

**Dipl.–Ing. Peter Seydel**

**Modellbasierte Prozessführung zur  
Kultivierung des Bakteriums  
Photorhabdus luminescens**



**Modellbasierte Prozessführung zur  
Kultivierung 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. Peter Seydel**

1. Gutachter

Prof. Dr.-Ing. H. Röck

2. Gutachter

Prof. Dr.-Ing. J. Lunze

Datum der mündlichen Prüfung

31. Mai 2002

## Danksagung

Viele Menschen haben dazu beigetragen, dass ich diese Arbeit fertigstellen 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. J. Lunze von der Universität Bochum danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Ralf Ehlers, dem Leiter der Abteilung Biotechnologie und Biologischer Pflanzenschutz des Instituts für Phytopathologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel danke ich herzlich für die große Unterstützung und Zusammenarbeit. Danken möchte ich den Mitarbeitern am Institut für Phytopathologie und der e-nema GmbH für das große Interesse und die Unterstützung der Arbeit auf allen Ebenen.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Kourosch Kolahi, Klaus Lebert und Rudolf Stanka. Ihnen ist es zu verdanken, dass ich mich in die Bearbeitung dieser interdisziplinären Aufgabenstellung hineingefunden habe.

Ralf Storm, Thorsten Schröder und Andreas Buchen danke ich sehr für die Anregungen in den zahlreichen Diskussionen und die große Mithilfe.

Bei Inge Baumann bedanke ich mich sehr für die Hilfe im Verwaltungsdschungel, die offenen Worte und die zahllosen Aufmunterungen.

Ich bedanke mich sehr bei Manuela Lieb, Antonia Wieczorek und Sonja Hollmer für die Unterstützung und Geduld im Biolabor und die zahlreichen Anregungen.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Andrea Frahm, Carla Bürgers, Sabine Mumm und Andrea Polic. Sie haben mich nicht nur fachlich und moralisch unterstützt, sondern auch sehr zu dem angenehmen Arbeitsklima beigetragen.

Mein Dank gilt allen studentischen Hilfskräften und Studien- und Diplomarbeitern für die Bereitschaft in dieses interdisziplinäre Projekt mit einzusteigen. Danke Joachim Adelung, Frank Bossy, Tobias Rieper und Nils Arendt.

Darüber hinaus gilt mein Dank allen Kolleginnen und Kollegen für ihr Verständnis, ihre Hilfsbereitschaft und ihre Aufmunterung. Sie hatten jederzeit ein offenes Ohr für Fragen und Diskussionen und haben durch ihr Interesse motivierend meine Arbeit unterstützt.

Vielen Dank an alle Freunde, die mich in den letzten Jahren begleitet haben. Ohne ihre Hilfe und ihr Verständnis wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meiner Mutter, meinem Vater und meiner Schwester für die große Unterstützung auf meinem Weg.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1 Biologischer Prozess</b>	<b>3</b>
1.1 Biologischer Pflanzenschutz mit Nematoden . . . . .	3
1.2 Industrielle Produktion von Nematoden . . . . .	4
1.3 Material und Methoden . . . . .	6
1.3.1 Organismus . . . . .	6
1.3.2 Kultivierungsumgebung . . . . .	7
1.3.3 Online-Messtechnik . . . . .	7
1.3.4 Offline-Analysetechnik . . . . .	10
1.3.5 Nährmedien . . . . .	10
1.3.6 Fed-Batch Kultivierungen . . . . .	11
<b>2 Wachstumsmodelle</b>	<b>13</b>
2.1 Einführung . . . . .	13
2.2 Allgemeine Modellstruktur . . . . .	16
2.2.1 Definition der zu berücksichtigenden Größen . . . . .	16
2.2.2 Stöchiometrische Betrachtung . . . . .	18
2.2.3 Reaktionskinetiken . . . . .	20
2.3 Modell des Wachstums auf YS-Medium . . . . .	22
2.3.1 YS-Modell . . . . .	22
2.3.2 Untersuchung des YS-Mediums . . . . .	26
2.3.3 Parameter des YS-Modells . . . . .	28
2.4 Entwicklung des definierten Mediums . . . . .	33

2.4.1	Verbrauch von Aminosäuren im YS-Medium . . . . .	35
2.4.2	Ersatz des Hefeextrakts durch Aminosäuren . . . . .	37
2.5	Amino-Modell . . . . .	40
2.5.1	Modellierung des Glucose- und Tyrosinbedarfs . . . . .	40
2.5.2	Modell für $N$ Substrate . . . . .	52
<b>3</b>	<b>Online-Messtechnik</b>	<b>57</b>
3.1	Einführung . . . . .	57
3.2	Messtechnik bei der Kultivierung von <i>P. luminescens</i> . . . . .	58
3.2.1	Bestimmung der Biomasse . . . . .	58
3.2.2	Bestimmung der Substratkonzentrationen . . . . .	59
3.2.3	Analyse der Zu- und Abluft der Kultur . . . . .	60
3.3	Kombination der Messungen durch modellbasierte Verfahren . . . . .	63
3.3.1	Problemstellung . . . . .	63
3.3.2	Erweitertes Kalman Filter . . . . .	64
3.3.3	Erweitertes Kalman-Filter als Beobachter . . . . .	67
<b>4</b>	<b>Flachheitsbasierte Untersuchung</b>	<b>74</b>
4.1	Einführung . . . . .	74
4.2	Definition der differentiellen Flachheit . . . . .	74
4.3	Flachheitsbasierte Analyse der Wachstumsmodelle . . . . .	78
4.3.1	Flachheit des YS-Modells . . . . .	78
4.3.2	Flachheit des Amino-Modells . . . . .	81
4.4	Anwendungen . . . . .	87
4.4.1	Trajektorienplanung . . . . .	87
4.4.2	Steuerung des Wachstumsprozesses . . . . .	89
4.4.3	Trajektorienfolgeregelung der <i>P. luminescens</i> Kultur . . . . .	92
4.4.4	Regelung nach dem internen Modell-Prinzip . . . . .	94

<b>5 Fed-Batch Experimente</b>	<b>102</b>
5.1 Problemstellung . . . . .	102
5.2 YS-Medium (open-loop control) . . . . .	103
5.2.1 Trajektorienplanung . . . . .	103
5.2.2 Ergebnisse der Kultivierungen . . . . .	103
5.3 Definiertes Medium (open-loop control) . . . . .	108
5.3.1 Trajektorienplanung . . . . .	108
5.3.2 Ergebnisse der Kultivierungen . . . . .	109
<b>Zusammenfassung</b>	<b>114</b>
<b>A Ergebnisse der Experimente</b>	<b>117</b>
A.1 Allgemeines . . . . .	117
A.2 Experiment <i>YS_Batch_A</i> . . . . .	118
A.3 Experiment <i>YS_Batch_B</i> . . . . .	122
A.4 Experiment <i>YS_Batch_C</i> . . . . .	123
A.5 Experiment <i>Amino_Batch_A</i> . . . . .	125
A.6 Experiment <i>Amino_Batch_B</i> . . . . .	128
A.7 Experiment <i>Amino_Batch_C</i> . . . . .	130
A.8 Experiment <i>YS_FedBatch_A</i> . . . . .	132
A.9 Experiment <i>YS_FedBatch_B</i> . . . . .	134
A.10 Experiment <i>YS_FedBatch_C</i> . . . . .	136
A.11 Experiment <i>Amino_FedBatch_A</i> . . . . .	137
A.12 Experiment <i>Amino_FedBatch_B</i> . . . . .	140
<b>Literatur</b>	<b>143</b>

# Symbolverzeichnis

## Lateinische Buchstaben

- $A$  ( $J \times N$ )-Matrix der stöchiometrischen Koeffizienten der Substrate in den intrazellulären Reaktionen – Seite 19
- $A_P$  ( $M \times N$ )-Matrix der stöchiometrischen Koeffizienten der Substrate in den Reaktionen zur Produktabgabe – Seite 19
- $A_S$  ( $N \times N$ )-Matrix der stöchiometrischen Koeffizienten der Substrate in den Reaktionen zur Substrataufnahme – Seite 18
- $B$  ( $J \times M$ )-Matrix der stöchiometrischen Koeffizienten der Produkte in den intrazellulären Reaktionen – Seite 19
- $B_P$  ( $M \times M$ )-Matrix der stöchiometrischen Koeffizienten der Produkte in den Reaktionen zur Produktabgabe – Seite 19
- $B_S$  ( $N \times M$ )-Matrix der stöchiometrischen Koeffizienten der Produkte in den Reaktionen zur Substrataufnahme – Seite 18
- $C_{\tilde{P}_i}$  Konzentration des  $i$ -ten Produktes in der abiotischen Phase – Seite 17
- $\underline{C}_{\tilde{P}}$   $M$ -dim. Vektor der Konzentration der Produkte in der abiotischen Phase – Seite 17
- $C_{P_i}$  Konzentration des  $i$ -ten Produktes in der biotischen Phase – Seite 17
- $\underline{C}_P$   $M$ -dim. Vektor der Konzentration der Produkte in der biotischen Phase – Seite 17
- $C_{\tilde{S}_i}$  Konzentration des  $i$ -te Substrates in der abiotischen Phase – Seite 17
- $\underline{C}_{\tilde{S}}$   $N$ -dim. Vektor der Konzentration der Substrate in der abiotischen Phase – Seite 17
- $C_{S_i}$  Konzentration des  $i$ -te Substrates in der biotischen Phase – Seite 17
- $\underline{C}_S$   $N$ -dim. Vektor der Konzentration der Substrate in der biotischen Phase – Seite 17

- 
- $C_{X_i}$  Anteil der  $i$ -ten Komponente der biotischen Phase an deren Gesamtmasse – Seite 17
- $\underline{C}_X$   $L$ -dim. Vektor der Anteile der Komponenten der biotischen Phase an deren Gesamtmasse – Seite 17
- $K_{\dots}$  Konstante in den Kinetiken der mathematischen Modelle
- $L$  Anzahl der Komponenten der biotischen Phase – Seite 17
- $M$  Anzahl der bilanzierten Produkte – Seite 17
- $N$  Anzahl der bilanzierten Substrate – Seite 17
- $\tilde{P}_i$   $i$ -tes Produkt in der abiotischen Phase – Seite 17
- $\underline{\tilde{P}}$   $M$ -dim. Vektor der Produkte in der abiotischen Phase – Seite 17
- $P_i$   $i$ -tes Produkt in der biotischen Phase – Seite 17
- $\underline{P}$   $M$ -dim. Vektor der Produkte in der biotischen Phase – Seite 17
- $q_{S_1}$  Verbrauchsrate des 1. Substrats im YS-Modell – Seite 24
- $q_{S_2}$  Verbrauchsrate des 2. Substrats im YS-Modell – Seite 24
- $q_{S_1,max}$  maximale Verbrauchsrate des 1. Substrats im YS-Modell – Seite 24
- $q_{S_2,max}$  maximale Verbrauchsrate des 2. Substrats im YS-Modell – Seite 24
- $\underline{r}$   $J$ -dim. Vektor der Reaktionsraten in den zellinternen Reaktionen – Seite 21
- $r_i$  Rate der  $i$ -ten zellinternen Reaktion – Seite 21
- $r_{O_2}$  molare Kohlendioxidproduktionsrate in mol/s – Seite 60
- $r_{O_2}$  molare Sauerstoffverbrauchsrate in mol/s – Seite 60
- $r_{O_2,S_1}$  molare Sauerstoffverbrauchsrate für Substrat 1 im YS-Modell in mol/s – Seite 25
- $r_{O_2,S_2}$  molare Sauerstoffverbrauchsrate für Substrat 2 im YS-Modell in mol/s – Seite 25
- $r_{O_2,total}$  gesamte molare Sauerstoffverbrauchsrate im YS-Modell in mol/s – Seite 25

- $\underline{r}_P$   $M$ -dim. Vektor der Reaktionsraten der Ausschleusung von Produkten – Seite 21
- $r_{P,i}$   $i$ -te Reaktionsrate der Produktabgabe – Seite 21
- $\underline{r}_S$   $N$ -dim. Vektor der Reaktionsraten der Substrataufnahme – Seite 21
- $r_{S,i}$   $i$ -te Reaktionsrate der Substrataufnahme – Seite 21
- $\tilde{S}_i$   $i$ -tes Substrat in der abiotischen Phase – Seite 17
- $\tilde{\underline{S}}$   $N$ -dim. Vektor der Substrate in der abiotischen Phase – Seite 17
- $S_i$   $i$ -tes Substrat in der biotischen Phase – Seite 17
- $\underline{S}$   $N$ -dim. Vektor der Substrate in der biotischen Phase – Seite 17
- $V_l$  Volumen der Flüssigphase im Bioreaktor in  $\text{m}^3$  – Seite 61
- $X_i$   $i$ -te Komponente der biotischen Phase – Seite 17
- $\underline{X}_i$   $L$ -dim. Vektor der Komponenten der biotischen Phase – Seite 17
- $\underline{y}$  Vektor des flachen Ausgangs eines Systems mit  $\underline{y} = [y_1, \dots, y_m]^T$  – Seite 75
- $Y_{X/S_1}$  Yield-Koeffizient des Hefeextrakts im YS-Modell – Seite 24
- $Y_{X/S_2}$  Yield-Koeffizient der Glucose im YS-Modell – Seite 24
- $\underline{z}$  Vektor der zur Systembeschreibung verwendeten Systemgrößen mit  $\underline{z} = [z_1, \dots, z_n]^T$  – Seite 75

### Griechische Buchstaben

- $\alpha_{j,i}$  stöchiometrischer Koeffizient des  $i$ -ten Substrates  $S_i$  in der  $j$ -ten intrazellulären Reaktion – Seite 19
- $\alpha_{P,j,i}$  stöchiometrischer Koeffizient des  $i$ -ten Substrates  $S_i$  in der  $j$ -ten Reaktion zur Produktabgabe – Seite 19
- $\alpha_{S,j,i}$  stöchiometrischer Koeffizient des  $i$ -ten Substrates  $S_i$  in der  $j$ -ten Reaktion zur Substrataufnahme – Seite 18
- $\beta_{j,i}$  stöchiometrischer Koeffizient des  $i$ -ten Produktes  $P_i$  in der in der  $j$ -ten intrazellulären Reaktion – Seite 19

- 
- $\beta_{P,j,i}$  stöchiometrischer Koeffizient des  $i$ -ten Produktes  $P_i$  in der  $j$  – ten Reaktion zur Produktabgabe – Seite 19
- $\beta_{S,j,i}$  stöchiometrischer Koeffizient des  $i$ -ten Produktes  $P_i$  in der  $j$  – ten Reaktion zur Substrataufnahme – Seite 18
- $\Gamma$   $(J \times L)$ -Matrix der stöchiometrischen Koeffizienten der intrazellulären Komponenten in den intrazellulären Reaktionen – Seite 19
- $\gamma_{j,i}$  stöchiometrischer Koeffizient der  $i$ -ten Komponente  $X_i$  in der in der  $j$  – ten-intrazellulären Reaktion – Seite 19
- $\Gamma_P$   $(M \times L)$ -Matrix der stöchiometrischen Koeffizienten der intrazellulären Komponenten in den Reaktionen zur Produktabgabe – Seite 19
- $\gamma_{P,j,i}$  stöchiometrischer Koeffizient der  $i$ -ten Komponente  $X_i$  in der  $j$  – ten Reaktion zur Produktabgabe – Seite 19
- $\Gamma_S$   $(N \times L)$ -Matrix der stöchiometrischen Koeffizienten der intrazellulären Komponenten in den Reaktionen zur Substrataufnahme – Seite 18
- $\gamma_{S,j,i}$  stöchiometrischer Koeffizient der  $i$ -ten Komponente  $X_i$  in der  $j$  – ten-Reaktion zur Substrataufnahme – Seite 18
- $\phi_i(\underline{z})$  Funktion zur Berechnung der  $i$ -ten Komponente des flachen Ausgangs aus den Systemgrößen  $\underline{z}$  – Seite 76
- $\psi_i(\underline{y})$  Funktion zur Berechnung der  $i$ -ten Systemgröße dem flachen Ausgang  $\underline{y}$  – Seite 76

# Kurzfassung

Diese Arbeit zeigt die Anwendung modellbasierter Methoden für die industrielle Kultivierung von Nematoden der Gattung *Heterorhabditis bacteriophora*. Diese werden als Antagonisten von im Boden lebenden Insektenlarven für die biologische Schädlingsbekämpfung in Landwirtschaft und Gartenbau kommerziell eingesetzt. Ein wesentlicher Verfahrensschritt bei der Produktion der Nematoden in Flüssigkultur besteht in der Etablierung einer Kultur des symbiotischen Bakteriums der Gattung *Photorhabdus luminescens*. Der Zustand dieser Bakterienkultur, insbesondere deren Zelldichte, beeinflusst maßgeblich die Entwicklung der Nematoden und damit die Ausbeute des Produktionsverfahrens. Ziel ist es, eine automatisierte Kultivierung der Bakterien unter reproduzierbaren Wachstumsbedingungen mit einer möglichst hohen Zelldichte zu ermöglichen.

Die Grundlage der modellbasierten Methoden bilden mathematische Modellvorstellungen über den Wachstumsprozess der Mikroorganismen. Ein erster Schritt ist die Untersuchung und Erweiterung der bereits bestehenden Modellvorstellungen für das Wachstum der Bakterien auf einem komplexen Nährmedium. Die Untersuchung des Stoffwechsels der Bakterien in einem neu entwickelten definierten Medium erlaubt eine wesentlich differenziertere mathematische Beschreibung und führt zu einem strukturierten Wachstumsmodell.

Eine Anwendung der modellbasierten Methoden ist die Beobachtung der relevanten Prozessgrößen. Mit Hilfe eines erweiterten Kalman-Filters gelingt die online-Bestimmung der schwer oder gar nicht messbaren Größen wie der Biomasse oder der Konzentrationen der einzelnen Nährsubstrate.

Die wichtigste Anwendung der mathematischen Modellvorstellung liegt jedoch in der Entwicklung von Prozessführungsstrategien. Hierzu sind Konzepte und Ideen aus der Theorie differentiell flacher Systeme gezeigt. Es handelt sich dabei um Systeme gewöhnlicher nichtlinearer Differentialgleichungen, deren besondere Eigenschaft die Existenz virtueller Ausgänge, sogenannter flacher Ausgänge ist. Diese beinhalten die volle Information über die Dynamik des Systems.

Eine, sich aus dieser Eigenschaft ergebende Anwendung, besteht in der Berechnung der Eingänge des Systems aus vorgegebenen Trajektorien für den flachen Ausgang. Es wird zudem gezeigt, wie durch Transformation des Systems auf die Koordinaten des flachen Ausgangs komplexe Trajektorienfolgeregelungen realisiert werden können. In der Praxis führen die flachheitsbasierten Steuerungen zu deutlich höheren Bakteriendichten, als sie zur Zeit in der industriellen Produktion erzielt werden.

# Einleitung

In der biotechnologischen Verfahrenstechnik werden in zunehmendem Maße modellgestützte Verfahren zur Prozessführung und Prozessautomatisierung eingesetzt. Diese modellgestützten Verfahren nutzen a priori vorhandene Strukturinformationen wie Reaktionsgeschwindigkeiten, Stöchiometrie oder Wachstumskinetiken in Form von mathematischen Modellen. Diese bestehen in der Regel aus Systemen von nichtlinearen Differentialgleichungen, deren Nichtlinearitäten unbedingt zu berücksichtigen sind, da die Systemgrößen biotechnologischer Prozesse meist einen großen Wertebereich durchlaufen. Die Entwicklung von Führungsstrategien für derartige instationäre nichtlineare Prozesse erfordert daher die Anwendung von Methoden der modernen nichtlinearen Regelungstheorie [40].

Die Theorie der flachen Systeme, die von M. Fliess et al. 1992 eingeführt wurde [16], bezieht sich auf nichtlineare Systeme deren besondere Eigenschaft die Existenz virtueller Ausgänge, sogenannter flacher Ausgänge ist. Diese beinhalten die volle Information über die Dynamik des Systems und ermöglichen es, den Verlauf aller Systemgrößen, im besonderen der Systemzustände und Systemeingänge, lediglich aus dem Verlauf eines flachen Ausgangs und dessen Ableitungen zu bestimmen. Die sich aus der speziellen Systemeigenschaft der Flachheit ergebenden Methoden sind vielfältig und neben der systemtheoretischen Analyse des Prozesses auch zur Synthese von Trajektorienplanungen und -folgeregelungen einsetzbar.

Die vorliegende Arbeit zeigt nach einer kurzen Einführung in das Konzept der flachen Systeme dessen spezielle Anwendung bei der industriellen Kultivierung von Mikroorganismen in Bioreaktoren (Kapitel 4). Der in dieser Arbeit betrachtete Prozess zur Züchtung von Bakterien der Gattung *Photorhabdus luminescens* ist ein Verfahrensschritt bei der industriellen Produktion von Nematoden (Fadenwürmern) der Gattung *Heterorhabditis bacteriophora* [12]. Die kommerzielle Nutzung dieser Nematoden besteht in der biologischen Schädlingsbekämpfung von im Boden lebenden Käferlarven in Landwirtschaft und Gartenbau. Der effektiven und zugleich umweltschonenden Wirkungsweise stehen hohe Kosten bei der industriellen Züchtung der Nematoden entgegen. Für diese Züchtung wird zunächst eine Kultur der Bakterien *Photorhabdus luminescens*, die im wesentlichen als Nahrungsquelle dienen, hergestellt. In der Bakterienkultur entwickeln und vermehren sich dann die Nematoden. Es ist offensichtlich, dass der Zustand der Bakterienkultur, insbesondere deren Zelldichte, stark die Ausbeute an Nematoden beeinflusst. Daraus ergibt sich die Problemstellung der Kultivierung von *Photorhabdus luminescens* mit möglichst hoher

Zelldichte unter reproduzierbaren Bedingungen. Eine derartige Kultivierung bildet zudem einen Ausgangspunkt für die weitere Erforschung der bislang noch wenig bekannten symbiotischen Beziehungen zwischen *H. bacteriophora* und *P. luminescens*. Die biologischen und verfahrenstechnischen Hintergründe sowie die daraus resultierenden Problemstellungen für diese Arbeit werden in Kapitel 1 ausführlich dargelegt.

Der hier vorgestellte Weg zu Erzielung reproduzierbarer Wachstumsverläufe der Bakterienkultur besteht in einer gezielten Zufuhr von Nährsubstraten im Fed-Batch Betrieb. Die Zufütterungsstrategien resultieren aus flachheitsbasierten Trajektorienplanungen, d. h. sie werden aus Zeitverläufen für den flachen Ausgang des mathematischen Modells ermittelt. Um auch bei nicht zu vermeidenden Störungen und Modellunsicherheiten den gewünschten Wachstumsverlauf garantieren zu können, wird eine nichtlineare Rückführung der Abweichungen von den Solltrajektorien vorgestellt. Die reine Trajektorienplanung wird somit zur Trajektorienfolgeregelung. Die Ergebnisse der so erzielten Wachstumsverläufe gibt Kapitel 5 wieder.

Insbesondere für die Anwendung der Trajektorienfolgeregelung ist die umfassende Kenntnis von Systemgrößen wie Zelldichte und Substratkonzentrationen unverzichtbar. Diese a priori nicht vorhandenen Informationen sind meist nur durch aufwendige und zeitintensive Analyseverfahren zu beschaffen und damit schwer online zur Verfügung zu stellen. Ein nicht unerheblicher Teil dieser Arbeit besteht daher in der Kombination von online durchführbaren Analysen und Messungen, z.B. chromatographischer Verfahren (HPLC) und der Messung von Gaskonzentrationen in der Reaktorabluft mit Hilfe von modellgestützten Beobachterverfahren (Kapitel 3). So gelingt es, Nachteile wie lange Analysezeiten oder stark verrauschte Messwerte auszugleichen. Die auf diese Weise geschätzten Werte für die Systemzustände sind nicht nur für eine Folgeregelung unverzichtbar sondern erweisen sich darüberhinaus für eine Prozessüberwachung von großem Nutzen.

All diesen Verfahren liegen mathematische Beschreibungen des biotechnologischen Prozesses zu Grunde. Diese Modellvorstellungen basieren auf den Untersuchungen und Ergebnissen von K. Lebert und R. Stanka [28][53]. Die dort erarbeiteten formalkinetischen Modellansätze werden in dieser Arbeit um Bilanzgleichungen für zusätzliche Substrate, insbesondere die Aminosäure Tyrosin erweitert. Diese Betrachtungen sind Gegenstand von Kapitel 2.

# Kapitel 1

## Biologischer Prozess

### 1.1 Biologischer Pflanzenschutz mit Nematoden

Durch gesetzliche Vorgaben wird der Einsatz von chemischen Pflanzenschutzmitteln in der Schädlingsbekämpfung immer mehr eingeschränkt. Besonders im Gemüse-, Obst- und Gartenbau werden alternative biologische Verfahren im Pflanzenschutz benötigt. Zur Bekämpfung von im Boden lebenden Insektenlarven, insbesondere die der als Schädlinge geltenden Gartenlaubkäfer und Junikäfer, können insektenpathogene Nematoden (Fadenwürmer) der Gattung *Heterorhabditis bacteriophora* eingesetzt werden [11][14]. Dabei besteht eine enge Symbiose zwischen *H. bacteriophora* und Bakterien der Gattung *Photorhabdus luminescens* (s. Bild 1.1).



Bild 1.1: Mikroskopische Aufnahme von *Photorhabdus luminescens* im Phasenkontrast (1000-fache Vergrößerung). Deutlich erkennbar sind die kristallinen Einschlusskörper (CIP).

Die Wirkungsweise der Nematoden bei der Schädlingsbekämpfung ist in Bild 1.2 vereinfacht dargestellt. Nach dem Eindringen in die Larve eines Schadinsekts (B) geben sie die zuvor eingelagerten Zellen von *Photorhabdus luminescens* in das Innere der

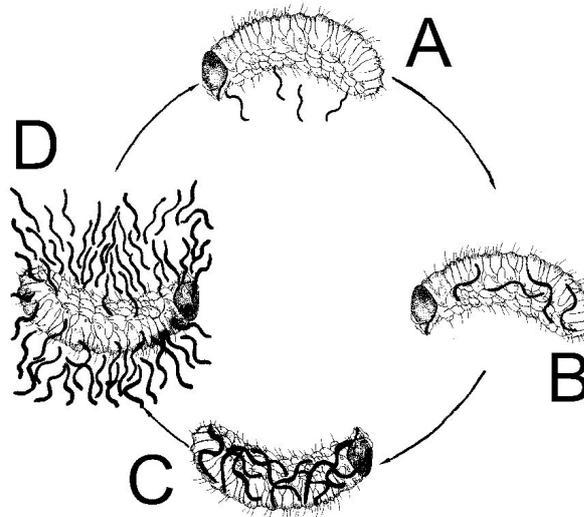


Bild 1.2: Lebenszyklus von *Heterorhabditis bacteriophora* in einer infizierten Käferlarve

Quelle: Ehlers, [12]

Larve ab. Diese überwinden das Immunsystem, vermehren sich im Inneren der Larve und erschließen sie damit für die Nematoden als Nahrungsquelle [22][23]. Die Nematoden können sich entwickeln und fortpflanzen (C), wobei sie sich im wesentlichen von den Bakterien ernähren. Sind alle Nahrungsquellen erschöpft, verlassen die Nematoden als Dauerlarven den Kadaver (D) und warten auf einen neuen Wirt (A). Sie dienen dabei den Bakterien, von denen einige wenige in ihrem Darm eingelagert werden, als Transportmittel und als Schutz vor Umwelteinflüssen [12].

## 1.2 Industrielle Produktion von Nematoden

Um dieses Pflanzenschutzverfahren wirtschaftlich sinnvoll und großflächig einsetzen zu können, müssen Nematoden in großen Mengen kostengünstig produziert werden. Dies erfolgt bevorzugt in flüssiger Kultur in der zunächst Bakterien heranwachsen (s. Bild 1.3 und 1.4) [13][12].

Nachdem eine ausreichende Bakteriendichte erreicht ist, werden Dauerlarven von *H. bacteriophora* in den Bioreaktor inokuliert. Diese entwickeln und vermehren sich bis alle Nährstoffe verbraucht sind. Danach fallen sie in das Dauerlarvenstadium zurück und können abgeerntet werden [41]. Bei der industriellen Züchtung bereitet insbesondere die Entwicklung der Nematoden vom Dauerlarvenstadium zu selbstbefruchtenden Hermaphroditen, die sogenannte Recovery, Schwierigkeiten. Die Entwicklungsra-



Bild 1.3: Industrieller Bioreaktor mit 3000 l Arbeitsvolumen zur Züchtung von entomopathogenen Nematoden

Quelle: Fa. E-Nema, Raisdorf

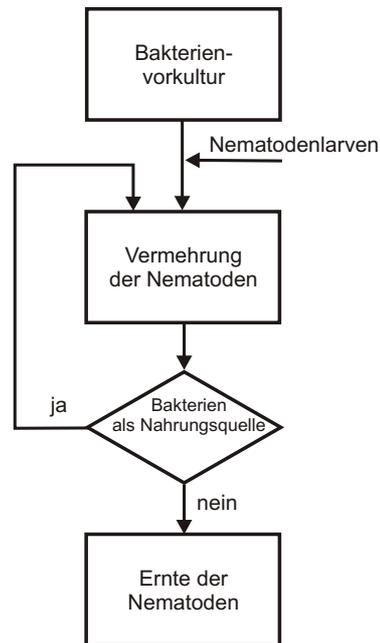


Bild 1.4: Stark vereinfachter Ablauf der industriellen Züchtung von *Heterorhabditis bacteriophora*

ten nach der Inokulation liegen auf niedrigem Niveau im Vergleich zur Entwicklung in Insektenlarven und schwanken stark [31]. Da die Recovery in großem Maße von den Bedingungen in der Bakterienvorkultur abhängt [23], ist es notwendig, definierte Bedingungen bei gleichzeitig hoher Zelldichte in der Bakterienvorkultur einzustellen. Aus wirtschaftlichen Gründen ist dabei ein hoher Grad an Automatisierung wünschenswert.

## 1.3 Material und Methoden

Der folgende Abschnitt spezifiziert den verwendeten Organismus, die eingesetzten Nährmedien sowie die Prozesstechnik und Analysemethoden.

### 1.3.1 Organismus

Das für die Kultivierung verwendete Bakterium *Photorhabdus luminescens Hb1.3* (DSM 12205) wurde von R.-U. Ehlers aus dem Haemolymph der mit *Heterorhabditis bacteriophora* infizierten Larve von *Galleria mellonella* (Lepidoptera) isoliert [15]. Die Kultivierung erfolgte bei 25°C in einem Hefe-Salz Medium mit der Zusammensetzung

(pro Liter destillierten Wassers): 0.5 g  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , 0.5 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.2 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 5 g NaCl, 5 g Hefeextrakt (Merck) [2]. Die Stammhaltung und Lagerung bei  $-80^\circ\text{C}$  erfolgte durch O. Strauch und K. Krasomil-Osterfeld nach [54]. Auf diese Weise ist sichergestellt, dass alle Experimente im Rahmen dieser Arbeit mit identischen Starter-Kulturen durchgeführt wurden.

### 1.3.2 Kultivierungsumgebung

Die Kultivierungen erfolgten in zwei Labor-Bioreaktoren (Typ Biostat<sup>®</sup> C, B. Braun Biotech International, Melsungen) mit jeweils einem Arbeitsvolumen von 10 l bzw. 2 l (Bild 1.5 und 1.6). Während der Experimente herrschten, sofern nicht anders angegeben, folgende Kultivierungsbedingungen:

- Temperatur konstant bei  $25^\circ\text{C}$
- Rührerdrehzahl konstant bei 500 rpm
- pH-Wert konstant bei 7.0, eingestellt durch Zugabe von 1 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$  bzw. 1 M NaOH
- Druck ca. 80 mbar
- Begasung konstant bei 6 l/min im 10 l Bioreaktor, 2 l/min im 2 l Bioreaktor, 1 l/min bei Exp. *Amino\_Batch\_A* und *Amino\_Batch\_A*  
Zusammensetzung: 21%  $\text{O}_2$ , 78%  $\text{N}_2$

Die Kulturgefäße wurden bei allen Experimenten zunächst mit dem Medium ohne Zucker und Vitamine gefüllt und nach Einstellung des pH-Werts auf 7.0 für 30 min bei  $121^\circ\text{C}$  in-situ sterilisiert. Danach wurde das Medium je nach Experiment mit Vitaminlösung und Glucose über einen Sterilfilter mit einer Porenweite von  $0.2\ \mu\text{m}$  vervollständigt.

Die Vorkulturen wurden in Schüttelkolben im jeweiligen Kultivierungsmedium angesetzt und 24 Stunden bei  $25^\circ\text{C}$  und 180 rpm inkubiert (Schüttler Typ GFL 3031, Gesellschaft für Labortechnik, Deutschland). Die Inokulation erfolgte mit einer Menge der Vorkultur, die 0.5% des Volumens des Kulturgefäßes entspricht.

### 1.3.3 Online-Messtechnik

Die Tabelle 1.1 enthält eine Übersicht über Arten und Methoden der bei den Experimenten online eingesetzten Messgeräte. Die Werte wurden automatisch und kontinuierlich von einem Prozessleitsystem (MFCS/win 1.0 der Fa. B. Braun Biotech, Melsungen) ermittelt und aufgezeichnet.



Bild 1.5: Für die Experimente eingesetzter Bioreaktor mit 10 l Arbeitsvolumen



Bild 1.6: Für die Experimente eingesetzter Bioreaktor mit 2 l Arbeitsvolumen

Quelle: Fa. B.Braun Biotech, Melsungen

Tabelle 1.1: Online-Messgrößen und Messinstrumente

Messgröße	Methode / Messinstrument
Temperatur	Pt-100 Temperaturfühler
pH-Wert	Gel-pH-Elektrode Pa/12, Ingold AG
Gelöst-Sauerstoff	Elektrode (CLARK-Prinzip) / Ingold AG
Begasungsrate	Bronkhorst EL Flow BRA 013F
Trübung	Absorptionsmessung bei 890 nm mit Monitex FS5 und CT6
CO <sub>2</sub> -Gehalt (Zu- und Abluft)	Infrarot-Absorption mit Hartmann & Braun, Advance Optima Uras 14
O <sub>2</sub> -Gehalt (Zu- und Abluft)	Magnetomechanisches Prinzip mit Hartmann & Braun, Advance Optima Magnos 16

### 1.3.4 Offline-Analysetechnik

Während der Experimente wurden den Kulturen manuell Proben entnommen, deren Analyse außerhalb der Prozessumgebung (offline) stattfand. Die Tabelle 1.2 gibt einen Überblick über die Messgrößen und Analysemethoden.

Tabelle 1.2: Offline-Messgrößen, Messinstrumente und Analysemethoden

Messgröße	Methode / Messinstrument
Optische Dichte	Absorptionsmessung bei 725 nm mit Nicolet Unicam UV1-Spectrometer
Glucosekonzentration	Enzymatische Bestimmung mit dem Boehringer Mannheim Test für D-Glucose, Extinktion bei 340nm sowie HPLC-Analyse: 10 $\mu$ l Probe auf Trennsäule Typ Alltech 700 CH (300x6.5mm) und Brechungsindexmessung mit Shodex RI-71
Saccharosekonzentration	HPLC-Analyse: 10 $\mu$ l Probe auf Trennsäule Typ Alltech 700 CH (300x6.5mm) und Brechungsindexmessung mit Shodex RI-71
Aminosäurekonzentrationen	HPLC-Analyse: Markierung einer 10 $\mu$ l Probe mit DABSYL-Chlorid [27], Gradientenelution über Trennsäule Typ Waters Nova-Pak C18 60Å 4 $\mu$ m, 3.9x150mm; Detektion bei 478nm mit Thermo Quest UV 3000

### 1.3.5 Nährmedien

#### 1.3.5.1 Komplexes Medium (YS-Medium)

Für einen Großteil der Experimente wurde ein komplexes Medium auf der Basis von Hefeextrakt eingesetzt, das im folgenden als *YS-Medium* bezeichnet wird. Dieses entspricht dem von R. Stanka und K. Lebert verwendeten Medium zur kontinuierlichen Kultivierung von *P. luminescens* [53][28]. Es enthält pro Liter destillierten Wassers 1.38 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 1.43 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.75 g  $\text{KCl}$ , 0.28 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 0.12 g  $\text{MgCl}_2$ , 0.049 g  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.0375 g  $\text{NaCl}$  sowie 1 ml Spurenelemente-Lösung. Für die Spurenelemente-Lösung wurden 330 mg  $\text{ZnCl}_2$ , 100 mg  $\text{MnCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ , 238 mg

$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ , 85 mg  $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 121 mg  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 31 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$  und 5 ml HCl (25 %) in dest.  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und zu 1 l aufgefüllt.

Zu diesem Medium wurden in den Experimenten *YS\_Batch\_A* und *YS\_Batch\_B* 7.5 g/l Hefeextrakt (Merck) und 0.55 g/l Glucose-Monohydrat und in dem Experiment *YS\_Batch\_C* 50 g/l Hefeextrakt und 10 g/l Glucose gegeben.

### 1.3.5.2 Definiertes Medium (Amino-Medium)

Das definierte Medium, das im folgenden als *Amino-Medium* bezeichnet wird, besteht aus sieben Aminosäuren, Salzen und Vitaminen. Das Basismedium enthält pro Liter destillierten Wassers 1.38 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 1.43 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.75 g  $\text{KCl}$ , 0.28 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 0.12 g  $\text{MgCl}_2$ , 0.049 g  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.0375 g  $\text{NaCl}$ , 0.0017 g  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  sowie 1 ml Spurenelemente-Lösung und 10 ml Vitaminlösung. Die Vitaminlösung besteht pro 10 ml destillierten Wassers aus 5 mg Cyanocobalamin, 4 mg P-Aminobenzoessäure, 1 mg Biotin, 10 mg Nicotinsäure, 5 mg Calcium (D+)-Pantothenat und 10 mg Thiaminchlorid-hydrochlorid. Für die Spurenelemente-Lösung wurden 330 mg  $\text{ZnCl}_2$ , 100 mg  $\text{MnCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ , 238 mg  $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ , 85 mg  $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 121 mg  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 31 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$  und 5 ml HCl (25 %) in dest.  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und zu 1 l aufgefüllt. Die Konzentrationen der Aminosäuren sind in Tabelle 1.3 aufgeführt. In Experiment *Amino\_Batch\_C* wurde dem Medium zusätzlich noch 4 g/l Glycerin zugegeben.

Tabelle 1.3: Konzentrationen der Aminosäuren in den Experimenten mit dem definierten Medium

Glutaminsäure	10 mmol/l
Threonin	10 mmol/l
Methionin	10 mmol/l
Histidin	10 mmol/l
Serin	10 mmol/l
Lysin	2 mmol/l
Tyrosin	2 mmol/l

### 1.3.6 Fed-Batch Kultivierungen

In den Fed-Batch-Experimenten wurden während der Kultivierung kontinuierlich Substrate über Schlauchpumpen (Ismatec, Deutschland) der Kulturflüssigkeit zugeführt. Die Versuche wurden im 2 l fassenden Bioreaktor mit den in Abschn. 1.3.2

aufgeführten Kultivierungsbedingungen durchgeführt. Lediglich die Rührerdrehzahl wurde auf 900 rpm heraufgesetzt, um eine ausreichende Versorgung der Bakterienkultur mit Sauerstoff auch bei hohen Bakteriendichten zu gewährleisten. Die eingesetzten Nährmedien und die als Substratzufuhr verwendeten Vorlagen sind in Tabelle 1.4 aufgeführt.

Tabelle 1.4: In den einzelnen Fed-Batch-Experimenten eingesetzte Nährmedien und für die Substratzufuhr verwendete Vorlagen

Experiment / Medium	Vorlage 1	Vorlage 2
<i>YS_FedBatch_A</i> YS-Medium	150 g Hefeextrakt in 350 ml dest. Wasser	50 g Glucose-Monohydrat in 450 ml dest. Wasser
<i>YS_FedBatch_B</i> YS-Medium	400 g Hefeextrakt in 600 ml dest. Wasser	80 g Glucose-Monohydrat in 720 ml dest. Wasser
<i>YS_FedBatch_C</i> YS-Medium	400 g Hefeextrakt in 600 ml dest. Wasser	80 g Glucose-Monohydrat in 720 ml dest. Wasser
<i>Amino_FedBatch_A</i> Amino-Medium	22 g Tyrosin in 400 ml 1M HCl	40 g Glucose-Monohydrat in 500 ml dest. Wasser
<i>Amino_FedBatch_B</i> Amino-Medium	22 g Tyrosin in 400 ml 1M HCl	40 g Glucose-Monohydrat in 200 ml dest. Wasser

In den Experimenten *Amino\_FedBatch\_A* und *Amino\_FedBatch\_B* wurde zusätzlich ein Gemisch aus Aminosäuren über eine Schlauchpumpe mit der gleichen Flussrate wie die Vorlage 2 zugeführt. Die Zusammensetzung dieses Gemisches war:

*In Amino\_FedBatch\_B*

89 g Serin, 6.2 g Histidin, 5.9 g Glutaminsäure, 4.76 g Threonin, 5.9 g Methionin und 1.2 g Lysin in 500 ml dest. Wasser.

*In Amino\_FedBatch\_B*

103 g Serin, 5.8 g Histidin, 16.2 g Glutaminsäure, 9.8 g Threonin, 3.9 g Methionin und 3.2 g Lysin in 400 ml 0.5 M NaOH.

# Kapitel 2

## Wachstumsmodelle

### 2.1 Einführung

Die Vorgehensweise bei der mathematischen Beschreibung biotechnologischer Prozesse folgt einer Systematik, die der Modellierung technischer, zum Beispiel elektrotechnischer oder mechanischer Systeme gleicht. Dieser Ablauf ist in Bild 2.1 schematisch dargestellt.

Am Beginn stehen Hypothesen, die aufgrund von Experimenten und theoretischen Überlegungen aufgestellt werden und häufig auf dem Expertenwissen von Verfahrenstechnikern und Biologen basieren. Eine große Herausforderung besteht darin, dieses Wissen zusammenzutragen und aufzubereiten.

Auf der Grundlage dieser Hypothesen gilt es dann, geeignete Experimente durchzuführen, um die zu berücksichtigenden Effekte und vor allem die möglichen Einflussfaktoren auf den Prozess näher zu untersuchen. Da Experimente mit biotechnologischen Systemen mit einem hohen Zeitaufwand verbunden sind, ist ein besonderes Augenmerk auf eine sorgfältige Planung zu legen. An dieser Stelle können Simulationen mit vereinfachten Modellen des biologischen Prozesses und der verfahrenstechnischen Anlage helfen, vorab den Ablauf und die Erfolgsaussichten der Experimente zu überprüfen.

Aus den gewonnenen Versuchsergebnissen ist im nächsten Schritt eine qualitative Beschreibung der Phänomene zu erarbeiten. Dies erfolgt oft nicht in Form mathematischer Gleichungen sondern besteht in umgangssprachlich formulierten Hypothesen. Falls diese im Widerspruch zu den bereits aufgestellten Hypothesen stehen oder bisher nicht betrachtete Effekte auftreten, ist es sinnvoll, erneut Experimente zu planen und durchzuführen.

Die qualitative Beschreibung des Prozesses bildet den Ausgangspunkt für das Aufstellen von mathematischen Gleichungssystemen. Diese sollen die als relevant erkannten Phänomene nachbilden, wobei besonderes Augenmerk auf die spätere Anwendung der mathematischen Modelle gelegt werden sollte. So ist für die Anwendung von Verfahren aus der Systemtheorie ein System gekoppelter Differentialgleichungen mit konzentrierten Parametern äußerst sinnvoll. Im Gegensatz dazu können für andere

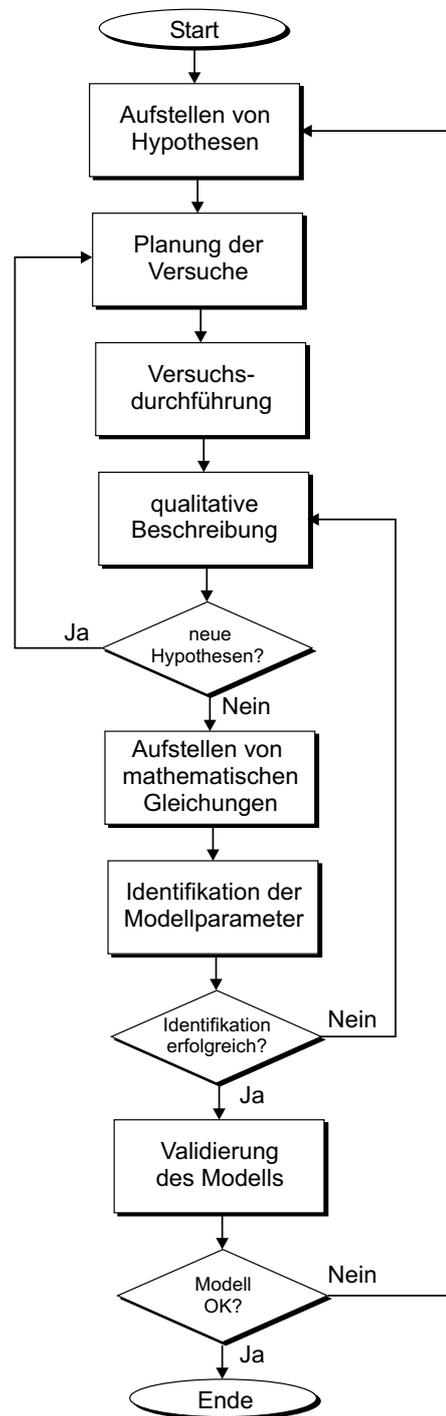


Bild 2.1: Vorgehensweise bei der Modellierung biotechnologischer Systeme

Anwendungen, zum Beispiel der Qualitätskontrolle, statistische Betrachtungen von größerer Bedeutung sein [23].

Im Anschluss an die mathematische Formulierung ist eine Identifikation der Modellparameter durchzuführen. Zur Lösung derartiger Optimierungsproblemen stehen zahlreiche numerische Verfahren zur Verfügung [21][53]. Gelingt es nicht, einen geeigneten Satz Parameter zu finden, mit dem das mathematische Modell die Experimente ausreichend genau beschreibt, so sind die qualitative und mathematische Modellvorstellung zu überarbeiten.

Nach erfolgreicher Identifikation der Parameter besteht der letzte Schritt in der Validierung des mathematischen Modells anhand neuer Experimente und nicht bereits zur Identifikation verwendeter Daten. Ergeben sich dabei Abweichungen zwischen Modell und Realität, die nicht toleriert werden können, so sind erneut Hypothesen zu erarbeiten, aus denen dann eine neue Versuchsplanung und erweiterte Modellvorstellung zu entwickeln ist.

Für das Wachstum von *Photobacterium luminescens* liegen bereits einfache Modelle vor [29][28][53]. Die in diesen Arbeiten aufgeführten Modelle beschreiben das Wachstum der Bakterien auf dem komplexen Nährmedium mit den Bestandteilen Hefeextrakt und Glucose (YS-Medium). Analysen der Konzentrationen der Aminosäuren in diesem Nährmedium ([50]) und deren Verbrauch beim Wachstum von *P. luminescens* ermöglichen eine Zuordnung der Zustandsgrößen dieser Modelle. Dies ist Gegenstand von Abschnitt 2.3.

Die Kenntnis des Bedarfs an Aminosäuren während des Wachstums von *P. luminescens* bildet die Grundlage für die Entwicklung eines definierten Nährmediums (s. Abschnitt 2.4). Die Untersuchung des Stoffwechsels der Bakterien in einem definierten Nährmedium ermöglicht eine wesentlich differenziertere mathematische Beschreibung. Diese ist die in Abschnitt 2.5 ausführlich dargestellt.

Zunächst wird in Abschnitt 2.2 ein generelles Konzept zur Beschreibung des Wachstums von Mikroorganismen und der dabei ablaufenden intrazellulären Reaktionen vorgestellt. Dies basiert auf der Annahme, dass die für das Wachstum der Mikroorganismen charakteristischen Zeitkonstanten deutlich größer sind als die Zeitkonstanten für den Massentransport – zum Beispiel zwischen Flüssig- und Gasphase – im verwendeten Bioreaktor. Darüberhinaus sollen Inhomogenitäten im Kultivierungsmedium vernachlässigt werden, obwohl diese einen großen Einfluss auf das Wachstum und die Bildung von Sekundärmetaboliten haben können. Für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente mit Batch- und Fed-Batch-Kultivierungen von *P. luminescens* sind beide Annahmen zulässig, da es sich um Bioreaktoren im Labor- und Pilotmaßstab handelt (s. Abschnitt 1.3.2). Im folgenden wird daher nicht auf eine Modellierung der verfahrenstechnischen Anlage eingegangen.

## 2.2 Allgemeine Struktur zur Modellierung biologischer Prozesse

Die hier wiedergegebene allgemeine Struktur zur Modellierung biologischer Prozesse stammt von J. Nielsen und J. Villadsen ([39]). Die Autoren definieren einen generellen Rahmen und eine einheitliche Nomenklatur für die Formulierung von sowohl unstrukturierten als auch strukturierten Wachstumsmodellen.

Dies bietet den Vorteil einer einheitlichen Systematik beim Aufstellen der mathematischen Gleichungen, die das Übertragen von Hypothesen über den biologischen Prozess in mathematische Gleichungssysteme vereinfacht. Ein weiterer Vorteil liegt darin, Modelle verschiedener Autoren auf einfache Weise miteinander vergleichen zu können.

Unstrukturierte Modelle beschreiben das mikrobiologische Wachstum ohne die Zusammensetzung und den Zustand der Zelle zu berücksichtigen. Ebenso werden unterschiedliche morphologische Formen der Zellen innerhalb einer Kultur nicht betrachtet. Speziell bei schnellen Änderungen der Substratkonzentrationen im Nährmedium reicht ein unstrukturiertes Modell zu Beschreibung der Phänomene oft nicht aus. Eine Betrachtung intrazellulärer Größen ist trotz des hohen Aufwandes angebracht.

### 2.2.1 Definition der zu berücksichtigenden Größen

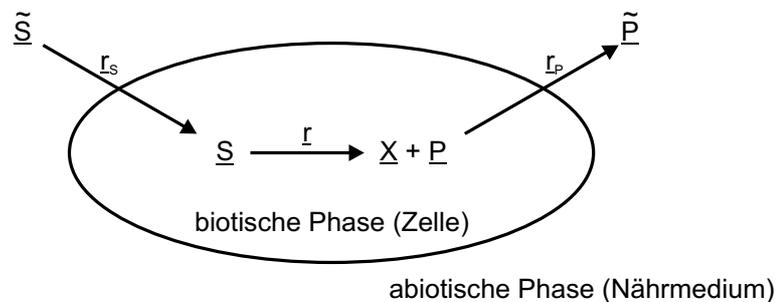


Bild 2.2: Bei der Modellierung des Wachstums von Mikroorganismen betrachtete Größen

In Bild 2.2 sind die zu berücksichtigenden Größen dargestellt, wobei die Größen in der abiotischen Phase und die in der biotischen Phase – oft innerhalb einer Zelle – zu unterscheiden sind. Hier und im folgenden sind die in der abiotischen Phase – meist das Nährmedium – betrachteten Größen mit einer Tilde gekennzeichnet. Dies macht deutlich, dass es sich nicht zwingend um gleiche Stoffe in den beiden Phasen handeln muss. So ist es beispielsweise möglich, dass ein Substrat innerhalb einer Zelle in einer

anderen Form vorliegt als im Nährmedium. Ein Beispiel hierfür ist die Umwandlung von Glucose in Glucose-6-Phosphat unter Verbrauch von ATP bei der Aufnahme durch das Bakterium *Escherichia coli* ([38] S. 149ff).

In der *abiotischen Phase* seien  $N$  Substrate  $\tilde{S}_1 \dots \tilde{S}_N$  mit den jeweiligen Konzentrationen  $C_{\tilde{S}_1} \dots C_{\tilde{S}_N}$  (in g/l) und  $M$  Produkte  $\tilde{P}_1 \dots \tilde{P}_M$  mit den Konzentrationen  $C_{\tilde{P}_1} \dots C_{\tilde{P}_M}$  (in g/l) enthalten. Diese sind in vektorieller Form darstellbar als

$$\begin{aligned} \underline{\tilde{S}} &:= \begin{bmatrix} \tilde{S}_1 \\ \vdots \\ \tilde{S}_N \end{bmatrix} & \text{und} & \underline{C_{\tilde{S}}} &:= \begin{bmatrix} C_{\tilde{S}_1} \\ \vdots \\ C_{\tilde{S}_N} \end{bmatrix} \\ \underline{\tilde{P}} &:= \begin{bmatrix} \tilde{P}_1 \\ \vdots \\ \tilde{P}_M \end{bmatrix} & \text{und} & \underline{C_{\tilde{P}}} &:= \begin{bmatrix} C_{\tilde{P}_1} \\ \vdots \\ C_{\tilde{P}_M} \end{bmatrix} \end{aligned}$$

In der *biotischen Phase* seien ebenfalls  $N$  Substrate  $S_1 \dots S_N$  mit den Konzentrationen  $C_{S_1} \dots C_{S_N}$  (in g/g) und  $M$  metabolische Produkte  $P_1 \dots P_M$  mit den Konzentrationen  $C_{P_1} \dots C_{P_M}$  (in g/g) enthalten. Analog ergibt sich in vektorieller Form

$$\begin{aligned} \underline{S} &:= \begin{bmatrix} S_1 \\ \vdots \\ S_N \end{bmatrix} & \text{und} & \underline{C_S} &:= \begin{bmatrix} C_{S_1} \\ \vdots \\ C_{S_N} \end{bmatrix} \\ \underline{P} &:= \begin{bmatrix} P_1 \\ \vdots \\ P_M \end{bmatrix} & \text{und} & \underline{C_P} &:= \begin{bmatrix} C_{P_1} \\ \vdots \\ C_{P_M} \end{bmatrix} \end{aligned}$$

Die biotische Phase selbst bestehe aus  $L$  Komponenten  $X_1 \dots X_L$  mit den jeweiligen Anteilen  $C_{X_1} \dots C_{X_L}$  (in g/g) an der Gesamtmasse. Beispiele hierfür sind zellinterne Größen wie ATP oder intrazelluläre Enzyme. Nicht selten wird die biotische Phase auch in aktive und inaktive Komponenten unterteilt.

Die Komponenten seien als folgende Vektoren zusammengefasst

$$\underline{X} := \begin{bmatrix} X_1 \\ \vdots \\ X_L \end{bmatrix} \quad \text{und} \quad \underline{C_X} := \begin{bmatrix} C_{X_1} \\ \vdots \\ C_{X_L} \end{bmatrix}$$

Diese Definitionen gelten für den Fall einer homogenen Kultur von Mikroorganismen. Sollen  $Q$  verschiedene morphologische Formen betrachtet werden, so ergibt sich für

jede Form ein Satz von Vektoren  $\tilde{S}_i$ ,  $\tilde{P}_i$ ,  $\underline{S}_i$ ,  $\underline{P}_i$  und  $\underline{X}_i$  mit  $i = 1 \dots Q$  sowie für deren Konzentrationen. Werden diese jeweils zu Matrizen mit  $Q$  Spalten zusammengefasst so gelten die im folgenden angegebenen Gleichungen weiterhin und es ergibt sich ein segregiertes Modell [39]. Die in dieser Arbeit modellierte Kultur von *P. luminescens* soll als homogen betrachtet werden und ist mit einem unsegregierten Modell beschreibbar.

## 2.2.2 Stöchiometrische Betrachtung

Während des Wachstums der Mikroorganismen finden drei Typen von Reaktionen statt. Es existieren Mechanismen zur Substrataufnahme aus der abiotischen Phase sowie zur Bildung von Biomasse und Produkten in der biotischen Phase. Eine dritte Gruppe von Reaktionen dient der Ausschleusung von Produkten aus der biotischen Phase.

### 1. Substrataufnahme

Die in Abschnitt 2.2.1 definierten Größen erfordern die Betrachtung von  $N$  Reaktionen zur Substrataufnahme deren Stöchiometrie nach [39] beschreibbar ist mit

$$\sum_{i=1}^N \alpha_{S,j,i} S_i + \sum_{i=1}^L \gamma_{S,j,i} X_i + \sum_{i=1}^M \beta_{S,j,i} P_i = \tilde{S}_j, \quad (2.1)$$

mit  $j = 1 \dots N$ .

Dabei seien die stöchiometrischen Koeffizienten  $\alpha_{S,j,i}$ ,  $\gamma_{S,j,i}$  und  $\beta_{S,j,i}$  als Konstanten angenommen. Durch Einführung der  $(N \times N)$ -Matrix  $A_S$ , der  $(N \times L)$ -Matrix  $\Gamma_S$  und der  $(N \times M)$ -Matrix  $B_S$ , die sich aus den jeweiligen stöchiometrischen Koeffizienten zusammensetzen, folgt Gl. (2.1) in vektorieller Form

$$A_S \underline{S} + \Gamma_S \underline{X} + B_S \underline{P} = \tilde{\underline{S}} \quad , \quad (2.2)$$

Es liegt nahe, anzunehmen, dass keine intrazellulären Produkte an der Aufnahme von Substraten beteiligt sind. Sind alle zur Substrataufnahme benötigten intrazellulären Bestandteile im Vektor  $\underline{X}$  enthalten, so folgt

$$B_S \equiv 0 \quad .$$

Ferner ist es unwahrscheinlich, dass die Aufnahme eines Substrates die Konzentration der übrigen in der biotischen Phase vorliegenden Substrate beeinflusst. Aus dieser Annahme folgt, dass die Matrix  $A_S$  nur Einträge auf der Hauptdiagonalen aufweist.

### 2. Zellinterne Reaktionen

Innerhalb der biotischen Phase laufen  $J$  Reaktionen zum Aufbau der einzelnen Komponenten der biotischen Phase unter Beteiligung von internen Substraten und Produkten ab. Die Stöchiometrie dieser Reaktionen folgt den Gleichungen

$$\sum_{i=1}^N \alpha_{j,i} S_i + \sum_{i=1}^L \gamma_{j,i} X_i + \sum_{i=1}^M \beta_{j,i} P_i = 0 \quad , \quad (2.3)$$

mit  $j = 1 \dots J$ .

Dies kann mit der  $(J \times N)$ -Matrix  $A$ , der  $(J \times L)$ -Matrix  $\Gamma$  und der  $(J \times M)$ -Matrix  $B$  in vektorieller Form dargestellt werden als

$$A\underline{S} + \Gamma\underline{X} + B\underline{P} = 0 \quad . \quad (2.4)$$

Die stöchiometrischen Koeffizienten  $\alpha_{j,i}$ ,  $\gamma_{j,i}$  und  $\beta_{j,i}$  seien konstant. Ihr Wert sei positiv, falls in der  $j$ -ten Reaktion die Komponente  $X_i$  bzw. das Produkt  $P_i$  gebildet wird, und negativ, falls die Komponenten  $X_i$  bzw. das Substrat  $S_i$  verbraucht wird.

### 3. Ausschleusung von Produkten

Die  $M$  stöchiometrischen Gleichungen für die Ausschleusung von Produkten ergeben sich analog zu den Beziehungen (2.1)

$$\sum_{i=1}^N \alpha_{P,j,i} S_i + \sum_{i=1}^L \gamma_{P,j,i} X_i + \sum_{i=1}^M \beta_{P,j,i} P_i = \tilde{P}_j \quad , \quad (2.5)$$

mit  $j = 1 \dots M$ .

Mit der  $(M \times N)$ -Matrix  $A_P$ , der  $(M \times L)$ -Matrix  $\Gamma_P$  und der  $(M \times M)$ -Matrix  $B_P$  ist die vektorielle Darstellung dieser Gleichungen

$$A_P\underline{S} + \Gamma_P\underline{X} + B_P\underline{P} = \tilde{\underline{P}} \quad . \quad (2.6)$$

Analog zu den oben getroffenen Annahmen folgt die Vereinfachung

$$A_P \equiv 0$$

sowie die Eigenschaft, dass die Matrix  $B_P$  lediglich Einträge auf der Hauptdiagonalen aufweist.

### Zusätzliche Bedingungen

Da die im wesentlichen zur Biomasse beitragenden Größen im Vektor  $\underline{X}$  enthalten sind, ist die Masse der in der biotischen Phase vorhandenen Substrate und Produkte vernachlässigbar klein. Dies rechtfertigt die Annahme, dass die Biomasse bei der Substrataufnahme sowie der Ausschleusung von Produkten erhalten bleibt. Um dies zu erreichen, müssen die Koeffizienten folgende Bedingungen erfüllen

$$\sum_{i=1}^l \gamma_{S,j,i} = 0 \quad \text{mit } j = 1 \dots N \quad \text{und}$$

$$\sum_{i=1}^l \gamma_{P,j,i} = 0 \quad \text{mit } j = 1 \dots M \quad .$$

Dieser Zusammenhang kann ebenfalls in vektorieller Form angegeben werden. Dazu dient die Einführung des  $1 \times L$  dimensionalen Vektors  $\underline{e}_L^T := [1 \dots 1]$ . Hiermit ergeben sich die Bedingungen als

$$\underline{e}_L^T \Gamma_S^T = 0 \quad \text{und} \tag{2.7}$$

$$\underline{e}_L^T \Gamma_P^T = 0 \quad . \tag{2.8}$$

Diese vereinfachenden Annahmen erleichtern in großem Maße die Bestimmung der stöchiometrischen Koeffizienten anhand von Mess- und Analysewerten.

### 2.2.3 Reaktionskinetiken

Die Geschwindigkeiten der durch Gl. (2.2),(2.4) und (2.6) beschriebenen Reaktionen seien nach [39] durch folgende Vektoren in der Einheit 1/h gegeben<sup>(1)</sup>:

$$\underline{r}_S := \begin{bmatrix} r_{S,1} \\ \vdots \\ r_{S,N} \end{bmatrix} \quad \text{(Substrataufnahme),}$$

$$\underline{r} := \begin{bmatrix} r_1 \\ \vdots \\ r_J \end{bmatrix} \quad \text{(zellinterne Reaktionen),} \tag{2.9}$$

$$\underline{r}_P := \begin{bmatrix} r_{P,1} \\ \vdots \\ r_{P,M} \end{bmatrix} \quad \text{(Ausschleusung von Produkten).}$$

<sup>(1)</sup>Die Verwendung der Einheit 1/h statt der SI-Einheit 1/s bietet sich aufgrund der hohen Zeitkonstanten bei biotechnologischen Prozessen an und findet in nahezu allen Veröffentlichungen Verwendung.

Die spezifischen Raten ergeben sich durch Multiplikation mit den stöchiometrischen Koeffizienten. So ist beispielsweise die spezifische Bildungsrate der  $i$ -ten Komponente  $X_i$  der biotischen Phase in der  $j$ -ten Reaktion durch  $\gamma_{i,j} r_j$  gegeben. Analog können die spezifischen Raten für die Aufnahme von Substraten bzw. die Ausschleusung von Produkten angegeben werden.

Die spezifische Wachstumsrate  $\mu$  der Biomasse<sup>(2)</sup> folgt aus Addition der spezifischen Bildungsrate der einzelnen Komponenten in allen  $J$  Reaktionen

$$\mu = \sum_{i=1}^L \sum_{j=1}^J \gamma_{i,j} r_j = \underline{e}_L^T \Gamma^T \underline{r} \quad \text{in g/g 1/h} \quad (2.10)$$

mit dem  $1 \times L$  dimensionalen Vektor  $\underline{e}_L^T := [1 \dots 1]$ .

Für den einfachsten Fall, in dem lediglich eine Komponente der biotischen Phase betrachtet wird ( $L = 1$ ) und deren Bildung nur in einer einzigen Reaktion ( $J = 1$ ) erfolgt, ergibt sich ein unstrukturiertes Modell mit der spezifischen Wachstumsrate  $\mu = \gamma r$ .

Die spezifische Wachstumsrate der Biomasse mit der Masse  $m$  (in g) ist definiert als

$$\mu := \frac{1}{m} \cdot \frac{dm}{dt} \quad (2.11)$$

Eine Massenbilanz aller Reaktionen – auch der für Aufnahme und Ausschleusung von Stoffen – ergibt

$$\begin{aligned} \Gamma_S^T \underline{r}_S \cdot m + \Gamma^T \underline{r} \cdot m + \Gamma_P^T \underline{r}_P \cdot m &= \frac{d}{dt} \{ \underline{X} m \} \\ &= m \cdot \frac{d\underline{X}}{dt} + \underline{X} \cdot \frac{dm}{dt} \quad . \end{aligned} \quad (2.12)$$

Es folgt die Nettobildungsrate von  $\underline{X}$  (in g/g 1/h)

$$\underline{R} := \frac{d\underline{X}}{dt} = \Gamma^T \underline{r} + \Gamma_S^T \underline{r}_S + \Gamma_P^T \underline{r}_P - \mu \underline{X} \quad . \quad (2.13)$$

Analog ergeben sich die Nettoaufnahme- und die Nettoabgaberate für Substrate zu

$$\underline{R}_S := \frac{d\underline{S}}{dt} = A^T \underline{r} + A_S^T \underline{r}_S - \mu \underline{S} \quad (2.14)$$

$$\underline{R}_P := \frac{d\underline{P}}{dt} = B^T \underline{r} + B_P^T \underline{r}_P - \mu \underline{P} \quad (2.15)$$

---

<sup>(2)</sup>Die Bezeichnung der spezifischen Wachstumsrate mit dem Buchstaben  $\mu$  hat sich in der Literatur zur Modellierung biotechnologischer Prozesse durchgesetzt und soll hier ebenfalls verwendet werden.

Da im Normalfall die Zeitkonstanten für die Aufnahme von Substraten sehr viel kleiner sind als die Zeitkonstanten für das Wachstum der Biomasse, kann die Gl. (2.14) als quasistationär, d. h.  $\underline{R}_S = 0$  angesehen werden. Damit ergeben sich (implizite) algebraische Gleichungen zur Bestimmung der Substrate in der biotischen Phase bzw. deren Aufnahmeraten:

$$\underline{S} = \frac{1}{\mu} (A^T \underline{r} + A_S^T \underline{r}_S) \quad (2.16)$$

$$\underline{r}_S = A_S^{-1} (-A^T \underline{r} + \mu \underline{S}) \quad . \quad (2.17)$$

Wie in Abschnitt 2.2.2 angenommen, ist  $\underline{S}$  sehr klein gegenüber  $\underline{X}$  und damit klein gegenüber  $-A^T \underline{r}$ . Da  $\mu$  in der Größenordnung von  $-A^T \underline{r}$  vorliegt, ist folgende Näherung zulässig:

$$\underline{r}_S \approx -A_S^{-1} A^T \underline{r} \quad . \quad (2.18)$$

Dies bedeutet, dass die Rate der Substrataufnahme  $\underline{r}_S$  als Funktion der Reaktionsraten der internen Reaktionen angesehen werden kann.

Analog ergibt sich die Näherung für die Rate der Ausschleusung von Produkten zu

$$\underline{r}_P \approx -B_P^{-1} B^T \underline{r} \quad . \quad (2.19)$$

## 2.3 Modell des Wachstums auf YS-Medium

### 2.3.1 YS-Modell

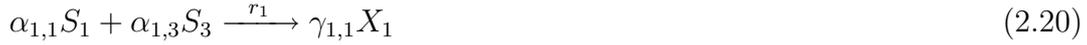
Bei der Kultivierung von *Photothabdus luminescens* in dem komplexen YS-Medium mit den wesentlichen Bestandteilen Hefeextrakt und Glucose (s. Abschnitt 1.3.5.1), zeigt sich ein Aufbau von Biomasse unter parallelem Verbrauch von Glucose und Bestandteilen des Hefeextrakts [53][28][50]. Weiterhin wird während des Wachstums der Bakterien der im Nährmedium gelöste Sauerstoff in den Stoffwechsel eingebracht.

Für eine Modellierung gemäß Abschnitt 2.2 sind  $N = 3$  Substrate im Nährmedium und innerhalb der Zelle zu berücksichtigen. Dabei wird angenommen, dass keine Umwandlung während der Substrataufnahme stattfindet. Im einzelnen sind zu berücksichtigen:

$$\begin{aligned} \text{Hefeextrakt} \quad \tilde{S}_1 &= S_1 \\ \text{Glucose} \quad \tilde{S}_2 &= S_2 \\ \text{Sauerstoff} \quad \tilde{S}_3 &= S_3 \end{aligned}$$

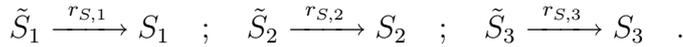
Die Zelle selbst bestehe aus lediglich einer Komponente  $\underline{X} = X_1$  ( $L = 1$ ). Zunächst sollen keine Produkte berücksichtigt werden, d. h.  $\underline{P} \equiv 0$ .

Der Aufbau von Biomasse  $X_1$  kann sowohl unter Verbrauch von Hefeextrakt  $S_1$  und Sauerstoff  $S_3$ , als auch unter Verbrauch von Glucose  $S_2$  und Sauerstoff erfolgen. Damit liegen folgende  $J = 2$  intrazelluläre Reaktionen vor



Die stöchiometrischen Koeffizienten  $\alpha_{i,j}$  seien negativ und  $\gamma_{i,j}$  positiv. Sie seien so gewählt, dass  $\alpha_{1,1} = \alpha_{2,2} = -1$  gilt.

Die Aufnahme der Substrate soll in drei Reaktionen erfolgen bei der keine Umwandlungen stattfinden:



Damit ergeben sich die folgenden stöchiometrischen Matrizen:

$$A = \begin{bmatrix} -1 & 0 & \alpha_{1,3} \\ 0 & -1 & \alpha_{2,3} \end{bmatrix} \quad ; \quad \Gamma = \begin{bmatrix} \gamma_{1,1} \\ \gamma_{2,1} \end{bmatrix} \quad ; \quad B = 0 ;$$

$$A_S = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad ; \quad \Gamma_S = 0 \quad ; \quad B_S = 0 .$$

Die Reaktionsraten sollen von der Konzentration  $C_{\tilde{S}_i}$  des jeweils verwendeten Substrates im Medium abhängen und Wachstumskinetiken nach Monod entsprechen

$$r_i = r_{i,max} \cdot \frac{C_{\tilde{S}_i}}{K_{S_i} + C_{\tilde{S}_i}} \quad , \quad i = 1 \dots 2$$

mit den Konstanten  $K_{S_i}$  und  $r_{i,max}$ .

Aus den stöchiometrischen Gleichungen und den Reaktionsraten ergibt sich ein System gekoppelter Differentialgleichungen mit Hilfe der Beziehungen

$$\frac{dC_{\tilde{X}}}{dt} = \mu C_{\tilde{X}} \quad \text{und} \quad \frac{dC_{\tilde{S}}}{dt} = -\underline{r}_S C_{\tilde{X}} \quad . \quad (2.22)$$

$C_{\tilde{X}}$  sei die Konzentration und  $\mu$  sei die spezifische Wachstumsrate der Biomasse im Bioreaktor. Nach Gl. (2.10) (S. 21) ergibt sich

$$\mu = \underline{e}_L^T \Gamma^T \underline{r} = 1 \cdot [\gamma_{1,1} \quad \gamma_{2,1}] \cdot \begin{bmatrix} r_1 \\ r_2 \end{bmatrix} = (\gamma_{1,1} r_1 + \gamma_{2,1} r_2) \quad .$$

Die Raten der Substrataufnahme folgen nach Gl. (2.18) (S. 22)

$$\underline{r}_S = -A^T \underline{r} = - \begin{bmatrix} -1 & 0 \\ 0 & -1 \\ \alpha_{1,3} & \alpha_{2,3} \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} r_1 \\ r_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} r_1 \\ r_2 \\ -\alpha_{1,3}r_1 - \alpha_{2,3}r_2 \end{bmatrix} .$$

Durch die Einführung neuer Bezeichner für die Modellparameter folgt das von R. Stanka und K. Lebert aufgestellte formalkinetischen Modell für das Wachstum von *P. luminescens* [53][28]. Mit den Yield-Faktoren

$$Y_{X/S_1} := \gamma_{1,1} \quad , \quad Y_{X/S_2} := \gamma_{2,1} \quad ,$$

den Substratverbrauchsraten

$$q_{S_1} := r_1 \quad , \quad q_{S_2} := r_2$$

sowie den maximalen Substratverbrauchsraten

$$q_{S_1,max} := r_{1,max} \quad , \quad q_{S_2,max} := r_{2,max}$$

folgt aus (2.22)

$$\dot{C}_{\bar{X}} = (Y_{X/S_1} \cdot q_{S_1} + Y_{X/S_2} \cdot q_{S_2}) \cdot C_{\bar{X}} \quad (2.23)$$

$$\dot{C}_{\bar{S}_1} = -q_{S_1} \cdot C_{\bar{X}} \quad (2.24)$$

$$\dot{C}_{\bar{S}_2} = -q_{S_2} \cdot C_{\bar{X}} \quad . \quad (2.25)$$

Die Substratverbrauchsraten folgen der Kinetik

$$q_{S_i} = q_{S_i,max} \cdot \frac{C_{\bar{S}_i}}{K_{S_i} + C_{\bar{S}_i}} \quad , \quad i = 1 \dots 2 \quad . \quad (2.26)$$

Bei diesem Ansatz bleiben – im Gegensatz zu den Modellvorstellungen in [53] und [28] – der verzögerte Verbrauch von Glucose in kontinuierlicher Kultur sowie die Inhibierung durch zu hohe Konzentrationen von Glucose (s. [29]) unberücksichtigt. Diese Effekte sind mit dem vorgestellten unstrukturierten Modellansatz nur schwer zu beschreiben. Das in Abschnitt 2.5 beschriebene strukturierte Modell ist hierzu deutlich besser geeignet.

Eine getrennte Betrachtung des Sauerstoffs ( $S_3$ ) in den beiden Reaktionen (2.20) und (2.21) durch die Definitionen der Größen

$$C_{S_{3,1}} := \alpha_{1,3} C_{S_3} \quad \text{und} \quad C_{S_{3,2}} := \alpha_{2,3} C_{S_3}$$

mit der gesamten Sauerstoffaufnahme

$$\begin{aligned} \dot{C}_{S_3} &= \dot{C}_{S_{3,1}} + \dot{C}_{S_{3,2}} \\ &= \alpha_{1,3} r_1 + \alpha_{2,3} r_2 \end{aligned}$$

ermöglicht die Berechnung der Reaktionsraten

$$r_1 = \frac{\dot{C}_{S_{3,1}}}{\alpha_{1,3}} \quad \text{und} \quad r_2 = \frac{\dot{C}_{S_{3,2}}}{\alpha_{2,3}} \quad .$$

Eingesetzt in das Gleichungssystem (2.22) folgt

$$\begin{aligned} \dot{C}_{\tilde{X}} &= \left( \frac{\gamma_{1,1}}{\alpha_{1,3}} \dot{C}_{S_{3,1}} + \frac{\gamma_{2,1}}{\alpha_{2,3}} \dot{C}_{S_{3,2}} \right) \cdot C_{\tilde{X}} \\ \dot{C}_{\tilde{S}_1} &= -\frac{\gamma_{1,1}}{\alpha_{1,3}} \dot{C}_{S_{3,1}} \cdot C_{\tilde{X}} \\ \dot{C}_{\tilde{S}_2} &= -\frac{\gamma_{2,1}}{\alpha_{2,3}} \dot{C}_{S_{3,2}} \cdot C_{\tilde{X}} \\ \dot{C}_{S_3} &= \dot{C}_{S_{3,1}} + \dot{C}_{S_{3,2}} \end{aligned}$$

Die Einführung der Konstanten  $K_1 := \frac{\gamma_{1,1}}{\alpha_{1,3}}$  und  $K_2 := \frac{\gamma_{2,1}}{\alpha_{2,3}}$  sowie der molaren Sauerstoffaufnahme

$$r_{O_2, \text{total}} := \dot{C}_{S_3} \quad , \quad r_{O_2, S_1} := \dot{C}_{S_{3,1}} \quad \text{und} \quad r_{O_2, S_2} := \dot{C}_{S_{3,2}}$$

ergibt die in [28] beschriebene Modellierung des Bakterienwachstums über die modellgestützte Gasanalyse<sup>(3)</sup>:

$$\dot{C}_{\tilde{X}} = (K_1 r_{O_2, S_1} + K_2 \cdot r_{O_2, S_2}) \cdot C_{\tilde{X}} \quad (2.27)$$

$$\dot{C}_{\tilde{S}_1} = -\frac{K_1}{Y_{X/S_1}} \cdot r_{O_2, S_1} \cdot C_{\tilde{X}} \quad (2.28)$$

$$\dot{C}_{\tilde{S}_2} = -\frac{K_2}{Y_{X/S_2}} \cdot r_{O_2, S_2} \cdot C_{\tilde{X}} \quad (2.29)$$

$$r_{O_2, \text{total}} = r_{O_2, S_1} + r_{O_2, S_2} \quad . \quad (2.30)$$

---

<sup>(3)</sup>Die Berechnung der Sauerstoffaufnahme  $r_{O_2, \text{total}}$  aus der Analyse der Zu- und Abluft des Bioreaktors ist Gegenstand von Abschnitt 3.2.3

### 2.3.2 Untersuchung des YS-Mediums

Im Unterschied zu dem Substrat  $S_2$  (Glucose) ist das Substrat  $S_1$  in [53] und [28] nicht spezifiziert. Beide Autoren gehen davon aus, es handele sich um einen Bestandteil des Hefeextrakts oder eine Kombination mehrerer darin enthaltener Stoffe. Aufgrund der Komplexität des Hefeextrakts, der unter anderem 19 verschiedene Aminosäuren enthält, und der Fähigkeit der Bakterien, verschiedene Stoffwechselwege zu aktivieren, ist die Bestimmung limitierender Wachstumsfaktoren in dem komplexen YS-Medium schwierig und auch nicht eindeutig.

Eine Analyse der einzelnen Bestandteile des Nährmediums mittels HPLC (s. Abschnitt 1.3) zu verschiedenen Zeitpunkten während des Wachstums von *P. luminescens* gibt Hinweise auf das unbekannte Substrat  $S_1$ . Das Bild 2.3 zeigt neben einigen im Medium enthaltenen Aminosäuren auch den Verlauf der Biomasse  $C_{\bar{X}}$  im Bioreaktor. Zur Beurteilung der Wachstumsrate ist zusätzlich noch die Kohlendioxidproduktionsrate  $r_{\text{CO}_2}$  dargestellt (s. Abschn. 3.2.3).

Am Verlauf der Kohlendioxidproduktionsrate ist deutlich erkennbar, dass die Wachstumsrate bei  $t = 14$  h stark einbricht. Genau zu diesem Zeitpunkt ist die Glutaminsäure im Medium verbraucht. Weitere Experimente in definierten Nährmedien (s. Abschnitt 2.5) zeigen ebenfalls einen starken Einbruch der Wachstumsrate falls diese Aminosäure im Nährmedium verbraucht ist. Damit liegt es nahe, die Glutaminsäure als Substrat  $S_1$  anzusehen.

Ein weiterer Anhaltspunkt ist die Bedeutung von Glutaminsäure im Stoffwechsel von *Escherichia coli*. Diese Aminosäure ist dort wesentlich für die Assimilation des Ammonium-Ions ( $\text{NH}_4^+$ ) im GS-GOGAT-Zyklus. Eine detaillierte Beschreibung dieses Sachverhaltes ist zum Beispiel in [38], S. 144ff zu finden. Beim GS-GOGAT-Zyklus handelt sich um eine Kette von Reaktionen, in denen  $\text{NH}_4^+$  unter Mitwirkung der Enzyme Glutamin-Synthetase (GS) und Glutamat- $\alpha$ -Oxoglutarat-Aminotransferase (GOGAT) – auch als Glutamat-Synthetase bekannt – während der Synthese von Glutamin aus Glutaminsäure assimiliert wird. Es ist anzunehmen, dass dieser Mechanismus auch Bestandteil der Stoffwechselwege von *P. luminescens* ist. Damit kann das Fehlen von Glutaminsäure einen erheblichen Einfluss auf die Wachstumsrate haben.

Interessant ist ferner die Untersuchung des Gehalts an Kohlenwasserstoff im Nährmedium. Eine HPLC-Analyse des Nährmediums (s. Abschnitt 1.3) zeigt, dass neben der Glucose auch der zweiwertige Zucker Saccharose enthalten ist und von den Bakterien verbraucht wird (s. Bild 2.4). Dies ist ungewöhnlich, da sich in der Literatur keine Anhaltspunkte für das Wachstum von *P. luminescens* auf Saccharose finden. Ebenso ungewöhnlich ist der parallele Verbrauch beider Zucker. Bei Wachstum in anderen Nährmedien ist Glucose die von *P. luminescens* bevorzugte Kohlenstoffquelle.

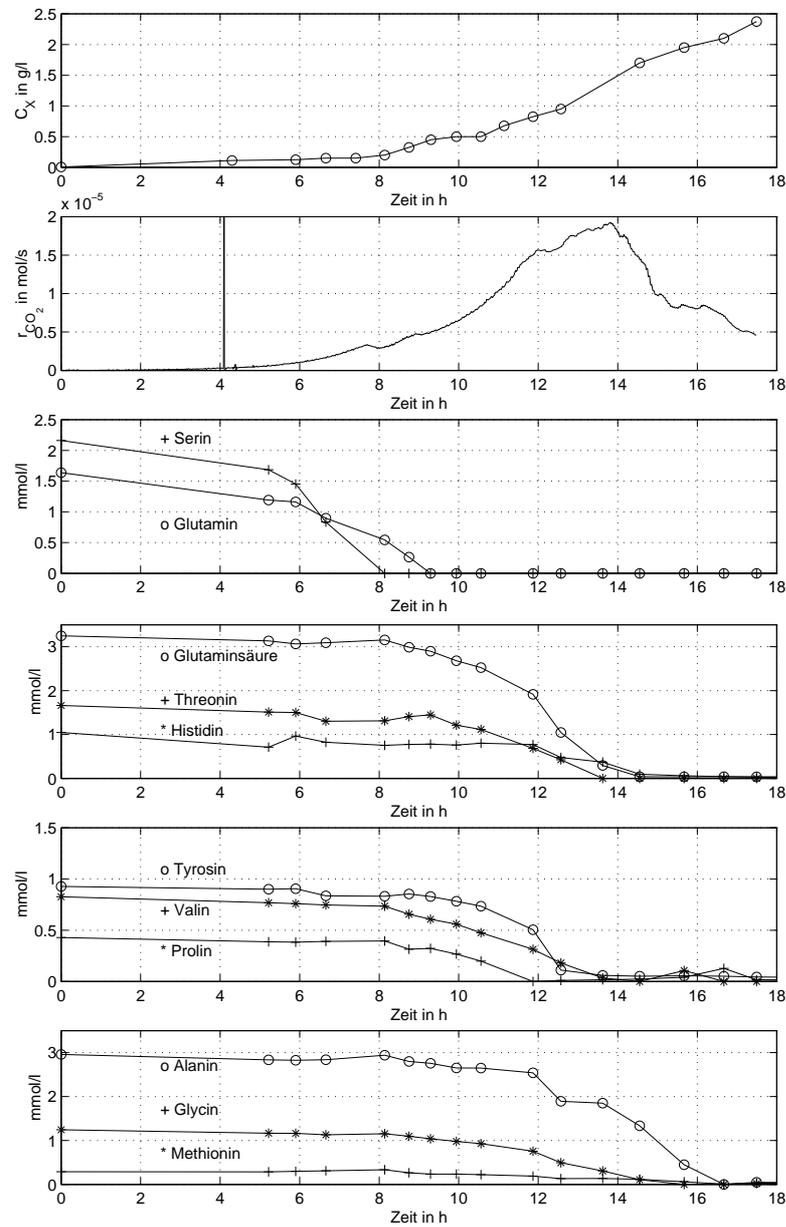


Bild 2.3: Konzentration der Aminosäuren über der Zeit bei Wachstum von *P. luminescens* im komplexen YS-Medium auf der Basis von Hefeextrakt (Exp. *YS\_Batch\_A*).

Für die Modellierung des Bakterienwachstums in dem komplexen YS-Medium mit Hefeextrakt ist demnach neben der Glutaminsäure als Substrat  $S_1$  die Summe der beiden Zucker als Substrat  $S_2$  anzusehen.

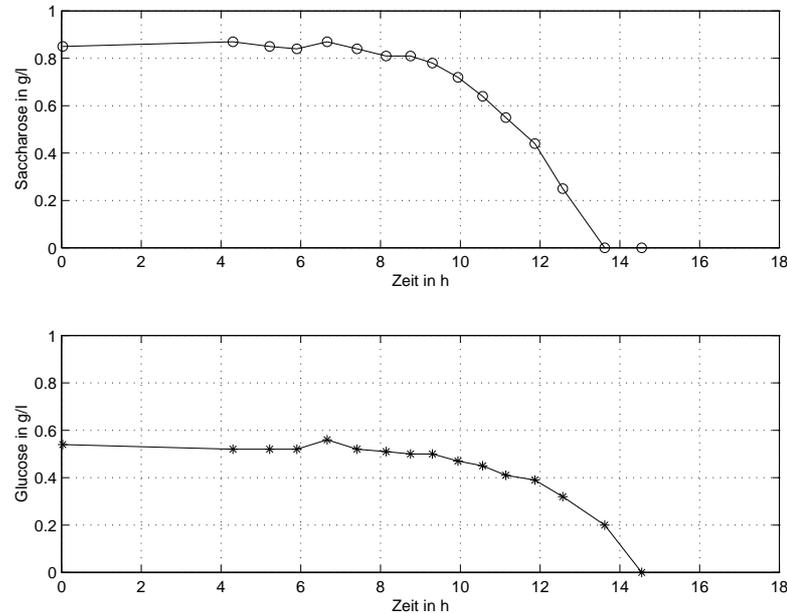


Bild 2.4: Konzentration von Saccharose und Glucose über der Zeit bei Wachstum von *P. luminescens* in dem komplexen YS-Medium

### 2.3.3 Parameter des YS-Modells

#### 2.3.3.1 Parameter für geringe Biomassekonzentration

Für Batch-Kultivierungen mit Konzentrationen der Biomasse von weniger als 5 g/l, die durch Substratvorlagen von weniger als 1 g/l Glucose und 7.5 g/l Hefeextrakt bedingt sind, gibt R. Stanka die in Tabelle 2.1 aufgeführten Parameter an [53]. Die Zeiten  $T_{L,S_1}$  und  $T_{L,S_2}$  sind Verzögerungszeiten nach der Inokulation. In den Simulationen findet bis zu diesen Zeiten kein Substratverbrauch statt, um die in den Experimenten beobachteten Lag-Phasen zu berücksichtigen.

Eine Simulation der Modellgleichungen (2.23) – (2.25) (auf S. 24) mit diesen Parametern ergibt die in Bild 2.5 dargestellten Verläufe für die optische Dichte (OD) und die Glucosekonzentration. Die Parameter sind so gewählt, dass die Verläufe der OD der in [53] und [28] beschriebenen Experimente möglichst genau approximiert werden. Da die Konzentration der Biomasse  $C_X$  bei geringen Bakteriendichten als

Tabelle 2.1: Parameter nach R. Stanka für das Modell des Wachstums auf dem komplexen YS-Medium

$$\frac{K_{S_1} = 0.049 \frac{\text{g}}{\text{l}} \mid q_{S_1, \max} = 0.06 \frac{1}{\text{h}} \mid Y_{X/S_1} = 3.5 \mid T_{L, S_1} = 2 \text{ h}}{K_{S_2} = 0.070 \frac{\text{g}}{\text{l}} \mid q_{S_2, \max} = 0.05 \frac{1}{\text{h}} \mid Y_{X/S_2} = 3.2 \mid T_{L, S_2} = 8 \text{ h}}$$

Quelle: [53], S. 126

proportional zur OD angenommen werden kann, stellt die Betrachtung der OD an dieser Stelle keine Einschränkung dar. Die Anfangsbedingungen für die Simulation sind

$$OD_0 = 0.18, C_{\tilde{S}_1, 0} = 0.5 \text{ g/l}, C_{\tilde{S}_2, 0} = 0.55 \text{ g/l}.$$

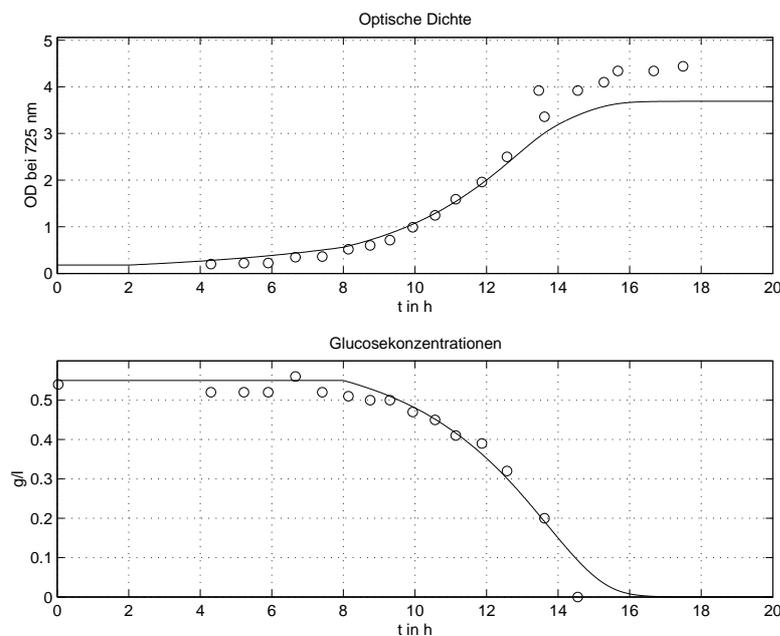


Bild 2.5: Vergleich der Messwerte (o) für die optische Dichte und die Glucosekonzentration aus Experiment *YS\_Batch\_A* mit der Simulation (—) des Modells für Wachstum auf YS-Medium (Gl. (2.23) – (2.25)) mit Parametern nach R. Stanka (Tab. 2.1).

Den simulierten Zeitverläufen sind die Messwerte aus Experiment *YS\_Batch\_A* gegenübergestellt. Obwohl in weiten Bereichen eine gute Übereinstimmung zu erkennen ist, macht die Simulation die Grenzen der Modellvorstellung deutlich. So ist trotz

des vollständigen Verbrauchs der Kohlenstoffquellen nach  $t = 15$  h ein Anstieg der Bakteriendichte zu beobachten. Möglicherweise bringen die Bakterien nachdem die Glucose erschöpft ist, Aminosäuren als Kohlenstoffquelle in ihren Stoffwechsel ein. Dieses Verhalten ist durch die einfache Modellvorstellung, die von lediglich 2 Substraten ausgeht, nicht berücksichtigt. Dies wirkt sich durch eine zu geringe simulierte OD gegen Ende des Experimentes aus.

Die in Tabelle 2.1 wiedergegebenen Parameter ermöglichen es nicht, den Verlauf der Glutaminsäure als Substrat  $S_1$  zu simulieren. Um dies zu erreichen, wäre eine entsprechende Skalierung des Koeffizienten  $Y_{X/S_1}$ , der maximalen Substratverbrauchsrate  $q_{S_1,max}$  sowie der Anfangskonzentration  $C_{\tilde{S}_1,0}$  notwendig. Da die vorliegenden Parameter ohnehin nur für Experimente mit geringer Bakteriendichte gelten, ist die Identifikation eines neuen Satzes von Parametern unumgänglich.

### 2.3.3.2 Parameter für hohe Biomassekonzentration

Bei Experimenten mit hohen Anfangskonzentrationen für die Substrate sowie für Fed-Batch-Experimente ergeben Simulationen mit den in Tabelle 2.1 aufgeführten Parameter für das YS-Modell keine Übereinstimmung mit realen Messdaten. Es ist allerdings möglich, einen neuen Satz von Parametern zu identifizieren, mit dem sich gute Ergebnisse erzielen lassen. Exemplarisch sind nachfolgend die Messdaten aus Experiment *YS\_Batch\_C* mit einer Substratvorlage von 50 g/l Hefeextrakt und 10 g/l Glucose den Zeitverläufen aus verschiedenen Simulationen gegenübergestellt. Die Ermittlung der Modellparameter erfolgt schrittweise.

Die Modellgleichungen (s. (2.23) – (2.25) auf S. 24)

$$\begin{aligned}\dot{C}_{\tilde{X}} &= (Y_{X/S_1} \cdot q_{S_1} + Y_{X/S_2} \cdot q_{S_2}) \cdot C_{\tilde{X}} \\ \dot{C}_{\tilde{S}_1} &= -q_{S_1} \cdot C_{\tilde{X}} \\ \dot{C}_{\tilde{S}_2} &= -q_{S_2} \cdot C_{\tilde{X}} \quad .\end{aligned}$$

mit den Substratverbrauchsraten

$$q_{S_i} = q_{S_i,max} \cdot \frac{C_{\tilde{S}_i}}{K_{S_i} + C_{\tilde{S}_i}} \quad , \quad i = 1 \dots 2$$

vereinfachen sich am Beginn eines Batch-Experimentes. Zu diesem Zeitpunkt liegen die Substrate in hoher Konzentration vor, d. h.  $C_{\tilde{S}_1} \gg K_{S_1}$  und  $C_{\tilde{S}_2} \gg K_{S_2}$ . Damit

werden die Modellgleichungen näherungsweise zu

$$\dot{C}_{\tilde{X}} = \underbrace{(Y_{X/S_1} \cdot q_{S_1,max} + Y_{X/S_2} \cdot q_{S_2,max})}_{=:\mu_{max}} \cdot C_{\tilde{X}} \quad (2.31)$$

$$\dot{C}_{\tilde{S}_1} = -q_{S_1,max} \cdot C_{\tilde{X}} \quad (2.32)$$

$$\dot{C}_{\tilde{S}_2} = -q_{S_2,max} \cdot C_{\tilde{X}} \quad , \quad (2.33)$$

deren Lösung durch

$$C_{\tilde{X}}(t) = C_{\tilde{X},0} \cdot e^{\mu_{max}t} \quad (2.34)$$

gegeben ist.

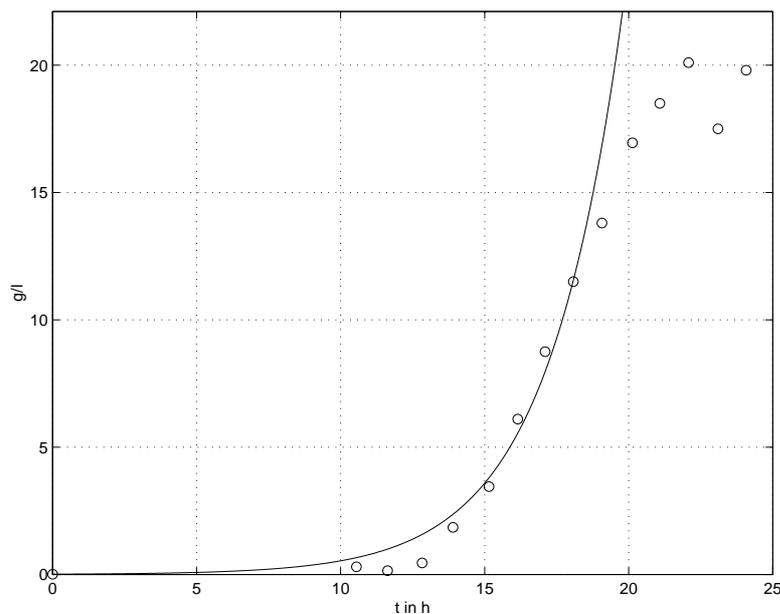


Bild 2.6: Vergleich der Messwerte für die Konzentration der Biomasse (o) aus Experiment *YS\_Batch\_C* mit dem Verlauf (—) der Funktion (2.34).

Die Anfangskonzentration  $C_{\tilde{X},0}$  und die maximale Wachstumsrate  $\mu_{max}$  sind durch einen Vergleich der Funktion (2.34) mit Messwerten für die Konzentration der Biomasse zu ermitteln. Durch die Wahl von  $C_{\tilde{X},0} = 0.012 \frac{\text{g}}{\text{l}}$  und  $\mu_{max} = 0.38 \frac{1}{\text{h}}$  entsteht eine Übereinstimmung während der ersten 17 h (s. Bild 2.6).

Durch Einsetzen der Lösung (2.34) in (2.32) bzw. (2.33) ergeben sich die Zeitfunktionen für die Substrate

$$C_{\tilde{S}_1}(t) = C_{\tilde{S}_1,0} - q_{S_1,max} \cdot \frac{C_{\tilde{X},0}}{\mu_{max}} \cdot e^{\mu_{max}t} \quad (2.35)$$

$$C_{\tilde{S}_2}(t) = C_{\tilde{S}_2,0} - q_{S_2,max} \cdot \frac{C_{\tilde{X},0}}{\mu_{max}} \cdot e^{\mu_{max}t} \quad (2.36)$$

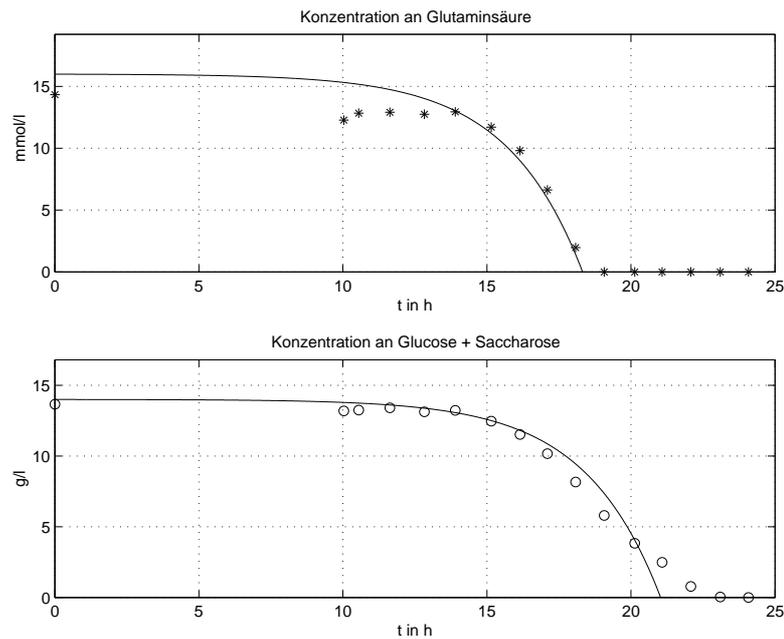


Bild 2.7: Vergleich der Messwerte für die Konzentration der Glutaminsäure (\*) sowie der Summe der Konzentration der Glucose und Saccharose (o) aus Experiment *YS\_Batch\_C* mit dem Verlauf (—) der Funktionen (2.35) bzw. (2.36).

Auch die Identifikation der beiden maximalen Substratverbrauchsraten  $q_{S_i,max}$  und Anfangskonzentrationen  $C_{\tilde{S}_i,0}$  mit  $i = 1 \dots 2$  ist anhand eines Vergleiches der Zeitverläufe (2.35) und (2.36) möglich. Wie in Abschnitt 2.3.2 erläutert, soll  $C_{\tilde{S}_1}$  die Konzentration der Glutaminsäure und  $C_{\tilde{S}_2}$  die Summe aus den Konzentrationen der Glucose und Saccharose repräsentieren. Das Bild 2.7 zeigt, dass mit

$$C_{\tilde{S}_1,0} = 16 \text{ mmol/l} \quad , \quad q_{S_1,max} = 0.48 \frac{\text{mmol}}{\text{g h}}$$

$$C_{\tilde{S}_2,0} = 14 \frac{\text{g}}{\text{l}} \quad , \quad q_{S_2,max} = 0.48 \frac{1}{\text{h}}$$

die Approximation der Messwerten für  $t \leq 17$  h gelingt.

Damit sind alle Anfangswerte sowie zwei wichtige Modellparameter bekannt. Durch Auswertung der Gleichung (2.31) für die maximale Wachstumsrate folgt eine algebraische Beziehung zwischen den Ausbeutekoeffizienten:

$$Y_{X/S_1} = \frac{\mu_{max} - Y_{X/S_2} q_{S_2,max}}{q_{S_1,max}} \quad . \quad (2.37)$$

Damit verbleiben lediglich 3 Modellparameter die anhand von Simulationen der Modellgleichungen (2.23) – (2.25) und Vergleichen mit den realen Daten identifizierbar sind. Diese Vorgehensweise führt zu dem in Tabelle 2.2 enthaltenen Parametersatz. Auf die Verwendung von Verzögerungszeiten zur Modellierung der Lag-Phase kann bei geeigneter Wahl der Anfangskonzentration der Biomasse verzichtet werden, wie die nachfolgend aufgeführte Simulation zeigt.

Tabelle 2.2: Parameter des Modells für Wachstum auf dem YS-Medium bei hohen Bakteriendichten

$K_{S_1} = 0.2 \text{ mmol/l}$	$q_{S_1,max} = 0.48 \frac{\text{mmol}}{\text{g h}}$	$Y_{X/S_1} = 0.45$
$K_{S_2} = 0.4 \frac{\text{g}}{\text{l}}$	$q_{S_2,max} = 0.19 \frac{1}{\text{h}}$	$Y_{X/S_2} = 0.86$

Für den Vergleich mit den Messdaten aus Experiment *YS\_Batch\_C* gelten die oben ermittelten Anfangsbedingungen:

$$C_{\bar{X},0} = 0.012 \frac{\text{g}}{\text{l}}, C_{\bar{S}_1,0} = 16 \text{ mmol/l}, C_{\bar{S}_2,0} = 14 \frac{\text{g}}{\text{l}} \text{ g/l}.$$

In Bild 2.8 ist deutlich erkennbar, wie gut die Simulationen und die zugehörigen Messwerte übereinstimmen.

## 2.4 Entwicklung des definierten Mediums

Um eine erfolgreiche und alle wesentlichen Effekte beschreibende Modellierung des Bakterienwachstums zu erreichen, sind Untersuchungen mit komplexen Nährmedien unzureichend. Häufig ist deren Zusammensetzung nicht vollständig bekannt und variiert von Experiment zu Experiment. Letzteres ist insbesondere bei der Verwendung von Hefeextrakt im Nährmedium der Fall. Abhilfe kann durch die Verwendung eines definierten, rein synthetischen Nährmediums geschaffen werden. Die damit einstellbaren definierten Rahmenbedingungen für das Bakterienwachstum sind Voraussetzung

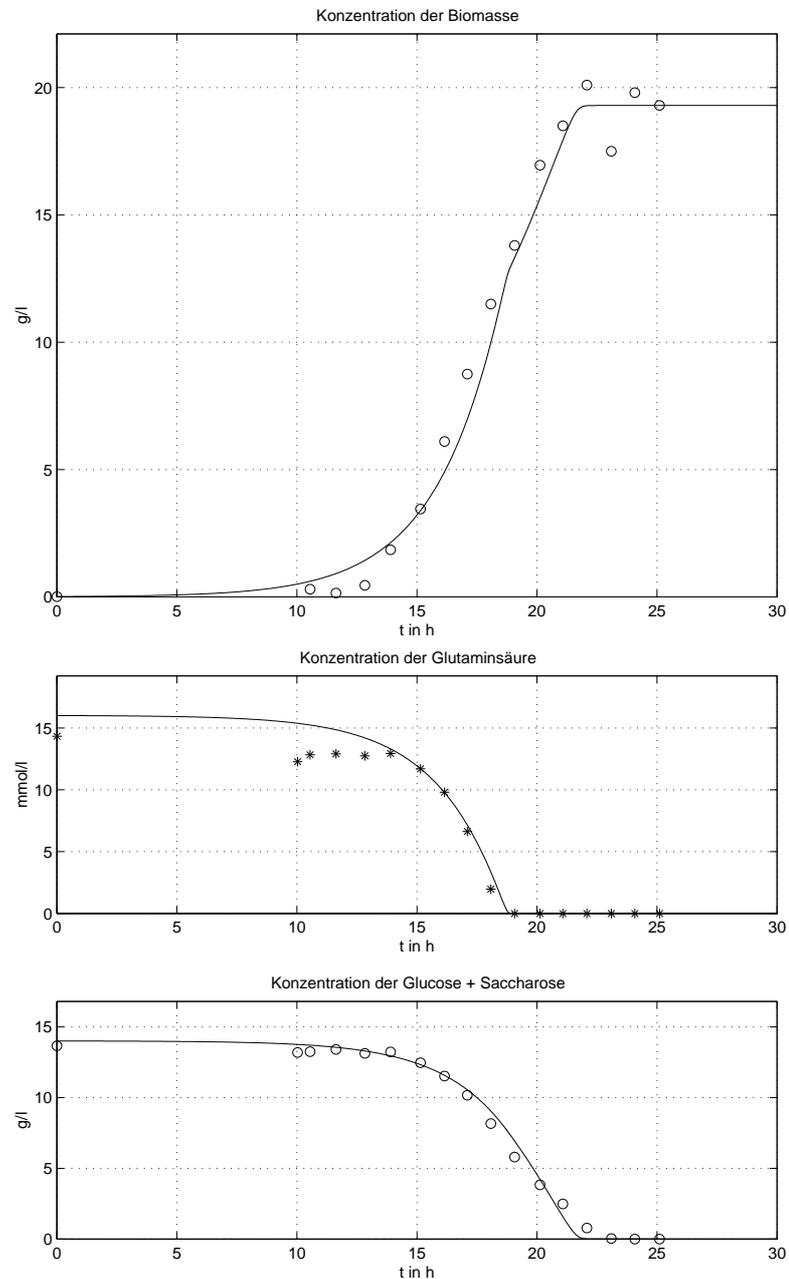


Bild 2.8: Vergleich der Messwerte (o) für die Konzentration der Biomasse, der Glutaminsäure sowie der Summe der Konzentration der Glucose und Saccharose aus Experiment *YS\_Batch\_C* mit der Simulation (—) des Modells (2.23) – (2.25) mit Parametern nach Tab. 2.2.

für eine Untersuchung des Stoffwechsels und eine Modellierung der das Wachstum beeinflussenden Größen [24].

Die in der Literatur angegebenen definierten Medien für die Kultivierung von *Photobacterium luminescens* erlauben lediglich geringe Wachstumsraten  $\mu$  mit großen Verdopplungszeiten  $t_d := \frac{\ln 2}{\mu}$  von mehr als 10 h gegenüber  $t_d \leq 2$  h bei Verwendung komplexer Nährmedien [5]. Derartige Wachstumsraten sind insbesondere für Untersuchungen in kontinuierlicher Kultur sowie für industrielle Anwendungen zu gering. Daher ist die Entwicklung eines definierten Mediums auf der Basis möglichst weniger Bestandteile bei gleichzeitig ausreichend hoher Wachstumsrate notwendig.

### 2.4.1 Verbrauch von Aminosäuren im YS-Medium

Der Bedarf an Aminosäuren über der Zeit bei Kultivierung von *P. luminescens* in dem komplexen YS-Medium mit Hefeextrakt ist in Bild 2.9 zu erkennen. Zusätzlich sind die optische Dichte (OD) – die hier als proportional zu der Konzentration der Biomasse angesehen werden kann – und die Kohlendioxidproduktionsrate  $r_{\text{CO}_2}$  in der Reaktorabluft dargestellt. In Bild 2.10 sind die zugehörigen Konzentrationen von Saccharose und Glucose im Nährmedium dargestellt.<sup>(4)</sup>

Es sind jedoch nicht alle Aminosäuren aufgeführt. Cystein und Ornithin sind nicht im Medium nachweisbar. Die Konzentrationen von Aspartat, Arginin, Isoleucin, Lysin und Phenylalanin nehmen bis zum Ende des Wachstums bei  $t = 18$  h nicht signifikant ab. Im Gegensatz dazu sind die beiden Aminosäuren Serin und Glutamin bereits nach  $t = 8$  h bzw.  $t = 9.5$  h vollständig verbraucht. Zu diesen Zeitpunkten sind leichte Einbrüche in dem Verlauf der Kohlendioxidproduktionsrate erkennbar. Ein weiterer Einbruch ist nach  $t = 12.5$  h sichtbar, wenn Tyrosin und Prolin nahezu erschöpft sind.

Ein großer Einbruch in der Kohlendioxidproduktionsrate ist bei  $t = 14$  h zu erkennen. Dies fällt mit dem vollständigem Verbrauch von Glutaminsäure zusammen. Kurze Zeit später sind auch Threonin, Histidin und Valin sowie Glucose fast vollständig verbraucht. Dennoch wachsen die Bakterien weiter, bis auch Glycin und Alanin nicht mehr nachweisbar sind.

Dies macht deutlich, dass *P. luminescens* in dem komplexen YS-Medium auf der Basis von Glucose und Hefeextrakt viele der zur Verfügung stehenden Aminosäuren verbrauchen kann. Dies gilt nicht für Aspartat, Arginin, Isoleucin und Phenylalanin, die nach  $t = 18$  h mit nahezu gleichen Konzentrationen im Nährmedium vorliegen wie zu Beginn der Kultivierung. Dies legt nahe, dass vor allem Isoleucin und Aspartat

---

<sup>(4)</sup>Um die Übersichtlichkeit zu erhöhen sind hier die Bilder 2.3 und 2.4 der Seiten 27 bzw. 28 erneut wiedergegeben.

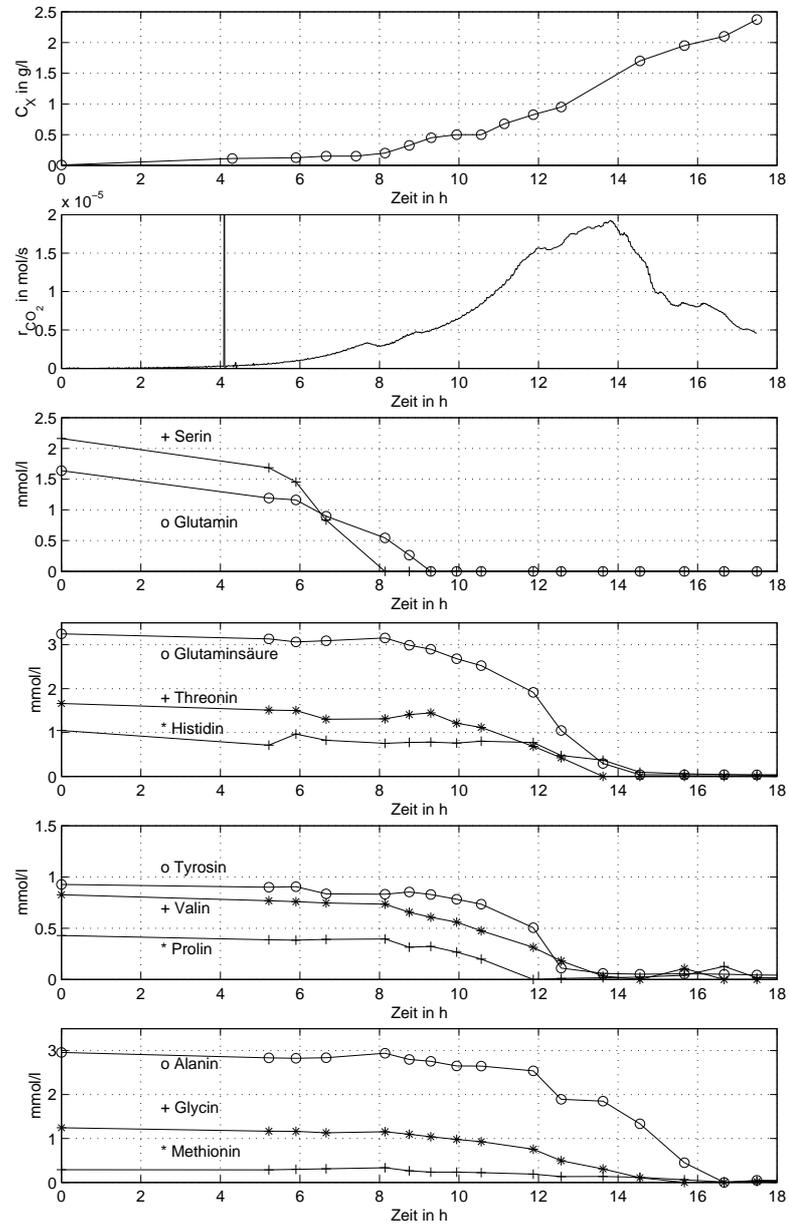


Bild 2.9: Konzentration der Aminosäuren über der Zeit bei Wachstum von *P. luminescens* im komplexen YS-Medium auf der Basis von Hefeextrakt (Exp. *YS\_Batch\_A*).

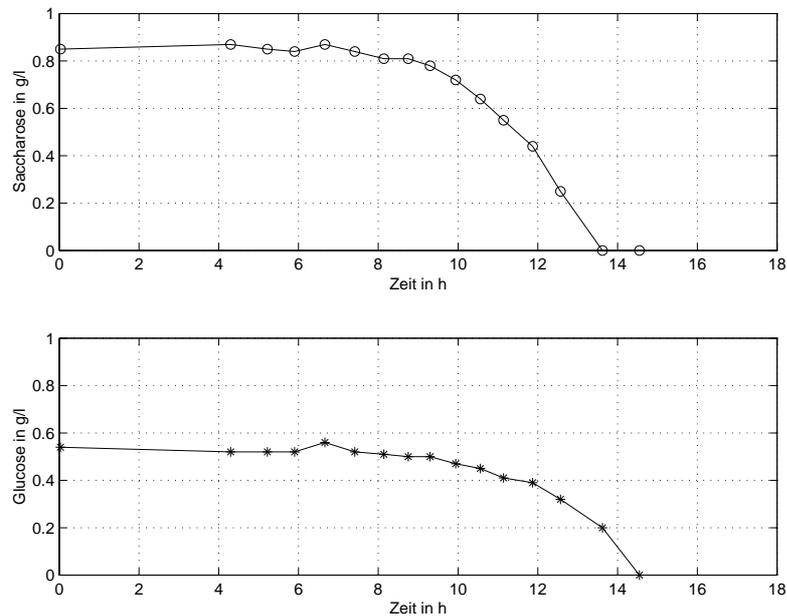


Bild 2.10: Konzentration von Saccharose und Glucose über der Zeit bei Wachstum von *P. luminescens* in dem komplexen YS-Medium

von *P. luminescens* synthetisiert werden können, da diese Aminosäuren in großen Mengen in kristallinen Einschlussproteinen (CIP) der Bakterien zu finden sind [4].

Ebenso wird deutlich, dass sich das Vorhandensein von Serin, Glutamin und Tyrosin günstig auf das Bakterienwachstum auswirkt. Besonders stark wirkt sich jedoch die Anwesenheit von Glutaminsäure auf die Wachstumsrate von *P. luminescens* aus.

## 2.4.2 Ersatz des Hefeextrakts durch Aminosäuren

Mit dem Ziel, den komplexen Bestandteil Hefeextrakt durch einzelne Aminosäuren zu ersetzen, wurde eine Reihe von Experimenten in 100 ml Schüttelkolben mit je 50 ml Basismedium durchgeführt. Das Basismedium enthielt (pro l destillierten Wassers): 0.55 g Glucose Monohydrat, 1.4 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 1.4 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.75 g  $\text{KCl}$ , 0.28 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 0.12 g  $\text{MgCl}_2$ , 0.05 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.0375 g  $\text{NaCl}$ , 0.0017 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1 ml Spurenelementelösung und 10 ml Vitaminlösung.

Die Spurenelemente-Lösung enthielt (pro l destillierten Wassers): 330 mg  $\text{ZnCl}_2$ , 100 mg  $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 238 mg  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 85 mg  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 121 mg  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 31 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$  und 5 ml  $\text{HCl}$  25 %.

Die Vitaminlösung enthielt (pro 10 ml destillierten Wassers): 5 mg Cyanocobalamin, 4 mg p-Aminobenzoesäure, 1 mg Biotin, 10 mg Nicotinsäure, 5 mg Calcium-(D+)-Pantothenat, 10 mg Thiaminchlorid-hydrochlorid.

Tabelle 2.3: Gehalt an Aminosäuren in den Experimenten in Schüttelkolben

Nr.	Beschreibung	Gehalt an Aminosäuren (in mmol/l)
1.1	AA 19	Ala 3 , Arg 1.5 , Asp 1, Gln 2 , Glu 3 , Gly 1.2 , His 0.7 , Ileu 1 , Leu 1.8 , Lys 1 , Met 0.4 , Orn 0.2 , Phe 1 , Pro 0.5 , Ser 2 , Thr 1 , Trp 0.2 , Tyr 0.7 , Val 0.7
1.2	AA 19 ohne Alanin, Glycin	Pro, Ser, Gln, Glu, Thr, His, Val, Asp, Arg, Met, Ileu, Leu, Phe, je 2.3 ; Trp, Tyr, Lys, Orn, je 1
1.3	1.2 ohne Asparagin, Leucin und Phenylalanin	Pro, Ser, Gln, Glu, Thr, His, Val, Arg, Met, Ileu, je 3 ; Trp, Tyr, Lys, Orn, je 1
1.4	1.3 ohne Arginin und Methionin	Pro, Ser, Gln, Glu, Thr, His, Val, Ileu, je 4 ; Trp, Tyr, Lys, Orn, je 1
2.1	AA 14	Pro, Ser, Gln, Glu, Thr, His, Val, Arg, Met, Ileu, je 3 ; Trp, Tyr, Lys, Orn, je 1
2.2	AA 14 ohne Lysin	Pro, Ser, Gln, Glu, Thr, His, Val, Arg, Met, Ileu, je 3 ; Trp, Tyr, Orn, je 1
2.3	AA 14 ohne Tyrosin	Pro, Ser, Gln, Glu, Thr, His, Val, Arg, Met, Ileu, je 3 ; Trp, Lys, Orn, je 1
2.4	AA 14 ohne Ornithin	Pro, Ser, Gln, Glu, Thr, His, Val, Arg, Met, Ileu, je 3 ; Trp, Tyr, Lys, je 1
2.5	AA 14 ohne Tryptophan	Pro, Ser, Gln, Glu, Thr, His, Val, Arg, Met, Ileu, je 3 ; Tyr, Lys, Orn, je 1
3.1	AA 6	Ser, Glu, Met, Thr, je 7; Tyr, Lys, je 1
3.2	AA 6 plus Histidin	Ser, Glu, Met, Thr, His, je 7; Tyr, Lys, je 1
3.3	AA 6 plus Histidin und Valin	Ser, Glu, Met, Thr, His, Val, je 7; Tyr, Lys, je 1

Die Kolben wurden gemäß Tab. 2.3 mit verschiedenen Aminosäuren vervollständigt. Vor der Sterilisation bei 121 °C für 30 min wurde der pH-Wert auf 7.0 eingestellt. Die Glucose und die Vitamine wurden nach der Sterilisation über einen Membranfilter (Porenweite 0,2  $\mu\text{m}$ ) zugegeben.

Die Kolben wurden mit je 1 % der Kulturflüssigkeit inokuliert. Die dazu verwendeten Vorkulturen wurden in Kolben mit dem Medium AA 19 für 24 h kultiviert. Die

Kolben wurden bei 25 °C inkubiert und mit 180 rpm geschüttelt (Schüttler Typ 3031, GFL, Deutschland). Es wurden nach  $t = 24$  h und nach  $t = 30$  h Proben entnommen und die optischen Dichte (OD) festgehalten.

Tabelle 2.4: optische Dichte (OD) bei 725 nm von Kulturen von *P. luminescens* in Medien mit unterschiedlichem Gehalt an Aminosäuren (s. Tab. 2.3) nach 24 h und 30 h Inkubation in Schüttelkolben.

Nr.	Beschreibung	OD nach 24 h	OD nach 30 h
1.1	AA 19	3	3.3
1.2	AA 19 ohne Alanin und Glycin	2.6	3.2
1.3	1.2 ohne Asparagin, Leucin und Phenylalanin	2.6	3.2
1.4	1.3 ohne Arginin und Methionin	1.5	2.7
2.1	AA 14	2.2	2.8
2.2	AA 14 ohne Lysin	1.4	2.3
2.3	AA 14 ohne Tyrosin	1.3	2.2
2.4	AA 14 ohne Ornithin	2.2	3.2
2.5	AA 14 ohne Tryptophan	2.4	3
3.1	AA 6	2	2.4
3.2	AA 6 plus Histidin	2.5	2.8
3.3	AA 6 plus Histidin und Valin	2.5	2.8

Die OD nach 24 h und 30 h nach der Inokulation in das Basismedium, das mit den verschiedenen Aminosäuren vervollständigt wurde ist in Tabelle 2.4 zusammengefasst. Falls zur Kultivierung von *P. luminescens* alle 19 Aminosäuren, die auch im Hefeextrakt enthalten sind (Medium AA 19), zur Verfügung stehen, wird eine OD von 3.3 nach  $t = 30$  h erreicht. Diese wird auch dann erreicht, falls Alanin, Glycin, Asparagin, Leucin und Phenylalanin nicht im Medium vorhanden sind (Medien 1.2 und 1.3). In dem Medium, in dem Arginin und Methionin fehlen (Medium 1.4), ist die gemessene OD nach  $t = 24$  h deutlich niedriger.

Im zweiten Satz von Experimenten in einem Medium mit 14 Aminosäuren (AA 14), die denen im Experiment 1.3 entsprechen liegt die erreichbare OD nach  $t = 24$  h bei 2.2. Diese ist dramatisch niedriger, falls Lysin oder Tyrosin entfernt werden (Medium 2.2 bzw. 2.3), ist aber nahezu identisch, falls Ornithin oder Tryptophan weggelassen werden (Medium 2.4 bzw. 2.5).

Im dritten Satz von Experimenten ist das Medium auf 6 Aminosäuren reduziert (AA

6), was sich in einem Abfall der OD nach  $t = 24$  h auf 2.0 bemerkbar macht. Durch Zugabe von Histidin (Medium 3.2) erhöht sich diese auf 2.5, während die Zugabe von Valin (Medium 3.3) keinen messbaren Effekt zeigt.

Diese Experimente decken lediglich einen kleinen Teil der denkbaren Kombinationen von Aminosäuren ab. Sie zeigen jedoch, dass es möglich ist, *P. luminescens* in einem definierten Nährmedium, das lediglich 7 Aminosäuren enthält, bei ausreichend hoher Wachstumsrate zu kultivieren. Bei den 7 Aminosäuren, die dem Basismedium aus Salzen, Vitaminen und Spurenelementen zugesetzt werden sollten, handelt es sich um Serin, Glutaminsäure, Methionin, Threonin, Histidin, Tyrosin und Lysin.

## 2.5 Modell des Wachstums im definierten Nährmedium (Amino-Modell)

Gegenstand dieses Abschnittes ist die Erarbeitung eines strukturierten Modells für den Biomasseaufbau und den Substratverbrauch bei Kultivierung von *Phototrhhabdus luminescens* in dem neu entwickelten definierten Medium (s. Abschnitt 2.4). Dieses wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit als *Amino-Modell* bezeichnet.

In dem, hinsichtlich der Komplexität stark reduzierten definierten Medium (Amino-Medium) ist eine Limitierung des Wachstums von *P. luminescens* zu beobachten, falls die Aminosäure Tyrosin in zu geringer Konzentration vorliegt [50]. Der Schwerpunkt der Modellierung liegt daher auf der mathematischen Beschreibung des Einflusses von Tyrosin auf das Wachstumsverhalten. Die Betrachtung von Tyrosin ist von Bedeutung, da diese Aminosäure nur in sehr geringen Konzentrationen von unter 2.2 mmol/l in dem wässrigen Nährmedium löslich ist. Eine kontinuierliche Zufuhr von Tyrosin während der Wachstumsphase zur Erzielung hoher Bakteriendichten ist unerlässlich.

Weitere zu bilanzierende Substanzen sind die Aminosäuren Serin und Glutaminsäure, deren Vorhandensein im Kulturmedium die Wachstumsrate ebenfalls deutlich heraufsetzt.

Das im folgenden aufgestellte Modell berücksichtigt den Verbrauch von Tyrosin und Glucose. Im Anschluss daran wird diese Modellstruktur auf den allgemeinen Fall für *N*-Substrate erweitert, das als Grundlage für zukünftige Arbeiten dienen kann.

### 2.5.1 Modellierung des Glucose- und Tyrosinbedarfs

Bei Abwesenheit von Tyrosin verringert sich die Wachstumsrate von *P. luminescens* erheblich. Zudem ist davon auszugehen, dass ein zusätzlicher Bedarf an Kohlenstoffquellen für die Synthese dieses wichtigen Bausteins entsteht.

Dieser Effekt ist zum Beispiel in Experiment *Amino\_Batch\_A* deutlich zu erkennen. Hier wurde das definierte Medium mit 5 g/l Glucose angesetzt. Eine Limitierung durch Mangel an Glucose ist daher erst zu einem sehr späten Zeitpunkt zu erwarten. Bis dahin sind bereits einige der Aminosäuren wie auch das Tyrosin verbraucht.

Die Ergebnisse des Experimentes sind in den Bildern 2.11 — 2.14 dargestellt. Neben der Biomasse und der optischen Dichte sind die Auswertung der Gasanalyse sowie die Konzentrationen der Substrate dargestellt. Anhand des Verlaufs der Sauerstoffverbrauchsrate  $r_{O_2}$  ist ein Einbruch der Wachstumsgeschwindigkeit bei  $t \approx 17$  h erkennbar. Zu diesem Zeitpunkt ist das im Medium vorgelegte Tyrosin vollständig verbraucht. Obwohl sich die Wachstumsrate der Bakterien stark verringert, ist ein Anstieg des Verbrauchs der Glucose zu beobachten. Für  $t < 17$  h ist weniger als 1 g Glucose notwendig um 1 g Biomasse aufzubauen. Nach dem Verbrauch von Tyrosin werden die restlichen 3.5 g/l Glucose in lediglich 2.2 g/l Biomasse umgesetzt.

Dieser Anstieg im Verbrauch von Glucose bei gleichzeitig verringerter Wachstumsgeschwindigkeit ist mit dem bisher vorgestellten unstrukturierten Modellansatz nicht beschreibbar. Im folgenden wird daher ein einfaches strukturiertes Modell vorgestellt, mit dem die beobachteten Phänomene mathematisch nachgebildet werden können.

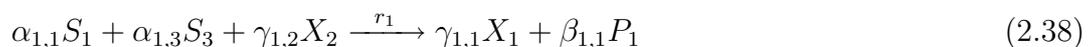
### 2.5.1.1 Stöchiometrische Betrachtung

Die im Kulturmedium vorhandene Glucose sei mit  $\tilde{S}_1$  und das im Medium vorliegende Tyrosin sei mit  $\tilde{S}_2$  bezeichnet. Die Stoffe innerhalb der Zelle sollen denen im Medium entsprechen, d. h.  $S_1 = \tilde{S}_1$  und  $S_2 = \tilde{S}_2$ .

Die biotische Phase bestehe aus den zwei Komponenten  $X_1$  und  $X_2$ . Die zweite Komponente  $X_2$  soll das zum Zellaufbau zur Verfügung stehende Tyrosin repräsentieren während  $X_1$  alle übrigen Bestandteile der biotischen Phase beinhaltet. Es kann davon ausgegangen werden, dass der Anteil von  $X_2$  an der Biomasse verschwindend gering ist, d. h.  $X_2 \ll 1$  und  $X_1 \approx 1$ .

Der beim Aufbau von Biomasse verbrauchte Sauerstoff sowie das produzierte Kohlendioxid sollen ebenfalls in die Modellierung eingehen. Der Sauerstoff wird als Substrat  $S_3$  angesehen, welches in ausreichender Menge im Nährmedium vorliegt. Ein Einfluss des Sauerstoffpartialdrucks  $p_{O_2}$  im Medium auf die Geschwindigkeiten der folgenden Reaktionen ist demnach vernachlässigbar. Das Kohlendioxid soll als Stoffwechselprodukt  $P_1$  eingehen und beim Abbau von Glucose unter Verbrauch von Sauerstoff entstehen.

Der Aufbau von Biomasse  $X_1$  erfolgt unter Verwendung des Bausteins Tyrosin  $X_2$  und dem Energieträger Glucose  $S_1$  sowie von Sauerstoff  $S_3$  mit der Reaktion



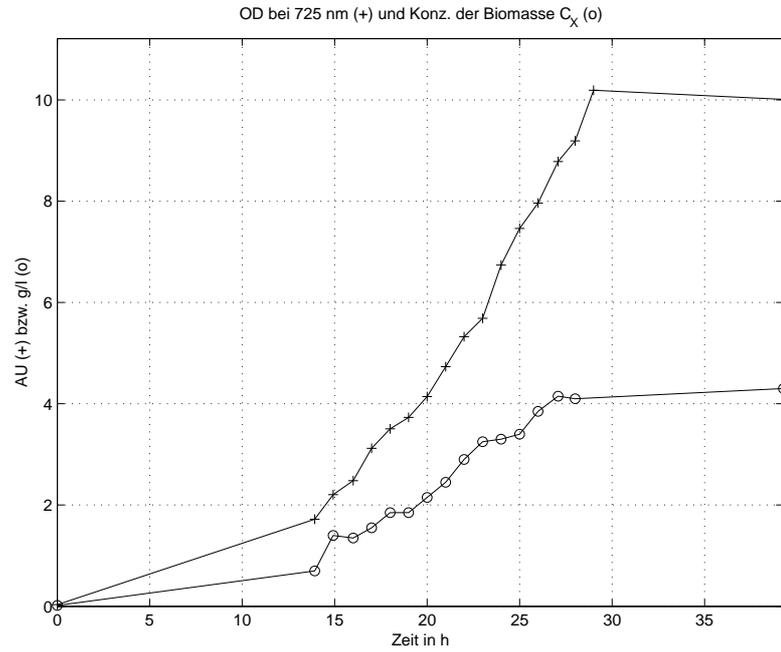


Bild 2.11: Exp. *Amino\_Batch\_A*: Optische Dichte (+) und Konzentration (in g/l) der Biomasse (o).

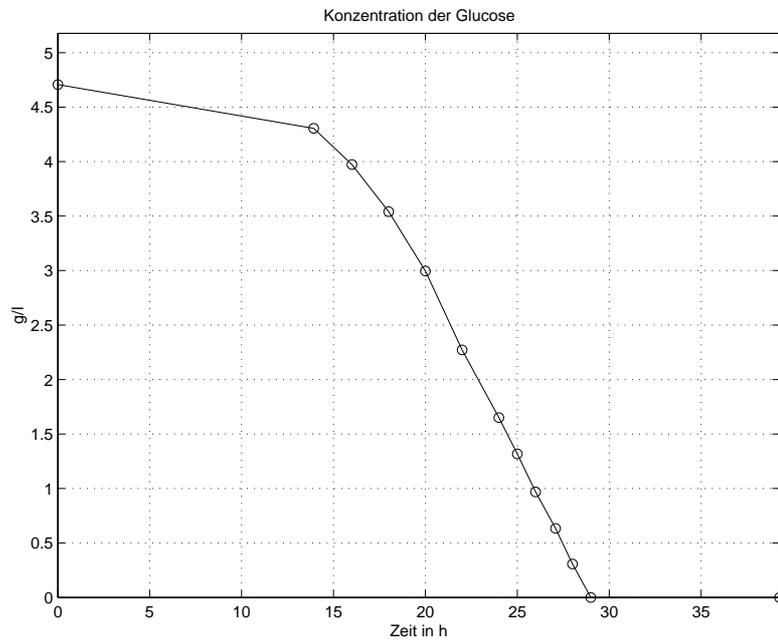


Bild 2.12: Exp. *Amino\_Batch\_A*: Konzentration (in g/l) der Glucose (o) im Kulturmedium.

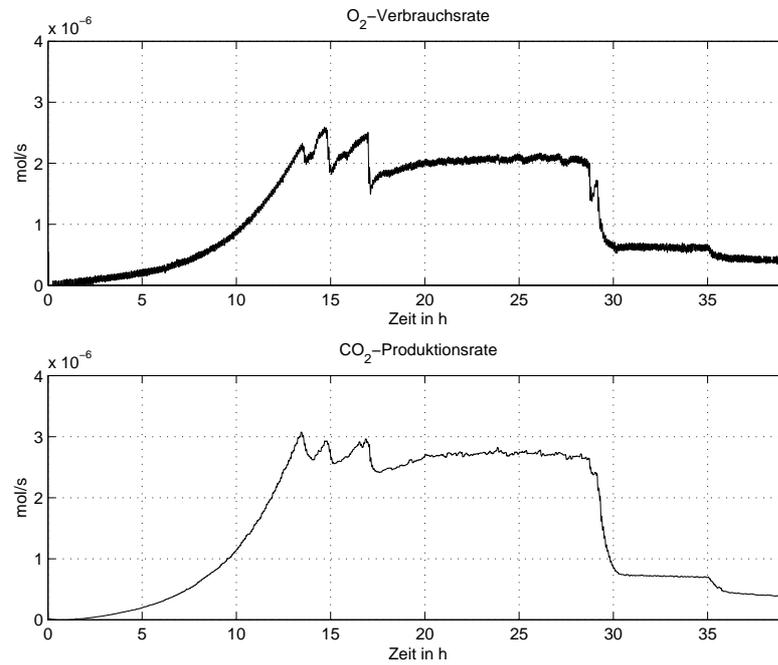


Bild 2.13: Exp. *Amino\_Batch\_A*: Sauerstoffverbrauchsrate (oben) und Kohlendioxidproduktionsrate (unten) in mol/s

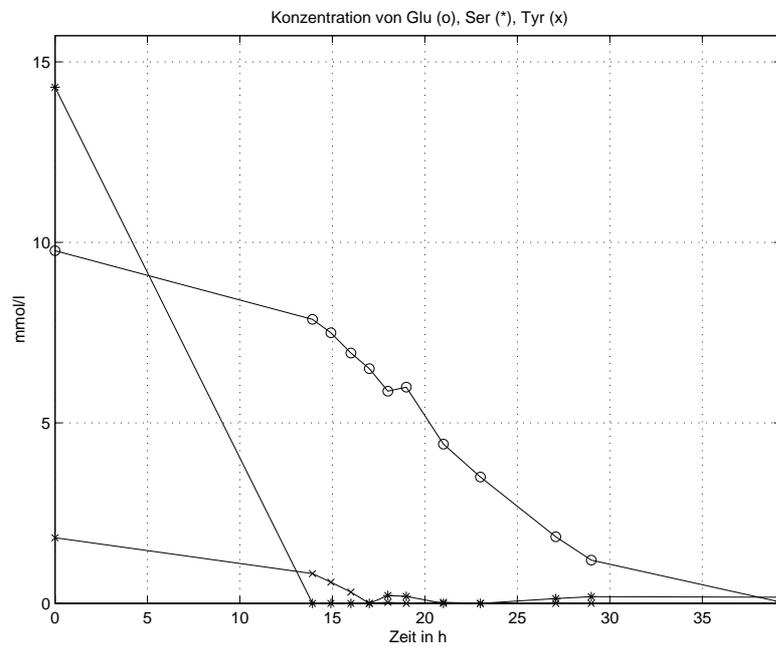


Bild 2.14: Exp. *Amino\_Batch\_A*: Konzentration (in mmol/l) an Glutaminsäure (o), Serin (\*) und Tyrosin (x)

Die Synthese von Tyrosin  $X_2$  ist ebenfalls unter Abbau von Glucose  $S_1$  möglich:

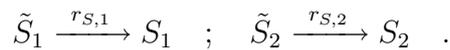


Für den Fall, dass aus dem Kulturmedium aufgenommenes Tyrosin  $S_2$  vorliegt, kann dieses als Baustein  $X_2$  verfügbar gemacht werden:

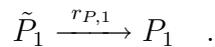


Die stöchiometrischen Koeffizienten der Reaktionen seien so gewählt, dass  $\alpha_{1,1} = \alpha_{2,1} = \alpha_{3,2} = -1$  gilt.<sup>(5)</sup>

Die Aufnahme der Substrate soll in zwei Reaktionen erfolgen bei denen keine Umwandlungen stattfinden:



Die Ausschleusung von  $\text{CO}_2$  in das Medium erfolge ebenfalls ohne Umwandlung:



Mit

$$\underline{S} := \begin{bmatrix} S_1 \\ S_2 \end{bmatrix}, \quad \tilde{\underline{S}} := \begin{bmatrix} \tilde{S}_1 \\ \tilde{S}_2 \end{bmatrix}, \quad \underline{P} := [P_1], \quad \tilde{\underline{P}} := [\tilde{P}_1] \quad \text{und} \quad \underline{X} := \begin{bmatrix} X_1 \\ X_2 \end{bmatrix}$$

ergeben sich die folgenden stöchiometrischen Matrizen:

$$\begin{aligned} A &= \begin{bmatrix} -1 & 0 & \alpha_{1,3} \\ -1 & 0 & \alpha_{2,3} \\ 0 & -1 & 0 \end{bmatrix}; & \Gamma &= \begin{bmatrix} \gamma_{1,1} & \gamma_{1,2} \\ 0 & \gamma_{2,2} \\ 0 & \gamma_{3,2} \end{bmatrix}; \\ B &= \begin{bmatrix} \beta_{1,1} \\ \beta_{2,1} \\ 0 \end{bmatrix}; & B_P &= 1 \\ A_S &= \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{bmatrix}; & \Gamma_S &= \Gamma_P = 0. \end{aligned}$$

<sup>(5)</sup>Diese Wahl der Koeffizienten erfolgt analog zu der Wahl der Koeffizienten für das YS-Modell. Dort ermöglicht sie den direkten Vergleich der Koeffizienten mit den Parametern aus den Arbeiten [53] und [28].

### 2.5.1.2 Reaktionskinetiken

Bei der Betrachtung der Tyrosinsynthese in dieser Form werden nicht die tatsächlichen zellinternen Regulationsmechanismen sondern lediglich stark vereinfachte Zusammenhänge nachgebildet.

Die Reaktionsgeschwindigkeit  $r_1$  für den Aufbau von Biomasse  $X_1$  in Reaktion (2.38) soll von der Glucosekonzentration  $C_{\tilde{S}_1}$  in der abiotische Phase und der Konzentration des als Baustein vorliegenden Tyrosins  $C_{X_2}$  abhängen

$$r_1 = r_{1,max} \cdot \frac{C_{\tilde{S}_1}}{K_{1,1} + C_{\tilde{S}_1}} \cdot \frac{C_{X_2}}{K_{1,2} + C_{X_2}} \quad (2.41)$$

Eine Synthese von zellinternem Tyrosin  $X_2$  unter Glucoseverbrauch soll nur bei geringer Konzentration von  $X_2$  erfolgen. Zusätzlich soll die Reaktion sich verlangsamen, wenn die Glucosekonzentration im Nährmedium zu gering wird.

Die Reaktionsgeschwindigkeit  $r_2$  hängt damit von  $C_{\tilde{S}_1}$  und  $C_{X_2}$  ab und ergibt sich zu

$$r_2 = r_{2,max} \cdot \frac{C_{\tilde{S}_1}}{K_{2,1} + C_{\tilde{S}_1}} \cdot \frac{K_{2,2}}{K_{2,2} + C_{X_2}} \quad (2.42)$$

Die Umwandlung des aus dem Medium aufgenommenen Tyrosins soll ebenfalls mit einer einfachen Enzymkinetik nach Monod nachgebildet werden. Auch diese Reaktion soll lediglich bei geringer Menge an  $X_2$  innerhalb der Zelle stattfinden.

$$r_3 = r_{3,max} \cdot \frac{C_{\tilde{S}_2}}{K_{3,1} + C_{\tilde{S}_2}} \cdot \frac{K_{3,2}}{K_{3,2} + C_{X_2}} \quad (2.43)$$

### 2.5.1.3 Differentialgleichungssystem

Bei Kultivierung von *P. luminescens* im definierten Medium sind genau wie bei Verwendung von komplexen Medien bisher keine verschiedenen morphologischen Formen der Bakterien innerhalb eines Bioreaktors aufgetreten. Daher ist hier ebenfalls ein un-segregiertes Modell ausreichend und lediglich die Konzentration  $C_{\tilde{X}}$  der insgesamt im Bioreaktor vorliegenden Biomasse mit der Wachstumsrate  $\mu$  zu betrachten.

Analog zu Gl. (2.22) ergibt sich aus den stöchiometrischen Gleichungen und den Reaktionsraten mit Hilfe der Beziehungen

$$\frac{dC_{\tilde{X}}}{dt} = \mu C_{\tilde{X}} \quad , \quad (2.44)$$

$$\frac{dC_{\tilde{S}}}{dt} = -r_S C_{\tilde{X}} \quad \text{und} \quad (2.45)$$

$$\frac{dC_{\tilde{P}}}{dt} = -r_P C_{\tilde{X}} \quad (2.46)$$

ein System gekoppelter Differentialgleichungen. Nach Gl. (2.10) (S. 21) gilt

$$\begin{aligned}\mu &= \underline{e}_L^T \Gamma^T \underline{r} = [1 \quad 1] \cdot \begin{bmatrix} \gamma_{1,1} & 0 & 0 \\ \gamma_{1,2} & \gamma_{2,2} & \gamma_{3,2} \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} r_1 \\ r_2 \\ r_3 \end{bmatrix} \\ &= (\gamma_{1,1} + \gamma_{1,2}) r_1 + \gamma_{2,2} r_2 + \gamma_{3,2} r_3 \approx (\gamma_{1,1} + \gamma_{1,2}) r_1 \quad .\end{aligned}$$

Die Näherung für  $\mu$  ist zulässig, da die Biomasse nahezu vollständig in  $X_1 \approx 1$  enthalten sein soll. Die Geschwindigkeiten, mit denen Tyrosin synthetisiert bzw. aufgenommen wird wirken sich daher nicht direkt aus. Allerdings besteht über die Abhängigkeit von  $r_1$  von  $C_{X_2}$  eine starke Kopplung der Wachstumsgeschwindigkeit mit der Tyrosinkonzentration im Medium.

Die Raten der Substrataufnahme folgen nach Gl. (2.18) (S. 22)

$$\begin{aligned}\underline{r}_S &\approx -A^T \underline{r} = - \begin{bmatrix} -1 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & -1 \\ \alpha_{1,3} & \alpha_{2,3} & 0 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} r_1 \\ r_2 \\ r_3 \end{bmatrix} \\ &= \begin{bmatrix} r_1 + r_2 \\ r_3 \\ -\alpha_{1,3} r_1 - \alpha_{2,3} r_2 \end{bmatrix} \quad .\end{aligned}$$

Für die CO<sub>2</sub>-Produktion gilt

$$\begin{aligned}\underline{r}_P &\approx -B^T \underline{r} = - [\beta_{1,1} \quad \beta_{2,1} \quad 0] \cdot \begin{bmatrix} r_1 \\ r_2 \\ r_3 \end{bmatrix} \\ &= -\beta_{1,1} r_1 - \beta_{2,1} r_2 \quad .\end{aligned}$$

#### 2.5.1.4 Modellparameter

Die Bestimmung der Parameter des hier entwickelten Modells für den Aufbau von Biomasse unter Verbrauch von Glucose und Tyrosin (s. Abschnitt 2.5.1.3) ist anhand von Mess- und Analysewerten möglich. Hierzu dienen exemplarisch die Daten des Batch-Experimentes *Amino-Batch-A*.

Die stöchiometrischen Parameter ergeben sich aus der Betrachtung des Bedarfs an Substrat (s. Bild 2.11 u. 2.12). So folgt aus dem Aufbau von Biomasse für die Zeit  $t < 17$  h – während die Tyrosinkonzentration ausreichen hoch ist – der Koeffizient

$$\gamma_{1,1} = \frac{C_{\bar{X}}(t = 17 \text{ h}) - C_{\bar{X},0}}{C_{\bar{S}_1}(t = 17 \text{ h}) - C_{\bar{S}_1,0}} \approx 1.6 \quad .$$

Da keine Messdaten über die interne Konzentration von  $C_{X_2}$  vorliegen können, ist  $\gamma_{1,2}$  nahezu frei wählbar. Es gelte

$$\gamma_{1,2} := -0.01 \cdot \gamma_{1,1} = -0.016 \quad .$$

Damit folgt aus Bild 2.14

$$\gamma_{3,2} = 0.01 \quad .$$

Die maximale Reaktionsrate  $r_{1,max}$  ergibt sich aus der nahezu konstanten Wachstumsrate der Bakterien während der ersten 12 h des Experimentes zu

$$r_{1,max} = 0.29 \text{ 1/s} \quad .$$

Die Reaktionsraten für die Tyrosinsynthese und -aufnahme seien etwa um den Faktor drei größer:

$$r_{2,max} = r_{3,max} = 1 \text{ 1/s} \quad .$$

Die Halbsättigungskonstanten  $K_{i,j}$  ergeben sich durch Minimierung der quadratischen Abweichung der simulierten Werte für die Substrat- und Biomassekonzentrationen von den gemessenen Daten. Auf die gleiche Weise ist der Parameter  $\alpha_{1,3}$  bestimmbar.

Die Messdaten zeigen keinen zusätzlichen Sauerstoffbedarf für die Tyrosinsynthese (s. Bild 2.13). Damit gelte

$$\alpha_{2,3} := 0 \quad .$$

Das Verhältnis des Sauerstoffbedarfs zur Kohlendioxidproduktion (RQ-Wert) ist bis zum vollständigen Verbrauch der Glucose im betrachteten Experiment nahezu konstant. Somit folgt

$$\beta_{1,1} = \frac{-\alpha_{1,3}}{0.8} \quad , \quad \beta_{2,1} = \frac{-\alpha_{2,3}}{0.8} \quad .$$

Zusammen mit den Anfangsbedingungen aus den Analysewerten ergeben sich die in Tabelle 2.5 aufgeführten Parameter des strukturierten Modells.

Eine Simulation der Differentialgleichungen des Modells ergibt eine gute Übereinstimmung mit den gemessenen Daten. Dies wird besonders bei der Betrachtung der

Tabelle 2.5: Parameter für das strukturierte Modell bei Berücksichtigung der Substrate Glucose  $S_1$  und Tyrosin  $S_2$

	stöchiometrisch		kinetisch		Anfangsbed.
$\alpha_{1,3}$	-0.136 mol·l/g	$r_{1,max}$	0.29 1/s	$C_{\tilde{X},0}$	0.017 g/l
$\alpha_{2,3}$	0 mol·l/g	$r_{2,max}$	1.0 1/s	$C_{X_2,0}$	0 %
$\beta_{1,1}$	85 mmol·l/g	$r_{3,max}$	1.0 1/s	$C_{\tilde{S}_1,0}$	4.7 g/l
$\beta_{2,1}$	0 mol·l/g	$K_{1,1}$	0.15 g/l	$C_{\tilde{S}_2,0}$	1.8 mmol/l
$\gamma_{1,1}$	1.6	$K_{1,2}$	0.001	$C_{\tilde{S}_3,0}$	1 M
$\gamma_{1,2}$	-0.016	$K_{2,1}$	0.15 g/l	$C_{\tilde{P},0}$	0 M
$\gamma_{2,2}$	0.014	$K_{2,2}$	$1.4 \cdot 10^{-5}$		
$\gamma_{3,2}$	0.01 mmol/g	$K_{3,1}$	0.1 mmol/l		
		$K_{3,2}$	$8.0 \cdot 10^{-4}$		

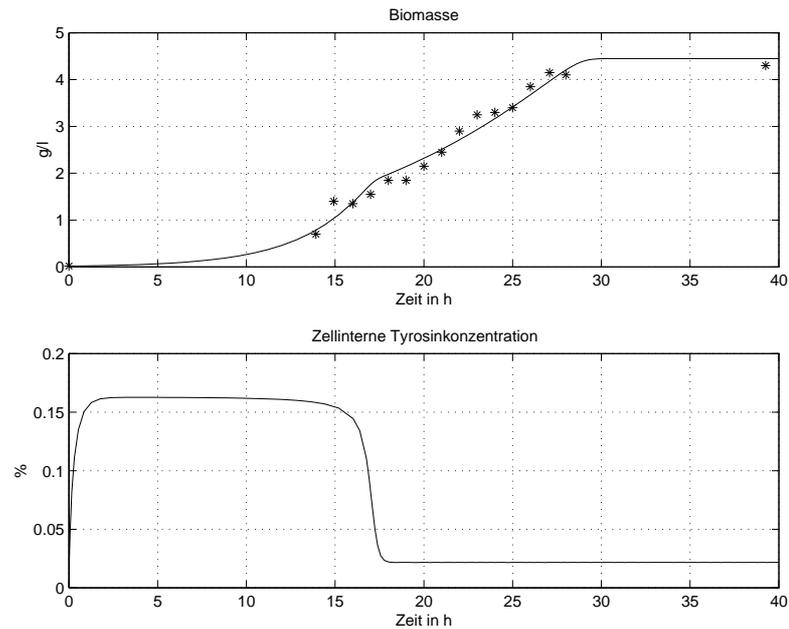


Bild 2.15: Vergleich der Konzentration der Biomasse  $C_{\tilde{X}}$  aus Exp. *Amino\_Batch\_A* mit Ergebnissen einer Simulation (-) des strukturierten Modells mit Parametern nach Tab. 2.5 sowie simulierter Anteil des innerhalb der Zelle verfügbaren Tyrosins  $C_{X_2}$

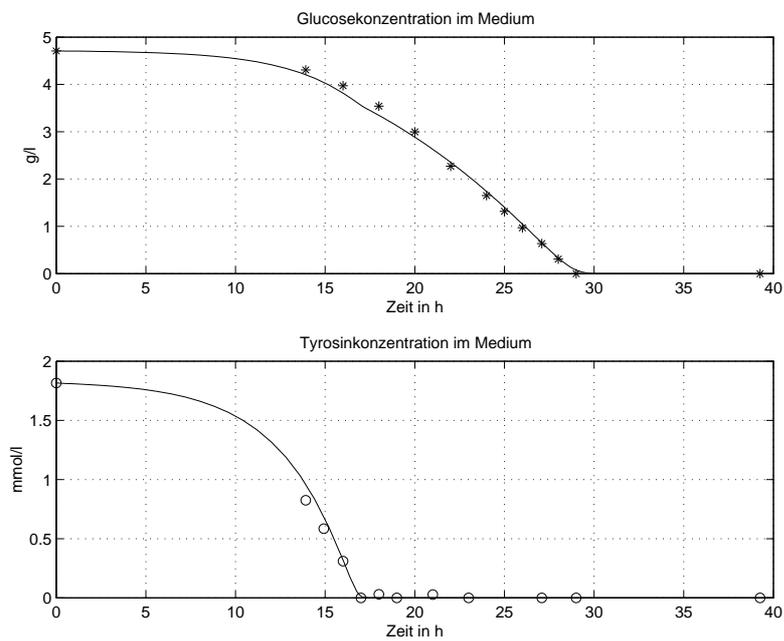


Bild 2.16: Vergleich der Konzentrationen der Glucose  $C_{\tilde{s}_1}$  (\*) und des Tyrosins (o) aus Exp. *Amino-Batch-A* mit Ergebnissen einer Simulation (-) des strukturierten Modells mit Parametern nach Tab. 2.5

Entwicklung der Biomasse in Bild 2.15 deutlich. Sowohl die Wachstumsgeschwindigkeit, als auch die Ausbeute stimmen überein. Dies gilt ebenso für die Abnahme der beiden Substrate Glucose und Tyrosin (s. Bild 2.16). Die Modellstruktur ist offensichtlich geeignet, den erhöhten Bedarf an Glucose nach Erschöpfung des Tyrosins bei gleichzeitig verringerter Wachstumsrate nachzubilden.

Der dazu angenommene Verlauf des Anteils des als Baustein innerhalb der Zelle vorliegenden Tyrosins  $C_{X_2}$  ist ebenfalls in Bild 2.15 dargestellt. Deutlich zu erkennen ist der über lange Zeiten konstante Verlauf, der sich durch die gegenüber der Wachstumsrate hohe Aufnahme- bzw. Syntheserate ergibt.

Der Vergleich der Simulation der Sauerstoffaufnahme und der Kohlendioxidproduktion mit den realen Werten ist zufriedenstellend, macht jedoch die Grenzen der Modellstruktur deutlich (s. Bild 2.17). Während der ersten 13 h des Experimentes ist die Übereinstimmung der Simulation mit den realen Daten bestechend gut. Die Wachstumsrate der Mikroorganismen und die simulierte Wachstumsgeschwindigkeit scheinen in dieser Phase übereinzustimmen. Die darauf folgenden Einbrüche in den Verbrauchs- und Produktionsraten sind jedoch nicht mit dem vorliegenden Modell beschreibbar. Offensichtlich sind zu diesen Zeitpunkten nicht im Modell berücksichtigte Substrate wie Serin verbraucht, wodurch sich eine Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit ergibt.

Erst der Einbruch bei  $t = 17$ , der mit dem vollständigen Verbrauch des Tyrosins zusammenfällt, ist auch in den simulierten Verläufen erkennbar. Die anschließende Wachstumsphase ist durch einen konstanten Verlauf der Respiration charakterisiert. Dies ist mit dem vorliegenden Modell ebenfalls nicht beschreibbar, da die Lösungen des Differentialgleichungssystems auch nach vollständigem Verbrauch von Tyrosin ein exponentielles Wachstum der Biomasse ergeben. Somit weisen die simulierten Verläufe deutlich höhere Werte auf als die auf Messwerten basierende Gasanalyse.

Wie schon in der Diskussion des unstrukturierten Modells für das Wachstum auf Hefeextrakt angesprochen, ist in der Modellvorstellung kein Wachstum und damit keine Respiration der Mikroorganismen ohne Kohlenstoffquelle möglich. In den realen Daten ist jedoch auch ohne Glucose im Medium eine geringe Stoffwechselaktivität erkennbar, die jedoch zu keiner merklichen Erhöhung der Biomasse führt. Interessant ist der sichtbare Abfall der Respiration für  $t > 35$  h, der vermutlich auf den vollständigen Verbrauch der Glutaminsäure zurückzuführen ist (s. Bild 2.14 auf S. 43).

Die Simulationsstudie macht deutlich, dass die angenommene Modellstruktur mit der Berücksichtigung von Tyrosin und Glucose geeignet ist, die wesentlichen Effekte zu beschreiben. Eine Verfeinerung der Modellvorstellung, d. h. die Einbeziehung weiterer Substrate erscheint jedoch sinnvoll. Insbesondere die Verwendung der Messdaten aus der Gasanalyse in modellgestützten Beobachterverfahren erfordert eine umfassendere

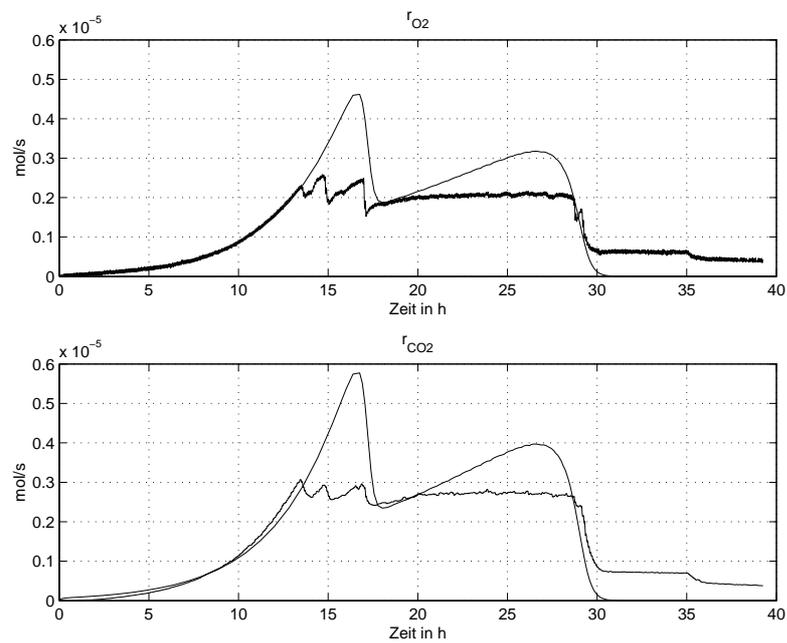


Bild 2.17: Vergleich der Sauerstoffverbrauchsrate  $r_{O_2}$  und Kohlendioxidproduktionsrate  $r_{CO_2}$  aus Exp. *Amino-Batch-A* mit Ergebnissen einer Simulation (-) des strukturierten Modells mit Parametern nach Tab. 2.5

Modellvorstellung. Der folgende Abschnitt behandelt die Erweiterung der Modellgleichungen auf  $N$ -Substrate. Die Bestimmung der Parameter des erweiterten Modells erfordert jedoch eine Reihe weiterer Experimente und sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

## 2.5.2 Modell für $N$ Substrate

Nicht nur die Abwesenheit von Tyrosin setzt die Wachstumsrate von *P. luminescens* deutlich herab. Auch das Fehlen einer oder mehrerer der übrigen 6 Aminosäuren verlangsamt den Aufbau von Biomasse. Dies ist nicht nur an den in Abschnitt 2.4 beschriebenen Experimenten in Schüttelkolben erkennbar, sondern wird auch in Batch-Experimenten deutlich. Zum Beispiel ist in Experiment *Amino\_Batch\_A* (s. Bild 2.11 — 2.14, S. 42ff) bei  $t \approx 13$  h ein Einbruch in der Sauerstoffverbrauchsrate und damit der Wachstumsrate sichtbar, der mit großer Wahrscheinlichkeit auf einen Mangel an Serin zurückzuführen ist. Um diesen und ähnliche Effekte zu modellieren, soll das im vorigen Abschnitt beschriebenen Modell auf den allgemeinen Fall von  $N$  Substraten erweitert werden.

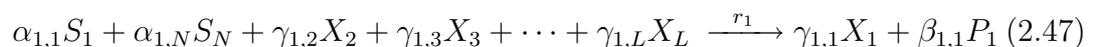
### 2.5.2.1 Stöchiometrische Betrachtung

Die im Kulturmedium vorhandene Glucose sei weiterhin mit  $\tilde{S}_1$  bezeichnet.  $\tilde{S}_i$  mit  $i = 2 \dots N - 1$  sollen die übrigen, im Medium vorliegenden Substrate repräsentieren. Die Stoffe innerhalb der Zelle sollen denen im Medium entsprechen, d. h.  $S_1 = \tilde{S}_1$  und  $S_i = \tilde{S}_i$ .

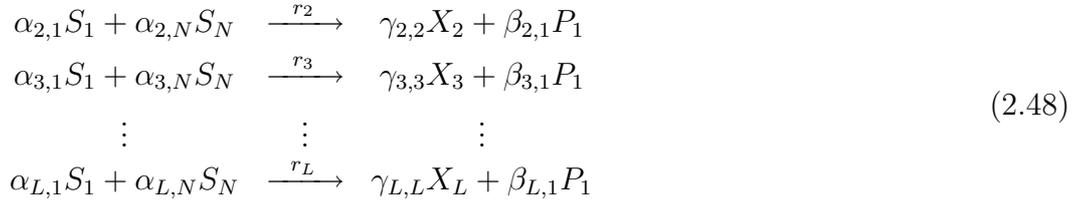
Die biotische Phase bestehe aus den  $L = N - 1$  Komponenten  $X_1$  und  $X_i$  ( $i = 2 \dots L$ ). Die Komponenten  $X_i$  sollen die für den Zellaufbau zur Verfügung stehenden Substrate repräsentieren während  $X_1$  alle übrigen Bestandteile der biotischen Phase beinhaltet. Es kann davon ausgegangen werden, dass der jeweilige Anteil von  $X_i$  an der Biomasse verschwindend gering ist, d. h.  $X_i \ll 1$  und  $X_1 \approx 1$ .

Der zum Wachstum benötigte Sauerstoff soll als Substrat  $S_N$  und das dabei entstehende Kohlendioxid als Stoffwechselprodukt  $P_1$  eingehen.

Der Aufbau von Biomasse erfolgt unter Verwendung der einzelnen Bausteine, des Energieträgers Glucose und des Sauerstoff mit der Reaktion



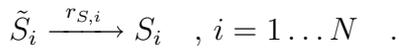
Die Synthese der Bausteine  $X_i$  ist ebenfalls unter Abbau von Glucose möglich:



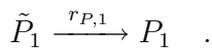
Für den Fall, dass aus dem Kulturmedium aufgenommene Substrate vorliegen, können diese als Bausteine  $X_i$  verfügbar gemacht werden:



Die stöchiometrischen Koeffizienten der Reaktionen seien so gewählt, dass  $\alpha_{j,i} = -1$  gilt (mit  $j = 1 \dots 2L - 1$  und  $i = 1 \dots L$ ). Die Aufnahme der Substrate soll in  $N$  Reaktionen erfolgen bei denen keine Umwandlungen stattfinden:



Die Ausschleusung von  $\text{CO}_2$  in das Medium erfolge ebenfalls ohne Umwandlung:



Mit

$$\underline{S} := \begin{bmatrix} S_1 \\ S_2 \\ \vdots \\ S_N \end{bmatrix}, \quad \tilde{\underline{S}} := \begin{bmatrix} \tilde{S}_1 \\ \tilde{S}_2 \\ \vdots \\ \tilde{S}_N \end{bmatrix}, \quad \underline{X} := \begin{bmatrix} X_1 \\ X_2 \\ \vdots \\ X_N \end{bmatrix}$$

und

$$\underline{P} := [P_1], \quad \tilde{\underline{P}} := [\tilde{P}_1]$$

ergeben sich die folgenden stöchiometrischen Matrizen:

$$\begin{aligned}
 A &= \begin{bmatrix} -1 & 0 & 0 & \cdots & 0 & \alpha_{1,N} \\ -1 & 0 & 0 & \cdots & 0 & \alpha_{2,N} \\ \vdots & \vdots & \vdots & & \vdots & \vdots \\ -1 & 0 & 0 & \cdots & 0 & \alpha_{L,N} \\ 0 & -1 & 0 & \cdots & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & \cdots & 0 & 0 \\ \vdots & \vdots & \vdots & & \vdots & \vdots \\ 0 & 0 & 0 & \cdots & -1 & 0 \end{bmatrix}; B = \begin{bmatrix} \beta_{1,1} \\ \beta_{2,1} \\ \vdots \\ \beta_{L,1} \\ 0 \\ 0 \\ \vdots \\ 0 \end{bmatrix} \\
 \Gamma &= \begin{bmatrix} \gamma_{1,1} & \gamma_{1,2} & \gamma_{1,3} & \cdots & \gamma_{1,L} \\ 0 & \gamma_{2,2} & 0 & \cdots & 0 \\ 0 & 0 & \gamma_{3,3} & \cdots & 0 \\ \vdots & \vdots & \vdots & & \vdots \\ 0 & 0 & 0 & \cdots & \gamma_{L,L} \\ 0 & \gamma_{L+1,2} & 0 & \cdots & 0 \\ 0 & 0 & \gamma_{L+2,3} & \cdots & 0 \\ \vdots & \vdots & \vdots & & \vdots \\ 0 & 0 & 0 & \cdots & \gamma_{2L-1,L} \end{bmatrix}; \\
 A_S &= \begin{bmatrix} 1 & 0 & \cdots & 0 \\ 0 & 1 & \cdots & 0 \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ 0 & 0 & \cdots & 1 \end{bmatrix}; B_P = 1; \Gamma_S = \Gamma_P = 0.
 \end{aligned}$$

### 2.5.2.2 Reaktionskinetiken

Die Reaktionsgeschwindigkeit  $r_1$  für den Aufbau von Biomasse  $X_1$  in Reaktion (2.47) soll analog zu (2.41) von der Glucosekonzentration  $C_{\tilde{S}_1}$  in der abiotische Phase und der Konzentration der als Bausteine vorliegenden Substrate  $C_{X_i}$  abhängen

$$r_1 = r_{1,max} \cdot \frac{C_{\tilde{S}_1}}{K_{1,1} + C_{\tilde{S}_1}} \cdot \frac{C_{X_2}}{K_{1,2} + C_{X_2}} \cdots \frac{C_{X_L}}{K_{1,L} + C_{X_L}}. \quad (2.50)$$

Eine Synthese von  $X_i$  ( $i = 1 \dots L$ ) unter Glucoseverbrauch soll nur bei geringer Konzentration  $C_{X_i}$  innerhalb der biotischen Phase erfolgen.

Die Reaktionsgeschwindigkeiten  $r_i$  hängen daher von  $C_{\tilde{X}_i}$  selbst sowie der Glucosekonzentration  $C_{S_1}$  ab und ergeben sich zu

$$r_i = r_{i,max} \cdot \frac{C_{\tilde{S}_1}}{K_{i,1} + C_{\tilde{S}_1}} \cdot \frac{K_{i,2}}{K_{i,2} + C_{X_i}}, \quad (2.51)$$

mit  $i = 2 \dots L$ .

Die Umwandlung der aus dem Medium aufgenommenen Substrate soll ebenfalls mit einer einfachen Enzymkinetik nach Monod nachgebildet werden. Auch diese Reaktion soll lediglich bei geringer Menge an  $X_i$  innerhalb der Zelle stattfinden.

$$r_{L+i-1} = r_{L+i-1,max} \cdot \frac{C_{\tilde{S}_i}}{K_{L+i-1,1} + C_{\tilde{S}_i}} \cdot \frac{K_{L+i-1,2}}{K_{L+i-1,2} + C_{X_i}} \quad , \quad (2.52)$$

mit  $i = 2 \dots L$ .

### 2.5.2.3 Differentialgleichungssystem

Auch hier wird von einem unsegregierten Modell ausgegangen, bei dem die insgesamt im Bioreaktor vorliegenden Biomasse mit der Konzentration  $C_{\tilde{X}}$  und der Wachstumsrate  $\mu$  zu betrachten ist.

Analog zu Gl. (2.22) ergibt sich aus den stöchiometrischen Gleichungen und den Reaktionsraten mit Hilfe der Beziehungen

$$\frac{dC_{\tilde{X}}}{dt} = \mu C_{\tilde{X}} \quad , \quad (2.53)$$

$$\frac{dC_{\tilde{S}}}{dt} = -r_S C_{\tilde{X}} \quad \text{und} \quad (2.54)$$

$$\frac{dC_{\tilde{P}}}{dt} = -r_P C_{\tilde{X}} \quad (2.55)$$

ein System gekoppelter Differentialgleichungen.

Nach Gl. (2.10) (S. 21) gilt

$$\begin{aligned} \mu &= \underline{e}_L^T \Gamma^T r \\ &= r_1 \cdot \sum_{i=1}^L \gamma_{1,i} + \sum_{i=1}^L (\gamma_{i,i} \cdot r_i) + \sum_{i=1}^L (\gamma_{L+1-i,i} \cdot r_{L+1-i}) \\ &\approx r_1 \cdot \sum_{i=1}^L \gamma_{1,i} \quad . \end{aligned}$$

Wie zuvor ist die Näherung für  $\mu$  zulässig, da die Biomasse nahezu vollständig in  $X_1 \approx 1$  enthalten sein soll. Die Geschwindigkeiten, mit denen Substrate synthetisiert bzw. aufgenommen werden, wirken sich nicht direkt aus. Allerdings besteht über die Abhängigkeit von  $r_1$  von  $C_{X_i}$  ( $i = 2 \dots L$ ) eine starke Kopplung der Wachstumsgeschwindigkeit mit den Substratkonzentrationen im Medium.

Die Raten der Substrataufnahme folgen nach Gl. (2.18) (S. 22)

$$\underline{r}_S \approx -A^T \underline{r} = \begin{bmatrix} \sum_{i=1}^L r_i \\ r_{L+1} \\ \vdots \\ r_{2L-1} \\ -\sum_{i=1}^L (\alpha_{i,N} \cdot r_i) \end{bmatrix} .$$

Für die CO<sub>2</sub>-Produktion gilt

$$\begin{aligned} \underline{r}_P \approx -B^T \underline{r} &= -[\beta_{1,1} \quad \beta_{2,1} \quad \dots \quad \beta_{L,1} \quad 0 \quad \dots \quad 0] \cdot \begin{bmatrix} r_1 \\ r_2 \\ \vdots \\ r_{2L-1} \end{bmatrix} \\ &= -\beta_{1,1} r_1 - \beta_{2,1} r_2 - \dots - \beta_{L,1} r_L . \end{aligned}$$

Eine Parameteridentifikation für andere als die drei Substrate Glucose, Tyrosin und Sauerstoff ist anhand der für diese Arbeit zur Verfügung stehenden Experimente nicht möglich. Eine interessante Erweiterung, die in nachfolgenden Arbeiten betrachtet werden könnte, stellt die Berücksichtigung der Aminosäuren Serin und Glutaminsäure dar. Ebenso wichtig ist die Untersuchung der von *P. luminescens* gebildeten Stoffwechselprodukte. Dies gilt vor allem für die Berücksichtigung der für die Symbiose zwischen Bakterien und Nematoden wichtigen Produkte, zum Beispiel der Einschlusskörper (CIP).

# Kapitel 3

## Online-Messtechnik

### 3.1 Einführung

Die Erfassung charakteristischer Größen eines biotechnologischen Prozesses online durchzuführen ist oft mit einem großen Aufwand verbunden und in einigen Fällen sogar überhaupt nicht möglich. Die zahlreichen hierzu einsetzbaren Messsysteme und Verfahren lassen sich generell in vier Gruppen einteilen:

#### *Klassische Prozesssensorsysteme*

Hierunter fallen die in der biologischen und chemischen Verfahrenstechnik bewährten Inline-Prozesssensoren. Sie gehören zur Standardausrüstung von Bioreaktoren und umfassen unter anderem Sonden für Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffpartialdruck, Trübung sowie Messsysteme für Sauerstoff- und Kohlendioxidgehalt in der Zu- und Abluft der Bioreaktoren. Die während der Kultivierung von *P. luminescens* eingesetzten Systeme sind in Abschnitt 1.3 und [53] detailliert beschrieben. Durch deren Einbindung in ein Prozessleitsystem stehen die Messwerte online für eine weitere Verarbeitung, zum Beispiel für die modellgestützte Gasanalyse 3.2.3, zur Verfügung.

#### *Biosensoren*

Bei Biosensoren werden die biochemischen Eigenschaften eines Substrates (Rezeptor) zur Messung und Detektion biotechnologischer Größen ausgenutzt. Neben dem biochemischen Rezeptor beinhalten sie in der Regel einen Wandler, um die biologische Reaktion in ein messbares physikalisches Signal umzuwandeln.

Als Rezeptor kommen aufgrund ihrer Selektivität häufig Enzyme zum Einsatz. Es gibt allerdings auch Rezeptoren auf der Basis von Mikroorganismen, Antikörpern, Nucleinsäuren und pflanzlichen oder tierischen Zellen.

Wesentliche Nachteile der meisten Biosensoren sind eine zu geringe Standzeit und mangelnde Temperaturbeständigkeit. Ein in-situ Einsatz dieser System unter sterilen

Bedingungen ist daher kaum möglich. Sie eignen sich jedoch als Detektoren in automatisierten Analysesystemen, zum Beispiel Fließ-Injektions-Analysesystemen (FIA). Bei der Kultivierung von *P. luminescens* kamen bereits Biosensoren auf der Basis des Enzyms Glucoseoxidase in einem FIA-System zum Einsatz [53].

### *Automatisierte Analysesysteme*

Eine große Zahl von Prozessgrößen ist nur mit Hilfe aufwendiger Analyseverfahren bestimmbar. Dies ist insbesondere bei der Bestimmung der Substrat- und Produktkonzentrationen biotechnologischer Prozesse der Fall. Selbst wenn bereits Analysemethoden, zum Beispiel chromatographische Verfahren wie HPLC (Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie) oder GC (Gaschromatographie) zu einer offline-Bestimmung etabliert sind, bestehen zum Teil große Schwierigkeiten bei der online-Anbindung an den biotechnologischen Prozess. Besonders hervorzuheben ist dabei die Problematik der Probenahme und Filterung sowie lange Analysezeiten.

Die Anbindung eines Online-Glucose-Analysesystems (OLGA) an den betrachteten Prozess ist in [53] beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine HPLC-Anlage zur Analyse des Gehalts an Kohlehydraten und Aminosäuren der Kulturflüssigkeit online an den Prozess gekoppelt.

### *Softwaresensoren*

Eine elegante Möglichkeit zur Bestimmung schwer oder überhaupt nicht zugänglicher Messgrößen ergibt sich durch den Einsatz modellgestützter Verfahren. Hierbei ist dem realen Prozess ein Modell parallel geschaltet, das über geeignete Bewertungsfunktionen mit Messwerten aus dem realen Prozess diesem angeglichen werden kann. Ein Beispiel hierfür ist der in Abschnitt 3.3 und [49] beschriebene Einsatz eines erweiterten Kalman-Filters zur Kombination der Messgrößen aus der automatisierten Analytik und den Prozesssensoren.

## **3.2 Messtechnik bei der Kultivierung von *P. luminescens***

### **3.2.1 Bestimmung der Biomasse**

Die optische Dichte (OD) der Kulturflüssigkeit stellt ein Maß für die enthaltene Biomasse dar. Bei geeigneter Verdünnung der Proben ergibt sich ein linearer Zusammenhang zwischen der bei einer Wellenlänge von 725 nm gemessenen  $OD_{725\text{ nm}}$

und der Konzentration der Biomasse [53]. Aus den Experimenten ergibt sich der Zusammenhang

$$C_{\bar{X}} = 0.47 \frac{\text{g}}{\text{l}} \cdot \text{OD}_{725 \text{ nm}} \quad .$$

Im Gegensatz zur Biotrockenmasse, aus der sich  $C_{\bar{X}}$  berechnen lässt, ist die OD zur Laufzeit des Prozesses mit Hilfe einer Trübungssonde sogar online bestimmbar.

Die Trübungssonde taucht direkt in die Kulturflüssigkeit ein und liefert kontinuierlich Messwerte für die Trübung im Bioreaktor. Die Messung der Trübung ist jedoch durch Blasenbildung und Turbulenzen stark gestört. Damit ist der Messwert nicht nur von der Biomasse und der Trübung durch feste Medienbestandteile sondern auch von der Begasung und dem Strömungsprofil des verwendeten Bioreaktors abhängig. Für unterschiedliche Prozessumgebungen und Kultivierungsbedingungen ist daher jeweils eine Kalibrierung anhand offline gemessener Daten erforderlich [19].

Die größte Schwierigkeit liegt jedoch in der Tatsache, dass das Medium vor der Messung nicht verdünnt werden kann. Dadurch verringert sich die Auflösung der Trübungsmessung bei hohen Konzentrationen der Biomasse erheblich. Die Umrechnung dieser nichtlinearen Kennlinie erfolgt mit Polynomen dritter Ordnung und ist direkt in die Auswertelektronik des bei der Kultivierung von *P. luminescens* verwendeten Gerätes integriert.

### 3.2.2 Bestimmung der Substratkonzentrationen

Die Substratkonzentrationen stellen wesentliche, das Wachstum der Mikroorganismen beeinflussende Prozessgrößen dar. Ihre Bestimmung ist jedoch aufwendig und nur bedingt online durchführbar. Hierzu erfolgt die sterile Entnahme von Proben über ein Membranfilter (Porenweite  $0.2 \mu\text{m}$ ) und anschließende Auswertung mit Hilfe einer automatisierten HPLC-Anlage (Hochdruck-Flüssigchromatographie). Die dabei verwendeten Analysemethoden und Geräte unterscheiden sich nicht von den in Abschnitt 1.3.4 aufgeführten offline-Verfahren.

Bei diesen Verfahren erfolgt eine zeitliche Auftrennung der einzelnen Medienbestandteile in der zu untersuchenden Probe über Trennsäulen. Dies bedingt lange Laufzeiten und Spülzyklen, so dass nur sehr geringe Abtastraten zu realisieren sind. Eine Bestimmung der Glucosekonzentration ist damit nur alle 30 bis 60 min durchführbar. Eine Analyse aller Aminosäuren erfordert inklusive Aufbereitung der Proben nahezu 130 min.<sup>(1)</sup>

---

<sup>(1)</sup>Diese Zeiten ließen sich durch eine Reduktion der Trennleistung des HPLC-Systems, zum Beispiel durch Verkürzen der Säulenlänge verkleinern. Dies reduziert jedoch die Auflösung und Genauigkeit der Messung deutlich.

### 3.2.3 Analyse der Zu- und Abluft der Kultur

Neben den Messdaten für die optische Dichte und für die Substratkonzentrationen sollen auch die Analysen des Sauerstoff- und Kohlendioxidgehalts in Zu- und Abluft als Informationsquelle genutzt werden, da diese einen Indikator für die Stoffwechsellaktivität der Bakterien darstellen.

#### 3.2.3.1 Messung der Kohlendioxid-Produktion

Die Kohlendioxid-Produktionsrate kann unter Berücksichtigung weiterer Messdaten aus dem  $\text{CO}_2$ -Gehalt der Zu- und Abluft bestimmt werden. K. Lebert entwickelt in [28] ein Messmodell aus der Betrachtung der Flüssig- und Gasphase sowie der Phasengrenze. Daraus werden die für diese Arbeit notwendigen Ergebnisse im folgenden kurz zusammengefasst.

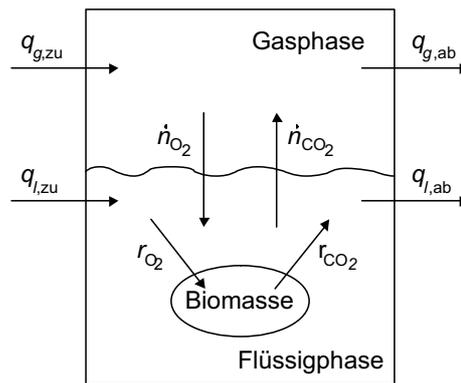


Bild 3.1: Austauschströme zwischen den Phasen

Quelle: Lebert, [28]

Bild 3.1 zeigt die wichtigsten Austauschströme zwischen der gasförmigen, der flüssigen und der biotischen Phase. Wie in dem Bild angedeutet, können die Kohlendioxid-Produktionsrate  $r_{\text{CO}_2}$  und die Sauerstoff-Verbrauchsrate  $r_{\text{O}_2}$  aus Bilanzen von Austauschströmen berechnet werden.

$$r_{\text{CO}_2} = q_{l,zu}[\text{CO}_2]_l \left( 1 + \frac{K_1}{[\text{H}^+]} + \frac{K_1 K_2}{[\text{H}^+]^2} \right) + \dot{n}_{\text{CO}_2} - V_l \frac{d[\text{CO}_2]_l}{dt} \quad (3.1)$$

$$r_{\text{O}_2} = -q_{l,zu}[\text{O}_2]_l + \dot{n}_{\text{O}_2} - V_l \frac{d[\text{O}_2]_l}{dt} \quad (3.2)$$

Dabei ist der pH-Wert durch die Konzentration der  $H^+$ -Ionen

$$[H^+] = 10^{-\text{pH}+3} \frac{\text{mol}}{\text{m}^3}$$

berücksichtigt. Für die Dissoziation von Kohlendioxid in Wasser lauten die Dissoziationskonstanten

$$K_1 = 4.3 \cdot 10^{-4} \frac{\text{mol}}{\text{m}^3} \quad ; \quad K_2 = 4.67 \cdot 10^{-8} \frac{\text{mol}}{\text{m}^3} \quad .$$

Da dem Bioreaktor keine Flüssigkeit zugeführt wird, vereinfachen sich die Gleichungen (3.1) und (3.2) im Batch- bzw. Fed-Batch-Betrieb zu

$$r_{\text{CO}_2} = \dot{n}_{\text{CO}_2} - V_l \frac{d[\text{CO}_2]_l}{dt} \quad (3.3)$$

$$r_{\text{O}_2} = \dot{n}_{\text{O}_2} - V_l \frac{d[\text{O}_2]_l}{dt} \quad (3.4)$$

Zur Berechnung von  $r_{\text{CO}_2}$  und  $r_{\text{O}_2}$  müssen die Ströme durch die Phasengrenze  $\dot{n}_{\text{CO}_2}$  und  $\dot{n}_{\text{O}_2}$ , die Konzentrationen in der Flüssigphase  $[\text{CO}_2]_l$  und  $[\text{O}_2]_l$  bzw. deren Ableitungen sowie das Volumen der Flüssigphase  $V_l$  bestimmt werden.

### 3.2.3.2 Konzentrationen in der Flüssigphase

Die Konzentration an Sauerstoff erhält man über die Messung des Sauerstoffpartialdrucks in der Flüssigkeit

$$[\text{O}_2]_l = \frac{p_{\text{O}_2}}{\tilde{H}_{\text{O}_2}} p_{g,\text{cal}} \tilde{y}_{\text{O}_2,\text{cal}}$$

mit dem Normaldruck  $p_{g,\text{cal}} = 1.013 \cdot 10^5 \text{ Pa}$  und dem Anteil an Sauerstoff in der Belüftung  $\tilde{y}_{\text{O}_2,\text{cal}} = 0.21$  .

Die Henrykoeffizienten von Kohlendioxid und Sauerstoff können der Literatur entnommen werden [45]:

$$H_{\text{CO}_2} = 1.67 \cdot 10^8 \text{ Pa} \quad ; \quad H_{\text{O}_2} = 4.4 \cdot 10^9 \text{ Pa}$$

Der Übergang zu der molaren Form  $\tilde{H}_{\text{O}_2}$  bzw.  $\tilde{H}_{\text{CO}_2}$  erfolgt über das Normalvolumen  $V_N$ .

$$\tilde{H} = V_N H$$

Mit der Gaskonstante  $R = 8.3144 \frac{\text{m}^3 \text{Pa}}{\text{molK}}$  und den Kultivierungsbedingungen Temperatur  $T = 298.15 \text{ K}$  und Druck  $p = 1.093 \cdot 10^5 \text{ Pa}$  (vgl. Abschnitt 1.3) ergibt sich das Normalvolumen aus dem idealen Gasgesetz zu

$$V_N = \frac{RT}{p} = 22.68 \frac{\text{l}}{\text{mol}} .$$

Im Unterschied zur Bestimmung von  $[\text{O}_2]_l$ , steht weder die zu bestimmende Konzentration von Kohlendioxid in der Flüssigphase noch der Kohlendioxidpartialdruck direkt als Messwert zur Verfügung. Die gesuchte Größe kann aber über eine Messgleichung aus dem  $k_l a$ -Wert und dem Phasenübergangstrom für Kohlendioxid sowie aus dem  $\text{CO}_2$ -Anteil in der Gasphase bestimmt werden:

$$[\text{CO}_2]_l = \frac{\dot{n}_{\text{CO}_2}}{V_l k_l a_{\text{CO}_2}} + \frac{p_g}{\tilde{H}_{\text{CO}_2}} \tilde{y}_{\text{CO}_2} \quad (3.5)$$

Der  $k_l a$ -Wert von Kohlendioxid kann über den wiederum aus einer Messgleichung ermittelten  $k_l a$ -Wert von Sauerstoff ausgedrückt werden.

$$\begin{aligned} k_l a_{\text{CO}_2} &= D_{\text{C/O}} k_l a_{\text{O}_2} \\ &= D_{\text{C/O}} \frac{\tilde{H}_{\text{O}_2} \dot{n}_{\text{O}_2}}{V_l (p_g \tilde{y}_{\text{O}_2} - p_{\text{O}_2} p_{g,\text{cal}} \tilde{y}_{\text{O}_2,\text{cal}})} \end{aligned}$$

Dabei wird die Konstante  $D_{\text{C/O}}$  gleich 1 gesetzt.

Die Differentialquotienten der Konzentrationen werden zur Berechnung durch einfache Rückwärtsdifferenzen angenähert.

$$\frac{d[\text{CO}_2]_l}{dt} \approx \frac{[\text{CO}_2]_l(t) - [\text{CO}_2]_l(t - T_S)}{T_S} \quad (3.6)$$

$$\frac{d[\text{O}_2]_l}{dt} \approx \frac{[\text{O}_2]_l(t) - [\text{O}_2]_l(t - T_S)}{T_S} \quad (3.7)$$

### 3.2.3.3 Flüssigvolumen

Das Volumen der Flüssigphase  $V_l$  nimmt mit der Zeit ab, da während des Experiments Proben zur Bestimmung der optischen Dichte und der Substratkonzentrationen entnommen werden. Unter der Annahme einer konstanten spezifischen Dichte des Mediums von  $\rho_l = 1 \text{ kg/l}$ , kann  $V_l$  aus dem gemessenen Gewicht  $m$  des Bioreaktors berechnet werden.

$$V_l = V_{l,0} + \frac{1}{\rho_l} (m - m_0) \quad (3.8)$$

### 3.2.3.4 Molenströme

Die für die Berechnung der Produktions- bzw. Verbrauchsrate nach den Gleichungen (3.3) und (3.4) sowie des Kohlendioxidgehalts nach Gleichung (3.5) benötigten Phasenübergangsströme können mit Hilfe der Begasungsrate  $q_{g,zu}$  und dem Volumen des Gasraumes  $V_g$  aus den Messwerten für Kohlendioxid- und Sauerstoffanteil in Gasphase und Zuluft bestimmt werden.

$$\dot{n}_{\text{CO}_2} = \frac{V_g}{V_N} \left[ - \frac{q_{g,zu} \tilde{y}_{\text{CO}_2,zu} (1 - \tilde{y}_{\text{O}_2}) - \tilde{y}_{\text{CO}_2} (1 - \tilde{y}_{\text{O}_2,zu})}{1 - \tilde{y}_{\text{O}_2} - \tilde{y}_{\text{CO}_2}} - \dot{y}_{\text{CO}_2} \right] \quad (3.9)$$

$$\dot{n}_{\text{O}_2} = \frac{V_g}{V_N} \left[ \frac{q_{g,zu} \tilde{y}_{\text{O}_2,zu} (1 - \tilde{y}_{\text{CO}_2}) - \tilde{y}_{\text{O}_2} (1 - \tilde{y}_{\text{CO}_2,zu})}{1 - \tilde{y}_{\text{O}_2} - \tilde{y}_{\text{CO}_2}} - \dot{y}_{\text{O}_2} \right] \quad (3.10)$$

Dabei werden analog zu den Gleichungen (3.6) und (3.7) die Differentialquotienten über Rückwärtsdifferenzen angenähert.

$$\dot{y}_{\text{CO}_2} \approx \frac{\tilde{y}_{\text{CO}_2}(t) - \tilde{y}_{\text{CO}_2}(t - T_S)}{T_S} \quad (3.11)$$

$$\dot{y}_{\text{O}_2} \approx \frac{\tilde{y}_{\text{O}_2}(t) - \tilde{y}_{\text{O}_2}(t - T_S)}{T_S} \quad (3.12)$$

Das Volumen des Gasraumes  $V_g$  ist dabei nicht konstant und kann aus dem Flüssigvolumen  $V_l$  (siehe Gleichung 3.8) und dem Gesamtvolumen des Bioreaktors  $V_{\text{Ferm}}$  berechnet werden.

$$V_g = V_{\text{Ferm}} - V_l$$

Mit den Konzentrationen in der Flüssigphase, den Molenströmen und dem Volumen der Flüssigphase stehen alle Größen für die Bestimmung der Produktions- bzw. Verbrauchsraten nach Gleichung (3.3) und (3.4) zur Verfügung.

## 3.3 Kombination der Messungen durch modellbasierte Verfahren

### 3.3.1 Problemstellung

In Tabelle 3.1 sind die online zur Verfügung stehenden Messgrößen zusammen mit einer qualitativen Bewertung ihrer Messunsicherheiten zusammengestellt. Dies ist zum einen die optische Dichte der Kulturflüssigkeit, die in die Konzentration der

Biomasse  $C_{\tilde{X}}$  umgerechnet werden kann. Sie ist mit einer Trübungssonde, die direkt in den Bioreaktor eintaucht, messbar. Damit stehen alle 5 min Messinformationen über die Biomasse zur Verfügung, die jedoch stark verrauscht sind – zum Beispiel aufgrund von Blasenbildung. Ebenfalls alle 5 min erfolgt eine modellbasierte Auswertung der Zu- und Abluft der Bakterienkultur. Auch die daraus resultierenden Messwerte sind verrauscht.

Tabelle 3.1: Online zur Verfügung stehende Messgrößen

Symbol	Messgröße	Abtastzeit	Messunsicherheit
$C_{\tilde{X}}$	Konz. der Biomasse	5 min	groß
$r_{O_2, \text{total}}$	Sauerstoffverbrauchsrate	5 min	groß
$r_{CO_2, \text{total}}$	Kohlendioxidproduktionsrate	5 min	groß
$C_{\tilde{S}_1}$	Konz. der Glucose	30-60 min	klein
$C_{\tilde{S}_2}, \dots, C_{\tilde{S}_N}$	Konz. der Aminosäuren	140 min	klein

Wesentlich genauer hingegen ist die Analyse von Proben, die steril aus dem Bioreaktor entnommen und mit einer HPLC-Anlage untersucht werden. Auf diese Weise ist eine genaue und direkte Messung der Substratkonzentrationen möglich. Allerdings ist diese Analyse mit lang andauernden Spülzyklen des Probenahme- und Analysesystems verbunden. Hinzu kommen lange Latenzzeiten. So liegt zum Beispiel der Messwert für die Glucosekonzentration erst 15 min nach Entnahme einer Probe vor. Eine vollständige Analyse der Aminosäuren ist erst 120 min nach Probenahme abgeschlossen.

Für sich allein betrachtet, ist jede dieser einzelnen Messgrößen ungeeignet, um eine Prozessüberwachung oder Regelung durchzuführen. Eine Kombination aller Messgrößen unter Einbeziehung des in Form eines mathematischen Modells vorliegenden a priori Wissens erlaubt jedoch eine sehr gute Schätzung der relevanten Zustandsgrößen. Die folgenden Abschnitte beschreiben, wie dies mit Hilfe eines erweiterten Kalman-Filters realisiert ist.

### 3.3.2 Erweitertes Kalman Filter

Ein erweitertes Kalman-Filter basiert auf dem Kalman-Filter-Algorithmus für lineare Systeme (s. [18], S. 182ff). Um das für lineare und zeitvariante Systeme anwendbare Kalman-Filter auch für die Beobachtung nichtlinearer Prozesse einsetzen zu können, approximiert man die nichtlineare Prozessbeschreibung durch eine Taylorentwicklung erster Ordnung.

Im folgenden wird eine nichtlineare Systembeschreibung

$$\dot{\underline{x}}(t) = \underline{f}(\underline{x}(t)) + \underline{g}(\underline{u}(t)) + \underline{w}(t) \quad , \quad (3.13)$$

mit dem Zustandsvektor  $\underline{x} \in \mathbb{R}^n$  und dem Steuervektor  $\underline{u} \in \mathbb{R}^p$  zugrundegelegt. Der Vektor  $\underline{w}(t) \in \mathbb{R}^n$  stellt einen mittelwertfreien Rauschprozess mit Gauß'scher Amplitudenverteilung und der Kovarianzmatrix  $Q(t)$  dar, so dass gilt

$$E \{ \underline{w}(t) \underline{w}^T(\tau) \} = Q(t) \cdot \delta_d(t - \tau) \quad ,$$

wobei  $\delta_d$  die Diracsche-Deltafunktion darstellt.<sup>(2)</sup>

Da die Messwerte nur zu diskreten Zeitpunkten  $t_k$  verfügbar sind, zum Beispiel nach Entnahme und Analyse von Proben aus der Kulturflüssigkeit, gilt für das Messmodell

$$\underline{y}_k = \underline{h}_k(\underline{x}(t_k)) + \underline{v}_k \quad \text{mit } \underline{y}_k \in \mathbb{R}^m \quad , \quad (3.14)$$

wobei  $\underline{h}_k$  eine nichtlineare Funktion der Zustandsgrößen und  $\underline{v}_k \in \mathbb{R}^m$  einen mittelwertfreien, weißen Rauschprozess mit Gauß'scher Amplitudenverteilung und der Kovarianzmatrix

$$E \{ \underline{v}_k \underline{v}_{k+\tau}^T \} = R(t) \cdot \delta_k(\tau) \quad , \quad \text{mit } \delta_k(\tau) = \begin{cases} 0 & \text{für } \tau \neq 0 \\ 1 & \text{für } \tau = 0 \end{cases}$$

darstellt.

Integriert man formal die Systemgleichungen (3.13), ausgehend von einem Anfangswert  $\underline{x}(t_{k-1})$ , so ergibt sich

$$\underline{x}(t) = \underline{x}(t_{k-1}) + \int_{t_{k-1}}^t \underline{f}(\underline{x}(\tau)) d\tau + \int_{t_{k-1}}^t \underline{g}(\underline{u}(\tau)) d\tau + \int_{t_{k-1}}^t \underline{w}(\tau) d\tau \quad . \quad (3.15)$$

Durch Erwartungswertbildung und Differentiation folgt hieraus

$$\frac{d}{dt} E \{ \underline{x}(t) \} = E \{ \underline{f}(\underline{x}(t)) \} + \underline{g}(\underline{u}(t)) =: \hat{\underline{f}}(\underline{x}(t)) + \underline{g}(\underline{u}(t)) \quad (3.16)$$

---

<sup>(2)</sup>Die Diracsche-Deltafunktion (Impulsfunktion)  $\delta_d(t-t_0)$  ist anschaulich als Grenzfall eines Rechteckimpulses der Breite  $T$  und der Höhe  $\frac{1}{T}$  an der Stelle  $t = t_0$  interpretierbar

$$\delta_d(t - t_0) = \lim_{T \rightarrow 0} \frac{1}{T} [u(t - t_0) - u(t - t_0 - T)] \quad .$$

Für eine stetige Funktion  $s(t)$  gilt:

$$\int_a^b s(t) \delta_d(t - t_0) dt = \begin{cases} s(t_0) & , \quad \text{falls } t_0 \text{ innerhalb } (a, b) \\ 0 & , \quad \text{falls } t_0 \text{ außerhalb } (a, b) \end{cases}$$

mit der Anfangsbedingung

$$E\{\underline{x}(t_{k-1})\} = \hat{\underline{x}}(t_{k-1}) \quad .$$

Eine ähnliche Betrachtung führt auf die Differentialgleichung der Kovarianzmatrix  $P(t)$  des Schätzfehlers

$$\tilde{\underline{x}}(t) = \hat{\underline{x}}(t) - \underline{x}(t) \quad .$$

Durch die Definition

$$P(t) = E\{\tilde{\underline{x}}(t)\tilde{\underline{x}}^T(t)\} \quad (3.17)$$

erhält man im Intervall  $t_{k-1} \leq t < t_k$  (mit  $\underline{x}(t)$  aus Gleichung (3.15))

$$\dot{P}(t) = \underline{\widehat{x}} \underline{\widehat{f}}^T - \hat{\underline{x}} \hat{\underline{f}}^T + \underline{\widehat{f}} \underline{\widehat{x}}^T - \hat{\underline{f}} \hat{\underline{x}}^T + Q(t) \quad . \quad (3.18)$$

Um einen praktikablen Schätzalgorithmus zu erhalten, muss das nichtlineare Prozessmodell approximiert werden. Mit einer Taylorentwicklung um den zuletzt ermittelten Schätzwert  $\hat{\underline{x}}(t)$  folgt aus

$$\underline{f}(\underline{x}(t)) = \underline{f}(\hat{\underline{x}}(t)) + \left. \frac{\partial \underline{f}}{\partial \underline{x}} \right|_{\underline{x}=\hat{\underline{x}}} (\underline{x}(t) - \hat{\underline{x}}(t)) + \dots \quad (3.19)$$

nach Bildung des Erwartungswerts

$$\hat{\underline{f}}(\underline{x}(t)) = \underline{f}(\hat{\underline{x}}(t)) + \underline{0} + \dots \quad . \quad (3.20)$$

Für eine Taylorentwicklung 1. Ordnung gilt

$$\hat{\underline{f}}(\underline{x}(t)) = \underline{f}(\hat{\underline{x}}(t)) \quad .$$

Entsprechend ergibt sich für die Differentialgleichung der Kovarianzmatrix des Schätzfehlers

$$\dot{P}(t) = F(\hat{\underline{x}}(t))P(t) + P(t)F^T(\hat{\underline{x}}(t)) + Q(t) \quad (3.21)$$

mit der Jacobi - Matrix

$$F(\hat{\underline{x}}(t)) = \left. \frac{\partial \underline{f}(\underline{x}(t))}{\partial \underline{x}(t)} \right|_{\underline{x}(t)=\hat{\underline{x}}(t)} \quad . \quad (3.22)$$

Wie im linearen Fall besteht der Kalman-Filter-Algorithmus auch im nichtlinearen Fall aus einem Prädiktions- und einem Filterschritt. Solange kein neuer Messwert vorliegt, werden im sogenannten Prädiktionsschritt die Zustandsgleichung

$$\dot{\hat{\underline{x}}}(t) = \underline{f}(\hat{\underline{x}}(t)) + \underline{g}(\underline{u}(t))$$

und die Differentialgleichung der Kovarianzmatrix des Schätzfehlers (3.21)

$$\dot{P}(t) = F(\hat{\underline{x}}(t))P(t) + P(t)F^T(\hat{\underline{x}}(t)) + Q(t)$$

im Intervall  $t_{k-1} \leq t < t_k$  integriert.

Trifft zum Zeitpunkt  $t = t_k$  ein neuer Messwert ein, so wird der sogenannte Filterschritt durchgeführt. Der a posteriori Schätzvektor ergibt sich aus einer Linearkombination von a priori Schätzvektor  $\hat{\underline{x}}(-) = \hat{\underline{x}}(t_k)$  und dem neu eingetroffenen Messwert  $\underline{y}_k$

$$\hat{\underline{x}}_k(+) = \hat{\underline{x}}_k(-) + K_k[\underline{y}_k - \underline{h}_k(\hat{\underline{x}}_k(-))] \quad (3.23)$$

Dies erfolgt unter der Maßgabe, dass die a posteriori Kovarianz des Schätzfehlers minimiert werden soll. Im Prädiktionsschritt vergrößert sich somit die Kovarianz des Schätzfehlers und reduziert sich im Filterschritt. Bezeichnet man mit  $P_k(-)$  die a priori und mit  $P_k(+)$  die a posteriori Kovarianz des Schätzfehlers, so ergeben sich die in Tabelle 3.2 aufgeführten Filtergleichungen [18].

### 3.3.3 Erweitertes Kalman-Filter als Beobachter

#### 3.3.3.1 Beobachtbarkeit

Ein nichtlineares System ist in  $x_0$  beobachtbar, wenn jeder Anfangszustand  $x_0$  in einer Umgebung  $X_0$  von  $x_0$  bei bekannten Eingangsgrößen  $u(t)$  und Ausgangsgrößen  $y(t)$  von jedem anderen Zustand  $x_1 \in X_0$  unterschieden werden kann.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Modelle für das Wachstum von *P. luminescens* sind differentiell flach, wie in Kapitel 4 gezeigt wird. Differentiell flache Systeme sind immer vollständig beobachtbar, so dass an dieser Stelle keine weitere Überprüfung der Beobachtbarkeit notwendig ist.

Für das YS-Modell, das ein Wachstum auf Hefeextrakt beschreibt, findet sich ein weiterer Nachweis der Beobachtbarkeit in [6] (S. 36ff).

Tabelle 3.2: Zusammenstellung der Gleichungen des erweiterten Kalman-Filters

<b>Systembeschreibung</b>	
Systemgleichung	$\dot{\underline{x}}(t) = \underline{f}(\underline{x}(t)) + \underline{g}(\underline{u}(t)) + \underline{w}(t) ; \quad \underline{w}(t) \sim N(\underline{0}, Q(t));$ $\underline{x}, \underline{w} \in \mathbb{R}^n ; \underline{u} \in \mathbb{R}^p$
Messgleichung	$\underline{y}_k = \underline{h}_k(\underline{x}(t_k)) + \underline{v}_k ; \quad \underline{v}(t) \sim N(\underline{0}, R(t)) ;$ $\underline{y}_k, \underline{v}_k \in \mathbb{R}^m ; k = 1, 2, \dots$
<b>Prädiktionsschritt</b>	
Zustand	$\dot{\hat{\underline{x}}}(t) = \underline{f}(\hat{\underline{x}}(t)) + \underline{g}(\underline{u}(t))$
Fehler-Kovarianz	$\dot{P}(t) = F(\hat{\underline{x}}(t))P(t) + P(t)F^T(\hat{\underline{x}}(t)) + Q(t)$ $t_{k-1} \leq t < t_k ; \hat{\underline{x}}(t_{k-1}) = \hat{\underline{x}}_{k-1}(+) ; P(t_{k-1}) = P_{k-1}(+)$
<b>Filterschritt</b>	
Zustand	$\hat{\underline{x}}_k(+) = \hat{\underline{x}}_k(-) + K_k[\underline{y}_k - \underline{h}_k(\hat{\underline{x}}_k(-))]$
Fehler-Kovarianz	$P_k(+) = [I - K_k H_k(\hat{\underline{x}}_k(-))] \cdot P_k(-)$
Kalman-Verstärkung	$K_k = P_k(-) H_k^T(\hat{\underline{x}}_k(-)) [H_k(\hat{\underline{x}}_k(-)) P_k(-) H_k^T(\hat{\underline{x}}_k(-)) + R_k]^{-1}$
<b>Definitionen</b>	
Jacobi-Matrizen	$F(\hat{\underline{x}}(t)) := \left. \frac{\partial \underline{f}(\underline{x}(t))}{\partial \underline{x}(t)} \right _{\underline{x}(t)=\hat{\underline{x}}(t)} ; H(\hat{\underline{x}}_k(-)) := \left. \frac{\partial \underline{h}_k(\underline{x}(t_k))}{\partial \underline{x}(t_k)} \right _{\underline{x}(t_k)=\hat{\underline{x}}_k(-)}$
Gauß-Verteilung	$\underline{z}(t) \sim N(\underline{\bar{z}}, S(t))$ $\underline{z}(t)$ ist ein n-dimensionaler Zufallsvektor mit dem Mittelwert $\underline{\bar{z}}$ , der Kovarianz $Z(t)$ und der Verteilung $f = \frac{1}{(2\pi)^{n/2}  Z ^{1/2}} e^{-1/2(\underline{z}-\underline{\bar{z}})^T Z^{-1}(\underline{z}-\underline{\bar{z}})}$

Quelle: Gelb, [18], S. 189

### 3.3.3.2 Realisierung

Bei der Kultivierung von Bakterien handelt es sich um einen langsamen Prozess. Die Taktrate, mit der Messwerte eintreffen beträgt  $1/(300 \text{ s})$ . Bei einer derartig niedrigen Taktrate ist es möglich, den Kalman-Filter-Algorithmus bei jedem Taktschritt für den gesamten Zeithorizont einer Fermentation ( $0 \leq t < 60h$ ) auszuwerten. Auf diese Weise können auch Messwerte mit großen Latenzzeiten, die vor allem bei der HPLC-Analyse auftreten, korrekt eingebracht werden. Zusätzlich erhält man eine Prädiktion für den Prozessverlauf, deren Zuverlässigkeit mit zunehmender Prozesszeit steigt.

In den im vorigen Abschnitt aufgeführten Gleichungen wurde davon ausgegangen, dass sämtliche Messwerte zeitgleich eintreffen. Dies bedeutet, dass sich die Messgleichungen  $\underline{h}_k(\underline{x}(t_k))$  und deren Linearisierungen  $H_k(\hat{\underline{x}}_k(-))$  nicht ändern. In der Praxis ist bei biologischen Systemen jedoch eine simultane Aufnahme der Messwerte nur schwer realisierbar. In diesen Fällen bietet sich der Einsatz von schaltenden Beobachtern oder von Kalman-Filtern für gemischte diskrete und kontinuierliche Messwerte an [34][10].

Bei dem hier betrachteten Prozess kann mit Hilfe der Gasanalyse sichergestellt werden, dass der Messvektor  $y_k$  zu jedem Abtastzeitpunkt  $t_k$  vollständig vorliegt. Dies ist im folgenden für das YS-Modell für Wachstum auf Hefeextrakt gezeigt. Mit Hilfe der Gasanalyse ist es möglich, die Konzentration der einzelnen Substrate alle 5 min zu berechnen, jedoch mit geringer Genauigkeit. Zusätzlich wird die Glucosekonzentration mit Hilfe der Online-HPLC bestimmt, allerdings aufgrund des aufwendigen Analyseverfahrens nur alle 30 bis 60 min.

Im Kalman-Filter ist lediglich die unterschiedliche Genauigkeit der Messwerte zu gewichten. Je nachdem, welcher Messwert eintrifft, ist die Kovarianzmatrix des Messrauschens  $R_k$  entsprechend anzupassen. Diese wird im Filterschritt (3.23) so gewählt, dass den Messwerten aus der HPLC-Analyse ein größeres Vertrauen geschenkt wird als den aus der Gasanalyse und Messung der Trübung generierten Werten.

Für die Aufbereitung der Messwerte ergibt sich damit folgendes Vorgehen:

1. Messung der Konzentrationen der Biomasse  $C_{\bar{x}}$  über die Trübung des Kulturmediums.
2. Bestimmung der Sauerstoffverbrauchrate  $r_{O_2, total}$  aus der modellgestützten Gasanalyse.
3. Berechnung von  $C_{\bar{s}_1}$  und  $C_{\bar{s}_2}$  durch numerische Integration der Gleichungen (2.28) und (2.29) (alle 5 min). Die in den Gleichungen auftretenden Sauerstoffverbrauchsraten  $r_{O_2, s_1}$  und  $r_{O_2, s_2}$  folgen gemäß (2.27) und (2.30) aus dem

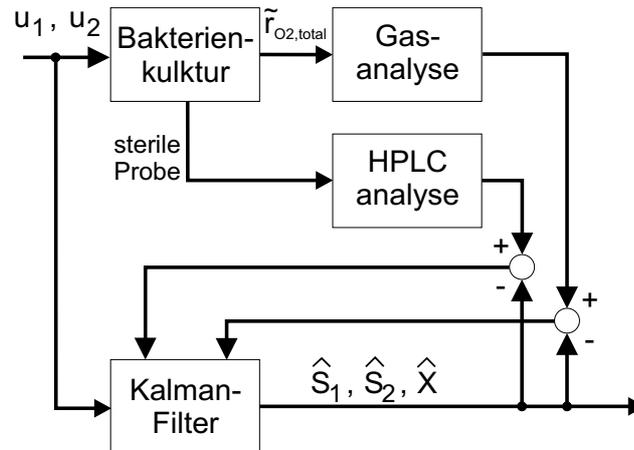


Bild 3.2: Blockschaltbild des Prozesses mit Analytik und Kalman-Filter

Messwert  $r_{O_2,total}$  und der Wachstumsgeschwindigkeit  $\dot{C}_{\tilde{X}}$  der Biomasse, die sich durch numerische Differentiation ergibt:

$$r_{O_2,S_1} = \frac{1}{K_1 - K_2} \left( \dot{C}_{\tilde{X}} - K_2 r_{O_2,total} \right) \quad (3.24)$$

$$r_{O_2,S_2} = \frac{1}{K_1 - K_2} \left( -\dot{C}_{\tilde{X}} + K_1 r_{O_2,total} \right) \quad (3.25)$$

4. Bestimmung der Konzentration der Glucose  $C_{\tilde{S}_2}$  durch Probenahme und HPLC-Analyse
5. Diese Informationen werden je nach Quelle, d. h. Gas- oder HPLC-Analyse mit unterschiedlichen Kovarianzmatrizen  $R_{Gas}$  bzw.  $R_{HPLC}$  dem erweiterten Kalman-Filter zur Berechnung der a posteriori Schätzwerte zugeführt (s. Bild 3.2).

Als Beispiel sei hier der Einsatz des Kalman-Filters bei Experiment *YS\_Batch\_A* aufgeführt. Dabei handelt es sich um eine Batch-Kultivierung mit komplexem Medium in dem 10 l fassenden Bioreaktor. Es waren die modellgestützte Gasanalyse, die Trübungssonde und das HPLC-System online angekoppelt. Auf diese Weise standen Messwerte für die Konzentration der Biomasse und der Glucose sowie die Sauerstoffverbrauchsrate zu den oben beschriebenen Zeitpunkten zur Verfügung. Mit dem erweiterten Kalman-Filter konnte zur Laufzeit der aktuelle Zustand der Bakterienkultur geschätzt werden. Details zu der Programmierung mit Hilfe der numerischen Softwarepakete Matlab und Simulink und dem Datenaustausch mit dem Prozessleitsystem sind in [6] aufgeführt.

Das zugrunde liegende mathematische Modell ist das YS-Modell mit den drei Systemzuständen

$$\underline{x} = \begin{bmatrix} C_{\bar{X}} \\ C_{\bar{S}_1} \\ C_{\bar{S}_2} \end{bmatrix}$$

mit den Substraten Glutaminsäure ( $S_1$ ) und Glucose ( $S_2$ ). Als Kovarianzmatrix des Prozessrauschens dient

$$Q := \begin{bmatrix} 0.001 & 0 & 0 \\ 0 & 0.001 & 0 \\ 0 & 0 & 0.001 \end{bmatrix} .$$

Die Kovarianzmatrix des Messrauschens weist ebenfalls Diagonalform auf. Falls die Messwerte auf der Gasanalyse basieren, sind die Messunsicherheiten groß. Dies wird durch die Wahl der Matrix

$$R_{\text{Gas}} := \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0.01 & 0 \\ 0 & 0 & 0.01 \end{bmatrix}$$

berücksichtigt. Liegen Werte für die Konzentration der Glucose aus der HPLC-Analyse vor, verringert sich die Messunsicherheit. In diesem Fall wird

$$R_{\text{HPLC}} := \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0.01 & 0 \\ 0 & 0 & 0.001 \end{bmatrix}$$

verwendet. Anfangswerte der Kalman-Verstärkung und der Kovarianz des Schätzfehlers sind

$$K_k(t=0) := \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

$$P_k(t=0) := 10^4 \cdot \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

Bei den in den Bildern 3.3 und 3.4 dargestellten Zeitverläufen wird die Leistungsfähigkeit des Kalman-Filters als Beobachter deutlich. Den geschätzten Verläufen sind die Ergebnisse der offline durchgeführten Analysen gegenübergestellt.

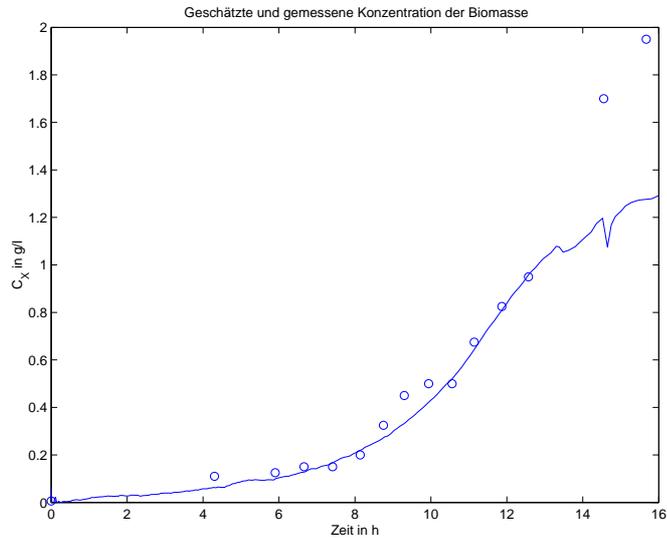


Bild 3.3: Vergleich der offline gemessenen (o) und online geschätzten Werte für die Konzentration der Biomasse  $C_{\hat{X}}$  beim Einsatz des Erweiterten Kalman Filters (*YS\_Batch\_A*)

Es zeigt sich, dass die Schätzung der Biomasse sehr gut gelingt. Lediglich in dem vom mathematischen Modell nicht beschriebenen Bereich für  $t > 14$  h ist eine Abweichung erkennbar. Dies ist nicht verwunderlich, da in der Modellvorstellung kein Wachstum der Mikroorganismen ohne Substrat möglich ist. Offensichtlich sind die Bakterien in der Lage, auch die nicht im Modell berücksichtigten Aminosäuren zu verwerten.

Es zeigt sich zudem, dass neben der Schätzung der Glucosekonzentration auch die nicht online gemessene Konzentration der Glutaminsäure gut geschätzt wird. Deutlich erkennbar ist die starke Korrektur des prädizierten Zeitverlaufs beim Eintreffen eines neuen Messwertes von der HPLC-Analyse.

Dies macht deutlich, wie sinnvoll der Einsatz des erweiterten Kalman-Filters zur Kombination der unterschiedlichen, online verfügbaren Messwerte ist.

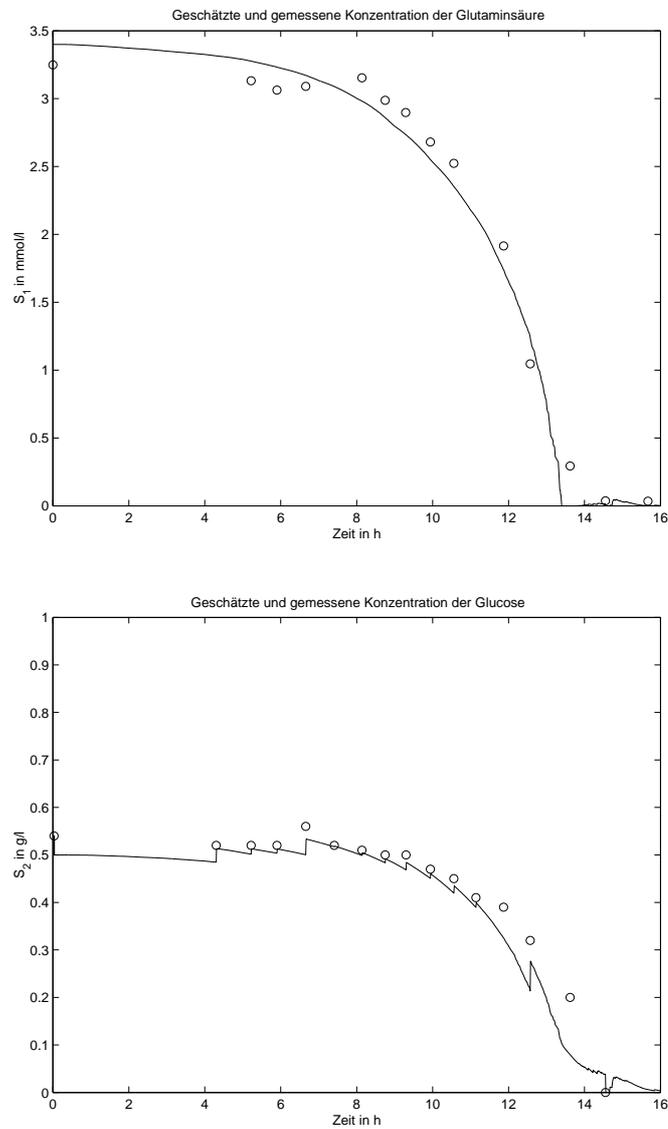


Bild 3.4: Vergleich der offline gemessenen (o) und online geschätzten Werte für die Konzentration der Substrate beim Einsatz des erweiterten Kalman Filters (*YS\_Batch\_A*)

# Kapitel 4

## Flachheitsbasierte Untersuchung

### 4.1 Einführung

Das folgende Kapitel ist eine kurze Einführung in die Theorie differentiell flacher Systeme. Dies sind Systeme gewöhnlicher nichtlinearer Differentialgleichungen, deren besondere Eigenschaft die Existenz virtueller Ausgänge, sogenannter flacher Ausgänge ist. Diese flachen Ausgänge beinhalten die volle Information über die Dynamik des Systems. Bei derartigen Systemen ist es möglich, den Verlauf der abhängigen Variablen, d. h. der Systemzustände und Systemeingänge, aus dem Verlauf des flachen Ausgangs und dessen Ableitungen zu bestimmen ohne die Systemdifferentialgleichungen explizit, zum Beispiel durch Integration zu lösen [16][46].

Eine, sich aus dieser Eigenschaft ergebende Anwendung, besteht in der Berechnung der Eingänge des Systems aus vorgegebenen Trajektorien für den flachen Ausgang. So entworfene Steuerungen sind jedoch anfällig für Störungen und Modellunsicherheiten, so dass der Einsatz von Trajektorienfolgeregelungen unerlässlich ist. Aufgrund der Tatsache, dass alle flachen Systeme durch eine Zustandsrückführung exakt linearisierbar sind, bieten sich hier vielfältige Möglichkeiten.

Neben der Definition der Flachheit und der daraus abzuleitenden Eigenschaften, soll in den folgenden Abschnitten auch auf die Planung von Trajektorien und den Entwurf von Folgeregelungen eingegangen werden. Hierzu wird die Eigenschaft der Flachheit für die beiden in Kapitel 2 aufgestellten mathematischen Modelle für den Wachstumsprozess von *Photobacterium luminescens* in verschiedenen Nährmedien nachgewiesen.

### 4.2 Definition der differentiellen Flachheit

Differentielle Flachheit ist ein von M. Fliess, J. Levine, Ph. Martin und P. Rouchon im Jahre 1992 eingeführtes Konzept [16], das sich auf unterbestimmte Systeme gewöhnlicher Differentialgleichungen bezieht.

Ein allgemeines System von gewöhnlichen, nichtlinearen Differentialgleichungen der Ordnung  $\sigma$  kann in der Form

$$S_i(t, \underline{z}, \dot{\underline{z}}, \ddot{\underline{z}}, \dots, \underline{z}^{(\sigma)}) = 0 \quad , \quad i = 1 \dots n - m \quad (4.1)$$

angegeben werden. Dabei sei  $S_i$  eine  $C^\infty$ -glatte Funktion,  $t$  sei die unabhängige Variable (für gewöhnlich die Zeit) und  $\underline{z} = [z_1, \dots, z_n]^T \in \mathbb{R}^n$  beinhalte die abhängigen Variablen und damit alle zur Systembeschreibung verwendeten Größen. Diese, im folgenden als Systemgrößen bezeichneten Variablen, umfassen z. B. Zustandsgrößen und Eingangsgrößen des Systems. Die Schreibweise  $\underline{z}^{(\mu)}$  steht für die  $\mu$ -te Ableitung von  $\underline{z}$  nach der Zeit  $t$ , mit  $\underline{z}^{(1)} = \dot{\underline{z}}$  und  $\underline{z}^{(2)} = \ddot{\underline{z}}$ . Die Zahl  $m \geq 1$  steht für die Zahl der Gleichungen um die das System unterbestimmt ist. <sup>(1)</sup>

**Definition 1** Das durch (4.1) gegebene System heißt (differentiell)<sup>(2)</sup> flach, falls Variablen  $\underline{y} = [y_1, \dots, y_m]^T$  existieren, die durch Funktionen der Systemgrößen und deren Ableitungen gegeben sind, d. h.

$$y_i = \phi_i(\underline{z}, \dot{\underline{z}}, \ddot{\underline{z}}, \dots, \underline{z}^{(\beta)}) \quad i = 1 \dots m, \beta \in \mathbb{N}, \quad (4.2)$$

und die folgenden zwei Bedingungen erfüllen:

1. Alle Systemgrößen, d. h. die Komponenten von  $\underline{z}$ , können (lokal)<sup>(3)</sup> durch  $\underline{y}$  und dessen Zeitableitungen ausgedrückt werden:

$$z_j = \psi_j(\underline{y}, \dot{\underline{y}}, \dots, \underline{y}^{(\delta)}) \quad j = 1 \dots n, \delta \in \mathbb{N}. \quad (4.3)$$

Dies gilt damit auch für alle Zeitableitungen von  $\underline{z}$  und sämtliche Funktionen dieser Größen.

2. Es existiert keine Differentialgleichung der Form

$$R(\underline{y}, \dot{\underline{y}}, \dots, \underline{y}^{(\gamma)}) = 0 \quad , \gamma \in \mathbb{N}, \quad (4.4)$$

die Komponenten von  $\underline{y}$  miteinander verknüpft, d. h.  $\underline{y}$  ist differentiell unabhängig. Diese Forderung ist äquivalent zu der Bedingung, dass die Anzahl

---

<sup>(1)</sup>Der Fall  $m = 0$  – also der Fall eines autonomen Systems – ist bei der Betrachtung der Flachheit nicht von Bedeutung.

<sup>(2)</sup>Die Bezeichnung „differentiell“ wird gewählt, da lediglich Differentiationen und keine Integrationen zur Berechnung der Systemgrößen aus dem flachen Ausgang benötigt werden.

<sup>(3)</sup>Nach dem Satz über implizite Funktionen ist die Angabe von Funktionen nach Gleichung (4.3) im allgemeinen nur lokal möglich. Zudem treten nicht selten Singularitäten in den Transformationen (4.2) und (4.3) auf.

der Komponenten von  $\underline{y}$  der Anzahl  $m$  von Gleichungen entspricht um die das System unterbestimmt ist

$$\dim(\underline{y}) = m. \quad (4.5)$$

Die Variablen  $\underline{y} = [y_1, \dots, y_m]^T$  werden als flacher Ausgang des Systems bezeichnet.

Die Flachheit ermöglicht es, anhand von vorgegebenen Kurven  $\underline{y}(t)$  in  $\mathbb{R}^m$  mittels (4.3) die Lösungen  $\underline{z}(t)$  der Systemdifferentialgleichungen (lokal) zu berechnen. Die Bedingung 2 stellt sicher, dass die Zeitverläufe für die Komponenten des flachen Ausgangs unabhängig voneinander gewählt werden können. Allerdings ist die Wahl des flachen Ausgangs nicht eindeutig. Mit Gleichung (4.3) lassen sich zwei flache Ausgänge ohne Integration ineinander umrechnen, da sie jeweils nur von den Systemgrößen und deren Ableitungen abhängen (s. (4.2)).

Bei der Untersuchung flacher Systeme und insbesondere bei dem Nachweis der Existenz flacher Ausgänge ist die Anwendung des Satzes über implizite Funktionen aus der Analysis sehr hilfreich.

Dieser gibt Auskunft über die eindeutige Auflösbarkeit von Funktionen  $\underline{f}(\underline{x}, \underline{y}) = 0$  nach  $\underline{y}$ . Die folgende Fassung entspricht dem Satz 6.15 aus [7], S. 506ff. Ein Beweis dieses Satzes findet sich in [55] S. 300–303.

**Satz 1** (über implizite Funktionen, allgemeiner Fall)

Durch

$$\underline{f}(\underline{x}, \underline{y}) := \underline{f}(x_1, \dots, x_m, y_1 \dots y_n) = \begin{bmatrix} f_1(x_1, \dots, x_m, y_1 \dots y_n) \\ \vdots \\ f_n(x_1, \dots, x_m, y_1 \dots y_n) \end{bmatrix}$$

sei eine stetig differenzierbare Abbildung auf einer offenen Menge  $D \subset \mathbb{R}^{m+n}$  in  $\mathbb{R}^n$  beschrieben. Die Variablen werden zu folgenden Vektoren zusammengefasst:

$$\underline{x} = \begin{bmatrix} x_1 \\ \vdots \\ x_m \end{bmatrix}, \quad \underline{y} = \begin{bmatrix} y_1 \\ \vdots \\ y_m \end{bmatrix}, \quad \begin{bmatrix} \underline{x} \\ \underline{y} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} x_1 \\ \vdots \\ x_m \\ y_1 \\ \vdots \\ y_m \end{bmatrix}.$$

Für einen Punkt  $\begin{bmatrix} \underline{x}_0 \\ \underline{y}_0 \end{bmatrix} \in D$  gelte

$$\underline{f}(\underline{x}_0, \underline{y}_0) = 0 \quad .$$

Ferner sei die Matrix

$$\underline{f}_{\underline{y}}(\underline{x}_0, \underline{y}_0) := \left[ \frac{\partial f_i}{\partial y_k}(\underline{x}_0, \underline{y}_0) \right]_{\substack{1 \leq i \leq n \\ 1 \leq k \leq n}}$$

regulär.

Damit folgt:

1. Es gibt eine Umgebung  $U \subset \mathbb{R}^m$  von  $\underline{x}_0$  und eine Umgebung  $V \subset \mathbb{R}^n$  von  $\underline{y}_0$  mit der Eigenschaft: Zu jedem  $\underline{x} \in U$  existiert genau ein  $\underline{y} \in V$  mit

$$\underline{f}(\underline{x}, \underline{y}) = 0 \quad .$$

Jedem  $\underline{x} \in U$  ist auf diese Weise genau ein  $\underline{y} \in V$  zugeordnet. Die dadurch definierte Abbildung  $\underline{g} : U \rightarrow V$  erfüllt also

$$\underline{f}(\underline{x}, \underline{g}(\underline{x})) = 0 \quad \text{für alle } \underline{x} \in U \quad ,$$

2.  $\underline{g}$  ist stetig differenzierbar, und es gilt für jedes  $\underline{x} \in U$

$$\frac{d\underline{g}}{d\underline{x}} = \underline{f}_{\underline{y}}(\underline{x}, \underline{y})^{-1} \underline{f}_{\underline{x}}(\underline{x}, \underline{y}) \quad , \quad \underline{y} = \underline{g}(\underline{x}) \quad ,$$

mit den Abkürzungen

$$\underline{f}_{\underline{y}}(\underline{x}, \underline{y}) := \left[ \frac{\partial f_i}{\partial y_k}(\underline{x}, \underline{y}) \right]_{\substack{1 \leq i \leq n \\ 1 \leq k \leq n}} \quad ,$$

$$\underline{f}_{\underline{x}}(\underline{x}, \underline{y}) := \left[ \frac{\partial f_i}{\partial x_k}(\underline{x}, \underline{y}) \right]_{\substack{1 \leq i \leq n \\ 1 \leq k \leq m}} \quad .$$

## 4.3 Flachheitsbasierte Analyse der Wachstumsmodelle

### 4.3.1 Flachheit des YS-Modells

Das in Abschnitt 2.3 beschriebene formalkinetische Modell (YS-Modell) für das Bakterienwachstum auf Hefeextrakt und Glucose ist differentiell flach, wie im folgenden gezeigt werden soll [51]. Das YS-Modell besteht aus Bilanzgleichungen für fünf Systemgrößen  $\underline{z} = [z_1 \dots z_5]^T$  mit

Biomasse	$z_1 := C_{\tilde{X}}$
Hefeextrakt	$z_2 := C_{\tilde{S}_1}$
Glucose	$z_3 := C_{\tilde{S}_2}$
Zufuhr von Hefeextrakt	$z_4 := u_1$
Zufuhr von Glucose	$z_5 := u_2$

Eine Betrachtung der Sauerstoffaufnahme soll hier nicht erfolgen, da sich diese mit Hilfe algebraischer Beziehungen aus  $\underline{z}$  berechnen lässt (Gl. (2.27) – (2.30) auf S. 25).

Die Systemdifferentialgleichungen (2.23)–(2.25) (auf S. 24) lauten

$$\dot{z}_1 = \mu z_1 = (q_{S_1} Y_{X/S_1} + q_{S_2} Y_{X/S_2}) z_1 \quad , \quad (4.6)$$

$$\dot{z}_2 = -q_{S_1} z_1 + z_4 \quad , \quad (4.7)$$

$$\dot{z}_3 = -q_{S_2} z_1 + z_5 \quad , \quad (4.8)$$

mit

$$q_{S_1} = q_{S_1, \max} \frac{z_2}{K_{S_1} + z_2} \quad ,$$

$$q_{S_2} = q_{S_2, \max} \frac{z_3}{K_{S_2} + z_3}$$

Für dieses System ist  $\underline{y} = [y_1 \quad y_2]^T$  mit

$$y_1 = \phi_1(\underline{z}) := z_1 = C_{\tilde{X}} \quad (4.9)$$

$$y_2 = \phi_2(\underline{z}) := z_2 = C_{\tilde{S}_1} \quad (4.10)$$

ein flacher Ausgang nach Definition 1.

Es ist offensichtlich, dass die Berechnung des flachen Ausgangs und dessen Ableitungen aus den Systemzuständen und Eingängen mit (4.9) und (4.10) möglich ist. Im einzelnen ergibt sich

$$y_1 = z_1 \quad (4.11)$$

$$y_2 = z_2 \quad (4.12)$$

$$\dot{y}_1 = \dot{z}_1 = (q_{S_1} Y_{X/S_1} + q_{S_2} Y_{X/S_2}) z_1 \quad (4.13)$$

$$\dot{y}_2 = \dot{z}_2 = -q_{S_1} z_1 + z_4 \quad (4.14)$$

$$\begin{aligned} \ddot{y}_1 &= \frac{d}{dt} [(q_{S_1} Y_{X/S_1} + q_{S_2} Y_{X/S_2}) z_1] \\ &= (\dot{q}_{S_1} Y_{X/S_1} + \dot{q}_{S_2} Y_{X/S_2}) z_1 + \dot{z}_1 (q_{S_1} Y_{X/S_1} + q_{S_2} Y_{X/S_2}) \\ &= z_1 q_{S_1, max} \frac{\dot{z}_2 (K_{S_1} + z_2) - z_2 \dot{z}_2}{(K_{S_1} + z_2)^2} Y_{X/S_1} \\ &\quad + z_1 q_{S_2, max} \frac{\dot{z}_3 (K_{S_2} + z_3) - z_3 \dot{z}_3}{(K_{S_2} + z_3)^2} Y_{X/S_2} \\ &\quad + \dot{z}_1 (q_{S_1} Y_{X/S_1} + q_{S_2} Y_{X/S_2}) \end{aligned} \quad (4.15)$$

$$\text{mit } \dot{z}_3 = -q_{S_2} z_1 + z_5 \quad .$$

Die Rücktransformation, also die Bestimmung der Systemgrößen  $\underline{z}$  aus dem flachen Ausgang  $\underline{y}$  und dessen Ableitungen ist ebenfalls möglich. Die nötigen algebraischen Gleichungen lauten

$$z_1 = y_1 =: \psi_1(y_1) \quad (4.16)$$

$$z_2 = y_2 =: \psi_2(y_2) \quad (4.17)$$

(4.6)  $\rightarrow$

$$\dot{y}_1 = q_{S_1} Y_{X/S_1} y_1 + q_{S_2, max} \frac{z_3}{K_{S_2} + z_3} Y_{X/S_2} \quad (4.18)$$

$$y_1 z_3 = (K_{S_2} + z_3) \cdot \frac{\dot{y}_1 - q_{S_1} Y_{X/S_1} y_1}{q_{S_2, max} Y_{X/S_2} y_1} \quad (4.19)$$

$$z_3 = \left( 1 - \frac{\dot{y}_1 - q_{S_1} Y_{X/S_1} y_1}{q_{S_2, max} Y_{X/S_2} y_1} \right)^{-1} \cdot \frac{K_{S_2} (\dot{y}_1 - q_{S_1} Y_{X/S_1} y_1)}{q_{S_2, max} Y_{X/S_2} y_1} \quad (4.20)$$

$$z_3 = \frac{K_{S_2}}{\frac{q_{S_2, max} Y_{X/S_2} y_1}{\dot{y}_1 - q_{S_1} Y_{X/S_1} y_1} - 1} =: \psi_3(y_1, \dot{y}_1, y_2) \quad (4.21)$$

(4.7)  $\rightarrow$

$$\dot{y}_2 = -q_{S_1} y_1 + z_4 \quad (4.22)$$

$$z_4 = \dot{y}_2 + q_{S_1} y_1 =: \psi_4(y_1, y_2, \dot{y}_2) \quad (4.23)$$

(4.6)  $\rightarrow$

$$\dot{q}_{S_1} = q_{S_1, \max} \frac{\dot{y}_2(K_{S_1} + y_2) - y_2 \dot{y}_2}{(K_{S_1} + y_2)^2} \quad (4.24)$$

$$= q_{S_1, \max} \frac{K_{S_1} \dot{y}_2}{(K_{S_1} + y_2)^2} \quad (4.25)$$

(4.21)  $\rightarrow$

$$\dot{z}_3 = \frac{d\psi_3}{dt} \quad (4.26)$$

$$\begin{aligned} & -K_{S_2} \frac{y_1 q_{S_2, \max} Y_{X/S_2} (\dot{y}_1 - q_{S_1} Y_{X/S_1} y_1)}{(\dot{y}_1 - q_{S_1} Y_{X/S_1} y_1)^2} \\ &= \frac{\left( \frac{q_{S_2, \max} Y_{X/S_2} y_1}{\dot{y}_1 - q_{S_1} Y_{X/S_1} y_1} - 1 \right)^2}{} \\ & \quad + \frac{K_{S_2} \frac{(\dot{y}_1 - q_{S_1} Y_{X/S_1} \dot{y}_1 - q_{S_1} y_1 Y_{X/S_1}) y_1 q_{S_2, \max} Y_{X/S_2}}{(\dot{y}_1 - q_{S_1} Y_{X/S_1} y_1)^2}}{\left( \frac{q_{S_2, \max} Y_{X/S_2} y_1}{\dot{y}_1 - q_{S_1} Y_{X/S_1} y_1} - 1 \right)^2} \end{aligned} \quad (4.27)$$

$$= \frac{K_{S_2} q_{S_2, \max} Y_{X/S_2} (y_1 \ddot{y}_1 - \dot{y}_1^2 - y_1^2 \dot{q}_{S_1} Y_{X/S_1})}{(y_1 q_{S_2, \max} Y_{X/S_2} - \dot{y}_1 + q_{S_1} Y_{X/S_1} y_1)^2} \quad (4.28)$$

(4.8)  $\rightarrow$

$$z_5 = \dot{z}_3 + q_{S_2} y_1 \quad (4.29)$$

$$= \frac{d\psi_3}{dt} + q_{S_2, \max} \frac{\psi_3}{K_{S_2} + \psi_3} y_1 \quad (4.30)$$

$$=: \psi_5(y_1, y_2, \dot{y}_1, \dot{y}_2, \ddot{y}_1) \quad (4.31)$$

Damit ist gezeigt, dass sich die beiden Komponenten  $y_1$  und  $y_2$  des flachen Ausgangs und deren Ableitungen als Funktionen der Systemgrößen  $\underline{z}$ , d. h. der Systemzustände  $C_{\tilde{X}}$ ,  $C_{\tilde{S}_1}$ ,  $C_{\tilde{S}_2}$  sowie der Systemeingänge  $u_1$ ,  $u_2$  darstellen lassen und folgende zwei Bedingungen erfüllen:

1. Die Systemgrößen  $\underline{z}$ , d. h. die Systemzustände  $C_{\tilde{X}}$ ,  $C_{\tilde{S}_1}$ ,  $C_{\tilde{S}_2}$  und die Systemeingänge  $u_1$ ,  $u_2$  sind als Funktionen von  $y_1$ ,  $y_2$  und einer endlichen Anzahl derer Zeitableitungen darstellbar.

2. Die Anzahl der Komponenten des flachen Ausgangs entspricht der Anzahl  $m = 2$  der Systemeingänge.

Nach der Definition 1 (S. 75) ist das hier betrachtete System (4.6)–(4.8) differentiell flach und der Vektor

$$\underline{y} = \begin{bmatrix} y_1 \\ y_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} C_{\tilde{x}} \\ C_{\tilde{s}_1} \end{bmatrix}$$

ist ein möglicher flacher Ausgang.

Die Transformationsbeziehungen (4.16)–(4.31) weisen Singularitäten auf. Offensichtlich, jedoch für die praktischen Anwendung nicht von Bedeutung, ist der Fall  $y_1 = \dot{y}_1 = 0$ .

Die zweite Singularität besteht in (4.21) und (4.28) für

$$\dot{y}_1 = (q_{S_1} Y_{X/S_1} + q_{S_2, max} Y_{X/S_2}) y_1 \quad .$$

Dies ist von Bedeutung, falls die Verbrauchsrate des zweiten Substrats  $q_{S_2} = q_{S_2, max}$  wird. Dies ist nur für unendlich hohe Substratkonzentrationen  $C_{\tilde{s}_2} \rightarrow \infty$  möglich. Neben numerischen Problemen ist bei realen Anwendungen auch die maximale Zufuhr und Menge an Substrat beschränkt. Daher sollte bei der Vorgabe von Trajektorien für den flachen Ausgang eine an  $q_{S_2, max}$  heranreichende Verbrauchsrate für  $C_{\tilde{s}_2}$  vermieden werden.

### 4.3.2 Flachheit des Amino-Modells

Um auch für das Amino-Modell für  $N$ -Substrate die Eigenschaft der Flachheit zu erreichen werden  $(N - 1)$ -Eingänge, die die Zufuhr der einzelnen Substrate im Fed-Batch-Betrieb repräsentieren eingeführt. Die Zufuhr von Sauerstoff ist kein Systemeingang des Wachstumsmodells, da in allen Experimenten eine ausreichende Sauerstoffversorgung<sup>(4)</sup> der Bakterien sichergestellt sein muss.

---

<sup>(4)</sup>Ein Wachstum von *P. luminescens* unter Sauerstoffmangel ( $pO_2 < 30$  % Sättigung) führt zu einer Änderung der Phasenvariante der Kultur. Die sich dann entwickelnde Sekundärform der Bakterien ist nicht mehr als Nahrung für die Kultivierung von Nematoden geeignet [26].

Zusammen mit den Systemeingängen  $\underline{u} = [u_1 \ u_2 \ \dots \ u_{N-1}]^T$  existieren folgende  $(2N + L + 1)$  Systemgrößen  $\underline{z} = [z_1 \ \dots \ z_{2N+L+1}]^T$ :

Biomasse	$z_1 := C_{\tilde{X}}$
Glucose	$z_2 := C_{\tilde{S}_1}$
Substrat 2	$z_3 := C_{\tilde{S}_2}$
$\vdots$	$\vdots$
Substrat $N - 1$	$z_N := C_{\tilde{S}_{N-1}}$
Sauerstoffaufnahme	$z_{N+1} := \dot{C}_{\tilde{S}_N}$
CO <sub>2</sub> -Produktionsrate	$z_{N+2} := \dot{C}_{\tilde{P}_1}$
Zufuhr von Glucose	$z_{N+3} := u_1$
Zufuhr von Substrat 2	$z_{N+4} := u_2$
$\vdots$	$\vdots$
Zufuhr von Substrat $N - 1$	$z_{2N+1} := u_{N-1}$
zellinterne Komponente 1	$z_{2N+2} := C_{X_1}$
$\vdots$	$\vdots$
zellinterne Komponente $L$	$z_{2N+L+1} := C_{X_L}$ .

Das durch (2.53)–(2.55) (S. 55) gegebene Differentialgleichungssystem wird damit zu

$$\dot{z}_1 = \mu z_1 \quad , \quad (4.32)$$

$$\dot{z}_2 = -r_{S,1} z_1 + z_{N+3} \quad (4.33)$$

$$\vdots$$

$$\dot{z}_N = -r_{S,N-1} z_1 + z_{2N+1} \quad (4.34)$$

$$z_{N+1} = -r_{S,N} z_1 \quad (4.35)$$

$$z_{N+2} = -r_{P,1} z_1 \quad . \quad (4.36)$$

Wie in Abschnitt 2.5.2 gezeigt, ergibt sich die Wachstumsrate aus

$$\mu \approx r_1 \cdot \sum_{i=1}^L \gamma_{1,i} \quad . \quad (4.37)$$

Für die Substrataufnahmerate und die Rate der CO<sub>2</sub>-Produktion wurden dort fol-

gende Beziehungen abgeleitet:

$$\underline{r}_S = \begin{bmatrix} r_{S,1} \\ \vdots \\ r_{S,N} \end{bmatrix} \approx \begin{bmatrix} \sum_{i=1}^L r_i \\ r_{L+1} \\ \vdots \\ r_{2L-1} \\ -\sum_{i=1}^L (\alpha_{i,N} \cdot r_i) \end{bmatrix}, \quad (4.38)$$

$$r_{P,1} \approx -\beta_{1,1} r_1 - \beta_{2,1} r_2 - \cdots - \beta_{L,1} r_L. \quad (4.39)$$

Nach Definition 1 entspricht die Dimension eines flachen Ausgangs für dieses System der Dimension der Systemeingänge

$$\dim(\underline{y}) = \dim(\underline{u}) = N - 1.$$

Ein Ansatz für einen flachen Ausgang besteht in der Berücksichtigung der Konzentrationen der Biomasse  $C_{\tilde{X}}$ , der Glucose  $C_{\tilde{S}_1}$  sowie der Konzentration von allen bis auf einer (d. h.  $N - 3$ ) der im Modell aufgeführten Aminosäuren  $C_{\tilde{S}_2} \cdots C_{\tilde{S}_{N-2}}$ :

$$\underline{y} = \begin{bmatrix} \phi_1(\underline{z}) \\ \phi_2(\underline{z}) \\ \vdots \\ \phi_{N-1}(\underline{z}) \end{bmatrix} := \begin{bmatrix} z_1 \\ z_2 \\ \vdots \\ z_{N-1} \end{bmatrix}. \quad (4.40)$$

Zum Nachweis, dass es sich bei diesem Vektor um einen flachen Ausgang des Systems handelt, ist zu zeigen, wie die Systemgrößen  $\underline{z}$  aus den Komponenten sowie deren Zeitableitungen berechnet werden können. Dies ist trivial für die in  $\underline{y}$  enthaltenen Systemgrößen

$$z_i = y_i =: \psi_i(\underline{y}), \quad \text{für } i = 1 \dots N - 1. \quad (4.41)$$

Die Berechnung der Mengen der zellinternen Bausteine  $C_{X_1} \dots C_{X_L}$  kann nicht direkt aus den Gleichungen (4.32)–(4.36) erfolgen. Hierzu wäre die Integration der Differentialgleichungen erforderlich, was der Definition der differentiellen Flachheit widerspräche.

Die Eigenschaft der Flachheit kann für das gegebene System jedoch durch eine Näherung erreicht werden. Für die Ableitung des Vektors der einzelnen zellinternen Komponenten gilt nach (2.13) (auf S. 21)

$$\frac{d\underline{C}_X}{dt} = \Gamma^T \underline{r} + \Gamma_S^T \underline{r}_S + \Gamma_P^T \underline{r}_P - \mu \underline{C}_X$$

Da in der betrachteten Modellvorstellung keine zellinternen Bausteine an den Transportvorgängen für Substrate und Produkte beteiligt sind, gilt  $\Gamma_S = \Gamma_P = 0$  (s. Abschn. 2.5.2) und damit

$$\frac{dC_X}{dt} = \begin{bmatrix} \gamma_{1,1}r_1 \\ \gamma_{1,2}r_1 + \gamma_{2,2}r_2 & +\gamma_{L+1,2}r_{L+1} \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ \gamma_{1,L}r_1 & +\gamma_{L,L}r_L & +\gamma_{2L-1,L}r_{2L-1} \end{bmatrix} - \mu \begin{bmatrix} C_{X_1} \\ C_{X_2} \\ \vdots \\ C_{X_L} \end{bmatrix}$$

Die Simulationen aus Abschnitt 2.5.1.4 zeigen, dass sich sehr schnell ein Gleichgewicht zwischen der Bildung der zellinternen Komponenten und deren Verbrauch zum Aufbau von Biomasse einstellt (s. Bild 2.15 auf S. 48). Daher kann die Zusammensetzung der biotischen Phase als quasistationär angenommen werden, d. h.  $\frac{dC_X}{dt} = 0$  und es ergibt sich folgendes System algebraischer Gleichungen

$$\begin{bmatrix} \gamma_{1,1}r_1 \\ \gamma_{1,2}r_1 + \gamma_{2,2}r_2 & +\gamma_{L+1,2}r_{L+1} \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ \gamma_{1,L}r_1 & +\gamma_{L,L}r_L & +\gamma_{2L-1,L}r_{2L-1} \end{bmatrix} = \mu \begin{bmatrix} C_{X_1} \\ C_{X_2} \\ \vdots \\ C_{X_L} \end{bmatrix} \quad (4.42)$$

Mit  $y_1 = z_1$  und dessen Ableitung nach der Zeit  $\dot{y}_1 = \dot{z}_1$  folgt die Wachstumsrate der Mikroorganismen aus (4.32)

$$\frac{\dot{y}_1}{y_1} = \mu = r_1 \cdot \sum_{i=1}^L \gamma_{1,i}$$

und damit

$$r_1 = \frac{\dot{y}_1}{y_1} \cdot \frac{1}{\sum_{i=1}^L \gamma_{1,i}} \quad (4.43)$$

Dies erlaubt die Bestimmung der Komponente

$$C_{X_1} = z_{2N+2} = \frac{\dot{y}_1}{y_1} \cdot \frac{\gamma_{1,1}}{\sum_{i=1}^L \gamma_{1,i}} =: \psi_{2N+2}(\underline{y}, \underline{\dot{y}}) \quad (4.44)$$

Für die Reaktionsraten  $r_2 \cdots r_L$  der Synthesereaktionen gilt mit  $y_2 = C_{\tilde{S}_1}$  (s. (2.51) auf S. 54)

$$r_i = r_{i,max} \cdot \frac{y_2}{K_{i,1} + y_2} \cdot \frac{K_{i,2}}{K_{i,2} + C_{X_i}} \quad , \text{ mit } i = 2 \dots L \quad (4.45)$$

Für die Reaktionsraten  $r_{L+1} \cdots r_{2L-2}$  der Synthesereaktionen gilt (s. (2.52) auf S. 55)

$$r_{L+i-1} = r_{L+i-1,max} \cdot \frac{y_{i+1}}{K_{L+i-1,1} + y_{i+1}} \cdot \frac{K_{L+i-1,2}}{K_{L+i-1,2} + C_{X_i}} \quad (4.46)$$

mit  $i = 2 \dots (L-1)$  und  $y_{i+1} = C_{\tilde{S}_i}$ .

Da  $C_{\tilde{S}_{N-1}}$  nicht in  $\underline{y}$  enthalten ist, kann die Reaktionsrate  $r_{2L-1}$  nicht direkt in Abhängigkeit vom flachen Ausgang angegeben werden.

Durch Einsetzen der Reaktionsraten in (4.42) folgen  $L-2$  Bestimmungsgleichungen für  $C_{X_2} \dots C_{X_{L-1}}$  der Form

$$\begin{aligned} 0 = & -\mu C_{X_i} + \gamma_{1,i} r_1 \\ & + \gamma_{i,i} r_{i,max} \cdot \frac{y_2}{K_{i,1} + y_2} \cdot \frac{K_{i,2}}{K_{i,2} + C_{X_i}} \\ & + \gamma_{L+i-1,i} r_{L+i-1,max} \cdot \frac{y_{i+1}}{K_{L+i-1,1} + y_{i+1}} \cdot \frac{K_{L+i-1,2}}{K_{L+i-1,2} + C_{X_i}} =: f_i(\underline{y}, \dot{\underline{y}}, C_{X_i}) \quad , \end{aligned}$$

für  $i = 2 \dots (L-1)$ .

Diese können in Polynome dritter Ordnung von  $C_{X_i}$  umgeformt und numerisch nach  $C_{X_i}$  aufgelöst werden. Die Existenz einer eindeutigen Lösung garantiert der Satz 1 über implizierte Funktionen aus der Analysis (s. S. 76). Hierzu sind die partiellen Ableitungen der Funktionen  $f_i$  zu betrachten:

$$\begin{aligned} \frac{\partial f_i}{\partial C_{X_i}} = & -\mu - \gamma_{i,i} r_{i,max} \cdot \frac{y_2}{K_{i,1} + y_2} \cdot \frac{K_{i,2}}{(K_{i,2} + C_{X_i})^2} \\ & - \frac{\gamma_{L+i-1,i} r_{L+i-1,max} \cdot y_{i+1}}{K_{L+i-1,1} + y_{i+1}} \cdot \frac{K_{L+i-1,2}}{(K_{L+i-1,2} + C_{X_i})^2} \quad , \end{aligned}$$

für  $i = 2 \dots (L-1)$ .

Sämtliche Modellparameter, d. h.  $\gamma_{i,i}$ ,  $r_{i,max}$ ,  $K_{i,1}$ ,  $K_{i,2}$ ,  $\gamma_{L+i-1,i}$ ,  $r_{L+i-1,max}$ ,  $K_{L+i-1,1}$  und  $K_{L+i-1,2}$  sind positiv. Auch die Wachstumsrate und die Substratkonzentrationen können keine negativen Werte annehmen, d. h.

$$\mu \geq 0 \quad , \quad y_2 \geq 0 \quad , \quad y_{i+1} \geq 0 \quad .$$

Solange nicht  $\mu = y_2 = y_{i+1} = 0$  gilt, folgt

$$\frac{\partial f_i}{\partial C_{X_i}} < 0 \quad .$$

Damit existiert nach Satz 1 eine eindeutige Abbildung  $g_i(\underline{y}, \underline{\dot{y}})$  mit

$$f_i(\underline{y}, \underline{\dot{y}}, g_i(\underline{y}, \underline{\dot{y}})) = 0 \quad \text{für } i = 2 \dots (L-1) \quad .$$

Die Berechnung von

$$z_{2N+1+i} = C_{X_i} = g_i(\underline{y}, \underline{\dot{y}}) =: \psi_{2N+1+i}(\underline{y}, \underline{\dot{y}}) \quad , \quad \text{für } i = 2 \dots (L-1) \quad (4.47)$$

ist demnach möglich, erfordert jedoch in den meisten Fällen die Anwendung numerischer Verfahren, zum Beispiel des Newton-Verfahrens.

Die so berechneten  $C_{X_2} \dots C_{X_{L-1}}$  dienen zusammen mit dem durch (4.43) gegebenen Wert für  $r_1$  zur Berechnung von  $C_{X_L}$ . Mit Hilfe der Definition von  $r_1$  (Gl. (2.50) auf S. 54)

$$r_1 = r_{1,max} \cdot \frac{y_2}{K_{1,1} + y_2} \cdot \frac{C_{X_2}}{K_{1,2} + C_{X_2}} \cdot \dots \cdot \frac{C_{X_L}}{K_{1,L} + C_{X_L}}$$

folgt

$$\begin{aligned} C_{X_L} = z_{2N+L+1} &= \frac{K_{1,L} \cdot r_1}{r_{1,max} \cdot \frac{y_2}{K_{1,1} + y_2} \cdot \frac{C_{X_2}}{K_{1,2} + C_{X_2}} \cdot \dots \cdot \frac{C_{X_{L-1}}}{K_{1,L-1} + C_{X_{L-1}}} - r_1} \\ &=: \psi_{2N+L+1}(\underline{y}, \underline{\dot{y}}) \end{aligned} \quad (4.48)$$

Die Kenntnis von  $C_{X_L}$  erlaubt es, die Konzentration  $C_{\tilde{S}_{N-1}}$  des nicht im Vektor  $\underline{y}$  enthaltenen Substrates zu berechnen. Aus (4.42) folgt

$$C_{\tilde{S}_{N-1}} = z_N = \frac{K_{2L-1,2}}{\frac{\gamma_{2L-1,L} r_{2L-1,max}}{\mu C_{X_L} - \gamma_{1,L} r_1 - \gamma_{L,L} r_L} - 1} =: \psi_N(\underline{y}, \underline{\dot{y}}) \quad . \quad (4.49)$$

Die Systemeingänge  $u_1 \dots u_{N-2}$  sind direkt aus den Systemdifferentialgleichungen (4.32)–(4.36) angebbbar.

$$u_i = z_{N+2+i} = \dot{y}_{i+1} + r_{S,i} y_1 =: \psi_{N+2+i}(\underline{y}, \underline{\dot{y}}) \quad , \quad \text{für } i = 1 \dots N-2 \quad (4.50)$$

Der hierzu benötigte Vektor  $\underline{r}_S$  der Substrataufnahmeraten folgt aus (4.38) durch Einsetzen der bereits ermittelten zellinternen Größen.

Die Systemgröße  $z_N = C_{\tilde{S}_{N-1}}$  ist über die Beziehung (4.49) gegeben. Die Zeitableitung dieser Größe ist

$$\dot{z}_N = \frac{K_{2L-1,2} \gamma_{2L-1,L} r_{2L-1,max} \left( \dot{C}_{X_L} - \gamma_{1,L} \dot{r}_1 - \gamma_{L,L} \dot{r}_L \right)^2}{\left( \gamma_{2L-1,L} r_{2L-1,max} - \mu C_{X_L} + \gamma_{1,L} r_1 + \gamma_{L,L} r_L \right)^2} . \quad (4.51)$$

An dieser Stelle kann erneut von der Näherung  $\dot{C}_X = 0$  und speziell  $\dot{C}_{X_L} = 0$  Gebrauch gemacht werden (s. (4.42) auf S. 84). Die anderen beiden Ableitungen sind nach (4.43) bzw. (4.45) gegeben durch

$$\begin{aligned} \dot{r}_1 &= \frac{\ddot{y}_1 y_1 - \dot{y}_1^2}{y_1^2} \cdot \frac{1}{\sum_{i=1}^L \gamma_{1,i}} \\ \dot{r}_L &= r_{L,max} \cdot \frac{K_{L,1} \dot{y}_2}{(K_{L,1} + y_2)^2} \cdot \frac{K_{i,2}}{K_{i,2} + C_{X_i}} . \end{aligned}$$

Diese Beziehungen ermöglichen schließlich die Ermittlung der Substratzufuhr

$$u_{N-1} = z_{2N+1} = \dot{z}_N + r_{S,N-1} y_1 =: \psi_{2N+1}(\underline{y}, \underline{\dot{y}}, \underline{\ddot{y}}_1) . \quad (4.52)$$

Die Sauerstoffverbrauchsrate  $z_{N+2}$  und die Kohlendioxidproduktionsrate  $z_{N+3}$  folgen durch Einsetzen der ermittelten Systemgrößen in die Systemgleichungen (4.32)–(4.36) und die Definitionen der Reaktionsgeschwindigkeiten (4.38) und (4.39):

$$z_{N+2} = \dot{C}_{\tilde{S}_N} = y_1 \cdot \sum_{i=1}^L (\alpha_{i,N} \cdot r_i) =: \psi_{N+2}(\underline{y}, \underline{\dot{y}}, \underline{\ddot{y}}_1) \quad (4.53)$$

$$z_{N+3} = \dot{C}_{\tilde{P}_1} = y_1 (\beta_{1,1} r_1 + \beta_{2,1} r_2 + \dots + \beta_{L,1} r_L) =: \psi_{N+3}(\underline{y}, \underline{\dot{y}}, \underline{\ddot{y}}_1) . \quad (4.54)$$

Somit ist gezeigt, wie sich alle Systemgrößen  $\underline{z}$  aus den Komponenten des Vektors  $\underline{y}$  sowie deren Zeitableitungen ergeben. Nach Definition 1 (auf S. 75) ist  $\underline{y}$  ein flacher Ausgang des Systems (4.32)–(4.36).

## 4.4 Anwendungen

### 4.4.1 Trajektorienplanung

Die Transformationsbeziehungen  $\underline{\psi}$  ermöglichen es, aus einer Trajektorie für den flachen Ausgang  $\underline{y}(t)$  den Zeitverlauf der Eingangsgrößen  $\underline{u}(t)$  zu berechnen. Somit können leicht Steuerungen angegeben werden, mit der ein System Solltrajektorien

durchläuft. Als Beispiel dient hier und im folgenden das YS-Modell für das Wachstum von *P. luminescens* auf Hefeextrakt und Glucose für das ein flacher Ausgang in Abschnitt 4.3.1 angegeben ist.

Eine Solltrajektorie für die Biomasse  $y_1 = C_{\tilde{X}}$  ergibt sich zum Beispiel aus der Forderung nach einer konstanten Wachstumsrate

$$\mu(S) = \mu_d = \textit{konstant} \quad . \quad (4.55)$$

Damit wird die Differentialgleichung (4.6) zu

$$\mu(S) = \frac{\dot{y}_1}{y_1} = \mu_d \quad .$$

Mit  $y_1(0) = C_{\tilde{X},0}$  ist deren Lösung

$$\begin{aligned} y_{1,d}(t) &= C_{\tilde{X},0} e^{\mu_d t} \\ \dot{y}_{1,d}(t) &= \mu_d C_{\tilde{X},0} e^{\mu_d t} \\ \ddot{y}_{1,d}(t) &= \mu_d^2 C_{\tilde{X},0} e^{\mu_d t} \quad . \end{aligned} \quad (4.56)$$

Für die Solltrajektorie des Substrats  $y_2 = C_{\tilde{S}_1}$  dient beispielhaft ein Polynom 2. Ordnung

$$y_{2,d}(t) = \alpha_1 + \alpha_2 t + \alpha_3 t^2 \quad .$$

Mit den Nebenbedingungen

$$\begin{aligned} y_{2,d}(0) &= C_{\tilde{S}_1,0} \\ y_{2,d}(t = t_e) &= 0 \end{aligned}$$

wird ein Zeitintervall definiert, in dem die Bakterien das Substrat  $C_{\tilde{S}_1}$  vollständig verbraucht haben sollen. Für die Koeffizienten des Polynoms folgt

$$\begin{aligned} \alpha_1 &= C_{\tilde{S}_1,0} \\ \alpha_2 &:= 0 \\ \alpha_3 &= -\frac{C_{\tilde{S}_1,0}}{t_e^2} \quad . \end{aligned}$$

Die Solltrajektorie und deren Ableitungen lauten

$$y_{2,d} = C_{\tilde{S}_1,0} \left( 1 - \frac{1}{t_e^2} t^2 \right) \quad (4.57)$$

$$\dot{y}_{2,d} = -2 \frac{C_{\tilde{S}_1,0}}{t_e^2} t \quad .$$

Die gesuchte Steuerung, d. h. der gesuchte Verlauf der Substratzufuhr kann durch Einsetzen der Solltrajektorien (4.56), (4.57) in (4.23) und (4.31) berechnet werden:

$$u_1(t) = \psi_4(y_{1,d}(t), y_{2,d}(t), \dot{y}_{2,d}(t)) \quad (4.58)$$

$$u_2(t) = \psi_5(y_{1,d}(t), y_{2,d}(t), \dot{y}_{1,d}(t), \ddot{y}_{1,d}(t), \dot{y}_{2,d}(t)) \quad . \quad (4.59)$$

#### 4.4.2 Steuerung des Wachstumsprozesses

In der folgenden Simulationsstudie werden die von R. Stanka ermittelten Parameter für das YS-Modell, das ein Wachstum von *P. luminescens* auf Hefeextrakt ( $C_{\tilde{S}_1}$ ) und Glucose ( $C_{\tilde{S}_2}$ ) beschreibt, verwendet (s. Tabelle 2.1, S. 29).

Für die Trajektorie des flachen Ausgangs werden

$$C_{\tilde{X},0} = 0.5, \quad \mu_d = q_{S_1,max} Y_{X/S_1}$$

$$C_{\tilde{S}_1,0} = 0.5, \quad t_E = 22 \text{ h}$$

angenommen.

Diese Wahl der Parameter garantiert geringe Mengen an Zucker in der Kulturflüssigkeit und vermeidet so inhibierende Einflüsse auf das Bakterienwachstum (s. [29][26]).

Zunächst wird die nach Abschnitt 4.4.1 entwickelte Steuerung am nominalen Modell getestet. Die Ergebnisse, die in Bild 4.1 dargestellt sind, zeigen, dass sowohl die Vorgabe eines konstanten Wachstums  $\mu = \mu_d$  als auch der Verlauf des Substrats  $C_{\tilde{S}_1} = y_{2,d}$  eingehalten wird.

Dies ist jedoch nur für das nominale Modell gegeben. Falls Modellunsicherheiten oder Störungen vorliegen, kann eine exakte Trajektorienfolge nicht gewährleistet werden. Als Beispiel, welche Auswirkungen Modellunsicherheiten haben, wird die Steuerung mit einer relativen Abweichung von 10 % für den Ausbeutekoeffizienten  $Y_{X/S_1}$  des realen Modells simuliert.

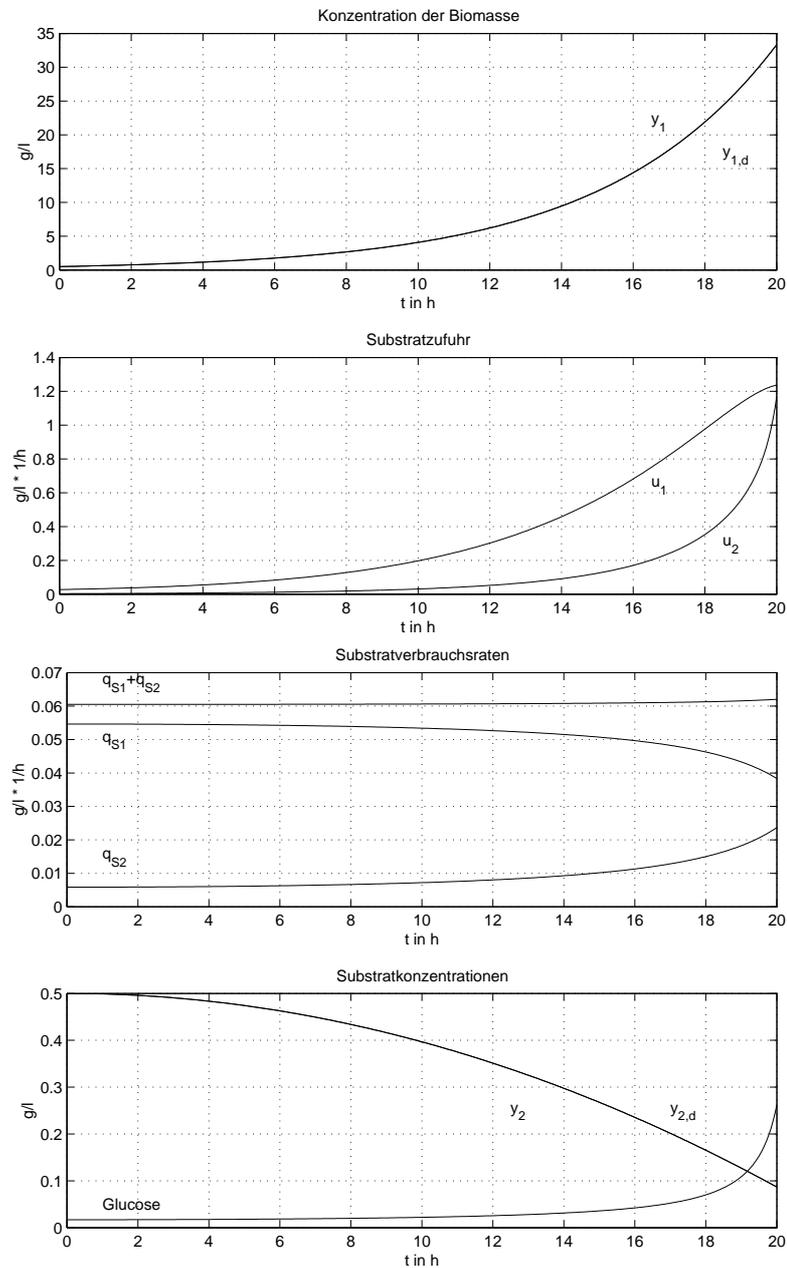


Bild 4.1: Verlauf der Konzentration der Biomasse  $y_1 = C_{\bar{X}}$ , der Solltrajektorie  $y_{1,d}$ , der Substratzufuhr, der Substratverbrauchsraten, der Substratkonzentrationen  $C_{\bar{S}_1}$ ,  $C_{\bar{S}_2}$  und der Solltrajektorie  $y_{2,d}$  bei flachheitsbasierter Steuerung des Wachstums von *P. luminescens* (Simulation)

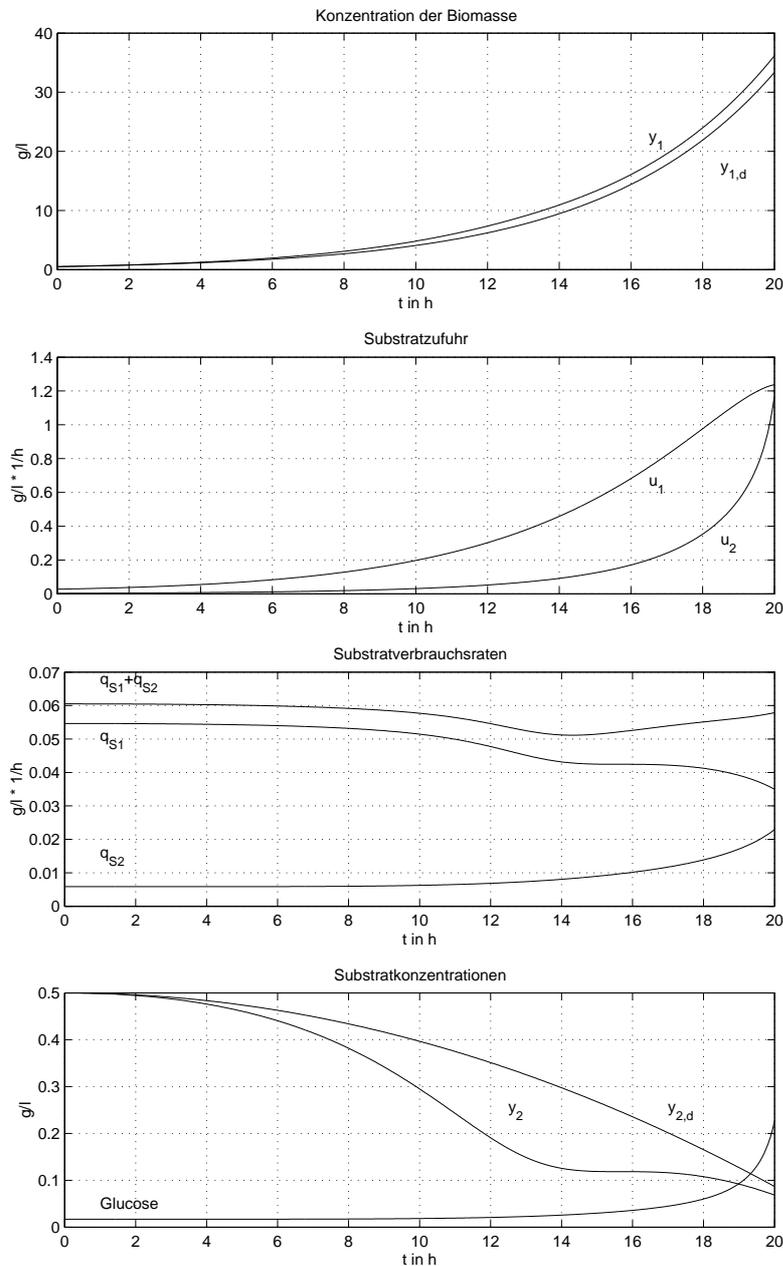


Bild 4.2: Verlauf der Konzentration der Biomasse  $y_1 = C_{\bar{X}}$ , der Solltrajektorie  $y_{1,d}$ , der Substratzufuhr, der Substratverbrauchsrate, der Substratkonzentrationen  $C_{\bar{S}_1}$ ,  $C_{\bar{S}_2}$  und der Solltrajektorie  $y_{2,d}$  bei flachheitsbasierter Steuerung des Wachstums von *P. luminescens* unter Annahme des Parameterfehlers  $\frac{\Delta Y_{X/S_1}}{Y_{X/S_1}} = 0.1$  (Simulation)

Wie in Bild 4.2 erkennbar ist, entstehen erhebliche Abweichungen sowohl in der Wachstumsrate  $\mu$  und damit in der Entwicklung der Biomasse  $C_{\bar{X}}$  als auch im Substratverlauf  $C_{\bar{S}_1}$  von den Solltrajektorien. Im folgenden Abschnitt wird daher ein Konzept vorgestellt, um eine Trajektorienfolge auch unter diesen Bedingungen zu gewährleisten.

### 4.4.3 Trajektorienfolgeregelung der *P. luminescens* Kultur

Die Ergebnisse des Abschnittes 4.4.2 machen deutlich, wie wichtig die Entwicklung eines Konzeptes zur Ausregelung des Trajektorienfolgefehlers ist. Dies ist aufgrund des nichtlinearen Systemverhaltens keine triviale Problemstellung. Die Transformation des Systems auf die Koordinaten des flachen Ausgangs erlaubt allerdings eine elegante Lösung durch exakte Linearisierung mittels geeigneter Zustandsrückführung. Wie in den vorhergehenden Abschnitten soll hier das YS-Modell als Beispiel dienen.

Zunächst wird ein virtueller Systemeingang

$$\underline{v} := \begin{bmatrix} v_1 \\ v_2 \end{bmatrix}$$

definiert. Die Komponenten von  $\underline{v}$  seien die jeweils höchsten, in den Transformationsbeziehungen (4.23) und (4.31) auftretenden Zeitableitungen des flachen Ausgangs

$$\begin{aligned} v_1 &:= \ddot{y}_1 \\ v_2 &:= \dot{y}_2 \quad . \end{aligned}$$

Durch diese Definition ergibt sich ein System mit den Koordinaten des flachen Ausgangs in der sogenannten Brunovsky-Normalform ([40])

$$\begin{bmatrix} \dot{y}_1 \\ \dot{y}_1 \\ \dot{y}_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} y_1 \\ \dot{y}_1 \\ y_2 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} 0 & 0 \\ 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} v_1 \\ v_2 \end{bmatrix} \quad . \quad (4.60)$$

Da es sich bei diesem System um 2 entkoppelte lineare Eingrößensysteme handelt, können getrennte Regler für die Regelgrößen  $y_1$  und  $y_2$  entworfen werden (s. Bild 4.3).

Zur Ausregelung der Abweichungen in  $y_1$  soll aufgrund des Doppelintegratorverhaltens ein PD-Ansatz gemacht werden. Als Regler für  $y_2$  dient ein einfacher Proportionalregler. Führt man den Trajektorienfolgefehler

$$e_1(t) := y_{1,d}(t) - y_1(t) \quad (4.61)$$

$$e_2(t) := y_{2,d}(t) - y_2(t) \quad (4.62)$$

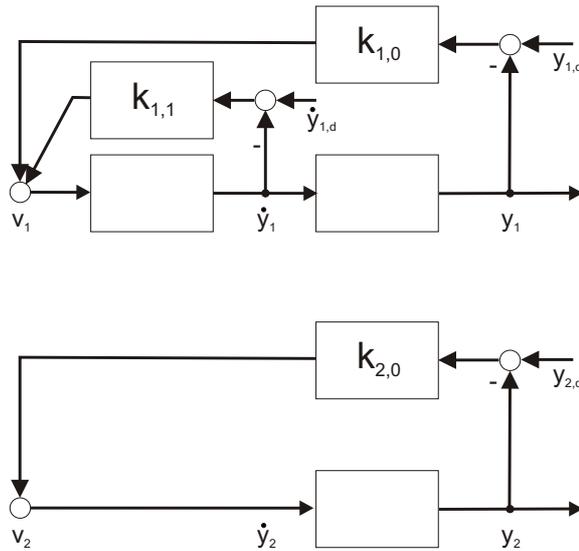


Bild 4.3: Systemdarstellung in Brunovsky-Normalform mit einschleifigen Rückführungen

ein, so ergeben sich die Differentialgleichungen der Fehlerdynamik zu

$$v_1 = k_{1,0} e_1(t) + k_{1,1} \dot{e}_1(t) \quad (4.63)$$

$$v_1 = k_2 e_2(t) \quad , \quad (4.64)$$

$$\ddot{y}_1 + k_{1,1} \dot{y}_1(t) + k_{1,0} y_1 = k_{1,0} y_{1,d} + k_{1,1} \dot{y}_{1,d} \quad (4.65)$$

$$\dot{y}_2 + k_{2,0} y_2 = k_{2,0} y_{2,d} \quad (4.66)$$

Die realen Systemeingänge  $u_1$  und  $u_2$  sind wie folgt zu berechnen:

1. Transformation des Systems auf Koordinaten des flachen Ausgangs durch Berechnung von  $y_1 = \phi_1(z)$ ,  $\dot{y}_1 = \frac{d}{dt} \phi_1(z)$  und  $y_2 = \phi_2(z)$  mit (4.9), (4.13) und (4.10).
2. Berechnung des virtuellen Systemeingangs  $\underline{v}$  mit Hilfe der Differentialgleichungen der Fehlerdynamik (4.65) und (4.66).
3. Berechnung der realen Systemeingänge nach (4.23) und (4.31)

$$u_1 = \psi_4(y_1, y_2, v_2) \quad , \quad (4.67)$$

$$u_2 = \psi_5(y_1, y_2, \dot{y}_1, v_1, v_2) \quad . \quad (4.68)$$

Durch diese Vorgehensweise erhält man eine nichtlineare Zustandsrückführung für eine Ausregelung des Trajektorienfolgefehlers mit der vorgegebenen Dynamik. Dabei wird die Kenntnis der Systemzustände vorausgesetzt, die jedoch nicht ohne weiteres gegeben ist. Wie die nicht direkt messbaren Zustände am realen Prozess aus online durchführbaren Messungen mit Hilfe von Beobachterverfahren geschätzt werden können, ist in Kapitel 3 gezeigt.

Für die in Bild 4.4 gezeigte Simulationsstudie ist die Fehlerdynamik durch die Reglerparameter so gewählt, dass sich Polstellen bei  $s_{1,1} = -1.5$ ,  $s_{1,2} = -3$  für  $e_1$  und  $s_{2,1} = -2$  für  $e_2$  ergeben.

Die Vorteile der so entworfenen Rückführung wird beim Auftreten von Modellfehlern oder Störungen deutlich. Zum Vergleich mit der Steuerung aus Abschnitt 4.4.2 ist in Bild 4.4 das Ergebnis der Simulation für den Fall dargestellt, dass erneut der Parameter  $Y_{X/S_1}$  um 10% größer ist, als bei der Berechnung der Transformationsbeziehungen angenommen. Es ist klar erkennbar, dass der Folgefehler wesentlich kleiner ausfällt als bei einer Steuerung der Bakterienkultur. Die bleibende dynamische Regelabweichung von der Solltrajektorie  $y_{2,d}$  für das Substrat  $C_{S_1}$  ist nicht verwunderlich, da die Fehlerdynamik nicht nach dem *internen Modell-Prinzip* entworfen wurde. Dies ist Gegenstand des folgenden Abschnittes. Ein weiterer Grund für die geringfügigen Abweichungen ist die Tatsache, dass in den ersten Stunden eine negative Substratzufuhr  $u_2$  benötigt wird. Eine negative Substratzufuhr wurde für diese Simulation ausgeschlossen, da sie in der Realität nicht realisierbar ist.<sup>(5)</sup>

#### 4.4.4 Regelung nach dem internen Modell-Prinzip

##### 4.4.4.1 Formulierung im Zustandsraum

Gegeben sei ein Standard-Regelkreis nach Bild 4.5 sowie das Signalmodell der Führungsgröße  $w(t)$  und der Störung  $d(t)$  bzw. deren Laplace-Transformierte  $W(s)$  und  $D(s)$ .

Das interne Modell-Prinzip besagt, dass ein Regelkreis den Anforderungen nach perfekter Sollwertfolge und Störungsausregelung genügt, falls die Übertragungsfunktion des offenen Regelkreises  $G_0(s)$  die Pole des jeweiligen Signalmodells  $W(s)$  bzw.  $D(s)$  enthält.

Für die Realisierung des Prinzips müssen die Pole der Signalmodelle in der Übertragungsfunktion des Reglers  $K(s)$  vorhanden sein. Bei einer Darstellung im Zustands-

---

<sup>(5)</sup>Eine Möglichkeit zur Verringerung der Substratkonzentrationen besteht z. B. im Einsatz von Dialysemembranen. Diese kostspielige Methode erlaubt jedoch nur geringe Änderungen der Konzentrationen und steht für den hier betrachteten Prozess nicht zur Verfügung.

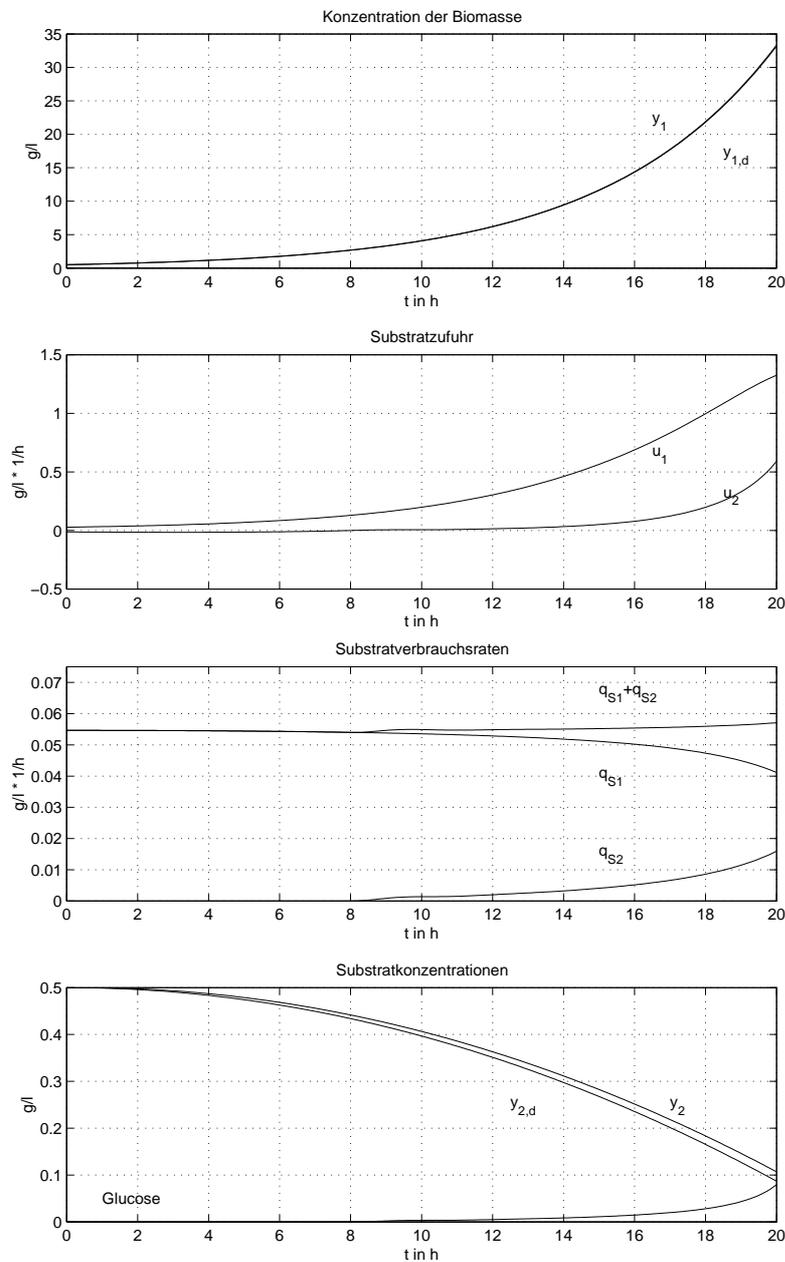


Bild 4.4: Verlauf der Konzentration der Biomasse  $y_1 = C_{\tilde{X}}$ , der Solltrajektorie  $y_{1,d}$ , der Substratzufuhr, der Substratverbrauchsrate, der Substratkonzentrationen  $C_{\tilde{S}_1}$ ,  $C_{\tilde{S}_2}$  und der Solltrajektorie  $y_{2,d}$  bei flachheitsbasierter Trajektorienregelung des Wachstums von *P. luminescens* unter Annahme des Parameterfehlers  $\frac{\Delta Y_{X/S_1}}{Y_{X/S_1}} = 0.1$  (Simulation)

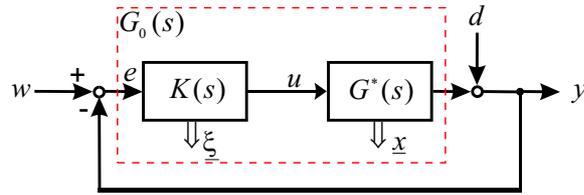


Bild 4.5: Standard-Regelkreis

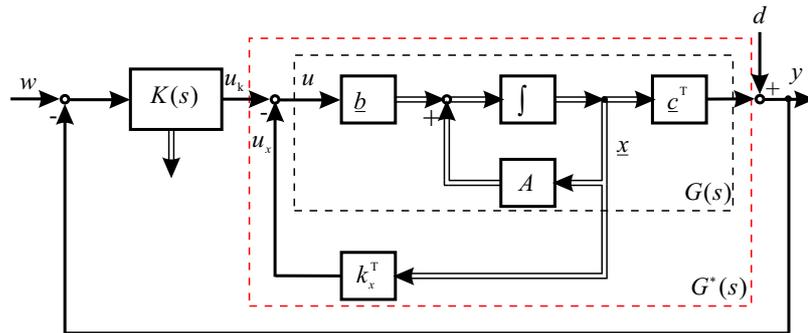


Bild 4.6: Darstellung des Regelkreises im Zustandsraum

raum ergibt sich (s. Bild 4.6) für den Regler

$$\begin{aligned}\dot{\underline{\xi}} &= A_K \underline{\xi} + \underline{b}_K (w - y) \\ u_k &= \underline{c}_K^T \underline{\xi} + d_k (w - y)\end{aligned}$$

und für die Strecke

$$\begin{aligned}\dot{\underline{x}} &= A \underline{x} + \underline{b} u \\ y &= \underline{c}^T \underline{x} \quad .\end{aligned}$$

Mit

$$u = u_k - \underline{k}_x^T \underline{x} = d_K w - \left[ (d_K \underline{c}^T + \underline{k}_x^T) \quad -\underline{c}_K^T \right] \cdot \begin{bmatrix} \underline{x} \\ \underline{\xi} \end{bmatrix}$$

ergibt sich das erweiterte Zustandsraummodell

$$\begin{bmatrix} \dot{\underline{x}} \\ \dot{\underline{\xi}} \end{bmatrix} = \underbrace{\begin{bmatrix} A & 0 \\ -\underline{b}_K \underline{c}^T & A_K \end{bmatrix}}_{A^*} \begin{bmatrix} \underline{x} \\ \underline{\xi} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \underline{b} \\ 0 \end{bmatrix} u + \begin{bmatrix} 0 \\ \underline{b}_K \end{bmatrix} w \quad .$$

Für dieses System ( $A^*$ ) ist ein Polvorgaberegler

$$\underline{k}^{*T} = \begin{bmatrix} \underline{k}_1^T \\ \underline{k}_2^T \end{bmatrix}$$

zu entwerfen. Aus

$$\underline{k}^{*T} = [(d_K \underline{c}^T + \underline{k}_x^T) \quad -\underline{c}_K^T]$$

ergibt sich

$$\begin{aligned} \underline{c}_K^T &= -\underline{k}_2^T \\ \underline{k}_x^T &= \underline{k}_1^T - d_K \underline{c}^T \quad . \end{aligned}$$

Bei der Wahl von  $d_K$  bestehen Freiheitsgrade. Eine Möglichkeit besteht in der Wahl von

$$d_K = \frac{-1}{\underline{c}^T A^{-1} \underline{b}} \quad ,$$

so dass für einen Sollwertsprung

$$u(t = 0_+) = u(t \rightarrow \infty)$$

gilt.

#### 4.4.4.2 Regler mit Führungsmodell

Grundlage der Anwendung des internen Modell-Prinzips zur perfekten Sollwertfolge ist das Signalmodell der zu folgenden Führungsgröße. Speziell bei der flachheitsbasierten Trajektorienfolgeregelung liegt dies in Form der Zeitverläufe des flachen Ausgangs vor. Es soll folgende Trajektorie für das Wachstum von *P. luminescens* auf Hefeextrakt und Glucose (YS-Modell nach Gl. (2.23)–(2.25) und Tab. 2.1) gelten:

1. Die Konzentration der Biomasse soll exponentiell mit konstanter Wachstumsrate  $\mu_d$  zunehmen (s. 4.56). Mit  $y_1(0) = C_{\tilde{x},0}$  folgt

$$\begin{aligned} y_{1,d}(t) &= C_{\tilde{x},0} e^{\mu_d t} \\ \dot{y}_{1,d}(t) &= \mu_d C_{\tilde{x},0} e^{\mu_d t} \\ \ddot{y}_{1,d}(t) &= \mu_d^2 C_{\tilde{x},0} e^{\mu_d t} \quad . \end{aligned} \tag{4.69}$$

2. Die Konzentration des Hefeextrakts soll exponentiell abnehmen. Mit  $y_2(0) = C_{\tilde{s}_1,0}$  folgt

$$y_{2,d} = C_{\tilde{s}_1,0} (1 - 0.1e^{0.1t}) \quad (4.70)$$

$$\dot{y}_{2,d} = -C_{\tilde{s}_1,0} \cdot 0.01e^{0.1t} \quad (4.71)$$

Die Wahl des Exponenten für die Solltrajektorie genügt der Forderung, dass die Substrataufnahmeraten geringer sein müssen als die maximalen Raten  $q_{S_1,max}$  und  $q_{S_12,max}$  (s. Abschnitt 4.3.1, S. 81).

Die Transformation des Wachstumsmodells auf Brunovsky-Normalform durch die in Abschnitt 4.4.3 angegebene Zustandsrückführung erlaubt die Entkoppelung beider Regelgrößen und damit den getrennten Entwurf von zwei Zustandsreglern.

Die Regelstrecke für  $y_1$  (Doppelintegrator) hat folgende Zustandsraumdarstellung

$$\begin{aligned} \begin{bmatrix} \dot{y}_1 \\ \dot{y}_1 \end{bmatrix} &= \underbrace{\begin{bmatrix} 0 & 1 \\ 0 & 0 \end{bmatrix}}_{A_1} \begin{bmatrix} y_1 \\ \dot{y}_1 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} 0 \\ 1 \end{bmatrix} v_1 \\ \underline{y}^* &= \underbrace{\begin{bmatrix} 1 & 0 \end{bmatrix}}_{\underline{c}_1^T} \begin{bmatrix} y_1 \\ \dot{y}_1 \end{bmatrix} . \end{aligned}$$

Die Solltrajektorie (4.69) weist einen Pol bei  $s = \mu_d$  auf. Damit der offene Regelkreis ebenfalls diese Polstelle aufweist, erfolgt der Reglerentwurf für das erweiterte System

$$\begin{aligned} \begin{bmatrix} \dot{y}_1 \\ \dot{y}_1 \\ \dot{\xi}_1 \end{bmatrix} &= \underbrace{\begin{bmatrix} 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ -1 & 0 & \mu_d \end{bmatrix}}_{A_1^*} \begin{bmatrix} y_1 \\ \dot{y}_1 \\ \xi_1 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} 0 \\ 1 \\ 0 \end{bmatrix} v_1 + \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 1 \end{bmatrix} y_{1,d} \\ \underline{y}_1^* &= \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} y_1 \\ \dot{y}_1 \\ \xi_1 \end{bmatrix} . \end{aligned}$$

Mit den Polen  $s_{1,1} = -1.4$ ,  $s_{1,2} = -1.3$  und  $s_{1,3} = -20$  ergibt sich der Rückführvektor

$$\underline{k}_1^{*T} = [(d_{K,1}\underline{c}_1^T + \underline{k}_{x,1}^T) \quad -\underline{c}_{K,1}^T] = [60.6 \quad 22.9 \quad -49.1]$$

und damit für  $d_{K,1} = 0$

$$\underline{c}_{K,1}^T = [49.1]$$

$$\underline{k}_{x,1}^T = [60.6 \quad 22.9] .$$

Für das zweite Teilsystem (Integrator) kann analog ein Regler nach dem internen Modell-Prinzip entworfen werden. Die Trajektorie (4.70) weist einen Pol bei  $s = 0.1$  auf. Zusätzlich soll der offene Regelkreis noch einen Pol bei  $s = 0$  besitzen, damit sprungförmigen Änderungen der Sollgröße ebenfalls perfekt gefolgt werden kann. Die in der Strecke vorliegende Polstelle bei  $s = 0$  wird bereits durch die innere Zustandsrückführung verschoben und tritt nicht mehr in der Übertragungsfunktion des offenen Kreises auf. Damit ist das folgende erweiterte System zu betrachten

$$\begin{bmatrix} \dot{y}_2 \\ \dot{\xi}_2 \\ \ddot{\xi}_2 \end{bmatrix} = \underbrace{\begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \\ -1 & 0 & 0.1 \end{bmatrix}}_{A_2^*} \begin{bmatrix} y_1 \\ \xi_2 \\ \dot{\xi}_2 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix} v_2 + \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 1 \end{bmatrix} y_{2,d}$$

$$\underline{y}_2^* = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} y_2 \\ \xi_2 \\ \dot{\xi}_2 \end{bmatrix} .$$

Mit den Polen  $s_{2,1} = -10$ ,  $s_{2,2} = -20$  und  $s_{2,3} = -15$  ergibt sich der Rückführvektor

$$\underline{k}_2^{*T} = [(d_{K,2}\underline{c}_2^T + \underline{k}_{x,2}^T) \quad -\underline{c}_{K,2}^T] = [45.1 \quad -3000 \quad -645.5]$$

und damit für  $d_{K,2} = 0$

$$\underline{c}_{K,2}^T = [-3000 \quad -645.5] \quad , \quad \underline{k}_{x,2}^T = [45.1] \quad .$$

Die mit diesem Konzept erreichbare Regelgüte ist anhand der in Bild 4.7 dargestellten Simulationsstudie zu erkennen. Dabei herrschen die gleichen Bedingungen wie für die Simulationen in Abschnitt 4.4.3 (s. Bild 4.4). Auch hier gilt die Annahme des Parameterfehlers  $\frac{\Delta Y_{X/S_1}}{Y_{X/S_1}} = 0.1$  gegenüber dem nominalen Modell des Bakterienwachstums.

Mit Hilfe des internen Modell-Prinzips gelingt es der Solltrajektorie nach einer Einschwingzeit von weniger als einer Stunde exakt zu folgen. Dies ist jedoch mit großen Stelleingriffen verbunden, die zu Beginn der Simulation auch negative Werte aufweisen. In der Realität sind derartige Stellgrößen nur mit einem erheblichen Aufwand zu realisieren. Die dadurch theoretisch entstehenden negativen Substratkonzentrationen sind nicht realisierbar und wurden daher in der Simulation ausgeschlossen. Trotz dieser Nichtlinearität gelingt es sehr gut, den Solltrajektorien zu folgen.

Es bleibt festzuhalten, dass insbesondere für die flachheitsbasierte Trajektorienfolge-Regelung das interne Modell-Prinzip eine äußerst sinnvolle Ergänzung darstellt. Sowohl die Tatsache, dass die Solltrajektorien unabhängig voneinander wählbar sind und

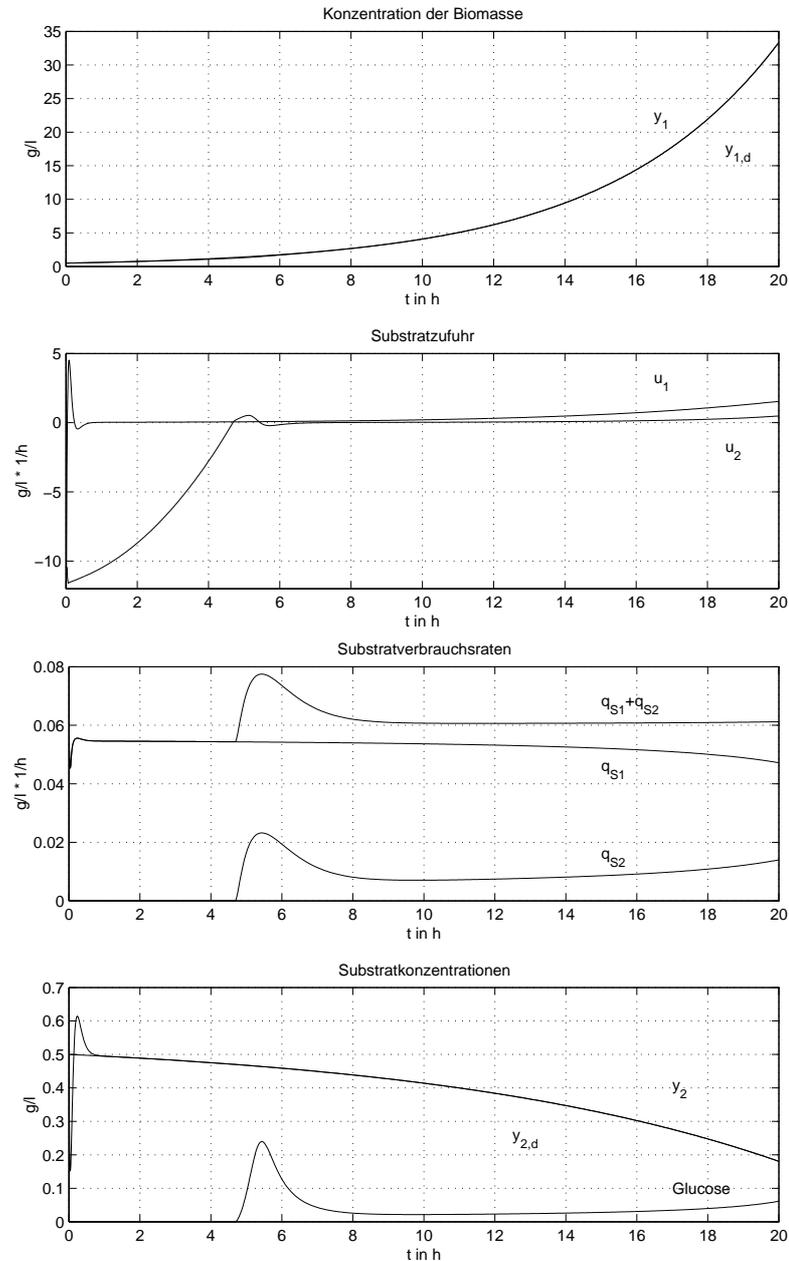


Bild 4.7: Verlauf der Konzentration der Biomasse  $y_1 = C_{\bar{X}}$ , der Solltrajektorie  $y_{1,d}$ , der Substratzufuhr, der Substratverbrauchsrate, der Substratkonzentrationen  $C_{\bar{S}_1}$ ,  $C_{\bar{S}_2}$  und der Solltrajektorie  $y_{2,d}$  bei flachheitsbasierter Trajektorienregelung des Wachstums von *P. luminescens* unter Annahme des Parameterfehlers  $\frac{\Delta Y_{X/S_1}}{Y_{X/S_1}} = 0.1$  bei Berücksichtigung des Führungsmodells im Regler (Simulation)

---

damit als Signalmodell zur Verfügung stehen, als auch die Transformation des Systems auf entkoppelte Integratorketten (Brunovsky-Normalform) erlauben eine einfache Anwendung dieses Prinzips.

Die Darstellung und der Reglerentwurf im Zustandsraum bieten den Vorteil eines numerisch auswertbaren Verfahrens, das die Berechnung der Rückführung auch bei sich ändernden Solltrajektorien, zum Beispiel während der Laufzeit eines Prozesses, erlaubt.

# Kapitel 5

## Fed-Batch Experimente

### 5.1 Problemstellung

Zur Züchtung der Nematoden *H. bacteriophora* wird eine Kultur der Bakterien *P. luminescens* benötigt, in der sich die Nematoden entwickeln und vermehren. Der Zustand der Bakterienkultur, insbesondere deren Zelldichte, beeinflusst die Ausbeute an Nematoden stark [12]. Daraus ergibt sich die Problemstellung der Kultivierung von *P. luminescens* unter reproduzierbaren Bedingungen mit möglichst hoher Zelldichte. Die zur Zeit in der industriellen Produktion erzielbaren Konzentrationen der Biomasse schwanken zwischen 7 g/l und 15 g/l.

Der hier vorgestellte Lösungsweg besteht in einer gezielten Zufuhr von Substraten im Fed-Batch-Betrieb. Die Zufütterungsstrategien resultieren aus den in Kapitel 4 vorgestellten flachheitsbasierten Trajektorienplanungen, d. h. sie ergeben sich aus Trajektorien für die flachen Ausgänge der mathematischen Modelle.

Bei der Kultivierung von *P. luminescens* im reinen Batch-Betrieb, d. h. mit Vorlage der insgesamt benötigten Nährmedien, ist die maximal erreichbare Bakteriendichte gering. Ein Grund hierfür beruht auf der Tatsache, dass sich die Bakterien nur unter geringen osmotischen Drücken entwickeln können. Die maximal vertretbare Osmolarität liegt bei 600 mOsmol/kg [26]. Dies ist vor allem bei der Verwendung des salzhaltigen Hefeextrakts problematisch.

Im definierten Medium treten zudem Probleme mit der Löslichkeit der benötigten Aminosäuren auf. Insbesondere die Löslichkeit von Tyrosin in Wasser ist auf ca. 2 mmol/l beschränkt, was in einer relativ niedrigen Bakteriendichte resultiert. Da die Wachstumsrate ohne diese Aminosäure deutlich herabgesetzt wird, ist eine Zugabe während des laufenden Prozesses angebracht.

Eine weitere Anwendung der gezielten Zugabe von Nährsubstraten besteht in der Beschränkung der maximalen Wachstumsrate. Dies ist vor allem bei hohen Bakteriendichten sinnvoll, da ansonsten keine ausreichende Versorgung der Bakterien mit Sauerstoff erfolgen kann. In [44] wird diese Vorgehensweise bei der Hochzelldichtekultivierung von *E. coli* vorgestellt.

## 5.2 YS-Medium (open-loop control)

### 5.2.1 Trajektorienplanung

Für die Kultivierung im YS-Medium soll eine geringe aber konstante Konzentration an Hefeextrakt vorliegen. Dies garantiert eine ausreichende Versorgung der Bakterien mit allen notwendigen Aminosäuren während der gesamten Laufzeit des Prozesses. Da nicht alle Aminosäuren in gleich hoher Konzentration im Hefeextrakt enthalten sind, wäre dies bei Verwendung der in Kapitel 4 vorgestellten und in den Simulationen verwendeten Trajektorien nicht der Fall.

Der Zeitverlauf für die Biomasse selbst ergibt sich aus der Forderung, dass die Wachstumsrate auf 90 % der maximal möglichen begrenzt bleiben soll. Damit ergeben sich folgende Solltrajektorien für das Wachstum von *P. luminescens* auf Hefeextrakt und Glucose

1. Die Konzentration der Biomasse soll exponentiell mit konstanter Wachstumsrate  $\mu_d = 0.9 \mu_{max}$  zunehmen (s. 4.56). Mit  $y_1(0) = C_{\tilde{X},0}$  folgt

$$y_{1,d}(t) = C_{\tilde{X},0} e^{\mu_d t}; \quad \dot{y}_{1,d}(t) = \mu_d C_{\tilde{X},0} e^{\mu_d t}; \quad \ddot{y}_{1,d}(t) = \mu_d^2 C_{\tilde{X},0} e^{\mu_d t}.$$

2. Die Konzentration des Hefeextrakts im Medium soll konstant sein.

$$y_{2,d} = 5 \text{ g/l}; \quad \dot{y}_{2,d} = 0$$

Mit Hilfe der Transformationsbeziehungen zur Berechnung der Systemeingänge aus den Zeitverläufen für den flachen Ausgang des YS-Modells folgen die beiden Substratzufuhren (s. Abschnitt 4.3.1).

### 5.2.2 Ergebnisse der Kultivierungen

Die Fed-Batch Kultivierungen von *P. luminescens* mit der flachheitsbasierten Steuerung wurden in dem 2 l fassenden Bioreaktor durchgeführt (s. Abschn. 1.3.2).

In Experiment *YS\_FedBatch\_A* erfolgte die Zufuhr der Substrate nach den in Bild 5.1 dargestellten Zeitverläufen für die Zufuhr von Hefeextrakt und Glucose. Aufgrund technischer Probleme mit der Zugabevorrichtung am Bioreaktor endete die Zugabe von Hefeextrakt bereits nach 18 Stunden. Die Zugabe von Glucose erfolgte wie gewünscht über einen Zeitraum von 24 Stunden.

Die durch diese Steuerung erzielte Konzentration der Biomasse ist am Ende der Kultivierung deutlich geringer als die der Solltrajektorie (s. Bild 5.2). Dennoch ist

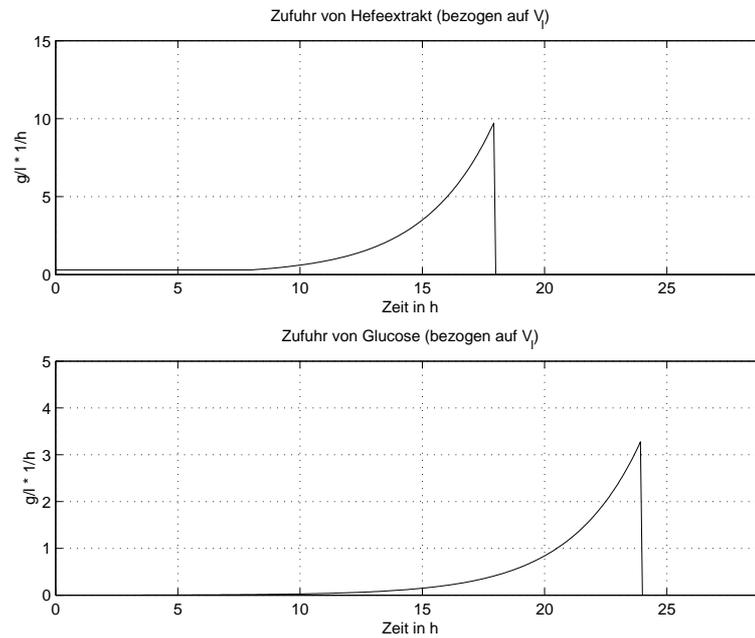


Bild 5.1: Substratzufuhr für die Fed-Batch Kultivierung von *P. luminescens* in Exp. *YS\_FedBatch\_A*.

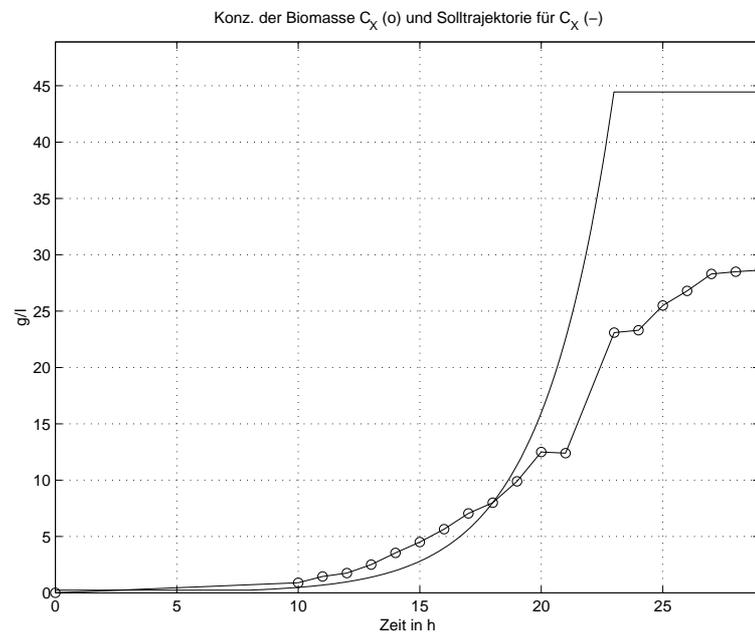


Bild 5.2: Mit Steuerung nach Bild 5.1 erzielter Wachstumsverlauf. Dargestellt sind die Konzentration der Biomasse  $C_{\tilde{X}}$  (o) und die Solltrajektorie  $y_{1,d}$  (-) (Exp. *YS\_FedBatch\_A*)

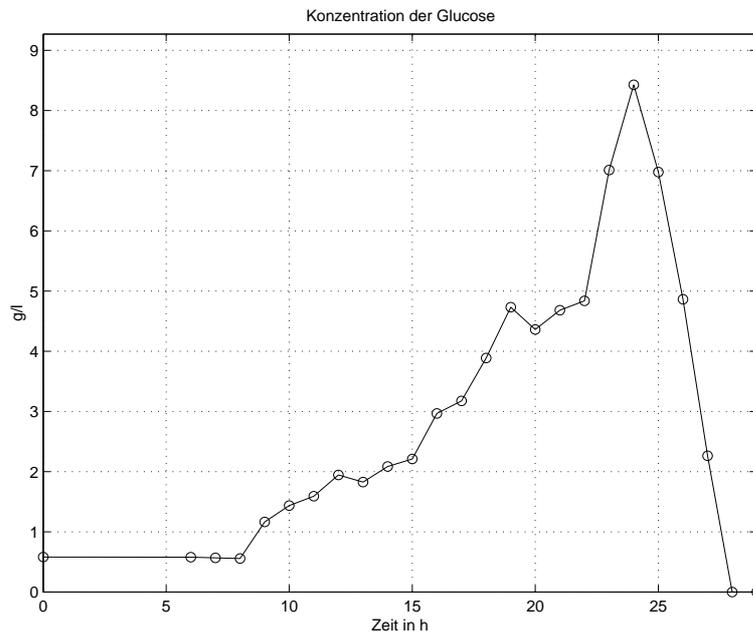


Bild 5.3: Exp. *YS\_FedBatch\_A*: Konzentration (in g/l) der Glucose (○) im Kulturmedium.

sie mit fast 30 g/l etwa um den Faktor 2 größer als die in der industriellen Produktion erreichten Bakteriendichten.

Die großen Abweichungen von der Solltrajektorie treten erst nach dem Ausbleiben der Zugabe von Hefeextrakt auf. Dies wird auch anhand des Zeitverlaufs der Glucosekonzentration deutlich, der in Bild 5.3 gezeigt ist. Hier ist ein starker Anstieg des Glucosegehalts nach  $t = 22$  h erkennbar.

In Experiment *YS\_FedBatch\_B* traten derartige Schwierigkeiten mit der Substratzufuhr nicht auf. Hier konnten die gewünschten Zeitverläufe (s. Bild 5.4) für die Zugabe von Hefeextrakt und Glucose bis zu deren geplanten Erschöpfung nach 23 h bzw. nach 27 h eingehalten werden.

In Bild 5.5 ist der Wachstumsverlauf der Biomasse der Solltrajektorie gegenübergestellt. Die am Ende der Kultivierung erreichte Bakteriendichte erreicht den gewünschten Wert von fast 45 g/l was einer optischen Dichte von über 90 entspricht. Derartige Werte sind deutlich höher als die bisher erreichten Bakteriendichten und stellen einen guten Ausgangspunkt für die Kultivierung der Nematoden dar.

Allerdings sind Abweichungen von der Solltrajektorie ab dem Zeitpunkt  $t = 20$  h erkennbar. Dies wird auch bei der Betrachtung der Konzentrationen der Saccharose und Glucose im Kulturmedium deutlich (Bild 5.6). Beide Konzentrationen nehmen über

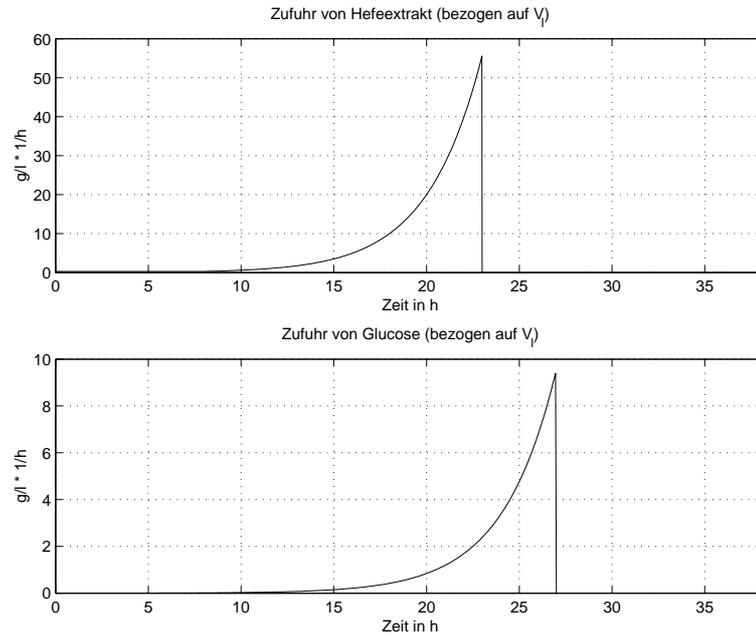


Bild 5.4: Berechnete Substratzufuhr für die Fed-Batch Kultivierung von *P. luminescens* in Exp. *YS\_FedBatch\_B*.

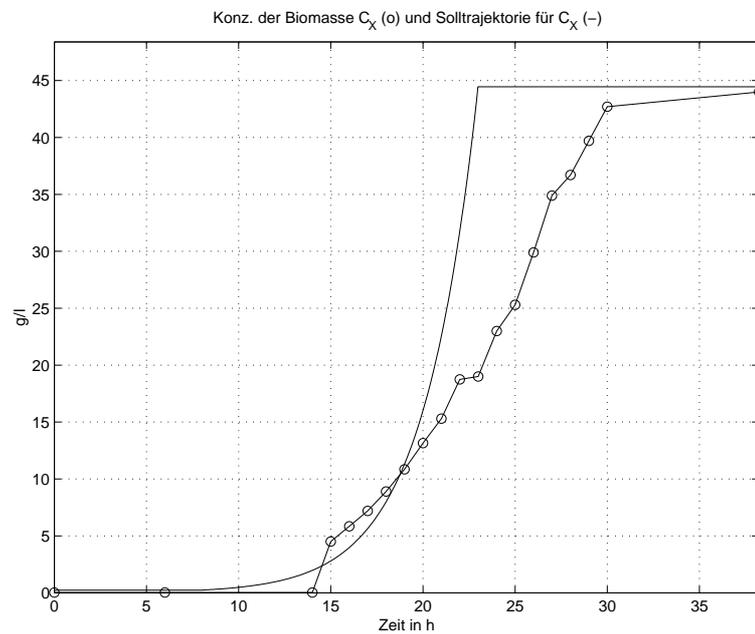


Bild 5.5: Mit Steuerung nach Bild 5.4 erzielter Wachstumsverlauf. Dargestellt sind die Konzentration der Biomasse  $C_{\tilde{X}}$  (o) und die Solltrajektorie  $y_{1,d}$  (-) (Exp. *YS\_FedBatch\_B*)

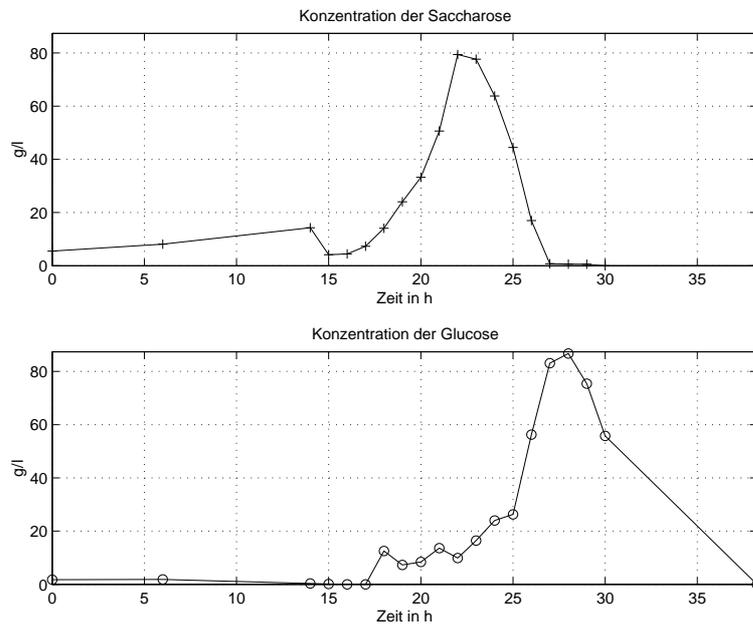


Bild 5.6: Exp. *YS\_FedBatch\_B*: Konzentration (in g/l) der Saccharose (+) und der Glucose (o) im Kulturmedium.

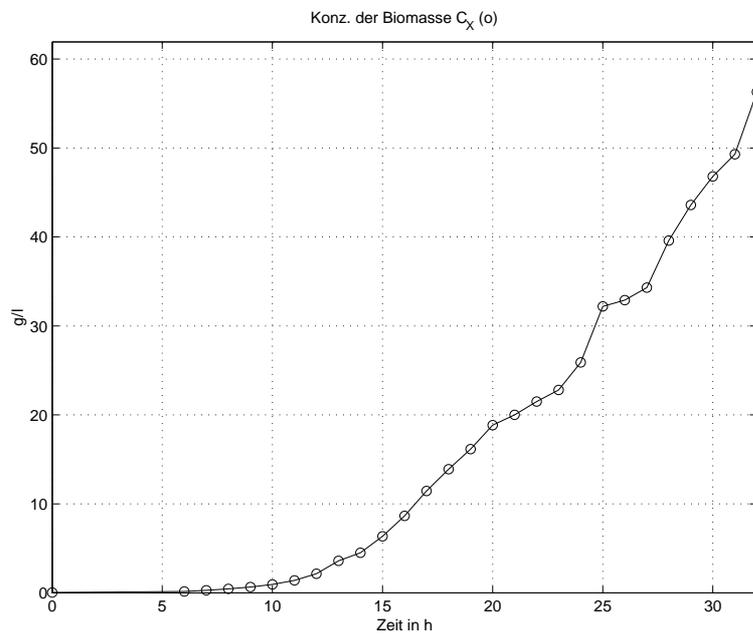


Bild 5.7: Exp. *YS\_FedBatch\_C*: Wiederholung des Experiments *YS\_FedBatch\_B* mit Anwendung der in Bild 5.4 gezeigten Steuerung.

das erwartete Maß hinaus zu, da die Substratzufuhr nicht an das offensichtlich verlangsamte Bakterienwachstum angepasst werden konnten. Wodurch sich die Wachstumsrate verringert ist bisher nicht geklärt, da keine Erfahrungen mit Kulturen von *P. luminescens* mit Zelldichten dieser Größenordnung vorliegen. Eine Möglichkeit besteht im Fehlen wichtiger Nährstoffe, die nicht im Hefeextrakt enthalten sind. Ebenfalls denkbar ist das Auftreten von Stoffwechselprodukten der Bakterien, die eine inhibierende Wirkung haben. Da ein derartiger Einbruch der Wachstumsrate auch bei Wiederholungen des Experiments zu beobachten ist, ist dieses Verhalten vermutlich nicht auf einen Fehler in der Durchführung der Experimente zurückzuführen (s. Bild 5.7). Eine tiefere Untersuchung dieses Phänomens sollte Gegenstand zukünftiger Arbeiten sein.

## 5.3 Definiertes Medium (open-loop control)

### 5.3.1 Trajektorienplanung

In den Fed-Batch-Experimenten mit dem definierten Medium dienen die Zufuhr von Glucose und Tyrosin als Systemeingänge. Alle übrigen Aminosäuren werden über eine zusätzliche Substratvorlage mit der gleichen Flussrate wie die Glucose zugegeben (s. Abschn. 1.3.6). Dies soll sicherstellen, dass keine Beeinflussung des Bakterienwachstums durch zu geringe Konzentrationen dieser Aminosäuren auftreten.

Damit besteht der flache Ausgang des Systems aus der Konzentration der Biomasse und der Glucose. Analog zu den Experimenten mit dem YS-Medium soll ein exponentieller Verlauf für die Biomasse mit einer konstanten Wachstumsrate erzielt werden. Für die Konzentration der Glucose wird eine Solltrajektorie vorgegeben, die eine konstante Konzentration von 0.5 g/l ermöglicht.

Damit ergeben sich folgende Solltrajektorien

1. Die Konzentration der Biomasse soll exponentiell mit konstanter Wachstumsrate  $\mu_d = \frac{\ln 2}{3.2 \text{ h}} = 0.22 \frac{1}{\text{h}}$  zunehmen. Mit  $y_1(0) = C_{\tilde{X},0}$  folgt  $y_{1,d}(t) = C_{\tilde{X},0} e^{\mu_d t}$ . Die Anfangskonzentrationen der Biomasse liegen in Exp. *Amino-FedBatch-A* bei  $C_{\tilde{X},0} = 0.06$  g/l und in Exp. *Amino-FedBatch-B* bei  $C_{\tilde{X},0} = 0.03$  g/l. Die unterschiedlichen Startwerte resultieren aus den unterschiedlichen Dichten der jeweiligen Starterkulturen.
2. Die Konzentration der Glucose im Medium soll konstant sein:  $y_{2,d} = 0.5$  g/l.

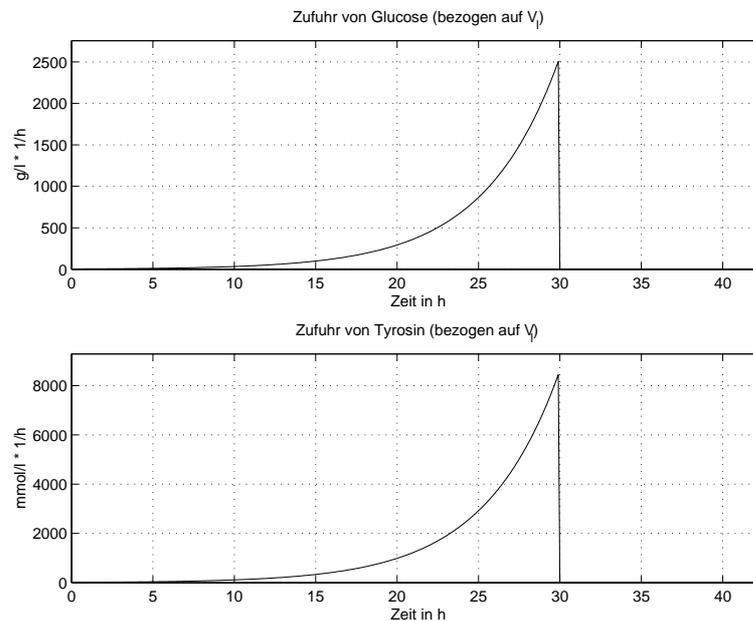


Bild 5.8: Berechnete Substratzufuhr für die Fed-Batch Kultivierung von *P. luminescens* in Exp. *Amino\_FedBatch\_A*.

### 5.3.2 Ergebnisse der Kultivierungen

Die Kultivierung von *P. luminescens* im Fed-Batch-Betrieb mit dem definierten Medium und der in Bild 5.8 gezeigten Zugabe von Glucose und Tyrosin führt während der ersten 26 Stunden des Experiments zu dem erwarteten Verlauf für die Konzentration der Biomasse (s. Bild 5.9). Ab dem Zeitpunkt  $t = 26$  h ist jedoch ein starker Einbruch des Bakterienwachstums zu verzeichnen.<sup>(1)</sup> Die Folge ist eine Erhöhung der Tyrosinkonzentration im Medium über das erwartete Maß hinaus (s. Bild 5.10).

Die für einige Stunden verringerte Wachstumsrate der Bakterien ist vermutlich die Folge eines Mangels an Glutaminsäure, die für die Zeit von  $t = 25$  h bis  $t = 30$  h in nur sehr geringen Mengen in der Kulturflüssigkeit nachgewiesen werden kann (s. Bild 5.10). Aus diesem Grund wurden die Konzentrationen der Aminosäuren in der zusätzlichen Substratvorlage für die Wiederholung des Experiments deutlich erhöht (s. Abschn. 1.3.6).

Es bleibt jedoch festzuhalten, dass auch mit dem definierten Medium ausreichend hohe Bakteriendichten zu erreichen sind. In dem hier vorliegenden Fall ergibt sich eine maximale Dichte von  $C_{\bar{X}} = 14$  g/l, die mehr als ausreichend für die Kultivierung von Nematoden ist.

<sup>(1)</sup>Die sichtbare Verringerung der gemessenen Biotrockenmasse ist auf die Verdünnung der Kulturflüssigkeit durch die Substratzufuhr zu erklären.

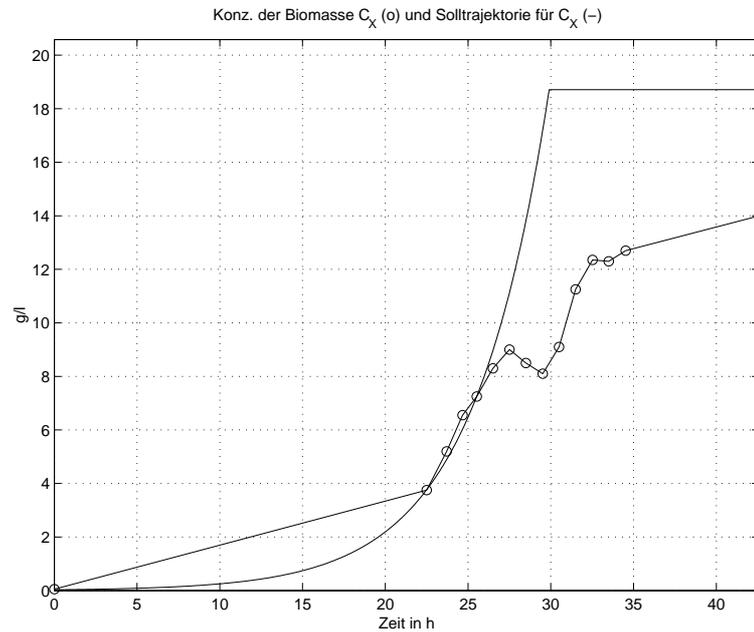


Bild 5.9: Mit Steuerung nach Bild 5.8 erzielt Wachstum. Dargestellt sind die Konzentration der Biomasse  $C_X$  (o) und die Solltrajektorie  $y_{1,d}$  (-) (Exp. *Amino\_FedBatch\_A*)

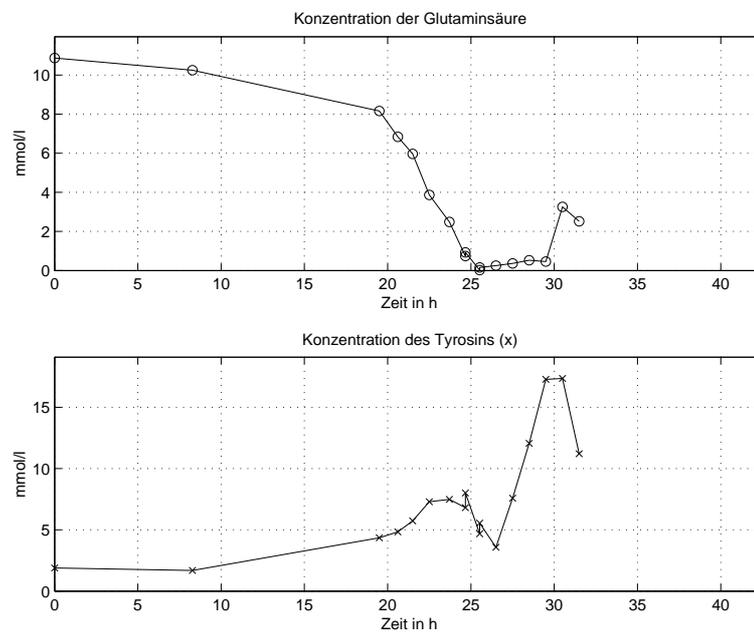


Bild 5.10: Exp. *Amino\_FedBatch\_A*: Konzentration (in mmol/l) der Glutaminsäure (o) und des Tyrosins (+).

Die Wiederholung des Experiments mit deutlich höheren Konzentrationen der Substratvorlagen führt zu einer geringfügig höheren Bakteriendichte von  $C_{\bar{X}} = 16$  g/l (s. Bild 5.12). Die entsprechend angepassten Substratzufuhren sind in Bild 5.11 dargestellt. Auffallend ist, dass der gewünschte Verlauf für die Biomasse bis zu einem Zeitpunkt von  $t = 32$  h eingehalten wird. Dies gilt jedoch nicht für die Konzentration der Glucose im Medium. Diese ist vor allem in den ersten 20 Stunden der Kultivierung deutlich höher als erwartet (s. Bild 5.13).

Der Einbruch des Bakterienwachstums bei  $t = 32$  h ist mit den vorliegenden Messwerten nicht zu erklären. Wie Bild 5.14 zeigt, ist die Versorgung mit Glutaminsäure und Tyrosin ausreichend. Auch alle übrigen Aminosäuren sowie Sauerstoff liegen in ausreichend hohen Konzentrationen vor (s. Anhang A.12). Mögliche Erklärungen wären eine zu geringe Versorgung der Bakterien mit Vitaminen oder die Bildung von Stoffwechselprodukten, die das Wachstum hemmen. Wie bei den Fed-Batch-Experimenten im YS-Medium, ist auch dies eine mögliche Fragestellung zukünftiger Untersuchungen.

Es wird mehr als deutlich, dass die reine Steuerung des Bakterienwachstums zu hohen Bakteriendichten führen kann. Um reproduzierbare Zeitverläufe und einen wirtschaftlichen Einsatz der Nährmedien gewährleisten zu können, ist jedoch der Einsatz einer Trajektorienfolgeregelung unerlässlich. Die reale Umsetzung der in Kapitel 4 vorgestellten Konzepte stellt einen Ausblick auf nachfolgende Arbeiten dar. Die Ergebnisse der Experimente zeigen allerdings, dass hierzu ein noch tieferes Verständnis des Stoffwechsels von *P. luminescens* und der gebildeten Produkte erforderlich ist.

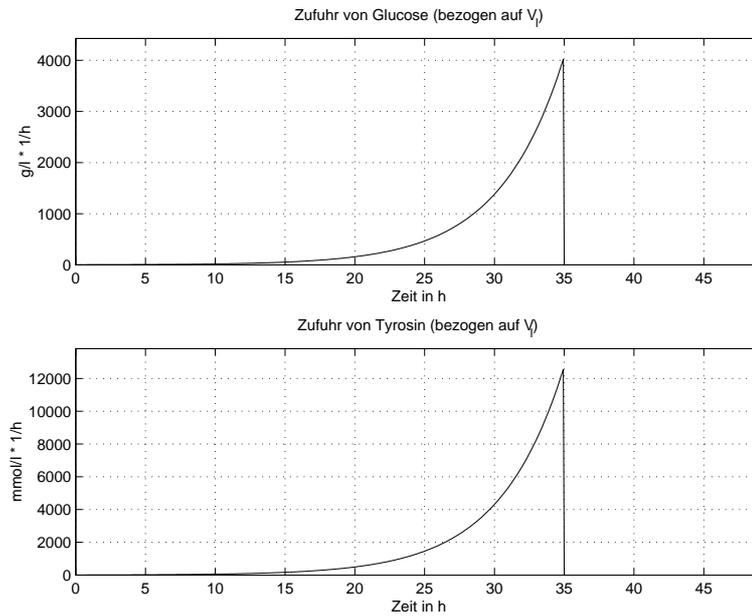


Bild 5.11: Berechnete Substratzufuhr für die Fed-Batch Kultivierung von *P. luminescens* in Exp. *Amino\_FedBatch\_B*.

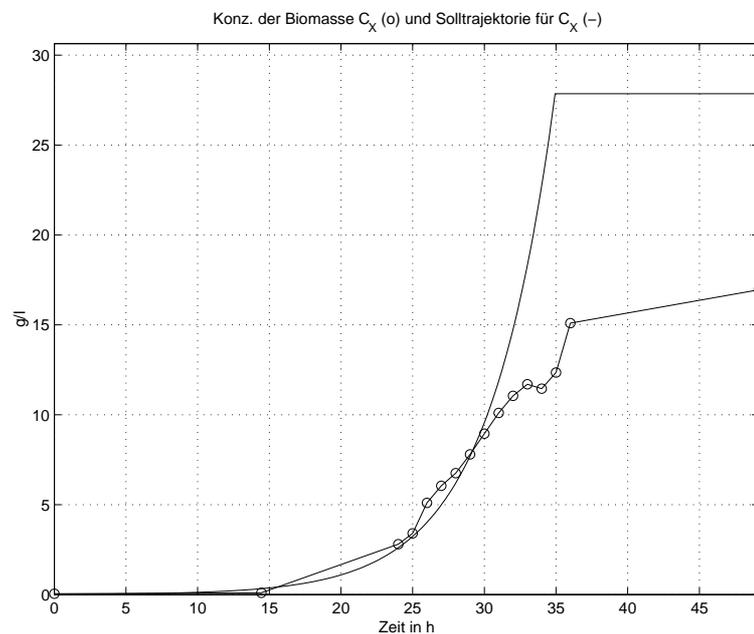


Bild 5.12: Mit Steuerung nach Bild 5.11 erzielt Wachstum. Dargestellt sind die Konzentration der Biomasse  $C_{\hat{X}}$  (o) und die Solltrajektorie  $y_{1,d}$  (-) (Exp. *Amino\_FedBatch\_B*)

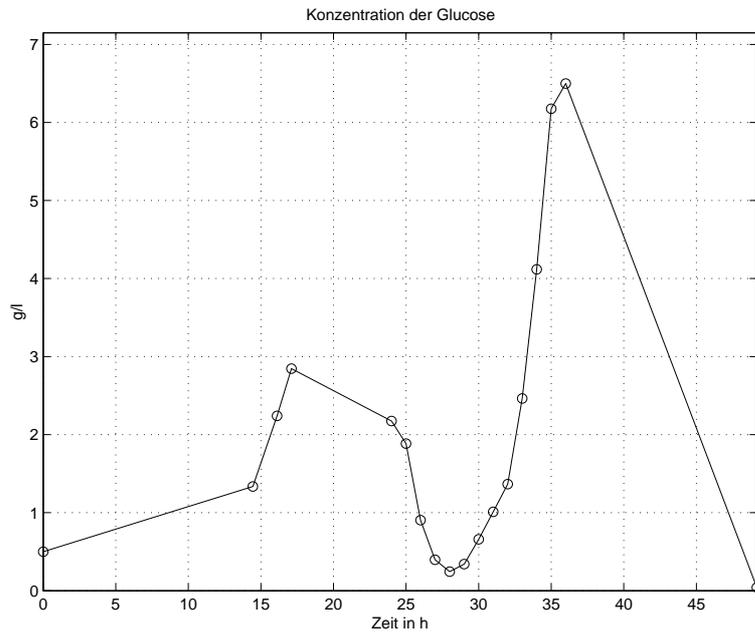


Bild 5.13: Exp. *Amino-FedBatch-B*: Konzentration (in g/l) der Glucose ( $\circ$ ) im Kulturmedium.

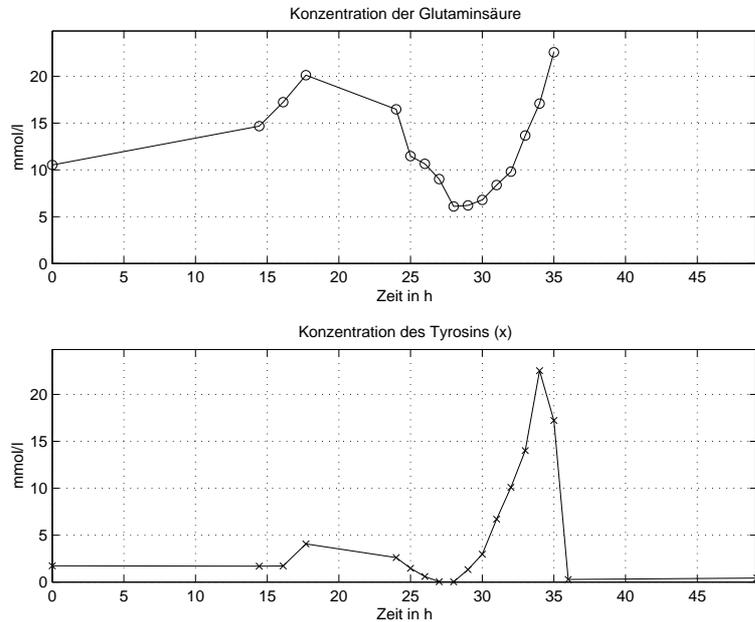


Bild 5.14: Exp. *Amino-FedBatch-B*: Konzentration (in mmol/l) der Glutaminsäure ( $\circ$ ) und des Tyrosins ( $+$ ) im Kulturmedium.

# Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit zeigt die Anwendung modellbasierter Methoden für die industriellen Kultivierung von Nematoden der Gattung *Heterorhabditis bacteriophora*. Diese werden als Antagonisten von im Boden lebenden Insektenlarven für die biologische Schädlingsbekämpfung in Landwirtschaft und Gartenbau kommerziell eingesetzt.

Ein wesentlicher Verfahrensschritt bei der Produktion von *H. bacteriophora* in Flüssigkultur besteht in der Etablierung einer Kultur von Bakterien der Gattung *Photobacterium luminescens*. Der Zustand dieser Bakterienkultur, insbesondere deren Zelldichte, beeinflusst maßgeblich die Entwicklung der Nematoden und damit die Ausbeute des Produktionsverfahrens. Aus diesem Grund besteht die Motivation für die Anwendung der hier beschriebenen Methoden darin, eine automatisierte Kultivierung von *P. luminescens* unter reproduzierbaren Wachstumsbedingungen mit dem Ziel einer möglichst hohen Bakteriendichte zu ermöglichen.

Die Grundlage der modellbasierten Methoden bilden mathematische Modellvorstellungen über den Wachstumsprozess der Mikroorganismen in Bioreaktoren. Daher wird zunächst ein generelles Konzept zur Beschreibung des Wachstums von Mikroorganismen und der dabei ablaufenden intrazellulären Reaktionen vorgestellt. Dieses Konzept ermöglicht sowohl die Betrachtung von unstrukturierten als auch strukturierten Modellansätzen mit einer einheitlichen Nomenklatur und Systematik. Dies erleichtert wesentlich die Untersuchung der aus früheren Arbeiten vorliegenden Modellvorstellungen für das Wachstum der Bakterien auf einem komplexen Nährmedium mit den Bestandteilen Hefeextrakt und Glucose.

Durch die Analyse der Konzentrationen der Aminosäuren in diesem Nährmedium und deren Verbrauch beim Wachstum von *P. luminescens* wird ein entscheidender Einfluss der Glutaminsäure auf die Wachstumsrate der Bakterien deutlich. Die Bilanzierung dieser Komponente des Hefeextrakts führt zu einer Anpassung der Parameter des Modells, die es ermöglicht, auch Wachstumsverläufe mit hohen Bakteriendichten nachzubilden.

Die Kenntnis des Bedarfs an Aminosäuren während des Wachstums von *P. luminescens* bildet zudem die Grundlage für die Entwicklung eines definierten Nährmediums. Dieses Medium besteht im wesentlichen aus sieben Aminosäuren und erlaubt ausreichend hohe Wachstumsraten für die Untersuchung des Stoffwechsels der Bakterien. Diese Untersuchungen ermöglichen eine wesentlich differenziertere mathema-

tische Beschreibung und führen zu dem zweiten in dieser Arbeit vorgestellten Wachstumsmodell.

Dabei handelt es sich um ein strukturiertes Modell, wobei der Betrachtung der Aminosäure Tyrosin eine besondere Bedeutung zukommt. Neben der Bilanzierung des Bedarfs an Tyrosin, Glucose und Sauerstoff beinhaltet das Modell auch die intrazelluläre Synthese von Tyrosin und die Produktion von Kohlendioxid. Eine Simulationsstudie macht deutlich, dass die angenommene Modellstruktur mit der Berücksichtigung von Tyrosin und Glucose geeignet ist, die bisher beobachteten Effekte zu beschreiben. Eine Verfeinerung der Modellvorstellung, d. h. die Einbeziehung weiterer Substrate erscheint jedoch sinnvoll. Daher erfolgt die Erweiterung der Modellgleichungen auf *N*-Substrate.

Eine Identifikation von Parametern zur Bilanzierung der übrigen im definierten Medium vorhandenen Substrate ist anhand der für diese Arbeit zur Verfügung stehenden Experimente nicht möglich. Eine interessante Erweiterung, die in nachfolgenden Arbeiten betrachtet werden könnte, stellt die Berücksichtigung der Aminosäuren Serin und Glutaminsäure dar. Ebenso wichtig wäre die Untersuchung der während des Wachstums gebildeten Stoffwechselprodukte. Dabei ist ein besonderes Augenmerk auf die für die Symbiose zwischen Bakterien und Nematoden wichtigen Produkte, zum Beispiel der Einschlusskörper zu legen.

Eine interessante Anwendung von modellbasierten Methoden liegt in der Verbesserung der online am Prozess anwendbaren Messtechnik. Dies umfasst neben der modellgestützten Auswertung der Gasanalyse der Zu- und Abluft des Bioreaktors auch die Bestimmung der Biomasse über optische Verfahren und eine automatisierte Analytik mit Hilfe einer HPLC-Anlage (Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie-Anlage).

Diese online durchführbaren Analyseverfahren weisen eine Reihe von Unzulänglichkeiten, wie zu lange Analysezeiten bei der HPLC-Anlage oder starke Störungen durch Messrauschen bei der Gasanalyse auf. Es wird gezeigt wie sich diese mit Hilfe eines modellbasierten Beobachterverfahrens ausgleichen lassen. Der hierfür vorgestellte Kalman-Filter-Algorithmus ist besonders geeignet, da er auch bei nichtlinearen und zeitvarianten Systemen anwendbar ist.

Die wichtigste Anwendung der mathematischen Modellvorstellung liegt jedoch in der Entwicklung von Prozessführungsstrategien. Die vorliegende Arbeit zeigt die Anwendung einiger Konzepte und Ideen aus der Theorie differentiell flacher Systeme. Dabei handelt es sich um Systeme gewöhnlicher nichtlinearer Differentialgleichungen, deren besondere Eigenschaft die Existenz virtueller Ausgänge, sogenannter flacher Ausgänge ist. Diese beinhalten die volle Information über die Dynamik des Systems. Dies ermöglicht es, den Verlauf der Systemzustände und Systemeingänge allein aus dem Zeitverlauf des flachen Ausgangs und dessen Ableitungen zu bestimmen, ohne die Systemdifferentialgleichungen explizit zu lösen.

Eine, sich aus dieser Eigenschaft ergebende Anwendung, besteht in der Berechnung der Eingänge des Systems aus vorgegebenen Trajektorien für den flachen Ausgang. In Simulationsstudien wird jedoch gezeigt, dass die so entworfenen Steuerungen anfällig für Störungen und Modellunsicherheiten sind, so dass der Einsatz von Trajektorienregelungen unerlässlich ist. Basierend auf der Tatsache, dass alle flachen Systeme durch eine Zustandsrückführung exakt linearisierbar sind, wird gezeigt, wie sich die komplexen nichtlinearen Wachstumsmodelle auf Systeme in Brunovsky-Normalform, d. h. entkoppelte Integratorketten transformieren lassen.

Hier wird deutlich, dass insbesondere für die flachheitsbasierte Trajektorienregelung das interne Modell-Prinzip eine äußerst sinnvolle Ergänzung darstellt. Die Tatsache, dass die Solltrajektorien unabhängig voneinander wählbar sind und damit als Signalmodell zur Verfügung stehen, erlaubt eine einfache Anwendung dieses Prinzips.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Prozessführungen bestehen in einer gezielten Zufuhr von Substraten im Fed-Batch-Betrieb. Die Zufütterungsstrategien resultieren aus flachheitsbasierten Trajektorienplanungen, d. h. sie ergeben sich aus Trajektorien für die flachen Ausgänge der mathematischen Modelle. Auf diese Weise können Beschränkungen bezüglich der maximal erreichbaren Zelldichten umgangen werden. Diese Beschränkungen liegen zum einen in der maximal vertretbaren Osmolarität und zum anderen in der beschränkten Löslichkeit der Nährmedien bei neutralen pH-Werten.

Es ist offensichtlich, dass eine flachheitsbasierten Steuerung des Bakterienwachstums zu deutlich höheren Bakteriendichten führen kann, als sie zur Zeit in der industriellen Produktion erzielt werden. Ebenso wird deutlich, dass auch in dem neu entwickelten definierten Medium ausreichend hohe Bakteriendichten für die Zucht von Nematoden im Fed-Batch-Betrieb zu erreichen sind.

Um reproduzierbare Zeitverläufe und einen wirtschaftlichen Einsatz der Nährmedien gewährleisten zu können, ist jedoch der Einsatz einer Trajektorienregelung unerlässlich. Einen weiteren Ausblick auf nachfolgende Arbeiten stellt daher die reale Umsetzung der vorgestellten Konzepte zur Trajektorienregelung dar. Die Ergebnisse der Experimente zeigen allerdings, dass hierzu ein noch tieferes Verständnis des Stoffwechsels von *P. luminescens* und der gebildeten Produkte erforderlich ist.

# Anhang A

## Ergebnisse der Experimente

### A.1 Allgemeines

Gegenstand dieses Abschnitts sind die Ergebnisse der in dieser Arbeit aufgeführten Experimente. Dies soll deren Interpretation nachvollziehbar machen und die Verwendung der Ergebnisse in nachfolgenden Arbeiten ermöglichen.

Alle Größen sind über der Zeit aufgetragen. Der Name eines Experiments besteht jeweils aus einer Kennung für das verwendete Kulturmedium. Dabei steht *YS* für das *YS*-Medium (yeast-salt-medium) auf der Basis von Hefeextrakt (yeast-extract) und Glucose und *Amino* für das definierte Medium, das im wesentlichen aus sieben Aminosäuren besteht. Zusätzlich beinhaltet der Name die Betriebsart, d. h. Batch oder Fed-Batch Betrieb.

## A.2 Experiment *YS\_Batch\_A*

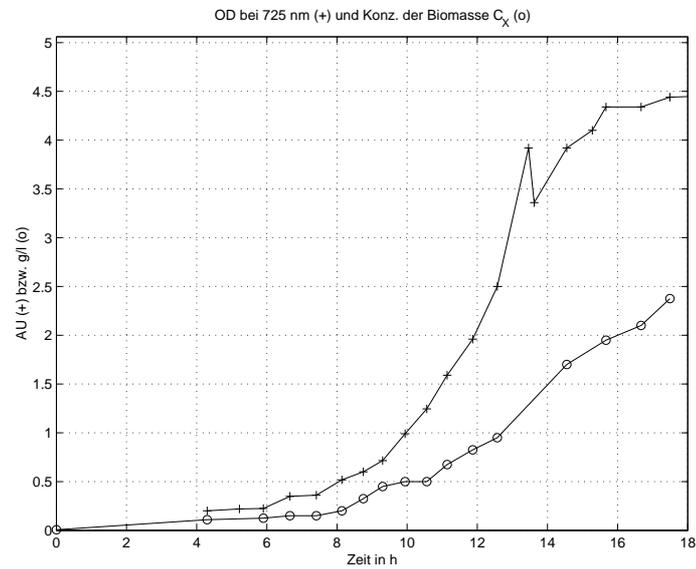


Bild A.1: Exp. *YS\_Batch\_A*: Optische Dichte (+) und Konzentration (in g/l) der Biomasse (o).

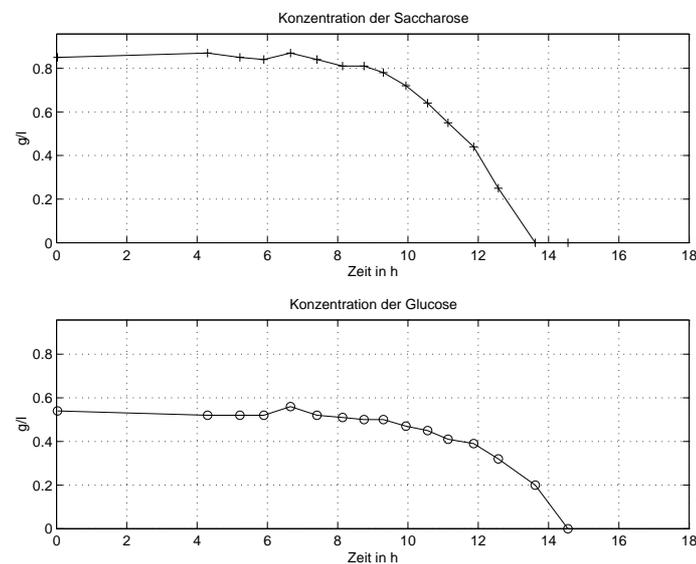


Bild A.2: Exp. *YS\_Batch\_A*: Konzentration (in g/l) der Saccharose (+) und der Glucose (o) im Kulturmedium.

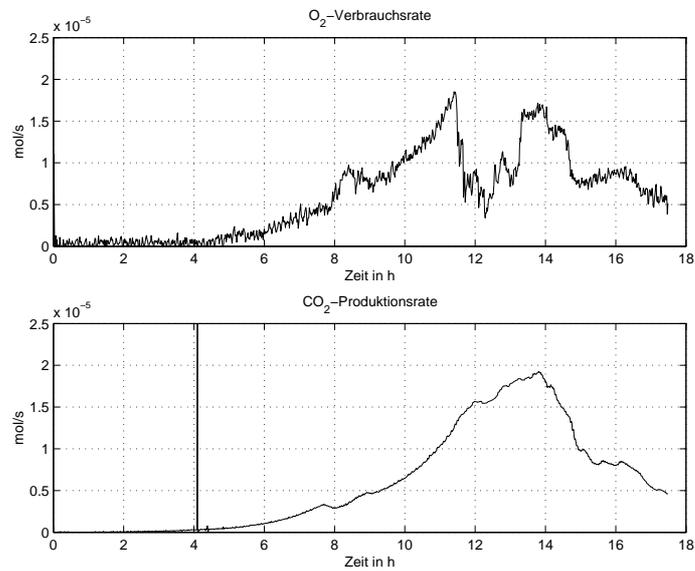


Bild A.3: Exp. *YS\_Batch\_A*: Sauerstoffverbrauchsrate (oben) und Kohlendioxidproduktionsrate (unten) in mol/s

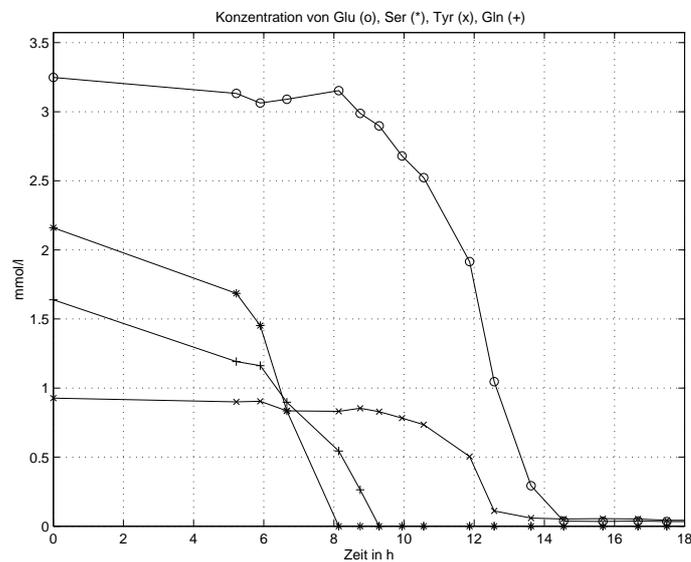


Bild A.4: Exp. *YS\_Batch\_A*: Konzentration (in mmol/l) an Glutaminsäure (o), Serin (\*), Tyrosin (x) und Glutamin (+) im Kulturmedium.

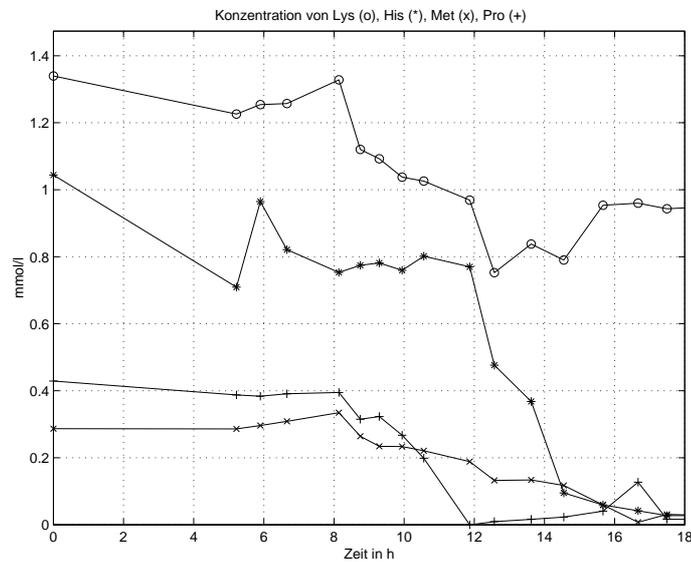


Bild A.5: Exp. *YS\_Batch\_A*: Konzentration (in mmol/l) an Lysin (o), Histidin (\*), Methionin (x) und Prolin (+) im Kulturmedium.

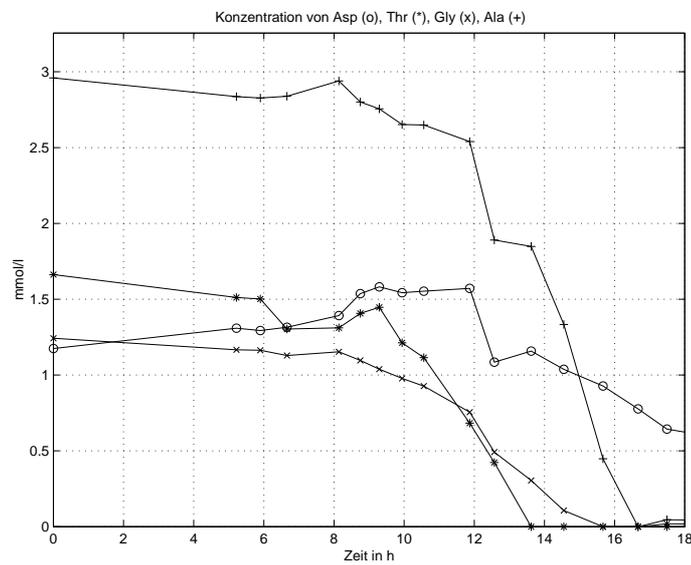


Bild A.6: Exp. *YS\_Batch\_A*: Konzentration (in mmol/l) an Asparagin (o), Threonin (\*), Glycin (x) und Alanin (+) im Kulturmedium.

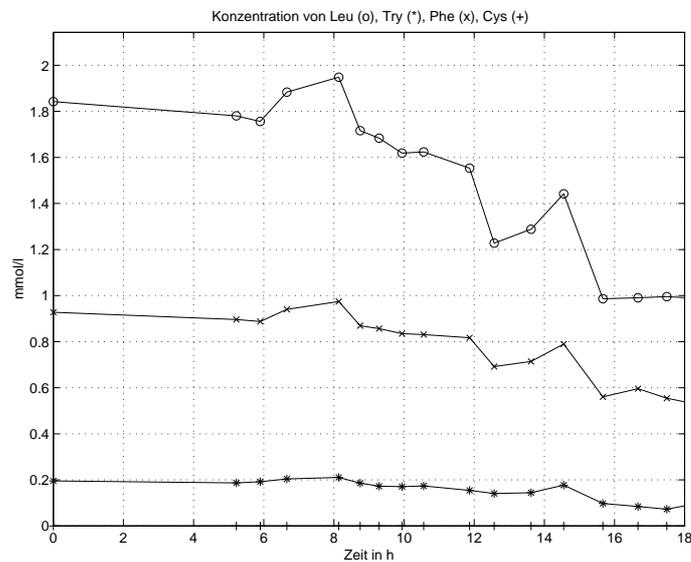


Bild A.7: Exp. *YS\_Batch\_A*: Konzentration (in mmol/l) an Leucin (o), Tryptophan (\*), Phenylalanin (x) und Cystein (+) im Kulturmedium.

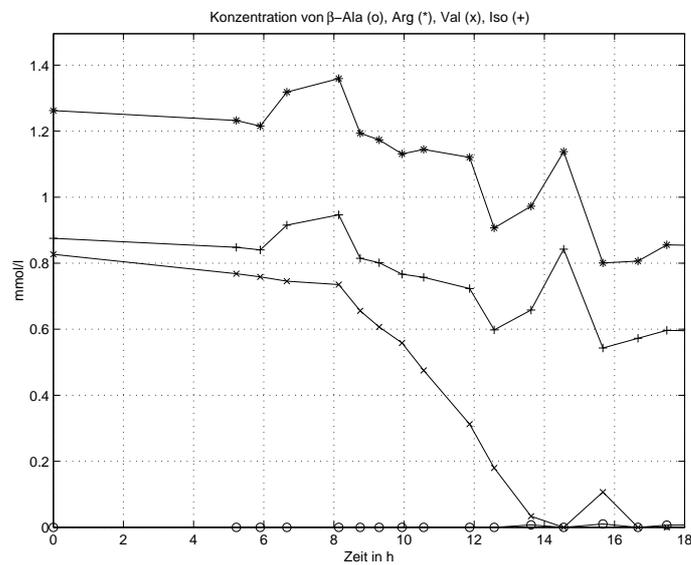


Bild A.8: Exp. *YS\_Batch\_A*: Konzentration (in mmol/l) an  $\beta$ -Alanin (o), Arginin (\*), Valin (x) und Isoleucin (+) im Kulturmedium.

### A.3 Experiment YS\_Batch\_B

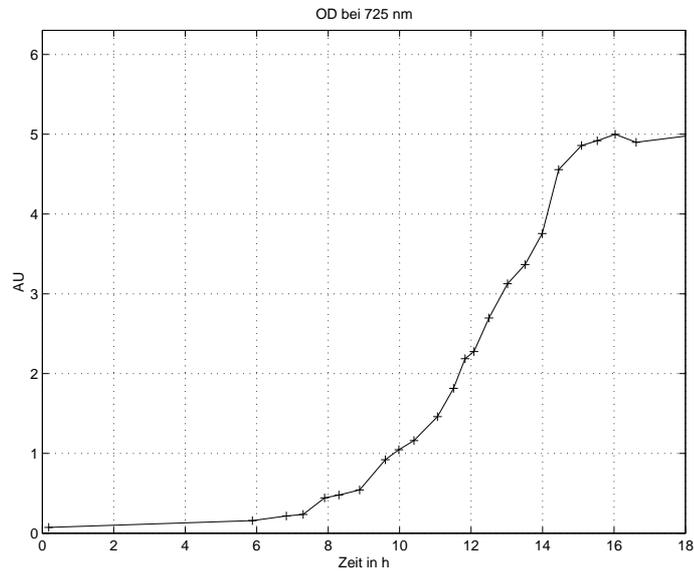


Bild A.9: Exp. *YS\_Batch\_B*: Optische Dichte.

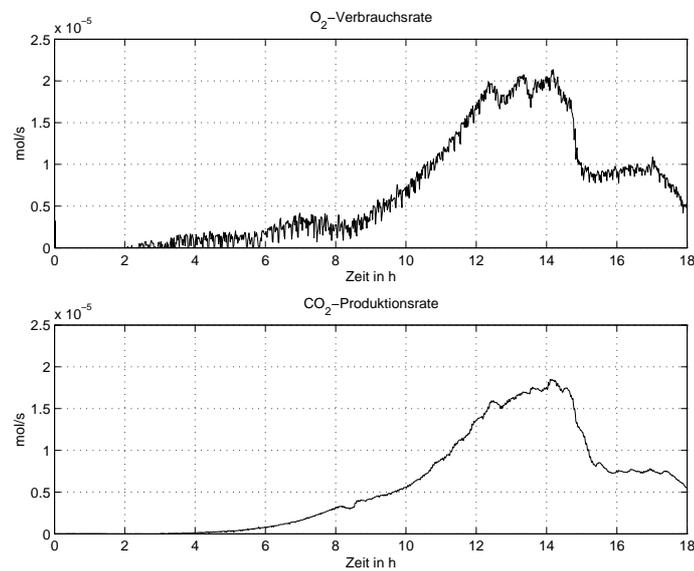


Bild A.10: Exp. *YS\_Batch\_B*: Sauerstoffverbrauchsrate (oben) und Kohlendioxidproduktionsrate (unten) in mol/s

## A.4 Experiment *YS\_Batch\_C*

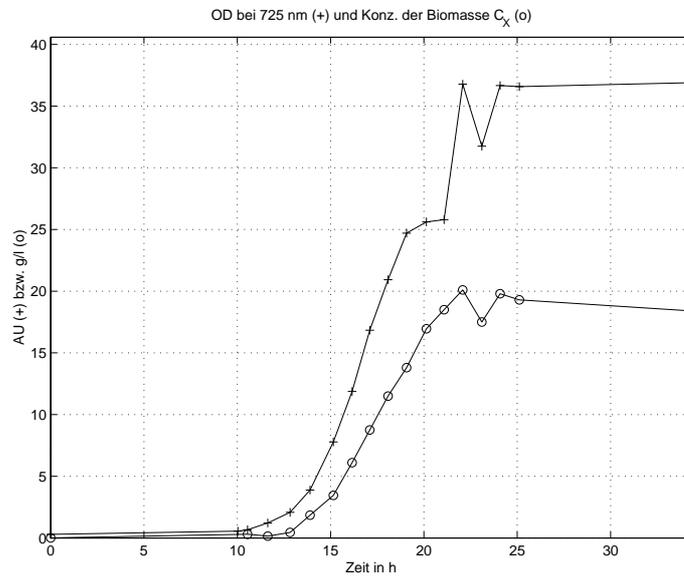


Bild A.11: Exp. *YS\_Batch\_C*: Optische Dichte (+) und Konzentration (in g/l) der Biomasse (o).

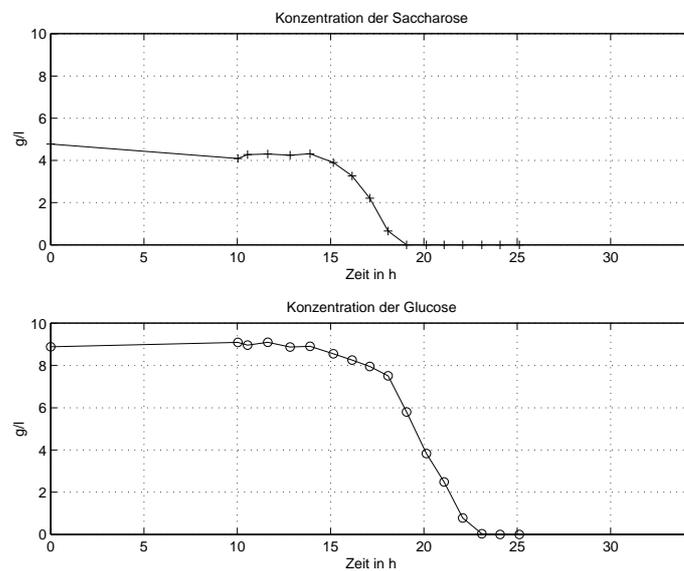


Bild A.12: Exp. *YS\_Batch\_C*: Konzentration (in g/l) der Saccharose (+) und der Glucose (o) im Kulturmedium.

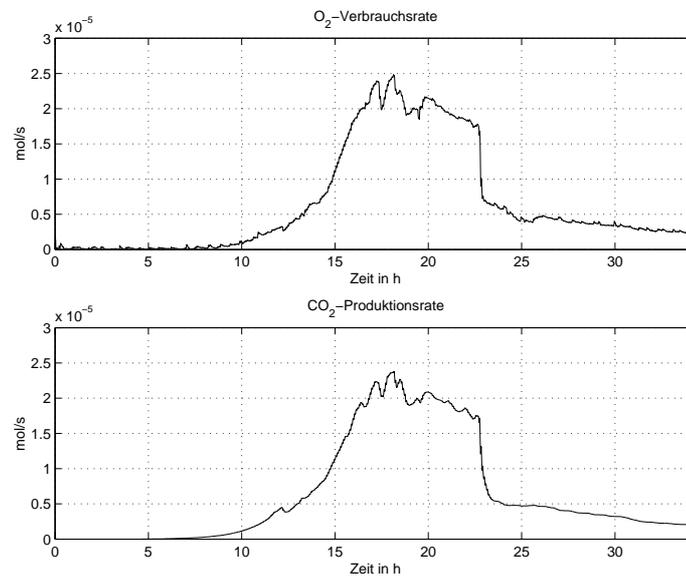


Bild A.13: Exp. *YS\_Batch\_C*: Sauerstoffverbrauchsrate (oben) und Kohlendioxidproduktionsrate (unten) in mol/s

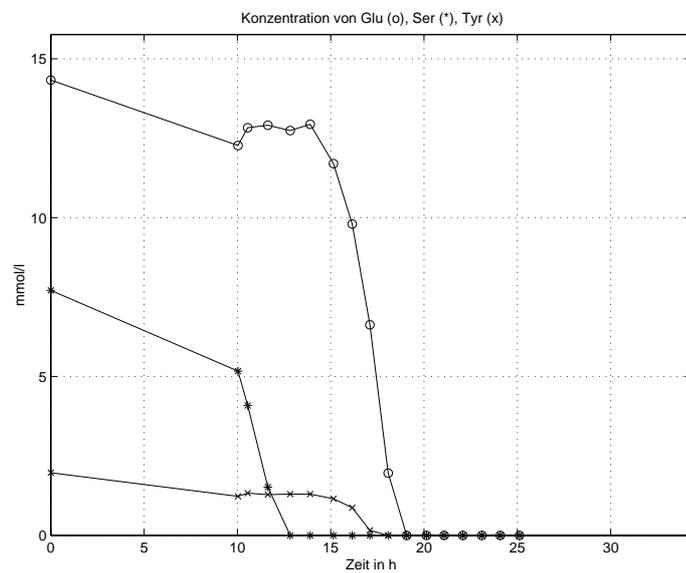


Bild A.14: Exp. *YS\_Batch\_C*: Konzentration (in mmol/l) an Glutaminsäure (o), Serin (\*) und Tyrosin (x) im Kulturmedium.

## A.5 Experiment Amino\_Batch\_A

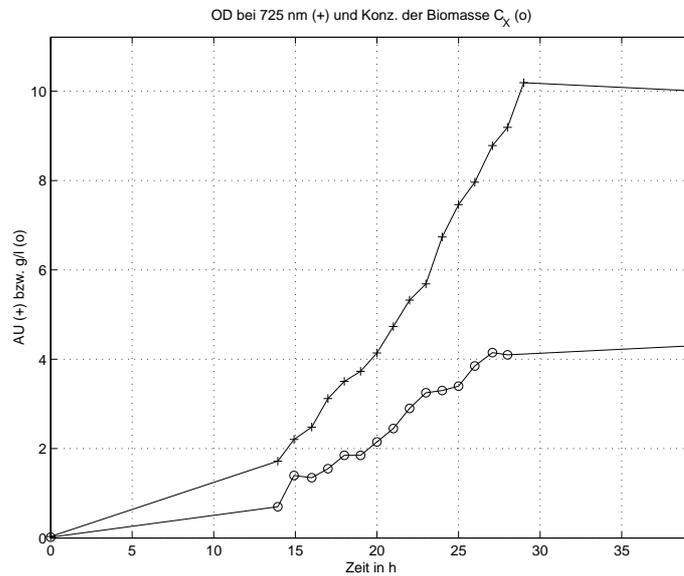


Bild A.15: Exp. *Amino\_Batch\_A*: Optische Dichte (+) und Konzentration (in g/l) der Biomasse (o).

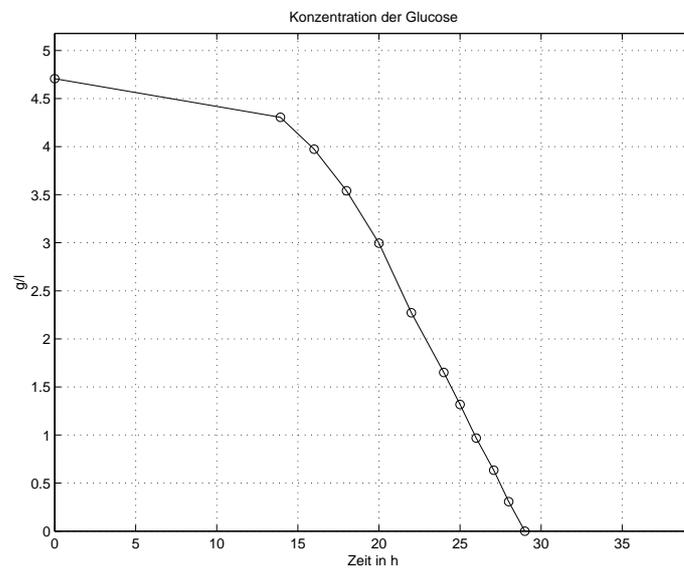


Bild A.16: Exp. *Amino\_Batch\_A*: Konzentration (in g/l) der Glucose (o) im Kulturmedium.

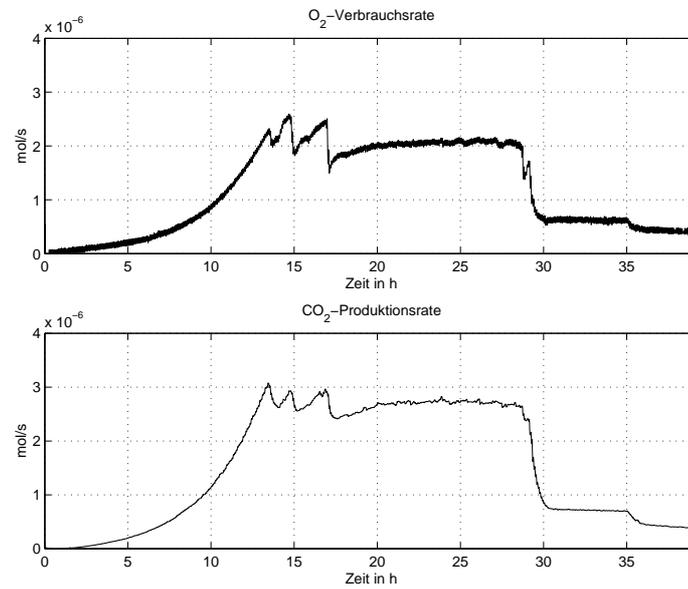


Bild A.17: Exp. *Amino\_Batch\_A*: Sauerstoffverbrauchsrate (oben) und Kohlendioxidproduktionsrate (unten) in mol/s

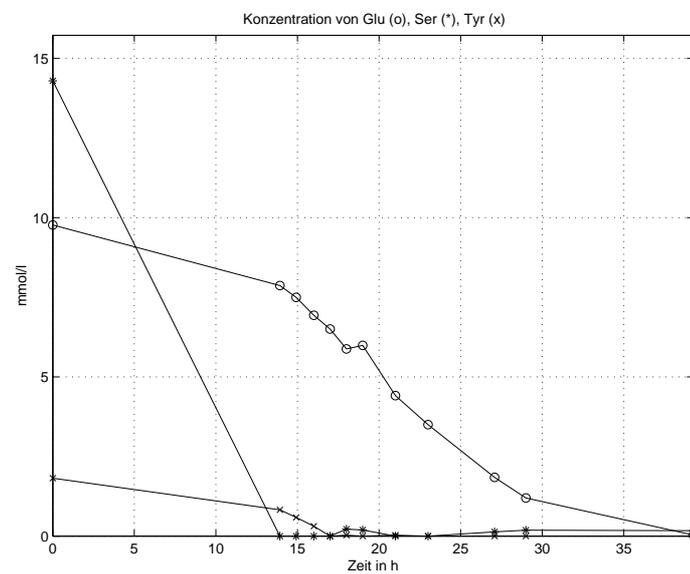


Bild A.18: Exp. *Amino\_Batch\_A*: Konzentration (in mmol/l) an Glutaminsäure (o), Serin (\*) und Tyrosin (x) im Kulturmedium.

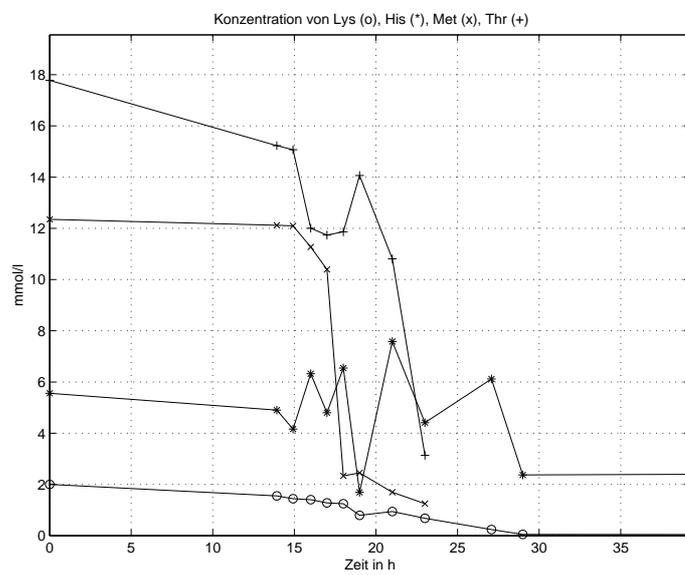


Bild A.19: Exp. *Amino\_Batch\_A*: Konzentration (in mmol/l) an Lysin (o), Histidin (\*), Methionin (x) und Threonin (+) im Kulturmedium.

## A.6 Experiment Amino\_Batch\_B

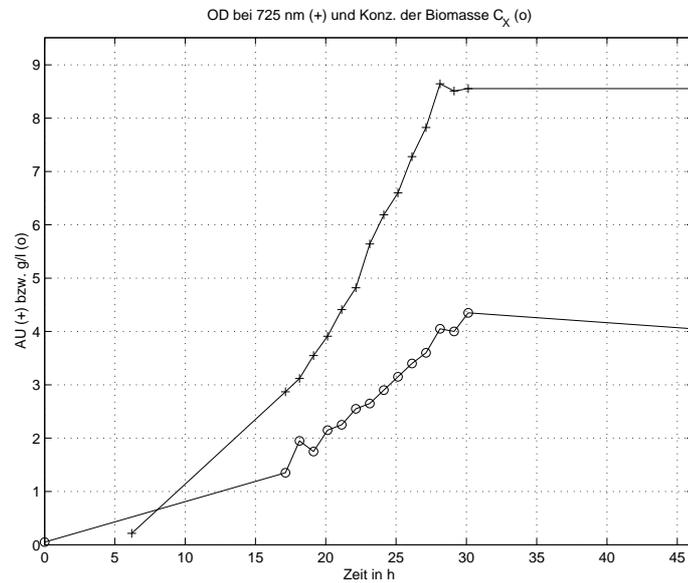


Bild A.20: Exp. *Amino\_Batch\_B*: Optische Dichte (+) und Konzentration (in g/l) der Biomasse (o).

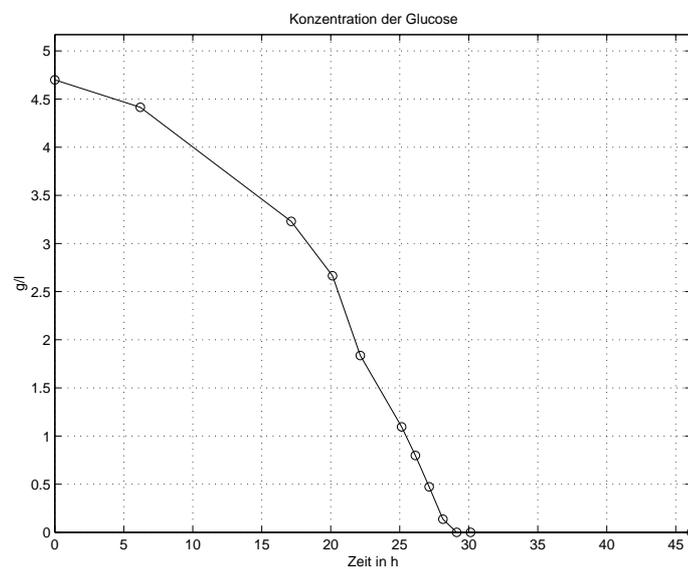


Bild A.21: Exp. *Amino\_Batch\_B*: Konzentration (in g/l) der Glucose (o) im Kulturmedium.

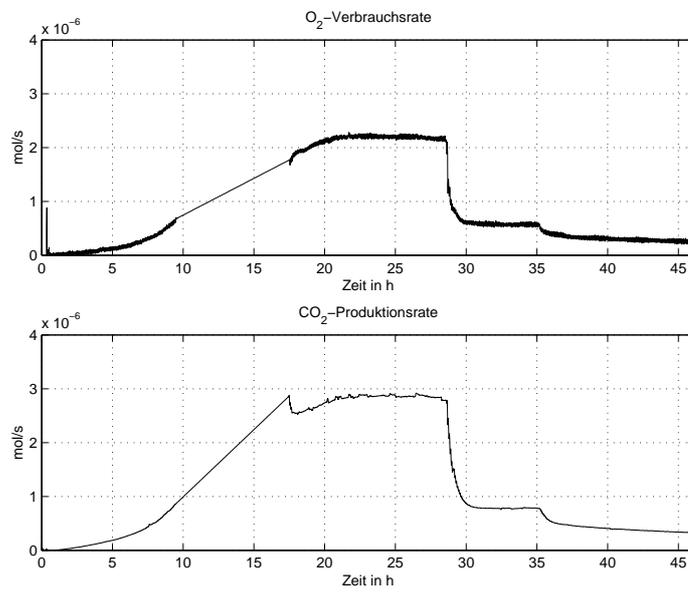


Bild A.22: Exp. *Amino\_Batch\_B*: Sauerstoffverbrauchsrate (oben) und Kohlendioxidproduktionsrate (unten) in mol/s

## A.7 Experiment Amino\_Batch\_C

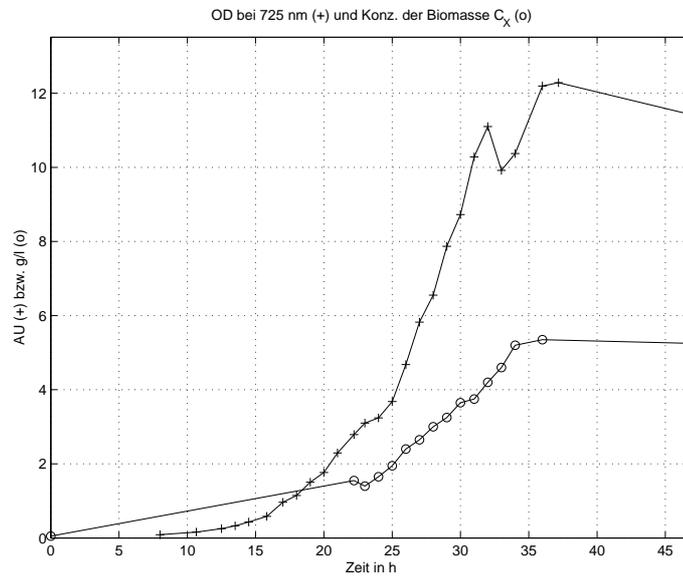


Bild A.23: Exp. *Amino\_Batch\_C*: Optische Dichte (+) und Konzentration (in g/l) der Biomasse (o).

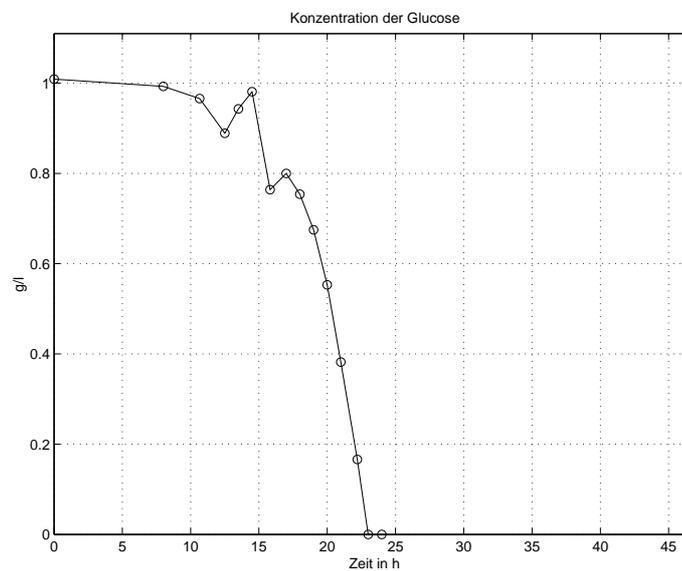


Bild A.24: Exp. *Amino\_Batch\_C*: Konzentration (in g/l) der Glucose (o) im Kulturmedium.

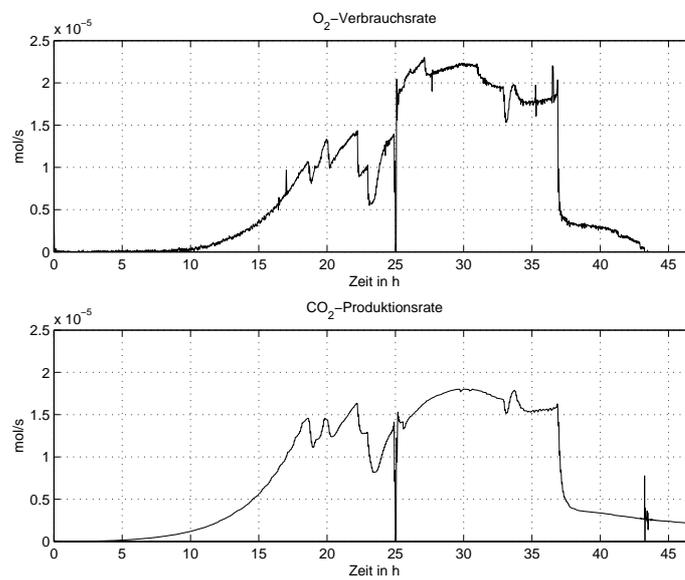


Bild A.25: Exp. *Amino\_Batch\_C*: Sauerstoffverbrauchsrate (oben) und Kohlendioxidproduktionsrate (unten) in mol/s

## A.8 Experiment YS\_FedBatch\_A

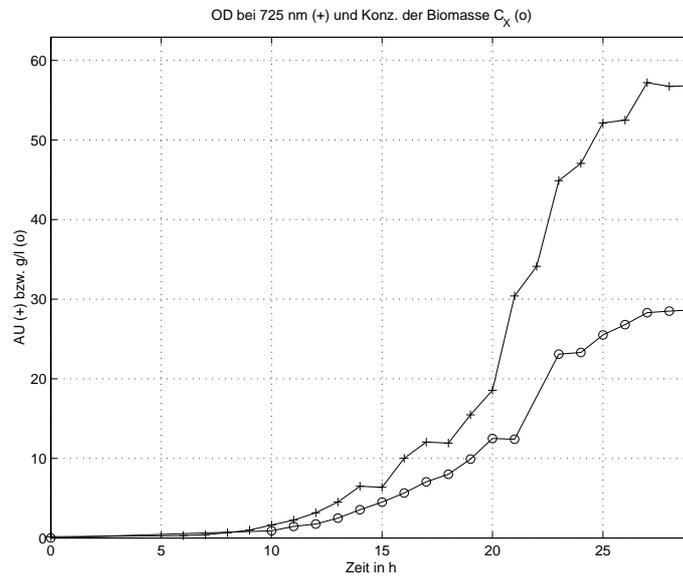


Bild A.26: Exp. *YS\_FedBatch\_A*: Optische Dichte (+) und Konzentration (in g/l) der Biomasse (o).

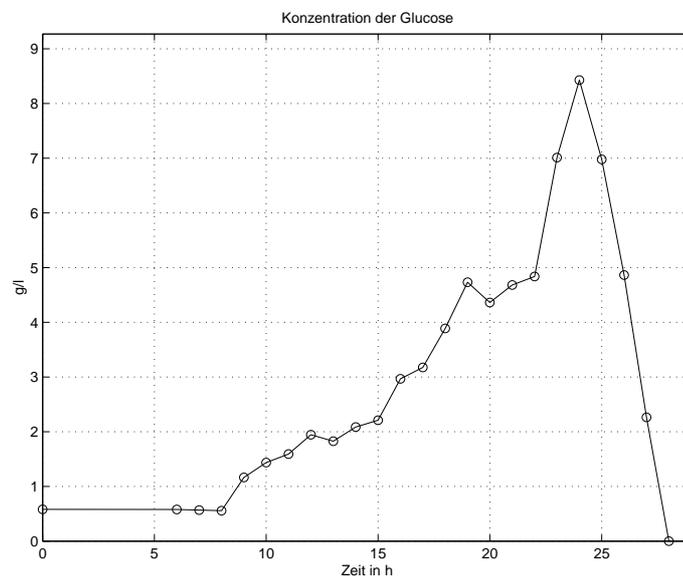


Bild A.27: Exp. *YS\_FedBatch\_A*: Konzentration (in g/l) der Glucose (o) im Kulturmedium.

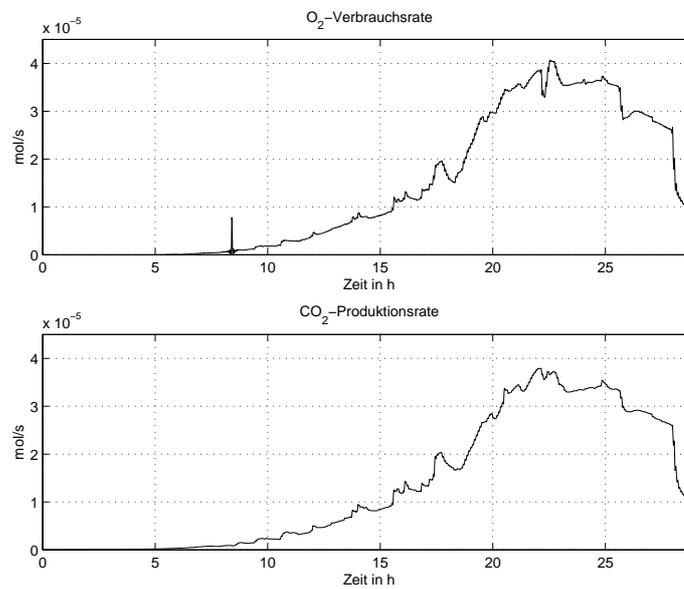


Bild A.28: Exp. *YS\_FedBatch\_A*: Sauerstoffverbrauchsrate (oben) und Kohlendioxidproduktionsrate (unten) in mol/s

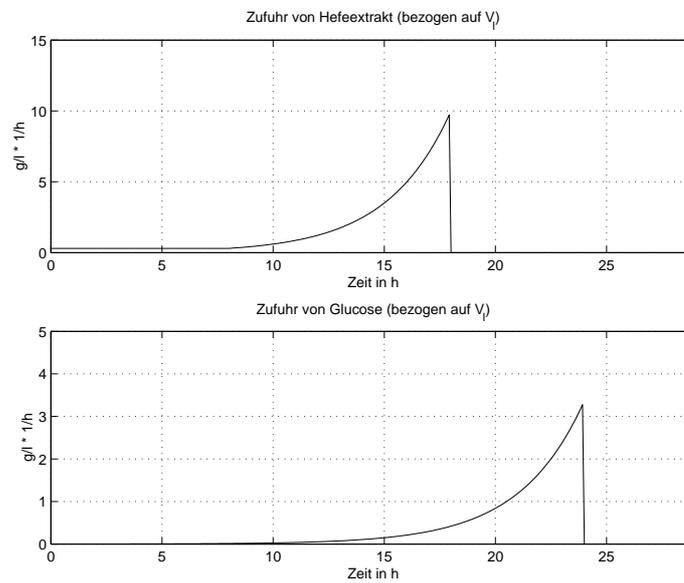


Bild A.29: Exp. *YS\_FedBatch\_A*: Zufuhr von Hefeextrakt (oben) und Glucose (unten) in g/l bezogen auf das Volumen  $V_l = 2$  l des Bioreaktors

## A.9 Experiment YS\_FedBatch\_B

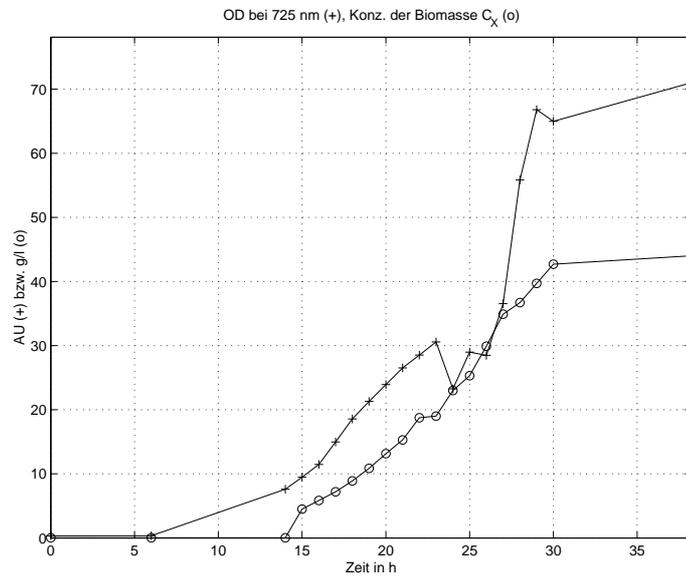


Bild A.30: Exp. *YS\_FedBatch\_B*: Optische Dichte (+) und Konzentration (in g/l) der Biomasse (o).

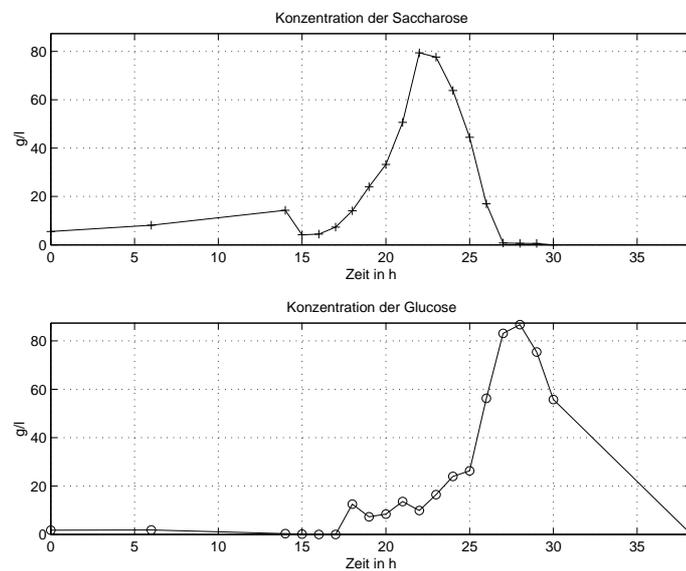


Bild A.31: Exp. *YS\_FedBatch\_B*: Konzentration (in g/l) der Saccharose (+) und der Glucose (o) im Kulturmedium.

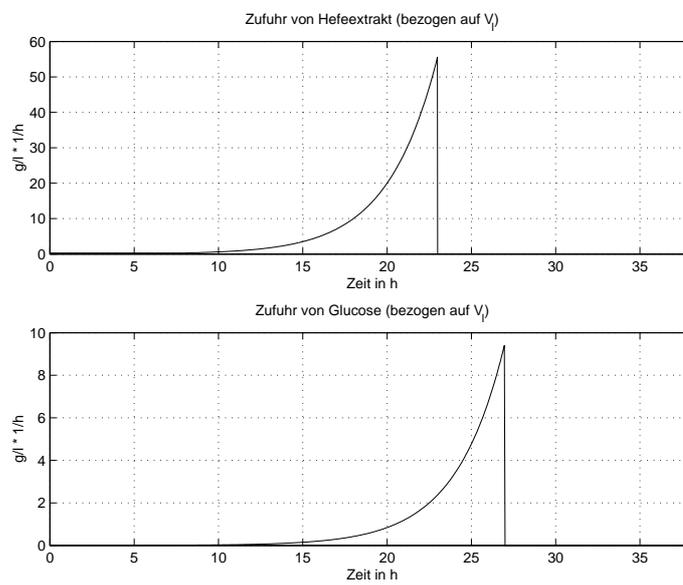


Bild A.32: Exp. *YS\_FedBatch\_B*: Zufuhr von Hefeextrakt (oben) und Glucose (unten) in g/l bezogen auf das Volumen  $V_l = 2$  l des Bioreaktors

## A.10 Experiment YS\_FedBatch\_C

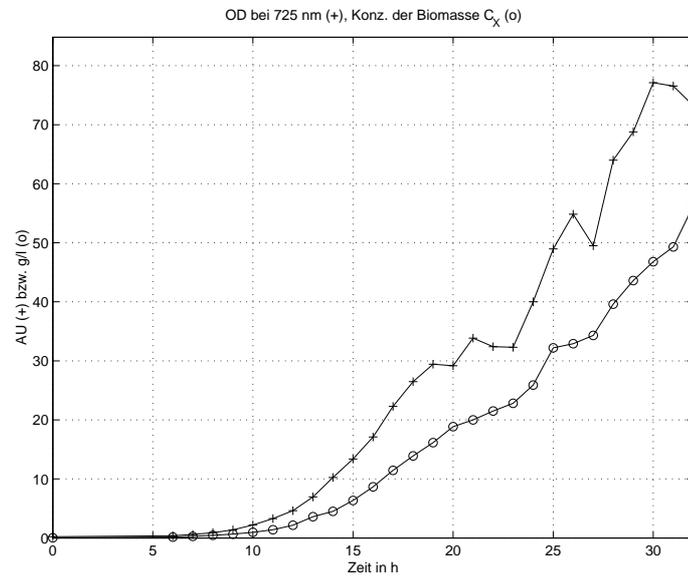


Bild A.33: Exp. *YS\_FedBatch\_C*: Optische Dichte (+) und Konzentration (in g/l) der Biomasse (o).

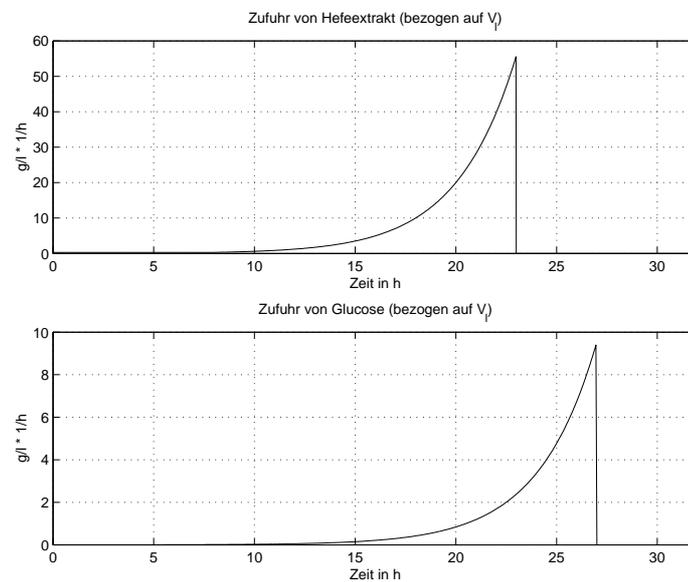


Bild A.34: Exp. *YS\_FedBatch\_C*: Zufuhr von Hefeextrakt (oben) und Glucose (unten) in g/l bezogen auf  $V_l = 2$  l

## A.11 Experiment Amino\_FedBatch\_A

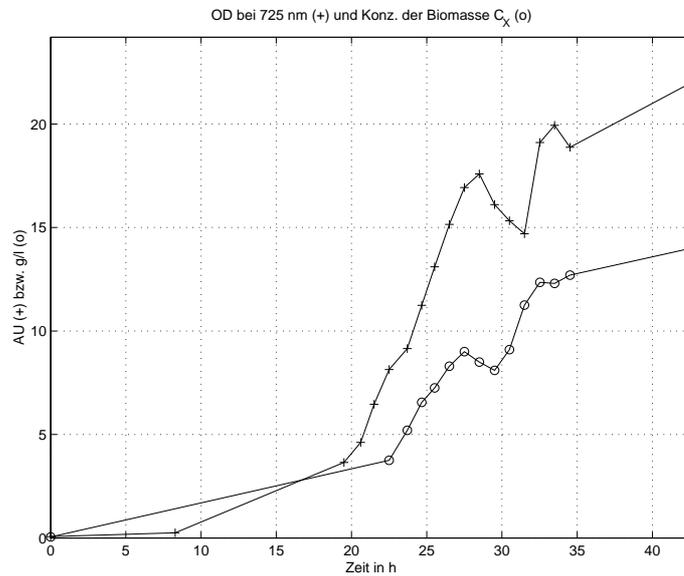


Bild A.35: Exp. *Amino\_FedBatch\_A*: Optische Dichte (+) und Konzentration (in g/l) der Biomasse (o).

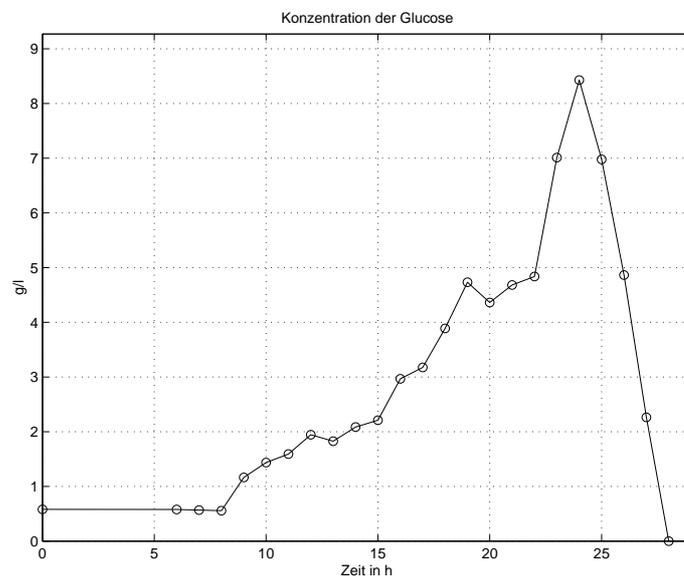


Bild A.36: Exp. *Amino\_FedBatch\_A*: Konzentration (in g/l) der Glucose (o) im Kulturmedium.

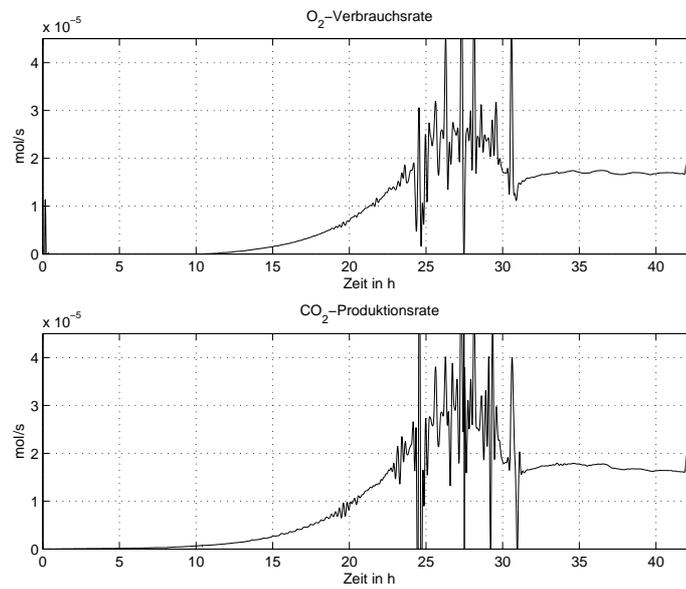


Bild A.37: Exp. *Amino\_FedBatch\_A*: Sauerstoffverbrauchsrate (oben) und Kohlendioxidproduktionsrate (unten) in mol/s

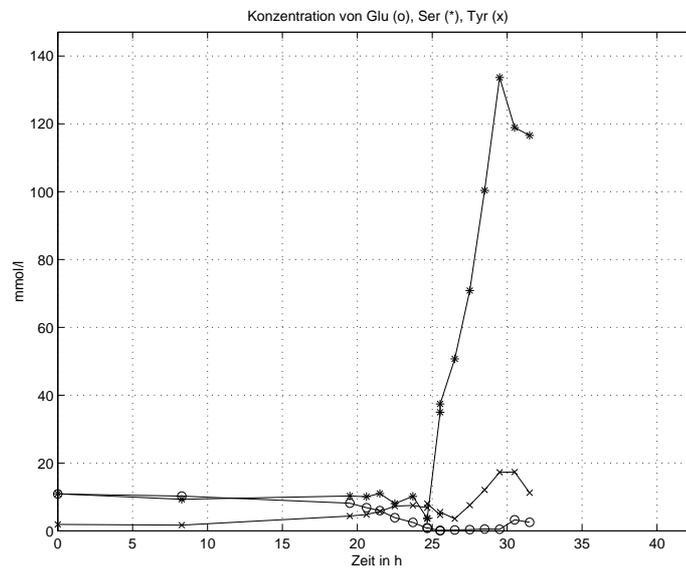


Bild A.38: Exp. *Amino\_FedBatch\_A*: Konzentration (in mmol/l) an Glutaminsäure (o), Serin (\*) und Tyrosin (x) im Kulturmedium.

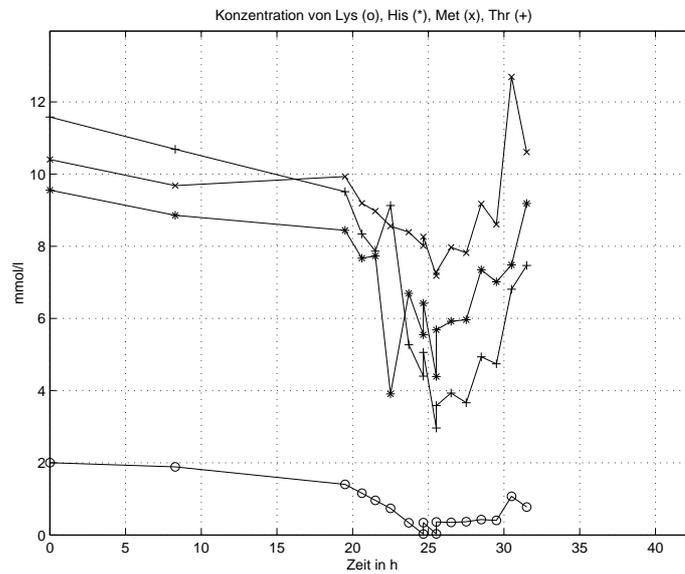


Bild A.39: Exp. *Amino\_FedBatch\_A*: Konzentration (in mmol/l) an Lysin (o), Histidin (\*), Methionin (x) und Threonin (+) im Kulturmedium.

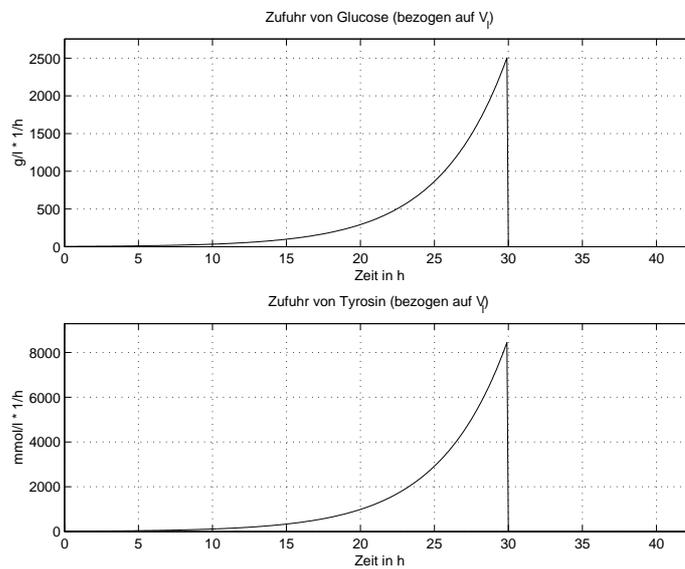


Bild A.40: Exp. *Amino\_FedBatch\_A*: Zufuhr von Tyrosin (unten) (in mmol/l) und Glucose (oben) in g/l bezogen auf das Volumen  $V_l = 2$  l des Bioreaktors

## A.12 Experiment Amino\_FedBatch\_B

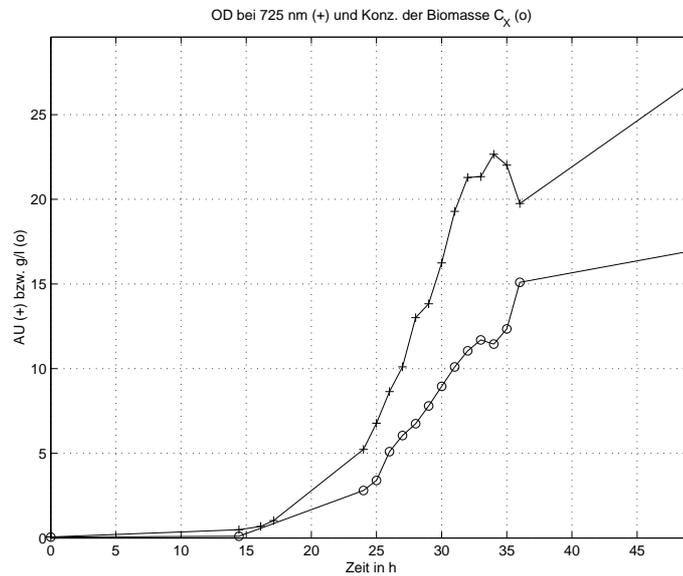


Bild A.41: Exp. *Amino\_FedBatch\_B*: Optische Dichte (+) und Konzentration (in g/l) der Biomasse (o).

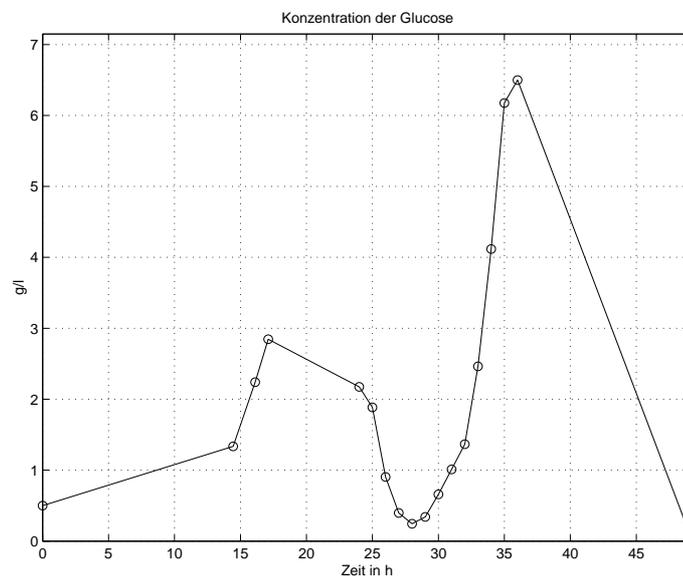


Bild A.42: Exp. *Amino\_FedBatch\_B*: Konzentration (in g/l) der Glucose (o) im Kulturmedium.

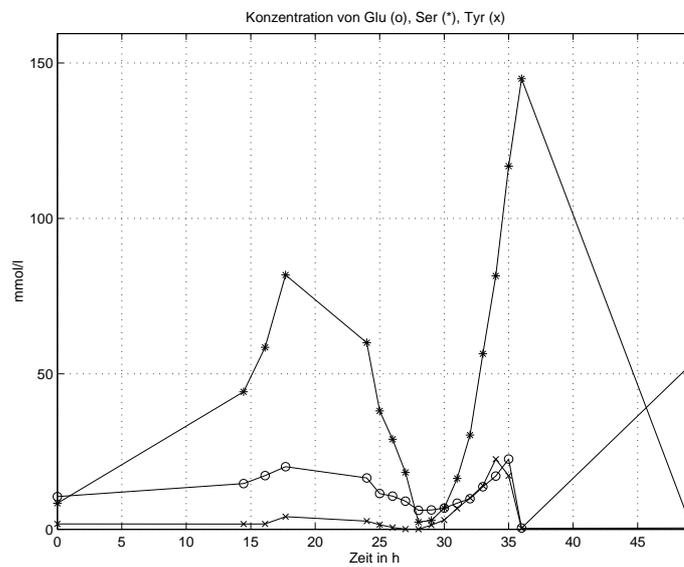


Bild A.43: Exp. *Amino\_FedBatch\_B*: Konzentration (in mmol/l) an Glutaminsäure (o), Serin (\*) und Tyrosin (x) im Kulturmedium.

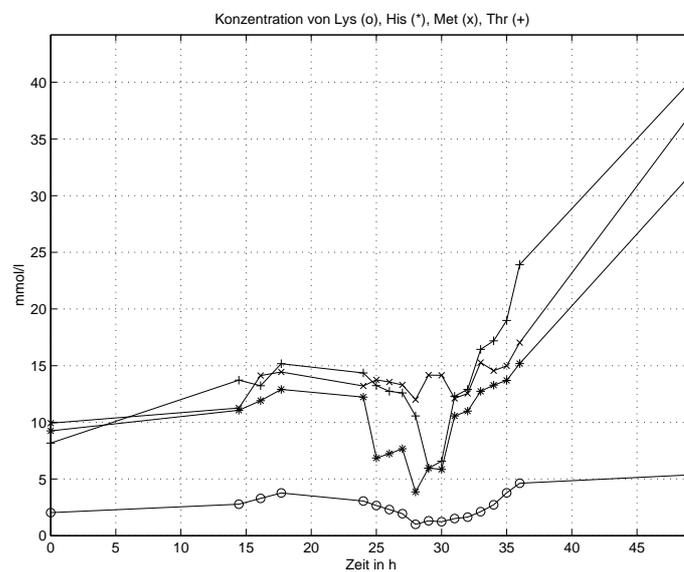


Bild A.44: Exp. *Amino\_FedBatch\_B*: Konzentration (in mmol/l) an Lysin (o), Histidin (\*), Methionin (x) und Threonin (+) im Kulturmedium.

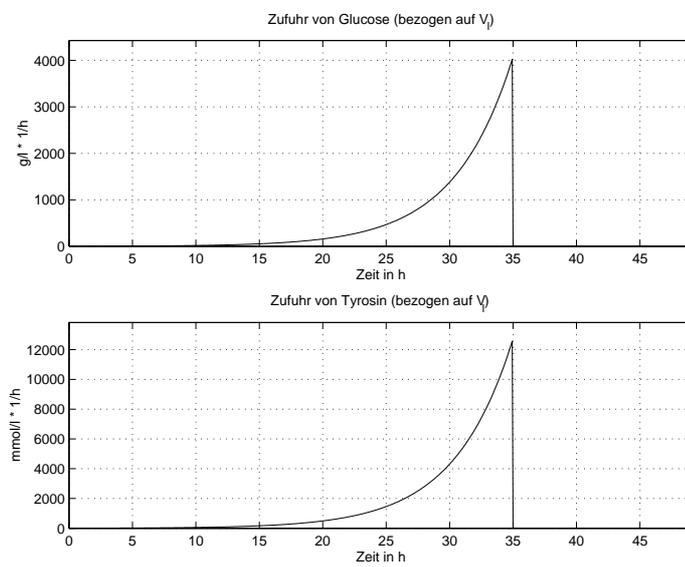


Bild A.45: Exp. *Amino\_FedBatch\_B*: Zufuhr von Tyrosin (unten) (in mmol/l) und Glucose (oben) in g/l bezogen auf das Volumen  $V_l = 2$  l des Bioreaktors

# Literatur

- [1] Adam, G.; Wilsdorf, D.; Rudolph, J.: Erfolgsfaktoren für die Übertragung von Labor-Analytik in Online-Prozessanalytik. atp-Automatisierungstechnische Praxis. 7 (1998) S. 11–16.
- [2] Akhurst, R. J.: Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes *Neoplectana* and *Heterorhabditis*. Journal of General Microbiology. 121 (1980) S. 303–309.
- [3] Bindel, R.; Nitsche, R.; Rothfuß, R.; Zeitz, M.: Flachheitsbasierte Regelung eines hydraulischen Antriebs mit zwei Ventilen für einen Großmanipulator. at - Automatisierungstechnik. 48 (2000) Nr. 3, S. 124–131.
- [4] Bintrim, S. B.: A study of crystalline inclusion proteins of *Photobacterium luminescens*. Dissertation, University of Wisconsin, Madison USA, 1994.
- [5] Bleakley, B.; Neelson, K. H.: Characterization of primary and secondary forms of *Xenorhabdus luminescens* strain Hm. FEMS Microbiology Ecology. 53 (1988) S. 241 – 250.
- [6] Bossy, F.: Zustands- und Parameterschätzung beim Wachstum von *Photobacterium luminescens* mit Hilfe eines nichtlinearen Kalman-Filters, gestützt auf Meßdaten mit unterschiedlichen Taktraten. Diplomarbeit, Christian-Albrechts-Universität, Kiel, 1999.
- [7] Burg, K.; Haf, H.; Wille, F.: Höhere Mathematik für Ingenieure, Analysis, Band 1. Stuttgart: B. G. Teubner, 1992.
- [8] Chmiel, H.: Bioprozeßtechnik, Band 1. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1991.
- [9] Claes, J.; Ryckhaert, G.; Van Impe, J.: Modeling and identification of the specific growth rate and the oxygen uptake rate on a full scale wastewater treatment system. In CESA '96 IMACS Multiconf., Lille, 1996.
- [10] de Nicolao, G.; Strada, S.: Kalman filtering with mixed discrete-continuous observations. Int. J. Control. 70 (1998) Nr. 1, S. 71–84.
- [11] Ehlers, R.-U.: Current and future use of nematodes in biocontrol: Practice and commercial aspects in regard to regulatory policies. Biocontrol Science and Technology. 6 (1996) S. 303–316.

- [12] Ehlers, R.-U.: Mass Production of Entomopathogenic Nematodes for Plant Protection. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56 (2001) S. 623–633.
- [13] Ehlers, R.-U.; Lunau, S.; Krasomil-Osterfeld, K.; Osterfeld, K. H.: Liquid culture of the entomopathogenic nematode–bacterium–complex *Heterorhabditis megidis* / *Photorhabdus luminescens*. *BioControl*. 43 (1998) S. 77–86.
- [14] Ehlers, R.-U.; Peters, A.: Bekämpfung von Engerlingen auf Sportrasen. *Rasen Greenkeepers Journal*. 3 (1998).
- [15] Ehlers, R.-U.; Stoessel, S.; Wyss, U.: 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 (1990) Nr. 4, S. 417–424.
- [16] Fliess, M.; Lèvine, J.; Martin, P.; Rouchon, P.: On differentially flat nonlinear systems. *Nonlinear Control Systems Design*. (1992) S. 408–412.
- [17] Fliess, M.; Levine, J.; Martin, P.; Rouchon, P.: Flatness and defect of nonlinear systems: introductory theory and examples. *Intern. J. Control*. 61 (1995) S. 1327–1361.
- [18] Gelb, A.: Applied optimal estimation. Massachusetts, USA: The M.I.T. Press, 1992.
- [19] Gregory, M.; Thornbill, N.: The effects of aeration and agitation on the measurement of yeast biomass using a laser turbidity probe. *Bioprocess Engineering*. 16 (1997) S. 339–344.
- [20] Hitzmann, B.; Broxtermann, O.; Cha, Y.-L.; Sobieh, O.; Stärk, E.; Scheper, T.: The control of glucose concentration during yeast fed-batch cultivation using a fast measurement complemented by an extended Kalman filter. *Bioprocess Engineering*. 23 (2000) S. 337–341.
- [21] Isermann, R.: Identifikation dynamischer Systeme. Berlin: Springer-Verlag, 1992.
- [22] Johnigk, S.-A.; Ehlers, R.-U.: Juvenile development and life cycle of *Heterorhabditis bacteriophora* and *H. indica* (Nematoda: Heterorhabditidae). *Nematology*. 1 (1999) S. 251–260.
- [23] Johnigk, S.-A.; Ehlers, R.-U.: *Endotokia matricida* in hermaphrodites of *Heterorhabditis* spp. and the effect of the food supply. *Nematology*. 1 (1999) S. 717–726.
- [24] King, R.: Mathematische Modelle myzelförmig wachsender Mikroorganismen. Düsseldorf: VDI-Verlag, 1994.

- [25] Konstantinov, K.; Nishio, N.; Yoshida, T.: Glucose feeding strategy accounting for the decreasing oxidative capacity of recombinant *Escherichia coli* in fed-batch cultivation for phenylalanine production. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 70 (1990) S. 253–260.
- [26] Krasomil-Osterfeld, K.: Charakterisierung von Phasenvarianten des symbiotischen Begleitbakteriums *Xenorhabdus luminescens* (XSH1) und ihr Einfluß auf die Vermehrung des entomopathogenen Nematoden *Heterorhabditis* sp. (HSH1) in monoxenischer Flüssigkultur. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität, Kiel, 1993.
- [27] Krause, I.; Bockhardt, A.; Neckmann, H.; Henle, T.; Klostermeyer, H.: Simultaneous determination of amino acids and biogenic amines by reversed-phase high-performance liquid chromatography of the dabsyl derivatives. *Journal of Chromatography A*. 715 (1995) S. 67–79.
- [28] Lebert, K.: Modellierung des Wachstums von *Photorhabdus luminescens* über die modellgestützte Gasanalyse. Aachen: Shaker Verlag, 2000.
- [29] Lebert, K.; Stanka, R.; Röck, H.: A first step towards computer controlled cultivation of nematodes – growth modelling of the symbiotic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *IEEE International Conference on Control Applications CCA* (1998) S. 373–377.
- [30] Locher, G.; Sonnleitner, B.; Fiechter, A.: On-line measurement in biotechnology: Techniques. *Journal of Biotechnology*. 25 (1992) S. 23–53.
- [31] Lunau, S.: Untersuchungen zur Biologie des entomopathogenen Nematoden *Heterorhabditis* sp. (Stamm HSH1) und seiner Vermehrung in Flüssigkultur. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität, Kiel, 1993.
- [32] Lunze, J.: *Robust multivariable feedback control*. Prentice Hall, 1989.
- [33] Lunze, J.: *Feedback control of large scale systems*. Prentice Hall, 1992.
- [34] Lunze, J.: Ein Beispiel für den Entwurf schaltender Beobachter. *Automatisierungstechnik*. 48 (2000) S. 556–562.
- [35] Mendoza-Vega, O.; Herbert, C.; Brown, S.: Production of recombinant hirudin by high cell density fed-batch cultivations of a *Saccharomyces cerevisiae* strain: Physiological considerations during the bioprocess design. *Journal of Biotechnology*. 32 (1994) S. 249–259.
- [36] Monod, J.: *Recherches sur la Croissance des Cultures Bactériennes*. Paris: Hermann, 1942.

- [37] Munack, A.: Modellierung und Prozeßführung in der Bioverfahrenstechnik. at-Automatisierungstechnik. 8 (1998) S. 363–367.
- [38] Neidhardt, F. C.; Ingraham, J. L.; Schaechter, M.: Physiology of the bacterial cell: A molecular approach. Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Associates, Inc., 1990.
- [39] Nielsen, J.; Villadsen, J.: Modelling of microbial kinetics. Chemical Engineering Science. 47 (1992) S. 4225–4270.
- [40] Nijmeijer, H.; Van der Schaft, A.: Nonlinear dynamic control systems. New York: Springer-Verlag, 1990.
- [41] Osterfeld, K.-H.: Biotechnische Vermehrung des entomopathogenen Nematoden *Heterorhabditis* sp. (Stamm HSH1) in Laborreaktoren. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität, Kiel, 1993.
- [42] Pirsing, A.; Wiesmann, U.; Kelterbach, G.; Schaffranietz, U.; Röck, H.; Eichner, B.; Szukal, S.; Schulze, G.: On-line-monitoring and modelling based process control of high rate nitrification - lab scale experiment. Bioprocess Engineering. 15 (1996) S. 181–188.
- [43] Präve, P.; Faust, U.; Sittig, W.; Sukatsch, D.: Handbuch der Biotechnologie. R. Oldenbourg Verlag, 1994.
- [44] Riesenberg, D.; Schulz, V.; Knorre, W. A.; Pohl, H.-D.; Korz, D.; Sanders, E. A.; Roß, A.; Deckwer, W.-D.: High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate. Journal of Biotechnology. 20 (1991) S. 17–28.
- [45] Römpp-Lexikon: Biotechnologie und Gentechnik. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1999.
- [46] Rothfuss, R.: Anwendung der flachheitsbasierten Analyse und Regelung nichtlinearer Mehrgrößensysteme. Düsseldorf: VDI-Verlag, 1997.
- [47] Schaffranietz, U.; Röck, H.: A hybrid controller combining model- and knowledge-based methods applied to a bioprocess. In 3rd IEEE Conference on Control Applications, University of Strathclyde, Glasgow, 1994.
- [48] Schaffranietz, U.; Röck, H.: Regelung des Nitrifikationsprozesses bei hochbelasteten Abwässern mittels Fuzzy-Logik. at - Automatisierungstechnik. 5.
- [49] Seydel, P.; Bossy, F.; Röck, H.: Kombination von modellgestützter Gasanalyse und Online-HPLC mit Hilfe eines erweiterten Kalman-Filters zur Beobachtung einer Bakterienkultur. In 45. Internationales Wissenschaftliches Kolloquium, Ilmenau: Technische Universität, 2000.

- 
- [50] Seydel, P.; Lieb, M.; Ehlers, R.-U.; Röck, H.: Amino acid uptake of *Photorhabdus luminescens* in batch and fed-batch fermentations. In COST 819 symposium & working group meetings, Maynooth, Ireland, 2000.
- [51] Seydel, P.; Röck, H.: Flat-based controlled fed-batch fermentation of the bacterium *Photorhabdus luminescens*. In IEEE Int. Conf. on Control Applications CCA, Anchorage, Alaska, USA, 2000.
- [52] Sonnleitner, B.; Locher, G.; Fiechter, A.: Biomass Determination. Journal of Biotechnology. 25 (1992) S. 5 – 22.
- [53] Stanka, R.: Entwicklung einer Prozeßumgebung für die kontinuierliche Kultivierung von *Photorhabdus luminescens* in einem Chemostaten. Aachen: Shaker Verlag, 2000.
- [54] Strauch, O.: Untersuchungen zur Biologie entomopathogener Nematoden (*Heterorhabditis* spp.) und daraus resultierende Konsequenzen für eine biotechnische Vermehrung in Flüssigkultur. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität, Kiel, 1997.
- [55] Wille, F.: Analysis. Stuttgart: Teubner, 1976.
- [56] Yamane, T.; Hibino, W.; Ishihara, K.; Kadotani, Y.; Komimami, M.: Fed-batch culture automated by uses of continuously measured cell concentration and culture volume. Biotechnology and Bioengineering. 39 (1992) S. 550 – 555.

# Curriculum Vitae

Peter Seydel

geboren am 26. März 1971 in Kiel

1981 – 1990 Käthe-Kollwitz-Gymnasium Kiel

1990 – 1991 Grundwehrdienst

1991 – 1996 Studium der allgemeinen Elektrotechnik an der  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

1996 – 2002 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für  
Automatisierungs- und Regelungstechnik an der  
Technischen Fakultät der Christian-Albrechts-  
Universität zu Kiel

31. Mai 2002 Disputation