherstellung	11
2.2	Milchsäurebakterien	14
2.2.1	Gemeinsame Merkmale	14
2.2.2	Unterscheidungsmerkmale	16
2.2.3	Praktische Bedeutung der Milchsäurebakterien	18
2.3	<i>Streptococcus thermophilus</i>	19
2.3.1	Merkmale	19
2.3.2	Energiestoffwechsel	19
2.3.3	Zellvermehrung	22
2.3.4	Industrielle Anwendung als Starterkultur	23
2.3.5	Industrielle Herstellung als Starterkultur	25
3	Experimenteller Kultivierungsprozess	31
3.1	Prozessmaterial und Versuchsbedingungen	31
3.1.1	Organismus	31
3.1.2	Vorkultur	31
3.1.3	Nährmedium	32

3.1.4	Kultivierungsbedingungen	33
3.2	Prozessumgebung	34
3.2.1	Fermenteranlage	36
3.2.2	Mess- und Regelungssystem	36
3.2.3	Prozessleitsystem	36
3.3	Prozessanalytik	36
3.3.1	Online-Messtechnik	38
3.3.2	Offline-Analysen	41
3.4	Prozessablauf	45
4	Modellbildung	49
4.1	Allgemeines	49
4.2	Modellierung des Kultivierungsprozesses	51
4.2.1	Modellierungskonzepte für mikrobielle Systeme	52
4.2.2	Bakterielles Wachstum	53
4.2.3	Produktbildung	58
4.2.4	Substratverbrauch	59
4.2.5	Gleichungen des Prozessmodells	59
4.3	Modellierung des pH-Wertes	60
4.3.1	Grundlagen	60
4.3.2	pH-Modell eines allgemeinen Säure-Base-Systems	66
4.3.3	Übertragung der Methodik auf die spezifische Kulturlösung	70
4.3.4	Gleichungen des pH-Modells	73
4.4	Parameteridentifikation	75
4.4.1	Formulierung der Optimierungsaufgabe	75
4.4.2	Gütekriterium	76
4.4.3	Optimierungsalgorithmus	76
4.4.4	Aufstellung der Optimierungsaufgabe für das Prozessmodell	78

4.4.5	Aufstellung der Optimierungsaufgabe für das pH-Modell . . .	81
4.4.6	Ablauf der Parameteridentifikation	83
4.4.7	Parameterwerte	88
4.5	Validierung	89
4.5.1	Ergebnisse für das Prozessmodell	89
4.5.2	Ergebnisse für das pH-Modell	93
5	Prädiktive Bestimmung des Zeitpunktes maximaler Säuerungsaktivität	99
5.1	Methodik	99
5.1.1	Verknüpfung der Einzelmodelle zum Gesamtprozessmodell . .	99
5.1.2	Einfluss der Größen $c_{x,0}$ und t_{lag} auf die Simulationsergebnisse	101
5.1.3	Einstellung der kultivierungsabhängigen Modellgrößen auf das Prozessgeschehen	106
5.2	Erprobung des prädiktiven Verfahrens	109
5.2.1	Bestimmung des tatsächlichen Zeitpunktes maximaler Säuerungsaktivität aus Messdaten	109
5.2.2	Generierung der experimentellen Testdaten	113
5.2.3	Ablauf des prädiktiven Verfahrens	114
5.3	Ergebnisse für den experimentellen Kultivierungsprozess	116
5.4	Übertragung der Methodik auf den industriellen Prozess	124
5.4.1	Ergebnisse für den Stamm <i>Streptococcus thermophilus</i> 1974 . .	126
5.4.2	Ergebnisse für den Stamm <i>Streptococcus thermophilus</i> F3 . . .	133
5.4.3	Ergebnisse für den Stamm <i>Streptococcus thermophilus</i> F4 . . .	136
6	Zusammenfassung und Ausblick	143
A	Lösungsverfahren für die Polynomgleichung des pH-Modells	151
B	Downhill-Simplex-Algorithmus	157
	Literaturverzeichnis	163

Abbildungsverzeichnis

1.1	Unterscheidung von unregelter und geregelter Phase des pH-Wert-Verlaufs in Fermentationen von <i>Streptococcus thermophilus</i>	4
1.2	Messkurven der pH-Wert-Absenkung in Produktionsfermentationen von <i>Streptococcus thermophilus</i>	5
2.1	Schema biotechnologischer Herstellung fermentierter Lebensmittel mit Hilfe von Mikroorganismen	12
2.2	Umwandlung von Lactose in Milchsäure durch Milchsäurebakterien .	16
2.3	Strukturformel der L(+)-Milchsäure und der D(-)-Milchsäure	17
2.4	Mikroskopische Aufnahme des Bakteriums <i>Streptococcus thermophilus</i>	20
2.5	Energiegewinnung im Stoffwechsel von <i>Streptococcus thermophilus</i> beim Abbau von Lactose zu Lactat über die Glycolyse	21
2.6	Zentraler Stoffwechselweg von <i>Streptococcus thermophilus</i>	22
2.7	Vorgang der Zellteilung bei einem Bakterium	24
2.8	Vermehrung von <i>Streptococcus thermophilus</i>	24
2.9	Mikroskopische Aufnahme des Bakteriums <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	25
2.10	Schematische Darstellung des Prozesses zur Herstellung von Starterkulturen	26
2.11	Phasen und wichtige Verfahrensschritte des industriellen Prozesses zur Herstellung von <i>Streptococcus thermophilus</i> als Starterkultur	29
3.1	Komponenten der biotechnologischen Versuchsanlage	35
3.2	Laborfermenter mit Zugabeeinheiten und Messinstrumenten	37
3.3	Charakteristische Verläufe von online zur Verfügung stehenden Größen pH-Wert, Laugenverbrauch und elektrolytische Leitfähigkeit	39
3.4	Charakteristische Verläufe der durch Offline-Analysen bestimmten Größen Keimzahl, Milchsäure- und Lactosekonzentration	42

3.5	Petrischale mit kolonienbildenden Einheiten des Bakteriums <i>Streptococcus thermophilus</i> auf Lactic-Agar	43
3.6	Schematische Darstellung einer Brechungsindexmessung	45
4.1	Allgemeines Ablaufschema der mathematischen Modellbildung	50
4.2	Unterscheidung der Wachstumsphasen	54
4.3	Zusammenhang zwischen Milchsäurekonzentration und Lactosekonzentration	60
4.4	Blockdiagramm der Parameteridentifikation	79
4.5	Ablaufschema der strukturierten Parameteridentifikation	85
4.6	Verlauf des pH-Wertes in Versuchen mit und ohne pH-Wert-Regelung	86
4.7	Verläufe von Keimzahl, Milchsäure- und Lactosekonzentration in Versuchen mit und ohne pH-Wert-Regelung	87
4.8	Vergleich von Simulation und Messergebnissen, Versuch ct20091111, 1%ige Inokulation	90
4.9	Vergleich von Simulation und Messergebnissen, Versuch ct20100317, 0.5%ige Inokulation	91
4.10	Vergleich von Simulation und Messergebnissen, Versuch ct20100217, 2%ige Inokulation	92
4.11	Vergleich von gemessener und modellierter pH-Wert-Absenkung, Versuch ct20091111, 1%ige Inokulation	95
4.12	Vergleich von gemessener und modellierter pH-Wert-Absenkung, Versuch ct20110317 ohne pH-Wert-Regelung, 1%ige Inokulation	95
4.13	Vergleich von gemessener und modellierter pH-Wert-Absenkung, Versuch ct20100317, 0.5%ige Inokulation	96
4.14	Vergleich von gemessener und modellierter pH-Wert-Absenkung, Versuch ct20100217, 2%ige Inokulation	96
5.1	Verknüpfung des Prozessmodells und des pH-Modells zum Gesamtprozessmodell	100
5.2	Einfluss der Anfangskeimzahl $c_{x,0}$ auf die Verläufe von Keimzahl, Milchsäure- und Lactosekonzentration	103
5.3	Einfluss des Parameters t_{lag} auf die Verläufe von Keimzahl, Milchsäure- und Lactosekonzentration	104

5.4	Einfluss der Anfangskeimzahl $c_{x,0}$ auf die pH-Wert-Absenkung	105
5.5	Einfluss des Parameters t_{lag} auf die pH-Wert-Absenkung	105
5.6	Blockdiagramm des Prozesses zur Anpassung der berechneten pH-Wert-Absenkung an Messdaten	107
5.7	Verläufe der Milchsäurekonzentration und des Laugenverbrauchs	111
5.8	Verläufe der Milchsäurekonzentration und der Leitfähigkeit	111
5.9	Vergleich von Milchsäurekurven in Versuchen mit abweichenden Inokulationsmengen	115
5.10	Vergleich von Messkurven der pH-Wert-Absenkung in Versuchen mit abweichenden Inokulationsmengen	115
5.11	Vergleich von Simulation und Messergebnissen, Versuch ct20100317, 0.5%ige Inokulation	117
5.12	Vergleich von Simulation und Messergebnissen, Versuch ct20091111, 1%ige Inokulation	118
5.13	Vergleich von Simulation und Messergebnissen, Versuch ct20110622, 1%ige Inokulation	119
5.14	Vergleich von Simulation und Messergebnissen, Versuch ct20100217, 2%ige Inokulation	120
5.15	Vergleich von Simulation und Messergebnissen, Versuch ct20100421, 3%ige Inokulation	121
5.16	Vergleich von Simulation und Messergebnissen, Versuch ct20100310, 4%ige Inokulation	122
5.17	Periodische Laugenzudosierung	125
5.18	Vergleich von Simulation und Messergebnissen für den Stamm <i>Streptococcus thermophilus</i> 1974, Fermentationen 4110935869, 4111145864, 4111074371	128
5.19	Vergleich von Simulation und Messergebnissen für den Stamm <i>Streptococcus thermophilus</i> 1974, Fermentationen 4111237443, 4111057671, 4111284834	129
5.20	Einfluss des Parameters μ_{max} auf die Verläufe von Keimzahl, Milchsäure- und Lactosekonzentration	131
5.21	Vergleich von Simulation und Messergebnissen für den Stamm <i>Streptococcus thermophilus</i> 1974 nach Anpassung von μ_{max} , Fermentationen 4110935869, 4111145864, 4111074371	134

5.22	Vergleich von Simulation und Messergebnissen für den Stamm <i>Streptococcus thermophilus</i> 1974 nach Anpassung von μ_{\max} , Fermentationen 4111237443, 4111057671, 4111284834	135
5.23	Vergleich von Simulation und Messergebnissen für den Stamm <i>Streptococcus thermophilus</i> F3, Fermentationen 4111102366, 4111229499, 4111221784	137
5.24	Vergleich von Simulation und Messergebnissen für den Stamm <i>Streptococcus thermophilus</i> F3, Fermentationen 4110869515, 4111372236, 4111302019	138
5.25	Vergleich von Simulation und Messergebnissen für den Stamm <i>Streptococcus thermophilus</i> F4, Fermentationen 4110939399, 4110954185, 4111332748	140
5.26	Vergleich von Simulation und Messergebnissen für den Stamm <i>Streptococcus thermophilus</i> F4, Fermentationen 4111170743, 4111036912, 4111440746	141
B.1	Illustration der geometrischen Operationen beim Downhill-Simplex-Algorithmus für den zweidimensionalen Fall	161

Tabellenverzeichnis

2.1	Erwünschte Wirkungen von Mikroorganismen in Lebensmitteln	15
3.1	Rezeptur des Nährmediums für experimentelle Fermentationen von <i>Streptococcus thermophilus</i>	33
3.2	Kultivierungsbedingungen für Standardfermentationen von <i>Streptococcus thermophilus</i>	34
4.1	Beschränkung der Wertebereiche für die Identifikation des dynamischen Prozessmodells	82
4.2	Beschränkung der Wertebereiche für die Identifikation des pH-Modells	83
4.3	Ergebnisse der Parameterschätzung für das dynamische Prozessmodell	88
4.4	Ergebnisse der Parameterschätzung für das pH-Modell	88
5.1	Beschränkung der Wertebereiche für die anzupassenden Größen im Gesamtprozessmodell	108
5.2	Ergebnisse der prädiktiven Bestimmung des Zeitpunktes maximaler Säuerungsaktivität für experimentelle Fermentationen von <i>Streptococcus thermophilus</i> 1974	123
5.3	Ergebnisse der prädiktiven Bestimmung des Zeitpunktes maximaler Säuerungsaktivität für Produktionsfermentationen des Stammes <i>Streptococcus thermophilus</i> 1974	126
5.4	Ergebnisse der prädiktiven Bestimmung des Zeitpunktes maximaler Säuerungsaktivität für Produktionsfermentationen des Stammes <i>Streptococcus thermophilus</i> 1974 nach Anpassung des Parameters μ_{\max} . .	133
5.5	Ergebnisse der prädiktiven Bestimmung des Zeitpunktes maximaler Säuerungsaktivität für Produktionsfermentationen des Stammes <i>Streptococcus thermophilus</i> F3	136
5.6	Ergebnisse der prädiktiven Bestimmung des Zeitpunktes maximaler Säuerungsaktivität für Produktionsfermentationen des Stammes <i>Streptococcus thermophilus</i> F4	139

Symbolverzeichnis

Generelle Notation

a	Skalar, skalarwertige Funktion
\mathbf{a}	Vektor, vektorwertige Funktion
A	Skalar
\mathbf{A}	Matrix
A	chemischer Stoff

Lateinische Buchstaben

a	Polynomkoeffizient, thermodynamische Aktivität
a, b	stöchiometrische Koeffizienten
c	Konzentration (massen- oder stoffmengenbezogen)
\hat{c}	Gesamtstoffmengenkonzentration
\mathbf{C}	quadratische Matrix
d, e	stöchiometrische Koeffizienten
\mathbf{e}	Fehlervektor
f	Funktion des Signalmodells
\mathbf{f}	Systemfunktion
g	Zielfunktion im Gütekriterium
G	obere Schranke einer Sigmoiden
h	Ausgangsfunktion
\mathbf{I}	Einheitsmatrix
k	kinetische Konstante
K	Geschwindigkeitskonstante, Gleichgewichtskonstante

M	molare Masse
n	Polynomgrad, Anzahl der Elemente eines Vektors
\mathbf{n}	Einheitsvektor
p	Polynom
q	elektrische Ladung
\mathbf{Q}	Transformationsmatrix
\mathbf{R}	Dreiecksmatrix
s	komplexe Frequenz
t	Zeit
T	Temperatur
v	Geschwindigkeit
\mathbf{v}	neuer Eckpunkt eines Simplex nach Kompressionsschritt
w	Gewichtungsparameter
\mathbf{W}	Gewichtungsmatrix
\mathbf{x}	Eckpunkt eines Simplex, Zustandsvektor
X	Zellzahl
\mathbf{y}	Ausgangsvektor

Griechische Buchstaben

α	wachstumsassoziierter Parameter
β	biomasseassoziierter Parameter
γ	Kontraktionskoeffizient, Aktivitätskoeffizient
δ	Parameter für die Konstruktion eines Anfangssimplex
Δ	Differenz, Änderung
ε	Fehlertoleranz
θ	Modellparameter
$\boldsymbol{\theta}$	Parametervektor
λ	Eigenwert

μ	spezifische Wachstumsgeschwindigkeit
ρ	Reflexionskoeffizient, Dichte
σ	Kompressionskoeffizient
Σ	Summe starker Säuren und starker Basen
τ	Dissoziationsgrad
χ	Expansionskoeffizient
ψ	Straffunktion
Ψ	Strafterm

Indizes

0	Anfangswert, Standardwert
c	äußere Kontraktion
cc	innere Kontraktion
diss	dissoziierte Stoffkomponente
dyn	dynamisches Prozessmodell
e	Expansion
g	Generationszeit
ges	Gesamtprozessmodell
GLF	generalisierte logistische Funktion
h	Zeitpunkt maximaler Säuerungsaktivität
hin	Hinreaktion
i	Inhibierung
i, j, k	Laufvariablen
lag	Lag-Phase
LF	logistische Funktion
max	maximaler Wert
mess	Messwert
min	minimaler Wert

p	Produkt (bei massenbezogenen Konzentrationen)
P	Produkt (bei stoffmengenbezogenen Konzentrationen)
präd	prädizierter Wert
r	Reflexion
rück	Rückreaktion
s	Substrat
sig	Signalmodell
sim	Prozesssimulation
undiss	undissoziierte Stoffkomponente
W	Wasser
WLS	gewichtete kleinste Fehlerquadrate (Weighted Least Squares)
x	Biomasse, Keimzahl

Chemische Symbole

A, B	Ausgangsstoffe einer Gleichgewichtsreaktion
A ⁻	Säureanion
B	Base
C	Kohlenstoff
C ₃ H ₅ O ₃ ⁻	Lactat
C ₃ H ₆ O ₃	Milchsäure
D, E	Produkte einer Gleichgewichtsreaktion
H ⁺	Wasserstoffion
H ₂ O	Wasser
H ₃ O ⁺	Oxoniumion
H ₃ PO ₄	Phosphorsäure
HA	Säure
HB ⁺	Basenkation
NaOH	Natronlauge

NH_4OH	Ammoniaklauge
O	Sauerstoff
OH^-	Hydroxidion

Abkürzungen

CAU	Christian-Albrechts-Universität
cfu	kolonienbildende Einheiten (Colony Forming Units)
DCU	digitale Steuer- und Regeleinheit (Digital Control Unit)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic Acid)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography)
KNN	künstliches neuronales Netz
PID	Proportional-Integral-Differential
m/v	Masse pro Volumen
rpm	Umdrehungen pro Minute (Revolutions per Minute)
subsp.	Subspezies
v/v	Volumen pro Volumen
VE	voll entsalzt

Sonstige Symbole

$\mathbf{0}$	Nullvektor
$(\dot{})$	Zeitableitung
$(\bar{})$	Mittelwert, geometrischer Schwerpunkt
$()^*$	optimaler Wert bezüglich eines Kriteriums
$()^T$	transponiert
$(+)$	rechtsdrehend
$(-)$	linksdrehend

Kapitel 1

Einleitung

Mikroorganismen sind ein unentbehrliches Element der biotechnologischen Lebensmittelherstellung. Erst unter ihrer Mitwirkung entsteht eine Vielzahl Lebensmittel des täglichen Bedarfs wie z. B. Käse, Rohwurst und Brot sowie Genussmittel wie z. B. Bier und Wein. Die mikrobiellen Kulturen verändern aufgrund ihrer spezifischen StoffwechsellLeistungen das Lebensmittelrohprodukt in einem enzymatischen Umwandlungsprozess und verleihen ihm so den charakteristischen Geschmack, das typische Aroma oder die Konsistenz. Von großer kommerzieller Bedeutung für die milchverarbeitende Industrie ist das Milchsäurebakterium *Streptococcus thermophilus*, das allein oder in Kombination mit anderen Bakterien als Starterkultur bei der Herstellung von Milchprodukten wie Joghurt und Käse eingesetzt wird. Seine Hauptaufgabe dabei ist die Säuerung von Milch durch die Milchsäure, die als Stoffwechselprodukt beim Abbau von Kohlenhydraten entsteht.

1.1 Motivation

Die industrielle Herstellung von *Streptococcus thermophilus* als Starterkultur erfolgt in einem mehrstufigen biotechnologischen Prozess. Im ersten Schritt wird eine vermehrungsfähige Vorkultur hergestellt, diese dann zur Steigerung der vitalen Biomasse im Bioreaktor unter günstigen Wachstumsbedingungen auf dem Substrat Lactose kultiviert, die vermehrte Biomasse nach Beendigung der Kultivierung geerntet und im letzten Herstellungsschritt zu einem verkaufsfertigen und in der Lebensmittelindustrie einsetzbaren Starterprodukt aufgearbeitet.

Das wichtigste Qualitätsmerkmal dieses Starterprodukts ist die Säuerungsaktivität, die die Kultur nach dem Beimpfen im Lebensmittelrohprodukt entwickelt. Eine hohe Aktivität bedeutet, dass der pH-Wert der beimpften Milch schnell in den sauren Bereich verschoben wird, wodurch eine wesentliche Funktion der Starterkultur zum Tragen kommt. Durch die Absenkung des pH-Wertes wird die Vermehrung von unerwünschten Mikroorganismen im Lebensmittel erschwert, was seine Haltbarkeit und seinen hygienischen Zustand verbessert.

Sowohl die Qualität des Starterprodukts als auch seine Ausbeute werden in den verschiedenen Stufen seines Herstellprozesses durch viele Faktoren beeinflusst. Ein ent-

scheidender Einflussfaktor ist dabei der Zeitpunkt der Biomassenernte [49, 50]. Die Biomassenernte wird eingeleitet durch die Kühlung der Kulturlösung im Fermenter. Sie soll dafür sorgen, dass die Stoffwechselaktivität der Bakterien rasch auf ein Minimum reduziert wird und ihr gegenwärtiger aktiver Zustand so bis zum Einsatz in Lebensmitteln aufrechterhalten wird.

Die Firma Danisco ist ein Hersteller von Kulturen und Zutaten für Lebensmittelprodukte, mit dem der Lehrstuhl für Automatisierungs- und Regelungstechnik der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (CAU) ein Kooperationsprojekt zur Prozessoptimierung bei der Starterkulturenherstellung durchgeführt hat. Dieser Kulturenhersteller verwendet in Fermentationen zur Herstellung von *Streptococcus thermophilus* als Starterkultur als optimalen Erntezeitpunkt den Prozesszeitpunkt, zu dem die Säuerungsaktivität der Kultur, also die Milchsäurebildungsgeschwindigkeit, maximal ist. Da diese Größe während des laufenden Prozesses nicht direkt gemessen werden kann, erfolgt die Detektion des betrachteten prozesskritischen Zustandes über die Messwerte der zudosierten Lauge, die zur Regelung des pH-Wertes verwendet wird. Die Lauge neutralisiert die Milchsäure und soll so den pH-Wert auf einem konstanten Level halten, damit optimale pH-Bedingungen für das bakterielle Wachstum während der Kultivierung gewährleistet werden können.

Aufgrund von Schwankungen der Qualität der verwendeten Impfkulturen entwickeln sich die Folgekulturen oft unterschiedlich, sodass der optimale Erntezeitpunkt und damit die Fermentationsdauer von Produktionslauf zu Produktionslauf abweichen. In Produktionsfermentationen von *Streptococcus thermophilus* kann die Fermentationsdauer bis zu einer Stunde variieren, sodass sie gewöhnlich 3–4 h beträgt [10]. Dabei ist eine zeitnahe Detektion des richtigen Erntezeitpunktes wichtig, denn eine Fortführung der Fermentation über diesen Zeitpunkt hinaus führt zu einem qualitativ schlechteren Produkt, während eine zu früh beendete Fermentation eine geringere Ausbeute der Biomasse bedeutet.

Vielmehr als an einer zeitnahen Detektion des optimalen Erntezeitpunktes bzw. des Zeitpunktes maximaler Säuerungsaktivität ist man daran interessiert, diesen Zeitpunkt schon in einem frühen Stadium der Kultivierung vorherbestimmen zu können. Denn die Kenntnis des zukünftigen Prozessverlaufs bietet zusätzliche Möglichkeiten zur Optimierung der bestehenden Prozessführung, aber auch zur Entwicklung neuer Prozessführungsstrategien, die zu einem besseren Produkt führen können. So kann der Produktionsablauf und damit die Wirtschaftlichkeit des Produktionsbetriebs optimiert werden, wenn die Dauer der Fermentation im Voraus bekannt ist. Darüber hinaus kann der vorherbestimmte Erntezeitpunkt z. B. als Bezugspunkt bei der Anwendung von Kühlstrategien verwendet werden, die schon vor dem Eintritt der maximalen Säuerungsaktivität eingeleitet werden sollen.

Um diese Optimierungsmöglichkeiten für den industriellen Herstellungsprozess von *Streptococcus thermophilus* nutzen zu können, soll in dieser Arbeit eine Lösung für

die Aufgabe der prädiktiven Bestimmung des Zeitpunktes der maximalen Säuerungsaktivität in Fermentationen dieses Bakteriums entwickelt werden.

1.2 Lösungsansatz

Ein Verfahren zur prädiktiven Bestimmung des optimalen Erntezeitpunktes in Fermentationen von *Streptococcus thermophilus* wurde in der Arbeit [27] vorgestellt. Der Grundgedanke dabei ist, den gefragten Zeitpunkt aus dem Verlauf des unregulierten pH-Wertes in der Anfangsphase der Kultivierung zu schätzen. Dieser Ansatz, der in [27] mit Hilfe einer datenbasierten Modellierungstechnik umgesetzt wurde, wird auch in der vorliegenden Arbeit verfolgt. Jedoch soll zur Vorhersage des optimalen Erntezeitpunktes ein mathematisches Modell verwendet werden, das die Prozessdynamik erfasst. Die Vorteile dieser Vorgehensweise und der grundsätzliche Ansatz sollen im Folgenden erläutert werden.

Im industriellen Prozess zur Herstellung von *Streptococcus thermophilus* als Starterkultur wird der pH-Wert der Kulturlösung nicht unmittelbar nach dem Beimpfen des Fermenters geregelt, sondern erst nach einer milchsäurebedingten Absenkung auf einen Sollwert von 6.0 von einem höheren Anfangswert, der entsprechend den Kultivierungsbedingungen eingestellt wird. Es lassen sich damit eine unregelte und eine geregelte Prozessphase unterscheiden. In Abbildung 1.1 ist ein typischer Verlauf des pH-Wertes in Fermentationen von *Streptococcus thermophilus* mit einer Kennzeichnung der beiden Prozessphasen dargestellt. Während der pH-Wert-Regelung tritt ein Schwingen um den Sollwert auf.

Der Verlauf der pH-Wert-Absenkung in der unregulierten Prozessphase stellt ein Kriterium zur Bewertung der Qualität der verwendeten Impfkultur dar [54]. Die Qualität dieses Inokulums bzw. der Vorkultur, aus der das Inokulum stammt, ist wiederum maßgebend für die Leistung und die Reproduzierbarkeit eines Fermentationsprozesses [40,54]. Die Inokulumqualität stellt damit eine wesentliche Einflussgröße in Bezug auf den optimalen Erntezeitpunkt der Biomasse dar, welcher dadurch gekennzeichnet ist, dass die Bakterienkultur ihre maximale Säuerungsaktivität erreicht. Da der pH-Wert online gemessen werden kann, ist dieses Kriterium während der laufenden Fermentation zugänglich und kann zur Online-Charakterisierung der Inokulumqualität in einer frühen Phase der Kultivierung herangezogen werden.

Die qualitativen Eigenschaften eines Inokulums in Bezug auf die bakterielle Säuerungsaktivität lassen sich über die beiden Merkmale

- Konzentration und
- physiologischer Zustand

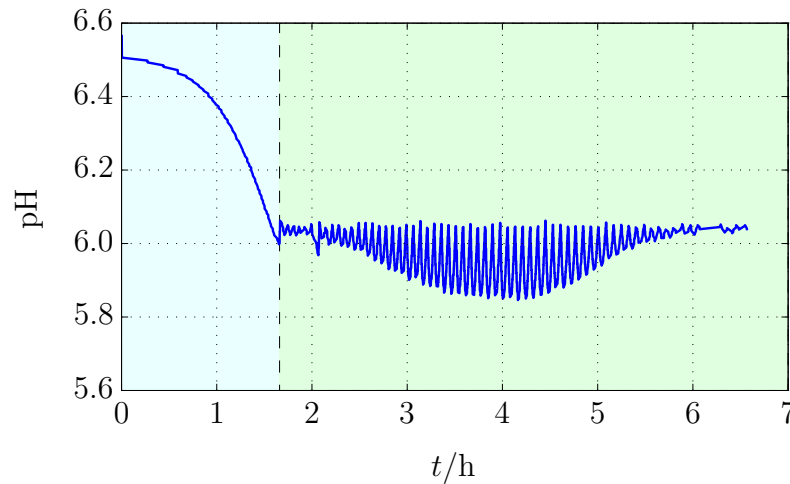


Abbildung 1.1: Unterscheidung von unregelter und geregelter Phase des pH-Wert-Verlaufs in Fermentationen von *Streptococcus thermophilus*.

- Prozessphase ohne pH-Wert-Regelung
- Prozessphase mit pH-Wert-Regelung

der Zellen definieren. Der physiologische Zustand der Zellen beschreibt ihr Alter in Bezug auf die Wachstumsphase, in der sie sich befinden und die für die metabolische Zellaktivität kennzeichnend ist.

Die beiden genannten Qualitätsmerkmale unterliegen auf der einen Seite einer biologisch bedingten Streuung des Organismus, die sich der Kontrolle entzieht. Auf der anderen Seite werden diese Merkmale bei der Herstellung der Vorkultur z. B. durch unvorhergesehene Unterbrechungen bei der Anzucht oder Aufbewahrung beeinflusst. Dadurch können deutliche Veränderungen der Merkmale entstehen, die dazu führen, dass die Bakterienkulturen in den Fermentationen nicht das Wachstumsverhalten zeigen, das aufgrund der verwendeten Impfmenge zu erwarten wäre [40]. Es können einfache zeitliche Verschiebungen auftreten, die sich aus der unterschiedlichen Zahl der Zellen erklären, oder sich ganz andere Verläufe ergeben [40]. Eine junge Impfkultur beispielsweise, die sich also in einer metabolisch aktiven Phase befindet, wird nach der Überimpfung in der Regel schneller anwachsen als eine Kultur, bei der das Wachstum z. B. aufgrund von Substratmangel zum Stillstand gekommen ist. Der physiologische Zustand der überimpften Zellen beeinflusst also die Dauer dieser Anlaufphase, auch Lag-Phase genannt, wodurch sich ebenfalls zeitliche Verschiebungen ergeben können.

Da das bakterielle Wachstum und die Produktbildung eng miteinander verknüpft sind, wird zu Prozessbeginn die Säuerungsaktivität einer Kultur, die mit einer gerin-

geren Anfangszellzahl startet oder sich verzögert entwickelt, geringer sein als bei einer Kultur, die aus einem qualitativ besseren Inokulum hervorgegangen ist. Es wird also je nach Inokulumqualität mehr oder weniger Milchsäure produziert, sodass der pH-Wert schneller oder langsamer auf den Sollwert von 6.0 abgesenkt wird. Dies kann in Abbildung 1.2 anhand von pH-Wert-Profilen veranschaulicht werden, die in Produktionsfermentationen von *Streptococcus thermophilus* bei der Firma Danisco aufgezeichnet wurden. Dabei besteht für das Bakterium *Streptococcus thermophilus* wie auch für andere Milchsäurebakterien ein direkter Zusammenhang zwischen der Zeit, die für eine pH-Wert-Absenkung benötigt wird, und der Anfangszellzahl [37, 53, 57].

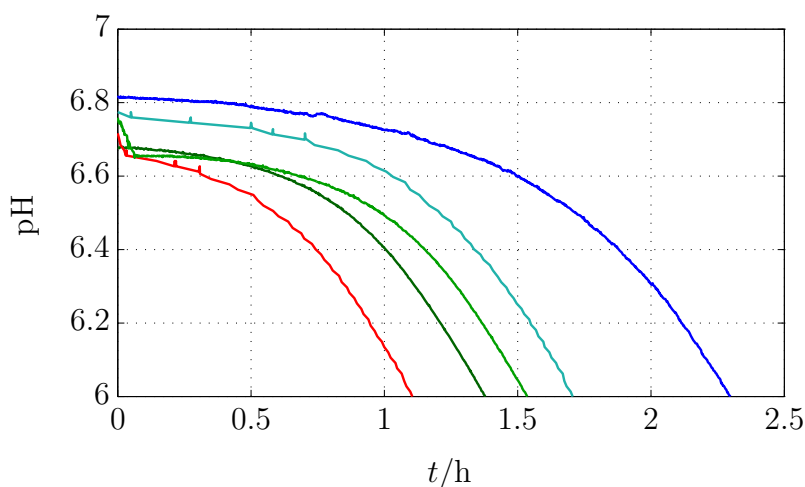


Abbildung 1.2: Messkurven der pH-Wert-Absenkung in Produktionsfermentationen von *Streptococcus thermophilus*.

Der pH-Wert-Verlauf in der Anfangsphase einer Fermentation ist also ein Indikator für die zu erwartende Kinetik des Prozesses. Bei einer anfänglich bereits hohen Säuerungsaktivität der Bakterienkultur kann damit gerechnet werden, dass sich der Zustand der maximalen Säuerungsaktivität früher einstellt als im gegenteiligen Fall. Es besteht also ein funktionaler Zusammenhang zwischen dem Kurvenprofil der pH-Wert-Absenkung und dem Zeitpunkt, zu dem die bakterielle Aktivität maximal ist.

In [27] wird dieser Zusammenhang mit Hilfe der Methode der künstlichen neuronalen Netze (KNN) auf Basis historischer Daten modelliert und das aufgestellte neuronale Modell dann zur Vorhersage des prozesskritischen Zeitpunktes mit Methoden der Mustererkennung verwendet. Künstliche neuronale Netze sind ein datenbasiertes Verfahren zur Approximation von funktionalen Zusammenhängen. Ihre Funktionsweise ist dem biologischen Vorbild eines Nervensystems nachempfunden. Für eine konkrete Anwendung muss ein KNN mit einer geeigneten Netzstruktur aufgestellt werden und dann mit Daten trainiert werden, zwischen denen der unbekannte Zusammenhang hergestellt werden soll.

Um mit einem trainierten KNN während einer laufenden Fermentation den gefragten Zeitpunkt nach dem in [27] beschriebenen Verfahren schätzen zu können, werden nach der Absenkung des pH-Wertes auf den Sollwert aus der pH-Messkurve Werte extrahiert und zu einem Merkmalsvektor zusammengesetzt. Das so erzeugte Muster wird dann dem trainierten KNN als Eingabe präsentiert, das als Ausgabe einen Schätzwert für den gesuchten Zeitpunkt liefert.

Datenbasierte Verfahren zur Modellbildung, wie das der künstlichen neuronalen Netze, bieten die Vorteile, dass die zu beschreibenden funktionalen Zusammenhänge ungeachtet ihrer Komplexität und ohne die Kenntnis der zu Grunde liegenden Mechanismen relativ einfach mathematisch erfasst werden können.

Nachteilig für diese Art der Modellierung ist jedoch, dass nur ein spezifisches externes Prozessverhalten erfasst wird. So ist das im KNN abgelegte Strukturwissen über den Prozess im Allgemeinen nicht zugänglich, weshalb künstliche neuronale Netze auch als Black-Box-Modelle bezeichnet werden. Damit kann der Prozess mit einem KNN weder skaliert werden noch kann der Einfluss der Modellparameter auf das Prozessverhalten simulativ untersucht werden, sodass der Zugang zu einem besseren Verständnis über den Prozess verwehrt wird.

Ein weiterer Nachteil, der für künstliche neuronale Netze typisch ist, besteht darin, dass ihre Vorhersagegüte verloren gehen kann, wenn Prozessbedingungen variiert werden [2]. In einem solchen Fall muss dann ein neues Netz erstellt werden, das die Veränderungen berücksichtigt. Dies ist in der Regel mit einem großen Datenbedarf verbunden, der für ein erfolgreiches Training des Netzes benötigt wird, wobei die Beschaffung dieser Daten gerade bei biotechnologischen Prozessen langwierig sein kann.

Aufgrund der genannten Nachteile mit datenbasierten Modellierungstechniken soll in dieser Arbeit ein Lösungsansatz vorgestellt werden, der auf einem mathematischen Modell bzw. Formelapparat basiert.

1.3 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines modellgestützten Verfahrens, mit dem es möglich ist, den Zeitpunkt der maximalen Säuerungsaktivität von *Streptococcus thermophilus* aus dem Verlauf der säurebedingten pH-Wert-Absenkung in der Anfangsphase der Kultivierung vorherbestimmen zu können.

Die Säuerungsaktivität der Kultur im Prozess soll über die zeitliche Änderung der Milchsäurekonzentration im Bioreaktor erfasst werden. Für eine Vorhersage des Verlaufs dieser Größe, aus dem der gefragte prozesskritische Zeitpunkt prädiktiv bestimmt werden soll, wird ein Prozessmodell benötigt, das die Milchsäurekonzentration

als dynamische Größe beschreibt. In [5] wurde ein Kultivierungsprozess von *Streptococcus thermophilus* mathematisch analysiert, bei welchem jedoch die pH-Wert-Regelung von Prozessbeginn an aktiv ist, eine pH-Wert-Absenkung in der Prozessanfangsphase also nicht auftritt. Es wurde festgestellt, dass die Prozessdynamik durch die drei miteinander verkoppelten Systemzustände Keimzahl, Milchsäure- und Lactosekonzentration bestimmt wird. Das aufzustellende Prozessmodell soll deshalb diese drei Zustandsgrößen berücksichtigen.

Die anfängliche Säuerungsaktivität der überimpften Zellen, die sich aus den Messwerten der pH-Wert-Absenkung ablesen lässt, ist kultivierungsabhängig und ein Indikator für die weitere Entwicklung der Zellpopulation. Sie soll im Modell über eine entsprechende Anfangskeimzahl und einen Parameter erfasst werden, der den physiologischen Zustand der überimpften Zellen beschreibt. Ein bestimmter physiologischer Zustand der überimpften Bakterien kann über eine entsprechende Verzögerung beim Anwachsen in der Lag-Phase modelliert werden. Gelingt es, die beiden genannten Größen, welche die qualitativen Merkmale der Impfkultur beschreiben, früh im Prozess dem Prozessgeschehen entsprechend einzustellen, kann das Prozessmodell als Simulator eingesetzt und der gesuchte prozesskritische Zeitpunkt aus der generierten Ableitung der Milchsäurekonzentration prädiktiv bestimmt werden.

Um die benötigten Informationen in Bezug auf die qualitativen Merkmale des Inokulums aus dem pH-Wert-Verlauf während einer Fermentation ableiten zu können, soll ein Messmodell aufgestellt werden, das den pH-Wert in Abhängigkeit der Milchsäurekonzentration und der chemischen Eigenschaften des Nährmediums beschreibt. Dieses statische pH-Modell soll über die Milchsäurekonzentration mit dem dynamischen Prozessmodell zu einem Gesamtmodell des Bioprozesses verknüpft werden. Eine Modellverknüpfung dieser Art wurde z. B. in [22] mit Erfolg genutzt, um in einem Bioprozess den Verlauf des unregulierten pH-Wertes durch Prozesssimulation vorherbestimmen zu können, wobei in diesem Fall die Anfangskonzentration der beteiligten Bakterien als bekannt angenommen wurde.

In der vorliegenden Arbeit soll die Modellverknüpfung dazu dienen, den Verlauf der gemessenen pH-Wert-Absenkung nachbilden zu können. Damit dies gelingt, muss ein dem Prozessgeschehen entsprechender Verlauf der Milchsäurekonzentration als Eingang des pH-Modells generiert werden. Dies führt auf das Problem der Schätzung der Anfangskeimzahl sowie des Parameters der Lag-Phase. Durch die Modellverknüpfung wird also ein funktionaler Zusammenhang zwischen dem Verlauf der pH-Wert-Absenkung und den beiden genannten Größen hergestellt. Diese sind für eine betrachtete Fermentation so einzustellen, dass für einen generierten Verlauf der Milchsäurekonzentration ein pH-Wert-Verlauf berechnet werden kann, der mit dem gemessenen pH-Wert-Verlauf übereinstimmt. Zuvor ist noch zu untersuchen, inwieweit beide Größen dafür geeignet sind. Die Einstellung soll mit Hilfe einer optimierungsbasierten Methodik durchgeführt werden, wobei sich die gesuchten Werte aus der Minimierung der

Summe der Abweichungen zwischen den über das Gesamtprozessmodell generierten pH-Werten und den gemessenen pH-Werten ergeben.

Das prädiktive Verfahren soll zuerst mit Daten aus experimentellen Fermentationen von *Streptococcus thermophilus* erprobt werden, die im Biolabor des Lehrstuhls für Automatisierungs- und Regelungstechnik der CAU Kiel generiert wurden. Danach soll die Übertragbarkeit auf den industriellen Kultivierungsprozess untersucht werden. Dafür sollen Daten aus Produktionsfermentationen des in den Experimenten eingesetzten Stammes sowie von zwei weiteren Stämmen des Organismus verwendet werden, die bei der Firma Danisco am Standort Niebüll durchgeführt wurden.

1.4 Gliederung

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in sechs Kapitel. In Kapitel 2 wird einführend auf die Grundlagen der mikrobiellen Herstellung fermentierter Lebensmittel eingegangen. Es werden die Mikroorganismen betrachtet, die in Lebensmittelfermentationen Anwendung finden, wobei das Augenmerk auf die Gruppe der Milchsäurebakterien gelegt wird. Das Milchsäurebakterium *Streptococcus thermophilus*, welches Gegenstand dieser Arbeit ist, wird vorgestellt und es werden sein Energiestoffwechsel, seine Vermehrung, seine industrielle Anwendung und Herstellung als Starterkultur in der Milchindustrie beschrieben.

Kapitel 3 beschreibt den experimentellen Prozess zur Kultivierung von *Streptococcus thermophilus*, für den im nachfolgenden Kapitel eine mathematische Modellvorstellung formuliert werden soll. Es werden die zur Verfügung stehenden Materialien und die Methodik zur Durchführung der Fermentationsversuche erläutert. Dies umfasst neben der Beschreibung des eingesetzten Organismus, der Herstellung der Vorkultur und des Nährmediums sowie der Kultivierungsbedingungen auch die Beschreibung der Prozessumgebung, der Prozessanalytik und der Details zum Ablauf der Versuche.

Kapitel 4 behandelt die mathematische Modellierung der relevanten Vorgänge im Bioprozess in Bezug auf das formulierte Ziel der Arbeit. Nach der Beschreibung des allgemeinen strukturierten Vorgehens bei der mathematischen Modellbildung werden im ersten Schritt mit Hilfe einfacher Bilanzgleichungen das bakterielle Wachstum, die Produktbildung und der Substratverbrauch modelliert. Die aufgestellten Gleichungen ergeben ein dynamisches Modell des Bioprozesses. Im zweiten Schritt wird eine Modellvorstellung für den pH-Wert der Kulturlösung als Funktion der Produktkonzentration formuliert, wobei dieses statische pH-Modell als Messmodell dienen soll. Zur Anpassung des dynamischen Prozessmodells und des statischen pH-Modells an experimentelle Daten wird die Aufgabe der Identifikation freier Parameter als Optimierungsaufgabe formuliert. Das angewendete Optimierungsverfahren wird vorgestellt und die beiden Modelle werden separat identifiziert. Im abschließenden Schritt der

Modellbildung werden die beiden Modelle anhand experimenteller Daten, die nicht Bestandteil der Identifikation waren, überprüft.

Die Anwendung des Prozessmodells in Kombination mit dem pH-Modell zur prädiktiven Bestimmung des Zeitpunktes maximaler Säuerungsaktivität der Kultur in der Simulation ist Gegenstand von Kapitel 5. Das prädiktive Verfahren wird genauer erläutert. Dazu gehört die Beschreibung der Verknüpfung der beiden Modelle zum Gesamtprozessmodell sowie die Formulierung der Optimierungsaufgabe zur Angleichung der über dieses Gesamtprozessmodell modellierten pH-Wert-Absenkung an Messdaten. Um geeignete Optimierungsparameter festzulegen, wird in Simulationsstudien der Einfluss der Anfangskonzentration der Biomasse und des Parameters der Lag-Phase auf den modellierten pH-Wert-Verlauf untersucht.

Um die Genauigkeit der prädiktiv bestimmten Zeitpunkte maximaler Säuerungsaktivität beurteilen zu können, die sich nach dem vorgestellten Verfahren ergeben, muss für jede betrachtete Fermentation aus Messdaten der tatsächliche Zeitpunkt der maximalen Säuerungsaktivität ermittelt werden, der dann als Vergleichswert dient. Die zur Bestimmung dieser Vergleichswerte verwendete Methode wird vorgestellt. Es werden weiter die experimentellen Fermentationen angeführt, die zur Erprobung des Verfahrens verwendet wurden, und es wird der Ablauf einer prädiktiven Bestimmung des fragten Zeitpunktes für eine Online-Anwendung des Verfahrens skizziert.

Das prädiktive Verfahren wird zuerst mit Daten aus dem experimentellen Kultivierungsprozess von *Streptococcus thermophilus* getestet und es werden die Ergebnisse vorgestellt. Anschließend wird die Übertragbarkeit auf den industriellen Prozess untersucht. Dabei wird das Verfahren auf Daten aus industriellen Fermentationen des in den Experimenten untersuchten Stammes von *Streptococcus thermophilus* sowie von zwei weiteren Stämmen dieser Spezies angewendet. Die daraus gewonnenen Resultate werden präsentiert.

Die Arbeit schließt mit Kapitel 6, in dem wichtige Ergebnisse der Arbeit rekapituliert und diskutiert werden. Im Anschluss daran wird ein Ausblick auf weiterführende Arbeiten gegeben und es werden weitere Anwendungsmöglichkeiten für das vorgestellte prädiktive Verfahren genannt.

Kapitel 2

Grundlagen

In diesem Kapitel wird auf die Grundlagen der mikrobiellen Herstellung fermentierter Lebensmittel eingegangen. Es werden die Mikroorganismen betrachtet, die in Lebensmittelfermentationen Anwendung finden, und es werden ihre Funktionen, die sie dabei erfüllen, genannt. Ein besonderes Augenmerk wird auf die Gruppe der Milchsäurebakterien gelegt, die als Fermentationsorganismen vor allem in der milchverarbeitenden Industrie von großer Bedeutung sind. Ein Vertreter dieser Bakteriengruppe, das Bakterium *Streptococcus thermophilus*, ist Gegenstand dieser Arbeit und soll deshalb näher betrachtet werden.

2.1 Mikroorganismen für die Lebensmittelherstellung

Die Nutzung von Mikroorganismen gehört zu den ältesten Methoden für die Herstellung von lagerfähigen und hygienisch sicheren Lebensmitteln. Die ursprüngliche Verwendung mikrobiell hergestellter Lebensmittel reicht historisch viele tausend Jahre zurück und ist auf Zufallsbeobachtungen zurückzuführen. Man beobachtete, dass verderbliche Lebensmittel unter bestimmten Bedingungen einen spontanen Veränderungsprozess durchliefen, der zu einer Steigerung der Haltbarkeit führte [2].

Obwohl der Mensch diese natürliche Methode der Lebensmittelkonservierung seit jeher nutzt, waren die wirksamen mikrobiologischen Prinzipien der Fermentation lange Zeit unbekannt. Erst im 19. Jahrhundert entdeckte Pasteur, dass bei der Milchsäuregärung der Abbau von Kohlenhydraten zu Milchsäure unter der Beteiligung von lebenden Mikroorganismen, den Milchsäurebakterien, erfolgt. Die anschließende wissenschaftliche Erforschung der Mikrobiologie fermentierter Lebensmittel führte zu einem grundlegenden Verständnis der Fermentationsprozesse und schuf so die Möglichkeit für einen gezielten Einsatz mikrobieller Kulturen in der modernen Lebensmittelherstellung.

Fermentierte Lebensmittel sind Produkte tierischen und pflanzlichen Ursprungs, die einen Veränderungsprozess durchlaufen haben und sich infolge dessen gegenüber dem Ausgangsprodukt durch Veredelung und/oder Konservierung auszeichnen. Sie sind

ein wichtiger Bestandteil der menschlichen Ernährung und stellen heutzutage etwa ein Drittel der verzehrten Lebensmittel dar [24]. Beispiele sind Lebensmittel des täglichen Bedarfs wie Käse, Joghurt, Rohwurst, Brot, Sauerkraut und Genussmittel wie Bier und Wein.

Fermentierte Lebensmittel werden traditionell, wie in Abbildung 2.1 schematisch gezeigt, unter der Mitwirkung lebender Mikroorganismen hergestellt, die durch ihre spezifischen Stoffwechselleistungen an den organischen Stoffen eine enzymatische Umwandlung bewirken. Dieser Umwandlungsprozess wird in der Mikrobiologie als Fermentation bezeichnet.

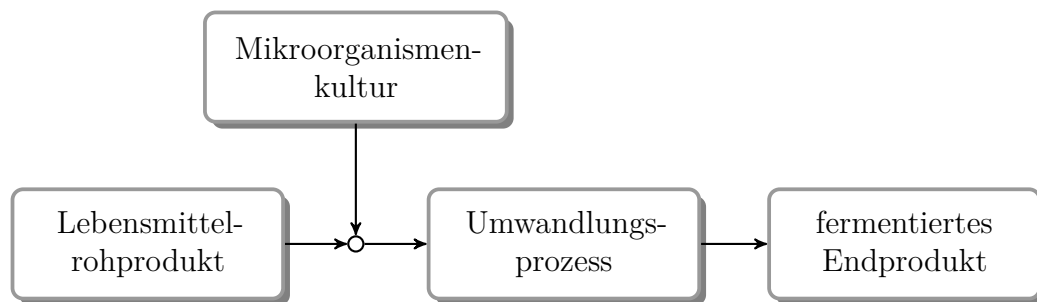


Abbildung 2.1: Schema biotechnologischer Herstellung fermentierter Lebensmittel mit Hilfe von Mikroorganismen.

Im klassischen Sinne beschreibt der Begriff Fermentation einen Gärungsprozess, d. h. einen Vorgang, bei dem Mikroorganismen anaerob, also unter Ausschluss von Sauerstoff, organische Stoffe zur Energiegewinnung abbauen. In der modernen Mikrobiologie wird dieser Begriff weitreichender definiert, wobei er sämtliche Prozesse der Biotransformation umfasst. Dies betrifft Prozesse, die sowohl anaerob als auch aerob, also unter Einwirkung von Sauerstoff, ablaufen, aber auch Prozesse, die nicht mikrobiell, sondern durch die Zugabe von Enzymen ausgeführt werden [12].

Bei der industriellen Herstellung fermentierter Lebensmittel kommen verschiedene Mikroorganismen zur Anwendung. Eine Bedeutung haben dabei [2]

- Bakterien,
- Schimmelpilze und
- Hefen.

Die Vielfalt dieser Organismen erlaubt aufgrund ihrer unterschiedlichen spezifischen Stoffwechselleistungen die Anwendung in einer Vielzahl von Lebensmitteln. Die eingesetzten Kulturen erfüllen dabei je nach Einsatzzweck unterschiedliche Funktionen

und können in Bezug auf ihre Hauptfunktion in die drei folgenden Kategorien eingeteilt werden [2]:

- Schutzkulturen,
- Reifungskulturen und
- Starterkulturen.

Schutzkulturen sind Kulturen von Mikroorganismen, die Lebensmitteln vorwiegend mit dem Ziel zugesetzt werden, sie vor Befall durch verderbende oder krankmachende Mikroorganismen zu schützen. Ihre Wirksamkeit beruht dabei meist entweder auf Verdrängung oder der Bildung von antimikrobiell wirkenden Stoffwechselprodukten, die das Wachstum von unerwünschten Organismen hemmen oder erschweren. So verhindern z. B. Schimmelpilze, die die Oberflächen von bestimmten Käse- und Rohwurstprodukten vollständig bedecken, dass konkurrierende Mikroorganismen sich auf diesen Produkten ansiedeln können. Bakterien wie z. B. Milchsäurebakterien oder Essigsäurebakterien können neben dem jeweiligen namensgebenden Endprodukt des Gärungsprozesses, also der Milchsäure bzw. Essigsäure, eine Reihe weiterer antimikrobiell wirkenden Substanzen produzieren. Ein bekanntes Beispiel ist der von dem Milchsäurebakterium *Lactococcus lactis* gebildete Hemmstoff Nisin, der in der Lebensmittelindustrie als Konservierungsstoff Anwendung findet [52].

Kulturen, die den Reifungsprozess unterstützen und dabei vorwiegend der Entwicklung des Geschmacks und des Aromas sowie der Textur und der Konsistenz dienen, werden als Reifungskulturen bezeichnet. Als Beispiele von Reifungskulturen können Staphylokokken, Schimmelpilze, Propionsäurebakterien und Brevibakterien genannt werden. Staphylokokken und Schimmelpilze werden u. a. zur Reifung von Käse und Rohwürsten eingesetzt. Propionsäurebakterien sind bei einigen Käsesorten für die typische Lochbildung verantwortlich. Brevibakterien sind entscheidend für die Aromabildung und die Färbung der Rotschmierekäsen.

Ist die Hauptfunktion der eingesetzten Fermentationskulturen die Konservierung durch Säure- oder Alkoholbildung, werden diese Kulturen Starterkulturen genannt. Diese Bezeichnung erklärt sich aus der Eigenschaft, dass die Mikroorganismen die Umwandlung der Lebensmittel in Gang setzen, also starten. Repräsentativ für Starterkulturen können Milchsäurebakterien und Hefen genannt werden. Hefen verrichten z. B. bei der Wein- und Bierherstellung eine wichtige Arbeit, indem sie in der alkoholischen Gärung Kohlenhydrate zu Ethanol, also Alkohol, umsetzen.

Der Ausdruck Starterkultur wird vielfach und zunehmend auch für gezielt eingesetzte Fermentationskulturen gebraucht [2]. In diesem Sinne sind Starterkulturen selektierte, gezielt eingesetzte Mikroorganismenkulturen, deren Stoffwechselaktivität im Fermentationssubstrat Lebensmittel erwünschte Wirkungen hervorruft [12]. Eine Übersicht

dieser positiven Wirkungen und der beteiligten Organismen mit Anwendungsbeispielen für fermentierte Lebensmittelprodukte ist in Tabelle 2.1 gegeben.

Eine besondere Bedeutung als Starterkultur kommt den Milchsäurebakterien und speziell dem in dieser Arbeit eingesetzten Vertreter dieser Bakteriengruppe, dem Bakterium *Streptococcus thermophilus*, zu. Deshalb sollen die beiden Begriffe Milchsäurebakterien und *Streptococcus thermophilus* in den folgenden Abschnitten näher erläutert werden.

2.2 Milchsäurebakterien

Milchsäurebakterien stellen das wichtigste Element der Fermentationskulturen dar, da sie an der Erzielung aller in Tabelle 2.1 genannten Wirkungen in Lebensmitteln beteiligt sind [12]. Eine große Bedeutung kommt den Milchsäurebakterien in der Milchwirtschaft zu, in der der höchst entwickelte Stand in der Anwendung von Fermentationskulturen erreicht wurde [28].

2.2.1 Gemeinsame Merkmale

Der Begriff Milchsäurebakterien besitzt in der Taxonomie keine einheitliche Definition [28]. Im Allgemeinen werden unter diesem Begriff stäbchen- und kokkenförmige, meist unbewegliche, säuretolerante, grampositive¹, nicht sporenbildende Bakterien zusammengefasst, die durch Gärung verschiedene Kohlenhydrate, also Zucker, zu Milchsäure als Hauptprodukt des Stoffwechsels sowie zu weiteren Nebenprodukten abbauen. Dieser Umwandlungsprozess ist in Abbildung 2.2 am Beispiel von Lactose oder Milchzucker unter Angabe der chemischen Strukturformeln schematisch dargestellt.

Milchsäurebakterien sind anaerob, die meisten aber aerotolerant. Sie sind also nicht auf Sauerstoff angewiesen, um überleben zu können, können aber auch in Gegenwart von Sauerstoff wachsen. Zu ihrem natürlichen Lebensraum gehören Milch und Milchprodukte. Milchsäurebakterien wachsen auch in mazeriertem, also aufgeweichtem, Pflanzenmaterial und kommen beim Menschen und bei vielen Tieren als wesentlicher Teil der natürlichen Bakterienflora vor, die für die Gesunderhaltung wichtig ist.

Obwohl Milchsäurebakterien auf das Wachstum in Milch spezialisiert sind, stellt Milch kein optimales Wachstumsmedium für die Organismen dar [50]. Aufgrund ihres hohen Bedarfs an bestimmten Wachstumsfaktoren in Form von Aminosäuren und

¹Es werden grampositive und gramnegative Bakterien durch eine Färbetechnik, die Gramfärbung, unterschieden. Dieses diagnostische Verfahren dient der taxonomischen Differenzierung von Bakterien anhand der Zellwandstruktur.

Tabelle 2.1: Erwünschte Wirkungen von Mikroorganismen in Lebensmitteln, in Anlehnung an [12].

Erwünschte Wirkung	Organismengruppe	Anwendungsbeispiele
Haltbarkeit	Milchsäurebakterien	alle milchsauer fermentierten Lebensmittel
	Hefen	Alkoholische Getränke
	Propionsäurebakterien	Käse
	Essigsäurebakterien	Essig
Geschmack	Milchsäurebakterien	fermentierte Milchprodukte, Sauergemüse, Rohwurst, Brot, Bier, Wein
	Essigsäurebakterien	Essig
Aroma	Milchsäurebakterien	wie bei Geschmack
	Propionsäurebakterien	Hartkäse, Schnittkäse
	Staphylokokken, Hefen, Brevibakterien	Rotschmierkäse
	Staphylokokken	Rohwurst, Fischsauce, Brot, fermentierte Milchprodukte
	Schimmelpilze	Käse, Rohwurst, Sojasauce
Textur, Konsistenz, Gasbildung	Milchsäurebakterien	fermentierte Milchprodukte, Käse, Rohwurst, Brot, Sauergemüse
	Hefen	Bier, Schaumwein, Kefir, Backwaren
	Schimmelpilze, Staphylokokken, Brevibakterien	Käse
	Propionsäurebakterien	Hartkäse, Schnittkäse
Farbe	Milchsäurebakterien, Staphylokokken	Rohwurst
	Brevibakterien	Rotschmierkäse
Ernährungs-physiologische Qualität	Milchsäurebakterien	Verbesserung der Verdaubarkeit
	Hefen	Vitaminanreicherung

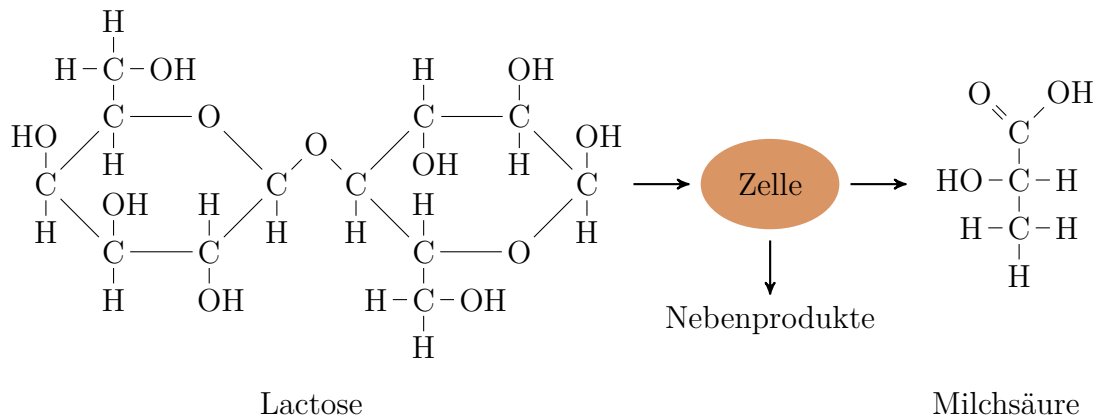


Abbildung 2.2: Biochemische Umwandlung von Zuckern, wie z. B. Lactose, in Milchsäure durch Milchsäurebakterien.

Vitaminen werden sie bei ihrer Produktion als Starterkultur in Medien kultiviert, die diese Stoffe in einer ausreichenden Menge, z. B. in Form von Hefen oder Molke, bereitstellen [16].

2.2.2 Unterscheidungsmerkmale

Alle Milchsäurebakterien sind auf Kohlenhydrate als Nahrungs- und Energiequelle angewiesen [16]. Bezüglich ihrer physiologischen Eigenschaft, Kohlenhydrate entweder bevorzugt zu Milchsäure oder zu Milchsäure und weiteren Nebenprodukten in relevanten Mengen abzubauen, werden

- homofermentative und
- heterofermentative

Milchsäurebakterien unterschieden. Homofermentative Milchsäurebakterien setzen mehr als 90 % der verstoffwechselten Kohlenhydrate zu Milchsäure um [28]. Heterofermentative Milchsäurebakterien können als Endprodukt des Stoffwechsels Milchsäure, etwa zu 50 %, sowie Ethanol, Essigsäure und Kohlendioxid produzieren [28].

Ein weiteres Unterscheidungskriterium für Milchsäurebakterien ist die Art der freigesetzten Milchsäure, die für jeden Organismus spezifisch ist. Das Molekül der Milchsäure kommt in zwei verschiedenen räumlichen Anordnungen der Atome mit der gleichen Summenformel $C_3H_6O_3$ vor. Diese beiden Konfigurationen werden als L(+)-Milchsäure und D(-)-Milchsäure bezeichnet. Sie unterscheiden sich, wie in Abbildung 2.3 anhand der chemischen Strukturformeln zu sehen, durch die asymmetrisch

angeordnete OH-Gruppe am zentralen Kohlenstoffatom. Entsprechend der Bezeichnung der Milchsäureform steht diese OH-Gruppe bei der L(+)-Milchsäure links (lat. *laevus*), bei der D(-)-Milchsäure rechts (lat. *dexter*).

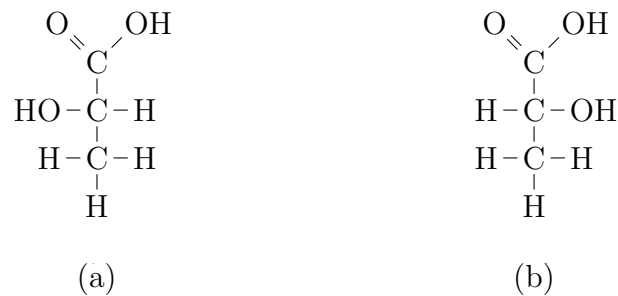


Abbildung 2.3: Strukturformel (a) der L(+)-Milchsäure und (b) der D(-)-Milchsäure.

Die zwei isomeren Formen der Milchsäure lassen sich in wässriger Lösung durch Bestrahlung mit linear polarisiertem Licht unterscheiden, wobei die L(+)-Milchsäure die Schwingungsebene des Lichts im Uhrzeigersinn dreht, die D(-)-Milchsäure gegen den Uhrzeigersinn. Diese unterschiedlichen optischen Aktivitäten der beiden Milchsäureformen werden mit den Symbolen (+) für rechtsdrehend und (-) für linksdrehend entsprechend gekennzeichnet.

Je nach Organismus wird entweder L(+)- oder D(-)-Milchsäure oder eine Mischung von beiden Milchsäureformen produziert [50].

In der Lebensmittelindustrie eingesetzte Milchsäurebakterien werden nach ihrem optimalen Wachstumstemperaturbereich und anhand ihrer Zusammensetzung unterteilt. Bezüglich des optimalen Temperaturbereichs werden

- mesophile Bakterienkulturen und
- thermophile Bakterienkulturen

unterschieden. Mesophile Bakterienkulturen wachsen bevorzugt in einem Temperaturbereich von 18–32 °C, wohingegen sich der optimale Temperaturbereich der thermophilen Bakterienkulturen von 35–45 °C erstreckt [59]. Hinsichtlich der Zusammensetzung der Kultur wird differenziert zwischen [50]

- Einzelstammkulturen,
- Mehrstammkulturen und
- Mischkulturen.

Eine Einzelstammkultur enthält nur einen einzigen Stamm einer Spezies, der mikrobiologisch und biochemisch definiert ist. Eine Mehrstammkultur umfasst mehrere unterschiedliche, definierte Stämme einer einzigen Spezies, wohingegen sich eine Mischkultur aus Stämmen verschiedener Spezies zusammensetzt. Je nachdem, ob eine Mischkultur eine Komposition definierter Organismen darstellt oder zum Teil bzw. nur unbekannte Organismen enthält, wird zwischen definierten Mischkulturen und undefinierten Mischkulturen unterschieden.

2.2.3 Praktische Bedeutung der Milchsäurebakterien

Milchsäurebakterien spielen als Fermentationsorganismen für eine Vielzahl von Lebensmitteln eine entscheidende Rolle. Ihre Hauptanwendungsgebiete sind dabei Produktgruppen der Milchwirtschaft wie Käse, Sauermilchprodukte und probiotische Milcherzeugnisse.

Probiotische Lebensmittel sind Produkte, denen eine gesundheitsfördernde Wirkung auf den Menschen zugeschrieben wird. Diese Produkte haben vor allem in den letzten Jahren zunehmend an Marktbedeutung gewonnen und werden als funktionale Lebensmittel aufgefasst [34]. In probiotischen Lebensmitteln werden magensäuretolerante Milchsäurebakterien eingesetzt. Diese sollen in einer ausreichenden Menge und in aktiver Form im menschlichen Verdauungstrakt ankommen, ihn besiedeln und unerwünschte Organismen zurückdrängen.

Darüber hinaus haben Milchsäurebakterien eine praktische Bedeutung bei der Herstellung von Lebensmitteln wie Sauerteig, Rohwurst und fermentiertem Gemüse, Futtermitteln wie Silage und bei der Reifung von Genussmitteln wie Kaffee- und Kakaobohnen [16].

Die Hauptaufgabe der Milchsäurebakterien als Starterkultur der Milchwirtschaft ist die Bildung von Milchsäure. Die freigesetzte Milchsäure trägt zur Dicklegung der Milch bei und verändert so die Textur der Milcherzeugnisse. Darüber hinaus hat Milchsäure eine sterilisierende und konservierende Wirkung. Sie wirkt zum einen antimikrobiell, zum anderen verschiebt sie in den Lebensmittelprodukten den pH-Wert in den sauren Bereich, sodass das Wachstum von vielen unerwünschten Mikroorganismen unter diesen pH-Bedingungen verlangsamt oder ganz unterdrückt wird.

Außer der Bildung von Milchsäure erfüllen Milchsäurebakterien in Lebensmitteln viele weitere nützliche Aufgaben. Hierzu gehört z. B. die Bildung von Vitaminen, Enzymen sowie geschmacks- und aromagebenden Komponenten [34]. Diese zum Teil flüchtigen Aromastoffe entstehen als Nebenprodukte bei der Milchsäuregärung oder anderen Stoffwechselfvorgängen. Eine weitere Aufgabe von Milchsäurebakterien ist Viskositätsbildung bei Sauermilcherzeugnissen, die durch das Freisetzen von Polysacchariden, den Vielfachzuckern, hervorgerufen wird.

Nach der derzeit gültigen taxonomischen Klassifikation besteht die Gruppe der Milchsäurebakterien aus zwölf Gattungen, von welchen sieben in Lebensmittelfermentationen Anwendung finden [28]. Jene sind die Gattungen *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus* und *Tetragenococcus*. In der milchverarbeitenden Industrie als Starterkultur eingesetzte Milchsäurebakterien sind Spezies der ersten vier genannten Gattungen [28].

Ein für die milchverarbeitende Industrie wichtiger Vertreter der Gattung *Streptococcus* ist das Bakterium *Streptococcus thermophilus*. Es soll im Folgenden vorgestellt werden, wobei auf seinen zentralen Energiestoffwechsel, seine Vermehrung sowie seine industrielle Anwendung und Herstellung als Starterkultur eingegangen wird.

2.3 *Streptococcus thermophilus*

Die Spezies *Streptococcus thermophilus* ist ein relativ schnell säuerndes Milchsäurebakterium, das erstmalig 1919 unter diesem Namen beschrieben wurde [51]. Dieser Organismus hat eine große kommerzielle Bedeutung für die Lebensmittelindustrie und gilt als die zweitwichtigste industriell genutzte Starterkultur der Milchwirtschaft nach *Lactococcus lactis* [23].

2.3.1 Merkmale

Das Bakterium *Streptococcus thermophilus* ist thermophil, also wärmeliebend, homofermentativ und bildet rechtsdrehende L(+)-Milchsäure als Hauptprodukt des Stoffwechsels. Es wächst fakultativ anaerob, nicht bei 15 °C, toleriert höhere Temperaturen bis 65 °C, wobei die optimale Temperatur 40 °C beträgt [15,59]. Morphologisch ist der Organismus gekennzeichnet durch kugelige oder ellipsoide Zellen mit einem Durchmesser von 0.7–0.9 µm, die in Paaren oder in verschiedenen langen Ketten angeordnet sind [59]. Abbildung 2.4 zeigt eine mikroskopische Aufnahme dieser Spezies.

2.3.2 Energiestoffwechsel

Wie alle Mikroorganismen ist auch das Bakterium *Streptococcus thermophilus* zur Erhaltung von lebenswichtigen zellulären Vorgängen sowie zur Neusynthese von Zellbestandteilen in der Wachstumsphase auf eine ständige Energiezufuhr angewiesen. Milchsäurebakterien beziehen die dafür benötigte Energie aus Kohlenhydraten, die sie über das Nährmedium aufnehmen und mit Hilfe von spezifischen Enzymen chemisch umwandeln. Bei diesen Umwandlungsprozessen entstehen in den Lebensmitteln die typischen aromagebenden und konservierenden Stoffwechselprodukte, die diesen

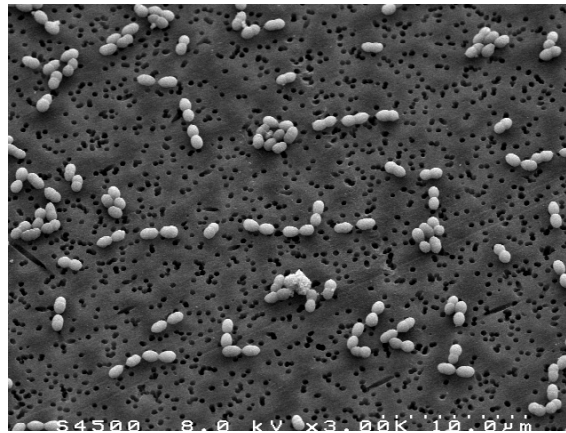


Abbildung 2.4: Mikroskopische Aufnahme des Bakteriums *Streptococcus thermophilus* [11].

Lebensmitteln ihren charakteristischen Geschmack, ihre Konsistenz und Haltbarkeit verleihen.

Die Gesamtheit dieser gesteuert ablaufenden Umwandlungsprozesse innerhalb der Zelle besteht aus einem komplexen Netzwerk von einzelnen Stoffwandlungsreaktionen, dem Zellstoffwechsel oder Metabolismus, der in katabole, also abbauende, und anabole, aufbauende, Reaktionen eingeteilt wird.

Die Energiegewinnung erfolgt in katabolen Stoffwechselreaktionen. Dabei werden die energieliefernden, chemisch komplexen Verbindungen zunächst in chemisch einfachere Verbindungen zerlegt und dann weiter zu Zwischenprodukten umgesetzt. Diese Zwischenprodukte dienen in den anabolen Folgereaktionen als Ausgangsverbindungen für die Synthese von zelleigenen Substanzen sowie von weiteren Stoffwechselprodukten, die am Ende der katabolen Stoffwechselwege entstehen. Die chemische Energie, die in den Abbaureaktionen freigesetzt wird, wird in Form von energiereichen Verbindungen zwischengespeichert und später für energieaufwändige Aufbau-, Stofftransport- sowie Regulationsvorgänge innerhalb der Zelle verwertet. Ein kleiner Energiebetrag wird als Wärme an die Umgebung abgegeben.

Das Bakterium *Streptococcus thermophilus* nutzt im Energiestoffwechsel als Energiequelle bevorzugt das Disaccharid Lactose, das in mehreren hintereinandergeschalteten biochemischen Reaktionen zu Milchsäure, genauer zu Lactat, dem Anion der Milchsäure, abgebaut wird, wie in Abbildung 2.5 schematisch gezeigt. Die hohe Anpassung des Organismus an Lactose beruht auf seiner Spezialisierung auf Wachstum in Milch. Neben Lactose ist das Bakterium in der Lage, auch andere Zucker abzubauen, wie z. B. das Disaccharid Saccharose und das Monosaccharid Glucose [23]. Einige wenige Stämme können auch die Monosaccharide Galactose und Fructose verstoffwechseln [23].

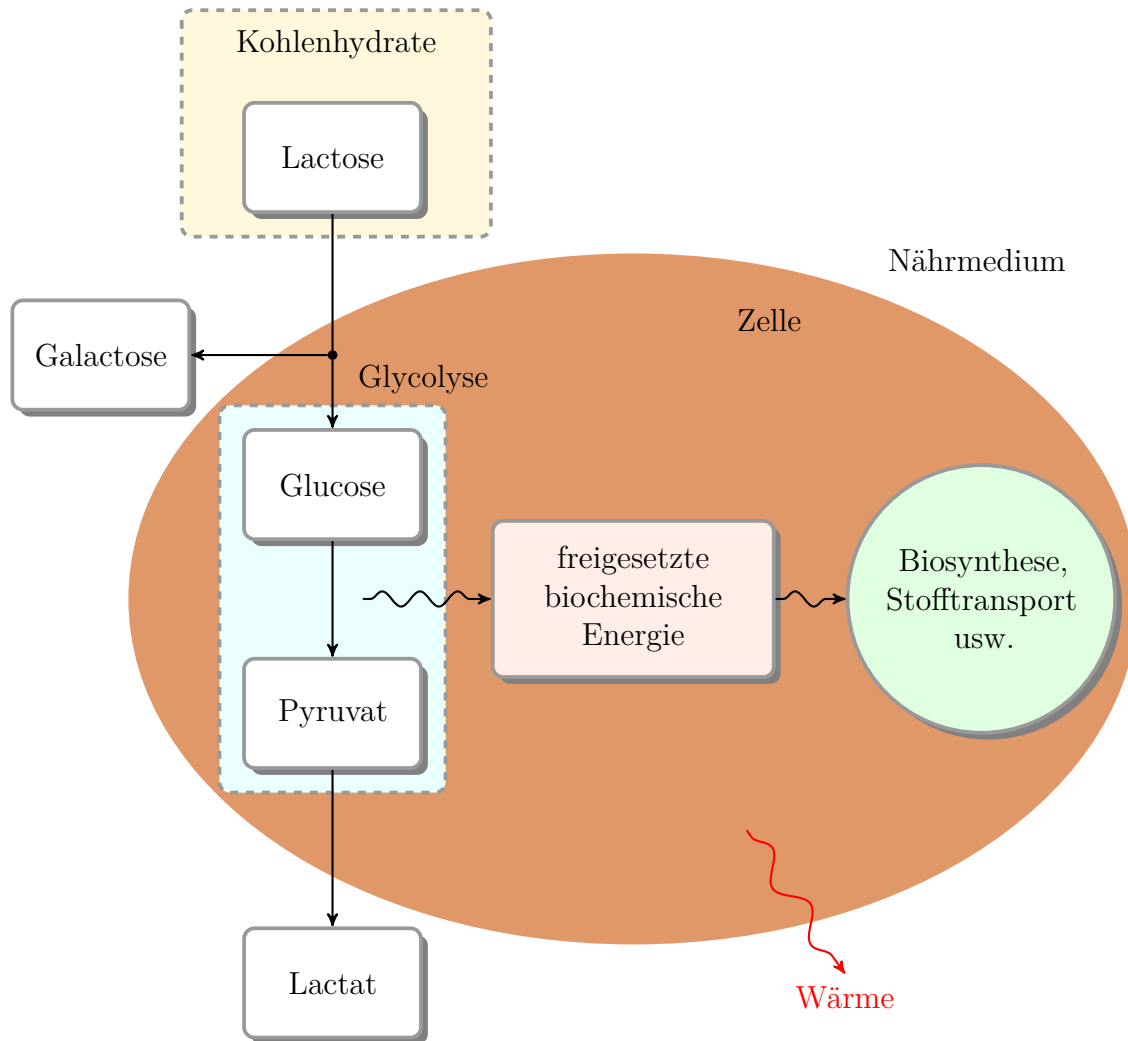


Abbildung 2.5: Energiegewinnung im Stoffwechsel von *Streptococcus thermophilus* beim Abbau von Lactose zu Lactat über die Glycolyse.



Beim Abbau der aus dem Medium aufgenommenen Lactose wird diese, wie in Abbildung 2.5 dargestellt, zunächst in die Monosaccharide Glucose und Galactose gespalten. Von den beiden Spaltprodukten wird nur die Glucose weiter verwertet, indem sie über den Stoffwechselweg der Glycolyse zum Stoff Pyruvat umgesetzt wird, während die Galactose aus der Zelle ausgeschieden wird.

Die Glycolyse, auch als Embden-Mayerhof-Parnas-Weg bezeichnet, ist ein zentraler Vorgang im Zellstoffwechsel homofermentativer Milchsäurebakterien und enthält die wichtigsten Stoffwechselreaktionen für die Energieumsetzung. Am Ende dieses katabolen Stoffwechselweges wird der Großteil des Pyruvats zu Lactat vergoren, ein kleiner Teil dieses Stoffes wird für die Bildung von Nebenprodukten verwendet. Deshalb wird das theoretische Verhältnis der Umsetzung von einem Molekül Lactose in zwei Lactationen über die Zwischenprodukte Glucose und Pyruvat, wie in Abbildung 2.6 vereinfacht dargestellt, in der Realität nicht erreicht.

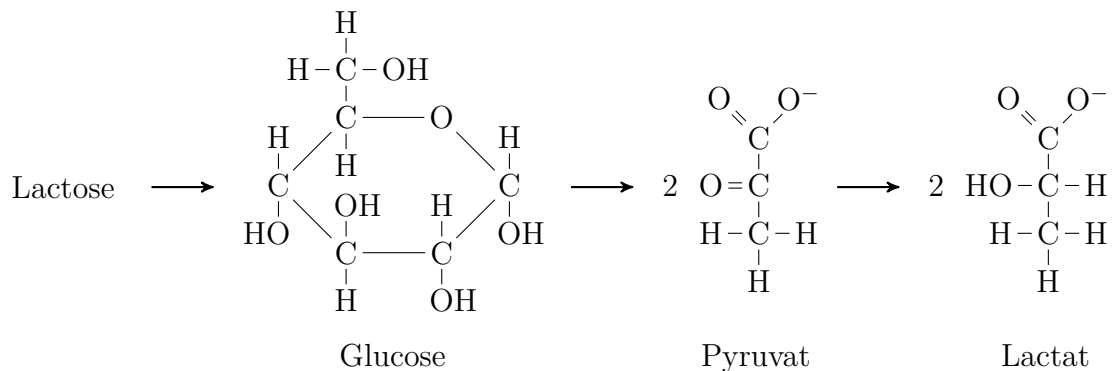


Abbildung 2.6: Vereinfachte Darstellung des zentralen Stoffwechselweges von *Streptococcus thermophilus* zur Umwandlung von Lactose über die Zwischenprodukte Glucose und Pyruvat in Lactat.

2.3.3 Zellvermehrung

Die Vermehrung der Bakterien erfolgt durch die Teilung der Zelle. Wie in Abbildung 2.7 schematisch gezeigt, entstehen aus einer teilungsfähigen Zelle, der Mutterzelle, nach Abschluss eines Teilungsvorgangs zwei Zellen, die etwa die gleiche Größe und Form besitzen wie die Mutterzelle. Diese Tochterzellen bleiben nach der Teilung zunächst miteinander verbunden und bilden so Paare oder nach weiteren Teilungen Ketten, die in Abhängigkeit von Umweltbedingungen in kürzere Teilketten aufbrechen können.

Die Zellteilung steht in engem Zusammenhang mit dem Zellwachstum. Um sich teilen zu können, muss die Zelle Zellsubstanz aufbauen, die sie in anabolen Stoffwechselvor-

gängen synthetisiert. Dabei streckt sich der Zellkörper. Die Erbsubstanz, die in der Bakterienzelle als ringförmig geschlossener DNA-Faden vorliegt, verdoppelt sich.

Während des Streckungswachstums schnürt sich die Zellwand etwa in der Mitte des Zellkörpers ein. Es bilden sich von außen nach innen Querwände aus, die die neu entstehenden Tochterzellen voneinander abgrenzen. Die DNA-Fäden werden auf die beiden Zellen verteilt, sodass nach einer abgeschlossenen Querteilung zwei identische Tochterzellen entstehen, die die gleiche Erbinformation tragen, wie die Mutterzelle, aus der sie hervorgegangen sind. Abbildung 2.8 zeigt eine mikroskopische Aufnahme von *Streptococcus thermophilus*, in der Zellen in verschiedenen Teilungsstadien zu sehen sind.

Die freie Zellvermehrung findet im Allgemeinen solange statt, bis ein Einflussfaktor wachstumsbegrenzend wirkt. Die Vermehrungsrate hängt dabei sowohl von organismusspezifischen inneren als auch durch die Umgebung bestimmten äußeren Faktoren ab [9].

2.3.4 Industrielle Anwendung als Starterkultur

Die Gattung *Streptococcus* umfasst mehr als 40 verschiedene Streptokokkenspezies, darunter auch viele solche, die pathogen sind, also Infektionen auslösen können [31]. Die Spezies *Streptococcus thermophilus* gilt als apathogen und sicher und ist bisher der einzige Vertreter seiner Gattung, der in der Lebensmittelindustrie Anwendung findet [14, 28, 31].

Anwendungsgebiete von *Streptococcus thermophilus* als Starterkultur sind Joghurtprodukte und verschiedene Hart- und Weichkäsesorten, wie z. B. Emmentaler und Mozzarella. Darüber hinaus wird dem Organismus ein Potential als probiotische Kultur zugeschrieben [31, 52].

Bei der Herstellung von Käse findet *Streptococcus thermophilus* in Form von Einzel- oder Mehrstammkulturen Anwendung [33, 59]. Bei der Herstellung von Joghurtprodukten kommt *Streptococcus thermophilus* gewöhnlich zusammen mit anderen Bakterienarten in Form von Mischkulturen zum Einsatz, wobei er für die rasche Säuerung sowie den mildsauren Geschmack des Produkts wesentlich ist.

So findet die Herstellung der klassischen Joghurtsorte, die als *Joghurt* gekennzeichnet ist, mit *Streptococcus thermophilus* und *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* als Hauptorganismen statt. Diese zwei Organismen wachsen in einer symbiotischen Partnerschaft, von der beide profitieren, indem sie sich gegenseitig in ihrem Wachstum und ihrer Stoffwechselaktivität durch Zurverfügungstellung von Stoffwechselprodukten stimulieren [2]. Eine mikroskopische Aufnahme des in Stäbchen wachsenden Bakteriums *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* zeigt Abbildung 2.9.

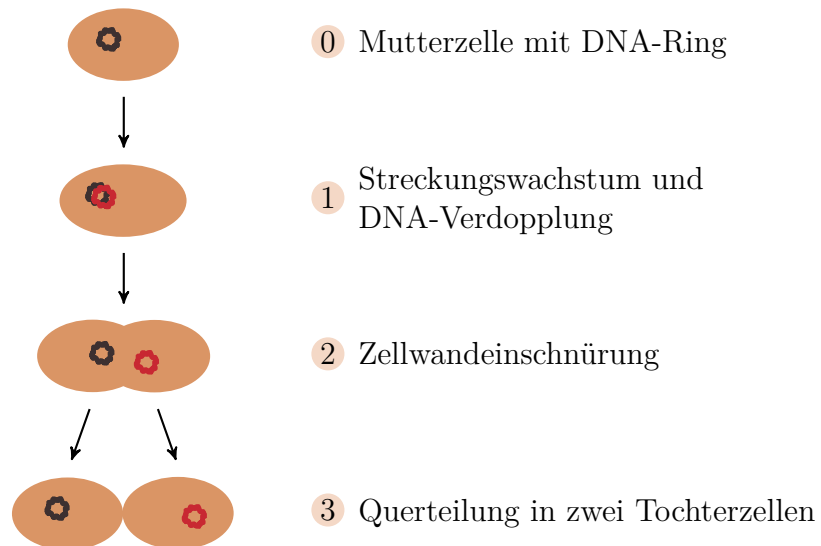


Abbildung 2.7: Vorgang der Zellteilung bei einem Bakterium, in Anlehnung an [9].

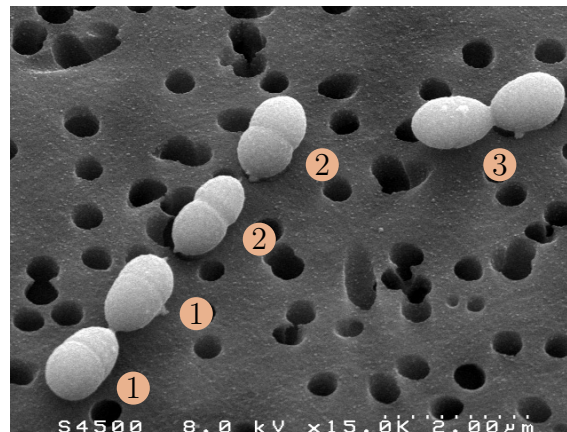


Abbildung 2.8: Vermehrung von *Streptococcus thermophilus*, in Anlehnung an [11]. Links in der Abbildung sind Zellen in verschiedenen Teilungsstadien zu sehen, rechts oben ist eine abgeschlossene Zellteilung erkennbar, vgl. Abbildung 2.7.

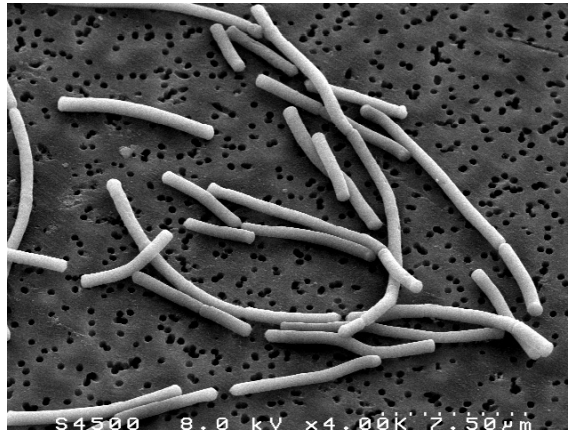


Abbildung 2.9: Mikroskopische Aufnahme des Bakteriums *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* [11]. Dieses Bakterium wird zusammen mit *Streptococcus thermophilus* in der Joghurtproduktion eingesetzt.

Joghurtprodukte, die als *Joghurt mild* gekennzeichnet sind, werden mit *Streptococcus thermophilus*, jedoch ohne die Beteiligung von *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* hergestellt. Stattdessen werden andere Vertreter der Gattung *Lactobacillus* verwendet, um ein weniger kräftig gesäuertes Joghurtprodukt zu erhalten [2].

2.3.5 Industrielle Herstellung als Starterkultur

Bakterien, die als Starterkulturen in der Lebensmittelindustrie Anwendung finden, werden heutzutage von den Kulturenherstellern unter kontrollierten Bedingungen in großtechnischem Maßstab meist als definierte Einzelstammkulturen hergestellt. Diese Methode hat den Vorteil, dass die Kulturen im gewünschten Verhältnis mit weiteren Stämmen gleicher oder verschiedener Spezies zu definierten Mehrstamm- oder Mischkulturen kombiniert werden können. Dadurch wird eine Justierung der Endprodukteigenschaften möglich sowie die Entwicklung von neuen Produkten, für die z. B. eine natürlich gewachsene Bakterienkultur nicht leicht gefunden werden kann [20].

Die industrielle Herstellung von Starterkulturen erfolgt in sterilen Bioreaktoren, die über ein Fassungsvermögen von mehreren zehntausend Liter verfügen können. Wie in Abbildung 2.10 vereinfacht dargestellt, werden zunächst ein für optimales Wachstum geeignetes Nährmedium und eine Vorkultur des Bakteriums hergestellt. Dann wird das Nährmedium im Bioreaktor mit der Vorkultur beimpft und die Kultivierung startet. Nach der Beendigung der Kultivierung wird die Biomasse vom Medium abgetrennt und schließlich zum verkaufsfertigen Starterprodukt aufgearbeitet.

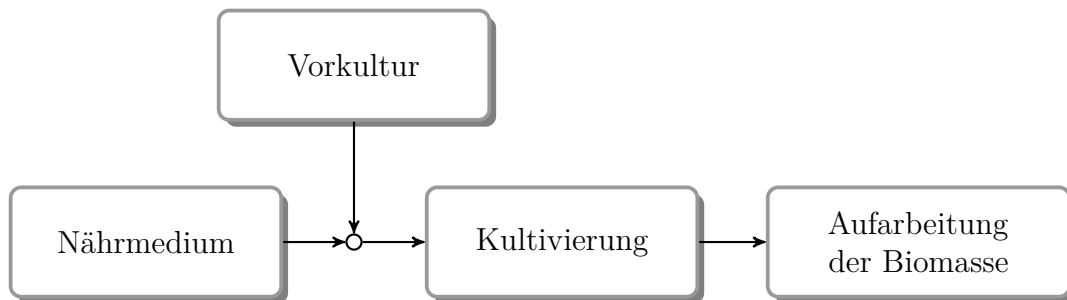


Abbildung 2.10: Schematische Darstellung des Prozesses zur Herstellung von Starterkulturen.

Batch-Verfahren

Bei der industriellen Herstellung des Bakteriums *Streptococcus thermophilus* als Starterkultur wird die Kultivierung des Bakteriums traditionell im Batch-Verfahren durchgeführt. Diese Betriebsart zeichnet sich dadurch aus, dass während des Prozesses weder ein Zufluss an Nährmedium in den Fermenter noch ein Abfluss an Kulturlösung aus dem Fermenter zur Produktgewinnung erfolgt. Der Fermenter wird schon zu Prozessbeginn mit der Menge Nährmedium gefüllt, die zur Durchführung einer Fermentation erforderlich ist. In diesem Sinne stellt der beimpfte Fermenter ein geschlossenes System dar, in dem sich die Konzentrationen der Nährstoffe, der Stoffwechselprodukte und von Zellen mit fortschreitendem Wachstum verändern.

Das Batch-Verfahren kommt bei den meisten Starterkulturen zur Anwendung, weil es gegenüber den modernen Kultivierungsverfahren mit halboffenen oder offenen Systemen mehrere Vorteile bietet. Zum einen ist ein geringerer apparativer und personeller Aufwand erforderlich, zum anderen birgt die geschlossene Fahrweise ein geringeres Risiko der Kontamination mit Fremdorganismen [50].

Produktionsphasen

Der technische Ablauf des industriellen Prozesses zur Herstellung von *Streptococcus thermophilus* als Starterkultur kann in die drei nacheinander ablaufenden Prozessphasen [9]

- Upstreaming,
- Kultivierung und
- Downstreaming

eingeteilt werden, also in eine vorbereitende, eine Anzucht- und eine Aufarbeitungsphase. Diese sollen im Folgenden genauer beschrieben werden.

Phase 1: Upstreaming

Am Anfang des Herstellungsprozesses steht das sogenannte Upstreaming. Diese Prozessphase umfasst sämtliche Abläufe, die notwendig sind, damit die Kultivierung gestartet werden kann. Dies schließt die Anmischung eines Nährmediums und das Ansetzen einer Vorkultur ein, aus der das Impfmateriale zur Beimpfung des Bioreaktors entnommen wird. Als Nahrungs- und Energiequelle für die Zellen wird Lactose verwendet. Die hergestellte lactosehaltige Nährlösung wird sterilisiert, um Keimfreiheit zu gewährleisten, temperiert und mit einer konstanten Drehzahl im Fermenter durchmischt. Die Durchmischung erfolgt mit Hilfe eines in der Mitte des Fermenters angeordneten Rührwerks und soll für eine homogene Verteilung der Nährstoffe sorgen.

Zur Beimpfung des Bioreaktors wird aus der Vorkultur 1 % des Reaktorarbeitsvolumens entnommen und in den Bioreaktor gegeben. Um die benötigte Menge Impfmateriale für eine Fermentation herstellen zu können, wird das Volumen der Vorkultur gewöhnlich in mehreren Verfahrensschritten erhöht. Dabei werden die Kulturen nach jeder Passage in einen größeren Vorfermenter überimpft und dort weiter vermehrt.

Phase 2: Kultivierung

Nach Abschluss des Upstreamings wird ein mit Nährlösung gefüllter Produktionsfermenter mit der Vorkultur beimpft und es beginnt die Kultivierungsphase, in der eine rasche Vermehrung der Zellen um mehrere Größenordnungen angestrebt wird. Die Bakterien nehmen dabei das Substrat Lactose aus der Nährlösung auf, verstoffwechseln es und scheiden Milchsäure als Stoffwechselprodukt aus den Zellen an die Umgebung aus.

Damit die Vermehrung der Bakterien im Fermenter ungehindert ablaufen kann, werden verschiedene Kultivierungsparameter, die Einfluss auf das mikrobielle Wachstum ausüben, eingestellt und geregelt. Wichtige Kontrollparameter sind z. B. die Temperatur und der pH-Wert der Nährlösung. Die Temperatur wird während der Kultivierung auf 40 °C geregelt. Der pH-Wert wird vor der Inokulation gemäß den Kultivierungsbedingungen [10] so eingestellt, dass er unmittelbar nach der Inokulation den Wert 6.6 bei einer zulässigen Abweichung von ± 0.2 annimmt. Im weiteren Verlauf der Kultivierung wird der pH-Wert ausgehend von diesem Startwert durch die freigesetzte Milchsäure kontinuierlich abgesenkt und ab dem Zeitpunkt, zu dem ein Wert von 6.0 erreicht ist, auf diesen Sollwert durch Zudosierung von Lauge geregelt.

Je nachdem, wie schnell sich die Bakterienkultur entwickelt, wird die Kultivierung nach etwa 3–4 h beendet und die Ernte der Biomasse gestartet. Die Biomasse wird dabei aus der Kulturlösung isoliert und in weiteren Verfahrensschritten aufgearbeitet, bis das fertige, in der Lebensmittelindustrie einsetzbare Starterprodukt zur Verfügung steht. Dieser Ernte- und Aufarbeitungsprozess wird auch Downstreaming genannt.

Phase 3: Downstreaming

Das Downstreaming beginnt zum gewählten Erntezeitpunkt mit einer Kühlung des Fermenterinhalt. Eine Kühlung auf unter 12 °C soll dafür sorgen, dass die Zellen ihre Stoffwechselaktivität einstellen und nicht weiter wachsen. Die Bakterien sollen erst in Lebensmittelfermentationen ihre Aktivität wiedererlangen und dort die gewünschten Stoffwechsellleistungen erbringen. Auf die Kühlung des Bioreaktors folgen die Verfahrensschritte Konzentrierung, Konservierung, Abfüllung, Verpackung und Lagerung. Dabei wird die Biomasse zunächst vom Nährmedium abgetrennt, vorzugsweise durch Zentrifugation, im Anschluss daran durch Konservierung haltbar gemacht, abgefüllt, verpackt und bis zur Auslieferung an die milchverarbeitende Industrie gekühlt gelagert.

Als Konservierungstechnik kommt je nach späterem Anwendungszweck meist die Gefriertrocknung oder das Einfrieren in Flüssigstickstoff zum Einsatz. Die letztgenannte Konservierungsmethode zeichnet sich durch besonders hohe Überlebensraten und lange Haltbarkeit aus [35]. Sie wird deshalb bevorzugt für die Langzeitlagerung der Organismen verwendet.

Für die Herstellung von Kulturmischungen werden die einzelnen Reinstämme je nach Anwendungsziel und den gewünschten Eigenschaften der Lebensmittelprodukte im geeigneten Mischungsverhältnis kombiniert und für den Direkteinsatz in der Lebensmittelindustrie in Dosen oder Beuteln abgefüllt. Gefriergetrocknete, als Pulver vorliegende Kulturen werden bei −20 °C gelagert, tiefgefrorene Kulturen in Form von Pellets bei −45 °C. Um Zellschädigungen bei der Konservierung und Lagerung zu verhindern, werden den konzentrierten Kulturen Schutzstoffe zugegeben.

Der beschriebene industrielle Prozess zur Herstellung von *Streptococcus thermophilus* als Starterkultur ist in Abbildung 2.11 schematisch dargestellt.

Bedeutung des Erntezeitpunktes für den Produktionserfolg

Zu den qualitativen Merkmalen einer Starterkultur gehören ihre säure-, aroma- und geschmacksbildenden Eigenschaften sowie ihre Sterilität und Lagerstabilität, wobei das wichtigste Qualitätsmerkmal ihre Säuerungsaktivität ist. Eine hohe Säuerungsaktivität bedeutet, dass der pH-Wert eines Milcherzeugnisses nach der Beimpfung mit der Kultur rasch abgesenkt wird. Eine rasche Säuerung ist für den weiteren fermentativen Umwandlungsprozess und die hygienische Sicherheit der mikrobiell hergestellten Lebensmittelprodukte von grundlegender Bedeutung [49].

Ein entscheidender Einflussfaktor der Starterproduktqualität ist der gewählte Erntezeitpunkt [49, 50]. Bei Milchsäurebakterien, die im Batch-Prozess kultiviert werden, existiert eine organismusspezifische optimale Zeitspanne, während der die Biomasse in einem günstigen physiologischen Zustand in Bezug auf die bakterielle Aktivität und Zellkonzentration geerntet werden kann [28, 49]. Danisco gibt für *Streptococcus*

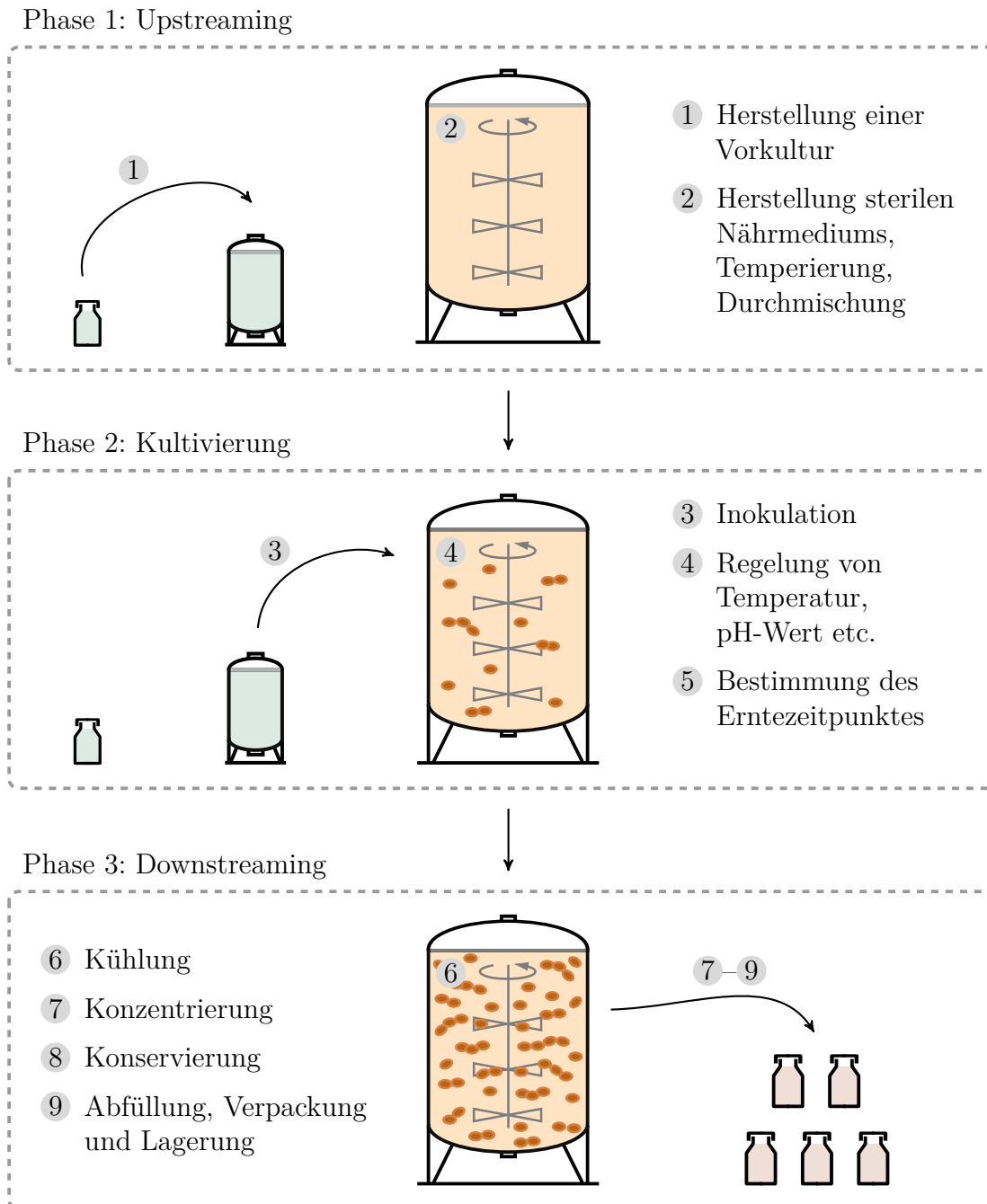


Abbildung 2.11: Phasen und wichtige Verfahrensschritte des industriellen Prozesses zur Herstellung von *Streptococcus thermophilus* als Starterkultur.



thermophilus als optimal den Prozesszeitpunkt an, zu dem die Säuerungsaktivität der Kultur maximal ist. Da die Säuerungsaktivität während der Kultivierung nicht direkt gemessen werden kann, wird als online zugängliches Kriterium der Zeitpunkt verwendet, zu dem die Laugenzugaberate ein Maximum aufweist. Anschaulich entspricht dieser Zeitpunkt der Wendestelle der zur pH-Wert-Regelung verbrauchten Laugenmenge als Funktion der Zeit. Es muss also die erste Ableitung der Laugenverbrauchskurve bestimmt und überwacht werden.

Der Zeitpunkt maximaler Säuerungsaktivität der Bakterienkultur weist im industriellen Kultivierungsprozess von *Streptococcus thermophilus* bei der Firma Danisco eine unerwünschte Streuung von bis zu einer Stunde auf, die auf eine unvermeidbare Variabilität der qualitativen Eigenschaften des verwendeten Impfmateri als zurückzuführen ist. Dabei ist eine genaue Detektion des optimalen Erntezeitpunktes von großer Bedeutung für die Qualität des Starterprodukts und damit auch für den Produktionserfolg, denn die Aktivität von *Streptococcus thermophilus* nimmt rasch ab, wenn der Erntezeitpunkt verzögert wird [50]. Ein qualitativ schlechteres Starterprodukt ist dann die Folge. Der optimale Erntezeitpunkt muss deshalb zeitnah und kultivierungsabhängig bestimmt werden.

Da die gegenwärtige Prozessführung teilweise noch auf traditionellen Produktionstechniken beruht, können die genannten Forderungen nicht im gewünschten Maße erfüllt werden. So erfolgt die Detektion des optimalen Erntezeitpunktes manuell, sodass die Einleitung der Reaktorkühlung im Ermessen des Bedienpersonals liegt. Dabei kann der optimale Erntezeitpunkt zuverlässig erst nach einer gewissen Verzugszeit festgestellt werden, sodass die Kühlung mit Verzögerung eingeleitet wird. Diese Verzugszeit variiert von Fermentation zu Fermentation, wodurch Schwankungen in Ausbeute und Qualität des Starterprodukts begünstigt werden.

Um eine gleichbleibend hohe Qualität des Starterprodukts bei hoher Wirtschaftlichkeit gewährleisten zu können, ist eine zuverlässige und auf objektiven Kriterien basierende Erkennungsmethodik nötig. Zusätzliche Möglichkeiten zur Prozessoptimierung ergeben sich, wenn der optimale Erntezeitpunkt schon im Voraus bestimmt werden kann. Dieses Ziel wird in der vorliegenden Arbeit durch die Entwicklung eines dafür geeigneten modellbasierten prädiktiven Verfahrens verfolgt.

Vor der Aufstellung des mathematischen Modells, auf dem das prädiktive Verfahren basieren soll, wird im folgenden Kapitel der betrachtete Kultivierungsprozess von *Streptococcus thermophilus* behandelt. Es wird der experimentelle Kultivierungsprozess beschrieben. Die im Labormaßstab durchgeführten Fermentationen ermöglichen es, auch Daten von Größen gewinnen zu können, welche im industriellen Prozess messtechnisch nicht erfasst werden, die aber für die Identifikation und Validierung des aufzustellenden Modells benötigt werden. Dies betrifft die drei Systemgrößen Keimzahl, Milchsäure- und Lactosekonzentration.

Kapitel 3

Experimenteller Kultivierungsprozess

In diesem Kapitel werden die zur Durchführung der Kultivierungsversuche mit *Streptococcus thermophilus* und zur Erfassung und Analyse von Messgrößen verwendeten Materialien und Methoden vorgestellt. Dies umfasst neben der Beschreibung des eingesetzten Organismus, der Herstellung der Vorkultur und des Nährmediums sowie der Kultivierungsbedingungen auch die Beschreibung der verwendeten Prozessumgebung, der Online-Messtechnik und der Methoden der Offline-Analysen zur Datenerfassung. Schließlich werden die Details zum Ablauf der Versuche erläutert.

3.1 Prozessmaterial und Versuchsbedingungen

Dieser Abschnitt behandelt den in den Experimenten verwendeten Organismus, die Herstellung der Vorkultur und des Nährmediums sowie die Kultivierungsbedingungen zur Durchführung der Experimente.

3.1.1 Organismus

In den Kultivierungsversuchen wird stets der Stamm *Streptococcus thermophilus* 1974 verwendet. Dieser Produktionsstamm wird von der Firma Danisco in konzentrierter Form zur Verfügung gestellt und im Biolabor des Lehrstuhls für Automatisierungs- und Regelungstechnik der CAU Kiel bis zu seiner Weiterverwendung gekühlt gelagert. Die Stammmnummer 1974 ist eine Danisco-interne Bezeichnung.

3.1.2 Vorkultur

Soll ein Kultivierungsversuch mit *Streptococcus thermophilus* durchgeführt werden, wird ein an die Anforderungen des Organismus angepasstes Nährmedium hergestellt und dieses dann mit einer Kultur des Bakteriums beimpft. Beim Beimpfen ist darauf

zu achten, dass das eingebrachte Impfmateriale in Bezug auf das Mediumvolumen eine ausreichend hohe Zahl aktiver und vermehrungsfähiger Zellen besitzt, um ein rasches Anwachsen der Kultur gewährleisten zu können [54]. Um ein entsprechend konditioniertes Impfmateriale zu erhalten, wird auf Basis des vorliegenden Zellkonzentrats eine Vorkultur angesetzt und aus dieser das Inokulum entnommen. Das entnommene Volumen entspricht in Standardfermentationen 1 % des Mediumvolumens, wobei die Konzentration der Bakterien im Inokulum bzw. in der Vorkultur im Normalfall etwa $1 \cdot 10^9$ Keime/ml beträgt.

Die Herstellung der Vorkultur erfolgt für gewöhnlich in mehreren Durchgängen, auch Passagen genannt, um das erforderliche Volumen durch eine ressourcenschonende Behandlung des Ausgangsmaterials schrittweise zu erhalten. Für experimentelle Fermentationen von *Streptococcus thermophilus* sind dafür zwei Passagen ausreichend. Nach jeder Passage werden die Zellen in einen größeren Behälter überimpft, in dem sie sich weiter vermehren können.

Als Nährmedium für die Vorkultur dient 9%ige m/v rekonstruierte Magermilch, die aus 9 g Magermilchpulver und 91 ml voll entsalztem Wasser (VE-Wasser) zubereitet wird. Die Bezeichnung m/v bringt hierbei zum Ausdruck, dass die vorstehende Prozentzahl den Anteil der Masse des Magermilchpulvers in Bezug auf das Gesamtvolumen der herzustellenden Magermilch angibt. Vor der Zugabe des Organismus zum Medium wird die Magermilch 15 min bei 110 °C im Autoklaven erhitzt, um sterile Bedingungen zu gewährleisten.

Für die Herstellung der ersten Passage der Vorkultur wird die Magermilch 1%ig m/v mit dem Zellkonzentrat beimpft. Dazu werden 0.1 g des Zellkonzentrats in 9 ml Medium suspendiert und bei 40 °C für 5–7 h inkubiert. Anschließend wird für die Herstellung der zweiten Passage ein Volumen Magermilch 2%ig v/v mit der Kultur aus der ersten Passage beimpft und im Inkubator bei 30 °C über einen Zeitraum von 14–16 h bebrütet. Das Produkt der zweiten Passage ist die Vorkultur, aus der das Inokulum zur Beimpfung des Nährmediums entnommen wird. Die Produkte der einzelnen Passagen sind zur Weiterverwendung geeignet, wenn die Zellen sich ausreichend vermehrt haben, was sich durch das Dicklegen der Milch am Ende jeder Passage leicht feststellen lässt.

3.1.3 Nährmedium

Das Nährmedium zur Durchführung der Kultivierungsversuche mit *Streptococcus thermophilus* setzt sich aus den Komponenten zusammen, die in Tabelle 3.1 aufgelistet sind. Diese Zusammensetzung entspricht genau der Rezeptur, die von der Firma Danisco für Produktionsfermentationen von *Streptococcus thermophilus* verwendet wird.

Tabelle 3.1: Rezeptur für 1l Nährmedium [10].

Bestandteil	Wert	Einheit
VE-Wasser	962	ml
Lactose	37	g
Molkepulver	20	g
Hefeextrakt	13	g
Magermilchpulver	5	g
Calciumcarbonat	1	g

Bei dem verwendeten Nährmedium handelt es sich um ein Komplexmedium, das die Bakterien mit dem Substrat Lactose und wichtigen Wachstumshilfsstoffen wie Aminosäuren und Vitaminen versorgt. Ein Komplexmedium enthält im Gegensatz zu einem chemisch definierten Medium organische Bestandteile, deren chemische Zusammensetzung nicht genau bekannt ist. Im verwendeten Nährmedium werden diese Komplexbestandteile in Form von Hefeextrakt und Molkepulver zugegeben.

Für einen Kultivierungsversuch mit *Streptococcus thermophilus* werden 2l Komplexmedium hergestellt. Dazu werden die festen Bestandteile des Mediums in VE-Wasser aufgelöst und die Nährlösung zur Sterilisation 10 min bei 121 °C im Autoklaven erhitzt. Zur Erhöhung der Stabilität der Medienbestandteile während der Sterilisation wird der pH-Wert vor dieser Behandlung von 6.6 auf 7.5 durch die Zugabe von Natronlauge (NaOH) angehoben. Nach der Sterilisation bzw. vor dem Beimpfen des Nährmediums mit der Kultur wird der pH-Wert mit Hilfe von Phosphorsäure (H₃PO₄) wieder auf 6.6 gesenkt.

3.1.4 Kultivierungsbedingungen

Die Versuche zur Kultivierung von *Streptococcus thermophilus* werden im Batch-Verfahren durchgeführt. Die Kultivierungsbedingungen, betreffend die Temperatur und den pH-Wert des Mediums sowie die Rührerdrehzahl und die Inokulationsmenge, werden für eine Standardfermentation wie in Tabelle 3.2 angegeben gewählt. Sie entsprechen den Bedingungen für industrielle Fermentationen des Organismus in Produktionsanlagen der Firma Danisco.

Das Medium wird also mit 1% Anteil des Mediumvolumens beimpft, was bei einem Mediumvolumen von 2l einem Inokulum von 20ml entspricht. Der pH-Wert wird zu Prozessbeginn so eingestellt, dass er vor der Inokulation den Wert 6.6 bei einer Toleranz von ± 0.2 annimmt. Nach der Inokulation sinkt der pH-Wert im Verlauf des

Tabelle 3.2: Kultivierungsbedingungen für Standardfermentationen von *Streptococcus thermophilus* [10].

Parameter	Einstellung
Temperatur	$(40 \pm 0.5) \text{ }^\circ\text{C}$
pH-Sollwert vor der Inokulation	$(6.6 \pm 0.2) \text{ pH}$
pH-Sollwert während der Kultivierung ²	$(6.0 \pm 0.2) \text{ pH}$
Rührerdrehzahl	400 rpm
Inokulationsmenge	1 % v/v

Prozesses aufgrund der von den Bakterien produzierten Milchsäure. Sobald ein pH-Wert von 6.0 erreicht ist, wird zweimolare Natronlauge zudosiert, um den pH-Wert auf diesen Sollwert zu regeln. Dies dient dem Zweck, optimale pH-Bedingungen für das Wachstum der Kultur zu gewährleisten. Bei der Regelung des pH-Wertes wird eine Abweichung von ± 0.2 toleriert.

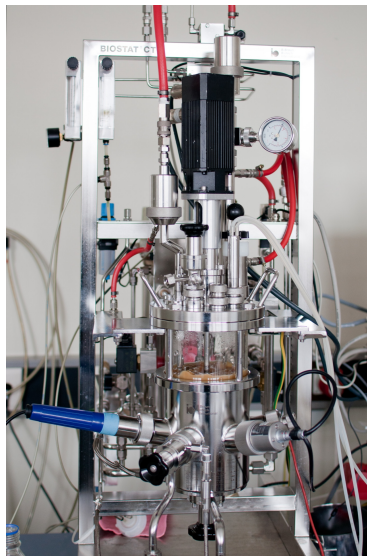
Neben Standardversuchen sollen für die notwendigen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit auch Experimente mit veränderten Kultivierungsbedingungen durchgeführt werden. Diese Veränderungen betreffen zum einen die Inokulationsmenge, die im Bereich von 0.5–4 % v/v variiert werden soll. Zum anderen sollen Versuche mit ausgeschalteter pH-Wert-Regelung durchgeführt werden.

3.2 Prozessumgebung

Das Biolabor des Lehrstuhls für Automatisierungs- und Regelungstechnik der CAU Kiel ist mit einer Prozessumgebung ausgestattet, die eine Durchführung und Analyse von biotechnologischen Fermentationen ermöglicht. Diese Versuchsumgebung wurde verwendet, um die für diese Arbeit notwendigen Kultivierungsversuche mit dem Bakterium *Streptococcus thermophilus* durchführen zu können.

Die Versuchsumgebung besteht aus einer Labor-Fermenteranlage des Typs Biostat CT der Firma BBI Biotech, ausgestattet mit einem in situ sterilisierbaren Fermenter mit dazugehörigen Peripherieeinrichtungen, einem digitalen Mess- und Regelungssystem zur Anlagenautomatisierung sowie einem modular aufgebauten Prozessleitsystem zur Prozessvisualisierung, -protokollierung und Speicherung der aufgezeichneten Daten. Diese drei Komponenten der biotechnologischen Versuchsanlage, die in Abbildung 3.1 gezeigt werden, sollen im Folgenden näher beschrieben werden.

²Die Regelung des pH-Wertes während der Kultivierung wird aktiviert, sobald der pH-Wert infolge der bakteriellen Säuerungsaktivität auf den Sollwert von 6.0 gefallen ist.



(a)



(b)



(c)

Abbildung 3.1: Komponenten der biotechnologischen Versuchsanlage am Lehrstuhl für Automatisierungs- und Regelungstechnik der CAU Kiel: (a) Fermenteranlage mit 2-Liter-Gefäß, Typ Biostat CT, (b) Mess- und Regelungssystem für Temperatur, pH-Wert und Rührerdrehzahl mit Bedieneinheit und Versorgungseinrichtung mit Schlauchpumpen zur pH-Wert-Korrektur mit Säure und Lauge, (c) Prozessleitsystem im 19"-Schrank mit Bedien- und Visualisierungssystem WinCC Siemens, Messverstärker für Leitfähigkeitssonde und unterbrechungsfreier Stromversorgung.

3.2.1 Fermenteranlage

Die zentrale Einheit der Laborfermenteranlage ist ein Rührfermenter mit 21 Arbeitsvolumen. Dieser Fermenter besteht aus einem Glasmantel mit einer Edelstahldeckelplatte, einem Edelstahlbodenteil und einem außenliegenden Doppelmantel für die Temperierung. Die Deckelplatte verfügt über Zugabeeinheiten für das Befüllen mit Nährmedium sowie das Einfüllen des Impfmateri als und die Zugabe von Lauge und Säure zur pH-Wert-Korrektur. Für die Echtzeitmessung des pH-Wertes und anderer Prozessgrößen können über Seitenstutzen Messinstrumente aufgenommen werden. Zur sterilen Entnahme von Proben während der Kultivierung steht ein bedampfbares Ventil zur Verfügung. Abbildung 3.2 zeigt den mit Messinstrumenten bestückten Laborfermenter während eines Kultivierungsversuchs.

3.2.2 Mess- und Regelungssystem

Die Fermenteranlage ist an ein digitales Mess- und Regelungssystem gekoppelt, die Digital Control Unit 3 (DCU). Die DCU stellt eine an die Ausführung der Fermenteranlage angepasste Softwareumgebung zur Verfügung, die sowohl Mess- und Regelungsaufgaben als auch Konfigurationsaufgaben übernimmt. Dazu gehören z. B. die Kalibrierung der Sensoren, die Messwerterfassung und die Regelung der Prozessgrößen wie Temperatur, pH-Wert und Rührerdrehzahl.

3.2.3 Prozessleitsystem

Eingebunden ist die DCU sowie die übrigen Anlagenkomponenten, die nicht mit der DCU in Verbindung stehen, in ein Prozessleitsystem, das alle verfügbaren Prozessdaten archiviert, verwaltet und sämtliche Standardaufgaben der Prozessüberwachung und -steuerung übernimmt. Über das integrierte Prozessvisualisierungssystem WinCC der Firma Siemens werden die von den Sensoren gelieferten Online-Messwerte graphisch dargestellt und protokolliert. Für eine Analyse und Weiterverarbeitung können die gespeicherten Daten über eine Schnittstelle externen Anwendungen wie z. B. MATLAB zur Verfügung gestellt werden. Dies erlaubt die Realisierung von leistungsfähigen Prozessführungs-, Beobachtungs- und Regelungskonzepten.

3.3 Prozessanalytik

Für die Analyse der durchgeführten Fermentationsversuche werden Messinformationen von verschiedenen Größen benötigt, die Aufschluss über die beim Bioprozess



Abbildung 3.2: 2-Liter-Laborfermenter mit einer Kultur des Bakteriums *Streptococcus thermophilus* und den für die Versuchsdurchführung notwendigen Zugabeeinheiten und Messinstrumenten während eines Experiments.

- | | |
|-------------------------------------|-----------------------|
| ① Zugabeeinheit für Medium | ④ pH-Elektrode |
| ② Zugabeeinheit für Inokulum | ⑤ Probenahmeventil |
| ③ Zugabeeinheit für Säure und Lauge | ⑥ Leitfähigkeitssonde |

ablaufenden Vorgänge geben. Den Zugang zu einigen dieser Größen bietet die Online-Messtechnik der Fermenteranlage, die über Sensoren Messwerte aufnimmt und in Echtzeit ausgibt. Andere Größen, die während des laufenden Prozesses nicht gemessen werden können, werden nach Abschluss des Prozesses mit Hilfe von Offline-Analysen bestimmt. Die für die Online- und die Offline-Datenerfassung eingesetzten Methoden sollen in den folgenden Unterabschnitten beschrieben werden.

3.3.1 Online-Messtechnik

Um für die Bakterien während der Kultivierung günstige Wachstumsbedingungen gewährleisten und aufrechterhalten zu können, werden die Temperatur und der pH-Wert der Kulturlösung von der DCU überwacht und geregelt. Für die Messung der Temperatur wird dabei ein Pt100-Widerstandstemperaturfühler verwendet, der pH-Wert wird mit einer Standard-pH-Elektrode aufgenommen. Die beiden Sensoren werden über Seitenstutzen in den Fermenter eingebaut.

Weitere Prozessgrößen, die online gemessen werden können, sind die verbrauchte Laugenmenge für die pH-Wert-Regelung und die elektrolytische Leitfähigkeit der Kulturlösung. Die zudosierte Laugenmenge wird direkt über die DCU messtechnisch erfasst. Die Leitfähigkeit wird mit einer Sonde in einem Seitenstutzen des Fermenters gemessen, wobei die Messsignale über einen Messverstärker an das Prozessleitsystem weitergegeben und dort verarbeitet werden.

Da die Temperatur der Kulturlösung im Verlauf des gesamten Kultivierungsprozesses durch Regelung nahezu konstant gehalten wird, liefert sie keine Informationen über das Prozessgeschehen und ist damit für die Prozessanalyse nicht weiter relevant. Für die anderen drei Prozessgrößen, also pH-Wert, Laugenverbrauch und elektrolytische Leitfähigkeit, deren Verläufe einen Einblick in das Prozessgeschehen erlauben, soll die hierzu verwendete Messtechnik näher beschrieben werden. Die charakteristischen Verläufe dieser drei Größen in Standardfermentationen sind in Abbildung 3.3 gezeigt.

pH-Wert

Der pH-Wert ist ein Maß dafür, wie sauer oder basisch eine wässrige Lösung ist. Zur Bestimmung des pH-Wertes der Kulturlösung bzw. seines Verlaufs in einer Fermentation wird eine pH-Elektrode der Firma Mettler-Toledo eingesetzt. Diese pH-Elektrode misst den pH-Wert nach dem potentiometrischen Verfahren, bei dem eine elektrische Potentialdifferenz zwischen zwei Elektroden, der Mess- und der Referenzelektrode, als ein Maß für den pH-Wert dient. Dabei registriert die Messelektrode ein dem pH-Wert der Kulturlösung proportionales Potential, während die Referenzelektrode ein konstantes und vom pH-Wert der Kulturlösung unabhängiges Bezugspotential liefert. Die beiden Elektroden sind in einem Schaft konstruktiv zu einer Einheit zusammengefasst und bilden eine sogenannte pH-Einstabmesskette.

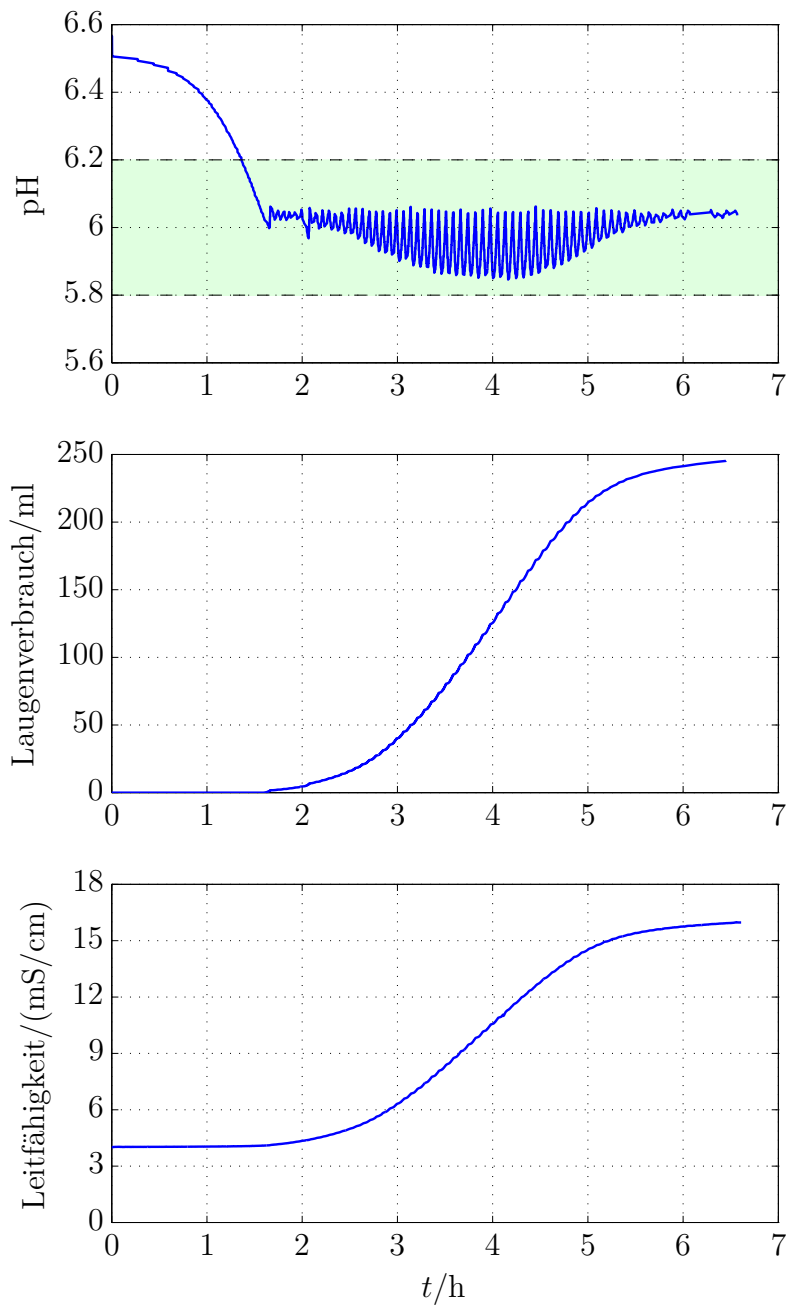


Abbildung 3.3: Charakteristische Verläufe von online zur Verfügung stehenden Größen pH-Wert, Laugenverbrauch und elektrolytische Leitfähigkeit.

■ zulässiger Wertebereich während der pH-Wert-Regelung

Das zentrale Element der Messelektrode ist eine pH-sensitive Glasmembran. Kommt diese Membran mit der Kulturlösung in Kontakt, baut sich an der Kontaktstelle ein vom pH-Wert der Kulturlösung abhängiges Potential auf. Dieses Potential wird mit dem Bezugspotential der Referenzelektrode verglichen und die bestehende Differenz mit Hilfe der sogenannten Nernst-Gleichung in einen zugehörigen pH-Wert umgerechnet [3].

Die mit der pH-Einstabmesskette registrierten pH-Werte werden vor jeder Fermentation mit den vorgegebenen Sollwerten abgeglichen. Für eine 2-Punkt-Kalibrierung werden Pufferlösungen mit pH-Werten von 7.0 und 4.0 verwendet. Ein Puffer ist ein Stoffgemisch, das den pH-Wert weitgehend konstant hält, wenn Säuren oder Basen in begrenzter Menge zugegeben werden.

Laugenverbrauch

Die Regelung des pH-Wertes der Kulturlösung auf den vorgegebenen Sollwert von 6.0 erfolgt über die Zudosierung von Natronlauge. Die DCU stellt hierfür einen PID-Regler zur Verfügung, mit dem die Schlauchpumpe, mit welcher die Lauge aus dem Laugenbehälter in den Fermenter gepumpt wird, ein- und ausgeschaltet werden kann. Die Pumpe besitzt eine fest eingestellte Drehgeschwindigkeit, sodass die Dosierung der Lauge über die Dauer von Ein- und Ausschaltvorgängen erfolgt [3]. Die DCU erfasst die Pumpenumdrehungen, rechnet den Wert in ein entsprechendes Volumen für die zudosierte Laugenmenge um und übergibt das Ergebnis schließlich als Messwert an das Prozessleitsystem.

Elektrolytische Leitfähigkeit

Die elektrolytische Leitfähigkeit gibt die Fähigkeit einer wässrigen Lösung an, elektrischen Strom leiten zu können. Sie wird verursacht durch Ionen, die beim Anlegen eines elektrischen Feldes eine auf die Elektroden ausgerichtete Bewegung ausführen und damit einen Stromfluss erzeugen. Eine wässrige Lösung, die nachweisbar bewegliche Ionen enthält, wird auch als Elektrolyt bezeichnet.

Eine einfache Messvorrichtung zur Bestimmung der elektrolytischen Leitfähigkeit einer wässrigen Lösung besteht aus einem einzelnen Elektrodenpaar, einer sogenannten 2-Pol-Messzelle. An die Elektroden dieser Messzelle wird eine Wechselspannung angelegt und der fließende Wechselstrom durch das Medium erfasst. In Verbindung mit der vorgegebenen Spannung berechnet ein Messumformer daraus den entsprechenden Leitfähigkeitswert. Jedoch kann bei diesem Messprinzip der zu erfassende Stromfluss und damit auch das Messergebnis durch Effekte an den Grenzflächen zwischen Elektrode und Medium deutlich verfälscht werden, z. B. durch Polarisationserscheinungen oder Verschmutzungen.

Eine Verbesserung der klassischen 2-Pol-Messzelle wird durch eine 4-Pol-Technik erreicht. Bei diesen Messzellen wird mit Hilfe eines weiteren Elektrodenpaares eine

Trennung zwischen Speisung und Messung realisiert, wodurch es möglich wird, die genannten Störeinflüsse zu kompensieren.

In Kultivierungsversuchen mit *Streptococcus thermophilus* wird zur Messung der elektrolytischen Leitfähigkeit eine 4-Pol-Messzelle vom Typ CS60 der Firma Optek-Danulat in Kombination mit dem Messumformer C200 derselben Firma verwendet.

3.3.2 Offline-Analysen

Für eine aussagekräftige Beschreibung des Fermentationsverlaufs wird neben den online messbaren Größen, also pH-Wert, Laugenverbrauch und Leitfähigkeit, die Information über weitere prozessrelevante Größen benötigt, die nicht über Sensoren in Echtzeit erfasst werden können, sondern erst nach Ablauf des Prozesses durch Offline-Analysen bestimmt werden müssen. Hierzu gehören die Keimzahl, die Konzentration des Produkts Milchsäure sowie des Substrats Lactose im Fermenter.

Um diese drei Größen a posteriori bestimmen zu können, werden im Verlauf einer Fermentation über das Probenahmeventil sterile Proben aus dem Fermenter entnommen, anschließend aufbereitet und nach dem Prozess analysiert. Die Probenahmen erfolgen gewöhnlich in einem zeitlichen Abstand von etwa 20–30 min. Die typischen Messkurven von Keimzahl, Milchsäure- und Lactosekonzentration in Standardfermentationen zeigt Abbildung 3.4.

Keimzahl

Die Bestimmung der Keimzahl erfolgt nach dem Koch'schen Plattengussverfahren. Dieses Verfahren beruht auf der Annahme, dass aus einer Keimzelle unter günstigen Wachstumsbedingungen nach einiger Zeit eine Bakterienkolonie entsteht, die mit freiem Auge sichtbar ist. Die sichtbaren Kolonien, man spricht in diesem Zusammenhang auch von kolonienbildenden Einheiten (engl. *colony-forming units*, kurz CFU), können ausgezählt und die Konzentration der Bakterien im Fermenter für jeden Probenahmezeitpunkt auf diese Weise leicht ermittelt werden.

Aufgrund der hohen Zellzahl in der Kultur müssen die Proben für eine praktikable Auszählung der Keimzellen verdünnt werden. Um eine auszählbare Verteilung der Keimzellen auf der Platte zu erhalten, werden mehrere Verdünnungsstufen benötigt. Ziel ist dabei, dass 1 ml der verdünnten Probe, die auf die Platte gegeben wird, nicht weniger als 20 und nicht mehr als 200 Keimzellen enthält. Die Anzahl der Keimzellen auf der Platte soll einerseits nicht zu klein sein, damit der statistische Fehler durch Zählfehler nicht zu groß wird, andererseits sollen sich auf der Platte nicht zu viele Keimzellen befinden, damit sie sich dort besser verteilen können und sich nicht gegenseitig im Wachstum hemmen. Die Anzahl der Verdünnungsstufen, die notwendig ist, um die gewünschte Keimzahl auf der Platte zu erhalten, richtet sich nach der in der

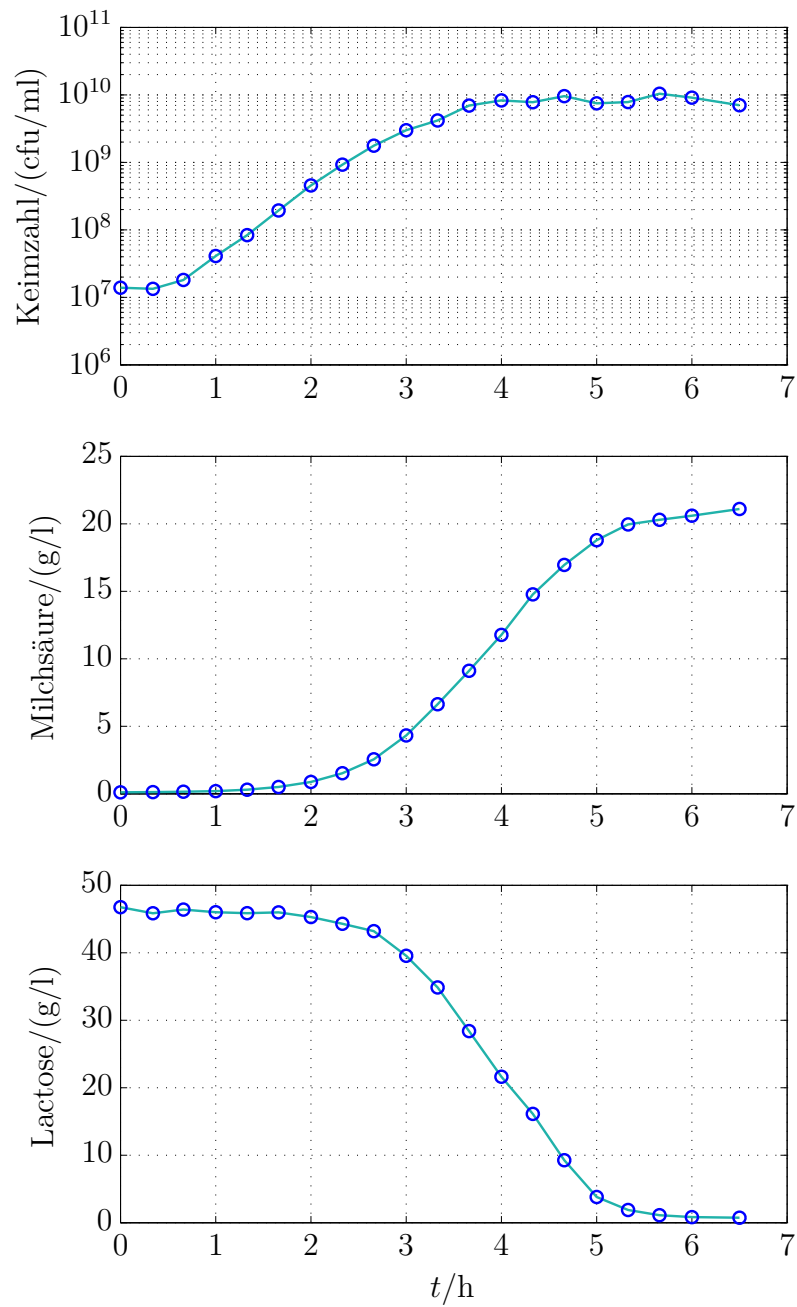


Abbildung 3.4: Charakteristische Verläufe der durch Offline-Analysen bestimmten Größen Keimzahl, Milchsäure- und Lactosekonzentration.

- Messwerte
- lineare Interpolation

Probe zu erwartenden Keimzahldichte, die vom Zeitpunkt der Probenahme abhängt. In einer Standardfermentation sind für Proben, die am Anfang der Fermentation entnommen wurden, Verdünnungsreihen mit fünf Verdünnungsstufen ausreichend. Zum Ende der Fermentation muss die Zahl der Verdünnungsstufen auf acht erhöht werden.

In jeder Verdünnungsstufe wird eine 1 : 10 Verdünnung angelegt. In der ersten Verdünnungsstufe wird 1 ml des Probenmaterials in ein Reagenzglas mit 9 ml Verdünnungslösung gegeben und anschließend mit einem Rüttler durchmischt, um eine gleichmäßige Verteilung der Keimzellen im Reagenzglas zu gewährleisten. Weitere Verdünnungsstufen werden nach der gleichen Methode hergestellt, wobei für die Herstellung einer nächstfolgenden Verdünnungsstufe 1 ml aus der vorherigen Verdünnungsstufe verwendet wird.

Nach der Herstellung der Verdünnungsreihe wird aus der letzten Verdünnungsstufe 1 ml entnommen, auf eine sterile Petrischale aufgebracht und anschließend mit verflüssigtem und temperiertem Nährboden vermengt. Als Nährboden wird Lactic-Agar verwendet. Dieser Nährboden wird speziell für den Keimzahnachweis von Streptokokken und Lactobazillen eingesetzt. Damit sich die Zellen auf dem Nährboden vermehren und Kolonien bilden können, werden die behandelten Platten, nachdem der Nährboden abgekühlt und fest geworden ist, drei Tage bei 37 °C im Inkubator bebrütet. Nach der Inkubation sind die Kolonien auf dem gelförmigen Nährboden, wie in Abbildung 3.5 zu sehen, als helle Punkte zu erkennen, sodass sie leicht ausgezählt werden können.

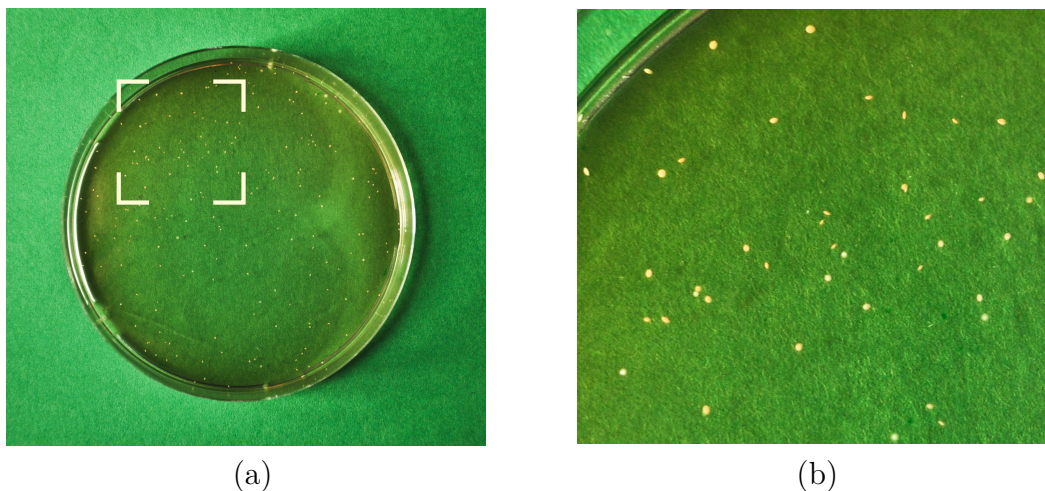


Abbildung 3.5: Bestimmung der Keimzahl einer Fermenterprobe mittels Plattengussverfahren: (a) Petrischale mit kolonienbildenden Einheiten des Bakteriums *Streptococcus thermophilus* auf Lactic-Agar, (b) vergrößerte Darstellung des im linken Bild markierten Ausschnitts. Die Kolonien sind hier als helle Punkte erkennbar.

Um die Genauigkeit der Keimzahlbestimmung zu erhöhen, wird jede Probe auf vier Platten ausplattiert, die Platten einzeln ausgewertet und aus den Einzelergebnissen ein arithmetisches Mittel gebildet. Das Resultat der 4fach-Bestimmung wird durch den jeweiligen Verdünnungsfaktor dividiert und man erhält eine durchschnittliche Gesamtkeimzahl, die in der Einheit cfu/ml angegeben wird. Der Verdünnungsfaktor entspricht dabei der negativen Zehnerpotenz der Anzahl der Verdünnungsstufen, die für die Herstellung der Verdünnungsreihe benötigt wurde.

Milchsäure- und Lactosekonzentration

Die Bestimmung der Konzentration von Milchsäure und Lactose in den Fermenterproben erfolgt mit Hilfe eines HPLC-Systems der Firma Thermo Separation Products.

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. *high-performance liquid chromatography*, kurz HPLC) ist eine Standardanalysetechnik für komplexe Flüssigkeitsgemische. Um definierte chemische Stoffe in der zu untersuchenden Probe zu identifizieren und zu quantifizieren, wendet die HPLC ein chromatographisches Trennverfahren an, bei dem die Probe zusammen mit einem Laufmittel, dem Eluenten, eine Trennsäule durchströmt. Während des Durchlaufs gehen die verschiedenen Stoffe in der Probe unterschiedlich starke Wechselwirkungen mit den Feststoffpartikeln der Trennsäule ein, was zu unterschiedlichen Verweilzeiten dieser Stoffe in der Säule führt. Sie verlassen die Trennsäule aufgrund der resultierenden unterschiedlichen Fließgeschwindigkeiten mit einer zeitlichen Verschiebung gegeneinander und können so im Anschluss getrennt voneinander analysiert werden.

Bei dieser Analyse wird mit Hilfe eines Detektors kontinuierlich der Brechungsindex des aus der Säule ausströmenden Gemisches gemessen. Das aufgenommene Signal liefert ein Chromatogramm, auf dem die detektierten Stoffe als Peaks über einer Zeitachse auftreten, wie in Abbildung 3.6 für zwei verschiedene Stoffe schematisch gezeigt.

Der Zeitpunkt, an dem ein Peak auftritt, gibt die Durchlaufzeit des zugehörigen Stoffes an, während der Inhalt der Fläche unter dem Peak ein Maß für die Konzentration ist. Um die Peaks den Stoffen anhand ihrer Durchlaufzeiten zuzuweisen und die Flächeninhalte Konzentrationswerten zuzuordnen zu können, werden anhand von Standards Referenzwerte ermittelt und mit den Ergebnissen aus dem Chromatogramm verglichen. Diese Auswertung wird mit Hilfe der Software ChromQuest der Firma Thermo Separation Products durchgeführt, wobei zur Messung des Brechungsindex ein Brechungsindexdetektor der Firma Shodex verwendet wird.

Da die aus dem Fermenter entnommenen Proben Zellbestandteile und Mediumkomponenten enthalten, die die Trennsäule verunreinigen können, werden die Proben vor dem Einsatz in der HPLC aufbereitet. Sie werden zentrifugiert, um eine Abtrennung der festen von der flüssigen Phase zu erreichen, und der Überstand wird nach der

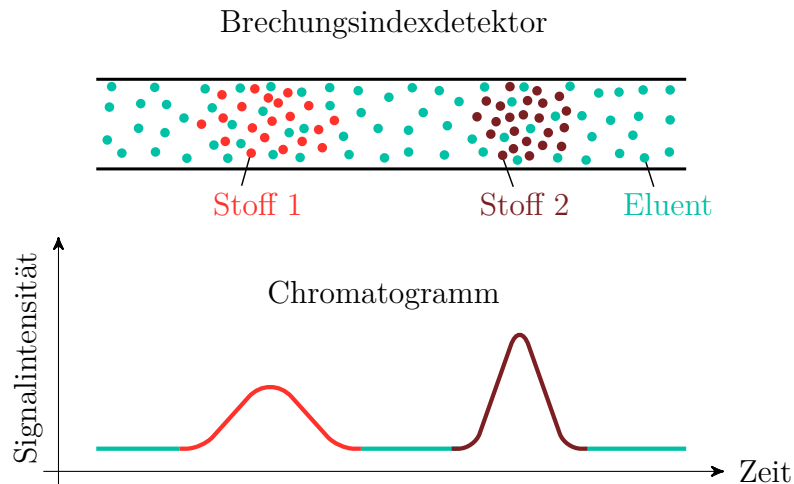


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung einer Brechungsindexmessung und des zugehörigen Chromatogramms, in Anlehnung an [63].

Zentrifugation filtriert. Bis zur Verwendung in der HPLC werden die aufbereiteten Proben eingefroren, um Probenstabilität über einen längeren Zeitraum gewährleisten zu können.

Im Folgenden wird der allgemeine Ablauf eines unter Standardbedingungen durchgeführten Kultivierungsversuchs mit dem Bakterium *Streptococcus thermophilus* beschrieben.

3.4 Prozessablauf

Zur Durchführung eines Standardkultivierungsversuchs wird der Fermenter zunächst sterilisiert, danach mit 2l sterilem Nährmedium der Zusammensetzung nach Tabelle 3.1 befüllt und temperiert. Anschließend wird das Medium mit 1% Volumenanteil Vorkultur beimpft und die Bakterien werden dann unter den Bedingungen, wie in Tabelle 3.2 angegeben, kultiviert.

Damit die zu beschreibenden Vorgänge im Kultivierungsprozess mit Hilfe einer Modellvorstellung, die im nachfolgenden Kapitel formuliert werden soll, besser nachgebildet werden können, wird der Prozess über den optimalen Erntezeitpunkt hinaus bis zum vollständigen Abbau der Lactose durch die Bakterien weitergeführt. Dies entspricht einer Fermentationsdauer von 6–7h. Dann endet der praktische Teil des Versuchs, an den sich der analytische Teil anschließt. Ein Downstreaming wie im industriellen Prozess ist nicht Bestandteil der Experimente.

Der Ablauf des Kultivierungsprozesses soll anhand der in den Abbildungen 3.3 und 3.4 gezeigten Verläufe der online gemessenen Größen pH-Wert, Laugenverbrauch und Leitfähigkeit und der offline bestimmten Größen Keimzahl, Milchsäure- und Lactosekonzentration genauer beschrieben werden.

Nach der Inokulation, zum Prozesszeitpunkt $t = 0$, kann im Fermenter eine Keimzahl von etwa $1 \cdot 10^7$ cfu/ml gemessen werden sowie eine Lactosekonzentration von etwa 47 g/l. Durch das eingebrachte Impfmateriale befindet sich zu diesem Zeitpunkt auch eine geringe Menge Milchsäure im Bioreaktor. Im Verlauf der Fermentation wird die Lactose durch die Bakterien abgebaut und die Kulturlösung zunehmend mit Lactat angereichert, von welchem der Großteil mit Wasser zu Milchsäure reagiert. Die ansteigende bakterielle Aktivität kann in der Anfangsphase des Prozesses online nur über die Absenkung des pH-Wertes beobachtet werden, während die Leitfähigkeit in dieser Prozessphase, wie in Abbildung 3.3 zu sehen, noch keine nennenswerten Veränderungen zeigt.

Nach einer Fermentationszeit von etwa 1.5 h ist der pH-Wert auf den Sollwert von 6.0 gesunken und die pH-Wert-Regelung wird aktiv. Die zudosierte Lauge neutralisiert die ab diesem Zeitpunkt gebildete Menge Milchsäure, wodurch einer Absenkung des pH-Wertes in einen die Zellaktivität hemmenden Bereich entgegengewirkt wird. Am Ende des Kultivierungsversuchs, das im betrachteten Fall nach 6.5 h erreicht ist, sind etwa 250 ml Lauge verbraucht worden.

Sowohl die freigesetzten Lactationen als auch die ionisierten Moleküle der Lauge tragen zur Erhöhung der elektrolytischen Leitfähigkeit der Kulturlösung bei. So steigt die Leitfähigkeit im Verlauf der Fermentation von etwa 4 mS/cm am Anfang auf etwa 16 mS/cm zum Ende des Experiments an.

Wie in Abbildung 3.3 zu sehen, schwingt der pH-Wert während der Regelung. Da die Oszillationen innerhalb des geltenden Toleranzbereichs liegen, ist ein negativer Einfluss auf das bakterielle Wachstum nicht zu erwarten. Durch eine bessere Einstellung des pH-Wert-Reglers kann dieses Schwingen jedoch weitestgehend beseitigt werden, wie in einem Standardversuch (Versuch ct20110622), der in Kapitel 5 behandelt wird, zu sehen ist.

Nach einer Fermentationsdauer von etwa 4 h kommt die Zellvermehrung schließlich zum Erliegen und die Bakterien stellen den Stoffwechsel auf Erhalt um. Zu diesem Zeitpunkt ist die Bakteriendichte etwa um den Faktor 1000 auf einen Wert von $1 \cdot 10^{10}$ cfu/ml angestiegen und die Lactose etwa zur Hälfte verstoffwechselt.

Im weiteren Verlauf der Fermentation wird, um den Stoffwechsel in den Zellen aufrechterhalten zu können, auch die restliche Lactose abgebaut, sodass das Medium weiter mit Milchsäure angereichert wird. Dabei bleibt die Keimzahl relativ stabil. Schwankungen, die in Abbildung 3.4 zu sehen sind, sind auf Messunsicherheiten zurückzuführen.

Wie in Abbildung 3.4 zu sehen, ist die Lactose nach 6.5 h vollständig abgebaut und es wird keine Milchsäure mehr gebildet. Zu diesem Zeitpunkt kann im Fermenter eine Milchsäurekonzentration von etwa 21 g/l nachgewiesen werden. Da die Lactose und die Milchsäure über den Zellstoffwechsel eng miteinander verknüpft sind, weisen ihre Messkurven einen ähnlichen, zueinander gespiegelten Verlauf auf.

Kapitel 4

Modellbildung

Dieses Kapitel befasst sich zum einen mit der mathematischen Beschreibung der Vorgänge Wachstum, Produktbildung und Substratverbrauch im experimentellen Kultivierungsprozess von *Streptococcus thermophilus*. Zum anderen soll eine Berechnungsvorschrift für den pH-Wert der Kulturlösung als Funktion der Milchsäurekonzentration aufgestellt werden.

Entsprechend dem allgemeinen Ablauf der mathematischen Modellbildung, der eingehend erläutert wird, werden zunächst geeignete Strukturen für die zwei aufzustellenden Modelle bestimmt. Dann werden die freien Parameter der Modelle durch Anpassung an experimentelle Daten identifiziert. Im letzten Schritt der Modellbildung wird die Vorhersagegüte der identifizierten Modelle durch Vergleich von Simulationen mit Messdaten, die nicht Bestandteil der Parameteridentifikation waren, überprüft.

4.1 Allgemeines

Ein mathematisches Modell stellt eine Möglichkeit dar, Wissen über ein technisches, biologisches oder chemisches System, kodiert als Formelapparat, abzulegen. Das auf diese Weise formulierte Wissen kann genutzt werden, um mit Hilfe von mathematischen Methoden neue Erkenntnisse über die Eigenschaften des Systems zu gewinnen oder sein Verhalten vorherzusagen, was eine Voraussetzung für die Optimierung bestehender und die Entwicklung neuer modellbasierter Prozessführungsstrategien ist.

Die mathematische Modellbildung beschreibt einen iterativen Prozess, bei dem im Allgemeinen Methoden der experimentellen Analyse mit Methoden der theoretischen Analyse kombiniert werden [30]. Die theoretische Analyse ermöglicht dabei die Bestimmung einer geeigneten Modellstruktur auf der Grundlage bekannter Gesetzmäßigkeiten, die für die im Prozess ablaufenden Vorgänge maßgebend sind. Die experimentelle Analyse oder Identifikation dient dem Ziel, mit Hilfe einer zu Grunde gelegten Modellstruktur das gemessene Prozessverhalten möglichst genau zu beschreiben, was auf das Problem der Parameteridentifikation führt.

Der prinzipielle Ablauf bei der Entwicklung eines mathematischen Modells ist in Abbildung 4.1 skizziert.

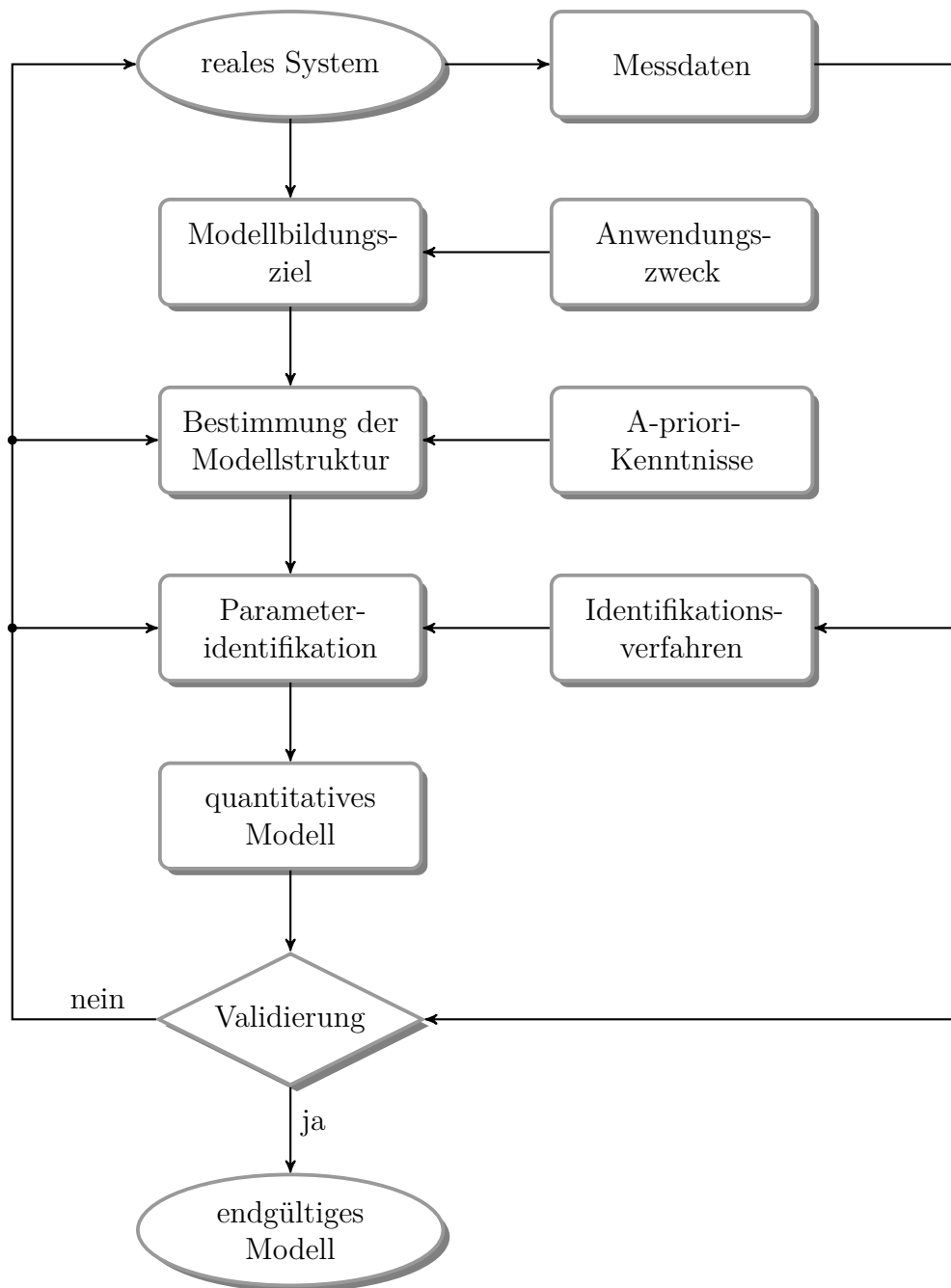


Abbildung 4.1: Allgemeines Ablaufschema der mathematischen Modellbildung.

Der erste Schritt bei der Entwicklung eines mathematischen Modells besteht in der Formulierung eines Modellbildungsziels für das betrachtete reale System. Das Modellbildungsziel ist sowohl vom Anwendungszweck als auch von der vorhandenen Informationsstruktur abhängig, und es bestimmt, welche Verhaltensformen des Systems relevant sind und mit welcher Genauigkeit sie im Modell berücksichtigt werden sollen.

Es werden dann die Größen herausgearbeitet, die das zu modellierende Systemverhalten wesentlich beeinflussen und beschreiben. Über deren strukturelle Verknüpfung werden A-priori-Kenntnisse zusammengestellt, die dann in Form eines Gleichungssystems aufgeschrieben werden. Das Gleichungssystem lässt sich dabei noch ohne Kenntnis der quantitativen Beziehungen der einzelnen Größen aufstellen, sodass man zunächst ein qualitatives parametrisches Modell des Systems mit einer festgelegten Struktur erhält. Günstig ist es hierbei, wenn die Modellstruktur über die theoretische Analyse bestimmt wird, weil dadurch die Genauigkeit des endgültigen mathematischen Modells erhöht werden kann [30].

Die Modellparameter lassen sich nur in den wenigsten Fällen direkt aus physikalischen oder chemischen Grundgleichungen ermitteln oder aus allgemein gültigen Gesetzen ableiten. Sie müssen vielmehr durch Anpassung der über das Modell generierten Werte an reale Werte bestimmt werden. Die Güte der Anpassung wird dabei über ein Fehlerkriterium bewertet, welches es zu minimieren gilt, um in Bezug auf dieses Kriterium bestmöglichen Parametersatz zu erhalten. Hierzu werden meist rechnergestützte Identifikationsverfahren eingesetzt.

Nach der Parameteridentifikation wird das mathematische Modell überprüft, um festzustellen, ob das Modell das reale Systemverhalten mit der erforderlichen Genauigkeit wiedergeben kann. Dazu wird die Modellantwort mit Messdaten, die nicht Grundlage der Identifikation waren, verglichen und es werden anschließend die resultierenden Abweichungen beurteilt.

Wird beim Vergleich von Realität und Modellbeschreibung eine zu große Abweichung festgestellt, muss eine Korrektur der Modellstruktur und/oder der Parameterwerte vorgenommen werden. Es entsteht ein Kreislauf, der oft mehrmals durchlaufen werden muss, bis eine Genauigkeit, die für die weiterführende Anwendung des mathematischen Modells benötigt wird, erreicht ist.

4.2 Modellierung des Kultivierungsprozesses

In diesem Abschnitt sollen die drei Vorgänge Wachstum, Produktbildung und Substratverbrauch im Kultivierungsprozess von *Streptococcus thermophilus* modelliert werden. Bei diesen über den Zellmetabolismus miteinander verknüpften Vorgängen

handelt es sich, wie es bei biologischen Prozessen im Allgemeinen der Fall ist, um hoch nichtlineare und komplexe Prozesse. Um ein anschauliches Prozessmodell zu entwickeln, das die komplexen Sachverhalte biologisch sinnvoll vereinfacht, die grundlegenden Eigenschaften jedoch mit der erforderlichen Genauigkeit erfasst, muss zunächst ein geeignetes Modellierungskonzept gewählt werden.

4.2.1 Modellierungskonzepte für mikrobielle Systeme

Mathematische Modelle, die zur Beschreibung von Vorgängen in mikrobiellen Systemen verwendet werden, lassen sich hinsichtlich des Grades ihrer Abstraktion bzw. Komplexität in verschiedene Modellklassen einteilen. Die Klassifizierung nach [58] differenziert dabei zwischen der Darstellung der Zellpopulation auf der einen Seite und der Darstellung der Zelle auf der anderen Seite.

Bei der Darstellung der Zellpopulation wird zwischen der segregierten und der unsegregierten Betrachtungsweise unterschieden. Segregierte Modelle beschreiben Zellpopulationen als heterogene Systeme aus unterscheidbaren Einheiten [9]. Eine Einheit bzw. ein Segregat kann dabei durch eine einzelne Zelle oder eine Unterpopulation repräsentiert werden, wobei mögliche Unterscheidungskriterien Eigenschaften sind wie z. B. morphologischer und physiologischer Zustand, Größe, Masse und die chemische Zusammensetzung der Zelle [58]. Unsegregierte Modelle hingegen berücksichtigen die Heterogenität der Segregate nicht. Die Zellkultur wird als eine Summe mittlerer Zellen mit identischen Zelleigenschaften beschrieben.

Hinsichtlich der Darstellung der Zelle wird differenziert zwischen der strukturierten und der unstrukturierten Sichtweise. Strukturierte Modelle beschreiben die Zelle als ein System aus mehreren unterscheidbaren Strukturelementen und Komponenten, wie z. B. DNA, Proteinen und Aminosäuren [9]. Diese Modelle werden auf der Grundlage einer theoretischen Analyse entwickelt, die detailliertes Wissen über die chemische Zusammensetzung der Zelle, ihre Funktion und die Stoffwechselwege voraussetzt. Die Prozessphänomene wie Zellvermehrung, Substratverbrauch und Produktbildung werden dabei auf Reaktionen in der Zelle zurückgeführt.

In unstrukturierten Modellen hingegen wird die Zelle idealisiert betrachtet und als eine einzelne Komponente dargestellt. Die beobachteten Prozessphänomene werden über makroskopische Größen wie Zellzahl, Masse oder Konzentration beschrieben. Gewöhnlich bedient man sich hierbei formal-kinetischer Ansätze, die die Zusammenhänge zwischen den Größen durch mathematische Funktionen beschreiben, die Analogien zu bereits bekannten Prozessen besitzen [43].

An der realen Situation am stärksten orientieren sich segregierte, strukturierte Modelle, während unsegregierte, unstrukturierte Modelle den höchsten Grad an Abstraktion besitzen. Letztere erlauben aufgrund ihrer Einfachheit, die grundlegenden

Vorgänge im Bioprozess mathematisch schnell zu erfassen, weshalb sie in der Mikrobiologie eine breite Anwendung finden.

Im industriellen Kultivierungsprozess zur Herstellung des Bakteriums *Streptococcus thermophilus* als Starterkultur wird der Produktionserfolg an der Menge der Biomasse und ihren qualitativen Eigenschaften gemessen. Der Prozess wird also im makroskopischen Maßstab betrachtet, sodass eine unsegregierte und unstrukturierte Betrachtungsweise der mikrobiellen Vorgänge ausreichend ist.

4.2.2 Bakterielleres Wachstum

Werden Bakterien in ein Nährmedium übertragen, in dem sie alle lebensnotwendigen Voraussetzungen vorfinden, beginnen sie zu wachsen und sich zu vermehren. Die Vermehrung findet dabei solange statt, bis ein Einflussfaktor begrenzend wirkt. Da in einer Batch-Fermentation ein begrenztes Nahrungsangebot vorliegt, verläuft das bakterielle Wachstum nicht mit kontinuierlich konstanter Geschwindigkeit. Es können mehrere Wachstumsphasen unterschieden werden.

Wachstumsphasen

In Batch-Fermentationen von *Streptococcus thermophilus* lassen sich anhand des Keimzahlverlaufs, wie in Abbildung 4.2 veranschaulicht, drei Wachstumsphasen unterscheiden: eine sogenannte Lag-Phase, eine exponentielle Phase und eine stationäre Phase.

Die Lag-Phase ist generell die erste Phase im Wachstumszyklus der Bakterienkultur. Sie umfasst den Zeitraum von der Beimpfung des Nährmediums im Fermenter zum Prozesszeitpunkt $t = 0$ bis zum Erreichen einer maximalen Wachstumsgeschwindigkeit, mit der die exponentielle Phase startet. In der Lag-Phase, in der noch keine nennenswerte Vermehrung beobachtet werden kann, findet eine Anpassung des bakteriellen Stoffwechsels an die neuen Lebensbedingungen im Bioreaktor statt. Die Länge der Lag-Phase ist im Allgemeinen organismusspezifisch und von der Qualität der Vorkultur abhängig [16]. Sie ist z. B. besonders lang, wenn die überimpften Bakterienzellen alt oder geschädigt sind [60].

Nach der Adaption an die neuen Lebensbedingungen im Fermenter beginnt die Phase des exponentiellen Wachstums der Bakterienkultur. Die Wachstumsgeschwindigkeit ist in dieser Phase konstant und maximal. Bei logarithmischer Darstellung der Keimzahl über der Zeitachse entspricht dies, wie in Abbildung 4.2 zu sehen, einem linear ansteigenden Kurvenverlauf.

Nach einer gewissen Zeit verlangsamt sich schließlich das Wachstum rasch und es folgt die stationäre Phase, die durch eine nahezu konstante, maximale Keimzahl gekenn-

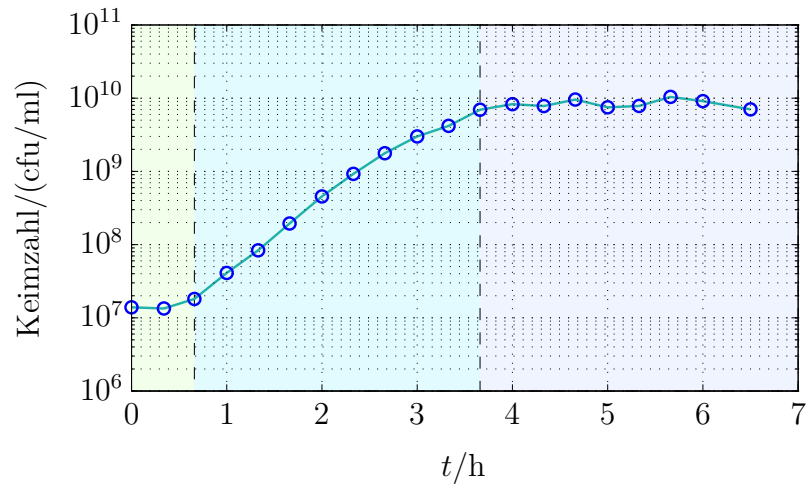


Abbildung 4.2: Unterscheidung der Wachstumsphasen im Kultivierungsprozess von *Streptococcus thermophilus*.

- Lag-Phase
- exponentielle Phase
- stationäre Phase

zeichnet ist. Diese Phase dauert bis zum Ende der Fermentation an. Ein Absterben der Zellen kann in dieser Zeit noch nicht beobachtet werden.

Im Folgenden soll eine mathematische Beschreibung für das Wachstum von *Streptococcus thermophilus* unter Berücksichtigung der einzelnen Phasen bestimmt werden. Als Ausgangspunkt wird das Wachstum in der exponentiellen Phase betrachtet.

Exponentielles Wachstum

Wie in Kapitel 2 beschrieben, vermehren sich Bakterien durch Zellteilung. Dabei entstehen nach jedem Teilungsvorgang aus einer Zelle zwei neue Zellen, sodass sich bei einer zunächst ungestörten Vermehrung ein exponentielles Wachstum der Bakterienkultur ergibt.

Unterstellt man, dass für die Verdopplung der Zellzahl eine konstante Generationszeit t_g benötigt wird, dann beträgt die Zellzahl X nach k Teilungsphasen zum Prozesszeitpunkt $t = t_k$

$$X = X_0 2^k, \quad (4.1)$$

mit der Anfangszellzahl X_0 zum Prozesszeitpunkt $t = 0$. Unter Anwendung der Ex-

ponentialfunktion und unter Berücksichtigung der Beziehung

$$k = \frac{t_k}{t_g} \quad (4.2)$$

kann die Zellzahl in Abhängigkeit der diskreten Zeit t_k angegeben werden mit

$$X = X_0 e^{\frac{\ln(2)}{t_g} t_k} . \quad (4.3)$$

Die absolute Zellzahl hat für den industriellen Kultivierungsprozess von *Streptococcus thermophilus* keine praktische Bedeutung. Relevant ist die Biomassenzunahme, die sich kontinuierlich vollzieht. Daher wird anstelle der Zellzahl die Biomasse im Sinne eines zeitkontinuierlichen, sich autokatalytisch vermehrenden Systems betrachtet. Im ungestörten Wachstum gilt für die Biomasse c_x in Analogie zu Gleichung (4.3) dann

$$c_x = c_{x,0} e^{\mu t} , \quad (4.4)$$

wobei $c_{x,0}$ die Anfangsbiomasse zum Prozesszeitpunkt $t = 0$ und μ einen wachstumsbezogenen Parameter beschreiben. Die zugehörige Differentialgleichung, die die exponentielle Wachstumsgeschwindigkeit der Biomasse nachbildet und dabei Gleichung (4.4) als Lösung besitzt, lautet zusammen mit der Anfangsbedingung

$$\dot{c}_x = \mu c_x , \quad c_x(0) = c_{x,0} . \quad (4.5)$$

Der Parameter μ ist in diesem speziellen Fall konstant und bezeichnet die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit der Biomasse.

Im Allgemeinen ist μ zeitvariant und von vielen biologischen, physikalischen und chemischen Umweltfaktoren im Fermenter abhängig. Zu den wichtigsten Einflussgrößen von μ gehören die Substratkonzentration c_s , die Produktkonzentration c_p sowie die Temperatur T und der pH-Wert des Mediums.

Um die kausalen Zusammenhänge mathematisch zu erfassen, wird μ gewöhnlich durch ein Produkt von Kinetiktermen gemäß der Gleichung

$$\mu = \mu_1(t) \mu_2(c_s) \mu_3(c_p) \mu_4(T) \mu_5(\text{pH}) \dots \quad (4.6)$$

dargestellt [6]. Dabei wird jedem Kinetikterm eine Einflussgröße zugeordnet und ihr Einfluss auf μ durch eine mathematische Funktion, die meist auf einem formalkinetischen Ansatz oder auf einer reinen Kurvenanpassung basiert, beschrieben. Eine Übersicht über die häufig verwendeten Kinetiken findet sich beispielsweise in [6, 8].

Auch in dieser Arbeit soll die multiplikative Form in Gleichung (4.6) für die Darstellung der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit der Biomasse verwendet werden. Da die Temperatur der Kulturlösung während der gesamten Fermentation durch Regelung relativ konstant bleibt, kann sie als Einflussgröße auf μ vernachlässigt werden.

Der pH-Wert wird nach einer milchsäurebedingten Absenkung in der Anfangsphase der Kultivierung ebenfalls auf Sollwert geregelt. Dabei treten Oszillationen des pH-Wertes auf. Es wird angenommen, dass diese Oszillationen keinen relevanten Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Biomasse ausüben, solange sie im Toleranzband um den Sollwert liegen. Des Weiteren stellte sich heraus, dass die Modellierung der pH-Wert-Absenkung in der unregulierten Phase mit Hilfe eines der Literatur entnommenen Kinetikterms keine nennenswerten Verbesserungen bei der Beschreibung des Biomassenverlaufs liefert. Deshalb werden als maßgebende Einflussgrößen auf μ die Konzentrationen der Milchsäure und der Lactose im Fermenter betrachtet.

Bei der Darstellung des Zellwachstums im Kultivierungsprozess von *Streptococcus thermophilus* mit Hilfe der Differentialgleichung (4.5) ist zu beachten, dass diese sich auf die Biomasse bezieht, während in der Keimzahlanalyse die Anzahl der Bakterienkolonien messtechnisch erfasst wird. Da eine Kolonie sowohl aus einer einzigen Zelle als auch aus einer Zellkette entstehen kann, ist der Zusammenhang zwischen Kolonienanzahl und Gesamtzellzahl oder auch Biomasse generell nicht eindeutig. Nach [5] kann aber davon ausgegangen werden, dass im betrachteten Kultivierungsprozess ein proportionaler Zusammenhang zwischen der ausgezählten Kolonienanzahl und der tatsächlichen Biomasse besteht. Gleichung (4.5) kann deshalb zur Beschreibung der Messgröße, also der Keimzahl, verwendet werden. In den folgenden Ausführungen soll mit c_x die Keimzahl bezeichnet werden.

Substratlimitierung

Damit die Bakterienkultur während der Kultivierung ungehindert wachsen kann, muss das Nährmedium die für das Wachstum erforderlichen Nährstoffe in ausreichender Konzentration enthalten. Sind diese Stoffe im Überschuss vorhanden, dann wird die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit der Kultur durch den Stoffwechsel und seine Regulation bestimmt [7]. Ist die Verfügbarkeit eines Nährstoffs aber begrenzt und sind keine alternativen Nährstoffe verfügbar, kommt es im Zuge des exponentiellen Wachstums nach einer gewissen Zeit zu Substratverarmung und schließlich zum Erliegen des Wachstums. Im Kultivierungsprozess des Bakteriums *Streptococcus thermophilus* ist das Wachstum durch die begrenzt verfügbare Lactose limitiert.

Eine weit verbreitete mathematische Darstellung des Bakterienwachstums unter Substratlimitierung ist die Kinetik von Monod [41]. Dieser formalkinetische Ansatz stellt die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit der Kultur in Abhängigkeit der Konzentration des limitierenden Substrats c_s durch die Gleichung

$$\mu(c_s) = \mu_{\max} \frac{c_s}{k_x + c_s} \quad (4.7)$$

dar, welche von Monod aus der Enzymkinetik übernommen und in die Wachstumskinetik der Mikroorganismen eingeführt wurde.

Der Parameter μ_{\max} in Gleichung (4.7) gibt die maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit der Bakterienkultur an, die unter den gegebenen Umweltbedingungen für Substratkonzentrationen $c_s \gg k_x$ erreicht wird. Der positive Parameter k_x bezeichnet die sogenannte Halbsättigungskonstante und ist ein Maß für die Substrataffinität des Organismus. Der Wert von k_x gibt die Substratkonzentration an, für die gerade die Hälfte der maximalen spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit erreicht wird.

Verzögertes Wachstum in der Lag-Phase

Die Monod-Kinetik in Gleichung (4.7) kann nur das Wachstum in der exponentiellen und der stationären Wachstumsphase beschreiben. Um das verzögerte Anwachsen in der Lag-Phase zu berücksichtigen, wird der Ansatz nach [7] verwendet, der die Monod-Kinetik um einen von der Zeit t abhängigen Korrekturterm gemäß der Gleichung

$$\mu(t, c_s) = \mu_{\max} (1 - e^{-t/t_{\text{lag}}}) \frac{c_s}{k_x + c_s} \quad (4.8)$$

erweitert. Dieser Ansatz geht von der Annahme aus, dass das bakterielle Wachstum in der Lag-Phase mit einer verschwindenden Geschwindigkeit startet, die sich dann mit der Zeit erhöht und für $t \gg t_{\text{lag}}$ den Normalwert annimmt. Der positive Parameter t_{lag} charakterisiert dabei die zeitliche Ausdehnung dieser Anlaufphase.

Produktinhibierung

Die Milchsäure ist ein weiterer Einflussfaktor, der wachstumsbegrenzend auf die Bakterienkultur wirkt. Sie wirkt ab einem gewissen Konzentrationswert hemmend auf die Zellaktivität, wobei die Inhibierung noch vor der Substratlimitierung auftritt und den Übergang in die stationäre Phase einleitet.

Der inhibierende Einfluss der Milchsäure auf das Wachstum kann bei der Formulierung von μ durch eine monoton fallende Kinetik berücksichtigt werden. In der Literatur wie z. B. [6] finden sich zur mathematischen Darstellung einer solchen Kinetik verschiedene Vorschläge, die meist auf empirischen Ansätzen beruhen. Zur Beschreibung der Produktinhibierung im Kultivierungsprozess von *Streptococcus thermophilus* hat sich der Ansatz nach [1] als geeignet erwiesen, mit dem in Simulationsstudien gute Ergebnisse erzielt werden konnten.

Die Hemmung des Wachstums bei diesem Ansatz wird über eine exponentiell abklingende Kinetik der Form

$$\mu(c_p) = e^{-k_i c_p} \quad (4.9)$$

beschrieben, wobei der positive Term k_i den Inhibierungsparameter darstellt.

Gesamtgleichung

Die vorgestellten Kinetiken zur Beschreibung des in der Lag-Phase verzögerten, durch die Milchsäure inhibierten und die Lactose limitierten Bakterienwachstums ergeben

zusammen eine Darstellung der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit von *Streptococcus thermophilus* im Kultivierungsprozess. Für μ kann also geschrieben werden

$$\mu = \mu_{\max} (1 - e^{-t/t_{\text{lag}}}) \frac{c_s}{k_x + c_s} e^{-k_i c_p} . \quad (4.10)$$

Die Differentialgleichung zur Beschreibung der Keimzahl zusammen mit der Anfangsbedingung lautet damit

$$\dot{c}_x = \left(\mu_{\max} (1 - e^{-t/t_{\text{lag}}}) \frac{c_s}{k_x + c_s} e^{-k_i c_p} \right) c_x , \quad c_x(0) = c_{x,0} . \quad (4.11)$$

4.2.3 Produktbildung

Eine Grundlage für die mathematische Beschreibung der Produktbildung bei Milchsäurebakterien liefert die Luedeking-Piret-Differentialgleichung [38]

$$\dot{c}_p = \alpha_p \dot{c}_x + \beta_p c_x . \quad (4.12)$$

Dieser klassische Ansatz geht von der Annahme aus, dass für die Produktbildung zwei Prozesse einer Zelle ursächlich sind: Wachstum und Stoffwechselerhaltung. Folglich wird die zeitliche Änderung der Produktkonzentration dargestellt durch die Summe aus einem wachstumsassoziierten Term mit positivem Parameter α_p und einem biomasseassoziierten Term mit ebenfalls positivem Parameter β_p .

Gemäß Gleichung (4.12) ist die Geschwindigkeit der Produktbildung \dot{c}_p im Normalfall, d. h., wenn $c_x > 0$ und $\dot{c}_x \geq 0$ gilt, stets positiv und von null verschieden. Diese Modellvorstellung berücksichtigt jedoch nicht die Situation, wenn es zu Substratverarmung kommt und schließlich keine Milchsäure mehr gebildet wird, sodass die Geschwindigkeit der Milchsäurebildung dann den Wert null annimmt.

Es muss also die Limitierung der Produktbildung durch das Substrat in der Differentialgleichung (4.12) berücksichtigt werden. Dabei muss gewährleistet sein, dass die Geschwindigkeit der Produktbildung bei kleiner werdender Konzentration des Substrats ebenfalls klein wird. Um diese Forderung zu erfüllen, wird in [5] eine Erweiterung der Luedeking-Piret-Gleichung in der Form

$$\dot{c}_p = (\alpha_p \dot{c}_x + \beta_p c_x) \frac{c_s}{k_p + c_s} \quad (4.13)$$

verwendet. Diese multiplikative Erweiterung beschreibt in Analogie zur Wachstumskinetik (4.7) einen Monod-Term mit einer Halbsättigungskonstante k_p .

Die Differentialgleichung (4.13) soll im Weiteren zur Beschreibung der Milchsäurekonzentration im Kultivierungsprozess von *Streptococcus thermophilus* verwendet werden.

4.2.4 Substratverbrauch

Im Kultivierungsprozess von *Streptococcus thermophilus* weisen die Konzentrationen von Milchsäure und Lactose aufgrund der metabolischen Zusammenhänge einen ähnlichen, zueinander gespiegelten Verlauf auf, wie in Abbildung 3.4 zu sehen ist. Deshalb kann eine Differentialgleichung der Form (4.13) auch zur Beschreibung der Lactosekonzentration in analoger Weise wie in [5] verwendet werden.

Eine solche von der Milchsäurekonzentration unabhängige Darstellung der Lactosekonzentration ist dann nützlich, wenn wie in [5] Experimente durchgeführt werden sollen, in denen eine Manipulation der Lactosekonzentration von außen erforderlich ist. In der vorliegenden Arbeit wird diese Art der Experimente nicht durchgeführt, sodass sich eine einfachere mathematische Beschreibung der Lactosekonzentration anbietet, die gegenüber einer Darstellung analog zu (4.13) eine geringere Anzahl Parameter aufweist. Dadurch lässt sich die Komplexität des Gesamtmodells reduzieren.

Wie Abbildung 4.3 exemplarisch für einen Standardversuch zeigt, besteht zwischen der Milchsäurekonzentration und der Lactosekonzentration ein annähernd linearer Zusammenhang. Deshalb kann die Lactosekonzentration c_s durch eine algebraische Gleichung der Form

$$c_s = c_{s,0} - k_s(c_p - c_{p,0}) \quad (4.14)$$

in Abhängigkeit von der Milchsäurekonzentration c_p mit positivem Parameter k_s beschrieben werden, wobei $c_{s,0}$ für den Anfangswert der Lactosekonzentration steht und $c_{p,0}$ die Anfangsmilchsäurekonzentration bezeichnet.

4.2.5 Gleichungen des Prozessmodells

Die drei aufgestellten Gleichungen (4.11), (4.13) und (4.14) zur Beschreibung der Keimzahl, der Milchsäure- und der Lactosekonzentration ergeben ein nichtlineares dynamisches Modell des Kultivierungsprozesses von *Streptococcus thermophilus*. Die Modellgleichungen lauten also

$$\begin{aligned} \dot{c}_x &= \left(\mu_{\max} (1 - e^{-t/t_{\text{lag}}}) \frac{c_s}{k_x + c_s} e^{-k_i c_p} \right) c_x, & c_x(0) &= c_{x,0} \\ \dot{c}_p &= (\alpha_p \dot{c}_x + \beta_p c_x) \frac{c_s}{k_p + c_s}, & c_p(0) &= c_{p,0} \\ c_s &= c_{s,0} - k_s(c_p - c_{p,0}), \end{aligned} \quad (4.15)$$

mit $c_{x,0}$, $c_{p,0}$, $c_{s,0}$, den entsprechenden Anfangswerten zum Prozesszeitpunkt $t = 0$, der dem Zeitpunkt der Inokulation entspricht. Die zu identifizierenden Parameter werden zu einem Vektor zusammengefasst. Dieser lautet

$$\boldsymbol{\theta}_{\text{dyn}} = [\mu_{\max} \ t_{\text{lag}} \ \alpha_p \ \beta_p \ k_x \ k_i \ k_p \ k_s]^\top. \quad (4.16)$$

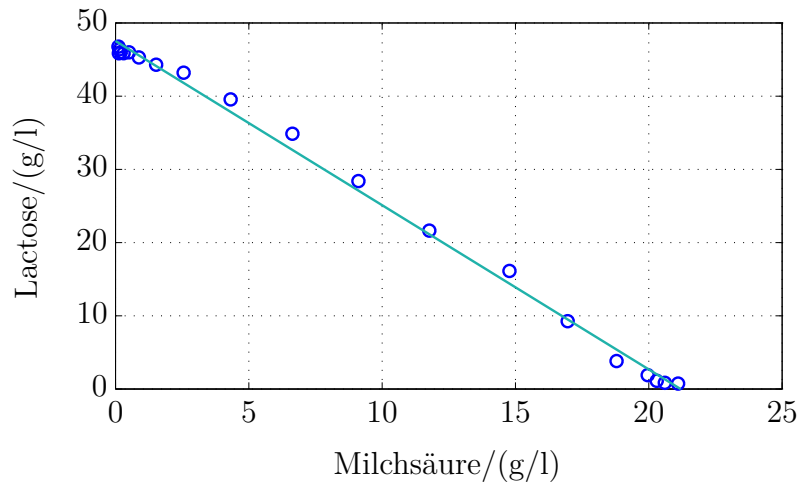


Abbildung 4.3: Zusammenhang zwischen Milchsäure- und Lactosekonzentration im Kultivierungsprozess von *Streptococcus thermophilus*.

- Messwerte, Versuch ct20091111
- Ausgleichsgerade

4.3 Modellierung des pH-Wertes

In diesem Abschnitt soll auf der Grundlage von elementaren chemischen Gesetzen und Bilanzgleichungen die Struktur eines Modells zur Beschreibung des pH-Wertes in Fermentationen des Bakteriums *Streptococcus thermophilus* entwickelt werden. Da die Entwicklung dieses pH-Modells einen wesentlichen Beitrag der Arbeit darstellt, wird dieses Thema ausführlich behandelt.

Die für das weitere Verständnis notwendigen Grundlagen werden zunächst kurz dargestellt. Danach wird das pH-Modell einer allgemeinen wässrigen Lösung aufgestellt, um eine grundlegende Modellstruktur zu ermitteln. Diese Modellstruktur dient später als Grundlage für die Modellierung des pH-Wertes der spezifischen Kulturlösung. Hierbei werden die Komplexbestandteile des Nährmediums durch ein Säure-Base-Ersatzsystem modelliert, um die Versäuerung der Reaktorbrühe aufgrund der metabolischen Aktivität der Bakterien hinreichend genau beschreiben zu können.

4.3.1 Grundlagen

Die verwendeten Begriffe und chemischen Gesetze zur Aufstellung der Modellgleichungen werden erläutert. Dies umfasst die Definition des pH-Wertes, die Behandlung der

elektrolytischen Dissoziation, die den reversiblen Zerfall von chemischen Verbindungen in Ionen beschreibt, sowie der Eigendissoziation von Wasser.

pH-Wert

Der pH-Wert gibt auf einer dimensionslosen Skala von 0 bis 14 die saure, neutrale oder basische Wirkung einer wässrigen Lösung an, wobei pH-Werte zwischen 0 und 7 einer sauren Lösung und pH-Werte zwischen 7 und 14 einer basischen Lösung zugeordnet sind. Liegt der pH-Wert bei 7, ist die Lösung chemisch neutral. Die Acidität bzw. Basizität einer Lösung ist dabei umso stärker, je weiter der pH-Wert von diesem neutralen Wert in Richtung kleinerer bzw. größerer Werte entfernt ist.

Der pH-Wert ist definiert als der negative dekadische Logarithmus der Aktivität a_{H^+} der Wasserstoffionen H^+ , die in der Lösung enthalten sind. Es gilt also

$$\text{pH} = -\log_{10}(a_{\text{H}^+}) . \quad (4.17)$$

Die Aktivität der Wasserstoffionen

$$a_{\text{H}^+} = \frac{\gamma_{\text{H}^+} c_{\text{H}^+}}{c_0} \quad (4.18)$$

ist ein Produkt aus dem Aktivitätskoeffizienten γ_{H^+} und der molaren Konzentration c_{H^+} der Wasserstoffionen, geteilt durch die Standardstoffmengenkonzentration

$$c_0 = 1 \text{ mol/l} , \quad (4.19)$$

um für die Anwendung der Logarithmusfunktion einen dimensionslosen Wert zu erhalten.

Bei der Aktivität a_{H^+} handelt es sich um eine thermodynamische Größe, die in der Chemie verwendet wird, um das Verhalten realer Lösungen beschreiben zu können. Im Allgemeinen gibt die Aktivität die Änderung einer physikalischen Messgröße in Abhängigkeit der Stoffkonzentration an.

Für ideale Lösungen, d. h. bei unendlich starker Verdünnung, wird angenommen, dass sich die gelösten Teilchen in einem so großen Abstand zueinander befinden, dass zwischen ihnen keine Wechselwirkung vorhanden ist. Unter diesen idealen Bedingungen ist die saure bzw. basische Wirkung einer Lösung dann allein von der Konzentration der darin enthaltenen Wasserstoffionen abhängig.

Für reale Lösungen gilt diese Annahme nicht. Es kommt zu Wechselwirkungen zwischen den Teilchen, die z. B. elektrostatisch sein können, wie im Falle von Ionen. Änderungen von Temperatur, Druck oder Volumen können die Wechselwirkungen und damit das beobachtete Verhalten der Lösung beeinflussen, sodass reale Lösungen trotz der gleichen Konzentration an Wasserstoffionen unterschiedlich sauer oder

basisch reagieren können. Um die in den Messungen beobachtete wirksame Stoffkonzentration auf die tatsächliche Konzentration zurückzuführen, wird ein Korrekturfaktor in Form eines Aktivitätskoeffizienten verwendet, der die Abweichungen vom Idealverhalten quantitativ erfasst.

Aktivitätskoeffizienten besitzen im Regelfall einen Zahlenwert zwischen 0 und 1, der umso näher an der eins liegt, je stärker die Verdünnung ist. In ausreichend verdünnten Lösungen ist der Aktivitätskoeffizient also vernachlässigbar, sodass der pH-Wert einer Lösung in Näherung über die Konzentration der Wasserstoffionen anstelle über ihre Aktivität bestimmt werden kann.

Dabei muss bei genauer Betrachtung angemerkt werden, dass freie Wasserstoffionen in wässrigen Lösungen nicht auftreten, da sie sofort mit Wassermolekülen reagieren und Oxoniumionen H_3O^+ bilden. In der Realität wird der pH-Wert einer Lösung also durch die Konzentration der Oxoniumionen, genauer gesagt ihrer Aktivität, bestimmt. Dies kann in den Gleichungen zur Berechnung des pH-Wertes formal berücksichtigt werden, indem die Bezeichnung $c_{\text{H}_3\text{O}^+}$ für die molare Konzentration der Oxoniumionen anstelle der Bezeichnung c_{H^+} für die molare Konzentration der Wasserstoffionen verwendet wird.

Diese an der Realität orientierte Schreibweise soll in den weiteren Ausführungen verwendet werden. Damit kann für den pH-Wert einer verdünnten Lösung in Näherung geschrieben werden

$$\text{pH} \cong -\log_{10} \left(\frac{c_{\text{H}_3\text{O}^+}}{c_0} \right) . \quad (4.20)$$

Im Kultivierungsprozess von *Streptococcus thermophilus* ist die Kulturlösung durch VE-Wasser stark verdünnt, sodass angenommen wird, dass sich die Aktivität der Oxoniumionen im Fermenter durch die Stoffmengenkonzentration annähern lässt. Deshalb soll zur Beschreibung des pH-Wertes der Kulturlösung die Notation (4.20) verwendet werden.

Elektrolytische Dissoziation

Um den pH-Wert der Kulturlösung nach Gleichung (4.20) berechnen zu können, muss die Konzentration der Oxoniumionen in der Kulturlösung ermittelt werden. Bei der Betrachtung von Ionen in einer wässrigen Lösung müssen die Zerfallsprozesse von chemischen Verbindungen in Ionen berücksichtigt werden.

Ionen sind Moleküle oder Atome mit einer elektrischen Ladung. In wässrigen Lösungen bilden sich Ionen, wenn chemische Verbindungen in Anionen und Kationen, d. h. in negativ und positiv geladene Ionen, zerfallen. Stoffe, die dazu in der Lage sind, werden auch als Elektrolyte bezeichnet. Der Zerfall in Ionen wird elektrolytische Dissoziation genannt.

Wichtige Elektrolyte sind Säuren und Basen, für die es verschiedene Begriffsdefinitionen gibt. Nach dem Säure-Base-Konzept von Brønsted und Lowry, das in der allgemeinen Chemie dominiert, ist eine Säure dadurch charakterisiert, dass sie ein Wasserstoffion an einen Reaktionspartner abgeben kann, wohingegen eine Base in der Lage ist, ein Wasserstoffion aufzunehmen. Nach dieser Definition werden die beiden Begriffe nicht als absolut angesehen, sondern nach ihrer Funktion relativ zum Reaktionspartner. Danach kann ein Stoff sowohl als Säure als auch als Base auftreten, was beispielsweise für Wasser gilt.

Die Dissoziation eines Elektrolyts in einer wässrigen Lösung kann so ablaufen, dass der Zerfall in Ionen alle Teilchen dieses Stoffes betrifft oder nur eine Teilmenge. Diesbezüglich wird unterschieden zwischen starken und schwachen Elektrolyten, mit Wasser als Bezugsgröße. Starke Elektrolyte haben die Eigenschaft, dass sie in wässrigen Lösungen vollständig in Form von Ionen vorliegen. Schwache Elektrolyte dissoziieren dagegen nur teilweise, sodass in der Lösung sowohl eine dissoziierte als auch eine undissoziierte Stoffkomponente vorhanden ist.

Die Dissoziation von schwachen Elektrolyten beschreibt eine reversible chemische Reaktion. Dabei laufen bei genauer Betrachtung zu jedem Zeitpunkt zwei Teilreaktionen entgegengesetzt gerichtet ab, äußerlich betrachtet aber erscheint die Gesamtreaktion ruhend. Dagegen kann die Dissoziation von starken Elektrolyten als ein Vorgang betrachtet werden, der nur in einer Richtung verläuft.

Eine allgemeine chemische Gleichgewichtsreaktion lässt sich durch eine Reaktionsgleichung der Form



darstellen. Hierbei bezeichnen A und B die Ausgangsstoffe, die miteinander in Reaktion gebracht wurden, und D und E die Produkte, die bei der Reaktion entstehen. Die ganzzahligen Parameter a , b , d und e geben die stöchiometrischen Koeffizienten an, die die Mengenverhältnisse der an der Reaktion beteiligten Substanzen beschreiben. Der Doppelpfeil in Gleichung (4.21) bringt den reversiblen Charakter der Reaktion zum Ausdruck.

Zu Beginn läuft die Reaktion zunächst nur in einer Richtung ab und es entstehen in dieser Hinreaktion die ersten Reaktionsprodukte. Diese neu gebildeten Stoffe reagieren wiederum miteinander und es setzt während der Hinreaktion eine Rückreaktion ein, bei der sich wieder Ausgangsstoffe bilden. Dabei verläuft die Rückreaktion anfangs langsamer als die Hinreaktion, da die Konzentrationen der Produkte, c_D und c_E , zu diesem Zeitpunkt noch klein sind. Die Rückreaktion wird im Verlauf des Prozesses schneller, während die Hinreaktion aufgrund der kleiner werdenden Konzentrationen der Ausgangsstoffe, c_A und c_B , langsamer wird. Nach einer gewissen Zeit hat sich die Geschwindigkeit der Hinreaktion, für die gilt [42]

$$v_{\text{hin}} = K_{\text{hin}} c_A^a c_B^b, \quad (4.22)$$

so weit verringert und die Geschwindigkeit der Rückreaktion, die analog

$$v_{\text{rück}} = K_{\text{rück}} c_{\text{D}}^d c_{\text{E}}^e \quad (4.23)$$

lautet, so weit erhöht, dass beide Vorgänge gleich schnell ablaufen und

$$v_{\text{hin}} = v_{\text{rück}} \quad (4.24)$$

geschrieben werden kann. Die Größen K_{hin} und $K_{\text{rück}}$ in Gleichung (4.22) bzw. (4.23) bezeichnen die Geschwindigkeitskonstante der Hinreaktion bzw. Rückreaktion. Es stellt sich ein dynamischer Gleichgewichtszustand ein, sodass die Konzentrationen der Ausgangsstoffe und der Produkte konstant bleiben.

Das Verhältnis der Konzentrationen im Gleichgewichtszustand wird durch das Massenwirkungsgesetz

$$\frac{c_{\text{D}}^d c_{\text{E}}^e}{c_{\text{A}}^a c_{\text{B}}^b} = \frac{K_{\text{hin}}}{K_{\text{rück}}} = K \quad (4.25)$$

erfasst, das aus der Gleichheit der Geschwindigkeiten für die Hin- und die Rückreaktion in (4.24) resultiert. Der Quotient aus den Geschwindigkeitskonstanten K_{hin} und $K_{\text{rück}}$ in Gleichung (4.25) wird mit K bezeichnet und Gleichgewichtskonstante genannt.

Der Wert einer Gleichgewichtskonstante muss für eine gegebene Reaktion und Temperatur experimentell ermittelt werden [42]. Er gibt an, auf welcher Seite der Reaktionsgleichung sich das chemische Gleichgewicht einstellen wird. Bei großen K -Werten liegt das Gleichgewicht auf der Seite der Produkte. Bei kleinen K -Werten verhält es sich umgekehrt – das Gleichgewicht stellt sich auf der Seite der Reaktanden ein.

Häufig wird anstelle eines K -Wertes sein negativer dekadischer Logarithmus angegeben, der mit pK bezeichnet wird. Es gilt also der Zusammenhang

$$K = 1 \cdot 10^{-pK} \text{ mol/l} . \quad (4.26)$$

Bei genauer Betrachtung müssen Gleichgewichte wie bei Lösungen von Ionen in Abhängigkeit von den Aktivitäten behandelt werden. In Gleichung (4.25) sind die Konzentrationen dann durch die entsprechenden Aktivitäten zu ersetzen. Für hinreichend verdünnte Lösungen liegen die Aktivitätskoeffizienten nahe bei eins, sodass das Massenwirkungsgesetz in diesem Fall ohne Berücksichtigung der Aktivitätskoeffizienten wie in Gleichung (4.25) angewendet werden kann.

Eigendissoziation von Wasser

Ein wichtiger Spezialfall der elektrolytischen Dissoziation ist das chemische Gleichgewicht von Wasser. Die Wassermoleküle gehen nicht nur mit dem stofffremden Reaktionspartner eine chemische Reaktion ein, sondern auch miteinander, wobei sie zu

gleichen Teilen in Oxoniumionen H_3O^+ und Hydroxidionen OH^- dissoziieren. Die Dissoziation der Wassermoleküle erfolgt dabei in sehr geringem Maße, sodass das Gleichgewicht der Reaktion, die sich durch die Reaktionsgleichung



beschreiben lässt, stark auf der linken Seite der Gleichung liegt.

Das Ausmaß der Eigendissoziation von Wasser kann veranschaulicht werden durch einen Vergleich der molaren Konzentrationen der dissoziierten Komponenten mit der Gesamtstoffmengenkonzentration des Wassers. Unter Normalbedingungen, d. h. bei einer Umgebungstemperatur von $25\text{ }^\circ\text{C}$ und Normaldruck, betragen die Stoffmengenkonzentrationen der Oxoniumionen und der Hydroxidionen in reinem Wasser [42]

$$c_{\text{H}_3\text{O}^+} = c_{\text{OH}^-} = 1 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l} . \quad (4.28)$$

Die Dichte von Wasser beträgt unter Normalbedingungen $\rho_{\text{W}} = 997.048 \text{ g/l}$ und die molare Masse beträgt $M_{\text{W}} = 18.01528 \text{ g/mol}$ [36]. Damit ergibt sich für die Gesamtstoffmengenkonzentration des Wassers \hat{c}_{W} ein Wert von

$$\hat{c}_{\text{W}} = \frac{\rho_{\text{W}}}{M_{\text{W}}} = \frac{997.048 \text{ g/l}}{18.01528 \text{ g/mol}} \approx 55.345 \text{ mol/l} . \quad (4.29)$$

Vergleicht man diesen Wert mit dem Wert in (4.28), dann stellt man fest, dass die Menge Wassermoleküle, die zur Bildung der Oxonium- und der Hydroxidionen benötigt wird, vernachlässigbar ist im Vergleich zu der Menge der undissoziierten Wassermoleküle. Dieses Ergebnis wird bei der Bestimmung der Gleichgewichtskonstante des Wassers berücksichtigt.

Die Anwendung des Massenwirkungsgesetzes auf die Eigendissoziation von Wasser liefert

$$\tilde{K}_{\text{W}} = \frac{c_{\text{H}_3\text{O}^+} c_{\text{OH}^-}}{c_{\text{H}_2\text{O}}^2} . \quad (4.30)$$

Da die Konzentration $c_{\text{H}_2\text{O}}$ der undissoziierten Wassermoleküle nahezu unverändert bleibt, wird sie in reinem Wasser wie auch in stark verdünnten wässrigen Lösungen als konstant betrachtet. Der Nenner auf der rechten Seite der Gleichung (4.30) kann damit in die Konstante \tilde{K}_{W} einbezogen werden. Es ergibt sich die Gleichgewichtskonstante des Wassers

$$K_{\text{W}} = c_{\text{H}_3\text{O}^+} c_{\text{OH}^-} . \quad (4.31)$$

Das Produkt der Stoffmengenkonzentrationen von Oxoniumionen und Hydroxidionen in Gleichung (4.31) wird auch als Ionenprodukt des Wassers bezeichnet. Unter Normalbedingungen gilt

$$K_{\text{W}} = 1 \cdot 10^{-\text{p}K_{\text{W}}} \text{ mol}^2/\text{l}^2 , \quad \text{p}K_{\text{W}} = 14 . \quad (4.32)$$

Bei abweichenden Bedingungen muss der Wert der Gleichgewichtskonstante K_W bzw. von pK_W korrigiert werden, da es sich um thermodynamische Größen handelt.

Für eine Kultivierungstemperatur von 40 °C nimmt der Exponent pK_W nach [36] den Wert 13.542 an. Damit kann für das Ionenprodukt des Wassers für diese Temperatur in einer Darstellung mit ganzzahligem Exponenten geschrieben werden

$$K_W(40\text{ °C}) = 2.871 \cdot 10^{-14} \text{ mol}^2/\text{l}^2 . \quad (4.33)$$

4.3.2 pH-Modell eines allgemeinen Säure-Base-Systems

Der pH-Wert im chemischen Gleichgewicht einer wässrigen Lösung von Säuren und Basen kann, ungeachtet der Komplexität des Gleichgewichts, durch eine systematische Behandlung von elementaren Gesetzmäßigkeiten als Grundbedingungen beschrieben werden.

Grundbedingungen

Diese Grundbedingungen sind die Gesetzmäßigkeiten

- Massenwirkungsgesetz,
- Ionenprodukt des Wassers,
- Massenerhaltungssatz und
- Elektroneutralitätsbedingung.

Das Massenwirkungsgesetz und das Ionenprodukt des Wassers wurden im vorigen Unterabschnitt behandelt. Diese Gesetze machen eine Aussage über das Konzentrationsverhältnis der Reaktionspartner im chemischen Gleichgewicht bei allgemeinen chemischen Reaktionen sowie speziell bei Eigendissoziation von Wasser.

Neben diesen Gesetzen gilt für chemische Reaktionen das Gesetz von der Erhaltung der Masse, das sich gleichermaßen auf Konzentrationen übertragen lässt. Das Massenerhaltungsgesetz besagt, dass in einem geschlossenen System die Summe aller Massen der beteiligten Partner vor der Reaktion genau gleich groß ist wie die Summe aller Massen der Produkte nach der Reaktion. In elektrolytischen Lösungen gilt demnach, dass die Gesamtstoffmengenkonzentration \hat{c}_i einer Teilchenspezies i gleich ist der Summe der Stoffmengenkonzentrationen der dissoziierten und der undissoziierten Teilchen $c_{i,\text{diss}}$ und $c_{i,\text{undiss}}$, d. h., es gilt

$$\hat{c}_i = c_{i,\text{diss}} + c_{i,\text{undiss}} . \quad (4.34)$$

Elektrolytische Lösungen erfüllen außerdem wie alle wässrige Lösungen die Elektroneutralitätsbedingung. Die Ionen treten in der Lösung stets in Paaren so auf, dass sich ihre Ladungen aufheben und die Lösung damit nach außen elektrisch neutral ist. Die Ladungsbilanz wird dabei durch die Gleichung

$$0 = \sum_i q_i c_{i,\text{diss}} \quad (4.35)$$

beschrieben, wobei q_i die Ladung eines Ions der Spezies i ist und $c_{i,\text{diss}}$ die Stoffmengenkonzentration dieser dissoziierten Teilchen angibt.

Aufstellung des pH-Modells

Betrachtet werden soll zunächst ein Säure-Base-System, das von einer in Wasser gelösten schwachen Säure und einer schwachen Base gebildet wird. Dieses einfache System dient als Ausgangspunkt für die Aufstellung der Vorschrift zur Berechnung der Oxoniumionenkonzentration bzw. des pH-Wertes, welche dann systematisch auf ein allgemeines System mit beliebig vielen schwachen sowie starken Säuren und Basen erweitert werden soll.

Bei der Dissoziation einer schwachen Säure in Wasser werden die Säuremoleküle HA in ein Wasserstoffion H^+ und ein Säureanion A^- aufgespalten. Die abgegebenen Wasserstoffionen reagieren mit den Wassermolekülen H_2O , sodass sich Oxoniumionen H_3O^+ bilden. Die Reaktionsprodukte A^- und H_3O^+ liegen dabei zu gleichen Teilen vor. Die Gesamtreaktion lässt sich beschreiben durch die Gleichung



Bei der Reaktion einer schwachen Base mit Wasser spalten sich Wasserstoffionen H^+ von den Wassermolekülen H_2O ab und verbinden sich mit den Basenmolekülen B. Es entstehen zu gleichen Teilen Kationen der Base HB^+ und Hydroxidionen OH^- . Die Reaktionsgleichung für diesen Vorgang lautet



Aufgrund der Elektroneutralitätsbedingung für wässrige Lösungen ist die Ladungsbilanz stets ausgeglichen. Die Ladung aller positiv geladenen Ionen in der Lösung ist genauso groß wie die Ladung aller negativ geladenen Ionen. Damit gilt für die Stoffmengenkonzentrationen der im betrachteten System enthaltenen Ionen die Ladungsbilanzgleichung

$$0 = c_{\text{H}_3\text{O}^+} - c_{\text{A}^-} + c_{\text{HB}^+} - c_{\text{OH}^-} \quad (4.38)$$

Diese Gleichung bildet die Grundlage für die Bestimmung der Oxoniumionenkonzentration $c_{\text{H}_3\text{O}^+}$.

Um die Konzentration der Oxoniumionen nach Gleichung (4.38) bestimmen zu können, darf nur $c_{\text{H}_3\text{O}^+}$ als Unbekannte in dieser Gleichung auftreten. Ziel ist es daher, alle anderen Konzentrationen in dieser Gleichung durch Ausdrücke zu ersetzen, die sich aus bekannten Größen zusammensetzen oder sich in Abhängigkeit von $c_{\text{H}_3\text{O}^+}$ darstellen lassen. Dabei muss vorausgesetzt werden, dass die Gesamtstoffmengenkonzentrationen aller beteiligten Substanzen sowie die Gleichgewichtskonstanten der betreffenden Reaktionen bekannt sind.

Das Ionenprodukt des Wassers wird verwendet, um die Konzentration der Hydroxidionen c_{OH^-} über die Konzentration der Oxoniumionen $c_{\text{H}_3\text{O}^+}$ auszudrücken. Es gilt

$$c_{\text{OH}^-} = \frac{K_{\text{W}}}{c_{\text{H}_3\text{O}^+}} . \quad (4.39)$$

Für die Konzentration der Basenkationen c_{HB^+} und die Konzentration der Säureanionen c_{A^-} können geeignete Darstellungen mit Hilfe des Massenerhaltungsgesetzes und des Massenwirkungsgesetzes wie folgt bestimmt werden.

Nach dem Massenerhaltungsgesetz gilt für die Gesamtstoffmengenkonzentration der schwachen Säure

$$\hat{c}_{\text{A}} = c_{\text{HA}} + c_{\text{A}^-} \quad (4.40)$$

und für die Gesamtstoffmengenkonzentration der schwachen Base

$$\hat{c}_{\text{B}} = c_{\text{B}} + c_{\text{HB}^+} . \quad (4.41)$$

Die Anwendung des Massenwirkungsgesetzes auf die Reaktionen (4.36) und (4.37) liefert die zugehörigen Gleichgewichtskonstanten, die sich zu

$$K_{\text{A}} = \frac{c_{\text{H}_3\text{O}^+} c_{\text{A}^-}}{c_{\text{HA}}} \quad (4.42)$$

und

$$\tilde{K}_{\text{B}} = \frac{c_{\text{HB}^+} c_{\text{OH}^-}}{c_{\text{B}}} \quad (4.43)$$

ergeben. Da die in (4.43) angegebene Gleichgewichtskonstante für die Reaktion der Base im Weiteren noch umgerechnet wird und die neue Darstellung mit K_{B} bezeichnet werden soll, wurde die Bezeichnung an dieser Stelle als Zwischenergebnis mit einer Tilde versehen.

Unter Einbeziehung von Gleichung (4.42) lässt sich die Konzentration c_{A^-} in Abhängigkeit der Gesamtstoffmengenkonzentration darstellen als

$$c_{\text{A}^-} = \frac{\hat{c}_{\text{A}} K_{\text{A}}}{c_{\text{H}_3\text{O}^+} + K_{\text{A}}} = \tau_{\text{A}} \hat{c}_{\text{A}} , \quad (4.44)$$

wobei τ_A den Dissoziationsgrad der Säure bezeichnet. Mit Gleichung (4.44) ist die gewünschte Darstellung für c_{A^-} gefunden, in welcher außer der zu bestimmenden Konzentration $c_{H_3O^+}$ nur als bekannt angenommene Größen auftreten.

Analog lässt sich die Konzentration c_{HB^+} unter Berücksichtigung von Gleichung (4.43) in die Darstellung

$$c_{HB^+} = \frac{\hat{c}_B \tilde{K}_B}{c_{OH^-} + \tilde{K}_B} \quad (4.45)$$

überführen. Im Nenner der Gleichung muss noch der Term c_{OH^-} eliminiert werden. Die Anwendung des Ionenprodukts des Wassers (4.31) mit der Substitution

$$\tilde{K}_B = \frac{K_W}{K_B} \quad (4.46)$$

liefert die Darstellung

$$c_{HB^+} = \frac{\hat{c}_B c_{H_3O^+}}{c_{H_3O^+} + K_B} = \tau_B \hat{c}_B, \quad (4.47)$$

mit τ_B für den Dissoziationsgrad der Base.

Die Umformungen (4.39), (4.44) und (4.47) werden in die Ladungsbilanzgleichung (4.38) eingesetzt. Es ergibt sich eine Darstellung der Gleichung in der gewünschten Form zu

$$0 = c_{H_3O^+} - \frac{\hat{c}_A K_A}{c_{H_3O^+} + K_A} + \frac{\hat{c}_B c_{H_3O^+}}{c_{H_3O^+} + K_B} - \frac{K_W}{c_{H_3O^+}}. \quad (4.48)$$

Bei einem komplexeren Säure-Base-System, das noch weitere Säuren oder Basen in relevanten Konzentrationen enthält, wird Gleichung (4.48) um die Anteile der dissoziierten Komponenten systematisch erweitert. Starke Säuren und starke Basen werden dabei mit einem Dissoziationsgrad von eins berücksichtigt, da sie vollständig in Ionen dissoziieren. Auf diese Weise lässt sich eine Ladungsbilanzgleichung für ein Säure-Base-System von beliebiger Komplexität aufstellen.

Modellgleichungen

Für die Ladungsbilanzgleichung eines allgemeinen Säure-Base-Systems mit den Säuren A_i und den Basen B_j kann damit geschrieben werden

$$0 = c_{H_3O^+} - \sum_i \tau_{A,i} \hat{c}_{A,i} + \sum_j \tau_{B,j} \hat{c}_{B,j} - \frac{K_W}{c_{H_3O^+}}, \quad (4.49)$$

wobei für die Dissoziationsgrade der Säuren gilt

$$\tau_{A,i} = \begin{cases} \frac{K_{A,i}}{c_{\text{H}_3\text{O}^+} + K_{A,i}}, & \text{wenn Säure } A_i \text{ schwach} \\ 1, & \text{wenn Säure } A_i \text{ stark} \end{cases} \quad (4.50)$$

und für die Dissoziationsgrade der Basen gilt

$$\tau_{B,j} = \begin{cases} \frac{c_{\text{H}_3\text{O}^+}}{c_{\text{H}_3\text{O}^+} + K_{B,j}}, & \text{wenn Base } B_j \text{ schwach} \\ 1, & \text{wenn Base } B_j \text{ stark.} \end{cases} \quad (4.51)$$

Um die Oxoniumionenkonzentration über die Gleichung (4.49) berechnen zu können, wird diese Gleichung in eine Polynomgleichung der Form

$$0 = c_{\text{H}_3\text{O}^+}^n + a_{n-1}c_{\text{H}_3\text{O}^+}^{n-1} + \dots + a_2c_{\text{H}_3\text{O}^+}^2 + a_1c_{\text{H}_3\text{O}^+} + a_0 \quad (4.52)$$

überführt. Es müssen nun die n Wurzeln der Gleichung bzw. Nullstellen des Polynoms in $c_{\text{H}_3\text{O}^+}$ ermittelt werden, von welchen nur die positiven reellen als Lösungen für $c_{\text{H}_3\text{O}^+}$ in Frage kommen. Da das Polynom in (4.49) nach [62] nur eine einzige positive reelle Nullstelle besitzt, ist die gesuchte Konzentration $c_{\text{H}_3\text{O}^+}$ und damit auch der pH-Wert nach Gleichung (4.20) eindeutig bestimmt.

Das aufgestellte pH-Modell (4.49)–(4.51) für ein allgemeines Säure-Base-System basiert auf der Behandlung von chemischen Reaktionen, die nur in einem Schritt ablaufen. Obwohl in den Gleichungen dieses Modells mehrstufige Reaktionen nicht explizit berücksichtigt sind, in welchen also Säuren und Basen mehrere Wasserstoffionen abgeben bzw. aufnehmen, stellt dies im Allgemeinen keine Einschränkung für das Modell dar, da mehrstufige Reaktionen durch mehrere einstufige Reaktionen beschrieben werden können, wie z. B. in [19] gezeigt wird.

4.3.3 Übertragung der Methodik auf die spezifische Kulturlösung

Einflussfaktoren des pH-Wertes im Kultivierungsprozess

In einer Fermentation des Bakteriums *Streptococcus thermophilus* wird der pH-Wert des wässrigen Kulturgemisches maßgeblich durch die folgenden drei Faktoren bestimmt:

- von den Bakterien produzierte Milchsäure,

- chemische Zusammensetzung des Nährmediums und
- zudosierte Natronlauge zur pH-Wert-Regelung.

Die von den Bakterien laufend produzierte Milchsäure sorgt für eine kontinuierliche Verschiebung des Gleichgewichts-pH-Wertes, während durch die chemischen Eigenschaften des spezifischen Nährmediums bestimmt wird, in welchem Maße diese Veränderung durch die Milchsäure, aber auch durch die zudosierte Lauge bei der pH-Wert-Regelung erfolgt.

Für die Beschreibung des pH-Wert-Verlaufs in der unregelmäßigen Prozessphase sind nur die ersten zwei der drei genannten Einflussfaktoren von Bedeutung. Die zudosierte Lauge wird also in dem aufzustellenden pH-Modell nicht berücksichtigt.

Für die milchsäurebedingte Änderung des pH-Wertes in der Absenkphase wird angenommen, dass die ablaufenden chemischen Reaktionen, die diese Änderung verursachen, so schnell ablaufen, dass der pH-Wert zu jedem Zeitpunkt über das chemische Gleichgewicht der Reaktionspartner beschrieben werden kann. Diese Annahme ist angemessen, da chemische Reaktionen in der Realität meist sehr schnell ablaufen [42].

Bestimmung der Modellstruktur für die Kulturlösung

Beim Aufstellen des pH-Modells (4.49)–(4.51) für ein allgemeines Säure-Base-System wurde vorausgesetzt, dass für die zu berücksichtigenden chemischen Reaktionen die Gesamtstoffmengenkonzentrationen der Reaktionspartner und die zugehörigen Gleichgewichtskonstanten bekannt sind. Im Kultivierungsprozess von *Streptococcus thermophilus* werden diese Bedingungen für den Reaktionspartner Milchsäure in Bezug auf die Gleichgewichtskonstante erfüllt. Die Konzentration der Milchsäure hingegen ist während einer laufenden Fermentation, was den Anwendungsfall des zu bestimmenden pH-Modells darstellt, nicht bekannt und muss daher über das aufgestellte dynamische Prozessmodell (4.15) nachgebildet werden.

Auch in Bezug auf das verwendete spezifische Nährmedium werden die genannten Voraussetzungen nicht erfüllt, da es sich um ein Komplexmedium handelt. Dabei kann für die Komponenten wie Hefeextrakt und Molke keine definierte chemische Zusammensetzung angegeben werden, die es erlauben würde, die Wirkung der Medienbestandteile auf den pH-Wert mathematisch zu erfassen. Deshalb soll das Komplexmedium durch ein Säure-Base-System mit äquivalenten chemischen Eigenschaften approximiert werden. Die unbekannt Konzentrationen und Gleichgewichtskonstanten werden aus experimentellen Daten ermittelt.

Das chemische Gleichgewicht von Milchsäure in wässriger Lösung lässt sich durch die Reaktionsgleichung



beschreiben. Hierbei steht $C_3H_6O_3$ für ein Milchsäuremolekül und $C_3H_5O_3^-$ für ein Lactat, das Anion der Milchsäure.

Da es sich bei Milchsäure um eine schwache Säure handelt, dissoziieren die Säuremoleküle in wässriger Lösung nur zu einem kleinen Anteil. Wird Lactat von den Bakterien in das Medium abgegeben, assoziieren diese Ionen mit den Oxoniumionen zu Milchsäuremolekülen und Wassermolekülen in gleichen Teilen, wobei ein geringer Teil der Milchsäuremoleküle wieder in Lactationen und Oxoniumionen zerfällt. Es stellt sich ein Gleichgewicht ein, das durch eine Gleichgewichtskonstante K_P beschrieben wird.

Für die molare Konzentration von Lactat, also der dissoziierten Komponente der Milchsäure, die in der Ladungsbilanzgleichung zu berücksichtigen ist, kann geschrieben werden

$$c_{P,\text{diss}} = \frac{\hat{c}_P K_P}{c_{H_3O^+} + K_P} , \quad (4.54)$$

mit \hat{c}_P für die Gesamtstoffmengenkonzentration der Milchsäure. Die Gesamtstoffmengenkonzentration der Milchsäure wird ermittelt durch die Umrechnung der massenbezogenen Konzentration der Milchsäure c_p aus dem dynamischen Prozessmodell auf den molaren Maßstab gemäß der Gleichung

$$\hat{c}_P = \frac{c_p}{M_P} . \quad (4.55)$$

Hierbei bezeichnet M_P die molare Masse der Milchsäure, für die gilt [36]

$$M_P = 90.078 \text{ g/mol} . \quad (4.56)$$

Für die Berechnung der Lactatkonzentration gemäß Gleichung (4.54) wird noch die Gleichgewichtskonstante der Milchsäure K_P für die Kultivierungstemperatur von 40°C benötigt. Die Temperaturabhängigkeit dieser thermodynamischen Größe wird in [47] über die Gleichung

$$\text{p}K_P(T) = 3.862 + 5 \cdot 10^{-5} \left(\frac{T}{T_0} - 23.5 \right)^2 \quad (4.57)$$

angegeben, wobei $T_0 = 1^\circ\text{C}$ ist. Diese Gleichung gilt für den Temperaturbereich $0\text{--}50^\circ\text{C}$. Für einen Wert $T = 40^\circ\text{C}$ ergibt sich damit

$$\text{p}K_P(40^\circ\text{C}) = 3.876 \quad (4.58)$$

bzw.

$$K_P(40^\circ\text{C}) = 1.332 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l} . \quad (4.59)$$

Die pH-Eigenschaften des Komplexmediums werden mit Hilfe eines Säure-Base-Ersatzsystems bestehend aus drei verschiedenen Elektrolyten beschrieben. Dieses einfache System hat sich in Simulationen als angemessen erwiesen. Es setzt sich zusammen aus einer schwachen Säure mit Gesamtstoffmengenkonzentration \hat{c}_A und Gleichgewichtskonstante K_A , einer schwachen Base mit Gesamtstoffmengenkonzentration \hat{c}_B und Gleichgewichtskonstante K_B sowie einem Schlüsselterm \hat{c}_Σ , der die kumulative Wirkung der starken Säuren und Basen im Komplexmedium repräsentiert. Dieser Term wird als Base angesetzt und in der Ladungsbilanzgleichung deshalb mit einem positiven Vorzeichen berücksichtigt. Außerdem wird angenommen, dass die Konzentrationen der durch \hat{c}_A , \hat{c}_B und \hat{c}_Σ beschriebenen Substanzen im Medium nur durch die Anfangsbedingungen zum Prozesszeitpunkt $t = 0$ bestimmt sind und sich im Verlauf der Fermentation daher nicht ändern.

Die modellierte schwache Säure im beschriebenen Säure-Base-System repräsentiert sauer wirkende Substanzen im Komplexmedium, wie z. B. die im Hefeextrakt enthaltenen freien Aminosäuren, während durch die modellierte schwache Base basisch wirkende Substanzen berücksichtigt werden sollen, wie z. B. das Calcium, das in Molkepulver, Magermilchpulver und Calciumcarbonat enthalten ist.

Für das vollständige Säure-Base-System zur Beschreibung der pH-Eigenschaften des Nährmediums zusammen mit dem Stoffwechselprodukt Milchsäure ergibt sich die Ladungsbilanzgleichung

$$0 = c_{\text{H}_3\text{O}^+} + \hat{c}_\Sigma - \frac{\hat{c}_P K_P}{c_{\text{H}_3\text{O}^+} + K_P} - \frac{\hat{c}_A K_A}{c_{\text{H}_3\text{O}^+} + K_A} + \frac{\hat{c}_B c_{\text{H}_3\text{O}^+}}{c_{\text{H}_3\text{O}^+} + K_B} - \frac{K_W}{c_{\text{H}_3\text{O}^+}}, \quad (4.60)$$

mit \hat{c}_P aus Gleichung (4.55), K_P aus Gleichung (4.59) und K_W aus Gleichung (4.33). Der strukturelle Aufbau des pH-Modells ist damit festgelegt.

4.3.4 Gleichungen des pH-Modells

Um die Oxoniumionenkonzentration aus der Ladungsbilanzgleichung (4.60) ermitteln zu können, wird diese Gleichung in eine normierte Polynomgleichung für $c_{\text{H}_3\text{O}^+}$ überführt. Die Polynomgleichung zusammen mit Gleichung (4.20) zur Berechnung des pH-Wertes über die Oxoniumionenkonzentration ergibt ein nichtlineares pH-Modell der Kulturlösung, das eine Gültigkeit für die unregelte Prozessphase besitzt. Die Modellgleichungen lauten

$$\begin{aligned} 0 &= c_{\text{H}_3\text{O}^+}^5 + a_4 c_{\text{H}_3\text{O}^+}^4 + a_3 c_{\text{H}_3\text{O}^+}^3 + a_2 c_{\text{H}_3\text{O}^+}^2 + a_1 c_{\text{H}_3\text{O}^+} + a_0 \\ \text{pH} &= -\log_{10} \left(\frac{c_{\text{H}_3\text{O}^+}}{c_0} \right), \end{aligned} \quad (4.61)$$

mit den Berechnungsvorschriften für die Koeffizienten

$$\begin{aligned}
a_0 &= -K_A K_B K_P K_W \\
a_1 &= K_A K_B K_P (\hat{c}_\Sigma - \hat{c}_A - \hat{c}_P) - K_W (K_A K_B + K_A K_P + K_B K_P) \\
a_2 &= K_A K_P (\hat{c}_B + \hat{c}_\Sigma - \hat{c}_A - \hat{c}_P) - K_W (K_A + K_B + K_P) \\
&\quad + K_B K_P (\hat{c}_\Sigma - \hat{c}_P + K_A) + K_A K_B (\hat{c}_\Sigma - \hat{c}_A) \\
a_3 &= K_A (\hat{c}_B - \hat{c}_A + \hat{c}_\Sigma + K_B + K_P) - K_W + K_B \hat{c}_\Sigma \\
&\quad + K_P (\hat{c}_B + \hat{c}_\Sigma - \hat{c}_P + K_B) \\
a_4 &= \hat{c}_B + \hat{c}_\Sigma + K_A + K_B + K_P .
\end{aligned} \tag{4.62}$$

Die zu identifizierenden Parameter werden zum Vektor

$$\boldsymbol{\theta}_{\text{pH}} = [\hat{c}_A \ \hat{c}_B \ \hat{c}_\Sigma \ K_A \ K_B]^\top \tag{4.63}$$

zusammengefasst.

Die Gesamtstoffmengenkonzentration der Milchsäure \hat{c}_P stellt die Eingangsgröße des pH-Modells dar. Soll für einen Wert \hat{c}_P ein entsprechender pH-Wert nach dem dargestellten Modell berechnet werden, muss das Nullstellenproblem für die Polynomgleichung gelöst werden.

Eine geschlossene Lösung einer Polynomgleichung wie in (4.61) kann mit Hilfe von Wurzelausdrücken nur bis zu einem Grad von $n = 4$ angegeben werden [65]. Für allgemeine Polynomgleichungen höheren Grades existiert eine analytische Lösung nicht, wie von Abel bewiesen wurde. Für die Polynomgleichung des aufgestellten pH-Modells, die den Grad $n = 5$ besitzt, muss deshalb eine Lösung mit Hilfe von numerischen Näherungsverfahren bestimmt werden.

Zur Berechnung der Nullstellen von Polynomen existiert eine Reihe von numerischen Verfahren. Eine Übersicht der bekannten Verfahren wird z. B. in [39] gegeben. Viele dort genannter Verfahren sind darauf ausgelegt, als Ergebnis der Berechnung nur eine Nullstelle des Polynoms zu ermitteln. Meist wird eine Anfangsschätzung für die gesuchten Nullstellen verlangt, um die Suche nach einer Nullstelle mit dem eingesetzten Algorithmus von dem vorgegebenen Schätzwert aus starten zu können. Dabei kann das Ergebnis der Nullstellensuche maßgeblich davon abhängen, wie nah der gewählte Startwert an der tatsächlichen Nullstelle liegt. Bei einem ungeeigneten Startwert sind große Abweichungen von der gesuchten Lösung möglich.

Ein gängiges Verfahren, das keine Startwerte benötigt und alle Nullstellen eines Polynoms simultan bestimmen kann, beruht auf der Lösung eines dem Polynom zugeordneten Eigenwertproblems mit Hilfe des Matrizenkalküls. Aufgrund der genannten Vorteile wird dieses Verfahren zur Nullstellenbestimmung des pH-Modells (4.61) eingesetzt. Eine Beschreibung befindet sich in Anhang A.

4.4 Parameteridentifikation

In den vorigen Abschnitten dieses Kapitels wurden zwei Modelle aufgestellt, die die Größen Keimzahl, Milchsäure- und Lactosekonzentration bzw. den pH-Wert der Kulturlösung im Kultivierungsprozess von *Streptococcus thermophilus* beschreiben. Die Gleichungen dieser Modelle enthalten eine Reihe unbekannter prozessspezifischer Parameter, denen Zahlenwerte zugeordnet werden müssen, um die Modelle anwenden zu können.

4.4.1 Formulierung der Optimierungsaufgabe

Bei der Identifikation eines Modells werden die freien Modellparameter so bestimmt, dass das gemessene Ein-/Ausgangsverhalten des zu modellierenden Systems möglichst gut mit der zu Grunde gelegten Modellstruktur nachgebildet werden kann. Diese Aufgabenstellung wird gewöhnlich als Optimierungsaufgabe formuliert, wobei das Ziel darin besteht, eine Parameterkombination so zu finden, dass die Abweichungen zwischen den Messdaten und den über das Modell generierten Daten bezüglich eines frei definierbaren Kriteriums möglichst klein werden.

Bei einem allgemeinen System mit mehreren Ausgängen werden also die Messwerte des Ausgangsvektors $\mathbf{y}_{k,\text{mess}}$, die zu den Zeitpunkten t_k , $k \in \{1, 2, \dots, n\}$ aufgezeichnet wurden, mit den Simulationen $\mathbf{y}_k(\boldsymbol{\theta})$ verglichen, die sich nach dem Modell in Abhängigkeit eines angenommenen Parametervektors $\boldsymbol{\theta}$ zu den Messzeitpunkten t_k ergeben. Dazu werden die Ausgangsfehler

$$\mathbf{e}_k(\boldsymbol{\theta}) = \mathbf{y}_{k,\text{mess}} - \mathbf{y}_k(\boldsymbol{\theta}) \quad (4.64)$$

berechnet und analysiert. Um das Ausmaß der Fehler quantitativ bewerten zu können, wird ein Gütekriterium formuliert und mathematisch in Form einer reellen skalarwertigen Funktion, die mit g bezeichnet sei, aufgeschrieben. Gewöhnlich werden gerade Funktionen verwendet, um die Existenz eines globalen Minimums zu gewährleisten. Der Parametervektor $\boldsymbol{\theta} = \boldsymbol{\theta}^*$, für den der Zielfunktionswert $g(\boldsymbol{\theta}^*)$ sein Minimum annimmt, ist der gesuchte, im Sinne des gewählten Gütekriteriums optimale Parametervektor.

Der mit einer Vorkultur beimpfte Bioreaktor kann während einer Batch-Fermentation als ein autonomes dynamisches System betrachtet werden, in dem also freie, von außen nicht angeregte Vorgänge ablaufen. Diese beschreiben das bakterielle Wachstum, die Stoffumsetzung und die damit verbundene freie pH-Wert-Absenkung in der Anfangsphase der Fermentation. Die Parameterschätzaufgabe als Minimierungsaufgabe für ein System dieser Art, das in Zustandsraumdarstellung mit Zustandsvektor \mathbf{x} ,

Systemfunktion \mathbf{f} , Ausgangsvektor \mathbf{y} , Ausgangsfunktion \mathbf{h} und Anfangsbedingung \mathbf{x}_0 zum Zeitpunkt $t = t_0$ gegeben ist, lautet in allgemeiner Form

$$\begin{aligned} \boldsymbol{\theta}^* = \arg \min g(\boldsymbol{\theta}) , \quad \text{NB: } \dot{\mathbf{x}} = \mathbf{f}(t, \mathbf{x}, \boldsymbol{\theta}) , \quad \mathbf{x}(t_0) = \mathbf{x}_0 \\ \mathbf{y} = \mathbf{h}(t, \mathbf{x}, \boldsymbol{\theta}) . \end{aligned} \quad (4.65)$$

Die Modellgleichungen, die das System beschreiben, treten als Nebenbedingungen (NB) in der Minimierungsaufgabe auf. Weitere Nebenbedingungen in Form von Gleichungen oder Ungleichungen können hinzukommen, wenn z. B. Restriktionen in den Wertebereichen der Parameter berücksichtigt werden sollen.

4.4.2 Gütekriterium

Für die quantitative Bewertung der Güte der Parameteranpassung können verschiedene Gütekriterien herangezogen werden. Ein häufig verwendetes Kriterium basiert auf der Methode der gewichteten kleinsten Fehlerquadrate (engl. *weighted least squares*, kurz WLS), die eine Erweiterung des klassischen Least-Squares-Verfahrens darstellt. Dabei gilt es, die Summe der gewichteten quadrierten Abweichungen $\mathbf{e}_k(\boldsymbol{\theta})$ zwischen Modellausgang und Systemausgang zu minimieren. In Matrixschreibweise lautet das Gütefunktional

$$g_{\text{WLS}}(\boldsymbol{\theta}) = \sum_{k=1}^n \mathbf{e}_k^{\text{T}}(\boldsymbol{\theta}) \mathbf{W} \mathbf{e}_k(\boldsymbol{\theta}) , \quad (4.66)$$

wobei \mathbf{W} eine Gewichtungsmatrix darstellt. Über die Gewichtungsmatrix \mathbf{W} können die Abweichungen der einzelnen Ausgangsgrößen des Modells von den Messdaten sowohl über der Zeit als auch relativ zueinander gewichtet werden. Letzteres ist z. B. dann sinnvoll, wenn die Ausgangsgrößen unterschiedliche Größenordnungen besitzen, wie dies bei der Keimzahl und den Konzentrationen von Milchsäure und Lactose der Fall ist.

Eine analytische Lösung der beschriebenen Optimierungsaufgabe kann für den Fall angegeben werden, dass das zu identifizierende mathematische Modell, genauer der gebildete Fehlervektor, in den zu optimierenden Parametern linear ist. Im nichtlinearen Fall sowie bei Beschränkungen in der Zielfunktion kann eine geschlossene Lösung nicht angegeben werden [61].

Da die beiden Modelle, die zu identifizieren sind, nichtlinear sind, muss ihre Identifikation iterativ mit Hilfe eines Optimierungsalgorithmus durchgeführt werden.

4.4.3 Optimierungsalgorithmus

Ziel der iterativen Optimierung ist es, in jedem Iterationsschritt, ausgehend von einem vorzugebenden Startpunkt im Parameterraum, einen besseren Punkt so zu

finden, dass die Folge der Iterationsschritte gegen einen Punkt im Parameterraum konvergiert, in dem die Gütefunktion ein Minimum annimmt. Um einen besseren Punkt zu ermitteln, wird nach einer bestimmten Suchstrategie mit Hilfe eines Optimierungsalgorithmus ein Gebiet des Parameterraums abgesucht. Da das gesamte Gebiet, das zur Auffindung eines Minimums abgesucht wurde, nur ein Teilgebiet des Parameterraums abdecken kann, kann nicht ausgeschlossen werden, dass außerhalb des Suchraums noch ein besserer Punkt als das ermittelte Minimum existiert. Ein iterativer Optimierungsalgorithmus bietet deshalb keine Gewähr dafür, dass ein globales Optimum der Zielfunktion gefunden werden kann.

Suchstrategien von Optimierungsalgorithmen

Die Wahrscheinlichkeit zur Auffindung des globalen Minimums der Zielfunktion lässt sich durch eine bessere Abdeckung des Suchraums erhöhen. Im Hinblick darauf lassen sich iterative Optimierungsalgorithmen einteilen in

- lokale Verfahren und
- globale Verfahren.

Lokale Optimierungsverfahren gehen bei der Suche nach dem Minimum einer Zielfunktion so vor, dass sie, ausgehend von einem Startpunkt, die Umgebung um die aktuelle Iterierte nach einem einzigen Punkt mit kleinerem Funktionswert absuchen. Globale Optimierungsverfahren suchen in jedem Iterationsschritt die Umgebung nach mehreren besseren Punkten ab.

Im Hinblick darauf, mit welcher Technik die Suchrichtung zur Verbesserung einer Iterierten im Iterationsprozess bestimmt wird, lassen sich Optimierungsverfahren in

- Gradientenverfahren und
- gradientenfreie Verfahren

einteilen. Gradientenverfahren verwenden hierzu den Gradienten oder auch die zweite Ableitung der Zielfunktion nach den Optimierungsparametern, während gradientenfreie Optimierungsverfahren, auch Verfahren der direkten Suche genannt, ohne diese Informationen auskommen und einen besseren Punkt im Parameterraum durch einen direkten Vergleich von Funktionswerten bestimmen.

In dieser Arbeit wird zur Parameteridentifikation ein Optimierungsalgorithmus aus der Gruppe lokaler gradientenfreier Verfahren verwendet. Dabei handelt es sich um den Downhill-Simplex-Algorithmus [46], der zurückgehend auf seine Entwickler auch als Nelder-Mead-Algorithmus bezeichnet wird.

Downhill-Simplex-Algorithmus

Mit dem Downhill-Simplex-Algorithmus lassen sich Optimierungsprobleme für skalarwertige nichtlineare und unbeschränkte Funktionen von mehreren reellen Variablen behandeln [32]. Da dieser Optimierungsalgorithmus über gute Konvergenzeigenschaften verfügt, kann das gesuchte globale Minimum trotz einer lokalen Suchmethodik in den meisten Fällen aufgefunden werden [44]. Der Algorithmus hat sich in einer Vielzahl von Anwendungsfällen in verschiedenen Bereichen bewährt und zählt zu den am weitesten verbreiteten Verfahren seiner Klasse [32]. Eine detaillierte Beschreibung des Algorithmus befindet sich in Anhang B. An dieser Stelle soll nur das verwendete Suchprinzip erläutert werden.

Der Downhill-Simplex-Algorithmus beruht auf einem geometrischen Suchprinzip. Dabei werden zur Behandlung eines Minimierungsproblems für eine Zielfunktion mit n reellen Variablen, die zu einem Vektor zusammengefasst sind, zuerst $n + 1$ verschiedene Startvektoren gewählt und die Zielfunktion dann an diesen Punkten ausgewertet. Bei den Startvektoren handelt es sich um eine vorzugebende Schätzung für die Lösung des Minimierungsproblems und weitere n Vektoren, die unter Zuhilfenahme dieser Schätzung konstruiert werden. Die Startvektoren können in dem n -dimensionalen Suchraum als Eckpunkte eines Polyeders angesehen werden, welche dieses sogenannte Simplex aufspannen. Bei einem z. B. zweidimensionalen Optimierungsproblem entspricht das Simplex einem Dreieck.

Um ein Minimum der Zielfunktion zu finden, werden die Eckpunkte des Anfangssimplex mit Hilfe von geometrischen Operationen sukzessive so verändert, dass die in der Folge entstehenden Simplexe sich systematisch in Richtung eines Funktionsminimums verlagern und sich über diesem zusammenziehen. Dieser Prozess lässt sich bei einer zweidimensionalen Optimierungsaufgabe anschaulich als eine Abfahrt von einem Punkt im Gebirge Richtung Tal (engl. *downhill*) beschreiben. Die beiden zu optimierenden Parameter spannen dabei die Längen- und die Tiefenachse auf, während sich das Höhenprofil durch die Auswertung der Zielfunktion über einem Lösungsraum für die Parameter ergibt.

Abbildung 4.4 zeigt das prinzipielle Vorgehen bei der Anwendung des Downhill-Simplex-Algorithmus. Die Parameterbestimmung, formuliert als Optimierungsaufgabe, wird zunächst für das dynamische Prozessmodell und dann für das pH-Modell durchgeführt.

4.4.4 Aufstellung der Optimierungsaufgabe für das Prozessmodell

Die Parameterschätztaufgabe wird als Minimierungsproblem für die Abweichungen zwischen den gemessenen und den über das dynamische Prozessmodell generierten

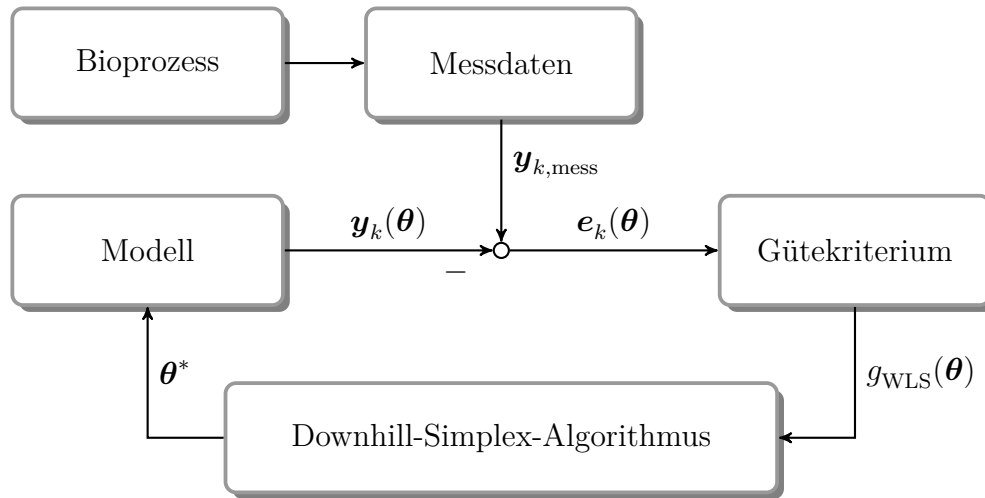


Abbildung 4.4: Blockdiagramm der Parameteridentifikation.

Werten von Keimzahl, Milchsäure- und Lactosekonzentration formuliert.

Gütekriterium

Es wird ein Gütekriterium basierend auf der Methode der gewichteten kleinsten Fehlerquadrate analog zu (4.66) verwendet. Als Gewichtungsmatrix dient eine Diagonalmatrix $\mathbf{W} = \text{diag}(w_x, w_p, w_s)$. Sie muss iterativ eingestellt werden, bis eine zufriedenstellende Nachbildung der Messdaten von allen drei Messgrößen vorliegt. Da sich die Keimzahl von den beiden Größen Milchsäure- und Lactosekonzentration um mehrere Größenordnungen unterscheidet, ist es sinnvoll, sie im Gütekriterium im logarithmischen Maßstab zu betrachten, damit über Fehler von gleicher Größenordnung summiert werden kann. Um eine gewünschte Beschränkung der Wertebereiche der Optimierungsparameter mit dem Downhill-Simplex-Algorithmus realisieren zu können, muss die Problemformulierung auf den restringierten Fall erweitert werden. Dazu wird in der Zielfunktion ein multiplikativer Strafparameter ψ eingeführt, wobei dieser im Allgemeinen eine Funktion der Optimierungsvariablen darstellt. Somit kann für die Zielfunktion geschrieben werden

$$\begin{aligned}
 g_{\text{WLS}}(\boldsymbol{\theta}_{\text{dyn}}) = \psi(\boldsymbol{\theta}_{\text{dyn}}) & \left(\sum_{k=1}^n w_x \left(\log_{10} \left(\frac{c_{x,k,\text{mess}}}{c_{0,\text{cfu}}} \right) - \log_{10} \left(\frac{c_{x,k}(\boldsymbol{\theta}_{\text{dyn}})}{c_{0,\text{cfu}}} \right) \right)^2 \right. \\
 & + \sum_{k=1}^n w_p \left(c_{p,k,\text{mess}} - c_{p,k}(\boldsymbol{\theta}_{\text{dyn}}) \right)^2 \\
 & \left. + \sum_{k=1}^n w_s \left(c_{s,k,\text{mess}} - c_{s,k}(\boldsymbol{\theta}_{\text{dyn}}) \right)^2 \right). \quad (4.67)
 \end{aligned}$$

Dabei bezeichnen $c_{x,k,\text{mess}}$, $c_{p,k,\text{mess}}$ und $c_{s,k,\text{mess}}$ die Messwerte der Keimzahl, der Milchsäure- und der Lactosekonzentration zum Probenahmezeitpunkt $t = t_k$ und $c_{x,k}(\boldsymbol{\theta}_{\text{dyn}})$, $c_{p,k}(\boldsymbol{\theta}_{\text{dyn}})$, $c_{s,k}(\boldsymbol{\theta}_{\text{dyn}})$ stehen für die Werte, die über das dynamische Prozessmodell mit einem geschätzten Parametervektor $\boldsymbol{\theta}_{\text{dyn}}$ in (4.16) generiert wurden. Mit Hilfe der Parameter w_x , w_p und w_s wird die Gewichtung zwischen den drei Zustandsgrößen eingestellt. Außerdem gilt

$$c_{0,\text{cfu}} = 1 \text{ cfu/ml} . \quad (4.68)$$

Die Beschränkung der Wertebereiche wird durch ein Penalty-Verfahren realisiert, wie in [46] vorgeschlagen. So wird im Falle einer Verletzung des vorgegebenen Wertebereichs für einen Parameter in $\boldsymbol{\theta}_{\text{dyn}}$ dem Strafparameter ψ eine große positive Zahl zugeordnet, wodurch auch die Zielfunktion einen großen Wert annimmt. Der ermittelte Parametervektor $\boldsymbol{\theta}_{\text{dyn}}$ wird damit als schlecht bewertet, sodass er als Kandidat für die Lösung der Minimierungsaufgabe ausscheidet. Auf diese Weise wird erreicht, dass die Suche nach einer Parameterkombination, die die Bedingungen in Bezug auf die Wertebereiche erfüllt, fortgesetzt wird.

Die Beschränkung der Wertebereiche bei der Parameterschätzung ist sinnvoll, weil dadurch auf der einen Seite die Konvergenz des Optimierungsalgorithmus beschleunigt werden kann, da das abzusuchende Parametergebiet verkleinert wird. Auf der anderen Seite kann das Ergebnis der Parameterschätzung verbessert werden, da der Suche in einem Parameterraum, der keinen gültigen Lösungsraum darstellt, vorgebeugt wird. Die gültigen Wertebereiche der Parameter werden im Folgenden festgelegt.

Beschränkung der Wertebereiche

Im Modell des Kultivierungsprozesses müssen alle zu identifizierenden Parameter positive Werte annehmen, um ein physikalisch sinnvolles Ergebnis zu erhalten. Für einige Parameter lässt sich der gültige Wertebereich noch genauer angeben.

So beschreibt der Parameter k_s in der Gleichung für die Lactosekonzentration das massenbezogene Verhältnis der verstoffwechselten Lactose zur produzierten Milchsäure. Für diesen Parameter existiert eine untere Schranke, die aus der theoretisch vollständigen, stoffmengenbezogenen Umsetzung resultiert, also der Umsetzung von einem Molekül Lactose zu genau zwei Molekülen Lactat bzw. Milchsäure. Mit der molaren Masse der Lactose von 342.296 g/mol und der molaren Masse der Milchsäure von 90.078 g/mol nach [36] ergibt sich ein massenbezogenes Umsetzungsverhältnis von $342.296 : (2 \cdot 90.078)$ bzw. nach der Auswertung etwa $1.9 : 1$. Da die beim Verstoffwechseln von Lactose gewonnene Energie außer für die Bildung von Milchsäure noch für weitere Vorgänge verwendet wird, müssen für eine Produktion von 1 g Milchsäure mehr als 1.9 g Lactose abgebaut werden. Die Zahl 1.9 kann damit als eine untere Schranke für k_s angenommen werden.

Eine obere Schranke für den Parameter k_s kann aus Messdaten abgeschlossener Kultivierungsversuche abgeschätzt werden. In Kapitel 3 wurde der Verlauf eines unter Standardbedingungen durchgeführten Versuchs beschrieben. In diesem Versuch wurden am Ende der Fermentation 47 g Lactose verstoffwechselt, wobei etwa 21 g Milchsäure im Fermenter nachgewiesen werden konnten. Dies entspricht einem massenbezogenen Umsetzungsverhältnis von etwa 2.2 : 1. Unter Berücksichtigung dieses Ergebnisses wird als maximaler Wert für k_s die Zahl 3 gewählt.

Des Weiteren können für einige Parameter auf der Grundlage von Plausibilitätsüberlegungen und Erfahrungswerten maximale Werte angesetzt werden. So ist der Wert des Parameters t_{lag} , der die Dauer der Lag-Phase in der Einheit Stunden beschreibt, durch die Dauer des Prozesses selbst beschränkt. Werte größer 6 h sind demnach nicht sinnvoll. Die Parameter α_p und β_p des Luedeking-Piret-Terms in der Gleichung für die Milchsäurekonzentration beschreiben den Zusammenhang zwischen der Keimzahl, ihrer Änderungsgeschwindigkeit und der Geschwindigkeit der Milchsäurebildung. Aufgrund der bestehenden Größenverhältnisse sind für die beiden Parameter Werte größer eins nicht sinnvoll.

Weiter können für die Monod-Konstanten k_x und k_p , welche Konzentrationen in der Substratlimitierung beschreiben, Werte kleiner 10 g/l angenommen werden, da nach [5] eine Substratlimitierung bei kleineren Konzentrationen im Falle der Milchsäurebakterien ausgeschlossen werden kann.

In Tabelle 4.1 sind die festgelegten Beschränkungen für die Wertebereiche der einzelnen Parameter θ_i mit der Angabe der unteren Schranke $\theta_{i,\text{min}}$ und der oberen Schranke $\theta_{i,\text{max}}$ zusammengefasst. Diese Bedingungen an die Schätzung θ_{dyn} werden über die Straffunktion ψ mit der Fallunterscheidung

$$\psi(\theta_{\text{dyn}}) = \begin{cases} 1, & \text{wenn } \theta_{\text{dyn}} \text{ die Bedingungen in Tabelle 4.1 erfüllt} \\ \Psi, & \text{sonst} \end{cases} \quad (4.69)$$

in das Gütekriterium integriert, wobei der Term Ψ eine große positive Zahl repräsentiert.

4.4.5 Aufstellung der Optimierungsaufgabe für das pH-Modell

Die Parameterschätzaufgabe für das pH-Modell der Kulturlösung wird auf der Grundlage eines zu minimierenden Gütekriteriums formuliert. Des Weiteren wird die geltende Beschränkung der Wertebereiche der zu optimierenden Parameter definiert.

Tabelle 4.1: Beschränkung der Wertebereiche für die Identifikation des dynamischen Prozessmodells.

Parameter θ_i	$\theta_{i,\min}$	$\theta_{i,\max}$	Einheit
μ_{\max}	0	∞	1/h
t_{lag}	0	6	h
α_{p}	0	1	g/(cfu · 1000)
β_{p}	0	1	g/(cfu · h · 1000)
k_{x}	0	10	g/l
k_{i}	0	∞	l/g
k_{p}	0	10	g/l
k_{s}	1.9	3	—

Gütekriterium

Es wird ein Gütekriterium basierend auf der Methode der kleinsten Fehlerquadrate verwendet. Die zu minimierende Zielfunktion lautet

$$g_{\text{WLS}}(\boldsymbol{\theta}_{\text{pH}}) = \psi(\boldsymbol{\theta}_{\text{pH}}) \sum_{k=1}^n \left(\text{pH}_{k,\text{mess}} - \text{pH}_k(\boldsymbol{\theta}_{\text{pH}}, \hat{c}_{\text{P},k}) \right)^2, \quad (4.70)$$

mit der Straffunktion ψ , den pH-Werten $\text{pH}_{k,\text{mess}}$, die zu den Messzeitpunkten $t = t_k$, $k \in \{1, 2, \dots, n\}$ gemessen wurden, und den berechneten pH-Werten $\text{pH}_k(\boldsymbol{\theta}_{\text{pH}}, \hat{c}_{\text{P},k})$, die sich nach dem pH-Modell mit einem geschätzten Parametervektor $\boldsymbol{\theta}_{\text{pH}}$ in (4.63) für die Eingangswerte $\hat{c}_{\text{P},k}$ ergeben. Als Eingangsgröße des pH-Modells dient dabei die molare Konzentration der Milchsäure \hat{c}_{P} im Fermenter. Die für die betrachteten Zeitpunkte $t = t_k$ benötigten Eingangswerte $\hat{c}_{\text{P},k}$ werden durch Interpolation zwischen den in der HPLC-Analyse gewonnenen Messwerten mit anschließender Umrechnung auf den molaren Maßstab gemäß Gleichung (4.55) ermittelt.

Die Wertebereiche der zu optimierenden Parameter, die zum Vektor $\boldsymbol{\theta}_{\text{pH}}$ zusammengefasst sind, sollen beschränkt werden, um sinnvolle Ergebnisse der Parameterschätzung zu erhalten.

Beschränkung der Wertebereiche

Die Parameter des pH-Modells, die zu identifizieren sind, beschreiben Stoffmengenkonzentrationen und Gleichgewichtskonstanten, weshalb nur positive Werte sinnvoll sind. Darüber hinaus lassen sich obere Schranken abschätzen, sodass die Wertebereiche noch stärker eingeschränkt werden können, wie im Folgenden beschrieben wird.

VE-Wasser ist mit über 90 % Massenanteil die Hauptkomponente des verwendeten Nährmediums. Demnach werden die Gesamtstoffmengenkonzentrationen \hat{c}_A , \hat{c}_B und \hat{c}_Σ der modellierten Stoffe A, B und Σ deutlich kleinere Werte annehmen als die Gesamtstoffmengenkonzentration von Wasser, die in (4.29) für Normalbedingungen zu 55.345 mol/l berechnet wurde. Als obere Schranke für die einzelnen Konzentrationen \hat{c}_A , \hat{c}_B und \hat{c}_Σ wird ein Wert von 5 mol/l festgelegt.

Die modellierten Stoffe A und B repräsentieren im pH-Modell schwache Elektrolyte, die also in Wasser nur zum Teil in Ionen zerfallen. Nach [42] sind schwache Elektrolyte dadurch charakterisiert, dass der negative dekadische Logarithmus pK der Gleichgewichtskonstante K , die die chemische Reaktion des Stoffes in Wasser kennzeichnet, Werte größer 3.5 annimmt. Dementsprechend bringt der für Milchsäure ermittelte pK -Wert in (4.58) quantitativ zum Ausdruck, dass es sich hierbei um eine schwache Säure handelt. Gemäß Gleichung (4.26) ist $pK > 3.5$, wenn $K < 3.162 \cdot 10^{-4}$ mol/l gilt. Aufgrund dieses Resultats wird für die Gleichgewichtskonstanten K_A und K_B der modellierten Stoffe A und B eine obere Schranke von $4 \cdot 10^{-4}$ mol/l gewählt.

Tabelle 4.2 fasst die geltenden Bedingungen an die Wertebereiche der Parameter zusammen.

Tabelle 4.2: Beschränkung der Wertebereiche für die Identifikation des pH-Modells.

Parameter θ_i	$\theta_{i,\min}$	$\theta_{i,\max}$	Einheit
\hat{c}_A	0	5	mol/l
\hat{c}_B	0	5	mol/l
\hat{c}_Σ	0	5	mol/l
K_A	0	$4 \cdot 10^{-4}$	mol/l
K_B	0	$4 \cdot 10^{-4}$	mol/l

Für die Straffunktion ψ in der Zielfunktion (4.70) gilt analog zur Optimierungsaufgabe für das dynamische Prozessmodell im vorhergehenden Unterabschnitt

$$\psi(\boldsymbol{\theta}_{\text{pH}}) = \begin{cases} 1, & \text{wenn } \boldsymbol{\theta}_{\text{pH}} \text{ die Bedingungen in Tabelle 4.2 erfüllt} \\ \Psi, & \text{sonst.} \end{cases} \quad (4.71)$$

4.4.6 Ablauf der Parameteridentifikation

Als technisches Hilfsmittel für die Durchführung der Parameteridentifikation wird die Softwareumgebung MATLAB verwendet. Sie stellt für die numerischen Berech-

nungen entsprechende Routinen zur Verfügung, beispielsweise für die Umsetzung des Downhill-Simplex-Algorithmus sowie des matrizenbasierten Verfahrens zur Lösung von Nullstellenproblemen. Die verwendeten MATLAB-Funktionen werden in einen übergeordneten MATLAB-Programmcode integriert, der als Ergebnis der Parameterschätzung einen Parametersatz für das jeweilige Modell liefert.

Ablaufschema

Die Parameterschätzung erfolgt sowohl für das dynamische Prozessmodell als auch für das statische pH-Modell nach dem in Abbildung 4.5 gezeigten Schema. Zu Beginn des Identifikationsprozesses werden die Messdaten, die für die Identifikation verwendet werden sollen, an den Optimierungsalgorithmus übergeben. Im Falle des dynamischen Prozessmodells betrifft dies die Messwerte der Keimzahl, der Milchsäure- und der Lactosekonzentration und im Falle des pH-Modells die gemessenen pH-Werte und die Messwerte der Milchsäurekonzentration. Der Optimierungsalgorithmus wird dann mit sinnvollen Anfangswerten initialisiert und gestartet. Die Modellgleichungen werden mit einem Parametervektor gelöst und es werden dann die Abweichungen zwischen den Simulationsergebnissen und den Messergebnissen bestimmt. Danach wird die aufgestellte Zielfunktion ausgewertet. Um ein Minimum der Zielfunktion zu finden, wird versucht, einen besseren Parametervektor zu ermitteln. Diese Prozedur wird solange wiederholt, bis ein Abbruchkriterium erfüllt ist und ein Parametervektor als Ergebnis der Parameterschätzung zur Verfügung steht. Mit diesem soll des Weiteren die Validierung des betrachteten Modells durchgeführt werden.

Verwendete Datensätze für die Parameteridentifikation

Die Parameterschätzung erfolgt für beide Modelle anhand von Messdaten aus dem Datenbestand des institutseigenen Biolabors, wobei für jedes Modell ein anderer Datensatz genutzt wird. So werden für die Parametrierung des dynamischen Prozessmodells die Messdaten aus einem Standardversuch (Versuch ct20100203) verwendet. Die Parametrierung des pH-Modells erfolgt dagegen anhand von Messdaten aus einem Kultivierungsversuch (Versuch ct20110210), bei dem, abweichend von den Standardkultivierungsbedingungen in Tabelle 3.2, die pH-Wert-Regelung ausgeschaltet war, jedoch alle anderen in dieser Tabelle genannten Einstellungen nicht verändert wurden. Die Verwendung eines Versuchs mit dieser Konfiguration für die Parametrierung des pH-Modells hat den Vorteil, dass die Anpassung an einen größeren pH-Wertbereich erfolgen kann, wodurch sich ein besseres Resultat der Parameteridentifikation ergibt.

Der pH-Wert-Verlauf im betrachteten Versuch ohne pH-Wert-Regelung ist in Abbildung 4.6 dargestellt. Zum Vergleich ist der pH-Wert-Verlauf aus dem Standardversuch aufgetragen, der zur Parametrierung des dynamischen Prozessmodells verwendet werden soll. Während in diesem Versuch ein pH-Wertbereich von 6.5 bis 6.0 für die

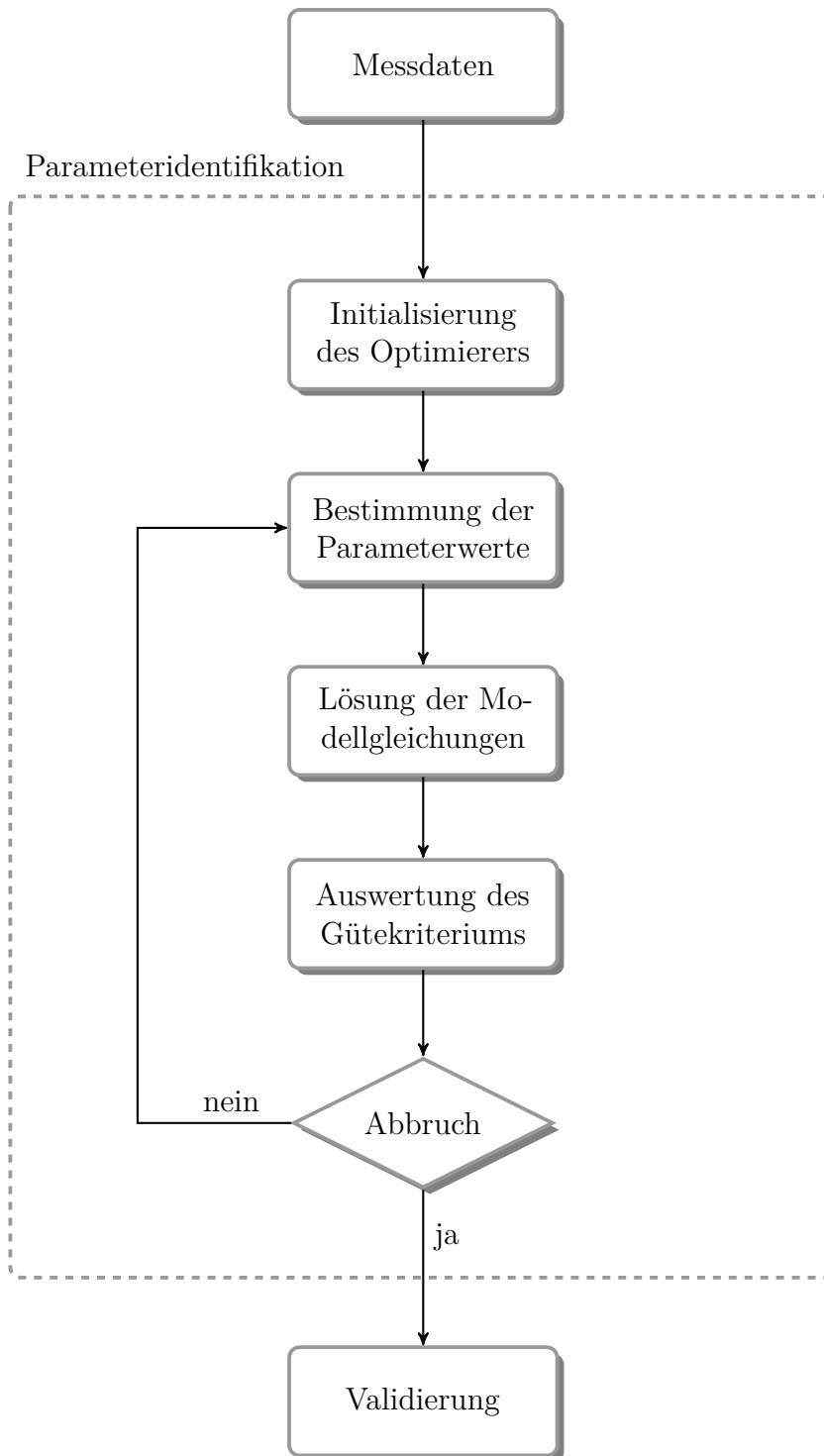


Abbildung 4.5: Ablaufschema der strukturierten Parameteridentifikation für das Prozessmodell und das pH-Modell.

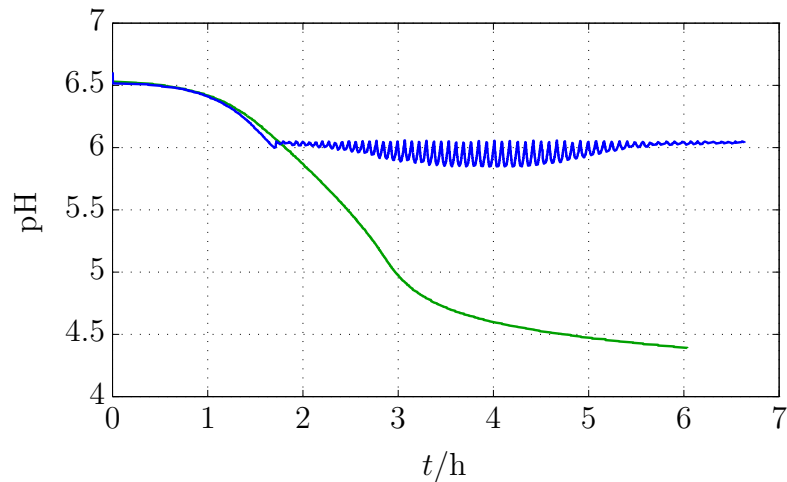


Abbildung 4.6: Verlauf des pH-Wertes in Versuchen mit und ohne pH-Wert-Regelung.

- mit pH-Wert-Regelung, Versuch ct20100203
- ohne pH-Wert-Regelung, Versuch ct20110210

Identifikation genutzt werden kann, steht in dem Versuch ohne pH-Wert-Regelung für die Parameterschätzung ein pH-Wertbereich von 6.5 bis 4.4 zur Verfügung.

Wie in Abbildung 4.6 zu sehen ist, fällt im Versuch mit ausgeschalteter pH-Wert-Regelung der pH-Wert nach einer Absenkung auf den Sollwert von 6.0 zunächst mit konstanter Geschwindigkeit weiter ab. Ab dem Zeitpunkt $t = 3$ h, bei einem pH-Wert von etwa 5.0, verlangsamt sich die Absenkung dann immer mehr, was auf einen abrupten Rückgang der metabolischen Aktivität zurückzuführen ist. Aufgrund des niedrigen pH-Wertes kommt es zu Zellschädigungen und der damit verbundenen Wachstumshemmung. Dadurch wird weniger Milchsäure produziert, was an dem abgeflachten pH-Wert-Verlauf zu erkennen ist. Dieses Verhalten kann bei Milchsäurebakterien nach Unterschreitung eines kritischen pH-Wertes beobachtet werden [21, 29]. Der kritische pH-Wert für *Streptococcus thermophilus* wird in [29, 45] mit 5.0 angegeben. Dieser Wert kann anhand durchgeführter Experimente bestätigt werden.

In welchem Umfang der niedrige pH-Wert das Wachstum, die Produktbildung und die Substrataufnahme der Bakterien in einem Kultivierungsversuch mit ausgeschalteter pH-Wert-Regelung hemmt, ist in Abbildung 4.7 zu sehen. In dieser Abbildung sind die Verläufe von Keimzahl, Milchsäure- und Lactosekonzentration aus den beiden mit und ohne pH-Wert-Regelung durchgeführten Versuchen dargestellt, die zur Parameterschätzung verwendet werden sollen. So kann im Versuch mit ausgeschalteter pH-Wert-Regelung in der stationären Phase eine um etwa eine Größenordnung niedrigere durchschnittliche Keimzahl gemessen werden als im Versuch mit eingeschalteter

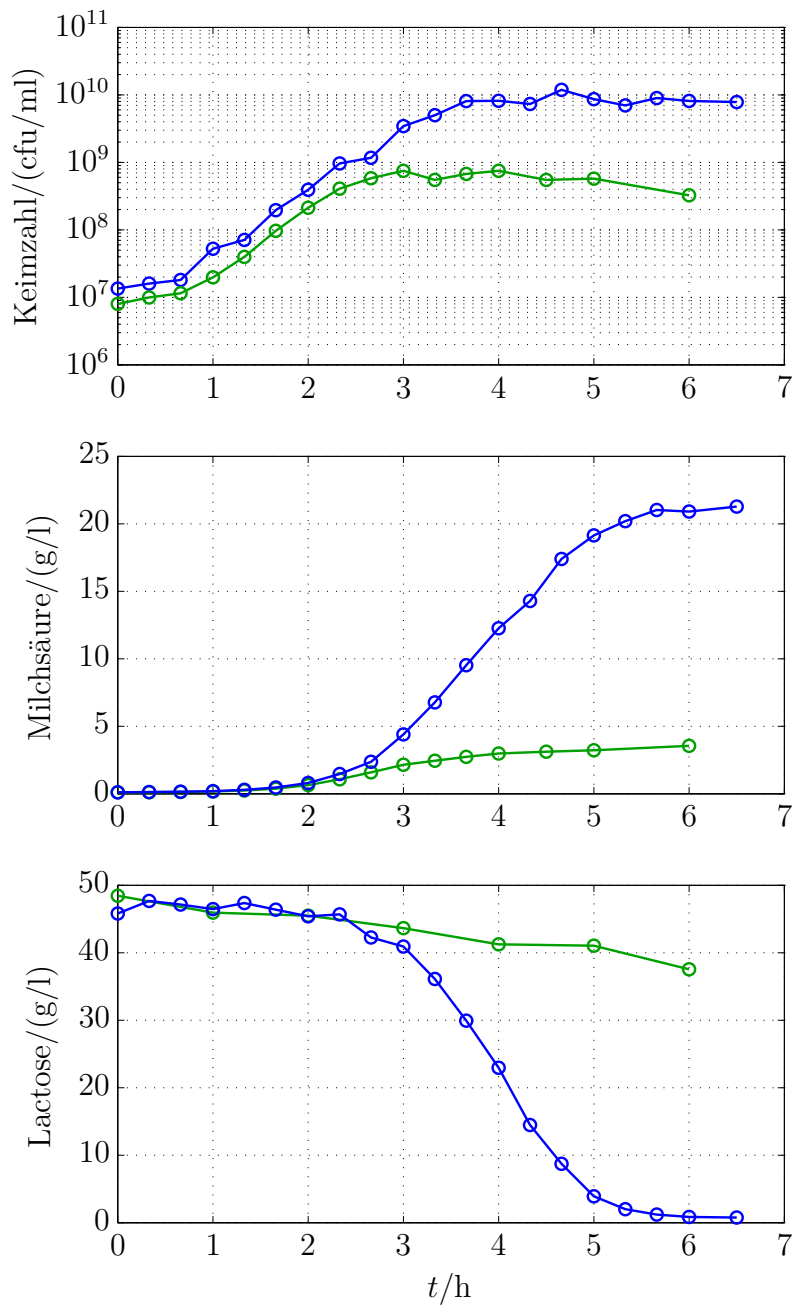


Abbildung 4.7: Verläufe von Keimzahl, Milchsäure- und Lactosekonzentration in Versuchen mit und ohne pH-Wert-Regelung.

- mit pH-Wert-Regelung, Versuch ct20100203
- ohne pH-Wert-Regelung, Versuch ct20110210

pH-Wert-Regelung. Die produzierte Milchsäuremenge beträgt am Ende des Versuchs, nach einer Prozessdauer von 6 h, nur etwa ein Fünftel der Menge, die im Standardversuch zum gleichen Prozesszeitpunkt festgestellt werden kann. Das Gleiche gilt für die verstoffwechselte Lactosemenge, wie in Abbildung 4.7 zu sehen ist.

4.4.7 Parameterwerte

Die Parameterschätzung für das dynamische Prozessmodell und das pH-Modell wird wie im vorigen Unterabschnitt beschrieben durchgeführt. Die ermittelten Parameterwerte sind in Tabelle 4.3 bzw. 4.4 angegeben. Wie die Ergebnisse zeigen, werden die aufgestellten Bedingungen an die Wertebereiche in den Tabellen 4.1 und 4.2 von allen geschätzten Parametern erfüllt.

Tabelle 4.3: Ergebnisse der Parameterschätzung für das dynamische Prozessmodell.

Parameter	Wert	Einheit
μ_{\max}	2.52	1/h
t_{lag}	$2.73 \cdot 10^{-1}$	h
α_{p}	$1.21 \cdot 10^{-9}$	g/(cfu · 1000)
β_{p}	$1.47 \cdot 10^{-9}$	g/(cfu · h · 1000)
k_{x}	8.12	g/l
k_{i}	$1.22 \cdot 10^{-1}$	l/g
k_{p}	4.19	g/l
k_{s}	2.23	—

Tabelle 4.4: Ergebnisse der Parameterschätzung für das pH-Modell.

Parameter	Wert	Einheit
\hat{c}_{A}	$2.136 \cdot 10^{-2}$	mol/l
\hat{c}_{B}	$1.315 \cdot 10^{-2}$	mol/l
\hat{c}_{Σ}	$1.994 \cdot 10^{-2}$	mol/l
K_{A}	$2.518 \cdot 10^{-6}$	mol/l
K_{B}	$1.100 \cdot 10^{-5}$	mol/l

Die Parameteridentifikation ist damit abgeschlossen. Bevor die beiden Modelle zur Anwendung kommen, muss noch ihre Vorhersagegüte anhand von Daten aus Experimenten, die nicht Bestandteil der Identifikation waren, überprüft werden.

4.5 Validierung

Die Nachbildungseigenschaften des dynamischen Prozessmodells und des pH-Modells werden anhand von Messdaten aus einem Standardversuch und aus zwei weiteren Versuchen geprüft, die in Bezug auf die im Standardversuch verwendete Inokulationsmenge mit halber bzw. doppelter Inokulationsmenge durchgeführt wurden. Es werden also Experimente mit einer 1%igen, einer 0.5%igen und einer 2%igen Inokulationsmenge betrachtet.

Außer für diese drei Experimente soll die Vorhersagekraft des pH-Modells zusätzlich noch für einen Versuch getestet werden, der ohne pH-Wert-Regelung durchgeführt wurde. Aufgrund des größeren nachzubildenden Wertebereichs in diesem Versuch kann das pH-Modell auf seine Güte genauer geprüft werden.

Durch die Verwendung von unterschiedlichen Impfmengen wird erreicht, dass die Bakterienkulturen sich in den Versuchen unterschiedlich schnell entwickeln. Das Wachstumsverhalten und das Säuerungsverhalten verändern sich und damit auch der Verlauf des pH-Wertes in der Anfangsphase der Fermentation. Auf diese Weise sollen die im industriellen Kultivierungsprozess beobachteten unterschiedlich schnellen Absenkungen des pH-Wertes auf den Sollwert nachgebildet werden.

Ein verändertes Wachstum in der Anfangsphase des Prozesses bedeutet, dass sich die Dauer der Lag-Phase ändert. Dies muss im dynamischen Prozessmodell mit einem entsprechenden Wert des Parameters t_{lag} , der die Dauer der Lag-Phase beschreibt, berücksichtigt werden, um eine gute Nachbildung der Messdaten zu erhalten. Der Wert dieses Parameters, der in der Parameterschätzung ermittelt wurde, bildet in Bezug auf die verwendete Inokulationsmenge die Situation in Standardversuchen ab, also bei einer 1%igen Inokulation. Bei Versuchen mit abweichenden Inokulationsmengen muss der Wert entsprechend der Situation im Prozess angepasst werden.

4.5.1 Ergebnisse für das Prozessmodell

Die Ergebnisse der Validierung des dynamischen Prozessmodells sind in den Abbildungen 4.8–4.10 dargestellt. Diese zeigen für die drei untersuchten Experimente die Messwerte der Zustandsgrößen Keimzahl, Milchsäure- und Lactosekonzentration im Vergleich mit den Simulationsverläufen, die über das Prozessmodell generiert wurden.

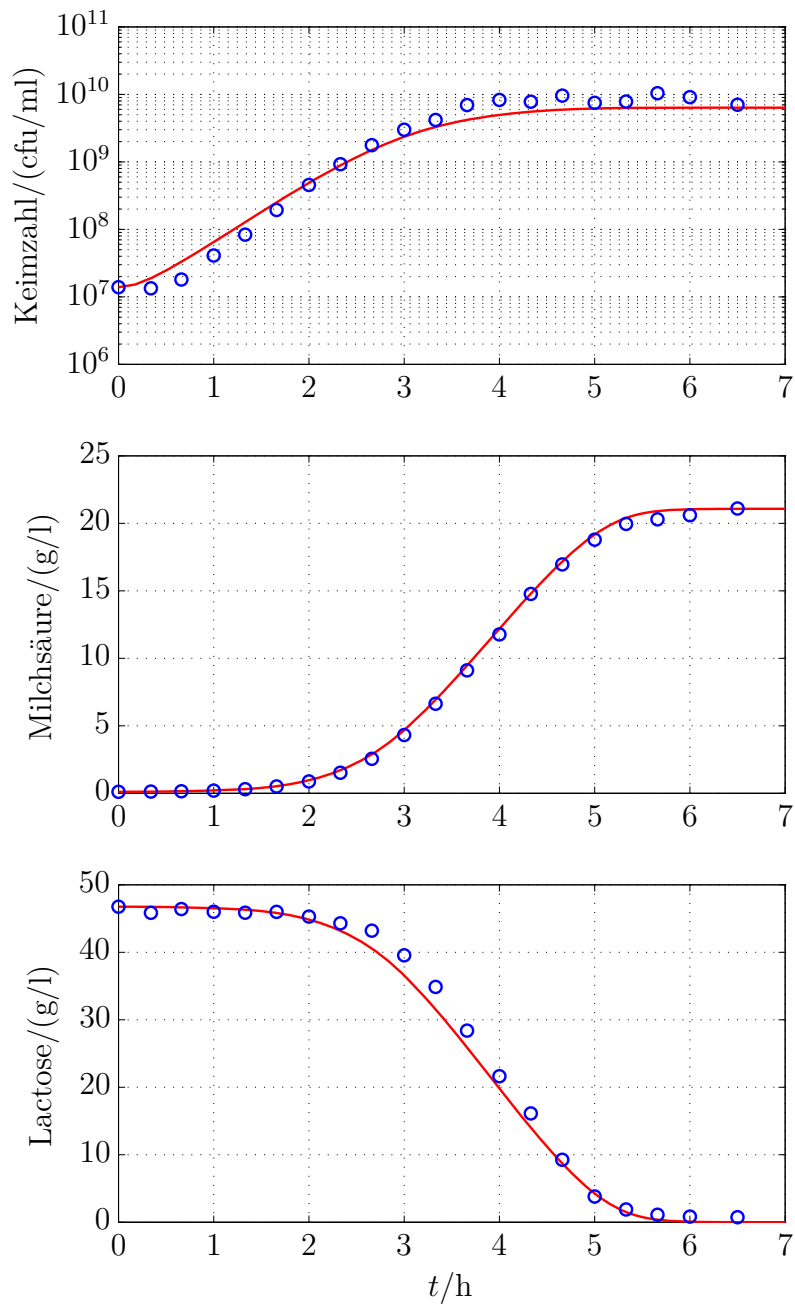


Abbildung 4.8: Vergleich von Simulation und Messergebnissen, Versuch ct20091111, 1%ige Inokulation.

- Messwerte
- Simulation nach Prozessmodell (4.15) mit Parameterwerten in Tabelle 4.3

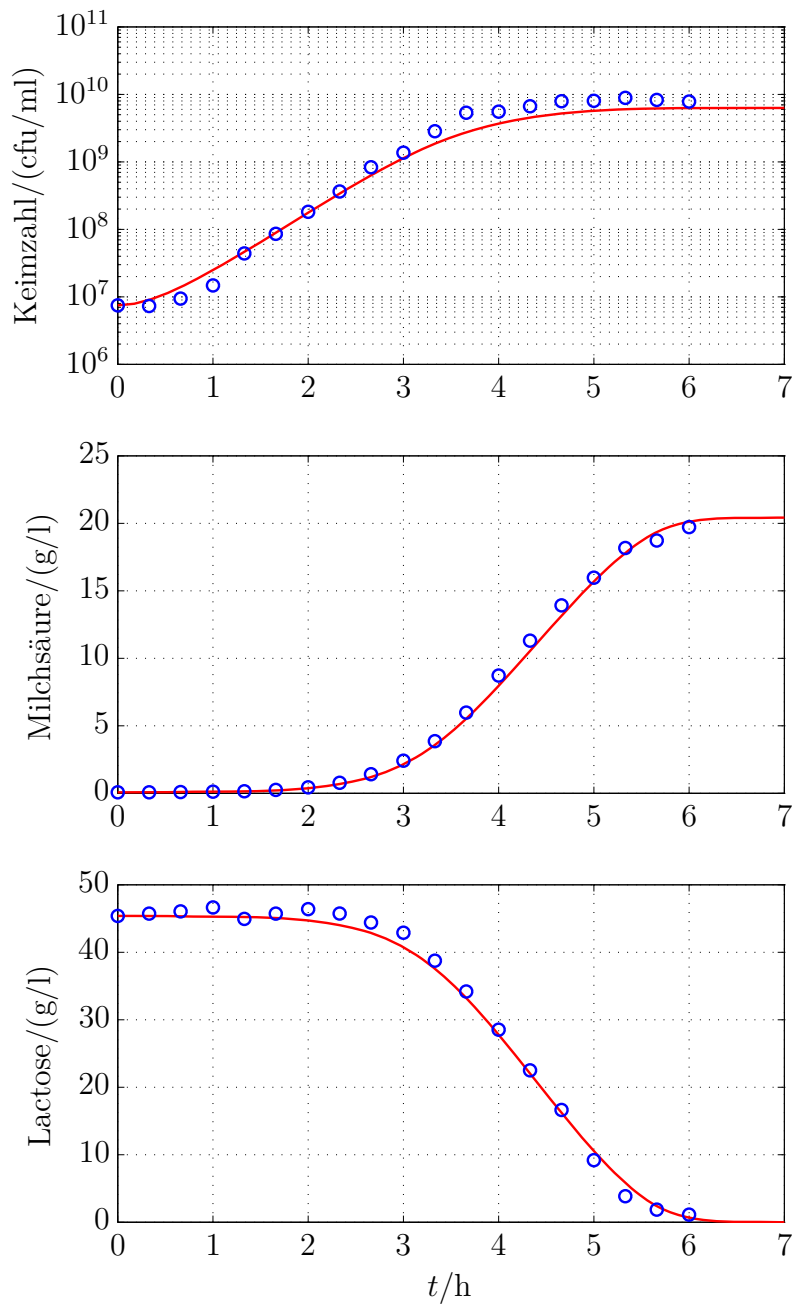


Abbildung 4.9: Vergleich von Simulation und Messergebnissen, Versuch ct20100317, 0.5%ige Inokulation.

- Messwerte
- Simulation nach Prozessmodell (4.15) mit $t_{\text{lag}} = 5 \cdot 10^{-1} \text{ h}$ und den Werten in Tabelle 4.3 für die übrigen Parameter

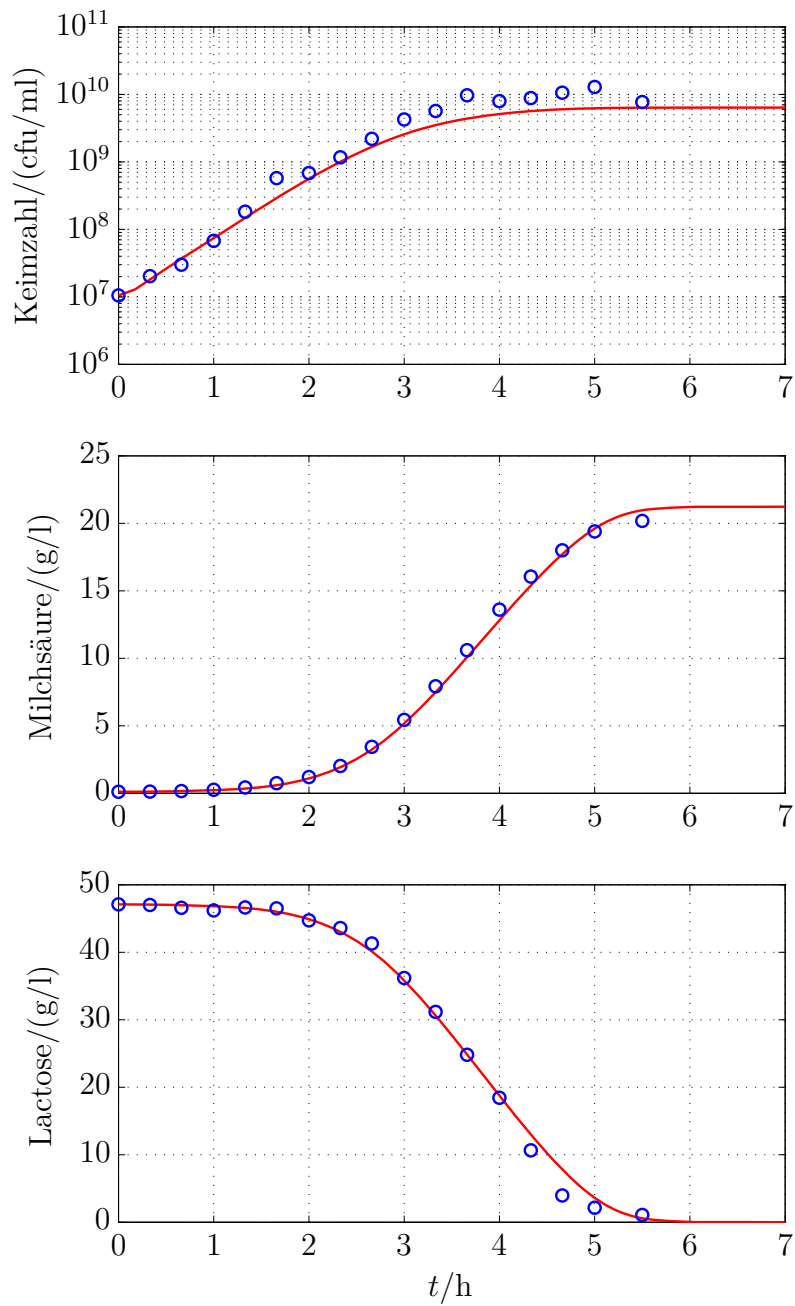


Abbildung 4.10: Vergleich von Simulation und Messergebnissen, Versuch ct20100217, 2%ige Inokulation.

- Messwerte
- Simulation nach Prozessmodell (4.15) mit $t_{\text{lag}} = 1 \cdot 10^{-4}$ h und den Werten in Tabelle 4.3 für die übrigen Parameter

Die Anfangswerte der drei Zustandsgrößen wurden als bekannt vorausgesetzt und in den Modellgleichungen mit den entsprechenden Messwerten berücksichtigt.

Die Simulation des Prozessverlaufs für den Standardversuch, der in Abbildung 4.8 betrachtet wird, wurde mit unveränderten Parameterwerten aus der Parameterschätzung in Tabelle 4.3 durchgeführt. Wie die Abbildung zeigt, können die Simulationsergebnisse die gemessenen Daten gut nachbilden.

Die Abbildungen 4.9–4.10 zeigen die Ergebnisse für die Versuche mit Inokulationsmengen von 0.5% und 2%. Die Simulationen des Prozessverlaufs wurden hierbei mit einem veränderten, manuell angepassten Parameter t_{lag} durchgeführt, um eine gute Nachbildung der gemessenen Daten zu erhalten. Für die übrigen Modellparameter wurden die Werte aus der Parameterschätzung verwendet.

Wie der Verlauf der Keimzahl im Versuch mit 0.5%iger Inokulationsmenge in Abbildung 4.9 zeigt, dauert die Lag-Phase in diesem Versuch länger als im Standardversuch aus Abbildung 4.8. Folglich muss für eine gute Nachbildung der Messdaten der Wert des Parameters t_{lag} angehoben werden. Als geeignet hat sich dabei ein Wert von $5 \cdot 10^{-1}$ h erwiesen. Hingegen muss für den Versuch mit 2%iger Inokulationsmenge ein kleinerer t_{lag} -Wert als im Standardversuch verwendet werden. Wie in Abbildung 4.10 zu sehen, startet die Bakterienkultur in diesem Versuch sofort mit exponentiellem Wachstum. Eine Lag-Phase kann also nicht beobachtet werden. Dies wurde mit einem Wert von $1 \cdot 10^{-4}$ h für t_{lag} berücksichtigt.

Wie die präsentierten Ergebnisse zeigen, kann mit dem aufgestellten dynamischen Prozessmodell das Prozessverhalten in Versuchen mit *Streptococcus thermophilus* sowohl unter Standardkultivierungsbedingungen als auch bei abweichenden Bedingungen in Bezug auf die Inokulationsmenge gut nachgebildet werden. Der Parameter der Lag-Phase t_{lag} muss dabei kultivierungsabhängig eingestellt werden.

4.5.2 Ergebnisse für das pH-Modell

Die Validierung des pH-Modells erfolgt anhand von Daten aus denselben drei Versuchen, die auch zur Prüfung des dynamischen Prozessmodells verwendet wurden, sowie anhand von Daten aus einem weiteren Versuch, in dem der pH-Wert nicht geregelt wurde. Die Ergebnisse der Validierung sind in den Abbildungen 4.11–4.14 gezeigt.

Zur Simulation der pH-Wert-Verläufe wird das pH-Modell zu den Messzeitpunkten des pH-Wertes in der unregulierten Phase ausgewertet, wobei als Eingangswerte des Modells die Werte der Gesamtstoffmengenkonzentration der Milchsäure dienen, ermittelt aus den Messwerten der HPLC-Analyse gemäß Gleichung (4.55). Damit die Eingangswerte genau zu den Messzeitpunkten des pH-Wertes zur Verfügung stehen, werden die Messwerte der HPLC-Analyse entsprechend interpoliert.

In Abbildung 4.11 sind die Ergebnisse für den Versuch mit einer 1%igen Inokulationsmenge gezeigt. Da das pH-Modell nur die Situation in der unregulierten Prozessphase beschreibt, verläuft die Simulation nicht über die gesamte Prozessdauer, die sich anhand der dargestellten Messwerte ablesen lässt, sondern nur bis zu dem Zeitpunkt, zu dem die pH-Wert-Regelung startet. Es zeigt sich, dass der gemessene pH-Wert-Verlauf in der unregulierten Phase des hier betrachteten Standardversuchs mit dem pH-Modell gut nachgebildet werden kann.

Abbildung 4.12 vergleicht den simulierten pH-Wert-Verlauf mit dem gemessenen für einen Versuch mit der Konfiguration eines Standardversuchs, in dem aber die pH-Wert-Regelung nicht eingeschaltet wird. Wie in dieser Abbildung zu sehen ist, kann der gemessene pH-Wert-Verlauf über das gesamte, fast sechsstündige Messintervall genau wiedergegeben werden. Nur in einem Bereich von etwa $t = 3\text{ h}$ bis $t = 3.5\text{ h}$ ergeben sich größere Abweichungen. Diese sind allerdings der linearen Interpolation der Modelleingangswerte zwischen den relativ weit auseinander liegenden Messwerten der Milchsäure geschuldet, wodurch eine genauere Nachbildung der gekrümmten Kurve in diesem Bereich verhindert wird. Es zeigt sich also, dass das pH-Modell auch dann gute Ergebnisse liefert, wenn der Einsatzbereich erweitert wird.

Bei der Nachbildung des pH-Wert-Verlaufs muss im Allgemeinen berücksichtigt werden, dass der pH-Anfangswert von Fermentation zu Fermentation in einem Toleranzbereich variieren kann. Der pH-Anfangswert hängt im Wesentlichen sowohl von der Einstellung vor dem Beimpfen des Nährmediums ab, die mit Hilfe von Phosphorsäure und Natronlauge vorgenommen wird, als auch von der Menge Milchsäure, die durch das Inokulum in den Fermenter eingebracht wird. Da die Konzentrationen von Phosphorsäure, Natronlauge und Milchsäure hierbei in gewissen Bereichen schwanken, können nach dem Beimpfen des Nährmediums, also zu Beginn des Kultivierungsprozesses, unterschiedliche pH-Werte von Prozesslauf zu Prozesslauf gemessen werden.

Der Einfluss von starken Säuren und starken Basen auf den pH-Wert, wie die Phosphorsäure und die Natronlauge sie darstellen, wird im pH-Modell über den Parameter \hat{c}_Σ erfasst. Dieser muss also generell kultivierungsabhängig angepasst werden. Die veränderliche Anfangskonzentration der Milchsäure muss im pH-Modell bei seiner Validierung jedoch nicht explizit berücksichtigt werden, da dies indirekt über einen entsprechenden Wert der Milchsäurekonzentration als Eingangswert des pH-Modells geschieht.

In den beiden bereits betrachteten Versuchen aus den Abbildungen 4.11 und 4.12 konnte mit dem in der Parameterschätzung ermittelten Wert für \hat{c}_Σ in Tabelle 4.4 die jeweilige Situation in Bezug auf die Konzentrationen der starken Elektrolyte im Fermenter gut getroffen werden. Für die Versuche mit einer 0.5%igen und einer 2%igen Inokulationsmenge jedoch, die in den folgenden Abbildungen betrachtet werden, ist eine Korrektur dieses Wertes notwendig. Die Werte der übrigen Modellparameter aus der Parameterschätzung müssen nicht verändert werden.

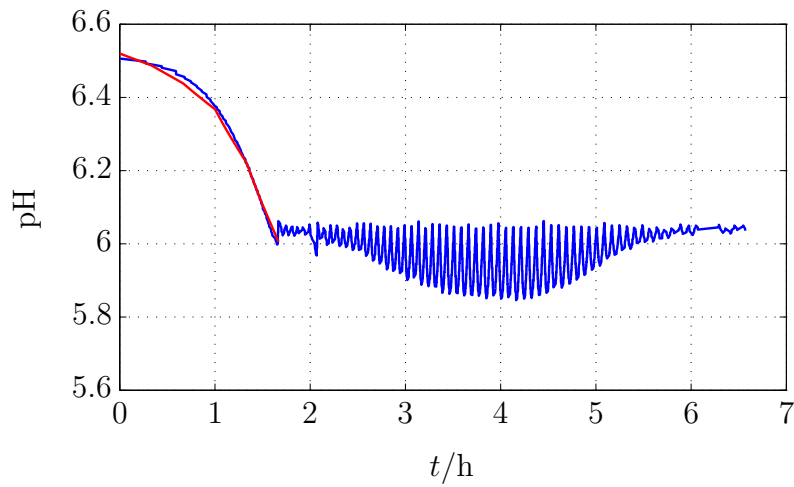


Abbildung 4.11: Vergleich von gemessener und modellierter pH-Wert-Absenkung, Versuch ct20091111, 1%ige Inokulation.

- Messwerte
- Simulation nach Modell (4.61)–(4.62) mit Parameterwerten in Tabelle 4.4

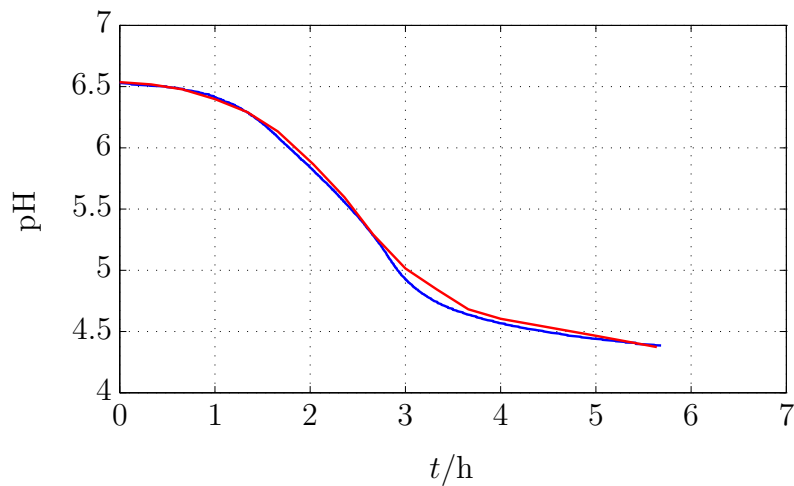


Abbildung 4.12: Vergleich von gemessener und modellierter pH-Wert-Absenkung, Versuch ct20110317 ohne pH-Wert-Regelung, 1%ige Inokulation.

- Messwerte
- Simulation nach Modell (4.61)–(4.62) mit Parameterwerten in Tabelle 4.4

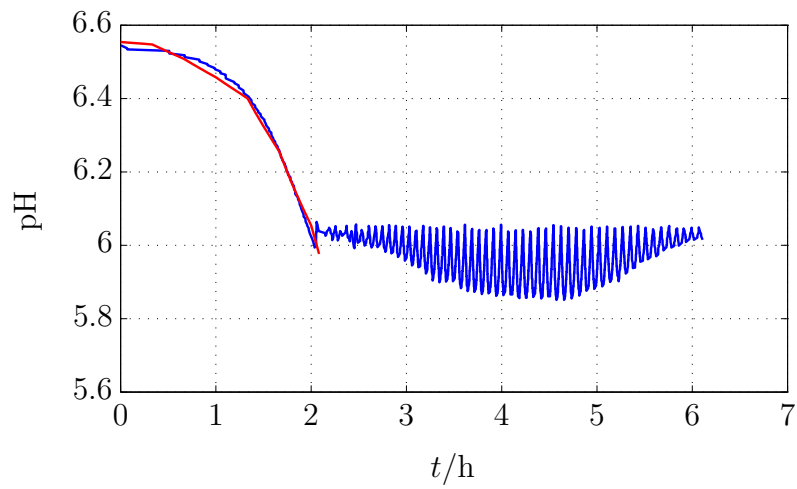


Abbildung 4.13: Vergleich von gemessener und modellierter pH-Wert-Absenkung, Versuch ct20100317, 0.5%ige Inokulation.

- Messwerte
- Simulation nach Modell (4.61)–(4.62) mit Parameterwerten in Tabelle 4.4 und Anpassung $\hat{c}_{\Sigma} = 1.97 \cdot 10^{-2} \text{ mol/l}$

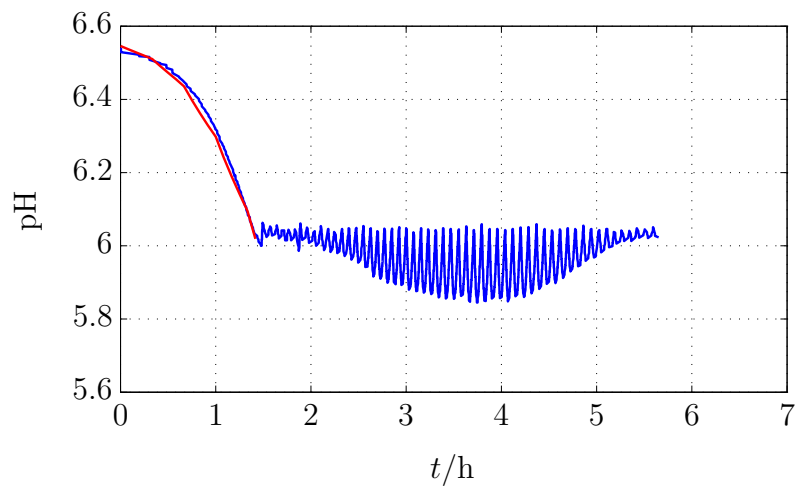


Abbildung 4.14: Vergleich von gemessener und modellierter pH-Wert-Absenkung, Versuch ct20100217, 2%ige Inokulation.

- Messwerte
- Simulation nach Modell (4.61)–(4.62) mit Parameterwerten in Tabelle 4.4 und Anpassung $\hat{c}_{\Sigma} = 2.01 \cdot 10^{-2} \text{ mol/l}$

Die Abbildungen 4.13–4.14 zeigen die Messergebnisse im Vergleich zu den Simulationsergebnissen, die für diese zwei Versuche mit jeweils angepasstem Parameter \hat{c}_Σ ermittelt wurden. Da hier wieder Versuche mit pH-Wert-Regelung betrachtet werden, erfolgen die Simulationen nur bis zum Start der pH-Wert-Regelung. Die Simulation des pH-Wert-Verlaufs im Versuch mit der 0.5%igen Inokulationsmenge wird dabei mit der Einstellung $\hat{c}_\Sigma = 1.97 \cdot 10^{-2} \text{ mol/l}$ durchgeführt. Für den Versuch mit der 2%igen Inokulationsmenge wird die Einstellung $\hat{c}_\Sigma = 2.01 \cdot 10^{-2} \text{ mol/l}$ gewählt. Wie in den Abbildungen 4.13–4.14 zu sehen ist, können die gemessenen pH-Wert-Verläufe in der unregulierten Phase mit diesen Einstellungen gut nachgebildet werden.

Die vorgestellten Ergebnisse in diesem Unterabschnitt zeigen, dass die Struktur des aufgestellten pH-Modells zusammen mit den Parameterwerten aus der Parameterschätzung, bis auf den Wert für \hat{c}_Σ , geeignet ist, die pH-Wert-Absenkung im Kultivierungsprozess von *Streptococcus thermophilus* hinreichend genau nachzubilden. Die hohe Güte des Modells wird dabei durch die Nachbildung des Verlaufs in einem Versuch ohne pH-Wert-Regelung nachgewiesen. Für den Parameter \hat{c}_Σ ist im Allgemeinen eine kultivierungsabhängige Einstellung nötig.

Kapitel 5

Prädiktive Bestimmung des Zeitpunktes maximaler Säuerungsaktivität

In diesem Kapitel wird ein Verfahren zur prädiktiven Bestimmung des Zeitpunktes der maximalen Säuerungsaktivität in Fermentationen von *Streptococcus thermophilus* vorgestellt sowie seine Erprobung mit realen Daten gezeigt. Nach der Erläuterung des methodischen Vorgehens und der für die Erprobung benötigten methodischen Hilfsmittel werden zunächst die Ergebnisse für den experimentellen Kultivierungsprozess vorgestellt. Im Anschluss daran wird die Übertragbarkeit der Methodik auf den industriellen Prozess geprüft. Dies erfolgt anhand von Daten aus Produktionsfermentationen des Stammes *Streptococcus thermophilus* 1974, der in den Experimenten eingesetzt wurde, sowie von zwei weiteren Stämmen mit den Namen *Streptococcus thermophilus* F3 und *Streptococcus thermophilus* F4, die ebenfalls als Starterkulturen bei der Firma Danisco produziert werden.

5.1 Methodik

Das prädiktive Verfahren basiert auf einer Verknüpfung der im vorigen Kapitel aufgestellten Modelle zur Beschreibung des Kultivierungsprozesses und des pH-Wert-Verlaufs in der unregulierten Prozessphase. Die Zusammenschaltung der beiden Modelle zu einem Gesamtprozessmodell und deren Aufgaben, die sie in dem Modellverbund erfüllen sollen, werden im Folgenden beschrieben.

5.1.1 Verknüpfung der Einzelmodelle zum Gesamtprozessmodell

Das dynamische Prozessmodell und das statische pH-Modell werden zu einem Gesamtprozessmodell, wie in Abbildung 5.1 gezeigt, über die Milchsäurekonzentration miteinander verknüpft. Dabei stellt die Milchsäurekonzentration des dynamischen

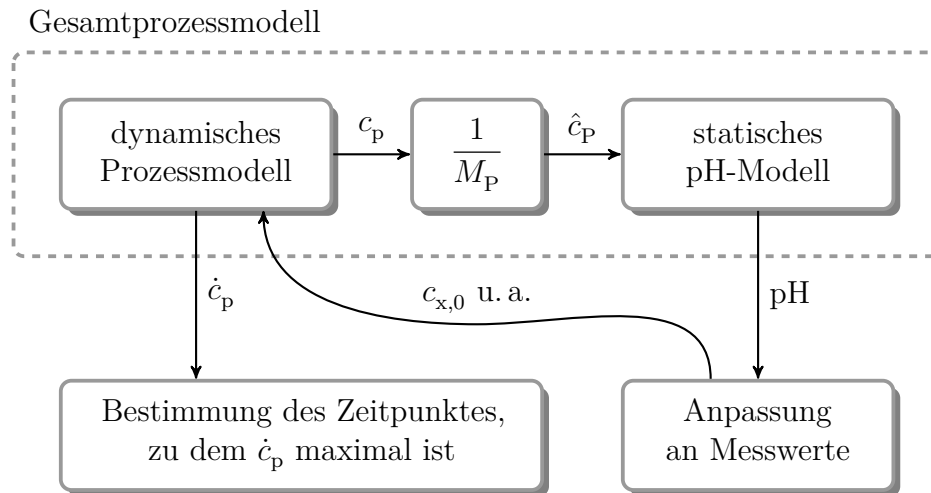


Abbildung 5.1: Verknüpfung des dynamischen Prozessmodells und des statischen pH-Modells zu einem Gesamtprozessmodell.

Prozessmodells die Eingangsgröße des statischen pH-Modells dar. Im dynamischen Prozessmodell beschreibt die Milchsäure eine massenbezogene Größe. Da im statischen pH-Modell molare Größen verwendet werden, muss die Milchsäurekonzentration c_p mit Hilfe der molaren Masse der Milchsäure M_p in eine molare Größe \hat{c}_p umgerechnet werden.

Die Aufgabe des dynamischen Prozessmodells in dem Modellverbund ist neben der Zurverfügungstellung der Eingangswerte für das pH-Modell die Generierung des Verlaufs der Milchsäurebildungsgeschwindigkeit \dot{c}_p gemäß Gleichung (4.13), um den Zeitpunkt maximaler Säuerungsaktivität anhand der Maximumstelle von \dot{c}_p prädiktiv bestimmen zu können. Das pH-Modell dient hierbei als Messmodell des pH-Wertes. Es wird genutzt, um das dynamische Prozessmodell auf den laufenden Prozess einstellen zu können, damit eine verlässliche Prädiktion des Prozessverlaufs gewährleistet wird. Der verfolgte Ansatz lässt sich genauer wie folgt darstellen.

Der Prozessverlauf wird in einer frühen Phase der Fermentation mit Hilfe des dynamischen Prozessmodells simuliert, sodass eine Prädiktion des Verlaufs von \dot{c}_p zur Verfügung steht. Da das Prozessmodell hierbei als Simulator verwendet wird, wird der aus dem Verlauf von \dot{c}_p prädiktiv bestimmte Zeitpunkt der maximalen Säuerungsaktivität mit dem Zeitpunkt, zu dem die maximale Säuerungsaktivität tatsächlich eintritt, nur dann übereinstimmen können, wenn das Modell das Prozessgeschehen in der betrachteten Fermentation genau abbildet. Die Prozessvariabilität, die in industriellen Fermentationen von *Streptococcus thermophilus* anhand des pH-Wert-Verlaufs in der unregulierten Phase des Prozesses beobachtet werden kann, muss also berücksichtigt werden. Als zentraler Faktor für die abweichenden Prozessverläufe wird die Qualität

des Inokulums betrachtet. Die qualitativen Merkmale des Inokulums werden im dynamischen Prozessmodell über die Anfangskeimzahl $c_{x,0}$ und den Parameter der Lag-Phase t_{lag} erfasst. Diese Größen müssen während des laufenden Prozesses geschätzt werden.

Zu diesem Zweck wird das aufgestellte pH-Modell herangezogen, wobei für die Schätzung ein optimierungsbasierter Ansatz verwendet werden soll. Mit Hilfe des pH-Modells und der Simulation der Milchsäurekonzentration, die das dynamische Prozessmodell liefert, wird ein pH-Wert-Verlauf berechnet und mit dem gemessenen pH-Wert-Verlauf in der unregulierten Phase des Prozesses verglichen. Bei einer guten Übereinstimmung der Kurven kann angenommen werden, dass auch die simulierte bzw. prädierte Milchsäurekurve, die als Eingang des pH-Modells verwendet wurde, mit dem tatsächlichen Verlauf gut übereinstimmt. In diesem Fall kann dem vorherbestimmten Zeitpunkt der maximalen Milchsäurebildungsgeschwindigkeit vertraut werden. Bei relevanten Abweichungen zwischen den berechneten und den gemessenen pH-Werten sollen die kultivierungsabhängigen Modellgrößen mit Hilfe eines Optimierungsalgorithmus so angepasst werden, dass die Abweichungen möglichst klein werden. Diese Aufgabe soll als Minimierungsaufgabe für eine Zielfunktion formuliert werden, die auf der Summe der kleinsten Fehlerquadrate basiert.

Simulationsstudien, die im Folgenden beschrieben werden, haben ergeben, dass Veränderungen der Anfangskeimzahl $c_{x,0}$ und des Parameterwertes t_{lag} , die über den Optimierer eingestellt werden sollen, den Verlauf der Milchsäurekonzentration und damit auch den Verlauf des pH-Wertes auf die gleiche Weise beeinflussen. Das bedeutet, dass eine eindeutige Rekonstruktion von $c_{x,0}$ und t_{lag} aus einem gemessenen pH-Wert-Verlauf nicht möglich ist. Es ist daher sinnvoll, nur eine dieser Größen als Optimierungsparameter in der Minimierungsaufgabe zu berücksichtigen. Die Auswahl soll auf der Grundlage der durchgeführten Simulationen getroffen werden.

5.1.2 Einfluss der Größen $c_{x,0}$ und t_{lag} auf die Simulationsergebnisse

Anhand von Simulationen wird der Einfluss der Anfangskeimzahl $c_{x,0}$ und des Parameters t_{lag} auf die Verläufe der Keimzahl, der Milchsäure- und der Lactosekonzentration sowie auf den Verlauf der pH-Wert-Absenkung untersucht. Zuerst wird der Einfluss von $c_{x,0}$ bei einem konstanten Wert t_{lag} analysiert. Anschließend werden die Rollen vertauscht.

Die Simulationen werden mit den in Kapitel 4 identifizierten Parameterwerten durchgeführt. Für die Parameter des dynamischen Prozessmodells und des pH-Modells werden also die Werte in Tabelle 4.3 bzw. 4.4 zu Grunde gelegt. Für die Anfangswerte der

Milchsäurekonzentration $c_{p,0}$ und der Lactosekonzentration $c_{s,0}$ werden die entsprechenden Messwerte aus dem Fermentationsversuch (Versuch ct20100203) gewählt, der die Grundlage der Parameteridentifikation für das dynamische Prozessmodell war. Der Anfangswert der Keimzahl $c_{x,0}$ wird in Bezug auf den in diesem Standardversuch gemessenen Wert, der einer Inokulationsmenge von 1 % v/v entspricht, im Bereich von 0.5–4 % v/v variiert. Der Parameter der Lag-Phase t_{lag} wird im Bereich von 0–1 h verändert. Dabei werden sowohl für $c_{x,0}$ als auch für t_{lag} fünf verschiedene Werte gewählt.

Einfluss auf die Verläufe der Keimzahl, der Milchsäure- und der Lactosekonzentration

In Abbildung 5.2 ist der Einfluss des Anfangswertes der Keimzahl $c_{x,0}$ auf die Verläufe der Keimzahl, der Milchsäure- und der Lactosekonzentration gezeigt. Der Einfluss des Parameters t_{lag} auf diese drei Größen wird in Abbildung 5.3 demonstriert.

Wie die Simulationen zeigen, bewirkt sowohl eine Veränderung der Anfangskeimzahl $c_{x,0}$ als auch eine Variation des Parameters t_{lag} eine Verschiebung der Milchsäurekurve entlang der Zeitachse. Die Form der Kurve verändert sich dabei nicht. Durch die zeitliche Verschiebung der Kurve verändert sich die Stelle des Wendepunktes, die den Zeitpunkt der maximalen Säuerungsaktivität der Bakterienkultur im Prozess angibt. Um dies zu veranschaulichen, sind die Wendepunkte der Milchsäurekurven in den Abbildungen 5.2 und 5.3 mit einer Markierung versehen worden.

Einfluss auf den Verlauf der pH-Wert-Absenkung

Um die Einflüsse der Anfangskeimzahl $c_{x,0}$ und des Parameters t_{lag} auf den Verlauf der pH-Wert-Absenkung zu untersuchen, werden die Simulationen der Milchsäurekonzentration aus den Abbildungen 5.2 und 5.3 als Eingangsdaten des pH-Modells verwendet, damit die zugehörigen pH-Wert-Verläufe berechnet werden können. Die so generierten pH-Wert-Verläufe sind in den Abbildungen 5.4–5.5 dargestellt, wobei Abbildung 5.4 die Simulationsergebnisse für die veränderte Anfangskeimzahl $c_{x,0}$ zeigt und Abbildung 5.5 die Simulationsergebnisse für den variierten Parameter t_{lag} .

Es zeigt sich zum einen, dass die berechneten pH-Wert-Verläufe die in Abbildung 1.2 dargestellten realen pH-Profile, die in Produktionsfermentationen von *Streptococcus thermophilus* aufgezeichnet wurden, qualitativ gut nachbilden können. Zum anderen geht aus einem Vergleich der beiden Abbildung 5.4 und 5.5 hervor, dass ein bestimmter Verlauf der pH-Wert-Absenkung mit verschiedenen Wertekombinationen von $c_{x,0}$ und t_{lag} generiert werden kann. Im Umkehrschluss bedeutet das, dass aus einer Messkurve der pH-Wert-Absenkung eine eindeutige Rekonstruktion der beiden Größen $c_{x,0}$ und t_{lag} nicht möglich ist.

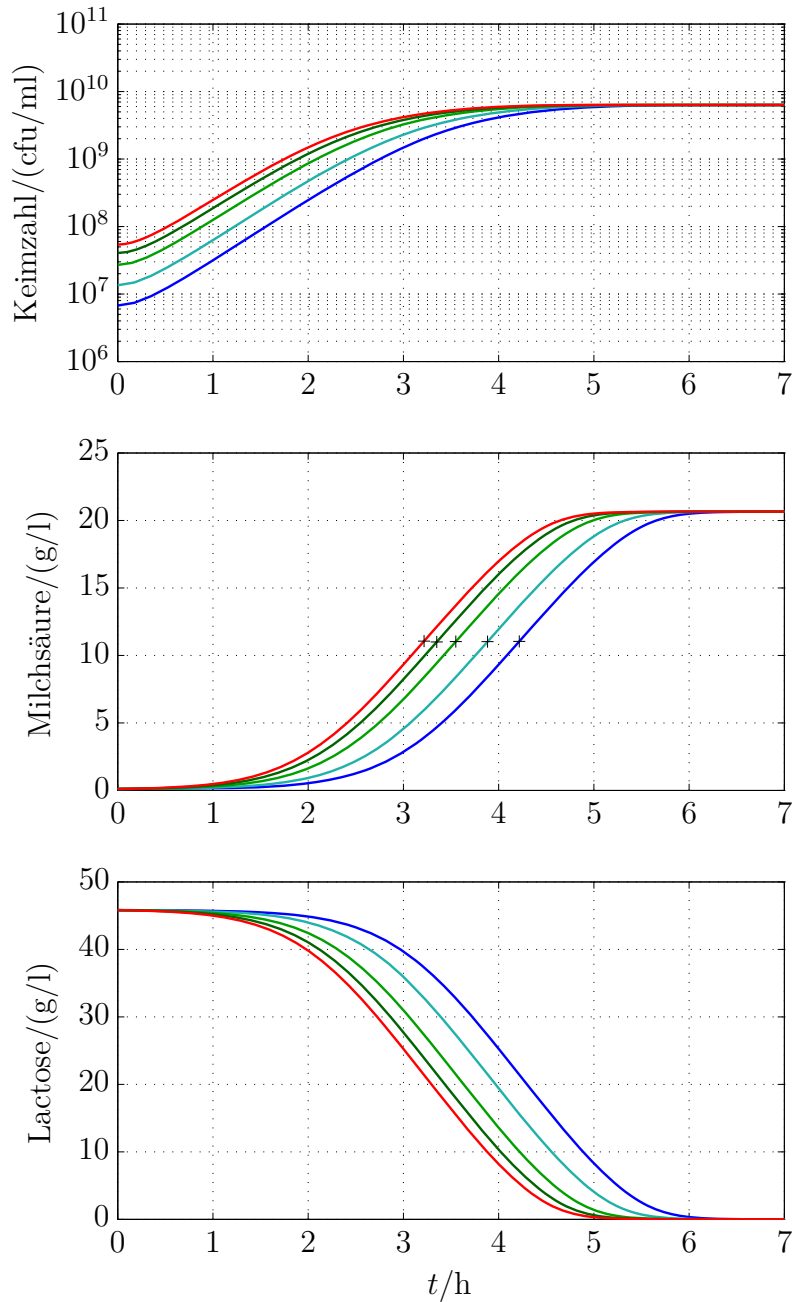


Abbildung 5.2: Einfluss der Inokulationsmenge auf die Verläufe von Keimzahl, Milchsäure- und Lactosekonzentration. Die Werte in Klammern geben die zugehörige Anfangskeimzahl $c_{x,0}$ an.

- | | |
|-------------------------------------|-----------------------------------|
| — 0.5 % ($6.75 \cdot 10^6$ cfu/ml) | — 3 % ($4.05 \cdot 10^7$ cfu/ml) |
| — 1 % ($1.35 \cdot 10^7$ cfu/ml) | — 4 % ($5.40 \cdot 10^7$ cfu/ml) |
| — 2 % ($2.70 \cdot 10^7$ cfu/ml) | + Wendepunkt |

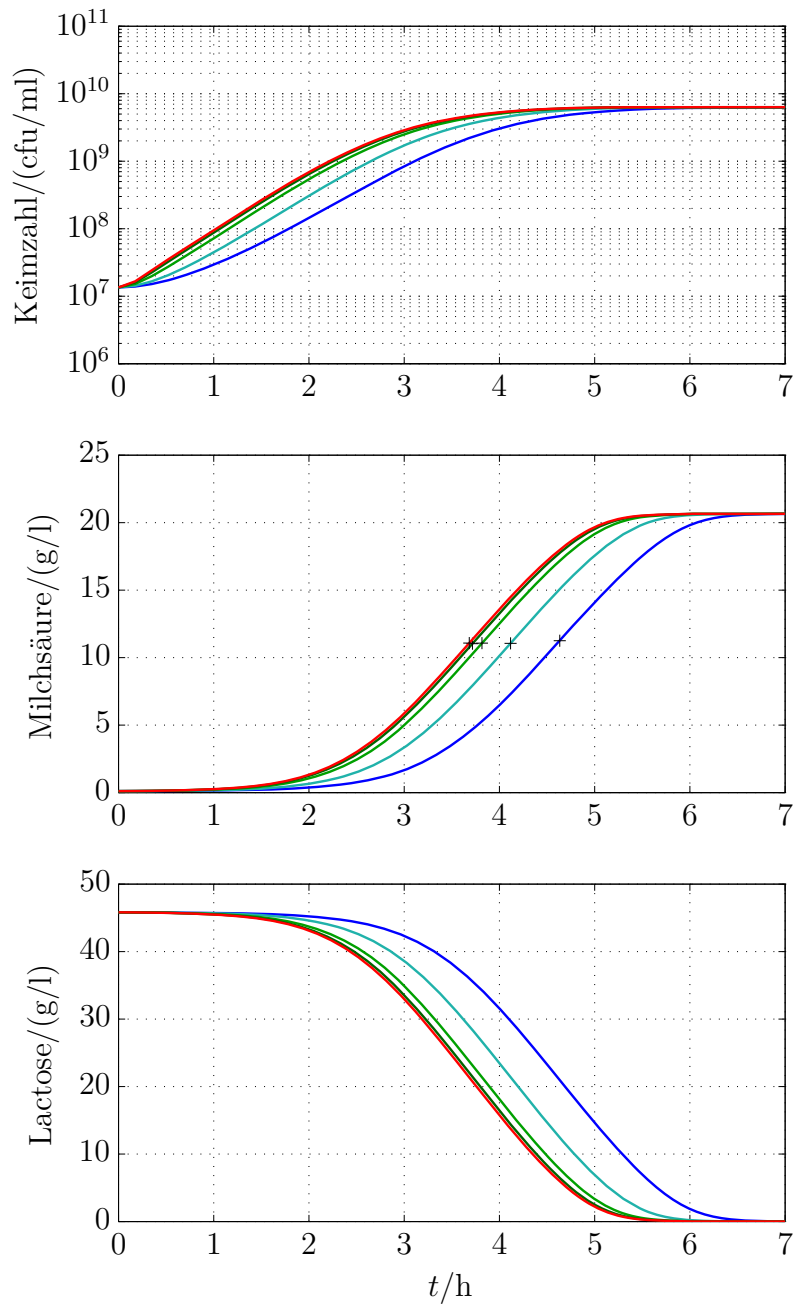


Abbildung 5.3: Einfluss des Parameters t_{lag} auf die Verläufe von Keimzahl, Milchsäure- und Lactosekonzentration.

- $t_{\text{lag}} = 1.0 \text{ h}$
 - $t_{\text{lag}} = 0.5 \text{ h}$
 - $t_{\text{lag}} = 0.2 \text{ h}$
- $t_{\text{lag}} = 0.1 \text{ h}$
 - $t_{\text{lag}} \rightarrow 0$
 - + Wendepunkt

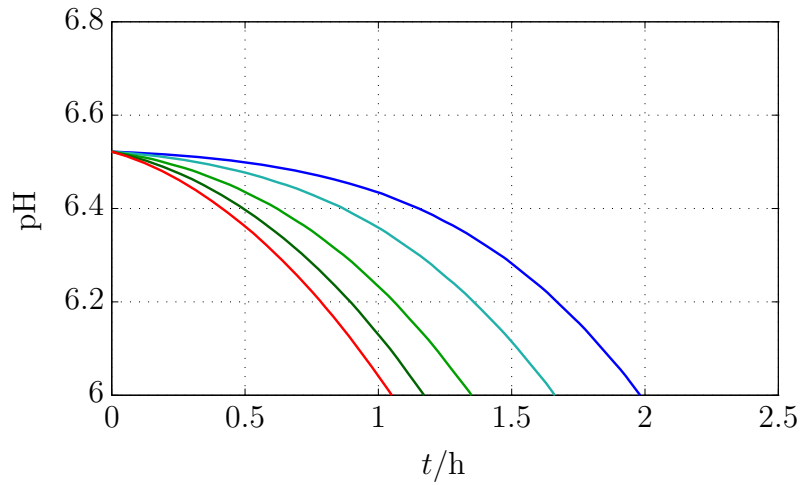


Abbildung 5.4: Einfluss der Anfangskeimzahl $c_{x,0}$ auf die pH-Wert-Absenkung.

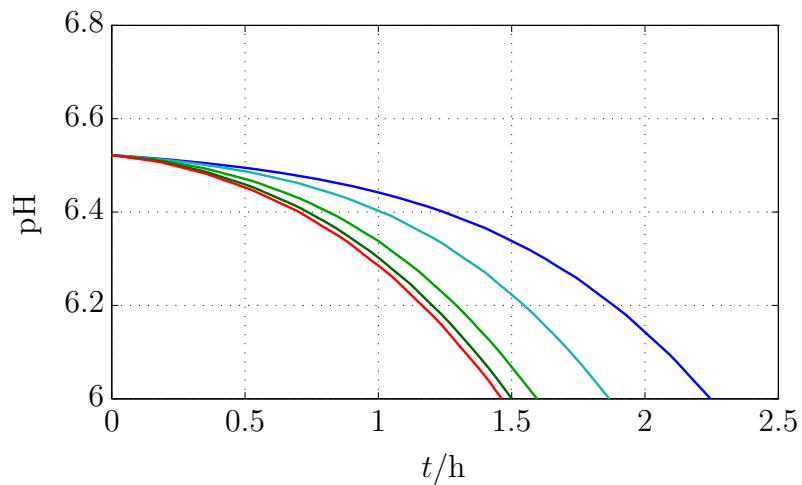
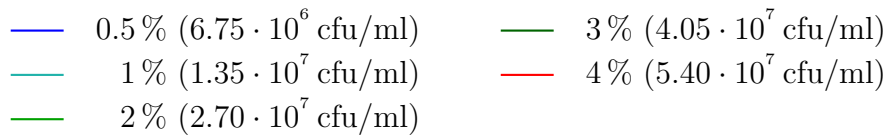


Abbildung 5.5: Einfluss des Parameters t_{lag} auf die pH-Wert-Absenkung.



Schlussfolgerungen in Bezug auf die aufzustellende Optimierungsaufgabe

Aufgrund der vorgestellten Simulationsergebnisse wird von den beiden Größen $c_{x,0}$ und t_{lag} nur eine als Optimierungsparameter berücksichtigt. Dabei ist der Anfangswert der Keimzahl $c_{x,0}$ dem Parameter t_{lag} vorzuziehen, da eine Veränderung von $c_{x,0}$ insgesamt eine höhere Flexibilität bei der Anpassung erlaubt. Dies ist in den Simulationen daran zu erkennen, dass die Zeitspanne der pH-Wert-Absenkung von Prozessbeginn bis zum Erreichen des Sollwertes von 6.0 über ein veränderliches $c_{x,0}$ bei fest gewähltem Parameter t_{lag} beliebig klein oder groß eingestellt werden kann. Dagegen sind bei einem fest eingestellten Wert $c_{x,0}$ der Verkleinerung dieser Zeitspanne für $t_{\text{lag}} \rightarrow 0$ Grenzen gesetzt, wie in Abbildung 5.5 zu sehen ist. Der Parameter t_{lag} wird auf den Wert aus der Parameteridentifikation in Kapitel 4 fixiert.

Dabei bedeutet eine Fixierung des kultivierungsabhängigen Parameters t_{lag} beim Angleichen des berechneten pH-Wert-Verlaufs an die Messergebnisse, dass der physiologische Zustand des Inokulums, der von einem anderen als dem festgelegten Wert t_{lag} erfasst werden müsste, auf einen Wert $c_{x,0}$ mit projiziert wird. Daher wird die vom Optimierer ermittelte Anfangskeimzahl $c_{x,0}$ mit der tatsächlichen Situation im Allgemeinen nicht übereinstimmen. Die Schätzung $c_{x,0}$ ist damit als ein Wert anzusehen, der für den betrachteten Prozess repräsentativ ist.

Die aufzustellende Optimierungsaufgabe wird im Folgenden formuliert. Dabei ist es nötig, neben der Anfangskeimzahl $c_{x,0}$ noch zwei weitere kultivierungsabhängige Größen zu schätzen, damit eine gute Übereinstimmung zwischen den gemessenen und den berechneten pH-Werten erreicht werden kann.

5.1.3 Einstellung der kultivierungsabhängigen Modellgrößen auf das Prozessgeschehen

Außer dem Anfangswert der Keimzahl $c_{x,0}$ werden als weitere Optimierungsparameter der Anfangswert der Milchsäurekonzentration $c_{p,0}$ und der Parameter \hat{c}_{Σ} des pH-Modells berücksichtigt. Eine kultivierungsabhängige Einstellung der beiden letztgenannten Größen ist nötig, um den veränderlichen pH-Anfangswert nachbilden zu können.

Die Menge Milchsäure, die sich zum Prozesszeitpunkt $t = 0$ im Fermenter befindet, wird über das Inokulum in das Medium eingebracht. Sie variiert von Fermentation zu Fermentation je nach Qualität der Vorkultur und übt über die Dissoziation Einfluss auf den pH-Anfangswert aus. Um die berechneten pH-Werte an die gemessenen Werte angleichen zu können, muss der Anfangswert der Milchsäurekonzentration $c_{p,0}$ entsprechend eingestellt werden.

Darüber hinaus wird der pH-Anfangswert wie auch der weitere pH-Wert-Verlauf durch die starken Säuren und Basen in der Kulturlösung beeinflusst, die zum Teil vor

der Inokulation während der Einstellung des pH-Wertes in das Medium eingebracht werden. Im pH-Modell wird die kumulative Wirkung dieser Stoffe auf den pH-Wert über den Parameter \hat{c}_Σ erfasst. Da die Menge von Säure und Base, die zur Einstellung des pH-Anfangswertes verwendet wurde, von Fermentation zu Fermentation variieren kann, muss \hat{c}_Σ generell kultivierungsabhängig eingestellt werden.

Die Lactose im Fermenter übt auf den pH-Wert keinen Einfluss aus. Daher wird der leicht schwankende Anfangswert $c_{s,0}$ als Optimierungsparameter in der Minimierungsaufgabe nicht berücksichtigt. Ein Anfangswert wird jedoch im dynamischen Prozessmodell für Berechnungen benötigt. Dabei ist es ausreichend, einen über mehrere Datensätze gemittelten Wert anzusetzen, der zu 47 g/l bestimmt wurde.

Die drei kultivierungsabhängig einzustellenden Größen $c_{x,0}$, $c_{p,0}$ und \hat{c}_Σ werden zum Optimierungsvektor

$$\boldsymbol{\theta}_{\text{ges}} = [c_{x,0} \quad c_{p,0} \quad \hat{c}_\Sigma]^\top \quad (5.1)$$

zusammengefasst. Der Optimierungsprozess, bei dem also der Vektor $\boldsymbol{\theta}_{\text{ges}}$ so anzupassen ist, dass der gemessene pH-Wert-Verlauf durch das pH-Modell möglichst gut nachgebildet wird, ist in Abbildung 5.6 schematisch in Form eines Blockdiagramms dargestellt.

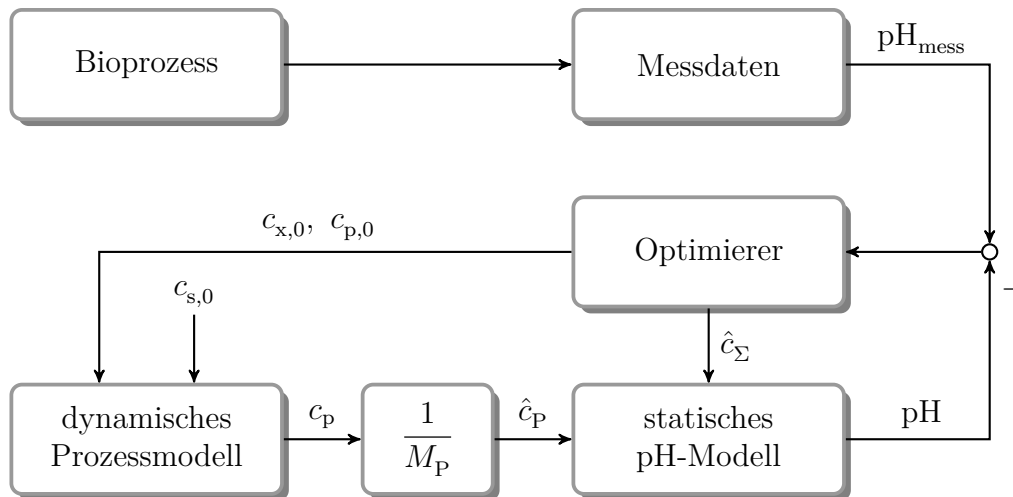


Abbildung 5.6: Blockdiagramm des Prozesses zur Anpassung der berechneten pH-Wert-Absenkung an Messdaten.

Als Optimierer soll der im vorigen Kapitel vorgestellte Downhill-Simplex-Algorithmus verwendet werden. Der Optimierungsprozess wird in einer Fermentation gestartet, sobald die Messwerte der pH-Wert-Absenkung für die Verarbeitung durch den

Algorithmus zur Verfügung stehen, d. h., wenn der pH-Wert auf den Sollwert von 6.0 abgesenkt wurde bzw. die pH-Wert-Regelung aktiv wird.

Gütekriterium

Für die Bewertung der Abweichungen zwischen den berechneten und den gemessenen pH-Werten wird ein Gütekriterium basierend auf der Methode der kleinsten Fehlerquadrate verwendet. Das zu minimierende Gütefunktional lautet

$$g_{\text{WLS}}(\boldsymbol{\theta}_{\text{ges}}) = \psi(\boldsymbol{\theta}_{\text{ges}}) \sum_{k=1}^n \left(\text{pH}_{k,\text{mess}} - \text{pH}_k(\boldsymbol{\theta}_{\text{ges}}, \hat{c}_{\text{P},k}) \right)^2, \quad (5.2)$$

mit n Messpunkten des pH-Wertes $\text{pH}_{k,\text{mess}}$ und den nach dem pH-Modell zu den Messzeitpunkten $t = t_k$ mit einem Parametervektor $\boldsymbol{\theta}_{\text{ges}}$ und den Eingangswerten $\hat{c}_{\text{P},k}$ berechneten pH-Werten $\text{pH}_k(\boldsymbol{\theta}_{\text{ges}}, \hat{c}_{\text{P},k})$. Eine Straffunktion ψ dient hier wieder dazu, bei der Suche nach dem Minimum der Zielfunktion eine Beschränkung des Suchraums, die im Folgenden definiert wird, berücksichtigen zu können.

Beschränkung der Wertebereiche

Die Wertebereiche der Optimierungsvariablen, die zum Vektor $\boldsymbol{\theta}_{\text{ges}}$ zusammengefasst sind, sollen beschränkt werden, um sinnvolle Schätzergebnisse zu erhalten. Die geltenden unteren und oberen Schranken sind in Tabelle 5.1 angegeben.

Tabelle 5.1: Beschränkung der Wertebereiche für die anzupassenden Größen im Gesamtprozessmodell.

Parameter θ_i	$\theta_{i,\text{min}}$	$\theta_{i,\text{max}}$	Einheit
$c_{\text{x},0}$	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^8$	cfu/ml
$c_{\text{p},0}$	0	0.5	g/l
\hat{c}_{Σ}	0	0.1	mol/l

Der geltende Wertebereich für den Anfangszustand $c_{\text{x},0}$ wurde im Hinblick darauf gewählt, dass das vorgestellte prädiktive Verfahren bei seiner Erprobung im nachfolgenden Kapitel auch auf Versuche mit kleineren und größeren Anfangskeimzahlen als im Standardversuch angewendet werden soll. Eine obere Schranke für die Anfangskonzentration der Milchsäure, die stets positiv sein muss, kann auf der Grundlage von Daten aus bereits durchgeführten Versuchen bestimmt werden. Damit kann ein maximaler Wert von 0.5 g/l angenommen werden. Der ursprünglich angenommene maximale Wert für den Parameter \hat{c}_{Σ} in Tabelle 4.2 wurde unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Parameteridentifikation in Tabelle 4.4 korrigiert, indem er durch

einen kleineren Zahlenwert ersetzt wurde. Für die Straffunktion ψ im Gütekriterium (5.2) kann geschrieben werden

$$\psi(\boldsymbol{\theta}_{\text{ges}}) = \begin{cases} 1, & \text{wenn } \boldsymbol{\theta}_{\text{ges}} \text{ die Bedingungen in Tabelle 5.1 erfüllt} \\ \Psi, & \text{sonst,} \end{cases} \quad (5.3)$$

wobei der Strafterm Ψ auch an dieser Stelle für eine große positive Zahl steht.

5.2 Erprobung des prädiktiven Verfahrens

Das im vorigen Abschnitt vorgestellte prädiktive Verfahren soll zunächst anhand von experimentell gewonnenen Daten erprobt werden. Dann soll die Übertragbarkeit der Methodik auf den industriellen Kultivierungsprozess untersucht werden.

Dabei muss für eine Beurteilung des Verfahrens die Genauigkeit der prädiktiv bestimmten Zeitpunkte maximaler Säuerungsaktivität festgestellt werden. Dazu müssen die tatsächlichen Zeitpunkte der maximalen Säuerungsaktivität aus den Messdaten ermittelt und mit der jeweiligen Prädiktion verglichen werden. In diesem Abschnitt soll die dazu verwendete Methodik dargestellt werden. Die Ergebnisse der Verfahrenserprobung werden in den darauffolgenden Abschnitten vorgestellt. Des Weiteren soll im vorliegenden Abschnitt noch auf die Generierung der experimentellen Testdaten eingegangen werden und es soll der allgemeine Ablauf des prädiktiven Verfahrens skizziert werden.

5.2.1 Bestimmung des tatsächlichen Zeitpunktes maximaler Säuerungsaktivität aus Messdaten

Für die Bestimmung des Zeitpunktes in einer Fermentation, zu dem die Säuerungsaktivität der Bakterien maximal war, muss die Maximumstelle der Milchsäurebildungsgeschwindigkeit ermittelt werden. Dazu müssen die Messwerte der Milchsäurekonzentration durch eine Kurve approximiert werden und es muss dann die Ableitung dieser Kurve gebildet werden.

Die Nutzung von Messwerten der Milchsäurekonzentration für diese Analyse ist allerdings nur im Falle der experimentellen Fermentationen möglich. Denn für die industriellen Fermentationen stehen diese Messwerte wie auch die Messwerte von Keimzahl und Lactosekonzentration, die also durch Offline-Analysen erfasst werden müssen, nicht zur Verfügung, da die Erfassung dieser Daten in den Produktionsfermentationen bei der Firma Danisco generell nicht stattfindet. Es sind nur die Messwerte aus der Online-Analyse verfügbar.

Aus diesem Grund muss der gesuchte Zeitpunkt in den zu untersuchenden industriellen Fermentationen aus den Messwerten einer online verfügbaren Größe ermittelt werden, die dafür geeignet ist. Als geeignet erweist sich der gemessene Laugenverbrauch für die pH-Wert-Regelung. Diese Größe bildet die ab Regelungsbeginn produzierte Menge Milchsäure im Fermenter ab. Während der pH-Wert-Regelung wird für jede Einheit produzierter Milchsäure, die eine Verschiebung des pH-Wertes auf einen Wert unterhalb des Sollwertes von 6.0 auslöst, eine äquivalente Einheit Lauge zudosiert, um diese Menge Milchsäure neutralisieren zu können. Deshalb wird zum Zeitpunkt der maximalen Milchsäurebildungsgeschwindigkeit auch die Laugenverbrauchsgeschwindigkeit maximal werden.

Eine weitere online verfügbare Messgröße, die für die Bestimmung des Zeitpunktes maximaler Säuerungsaktivität ebenfalls genutzt werden kann, ist die elektrolytische Leitfähigkeit der Kulturlösung. Die Messwerte dieser Größe verändern sich während der Fermentation jedoch nicht nur aufgrund der stetig steigenden Milchsäurekonzentration im Fermenter, sondern auch durch die zudosierte Lauge.

Der bestehende lineare Zusammenhang zwischen Milchsäurekonzentration und Laugenverbrauch sowie zwischen Milchsäurekonzentration und Leitfähigkeit im Kultivierungsprozess von *Streptococcus thermophilus* kann anhand der Deckungsgleichheit der Messwertverläufe gezeigt werden. Die Abbildungen 5.7–5.8 veranschaulichen dies exemplarisch anhand von Messdaten aus einem Standardversuch.

Die gute Übereinstimmung der Kurvenverläufe in beiden Fällen zeigt also, dass sowohl die Messwerte des Laugenverbrauchs als auch die der elektrolytischen Leitfähigkeit zur indirekten Bestimmung des Zeitpunktes maximaler Säuerungsaktivität herangezogen werden können. Da im realen Prozess bei der Firma Danisco die Laugezudosierung für die Detektion des optimalen Erntezeitpunktes entscheidend ist, sollen auch in dieser Arbeit die Messwerte des Laugenverbrauchs für die Analyse genutzt werden.

Dabei sei angemerkt, dass die Messkurve des Laugenverbrauchs, aber auch die der Leitfähigkeit in der Realität durch eine unvollkommene pH-Wert-Regelung verzerrt werden kann. Der Zeitpunkt maximaler Laugenverbrauchsgeschwindigkeit stellt damit im Allgemeinen eine Näherung des gesuchten Zeitpunktes der maximalen Säuerungsaktivität bzw. Milchsäurebildungsgeschwindigkeit dar. Aus diesem Grund werden im Falle der experimentellen Fermentationen zur Analyse die Messwerte der Milchsäurekonzentration herangezogen. Im Falle der industriellen Fermentationen werden dazu die Messwerte des Laugenverbrauchs genutzt.

Eine geeignete mathematische Funktion wird benötigt, um die Messwerte durch eine glatte Kurve zu approximieren, damit aus deren Ableitung der gesuchte Zeitpunkt eindeutig bestimmt werden kann. Aufgrund der ähnlichen Verläufe der Milchsäurekonzentration und des Laugenverbrauchs kann dafür der gleiche Modellansatz verwendet werden. Das verwendete Signalmodell wird im Folgenden vorgestellt.

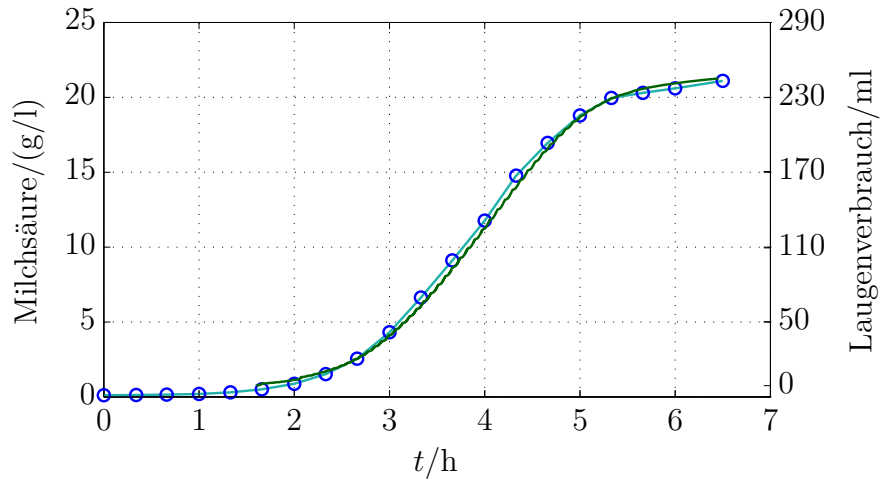


Abbildung 5.7: Verläufe der Milchsäurekonzentration und des Laugenverbrauchs, Versuch ct20091111.

- Milchsäurekonzentration
- Laugenverbrauch

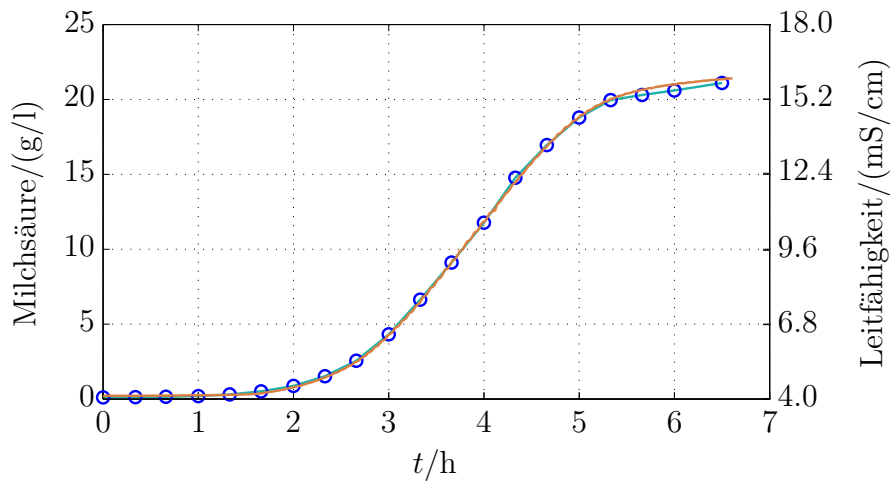


Abbildung 5.8: Verläufe der Milchsäurekonzentration und der elektrolytischen Leitfähigkeit, Versuch ct20091111.

- Milchsäurekonzentration
- elektrolytische Leitfähigkeit

Signalmodell

Die Kurven der Milchsäurekonzentration und des Laugenverbrauchs weisen in Fermentationen von *Streptococcus thermophilus* einen ansteigenden sigmoiden, d. h. S-förmigen, Verlauf auf, wie in den Abbildungen 3.3 und 3.4 zu sehen ist. Eine mathematische Funktion, die zur Beschreibung von Verläufen dieser Art oft verwendet wird, ist die logistische Funktion [13]. Sie ist gegeben durch die Gleichung

$$f_{\text{LF}}(t) = \frac{G}{1 + e^{a_0 + a_1 t}} . \quad (5.4)$$

Dabei gibt der positive Parameter G den oberen Grenzwert der ansteigenden Sigmoiden an, der sich für $t \rightarrow \infty$ ergibt, wenn der Koeffizient a_1 des Polynoms der Exponentialfunktion im Nenner negativ gewählt wird.

Die logistische Funktion (5.4) besitzt genau einen Wendepunkt, zu dem sie punktsymmetrisch ist. Diese Symmetrieeigenschaft kann allerdings von Nachteil sein, da hierdurch die Güte der Approximation bei allgemeineren sigmoiden Kurvenverläufen eingeschränkt wird. Eine weitere Einschränkung bei der Nachbildung mit dieser Funktion ist, dass sie die Lag-Phase einer Wachstumskurve nicht adäquat wiedergeben kann [13].

Da die Messkurven der Milchsäurekonzentration und des Laugenverbrauchs nicht zwingend punktsymmetrisch sein müssen und zudem eine ausgeprägte Lag-Phase aufweisen, muss die Flexibilität der vorgestellten logistischen Funktion verbessert werden. Dies kann erreicht werden, indem das Polynom der Exponentialfunktion im Nenner von f_{LF} , das den Grad $n = 1$ besitzt, zu einem allgemeinen Polynom vom Grad $n > 1$ erweitert wird. Auf diese Weise gelangt man zu einer generalisierten logistischen Funktion der Form [13]

$$f_{\text{GLF}}(t) = \frac{G}{1 + e^{p(t)}} , \quad (5.5)$$

wobei gilt

$$p(t) = a_0 + a_1 t + a_2 t^2 + \dots + a_n t^n . \quad (5.6)$$

Die generalisierte logistische Funktion nutzt die positiven Eigenschaften von Polynomen, leicht berechenbar und flexibel zu sein, sodass sie an viele verschiedene Kurvenformen angepasst werden kann [13].

Zur Nachbildung von wachsenden sigmoiden Kurvenverläufen wie bei der Milchsäurekonzentration und dem Laugenverbrauch eignen sich Polynome von ungeradem Grad n [13]. Dabei muss bei der Wahl des Polynomgrades stets ein Kompromiss zwischen der Genauigkeit der strukturellen Approximation der Daten und ihrer Glättung geschlossen werden. Gute Ergebnisse für die betrachteten Messwertsätze konnten mit einer Polynomordnung von $n = 7$ erzielt werden.

Parameteranpassung

Um einen gegebenen Messwertverlauf mit Hilfe des vorgestellten phänomenologischen Signalmodells nachbilden zu können, müssen für die Parameter, zusammengefasst zum Vektor

$$\boldsymbol{\theta}_{\text{sig}} = [G \ a_0 \ \cdots \ a_n]^\top, \quad (5.7)$$

geeignete Werte berechnet werden. Diese Aufgabe wird als Minimierungsaufgabe für das Gütefunktional

$$g_{\text{WLS}}(\boldsymbol{\theta}_{\text{sig}}) = \sum_{k=1}^n \left(c_{i,k,\text{mess}} - c_{i,k}(\boldsymbol{\theta}_{\text{sig}}) \right)^2 \quad (5.8)$$

formuliert, das auf der Methode der kleinsten Fehlerquadrate beruht. Diese Zielfunktion gilt formal sowohl für die Messdaten der Milchsäurekonzentration aus den experimentellen Fermentationen als auch für die Messdaten des Laugenverbrauchs aus den industriellen Fermentationen. Dabei bezeichnet $c_{i,k,\text{mess}}$ einen Messwert, der zum Zeitpunkt $t = t_k$ gemessen wurde, und $c_{i,k}(\boldsymbol{\theta}_{\text{sig}}) = f_{\text{GLF}}(t_k, \boldsymbol{\theta}_{\text{sig}})$ gibt einen durch das Signalmodell mit einem Parametervektor $\boldsymbol{\theta}_{\text{sig}}$ generierten Wert an.

Da die logistische Funktion des Signalmodells (5.5)–(5.6) in den Parametern nichtlinear ist, muss die Optimierungsaufgabe iterativ gelöst werden. Der im vorigen Kapitel vorgestellte Downhill-Simplex-Algorithmus wird angewendet, um eine numerische Lösung zu erhalten. Da die anzupassenden Parameter keine physikalische Bedeutung haben und nur die Nachbildung der Messwerte im Vordergrund steht, ist eine Beschränkung der Wertebereiche in diesem Fall nicht notwendig.

5.2.2 Generierung der experimentellen Testdaten

Für die Erprobung des prädiktiven Verfahrens wurden Kultivierungsversuche mit abweichenden Inokulationsmengen durchgeführt, um Prozessverläufe mit unterschiedlichen Entwicklungen der Bakterienkulturen zu generieren, wie sie im industriellen Prozess anhand des pH-Wertes beobachtet werden können. Die Inokulationsmenge wurde dabei analog zu den in Abbildung 5.2 gezeigten Simulationen im Bereich von 0.5–4 % v/v variiert.

Aufgrund der gezielt veränderten biologischen Anfangsbedingungen kommt es in diesen Experimenten zu einer Verschiebung der Milchsäurekurve entlang der Zeitachse, wie sie in den Simulationen in Abbildung 5.2 vorausgesagt wurde. Abbildung 5.9 veranschaulicht diesen Effekt anhand von fünf Versuchen, die mit Inokulationsmengen von 0.5 %, 1 %, 2 %, 3 % und 4 % durchgeführt wurden. Die dargestellten Milchsäurekurven in dieser Abbildung entstehen durch Approximation der Messwerte mit dem

Signalmodell (5.5)–(5.6). Die mit einer Markierung versehenen Wendepunkte geben dabei die Stellen der maximalen Milchsäurebildungsgeschwindigkeit an, die mit Hilfe des Signalmodells ermittelt wurden und die im Weiteren zum Vergleich mit den prädiktiv bestimmten Zeitpunkten der maximalen Säuerungsaktivität herangezogen werden sollen.

In Abbildung 5.10 sind die Messkurven der pH-Wert-Absenkung für die in Abbildung 5.9 betrachteten Versuche dargestellt. Sie zeigen in Übereinstimmung mit den Simulationsergebnissen in Abbildung 5.4, dass der Kurvenverlauf umso stärker gekrümmt ist, je höher die Anfangskonzentration der Zellen im Fermenter gewählt wird. Dies wird insbesondere anhand der drei pH-Kurven deutlich, die etwa mit dem gleichen Anfangswert beginnen. Im Versuch mit einer 4%igen Inokulationsmenge wird die für den pH-Anfangswert vorgegebene untere Grenze von 6.4 leicht unterschritten.

5.2.3 Ablauf des prädiktiven Verfahrens

Der generelle Ablauf des Verfahrens zur prädiktiven Bestimmung des Zeitpunktes maximaler Säuerungsaktivität soll an dieser Stelle beschrieben werden. Er besteht aus den drei aufeinanderfolgenden Schritten

- Messwertaufnahme,
- Anpassung der kultivierungsabhängigen Größen an das Prozessgeschehen und
- Prozesssimulation.

Soll das Verfahren in einer Fermentation angewendet werden, müssen zunächst die Messwerte der pH-Wert-Absenkung aufgenommen und abgespeichert werden. Sobald der Datensatz für die Weiterverarbeitung zur Verfügung steht, wird die aufgezeichnete Messkurve mit einem pH-Wert-Verlauf, der mit Hilfe des Gesamtprozessmodells generiert wurde, verglichen. Die Güte der Übereinstimmung wird über die Zielfunktion (5.2) erfasst. Damit die Zielfunktion ein Minimum annimmt, die pH-Kurven also zur Deckung gebracht werden, werden die kultivierungsabhängigen Größen des Gesamtprozessmodells $c_{x,0}$, $c_{p,0}$ und \hat{c}_Σ mit Hilfe des Downhill-Simplex-Algorithmus angepasst. Als Startwerte bei der Initialisierung des Algorithmus dienen für die Anfangskeimzahl $c_{x,0}$ und die Anfangsmilchsäurekonzentration $c_{p,0}$ die im Standardversuch ct20100203 gemessenen Anfangswerte. Der Parameter \hat{c}_Σ wird mit dem in Tabelle 4.4 angegebenen Wert aus der Parameterschätzung initialisiert.

Sobald eine Lösung der beschriebenen Optimierungsaufgabe zur Verfügung steht, wird der zukünftige Prozessverlauf mit Hilfe des dynamischen Prozessmodells und den ermittelten Schätzungen für die Anfangswerte $c_{x,0}$ und $c_{p,0}$ simuliert. Dann wird

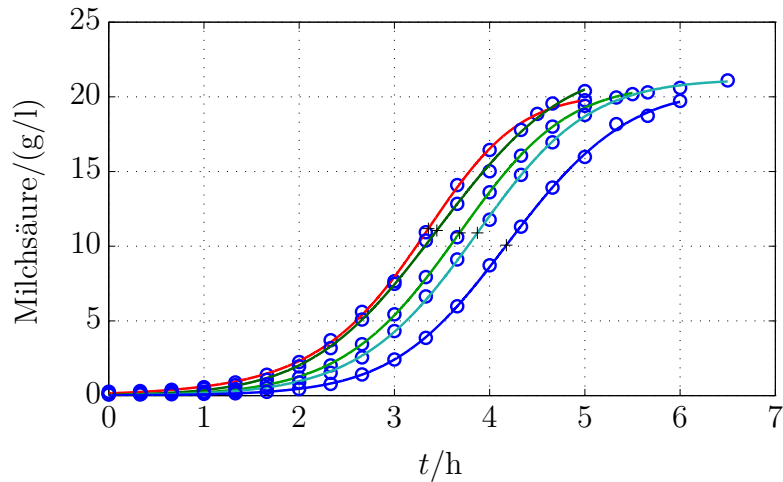


Abbildung 5.9: Vergleich von Milchsäurekurven in Versuchen mit abweichenden Inokulationsmengen. Durchgezogene Linien sind nach Signalmodell (5.5)–(5.6) approximierte Verläufe.

- Messwerte
- 0.5 %, Versuch ct20100317
- 1 %, Versuch ct20091111
- 2 %, Versuch ct20100217
- 3 %, Versuch ct20100421
- 4 %, Versuch ct20100310
- + Wendepunkt

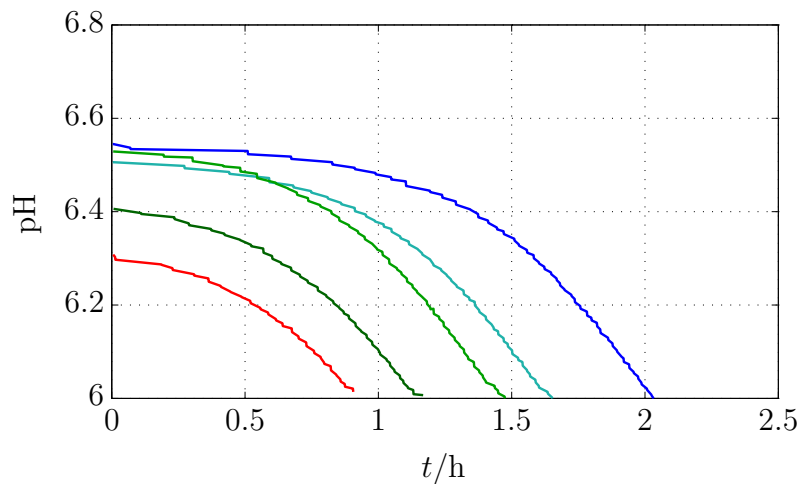


Abbildung 5.10: Vergleich von Messkurven der pH-Wert-Absenkung in Versuchen mit abweichenden Inokulationsmengen.

- 0.5 %, Versuch ct20100317
- 1 %, Versuch ct20091111
- 2 %, Versuch ct20100217
- 3 %, Versuch ct20100421
- 4 %, Versuch ct20100310

der Zeitpunkt $t_{h,präd}$ bestimmt, zu dem die prädizierte Milchsäurebildungsgeschwindigkeit ein Maximum aufweist. Da der gesamte Berechnungsaufwand relativ gering ist, steht der prädiktiv bestimmte Zeitpunkt der maximalen Säuerungsaktivität $t_{h,präd}$ kurz nach der Messwertaufnahme bzw. nach dem Start der pH-Wert-Regelung zur Verfügung.

5.3 Ergebnisse für den experimentellen Kultivierungsprozess

Das prädiktive Verfahren wird auf die Datensätze aus den fünf Kultivierungsversuchen, die in Abbildung 5.9 betrachtet wurden, und auf einen weiteren Datensatz aus einem Standardversuch (Versuch ct20110622) angewendet. Im Folgenden sollen zuerst die prädiktiv bestimmten Verläufe der Keimzahl, der Milchsäure- und der Lactosekonzentration für diese sechs Versuche gezeigt werden. Danach werden die Ergebnisse der prädiktiven Bestimmung des Zeitpunktes der maximalen Säuerungsaktivität vorgestellt.

Ergebnisse für die Verläufe der Keimzahl, der Milchsäure- und der Lactosekonzentration

Die prädizierten Verläufe der Keimzahl, der Milchsäure- und der Lactosekonzentration sind in den Abbildungen 5.11–5.16 im Vergleich zu den Messwerten dargestellt. Darüber hinaus ist der gemessene pH-Wert-Verlauf aufgetragen, um die Phase der milchsäurebedingten pH-Wert-Absenkung, die nachzubilden ist, zu markieren. Diese Phase endet zu einem Prozesszeitpunkt t_{sim} , der bei einer Online-Anwendung des Verfahrens der Stelle im Prozess entspricht, an der die Daten zur Simulation des Prozessverlaufs generiert werden. Folglich stellt die Zeitspanne zwischen dem Zeitpunkt t_{sim} und dem simulierten Prozessende den Prädiktionshorizont dar, wie in den Abbildungen 5.11–5.16 veranschaulicht.

Wie in den Abbildungen 5.11–5.16 zu sehen ist, ergeben sich für alle sechs untersuchten Kultivierungsversuche gute Übereinstimmungen zwischen den gemessenen und den prädizierten Verläufen. Eine gute Übereinstimmung zwischen Messwert und Schätzwert ergibt sich auch für den Anfangswert der Keimzahl, der in den betrachteten Versuchen über die Inokulationsmenge variiert wurde. Dies zeigt, dass eine Rekonstruktion der Anfangskeimzahl aus dem pH-Wert-Verlauf generell gelingen kann. Eine Ausnahme bildet der Versuch ct20100217 in Abbildung 5.14, bei dem eine größere Abweichung auftritt. Der größere Fehler hier erklärt sich damit, dass die Bakterienkultur in diesem Experiment ohne Lag-Phase sofort mit exponentiellem Wachstum startet, während das Prozessmodell wegen $t_{lag} > 0$ eine Lag-Phase erwartet. Um den pH-Wert-Verlauf, der mit der falsch angenommenen Lag-Phase generiert wurde, an

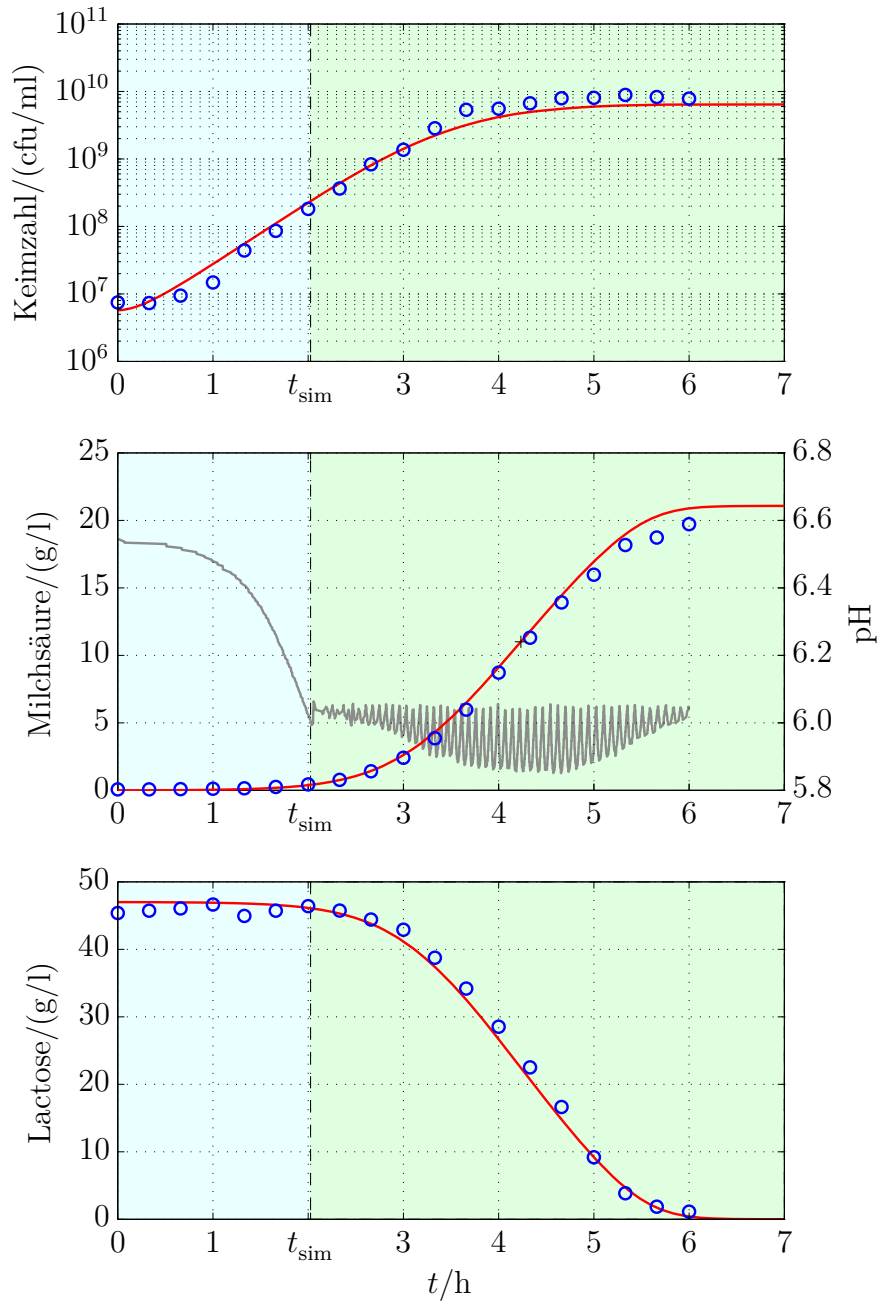







Abbildung 5.11: Vergleich von Simulation und Messergebnissen, Versuch ct20100317, 0.5%ige Inokulation.

- | | | | |
|---|-------------------------------------|---|---------------------|
|  | Messwerte |  | pH-Wert-Absenkung |
|  | Simulation |  | Prädiktionshorizont |
| t_{sim} | Zeitpunkt der Daten-
generierung |  | Wendepunkt |

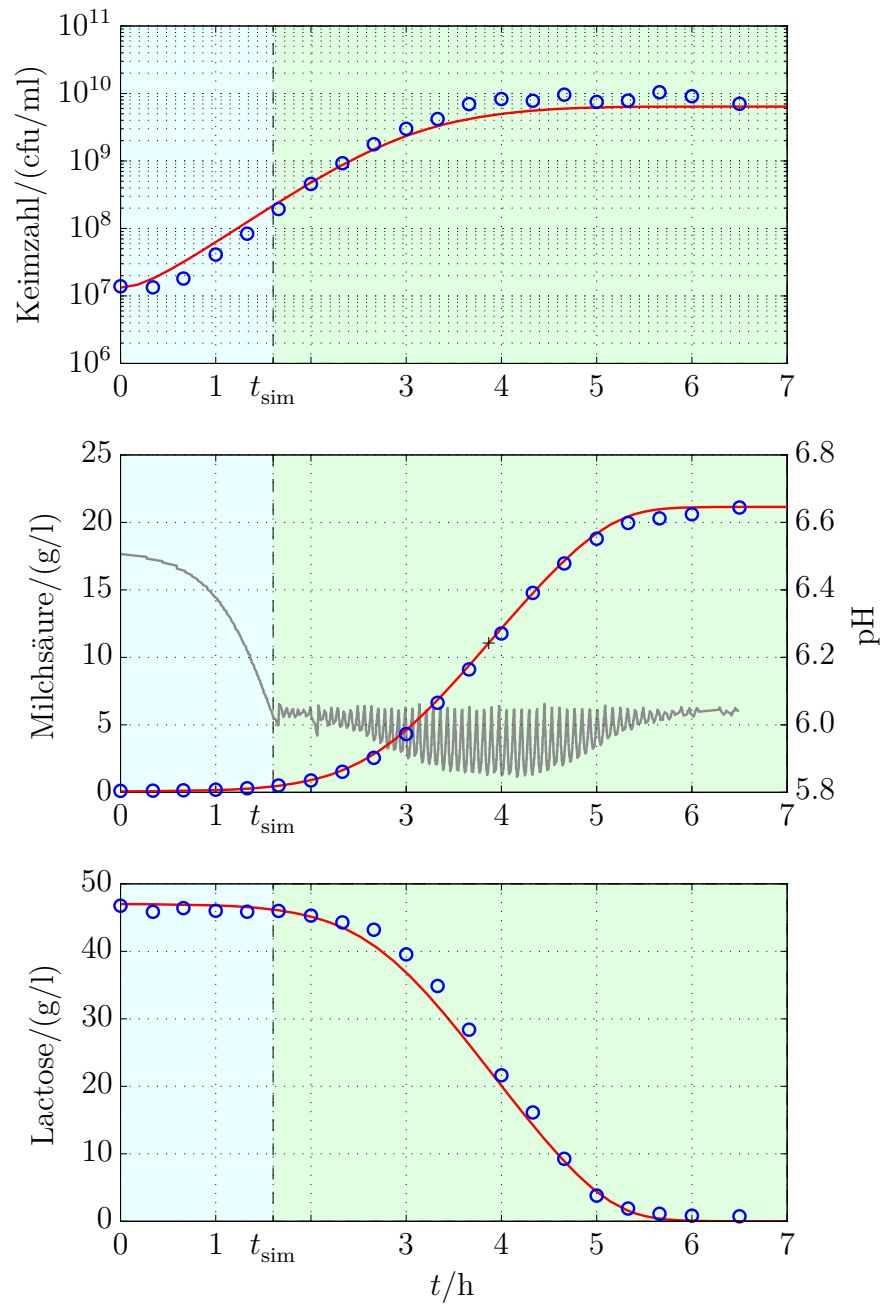







Abbildung 5.12: Vergleich von Simulation und Messergebnissen, Versuch ct20091111, 1%ige Inokulation.

- | | |
|--|---|
|  Messwerte |  pH-Wert-Absenkung |
|  Simulation |  Prädiktionshorizont |
| t_{sim} Zeitpunkt der Daten-
generierung |  Wendepunkt |

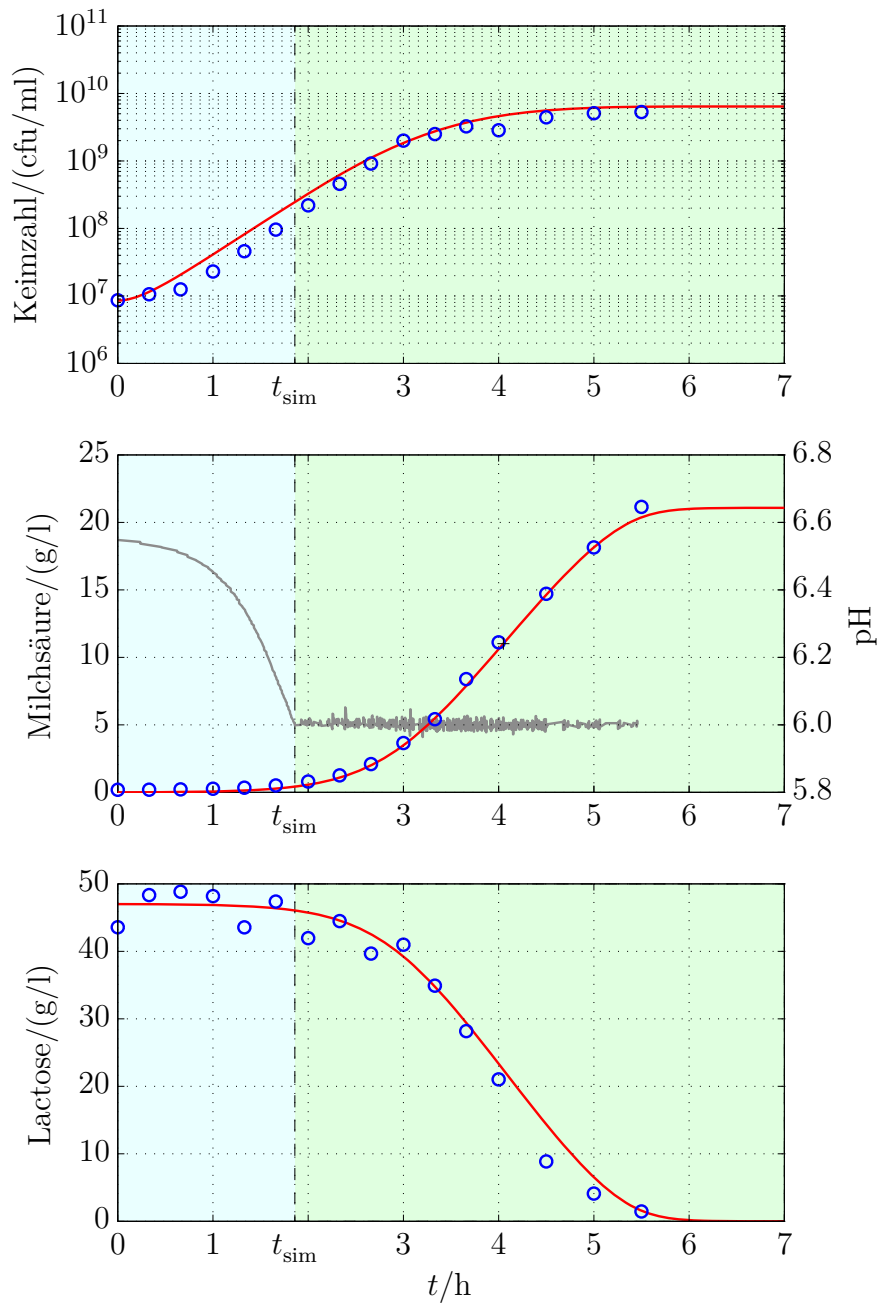







Abbildung 5.13: Vergleich von Simulation und Messergebnissen, Versuch ct20110622, 1%ige Inokulation.

- | | | | |
|---|-------------------------------------|---|---------------------|
|  | Messwerte |  | pH-Wert-Absenkung |
|  | Simulation |  | Prädiktionshorizont |
| t_{sim} | Zeitpunkt der Daten-
generierung |  | Wendepunkt |

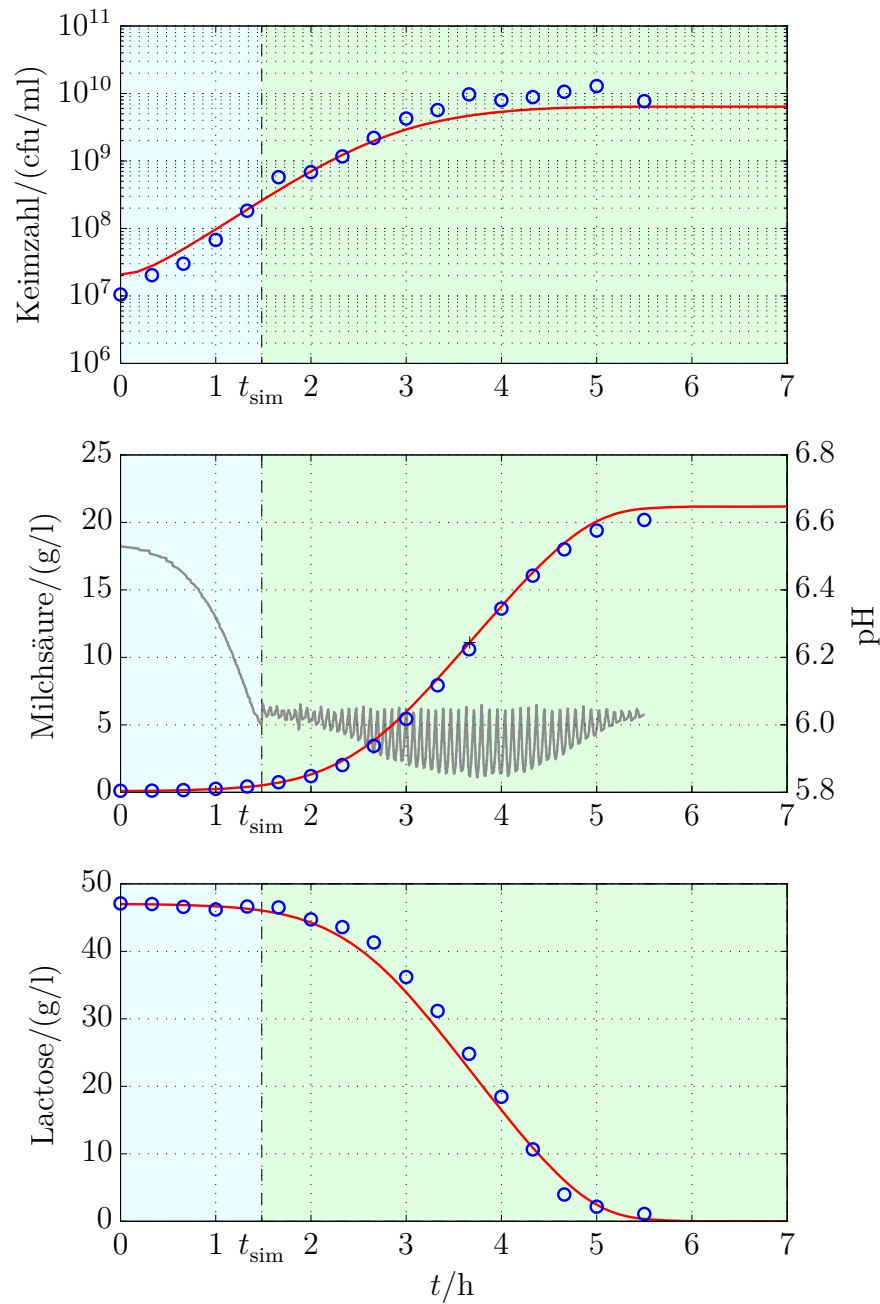







Abbildung 5.14: Vergleich von Simulation und Messergebnissen, Versuch ct20100217, 2%ige Inokulation.

- | | |
|--|---|
|  Messwerte |  pH-Wert-Absenkung |
|  Simulation |  Prädiktionshorizont |
| t_{sim} Zeitpunkt der Daten-
generierung |  Wendepunkt |

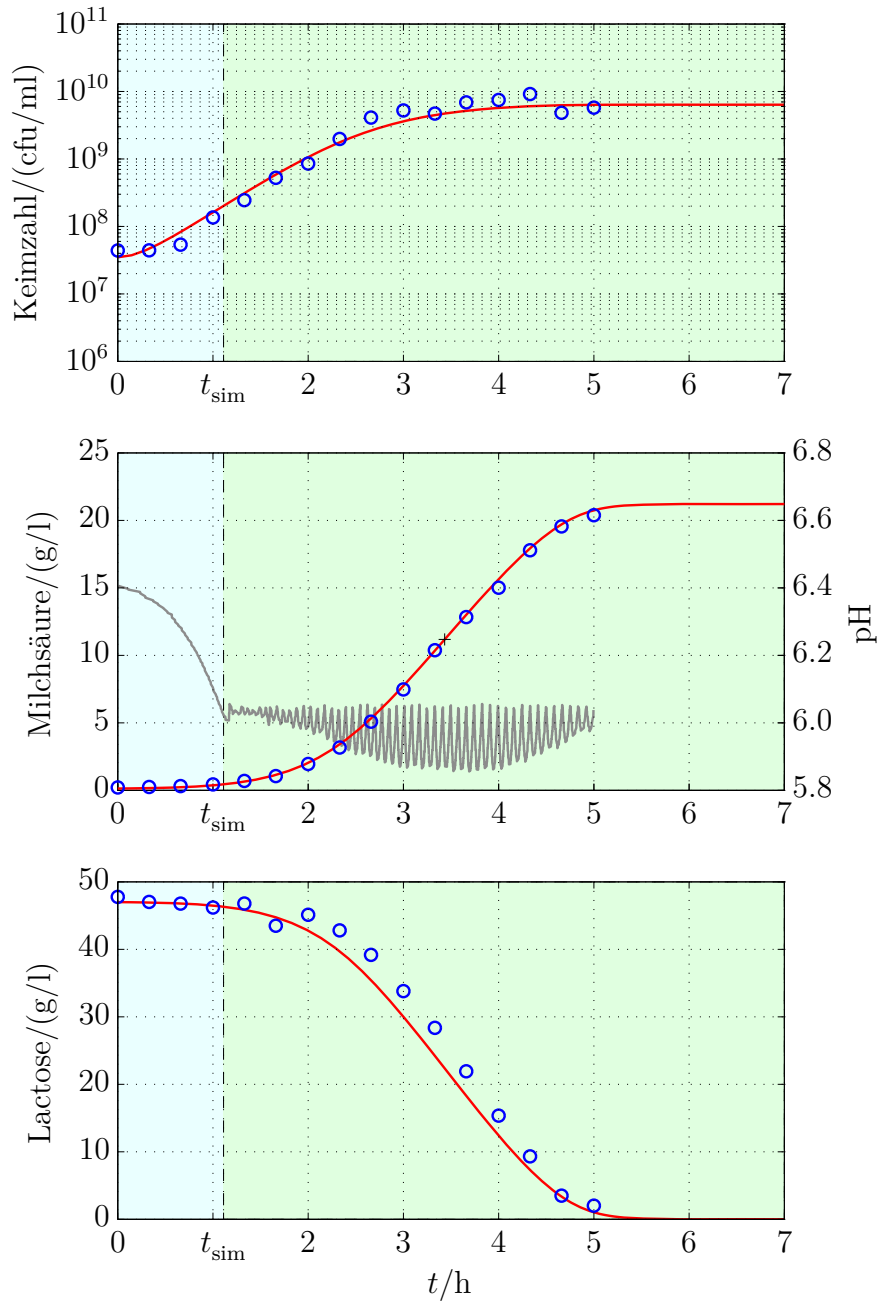







Abbildung 5.15: Vergleich von Simulation und Messergebnissen, Versuch ct20100421, 3%ige Inokulation.

- | | |
|--|---|
|  Messwerte |  pH-Wert-Absenkung |
|  Simulation |  Prädiktionshorizont |
| t_{sim} Zeitpunkt der Daten-
generierung |  Wendepunkt |

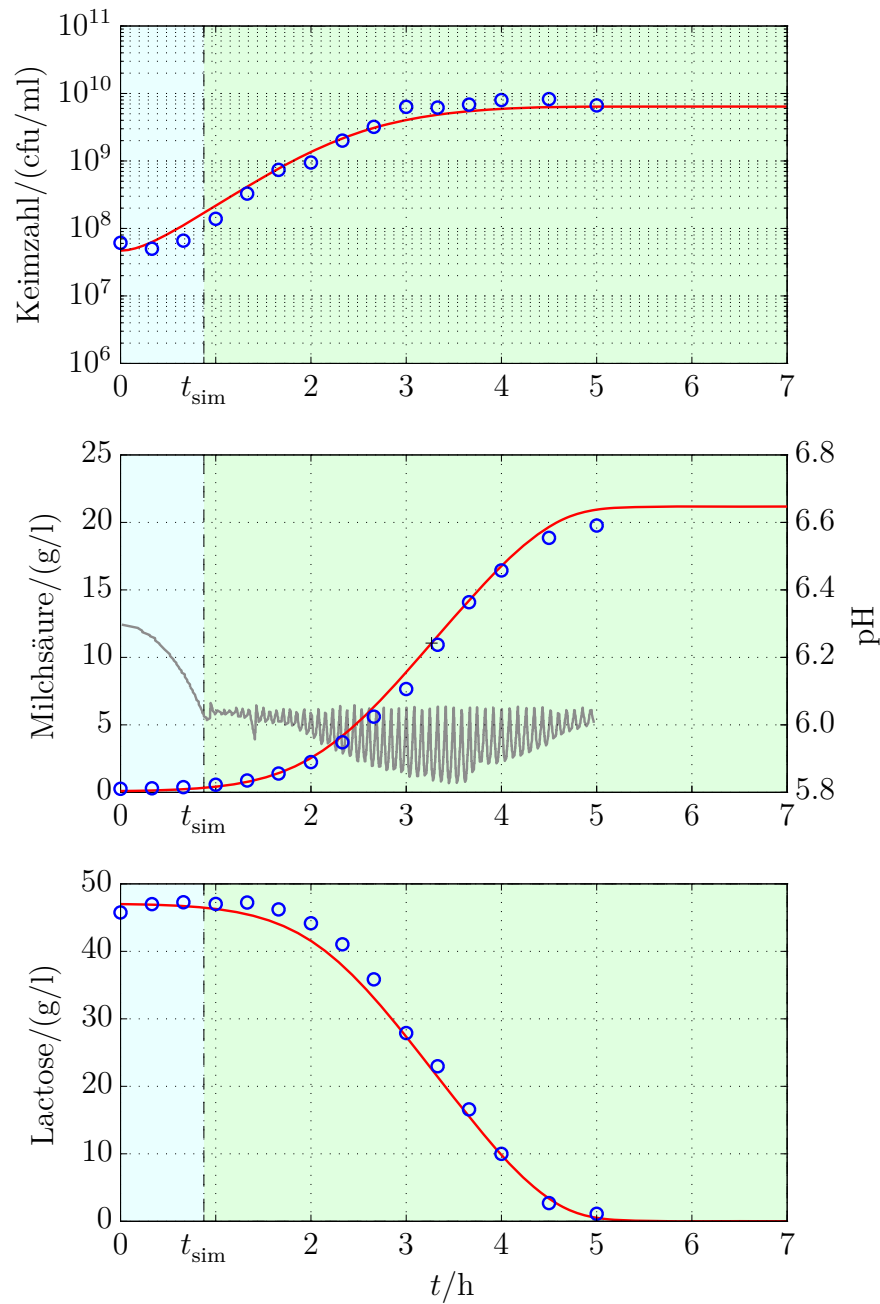


Abbildung 5.16: Vergleich von Simulation und Messergebnissen, Versuch ct20100310, 4%ige Inokulation.

- Messwerte
- Simulation
- t_{sim} Zeitpunkt der Daten-
generierung
- pH-Wert-Absenkung
- Prädiktionshorizont
- + Wendepunkt

den gemessenen pH-Wert-Verlauf anzugleichen, muss bei der Schätzung der kultivierungsabhängigen Größen $c_{x,0}$, $c_{p,0}$ und \hat{c}_Σ eine höhere Anfangskeimzahl angenommen werden, als sie der Realität entspricht.

Ergebnisse für den Zeitpunkt der maximalen Säuerungsaktivität

Um den Zeitpunkt maximaler Säuerungsaktivität prädiktiv zu bestimmen, wird die Ableitung der Milchsäurekonzentration, die das prädiktive Verfahren zusammen mit den Verläufen von Keimzahl, Milchsäure- und Lactosekonzentration zum Prozesszeitpunkt t_{sim} liefert, analysiert. Dabei wird der Zeitpunkt ermittelt, zu dem die Ableitung ein Maximum aufweist. In den Abbildungen 5.11–5.16 ist dieser Zeitpunkt in den einzelnen Versuchen anhand des markierten Wendepunktes der Milchsäurekurve ablesbar.

Zur Überprüfung der Aussagekraft dieser prädizierten Zeitpunkte $t_{h,\text{präd}}$ werden aus den Messdaten der Milchsäurekonzentration die tatsächlichen Zeitpunkte maximaler Säuerungsaktivität t_h ermittelt. Dazu wird jeder Messdatensatz durch das logistische Signalmodell (5.5)–(5.6) approximiert. Die Maximumstelle der Ableitung des Signalmodells liefert den gesuchten Zeitpunkt. In Tabelle 5.2 sind die ermittelten Werte $t_{h,\text{präd}}$ und t_h sowie die resultierenden Abweichungen

$$\Delta t_h = t_h - t_{h,\text{präd}} \quad (5.9)$$

angegeben. Für die Abweichungen Δt_h ergeben sich Werte im Bereich von ± 5 min. Dieses Resultat zeigt, dass das prädiktive Verfahren in der Lage ist, den Zeitpunkt maximaler Säuerungsaktivität während des Prozesslaufs bis auf ein relativ schmales Zeitfenster genau vorherzusagen.

Tabelle 5.2: Vergleich der prädiktiv bestimmten Zeitpunkte der maximalen Milchsäurebildungsgeschwindigkeit $t_{h,\text{präd}}$ mit den tatsächlichen Zeitpunkten t_h . Der Term Δt_h gibt die Abweichungen zwischen t_h und $t_{h,\text{präd}}$ an.

Versuch	t_h	$t_{h,\text{präd}}$	Δt_h
ct20100317	4 h 11 min	4 h 14 min	–3 min
ct20091111	3 h 51 min	3 h 52 min	–1 min
ct20110622	4 h 02 min	4 h 03 min	–1 min
ct20100217	3 h 41 min	3 h 40 min	1 min
ct20100421	3 h 25 min	3 h 26 min	–1 min
ct20100310	3 h 21 min	3 h 16 min	5 min

5.4 Übertragung der Methodik auf den industriellen Prozess

Die Übertragbarkeit des prädiktiven Verfahrens auf den industriellen Kultivierungsprozess von *Streptococcus thermophilus* wird untersucht anhand von Daten aus Fermentationen, die bei der Firma Danisco zur Herstellung von *Streptococcus thermophilus* als Starterkultur durchgeführt wurden. Dabei werden Fermentationen von drei verschiedenen Stämmen dieses Organismus betrachtet, die sich in Bezug auf ihre qualitativen Eigenschaften als Starterkultur unterscheiden. Dies sind zum einen der in den experimentellen Fermentationen untersuchte Stamm *Streptococcus thermophilus* 1974 und zum anderen die Stämme *Streptococcus thermophilus* F3 und *Streptococcus thermophilus* F4. Die Stammnamen F3 und F4 sind wie der Stammname 1974 Danisco-interne Bezeichnung. Je Stamm werden sechs Datensätze zur Erprobung des Verfahrens herangezogen.

Wie bereits erwähnt, werden in industriellen Fermentationen von *Streptococcus thermophilus* bei der Firma Danisco grundsätzlich nur die Messwerte der online verfügbaren Prozessgrößen erfasst. Die Messdaten von Keimzahl, Milchsäure- und Laktosekonzentration stehen also nicht zur Verfügung. Damit kann die Aussagekraft ihrer simulierten Verläufe, die das prädiktive Verfahren liefert, nicht überprüft werden, sodass von einer Darstellung dieser Verläufe abgesehen wird.

Da die Messwerte der Milchsäurekonzentration nicht verfügbar sind, wird der tatsächliche Zeitpunkt der maximalen Säuerungsaktivität t_h in den einzelnen Fermentationen aus den Messdaten des Laugenverbrauchs ermittelt, um die Aussagekraft seiner Prädiktion $t_{h,präd}$ überprüfen zu können. Dafür werden die Messdaten mit dem logistischen Signalmodell (5.5)–(5.6) approximiert und die Ableitung des Signalmodells, d. h. die Laugenverbrauchsgeschwindigkeit, bestimmt. Die Stelle, an der die Laugenverbrauchsgeschwindigkeit maximal ist, liefert den gesuchten Zeitpunkt t_h .

Die Kurvenverläufe der approximierten Laugenverbrauchsgeschwindigkeit und der prädizierten Milchsäurebildungsgeschwindigkeit, die die tatsächliche bzw. die prädiktiv bestimmte Säuerungsaktivität der Bakterienkultur in der betreffenden Fermentation beschreiben und aus welchen sich die Zeitpunkte t_h bzw. $t_{h,präd}$ ergeben, sollen dargestellt werden, um die Ergebnisse bei der Übertragung der Methodik auf den industriellen Prozess besser veranschaulichen zu können. Da das Augenmerk auf dem Vergleich der Stellen liegt, wo die Maxima dieser Kurven auftreten, sind die absoluten Kurvenwerte nicht weiter von Bedeutung. Für einen besseren Vergleich werden die Kurven deshalb normiert dargestellt. Dabei werden die Daten auf den jeweiligen Maximalwert bezogen, indem die Werte durch diesen geteilt werden.

Des Weiteren soll zusammen mit diesen Kurven der Verlauf jener Messgröße dargestellt werden, anhand der die bakterielle Säuerungsaktivität im industriellen Prozess

bei der Firma Danisco überwacht wird, um den besten Erntezeitpunkt detektieren zu können. Hierbei handelt es sich um den gemessenen Volumenstrom der periodisch zudosierten Lauge. Das Integral über die Messwerte dieser Größe entspricht dem Laugenverbrauch über der Zeit in der betreffenden Fermentation.

Der Volumenstrom der periodischen Laugenzudosierung wird über den Öffnungsgrad und die Öffnungsdauer eines Dosierventils geregelt. Da die Zudosierung un stetig erfolgt, ergibt sich ein pulsförmiger Verlauf mit Pulsen von unterschiedlicher Höhe und Breite, wie die in Abbildung 5.17 dargestellten Messwerte aus einer Produktionsfermentation des Stammes *Streptococcus thermophilus* 1974 exemplarisch zeigen. Während der Fermentation steigt die Höhe der Pulse aufgrund der zunehmenden bakteriellen Säuerungsaktivität im Mittel an, erreicht ein Maximum und klingt wieder ab, sobald die Aktivität wieder abnimmt.

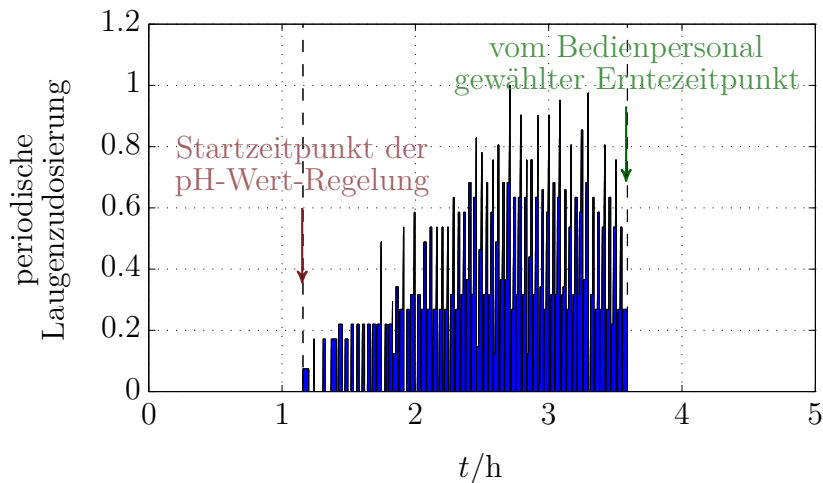


Abbildung 5.17: Periodische Laugenzudosierung in einer Produktionsfermentation des Stammes *Streptococcus thermophilus* 1974, normierte Darstellung.

Die periodische Laugenzudosierung wird während des Kultivierungsprozesses vom Bediersonal überwacht. Sobald aus dem Verlauf der Messwerte der Eintritt des Maximums erkannt oder ein Rückgang der Messwerte festgestellt wurde, wird die Kultivierung durch die Einleitung der Fermenterkühlung beendet. Aufgrund des pulsförmigen, nichtmonotonen Messwertverlaufs in Verbindung mit der verwendeten manuellen Erkennungstechnik kann der Zeitpunkt, zu dem das Maximum eintritt, also der beste Erntezeitpunkt, nur mit einem gewissen Verzug sicher detektiert werden.

Der in einer Fermentation vom Bediersonal gewählte Erntezeitpunkt bzw. Kühlungszeitpunkt ist anhand des letzten aufgezeichneten Messwertes der periodischen Laugenzudosierung direkt ablesbar, wie in Abbildung 5.17 dargelegt. Der erste Mess-

punkt gibt den Startzeitpunkt der pH-Wert-Regelung an. Dieser entspricht dem Zeitpunkt t_{sim} , zu dem also die Verläufe von Keimzahl, Milchsäure- und Lactosekonzentration sowie der Verlauf der Ableitung der Milchsäurekonzentration durch das dynamische Prozessmodell generiert werden, wenn das prädiktive Verfahren angewendet wird.

5.4.1 Ergebnisse für den Stamm *Streptococcus thermophilus* 1974

Das prädiktive Verfahren wird auf Daten aus sechs Produktionsfermentationen des Stammes *Streptococcus thermophilus* 1974 angewendet. Dabei werden für die Parameter des dynamischen Prozessmodells und des pH-Modells sowie für die Anfangsschätzungen der drei kultivierungsabhängig einzustellenden Größen $c_{x,0}$, $c_{p,0}$ und \hat{c}_{Σ} die gleichen Werte zu Grunde gelegt wie bei der Anwendung des Verfahrens auf die experimentellen Fermentationen im vorigen Abschnitt. Dies gilt auch in Bezug auf den Anfangswert der Lactosekonzentration $c_{s,0}$.

In Tabelle 5.3 sind die prädiktiv bestimmten Zeitpunkte der maximalen Säuerungsaktivität $t_{h,\text{präd}}$ und die Zeitpunkte der maximalen Laugenverbrauchsgeschwindigkeit t_h , die aus Messdaten des Laugenverbrauchs ermittelt wurden, gegenübergestellt. Angegeben sind außerdem die resultierenden Abweichungen Δt_h sowie die Danisco-internen Nummern der Produktionsfermentationen.

Tabelle 5.3: Vergleich der Zeitpunkte der maximalen Laugenverbrauchsgeschwindigkeit t_h mit den prädizierten Zeitpunkten der maximalen Milchsäurebildungsgeschwindigkeit $t_{h,\text{präd}}$ für Produktionsfermentationen des Stammes *Streptococcus thermophilus* 1974.

Fermentation	t_h	$t_{h,\text{präd}}$	Δt_h
4110935869	2 h 55 min	3 h 15 min	−20 min
4111145864	3 h 05 min	3 h 24 min	−19 min
4111074371	3 h 07 min	3 h 33 min	−26 min
4111237443	3 h 19 min	3 h 47 min	−28 min
4111057671	3 h 32 min	3 h 53 min	−21 min
4111284834	4 h 09 min	4 h 28 min	−19 min

Um die Ergebnisse graphisch zu veranschaulichen, sind in den Abbildungen 5.18 und 5.19 die Kurvenverläufe dargestellt, die zur Bestimmung der in Tabelle 5.3 angegebenen Zeitpunkte $t_{h,\text{präd}}$ und t_h genutzt wurden. Gezeigt werden also zum einen die

prädizierten Verläufe der Milchsäurebildungsgeschwindigkeit, zum anderen die Verläufe der Laugenverbrauchsgeschwindigkeit, die anhand von Messwerten der periodischen Laugenzudosierung approximiert wurden. Die prädizierte Milchsäurebildungsgeschwindigkeit und die approximierte Laugenverbrauchsgeschwindigkeit beschreiben die prädizierte bzw. die tatsächliche Säuerungsaktivität der Bakterien in den Fermentationen. Die Messwerte der periodischen Laugenzudosierung, welche die während des Fermentationslaufs erfasste und vom Bedienpersonal überwachte Säuerungsaktivität darstellen, sind in den Abbildungen 5.18 und 5.19 mit aufgetragen. Des Weiteren sind die Abweichungen Δt_h zwischen den Zeitpunkten t_h und $t_{h,präd}$, genauer die Beträge von Δt_h , durch vertikale graue Säulen graphisch kenntlich gemacht.

Es stellt sich heraus, dass das prädiktive Verfahren für die betrachteten industriellen Fermentationen eine wesentlich ungenauere Prädiktion des gesuchten Zeitpunktes liefert als für die untersuchten experimentellen Fermentationen im vorigen Abschnitt. Zwischen den prädizierten und den tatsächlichen Zeitpunkten der maximalen Säuerungsaktivität ergeben sich Abweichungen zwischen -19 min und -28 min, wie in Tabelle 5.3 zu sehen ist. Die negativen Vorzeichen geben hierbei an, dass sich die prädiktiv bestimmten Zeitpunkte auf einen Prozesszeitpunkt nach dem tatsächlichen Eintritt der maximalen Säuerungsaktivität beziehen, wie in den Abbildungen 5.18 und 5.19 zu erkennen ist.

Die erhaltenen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass sich die Dynamik der Produktbildung im experimentellen Prozess von der Dynamik im industriellen Prozess unterscheidet. Bei einer gleichen anfänglichen Säuerungsaktivität, gemessen anhand des pH-Wert-Verlaufs in der unregulierten Phase, entwickeln sich die Bakterienkulturen im industriellen Prozess im weiteren Verlauf der Kultivierung offenbar schneller, sodass das Maximum der Säuerungsaktivität früher eintritt als im experimentellen Prozess. Da das dynamische Prozessmodell Parameterwerte aus der Identifikation des experimentellen Prozesses verwendet, wird der Eintritt der maximalen Säuerungsaktivität für einen späteren Zeitpunkt prädiziert, wenn das Verfahren auf den industriellen Prozess angewendet wird.

Die Gründe für das unterschiedliche Produktbildungsverhalten der Bakterienkulturen konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Eine mögliche Erklärung liefern z. B. die Literaturquellen [17, 25, 48, 50, 64], in welchen die unterschiedlichen zur pH-Wert-Regelung eingesetzten Laugen als Einflussfaktoren genannt werden. Während in den Kultivierungsversuchen als Neutralisationsmittel Natronlauge (NaOH) verwendet wird, kommt in Produktionsfermentationen von *Streptococcus thermophilus* bei Danisco standardmäßig Ammoniaklauge (NH₄OH) zum Einsatz.

In den angeführten Quellen wird berichtet, dass Milchsäurebakterien abhängig von der Art des Neutralisationsmittels unterschiedliches Wachstums- und Produktbildungsverhalten zeigen. So wird z. B. für das Bakterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, das ursprünglich der Gattung *Streptococcus* angehörte und vor der Um-

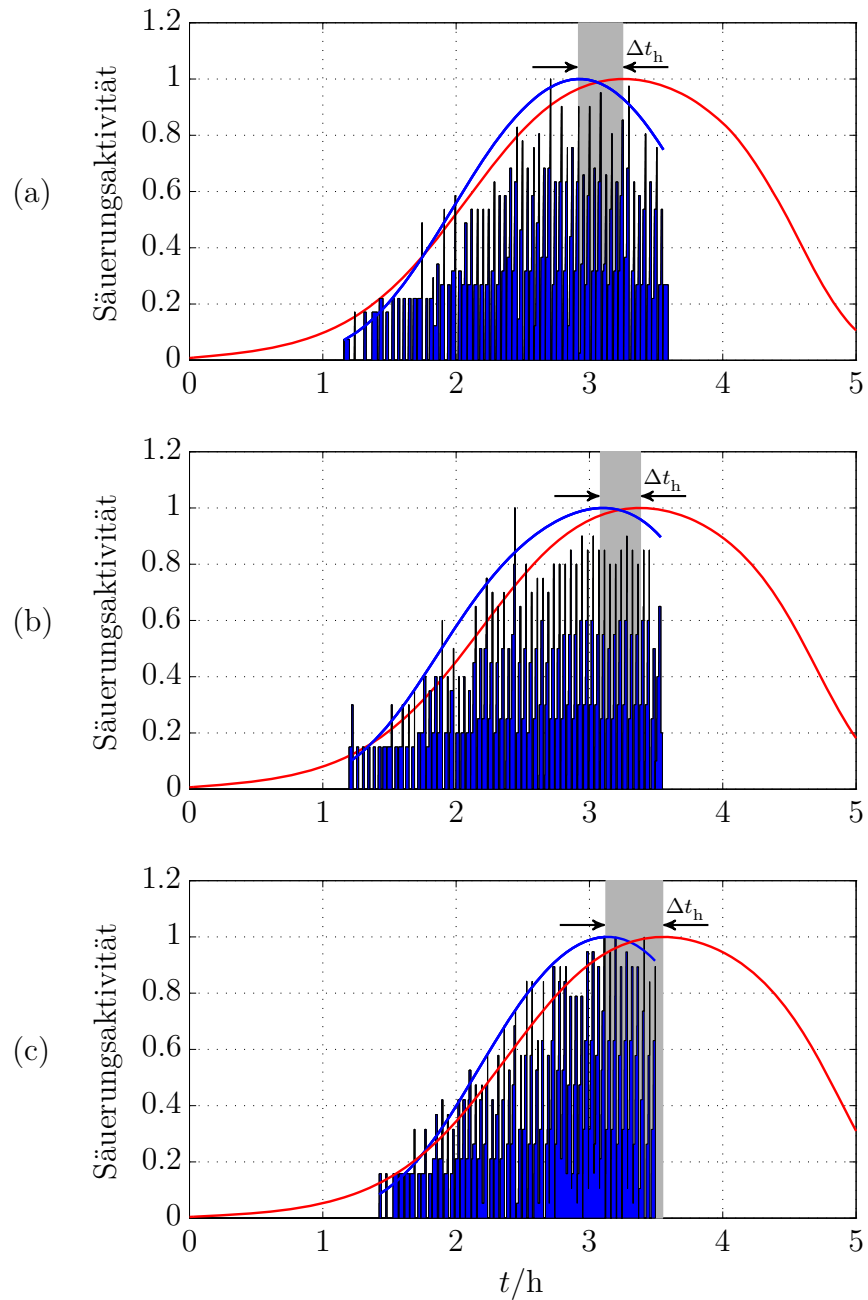


Abbildung 5.18: Vergleich von Simulation und Messergebnissen für den Stamm *Streptococcus thermophilus* 1974, normierte Darstellung. Fermentation: (a) 4110935869, (b) 4111145864, (c) 4111074371.

- Prädiktion der Milchsäurebildungsgeschwindigkeit
- Approximation der Laugenverbrauchsgeschwindigkeit
- Messwerte der periodischen Laugenzudosierung

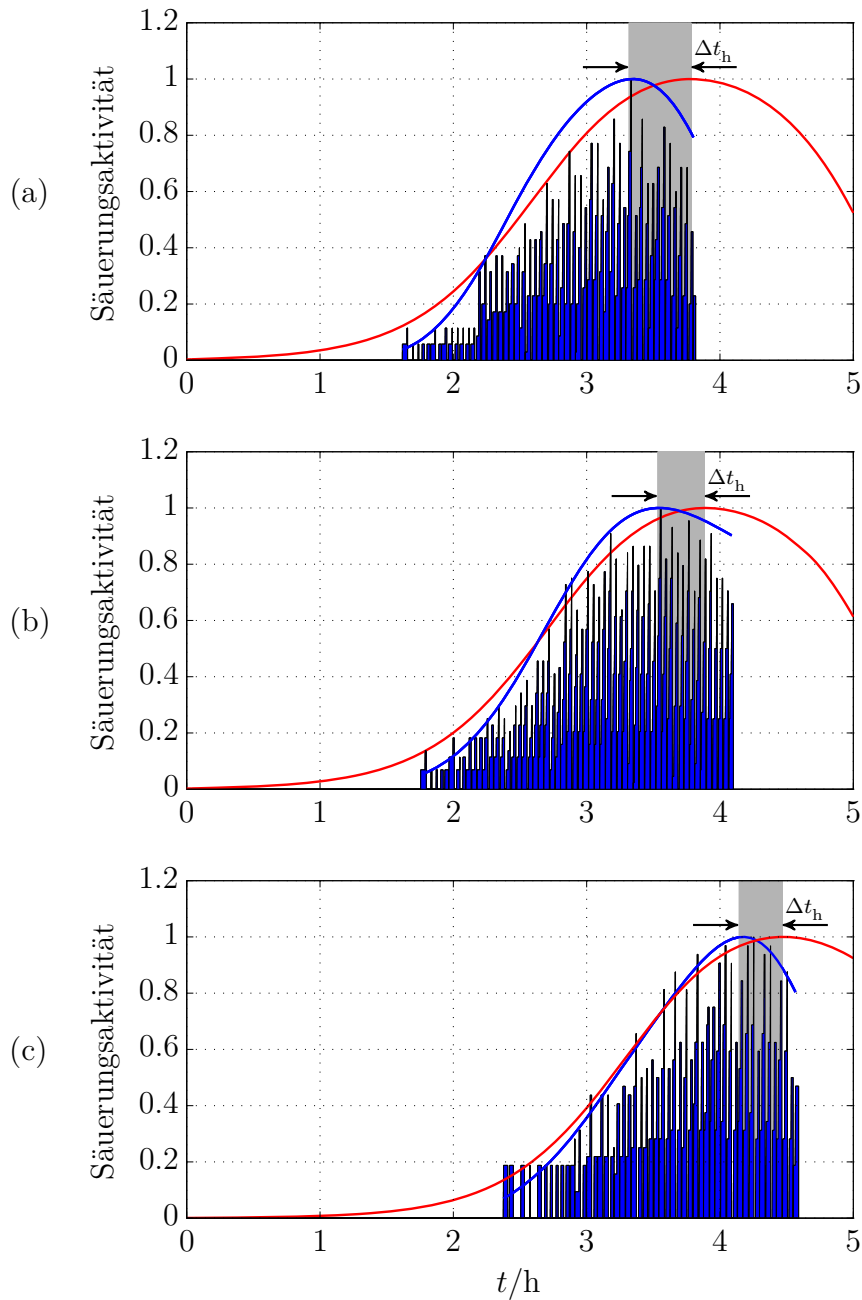


Abbildung 5.19: Vergleich von Simulation und Messergebnissen für den Stamm *Streptococcus thermophilus* 1974, normierte Darstellung. Fermentation: (a) 4111237443, (b) 4111057671, (c) 4111284834.

- Prädiktion der Milchsäurebildungsgeschwindigkeit
- Approximation der Laugenverbrauchsgeschwindigkeit
- ▒▒▒ Messwerte der periodischen Laugenzudosierung

benennung unter dem Namen *Streptococcus cremoris* bekannt war, in [17, 48] angegeben, dass die Verwendung von NH_4OH anstelle von NaOH die Endzellzahl positiv beeinflusst. Dabei wird die höhere Endzellzahl nach einer kürzeren Fermentationszeit erreicht als bei Regelung mit NaOH . Größeres Wachstum zeigen auch die Bakterien *Lactobacillus plantarum* und *Lactobacillus brevis*, wenn von NaOH auf NH_4OH gewechselt wird [64]. Beim Bakterium *Lactobacillus delbrueckii* kann darüber hinaus eine höhere Produktbildungsgeschwindigkeit beobachtet werden [25]. Generell lässt sich mit Ammoniaklauge in Fermentationen von Mischkulturen eine höhere Ausbeute der Biomasse erzielen als mit anderen Neutralisationsmitteln [50].

Unter der Annahme, dass die beschriebenen Effekte in Bezug auf Wachstum und Produktbildung auch im Kultivierungsprozess von *Streptococcus thermophilus* auftreten, wenn von NaOH auf NH_4OH gewechselt wird, soll der veränderte Prozessverlauf mit Hilfe des dynamischen Prozessmodells qualitativ nachgebildet werden. Dabei soll untersucht werden, ob die beschriebenen Veränderungen im Einklang stehen mit den erhaltenen abweichenden Ergebnissen in Bezug auf den Zeitpunkt der maximalen Säuerungsaktivität.

Eine Simulation einer Fermentation, in der sowohl eine höhere Endzellzahl früher erreicht wird als auch eine höhere maximale Produktbildungsgeschwindigkeit auftritt, kann mit dem dynamischen Prozessmodell generiert werden, wenn der Parameter μ_{\max} größer gewählt wird. Den Parameter μ_{\max} an dieser Stelle zu berücksichtigen, ist angemessen, da die durch ihn beschriebene maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit einer Zellkultur von den Umweltbedingungen abhängt, unter welchen die Zellvermehrung stattfindet [4]. Die durchgeführten Simulationsstudien zur Untersuchung des Einflusses von μ_{\max} auf den Prozessverlauf werden im Folgenden vorgestellt.

Untersuchung des Einflusses von μ_{\max} auf den Prozessverlauf

Die Simulationen werden mit den Parameterwerten aus der Parameterschätzung in Kapitel 4 durchgeführt. Für die Anfangswerte $c_{x,0}$, $c_{p,0}$ und $c_{s,0}$ der drei Zustandsgrößen Keimzahl, Milchsäure- und Lactosekonzentration werden die entsprechenden Messwerte aus dem Standardversuch gewählt, der die Grundlage der Parameterschätzung in Kapitel 4 war. Der Parameter μ_{\max} wird ausgehend von seinem in der Parameterschätzung bestimmten Wert um $\pm 10\%$ und $\pm 20\%$ verändert, sodass sich fünf verschiedene Simulationen des Prozessverlaufs ergeben. Diese sind in Abbildung 5.20 gezeigt.

Aus Abbildung 5.20 geht hervor, dass eine größere maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit μ_{\max} im Zusammenhang mit einer größeren Endzellzahl und einer größeren maximalen Produktbildungsgeschwindigkeit steht. Die Simulationsergebnisse zeigen weiterhin, dass sich die Stelle des Wendepunktes der Milchsäurekurve für

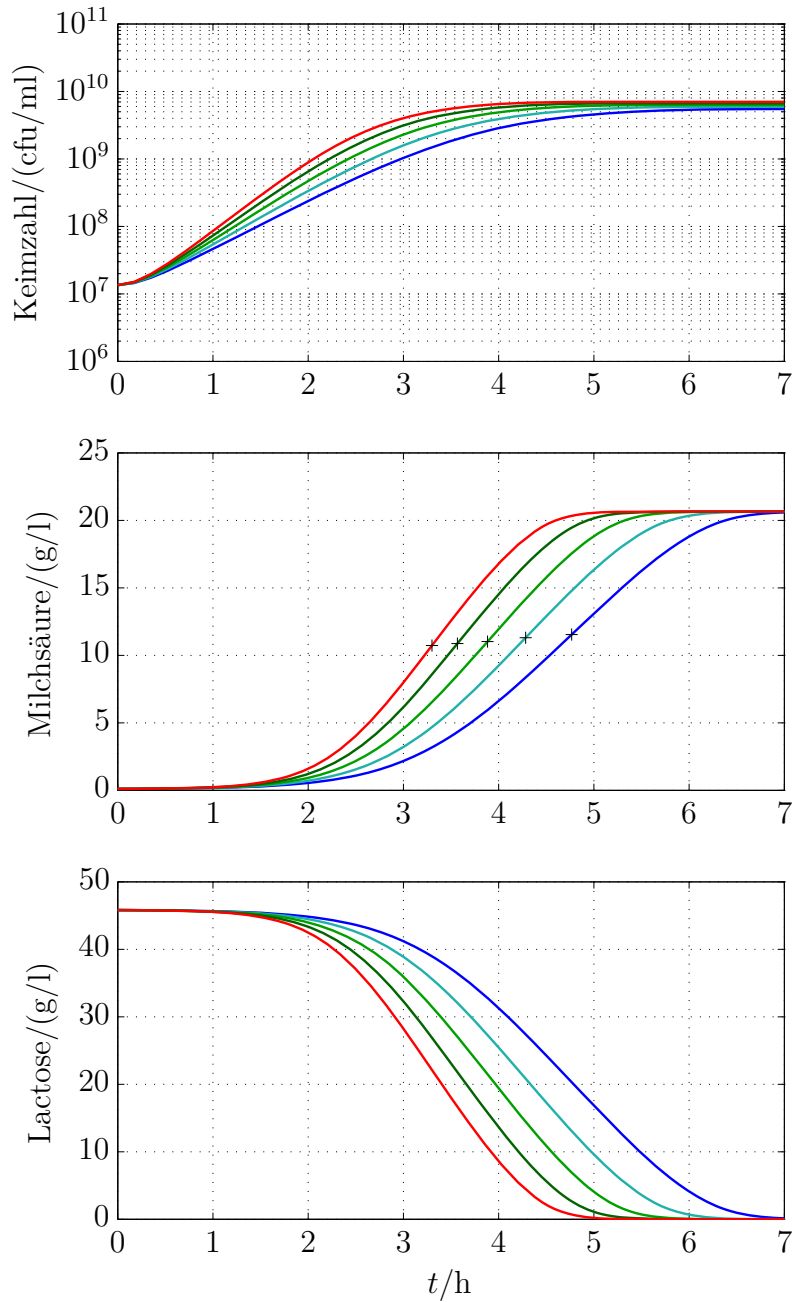


Abbildung 5.20: Einfluss des Parameters μ_{\max} auf die Verläufe von Keimzahl, Milchsäure- und Lactosekonzentration. Die Variable $\Delta\mu_{\max}$ gibt die prozentuale Änderung des Wertes in Tabelle 4.3 an.

- | | | | |
|---|------------------------------|---|----------------------------|
| — | $\Delta\mu_{\max} = -20\%$ | — | $\Delta\mu_{\max} = +10\%$ |
| — | $\Delta\mu_{\max} = -10\%$ | — | $\Delta\mu_{\max} = +20\%$ |
| — | $\Delta\mu_{\max} = \pm 0\%$ | + | Wendepunkt |

größere μ_{\max} -Werte hin zu kleineren Zeitwerten verschiebt. Dies wird durch eine Markierung der Wendepunkte verdeutlicht. Das Maximum der bakteriellen Säuerungsaktivität tritt also umso früher ein, je größer die maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit ist.

Es zeigt sich also, dass durch eine Vergrößerung des Parameters μ_{\max} sowohl die in der Literatur beschriebenen wachstums- und stoffwechselbezogenen Effekte, die im Zusammenhang mit dem Wechsel des Neutralisationsmittels stehen, berücksichtigt werden können, als auch das frühere Eintreten der maximalen Säuerungsaktivität in den industriellen Fermentationen nachgebildet werden kann. Aufgrund dieses Resultats wird die maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit μ_{\max} als wesentlicher Faktor der abweichenden Dynamik der Produktbildung im industriellen Prozess betrachtet.

Der Parameter μ_{\max} soll für die untersuchten sechs Produktionsfermentationen des Stammes *Streptococcus thermophilus* 1974 angepasst werden. Die Anpassung soll in solcher Weise durchgeführt werden, dass die mit Hilfe des prädiktiven Verfahrens bestimmten Zeitpunkte der maximalen Säuerungsaktivität $t_{h,\text{präd}}$ mit den Zeitpunkten der maximalen Laugenverbrauchsgeschwindigkeit t_h in Tabelle 5.3 möglichst gut übereinstimmen. Der Parameter μ_{\max} wird manuell für die ersten drei Fermentationen in Tabelle 5.3 eingestellt. Die übrigen drei Fermentationen werden zur Validierung verwendet. Als geeignet hat sich ein Wert

$$\mu_{\max} = 3.02 \text{ h}^{-1} \quad (5.10)$$

erwiesen, der etwa einer 20%igen Erhöhung des ursprünglich angenommenen Wertes entspricht. Mit diesem angepassten Wert wird das prädiktive Verfahren auf die Datensätze erneut angewendet.

Ergebnisse für den Stamm *Streptococcus thermophilus* 1974 nach Anpassung von μ_{\max}

Die neuen Zeitpunkte der maximalen Säuerungsaktivität $t_{h,\text{präd}}$, die das prädiktive Verfahren mit dem angepassten Parameter μ_{\max} liefert, sind in Tabelle 5.4 angegeben. Sie werden verglichen mit den Zeitpunkten der maximalen Laugenverbrauchsgeschwindigkeit t_h , die aus Tabelle 5.3 übernommen wurden.

Wie die Ergebnisse zeigen, wird die Güte der Prädiktion durch die vorgenommene Anpassung von μ_{\max} deutlich verbessert. Die Abweichungen zwischen den Zeitpunkten t_h und $t_{h,\text{präd}}$ können auf Werte im Bereich von ± 6 min reduziert werden. Aufgrund dieses Resultats wird davon ausgegangen, dass das dynamische Prozessmodell zusammen mit dem angepassten Parameter μ_{\max} und den übrigen Parametern aus der Identifikation des experimentellen Kultivierungsprozesses die Produktbildung im industriellen Kultivierungsprozess adäquat beschreibt.

Tabelle 5.4: Vergleich der Zeitpunkte der maximalen Laugenverbrauchsgeschwindigkeit t_h mit den prädizierten Zeitpunkten der maximalen Milchsäurebildungsgeschwindigkeit $t_{h,\text{präd}}$ für Produktionsfermentationen des Stammes *Streptococcus thermophilus* 1974 nach Anpassung des Parameters μ_{max} .

Fermentation	t_h	$t_{h,\text{präd}}$	Δt_h
4110935869	2 h 55 min	2 h 53 min	2 min
4111145864	3 h 05 min	2 h 59 min	6 min
4111074371	3 h 07 min	3 h 12 min	-5 min
4111237443	3 h 19 min	3 h 22 min	-3 min
4111057671	3 h 32 min	3 h 30 min	2 min
4111284834	4 h 09 min	4 h 05 min	4 min

In den Abbildungen 5.21–5.22 sind die graphischen Veranschaulichungen der Ergebnisse gegeben. Sie lassen erkennen, dass der Start des Ernteprozesses in den Produktionsfermentationen generell mit einer zeitlichen Verzögerung erfolgt. Die Länge dieser Verzögerung variiert von Fermentation zu Fermentation und ist in den Abbildungen anhand des zeitlichen Abstandes des letzten aufgenommenen Messpunktes der periodischen Laugenzudosierung zur Maximumstelle der approximierten Laugenverbrauchsgeschwindigkeit zu erkennen. Dabei können für die untersuchten sechs Fermentationen Werte bis zu 40 min festgestellt werden. Eine zuverlässige Prädiktion des optimalen Erntezeitpunktes, wie sie mit dem prädiktiven Verfahren möglich ist, erlaubt also, nicht nur die Qualität des Starterprodukts zu optimieren, sondern auch den Kultivierungsprozess im Allgemeinen deutlich wirtschaftlicher zu gestalten.

5.4.2 Ergebnisse für den Stamm *Streptococcus thermophilus* F3

Das prädiktive Verfahren wird im Folgenden anhand von Daten eines weiteren Stammes der Spezies *Streptococcus thermophilus* getestet. Gegenstand dieser Untersuchung sind sechs Produktionsfermentationen des Stammes *Streptococcus thermophilus* F3. Das Vorgehen erfolgt dabei analog zu der im vorigen Unterabschnitt beschriebenen Analyse des Stammes *Streptococcus thermophilus* 1974. Das bedeutet, dass sowohl die Parameter des dynamischen Prozessmodells, bis auf μ_{max} , als auch die Parameter des pH-Modells wie bei der Analyse der experimentellen Fermentationen gewählt werden. Dasselbe gilt auch für die Anfangsschätzungen der drei kultivierungsabhängig

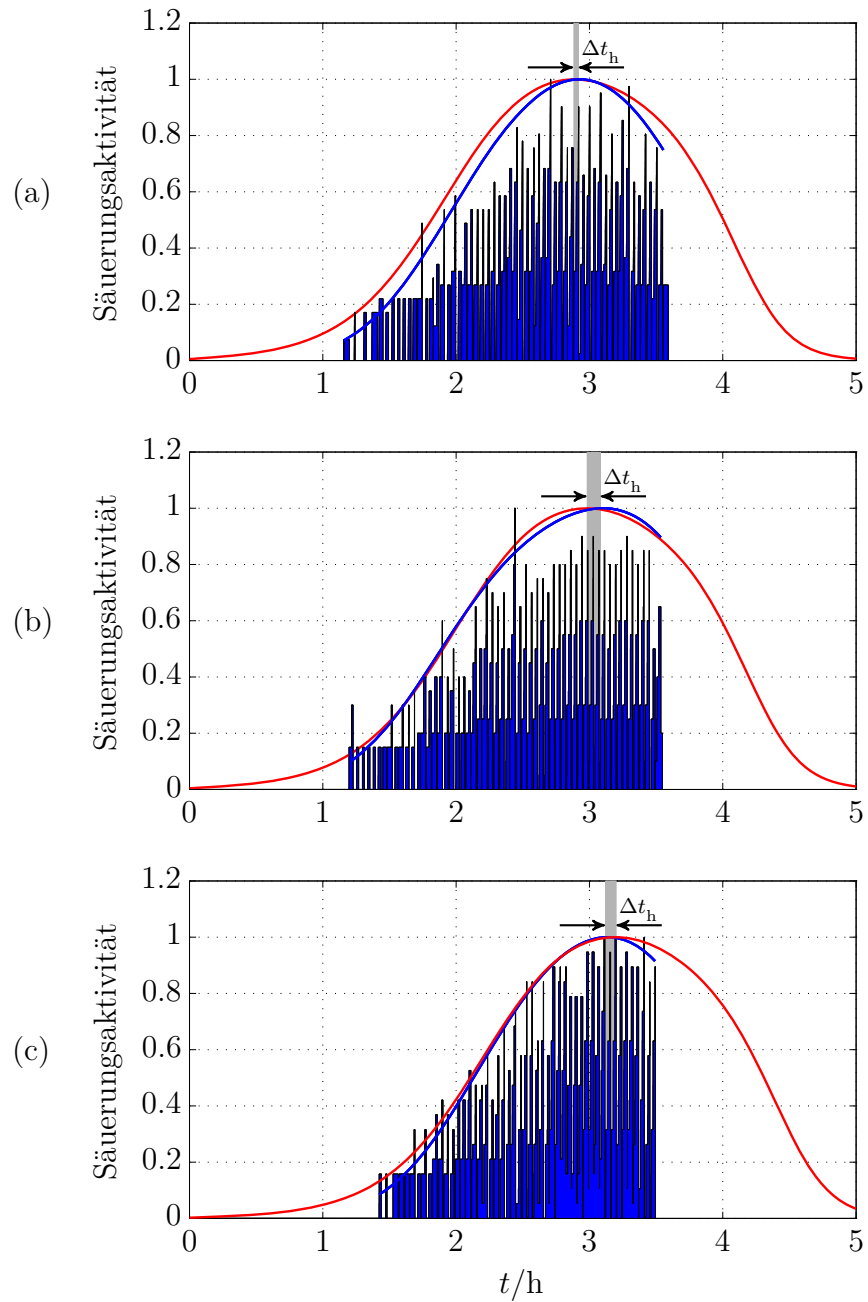


Abbildung 5.21: Vergleich von Simulation und Messergebnissen für den Stamm *Streptococcus thermophilus* 1974 nach Anpassung von μ_{\max} , normierte Darstellung. Fermentation: (a) 4110935869, (b) 4111145864, (c) 4111074371.

- Prädiktion der Milchsäurebildungsgeschwindigkeit
- Approximation der Laugenverbrauchsgeschwindigkeit
- ▒ Messwerte der periodischen Laugenzudosierung

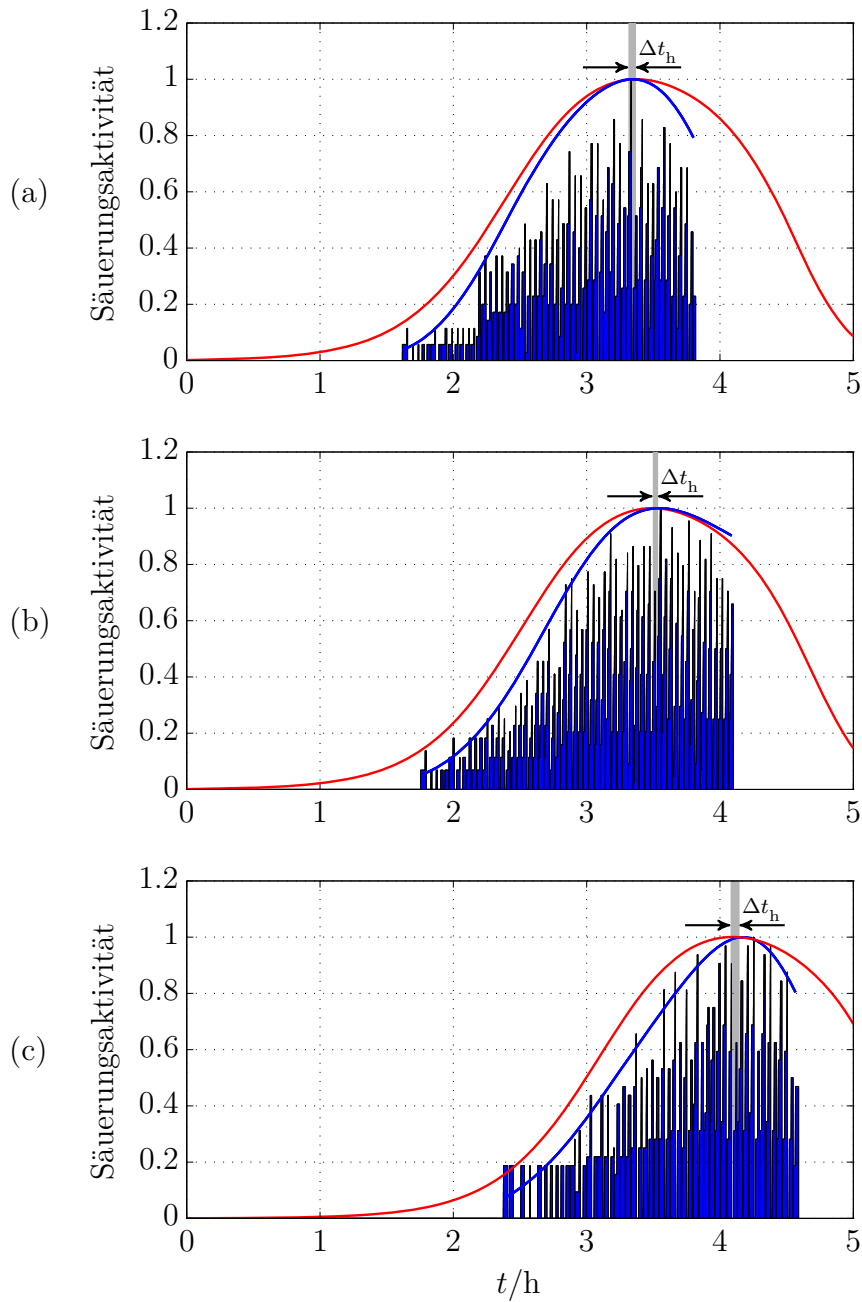


Abbildung 5.22: Vergleich von Simulation und Messergebnissen für den Stamm *Streptococcus thermophilus* 1974 nach Anpassung von μ_{\max} , normierte Darstellung. Fermentation: (a) 4111237443, (b) 4111057671, (c) 4111284834.

- Prädiktion der Milchsäurebildungsgeschwindigkeit
- Approximation der Laugenverbrauchsgeschwindigkeit
- ▒ Messwerte der periodischen Laugenzudosierung

einzustellenden Größen $c_{x,0}$, $c_{p,0}$ und \hat{c}_Σ sowie den Anfangswert der Lactosekonzentration $c_{s,0}$. Für den Parameter μ_{\max} wird der angepasste Wert in (5.10) angenommen.

In Tabelle 5.5 sind die prädiktiv bestimmten Zeitpunkte der maximalen Säuerungsaktivität $t_{h,\text{präd}}$ und die Zeitpunkte der maximalen Laugenverbrauchsgeschwindigkeit t_h , die aus den Messdaten des Laugenverbrauchs ermittelt wurden, zusammen mit den resultierenden Abweichungen Δt_h aufgelistet. Die graphischen Veranschaulichungen der Ergebnisse sind in den Abbildungen 5.23–5.24 gezeigt.

Tabelle 5.5: Vergleich der Zeitpunkte der maximalen Laugenverbrauchsgeschwindigkeit t_h mit den prädizierten Zeitpunkten der maximalen Milchsäurebildungsgeschwindigkeit $t_{h,\text{präd}}$ für Produktionsfermentationen des Stammes *Streptococcus thermophilus* F3.

Fermentation	t_h	$t_{h,\text{präd}}$	Δt_h
4111102366	2 h 41 min	2 h 47 min	–6 min
4111229499	2 h 59 min	2 h 56 min	3 min
4111221784	2 h 59 min	3 h 04 min	–5 min
4110869515	2 h 59 min	2 h 52 min	7 min
4111372236	3 h 15 min	3 h 12 min	3 min
4111302019	3 h 22 min	3 h 21 min	1 min

Für alle sechs untersuchten Fermentationen ergeben sich gute Übereinstimmungen zwischen den prädiktiv bestimmten und den aus Messdaten des Laugenverbrauchs ermittelten Zeitpunkten der maximalen Säuerungsaktivität. Die Abweichungen betragen zwischen –6 min und 7 min. Dies zeigt, dass das prädiktive Verfahren in der Lage ist, auch für diesen Stamm den gefragten Erntezeitpunkt im Voraus auf ein relativ schmales Zeitfenster genau zu bestimmen. Eine Justierung des dynamischen Prozessmodells ist in diesem Fall nicht notwendig. Die Parameterwerte, die für den Stamm *Streptococcus thermophilus* 1974 verwendet wurden, können also auch für den Stamm *Streptococcus thermophilus* F3 herangezogen werden. Dies lässt darauf schließen, dass die Dynamik der Produktbildung bei beiden Stämmen vergleichbar ist.

5.4.3 Ergebnisse für den Stamm *Streptococcus thermophilus* F4

Das prädiktive Verfahren wird anhand von Daten eines dritten Stammes der Spezies *Streptococcus thermophilus* getestet. Bei dieser abschließenden Analyse werden sechs

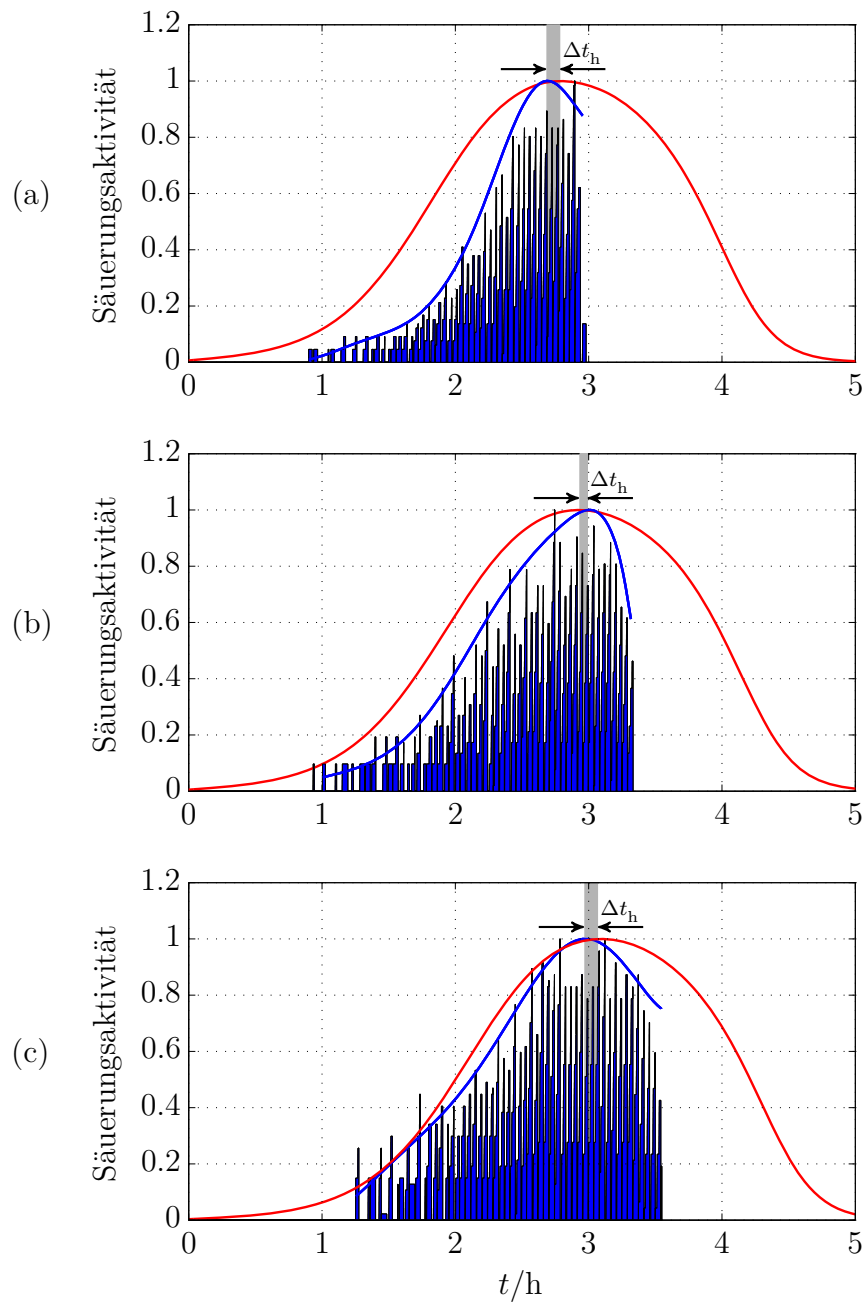


Abbildung 5.23: Vergleich von Simulation und Messergebnissen für den Stamm *Streptococcus thermophilus* F3, normierte Darstellung. Fermentation: (a) 4111102366, (b) 4111229499, (c) 4111221784.

- Prädiktion der Milchsäurebildungsgeschwindigkeit
- Approximation der Laugenverbrauchsgeschwindigkeit
- ▒▒▒ Messwerte der periodischen Laugenzudosierung

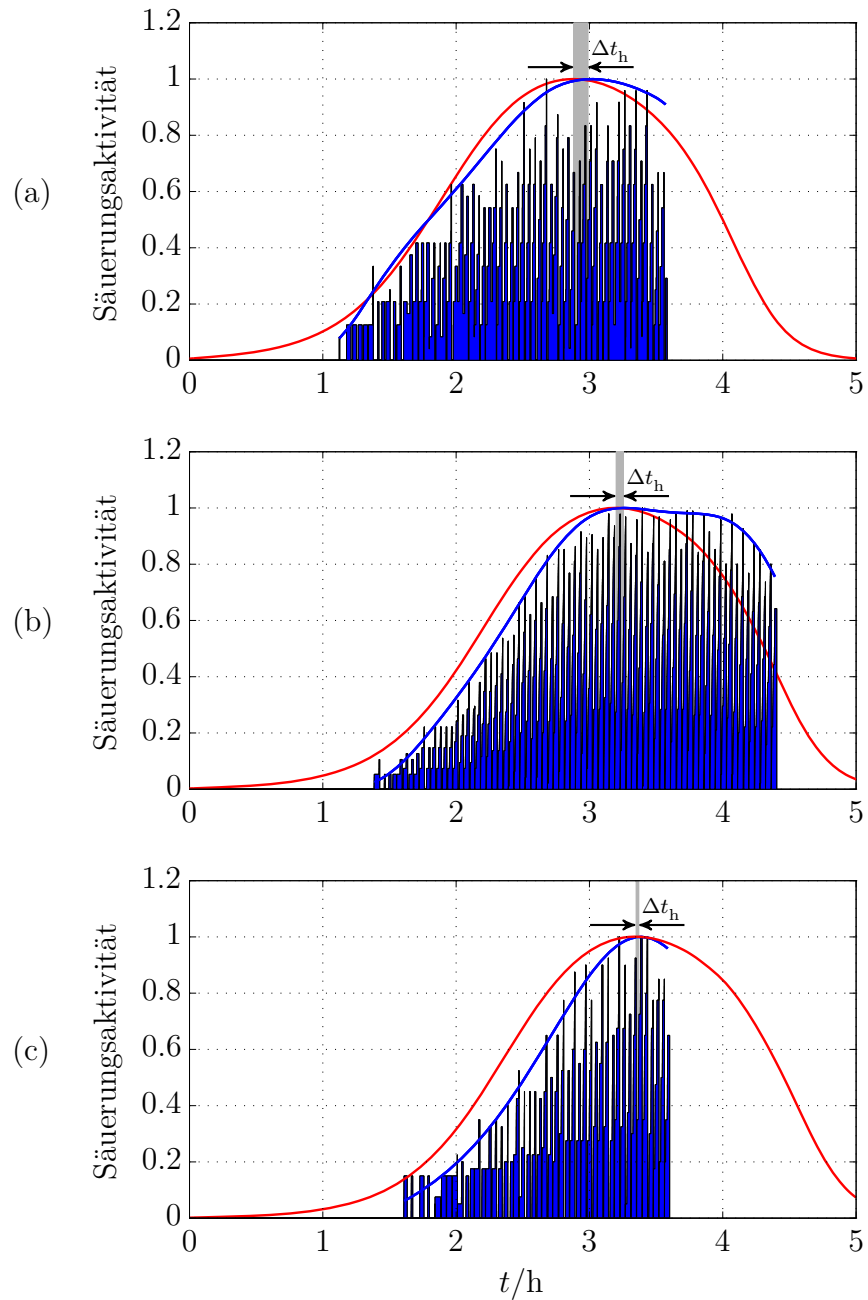


Abbildung 5.24: Vergleich von Simulation und Messergebnissen für den Stamm *Streptococcus thermophilus* F3, normierte Darstellung. Fermentation: (a) 4110869515, (b) 4111372236, (c) 4111302019.

- Prädiktion der Milchsäurebildungsgeschwindigkeit
- Approximation der Laugenverbrauchsgeschwindigkeit
- ▒ Messwerte der periodischen Laugenzudosierung

Produktionsfermentationen des Stammes *Streptococcus thermophilus* F4 betrachtet. Die Einstellungen in Bezug auf die Modellparameter und Anfangsschätzungen werden wie für die beiden zuvor untersuchten Stämme gewählt.

Tabelle 5.6 listet die prädiktiv bestimmten Zeitpunkte der maximalen Säuerungsaktivität $t_{h,\text{präd}}$ und die aus Messdaten des Laugenverbrauchs ermittelten Zeitpunkte der maximalen Laugenverbrauchsgeschwindigkeit t_h zusammen mit den resultierenden Abweichungen Δt_h auf. In den Abbildungen 5.25–5.26 werden die Ergebnisse graphisch veranschaulicht.

Tabelle 5.6: Vergleich der Zeitpunkte der maximalen Laugenverbrauchsgeschwindigkeit t_h mit den prädizierten Zeitpunkten der maximalen Milchsäurebildungsgeschwindigkeit $t_{h,\text{präd}}$ für Produktionsfermentationen des Stammes *Streptococcus thermophilus* F4.

Fermentation	t_h	$t_{h,\text{präd}}$	Δt_h
4110939399	2 h 58 min	3 h 03 min	–5 min
4110954185	3 h 05 min	3 h 10 min	–5 min
4111332748	3 h 08 min	3 h 14 min	–6 min
4111170743	3 h 13 min	3 h 10 min	3 min
4111036912	3 h 14 min	3 h 17 min	–3 min
4111440746	3 h 15 min	3 h 21 min	–6 min

Wie die angeführten Resultate zeigen, kann der gefragte Zeitpunkt auch für diesen Stamm zuverlässig prädiziert werden. Die Abweichungen zwischen den prädiktiv bestimmten und den tatsächlichen Zeitpunkten der maximalen Säuerungsaktivität betragen zwischen –6 min und 3 min. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den Resultaten, die für die zuvor untersuchten Stämme *Streptococcus thermophilus* 1974 und *Streptococcus thermophilus* F3 erzielt wurden. Daraus kann abgeleitet werden, dass die drei untersuchten Bakterienstämme bei vergleichbaren biologischen Anfangsbedingungen im Kultivierungsprozess eine ähnliche Dynamik bei der Produktbildung entwickeln.

Die Überprüfung der Übertragbarkeit des prädiktiven Verfahrens auf den industriellen Kultivierungsprozess des Bakteriums *Streptococcus thermophilus* ist an dieser Stelle abgeschlossen. Wie die vorgestellten Ergebnisse für die drei untersuchten Stämme dieser Spezies in diesem und den vorigen Unterabschnitten zeigen, gelingt die Übertragung des Verfahrens mit gutem Erfolg.

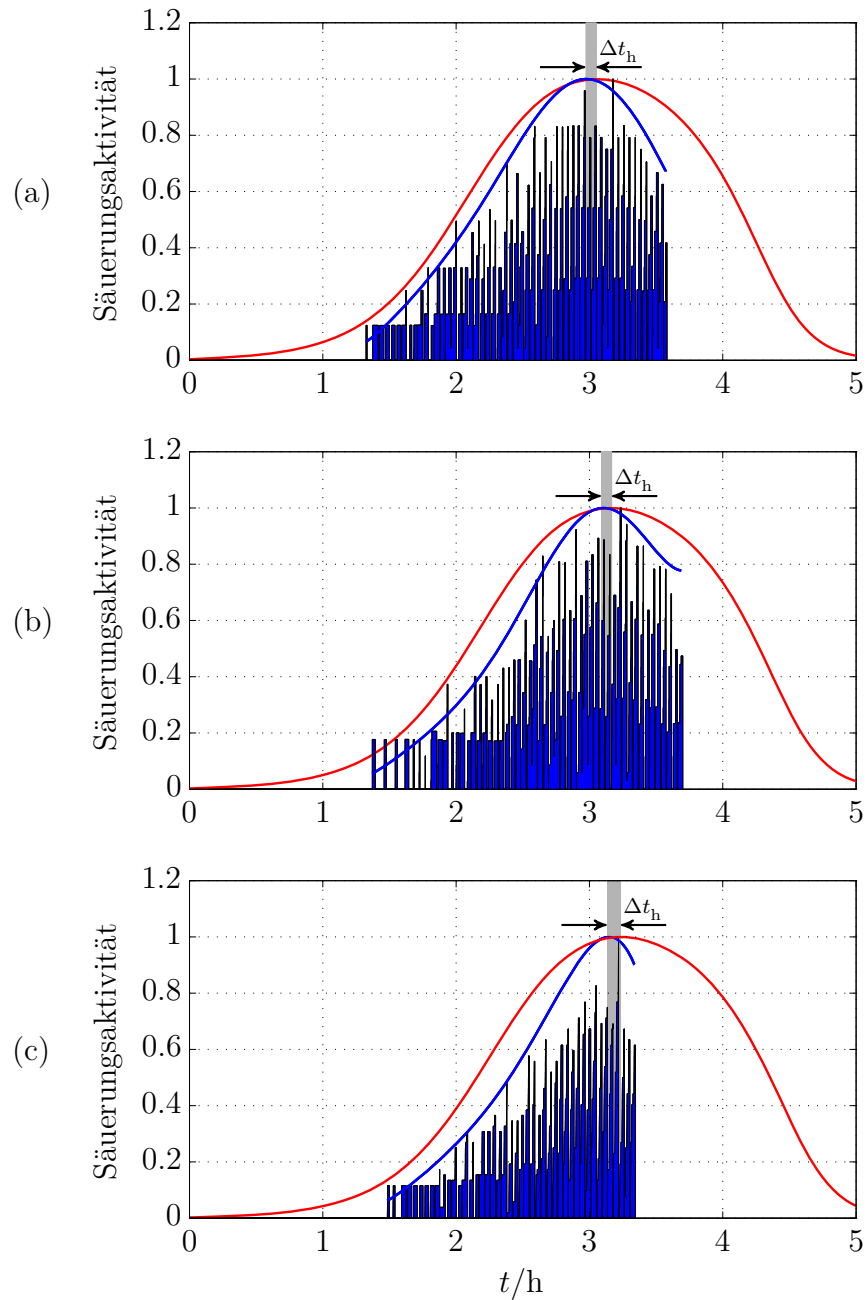


Abbildung 5.25: Vergleich von Simulation und Messergebnissen für den Stamm *Streptococcus thermophilus* F4, normierte Darstellung. Fermentation: (a) 4110939399, (b) 4110954185, (c) 4111332748.

- Prädiktion der Milchsäurebildungsgeschwindigkeit
- Approximation der Laugenverbrauchsgeschwindigkeit
- Messwerte der periodischen Laugenzudosierung

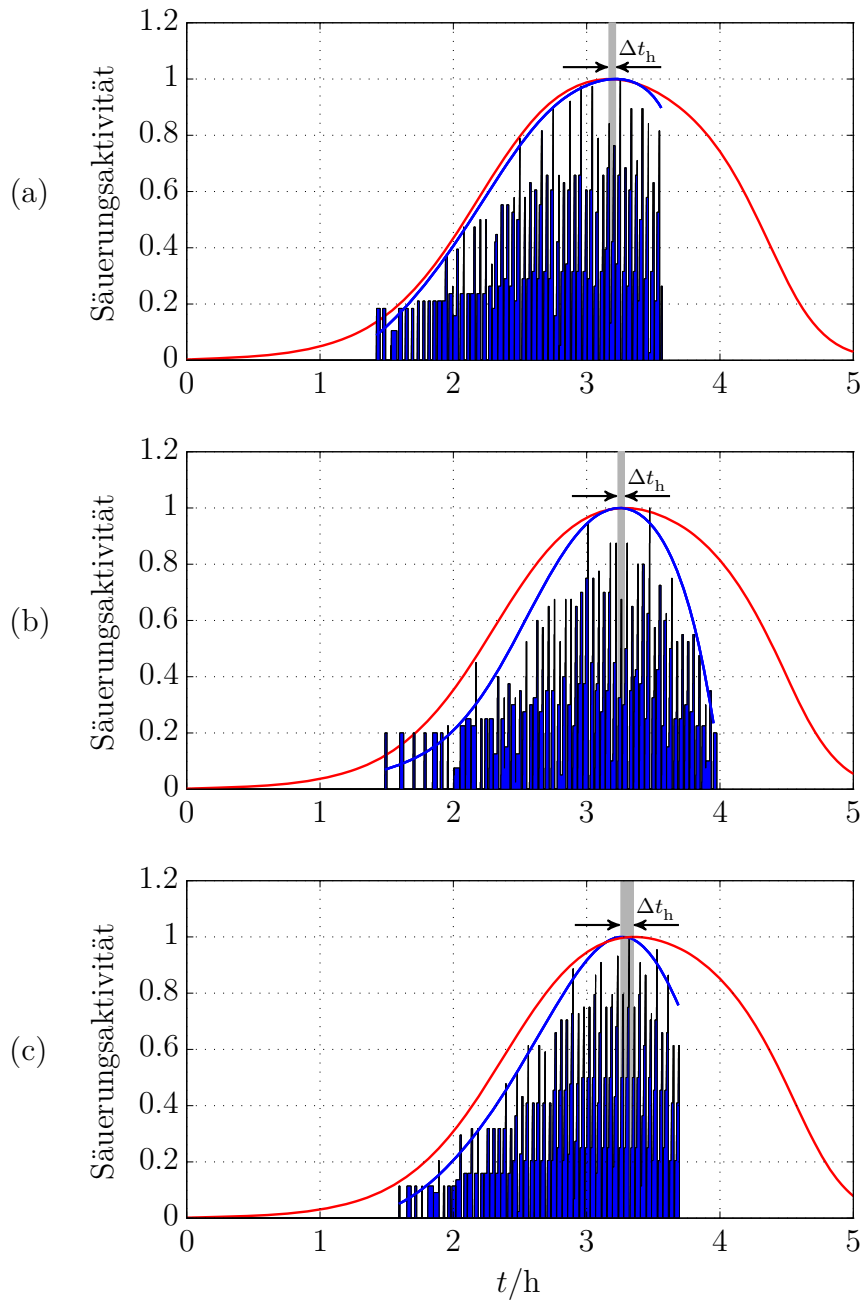


Abbildung 5.26: Vergleich von Simulation und Messergebnissen für den Stamm *Streptococcus thermophilus* F4, normierte Darstellung. Fermentation: (a) 4111170743, (b) 4111036912, (c) 4111440746.

- Prädiktion der Milchsäurebildungsgeschwindigkeit
- Approximation der Laugenverbrauchsgeschwindigkeit
- ▒ Messwerte der periodischen Laugenzudosierung

Kapitel 6

Zusammenfassung und Ausblick

Das Milchsäurebakterium *Streptococcus thermophilus* hat eine große kommerzielle Bedeutung für die milchverarbeitende Industrie, in der es als Starterorganismus bei der Herstellung von Milcherzeugnissen wie Joghurt und Käse eingesetzt wird. Im industriellen Kultivierungsprozess zur Produktion dieses Bakteriums als Starterkultur ist es wichtig, die Biomasse zum richtigen Zeitpunkt zu ernten, damit eine gleichbleibend hohe Qualität und Ausbeute des Starterprodukts realisiert werden kann. Als Kriterium dafür wird der Prozesszeitpunkt verwendet, zu dem die Säuerungsaktivität der Bakterienkultur maximal ist. Mit der gegenwärtigen Prozessführung kann dieser Zeitpunkt jedoch erst nach einer gewissen Verzugszeit sicher detektiert werden, die nicht zu vernachlässigen ist. Aus diesem Grund ist es von großem Interesse, den optimalen Erntezeitpunkt zeitnah bestimmen zu können.

Noch größere Möglichkeiten zur Prozessoptimierung, aber auch zur Prozessentwicklung ergeben sich, wenn der optimale Erntezeitpunkt schon früh im Prozess vorherbestimmt werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Lösung für diese Aufgabe präsentiert. Die relevanten Vorgänge im Fermentationsprozess von *Streptococcus thermophilus* wurden mathematisch erfasst. Darauf aufbauend wurde ein prädiktives Verfahren entwickelt und anhand von Messdaten erprobt.

Zusammenfassung

Der in [27] vorgestellte Ansatz, bei dem es darum geht, den optimalen Erntezeitpunkt aus dem Verlauf der pH-Wert-Absenkung in der Anfangsphase der Fermentation zu schätzen, wurde in dieser Arbeit weiterverfolgt und mit Hilfe einer modellbasierten Methodik realisiert.

Als grundlegende Instrumente dieser Methodik dienen ein dynamisches Modell des Kultivierungsprozesses, das die Prozessdynamik über die drei Größen Keimzahl, Konzentration des Produkts Milchsäure sowie des Substrats Lactose beschreibt, und ein statisches pH-Modell, das den pH-Wert des Mediums in Abhängigkeit der Milchsäurekonzentration darstellt. Eine optimierungsbasierte Technik wurde angewendet, um das dynamische Prozessmodell mit Hilfe des pH-Modells durch die Bestimmung einer repräsentativen Anfangskeimzahl auf das Prozessgeschehen einstellen zu können.

Dadurch wird es möglich, das dynamische Prozessmodell als Simulator für eine Vorhersage des Prozessverlaufs zu verwenden und aus der Simulation der Milchsäurebildungsgeschwindigkeit den gesuchten Zeitpunkt im frühen Stadium der Fermentation zu präzisieren.

Bei der mathematischen Modellbildung des Kultivierungsprozesses wurde eine unstrukturierte Betrachtungsweise der Zelle und eine unsegregierte Sichtweise der Zellpopulation genutzt, um das bakterielle Wachstum im makroskopischen Maßstab mathematisch zu erfassen. Das Wachstum in den drei Wachstumsphasen Lag-Phase, exponentielle Phase und stationäre Phase wurde durch geeignete Kinetikterme beschrieben, die sowohl die Limitierung durch die Lactose als auch die Inhibierung durch die Milchsäure berücksichtigen.

Die Dynamik der Produktbildung wird sowohl durch das Wachstum und den Erhaltungsstoffwechsel der Biomasse bestimmt als auch durch die Lactose limitiert. Die Milchsäurekonzentration wurde deshalb durch eine Differentialgleichung beschrieben, die sich aus einem wachstumsassoziierten und einem biomassenassoziierten Term zusammensetzt, ergänzt um eine Limitierungskinetik.

Die beiden Vorgänge Substratverbrauch und Produktbildung weisen aufgrund des Zellmetabolismus einen ähnlichen Kurvenverlauf auf. Aufgrund des bestehenden linearen Zusammenhangs wurde die Lactosekonzentration durch eine algebraische Gleichung in Abhängigkeit der Milchsäurekonzentration dargestellt.

Ein statisches pH-Modell wurde entwickelt, um die milchsäurebedingte pH-Wert-Abenkung in der Anfangsphase der Kultivierung nachbilden zu können. Um die pH-Eigenschaften des verwendeten spezifischen Komplexmediums mathematisch zu erfassen, wurde es durch ein chemisches System mit äquivalenten pH-Eigenschaften approximiert. Als Ausgangspunkt für den strukturellen Aufbau des pH-Modells diente die Modellbeschreibung des pH-Wertes eines allgemeinen Säure-Base-Systems, die auf der Grundlage von Bilanzgleichungen, elementaren physikalischen und chemischen Gesetzen formuliert wurde.

Die Polynomgleichung für die Oxoniumionenkonzentration $c_{\text{H}_3\text{O}^+}$ im aufgestellten pH-Modell, die zur Berechnung des pH-Wertes benötigt wird, kann aufgrund der hohen Polynomordnung nur iterativ mittels numerischer Verfahren gelöst werden. Verwendet wurde an dieser Stelle ein Verfahren, das die Nullstellen des Polynoms in $c_{\text{H}_3\text{O}^+}$ über die Eigenwerte einer Matrix berechnet, die dem Polynom zugeordnet wird. Dieses Verfahren zeichnet sich dadurch aus, dass es ohne eine Schätzung der Nullstellen zur Initialisierung des Algorithmus auskommt und sämtliche Nullstellen des Polynoms simultan berechnet.

Die Parameter des dynamischen Prozessmodells und des statischen pH-Modells wurden anhand experimenteller Daten identifiziert. Die Identifikation wurde als Minimierungsaufgabe im Sinne der Methode der kleinsten Fehlerquadrate für jedes Modell

separat formuliert. Als Optimierungsverfahren wurde der Downhill-Simplex-Algorithmus eingesetzt, der sich durch schnelle Konvergenz und Robustheit auszeichnet.

Die Validierung des dynamischen Prozessmodells und des pH-Modells erfolgte durch Vergleich von Simulationsergebnissen mit Messdaten. Dabei zeigte sich, dass der Parameter t_{lag} des dynamischen Prozessmodells, der die zeitliche Ausdehnung der Lag-Phase des bakteriellen Wachstums beschreibt, kultivierungsabhängig eingestellt werden muss, um eine gute Nachbildung der Daten zu erhalten. Dies gilt auch für den Parameter \hat{c}_{Σ} des pH-Modells, der die kumulative Wirkung der starken Elektrolyte im Medium auf den pH-Wert erfasst. Die Werte der übrigen Parameter aus der Parameterschätzung behalten ihre Gültigkeit.

Damit das dynamische Prozessmodell für eine Vorhersage des Prozessverlaufs als Simulator genutzt werden kann, müssen der Anfangswert der Keimzahl $c_{x,0}$ und der Parameter der Lag-Phase t_{lag} über den gemessenen Verlauf der pH-Wert-Absenkung auf das Prozessgeschehen eingestellt werden. Zu diesem Zweck wurden die beiden Einzellmodelle zum Gesamtprozessmodell miteinander so verbunden, dass die Milchsäurekonzentration aus dem dynamischen Prozessmodell die Eingangsgröße des pH-Modells darstellt. Die beiden Größen $c_{x,0}$ und t_{lag} bilden die qualitativen Merkmale des verwendeten Inokulums ab, die von Fermentation zu Fermentation variieren und dadurch Einfluss auf den optimalen Erntezeitpunkt ausüben. Sie sind so anzupassen, dass die Abweichungen zwischen den über das Gesamtprozessmodell berechneten pH-Werten und den gemessenen pH-Werten minimiert werden. Um den schwankenden pH-Anfangswert nachbilden zu können, müssen der Anfangswert der Milchsäurekonzentration $c_{p,0}$ und der kultivierungsabhängige Parameter \hat{c}_{Σ} des pH-Modells neben $c_{x,0}$ und t_{lag} als weitere Optimierungsparameter in der gegebenen Minimierungsaufgabe berücksichtigt werden.

Simulationen haben jedoch ergeben, dass Änderungen von $c_{x,0}$ und t_{lag} den Verlauf der Milchsäurekonzentration und damit auch den pH-Wert-Verlauf auf die gleiche Weise beeinflussen. Deshalb ist die Berücksichtigung nur einer dieser Größen als Optimierungsparameter sinnvoll. Da ein frei einstellbarer Anfangswert der Keimzahl $c_{x,0}$ eine höhere Flexibilität bei der Nachbildung des gemessenen pH-Wert-Verlaufs bietet, ist es also von Vorteil, wenn $c_{x,0}$ kultivierungsabhängig bestimmt wird und t_{lag} konstant gewählt wird.

Die drei Größen $c_{x,0}$, $c_{p,0}$ und \hat{c}_{Σ} werden unter Anwendung des Downhill-Simplex-Algorithmus geschätzt, sobald der pH-Wert auf den Sollwert abgesenkt wurde und die pH-Wert-Regelung aktiv wird. Anschließend wird mit den ermittelten Werten der zukünftige Prozessverlauf simuliert und der Zeitpunkt maximaler Säuerungsaktivität aus dem simulierten Verlauf der Milchsäurebildungsgeschwindigkeit prädiktiv bestimmt.

Für die Erprobung des prädiktiven Verfahrens wurden Daten aus sechs Kultivierungsversuchen herangezogen, die mit unterschiedlichen Inokulationsmengen durchgeführt

wurden. Um die Genauigkeit der ermittelten Prädiktionsergebnisse zu überprüfen, wurden aus den Messdaten der Milchsäurekonzentration der einzelnen Versuche die Zeitpunkte ermittelt, zu welchen die Säuerungsaktivität tatsächlich maximal war. Dazu wurde jeder Datensatz mit einem phänomenologischen Signalmodell approximiert und der gesuchte Zeitpunkt aus der Ableitung der Modellfunktion bestimmt. Beim Vergleich der prädiktiv bestimmten Zeitpunkte maximaler Säuerungsaktivität mit denen aus Messdaten ermittelten wurden Abweichungen im Bereich von nur ± 5 min festgestellt, was die hohe Güte des prädiktiven Verfahrens demonstriert.

Des Weiteren wurde für eine Anwendung des Verfahrens im Produktionsbetrieb seine Übertragbarkeit anhand von Daten aus Produktionsfermentationen von *Streptococcus thermophilus* untersucht. Dabei wurden die drei Stämme *Streptococcus thermophilus* 1974, *Streptococcus thermophilus* F3 und *Streptococcus thermophilus* F4 aus dem Keimangebot der Firma Danisco betrachtet. Je Stamm wurden sechs Datensätze zur Erprobung des Verfahrens herangezogen.

Da aus den Produktionsfermentationen die Messwerte der Keimzahl, der Milchsäure- und der Lactosekonzentration nicht zur Verfügung stehen, sondern nur die Daten der online messbaren Größen wie pH-Wert und Laugenverbrauch, ist eine Identifikation des dynamischen Prozessmodells mit Daten aus dem industriellen Prozess nicht möglich. Es wurden deshalb die Parameterwerte aus der Identifikation mit experimentellen Daten zu Grunde gelegt. Eine Identifikation des pH-Modells mit industriellen Prozessdaten erübrigt sich, da in den Produktionsfermentationen und den Kultivierungsversuchen die gleiche Mediumrezeptur verwendet wurde.

Da die Messwerte der Milchsäurekonzentration aus den Produktionsfermentationen nicht verfügbar sind, wurden zur Bestimmung der tatsächlichen Zeitpunkte maximaler Säuerungsaktivität die Messwerte der zur pH-Wert-Regelung verbrauchten Laugenmenge verwendet, um die Genauigkeit der prädizierten Zeitpunkte maximaler Säuerungsaktivität mittels Vergleich überprüfen zu können. Dazu wurden die Messwerte analog zum experimentellen Fall mit Hilfe eines phänomenologischen Signalmodells approximiert und dann die Ableitung des Signalmodells analysiert.

Für den als ersten untersuchten Stamm *Streptococcus thermophilus* 1974 zeigte sich, dass der Eintritt der maximalen Säuerungsaktivität zu einem wesentlich späteren Prozesszeitpunkt vorhergesagt wird. Dabei ergeben sich zwischen den prädiktiv bestimmten Zeitpunkten maximaler Säuerungsaktivität und denen aus Messdaten ermittelten Abweichungen zwischen 19 min und 28 min. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Bakterienkulturen im industriellen Prozess eine höhere Dynamik bei der Produktbildung entwickeln als die Bakterienkulturen im experimentellen Prozess. Dadurch tritt das Maximum der Säuerungsaktivität bei einer vergleichbaren anfänglichen bakteriellen Aktivität, gemessen anhand des pH-Wert-Verlaufs in der unregulierten Phase, früher auf. Da das dynamische Prozessmodell Parameterwerte verwendet, die für den experimentellen Prozess identifiziert wurden, ist es nicht in der

Lage, die Milchsäurebildungsgeschwindigkeit bzw. die Säuerungsaktivität der Bakterienkulturen in den Produktionsfermentationen adäquat wiederzugeben, wodurch sich die genannten Abweichungen ergeben.

Die Ursachen für das unterschiedliche Produktbildungsverhalten der Bakterienkulturen in experimentellen Fermentationen und Produktionsfermentationen konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht ermittelt werden. Eine Erklärung liefert die Literatur, in der die Art des verwendeten Neutralisationsmittels in Fermentationen von Milchsäurebakterien als Einflussfaktor des Wachstums und der damit zusammenhängenden Produktbildung genannt wird. In den untersuchten Kultivierungsversuchen wurde als Neutralisationsmittel Natronlauge (NaOH) eingesetzt, in den industriellen Fermentationen jedoch Ammoniaklösung (NH₄OH).

Eine Justierung des dynamischen Prozessmodells war somit nötig, um es auf die Dynamik im industriellen Prozess einstellen zu können. Simulationsstudien haben ergeben, dass die in der Literatur beschriebenen positiven Effekte in Bezug auf Zellwachstum und Produktbildung, die beim Wechsel von NaOH auf NH₄OH auftreten, über einen größeren Wert der maximalen spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit μ_{\max} nachgebildet werden können. Gleichzeitig kann mit einem größeren μ_{\max} -Wert auch das frühere Eintreffen des Zeitpunktes maximaler Säuerungsaktivität im industriellen Prozess erklärt werden. Der Modellparameter μ_{\max} erwies sich damit als geeignet, das unterschiedliche Verhalten der Bakterienkulturen zu beschreiben.

An dieser Stelle zeigte sich ein wesentlicher Vorteil einer mathematischen Modellvorstellung gegenüber einem datenbasierten Modell. Auswirkungen von veränderten Prozessbedingungen auf den Prozessverlauf, wie das im gegebenen Fall die Art des Neutralisationsmittels betrifft, können ohne Veränderungen der Modellstruktur durch eine biologisch plausible Parameteranpassung berücksichtigt werden, was bei einem Modell, das z. B. auf künstlichen neuronalen Netzen basiert, so nicht möglich ist.

Der Wert des Parameters μ_{\max} wurde für drei von sechs untersuchten Produktionsfermentationen des Stammes *Streptococcus thermophilus* 1974 so angepasst, dass die prädiktiv bestimmten Zeitpunkte der maximalen Säuerungsaktivität mit den aus Daten des Laugenverbrauchs ermittelten Vergleichswerten möglichst gut übereinstimmen. Die Daten aus den übrigen drei Fermentationen wurden für die Validierung verwendet. Mit dem angepassten μ_{\max} -Wert ergaben sich sowohl für diese drei Fermentationen als auch für die im Anschluss untersuchten sechs Fermentationen des Stammes *Streptococcus thermophilus* F3 und sechs Fermentationen des Stammes *Streptococcus thermophilus* F4 Abweichungen im Bereich von nur ± 7 min. Damit ist gezeigt, dass die Übertragung des Verfahrens auf den industriellen Prozess gelungen ist.

Die vorgestellten Ergebnisse sowohl für den experimentellen Kultivierungsprozess von *Streptococcus thermophilus* als auch für den industriellen Prozess am Beispiel von drei verschiedenen Stämmen dieser Spezies demonstrieren die erfolgreiche Erprobung des in dieser Arbeit entwickelten prädiktiven Verfahrens. Das Ziel der Arbeit,

die Entwicklung einer anwendungsfähigen modellbasierten Methode zur prädiktiven Bestimmung des Zeitpunktes maximaler Säuerungsaktivität von *Streptococcus thermophilus* in einem frühen Stadium des Fermentationsprozesses, wurde erreicht. Das Verfahren besitzt eine sehr gute Vorhersagekraft und lässt sich durch Parameterjustierung auf abweichende Prozessverläufe übertragen. Damit steht für die industrielle Praxis ein zuverlässiges und leistungsstarkes Werkzeug für die Prozessoptimierung und die Prozessentwicklung zur Verfügung.

Ausblick

Der Einfluss der Neutralisationsmittel NaOH und NH_4OH auf das Wachstum und den Metabolismus von *Streptococcus thermophilus* sollte näher untersucht werden, um die in der Literatur für andere Milchsäurebakterien beschriebenen unterschiedlichen Auswirkungen auch für diesen Organismus analytisch verifizieren zu können. Die Ergebnisse dieser Untersuchung können zu einem besseren Verständnis des Kultivierungsprozesses beitragen und die Vergleichbarkeit zwischen den mit NaOH und NH_4OH durchgeführten Fermentationen erhöhen.

Des Weiteren sollte der industrielle Kultivierungsprozess von *Streptococcus thermophilus* genauer analysiert werden, um charakteristische Verläufe der online nicht zur Verfügung stehenden Größen Keimzahl, Milchsäure- und Lactosekonzentration zu erfassen, damit das dynamische Prozessmodell mit Messdaten aus diesem Prozess identifiziert werden kann. Das ist sinnvoll, weil dadurch die Unsicherheiten des dynamischen Prozessmodells eliminiert werden, die entstehen, wenn für die prädiktive Bestimmung des Zeitpunktes maximaler Säuerungsaktivität in den Produktionsfermentationen Parameterwerte verwendet werden, die für den experimentellen Prozess identifiziert wurden. Eine Anpassung des Parameters μ_{\max} , wie sie aufgrund der abweichenden Prozessdynamik notwendig war, entfällt. Die prädizierten Verläufe von Keimzahl, Milchsäure- und Lactosekonzentration, die das entwickelte Verfahren liefert, gewinnen an Aussagekraft, sodass der zukünftige Prozessverlauf besser beurteilt werden kann.

Das in dieser Arbeit entwickelte prädiktive Verfahren kann neben der Anwendung in Fermentationen von Starterkulturen wie des Bakteriums *Streptococcus thermophilus* auch in anderen Bereichen der industriellen Biotechnologie nützlich sein. Dazu gehören z. B. Fermentationsprozesse zur Herstellung von Milcherzeugnissen, in welchen der Verlauf der säurebedingten pH-Wert-Absenkung für die weitere Prozessführung von zentraler Bedeutung ist und eine Vorhersage dieses Verlaufs daher einen großen Nutzen darstellt.

Ein Anwendungsbeispiel ist die Produktion von Käse. Beim Herstellungsprozess wird der Milch nach ihrer Ansäuerung durch die Starterkultur Lab zugegeben und so das Dicklegen der Milch gezielt gestartet. Der richtige Zeitpunkt der Labzugabe ist entscheidend für die Qualität des Käseprodukts und wird aus dem Verlauf des pH-Wertes

während der Milchsäuerung bestimmt [26]. Aufgrund von abweichenden qualitativen Eigenschaften der verwendeten Starterkulturen oder von Milch können sich wie im untersuchten industriellen Fermentationsprozess von *Streptococcus thermophilus* abweichende Profile der pH-Wert-Absenkung ergeben [26]. Kann der pH-Wert-Verlauf und daraus der ideale Zeitpunkt der Labzugabe prädiktiv bestimmt werden, dann kann diese Information z. B. für eine optimierte Verteilung der zur Verfügung stehenden Ressourcen genutzt werden.

Wie die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen, ist das aufgestellte pH-Modell in der Lage, eine pH-Wert-Absenkung in Fermentationen ohne pH-Wert-Regelung mit hoher Genauigkeit nachzubilden, sodass es sich generell auch für eine Anwendung wie beschrieben eignet. Anpassungen der Modellstruktur an die pH-Eigenschaften der Milch, die gegebenenfalls erforderlich sind, lassen sich durch eine systematische Erweiterung um die entsprechenden chemischen Komponenten leicht realisieren.

Als weiteres Anwendungsgebiet für das vorgestellte prädiktive Verfahren kann die prädiktive Mikrobiologie genannt werden. Die prädiktive Mikrobiologie befasst sich mit der mathematischen Beschreibung des Wachstums von Mikroorganismen, die Lebensmittel verderben oder vergiften, sowie von Erregern von Infektionskrankheiten in Lebensmitteln. Die verwendeten Modelle sollen dabei helfen, zum einen den Einfluss von wichtigen Kontrollparametern wie z. B. Temperatur und pH-Wert auf das mikrobielle Wachstum durch Vorabsimulationen zu untersuchen, um daraus Maßnahmen zur Verbesserung der Sicherheit und Qualität der Lebensmittelprodukte bei ihrer Herstellung und Lagerung ableiten zu können. Zum anderen sollen auf der Grundlage von mathematischen Modellen und Daten aus prozessbegleitenden Analysen im Rahmen der Qualitätskontrolle kritische Stufen beim Verderbnisgrad vorherbestimmt werden, beispielsweise aus dem Verlauf des pH-Wertes bei säurebildenden Keimen. Ein ausschlaggebendes Kriterium für die Haltbarkeit bzw. Lagerdauer ist dabei die Anfangskeimzahl [59]. Ihrer Bestimmung kommt also eine große Bedeutung zu, wodurch sich Anwendungsmöglichkeiten für das vorgestellte Verfahren ergeben.

Anhang A

Lösungsverfahren für die Polynomgleichung des pH-Modells

Das verwendete Verfahren zur Bestimmung der Nullstellen des Polynoms für die Oxoniumionenkonzentration $c_{\text{H}_3\text{O}^+}$ im aufgestellten pH-Modell (4.61) soll im Folgenden genauer dargestellt werden. Es basiert auf der Lösung eines dem Polynom zugeordneten Eigenwertproblems mit Hilfe des Matrizenkalküls.

Ein Eigenwert einer quadratischen $(n \times n)$ -Matrix \mathbf{C} ist eine Zahl λ , für die es einen Vektor $\mathbf{x} \neq \mathbf{0}$ so gibt, dass die Gleichung

$$\mathbf{C}\mathbf{x} = \lambda\mathbf{x} \quad (\text{A.1})$$

gilt. Der Vektor \mathbf{x} heißt dann Eigenvektor der Matrix \mathbf{C} zum Eigenwert λ . Stellt man für die Matrix \mathbf{C} die sogenannte charakteristische Gleichung

$$\det(s\mathbf{I} - \mathbf{C}) = 0 \quad (\text{A.2})$$

auf, wobei die linke Seite dieser Gleichung das charakteristische Polynom

$$p(s) = \det(s\mathbf{I} - \mathbf{C}) \quad (\text{A.3})$$

von \mathbf{C} darstellt, dann gilt, dass die n Lösungen $s_i = \lambda_i$, $i \in \{1, 2, \dots, n\}$ der Gleichung (A.2), wenn diese entsprechend ihrer Vielfachheit gezählt werden, genau die Eigenwerte der Matrix \mathbf{C} sind. Die Berechnung von Eigenwerten einer Matrix und die Bestimmung von Nullstellen eines Polynoms sind also äquivalente mathematische Problemstellungen.

Überführung des Nullstellenproblems in ein Eigenwertproblem

Um eine Lösung des Nullstellenproblems für ein gegebenes normiertes Polynom vom Grad n der Form

$$p(s) = s^n + a_{n-1}s^{n-1} + \dots + a_2s^2 + a_1s + a_0 \quad (\text{A.4})$$

mit Hilfe des Matrizenkalküls bestimmen zu können, muss dem Polynom also eine geeignete $(n \times n)$ -Matrix \mathbf{C} zugeordnet werden und es müssen dann die Eigenwerte

dieser Matrix bestimmt werden. Eine Matrix \mathbf{C} ist geeignet, wenn sie die Gleichung (A.3) mit $p(s)$ aus (A.4) erfüllt.

Die Zuordnung einer Matrix zu einem Polynom ist nicht eindeutig, sodass sich beliebig viele Matrizen finden lassen, die die Gleichung (A.3) erfüllen. Gewöhnlich wird eine Darstellung in der Frobeniusnormalform gewählt mit

$$\mathbf{C} = \begin{bmatrix} 0 & 0 & \cdots & 0 & -a_0 \\ 1 & 0 & \cdots & 0 & -a_1 \\ 0 & 1 & \ddots & \vdots & -a_2 \\ \vdots & \ddots & \ddots & 0 & \vdots \\ 0 & \cdots & 0 & 1 & -a_{n-1} \end{bmatrix}. \quad (\text{A.5})$$

Da diese Matrix alle Koeffizienten des zu untersuchenden Polynoms $p(s)$ in (A.4) direkt als Elemente enthält, wird sie in der Literatur auch Begleitmatrix zu $p(s)$ genannt [39].

Numerische Lösung des Eigenwertproblems

Der Grundgedanke bei der numerischen Bestimmung der Eigenwerte der Begleitmatrix mit Hilfe der matrixenbasierten Methode ist, die Begleitmatrix durch geeignete Matrixtransformationen in eine neue Matrix gleicher Dimension zu überführen, aus der die Eigenwerte dann leichter bestimmt werden können. Die angewendeten Transformationen müssen dabei gewährleisten, dass die Eigenwerte nicht verändert werden. Diese Forderungen werden durch sogenannte Ähnlichkeitstransformationen erfüllt.

Bei einer Ähnlichkeitstransformation wird eine quadratische Matrix \mathbf{C} mit Hilfe einer invertierbaren Matrix \mathbf{Q} gemäß der Transformationsvorschrift

$$\mathbf{Q}^{-1}\mathbf{C}\mathbf{Q} = \mathbf{R} \quad (\text{A.6})$$

in eine zu \mathbf{C} ähnliche Matrix \mathbf{R} überführt. Eine für praktische Anwendungen zweckmäßige Darstellung von \mathbf{R} ist die Gestalt einer oberen Dreiecksmatrix

$$\mathbf{R} = \begin{bmatrix} \mathbf{R}_{1,1} & * & \cdots & * \\ 0 & \mathbf{R}_{2,2} & \ddots & \vdots \\ \vdots & \ddots & \ddots & * \\ 0 & \cdots & 0 & \mathbf{R}_{n,n} \end{bmatrix} \quad (\text{A.7})$$

oder unteren Dreiecksmatrix \mathbf{R}^\top , bei welchen also die Einträge unterhalb bzw. oberhalb der Hauptdiagonalen verschwinden. Die Einträge $\mathbf{R}_{i,i}$ auf der Hauptdiagonalen können dabei ein- oder zweireihigen Matrizen sein. Die einreihigen Matrizen, welche also Skalaren entsprechen, geben dann genau die reellen Eigenwerte der Dreiecksmatrix an, während die (2×2) -Diagonalblöcke die Paare der konjugiert komplexen

Eigenwerte beschreiben. Damit lassen sich aus den Diagonalelementen von \mathbf{R} bzw. ihrer Transponierten \mathbf{R}^\top die Eigenwerte von \mathbf{C} aufgrund der Ähnlichkeit direkt ablesen bzw. leicht berechnen.

Um die Transformation der Begleitmatrix \mathbf{C} auf Dreiecksgestalt, genauer gesagt auf Block-Dreiecksgestalt, gemäß Gleichung (A.6) durchführen zu können, muss eine geeignete Transformationsmatrix \mathbf{Q} gefunden werden. Die Existenz einer solchen Matrix wird dabei gewährleistet durch das Theorem von Schur, wobei gilt, dass im betrachteten reellen Fall die gesuchte Matrix \mathbf{Q} eine orthogonale Matrix ist. Orthogonale Matrizen sind reelle quadratische Matrizen, die die Bedingung

$$\mathbf{Q}^\top \mathbf{Q} = \mathbf{I} \quad (\text{A.8})$$

erfüllen, woraus folgt, dass

$$\mathbf{Q}^{-1} = \mathbf{Q}^\top \quad (\text{A.9})$$

gilt.

Die Bestimmung der Transformationsmatrix \mathbf{Q} stellt jedoch trotz ihrer gesicherten Existenz keine triviale Aufgabe dar. Denn aufgrund der Äquivalenz zwischen Polynomnullstellen und Eigenwerten kann diese Aufgabe bei Matrizen höherer Ordnung nach Abel nur approximativ gelöst werden, sodass der Lösungsweg in so einem Fall über numerische Näherungsverfahren führt.

Zur Anwendung in dieser Arbeit kommt das QR-Verfahren. Dabei handelt es sich um ein Standardverfahren zur Transformation von quadratischen Matrizen auf Dreiecksgestalt. Ziel des QR-Verfahrens ist es, eine gegebene quadratische Matrix \mathbf{C} unter Anwendung von Ähnlichkeitstransformationen einer Dreiecksgestalt anzunähern. Dabei wird mit Hilfe von Orthogonalmatrizen \mathbf{Q}_k eine rekursive Folge von iterierten Matrizen

$$\mathbf{C}_{k+1} = \begin{cases} \mathbf{C}, & \text{wenn } k = 0 \\ \mathbf{Q}_k^\top \mathbf{C}_k \mathbf{Q}_k, & \text{wenn } k > 0 \end{cases} \quad (\text{A.10})$$

generiert. Formal erhält man durch Rückwärtseinsetzen dieser Matrizen für eine Iterierte mit $k \gg 0$ die Darstellung

$$\begin{aligned} \mathbf{C}_{k+1} &= \mathbf{Q}_k^\top \mathbf{Q}_{k-1}^\top \cdots \mathbf{Q}_1^\top \mathbf{C} \mathbf{Q}_1 \cdots \mathbf{Q}_{k-1} \mathbf{Q}_k \\ &= (\mathbf{Q}_1 \cdots \mathbf{Q}_{k-1} \mathbf{Q}_k)^\top \mathbf{C} (\mathbf{Q}_1 \cdots \mathbf{Q}_{k-1} \mathbf{Q}_k). \end{aligned} \quad (\text{A.11})$$

Aus dem Vergleich mit Gleichung (A.6) wird deutlich, dass für eine Transformation auf Dreiecksgestalt die Folge der Transformationsmatrizen so bestimmt werden muss, dass der Grenzwert der Hintereinandermultiplikation dieser Matrizen

$$\lim_{k \rightarrow \infty} \mathbf{Q}_1 \cdots \mathbf{Q}_{k-1} \mathbf{Q}_k = \mathbf{Q} \quad (\text{A.12})$$

einer Orthogonalmatrix \mathbf{Q} angenähert wird, und zwar dergestalt, dass damit für den Grenzwert der Iterierten gilt

$$\lim_{k \rightarrow \infty} \mathbf{C}_{k+1} = \mathbf{Q}^\top \mathbf{C} \mathbf{Q} = \mathbf{R}, \quad (\text{A.13})$$

er also gegen die Dreiecksform \mathbf{R} in (A.7) oder ihre Transformierte konvergiert.

Zur Bestimmung der Folge von geeigneten Orthogonalmatrizen \mathbf{Q}_k wird die sogenannte QR-Zerlegung angewendet. Bei diesem Verfahren wird, wie im Folgenden gezeigt, die aktuelle Iterierte in zwei Matrizen zerlegt und aus diesen die nachfolgende Iterierte konstruiert.

QR-Algorithmus

Eine Iteration des QR-Algorithmus in seiner Grundversion besteht aus den folgenden Berechnungen in zwei Schritten.

1. QR-Zerlegung

Ausgehend von einer aktuellen Iterierten \mathbf{C}_k , welche im Initialisierungsschritt der Ausgangsmatrix \mathbf{C} entspricht, wird eine Zerlegung in eine orthogonale Matrix \mathbf{Q}_k und eine Dreiecksmatrix \mathbf{R}_k durchgeführt, sodass gilt

$$\mathbf{C}_k = \mathbf{Q}_k \mathbf{R}_k. \quad (\text{A.14})$$

Dies wird erreicht, indem zuerst die Matrix \mathbf{Q}_k mit Hilfe von geeigneten Verfahren, wie z. B. der Householder-Transformation [18], konstruiert wird und dann die Matrix \mathbf{R}_k durch Umstellen der Gleichung zu

$$\mathbf{R}_k = \mathbf{Q}_k^{-1} \mathbf{C}_k = \mathbf{Q}_k^\top \mathbf{C}_k \quad (\text{A.15})$$

bestimmt wird. Aufgrund von Orthogonalität kann die rechenaufwendigere Inversion von \mathbf{Q}_k durch einen einfacheren Transponierungsschritt ersetzt werden.

2. Definition der neuen Iterierten

Mit den Matrizen \mathbf{Q}_k und \mathbf{R}_k aus dem ersten Schritt wird eine neue Iterierte nach der Vorschrift

$$\mathbf{C}_{k+1} = \mathbf{R}_k \mathbf{Q}_k \quad (\text{A.16})$$

gebildet. Anschließend wird geprüft, ob diese Matrix im Rahmen einer vorgegebenen Genauigkeit bereits die gewünschte Dreiecksgestalt besitzt. Trifft dieses zu, endet die Iteration. Bei negativem Ergebnis wird mit einer neuen Iteration fortgesetzt.

Nach Beendigung des Iterationsprozesses liefert die letzte Iterierte \mathbf{C}_{k+1} in der Folge das Ergebnis der Transformation von \mathbf{C} auf Block-Dreiecksgestalt, aus der die gesuchten Nullstellen des betrachteten Polynoms bestimmt werden.

Der QR-Algorithmus in der beschriebenen Grundversion konvergiert gegen eine Matrix in Block-Dreiecksgestalt, falls die Beträge der reellen Eigenwerte und der komplexen Eigenwertpaare paarweise verschieden sind [55]. Mit erweiterten Versionen des QR-Algorithmus, die auf sogenannten Shift-Techniken beruhen, lassen sich auch Matrizen mit mehreren betragsgleichen Eigenwerten behandeln. Diese Techniken sollen jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht näher ausgeführt werden. Eine detaillierte Beschreibung der Shift-Techniken, die gewöhnlich verwendet werden, wird z. B. in [55] gegeben.

Anhang B

Downhill-Simplex-Algorithmus

Der Downhill-Simplex-Algorithmus [32] ist ein iteratives numerisches Optimierungsverfahren, das zur Gruppe lokaler gradientenfreier Verfahren gehört und auf einem geometrischen Suchprinzip beruht. Die Suchrichtung zur Verbesserung einer Iterierten im Iterationsprozess wird bei diesem Verfahren durch einen direkten Vergleich der Werte der Zielfunktion bestimmt. Die Generierung neuer Iterierten erfolgt mit Hilfe der vier geometrischen Operationen

- Reflexion,
- Expansion,
- Kontraktion und
- Kompression,

denen entsprechend die Parameter ρ , χ , γ bzw. σ zugeordnet sind. Die Werte dieser Parameter, die die Bedingungen

$$\rho > 0, \quad \chi > 1, \quad \chi > \rho, \quad 0 < \gamma < 1 \quad \text{und} \quad 0 < \sigma < 1 \quad (\text{B.1})$$

erfüllen müssen, werden vor dem Start des Algorithmus gewählt. Gewöhnlich werden die Werte verwendet [32]

$$\rho = 1, \quad \chi = 2 \quad \text{und} \quad \gamma = \sigma = \frac{1}{2}. \quad (\text{B.2})$$

Bei der Behandlung eines Minimierungsproblems für eine Zielfunktion g mit n reellen Variablen werden zur Initialisierung des Algorithmus $n+1$ verschiedene Startvektoren $\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2, \dots, \mathbf{x}_{n+1}$ gewählt. Diese bilden die Eckpunkte des Startsimplex in dem n -dimensionalen Lösungsraum für die Parameter. Bei den Startvektoren handelt es sich um eine vorzugebende Schätzung \mathbf{x}_1 für die Lösung des Minimierungsproblems und weitere n Vektoren, die unter Zuhilfenahme von \mathbf{x}_1 konstruiert werden. In [56] z. B. werden diese Vektoren über die Vorschrift

$$\mathbf{x}_{i+1} = \mathbf{x}_1 + \delta_{i+1} \mathbf{n}_i, \quad i \in \{1, 2, \dots, n\} \quad (\text{B.3})$$

berechnet. Hiernach entsteht jeder Vektor \mathbf{x}_{i+1} dadurch, dass zu jeder Komponente i von \mathbf{x}_1 ein Zahlenwert δ_{i+1} mittels des zugehörigen kanonischen Einheitsvektors \mathbf{n}_i hinzugefügt wird. Auf diese Weise lässt sich die Größe des Anfangssimplex einstellen. Die Terme δ_{i+1} werden in [56] mit 5 % der jeweiligen Komponente i von \mathbf{x}_1 gewählt, wenn diese von null verschieden ist, anderenfalls wird ein Wert von $2.5 \cdot 10^{-4}$ angenommen.

In jeder Iteration des Downhill-Simplex-Algorithmus wird ein neues Simplex in der Folge der iterierten Simplexe ermittelt, indem der Eckpunkt mit dem ungünstigsten Funktionswert zur Verbesserung der Iterierten durch einen geeigneten Nachfolger ersetzt wird.

Eine Iteration des Downhill-Simplex-Algorithmus nach Nelder und Mead besteht für ein gegebenes Startsimplex, wie in [32] beschrieben, aus den folgenden fünf möglichen Schritten, von welchen die ersten zwei Grundschritte sind und die anderen drei nur unter bestimmten Bedingungen ausgeführt werden.

1. Auswertung und Sortierung

Die Zielfunktion g wird an allen $n+1$ Eckpunkten des Simplex ausgewertet und die Eckpunkte anschließend so sortiert, dass für die berechneten Funktionswerte gilt

$$g(\mathbf{x}_1) \leq g(\mathbf{x}_2) \leq \dots \leq g(\mathbf{x}_{n+1}) . \quad (\text{B.4})$$

Der Eckpunkt \mathbf{x}_1 mit dem kleinsten Funktionswert ist damit der beste Eckpunkt des Simplex im Sinne des Minimierungsziels, der Eckpunkt \mathbf{x}_{n+1} mit dem größten Funktionswert entsprechend der schlechteste.

2. Reflexion

Der schlechteste Eckpunkt \mathbf{x}_{n+1} wird am Schwerpunkt

$$\bar{\mathbf{x}} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \mathbf{x}_i \quad (\text{B.5})$$

der besten n Eckpunkte reflektiert. Der Reflexionspunkt ist dabei gegeben durch

$$\mathbf{x}_r = \bar{\mathbf{x}} + \rho(\bar{\mathbf{x}} - \mathbf{x}_{n+1}) . \quad (\text{B.6})$$

Die Zielfunktion wird an diesem Punkt zu $g(\mathbf{x}_r)$ ausgewertet und im Anschluss die folgende Fallunterscheidung durchgeführt:

- a) Falls $g(\mathbf{x}_r) < g(\mathbf{x}_1)$ gilt, der Reflexionspunkt \mathbf{x}_r also unter allen Eckpunkten des Simplex den besten Funktionswert besitzt, wird versucht, diesen potenziellen neuen Eckpunkt durch Expansion in Schritt 3 noch weiter zu verbessern.
- b) Kann der Reflexionspunkt \mathbf{x}_r , der in einer Umgebung außerhalb des Simplex liegt, die Position des schlechtesten Eckpunktes in der Reihenfolge nicht verbessern, gilt also $g(\mathbf{x}_r) \geq g(\mathbf{x}_n)$, wird durch Kontraktion in Schritt 4 versucht, einen besseren Punkt als \mathbf{x}_r innerhalb des Simplex zu ermitteln.
- c) Liefert der Reflexionspunkt \mathbf{x}_r eine mittlere Verbesserung, sodass also gilt $g(\mathbf{x}_1) \leq g(\mathbf{x}_r) < g(\mathbf{x}_n)$, wird der schlechteste Eckpunkt durch den reflektierten Punkt ersetzt und die Iteration endet.

3. Expansion

Es wird der Expansionspunkt

$$\mathbf{x}_e = \bar{\mathbf{x}} + \chi(\mathbf{x}_r - \bar{\mathbf{x}}) \quad (\text{B.7})$$

des Reflexionspunktes \mathbf{x}_r berechnet und der zugehörige Funktionswert $g(\mathbf{x}_e)$ ermittelt. Falls

- a) $g(\mathbf{x}_e) < g(\mathbf{x}_r)$ gilt, die Expansion also zu einer weiteren Verbesserung geführt hat, wird der schlechteste Eckpunkt \mathbf{x}_{n+1} durch \mathbf{x}_e ersetzt,
- b) anderenfalls wird der reflektierte Punkt \mathbf{x}_r gewählt,

und die Iteration endet in jedem Fall.

4. Kontraktion

Es wird zwischen äußerer und innerer Kontraktion unterschieden:

- a) Innere Kontraktion wird durchgeführt, wenn der Reflexionspunkt \mathbf{x}_r keine Verbesserung des schlechtesten Eckpunktes \mathbf{x}_{n+1} darstellt, d. h., wenn $g(\mathbf{x}_r) \geq g(\mathbf{x}_{n+1})$ gilt. In diesem Fall wird der innere Kontraktionspunkt

$$\mathbf{x}_{cc} = \bar{\mathbf{x}} - \gamma(\bar{\mathbf{x}} - \mathbf{x}_{n+1}) \quad (\text{B.8})$$

berechnet und der zugehörige Funktionswert $g(\mathbf{x}_{cc})$ bestimmt. Gilt dann

- i) $g(\mathbf{x}_{cc}) < g(\mathbf{x}_{n+1})$, wird der schlechteste Eckpunkt \mathbf{x}_{n+1} durch den Punkt \mathbf{x}_{cc} ersetzt und die Iteration endet.
- ii) Anderenfalls wird mit Komprimierung in Schritt 5 fortgesetzt.

- b) Wenn gilt $g(\mathbf{x}_n) \leq g(\mathbf{x}_r) < g(\mathbf{x}_{n+1})$, dann wird eine äußere Kontraktion durchgeführt. Der äußere Kontraktionspunkt

$$\mathbf{x}_c = \bar{\mathbf{x}} + \gamma(\mathbf{x}_r - \bar{\mathbf{x}}) \quad (\text{B.9})$$

wird ermittelt und der Funktionswert $g(\mathbf{x}_c)$ an diesem Punkt berechnet. Gilt dann weiter

- i) $g(\mathbf{x}_c) \leq g(\mathbf{x}_r)$, wird der schlechteste Eckpunkt \mathbf{x}_{n+1} durch den äußeren Kontraktionspunkt \mathbf{x}_c ersetzt und die Iteration endet,
- ii) anderenfalls wird mit Kompression in Schritt 5 fortgesetzt.

5. Kompression

Kann eine Verbesserung des schlechtesten Eckpunktes weder durch Reflexion noch durch Kontraktion erreicht werden, wird eine Kompression des Simplex durchgeführt. Hierbei werden bis auf den besten Eckpunkt \mathbf{x}_1 alle anderen n Eckpunkte des Simplex \mathbf{x}_i durch neue Punkte \mathbf{v}_i ersetzt. Diese ergeben sich mit dem besten Eckpunkt \mathbf{x}_1 zu

$$\mathbf{v}_i = \mathbf{x}_1 + \sigma(\mathbf{x}_i - \mathbf{x}_1), \quad i \in \{2, 3, \dots, n+1\}. \quad (\text{B.10})$$

Der beschriebene Iterationsprozess wird so lange weitergeführt, bis die Abbruchbedingung

$$\sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n+1} (g(\mathbf{x}_i) - \bar{g})^2} < \varepsilon \quad (\text{B.11})$$

mit

$$\bar{g} = \frac{1}{n+1} \sum_{i=1}^{n+1} g(\mathbf{x}_i) \quad (\text{B.12})$$

und \mathbf{x}_i , den Eckpunkten des letzten Simplex in der Folge, für eine vorgegebene positive Zahl ε erfüllt ist [46]. Der beste Eckpunkt dieses Simplex stellt die ermittelte Lösung der Minimierungsaufgabe dar.

Eine Veranschaulichung der Iterationsschritte 2 bis 5 des Downhill-Simplex-Algorithmus für den zweidimensionalen Fall wird in Abbildung B.1 gegeben.

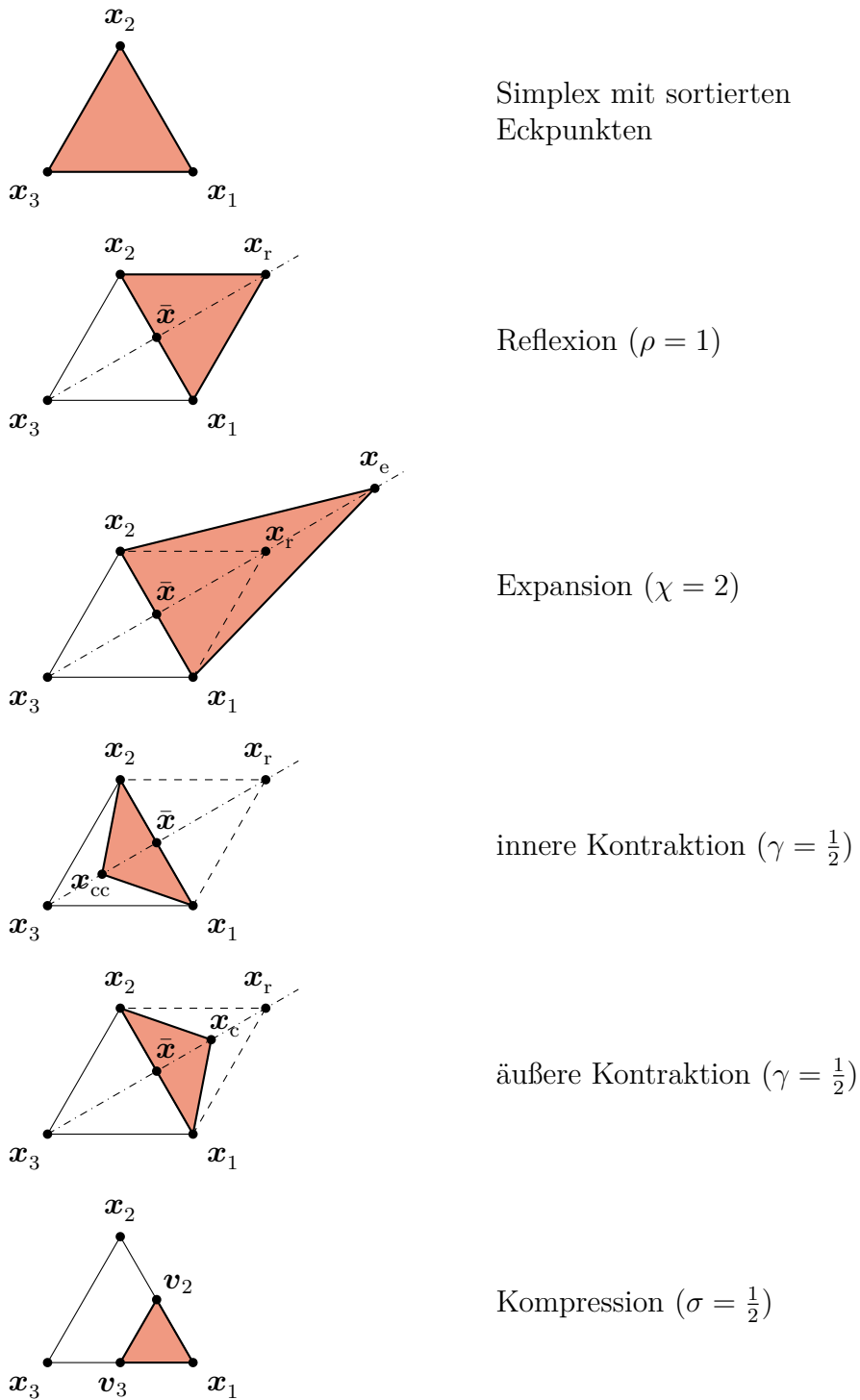


Abbildung B.1: Illustration der geometrischen Operationen beim Downhill-Simplex-Algorithmus für den zweidimensionalen Fall, in Anlehnung an [32].

Literaturverzeichnis

- [1] Aiba, S., M. Shoda und M. Nagatani: Kinetics of Product Inhibition in Alcohol Fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 10(6):845–864, 1968.
- [2] Antranikian, G. (Hrsg.): *Angewandte Mikrobiologie*. Springer, Berlin, 2006.
- [3] B. Braun Biotech International GmbH (Hrsg.): *Betriebshandbuch Biostat CT – DCU3*. Technische Dokumentation, 2000.
- [4] Baranyi, J. und T. A. Roberts: A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23(3):277–294, 1994.
- [5] Barth, D.: *Mathematische Analyse eines biotechnologischen Prozesses am Beispiel der Fermentation von Streptococcus thermophilus als Starterkultur*. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, 2011.
- [6] Bastin, G. und D. Dochain: *On-line Estimation and Adaptive Control of Bioreactors*. Elsevier, Amsterdam, 1991.
- [7] Bergter, F. und W. A. Knorre: Computersimulation von Wachstum und Produktbildung bei *Saccharomyces cerevisiae*. *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie*, 12(8):613–629, 1972.
- [8] Bouguettoucha, A., B. Balanec und A. Amrane: Unstructured Models for Lactic Acid Fermentation – A Review. *Food Technology and Biotechnology*, 49(1):3–12, 2011.
- [9] Chmiel, H. (Hrsg.): *Bioprozesstechnik*. Springer, Heidelberg, 3. Aufl., 2011.
- [10] Danisco Deutschland GmbH (Hrsg.): *Prozessleitplan zur Kultivierung des Stammes Streptococcus thermophilus 1974*. Firmeninterne Unterlagen zur Fermentationsdurchführung (unveröffentlicht), Niebüll, 2009.
- [11] Danone Ltd. (Hrsg.): *Probiotics News - Library - Scientific visuals - High resolution*. Online, verfügbar unter: <http://www.probioticsnews.creativetesting.co.uk/library/scientific-visuals/high-resolution>, Abruf am 22.05.2011.
- [12] Deutsche Forschungsgemeinschaft (Hrsg.): *Mikrobielle Kulturen für Lebensmittel: Endfassung vom 29.03.2010*. DFG Senatskommission zur gesundheitlichen Bewertung von Lebensmitteln SKLM, Bonn, 2010.

-
- [13] Edwards, V. H. und C. R. Wilke: Mathematical Representation of Batch Culture Data. *Biotechnology and Bioengineering*, 10(2):205–232, 1968.
- [14] EFSA Panel on Biological Hazards (Hrsg.): Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2013 update). *EFSA Journal*, 11(11):3449, 2013.
- [15] Farrow, J. A. E. und M. D. Collins: DNA Base Composition, DNA–DNA Homology and Long-chain Fatty Acid Studies on *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*. *Journal of General Microbiology*, 130(2):357–362, 1984.
- [16] Fuchs, G. (Hrsg.): *Allgemeine Mikrobiologie*. Thieme, Stuttgart, 8. Aufl., 2007.
- [17] Gilliland, S. E.: *Bacterial Starter Cultures for Foods*. CRC Press, Boca Raton, 1985.
- [18] Golub, G. H. und C. F. Van Loan: *Matrix Computations*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD, 4. Aufl., 2012.
- [19] Gustafsson, T. K., B. O. Skrifvars, K. V. Sandström und K. V. Waller: Modeling of pH for Control. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 34(3):820–827, 1995.
- [20] Hansen, E. B.: Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *International Journal of Food Microbiology*, 78(1):119–131, 2002.
- [21] Harvey, R. J.: Damage to *Streptococcus Lactis* Resulting from Growth at Low pH. *Journal of Bacteriology*, 90(5):1330–1336, 1965.
- [22] Hatzinikolaou, D. G. und H. Y. Wang: Quantitative Evaluation of the pH Profile in Organic Acid Fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, 37(2):190–195, 1991.
- [23] Hols, P., F. Hancy, L. Fontaine, B. Grossiord, D. Prozzi, N. Leblond-Bourget, B. Decaris, A. Bolotin, C. Delorme, S. Dusko Ehrlich, E. Guédon, V. Monnet, P. Renault und M. Kleerebezem: New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(3):435–463, 2005.
- [24] Holzapfel, W. (Hrsg.): *Lexikon Lebensmittel-Mikrobiologie und -Hygiene*. Behr's Verlag, Hamburg, 3. Aufl., 2004.
- [25] Hongo, M., Y. Nomura und M. Iwahara: Novel Method of Lactic Acid Production by Electrodialysis Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 52(2):314–319, 1986.

- [26] Horiuchi, J., T. Shimada, H. Funahashi, K. Tada, M. Kobayashi und T. Kanno: Artificial neural network model with a culture database for prediction of acidification step in cheese production. *Journal of Food Engineering*, 63(4):459–465, 2004.
- [27] Hörrmann, J.: *Prozessführung eines biotechnologischen Prozesses am Beispiel der Fermentation des Bakteriums Streptococcus thermophilus*. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, 2010.
- [28] Hutkins, R. W.: *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. Blackwell Publishing, Ames, 2006.
- [29] Hutkins, R. W. und N. L. Nannen: pH Homeostasis in Lactic Acid Bacteria. *Journal of Dairy Science*, 76(8):2354–2365, 1993.
- [30] Isermann, R.: *Identifikation dynamischer Systeme 1*. Springer, Berlin, 2. Aufl., 1992.
- [31] Iyer, R., S. K. Tomar, T. U. Maheswari und R. Singh: *Streptococcus thermophilus* strains: Multifunctional lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 20(3):133–141, 2010.
- [32] Lagarias, J. C., J. A. Reeds, M. H. Wright und P. E. Wright: Convergence Properties of the Nelder-Mead Simplex Method in Low Dimensions. *SIAM Journal on Optimization*, 9(1):112–147, 1998.
- [33] Law, B. A. und A. Y. Tamime (Hrsg.): *Technology of Cheesemaking*. Wiley-Blackwell, Chichester, 2. Aufl., 2010.
- [34] Leroy, F. und L. De Vuyst: Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2):67–78, 2004.
- [35] Leuchtenberger, A.: *Grundwissen zur mikrobiellen Biotechnologie*. Teubner, Stuttgart, 1998.
- [36] Lide, D. R.: *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. CRC Press, Boca Raton, 2004.
- [37] Lievense, L. C., K. van 't Riet und A. Noomen: Measuring and modelling the glucose-fermenting activity of *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 32(6):669–673, 1990.
- [38] Luedeking, R. und E. L. Piret: A Kinetic Study of the Lactic Acid Fermentation. Batch Process at Controlled pH. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering*, 1(4):393–412, 1959.

- [39] McNamee, J. M.: *Numerical methods for roots of polynomials: Part I*. Elsevier, Amsterdam, 2007.
- [40] Metz, H.: Probleme der Optimierung von Fermentationsverfahren. *Chemie Ingenieur Technik*, 43(1-2):60–65, 1971.
- [41] Monod, J.: The Growth of Bacterial Cultures. *Annual Reviews in Microbiology*, 3(1):371–394, 1949.
- [42] Mortimer, C. E. und U. Müller: *Chemie: Das Basiswissen der Chemie*. Thieme, Stuttgart, 10. Aufl., 2010.
- [43] Moser, A.: *Bioprocess Technology: Kinetics and Reactors*. Springer, New York, 1988.
- [44] Motulsky, H. J. und L. A. Ransnas: Fitting curves to data using nonlinear regression: a practical and nonmathematical review. *FASEB Journal*, 1(5):365–374, 1987.
- [45] Nannen, N. L. und R. W. Hutkins: Intracellular pH Effects in Lactic Acid Bacteria. *Journal of Dairy Science*, 74(3):741–746, 1991.
- [46] Nelder, J. A. und R. Mead: A simplex method for function minimization. *Computer Journal*, 7(4):308–313, 1965.
- [47] Nims, L. F. und P. K. Smith: The ionization of lactic acid from zero to fifty degrees. *Journal of Biological Chemistry*, 113(1):145–152, 1936.
- [48] Peebles, M. M., S. E. Gilliland und M. L. Speck: Preparation of Concentrated Lactic Streptococcus Starters. *Applied Microbiology*, 17(6):805–810, 1969.
- [49] Rault, A., M. Bouix und C. Béal: Fermentation pH Influences the Physiological-State Dynamics of *Lactobacillus bulgaricus* CFL1 during pH-Controlled Culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(13):4374–4381, 2009.
- [50] Salminen, S., A. von Wright und A. Ouwehand (Hrsg.): *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. Marcel Dekker, New York, 3. Aufl., 2004.
- [51] Schleifer, K. H., M. Ehrmann, U. Krusch und H. Neve: Revival of the Species *Streptococcus thermophilus* (ex Orla-Jensen, 1919) nom. rev. *Systematic and Applied Microbiology*, 14(4):386–388, 1991.
- [52] Soomro, A., T. Masud und A. Kiran: Role of Lactic Acid Bacteria (LAB) in Food Preservation and Human Health – A Review. *Pakistan Journal of Nutrition*, 1(1):20–24, 2002.

- [53] Spinnler, H. E. und G. Corrieu: Automatic method to quantify starter activity based on pH measurement. *Journal of Dairy Research*, 56(5):755–764, 1989.
- [54] Stanbury, P. F., A. Whitaker und S. J. Hall: *Principles of Fermentation Technology*. Butterworth-Heinemann, Oxford, 2. Aufl., 1995.
- [55] Stoer, J. und R. Bulirsch: *Numerische Mathematik 2*. Springer, Berlin, 5. Aufl., 2005.
- [56] The MathWorks Inc. (Hrsg.): *Optimization Toolbox User's Guide R2014a*. PDF, verfügbar unter: http://www.mathworks.de/help/releases/R2014a/pdf_doc/optim/optim_tb.pdf, Abruf am 16.07.2014.
- [57] Torrestiana S., B., E. Brito de la Fuente, C. Lacroix und L. Choplin: Modeling the acidifying activity profile of *Lactobacillus bulgaricus* cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41(2):192–196, 1994.
- [58] Tsuchiya, H. M., A. G. Fredrickson und R. Aris: Dynamics of microbial cell populations. *Advances in Chemical Engineering*, 6:125–206, 1966.
- [59] Weber, H. (Hrsg.): *Mikrobiologie der Lebensmittel: Milch und Milchprodukte*. Behr's Verlag, Hamburg, 2. Aufl., 2006.
- [60] Weber, H. (Hrsg.): *Mikrobiologie der Lebensmittel: Grundlagen*. Behr's Verlag, Hamburg, 9. Aufl., 2010.
- [61] Wernstedt, J.: *Experimentelle Prozeßanalyse*. Oldenbourg, München, 1989.
- [62] Westerlund, T., B. Skrifvars und S. Karrila: On the Uniqueness in pH Calculations. *Chemical Engineering Science*, 40(6):973–976, 1985.
- [63] Wiley Information Services GmbH (Hrsg.): *Grundlagen der Chromatographie*. Online, verfügbar unter: http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/3/anc/croma/chromatographie_grundlagen.vlu/Page/vsc/de/ch/3/anc/croma/basics/saulen_chr/chromatogramm/chromatogramm65ht1100.vscml.html, Abruf am 12.02.2013.
- [64] Zannini, E., S. Santarelli, A. Osimani, L. Dell'Aquila und F. Clementi: Effect of process parameters on the production of lactic acid bacteria in batch fermentation. *Annals of Microbiology*, 55(4):273–278, 2005.
- [65] Zeidler, E. (Hrsg.): *Teubner-Taschenbuch der Mathematik*. Teubner, Stuttgart, 1996.