

Dipl.-Ing. Andreas Buchen

Modellierung des Wachstums und  
der Einschlusskörperbildung des  
Bakteriums *Photorhabdus*  
*luminescens*



Modellierung des Wachstums und der  
Einschlusskörperbildung des  
Bakteriums *Photorhabdus  
luminescens*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Ingenieurwissenschaften

(Dr.-Ing.)

der Technischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Dipl.-Ing. Andreas Buchen**

Kiel

März 2007

1. Gutachter

Prof. Dr.-Ing H. Röck

2. Gutachter

Prof. Dr.-Ing C. Schmid

Datum der mündlichen Prüfung

16. März 2007

# Danksagung

Viele Menschen haben dazu beigetragen, dass ich diese Arbeit fertig stellen konnte. Einigen möchte ich an dieser Stelle danken.

Mein besonderer Dank geht an Prof. Dr.-Ing. H. Röck, dem Inhaber des Lehrstuhls für Automatisierung- und Regelungstechnik der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, für die Betreuung meiner Promotion. Er hat diese Arbeit mit vielfältigen Anregungen begleitet und sehr zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Prof. Dr.-Ing. C. Schmid von der Ruhr-Universität Bochum danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Des Weiteren danke ich der Innovationsstiftung Schleswig-Holstein, die wichtige Teile dieser Arbeit finanziell gefördert hat.

PD Dr. Ralf Ehlers, dem Leiter der Abteilung Biotechnologie und Biologischer Pflanzenschutz des Instituts für Phytopathologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und der e nema GmbH danke ich für die große Unterstützung und Zusammenarbeit.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Manuela Lieb, Kourosch Kolahi und Peter Seydel für ihre große fachliche Unterstützung, ihre Hilfsbereitschaft und ihre Aufmunterung bei dieser interdisziplinären Aufgabenstellung.

Thorsten Schröder, Ralf Storm, Inge Baumann, Peter Papazov, Ekaterina Papazova, Sonja Hollmer, Wei Zong, Dorothee Barth, Joachim Hörrmann danke ich sehr für die Anregungen in den zahlreichen Diskussionen.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Andrea Frahm, Andrea Fleischer und Saskia Sukop, die mich stets literarisch und moralisch unterstützt haben.

Mein Dank gilt Sönke Thomsen, Stefanie Gramke, Jörg Dannehl und Malte Wirbsinski, die als studentische Hilfskräfte und Studien- und Diplomarbeiter bereit waren, in dieses interdisziplinäre Projekt mit einzusteigen.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, Schwestern und Schwiegereltern für die große Unterstützung auf meinem Weg.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Frau Merle für den Rückhalt und die uneingeschränkte Unterstützung bedanken, die diese Arbeit möglich gemacht hat.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>2</b>
1.1	Motivation . . . . .	2
1.2	Aufgabenstellung . . . . .	3
1.3	Gliederung . . . . .	4
<b>2</b>	<b>Biologischer Pflanzenschutz</b>	<b>6</b>
2.1	Schädlingsbekämpfung mit Nematoden . . . . .	6
2.2	Das symbiotische Bakterium <i>Photorhabdus luminescens</i> . . . . .	7
2.3	Biotechnologische Produktion von Nematoden der Gattung <i>Heterorhabditis ssp.</i> . . . . .	9
<b>3</b>	<b>Einschlusskörper (CIP) des Bakteriums <i>Photorhabdus luminescens</i></b>	<b>12</b>
3.1	Einschlusskörperbildung bei <i>Photorhabdus luminescens</i> . . . . .	12
3.1.1	Aggregation und Bildung von Einschlusskörpern . . . . .	13
3.2	Voruntersuchung verschiedener Kultivierungsbedingungen auf die Einschlusskörperbildung . . . . .	13
3.3	Quantifizierung der Einschlusskörper . . . . .	15
3.3.1	Mikroskopische Untersuchung der Einschlusskörper . . . . .	15
3.3.2	Zellaufschluss . . . . .	15
3.3.3	Aufreinigung der Einschlusskörper zur Gewinnung eines CIP-Protein-Standards . . . . .	17
3.3.4	ELISA-Verfahren zur Quantifizierung der CIP . . . . .	17
3.3.5	Chromatographische Identifizierung und Quantifizierung der CIP	20

---

<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>23</b>
4.1	Organismus, Kultivierungsmedium und Kultivierungsbedingungen . . .	23
4.1.1	Organismus . . . . .	23
4.1.2	Definiertes Kultivierungsmedium (DKM) . . . . .	23
4.1.3	Standard-Kultivierungsbedingungen (SKB) . . . . .	25
4.2	Methoden zur Quantifizierung des Einschlusskörperproteins . . . . .	25
4.2.1	CIP-Aufreinigung . . . . .	25
4.2.2	SDS-PAGE-Verfahren . . . . .	26
4.2.3	Herstellung von polyklonalen Antikörpern . . . . .	27
4.3	Standard Offline-Analysen . . . . .	27
4.3.1	Aminosäurenanalyse . . . . .	27
4.3.2	Glukosebestimmung . . . . .	27
4.3.3	ELISA-Verfahren zur CIP-Proteinbestimmung . . . . .	27
4.3.4	Bestimmung der Anzahl der Zellen mit CIP . . . . .	28
4.3.5	Biotrockenmassebestimmung . . . . .	28
4.3.6	Bestimmung der Zelldichte . . . . .	28
4.4	Versuchsanlage . . . . .	29
4.5	Online-Messtechnik . . . . .	32
4.5.1	Standard-Messtechnik der Kontrollvariablen . . . . .	32
4.5.2	Online-Trübungsmessung . . . . .	33
4.5.3	Online-Glukosemessung . . . . .	34
4.5.4	Abgasanalyse . . . . .	35
4.6	Prozessüberwachung und Prozessführung . . . . .	39
4.6.1	Struktur des Prozessleitsystems . . . . .	39



---

<b>5</b>	<b>Modellierung</b>	<b>44</b>
5.1	Modellierung mikrobiologischer Systeme . . . . .	46
5.2	Modellierungskonzept . . . . .	49
5.2.1	Einfache Modellstruktur . . . . .	50
5.2.2	Erweiterung der Modellstruktur für eine strukturierte Beschreibung der Zelle . . . . .	55
5.2.3	Erweiterung der Modellstruktur für eine segregierte Beschreibung der biotischen Phase . . . . .	62
5.2.4	Die Reaktionskinetiken . . . . .	67
5.3	Modelle für das Bakterium <i>Photorhabdus luminescens</i> . . . . .	69
5.3.1	Das YS-Modell . . . . .	69
5.3.2	Das Amino-Modell . . . . .	72
5.4	Erweiterung der Modellansätze . . . . .	77
5.4.1	Versuchsauswertung . . . . .	78
5.4.2	CIP-Modellansatz 1 . . . . .	90
5.4.3	CIP-Modellansatz 2 . . . . .	103
<b>6</b>	<b>Zustandsschätzung</b>	<b>107</b>
6.1	Beobachter für dynamische Systeme . . . . .	107
6.1.1	Beobachter für lineare Systeme . . . . .	109
6.1.2	Beobachter für nichtlineare Systeme . . . . .	110
6.1.3	Zustandserweiterung . . . . .	114
6.1.4	Abgetastete Systeme . . . . .	114
6.2	Optimierungsbasierte Beobacherverfahren . . . . .	115
6.2.1	Least Square Formulierung . . . . .	116
6.2.2	Zustandsschätzung auf bewegtem Horizont . . . . .	120
6.2.3	Beschränkungen bei der Zustandsschätzung . . . . .	123
6.2.4	Diskretisierung kontinuierlicher Differentialgleichungen durch Kollokation . . . . .	123

6.3	Zustandsschätzung auf bewegtem Horizont für unterschiedliche Abstraten . . . . .	127
6.4	Anwendung der Zustandsschätzung auf bewegtem Horizont . . . . .	128
6.4.1	Anwendungsbeispiel . . . . .	132
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>136</b>

# Symbolverzeichnis

## Generelle Notation

$A, a, \alpha, \dots$  - Skalare

$\underline{A}, \underline{a}, \dots$  - Vektoren

$\mathbf{A}, \mathbf{a}, \dots$  - Matrizen

$c_{\{\dots\}}$  - Stoffmengenkonzentration in  $\text{mol l}^{-1}$

$C_{\{\dots\}}$  - Massenkonzentration in  $\text{g l}^{-1}$

$n_{\{\dots\}}$  - Stoffmenge in mol

$M_{\{\dots\}}$  - Molare Masse in  $\text{g mol}^{-1}$

$m_{\{\dots\}}$  - Stoffportion in g

$q_{\{\dots\}}$  - zellspezifische Rate in  $\text{h}^{-1}$

$r_{\{\dots\}}$  - absolute Rate in  $\text{g l}^{-1} \text{h}^{-1}$

## Lateinische Buchstaben

$\mathbf{A}$  - Systemmatrix

$a_{P_j,i}$  - Koeffizient des  $i$ -ten Produktes in der  $j$ -ten Reaktion

$\mathbf{A}_P$  -  $p \times m$  Koeffizientenmatrix der  $m$  Produkte in den  $p$  Reaktionen

$a_{S_j,i}$  - Koeffizient des  $i$ -ten Substrates in der  $j$ -ten Reaktion

$\mathbf{A}_S$  -  $p \times n$  Koeffizientenmatrix der  $n$  Substrate in den  $p$  Reaktionen

$a_{X_j}$  - Koeffizient der Zelle in der  $j$ -ten Reaktion

$\underline{a}_X$  -  $p \times 1$  Koeffizientenvektor der Zelle in den  $p$  Reaktionen

$a_{Z,j,i}$  - Koeffizient des  $i$ -ten zellinternen Stoffes in der  $j$ -ten Reaktion

$\mathbf{A}_Z$  -  $p \times q$  Koeffizientenmatrix der  $q$  zellinternen Stoffe in den  $r$  Reaktionen

- B** - Eingangsmatrix
- C** - Ausgangsmatrix
- $\underline{f}$  - Zustandsvektorfunktion
- $g$  - Erdbeschleunigung  $9,81 \text{ m s}^{-2}$
- $\underline{h}$  - Ausgangsvektorfunktion
- $k_{la}$  - Transportkoeffizient über die Phasengrenzfläche
- $m$  - Anzahl der Produkte
- $M_{O_2}$  - Molare Masse von Sauerstoff( $O_2$ )  $31,9988 \text{ g mol}^{-1}$
- $M_{CO_2}$  - Molare Masse von Kohlendioxid  $44,01 \text{ g mol}^{-1}$
- $\mathbb{N}$  - Menge der natürlichen Zahlen
- $n$  - Anzahl der Substrate
- $\underline{P}$  -  $m \times 1$  Produktvektor in der abiotischen Phase
- $p$  - Druck
- $p$  - Anzahl der Reaktionen
- P** - Kovarianzmatrix der Zustände
- $q$  - Anzahl der internen Zustände
- $q_{g,zu}$  - Zuluftstrom in den Reaktor in  $\text{l h}^{-1}$
- $q_{g,ab}$  - Abluftstrom aus dem Reaktor in  $\text{l h}^{-1}$
- $\underline{q}_P$  -  $m \times 1$  Vektor der zellspezifischen Produktbildungsraten in  $\text{h}^{-1}$
- $\underline{q}_S$  -  $n \times 1$  Vektor der zellspezifischen Substratverbrauchsraten in  $\text{h}^{-1}$
- $\mu$  - spezifische Wachstumsgeschwindigkeit in  $\text{h}^{-1}$
- $\underline{q}_Z$  -  $q \times 1$  Vektor der zellspezifischen Raten mit der die zellinternen Stoffe gebildet werden in  $\text{h}^{-1}$
- Q** - Kovarianzmatrix der Störung auf die Zustände
- $\mathbf{Q}_b$  - Beobachtungsmatrix

- 
- $r_i$  - Reaktionsgeschwindigkeit der  $i$ -ten Reaktion in  $\text{h}^{-1}$
- $r_{O_2}$  - Sauerstoffaufnahme in  $\text{g l}^{-1} \text{h}^{-1}$
- $r_{CO_2}$  - Kohlendioxidproduktionsrate in  $\text{g l}^{-1} \text{h}^{-1}$
- $\mathbb{R}$  - Menge der reellen Zahlen
- $\mathbf{R}$  - Kovarianzmatrix der Störung auf den Ausgang
- $\underline{S}$  -  $n \times 1$  Substratvektor in der abiotischen Phase
- $T$  - Abtastzeit
- $T\underline{u}$  - Eingangsvektor
- $V_L$  - Volumen der flüssigen Phase in l
- $V_G$  - Volumen der gasförmigen Phase in l
- $V_N$  - Molvolumen
- $\underline{v}$  - Störungen die auf die Ausgänge wirken
- $\underline{w}$  - Störungen die auf die Zustände wirken
- $X$  - Zelltyp aus dem die biotische Phase besteht
- $\underline{x}$  - Zustandsvektor
- $y_{CO_2, zu}$  - Kohlendioxidmolanteil in der Zuluft
- $y_{CO_2, ab}$  - Kohlendioxidmolanteil in der Abluft
- $y_{O_2, zu}$  - Sauerstoffmolanteil in der Zuluft
- $y_{O_2, ab}$  - Sauerstoffmolanteil in der Abluft
- $\underline{y}_Z$  -  $q \times 1$  Vektor der Gewichtsanteile der zellinternen Stoffe am Gesamtgewicht der Zelle
- $\underline{y}$  - Ausgangsvektor
- $\underline{Z}$  -  $q \times 1$  Vektor der zellinternen Stoffe



# Kurzfassung

Das Bakterium *Photobacterium luminescens* wird zusammen mit den Nematoden (Fadenwürmer) der Gattung *Heterorhabditis ssp.* erfolgreich zur Bekämpfung von im Boden lebenden Schadinsekten eingesetzt. Bei deren Produktion im industriellen Maßstab dienen Kulturen des Bakteriums als Vorkultur. Aufgrund starker symbiotischer Beziehungen beeinflusst der Zustand der Bakterienvorkultur stark die Entwicklung der Nematoden und damit die Ausbeute der Produktion.

Während des Wachstums von *P. luminescens* bilden sich kristalline, aus Proteinen aufgebaute Einschlusskörper. Die Menge an gebildeten Einschlusskörpern und die Bakteriendichte sind wesentliche, die Nematodenentwicklung beeinflussende Faktoren. Mit Hilfe von mathematischen Wachstumsmodellen sind geeignete Prozessführungsstrategien realisierbar. Diese überführen die Bakterienkultur in einen definierten Zustand zum Zeitpunkt der Nematodeninokulation. So können schwankende Ausbeuten im Produktionsprozess vermieden werden und eine weitere Untersuchung der symbiotischen Beziehung zwischen Bakterien und Nematoden wird hierdurch ermöglicht.

Eine Voraussetzung für die Implementierung dieser Strategien ist eine detaillierte Information über die internen Zustände des Prozesses (Substratkonzentrationen, Biomasse, Einschlusskörperprotein, etc), die aber bei biotechnologischen Prozessen meist schwer online zu erlangen sind.

Auf der Basis von neu eingesetzten bioanalytischen Verfahren zur Quantifizierung des Einschlusskörperproteins wurden erweiterte mathematische Modelle für das Wachstum des Bakteriums *P. luminescens* entwickelt. Diese Modelle ermöglichen, sowohl die Populationsentwicklung als auch die Produktion von Einschlusskörperproteinen in Abhängigkeit von den zugefütterten Substraten zu beschreiben.

Die neu entwickelten Wachstumsmodelle dienen als Grundlage für den Entwurf eines Zustandsschätzverfahrens, welches für unterschiedliche Abtastzeiten und große Modellunsicherheiten geeignet ist. In dieser Arbeit wird ein Software-Sensor beschrieben, der auf der Zustandsschätzung auf einem bewegtem Zeithorizont basiert (Moving Horizon Estimation, MHE). Dieses Verfahren wird erfolgreich zur Schätzung der Biomasse und des zellinternen Einschlusskörperproteins bei der Kultivierung des Bakteriums *Photobacterium luminescens* eingesetzt.

# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Motivation

Entomopathogene Nematoden, EPN (Fadenwürmer) der Gattung *Heterorhabditis ssp.* werden erfolgreich zur Bekämpfung von im Boden lebenden Schadinsekten eingesetzt [12]. Die Nematoden sind über eine Symbiose mit den Bakterien der Gattung *Photorhabdus luminescens* verbunden, die als Hauptnahrungsquelle für die Nematoden dienen.

Der Einsatz der EPN als ein kommerziell nutzbares, biologisches Pflanzenschutzmittel weist zahlreiche ökologische Vorteile auf. Die EPN sind hoch effektiv und übertreffen in der Bekämpfung häufig chemische Pflanzenschutzmittel, sie sind gänzlich unschädlich für den Menschen und stellen keine Belastung für die Böden und das Grundwasser dar. Die EPN sind sehr selektiv und haben nur eine geringe Wirkung bei Nicht-Zielorganismen, so dass das ökologische Umfeld kaum gestört wird. In nahezu allen Ländern können EPN ohne Beschränkungen eingesetzt werden [15].

Eine wichtige Voraussetzung für die Nutzung und Etablierung als biologisches Pflanzenschutzmittel ist die Massenproduktion zu niedrigen Kosten. Besonders geeignet für die Massenproduktion ist die *in vitro* Kultivierung in Flüssigkultur mit Rührkesselreaktoren. Hierbei dienen Kulturen des Bakteriums *P. luminescens* als Vorkultur [13].

Da zwei Organismen zusammen in einem Rührkessel kultiviert werden und einer davon sogar ein mehrzelliger Organismus ist, muss die Populationsdynamik und die symbiotische Wechselwirkung zwischen den Organismen verstanden sein, um den Produktionsprozess effektiv gestalten zu können. Bei der industriellen Kultivierung treten jedoch noch sehr große Schwankungen in der Ausbeute der Nematoden auf [24], die auf eine starke Variabilität der Bakterienkultur und ein unzureichendes Verständnis der Symbiose zurückzuführen sind.

Definierte und reproduzierbare Kultivierungsbedingungen für alle Teilprozesse sind notwendig, um die Symbiose tiefergehend zu erforschen und um eine gleichbleibend hohe Produktausbeute zu garantieren [46].



Moderne modellbasierte Methoden der Regelungstechnik stellen vielversprechende Lösungsansätze für derartige nichtlineare instationäre Prozesse dar. Für den praktischen Einsatz solcher Konzepte ist eine adäquate Systembeschreibung und das Vorhandensein von relevanten Prozessdaten notwendig [21].

Gerade im Bereich der biotechnologischen Verfahrenstechnik fehlen häufig geeignete Messinstrumente um relevante Zustandsgrößen wie die Biomasse, die Produkte oder die Medienkonzentrationen zu erfassen. Diese Zustandsgrößen sind aber die unverzichtbare Grundlage für die Realisierung einer geeigneten Prozessführung [43].

Gerade hier können modellgestützte Beobachterverfahren oder Software-Sensoren eingesetzt werden, um auf der Grundlage von einem Prozessmodell und den vorhandenen Prozessdaten die nicht messbaren Zustandsgrößen zu rekonstruieren.

In einer Kooperation des Lehrstuhls für Automatisierungs- und Regelungstechnik mit dem Institut für Phytopathologie der Christians-Albrechts-Universität zu Kiel, mit Unterstützung der Firma e~nema und der Technologiestiftung Schleswig-Holstein, werden die Grundlagen für die Automatisierung und die modellgestützte Regelung für die Produktion von EPN erarbeitet. Ziel ist es zum einen, den Einsatz moderner Methoden der Regelungstechnik in der Biotechnologie zu erforschen und zum anderen das Produkt EPN zu einer konkurrenzfähigen Alternative zur herkömmlichen chemischen Schädlingsbekämpfung zu machen.

## 1.2 Aufgabenstellung

Um die schwankenden Ausbeuten bei dem Produktionsprozess der EPN zu vermeiden wird der Prozess in Teilprozesse aufgeteilt. Ein Teilprozess ist die Bakterienkultur, deren Zustand die Nematodenentwicklung entscheidend beeinflusst.

Während des Wachstums von *P. luminescens* bilden sich kristalline, aus Proteinen aufgebaute Einschlusskörper (CIP<sup>1</sup>). Das Vorhandensein dieser Einschlusskörper in hoher Konzentration begünstigt die Entwicklung der Nematoden in großem Maße. Die Menge an gebildeten Einschlusskörpern ist damit ein wesentlicher, die Ausbeute der Nematodenproduktion beeinflussender Faktor.

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines mathematischen Modells für das Wachstum des Bakteriums *P. luminescens*, welches es ermöglicht, sowohl die Populationsentwicklung als auch die Produktion von Einschlusskörperproteinen in Abhängigkeit von den zugefütterten Substraten zu beschreiben.

Um die Einschlusskörperbildung zu untersuchen, müssen geeignete Mess- und Analyseverfahren zur Identifizierung und Quantifizierung erarbeitet und erprobt werden.

---

<sup>1</sup>Criystalline Inclusion Protein

Auf Grundlage der neu zur Verfügung stehenden Analysetechnik sollen Batch- und Fed-Batch-Experimente in Laborfermentern durchgeführt werden, um den Einfluss der Medienzusammensetzung auf die CIP-Bildung zu untersuchen.

Da die Analyseverfahren zur Bestimmung des CIP-Proteins nicht online einsetzbar sind, liegt ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit in der Untersuchung geeigneter nichtlinearer Beobachterverfahren zur modellgestützten Schätzung des CIP-Proteins. Ein solches Beobachterverfahren soll aus messbaren Prozessgrößen wie Trübung, Sauerstoffgehalt im Abgas oder Substratkonzentrationen eine Schätzung der CIP-Konzentration erlauben. Hierbei ist die bestehende online-Prozesstechnik zu erweitern und der Integrationsgrad der Versuchsanlage zu erhöhen.

### 1.3 Gliederung

In *Kapitel 2* wird auf die Grundlagen des biologischen Pflanzenschutzes mit Nematoden eingegangen, hierbei wird kurz der Einsatz und die Wirkungsweise der Nematoden erläutert. Des Weiteren wird die Problematik der Massenproduktion der Nematoden beschrieben und das symbiotische Bakterium *P. luminescens* näher betrachtet.

Die Eigenschaft des Bakteriums *P. luminescens* kristalline proteinhaltige Einschlusskörper (CIP) zu bilden, wird in *Kapitel 3* näher untersucht. Es werden die vorhandenen Informationen zusammengestellt und es wird auf die Analyseverfahren zur Quantifizierung eingegangen.

*Kapitel 4* stellt die für die weitere experimentelle Untersuchung verwendeten Materialien und Methoden zusammen. Es wird der Aufbau der Versuchsanlage beschrieben und die vorhandenen Prozesssensoren sowie die Prozessleittechnik erläutert.

Die Modellierung des Wachstums von *P. luminescens* mit speziellem Augenmerk auf die CIP-Bildung in einem definierten Kultivierungsmedium ist Gegenstand von *Kapitel 5*. Es wird zunächst ein einheitlicher Formalismus zur Beschreibung biotechnologischer Systeme vorgeschlagen, mit dessen Hilfe alle, in dieser Arbeit behandelten Modelle, dargestellt werden. Die bereits existierenden Modelle für das Bakterium werden zusammengefasst. Auf der Grundlage neuer Experimente wird ein erweiterter Modellansatz präsentiert, der eine Vielzahl von Stoffwechsellumstellungen und die CIP-Bildung beschreiben kann. Eine Vereinfachung des neuen Modells wird als Grundlage für die Anwendung modellbasierter Prozessbeobachtungs- und Prozessführungsverfahren vorgeschlagen.

Das *Kapitel 6* betrachtet den Einsatz von Beobachterverfahren in Hinsicht auf den Einsatz in biotechnologischen Prozessen. Nach einer kurzen Einleitung in die Problematik der nichtlinearen Zustandsbeobachtung wird ein spezielles Beobachterver-

---

fahren vorgestellt, das Verfahren der Beobachtung auf einem bewegten Horizont, der MHE-Beobachter (Moving-Horizon-Estimation). Die Vorzüge dieses Verfahrens im Zusammenhang mit biotechnologischen Prozessen werden dargestellt. In einem Anwendungsbeispiel, bei dem dieses Beobachterverfahren in einem Software-Sensor eingesetzt wird, bestätigen die Vorzüge.

Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen und weiterzuführende Arbeiten sind in *Kapitel 7* zusammengefasst.

# Kapitel 2

## Biologischer Pflanzenschutz

Unter biologischem Pflanzenschutz ist im engeren Sinne die Verwendung lebender Organismen mit dem Ziel zu verstehen, die Populationsdichte oder die Auswirkungen von Schadorganismen so weit zu vermindern, dass der wirtschaftliche Schaden weitgehend reduziert wird [18]. In jeder intensiven Landwirtschaft und gartenbaulichen Produktion ist die Schädlingsbekämpfung ein unverzichtbares Instrument. Insektenlarven, die ihren bevorzugten Lebensraum im Boden haben und durch Wurzelfraß einen hohen Schaden an Nutzpflanzen anrichten, stellen ein besonderes Problem dar. Die Bekämpfung dieser im Boden lebenden Insekten ist nur unter einem unverhältnismäßig hohen Aufwand an chemischen Pflanzenschutzmitteln oder überhaupt nicht möglich. Die besonderen Eigenschaften des komplexen Mediums Boden mit seiner großen Absorbtiionsfläche und der mikrobiologischen Aktivität, erfordern den Einsatz hoch toxischer Stoffe, um die Schädlinge zu bekämpfen. Hohe Sicherheitsrisiken für Umwelt und Verbraucher haben zu einem weitgehenden Anwendungsverbot konventioneller Bodeninsektizide geführt.

Die biologische Schädlingsbekämpfung ist zum Teil der einzige Weg, um diese Schädlinge bei minimalen Einflüssen auf die menschliche Gesundheit und die Umwelt zu bekämpfen. Ein hervorragendes biologisches Schädlingsbekämpfungsmittel sind entomopathogene Nematoden, Fadenwürmer, die bei Insekten krankheitserregend wirken. Sie kommen als natürliche Antagonisten von Insekten vor, die als Pflanzenschädlinge im Boden leben [47].

### 2.1 Schädlingsbekämpfung mit Nematoden

Entomopathogene Nematoden sind ca. 1mm lange Fadenwürmer, die in der Lage sind im Boden lebende Insektenlarven aufzuspüren und in diese einzudringen. Die kommerziell genutzten entomopathogenen Nematoden gehören in die Gattungen *Steinernema* und *Heterorhabditis*, welche mit den Bakterien der Gattung *Xenorhabdus* bzw. *Photorhabdus* vergesellschaftet sind. Der Lebenszyklus der Nematoden ist in Abbildung 2.3 dargestellt.



Abb. 2.1: Befallene Insektenlarve mit Nematoden, die zu Tausenden den Kadaver verlassen.

Quelle: Ehlers

Sobald die infektiösen Stadien dieser Nematoden, bezeichnet als Dauer Juvenile (DJ), in ein Insekt eingedrungen sind, entlassen sie ihr symbiotisches Bakterium aus dem Darmlumen. Die Bakterien produzieren Toxine und andere Produkte, um das Immunsystem des Insekts zu überwinden. Sie töten das Insekt innerhalb von 1-2 Tagen nachdem die Nematoden eingedrungen sind. *Heterorhabditis spp* sind nicht in der Lage ohne das Bakterium *P. luminescens* das Insekt zu töten. Die Bakterien vermehren sich in dem Insekt und stellen geeignete Bedingungen für die Reproduktion der Nematoden her. Die Nematoden ernähren sich von den Bakterien und produzieren Nachkommen. Wenn die Nährstoffe verbraucht sind, entwickeln sich die Nematoden wieder bis zum DJ-Stadium, lagern Bakterien in ihrem Darm ein und verlassen den Kadaver, siehe Abbildung 2.1, auf der Suche nach neuen Wirtsorganismen [15].

Bei der Anwendung im Pflanzenschutz zeichnen sich die entomopathogenen Nematoden durch einen hohen Wirkungsgrad aus. Sie sind weder für Pflanzen noch für Wirbeltiere schädlich, die Nebenwirkungen auf den Naturhaushalt sind gering und sie können auf artifiziellen Medien vermehrt werden.

## 2.2 Das symbiotische Bakterium *Photorhabdus luminescens*

Das Bakterium *P. luminescens*, Abbildung 2.2, stellt zwar die Nahrungsquelle der Nematoden dar, doch wenn die Nährstoffe im Insektenkadaver zur Neige gehen, werden sie ohne verdaut zu werden, intakt im Darm der Nematoden eingelagert. Sie benutzen so die Nematoden, um von einem Insekt zum anderen übertragen zu werden.

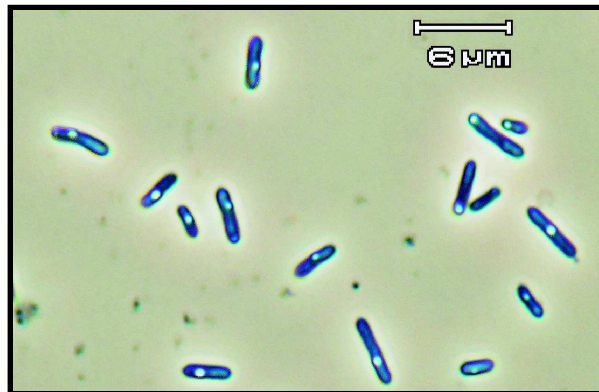


Abb. 2.2: Das symbiotische Bakterium *P. luminescens* mit deutlich zu erkennenden kristallinen Einschlüssen.

Die molekularbiologischen Eigenschaften des Bakteriums wurden von Forst und Nealson [17] beschrieben. Hierbei besteht auch ein großes kommerzielles Interesse an den von den Bakterien produzierten Toxinen, die für ihre Pathogenität verantwortlich sind.

Typisch für das symbiotische Bakterium ist das Phänomen der Phasenvariation, dessen Extreme als Primär- und Sekundärform bezeichnet werden [1]. Die Primärform wird aus Nematoden im DJ-Stadium oder aus befallenen Insekten gewonnen, während die Sekundärform meistens nach in vitro Subkultivierung beobachtet wird. Bakterien der Sekundärform werden nicht von den Nematoden im DJ-Stadium eingelagert. Die Sekundärform der Bakterien kann durch Kultivierung der Primärform unter verschiedenen Stressbedingungen, wie z.B. geringem osmotischen Druck, induziert werden. Begleitet wird der Phasenwechsel zur Sekundärform durch den Verlust von zahlreichen metabolischen Funktionen, wie die Produktion von Proteasen, Lipasen, intrazellulären kristallinen Proteinen (CIP), Antibiotika und Pigmenten [4]. Der größte Nachteil jedoch ist, dass die Sekundärform der Bakterien einen signifikant negativen Effekt auf die Entwicklung der Nematoden und die Ausbeute hat. Hierbei ist das intrazelluläre kristalline Protein von größter Wichtigkeit für die Versorgung der Nematoden mit Nährstoffen [40]. In jedem Fall sollte einem Phasenwechsel zur Sekundärform, durch Reduzierung von Stressfaktoren, vorgebeugt werden. Die grundlegenden Mechanismen, die den Phasenwechsel verursachen, sind bis heute unbekannt, wie auch noch zahlreiche symbiotische Mechanismen zwischen den Bakterien und den Nematoden.

## 2.3 Biotechnologische Produktion von Nematoden der Gattung *Heterorhabditis* ssp.

Die Massenproduktion von entomopathogenen Nematoden der Gattung *Heterorhabditis* ssp. geschieht in Flüssigkultur [15]. Hierzu wird der natürliche Lebenszyklus der Nematoden auf den biotechnologischen Prozess abgebildet, siehe Abbildung 2.3. Das symbiotische Bakterium und die Nematoden werden aus befallenen Insektenlarven gewonnen und für die in vitro Kultivierung vorbereitet. Im Bioreaktor werden die Bakterien 24 h - 36 h kultiviert, siehe Abbildung 2.4, bis DJ-Larven inokuliert werden. Die Recovery (Entwicklung) der Nematoden beginnt und die DJ-Larven entwickeln sich zu selbstbefruchtenden Hermaphroditen, die Eier legen. Nach ca. 12 Tagen Kultivierung der Nematoden haben sich wieder DJ-Stadien im Reaktor entwickelt, die dann geerntet, entsprechend formuliert und verpackt werden, um sie als biologisches Pflanzenschutzmittel einzusetzen.

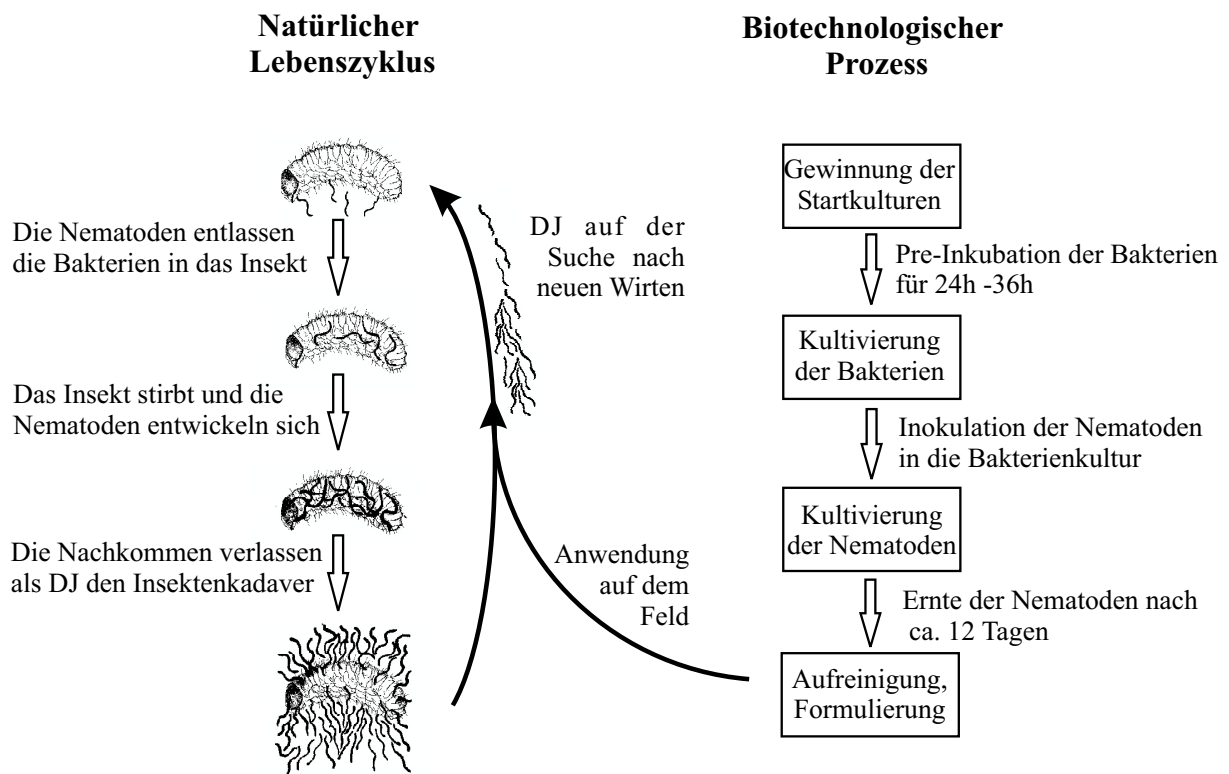


Abb. 2.3: Lebenszyklus der entomopathogenen Nematoden und das Flussdiagramm des biotechnologischen Produktionsprozesses.

Die Massenproduktion der EPN ist mit großen Schwankungen der Ausbeute und der

Prozessstabilität verbunden.

Optimale Prozessparameter für das Wachstum und die Reproduktion des Nematoden-Bakterienkomplexes konnten, aufgrund der großen Variabilität der Populationsentwicklung, noch nicht ausreichend untersucht werden.

Es fehlt die Möglichkeit, die Populationsdynamik gezielt gestalten zu können. Grundsätzlich wird die Entwicklung durch das Vorhandensein von Nahrung (Bakterien) gesteuert. Hohe Konzentrationen induzieren die Recovery aus dem DJ-Stadium und die Entwicklung der Nematoden. Eine niedrige Nahrungsversorgung und eine hohe Nematodenkonzentration veranlassen hingegen die Nematoden, sich in das DJ-Stadium zu entwickeln.



Abb. 2.4: Forschungs-Bioreaktor mit einer Kultur des Bakteriums *P. luminescens* am Lehrstuhl für Automatisierungs- und Regelungstechnik der CAU zu Kiel.

Als Hauptgrund für die hohe Variabilität des Prozesses und der Ausbeute wird die nicht vorhersagbare und asynchron ablaufende DJ-Recovery der in vitro Kultur angesehen. Im Insekt findet eine nahezu 100 %-Recovery der Nematoden statt, für die



### 2.3 Biotechnologische Produktion von Nematoden der Gattung *Heterorhabditis* ssp.11

unbekannte „Food Signals“ verantwortlich gemacht werden. In einem Flüssigmedium kann das Food Signal nur durch vorherige Kultivierung des symbiotischen Bakteriums erzeugt werden, hierdurch wird erst die *in vitro* Nematodenproduktion möglich. Bei diesem Prozess werden jedoch nur 18% - 90% der inokulierten Dauerlarven veranlasst sich zu entwickeln [48].

Die Bakterienvorkultur und ihr Stadium (definiert durch die Bakteriendichte und metabolischen Produkte) zum Zeitpunkt der Nematodeninokulation haben also einen entscheidenden Einfluss auf die Nematoden-Recovery und deren weitere Entwicklung.

Die Phasenvariation der Bakterien spielt hierbei ebenfalls eine große Rolle, da die Bakterien der unterschiedlichen Phasen verschiedene metabolische Produkte erzeugen.

Nur wenn bei dem Bakterienprozess gewährleistet werden kann, dass die Bakteriendichte und die metabolischen Zwischen- und Endprodukte reproduzierbar erzeugt werden können, kann die Recovery und der gesamte sich anschließende Prozess zur Nematodenkultivierung systematisch untersucht werden.

Jede Abweichung von den definierten Kultivierungsbedingungen kann die Bildung von Bakterien der Sekundärphase verursachen und die Nematodenentwicklung beeinträchtigen.

Um eine systematische Untersuchung der Recovery in dem *in vitro* Produktionsprozess zu ermöglichen, wurde ein synthetisches, genau definiertes Kultivierungsmedium entwickelt [44]. Mit diesem Kultivierungsmedium und mit geeigneten Zufütterstrategien der Nährstoffe kann dann gezielt und reproduzierbar ein definierter Zustand der Bakterienkultur zum Zeitpunkt der Nematodeninokulation eingestellt werden.

# Kapitel 3

## Einschlusskörper (CIP) des Bakteriums *Photorhabdus luminescens*

Primärformen des Bakteriums *P. luminescens* bilden während des Wachstums kristalline, aus Proteinen aufgebaute Einschlusskörper (CIP). Das Vorhandensein der Einschlusskörper in hoher Zahl begünstigt die Entwicklung der Nematoden in großem Maße. Die Menge an gebildeten Einschlusskörpern ist damit ein wesentlicher, die Ausbeute der Nematoden beeinflussender Faktor.

Dieses Kapitel stellt die vorhandenen Informationen über die Einschlusskörperbildung zusammen und beschreibt die möglichen Identifizierungs- und Quantifizierungsverfahren für das Einschlusskörperprotein.

### 3.1 Einschlusskörperbildung bei *Photorhabdus luminescens*

Zellen der Primärform des Bakteriums *P. luminescens* können zwei Typen intrazellulärer Einschlüsse in ihrem Cytoplasma produzieren. Die beiden Typen von Einschlusskörpern bestehen jeweils aus einem Proteinmonomer mit einer molekularen Masse von 11.000 Da. Die kristallinen Einschlüsse sind mit einem Phasenkontrastmikroskop bei 1000-facher Vergrößerung als leuchtende Punkte, siehe Abbildung 2.2, erst am Ende der exponentiellen Wachstumsphase in den Zellen sichtbar. Wenn sie während der stationären Wachstumsphase ihre maximale Größe erreichen, stellen sie ca. 40% des gesamten zellulären Proteins dar. Bereits Mitte der exponentiellen Wachstumsphase kann das CIP-Protein das erste Mal mit spezifischen polyklonalen Antikörpern in den Zellen detektiert werden. Das Protein wird nicht an das Kulturmedium abgegeben. Zellen der Sekundärform enthalten keine messbaren Anteile der Proteine. Die Menge an gebildetem Einschlusskörperprotein hängt stark von dem Kultivierungsmedium ab. Die Einschlusskörper scheinen keine Form von Nährstoffspeicher für die Bakterien zu sein, da sie nicht in der Periode des Alterns und in Perioden

des Nährstoffmangels verwendet werden [5] [2]. Für die Nematoden jedoch stellen die Einschlusskörper wichtige Nährstoffreservoirs dar, da die Einschlusskörper hohe Konzentrationen von verschiedenen Aminosäuren wie Lysin, Methionin, Valin, Leucin und Isoleucin [10] besitzen, welche für die Nematodenvermehrung essentiell sind [23]. Des Weiteren besitzen die Einschlusskörper keine pathogene Wirkung bei Insekten, wie dies bei anderen bekannten Einschlusskörpern von *Bacillus turingensis* der Fall ist.

Die Funktion des Einschlusskörperproteins für das Bakterium *P. luminescens* ist noch unbekannt. Die Tatsache, dass das Bakterium einen ungewöhnlich hohen Aufwand betreiben muss, so große Mengen des Proteins zu bilden, legt die Vermutung nahe, dass es eine wichtige Rolle für das Bakterium spielen muss.

#### 3.1.1 Aggregation und Bildung von Einschlusskörpern

Durch Überexpression der entsprechenden Gene kann die Konzentration von Proteinen in der Zelle weit über ihren natürlichen Wert hinaus angehoben werden. Unter Überexpression ist die erhöhte Expressions- bzw. Transkriptionsrate eines Gens zu verstehen. Voraussetzungen für eine erhöhte Proteinkonzentration sind gesteigerte Transkriptionsraten des codierenden Gens, erhöhte Translationsraten der entsprechenden mRNA oder eine erhöhte Stabilität des Proteins durch verminderten proteolytischen Abbau. Die Überexpression bestimmter Proteine als Antwort auf unterschiedliche Milieubedingungen, z.B. ein verändertes Nahrungsangebot oder Temperaturschwankungen, ist für einen regulierbaren Stoffwechsel unverzichtbar. Natürliche Überexpressionssysteme sind immer induzierte (aktivierte) Systeme [28].

Eine hohe Überexpression hydrophober Proteine führt häufig zur Aggregatbildung. Diese Aggregate können in Bakterien und Eukaryonten auftreten. Sie bestehen vorwiegend aus Protein, das nicht in nativer Konformation vorliegt. Fehlende Cofaktoren oder die Abwesenheit der mit dem überexprimierten Protein assoziierten Proteine, können zu Einschlusskörpern führen. Da die Bildung von Einschlusskörpern durch die hohe Konzentration des überexprimierten Proteins bedingt ist, kann die Aggregatbildung durch eine limitierte Induktion unterdrückt werden [28].

### 3.2 Voruntersuchung verschiedener Kultivierungsbedingungen auf die Einschlusskörperbildung

Die Einschlusskörperbildung von *P. luminescens* ist stark von den Kultivierungsbedingungen abhängig. Kultivierungen in verschiedenen komplexen Nährmedien [5]

zeigen einen starken Einfluss auf die CIP-Bildung.

Ziel ist es, das verwendete synthetische definierte Kultivierungsmedium (DKM), siehe Kapitel 4.1, auf seinen Einfluss bezüglich der Einschlusskörperbildung zu untersuchen und die Medienzusammensetzung gegebenenfalls zu erweitern, um die Bildung zu optimieren.

In mehreren Schüttelkolbenversuchen wurden verschiedene Einflüsse auf die CIP-Bildung qualitativ untersucht, deren Ergebnisse hier kurz zusammengefasst werden:

- Es besteht eine starke Abhängigkeit der Einschlusskörperbildung von der Konzentration der C-Quelle im DKM-Medium. Hohe Konzentrationen sowohl von Glukose als auch von Glycerin haben einen positiven Einfluss, siehe Tabelle 3.1.
- Das Alter der Vorkultur zum Zeitpunkt der Überimpfung hat keinen Einfluss auf die CIP-Bildung.
- Die Variation der Spurenelemente, der Salze und der Vitamine hat keinen Einfluss auf die CIP-Bildung im DKM-Medium.
- Es besteht weiterhin kein signifikant positiver Einfluss auf die CIP-Bildung bei Verwendung jener zusätzlichen Aminosäuren (jeweils ca. 0,7 g l<sup>-1</sup> Asparagin, Glutamin, Isoleucin, Leucin, Valin) im DKM-Medium, die zu hohen Anteilen in dem Einschlusskörperprotein, nach Angaben von Bowen [11], vorhanden sind .

C-Quelle	1 g/l Glukose	2 g/l Glukose	4 g/l Glukose	5 g/l Glukose
OD 53h	6,1	7,4	9,9	11,1
CIP	o	o	+	++
C- Quelle	1,3 g/l Glycerin	2,5 g/l Glycerin	5,0 g/l Glycerin	10 g/l Glycerin
OD 53h	5,1	6,4	9,5	15,1
CIP	o	o	+	++

Tab. 3.1: Abhängigkeit der CIP-Bildung bei Variation der C-Quelle im DKM-Medium, Vergleich nach 53h Kultivierungszeit in Schüttelkolben. - CIP < 1%, o CIP < 10%, + CIP ~ 40%, ++ CIP > 70%

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die CIP-Bildung gezielt durch Verknappung bzw. Zufuhr von Substraten beeinflusst werden kann. Hierzu ist es notwendig, den Zusammenhang zwischen Einschlusskörperbildung und den zur Verfügung stehenden Substraten und anderen Kultivierungsbedingungen zu kennen. Für eine genauere Untersuchung der Einschlusskörperbildung ist die Entwicklung bioanalytischer Verfahren zur Quantifizierung des Einschlusskörperproteins notwendig.

## 3.3 Quantifizierung der Einschlusskörper

Die Identifizierung und Quantifizierung der Einschlussproteine kann auf verschiedene Arten erfolgen. Die einfachste Art besteht in einer mikroskopischen Untersuchung der Bakterien und dem Auszählen der Bakterien mit CIP-Kristallen pro Volumeneinheit. Eine zweite Möglichkeit nutzt einen Zellaufschluss mittels Ultraschall in Verbindung mit einer anschließenden Aufreinigung der Einschlusskörperproteine in einer Trennsäule (FPLC) und photometrischer Detektion. Eine dritte Möglichkeit besteht darin, die Einschlussproteine nach dem Zellaufschluss durch polyklonale Antikörper zu markieren und die so gekennzeichneten Proteine photometrisch zu detektieren und ihre Konzentration zu bestimmen.

Alle drei Methoden wurden im Rahmen dieser Arbeit auf ihre Brauchbarkeit hin untersucht, um als Standard-Analyseverfahren eingesetzt zu werden.

### 3.3.1 Mikroskopische Untersuchung der Einschlusskörper

Zur mikroskopischen Untersuchung der Einschlusskörper wurde ein Durchlichtmikroskop mit Kamera der Firma Olympus benutzt. Das mit einem Phasenkontrastobjektiv 1000-facher Endvergrößerung ausgestattete Mikroskop erlaubt im Vergleich zu anderen Objektiven die beste Identifizierung der Einschlusskörper.

Bei dieser Methode wird der prozentuale Anteil von Bakterien mit Einschlusskörpern in einem definierten Gesichtsfeld bestimmt. Mehrere Gesichtsfelder einer Probe werden ausgewertet, bis eine Anzahl von 100 Bakterienzellen erreicht ist. Nachteilig ist, dass zwischen verschiedenen Größen der Einschlusskörper nur schwer differenziert werden kann. Eine quantitative Aussage über die Entwicklung des Einschlusskörperproteingehaltes ist so nur vage möglich. Man kann mit Hilfe dieser Methode den Zeitpunkt eingrenzen, wann Einschlusskörperkristalle gebildet werden und abschätzen, wie viele Bakterien Einschlusskörperkristalle besitzen.

Um verschiedene, zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführte Kultivierungen miteinander vergleichen zu können, wurde das Mikroskop mit einer Digitalkamera ausgestattet. So konnte das mikroskopische Bild archiviert werden und erlaubte eine nachträgliche Auswertung.

### 3.3.2 Zellaufschluss

Um das Einschlusskörperprotein der Bakterien quantifizieren zu können, ist in einem ersten Schritt die Zerstörung der Zellmembran notwendig. Dabei entsteht ein Gemisch aus intakten und aufgebrochenen Zellen, Membranfragmenten und anderen

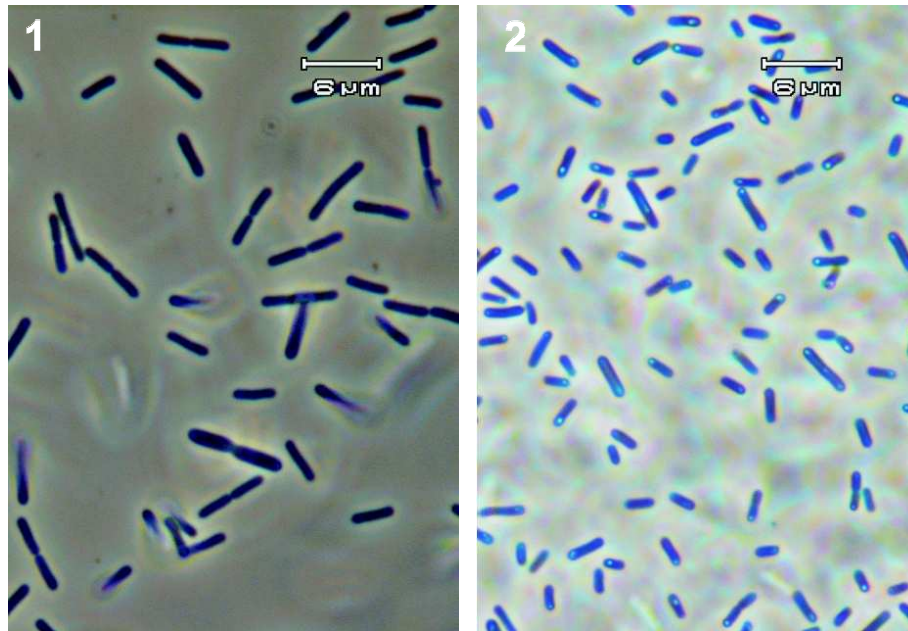


Abb. 3.1: Mikroskopische Aufnahmen von Bioreaktorproben zu verschiedenen Zeitpunkten. 1)  $t = 18$  h, 0 % Bakterien mit CIP; 2)  $t = 42$  h, 85 % Bakterien mit CIP.

komplexen Verbindungen. Soll die Menge der intrazellulären Proteine quantifiziert werden, müssen möglichst alle Zellen der Probe aufgebrochen werden. Für die technische Realisierung stehen zahlreiche Methoden zur Verfügung, wie beispielsweise Lysozym, Zelmühlen, Einfrieren-Auftauen, Ultraschall, Hochdruckpresse, usw.

Um einen nahezu vollständigen Aufschluss aller Bakterienzellen in einer Probe zu erreichen, wurde eine Molekular-Hochdruckpresse (French press der Firma Polytec) verwendet, die besonders zum Aufschluss von Mikroorganismen geeignet ist. Bei dieser Methode wird eine Zellsuspension unter hohem Druck durch eine enge Öffnung gepresst, wobei durch die auftretende Druckdifferenz die Zellen zerstört werden. Der Einsatz gewährleistet einen hohen Aufschlussgrad, wie er mit anderen Methoden bei diesen Organismen nur schwer zu erreichen ist.

Der Zellaufschluss findet bei einem Druck von 19000 psi (ca. 1300 bar) statt. Mikroskopische Untersuchungen zeigen, dass nach dem Aufschluss weniger als 1% der Bakterienzellen intakt sind. In Abbildung 3.2 ist eine Zellsuspension vor und nach dem Aufschluss zu sehen.

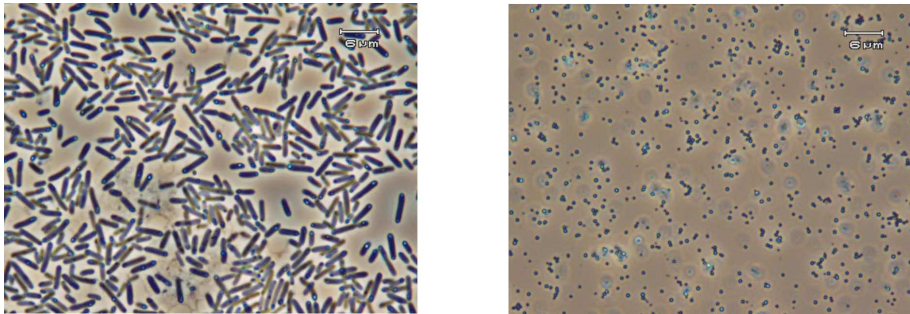


Abb. 3.2: Zellsuspension vor und nach dem Aufschluss

### 3.3.3 Aufreinigung der Einschlusskörper zur Gewinnung eines CIP-Protein-Standards

Nach dem Zerstören der Zellmembranen in der Hochdruckpresse, kann das Zellysate, welches aus intrazellulären Bestandteilen und Membranfragmenten besteht, weiterverarbeitet werden. Für die Etablierung analytischer Verfahren zur Quantifizierung des CIP-Proteins in einem Gemisch ist zunächst die Gewinnung eines reinen CIP-Proteinstandards notwendig. Um die Einschlusskörper aufzureinigen wird die einheitliche spezifische Dichte des Einschlusskörperkristalls bei verschiedenen Zentrifugationsschritten ausgenutzt.

Nach Durchführung der einzelnen Aufreinigungsschritte, siehe Kapitel 4.2.1, kann ein kalkweißes Pellet aus Einschlusskörpern gewonnen werden. Die Reinheit der aufgereinigten Probe wurde mit Hilfe eines SDS-PAGE-Verfahrens, siehe Kapitel 4.2.2, überprüft. Dies ist ein elektrophoretisches Verfahren, bei dem ein Probengemisch im elektrischen Feld aufgrund unterschiedlicher Ladung und Größe getrennt wird. Abbildung 3.3 zeigt das Ergebnis, in dem die aufgereinigten Proben mit einem Proteinstandard verglichen werden.

Eine Fraktionierung der beiden möglichen unterschiedlichen Einschlusskörper wurde bei diesem Verfahren nicht durchgeführt, da bei dem von uns verwendeten Stamm von *P. luminescens* (HB-1.3) nur eine Form von Einschlusskörpern beobachtet wurde.

Zur weiteren Verwendung des CIP-Proteinstandards wurde die Gesamt-Proteinmenge der so aufgereinigten Proben bestimmt, aliquotiert (portioniert) und für die weitere Verwendung im ELISA-Verfahren bei  $-30^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### 3.3.4 ELISA-Verfahren zur Quantifizierung der CIP

Das ELISA-Verfahren (Enzyme-Linked-Immunesorbent-Assay) eignet sich besonders gut zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen in komplexen Gemischen.

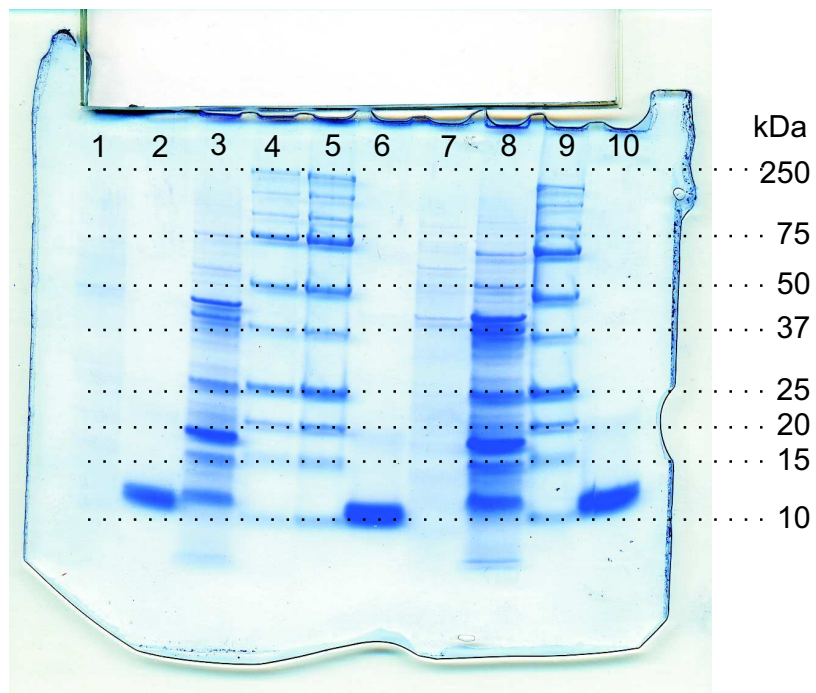


Abb. 3.3: SDS-PAGE zur Überprüfung der Aufreinigung der Einschlusskörper. Lauf 1-4, 10  $\mu\text{l}$  Probenauftrag und Lauf 5-10, 20  $\mu\text{l}$  Probenauftrag. Lauf 2,6,10 aufgereinigte CIP, Lauf 4,5,9 Proteingrößenstandard, Lauf 1,3,7,8 Bioreaktorproben zu unterschiedlichen Zeitpunkten.



Dieses Verfahren beruht auf der Eigenschaft des Immunsystems höherer Lebewesen gegen artfremdes Eiweiß spezifische Antikörper zu entwickeln. Diese Antikörper bilden dann nur mit dem Protein, für das sie spezifisch sind, einen Protein-Antikörper-Komplex. Mit Hilfe solcher spezifischen Antikörper kann in dem ELISA-Verfahren die Konzentration eines bestimmten Proteins in einem Gemisch bestimmt werden.

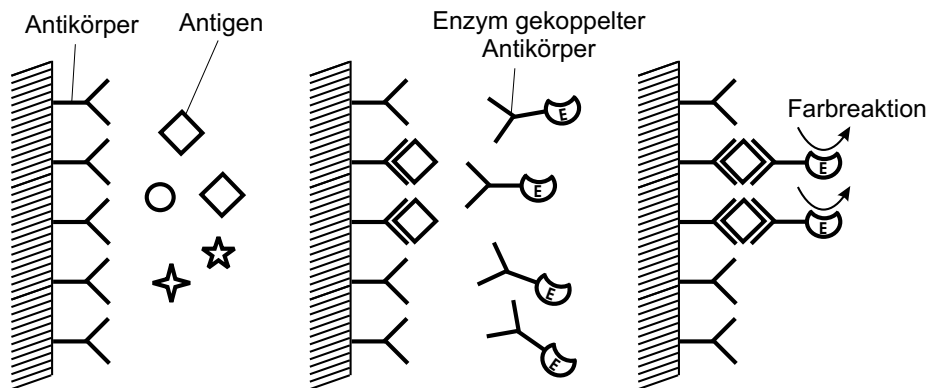


Abb. 3.4: Schrittweiser Aufbau der Sandwich-Struktur bei dem ELISA-Verfahren bestehend aus Antikörper, Antigen und enzymmarkiertem Antikörper.

Quelle: Schügerl [42]

Dieses Verfahren wird in Mikrotiterplatten durchgeführt, die in mehreren Schritten beschichtet werden. Bei dem von uns verwendeten ELISA-Verfahren handelt es sich um einen so genannten Sandwich-ELISA. Hierbei wird eine Sandwich-Struktur an der Mikrotiterplattenoberfläche aufgebaut, Abbildung 3.4. In einem ersten Schritt wird die Oberfläche der Reaktionsgefäße mit dem spezifischen Antikörper beschichtet. Im zweiten Schritt wird das Proteingemisch hinzu gegeben, wobei nur das spezifische Protein an den Antikörpern bindet und so immobilisiert wird. Das restliche Protein wird herausgewaschen. Im letzten Schritt wird ein enzymmarkierter Antikörper hinzugegeben, der nur an dem zuvor gebundenen Protein bindet. Wird nun in die so beschichteten Reaktionsgefäße ein Substrat gegeben, dann findet durch das Enzym eine Farbreaktion statt, die photometrisch detektiert wird. Um die Proteinkonzentration in einem unbekanntem Gemisch zu bestimmen, wird die Intensität der Farbreaktion mit der eines bekannten Proteinstandards verglichen.

Die für das Verfahren notwendigen spezifischen Antikörper wurden in Kaninchen produziert, durchgeführt von der Firma Charles-River. Zur Immunisierung wurde aufgereinigtes CIP-Protein verwendet, siehe Abschnitt 4.2.3. Mit diesen Antikörpern wurde ein Sandwich-ELISA für das CIP-Protein in Zellhomogenisat entwickelt. Dies beinhaltet die Festlegung der Löslichkeitsbedingungen für das Einschlusskörperkristall, die Bestimmung der optimalen Konzentrationen der Antikörper und der Inkubationszeiten der einzelnen Reagenzien. Die Durchführung des Verfahrens ist in

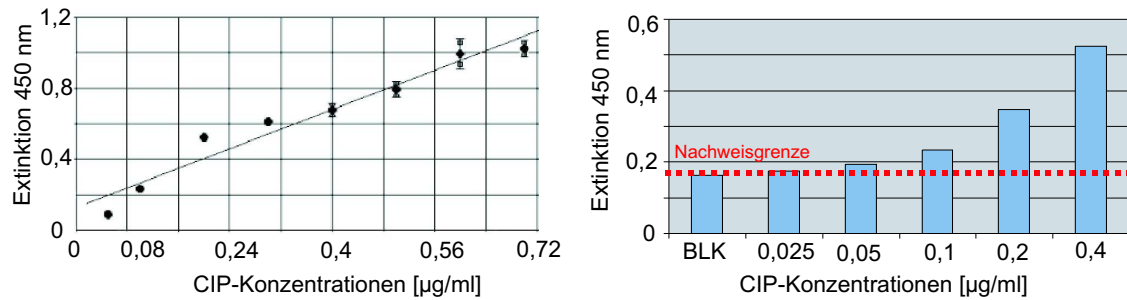


Abb. 3.5: Intensität der Farbreaktion in Abhängigkeit von der Konzentration des CIP-Proteinstandards. In der linken Abbildung ist zusätzlich die Regressionsgerade und in der rechten Abbildung die Intensität des Leerwertes (BLK) und die Nachweisgrenze eingezeichnet.

Abschnitt 4.3.3 beschrieben. Die Abbildung 3.5 zeigt die Intensität der Farbreaktionen des ELISA-Verfahrens in Abhängigkeit von der CIP-Proteinkonzentration. Im linken Bild der Abbildung 3.5 ist zusätzlich die Regressionsgerade eingezeichnet, die den linearen Charakter der Daten widerspiegelt. In der rechten Graphik ist die Nachweisgrenze des Verfahrens dargestellt. Unterhalb dieser Grenze können Proteinkonzentrationen nicht mehr detektiert werden.

Ein entscheidender Vorteil des ELISA-Verfahrens ist seine hohe Spezifität. Zur Quantifizierung von Fermenterproben ist es nicht notwendig, das Zelllysate nach dem Zellaufschluss aufzureinigen [6].

In Abbildung 3.6 ist die Entwicklung der Biomasse und der Einschlusskörperproteinkonzentration während einer Fermentation dargestellt. Die Proteinkonzentration wurde mit dem ELISA-Verfahren bestimmt.

### 3.3.5 Chromatographische Identifizierung und Quantifizierung der CIP

Ein weiteres Verfahren zur Identifizierung und Quantifizierung des CIP-Proteins ist der Einsatz eines chromatographischen Verfahrens, siehe Abbildung 3.7. Bei diesem Verfahren wird ein Probengemisch auf einer Säule räumlich und zeitlich voneinander getrennt, in Abhängigkeit von der Affinität zwischen den einzelnen Probenkomponenten zur Säule. Die Konzentration des so fraktionierten Gemisches wird an einem Detektor photometrisch bestimmt und über der Zeit aufgezeichnet. Um ein bestimmtes Protein detektieren und quantifizieren zu können ist es notwendig den Auswaschzeitpunkt zu kennen. Der entsprechende Peak des Chromatogramms wird dann mit

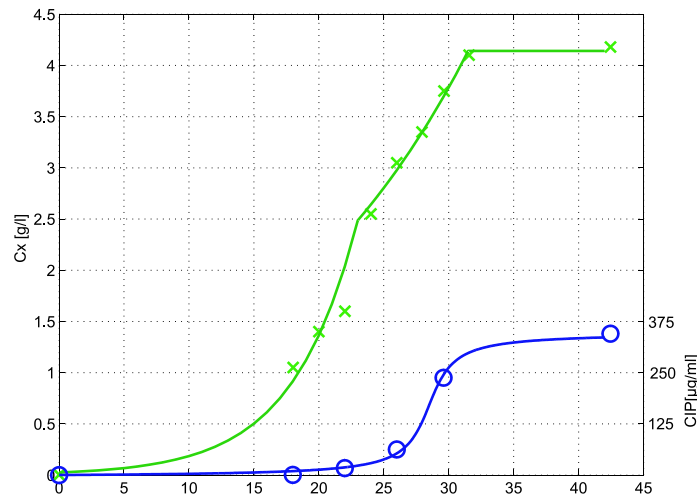


Abb. 3.6: Entwicklung der Biomasse und der CIP-Protein-  
konzentration während einer Fermentation

einem Proteinstandard verglichen und die Konzentration bestimmt. Bei dem von

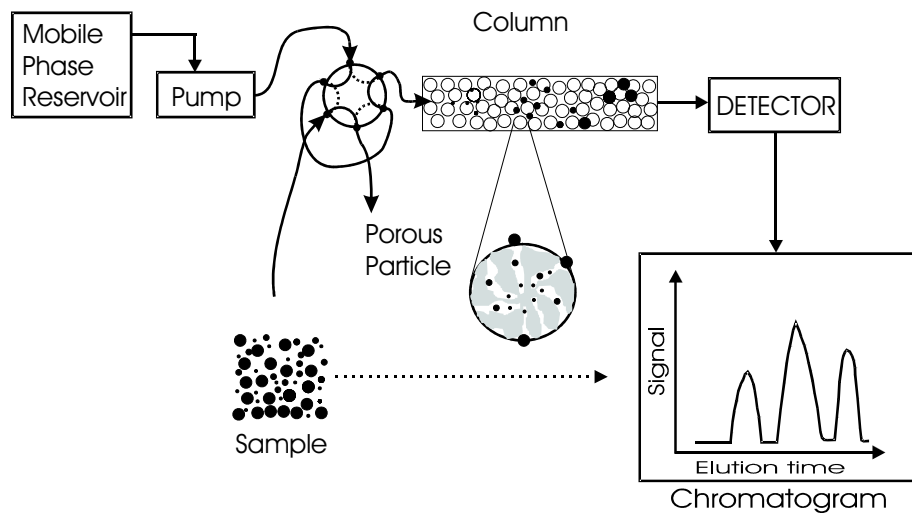


Abb. 3.7: Schematische Darstellung des Ausschlusschromatographiesystems

uns untersuchten Verfahren wurde eine FPLC-Anlage der Firma BIORAD mit der Säule Bio-Prep SE-100/17 eingesetzt, die einen Einsatzbereich von 5 kDa - 100 kDa hat.

Um Fermenterproben mit diesem Verfahren untersuchen zu können, ist es notwendig, die Proben nach dem Zellaufschluss aufzureinigen, da nur begrenzt komplexe Gemis-

sche mit der Säule aufgetrennt werden können. Dies ist ein entscheidender Nachteil des Verfahrens, da bei der Aufreinigung der Bioreaktorproben hohe Verluste an CIP-Protein entstehen. Aus diesem Grund ist das Verfahren nicht als Standardverfahren zur Untersuchung von Bioreaktorproben geeignet und wird deshalb in dieser Arbeit nicht weiter betrachtet.

# Kapitel 4

## Material und Methoden

Dieser Abschnitt fasst die für die Experimente und für die Modellierung verwendeten Materialien und Methoden zusammen. Dies sind die Kultivierungsbedingungen, die Methoden zur Entwicklung von Verfahren zur Quantifizierung des Einschlusskörperproteins, die Standard-Offline-Analysemethoden, der Aufbau der Versuchsanlage, die Online-Messtechnik, die Prozessüberwachung und die Prozessführung der Versuchsanlage.

### 4.1 Organismus, Kultivierungsmedium und Kultivierungsbedingungen

#### 4.1.1 Organismus

Alle Experimente wurden mit dem Bakterium *Photorhabdus luminescens* HB-1.3 (DSM 12205) durchgeführt. Zur Gewinnung der Bakterien wurden *Galleria mellonella* Larven mit Nematoden *Heterophabditis bacteriophora* infiziert. Die Bakterien wurden aus der Hämolymphe der Larven, nach der von Ehlers et al. [14] beschriebenen Methode, gewonnen und in einem Hefeextraktmedium, bestehend aus (pro. Liter destilliertem Wasser) 0.5 g  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , 0.5 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.2 g  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 5 g NaCl, 5 g Hefeextrakt (Merck) nach Akhurst [1] in einem 2 l-Bioreaktor kultiviert. Die Bakterienbrühe wurde mit 15 % (v/v) Glycerin verdünnt und in 2 ml Eppendorfcaps aliquotiert und bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  für die Weiterverwendung eingefroren.

#### 4.1.2 Definiertes Kultivierungsmedium (DKM)

Um reproduzierbare und definierte Kultivierungsbedingungen zu schaffen, wurde das von Seydel [44] entwickelte definierte Kultivierungsmedium eingesetzt. Wenn nicht anders angegeben, besteht das Medium aus der in Tabelle 4.1 angegebenen Zusammensetzung. Die verwendete Vitamin-Stammlösung besteht aus (gelöst in destilliertem Wasser)  $0,5\text{ g l}^{-1}$  Cyanocobalamin,  $0,4\text{ g l}^{-1}$  4-Aminobenzoesäure,  $0,1\text{ g l}^{-1}$  Bio-

tin,  $1 \text{ g l}^{-1}$  Nicotinsäure,  $0,5 \text{ g l}^{-1}$  Calcium (D+)-Pantothenat,  $1 \text{ g l}^{-1}$  Thiaminchloridhydrochlorid. Die eingesetzte Spurenelement-Stammlösung besteht aus (gelöst in destilliertem Wasser)  $0,33 \text{ g l}^{-1}$   $\text{ZnCl}_2$ ,  $0,1 \text{ g l}^{-1}$   $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $0,238 \text{ g l}^{-1}$   $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $0,085 \text{ g l}^{-1}$   $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $0,121 \text{ g l}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ,  $0,031 \text{ g l}^{-1}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $5 \text{ ml HCl}$  (25% (v/v)).

Aminosäuren		
Glutaminsäure (Glu)	1,471	$\text{g l}^{-1}$
Serin (Ser)	1,051	$\text{g l}^{-1}$
Histidin (His)	1,552	$\text{g l}^{-1}$
Threonin (Thr)	1,191	$\text{g l}^{-1}$
Methionin (Met)	1,492	$\text{g l}^{-1}$
Tyrosin (Tyr)	0,362	$\text{g l}^{-1}$
Lysin (Lys)	0,292	$\text{g l}^{-1}$

C-Quelle		
Glukose·H <sub>2</sub> O	5,5	$\text{g l}^{-1}$

Salze		
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,4	$\text{g l}^{-1}$
$\text{NH}_4\text{Cl}$	1,4	$\text{g l}^{-1}$
KCl	0,75	$\text{g l}^{-1}$
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	0,28	$\text{g l}^{-1}$
$\text{MgCl}_2$	0,12	$\text{g l}^{-1}$
$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,05	$\text{g l}^{-1}$
NaCl	0,0375	$\text{g l}^{-1}$
$\text{FeCl}_3$	0,0017	$\text{g l}^{-1}$

Spurenelemente		
Stammlösung	2	$\text{ml l}^{-1}$

Vitamine		
Stammlösung	4	$\text{ml l}^{-1}$

Tab. 4.1: Zusammensetzung des definierten Kultivierungsmediums (DKM).

### 4.1.3 Standard-Kultivierungsbedingungen (SKB)

Alle Versuche mit *P. luminescens* wurden unter sterilen Bedingungen mit autoklavierten Medien durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben, wurden bei den Versuchen die Standard-Kultivierungsbedingungen (SKB) laut Tabelle 4.2 angewendet. Die Begasung erfolgte mit Luft (Zusammensetzung (v/v): 78 % N<sub>2</sub>, 21 % O<sub>2</sub>, 0,03 % CO<sub>2</sub>) und der pH-Wert wurde durch Zugabe von 1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> bzw. 1 M NaOH eingestellt. Wenn Schaumbildung auftrat, wurde das Antischaummittel Polypropylenglycol tropfenweise zugegeben.

Die Vorkultur wurde in Schüttelkolben unter SKB-Bedingungen und mit DKM-Medium 24 h - 30 h inkubiert. Das Inokulationsvolumen wurde so berechnet, dass die Bakteriendichte nach der Inokulation 0,025 AU im Reaktor betrug.

	10 l Bioreaktor (C)	2 l Bioreaktor (CT)	Schüttelkolben
Temperatur	25 °C geregelt	25 °C geregelt	25 °C geregelt
Drehzahl	500 rpm	500 rpm	180 rpm
pH-Wert	7,0 geregelt	7,0 geregelt	7,0 ungeregelt
Druck	ca. 100 mbar Überdruck	ca. 100 mbar Überdruck	-
Begasungsrate	300 l h <sup>-1</sup>	60 l h <sup>-1</sup>	-

Tab. 4.2: Standard-Kultivierungsbedingungen (SKB)

## 4.2 Methoden zur Quantifizierung des Einschlusskörperproteins

### 4.2.1 CIP-Aufreinigung

Zur Gewinnung des Proteinstandards wurde eine Bakterienkultur in einem 10 l Bioreaktor in dem DKM-Medium kultiviert. Nach 45 h wurden 500 ml der Bakterienbrühe geerntet. Die Zellsuspension wurde in 50 ml Zentrifugenröhrchen bei 5000 g<sup>1</sup> für 10 min zentrifugiert (Haereus, Biofuge Primo R). Die resultierenden Pellets wurden in 250 ml Phosphatpuffer (PBS) bestehend aus 15 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 85 mM NaCl bei pH 7,3 gelöst und wiederum bei 5000 g für 10 min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde 4-mal wiederholt bis der rote Bakterienfarbstoff Anthraquinone [36] ausgewaschen war. Die Zellsuspension wurde dann mit Hilfe der French Press (Polytec) bei 16000 psi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>g bedeutet hier die Erdbeschleunigung von 9,81 m s<sup>-2</sup>

<sup>2</sup>pounds per square inch, 1 bar = 14.5 psi

aufgeschlossen. Dieser Vorgang wurde 2-mal wiederholt. Das Zelllysate wurde mit 250 ml PBS verdünnt und bei 5000 *g* für 10 min zentrifugiert, auch dieser Schritt wurde 4-mal wiederholt. Die weißen Pellets wurden in 50 ml PBS gelöst. Jeweils 5 ml wurden auf eine 20 ml Schicht von 30 % (v/v) Glycerin in ein 25 ml-Zentrifugenröhrchen pipettiert und anschließend in einem Ausschwingrotor (Haeraeus, Nr. 7591) bei 4000 *g* für 30 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 ml PBS gelöst und bei 5000 *g* für 10 min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde 4-mal wiederholt. Jeweils 5 ml wurden auf eine 20 ml Schicht von 60 % (v/v) Glycerin in ein 25 ml-Zentrifugenröhrchen pipettiert und anschließend in einem Ausschwingrotor bei 1500 *g* für 15 min zentrifugiert. Die Einschlusskörper verblieben auf der Glycerin-Grenzschicht und wurden abpipettiert. Diese Fraktion wurde 4-mal gewaschen, indem sie in PBS aufgelöst und bei 5000 *g* für 10 min abzentrifugiert wurde. Der Gesamt-Proteingehalt des aufgereinigten Proteins wurde mit Hilfe des BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce Chemical Company) bestimmt und Aliquote von 422  $\mu\text{g}$  CIP pro ml wurden als Standard bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für den weiteren Gebrauch eingefroren. Die Aufreinigung wurde mit Hilfe einer SDS-Gelelektrophorese überwacht und auf Reinheit überprüft.

#### 4.2.2 SDS-PAGE-Verfahren

Zur Überprüfung der Reinheit des isolierten CIP-Proteins wurde das SDS-PAGE-Verfahren (SDS-Polyacrylamid Gel Elektrophorese) benutzt. Als Proteinstandard wurde Precision Plus Protein All blue Standards verwendet (Biorad, Nr. 161-0373), 20  $\mu\text{l}$  Standard wurden mit 40  $\mu\text{l}$  Probenpuffer (PP), bestehend aus 75 % (v/v) Tris Tricine SDS Probenpuffer zweifach-konzentriert (Anamed, Nr. TR02007), 22 % (v/v) VE-Wasser und 3 %  $\beta$ -Mercaptoethanol verdünnt und 5 min gekocht. 50  $\mu\text{l}$  der zu untersuchenden Probe wurde mit 100  $\mu\text{l}$  PP vermischt und ebenfalls 5 min gekocht. Von den so vorbereiteten Lösungen wurden jeweils 10  $\mu\text{l}$  und 20  $\mu\text{l}$  in die Probenaschen des Fertiggels 10 % Tris Tricin, 1mm (Anamed, Nr. 13071001001) pipettiert. Als Laufpuffer für die Elektrophoresezelle wurde Tricine SDS-Laufpuffer, 10-fach (Anamed, Nr. TR05006) 1:10 in VE-Wasser verdünnt, verwendet. Die Laufbedingungen des Netzgerätes (Biorad, Power Pac 1000) waren 150 V bei 146 mA für eine Laufdauer von 42 min. Danach wurde das Gel entnommen und über Nacht mit einer Coomassie-Farblösung, bestehend aus 0,1 % Coomassie-Brillantblau R250 (Roth, Nr. 3862.1), 40 % Methanol, 10 % Essigsäure, 49 % VE-Wasser gefärbt. Danach wurde das Gel in einer Entfärbelösung, bestehend aus 30 % Methanol, 10 % Essigsäure, 60 % VE-Wasser 3 Tage entfärbt. Anschließend konnte das Gel ausgewertet werden.



### 4.2.3 Herstellung von polyklonalen Antikörpern

Das Antiserum wurde von Charles-River Deutschland in 2 Kaninchen (Stamm CHB) produziert. Die Immunisierung der Kaninchen fand durch subkutane Injektionen der aufgereinigten CIP mit Hilfe von Adjuvans statt und wurde nach 28, 42 und 56 Tagen wiederholt. Nach 70 Tagen wurde das Serum durch Entblutung der Kaninchen gewonnen. Die antigen-spezifischen Antikörper wurden aus dem Serum durch affinitätschromatographische Isolierung gewonnen. Ein Teil der so aufgereinigten Antikörper wurde mit dem Enzym Alkalische-Phosphatase gekoppelt, um es als Markierungsantikörper zu verwenden.

## 4.3 Standard Offline-Analysen

### 4.3.1 Aminosäurenanalyse

Die Konzentrationen der Aminosäuren im Überstand der Bakteriensuspension wurden mit einer HPLC-Anlage (ThermoQuest) durch Derivatisierung mit Dabsylchlorid, nach der Vorschrift des FML-FAA-KIT (Forschungszentrum Weihenstephan), bestimmt. Hierzu wurden Bioreaktor-Proben mit 22.000 g für 5 min zentrifugiert. 10  $\mu$ l des zellfreien Überstandes wurden zur Derivatisierung mit Dabsylchlorid inkubiert. Anschließend wurden die Aminosäuren auf einer C18 Reversed-Phase-Säule (Nova Pak C18, Waters) in einer Gradientenelution mit Acetonitril und einem Phosphatpuffer aufgetrennt und bei einer Wellenlänge von 478 nm mit einem Photometer (ThermoQuest, UV 3000) detektiert. Im Vergleich mit einem externen Standardgemisch konnte die Konzentration der einzelnen Aminosäuren bestimmt werden.

### 4.3.2 Glukosebestimmung

Die Glukosekonzentration wurde ebenfalls mit einer HPLC-Anlage (ThermoQuest) bestimmt. Hierzu wurden 10  $\mu$ l des zellfreien Überstandes mit einer Ionenaustausch-Säule (Alltech, Nr. 700CH) aufgetrennt und die Zuckerkonzentration über den Brechungsindex mit einem Refraktometer (Shodex, RI-71), im Vergleich zu einem externen Standard, bestimmt.

### 4.3.3 ELISA-Verfahren zur CIP-Proteinbestimmung

Polyklonales Antiserum gegen CIP-Protein von *P. luminescens* HB-1.3 wurde zur Messung des gelösten CIP-Proteins in einem Sandwich-ELISA verwendet. 96-Well

Mikrotiter-Platten (Nunc, Maxi-Sorp) wurden mit 50  $\mu\text{l}$  CIP-Antikörperlösung (10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  Antikörper in PBS-Puffer + 0.1 % Na-acid) beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Antikörperlösung wurde aus den Wells entfernt und 350  $\mu\text{l}$  BSA-Lösung (1 % BSA + 0,1 % NA-acid in PBS-Puffer) zur Blockierung der freien Bindungsstellen zugegeben und für 2 h bei 24 °C inkubiert. Das zu untersuchende Zell-Lysat wurde aus 15 ml Bioreaktorproben durch Zerstörung der Zellmembran mit einer French-Press bei einem Druck von 19000 psi gewonnen. Das Zell-Lysat und der CIP-Proteinstandard wurden 1:2 in 0,15 M NaOH gelöst und anschließend 1:10 in Verdünnungs-Puffer mit (0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,1 M NaCl, 0,1 M EDTA, pH 8) vorverdünnt. In verschiedenen Endverdünnungen wurden dann 100  $\mu\text{l}$  der Proben in die mit Antikörper beschichteten Wells pipettiert und 2 h bei 24 °C inkubiert, bevor die Wells gewaschen wurden. Das gebundene CIP-Protein wurde dann durch Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  CIP-Antikörpern, die mit dem Enzym alkalischer Phosphatase gekoppelt waren, bei 24 °C markiert. Nach 45 min Inkubation wurden die Wells gewaschen und 200  $\mu\text{l}$  Phosphat-Substrat (Sigma) auf die Sandwich-Struktur gegeben. 45 min später konnte die Farbreaktion bei 405 nm und als Referenz bei 580 nm mit einem Photometer ( $\mu$ -quant, Bio-Tek) gemessen werden. Die Absorbtion der Proben wurde mit der des CIP-Proteinstandards verglichen und die Konzentration berechnet.

#### 4.3.4 Bestimmung der Anzahl der Zellen mit CIP

Der prozentuale Anteil von Bakterienzellen mit Einschlusskörpern wurde mit einem Phasenkontrastmikroskop (BX-51, OLYMPUS) bei 1000-facher Vergrößerung bestimmt. Hierzu wurden so viele Gesichtsfelder ausgewertet, bis eine Gesamtzahl von 100 Bakterienzellen erreicht war.

#### 4.3.5 Biotrockenmassebestimmung

Zur Trockenmassebestimmung der Bakterien wurde 1 ml der Bioreaktorproben in 1,5 ml Eppendorf-Caps bei 22.000  $g$  für 5 min zentrifugiert. Der Zentrifugationsschritt wurde 2-mal wiederholt indem das Pellet mit deionisiertem Wasser gewaschen wurde. Danach wurden die Caps bei 60 °C für 48 h bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

#### 4.3.6 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte der Bioreaktorproben wurde durch die Messung der optischen Dichte (OD) bestimmt. Hierzu wurden die Proben bei einer Wellenlänge von 725 nm mit einem Photometer (Nicolet, Unicam UV1-Spectrometer) gemessen und gegebenenfalls mit 0,5-facher Ringerlösung (Merck) verdünnt, sodass die Messung der OD im linearen Messbereich, unter 0,3 OD-Einheiten, durchgeführt werden konnte.

## 4.4 Versuchsanlage

Zur Entwicklung und Erprobung moderner Prozessführungs- und Überwachungskonzepte für biotechnologische Prozesse wurde am Lehrstuhl für Automatisierungs- und Regelungstechnik der CAU zu Kiel eine Versuchsanlage aufgebaut und ständig erweitert, siehe Abbildung 4.1. Diese Anlage ermöglicht die reproduzierbare Durchführung von Batch- und Fed-Batch-Experimenten mit hoher Genauigkeit.

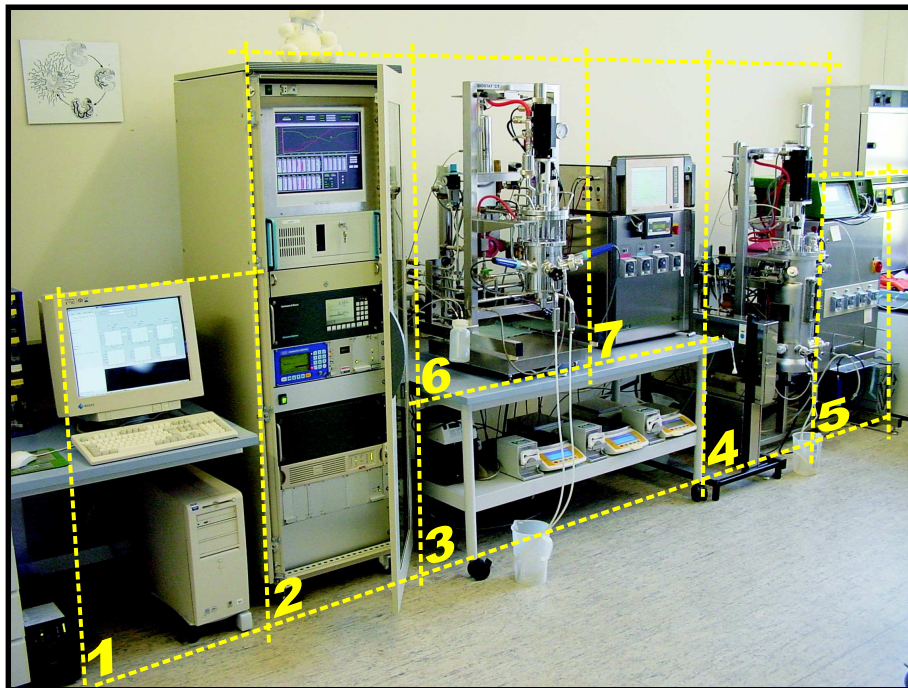


Abb. 4.1: Biotechnologische Versuchsanlage am Lehrstuhl für Automatisierungs- und Regelungstechnik der CAU zu Kiel. 1) Bedienterminal. 2) 19" Schrank mit Prozessleitrechner (Bedien- und Beobachtungssystem Win CC Siemens), Abgasanalyse, Messverstärker für die Trübungssonden, unterbrechungsfreie Stromversorgung. 3) Analysenwaagen und Schlauchpumpen für Fed-batch-Experimente. 4) 10 l Bioreaktor, Typ Biostat C. 5) Digitale Control Unit DCU 2 und Versorgungseinrichtung mit Schlauchpumpen. 6) 2 l Bioreaktor, Typ Biostat CT. 7) Digitale Control Unit DCU 3 und Versorgungseinrichtung mit Schlauchpumpen.

Schematisch ist der Aufbau der Versuchsanlage in Abbildung 4.2 zu sehen.

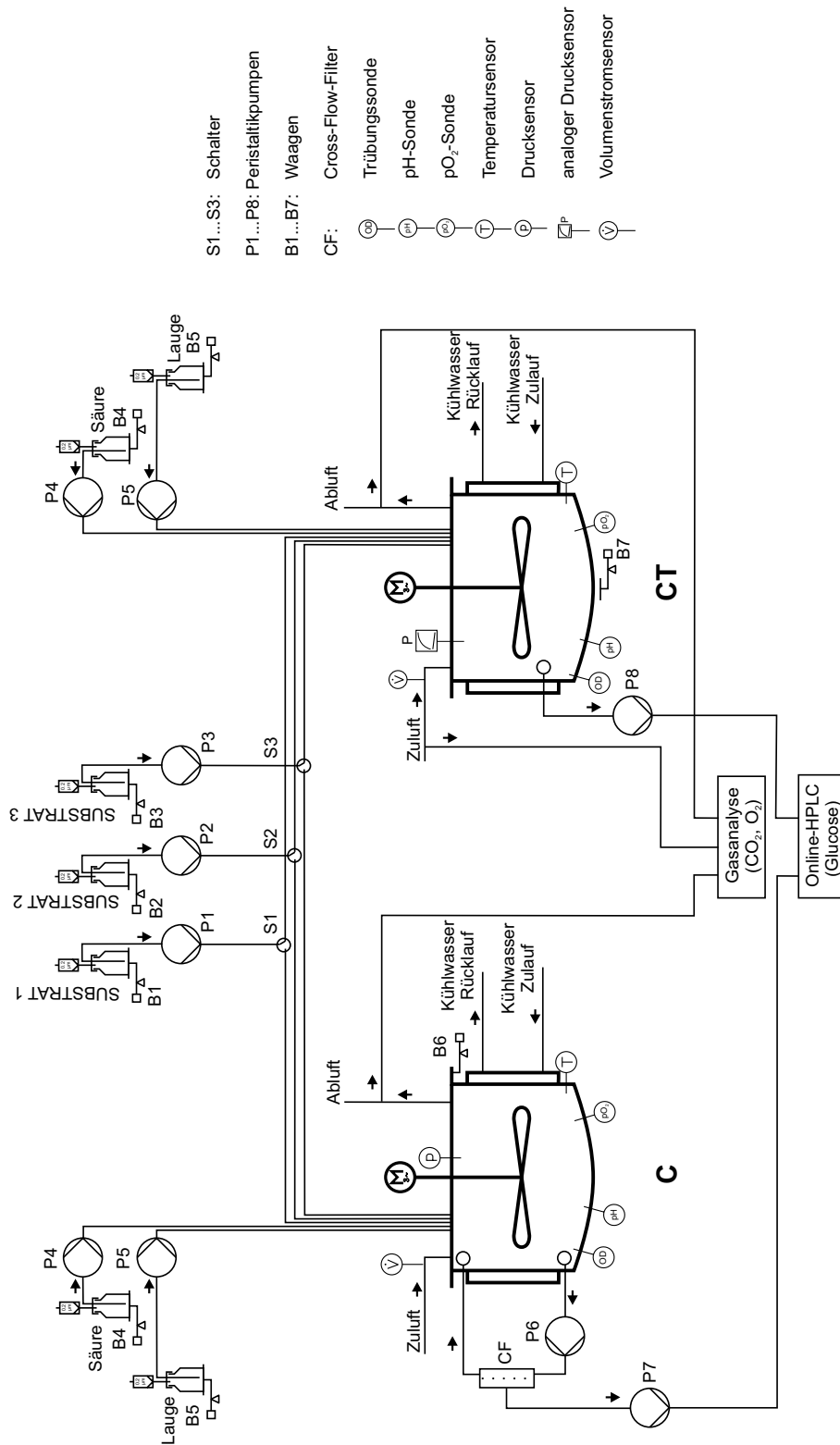


Abb. 4.2: Schematische Darstellung der Versuchsanlage

Die Versuchsanlage besteht aus zwei in-situ-sterilisierbaren Rührkessel-Bioreaktoren vom Typ Biostat-CT und Biostat-C (Sartorius BBI System) mit einem Arbeitsvolumen von 2 l bzw. 10 l, die Standard-Sensorik und die Aktorik beider Reaktoren ist jeweils mit einer DCU (Digital-Control-Unit, DCU3 bzw. DCU2, Sartorius BBI System) und einer Versorgungseinrichtung verbunden.

Zur Gewinnung zusätzlicher Online-Messgrößen sind die Bioreaktoren mit drei weiteren Messsystemen ausgestattet. Beide Bioreaktoren verfügen jeweils über eine Trübungssonde zur Online-Bestimmung der optischen Dichte des Kultivierungsmediums. Eine Gasanalyse der Zuluft und der beiden Abluftströme ermöglicht die Bestimmung der Sauerstoffverbrauchsraten und der Kohlendioxidproduktionsraten der Kulturen. Eine automatische zellfreie Probennahme über ein Querstromfiltrationsmodul oder eine Probennahmesonde und die Anbindung an eine HPLC ermöglicht die Online-Analyse der Medienzusammensetzung.

Für Fed-Batch-Experimente stehen 3 Pumpen-Waagen-Systeme zur Verfügung, die jeweils mit einem Reaktor verbunden werden können. Sie ermöglichen die präzise Zugabe von einzelnen Medienkomponenten, um bestimmte Prozessführungen zu realisieren.

Die Prozessüberwachung und Prozessführung wird von einem modularen, dezentralen Prozessleitsystem durchgeführt.

## 4.5 Online-Messtechnik

Die Online-Messtechnik biotechnologischer Prozesse wird klassischer Weise in die Messung der Kontrollvariablen, die für die Überwachung und Aufrechterhaltung der Umweltbedingungen notwendig sind und die Messung der „Zustandsvariablen“ eingeteilt. Unter Zustandsvariablen des Prozesses sind sogenannte Schlüsselgrößen zu verstehen, wie Bakteriendichte, Medienkonzentration oder auch zellinterne Größen. Die Messung der Kontrollvariablen wie pH-Wert, Temperatur usw. ist technisch unproblematisch und wird standardmäßig in der Industrie eingesetzt, während die Messung der „Zustandsvariablen“ nur schwer in situ durchzuführen ist. Die Gewinnung relevanter Zustandsinformationen ist eines der größten Probleme biotechnologischer Prozesse und ist deshalb Gegenstand aktueller Forschungen.

### 4.5.1 Standard-Messtechnik der Kontrollvariablen

Während der Experimente in den Bioreaktoren wurden folgende Sensoren für die Kontrollvariablen eingesetzt:

- **Temperatur:** Pt-100 Temperaturfühler
- **pH-Wert:** Gel-pH-Elektrode Pa/12, Ingold
- **Druck:** PHILIPS Drucksensor Typ: 9404 und WIKA Barometer
- **Begasungsrate:** Massendurchfluss Messer Brokhorst EL Flow BRA 013F
- **Gelöstsauerstoffkonzentration:** Sauerstoffpartialdruck, pO<sub>2</sub>-Elektrode (CLARK-Prinzip), Ingold
- **Rührgeschwindigkeit:** Tachogenerator
- **Gewicht:** Wägezellen HBM, Typ: Z6FD1 und Sartorius Waage

Die Sensorsignale wurden für jeden Reaktor in einem Mess- und Regelsystem (DCU2 und DCU3, Sartorius BBI System) weiterverarbeitet und gegebenenfalls für eine unterlagerte Regelung verwendet.

## 4.5.2 Online-Trübungsmessung

Zur Online-Bestimmung der Biomasse wurde die Online-Trübungsmessung des Kultivierungsmediums verwendet. Diese Methode ist besonders geeignet, da die Messung zum einen in situ durchgeführt werden kann und zum anderen die Messwerte ohne Verzögerung zur Verfügung stehen. Problematisch bei diesem Messverfahren ist der nichtlineare Charakter des Messprinzips bei zunehmender Trübung des Mediums, siehe Abbildung 4.3. Einen störenden Einfluss auf den Messwert haben zudem die Luftblasen im Medium, deren Einfluss sich in Abhängigkeit der Rührerdrehzahl und der Begasungsrate ändert. Zur Korrektur dieser Einflüsse ist deshalb eine nichtlineare Kennlinie und eine Kalibrierung durch Offline-Referenzmessungen der Trübung notwendig.

Verwendet wurden die Sonden ASD 19-N und ASD 25-BT-N (Fa. Optek, Essen) mit der optischen Weglänge von 2 mm. Die Trübungsmessung, zur farbunabhängigen Konzentrationsmessung, fand im NIR-Bereich bei den Wellenlängen 840 nm -910 nm statt. Die Sonden waren über den Messumformer (Fermenter Control, Optec) und einem A/D-Wandler (PCI-MIO-16XE-50, National Instruments) mit dem Prozessrechner verbunden.

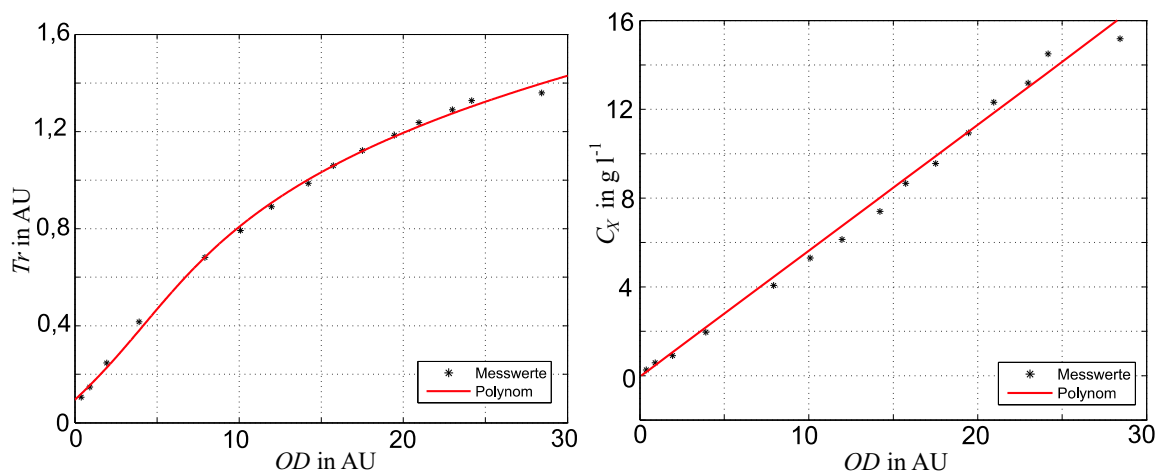


Abb. 4.3: Linke Abbildung: Kennlinie zwischen offline-bestimmter optischer Dichte  $OD$  und online-gemessener Trübung  $Tr$  in Absorptionseinheiten (AU) bei SKB-Bedingungen, Polynom:  $OD = (-1,6 + 18,4(\frac{Tr}{AU}) - 14,7(\frac{Tr}{AU})^2 + 12,1(\frac{Tr}{AU})^3)AU$ . Rechte Abbildung: Kennlinie zwischen  $OD$  und Biotrockenmasse  $C_X$  (Offline),  $C_X = 0,57\frac{OD}{AU} \frac{g}{l}$ .

Da die Trübungssonden erst zu einem späteren Zeitpunkt in die Versuchsanlage integriert wurden, stand die Messinformation während der Modellierungsphase noch

nicht zur Verfügung.

### 4.5.3 Online-Glukosemessung

Zur Online-Glukosemessung wurde ein Querstrom-Filtrationsmembran-Modul (Cross-Flow Filtermodul) Sartococon Micro  $0,2\ \mu\text{m}$  (Sartorius) verwendet um einen zellfreien kontinuierlichen Flüssigkeitsstrom aus dem Reaktor zu entnehmen. Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 4.4 zu sehen. Für die Realisierung wurden in situ sterilisierbare Zugabe- und Probenahmeeinheiten AP19 und AP25 (Sartorius BBI System) verwendet. Zwei Schlauchpumpen (reglo digital) wurden zum einen dazu benutzt, um die Reaktorbrühe mit  $28,8\ \text{l h}^{-1}$  an der Filtermembran vorbeizupumpen und zum anderen einen zellfreien Querstrom von  $24\ \text{ml h}^{-1}$  durch die Membran zu realisieren. Der zellfreie Flüssigkeitsstrom wurde über ein 2-Positionen-6-Wegeventil (LabPRO, Rheodyne) durch eine Probenschleife von  $3\ \text{ml}$  Volumen in ein Abfallgefäß gepumpt. Zur Probenahme wurde das Ventil von dem Autosampler (AS3000, Thermo) einmal pro Stunde umgeschaltet, um  $1,5\ \text{ml}$  des Probenschleifen-Volumens in ein Analysefläschchen abzufüllen und danach in die Ausgangsstellung zurückgeschaltet. Anschließend erfolgte die Analyse der Glukose in der zellfreien Probe wie in Abschnitt 4.3.2 beschrieben, der Messwert der Glukosekonzentration stand nach einer Analysezeit von  $1\ \text{h}$  zur weiteren Verarbeitung zur Verfügung.

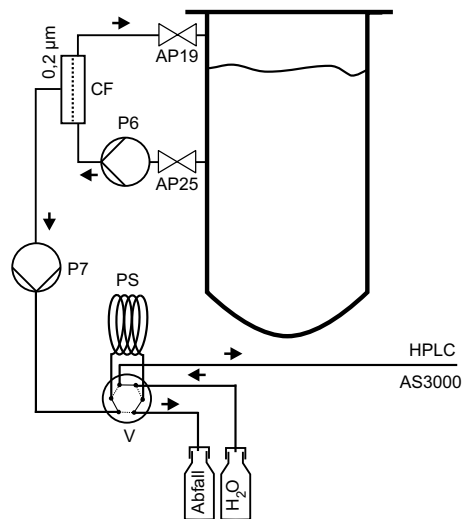


Abb. 4.4: Online-Glukosemessung: P5, P6: Schlauchpumpen, CF: Cross-Flow Filtermodul, AP19, AP25: Sterile Probenahmeeinheiten, PS: Probenschleife, V: 2-Positionen-6-Wegeventil.



Alternativ zum Cross-Flow-Filtermodul wurde eine Probenahmesonde (PP19, abc Pachheim) über eine Schlauchpumpe mit dem 2-Positionen-6-Wegeventil verbunden. Der Flüssigkeitsstrom aus dem Reaktor betrug ebenfalls  $24 \text{ ml h}^{-1}$ , die weitere Probenahme erfolgte wie oben beschrieben.

#### 4.5.4 Abgasanalyse

Durch die Abgasanalyse wurden die Sauerstoffaufnahme  $r_{O_2}$  und die Kohlendioxidproduktionsrate  $r_{CO_2}$  der biotischen Phase in  $\text{g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  bestimmt.

Diese Größen werden über die molaren Phasenübergangsströme  $\dot{n}_{O_2}^{BL}$  und  $\dot{n}_{CO_2}^{BL}$  zwischen der biotischen Phase (B) und der flüssigen Phase (L), siehe Abbildung 4.5, berechnet indem sie auf das Flüssigvolumen  $V_L$  und die jeweiligen molare Masse  $M_{\{.,\}}$  bezogen werden.

$$r_{O_2} = \dot{n}_{O_2}^{BL} \cdot \frac{M_{O_2}}{V_L}, \quad (4.1)$$

$$r_{CO_2} = \dot{n}_{CO_2}^{BL} \cdot \frac{M_{CO_2}}{V_L}. \quad (4.2)$$

Da die Phasenübergangsströme  $\dot{n}_{.,.}^{BL}$  nicht direkt messbar sind, ist ein Messmodell notwendig um diese aus den messbaren  $CO_2$ - und  $O_2$ -Molanteile in der Zu- und Abluft  $\{y_{CO_2,zu}, y_{CO_2,ab}, y_{O_2,zu}, y_{O_2,ab}\}$  und dem Sauerstoffpartialdruck  $p_{O_2}$  in der Flüssigphase zu bestimmen.

Das verwendete Messmodell wurde der Arbeit von Lebert [26] entnommen und kann unter der Voraussetzung, dass kein Austausch der flüssigen Phase des Reaktors stattfindet, der pH-Wert, die Temperatur und der Druck konstant sind, durch die folgenden Gleichungen vereinfacht dargestellt werden:

Für die Herleitung wird eine Bilanzierung des Reaktionsraumes, Abbildung 4.5, für  $CO_2$  und  $O_2$  durchgeführt.

Die Bilanzgleichungen für die molaren Konzentrationsänderungen in der gasförmigen Phase lauten:

$$\frac{dc_{O_2}^G}{dt} = (\dot{n}_{O_2}^{G,zu} - \dot{n}_{O_2}^{GL} - \dot{n}_{O_2}^{G,ab})/V_G, \quad (4.3)$$

$$\frac{dc_{CO_2}^G}{dt} = (\dot{n}_{CO_2}^{G,zu} + \dot{n}_{CO_2}^{GL} - \dot{n}_{CO_2}^{G,ab})/V_G \quad (4.4)$$

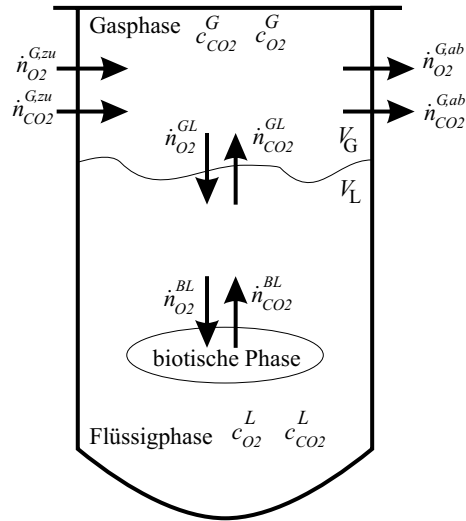


Abb. 4.5: Schematische Darstellung der Konzentrationen und Phasenströme für  $CO_2$  und  $O_2$  bei einem biotechnologischen Prozess. G: Gasphase, L: Flüssigphase, B: biotische Phase

und für die flüssige Phase

$$\frac{dc_{O_2}^L}{dt} = (-\dot{n}_{O_2}^{BL} + \dot{n}_{O_2}^{GL})/V_L, \quad (4.5)$$

$$\frac{dc_{CO_2}^L}{dt} = (\dot{n}_{CO_2}^{BL} - \dot{n}_{CO_2}^{GL})/V_L. \quad (4.6)$$

Zur Berechnung der Sauerstoffaufnahme wird Gleichung 4.3 in Gleichung 4.5 eingesetzt und nach dem Phasenübergangstrom  $\dot{n}_{O_2}^{BL}$  umgestellt. Hierbei wird  $\dot{n}_{O_2}^{BL}$  laut Gleichung 4.1 auf das Flüssigvolumen  $V_L$  und die molare Masse  $M_{O_2}$  bezogen:

$$r_{O_2} = \dot{n}_{O_2}^{BL} \cdot \frac{M_{O_2}}{V_L} = \left( -\frac{dc_{O_2}^L}{dt} V_L - \frac{dc_{O_2}^G}{dt} V_G - \dot{n}_{O_2}^{G,ab} + \dot{n}_{O_2}^{G,zu} \right) \frac{M_{O_2}}{V_L}. \quad (4.7)$$

Zur Berechnung dieser Gleichung sind die  $O_2$ -Molenströme für die Zu- bzw. Abluft notwendig, die durch die Gleichungen

$$\dot{n}_{O_2}^{G,zu} = q_{g,zu} \frac{y_{O_2,zu}}{V_N} \quad \dot{n}_{O_2}^{G,ab} = q_{g,ab} \frac{y_{O_2,ab}}{V_N} \quad (4.8)$$

$$(4.9)$$

aus den gemessenen Molanteilen und der Begasungsrate  $q_{g,zu}$  bestimmt werden. Das Molvolumen der Luft  $V_N = \frac{RT}{p} = 0.0226 \text{ m}^3\text{mol}^{-1}$  wird durch das ideale Gasgesetz bei den Kultivierungsbedingungen von  $T = 298.15 \text{ K}$ ,  $p = 1.093 \cdot 10^5 \text{ Pa}$  und der Gaskonstante  $R = 8.3144 \text{ m}^3 \text{ Pa mol}^{-1}\text{K}^{-1}$  bestimmt. Da ein Messwert für den Abluftstrom  $q_{g,ab}$  nicht zur Verfügung steht, wird dieser über die Bilanzierung des Inertgases Stickstoff in der Begasung durch

$$q_{g,ab} \approx q_{g,zu} \frac{1 - y_{O_2,zu} - y_{CO_2,zu}}{1 - y_{O_2,ab} - y_{CO_2,ab}} \quad (4.10)$$

angenähert.

Die in Gleichung (4.14) benötigten Zeitableitungen der Sauerstoffkonzentrationen in der flüssigen Phase  $\frac{dc_{O_2}^L}{dt}$  und in der gasförmigen Phase  $\frac{dc_{O_2}^G}{dt}$  werden über den Differenzquotienten

$$\frac{dc}{dt} \approx \frac{c(t) - c(t - T)}{T} \quad (4.11)$$

approximiert.  $T$  ist die verwendete Abtastzeit.

Die Sauerstoffkonzentration der flüssigen Phase  $c_{O_2}^L$  wird mit Hilfe des gemessenen Sauerstoffpartialdruckes  $p_{O_2}$  über das Henrysche Gesetz durch

$$c_{O_2}^L = \frac{1}{H_{O_2} V_N} p_{O_2} \quad (4.12)$$

bestimmt. Der Henrykoeffizienten  $H_{O_2} = 4.4 \cdot 10^9 \text{ Pa}$  wurde der Literatur [38] entnommen. Die Sauerstoffkonzentration der gasförmigen Phase wird aus dem Sauerstoffmolanteil in der Abluft bestimmt.

$$c_{O_2}^G = \frac{y_{O_2,ab}}{V_N}. \quad (4.13)$$

Die Berechnung der Kohlendioxidproduktionsrate

$$r_{CO_2} = \dot{n}_{CO_2}^{BL} \cdot \frac{M_{CO_2}}{V_L} = \left( \frac{dc_{CO_2}^L}{dt} V_L + \frac{dc_{CO_2}^G}{dt} V_G - \dot{n}_{CO_2}^{G,zu} + \dot{n}_{CO_2}^{G,ab} \right) \frac{M_{O_2}}{V_L}. \quad (4.14)$$

verläuft analog zur Berechnung der Sauerstoffverbrauchsrate bis auf die Bestimmung der Kohlendioxidkonzentration  $c_{CO_2}^L$  in der Flüssigphase, da der Kohlendioxidpartialdruck nicht als Messwert zur Verfügung steht.

Zur Berechnung wird hier ein Ansatz nach der Zweifilmtheorie verwendet, wonach sich die Konzentration in Flüssigphase durch

$$c_{CO_2}^L = \frac{\dot{n}_{CO_2}^{GL}}{V_L k_{laCO_2}} + \frac{p}{H_{CO_2} V_N} y_{CO_2,ab} \quad (4.15)$$

bestimmen lässt.

Hierzu wird der Transportkoeffizient über die Phasengrenzfläche  $k_{laCO_2}$  benötigt, um über den Molenstrom  $\dot{n}_{CO_2}^{GL}$  und den Kohlendioxidanteil der Gasphase die Konzentration in der Flüssigphase zu bestimmen. Der Henrykoeffizienten für  $CO_2$  lautet  $H_{CO_2} = 1.67 \cdot 10^8$  Pa. Der  $k_{la}$  Wert für Kohlendioxid wird gleich dem  $k_{la}$  für Sauerstoff gesetzt, der über die Gleichung

$$k_{laCO_2} \approx k_{laO_2} = \frac{\tilde{H}_{O_2} \dot{n}_{O_2}^{GL}}{V_L (p \cdot y_{O_2,ab} - p_{O_2})} \quad (4.16)$$

aus den Messgrößen berechnet werden kann.

Zur Messung der  $O_2$ -Molanteile in der Zu- und Abluft  $\{y_{O_2,zu}, y_{O_2,ab}\}$  wurde ein Analysator verwendet, dessen Messprinzip auf dem Paramagnetismus des Sauerstoffs basiert (Optima Magnos 16, Hartmann & Braun). Für die  $CO_2$ -Messung  $\{y_{CO_2,zu}, y_{CO_2,ab}\}$  wurde ein Infrarot-Absorptions-Analysator (Uras 14, Hartmann & Braun) verwendet. Über eine Verbindung mit dem Prozessleitsystem standen die Messwerte beider Analysatoren mit einer Abtastzeit von 5 min zur Verfügung.

## 4.6 Prozessüberwachung und Prozessführung

Zur Realisierung moderner Prozessführungs- und Überwachungskonzepte wurde eine modulare, verteilte Prozessleitsystem-Struktur verwendet, die flexibel genug ist, den Anforderungen im Bereich der Forschung gerecht zu werden. Hierbei wurden bestehende Teilsysteme wie DCU, Online-HPLC, Abgasanalyse, Bedien- und Beobachtungssystem und Programmierumgebung (Matlab) zu einem Prozessleitsystem integriert. Die einzelnen Teilsysteme benutzen Kommunikationskanäle wie DDE oder OPC (standardisierte Software-Schnittstellen), die eine beliebige Verteilung oder Zusammenfassung der Teilaufgaben auf verschiedenen Rechnern in einem lokalen TCP/IP-Netzwerk erlauben. Über die Anbindung an das Internet stehen weiter vielfältige Verteilungsmöglichkeiten zur Verfügung.

### 4.6.1 Struktur des Prozessleitsystems

Die Hardware-Verbindung zwischen den verschiedenen Anlagenkomponenten ist in Abbildung 4.6 dargestellt.

Die Aufgabe der beiden DCU-Einheiten an den Reaktoren ist die Prozessdatenerfassung der Kontrollvariablen und die Realisierung der unterlagerten Regelungen. Dies sind beispielsweise die Drehzahlregelung, die pH-Wert-Regelung oder die Temperaturregelung. Über eine RS422-Schnittstelle und eine Interface-Box (IFB) werden die erfassten Prozessgrößen und Reglerparameter mit einem OPC-Server (MFCS) auf dem Prozessleitrechner ausgetauscht und stehen somit anderen Teilsystemen zur Verfügung.

Die Online-HPLC ist mit einem Analyserechner verbunden, der die chromatographischen Daten der Anlage auswertet und ein Analyse-Protokoll erzeugt, welches über das TCP/IP-Netzwerk zur Verfügung gestellt wird.

Die Signale der Trübungssonden werden über einen Messverstärker zu einer A/D-Wandlerkarte im Prozessleitrechner übertragen. Die A/D-Wandlerkarte wird von einer LabView-Anwendung ausgewertet, die die Daten über einen DDE-Serverdienst zur Verfügung stellt.

Die beiden Gasanalysatoren sind über einen internen Bus miteinander verbunden, während zum Prozessleitrechner die Daten über eine Modbus-Verbindung ausgetauscht werden, die direkt von der Software WinCC ausgewertet wird.

Für Fed-Batch-Experimente sind jeweils drei Schlauchpumpen und Waagen über RS232-Schnittstellen mit dem Prozessleitrechner verbunden. Diese Schnittstellen werden von Matlab ausgelesen und die Daten wiederum über einen DDE-Server auf dem Prozessleitrechner zur Verfügung gestellt.

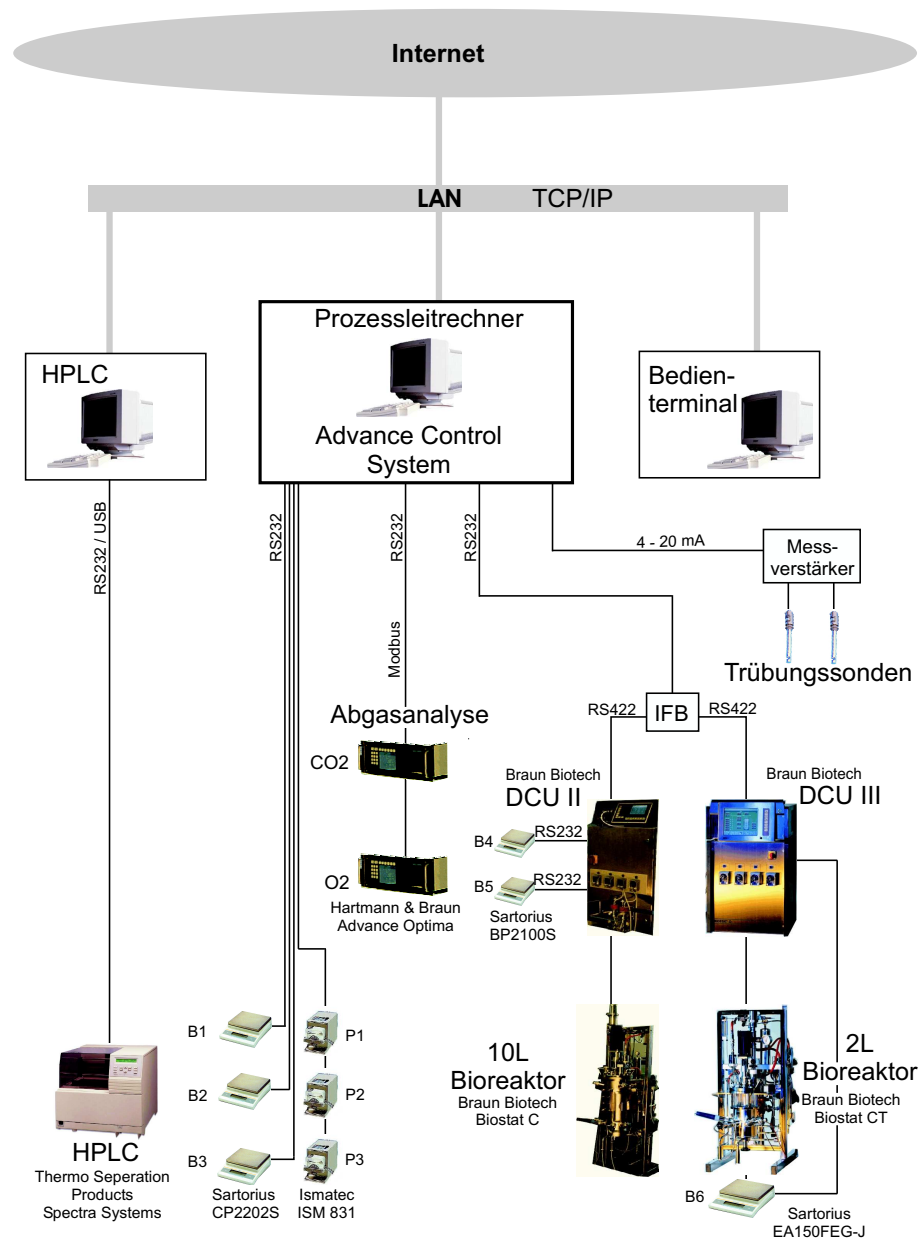


Abb. 4.6: Hardware-Verbindung zwischen den verschiedenen Anlagenkomponenten.

Die Kommunikationsstruktur der Teilsysteme auf dem Prozessleitrechner ist in Abbildung 4.7 im Detail zu sehen. Als zentrale Anwendung wird das Bedien- und Beobachtungssystem WinCC von Siemens verwendet. Dieses System sorgt nicht nur für die Visualisierung und die HMI-Schnittstelle (Human-Machine Interface), siehe Abbildung 4.8 zu den Prozessdaten, sondern stellt auch andere wichtige Module zur Verfügung, wie:

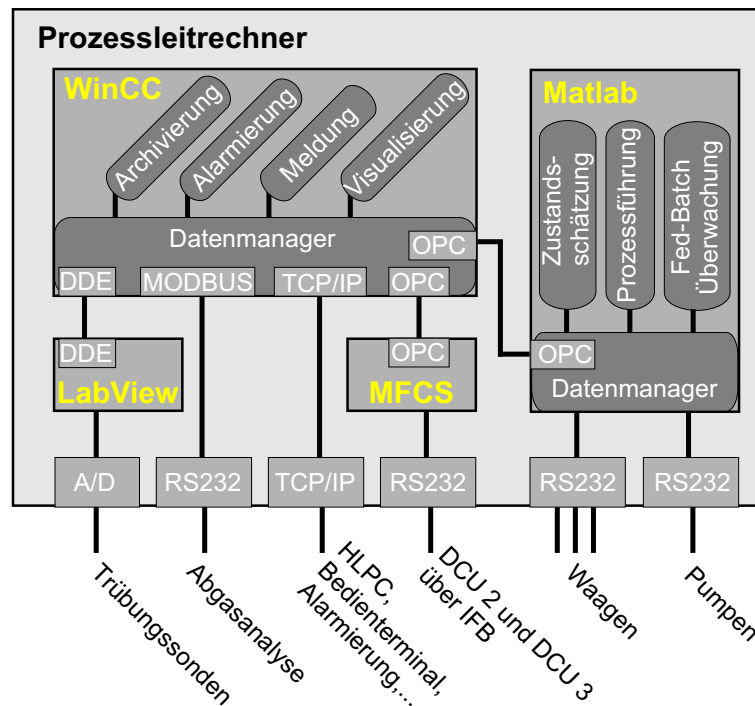


Abb. 4.7: Prozessleitrechner

- **Datenmanager:** Dieses Modul verwaltet alle Verbindungen zu WinCC, es stellt verschiedene Kommunikationskanäle zur Verfügung, koordiniert den Datenzugriff und überwacht die Verbindungen sowie die Grenzwerte der Prozessvariablen.
- **Archivierung:** In einer zentralen Datenbank werden alle vom Datenmanager erfassten Daten archiviert und stehen internen und externen Anwendungen zur Verfügung.
- **Alarmierung:** Wenn bestimmte Grenzwerte überschritten werden oder Anlagen-teile ausfallen werden vorkonfigurierte Alarmierungsaktionen ausgeführt, wie SMS oder E-mail versenden.
- **Meldung:** Erzeugung von Benachrichtigungen im Routine-Betrieb.

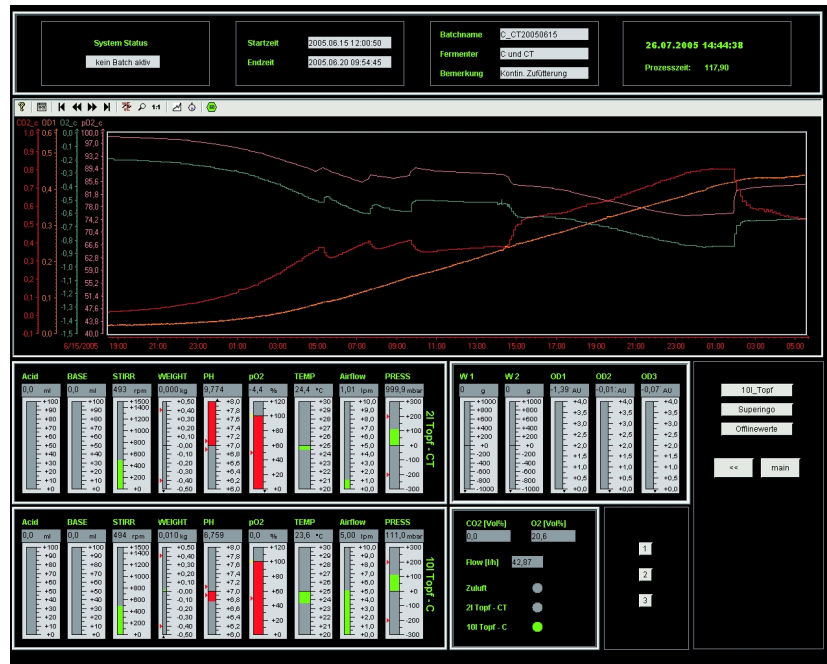


Abb. 4.8: Visualisierung aller wichtigen Kontrollvariablen beider Reaktoren, eine Übersichtsdarstellung.

Neben der zentralen Anwendung WinCC, die die Standardaufgaben der Prozessüberwachung übernimmt, ist Matlab die zweite wichtige Anwendung die leistungsfähige numerische Datenverarbeitungsstrukturen zur Verfügung stellt. Matlab ermöglicht den komfortablen Einsatz aufwendiger modellbasierter Beobachterverfahren zur Schätzung nicht messbarer Zustände und den Einsatz modellbasierter Prozessführungskonzepte (flachheitsbasierte Vorsteuerung, modellprädiktive Regelung). Hierzu sind die Aufgaben, die von Matlab zu bewältigen sind, in einzelne Module aufgeteilt:

- **Datenmanager:** Der Datenmanager in Matlab übernimmt auch hier die Verwaltung des Datenzugriffs. Dies ist zum einen die Verbindung zu WinCC über eine OPC-Schnittstelle und zum anderen die Ansteuerung der Pumpen und das Auslesen der Waagen-Werte über die RS232-Schnittstellen des Rechners zur Realisierung von Fed-Batch-Experimenten. Alle Daten werden zentral in Matlab zur Verfügung gestellt.
- **Fed-Batch-Überwachung:** Dieses Modul realisiert die Umsetzung der gewünschten Zufütterung und garantiert durch eine unterlagerte Regelung über die Waagen die Substratzufuhr.
- **Zustandsschätzung:** Auf der Basis aller zur Verfügung stehender Messwerte können mit Hilfe geeigneter Beobachterverfahren (Extended Kalman Filter, Moving



Horizon Estimator, ...) nicht messbare Zustände des biotechnologischen Prozesses geschätzt werden. Diese Größen können dann zur Prozessüberwachung oder Prozessführung verwendet werden.

- **Prozessführung:** Dieses Modul stellt die Trajektorie für die Zufütterung zur Verfügung (Stellgröße). Dies kann eine im Voraus berechnete Trajektorie sein (Steuerung) oder eine Trajektorie, die auf der Basis der zur Verfügung stehenden Messinformation ständig neu generiert wird (Regelung).

Der modulare Aufbau des Prozessleitsystems ermöglicht eine einfache Verteilung der Teilaufgaben auf mehrere Rechner in einem LAN-Netzwerk. Gerade die Zustandsschätzung und die modellgestützte Prozessführung sind rechenzeitintensive Anwendungen, die somit einfach verteilt werden können.

# Kapitel 5

## Modellierung

„Die Konstruktion von Modellen für ein kleines Stückchen Realität und das Studieren seiner Eigenschaften ist das, wovon Wissenschaft wirklich handelt. Die Modelle - „die Hypothesen“, „die Grundgesetze der Natur“, „die Paradigmen“ - können mehr oder weniger formalen Charakter besitzen, aber allen ist die fundamentale Eigenschaft gemein, dass sie versuchen, Beobachtungen mit bestimmten Mustern zu verbinden.“

*L. Ljung [25]*

In der allgemeinen Modelltheorie nach Stachowiak [45], siehe auch Abbildung 5.1, ist ein Modell durch drei Merkmale gekennzeichnet:

- **Abbildungsmerkmal:** Ein Modell ist immer eine Abbildung (Repräsentation) eines Originals.
- **Verkürzungsmerkmal:** Ein Modell erfasst nicht alle Attribute des Originals, sondern nur diejenigen, die dem Modellierer relevant erscheinen.
- **Pragmatismusmerkmal:** Modellierungszweck oder Interpretation des Modells für einen bestimmten Zweck.

Demnach ist ein Modell eine Abstraktion der Realität, die bewusste Vernachlässigung bestimmter Merkmale, um die für den Modellierungszweck wesentlichen Eigenschaften hervorzuheben.

Bei naturwissenschaftlichen Fragestellungen wird die Modellierung häufig auf Systeme angewendet. Das Systemkonzept kann in verschiedenen Weisen definiert werden. Ein System ist eine abgegrenzte Anordnung von aufeinander einwirkenden Gebilden (Objekten). Solche Gebilde können sowohl Gegenstände als auch Denkmethode (mathematische Methoden) und deren Ergebnisse sein.

Das Ziel der Modellierung ist hierbei beispielsweise

- die Beschreibung von Systemen,

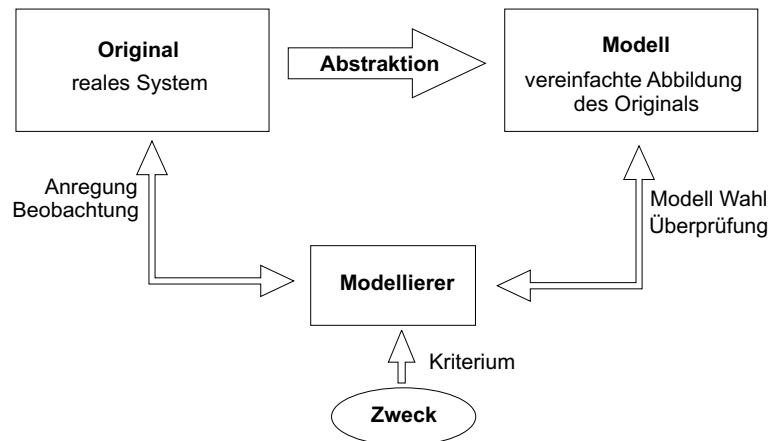


Abb. 5.1: Modellierung.

- die Strukturierung der Information über ein System,
- die Synthese eines neuen Systems,
- die Optimierung des Systems,
- die Durchführung von Simulationen und die Prädiktion des Originalsystems.

Die Systemtheorie stellt Methoden zur Verfügung die allgemein auf alle Systeme angewendet werden können. Diese Methoden basieren auf Grundprinzipien des Zusammenhangs zwischen der Struktur und des Verhaltens von Systemen. Dies sind in naturwissenschaftlichen und ingenieurwissenschaftlichen Bereichen in erster Linie mathematische Methoden und Strukturen zur Systemanalyse und -synthese. Die mathematische Formulierung erlaubt eine einheitliche Darstellung, die den Charakter der Systeme beschreibt, unabhängig von den jeweiligen Fachrichtungen.

Eine mathematische Systembeschreibung besteht aus einer Systemstruktur und Systemparametern, die im Laufe des Modellierungsprozesses bestimmt werden, hierbei spricht man auch von Systemidentifikation. Die Systemidentifikation ist eine Prozedur die mehrmals durchlaufen wird. Sie kann in drei Hauptaufgaben unterteilt werden[27],[25]:

- **Die Beobachtungen**, das Sammeln von Messinformationen. Dieser Schritt beinhaltet nicht nur die Wahl der Messanordnung, sondern auch eine sinnvolle Anregung des Systems, so dass die Daten die „wichtigsten“ Eigenschaften des Systems widerspiegeln.

- **Definition des Modells.** Dies ist wohl der schwierigste Schritt in der Systemidentifikation. Dieser Schritt kann wiederum in drei Teilaufgaben unterteilt werden. Die erste Teilaufgabe ist die Wahl der Modellstruktur. Diese beinhaltet unter anderem die Auswahl zwischen linearen- und nichtlinearen Darstellungen, zwischen „Black-box“ und physikalisch interpretierbaren Ansätzen. Der nächste Punkt ist die Auswahl der möglichen Variablen, wie Anzahl und Art der Ein- und Ausgänge, die in dem Modell berücksichtigt werden sollen. Dieser Schritt beinhaltet auch die Festlegung der Modellordnung und der Zustände. Der letzte notwendige Punkt zur Erstellung eines Modells ist die Parametrisierung des Modells.
- **Validierung des Modells** anhand eines Gütekriteriums. Das Gütekriterium erlaubt eine Bewertung des Modells und einen Vergleich zwischen verschiedenen Modellansätzen. In dem Gütekriterium ist festgelegt, wie die Überprüfung des Zwecks des Modells durchgeführt wird. Dies entspricht einer Überprüfung der aufgestellten Hypothesen. Werden die Modellansätze aufgrund der Validierung als nicht ausreichend angesehen, muss die Prozedur zur Systemidentifikation wiederholt werden, um akzeptable Modelle zu erhalten.

Im weiteren Verlauf dieses Kapitels wird die Modellierung eines biotechnologischen Systems im Detail behandelt. Ziel ist es das dynamische Verhalten des Produktionsprozesses des Bakteriums *P. luminescens* zu beschreiben.

Zunächst wird auf die speziellen Eigenschaften biotechnologischer Systeme eingegangen. A priori Wissen wird zusammengestellt und eine sinnvolle Modellstruktur und ein einheitliches Modellierungskonzept vorgeschlagen.

Modellansätze, die bereits für das Bakterium *P. luminescens* entwickelt wurden, werden zusammengefasst und einheitlich dargestellt.

Auf dieser Basis und auf Grundlage neuer Experimente werden erweiterte Modellansätze entwickelt, die eine größere Zahl relevanter Einflussfaktoren berücksichtigen und die Bildung eines wichtigen Produktes, die Synthese eines Einschlusskörperproteins, beschreiben.

Die so erweiterten Modelle sollen verbesserte simulative und prädiktive Eigenschaften besitzen und als Grundlage für modellbasierte Beobachtungs-, Steuerungs- und Regelungsverfahren dienen können.

## 5.1 Modellierung mikrobiologischer Systeme

Werden lebende Zellen in eine Lösung suspendiert, die die wesentlichen Nährstoffe enthält und die richtigen physiologischen Bedingungen besitzt, wie zum Beispiel die

geeignete Temperatur und den geeigneten pH Wert, dann wachsen Zellen [9]. Das Wachstum der Zellpopulation geht einher mit der Zunahme der Biomasse und einer Erhöhung der Zellzahl.

Die Zellteilung ist der grundlegende biologische Prozess, der das Wachstum und die Fortpflanzung aller Lebewesen gewährleistet. Bei der Zellteilung entstehen zwei neue Zellen aus einer alten, Abbildung 5.2. Teilen sich die Zellen mit einer konstanten Geschwindigkeit, ist eine exponentielle Zunahme der Zellzahl zu beobachten.

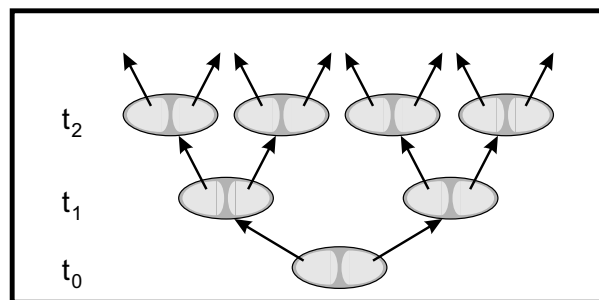


Abb. 5.2: Wachstum durch Zellteilung

Die Aufnahme von Stoffen (Substraten) aus der Umgebung ist ursächlich mit dem Zellwachstum verbunden und eine Folge des Stoffwechsels ist die Abgabe von metabolischen Zwischen- oder Endprodukten (im Weiteren als Produkte bezeichnet) an das umgebende Medium, Abbildung 5.3.

Wird das Zellwachstum in einer Suspension näher untersucht, kann zwischen zwei miteinander wechselwirkenden Systemen unterschieden werden, der biotischen und der abiotischen Phase. Die biotische Phase besteht aus der Zellpopulation (Gesamtheit des biologisch aktiven Materials), und die abiotische Phase aus dem umgebenden Medium.

In der biotischen Phase besteht im Allgemeinen eine signifikante Heterogenität von Zelle zu Zelle. Zu einem gegebenen Zeitpunkt in einem Volumenelement unterscheiden sich die Zellen hinsichtlich ihres individuellen Alters und ihrer biochemischen Aktivität. Die individuelle Zelle selbst stellt zudem ein kompliziertes nichtlineares Multikomponentensystem dar, in dem viele biochemische Reaktionen ablaufen und sich gegenseitig regulieren.

Die biotische Phase repräsentiert also ein hochkomplexes System, welches nun in geeigneter Weise abstrahiert werden muss, um bestimmte Eigenschaften genauer zu untersuchen.

Die schwierigste Aufgabe der Modellierung solcher Systeme besteht darin, die geeigneten Vereinfachungen und Approximationen durchzuführen. Der Zweck, den das

Modell erfüllen soll, muss hierbei stets berücksichtigt werden, da die Gültigkeit dieser Modelle nur für den entsprechenden Zweck, also nur für einen kleinen Definitionsbereich gegeben ist. Die Extrapolationseigenschaften des Modells sind aufgrund der erheblichen Komplexität der biotischen Phase stark eingeschränkt.

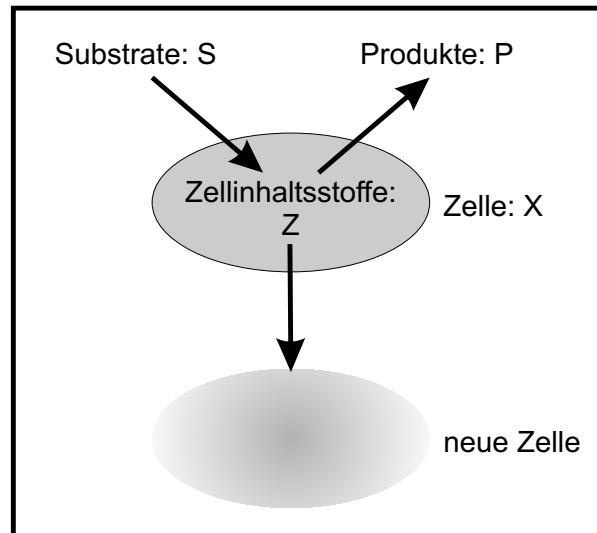


Abb. 5.3: Stoffwechsel einer Zelle

Es ist daher eine gebräuchliche Methode bei der Modellierung die relevanten Zustandsgrößen zu bestimmen. In einem Wachstumsmedium liegen meist alle Komponenten bis auf eine in so hohen Konzentrationen vor, dass deren Konzentrationsänderungen die Gesamtgeschwindigkeit des Prozesses nicht beeinflusst. Das bedeutet, dass nur eine Komponente geschwindigkeitsbestimmend ist. Genau diese Komponente ist dann eine relevante Zustandsgröße im Modell und die anderen Komponenten können ihr gegenüber vernachlässigt werden. Um kompliziertere Wachstumsverhältnisse beschreiben zu können, ist es notwendig mehrere Komponenten, sowohl im Medium als auch in der Zelle oder sogar eine heterogene biotische Phase, zu betrachten.

Zellpopulationsmodelle (Modelle für die biotische Phase) werden bezüglich ihrer Komplexität in verschiedene Kategorien unterteilt, siehe Abb. 5.4. Werden individuelle Zellen oder Gruppen unterschiedlicher morphologischer Formen in der biotischen Phase berücksichtigt, spricht man von segregierten Modellen. Wird stattdessen eine mittlere Zelle betrachtet, ist das Modell nicht segregiert. Die Komplexität der Zelle dagegen wird als unstrukturiert bezeichnet, wenn nur eine Komponente betrachtet wird und als strukturiert, wenn mehrere Komponenten berücksichtigt werden.[9]

Bei der Entwicklung von Bioprozessmodellen ist es neben der Modellierung der biotischen Phase notwendig, die Prozessbedingungen mit zu berücksichtigen. Dies umfasst

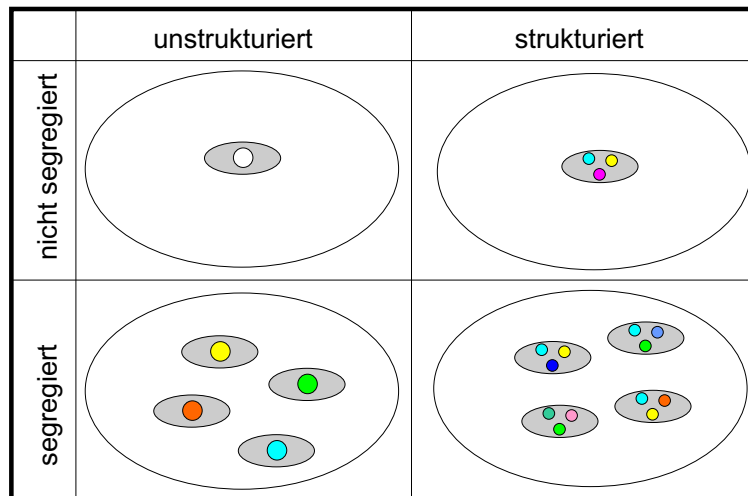


Abb. 5.4: Kategorisierung von Zellpopulationsmodellen

dann den Einfluss des Reaktionsgefäßes und die Betriebsweise des Prozesses. Bei den hier betrachteten Bioprozessmodellen wird von einem idealen Reaktor ausgegangen, der keine Inhomogenitäten besitzt und Durchmischungszeiten aufweist, die klein gegenüber den charakteristischen Zeitkonstanten der mikrobiologischen Kinetik sind [43].

## 5.2 Modellierungskonzept

Dem Modellierungskonzept liegen die Arbeiten von Nielson und Villadsen [33] zugrunde, die auch in der Dissertation von Seydel [44] zusammengefasst wurden. Ziel ist es, einen generellen Rahmen und eine einheitliche Nomenklatur für die Darstellung von mikrobiologischen Systemen zu liefern. Im Unterschied zu den genannten Arbeiten, in denen zwischen intrazellulären Substraten, intrazellulären Produkten und weiteren intrazellulären Komponenten unterschieden wird, wird in dem hier vorgestellten Ansatz, zur Erhöhung der Übersichtlichkeit, von nur einem einzigen intrazellulären Zustandsvektor ausgegangen, der alle relevanten zellinternen Komponenten eines Zelltyps enthält. Zur Herleitung und zum besseren Verständnis einer einheitlichen Nomenklatur wird zunächst eine einfache, unstrukturierte und nicht segregierte Modellstruktur hergeleitet, die zur klassischen Betrachtungsweise biotechnologischer Systeme führt, siehe auch [30]. Auf dieser Basis wird dann die erweiterte Modellstruktur hergeleitet, die eine strukturierte und segregierte Beschreibung zulässt.

Tabelle 5.1 fasst die für die Modellierung relevanten Prozessgrößen zusammen.

Symbol	Einheit	Definition
$ \nu_{\{.. \}} $	-	Stöchiometrischer Koeffizient
$ a_{\{.. \}} $	-	Koeffizient bezogen auf Massenverhältnisse
S,Z,P,X	-	Stoffbezeichnung
$r_i$	$\text{h}^{-1}$	Reaktionsgeschwindigkeit der Reaktion i
$r_{\{.. \}}$	$\text{g} \cdot \text{l}^{-1} \text{h}^{-1}$	Produktions- bzw. Verbrauchsrate
$n_{\{.. \}}$	mol	Stoffmenge
$m_{\{.. \}}$	g	Stoffportion
$q_{\{.. \}}$	$\text{h}^{-1}$	Zellspezifische Produktions- bzw. Verbrauchsrate
$\mu$	$\text{h}^{-1}$	Zellspezifische Wachstumsrate
$c_{\{.. \}}$	$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$	Stoffmengenkonzentration
$C_{\{.. \}}$	$\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$	Stoffmassenkonzentration
$u_{\{.. \}}$	$\text{g} \cdot \text{l}^{-1} \text{h}^{-1}$	Zufuhraten

Tab. 5.1: Zusammenfassung der für die Modellierung relevanten Prozessgrößen

### 5.2.1 Einfache Modellstruktur

Die Grundlage der Beschreibung des Zellwachstums bilden Reaktionsgleichungen. Die Reaktionsgleichungen stellen das charakteristische Verhalten des Zellwachstums dar, welches durch unzählbar viele Elementarreaktionen hervorgerufen wird. Als relevante makroskopische Prozessgrößen werden hierbei Substrate, Produkte und Zellen aufgefasst. Die Reaktionsgleichung, die den Stoffumwandlungsprozess bezogen auf eine Zelle oder ein Vielfaches davon beschreibt, lautet für ein einfaches Beispiel



Eine Zelle nimmt das Substrat  $S$  auf und wandelt es in das Produkt  $P$  und weitere Biomasse  $X$  um. Die stöchiometrischen Koeffizienten  $|\nu_i|$  beschreiben Mengenverhältnisse der beteiligten Stoffe, wobei  $\nu_i$  ein negatives Vorzeichen besitzt, wenn der betreffende Stoff in der Reaktion verbraucht wird und ein positives, wenn er gebildet wird.

Diese Reaktionsgleichung ist aber eine grobe Näherung zahlreicher tatsächlich ablaufender Reaktionen. Zur Bildung des Produktes  $P$  und der Biomasse  $X$  werden noch weitere andere Stoffe benötigt, die aber in ausreichend hoher Konzentration vorliegen, so dass sie das charakteristische Verhalten der Reaktion nicht beeinflussen. Bei dieser Art von grober Reaktionsgleichung (5.1), bei der nicht alle Reaktionsstoffe



berücksichtigt werden, ist zu beachten, dass die Massenbilanz im Allgemeinen nicht erfüllt ist. Die Bilanzierung hierfür lautet

$$\sum_i \nu_i M_i \neq 0, \quad \nu_S M_S + \nu_P M_P + \nu_X M_X = \Delta M, \quad (5.2)$$

wobei  $M_i$  die molare Masse des Stoffes  $i$  ist und  $\Delta M$  die Massen der nicht berücksichtigten Stoffe symbolisiert.

Die in den Gleichungen (5.1) und (5.2) verwendeten stöchiometrischen Koeffizienten sind durch Stoffmengenverhältnisse definiert:

$$\frac{n_{S,x}}{n_X} = |\nu_S|, \quad \frac{n_{P,x}}{n_X} = |\nu_P|, \quad \frac{n_{X,x}}{n_X} = |\nu_X|. \quad (5.3)$$

Hierbei sind  $n_{S,x}$ ,  $n_{P,x}$  und  $n_{X,x}$  die Stoffmengen, die von den Zellen  $n_X$  nach einer vollständig ablaufenden Reaktion verbraucht bzw. gebildet wurden. Bei der Indizierung  $n_{\{.. \}, \{.. \}}$  kennzeichnet der erste Index die Stoffart und der zweite Index, dass diese Stoffmenge aus der Reaktion mit der Biomasse  $X$  hervorgegangen ist bzw. verbraucht wird.

Die reaktionsspezifischen Stoffänderungsgeschwindigkeiten der einzelne Stoffe, bezogen auf ihre stöchiometrischen Koeffizienten

$$\frac{dn_{S,x}}{dt} \cdot \frac{1}{n_X \nu_S} = \frac{dn_{P,x}}{dt} \cdot \frac{1}{n_X \nu_P} = \frac{dn_{X,x}}{dt} \cdot \frac{1}{n_X \nu_X} = r \quad (5.4)$$

sind für alle beteiligten Stoffe gleich und werden als Reaktionsgeschwindigkeit oder Reaktionskinetik  $r$  bezeichnet.

Die Reaktionskinetik ist eine nichtlineare Funktion, die von zahlreichen Größen abhängt, wie beispielsweise von den Konzentrationen der verschiedenen Stoffe in dem umgebenden Medium (abiotische Phase) oder von physikalischen Parametern wie Temperatur, Druck usw. Zwei wichtige Reaktionskinetiken werden in Abschnitt 5.2.4 näher betrachtet.

Stellt  $n_X$  in Gleichung (5.4) die Anzahl der Zellen in der biotischen Phase dar, dann ergeben sich durch Umstellen der Gleichung (5.4) die durch die biotische Phase hervorgerufenen Stoffmengenänderungen

$$\begin{aligned}
\frac{dn_{X,x}}{dt} &= \nu_X \cdot r \cdot n_X, \\
\frac{dn_{S,x}}{dt} &= \nu_S \cdot r \cdot n_X, \\
\frac{dn_{P,x}}{dt} &= \nu_P \cdot r \cdot n_X.
\end{aligned} \tag{5.5}$$

Bei biotechnologischen Prozessen ist es im Allgemeinen nicht möglich die Stoffmengen selbst zu bestimmen. In diesem Fall werden meist andere physikalische Eigenschaften des Stoffes ausgenutzt, die sich proportional zur Stoffmenge verhalten. Gebräuchlich sind hier Stoffmassen  $m$  bzw. Massenkonzentrationen  $m/V_L$ ,  $V_L$  stellt das Volumen des Reaktionsgemisches dar (Flüssigvolumen). Hierbei wird angenommen, dass das spezifische Gewicht  $M_i$  eines Stoffes konstant ist. Diese Annahme muss jedoch nicht bei Zellen und anderen komplexen biologischen Verbindungen erfüllt sein. Im Weiteren wird jedoch von einem konstanten spezifischen Gewicht ausgegangen.

Eine äquivalente Darstellung zu Gleichung (5.5), in der nun Massen anstatt Stoffmengen betrachtet werden, ergibt sich durch Einsetzen der Beziehung

$$m_{i,x} = n_{i,x} \cdot M_i \quad i = S, P, X, \quad m_X = n_X \cdot M_X \tag{5.6}$$

und der Definition neuer Koeffizienten  $a_i$ , die sich hier auf Massenverhältnisse beziehen:

$$\frac{m_{i,x}}{m_X} = |a_i|, \quad a_i = \nu_i \cdot \frac{M_i}{M_X}, \quad i = S, P, X. \tag{5.7}$$

Die Gleichungen lauteten dann

$$\begin{aligned}
\frac{dm_{X,x}}{dt} &= \underbrace{a_X \cdot r}_{q_X} \cdot m_X, \\
\frac{dm_{S,x}}{dt} &= \underbrace{a_S \cdot r}_{q_S} \cdot m_X, \\
\frac{dm_{P,x}}{dt} &= \underbrace{a_P \cdot r}_{q_P} \cdot m_X
\end{aligned} \tag{5.8}$$

und beschreiben die Massenänderungen, die durch die biotische Phase herangerufen wird. Die biotische Phase wird durch  $m_X$  definiert.

Die Größe  $q_X$  (häufig wird auch  $\mu$  verwendet) bezeichnet die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen und die Größen  $q_S$  und  $q_P$  die spezifische Verbrauchs- bzw. Produktionsrate.

Sollen nun die Zustandsgrößen  $m_X$ ,  $m_S$  und  $m_P$  des biotechnologischen Systems bilanziert werden, müssen alle Einflüsse, die zu einer zeitlichen Änderung dieser Größen führen, berücksichtigt werden. Diese Einflüsse können zum einen Prozesse sein, die innerhalb der Systemgrenzen ablaufen (Quellentерme) und zum anderen Prozesse, die über die Systemgrenzen hinweg die Zustandsgrößen beeinflussen (Zu-/Abflussterme).

Für das gesamte biotechnologische System bestehend aus biotischer und abiotischer Phase stellen die Gleichungen (5.8), die das Wachstum der Bakterien beschreiben, Quellenterme dar. Finden keine weiteren Reaktionen in der abiotischen Phase statt, müssen nur noch Zu-/Abflusströme  $\frac{dm_{i,u}}{dt}$  über die Systemgrenzen der Flüssigphase hinweg mit berücksichtigt werden, um das gesamte System zu bilanzieren:

$$\frac{dm_i}{dt} = \frac{dm_{i,x}}{dt} + \frac{dm_{i,u}}{dt} \quad i = S, P, X. \quad (5.9)$$

Werden nun statt Massen  $m_i$  Massenkonzentrationen  $C_i$  der einzelnen Stoffe, bezogen auf das Flüssigvolumen  $V_L$ , betrachtet,

$$C_i = \frac{m_i}{V_L} \quad i = S, P, X \quad (5.10)$$

dann gilt für die Änderung der einzelnen Stoffkonzentrationen im Reaktionsgemisch

$$\frac{dC_i}{dt} = \frac{d}{dt} \frac{m_i}{V_L} = \underbrace{\frac{dm_{i,x}}{dt} \frac{1}{V_L}}_{r_{i,x}} + \underbrace{\frac{dm_{i,u}}{dt} \frac{1}{V_L}}_{r_{i,u}} - \underbrace{\frac{dV_L}{dt} \frac{C_i}{V_L}}_{r_{i,v}}. \quad (5.11)$$

Hierbei wird zwischen drei verschiedenen absoluten Raten unterschieden.  $r_{i,x}$  beschreibt die Änderungsrate aufgrund des Zellwachstums,  $r_{i,u}$  die Änderungsrate aufgrund von Zu-/Abflusströmen und  $r_{i,v}$  die Änderungsrate aufgrund der Volumenänderung.

Zur Bilanzierung des gesamten Systems muss das Flüssigvolumen mit als Zustandsgröße berücksichtigt werden. Das vollständige Differentialgleichungssystem für das biotechnologische System lautet dann:

$$\begin{aligned}
\frac{dC_X}{dt} &= \underbrace{q_X \cdot C_X}_{r_{X,x}} + r_{X,u} - r_{X,v}, \\
\frac{dC_S}{dt} &= \underbrace{q_S \cdot C_X}_{r_{S,x}} + r_{S,u} - r_{S,v}, \\
\frac{dC_P}{dt} &= \underbrace{q_P \cdot C_X}_{r_{P,x}} + r_{P,u} - r_{P,v}, \\
\frac{dV_L}{dt} &= \phantom{\underbrace{q_P \cdot C_X}_{r_{P,x}} + r_{P,u} - r_{P,v},} + r_{V,u}.
\end{aligned} \tag{5.12}$$

Die Größe  $r_{V,u}$  beschreibt einen Volumenstrom über die Systemgrenze hinweg. Es wird davon ausgegangen, dass keine weiteren Prozesse vorkommen, die das Volumen  $V_L$  verändern. Viele Betriebszustände gehen zusätzlich von  $\frac{dV_L}{dt} \approx 0$  aus, welches eine Vereinfachung des Gleichungssystems (5.12) bedeutet, indem die Terme  $r_{i,v}$  wegfallen. Diese Annahme gilt auch für die meisten fed-batch Experimente, bei denen die Volumenänderung durch Zuflüsse vernachlässigt werden kann.

Wird das Differentialgleichungssystem (5.12) in vektorieller Form aufgeschrieben

$$\underbrace{\begin{bmatrix} \dot{C}_X \\ \dot{C}_S \\ \dot{C}_P \\ \dot{V}_L \end{bmatrix}}_{\underline{\dot{x}}} = \underbrace{\begin{bmatrix} r_{X,x} \\ r_{S,x} \\ r_{P,x} \\ 0 \end{bmatrix}}_{r_{Bio}(\underline{x})} + \underbrace{\begin{bmatrix} -r_{X,v} \\ -r_{S,v} \\ -r_{P,v} \\ 0 \end{bmatrix}}_{r_v(\underline{x}, \underline{u})} + \underbrace{\begin{bmatrix} r_{X,u} \\ r_{S,u} \\ r_{P,u} \\ r_{V,u} \end{bmatrix}}_{r_u(\underline{x}, \underline{u})} \tag{5.13}$$

und der Zustandsvektor und Eingangsvektor

$$\underline{x} = \begin{bmatrix} C_X \\ C_S \\ C_P \\ V_L \end{bmatrix} \quad \text{bzw.} \quad \underline{u} = \begin{bmatrix} \dot{m}_{X,u} \\ \dot{m}_{S,u} \\ \dot{m}_{P,u} \\ r_{V,u} \end{bmatrix}, \tag{5.14}$$

eingeführt, dann lässt sich das Differentialgleichungssystem in der allgemeinen Zustandsraumdarstellung

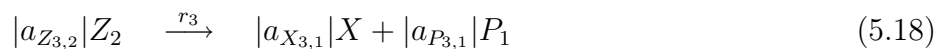
$$\underline{\dot{x}} = r_{Bio}(\underline{x}) + r_v(\underline{x}, \underline{u}) + r_u(\underline{x}, \underline{u}) = \underline{f}(\underline{x}, \underline{u}) \tag{5.15}$$

angeben. Diese Darstellung wird für alle weiteren systemtheoretischen Untersuchungen verwendet. Der Term  $\underline{r}_{Bio}(\underline{x})$  fasst die Zustandsänderungen aufgrund des Stoffwechsels in der biotischen Phase zusammen, der Term  $\underline{r}_u(\underline{x}, \underline{u})$  die Zustandsänderung aufgrund von Einflüssen über die Systemgrenzen hinweg und der Term  $\underline{r}_v(\underline{x}, \underline{u})$  den Einfluss bezüglich der Volumenänderung.

### 5.2.2 Erweiterung der Modellstruktur für eine strukturierte Beschreibung der Zelle

Eine erweiterte Modellstruktur des biotechnologischen Prozesses soll zusätzlich eine strukturierte Beschreibung der Zelle ermöglichen. Hierbei werden nun zellinterne Stoffe mit berücksichtigt. Grundlage der Modellierung sind wiederum die Stoffwechselfvorgänge in einer Zelle, wie schon in Abbildung 5.3 dargestellt.

Die Reaktionen



stellen ein Beispiel für die strukturierte Beschreibung eines Zellwachstumsprozesses dar. In diesem Beispiel wird der Stoffwechselprozess mit drei Reaktionsgleichungen beschrieben. In einer ersten Reaktion werden zwei Substrate  $S_1$  und  $S_2$  von den Zellen aufgenommen und in den zellinternen Stoff  $Z_1$  umgewandelt. Die zweite Reaktion beschreibt eine Umwandlung des zellinternen Stoffs  $Z_1$  in einen anderen zellinternen Stoff  $Z_2$ . Und eine dritte Reaktion beschreibt die gleichzeitige Bildung von Biomasse  $X_1$  und Produkt  $P_1$  unter Verbrauch von  $Z_2$ . Die stöchiometrischen Koeffizienten sind hier von vornherein auf die Biomasse bezogen, siehe Gleichung (5.7).

Auf Grund der Massenbilanzgleichung (5.2) können die Reaktionen auch durch folgende Bilanzgleichungen

$$a_{S_{1,1}}S_1 + a_{S_{1,2}}S_2 + a_{Z_{1,1}}Z_1 = \Delta_1, \quad (5.19)$$

$$a_{Z_{2,1}}Z_1 + a_{Z_{2,2}}Z_2 = \Delta_2, \quad (5.20)$$

$$a_{X_{3,1}}X + a_{P_{3,1}}P_1 + a_{Z_{3,2}}Z_2 = \Delta_3 \quad (5.21)$$

ausgedrückt werden. Der Term  $\Delta_i$  auf der rechten Gleichungsseite symbolisiert die nicht berücksichtigten Reaktionskomponenten und verdeutlicht, dass es sich um eine

grobe Reaktionsgleichung handelt. Diese Darstellung soll bei der Einführung einer vektoriellen Betrachtungsweise hilfreich sein.

Zunächst werden die einzelnen Zustandsgrößen zu folgenden Vektoren zusammengefasst:

- **Substrate**  $\underline{S} = [S_1 \cdots S_n]^T$
- **Produkte**  $\underline{P} = [P_1 \cdots P_m]^T$
- **Zellindividuen**  $X$
- **Zellinterne Zustände (Strukturierung)**  $\underline{Z} = [Z_1 \cdots Z_q]^T$ .

Hierbei ist  $n$  die maximale Anzahl der Substrate,  $m$  die Anzahl der Produkte,  $q$  die Zahl der berücksichtigten internen Zustände.

Für diese Zustandsgrößen lässt sich eine allgemeine Bilanzgleichung  $i$

$$a_{S_{i,1}}S_1 + \cdots + a_{S_{i,n}}S_n + a_{Z_{i,1}}Z_1 + \cdots + a_{Z_{i,p}}Z_p + a_{P_{i,1}}P_1 + \cdots + a_{P_{i,m}}P_m + a_{X_{i,i}}X = \Delta_i \quad (5.22)$$

mit der zugehörigen Reaktionsgeschwindigkeit  $r_i$  angeben. Sind bei dieser verallgemeinerten Reaktion einzelne Stoffe nicht beteiligt, wird ihnen die Verhältniszahl  $a_{\{..\}} = 0$  zugeordnet.

In vektorieller Form lautet diese Reaktionsbilanzgleichung

$$\underbrace{[a_{S_{i,1}} \cdots a_{S_{i,n}}]}_{\underline{S}} \underbrace{\begin{bmatrix} S_1 \\ \vdots \\ S_n \end{bmatrix}}_{\underline{S}} + \underbrace{[a_{P_{i,1}} \cdots a_{P_{i,m}}]}_{\underline{P}} \underbrace{\begin{bmatrix} P_1 \\ \vdots \\ P_m \end{bmatrix}}_{\underline{P}} + \underbrace{[a_{Z_{i,1}} \cdots a_{Z_{i,q}}]}_{\underline{Z}} \underbrace{\begin{bmatrix} Z_1 \\ \vdots \\ Z_q \end{bmatrix}}_{\underline{Z}} + a_{X_{i,1}}X = \Delta_i \quad (5.23)$$

Werden insgesamt  $p$  Reaktionen zur Beschreibung des Stoffwechselvorganges einer Zelle berücksichtigt, können diese zu

$$\underbrace{\begin{bmatrix} a_{S_{1,1}} & \cdots & a_{S_{1,n}} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ a_{S_{p,1}} & \cdots & a_{S_{q,n}} \end{bmatrix}}_{\mathbf{A}_S} \underline{S} + \underbrace{\begin{bmatrix} a_{P_{1,1}} & \cdots & a_{P_{1,m}} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ a_{P_{p,1}} & \cdots & a_{P_{p,m}} \end{bmatrix}}_{\mathbf{A}_P} \underline{P} + \underbrace{\begin{bmatrix} a_{Z_{1,1}} & \cdots & a_{Z_{1,q}} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ a_{Z_{p,1}} & \cdots & a_{Z_{p,q}} \end{bmatrix}}_{\mathbf{A}_Z} \underline{Z} \\
 + \underbrace{\begin{bmatrix} a_{X_{1,1}} \\ \vdots \\ a_{X_{p,1}} \end{bmatrix}}_{\underline{a}_X} X = \underline{\Delta} \quad (5.24)$$

oder

$$\mathbf{A}_S \underline{S} + \mathbf{A}_P \underline{P} + \mathbf{A}_Z \underline{Z} + \underline{a}_X X = \underline{\Delta} \quad (5.25)$$

zusammengefasst werden. Die Matrizen  $\mathbf{A}_S$ ,  $\mathbf{A}_P$ ,  $\mathbf{A}_Z$  und der Vektor  $\underline{a}_X$  fassen die auf Massenverhältnisse bezogenen stöchiometrischen Koeffizienten für die Substrate, die Produkte, die zellinternen Komponenten und die Zellen zusammen. In dem Vektor

$$\underline{r} = \begin{bmatrix} r_1 \\ \vdots \\ r_p \end{bmatrix} \quad (5.26)$$

werden die zu den einzelnen Reaktionsgleichungen gehörenden Reaktionsgeschwindigkeiten angeordnet.

Zur Bilanzierung des Reaktionssystems Zelle, welches durch die Reaktionsgleichungen definiert ist, müssen die spezifischen Verbrauchs- bzw. Produktionsraten für jede Zustandsgröße bestimmt werden.

Diese ergeben sich analog zu der in Abschnitt 5.2.1 in Gleichung (5.8) betrachteten einfachen Modellstruktur, durch Multiplikation der Reaktionsgeschwindigkeit  $r_i$  mit dem zu der Reaktion  $i$  und der Zustandsgröße gehörigen Koeffizienten  $a_{\{.\}}$ . Da aber bei dem hier betrachteten verallgemeinerten Fall eine Zustandsgröße in verschiedenen Reaktionen gebildet oder verbraucht werden kann, muss die Summe über alle Reaktionen gebildet werden:

$$q_X = \sum_{i=1}^p a_{X_i} r_i, \quad q_{S_j} = \sum_{i=1}^p a_{S_{i,j}} r_i, \quad j = 1, \dots, n, \quad (5.27)$$

$$q_{P_j} = \sum_{i=1}^p a_{P_{i,j}} r_i, \quad j = 1, \dots, m, \quad q_{Z_j} = \sum_{i=1}^p a_{Z_{i,j}} r_i, \quad j = 1, \dots, q, \quad (5.28)$$

oder in vektorieller Form

$$\underline{q}_X = \underline{a}_X^T \underline{r}, \quad \underline{q}_S = \mathbf{A}_S^T \underline{r}, \quad \underline{q}_P = \mathbf{A}_P^T \underline{r}, \quad \underline{q}_Z = \mathbf{A}_Z^T \underline{r}. \quad (5.29)$$

Man erhält so die spezifischen Stoffströme  $\underline{q}_S$ ,  $\underline{q}_P$ ,  $\underline{q}_Z$  und  $q_X$  für das Reaktionssystem Zelle. Die Stoffströme  $\underline{q}_S$ ,  $\underline{q}_P$  und  $q_X$  sind Stoffströme über die Systemgrenzen der Zelle hinweg, während  $\underline{q}_Z$  für dieses System einen Quellterm darstellt, der die Veränderung der Zellzusammensetzung  $\underline{y}_Z = \frac{m_{Z,x}}{m_X}$  beschreibt:

$$\frac{d\underline{y}_Z}{dt} = \underline{q}_Z. \quad (5.30)$$

Die Zellzusammensetzung zu einem bestimmten Zeitpunkt  $t$  kann durch das Integral

$$\underline{y}_Z = \underline{y}_{Z_0} + \int_{t_0}^t \underline{q}_Z(\tau) d\tau \quad (5.31)$$

aus der zellspezifischen Rate  $q_Z$ , unter Berücksichtigung des Anfangszustandes der Zelle  $y_{Z_0}$ , bestimmt werden.

Abbildung 5.5 veranschaulicht graphisch die Bilanzierung einer Zelle auf der Basis der Reaktionsgleichungen.

Zur Bilanzierung der biotischen und abiotischen Phase werden, wie bei der einfachen Modellstruktur Massenkonzentrationen der einzelnen Stoffe betrachtet. Die Bilanzgleichungen hierfür können dann analog zu den Gleichungen (5.12) angegeben werden. In diesem erweiterten Fall ergeben sich lediglich vektorielle Gleichungen für die Konzentrationen der Substrate und Produkte in der abiotischen Phase:



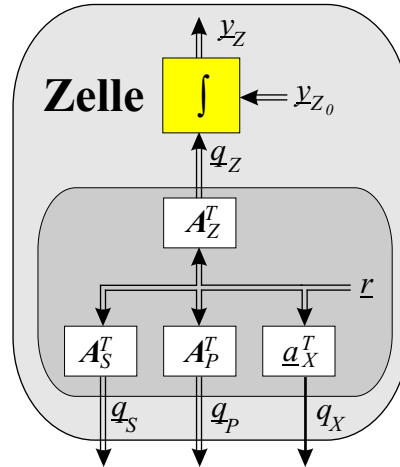


Abb. 5.5: Spezifische Stoffströme  $\underline{q}_S, \underline{q}_P, \underline{q}_Z$  und  $q_X$  einer Zelle und Bilanzierung ihrer Zusammensetzung  $\underline{y}_Z$ .

$$\begin{aligned}
 \frac{dC_X}{dt} &= \underbrace{q_X \cdot C_X}_{r_{X,x}} + r_{X,u} - r_{X,v}, \\
 \frac{dC_S}{dt} &= \underbrace{q_S \cdot C_X}_{r_{S,x}} + r_{S,u} - r_{S,v}, \\
 \frac{dC_P}{dt} &= \underbrace{q_P \cdot C_X}_{r_{P,x}} + r_{P,u} - r_{P,v}, \\
 \frac{dV_L}{dt} &= \quad \quad \quad + r_{V,u}.
 \end{aligned} \tag{5.32}$$

Werden die Differentialgleichungen (5.32) und (5.30) in Vektoren zusammengefasst

$$\underbrace{\begin{bmatrix} \dot{C}_X \\ \dot{C}_S \\ \dot{C}_P \\ \dot{y}_Z \\ \dot{V}_L \end{bmatrix}}_{\dot{\underline{x}}} = \underbrace{\begin{bmatrix} r_{X,x} \\ r_{S,x} \\ r_{P,x} \\ \underline{q}_Z \\ 0 \end{bmatrix}}_{r_{Bio}(\underline{x})} + \underbrace{\begin{bmatrix} -r_{X,v} \\ -r_{S,v} \\ -r_{P,v} \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}}_{r_v(\underline{x}, \underline{u})} + \underbrace{\begin{bmatrix} r_{X,u} \\ r_{S,u} \\ r_{P,u} \\ 0 \\ r_{V,u} \end{bmatrix}}_{r_u(\underline{x}, \underline{u})} \tag{5.33}$$

und der Zustandsvektor und Eingangsvektor

$$\underline{x} = \begin{bmatrix} C_X \\ C_S \\ C_P \\ y_Z \\ \dot{V}_L \end{bmatrix} \quad \text{bzw.} \quad \underline{u} = \begin{bmatrix} \dot{m}_{X,u} \\ \dot{m}_{S,u} \\ \dot{m}_{P,u} \\ r_{V,u} \end{bmatrix}, \quad (5.34)$$

definiert, erhält man eine Systembeschreibung analog zu Gleichung (5.15), die eine Strukturierung der Zelle zulässt.

Eine graphische Veranschaulichung des gesamten biotechnologischen Systems, definiert durch die Differentialgleichung (5.33) unter Einbeziehung der spezifischen Stoffströme der Zellen nach Abbildung 5.5, ist in Abbildung 5.6 zu sehen. Hierbei ist das kleinste Teilsystem die Zelle. Aufgrund von Stoffwechselvorgängen können vier verschiedene zellspezifische Raten oder Stoffströme definiert werden, wovon  $\underline{q}_S$ ,  $\underline{q}_P$  und  $\underline{q}_X$  Stoffströme über die Systemgrenze hinweg beschreiben und  $\underline{q}_Z$  einen Quellenterm für das System Zelle darstellt. Über die Bilanzierung von  $\underline{q}_Z$  wird die Zellzusammensetzung beschrieben.

Die biotische Phase besteht aus der Gesamtheit aller Zellen. Durch Multiplikation der zellspezifischen Raten mit der Zellkonzentration ergeben sich die absoluten Raten  $\underline{r}_{S,x}$ ,  $\underline{r}_{P,x}$  und  $r_{X,x}$ , mit der die einzelnen Stoffe von der biotischen Phase verbraucht bzw. gebildet werden. Die absoluten Raten  $\underline{r}_{S,x}$ ,  $\underline{r}_{P,x}$  stellen wiederum Stoffströme über die Systemgrenze der biotischen Phase dar, während  $r_{X,x}$  für dieses Teilsystem einen Quellenterm darstellt und den autokatalytischen Charakter des Zellwachstums repräsentiert.

Die Änderung der Zellkonzentration  $\dot{C}_X$  kann nicht nur durch das Zellwachstum  $r_{X,x}$  beeinflusst werden, sondern auch von außen über die Zugabe oder das Entfernen von Zellen  $r_{X,u}$ . Ändert sich das Volumen der Flüssigphase  $\dot{V}_L \neq 0$ , übt dies einen zusätzlichen Einfluss auf die Konzentrationen aller Komponenten aus. Jedoch ist dieser Einfluss bei den üblichen Betriebsweisen des Reaktors zu vernachlässigen. Das Integral über die Änderung der Zellkonzentration  $\dot{C}_X$  liefert die Zusammensetzung der biotischen Phase. Die Zusammensetzung der abiotischen Phase ist über die Bilanzierung der absoluten Raten  $\underline{r}_{S,x}$ ,  $\underline{r}_{P,x}$  der biotischen Phase, der von außen vorgegebenen Raten  $\underline{r}_{S,u}$ ,  $\underline{r}_{P,u}$  und durch die von außen hervorgerufene Volumenänderung gegeben. Wie bereits erwähnt, ist die Volumenänderung in den meisten Betriebsfällen zu vernachlässigen.

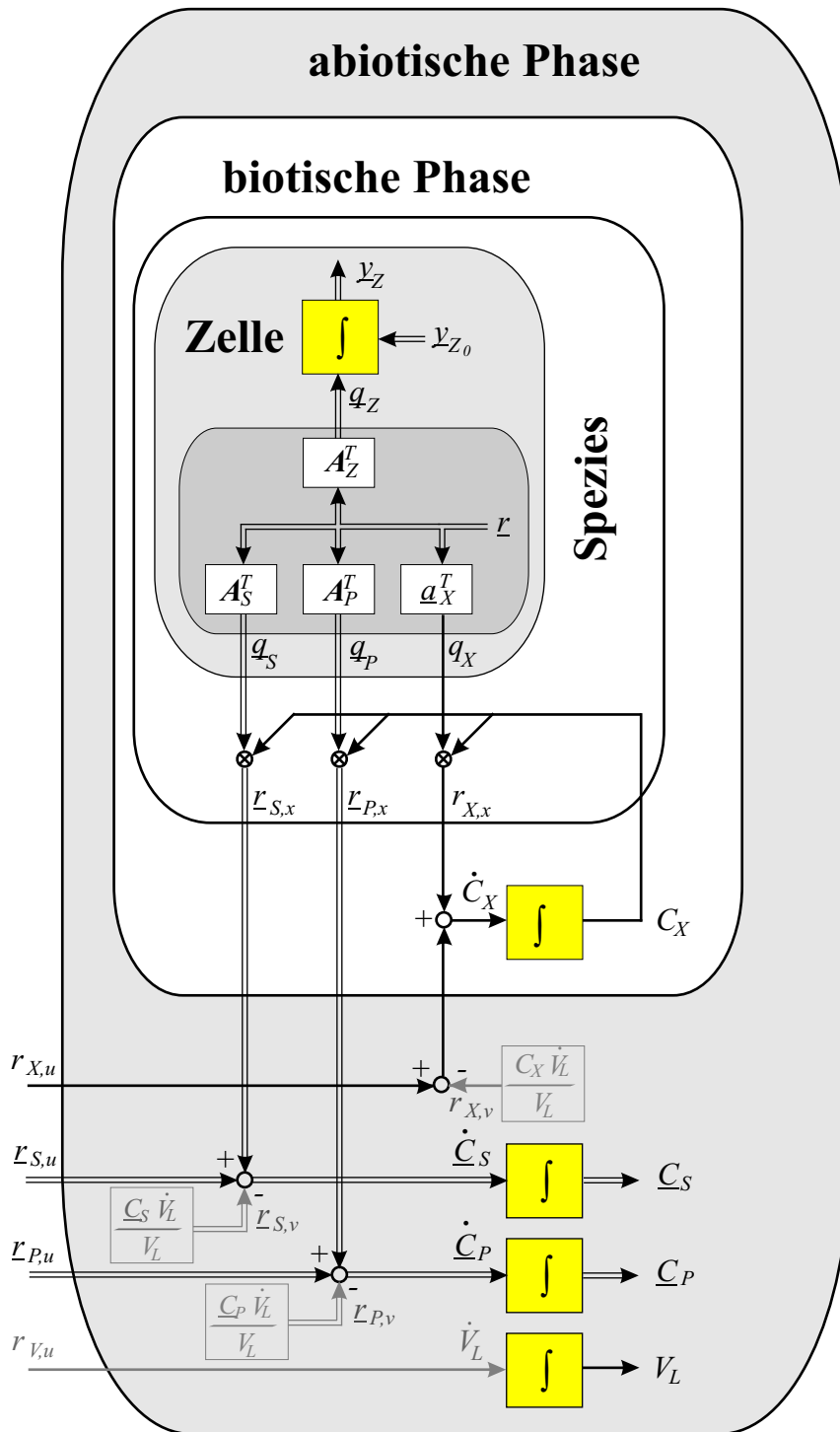


Abb. 5.6: Schematische Darstellung der Stoffströme eines biotechnologischen Prozesses. Aufteilung des Prozesses in biotische Phase ( $C_X$ ) und abiotische Phase ( $C_S, C_P, V_L$ ), wobei die biotische Phase aus einem Zelltyp besteht, der durch die Zusammensetzung  $y_Z$  charakterisiert wird.

### 5.2.3 Erweiterung der Modellstruktur für eine segregierte Beschreibung der biotischen Phase

Um auch kompliziertere Zusammenhänge des mikrobiologischen Wachstums zu beschreiben, kann es notwendig sein, verschiedene morphologische Formen (Zellindividuen, die sich unterschiedlich verhalten) in der biotischen Phase in einem Modell zu berücksichtigen. Zur Erweiterung der im vorherigen Abschnitt hergeleiteten strukturierten Beschreibung werden folgende Zustandsgrößen eingeführt:

- **Zellindividuen, morphologische Formen, (Segregation)**  $\underline{X} = [X_1 \cdots X_i \cdots X_l]^T$  die in der biotischen Phase unterschieden werden können

und die jeweils zu den einzelnen unterschiedenen Spezien gehörenden

- **internen Zustände, (Strukturierung)**  $\underline{Z}_i = [Z_{i,1} \cdots Z_{i,q}]^T$ , wobei sich der Index  $i$  auf die  $i$ -te morphologische Form im Vektor  $\underline{X}$  bezieht .

Für jede morphologische Form  $X_i$  kann wiederum ein System von Reaktionsgleichungen angegeben werden. Diese Reaktionsgleichungen können wie bei der strukturierten Beschreibungsform, ähnlich wie in Gleichung (5.25), zusammengefasst werden.

$$\mathbf{A}_{S,i}\underline{S} + \mathbf{A}_{P,i}\underline{P} + \mathbf{A}_{Z,i}\underline{Z}_i + \mathbf{A}_{X,i}\underline{X} = \underline{\Delta}_i. \quad (5.35)$$

Hierbei bezieht sich der Index  $i$  auf die  $i$ -te morphologische Form. Im Unterschied zur strukturierten Beschreibung in Gleichung (5.25), bei der nur das Wachstum einer morphologischen Form durch den Ausdruck  $\underline{a}_X X$  berücksichtigt wurde, wird hier auch die Umwandlung in eine andere morphologische Form durch die allgemeinere Darstellung  $\mathbf{A}_{X,i}\underline{X}$  in Erwägung gezogen.

Findet bei dieser segregierten Beschreibungsform beispielsweise keine Umwandlung zwischen den betrachteten Erscheinungsformen statt, dann gilt für die Matrix  $\mathbf{A}_{X,i} = [\underline{a}_{X,i_1} \cdots \underline{a}_{X,i_j} \cdots \underline{a}_{X,i_l}]$ , dass die Spaltenvektoren  $\underline{a}_{X,i_j} = \underline{0}$  für  $j \neq i$  sind. Der dann von Null verschiedene Vektor  $\underline{a}_{X,i_i}$  beschreibt das autokatalytische Wachstum der  $i$ -ten Form. In diesem Fall entspricht das Modell einer einfachen Zusammenfassung mehrerer strukturierter Modelle.

Die zu dem Reaktionssystem (5.35) gehörenden Reaktionsgeschwindigkeiten werden für jede morphologische Form  $X_i$  in einem Vektor

$$\underline{r}_i = [r_{i,1} \cdots r_{i,p_i}]^T \quad (5.36)$$

zusammengefasst, wobei eine Anzahl von  $p_i$  Reaktionen betrachtet wird.

Die Dimensionen der stöchiometrischen Matrizen ergeben sich dann für die einzelnen Stoffgruppen zu

$$\mathbf{A}_{S,i} \in \mathbb{R}^{p_i \times n}, \quad \mathbf{A}_{P,i} \in \mathbb{R}^{p_i \times m}, \quad \mathbf{A}_{Z,i} \in \mathbb{R}^{p_i \times q}, \quad \mathbf{A}_{X,i} \in \mathbb{R}^{p_i \times l}. \quad (5.37)$$

Durch Multiplikation der stöchiometrischen Matrizen mit den Reaktionsgeschwindigkeiten lassen sich wiederum die spezifischen Stoffmengenströme der einzelnen Komponenten des Zelltyps  $i$  angeben:

$$\underline{q}_{S,i} = \mathbf{A}_{S,i}^T \underline{r}_i, \quad \underline{q}_{P,i} = \mathbf{A}_{P,i}^T \underline{r}_i, \quad \underline{q}_{Z,i} = \mathbf{A}_{Z,i}^T \underline{r}_i, \quad \underline{q}_{X,i} = \mathbf{A}_{X,i}^T \underline{r}_i. \quad (5.38)$$

Wird die gesamte biotische Phase betrachtet, bestehend aus  $l$  morphologischen Formen oder Zelltypen, können sämtliche Reaktionsgleichungen in der Form

$$\underbrace{\begin{bmatrix} \mathbf{A}_{S,1} \\ \vdots \\ \mathbf{A}_{S,i} \\ \vdots \\ \mathbf{A}_{S,l} \end{bmatrix}}_{\mathbf{A}_S^*} \underline{S} + \underbrace{\begin{bmatrix} \mathbf{A}_{P,1} \\ \vdots \\ \mathbf{A}_{P,i} \\ \vdots \\ \mathbf{A}_{P,l} \end{bmatrix}}_{\mathbf{A}_P^*} \underline{P} + \underbrace{\begin{bmatrix} \mathbf{A}_{Z,1} & 0 & \cdots & \cdots & 0 \\ 0 & \ddots & \ddots & 0 & \vdots \\ \vdots & \ddots & \mathbf{A}_{Z,i} & \ddots & \vdots \\ \vdots & 0 & \ddots & \ddots & 0 \\ 0 & \cdots & \cdots & 0 & \mathbf{A}_{Z,l} \end{bmatrix}}_{\mathbf{A}_Z^*} \underbrace{\begin{bmatrix} \underline{Z}_1 \\ \vdots \\ \underline{Z}_i \\ \vdots \\ \underline{Z}_l \end{bmatrix}}_{\underline{Z}^*} + \underbrace{\begin{bmatrix} \mathbf{A}_{X,1} \\ \vdots \\ \mathbf{A}_{X,i} \\ \vdots \\ \mathbf{A}_{X,l} \end{bmatrix}}_{\mathbf{A}_X^*} \underbrace{\begin{bmatrix} X_1 \\ \vdots \\ X_i \\ \vdots \\ X_l \end{bmatrix}}_{\underline{X}} = \underline{\Delta}^* \quad (5.39)$$

zusammengefasst werden, indem die erweiterten stöchiometrischen Matrizen  $\mathbf{A}_{\{.. \}}^*$  definiert werden. Die zugehörigen Reaktionsgeschwindigkeiten werden in der Matrix

$$\mathbf{R} = \begin{bmatrix} \underline{r}_1 & 0 & \cdots & \cdots & 0 \\ 0 & \ddots & \ddots & 0 & \vdots \\ \vdots & \ddots & \underline{r}_i & \ddots & \vdots \\ \vdots & 0 & \ddots & \ddots & 0 \\ 0 & \cdots & \cdots & 0 & \underline{r}_l \end{bmatrix} \quad (5.40)$$

angeordnet. Die spezifischen Reaktionsraten ergeben sich nun durch Multiplikation der transponierten erweiterten stöchiometrischen Matrizen  $\mathbf{A}_{\{.. \}}^{*T}$  mit der Matrix  $\mathbf{R}$  der Reaktionsgeschwindigkeiten:

$$\mathbf{Q}_S = [\underline{q}_{S,1} \quad \cdots \quad \underline{q}_{S,l}] = \mathbf{A}_S^{*\top} \mathbf{R}, \quad (5.41)$$

$$\mathbf{Q}_P = [\underline{q}_{P,1} \quad \cdots \quad \underline{q}_{P,l}] = \mathbf{A}_P^{*\top} \mathbf{R}, \quad (5.42)$$

$$\mathbf{Q}_Z = \begin{bmatrix} \underline{q}_{Z,1} & 0 & \cdots & 0 \\ 0 & \ddots & 0 & \vdots \\ \vdots & 0 & \ddots & 0 \\ 0 & \cdots & 0 & \underline{q}_{Z,l} \end{bmatrix} = \mathbf{A}_Z^{*\top} \mathbf{R}, \quad \underline{q}_Z = \begin{bmatrix} \underline{q}_{Z,1} \\ \vdots \\ \underline{q}_{Z,l} \end{bmatrix} = \mathbf{Q}_Z \underline{E}, \quad \underline{E} = \begin{bmatrix} 1 \\ \vdots \\ 1 \end{bmatrix} \quad (5.43)$$

$$\mathbf{Q}_X = [\underline{q}_{X,1} \quad \cdots \quad \underline{q}_{X,l}] = \mathbf{A}_X^{*\top} \mathbf{R}. \quad (5.44)$$

Die Differentialgleichungen für den gesamten biotechnologischen Prozess ergeben sich ähnlich wie für die strukturierte Beschreibungsform Gleichung (5.32) und Gleichung (5.30), indem die spezifischen vektoriellen Reaktionsraten  $\underline{q}_{\{\cdot,\cdot\}}$  durch die entsprechenden Matrizen  $\mathbf{Q}_{\{\cdot,\cdot\}}$  und die Biomasse  $C_X$  durch die vektorielle Größe  $\underline{C}_X$  ersetzt werden:

$$\dot{\underline{C}}_X = \underbrace{\mathbf{Q}_X \underline{C}_X}_{\underline{r}_{X,Bio}} - \underline{r}_{X,v} + \underline{r}_{X,u} \quad (5.45)$$

$$\dot{\underline{C}}_S = \underbrace{\mathbf{Q}_S \underline{C}_X}_{\underline{r}_{S,Bio}} - \underline{r}_{S,v} + \underline{r}_{S,u} \quad (5.46)$$

$$\dot{\underline{C}}_P = \underbrace{\mathbf{Q}_P \underline{C}_X}_{\underline{r}_{P,Bio}} - \underline{r}_{P,v} + \underline{r}_{P,u} \quad (5.47)$$

$$\dot{V} = \quad \quad \quad + r_{V,u} \quad (5.48)$$

$$\dot{\underline{y}}_Z = \underbrace{\mathbf{Q}_Z \underline{E}}_{\underline{q}_Z}. \quad (5.49)$$

Diese verallgemeinerte Modellstruktur erlaubt nun die Beschreibung verschiedener komplexer Modelle mit der selben Systematik.

Abbildung 5.7 stellt den biotechnologischen Prozess für eine segregierte und strukturierte biotische Phase dar. Die allgemeine Zustandsraumdarstellung der Differentialgleichungen

$$\underbrace{\begin{bmatrix} \dot{\underline{C}}_X \\ \dot{\underline{C}}_S \\ \dot{\underline{C}}_P \\ \dot{\underline{y}}_Z \\ \dot{\underline{V}}_L \end{bmatrix}}_{\dot{\underline{x}}} = \underbrace{\begin{bmatrix} \underline{r}_{X,Bio} \\ \underline{r}_{S,Bio} \\ \underline{r}_{P,Bio} \\ \underline{q}_Z \\ 0 \end{bmatrix}}_{\underline{r}_{Bio}(\underline{x})} + \underbrace{\begin{bmatrix} \underline{r}_{X,V} \\ \underline{r}_{S,V} \\ \underline{r}_{P,V} \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}}_{\underline{r}_v(\underline{x},\underline{u})} + \underbrace{\begin{bmatrix} \underline{r}_{X,u} \\ \underline{r}_{S,u} \\ \underline{r}_{P,u} \\ 0 \\ r_{V,u} \end{bmatrix}}_{\underline{r}_u(\underline{x},\underline{u})} \quad (5.50)$$

ergibt sich mit der Definition des Zustandsvektors und des Eingangsvektors

$$\underline{x} = \begin{bmatrix} \underline{C}_X \\ \underline{C}_S \\ \underline{C}_P \\ \underline{y}_Z \\ \underline{V}_L \end{bmatrix} \quad \text{bzw.} \quad \underline{u} = \begin{bmatrix} \dot{\underline{m}}_{X,u} \\ \dot{\underline{m}}_{S,u} \\ \dot{\underline{m}}_{P,u} \\ r_{V,u} \end{bmatrix} \quad (5.51)$$

zu

$$\dot{\underline{x}} = \underline{f}(\underline{x}, \underline{u}) = \underline{r}_{Bio}(\underline{x}) + \underline{r}_v(\underline{x}, \underline{u}) + \underline{r}_u(\underline{u}). \quad (5.52)$$

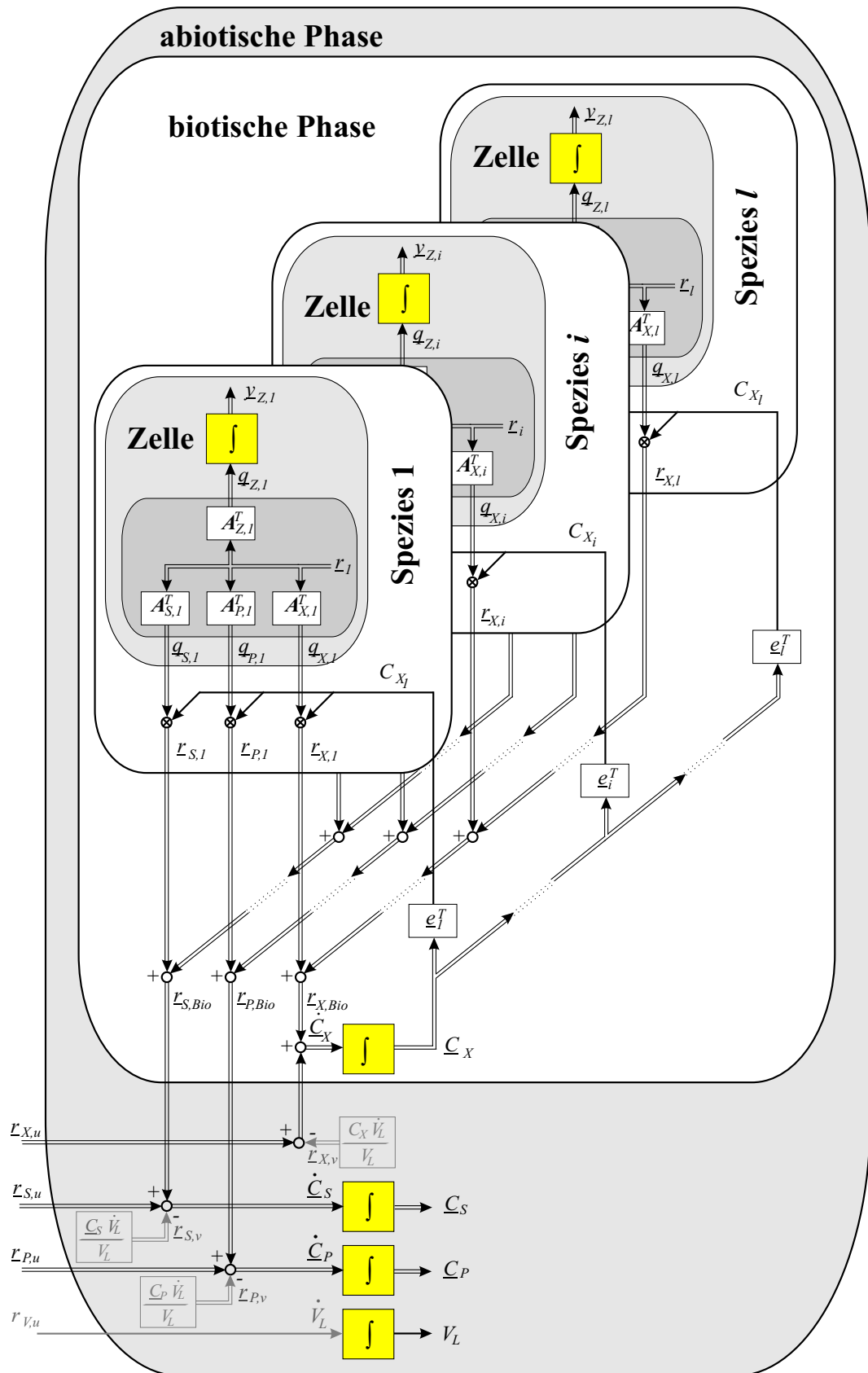


Abb. 5.7: Schematische Darstellung der Stoffströme eines biotechnologischen Prozesses für eine segregierte und strukturierte biotische Phase.



### 5.2.4 Die Reaktionskinetiken

Die Reaktionskinetik beschreibt den zeitlichen Ablauf einer Reaktion, während die zeitunabhängigen, stöchiometrischen Koeffizienten die Verhältnisse der umgesetzten Stoffe zueinander beschreiben. Bei der einfachen Reaktionsgleichung



gilt für die, durch die Reaktion hervorgerufene, zeitliche Änderung der Stoffe folgende Beziehung

$$\frac{dC_S}{dt} \cdot \frac{1}{C_X a_S} = \frac{dC_P}{dt} \cdot \frac{1}{C_X a_P} = \frac{dC_X}{dt} \cdot \frac{1}{C_X a_X} = r. \quad (5.54)$$

Die Reaktionsgeschwindigkeit  $r$  ist im Allgemeinen eine nichtlineare Funktion

$$r = r(T, p, C_i, \dots), \quad (5.55)$$

die eine sehr starke Abhängigkeit unter anderem von der Temperatur  $T$ , vom Druck  $p$  und verschiedenen Stoffkonzentrationen  $C_i$  besitzt.

Viele Betrachtungen dieser Kinetik werden jedoch bei konstanten physikalischen Bedingungen durchgeführt, wie bei konstantem Druck oder konstanter Temperatur, so dass ihr Einfluss nicht betrachtet werden muss. Das charakteristische Verhalten der Kinetik  $r$  ist dann nur noch durch die beteiligten Stoffkonzentrationen beeinflusst, da sich diese im Laufe der Reaktion stark ändern. Eine häufig verwendete Beschreibung der Kinetik ist die Monod-Kinetik [30]

$$r = r_{max} \frac{C_S}{K_S + C_S}. \quad (5.56)$$

Die Monod-Kinetik beschreibt die Reaktionsgeschwindigkeit und somit das Wachstum in Abhängigkeit von einem betrachteten Substrat. Diese Reaktionskinetik hat die gleiche Form wie die Standardgleichung für eine enzymkatalysierte Reaktion mit einem Substrat (Michaelis-Menten-Kinetik). Sie basiert auf der Charakteristik elementarer Stoffwechselforgänge in einer Zelle.

Bei dieser Kinetik ist  $r_{max}$  die maximal erreichbare Reaktionsgeschwindigkeit, wenn  $C_S \gg K_S$  ist. Der Parameter  $K_S$  wird als Halbsättigungskonstante bezeichnet und entspricht der Konzentration des Substrates bei der die Hälfte der maximalen Wachstumsgeschwindigkeit erreicht wird. Für Substratkonzentrationen  $C_S \gg K_S$  ist die Empfindlichkeit der Reaktionsgeschwindigkeit bezüglich der Substratkonzentration sehr gering und somit ist die Reaktionsgeschwindigkeit in diesem Bereich annähernd konstant.

Ein weiterer wichtiger Ansatz zur Beschreibung der Reaktionsgeschwindigkeit, der das Phänomen der Produktinhibierung mit berücksichtigt, ist der Ansatz von Jerusalemsky und Aiba [30]:

$$r = r_{max} \frac{C_S}{K_S + C_S} \frac{K_P}{K_P + C_P}. \quad (5.57)$$

Diese Kinetik setzt sich aus einer Monod-Kinetik und einem weiteren Teil zusammen, der eine Produktabhängigkeit beschreibt. Ist bei diesem Ausdruck die Produktkonzentration  $C_P \ll K_P$ , dann liegt näherungsweise ein Verhalten vor, welches durch die Monod-Kinetik charakterisiert wird. Steigt hingegen die Produktkonzentration an, so dass  $C_P \gg K_P$  gilt, dann wird die Reaktionsgeschwindigkeit stark verlangsamt. Der Parameter  $K_P$  stellt die Produktkonzentration dar, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit durch das Produkt um die Hälfte reduziert wird.

Zur Beschreibung der Wachstumsgeschwindigkeit und des zeitlichen Verlaufs der Stoffwechselforgänge bei Zellpopulationen existieren noch zahlreiche weitere Ansätze, die meist auf empirischen Untersuchungen basieren. Siehe hierzu auch [9] oder [30].

## 5.3 Modelle für das Bakterium *Photobacterium luminescens*

Für das Bakterium *P. luminescens* existieren zwei dynamische Wachstumsmodelle, die die Entwicklung der Biomasse in Abhängigkeit bestimmter Substrate beschreiben. Die beiden Wachstumsmodelle sind für unterschiedliche Medienzusammensetzungen entwickelt worden.

Das erste Wachstumsmodell (YS-Modell) von Stanka und Lebert [46], [26], ursprünglich für ein Hefeextrakt/Glukose-Medium entwickelt und später von Seydel [44] modifiziert, beschreibt das Wachstum in einem komplexen Medium.

Das zweite Wachstumsmodell (Amino-Modell) [44] wurde für ein rein synthetisches Nährmedium aufgestellt, in dem die Anzahl der Medienkomponenten stark begrenzt wurde und in definierten Mengen vorgegeben werden kann.

### 5.3.1 Das YS-Modell

Das Wachstum der Bakterien wird hier in Abhängigkeit der zwei Medienbestandteile Hefeextrakt und Glukose und dem von den Bakterien verstoffwechselten Sauerstoff betrachtet. Tabelle 5.2 fasst die im Modell betrachteten Stoffe zusammen.

Stoff	Symbol
Biotrockenmasse	$X$
Hefeextrakt	$S_1$
Glukose	$S_2$
Sauerstoff	$S_3$

Tab. 5.2: Zusammenfassung der im YS-Modell von Stanka und Lebert betrachteten Stoffe.

In  $p = 2$  Reaktionen



oder in Form von Bilanzen ausgedrückt

$$\underbrace{\begin{bmatrix} a_{S_{1,1}} & 0 & a_{S_{1,3}} \\ 0 & a_{S_{2,2}} & a_{S_{2,3}} \end{bmatrix}}_{\mathbf{A}_S} \underline{S} + \underbrace{\begin{bmatrix} a_{X_1} \\ a_{X_2} \end{bmatrix}}_{\underline{a}_X} X = \underline{\Delta}, \quad \underline{r} = \begin{bmatrix} r_1 \\ r_2 \end{bmatrix} \quad (5.60)$$

wird der Aufbau der Biomasse unter dem parallelen Verbrauch von Hefeextrakt, Glukose und Sauerstoff beschrieben. Die durch dieses Reaktionssystem beschriebene biotische Phase verursacht bei Wachstum die Stoffströme, die in

$$\underline{r}_{Bio} = \begin{bmatrix} a_{X_1}^T \\ a_{X_2}^T \\ \mathbf{A}_S^T \end{bmatrix} \cdot \underline{r} \cdot C_X \quad (5.61)$$

zusammengefasst sind. Für den batch-Betrieb des biotechnologischen Prozesses lässt sich dann folgendes Differentialgleichungssystem angeben:

$$\begin{bmatrix} \dot{C}_X \\ \dot{C}_{S_1} \\ \dot{C}_{S_2} \\ \dot{C}_{S_3} \end{bmatrix} = \underline{r}_{Bio} = \begin{bmatrix} (a_{X_1} r_1 + a_{X_2} r_2) \cdot C_X \\ a_{S_{1,1}} r_1 \cdot C_X \\ a_{S_{2,2}} r_2 \cdot C_X \\ (a_{S_{1,3}} r_1 + a_{S_{2,3}} r_2) \cdot C_X \end{bmatrix}. \quad (5.62)$$

Die Geschwindigkeiten  $r_1$  und  $r_2$  der beiden Reaktionen werden mit folgender Monod-Kinetik beschrieben:

$$r_1 = r_{1_{max}} \frac{C_{S_1}}{K_1 + C_{S_1}}, \quad (5.63)$$

$$r_2 = r_{2_{max}} \frac{C_{S_2}}{K_2 + C_{S_2}}. \quad (5.64)$$

$r_{1_{max}}$  und  $r_{2_{max}}$  geben die maximale Reaktionsgeschwindigkeit an, während  $K_1$  und  $K_2$  den Konzentrationen entsprechen, bei denen die zugehörige Geschwindigkeit gleich der halben maximalen Geschwindigkeit ist. Für dieses Modell wird in der Arbeit von Stanka [46] ein Parametersatz, siehe Tabelle 5.3, angegeben. Die Parameter des Modells sind so gewählt, dass alle Konzentrationen die Einheit  $\text{g l}^{-1}$  besitzen. Diese Parameter beschreiben das Wachstum für niedrige Biomassekonzentrationen bis zu einer Biotrockenmasse von weniger als  $5 \text{ g l}^{-1}$ . Die maximale spezifische Wachstumsrate beträgt hier  $\mu_{max} = 0.37 \text{ h}^{-1}$ .

stöch. Param.	kin. Param
$a_{S_{1,1}} = -1$	$K_1 = 0.049 \text{ g l}^{-1}$
$a_{S_{1,3}} = -6.67$	$K_2 = 0.070 \text{ g l}^{-1}$
$a_{S_{2,2}} = -1$	$r_{1max} = 0.06 \text{ h}^{-1}$
$a_{S_{2,3}} = -0.64$	$r_{2max} = 0.05 \text{ h}^{-1}$
$a_{X_1} = 3, 5$	
$a_{X_2} = 3, 2$	

Tab. 5.3: Parameter des YS-Modells für niedrige Biomassekonzentration.

Quelle: [46]

Ursprünglich wurde das Substrat Hefeextrakt nicht genauer spezifiziert. Hefeextrakt besteht jedoch aus 19 verschiedenen Aminosäuren und zahlreichen anderen Bestandteilen, die auf unterschiedlichen Stoffwechselwegen verbraucht werden. Eine Reduzierung auf eine geschwindigkeitsbestimmende Komponente ist deshalb nur schwer möglich.

Aufgrund von HPLC-Analysen des komplexen Mediums [44] wurde das ursprüngliche Modell modifiziert. Hierbei wurde die Glutaminsäure als eine messtechnisch erfassbare, repräsentative Größe für das Substrat  $S_1$  in dem Kultivierungsmedium eingeführt. Des Weiteren zeigte sich, dass in dem Nährmedium neben der Glukose als Kohlenstoffquelle noch der zweiwertige Zucker Saccharose, durch die Zugabe des Hefeextrakts, enthalten ist. Dieser Zucker wird parallel mit der Glukose verstoffwechselt. Das Substrat  $S_2$  wird deshalb als die Summe der beiden Zucker angesehen.

Für dieses Modell wird der zweite Parametersatz, für eine höhere Biomasse-Konzentration von über  $5 \text{ g l}^{-1}$  Biotrockenmasse [44] in Tabelle 5.4 angegeben. Das Modell mit diesen Parametern beschreibt eine maximale spezifische Wachstumsrate von  $\mu_{max} = 0.38 \text{ h}^{-1}$ .

stöch. Param.	kin. Param
$a_{S_{1,1}} = -1$	$K_1 = 0.029 \text{ g l}^{-1}$
$a_{S_{2,2}} = -1$	$K_2 = 0.4 \text{ g l}^{-1}$
$a_{X_1} = 3.06$	$r_{1max} = 0.071 \text{ h}^{-1}$
$a_{X_2} = 0, 86$	$r_{2max} = 0.19 \text{ h}^{-1}$

Tab. 5.4: Parameter des YS-Modells für eine hohe Biomasse-Konzentration. Für die Modellgleichung 5.62 wurden keine stöchiometrischen Parameter angegeben.

Quelle: [44]

Bei weiteren Versuchen, speziell bei Fed-Batch-Experimenten für hohe Zelldichten, zeigte sich, dass diese vereinfachte Modellierung des Hefeextraktes nicht ausreichend ist, da sich einige Komponenten aufkonzentrieren, während andere bereits verbraucht sind. Aus diesem Grunde wurde ein rein synthetisches Aminosäure/Glukose-Medium entwickelt, das die Bilanzierung und Zugabe aller relevanten Bestandteile erlaubt.

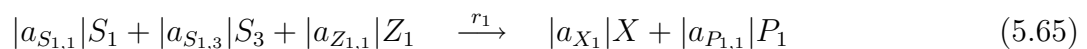
### 5.3.2 Das Amino-Modell

Dieses Modell wurde für das definierte Aminosäure/Glukose Medium mit 7 Aminosäuren aufgestellt. Für die Modellierung werden im Medium nur der Zucker Glukose und die Aminosäure Tyrosin betrachtet. In der Bakterienzelle selbst wird ein Zustand eingeführt, der die Konzentration des in der Zelle befindlichen Tyrosins beschreibt. Tabelle 5.5 fasst die im Modell betrachteten Stoffe zusammen.

Stoff	Symbol
Biotrockenmasse	$X$
Glukose	$S_1$
Tyrosin	$S_2$
Sauerstoff	$S_3$
Kohlendioxid	$P_1$
Tyrosin in der Zelle	$Z_1$

Tab. 5.5: Zusammenfassung der im Amino-Modell betrachteten Stoffe.

Die drei Reaktionsgleichungen



modellieren das Wachstum der Bakterien für den Batch-Betrieb. Die Reaktion 5.65 beschreibt die Entstehung der Biomasse und des Kohlendioxids, während Glukose, Sauerstoff und zellinternes Tyrosin verbraucht werden. Die Reaktionen 5.66 und 5.67 geben die beiden Stoffwechselwege an, aus welchen Stoffen das zellinterne Tyrosin synthetisiert wird.

Die Reaktionen 5.65 - 5.67 werden zu dem Gleichungssystem

$$\begin{aligned}
\underbrace{\begin{bmatrix} a_{S_{1,1}} & 0 & a_{S_{1,3}} \\ a_{S_{2,1}} & 0 & 0 \\ 0 & a_{S_{3,2}} & 0 \end{bmatrix}}_{\mathbf{A}_S} \underbrace{\begin{bmatrix} S_1 \\ S_2 \\ S_3 \end{bmatrix}}_{\underline{S}} + \underbrace{\begin{bmatrix} a_{X_1} \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}}_{\underline{a}_X} X + \underbrace{\begin{bmatrix} a_{P_{1,1}} \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}}_{\underline{a}_P} \underbrace{\begin{bmatrix} P_1 \\ \vdots \\ P \end{bmatrix}}_{\underline{P}} \\
+ \underbrace{\begin{bmatrix} a_{Z_{1,1}} \\ a_{Z_{2,1}} \\ a_{Z_{3,1}} \end{bmatrix}}_{\underline{a}_Z} Z = \underline{\Delta}, \quad \underline{r} = \begin{bmatrix} r_1 \\ r_2 \\ r_2 \end{bmatrix}
\end{aligned} \tag{5.68}$$

zusammengefasst, um die stöchiometrischen Matrizen zu definieren. Hieraus lässt sich wiederum der Vektor

$$\underline{r}_{Bio} = \begin{bmatrix} \underline{a}_X^T \\ \mathbf{A}_S^T \\ \underline{a}_P^T \\ 0 \end{bmatrix} \cdot \underline{r} \cdot C_X + \begin{bmatrix} 0 \\ \underline{0} \\ 0 \\ \underline{a}_Z^T \end{bmatrix} \cdot \underline{r} \tag{5.69}$$

bestimmen. Der letzte Term des Vektors  $\underline{r}_{Bio}$  enthält eine zellspezifische Rate, die die zeitliche Änderung des zellinternen Stoffes  $Z$  beschreibt. Das Differentialgleichungssystem kann für den Batch-Betrieb in der Form

$$\begin{bmatrix} \dot{C}_X \\ \dot{C}_{S_1} \\ \dot{C}_{S_2} \\ \dot{C}_{S_3} \\ \dot{C}_{P_1} \\ \dot{y}_Z \end{bmatrix} = \underline{r}_{Bio} = \begin{bmatrix} a_{X_1} r_1 \cdot C_X \\ (a_{S_{1,1}} r_1 + a_{S_{2,1}} r_2) \cdot C_X \\ a_{S_{3,2}} r_3 \cdot C_X \\ a_{S_{1,3}} r_1 \cdot C_X \\ a_{P_{1,1}} r_1 \cdot C_X \\ a_{Z_{1,1}} r_1 + a_{Z_{2,1}} r_2 + a_{Z_{3,1}} r_3 \end{bmatrix} \tag{5.70}$$

angegeben werden. Die Kinetiken

$$r_1 = r_{1max} \frac{C_{S_1}}{K_{1,1} + C_{S_1}} \cdot \frac{y_Z}{K_{1,2} + y_Z}, \tag{5.71}$$

$$r_2 = r_{2max} \frac{C_{S_1}}{K_{2,1} + C_{S_1}} \cdot \frac{K_{2,2}}{K_{2,2} + y_Z}, \tag{5.72}$$

$$r_3 = r_{3max} \frac{C_{S_2}}{K_{3,1} + C_{S_2}} \cdot \frac{K_{3,2}}{K_{3,2} + y_Z} \tag{5.73}$$

bestimmen die zu den Reaktionen gehörenden Geschwindigkeiten und beschreiben die Umstände, unter denen die Reaktionen ablaufen. Die zu diesem Modell angegebenen Parameter sind in der Tabelle 5.6 zusammengestellt. Im Gegensatz zu den ursprünglich von Seydel angegebenen Parametern beziehen sich die hier zusammengestellten Parameter auf Konzentrationsangaben der Stoffe in der Einheit  $g\ l^{-1}$ .

stöch. Param.	kin. Param	
$a_{S_{1,1}} = -1$	$K_{1,1} = 0.15$	$g\ l^{-1}$
$a_{S_{1,3}} = -1.1605$	$K_{2,1} = 0.15$	$g\ l^{-1}$
$a_{S_{2,1}} = -1$	$K_{3,1} = 0.0181$	$g\ l^{-1}$
$a_{S_{3,2}} = -1$	$K_{1,2} = 0.001$	
$a_{P_{1,1}} = 1.9951$	$K_{2,2} = 1.33 \cdot 10^{-5}$	
$a_{X_1} = 1.6$	$K_{3,2} = 1.0147 \cdot 10^{-4}$	
$a_{Z_{1,1}} = -0.016$	$r_{1max} = 0.29$	$h^{-1}$
$a_{Z_{2,1}} = 0.0140$	$r_{2max} = 1$	$h^{-1}$
$a_{Z_{3,1}} = 0.0480$	$r_{3max} = 1$	$h^{-1}$

Tab. 5.6: Parameter des Amino-Modells.

Quelle: [44]

Die Abbildungen 5.8 und 5.9 zeigen den Vergleich von simulierten und gemessenen Prozessgrößen eines Standard-Batch-Experimentes.



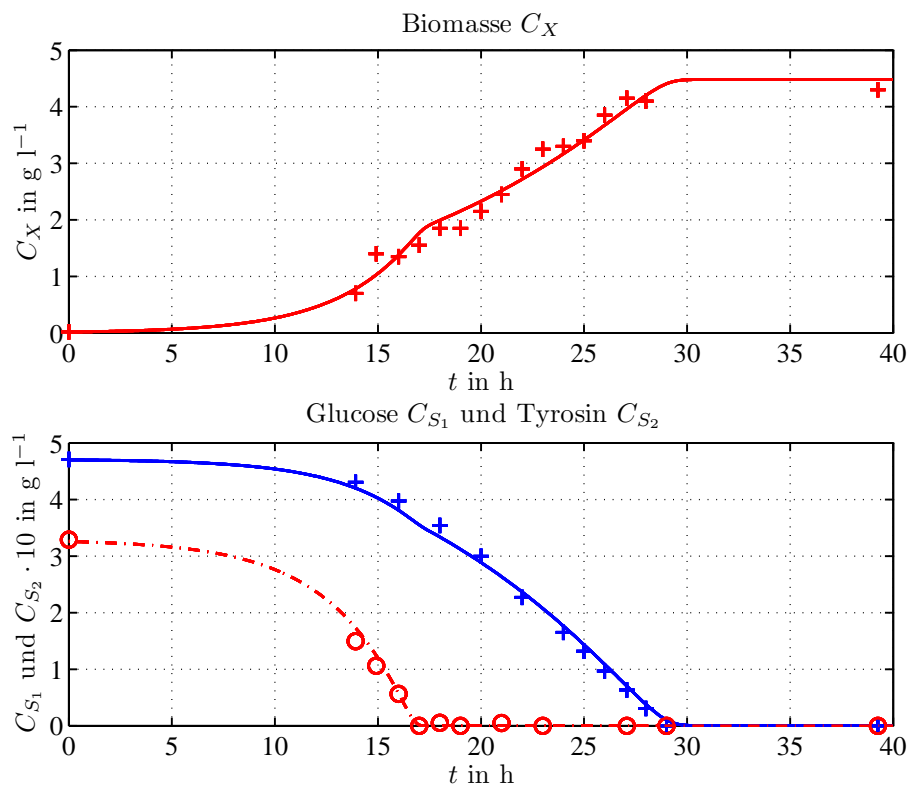


Abb. 5.8: Vergleich der Messwerte (Symbole) und der Simulation (Kontinuierlicher Verlauf) des Amino-Modells für ein Standard-Batchexperiment. Biomasse (+ -), Glukose (+ -), Tyrosin (o - -)

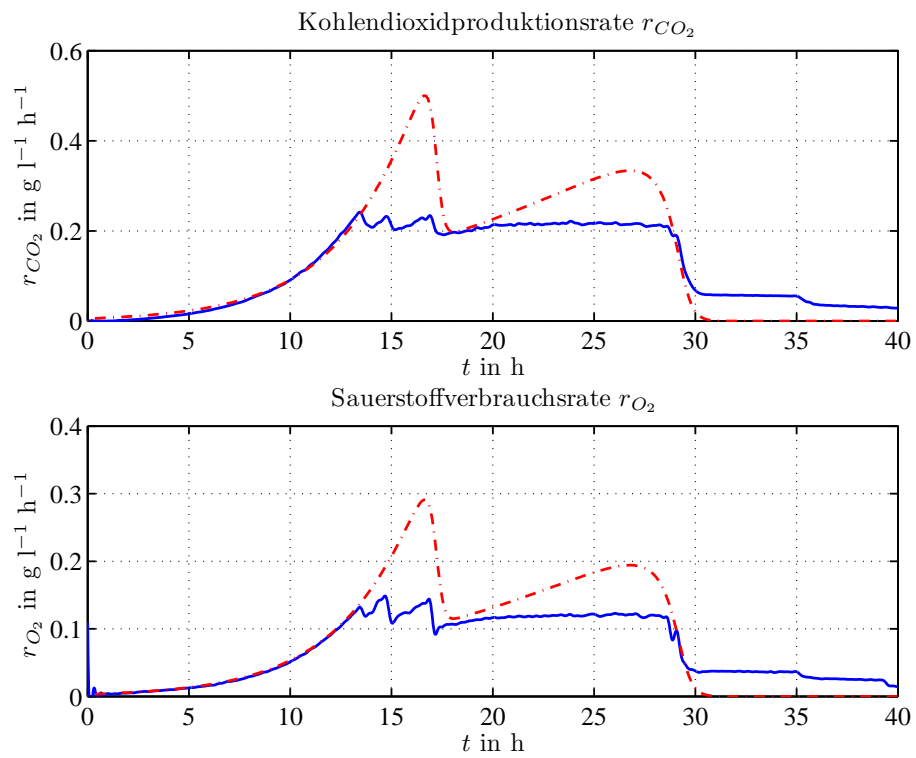


Abb. 5.9: Vergleich der Messwerte (-) und der Simulation (-·-) bei dem Amino-Modell für ein Standard-Batch-Experiment.

## 5.4 Erweiterung der Modellansätze

Die in Kapitel 5.3 vorgestellten Modelle beschreiben nur die Entwicklung der Biomasse in Abhängigkeit einiger weniger Substrate. Die Eigenschaften oder die Qualität der Bakterien bzw. der Biomasse wird bei diesen Ansätzen nicht berücksichtigt. Unter Eigenschaften oder Qualität der Biomasse können verschiedene Stoffe aufgefasst werden, die die Bakterien nur unter bestimmten Kultivierungsbedingungen bilden.

Als ein wichtiges Qualitätsmerkmal bei diesem Prozess wird die Menge eines kristallinen Einschlusskörperproteins angesehen, welches die Bakterien im Laufe ihrer Kultivierung bilden können. Dieses Einschlusskörperprotein spielt eine sehr wichtige Rolle bei der erfolgreichen Weiterkultivierung der Nematoden, für die die Bakterien als Nährmedium dienen.

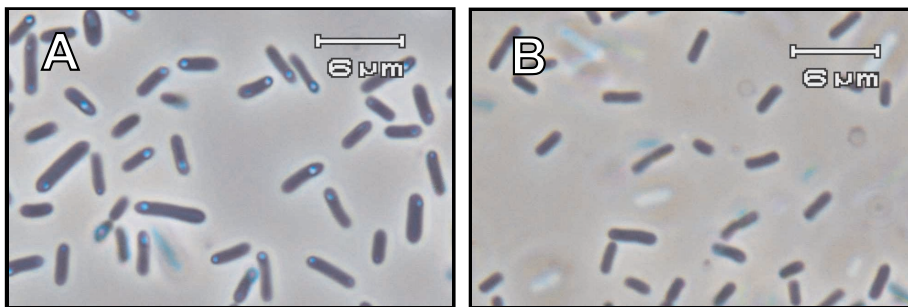


Abb. 5.10: Mikroskopische Aufnahmen von *P. luminescens* Kulturen nach 35 h Kultivierungszeit unter den Kultivierungsbedingungen A und B in einem Bioreaktor.

Anhand von Voruntersuchungen zu den Einschlusskörpern wurde ein starker Einfluss der Medienzusammensetzung auf die Einschlusskörperbildung festgestellt [8]. Hierbei konnte der Haupteinfluss auf die Aminosäure Serin und die Kohlenstoffquelle Glukose reduziert werden. Zwei Versuchsanordnungen, die im Weiteren als A und als B bezeichnet werden, unterscheiden sich stark durch die Menge an gebildeten Einschlusskörpern. Diese beiden Versuchsanordnungen werden aus einer Reihe von Versuchen näher betrachtet, um das Vorgehen bei der Modellierung der beobachteten Effekte zu beschreiben. Beide Anordnungen bestanden aus SKB-Bedingungen und DKM-Medium, abweichend davon wurde bei der Versuchsanordnung B eine 5-fach höhere Serinkonzentration im Medium vorgelegt. Abbildung 5.10 zeigt die mikroskopischen Aufnahmen von Bakterien nach 35 h Kultivierungszeit aus den beiden Versuchsanordnungen. Die Bakterien, denen eine 5-fach höhere Serinkonzentration im Medium zur Verfügung stand, haben keine Einschlusskörper gebildet, während die Bakterien, die in dem DKM-Medium kultiviert wurden, deutliche Einschlusskörper ausgebildet haben.

Die erweiterten Modellansätze sollen die beobachteten Effekte quantitativ beschreiben und einen funktionalen Zusammenhang zur Verfügung stellen, der als Basis für die Entwicklung modellbasierte Prozessführungs- und Beobachtungsverfahren dienen kann.

### 5.4.1 Versuchsauswertung

Um einen funktionalen Zusammenhang zwischen dem Wachstum der Bakterien, der Einschlusskörperbildung und dem Verbrauch der Substrate herzuleiten, wurden bei allen Experimenten Analysen bezüglich der Stoffe in Tabelle 5.7 vorgenommen.

Stoff	Bezeichnung
Biotrockenmasse	$X$
Glukose	$S_1$
Tyrosin	$S_2$
Serin	$S_3$
Lysin	$S_4$
Glutaminsäure	$S_5$
Threonin	$S_6$
Histidin	$S_7$
Methionin	$S_8$
Sauerstoff	$S_9$
Kohlendioxid	$P_1$
CIP-Protein	$P_2$

Tab. 5.7: Zusammenfassung der Stoffe die im Modell betrachtet werden sollen.

Für beide Versuchsanordnungen A und B wurden mehrere Experimente unter den gleichen Bedingungen, siehe Tabelle 5.8, durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit beurteilen zu können. Die Kohlendioxidproduktionsraten und die Biotrockenmassen von zwei Experimenten für jede Versuchsanordnung (V1 und V4 unter Versuchsbedingungen A und V2 und V3 unter Versuchsbedingungen B), sind in der Abbildung 5.11 dargestellt. Anhand dieser Abbildungen wird der durch die unterschiedliche Serinkonzentration verursachte, charakteristische Wachstumsverlauf deutlich.

Unter Versuchsbedingung B (5-fach höhere Serinkonzentration) wird wesentlich mehr Kohlendioxid und Biomasse produziert als unter Versuchsbedingung A, jedoch weisen die Bakterien unter Versuchsbedingung B keine sichtbaren Einschlusskörper auf.

Zu beachten ist, dass aufgrund unterschiedlicher, nicht zu beeinflussender Anfangsbedingungen das Wachstum der einzelnen Experimente zeitversetzt statt fand. Zum

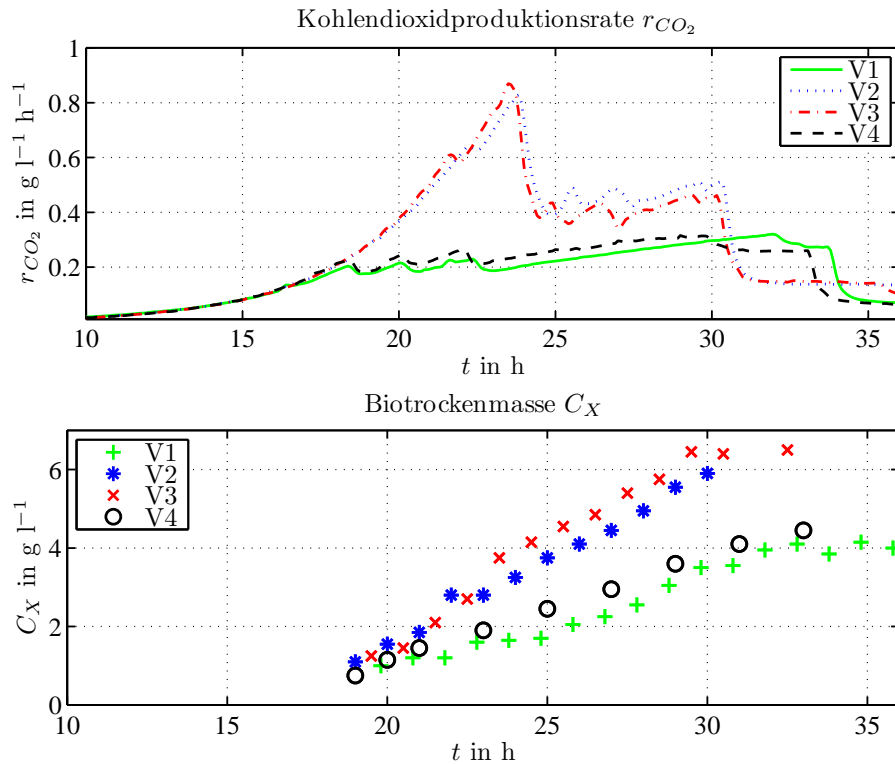


Abb. 5.11: Vergleich von vier Kultivierungsexperimenten. Experimente V1 und V4 unter Versuchsbedingungen A und Experimente V2 und V3 unter Versuchsbedingungen B. Dargestellt sind die Kohlendioxidproduktionsraten und Biotrockenmassen.

Anordnung	Versuche	Medium
A	V1, V4	DKM-Medium
B	V2, V3	wie A aber 5-fach Serinkonzentration

Tab. 5.8: Versuchsanordnungen

besseren Vergleich der Experimente wurde eine Justierung der Zeitachse durchgeführt. Hierbei wurden die  $r_{CO_2}$ -Kurven während des nicht substratlimitierten Wachstums, etwa bei der Prozesszeit 15 h, zur Überlappung gebracht. Die Zeitverschiebung

$$t = t_{V_i} + \tau_i, \quad i = 1, 2, 3, 4 \quad (5.74)$$

der einzelnen Batchzeiten  $t_{V_i}$  der Versuche betrug

$$\tau_1 = -0,2 \text{ h}, \quad \tau_2 = 3 \text{ h}, \quad \tau_3 = 4 \text{ h} \text{ und } \tau_4 = 1,5 \text{ h}. \quad (5.75)$$

Die  $r_{CO_2}$ -Messwerte als auch die Messwerte für die Biotrockenmasse  $C_X$ , in Abbildung 5.11, weisen für beide Versuchsanordnungen A und B signifikant unterschiedliche Kurvenverläufe auf. Wobei die Experimente, die zu der selben Versuchsanordnung gehören, einen reproduzierbaren charakteristischen Verlauf haben.

Zunächst wird der Zusammenhang zwischen der Kohlendioxidproduktionsrate und der Biomasse etwas genauer betrachtet, da die Biomasse die zentrale Zustandsgröße in dem System darstellt und die Kohlendioxidproduktionsrate der wichtigste online-Messwert ist, der mit ihr in Zusammenhang steht.

Zur Interpretation der Messwerte soll zunächst ein einfacher Zusammenhang zwischen der Kohlendioxidproduktionsrate und der Biomasse hergeleitet werden, um erste qualitative Abschätzungen über den Wachstumsprozess machen zu können.

Hierbei wird davon ausgegangen, dass die absolute Wachstumsrate der Zellen  $r_X$  durch die Gleichung

$$r_X = \mu(t) \cdot C_X = \dot{C}_X \quad (5.76)$$

beschrieben werden kann. Diese Gleichung beschreibt einen autokatalytischen Wachstumsprozess mit der zeitvarianten Wachstumsgeschwindigkeit  $\mu$ . Weiterhin wird die Annahme getroffen, dass der Kohlendioxidausstoß der Zellen  $r_{CO_2}$  proportional zur Wachstumsrate ist:

$$r_{CO_2} = 1/Y_{X|CO_2} \cdot r_X. \quad (5.77)$$

Der Proportionalitätsfaktor  $Y_{X|CO_2}$  wird auch als Ausbeutekoeffizient bezeichnet und stellt eine Konstante dar.

Auf Grundlage dieser beiden Annahmen kann eine Bestimmungsgleichung für die Zellkonzentration in Abhängigkeit der Kohlendioxidproduktionsrate angegeben werden:

$$C_X(t) \approx \int_{t_0}^t Y_{X|CO_2} \cdot r_{CO_2}(\tau) d\tau + C_{X_{t_0}}. \quad (5.78)$$

---

Ein Vergleich mit der gemessenen Biomasse (Least-Squares-Schätzung) ermöglicht die Bestimmung der beiden unbekannt Parameter  $Y_{X|CO_2}$  und  $C_{X_{t_0}}$ .

In Abbildung 5.12 sind sowohl die Messwerte  $C_X$  für die Biotrockenmassen als auch die approximierten Verläufe, die über die Kohlendioxidproduktionsrate berechnet wurden, zu sehen.

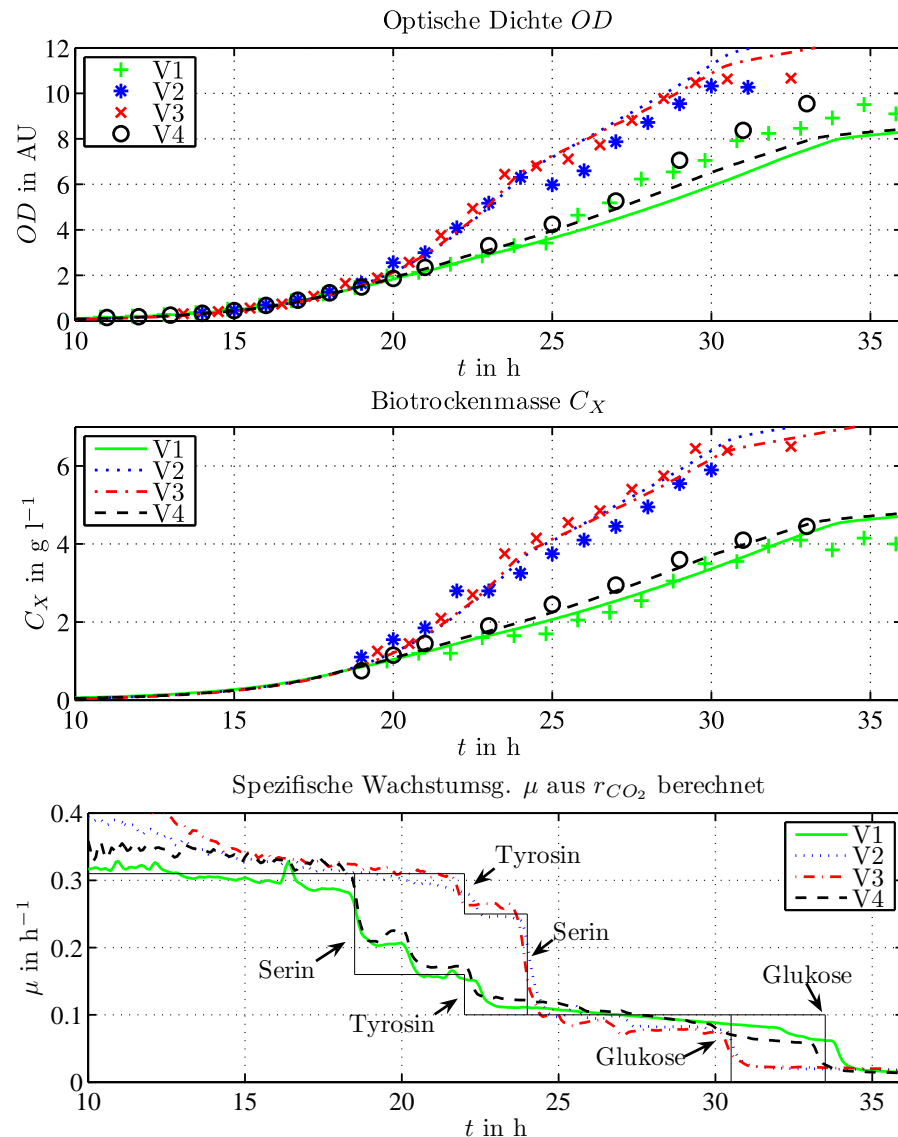


Abb. 5.12: Vergleich von vier Kultivierungsexperimenten. Experimente V1 und V4 unter Versuchsbedingungen A und Experimente V2 und V3 unter Versuchsbedingungen B. In den beiden oberen Abbildungen sind die gemessenen optischen Dichten  $OD$ , die Biotrockenmassen  $C_X$  (jeweils durch Symbole gekennzeichnet) und der aus der jeweiligen Kohlendioxidproduktionsrate geschätzte kontinuierliche Verlauf dargestellt. In der unteren Abbildung sind die aus den Kohlendioxidproduktionsraten geschätzten Wachstumsgeschwindigkeiten  $\mu$  dargestellt. Die treppenförmigen Kurven (dünne schwarze Linien) approximieren  $\mu$  für die Versuchsbedingungen A und B. Die Stufen sind mit den Substraten gekennzeichnet, die zu diesen Zeitpunkten zur Neige gehen.



Der approximierte Verlauf der Biomasse wird sehr gut für alle Versuche durch die Gleichung 5.78 beschrieben, und bestätigt den angenommenen Zusammenhang. Ein Vergleich mit den Messwerten der optischen Dichte  $OD$  der einzelnen Experimente, über die Beziehung  $OD(t) = \frac{1}{0,57} \cdot C_X(t)$  [g<sup>-1</sup>l AU] aus Kapitel 4.5.2, zeigt ebenfalls eine gute Übereinstimmung, die jedoch in einigen Bereichen des Wachstumsverlaufes größere Abweichungen aufweist als für die Biomasse. Diese Abweichungen stehen wahrscheinlich in Zusammenhang mit veränderten Eigenschaften der Bakterien, die sich auf die optischen Eigenschaften der Bakterienbrühe auswirken.

Da die Approximation laut Gleichung 5.78 sehr gut mit dem Verlauf der Biomasse korreliert, wird über die  $r_{CO_2}$ -Messung auch die Wachstumsgeschwindigkeit der Bakterien approximiert.

$$\mu(t) = \frac{r_X}{C_X} \approx \frac{Y_{X|CO_2} \cdot r_{CO_2}}{\int_{t_0}^t Y_{X|CO_2} \cdot r_{CO_2}(\tau) d\tau + C_{X_0}}. \quad (5.79)$$

In der unteren Abbildung von 5.12 ist der approximierte Verlauf der Wachstumsgeschwindigkeit für alle Experimente dargestellt. Anhand dieser Verläufe können sehr deutlich die Stoffwechsellumstellungen der Bakterien charakterisiert werden. Die Einbrüche der Wachstumsgeschwindigkeit sind auf das zur Neigegehen von bestimmten Substraten zurückzuführen. Die wichtigsten Substrate hierbei sind Glukose  $S_1$ , Tyrosin  $S_2$  und Serin  $S_3$ . Mit einer dünnen schwarzen Linie ist in Abbildung 5.12 der charakteristische Verlauf der Wachstumsgeschwindigkeit angenähert. Hierbei wurde die Annahme getroffen, dass zwischen fünf Wachstumsphasen unterschieden werden kann, in denen sich die Wachstumsgeschwindigkeiten stark unterscheiden. Die erste Wachstumsphase stellt das unlimitierte Wachstum der Bakterien dar, in der keines der Substrate das Wachstum limitiert. Hier wachsen die Bakterien mit einer maximalen Wachstumsgeschwindigkeit von  $\mu \approx 0.31 \text{ h}^{-1}$ . Die zweite und dritte Wachstumsphase ist entweder durch Serin  $\mu \approx 0.16 \text{ h}^{-1}$  oder Tyrosin  $\mu \approx 0.25 \text{ h}^{-1}$  limitiert, in beiden Fällen verlangsamt sich das Wachstum. Die vierte Phase ist durch das gemeinsame Fehlen von Serin und Tyrosin charakterisiert, hierbei stellt sich eine Wachstumsgeschwindigkeit von  $\mu \approx 0.1 \text{ h}^{-1}$  ein. Die fünfte Phase ist zusätzlich zu Tyrosin und Serin durch Glukose limitiert, es findet nun fast gar kein Wachstum mehr statt,  $\mu \approx 0 \text{ h}^{-1}$ .

Für die weitere Analyse wird für jede Versuchsanordnung ein Versuch exemplarisch betrachtet. Für die Versuchsanordnung A der Versuch V1, Abbildungen 5.13 und 5.14, für die Versuchsanordnung B der Versuch V2, Abbildungen 5.15 und 5.16. Die Darstellungen der Experimente umfassen alle Analysenwerte der Mediumkomponenten, der Biomasse, der optischen Dichte und der Gesamtmenge an Einschlusskörperprotein.

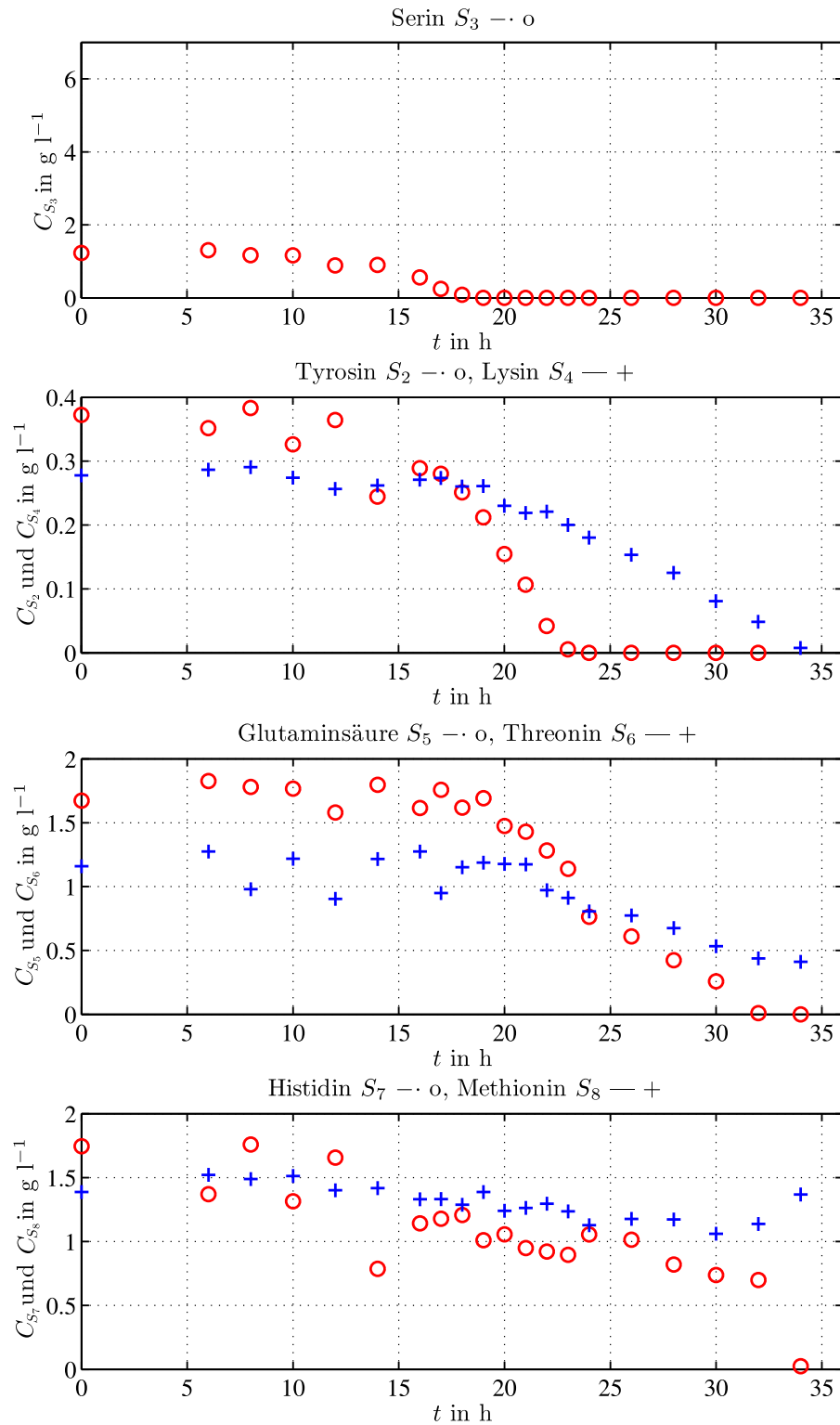


Abb. 5.13: Versuchsbedingung A: Analysenwerte der Aminosäuren im Kultivierungsmedium für das Experiment V1.

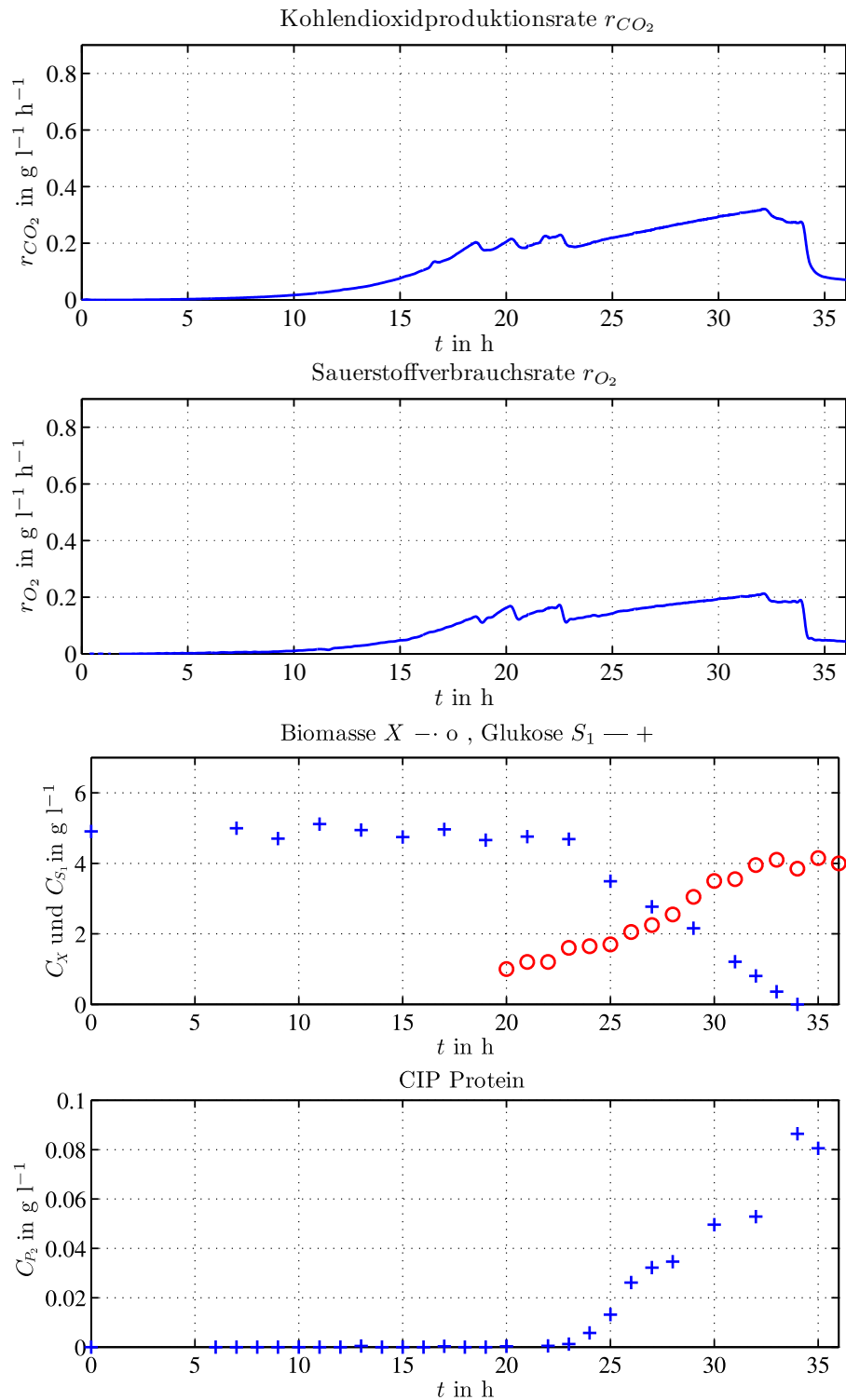


Abb. 5.14: Versuchsbedingung A: Analysenwerte der Kohlendioxidproduktionsrate, der Sauerstoffverbrauchsrate, der Biomasse, der Glukose im Medium und der Menge an gebildetem CIP-Protein für das Experiment V1.

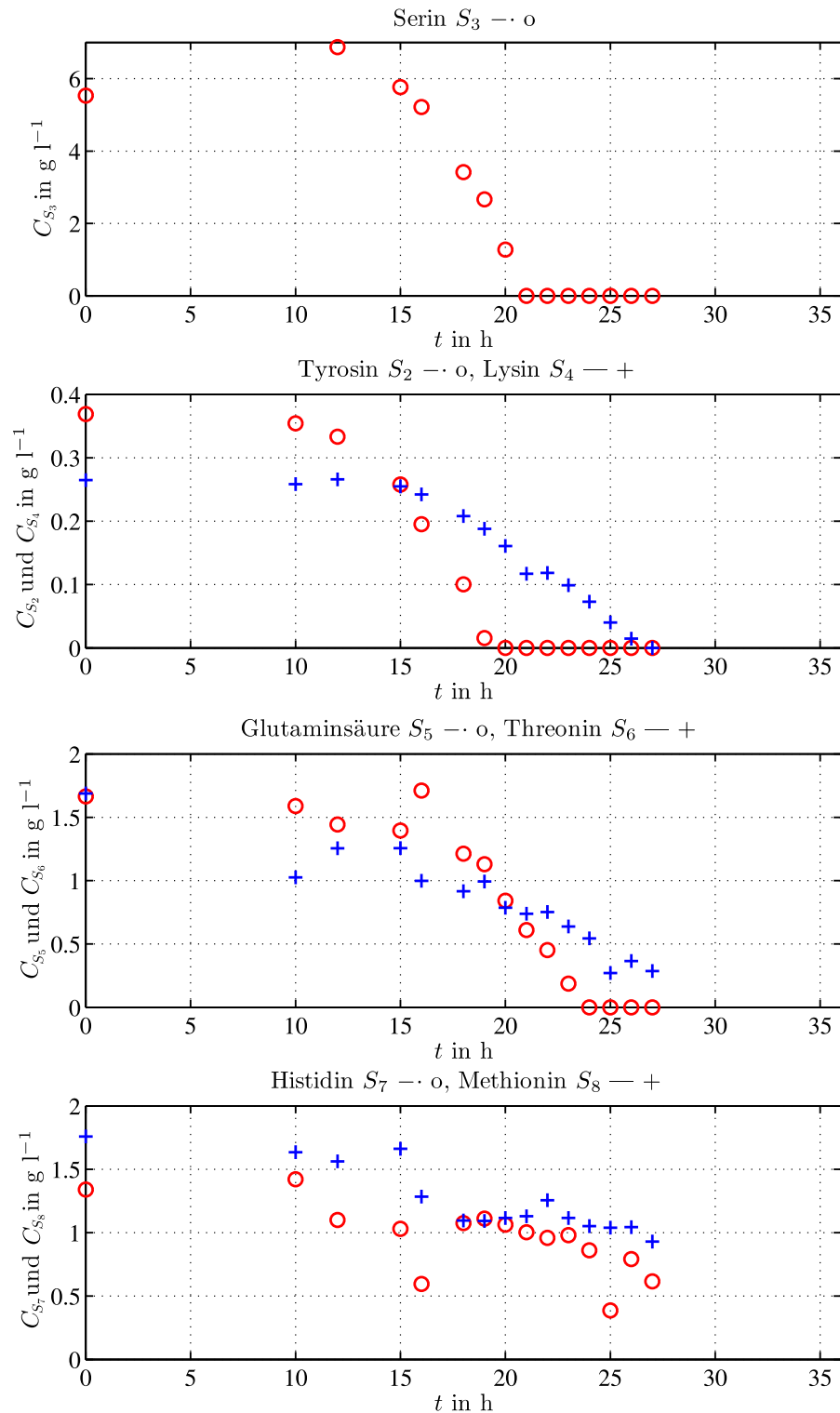


Abb. 5.15: Versuchsbedingung B: Analysenwerte der Aminosäuren im Kultivierungsmedium für das Experiment V2.

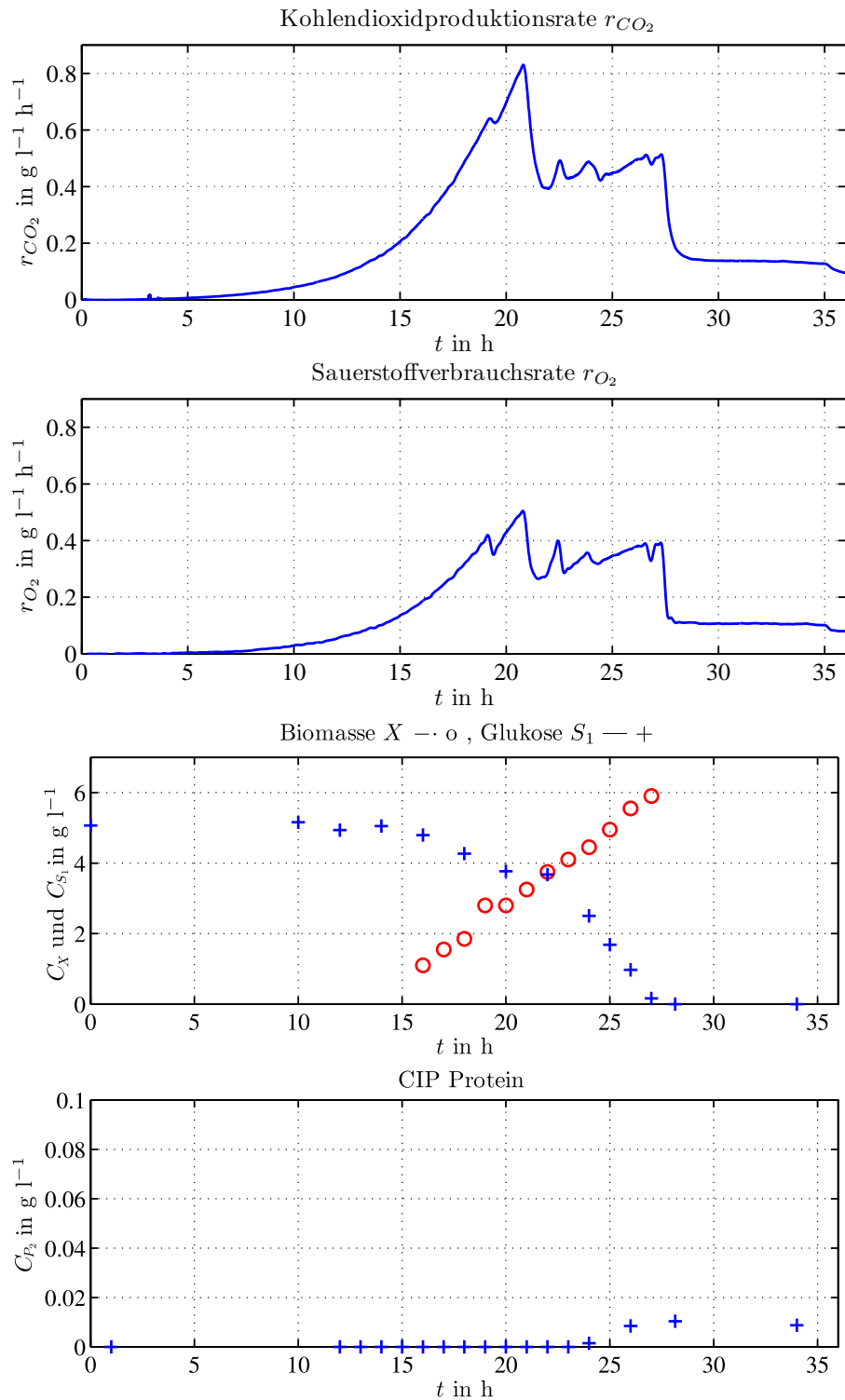


Abb. 5.16: Versuchsbedingung B: Analysenwerte der Kohlendioxidproduktionsrate, der Sauerstoffverbrauchsrate, der Biomasse, der Glukose im Medium und der Menge an gebildetem CIP-Protein für das Experiment V2.

Mit Hilfe der gemessenen Substratverläufe und dem approximierten Verlauf der Biomasse durch die  $r_{CO_2}$ -Messung können Substrat-Ausbeutekoeffizienten  $Y_{X|S_i}$  für die einzelnen Wachstumsphasen aus den Experimenten bestimmt werden. Hierbei wird davon ausgegangen, dass der Substratverbrauch mit dem Wachstum der Biomasse in den einzelnen Wachstumsphasen über ein konstantes Verhältnis miteinander verbunden ist.

Die Gleichungen

$$\dot{C}_{S_i} = r_{S_i} = 1/Y_{X|S_i} \cdot r_X \quad (5.80)$$

$$C_{S_i}(t) \approx \int_{t_a}^{t_e} \frac{Y_{X|CO_2}}{Y_{X|S_i}} \cdot r_{CO_2}(\tau) d\tau + C_{S_i,t_a} \quad (5.81)$$

beschreiben diesen Zusammenhang für ein Zeitintervall, in dem die Ausbeutekoeffizienten als konstant angenommen werden. Die Ausbeutekoeffizienten  $Y_{X|S_i}$  werden durch den Vergleich der nach Gleichung 5.81 approximierten Substratkonzentrationen mit den Analysewerten bestimmt (Least-Squares Schätzung). In Tabelle 5.9 sind die so ermittelten Ausbeutekoeffizienten für die beiden wichtigsten Wachstumsphasen, ohne Substratbeschränkung und mit Beschränkung durch Tyrosin und Serin zusammengefasst. Für die anderen Wachstumsphasen standen nicht genügend Messwerte für die Substratkonzentrationen zur Verfügung. Die angegebenen Werte der Ausbeutekoeffizienten entsprechen dem Mittelwert aus beiden Versuchen.

Koeffizient[g/g]	alle Substrate vorhanden $Y_{\{..\}}^{unb.}$	ohne Ser und Tyr $Y_{\{..\}}^{bes.}$
$X P_1$	1	1
$X S_1$	-2.5	-0.6
$X S_2$	-6.4	-
$X S_3$	-0.63	-
$X S_4$	-19.2	-18.2
$X S_5$	-3.65	-2.08
$X S_6$	-7.1	-7.1
$X S_7$	-6.8	-6.8
$X S_8$	-7.7	-7.7
$X S_9$	-1.43	-1.43

Tab. 5.9: Ausbeutekoeffizient

Anhand dieser ersten einfachen Betrachtungen kann für die Stoffe Kohlendioxid  $P_1$ , Threonin  $S_6$ , Histidin  $S_7$ , Methionin  $S_8$  und Sauerstoff  $S_9$  ein konstanter Ausbeutekoeffizient, für die betrachteten Wachstumsphasen, angenommen werden.

Für die Glukose  $S_1$  hingegen ergibt sich ein stark erhöhter Verbrauch in der Wachstumsphase die durch das Fehlen von Tyrosin und Serin gekennzeichnet ist. Wird der Glukoseverbrauch in Abbildung 5.16 betrachtet, dann wird deutlich, dass die Abnahme der Glukoseausbeute mit dem zur Neigegehen von Serin korreliert.

Für die beiden Aminosäuren Lysin  $S_4$  und Glutaminsäure  $S_5$  werden ebenfalls geringere Ausbeutekoeffizienten für die Wachstumsphase ohne Serin und Tyrosin beobachtet.

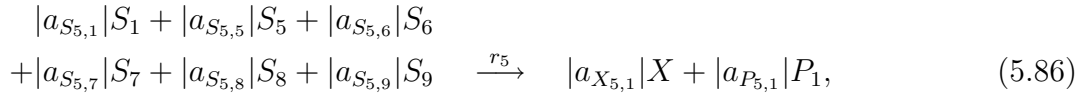
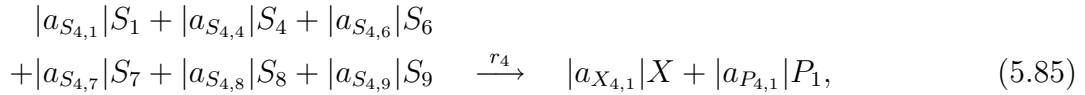
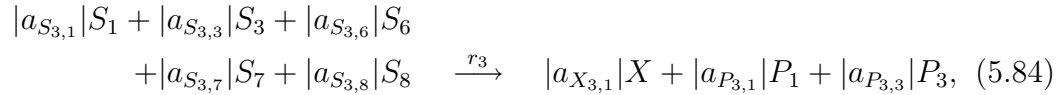
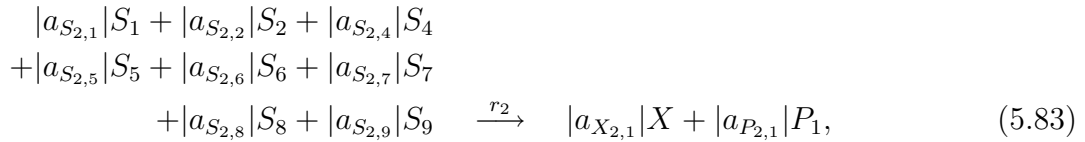
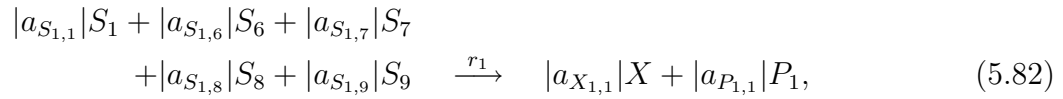
Betrachtet man die Einschlusskörperbildung in den beiden Experimenten, kann die Aussage getroffen werden, dass die Einschlusskörperbildung erst dann statt findet, wenn Serin  $S_3$  und Tyrosin  $S_2$  verbraucht sind und dass das Einschlusskörperprotein nur solange produziert wird, wie alle anderen Aminosäuren und Glukose  $S_1$  vorhanden sind. Anhand von weiteren Experimenten wurde ein generell negativer Einfluss auf die Einschlusskörperbildung durch eine verlängerte Wachstumsphase der Bakterien auf Serin  $S_3$  festgestellt. Die Fähigkeit Einschlusskörper zu bilden wird hierdurch herabgesetzt.

Die durch die Experimente gewonnenen Aussagen über das Wachstum und die Einschlusskörperbildung sind in den folgenden Punkten zusammengefasst:

- Der  $\text{CO}_2$ -Ausstoß und der  $\text{O}_2$ -Verbrauch sind proportional zum Wachstum.
- Der Verbrauch der Aminosäuren Threonin  $S_6$ , Histidin  $S_7$  und Methionin  $S_8$  ist proportional zum Wachstum.
- Ist Serin  $S_3$  im Medium verbraucht, vervierfacht sich der Glukoseverbrauch. Der  $\text{CO}_2$ -Ausstoß erhöht sich in diesem Fall nicht.
- Ist Tyrosin  $S_2$  im Medium verbraucht, erhöht sich der Verbrauch der Aminosäuren Glutaminsäure  $S_5$  und Lysin  $S_4$ .
- Die CIP-Bildung findet erst dann statt, wenn sich Serin  $S_3$  und Tyrosin  $S_2$  nicht mehr im Medium befinden.
- Die CIP-Bildung wird nur dann beobachtet, wenn sich Glukose  $S_1$  und alle weiteren Substrate ( $S_4, \dots, S_9$ ) bis auf Serin  $S_3$  und Tyrosin  $S_2$  im Medium befinden.
- Die Einschlusskörperbildung wird durch ein verlängertes Wachstum auf Serin  $S_3$  gehemmt.

## 5.4.2 CIP-Modellansatz 1

Mit Hilfe des ersten Modellansatzes wird versucht, alle beobachteten Phänomene in einem Modell zu beschreiben. Diese Beschreibung soll sämtliche bilanzierten Stoffe, wie alle Substrate, die Biomasse und die beiden Produkte Kohlendioxid und Einschlusskörperprotein berücksichtigen. Die Stoffwechselfvorgänge werden hierbei mit 7 Reaktionsgleichungen beschrieben:



Die ersten fünf Reaktionen (5.82) - (5.86) beschreiben den Aufbau der Biomasse  $X$  unter parallelem Verbrauch von Sauerstoff  $S_9$ , Glukose  $S_1$ , Threonin  $S_6$ , Histidin  $S_7$ , Methionin  $S_8$  und der Bildung von Kohlendioxid  $P_1$ . In Gleichung (5.83) werden zusätzlich die Stoffe Tyrosin  $S_2$ , Lysin  $S_4$  und Glutaminsäure  $S_5$  berücksichtigt. Gleichung (5.84) enthält zusätzlich die Stoffe Serin  $S_3$  und das Produkt  $P_3$ . Das Produkt  $P_3$  wurde nicht gemessen, es wird eingeführt um die Inhibierung der Einschlusskörperbildung bei einem verlängertem Wachstum auf Serin zu modellieren. In Gleichung



(5.85) wird zusätzlich Lysin  $S_4$  und in Gleichung (5.86) zusätzlich Glutaminsäure  $S_5$  berücksichtigt.

Die letzten beiden Reaktionen (5.87) und (5.88) sind nicht direkt mit der Zunahme der Biomasse verbunden und beschreiben einen zusätzlichen Verbrauch der Glukose  $S_1$  und die Bildung der Einschlusskörper  $P_2$ . Diese beiden Reaktionsgleichungen sind unvollständig. Es konnte kein proportionaler Zusammenhang zwischen diesen beiden Stoffen gefunden werden, der für beide Versuchsanordnungen gültig ist. Es wird offen gelassen, in welche Zwischenprodukte die Glukose umgewandelt wird und aus welchen Zwischenprodukten die Einschlusskörper gebildet werden. Für eine genauere Modellierung ist eine tiefergehende Analyse der Stoffwechselwege notwendig.

Die zu den Reaktionsgleichungen gehörenden Kinetiken, die die jeweilige Reaktionsgeschwindigkeit bestimmen, lauten:

$$r_1 = r_{1max} \frac{C_{S_1}}{K_{1,1} + C_{S_1}} \quad (5.89)$$

$$r_2 = r_{2max} \frac{C_{S_2}}{K_{2,1} + C_{S_2}} \quad (5.90)$$

$$r_3 = r_{3max} \frac{C_{S_3}}{K_{3,1} + C_{S_3}} \quad (5.91)$$

$$r_4 = r_{4max} \frac{C_{S_4}}{K_{4,1} + C_{S_4}} \quad (5.92)$$

$$r_5 = r_{5max} \frac{C_{S_5}}{K_{5,1} + C_{S_5}} \quad (5.93)$$

$$r_6 = r_{6max} \frac{C_{S_1}}{K_{6,1} + C_{S_1}} \cdot \frac{K_{6,2}}{K_{6,2} + C_{S_3}} \quad (5.94)$$

$$r_7 = r_{7max} \frac{C_{S_1}}{K_{7,1} + C_{S_1}} \cdot \frac{C_{S_5}}{K_{7,2} + C_{S_5}} \cdot \frac{K_{7,3}}{K_{7,3} + C_{S_3}} \cdot \frac{K_{7,4}}{K_{7,4} + C_{S_2}} \cdot \frac{K_{7,5}}{K_{7,5} + P_3} \quad (5.95)$$

Die Kinetikterme der einzelnen Reaktionen berücksichtigen oftmals nur einen der Stoffe, die an der Reaktion beteiligt sind. Für alle anderen an der Reaktion beteiligten Stoffe gilt dann, dass sie so lange in ausreichend hoher Konzentration vorliegen, bis der die Kinetik bestimmende Stoff verbraucht ist. Diese Bedingung ist für alle durchgeführten Experimente erfüllt.

Anhand der Kinetik-Terme kann dann die modellierte Limitierung abgelesen werden:

- Gleichung (5.82) und (5.89): Glukose  $S_1$  limitierter Biomasseaufbau.
- Gleichung (5.83) und (5.90): Tyrosin  $S_2$  limitierter Biomasseaufbau.

- Gleichung (5.84) und (5.91): Serin  $S_3$  limitierter Biomasseaufbau.
- Gleichung (5.85) und (5.92): Lysin  $S_4$  limitierter Biomasseaufbau.
- Gleichung (5.86) und (5.93): Glutaminsäure  $S_5$  limitierter Biomasseaufbau.
- Gleichung (5.87) und (5.94): Zusätzlicher Glukoseverbrauch durch Serin  $S_3$  inhibiert und Glukose  $S_1$  limitiert.
- Gleichung (5.88) und (5.95): Bildung von CIP-Protein  $P_2$  durch Glukose  $S_1$  und Glutaminsäure  $S_5$  limitiert, inhibiert durch Serin  $S_3$ , Tyrosin  $S_2$  und durch das Serinstoffwechselprodukt  $P_3$ .

Mit Hilfe der ersten fünf Reaktionsgleichungen (5.82) - (5.86) können die einzelnen Wachstumsphasen mit unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten beschrieben werden. Finden alle fünf Reaktionen zum Substrataufbau statt, liegt die maximale Wachstumsgeschwindigkeit vor.

Zur Definition der stöchiometrischen Matrizen werden die Reaktionen 5.82 - 5.88 zu dem Gleichungssystem

$$\underbrace{\begin{bmatrix} a_{S_{1,1}} & 0 & 0 & 0 & 0 & a_{S_{1,6}} & a_{S_{1,7}} & a_{S_{1,8}} & a_{S_{1,9}} \\ a_{S_{2,1}} & a_{S_{2,2}} & 0 & a_{S_{2,4}} & a_{S_{2,5}} & a_{S_{2,6}} & a_{S_{2,7}} & a_{S_{2,8}} & a_{S_{2,9}} \\ a_{S_{3,1}} & 0 & a_{S_{3,3}} & 0 & 0 & a_{S_{3,6}} & a_{S_{3,7}} & a_{S_{3,8}} & a_{S_{3,9}} \\ a_{S_{4,1}} & 0 & 0 & a_{S_{4,4}} & 0 & a_{S_{4,6}} & a_{S_{4,7}} & a_{S_{4,8}} & a_{S_{4,9}} \\ a_{S_{5,1}} & 0 & 0 & 0 & a_{S_{5,5}} & a_{S_{5,6}} & a_{S_{5,7}} & a_{S_{5,8}} & a_{S_{5,9}} \\ a_{S_{6,1}} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}}_{\mathbf{A}_S} \underbrace{\begin{bmatrix} S_1 \\ S_2 \\ S_3 \\ S_4 \\ S_5 \\ S_6 \\ S_7 \\ S_8 \\ S_9 \end{bmatrix}}_{\underline{S}} + \underbrace{\begin{bmatrix} a_{X_{1,1}} \\ a_{X_{2,1}} \\ a_{X_{3,1}} \\ a_{X_{4,1}} \\ a_{X_{5,1}} \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}}_{\underline{a}_X} X + \quad (5.96)$$

$$\underbrace{\begin{bmatrix} a_{P_{1,1}} & 0 & 0 \\ a_{P_{2,1}} & 0 & 0 \\ a_{P_{3,1}} & 0 & a_{P_{3,3}} \\ a_{P_{4,1}} & 0 & 0 \\ a_{P_{5,1}} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & a_{P_{7,2}} & 0 \end{bmatrix}}_{\mathbf{A}_P} \underbrace{\begin{bmatrix} P_1 \\ P_2 \\ P_3 \end{bmatrix}}_{\underline{P}} = \underline{\Delta} \quad (5.97)$$

zusammengefasst.

$$\underline{r}_{Bio} = \begin{bmatrix} a_X^T \\ \mathbf{A}_S^T \\ \mathbf{A}_P^T \end{bmatrix} \cdot \underline{r} \cdot C_X \quad (5.98)$$

Das Differentialgleichungssystem lautet für den Batch-Betrieb:

$$\begin{bmatrix} \dot{C}_X \\ \dot{C}_{S_1} \\ \dot{C}_{S_2} \\ \dot{C}_{S_3} \\ \dot{C}_{S_4} \\ \dot{C}_{S_5} \\ \dot{C}_{S_6} \\ \dot{C}_{S_7} \\ \dot{C}_{S_8} \\ \dot{C}_{S_9} \\ \dot{C}_{P_1} \\ \dot{C}_{P_2} \\ \dot{C}_{P_3} \end{bmatrix} = \underline{r}_{Bio} = \begin{bmatrix} [a_{X_{1,1}}r_1 + a_{X_{2,1}}r_2 + a_{X_{3,1}}r_3 + a_{X_{4,1}}r_4 + a_{X_{5,1}}r_5] \cdot C_X \\ [a_{S_{1,1}}r_1 + a_{S_{2,1}}r_2 + a_{S_{3,1}}r_3 + a_{S_{4,1}}r_4 + a_{S_{5,1}}r_5 + a_{S_{6,1}}r_6] \cdot C_X \\ a_{S_{2,2}}r_2 \cdot C_X \\ a_{S_{3,3}}r_3 \cdot C_X \\ [a_{S_{2,4}}r_2 + a_{S_{4,4}}r_4] \cdot C_X \\ [a_{S_{2,5}}r_2 + a_{S_{5,5}}r_5] \cdot C_X \\ [a_{S_{1,6}}r_1 + a_{S_{2,6}}r_2 + a_{S_{3,6}}r_3 + a_{S_{4,6}}r_4 + a_{S_{5,6}}r_5] \cdot C_X \\ [a_{S_{1,7}}r_1 + a_{S_{2,7}}r_2 + a_{S_{3,7}}r_3 + a_{S_{4,7}}r_4 + a_{S_{5,7}}r_5] \cdot C_X \\ [a_{S_{1,8}}r_1 + a_{S_{2,8}}r_2 + a_{S_{3,8}}r_3 + a_{S_{4,8}}r_4 + a_{S_{5,8}}r_5] \cdot C_X \\ [a_{S_{1,9}}r_1 + a_{S_{2,9}}r_2 + a_{S_{3,9}}r_3 + a_{S_{4,9}}r_4 + a_{S_{5,9}}r_5] \cdot C_X \\ [a_{P_{1,1}}r_1 + a_{P_{2,1}}r_2 + a_{P_{3,1}}r_3 + a_{P_{4,1}}r_4 + a_{P_{5,1}}r_5] \cdot C_X \\ a_{P_{7,2}}r_7 \cdot C_X \\ a_{P_{3,3}}r_3 \cdot C_X \end{bmatrix} \quad (5.99)$$

## Parameterbestimmung

Die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten  $r_{1,max} \cdots r_{5,max}$  für die einzelnen Reaktionen wurden aus der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit Abbildung 5.12 ermittelt. Sie entsprechen jeweils dem Betrag um den sich die Wachstumsgeschwindigkeit verringert, wenn das Substrat, welches die Reaktion limitiert, zur Neige geht. Die Summe aller Reaktionsgeschwindigkeiten ergibt die maximale Wachstumsgeschwindigkeit  $\mu_{max} = 0,31 \text{ h}^{-1}$  mit der die Bakterien wachsen können.

Die stöchiometrischen Parameter für die Biomasse  $a_{X_{1,1}} \cdots a_{X_{5,1}}$  werden zu 1 festgelegt. Die weiteren stöchiometrischen Parameter der Zustandsgrößen, die mit dem Wachstum assoziiert sind, ergeben sich aus den Ausbeutekoeffizienten laut Tabelle 5.9 durch die Auswertung der Beziehung  $Y_{X|S_i} = \frac{r_X}{r_{S_i}}$ ,  $i = 1 \cdots 9$  für die einzelnen Wachstumsphasen.

Für die Substrate  $S_6, S_7, S_8, S_9$  wird ein konstanter Ausbeutekoeffizient

$$Y_{X|S_i} = \frac{r_X}{r_{S_i}} = \frac{(r_1 + r_2 + r_3 + r_4 + r_5)}{a_{S_{1,i}}r_1 + a_{S_{2,i}}r_2 + a_{S_{3,i}}r_3 + a_{S_{4,i}}r_4 + a_{S_{5,i}}r_5} \quad i = 6 \dots 9. \quad (5.100)$$

angenommen. Da der Verbrauch  $r_{S_i}$  dieser Substrate im Modell proportional zum Wachstum  $r_X$  angenommen wird, gilt unter diesen Umständen für die Koeffizienten die Beziehung

$$a_{S_{1,i}} = a_{S_{2,i}} = a_{S_{3,i}} = a_{S_{4,i}} = a_{S_{5,i}} = a_{S_{\{\cdot\},i}} \quad i = 6 \dots 9. \quad (5.101)$$

Hieraus ergibt sich für Gleichung (5.100)

$$Y_{X|S_i} = \frac{r_X}{r_{S_i}} = \frac{(r_1 + r_2 + r_3 + r_4 + r_5)}{a_{S_{\{\cdot\},i}} \cdot (r_1 + r_2 + r_3 + r_4 + r_5)} \quad i = 6 \dots 9 \quad (5.102)$$

die dann zur Bestimmung der stöchiometrischen Parameter verwendet wird:

$$a_{S_{\{\cdot\},i}} = \frac{1}{Y_{X|S_i}} \quad i = 6 \dots 9 \quad (5.103)$$

Für das Produkt  $P_1$  gelten diese Betrachtungen analog:

$$a_{P_{\{\cdot\},1}} = \frac{1}{Y_{X|P_1}}. \quad (5.104)$$

Der Verbrauch von Glukose  $r_{S_1}$  ist nicht für den gesamten Wachstumsverlauf proportional zu  $r_X$ . Er wird in zwei Teile aufgeteilt, einen Teil der proportional zum Wachstum der Bakterien ist, beschrieben durch die Koeffizienten  $a_{S_{1,1}} \dots a_{S_{5,1}}$  und einen zusätzlichen Verbrauch  $a_{S_{6,1}}$ , der berücksichtigt werden muss, wenn Serin im Medium verbraucht ist. Für die Koeffizienten gilt:

$$a_{S_{1,1}} = a_{S_{2,1}} = a_{S_{3,1}} = a_{S_{4,1}} = a_{S_{5,1}} = a_{S_{\{\cdot\},1}}. \quad (5.105)$$

Für die Ausbeute gilt dann allgemein

$$\frac{r_X}{r_{S_1}} = \frac{(r_1 + r_2 + r_3 + r_4 + r_5)}{a_{S_{\{..,1\}}} \cdot (r_1 + r_2 + r_3 + r_4 + r_5) + a_{S_{6,1}} r_6}. \quad (5.106)$$

Für das unbeschränkte Wachstum, wenn alle Substrate im Medium vorhanden sind, gilt im Speziellen

$$\frac{r_X}{r_{S_1}} \Big|_{\text{unb.}} \approx \frac{(r_{1_{max}} + r_{2_{max}} + r_{3_{max}} + r_{4_{max}} + r_{5_{max}})}{a_{S_{\{..,1\}}} \cdot (r_{1_{max}} + r_{2_{max}} + r_{3_{max}} + r_{4_{max}} + r_{5_{max}})} = Y_{X|S_1}^{\text{unb.}}. \quad (5.107)$$

In diesem Fall ist die Reaktionsgeschwindigkeit  $r_6 \approx 0$ , da diese Reaktion durch das Vorhandensein von Serin  $S_3$  inhibiert wird. Der Parameter  $a_{S_{\{..,1\}}}$  lässt sich dann durch

$$a_{S_{\{..,1\}}} = \frac{1}{Y_{X|S_1}^{\text{unb.}}} \quad (5.108)$$

bestimmen. Sind Serin  $S_3$  und Tyrosin  $S_2$  nicht mehr im Medium vorhanden gilt für das so beschränkte Wachstum

$$\frac{r_X}{r_{S_1}} \Big|_{\text{bes.}} \approx \frac{(r_{1_{max}} + r_{4_{max}} + r_{5_{max}})}{a_{S_{\{..,1\}}} \cdot (r_{1_{max}} + r_{4_{max}} + r_{5_{max}}) + a_{S_{6,1}} r_{6_{max}}} = Y_{X|S_1}^{\text{bes.}} \quad (5.109)$$

da  $r_2 \approx 0$  und  $r_3 \approx 0$  sind. Die Reaktion  $r_6$  wird nun nicht mehr durch Serin  $S_3$  inhibiert und muss deshalb in diesem Fall mit berücksichtigt werden. Diese Gleichung lässt sich dann für die Bestimmung der unbekannt Parameter umformen:

$$a_{S_{6,1}} \cdot r_{6_{max}} = \frac{(r_{1_{max}} + r_{4_{max}} + r_{5_{max}})(1 - Y_{X|S_1}^{\text{bes.}} \cdot a_{S_{\{..,1\}}})}{Y_{X|S_1}^{\text{bes.}}} \quad (5.110)$$

Wird die Reaktionsgeschwindigkeit  $r_{6_{max}} = 0.1 \text{ h}^{-1}$  beliebig festgelegt, kann der Parameter  $a_{S_{6,1}}$  bestimmt werden.

Die stöchiometrischen Parameter für Tyrosin  $a_{S_{2,2}}$  und für Serin  $a_{S_{3,3}}$  werden jeweils über ihre Ausbeutekoeffizienten während des unbeschränkten Wachstums bestimmt:

$$\left. \frac{r_X}{r_{S_i}} \right|_{\text{unb.}} \approx \frac{(r_{1_{max}} + r_{2_{max}} + r_{3_{max}} + r_{4_{max}} + r_{5_{max}})}{a_{S_i,i} \cdot r_{i_{max}}} = Y_{X|S_i}^{\text{unb.}} \quad i = 1, 2 \quad (5.111)$$

$$a_{S_i,i} = \frac{(r_{1_{max}} + r_{2_{max}} + r_{3_{max}} + r_{4_{max}} + r_{5_{max}})}{r_{i_{max}} \cdot Y_{X|S_i}^{\text{unb.}}} \quad i = 1, 2 \quad (5.112)$$

Für die Ausbeute der beiden Substrate Lysin  $S_4$  und Glutaminsäure  $S_5$  gilt allgemein:

$$\frac{r_X}{r_{S_i}} = \frac{(r_1 + r_2 + r_3 + r_4 + r_5)}{a_{S_2,i} \cdot r_2 + r_i \cdot a_{S_i,i}} \quad i = 4, 5 \quad (5.113)$$

Für das beschränkte Wachstum ( $r_2 \approx 0$  und  $r_3 \approx 0$ ) gilt

$$\left. \frac{r_X}{r_{S_i}} \right|_{\text{bes.}} \approx \frac{(r_{1_{max}} + r_{4_{max}} + r_{5_{max}})}{r_{i_{max}} \cdot a_{S_i,i}} = Y_{X|S_i}^{\text{bes.}} \quad i = 4, 5 \quad (5.114)$$

$$a_{S_i,i} = \frac{(r_{1_{max}} + r_{4_{max}} + r_{5_{max}})}{r_{i_{max}} \cdot Y_{X|S_i}^{\text{bes.}}} \quad i = 4, 5 \quad (5.115)$$

und für das unbeschränkte Wachstum

$$\left. \frac{r_X}{r_{S_i}} \right|_{\text{unb.}} \approx \frac{(r_{1_{max}} + r_{2_{max}} + r_{3_{max}} + r_{4_{max}} + r_{5_{max}})}{r_{2_{max}} \cdot a_{S_2,i} + r_{i_{max}} \cdot a_{S_i,i}} = Y_{X|S_i}^{\text{unb.}} \quad i = 4, 5 \quad (5.116)$$

$$a_{S_2,i} = \frac{r_{1_{max}} + r_{2_{max}} + r_{3_{max}} + r_{4_{max}} + r_{5_{max}} - r_{i_{max}} \cdot a_{S_i,i} Y_{X|S_i}^{\text{unb.}}}{r_{2_{max}} \cdot Y_{X|S_i}^{\text{unb.}}} \quad i = 4, 5 \quad (5.117)$$

Das Produkt  $P_3$  soll mit der selben Geschwindigkeit gebildet werden, mit der Serin  $S_3$  im Medium verbraucht wird.

$$r_{S_3} = r_{P_3} \quad (5.118)$$

$$a_{S_{3,3}} \cdot r_3 = a_{P_{3,3}} \cdot r_3 \quad (5.119)$$

$$a_{P_{3,3}} = a_{S_{3,3}} \quad (5.120)$$

Alle weiteren kinetischen Parameter des Modells ergeben sich durch Minimierung der quadratischen Abweichung zwischen den simulierten und gemessenen Zustandsgrößen. Auf diese Weise wurde auch der Parameter  $a_{P_{7,2}}$  bestimmt.

stöch. Param.	stöch. Param.	kin. Param	kin. Param
$a_{S_{1,1}} = -0.4$	$a_{X_{1,1}} = 1$	$K_{1,1} = 0.01 \text{ g l}^{-1}$	$r_{1_{max}} = 0.08 \text{ h}^{-1}$
$a_{S_{2,1}} = -0.4$	$a_{X_{2,1}} = 1$	$K_{2,1} = 0.01 \text{ g l}^{-1}$	$r_{2_{max}} = 0.06 \text{ h}^{-1}$
$a_{S_{3,1}} = -0.4$	$a_{X_{3,1}} = 1$	$K_{3,1} = 0.03 \text{ g l}^{-1}$	$r_{3_{max}} = 0.15 \text{ h}^{-1}$
$a_{S_{4,1}} = -0.4$	$a_{X_{4,1}} = 1$	$K_{4,1} = 0.001 \text{ g l}^{-1}$	$r_{4_{max}} = 0.005 \text{ h}^{-1}$
$a_{S_{5,1}} = -0.4$	$a_{X_{5,1}} = 1$	$K_{5,1} = 0.005 \text{ g l}^{-1}$	$r_{5_{max}} = 0.015 \text{ h}^{-1}$
$a_{S_{6,1}} = -1.26$	$a_{P_{1,1}} = 1$	$K_{6,1} = 0.5 \text{ g l}^{-1}$	$r_{6_{max}} = 0.1 \text{ h}^{-1}$
$a_{S_{2,2}} = -0.81$	$a_{P_{2,1}} = 1$	$K_{6,2} = 0.001 \text{ g l}^{-1}$	$r_{7_{max}} = 0.07 \text{ h}^{-1}$
$a_{S_{3,3}} = -3.24$	$a_{P_{3,1}} = 1$	$K_{7,1} = 0.5 \text{ g l}^{-1}$	
$a_{S_{2,4}} = -0.18$	$a_{P_{4,1}} = 1$	$K_{7,2} = 0.2 \text{ g l}^{-1}$	
$a_{S_{4,4}} = -1.1$	$a_{P_{5,1}} = 1$	$K_{7,3} = 0.001 \text{ g l}^{-1}$	
$a_{S_{2,5}} = -0.61$	$a_{P_{7,2}} = 0.2$	$K_{7,4} = 0.001 \text{ g l}^{-1}$	
$a_{S_{5,5}} = -3.2$	$a_{P_{3,3}} = 3.24$	$K_{7,5} = 1.1 \text{ g l}^{-1}$	
$a_{S_{1,6}} = -0.14$	$a_{S_{1,9}} = -0.7$		
$a_{S_{2,6}} = -0.14$	$a_{S_{2,9}} = -0.7$		
$a_{S_{3,6}} = -0.14$	$a_{S_{3,9}} = -0.7$		
$a_{S_{4,6}} = -0.14$	$a_{S_{4,9}} = -0.7$		
$a_{S_{5,6}} = -0.14$	$a_{S_{5,9}} = -0.7$		
$a_{S_{1,7}} = -0.15$	$a_{S_{1,8}} = -0.13$		
$a_{S_{2,7}} = -0.15$	$a_{S_{2,8}} = -0.13$		
$a_{S_{3,7}} = -0.15$	$a_{S_{3,8}} = -0.13$		
$a_{S_{4,7}} = -0.15$	$a_{S_{4,8}} = -0.13$		
$a_{S_{5,7}} = -0.15$	$a_{S_{5,8}} = -0.13$		

Tab. 5.10: Parameter CIP-Modellansatz 1.

Die Parameter des Modells sind in der Tabelle 5.10 zusammengefasst.

Mit diesem Modell lassen sich nun die beobachteten Phänomene sehr gut beschreiben. Die Abbildungen 5.18, 5.17 und 5.20, 5.19 zeigen die Analysenwerte im Vergleich zu den simulierten Werten. Die Struktur und die Parameter des Modells sind in der

Lage, die beobachteten Phänomene zu beschreiben. Die einzelnen Wachstumsphasen werden richtig abgebildet und die Substratverläufe der beiden verschiedenen Experimente stimmen sehr gut mit den simulierten Verläufen überein. Das Modell ist in der Lage, den  $r_{CO_2}$ - und  $r_{O_2}$ -Verlauf beider Experimente gut zu beschreiben. In diesen wichtigen Messwerten sind die Stoffwechsellumstellungen der Bakterien zwischen den einzelnen Wachstumsphasen besonders gut zu erkennen.

Der Einbruch in diesen Messwerten, ca. 2 Stunden nachdem Serin verbraucht wurde, wird nicht von dem Modell beschrieben. Die Ursache für diesen Einbruch ist noch nicht geklärt.

Die Menge an gebildetem CIP-Protein das im Verlauf der beiden Experimente gebildet wird, wird richtig geschätzt. Bei Experiment V1 stimmt auch das dynamische Verhalten und der Zeitpunkt, ab wann das Protein gebildet wird, überein. Bei dem Experiment V2 wird die Proteinbildung zwei Stunden zu früh vom Modell vorhergesagt.

Bei diesem Modellansatz ist unbefriedigend, dass kein direkter Zusammenhang zwischen den Substratverbräuchen und der CIP-Proteinbildung vorliegt.



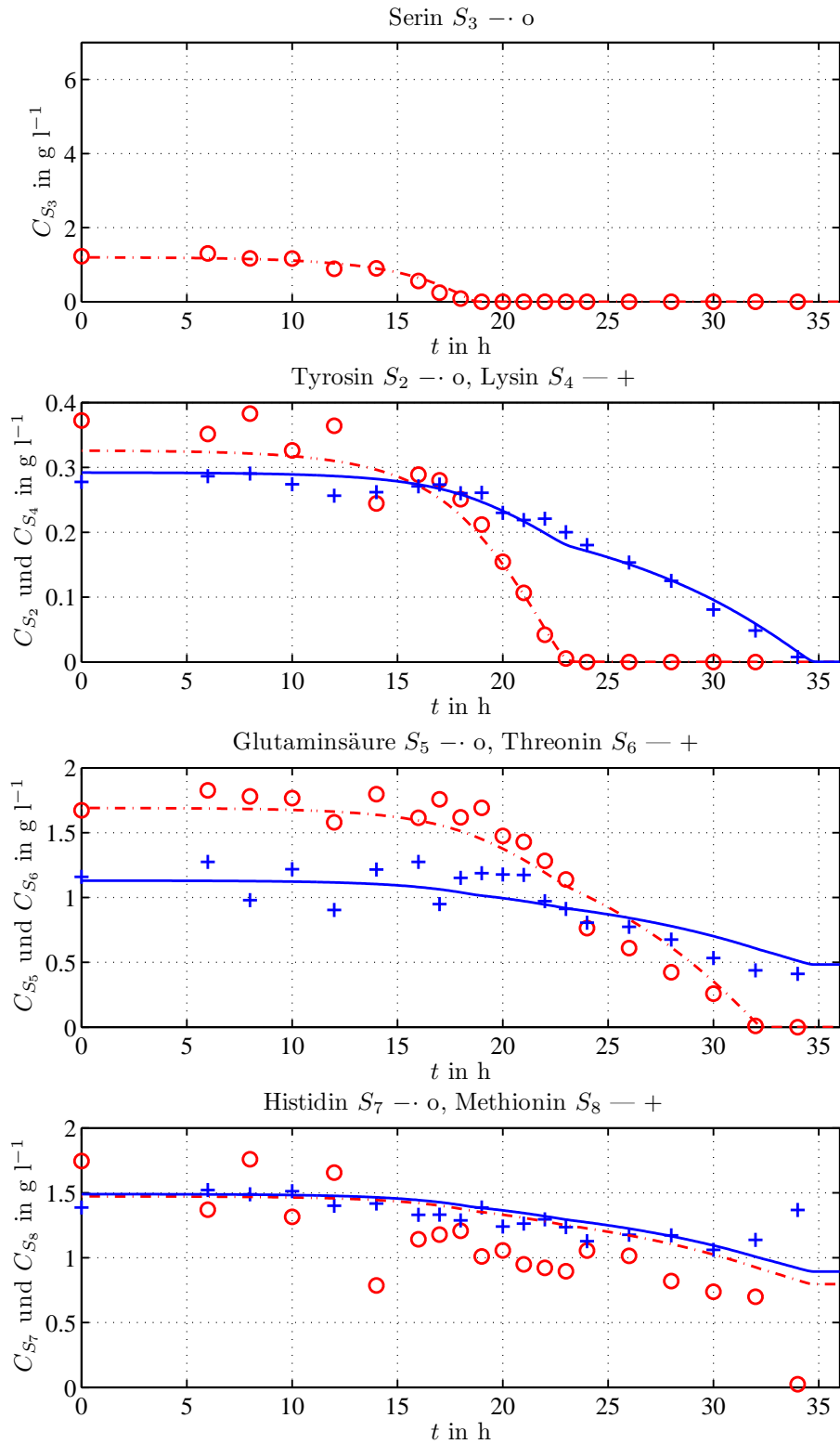


Abb. 5.17: Experiment V1: Bilanzierte Medienkomponenten Serin, Glukose, Tyrosin, Lysin, Glutaminsäure, Threonin, Histidin, Methionin und Simulation der Zustände mit dem CIP-Modellansatz 1.

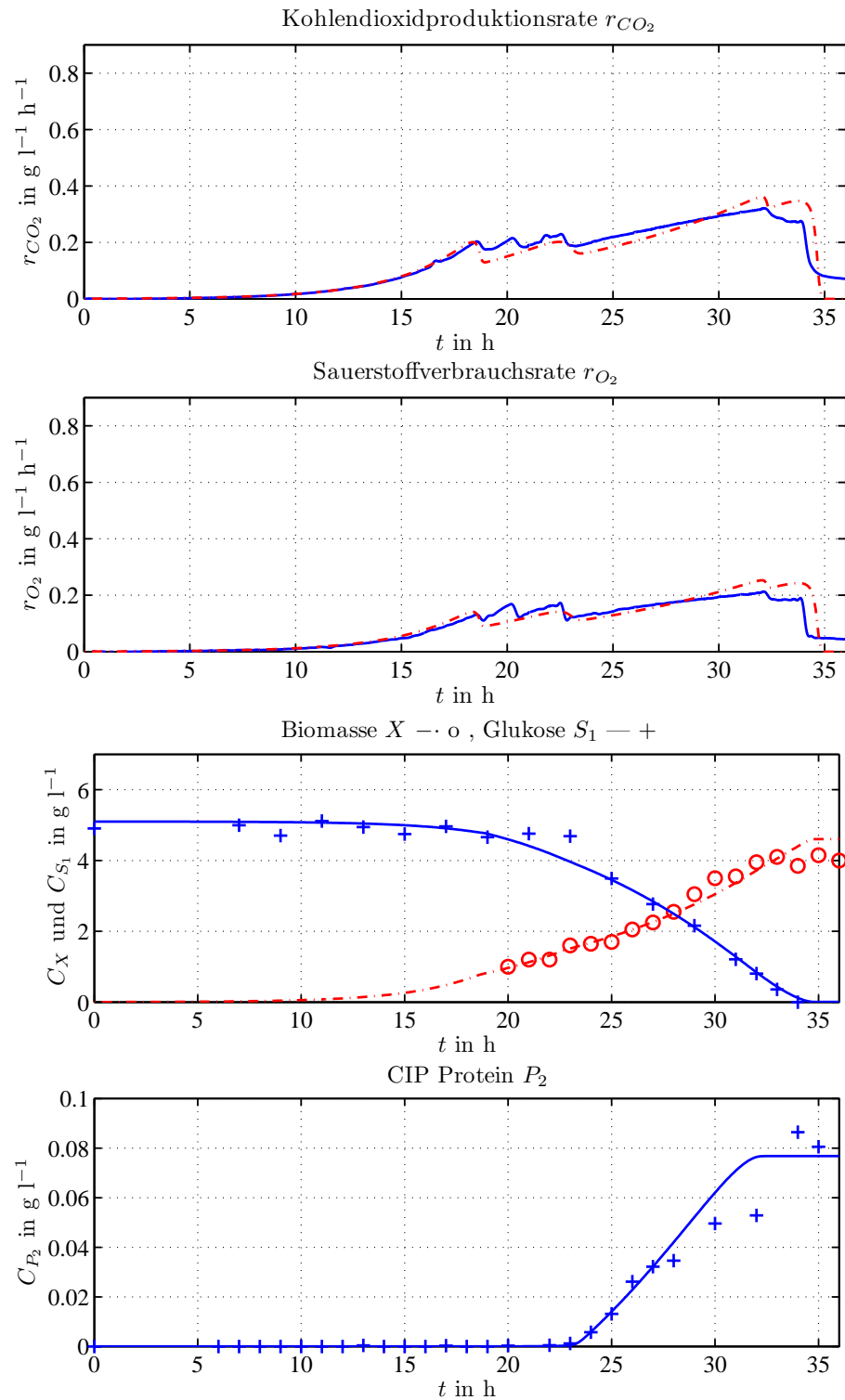


Abb. 5.18: Experiment V1: CIP-Protein, Bakterienzellen mit Einschlusskörpern, Optische Dichte, Biotrockenmasse und Simulation der Zustände mit dem CIP-Modellansatz 1.

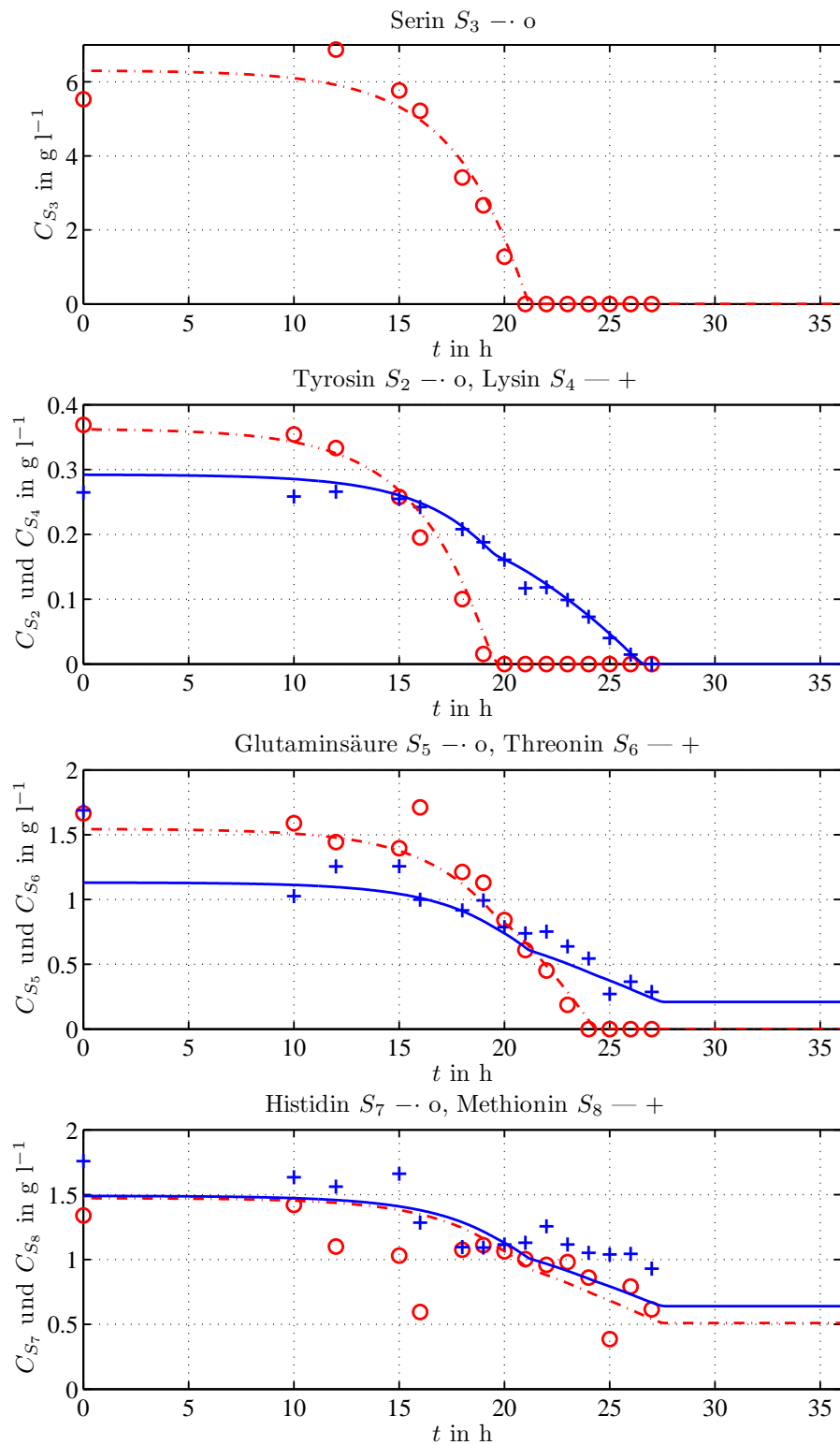


Abb. 5.19: Experiment V2: Bilanzierte Medienkomponenten Serin, Glukose, Tyrosin, Lysin, Glutaminsäure, Threonin, Histidin, Methionin und Simulation der Zustände mit dem CIP-Modellansatz 1.

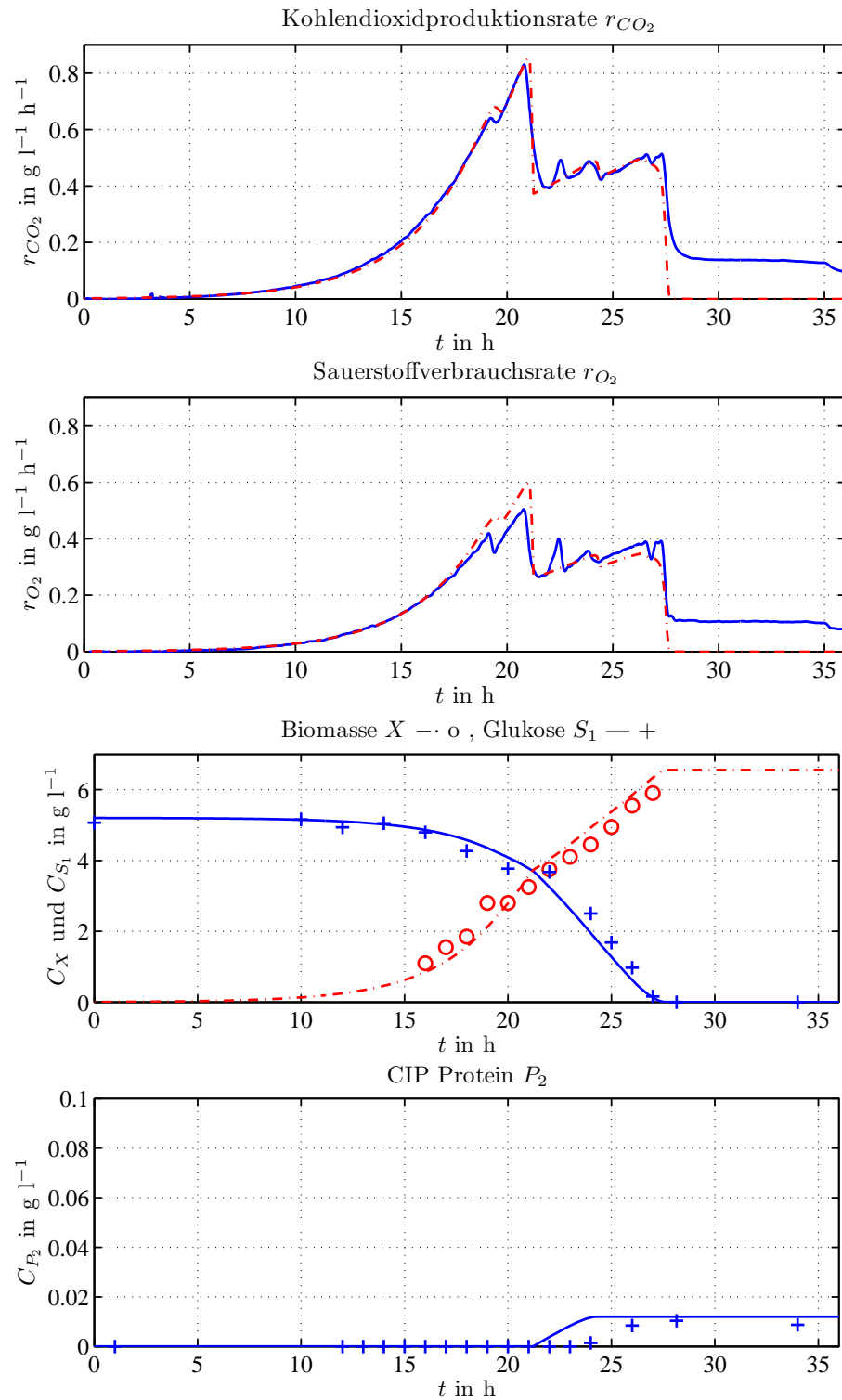


Abb. 5.20: Experiment V2: CIP-Protein, Bakterienzellen mit Einschlusskörpern, Optische Dichte, Biotrockenmasse und Simulation der Zustände mit dem CIP-Modellansatz 1.

### 5.4.3 CIP-Modellansatz 2

Eine starke Vereinfachung des Modellansatzes aus Kapitel 5.4.2 ergibt sich, wenn die Kultivierungsbedingungen eingeschränkt werden. Wird vorausgesetzt, dass bei niedrigen Serinkonzentrationen  $C_{S_3} \leq 1,05 \text{ g l}^{-1}$  kultiviert wird, dann kann der Effekt der Inhibierung der CIP-Bildung durch hohe Serinkonzentrationen vernachlässigt werden.

In diesem Fall ist nur der Effekt zu berücksichtigen, dass eine CIP-Bildung in dem Zeitraum stattfindet, in dem Serin und Tyrosin bereits nicht mehr im Medium vorhanden sind, aber Glukose und alle weiteren Aminosäuren in ausreichend hoher Konzentration vorliegen.

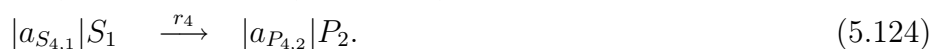
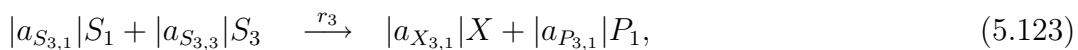
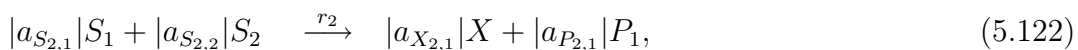
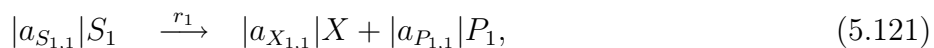
Diese Beschränkung der Kultivierungsbedingungen hat weiterhin den Vorteil, dass nun ein direkter Zusammenhang zwischen einem erhöhtem Glukoseverbrauch und der CIP-Bildung aufgestellt werden kann.

Wird gewährleistet, dass die Substrate Lysin  $S_4$ , Glutaminsäure  $S_5$ , Threonin  $S_6$ , Histidin  $S_7$  und Methionin  $S_8$  in ausreichend hoher Konzentration zur Verfügung stehen, können sie im Modell vernachlässigt werden. In diesem Fall ist eine Beschränkung auf die Stoffe der Tabelle 5.11 möglich.

Stoff	Bezeichnung
Biomasse	$X$
Glukose	$S_1$
Tyrosin	$S_2$
Serin	$S_3$
Kohlendioxid	$P_1$
CIP-Protein	$P_2$

Tab. 5.11: Zusammenfassung der im vereinfachten CIP-Modell betrachteten Stoffe

Die Reaktionsgleichungen, zur Beschreibung des Wachstums, beschränken sich dann auf die Gleichungen



Der Aufbau von Biomasse wird in den ersten drei Reaktionen (5.121), (5.122) und (5.123) beschrieben. In jeder der drei Reaktionen wird Glukose verbraucht und Kohlendioxid produziert. In den beiden letzteren Reaktionen (5.122) und (5.123) wird zusätzlich einmal Serin und das andere mal Tyrosin zum Biomasseaufbau benötigt.

Die Einschlusskörperbildung wird in einer zusätzlichen Reaktion berücksichtigt, bei der die Einschlusskörperbildung nun durch einen zusätzlichen Verbrauch von Glukose beschrieben werden kann.

Die Reaktionskinetiken beschreiben die Reaktionsgeschwindigkeiten unter denen die Reaktionen ablaufen. Die ersten drei Kinetiken stellen Monod-Kinetiken dar, wie sie auch für den CIP-Modellansatz 1 verwendet wurden. Die Kinetik  $r_4$  beschreibt im Vergleich zum CIP-Modellansatz 1 eine veränderte Einschlusskörperbildung. Der erste Term beschreibt die monod-förmige Abhängigkeit von der Glukose bei der Einschlusskörperbildung. Der zweite und dritte Term beschreiben die Inhibierung verursacht durch die beiden Aminosäuren Serin und Tyrosin.

$$r_1 = r_{1max} \frac{C_{S_1}}{K_{1,1} + C_{S_1}}, \quad (5.125)$$

$$r_2 = r_{2max} \frac{C_{S_2}}{K_{2,1} + C_{S_2}}, \quad (5.126)$$

$$r_3 = r_{3max} \frac{C_{S_3}}{K_{3,1} + C_{S_3}}, \quad (5.127)$$

$$r_4 = r_{4max} \frac{C_{S_1}}{K_{4,1} + C_{S_1}} \cdot \frac{K_{4,2}}{K_{4,2} + C_{S_2}} \cdot \frac{K_{4,3}}{K_{4,3} + C_{S_3}}. \quad (5.128)$$

Die Reaktionen (5.125) - (5.128) werden zu dem Gleichungssystem

$$\underbrace{\begin{bmatrix} a_{S_{1,1}} & 0 & 0 \\ a_{S_{2,1}} & a_{S_{2,2}} & 0 \\ a_{S_{3,1}} & 0 & a_{S_{3,3}} \\ a_{S_{4,1}} & 0 & 0 \end{bmatrix}}_{\mathbf{A}_S} \underbrace{\begin{bmatrix} S_1 \\ S_2 \\ S_3 \end{bmatrix}}_{\underline{S}} + \underbrace{\begin{bmatrix} a_{X_{1,1}} \\ a_{X_{2,1}} \\ a_{X_{3,1}} \\ 0 \end{bmatrix}}_{\underline{a}_X} X + \underbrace{\begin{bmatrix} a_{P_{1,1}} & 0 \\ a_{P_{2,1}} & 0 \\ a_{P_{3,1}} & 0 \\ 0 & a_{P_{4,2}} \end{bmatrix}}_{\mathbf{A}_P} \underbrace{\begin{bmatrix} P_1 \\ P_2 \end{bmatrix}}_{\underline{P}} = \underline{\Delta} \quad (5.129)$$

zusammengefasst, um die stöchiometrischen Matrizen zu definieren.

$$\underline{r}_{Bio} = \begin{bmatrix} a_X^T \\ \mathbf{A}_S^T \\ \mathbf{A}_P^T \end{bmatrix} \cdot \underline{r} \cdot C_X \quad (5.130)$$

Das Differentialgleichungssystem kann für den Batch-Betrieb in der Form

$$\begin{bmatrix} \dot{C}_X \\ \dot{C}_{S_1} \\ \dot{C}_{S_2} \\ \dot{C}_{S_3} \\ \dot{C}_{P_1} \\ \dot{C}_{P_2} \end{bmatrix} = \underline{r}_{Bio} = \begin{bmatrix} (a_{X_{1,1}}r_1 + a_{X_{2,1}}r_2 + a_{X_{3,1}}r_3) \cdot C_X \\ [(a_{S_{1,1}}r_1 + a_{S_{2,1}}r_2 + a_{S_{3,1}}r_3) + a_{S_{4,1}}r_4] \cdot C_X \\ a_{S_{2,2}}r_2 \cdot C_X \\ a_{S_{3,3}}r_3 \cdot C_X \\ (a_{P_{1,1}}r_1 + a_{P_{2,1}}r_2 + a_{P_{3,1}}r_3) \cdot C_X \\ a_{P_{4,2}}r_4 \cdot C_X \end{bmatrix} \quad (5.131)$$

angegeben werden. Die Parameter für das Modell wurden wie in Kapitel 5.4.2 beschrieben bestimmt. In der Tabelle 5.12 sind die verwendeten Parameter zusammengefasst.

stöch. Param.	stöch. Param.	kin. Param	kin. Param
$a_{S_{1,1}} = -0.4$	$a_{X_{1,1}} = 1$	$K_{1,1} = 0.1 \text{ g l}^{-1}$	$r_{1max} = 0.1$
$a_{S_{2,1}} = -0.4$	$a_{X_{2,1}} = 1$	$K_{2,1} = 0.0002 \text{ g l}^{-1}$	$r_{2max} = 0.06$
$a_{S_{3,1}} = -0.4$	$a_{X_{2,1}} = 1$	$K_{3,1} = 0.001 \text{ g l}^{-1}$	$r_{3max} = 0.15$
$a_{S_{4,1}} = -2.25$	$a_{P_{1,1}} = 1$	$K_{4,1} = 0.5 \text{ g l}^{-1}$	$r_{4max} = 0.07$
$a_{S_{2,2}} = -0.81$	$a_{P_{2,1}} = 1$	$K_{4,2} = 0.001 \text{ g l}^{-1}$	
$a_{S_{3,3}} = -3.24$	$a_{P_{3,1}} = 1$	$K_{4,3} = 0.001 \text{ g l}^{-1}$	
	$a_{P_{4,2}} = 0.55$		

Tab. 5.12: Parameter CIP-Modellansatz 2.

Dieser vereinfachte Modellansatz (CIP-Modellansatz 2) stellt eine Reduzierung des CIP-Modellansatzes 1 dar. Werden die Bedingungen für die Verwendung dieses Modells eingehalten, wird eine gute Übereinstimmung zwischen den Analysewerten und den simulierten Werten erzielt, siehe Abbildung 5.21. Der Vorteil bei diesem Modellansatz ist, dass unter den gegebenen Randbedingungen, ein direkter Zusammenhang zwischen dem erhöhten Glukoseverbrauch und der Einschlusskörperbildung hergestellt werden kann.

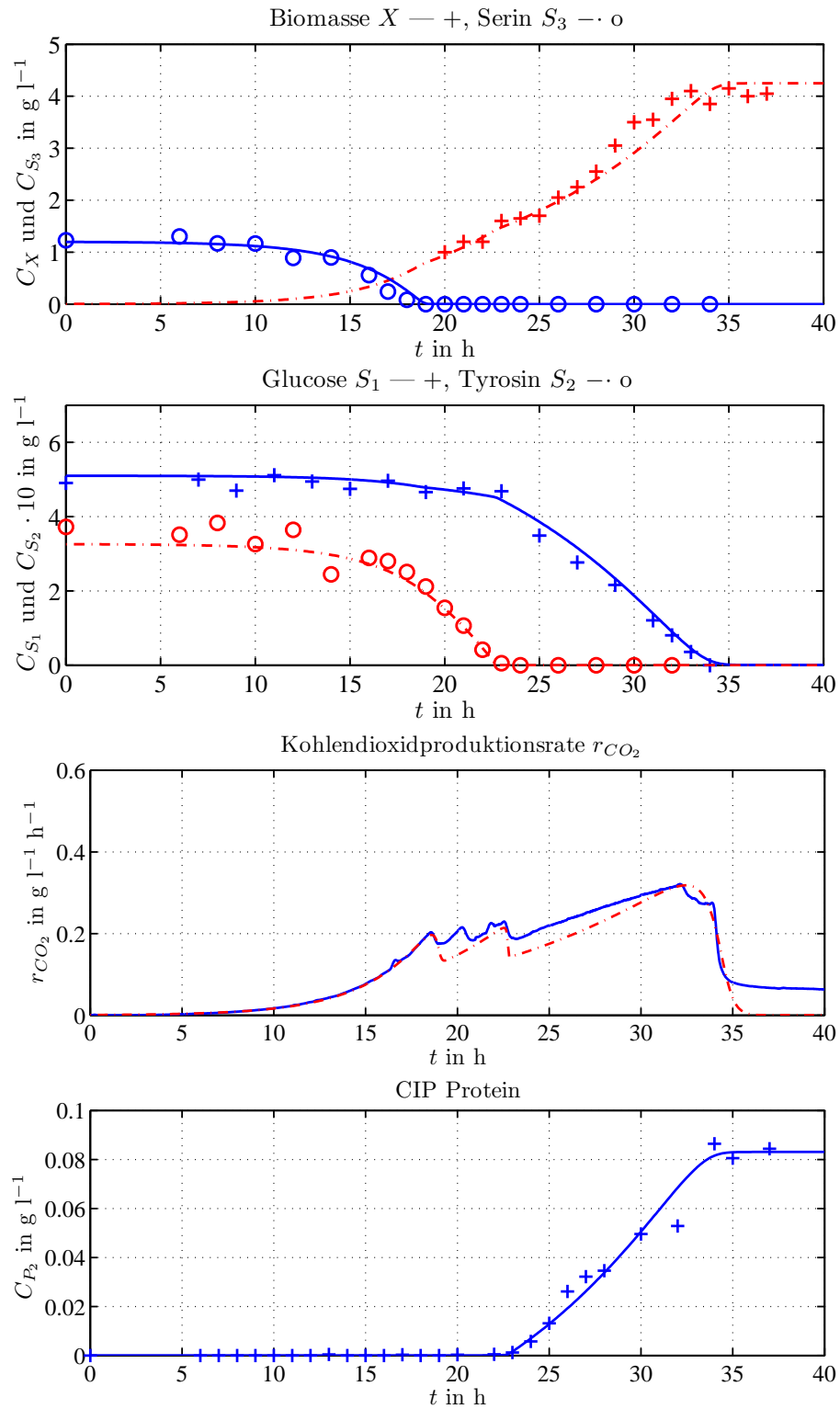


Abb. 5.21: Experiment V2: Messwerte und Simulation der Zustände mit dem CIP-Modellansatz 2.



# Kapitel 6

## Zustandsschätzung

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit dem wichtigen Problem der Zustands- und Parameterschätzung, das in fast allen wissenschaftlichen Bereichen von der Regelungstechnik und Messtechnik bis hin zur Biologie und Wirtschaftswissenschaften auftritt. Die Grundlage der Zustands- und Parameterschätzung bildet eine Modellstruktur des betrachteten Systems, die zusammen mit Beobachtungen (Messungen) eine Aussage über die Parameter und/oder die Zustände erlaubt. Die breite Anwendung dieser Verfahren bei der Systemidentifikation, der modellgestützten Messung oder der Fehlererkennung hat zur Entwicklung zahlreicher Varianten geführt. Eine grobe Klassifizierung dieser Verfahren führt zu der Gruppierung nach

- online - offline Verfahren,
- rekursiver - blockweiser (batch) Verarbeitung der Daten,
- deterministischen - stochastischen Signalmodellen,
- linearer - nichtlinearer Modellstruktur.

Einen Überblick über die in der angewandten Systemtheorie (Regelungstechnik) gebräuchlichen Verfahren geben beispielsweise die Lehrbücher von Ljung [27], Gelb [19], Isermann [22] und Engell [16]. Als Einführung wird zunächst in diesem Kapitel allgemein auf die Beobachtungsaufgabe für dynamische Systeme eingegangen und die Standardverfahren zusammengefasst. Ein spezielles Verfahren, das der Zustandsschätzung auf bewegtem Horizont (Moving Horizon Estimator, MHE) wird hergeleitet und die Vorzüge bezüglich der Anwendung bei biotechnologischen Systemen hervorgehoben.

### 6.1 Beobachter für dynamische Systeme

Eine große Klasse dynamischer Systeme und Prozesse kann mit Hilfe nichtlinearer, zeitkontinuierlicher Zustandsdifferentialgleichungen mit konzentrierten Parametern durch die Gleichungen

$$\Sigma : \quad \dot{\underline{x}}(t) = \underline{f}(\underline{x}(t), \underline{u}(t), \underline{s}(t), \underline{p}, t) \quad t \geq 0, \quad \underline{x}(0) = \underline{x}_0, \quad (6.1)$$

$$\underline{y}(t) = \underline{h}(\underline{x}(t), \underline{u}(t), \underline{s}(t), \underline{p}, t) \quad (6.2)$$

beschrieben werden. Die Funktion  $\underline{f}$  beschreibt das dynamische Verhalten der internen Zustände  $\underline{x}(t) \in \mathbb{R}^n$  in Abhängigkeit der bekannten und unbekanntenen Eingangsgrößen  $\underline{u}(t) \in \mathbb{R}^m$  und  $\underline{s}(t) \in \mathbb{R}^{n_s}$ . Die Funktion  $\underline{h}$  stellt die Messgleichung dar und beschreibt, wie sämtliche Größen auf den Ausgang  $\underline{y}(t) \in \mathbb{R}^r$  des Systems wirken. In dem Vektor  $\underline{p} \in \mathbb{R}^{n_p}$  sind die Parameter des Modells zusammengefasst.

Moderne Verfahren der Prozessführung und Überwachung benötigen die vollständige Zustandsinformation  $\underline{x}(t)$  des Systems. Im Allgemeinen kann diese nur schwer oder gar nicht durch direkte Messung gewonnen werden. Berücksichtigt man jedoch die Systemgleichungen (6.1, 6.2) und die bekannten Eingangsgrößen, ist es möglich, unter der Voraussetzung, dass die Beobachtbarkeit des Systems gegeben ist, die Zustandsinformation zu rekonstruieren.

Hierzu muss ein Beobachter entworfen werden:

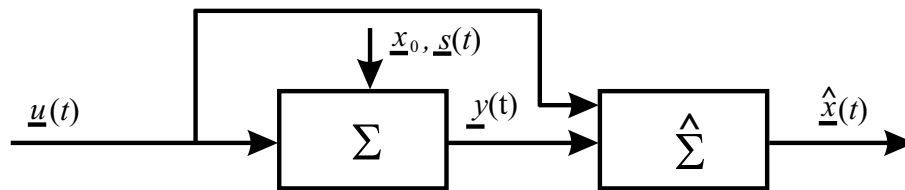


Abb. 6.1: System und Beobachter

Die Lösung der Beobachtungsaufgabe besteht in dem Entwurf eines dynamischen Systems  $\hat{\Sigma}$ , Abbildung 6.1 mit dem Ausgang  $\hat{\underline{x}}(t)$  und den Eingängen  $\underline{u}(t)$  und  $\underline{y}(t)$ , so dass der Ausgang  $\hat{\underline{x}}(t)$  gegen den Zustand  $\underline{x}(t)$  des Systems konvergiert. Die Konvergenz  $\hat{\underline{x}}(t) \rightarrow \underline{x}(t)$  muss für alle Anfangszustände  $\underline{x}_0$ , bekannten und unbekanntenen Eingangsgrößen  $\underline{u}(t)$  und  $\underline{s}(t)$  gesichert sein (Konvergenzbedingung) [29].

Die Schätzung des Zustandes  $\underline{x}(t)$  ist letztendlich äquivalent mit der Rekonstruktion des unbekanntenen Anfangszustandes  $\underline{x}_0$  und der unbekanntenen Eingangsgrößen  $\underline{s}(t)$ , die auf das System  $\Sigma$  wirken. Sind diese Größen bekannt, können die Zustände mit Hilfe der Systemgleichungen (6.1) berechnet werden (Simulatorbedingung).

Zur Untersuchung der Lösbarkeit dieser Aufgabe ist eine Beobachtbarkeitsanalyse erforderlich [39].

Für die nichtlineare Systembeschreibung (6.1, 6.2) existiert sowohl bei der Untersuchung der Beobachtbarkeit, als auch für den Entwurf eines Beobachters kein für

alle Systeme allgemein anwendbares Verfahren [41]. Die Vielfalt und mathematische Komplexität nichtlinearer Systeme führt zu einer großen Anzahl verschiedener Entwurfsverfahren, die entweder nur auf Sonderfälle der nichtlinearen Systembeschreibung anwendbar sind oder auf unterschiedlichen Näherungen basieren.

### 6.1.1 Beobachter für lineare Systeme

Die Theorie der Zustandsbeobachtung linearer Systeme ist auf die Arbeiten von Luenberger und für stochastisch gestörte Systeme auf Kalman zurückzuführen. Sie bilden die Grundlage für die Entwicklung von Beobachtern nichtlinearer Systeme. Im Fall linearer Systeme der Form

$$\dot{\underline{x}} = \mathbf{A}\underline{x} + \mathbf{B}\underline{u} \quad t \geq 0, \quad \underline{x}(0) = \underline{x}_0, \quad (6.3)$$

$$\underline{y} = \mathbf{C}\underline{x} \quad , \mathbf{A} \in \mathbb{R}^{n \times n}, \mathbf{B} \in \mathbb{R}^{n \times m}, \mathbf{C} \in \mathbb{R}^{r \times n} \quad (6.4)$$

stellt der Entwurf eines Luenberger-Beobachters eine Standardaufgabe dar.

Hierbei besitzt der Beobachter die Struktur

$$\dot{\hat{\underline{x}}} = \mathbf{A}\hat{\underline{x}} + \mathbf{B}\underline{u} + \mathbf{K}(\underline{y} - \mathbf{C}\hat{\underline{x}}) \quad t \geq 0, \quad \hat{\underline{x}}(0) = \hat{\underline{x}}_0, \quad (6.5)$$

$$\hat{\underline{y}} = \mathbf{C}\hat{\underline{x}}, \quad (6.6)$$

wobei die Entwurfsaufgabe in der Parametrisierung der Matrix  $\mathbf{K} \in \mathbb{R}^{r \times n}$  besteht, so dass der Schätzfehler  $\tilde{\underline{x}} = \underline{x} - \hat{\underline{x}}$  asymptotisch abklingt. Dies kann nur dann erreicht werden, wenn das lineare System vollständig beobachtbar ist.

**Definition:** Ein lineares System ist vollständig beobachtbar, wenn bei bekannter Anregung  $\underline{u}(t)$  aus dem Ausgangsvektor  $\underline{y}(t)$  über ein endliches Zeitintervall  $t_0 \leq t < t_1$  der Anfangszustand  $\underline{x}_0$  eindeutig bestimmt werden kann.

Diese Systemeigenschaft ist bei linearen Systemen nur von der Struktur abhängig und kann durch die Rangüberprüfung der Beobachtbarkeitsmatrix nachgewiesen werden:

$$\text{Rang}(\mathbf{Q}_b) = \text{Rang} \begin{bmatrix} \mathbf{C} \\ \mathbf{C}\mathbf{A} \\ \mathbf{C}\mathbf{A}^2 \\ \vdots \\ \mathbf{C}\mathbf{A}^{n-1} \end{bmatrix} = n. \quad (6.7)$$

## 6.1.2 Beobachter für nichtlineare Systeme

Die gebräuchlichsten Entwurfsverfahren für nichtlineare Systeme führen das Entwurfsproblem auf ein lineares Problem zurück und wenden Methoden der linearen Theorie an, wie z.B. das Erweiterte Kalman Filter oder der Erweiterte Luenberger Beobachter.

Für die Herleitung vieler, in der Praxis relevanter Beobachterverfahren wird von einer Klasse von Systemen ausgegangen, die durch die Gleichungen

$$\dot{\underline{x}} = \underline{f}(\underline{x}, \underline{u}) + \underline{w}(t) \quad t \geq 0, \quad \underline{x}(0) = \underline{x}_0, \quad (6.8)$$

$$\underline{y} = \underline{h}(\underline{x}) + \underline{v}(t) \quad (6.9)$$

beschrieben werden können. Im Vergleich zur allgemeineren Systemdarstellung in der Gleichung (6.1,6.2) wurden die unbekanntes Eingangsgrößen  $\underline{s}(t)$  in zwei Vektoren  $\underline{w}(t) \in \mathbb{R}^n$  und  $\underline{v}(t) \in \mathbb{R}^r$  aufgeteilt, die Störungen in den Zustandsgleichungen bzw. in den Messungen darstellen.

Das Erweiterte Kalman Filter (EKF) bildet, für diese Klasse von Systemen, die Grundlage für den Entwurf vieler nichtlinearer Beobachtungsverfahren. Die Gleichungen für das kontinuierliche EKF werden nach Gelb [19] zusammengefasst. Bei dem Entwurf wird davon ausgegangen, dass es sich bei den Störungen  $\underline{w}(t)$  und  $\underline{v}(t)$  um stochastische Größen handelt, die durch weiße Rauschprozesse mit den Kovarianzmatrizen  $\mathbf{Q}$  und  $\mathbf{R}$  beschrieben werden können. In dem Fall stochastisch gestörter Systeme hat sich die Bezeichnung Filter durchgesetzt.

Analog zu dem Beobachter linearer Systeme, besitzt das nichtlineare Filter die gleiche Struktur

$$\dot{\hat{\underline{x}}} = \underline{f}(\hat{\underline{x}}, \underline{u}) + \mathbf{K}(t)(\underline{y} - \underline{h}(\hat{\underline{x}})) \quad t \geq 0, \quad \hat{\underline{x}}(0) = \hat{\underline{x}}_0, \quad (6.10)$$

$$\hat{\underline{y}} = \underline{h}(\hat{\underline{x}}) \quad (6.11)$$

mit einem Simulations- und einem Korrekturterm. Die Entwurfsaufgabe besteht nun wiederum in der Bestimmung der Matrix  $\mathbf{K}(t)$ , die für das EKF zeitvariant ist. Die Matrix  $\mathbf{K}(t)$  wird so gewählt, dass die Approximation der Kovarianz  $\mathbf{P}(t)$  des Zustandsschätzfehlers  $\tilde{\underline{x}}$  minimal wird. Die approximative Bestimmung der Kovarianzmatrix  $\mathbf{P}(t)$  basiert auf den Linearisierungen

$$\mathbf{A}(t) = \left. \frac{\partial \underline{f}(\underline{x}, \underline{u})}{\partial \underline{x}} \right|_{\underline{u}(t), \hat{\underline{x}}(t)}, \quad \mathbf{C}(t) = \left. \frac{\partial \underline{h}(\underline{x})}{\partial \underline{x}} \right|_{\hat{\underline{x}}(t)} \quad (6.12)$$

der Systemgleichungen um den Schätzwert  $\hat{\underline{x}}$  und führen zur Matrix-Riccati Differentialgleichung

$$\dot{\mathbf{P}}(t) = \mathbf{A}(t)\mathbf{P}(t) + \mathbf{P}(t)\mathbf{A}^T(t) + \mathbf{Q} - \mathbf{P}(t)\mathbf{C}^T(t)\mathbf{R}^{-1}\mathbf{C}(t)\mathbf{P}(t), \quad (6.13)$$

deren Lösung zur Berechnung der Korrekturmatrix

$$\mathbf{K}(t) = \mathbf{P}(t)\mathbf{C}^T(t)\mathbf{R}^{-1} \quad (6.14)$$

benutzt wird.

Wie im linearen Fall kann der Entwurf eines Beobachters nur dann erfolgreich sein, wenn das System die Struktureigenschaft der Beobachtbarkeit besitzt. Wenn ein lineares System vollständig beobachtbar ist, so ist jeder Zustand des Zustandsraumes, unabhängig von der Eingangsgröße, beobachtbar. Im nichtlinearen Fall ist es dagegen möglich, dass nur Teilbereiche des Zustandsraumes beobachtbar sind und dies führt zu verschiedenen Definitionen der Beobachtbarkeit [3]. Die im Hinblick auf den Entwurf nichtlinearer Beobachter und Filter wichtigen Definitionen sind die globale-, die lokale- und die Arbeitspunkt-Beobachtbarkeit.

Die verschiedenen Formen der Beobachtbarkeit sind für das ungestörte nichtlineare System

$$\dot{\underline{x}} = \underline{f}(\underline{x}, \underline{u}), \quad \underline{x}(0) = \underline{x}_0, \quad (6.15)$$

$$\underline{y} = \underline{h}(\underline{x}) \quad (6.16)$$

wie folgt definiert:

**Global beobachtbar:** Ein nichtlineares System ist global beobachtbar, wenn alle Anfangszustände  $\underline{x}_0 \in X_0$  aus  $\underline{u}(t)$  und  $\underline{y}(t)$  im gesamten Definitionsbereich eindeutig bestimmbar sind.

**Lokal beobachtbar:** Ein nichtlineares System ist in einem Punkt  $\underline{x}_p$  lokal beobachtbar, wenn alle Anfangszustände  $\underline{x}_0$  in einer Umgebung  $\|\underline{x}_0 - \underline{x}_p\| < \rho$  aus  $\underline{u}(t)$  und  $\underline{y}(t)$  eindeutig bestimmbar sind.

**Arbeitspunkt beobachtbar:** Ein nichtlineares System ist in einem Punkt  $\underline{x}_s, \underline{u}_s$  arbeitspunkt-beobachtbar, wenn alle Anfangszustände  $\underline{x}_0$  in einer Umgebung  $\|\underline{x}_0 - \underline{x}_s\| < \rho_x, \quad \|\underline{u} - \underline{u}_s\| < \rho_u$  des stationären Arbeitspunktes mit  $\underline{f}(\underline{x}_s, \underline{u}_s) = 0$  aus  $\underline{u}(t)$  und  $\underline{y}(t)$  eindeutig bestimmbar sind.

Die nichtlineare Beobachtbarkeitsanalyse basiert auf der Beobachtbarkeitsabbildung [3],[39]

$$\underline{q}(\underline{x}, \underline{u}^{[n-2]}) = \begin{bmatrix} q_1(\underline{x}, \underline{u}^{[n-2]}) \\ q_2(\underline{x}, \underline{u}^{[n-2]}) \\ \vdots \\ q_r(\underline{x}, \underline{u}^{[n-2]}) \end{bmatrix} \quad \text{mit} \quad \underline{q}_i(\underline{x}, \underline{u}^{[n-2]}) = \begin{bmatrix} y_i \\ \frac{d}{dt} y_i \\ \vdots \\ \frac{d^{n-1}}{dt^{n-1}} y_i \end{bmatrix} \quad (6.17)$$

und  $\underline{u}^{[n-2]} := [\underline{u}^T \quad \underline{\dot{u}}^T \quad \dots \quad \underline{u}^{(n-2)T}]^T$ .

Dieser Zusammenhang stellt eine Abbildung zwischen den Zuständen  $\underline{x}$  und den Eingängen  $\underline{u}^{[n-2]}$  auf die Zeitableitungen von  $y_i(t)$ ,  $i = 1, \dots, r$  dar.

Die ersten zeitlichen Ableitungen der Ausgangsgröße liefert nach Einsetzen von  $\underline{\dot{x}} = \underline{f}(\underline{x}, \underline{u})$  die Beziehung

$$\dot{y}_i = \frac{\partial h_i(\underline{x})}{\partial \underline{x}} \underline{f}(\underline{x}, \underline{u}) \quad (6.18)$$

$$\ddot{y}_i = \frac{\partial}{\partial \underline{x}} \left( \frac{\partial h_i(\underline{x})}{\partial \underline{x}} \underline{f}(\underline{x}, \underline{u}) \right) \underline{f}(\underline{x}, \underline{u}) + \frac{\partial}{\partial \underline{u}} \left( \frac{\partial h_i(\underline{x})}{\partial \underline{x}} \underline{f}(\underline{x}, \underline{u}) \right) \underline{\dot{u}} \quad (6.19)$$

⋮

Durch maximal  $n - 1$  maliges Differenzieren der Ausgangsgröße  $y_i(t)$ , können die Zeitableitungen der Eingangsgröße  $\underline{u}$  bis zur  $n - 2$ . Ordnung auftreten. Für eine konstante Stellgröße  $\underline{u}$  ist die Zeitableitung  $\frac{d^k}{dt^k} y_i(t)$  äquivalent mit der Lie-Ableitung  $L_f^k h_i$  der Funktion  $h_i(\underline{x})$  in Richtung des Vektorfeldes  $\underline{f}(\underline{x})$ .

Die Beobachtbarkeitsabbildung, Gleichung (6.17), stellt in der Regel ein überbestimmtes Gleichungssystem für  $\underline{x}$  dar. Zur Bestimmung von  $\underline{x}$  bzw  $\underline{x}_0$  müssen  $n$  der maximal  $n \cdot r$  Gleichungen zu einer Auswahlabbildung  $\underline{q}_A(\underline{x}, \underline{u})$  zusammengefasst werden. Wenn die Auswahlabbildung überall invertierbar ist, das heißt nach  $\underline{x}$  auflösbar, so ist das nichtlineare System global beobachtbar. Ein solcher Nachweis ist aber nur in seltenen Fällen möglich.

Mathematisch einfacher als die Analyse der globalen Beobachtbarkeit ist die Untersuchung der lokalen Beobachtbarkeit um einen Punkt  $\underline{x}_p$ . Hierzu wird die Invertierbarkeit von  $q(\underline{x}, \underline{u}^{[n-2]})$  nur in der Umgebung des Punktes  $\underline{x}_p$  untersucht, indem eine Rangprüfung der Jacobi-Matrix  $\partial q(\underline{x}, \underline{u}^{[n-2]})/\partial \underline{x}$  durchgeführt wird.

Das System ist lokal beobachtbar, wenn die Beobachtbarkeitsmatrix  $\mathbf{Q}_b(\underline{x}, \underline{u}^{[n-2]})$  die folgende Rangbedingung im gesamten Definitionsbereich erfüllt:

$$\text{Rang } \mathbf{Q}(\underline{x}, \underline{u}^{[n-2]}) = n \quad \forall \underline{x} \in \mathbb{R}^n, \quad \forall \underline{u} \in \mathbb{R}^m \quad (6.20)$$

$$\text{mit } \mathbf{Q}(\underline{x}, \underline{u}^{[n-2]}) = \frac{\partial q(\underline{x}, \underline{u}^{[n-2]})}{\partial \underline{x}}. \quad (6.21)$$

Die Untersuchung der Arbeitspunkt-Beobachtbarkeit schränkt den Definitionsbereich, in dem die Rangbedingung für die Beobachtbarkeitsmatrix erfüllt sein muss, auf den stationären Punkt  $\underline{x}_s, \underline{u}_s$  ein. Für diesen Fall ist die Beobachtbarkeitsmatrix identisch mit der Beobachtbarkeitsmatrix für das um den Arbeitspunkt  $\underline{x}_s, \underline{u}_s$  linearisierte System.

$$\dot{\underline{x}} = \underbrace{\frac{\partial f}{\partial \underline{x}} \bigg|_{\underline{x}_s, \underline{u}_s}}_{\mathbf{A}_s} \underline{x} + \underbrace{\frac{\partial f}{\partial \underline{u}} \bigg|_{\underline{x}_s, \underline{u}_s}}_{\mathbf{B}_s} \underline{u} \quad (6.22)$$

$$\underline{y} = \underbrace{\frac{\partial h}{\partial \underline{x}} \bigg|_{\underline{x}_s, \underline{u}_s}}_{\mathbf{C}_s} \underline{x}. \quad (6.23)$$

Damit ergibt sich die Bedingung für die arbeitspunktabhängige Beobachtungsmatrix zu:

$$\text{Rang}(\mathbf{Q}_b(\underline{x}_s, \underline{u}_s)) = \text{Rang} \begin{bmatrix} \mathbf{C}_s \\ \mathbf{C}_s \mathbf{A}_s \\ \mathbf{C}_s \mathbf{A}_s^2 \\ \vdots \\ \mathbf{C}_s \mathbf{A}_s^{n-1} \end{bmatrix} = n. \quad (6.24)$$

### 6.1.3 Zustandserweiterung

Ist die Übertragungsfunktion  $\underline{f}$  oder die Messgleichung  $\underline{h}$  von zusätzlichen Einflussgrößen wie unbekanntem Systemparametern und Eingangssignalen abhängig, können diese Größen durch eine Zustandserweiterung [19] mit in das Beobachtungsproblem integriert werden. Die unbekanntem Parameter und Einflussgrößen werden in einem Vektor  $\underline{p}_u$  zusammengefasst. Bei diesem Ansatz wird  $\underline{p}_u$  meist als konstant oder als Brownsche Bewegung modelliert. Auch eine allgemeinere zeitvariante Modellierung ist möglich. Hierzu wird ein neuer Zustandsvektor

$$\underline{x}^* = \begin{bmatrix} \underline{x} \\ \underline{p}_u \end{bmatrix} \quad (6.25)$$

eingeführt und die Systemgleichungen durch einen Ansatz

$$\dot{\underline{p}}_u = \underline{0} + \underline{w}^p \quad (6.26)$$

zu

$$\dot{\underline{x}}^* = \begin{bmatrix} \underline{f}(\underline{x}, \underline{u}, \underline{p}_u) \\ \underline{0} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \underline{w} \\ \underline{w}^p \end{bmatrix} = \underline{F}^*(\underline{x}^*, \underline{u}) + \underline{w}^* \quad (6.27)$$

$$\underline{y} = \underline{h}(\underline{x}^*) + \underline{v} \quad (6.28)$$

erweitert. Der Vektor  $\underline{w}^p$  stellt hier einen weißen Rauschprozess dar.

Die Zustandsschätzung findet dann mit dem erweiterten Systemmodell statt.

### 6.1.4 Abgetastete Systeme

Bei der praktischen Anwendung spielen abgetastete Systeme eine besonders wichtige Rolle. Die diskrete Beschreibungsform ermöglicht den Einsatz numerischer Verfahren zur Lösung und Optimierung vieler regelungstechnischer Probleme. In einigen Anwendungsfällen treten zudem keine kontinuierlichen Messungen der Prozessgrößen auf, wie bei der seriellen Messung und Verarbeitung mehrerer Prozessgrößen durch einzelne Geräte.

Hierzu wird zunächst von der kontinuierlichen Systembeschreibung (6.8) mit diskreten Messungen



$$\dot{\underline{x}} = \underline{f}(\underline{x}, \underline{u}) + \underline{w}(t) \quad t \geq 0, \quad \underline{x}(0) = \underline{x}_0, \quad (6.29)$$

$$\underline{y}_k = \underline{h}(\underline{x}_k) + \underline{v}_k \quad k = 0, 1, 2, \dots \quad t_k = k \cdot T \quad T > 0 \quad (6.30)$$

ausgegangen, wobei  $\underline{y}_k$  der diskrete Ausgangvektor,  $\underline{v}_k$  eine diskrete Störung und  $\underline{x}_k$  der Zustand zum diskreten Zeitpunkt  $t_k$  ist. Die Dimensionen der diskreten Signale entsprechen denen im kontinuierlichen Fall. Die Konstante  $T$  definiert die Abtastzeit; die Messungen erfolgen also zu den diskreten Zeitpunkten  $t_k = k \cdot T$ .

Bei der Wahl der Abtastzeit  $T$  ist darauf zu achten, dass die den Prozess bestimmende Dynamik erfasst werden kann, ansonsten geht die Beobachtbarkeit des Systems verloren. Einen Anhaltspunkt für die Wahl der Abtastzeit kann das Shannonsche Abtasttheorem geben. Es ist jedoch zu beachten, dass die Voraussetzung der Tiefpassbegrenzung der abgetasteten Signale praktisch nicht gegeben ist.

Die Lösung der kontinuierlichen Gleichung (6.29) für einen Abtastschritt ist durch

$$\underline{x}_k = \underline{x}_{k-1} + \int_{t_{k-1}}^{t_k} \underline{f}(\underline{x}(t), \underline{u}_{k-1}) dt + \int_{t_{k-1}}^{t_k} \underline{w}(t) dt \quad (6.31)$$

gegeben. Unter der Annahme, dass die Stellgröße stückweise konstant ist, kann sie in kompakter Schreibweise durch

$$\underline{x}_k = \underline{F}(\underline{x}_{k-1}, \underline{u}_{k-1}) + \underline{w}_{k-1} \quad (6.32)$$

dargestellt werden. Im Allgemeinen kann die Funktion  $\underline{F}$  nicht geschlossen angegeben werden, sie wird in der Regel durch die numerische Lösung zu den Abtastzeitpunkten repräsentiert.

## 6.2 Optimierungsbasierte Beobachterverfahren

Die Verfahren zur Identifikation und Schätzung können in Offline- und Online-Methoden aufgeteilt werden, wobei unter Offline-Methoden diejenigen zu verstehen sind, bei denen die gesammelten Daten als ganzer Datensatz verarbeitet werden. Dieses Schätzproblem wird oft als Least-Squares Optimierung bezeichnet, bei dem die zu schätzenden Größen durch Minimierung des quadratischen Fehlers zwischen den Messungen und der Modellvorhersage bestimmt werden. Die Online-Methoden stellen in erster

Linie Verfahren dar, die eine rekursive Verarbeitung der Daten durchführen um so die zu verarbeitende Menge der Daten zu reduzieren. Ein weit verbreiteter Ansatz ist die stochastische Formulierung des Problems, indem die Zustände und Parameter als stochastische Variablen modelliert werden und die Varianz des Schätzfehlers minimiert wird. Diese Methode hat den Vorteil gegenüber der deterministischen Least-Squares Formulierung, dass die Qualität der Schätzung durch die Kovarianz des Schätzwertes quantifiziert werden kann.

Viele Online-Methoden stellen die rekursive Lösung bestimmter Offline-Methoden dar. Aufgrund ihrer rechentechnischen Vorteile und der Möglichkeit nichtstationäres Verhalten der Daten und Systemeigenschaften zu berücksichtigen, werden rekursive Verfahren bevorzugt eingesetzt.

Bei nichtlinearen Systemen, wie in Gleichung (6.29, 6.30), mit einer überschaubaren Anzahl von Zuständen wird die Offline-Lösung des Least-Squares Problems mit einer hohen Anzahl an Messwerten rechentechnisch so aufwendig, dass sie nicht mehr durchführbar ist. In diesem Fall ist die rekursive Lösung die einzige Alternative, jedoch ist diese Lösung bei nichtlinearen Systemen nur mit Hilfe von Approximationen durchzuführen. Dieses führte zur Entwicklung zahlreicher nichtlinearer Filter die auf Approximationen basieren, wie z.B. das Extended Kalman Filter (EKF) oder das iterative EKF. Aufgrund der Approximationen stellen sie jedoch keine exakte Lösung des Schätzproblems dar und können unter bestimmten Umständen sogar divergieren.

Eine Alternative ist ein Kompromiss beider Verfahren, der zu einer batch Least-Squares Schätzung auf einem bewegten Zeithorizont führt und als Moving Horizon Estimation (MHE) bezeichnet wird. Grundlegende Veröffentlichungen hierzu sind [32], [31], [35] und [37].

Hierbei findet ein Kompromiss zwischen einer Erhöhung des rechentechnischen Aufwandes und einer Verbesserung der Genauigkeit statt, da weniger Informationen vernachlässigt werden.

Ein weiterer entscheidender Vorteil der Least-Squares Formulierung des Schätzproblems bildet die Möglichkeit, zusätzliche Beschränkungen mit bei der Schätzung zu berücksichtigen. Werden numerische Optimierungsverfahren zur Lösung verwendet, können zusätzliche Nebenbedingungen in Form von Ungleichungen verwendet werden, die beispielsweise die Zustandsgrößen oder Störungen beschränken. Hiermit kann zusätzliches Prozesswissen eingebracht werden um eine genauere und robustere Schätzung zu erhalten.

### 6.2.1 Least Square Formulierung

Das Ziel der Least Squares Zustandsschätzung zum Zeitpunkt  $k$  für ein System nach Gleichung (6.32,6.30)

$$\underline{x}_k = \underline{F}(\underline{x}_{k-1}, \underline{u}_{k-1}) + \underline{w}_{k-1} \quad (6.33)$$

$$\underline{y}_k = \underline{h}(\underline{x}_k) + \underline{v}_k \quad k = 0, 1, 2, \dots \quad t_k = k \cdot T \quad T > 0 \quad (6.34)$$

kann folgendermaßen definiert werden [37]:

**Definition:** Für einen gegebenen Anfangszustand  $\underline{x}_{0|0}$ , einer Sequenz von Messungen  $\{\underline{y}_1, \dots, \underline{y}_k\}$  und den Modellgleichungen (6.32,6.30), schätze den Fehler des Anfangszustandes  $\hat{\underline{w}}_{0|k}$  und die Sequenz  $\{\hat{\underline{w}}_{1|k}, \dots, \hat{\underline{w}}_{k-1|k}\}$  der unbekanntes Terme in den Zustandsgleichungen.

Die Notation  $\{\cdot\}_{l|k}$  bedeutet, dass es sich um einen Schätzwert für den Zeitpunkt l, zum Zeitpunkt k handelt.

Ist die Schätzung der Sequenz  $\hat{W}_k = \{\hat{\underline{w}}_{0|k}, \hat{\underline{w}}_{1|k}, \dots, \hat{\underline{w}}_{k-1|k}\}$  erfolgt, dann kann über das Modell der Zustand  $\hat{\underline{x}}$  und die Sequenz  $\hat{V}_k = \{\hat{\underline{v}}_0, \hat{\underline{v}}_1, \dots, \hat{\underline{v}}_k\}$  berechnet werden. Die Sequenz  $\hat{V}_k$  ist somit nicht unabhängig von  $\hat{W}_k$ .

Im Allgemeinen existiert eine unendliche Anzahl von Wahlmöglichkeiten für die Sequenzen  $\hat{W}_k$  und  $\hat{V}_k$ , die konsistent mit der gegebenen Sequenz von Messwerten  $Y_k = \{\underline{y}_1, \dots, \underline{y}_k\}$  ist. Es ist deshalb notwendig, ein Kriterium für die beste Schätzung der unbekanntes Variablen zu definieren. Werden die Sequenzen  $\hat{W}_k, \hat{V}_k$  als Fehler aufgefasst, kann die klassische Least-Squares Schätzung angewendet werden, um diese Fehler bezüglich eines quadratischen Gütefunktions zu minimieren und um in diesem Sinne die beste Trajektorie für  $\hat{\underline{x}}$  zu erhalten. Hierzu wird ein Optimierungsproblem mit Neben- und Randbedingungen wie folgt formuliert:

$$\min_{\hat{\underline{w}}_{0|k}, \dots, \hat{\underline{w}}_{k-1|k}} J_k = \hat{\underline{w}}_{0|k}^T \mathbf{P}_{0|k}^{-1} \hat{\underline{w}}_{0|k} + \sum_{l=1}^{k-1} \hat{\underline{w}}_{l|k}^T \mathbf{Q}^{-1} \hat{\underline{w}}_{l|k} + \sum_{l=1}^k \hat{\underline{v}}_{l|k}^T \mathbf{R}^{-1} \hat{\underline{v}}_{l|k}$$

Nebenbedingungen :

$$\begin{aligned} \hat{\underline{v}}_{l|k} &= \underline{y}_{l|k} - \underline{h}(\hat{\underline{x}}_{l|k}, \hat{\underline{p}}_{l|k}) \\ \hat{\underline{x}}_{l|k} &= \underline{F}(\hat{\underline{x}}_{l-1|k}, \underline{u}_{l-1|k}, \hat{\underline{p}}_{l-1|k}) + \hat{\underline{w}}_{l-1|k} \end{aligned} \quad (6.35)$$

Randbedingungen:

$$\hat{\underline{x}}_{0|k} = \hat{\underline{x}}_{0|0}$$

Die Matrizen  $\mathbf{R}^{-1}, \mathbf{Q}^{-1}$  und  $\mathbf{P}_{0|0}^{-1}$  sind positiv definite Matrizen. Sie stellen ein quantitatives Vertrauensmaß für die Messungen, das Systemmodell, und den Anfangszustand des Systems dar.

Um die Gewichtungsmatrizen festzulegen, bietet sich eine statistische Betrachtungsweise des Schätzproblems an. Hierbei repräsentiert die bedingte Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion  $p(\underline{x}_1, \dots, \underline{x}_k | \underline{y}_1, \dots, \underline{y}_k)$  sämtliche Informationen über die Zustände, die in der Sequenz der Messungen enthalten sind. Werden die Modellgleichungen zugrunde gelegt und die Größen  $\underline{x}_{0|0}$ ,  $\underline{w}_k$  und  $\underline{v}_k$  als weiße Rauschprozesse mit den Kovarianzen  $\mathbf{P}_{0|0}$ ,  $\mathbf{Q}$  und  $\mathbf{R}$  modelliert, dann kann die bedingte Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion für die Zustände angegeben werden als [37]:

$$p(\underline{x}_1, \dots, \underline{x}_k | \underline{y}_1, \dots, \underline{y}_k) = c \cdot \exp\left[-\frac{1}{2}(\underline{w}_0^T \mathbf{P}_{0|0}^{-1} \underline{w}_0 + \sum_{l=1}^{k-1} \underline{w}_l^T \mathbf{Q}^{-1} \underline{w}_l + \sum_{l=1}^k \underline{v}_l^T \mathbf{R}^{-1} \underline{v}_l)\right] \quad (6.36)$$

Das Maximum der bedingten Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion ist dann durch Minimierung des Gütefunktional (6.35) gegeben.

In kompakter Form ist das Zustandsschätzproblem in der Tabelle 6.1 zusammengefasst.

Zur Lösung dieses nichtlinearen dynamischen Optimierungsproblems kommen nur numerische Verfahren in Frage. Eine Möglichkeit ist die Kombination eines Integrationsverfahrens z.B. Runge-Kutta für die Lösung der Differentialgleichung gekoppelt mit einem nichtlinearen Optimierungsalgorithmus. Eine andere Methode besteht in der Diskretisierung der Differentialgleichung z.B. durch Kollokationsmethoden und der Überführung der differentiellen Nebenbedingungen in algebraische Nebenbedingungen [49].

<b>Start</b>	
$\hat{\underline{x}}_{0 0} = \hat{\underline{x}}_0, \quad \mathbf{P}_{0 0}, \quad \mathbf{Q}, \quad \mathbf{R}$	
$\hat{\underline{x}}_{k k-1} = F(\hat{\underline{x}}_{k-1 k-1}, \underline{u}_{k-1})$	<b>Vorhersage:</b> a priori Schätzwert für den Zeitpunkt k
$Y_k^T = [\underline{y}_1^T \cdots \underline{y}_k^T], \quad \hat{\underline{x}}_{0 0}$	<b>Messung:</b> $y_k$
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p><b>Optimierungsproblem:</b></p> <math display="block">\min_{\hat{\underline{w}}_{0 k}, \dots, \hat{\underline{w}}_{k-1 k}} J_k = (\hat{\underline{x}}_{0 0}, Y_k^T, \mathbf{P}_{0 0}, \mathbf{Q}, \mathbf{R})</math> <p>Bestimmung von:</p> <math display="block">\hat{\underline{w}}_{0 k}, \dots, \hat{\underline{w}}_{k-1 k}</math> </div>	
$\hat{\underline{x}}_{k k} = F(\hat{\underline{x}}_{k-1 k}, \underline{u}_{k-1}) + \hat{\underline{w}}_{k-1 k}$	a posteriori Schätzwert für den Zeitpunkt k

Tab. 6.1: Least-Squares Zustandsschätzung

## 6.2.2 Zustandsschätzung auf bewegtem Horizont

Die Ordnung des Least-Squares Optimierungsproblems steigt linear mit der Zahl der Messwerte. Um die Dimension des Optimierungsproblems zu beschränken, wird eine maximale Anzahl von zurückliegenden Daten in einem Beobachtungsfenster betrachtet. Ist die maximale Anzahl erreicht, wird mit jedem neu hinzukommenden Messwert das Beobachtungsfenster um einen Abtastschritt verschoben. Das Zustandsschätzproblem zum Zeitpunkt  $k$  für einen bewegten Horizont der Länge  $N$  kann wie folgt formuliert werden:

$$\min_{\hat{\mathbf{w}}_{k-N|k}, \dots, \hat{\mathbf{w}}_{k-1|k}} J_k^N = \hat{\mathbf{w}}_{k-N|k}^T \mathbf{P}_{k-N|k}^{-1} \hat{\mathbf{w}}_{k-N|k} + \sum_{l=k-N+1}^{k-1} \hat{\mathbf{w}}_{l|k}^T \mathbf{Q}^{-1} \hat{\mathbf{w}}_{l|k} + \sum_{l=k-N+1}^k \hat{\mathbf{w}}_{l|k}^T \mathbf{R}^{-1} \hat{\mathbf{w}}_{l|k}$$

Nebenbedingungen :

$$\begin{aligned} \hat{\mathbf{v}}_{l|k} &= \mathbf{y}_{l|k} - \mathbf{h}(\hat{\mathbf{x}}_{l|k}) \\ \hat{\mathbf{x}}_{l|k} &= \mathbf{F}(\hat{\mathbf{x}}_{l-1|k}, \mathbf{u}_{l-1|k}, ) + \hat{\mathbf{w}}_{l-1|k} \end{aligned} \quad (6.37)$$

Randbedingungen:

$$\begin{aligned} \hat{\mathbf{x}}_{k-N|k} &= \hat{\mathbf{x}}_{0|0} \quad \text{für } k \leq N \\ \hat{\mathbf{x}}_{k-N|k} &= \hat{\mathbf{x}}_{k-N|k-N} \quad \text{für } k > N \end{aligned}$$

Der MHE wird bis zum Erreichen der Horizontlänge  $N$  als batch Least-Squares Schätzer betrieben. Ist die Horizontlänge erreicht, wird der älteste Messwert verworfen sobald ein neuer Messwert aufgenommen wird. Hierbei stellt  $\hat{\mathbf{x}}_{k-N|k} = \hat{\mathbf{x}}_{k-N|k-N}$  den Schätzwert für den Zustand zu Beginn des Zeithorizontes dar, der nicht auf den Messwerten basiert, die in dem Zeitfenster berücksichtigt werden (siehe Abbildung 6.2). Dies ist notwendig, um die Messinformation nicht mehrfach zu verwenden. Die Gewichtungsmatrix  $\mathbf{P}_{k-N|k}$  repräsentiert das Vertrauen in den Anfangszustand des Schätzfensters. Die statistische Interpretation der Matrix  $\mathbf{P}_{k-N|k}$  als Kovarianz des Schätzwertes für  $\hat{\mathbf{x}}_{k-N|k}$  ermöglicht eine näherungsweise Berechnung. Hierzu kann direkt auf die Gleichungen zur Berechnung der Kovarianz  $\mathbf{P}$  des diskreten EKF zurückgegriffen werden [37].

Prädiktion der Kovarianzmatrix basierend auf dem letzten Schätzwert:

$$\mathbf{P}_{k|k-1} = \mathbf{A}_{k-1|k-1} \mathbf{P}_{k-1|k-1} \mathbf{A}_{k-1|k-1}^T + \mathbf{Q} \quad (6.38)$$

$$\mathbf{A}_{k-1|k-1} = \exp\left(\frac{\partial \mathbf{f}(\mathbf{x}, \mathbf{u})}{\partial \mathbf{x}} \bigg|_{\mathbf{x}_{k-1|k-1}, \mathbf{u}_{k-1}} \cdot T\right) \quad (6.39)$$

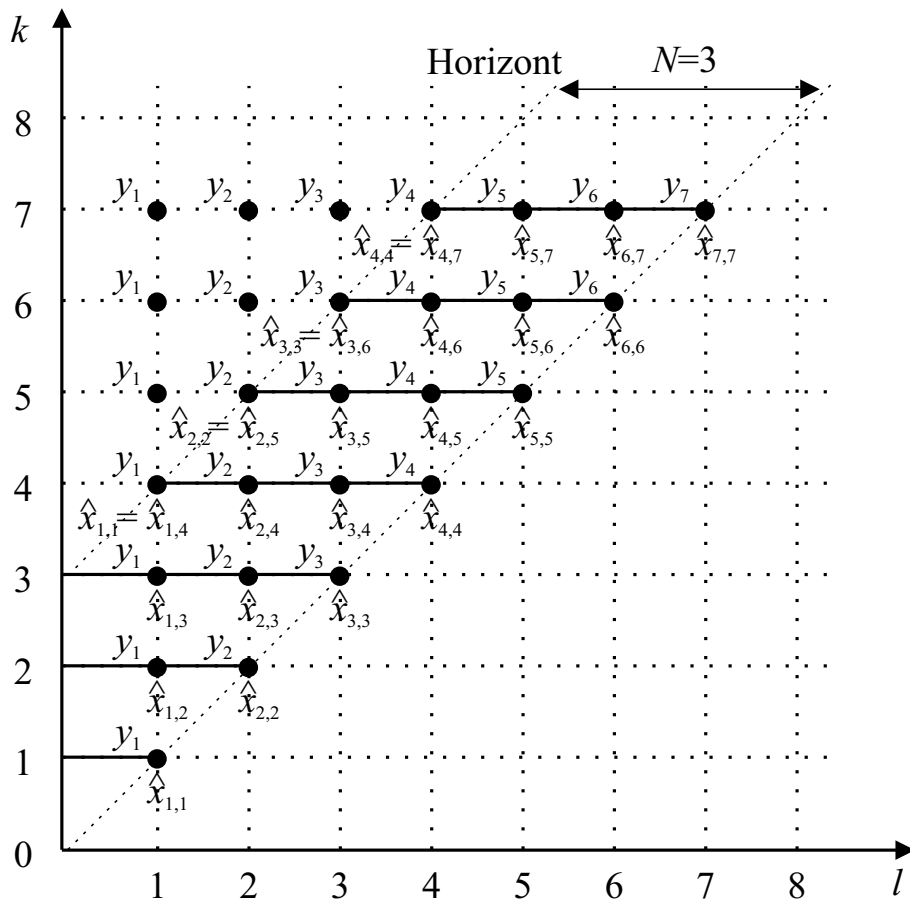


Abb. 6.2: Prinzip der Zustandsschätzung auf bewegtem Horizont.

Korrektur der Kovarianzmatrix wenn ein neuer Messwert vorliegt:

$$\mathbf{P}_{k|k} = \mathbf{P}_{k|k-1} - \mathbf{P}_{k|k-1} \mathbf{C}_{k|k-1}^T (\mathbf{C}_{k|k-1} \mathbf{P}_{k|k-1} \mathbf{C}_{k|k-1}^T + \mathbf{R})^{-1} \quad (6.40)$$

$$\mathbf{C}_{k|k-1} = \left. \frac{\partial h(\underline{x})}{\partial \underline{x}} \right|_{\hat{\underline{x}}_{k|k-1}} \quad (6.41)$$

Da in dem Gütefunktional die Kovarianzmatrix  $\mathbf{P}_{k-N|k-N}$  und der Zustand  $\hat{\underline{x}}_{k-N|k-N}$  eingehen, müssen die letzten  $N$  Kovarianzmatrizen und Zustände zwischengespeichert werden.

Eine Zusammenfassung des Algorithmus ist in Tabelle 6.2 gegeben.

<b>Start</b>	
$\hat{\underline{x}}_{0 0} = \hat{\underline{x}}_0, \quad \mathbf{P}_{0 0}, \quad \mathbf{Q}, \quad \mathbf{R} \quad N$	
$\hat{\underline{x}}_{k k-1} = F(\hat{\underline{x}}_{k-1 k-1}, \underline{u}_{k-1})$ $\mathbf{P}_{k k-1} = \mathbf{A}_{k-1 k-1} \mathbf{P}_{k-1 k-1} \mathbf{A}_{k-1 k-1}^T + \mathbf{Q}$	<b>Vorhersage:</b> a priori Schätzwert für den Zeitpunkt $k$
$Y_k^T = [y_{k-N+1}^T \cdots y_k^T],$ $\hat{\underline{x}}_{k-N k} = \hat{\underline{x}}_{k-N k-N}$ $\hat{\mathbf{P}}_{k-N k} = \hat{\mathbf{P}}_{k-N k-N}$	<b>Messung:</b> $y_k$
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p><b>Optimierungsproblem:</b></p> <math display="block">\min_{\hat{\underline{w}}_{k-N k}, \dots, \hat{\underline{w}}_{k-1 k}} J_k = (\hat{\underline{x}}_{k-N k-N}, Y_k^T, \mathbf{P}_{k-N k}, \mathbf{Q}, \mathbf{R})</math> <p>Bestimmung von:</p> <math display="block">\hat{\underline{w}}_{k-N k}, \dots, \hat{\underline{w}}_{k-1 k}</math> </div>	
$\hat{\underline{x}}_{k k} = F(\hat{\underline{x}}_{k-1 k}, \underline{u}_{k-1}) + \hat{\underline{w}}_{k-1 k}$ $\mathbf{P}_{k k} = \mathbf{P}_{k k-1} - \mathbf{P}_{k k-1} \mathbf{C}_{k k-1}^T (\mathbf{C}_{k k-1} \mathbf{P}_{k k-1} \mathbf{C}_{k k-1}^T + \mathbf{R})^{-1}.$ $\mathbf{C}_{k k-1} \mathbf{P}_{k k-1}$	a posteriori Schätzwert für den Zeitpunkt $k$

Tab. 6.2: Moving-Horizon-Estimation



### 6.2.3 Beschränkungen bei der Zustandsschätzung

Die Zustände, Parameter und auch die Störungen  $\underline{v}_k$  bzw.  $\underline{w}_k$  entsprechen physikalischen Charakteristiken des Systems. Im Allgemeinen ist eine Formulierung eines stochastischen Modells für diese Variablen schwierig, normalerweise besitzt man aber Kenntnisse über den möglichen Wertebereich. Diese Information kann dazu benutzt werden, weitere Nebenbedingungen für das Least-Squares Gütefunktional vorzugeben. Mögliche Nebenbedingungen sind beispielsweise:

$$\begin{aligned}
 \underline{v}_{min} &\leq \underline{v}_l \leq \underline{v}_{max} \\
 \underline{w}_{min} &\leq \underline{w}_l \leq \underline{w}_{max} \\
 \underline{x}_{min} &\leq \underline{x}_l \leq \underline{x}_{max} \\
 \underline{p}_{min} &\leq \underline{p}_l \leq \underline{p}_{max}
 \end{aligned} \tag{6.42}$$

Kompliziertere Formulierungen der Beschränkungen sind ebenfalls möglich.

### 6.2.4 Diskretisierung kontinuierlicher Differentialgleichungen durch Kollokation

Da bei der Lösung des Optimierungsproblems die Differentialgleichung in jedem Optimierungsschritt gelöst werden muss, ist eine Überführung der differentiellen Nebenbedingung in eine algebraische Nebenbedingung von großem Vorteil um das Optimierungsproblem effektiv lösen zu können [34]. Die Grundlage für die hier vorgestellte Methode bildet die Funktionsapproximation auf der Basis Lagrangescher Interpolationspolynome, die bei stetigen Funktionen angewendet werden kann.

Die Funktion  $x(t) = y$  soll an  $N + 1$  Stützstellen

$$x(t_i) = y_i, \quad i = 0, 1, \dots, N \tag{6.43}$$

durch ein Polynom  $N$ -ten Grades

$$P(t) = a_0 + a_1 t + a_2 t^2 + \dots + a_N t^N \tag{6.44}$$

approximiert werden, welches die Interpolationsbedingung

$$P(t_i) = y_i \tag{6.45}$$

erfüllt. Das Interpolationspolynom  $P(t)$  lässt sich mit Hilfe der  $N+1$  Lagrangeschen Basispolynome

$$L_i(t) := \prod_{\substack{j=0 \\ j \neq i}}^N \frac{(t - t_j)}{(t_i - t_j)} \quad (6.46)$$

angeben:

$$P(t) := \sum_{i=0}^N y_i L_i(t) \quad (6.47)$$

So dass

$$x(t) = P(t) = [L_0(t) \quad \cdots \quad L_N(t)] \begin{bmatrix} y_0 \\ \vdots \\ y_N \end{bmatrix} \quad \forall t \in \{t_0, t_1, \dots, t_N\} \quad (6.48)$$

gilt.

Diese Beziehung kann dazu genutzt werden eine skalare Differentialgleichung

$$\dot{x} = f(x(t)) \quad (6.49)$$

mit den Anfangsbedingungen

$$x_0 = x(t_0) \quad (6.50)$$

für die diskreten Stützstellen

$$\{t_0, t_1, \dots, t_N\}, \quad T = t_i - t_{i-1} \quad (6.51)$$

in ein algebraisches Gleichungssystem umzuwandeln. Es wird der Ansatz  $x(t) \approx P(t)$  gewählt, wobei diese Beziehung für die diskreten Stützstellen exakt erfüllt ist

$$x(t) = P(t) = [L_0(t) \ \cdots \ L_N(t)] \begin{bmatrix} x_0 \\ \vdots \\ x_N \end{bmatrix} \quad \forall \ t \in \{t_0, t_1, \dots, t_N\}. \quad (6.52)$$

Wird nun die Zeitableitung

$$\frac{dP(t)}{dt} = \left[ \frac{dL_0(t)}{dt} \ \cdots \ \frac{dL_N(t)}{dt} \right] \begin{bmatrix} x_0 \\ \vdots \\ x_N \end{bmatrix} \quad (6.53)$$

des Interpolationspolynoms gebildet, gilt an den Stützstellen

$$\dot{x} = \frac{dP(t)}{dt} + O(T^N) \quad \forall \ t \in \{t_0, t_1, \dots, t_N\}, \quad (6.54)$$

oder

$$f(x(t)) = \left[ \frac{dL_0(t)}{dt} \ \cdots \ \frac{dL_N(t)}{dt} \right] \cdot \begin{bmatrix} x_0 \\ \vdots \\ x_N \end{bmatrix} + O(T^N) \quad \forall \ t \in \{t_0, t_1, \dots, t_N\}. \quad (6.55)$$

Dabei wird durch  $O(T^N)$  der Approximationsfehler dargestellt, der bei abnehmender Abtastzeit  $T$  und zunehmender Polynomordnung  $N$  kleiner wird.

Wird Gleichung 6.55 an den Stützstellen  $\{t_1, \dots, t_N\}$  ausgewertet, erhält man ein algebraisches Gleichungssystem

$$\begin{bmatrix} f(\hat{x}_1) \\ \vdots \\ f(\hat{x}_N) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \left. \frac{dL_1(t)}{dt} \right|_{t=t_1} & \cdots & \left. \frac{dL_N(t)}{dt} \right|_{t=t_1} \\ \vdots \\ \left. \frac{dL_1(t)}{dt} \right|_{t=t_N} & \cdots & \left. \frac{dL_N(t)}{dt} \right|_{t=t_N} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \hat{x}_1 \\ \vdots \\ \hat{x}_N \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \left. \frac{dL_0(t)}{dt} \right|_{t=t_1} \\ \vdots \\ \left. \frac{dL_0(t)}{dt} \right|_{t=t_N} \end{bmatrix} x_0 + \underline{Q}(T^N) \quad (6.56)$$

dessen Lösung  $\{\hat{x}_1, \dots, \hat{x}_N\}$  für den Anfangswert  $x_0$  bestimmt werden kann.

In dem Fall linearer Systeme kann das Gleichungssystem analytisch gelöst werden. Für den nichtlinearen Fall ist dies im Allgemeinen nicht möglich und es müssen numerische Lösungsverfahren eingesetzt werden. Eine Möglichkeit ist die Lösung mit Hilfe nichtlinearer Optimierungsverfahren.

Wird die Kollokationsmethode dazu benutzt, die differentiellen Nebenbedingung bei einem Optimierungsproblem, wie dem MHE-Verfahren, durch algebraische Nebenbedingungen zu ersetzen, dann müssen die unbekanntenen Größen  $\{\hat{x}_1, \dots, \hat{x}_N\}$  mit in die Gruppe der Optimierungsvariablen aufgenommen werden.

Auf die Zustandsraumdarstellungen (6.29) angewendet, gilt

$$\underline{f}(\underline{u}_k, \hat{\underline{x}}_k) + \hat{\underline{w}}_k = \mathbf{I}_n \frac{dP(t)}{dt} \Big|_{t=t_k} \quad t_k \in \{t_0, t_1, \dots, t_N\}, \quad (6.57)$$

$$\mathbf{I}_n = \begin{bmatrix} 1 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & \ddots & 0 & \vdots \\ \vdots & 0 & \ddots & 0 \\ 0 & \dots & 0 & 1 \end{bmatrix} \in \mathbb{R}^{(n \times n)}. \quad (6.58)$$

In diesem Fall enthält  $\hat{\underline{w}}_k$  noch den Approximationsfehler und  $n$  entspricht der Anzahl der Zustände. Wird Gleichung (6.57) an den Stützstellen  $\{t_1, \dots, t_N\}$  ausgewertet und in vektorieller Form zusammengefasst erhält man die algebraischen Nebenbedingungen für das MHE-Verfahren:

$$\underbrace{\begin{bmatrix} \underline{f}(\hat{\underline{x}}_1, \underline{u}_1) \\ \vdots \\ \underline{f}(\hat{\underline{x}}_N, \underline{u}_N) \end{bmatrix}}_{\underline{f}^*(\underline{u}^*, \hat{\underline{x}}^*)} + \underbrace{\begin{bmatrix} \hat{\underline{w}}_1 \\ \vdots \\ \hat{\underline{w}}_N \end{bmatrix}}_{\hat{\underline{w}}^*} = \underbrace{\begin{bmatrix} \frac{dL_1(t)}{dt} \Big|_{t=t_1} \mathbf{I}_n & \dots & \frac{dL_N(t)}{dt} \Big|_{t=t_1} \mathbf{I}_n \\ \vdots \\ \frac{dL_1(t)}{dt} \Big|_{t=t_N} \mathbf{I}_n & \dots & \frac{dL_N(t)}{dt} \Big|_{t=t_N} \mathbf{I}_n \end{bmatrix}}_{\mathbf{L}^*} \underbrace{\begin{bmatrix} \hat{\underline{x}}_1 \\ \vdots \\ \hat{\underline{x}}_N \end{bmatrix}}_{\hat{\underline{x}}^*} + \underbrace{\begin{bmatrix} \frac{dL_0(t)}{dt} \Big|_{t=t_1} \mathbf{I}_n \\ \vdots \\ \frac{dL_0(t)}{dt} \Big|_{t=t_N} \mathbf{I}_n \end{bmatrix}}_{\mathbf{L}_0^*} \underline{x}_0 \quad (6.59)$$

$$(6.60)$$

## 6.3 Zustandsschätzung auf bewegtem Horizont für unterschiedliche Abtastraten

Gerade bei verfahrenstechnischen Prozessen ergibt sich häufig die Problemstellung, dass Messwerte über den Prozessverlauf durch verschiedenste Mess- und Analyseverfahren gewonnen werden. Ein Teil der Messwerte steht zu festen Abtastzeitpunkten und mit kleinen Abtastzeiten zur Verfügung, andere fallen zu nicht äquidistanten Abtastzeitpunkten an und weisen große Totzeiten auf. Hieraus ergibt sich die Aufgabenstellung, diese Messwerte möglichst optimal miteinander zu verarbeiten, um möglichst viel Information über den Prozesszustand zu gewinnen. Rekursive Verfahren sind für diese Aufgabenstellung nicht sonderlich gut geeignet. Die optimierungsbasierten Verfahren, die eine Batchverarbeitung der Daten durchführen, erweisen sich hingegen für diese Aufgabe gut einsetzbar.

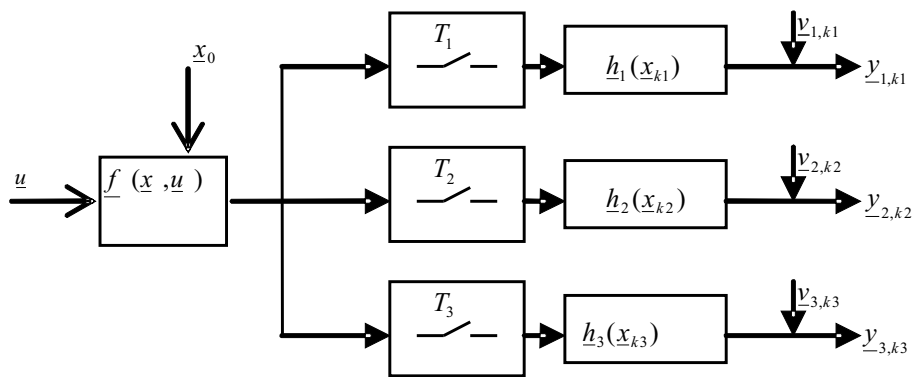


Abb. 6.3: Kontinuierlich-diskretes System mit verschiedenen Abtastzeiten.

In Abbildung 6.3 ist das Blockschaltbild für ein kontinuierlich-diskretes System mit drei verschiedenen Abtastzeiten dargestellt. Hierbei ist  $T_1$  die niedrigste Abtastzeit und alle anderen Abtastzeiten sind ganzzahlige Vielfache von  $T_1$ :

$$T_1 = \frac{T_2}{d_2} = \frac{T_3}{d_3} = \dots, \quad d_2, d_3, \dots \in \mathbb{N}^+. \quad (6.61)$$

Dieses System besitzt nun für jede Abtastzeit  $T_i, i = 1, 2, \dots$  einen Ausgangsvektor  $\underline{y}_{i,k_i}$ :



entscheidender Bedeutung. Die Kenntnis des Zustandes und die Möglichkeit diesen gezielt zu beeinflussen, ist deshalb von großem Interesse. Der Zustand der Bakterienkultur, der durch die Biomasse und die Menge an einem gebildeten Einschlusskörperprotein charakterisiert ist, kann aber nur offline bestimmt werden. Durch die Realisierung eines so genannten Software-Sensors kann unter bestimmten Umständen die fehlende Messinformation online rekonstruiert werden. Dazu werden die online zur Verfügung stehenden Messgrößen in dem hier verwendeten Software-Sensor über die Zustandsschätzung auf bewegtem Horizont ausgewertet und ein Schätzwert für die Bakterienkonzentration und die Konzentration der Einschlusskörper generiert. Abbildung 6.4 zeigt die prinzipielle Anordnung des Software-Sensors bei dem Bakterienproduktionsprozess [7].

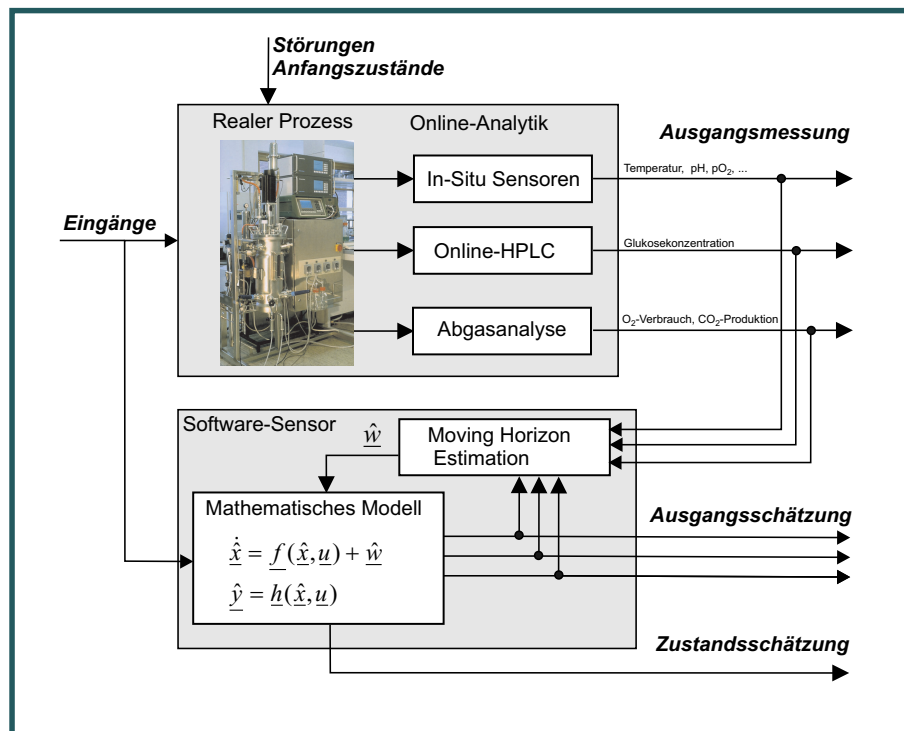


Abb. 6.4: Anordnung eines Software-Sensors bei dem biotechnologischen Produktionsprozess des Bakteriums *P. luminescens*. Nicht messbare Zustandsgrößen des Prozesses werden über ein Prozessmodell geschätzt.

Dem verwendeten Software-Sensor liegt das vereinfachte CIP-Modell aus Abschnitt 5.4.3 zugrunde. Nach diesem Modellansatz können die Stofftransportraten zwischen der biotischen und abiotischen Phase durch folgende Gleichungen beschrieben werden:

$$\underline{r}_{Bio} = \begin{bmatrix} r_X \\ r_{S_1} \\ r_{S_2} \\ r_{S_3} \\ r_{P_1} \\ r_{P_2} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} (a_{X_{1,1}}r_1 + a_{X_{2,1}}r_2 + a_{X_{3,1}}r_3) \cdot C_X \\ [(a_{S_{1,1}}r_1 + a_{S_{2,1}}r_2 + a_{S_{3,1}}r_3) + a_{S_{4,1}}r_4] \cdot C_X \\ a_{S_{2,2}}r_2 \cdot C_X \\ a_{S_{3,3}}r_3 \cdot C_X \\ (a_{P_{1,1}}r_1 + a_{P_{2,1}}r_2 + a_{P_{3,1}}r_3) \cdot C_X \\ a_{P_{4,2}}r_4 \cdot C_X \end{bmatrix} \quad (6.65)$$

Als Messwerte stehen die Glukosekonzentration im Medium  $C_{S_1}$  und die über die Gasanalyse bestimmte Kohlendioxidproduktionsrate der biotischen Phase  $r_{P_1}$  zur Verfügung:

$$y_1 = C_{S_1} \quad (6.66)$$

$$y_2 = r_{P_1} \quad (6.67)$$

Zusätzlich werden drei mögliche Stellgrößen für die drei Substrate in Betracht gezogen:

$$\underline{u} = \begin{bmatrix} r_{S_{1,u}} \\ r_{S_{2,u}} \\ r_{S_{3,u}} \end{bmatrix} \quad (6.68)$$

Die zur Beschreibung des Wachstums benötigten Zustände werden in dem Vektor

$$\underline{x} = \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \\ x_3 \\ x_4 \\ x_5 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} C_X \\ C_{S_1} \\ C_{S_2} \\ C_{S_3} \\ C_{P_2} \end{bmatrix} \quad (6.69)$$

zusammengefasst. Die Normierung des Systems erfolgt durch Weglassen der Einheiten bei den Parametern, Zuständen  $\underline{x}$ , Eingangsgrößen  $\underline{u}$  und Messgrößen  $\underline{y}$ . Dieses Vorgehen ist in diesem Anwendungsfall möglich, da sich alle Größen auf die gleichen Grundeinheiten wie Stunde, Liter und Gramm beziehen.

Es wird des Weiteren davon ausgegangen, dass die Volumenänderung des Reaktionsvolumens  $V_L$  zu vernachlässigen ist. Aus den Stofftransportraten  $\underline{r}_{Bio}$  und den



Stellgrößen  $\underline{u}$  ergibt sich die kontinuierliche Systemdifferentialgleichung für den biotechnologischen Prozess:

$$\begin{aligned} \dot{\underline{x}} = \underline{f}(\underline{x}, \underline{u}) &= \begin{bmatrix} r_X \\ r_{S_1} + r_{S_1,u} \\ r_{S_2} + r_{S_2,u} \\ r_{S_3} + r_{S_3,u} \\ r_{P_2} \end{bmatrix} \\ &= \begin{bmatrix} [a_{X_{1,1}}r_1 + a_{X_{2,1}}r_2 + a_{X_{3,1}}r_3] \cdot x_1 \\ [a_{S_{1,1}}r_1 + a_{S_{2,1}}r_2 + a_{S_{3,1}}r_3 + a_{S_{4,1}}r_4] \cdot x_1 + u_1 \\ a_{S_{2,2}}r_2 \cdot x_1 + u_2 \\ a_{S_{3,3}}r_3 \cdot x_1 + u_3 \\ a_{P_{4,2}}r_4 \cdot x_1 \end{bmatrix}. \end{aligned} \quad (6.70)$$

Die hierzu gehörenden Kinetiken sind:

$$r_1 = r_{1,max} \frac{x_2}{K_{1,1} + x_2}, \quad (6.71)$$

$$r_2 = r_{2,max} \frac{x_3}{K_{2,1} + x_3}, \quad (6.72)$$

$$r_3 = r_{3,max} \frac{x_4}{K_{3,1} + x_4}, \quad (6.73)$$

$$r_4 = r_{4,max} \frac{x_2}{K_{4,1} + x_2} \cdot \frac{K_{4,2}}{K_{4,2} + x_3} \cdot \frac{K_{4,3}}{K_{4,3} + x_4}. \quad (6.74)$$

Da die Messwerte für  $C_{S_1}$  und  $r_{P_1}$  zu unterschiedlichen diskreten Zeitpunkten eintreffen, ergeben sich zwei Messgleichungen für die beiden Abtastzeiten  $T_1$  und  $T_2$ :

$$\begin{aligned} y_{1,k_1} = r_{P_1}(t_{k_1}) &= [a_{P_{1,1}}r_1(t_{k_1}) + a_{P_{2,1}}r_2(t_{k_1}) + a_{P_{3,1}}r_3(t_{k_1})] \cdot x_1(t_{k_1}), \\ t_{k_1} &= k_1 \cdot T_1 \end{aligned} \quad (6.75)$$

und

$$y_{2,k_2} = C_{S_1}(t_{k_2}) = x_2(t_{k_2}), \quad t_{k_2} = k_2 \cdot T_2, \quad (6.76)$$

wenn für  $r_{P_1}$  die Beziehung aus dem Wachstumsmodell 6.65 verwendet wird.

Aufgrund der unterschiedlichen Abtastzeiten wurde der in Abschnitt 6.3 beschriebene MHE-Ansatz verwendet.

Der Software-Sensor wurde in MATLAB mit Hilfe der Optimization-Toolbox, die Standardverfahren der numerischen Optimierung zur Verfügung stellt, realisiert. Zur Lösung des dynamischen Optimierungsproblems wurde eine Sequentielle Quadratische Programmierung (SQP) verwendet. In jedem Teilschritt der Optimierung wird das Differentialgleichungssystem durch eine unterlagerte numerische Integration gelöst. Hierfür wurde ein implizites Runge-Kutta-Verfahren verwendet. Dies ist notwendig, da es sich hierbei um ein steifes Differentialgleichungssystem (stiff-ODE) handelt, bei dem es zu numerischen Stabilitätsproblemen kommen kann. Diese Stabilitätsprobleme werden durch die nichtlinearen Kinetik-Terme verursacht, die zu stark unterschiedlichen Dynamiken der einzelnen Zustände führen [20]. Dies ist auch der Grund dafür, dass die Diskretisierung mit Hilfe der Kollokationsmethode aus Abschnitt 6.2.4, die eine simultane Lösung der Optimierungsaufgabe und des Differentialgleichungssystems ermöglicht, nicht realisiert werden konnte. Die Stützstellen zur Diskretisierung bei der Kollokation sind für alle Zustände gleich und werden hier nicht an die unterschiedliche Dynamik der einzelnen Zustände angepasst.

Der Algorithmus wurde auf einem PC (Pentium 4 3,2GHz) berechnet. Die Rechenzeit des Verfahrens variiert stark und ist von zahlreichen Parametern wie der Horizontlänge, dem Grad des Differentialgleichungssystems, den Toleranzen für die Abbruchbedingungen der Integrationsroutine und des Optimierungsverfahrens abhängig. Diese Parameter müssen so angepasst werden, dass eine Lösung noch innerhalb der kleinsten Abtastzeit möglich ist.

### 6.4.1 Anwendungsbeispiel

Als Anwendungsbeispiel für den Software-Sensor wurde eine 36 h Batchkultivierung im DKM-Medium unter SKB-Bedingungen, siehe Kapitel 4.1.2, durchgeführt. Für die Zustandsschätzung auf bewegtem Horizont wurde eine Horizontlänge von  $N = 4$  gewählt. Die Messwerte standen mit den Abtastzeiten  $T_1 = 0.5$  h und  $T_2 = 2$  h zur Verfügung. Für alle Zustände  $\hat{x}$  und Störgrößen  $\hat{w}$  wurden folgende Beschränkungen

$$\underline{x}_{min} \leq \hat{x} \leq \underline{x}_{max} \quad (6.77)$$

$$\underline{w}_{min} \leq \hat{w} \leq \underline{w}_{max} \quad (6.78)$$

eingeführt. Anhand von Erfahrungswerten und dem zu erwartenden Verlauf wurden die Grenzen

$$\underline{x}_{min} = \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}, \quad \underline{x}_{max} = \begin{bmatrix} 10 \\ x_{1,0} \cdot 1,2 \\ x_{2,0} \cdot 1,2 \\ x_{3,0} \cdot 1,2 \\ 0.12 \end{bmatrix}, \quad (6.79)$$

und

$$-\underline{w}_{min} = \underline{w}_{max} = 0.1 \cdot \underline{x}_{max} \quad (6.80)$$

festgelegt, um zu verhindern, dass nicht sinnvolle Zustände geschätzt werden. Die Gewichtungsmatrizen  $\mathbf{Q}$ ,  $\mathbf{R}_1$ ,  $\mathbf{R}_2$  und  $\mathbf{P}_{0|0}$  wurden als Diagonal-Matrizen vorgegeben, die nur auf der Hauptdiagonalen von Null verschiedene Elemente besitzen. Die Elemente der Hauptdiagonalen der Matrix  $\mathbf{Q}$  und  $\mathbf{P}_{0|0}$  waren

$$\underline{q}_{diag} = \begin{bmatrix} 1 \cdot 10^{-3} \\ 5 \cdot 10^{-3} \\ 3 \cdot 10^{-1} \\ 5 \cdot 10^{-1} \\ 1 \cdot 10^{-3} \end{bmatrix}, \quad \underline{p}_{0|0diag} = \begin{bmatrix} 1 \cdot 10^{-3} \\ 1 \cdot 10^{-4} \\ 3 \cdot 10^{-1} \\ 5 \cdot 10^{-1} \\ 1 \cdot 10^{-3} \end{bmatrix}. \quad (6.81)$$

Die Elemente der beiden Matrizen  $\mathbf{R}_1$  und  $\mathbf{R}_2$ , die in diesem Fall Skalare sind, lauten

$$\underline{r}_{1,diag} = 1 \cdot 10^{-2}, \quad \underline{r}_{2,diag} = 1 \cdot 10^{-3}. \quad (6.82)$$

Die gewählten Matrizen drücken das Vertrauen in das Modell, den Anfangszustand und die verschiedenen Messwerte aus. Diese Werte wurden in Vorversuchen angepasst. Des Weiteren wurde darauf verzichtet, die Matrix  $\mathbf{P}_{k-N|k}$  zeitvariant auszuführen, da dies zu keiner signifikanten Verbesserung der Schätzung führte, sie wurde deshalb zu  $\mathbf{P}_{k-N|k} = \mathbf{P}_{0|0}$  gesetzt.

Abbildung 6.5 und 6.6 zeigen die Ergebnisse der Anwendung des Software-Sensors.

Abbildung 6.5 stellt die für die Schätzung verwendeten Messwerte  $C_{S_1}$  und  $r_{P_1}$  dar und die durch den Software-Sensor geschätzten kontinuierlichen Verläufe dieser Ausgangsgrößen. Abbildung 6.6 zeigt die geschätzten kontinuierlichen Verläufe der restlichen Zustände und die offline analysierten Messwerte, die hier zu Validierungszwecken dargestellt sind.

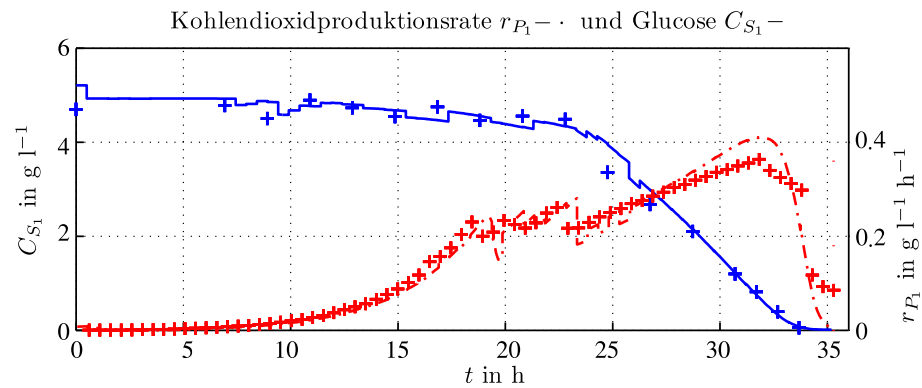


Abb. 6.5: Dargestellt sind die für die Schätzung verwendeten Messwerte  $C_{S_1}$  und  $r_{P_1}$  und die durch den Software-Sensor geschätzten kontinuierlichen Verläufe dieser Ausgangsgrößen

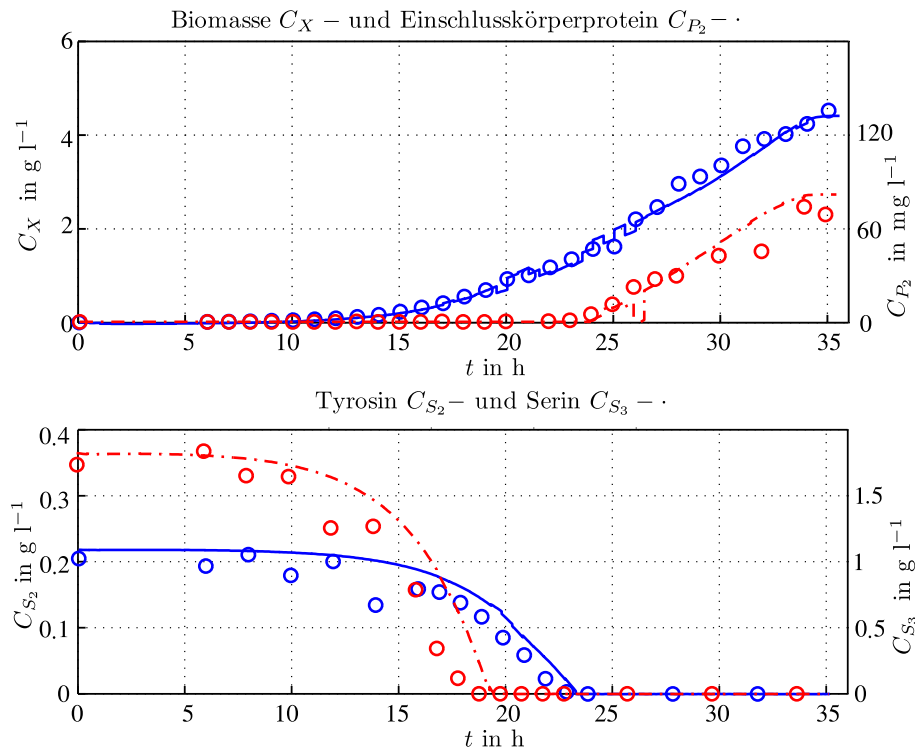


Abb. 6.6: Schätzung der kontinuierlichen Verläufe der Zustände des Prozesses und die offline analysierten Messwerte, die hier zu Validierungszwecken dargestellt sind.

Die Biomasse  $C_X$  und die Menge des Einschlusskörperproteins  $C_{P_2}$  wurden sehr gut geschätzt, während die Trajektorien der zwei Aminosäuren Serin  $C_{S_3}$  und Tyrosin  $C_{S_2}$  wie eine Prädiktion der Anfangszustände erscheint. Der Einfluss der Serin- und Tyrosinkonzentration auf das Wachstum ist nur für geringe Substratkonzentrationen gegeben. Die Sensitivität bezüglich dieser Größen ist zu Beginn des Experiments also sehr gering. Um die Schätzung zu verbessern, sind deshalb zusätzliche Messungen der Substrate notwendig.

Die Zustandsschätzung auf bewegtem Horizont MHE ist sehr gut für die Zustandsschätzung biotechnologischer Prozesse geeignet, bei denen große Modellunsicherheiten auftreten und die verschiedenen Messwerte zu unterschiedlichen Abtastzeitpunkten anfallen. Die Abtastung mit der kleinsten Abtastzeit (mehrere Minuten) ist jedoch noch immer groß genug, um die zeitintensive Lösung des Schätzproblems innerhalb einer Abtastzeit durchführen zu können. Die Möglichkeit zusätzliches Prozesswissen - z.B. eingeschränkter Wertebereich von Prozessvariablen - in der Optimierungsaufgabe zu berücksichtigen, erhöht die Robustheit des Verfahrens.

Von großem Interesse sind weitergehende Untersuchungen, die sich mit der Verschmelzung der beiden numerischen Verfahren zur Integration und Optimierung beschäftigen, um effizientere Lösungen zu ermöglichen.

# Kapitel 7

## Zusammenfassung und Ausblick

Zielsetzung der Arbeit war eine Erweiterung der mathematischen Modellierung des Bakteriums *Photobacterium luminescens*.

Bei der industriellen Produktion der Nematoden der Gattung *Heterorhabditis* dienen Kulturen des Bakteriums *Photobacterium luminescens* als Vorkultur. Aufgrund der starken symbiotischen Beziehung zwischen den beiden Organismen kommt es zu großen Schwankungen bei der Ausbeute der Nematodenproduktion. Definierte und reproduzierbare Kultivierungsbedingungen für alle Teilprozesse sind notwendig, um die schwankenden Ausbeuten zu vermeiden und um die symbiotische Beziehung zwischen Bakterien und Nematoden näher zu untersuchen. Einen entscheidenden Einfluss auf die Nematodenvermehrung haben die Bakteriendichte und die Menge eines kristallinen Einschlusskörperproteins, welches die Bakterien im Laufe ihres Kultivierungsprozesses bilden können. Beide Einflussgrößen können aber in Abhängigkeit der zu Verfügung stehenden Substrate stark variieren.

Moderne modellbasierte Methoden der Regelungstechnik stellen für derartige nichtlineare instationäre Prozesse vielversprechende Lösungsansätze dar. Grundvoraussetzung für den Einsatz solcher Verfahren ist jedoch eine adäquate Systembeschreibung.

Die bereits existierenden Modelle für das Bakterium *P. luminescens* berücksichtigten nur die Bakteriendichte in Abhängigkeit einiger weniger Substrate.

Um bei der Modellierung die Einschlusskörperbildung mit zu berücksichtigen, war es notwendig, hierfür Analyseverfahren zu entwickeln, die eine quantitative Beschreibung der Einschlusskörperbildung über der Zeit zulassen. Verschiedene Ansätze hierzu wurden bezüglich ihrer Brauchbarkeit untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein ELISA-Test zur Quantifizierung des gelösten Einschlusskörperproteins entwickelt. Dieses Verfahren erlaubt eine ausreichend genaue Quantifizierung ohne die Fermenterproben vorher aufzureinigen. Aufgrund von spezifischen Antikörpern ist es möglich das entsprechende Protein in einem Proteingemisch zu detektieren. Ein weiterer Vorteil dieses Verfahrens ist, dass das Protein bereits detektiert werden kann, bevor es kristallisiert und in der Zelle sichtbar wird. Erst die Entwicklung dieses Verfahrens ermöglicht die Beobachtung eines wichtigen Qualitätsmerkmals der Bakterien über der Zeit. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist

---

jedoch, dass es nicht online einsetzbar ist, da die Analyse lange Inkubationszeiten von mehreren Stunden benötigt.

Die Entwicklung des ELISA-Verfahrens ermöglichte eine genauere Untersuchung der Einschlusskörperbildung der Bakterien. Verschiedene Kultivierungsbedingungen wurden bezüglich ihres Einflusses auf die Einschlusskörperbildung untersucht. Hierbei konnte ein starker Einfluss der Medien-Zusammensetzung festgestellt werden. In dem definierten Kultivierungsmedium hatten die Aminosäuren Serin und Tyrosin und die Kohlenstoffquelle Glukose einen signifikanten Einfluss, sowohl auf die Einschlusskörperbildung, als auch auf die Bakteriendichte. Diese Voruntersuchungen bildeten die Grundlage für die mathematische Beschreibung des Bakterienwachstums.

Um definierte und reproduzierbare Kultivierungsexperimente durchführen zu können, wurde die bestehende Versuchsanlage am Lehrstuhl für Automatisierungs- und Regelungstechnik der CAU zu Kiel erweitert und ausgebaut. Ein Prozessleitsystem, das flexibel genug ist, den Anforderungen im Bereich der Forschung gerecht zu werden, wurde aufgebaut. Über dieses sind alle Anlagenkomponenten integriert und es ermöglicht den komfortablen Einsatz von MATLAB um modellbasierte Verfahren zur Prozessbeobachtung und -führung einzusetzen.

Auf der Basis der durchgeführten Experimente konnten zwei neue Modellansätze erarbeitet werden. Der erste umfassendere Modellansatz, CIP-Modellansatz 1, berücksichtigt alle im Medium vorhandenen Substrate, die Biomasse, die Kohlendioxidproduktion und die Bildung des Einschlusskörperproteins. Dieses Modell ermöglicht eine wesentlich genauere Beschreibung des Bakterienwachstums als die existierenden Modelle und es berücksichtigt zusätzlich die Bildung des Einschlusskörperproteins.

Der zweite Modellansatz, CIP-Modellansatz 2, ist eine Reduzierung des CIP-Modellansatzes 1, der bei niedrigen Serinkonzentrationen verwendet werden kann. Hierbei wird vorausgesetzt, dass alle nicht betrachteten Substrate in ausreichend hoher Konzentration vorhanden sind. Mit diesem Modell wird der einfachere Zusammenhang beschrieben, dass die Einschlusskörperbildung nur in dem Zeitraum zwischen dem zur Neigegehen der Substrate Serin/Tyrosin und der Glukose stattfindet. Die Reduzierung ist sinnvoll, da dies den Standard-Kultivierungsbedingungen entspricht, bei denen die Einschlusskörper gebildet werden können.

Um die vorhandenen und neuen Modellansätze vergleichend darzustellen, wurde ein Formalismus hergeleitet, der eine einheitliche Notation verwendet. Mit diesem Formalismus ist es möglich, die Modellstrukturen der verschiedenen Zellpopulationsmodelle einheitlich darzustellen.

Eine Anwendung der neuen CIP-Modellansätze liegt in der modellgestützten Zustandsschätzung. Da die CIP-Proteinkonzentration nicht online bestimmt werden kann, ist die Schätzung dieser wichtigen Zustandsgröße von großem Interesse. In

einem Software-Sensor wurde eine Zustandsschätzung auf einem bewegtem Zeithorizont realisiert, um die CIP-Proteinkonzentration, die Biomasse und zweier weiterer Substrate zu schätzen. Das Verfahren nutzt numerische Optimierungsmethoden, um die Schätzung durchzuführen. Ein entscheidender Vorteil dieses Verfahrens im Einsatz bei biotechnologischen Prozessen ist die Möglichkeit, Messwerte mit verschiedenen Abtastzeiten zu verarbeiten und zusätzliches Prozesswissen in Form von Ungleichungen mit in der Optimierungsaufgabe zu berücksichtigen. Die zusätzliche Prozessinformation sorgt für ein robusteres Verhalten bei der Schätzung, welches bei großen Modellunsicherheiten besonders wichtig ist. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist der hohe rechentechnische Aufwand, um die Optimierungsaufgabe zu lösen. Das Verfahren ist daher nur bei Prozessen mit großen Abtastzeiten einsetzbar.

Anhand der durchgeführten Arbeit ist man nun in der Lage, definierte und reproduzierbare Prozessverläufe zu planen, um die Symbiose zwischen Bakterien und Nematoden näher zu untersuchen und die relevanten Prozesszustände gezielt zu variieren. Hierfür können wiederum modellbasierte Verfahren wie die flachheitsbasierte Steuerung eingesetzt werden. Verbesserungen sind in der Prozesssensorik und Online-Analytik möglich, indem die Trübungsmessung mit in das Modell und die Zustandsschätzung aufgenommen wird. Auch die Bestimmung einzelner Substrate durch den Einsatz einer Online-HPLC zur Aminosäurenanalyse würde zu einer weiteren Verbesserung der Zustandsschätzung führen.



# Literatur

- [1] R. J. Akhurst. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. *Journal of General Microbiology*, 121:303–309, 1980.
- [2] S. B. Bintrim. *A study of crystalline inclusion proteins of Photorhabdus luminescens*. PhD thesis, University of Wisconsin, Madison USA, 1994.
- [3] Joachim Birk. *Rechnergestützte Analyse und Lösung nichtlinearer Beobachtungsaufgaben*. VDI-Verl., 1992.
- [4] N.E. Boemare and R.J. Akhurst. Biochemical and physiological characterisation of colony from variants in *Xenorhabdus* spp (Enterobacteriaceae). *J Gen Microbiol*, (134):751–761, 1988.
- [5] D. J. Bowen. *Characterization of a high molecular weight insecticidal protein complex produced by the entomopathogenic bacterium Photorhabdus luminescens*. PhD thesis, University of Wisconsin, Madison, USA, 1995.
- [6] A. Buchen. Quantification of the Crystalline Inclusion Protein of Photorhabdus Luminescens. *9th European Meeting of the IOBC/WPRS Working Group, Schloss Salza, 24.-28 May, 2003*.
- [7] A. Buchen, K. Kolahi, and H. Röck. Software-Sensor Based on Moving Horizon State Estimation Applied in Biotechnology. *Third IEEE International Conference on Systems, Signals and Devices, March 21-24, Sousse, Tunisia, 2005*.
- [8] A. Buchen, P. Seydel, and H. Röck. Einschlussprotein von Photorhabdus luminescens - Analytik und mathematische Modellierung. In *20. Dechema Jahrestagung der Biotechnologen*. Dechema, 6 2002.
- [9] Horst Chmiel. *Bioprozeßtechnik*, volume 1. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991.
- [10] Graham A. Couche and Richard P. Gregson. Protein inclusions produced by the entomopathogenic bacterium xenorhabdus nematophilus subsp. nematophilus. *Journal of Bacteriology*, 169(11):5279 – 5288, November 1987.

- 
- [11] J.C. Ensign D.J. Bowen. Isolation and Charakterisation of Intracellular Protein Inclusions Produced by The Entomopathogenic Bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67:10:4834–4841, 2001.
- [12] R.-U. Ehlers. Current and future use of nematodes in biocontrol: Practice and commercial aspects in regard to regulatory policies. *Biocontrol Science and Technology*, 6:303–316, September 1996.
- [13] R.-U. Ehlers, S. Lunau, K. Krasomil-Osterfeld, and K. H. Osterfeld. Liquid culture of the entomopathogenic nematode–bacterium–complex *Heterorhabditis megidis* / *Photorhabdus luminescens*. *BioControl*, 43:77–86, 1998.
- [14] R.-U. Ehlers, Stefan Stoessel, and Urs Wyss. The influence of phase variants of xenorhabdus spp. and escherichia coli (enterobacteriaceae) on the propagation of entomopathogenic nematodes of the genera steinernema and heterorhabditis. *Revue Nematology*, 13(4):417–424, 1990.
- [15] Ralf-Udo Ehlers. Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56:623–633, 2001.
- [16] S. Engell. *Entwurf nichtlinearer Regelungen*. Oldenbourg, 1995.
- [17] S. Forest and K. Neelson. Molecular biology of the symbiotic-pathogenic bacteria *Xenorhabdus* spp and *Photorhabdus* spp. *Microbiol Rev*, 60:21–43, 1996.
- [18] Biologische Bundesanstalt für Land-und Forstwirtschaft. Jahresbericht 2002. *Bericht*, page 1, 2002.
- [19] Arthur Gelb. *Applied optimal estimation*. The M.I.T. Press, Massachusetts, USA, 1992.
- [20] N. Köckler H.-R. Schwarz. *Numerische Mathematik*. B. G. Teubner Verlag, 5. edition, 2004.
- [21] J. F.M. Van Impe, P. A. Vanrolleghem, and D.M. Iserentant. *Advanced Instrumentation. Data Interpretation, and Control of Biotechnological Processes*. Kluwer, Netherlands, 1998.
- [22] Rolf Isermann. *Identifikation dynamischer Systeme*. Springer-Verlag, Berlin, 1992.
- [23] G. J. Jackson. *Neoplectana glaseri*: Essential amino acids. *Experimental Parasitology*, 34:111–114, 1973.

- [24] S. A. Johnigk, S. Hollmer, O. Strauch, U. Wyss, and R.-U. Ehlers. Heritability of the Liquid Culture Mass Production Potential of the Entomopathogenic Nematode *Heterohabditis bacteriophora*. *Biocontrol Science and Technology*, 12:267–276, 2002.
- [25] T. Glad L. Ljung. *Modeling of Dynamic Systems*. Prentice-Hall, Engelwood Cliffs, 1994.
- [26] Klaus Lebert. *Modellierung des Wachstums von Photorhabdus luminescens über die modellgestützte Gasanalyse*. Shaker Verlag, Aachen, 2000.
- [27] Lennart Ljung. *System identification : Theory for the user*. Prentice-Hall, 1987.
- [28] F. Lottspeich and H. Zorbas. *Bioanalytik*. Spektrum, Akad. Verl., Berlin, 1998.
- [29] D. G. Luenberger. An Introduction to observers. *IEEE Transactions on Automatic Control*, pages 596–602, 1971.
- [30] A. Moser. *Bioprocess Technology*. Springer-Verlag New York, 1988.
- [31] Lee J. H. Muske K. R., Rawlings J. R. Receding horizon recursive state estimation. *Proceedings of the American Control Conference, San Francisco*, pages 900–904, June 2-4 1993.
- [32] Rawlings J. B. Muske K. R. Nonlinear Moving Horizon State Estimation. *NATO ASI Series, Vol. 293*, pages 349–365, 1994.
- [33] J. Nielsen and J. Villadsen. Modelling of microbial kinetics. *Chemical Engineering Science*, 47:4225–4270, 1992.
- [34] K.-U. Klatt R. Gesthuisen. Zustandsschätzung auf bewegtem Horizont - ein simultaner Ansatz. *Automatisierungstechnik*, 49(3):124 – 131, 3 2001.
- [35] Ch.V. Rao and J.B. Rawlings. Nonlinear Moving Horizon State Estimation. *Progress in Systems and Control Theory, Vol. 26, Birkhäuser*, pages 45–69, 2000.
- [36] W. H. Richardson, T. M. Schmidt, and K. H. Nealson. Identification of an antraquinone pigment and a hydroxystilbene antibiotic from *Xenorhabdus luminescens*. *Appl Environ Microbiol*, 54:1602–1605, 1988.
- [37] Rawlings J.B. Robertson D.G., Lee J.H. A Moving Horizon-Based Approach for Least-Squares Estimation. *AIChE Journal Vol. 42, No.8*, pages 2209 – 2224, 1996.
- [38] Römpp-Lexikon. *Biotechnologie und Gentechnik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1999.

- [39] M. Rothfuß; R. und Zeitz. Einführung in die Analyse nichtlinearer Systeme. In S. Engel, editor, *Entwurf nichtlinearer Regelungen*, chapter 1, pages 3–22. Oldenburg, 1995.
- [40] J.C. Ensign S.B. Bintrim. Insertional inactivation of genes encoding the crystalline inclusion proteins of *Photobacterium luminescens* results in mutants with pleiotropic phenotypes. *J. Bacteriol.*, 180:1261–1269, 1998.
- [41] M. Schaffner, J. und Zeitz. Entwurf nichtlinearer Beobachter. In S. Engell, editor, *Entwurf nichtlinearer Regelungen*, chapter 1, pages 53–76. Oldenburg, 1995.
- [42] K. Schügerl. *Bioreaktionstechnik*, volume 1. Salle und Sauerländer, Frankfurt a. Main, 1985.
- [43] Karl Schügerl. *Bioreaktionstechnik: Bioprozesse mit Mikroorganismen und Zellen: Prozessüberwachung*. Birkhäuser, Berlin, 1997.
- [44] Peter Seydel. *Modellbasierte Prozessführung zur Kultivierung des Bakteriums Photobacterium luminescens*. PhD thesis, Christian-Albrechts-Universität, Kiel, 5 2002.
- [45] H. Stachowiak. *Allgemeine Modelltheorie*. Springer-Verlag, Wien, 1973.
- [46] R. Stanka. *Entwicklung einer Prozeßumgebung für die kontinuierliche Kultivierung von Photobacterium luminescens in einem Chemostaten*. Shaker Verlag, Aachen, 2000.
- [47] O. Strauch. *Untersuchungen zur Biologie entomopathogener Nematoden (Heterorhabditis spp.) und daraus resultierende Konsequenzen für eine biotechnische Vermehrung in Flüssigkultur*. PhD thesis, Christian-Albrechts-Universität, Kiel, 1997.
- [48] O. Strauch and R.-U. Ehlers. Food signal production of *Photobacterium luminescens* inducing the recovery of entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis* spp. in liquid culture. *Appl. Microbiol. Biotechnology*, 50:369 – 374, 1998.
- [49] J. Villadsen and M. L. Michelsen. Solution of Differential Equation Models by Polynomial Approximations. *Prentice Hall, Engelwood Cliffs, NJ*, 1978.

# Curriculum Vitae

Andreas Buchen

geboren am 16. November 1971 in Wattenscheid

- |               |  |
|---------------|--|
| 1982 - 1988   | Realschule in Bochum   |
| 1989 - 1991   | Fachoberschule in Bochum (Abendform)   |
| 1988 - 1992   | Ausbildung zum Kommunikationselektroniker Deutsche Telekom Fernmeldeamt Bochum   |
| 1992 - 1993   | Zivildienst in München   |
| 1993 - 1996   | Studium der Elektrotechnik, Bergische Universität Gesamthochschule Wuppertal (Vordiplom)   |
| 1996 - 2000   | Studium der Elektrotechnik, Ruhr-Universität Bochum (Diplom)   |
| 2000 - 2006   | Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Automatisierungs- und Regelungstechnik der Christian-Albrechts Universität zu Kiel |
| seit 2006     | Mitarbeiter bei der Howaldtswerke - Deutsche Werft GmbH  |
| 16. März 2007 | Disputation  |