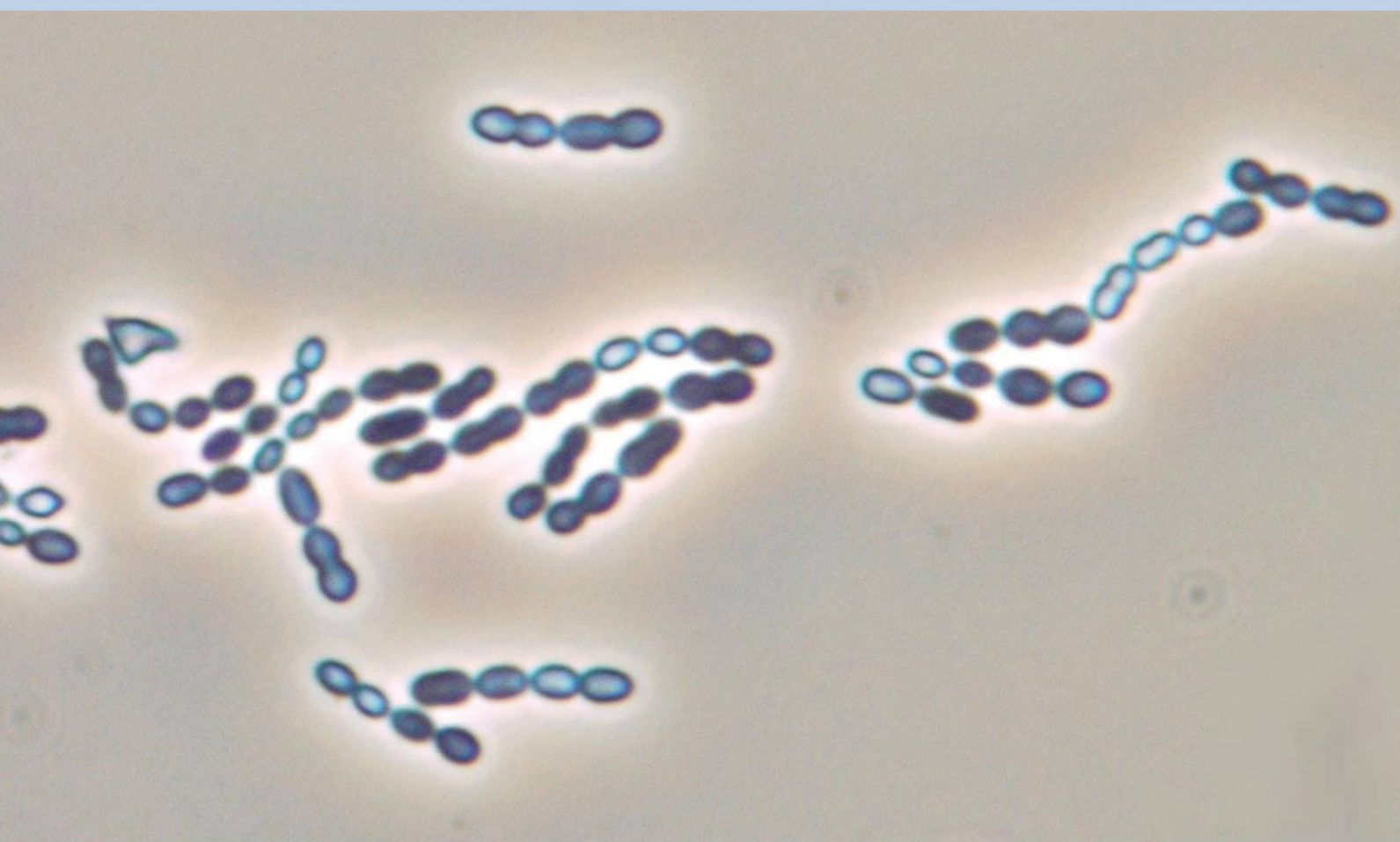


Dorothee Barth

**Mathematische Analyse eines
biotechnologischen Prozesses am
Beispiel der Fermentation von
Streptococcus thermophilus
als Starterkultur**



Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

**Mathematische Analyse eines
biotechnologischen Prozesses am
Beispiel der Fermentation von
Streptococcus thermophilus
als Starterkultur**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Ingenieurwissenschaften

(Dr.-Ing.)

der Technischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Dipl.-Ing. Dorothee Barth

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen: Cuvillier, 2011

Zugl. -Kiel, Univ., Diss., 2011

978-3-86955-802-8

1. Gutachter

Prof. Dr.-Ing. Helmut Röck

2. Gutachter

Prof. Dr.-Ing. Oliver Sawodny

Datum der mündlichen Prüfung

18. Februar 2011

© CUVILLIERiVERLAG, Göttingen 2011

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2011

Gedruckt auf säurefreiem Papier

978-3-86955-802-8

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr.-Ing. Helmut Röck, dem Inhaber des Lehrstuhls für Automatisierungs- und Regelungstechnik an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, für die Betreuung dieser Arbeit.

Prof. Dr.-Ing. Oliver Sawodny vom Institut für Systemdynamik der Universität Stuttgart danke ich für die Übernahme des Koreferates und die schnelle Anfertigung des Gutachtens.

Die Laborarbeiten wären ohne Manuela Lieb nicht möglich gewesen. Vielen Dank für die zahlreichen Anregungen, für die Bereitschaft, alles noch ein bisschen genauer zu machen, und für das gelegentliche Gewähren eines Refugiums!

Meinen Kollegen und Kolleginnen am Lehrstuhl ein Dankeschön für das angenehme Arbeitsklima, die gute Zusammenarbeit und das freundliche Miteinander.

Dem gesamten Team der Bibliothek ein großer Dank für die Unterstützung bei der Suche und Beschaffung von Literatur, für die netten Gespräche und für das Aufnehmen meiner Pflanzen nach meiner Kieler Zeit.

Kourosh Kolahi und Klaus Lebert gilt besonderer Dank für die zahlreichen Diskussionen und Anregungen zu meiner Arbeit, die mich schließlich einen roten Faden haben finden lassen.

Inge Baumann und Silke Marquardt-Hansen ein herzliches Dankeschön für die Unterstützung mit den verwaltungstechnischen Angelegenheiten und die aufmunternden Worte, besonders in der Zeit vor meiner Disputation.

Allen Kollegen und Studierenden an der Technischen Fakultät möchte ich herzlich für die nette Aufnahme in Kiel und die anregenden fach- und nichtfachlichen Gespräche danken.

Ein besonderer Dank an meine Eltern, Brüder, Lieblingsschwägerinnen und Nichte für die moralische Unterstützung. Kiitos myös Samille että olet niin söpö!

Abstract

The industrial cultivation process of *Streptococcus thermophilus* as starter culture for dairy industry is still highly determined by traditional process procedures, heuristic optimization methods and manual process control. In order to implement modern and innovative methods for process development and control, a mathematical model of the underlying dynamics is necessary.

The analysis of the cultivation of *Streptococcus thermophilus* shows, that the process dynamics are determined by the three state variables cell count, concentration of the substrate lactose and product lactate, respectively. The model consists of mathematical expressions for the description of each state dynamics.

As most important quality criterion of the starter, the concept of acidification activity was analyzed. It was possible to incorporate a mathematical description of the acidification activity into the model by setting it into relation with the lactate production rate of the process at time of sample taking.

The parameter identification is conducted by creating a hybrid of Genetic Algorithm and Downhill-Simplex. This hybrid algorithm is able to estimate the parameters in a robust and automated way, albeit high nonlinearities, noisy measurements, and parameter correlations that the problem poses.

The model structure is shown to be valid also for changed process parameters, can be transferred to fed-batch experiments by adding an input and also applied for further strains of *Streptococcus thermophilus*. The parameter estimation method thereby proves to give reliable results without change in the problem statement being necessary.

With the proposed model and parameter identification algorithm, innovative model-based optimization and process control methods can be implemented and easily transferred to different strains of *Streptococcus thermophilus*. Although the system is not observable, the model enables online monitoring of the starter's acidification activity through the established relationships.

Kurzfassung

Der industrielle Prozess zur Kultivierung von *Streptococcus thermophilus* als Starterkultur der Milchindustrie ist noch immer gekennzeichnet durch traditionelle Prozessverläufe, heuristische Optimierungsmethoden und manuelle Prozesssteuerung. Um moderne und innovative Methoden der Prozessentwicklung und -regelung anwenden zu können, ist ein mathematisches Modell dieses Systems notwendig.

Die Analyse des Kultivationsprozesses von *Streptococcus thermophilus* zeigt, dass die Dynamik durch die drei Systemzustände Keimzahl, Konzentration des Substrats Lactose sowie des Produkts Lactat bestimmt wird. Das Prozessmodell setzt sich somit aus Differentialgleichungen zur Beschreibung dieser drei Systemzustände zusammen.

Das wichtigste Qualitätsmerkmal einer Starterkultur ist ihre Säuerungsaktivität. Durch eine mathematische Beschreibung der Aktivität in Abhängigkeit der Lactatproduktionsrate ist es möglich, diese Eigenschaft in das mathematische Modell zu integrieren.

Die Parameteridentifikation wird durch einen Hybrid aus Genetischem Algorithmus und Downhill-Simplex durchgeführt. Dieser Hybrid ist in der Lage, das Problem der Parameterschätzung trotz Nichtlinearitäten des Modells, Messrauschen und Parameterkorrelationen robust und automatisiert zu lösen.

Die Modellstruktur lässt sich auf Prozesse mit veränderten Prozessparametern, auf weitere Stämme des Bakteriums *Streptococcus thermophilus* und auf Fed-Batch Experimente übertragen. Die Parameterschätzmethode gibt dabei verlässliche Ergebnisse, ohne dass der Algorithmus dem Problem neu angepasst werden muss.

Das Modell in Verbindung mit der Parameterschätzmethode ermöglicht damit die Anwendung moderner Verfahren der Regelungstechnik und Prozessoptimierung auf die Herstellung von *Streptococcus thermophilus* als Starterkultur.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	<i>Streptococcus thermophilus</i>	4
2.1	Starterkulturen	5
2.2	Milchsäurebakterien	5
2.3	<i>Streptococcus thermophilus</i>	7
2.3.1	Stoffwechsel von <i>Streptococcus thermophilus</i>	8
2.3.2	Vermehrung von <i>Streptococcus thermophilus</i>	10
2.4	Herstellung von <i>Streptococcus thermophilus</i> als Starterkultur . . .	12
2.4.1	Industrielle Herstellung	12
2.4.2	Fermentationsverlauf	15
2.4.3	Wichtige Kenngrößen des Starters	15
3	Experimentelle Versuchsdurchführung	18
3.1	Organismus	18
3.2	Vorkultur	19
3.3	Medium	19
3.4	Fermentationsbedingungen	21
3.5	Fermenter und Prozessumgebung	22
3.6	Online-Messdaten	24

3.6.1	pH-Messung	25
3.6.2	Laugenzugabe zum Medium	25
3.6.3	Leitfähigkeit	25
3.7	Offline-Analysen	26
3.7.1	Zucker und organische Säuren	26
3.7.2	Keimzahl	27
3.7.3	Aktivität	29
3.8	Datennachbearbeitung	31
3.8.1	Splines	31
3.8.2	Vorglätten der Messdaten	33
3.8.3	Glättung der Messdaten	34
4	Modellbildung	37
4.1	Allgemeines zur Modellbildung	37
4.2	Modellierung des Fermentationsprozesses	39
4.2.1	Bakterienwachstum	40
4.2.2	Lactoseaufnahme und Lactatproduktion	48
4.2.3	Kenngößen des Mediums	53
4.2.4	Aktivität	55
4.2.5	Gesamtmodell für den Fermentationsprozess	59
4.3	Untersuchung der Modellstruktur bei verändertem pH-Wert	61
4.3.1	Dynamische Größen	62
4.3.2	Aktivität	65
4.4	Simulationen	66
5	Parameteridentifizierung	69
5.1	Formulierung der Parameterschätzaufgabe	70

5.1.1	Gütekriterium	71
5.1.2	Messfehler	73
5.1.3	Minimierung des Gütekriteriums	76
5.2	Sensitivität, Identifizierbarkeit und Korrelation der Parameter . .	76
5.2.1	Untersuchungsmethoden	77
5.2.2	Ergebnisse der Untersuchungen	83
5.3	Optimierungsalgorithmen	89
5.3.1	Globale und lokale Optimierung	91
5.3.2	Genetische Algorithmen	91
5.3.3	Downhill-Simplex-Algorithmus	97
5.3.4	Hybridbildung	102
5.4	Durchführung der Parameterschätzung	107
5.4.1	Aufstellung des Parameterschätzproblems	107
5.4.2	Diskussion der Ergebnisse der Parameterschätzung	111
5.4.3	Automatisierter Ablauf der Parameterschätzung	116
5.4.4	Parameterwerte	116
6	Modellvalidierung	119
6.1	Ergebnisse für den pH-Wert 6.0	119
6.1.1	Veränderung der Anfangslactosekonzentration	119
6.1.2	Veränderung der Inokulationsmenge	120
6.2	Ergebnisse für die pH-Werte 5.7 und 6.3	120
7	Übertragung der Methodik	132
7.1	Fed-Batch-Experimente	132
7.2	<i>Streptococcus thermophilus</i> 782	135
8	Zusammenfassung und Ausblick	144

Inhaltsverzeichnis

8.1 Zusammenfassung	144
8.2 Ausblick	147
A Liste der Experimente	149
B Beispielgleichung der Sensitivitätsfunktionen	151
Literaturverzeichnis	i

Abbildungsverzeichnis

2.1	Mikroskopische Aufnahme von <i>Streptococcus thermophilus</i>	4
2.2	Mikroskopische Aufnahmen von <i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> und <i>Oenococcus oeni</i>	6
2.3	Spaltung des Disaccharids Lactose in die Monosaccharide Galactose und Glucose	8
2.4	Die Glucose wird in einer Kette von Reaktionen über Pyruvat zu Lactat umgewandelt und ausgeschieden	10
2.5	Vereinfachte Darstellung des zentralen Stoffwechsels von <i>Streptococcus thermophilus</i>	11
2.6	Vermehrung von <i>Streptococcus thermophilus</i>	11
2.7	Joghurtherstellung	13
2.8	Verfahrensschritte zur industriellen Herstellung von Milchsäurebakterien als Starterkulturen	14
2.9	Typischer Fermentationsverlauf der Kultivierung von <i>Streptococcus thermophilus</i>	16
3.1	Fermenter mit Anschlüssen und Sonden	23
3.2	Biotechnologische Versuchsanlage	24
3.3	Agarplatte mit Kolonien von <i>Streptococcus thermophilus</i>	28
3.4	Versuchsaufbau zur Aktivitätsbestimmung	30
3.5	Approximation der Messwerte der elektrolytischen Leitfähigkeit κ durch Splines mit $\lambda = 0.98$	34

3.6	Vergleich der Approximation der Daten einer Keimzahlbestimmung mit und ohne Gewichtung der Messpunkte	35
4.1	Formale Beziehung zwischen realem System und dessen Beschreibung durch ein mathematisches Modell	38
4.2	Unterscheidung von segregierten und nichtsegregierten sowie strukturierten und nichtstrukturierten Modellen	39
4.3	Unterscheidung der Wachstumsphasen der Bakterienkultur	41
4.4	Vermehrung der Bakterien durch Zweiteilung	42
4.5	Spezifische Wachstumsgeschwindigkeit aufgetragen über der Lactatkonzentration im Vergleich zur Modellkurve	44
4.6	Aufteilung der vitalen Bakterienpopulation in eine Population wachsender Zellen und eine Population nichtwachsender Zellen	45
4.7	Nicht am Wachstum beteiligte Biomasse während der Lag-Phase	47
4.8	Unterscheidung der Phasen der Substrataufnahme und Produktausscheidung	49
4.9	Modellvorstellung des Zellstoffwechsels	49
4.10	Zusammenhang zwischen spezifischer Lactoseaufnahme und spezifischer Wachstumsgeschwindigkeit	51
4.11	Zusammenhang zwischen spezifischer Lactatproduktion und spezifischer Wachstumsgeschwindigkeit	52
4.12	Laugen- und Lactatkonzentration	54
4.13	Leitfähigkeit und Lactatkonzentration	55
4.14	Säuerungskurven für die Aktivitätsbestimmung	56
4.15	Vergleich der Verläufe von Aktivität und Lactatproduktionsrate	58
4.16	Aktivität über Lactatproduktionsrate	59
4.17	Vergleich der Verläufe von Aktivität und Keimzahl sowie Wachstumsgeschwindigkeit	60
4.18	Inhibierung des Wachstums durch Lactat bei verschiedenen pH-Werten	63

4.19	pH-Abhängigkeit der wachstumsassoziierten Parameter	64
4.20	pH-Abhängigkeit der biomasseassoziierten Parameter	64
4.21	Aktivität einer Probe, die zum Zeitpunkt der maximalen Lactat- produktionsrate der Bakterienkultur entnommen wurde.	65
4.22	Vorläufige Simulationsergebnisse	67
5.1	Blockdiagramm der Parameterschätzung	70
5.2	Auszählergebnisse der Mehrfachbestimmung der Keimzahlanalyse	74
5.3	Abweichungen vom Mittelwert der Keimzahlbestimmung bei li- nearem Maßstab	75
5.4	Abweichungen vom Mittelwert der Keimzahlbestimmung bei lo- garithmischem Maßstab	75
5.5	Sensitivität der Zustandsgrößen bezüglich des Parameters t_w . . .	86
5.6	Sensitivität der Zustandsgrößen bezüglich des Parameters β_p . . .	87
5.7	Codierung von möglichen Lösungen als binäre Strings	92
5.8	Rekombination zweier Individuen mit einer und zwei Bruchstellen	94
5.9	Mutation in einem Bit und durch Negierung der gesamten Sequenz	94
5.10	Ablaufdiagramm des Genetischen Algorithmus	96
5.11	Ablaufschema der Iterationen des Nelder-Mead-Algorithmus . . .	101
5.12	Nelder-Mead Algorithmus am Beispiel eines 2-dimensionalen Sim- plex	102
5.13	Drei Ansätze zur Bildung eines konsekutiven Hybrids	104
5.14	Bildung einer neuen Generation durch einen Hybriden aus Gene- tischem Algorithmus und Simplex-Operationen	105
5.15	Konvergenz der Schätzalgorithmen anhand der durchschnittlichen besten Fitness einer Generation	112
5.16	Konvergenz der Schätzalgorithmen anhand der durchschnittlichen besten Fitness einer Generation	113
5.17	Simulationsergebnisse mit geschätzten Parametern	114

5.18	Relative Abweichung vom Medianwert aus 50 Durchläufen der Parameterschätzung	115
5.19	Ablauf der Parameterschätzung	117
6.1	Vergleich von Simulation und Messergebnissen, pH 6.0, normale Lactosekonzentration zu Beginn der Fermentation	121
6.2	Vergleich von Simulation und Messergebnissen, pH 6.0, verringerte Lactosekonzentration zu Beginn der Fermentation	122
6.3	Vergleich von Simulation und Messergebnissen, pH 6.0, ohne zusätzliche Lactosezugabe zum Medium	123
6.4	Vergleich von Simulation und Messergebnissen, pH 6.0, 2%ige Inokulation	124
6.5	Vergleich von Simulation und Messergebnissen, pH 6.0, 0.5%ige Inokulation	125
6.6	Vergleich von Simulation und Messergebnissen, pH 5.7, 2%ige Inokulation	126
6.7	Vergleich von Simulation und Messergebnissen, pH 5.7, 1%ige Inokulation	127
6.8	Vergleich von Simulation und Messergebnissen, pH 5.7, 0.5%ige Inokulation	128
6.9	Vergleich von Simulation und Messergebnissen, pH 6.3, 2%ige Inokulation	129
6.10	Vergleich von Simulation und Messergebnissen, pH 6.3, 1%ige Inokulation	130
6.11	Vergleich von Simulation und Messergebnissen, pH 6.3, 0.5%ige Inokulation	131
7.1	Vergleich von Simulation und Messergebnissen, pH 6.0, Zugabe von Lactosepulsen während der Fermentation	134
7.2	Vergleich von Simulation und Messergebnissen, pH 6.0, kontinuierliche Zugabe von Lactose.	136
7.3	Vergleich von Simulation und Messergebnissen, pH 6.0, Zugabe von einem Lactatpuls während der Fermentation	137

7.4	Fermentationsverlauf der Kultivierung von <i>Streptococcus thermophilus</i> 782	138
7.5	Vergleich von Simulation und Messergebnissen, <i>Streptococcus thermophilus</i> 782, 4%ige Inokulation	140
7.6	Vergleich von Simulation und Messergebnissen, <i>Streptococcus thermophilus</i> 782, 2%ige Inokulation	141
7.7	Vergleich von Simulation und Messergebnissen, <i>Streptococcus thermophilus</i> 782, 1%ige Inokulation	142

Symbolverzeichnis

Lateinische Buchstaben

a	Steigung
A	Aktivität
b	Beschränkungen
c	Stoffkonzentration
c	Polynomkoeffizienten der Splines
\mathbf{C}	Kovarianz
D	Einschränkungen
E	Erwartungswert
$f(\dots)$	Systemfunktion
\mathbf{F}	Fisher-Informations-Matrix
\mathbf{G}	lineare Nebenbedingungen
$g(\dots)$	Eingangsfunktion
$h(\dots)$	Ausgangsfunktion
I	Inhibitionsterm
\mathbf{I}	Einheitsmatrix
k	kinetische Konstanten, Proportionalitätsfaktoren
K	Anzahl der Parameter
l	Anzahl der Abschnitte in Splines
m, g	Parameter zur Einstellung von Gewichtungsfaktoren
m	Anzahl der Eingänge
n	Ordnung eines Parameterschätzproblems
N	Anzahl der Messpunkte