

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

**Reaktionstechnische Untersuchungen zur mikrobiellen  
Riboflavin-Herstellung in miniaturisierten  
Rührkesselreaktoren**

**Andrea G. St. Vester**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Maschinenwesen der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktor-Ingenieurs  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Rafael Macián-Juan, Ph.D.

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz
2. Univ.-Prof. Dr.rer.nat.habil. Bernhard Wolf

Die Dissertation wurde am 13.11.2008 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Maschinenwesen  
am 18.02.2009 angenommen.







---

## Vorwort

Die vorliegende Dissertation fasst die Ergebnisse meiner Arbeiten am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München zusammen. Während meiner praktischen Tätigkeiten von Oktober 2004 bis August 2008 standen mir die hervorragend ausgestatteten Labore und das Technikum des Lehrstuhls zur Verfügung. Ein erstklassiges Arbeitsklima und das interdisziplinären Umfeld machten die Arbeit zu einer besonderen Erfahrung.

Zum Erfolg dieser Arbeit haben unterschiedliche Personen auf vielseitige Art und Weise beigetragen. Bei Ihnen möchte ich mich an dieser Stelle auf das herzlichste bedanken:

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz für die hervorragende Betreuung sowie das in mich gesetzte Vertrauen und die Möglichkeit an seinem Lehrstuhl promovieren zu können. Seine Ratschläge, die stets konstruktive Kritik und interessanten Diskussionen haben in vielerlei Hinsicht zum Gelingen dieser Arbeit und meiner persönlichen Entwicklung beigetragen.

Bei DSM Nutritional Products bedanke ich mich für die Finanzierung des Projektes sowie die Bereitstellung der *Bacillus* Stämme. Speziell möchte ich mich bei meinen Ansprechpartnern und Projektmitgliedern Dr. Michael Hans, Dr. Hans-Peter Hohmann, Dr. Bas Romein und Dr. Luc Tjihuis für die sehr gute, offene und lehrreiche Zusammenarbeit bedanken. Vor allem die Projekttreffen waren in jeder Hinsicht eine Bereicherung meiner Arbeit.

Ich möchte auch allen derzeitigen und ehemaligen Kollegen meinen Dank für die gute Zusammenarbeit und das nette Arbeitsklima aussprechen: Juniorprof. Dr.-Ing. Ezequiel Franco-Lara, Dr. rer. Nat. Jan Havel, Dr.-Ing. Dariusch Hekmat, Dr.-Ing. Julia

---

Hiller, Dr.-Ing. Andreas Knepper, Dr.-Ing. Bettina Knorr, Dr.-Ing. Andreas Kusterer, Dr.-Ing. Holger Pfründer, Dr.-Ing. Robert Puskeiler, Dr.-Ing. Armin Tiemeyer, Dr.-Ing. Maya Tiemeyer, Dominik Maslak, Michael Finke, Hannes Link, Michael Hofinger, Ralf Hortsch, Peter Riedlberger, Kathrin Hölsch, Torben Höfel, Stefan Bräutigam, Clara Delhomme, Danielle Dennewald, Stefanie Brüning, Christoph Bendig, Gabi Gebhardt, Tanja Kurzrock, Martin Demler, Bernd Anselment und Michael Braun.

Viele von euch sind und werden mir in Freundschaft erhalten bleiben.

Im organisatorischen Bereich hat Irma Einsle mir vieles erleichtert. Für ihre Geduld und ordnende Hand möchte ich mich herzlich bedanken. Georg Kojro aus der elektrischen und Norbert Werth aus der mechanischen Werkstatt haben mich jederzeit bei den technischen Arbeiten unterstützt und standen darüber hinaus immer für Notfälle und kurzfristige Anliegen zur Verfügung. Markus Amman war immer zur Stelle, wenn eine weitere Hand gebraucht wurde und hat mit seiner unverwechselbaren Art zum Spaß an der Arbeit beigetragen. Vielen Dank!

Bei allen meinem Studenten und meinen beiden ‚Hiwinen‘ Eva Tchervenkova und Katharina Kinast bedanke ich mich für ihren Einsatz und ihre Hilfe.

Besonders möchte ich mich bei Gabi und Kathrin für ihre Freundschaft und Unterstützung in allen Lebenslagen bedanken. Bei Ralf und Hannes für die ergiebigen Diskussionen - von zum Teil auch nicht beruflicher Natur - sowie bei Christoph für die nicht selbstverständliche Hilfestellung und Unterstützung im Labor in den letzten Monaten. Bei Stefan für alle nützlichen und hilfreichen Tipps rund um das Abfassen der Dissertation.

Zusätzlich habe ich auch im privaten Bereich viel Unterstützung durch Freunde und Familie erhalten, wofür ich mich sehr glücklich schätze. Ein großer Dank geht an meinen Vater und seine Frau Eva sowie meinen Bruder Christian. Ebenso möchte ich Adeltrude Bender und meiner Großmutter Irmgard Stein für ihre mütterliche Fürsorge und ein jederzeit offenes Ohr danken.

Abschließend danke ich meinem Freund und Lebensgefährten Michael für seine Geduld, seine tatkräftige Unterstützung bei allem und für vieles, vieles mehr.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Problemstellung und Zielsetzung</b> .....	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Theoretische Grundlagen</b> .....	<b>6</b>
<b>3.1</b>	<b>Produktionsprozesse mit Mikroorganismen</b> .....	<b>6</b>
3.1.1	Mikrobielles Wachstum und Produktion.....	7
3.1.2	Sauerstofftransfer in begasten Bioreaktoren .....	11
3.1.3	Idealer Rührkesselreaktor .....	15
3.1.4	Kultivierung im Satzverfahren .....	16
3.1.5	Kultivierung im Zulaufverfahren .....	18
<b>3.2</b>	<b>Mess- und Regelungstechnik für den Bioreaktor</b> .....	<b>20</b>
3.2.1	Regelungstechnik in biologischen Systemen.....	20
3.2.2	Nicht invasive (optische) Messmethoden .....	23
3.2.3	Nicht-invasive Messung von pH und pO <sub>2</sub> .....	25
3.2.4	Messung der Temperatur.....	26
3.2.5	Regelung des pH .....	29
3.2.6	Regelung der Antischaumzugabe .....	32
<b>3.3</b>	<b>Optimierung von Reaktionsbedingungen im Parallelansatz</b> .....	<b>33</b>
3.3.1	Optimierung von Fermentationsmedien .....	34
3.3.2	Medienoptimierung mit Genetischem Algorithmus .....	39
<b>3.4</b>	<b>Maßstabsvergrößerung aerober Bioprozesse</b> .....	<b>40</b>
3.4.1	Ansätze für die Maßstabsübertragung in begasten Bioreaktoren.....	41
3.4.2	Einfluss von Konzentrationsgradienten auf die Kultivierung von .....	
	Mikroorganismen .....	43
<b>3.5</b>	<b>Industrielle Produktion von Riboflavin (Vitamin B<sub>2</sub>)</b> .....	<b>45</b>
<b>3.6</b>	<b><i>Bacillus subtilis</i></b> .....	<b>48</b>
3.6.1	Zentraler Kohlenstoffwechsel in <i>Bacillus subtilis</i> .....	49
3.6.2	Riboflavinbiosynthese in <i>Bacillus subtilis</i> .....	51
3.6.3	Gentechnisch veränderte Stämme von <i>Bacillus subtilis</i> zur .....	
	Riboflavinproduktion .....	54

<b>4</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>59</b>
<b>4.1</b>	<b>Parallele Bioreaktoren .....</b>	<b>59</b>
4.1.1	Bioreaktorblock.....	61
4.1.2	Einweg-Bioreaktoren .....	63
4.1.3	Laborroboter .....	63
<b>4.2</b>	<b>pH Messung und Regelung .....</b>	<b>64</b>
4.2.1	<i>At-line</i> pH-Messung .....	64
4.2.2	<i>Online</i> pH-Messung.....	66
4.2.3	Referenzmessung des pH.....	66
<b>4.3</b>	<b><i>Online</i> pO<sub>2</sub>-Messung .....</b>	<b>67</b>
<b>4.4</b>	<b><i>At-line</i> Analytik für den Bioreaktorblock.....</b>	<b>67</b>
<b>4.5</b>	<b>Temperaturmessung und Antischaumsensor .....</b>	<b>68</b>
<b>4.6</b>	<b>Laborbioreaktor.....</b>	<b>69</b>
<b>4.7</b>	<b>Statistische Verfahren .....</b>	<b>70</b>
<b>5</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>75</b>
<b>5.1</b>	<b>Evaluation der Riboflavinproduktion verschiedener <i>Bacillus subtilis</i> .....</b>	<b>75</b>
	<b>Stämme im Parallelexperiment .....</b>	<b>75</b>
5.1.1	Verdünntes Standardverfahren als Referenzprozess im Millilitermaßstab .....	75
5.1.2	Einfluss der Verdünnung des Standardverfahrens.....	77
5.1.3	Einfluss der intermittierenden Substratzugabe auf verschiedene Stämme von <i>Bacillus subtilis</i> .....	80
5.1.4	Vergleich der Produktionsstämme im Parallelansatz .....	82
5.1.5	Maßstabsvergrößerung .....	84
5.1.6	Diskussion .....	87
<b>5.2</b>	<b>Optimierung des Satzmediums zur Riboflavinproduktion im .....</b>	<b>88</b>
	<b>Zulaufverfahren .....</b>	<b>88</b>
5.2.1	Evaluierung der bisherigen Mediumskomponenten .....	89
5.2.2	Identifikation neuer Mediumskomponenten.....	92
5.2.3	Mediumsoptimierung im Zulaufverfahren mit Ammoniumhydroxid zur..... pH-Kontrolle.....	98
5.2.4	Mediumsoptimierung im Zulaufverfahren mit Natronlauge zur pH-Kontrolle.....	114



5.2.5	Validierung der Optimierungsergebnisse im Millilitermaßstab .....	126
5.2.6	Übertragung der Optimierungsergebnisse in den Labormaßstab .....	128
5.2.7	Diskussion.....	141
<b>5.3</b>	<b>Verbesserung der Prozesstechnik zur Riboflavinproduktion im .....</b>	
	<b>Parallelansatz .....</b>	<b>145</b>
5.3.1	Einfluss der Begasung auf die Reproduzierbarkeit.....	145
5.3.2	Einfluss der Prozessführung auf die Reproduzierbarkeit.....	152
5.3.3	Individuelle <i>online</i> Temperaturmessung in den Parallelbioreaktoren .....	159
5.3.4	Individuelle <i>online</i> Schaumsensorik für die Parallelbioreaktoren.....	162
5.3.5	Reaktionstechnische Untersuchungen zur <i>online</i> pH-Messung.....	169
5.3.6	Diskussion.....	174
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>178</b>
<b>7</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>182</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>184</b>
<b>9</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>192</b>
<b>10</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>195</b>
<b>10.1</b>	<b>Analytik und Messtechnik .....</b>	<b>195</b>
10.1.1	Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration.....	195
10.1.2	Bestimmung der Optischen Dichte von Zellsuspensionen.....	195
10.1.3	Bestimmung von Riboflavin .....	195
10.1.4	Bestimmung von Glucose .....	197
<b>10.2</b>	<b>Medien und Pufferlösungen .....</b>	<b>197</b>
10.2.1	Vorkulturmedien.....	197
10.2.2	Satzmedium .....	198
10.2.3	Zulauflösung .....	200
10.2.4	Puffer .....	200
10.2.5	Sonstige Chemikalien .....	200
<b>10.3</b>	<b>Mikroorganismen und ihre Kultivierung .....</b>	<b>202</b>
10.3.3	Verwendete Rekombinanten von <i>Bacillus subtilis</i> .....	202
10.3.4	Vorkultur.....	203
10.3.5	Parallelkultivierung.....	203
10.3.6	Kultivierung im Labormaßstab .....	205
<b>10.4</b>	<b>Prozessoptimierung.....</b>	<b>205</b>
10.4.3	Parallele Optimierung .....	205
10.4.4	Softwaretool Game.opt .....	209



## 1 Einleitung

Im Jahr 2005 gaben rund 5300 biotechnologisch orientierte Unternehmen weltweit 25 Milliarden US\$ für Forschung und Entwicklung aus und generierten 89 Milliarden US\$ Erlös. Nahezu 5 Milliarden US\$ Beteiligungskapital wurden seit dem Jahr 2000 allein in Europa aufgebracht, wobei die Deutsche Biotechnologie 489 Millionen anzog (Kircher 2006). Der Umsatz der deutschen Biotechnologie-Branche ist im Jahr 2007 von 827 Millionen Euro auf 945 Millionen Euro gestiegen, während sich die Ausgaben für Forschung und Entwicklung um fünf Prozent auf 834 Millionen Euro erhöhten (Ernst & Young 2007). Dabei beginnt die Ära der weißen Biotechnologie gerade erst (Kircher 2006). Die bisher attraktiven fossilen Rohstoffquellen wie Öl und Gas, verlieren langsam aber stetig ihren Kostenvorteil. Gleichzeitig wächst die biotechnologische Konkurrenz, die mit kosteneinsparenden und ökologisch vorteilhaften Substitutionsprozessen klassische Produktionsrouten ablöst.

Die Vielseitigkeit von mikrobiellen Biosynthesen ist enorm und ihr Anteil an der Weltwirtschaft wächst zunehmend (Demain 2006). Die industrielle oder auch ‚Weiße Biotechnologie‘ umfasst die industrielle Produktion von Grund- und Feinchemikalien, Wirkstoffen, Materialien sowie Treibstoffen/ Energie mit Hilfe von Enzymen oder ganzen Zellen. Sie hat sich in den letzten Jahren stark entwickelt und zu immer neuen Produkten und Anwendungen in den verschiedensten Bereichen geführt, wie z. B. der Medizin, Pharmazie sowie der Chemie- und Lebensmittelindustrie.

Neben der Entwicklung von neuen Produkten ist auch der Ersatz konventioneller industrieller Prozesse durch biologische Prozesse auf dem Vormarsch. Auf diesem Weg können Energiebedarf und Rohstoffeinsatz gesenkt sowie die Anzahl der Prozessstufen reduziert werden. Damit werden erhebliche Kosten eingespart und gleichzeitig ökologische Vorteile geschaffen. Die biotechnologische Herstellung von Riboflavin ist ein Beispiel für die Verdrängung eines etablierten chemischen Prozesses durch ein biologisches Verfahren (Stahmann et al. 2000).

Ein mehrstufiger chemischer Herstellungsprozess wurde durch einen einstufigen biologischen Prozess ersetzt, in dem Glucose durch Mikroorganismen direkt zu Riboflavin umgesetzt wird. Der Einsatz nicht-erneuerbarer Rohstoffe konnte erheblich reduziert werden, ebenso die Umweltbelastung in Form von Emissionen. Der größte und entscheidende Vorteil ist eine Kostenreduktion von 50% im Vergleich zum chemischen Herstellungsverfahren (OECD 2001).

Um Hochleistungsstämme zu erzeugen oder Enzyme zu optimieren werden neben den klassischen Mutations- und Selektionsverfahren mittlerweile vor allem gentechnische Methoden eingesetzt (Parekh et al. 2000; Schwister 2007). Das neugewonnene Methodenspektrum der Molekularbiologie ermöglicht die gezielte Veränderung von Stoffwechselwegen in Mikroorganismen und Zellen durch sogenanntes „Metabolic Engineering“. So können heutzutage Biokatalysator und technischer Prozess gemeinsam unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten gestaltet werden (Weuster-Botz 2006). Die Prozessentwicklung und Optimierung erhält dabei zunehmend Gewicht (Gupta und Lee 2007).

Die Entwicklung von biotechnologischen Produktionsprozessen erfolgt zumeist in drei miteinander verknüpften Arbeitsschritten: (1) Die Suche nach neuen Biokatalysatoren und deren Charakterisierung sowie Weiterentwicklung, (2) die Bioprozessentwicklung im Labormaßstab und (3) die Maßstabsvergrößerung zum Produktionsmaßstab.

Das Auffinden und die Optimierung potenzieller Biokatalysatoren sowie die Identifizierung der optimalen Reaktionsbedingungen der Mikroorganismen ist mit einem großen experimentellen Aufwand verbunden und erfolgt zumeist in miniaturisierten Parallelsystemen. Bisher werden für die hohe Anzahl von Parallelversuchen hauptsächlich einfache Satzreaktoren wie Schüttelkolben oder Mikrotiterplatten eingesetzt (Büchs 2001; Duetz 2000). Neue Technologien, die neben der hochgradigen Parallelisierung auch Automatisierung und Prozessähnlichkeit fokussieren, werden zunehmend entwickelt (Betts und Baganz 2006).

## 2 Problemstellung und Zielsetzung

Neben der Entwicklung neuer biotechnologischer Prozesse ist auch die reaktionstechnische Untersuchung und Optimierung bereits bestehender Prozesse von großer wirtschaftlicher Bedeutung. In der industriellen Biotechnologie werden die laufenden Produktionsprozesse fortwährend verbessert. Es werden neue rekombinante Produktionsstämme entwickelt („metabolic design“) und Prozessführung sowie Reaktionsbedingungen optimiert. Die Optimierung der Anfangsbedingungen und damit der Produktionsmedien ist hierbei ein wesentlicher Erfolgsfaktor. Das Fermentationsmedium hat nicht nur einen großen Einfluss auf die Produkt- sowie die Raum-Zeit-Ausbeute, sondern kann darüber hinaus durch die Reduktion der Mediumskosten die Wirtschaftlichkeit des Gesamtprozesses positiv beeinflussen.

Die Optimierung eines Produktionsmediums stellt einen großen Kosten- und Zeitfaktor dar. Für die Identifizierung einer optimalen Medienzusammensetzung müssen auch heute noch viele Einzelexperimente durchgeführt werden, da das Wissen um biochemische Zusammenhänge nicht ausreichend und die Stoffwechselkomplexität von Mikroorganismen zu hoch ist, als dass ein modellhafter Zugang zur Lösung des Optimierungsproblems beitragen könnte (Weuster-Botz 1999).

Aufgrund des hohen experimentellen Aufwandes ist die Evaluierung neuer Produktionsorganismen und die Optimierung des Produktionsverfahrens im laufenden Prozess nicht möglich. Deshalb werden maßstabsverkleinerte Produktionsverfahren im Parallelansatz eingesetzt, wobei bisher hauptsächlich einfache Satzreaktoren wie Schüttelkolben (Anderlei und Büchs 2001; Tolosa et al. 2002; Weuster-Botz 2001) oder Mikrotiterplatten (John et al. 2003; Kensey et al. 2005b) Verwendung fanden. Diese bieten in den meisten Fällen nur eine eingeschränkte Übertragbarkeit der Optimierungsergebnisse auf den Großmaßstab und sind nicht für die Durchführung von Zulaufverfahren ausgelegt. Die intensiv verwendeten Schüttelkolben besitzen zudem nur ein geringfügiges Automatisierungspotential.

Um den apparativen und personellen Aufwand der Experimente zu reduzieren, wurde am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München ein au-

tomatisiertes Parallelreaktorsystem mit 48 parallelen Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab entwickelt (Puskeiler 2004; Puskeiler et al. 2005a; Kusterer 2008, Kusterer et al. 2008). Knorr et al.(2007) zeigten bereits am Beispiel des industriellen Produktionsprozesses von Riboflavin mit *Bacillus subtilis* der Firma DSM Nutritional Products (DSM NP), dass dieses automatisierte Parallelreaktorsystem Untersuchungen unter prozessrelevanten Reaktionsbedingungen ermöglicht.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird dieses Reaktorsystem zur reaktionstechnischen Untersuchung des komplexen Riboflavinherstellungsprozesses eingesetzt. Es wird zunächst die Evaluierung von unterschiedlichen Produktionsstämmen durchgeführt, wobei die erwartete Prozessverbesserung teilweise nur wenige Prozent beträgt. Hierdurch ist eine hohe Reproduzierbarkeit der Versuche in den Milliliter-Reaktoren gefordert, da diese direkten Einfluss auf die Differenzierbarkeit der untersuchten Produktionsstämme hat. Je besser die Reproduzierbarkeit der Parallelexperimente ist, desto genauer lassen sich die Produktionsstämme voneinander unterscheiden. Für die reaktionstechnischen Untersuchungen zur Diskriminierung verschiedener Produktionsstämme im Parallelansatz sollen deshalb zunächst die Einflussgrößen auf die parallele Reproduzierbarkeit der Versuche identifiziert werden. Es ist ein Ziel dieser Arbeit die ‚Trennschärfe‘ des Reaktorsystems für den Riboflavinproduktionsprozess abzuschätzen und eine Methode zur Bestimmung der notwendigen Anzahl von Parallelreaktoren für ein Diskriminierungsexperiment aufzuzeigen.

Im nächsten Schritt wird mit der Prozessoptimierung des Riboflavinherstellungsverfahrens begonnen. Da das Reaktionsmedium großen Einfluss auf die Prozessleistung hat, wurde es bei DSM NP in Standardverfahren über viele Jahre hinweg optimiert und industriell etabliert. Diese Optimierung erfolgte in Labor-Rührkesselreaktoren im Litermaßstab. Da die Nutzung der einfachen parallelen Schüttelkolbentechnik zur Medienoptimierung bei diesem Zulaufprozess nicht möglich ist, sollen die Anfangsbedingungen für die mittlerweile verbesserten Produktionsstämme im automatisierten Parallelreaktorsystem optimiert werden.

Der verwendete Prototyp des Parallelreaktorsystems weist in Hinblick auf den mikrobiellen Herstellungsprozess von Riboflavin noch technische Unzulänglichkeiten auf, wie beispielsweise den Ausfall des Gaseintrags in das Kulturmedium bei hohen Produktkonzentrationen (Riboflavinkristalle), eine fehlende individuelle Temperatur-

Messung und eine fehlende individuelle Schaumdetektion. Darüber hinaus wird der pH bisher mittels einer at-line Analytik in einem Zeitintervall von 30 Minuten außerhalb der Reaktoren gemessen. Der auf diesen Messungen basierende Stelleingriff zur Regelung des pH erfolgt ebenfalls nur alle 30 Minuten. Eine dynamische pH-Regelung für biologische Prozesse ist unter diesen Bedingungen nur schwer zu realisieren. Die Nutzbarmachung der von Kusterer et al. (2008) eingeführten online pH-Messung mit immobilisierten chemischen Sensoren könnte hier Abhilfe schaffen. Allerdings stört das gebildete Riboflavin die *online* pH-Messung mit diesem System. Eine weitere Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung von technischen Lösungen, um die Paralleltechnik noch besser für reaktionstechnische Untersuchungen zur mikrobiellen Riboflavinproduktion einsetzen zu können.

## 3 Theoretische Grundlagen

### 3.1 Produktionsprozesse mit Mikroorganismen

Die biotechnologische Industrie basiert auf der Nutzung der Stoffwechselfähigkeit von Mikroorganismen, Pflanzen- und Tierzellen zur Herstellung einer Fülle von unterschiedlichsten Produkten, die in der chemischen, pharmazeutischen sowie der Lebensmittelindustrie Verwendung finden.

Die biotechnologische Stoffumwandlung unterscheidet sich in mehreren Punkten von der chemischen, auch wenn oft Methoden und Technologien aus der traditionelleren chemischen Verfahrenstechnik zur Lösung von prozesstechnischen Problemen der Bioverfahrenstechnik verwendet werden (z.B. Maßstabsübertragungen, Reaktorauslegung). So besitzen Biokatalysatoren zumeist eine höhere Enantio- und Regioselektivität als Homogenkatalysatoren. Die Reaktionskinetik ist nicht linear und wird meistens von mehreren Substraten und Produkten bestimmt, wobei bei aeroben Prozessen zusätzlich der Stofftransport über die Phasengrenze Gas-Flüssigkeit im Reaktor realisiert werden muss.

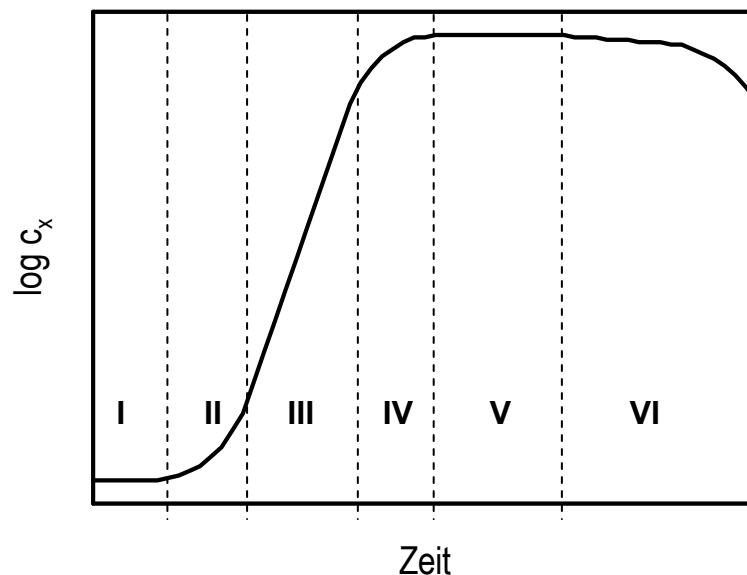
Im folgenden werden Grundlagen zum Verständnis von mikrobiellen Produktionsprozessen dargestellt. Da die biologischen Vorgänge in den industriellen Herstellungsprozessen sehr komplex sind, versucht man sie durch stark vereinfachte mathematische Modelle quantitativ zu beschreiben. Es ergeben sich die in Kapitel 3.1.1 vorgestellte Kinetik des Zellwachstums und der Produktbildung. Bei aeroben Prozessen spielt der Sauerstoffeintrag in das Kulturmedium eine entscheidende Rolle. In Kapitel 3.1.2 werden die Grundlagen zur Begasung von Bioreaktoren eingeführt.

Um auch die quantitative Charakterisierung des Reaktorsystems zu gewährleisten, ist es zweckmäßig die verwendeten Reaktoren auf wenige idealisierte Grundtypen zurückzuführen. In dieser Arbeit wird nur der ideale Rührkesselreaktor berücksichtigt (Kapitel 3.1.3). Die Reaktoren können auf verschiedene Weise betrieben werden, wobei die Betriebsweise von unterschiedlichen Parametern abhängt. Die Kultivierung im Satzverfahren wird in Kapitel 3.1.4 behandelt, die Kultivierung im Zulaufverfahren in Kapitel 3.1.5.



### 3.1.1 Mikrobielles Wachstum und Produktion

Lebensfähige Zellen reagieren auf eine Umgebung mit essenziellen Nährstoffen sowie geeignetem pH und Temperatur mit Wachstum. Zellwachstum bedeutet auch gleichzeitig Aufnahme von Stoffen aus dem direkten Umfeld der Zelle. Mikroorganismen können unter verschiedensten chemischen und physikalischen Bedingungen wachsen und auch die verwertbaren Nährstoffe sind vielseitig. Teile der Nährstoffe werden zur Produktion von Energie, andere für Biosynthesen und Produktbildung verwendet. Als Ergebnis der Umsetzung von Nährstoffen nimmt die Biomasse mit der Zeit zu und metabolische Zwischen- und Endprodukte entstehen.



**Abbildung 3.1.1: Wachstum von Zellen unter nicht limitierenden aber begrenzten Nährstoffbedingungen. I, lag'-Phase, II Übergangsphase, III exponentielles Wachstum, IV Substratlimitierung, V stationäre Phase, VI Absterbephase.**

Durch Wachstum und Produktion verändern die Organismen ihre Umwelt. Stoffkonzentrationen verändern sich, Wärme wird erzeugt, der pH sowie die Ionenstärke des Mediums verschieben sich und die Rheologie der Biosuspension wird verändert. Heterotrophe Mikroorganismen verwenden organische Kohlenstoffverbindungen, organische und anorganische Stickstoffquellen sowie Mineralsalze und Vitamine zum Wachstum. In der Industrie werden häufig komplexe Medienbestandteile wie Hefeextrakt, Pepton, Maisquellwasser und Melasse eingesetzt. Komplexe Medienkomponenten bestehen aus einer Vielzahl von Zuckern, Peptiden und freien Aminosäuren, Mineralsalzen und Vitaminen. Sie stammen zumeist aus der Lebensmittelindustrie, wo sie als

Rückstände oder Nebenprodukte anfallen und sind verhältnismäßig kostengünstig. Allerdings bringt ihre Verwendung auch Nachteile mit sich. So ist ein häufiges Problem die schwankende Qualität der Zusammensetzung. Außerdem scheiden Mikroorganismen zum Aufschluss dieser Bestandteile hydrolytische Enzyme aus, die auch synthetisierte Proteine zersetzen können. Lässt man Zellen unter nicht limitierenden, aber begrenzten Nährstoffbedingungen wachsen (z.B. Satzverfahren) ergibt sich die in Abbildung 3.1.1 dargestellte typische Wachstumskurve.

In einer ersten Adaptionsphase passen sich die Zellen den neuen Kultivierungsbedingungen an, wobei noch keine Zunahme der Biomasse zu erkennen ist. Es folgt eine Übergangsphase in der die Biomasse erst leicht und dann immer stärker zunimmt. An die Übergangsphase schließt sich das exponentielle Wachstum mit einer konstanten Wachstumsrate  $\mu_{\max}$  an. Diese ist wie folgt definiert:

$$\mu \equiv \frac{1}{c_X} \cdot \frac{dc_X}{dt} \quad \text{Gleichung 3.1}$$

mit  $\mu$  Wachstumsrate,  $\text{h}^{-1}$

$c_X$  Konzentration der Biotrockenmasse,  $\text{g L}^{-1}$

Die an das exponentielle Wachstum anschließende Übergangsphase wird durch die limitierende Konzentration ein oder mehrerer Substrate herbeigeführt. In dieser sogenannten Substratlimitierungsphase sinkt die Wachstumsrate, bis keine Zellzunahme mehr festzustellen ist. Die Kultur befindet sich dann in der stationären Phase, in der sich Wachstums- und Absterberate die Waage halten. In der anschließenden Absterbephase überwiegt letztendlich das Absterben und die Zellmasse nimmt ab.

Die Wachstumsrate  $\mu$  während der exponentiellen Wachstums- und der Substratlimitierungsphase kann mittels des formalkinetischen Ansatzes nach Monod (1945) als Funktion der Konzentration des limitierenden Substrats  $c_S$  beschrieben werden.

$$\mu \equiv \mu_{\max} \cdot \frac{c_S}{K_S + c_S} \quad \text{Gleichung 3.2}$$

- mit  $\mu_{\max}$  maximale Wachstumsrate unter nicht limitierenden Bedingungen,  $\text{h}^{-1}$   
 $c_S$  Konzentration des limitierenden Substrats,  $\text{g L}^{-1}$   
 $K_S$  Sättigungskonzentration des limitierenden Substrats,  $\text{g L}^{-1}$

Die Wachstumsrate  $\mu$  beträgt bei der Sättigungskonzentration  $K_S$  die Hälfte von  $\mu_{\max}$ . Analog zur Wachstumsrate können die spezifische Substrataufnahmerate  $q_S$ , die spezifische Sauerstoffaufnahmerate  $q_O$  und die spezifische Produktbildungsrate  $q_P$  definiert werden:

$$q_S \equiv \frac{1}{c_X} \cdot \frac{dc_S}{dt} \quad \text{Gleichung 3.3}$$

$$q_O \equiv \frac{1}{c_X} \cdot \frac{dc_O}{dt} \quad \text{Gleichung 3.4}$$

$$q_P \equiv \frac{1}{c_X} \cdot \frac{dc_P}{dt} \quad \text{Gleichung 3.5}$$

- mit  $c_S$  Konzentration des limitierenden Substrats,  $\text{g L}^{-1}$   
 $c_O$  Sauerstoffkonzentration,  $\text{g L}^{-1}$   
 $c_P$  Produktkonzentration,  $\text{g L}^{-1}$

Die spezifische Substrataufnahmerate setzt sich aus dem Verbrauch des limitierenden Substrats für das Zellwachstum  $q_{S,\mu}$ , die Produktbildung  $q_{S,P}$  und den Erhaltungstoffwechsel  $q_{S,m}$  zusammen.

$$q_S = q_{S,\mu} + q_{S,m} + q_{S,P} \quad \text{Gleichung 3.6}$$

Der Erhaltungstoffwechsel berücksichtigt alle zelleigenen Prozesse, die für die grundlegenden metabolischen Funktionen des Organismus benötigt werden. Die Substrataufnahmerate für den Erhaltungstoffwechsel eines bekannten Systems wird häufig als konstant angenommen und mit dem Erhaltungskoeffizient  $m_S$  bezeichnet.

Entsprechend der Formalkinetik können die differentiellen Ausbeutekoeffizienten für das Zellwachstum bezogen auf Substrat  $Y^*_{X/S}$  bzw. Sauerstoff  $Y^*_{X/O}$  und die differentielle Produktausbeute  $Y^*_{P/S}$  definiert werden:

$$Y^*_{X/S} \equiv \frac{\mu}{q_{S,\mu}} = \frac{dc_X/dt}{dc_S/dt} = \frac{dc_X}{dc_S} \quad \text{Gleichung 3.7}$$

$$Y^*_{X/O} \equiv \frac{\mu}{q_O} = \frac{dc_X/dt}{dc_O/dt} = \frac{dc_X}{dc_O} \quad \text{Gleichung 3.8}$$

$$Y^*_{P/S} \equiv \frac{q_P}{q_{S,P}} = \frac{dc_P/dt}{dc_S/dt} = \frac{dc_P}{dc_S} \quad \text{Gleichung 3.9}$$

Für viele Bakterien, die aerob mit Glucose als Kohlenstoffquelle wachsen, liegen typische Werte für den Ausbeutekoeffizienten bei 0,4 - 0,6 g g<sup>-1</sup>, während Werte für die Wachstumsausbeute für das Substrat Sauerstoff bei 0,9 - 1,4 g g<sup>-1</sup> liegen (Shuler und Kargi, 1992).

Zusammen mit den differentiellen Ausbeutekoeffizienten und dem Erhaltungskoeffizient  $m_S$  ergibt sich aus Gleichung 3.6 für die Substrataufnahmerate:

$$q_S = \frac{\mu}{Y^*_{X/S}} + m_S + \frac{q_P}{Y^*_{P/S}} \quad \text{Gleichung 3.10}$$

Wird nur der Erhaltungsstoffwechsel berücksichtigt, erweitern sich die Gleichungen für die Wachstumsrate und Substrataufnahmerate zu:

$$\mu \equiv \mu_{\max} \cdot \frac{c_S}{K_S + c_S} - m_S \cdot Y^*_{X/S} \quad \text{Gleichung 3.11}$$

$$q_S = \frac{\mu}{Y^*_{X/S}} + m_S \quad \text{Gleichung 3.12}$$

Für die differentiellen Ausbeutekoeffizienten ergeben sich häufig große Ungenauigkeiten bei der experimentellen Bestimmung, da die Quantifizierung von geringen Konzentrationsunterschieden stark fehlerbehaftet sein kann. Deshalb werden

zumeist die integralen Ausbeuten zur Charakterisierung von mikrobiellen Produktionsprozessen verwendet. Diese werden auf Basis der vom Start des Prozesses ( $t_0$ ) bis zu einem bestimmten Zeitpunkt  $t$  entstandenen Menge von Biomasse oder Produkt berechnet. Die erzeugte Biomasse bzw. das Produkt wird durch die im selben Zeitraum verbrauchte Substratmenge dividiert:

$$Y_{X/S} = - \frac{\Delta c_X \Big|_{t_0}^t}{\Delta c_S \Big|_{t_0}^t} \quad \text{Gleichung 3.13}$$

$$Y_{P/S} = - \frac{\Delta c_P \Big|_{t_0}^t}{\Delta c_S \Big|_{t_0}^t} \quad \text{Gleichung 3.14}$$

### 3.1.2 Sauerstofftransfer in begasten Bioreaktoren

Bei aeroben Prozessen ist der Gaseintrag in die Flüssigphase eine der wichtigsten verfahrenstechnischen Operationen, da eine ausreichende Versorgung der Organismen mit Sauerstoff und das Entfernen von Kohlendioxid aus der Flüssigphase eine hohe Priorität besitzen.

Unter Gleichgewichtsbedingungen gilt an der Gas-Flüssigkeits-Phasengrenzfläche das Henrysche Gesetz:

$$c_L^* = K_{H,O}(T) \cdot p_O^* \quad \text{Gleichung 3.15}$$

mit  $c_L^*$  als Grenzflächenkonzentrationen der Komponente in der Flüssigkeit und  $p_O^*$  als Sauerstoffpartialdruck an der Phasengrenze sowie  $K_{H,O}(T)$  als Henrysche Konstante für Sauerstoff. Die Henrysche Konstante  $K_H$  ist stark von der Temperatur und den Medienbestandteilen abhängig. Sauerstoff besitzt nur eine geringe Löslichkeit in wässrigen Lösungen, die sich mit der Konzentration von gelösten Salzen und anderen Medienbestandteilen sowie der Temperatur ändert. Während für Wasser bei 25 °C, Umgebungsdruck und Begasung mit Luft eine Löslichkeit von 7 mg L<sup>-1</sup> festgestellt werden kann (Shuler und Kargi, 1992) liegt die Löslichkeit in typischen Kultivierungsmedien zwischen 6-8 mg L<sup>-1</sup> (Schumpe et al. 1982, Schumpe 1993). Dieser geringen

Löslichkeit steht der hohe Sauerstoffverbrauch der Mikroorganismen gegenüber. Es muss folglich ein ständiger und mengenmäßig großer Transfer von Sauerstoff aus der Gas- in die Flüssigphase gesichert werden.

Den während der Kultivierung von allen Organismen im Reaktor aufgenommenen Sauerstoff pro Zeiteinheit bezeichnet man mit OUR (Oxygen Uptake Rate, Sauerstoffaufnahme rate). Um den Bedarf der Kultur an Sauerstoff zu erfüllen, muss ein ebenso großer Stofftransfer pro Zeiteinheit in das Kulturmedium vorliegen. Diesen Wert nennt man OTR (Oxygen Transfer Rate, Sauerstofftransfer rate).

Der Stofftransportwiderstand für Sauerstoff liegt in der Regel fast ausschließlich in der Flüssigkeitsphase (Storhas, 1994):

$$OTR = k_L \cdot a \cdot (c_L^* - c_L)$$

Gleichung 3.16

- mit  $k_L$  Stoffübergangskoeffizient für Sauerstoff,  $\text{ms}^{-1}$   
 $a$  volumenbezogene Stoffaustauschfläche,  $\text{m}^{-1}$   
 $c_L^*$  Sättigungskonzentration von Sauerstoff im Medium an der Phasengrenze,  $\text{g L}^{-1}$   
 $c_L$  Sauerstoffkonzentration im Medium,  $\text{g L}^{-1}$

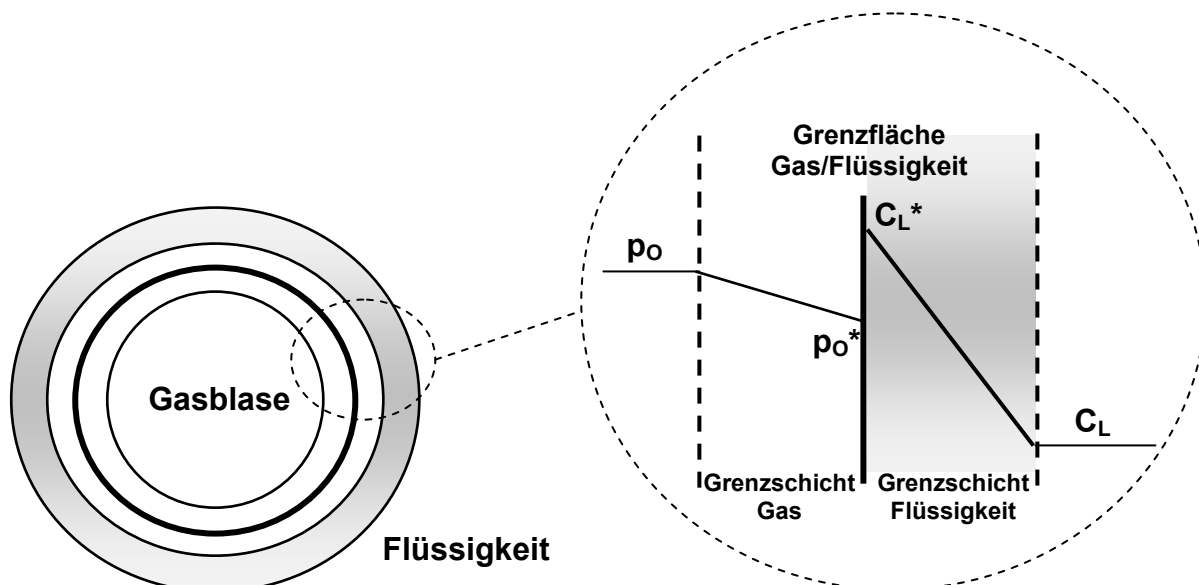


Abbildung 3.1.2: Verlauf der Sauerstoffkonzentration an der Phasengrenzfläche nach dem Zweifilmmodell

Durch die Vergrößerung der volumenbezogenen Stoffaustauschfläche  $a$  und des Stoffübergangskoeffizienten  $k_L$  kann der Sauerstoffeintrag ins Medium erhöht werden. Ziel einer direkten Begasung des Kulturmediums und des Einsatzes von Rührwerkzeugen im Rührkesselreaktor ist in der Regel die Intensivierung des Stofftransports zwischen dispergierter Gasphase und kontinuierlicher Flüssigphase.

Gleichung 3.16 liegt die allgemein verwendete Zweifilmtheorie zugrunde. Es wird angenommen, dass auf jeder Seite der Grenzfläche ein laminarer Film existiert, durch den der Stofftransport per Diffusion erfolgt. An der Phasengrenze soll die übergehende Komponente im Gleichgewicht mit der jeweiligen Phase stehen. Hier bleibt demnach die den Gleichgewichtskonzentrationen entsprechende Konzentrationsdifferenz bestehen. Die Phasen selbst gelten als ideal durchmischt. Die treibende Kraft ist die Konzentrationsdifferenz zwischen dem Kern der Flüssigphase und dem Kern der Gasphase. Unter der Annahme, dass der gesamte Stofftransportwiderstand auf der Seite des Flüssigkeitsfilms liegt, kann zur Vereinfachung als treibende Kraft das Konzentrationsgefälle zwischen dem Kern der Flüssigphase und der Konzentration des Flüssigkeitsfilms an der Phasengrenze  $(c_L^* - c_L)$  angenommen werden. Ein verbesserter Sauerstoffeintrag kann demnach ebenso über eine Erhöhung der Sättigungskonzentration  $c_L^*$  erreicht werden. Nach dem Henryschen Gesetz für das Gleichgewicht an der Gas-Flüssigkeits-Grenze (Gleichung 3.15) kann dies durch eine Erhöhung der Sauerstoffkonzentration im Zuluftstrom geschehen oder durch das Anheben des Gesamtdrucks des betrachteten Systems. Nach dem Daltonschen Gesetz (Gleichung 3.17) hängt der Partialdruck  $p_O$  von dem molaren Anteil  $\gamma_O$  des Sauerstoffs im Gas und dem Gesamtdruck  $p$  ab:

$$p_O = \gamma_O \cdot p$$

**Gleichung 3.17**

Beide Methoden führen zu einem höheren Sauerstoffpartialdruck  $p_{O^*}$  an der Phasengrenze und verbessertem Sauerstofftransport in die Flüssigkeitsphase.

Der Sauerstoffeintrag ist in der Mehrzahl der Fälle die limitierende Größe eines aeroben Prozesses. Bei der Auslegung eines Bioreaktors oder zur Maßstabsübertragung muss er deshalb möglichst exakt bestimmt werden können.

Die Bestimmung der Sauerstoffaufnahme rate OUR einer Kultur kann über die Bilanzierung des Sauerstoffs im Prozessgas erfolgen:

$$OUR = \frac{\dot{V}_{g,ein} \cdot \gamma_{O,ein} - \dot{V}_{g,aus} \cdot \gamma_{O,aus}}{V_R \cdot V_{mol}} \quad \text{Gleichung 3.18}$$

dabei sind  $\gamma_{O,ein}$  und  $\gamma_{O,aus}$  die Stoffmengenanteile des Sauerstoffs im Zu- und Abluftstrom ( $\dot{V}_{g,ein}$  und  $\dot{V}_{g,aus}$ ) und  $V_R$  das Reaktionsvolumen mit dem molaren Volumen  $V_{mol}$  des idealen Gases ( $=22,414 \text{ L mol}^{-1}$ ).

Ein Endprodukt vieler aerober Bioprozesse ist Kohlendioxid ( $\text{CO}_2$ ). Ähnlich der Sauerstoffaufnahme rate der Organismen kann eine Kohlendioxidbildungsrate (carbon dioxide evolution rate, CER) berechnet werden.

$$CER = \frac{\dot{V}_{g,aus} \cdot \gamma_{CO_2,aus} - \dot{V}_{g,ein} \cdot \gamma_{CO_2,ein}}{V_R \cdot V_{mol}} \quad \text{Gleichung 3.19}$$

Im Allgemeinen werden nur die Gaskonzentrationen im Abluftstrom gemessen. Der Sauerstoffanteil im Zuluftstrom bei Begasung mit Luft wird zu 20.95% angenommen, während der Kohlendioxidanteil zu Null gesetzt wird. Da der Zu- und Abluftstrom in den meisten Fällen als gleich groß angenommen werden kann, vereinfachen sich Gleichung 3.19 und Gleichung 3.20 zu:

$$OUR = \frac{\dot{V}_g}{V_R \cdot V_{mol}} \cdot (\gamma_{O,ein} - \gamma_{O,aus}) \quad \text{Gleichung 3.20}$$

$$CER = \frac{\dot{V}_g}{V_R \cdot V_{mol}} \cdot \gamma_{CO_2,aus} \quad \text{Gleichung 3.21}$$

Das Verhältnis zwischen der molaren Sauerstoffaufnahme rate und der molaren Kohlendioxidbildungsrate wird Respirationskoeffizient RQ genannt.

$$RQ \equiv \frac{CER}{OUR} = \frac{\gamma_{CO_2,aus}}{\gamma_{O,ein} - \gamma_{O,aus}} \quad \text{Gleichung 3.22}$$



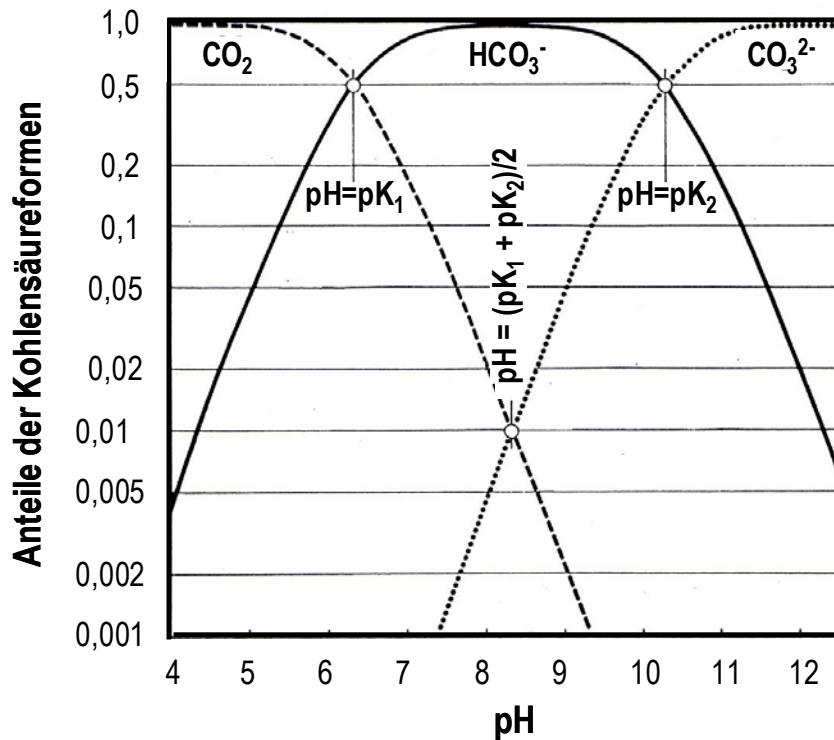


Abbildung 3.1.3: Kohlensäureformen als Funktion des pH (25°C). Der  $\text{pK}_1$  liegt bei pH 6,4 während  $\text{pK}_2$  bei pH 10,3 liegt.

Das entstandene Kohlendioxid muss aus der Kulturlösung entfernt werden. Es kann je nach pH in den verschiedenen Formen  $\text{CO}_2$ ,  $\text{HCO}_3^-$  und  $\text{CO}_3^{2-}$  in der Flüssigphase vorliegen (Abbildung 3.1.3). Deshalb ist je nach Situation der die  $\text{CO}_2$ -Entfernung bestimmende Schritt von physikalischer oder chemischer Natur. In den meisten Fällen erfolgt eine Entfernung durch entsprechende Begasung. Außer für das Wachstum benötigen Mikroorganismen auch für die Bildung vieler Produkte eine erhöhte Menge an Sauerstoff, was zu einer Sauerstoffverknappung im Medium führen kann. Oft hängt die Produktbildung auch von einer bestimmten Konzentration des gelösten Sauerstoffs ab (Moes et al. 1984). Diese wird kritische Sauerstoffkonzentration genannt und liegt für Bakterien zwischen 1 – 5 % der Sättigungskonzentration von Sauerstoff in mit Luft begasten Medien.

### 3.1.3 Idealer Rührkesselreaktor

Im idealen Rührkesselreaktor wird durch intensives Rühren eine vollständige Durchmischung des Kulturmediums erreicht. Örtlich ergeben sich keine Unterschiede in den Zustandgrößen (Stoffkonzentrationen, Temperatur, pH), der Reaktor wird als räumlich gradientenfrei angenommen. Die Konzentrationen der an der Reaktion beteiligten Stoff-

fe ändern sich nur zeitlich, abhängig von der Betriebsweise, dem Verbrauch von Substraten und der Bildung von Produkten.

Unter den genannten idealen Bedingungen kann die Massenbilanz für Substrat-, Biomasse- und Produktkonzentration nach Gleichung 3.24 berechnet werden:

$$\frac{dc_i}{dt} = \frac{\dot{V}_{ein}}{V_R} \cdot c_{i,ein} - \frac{\dot{V}_{aus}}{V_R} \cdot c_i + c_x \cdot r_i \quad \text{Gleichung 3.23}$$

- mit
- $\dot{V}_{ein}$     Volumenstrom in den Reaktor, L h<sup>-1</sup>
  - $\dot{V}_{aus}$     Volumenstrom aus dem Reaktor, L h<sup>-1</sup>
  - $c_{i,ein}$     Konzentration der Komponente i beim Einfließen in den Reaktor, g L<sup>-1</sup>
  - $c_i$         Konzentration der Komponente i im Reaktor, g L<sup>-1</sup>
  - $c_x$         Biomassekonzentration g L<sup>-1</sup>
  - $r_i$         Reaktionsgeschwindigkeit, h<sup>-1</sup>
  - $V_R$         Reaktionsvolumen

### 3.1.4 Kultivierung im Satzverfahren

Im Satzverfahren wird das Kulturmedium mit einer Mindestmenge lebender Zellen (Inokulum) beimpft. Das Satzmedium enthält alle notwendigen Nährstoffe und nach dem Inokulieren wird kein Medium mehr zu- oder abgeführt.

Der Betrieb eines Reaktors im Satzverfahren wird durch eine definierte Kultivierungszeit gekennzeichnet, während der sich die Stoffkonzentrationen und die Konzentration der Biomasse stark ändern und das Reaktorvolumen konstant bleibt. Der Betrieb ist instationär.

Mittels guter Durchmischung mit einem Rührer wird eine homogene Verteilung von Stoffen und Wärme herbeigeführt. Aufgrund der sehr geringen Löslichkeit von Sauerstoff in wässrigen Lösungen muss während des gesamten Prozesses kontinuierlich Sauerstoff zugeführt werden. Dies geschieht durch die Begasung des Reaktors mit Luft, wodurch gleichzeitig die Abluft kontinuierlich abgeführt wird.

Um den pH zu regeln, kann dem System Säure und/oder Lauge zugeführt werden. Bei Schaumbildung wird Antischaummittel zugegeben. Das Verfahren wird steril betrieben.

Diskontinuierliche Reaktoren werden eingesetzt, wenn ein Produkt nur in geringen Mengen hergestellt wird, derselbe Reaktor für verschiedene Produktionsprozesse verwendet werden soll sowie bei erhöhter Infektionsgefahr und Gefahr der Mutation der Mikroorganismen. Wenn das erzeugte Produkt das Wachstum oder die Produktbildung des Organismus inhibiert, ist das Satzverfahren nicht geeignet.

Für das Satzverfahren gelten die in Kapitel 3.1.1 dargestellten Gleichungen. Unter Berücksichtigung des konstanten Reaktionsvolumens, kann für die exponentielle Wachstumsphase der Verlauf der Biomassekonzentration über die Zeit angegeben werden.

Es gilt  $\mu = \mu_{\max} = \text{const.}$ :

$$c_x(t) = c_{X,0} \cdot e^{\mu_{\max} \cdot t} \quad \text{Gleichung 3.24}$$

mit  $c_{X,0}$  Konzentration der Biotrockenmasse zu Beginn der exponentiellen Phase,  $\text{g L}^{-1}$

Der Verlauf der Substratkonzentration ergibt sich zu:

$$c_S(t) = c_{S,0} - \frac{c_{X,0}}{Y_{X/S}^*} \cdot (e^{\mu_{\max} \cdot t} - 1) \quad \text{Gleichung 3.25}$$

mit  $c_{S,0}$  Substratkonzentration zu Beginn der exponentiellen Phase,  $\text{g L}^{-1}$

Die auf das Substrat bezogenen Gleichungen der Aufnahmerate (3.6) sowie der Formalkinetik (3.2) und der Ertragskoeffizienten (3.3, 3.5) aus Kapitel 3.1.1 gelten gleichfalls für das Substrat Sauerstoff.

Da Sauerstoff aber kontinuierlich zugeführt werden muss, gilt bei konstantem Reaktionsvolumen und idealer Rückvermischung von Flüssig- und Gasphase im Reaktor:

$$\frac{dc_{O_2}}{dt} = OTR - OUR = k_L a \cdot (c_{O_2}^* - c_{O_2}) - \frac{\mu}{Y_{X/O}^*} \cdot c_X \quad \text{Gleichung 3.26}$$

mit OTR Sauerstoff-Transferrate (oxygen transfer rate),  $\text{g L}^{-1}\text{h}^{-1}$

OUR Sauerstoff-Aufnahmerate (oxygen uptake rate),  $\text{g L}^{-1}\text{h}^{-1}$

$k_L a$  volumetrischer Stoffübergangskoeffizient für Sauerstoff,  $\text{s}^{-1}$

- $c_{O_2}^*$  Sättigungskonzentration von Sauerstoff im Medium bei Sauerstoffpartialdruck der Gasphase gleich dem des Abgases,  $\text{gL}^{-1}$
- $c_{O_2}$  Sauerstoffkonzentration im Medium,  $\text{gL}^{-1}$
- $Y_{X/O}^*$  Ertragskoeffizient Biotrockenmasse aus Sauerstoff  $\text{g}_{\text{BTMG}}^{-1}$

Die Sauerstoffaufnahme rate kann nach Gleichung 3.27 aus den Messwerten einer Abgasanalytik berechnet werden:

$$OUR = (\dot{V}_{\text{Luft, ein}} \cdot x_{O_2, \text{ein}} - \dot{V}_{\text{Luft, aus}} \cdot x_{O_2, \text{aus}}) \cdot V_R^{-1} \cdot V_{\text{mol}}^{-1} \quad \text{Gleichung 3.27}$$

- mit  $\dot{V}_{\text{Luft, ein}}$  Gasvolumenstrom in den Reaktor (Zuluft),  $\text{Lh}^{-1}$
- $\dot{V}_{\text{Luft, aus}}$  Gasvolumenstrom aus dem Reaktor (Abluft),  $\text{Lh}^{-1}$
- $x_{O_2, \text{ein}}$  Sauerstoffanteil in der Zuluft, %
- $x_{O_2, \text{aus}}$  Sauerstoffanteil in der Abluft, %
- $V_R$  Reaktionsvolumen,  $\text{L}^{-3}$
- $V_{\text{mol}}$  Molvolumen idealer Gase ( $22,414 \text{ L mol}^{-1}$ )

### 3.1.5 Kultivierung im Zulaufverfahren

Das Zulaufverfahren gehört zu den semikontinuierlichen Betriebsweisen eines Reaktors. Zunächst wird der Reaktor im Satzbetrieb angefahren, wobei das Reaktorvolumen nur zu einem geringen Teil genutzt wird. Nachdem das wachstumslimitierende Substrat verbraucht wurde, wird es in einer Zulauflösung konzentriert dem Reaktor nach einem vorgegebenen Profil weiter zugeführt. Der Prozess wird bis zu einem gewissen Nennvolumen weiterbetrieben und dann beendet. Auch im Zulaufverfahren ist die Betriebsweise instationär.

Die Massenbilanzen für Substrataufnahme, Zellwachstum und Produktbildung ergeben sich zu:

$$\frac{dc_S}{dt} = -\frac{\dot{V}_{ein}}{V_R} \cdot (c_{S,ein} - c_S) - c_x \cdot q_S \quad \text{Gleichung 3.28}$$

$$\frac{dc_X}{dt} = -\frac{\dot{V}_{ein}}{V_R} \cdot c_X + c_x \cdot \mu \quad \text{Gleichung 3.29}$$

$$\frac{dc_P}{dt} = -\frac{\dot{V}_{ein}}{V_R} \cdot c_P + c_x \cdot q_P \quad \text{Gleichung 3.30}$$

Gleichung 3.30 vereinfacht sich zu Gleichung 3.32 wenn die Verdünnung der Zellkonzentration durch den Zulauf klein genug ist, um vernachlässigt zu werden.

$$\frac{dc_x}{dt} = \mu \cdot c_X \quad \text{Gleichung 3.31}$$

Die Integration dieser Gleichung unter der Bedingung  $\mu = \text{konst.}$  führt zu Gleichung 3.33 (ohne Berücksichtigung des Erhaltungsstoffwechsels):

$$c_X = c_{X0} \cdot e^{\mu \cdot t} \quad \text{Gleichung 3.32}$$

mit  $c_{X0}$  als Konzentration der Zellmasse zu Beginn des exponentiellen Wachstums.

Wird eine konstante Substratkonzentration  $c_S$  angenommen, die gegenüber der Konzentration im Zulauf  $c_{S,in}$  vernachlässigbar gering ist, können die Gleichungen 3.29, 3.30 und 3.31 verwendet werden, um die exponentielle Zulauf rate für eine konstante Wachstumsrate zu berechnen. Wenn die Substrataufnahme für Produktbildung und Erhaltungsstoffwechsel vernachlässigt wird, gilt dann:

$$\dot{V}_{S,ein} = V_R \cdot \frac{\mu \cdot c_{X0}}{Y_{X/S}^* \cdot c_{S0}} \cdot e^{\mu \cdot (t-t_0)} \quad \text{Gleichung 3.33}$$

Eine konstante Wachstumsrate kann auf diese Weise aber nur eingestellt werden, wenn kein anderes Substrat wachstumslimitierend wirkt und kein Produkt das Wachstum inhibiert. In aeroben Zulaufkulturen wird oft die Konzentration des gelösten

Sauerstoffs zu einem limitierenden Faktor. Deshalb werden lineare oder konstante Zulaufprofile bevorzugt. In diesen Fällen nimmt das Wachstum kontinuierlich mit fortschreitender Prozesszeit ab.

Ein entscheidender Vorteil der Zulauf-Betriebsweise ist die Möglichkeit die Umweltbedingungen der Mikroorganismen entsprechend der Wachstumsphase oder Produktionsphase und dem Alter der Kultur optimal anpassen zu können.

Halbkontinuierliche Betriebsweisen werden häufig eingesetzt, wenn der kontinuierliche Betrieb wegen hoher Infektions- oder Mutationsgefahr nicht sinnvoll ist, im Satzbetrieb aber nicht die entsprechende Produktivität erreicht wird. Ein weiterer Grund für die Anwendung eines Zulaufverfahrens ist die Inhibierung des Wachstums oder der Produktbildung durch ein oder mehrere Substrate. Mittels des Zulaufverfahrens können die betreffenden Substrate genau dosiert und ihre Konzentrationen niedrig gehalten werden.

### **3.2 Mess- und Regelungstechnik für den Bioreaktor**

Neben der gentechnischen Veränderung von Mikroorganismen birgt auch die Prozessführung ein großes Optimierungspotenzial. Um die volle biologische Leistungsstärke der Zellen zu nutzen, müssen zumindest im Hinblick auf die wichtigsten Schlüsselparameter optimale Produktionsbedingungen im Reaktor geschaffen werden. Für die verschiedenen Betriebsweisen von Bioreaktoren sind deshalb kontrollierte technische Bedingungen erforderlich. Um diese Bedingungen einzustellen und während des gesamten Prozesses zu kontrollieren, werden unterschiedliche Zustandgrößen im Bioreaktor gemessen und geregelt.

Im Allgemeinen gehören zu den Zustandsgrößen die Temperatur im Reaktionsraum, der Leistungseintrag in den Reaktor (bei gerührten Reaktoren), die Begasungsrate und der  $p_{O_2}$  (für aerobe Organismen), pH, und in nicht wenigen Fällen auch die Sauerstoff- und Kohlendioxidkonzentration des Abgasstroms zur Ermittlung des Respirationskoeffizienten, der  $CO_2$ -Produktionsrate und der  $O_2$ -Aufnahmerate).

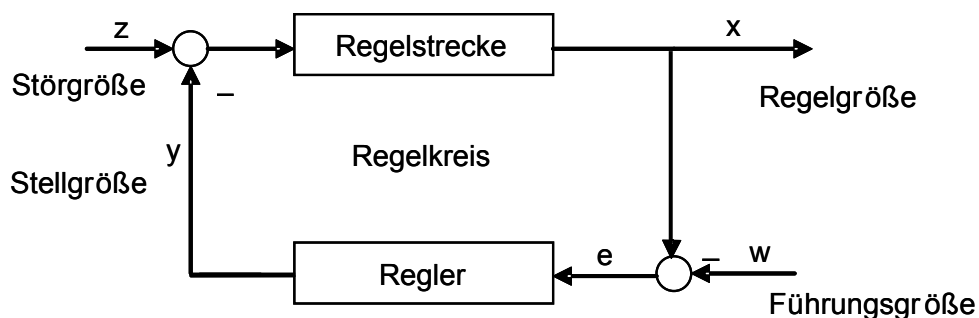
#### **3.2.1 Regelungstechnik in biologischen Systemen**

Ziel einer Regelung ist es, bestimmte Regelgrößen technischer Prozesse an vorgegebene Führungsgrößen anzugleichen. Dabei sollen die zu regelnden Größen (Regel-

größe  $x(t)$ ) von Störgrößen  $z(t)$ , die auf den Prozess einwirken können, möglichst wenig beeinflusst werden und Änderungen der Führungsgröße  $w(t)$  möglichst gut folgen (Abbildung 3.2.1). Um dies zu erreichen, werden die Regelgrößen gemessen und die Messdaten mit der Führungsgröße verglichen. Aus der sich ergebenden Abweichung  $e(t)$  zwischen der Regel- und der Führungsgröße werden Interventionen für den Prozess abgeleitet, welche die entstandene Differenz mindern sollen (Regler). Eine solche Rückführung von Ausgangsgrößen (Regelgröße) auf Eingangsgrößen (Stellgröße und Störgröße) erzeugen geschlossene Wirkungsabläufe, die allgemein als Regelkreise bezeichnet werden (genaue Definition in DIN 19226).

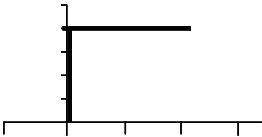
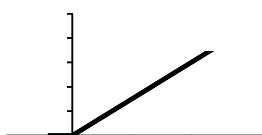
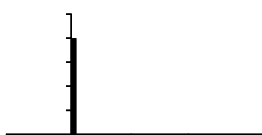
Obwohl die meisten technisch wichtigen Zusammenhänge nicht linear sind, wird in der Regelungstechnik zur modellhaften Beschreibung von Regelkreisen eine Linearisierung angestrebt. Lineare Zusammenhänge lassen sich leichter behandeln als nichtlineare und es existieren eine Vielzahl von Methoden zur Analyse und zum Reglerentwurf für lineare Regelkreise.

Besonders für lineare, zeitinvariante (auf eine Änderung der Stellgröße folgt nach einer festen Zeitspanne die Reaktion der Regelgröße) Systeme sind in der Literatur die Regelkreisglieder vielfach beschrieben (Paetzold 1995, Rake 1998). Ein solches häufig beschriebenes Übertragungsglied ist das PID-Glied, das hauptsächlich für Regler verwendet wird und in der Praxis zahlreich Anwendung findet (Rake 1998).



**Abbildung 3.2.1: Darstellung eines Regelkreises (Abbildung nach Rake 1998). Aus der gemessenen Regelgröße  $x(t)$  und der Führungsgröße  $w(t)$  wird die Regelabweichung  $e(t)$  berechnet. Der Regler bestimmt aufgrund dieser Abweichung die Stellgröße  $y(t)$ . Die Störgröße  $z(t)$  stellt jegliche Größe dar, die auf die Regelgröße außer der Stellgröße einwirkt. Die Regelstrecke stellt ein Gerät bzw. Anlage dar, dessen Ausgangsgröße geregelt wird, indem eine oder mehrere Eingangsgrößen verändert werden.**

**Tabelle 3.2.1: Darstellung der drei elementaren Übertragungsglieder.**

Übertragungsglied	Differentialgleichung und Übergangfunktion	Arbeitsweise	Vor- und Nachteile
P-Glied	$y(t) = K_p \cdot u(t)$ 	ausschließlich proportionaler Anteil der Verstärkung $K_p$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Schnelle Stellgrößen-Beeinflussung</li> <li>• bleibende Regelabweichung</li> <li>• große Schwingungsneigung bei hohem <math>K_p</math></li> </ul>
I-Glied	$y(t) = \frac{1}{T_I} \cdot \int_0^t u(\tau) d\tau + y_0$ 	zeitliche Integration der Regelabweichung $e$ Gewichtung durch die Nachstellzeit $T_I$ .	<ul style="list-style-type: none"> <li>• genauer, aber langsamer Regler</li> <li>• hinterlässt keine bleibende Regelabweichung</li> <li>• Wind-up-Effekt</li> </ul>
D-Glied	$y(t) = T_D \cdot \frac{du}{dt}$ 	Ausgangswert ist proportional zur Änderung der Regelabweichung	<ul style="list-style-type: none"> <li>• reagiert nicht auf die Regelabweichung, sondern nur auf deren Änderungsgeschwindigkeit</li> <li>• kann nur differenzieren, nicht regeln</li> <li>• vorzugsweise als Komponente in PD- und PID-Reglern eingesetzt</li> </ul>

Der PID-Regler setzt sich aus den drei elementaren Übertragungsgliedern Proportional- (P-), Integral- (I-) und Differential- (D-) Glied zusammen (Tabelle 3.2.1). Zur Regelung von biotechnologischen Prozessen werden in der Praxis üblicherweise auch weitere Kombinationen dieser Regelglieder wie PI- und PD-Regler verwendet (Lim und Lee 1991). Viele Regelparameter biotechnologischer Satz- und Zulaufverfahren sind zeitvariant und nicht linear. Die Anwendung von linearen Reglern ist deshalb schwierig und in vielen Fällen kritisch zu beurteilen. Es wurden unterschiedlichste Strategien entwickelt und angewendet, um dem Mangel an exakten mathematischen Modellen des Regelsystems und der nichtlinearen und zeitvarianten Natur der Prozessgrößen zu begegnen (Shimizu 1993). Von besonderem Interesse sind hierbei:

- der Feinabgleich von Regelparametern während des Prozesses - „gain scheduling“ (Cardello und San 1988)
- Feedbackkompensation (Takamatsu et al 1985)
- adaptive Regelung (Dochain and Bastin 1985)
- iterativ lernende Regelungen, welche die Daten der vorangehenden Regelschritte/Regelungen berücksichtigen (Shimizu et al. 1988)



Werden lineare Regler unter diesen Gesichtspunkten modifiziert, ist es möglich der zeitlichen Varianz und Nichtlinearität von biologischen Prozessen entgegen zu wirken. Einfach einzusetzende Werkzeuge sind hier:

- Toleranzbänder
- Stellgrößenbeschränkungen
- Rückkopplungen
- Einfließen von Daten aus vorherigen Regelschritten

Herkömmliche Regler wie PID- und PD-Glieder sind aufgrund der speziellen Anforderungen von biologischen Systemen und Prozessen meist nicht ohne langwierige und herausfordernde Einstellung der verwendeten Regelparameter einzusetzen (Shimizu1993). Besonders in Satz- und Zulaufkulturen sind die zu regelnden Größen stark zeitabhängig. Zum einen steigt mit der zunehmenden Biomassemenge der Sauerstoffbedarf, die Wärmeentwicklung und zum Teil auch die Produktion von schwachen Säuren oder Basen. Daneben besitzt das verwendete Medium eine bestimmte Pufferkapazität und in Zulaufprozessen verändert sich zudem das Reaktionsvolumen. Gerade die Regelung von wachstumsabhängigen Prozessgrößen wie der Gelöstsauerstoffkonzentration, Temperatur und pH, die zudem zu den wichtigsten Regelgrößen gehören, wird in Bioprozessen durch ihre inhärente zeitliche Varianz erschwert (Cardello und San 1988). Um zwischen systemdynamischen Veränderungen und Messrauschen ausreichend gut unterscheiden und regelnd in einen Prozess eingreifen zu können, muss der Zustand des Systems kontinuierlich erfasst werden. Die genaue und verlässliche Messung der wichtigsten Zustandgrößen des Systems ist hierfür unerlässlich.

### 3.2.2 Nicht invasive (optische) Messmethoden

In zahlreichen Applikationen der chemischen und biotechnologischen Industrie ist der direkte Medienkontakt bei der Erfassung von Messgrößen unerwünscht. Zum Teil sind korrosive Medienbestandteile und hohe Temperaturen ein Grund für die Verwendung von nicht invasiven Messmethoden. Zusätzlich sprechen konstruktive Einschränkungen gegen eine Verwendung von invasiven Sensoren. So muss ein medienberührender Sensor unter den meisten Einsatzbedingungen einen Behälter vollständig abdichten, dieselben Anforderungen an Material sowie Oberflächenbeschaffenheit erfüllen wie die Behälterinnenwand selbst und darf das Rührwerk nicht beeinträchtigen.

Hinzu kommen aufwendige Reparaturen im Servicefall, die ein Öffnen des Behälters und damit verbundene Nachteile unumgänglich machen.

Beispiele für die Umsetzung nicht invasiver Messmethoden in der Industrie sind die Qualitätssicherung in Getränke-Abfüllanlagen mittels Ultraschall (Zhao et al. 2004) und die Überwachung des Schmelzprozesses von Polymeren mittels spektroskopischer Verfahren (Barnes et al. 2007).

Wie im letztgenannten Beispiel gezeigt, werden für nicht invasive Messungen die vielfältigen Eigenschaften von optischen Sensoren genutzt.

Bei Absorptions- und den meisten Fluoreszenzmessungen wird die Leistung bzw. Intensität des Lichtes zur Messwerterfassung verwendet (Amplitude der elektromagnetischen Welle). Teilweise macht man sich bei der Erfassung nicht-optischer Messgrößen aber auch die Phase des elektromagnetischen Wellenfeldes zu Nutze. Diese gibt an, in welchem Bereich innerhalb einer Periode sich die Welle zu einem Referenzzeitpunkt und -ort befindet. Mittels dieser Methode lassen sich Messgrößen erfassen, welche direkt oder indirekt die Phase eines optischen Wellenfeldes beeinflussen. Vorteilhaft ist hier, dass im Gegensatz zur reinen Intensitätsmessung Veränderungen der anregenden Lichtquelle, des Photodetektors oder auch undefinierte optische Eigenschaften der Probe, wie Trübung, Brechungsindex usw., keine Auswirkung auf das Messsignal haben (Mayr et al. 2002).

Bei der Miniaturisierung von Reaktoren stellt sich häufig das Problem, dass herkömmliche Sonden nicht beliebig verkleinert werden können. In der Paralleltechnik kommt hinzu, dass auf engem Raum viele Reaktoren jeweils mit den entsprechenden Sensoren ausgerüstet werden müssen. Hier besteht ein großer Bedarf an neuen technischen Lösungen, um auf dem nur begrenzt zur Verfügung stehenden Raum, möglichst viele Messdaten zugänglich zu machen.

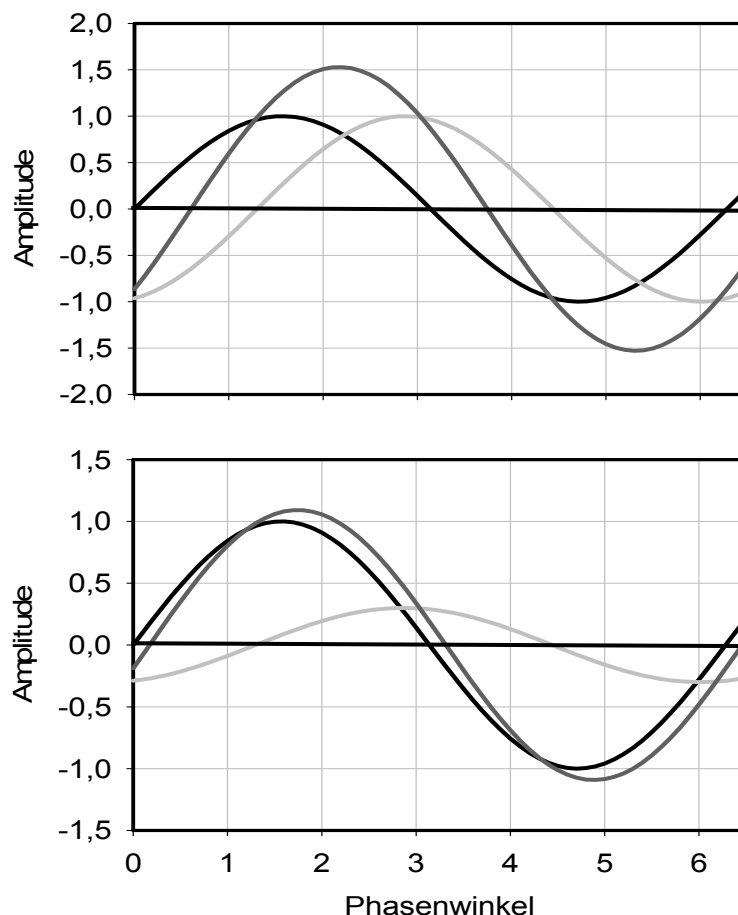
Messsysteme, welche entsprechend kleine Sensoren verwenden und zudem die Möglichkeit bieten diese vom übrigen Messgerät zu entkoppeln, sind in diesem Bereich besonders vorteilhaft. Optische Verfahren zeichnen sich durch sehr kleine Sensoren und die Möglichkeit aus, mittels optisch leitender Fasern Sensor und Messgerät zu entkoppeln. Sie bieten die ideale Lösung für die durch Miniaturisierung und Parallelisierung von den verwendeten Sensoren geforderten Eigenschaften.

Da die Abläufe in biologischen Systemen äußerst komplex und vielfältig sind, sollen während der Kultivierung möglichst viele Zustandsgrößen gemessen werden, um einen besseren Einblick in die ablaufenden Vorgänge zu erhalten. Mit der klassischen

Messtechnik, die vor allem auf elektrochemischen Prinzipien beruht, ist die Bestimmung dieser Zustandsgrößen für miniaturisierte und parallelisierte Systeme nur schwer umzusetzen. Neue Messtechniken optischer und nicht invasiver Natur bieten hierbei vielfältige Möglichkeiten.

### 3.2.3 Nicht-invasive Messung von pH und $pO_2$

Eine zur Messung von pH und  $pO_2$  geeignete, nicht invasive Methode beruht auf der Lumineszenzantwort eines  $pO_2$ - bzw. pH-sensitiven Leuchtstoffs. Diese ermöglicht es aus der Fluoreszenz eines Indikators und einer Referenz mit unterschiedlicher Abklingzeit eine Phasenverschiebung zu bestimmen, die ein Maß für den zu messenden Parameter darstellt (Klimant I. 1997 DE19829657). Die Messung basiert auf



**Abbildung 3.2.2:** „Dual lifetime referencing“: Das Referenzsignal (schwarz) ist invariant und wird vom parameterabhängigen Indikatorsignal überlagert (hellgrau). Zusammen bilden sie das Messsignal (dunkelgrau). In Abhängigkeit von der Amplitude des Indikatorsignals weist die Überlagerung von Indikator- und Referenzsignal eine Phasenverschiebung auf. Auf Basis dieser Phasenverschiebung wird der Messwert bestimmt.

dem sogenannten „Dual Lifetime Referencing“ (DLR), bei dem zwei Luminophore in die Matrix eines Sensors eingebettet wurden (Huber et al. 2001; Mayr et al. 2002). Der für den Parameter sensitive Luminophor besitzt eine kurze Abklingzeit  $T_{ind}$ , während ein nicht sensitiver, der Referenz-Luminophore, eine lange Abklingzeit  $T_{ref}$  besitzt. Die Luminophore weisen sich überschneidende Anregungs- und Emissionsspektren auf, so dass eine Anregungswellenlänge und ein Detektor für die überlagerte Fluoreszenzantwort ausreichen. Das Antwortsignal der Referenz wird als invariant und konstant betrachtet, während sich die Amplitude des sensitiven Luminophors mit dem zu messenden Parameter ändert. Das vom Detektor aufgenommene Antwortsignal weist durch die Überlagerung von Indikator- und Referenzsignal eine Phasenverschiebung  $\Phi_m$  auf, die allein von der Amplitude des  $pO_2$ - bzw. pH-sensitiven Leuchtstoffs abhängt. Mit einer entsprechend empfindlichen Elektronik kann die Verschiebung des Phasendurchgangs des Gesamtsignals verursacht durch die veränderliche Indikatoramplitude zeitlich aufgelöst und bestimmt werden. Die Phasenverschiebung wird über eine Kalibrierkurve mit dem pH bzw.  $pO_2$  korreliert. Die Funktionalität des beschriebenen Systems wurde bereits für die Kultivierung von *Escherischia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt (Kusterer et al. 2008).

### 3.2.4 Messung der Temperatur

Die Temperatur gilt gemeinhin als eine der wichtigsten und häufigsten gemessenen technisch-physikalischen Größen (Bernhard 2003). Auch in der Bioverfahrenstechnik kommt der Temperatur als Kontrollvariable eine wichtige Bedeutung zu, da das Wachstum von Mikroorganismen und ihre Produktbildung zumeist stark temperaturabhängig sind und während industrieller Prozesse das Einhalten eines bestimmten Optimums erwünscht ist. Im Allgemeinen werden für Bioreaktoren Messungen mit einer Präzision von  $\pm 0,5^\circ C$  in einem Messbereich von  $+20$  bis  $130^\circ C$  angestrebt (Schügerl 1991).

Um die empirische Temperatur  $\theta$  eines beliebigen Systems zu bestimmen, wird das thermische Gleichgewicht zwischen dem System und einem Thermometer hergestellt. Thermometer sind Messgeräte, die eine leicht und genau messbare Eigenschaft besitzen, die sich eindeutig mit der Temperatur ändert (Baehr 1992). Bei Bernhard 2003 findet man eine übersichtliche Darstellung technischer Temperaturmessverfahren. Diese Verfahren lassen sich grob in Messungen mit thermischem Kontakt (Kontakt-

thermometrie) und in Messungen der Temperaturstrahlung (Strahlungsthermometrie) einteilen.

Während bei der Kontaktthermometrie mittels eines Sensors immer ein Kontakt zum Messobjekt besteht, wird bei der Strahlungsthermometrie die Strahlung des Messobjekts berührungslos über einen infrarotempfindlichen Sensor gemessen.

Das thermische Gleichgewicht wird bei der Kontaktthermometrie durch Wärmeleitung hergestellt. Das Thermometer erhält auf diese Weise die Temperatur des zu messenden Gegenstandes oder der zu messenden Flüssigkeit.

Das einfache, robuste und kostengünstige Verfahren lässt sich in die folgenden Messmethoden einteilen, unterschieden bezüglich der temperaturabhängigen Eigenschaften der verwendeten Sensoren:

- Mechanische Methoden: thermische Ausdehnungskoeffizienten z.B. Volumenänderung von Flüssigkeiten und Gasen (Quecksilber- oder Bimetallthermometer)
- Elektrische Methoden: Temperaturabhängigkeit von elektrischen Widerständen oder auch Thermoelektrizität
- Wechsel charakteristischer Zustände: z.B. Schmelzpunkte, Erstarrungspunkte, Siedepunkte
- Änderung von charakteristischen Eigenschaften z.B. Änderungen von Transparenz, Reflexion, Farbe, der Strahlungsemission, des Elastizitätsmoduls.

Widerstandsthermometer beruhen auf der reproduzierbaren Änderung des elektrischen Widerstandes von Metallen, Halbleitern oder auch Elektrolyten. Bevorzugt kommen metallische Widerstände zum Einsatz, wie z.B. Platin und Nickel.

Die baulichen Ausführungen von Widerstandsthermometern sind äußerst vielfältig und lassen sich den spezifischen Gegebenheiten gut anpassen (Bernhard 2003). Darüber hinaus zeichnen sich dadurch aus, dass in einem Temperaturbereich von  $-220$  bis  $+850^{\circ}\text{C}$  sehr hohe Messgenauigkeiten bis  $0,001\text{K}$  erzielt werden können.

Die Abhängigkeit des Widerstandes von der Temperatur wird durch:

$$R(T) = R_0 \cdot (1 + \alpha T + \beta T^2 + \dots)$$

**Gleichung 3.34**

beschrieben.  $\alpha$  und  $\beta$  sind der lineare bzw. quadratische thermische Widerstandskoeffizient.  $R_0$  ist der Widerstand bei einer Bezugstemperatur, z.B. bei  $T_0 = 0^\circ\text{C}$ .

Zumeist ist es ausreichend in der Nähe der Bezugstemperatur von einer linearen Näherung auszugehen:

$$R(T) = R_0 \cdot (1 + \alpha' T)$$

**Gleichung 3.35**

$\alpha'$  ist hier der mittlere Temperaturbeiwert, der die mittlere Widerstandsänderung im Bereich von  $0^\circ\text{C}$  bis  $100^\circ\text{C}$  angibt. Werkstoffe mit einem hohen Temperaturbeiwert und großem spezifischen Widerstand eignen sich am besten für Widerstandsthermometer. Besonders die Metalle Platin und Nickel erfüllen die genannten Anforderungen. Sie zeichnen sich vor allem durch gut reproduzierbare Änderungen des Widerstands mit der Temperatur aus. Ein weiterer Vorteil dieser Metalle besteht darin, dass sich die Sensoren gut miniaturisieren lassen, da es durch den hohen spezifischen Widerstand möglich ist, den Widerstandsdraht auf kleinstem Raum aufzubringen.

In Tabelle 3.2.2 sind die wichtigsten Metalle und ihre Verwendungsbereiche sowie der mittlere Temperaturbeiwert aufgeführt.

**Tabelle 3.2.2: Temperaturbeiwerte einiger Metalle.**

Werkstoff	Temperaturbereich	$\alpha'$
Kupfer	$-50^\circ\text{C}$ bis $150^\circ\text{C}$	$4,27 \cdot 10^{-3} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$
Nickel	$-60^\circ\text{C}$ bis $150^\circ$	$6,17 \cdot 10^{-3} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$
Platin	$-220^\circ\text{C}$ bis $850^\circ\text{C}$	$3,85 \cdot 10^{-3} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$

In der Industrie hat sich Platin als Material für Widerstandsthermometer durchgesetzt. Chemische Beständigkeit, einfache Bearbeitung und gute Reproduzierbarkeit der elektrischen Eigenschaften gehören zu seinen herausragenden Merkmalen. Als industrieller Standard wurden PT100 und PT1000 Widerstandssensoren eingeführt. Da alle PT100-Sensoren einen Innenwiderstand von 100 Ohm bei  $0^\circ\text{C}$  und alle PT1000-Sensoren einen Innenwiderstand von 1000 Ohm bei  $0^\circ\text{C}$  aufweisen, sind sie beliebig austauschbar. Der Temperaturkoeffizient der Sensoren ist einheitlich  $3,850 \cdot 10^{-3} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$

(nach DIN EN 60751). PT100-Sensoren weisen im gesamten Messbereich Messfehler von deutlich unter einem Grad auf.

Neben Ungenauigkeiten, die im PT100-Sensor selbst begründet sind, kann es grundsätzlich zu den im Folgendem genannten Messfehlern kommen:

- **Eigenerwärmung:** Der Messstrom erzeugt eine Verlustleistung und damit Wärme am Sensor.
- **Wärmekapazität und Wärmeleitung:** Beim Einbau des Pt100 Messwiderstandes muss für optimalen Temperaturübergang gesorgt werden (z.B.: Wärmeleitpaste, geeignetes Isolationsmaterial). Wenn die Wärmekapazität des Sensors gegenüber der des Messobjekts nicht vernachlässigt werden darf, kann der Sensor dessen Temperatur auch verändern.
- **Isolationsfehler:** Die Messgenauigkeit kann durch Konvektion oder durch Wärmeableitung entlang des Sensors beeinträchtigt sein.
- **Parasitäre Thermospannung:** Beim Verbinden unterschiedlicher Metalle tritt eine Thermospannung auf. Solche Metallverbindungen entstehen z.B. beim Verlängern der Sensor-Anschlussdrähte mit Kupferdrähten.

Um Messfehler zu vermeiden, sollten diese Punkte beachtet und eine Systemkalibrierung durchgeführt werden.

Widerstandsthermometer können in sehr kleinen Baugrößen hergestellt werden und eignen sich damit besonders für die Miniaturisierung und Parallelisierung von Bioreaktoren. Sogenannte Dünnschichtsensoren bestehen aus einem Aluminiumoxid Plättchen auf das eine ca. 1mm dicke Platinschicht aufgedampft wird. Mittels eines Lasers wird die Platinschicht spiralförmig strukturiert. Zum Schutz der Platinschicht wird eine Schutzschicht (z.B. Glas) aufgebracht. Solche Sensoren sind klein, haben kurze Ansprechzeiten und sind durch Großserienfertigungen äußerst preisgünstig.

### 3.2.5 Regelung des pH

Zellen benötigen neben einer optimalen Temperatur auch einen optimalen pH für ihr Wachstum und die Produktbildung. Da in vielen Kulturen der pH während der Wach-

stums- und Produktionsphase starken Schwankungen unterliegt, muss Base bzw. Säure zugegeben werden, um den gewünschten, optimalen pH zu halten.

Die Regelung des pH in biologischen Systemen ist ein Beispiel für nichtlineares Regelverhalten. Da bei den meisten Kultivierungen gepufferte Medien eingesetzt werden, kommt es bereits aus diesem Grund zu einem nichtlinearen Verhalten.

Da in der Praxis trotzdem zumeist PID-Regler und in geringeren Anteilen PD- und PI-Regler verwendet werden, kommt der Einstellung der Regelparameter besondere Bedeutung für die Leistungsstärke des Regelsystems zu. Dabei ist zu beachten, welche Reglercharakteristik für Regelgröße und Prozess von Bedeutung ist.

Je nach Regelgröße verträgt das System z. B. ein Überschwingen der Stellgröße oder verzögerte Reglerantworten. Im Fall der Regelung von Temperatur und pH kann in den meisten Fällen auch ein kurzzeitiges Überschwingen zu starken Beeinflussungen des Prozesses führen. Die Regelung der Gelöstsauerstoffkonzentration ist diesbezüglich weitaus weniger empfindlich (Lim und Lee 1991).

Das Einstellen der Regelung wird zumeist empirisch durchgeführt, was es mühsam und zeitaufwendig werden lässt. Falls ein Prozessmodell zur Verfügung steht, können auch systematische Methoden zum Reglerentwurf verwendet werden.

Bei der pH-Regelung biotechnologischer Prozesse ist eine die Reglercharakteristik bestimmende Größe die Pufferwirkung des verwendeten Mediums. Zusammen mit Stoffwechselprodukten der Organismen, die schwache Säuren oder Basen darstellen können, führt dies zum zumeist nichtlinearen Verhalten der pH-Regelung.

Allgemein werden Lösungen, deren pH sich bei der Zugabe von Säure oder Base nur wenig verändert, als Pufferlösungen bezeichnet. Sie enthalten ein konjugiertes Säure-Base-Paar, auf dessen Gleichgewicht die Pufferwirkung basiert. Pufferlösungen werden hergestellt indem man eine schwache Säure HA mit ihrem Salz  $A^-$  mischt. In Gleichung 3.36 ist die Henderson-Hasselbach-Beziehung dargestellt mit  $a(HA)$  als eingesetzte Säure und  $a(A^-)$  als eingesetztem Salz:

$$pH = pK_a - \log \frac{a(A^-)}{a(HA)} \quad \text{Gleichung 3.36}$$

Liegen die Säure und die konjugierte Base in hoher Konzentration im Kulturmedium vor, können sie eine gewisse Menge zugesetzter  $H_3O^+$ - beziehungsweise  $OH^-$ - Ionen durch eine entsprechende chemische Reaktion abfangen, wobei die Säure  $OH^-$ -Ionen



neutralisiert und die Base  $H_3O^+$ -Ionen. Der pH der Lösung ändert sich aufgrund dieser Neutralisation nur geringfügig.

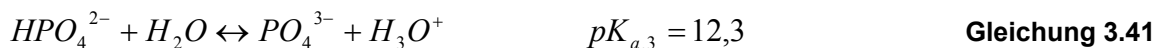
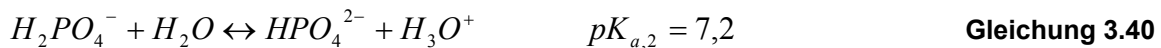
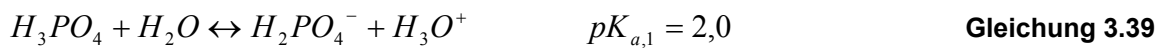


oder



Puffersysteme haben in der Nähe des  $pK_a$  die höchste Pufferintensität.

Phosphorsäure dissoziiert über drei Stufen und verfügt damit über drei unterschiedliche  $pK_a$  und auch Pufferbereiche:



Die gezeigten  $pK_a$  verdeutlichen, dass die Protonenabgabe nach jeder Stufe schwieriger wird. Die entstehenden Säuren nehmen in ihrer Stärke ab.

Die Pufferwirkung des konjugierten Säure-Base-Paares  $H_2PO_4^- / HPO_4^{2-}$  liegt im Bereich des Äquivalenzpunktes  $pK_{a,2} = 7,2$ . Nach  $pH = pK_a \pm 1$  liegt der Pufferbereich hier zwischen pH 6,2-8,2. Daher wird der Phosphatpuffer häufig verwendet, um neutrale pH-Bereiche einzustellen. Bewegt man sich in Bereichen unter einem pH von 7,2 überwiegt der Anteil an  $H_2PO_4^-$ -Ionen und die Zugabe von Base kann gut gepuffert werden. Oberhalb dieses pH liegen mehr  $HPO_4^{2-}$ -Ionen vor. Hier wird Säure gut neutralisiert. Rund um den  $pK_a$ -Wert ist der Anteil beider Ionen gleich hoch. Deshalb hängt die Pufferwirkung und Reaktion auf Base oder Säure vom pH des Prozesses ab und kann sich mit einer Verschiebung desselben erheblich ändern. Das entstehende nichtlineare Verhalten muss von herkömmlichen linearen Reglern kontrolliert werden. Um diese Problematik zu lösen, werden die bereits vorgestellten Standardregler modifiziert. Ist eine zeitnahe Intervention nicht notwendig, kann ein Toleranzband verwendet werden. Die Ansprechempfindlichkeit des Reglers wird hierdurch beeinflusst. Ist die Abweichung der Regelgröße von der Führungsgröße kleiner als diese festgelegte Abweichung (Toleranzbreite), wird sie für den Regler gleich Null gesetzt. Trotz Regelabweichung greift die Regeleinrichtung innerhalb des Toleranzbandes nicht ein. Das

Ansprechverhalten des Reglers kann auf diese Weise individuell beeinflusst werden. Des Weiteren besteht die Möglichkeit die Stellgröße quantitativ zu beschränken, damit sie einen bestimmten Wert nicht mehr unter- bzw. überschreiten kann. Diese Stellgrößenbeschränkung verhindert ein Überschwingen der Regelgröße. Diese Maßnahme eignet sich im Besonderen für PD-Regler. Soll sie für einen PID-Regler verwendet werden, empfiehlt sich der zusätzliche Einsatz einer „Anti-Windup“-Maßnahme, da der integrale Anteil des PID-Reglers zu einer Übersteuerung des Stellgliedes führen kann und durch eine Beschränkung der maximalen Zugabemenge dieser Effekt noch verstärkt wird. Das unnötige Anwachsen der Reglerausgangsgröße bezeichnet man als „Wind-up“-Effekt. Das Ziel von „Anti-wind“-up-Maßnahmen ist es, dieser unnötigen Integration auf unterschiedlichster Weise entgegenzuwirken. Ziel ist es ein ‚Weglaufen‘ des I-Anteils über bestimmte Grenzen zu vermeiden. So kann zum Beispiel der I-Anteil eingefroren werden, solange  $y_{\max}$  oder  $y_{\min}$  überschritten bzw. unterschritten wird („Anti-wind-up-hold“). Besser eignen sich dynamische Methoden wie z.B. der dynamischen Anti-wind-up-reset. Hier wird die Differenz der Stellgröße  $y(t)$  und der beschränkten Stellgröße  $y'(t)$  mit einem Faktor  $m$  gewichtet an den Regler zurückgeführt (Horn und Dourdoumas, 2004)

Mit den beiden genannten Modifikationen können sowohl der PI(D)- als auch der PD-Regler für die Regelung des pH in der Kultivierung von biologischen Systemen verwendet werden.

### 3.2.6 Regelung der Antischaumzugabe

Die Absorption und Desorption von Gasen in Flüssigkeiten wird im Regelfall von Schaumbildung begleitet (Viesturs et al. 1982). Hohe Schaumbildung birgt viele Nachteile für biotechnologische Prozesse. Oft reichern sich die Zellen aufgrund von Flotation im Schaum an. Zellwachstum und Produktbildung werden durch die Dezi-mierung der Zellkonzentration im Kulturmedium verringert. Technische Probleme bereitet die Schaumbildung, wenn dieser durch den Luftstrom aus dem Reaktor in die Abgasleitungen transportiert wird. Hier verstopfen die Abgasfilter und nicht selten werden die empfindlichen Abgasanalyseinstrumente in Mitleidenschaft gezogen. Kontaminationen eines Reaktors werden durch den aus dem Reaktionsraum austretenden Schaum wahrscheinlicher (Schügerl 1991). Deshalb gehört ein Schaumsensor ebenfalls zur Standardausrüstung eines Bioreaktors.

Schaum kann mittels Antischaummittel unterdrückt oder mit mechanischen Schaumzerstörern reduziert werden. Beide Methoden beeinflussen den Prozess und entsprechende Maßnahmen sollten wohl überlegt sein.

Da Antischaummittel durch ihre Anwesenheit im Kulturmedium Zellwachstum und Produktbildung negativ beeinflussen können, sollten sie sparsam und nur bei Bedarf verwendet werden. Hierfür werden in der Praxis geregelte Antischaumzugabesysteme eingesetzt. Schaumsensoren zeigen die Bildung von stabilem Schaum an und veranlassen die Zugabe des entsprechenden Antischaummittels. Verschiedene Regelungs- und Messsysteme sind hier im Einsatz, wovon der größte Teil von Leitfähigkeitssensoren und Ein-Ausregelungen gestellt wird (Viesturs et al. 1982).

### **3.3 Optimierung von Reaktionsbedingungen im Parallelansatz**

Das Ziel der Optimierung eines biotechnologischen Prozesses ist das Auffinden geeigneter Reaktionsbedingungen für ein bestimmtes biologisches System, um den Prozess ökonomischer oder technisch effizienter zu gestalten. Ökonomisch oder technologisch wichtige Prozessgrößen wie z.B. die Produktkonzentration, Ausbeute oder Selektivität sollen maximiert werden, während andere wie beispielsweise die Rohstoffkosten minimiert werden sollen.

Die Reaktionsbedingungen (Temperatur, pH-Wert, Medienzusammensetzung) haben einen großen Einfluss auf den Produktionsprozess. Durch eine Optimierung sollen die Extrema der entsprechenden Zielgrößen identifiziert und optimale Werte für die Prozessparameter festgelegt werden (Weuster-Botz 1999).

In anderen Disziplinen kann eine Optimierung über die Nutzung von detaillierten Kenntnissen des zu optimierenden Systems in Form von Modellen vereinfacht werden. Bei der Optimierung biotechnologischer Prozesse greift dieser Ansatz nicht. Aufgrund der großen Anzahl an Prozessvariablen, die teilweise miteinander interagieren und deshalb nicht systematisch variiert werden können, sowie der Stoffwechselkomplexität von Mikroorganismen können keine Modelle des Prozesses gebildet werden, die diesen in ausreichender Qualität abbilden. Der Einsatz von experimentellen Suchverfahren ist deshalb unumgänglich (Weuster-Botz 1999).

Um den bei der großen Anzahl von Prozessvariablen entstehenden experimentellen Aufwand so gering wie möglich zu halten, werden vor allem parallelisierte Minibioreaktoren in Optimierungsversuchen verwendet.

Da das Fermentationsmedium einen besonders großen Einfluss auf die Wirtschaftlichkeit eines Prozesses ausübt (Kennedy et al. 1994), stellt es zumeist den ersten Angriffspunkt für eine Optimierung der Reaktionsbedingungen dar.

### 3.3.1 Optimierung von Fermentationsmedien

Die chemische Umgebung und das Nährstoffangebot der Mikroorganismen werden in biotechnologischen Kulturen von der Medienzusammensetzung bestimmt. Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen, mineralische Salze, Spurenelemente, Peptide, Aminosäuren und Vitamine haben in ihrer Konzentration und Zusammensetzung einen erheblichen Einfluss auf die effektive und wirtschaftliche Herstellung der gewünschten Produkte eines Bioprozesses. Auch andere Prozessparameter, beispielsweise der pH-Verlauf, können stark vom Medium abhängen (Pufferwirkung, komplexe Medienbestandteile).

Bei der Optimierung von Fermentationsmedien ist die Anzahl der zu berücksichtigenden Variablen besonders groß. Unzureichende biochemische Detailkenntnisse und die große Anzahl an erforderlichen Medienkomponenten, die aus unterschiedlichsten Rohstoffquellen stammen können, erschweren ein systematisches und schnelles Vorgehen. Daneben kann zumeist nicht von einem linearen Zusammenhang zwischen Medienkomponenten und Zielgröße ausgegangen werden. Viele Einzelexperimente zur Optimierung sind die Folge einer solch komplexen Ausgangssituation.

Die klassische Methode, eine Optimierung mit einfachen Satzversuchen im Parallelansatz eindimensional mit sukzessiver Variation der Variablen durchzuführen, kann der Komplexität des Problems nicht gerecht werden. Außerdem werden auf diese Weise nur die Anfangsbedingungen der Reaktion in einem spezifischen Reaktionssystem, zumeist dem Schüttelkolben, berücksichtigt und optimiert. Im anschließenden Prozess wird fast immer ein kontrolliertes Zulaufverfahren eingesetzt. An diesem Punkt stellt sich oft heraus, dass sich vorher als einflussreich identifizierte Medienkomponenten in dieser Konstellation nicht mehr auswirken (Wu et al. 2007). Die Vermutung liegt nahe, dass im Gegenzug im Zulaufverfahren einflussnehmende Komponenten im Satzverfahren nicht identifiziert werden konnten.

Mangels Möglichkeiten und aus Kostengründen wird zudem in Schüttelkolben der zeitliche Verlauf der Prozessvariablen und der Zielgrößen nicht erfasst. Die für die Optimierung verwendeten Daten werden oft nur aus der Endpunktbestimmung gewonnen. Dadurch gehen wichtige Informationen nicht mit in die Betrachtung des Prozesses ein.

Ein weiteres Problem der Medienentwicklung besteht darin, dass eine große Datenmenge erzeugt wird, deren korrekte sowie genaue Auswertung einen weiteren Schlüssel zum Erfolg darstellt. Sobald eine große Anzahl von Versuchen mit meist mehr als fünf Variablen ausgewertet werden muss, verliert der Experimentator schnell den Überblick über Trends und Zusammenhänge. Ein gutes Verfahren zur Medienoptimierung stellt deshalb neben möglichst komprimierten Versuchsplänen auch eine erfolgreiche Datenanalyse zur Verfügung.

Neben dem klassischen und auch heute noch oft eingesetzten Verfahren der eindimensionalen Suche mit sukzessiver Variation der Variablen wurden viele weitere Methoden der Medienoptimierung entwickelt (Kennedy and Krouse, 1999). Im Folgenden werden in Kürze einige der populärsten Verfahren und ihre Vor- und Nachteile dargestellt.

Eine einfache und häufig angewandte Strategie ist es, eine Mediumkomponente gegen eine andere, ähnliche Komponente auf gleichem Konzentrationsniveau auszutauschen. Meist wird diese Methode verwendet, um die gleiche Komponente von verschiedenen Herstellern zu testen oder beispielsweise verschiedene Kohlenstoff- oder Stickstoffquellen direkt miteinander zu vergleichen.

Diese Methode ermöglicht eine schnelle und effektive Gegenüberstellung vieler Komponenten, eignet sich aber keinesfalls als umfassendes Verfahren zur Medienoptimierung. Es vernachlässigt den Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen und die Wechselwirkung der Komponenten untereinander. Es eignet sich deshalb nur als Selektionsmethode, die nachteilig wirkende Medienbestandteile ausschaltet.

Mit der Entwicklung einer grundlegenden Theorie zur Versuchsplanung (Fisher 1926) wurde gezeigt, dass die Variation von mehr als nur einer Variablen gleichzeitig viel effizienter zum Ziel führt. In der Medienoptimierung wurden solche Versuchsplanungen seit 1970 eingesetzt und seit den 80er Jahren häufiger verwendet als andere Verfahren (Kennedy and Krouse 1999). Sie zeigen große Verbesserungen gegenüber dem eindimensionalen Ansatz (Silveira et al. 1991).

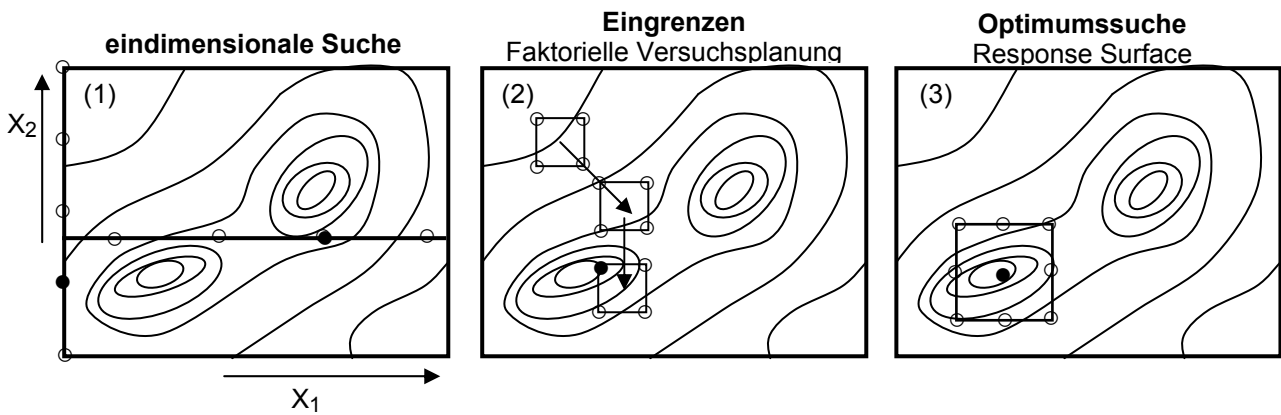
Faktorielle Versuchspläne haben sich in unterschiedlichen Varianten etabliert. Ihnen liegt die Annahme zu Grunde, dass sich die Beziehung zwischen Medienkomponenten und Zielgrößen durch einen (unvollständigen) Ansatz erster Ordnung darstellen lässt. Es werden zumeist nur die Wechselwirkungen zwischen zwei Mediumskomponenten zugelassen.

Voll-faktorielle Versuchspläne berücksichtigen alle denkbaren linearen Kombinationen von Konzentrationsstufen in die der zu untersuchende Konzentrationsbereich der Variablen aufgeteilt wird. Alle möglichen Medienzusammensetzungen werden somit getestet mit dem Nachteil, dass der experimentelle Aufwand sehr groß wird. Eingesetzt wird diese Versuchsplanung in der Praxis allerdings nur für zwei Konzentrationsstufen. Die Aussagekraft nimmt damit entscheidend ab, da so von linearen Zusammenhängen zwischen nur zwei Konzentrationsstufen und der Zielgröße ausgegangen wird.

Teilweise (fraktionelle, teil-) faktorielle Versuchsplanungen bieten einen Kompromiss zwischen reduzierten Konzentrationsstufen und der Anzahl der durchzuführenden Experimente. Unter der Annahme, dass Wechselwirkungen vernachlässigbar sind, können in den Versuchsplänen Wechselwirkungsspalten als Einstellstufen für Faktoren verwendet werden. Dadurch werden Effekte und Wechselwirkungen nicht mehr getrennt erfasst (Vermengung). Diese Methode wird vor allem angewandt, wenn nur zwei Konzentrationslevel, dafür aber eine große Zahl von Komponenten variiert werden soll. Zur Überwindung der Nachteile der beiden zuvor genannten Methoden wurde ein CCD (Central Composite Design) entwickelt. Es basiert auf den zweistufigen teil-faktoriellen Versuchsplänen, denen gerade genug weitere Versuchspunkte hinzugefügt werden, dass Abweichungen von der Linearität der Antwortfunktion der Zielgröße und Interaktionen zwischen den Medienbestandteilen abgeschätzt werden können. Aber auch in diesem Fall nimmt die Zahl der Experimente schnell zu. Zur Identifikation der wichtigsten Medienkomponenten wird in der Regel ein Plackett-Burman-Versuchsplan verwendet. Hierbei handelt es sich um hochvermengte Versuchspläne. Es wird eine lineare Beziehung zwischen Zielgröße und Konzentration vorausgesetzt und angenommen, dass keine Interaktionen zwischen den Medienkomponenten herrschen (Plackett et al. 1946). Die Zahl der notwendigen Versuche lässt sich so erheblich reduzieren.

Allein die Versuchsplanung ist noch nicht ausreichend, um ein Medium zu verbessern. Neben einem Versuchs-Design, das festlegt, welche Konzentrationen in welcher Kombination getestet werden, ist die mathematische Auswertung der gewonnenen Daten ausschlaggebend.

Die einfachste Auswertungsmethode ist die (multiple) lineare Regression. Kombiniert mit Methoden der faktoriellen Versuchsplanung ergeben sich das SA (steepest ascent) Verfahren und die RSM (response surface methodology). Bei der Methode des steilsten Anstiegs handelt es sich um ein Gradientenverfahren zur Optimumsuche.



**Abbildung 3.3.1: Vorgehensweise bei eindimensionaler Suche (1) und statistischer Versuchsplanung (2)-(3) zur Optimumsuche einer zweidimensionalen Beispielfunktion (● identifizierte ‚optimale‘ Variablenkombination) (nach Weuster-Botz 1999).**

Nach dem eine Versuchsreihe durchgeführt wurde, bestimmt das sich ergebende Versuchsergebnis in welche Richtung die weiteren Versuche durchgeführt werden. Dazu werden voll- und teilfaktorielle meist 2-stufige Versuchspläne mit Zentralpunkt eingesetzt.

Die RSM hat sich bei der Identifizierung eines Optimums innerhalb eines bereits bestimmten optimalen Variablenbereichs bewährt. Hierbei wird ein Polynom zweiter Ordnung verwendet. Als Versuchspläne werden unterschiedliche Methoden eingesetzt. Grundsätzlich lässt sich das Vorgehen bei der statistischen Versuchsplanung wie folgt in drei Schritte unterteilen (Abbildung 3.3.1):

- Identifizierung der wichtigsten Medienkomponenten (Aussieben)
- Identifizierung des optimalen Variablenbereichs (Eingrenzung)
- Identifizierung des Optimums

In der Praxis werden die oben genannten Methoden in diesen drei Phasen miteinander kombiniert.

In vielen Fällen wird die Beobachtungsvarianz  $\sigma^2$  vernachlässigt und damit die Identifikation signifikanter Medienkomponenten recht willkürlich, da gerade bei den verwendeten Satzversuchen diese Varianz recht hoch sein kann. Der Plackett-Burman-Versuchsplan bietet die Möglichkeit über zusätzliche „virtuelle“ Medienkomponenten oder Wiederholungsexperimente eine Schätzung der Beobachtungsvarianz  $\sigma^2$  zu erreichen. Grundsätzlich ist der Erfolg der statistischen Versuchsplanung vor allem von der zufällig richtigen Wahl der Variablenbereiche abhängig (Weuster-Botz 1999).

Als Alternative zu den Methoden der statistischen Versuchsplanung haben sich stochastische Suchstrategien etabliert. Sie haben ein sehr robustes Verhalten und sind in der Lage ein globales Optimum möglichst unabhängig von der Art der Zielfunktion zu bestimmen. Die einzelnen Methoden unterscheiden sich allein in der Art, wie neue Versuchspunkte in der Umgebung der vorangegangenen Versuchspunkte generiert und die Schrittweite erzeugt wird.

Stochastische Generationsmethoden sind besonders für Optimierungsprobleme mit der oben angesprochenen Beobachtungsvarianz geeignet.

Sie basieren auf dem einfachen Vorgehen:

1. Erzeugung eines (zufallsverteilten) ersten parallelen Versuchsansatz (1. Generation)
2. Experimentelle Bestimmung der Zielfunktion
3. Erzeugung weiterer Versuchspunkte in der Umgebung der besten Versuchspunkte der vorhergehenden Generation (2. Generation)
4. Wiederholung der Schritte 1-3 bis ein Abbruchkriterium erfüllt ist.

Stochastische Generationsmethoden heben sich vor allem durch die Verwendung von Versuchsgruppen, anstatt von Einzelversuchen, und die zielgerichtete Suche durch die Erzeugung neuer Versuchspunkte auf der Grundlage von Informationen aus bereits untersuchten Versuchspunkten hervor. Zudem werden Zufallstechniken zur weiträumigen Abtastung des Lösungsraums verwendet.

Ein Entscheidungskriterium zur Auswahl einer stochastischen Generationsmethode ist die Effizienz des Verfahrens im hochdimensionalen Variablenraum.

Der Standardansatz zur Verkleinerung eines solchen Variablenraums ist die Reduktion der Ordnung. Wie beschrieben erfolgt dies bei der statistischen Versuchsplanung durch ein Aussieben der Variablen, basierend auf der Annahme einer linearen Zielfunktion und ohne Berücksichtigung der Wechselwirkung von Variablen.

Eine Alternative zu diesem Ansatz besteht in der Abbildung des realen Variablenraums in einen virtuellen mit reduzierter Ordnung. In diesem verringerten Variablenraum kann dann die stochastische Suche stattfinden. Genetische Algorithmen verfolgen einen solchen Ansatz zur Reduktion der Ordnung.



### 3.3.2 Medienoptimierung mit Genetischem Algorithmus

Genetische Algorithmen bilden die Evolution nach, indem Operatoren wie beispielsweise Mutationen, Rekombinationen und Selektion verwendet werden. Sie codieren reale Variablen in Form von binären Zeichenketten, die Chromosomen gleichen. Ein solches ‚Chromosom‘ repräsentiert in Folge eine komplette Versuchsvorschrift. Diese ‚Chromosomen‘ werden mit den oben genannten Operatoren verändert, anhand ihrer Güte bezogen auf die Zielfunktion selektiert und danach paarweise angeordnet. Nach dem Prinzip des ‚Crossover‘ tauschen sie zufällig Binärzeichenabschnitte aus. Bei der Verarbeitung der Chromosomen durch den Algorithmus bilden sich Schemata in den Zeichenketten aus, die sich durch Anordnung und Länge charakterisieren lassen. Schemata mit überdurchschnittlicher Fitness nehmen nach der Selektion zu. Neben der Fitness sind auch Schemalänge und –anordnung entscheidend, ob diese sich über die Generationen durchsetzen. Schemata mit überdurchschnittlicher Fitness, kurzer Länge und niedriger Ordnung werden stark vermehrt. Die Rekombination zu längeren Schemata mit höherer Ordnung dienen der Optimumsuche. Der reale Variablenraum wird auf diese Weise in einem virtuellen Variablenraum mit stark reduzierter Ordnung abgebildet. Ein genetischer Algorithmus kann je Generation mit  $M$  Binärzeichenketten, die jeweils einem Versuchsansatz entsprechen, etwa  $M^3$  Schemata bearbeiten (Goldberg 1998). Hieraus ergibt sich der Vorteil dieser Methode. Mit wenigen Experimenten können ausgezeichnete Regionen in einem komplexen, multidimensionalen Variablenraum identifiziert werden (Holland 1992). Genetische Algorithmen sind daher eine besonders effektive Methode, um effizient in die direkte Umgebung des globalen Optimums zu gelangen.

Unter den verschiedenen zur Verfügung stehenden Genetischen Algorithmen eignen sich vor allem solche zur Prozessoptimierung, welche die gleichzeitige Optimierung unterschiedlicher Ziele ermöglichen. Am Institut für Bioverfahrenstechnik der TU München wurde die Software GAME.opt basierend auf dem Genetischen Algorithmus SPEA (Strength Pareto Evolutionary Algorithm) zur Versuchsplanung entwickelt (Link und Weuster-Botz 2006). GAME.opt soll durch geringe Populationsgrößen und reduzierte Generationenzahlen den experimentellen Aufwand gering halten, führt aber trotz der vergleichbar geringen Versuchszahl zu guten Optimierungsergebnissen (Link und Weuster-Botz 2006; Havel 2006). Obwohl Genetische Algorithmen bei der Suche in großen Variablenräumen sehr effizient arbeiten, ist die exakte Identifizierung des glo-

balen Optimums bei der experimentellen Versuchsplanung nicht sicher gestellt. Hierfür ist die Anzahl der Experimente zu gering. Mittels dieser explorativen Strategie gelangt man in der Regel schnell in die Nähe des globalen Optimums und von dort aus sind andere Verfahren wie die RSM von Vorteil.

Vielfach wird während der Optimierung die Konvergenz einzelner Medienkomponenten auf bestimmte Konzentrationsniveaus beobachtet. Dies bedeutet nicht, dass eine optimale Konzentration für die entsprechende Medienkomponente gefunden wurde. Auch hier ist die Anzahl an Experimenten zu gering, um eine allgemeingültige Aussage zu treffen. Es ist vielmehr ein Hinweis darauf, dass bestimmte Konzentrationsniveaus relativ häufig mit einer guten relativen Fitness verknüpft waren. Schlüsse, die aus solchem Verhalten gezogen werden, wie z.B. Inhibition, Limitierung etc. sind statistisch keinesfalls abgesichert und müssen in eigenen Experimenten untersucht werden. Bei der Betrachtung der Ergebnisse dürfen die einzelnen Komponenten nicht völlig voneinander getrennt bewertet und Wechselwirkungen müssen berücksichtigt werden. Trotzdem kann über das Konvergenzverhalten der einzelnen Variablen eine Tendenz für die Medienkomponenten abgelesen und Hinweise für weitere Untersuchungen erhalten werden.

Mit dem vorgestellten stochastischen Suchverfahren kann trotz hoher Variablenzahlen, großen Suchräumen und hoher Beobachtungsvarianz, wie sie für die Optimierung von Fermentationsmedien im Parallelansatz typisch sind, eine Prozessverbesserung erreicht werden. Es lassen sich Beispiele finden, bei denen sowohl für neue Variablenräume (Ersatz eines komplexen durch ein synthetisches Medium) aber auch für die Optimierung bereits über Standardverfahren verbesserter Medien, erhebliche Prozessverbesserungen gezeigt wurden (Weuster-Botz 1999).

### 3.4 Maßstabsvergrößerung aerober Bioprozesse

Ein Bioreaktor muss für den kultivierten Mikroorganismus geeignete physikalische und chemische Bedingungen bereitstellen. Hierzu gehören beispielsweise Temperatur, pH, Substratkonzentrationen und Sauerstoffversorgung. Für biologische Prozesse ist es besonders wichtig, dass die Mikroorganismen mit der richtigen Substratmenge zum richtigen Zeitpunkt versorgt werden, damit keine anderen als die gewünschten Stoffwechselwege aktiv sind. Genauso müssen alle Inhibitoren und Repressoren von den

Zellen entfernt werden, ob es sich nun um Produkte oder unerwünschte Nebenprodukte handelt. Da die biochemische Umsetzung in industriellen Prozessen generell nicht von physikalischen Transportprozessen getrennt werden kann und umgekehrt, ist die Ausschöpfung des Konversionspotenzials der Zellen in nicht unerheblicher Weise von den Möglichkeiten des Reaktors bestimmt, die Organismen optimal zu versorgen. Die Kopplung von Transport und Kinetik führt bei der Auslegung von Bioreaktoren und vor allem bei der Maßstabsübertragung zu Problemen, die daraus resultieren, dass biochemische Kinetiken maßstabsunabhängig sind, der physikalische Transport von Stoff und Wärme dagegen nicht (Lübbert 1991).

Der konventionelle Apparat für Bioprozesse ist der begaste Rührkesselreaktor, der durch seine technische Vielseitigkeit häufigen und dauerhaften Einsatz findet (Votruba und Sobotka, 1992). Rührreaktoren werden so ausgelegt, dass sie gute Mischeigenschaften aufweisen, die in möglichst kleinen Gradienten bezüglich der gelösten Reaktanden resultieren. Zusätzlich muss ein guter Wärmeaustausch und eine gleichmäßige Temperaturverteilung im Reaktor garantiert werden (Reuss 1993, Bellgardt 2000).

Das Ziel der Maßstabsvergrößerung ist es, im großen Maßstab das Verhalten zu reproduzieren, das in einem kleineren Maßstab gezeigt bzw. optimiert wurde. Da für industrielle Prozesse gängige Bioreaktoren oft mit dem in der Verfahrenstechnik gebräuchlichen kontinuierlichen Rührkessel verglichen werden, stammen viele Ansätze zur Maßstabsübertragung aus der chemischen Verfahrenstechnik (Einsele 1978). Ein traditioneller Weg der Maßstabsvergrößerung basiert auf Modelltheorien und dem Ähnlichkeitsprinzip (Diaz 1999).

Da es nicht möglich ist eine vollständige Ähnlichkeit zu erzeugen, wurden die unterschiedlichsten Kriterien und Strategien für die Maßstabsübertragung von Bioprozessen entwickelt. Im Folgenden werden einige dieser Ansätze für begaste Rührreaktoren mit newtonschen Flüssigkeitsverhalten betrachtet. Des Weiteren wird die Reaktion von mikrobiellen Systemen auf Gradienten der Substratkonzentration beschrieben.

#### 3.4.1 Ansätze für die Maßstabsübertragung in begasten Bioreaktoren

Experimente zur Optimierung von Bioprozessen werden idealer Weise im miniaturisierten Maßstab durchgeführt, um Zeit, Kosten und Ressourcen zu sparen. Die gewonnenen Ergebnisse müssen aus dem Kleinmaßstab in den Labor- und Pilotmaßstab übertragbar sein. Viele Kultivierungen ergeben aber im Großmaßstab deutlich geringere Produktausbeuten als nach den Laborexperimenten erwartet werden kann, da sich die

Prozesse in verschiedenen Maßstäben stark unterscheiden (Islam et al. 2008; Sweere et al. 1987). Zum einen liegt dies daran, dass miniaturisierte Reaktorsysteme zur Hochdurchsatzbioprozessentwicklung und –optimierung z.T. noch nicht ausführlich genug charakterisiert sind und zudem nicht vollständig geregelt werden können (Islam et al. 2007). Eine Maßstabsübertragung gestaltet sich in diesen Fällen schwierig. Zum anderen können vor allem die physikalischen Bedingungen der verschiedenen Maßstäbe nicht verglichen und bei einer Maßstabsübertragung schwer bis gar nicht beibehalten werden. Das Ergebnis von unvermeidlichen Kompromissen bei der Maßstabsübertragung ist eine Beeinflussung der Mischverhältnisse sowie des Stoff- und Wärmetransports, die oft zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen in den verschiedenen Maßstäben führen (Reuss 1993).

„The only uncontroversial fact about scale-up is that it is one of the most complicated tasks and challenging endeavours in the field of biochemical engineering.” (Reuss 1993)

Eine zuverlässige Maßstabsvergrößerung ist komplex und die existierende Literatur wird der bestehenden Problematik nicht annähernd gerecht. Obwohl viele Beiträge zu diesem Gegenstand zu finden sind, ist ein der Menge von Veröffentlichungen entsprechender Zuwachs an Wissen über das Thema der Maßstabsvergrößerung nicht zu beobachten (Reuss 1993).

Theoretisch kann eine vorhersagbare Maßstabsvergrößerung erfolgen, wenn (1) in jedem Maßstab exakt dieselben Bedingungen zur Verfügung gestellt werden. Das sind z.B. Mischeigenschaften des Systems, Sauerstofftransferaten etc. (2) wenn alle zeitlichen und räumlichen Veränderungen aller wichtigen Umgebungsvariablen exakt vorausgesagt werden können ebenso wie die jeweilige Antwort des verwendeten Organismus auf diese Veränderungen (Charles 1985b). Praktisch kann weder das eine noch das andere erfüllt werden. Die gebräuchlichen Praktiken zur Maßstabsübertragung setzen sich daher aus mehr oder weniger methodischen Ansätzen zusammen. In diese Methoden gehen vielfach Erfahrungswerte und Faustregeln ein, aber auch systematische Ansätze wie die Dimensionsanalyse (Sweere et al. 1987).

Die Dimensionsanalyse soll theoretisch erlauben, maßstabsunabhängige dimensionslose Korrelationen zu verwenden, aber sie zwingt auch signifikante theoretische Begrenzungen auf (Charles 1985b). Viele Maßstabsvergrößerungsregeln basieren auf

dem Versuch einen zuvor als maßgeblich identifizierten physikalischen Zusammenhang als Kennzahl in verschiedenen Maßstäben konstant zu halten. Typische Größen hierfür sind der Leistungseintrag pro Volumen, die Rührerspitzen geschwindigkeit und die Reynolds-Zahl, die das Verhältnis von Trägheits- zu Zähigkeitskräften als dimensionslose Kennzahl darstellt. Allerdings führen die Versuche einzelne Betriebsbedingungen konstant zu halten dazu, dass andere Betriebsparameter drastische Änderungen erfahren (Storhas 1994).

Deshalb besteht ein weiterer Ansatz darin, die maßstabsunabhängige Erhaltung sämtlicher extrazellulärer Bedingungen für den Organismus zusammengefasst unter der physiologischen Ähnlichkeit (Vortruba und Sobotka 1992) oder Ähnlichkeit der chemischen und physikalischen Umwelt (Junker 2004; Young 1979) sicherzustellen. Ist unter diesen Konstanten der Parameter, der den größten Einfluss auf die Produktivität der Organismen hat, kann eine Maßstabsübertragung gelingen. Der Erfolg dieser Vorgehensweise ist zum einen davon abhängig, ob geeignete Eigenschaften oder Parameterkombinationen gewählt werden. Zum anderen ist die Vorhersagbarkeit der Maßstabsabhängigkeiten und deren Effekt auf die gewählten Parameter entscheidend (Reuss 1993).

Ein für die Maßstabsvergrößerung aerober Bioprozesse häufig verwendetes Kriterium ist, den spezifischen Stoffübergangskoeffizienten ( $k_L a$ ) konstant zu halten. Dennoch ist die Leistungsstärke einer Zellpopulation in verschiedenen Maßstäben nicht allein von der Möglichkeit Sauerstoff in das Medium einzutragen, also dem  $k_L a$  abhängig, als vielmehr von der maximalen Sauerstofftransfer rate, welche die kritische Sauerstoffkonzentration für einen Organismus mitberücksichtigt (Ju und Chase 1992). Diese muss in jedem Fall hoch genug sein, um den Sauerstoffbedarf der Kultur erfüllen zu können (Diaz 1999).

### 3.4.2 Einfluss von Konzentrationsgradienten auf die Kultivierung von Mikroorganismen

Eine wesentliche Aufgabe von Bioreaktoren ist die Verteilung von Substraten und Substanzen, die lokal in den Reaktor zugegeben werden. Kurz gesagt sollen Konzentrations- und Temperaturgradienten schnell und effektiv abgebaut werden (Lübbert 1991).

Die Annahme, dass die Flüssigkeitsphase in Rührkesselreaktoren ideal durchmischt ist, vereinfacht zwar die Modellierung von Stoff- und Wärmetransportphänomenen, bil-

det aber in vielen Fällen nicht die Realität ab. Mit zunehmender Größe steigen auch die Mischzeiten in den Reaktoren, so dass Zonen schlechter Durchmischung vermehrt auftreten. Die Folge sind Gradienten in den Stoffkonzentrationen wie z.B. Kohlenstoff- und Sauerstoffkonzentration aber auch bezüglich der Temperatur und des pH.

Die Reaktion der Mikroorganismen auf solche Konzentrationsunterschiede ist vielfältig. Die inhomogene Verteilung von Substrat, im speziellen der limitierenden Kohlenstoffquelle, wurde weitaus weniger untersucht als räumliche Unterschiede in der Gelöst-sauerstoffkonzentration (Reuss 1993). Systematische Studien werden seit den 80iger Jahren durchgeführt und umfassen auch Versuche im Labormaßstab, in denen die Substratkonzentrationsgradienten durch verschiedene Reaktorsysteme simuliert werden (George et al. 1993; Bylund et al. 1999; Enfors et al. 2001, Papagianni et al. 2003). Bei Zulaufprozessen werden die Substratkonzentrationen in der direkten Nähe des Zugabepunktes maximal. In anderen Bereichen des Reaktors können dagegen Zonen mit geringer Substratkonzentration auftreten. Während in Zonen hoher Substratkonzentration ungenügende Durchmischung die Ursache für Konzentrationsgefälle ist, kommt in Bereichen niedriger Konzentrationen der Einfluss der Zellen zum Mischverhalten hinzu. Bei hohen Zelldichten wird hier das Substrat schneller verbraucht als neues Substrat durch das Medium herantransportiert werden kann. Die im Reaktor enthaltenen Organismen treffen somit auf recht unterschiedliche Umgebungsbedingungen, die von Konzentrationen nahe der Substratlimitierung bis hin zu Konzentrationen, die Überschuss-Metabolismus auslösen, reichen. Abhängig von der Größe und dem Mischverhalten des Reaktors sind die Organismen diesen Konzentrationsänderungen bis zu einigen Minuten ausgesetzt (Enfors et al. 2001).

In Bereichen mit hohen Substratkonzentrationen kann es durch die starke Verstoffwechslung zu lokalen Sauerstoffverarmungen kommen, die zusätzlich Stress auf die Organismen ausüben (Bylund et al. 1998). Diesem Sekundäreffekt der lokalen Sauerstofflimitierung schreiben Bylund et al. (1999) eine verringerte Biomasseausbeute und erhöhte Nebenproduktbildung für Substratschwankungen (Glucose) von 5 bis 4500 mgL<sup>-1</sup> in *Escherichia coli* Kultivierungen zu. Von ähnlichen Ergebnissen berichten Enfors et al. (2001). Die in den dargestellten Versuchen erhaltene verringerte Biomasseausbeute wird dem wiederholten Wechsel von Produktion und Verbrauch von unter Sauerstofflimitierung gebildetem Acetat zugeschrieben. Daneben konnten in einer Analyse der mRNA eindeutige Stressantworten anhand von ausgewählten, stressinduzierten Genen nachgewiesen werden. Auch die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* rea-

giert mit einer geringeren Biomasseausbeute und einer erhöhten Ethanolbildung auf Konzentrationsgradienten im Bioreaktor (George et al. 1993)

Die in der Literatur diskutierten Untersuchungen zu intermittierenden Substratzugaben unterscheiden sich in ihren Ergebnissen erheblich. So beobachteten Lin und Neubauer (2000) ein verringertes Wachstum und niedrigere Produktausbeuten, wenn Ein-Aus-Zulaufzyklen von 30 oder 120 Sekunden während einer *Escherichia coli* Kultivierung eingesetzt werden. Weuster-Botz et al. (2001) können dagegen für den gleichen Organismus eine gegenüber kontinuierlichen Kulturen gesteigerte Produktivität bei Zulaufintervallen von sechs bis sieben Minuten nachweisen.

Das Verhalten verschiedener Organismen bei intermittierendem Substratzulauf ist sehr unterschiedlich. Dennoch kann davon ausgegangen werden, dass in allen Fällen eine zelluläre Stressantwort in den Organismen ausgelöst wird, wenn die Schwankungen der Substratkonzentration nur ausreichend stark ausfallen und lang genug anhalten. Dann kommt es entweder zu Substratüberschuss oder Substratlimitierung, die eine entsprechende physiologische Antwort der Zelle hervorrufen und durch Analyse der mRNA nachgewiesen werden können (Schweder et al. 1999; Teich et al. 1999).

### 3.5 Industrielle Produktion von Riboflavin (Vitamin B<sub>2</sub>)

Die chemische Struktur von Riboflavin, auch Lactoflavin genannt, ist ein Iso-Alloxazinring, der mit Ribit, einem fünfwertigen Alkohol, verbunden ist. Riboflavin ist ein gelber Feststoff mit einem Molekulargewicht von  $376 \text{ g mol}^{-1}$ , der lichtempfindlich aber hitzestabil ist. Riboflavin besitzt die physiologische Funktion eines Vitamins (Vitamin B<sub>2</sub>) und dient als Vorstufe der Coenzyme Flavinmononukleotid (FMN) und Flavinadenin-Dinukleotid (FAD), die eine entscheidende Rolle als Elektronenakzeptoren im Stoffwechsel spielen (Perkins and Pero 1993).

Wie auch die anderen Vitamine aus dem B-Komplex wirkt Riboflavin beim Fett- und Kohlenhydratstoffwechsel sowie bei der Proteinsynthese mit. In der menschlichen Ernährung sind vor allem Hefe, Leber, Niere, Eidotter, Weizenkeime und grüne Pflanzen Hauptquelle für die Versorgung mit Vitamin B<sub>2</sub>. Mangelerscheinungen sind selten und äußern sich beim Menschen in Entzündungen der Haut und Schleimhäute, Wachstumsstörungen und Bindehautentzündungen. Geflügel und Schwein reagieren mit Wachstumsstörungen, reduzierter Nahrungsaufnahme und Diarrhoe auf Unterversorgung mit Riboflavin.

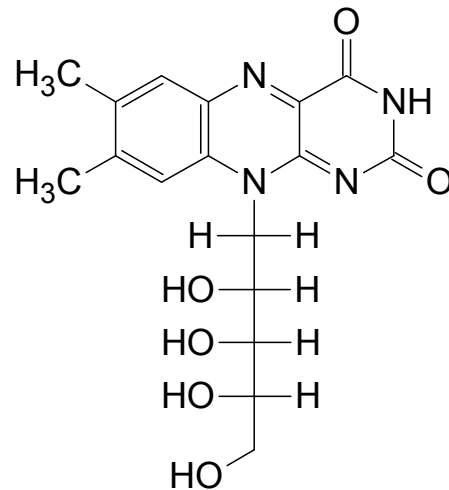


Abbildung 3.5.1: Chemische Struktur von Riboflavin (Vitamin B<sub>2</sub>).

Riboflavin wird in großen Mengen als Vitamin zur Nahrungsergänzung für Mensch und Tier produziert. Da eine Überdosierung von Vitamin B<sub>2</sub> unbedenklich ist, wird es vielfach als Farbstoff (E101) in der Lebensmittelindustrie verwendet, beispielsweise in Getränken und Milchprodukten (Stahmann et al. 2000). Für diese Anwendung und für die Verwendung in der pharmazeutischen Industrie wird hoch aufgereinigtes Riboflavin benötigt. Dagegen werden 80% des industriell produzierten Vitamins in weniger reiner Form als Futterzusatz in Tiernahrung eingesetzt (Stahmann et al. 2000).

Immer mehr chemische Verfahren werden von biotechnologischen Prozessen ersetzt, weil mit dem Wechsel zu mikrobiologischen Verfahren auf nachwachsende Rohstoffe, anstatt auf Mineralöle zurückgegriffen werden kann. Teilweise sind dadurch erhebliche Kostenreduktionen und eine höhere Umweltverträglichkeit möglich. Die biotechnologische Herstellung von Riboflavin ist hierbei ein Beispiel für die Verdrängung eines etablierten chemischen Prozesses durch ein biologisches Verfahren (Stahmann et al. 2000; Van Loon et al. 1996; Karos et al. 2004; Vandamme 1992). Auslöser für diesen Wandel sind Verfahren, die auf der Überproduktion einer Substanz durch Mikroorganismen basieren, wie z.B. die Herstellung von Riboflavin aus Glucose. Aber auch im Fall des Riboflavins waren die ersten Studien der Biosynthese bereits mit Versuchen verbunden, die natürliche Produktion des Vitamins künstlich zu steigern (Bacher et al. 2000). Für die verwendeten Organismen wie z.B. *Ashbya gossypii* wurde zunächst die klassische Stammentwicklung zur Verbesserung der Produktionsleistung herangezogen (Karos et al. 2004). Mittlerweile wird das Vitamin auch von gentechnisch veränderten Organismen produziert (*Ashbya gossypii*, *Bacillus subtilis*). Die gegenwärtige Ent-



wicklung biotechnologischer Prozesse wird noch immer von der Isolierung von Mikroorganismen bestimmt, die sich durch neue Leistungen auszeichnen. Um aber Hochleistungsproduktionsstämme zu erzeugen oder Enzyme zu optimieren werden neben den klassischen Mutations- und Selektionsverfahren mittlerweile vor allem gentechnische Methoden eingesetzt (Schwister 2007). Die Schlüsseltechnologie zur Wettbewerbsfähigkeit von biotechnologischen Prozessen ist deshalb die Gentechnik.

Als biotechnologisch produziertes Riboflavin 1990 in den Markt eingeführt wurde, betrug der Anteil 5% des globalen Vitamin-B<sub>2</sub>-Marktes. Im Jahr 2002 wurden bereits 75% des 4000 Tonnen jährlich produzierten Vitamins mit der Kultivierung von Mikroorganismen gewonnen (Karos et al. 2004). Zur Zeit wird Riboflavin in drei kommerziell relevanten, biotechnologischen Prozessen hergestellt. Hierbei handelt es sich bei allen um Prozesse mit rekombinanten Mikroorganismen: dem Pilz *Ashbya gossypii* (BASF, Ludwigshafen, Deutschland), der Hefe *Candida fermata* (Archer Daniels Midland, Decatur, IL, USA) und dem Bakterium *Bacillus subtilis* (DSM Nutritional Products, Basel, Switzerland) (Stahmann et al. 2000).

Der größte Teil des Produktes wird während des Prozesses aus den Zellen ausgeschleust, so dass sich das Riboflavin im Kulturmedium anreichert (Abbildung 3.5.2). Dort bildet es aufgrund seiner geringen Löslichkeit in neutralen wässrigen Lösungen (Van Loon et al. 1996) nadelförmige Kristalle. Nur geringe Mengen des Produktes verbleiben in den Zellen und damit in der Biomasse. Am Ende des Kultivierungsprozesses wird die Fermentationslösung pasteurisiert. Die Riboflavinkristalle

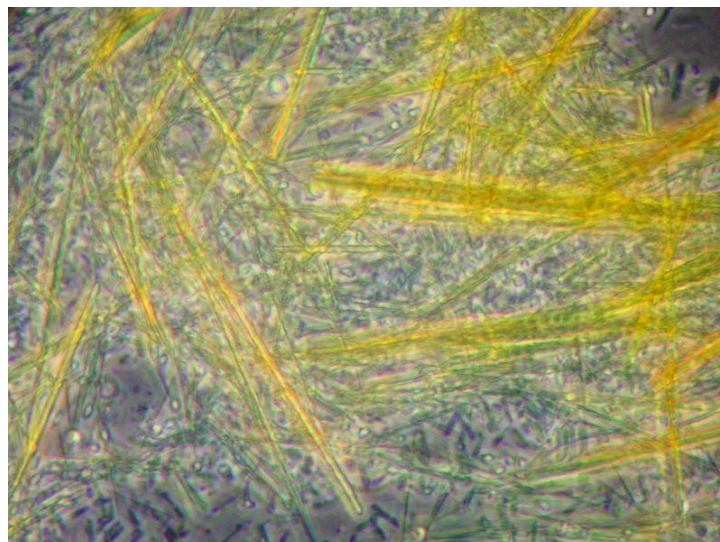


Abbildung 3.5.2: Riboflavinkristalle in einer *Bacillus subtilis* Kultur.

werden über Zentrifugation von der Biomasse abgetrennt und mit Säure gewaschen. Nach der Rekristallisierung steht ein Produkt mit einem Reinheitsgrad von mehr als 99 % zur Verfügung (Bretzel et al. 1999). In einem letzten Produktionsschritt wird Vitamin B2 als puderiges Produkt formuliert. In diesem Zustand ist es besser in Wasser löslich als die während der Kultivierung gebildeten Kristalle.

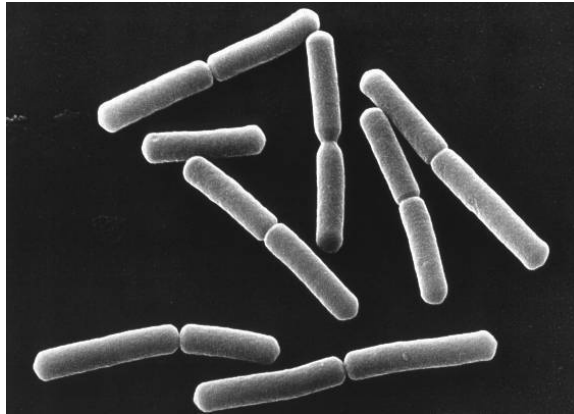
Das Produktionsverfahren mit dem rekombinanten *Bacillus* Stamm erfüllt die gleichen Produktspezifikationen wie der chemische Syntheseprozess und übertrifft noch dessen Qualitätskriterien (Bretzel et al. 1999). Aktuell werden jährlich mehr als 3000 Tonnen dieses Vitamins mit *Bacillus subtilis* produziert.

### 3.6 *Bacillus subtilis*

Die Gattung *Bacillus* umfasst eine Vielzahl von industriell bedeutsamen Spezies, die in der biotechnologischen Industrie weithin als Plattformorganismen verwendet werden (Arbige et al 1993; Harwood 1992). *Bacillus subtilis* ist ein gram-positives, aerob wachsendes, stäbchenförmiges Bakterium dieser Gattung (Abbildung 3.6.1).

Schnelles Wachstum und besonders die Fähigkeit zur extrazellulären Sekretion von Proteinen, die in großen Mengen direkt in das umgebende Medium abgegeben werden, macht diese Spezies für kommerzielle Anwendungen äußerst attraktiv.

*Bacillus subtilis* wird zur Herstellung einer Vielzahl von unterschiedlichen Produkten eingesetzt. Darunter befinden sich viele Enzyme (Ferrari et al. 1993; Pero und Sloma 1993), aber auch Purinnukleotide, Antibiotika, Insektizide und Vitamine (Schallmey et al. 2004, Perkins et al. 1999; Van Loon et al. 1996). Das nichtpathogene Bakterium *Bacillus subtilis* gehört hierbei zu den bestuntersuchten Vertretern der Gattung *Bacillus* und hat im Rahmen der gram-positiven Bakterien nicht nur einen industriellen sondern auch wissenschaftlichen Ausnahmestatus erreicht (Schallmey et al. 2004). *Bacillus subtilis* ist physiologisch, genetisch und biochemisch sehr gut beschrieben (Sonenshein et al 1993) was die Verwertung und Entwicklungen dieser Organismen bezüglich biotechnologischer und industrieller Anwendungen vereinfacht (Dauner and Sauer 2001; Harwood and Wipat 1996; Sauer et al. 1998; Zamboni et al. 2003). Das folgende Kapitel befasst sich mit dem Metabolismus von *Bacillus subtilis*, wobei der Fokus auf der Biosynthese von Riboflavin liegt. Weiterhin werden Strategien und Maßnahmen betrachtet, wie *Bacillus subtilis* Stämme mit einer erhöhten Riboflavinproduktivität erzeugt werden können.



**Abbildung 3.6.1:** Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Bacillus subtilis* (Nasa 2008).

### 3.6.1 Zentraler Kohlenstoffwechsel in *Bacillus subtilis*

Lebende Zellen sind ein im höchsten Maße geordneter Zustand von Materie. Es muss Energie aufgewendet werden, um diesen Ordnungszustand herzustellen und aufrecht zu erhalten. Diese Energie sowie die für den Aufbau und den Erhalt der Zelle notwendigen Substanzen gewinnt ein Organismus im Stoffwechsel.

Stoffwechselwege stellen demnach Vorstufen für die Zellbestandteile und Energie für deren Synthese bzw. andere Energie verbrauchende Prozesse zur Verfügung. Energiequelle sind hierbei Nahrungsstoffe, die aus der unmittelbaren Umgebung des Organismus aufgenommen und innerhalb der Zelle über spezifische Stoffwechselwege umgesetzt werden. Kohlenhydrate sind der Nährstoff für den überwiegenden Teil der Mikroorganismen. Wird Mikroorganismen eine Mischung verschiedener Substrate angeboten, verstoffwechseln sie diejenigen bevorzugt, die ihnen ein möglichst schnelles Wachstum ermöglichen (Stülke und Hillen 1999). *Bacillus subtilis* kann mindestens 18 verschiedene Mono- und Disaccharide als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen, wobei Glucose, wie auch bei vielen anderen Mikroorganismen, die favorisierte Nahrungsquelle darstellt (Stülke und Hillen 2000).

In nahezu allen Mikroorganismen sind die Hauptstoffwechselwege identisch. Hierzu gehören auch die Zucker-Abbauwege und die Atmungskette (Schlegel 1992). Es führen unterschiedliche Abbauwege von der Glucose zu C3-Körpern, wobei der am weitesten verbreitete der Emden-Meyerhof-Parnas-Weg, auch Glykolyse genannt, ist. Die Glykolyse ist in Abbildung 3.6.2 dargestellt und führt von Glucose zu Pyruvat, einem wichtigen Produkt im Intermediärstoffwechsel. Der überwiegende Teil des Pyruvats wird zu Acetyl-Coenzym A oxidiert und in den Tricarbonsäure-Cyclus eingeschleust.

Dieser dient der Oxidation von Acetyl-Coenzym A zu Kohlendioxid unter Übertragung von Elektronen und Protonen auf Reduktionsäquivalente ( $\text{NADPH}_2$ ). Diese werden in der Atmungskette unter Bildung des Energieäquivalents Adenosintriphosphat (ATP) regeneriert. Im Tricarbonsäure-Cyclus werden letztendlich nicht nur die aufgenommenen Kohlenhydrate terminal oxidiert, es werden auch zahlreiche Vorstufen für die Biosynthese zur Verfügung gestellt (Schlegel 1992). Der ebenfalls in Abbildung 3.7.1 dargestellte Pentosephosphat-Weg ist ein Nebenweg zur Glykolyse, der wichtige Ausgangssubstanzen und Reduktionsäquivalente für Synthesereaktionen zur Verfügung stellt. Hierzu gehören auch Intermediate zur Synthese von Riboflavin.

In Abhängigkeit von der Verfügbarkeit der Substrate im Nährmedium werden Zwischenprodukte des Stoffwechsels wie z.B. Pyruvat und Acetyl-Coenzym A zu Nebenprodukten des zentralen Kohlenstoffwechsels umgewandelt und in das Medium sekretiert. Diese Nebenprodukte sind zudem abhängig vom verwendeten Organismus, den Wachstumsbedingungen und der Wachstumsphase. Bei Wachstum auf Glucose bildet *Bacillus subtilis* in Chemostat-Kulturen unter verschiedenen Bedingungen die folgenden Nebenprodukte: Citrat, Acetat, Acetoin, Butandiol und Diacetyl (Amanullah et al. 2001; Dauner and Sauer 2001; Dauner et al. 2001b). Mehrfach wird der hohe Energiebedarf von *Bacillus subtilis* für den Erhaltungsstoffwechsel hervorgehoben (Sauer 1997; Tännler et al. 2008). Im Chemostat wurde von Sauer et al. (1996) für den Wildtyp  $0,08 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  bzw.  $0,12 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  für einen rekombinanten *Bacillus subtilis* Stamm als Grundbedarf bei langsamen Wachstum angegeben.

Da im Zulaufverfahren durch Substratlimitierung ein geringes Wachstum erzwungen werden kann und damit die Produktionsphase verlängert wird, ist für solche Produktionsprozesse eine niedrige Erhaltungsenergie vorteilhaft. Obwohl gerade gentechnische veränderte Stämme von *Bacillus subtilis* keine niedrige Erhaltungsenergie aufweisen, zeigt dieser Organismus andere stoffwechselspezifische Vorteile. Für die Bildung von Riboflavin sind hohe Flüsse durch den oxidativen Pentosephosphat-Weg besonders vorteilhaft (Tännler et al. 2008). Für *Bacillus subtilis* konnte während Satz- und Chemostat Kultivierungen ein erheblicher katabolischer Fluss durch den Pentosephosphat-Weg (Fuhrer et al. 2005) und ebenfalls ein hoher Fluss durch den respiratorischen Tricarbonsäure-Cyclus nachgewiesen werden (Sauer et al. 1998; Dauner et al. 2001b).

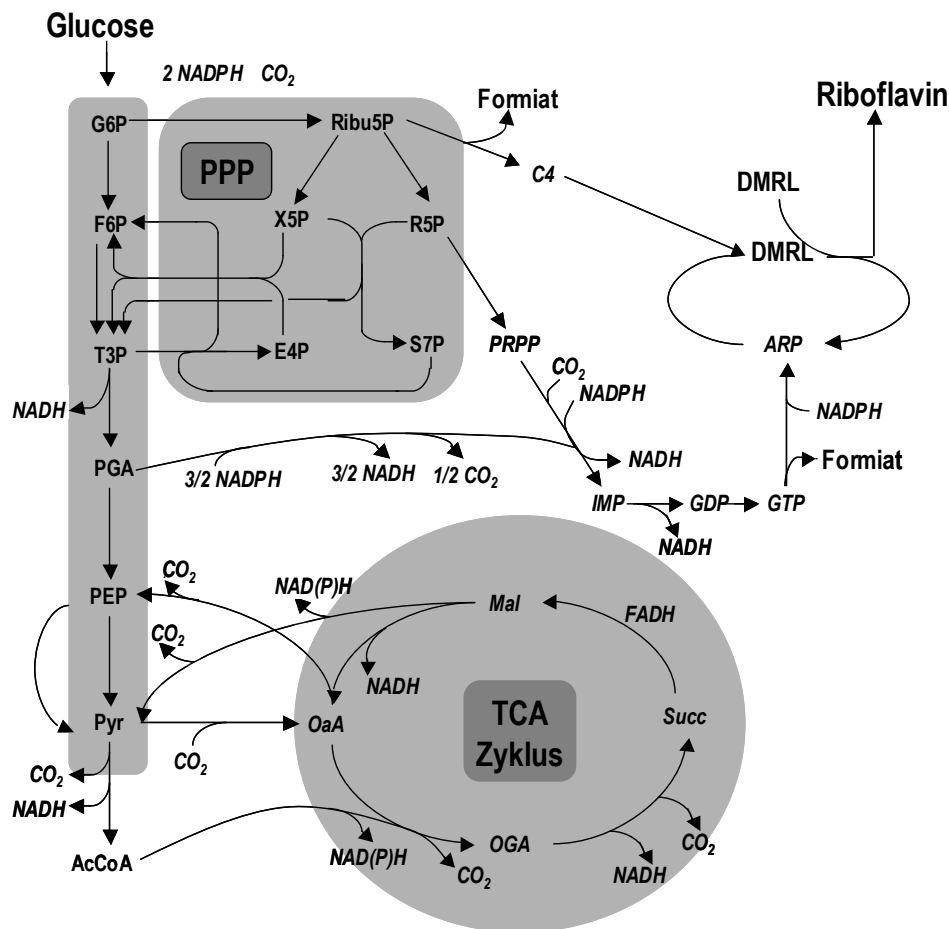


Abbildung 3.6.2: Ausschnitt aus dem biochemischen Reaktionsnetzwerk für *Bacillus subtilis* (vereinfachte Darstellung nach Sauer et al. 1996). Die grau hinterlegten Bereiche stellen die Glykolyse (Rechteck), den Pentosephosphat-Weg (PPP, Quadrat) mit der Verbindung zur Riboflavinsynthese sowie den Tricarbonsäurecyclus (TCA, Kreis) dar. Abkürzungen: ARP: 5-amino-6-(ribitylamino)-2,4-(1H,3H)-pyrimidinedion, AcCoA: Acetyl Coenzym A, C4: 3,4-dihydroxy-2-butanon, DMRL: 6,7-dimethyl-8-ribityllumazin, E4P: Erythrose-4-Phosphat, F6P: Fructose-6-Phosphat, G6P: Glucose-6-Phosphat, OaA: Oxalacetat, OGA: Oxoglutarat, PEP: Phosphoenolpyruvat, PGA: 3-Phosphoglycerinsäure, PRPP: Phosphoribosyl-diphosphat, Pyr: Pyruvat, R5P: Ribose-5-Phosphat, Ribul5P: Ribulose-5-Phosphat, S7: Seduheptulose-7-Phosphat, T3P: Triose-3-Phosphat, X5P: Xylulose-5-Phosphat.

### 3.6.2 Riboflavinbiosynthese in *Bacillus subtilis*

Riboflavin wird natürlicherweise von Mikroorganismen produziert. Doch nur wenige Spezies produzieren das Vitamin in Mengen, die ihren eigenen metabolischen Bedarf übersteigen. Natürliche Überproduktion findet man bei einigen Bakterien, Hefen und Pilzen (Demain 1972).

Für die Biosynthese von molekularem Riboflavin werden als Substrate ein Molekül Guanosintriphosphat (GTP) und zwei Moleküle von Ribulose-5-Phosphat benötigt. Eine Vereinfachung des Biosyntheseweges ist in Abbildung 3.6.3 dargestellt.

Der Imidazol-Ring des GTP (1) wird hydrolytisch geöffnet, wodurch 2,5-Diaminopyrimidin (2) entsteht, welches durch eine Reihe von Desaminierungen, Seitenkettenreaktionen und Dephosphorylierungen wiederum zu 5-Amino-6-Ribitylamino-2,4(1H,3H)-Pyrimidindion (4) umgesetzt wird. Die Kondensation von 5-Amino-6-Ribitylamino-2,4(1H,3H)-Pyrimidindion mit 3,4-Dihydroxy-2-Butanon-4-Phosphat (5), das über den Pentosephosphat-Weg aus Ribulose-5-Phosphat erhalten wird, bringt ein Molekül 6,7-Dimethyl-8-Ribityllumazin (DMRL, 6), eine Vorstufe von Riboflavin, hervor. Die Disproportionierung von DMRL führt direkt zu Riboflavin und 5-Amino-6-Ribitylamino-2,4(1H,3H)-Pyrimidindion (4), das im Biosyntheseweg Wiederverwendung findet (Bacher et al. 2000). In *Bacillus subtilis* sind die Gene für die sechs enzymatischen Reaktionen der Biosynthese im Riboflavin (*rib*) Operon mit einer Länge von 4.3 Kilobasenpaaren (kb) zusammengefasst (Perkins et al. 1999). Diese Anordnung ist in Abbildung 3.6.4 gezeigt. Die Gene sind nicht in der Reihenfolge der enzymatischen Umsetzungen angeordnet. So codiert das *ribA* Gen, das dritte Gen des Operons, die GTP-Cyclohydrolase II, die den ersten Schritt der Riboflavinbiosynthese katalysiert und zu 2,5-Diamino-6-Ribosylamino-4(3H)-Pyrimidin-5'-Phosphat (2) in Abbildung 3.6.3 führt. Das RibA Protein besitzt zudem noch eine zweite enzymatische Funktion. Es katalysiert die Transformation von Ribulose-5-Phosphat (5) zu 3,4-Dihydroxy-2-Butanon-4-Phosphat. Dieses Zwischenprodukt wird zur Synthesereaktion von DMRL verwendet. Das *ribG* Gen kodiert ebenfalls ein bi-funktionales Enzym mit Desaminase- und Reduktase-Aktivität für die Desaminierung des Pyrimidin-Rings und die Reduktion der Ribosyl-Seitenkette die zu 5-Amino-6-Ribitylamino-2,4(1H,3H)-Pyrimidindion-5'-Phosphat (3) führen. Die Gene *ribH* und *ribB* kodieren die Enzyme Lumazinsynthase und Riboflavinsynthase für den vorletzten und letzten Schritt der Biosynthese. Die Transkription der vier Riboflavingene wird in erster Linie durch den *ribP1* Promotor und die regulatorische Region am 5' Ende des Operons kontrolliert. Zusätzlich werden die letzten beiden Gene des Operons noch von einem zweiten Promotor und der entsprechenden regulatorischen Region kontrolliert (*ribP2*). Die Funktion des dem Gen *ribH* folgenden offenen Leserahmens *orf2* am 3' Ende des *rib* Operons ist bisher nicht geklärt (Perkins et al. 1999).

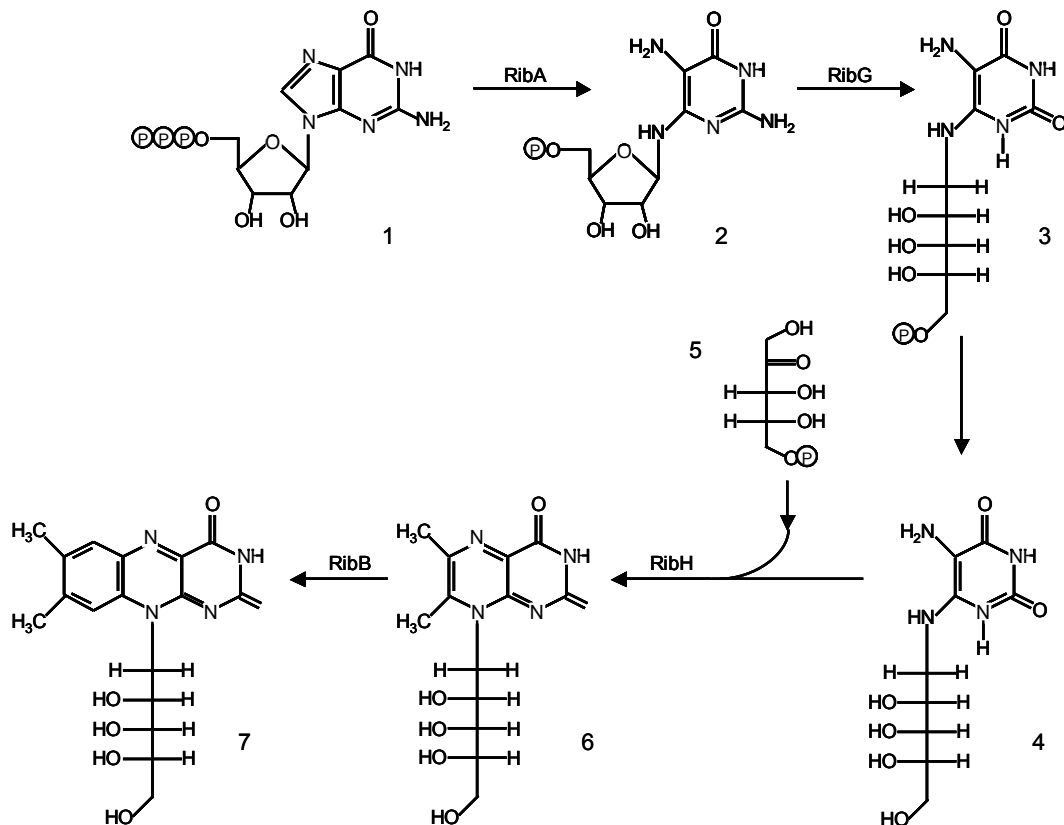


Abbildung 3.6.3: Riboflavinbiosynthese in Bakterien (nach Bacher et al., 2000).

Strukturen: 1: Guanosintriphsphat, 2: 2,5-Diamino-6-Ribosylamino-4(3H)-Pyrimidin-5'-Phosphat, 3: 5-Amino-6-Ribitylamino-2,4(1H,3H)-Pyrimidindion-5'-Phosphat, 4: 5-Amino-6-Ribitylamino-2,4(1H,3H)-Pyrimidindion, 5: Ribulose-5-phosphat, 6: 6,7-Dimethyl-8-Ribityllumazi (DMRL), 7: Riboflavin, Enzyme: RibA: GTP-Cyclohydrolase II, RibG: Riboflavin-Deaminase/Reduktase, RibH: Lumazinsynthase, RibB: Riboflavinsynthase.

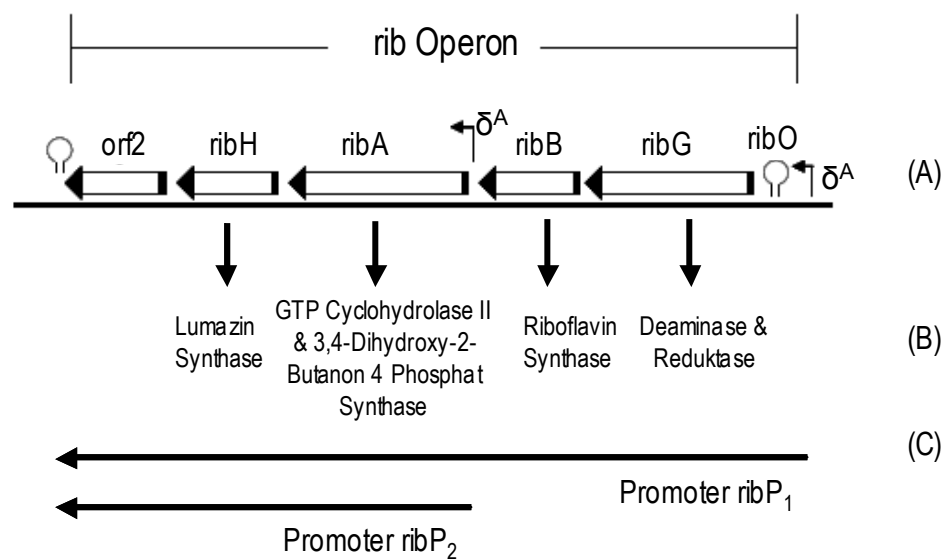


Abbildung 3.6.4: Vereinfachung der Struktur des rib Operons von *Bacillus subtilis* (basierend auf Perkins and Pero, 1993). Im rib Operon befinden sich die vier Gene *ribG*, *ribB*, *ribA* und *ribH* (A), welche die vier Enzyme der Riboflavinbiosynthese (B) darstellen. Die Transkription der Gene wird von den beiden Promotern *ribP1* und *ribP2* (C) kontrolliert.

Außerhalb der beschriebenen *rib* Gruppierung befindet sich ein weiteres wichtiges Gen für die Riboflavinbildung: *ribC* (Mack et al. 1998). Die Expression des *rib* Operons wird durch das *ribC* Gen reguliert. Dieses Gen kodiert eine Flavinkinase, welche das Riboflavin in die biologisch aktiven Cofaktoren Flavinmononukleotid (FMN) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) überführt (Coquard et al. 1997). Es wird allgemein angenommen, dass die Expression des *rib* Operons und des Gens *ribC* von den Flavinnukleotiden FMN und FAD kontrolliert wird.

Sauer et al. (1998) beschreibt, dass das Potential der Biosynthese von Riboflavin in *Bacillus subtilis* sowohl in einer optimierten Prozessführung als auch in einer gentechnischen Modifizierung des Organismus besteht. Im Mittelpunkt steht hier die optimale und effiziente Nutzung der eingesetzten Substrate, die vor allem in Kohlenstofflimitierten Zulaufkulturen erreicht wird. Sauer stellt auch fest, dass für die Produktion von Riboflavin in *Bacillus subtilis* die stoichiometrischen Konstanten die maximale Produktausbeute auf Glucose limitieren. Neben gentechnischen Methoden zur Verbesserung der Verwertung der Kohlenstoffquelle kann der Einsatz von alternativen Kohlenstoffquellen, wie Glycerol und Saccharose, sinnvoll sein, da hierbei die genannten stoichiometrischen Limitationen in anderem Maße oder gar nicht gelten.

### 3.6.3 Gentechnisch veränderte Stämme von *Bacillus subtilis* zur Riboflavinproduktion

Die industrielle Stammentwicklung ist ein zentraler Bestandteil der kommerziellen Entwicklung von Fermentationsprozessen. Nur wenige Verfahren verwenden Wildtypstämme, die direkt aus der Natur isoliert wurden, da die von Wildtypen erreichten Metabolitkonzentrationen meist zu niedrig für einen ökonomischen Nutzung sind. Die sogenannten Produktionsstämme werden an den gewünschten Prozess angepasst, da durch die Optimierung der Prozessbedingungen allein nicht die gewünschte Produktionssteigerung erreicht werden kann. Das Wachstumsverhalten, die Regulierung von biochemischen Stoffwechselwegen und die Produktivität werden letztendlich durch den genetischen Hintergrund der Organismen bestimmt und kontrolliert.

Die Biotechnologie wurde diesbezüglich von den Fortschritten der Genetik in den letzten 30 bis 40 Jahren stark beeinflusst. Früher konnten Stämme nur mit Hilfe der klassischen Mutagenese verändert werden. Heute stehen neben dieser auch zukünftig wichtigen Methode weitere Techniken zur Verfügung, so dass pro- und eukaryotische



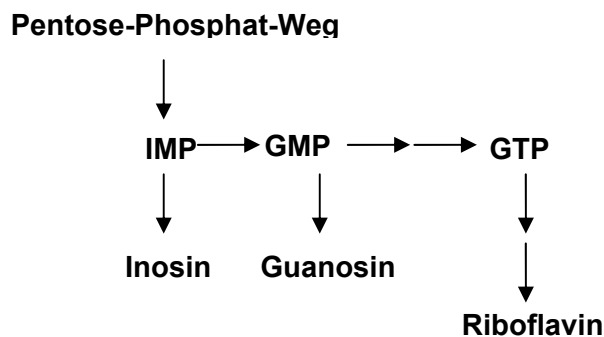
Organismen für spezielle Produktionsprozesse rekombinant hergestellt werden können (Crueger 1993).

Auch *Bacillus* Stämme wurden vielfach genetisch verändert, um ihre Produktivität in den unterschiedlichen Einsatzgebieten zu steigern. Perkins et al. (1999) verwendete die klassische Mutagenese zusammen mit weiteren Methoden der Gentechnik, um kommerziell relevante Riboflavinkonzentrationen mit einem neu *entwickelten Bacillus subtilis* Stamm zu produzieren. Im Folgenden wird eine kurze Zusammenfassung dieser Vorgehensweise gegeben.

### *Klassische Mutagenese*

Die klassische Mutagenese wurde bereits in früheren Arbeiten eingesetzt, um Stämme von verschiedenen *Bacillus*-Spezies zu entwickeln, die signifikante Mengen an Inosin und Guanosen ( $20\text{-}40\text{ g L}^{-1}$ ) produzieren (Debabov 1982). Inosin und Guanosen werden aus Inosinmonophosphat (IMP) gebildet, das gleichsam eines der Zwischenprodukte in der Riboflavinsynthese darstellt und im weiteren Verlauf zu Guanosintriphosphat (GTP) umgesetzt wird (Abb 3.6.5, Bacher et al. 2000).

Aus diesen Gründen wurde zunächst versucht, die Versorgung mit Purin-Precursoren in *Bacillus subtilis* mittels Mutagenese zu verbessern. Hierzu wurden gegen Purin Analoga resistente Stämme selektiert. Mit Hilfe dieser Methode wurde der Kohlenstofffluss zu GTP erhöht und die Umwandlung von IMP zu Andenosinmonophosphat (AMP), dessen Bildung in Konkurrenz zur GTP-Synthese steht, unterbrochen. Ferner wurde



**Abb. 3.6.5 :** Ausschnitt aus dem Purinsynthesenetzwerk von *Bacillus subtilis* (vereinfachte Darstellung nach Sauer et al. 1996). Abkürzungen: Inosinmonophosphat (IMP), Guanosenmonophosphat (GMP), Guanosenriphosphat (GTP).

durch das Riboflavin-Analogon Roseoflavin eine Deregulierung der Gene im *rib* Operon durch Mutation des kontrollierenden Gens *ribC* und mit Methioninsulfoxid (MS) eine Erhöhung des IMP-Levels erreicht. All diese resultierenden Stämme haben ihre Fähigkeit Sporen zu bilden verloren (Perkins et al. 1999).

#### *Genetische Modifikation der Bacillus subtilis Mutante RB50*

Unter Verwendung molekularbiologischer Techniken wurde die Riboflavinproduktion von *Bacillus subtilis* weiter gesteigert. Perkins et al. (1999) konstruierten zunächst ein Plasmid, welches das *rib* operon und eine Antibiotikumresistenz (Chloramphenicol) zur Selektion umfasst. Zusätzlich wurden die natürlichen Promoter *ribP*<sub>1</sub> und *ribP*<sub>2</sub> durch den starken konstitutiven Promoter P<sub>15</sub> ersetzt. Dieser Promoter stammt vom *Bacillus*-Bacteriophagen SP01. Das resultierende Plasmid pRF69 wurde in das Chromosom von *Bacillus subtilis* eingefügt und damit eine Verdoppelung der Gene für die Riboflavinsynthese erreicht.

Es zeigte sich jedoch, dass eine alleinige Vervielfältigung der *rib* Gene nicht für eine Überproduktion von Riboflavin ausreicht, sondern zwingend die zuvor beschriebene *ribC* Mutation erfordert.

Die Riboflavinproduktion wird weiter erhöht, wenn mehr als nur eine Kopie des *rib* Operons in den *Bacillus* Stamm eingefügt wird. Entsprechende Stämme lassen sich über das Erhöhen der Chloramphenicolkonzentration im Medium selektieren. Das Plasmid pRF93 wurde als Derivat des pRF69 Plasmids konzipiert, wobei die Chloramphenicolresistenz gegen eine Tetracyclinresistenz ausgetauscht und einer der P<sub>15</sub>-Promotoren örtlich verschoben wurde.

Die vielfache Integration dieser beiden Plasmide in das Chromosom der Mutante RB50 führt zum *Bacillus* Stamm RB50::[pRF69]n::[pRF93]m. Dieser Stamm produziert bei gleichem Wachstum im Vergleich zum Wildtyp-Stamm (Sauer et al. 1996) signifikant größere Mengen an Riboflavin (14 g L<sup>-1</sup>; Perkins et al. 1999).

Durch die Reduktion des Erhaltungsstoffwechsels mittels ‚metabolic engineering‘ konnte die Riboflavinproduktivität dieses Stammes weiter gesteigert werden. Verglichen mit dem Wildtyp verbrauchte der modifizierte Stamm in Chemostatkulturen trotzdem noch ungefähr 50 % mehr Energie für den Erhaltungsstoffwechsel (Sauer et al. 1996).

Zamboni et al. (2003) berichtet über eine 40%ige Reduktion der benötigten Erhaltungsenergie für eine Cytochrom-Oxidase-Knockout-Mutante von *Bacillus subtilis*

RB50::[pRF69]n::[pRF93]m. Diese Mutante zeichnet sich darüber hinaus durch eine erhöhte Riboflavinproduktion aus.

Laut Hümbelin et al (1999) ist die Expression des *ribA* Gens der die Produktionsrate limitierende Faktor. Das Einfügen einer einzelnen konstitutiv exprimierten Kopie des besagten Gens führt zu einer weiteren Steigerung der Riboflavinsynthese. Mit Glucose konnte so 25% mehr Riboflavinausbeute erreicht werden.

Weitere Modifikationen von *Bacillus subtilis* Stämmen wurden bezüglich des zentralen Kohlenstoffwechsels vorgenommen. Ein Schlüsselenzym des nicht-oxidativen Teils des Pentosephosphat-Weges ist die Transketolase. Sie katalysiert die reversible Konversion von Ribose-5-Phosphat und Xylulose-5-Phosphat zu Seduheptulose-7-Phosphat and Glyceraldehyd-3-Phosphat. Darüber hinaus katalysiert dieses Enzym auch die Umsetzung von Fructose-6-Phosphat und Glyceraldehyd-3-Phosphat zu Xylulose-5-Phosphat and Erythrose-4-Phosphat (Kochetov 1982).

Der metabolische Stofffluss in den Riboflavin Stoffwechselweg kann erhöht werden, wenn die intrazelluläre Konzentration von Ribulose-5-Phosphat über oder sehr nah an der Sättigungskonzentration der 3,4-Dihydroxy-2-Butanon-4-Phosphat-Synthase liegt. Von diesem Enzym wird angenommen, dass es limitierend auf die Riboflavinproduktionsrate wirkt. Diese gewünscht hohen Konzentrationen an Ribulose-5-Phosphat können erreicht werden, wenn dieses Metabolit nicht in den zentralen Kohlenstoffwechsel abfließt. In *Bacillus subtilis*-Mutanten wurde nun das Wildtyp-Gen gegen ein Gen ausgetauscht, das für eine modifizierte Transketolase kodiert. Die Transketolase-Mutante weist erhöhte intrazelluläre Konzentrationen von Ribulose-5-Phosphat and Ribose-5-Phosphat auf, welche aber keine Nachteile wie verzögertes Wachstum oder ähnliches aufweisen. Auf diese Weise kann die Riboflavinproduktion weiter verbessert werden (Lehmann 2007).

**Tabelle 3.6.1: Eigenschaften rekombinanter *Bacillus subtilis* Stämme ausgehend von RB50, die durch eine Kombination von klassischer Mutagenese und genetischer Modifikation erreicht wurden.**

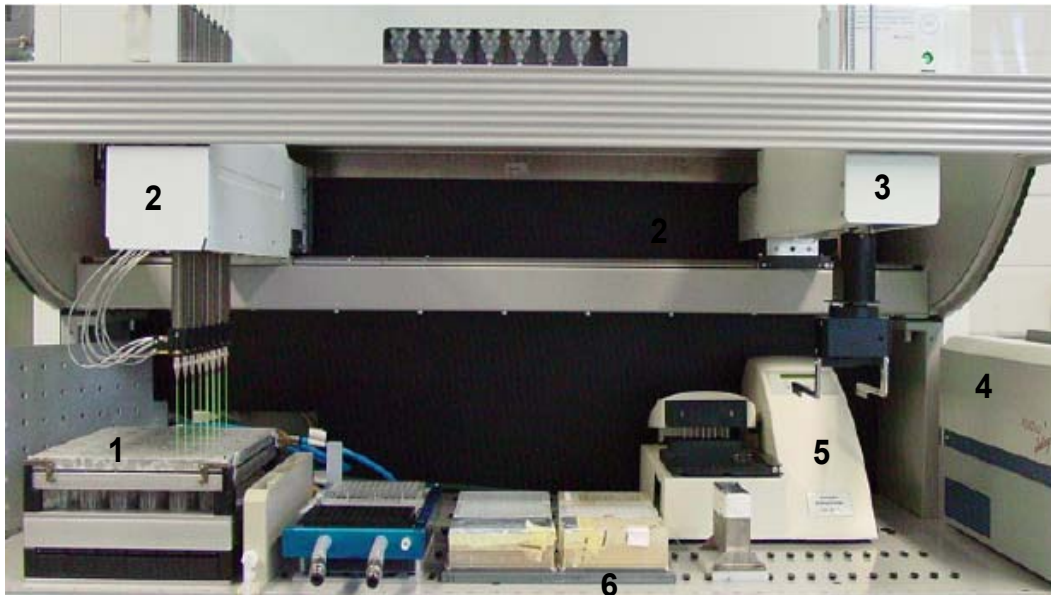
Stamm/ Plasmid	Eigen- schaften	Eigenschaften des Phänotyps	Referenz
<i>Bacillus subtilis</i> RB50	Az <sup>r</sup> -11	Resistenz gegenüber dem Purin-Analogon Azaguanin	Perkins et al. 1999
	Dc <sup>r</sup> -15	Resistenz gegenüber dem Purin-Analogon Decoyinin (GTP Überproduktion)	Perkins et al. 1999
	purA60	Restriktion der Synthese von AMP aus IMP	Perkins et al. 1999
	MS <sup>r</sup>	Resistenz gegenüber Methionin-sulfoxid (Erhöhung des IMP-Levels)	Perkins et al. 1999
	RoF <sup>r</sup> (Mutation in <i>ribC</i> )	Resistenz gegenüber dem Riboflavin-Analogon Roseoflavin (Deregulierung des <i>rib</i> Operons)	Coquard et al. 1997; Mack et al. 1998;
pRF69 (n-fold)	spo0A	Verlust der Sporulation	Perkins et al. 1999
	<i>rib</i> operon	Vier Gene, welche die Biosynthese von Riboflavin kodieren	Perkins et al., 1999
	<i>P15</i>	Starker konstitutiver Promoter	
pRF93 (m-fold)	Cat	Chloramphenicolresistenz	Perkins et al., 1999
	<i>rib</i> operon	Vier Gene, welche die Biosynthese von Riboflavin kodieren	
	<i>P15</i>	Starker konstitutiver Promoter	
BS3103	pRF69 <i>ribA</i>	Überexpression von Genen des Riboflavinbiosyntheseweges <i>ribBA</i> statt <i>ribA</i> (im <i>sacB</i> -locus)	Hümberlin et al. 1999
BS3528	pRF69	Punktmutation in einem Gen des zentralen Kohlenstoffwechsels <i>tkt</i> <sup>R357H</sup>	Lehmann 2007

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Parallele Bioreaktoren

In dem von Puskeiler et al. (2003, International Patent Application PCT EP03/14752) entwickelte Parallelbioreaktorblock werden 48 miniaturisierte Bioreaktoren parallel geschaltet. Jeder dieser Reaktoren besitzt ein magnetisch angetriebenes, gasinduzierendes Rührsystem. Diese Rührer sorgen für eine gleichmäßige Durchmischung und die Dispergierung der Gasphase. Das Arbeitvolumen liegt zwischen 8 und 16 mL und ist damit auch für Zulaufprozesse geeignet. Ein weiterer Vorteil des Systems ist die einfach zu realisierende Automatisierung. Der Bioreaktorblock kann durch einen Pipettierautomaten bedient werden, der individuelle Probenahmen, die Dosierung von Säure und Base zur pH-Kontrolle und Substratzugaben durchführen kann. Dadurch wird die parallele Kultivierung von Mikroorganismen selbst für ein kontrolliertes Zulaufverfahren ermöglicht (Knorr et al. 2007; Puskeiler et al. 2005b). Zur Prozessdatengewinnung können die genommenen Proben *at-line* im System verarbeitet und mit optischen Methoden (Fluoreszenz und Absorption) vermessen werden. Zu den im Prozess integrierten Analyse-Möglichkeiten gehören Bestimmungen des Zellwachstums, der Produktbildung und der Substratkonzentration. Die wichtigen physiologischen Parameter pH und  $pO_2$  können *online* über immobilisierte chemische Sensoren in den Bioreaktoren gemessen werden. Zusätzlich besteht die Möglichkeit den pH *at-line* mittels kommerziell erhältlicher Mikrotiterplatten (Hydroplate 96, Presens GmbH) mit pH-sensitiven Sensorpunkten zu bestimmen.

Die Reaktoren werden über die Sterilabdeckung gleichmäßig mit sterilem Prozessgas versorgt und vor Kontamination geschützt. Die Temperatur im Reaktionsraum und im Kopfraum (Abluftkühlung) der Reaktoren wird jeweils über entsprechende Wärmetauscher eingestellt. Je nach Betriebsbedingungen können für den Sauerstoffübergangskoeffizienten Werte bis über  $0,4 \text{ s}^{-1}$  erreicht werden (Puskeiler 2004). Der Leistungseintrag bei einer Rührerdrehzahl von  $2800 \text{ min}^{-1}$  und einem



**Abbildung 4.1.1: Experimenteller Aufbau mit Parallelbioreaktor: Der Pipettierarm (2) des Laborroboters bedient den Bioreaktorblock (1). Verschiedene Vorlage- und Mikrotiterplatten zur Analytik sind auf der Arbeitsfläche positioniert (3). Der MTP-Greifarm (6) des Laborroboters dient zum Transport der Probenplatten zum MTP-Lesegerät (4) und zur MTP-Waschstation (5).**

Volumen von 11,2 mL wurde mittels einer einphasigen CFD-Simulation zu  $2,9 \text{ WL}^{-1}$  geschätzt (Weuster-Botz et al. 2005). Der experimentelle Aufbau des verwendeten Reaktorsystems besteht aus den folgenden Komponenten (Abbildung 4.1.1):

- Bioreaktorblock
- Einweg-Bioreaktoren
- Laborroboter
- MTP-Lesegerät
- MTP-Waschstation
- Computer mit Robotersoftware Gemini und LabView Routinen zur Systemkontrolle und –steuerung

Daneben werden der Laborroboter und die MTP-Waschstation über einen 150 L Vorratsbehälter für sterilfiltriertes VE-Wasser versorgt. Ein 150 L fassender Abwasserbehälter (beide Schubert Kunststoff GmbH, München) fängt die kontaminierte Spülflüssigkeit auf. Die Temperaturkontrolle und Kühlung des Bioreaktorblocks erfolgt über einen externen Durchlaufkühler (MULTIstar 400 W, Fryka Kältetechnik GmbH, Esslingen) und über ein Heizbad (Gefäß Haake W15 mit Thermostat Haake C 10, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich). Die Versorgung mit Prozessluft wird mittels eines

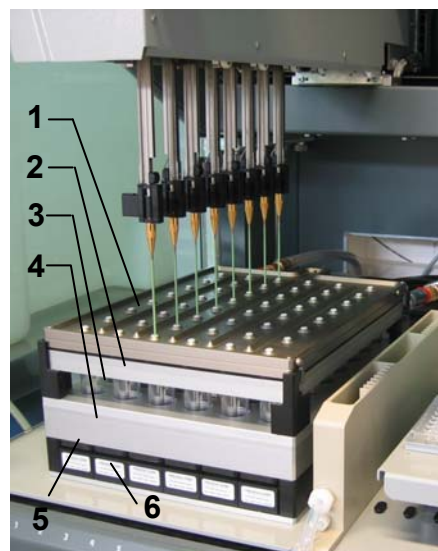
thermischen Massendurchflussregler (Brooks 5850S, Westphal Mess-und Regeltechnik GmbH, Ottobrunn) geregelt.

Der experimentelle Aufbau ist exemplarisch in Abbildung 4.1.1 dargestellt. Die wichtigsten Komponenten werden nachfolgend im Detail erläutert.

#### 4.1.1 Bioreaktorblock

Der Bioreaktorblock besteht aus den Komponenten: Sterilgasabdeckung, Kopfraumkühlung, Reaktorgefäß, Antrieb mit Temperaturkontrolle, Rührerüberwachung (Thermo Oberschleißheim GmbH, Oberschleißheim) sowie der Optosensorik (MultiChannel Reader for pH and oxygen, PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg) zur Messung des pH und  $pO_2$  (Abbildung 4.1.2).

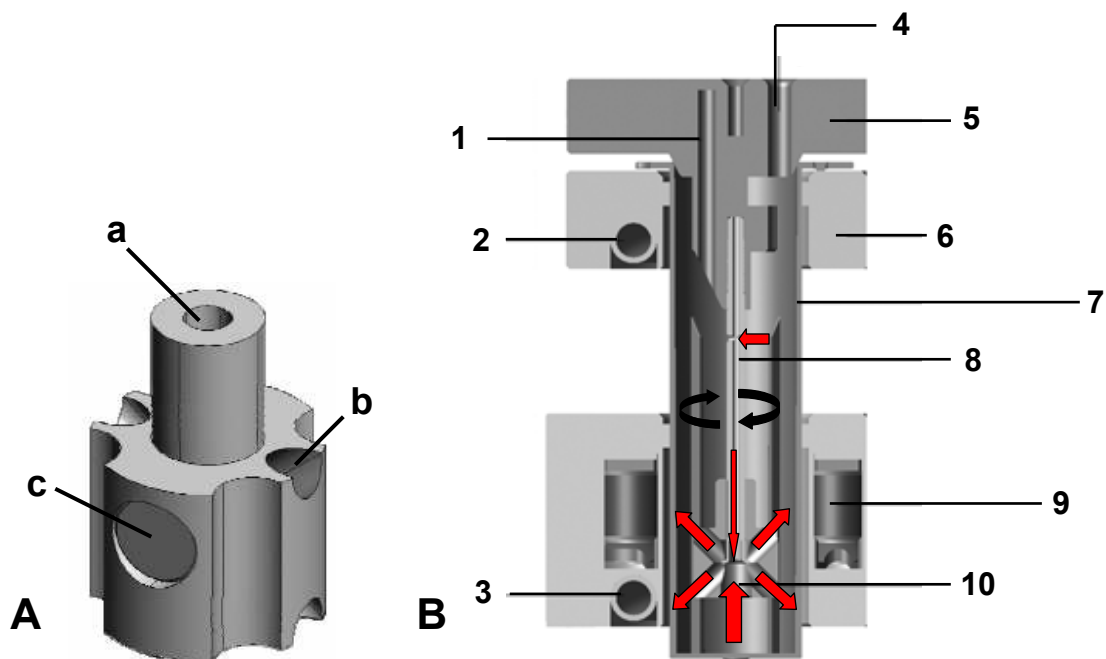
Die 48 Milliliter-Bioreaktoren sind in 8 Reihen mit jeweils 6 Reaktoren angeordnet. Die Reaktoren werden mit einer gemeinsamen Sterilgasabdeckung gegenüber der Umgebung abgedichtet, die zusätzlich zur Gasversorgung der Reaktoren dient. Durch eine Bohrung strömt das sterile Prozessgas zunächst zentral in die Sterilgasabdeckung ein und wird von dort aus in den Kopfraum der Reaktoren eingeleitet. Durch eine weitere Bohrung kann es den Reaktor wieder verlassen. Auf diese Weise wird der Kopfraum eines jeden Reaktors kontinuierlich mit sterilem Gas gespült. Unterhalb der Sterilgasabdeckung befindet sich die Kühleinrichtung des Kopfraumes und der



**Abbildung 4.1.2: Bioreaktorblock (B):** Die Sterilgasabdeckung (1) sitzt auf der Kopfraumkühlung (2) und dichtet die Reaktoren (3) nach außen ab. An dem magnetisch-induktiven Antrieb (4) mit integrierter Temperaturkontrolle der Reaktoren ist die Sensorik für die Rührerüberwachung (5) angebracht. Direkt darunter befindet sich die Optosensorik (6) zur Messung des pH und  $pO_2$ .

Sterilgasabdeckung. Die Kopfraumkühlung hat die Erniedrigung der Ablufttemperatur und damit eine Taupunktabenkung zum Ziel. Die Feuchtigkeit wird aus der Reaktorabluft abgeschieden, was den Verdunstungsverlust erheblich verringert. Der magnetisch-induktive Antrieb des Bioreaktorblocks ermöglicht Rührerdrehzahlen von 500 - 4000  $\text{min}^{-1}$ . Mit Hilfe der Temperaturkontrolle kann die Temperatur im Reaktionsraum eingestellt werden. Der Antrieb, die Temperaturkontrolle sowie die Kopfraumkühlung sind nicht für die einzelnen Reaktoren ansteuerbar. Für einen Parallelversuch können deshalb nur eine gleiche Rührerdrehzahl und Temperatur für alle Reaktoren eingestellt werden.

Das Rührorgan sitzt gleitend gelagert auf der Hohlachse und wird magnetisch induktiv angetrieben (Abbildung 4.1.3). In Rotation versetzt wird das Medium im Inneren des Rührorgans auf Grund der Zentrifugalkraft durch die Diagonalbohrungen ausgeschleudert. Durch die axiale Bohrung an der Unterseite fließt neues Medium nach.



**Abbildung 4.1.3:** (A): Der aus Polyether Ether Keton (PEEK) gefertigte, gasinduzierende Rührer verfügt über eine Laufbuchse (a) zur Aufnahme der Hohlachse, diagonale Querbohrungen (b) zum Austritt des Gas-Flüssigkeitsgemisches sowie eine in der Darstellung nicht sichtbare Bohrung an der Unterseite zum Ansaugen von Flüssigkeit. Die für den Antrieb benötigten Magnete sind in den Vertiefungen (c) untergebracht und ebenfalls mit PEEK verkapselt. (B): Prinzip des gas-induzierenden Rührers (Puskeiler, 2004). Durch die Rotation wird das Gas-Flüssigkeitsgemisch nach außen befördert und zieht neues Gas und neue Flüssigkeit nach. Das Gas stammt aus dem ständig mit Frischluft gefluteten Kopfraum des Reaktors. (1) Gaseinlass, (2) Wärmetauscher Kopfraumkühlung, (3) Wärmetauscher, (4) Gasauslass/ Probenahmeöffnung, (5) Sterilgasabdeckung, (6) Kopfraumkühlung, (7) Bioreaktor, (8) Hohlachse, (9) magnetischer Antrieb, (10) Rührer.



Im Medium, das durch den Rührer strömt, herrscht auf Grund der Fließgeschwindigkeit ein im Vergleich zur Umgebung hydrodynamisch verringerter Druck. Dadurch wird Gas aus der unteren Öffnung der im Inneren des Rührers endenden Achse angesaugt, zusammen mit dem Medium nach außen transportiert und durch die Rotation des Rührkörpers fein dispergiert. Über eine über dem Flüssigkeitsspiegel liegende Querbohrung in der Hohlachse wird kontinuierlich Gas aus dem Kopfraum des Reaktors angesaugt.

#### 4.1.2 Einweg-Bioreaktoren

Die Reaktoren des Milliliter-Bioreaktors sind aus Polystyrol gefertigte, spritzenkörperförmige Einweggefäße. Sie besitzen einen Außendurchmesser von 22,6 mm bei einer Höhe von 86 mm. Der leicht konische Innenraum hat am Boden einen Durchmesser von 20,3 mm. Die vier Strömungsbrecher zeigen eine Höhe von 58,7 mm bei einer Erhebung von 2 mm gegenüber der Reaktorwand. Am Boden der Reaktoren sind von innen chemische Sensoren zur optischen Messung von pH und pO<sub>2</sub> angebracht (PreSens, Regensburg). Die Reaktoren werden zu zwei Stück verpackt, sterilisiert und gebrauchsfertig geliefert (PreSens, Regensburg).



**Abbildung 4.1.4:** Die Einweg-Bioreaktoren (1) werden als Massenartikel im Spritzgussverfahren aus Polystyrol gefertigt. Nach dem Anbringen der Sensorpunkte (2) werden die Reaktoren verpackt (3) und mittels  $\beta$ -Strahlen sterilisiert.

#### 4.1.3 Laborroboter

Bei dem verwendeten Laborroboter handelt es sich um eine Genesis Workstation 150 (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim). Der Roboter verfügt über einen Pipettierarm mit 8 Nadeln mit einem Pipettiervolumen von 0,5 – 480  $\mu$ l. Die Nadeln des Arms können gespreizt und einzeln abgesenkt werden. Zusätzlich ist der Roboter mit einem

Greifarm zum Transport von Mikrotiterplatten ausgestattet. Die direkte Ansteuerung des Roboters erfolgt über die Software Gemini 3.40 SP2 (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim).

## 4.2 pH Messung und Regelung

### 4.2.1 *At-line* pH-Messung

Die *at-line* pH Messung wurde mit der kommerziell erhältlichen *HydroPlate*<sup>®</sup> der PreSens GmbH (Crailsheim) durchgeführt. Bei der *HydroPlate*<sup>®</sup> handelt es sich um eine kommerziell erhältliche Mikrotiterplatte, in der optische pH-Sensoren in den Kavitäten eingelassen sind (Abbildung 4.1.5). Diese Sensoren werden durch den Boden der Platte mit einem Fluoreszenzphotometer ausgelesen. Jeder der Sensoren ist mit zwei kovalent an ein Polymer gebundenen Farbstoffen ausgestattet. Der eine Farbstoff ist der pH-Indikator, der andere dient als Referenz und ist pH unabhängig.

Aus dem Verhältnis der Fluoreszenzen von  $I_{\text{Indikator}}$  (538nm) und  $I_{\text{Referenz}}$  (620nm) ergibt sich der  $I_{\text{Ratio}}$ -Wert. Dieser wird dann mit dem pH korreliert.

$$I_{\text{Ratio}} = \frac{I_{\text{Indikator}}}{I_{\text{Referenz}}}$$

Gleichung 4.1

Um jedem  $I_{\text{Ratio}}$ -Wert einen pH zuordnen zu können, wird eine Sigmoidal-Funktion über eine Sechs-Punkt-Kalibrierung bestimmt. Hierfür wird bei sechs Pufferlösungen mit

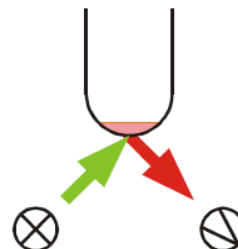
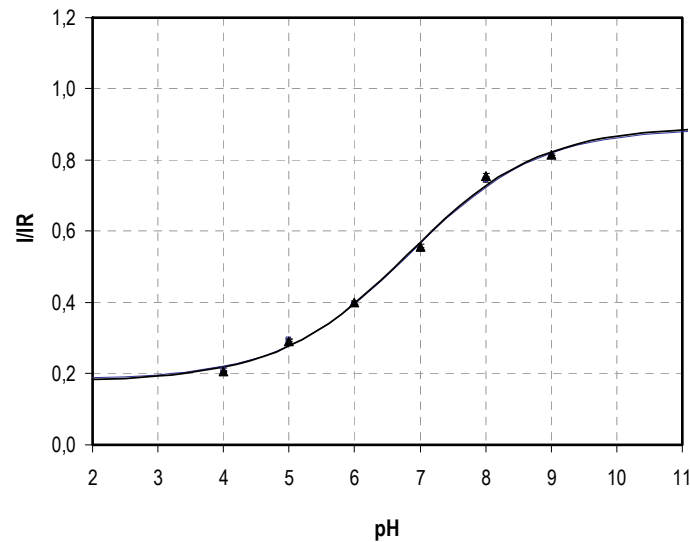


Abbildung 4.1.5: Messprinzip der HydroPlate HP96U (PreSens GmbH). In jeder Kavität ist ein optischer pH-Sensor fixiert. Die Sensoren werden im MTP-Fluoreszenzphotometer ausgelesen.



**Abbildung 4.1.6: Sigmoidal-Funktion der Kalibrierung einer HP96 U (Presens, Regensburg)**

bekanntem pH der  $I_{Ratio}$ -Wert bestimmt. Eine solche Kalibrierkurve ist in Abbildung 4.1.6 dargestellt. Die Gleichung der Sigmoidal-Funktion lautet:

$$pH = \ln \left( \frac{I_{\min} - I_{\max}}{I_{Ratio} - I_{\max}} - 1 \right) \cdot dpH + pH_0 \quad \text{Gleichung 4.2}$$

Unter Verwendung der Solver-Funktion von Microsoft Excel werden die Parameter dieser Sigmoidal-Funktion  $I_{\min}$ ,  $I_{\max}$ ,  $dpH$  und  $pH_0$  so angepasst, dass die Abweichung der Funktion von den Werten der Sechs-Punkt-Kalibrierung möglichst gering ist. Bei der Kalibrierung ist zu beachten, dass sowohl Temperatur, als auch Ionenstärke der Pufferlösungen den Proben entsprechen.

Die *at-line* Messung wird für den Riboflavinprozess alle 30 Minuten ausgeführt. Die Messwerte werden mittels eines Regelalgorithmus mit den Laugezugaben für die pH-Kontrolle korreliert. Hierbei wird auch die vorangegangene Laugezugabe und der vorangegangene pH für die Berechnung der aktuellen Zugabe mit berücksichtigt.

$$V_{base}(t_1) = V_{base}(t_0) + K_P [(pH(t_1) - pH_{set}) + K_D * (pH(t_1) - pH(t_0))] \quad \text{Gleichung 4.3}$$

mit  $V_{base}(t_0)$  Laugenvolumen im vorhergehenden Intervall dosiert  
 $V_{base}(t_1)$  Laugenvolumen im kommenden Intervall dosiert  
 $pH_{set}$  pH Sollwert

$pH(t_0)$	pH im vorhergehenden Intervall gemessen
$pH(t_1)$	pH im aktuellen Intervall gemessen
$K_P$	empirische Konstante (proportionaler Faktor)
$K_D^*$	empirische Konstante (differentieller Faktor)

#### 4.2.2 Online pH-Messung

Bei der Etablierung einer *online* pH Sensorik für den Riboflavinprozess in den miniaturisierten Bioreaktoren wurde eine optosensorische Einheit (MultiChannel Reader for pH and oxygen, PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg) verwendet. Am Reaktorboden sind dazu chemische pH-Sensoren immobilisiert, die mit einem Lichtblitz spezifischer Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt werden. Das Abklingverhalten des Fluoreszenzsignals ist eine Funktion der jeweiligen Analytkonzentration im Reaktor und kann mit den elektronischen Einheiten erfasst und ausgewertet werden. Zur Messung gibt der Hersteller die entsprechenden Daten der herstellerseitigen Kalibrierung an. Diese Kalibrierung ist für alle Reaktoren einer Charge gültig. Für Komplexmedien sollten eigene Kalibrierungen durchgeführt werden.

**Tabelle 4.1.1: Kalibrierdaten der Fluoreszenzsensoren für die online pH Messung.**

Parameter	Puffer bei 37 °C	Medium bei 37 °C	Medium bei 39 °C	vom Hersteller
$I_{min}$	53,84	52,67	53,29	54,77
$I_{max}$	25,35	24,3	24,51	25,31
pH0	6,77	6,77	6,76	6,90
dpH	0,51	0,51	0,5	0,62

#### 4.2.3 Referenzmessung des pH

Als Referenzmethode zur pH-Messung wurde eine pH-Einstabmesskette (Glaselektrode) (N 6000 A, SCHOTT Instruments GmbH, Mainz) an einem pH-Meter (CG 843, SCHOTT Instruments GmbH, Mainz) durchgeführt. Die 96 mm lange und 3 mm dicke Miniatur-Glaselektrode kann durch die Reaktorauslassbohrung bis ins Medium gelangen. Der Roboter muss dazu während der Messung angehalten werden um eine Be-

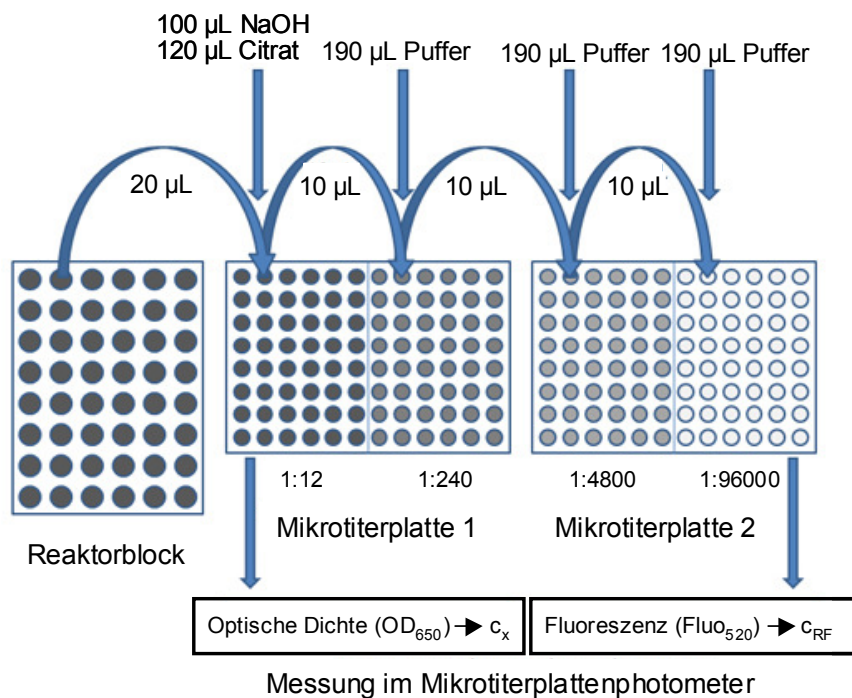
schädigung der Roboternadeln oder der Sonde zu vermeiden. Die Sonde wurde vor der Messung mit 96%-iger Ethanollösung desinfiziert.

### 4.3 *Online* pO<sub>2</sub>-Messung

Bei den Kultivierungen in den miniaturisierten Bioreaktoren wurde der Sauerstoffpartialdruck (pO<sub>2</sub>) mit Hilfe der optosensorischen Einheiten (MultiChannel Reader for pH and oxygen, PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg) gemessen. Auch für diese Messung sind am Boden des Reaktors chemische Sensoren immobilisiert, die hier aber auf Sauerstoff reagieren. Dieselbe elektronischen Einheit wie bei der *online* pH-Messung erfasst das optische Signal wertet es aus (siehe Kapitel 3.2.3). Zur Messung gibt der Hersteller die entsprechenden Daten der herstellerseitigen Kalibrierung an. Diese Kalibrierung ist für alle Reaktoren einer Charge gültig.

### 4.4 *At-line* Analytik für den Bioreaktorblock

Alle drei Stunden werden 20 µL Probe durch den Pipettierarm des Roboters entnommen und auf eine Mikrotiterplatte pipettiert. Die Probe wird anschließend mit 100 µL 1 M NaOH verdünnt. Die Zugabe der Natronlauge löst gebildete Riboflavinkristalle



**Abbildung 4.4.1:** Prinzip der Probenahme aus dem Reaktorblock und der kombinierten *atline* Analytik des Riboflavingehalts und der Zelldichte im MTP-Photometer. Die Probenahme und Zugabe erfolgt durch den Pipettierarm des Roboters.

Nach 2 Minuten wird die Probe mit 120  $\mu\text{L}$  0,3 M Zitronensäure neutralisiert. Die optische Dichte dieser 1:12 verdünnten Proben wird im Mikrotiterplattenphotometer bei  $\lambda = 650 \text{ nm}$  bestimmt. Über weitere Verdünnungsschritte wird durch Natriumphosphatpufferzugabe eine Verdünnung von 1:96.000 erreicht. Das Fluoreszenzphotometer ermittelt anschließend die Fluoreszenz der Proben bei einer Wellenlänge  $\lambda$  von 520 nm.

#### 4.5 Temperaturmessung und Antischaumsensor

Für die individuelle Temperaturmessung wurden Platin-Temperatursensoren in Dünnschichttechnik (DIN EN60751, Heraeus Sensor Technology GmbH, Kleinostheim) eingesetzt. Der verwendete Schaltplan ist in Abbildung 4.5.1 dargestellt. Da die Temperaturmessung am Boden des Reaktors in der Nähe des umlaufenden Magnetfeldes des Rührerantriebs stattfand und dadurch stark beeinflusst ist, wurde ein Breitbandfilter zur Glättung des Ausgangssignals verwendet.

Der Schaumsensor wurde als einfache Lichtschranke mit einer Leuchtdiode (SFH 409, Osram, München) und einem Phototransistor (SFH 309, Osram, München) realisiert. Es wurde der in Abbildung 4.5.2 dargestellte Schaltplan verwendet.

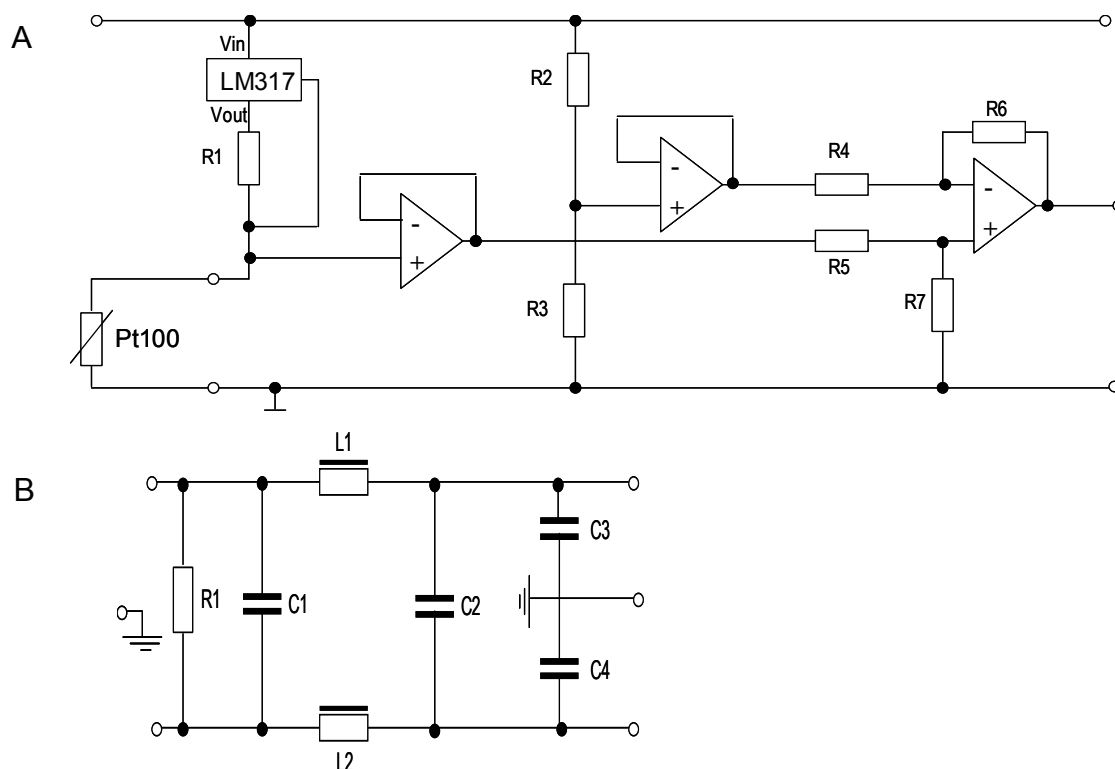
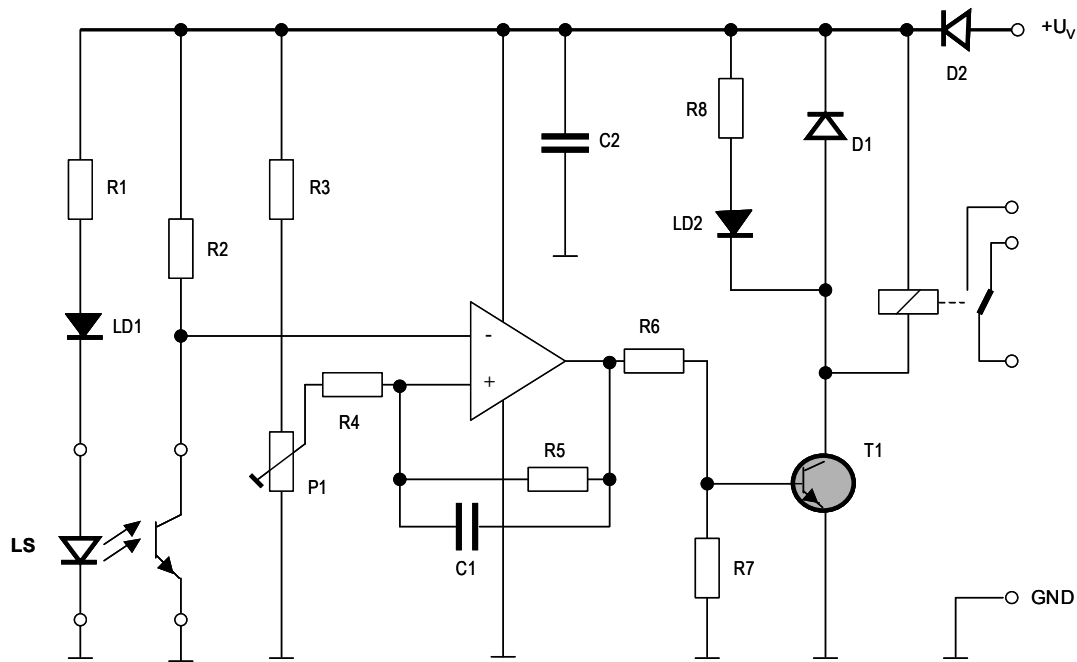


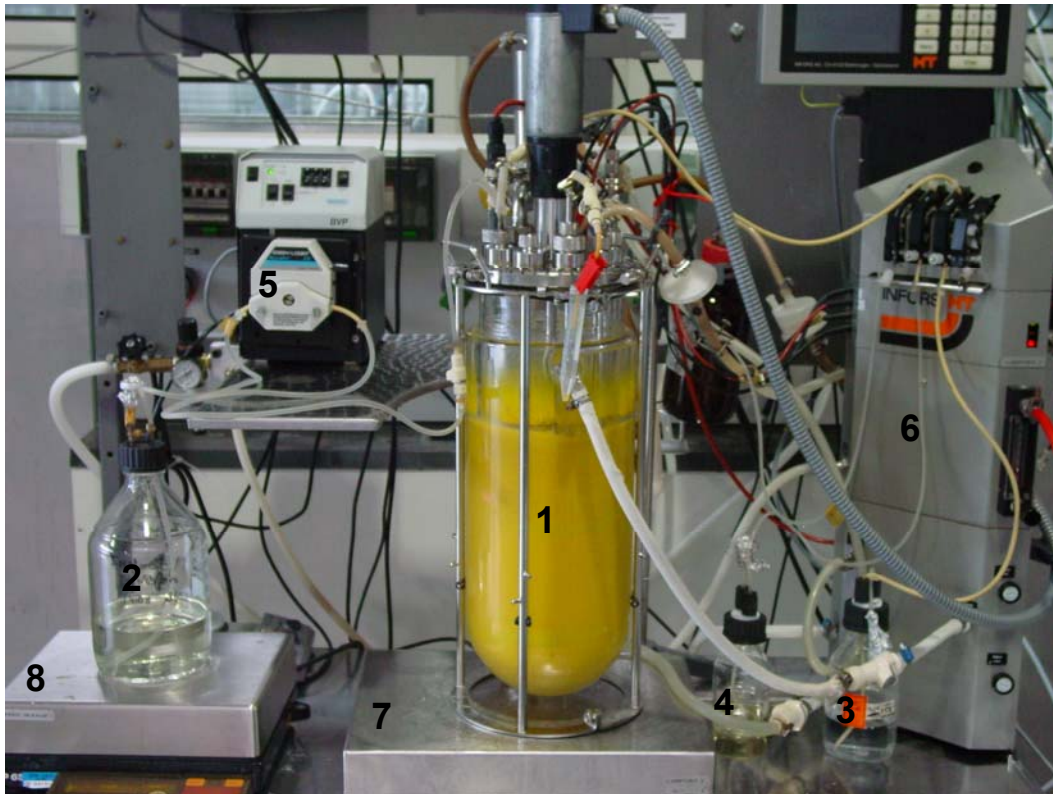
Abbildung 4.5.1: (A) Schaltplan für die Temperaturmessung mit Spannungsregler (LM317), Widerstand (R) und Temperatursensor (Pt100). Zum Glätten des Signals wurde ein Breitbandfilter basierend auf Kondensatoren verwendet (B).



**Abbildung 4.5.2.: Schaltplan zur Lichtschranke für den Antischaumsensor. Eine Leuchtdiode und ein Phototransistor bilden die Lichtschranke. (R) Widerstand, (LD) Leuchtdiode, (P) Potentiometer, (D) Diode, (C) Kondensator, (T) Transistor und (GND) Erdung.**

#### 4.6 Laborbioreaktor

Alle Kultivierungen im Litermaßstab wurden in einem Laborbioreaktor (Labfors, Infors GmbH, Bottmingen) mit einem Nennvolumen von 7,5 L durchgeführt. Der mit drei Rushton-Turbinen ausgestattete Glas-Rührkesselbioreaktor wird mit Wasser über den Doppelmantel beheizt und ist mit Sonden zur Messung von pH, pO<sub>2</sub>, Temperatur und Druck versehen. Er ist auf einer Waage platziert, um während der Zulaufphase das Gesamtgewicht zu überwachen. Das Zulaufmedium ist ebenfalls auf einer Waage platziert und wird mittels einer ansteuerbaren Pumpe in den Reaktor transportiert. Des Weiteren ist eine Base- und Antischaummittelvorlage angeschlossen. Der Laborbioreaktor wird über einen Gasverteiler begast und kann bis zu einem maximalen Überdruck von 0,6 bar betrieben werden. Es ist eine Abgasanalytik angeschlossen um Sauerstoff und Kohlendioxid im Abgasstrom zu analysieren. Der experimentelle Aufbau ist in Abbildung 4.6.1 dargestellt.



**Abbildung 4.6.1:** Versuchsaufbau für den Labormaßstab: (1) 7,5 L Bioreaktor, (2) Zulaufvorlage, (Basevorlage, (4) Antischaummittelvorlage, (5) Zulaufpumpe, (6) Steuerkonsole, (7) Waage, (8) Waage für den Zulauf.

#### 4.7 Statistische Verfahren

Eine übersichtliche Form die in den Parallelexperimenten gewonnen Daten graphisch darzustellen und zu vergleichen, bietet der so genannte „Box-and-Whisker-Plot“ (oder kurz Box Plot). Mehrere Gruppen von Daten werden jeweils anhand von Quantilen zusammengefasst und können so hinsichtlich ihrer Verteilung einfach verglichen werden. Neben der zentralen Lage erhält man ebenfalls einen groben Überblick über die Symmetrie der Verteilungen (Abbildung 4.7.1).

Die „Box“ wird aus dem 25 %-Quantil und dem 75 %-Quantil gebildet. Die untere Linie ist das 25 %-Quantil unterhalb dessen 25 % und darüber 75 % der Werte einer Stichprobe liegen. Die obere Linie ist das 75 %-Quantil unterhalb dessen 75 % der Werte situiert sind. Zwischen diesen beiden Quantilen liegt der Median, der die Mitte oder auch den Schwerpunkt der Werte beschreibt. Das 25 %-Quantil, der Median und das 75 %-Quantil werden auch als Quartile bezeichnet, da sie die Stichprobe in



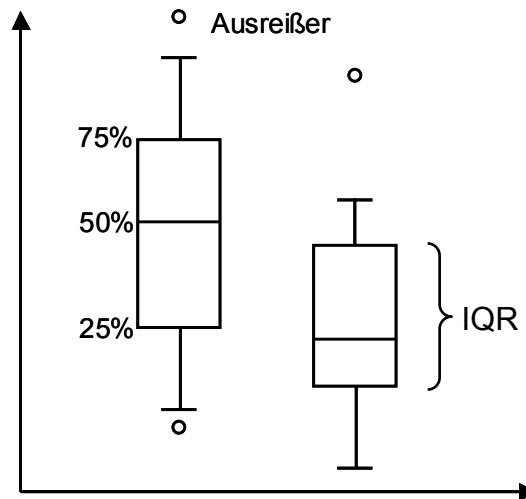


Abbildung 4.7.1: Darstellung eines Box-and-Whisker-Plots.

vier annähernd gleich große Bereiche unterteilen. Der Bereich zwischen dem 25 %- und dem 75 %-Quantil wird Interquartilabstand (IQR) genannt. Die ‚Whiskers‘ (Schnurrhaare) begrenzen zumeist das 10 %- und das 90 %-Quantil. Außerhalb dieses Bereichs liegen die Extremwerte, als Ausreißer bezeichnet, als separate Punkte. Ausreißer sind Daten, deren Wert den 1,5-fachen IQR von der oberen oder unteren Linie der Box entfernt liegt.

Wird der Stichprobenumfang mit  $n$  bezeichnet ist das  $x$  %-Quantil der  $x/100 \cdot n$  kleinste Wert der Stichprobe. Falls dieser Ausdruck einen nicht ganzzahligen Wert ergibt, wird für das  $x$  %-Quantil zumeist der nächst größere Wert der Stichprobe gewählt oder es entsteht durch Interpolation, wenn das Quantil nicht unbedingt ein tatsächlich beobachteter Wert sein muss.

Überschneiden sich die Interquartilabstände der einzelnen ‚Boxen‘ nicht, kann von einem statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ausgegangen werden. Dabei muss allerdings die Homogenität der Varianzen der Modellfehler zwischen den Gruppen gegeben sein. Diese lässt sich graphisch über gleiche Variationsbreiten bestätigen, die im Box Plot durch die Strecke zwischen den ‚Whiskers‘ dargestellt werden. Ebenso sollte das Kriterium der Normalverteilung der Modellfehler innerhalb der Gruppen erfüllt sein. Dies entspricht der Normalverteilung der abhängigen Variablen, die im Box Plot über die Lage des Meridians eingeschätzt werden kann. Liegt der Meridian nicht in der Mitte der Box, ist dies ein Zeichen für eine Schiefe der Daten. Die genannten Voraussetzungen für eine Varianzanalyse müssen durch entsprechende Versuchsplanung und den Stichprobenumfang gewährleistet werden. Die im Bioreaktorblock durchgeführten Versuche bieten entsprechende Voraussetzungen.

Neben der graphischen Auswertung können die Daten auch auf Basis verschiedener statistischer Methoden mathematisch analysiert werden.

Mittels eines Normal Probability Plots (Matlab, The MathWorks Inc., USA) können die im Box Plot gezeigten Daten auf ihre Normalverteilung geprüft werden. Die Varianz innerhalb der Gruppen kann mittels eines ‚Modified-Levene Equal-Variance‘-Tests (Minitab, Minitab Inc., USA) überprüft werden. Unterschiede in den Verteilungen zwischen mehr als zwei Gruppen wurden mittels ANOVA (Matlab) und anschließend dem Post-Hoc Tukey-Test (Tukey honestly significant difference (HSD) test), einem multiplen Vergleichstest, bestimmt (Rudolf und Kulisch, 2008). Das Signifikanzniveau wurde auf  $p \leq 0,05$  festgelegt.

Der Stichprobenumfang für multiple Mittelwertvergleiche kann statistisch abgesichert berechnet werden. Werden bei dem multiplen Vergleich nach Tukey die Stichprobenumfänge der Teilstichproben  $k$  gleich groß gewählt, kann der Stichprobenumfang  $n$  als Lösung der Gleichung 4.4:

$$n = \frac{2 \cdot \left( \frac{q_{k,k(n-1),1-\alpha}}{\sqrt{2}} + t_{k(n-1),1-\beta} \right)^2 \cdot \sigma^2}{\Delta^2} \quad \text{Gleichung 4.4}$$

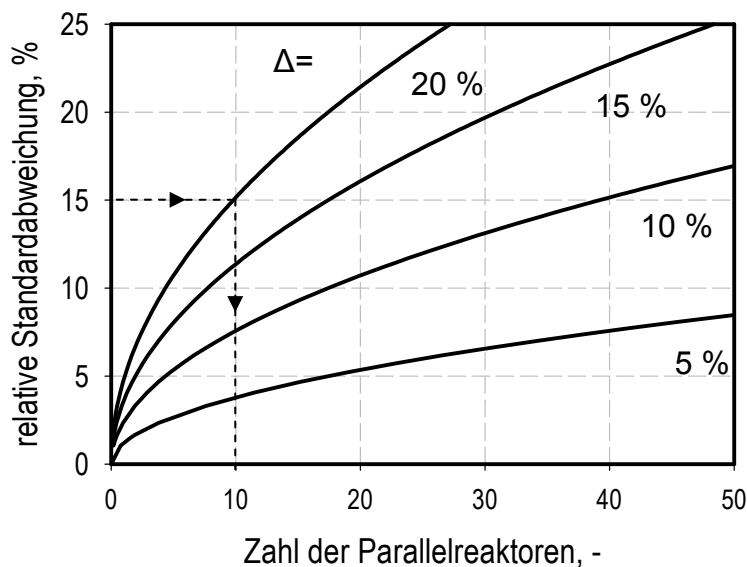
mit	$q_{k,k(n-1),1-\alpha}$	Quantil der studentisierten Spannweite mit Parameter $k$
	$n - k$	Freiheitsgrade der Ordnung $1 - \alpha$ ,
	$t_{k(n-1),1-\beta}$	Quantil der t-Verteilung
	$k \cdot (n - 1)$	Freiheitsgrade der Ordnung $1 - \beta$ .
	$\sigma^2$	mittlerer quadratischen Fehler
	$\Delta$	Differenz der Gruppen

berechnet werden.

Es gelten die Fehlerwahrscheinlichkeiten  $\alpha = 0.05$  und  $\beta = 0.2$ . Die Werte für die Quantile werden entsprechenden Tabellen entnommen (z.B. Rudolf et al. 2008) wobei  $k \cdot (n - 1) = \infty$  gewählt wird.

Die Berechnung des Stichprobenumfangs kann zur Versuchsplanung verwendet werden, wenn die aufzulösende Differenz zwischen den Mittelwerten der Prozessleistung und die relative Standardabweichung der Versuche bekannt sind. In Abbildung 4.7.2

wurde diese Beziehung graphisch dargestellt. Bei bekannter Standardabweichung folgt man der Horizontalen bis zur Kurve der entsprechenden mittleren Differenz der Prozessleistung und fällt das Lot, um die Zahl der benötigten Reaktoren auf der Abszisse abzulesen. Für eine Differenz von 20 % bei einer relativen Standardabweichung der Versuche von 15 % sind beispielweise zehn Reaktoren für die statistisch signifikante Differenzierung zwischen den Gruppen notwendig.



**Abbildung 4.7.2:** Abhängigkeit der Anzahl der Parallelreaktoren von der relativen Standardabweichung der Parallelversuche und dem zwischen zwei Gruppen aufzulösendem Abstand (Unterschied in der Produktionsleistung).

### *Varianzanalyse*

Mit der Varianzanalyse kann der Einfluss von einem oder mehreren Einflussfaktoren auf die abhängige Variable untersucht werden.

Mit der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) wird der Einfluss eines nominalskalierten Merkmals auf die abhängige Variable analysiert. Die Vorgehensweise basiert auf der Quadratsummenzerlegung in Anteile, die durch die Wirkung des Faktors zu erklären sind und Anteile die systemisch bedingt sind. Die Analyse untersucht, ob sich die Erwartungswerte einer metrischen Zufallsvariablen in verschiedenen Gruppen unterscheiden. Anhand der Prüfgrößen des Verfahrens wird analysiert, ob die Varianz zwischen den Gruppen größer ist als die Varianz innerhalb der Gruppe.

### *Plackett-Burman Versuchsplan*

Es handelt sich hierbei um einen speziellen Entwurf eines „two-level partial factorial designs“. Das bedeutet, dass auf zwei Konzentrationsebenen nicht alle möglichen Kombinationen der Medienkomponenten getestet werden, sondern nur einige ausgewählte Zusammensetzungen. Damit reduziert sich der experimentelle Aufwand erheblich. Dieses Design wird häufig dazu verwendet, wichtige Einflussfaktoren zu identifizieren. Allerdings können Interaktionen zwischen den Medienkomponenten nicht betrachtet werden. Bei  $n-1$  Komponenten genügen  $n$  Versuchsläufe um aussagekräftige Ergebnisse zu produzieren.

Der Versuchsplan wurde mittels einer multiplen Regressionsanalyse in Matlab (The MathWorks Inc., USA) ausgewertet, wobei für die X-Matrix die binäre Codierung 1, -1 verwendet wurde.

Die Software Minitab (Minitab Inc., USA), ein kommerzielles Statistikprogramm, kann zusätzlich die Effekte der Variablen berechnen. Mit der Überschreitungswahrscheinlichkeit, dem p-Wert für die jeweilige Komponente, wird dadurch der Einfluss auf die Zielgröße bewertet.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Evaluation der Riboflavinproduktion verschiedener *Bacillus subtilis* Stämme im Parallelexperiment

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden sechs verschiedene, gentechnisch veränderte *Bacillus subtilis* Stämme von DSM NP bereitgestellt und im Parallelansatz bezüglich ihrer Riboflavinproduktion untersucht. Ziel der Evaluation war es, das Parallelsystem des „Bioreaktorblocks“ nach der erfolgreichen Maßstabsverkleinerung des Riboflavinprozesses (Knorr et al. 2007) auf sein Potenzial als Selektions-Werkzeug zu prüfen. Dazu wurden unterschiedliche Produktionsstämme parallel in jeweils einem Versuchslauf in den Milliliter-Reaktoren im Zulaufverfahren kultiviert und Wachstum sowie Riboflavinproduktion verglichen. Die Untersuchungsgrößen waren die Riboflavinausbeute nach 24 und 48 Stunden, die dem finalen Vergleich der Stämme dienen.

Aus prozesstechnischen Gründen wurde das Standardverfahren modifiziert und damit die Glucosekonzentration in Satz- und Zulaufmedium halbiert. Zunächst wird in Kapitel 5.1.1 der verdünnte Referenzprozess dargestellt. In Kapitel 5.1.2 und 5.1.3 werden die Ergebnisse der reaktionstechnischen Untersuchung der verschiedenen Stämme in Bezug auf die Verdünnung, den intermittierenden Zulauf und die Erhöhung der Sauerstoffkonzentration in der Zuluft (vgl. Knorr 2005) präsentiert. Die Evaluation der unterschiedlichen Produktionsstämme wird in Kapitel 5.1.4 gezeigt. Die Untersuchung des Systems fand ihren Abschluss in der Validierung der Ergebnisse im Labormaßstab (Kapitel 5.1.5).

#### 5.1.1 Verdünntes Standardverfahren als Referenzprozess im Millilitermaßstab

Wie schon bei Knorr (2005) beschrieben, kam es bei der Durchführung des Riboflavinherstellungsverfahrens im Millilitermaßstab zu häufigen Ausfällen des Gaseintrags in die Reaktoren. Da sich die Hohlräume vermutlich mit Riboflavinkristallen und Biomasse zusetzten, wurde durch die 50 %ige Verdünnung des Zulaufmediums sowie der Glukosekonzentration im Satzmedium der Feststoffanteil in der Kulturlösung redu-

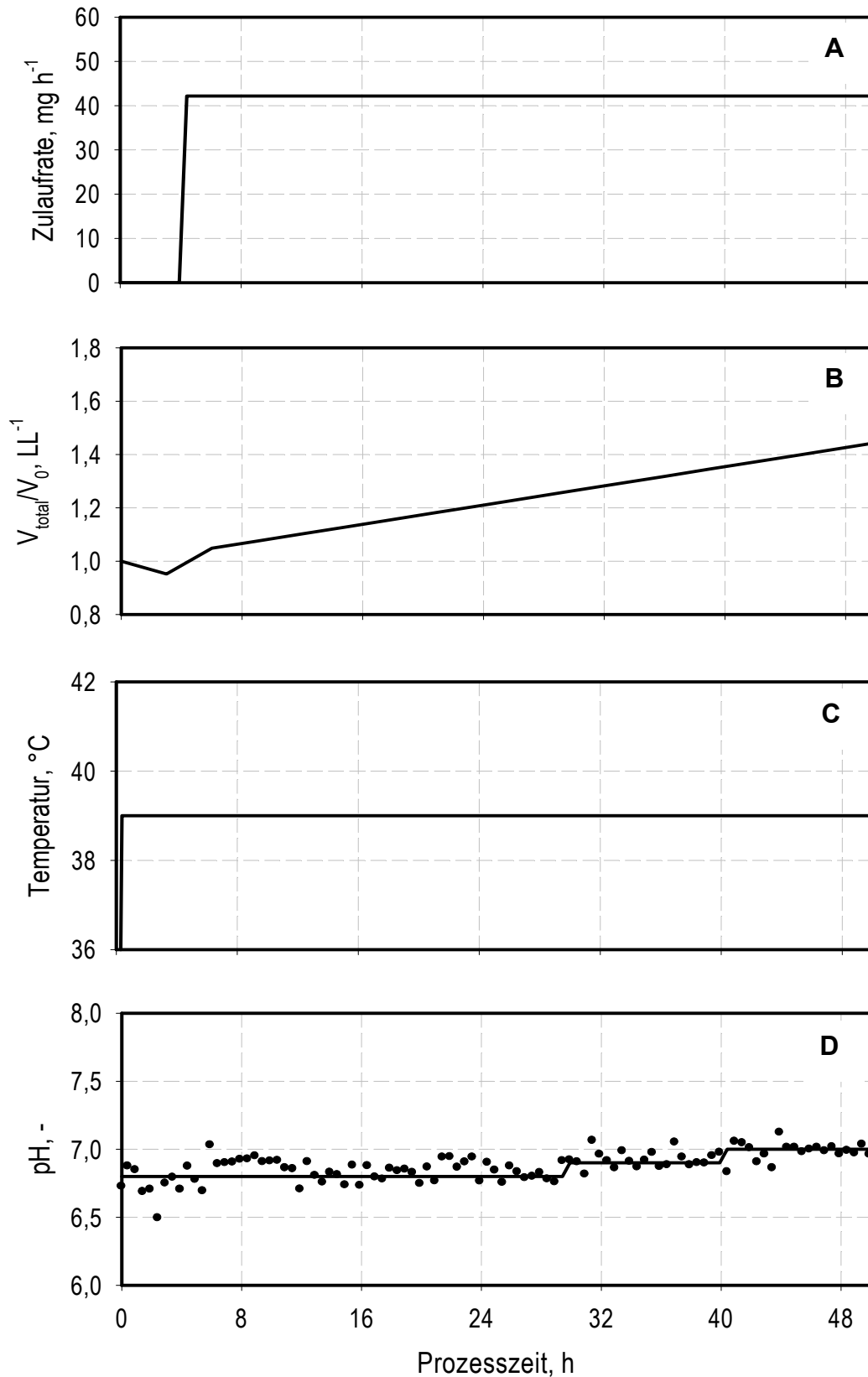
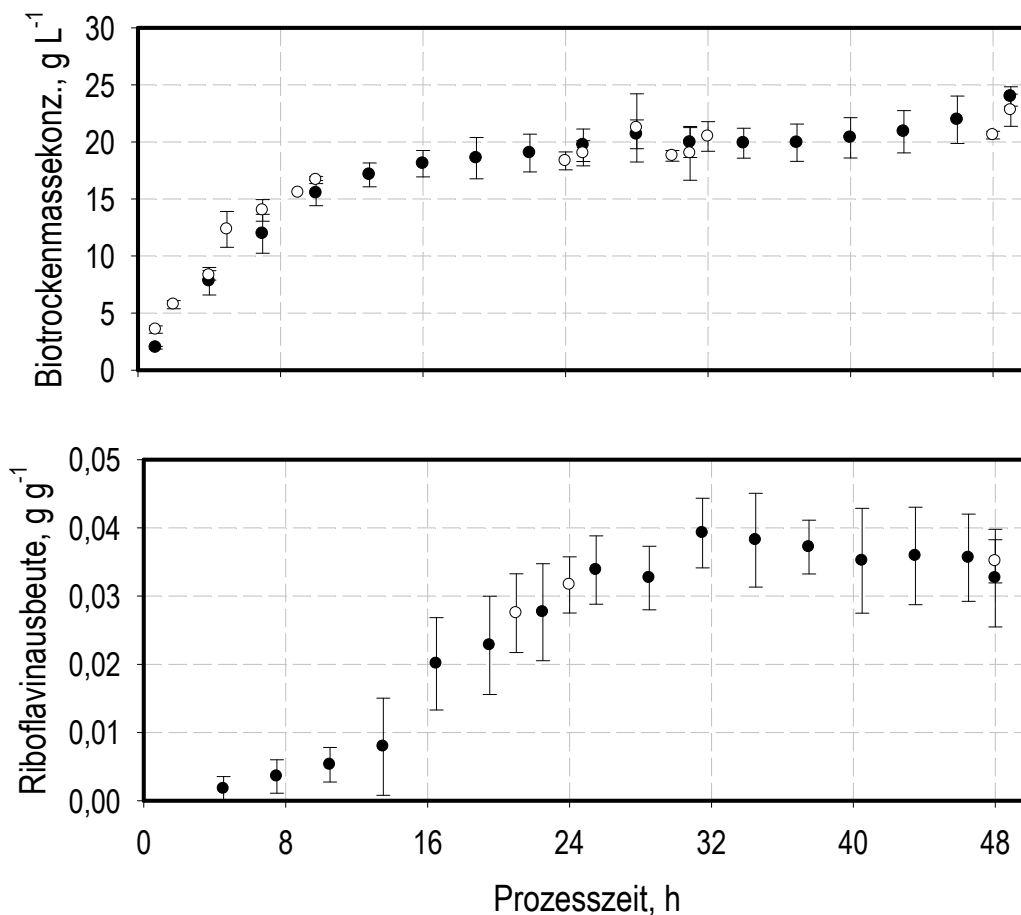


Abbildung 5.1.1: Zulaufrate (A), relative Volumenzunahme (B), Temperatur (C) und pH-Regelung (D) des verdünnten Standardverfahrens zur Riboflavinherstellung. Für die pH-Regelung sind sowohl der Sollwert (—) als auch Messwerte für den tatsächlichen pH (●) gezeigt. Bei der Darstellung der Volumenzunahme sind sowohl die Satzphase, in der in den Milliliterreaktoren das Volumen abnimmt, als auch das Umschalten der Kopfraumkühlung (höhere Verdunstung) während der Zulaufphase zu erkennen.

ziert. Ansonsten wurden die Zustands- und Stellgrößen des Standardprozesses beibehalten (Abbildung 5.1.1). Es ergaben sich für die Milliliter-Reaktoren im verdünnten Ansatz die in Abbildung 5.1.2 gezeigten Verläufe der Biomassekonzentration und Riboflavinausbeute über die Prozesszeit. Wenn nicht anders angegeben, gilt dieser verdünnte Prozess im Folgenden als Referenzprozess.



**Abbildung 5.1.2: Biotrockenmassekonzentration und Riboflavinausbeute für das verdünnte Standardverfahren zur Riboflavinherstellung. Gezeigt wird zum einen die *at-line* Analytik (●) und manuell aufbereitete *offline* Proben (○).**

### 5.1.2 Einfluss der Verdünnung des Standardverfahrens

Die Verdünnung der Glucosekonzentration darf auf die allgemeine Prozessleistung keine Auswirkung haben. Sowohl Riboflavin- als auch Biotrockenmasseausbeute müssen mit dem Standardverfahren vergleichbar sein. In Parallelversuchen wurde deshalb für verschiedene Produktionsstämme des *Bacillus subtilis* der Einfluss der Verdünnung auf die Prozessleistung untersucht. Zum einen wurde die Glucosekonzentration im Satzmedium beibehalten und jeweils eine unverdünnte und eine 1:2 verdünnte Zulauf-

**Tabelle 5.1.1: Parallelversuch zum Einfluss der Glucosekonzentration in Satz- und Zulaufmedium. Es wurden sechs Reaktoren pro Versuchsbedingung verwendet und für zwei Stämme unterschiedliche Kombinationen der Verdünnungen getestet. So wurden in einem Parallelansatz acht verschiedene Bedingungen untersucht.**

Bacillus Stamm	Konzentration Glucose im Satzmedium	Konzentration Zulauflösung	Ansatz
BS3528	100%	100%	1
		50%	2
	50%	100%	3
		50%	4
RB50 ::[pRF69] <sub>n</sub> A	100%	100%	5
		50%	6
	50%	100%	7
		50%	8

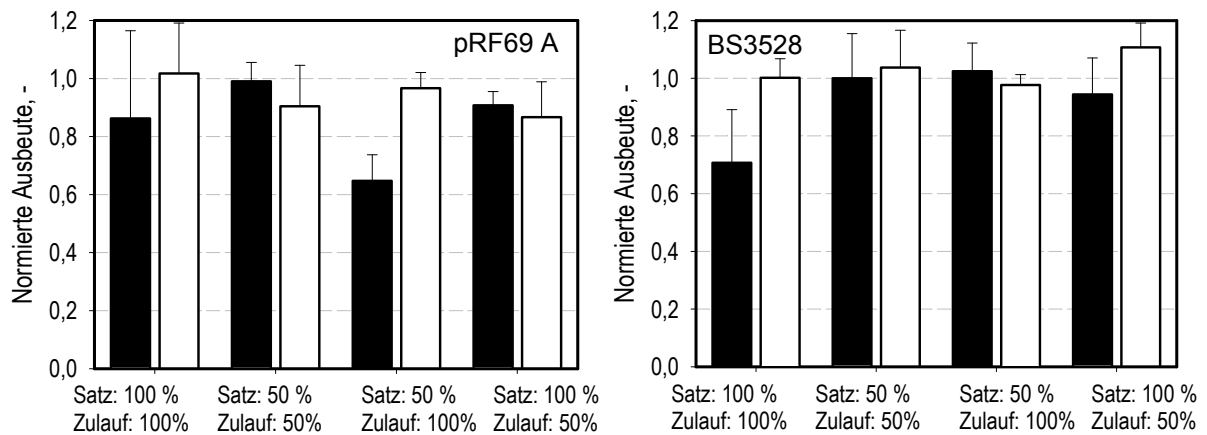
	1	2	3	4	5	6
A	1	1	1	1	1	1
B	2	2	2	2	2	2
C	3	3	3	3	3	3
D	4	4	4	4	4	4
E	5	5	5	5	5	5
F	6	6	6	6	6	6
G	7	7	7	7	7	7
H	8	8	8	8	8	8

lösung zugegeben. Zum anderen wurde die Glucosekonzentration im Satzmedium halbiert und wiederum eine unverdünnte und eine 1:2 verdünnte Zulauflösung zugegeben. Diese Versuche wurden für den Stamm RB50::[pRF69]<sub>n</sub> A und BS3528 durchgeführt, wobei jeweils sechs Reaktoren unter den gleichen Bedingungen kultiviert wurden. Die verschiedenen Versuchsansätze sind in Tabelle 5.1.1 zusammengefasst. Die Ergebnisse für die Biotrockenmasse- sowie die Riboflavinausbeute nach 48 Stunden sind in Abbildung 5.1.3 dargestellt. Die Grafik zeigt, dass für beide Stämme mit einer 50 %igen Glucosekonzentration im Satzmedium und einer 50 %igen Verdünnung der Zulauflösung die Riboflavinproduktion im 6-Liter-Maßstab reproduziert werden kann. Die auf den Referenzprozess im Litermaßstab normierten Riboflavinausbeuten erreichen eine Höhe von 99 %. Die Standardabweichung der Ergebnisse fällt gering aus (relative Standardabweichung: 7 %).

Die Ausgangskonzentration von Satz- und Zulaufmedium führt auch in diesem Experiment zu der bekannt hohen Standardabweichung innerhalb der parallelen Reaktoren (relative Standardabweichung: 32 %). Der Mittelwert der Riboflavinausbeute blieb infolge des in ca. 75% der Reaktoren beeinflussten Gaseintrags deutlich unterhalb des Referenzwertes.

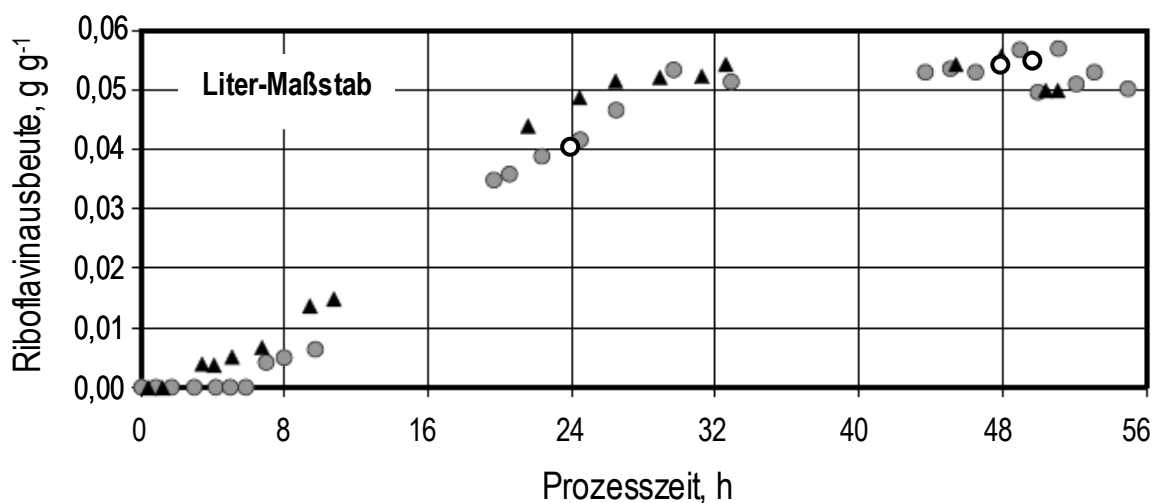
Der Vergleich der erreichten Biomasseausbeute nach 48 Stunden zeigt, dass die Verdünnung der Medien auch hier keinen negativen Einfluss hat. Die Biomasseausbeute liegt zwischen 0,010 – 0,012 g g<sup>-1</sup> und eine Analyse der Daten mittels einer Varianzanalyse (ANOVA) zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Datengruppen.





**Abbildung 5.1.3: Normierte Riboflavin- (schwarze Balken) und Biomasseausbeuten (weiße Balken) nach 48 Stunden für: links RB50::[pRF69]n A, rechts BS3528. für unterschiedliche Glucosekonzentrationen im Satz- (erste Zahl) und Zulaufmedium (zweite Zahl). Referenziert wurde mit den entsprechenden Ausbeuten im Litermaßstab.**

Referenzwert ist die Biomasseausbeute aus einem Experiment im Litermaßstab mit intermittierendem Zulauf. Für den Litermaßstab konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass sich die Halbierung der eingesetzten Glucosekonzentration nicht negativ auf die Riboflavin- und Biomassekonzentration % auswirkt. Die sich bei einer Kultivierung mit 50 % der Ausgangskonzentration der Glucose im Satzmedium und der verdünnten Zulauflösung (kontinuierliche Zugabe) im Litermaßstab ergebenden Riboflavinausbeuten, sind deckungsgleich mit Ergebnissen von Knorr (2005) bei unverdünnter Glucosekonzentration (Abbildung 5.1.4). Auch die Bildung der Biomasse zeigte einen vergleichbaren Verlauf und gleiche Endkonzentrationen (Daten nicht gezeigt).

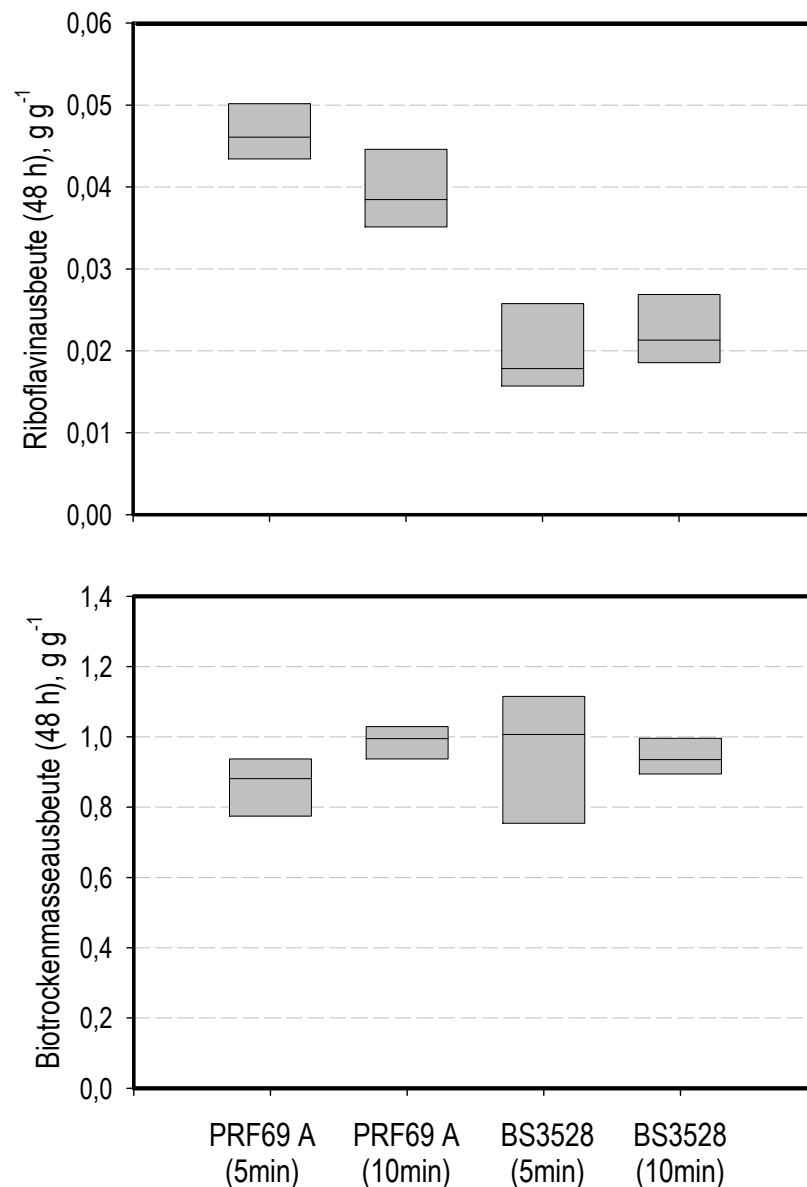


**Abbildung 5.1.4: Vergleich der Riboflavinausbeute im Labormaßstab für zwei Versuche mit 100 %iger Glucosekonzentration ((●) ▲, Knorr 2005) und einem Versuchslauf mit 50 %iger Glucosekonzentration im Satz- und Zulaufmedium (○).**

### 5.1.3 Einfluss der intermittierenden Substratzugabe auf verschiedene Stämme von *Bacillus subtilis*

Es wurde untersucht, ob die während der Maßstabsverkleinerung mit *Bacillus subtilis* RB50::[pRF69]<sub>n</sub> vorgenommene Modifikation des Zulaufs (Knorr et al. 2007) von einer kontinuierlichen zu einer intermittierenden Substratzugabe sowie die Länge des Zugabeintervalls auf alle weiteren *Bacillus* Stämme übertragen werden konnte. Die Länge dieses Intervalls wurde in vorhergehenden Arbeiten auf 10 Minuten festgelegt (Knorr 2005). Diese Intervalllänge ist erforderlich, um die notwendigen Arbeitsschritte wie intermittierende Dosierung, Probenahmen und pH-Kontrolle mit dem Laborroboter für den miniaturisierten Riboflavinprozess durchzuführen. Bei der Maßstabsübertragung hatte dieses Intervall auch im Litermaßstab nachweislich keinen negativen Einfluss auf die Riboflavinproduktion (Knorr 2005).

Die Gültigkeit dieser Annahme konnte auch für weitere Produktionsstämme bestätigt werden. Hierzu wurden im Millilitermaßstab verschiedene Substratzugabeintervalle während der parallelen Kultivierung der *Bacillus* Stämme untersucht. Beispielhaft ist dies für RB50::[pRF69]<sub>n</sub> A und BS3528 in Abbildung 5.1.5 dargestellt. Obwohl der Mittelwert der Riboflavinausbeute für RB50::[pRF69]<sub>n</sub> A im 5-Minuten-Intervall um 14 % höher lag, konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden verglichenen Gruppen festgestellt werden. Auch für BS3528 ließen sich die erreichten Riboflavinausbeuten für die beiden Intervalle (5 und 10 Minuten) nicht statistisch signifikant unterscheiden. Gleiches gilt für die Bildung von Biomasse. Die Biotrockenmasseausbeute nach 48 Stunden zeigte keine Beeinflussung durch die Länge des Zulaufintervalls (Abbildung 5.1.5). Die Tendenz von RB50::[pRF69]<sub>n</sub> A bei einem Zulaufintervall von 5 Minuten mehr Riboflavin zu bilden ist vergleichbar mit den Ergebnissen von Knorr (2005) im Litermaßstab. Dort wurde für RB50::[pRF69]<sub>n</sub> im kürzeren Zulaufintervall eine Steigerung der Riboflavinausbeute von ungefähr 10 % ermittelt. Der Effekt, dass durch die intermittierende Zugabe von Substrat die Sauerstofftransferate der Kultur temporär stark erhöht wird, konnte auch für alle weiteren Stämme beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die bei Knorr (2005) beschriebene Erhöhung des Sauerstoffpartialdrucks in der Zuluft wurde deshalb für die Evaluationsversuche beibehalten. Wie erwartet unterschieden sich die Amplitude und Frequenz der beobachteten Oszillationen für die unterschiedlich langen Zugabeintervalle. Während die maximale und die minimale Sauerstoffkonzentration im Medium für das 10-Minuten-Intervall



**Abbildung 5.1.5: Box Plot zweier unterschiedlicher Produktionsstämme für Riboflavin- und Biomasseausbeute nach 48 Stunden bei verschiedenen Zulaufintervallen. Die verglichenen Gruppen sind als statistisch nicht signifikant unterschiedlich zu werten.**

eine Differenz von 130 Prozent Luftsättigung zeigten, betrug der Unterschied für das 5-Minuten-Intervall nur maximal 65 Prozent Luftsättigung. Die Oszillationen bewegten sich in beiden Fällen in etwa um eine gleich hohe mittlere Sauerstoffkonzentration. Diese Daten lassen darauf schließen, dass die Substrataufnahmerate in den verglichenen Kulturen auf einem ähnlichen Niveau liegt.

Die bereits von Knorr (2005) beschriebene Reduktion der Biomasseausbeute durch eine erhöhte Sauerstoffkonzentration im Zuluftstrom, lässt sich auch für die übrigen

untersuchten *Bacillus* Stämme beobachten. Wurde die Konzentration des Sauerstoffs in der Zuluft gesenkt (54 % auf 34 %) konnte auch in den Milliliter-Reaktoren der Referenzwert von  $0,2 \text{ g g}^{-1}$  für die Biotrockenmasseausbeute (DSM, RB50::[pRF69]<sub>n</sub>) erreicht werden. In diesem Fall war aber die Sauerstoffversorgung zu gering, um die nötige Riboflavinausbeute zu gewährleisten (Daten nicht gezeigt).

#### 5.1.4 Vergleich der Produktionsstämme im Parallelansatz

Für den Vergleich genetisch unterschiedlicher Stämme ergaben sich infolge prozesstechnischer Gründe gewisse Einschränkungen (Abbildung 5.1.2). Weil die Reaktoren in einer Reihe von derselben Roboternadel bedient werden (Zeile 1-6), können bisher bis zu acht verschiedene Stämme (Reihe A-H) in einem Parallelexperiment untersucht werden. Die Roboternadeln werden zwischen den Zugabeschritten aus Zeitgründen nicht desinfiziert und würden Bakterien aus den vorderen Reaktoren in die hinteren verschleppen. Kreuzkontaminationen der Stämme untereinander sind in diesem Prozessschema nicht zu vermeiden (Knorr 2005). Damit stehen pro Stamm mindestens sechs Reaktoren für vergleichende Versuche zur Verfügung. Es wurden sechs unterschiedliche Produktionsstämme evaluiert.

Werden verschiedene Produktionsstämme in einem Parallelexperiment getestet, ist es von Interesse diese auch statistisch signifikant voneinander zu unterscheiden.

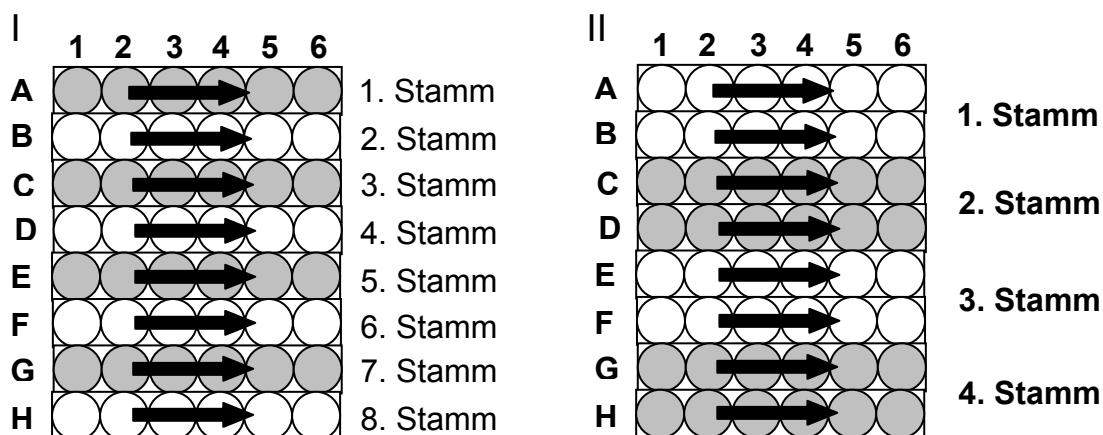
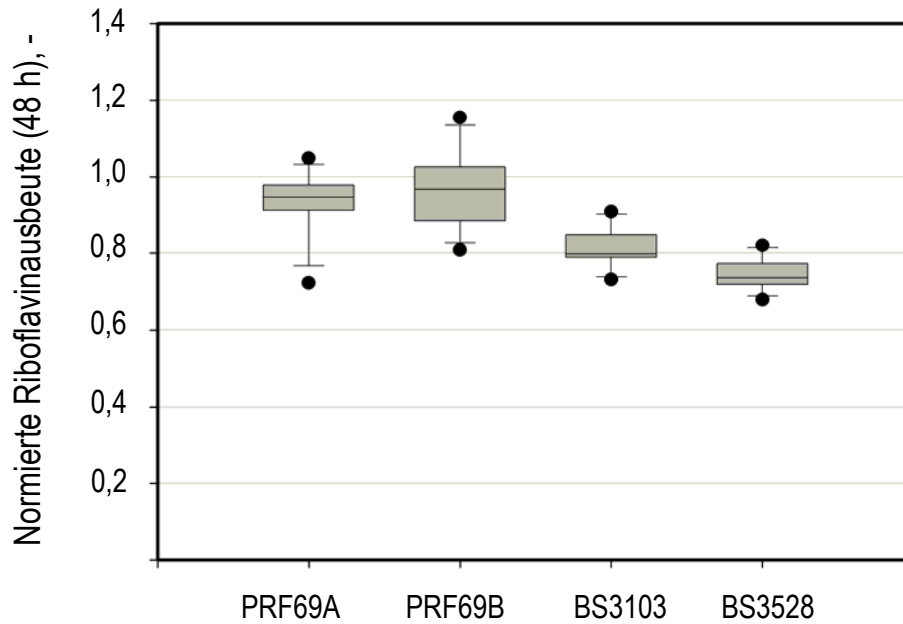


Abbildung 5.1.6: Anordnung der Produktionsstämme in den Parallelexperimenten. (I) Eine Nadel bedient sechs Reaktoren. (II) Um die Genauigkeit der Ergebnisse zu erhöhen, wurden in den Versuchen 12 Reaktoren pro Produktionsstamm verwendet.



**Abbildung 5.1.7:** Box Plot des direkten Vergleichs von vier Produktionsstämmen in einem Parallelexperiment. Es wurden jeweils zwölf Reaktoren für einen Stamm verwendet.

Herausfordernd ist die Differenzierung von Produktionsstämmen, die sich wie vier der verwendeten Stämme, nur geringfügig in ihrer Prozessleistung unterscheiden. Die Reproduzierbarkeit der Versuche und die Anzahl der verwendeten Reaktoren pro Produktionsstamm haben hierbei einen entscheidenden Einfluss auf die Trennschärfe der Differenzierung (vgl Kapitel 4.7). Für die Evaluation der Produktionsstämmen wurden deshalb 12 Reaktoren pro Stamm verwendet (Abbildung 5.1.6). Die Ergebnisse eines solchen Parallelexperiments sind in Abbildung 5.1.7 als Box Plot dargestellt. Es wurden drei genetisch verschiedene Stämme (pRF69A, BS3528, BS3103) und ein weiterer Stamm (pRF69B) untersucht, der aus einer anderen Zelllinie als pRF69A stammt, aber ansonsten mit ihm identisch ist. Im dargestellten Box Plot lassen sich die genetisch verschiedenen Stämme gut voneinander unterscheiden, während die Stämme aus den verschiedenen Zelllinien keinen statistisch signifikanten Unterschied aufweisen.

Die Ergebnisse des HSD-Tests (Tukey-Test) sind in Tabelle 5.1.2 dargestellt. Die statistische Auswertung mittels des HSD-Tests stellt die Hypothese auf, dass sich alle Stämme voneinander unterscheiden lassen bis auf pRF69A von pRF69B und BS3528 von BS3103. Anhand der Daten ist feststellbar, dass nur für diese beiden Paarungen die entsprechende Differenz kleiner ist als die kritische Differenz nach Tukey. Das bedeutet, dass aufgrund der Varianz innerhalb dieser Gruppen, kein statistisch signifikanter Unterschied annehmbar ist. Allerdings ist die empirische Differenz zwischen den

Mittelwerten von BS3103 und BS3528 nur geringfügig kleiner als die kritische Differenz.

Zwei der untersuchten Stämme sollten laut Daten von DSM NP nach 48 Stunden nur geringe Riboflavinausbeuten erreichen ( $0,046 \text{ g g}^{-1}$  und  $0,0285 \text{ g g}^{-1}$ ). In den Versuchen im Millilitermaßstab wurden diese Werte aber weit übertroffen, wobei der Start der überhöhten Riboflavinproduktion deutlich nach dem Beginn der Zulaufphase lag. Weiterführende Experimente zeigten, dass in nicht beimpfte Reaktorenreihen bereits nach 24 Stunden Wachstum und Riboflavinbildung zu beobachten war (Daten nicht gezeigt).

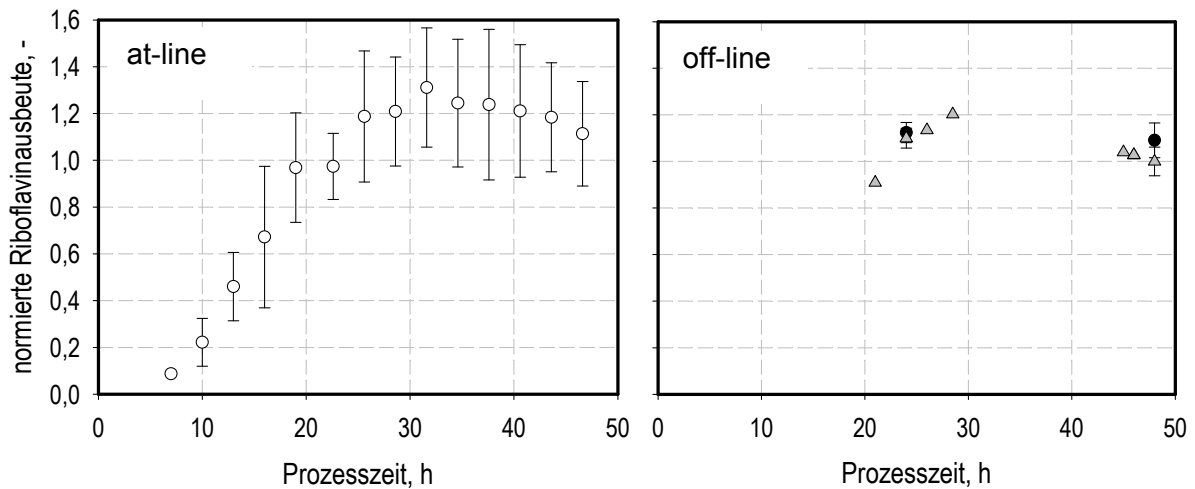
**Tabelle 5.1.2: Tabelle mit den Ergebnissen des Tukey-Tests zur Unterscheidung der im Parallelansatz verglichenen Produktionsstämme.**

Stamm	$\text{g g}^{-1}$	BS3528	BS3103	new	old	kritische Differenz nach Tukey
	Mittelwert	0,0260	0,0284	0,0327	0,0339	<b>0,00342</b>
BS3528	0,0260		0,00241	0,00665	0,00790	
BS3103	0,0284	-	-	0,00424	0,00549	
pRF69A	0,0327	-	-	-	0,00124	
pRF69B	0,0339	-	-	-	-	

### 5.1.5 Maßstabsvergrößerung

Die Ergebnisse, die in den Parallelexperimenten mit miniaturisierten Bioreaktoren erzielt wurden, müssen im Litermaßstab unter Prozessbedingungen (kontinuierlicher Zulauf, Überdruck 0,2-0,6 bar) verifiziert werden. Für die Evaluation der Produktionsstämme wurden vier Stämme für die Maßstabsübertragung in den Litermaßstab ausgewählt.

Beispielhaft ist ein Vergleich der Kultivierung von BS3528 im Milliliter-Maßstab (zwei Versuchsläufe) und im Litermaßstab (drei Versuchsläufe) in Abbildung 5.1.8 gezeigt. Die Riboflavinproduktion beginnt kurz nach Beendigung der Satzphase, die für beide Maßstäbe ungefähr 5 Stunden dauerte. Mittels der *at-line* Analytik wurde für jeden Stamm in 12 Milliliter-Reaktoren pro Versuchslauf die Riboflavinkonzentration bestimmt. Der Mittelwert (○) der errechneten Produktausbeute stimmt mit den Ergebnissen der *offline* Proben nach 24 und 48 Stunden überein (Abbildung 5.1.8 (●)). Allerdings ist der Fehler der *at-line* Analytik sehr groß, so dass *offline* Proben für eine genaue Analyse unabdingbar bleiben. Der Fehler ergibt sich aus der starken Verdünnung der Proben (1:96.000), die notwendig ist, um die Riboflavinkristalle aufzulösen und das



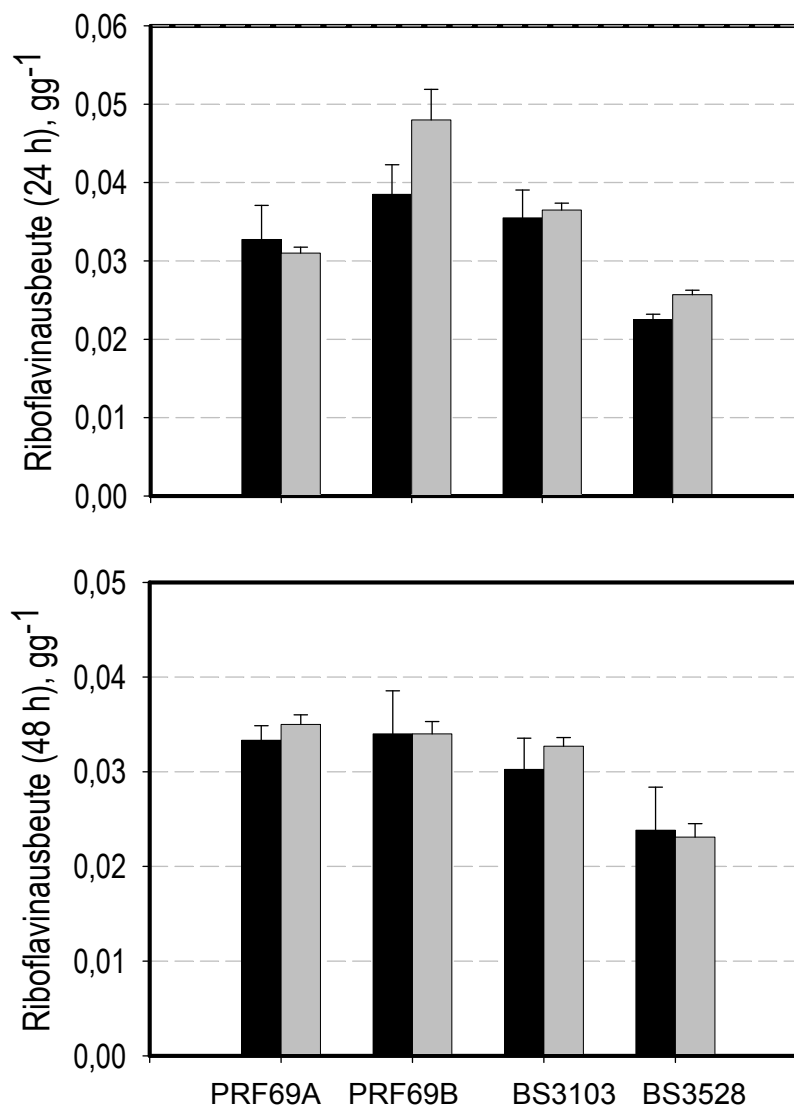
**Abbildung 5.1.8: Vergleich der Riboflavinausbeute für BS3528 in zwei unterschiedlichen Maßstäben.** Zum einen sind die Ergebnisse der at-line Analytik für den Milliliter-Maßstab dargestellt (○). Sie stimmen mit den offline Proben derselben Versuche überein (●). Die Ergebnisse der Versuche im Litermaßstab sind mit grauen Symbolen dargestellt (△). Es lässt sich eine erfolgreiche Maßstabsübertragung erkennen.

stark fluoreszierende Riboflavin in einem konventionellen Photometer über die Fluoreszenz zu messen. Die Verdünnung wird über vier Verdünnungsschritte erreicht, deren geringer einzelner Fehler sich zu einem relativ großen Gesamtfehler summiert. In Abbildung 5.1.8 sind darüber hinaus die Mittelwerte der Riboflavinausbeute nach 24 und 48 Stunden aus drei Kultivierungen sowie der Produktionsverlauf eines einzelnen Versuches im Litermaßstab gezeigt (△). Die Ergebnisse die im Milliliter-Maßstab gewonnen wurden stimmen sehr gut mit den aus dem Litermaßstab stammenden mittleren Riboflavinausbeuten überein.

Die Biomasseausbeute verhält sich wie bereits bei der Maßstabsverkleinerung beobachtet (Knorr 2005). In den Milliliter-Reaktoren wird aufgrund der intermittierenden Dosierung des Zulaufs und dem erhöhten Sauerstoffgehalt der Zuluft ca. 19 % weniger Biomasse gebildet als im Labormaßstab. Für den Stamm BS3528 bedeutet dies, dass die Biomasseausbeute im Milliliter-Maßstab bei  $0,133 \pm 0,00931 \text{ g g}^{-1}$  liegt. Im Litermaßstab wurde eine Ausbeute von  $0,165 \pm 0,0033 \text{ g g}^{-1}$  erreicht.

Ähnliche Ergebnisse konnten für die anderen Stämme beobachtet werden (Abbildung 5.1.9). Nach 24 Stunden ist nur für Stamm pRF69 B die im Milliliter-Maßstab erzielte Riboflavinausbeute niedriger als die zur gleichen Zeit erreichte Ausbeute im Litermaßstab. Dieser Umstand lässt sich auf Ungenauigkeiten bei der Probenahme zurückführen. Die Probenahme nach 24 Stunden wird vom Laborroboter durchgeführt, so dass höhere Abweichungen als bei den manuell gezogenen Proben nach 48 Stunden möglich sind. Für die Riboflavinausbeute nach 48 Stunden lassen sich die Daten für

alle Stämme reproduzieren. Die sequentielle Reproduzierbarkeit ist mit einer maximalen relativen Standardabweichung von 3 - 13 % zufriedenstellend. Bezüglich der Biomasse wird für alle der gezeigten Stämme eine ähnliche Beobachtung gemacht. Die Biomasseausbeute ist in den Milliliter-Reaktoren um 16-19 % gegenüber den Ausbeuten im Labormaßstab (3 L) reduziert (Tabelle 5.1.3).



**Abbildung 5.1.9: Maßstabsübertragung der mittleren Riboflavinausbeute von vier unterschiedlichen Produktionsstämmen nach 24 und 48 Stunden. Es werden die Daten aus dem Milliliter-Maßstab (■) mit den Daten aus dem Litermaßstab (□) verglichen und die Übereinstimmung im Rahmen der Messgenauigkeit gezeigt.**



**Tabelle 5.1.3: Erreichte Biomasseausbeute nach 48 Stunden für die vier miteinander verglichenen Stämme im Labor- und Milliliter-Maßstab.**

Stamm	Milliliter-Maßstab	Litermaßstab (3L)
pRF69 A	0,116 ± 0,0093 g g <sup>-1</sup>	0,156 g g <sup>-1</sup>
pRF69 B	0,14 ± 0,0098 g g <sup>-1</sup>	0,167 g g <sup>-1</sup>
BS3528	0,133 ± 0,0106 g g <sup>-1</sup>	0,165 g g <sup>-1</sup>
BS3103	0,136 ± 0,0109 g g <sup>-1</sup>	0,164 g g <sup>-1</sup>

### 5.1.6 Diskussion

Die Ergebnisse der zwei als niedrig produzierend bekannten Stämme und sowohl Wachstum als auch Produktbildung in nicht beimpften Reaktoren lassen auf eine Kreuzkontamination auch zwischen den Reaktorreihen schließen. Es ist zu vermuten, dass die zu hohen Riboflavinausbeuten durch den Eintrag anderer, höher produzierender Stämme in die betroffenen Reaktoren erreicht wurden. Die Versuche zur Kreuzkontaminationen zeigten, dass sich durch die starke Aerosolbildung des Prozesses eine ausreichende Menge von Organismen in der Luft über dem Reaktorblock befindet, so dass nach dem Waschen feuchte Nadeln diese in die Reaktoren eintragen können. Die gemeinsame Kultivierung und damit der direkte Vergleich niedrig produzierender Stämme mit höher produzierenden Stämmen in einem Parallelversuch war somit nicht möglich.

Der HSD-Test zur mathematischen Unterscheidung von Gruppen stellte - anders als das graphische Verfahren - die Hypothese auf, dass Produktionsstamm BS3528 und BS3103 aufgrund der errechneten kritischen Differenz nicht signifikant unterscheidbar sind. Allerdings war die empirische Differenz zwischen den Mittelwerten von BS3103 und BS3528 nur geringfügig kleiner als die kritische Differenz nach Tukey. Die in den Experimenten erreichte relative Standardabweichung liegt damit nur unwesentlich über der für eine signifikante Unterscheidung der Produktionsstämme notwendigen relativen Standardabweichung. Mit einer leichten Verbesserung der parallelen Reproduzierbarkeit kann auch diese Paarung auf Basis des HSD-Tests signifikant unterschieden werden. Die mittlere Standardabweichung innerhalb der Gruppen, die für diesen Versuch 0,00249 g g<sup>-1</sup> beträgt, müsste auf 0,0017 g g<sup>-1</sup> reduziert werden. Das entspricht einer Reduktion der mittleren relativen Standardabweichung innerhalb der Gruppen, von den bisher erreichten 7,8 % auf unter 5,7 %.

Der HSD-Test lässt sich darüber hinaus verwenden, um die für einen Versuch nötige Anzahl von Parallelreaktoren zu bestimmen. Diese ist abhängig von der aufzulösenden Differenz der Produktionsleistung der Stämme und der relativen Standardabweichung der Experimente. Bei bekannten Größen wird es dadurch möglich vor der Durchführung der Experimente die notwendige Anzahl der Reaktoren, den Stichprobenumfang, zu berechnen. Um das vorliegende Ergebnis bei gleicher Standardabweichung zu verbessern, sind jeweils 26 Reaktoren für die beiden Produktionsstämme nötig, um sie statistisch signifikant voneinander zu unterscheiden. Da das Ziel ist, möglichst wenig Reaktoren pro Gruppe zu verwenden, um möglichst viele Bedingungen gleichzeitig zu testen, ist in diesem Zusammenhang die Reproduzierbarkeit der Experimente zu verbessern.

Die Stämme pRF69A und pRF69B können mit ziemlicher Sicherheit nicht unterschieden werden, weil ihre Ergebnisse zu dicht beieinander liegen. Weder die nötige Anzahl an Reaktoren pro Gruppe noch das Erreichen einer entsprechenden Standardabweichung innerhalb eines Versuches sind realistisch.

Neben der Etablierung eines verdünnten Standardverfahrens, um das Auftreten durch Feststoffe zugesetzter Hohlachsen zu vermeiden, ergaben die Versuche mit verdünnter Glucosekonzentration Hinweise auf ein Optimierungspotential hinsichtlich der Zulauftrate für *BS3528*. Dieser Stamm zeigt eine Verbesserung der Riboflavinausbeute, wenn bei einer reduzierten Glucosekonzentration im Satzmedium die Glucosekonzentration im Zulauf beibehalten wurde. In anderen Fällen führt diese Kombination zu einer reduzierten Riboflavinproduktion, weil sich in der Zulaufphase zu hohe Glucosekonzentrationen ergeben, welche die Riboflavinproduktion aufgrund eines sich einstellenden Überflussmetabolismus unterbinden.

## **5.2 Optimierung des Satzmediums zur Riboflavinproduktion im Zulaufverfahren**

Als weitere Anwendung des parallelen Reaktorsystems sollte die Optimierung des für den Riboflavinprozess verwendeten industriellen Satzmediums im Zulaufverfahren durchgeführt werden.

Das Satzmedium wird seit vielen Jahren für den industriellen Produktionsprozess verwendet und wurde bereits mehrfach optimiert (Roche Vitamines, DSM NP). Da sich die Optimierung mit genetischen Algorithmen zur experimentellen Versuchsplanung auch in solchen Fällen längst schon als erfolgreich erwiesen hat, wurde zur Versuchspla-

nung die Software GAME.opt, basierend auf einem Genetischen Algorithmus zur mehrdimensionalen experimentellen Optimierung, verwendet. Es wird von der Möglichkeit Gebrauch gemacht, innerhalb weniger Experimente einen großen Variablenraum nach potentiell besseren Medienzusammensetzungen zu durchsuchen. Dabei sollen die Konzentrationsbereiche der gewählten Variablen möglichst weit gesteckt werden, um eine großflächige Suche zu ermöglichen. Da die Anzahl der untersuchten Variablen aufgrund des zu minimierenden experimentellen Aufwands so gering wie möglich gehalten werden sollen, wurden Voruntersuchungen durchgeführt. Zunächst wurden die bisherigen Bestandteile des Mediums in Hinblick auf die einflussreichsten Komponenten geprüft (Kapitel 5.2.1). Danach wurden zusätzliche und austauschbare Stickstoffquellen, Kohlenstoffquellen und weitere Medienkomponenten geprüft (Kapitel 5.2.2). Es folgte die Optimierung des Satzmediums mit dem genannten Genetischen Algorithmus zur experimentellen Versuchsplanung (Kapitel 5.2.3, Kapitel 5.2.4). Die Untersuchungen wurden mit der Validierung und der Übertragung der Optimierungsergebnisse in den Litermaßstab abgeschlossen (Kapitel 5.2.5).

### 5.2.1 Evaluierung der bisherigen Mediumskomponenten

Für die Evaluierung der Mediumskomponenten wurde ein Plackett-Burman-Versuchsplan verwendet. Damit wurde eine lineare Abhängigkeit der Antwortfunktion  $R$  von den untersuchten Mediumskomponenten  $X$  angenommen. Potentielle Wechselwirkungen zwischen den Komponenten wurden vernachlässigt:

$$R = b_1 X_1 + b_2 X_2 + \dots + b_n X_n + m$$

**Gleichung 5.1**

Es wurde ein Versuchsplan für 11 Mediumskomponenten mit dem Ausgangsmedium als sogenanntem zentralem Punkt (‘center point’) gewählt, um den experimentellen Fehler der Versuche zu berücksichtigen. Es wurden zwei Konzentrationsniveaus bestimmt, die symmetrisch um diesen zentralen Punkt verteilt liegen. Das Niveau ‘-1’ liegt bei 50 % der Ausgangskonzentration, das Niveau ‘+1’ bei 150 %.

Vorversuche mit einer 50 %igen Konzentration des Ausgangsmediums zeigten bereits Einschränkungen der Riboflavinausbeute (Kapitel 4.1.2), die auf eine Substratlimitierung hinwiesen. Dies ließ den ausgewählten zu untersuchenden Konzentrationsbereich als ausreichend groß erscheinen, um prinzipielle lineare Effekte der Medienbe-

standteile auf die Riboflavinproduktion zu identifizieren. Der vollständige Versuchsplan ist im Anhang dargestellt.

Um die statistische Aussagekraft der Experimente zu erhöhen, wurde jedes Medium in sechs Reaktoren untersucht. Jeder Parallelversuch bezog das Ausgangsmedium mit ein, so dass eine Beurteilung der sequentiellen Reproduzierbarkeit erfolgen konnte.

Bei der Auswertung der Ergebnisse mit den beiden Statistikprogrammen Minitab und Matlab wurden die gleichen Koeffizienten für die Geradengleichung erhalten (Tabelle 5.2.1). Die Komponenten

- Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ),
- Dikaliumhydrogenphosphat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ),
- Ammoniumchlorid ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ),
- Hefeextrakt,
- und Eisensulfat-Heptahydrat ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )

weisen alle eine Überschreitungswahrscheinlichkeit (p-Wert) kleiner  $\alpha = 0,05$  auf (siehe Tabelle 5.2.1) und zeigen damit einen signifikanten Einfluss auf die Riboflavinproduktion.

Anhand der mit der Software Minitab erhaltenen Werte für die Effekte kann der Einfluss der jeweiligen Komponente weiter abgeschätzt werden. So ergibt sich für die Phosphatsalze ein relativ großer Effekt in positive Richtung. Eine alleinige Erhöhung dieser Komponenten im Medium sollte demnach einen stark positiven Einfluss auf die Riboflavinbildung haben. Für Ammoniumchlorid ergibt sich ein stark negativer Effekt. Die Konzentration dieser Komponente könnte demzufolge im Medium erheblich reduziert werden. Für Hefeextrakt und Eisensulfat-Heptahydrat ergeben sich leichte Effekte in negative Richtung. Auch hier könnte eine Reduktion der Komponenten im Medium empfehlenswert sein.

Die Koeffizienten der Geradengleichung könnten theoretisch dazu verwendet werden, um die Riboflavinausbeute für unterschiedliche Medien vorauszusagen. Eine Validierung des Regressionsmodells zeigte aber, dass in dem vorliegenden Fall nicht von linearen Zusammenhängen ausgegangen werden kann. Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  der vorliegenden Geradengleichung, ein Parameter für die Güte des Regressionsmodells, wird zu 0,9896 berechnet. Die errechnete Überschreitungswahrscheinlichkeit  $p = 0,2594$  weist das verwendete Modell als nicht signifikant aus ( $> \alpha = 0,05$ ).

**Tabelle 5.2.1: Ergebnisse der Analyse des Plackett-Burman-Designs. Als linear einflussreiche Medienkomponenten konnten  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{CL}$ , Hefeextrakt und  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  identifiziert werden. Für diese Komponenten ist die Überschreitungswahrscheinlichkeit kleiner als die Irrtumswahrscheinlichkeit.**

Variable	Effekt	Koeffizient ( $b_1$ - $b_n$ )	t-Wert	p-Wert Signifikanzniveau: $\alpha = 0,05$
Konstante		2,7696	64,12	0,000
Natrium-Glutamat	0,0983	0,0492	1,14	0,262
<b><math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math></b>	<b>0,4758</b>	0,2379	5,51	<b>0,000</b>
<b><math>\text{K}_2\text{HPO}_4</math></b>	<b>0,2683</b>	0,1342	3,11	<b>0,004</b>
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ * 12 $\text{H}_2\text{O}$	0,0033	0,0017	0,04	0,969
<b><math>\text{NH}_4\text{CL}</math></b>	<b>-0,3283</b>	-0,1642	-3,80	<b>0,000</b>
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,1383	0,0692	1,60	0,117
<b>Hefeextrakt</b>	<b>-0,1808</b>	-0,0904	-2,09	<b>0,043</b>
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	-0,0225	-0,0112	-0,26	0,796
Spurenelemente	0,0900	0,0450	1,04	0,304
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ / $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	-0,0250	-0,0125	-0,29	0,774
<b><math>\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}</math></b>	<b>-0,2133</b>	-0,1067	-2,47	<b>0,018</b>
ZtrPkt		-0,1346	-0,86	0,393

Der lineare Zusammenhang ohne Berücksichtigung von Wechselwirkungen zwischen den Mediumskomponenten kann daher nicht zur modellhaften Berechnung der Riboflavinausbeute herangezogen werden.

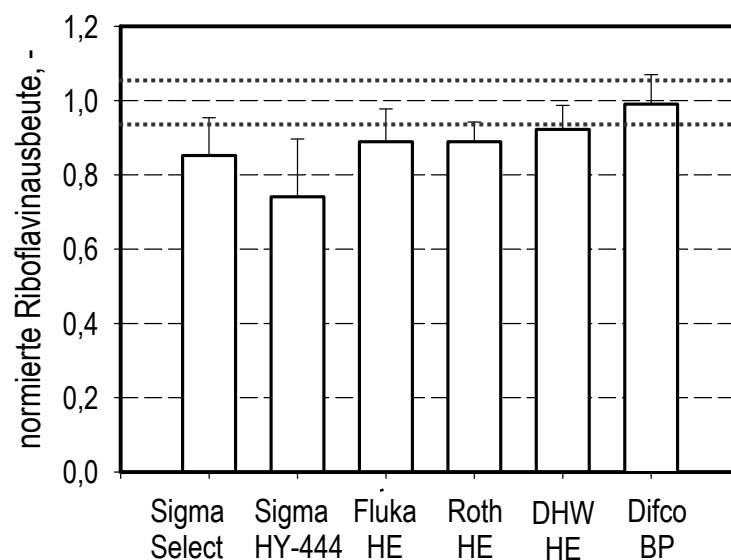
Bei der Beurteilung der Ergebnisse des verwendeten Versuchsplans ist ebenfalls die Reproduzierbarkeit der Versuche zu berücksichtigen. Die sequentielle Reproduzierbarkeit erwies sich anhand der mehrfach durchgeführten ‚center point‘- Versuche als mäßig gut. Die Mittelwerte der aufeinanderfolgenden Parallelversuche mit jeweils sechs Reaktoren wiesen relative Standardabweichungen von bis zu 16 % auf. Die Wiederholung einiger Versuchsansätze des Plackett-Burman-Versuchsplans zeigte bis zu 8 % relative Standardabweichung zwischen aufeinanderfolgenden Experimenten. Die Reproduzierbarkeit eines Parallelansatzes ist mit relativen Standardabweichungen

zwischen 7-17 % (durchschnittlich 11 %) ebenfalls als gerade noch zufriedenstellend zu bewerten.

### 5.2.2 Identifikation neuer Mediumskomponenten

Mittels dem Austausch einer Komponente gegen ähnliche, bisher noch nicht verwendete Komponenten bzw. Produkte eines anderen Herstellers, wurde der bislang im Ausgangsmedium verwendete Hefeextrakt untersucht. Dieser wurde durch 5 Hefeextrakte anderer Hersteller und Qualität (Sigma select, SIGMA HY-444, Fluka, Roth, Deutsche Hefewerke) sowie durch ein Pepton (Difco Bactopepton) ersetzt. Dabei wurde auf eine Äquivalenz des Stickstoffgehalts geachtet (ungefähr 10,5 %).

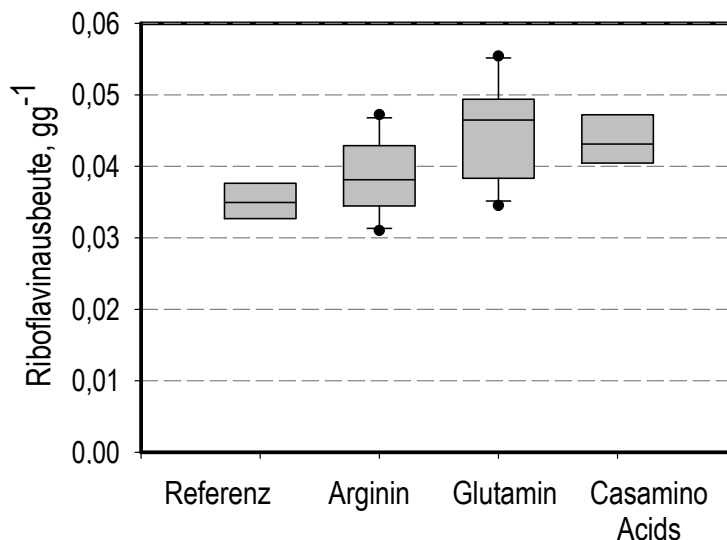
Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 5.2.1 dargestellt. Die Daten stammen aus verschiedenen Parallelexperimenten, wobei jeweils sechs Reaktoren zur Berechnung des dargestellten Mittelwertes der Riboflavinausbeute herangezogen lineare wurden. Um die Ergebnisse verschiedener Parallelversuche vergleichbar zu halten, wurden die Riboflavinausbeuten auf die Ausbeute des Referenzmediums bezogen, das in ebenfalls sechs Reaktoren in jedem Parallelversuch mitgeführt wurde. Es zeigt



**Abbildung 5.2.1: Ergebnisse für den Austausch der Stickstoffquelle Hefeextrakt (Merck, granuliert) gegen Hefeextrakte anderer Hersteller und gegen Bactopepton bei gleichwertigem Stickstoffgehalt. Die Riboflavinausbeute wurde referenziert, um den Vergleich der Ergebnisse aus verschiedenen Parallelexperimenten zu ermöglichen. Die Werte stammen aus sechs Ansätzen pro Parallelversuch. Der Bereich der Referenz, eingeschlossen der relativen Standardabweichung, ist grau gepunktet gekennzeichnet.**

sich, dass keines der verwendeten Hefeextrakte die Riboflavinausbeute nach 48 Stunden verbessern konnte. Die mittlere Abweichung der Parallelversuche, die anhand des Referenzmediums bestimmt wurde, liegt bei ungefähr 10 % und ist als grauer Bereich um den Wert 1 für das Referenzmedium im gezeigten Diagramm eingetragen. Da an verschiedenen Stellen in der Literatur beschrieben wird, dass vor allem Stickstoff einen großen Einfluss auf die Riboflavinproduktion hat (Wu et al. 2007; Jürgen et al. 2005), wurden weitere organische und anorganische Stickstoffquellen untersucht.

Stickstoffquellen, die bisher noch nicht im Satzmedium verwendet wurden, konnten mittels ‚one-at-a-time‘-Experimenten bezüglich ihres Einflusses auf die Riboflavinbildung geprüft werden. Hierbei wurden dem Satzmedium einzelne Komponenten in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt und der Einfluss auf die Zielgröße betrachtet. Es wurden die Aminosäuren Threonin, Methionin (Heefner 1988), Arginin, Prolin, Glycin (Precursor) sowie die für den *Bacillus subtilis* am besten geeignetste Stickstoffquelle Glutamin (Detsch und Stülke 2003; Jürgen et al. 2005) untersucht. Als weitere organische Stickstoffquelle und komplexer Medienbestandteil wurden ‚Casamino Acids‘ (Casaminohydrolysat) (Jürgen et al. 2005) verwendet. Die Aminosäuren liegen hier in freier Form vor und nicht wie in Hefeextrakt gebunden in Peptiden.



**Abbildung 5.2.2:** Einfluss von verschiedenen Aminosäuren und ‚Casamino Acids‘ auf die Riboflavinausbeute. Die vielversprechendsten Ergebnisse der ‚one-at-a-time‘ Experimente für Arginin ( $0,5 \text{ gL}^{-1}$ ) und Glutamin ( $0,5 \text{ gL}^{-1}$ ) sind statistisch nicht signifikant von der Referenz zu unterscheiden ( $p$ -Wert für Arginin  $0,093$  und für Glutamin  $0,055 > \alpha = 0,05$ ). ‚Casamino Acids‘ führen dagegen zu einer signifikanten Verbesserung der Riboflavinproduktion ( $p$ -Wert ist  $\ll 0,05$ ). Die Mittelwerte wurden für jeweils zwölf Reaktoren berechnet.

Des Weiteren wurden die anorganischen Stickstoffquellen Natriumnitrat, Ammoniumnitrat und Harnstoff auf ihre Verwendbarkeit als Stickstoffquelle zur Riboflavinproduktion untersucht. Arginin und Glutamin zeigten trotz einer Erhöhung der Reaktorzahl von sechs auf zwölf Reaktoren zur Steigerung der Trennschärfe keine signifikante Verbesserung der Riboflavinausbeute. Die zusätzliche Verwendung von ‚Casamino Acids‘ im Satzmedium erbringt dagegen eine signifikante Steigerung der Riboflavinausbeute um 29 % (Abbildung 5.2.2).

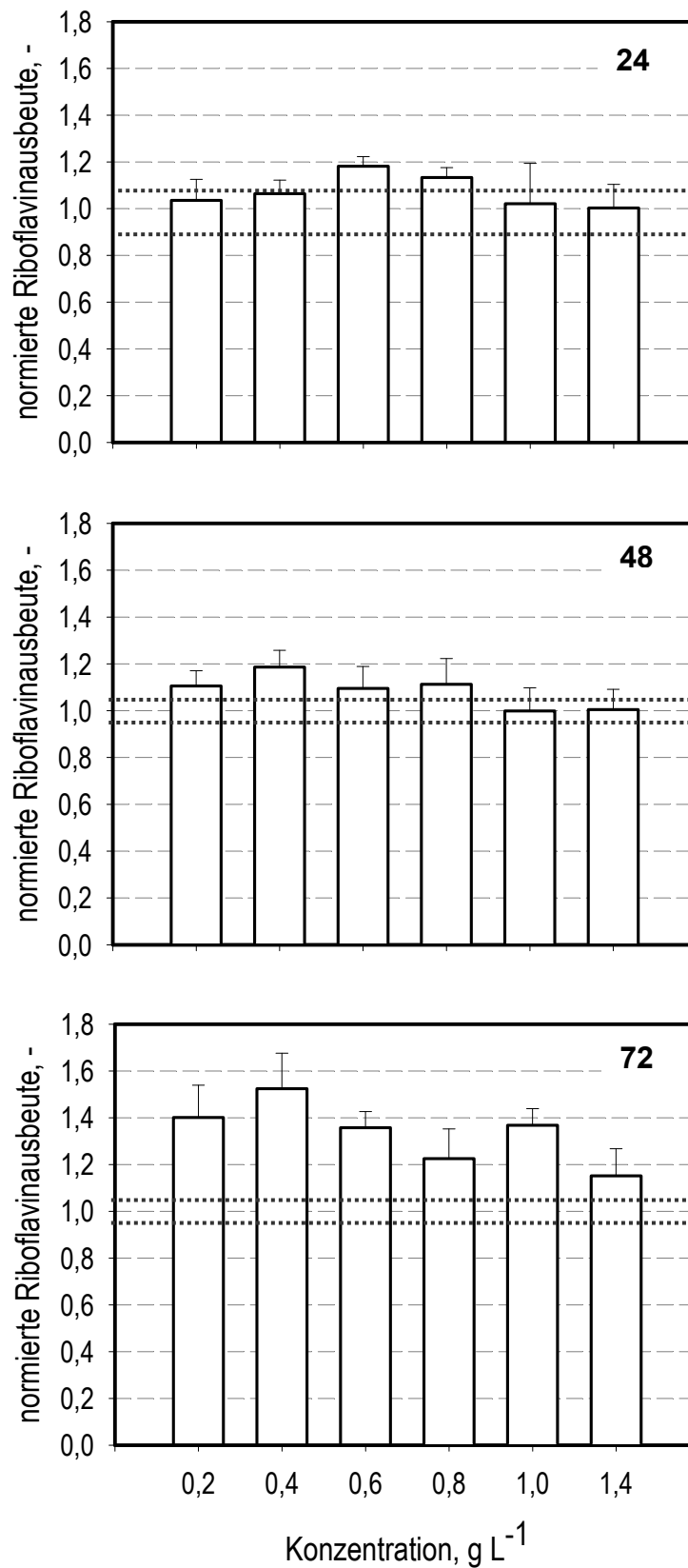
Die Untersuchung von Glycin, einer Vorstufe der Purinsynthese, zeigte eine signifikante Steigerung der Riboflavinproduktion nach 48 und vor allem nach 72 Stunden. In den Versuchen wurden jeweils sechs Reaktoren für eine Konzentrationsstufe verwendet und ein Konzentrationsbereich von 0,2 bis 1,4 g L<sup>-1</sup> untersucht, der durch Vorversuche bestimmt wurde. Es zeigte sich, dass nach 24 Stunden mittlere Konzentrationen zu leicht verbesserten Ausbeuten führten, während nach 48 und 72 Stunden eher Konzentrationen aus dem unteren Drittel des betrachteten Konzentrationsbereichs zu erhöhter Riboflavinproduktion führten. In Vorversuchen zeigten Konzentrationen von 0,75 g L<sup>-1</sup> und darüber zum Teil sogar Verschlechterungen der Riboflavinausbeute nach 48 Stunden. Die Ergebnisse der ‚one-at-a-time‘-Versuche sind in Abbildung 5.2.3 dargestellt. Die gezeigten Riboflavinausbeuten sind auf die zum jeweiligen Zeitpunkt mit dem Ausgangsmedium erreichten Ausbeuten bezogen.

Methionin, Prolin und Threonin verbesserten unabhängig von der eingesetzten Konzentration die Riboflavinausbeute nicht signifikant, während Harnstoff sogar einen negativen Einfluss zeigte (Variationsbereiche 0,1-1 g L<sup>-1</sup>).

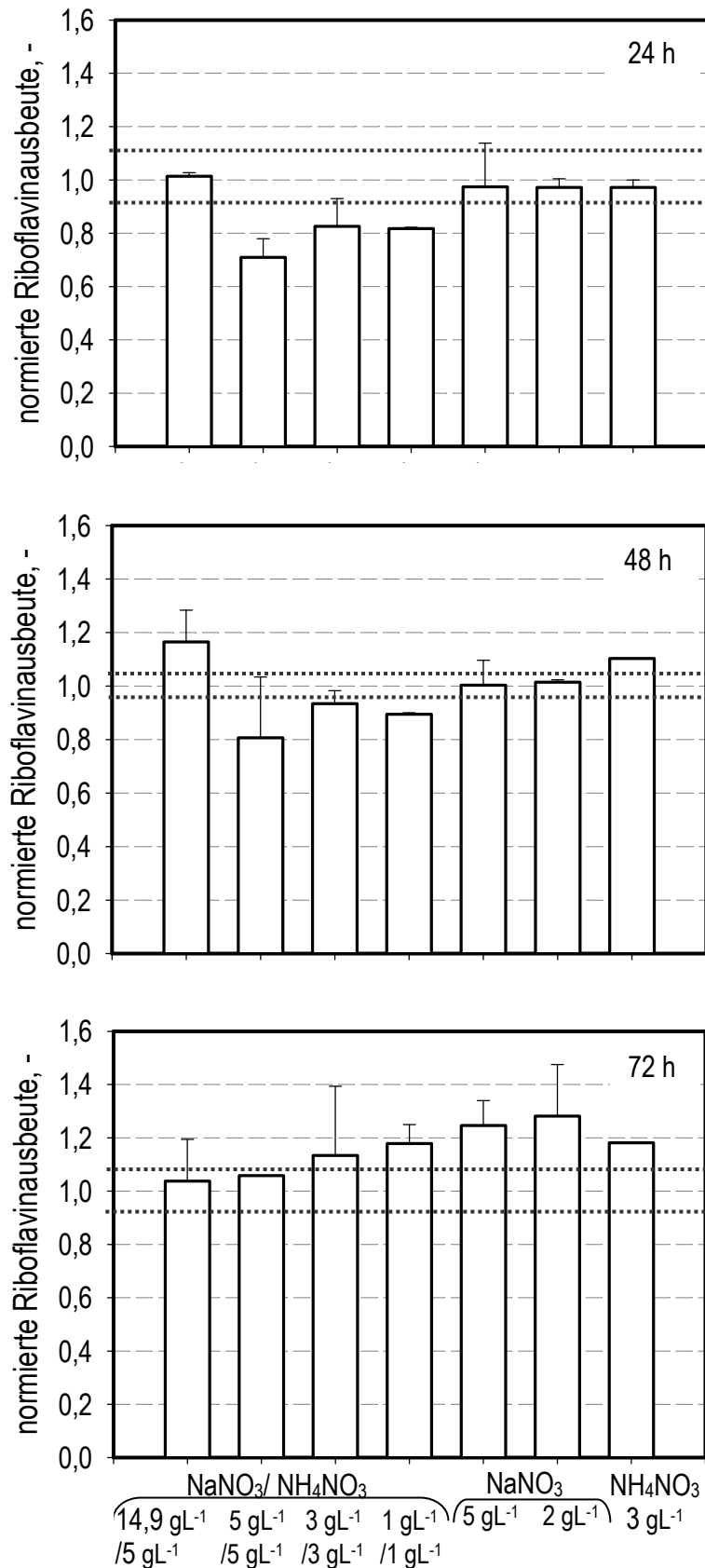
Bei der Untersuchung der anorganischen Stickstoffquellen Natriumnitrat und Ammoniumnitrat wurden sowohl Kombinationen der beiden Stickstoffquellen, als auch jede Komponente für sich untersucht. Die wichtigsten Ergebnisse sind in Abbildung 5.2.4 dargestellt. Nach 24 Stunden Prozesszeit ergab keine Kombination bessere Riboflavinausbeuten als das Referenzmedium. Nach 48 Stunden zeigten allein die Kombination mit 14,9 g L<sup>-1</sup> Natriumnitrat und 5 g L<sup>-1</sup> Ammoniumnitrat (Wu et al. 2007) und Ammoniumnitrat (3 g L<sup>-1</sup>) eine statistisch signifikante Verbesserung der Riboflavinausbeute. Nach 72 Stunden konnte eine Verbesserung der Riboflavinausbeute mit Natriumnitrat (5 und 2 g L<sup>-1</sup>) und eine leichte Verbesserung durch das Ammoniumnitrat (3 g L<sup>-1</sup>) beobachtet werden.

Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse nach 72 Stunden wurde Glycin und für die zweite Optimierung auch Natriumnitrat neben den signifikant Einfluss nehmenden



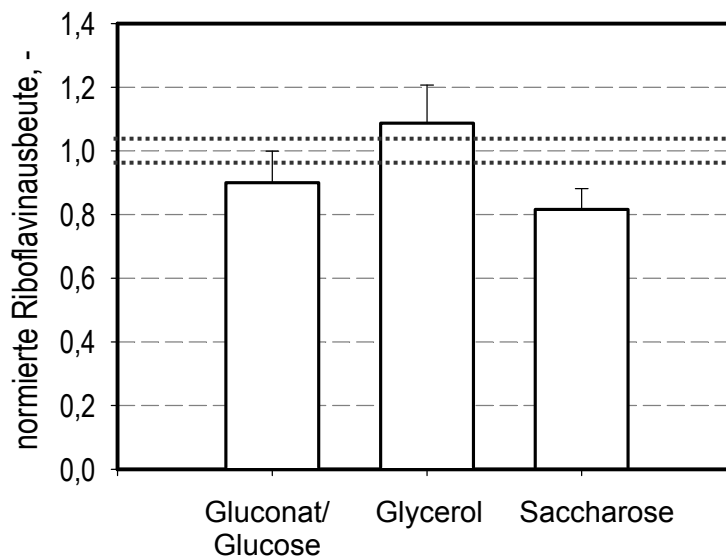


**Abbildung 5.2.3:** Ergebnisse für die Untersuchung von Glycin als zusätzliche Medienkomponente. Nach Voruntersuchungen wurde der Konzentrationsbereich auf Werte von 0,2 – 1,4 g L<sup>-1</sup> eingeschränkt. Es sind die referenzierten Riboflavinausbeuten nach 24, 48 und 72 Stunden gezeigt. Der Bereich der Referenz einschließlich der Standardabweichung ist grau punktiert gekennzeichnet.



**Abbildung 5.2.4:** Ergebnisse für die Untersuchung von anorganischen Stickstoffquellen. Es wurden die Kombinationen  $\text{NaNO}_3$  und  $\text{NH}_4\text{OH}$  ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ,  $3 \text{ g L}^{-1}$ ,  $1 \text{ g L}^{-1}$ ) sowie  $\text{NaNO}_3$  ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ,  $2 \text{ g L}^{-1}$ ) und  $\text{NH}_4\text{OH}$  ( $3 \text{ g L}^{-1}$ ) einzeln untersucht. Es sind die referenzierten Riboflavinausbeuten nach 24, 48 und 72 Stunden als Mittelwerte aus vier Parallelreaktoren gezeigt. Der Bereich der Referenz ist einschließlich der Standardabweichung grau punktiert gekennzeichnet.

‚Casamino Acids‘ als zusätzliche neue Komponente für die Medienoptimierung ausgewählt. Da auch Ammoniumchlorid als Variable in der Optimierung berücksichtigt wurde, konnte auf diese Weise die vielversprechendste Nitrat-Ammoniumsalz-Kombination untersucht werden. Es wurden außerdem verschiedene Kohlenstoffquellen für das Satzmedium untersucht. Im Austausch-Verfahren wurde so Glucose durch Glycerol und Saccharose sowie einer Mischung aus Gluconat und Glucose ersetzt. Hierbei wurde die elementare Kohlenstoffmenge konstant gehalten. Glycerol zeigte Riboflavinausbeuten, die um 21 % höher waren als die Riboflavinausbeuten, die mit dem Referenzmedium erreicht werden konnten. Dennoch konnte keine statistisch signifikante Verbesserung der Riboflavinproduktion festgestellt werden.



**Abbildung 5.2.5: Ergebnisse für den Austausch der Kohlenstoffquelle Glucose gegen andere Kohlenstoffquellen mit äquivalentem Kohlenstoffanteil. Nur Glycerol zeigt eine Verbesserung der Riboflavinausbeute, die aber nicht als signifikant zu bewerten ist.**

Nach eingehender Literaturrecherche wurden das Coenzym Myo-Inositol und Zinksulfat-Heptahydrat als mögliche weitere Medienkomponenten zur Verbesserung der Riboflavinproduktion untersucht.

Zinksulfat-Heptahydrat wurde als Bestandteil des Komplexes  $MgSO_4 \cdot 7H_2O / ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  bei der Evaluation des Satzmediums bereits bewertet und für nicht einflussnehmend erachtet. Trotzdem wurden ‚one-at-a-time‘-Experimente mit Zinksulfat-Heptahydrat durchgeführt, da Versuche anderer Gruppen mit dieser Komponente zu verbesserten Ergebnissen führten (persönliche Kommunikation DSM, Wu et al. 2007).

Auch diese Einzelversuche zeigten keine Verbesserung der Riboflavinausbeute unter Veränderung der Zinksulfatkonzentration. Der Einsatz von Myo-Inositol führte ebenso zu keiner Verbesserung der Riboflavinausbeute und war durch hohe Abweichungen innerhalb der Parallelexperimente gekennzeichnet (15 % - 20 %). Keine dieser beiden Komponenten wurde daher bei der Optimierung berücksichtigt.

### 5.2.3 Mediumoptimierung im Zulaufverfahren mit Ammoniumhydroxid zur pH-Kontrolle

Das Satzmedium für die Herstellung von Riboflavin im Zulaufverfahren, das bereits seit mehreren Jahren Anwendung im industriellen Prozess findet, sollte auf sein Potenzial bezüglich weiterer Verbesserung der Riboflavinausbeute untersucht werden. Im Fokus standen hierbei die nach 48 Stunden und 72 Stunden erreichten Riboflavinausbeuten. Bei den Voruntersuchungen stellte sich heraus, dass vor allem unterschiedliche Stickstoffquellen auch nach längerer Versuchsdauer noch Einfluss auf die Produktion haben. Als Variablen wurden daher neben den im Screening identifizierten Komponenten noch die Stickstoffquellen ‚Casamino Acids‘ und Glycin verwendet. Die Konzentrationsbereiche wurden auf Basis der Vorversuche und von Literaturangaben gewählt.

Um das Absuchen eines möglichst weitläufigen Lösungsraumes mit wenig Experimenten zu ermöglichen, wurde ein stochastisches Suchverfahren eingesetzt. Zur Versuchsplanung wurde die am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik entwickelte Software GAME.opt (Link, Weuster-Botz 2006) verwendet.

Die Konzentrationsbereiche der einzelnen Variablen wurden aufgrund der Ergebnisse der Vorversuche festgelegt und sind in Tabelle 5.2.2 dargestellt. Für die Phosphatsalze  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  wurde eine gemeinsame Konzentration während der Optimierung verwendet, um die Zahl der Variablen zu reduzieren. Die Obergrenze wurde als Fünffaches, die Untergrenze als ein Fünftel der Konzentration des Ausgangsmediums festgelegt. Der gleiche Faktor wurde für Hefeextrakt verwendet, während für ‚Casamino Acids‘ ein größerer Bereich untersucht wurde. Hier wurde der Faktor zehn bzw. ein Zehntel der als positiv wirkend identifizierten Konzentration von  $4 \text{ g L}^{-1}$  gewählt. Für Ammoniumchlorid wurde ein Konzentrationsbereich bestimmt, der zwei Zehnerpotenzen umfasst. Da die Vorversuche ergaben, dass eine Reduzierung der Konzentration zu erwarten war, lag die Ausgangskonzentration am oberen Rand des untersuchten Bereichs. Gleiches wurde für das verwendete Eisensulfat-Heptahydrat eingeführt. Das

als zusätzliche Stickstoffquelle eingeführte Glycin wurde in einem Konzentrationsbereich von 0,1 bis 5 g L<sup>-1</sup> verwendet.

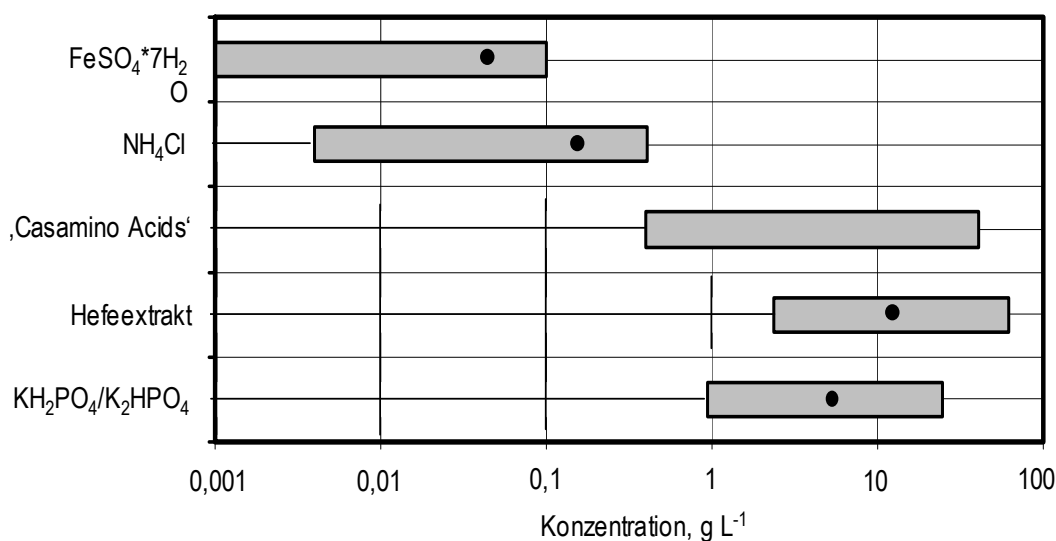
Die Konzentration der genannten Variablen konnte vom Genetischen Algorithmus auf acht Niveaus variiert werden, wobei sich die in Tabelle 5.2.2 dargestellten Schrittweiten ergaben. Die verwendete Konfiguration der Software GAME.opt ist in Tabelle 5.2.3 dargestellt.

Über die verwendete Binärzeichenkettenlänge  $l$  ergibt sich nach folgender Gleichung:

$$P = (1 - 0,5^{M-1})^l$$

**Gleichung 4.2**

unter der Bedingung, dass  $P > 0,99$  gilt, eine Populationsgröße von  $M = 12$  Individuen (Medien).  $P$  stellt dabei die Wahrscheinlichkeit dar, den Suchraum abzudecken. Da von jedem Medium vier Replikate getestet wurden, konnte eine Generation in jeweils einem Parallelexperiment untersucht werden. Das jeweilige Medium wurde aus Stammlösungen in einem Gefäß angesetzt, beimpft und dann auf die einzelnen Reaktoren verteilt. Diese Vorgehensweise garantiert eine möglichst gute Vergleichbarkeit der Replikate, die auf diese Weise keinerlei Konzentrationsunterschiede und die gleiche Menge Inokulum aufweisen. Die Riboflavinausbeute wurde aus der zu den jeweiligen Zeitpunkten gemessenen Riboflavinkonzentration, dem vorliegenden Volumen



**Abbildung 5.2.5: Variationsbereiche der Konzentrationen der untersuchten Medienkomponenten. Schwarze Symbole kennzeichnen die im Ausgangsmedium verwendete Konzentration.**

**Tabelle 5.2.2: Für die Optimierung verwendete Konzentrationsbereiche der Variablen**

<b>Konzentrationsbereiche Variablen, g/l</b>						
	$\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$	$\text{NH}_4\text{CL}$	Hefeextrakt	‚Casamino Acids‘	Glycin	$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
<b>Referenz</b>	4.71	0.23	11.77	0.00	0.00	0.0004
<b>Obere Grenze</b>	23.55	0.400	58.85	40.00	5.00	0.100
<b>Untere Grenze</b>	0.94	0.004	2.354	0.40	0.10	0.001
<b>Schrittweite</b>	2.83	0.05	7.06	4.95	0.61	0.012

**Tabelle 5.2.3: Einstellungen der Software GAME.opt.**

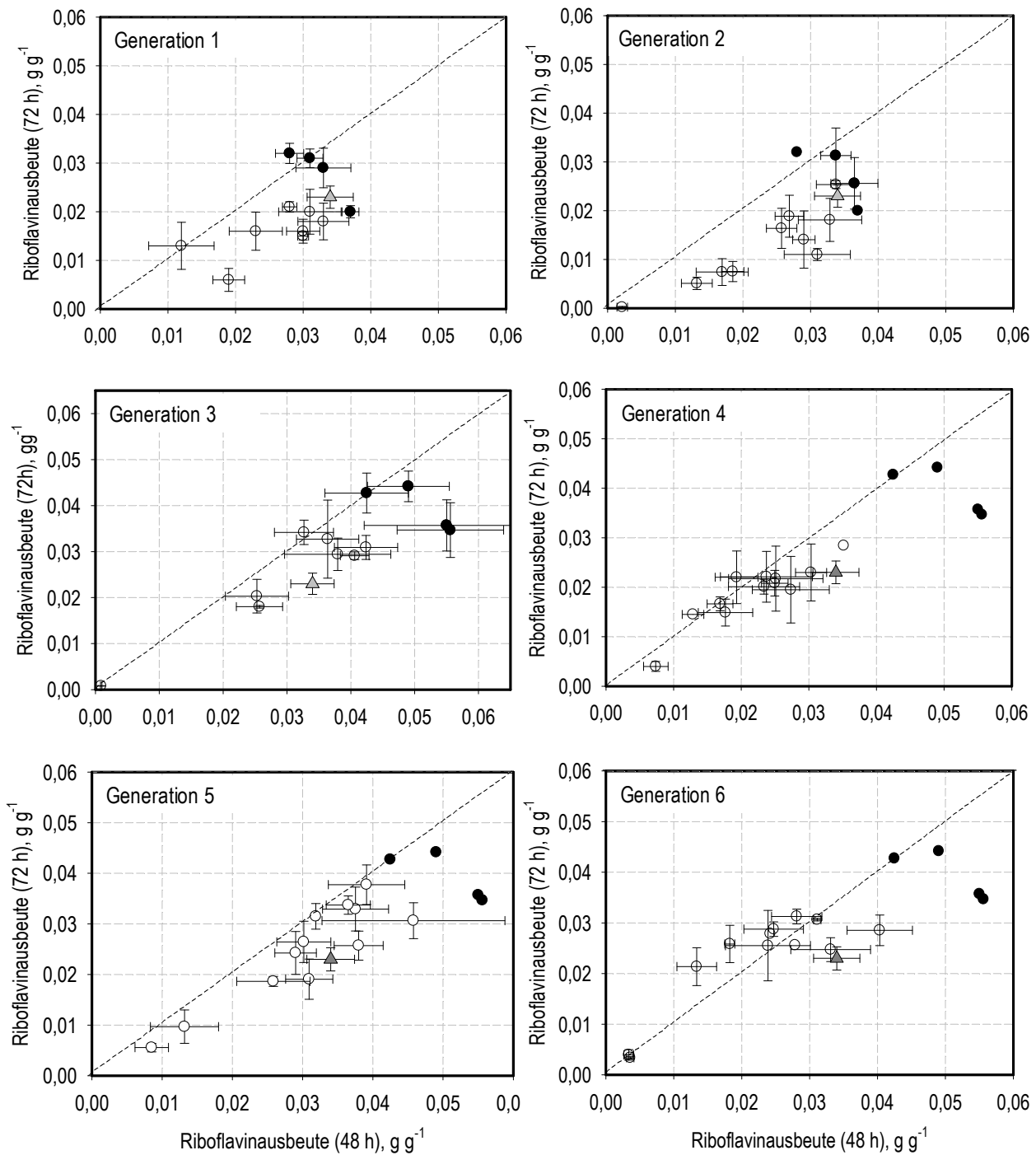
<b>Konfiguration von GAME.opt</b>		
Variablen	6	
Variationsbereich	8 Konzentrationsniveaus	
Zielgrößen	2	Maximierung der Riboflavinausbeute nach 48 h / 72 h
Binärzeichenkettenlänge	$l = 18$ bit	
Populationsgröße	$M = 12$	4 Replikate pro Individuum
Externe Population	$M_E = 6$	bis zu 6 Individuen
Crossover	2 Crossoverpunkte	
Mutationsrate	1% (Punktmutation)	

und der bis dahin zugeführten Substratmenge berechnet. Nach 72 Stunden wurde eine Endpunktbestimmung durchgeführt. Um einen höheren Durchsatz an Parallel-experimenten zu erreichen, wurde zur Bestimmung der Riboflavinkonzentration die Absorptionsmethode herangezogen. Es wurden sechs Parallelversuche (Generationen) durchgeführt, wobei insgesamt 72 verschiedene Medienzusammensetzungen untersucht wurden.

Um die Entwicklung der Optimierung bewerten zu können, werden die einzelnen Generationen im Lösungsraum dargestellt, der von den beiden Optimierungszielen, der Produktkonzentration nach 48 und nach 72 Stunden, gebildet wird (Abbildung 5.2.6).

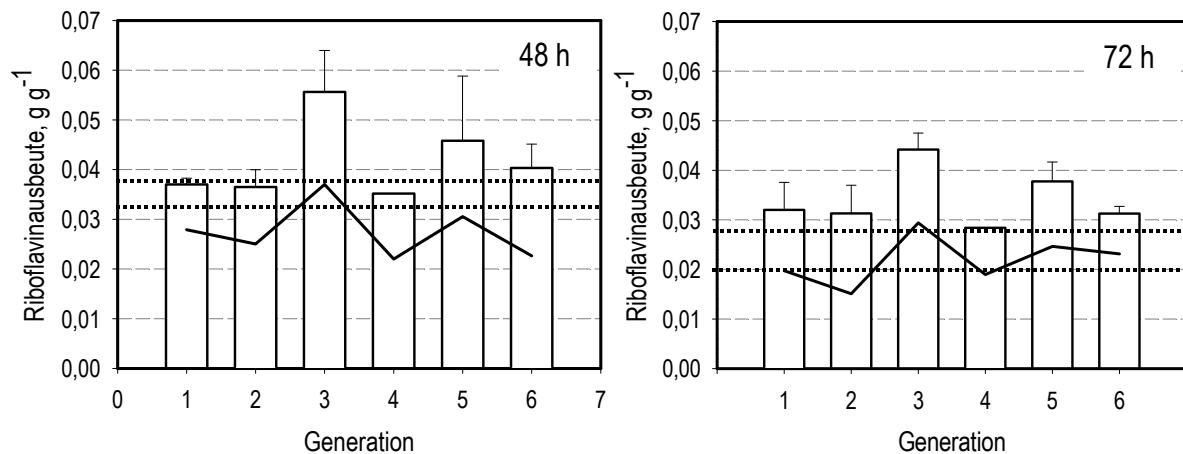
Die erfolgreichsten Medienzusammensetzungen bilden die sogenannte Pareto-Front und werden in GAME.opt als externe Population weitergeführt. Diese Pareto-Front ist in den Diagrammen mit schwarzen Symbolen gekennzeichnet. Grundsätzlich betrachtet, zeigen die meisten Medien Riboflavinausbeuten entlang der Winkelhalbierenden und im Bereich unterhalb derselben (rechte untere Hälfte des Diagramms). Da die Produktionsleistung der Organismen nach bisheriger Erfahrung mit fortlaufender Prozessdauer nachlässt, ist dieses Ergebnis nicht ungewöhnlich. Ziel der Optimierung ist die rechte obere Hälfte des Diagramms, optimaler Weise oberhalb der Winkelhalbierenden. Ein solches Medium würde eine kontinuierliche bis leicht gesteigerte Produktion von Riboflavin über die Prozessdauer bei guter Umsetzung des zugeführten Substrats garantieren. Generell sind keine Individuen im linken oberen Teil des Diagramms zu erwarten. Eine überproportionale Produktionssteigerung zwischen 48 und 72 Stunden ist nicht realistisch, insbesondere, wenn die Ausbeute schon nach 48 Stunden nicht groß ist. Aus den genannten Gründen bildete sich nur eine schmale Pareto-Front in einem kleinen Bereich oberhalb und einem größeren Bereich unterhalb der Winkelhalbierenden aus. Bis zur dritten Generation entwickelt sich diese kontinuierlich, wobei die dritte Generation im Vergleich zum Referenzmedium zu einer ausgeprägten Verbesserung der erreichten Ausbeuten sowohl nach 48 Stunden als auch nach 72 Stunden führt. In der 4. Generation kehrt sich dieser Trend der kontinuierlichen Produktionssteigerung ins Gegenteil. Die Riboflavinausbeuten bleiben deutlich hinter den bisher erzielten Ergebnissen zurück. Generation 5 schloss wieder zu den guten Ergebnissen der vorangegangenen Parallelexperimente auf, so dass auch von mehreren Individuen dieser Generation die Ergebnisse der Referenz signifikant übertroffen werden konnten. Da sich auch in der 6. Generation keine besseren Individuen als die in der Pareto-Front ergaben, wurde die Optimierung an dieser Stelle abgebrochen. Die maximal erreichte Riboflavinausbeute nach 48 Stunden lag bei  $0,056 \text{ g g}^{-1}$  mit einer relativen Standardabweichung von 15 %, während nach 72 Stunden eine maximale Ausbeute von  $0,044 \text{ g g}^{-1}$  mit einer relativen Standardabweichung von 7,5 % erreicht wurde. Damit konnte ein Medium gefunden werden, das im Vergleich zum Ausgangsmedium die Riboflavinausbeute nach 48 Stunden um 63 % verbessert sowie ein weiteres, das nach 72 Stunden die Ausbeute um 92 % erhöht.

In Abbildung 5.2.7 sind die maximalen Riboflavinausbeuten der jeweiligen Generation sowie die in jeder Generation erreichte mittlere Riboflavinausbeute gezeigt.



**Abbildung 5.2.6:** Diese Abbildung zeigt alle Individuen der sechs durchgeführten Generationen, aufgetragen im von den beiden Zielgrößen gebildeten Lösungsraum. Die schwarzen Symbole repräsentieren die externe Population (Pareto-Front), die sich ab Generation 3 nicht mehr weiterentwickelt. Das graue Symbol zeigt die Lage des Referenzpunktes im Lösungsraum.

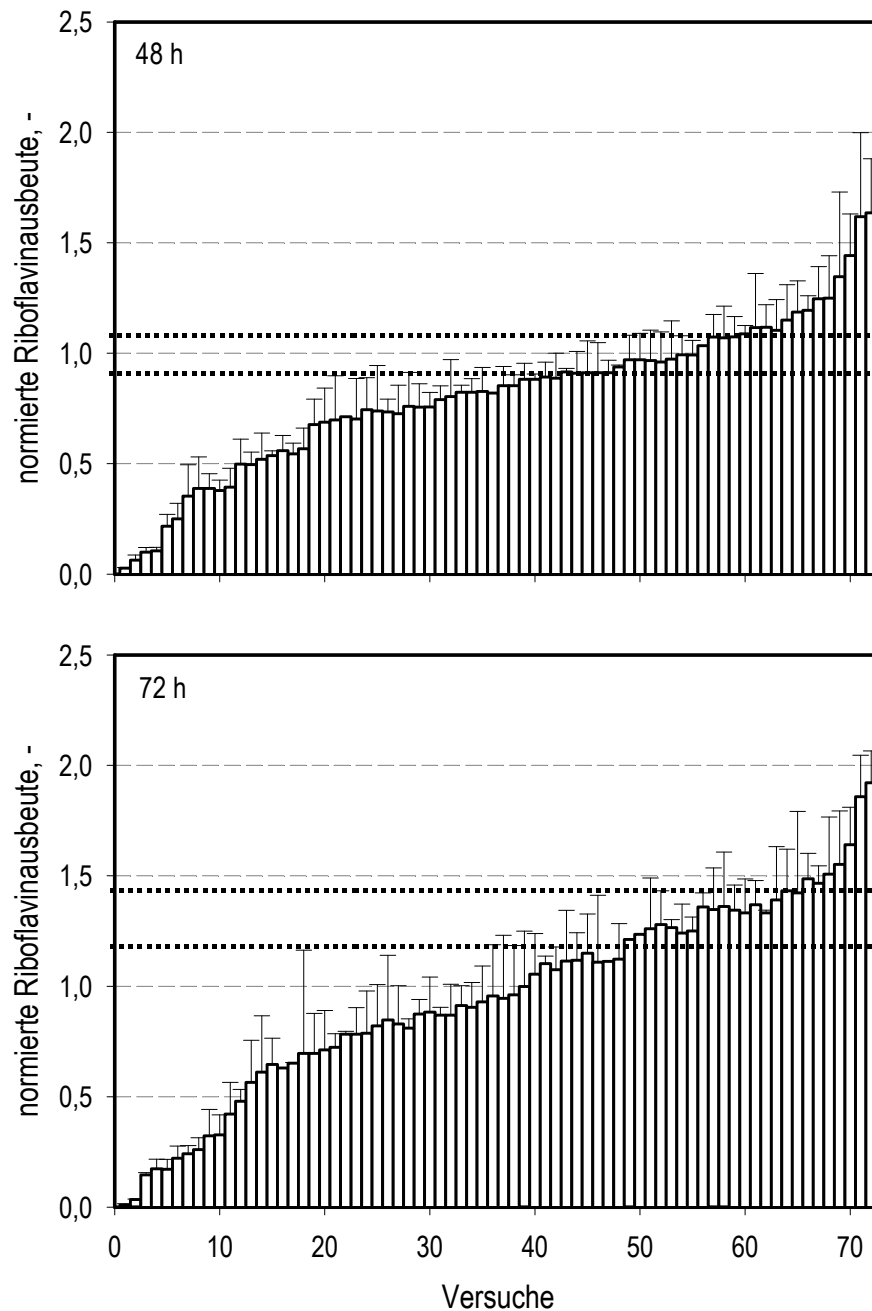




**Abbildung 5.2.7: Beste Riboflavinausbeuten (Säulen) jeder Generation sowie die sich aus allen Individuen ergebenden Mittelwerte (Linie) nach 48 und 72 Stunden. Die Standardabweichungen ergeben sich aus drei Replikaten des jeweiligen Mediums. Im Vergleich ist der Referenzprozess mit Standardabweichung als horizontaler gepunkteter Bereich dargestellt.**

Normalerweise wäre ein Anstieg der mittleren wie auch der maximalen Riboflavinausbeute über die Generationen zu erwarten. In dem dargestellten Fall wurde dagegen für beide Zielgrößen bereits mit der ersten Generation eine dem Referenzmedium gleichwertige Ausbeute erreicht, die daraufhin nur in den Generationen 3 und 5 deutlich erhöht werden konnte. Die mittlere sowie die maximale Riboflavinausbeute der 3. Generation zeigt hierbei einen auffällig starken Anstieg. In den darauffolgenden Generationen werden nicht annähernd so hohe Riboflavinausbeuten erreicht. Dies lässt die Ergebnisse für die 3. Generation zweifelhaft erscheinen. Da für die Optimierungsversuche keine Referenz mitgeführt wurde, fehlt die Aussage über einen möglichen systematischen Fehler.

In Abbildung 5.2.8 sind alle 72 Medien der Optimierung - sortiert nach der Produktionsleistung - für beide Zielgrößen dargestellt. Für das erste Optimierungsziel zeigten 5 % aller untersuchten Medien statistisch signifikante Steigerungen der Riboflavinproduktion. Die durchschnittliche relative Standardabweichung der verbesserten Medien lag bei 13,6 %. Für das zweite Optimierungsziel wurde für 25 % aller Medien eine statistisch signifikante Verbesserung erreicht. Hier lag die durchschnittliche relative Standardabweichung der verbesserten Medien bei 12,1 %. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die erzielten Riboflavinausbeuten während der Optimierung im Vergleich zur Referenz deutlich verbessert wurden, die Verbesserung aber nur einzelne Generationen betrifft.



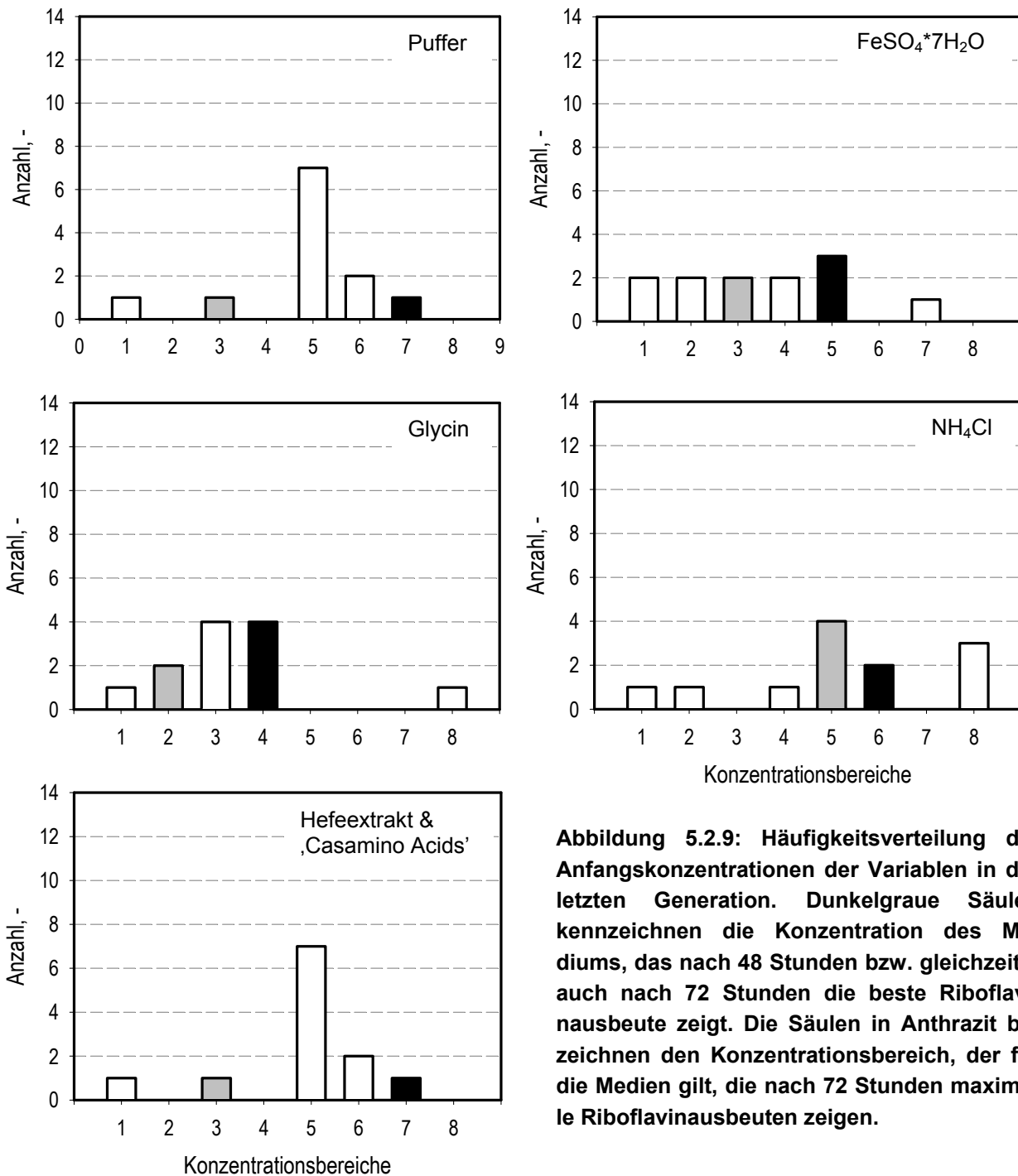
**Abbildung 5.2.8: Erreichte Riboflavinausbeuten nach 48 und 72 Stunden für alle untersuchten Medien der 1. Optimierung (72 Medien sortiert). Die dargestellten Ausbeuten sind auf die Ausbeute des Referenzmediums bezogen. Es erreichen 5 % der Medien nach 48 Stunden und 25 % der Medien nach 72 Stunden ein statistisch relevantes besseres Ergebnis als das Referenzmedium (Ausgangsmedium). Zum Vergleich ist die Riboflavinausbeute für das Ausgangsmedium mit Standardabweichung als horizontaler gepunkteter Bereich dargestellt.**

Die Zusammensetzungen der Individuen der Pareto-Front sind in Tabelle 5.2.4. dargestellt. Bis auf die Konzentration der Komponente Ammoniumchlorid weisen die Mediumszusammensetzungen keine Gemeinsamkeit auf. Betrachtet man die Entwicklung der Anfangskonzentration der einzelnen Mediumskomponenten über die Generationen in Häufigkeitsverteilungen, kann keine Konvergenz der Variablen festgestellt

werden. Die Häufigkeitsverteilung aller Variablen in der letzten Generation ist in Abbildung 5.2.9 dargestellt, die Häufigkeitsverteilung der Anfangskonzentrationen von Ammoniumchlorid in allen Generationen wird in Abbildung 5.2.10 gezeigt. Hefeextrakt und ‚Casamino Acids‘ wurden als komplexe organische Stickstoffquellen zusammen abgebildet. Schwarze Säulen kennzeichnen die Konzentration des Mediums, das nach 48 Stunden bzw. gleichzeitig auch nach 72 Stunden die beste Riboflavinausbeute zeigt. Die Säulen in grau bezeichnen den Konzentrationsbereich, der für die Medien gilt, die nach 72 Stunden maximale Riboflavinausbeuten zeigen. Die 1. Generation weist für alle Variablen eine zufällige Verteilung der Anfangskonzentrationen über den gesamten Variationsbereich auf. Diese Verteilung ändert sich über die Generationen für die getesteten Medienbestandteile nur geringfügig, so dass besonders für die Variablen Eisensulfat-Heptrahydrat, Hefeextrakt, ‚Casamino Acids‘, die Phosphatsalze und Ammoniumchlorid keine Konvergenz auf bestimmte Konzentrationsniveaus zu verzeichnen ist. Ammoniumchlorid und die Phosphatsalze weisen bevorzugte Konzentrationen auf, die sich im Vergleich zu anderen Konzentrationsstufen während der Optimierung weitaus häufiger zeigen. Für die Phosphatsalze ist dies zum einen die Konzentration von  $13,86 \text{ g L}^{-1}$  eine Konzentrationsstufe im oberen Mittel des Variationsbereichs und zum anderen einer Konzentration von  $0,94 \text{ g L}^{-1}$ , die unterste Konzentrationsstufe. Für Ammoniumchlorid zeigen sich die Konzentrationen  $0,23 \text{ g L}^{-1}$  und  $0,29 \text{ g L}^{-1}$  besonders häufig (Abbildung 5.2.10).

**Tabelle 5.2.4: Zusammensetzung der Individuen der Pareto-Front.**

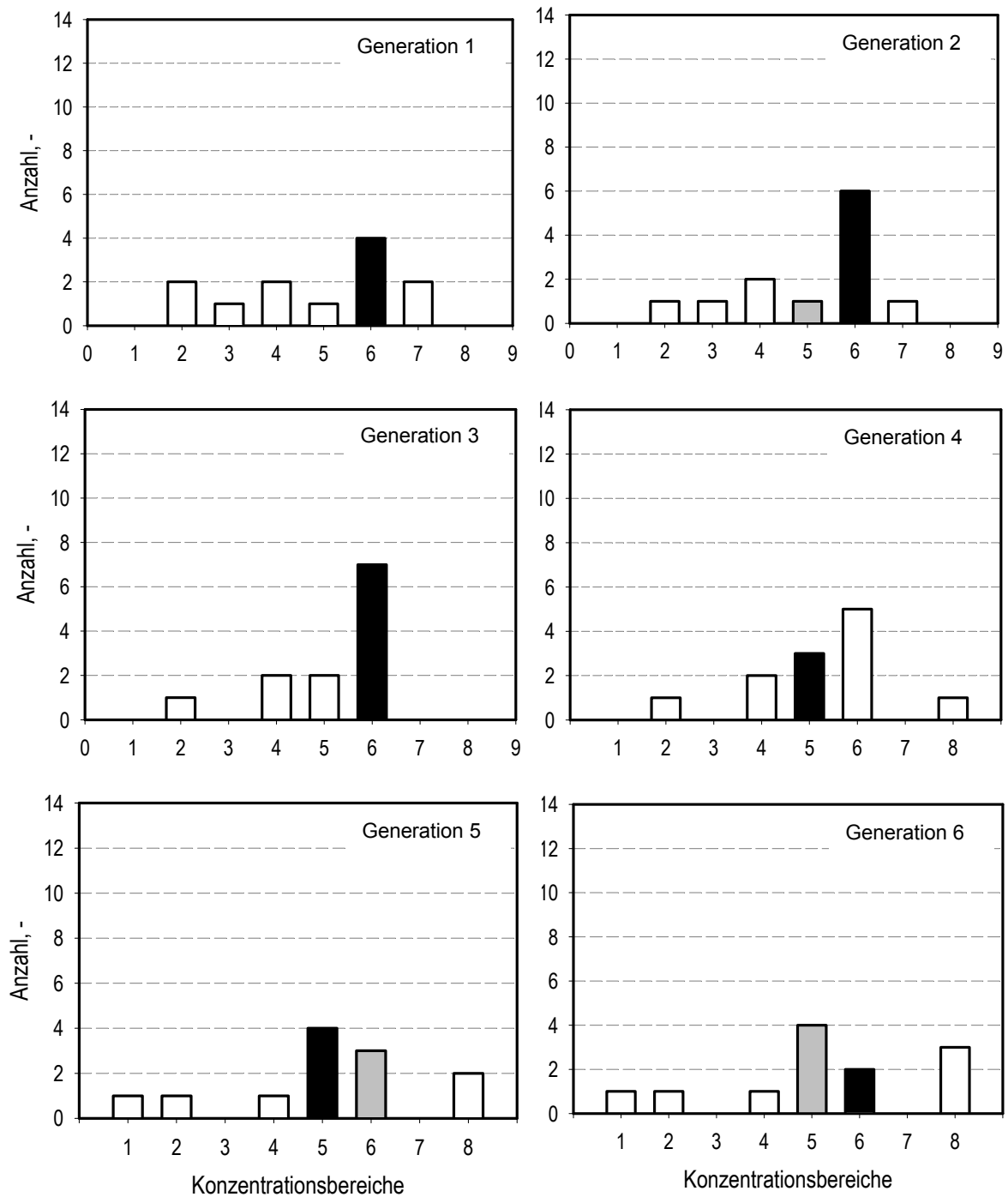
Individuum	$\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ $\text{g L}^{-1}$	$\text{NH}_4\text{CL}$ $\text{g L}^{-1}$	Hefe- extrakt $\text{g L}^{-1}$	‚Casamino Acids‘ $\text{g L}^{-1}$	Glycin $\text{g L}^{-1}$	$\text{FeSO}_4$ *7 $\text{H}_2\text{O}$ $\text{g L}^{-1}$	Riboflavin- ausbeute 48h	Riboflavin- ausbeute 72h
<b>6</b>	13,86	0,29	42,71	34,34	2,20	0,04	4,9%	4,4%
<b>9</b>	0,94	0,23	10,42	28,69	0,80	0,02	5,5%	3,6%
<b>11</b>	7,40	0,29	50,78	28,69	2,20	0,06	5,6%	3,5%



**Abbildung 5.2.9: Häufigkeitsverteilung der Anfangskonzentrationen der Variablen in der letzten Generation. Dunkelgraue Säulen kennzeichnen die Konzentration des Mediums, das nach 48 Stunden bzw. gleichzeitig auch nach 72 Stunden die beste Riboflavinausbeute zeigt. Die Säulen in Anthrazit bezeichnen den Konzentrationsbereich, der für die Medien gilt, die nach 72 Stunden maximale Riboflavinausbeuten zeigen.**

Diese stammen aus dem oberen Mittel des Variationsbereiches und stellen mehr oder weniger die Konzentration der Komponente im Ausgangsmedium dar ( $0,23 \text{ g L}^{-1}$ ). Allerdings ist über die sechs Generationen trotz der Häufung der genannten Konzentrationsstufen keine Konvergenz der Komponente zu beobachten.

Nur die Variable Glycin zeigt nach wenigen Generationen zumindest eine Einschränkung des auftretenden Konzentrationsbereichs. Konzentrationen über  $2,2 \text{ g L}^{-1}$  treten ab der 3. Generation selten bis gar nicht mehr auf.



**Abbildung 5.2.10: Häufigkeitsverteilung der Ammoniumchlorid Anfangskonzentrationen während der sechs Generationen der Optimierung. Obwohl keine Konvergenz auf einzelne Konzentrationsniveaus zu beobachten sind, weisen die besten Medien einer Generation immer eine der beiden Konzentrationsstufen 5 oder 6 auf, die den Bereich von  $0,2$  bis  $0,3 \text{ gL}^{-1}$  umfassen. Dunkelgraue Säulen kennzeichnen die Konzentration des Mediums, das nach 48 Stunden bzw. gleichzeitig auch nach 72 Stunden die beste Riboflavinausbeute zeigt. Die Säulen in Anthrazit bezeichnen den Konzentrationsbereich, der für die Medien gilt, die nach 72 Stunden maximale Riboflavinausbeuten zeigen.**

Wenn keine Konvergenz der Komponenten zu erkennen ist, kann das zum einen bedeuten, dass die jeweilige Komponente keinen Einfluss auf die Zielgrößen hat. Zum anderen ist es möglich, dass eine Komponente unterschiedlichen Einfluss auf die verschiedenen Zielgrößen hat und deshalb nicht konvergiert. Darüber hinaus können aber auch starke Wechselwirkungen zwischen mehreren Komponenten bestehen, so dass ein einfacher Rückschluss auf einzelne Variablenwerte nicht möglich ist. Es ist sehr wahrscheinlich, dass dies bei verschiedenen Stickstoffquellen, der Mehrzahl der hier untersuchten Variablen, zutrifft.

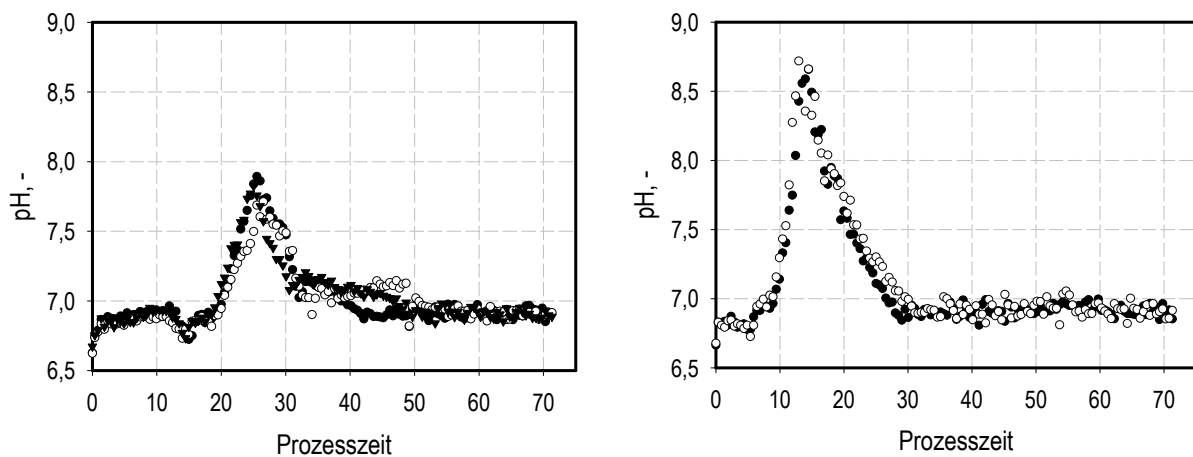
Ein weiterer möglicher Grund, der eine Konvergenz der Variablenwerte einschränkt, wäre die starke Einflussnahme eines Prozessparameters, der nicht durch die Wahl der Variablen abgedeckt wird und den Einfluss der untersuchten Komponenten überlagert. Viele Hinweise sprechen für diese Deutung der Ergebnisse in der durchgeführten Optimierung.

Im vorliegenden Fall wird der pH einseitig über die Zugabe von Ammoniumhydroxid geregelt. Ammoniumhydroxid dient gleichzeitig als weitere Stickstoffquelle für den Prozess. Obwohl Ammoniumhydroxid keine bevorzugte Stickstoffquelle für *Bacillus subtilis* darstellt, scheint gerade dieser Einfluss erheblich zu sein. Die Ergebnisse der Optimierung lassen darauf schließen, dass der Einfluss von Ammoniumhydroxid als Stickstoffquelle weitaus größer ist, als zunächst angenommen. Betrachtet man das Zusammenspiel von Pufferkonzentration, der Konzentration der komplexen Stickstoffquellen Hefeextrakt und ‚Casamino Acids‘ sowie der Basezugabe (Ammoniumhydroxid), zeigt sich der die Optimierung überlagernde Zusammenhang deutlich. Hauptsächlich abhängig von der Interaktion dieser drei Größen entwickelt sich die Riboflavinproduktion im Medium.

Sowohl Hefeextrakt als auch ‚Casamino Acids‘ haben einen großen Einfluss auf die Entwicklung des pH im Prozessverlauf. Bei ihrer Verstoffwechslung führen beide Komponenten in Abhängigkeit von ihrer Konzentration zu einer Erhöhung des pH durch die Freisetzung von Ammoniumionen. Dabei zeigt sich, dass Hefeextrakt grundsätzlich früher verstoffwechselt wird, als ‚Casamino Acids‘ (Abbildung 5.2.11). Da die pH-Regelung nur einseitig durch Basezugabe erfolgt, kann einer solchen Entwicklung im Prozess nicht entgegengewirkt werden. Während der pH größer als der Sollwert ist, wird keine Base und damit auch kein weiterer Stickstoff zugegeben.

Die im Medium vorliegende Pufferkonzentration spielt in diesem Zusammenhang ebenfalls eine entscheidende Rolle und beeinflusst als weiterer Faktor die Zugabe von

Ammoniumhydroxid. Eine hohe Pufferkonzentration wirkt dem Absinken des pH infolge von Stoffwechselprodukten wie organischer Säuren entgegen. Er schränkt damit die Zugabe der Base und somit der Stickstoffquelle Ammoniumhydroxid ebenfalls ein. Die Folge der verringerten Ammoniumhydroxidzugabe sind reduzierte Riboflavinausbeuten, vor allem wenn im Vergleich nur geringe Konzentrationen an weiteren Stickstoffquellen im Medium enthalten sind.



**Abbildung 5.2.11:** Der Verbrauch einer großen Menge an ‚Casamino Acids‘ ( $28,69 \text{ g L}^{-1}$ ) führt zu einem Anstieg des pH nach 25 Stunden (linkes Diagramm). Ein große Menge an Hefeextrakt ( $42,71 \text{ g L}^{-1}$ ) führt zu einem Anstieg des pH nach ungefähr 14 Stunden (rechtes Diagramm). Die Höhe des resultierenden pH wird zudem von der Pufferkonzentration bestimmt ( $20,32 \text{ g L}^{-1}$  links,  $7,4 \text{ g L}^{-1}$  rechts).

Ein Medium mit der Zusammensetzung  $23,55 \text{ g L}^{-1}$  Phosphatsalze ( $4,71 \text{ g L}^{-1}$  im Referenzmedium),  $2,35 \text{ g L}^{-1}$  Hefeextrakt ( $11,77 \text{ g L}^{-1}$  im Referenzmedium) und  $28,69 \text{ g L}^{-1}$  ‚Casamino Acids‘ erreicht nur Riboflavinausbeuten von  $0,017 \text{ g g}^{-1}$  nach 48 Stunden und  $0,007 \text{ g g}^{-1}$  nach 72 Stunden. Die Zugabe von Ammoniumhydroxid nach 72 Stunden bleibt unter  $0,45 \text{ mL}$ , während im Schnitt  $2,8 \text{ mL}$  im Referenzprozess zugegeben werden.

Eine erhöhte Konzentration der komplexen Stickstoffquellen hat im Fall von gesteigerten Pufferkonzentrationen eine positive Wirkung auf die Riboflavinproduktion (Individuum 6 und 11 der Pareto-Front, Tabelle 5.2.4). Da bei einer höheren Pufferkonzentration der pH auch bei höher dosierten komplexen Stickstoffquellen nicht zu stark und dauerhaft nach oben abweicht, zeigen Medien mit einer solchen Zusammensetzung gute Riboflavinausbeuten. Allerdings darf der Puffer nicht zu hoch konzentriert sein. Während der Optimierung zeigte sich eine obere Konzentrationsgrenze für die Phosphatsalze. Oberhalb dieser Konzentration von  $13,86 \text{ g L}^{-1}$  gab es keine einzige

Medienzusammensetzung, die während der Optimierungsversuche eine maximale Riboflavinausbeute gezeigt hätte. Eine weitere vielversprechende Kombination ist der Einsatz niedriger Pufferkonzentrationen und gemäßiger bis niedriger Konzentrationen der komplexen Stickstoffquellen (Individuum 9 der Pareto-Front Tabelle 5.2.4). In diesem Fall wird schon zu einem frühen Zeitpunkt mit der Basezugabe und damit zusätzlichen Stickstoffzugabe begonnen. Diese Sorte Medien zeigt tendenziell eine Verbesserungen der Produktionsleistung nach 48 Stunden und weist meist unzureichende Reproduzierbarkeit auf. Die Unterschiede im Prozessverlauf der einzelnen Reaktoren führen zu relativen Standardabweichungen von bis zu 30 % und liegen zumeist über der durchschnittlichen relativen Standardabweichung von 14,9 % (48 Stunden) und 17,7 % (72 Stunden), die für diese Experimente errechnet wurde.

Für gute Ergebnisse nach 72 Stunden scheint die Zugabe von ‚Casamino Acids‘ maßgeblich zu sein. So zeigt Individuum 6 mit der höchsten Konzentration dieser Komponente gegenüber den anderen beiden Individuen der Pareto-Front die deutlich bessere Riboflavinausbeute nach 72 Stunden (Tabelle 5.2.4).

Der Einfluss anderer untersuchter Medienkomponenten kann in diesem komplexen Gefüge nicht beurteilt werden.

Die gezeigten Ergebnisse machen deutlich, dass die Stickstoffzugabe über die pH-Regelung einen entscheidenden Einfluss auf die Riboflavinproduktion hat. Der pH-Verlauf ist stark von der Puffer-, Hefeextrakt- und ‚Casamino Acids‘-Konzentration abhängig. Dadurch ist das Optimierungsergebnis hauptsächlich von diesen drei Komponenten und der Zugabe von Ammoniumhydroxid bestimmt. Letzteres kann aber nicht als Variable im Versuchsplan berücksichtigt werden. Da dieser Parameter aber einen entscheidenden Einfluss auf das Ergebnis der Optimierung hatte, kann nur eine Entkopplung von Base- und Stickstoffzugabe zu einer methodisch richtigen Optimierung führen.

#### *Entkopplung der Base- und Stickstoffzugabe*

Die Base, mit der die einseitige pH Regelung des Milliliter-Prozesses durchgeführt wird, ist eine 12,5 %ige Ammoniumhydroxidlösung. Neben der Regelung des während des Prozesses durch die Produktion organischer Säuren abfallenden pH dient das Ammoniumhydroxid auch als Stickstoffquelle für die Riboflavinbildung. Um eine für alle Reaktoren gleiche Stickstoffzugabe zu gewährleisten, die nicht von der jeweiligen Zusammensetzung des Mediums über den pH Verlauf des Prozesses bestimmt wird, soll

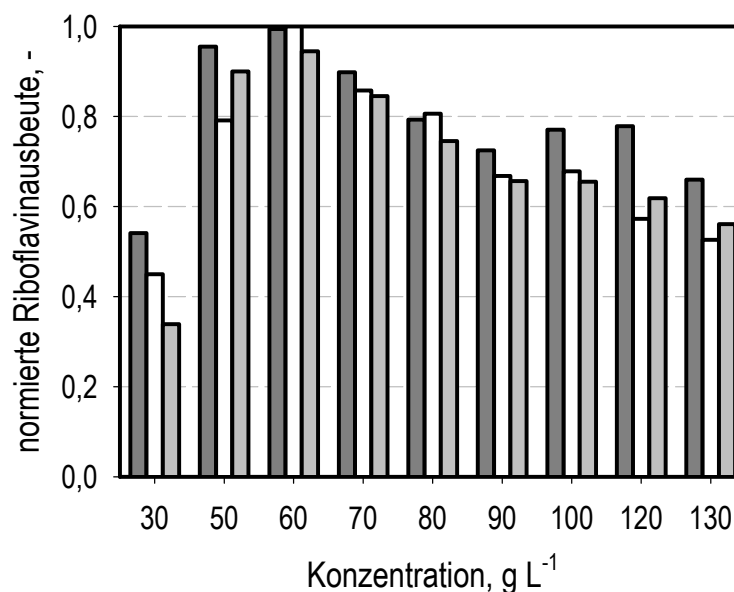


eine nicht stickstoffhaltige Base verwendet werden. Der bisher über die Base zugeführte Stickstoff soll alternativ über eine im Zulaufmedium gelöste Stickstoffquelle gleichmäßig in alle Reaktoren zugegeben werden.

Als Base wurde in den Versuchen eine 4 M Natronlauge eingesetzt, welche die bisher verwendete Ammoniumhydroxidlösung ersetzt, ohne dass Veränderung der Regelparameter der pH-Regelung nötig wurden. Als alternative Stickstoffquellen werden Ammoniumchlorid und Ammoniumsulfat in verschiedenen Konzentrationen verwendet. Zusätzlich wird Ammoniumhydroxid mit der Zugabelösung zudosiert.

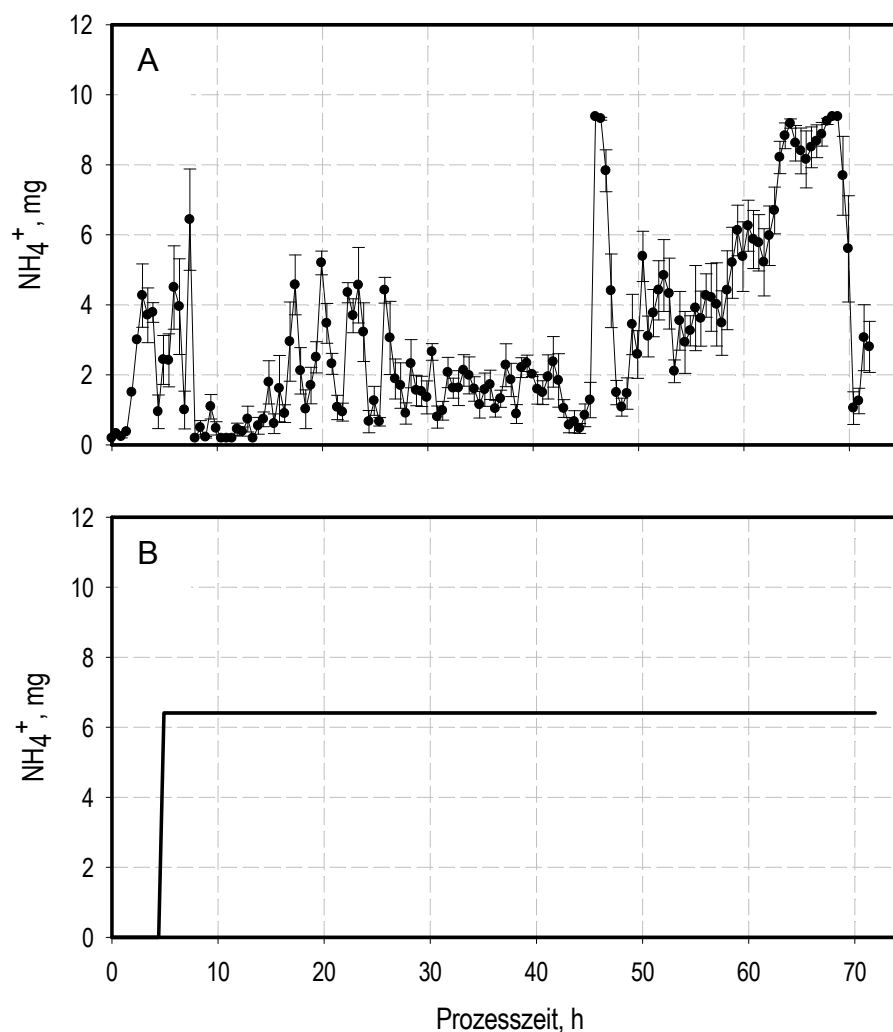
Die Reaktoren mit einem Zugabemedium mit Ammoniumhydroxid fielen bereits kurz nach Start der Zudosierung wegen eines stark angestiegenen pH aus. Mit jeder Zugabe konnte ein Anstieg des pH verzeichnet werden, der nach ca. 10 Stunden Prozessdauer bereits Werte über pH 8 erreichte.

Um die Ergebnisse des Referenzprozesses zu reproduzieren, mussten die Konzentrationen der beiden untersuchten Stickstoffquellen im Zulauf im Vergleich zum Standardverfahren um ca. 15 % erhöht werden. Es wurden Konzentrationen zwischen 30 g L<sup>-1</sup> und 130 g L<sup>-1</sup> Ammoniumchlorid und Ammoniumsulfat untersucht. Mit einer Ammoniumsulfatkonzentration von 60 g L<sup>-1</sup> in der Zulauflösung konnten die Ergebnisse des Referenzprozesses zuverlässig reproduziert werden (Abbildung 5.2.12). Konzentrationen ab 70 g L<sup>-1</sup> führten zu einem Rückgang der Riboflavinproduktion vor allem



**Abbildung 5.2.12:** Dargestellt ist die mit unterschiedlichen Ammoniumsulfatkonzentrationen im Zulauf erreichte Riboflavinausbeute. Die Daten wurden übersichtshalber auf den Referenzprozess normiert. (■) stellt die normierte Riboflavinausbeute nach 24 Stunden, (□) nach 48 Stunden und (▨) nach 72 Stunden dar.

nach 48 und 72 Stunden. Die aus der jeweiligen Dosierungsmethode resultierende Zugabemenge von Ammonium über die Prozesszeit ist für beide Verfahren in Abbildung 5.2.13 dargestellt. Die gewählte Stickstoffquelle ist kostengünstig und führt zu einer sehr guten parallelen und sequentiellen Reproduzierbarkeit. Nach 48 Stunden konnte sowohl für parallele als auch für sequentielle Experimente eine relative Standardabweichung von höchstens 6 % erreicht werden. Nach 72 Stunden Versuchsdauer liegt dieser Wert noch bei 10 %. Die Verbesserung der Reproduzierbarkeit und ihre Unabhängigkeit von der Güte der pH-Regelung bei über den Zulauf konstant zugeführtem Stickstoff zeigt sich in einem Parallelversuch mit verschiedenen Sollwerten für die pH-Regelung. Dieser Versuch wurde durchgeführt, um den Einfluss des pH auf die Riboflavinproduktion quantifizieren zu können. Dazu wurde während des Riboflavin-Referenzprozesses in Gruppen von jeweils sechs Reaktoren insgesamt sechs verschiedene pH Soll-Werte untersucht. Es zeigte sich zunächst, dass der verwendete

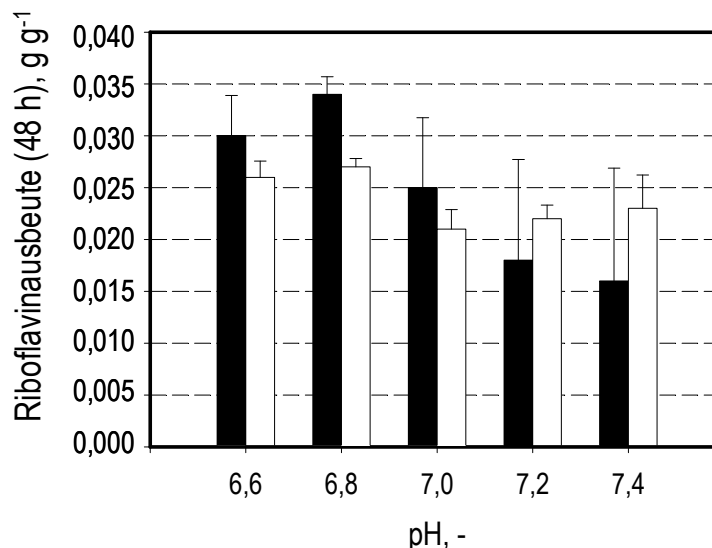


**Abbildung 5.2.13:** Zugabemengen und Zeitpunkt von Ammonium zum einen im Standardverfahren über die Laugenzugabe (A) und zum anderen im entkoppelten Verfahren über den Zulauf (B).

Regelalgorithmus nicht dazu geeignet ist, pH Werte abweichend von einem pH von 6,8 dauerhaft einzustellen. Nur für diesen Sollwert, für den die pH Regelung entwickelt wurde, konnten in dem Parallelansatz zufriedenstellende Ergebnisse erreicht werden. Deshalb war es nicht möglich eine Quantifizierung des Einflusses des pH auf die Riboflavinproduktion vorzunehmen.

Qualitativ zeigt sich jedoch auch bei diesem Versuch die wichtige Rolle des Ammoniumhydroxids für die Riboflavinproduktion und die Vorteile der Entkopplung der Stickstoffzugabe von der pH Regelung. Drei der sechs Reaktoren wurden mit Ammoniumhydroxid titriert, während in die drei übrigen Reaktoren Natronlauge zugegeben wurde und die Stickstoffzugabe über die Zulauflösung erfolgte.

Tendenziell neigte der Regler zum Überschwingen. Deshalb lag der tatsächliche pH in den Reaktoren größtenteils über den eingestellten Sollwerten. Es erfolgte demnach nur eine unregelmäßige bis ausbleibende Zugabe von Base. Im Fall von Ammoniumhydroxid als Base führte dies zu einer Unterversorgung mit Stickstoff und dementsprechend schlechten Riboflavinausbeuten und hoher Varianz der Ergebnisse. Diese liegen für den Versuch zwischen  $0,034 \text{ g g}^{-1}$  (pH 6,8) und  $0,002 \text{ g g}^{-1}$  (pH 7,6) für die verschiedenen pH Werte und auch innerhalb der Reaktoren ist die parallele Reproduzierbarkeit vor allem bei hohem pH als ungenügend zu bewerten. Teilweise wurden



**Abbildung 5.2.14:** Riboflavinausbeuten bei unterschiedlichen pH-Sollwerten und unterschiedlicher Base. Zum einen erfolgte die Zugabe von Ammoniumhydroxid (dunkelgraue Säulen), zum anderen die Zugabe von Natronlauge (hellgraue Säulen). Die große relative Standardabweichung und Varianz der erreichten mittleren Riboflavinausbeute für die mit Ammoniumhydroxid titrierten Reaktoren zeigt den Einfluss von Ammoniumhydroxid auf die Riboflavinproduktion. Die konstante Zugabe von Stickstoff über das Zulaufmedium macht den Prozess unabhängiger von der Zuverlässigkeit der pH-Regelung.

relative Standardabweichungen von über 50 % gemessen. Hier zeigt sich der Vorteil der Entkopplung von Stickstoffzugabe und pH Kontrolle sehr deutlich. Die Ergebnisse für die mit NaOH titrierten Reaktoren mit konstanter Stickstoffzugabe weisen eine deutlich geringere Varianz der erreichten Riboflavinausbeuten auf (Abbildung 5.2.14). Ebenso ist die parallele Reproduzierbarkeit deutlich besser. Die größte relative Standardabweichung ergab sich für pH 7,4 mit 14 %, die kleinste für pH 6,8 mit 3 %. Im Schnitt lag die relative Standardabweichung bei 7,6 %. Es blieb ungeklärt, warum bei diesem einen Versuch für die Regelung auf den Sollwert pH 6,8 die Riboflavinausbeuten mit Ammoniumhydroxid als Base höhere Ausbeuten zeigten als mit Natronlauge. In allen weiteren Versuchen wurde in den Prozessen mit entkoppelter Stickstoff- und Basezugabe eine der Referenz entsprechende Ausbeute erreicht.

Mit Hilfe der dargestellten Entkopplung der Stickstoff- von der Basezugabe wurde eine weitere Optimierung durchgeführt, die nicht mehr von einem unkontrollierten Parameter wie der Zugabe von Stickstoff über die Base beeinflusst wurde.

#### 5.2.4 Mediumoptimierung im Zulaufverfahren mit Natronlauge zur pH-Kontrolle

Der experimentelle Versuchsplan für die zweite Optimierung wurde über die Entkopplung von Base- und Stickstoffzugabe hinaus modifiziert. Die Variablen der Optimierung wurden um die anorganische Stickstoffquelle Natriumnitrat ergänzt. Auf Grund der Erfahrungen aus der ersten Optimierung wurden die Konzentrationsbereiche der Variablen verändert (Tabelle 5.2.5). Für Glycerin wurde die obere Konzentrationsgrenze von  $5 \text{ g L}^{-1}$  auf  $2 \text{ g L}^{-1}$  reduziert, um den relevanten Konzentrationsbereich genauer auflösen zu können. Die Höchstkonzentration der ‚Casamino Acids‘ wurde an die von Hefeextrakt angepasst ( $60 \text{ g L}^{-1}$ ). Der Konzentrationsbereich von Ammoniumchlorid wurde erweitert, da sich die Qualität dieser Komponente als Stickstoffquelle in den Versuchen zur Entkopplung von Stickstoff- und Basezugabe zeigte. Auch für Eisen-sulfat-Heptahydrat wurde der Konzentrationsbereich erweitert. In Abbildung 5.2.15 sind die Variationsbereiche der Medienkomponenten graphisch dargestellt.

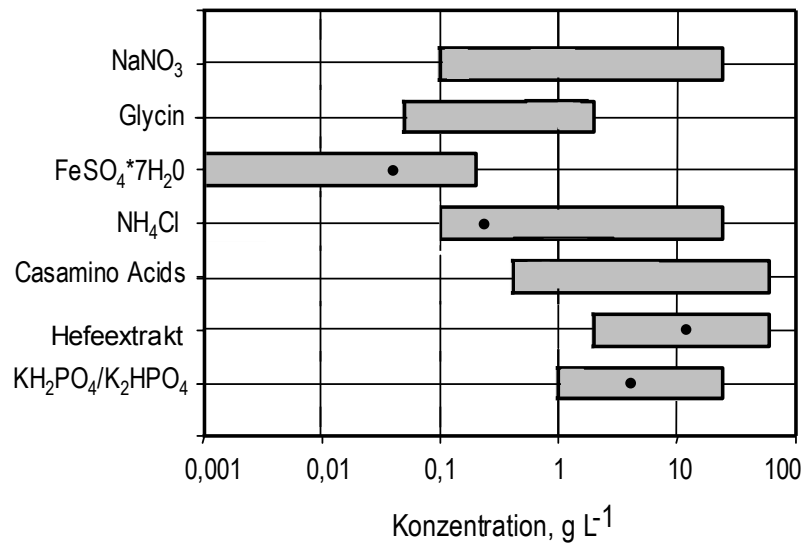


Abbildung 5.2.15: Variationsbereiche der Konzentrationen der untersuchten Medienkomponenten. Die schwarzen Symbole kennzeichnen die im Ausgangsmedium verwendete Konzentration.

Tabelle 5.2.5: Für die 2. Optimierung verwendete Konzentrationsbereiche der Variablen.

Konzentrationsbereiche der Variablen							
g L <sup>-1</sup>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	NH <sub>4</sub> CL	Hefeextrakt	„Casamino Acids“	Glycin	Natriumnitrat	FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O
<b>Referenz</b>	4,71	0,23	11,77	0,00	0,00	0,00	0,0004
<b>Obere Grenze</b>	24	24	60	60,00	2,00	24	0,200
<b>Untere Grenze</b>	1	0,1	2	0,4	0,05	0,1	0,001
<b>Schrittgröße</b>	1,53	1,59	3,87	3,97	0,13	1,59	0,01

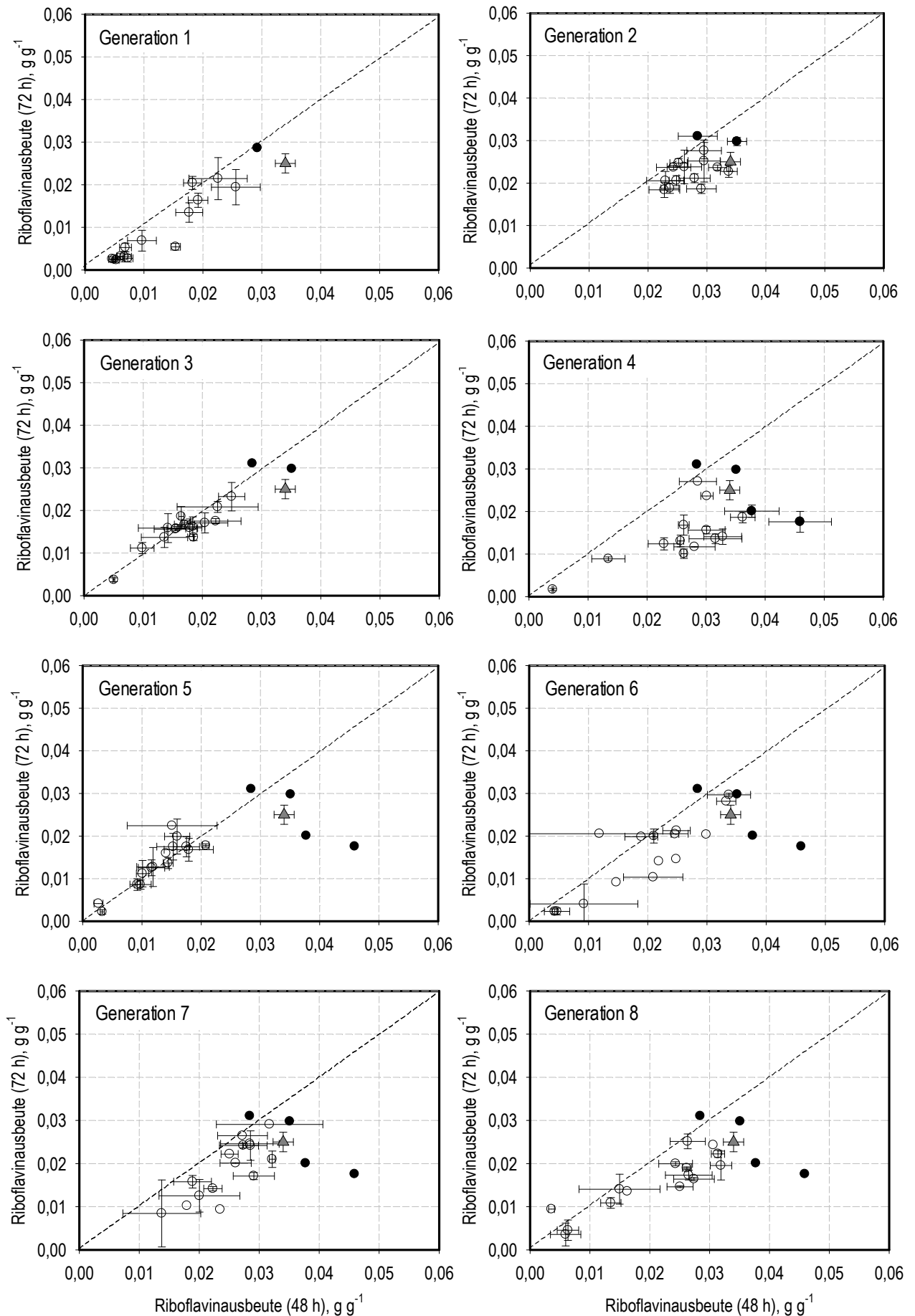
**Tabelle 5.2.6: Einstellungen der Software GAME.opt für die 2. Optimierung.**

Konfiguration von GA- ME.opt		
Variablen	7	
Variationsbereich	16 Konzentrationsniveaus	
Zielgrößen	2	Maximierung der Riboflavinausbeute nach 48 h /72 h
Binärzeichenkettenlänge	$l = 28$ bit	
Populationsgröße	$M = 15$	3 Replikate pro Individuum
Externe Population	$M_E = 8$	bis zu 8 Individuen
Crossover	2 Crossoverpunkte	
Mutationsrate	1% (Punktmutation)	

Als Ziel der Optimierung wurde die Maximierung der Riboflavinausbeute nach 48 und nach 72 Stunden beibehalten.

Aufgrund der Verwendung von Natronlauge als Base und der damit erheblich verbesserten, parallelen Reproduzierbarkeit wurden nur noch 3 Replikate pro Medienzusammensetzung verwendet. Damit konnte die Populationsgröße von 12 auf 15 Medien pro Versuchslauf erweitert werden. Die übrigen Prozessparameter wie die Temperatur, Zulauftrate, Zulaufzusammensetzung und der pH etc. wurden konstant gehalten. Pro Komponente wurden nun 16 verschiedene Konzentrationsstufen getestet, um den zum Teil vergrößerten Variationsbereichen gerecht zu werden und eine genauere Untersuchung der festgelegten Konzentrationsbereiche zu ermöglichen. Ein Medium wurde jeweils von einem Bitstring mit der Länge von 28 Bit (vorher 18 Bit) codiert. GAME.opt wurde so konfiguriert, dass zwei ‚Crossover‘-Punkte möglich waren und die Mutationsrate auf 1 % festgelegt wurde. Die Größe der externen Population wurde auf 7 Individuen beschränkt.

In jedem Lauf wurde als 16. Medium das ursprüngliche Satzmedium als Referenz verwendet. Auch wenn der Prozess durch die Entkopplung der Stickstoffzugabe von der pH Kontrolle nicht mehr so anfällig auf Abweichungen des pH reagiert, kann eine Störung des Prozessablaufs mittels der Referenz identifiziert und die Generation daraufhin bewertet werden.



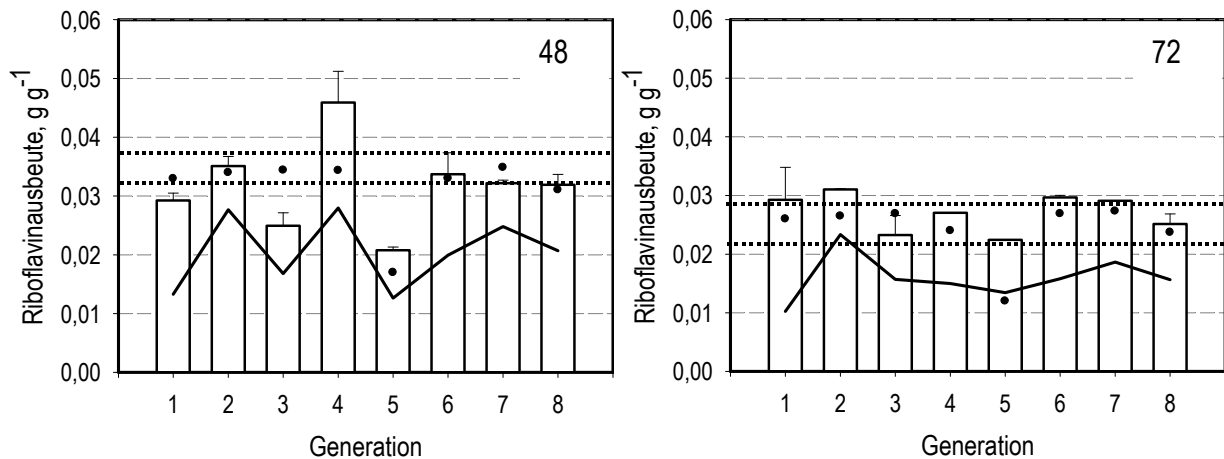
**Abbildung 5.2.16: Individuen der acht Generationen im Lösungsraum. (●) repräsentieren die externe Population (Pareto Front).**

Es wurden 8 Generationen untersucht, wobei insgesamt 120 unterschiedliche Medienzusammensetzungen getestet wurden. Betrachtet man die einzelnen Generationen der Optimierung im Lösungsraum, erreichen die Medienzusammensetzungen wie auch schon während der ersten Optimierung Riboflavinausbeuten, die sich zumeist entlang der Winkelhalbierenden verteilen (Abbildung 5.2.16). Wie zuvor liegt der Schwerpunkt der Lösungen des zweidimensionalen Optimierungsproblems eher unterhalb derselben. Auch hier konnte demnach keine bedeutsame Verbesserung der Produktion nach 48 Stunden Prozesszeit erreicht werden.

Im Verlauf der Optimierung bildet sich eine deutliche Pareto-Front aus, die sich ab der 4. Generation nicht mehr verändert. Die 5. Generation zeigt in dieser Darstellung auffällig niedrige Riboflavinausbeuten. Die weiteren Generationen können keine neuen Individuen für die Pareto-Front generieren. Folglich wird die Optimierung nach Generation 8 abgebrochen. Für die in jedem Versuch mitgeführte Referenz ergab sich eine mittlere Riboflavinausbeute von  $0,034 \text{ g g}^{-1}$  mit einer relativen Standardabweichung von 4,7 % nach 48 Stunden und eine mittlere Riboflavinausbeute von  $0,025 \text{ g g}^{-1}$  mit einer relativen Standardabweichung von 8,8 %.

Abbildung 5.2.17 zeigt die in jeder Generation maximal erreichten Riboflavinausbeuten sowie die mittlere Riboflavinausbeute jeder Generation nach 48 und 72 Stunden. Die höchste Riboflavinausbeute nach 48 Stunden lag bei  $0,046 \text{ g g}^{-1}$  mit einer relativen Standardabweichung von 11,6 % und wurde in der 4. Generation erreicht, während nach 72 Stunden eine maximale Ausbeute von  $0,031 \text{ g g}^{-1}$  mit einer relativen Standardabweichung von 1 % in der 2. Generation erreicht wurde. Damit konnte ein Medium identifiziert werden, das die Riboflavinausbeute nach 48 Stunden um 35 % verbessert sowie ein anderes Medium, was die Riboflavinausbeute nach 72 Stunden um 24 % verbessert. Wie auch schon in der ersten Optimierung ergibt sich keine stetige Verbesserung der maximalen oder auch der mittleren Riboflavinausbeute mit den fortlaufenden Generationen. Für die erste Zielgröße, die Riboflavinausbeute nach 48 Stunden, erreicht die 1. Generation noch nicht das Niveau der Referenz (gepunkteter Bereich). Ab der 2. Generation entspricht die maximale Riboflavinausbeute der meisten Generationen, der von der Referenz erzielten Ausbeute, die nur von dem besten Medium der 4. Generation deutlich übertroffen wird. Die 3. und 5. Generation zeigen dagegen deutlich niedrigere Riboflavinausbeuten als der Referenzversuch.

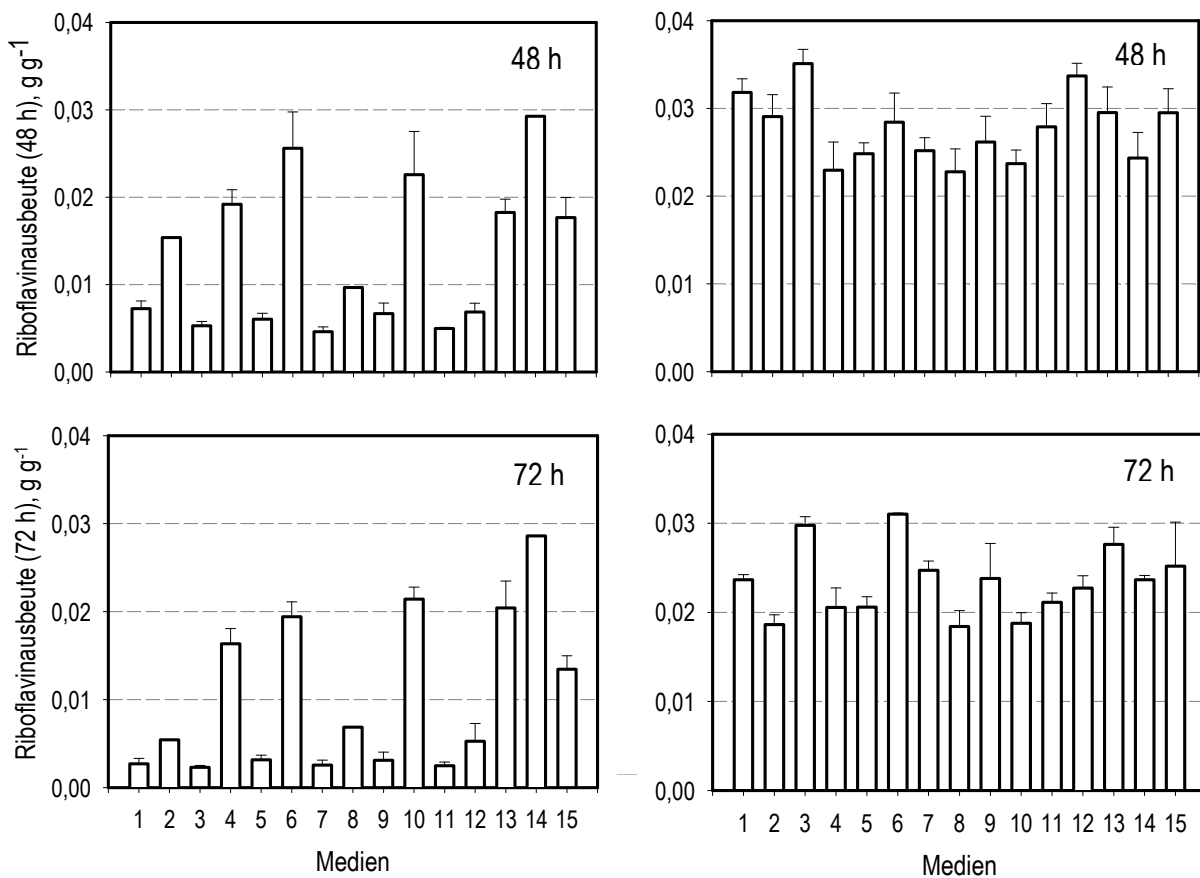




**Abbildung 5.2.17: Beste Riboflavinausbeuten (Säulen) jeder Generation sowie die sich aus allen Individuen ergebenden Mittelwerte (Linie) nach 48 und 72 Stunden. Die Standardabweichungen ergeben sich aus drei Replikaten des jeweiligen Mediums. Die Referenz, die innerhalb jedes Parallelexperiments mitgeführt wurde, ist als schwarzes geschlossenes Symbol gezeigt.**

Bei genauerer Betrachtung der 5. Generation zeigt auch das mitgeführte Referenzmedium um 40 % niedrigere Ausbeuten als im Durchschnitt. Hier liegt offensichtlich eine systematische Beeinflussung des Parallelexperiments vor, bei dem andere Einflüsse, die sich aufgrund der reduzierten Analytik nicht direkt feststellen lassen, auf den Prozess eingewirkt haben müssen. Für die Zielgröße nach 72 Stunden liegt die maximal erreichte Riboflavinausbeute schon in der 1. Generation über dem Wert des Referenzmediums. Das in der 2. Generation erzielte Ergebnis von  $0,031 \text{ g g}^{-1}$  Riboflavinausbeute kann in den folgenden Generationen nicht mehr übertroffen werden. Wie auch für die erste Zielgröße zeigt die 5. Generation erheblich niedrigere Riboflavinausbeuten, als die anderen Generationen und die Referenz.

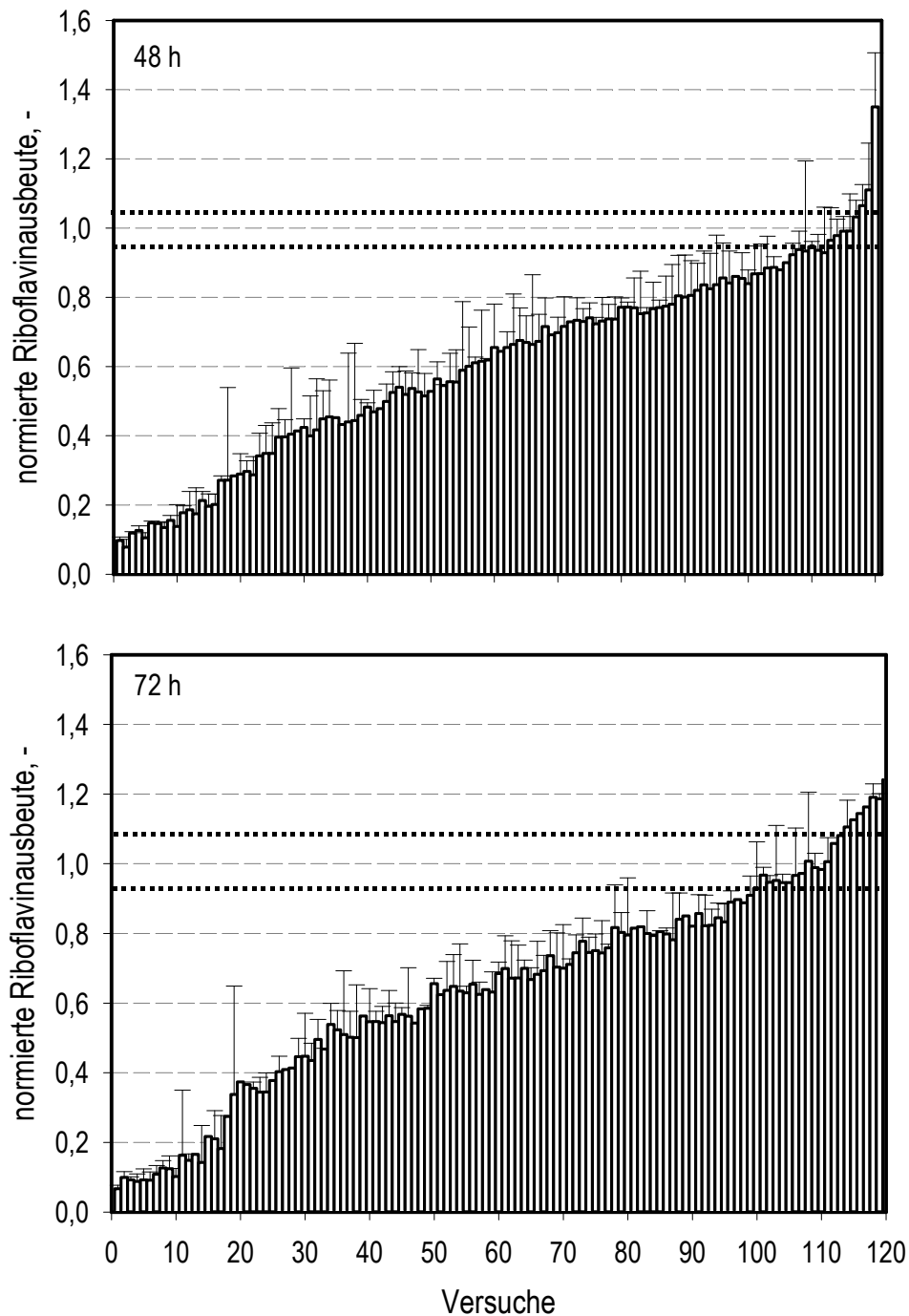
Es spricht nicht gegen die Effizienz des verwendeten Genetischen Algorithmus, dass nur wenige optimierte Medienzusammensetzungen identifiziert werden konnten. Diese zeigt sich bereits beim Vergleich der 1. und der 2. Generation (Abbildung 5.2.18). In der zufällig erzeugten 1. Generation weisen 60 % der Medien eine im Vergleich zur Referenz um mindestens 70 % reduzierte Riboflavinausbeute nach 48 Stunden auf. In der 2. Generation zeigt nicht ein einziges Medium so niedrige Produktausbeuten und auch in den weiteren Generationen bleibt der Anteil immer unter 15 %. Gleiches gilt für das zweite Optimierungsziel. In der 1. Generation zeigen über 50 % der Medienzusammensetzungen eine um 80 % reduzierte Riboflavinausbeute. In den folgenden Generationen liegt dieser Anteil im höchsten Fall bei 13 %.



**Abbildung 5.2.18: Riboflavinausbeute nach 48 Stunden und 72 Stunden in der zufällig erzeugten 1. Generation (links) und in der darauffolgenden 2. Generation (rechts).**

Die Ergebnisse sprechen eher dafür, dass das bisher verwendete Satzmedium bereits eine sehr gute Zusammensetzung aufweist und das Optimierungspotenzial des Satzmediums als geringfügig einzuschätzen ist. So erreichte schon die zweite Generation vielversprechende Medienzusammensetzungen, die von den weiteren Generationen nicht mehr übertroffen werden konnten.

Die Ergebnisse der insgesamt 120 Medien sind noch einmal in Abbildung 5.2.19, der Produktionsleistung nach sortiert, zusammengefasst. Wie schon in der ersten Optimierung zeigten nur sehr wenige Medien eine höhere Riboflavinausbeute nach 72 Stunden als nach 48 Stunden. Für das erste Optimierungsziel wurden nur vier Medien identifiziert, die eine verbesserte mittlere Riboflavinausbeute aufweisen. Von diesen 3,3 % verbesserter Medien zeigte nur ein Medium eine statistisch signifikante Verbesserung. Die relative Standardabweichung dieser Medien betrug 8,5 %. Nach 72 Stunden Prozesszeit wiesen 8,3 % der getesteten eine bessere mittlere Riboflavinausbeute als Referenzmedium auf. Nur 4,1 % aller Medien zeigten eine statistisch signifikante Verbes-



**Abbildung 5.2.19:** Erreichte Riboflavinausbeuten nach 48 Stunden und 72 Stunden für alle untersuchten Medien der 2. Optimierung (120 Medien sortiert). Die dargestellten Ausbeuten sind auf die Ausbeute des Referenzmediums bezogen. Es erreichte nur ein Medium nach 48 Stunden und 4,1 % der Medien nach 72h ein besseres Ergebnis als das Referenzmedium (Ausgangsmedium).

serung. Die relative Standardabweichung der verbesserten Medien nach 72 Stunden betrug 4,6 %. Abbildung 5.2.19 zeigt damit deutlich, dass in dieser Optimierung das Satzmedium nicht weiter verbessert werden konnte.

Die Zusammensetzungen der Individuen der Pareto-Front sind in Tabelle 5.2.7 darge-

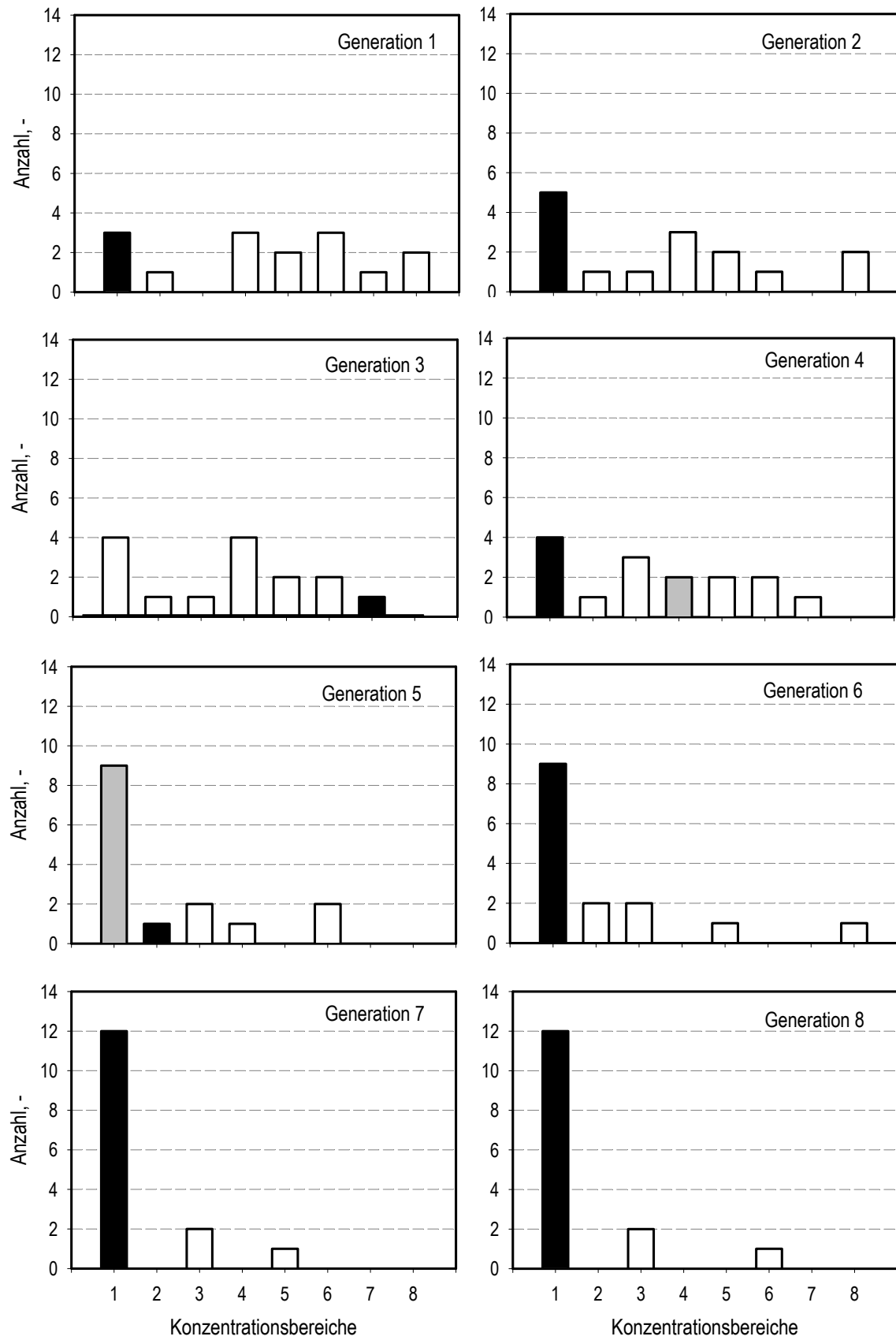
**Tabelle 5.2.7: Zusammensetzung der Individuen der Pareto-Front.**

Individuum	$\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ $\text{gL}^{-1}$	Hefe- extrakt $\text{gL}^{-1}$	,Casamino Acids' $\text{gL}^{-1}$	$\text{NH}_4\text{Cl}$ $\text{gL}^{-1}$	$\text{NaNO}_3$ $\text{gL}^{-1}$	Glycin $\text{gL}^{-1}$	$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ $\text{gL}^{-1}$
Ind 3 Gen 2	14,80	25,20	32,19	0,10	19,22	0,830	0,014
Ind 6 Gen 2	19,40	9,73	44,11	0,10	3,29	0,700	0,041
Ind 7 Gen 4	19,40	40,67	4,37	0,10	0,10	0,700	0,041
Ind 10 Gen 4	11,73	13,60	28,21	1,69	19,22	0,960	0,014

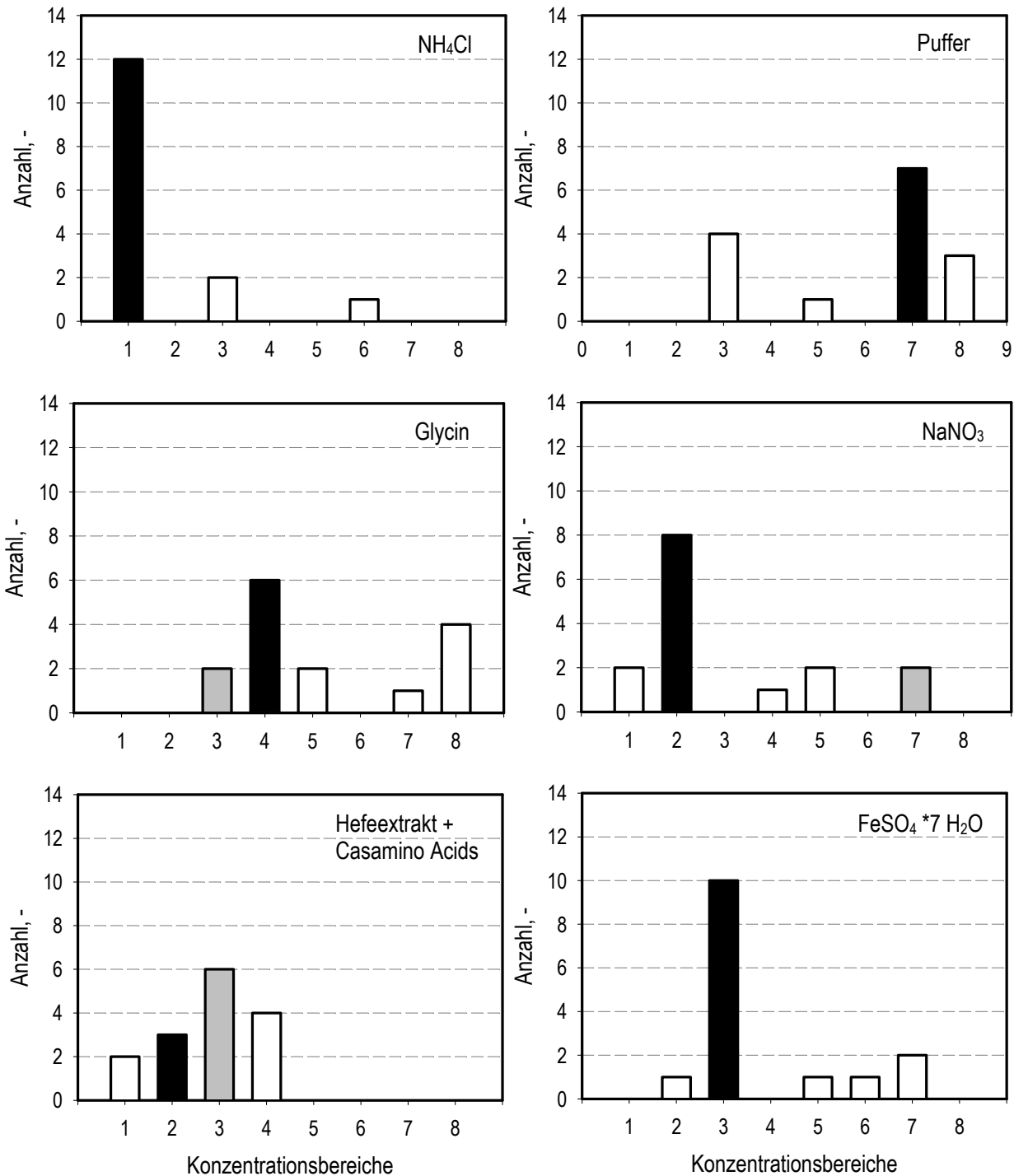
stellt. Im Fall von Ammoniumchlorid, Glycin und Eisensulfat weisen die Zusammensetzungen einige Gemeinsamkeiten auf. Betrachtet man die Komponenten Hefeextrakt und ,Casamino Acids' nicht einzeln, sondern zusammen als komplexe Stickstoffquelle, zeigt sich auch hier eine Gemeinsamkeit zwischen den Medien. Über die Konzentration der Phosphatsalze kann gesagt werden, dass sie sich für diese speziellen Medien im mittleren bis oberen Konzentrationsbereich befindet. Betrachtet man die Entwicklung der Anfangskonzentration der einzelnen Mediumskomponenten über die Generationen in Häufigkeitsverteilungen (siehe Abbildung 5.2.20 und Abbildung 5.2.21), kann im Gegensatz zur ersten Optimierung für mehrere Variablen eine Konvergenz festgestellt werden.

Zunächst weist die 1. Generation für alle Variablen eine zufällige Verteilung der Anfangskonzentrationen über den gesamten Variationsbereich auf. Dann zeigen sich mit jeder weiteren Generation für die Komponenten Ammoniumchlorid, die Phosphatsalze, Glycin, Eisensulfat-Heptahydrat und die komplexen Stickstoffquellen bestimmte Ausgangskonzentrationen, die immer öfter vom Genetischen Algorithmus für die Medienzusammenstellung vorgeschlagen werden.

Besonders deutlich ist diese Entwicklung für Ammoniumchlorid zu beobachten (Abbildung 4.2.20). Die Häufigkeitsverteilung der Anfangskonzentration über die Generationen strebt klar zum unteren Rand des Konzentrationsbereichs. In der 5. und 6. Generationen besitzen schon 60 % der Medien eine Ammoniumchloridkonzentration von  $0,1 \text{ g L}^{-1}$ . In den beiden darauffolgenden Generationen steigt dieser Anteil sogar auf 80 %. Auch die besten Medien jeder Generation weisen zu 70 % diese Konzentration auf. Da sich die Anfangskonzentration zum Ende der Optimierung so deutlich auf dem niedrigsten Konzentrationsniveau eingestellt hat, kann davon ausgegangen werden, dass der Variationsbereich für diese Medienkomponente ungünstig



**Abbildung 5.2.20: Häufigkeitsverteilung der Anfangskonzentrationen von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in den acht Generationen. Schwarz sind die Konzentrationsbereiche, in denen die beste Riboflavinausbeute nach 48 Stunden (bzw. gleichzeitig auch nach 72 Stunden) erreicht wurde. Die Bereiche in denen die beste Ausbeute nach 72 Stunden abweichend von den Ergebnissen nach 48 Stunden erreicht wurde, sind grau gekennzeichnet.**

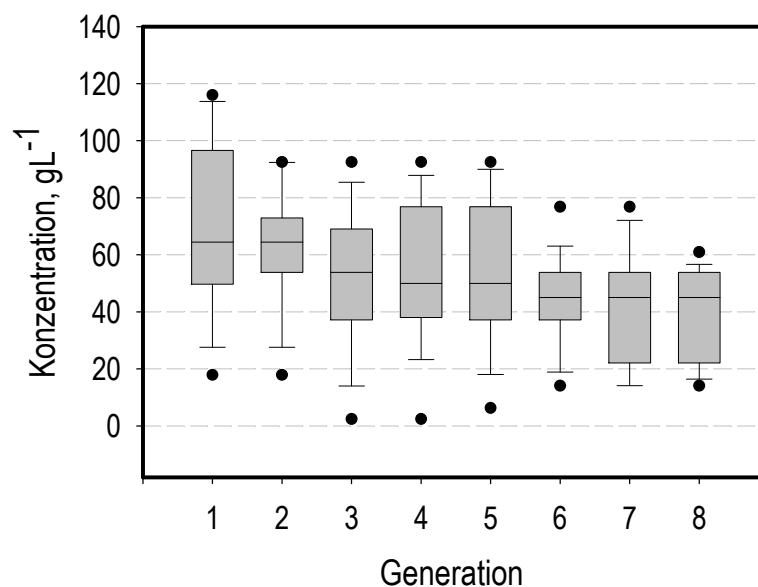


**Abbildung 5.2.21:** Häufigkeitsverteilung der Anfangskonzentrationen der Variablen in der letzten Generation (Generation 8). Die Konzentrationsbereiche, in denen die beste Riboflavinausbeute nach 48 Stunden (bzw. gleichzeitig auch nach 72 Stunden) erreicht wurde, sind schwarz gekennzeichnet. Die Bereiche in denen die beste Ausbeute nach 72 Stunden abweichend von den Ergebnissen nach 48 Stunden erreicht wurde, sind grau gekennzeichnet.

gewählt wurde. In Bezug auf die Anfangskonzentration des Phosphatpuffers stellen sich zum Ende der Optimierung zwei bevorzugte Konzentrationen heraus: zum einen eine hohe Anfangskonzentration von  $19,4 \text{ g L}^{-1}$ , zum anderen eine Konzentration im mittleren Variationsbereich ( $\sim 8,7 \text{ g L}^{-1}$ ). Dabei liegt der Fokus aber deutlich auf den

hohen Konzentrationen. Auch die besten Medien der letzten Generationen weisen diese Konzentrationsstufe auf. Bei der Komponente Glycin wird eindeutig eine Konzentration von  $0,7 \text{ g L}^{-1}$  bevorzugt. Betrachtet man die Häufigkeitsverteilung aller Generationen, zeigt sich ab der 4. Generation ein eindeutiger Trend zu Glycinkonzentrationen von  $0,57$  bis  $1,22 \text{ g L}^{-1}$ . Hier liegt auch der Schwerpunkt für die Konzentrationen, die in den besten Medium jeder Generation zu finden sind. Eisensulfat-Heptrahydrat zeigt eine starke Entwicklung hin zu der Konzentration  $0,041 \text{ g L}^{-1}$ , die zum Ende der Optimierung in fast 70 % der Medienzusammensetzungen zu finden ist. Hefeextrakt allein betrachtet, tendiert zu zwei verschiedenen Konzentrationen. Mit einem Anteil von 20-30 % zeigt sich eine hohe Konzentration von  $40,7 \text{ g L}^{-1}$  und mit einem noch größeren Anteil von 50-60 % eine relativ niedrige Konzentration von  $9,7 \text{ g L}^{-1}$ . Diese Konzentrationen finden sich bei vielen der besten Medien der Generationen. Die Betrachtung von ‚Casamino Acids‘ zeigt ein ähnliches Bild bezüglich der Konzentrationsstufen  $4,4 \text{ g L}^{-1}$  und  $44,1 \text{ g L}^{-1}$ .

Es ist aber sinnvoller, die beiden Medienbestandteile additiv zu betrachten. Hier zeigt sich bereits in der 3. Generation, dass Konzentrationen unterhalb einer Grenze von zusammen ungefähr  $65 \text{ g L}^{-1}$  bevorzugt werden. In den letzten drei Generationen wird eine Gesamtkonzentration der beiden Medienbestandteile von  $61 \text{ g L}^{-1}$  nicht mehr überschritten. Der Anteil an komplexen Stickstoffquellen im Medium nimmt von Generation zu Generation immer deutlicher ab (Abbildung 5.2.22).



**Abbildung 5.2.22:** Entwicklung der Gesamtkonzentration komplexer Stickstoffquellen in den vom Genetischen Algorithmus generierten Medienzusammensetzungen. Der Mittelwert nimmt mit jeder Generation weiter ab.

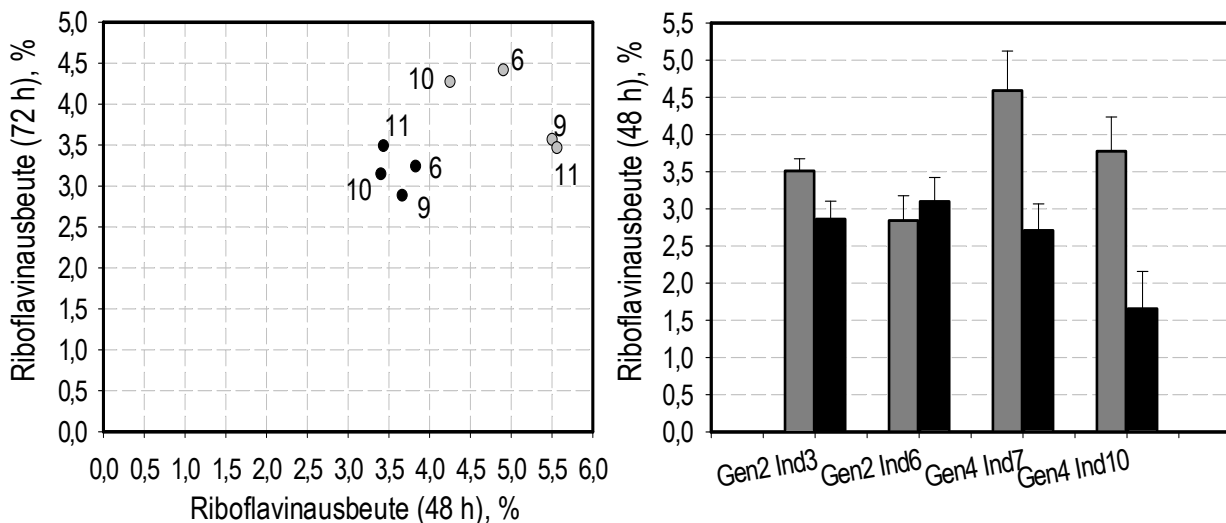
### 5.2.5 Validierung der Optimierungsergebnisse im Millilitermaßstab

Bevor die Maßstabsübertragung der besten Medien der Medienoptimierung vorgenommen wurde, fand eine Validierung dieser Medienzusammensetzungen in Parallelversuchen im Milliliter-Maßstab statt. Im Vordergrund stand hier die sequentielle Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aus der ersten und zweiten Optimierung.

Die Ergebnisse für die Pareto-Front der ersten Optimierung sind in Abbildung 5.2.23 links dargestellt. Die noch einmal untersuchten Medienzusammensetzungen aus der 3. Generation (Individuen 6,9,11), die alle Individuen der externen Population der 6. Generation darstellen, erbrachten beim zweiten Versuch deutlich niedrigere Riboflavinausbeuten. Zusätzlich wurde ein weiteres Medium (Individuum 10 Generation 3) untersucht. Auch das Ergebnis dieses Mediums erreichte nicht die ursprünglich erhaltenen Riboflavinausbeuten. Obwohl für jedes Medium zwölf Reaktoren verwendet wurden, lag die relative Standardabweichung zwischen 10 % und 20 %.

Für die Validierung der Medien der zweiten Optimierung wurden 4 Versuche gestartet, die alle aufgrund von technischen Problemen mit dem Laborroboter verfrüht abgebrochen werden mussten. Deshalb konnte nur ein Wert für die Riboflavinausbeute nach 48 Stunden für die vier Medien der Pareto-Front erhalten werden (Abbildung 5.2.23).

Die Versuche zeigen, dass, obwohl die sequentielle Reproduzierbarkeit für das Referenzmedium während der Optimierungsversuche als gut einzuschätzen ist, dies nicht



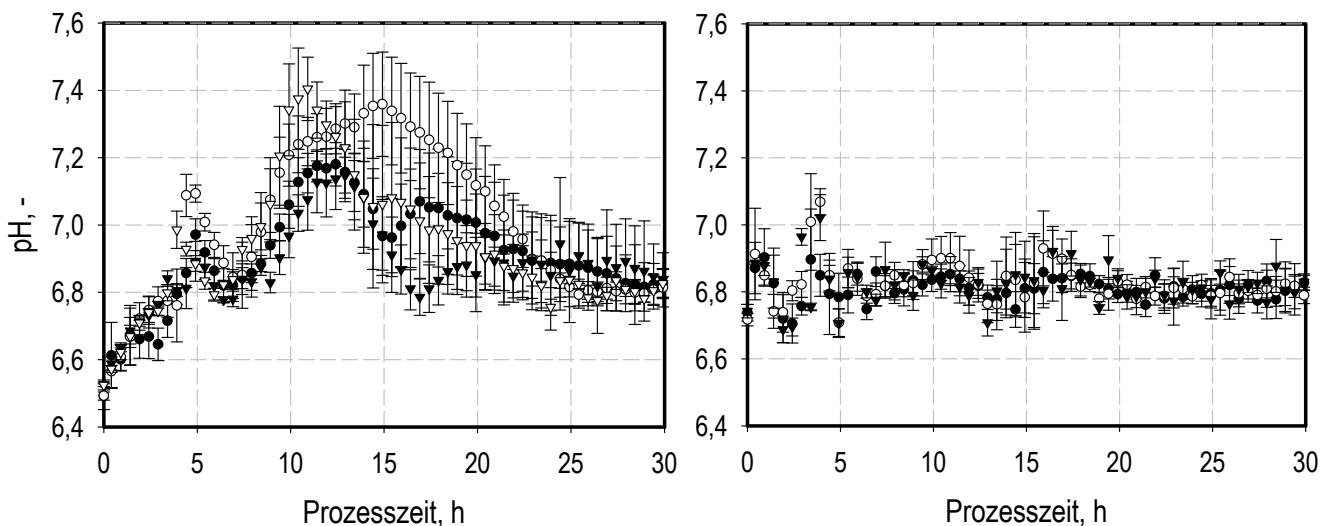
**Abbildung 5.2.23: Vergleich verschiedener Parallelexperimente mit Individuen der Pareto-Front der 1. Optimierung (links) und der 2. Optimierung (rechts). Es zeigt sich, dass die Ergebnisse aus den Optimierungs-Experimenten (grau) nicht reproduziert werden können. Die Ergebnisse der Wiederholungsversuche zeigen deutlich niedrigere Ausbeuten (schwarz).**



für die übrigen Medien der Optimierung gilt. Als mögliche Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse wurde der pH-Verlauf während des Prozesses identifiziert. Das Referenzmedium, das nur am Ende der Satzphase einen pH-Anstieg aufweist, zeigte immer denselben pH-Verlauf während der Experimente. In Abbildung 5.2.24 (rechts) sind die Mittelwerte des pH über die Prozesszeit aus jeweils drei bis sechs Reaktoren für das Referenzmedium aus den Wiederholungsversuchen zur Reproduktion der Pareto-Front gezeigt. Die Verläufe sind gut vergleichbar und auch die Standardabweichung ist gering.

Betrachtet man dagegen die Medien der Optimierung, z.B. Individuum 6 der 2. Generation (Abbildung 5.2.24 links), zeigen sich von Versuch zu Versuch recht unterschiedliche Verläufe über die Prozesszeit. Auch die auftretenden Standardabweichungen sind im Vergleich zum Referenzmedium hoch. So ergeben sich für zwei Reaktoren des selben Parallelversuches zum gleichen Zeitpunkt Unterschiede von 0,6 pH-Einheiten und mehr.

Bis kurz nach Ende der Satzphase, die durch einen steilen Anstieg des pH gekennzeichnet ist, laufen die Reaktoren parallel. Zu diesem Zeitpunkt ist auch zwischen den einzelnen Parallelexperimenten kein großer Unterschied zu erkennen.



**Abbildung 5.2.24:** Verlauf des pH in den Milliliter-Reaktoren für ein Medium der zweiten Optimierung (links) und das Referenzmedium (rechts). Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils vier verschiedenen Parallelexperimenten. Die gezeigten Fehlerbalken resultieren aus je drei Reaktoren. Während die Verläufe für das Referenzmedium parallel wie sequentiell gut reproduzierbar sind, zeigen sich für das Medium der Optimierung große Unterschiede vor allem in der sequentiellen Reproduzierbarkeit.

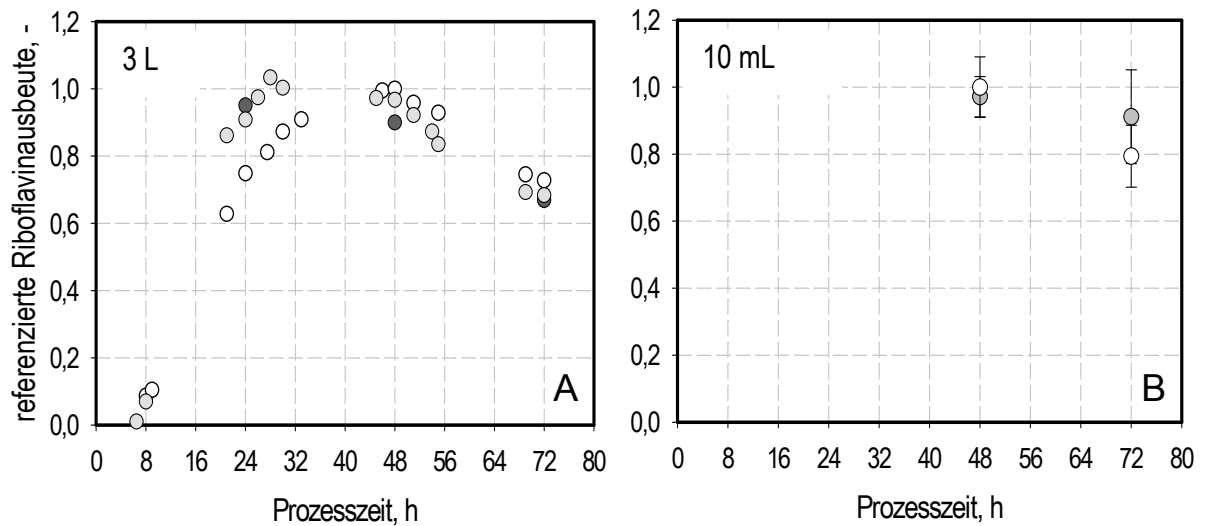
Ab Stunde 8 der Prozesszeit entwickelt sich der pH jedoch unterschiedlich, insbesondere wenn man die Mittelwerte der Parallelexperimente vergleicht. Da der pH zu dieser Zeit über dem Sollwert von pH 6,8 liegt und die einseitige Regelung nicht eingreifen kann, ist dadurch keine Kontrolle möglich. Besonders Medien mit einem hohen Anteil an komplexen Medienbestandteilen (Hefeextrakt und ‚Casamino Acids‘) zeigen beschriebene Verläufe, die durch niedrige Pufferkonzentrationen noch verstärkt werden.

#### 5.2.6 Übertragung der Optimierungsergebnisse in den Labormaßstab

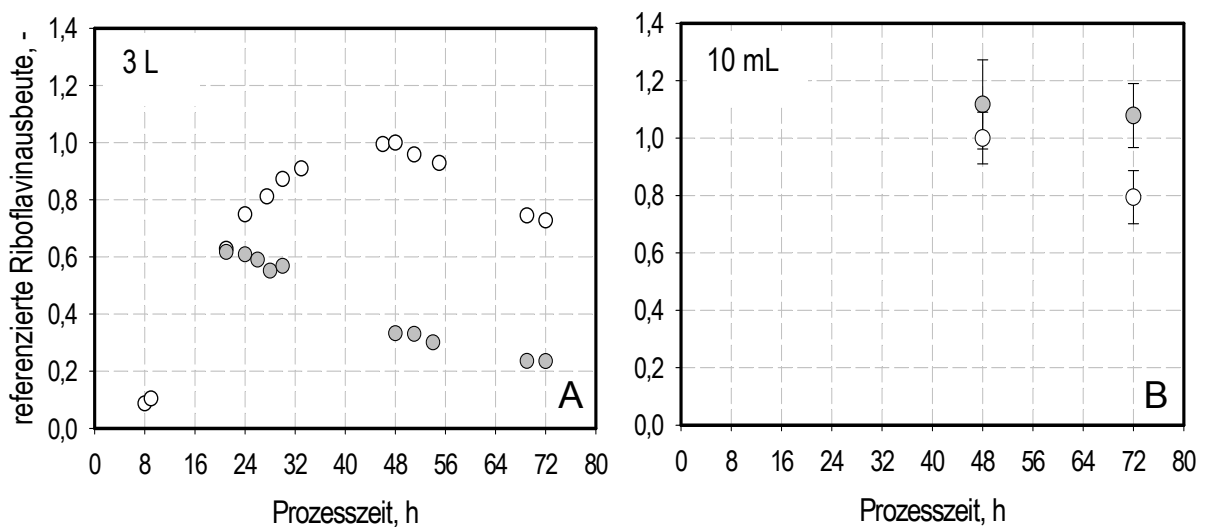
Beim Übertragen der Versuche in den Litermaßstab fiel zunächst auf, dass einige der Medien stark verlängerte Verzögerungsphase zeigen. So konnte der Zulauf für das Medium 7 der 4. Generation (2. Optimierung) im Labormaßstab erst 4 Stunden später gestartet werden. Eine ebenso lange Verzögerung ergab sich für das Medium 6 der 2. Generation (2. Optimierung).

Die Medien wurden für die Versuche im Litermaßstab, anders als die Medien für die Experimente im Milliliter-Maßstab, direkt und nicht aus Stammlösungen angesetzt. Teilweise kam es zu Ausfällungen nach dem Autoklavieren. Beide Medien zeichnen sich durch einen hohen Anteil an komplexen Medienkomponenten aus. Wurden auch für den Litermaßstab Stammlösungen hergestellt und diese erst nach dem Autoklavieren gemischt, endete die Satzphase zu fast gleichen Zeitpunkten wie im Milliliter-Maßstab. Trotz nun gleicher Verzögerungsphasen zeigten die untersuchten Medien im Litermaßstab ein völlig anderes Produktionsverhalten.

Für die erste Optimierung wurden vier Medien untersucht. Zwei der drei optimierten Medien der Pareto-Front zeigten keine nennenswerte Produktbildung. Daraufhin wurden zwei weitere Medien der Optimierung überprüft. Da alle Individuen der Pareto-Front aus einer Generation herrührten und ihre Ergebnisse im Milliliter-Maßstab nicht reproduziert werden konnten, stammten die gewählten Individuen aus anderen Generationen der Optimierung. Bei diesen Medien handelte es sich um Medium 10 der 2. Generation und Medium 12 der 5. Generation. Beide Medien zeichnen sich durch geringe Konzentrationen komplexer Medienbestandteile aus, wobei Individuum 10 der 2. Generation nur  $0,4 \text{ g L}^{-1}$  ‚Casamino Acids‘ aufweist. Medium 10 der 2. Generation erzielte eine gute Riboflavinproduktion, die sich in einem zweiten Experiment wiederholen ließ. In Abbildung 5.2.25 A werden die erreichten Produkt ausbeuten (referenziert auf die Riboflavinausbeute nach 48 Stunden) mit den Produktausbeuten des



**Abbildung 5.2.25: Medium 10 2. Generation der 1. Optimierung (A, graue Symbole) zeigt in zwei Versuchen bis 30 Stunden deutlich bessere Riboflavinausbeuten als das Referenzmedium (A, weiße Symbole). Für den Rest des Prozesses sind die Ausbeuten gut vergleichbar. Im Milliliter-Reaktor erreicht dasselbe Medium nach 48 Stunden mit dem Referenzmedium vergleichbare Ausbeuten, nach 72 Stunden liegen diese im Mittel etwas höher, zeigen aber keine statistisch signifikante Verbesserung (B).**



**Abbildung 5.2.26: Medium 12 der 5. Generation der 1. Optimierung (graue Symbole) zeigt nach ungefähr 22 Stunden einen Einbruch der Riboflavinproduktion (A). Im Milliliter-Reaktor erreicht das Medium nach 72 Stunden signifikant bessere Ausbeuten als das Referenzmedium (weiße Symbole) (B).**

Referenzmediums (○) verglichen. Das Medium zeigt in den ersten 32 Stunden im Vergleich erhöhte Ausbeuten. Nach 48 und 72 Stunden Prozesszeit liegen die Ergebnisse beider Medienzusammensetzung eng beieinander. In Abbildung 5.2.26 B sind die Ergebnisse des Parallelexperiments im Milliliter-Maßstab (graue Symbole) ebenfalls im Vergleich zum Referenzmedium (○) dargestellt. Nach 48 Stunden Prozess-

dauer sind die Produktausbeuten der beiden Medien, wie auch im Labormaßstab, gut miteinander vergleichbar. Nach 72 Stunden liegt die Ausbeute für das optimierte Medium etwas höher als die des Referenzmediums. Allerdings zeigen die Fehlerbalken, dass aufgrund der hohen Standardabweichung der Milliliter-Experimente während der ersten Optimierung kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden kann. Ein anderes Bild zeigt sich für Medium 12 der Generation 5 (Abbildung 5.2.26). Hier bricht die Riboflavinproduktion im Labormaßstab aus bisher unbekanntem Gründen nach etwa 20 Stunden ab. Bis dahin sind die erzielten Ausbeuten mit dem Referenzmedium (○) vergleichbar. Im Milliliter-Maßstab zeigen die Riboflavinausbeuten nach 48 Stunden einen leichten, aber nicht signifikanten Unterschied (graue Symbole). Nach 72 Stunden erweist sich das optimierte Medium als deutlich besser als die Referenz.

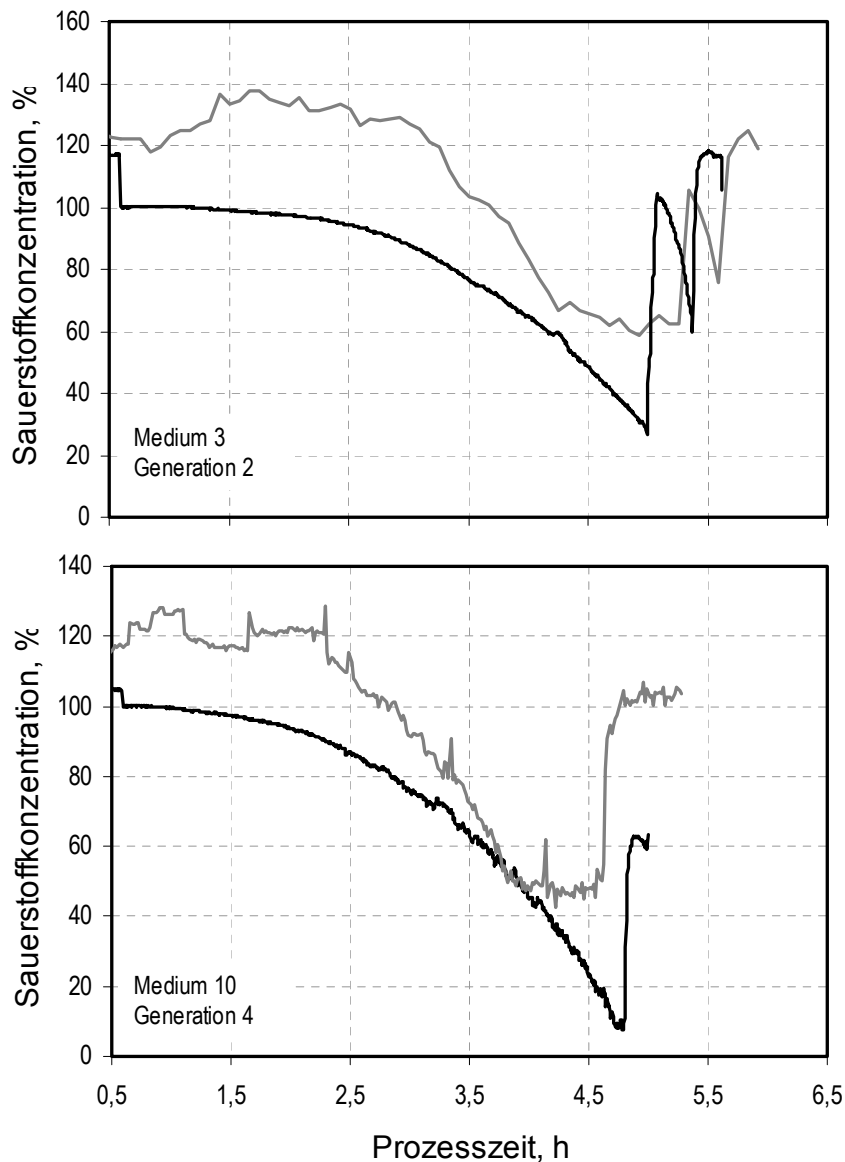
Für die Untersuchung der Medien der Pareto-Front der 2. Optimierung ergaben sich ähnliche Ergebnisse. Keines dieser Medien zeigte eine relevante Produktbildung während der Kultivierung im Litermaßstab.

#### *Untersuchung der Satzphase*

Das Ziel der Optimierung war eine Maximierung der Riboflavinausbeute aufgrund einer verbesserten Zusammensetzung des Satzmediums. Um Rückschlüsse auf das veränderte Verhalten der Produktion von Riboflavin im Labormaßstab ziehen zu können, wurde zunächst die Satzphase gründlich untersucht und in beiden Maßstäben verglichen. Da die Daten, die im Milliliter-Maßstab gewonnen werden können, begrenzt sind, konnte nur der Sauerstoffpartialdruck, der pH und die optische Dichte (OD) sowie die Länge der Satzphase verglichen werden.

Bisher wurde die Rührerdrehzahl im Litermaßstab anhand des Sauerstoffpartialdrucks im Medium geregelt, dessen Wert nicht unter 15 % fallen durfte. Eine bessere Vergleichbarkeit mit dem Verlauf der Sauerstoffkonzentration in den Milliliter-Reaktoren, bei denen die Rührerdrehzahl nicht geregelt wird, wurde dadurch erzeugt, dass im Litermaßstab von Anfang an die maximale Rührergeschwindigkeit von 1300 rpm eingestellt wurde.

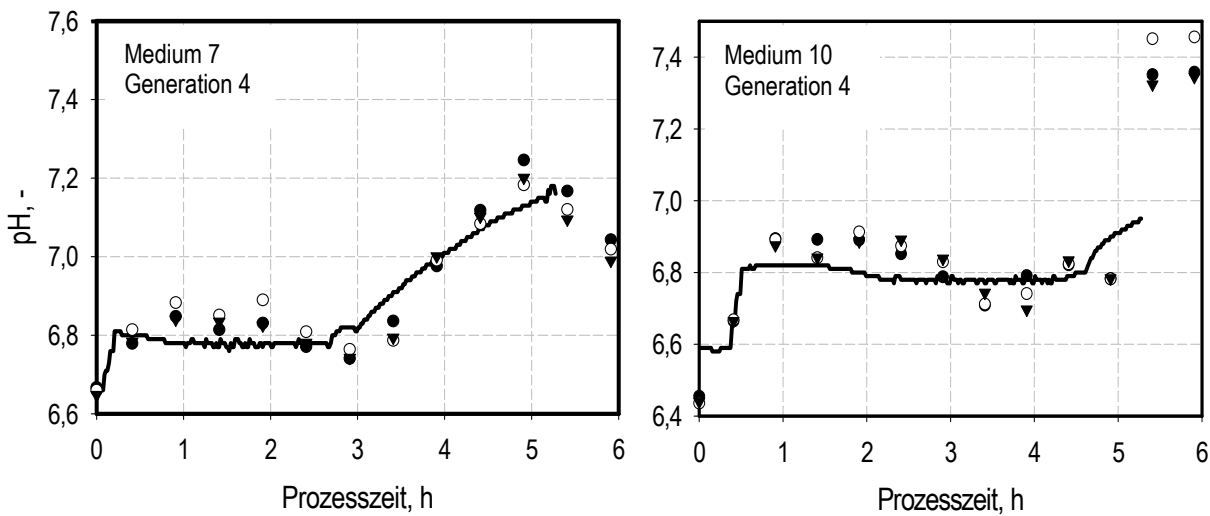
Das Profil des Sauerstoffpartialdrucks ist für alle getesteten Medien vergleichbar. In Abbildung 5.2.27 sind für zwei Medien jeweils die Verläufe im Liter (graue Linie) und Milliliter-Maßstab (schwarze Linie) gezeigt. Es zeigt sich hier deutlich, dass die Länge



**Abbildung 5.2.27: Verlauf des Sauerstoffpartialdrucks (Medium 3 Generation 2 und Medium 10 Generation 4 der zweiten Optimierung) über die Prozesszeit während der Satzphase im Litermaßstab (grau) und Milliliter-Maßstab (schwarz). Die Charakteristika der Kurven sind sehr ähnlich und auch die Länge der Satzphase, zu erkennen am letzten steilen Anstieg der Kurven, unterscheidet sich nur um ungefähr 15 Minuten. Der Litermaßstab wurde mit 0,2 bar Überdruck betrieben.**

der Satzphase für die präsentierten Individuen der 2. und 4. Generation fast gleich ist. Das Ende der Satzphase, zu erkennen am steilen Anstieg des Sauerstoffsignals, unterscheidet sich zeitlich nur um bis zu 15 Minuten. Für die anderen getesteten Medien der Pareto-Front konnte ein ähnliches Ergebnis festgestellt werden.

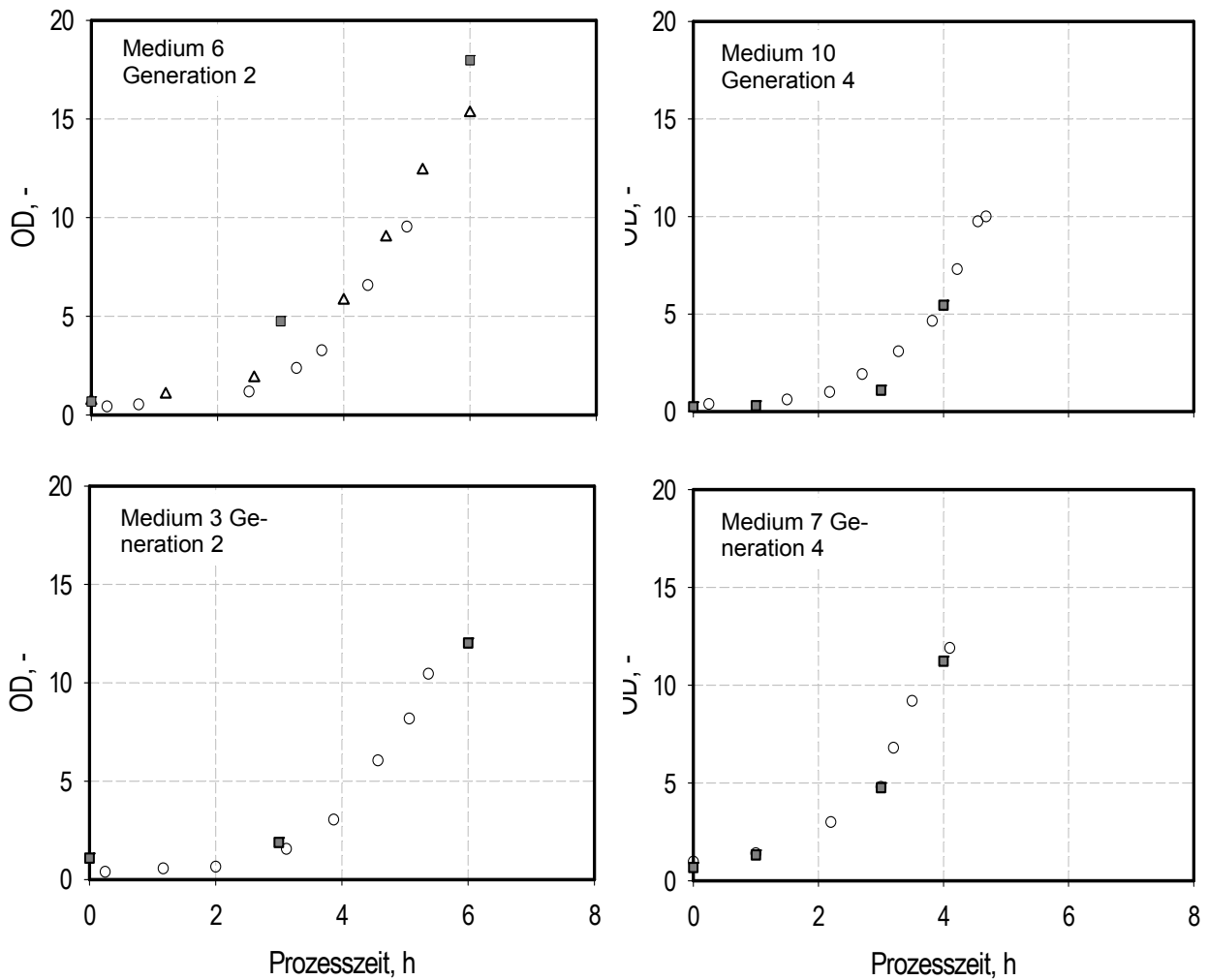
Für den Verlauf des pH während der Satzphase, konnte für drei Medien eine sehr gute Übereinstimmung beobachtet werden, während für das Medium 10 der 4. Generation der erhöhte pH am Ende der Satzphase im Litermaßstab nicht erreicht wurde.



**Abbildung 5.2.28:** Verlauf des pH (Medium 7 Generation 4 und Medium 10 Generation 4 der zweiten Optimierung) über die Prozesszeit während der Satzphase im Liter- (Linie) und Milliliter-Maßstab (Symbole). Die Charakteristika der Kurven sind für Medium 7 sehr ähnlich und auch der maximale pH am Ende der Satzphase erreicht den gleichen Wert (mL: pH 7,18; L: pH 7,16) in beiden Maßstäben. Für Medium 10 ist der Verlauf nur bis ca. Stunde 5 gleich. Danach ist der Anstieg im Litermaßstab nicht so hoch wie im Milliliter-Maßstab (mL: pH 7,3; L: pH 6,95).

Hier ergibt sich ein deutlicher Unterschied von ungefähr 0,5 pH Einheiten zum Milliliter-Maßstab (Abbildung 5.2.28).

Bezüglich des Wachstums zeigten die Kulturen in den vier Medien für beide Maßstäbe sehr ähnliche Verläufe (Abbildung 5.2.29). Aufgrund der seltenen Probenahme, die im Milliliter-Maßstab nur alle drei Stunden mittels des Pipetierroboters durchgeführt (Stunde 1, 4, 7 etc.) und bei einer zusätzlichen manuellen Messung auf weitere, um eine Stunde verschobene Messpunkte (Stunde 3, 6 etc.), ausgeweitet werden kann, bleibt der direkte Vergleich von Messdaten schwierig. Zum Vergleich der optischen Dichte am Ende der Satzphase musste in drei von vier Fällen ein Wert aus den vorhandenen Messdaten interpoliert werden, da diese um Stunde 5 der Prozesszeit herum endete. Zu diesen Zeitpunkten lag im Milliliter-Maßstab keine Messung vor. Der Vergleich zeigt, dass die erreichten optischen Dichten in beiden Maßstäben sehr gut vergleichbar sind. Die spezifischen Wachstumsraten der Kulturen im Litermaßstab betrugen in der Satzphase zwischen  $0,75$  und  $0,84 \text{ h}^{-1}$ , während die spezifischen Glukoseaufnahmeraten zwischen  $2,1$  und  $2,2 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  lagen. Die erhaltenen Werte sind gut mit dem Referenzmedium vergleichbar, das während der Satzphase eine maximale spezifische Wachstumsrate von  $0,8 \text{ h}^{-1}$  und eine spezifische Glukoseaufnahmerate von  $2,2 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  erreicht.



**Abbildung 5.2.29: Wachstum während der Satzphase für die vier Medien der Pareto-Front. Die Kulturen im Milliliter-Ansatz (graue Vierecke) zeigen ein ähnliches Wachstum wie auch die Kulturen im Labormaßstab (offene Symbole).**

In Tabelle 5.2.8 sind die Ergebnisse des direkten Vergleichs des Verhaltens in den beiden Maßstäben während der Satzphase für alle vier Medien zusammengefasst. Bis auf den deutlichen Unterschied im pH zum Ende der Satzphase für Medium 10 der Generation 4, konnten keine Differenzen zwischen den beiden Maßstäben festgestellt werden.

Da das Übertragungsproblem demnach nicht in der Satzphase zu finden war, wurde als nächstes die Zulaufphase untersucht.

**Tabelle 5.2.8: Vergleich der Satzphasen der Individuen der Pareto-Front der zweiten Optimierung im Liter und Milliliter-Maßstab. Verglichen werden jeweils der pH zum Start und zum Ende der Satzphase, die nach der Satzphase erreichte optische Dichte und die Länge der Satzphase.**

Medium	pH (Start)		pH (Ende Satzphase)		OD [-]		Länge der Satzphase [h:min]	
	mL	L	mL	L	mL	L	mL	L
Medium 3 Generation 2	6,45	6,57	6,89	6,87	~10,46	9,97	5:30	5:45
Medium 6 Generation 2	6,56	6,60	6,98	6,91	~14,8	12,4	5:00	5:10
Medium 7 Generation 4	6,66	6,66	7,18	7,16	11,2	11,9	4:20	4:10
Medium 10 Generation 4	6,44	6,59	7,3	6,95	~8,4	10	4:45	4:40

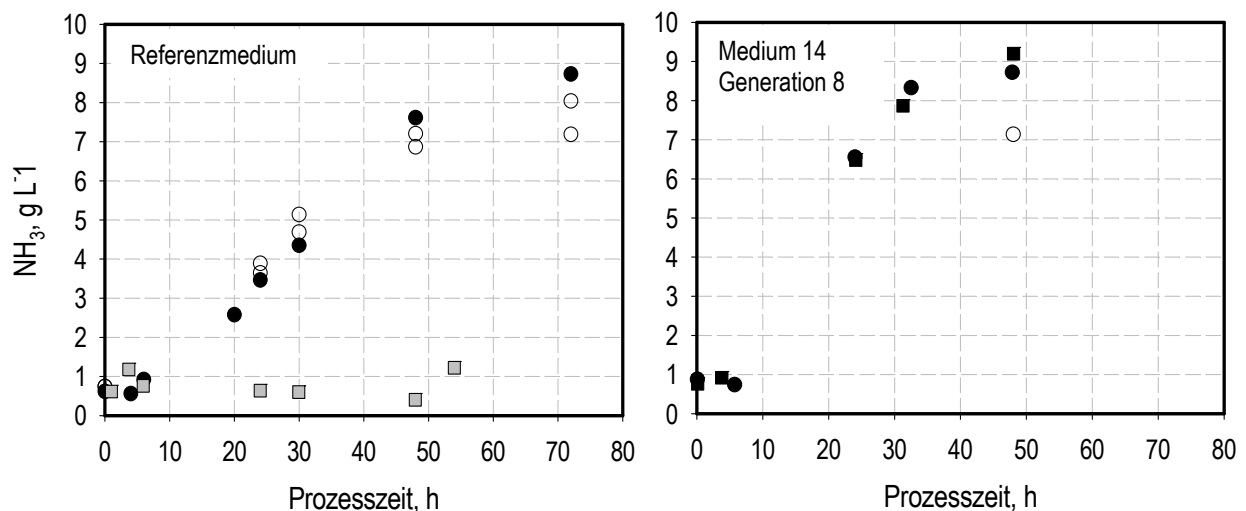
#### *Untersuchung der Zulaufphase*

Innerhalb der Zulaufphase steigen die spezifischen Produktbildungsraten des Riboflavins im Referenzmedium bis zu  $0,012 - 0,013 \text{ h}^{-1}$ . Ab Stunde 24 – 28 der Prozesszeit geht die Produktion zurück, bis sie zunächst nach 48 Stunden minimale Werte erreicht und nach 72 Stunden quasi keine Riboflavinproduktion mehr stattfindet (vgl. Knorr 2005). Ein ähnlicher Produktionsverlauf ließ sich bisher nur für ein Medium der 1. Optimierung beobachten. Medium 10 der Generation 2 erreicht spezifische Produktbildungsraten bis  $0,014 \text{ h}^{-1}$ , die bereits nach 24 – 26 Stunden auf Werte um  $0,010 \text{ h}^{-1}$  zurückgingen und im Laufe der Zeit weiter abnahmen. Alle weiteren getesteten Medien zeigten nur eine geringe bis keine Riboflavinproduktion. Wird im Litermaßstab in den ersten 24 Stunden kein oder nur wenig Riboflavin gebildet, bleibt die Produktausbeute nach 48 und 72 Stunden weit hinter den erwarteten Werten zurück. Deshalb wird bereits nach 24 Stunden deutlich, ob ein Medium erwartete Ausbeuten im Litermaßstab erzielen kann oder nicht. Die Ursache für die Probleme der Maßstabsübertragung zeigen sich daher bereits im ersten Drittel des Prozesses. Im Folgenden wird dieser Zeitraum für ausgewählte Medien im Litermaßstab näher untersucht.

Da eine hohe Ammoniumkonzentration im Medium unter Verdacht steht, die Riboflavinproduktion zu verringern, würde sich eine Aufkonzentration nachteilig auf den Produktionsprozess auswirken. Es wurde vermutet, dass die Unterschiede zwischen den verschiedenen Maßstäben dadurch zustande kommen, dass durch pH Werte oberhalb



von pH 7,2 über weite Bereiche des Prozesses das Gleichgewicht Ammonium-Ammoniak zugunsten des Ammoniaks verschoben und durch einen höheren Gasdurchsatz in den Milliliter-Reaktoren dieser gestriipt wurde. So würde es in den Milliliter-Reaktoren nicht zu entsprechend hohen Ammoniumkonzentrationen kommen wie im Litermaßstab. Messungen der Ammoniumkonzentration ergaben eine starke Konzentrationszunahme des Ammoniaks, nachdem der Zulauf gestartet wurde. Allerdings konnte diese Zunahme in ähnlichen Größenordnungen sowohl für den Litermaßstab, als auch für den Milliliter-Maßstab beobachtet werden (Abbildung 5.2.30). Selbst im Referenzmedium, das im Litermaßstab eine normale Riboflavinproduktion aufweist, reicherten sich nach 48 Stunden um die  $7 \text{ g L}^{-1}$  und bis zum Prozessende nach 72 Stunden bis zu  $8 \text{ g L}^{-1}$  Ammonium an. Die Ammoniumkonzentration nahm deutlich rascher zu, wenn das Medium besonders große Anteile komplexer Medienbestandteile aufwies. Im Fall des Mediums 14 der Generation 8 aus der zweiten Optimierung ist die Konzentration des Hefeextrakts  $40,7 \text{ g L}^{-1}$  und der Anteil der ‚Casamino Acids‘  $4,4 \text{ g L}^{-1}$ . Hier wurde schon nach 24 Stunden eine Ammoniumkonzentration von  $6,5 \text{ g L}^{-1}$  gemessen.



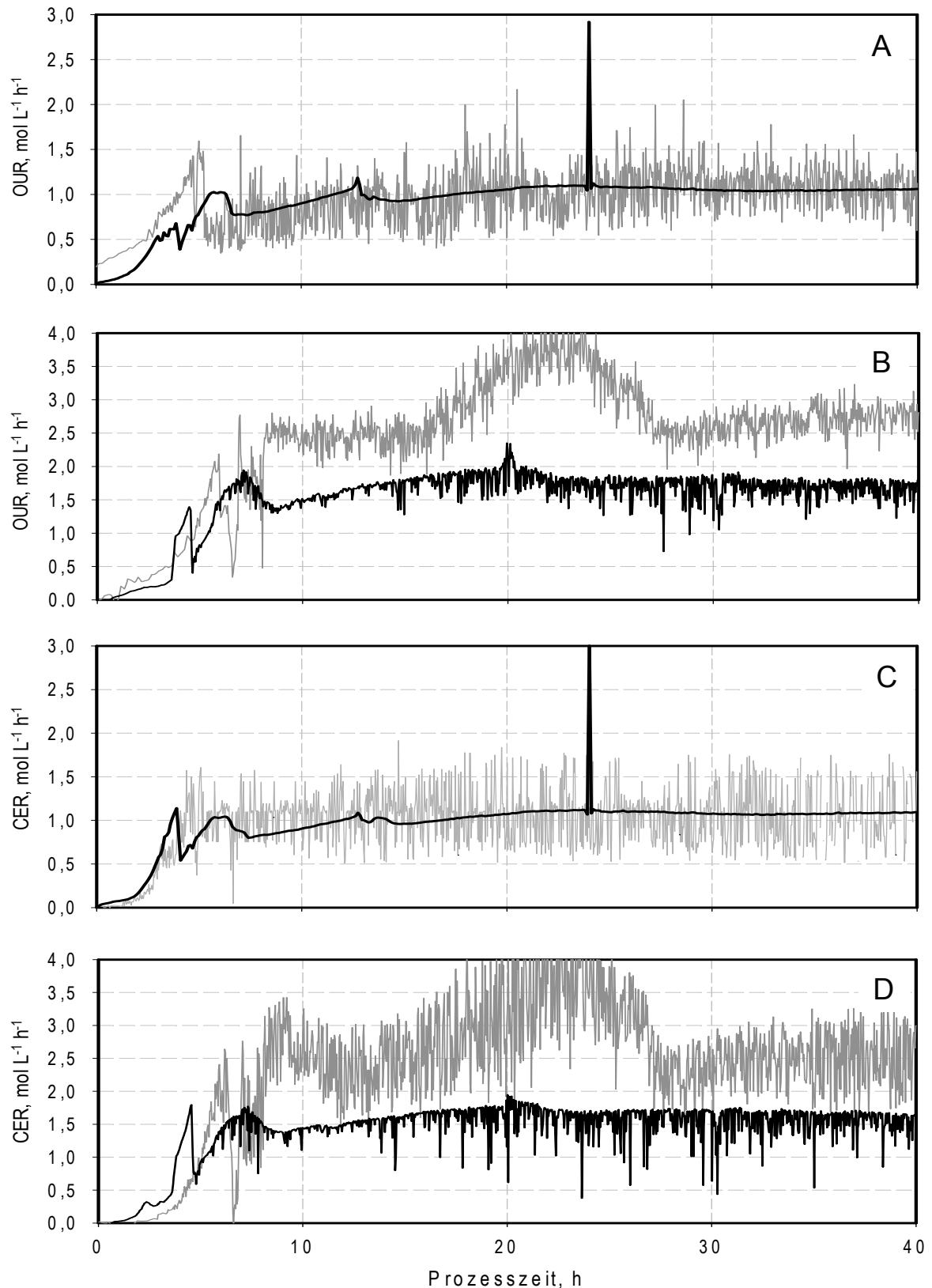
**Abbildung 5.2.30:** Der mit dem Zulauf zugeführte Stickstoff reichert sich als Ammonium mit zunehmender Prozessdauer im Medium an. Je höher die Konzentration an komplexen Bestandteilen im Medium ist, desto schneller steigt die Ammoniumkonzentration. Im Referenzmedium (links) sind  $11,7 \text{ g L}^{-1}$  Hefeextrakt enthalten. Im Medium der Optimierung (rechts) dagegen  $40,7 \text{ g L}^{-1}$  Hefeextrakt und  $4,4 \text{ g L}^{-1}$  ‚Casamino Acids‘. Die Messungen in den Milliliter-Reaktoren (weiße Symbole) zeigt für beide Medien zu allen Zeitpunkten vergleichbare Werte zum Labormaßstab (schwarze Symbole). Wird der Prozess mit Ammoniumhydroxid als Base und ohne Stickstoffquelle im Zulauf geführt (graue Rechtecke links), reichert sich kaum Ammonium im Medium an.

Für den Prozess mit Ammoniumhydroxid als Lauge war keine solch deutliche Akkumulation von Ammonium festzustellen. Hier war bis Stunde 48 des Prozesses nur eine geringfügige Aufkonzentration von Ammonium über die Zeit zu beobachten, die deutlich unter  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  blieb. Die Zunahme der Ammoniumkonzentration im Medium wird daher eindeutig durch Stickstoffquelle im Zulauf verursacht.

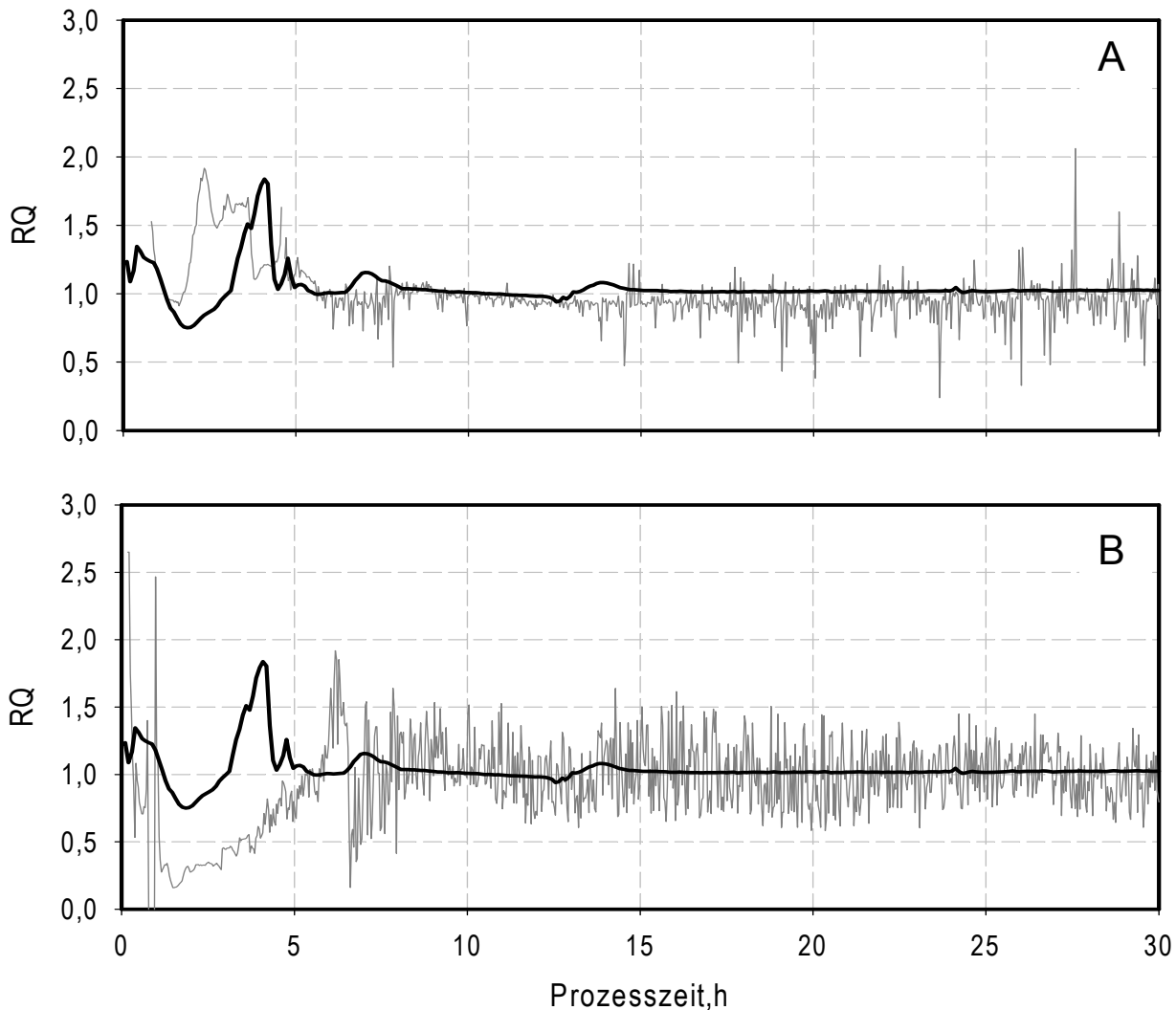
Auch die Auswertung der Daten der Abgasanalytik weisen daraufhin, dass keine Beeinflussung des Stoffwechsels durch Ammonium oder eine sonstige Inhibierung stattfand. Die Sauerstoffaufnahme sowie die Kohlendioxidbildungsrate lassen auf einen funktionstüchtigen Stoffwechsel der Organismen schließen. In Abbildung 5.2.31 werden zunächst die Sauerstoffaufnahme (OUR) des Prozesses im 6-Liter-Maßstab (schwarze Linie) mit dem Referenzprozess im 3-Litermaßstab (graue Linie) verglichen. Es zeigt sich ein ähnlicher Verlauf, wobei der Spitzenwert des Referenzprozesses mit  $1,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  am Ende der Satzphase etwas höher liegt als beim 6-Liter-Referenzversuch. Im darunter liegenden Diagramm sind die Sauerstoffaufnahme für Medium 10 der 4. Generation der ersten Optimierung (schwarz) und Medium 6 der 2. Generation der zweiten Optimierung (grau) gezeigt. Für das Medium der ersten Optimierung sind die Werte gegenüber dem Referenzprozess leicht erhöht, während sie für das Medium der zweiten Optimierung stark erhöht sind. Die gleichen Ergebnisse zeigen sich für die Kohlendioxidbildungsrate (CER).

Auffällig ist der Anstieg beider Raten für das Medium der 2. Optimierung nach ca. 14 Stunden, die bis ca. Stunde 24 anhält. Der in Abbildung 5.2.32 dargestellte Respirationskoeffizient (RQ) zeigt, dass der Stoffwechsel prinzipiell den gewünschten Weg geht, also keine Gärung stattfindet. Für beide Medien ist dieser, wenn auch zeitlich versetzt, mit den aus dem 6-Liter-Maßstab stammenden Daten vergleichbar.

Die gebildete Biotrockenmasse in Liter- und Milliliter-Maßstab kann nicht direkt verglichen werden, da durch die modifizierte Zulauf- und Begasungsweise im Milliliter-Reaktor eine auf 80 % reduzierte Biomassekonzentration vorliegt. Medium 14 der 8. Generation der zweiten Optimierung zeigte nach 24 und 48 Stunden Biotrockenmassekonzentrationen, die mit  $40$  und  $42 \text{ g L}^{-1}$  deutlich über der Konzentration im Referenzmedium von  $30 \text{ g L}^{-1}$  lagen. Im Milliliter-Maßstab zeigte sich der Unterschied nicht so ausgeprägt. Hier erreichte das Referenzmedium 86 % der Biotrockenmasse des Mediums 14 der 8. Generation. Die Kultur scheint im Litermaßstab besser zu



**Abbildung 5.2.31:** In Graphik A und C wird zum einen die Sauerstoffaufnahme- und zum anderen die Kohlendioxidentwicklungsrate für das Referenzmedium im 6-Litermaßstab (DSM, schwarz) und 3-Litermaßstab (grau) verglichen. In Graphik B und C sind beide Raten für Medium 10 Generation 2 der 1. Optimierung (schwarz) und Medium 6 Generation 2 der 2. Optimierung (grau) dargestellt. Die Verläufe liegen im Mittel höher, für das zweite Medium sogar deutlich höher, als bei den Referenzversuchen.



**Abbildung 5.2.32:** Vergleich des Respirationskoeffizienten des Referenzmediums (schwarz, DSM) mit (A) dem Medium 10 2. Generation der ersten Optimierung (grau) und (B) dem Medium 6 der 2. Generation der zweiten Optimierung.

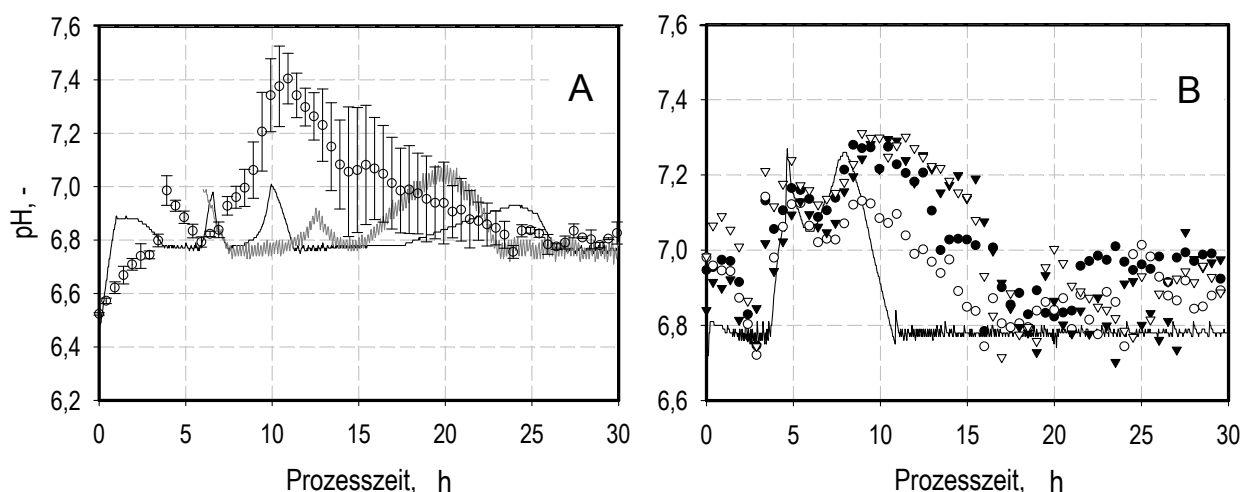
wachsen als im Milliliter-Maßstab. Ähnliches stellte man auch für Medium 6 der 2. Generation fest. Hier wurde im Litermaßstab, verglichen mit dem Referenzmedium, ebenfalls mehr Biotrockenmasse gebildet als im Milliliter-Maßstab.

Grundsätzlich fällt auch der Verlauf des pH während der ersten 15 bis 20 Stunden der Zulaufphase ins Auge. Es zeigten sich erhebliche Unterschiede zwischen den pH Verläufen der gleichen Medien in den beiden unterschiedlichen Maßstäben (Abbildung 5.2.33). Im Vergleich mit den pH-Profilen der Reaktoren im Milliliter-Maßstab zeigte der Prozess im Litermaßstab deutlich geringere Abweichungen vom pH-Sollwert. Während für Medium 6 Generation 2 (erste Optimierung) der maximal erreichte durchschnittliche pH nach 11 Stunden bei 7,4 lag, erreichte er im Litermaßstab bereits nach 10 Stunden seinen Maximalwert von nur pH 7,0. Nach weiteren 14 Stunden zeigte sich

im Litermaßstab ein nächster Anstieg mit einem Höchstwert von pH 6,9 (schwarze Linie, Abbildung 5.2.33). Auch die anderen Medien der Pareto-Front der zweiten Optimierung zeigten keine mit den Experimenten im Milliliter-Maßstab vergleichbaren pH Verläufe.

Im Falle des Mediums, das eine gute Riboflavinproduktion aufwies, folgte dagegen das pH-Profil im Litermaßstab recht genau der Entwicklung des pH in den Milliliter-Reaktoren. Der Unterschied zwischen den erreichten Maximalwerten betrug weniger als 0,1 pH Einheiten. Allerdings fiel der pH im Litermaßstab deutlich schneller als in den miniaturisierten Reaktoren. Er erreicht bereits nach 11 Stunden Prozesszeit wieder den angestrebten Sollwert (schwarze Linie Abbildung 5.2.33 rechts).

Da die Versuche im Milliliter-Maßstab mit intermittierendem Zulauf durchgeführt wurden und dies eine drastische Veränderung zum kontinuierlichen Zulauf darstellt, wurde das intermittierende Zulaufverfahren mit den Medien der Optimierung auch im Litermaßstab untersucht. Da durch dieses Verfahren in einem relativ kleinen Zeitraum große Konzentrationsunterschiede erzeugt werden, könnte eine Veränderung des Stoffwechsels der Organismen stattfinden, welche die Optimierungsergebnisse beeinflusst. Es zeigte sich, dass das pH Profil zwar auch in diesem Fall nicht dem der Milliliter-Reaktoren entsprach, sich der Verlauf aber erneut anders darstellte. So rückten die beiden Maxima näher zusammen, wobei das erste geringer ausfiel als beim kontinuierlichen Zulauf (pH 6,9) und um 2,5 Stunden verspätet auftrat.



**Abbildung 5.2.33: Vergleich des pH über die Prozesszeit im Liter- und Milliliter-Maßstab (Linien, Symbole). Medium 6 Generation 2 der zweiten Optimierung (A) zeigt in den beiden Maßstäben recht unterschiedliche Verläufe, die sich auch für die Art der Zudosierung, intermittierend (grau) oder kontinuierlich (schwarz), noch unterscheiden. Medium 10 Generation 2 der 1. Optimierung (B) zeigt dagegen einen mit den Milliliter-Reaktoren vergleichbaren Verlauf.**

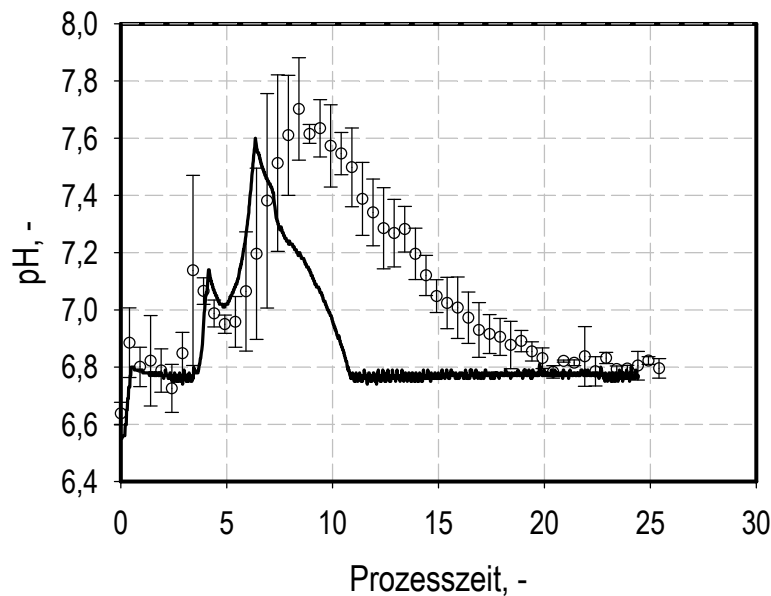
Dagegen lag die zweite Erhöhung ca. 4 Stunden vor der beim kontinuierlichen Zulauf und fiel mit einem Maximum von pH 7,05 deutlich stärker aus. Die Produktion von Riboflavin war im Prozess mit intermittierendem Zulauf nicht signifikant besser als mit kontinuierlichem Zulauf.

Die Vermutung, dass das pH Profil ausschlaggebend sein könnte, wurde überprüft, indem der Sollwert für die Regelung im Litermaßstab das Profil der Milliliter-Reaktoren nachstellte. In diesen Versuchen wurde fast gar kein Riboflavin produziert und zum Anheben des pH bedurfte es einer auffällig großen Laugemenge. Da ein Anheben des pH allein durch die pH-Regelung keine Verbesserung der Riboflavinproduktion erbrachte, wurde ein weiteres Medium aus der zweiten Optimierung ausgesucht, das von der Zusammensetzung Ähnlichkeit mit dem erfolgreichen Medium der 2. Generation der ersten Optimierung aufwies.

Da alle Medien der Pareto-Front einen sehr hohen Pufferanteil besitzen (11,7- 19.4 g L<sup>-1</sup>), ist es möglich, dass aufgrund der Pufferwirkung keine Erhöhung des pH im Litermaßstab stattfand. Deshalb wurde ein Medium gewählt, das eine ähnliche Pufferkonzentration besitzt wie Medium 10 Generation 2 der ersten Optimierung (~7 g L<sup>-1</sup>). Der Anteil der komplexen Medienkomponenten des gewählten Mediums entsprach denen des besten Mediums der 2. Optimierung im Milliliter-Maßstab. Die Konzentration des Hefeextrakts lag bei 40,7 g L<sup>-1</sup>, der Anteil der ‚Casamino Acids‘ bei 4,4 g L<sup>-1</sup>.

Der pH Verlauf im Litermaßstab wies eine große Ähnlichkeit mit dem Profil im Milliliter-Maßstab auf (Abbildung 5.2.34). Der Maximalwert von pH 7,7 wurde zwar nicht ganz erreicht, sondern um 0,1 pH Einheiten unterschritten, ähnelte aber in diesem Verhalten Medium 10 Generation 2 der ersten Optimierung. Auch in diesem Fall fiel der pH im Litermaßstab bedeutend schneller als in den Milliliter-Reaktoren und erreichte den Sollwert schon nach 11, anstatt erst nach 20 Stunden. Allerdings produzierte auch dieses Medium kaum Riboflavin.

Der Unterschied zwischen diesem und dem erfolgreichen Medium der ersten Optimierung bestand hauptsächlich in der hohen Konzentration an komplexen Stickstoffquellen. Zusammen mit der kontinuierlichen zudosierten Stickstoffquelle könnte es hier zu einer Anreicherung von Ammonium im Medium gekommen sein.



**Abbildung 4.2.34:** Der Verlauf des pH über die Prozesszeit ist für Medium 14 Generation 8 der zweiten Optimierung in beiden Maßstäben vergleichbar (Linie Litermaßstab, Symbole Millilitermaßstab).

### 5.2.7 Diskussion

Die Voruntersuchungen zur Optimierung des Satzmediums zeigten, dass sowohl organische als auch anorganische Stickstoffquellen eine wesentliche Rolle für die Riboflavinproduktion spielen. Von den sieben Variablen der Optimierung handelt es sich bei fünf der Komponenten um Stickstoffquellen.

Glutamin stellt die bevorzugte Stickstoffquelle für *Bacillus subtilis* dar, gefolgt von Arginin (Fisher 1999; Atkinson and Fisher, 1991). Daher wurde zunächst von einer Steigerung der Riboflavinproduktion durch ein verbessertes Angebot dieser beiden Stickstoffquellen im Medium ausgegangen. Glutamin und Arginin führten aber entgegen dieser Erwartung nicht zu signifikanten Produktionssteigerungen, wenn sie im Satzmedium verwendet wurden.

Hefeextrakt zeigte unter den untersuchten komplexen Stickstoffquellen die besten Ergebnisse. In Kombination mit ‚Casamino Acids‘ konnte in den Vorversuchen eine Steigerung der Riboflavinproduktion nach 48 Stunden erreicht werden. ‚Casamino Acids‘ scheinen vor allem erst spät im Prozess Einfluss auf die Produktion zu nehmen. Die pH Verläufe der verschiedenen Medien zeigten, dass die Verstoffwechselung der ‚Casamino Acids‘ erst spät und vor allem nach der Verstoffwechselung von Hefeextrakt begann. Diese Reihenfolge entspricht nicht den Erwartungen. ‚Casamino Acids‘ sind ein salzsaures Hydrolysat von Casein, das keine Peptide und Makropeptide mehr

enthält, sondern weitgehend aus Aminosäuren und anderen einfachen Bausteinen besteht. Im Hefeextrakt sind die Aminosäuren hauptsächlich in Form von Peptiden gebunden. Es wurde angenommen, dass in bezug auf die Aufnahme durch den Organismus die einfachen Bausteine einen Vorteil gegenüber komplexeren Bestandteilen haben. Der Organismus scheint aber als erstes die Peptide des Hefeextrakts aufzunehmen und erst später die freien Aminosäuren. *Bacillus* besitzt zahlreiche Aufnahmesysteme für Peptide und in der Literatur wird davon ausgegangen, dass die Organismen die Peptidform gegenüber den freien Aminosäuren bevorzugen, da ihre natürliche Umgebung zumeist nur erstere bietet und die Organismen optimal an diese Gegebenheit angepasst sind (Coffin 1989).

Die große Bedeutung der Ammoniumhydroxidzugabe, die für den Riboflavinprozess festgestellt wurde, deckt sich mit Ergebnissen aus der Literatur. Eigentlich wird Ammonium nur als sekundäre Stickstoffquelle für diesen Organismus angegeben (Detsch und Stülke 2003). *Bacillus subtilis* besitzt keine assimilatorische Glutamat-Dehydrogenase-Aktivität, wodurch Ammonium allein über den Glutamin-Synthase-Weg assimiliert wird. Glutamin-Synthase katalysiert die Bildung von Glutamin aus Ammonium und Glutamat, dem einzigen Stoffwechselweg für die Glutaminsynthese in der Zelle (Fisher 1999). Jürgen et al. (2005) kamen zu dem überraschenden Ergebnis, dass ein Zulauf von Ammonium vorteilhaft für das Wachstum von *Bacillus subtilis* ist. Besonders in Kombination mit den Aminosäuren Glutamin und Arginin aus ‚Casamino Acids‘, die ebenfalls dem Zulauf beigefügt wurden, konnten signifikant höhere Wachstumsraten festgestellt werden.

‚Casamino Acids‘ finden in der Industrie häufig Verwendung als reiner Aminosäuremix und ersetzen in Anteilen Hefeextrakt, der mehr Zellbestandteile aufweist. Der Gesamtstickstoffgehalt beträgt ca. 7 % und der Anteil der Aminosäure Glutamat ist mit über 21 % besonders hoch. Im Hefeextrakt ist der Anteil von Glutamat mit ca. 16 % geringer als in den ‚Casamino Acids‘, aber Arginin mit 5 % anstatt 3,6 % und Glycin mit 4,8 % anstatt 2,2 % sind höher konzentriert.

Die sich aufgrund der günstigen Zusammensetzung der ‚Casamino Acids‘ erhofften deutlichen Vorteile in bezug auf die Riboflavinproduktion zeigten sich bei der Optimierung des Satzmediums allerdings nicht.

Der Austausch der Kohlenstoffquelle wurde aufgrund der beobachteten Ergebnisse zurückgestellt. Der nur geringe Anteil, den die Kohlenstoffquelle im Satzmedium im Vergleich zum Zulaufmedium in der insgesamt zugeführten Kohlenstoffmenge



ausmacht, führte mit Sicherheit zu den unveränderten Riboflavinausbeuten nach 48 Stunden. Es ist in diesem Zusammenhang sinnvoller die Optimierung der Kohlenstoffquelle im Satzmedium zusammen mit einer Optimierung der Kohlenstoffquelle des Zulaufmediums durchzuführen.

Auch die Einzelversuche unter Veränderung der Zinksulfatkonzentration zeigten keine Verbesserung der Riboflavinausbeute. Der an anderer Stelle nachgewiesene positive Einfluss (Wu et al 2007, persönliche Kommunikation DSM) lässt sich damit erklären, dass dort die Untersuchungen jeweils in Satzverfahren vorgenommen wurden. Hier spielt Zinksulfat nachweislich eine Rolle. Im Zulaufverfahren, werden die Zellen durch die Zulauflösung fortwährend mit dieser Komponente versorgt. Ihr Einfluss dürfte demnach im Satzmedium im Vergleich zum Zulaufmedium als gering einzustufen sein und ist deshalb während der Optimierung im Zulaufverfahren zu vernachlässigen.

Die während der Optimierungsversuche hohen ‚Casamino Acids‘- sowie Hefeextraktkonzentrationen im Satzmedium standen im Zusammenhang mit zum Teil starken pH Anstiegen. Diese Effekte werden der Freisetzung von Ammoniak oder anderem basischen Material bei der Verwertung der Komponenten durch die Organismen zugeschrieben (Mueller und Miller 1940). Der Rückgang des pH auf das Niveau des Sollwerts nach einigen Stunden wird durch die Bildung von  $\text{CO}_2$  und organischen Säuren verursacht. Der Effekt, den die  $\text{CO}_2$ -Bildung auf den pH hat, lässt sich auch am Ende der Satzphase deutlich erkennen. Wenn die Kohlenstoffquellen des Mediums nach und nach aufgebraucht sind, geht die  $\text{CO}_2$ -Produktion zurück und es kommt zu dem beobachteten Anstieg des pH am Ende der Satzphase.

Durch die nur einseitige pH-Regelung des Prozesses führten deshalb hohe Konzentrationen dieser komplexen Medienbestandteile zu unkontrollierten und langanhaltenden Abweichungen vom pH-Sollwert. Dies hatte erheblichen Einfluss auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse im Millilitermaßstab aber auch bei der Maßstabsübertragung.

Den Einfluss, den eine Anreicherung von Ammonium im Medium auf die Übertragung der Optimierungsergebnisse in den Litermaßstab hat, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Ab einer bestimmten Konzentrationen von Ammoniumsulfat im Zulauf und damit einer entsprechenden Anreicherung im Medium kommt es eindeutig zu einer Reduzierung der Produktionsleistung. Allerdings zeigen die Untersuchungen keinen Unterschied in der Ammoniumkonzentration, die während der Versuche im Millilitermaßstab und im Litermaßstab gemessen wurden. Zudem wurde in Untersuchungen zur Toxizität von Ammonium bei verschiedenen Bakterien festgestellt, dass Ammo-

nium auf *Bacillus subtilis* nicht toxisch wirkt (Müller et al. 2006). Die beobachteten Einschränkungen des Wachstums bei molaren Konzentrationen sind hier auf generelle osmotische sowie ionische Effekte zurückzuführen. Der Ammoniumkonzentration ist daher kein eindeutiger Effekt zuzuordnen.

Die Vorversuche zur Medienoptimierung wurden nicht durch den für die erste Optimierung beschriebenen Einfluss der gekoppelten Lauge- und Stickstoffzugabe durch Ammoniumhydroxid beeinflusst, da hier nur moderate Veränderungen der Konzentrationen eingesetzt wurden. Die Verwendung der halben und anderthalbfachen Konzentration der Medienkomponenten genügte zur Identifizierung der wichtigsten Komponenten, führte aber nicht zu einem deutlich vom Standardprozess abweichendem pH. So konnten auch ohne Entkopplung von Stickstoff und Basezugabe Aussagen über den Einfluss von neuen und etablierten Komponenten gemacht werden.

Trotz der Entkopplung und damit einer methodisch besseren Versuchsdurchführung zeigte die erste Optimierung weitaus bessere Ergebnisse bezüglich der Steigerung der Riboflavinproduktion als die zweite Optimierung. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass der positive Einfluss von Ammoniumhydroxid als Stickstoffquelle weitaus größer ist, als zunächst angenommen. Die Kopplung mit der Basezugabe scheint ebenfalls von Vorteil zu sein. Die Stickstoffquelle Ammonium wird nur dann zugegeben, wenn sie wirklich vom Organismus gebraucht wird. Dies ist während einer starken Aktivität der Bakterien der Fall, die sich durch die Produktion von Kohlendioxid und organischen Säuren äußert und dadurch mit einem absinkenden pH verbunden ist. Erst in diesem Moment wird Stickstoff zugeführt, wodurch zu hohe Ammoniumkonzentrationen im Medium vermieden werden können.

Die Reproduktionsprobleme bei der Übertragung in den Litermaßstab scheinen aus den genannten Gründen mit dem pH-Verlauf, der Zugabeform von Stickstoff während des Prozesses und der Aufkonzentration von Ammonium im Medium verknüpft zu sein. Den stärksten Einfluss scheint aber die nicht Reproduzierbarkeit der pH-Verläufe zu haben.

Die starke pH-Abhängigkeit der Riboflavinproduktion in Verbindung mit der nur einseitigen pH-Kontrolle schränkt daher die Verwendung des Bioreaktorblocks als Paralleltechnik zur Medienoptimierung für diesen Prozess zum derzeitigen Zeitpunkt stark ein. Der Einsatz einer doppelseitigen pH Regelung ist daher zwingend notwendig.

### 5.3 Verbesserung der Prozesstechnik zur Riboflavinproduktion im Parallelansatz

Wie in den vorangegangenen Kapiteln gezeigt, hat die Prozessführung einen entscheidenden Einfluss auf die Riboflavinbildung im dargestellten Zulaufprozess. Der Bioreaktorblock weist bezüglich des Riboflavinprozesses noch erhebliche Defizite in den Punkten Prozesskontrolle und -führung auf, die zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Prozessleistung und der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse führen.

Neben den bisher genannten Einflüssen der Temperatur- und pH-Regelung bestimmt auch die Schaumbildung die Kultivierungsergebnisse erheblich. Im Folgenden werden die Probleme in der Prozessführung und -kontrolle näher beleuchtet und Anpassungen der Sensorik für den Reaktorblock dargestellt, die zu einer Verbesserung des Riboflavinherstellungsprozesses im Parallelansatz eingesetzt werden können.

#### 5.3.1 Einfluss der Begasung auf die Reproduzierbarkeit

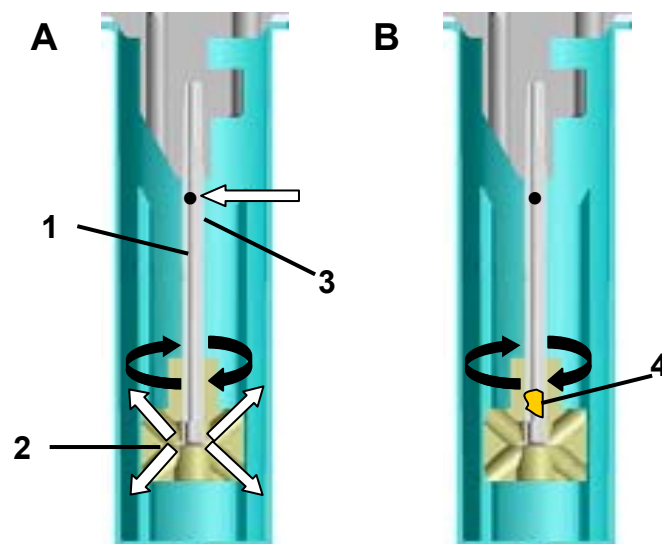
Anfänglich kam es bei der Verwendung der Milliliterreaktoren für den Prozess zur Riboflavinherstellung ab Stunde 24 bis Stunde 30 des Prozesses wiederholt zum Zusammenbruch des Gaseintrags bei bis zu 10 % der Reaktoren. Bis zum Prozessende nach 48 Stunden fielen bis zu 90 % der Reaktoren auf Grund ungenügender Sauerstoffversorgung aus. Mit der optischen *online*- Überwachung der Sauerstoffkonzentration im Medium konnte ein rascher Abfall des im Reaktor gemessenen Sauerstoffpartialdrucks auf 0 % Luftsättigung beobachtet werden. Auch visuell konnte der Ausfall der Gasversorgung erfasst werden. Fand keine ausreichende Begasung der Reaktoren mehr statt, sank der Füllstand gut erkennbar um ca. 1 mL.



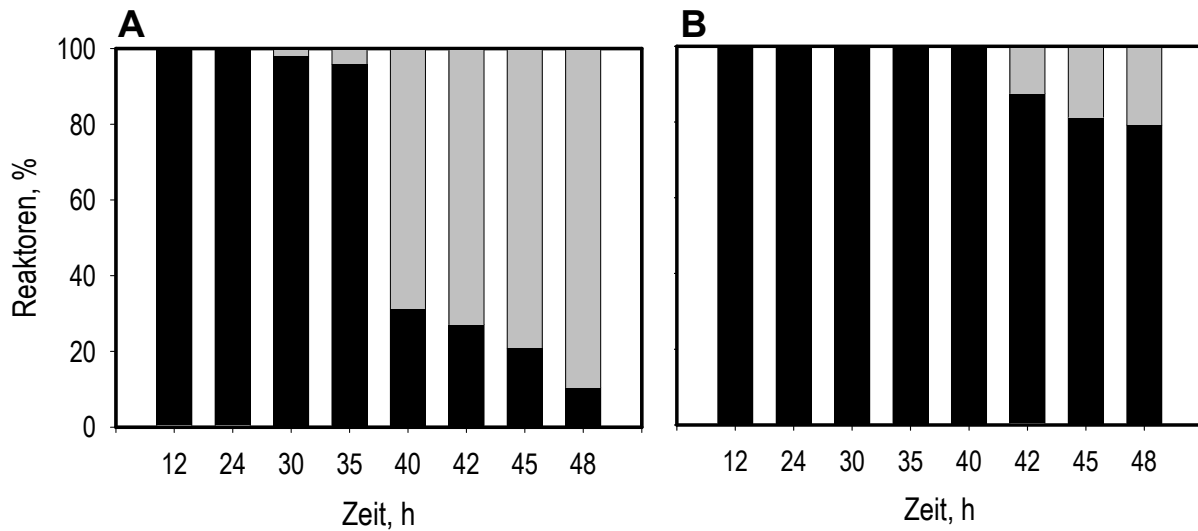
**Abbildung 5.3.1: Verschiedene visuelle Anzeichen für den Zusammenbruch der Gasversorgung in den Milliliterreaktoren: (A) Links ist das Absinken des Füllstandes und Ausbleiben von Blasenbildung gezeigt. Der rechte der beiden Reaktoren verfügt über eine intakte Gasversorgung, während der linke die beschriebenen Anzeichen aufweist. (B) Bei anderen Reaktoren desselben Versuches die Grünfärbung der Kulturbrühe zu beobachten. Auch hier ist keine Blasenbildung im Reaktor zu erkennen.**

Zudem war in einem solchen Zustand im Reaktor keine Blasenbildung mehr zu erkennen (Abbildung 5.3.1). Als weiteres Indiz diente die Verfärbung der Reaktoren von einem kräftigen Orange hin zu einem satten Grün, was auf Zwischen- oder Abbauprodukte schließen lässt. Nach einiger Zeit nahmen die betroffenen Reaktoren jedoch wieder einen orangen Farbton an. Die drei genannten optischen Merkmale traten nicht zwingender Weise gleichzeitig und bei allen betroffenen Reaktoren auf.

Als Ursache für den Zusammenbruch des Gaseintrags wurde die Agglomeration von Riboflavinkristallen und Zellen in den Hohlachsen und ein dadurch verursachter Verschluss vermutet. Nach der Kultivierung konnte aus den Hohlachsen der betroffenen Reaktoren eine zähe Masse, hauptsächlich bestehend aus Riboflavinkristallen und Zellen, entfernt werden. In Rotation versetzt saugt der gasinduzierende Rührer durch eine Belüftungsbohrung der Hohlachse Frischluft aus dem Kopfraum an und verteilt diese im Medium. Ein solcher Pfropfen, gebildet aus Feststoffen der Kulturbrühe, kann zu einem Verschluss der Hohlachse und damit dem Ausbleiben der Frischluftversorgung der Reaktoren während des Prozesses führen. Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass ab einer Riboflavinkonzentration von  $4\text{-}5\text{ g L}^{-1}$  erste Reaktoren mit den



**Abbildung 5.3.2:** Der gasinduzierende Rührer (2) saugt durch eine Begasungsbohrung (3) Frischluft aus dem Kopfraum des Reaktors an und verteilt sie im Medium. Ein Pfropfen aus Feststoff (4) (vornehmlich Riboflavinkristallen) bringt den Gasstrom zum Erliegen.



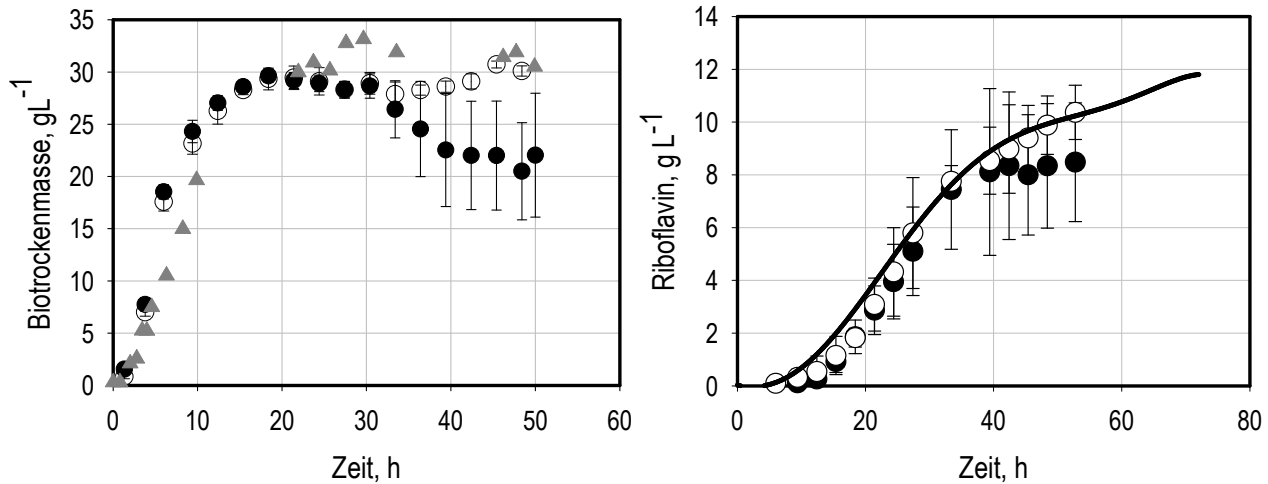
**Abbildung 5.3.3: Probleme mit dem Gaseintrag in den Reaktoren ab 30 Stunden Prozessdauer. (A) Bei der Verwendung von Hohllachsen mit einem Millimeter Innendurchmesser fielen bis zum Versuche 90 % der Reaktoren aus. (B) Bei Einsatz von industriell gefertigten Hohllachsen mit einem Innendurchmesser von 1,8 mm wurde das Zusetzen der Hohllachsen verzögert und abgeschwächt. Es fielen bis zum Versuche noch ca. 25 % der Reaktoren aus.**

oben aufgeführten Anzeichen ausfielen. Diese Konzentration stellt weniger als die Hälfte der tatsächlich am Ende des Prozesses erreichten Konzentration von ca.  $12 \text{ g L}^{-1}$  dar.

Zwischen Stunde 24 und 35 des Prozesses fielen bereits erste Reaktoren aus (Abbildung 5.3.3). Zur Stunde 40 lag der Anteil der nicht mehr bzw. schlecht begasten Reaktoren schon bei ca. 69 %. Bis zum Ende des Versuches waren ca. 90 % der Kulturen durch Probleme mit dem Gaseintrag in ihrer Produkt- und Biomassebildung beeinflusst. Dieses Ergebnis spiegelte sich im Verlauf der Biomasse- und Riboflavinkonzentration in den Milliliter-Reaktoren wieder (Abbildung 5.3.4). Zum Vergleich für den Verlauf der Biotrockenmasse ist ein Versuch im 3-Liter-Maßstab mit intermittierender Substratzugabe (Knorr 2005) dargestellt. Als Referenz der Riboflavinkonzentration dient ein Versuch im 6-Liter-Maßstab von DSM.

Der aus allen 48 Reaktoren errechnete Mittelwert für die Biotrockenmasse- und Riboflavinkonzentration zeigte für beide Prozessgrößen ab ca. Stunde 40 einen starken Rückgang. So wurde, anstatt einer Biotrockenmassekonzentration von  $30 \text{ g L}^{-1}$  im Referenzversuch, nur eine Konzentration von ca.  $22 \text{ g L}^{-1}$  in den Milliliter-Reaktoren gemessen. Die mittlere Riboflavinkonzentration aus 48 Reaktoren erreichte nur einen Wert von  $8,4 \text{ g L}^{-1}$ , anstatt der  $10,3 \text{ g L}^{-1}$  im Referenzversuch. Auch die relative Standardabweichung nahm drastisch zu. Für die Endpunktbestimmung der Biomassekon-

zentration ergab sich diese zu 28 % sowie zu 40 % für die Riboflavinkonzentration. Da die Volumenzunahme im betrachteten Experiment zwischen Milliliter-Maßstab und Labormaßstab gleich groß war, konnten die jeweiligen Konzentrationen direkt miteinander verglichen werden.



**Abbildung 5.3.4:** Verlauf der Biotrockenmasse- und Riboflavinkonzentration während eines Parallelexperiments mit *Bacillus subtilis* RB50::[pRF69]<sub>n</sub> A: (●) über *at-line* Analytik bestimmter Mittelwert für beide Konzentrationen (48 Reaktoren), (○) Reaktoren ohne Gaseintragsprobleme. Im Vergleich dazu sind die entsprechenden Referenzprozesse im Labormaßstab dargestellt ((▲) BTM, (—) Riboflavin).

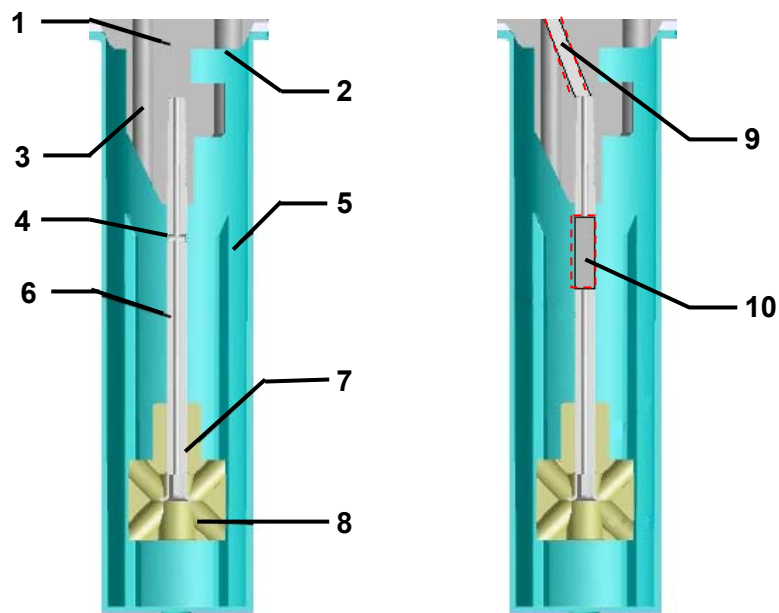
Betrachtet man nur die vier ohne Störung verlaufenen Kulturen, lassen sich die daraus ergebenden Werte gut mit den jeweiligen Referenzen vergleichen. Es ergeben sich im Mittel  $30,3 \text{ g L}^{-1}$  für die Biomassekonzentration und  $10,3 \text{ g L}^{-1}$  für die Riboflavinkonzentration (Abbildung 5.3.4). Die relative Standardabweichung mindert sich auf nur noch 7 % für die Riboflavinkonzentration und unter 3 % für die Biotrockenmassekonzentration. Die parallele Reproduzierbarkeit sowie die mittlere erreichte Riboflavin- und Biomassekonzentration wurde demnach durch die Gaseintragsprobleme stark herabgesetzt.

### Konstruktive Maßnahmen

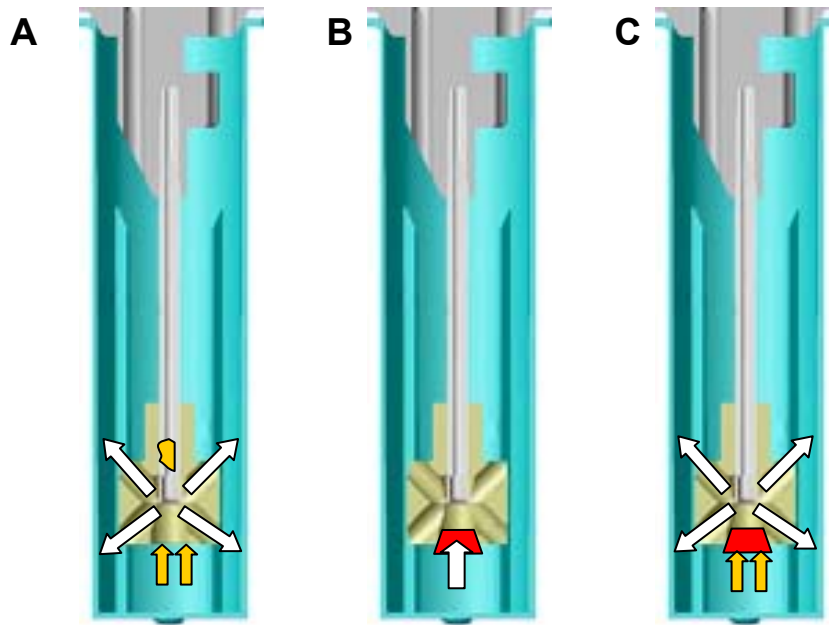
Um der Agglomeration von Riboflavin in den Hohlräumen (Abbildung 5.3.5) entgegenzuwirken, wurden verschiedene konstruktive Maßnahmen ergriffen. Grundsätzlich können die Feststoffe auf zwei unterschiedlichen Wegen in die Achse gelangen: zum einen über eine Bohrung in der Achse im begasteten Kopfraum (Abbildung 5.3.5), die zum Ansaugen von Gas aus dem Kopfraum dient, zum anderen über die im Kulturme-

dium gelegene untere Öffnung der Achse. Diese untere Öffnung dient als Gasauslass und steht mit dem Kulturmedium in ständigem Kontakt.

Ein Verstopfen der Hohlachsen, das durch den in die im Kopfraum liegenden Belüftungslöcher eingedrungenen Schaum verursacht wird, ließ sich nicht bestätigen. Dies wurde dadurch getestet, dass die Begasungslöcher am oberen Ende der Achse mit einem Schrumpfschlauch verschlossen (Abbildung 5.3.5) und die Gewinde, in welchen die Hohlachsen verschraubt sind, von den Versorgungskanälen der Sterilabdeckung schräg bis zum Hohlachsenkopf hinein (Abbildung 5.3.5) angebohrt wurden. Die Luft wurde aufgrund dieser Maßnahme nicht mehr aus dem Kopfraum des Reaktors, sondern direkt aus dem Versorgungskanal angesaugt. Trotzdem kam es weiterhin zu einem unverändert häufigen Verstopfen der Hohlachsen und damit ausbleibendem Gaseintrag in die Reaktoren. Nach Ausschluss der Möglichkeit des Eindringens von Kulturmedium über die obere Begasungsbohrung als Grund für das Zusetzen der Hohlachsen wurde die zweite mögliche Ursache untersucht. Demnach könnten die



**Abbildung 5.3.5: Aufbau der miniaturisierten Bioreaktoren und ihrer Einbauten: Verdrängungskörper der Sterilgasabdeckung (1), Gasauslass (2), Gaseinlass (3), Belüftungslöcher in der Achse (4), Reaktor (5), Hohlachse (6), Rührorgan (7), diagonalen Bohrungen zur Begasung des Mediums (8), Bohrung vom Gaseinlass bis zur Hohlachse (9), Schrumpfschlauch zum Verschluss der Belüftungslöcher im Kopfraum des Reaktors (10).**



**Abbildung 5.3.6:** (A): Damit bei Druckschwankungen im Zuluftstrom keine Kulturflüssigkeit und damit Riboflavin durch die untere Öffnung im Rührer in die Achse eindringen kann, wird die untere Verschließen dieser Öffnung des Rührers durch einen Silikonstopfen verschlossen (B). (C): Die Kulturflüssigkeit kann auf diesem Weg nicht mehr Eindringen.

Feststoffpartikel über die untere, in der Flüssigkeit befindliche Öffnung in die Achse gelangen. Aufgrund dieser Hypothese wurden die Rührer von unten mit einem Silikonstopfen verschlossen. Hierdurch sollte verhindert werden, dass bei Druckschwankungen des Gasflusses in der Rührerachse Medium aufsteigt, dort antrocknet und die Feststoffe mit der Zeit die Achse verstopfen. Die Druckschwankungen kommen dadurch zu Stande, dass der Spalt zwischen Strömungsbrechern und umlaufendem Rührer sehr klein ist. Das Ausströmen des Flüssigkeit-Gas-Gemisches wird hierdurch beeinflusst. Der Gasfluss durch die diagonalen Bohrungen der Rührer wurde als stark genug angenommen, um das Eintreten von Kulturmedium auf diesem Weg zu verhindern. Der Verschluss der Rühreröffnung beeinflusste den Gaseintrag ins Medium nicht signifikant. Im Vergleich zeigten mit Silikonstopfen verschlossene und die nicht verschlossenen Rührer bezüglich der Sauerstoffkonzentration in der Kultur gleiches Verhalten (Daten nicht gezeigt).

Diese Maßnahme zeigte ebenfalls keinen messbaren Erfolg. Trotz der Silikonstopfen gelangte weiterhin genügend Riboflavin in die Hohlachsen, um diese zu verschließen und den Gaseintrag zum Erliegen zu bringen. Experimentell konnte nicht gezeigt werden, auf welchem Weg genau Kulturflüssigkeit in die Hohlachse gelangt und welcher Mechanismus letztendlich zu einem Verstopfen führt.



Nachdem die vorhergehenden konstruktiven Lösungsversuche nicht erfolgreich waren, wurden neue Hohlachsen mit einem größeren Innendurchmesser (1,8 mm) gefertigt. Diese Maßnahme sollte das Zusetzen der Hohlachsen verhindern und einen ungehinderten Gaseintrag auch über die kritische Versuchsdauer von 30 Stunden hinaus gewährleisten. Der größere Innendurchmesser erhöhte die maximal mögliche Riboflavinkonzentration, die noch nicht zu einem Verstopfen der Hohlachsen führte, auf ungefähr  $7 \text{ g L}^{-1}$ . Allerdings wurde auf diese Weise das Verstopfen nur hinausgezögert. So zeigten Versuchsläufe mit den aufgebohrten Hohlachsen bereits bessere Ergebnisse aber es kam immer noch zu Ausfällen der Begasung ab 40 Stunden (Abbildung 5.3.3). Über 25 % der Reaktoren wiesen am Ende des Prozesses Gaseintragsprobleme auf.

Bezüglich der Biomasse wurde in diesen Versuchen eine bessere parallele Reproduzierbarkeit (maximale relative Standardabweichung 7 %) und zufriedenstellende Mittelwerte von 12-13 % für die erhaltene Biotrockenmasseausbeute von *Bacillus subtilis* RB50::[pRF69]<sub>n</sub> A festgestellt. Bezüglich der Riboflavinkonzentration blieben immer noch erhebliche Einschränkungen, aber der Mittelwert lag mit einer Konzentration von  $8,9 \text{ g L}^{-1}$  bis zu  $9,5 \text{ g L}^{-1}$  und einer Ausbeute von 3,0 - 3,2 % deutlich näher am Referenzwert.

Obwohl die relativen Standardabweichungen für die Riboflavinausbeuten deutlich unter 20 % blieben, kann noch nicht von einer ausreichend guten parallelen Reproduzierbarkeit gesprochen werden. Diesen konstruktiven Weg weiter zu verfolgen war nicht möglich, da industriell gefertigte Hohlachsen mit noch größerem inneren Durchmesser für die bestehende Sterilabdeckung technisch nicht realisierbar sind. Mittels einfacher konstruktiver Ansätze war es demnach nicht möglich, das Problem der verstopften Hohlachsen vollständig zu lösen.

Weitere Untersuchungen zeigten, dass allein die hohe Konzentration von Riboflavinkristallen im Medium zu einem Verstopfen der Hohlachsen führt. Reaktoren mit hoher Biomasse- aber geringer Riboflavinkonzentration zeigten keine Probleme mit dem Gaseintrag (Daten nicht gezeigt).

### *Prozesstechnische Maßnahmen*

Da der konstruktiven Lösung des Problems der verstopften Hohlachsen vor allem technische Grenzen gesetzt sind, wurden Maßnahmen bezüglich der Prozessführung ergriffen. Um die Konzentration der Feststoffe während des Prozesses zu verringern - eine Konzentration von bis  $7 \text{ g L}^{-1}$  führt bei Einsatz der Hohlachsen mit größerem In-

nendurchmesser nicht mehr zum Verstopfen - wurde die Glucosekonzentration im Satz- und Zulaufmedium halbiert. Diese Maßnahme sollte zu reduzierten Biomasse- und Riboflavinkonzentrationen führen, aber eine gleichbleibende Produktausbeute garantieren (siehe Kapitel 4.1.3).

### 5.3.2 Einfluss der Prozessführung auf die Reproduzierbarkeit

Trotz der durch die aufgeführten Maßnahmen stark verbesserten parallelen Reproduzierbarkeit, zeigte sich die sequentielle Reproduzierbarkeit weiterhin als unzureichend. Nur für den Stamm RB50::[pRF69]<sub>n</sub> A lag die relative Standardabweichung der mittleren Riboflavinkonzentration bei fünf aufeinanderfolgenden Parallelversuchen bei 9 %. Bei den übrigen untersuchten Stämmen kam es zu Abweichungen von bis zu 33 % zwischen den Versuchen. Die Ursache hierfür ist in der Prozessführung zu suchen. Mögliche Gründe für eine mangelhafte sequentielle Reproduzierbarkeit sind Schwankungen im pH sowie im Temperaturverlauf.

#### *Temperaturverlauf*

Der Einfluss der Temperatur war während der Versuche nur unzulänglich zu quantifizieren, da der Reaktorblock noch nicht über eine Temperaturmessung für die einzelnen Reaktoren verfügte. Die Temperatur konnte in den Reaktoren nur über ein durch die Probenahmeöffnung eingeführtes konventionelles Thermometer bestimmt werden, eine bei der Versuchsdurchführung nur bedingt einsetzbare Messmethode.

Zur Quantifizierung des Temperatureinflusses auf die Riboflavinproduktion, wurden mittels der Temperiereinheit des Blockes unterschiedliche Temperaturprofile eingestellt. Die Temperatur wurde in einzelnen Reaktoren zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit der oben beschriebenen Methode bestimmt. Dabei wurden maximale Temperaturen erreicht, die den Sollwert von 39 °C deutlich überstiegen. Es zeigte sich, dass bei geringfügigen Abweichungen von bis zu 1,5 °C vom Sollwert keine nennenswerte Beeinflussung der Riboflavinproduktion stattfand. In Tabelle 4.1.2 sind entsprechende Daten von vier Parallelversuchen aufgeführt. Der einzige Versuch bei dem die Riboflavinausbeute deutlich vermindert war, zeigte einen auffälligen pH-Verlauf mit starken Schwankungen. Allerdings führten Temperaturen von über 42 °C, die über einige Stunden gehalten wurden, und auch kurze Anstiege der Temperatur in den Reaktoren über 44 °C, zur offensichtlichen Störung des Prozesses und bis zu 40 % verminderter Riboflavinproduktion. Da diese Temperaturen in den Reaktoren aber nicht bei norma-

lem Gebrauch der Temperiereinheit und durch natürliche Schwankungen der Umgebungstemperatur erreicht wurden, sondern bewusst herbeigeführt werden mussten, kann bei den bisher durchgeführten Untersuchungen von einer Beeinflussung der Riboflavinproduktion durch die Temperaturabweichungen abgesehen werden. Trotzdem wäre eine Temperatursensorik für den Bioreaktorblock von Vorteil für die Prozesskontrolle.

**Tabelle 5.3.1: Einfluss der maximal erreichten Temperatur auf die Riboflavinausbeute.**

$T_{\max}$ [°C]	Riboflavinausbeute	Rel. Fehler	pH Verlauf
39,6	3,2 %	13%	normal
39,8	3,4 %	15 %	normal
39,9	3,2 %	11 %	normal
40,0	2,7 %	14%	auffällig
40,2	3,3 %	7 %	normal
40,3	3,5 %	9 %	normal

#### *pH Verlauf*

Der Verlauf und die Regelung des pH hat einen größeren Einfluss auf die sequentielle Reproduzierbarkeit. Hierbei sind zwei Effekte zu unterscheiden. Zum einen der Einfluss den der pH-Wert selbst auf die Riboflavinproduktion hat und zum anderen der Einfluss, den die Zugabe von Ammoniumhydroxid im Rahmen der pH-Regelung ausübt. Ammoniumhydroxid dient während des Prozesses als zusätzliche, im besten Fall quasi kontinuierlich zugegebene, Stickstoffquelle, die starke Auswirkungen auf die Riboflavinproduktion hat. Ohne diese zusätzliche Zugabe reduziert sich die Riboflavinausbeute für z.B. *Bacillus subtilis* RB50::[pRF69]<sub>n</sub> A nach 24 Stunden von ursprünglich 3,2 % auf 1,2 % und von 3,55 % auf nur noch 0,1 % nach 48 Stunden Prozessdauer. Um die Zugabe von Stickstoff über den gesamten Prozess zu garantieren, wurde ein minimales Zugabevolumen von 0,5 µL für jeden Zugabezyklus festgelegt. Auch wenn der pH über dem Sollwert lag, wurde diese Menge an Base zugegeben (Knorr 2005).

Stellt die pH Kontrolle als quasi kontinuierlich betriebene, einseitige Regelung im Litermaßstab kein Problem dar, ist sie für die Milliliterreaktoren relativ träge. Die erforderliche Basezugabe wird von einem einfachen PD-Regler (Kapitel 4.2.1) halbstündig berechnet. Diese Berechnung erfolgt basierend auf einer ebenfalls halbstündig vorgenommenen Probenahme. Es werden drei gleich große Zugabemengen berechnet, die in zehnminütigen Intervallen bis zur nächsten pH Messung zugegeben werden.

Anfangs geringe Varianzen des pH-Verlaufs in unterschiedlichen Reaktoren führen mit dieser nicht zeitnahen Regelung schnell zu völlig voneinander abweichenden Verläufen über die gesamte Prozessdauer. Ist die pH-Regelung sequentiell nicht reproduzierbar, werden in den Versuchen folglich unterschiedliche Mengen der Stickstoffquelle zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultur hinzugegeben und beeinflussen damit auf ungleiche Weise die Riboflavinbildung.

Ein weiteres Problem stellt die Messung des pH dar. Die verwendete Messmethode mit den kommerziell erhältlichen Hydroplates<sup>®</sup> (HP96 U) beruht auf der Bestimmung von Fluoreszenz, so dass erhöhte Konzentrationen von dem ebenfalls fluoreszierenden Riboflavin im Medium zu Messwertverfälschungen führen. Mit steigender Konzentration von Riboflavin im Medium wird eine Abweichung bei der Messung erzeugt, die durch die Eigenfluoreszenz des Riboflavins verursacht wird. Diese bewirkt schon bei relativ geringen bis mittleren Konzentrationen eine Überschätzung des realen Wertes von ca. 0,2 pH Einheiten (Abbildung 5.3.7) und führt bei höheren Konzentrationen zu noch größeren Fehlmessungen. Dieser Effekt wurde bereits bei Knorr (2005) beobachtet und die negative Wirkung mit einem pH Sollwertprofil eingeschränkt, das diese Messwertabweichung berücksichtigt. Die Reduktion der Riboflavinkonzentration durch die Halbierung der zugegebenen Glucosemenge erforderte ein neues Sollwertprofil,

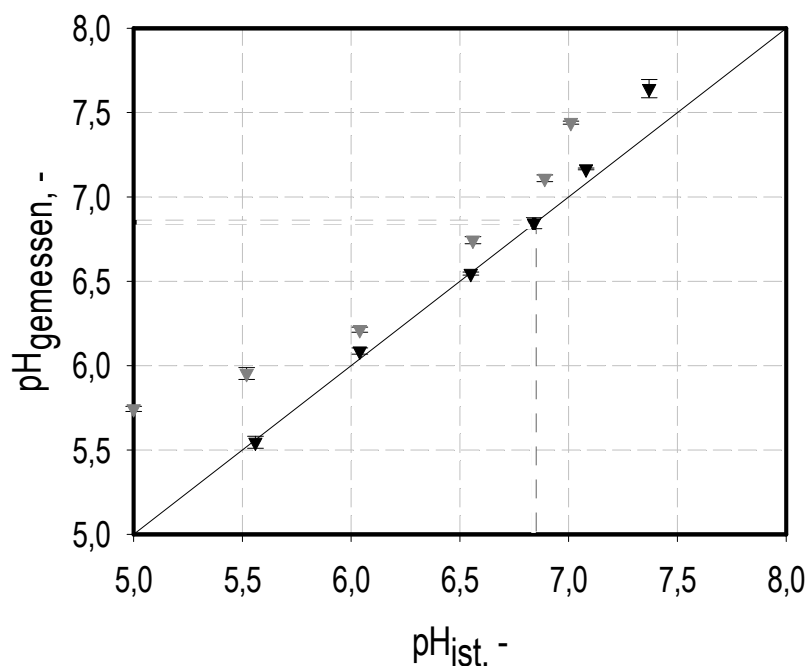


Abbildung 5.3.7: Die mit der HP96 gemessenen pH Werte für das Medium (schwarze Dreiecke) und Reaktionsmedium mit einer Riboflavinkonzentration von  $6 \text{ g L}^{-1}$  ( graue Dreiecke) wurden mit den Ergebnissen einer konventionellen Glaselektrode verglichen.

das an die nun erreichten Konzentrationen angepasst wurde. Das verbesserte pH Sollwertprofil beeinflusst den Prozessverlauf positiv, da näher am tatsächlichen pH-Wert geregelt wird, führt aber dem ungeachtet nicht zu einer quantifizierbaren Verbesserung der Riboflavinausbeute und einer ausreichenden Kontrolle über den pH. Diese Problematik ist in Abbildung 5.3.8 dargestellt. Hier wird die Kultivierung desselben Stamms unter denselben Kultivierungsbedingungen in drei aufeinanderfolgender Versuchsläufe im selben Milliliterreaktor gezeigt. Dargestellt ist die Satzphase des Prozesses und ein Teil der Zulaufphase. In dieser Zeit bereitet die Regelung des pH die meisten Schwierigkeiten. Der Zulauf wurde in allen Fällen nach ca. 5 Stunden gestartet. Das Ende der Satzphase zeigt sich bezüglich des pH in einem Anstieg desselben bis zu 0,2 pH Einheiten, so dass ein pH von 6,9 bis 7,0 erreicht wird. Der mit schwarzen Kreisen gezeigte pH Verlauf stellt einen erfolgreich geregelten Reaktor dar. Nach ca. 1,5 Stunden sinkt der pH Wert aufgrund der zunehmenden Stoffwechselaktivität der Organismen. Fällt der Wert unter den Sollwert von 6,8 wird eine auf Basis der gemessenen pH Daten berechnete Menge Base zugegeben. Ein deutlich abweichendes Bild zeigt sich im Falle der beiden anderen Versuche. Hier beginnt der pH schon etwas früher abzusinken. Die erste errechnete Basezugabe für beide Reaktoren reicht nicht aus um den pH zurück zum Sollwert zu bringen. Dafür führt bereits die nächste Zugabe für den einen Reaktor (○) zu einem deutlichen und für den anderen Reaktor (▼) zu einem leichten Überschwingen. Nach fast zwei Stunden Versuchsdauer weisen die drei Reaktoren zum ersten Mal einen gleichen pH auf. Zu beachten sind hier vor allem die bis zu diesem Zeitpunkt stark unterschiedlichen Basezugaben. In der nächsten Zugabe wird aufgrund des Überschwingens nur ein kleines Basevolumen zugegeben. Die pH Werte für die zwei Reaktoren sinken im gleichen Maße unter den Sollwert bis auf pH 6,6 ab. Die nächste Basezugabe ist so überdimensioniert, dass für den einen Reaktor (○) ein pH von 7,72 bei der nächsten pH Messung festgestellt wird. Für den anderen Reaktor wurde die Zugabe aufgrund des vorangegangenen Verlaufes etwas niedriger berechnet und das Überschwingen fällt deutlich geringer aus (pH 7,3). Im nächsten Zugabezyklus bleibt die Zugabe minimal. Während für den einen Reaktor (▼) der pH durch die Stoffwechselaktivität der Organismen fällt, steigt für den anderen Reaktor der pH auf einen maximalen Wert von pH 8,0 weiter an. Für den Reaktor mit fallendem pH wird wiederum ein zu geringes Basevolumen berechnet, so dass der pH weiter fällt und infolge des sich an den vorangegangenen Werten orientierenden

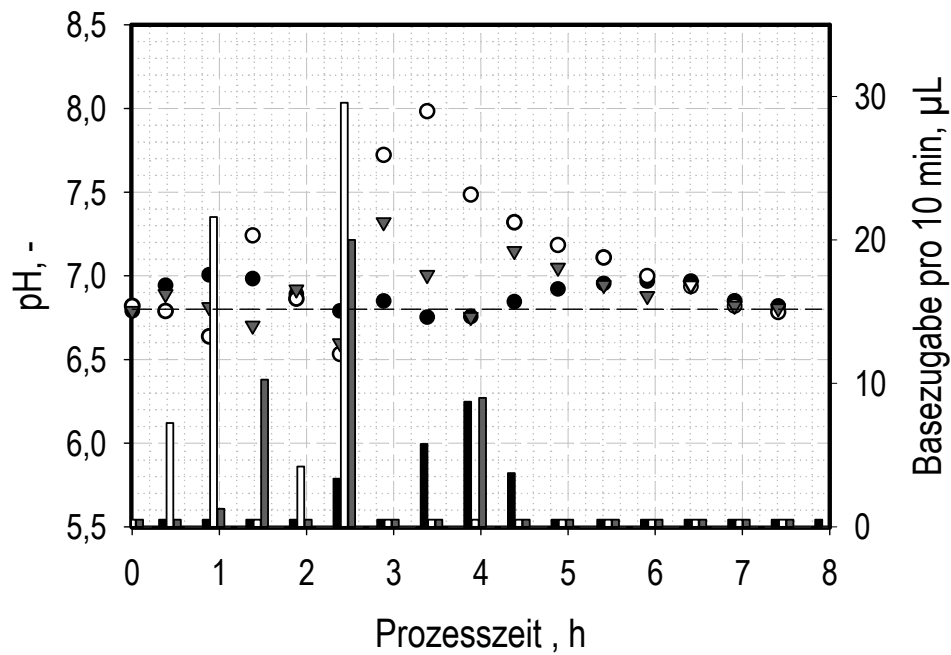


Abbildung 5.3.8: Verlauf des pH und Basezugabe bei der Kultivierung desselben Stamms unter denselben Kultivierungsbedingungen in drei aufeinanderfolgender Versuchsläufe im selben Milliliterreaktor.

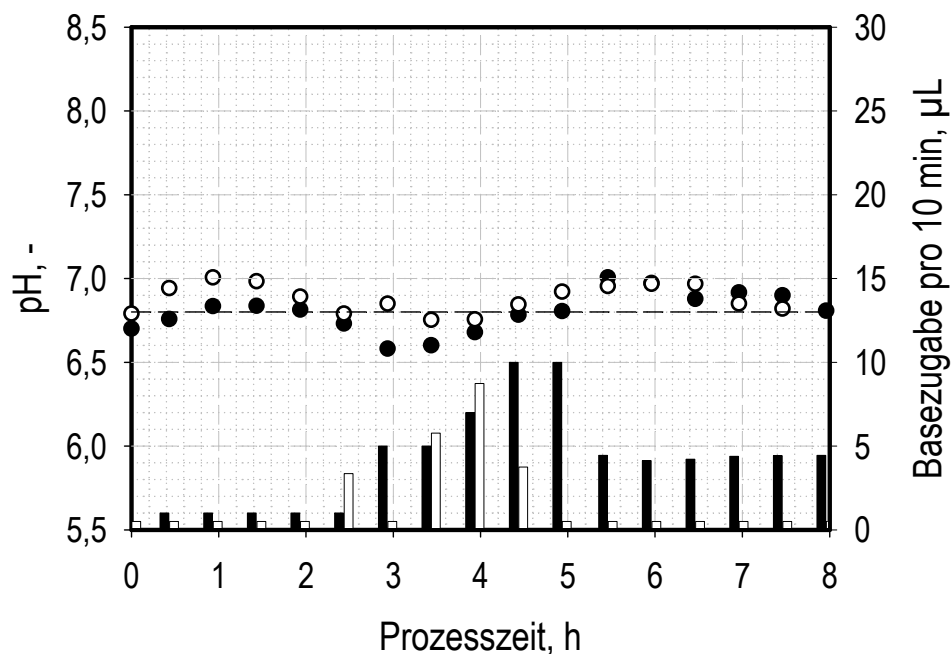


Abbildung 5.3.9: Verlauf des pH und Basezugabe bei der Kultivierung desselben Stamms unter denselben Kultivierungsbedingungen in zwei aufeinanderfolgender Versuchsläufe im selben Milliliterreaktor. Es wurden die Regelparameter optimiert und eine Beschränkung der Basezugabe vorgenommen.

Regelalgorithmus bei der nächsten Zugabe zu viel Base erhält und erneut überschwingt. Für den anderen Reaktor (○) wird in den nächsten drei Stunden nur das minimale Basevolumen zugegeben. In diese Zeit fällt der pH wieder, so dass kurz nach Start der Zulaufphase das Niveau der anderen Reaktoren erneut erreicht wird. Im Laufe dieser Fermentation kam es noch mehrmals zum Überschwingen des pH, so dass sich am Ende der Kultivierung recht ungleiche Verläufe darstellten. Bezüglich der Riboflavinausbeute zeigte dieser Unterschied deutlich Wirkung. So wurde im Falle der ersten Kultivierung (●) eine Ausbeute von  $0,035 \text{ g g}^{-1}$  erreicht, im Fall der Kultivierung mit sehr starken Abweichungen vom pH Sollwert (○) nur eine Ausbeute von  $0,027 \text{ g g}^{-1}$ . Für den Reaktor mit geringeren aber häufigen Abweichungen zeigte sich auch eine verminderte Riboflavinproduktion, die in einer Ausbeute von  $0,029 \text{ g g}^{-1}$  nach 48 Stunden resultierte.

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich erkennen, dass der Regelalgorithmus erst verzögert und dann zu stark auf Abweichungen vom Sollwert reagiert, so dass gerade bei Kulturen die schon zu Anfang der Kultivierung größere Diskrepanzen zeigen, ein starkes Abweichen des pH ins basische nicht verhindert werden kann.

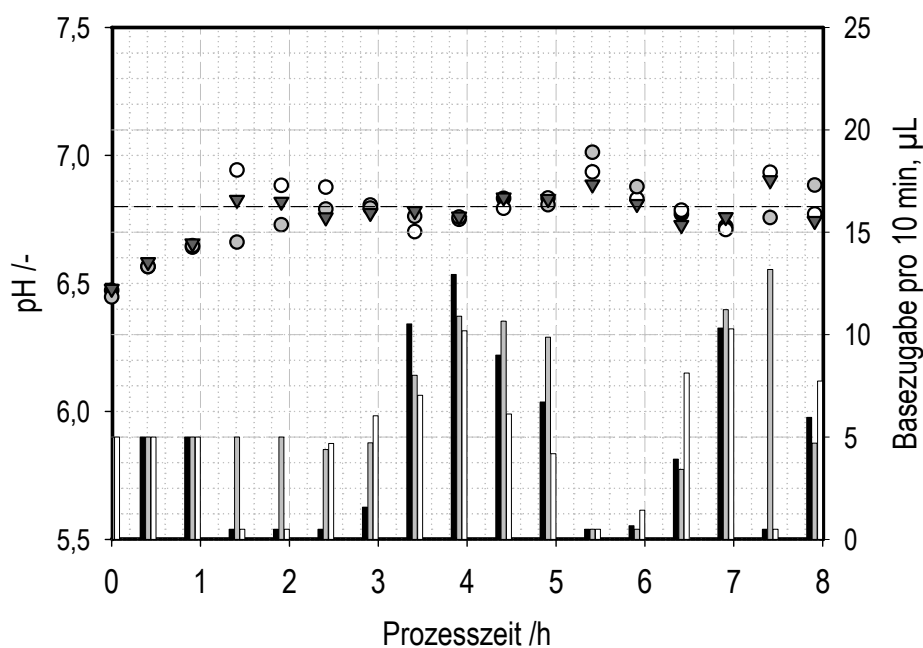
Um die Regelung zu verbessern, wurden die Regelparameter optimiert und eine Beschränkung des Zugabevolumens eingeführt. Diese orientiert sich an den Basevolumen, die bei erfolgreichen Regelungen in den ersten Stunden des Prozess zugegeben wurden, und kann manuell angepasst werden.

Die Optimierung der Regelparameter (Tabelle 5.3.2) führte nur zu leichten Verbesserungen der Regelung, da der Messzyklus von einer halben Stunde zu lang war, um die pH Werte der unterschiedlichen Reaktoren gleich gut auf den Sollwert zurückzuführen. Die manuelle Beschränkung des Basezugabevolumens auf 1 – 10  $\mu\text{L}$  zu Anfang des Prozesses konnte dagegen eine deutliche Verbesserung bewirken. Das Anpassen des

**Tabelle 5.3.2: Optimierte Regelparameter und Beschränkung des Zugabevolumens für die pH Regelung des Riboflavinprozesses.**

Optimierte Regelparameter		Beschränkung des Basezugabevolumens	
$K_p$	69	Stunde 0 - 2	1 $\mu\text{L}$
$K_D^*$	21	Stunde 2 – 2,5	3 $\mu\text{L}$
		Stunde 2,5 – 3,5	6 $\mu\text{L}$
		Stunde 3,5 – 8	10 $\mu\text{L}$

pH an den Sollwert nahm so etwas mehr Zeit in Anspruch, das Überschwingen der Regelung konnte aber erheblich reduziert werden. Der Verlauf des pH während der Kultivierung konnte so erheblich verbessert werden. In Abbildung 5.3.9 sind zwei Kulturen aufeinander folgender Parallelexperimente dargestellt, die mit den neuen Einstellungen der Regelung durchgeführt wurden. Für beide konnte eine mit dem Referenzprozess gut vergleichbare Riboflavinausbeute von zum einen  $0,033 \text{ g g}^{-1}$  und zum anderen  $0,034 \text{ g g}^{-1}$  erreicht werden. Der pH Verlauf gestaltete sich ohne wesentliche Abweichungen vom Sollwert und eine quasi kontinuierliche Zugabe von Ammoniumhydroxid wurde gesichert. Für die erste Kultur ( $\bullet$ ) wurde das maximale Basevolumen nach ungefähr 3 Stunden einen Zugabezyklus zu spät angehoben. Dadurch kam es zu einer Abweichung bis pH 6,6, die aber zügig ausgeglichen werden konnte. Auch für Medien anderer Zusammensetzung soll der pH Wert entsprechend gut geregelt werden können. Zudem wurde die Regelung genutzt, um die unterschiedlichen pH Startwerte von Medien während der Satzphase anzugleichen. Auch für einen solchen Fall zeigt die pH-Regelung zufriedenstellende Ergebnisse. In Abbildung 5.3.10 sind drei parallel betriebene Reaktoren dargestellt, bei denen die Pufferkonzentration herabgesetzt ist ( $2,35 \text{ g L}^{-1}$  anstatt  $4,71 \text{ g L}^{-1}$ ). Der pH kann für die Reaktoren zu jedem Zeitpunkt auf einem ähnlichen Niveau gehalten werden und es zeigen sich keine großen



**Abbildung 5.3.10:** Dargestellt sind drei parallel betriebene Reaktoren mit demselben Medium, bei dem die Pufferkonzentration herabgesetzt ist. Basezugabe und pH Verlauf weisen ausreichende Ähnlichkeit auf und auch die Anpassung der Startwerte erfolgt ohne Probleme.



Abweichungen vom Sollwert. Auch die Anpassung des pH vom Startwert um pH 6,45 an den Sollwert pH 6,8 funktioniert zügig und ohne Überschwingen. Die parallele Reproduzierbarkeit der Riboflavinausbeute zeigt mit einer relativen Standardabweichung von 8,5% einen guten Wert. Für Medien mit starken Abweichungen von der Zusammensetzung des Ausgangsmediums, wie sie während der Medienoptimierung verwendet wurden, konnte allerdings mit der verwendeten Regelung kein stabiler pH Verlauf erreicht werden.

### 5.3.3 Individuelle *online* Temperaturmessung in den Parallelbioreaktoren

Der Reaktorblock wird über Wärmetauscher temperiert, die mit einem externen Thermostat betrieben werden. Der elektromagnetische Antrieb der Rührorgane setzt eine große Wärmemenge frei, die über die Wärmetauscher abgeführt wird. So wird nur zu Beginn des Prozesses geheizt, um die bis zum Prozessstart gekühlten Medien auf die gewünschte Prozesstemperatur zu bringen. Im weiteren Verlauf dienen die Wärmetauscher zur Kühlung der Reaktoren. Je nach Aktivität der Organismen kommt es zu einer mehr oder minder starken Wärmeentwicklung in den einzelnen Reaktoren, die im Normalfall ebenfalls zur Erhöhung der Temperatur führt. Im Zusammenspiel der Einstellung der Kopfraumkühlung und des Heiz-/Kühlkreislaufes kann die Temperatur in den Reaktoren eingestellt werden. Bisher ist es aber nicht möglich die Temperatur des Reaktionsraums für jeden miniaturisierten Bioreaktor zu messen. Die Aufnahme eines

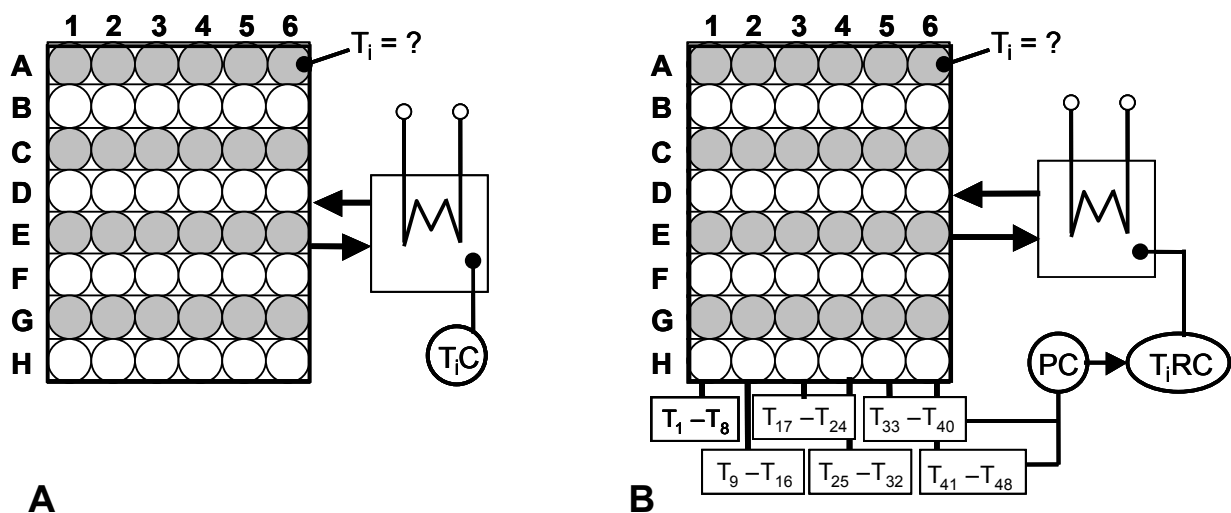
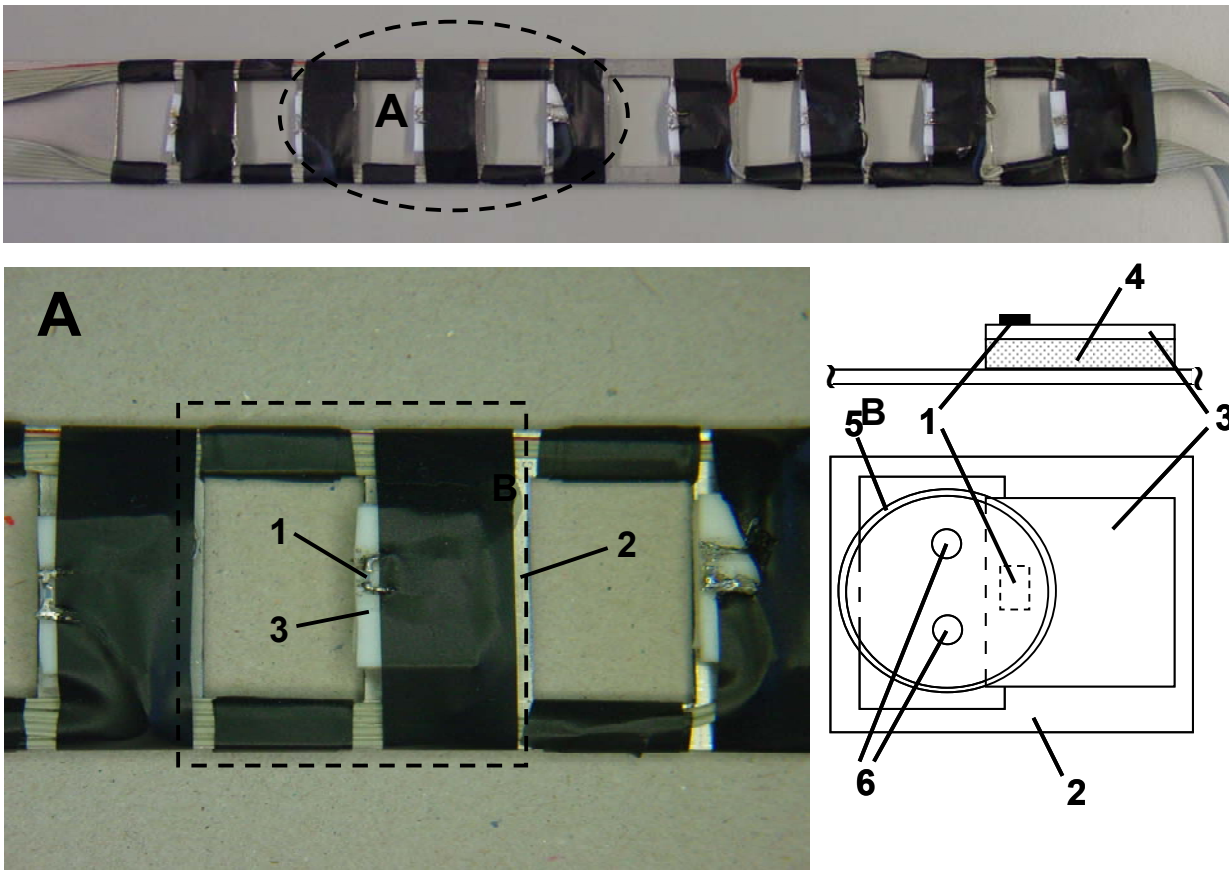


Abbildung 5.3.11: Aktuell wird der Reaktorblock über einen Wärmetauscher ohne direkte Temperaturmessung der Reaktoren temperiert (A). Individuelle Temperatursensoren sollen die Messung der Reaktortemperatur und eine Temperaturregelung ermöglichen (B).

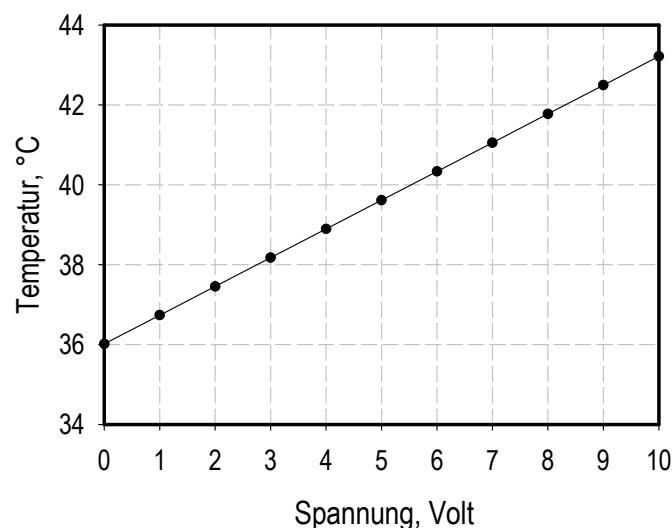


**Abbildung 5.3.12** Die Temperatursensoren (1) wurden flexibel auf einer Halterung (2) befestigt, die von unten am Reaktorblock angebracht wird. Die eingesetzten Reaktoren (5) drücken die Sensoren leicht auf der flexiblen Unterlage (4) nach unten, damit ein vollständiger Kontakt sichergestellt wird. Die Wärmeleitung wird mittels einer Wärmeleitpaste verbessert. Die Sensoren sind nach unten hin wärmeisoliert (3). Um weiterhin die pH und DO Messung (6) zu ermöglichen wurde eine Aussparung für die Sensorik vorgesehen.

*online* Temperaturprofil ist aber notwendig, damit für neue oder modifizierte Prozesse die Einstellung für die Wärmetauscher optimal angepasst werden und beim Analysieren von Kultivierungsergebnissen die Temperatur berücksichtigt werden kann. Für die Temperaturmessung im Bioreaktorblock wurden Widerstandstempersensoren ausgewählt, welche die Oberflächentemperatur des Reaktorbodens messen. Diese Messstelle liegt für das Anbringen der Sensoren zugänglich aber geschützt vor übermäßiger Konvektion zwischen Bioreaktor sowie online pH- und Sauerstoffmessung. Die Temperatursensoren wurden auf einem Rahmen befestigt und mit einer Kunststoffplatte nach unten isoliert, die wiederum auf einem Kunststoffschaum angebracht ist. Dieser sorgt für die nötige Flexibilität um beim Einsetzen der Reaktoren in den

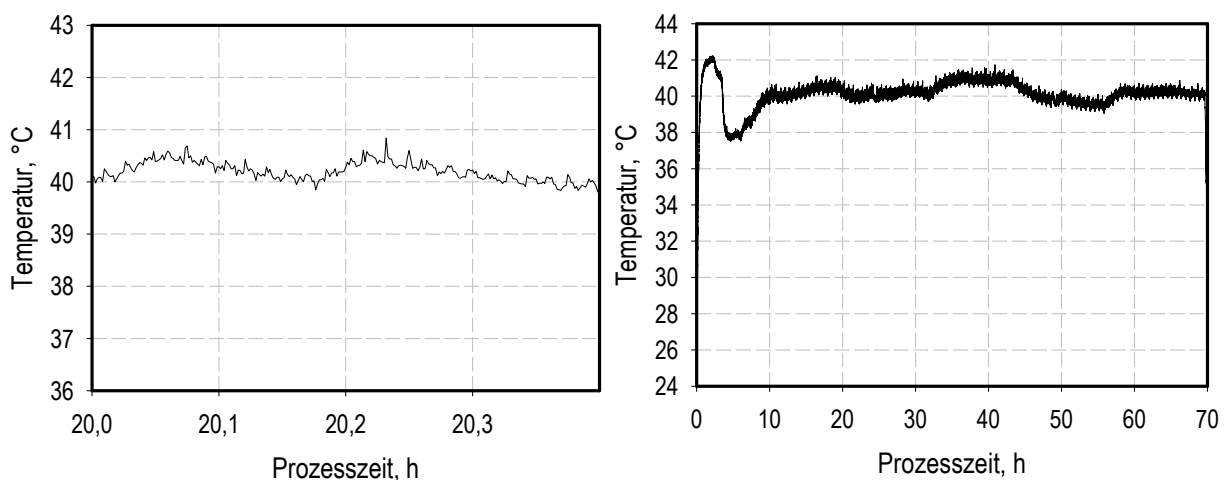
Reaktorblock für genügend guten Kontakt zwischen Sensor und Reaktorboden zu sor-

gen. Zudem wird eine Wärmeleitpaste für den optimalen Wärmefluss eingesetzt. Der Rahmen hat Aussparungen für die optische Sensorik von pH und Sauerstoff. Es wurden zunächst Temperaturmessstellen für eine Reaktorreihe (8 Reaktoren) vorgesehen. Da das Magnetfeld des Rührerantriebs die Messung mit Widerstandssensoren erheblich beeinträchtigt, wurde das entstehende Spannungssignal mit einem vorgeschalteten Kondensator geglättet und die Verbindung des Sensors mit der Messkarte mit abgeschirmten Kabeln realisiert. Diese bringen den Nachteil mit sich, dass sie wegen des erheblich größeren Durchmessers schwieriger am Reaktorblock unterzubringen sind als normale Kabel. Das resultierende Signal der Sensoren war immer noch durch die Magnetfelder gestört, konnte aber in ausreichender Genauigkeit für die Temperaturmessung verwendet werden. Zunächst wurde der Sensor in einem Temperaturbereich von 36 °C bis 43,8 °C kalibriert. Dieser Bereich ist für den Riboflavinprozess von Interesse. Dazu wurden die beiden Endpunkte der Geraden mit den Spannungen 0 und 10 Volt korreliert. Die Temperaturdifferenz von 7,8 °C konnte linear mit der Ausgabespannung zwischen 0-10 Volt in Relation gesetzt werden. Ein Spannungsunterschied von einem Volt gab damit eine Temperaturveränderung von 1,29 °C wieder. In Abbildung 5.3.13 ist die entsprechende Kalibriergerade dargestellt. Referenzmessungen mit einem kommerziell erhältlichen Widerstandsthermometer, das direkt mit der im Reaktor befindlichen Flüssigkeit über die Probenahmeöffnung in Berührung kam, ergaben eine gute und für biologische Prozesse ausreichende Genauigkeit für die Temperaturmessung mit dem Kontaktsensor. Abweichungen lagen unter 0,1 °C. Die Störung des Magnetfeldes äußerte sich in Schwingungen des Messsignals, die eine exakte, punktuelle Messung der Temperatur zu einem bestimmten Zeitpunkt im



**Abbildung 5.3.13: Kalibriergerade für den PT100. Der Bereich von 10 Volt wurde für eine Temperaturdifferenz von 7,8 °C verwendet.**

Moment nicht zulassen. Die Differenz zwischen dem maximal und dem minimal gemessenen Wert dieser Schwankungen liegt bei höchstens 0,5 °C. Nutzt man die Messung zur Beobachtung der Temperatur über die Prozesszeit, kann man über die Bestimmung des Mittelwertes die Temperatur zu einem bestimmten Zeitpunkt genau genug bestimmen. Darüber hinaus ist es möglich das Temperaturprofil zur Analyse eines Prozesses heranzuziehen, da prozessbeeinflussende Abweichungen bei der vorhandenen Messgenauigkeit deutlich zu Tage treten. In Abbildung 5.3.14 ist die Temperaturmessung in einem Reaktor über 70 Stunden dargestellt. Das Signal ist ausreichend gut, um über die Wärmetauscher eine gewünschte Solltemperatur in den Reaktoren einzustellen und notfalls Korrekturen durchzuführen. Auch hier konnte über Referenzmessungen im Inneren des Reaktors, die mit einem herkömmlichen Widerstandsthermometer durchgeführt wurden, die Messung des Kontaktsensors am Boden des Reaktors bestätigt werden.

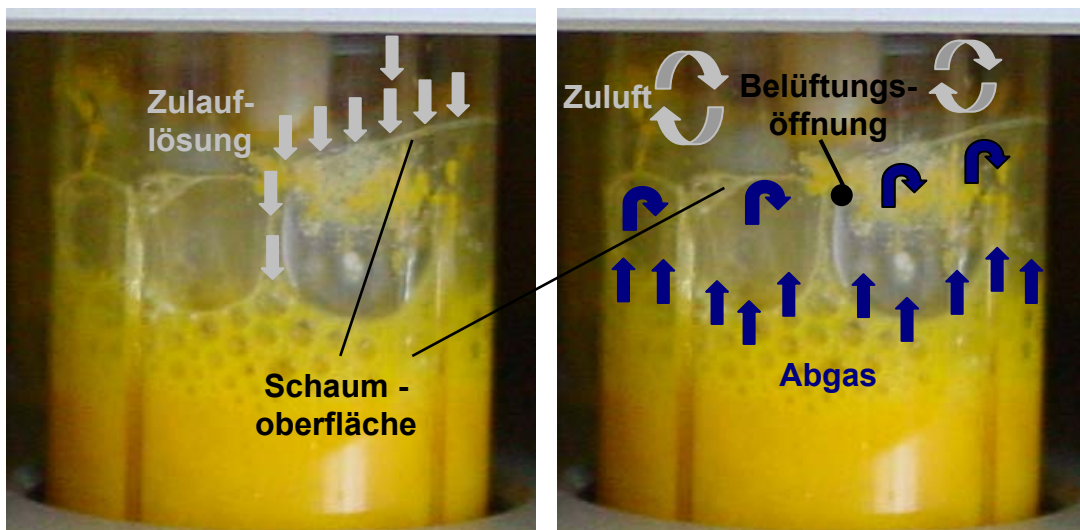


**Abbildung 5.3.14: Das wechselnde Magnetfeld erzeugt eine Störung, der das Messsignal überlagert (links). Dieses Störsignal ließ sich mittels eines Kondensators reduzieren, so dass ein Messsignal aufgenommen werden konnte, das im Mittel die Temperatur im Reaktor anzeigt. Mittels des kalibrierten Temperatursensors wurde die Temperatur in einem Reaktor gemessen (rechts). Die Temperatur kann über die beiden Wärmetauscher im Bioreaktorblock geregelt und eingestellt werden.**

#### 5.3.4 Individuelle *online* Schaumsensorik für die Parallelbioreaktoren

Als ein weiteres großes Problem, das ebenfalls starken Einfluss auf den Prozessverlauf und die Produktbildung nehmen kann, stellte sich die Schaumbildung heraus. Auf-

grund der Miniaturisierung und des geringen Volumens der Reaktoren sowie des induktiven Gaseintrags kam es bei Schaumbildung in den Milliliter-Reaktoren zu mehr als nur den bekannten Nachteilen. So wird im Allgemeinen vor allem das Aufschwimmen von Zellen und festen Bestandteilen aus dem Kulturmedium in den Schaum als negative Beeinträchtigung angesehen, da sie der eigentlichen Reaktion entzogen werden und sich im Schaum weniger optimale Bedingungen einstellen (Chmiel 1991, Storhas 1994). Biomasse- sowie Produktbildung werden ungewollt beeinflusst. Aufgrund des kleinen Kopfraumvolumens kam es darüber hinaus bei den miniaturisierten Bioreaktoren schneller zum Auffüllen des Reaktionsraums mit Schaum und Austreten desselben über die Probenahmeöffnung aus dem Reaktor. Außerdem kamen die Nadeln des Laborroboters bereits bei der Zugabe von Substraten mit der Kulturflüssigkeit in Berührung, wobei der Schaum großflächig an ihnen haften blieb. Beides erhöhte das Kontaminationsrisiko der Kultur erheblich und führte zu einem ungewollten Ausstrag von Produkt und Zellen aus dem Reaktor. Zudem verhielt sich der Schaum aufgrund der veränderten Proportionen anders als im Labormaßstab. Der kleine Reaktordurchmesser führt zu erheblichen Problemen mit der Schaumentwicklung. Der Schaum bildete schneller eine stabile, unbewegliche Schicht aus kugelförmigen Blasen, die sich nur noch mittels großer Mengen an Antischaummittel auflösen ließ. Die

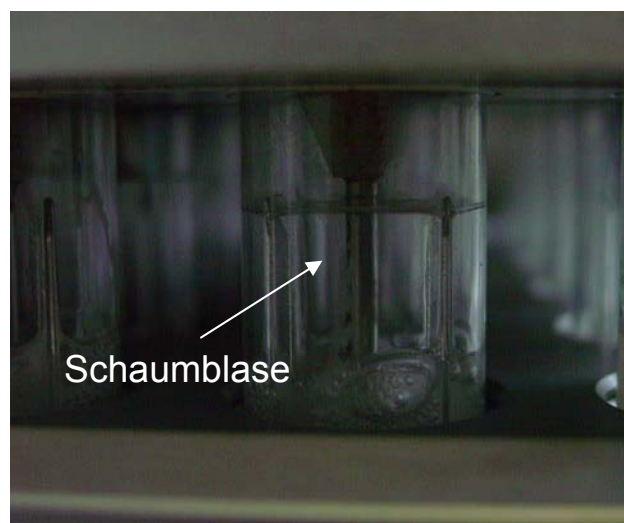


**Abbildung 5.3.15:** Bei Schaumbildung entstehen teilweise große Blasen an der Phasengrenze, so dass die zugegebene Zulauf-lösung das Medium nicht mehr direkt erreichen kann. Sie sammelt sich zunächst auf den oben gelegenen großen Blasen, läuft an deren Oberfläche hinab, bis sie zwischen den immer kleiner werdenden Blasen hindurch findet und letztendlich das Medium erreicht (graue Pfeile). Wenn sich die großen Blasen wie in der Abbildung gezeigt weit oben im Reaktor befinden, können sie die Belüftungsbohrung in der Hohlachse von der Frischluftzufuhr (graue Pfeile, rechts) abschneiden. Das bereits durch das Medium gepumpte Abgas wird immer

wieder im Kreis geführt (schwarze Pfeile, rechts) und verschlechtert die Sauerstoffversorgung des Mediums.

großen lockeren Blasen, die sich zumeist oben auf einer Schaumschicht bilden, hatten in den Milliliter-Reaktoren den Nachteil, dass sie die gesamte Oberfläche des Reaktors überspannten und eine elastische, beständige Schicht zwischen Kopfraum und Kulturmedium bildeten. In diesem Fall wurde die Substratzugabe und die Sauerstoffkonzentration im Medium stark beeinträchtigt. Das Zulaufmedium sammelte sich auf den Schaumblasen und lief erst ab einer bestimmten Menge über die Kanäle zwischen den Blasen bis in das Medium ab. Das Dosierintervall der Zulauflösung von 10 Minuten wurde dadurch erheblich gestört. Es wurde sogar beobachtet, dass eine einzelne große Blase den Kopfraum überspannte und das zugegebene Substrat von der elastischen Oberfläche an die Reaktorwand befördert wurde und so gar nicht erst ins Medium gelangte. Solche Blasen konnten sich in den miniaturisierten Reaktoren teilweise über Stunden immer wieder bilden. Reichte diese Blasenschicht bis über die Belüftungsöffnung in der Hohlachse konnte von dort nur noch das Abgas angesaugt und erneut durch die Kultur gepumpt werden.

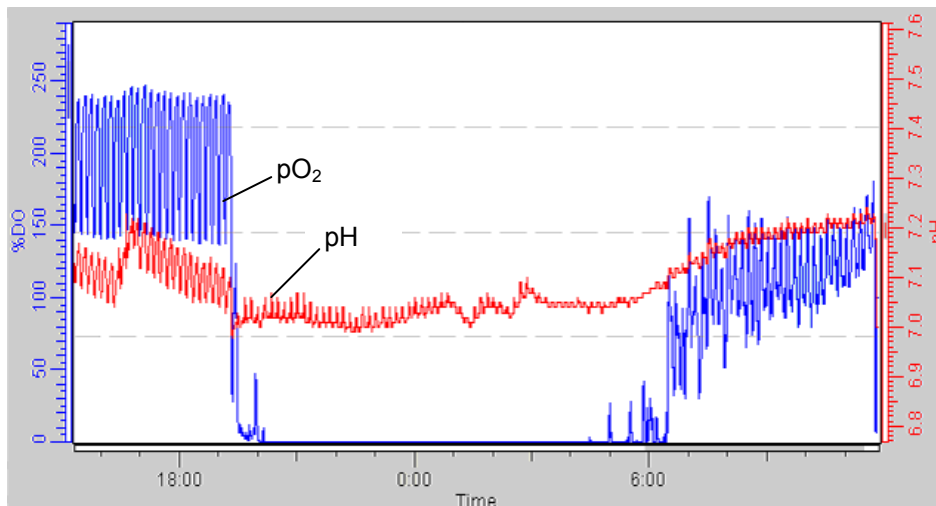
Das Begasungssystem war somit für lange Zeit von der Frischluftzufuhr über die Sterilgasabdeckung abgeschnitten. Bildete sich dichter, homogener Schaum mit kleinen Blasen, wurden das Belüftungsloch des Reaktors sogar ganz verstopft. Der Einfluss der Schaumbildung zeigte sich deutlich in der Aufzeichnung der Sauerstoffkonzentration im Kulturmedium (Abbildung 5.3.17). Überstieg die Schaumbildung ein gewisses Maß und zeigte die oben genannten Phänomene, hörte die durch den intermittierenden Zulauf hervorgerufene regelmäßige Oszillation der Sauerstoffkonzentration



**Abbildung 5.3.16: Einzelne große Schaumblasen können den gesamten Kopfraum überspannen und die Frischluftzufuhr abschneiden.**

im Medium auf und wurde durch ein zunächst unregelmäßiges Muster mit sinkender Konzentration abgelöst, bis die Sauerstoffkonzentration auf 0 % Sauerstoffpartialdruck in der Kulturbrühe absank. Dieser Zustand konnte über mehrere Stunden anhalten und unterschied sich von Reaktor zu Reaktor. Unregelmäßige Substratzugabe und schlechte Sauerstoffversorgung zeigten negativen Einfluss auf die Produktbildung. Betroffene Reaktoren wiesen bis zu 30 % Ausbeuteeinbußen auf.

Nach erfolgreicher Bekämpfung des Schaums mit der Zugabe von Antischaummittel zeigte das Sauerstoffsignal wieder die gewohnte Oszillation und auch das alte Niveau der Gelöstsauerstoffkonzentration im Medium konnte wieder erreicht werden. Vor allem bei Medien mit hohem Anteil an komplexen Mediumsbestandteilen, die oberflächenaktive Substanzen (Proteine, Peptide) enthalten, zeigte sich erhebliche Schaumbildung mit festem stabilen Schaum, der mit den vorhandenen Antischaummittel nur unzureichend zu bekämpfen war. Teilweise bildete sich eine feste Schaumschicht auf den Reaktoren die über mehrere Stunden die Zugabe von Substrat und den Gasaustausch in den Reaktoren negativ beeinflusste sowie den Kopfraum der Reaktoren teilweise komplett ausfüllte.



**Abbildung 5.3.17: Die starke Schaumbildung erschwert die Zugabe der Zulauflösung und beeinflusst den Gasaustausch im Reaktor. Die zugegebene Glucoselösung sammelt sich zunächst auf den großen Schaumblasen an der Oberfläche und läuft dann konzentriert ins Medium. Die Störung des Dosierintervalls und der Belüftung zeigt sich deutlich in der Konzentration des gelösten Sauerstoffs im Medium. Zunächst wird das Signal unregelmäßig, ein Oszillieren ist nicht mehr zu erkennen. Durch die punktuell erhöhte Glukosekonzentration im Medium und dem verringerten Gaseintrag über die Oberfläche sinkt der Sauerstoffgehalt bis auf 0 % Luftsättigung ab. Kann der Schaum reduziert werden, stellt sich das normale physiologische Verhalten wieder ein**

und es kommt erneut zum oszillierenden Sauerstoffsignal auf dem vorherigen Konzentrationsniveau.

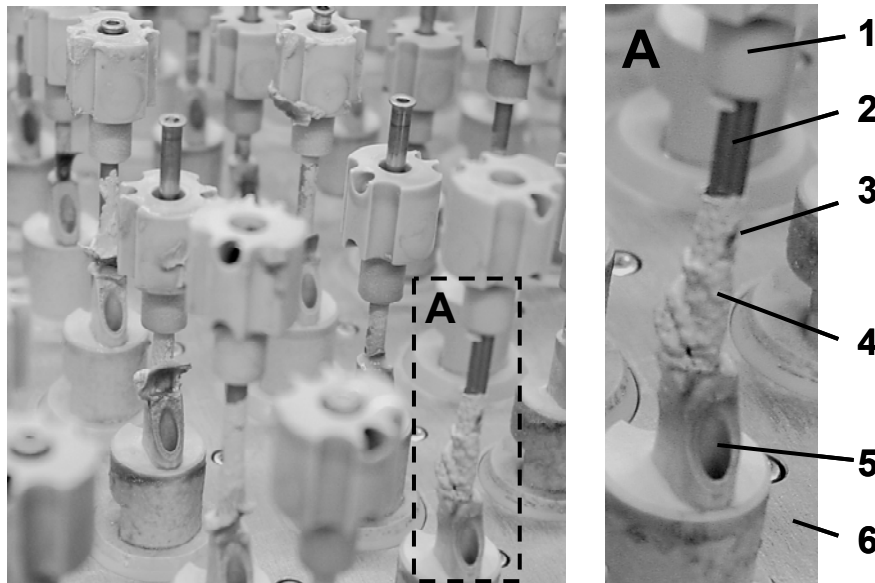
Bisher wurde versucht, die Schaumbildung mittels Antischaumzugabe nach einem festgelegten Zugabeprofil über den Pipettierroboter zu unterbinden. Dieses Profil beruhte auf Erfahrungswerten. Daher kam es auch hier teilweise zu unerwarteter Schaumbildung, gerade wenn die Kultur durch andere schwer zu kontrollierende Prozessparameter wie den pH ein verändertes Verhalten zeigte. Das Zugabeprofil konnte während des Experiments manuell verändert werden, so dass ein Eingreifen bei akuter Schaumbildung möglich war. Dafür war aber eine ständige Beaufsichtigung des Prozesses notwendig.

Bei der Kultivierung unterschiedlich zusammengesetzter Medien während der Medienoptimierung zeigten sich zwischen den Reaktorengruppen mit verschiedenen Medien starke Unterschiede in der Schaumbildung. Die Vorgabe eines effektiven Profils wurde durch unterschiedliche Intensität und zeitlich variierendes Auftreten des Schaums erschwert. Das Antischaumzugabeprofil konnte zwar für jeden Reaktor individuell vorgegeben werden, die Schaumbildung ließ sich aber nur schlecht antizipieren. Die unterschiedlichen Medien wurden nur einmalig eingesetzt, so dass die Vorgabe eines Antischaumprofils aufgrund fehlender Erfahrungswerte nur wenig effektiv war. Es musste in Kauf genommen werden, dass entweder zu viel Antischaummittel zugegeben wurde oder aber starkes Schäumen und die damit verbundenen Nachteile für die Kultivierung auftraten.

Die überhöhte Zugabe von Antischaummittel zeigte besondere Nachteile für die Bestimmung der Biotrockenmasse, da es sich nicht gleichermaßen aus jeder Probe entfernen ließ und damit die Werte stark verfälschen konnte (relative Standardabweichung 8 % statt  $< 2$  %). Auch die *at-line* Analytik der Biomasse über die Bestimmung der optischen Dichte wurde durch die mit dem Antischaummittel zunehmende Trübung der Proben negativ beeinflusst. Die Prozessführung litt ebenfalls unter zu hohen Antischaumzugaben. Zusammen mit den Riboflavinkristallen bildet das Antischaummittel eine zähe Masse, die sich im Schaum weiter verfestigte und sich an der Reaktorwand sowie den Einbauten wie Rührern und Hohlachsen anlagerte (Abbildung 5.3.18). In besonders drastischen Fällen kam es zur vollständigen Umhüllung der Hohlachsen, wobei auch die Belüftungsöffnungen zeitweise verschlossen wurden. Ein reproduzierbarer Verlauf der Kultivierung konnte für diese Fälle nicht mehr erreicht werden und die Riboflavinausbeuten blieben hinter den Durchschnittswerten zurück.

Des Weiteren ist bekannt, dass sich große Mengen von Antischaummittel nachteilig auf



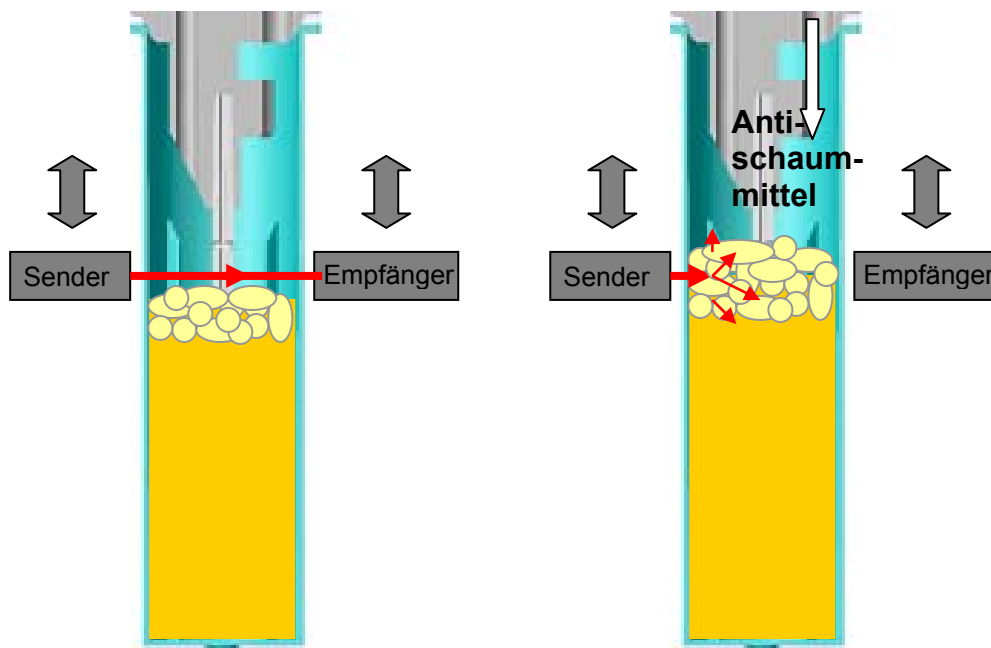


**Abbildung 5.3.18:** Werden große Mengen Antischaum zugegeben, bildet sich aus Antischaum, Biomasse und Riboflavin eine zähe Masse (4), die sich bevorzugt an Rührern (1) und Hohlachsen (2) ablagert. In einigen Fällen kann die Belüftungsbohrung (3) in der Achse verstopft werden (A). Die betroffenen Reaktoren können nicht mehr mit Sauerstoff versorgt werden und fallen aus. (5) Probenahmeöffnung, (6) Sterilabdeckung.

die Bakterienkultur und die Reaktionsbedingungen auswirken können. Die Wirkung des Antischaummittels auf die Mikroorganismen ist eine Funktion der Konzentration und der Einwirkzeit. Es musste also ein Kompromiss zwischen einer frühzeitigen Zugabe des Antischaummittels, um eine Schaumbildung von Anfang an zu unterbinden, und der Zugabe der Hauptmenge zu einem möglichst späten Zeitpunkt gefunden werden.

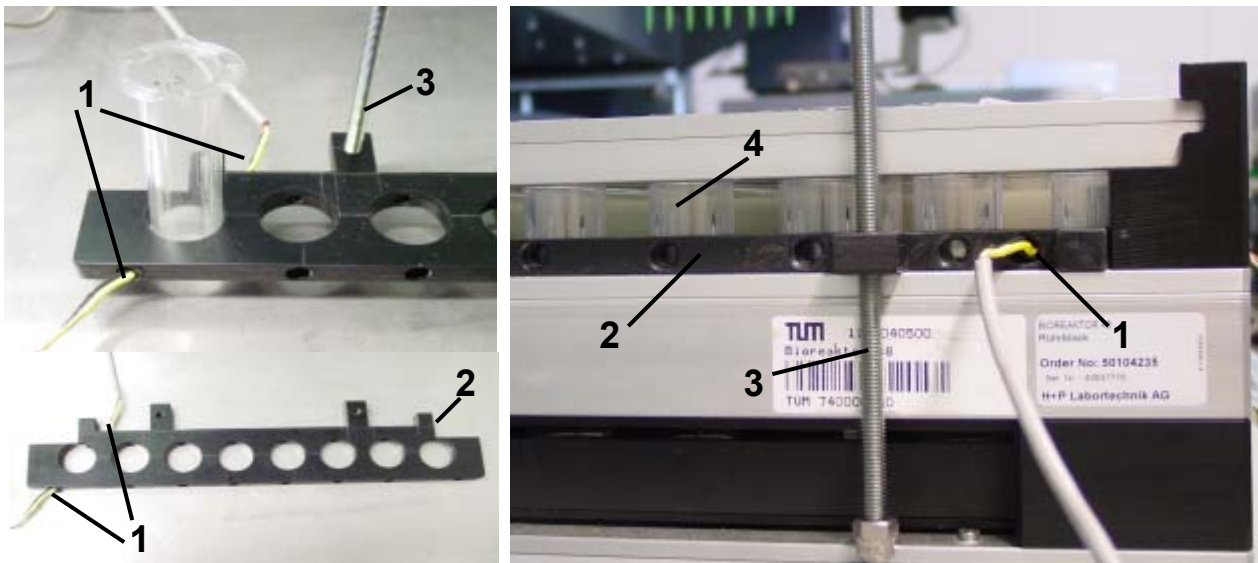
Die bisher eingesetzte Form der Zugabe nach einem Zugabeprofil ist in diesem Zusammenhang nicht flexibel genug. Potentiell wird zu viel Antischaummittel zugegeben. Die Zugabe durch den Pipettierroboter hat zudem den Nachteil, dass bestehender Schaum nur aus dem Medium heraus bekämpft werden kann. Um die Bildung einer festen Schaumschicht zu verhindern, müsste das Antischaummittel großräumig auf der Schaumschicht verteilt und nicht wie im vorliegenden Fall punktuell zugegeben werden. Der Zeitpunkt der Antischaumzugabe ist zudem wichtig, da sich bei sofortiger Bekämpfung kein stabiler Schaum bilden kann. Dies ist bei einem vorgegebenen Profil nicht möglich. Am effektivsten wäre die Zugabe einer möglichst geringen Menge genau zu den Zeitpunkten zu denen der Schaum gerade entsteht.

Eine solche Möglichkeit bietet die im folgenden beschriebene neu entwickelte Schaumsensorik mit automatischer Antischaumzugabe für den Bioreaktorblock. Das verwendete Prinzip beruht auf der Unterbrechung einer Lichtschranke durch den sich im Laufe der Zeit bildenden Schaum. Es wird eine Infrarot-Leuchtdiode (IR-LED) als Sender verwendet. Ein Phototransistor dient als Empfänger, der Licht in ein Spannungssignal umsetzt. Solange der Empfänger ein Signal erhält wird dem Prozess kein Antischaummittel zugegeben. Wird das Signal durch den Schaum unterbrochen, wird die durch die Photodiode erzeugte Spannungsänderung über eine Messkarte an den Kontrollrechner des Roboters weitergegeben und dort als Signal zum Erstellen einer Antischaum- Zugabeliste für den Laborroboter verwendet. Diese Zugabelisten werden automatisch mittels einer Mess-, Regel- und Steuersoftware (LabView) erstellt. Die neue Zugabeliste wird einmalig ausgeführt und eine vorher festgelegte Menge Antischaummittel zugegeben. Danach wird auf „keine Zugabe“ zurück geschaltet. Bleibt trotz der Zugabe das Signal unterbrochen, wird die Zugabeliste für den Roboter erneut freigeschaltet und eine weitere Zugabe Antischaummittel getätigt. Die Dioden werden in einem Rahmen gegenüberliegend angebracht, der am Reaktorblock befestigt, in der Höhe verstellbar ist. So kann der Sensor auch bei Zulaufversuchen mit zunehmendem Volumen verwendet werden. Die ersten Testläufe zeigten gute Ergebnisse. Sich bildender Schaum wurde ausnahmslos schon in geringen Mengen detektiert.



**Abbildung 5.3.19:** Eine Leuchtdiode dient als Sender, eine Photodiode als Empfänger. Das Signal wird zunächst von der Photodiode aufgenommen und in ein Spannungssignal umgewan-

delt. Bei vermehrter Schaumbildung streut der Schaum das Sendersignal, beim Empfänger kommt kein Licht mehr an. Dadurch ändert sich die Spannung der Photodiode, was als Signal für eine einmalige Zugabe von Antischaummittel verwendet wird.



**Abbildung 5.3.20:** Die Lichtschranke wird aus zwei gegenüberliegenden Dioden (1) gebildet, die in einem Gestell (2) befestigt sind. Dieses Gestell ist über eine Gewindeschraube (3) höhenverstellbar und fasst die Bioreaktoren ein. Es wird auf Höhe des Kopfraums (4) der Reaktoren am Bioreaktorblock installiert.

Die sofortige Zugabe von Antischaummittel nach der Detektion führte wieder zu schaumfreien Reaktoren. Die Zugabe von Antischaummittel zum Prozess konnte während des Einsatzes der Sensorik um ca. 50 % reduziert werden.

### 5.3.5 Reaktionstechnische Untersuchungen zur *online* pH-Messung

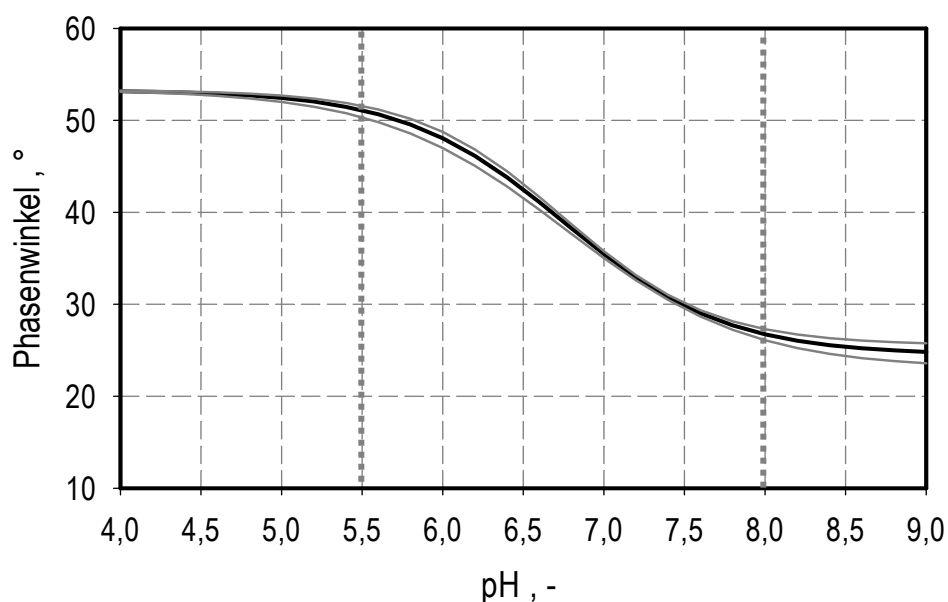
Während der Untersuchung des Riboflavinprozesses im Milliliter-Maßstab zeigte sich deutlich welchen Einfluss pH und pH-Regelung auf die Produktbildung und die Produktausbeute während des Prozesses haben. Die bisher verfügbare Regelung hat den Nachteil einen nicht geeigneten Regelansatz zu verwenden. Der eingesetzte PD-Regler ist zwar ein sehr schneller Regler, führt aber zu bleibenden Regelabweichungen. Erst ein integraler Anteil sichert eine genaue Rückführung der Regelgröße auf die Führungsgröße. Der PID-Regler ist kein schneller Regler ist aber anpassungsfähiger und hat keine bleibende Regelabweichung.

Die am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik für die globale Steuerung des Laborroboters zur Verfügung stehende Software fedbatch-XP (DasGip AG, Jülich, Deutschland) hat einen solchen Regler mit zusätzlicher „antiwind-up“-Funktion integriert (Kusterer 2008).

Letztere verhindert ein Übersteuern des Reglers. Zudem bietet sie ein Toleranzband und eine Stellgrößenbeschränkung zur optimalen Einstellung des Reglers. Für diese pH Regelung werden die Messwerte mit Hilfe der optosensorischen Einheiten (Multi-Channel Reader for pH and oxygen, PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg) ermittelt. Am Boden der Reaktoren sind chemische pH- bzw. Sauerstoffsensoren immobilisiert, die mit einem Lichtblitz spezifischer Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt werden. Das Abklingverhalten des Fluoreszenzsignals ist eine Funktion der jeweiligen Analytkonzentration im Reaktor und kann mit den elektronischen Einheiten erfasst und ausgewertet werden.

Die Verwendung dieser Messtechnik hat darüber hinaus den Vorteil, dass anstatt halbstündigen Messintervallen ein *online* pH Signal zur Verfügung steht. Neben der Verwendung eines besser geeigneten Reglersystems, ist eine für den Prozess vorteilhafte Echtzeit-Regelung möglich ist.

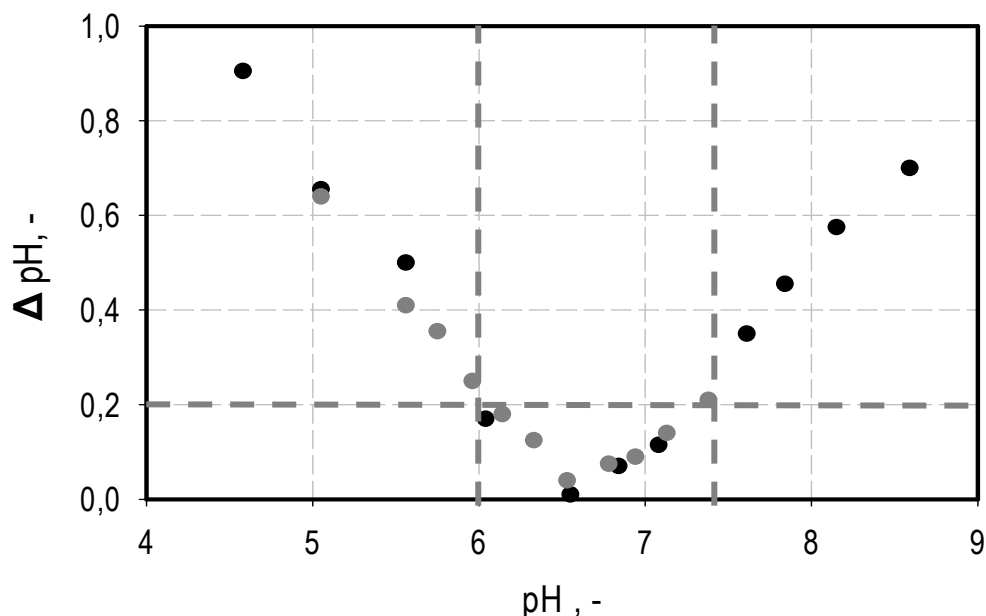
Es wurde zunächst die Kalibrierung der pH-Fluoreszenzmessung mit dem verwendeten Komplexmedium bei der Prozesstemperatur von 39 C durchgeführt (siehe Kusterer 2008). Der Wendepunkt der erhaltenen Sigmoiden liegt bei pH 6,87. Die relative Standardabweichung zwischen den für die Kalibrierung verwendeten 8 Reaktoren liegt im für die pH Messung verwendbaren Bereich von pH 5,5 bis 8 unter 3 %. Die erhaltenen Kalibrierdaten sind mit den für Phosphatpuffer geltenden und vom Hersteller angegebenen Werten (Daten nicht gezeigt) vergleichbar. Zur Bewertung der optischen pH-Messung wurde eine Referenzmessung mit einer herkömmlichen Glaselektrode durchgeführt.



**Abbildung 5.3.21: Sigmoide des Sensorsignals. Der effektiv nutzbare Bereich der Messung liegt zwischen pH 5,5 und 8. Oberhalb von pH 8 werden Änderungen des pH mit einem größer werdenden Fehler detektiert.**

Die sich ergebende Abweichung vom realen pH für die Messung in Phosphatpuffer und Komplexmedium ist in Abbildung 5.3.21 dargestellt. Trotz der medienspezifischen Kalibrierung kommt es zu vom pH abhängigen Messwertabweichungen. Im Bereich pH 6,5 bis 7,0 misst der optische Sensor zuverlässig, die Differenz nimmt mit dem pH nur geringfügig zu und beträgt weniger als 0,1 pH Einheiten. Die Messwertabweichungen bleiben bis zu einem Bereich von pH 6,0 bis 7,3 unter 0,2 pH Einheiten und damit tolerabel. Für den Riboflavinprozess ist dieser Messbereich ausreichend, da der pH auf einen Wert von 6,8 geregelt werden soll.

Beim Einsatz der optischen pH-Messung während des Riboflavinprozesses kam es nach einigen Stunden zu deutlichen Abweichungen zwischen der *at-line* pH-Messung und den Fluoreszenzsensoren. Bei Referenzmessungen mit einer Glaselektrode zeigte sich, dass, sobald Riboflavin im Medium gebildet wird, die Qualität der Messung mittels der optischen Sensoren drastisch abnimmt. Letztendlich wurde selbst bei realen pH Werten um pH 5,5 noch ein konstanter pH von 6,8 bis 7,0 angezeigt.



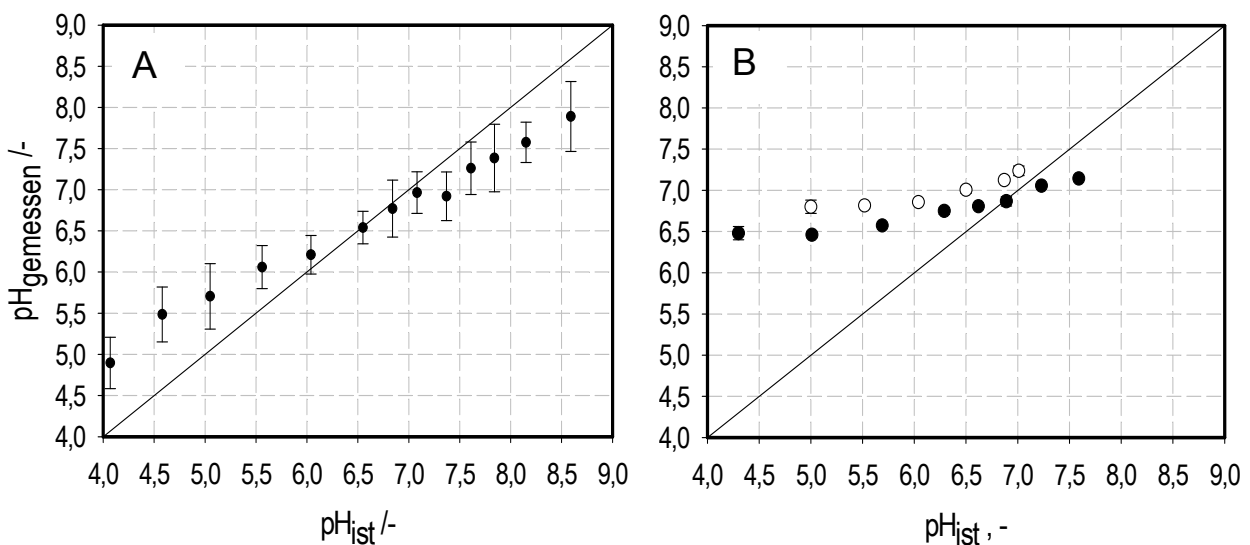
**Abbildung 5.3.22: Abweichung des gemessenen vom wirklichen pH ( $\Delta$  pH) für Puffer (grau) und Medium (schwarz). Der Messfehler nimmt zu den Rändern des Messbereiches von pH 5,5 bis 8,0**

immer deutlicher zu. Nur im Bereich zwischen pH6 und pH 7,3 bleiben die Abweichungen unter 0,2 pH-Einheiten.

In Abbildung 5.3.23 (B) ist ein Vergleich der Messung mit Sensoren und einer Glaselektrode für eine reine Riboflavinlösung ( $4 \text{ g l}^{-1}$ ) und Fermentationslösung ( $6 \text{ g L}^{-1}$  Riboflavin) dargestellt.

Für beide Lösungen ergeben sich unterhalb von pH 6,5 starke Abweichungen vom realen Wert. Der pH in den Reaktoren wird deutlich überschätzt. Das führt dazu, dass gerade für die Fermentationslösung und im für die pH-Regelung des Riboflavinprozesses interessanten Bereich unterhalb des Sollwerts pH 6,8 keine Messung des pH möglich ist. Im gesamten Messbereich liegt der mit den Sensoren erhaltene Wert immer bei pH 6,8 oder höher. Für die Regelung heißt das, dass während des Prozesses bei Riboflavinbildung zu keinem Zeitpunkt Base zugegeben würde.

Mit der Anreicherung von Riboflavin im Kulturmedium während des Prozesses wird die optische pH-Messung somit zusehends gestört, da die Eigenfluoreszenz des Riboflavins bei der verwendeten Anregungswellenlänge der optischen Sensoren so hoch ist, dass sie deren Fluoreszenz überlagert. Dieser Einfluss erreicht ab einer sehr geringen Riboflavinkonzentration von ca.  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  bereits ein solches Ausmaß, dass die Messung des pH auf diesem Wege nicht möglich erscheint. Darüber hinaus zeigt sich bei höheren Konzentrationen eine Art Sättigungseffekt. Selbst die Abweichung der Messungen in zwei Parallelreaktoren wird dann  $< 1 \%$ , während bei der Messung mit Komplexmedium bei guter Kalibrierung relative Abweichungen bis zu  $5 \%$  festzustellen



**Abbildung 5.3.23: Abweichung des wirklichen vom gemessenen pH. (A) Das Komplexmedium zeigt tolerable Abweichungen im Messbereich zwischen pH 6,0 und 7,2. Die auftretende relative Standardabweichung zwischen den Reaktoren liegt bei 5 % und darunter. (B) Für eine Riboflavinlösung mit einer Konzentration von  $4 \text{ g L}^{-1}$  (schwarz) und Kulturbrühe mit  $6 \text{ g L}^{-1}$  Riboflavin (weiß) wird der pH im gesamten Regelbereich überschätzt. Eine pH Regelung ist mit diesem Messverfahren nicht möglich.**

sind. Die zur Verfügung stehenden optischen pH-Sensoren erwiesen sich damit als für den Riboflavinprozess ungeeignet.

Es wurden verschiedene Möglichkeiten geprüft, die Messung trotz des störenden Einflusses des Riboflavins zu realisieren. Zum einen sollte die Helligkeit der Fluoreszenzsensoren erhöht werden. Entsprechende Sensoren („Testsensor Reihe HP5“; Presens GmbH, Regensburg) sollten mit ihrer höheren Fluoreszenzintensität, erzeugt durch weiße Pigmente in der Sensormatrix, die Querempfindlichkeit des Sensors minimieren. Es fanden Untersuchungen dieser immobilisierten Sensoren in Riboflavinlösungen verschiedenster Konzentrationen und mit Kulturbrühe statt. Es wurde mit diesem Testsensor keine Verbesserung erzielt. Dies kann mit der sehr starken Eigenfluoreszenz des Riboflavins begründet werden.

Auch das Abschirmen der Sensoren von der Hintergrundfluoreszenz im Reaktor und dem damit erzeugten Streulicht bewirkte keine Verbesserung. Weder die optische Isolierung der Fluoreszenzsensoren durch eine Beschichtung, noch das Schwärzen des Reaktorbodens erbrachte einen messtechnischen Vorteil. Das Riboflavin diffundiert wahrscheinlich in den Sensor ein und erzeugt dort eine störende Untergrundfluoreszenz. Da die Moleküle sehr klein sind ( $M_g = 376,37 \text{ g mol}^{-1}$ ) konnten sie mit bisher für solche Fälle zur Verfügung stehenden Membranen nicht daran gehindert werden, in die Matrix einzudiffundieren.

Referenzmessungen waren aufgrund der hohen Eigenfluoreszenz ebenfalls nicht hilfreich. Es wurde die Möglichkeit untersucht, über eine Referenzmessung während des Prozesses den Einfluss des nach und nach gebildeten Riboflavins zu eliminieren. Dies funktionierte aber nur für Reaktoren, in denen sehr wenig Riboflavin gebildet wurde. Bei einer Produktion wie sie für den Prozess zu erwarten ist, kam es schon nach kurzer Zeit zu so hohen Amplituden, dass eine Referenzierung nicht mehr möglich war.

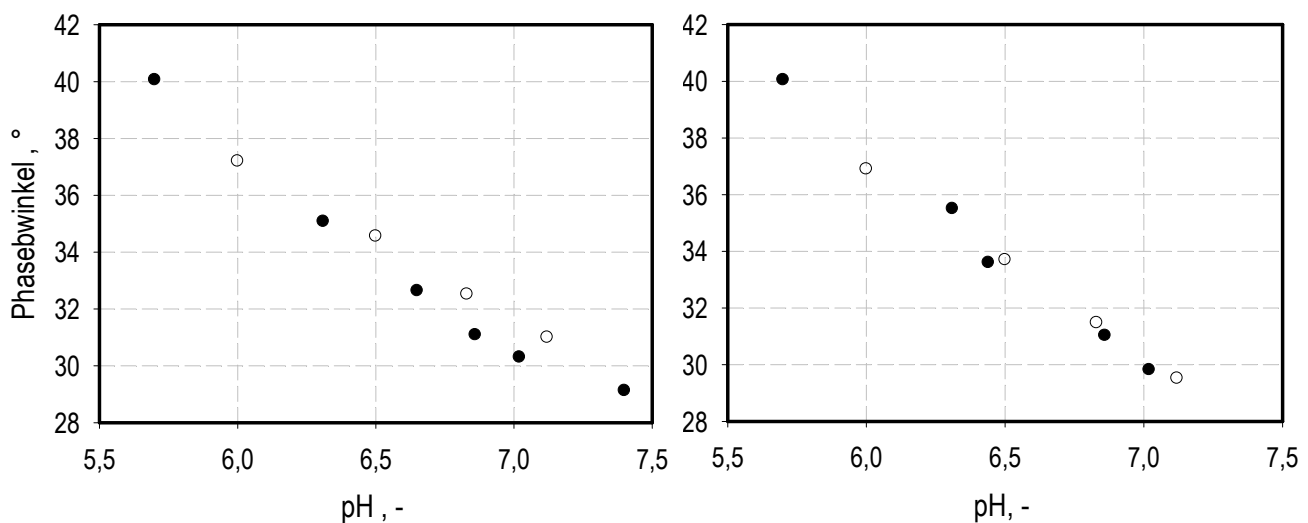
Mit zunehmender Riboflavinkonzentration nahm die Amplitude der Fluoreszenzantwort des Riboflavins zunächst deutlich zu. Ab einer gewissen Konzentration blieb die Amplitude konstant bei so hohen Amplituden, dass diese immer höher lagen, als die Amplitude der Fluoreszenz der immobilisierten Sensoren. Eine Referenzierung in diesen Konzentrationsbereichen ist daher nicht möglich. Da der angesprochene Bereich be-

reits bei einer Konzentration von ca.  $1\text{-}2\text{ g L}^{-1}$  Riboflavin beginnt, während im B2-Prozesses weit höhere Riboflavinkonzentrationen erreicht werden, scheidet diese Möglichkeit zur Problemlösung aus.

Die optischen Sensoren zur Detektion von Riboflavin zu verwenden ist demzufolge auch nicht möglich, da bei höheren Konzentrationen aufgrund der konstanten Amplitude nicht mehr zwischen verschiedenen Konzentrationen differenziert werden kann.

Als einzige Möglichkeit, die *online* pH Messung doch noch zu realisieren, blieb nur die Entwicklung neuer pH Sensoren, deren Anregung und Emission bei anderen Wellenlängen liegen.

Messungen mit einem Prototyp, der bei einer Wellenlänge von 630 nm angeregt wurde, sind in Abbildung 5.3.24 dargestellt. Die Messungen zeigten, dass bei dieser Anregungswellenlänge selbst kritische Riboflavinkonzentrationen von  $8\text{ g L}^{-1}$  keinen negativen Einfluss mehr besitzen.



**Abbildung 5.3.24:** Die neue optische Sensoren wurden zur pH-Messungen von Puffer (weiß) und Riboflavinlösung mit einer Konzentration von  $8\text{ g L}^{-1}$  (schwarz) mit dem Prototyp eines verwendet. Der Bereich der anregenden Wellenlänge wurde auf 630 nm verschoben. Das Riboflavin hat, wie bereits bei der Sauerstoffmessung festgestellt, hier keinen Einfluss auf die Messung.

### 5.3.6 Diskussion

Mit dem Prototyp eines Widerstandssensors konnte die Messung der Temperatur individuell für jeden Reaktor eingeführt werden. Eine Temperatur-Korrektur für jeden einzelnen Reaktor kann allerdings nicht durchgeführt werden, da nur zwei Wärmetauscher für alle 48 Reaktoren zur Verfügung stehen. Trotzdem steht nun eine weitere



Information über den Prozess zur Verfügung, die bei der Analyse hilfreich sein kann. Da auch Schwankungen der Umgebungstemperatur Einfluss auf die Temperatur in den Reaktoren haben, können Temperaturänderungen schnell erfasst und Gegenmaßnahmen ergriffen werden.

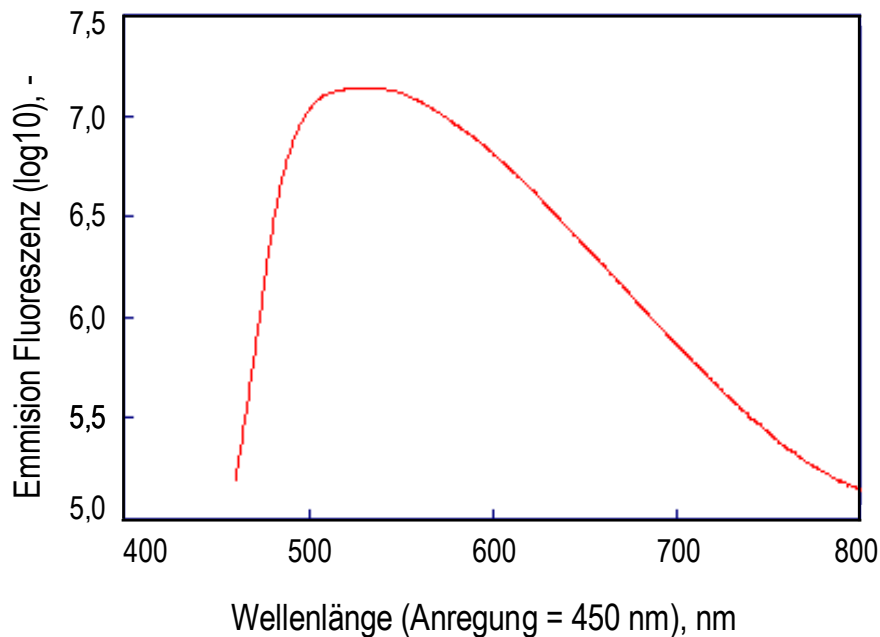
Der magnetische Antrieb beeinflusst die Temperaturmessung mit Widerstandssensoren und ohne entsprechende elektrotechnische Vorkehrungen und geschützte Leitungen sind die Messwertschwankungen nicht zu unterdrücken. Die Messung kann zusätzlich durch datentechnische Verarbeitung (mathematische Filter) weiter verbessert werden, sie entspricht in ihrem jetzigen Zustand jedoch völlig den an sie gestellten Ansprüchen (maximale Messwertabweichung = 0,5 °C). Die Ausrüstung des Bioreaktorblocks mit 48 der gezeigten Messstellen ist technisch durchführbar und kostengünstig. Auch das Einsetzen der Reaktoren unter der Sterilbank wird durch die Sensoren nicht negativ beeinflusst.

Die fluoreszierenden Sensoren für die optische pH-Messung werden bei einer Wellenlänge von 470 nm angeregt. Diese Wellenlänge erzeugt auch bei Riboflavin eine bezüglich der Fluoreszenzintensität maximale Fluoreszenzantwort. Der Wellenlängenbereich dieser Antwort wird in der Literatur unterschiedlich angegeben. Je nach Quelle werden andere Fluoreszenzmaxima genannt, die in einem Bereich zwischen 522-535nm liegen. Ein Fluoreszenzemissionsspektrum für Riboflavin bei einer Anregungswellenlänge von 450 nm ist in Abbildung 5.3.25 dargestellt. Über einen recht breiten Wellenlängenbereich bleibt die Fluoreszenzantwort bei nahezu maximalen Werten. Da auch der Sensor seine maximale Fluoreszenzantwort bei 530 nm aussendet, hilft der in der Analytik vorgeschaltete Filter, der nur Licht mit einer Wellenlänge von 540 nm durchlässt, nicht die Signale zu unterscheiden. Bei den so eng aneinanderliegenden Wellenlängenbereichen der maximalen Fluoreszenzantworten interferiert die Fluoreszenz des Riboflavins immer mit dem eigentlich zu messenden Signal. Als Folge wird ein zu hoher pH vorgetäuscht.

Auch andere *on-line* Überwachungssysteme, die bei gleicher Anregungs- und Emissionswellenlänge arbeiten wurden durch Riboflavin gestört (Surribas 2007).

Die Versuche eine optische pH Messung trotz der Eigenfluoreszenz des Riboflavins durch Erhöhung der Fluoreszenzintensität der Sensoren oder aber das Abschirmen der Sensorik von Streulicht zu ermöglichen, schlugen fehl. Spezielle Sensoren sollten mit ihrer größeren Fluoreszenzintensität die Querempfindlichkeit des Sensors mini-

mieren. Die Erhöhung der Intensität wird durch weiße Partikel in der Matrix des Sensors erreicht, welche die Intensität der Fluoreszenz durch Reflektion verstärken.



**Abbildung 5.3.25:** Fluoreszenzemissionsspektrum von Riboflavin bei einer Anregungswellenlänge von 450 nm (OMLC 2008).

Da aber die Riboflavinmoleküle aufgrund ihrer geringen Größe in die Sensormatrix eindiffundieren, wird ihre Fluoreszenz ebenfalls verstärkt. Aus demselben Grund nutzt auch die Abschirmung von Streulicht nicht viel, da sich die Riboflavinmoleküle in diesem Moment an derselben Stelle befinden wie auch die Moleküle des Indikators und von dort eine Untergrundfluoreszenz erzeugen. Die Abhängigkeit der Messstörung von in die Sensormatrix eindiffundierten Riboflavinmolekülen würde auch die Sättigungscharakteristik der Messungen erklären. Ab einem bestimmten Zeitpunkt sind bereits so viele Riboflavinmoleküle in der Matrix, dass auch höhere Konzentrationen im Medium nicht mehr zu einer Steigerung der Fluoreszenzintensität führen.

Neben diesem Sättigungsverhalten zeigte sich bei der Charakterisierung der Sensoren in Riboflavinlösung und Fermentationslösung, dass das Riboflavin bei kleinen pH Werten einen größeren Einfluss auf die Messung zu haben scheint, als bei höheren Werten. Die Abweichung vom real gemessenen pH wurde in niedrigeren pH Bereichen bedeutend höher. Über pH 6,8 näherte sich der Messwert der Fluoreszenzsensoren dem realen Wert immer weiter an. Fox und Thayer (1998) beschreiben diese pH Ab-

hängigkeit der Riboflavinfluoreszenz. Bei niedrigem pH bis ca. 7 ist sie maximal, bei höherem pH nimmt sie stark ab.

Betrachtet man das Fluoreszenzverhalten des Riboflavins weiter, erklärt sich, warum die auch auf Fluoreszenz basierende Messung mit der *at-line* pH-Messung, im Gegensatz zu den optischen Sensoren der *online* Messung, funktioniert. Beide Messmethoden zeigen durch die Eigenfluoreszenz des Riboflavins verursachte Effekte. Dennoch sind diese unterschiedlich ausgeprägt, so dass die *at-line* Messung verwertbare Messwerte liefert.

Gründe für den Unterschied sind zunächst in der anregenden Lichtquelle und den verwendeten Filter zu suchen. Die beiden Sensoren sind sich spektral recht ähnlich, der eingesetzte Filter hat aber erheblichen Einfluss auf die Güte der Messung. In Photometern werden zumeist Bandpassfilter verwendet, die viel mehr von der Störfluoreszenz abschneiden als die für die Sensorriegel verwendeten Langpassfilter (persönliche Kommunikation Firma Presens). Der Unterschied bei der Anregungslichtquelle ist ähnlich ausgeprägt. Das Photometer benutzt einen Bandpassfilter vor einer weißen Lichtquelle, die Messriegel dagegen einen Kurzpassfilter vor einer 470 nm LED. Im zweiten Fall wird mehr kurzwelliges Licht durchgelassen. Fox und Thayer (1998) betonen ebenfalls, dass Fluoreszenz- Anregungs- und Emissionsspektren für unterschiedliche Messinstrumente nicht unbedingt gleich sind. Fluoreszenzspektren hängen von der spektralen Verteilung der anregenden Lichtquelle sowie der Raman-Lichtstreuung ab. Zudem diffundiert Riboflavin in den optischen Sensor der *online* pH-Messung ein und erzeugt dort eine störende Untergrundfluoreszenz. Dies gilt im Prinzip für beide Sensoren. Für Sensoren der *at-line* Messung wurden aber schwarze Pigmente in der Matrix verarbeitet. Wenn das Riboflavin dort adsorbiert leuchtet es nicht mehr. In den Sensoren für die *online* Messung wurden weiße Pigmente verwendet. Die Adsorption des Riboflavins dort führt zu einer höheren Intensität des Signals. Im Mikrobioreaktor hat Riboflavin zudem Zeit in den Sensor zu diffundieren, während in den Mikrotiterplatten der *at-line* Analytik die Lösung nicht lange mit den Sensoren in Berührung ist. Diese Differenzen der auf ähnlichen Prinzipien beruhenden Messmethoden erklären das unterschiedliche Verhalten bezüglich der Riboflavinfluoreszenz.

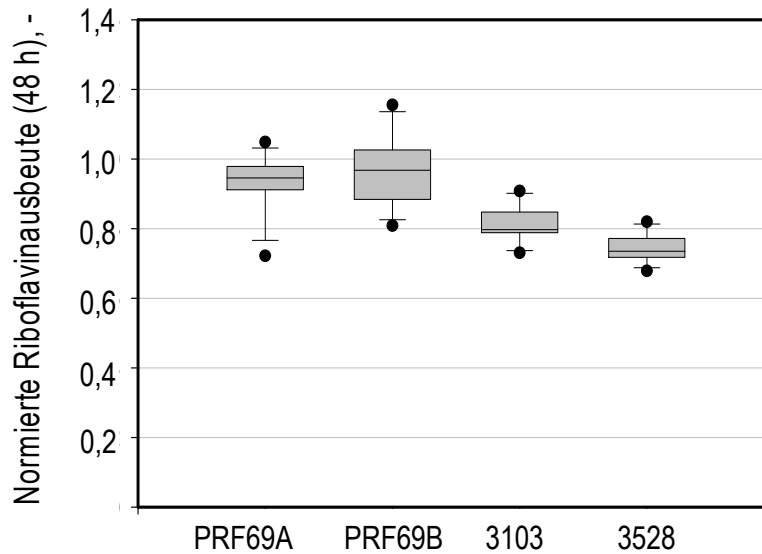
## 6 Zusammenfassung

Die reaktionstechnische Untersuchung und Optimierung bereits bestehender biotechnologischer Prozesse hat eine hohe wirtschaftliche Bedeutung. Hierbei stehen die Weiterentwicklung der verwendeten Organismen und die Optimierung der Reaktionsbedingungen im Vordergrund. Beide Ziele erfordern einen großen experimentellen Aufwand und sind damit ein wesentlicher Zeit- und Kostenfaktor. Zur Bewältigung der experimentellen Suchverfahren, die schnell in Hunderten von Einzelexperimenten resultieren, wurde am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik ein Parallelreaktorsystem entwickelt (Puskeiler et al. 2005a, Weuster-Botz 2005, Kusterer et al. 2008). Knorr (2005) zeigte am Beispiel eines industriellen Prozesses zur Riboflavinproduktion mit *Bacillus subtilis* (DSM NP), dass Untersuchungen unter prozessrelevanten Bedingungen in diesem Parallelreaktorsystem im Milliliter-Maßstab möglich sind.

Der Prototyp des entwickelten Parallelreaktorsystems wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst für die Evaluation der Riboflavin-Produktionsleistung unterschiedlicher Produktionsstämme von *Bacillus subtilis* und zur Medienoptimierung für den Riboflavinherstellungsprozess eingesetzt.

Zur beispielhaften Diskriminierung der Riboflavin-Produktionsleistung wurden vier unterschiedliche *Bacillus subtilis* Stämme in jeweils zwölf Parallelreaktoren pro Parallelexperiment untersucht. Zwischen den genetisch unterschiedlichen Stämmen BS3103, BS3528 und RB50::[pRF69]<sub>n</sub> zeigten sich nach 48 Stunden deutliche Unterschiede in der mittleren Riboflavinausbeute. Anhand einer graphischen Analyse im 'Box Plot' (Abbildung 6.1) ließen sich diese Stämme bezüglich ihres Produktionsverhaltens als statistisch signifikant unterschiedlich identifizieren. Die aus verschiedenen Zelllinien desselben Produktionsstammes RB50::[pRF69]<sub>n</sub> erhaltenen Stämme pRF69 A und pRF69 B zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Produktionsleistung. Evaluation verschiedener Produktionsstämme wurde erfolgreich durchgeführt.

Die ‚Trennschärfe‘, die mit diesem Bioreaktorsystem erreicht werden kann, ist eine Funktion der relativen Standardabweichung und der verwendeten Anzahl von Reaktoren. Je kleiner der aufzulösende Unterschied in der Produktionsleistung der Stämme ist, desto höhere Anforderungen werden an die Reproduzierbarkeit gestellt oder desto



**Abbildung 6.1:** ‚Box Plot‘ des direkten Vergleichs von vier Produktionsstämmen in einem Parallelexperiment. Es wurden jeweils zwölf Reaktoren für einen Stamm verwendet.

mehr Reaktoren müssen pro Stamm verwendet werden. Eine Abschätzung zur Berechnung der Anzahl der zu verwendenden Reaktoren in Abhängigkeit von der gewünschten Trennschärfe und der Genauigkeit der Parallelexperimente kann aus dem statistischen HSD-Test (Tukey-Test) gewonnen und zur Versuchsplanung eingesetzt werden.

Die Evaluierungsergebnisse im Millilitermaßstab wurden im Litermaßstab bestätigt. Alle vier Produktionsstämmen zeigten nach 48 Stunden Prozessdauer in beiden Maßstäben vergleichbare mittlere Riboflavinausbeuten.

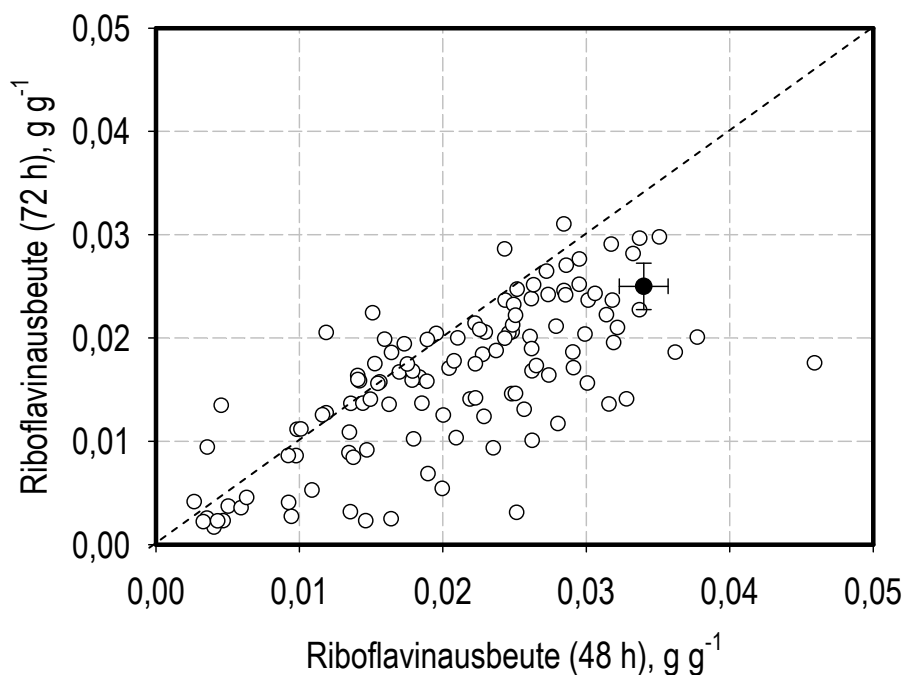
Bei den Vorversuchen zur Medienoptimierung im Millilitermaßstab konnten vier besonders relevante Bestandteile des bisherigen Produktionsmediums identifiziert werden: die beiden Phosphatsalze, Hefeextrakt und Eisensulfat-Heptahydrat. Des Weiteren wurden in einem Suchverfahren ‚Casamino Acids‘ (Casaminohydrolysat), Glycin und Natriumnitrat als zusätzliche Medienkomponenten mit Einfluss auf die Riboflavinproduktion im Zulaufverfahren identifiziert.

Während der Optimierungsversuche stellte sich heraus, dass die Zugabe von Ammoniumhydroxid als Titrationsmittel zur pH-Kontrolle einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf die Riboflavinproduktion ausübte. Ammoniumhydroxid stellt eine zusätzliche Stickstoffquelle für die Riboflavinproduktion dar und beeinflusste die Optimierung

in diesem Zusammenhang so stark, dass Effekte anderer Mediumkomponenten nicht mehr beobachtet werden. Daraufhin wurde die Titration zur pH-Kontrolle durch Verwendung von NaOH als Titrationsmittel von der Stickstoffzugabe entkoppelt, um eine definierte und damit vergleichbare Stickstoffversorgung für alle Reaktoren zu gewährleisten.

Durch diese Entkopplung ließ sich darüber hinaus die parallele und sequentielle Reproduzierbarkeit verbessern. Nach 48 Stunden konnte so die relative Standardabweichung der Riboflavinausbeute von durchschnittlich 10 % auf 6 % reduziert werden, nach 72 Stunden Versuchsdauer von 15 % auf 10 %.

Die Optimierung des Satzmediums wurde unter Verwendung der Software GAME.opt, im Parallelansatz durchgeführt. Trotz der Untersuchung von 120 verschiedenen Medien konnte keine statistisch signifikante Verbesserung der Satzmediumzusammensetzung in Bezug auf die beiden Optimierungsziele – die Riboflavinausbeute nach 48 Stunden ( $0,035 \text{ g g}^{-1}$ ) und nach 72 Stunden ( $0,023 \text{ g g}^{-1}$ ) – erreicht werden (Abbildung 6.2). Das bisher industriell verwendete Medium ist damit auch optimal für die Riboflavinproduktion mit dem hier verwendeten Produktionsstamm.



**Abbildung 6.2:** Prozessergebnisse mit den 120 im Parallelreaktorsystem untersuchten Satzmedien zur Herstellung von Riboflavin im Zulaufverfahren im Vergleich zum Ausgangsmedium (schwarz).

Weiterhin zeigte sich, dass sich die Prozessergebnisse der Medien mit hohen Konzentrationen komplexer Medienbestandteile im Milliliter-Maßstab nicht verlässlich reproduzieren ließen. Aufgrund der hohen Konzentrationen dieser Medienbestandteile (Hefeextrakt, ‚Casamino Acids‘) stieg der pH in diesen Reaktoren zeitweise weit über dem gewünschten Sollwert. Da nur einseitig geregelt wurde, blieb der pH dadurch bei vielen Medienzusammensetzungen für viele Stunden (5 – 20 Stunden) unkontrolliert. Die Analyse der verschiedenen Prozessverläufe im Milliliter- und Litermaßstab zeigt, dass dies mit hoher Wahrscheinlichkeit der Grund für die schlechte Reproduzierbarkeit der Produktionsleistung sein könnte.

Da die Riboflavinproduktion eine starke pH-Abhängigkeit zeigt, schränkt dies die Verwendung des Bioreaktorblocks mit *at-line* pH-Messung und einseitiger Regelung zur Prozessoptimierung für den Riboflavinprozess zum derzeitigen Zeitpunkt stark ein.

Die für den Bioreaktorblock von Kusterer et al. (2008) entwickelte *online* pH-Messung konnte für den Riboflavinprozess jedoch nicht verwendet werden, da die Eigenfluoreszenz des Riboflavins die Messung erheblich störte. Mit der Entwicklung eines neuen Prototypen der zur pH-Messung verwendeten optochemischen Sensoren konnte eine technische Lösung auf den Weg gebracht werden. Der neue Sensor wird auf einer höheren Wellenlänge als zuvor angeregt und emittiert auf einer anderen Wellenlänge als das Riboflavin. Die Voraussetzungen zur Anwendung der *online* Messtechnik wurden damit geschaffen.

Zusätzlich wurde zur Verbesserung der Prozessführung der Riboflavinherstellung im Millilitermaßstab ein Prototyp zur individuellen Temperaturmessung in jedem Reaktor und ein Prototyp einer individuellen Schaumsensorik entwickelt.

## 7 Ausblick

In dieser Arbeit wurde der Bioreaktorblock als paralleles Reaktorsystem zur reaktionstechnischen Untersuchung und Optimierung des industriellen Bioprozesses zur Riboflavinherstellung eingesetzt. Die Evaluation von verschiedenen Produktionsstämmen im Milliliter-Maßstab konnte erfolgreich abgeschlossen werden und die Ergebnisse ließen sich problemlos in den Litermaßstab übertragen. Die Ergebnisse der Medienoptimierung dagegen konnten weder im miniaturisierten Maßstab hinreichend reproduziert werden, noch zeigten sie im Rahmen der Maßstabsvergrößerung eine ausreichende Vergleichbarkeit. Die während der Optimierung identifizierten Medienzusammensetzungen zeigten nach der Maßstabsvergrößerung nur vereinzelt eine normale Produktbildung.

Ansatzpunkte zur Lösung dieses Problems waren bisher die Untersuchung der durch komplexe Medienbestandteile erhöhten Ammoniumkonzentration im Medium, die unterschiedlichen pH-Verläufe in den verschiedenen Maßstäben und die Entkopplung der Base- von der Stickstoffzugabe. In Zukunft sollten weitere Untersuchungen bezüglich der Maßstabsübertragung durchgeführt werden, die vornehmlich die Entwicklung des pH im Fokus haben.

Während der Maßstabsübertragung wurde ferner gezeigt, dass die Ammoniumkonzentration im Medium Einfluss auf die Produktbildung hat. Eine exakte Bestimmung des Konzentrationsniveaus bei dem die Riboflavinproduktion deutlich eingeschränkt wird, steht noch aus. In diesem Zusammenhang ist zudem der Einfluss, den die Ammoniumkonzentration zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Prozess ausübt, von Interesse.

Da sich bei den Versuchen mit entkoppelter Stickstoff- und Basezugabe erheblich mehr Ammonium im Medium konzentriert als im Referenzprozess, ist die Optimierung der Ammoniumsulfatkonzentration im Zulaufmedium sinnvoll.

Ausgehend von den bisherigen Ergebnissen kann der pH in den Milliliter-Reaktoren im Moment nicht ausreichend kontrolliert werden. Eine weiterführende Optimierung des Riboflavinprozesses erfordert jedoch eine deutliche Verbesserung der pH-Regelung.



Mit der Entwicklung von neuen Prototypen der Sensoren für die *online* pH-Messung wurde das Problem der Eigenfluoreszenz des Riboflavins gelöst. Die Prototypen müssen nun für einen generellen Gebrauch in den Milliliter-Reaktoren nutzbar gemacht werden, so dass bald möglich eine zweiseitige pH-Regelung in Verbindung mit der *online* pH-Messung für den Riboflavinproduktionsprozess eingesetzt werden kann. Da das industrielle Satzmedium bereits gute Produktionsbedingungen bereitstellt, kann im nächsten Schritt das Zulaufmedium optimiert werden.

## 8 Literaturverzeichnis

*Arbige, MV, Bulthuis BA, Schultz J, Crabb D (1993):* Fermentation of *Bacillus*. In A.L.Sonenshein, J.A. Hoch, and R. Losick (Hrsg.), *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

*Atkinson MR, Fisher SH (1991):* Identification of genes and gene products whose expression is activated during nitrogen-limited growth in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 173: 23-27.

*Bacher A, Eberhardt S, Fischer M, Kis K, Richter G. (2000):* Biosynthesis of Vitamin B2 (Riboflavin). *Annu Rev Nutr*, 20: 153-167.

*Baehr HD (1992):* Thermodynamik. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Auflage: 8. A.

*Barnes SE, Sibley MG, Edwards HGM, Coates P.D. (2007):* Process monitoring of polymer melts using in-line spectroscopy. *Transactions of the Institute of Measurement and Control*, Vol. 29, No. 5: 453-465.

*Bellgardt KH.* Introduction, in *Bioreaction Engineering: Modelling and Control*. Schügerl K, Bellgardt KH (Hrsg.). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 1-18.

*Bernhard F, (2003):* Technische Temperaturmessung. Physikalische und meßtechnische Grundlagen, Sensoren und Meßverfahren, Meßfehler und Kalibrierung. Springer, Berlin, 1. Auflage.

*Betts JJ, Baganz F (2006):* Miniature bioreactors: current practices and future opportunities. *Microbial Cell Factories*, 5 (1): 21–35.

*Bretzel W, Schurter W, Ludwig B, Kupfer E, Doswald S, Pfister M, Van Loon APGM (1999):* Commercial riboflavin production by recombinant *Bacillus subtilis*: downstream processing and comparison of the composition of riboflavin produced by fermentation or chemical synthesis. *J Indus Microbiol Biotechnol*, 22: 19-26.

*Buckland BC, Lilly MD (1993):* Fermentation: An overview, in *Biotechnology* (Vol. 3). Rehm HJ, Reed G (Hrsg.). VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim: 8- 22.

*Büchs J. (2001a):* Introduction to advances and problems of shaken cultures. *Biochem Eng J*, 7(2): 91-98.

*Cardello RJ, San K (1988):* The design of controllers for batch bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 32: 519-526.

Charles, M. (1985b): Fermentation scale-up: problems and possibilities, Trends Biotechnol, 3(6): 134-139.

Chmiel H (Hrsg.) (1991): Bioprozesstechnik : Einführung in die Bioverfahrenstechnik. Gustav Fischer Verlag Stuttgart.

Coffin RB (1989): Bacterial uptake of dissolved free and combined amino acids in estuarine waters. Limnol. Oceanogr., 34(3): 531-542.

Coquard D, Huecas M, Ott M, van Dijl JM, Van Loon APGM, and Hohmann HP. (1997): Molecular cloning and characterisation of the ribC gene from *Bacillus subtilis*: a point mutation in ribC results in riboflavin overproduction. Mol Gen Genet, 254: 81–84.

Crueger (1993): Mutagenesis. In Biotechnology Rehm H-J Reed G (Hrsg.), Volume 2, VHC Verlagsgesellschaft mbH Weinheim.

Dauner M, Bailey JE, Sauer U (2001a): Metabolic Flux Analysis with a Comprehensive Isotopomer Model in *Bacillus subtilis*. Biotechnol Bioeng, 76(2): 144-156.

Dauner M, Sauer U. (2001): Stoichiometric Growth Model for Riboflavin-Producing *Bacillus subtilis*. Biotechnol Bioeng, 76(2): 132-143.

Dauner M, Storni T, Sauer U (2001b): *Bacillus subtilis* Metabolism and Energetics in Carbon-Limited and Excess-Carbon Chemostat Culture. J Bacteriol, 183(24): 7308-7317.

Debabov VG (1982): The industrial use of bacilli, in The molecular biology of bacilli (Vol 1). Dubnau DA (Hrsg.). Academic Press Inc., New York: 331–370.

Demain AL (1972): Riboflavin Oversynthesis. Annu. Rev. Microbiol., 26: 369-388.

Demain AL (2000): Small bugs, big business: the economic power of the microbe. Biotechnol Adv., Oct; 18(6): 499-514.

Detsch C, Stülke J (2003): Ammonium utilization in *Bacillus subtilis*: Transport and regulatory functions of NrgA und NrgB. Microbiology, 149(11); 3289 – 3297.

Dochain D, Bastin G (1985): Adaptive identification and control algorithms for nonlinear bacterial growth system. Automatica, 20: 621-634

Duetz WA, Rüedi L, Hermann R, Minas W, O'Connor K, Büchs J, Witholt B. (2000): Methods for intense aeration, growth, storage, and replication of bacterial strains in microtiter plates. Appl Environ Microb, 66(6):2641–2646.

Duetz WA, Witholt B (2004): Oxygen transfer by orbital shaking of square vessels and deepwell microtiter plates of various dimensions. Biochemical Engineering Journal, 17 (3): 181–185.

Enfors SO, Jahic M, Rozkov A, Xu B, Hecker M, Jürgen B, Krüger E, Schweder T, Hamer G, O'Beirne D, Noisommit-Rizzi N, Reuss M, Boone L, Hewitt C, McFarlane C, Nienow A, Kovacs T, Trägårdh C, Fuchs L, Revstedt J, Friberg PC, Hjertager B, Blom-

sten G, Skogman H, Hjort S, Hoeks F, Lin HY, Neubauer P, Vander Lans R, Luyben K, Vrabel P, Manelius A. (2001): Physiological responses to mixing in large scale bioreactors. *J Biotechnol*, 85: 175–185.

Einsele, A. (1978): Scaling up bioreactors. *Process Biochem.*, 7, 13-14.

Ernst & Young, (2007): Biotech-Branche wächst. *Deutscher Biotechnologie-Report 2007*.

Ferrari E, Jarnagin AS, Schmidt BF (1993): Commercial Production of Extracellular Enzymes, in *Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria. Sonenshein AL, Hoch JA, Losick R (Hrsg.). American Society for Microbiology, Washington, D.C.: 917-938.

Fisher RA. (1926): The arrangement of field experiments. *J Min Agri*, 33: 503–513.

Fisher SH (1999): Regulation of nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: vive la difference! *Molecular Microbiology*, 32(2): 223-232.

Fuhrer T, Fischer E, Sauer U (2005): Experimental Identification and Quantification of Glucose Metabolism in Seven Bacterial Species. *J Bacteriol*, 187(5): 1581-1590.

Glick B, Pasternak J (1995): *Molekulare Biotechnologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford.

Gupta P, Lee KH (2007): Genomics and proteomics in process development: opportunities and challenges. *Trends in Biotechnology*, 25 (7): 324-330.

Harwood CR (1992): *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological workhorses. *Trends Biotechnol*, 10: 247-256.

Harwood CR, Wipat A. (1996): Sequencing and functional analysis of the genome of *Bacillus subtilis* strain 168. *FEBS Lett*, 389: 84-87.

Horn, M., Dourdoumas, N. (2004): *Regelungstechnik*. Pearson Studium. München.

Huber C, Klimant I, Krause C, Wolfbeis OS (2001): Dual lifetime referencing as applied to a chloride optical sensor. *Analytical Chemistry*, 73 (9): 2097–2103.

Islam RS, Tisi D, Levy MS, Lye GJ (2008): Scale-Up of *Escherichia coli* Growth and recombinant protein expression conditions from microwell to laboratory and pilot scale based on matched kLa, *Biotechnology and Bioengineering*, 99 (5): 1128-1139.

John G T, Klimant I, Wittmann Ch, Heinzle E (2003): Integrated Optical Sensing of Dissolved Oxygen in Microtiter Plates: A Novel Tool for Microbial Cultivation. *Biotechnology and Bioengineering*, 81 (7): 829-836.

Ju L-K, Chase GG, (1992): Improved scale-up strategies of bioreactors. *Bioprocess Engineering*, 8: 49-53.

Junker BH (2004): Scale-up methodologies for *Escherichia coli* and yeast fermentation processes, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 97 (6):347-364.

*Karl Schwister (Hrsg.) (2007): Taschenbuch der Verfahrenstechnik, Fachbuchverlag Leipzig, Carl Hanser Verlag München.*

*Karos M, Vilarino C, Bollschweiler C, Revuelta JL (2004): A genome-wide transcription analysis of a fungal riboflavin overproducer. J Biotechnol, 113: 69-76.*

*Kennedy MJ, Reader SL, Davies RJ (1994): The Kinetics of Developing Fermentation Media. Process Biochem 29: 529-534.*

*Kennedy M, Krouse D, (1999): Strategies for improving fermentation medium performance: a review. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 23: 456-475.*

*Kircher M (2006): White biotechnology: ready to partner and invest in. Biotechnol J. Jul-Aug; 1(7-8): 787-794.*

*Konstantin BK, Toshiomi Y (1992): Knowledge-Based Control of Fermentation Processes. Biotechnology and Bioengineering, 39: 479-587.*

*Klimant I (1997): Verfahren und Vorrichtung zur Referenzierung von Fluoreszenzintensitätssignalen Deutsche Patentschrift DE 19829657*

*Knorr B, Schlieker H, Hohmann H-P, Weuster-Botz D (2007): Scale-down and parallel operation 139ft he riboflavin production process with *Bacillus subtilis*. Biochemical Engineering Journal, 33: 263-274.*

*Kochetov GA (1982): Transketolase from yeast, rat liver, and pig liver, Methods Enzymol, 90: 209-23.*

*Kusterer A, Krause C, Kaufmann K, Arnold M, Weuster-Botz D. (2008): Fully automated single-use stirred-tank bioreactors for parallel microbial cultivations. Bioprocess Biosyst Eng, 31: 207-215.*

*Kusterer A. (2008): Reaktionstechnische Optimierung von Parallelreaktoren für kontrollierte Bioprozesse. Dissertation, TU München.*

*Lakowicz JR (1999): Principles of Fluorescence Spectroscopy. New York, USA: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2nd ed.*

*Lehmann M (2007): Modified transketolase and use thereof. European patent number WO 2007/051552 A1.*

*Lin HY, Neubauer P. (2000): Influence of controlled glucose oscillations on a fedbatch process of recombinant Escherichia coli. J Biotechnol ,79: 27–37.*

*Lim HC und Lee K-S (1991): Control of bioreactor systems. In Biotechnology (eds) Rehm H-J Reed G, Volume 4, VHC Verlagsgesellschaft mbH Weinheim.*

*Lübbert A (1991) Characterization of Bioreactors. In Biotechnology Rehm H-J Reed G (Hrsg.), Volume 4, VHC Verlagsgesellschaft mbH Weinheim: 107-148*

Mack M, Van Loon APGM, Hohmann HP. (1998): Regulation of Riboflavin Biosynthesis in *Bacillus subtilis* Is Affected by the Activity of the Flavokinase/Flavin Adenine Dinucleotide Synthetase Encoded by ribC. J Bacteriol. 180(4): 950-955.

Mayr T, Klimant I, Wolfbeis O S, Werner T (2002): Dual lifetime referenced optical sensor membrane for the determination of copper(II) ions. Analytica Chimica Acta, 462 (1): 1–10.

Mueller JH, Miller P (1940): Production of diphtheric toxin of high potency (100Lf) on a reproducible medium.

Müller T, Walter B, Wirtz A, Burkovski A (2006): Ammonium Toxicity in Bacteria Current Microbiology, Vol. 52: 400-406.

NASA (2008): [http://www.nasa.gov/images/content/177989main\\_Poem91.jpg](http://www.nasa.gov/images/content/177989main_Poem91.jpg)

OMLC (2008): [http://www.omlc.ogi.edu/spactra/PhotochemCAD/ems\\_gif/riboflavin](http://www.omlc.ogi.edu/spactra/PhotochemCAD/ems_gif/riboflavin)

Perkins JB, Pero JG. (1993): Biosynthesis of Riboflavin, Biotin, Folic Acid, and Cobalamin, in *Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria. Sonenshein AL, Hoch JA, Losick R (Hrsg.). American Society for Microbiology, Washington, D.C.: 319-334.

Perkins J, Sloma A, Hermann T, Thieriault K, Zachgo E, Erdenberger T, Hannet N, Chatterjee N, Williams V, Rufo G, Hatch R, Pero J. (1999): Genetic engineering of *Bacillus subtilis* for the commercial production of riboflavin. J Indus Microbiol Biotechnol, 22:8-12.

Pero J, Sloma A. (1993): Proteases, in *Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria. Sonenshein AL, Hoch JA, Losick R (Hrsg.). American Society for Microbiology, Washington, D.C.: 939-952.

Plackett RL, Burman JP (1946): The design of optimum multifactorial experiments. Biometrika, 33: 305-325.

Puskeiler R (2004): Miniaturisierte Parallelreaktoren zur Hochdurchsatz-Bioprozessentwicklung. Dissertation, TU München.

Puskeiler R, Kaufmann K, Weuster-Botz D (2005a): Development, parallelization, and automation of a gas-inducing milliliter-scale bioreactor for high-throughput bioprocess design (HTBD). Biotechnology and Bioengineering 89 (5): 512–523.

Ramanujam N. (2000): Fluorescence Spectroscopy In Vivo. In: Meyers RA ed. Encyclopedia of Analytical Chemistry. Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd: 20–56.

Rake H, Umdruck zur Vorlesung Regelungstechnik A, Aachener Forschungsgesellschaft Regelungstechnik e.V. (AFR), 22. Auflage.

Reuss M. (1993): Oxygen Transfer and Mixing: Scale-Up Implications, in Biotechnology (Vol. 3). Rehm HJ, Reed G (Hrsg.). VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim: 185-217.

Sauer U, Cameron DC, Bailey JE (1998): Metabolic capacity of *Bacillus subtilis* for the production of purine nucleosides, riboflavin, and folic acid. *Biotechnol Bioeng*, 59:227–238.

Sauer U, Hatzimanikatis V, Bailey JE, Hochuli M, Szyperski T, Wüthrich K. (1997): Metabolic fluxes in riboflavin-producing *Bacillus subtilis*. *Nature Biotechnol*, 15: 448-452.

Sauer U, Hatzimanikatis V, Hohmann HP, Manneberg M, Van Loon AP, Bailey JE. (1996): Physiology and metabolic fluxes of wild-type and riboflavin-producing *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol*, 62:3687-3696.

Schallmeyer M, Singh A, Ward OP (2004): Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian journal of microbiology*, 50: 1-17.

Schlegel Hans G (1992): *Allgemeine Mikrobiologie*, Stuttgart; New York; Thieme.

Schügerl K (1985): *Bioreaktionstechnik: Reaktionstechnik mit Mikroorganismen und Zellen*, Otto Salle Verlag GmbH & Co. Frankfurt am Main, Verlag Sauerländer AG, Aarau.

Schügerl K (1991): Common instruments for process analysis and control. In *Biotechnology* (eds) Rehm H-J Reed G, Volume 4, VHC Verlagsgesellschaft mbH Weinheim.

Schweder T, Krüger E, Xu B, Jürgen B, Blomsten G, Enfors SO, Hecker M (1999): Monitoring of genes that respond to process related stress in large scale bioprocesses. *Biotechnol Bioeng*, 65:151–159.

Shimizu H, Sada E, Shioya S, Suga K (1989): Measurement of enzyme reaction rates using advanced pH control system: application of repetitive PF system. *Biotechnology and Bioengineering*, 34: 794-803.

Shimizu, K. (1993): *An Overview on the Control System Design of Bioreactors*. Advances in Biochemical Engineering Biotechnology. Vol. 50: Measurement and Control. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York.

Shuler ML und Kargi F (1992): *Bioprocess Engineering*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.

Silveira RG, Kakizono T, Takemoto S, Nishio N and Nagai S (1991): Medium optimization by an orthogonal array design for the growth of *Methanosarcina barkeri*. *J Ferm Bioeng*, 72: 20–25.

Solovieva IM, Kreneva RA, Errais Lopes L, Perumov DA. (2005): The riboflavin kinase encoding gene *ribR* of *Bacillus subtilis* is a part of a 10 kb operon, which is negatively regulated by the *yrzC* gene product. *FEMS Microbiol Lett*, 243(1): 51-58.

Solovieva IM, Kreneva RA, Leak DJ, Perumov DA (1999): The *ribR* gene encodes a monofunctional riboflavin kinase which is involved in regulation of the *Bacillus subtilis* riboflavin operon. *Microbiology*, 145: 67–73.

Sonenshein AL, Hoch JA, Losick R (Hrsg.) (1993): *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics. American Society for Microbiology, Washington, D.C.: 127-132.

Stahmann KP, Revuelta JL, Seulberger H (2000): Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 53: 509–516.

Storhas W (1994): Bioreaktoren und periphere Einrichtungen. Friederich Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig/Wiesbaden.

Stülke J, Hillen W. (1999): Carbon catabolite repression in Bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 2:195-201.

Stülke J, Hillen W. (2000): Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. *Annu. Rev. Microbiol.*, 54: 849-880.

Sweere APJ, Luyben K Ch AM, Kossen NWF (1987): Regime analysis and scale-down: tools to investigate the performance of bioreactors, *Enzyme Microb. Technol*, (9): 386-398.

Tännler S, Decasper S, Sauer U (2008): Maintenance metabolism and carbon fluxes in *Bacillus* species. *Microbial Cell Factories*, 7:19.

Teich A, Meyer S, Lin HY, Andersson L, Enfors SO, Neubauer P. (1999): Growth rate related concentration changes of the starvation response regulators sigma (S) and ppGpp in glucose-limited fed-batch and continuous cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog*, 15(1): 123-129.

Viesturs U, Kristapsons M, Levitans E (1982): Foam in microbiological processes. *Advances in biochemical engineering*, 21: 169-224.

Thiry M, Cingolani D. (2002): Optimizing scale-up fermentation processes. *Trends Biotechnol*, 20(3): 103-105.

Vandamme EJ (1992): Production of vitamins, coenzymes and related biochemicals by biotechnological processes. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, Volume 53, (4): 313-327.

Van Loon APGM, Hohmann HP, Bretzel W, Hübelin M, Pfister M. (1996): Development of a Fermentation Process for the Manufacture of Riboflavin. *Chimica*, 50(9): 410-412.

Weuster-Botz D. (1999): Die Rolle der Reaktionstechnik in der mikrobiellen Verfahrensentwicklung. *Forschungszentrum Jülich GmbH, Jülich*.

Weuster-Botz (2002): Parallele Reaktorsysteme zur Bioprozessentwicklung, *Chemie Ingenieur Technik*, 74(12): 1762-1766.

Weuster-Botz (2006): Mikro-Bioverfahrenstechnik. *Chemie Ingenieur Technik*, 78 (3): 256-260.



*Weuster-Botz D, Puskeiler R, Kusterer A, Kaufmann K, John GT, Arnold M (2005):* Methods and milliliter scale devices for high-throughput bioprocess design. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 28 (2): 109–119.

*Wolf Paetzold (1995):* Meß- und Regelungstechnik. Christiani, Konstanz, Auflage: 4., neubearb. Aufl.

*Wolfram E, Arnold M, Franz A, Weuster-Botz D, Wandrey C. (2000a):* Verfahren für die Bestimmung von Substrat- und Produktkonzentration in einem Medium. Patent DE10024969.

*Wolfram E, Arnold M, Franz A, Weuster-Botz D, Wandrey C. (2000b):* Verfahren und Vorrichtung für die Bestimmung von Substrat- und Produktkonzentration in einem Medium. Patent DE 10024992.

*Wu QL, Chen T, Gan Y, Chen X, Zhao XM (2007):* Optimization of riboflavin production by recombinant *Bacillus subtilis* RH44 using statistical designs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(4): 783-94.

*Young TB (1979):* Fermentation scale-up: industrial experience with a total environmental approach, *Annals New York Academy of Science*, 326: 165-180.

*Zamboni N, Mouncey N, Hohmann HP, Sauer U (2003):* Reducing maintenance metabolism by metabolic engineering of respiration improves riboflavin production by *Bacillus subtilis*. *Metabol Eng*, 5:49-55.

*Zhao B, Basir OA, Mitta GS (2004):* Conceptual design and evaluation of an ultrasonic system for bottled beverages' quality measurement and control. *Transactions of the Institute of Measurement and Control*, Vol. 26, No. 1: 41-54.

## 9 Abkürzungsverzeichnis

$a$	volumenbezogene Stoffaustauschfläche, $\text{m}^{-1}$
$a_{\text{FluoRF}}$	Korrelationsfaktor für die Fluoreszenz von Riboflavin
$c_P$	Produktkonzentration, $\text{mol}^{-1}$
$c_{gi}$	Grenzflächenkonzentrationen der Komponente im Gas
$c_L^*$	Sättigungskonzentration von Sauerstoff im Medium bei Sauerstoffpartialdruck der Gasphase gleich dem des Abgases, $\text{gL}^{-1}$
$c_L$	Sauerstoffkonzentration im Medium, $\text{gL}^{-1}$
$c_{li}$	Grenzflächenkonzentrationen der Komponente in der Flüssigkeit.
$c_O$	Sauerstoffkonzentration, $\text{mol}^{-1}$
$c_S$	Konzentration des limitierenden Substrats, $\text{g L}^{-1}$
$c_X$	Konzentration der Biotrockenmasse, $\text{g L}^{-1}$
$c_{X,0}$	Konzentration der Biotrockenmasse zu Beginn der exponentiellen Phase, $\text{g L}^{-1}$
H(T)	Henryscher Verteilungskoeffizient
$K_{\text{H},\text{O}}$	Henry Konstante für Sauerstoff
$k_L$	Stoffübergangskoeffizient für Sauerstoff, $\text{ms}^{-1}$
$K_S$	Sättigungskonstante des limitierenden Substrats, $\text{g L}^{-1}$
$l$	Binärzeichenkettenlänge
$M$	Zahl der Individuen in einer Population
$n$	Stichprobenumfang
$p$	Überschreitungswahrscheinlichkeit
$p$	Gesamtdruck
$pK_a$	Säuredissoziationskonstante, [-]
$p_o$	Partialdruck
$q_{k,k(n-1),1-\alpha}$	Quantil der studentisierten Spannweite
$q_o$	spezifische Sauerstoffaufnahme, -
$q_s$	spezifische Substrataufnahme, -

$q_{S,\mu}$	Verbrauch des Substrats für das Zellwachstum, -
$q_{S,P}$	Verbrauch des Substrats für Produktbildung, -
$q_{S,m}$	Verbrauch des Substrats den Erhaltungsstoffwechsel, -
$R_0$	Widerstand bei $T_0 = 0^\circ\text{C}$
$t_{k(n-1),1-\beta}$	das Quantil der t-Verteilung
$Y^*_{X/S}$	differentieller Ausbeutekoeffizient für das Zellwachstum bezogen auf Substrat
$Y^*_{X/O}$	differentieller Ausbeutekoeffizient für das Zellwachstum bezogen auf Sauerstoff
$Y^*_{P/S}$	differentielle Produktausbeute
$Y_{X/S}$	integraler Ausbeutekoeffizient für das Zellwachstum bezogen auf Substrat
$Y_{P/S}$	integraler Produktausbeute
$\dot{V}_{ein}$	Zuluftstrom
$\dot{V}_{aus}$	Abluftstrom
$V_R$	Reaktionsvolumen
$V_{mol}$	molares Volumen des idealen Gases (=22,414 L mol <sup>-1</sup> ).
$\alpha$	lineare thermische Widerstandskoeffizient
$\alpha'$	mittlere Temperaturbeiwert
$\alpha$	Signifikanzniveau
$\beta$	quadratische thermische Widerstandskoeffizient
$\beta$	Signifikanzniveau
$\gamma_{O,ein}$	Stoffmengenanteil des Sauerstoffs im Zuluftstrom
$\gamma_{O,aus}$	Stoffmengenanteil des Sauerstoffs im Zu- und Abluftstrom
$\gamma_0$	Anteil des Sauerstoffs im Gas
$\Delta$	Leistungsdifferenz
$\sigma^2$	mittlerer quadratischen Fehler dar. Die Differenz
$\mu$	Wachstumsrate, h <sup>-1</sup>
$\mu_{max}$	maximale Wachstumsrate unter nicht limitierenden Bedingungen, h <sup>-1</sup> .
ANOVA	Varianzanalyse
CER	Kohlendioxidbildungsrate (carbon dioxide evolution rate)

FMN	Flavinmononukleotid
FAD	Flavinadenin-Dinukleotid
GTP	Guanosintriphosphat
HSD	Tukey honestly significant difference
IQR	Interquartilabstand
MTP	Mikrotiterplatte
OUR	Sauerstoff-aufnahmerate (Oxygen Uptake Rate)
OTR	Sauerstofftransferrate (Oxygen Transfer Rate)
RibA	GTP-Cyclohydrolase II
RibB	Riboflavinsynthase
RibG	Riboflavin-Deaminase/Reduktase
RibH	Lumazinsynthase
rpm	Drehzahl

## 10 Anhang

### 10.1 Analytik und Messtechnik

#### 10.1.1 Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration

Die Gesamttrockenmasse (GTM) der Proben wurde gravimetrisch bestimmt indem 1 mL der Zellsuspension in Eppendorfgefäßen zunächst zentrifugiert und dann bei 80°C mindestens 36 Stunden getrocknet wurden, bis ein konstantes Gewicht festgestellt werden konnte. Da die Probe sowohl aus Riboflavinkristallen als auch aus Zellen bestand, musste für die Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM) das Gewicht des Produkts abgezogen werden.

#### 10.1.2 Bestimmung der Optischen Dichte von Zellsuspensionen

##### *Einstrahl-Photometer*

Die Bestimmung der optischen Dichte (OD) erfolgte in einem Photometer (Spectronic Genesys 20, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich) bei 650 nm in Polystyrol-Einmalküvetten gegen Phosphat-Puffer. Zur Verdünnung der Zellsuspensionen auf eine maximale OD von 0,3 wurde ebenfalls Phosphat-Puffer verwendet. Zur Bestimmung der Biotrockenmasse aus der Messung der OD wurde eine lineare Korrelation angenommen:

$$c_x = 0.33 \text{gL}^{-1} \cdot OD_{650}$$

**Gleichung 10.1**

#### 10.1.3 Bestimmung von Riboflavin

Die Riboflavinkonzentration  $c_p$  in den ‚offline‘ Proben des Riboflavinprozesses im Milliliter-Maßstab wurden über Absorption oder HPLC bestimmt. Die automatisierte Riboflavinanalytik basiert auf der Messung von Fluoreszenz.

### Absorption

Für die Bestimmung der Riboflavinkonzentration  $c_p$  wurden 20  $\mu\text{L}$  Probe 1:11 in 1 M Natronlauge verdünnt, um die Riboflavinkristalle aufzulösen. Dann wurde die Probe mit 1,5 M Zitronensäure neutralisiert, um die Zerstörung des Riboflavins durch die Base zu vermeiden. Die Proben wurden für fünf Minuten bei 3300 g in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Die Messung der Absorption bei 444 nm ( $ABSO_{444}$ ) wurde in 1 ml des zellfreien Überstands durchgeführt. Die Riboflavinkonzentration konnte über die lineare Korrelation von Verdünnungsfaktor (DF) Absorptionswert und Korrelationsfaktor dargestellt in Gleichung A.2 berechnet wird. Für Absorptionswerte  $> 0,9$  wurde der Überstand weiter verdünnt.

$$c_p = DF \cdot ABSO_{444} \cdot 0.03305 \text{ gL}^{-1} \quad \text{Gleichung 10.2}$$

### Fluoreszenz

Riboflavin hat die Eigenschaft, dass es bei einer Anregung mit Licht der Wellenlänge  $\lambda = 440 \text{ nm}$  oder  $\lambda = 485 \text{ nm}$  Strahlen der Wellenlänge  $\lambda = 520 \text{ nm}$  emittiert. Diese Eigenfluoreszenz ( $FLUO_{520}$ ) kann gemessen werden. Ein linearer Zusammenhang des emittierten Lichtes und der Konzentration ergibt sich mit dem verwendeten Mikrotiterplattenphotometer bei einer Konzentration zwischen  $0,05 - 0,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Riboflavin.

$$c_p = a_{FluoRF} \cdot FLUO_{520} \quad \text{Gleichung 10.3}$$

### HPLC

Die Produktkonzentration wurde ebenfalls über HPLC (Agilent 1100 Series; Säule: GROM-SIL 100 ODS-2 FE (250 x 5 mm); 20 % Ethanol; 50°C; UV/VIS Detektor 403 nm) bestimmt. Eine 20  $\mu\text{L}$  Probe wurde zu 220  $\mu\text{L}$  1M NaOH zugegeben. Nach einer Minute wurde zum Neutralisieren erst 180  $\mu\text{L}$  1,5 M Zitronensäure und zur Verdünnung dann 1400  $\mu\text{L}$  Phosphat-Puffer hinzugefügt. Die Proben wurden gefiltert und in braune HPLC-Vials gegeben, um sie vor Licht zu schützen. Die Quantifizierung der Produktkonzentration erfolgte aufgrund einer mit Riboflavinstandards erzeugten Kalibrierkurve.

### 10.1.4 Bestimmung von Glucose

Zur Messung der Glucosekonzentration wird das Blutzuckermessgerät Accu-Chek<sup>®</sup> von Roche Diagnostics verwendet. Der Messbereich liegt zwischen 0,1 – 6 g L<sup>-1</sup>, so dass bei höher konzentrierten Proben diese entsprechend verdünnt werden müssen. Die Probe von 10 µL sollte nur durch Kapillarkräfte eingesaugt werden.

## 10.2 Medien und Pufferlösungen

### 10.2.1 Vorkulturmedien

Für die Vorkultur I werden folgende Komponenten benötigt:

**Tabelle 10.1: Medium für Vorkultur I.**

Komponente	Konzentration
Veal infusion broth (Fa. Difco, Nr. 234420)	30 g L <sup>-1</sup>
Sorbitol (Fa. Fluka BioChemika, Nr. 85532)	10 g L <sup>-1</sup>
Hefeextrakt (Fa. Roth, Nr. 2363.2 bzw. Fa. Merck, Nr. 1.03753)	5 g L <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (wasserfrei, Fa. Merck, Nr. 1.05104)	2,5 g L <sup>-1</sup>
Chloramphenicol	0,06 g L <sup>-1</sup>
Clerol™ FBA 265K 1:10	2 mL·L <sup>-1</sup>

Es werden je 50 mL der in VE-H<sub>2</sub>O gelösten Komponenten in 500 Milliliter-Schüttelkolben mit Schikanen abgefüllt und anschließend autoklaviert. Danach werden pro Kolben 100 µL der Chloramphenicol-Stammlösung ( $c = 30 \text{ g L}^{-1}$ ) zugegeben, so dass eine Chloramphenicol-Konzentration von 60 mg L<sup>-1</sup> im Kolben vorliegt. Des weiteren werden pro Kolben 1-2 Tropfen Antischaummittel Die Inokulierung erfolgt mit 1 ml Zellsuspension.

Für die Vorkultur II werden die in Tabelle 10.2.angegebenen Komponenten in VE-H<sub>2</sub>O gelöst. Die gelösten Komponenten werden autoklaviert und anschließend mit einer Spurenelement-Lösung ( $c = 2,0 \text{ mL L}^{-1}$ ), einer Mg/Zn-Lösung ( $c = 2,0 \text{ mL L}^{-1}$ ) und einer Fe-Lösung ( $c = 2,0 \text{ mL L}^{-1}$ ) versetzt, deren Herstellung in 10.3.2 beschrieben wird. Es werden je 150 mL Medium in sterile 1000 Milliliter-Schüttelkolben mit Schikanen abgefüllt. Jeder Kolben erhält 300 µL der Chloramphenicol-Stammlösung ( $c = 30 \text{ g L}^{-1}$ ) so-

wie 8-10 Tropfen Antischaummittel "Clerol". Die Inokulierung erfolgt mit 0,5 ml einer  $10^{-5}$  Verdünnung der 1. Vorkultur (OD= 0,8 – 1).

**Tabelle 10.2: Medium für Vorkultur II.**

Komponente	Konzentration
Na-Glutamat * 1 H <sub>2</sub> O (Fa. Merck, Nr. 1.06445)	0,6 g L <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (wasserfrei, Fa. Roth, Nr. 3904.1)	4,0 g L <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (wasserfrei, Fa. Merck, Nr. 1.05104)	4,0 g L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 12 H <sub>2</sub> O (Fa. Merck, Nr. 1.06579)	7 g L <sup>-1</sup>
NH <sub>4</sub> Cl (Fa. Merck, Nr. 1.01145)	0,2 g L <sup>-1</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Fa. Merck, Nr. 1.01217)	1,2 g L <sup>-1</sup>
Hefeextrakt (Fa. Roth, Nr. 2363.2 bzw. Fa. Merck, Nr. 1.03753)	15,0 g L <sup>-1</sup>
Chloramphenicol	0,06 g L <sup>-1</sup>
Clerol™ FBA 265K 1:10	2 mL·L <sup>-1</sup>

### 10.2.2 Satzmedium

Es wird VE-H<sub>2</sub>O bis 900 mL zu den in Tabelle 10.3 aufgeführten Chemikalien zugegeben, autoklaviert und ein gegebenenfalls dadurch entstandener Volumenverlust mit sterilem VE-H<sub>2</sub>O ausgeglichen. Außerdem wird 27,3 g Glucose \*H<sub>2</sub>O (Fa. Merck, Nr. 1.08346) in einen 50 Milliliter-Messzylinder abgewogen, mit VE-H<sub>2</sub>O auf 40 mL gefüllt, autoklaviert und den 900 mL Medium zugegeben. Zusätzlich wird 2,0 mL CaCl<sub>2</sub>-Lösung, 2,0 mL Spurenelement-Lösung, 2,0 mL Mg/Zn-Lösung und 2,0 mL Fe-Lösung zugegeben. Die Inokulierung des Satzmediums erfolgt mit 50 ml Vorkultur II (OD = 6-8) wodurch ein Gesamtvolumen von 1 L entsteht.

**Tabelle 10.3: Zusammensetzung des Satzmediums.**

Komponente	Konzentration
Na-Glutamat * 1 H <sub>2</sub> O (Fa. Merck, Nr. 1.06445)	0,75 g L <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (wasserfrei, Fa. Roth, Nr. 3904.1)	4,71 g L <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (wasserfrei, Fa. Merck, Nr. 1.05104)	4,71 g L <sup>-1</sup>



Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 12 H <sub>2</sub> O (Fa. Merck, Nr. 1.06579)	8,23 g L <sup>-1</sup>
NH <sub>4</sub> Cl (Fa. Merck, Nr. 1.01145)	0,23 g L <sup>-1</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Fa. Merck, Nr. 1.01217)	1,41 g L <sup>-1</sup>
Hefeextrakt (Fa. Roth, Nr. 2363.2 bzw. Fa. Merck, Nr. 1.03753)	11,77 g L <sup>-1</sup>
Clerol™ FBA 265K	0,2 mL L <sup>-1</sup>
Glucose * H <sub>2</sub> O (Fa. Merck, Nr. 1.08346)	27,3 g L <sup>-1</sup>
CaCl * 2H <sub>2</sub> O (Fa. Merck, Nr. 1.02382)	2,0 mL L <sup>-1</sup>
Spurenelementlösung 500x	2,0 mL L <sup>-1</sup>
Mg/Zn-Lösung 500x	2,0 mL L <sup>-1</sup>
Fe-Lösung 500x	2,0 mL L <sup>-1</sup>

---

Zur Herstellung der Stammlösungen sind folgende Substanzen nötig, die in VE-H<sub>2</sub>O gelöst werden:

• *CaCl<sub>2</sub>-Lösung:*

CaCl<sub>2</sub> \* 2 H<sub>2</sub>O (Fa. Merck, Nr. 1.02382) c = 31,25 g L<sup>-1</sup>

• *Spurenelemente-Lösung:*

MnSO<sub>4</sub> \* 1 H<sub>2</sub>O (Fa. Merck, Nr. 1.05941) c = 7,0 g L<sup>-1</sup>

CoCl<sub>2</sub> \* 6 H<sub>2</sub>O (Fa. Merck, Nr. 1.02539) c = 2,0 g L<sup>-1</sup>

(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> \* 4 H<sub>2</sub>O (Fa. Merck, Nr. 1.01182) c = 0,75 g L<sup>-1</sup>

AlCl<sub>3</sub> \* 6 H<sub>2</sub>O (Fa. Merck, Nr. 1.01084) c = 0,5 g L<sup>-1</sup>

CuCl<sub>2</sub> \* 2 H<sub>2</sub>O (Fa. Merck, Nr. 1.02733) c = 0,375 g L<sup>-1</sup>

• *Mg/Zn-Lösung:*

MgSO<sub>4</sub> \* 7 H<sub>2</sub>O (Fa. Merck, Nr. 1.05886) c = 500 g L<sup>-1</sup>

ZnSO<sub>4</sub> \* 7 H<sub>2</sub>O (Fa. Merck, Nr. 1.08883) c = 2,0 g L<sup>-1</sup>

• *Fe-Lösung* (für jedes Medium frisch anzusetzen):

FeSO<sub>4</sub> \* 7 H<sub>2</sub>O (Fa. Merck, Nr. 1.03965) c = 21 g L<sup>-1</sup>

### 10.2.3 Zulauflösung

Die für den Milliliter-Prozess verwendete Zulauflösung wird hergestellt, indem 149,28 g Glucose \* H<sub>2</sub>O (Fa. Merck, Nr. 1.08346) eingewogen, 190 mL VE-H<sub>2</sub>O zugegeben und autoklaviert wird. Danach erhält man etwa 290 mL Glucose-Lösung. Eine für die Zulauflösung benötigte Minerallösung wird separat autoklaviert und enthält folgende in VE-H<sub>2</sub>O zu lösende Komponenten:

- MgSO<sub>4</sub> \* 7 H<sub>2</sub>O (Fa. Merck, Nr. 1.05886) c = 1,0 g L<sup>-1</sup>
- Mn SO<sub>4</sub> \* 1 H<sub>2</sub>O (Fa. Merck, Nr. 1.05941) c = 7,3 mg L<sup>-1</sup>
- Zn SO<sub>4</sub> \* 7 H<sub>2</sub>O (Fa. Merck, Nr. 1.08883) c = 2,0 mg L<sup>-1</sup>

Die Glucosekonzentration der autoklavierten Lösung wird anschließend mit dem Blutzuckermessgerät Accu-Chek<sup>®</sup> von Roche Diagnostics bestimmt.

Daraus wird das Gesamtvolumen der Lösung berechnet, das nötig ist, um die gewünschte Glucosekonzentration zu erhalten. Das Gesamtvolumen wird erreicht, indem VE-H<sub>2</sub>O und Minerallösung zugegeben werden, wobei das zuzugebende Volumen der Minerallösung 2,5 % des Gesamtvolumens betragen muss. Die Konzentration der Zulauflösung wird anschließend noch einmal mit dem Blutzuckermessgerät überprüft.

### 10.2.4 Puffer

Um den 0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer mit pH = 7,4 herzustellen, werden folgende Komponenten in VE-H<sub>2</sub>O gelöst:

- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Fa. Merck, Nr. 1.06586) c = 11,385 g L<sup>-1</sup>
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> \* H<sub>2</sub>O (Fa. Merck, Nr. 1.06346) c = 2,732 g L<sup>-1</sup>

Anschließend wird der pH-Wert überprüft. Außerdem sollte vor jeder Verwendung des Puffers eine visuelle Kontrolle auf mikrobiellen Bewuchs durchgeführt werden.

### 10.2.5 Sonstige Chemikalien

### *Natronlauge*

Eine 1 M Natronlauge wird benötigt, um die in einer Probe enthaltenen Riboflavinkristalle für die *at-line* und *off-line* Analytik zu lösen, sowie zur Herstellung einer Riboflavinstammlösung. Dazu wird zuerst eine 10 M Stammlösung hergestellt, indem 40 g Natriumhydroxidplätzchen (Fa. Merck, Nr. 1.06482) eingewogen und aufgrund der starken Wärmeentwicklung erst nach und nach in 100 mL VE-H<sub>2</sub>O gelöst werden. Die 1 M NaOH wird anschließend durch eine 1:10-Verdünnung der 10 M NaOH hergestellt.

### *Ammoniumhydroxid*

Um während des Produktionsprozesses optimale Wachstumsbedingungen für den Mikroorganismus zu schaffen, sollte der pH-Wert idealerweise konstant auf pH = 6,8 gehalten werden. Da *Bacillus subtilis* bei der Produktion von Riboflavin Säure produziert, muss Base zudosiert werden. Ammoniumhydroxid wird unter anderem deshalb verwendet, da es zusätzlich als Stickstoffquelle für die Organismen dient. Dazu wird 25 %-iges NH<sub>4</sub>OH (Fa. Roth, Nr. 5460.2) zu gleichem Gewichtsanteil mit VE-H<sub>2</sub>O auf 12,5 %-iges NH<sub>4</sub>OH verdünnt.

### *Zitronensäure*

Um eine Zersetzung von Riboflavin zu vermeiden und dadurch eine längere Haltbarkeit zu garantieren, muss nach dem Lösen der Kristalle mit Natronlauge eine Senkung des pH-Wertes mit 1,5 M Zitronensäure erfolgen. 100 mL der 1,5 M Zitronensäure werden hergestellt, indem man 31,521 g C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> · H<sub>2</sub>O (Fa. Roth, Nr. 5110.1) in einem Messzylinder abwägt und diesen bis zur 100 Milliliter-Markierung mit VE-H<sub>2</sub>O auffüllt.

### *Antischaum*

Für die automatische Antischaumzugabe während des Prozesses mit Hilfe der Pipettieradeln des Roboters wird eine 1:4 Verdünnung des Antischaummittels „Biospumex“ (Fa. Cognis, Nr. Biospumex 30K) mit H<sub>2</sub>O verwendet.

Zur Reinigung der Pipettieradeln des Roboters wird Aceton (Fa. Merck Schuchardt, Nr. 822251) eingesetzt.

### Antibiotikum

Für die Bioprozesse wird ein rekombinanter Stamm des *Bacillus subtilis* verwendet. Der Stamm RB50::[pRF69]<sub>n</sub> besitzt eine Chloramphenicol-Resistenz. Diese Resistenz ist bis zu einer Konzentration von mindestens  $c_{CA} = 60 \text{ mg L}^{-1}$  vorhanden. Die dazu benötigte Stammlösung wird wie folgt hergestellt:

- 30 mg Chloramphenicol (Fa. Roche, Nr. 634 433) gelöst in 1 mL Ethanol (absolut zur Analyse, Fa. neoLab Migge, Nr. 3050.2500)

## 10.3 Mikroorganismen und ihre Kultivierung

### 10.3.3 Verwendete Rekombinanten von *Bacillus subtilis*

**Tabelle 10.4: Verwendete Produktionsstämme von *Bacillus subtilis*.**

Stamm/ Plasmid	Eigenschaften des Phänotyps	Referenz
RB50	Resistenz gegenüber dem Purin- Analogon Azaguanin Resistenz gegenüber dem Purin- Analogon Decoyinin (GTP Überproduktion) Restriktion der Synthese von AMP aus IMP Resistenz gegenüber Methioninsulfoxid (Erhöhung des IMP-Levels) Resistenz gegenüber dem Riboflavin- Analogon Roseoflavin (Deregulierung des <i>rib</i> Operons) Verlust der Sporulation	Perkins et al., 1999 Coquard et al., 1997; Mack et al., 1998;
RB50::[pRF69] <sub>n</sub>	Vier Gene, welche die Biosynthese von Riboflavin kodieren Starker konstitutiver Promoter Chloramphenicolresistenz	Perkins et al., 1999
BS3103	Überexpression von Genen des Riboflavin- biosyntheseweges	Hümberlin et al. 1999
BS3528	Punktmutation in einem Gen des zentralen Kohlenstoffwechsels	Lehmann 2007

#### 10.3.4 Vorkultur

Die Vorkultur, wie auch der restliche Prozess, wird nach der Vorgabe des Kooperationspartners DSM durchgeführt. Somit kann die Vergleichbarkeit der Prozesse gesichert werden.

Alle eingesetzten Medien werden, teilweise in getrennten Stammlösungen, sterilisiert. Lösungen und Schüttelkolben werden nach dem Öffnen und vor dem Schließen abgeflammt. Pipetten und nicht sterilisierbare Geräte werden vor der Benutzung mit Ethanol (70 %) gereinigt. Die gesamte Vorbereitung wird unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Im ersten Schritt wird ein 500 Milliliter-Schikanenkolben mit 50 mL Medium „Vorkultur 1“ befüllt. Hierbei ist zu beachten, dass Chloramphenicol in einer frisch angesetzten Chloramphenicol-Stammlösung (30 mg in 1 mL Ethanol) zugegeben wird, um die Wirkung des Antibiotikums sicherzustellen. Es folgt die Inokulierung. Die *Bacillus subtilis* RB50::[pRF69]-Stocks werden von -80 °C zunächst in Eiswasser aufgetaut und anschließend 1 mL des Stocks dem Kolben zugeführt. Nach einer Inkubation von etwa 5,5 Stunden bei 37 °C und 180 rpm erreicht die erste Vorkultur eine OD von 0,8 bis 1,0. Für das Inokulum der zweiten Vorkultur werden 100 µL der Vorkultur 1 bis auf 10<sup>-5</sup> verdünnt. 0,5 mL dieser Verdünnung werden in einen, mit 150 mL Medium „Vorkultur 2“ befüllten, 1000 Milliliter-Schikanenkolben überführt. Übernacht wird die zweite Vorkultur inkubiert, bis sie bei einer OD von 6-8 in das Satzmedium überführt werden kann.

#### 10.3.5 Parallelkultivierung

Die 48 sterilen Reaktoren werden in den Reaktorblock eingesetzt. Das Satzmedium bzw. die Satzmedien werden auf einen  $pH = 6,8$  eingestellt und mit 50 mL der Vorkultur pro Liter angeimpft, so dass die Start-OD bei etwa 0,3 liegt.

Sobald die Vorbereitungen abgeschlossen sind, werden die Reaktoren mit je 8,5 mL inokulierten Satzmedium unter der Sterilbank befüllt und der Reaktordeckel auf den Block aufgesetzt. Die Reaktoren sind somit verschlossen und der Reaktorblock kann in Position gebracht werden. Es folgt der Anschluss der sterilen Gaszufuhr und der Wärmetauscher. Das induktive Rührsystem wird auf 2700 rpm eingestellt. Der Prozess wird mit dem Aufrufen des Gemini-Programms zur Steuerung des Roboters gestartet. Der Prozess teilt sich in zwei Phasen – die Satzphase und die Zulaufphase. Die Satz-

phase dauert bis die Glucose im Satzmedium aufgebraucht ist. Sobald den Zellen keine Glucose mehr zur Veratmung zur Verfügung steht, steigt der  $pO_2$ - Druck wieder an und bleibt stabil. Ist dieser Punkt erreicht, wird die intermittierende Zulaufphase eingeleitet. Der Zeitpunkt variiert stark und ist vor allem vom Satzmedium und dem Zustand der Vorkultur abhängig. Der Prozess wird nach 72 Stunden abgebrochen.

#### *Intermittierender Zulauf*

Sobald die Zulaufphase gestartet ist, werden vom Laborroboter alle 10 Minuten jeweils 35,6  $\mu\text{L}$  Zulaufmedium zugegeben. Dies entspricht etwa 0,042 g Glucose pro Bioreaktor pro Stunde.

#### *$O_2$ -Partialdruckanalytik und Steuerung*

Mit Hilfe der am Boden einzelner Reaktoren immobilisierten Sensoren kann über die Sensorblocks der  $pO_2$  im Medium ausgelesen werden. Durch manuelle Umstellung wird der Sauerstoffgehalt der Gaszufuhr variiert und so dafür gesorgt, dass der  $pO_2$ -Gehalt stets über 20 % bleibt. Ein niedrigerer  $pO_2$ -Gehalt würde zu verringerter Produktbildung führen.

#### *pH-Analytik und Kontrolle*

Die Regelung des pH erfolgt über die *at-line* Messung via *HydroPlate*<sup>®</sup>. 20  $\mu\text{L}$  Probe werden vom Roboter alle 30 Minuten aus den Reaktoren in die *HydroPlate*<sup>®</sup> pipettiert und anschließend im Fluoreszenzphotometer gemessen. Die fluometrischen Sensoren werden bei einer Wellenlänge von 538 nm und 620 nm ausgelesen und der pH bestimmt. *LabView V7.0 express* gleicht den pH mit dem Sollwert ab und passt die Basezugabe an. Als Base wird 12,5 % Ammoniumhydroxid verwendet.

#### *Antischaum*

*Biospumex*<sup>®</sup> (1:4) wird anhand eines Zugabeprofils hinzugefügt. Dieses Profil kann nach Bedarf angepasst werden.

#### *Offline Analytik*

Nach 48 und 72 Stunden werden *offline*-Proben gemessen. Für die 48 h-Stunden Proben werden vom Roboter 20  $\mu\text{L}$  Probe genommen und in eine Deepwell-Platte über-

führt. Der Riboflavingehalt wird über die Absorption im Einstrahlphotometer und mit einem HPLC-UV-VIS-System bestimmt.

### *Füllmenge der Reaktoren*

Um die Produkt- und Biomasse anhand der Konzentration zu bestimmen, ist die Kenntnis des Reaktorfüllvolumens notwendig. Die Ermittlung des Füllstands  $V$  zu einem Zeitpunkt während des Prozesses erfolgt durch lineare Regression, da die Reaktoren für eine Messung nicht zugänglich sind. Um den Verlauf abschätzen zu können, wird Steigung zwischen Anfangsvolumen  $V_0$  und Endvolumen  $V_{Ende}$  über die Zeit für jeden Reaktor ermittelt. Der Berechnungszeitraum beginnt daher erst mit Umstellung der Kühlung (=  $t_{Umst.}$ ).

$$V(t) = \left( \frac{V_{Ende} - V_0}{t_{Ende} - t_0} - 1 \right) + V_0$$

**Gleichung 10.4**

### 10.3.6 Kultivierung im Labormaßstab

Das Startvolumen betrug 3L und erhöhte sich je nach Prozessdauer und Zulauftrate bis auf 7 L.

Die Glucosekonzentration im Satzmedium wurde halbiert sowie das Zulaufmedium verdünnt. Ansonsten wurden die Versuche, wenn nicht anders berichtet, wie bei Zamboni et al. (2003) beschrieben, durchgeführt. Dieses Protokoll entspricht dem Riboflavin-Standardprozess von DSM NP, wobei dort ein Startvolumen von 6L und ein entsprechend größerer Reaktor verwendet wurde.

## 10.4 Prozessoptimierung

### 10.4.3 Parallele Optimierung

Ziel der Optimierung ist es, die Riboflavinausbeute nach 48 Stunden und 72 Stunden zu optimieren. Die „offene Strategie“ („*Scanning*“) soll hierbei dazu dienen beliebige Komponenten zu finden, die positiven Einfluss auf die beiden Zielgrößen haben. Bei einem „*Screening*“ wurden mit einem Plackett-Burman-Versuchsplan die wichtigsten Komponenten des Ursprungsmediums identifiziert. Die ausgewählten neuen und alten

Komponenten dienen dann als Variablen für die Optimierung. Mittels genetischer Algorithmen soll die bestmögliche Kombination der Komponenten im Hinblick auf die Optimierungsziele gefunden werden („geschlossene Strategie“). Der Ablauf der durchgeführten Optimierung ist in Abbildung 10.4.1 dargestellt.

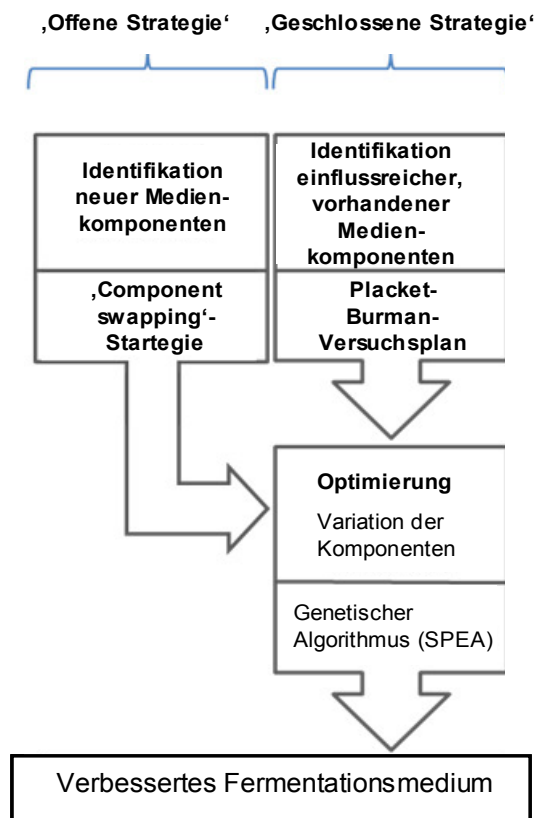


Abbildung 10.4.1: Schematischer Ablauf der Medienoptimierung.



	Na-Glutamat	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	K <sub>2</sub> HPO <sub>5</sub>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12H <sub>2</sub> O	NH <sub>4</sub> Cl	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Yeast extract (Merck)	CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	Spurenelementlg.	Mg/Zn-Lösung	Fe-Lösung
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	-1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1
3	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1
4	1	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1
5	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	-1
6	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1
7	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	1
8	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1
9	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1
10	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1
11	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1
12	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1
Cop	cp	cp	cp	cp	cp	cp	cp	cp	cp	cp	cp

Abbildung 10.4.2: Plackett-Burman-Design für das Screening der Medienkomponenten.

Die Voruntersuchungen zur Medienoptimierung wurden mit dem in Abbildung 10.4.2 dargestellten Plackett-Burman-Design durchgeführt.

Genetische Algorithmen (GA) ermöglichen die gleichzeitige Optimierung eines Prozesses auf unterschiedliche Prozessziele hin und sind sehr gut für komplexe Optimierungsaufgaben geeignet. Genetische Algorithmen wurden nach dem Vorbild der biologischen Evolution entwickelt. Die Prinzipien der Selektion und Variation wurden umgesetzt.

Der Algorithmus bildet hierfür eine künstliche Population. Jedes einzelne Individuum besitzt eine einzigartige Sequenz, in welcher die Designvariablen in kurzen Binärcodes (vergleichbar mit Genen) codiert werden. Jedes Individuum stellt eine mögliche Lösung des Optimierungsproblems im Variablenraum dar. Je besser eine Lösung ist, desto besser ist der Fitnesswert des jeweiligen Individuums. Die fittesten Individuen werden dann miteinander rekombiniert. Wobei gilt: je fitter ein Individuum ist, desto wahrscheinlicher ist dessen Fortpflanzung. Da mehrere Prozessziele optimiert werden, gibt es meist keine eindeutige optimale Lösung, um das Optimierungsproblem

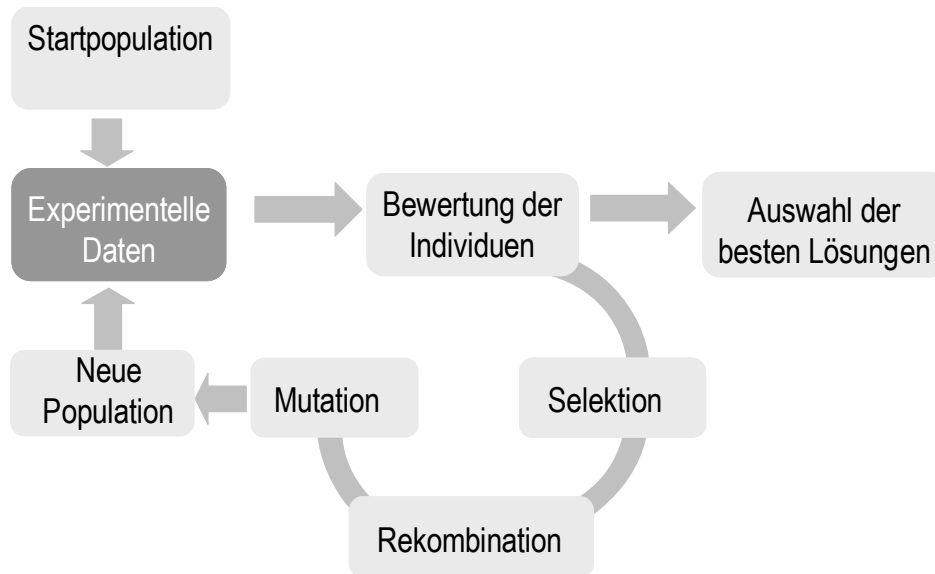


Abbildung 10.4.3: Prinzipielles Ablaufschema eines Genetischen Algorithmus.

1. Bildung einer zufälligen Startpopulation (Generation 1); 2. Bewertung der Individuen im Hinblick auf Zielfunktionen; 3. Selektion: Auswahl der Individuen, die für die Reproduktion in Frage kommen; 4. Rekombination der Sequenzen der selektierten Individuen; 5. Mutation: Zufällige Veränderung der Sequenzen der neuen Generation; 6. Auswahl der besten Lösung

zu lösen. Es ist erforderlich, ein Qualitätskriterium zu finden, das die verschiedenen Zielfunktionen berücksichtigt. Ein solches Kriterium ist das der Pareto-Dominanz. Ein Individuum dominiert ein anderes Individuum, wenn es in allen Zielfunktionen überlegen oder gleich ist und in mindestens einer Zielfunktion überlegen ist. Individuen, die

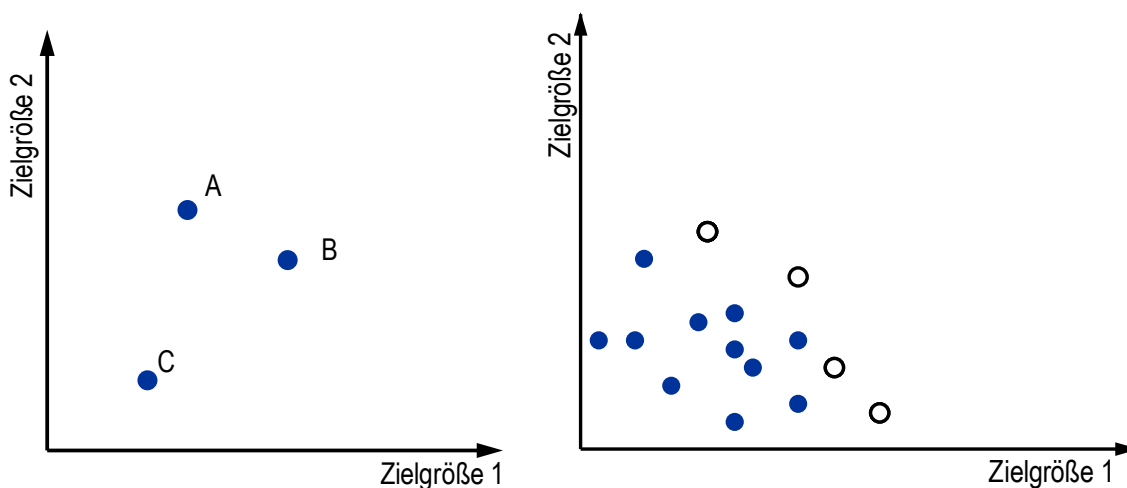


Abbildung 10.4.4: Prinzip der Pareto-Dominanz für ein Maximierungsproblem. Lösung A dominiert Lösung C, da es in beiden Zielfunktionen überlegen ist. C wird auch von B dominiert. Keine Dominanz liegt zwischen A und B vor, da beide in jeweils einer Zielfunktion überlegen sind. Ausbildung einer Paretofront für ein Maximierungsproblem. Dunkle Punkte stellen nicht-dominierte, pareto-optimale Lösungen dar. Helle Punkte werden von mindestens einer anderen Lösungen dominiert. (nach Link und Weuster-Botz, 2006)

von keinem anderen Individuum dominiert werden, werden als pareto-optimal bezeichnet und diese nicht-dominierten Individuen bilden gemeinsam eine sogenannte Paretofront (siehe Abbildung 10.4.4 (Zitzler und Thiele, 1999)).

#### *Strength Pareto Evolutionary Algorithm (SPEA)*

Eine Variante genetischer Algorithmen ist der ‚*Strength Pareto Evolutionary Algorithm*‘ (*SPEA*). Dieser Algorithmus benötigt nur eine geringe Anzahl an Individuen und ist aus diesem Grund sehr gut zur Medienoptimierung einsetzbar. (Zitzler und Thiele, 1999)

Ein wichtiges Charakteristikum vom *SPEA* ist, dass nicht-dominierte Lösungen separat in einer externen Population gespeichert werden. Die Zahl nichtdominierter Lösungen wird mit Hilfe eines Clustering-Verfahrens begrenzt. Die ursprüngliche Generation wird als interne Population bezeichnet. Die Bewertung der Individuen erfolgt anhand der Relation zwischen interner und externer Population. Die Beziehung der Individuen einer Population (intern oder extern) untereinander ist für die Bewertung ohne Bedeutung

#### 10.4.4 Softwaretool Game.opt

Die Versuchsplanung der Optimierung wurde mit dem am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik (TU München) entwickelten Softwaretool *GAME.opt* durchgeführt (Link und Weuster-Botz, 2006). *GAME.opt* basiert auf einem Genetischen Algorithmus des Typs „Strength Pareto Evolutionary Algorithm“ (*SPEA*) (Zitzler und Thiele, 1999). und ermöglicht Nutzern ohne Expertenwissen eine Mehrzieloptimierung durchzuführen.

#### *Durchführung*

##### *1. Erstellung eines neuen Projekts und Festlegen der Projektinformationen*

Alle festgelegten Designvariablen werden mit Einheit, niedrigster Wert, höchster Wert eingetragen. Durch gewünschte Anzahl der Bits pro Variable wird die Schrittweite und somit die Anzahl Stufen zwischen dem niedrigsten und dem höchsten Wert berechnet. Beispielsweise ermöglichen 3 Bits die Codierung von 23, also 8 Stufen. Dies bedeutet, dass es sechs Zwischenstufen zwischen den Grenzwerten geben wird.

In diesem Schritt ist zu beachten, dass je größer die Anzahl der Variablen und Bits, desto mehr Individuen und Generationen werden benötigt, um gute Optimierungsziele zu erreichen.

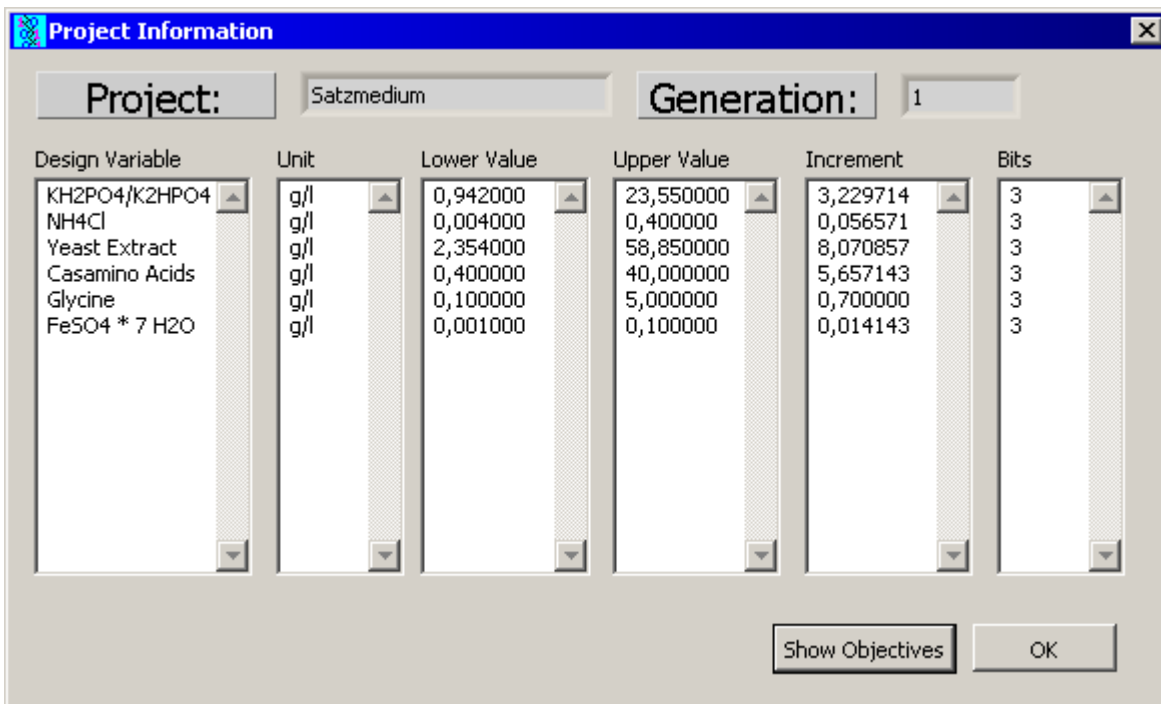


Abbildung 10.4.5: Darstellung der Projektinformationen im Softwaretool GAME.opt.

## 2. Eingabe der Zielfunktionen

Anzahl und Bezeichnung der Zielfunktionen werden definiert.

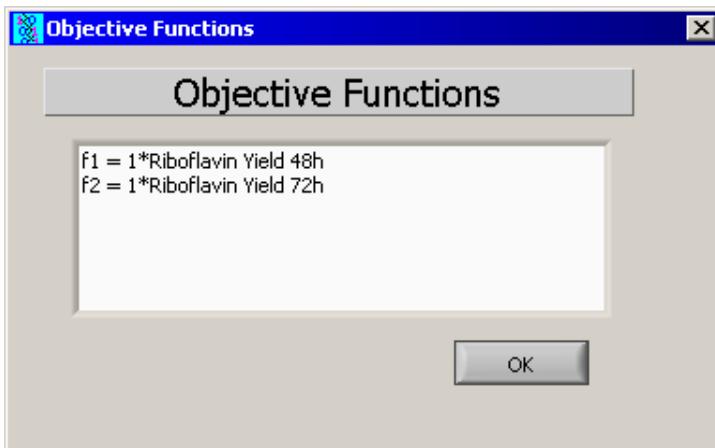


Abbildung 10.4.6: Darstellung der Zielfunktionen im Softwaretool GAME.opt.

## 3. Erstellung der Startpopulation

Das Programm erstellt die 1. Generation. Die Werte der einzelnen Individuen können nun in eine Text-Datei exportiert und in *Microsoft Excel* zur weiteren Verarbeitung geöffnet werden.

- 
4. *Eingabe der Ergebnisse und Erstellung der externen Population (Selektion)* Die Resultate der Versuche werden eingegeben. *GAME.opt* erstellt eine Archivpopulation.
  5. *Generierung der Nachfolge-Generation (Rekombination und Mutation)* Das Programm stellt sicher, dass kein Individuum erneut in einer Generation auftaucht.
  6. *Sprung zu Schritt 4*