

Bachelorarbeit

Fakultät Life Sciences
Studiendepartement Biotechnologie

Migration des Datenerfassungs- und Steuerungssystems
für Bioreaktoren MFCS/win und exemplarische Kultivie-
rung von *E. coli* BL21 nach dem i²HCDC-Verfahren

Marlon Scheffler

5. Juni 2019

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Hamburg, den 5. Juni 2019

Ort, Datum, Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

Symbolverzeichnis	IV
Besondere Schriften und Hervorhebungen	V
1 Einführung und Zielsetzung	1
2 Theoretische Grundlagen	3
2.1 Multi Fermentor Control System for Windows – MFCS/win	3
2.1.1 Programmstruktur	4
2.1.2 Datenstruktur	6
2.1.3 .ini-Dateien	7
2.1.4 Kommunikation zwischen Client und Server	7
2.1.5 Benutzer und Zugriffsrechte	7
2.2 Der Hochzelldichte-Kultivierungsprozess i ² HCDC	8
3 Upgrade des MFCS-Systems	11
3.1 Vorhandene Hardware und Verwendung	11
3.1.1 Bioreaktoren und Labornetzwerk	11
3.1.2 RS-232-LAN-Konverter	13
3.1.3 Prozessleitrechner	14
3.1.4 Bedienkonzept	14
3.1.5 Risikoeinschätzung	15
3.2 Entwicklung eines neuen Bedienkonzepts	16
3.2.1 Virtuelle Testumgebungen	16
3.2.2 Schema für Benutzerkonten	16
3.2.3 Client-basierte Bedienung	17
3.3 Einrichten des MFCS-Servers und Migration der Datenbanken	19
3.3.1 Hardware-Sicherheit	19
3.3.2 Systemeinstellungen	19
3.3.3 Installation von MFCS/win (Server)	22
3.3.4 Treiberinstallation und -konfiguration	22
3.3.5 Datenmigration	23
3.4 Setup und Anbindung eines MFCS-Clients	27
3.4.1 Voraussetzungen	27
3.4.2 Zugriff auf den Server einrichten	27

3.4.3	Installation von MFCS/win (Client)	28
3.4.4	Verbinden des Clients mit dem MFCS-Server	28
3.4.5	Installation weiterer Software	29
3.5	Funktionstest	29
4	Exemplarische Hochzelldichte-Kultivierung nach der Datenmigration	30
4.1	Material und Methoden	30
4.1.1	Stamm und Stammhaltung	30
4.1.2	Kulturmedium	30
4.1.3	Geräte und Material	32
4.1.4	Probenahme	32
4.1.5	Off-line-Analytik	33
4.1.6	On-line-Analytik	34
4.2	i ² HCDC-Kultivierung und Ergebnisse	36
4.2.1	Verlauf des Zellwachstums	36
4.2.2	Analyse des Systemverhaltens	39
4.2.3	Einfluss des neuen Bedienkonzepts	44
5	Zusammenfassung und Ausblick	46
5.1	Server-Client-Prinzip und Flexibilität der Bedienung	47
5.2	Benutzerkonten	48
5.3	Weitere Sicherheitsmaßnahmen	49
5.4	MFCS/win-Server und Windows 10	51
	Quellenverzeichnis	52

Symbolverzeichnis

Symbol	Beschreibung	Einheit
ΔOD	Optische Dichtedifferenz (gemessen bei 600 nm)	-
λ	Wellenlänge	nm
ϑ	Temperatur	°C
$F_{O_2, in}$	O ₂ -Volumenstrom in den Reaktor; geregelt durch MFC.	mL min ⁻¹
$F_{R, max}$	maximale Förderrate der Feedpumpe	mL min ⁻¹
$F_{R, rel}$	Förderrate der Feedpumpe relativ zu $F_{R, max}$	-
F_R	Förderrate der Feedpumpe	mL min ⁻¹
F_{air}	Begasungsrate des Reaktors	L min ⁻¹
N_{stirr}	Rührerdrehzahl	min ⁻¹
μ_{crit}	spezifische Wachstumsrate, ab der vermehrt wachstumsinhibierende Metabolite gebildet werden.	h ⁻¹
μ_{max}	maximale spezifische Wachstumsrate	h ⁻¹
μ_{set}	vorgegebene spezifische Wachstumsrate	h ⁻¹
c_{Glc}	Glucosekonzentration	g L ⁻¹
$f_{X/OD}$	Umrechnungsfaktor zw. Biotrockenmassekonzentration und optischer Dichtedifferenz	g L ⁻¹
f_d	Verdünnungsfaktor	-
$q_{Glc/X, m}$	Spezifische Glucoseverbrauchsrate für Erhaltungsstoffwechsel	g g ⁻¹
$y_{X/Glc, g}$	Glucoseausbeutekoeffizient, der nur Substratverbrauch für Biomassebildung (g = growth) berücksichtigt	g g ⁻¹
$y_{X/Glc}$	Glucoseausbeutekoeffizient, der Substratverbrauch für sowohl Biomassebildung als auch Erhaltungsstoffwechsel berücksichtigt	g g ⁻¹
$x_{O_2, in}$	Sollwert der Sauerstoffsättigung in der Zuluft des Reaktors.	%
OD_{med}	OD des ggf. verdünnten Mediums	-
OD_{smp}	OD der ggf. verdünnten Probe	-
$pO_2\%$	relativer Sauerstoffpartialdruck im Medium	%

Besondere Schriften und Hervorhebungen

In diesem Dokument verwendete Schriftarten und Formatierungen.

Der Normale Text dient jeweils als Vorlage. Als Merkmale sind lediglich die Unterschiede zum normalen Text aufgeführt.

Kategorie	Beispiel	Merkmale
Normaler Text	Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipisicing elit, sed eiusmod tempor incididunt ut labore et dolore magna aliqua. Ut enim ad minim veniam, quis nostrud exercitation ullamco laboris nisi ut aliquid ex ea commodi consequat.	Font: Open Sans Familie: sans-serif Stärke: normal Lage: recte Größe: 12
Fachbegriffe Eigennamen sonst. Hervorhebungen	<i>Legacy-Feature</i> <i>TeamViewer, CTA</i>	Lage: kursiv
Pfadangaben		Familie: typewriter
Netzwerkpfade (UNC)	 Server ▶ Freigabe ▶ Ordner	
Lokale Pfade	 C: ▶ MFCS_win ▶ TASKS  C: ▶ MFCS_win ▶ Database ▶ MFCSCONF.MDB	
Computerpfade	 Domain \ Computer (oder  Computer)	
Benutzerpfade	 Domain \ Benutzer (oder  Benutzer)	
Menüs und Schaltflächen	... Dialogfeld mit <input type="button" value="Ja"/> und <input type="button" value="Nein"/> ... Menüpunkt <input type="button" value="Datei"/> >> <input type="button" value="Speichern unter..."/>	Rahmen, guillemet-förmige Lücken bei Untermenüs
Befehle über den Ausführen-Dialog von Microsoft Windows	 + <input type="button" value="R"/> <input type="text" value="Eingabe in Befehlsfeld"/>	Familie: typewriter visualisierte Tasten

1 | Einführung und Zielsetzung

Die Prozessautomatisierung spielt in weiten Bereichen der Industrie eine tragende Rolle. Sie sorgt bei verschiedensten Abläufen für Berechenbarkeit und Wiederholbarkeit und reduziert die erforderliche manuelle Interaktion, sodass die Prozesse auch ohne einen anwesenden Bediener zuverlässig fortlaufen können. Biotechnologische Kultivierungsprozesse kommen angesichts der hohen Ansprüche an Qualität und Effizienz der Produktion kaum noch ohne Automatisierungstechniken aus. Diese reichen von vergleichsweise einfachen Regelsystemen zum Einstellen und Halten der Kultivierungsbedingungen bis hin zu vollautomatischen Produktionsanlagen mit vielen sequentiellen sowie parallelen Prozessschritten.

Die Kontrolle über die Sensoren, Regler und Aktoren des Systems kann von einem zentralen Prozessleitsystem übernommen werden, das dem Anwender eine Übersicht der Prozessdaten und Möglichkeiten zur Steuerung zur Verfügung stellt. Dieser Anwendungstypus wird allgemein als Supervisory Control and Data Acquisition (SCADA) bezeichnet und wird oft als Software auf einem Computer realisiert.

Das Labor für Bioverfahrenstechnik am Campus Bergedorf der HAW Hamburg ist mit mehreren Bioreaktoren ausgestattet, die – ebenso wie die an den Prozessen beteiligte Peripherie – über verschiedene Kommunikationswege von einem zentralen Prozessleitsystem gesteuert werden können. Der Prozessleitreechner des Labors nutzt die SCADA-Software Multi Fermentor Control System for Windows, Version 3.0 (MFCS/win) des Herstellers Sartorius Stedim Systems GmbH¹, die den Standard ANSI/ISA-88.01 (kurz S88) implementiert. Dieser beschreibt umfangreich alle Aspekte der chargenorientierten Prozessführung von den zu verwendenden Datenstrukturen über die Modellierung und Darstellung von Verfahrensrezepten bis hin zur Datenaufzeichnung. In einfachen Batch-Kultivierungen dient MFCS/win hauptsächlich zur Protokollierung und Visualisierung der Prozessparameter, beim Fed-Batch-Verfahren – wie es auch für die Hochzelldichte-Kultivierung i²HCDC eingesetzt wird – wird auch von den Steuerungsmöglichkeiten Gebrauch gemacht, um beispielsweise die Nachfütterrate exponentiell zu erhöhen.

Eine aktualisierte Version von MFCS/win war auf einem leistungsfähigeren PC unter neuerem Betriebssystem zu installieren, sodass auch eine höhere Sicherheit gegenüber Schadsoftware besteht. Die bisher aufgezeichneten Kultivierungsdaten, die Gerätekonfigurationen und die bestehenden S88-Rezepte mit mehreren hundert Variablen und Berechnungsformeln sollten weiterhin genutzt werden können, da eine Neueinrichtung einen erheblichen Aufwand bedeutet hätte.

¹Teil der Sartorius AG, im Folgenden vereinfacht zu Sartorius

Um einen möglichst nahtlosen Übergang vom alten auf das neue System zu realisieren, mussten einige Systemeinstellungen des neuen Prozessleitrechners angepasst und die MFCS-Datenbanken übertragen werden. Die Migration wurde anschließend durch eine Kultivierung nach dem i²HCDC-Verfahren überprüft. Diese nutzt einen großen Teil der in MFCS/win hinterlegten Berechnungsformeln und folgt einem mehrstufigen S88-Rezept mit einer Laufzeit von ca. 28 Stunden. Bei erfolgreichem Durchlaufen des Prozesses sollte das neue System seine Nutzbarkeit hinreichend unter Beweis gestellt haben.

2 | Theoretische Grundlagen

2.1 Multi Fermentor Control System for Windows – MFCS/win

Die MFCS/win SCADA-Software wird seit über 25 Jahren von Sartorius entwickelt und ist mit über 3000 Installationen [1] eine weit verbreitete Software zur Steuerung von Bioprozessen. Das Lizenzmodell von Sartorius ermöglicht es, MFCS/win für verschiedene Anzahlen von steuerbaren Bioreaktoren zu erwerben. Außerdem kann in verschiedenen Stufen gewählt werden, von wie vielen Client-Computern gleichzeitig auf den Prozessleitrechner zugegriffen werden kann. Die vorliegende Version ist für die gleichzeitige Steuerung von acht Bioreaktoren und die Verbindung von fünf Clients lizenziert.

MFCS/win lässt sich in zwei Varianten installieren. Die Client-Variante¹ besitzt keine Funktionalitäten zur Steuerung und Messdatenerfassung von angeschlossener Hardware, sondern nur das sogenannte Front-End (Bedienoberflächen, Dateneingabe und -visualisierung) des Systems. Sie wird auf Computern (Clients) installiert, die über ein lokales Netzwerk mit dem Server verbunden sind, um diesen von verschiedenen Orten aus steuern zu können.

Die Server-Variante wird auf dem Prozessleitrechner installiert, welcher mit den Bioreaktoren und deren Peripherie verbunden ist und stellt das Back-End für die Datenaufzeichnungs- und Steuerungsaufgaben bereit. Sie beinhaltet ebenfalls ein Front-End, sodass der Server auch ohne dezidierten Client-Computer über alle nötigen Bedienoberflächen verfügt, um gewissermaßen als sein eigener Client im Stand-Alone-Betrieb genutzt werden zu können.

¹Sartorius bezeichnet diese Software-Variante als MFCS/win-Workstation; um die Nomenklatur einheitlich zu halten, wird im Folgenden aber immer der Ausdruck *Client* verwendet.

2.1.1 Programmstruktur

Die Software ist stark in ihrem Hauptverzeichnis (standardmäßig $C:\backslash MFCS_win$) verankert und verwaltet dort alle Daten und Einstellungen lokal. Dies ist ein deutlicher Unterschied zum Großteil herkömmlicher Software, die ihre Aktivitäten häufig auf diverse Verzeichnisse des Computers und auch die Windows-Registry verteilt. Die Nutzung von Windows-Features beschränkt sich bei MFCS/win auf UI-Elemente wie Fenster, Menüs und Schaltflächen, das Dateisystem und Netzwerkfreigaben. Diese Funktionen werden mit dem *Win32 API* dauerhaft von Microsoft unterstützt und bleiben auch in aktuellen Versionen von Windows zumindest als *Legacy-Feature* erhalten. Durch diese Unabhängigkeit werden Übersicht, Stabilität und Wartungsfreundlichkeit sowohl für die Entwickler als auch den Anwender verbessert.

MFCS/win ist in mehrere Module unterteilt, die auf dem Computer jeweils als eigenständige Prozesse ausgeführt werden und sich in die Kategorien Server und Client einordnen lassen. Sie sind bei beiden Varianten von MFCS/win im Ordner $TASKS$ des MFCS-Hauptverzeichnisses im Format *.exe* (Windows-Anwendung) oder *.MDB/.MDE* (Microsoft Access) gespeichert. In dieser Arbeit erwähnte Module bzw. Prozessnamen sowie deren Aufgaben sind neben weiteren, nicht explizit genannten Modulen in **Tabelle 2.1** zu finden. Die Server-Module werden dem Namen entsprechend nur für Server-Versionen von MFCS/win installiert und bilden gemeinsam das Back-End (den Kernel²) des Systems. Sie werden bereits beim Systemstart im Hintergrund ausgeführt, selbst wenn noch kein Benutzer am System angemeldet ist.

Die Client-Module übernehmen einzelne Aufgaben im Bereich der Benutzerinteraktion und bilden als Gesamtheit das Front-End. Sie sind sowohl bei Server- als auch Client-Installationen von MFCS/win verfügbar und werden über das Shell-Modul (siehe **Abbildung 2.1**) vom Benutzer gestartet. Client-Module kommunizieren mit den Server-Modulen, welche die Anfragen verarbeiten und Ergebnisse zurückliefern, sodass diese dem Benutzer durch das Client-Modul präsentiert werden können.

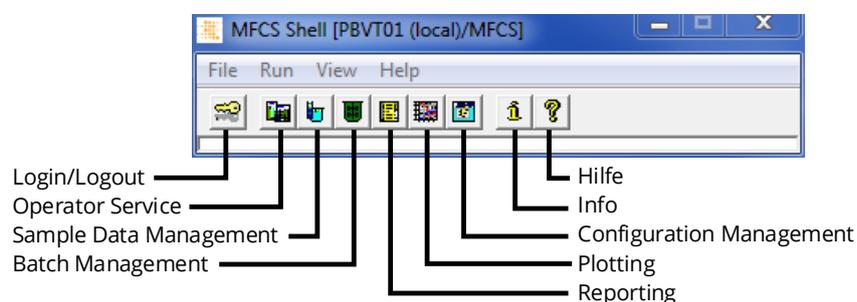


Abbildung 2.1: Screenshot der serverseitigen MFCS Shell

Die Shell-Anwendung ist der zentrale Ort zum Starten der Front-End-Module.

²Die Server-Module werden von Sartorius oft auch als Kernel-Module bezeichnet. Kernel und Back-End sind gleichbedeutend, Server kann das Gerät als solches oder auch die dortige MFCS-Installation meinen.

Tabelle 2.1: MFCS-Module

Modul	Klasse	Prozessname	Beschreibung
Module Loader	Server	MFCSLOD.EXE	Startet und stoppt Server-Module.
Memory Resident Datapool	Server	MFCSMRD.EXE	Beinhaltet und verwaltet alle on-line-Daten im Arbeitsspeicher und stellt das API zu Lesen und Schreiben für andere Module bereit.
DCU Serial Driver	Server	MFCSDSD.EXE	Treiber für die serielle Kommunikation mit Sartorius-DCUs.
DCU Ethernet Driver	Server	MFCSDDED.EXE	Treiber für die Ethernet-Kommunikation mit Sartorius-DCUs.
Alarm-Logger	Server	MFCSAEC.EXE	Protokolliert Alarmer und Benachrichtigungen, die beim Ablauf eines S88-Rezepts auftreten.
(on-line) Calculation Module	Server	MFCSCAL.EXE	Wendet hinterlegte Formeln auf Werte von Variablen an und speichert die Ergebnisse in anderen Variablen.
Online Profiler	Server	MFCSPRF.EXE	Berechnet Verlaufsprofile für Variablen, z. B. einen exponentiellen Anstieg oder ein Temperaturprofil für eine automatisierte Sterilisation.
Storage Module	Server	MFCSSSTO.EXE	Speichert on-line-Daten in die Batch-Datenbank.
Rezept-Prozessor	Server	MFCSS88C.EXE	Steuert den Ablauf von Prozessen entlang der definierten S88-Rezepte.
Shell	Client	MFCSSHL.EXE	Startet und stoppt Client-Module und meldet den Client am Server an.
Batch Report	Client	MFCSSBRP.MDB	MS Access-Anwendung zum Erstellen von Batch-Reports.
Configuration Manager	Client	MFCSCMA.MDE	MS Access-Anwendung zum Konfigurieren des gesamten Systems.
Batch Management	Client	MFCSBMA.EXE	Erstellen, Initialisieren und allgemeines Verwalten von Batches.
Operator Service	Client	MFCSSOPR.EXE	Konfigurierbare grafische Übersicht über Sensorwerte und Variablen.
Plotting Tool	Client	MFCSPLO.EXE	Erstellen von Graphen aus Prozesswerten nach oder auch während des Prozesses.
Sample Data Manager	Client	MFCSSDM.EXE	Verwalten von Probandaten. Ermöglicht das Eintragen von off-line gemessenen Werten.

Ein solches Client-Modul ist beispielsweise **MFCSOPR.EXE**, über das während einer Kultivierung die aktuellen Prozessgrößen beobachtet und ggf. Setpoints oder andere Variablen eingestellt werden können. Verschiedene Ansichten können in eigenen Unterfenstern geöffnet und frei angeordnet werden, sodass sich eine flexible Oberfläche zusammenstellen lässt. Es können auch die Daten mehrerer Prozesse gleichzeitig im Blick behalten werden, aufgrund der durch das Hauptfenster limitierten Fläche können jedoch möglicherweise nicht alle Unterfenster ohne Überlappung angeordnet werden.

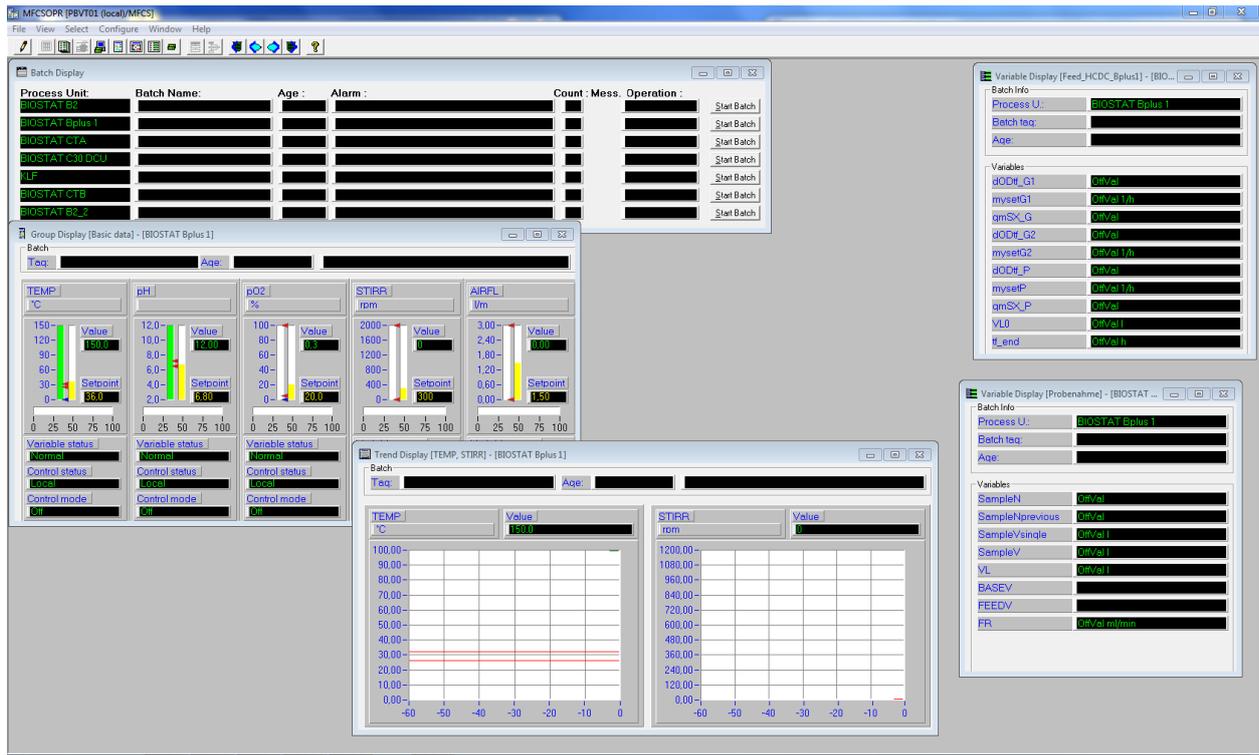


Abbildung 2.2: Screenshot des Moduls *Operator Service*
Innerhalb des Hauptfensters können verschiedene Unterfenster für zuvor konfigurierte Variablenansichten geöffnet und frei angeordnet werden.

2.1.2 Datenstruktur

Sämtliche Kommunikation der MFCS-Module untereinander erfolgt über den Memory Resident Datapool (MRD), den zentralen Speicher für on-line³-Daten des MFCS-Systems. Verwaltet wird der Speicher vom MRD-Modul **MFCSMRD.EXE**, welches allen anderen Modulen ein einheitliches Application Programming Interface (API) zum Lesen und Schreiben von Daten zur Verfügung stellt. Der Speicher beinhaltet alle Daten und Konfigurationen von MFCS/win, die beim Start des Kernels aus Microsoft Access-Datenbanken gelesen werden. Diese Datenbanken befinden sich als zugriffsgeschützte MDB-Dateien im (Server-)Programmverzeichnis von MFCS/win und dienen

³on-line in dem Sinne, dass die Daten für alle Module aller verbundenen Computer erreichbar sind.

lediglich als Ablage, solange der Kernel nicht läuft. Veränderungen an diesen Datenbanken werden nicht sofort wirksam, da dies zu Dateninkonsistenzen führen könnte. Wurde beispielsweise etwas an der Gerätekonfiguration geändert, werden diese neuen Einstellungen nur in die Access-Datenbank geschrieben. Damit sie wirksam werden, muss ein 'Configuration Update' initiiert werden, welches den Kernel (und damit auch das MRD-Modul) dazu veranlasst, herunterzufahren und beim Neustart die aktualisierte Konfigurationsdatenbank in den MRD einzulesen.

2.1.3 .ini-Dateien

Einige Einstellungen können für und von den Modulen selbst festgelegt werden. Diese Einstellungen sind nicht für den Kultivierungsprozess, sondern für die Arbeitsweise von MFCS/win relevant. Sie sind in zwei .ini-Dateien zu finden und können mit einem Texteditor angepasst werden, wobei einige der Einstellungen auch durch die Benutzeroberflächen verfügbar sind. Die MFCS.ini bietet Einstellungsmöglichkeiten für die Server-Module, während in der WKST.ini (WKST für Workstation, also Client) Optionen für die Client-Module gesetzt werden können. Beide .ini-Dateien befinden sich im Hauptverzeichnis der Server-Installation. Die Client-Version von MFCS/win bringt eine eigene WKST.ini mit, die beim Verbinden mit dem Server jedoch automatisch angepasst wird.

2.1.4 Kommunikation zwischen Client und Server

Für die Kommunikation zwischen einem Client und dessen Server wurde von Sartorius kein eigenes Netzwerkprotokoll entwickelt. Stattdessen basiert die Kommunikation auf dem Microsoft-Protokoll SMB, das vor allem für Dateifreigaben verwendet und von nahezu jedem Betriebssystem unterstützt wird. Voraussetzung zum Verbinden der Systeme ist die Freigabe des MFCS-Hauptverzeichnisses im Netzwerk. Sofern der Client-Computer die Windows-Rechte für den Zugriff auf diesen freigegebenen Ordner besitzt, kann er sich mit den durch den MRD des Servers verwalteten .MDB-Datenbanken (Microsoft Access 2000) verbinden. Die Konfiguration der Netzwerkpfade erfolgt über die serverseitige WKST.ini.

2.1.5 Benutzer und Zugriffsrechte

Nicht nur die Vernetzung von Servern und Clients basiert auf der *Windows NT* Rechteverwaltung, sondern auch das Benutzermanagement. Einstiegspunkt zum Starten der anderen Client-Module wie *Batch Management* oder *Operator Service* ist das Shell-Modul. Dieses fragt beim Start den aktuell angemeldeten Benutzer im Format  Computername\Nutzername ab und lässt anschließend vom Kernel prüfen, in welcher MFCS-Nutzergruppe dieser registriert ist. Existieren die entsprechenden Berechtigungen, öffnet sich die Shell-Oberfläche und stellt dem Benutzer die Module zur Verfügung, die im Benutzermanagement des Servers für ihn freigegeben wurden.

2.2 Der Hochzelldichte-Kultivierungsprozess i^2 HCDC

Die Kultivierung von Mikroorganismen zur Gewinnung eines bestimmten Zielproteins stößt mit klassischen Methoden sehr schnell an die Grenzen der wirtschaftlichen Praktikabilität, da dessen Anteil an der gesamten Zellsuspension typischerweise sehr gering ist. Die Steigerung der Produktausbeute und damit auch der Prozesseffizienz kann durch Verbesserung der Expressionsrate auf genetischer Ebene sowie durch die Erhöhung der Zelldichte auf Prozessebene erreicht werden. Mit einfachen Batch-Prozessen lassen sich diese hohen Dichten jedoch nicht erreichen, da die zu Beginn notwendigen Substratkonzentrationen inhibierende bis toxische Effekte [2] auf die Organismen hätten. Dieses Problem kann die Fed-Batch-Prozessführung lösen, da hier die für das Wachstum und die Proteinexpression notwendigen Komponenten graduell und in Abstimmung auf die gerade vorliegende Zellkonzentration zugeführt werden.

Der Begriff High Cell Density Cultivation (HCDC) wurde 1991 in mehreren Veröffentlichungen von Riesenberg et al. [3, 4] geprägt und beschreibt eine für den industriellen Einsatz geeignete Prozessführung mit anfänglicher unlimitierter Batch-Phase und anschließender Fed-Batch-Phase, in der eine definierte spezifische Wachstumsrate durch ein exponentielles Nachfütterungsprofil realisiert wird. In **Abbildung 2.3** ist der qualitative Verlauf der verschiedenen Prozessgrößen in den jeweiligen Phasen dargestellt.

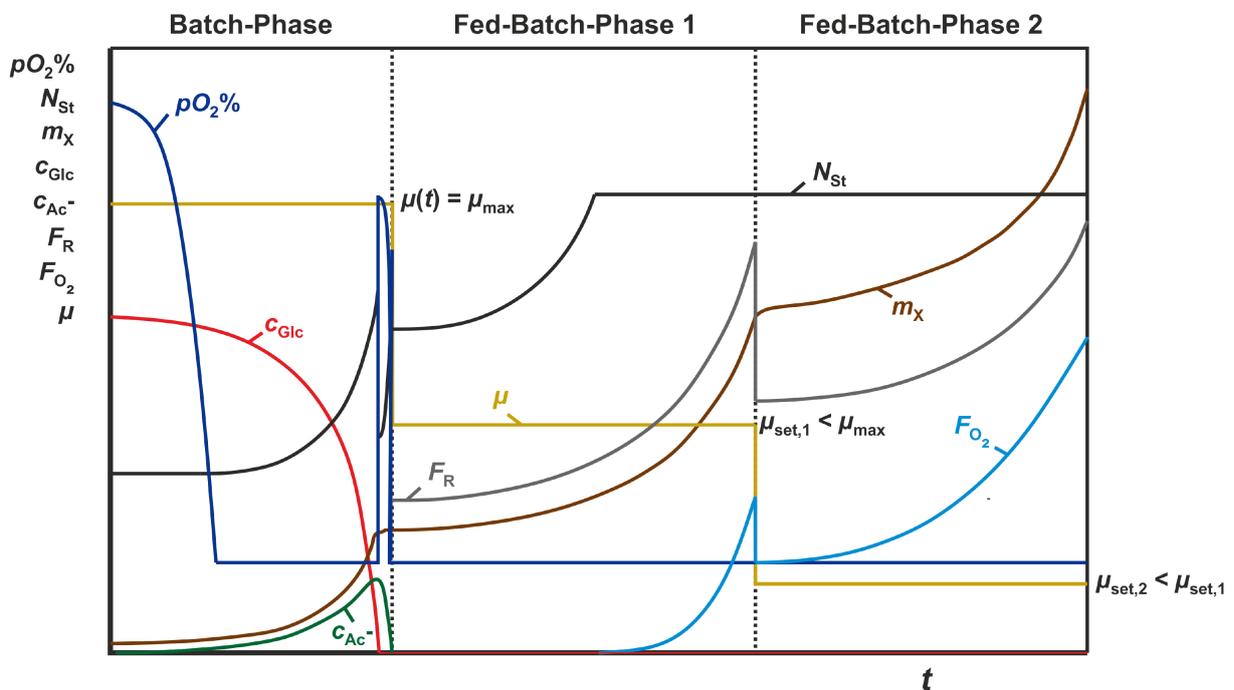


Abbildung 2.3: Qualitativer Verlauf der Prozessgrößen in den Phasen des HCDC-Prozesses
 Übernommen aus "Entwicklung neuer Strategien für die Hochzelldichte-Kultivierung verschiedener
 Derivate von *Escherichia coli*" [5]

Das von der AG Bioverfahrenstechnik (AG BVT) ausgearbeitete und in dieser Arbeit verwendete i^2 HCDC-Verfahren [5] basiert auf der ursprünglichen HCDC-Methode und wurde in Hinsicht auf die Anzahl der benötigten Mediumskomponenten sowie die Komplexität der Arbeitsabläufe verbessert. Für Vor- und Hauptkultur wird die selbe Feedlösung mit dem limitierenden Substrat Glucose verwendet. Die Vorkultur im Schüttelkolben erhält eine entsprechend berechnete Menge der Feedlösung, sodass die gewünschte Animpfzelldichte erreicht wird und die Sauerstoffmenge im Kopfraum des Kolbens ausreicht.

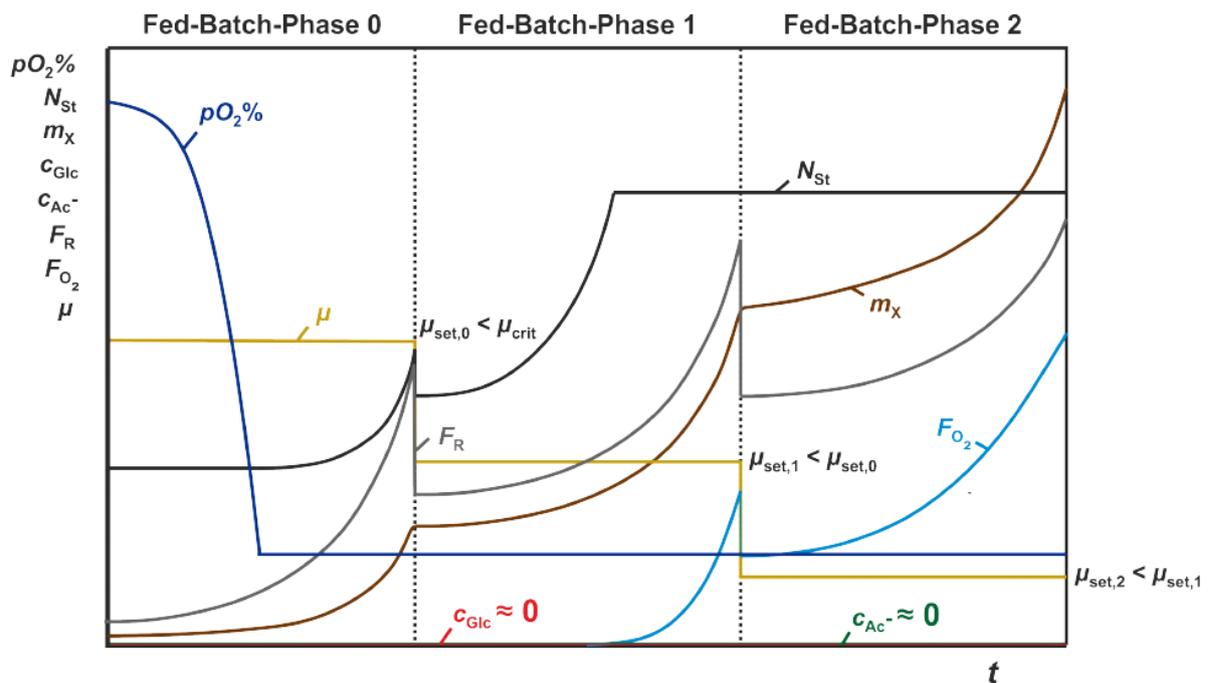


Abbildung 2.4: Qualitativer Verlauf der Prozessgrößen in den Phasen des i^2 HCDC-Prozesses
 Übernommen aus "Entwicklung neuer Strategien für die Hochzelldichte-Kultivierung verschiedener Derivate von *Escherichia coli*" [5]

Bei der Hauptkultur wird wie in **Abbildung 2.4** zu sehen auf die anfängliche Batch-Phase verzichtet und stattdessen nach Beimpfung mit der Vorkultur die exponentiell verlaufende Nachdosierung der restlichen Feedlösung gestartet. Da das Hauptkulturmedium zunächst keine Glucose enthält und die der Vorkultur restlos verbraucht wurde, kann mit Beginn der Nachfütterung der Startzeitpunkt des Zellwachstums genau definiert werden.

Die Zuführung der Feedlösung erfolgt unter der Annahme, dass das Wachstum allein durch Glucose limitiert wird. Der i²HCDC-Prozess ist in die drei Phasen G1, G2 (Growth) und P (Production) eingeteilt⁴, die jeweils mit einer definierten spezifischen Wachstumsrate μ_{set} ablaufen. Diese werden so gewählt, dass das Wachstum möglichst schnell erfolgt, die Sauerstoffversorgung jedoch gewährleistet werden kann und die Bildung wachstumsinhibierender Metabolite wie z. B. Acetat in einem akzeptablen (möglichst geringen) Bereich liegt. Um letzteres zu erreichen, ist die spezifische Wachstumsrate μ_{set} auf einen Wert unterhalb von μ_{crit} mit $\mu_{\text{crit}} < \mu_{\text{max}}$ zu regulieren [6, 7].

Auf dieser Grundlage lässt sich anhand von μ_{set} , $y_{\text{X/Glc, g}}$ und $q_{\text{Glc/X, m}}$ für jeden Zeitpunkt einer Phase i die notwendige Nachfütterrate berechnen [5]:

$$\dot{m}_{\text{Glc, R}}(t_{\text{F, } i} \leq t \leq t_{\text{F, } i+1}) = \left(\frac{\mu_{\text{set, } i}}{y_{\text{X/Glc, g, } i}} + q_{\text{Glc/X, m, } i} \right) m_{\text{X, 0, } i} e^{\mu_{\text{set, } i} (t - t_{\text{F, } i})} \quad (2.1)$$

Die Nachfütterung erfolgt ohne Feedback, sodass eine Überfütterung prinzipiell möglich ist. Da die Nachfütterrate jedoch von μ_{set} abhängig ist, welches grundsätzlich unterhalb von μ_{max} gewählt wird, kommt dies nur geringfügig zu Beginn des Prozesses vor und korrigiert sich automatisch. Grund dafür ist eine minimale Förderrate der Feedpumpe, die nicht unterschritten werden kann. In dem Zeitraum der Überfütterung wachsen die Zellen unlimitiert, bis sich ihre Glucoseaufnahme schließlich mit der Zufütterrate deckt. Ab dann wird die akkumulierte Glucose aufgebraucht, bis das Wachstum schließlich wieder dem vorgegebenen Profil folgt.

⁴In **Abbildung 2.4** als Fed-Batch-Phasen 0, 1 und 2 bezeichnet

3 | Upgrade des MFCS-Systems

Bei der Aktualisierung des MFCS-Systems wurde sichergestellt, dass der bisherige Prozessleit-rechner (Ausgangssystem) unverändert und einsatzbereit bleibt. Um den neuen Prozessleit-rechner (Zielsystem) jederzeit auf seinen Ausgangszustand zurücksetzen zu können, wurde vor Beginn der Arbeiten ein vollständiges Datenträgerabbild (*Image*) mit Clonezilla erstellt. Die Wiederherstellung eines solchen Images benötigt Zeit und überschreibt den aktuellen Zustand, sodass dieser vorher wiederum zeitaufwändig gesichert werden muss, wenn man zu ihm zurückkehren möchte. Um diese Zeit einzusparen und die Zustände flexibler versionieren zu können, wurden alle Änderungen zuvor in virtueller Umgebung getestet, bevor sie schließlich auf das Zielsystem angewendet wurden. Neben dem Software-Upgrade und der Datenmigration bot sich zudem Potential für einen komfortableren und in IT-Hinsicht sichereren Betrieb des MFCS-Systems. Die dafür notwendigen Änderungen am Bedienkonzept wurden an entsprechender Stelle bei der Konfiguration des Zielsystems berücksichtigt. Eine vollständige Liste der für diese Arbeit verwendeten Software ist in **Tabelle 3.1** zu finden.

3.1 Vorhandene Hardware und Verwendung

Im Folgenden soll ein Überblick über die Ausgangsbedingungen geschaffen werden, die den Rahmen der durchgeführten Arbeiten vorgeben.

3.1.1 Bioreaktoren und Labornetzwerk

Die Infrastruktur des Labors ist in **Abbildung 3.1** dargestellt. Es verfügt über fünf¹ Bioreaktoren der Sartorius AG bzw. der übernommenen BBI GmbH in verschiedenen Größen und Konfigurationen, die jeweils mit einer eigenen Digital Control Unit (DCU) verbunden sind. Bis auf die Ausnahme vom Reaktor *B2_2* (Ethernet) kommunizieren diese über einen RS-422-Bus mit dem Prozessleit-rechner PBVT01. Da dieser Computer keine solche Schnittstelle besitzt, werden die Daten mithilfe einer Interface-Box (MFCS/win IFB RS-422) von RS-232 auf RS-422 umgewandelt. In Vorbereitung auf eine eventuelle Umrüstung der DCUs auf neuere Modelle wurden bereits für alle Reaktoren IP-Adressen im laborinternen Ethernet-Netzwerk (LLAN) definiert. Das LLAN nutzt die vorhandene Infrastruktur der Hochschule, wird jedoch durch einen entsprechend konfigurierten Switch vom Hauptnetzwerk (HAW-LAN) isoliert.

¹Der Reaktor C30 ist noch in der Übersichtsgrafik zu sehen, wird aber aufgrund eines Defekts nicht mehr verwendet.

Tabelle 3.1: Vewendete Software

Software	Aufgabe/Beschreibung
Microsoft Windows XP Microsoft NT 5.1, Service Pack 3	Betriebssystem Einsatz im alten Prozessleitreehner Support endete endgültig im April 2014, seitdem sind keine Sicherheits- oder anderweitige Updates verfügbar.
Microsoft Windows 7 Microsoft NT 6.1, Service Pack 1 Build 7601	Betriebssystem Einsatz im neuen Prozessleitreehner Regulärer Support endete bereits im Januar 2015 Erweiterter Support endet im Januar 2020 Gegen Bezahlung ist noch ein Support bis 2023 möglich.
Microsoft Windows 10 Microsoft NT 10.0, Update 1709 Build 16299.461	Betriebssystem Einsatz in MFCS-Clients und virtuellem Server Aktuellstes und sicherstes Windows-Betriebssystem Aktiver Support und regelmäßige Sicherheitsupdates.
VMware Workstation 12 Pro VMware V 12.5.7, Build 5813279	Virtualisierung Beinhaltet das Feature, Snapshots des virtuellen Systems zu erstellen, umso jederzeit wieder an einen der vorherigen Zustände zurückzukehren.
Clonezilla live NCHC 20180329-artful-amd64	Datenbackup Festplattenbackup auf Blockebene.
Reglo Pumps Ulrich Scheffler V 2.1.13 (2012)	Treiber Setzt die Steuersignale von MFCS in RS-232-Signale für die Feed-Pumpen um.
BlueInOne Datenerfassung Ulrich Scheffler V 3.0.25 (05.02.2013)	Treiber Stellt Daten des Abgassensors über OPC DA für MFCS bereit.
ezVSP Sollae Systems V 5.0A	Treiber Sendet und empfängt TCP-Pakete und setzt diese in Signale eines emulierten seriellen Ports um.
Sophos AntiVirus Sophos Ltd.	Sicherheitslösung Von der HAW Hamburg lizenzierte und bereitgestellte Software zum Schutz des Computers vor Schadsoftware.
Firefox Mozilla Foundation V 61.0	Internet-Browser Sicherer Internet-Browser; basiert auf offenem Quellcode (open source) und vermeidet das Sammeln von Nutzerdaten.
PDFCreator pdfforge GmbH V 3.4.1 Build 5876	Dokumentverarbeitung Anwendung zum Betrachten, Erstellen und Bearbeiten von PDF-Dokumenten.
Microsoft Office 2017 Prof. Microsoft	Dokumentverarbeitung Enthält Microsoft Excel; genutzt zum Auswerten von off-line-Messungen.

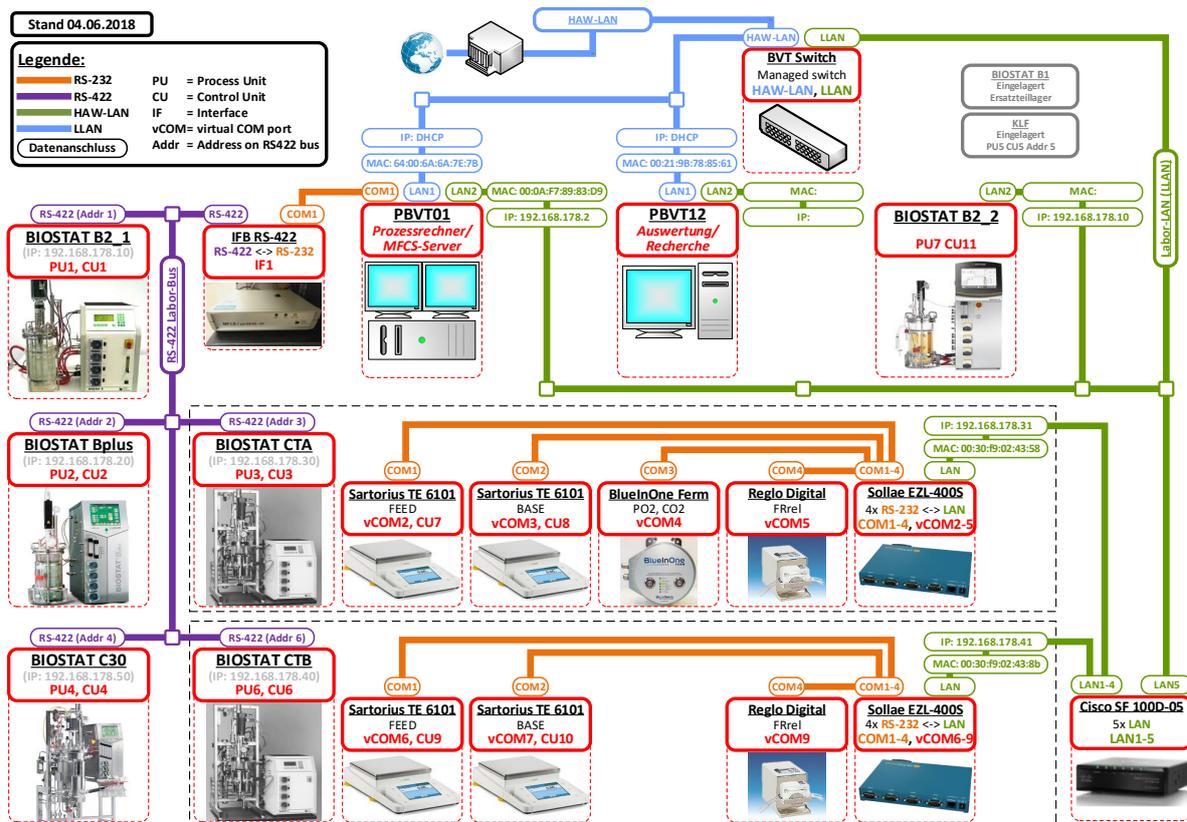


Abbildung 3.1: Übersicht über die vernetzten Geräte des Labors für Bioverfahrenstechnik

3.1.2 RS-232-LAN-Konverter

Die Reaktoren *CTA* und *CTB* nutzen zusätzliche Waagen, Pumpen und Abgasanalytik, die von MFCS/win über externe Treiber² ausgelesen und im Fall der Pumpe auch angesteuert werden. Da es sich bei RS-232 um eine point-to-point-Verbindung handelt und auf den Einbau einer Multi-RS-232-Karte und lange Verkabelung verzichtet werden soll, werden die Geräte stattdessen mithilfe eines RS-232-Ethernet-Konverters im bereits vorhandenen LLAN bereitgestellt. Eine Treibersoftware auf dem Prozessleitreechner emuliert serielle Schnittstellen (COM2 - COM9), deren Daten von ihr als TCP-Pakete im LLAN an die Konverter versendet bzw. von diesen empfangen werden. Für die eingangs erwähnten Gerätetreiber ist es unerheblich, ob die Peripheriegeräte direkt mit dem Computer oder indirekt über das Netzwerk verbunden sind, solange der COM-Port ansprechbar ist.

²Der Treiber für digitale Sartorius-Waagen ist separat bei Sartorius erhältlich, aber kein direkter Teil von MFCS/win. Die Treiber für die Pumpen und die Abgasanalytik wurden nicht von Sartorius entwickelt.

3.1.3 Prozessleitreehner

Beim Ausgangssystem handelt es sich um das Modell *Precision T3400* des Herstellers DELL. Darauf wurde MFCS/win in der Version *3.0 Service Pack 3 Patch B* im Stand-Alone-Modus betrieben. Zum Zeitpunkt der Beschaffung war Microsoft Windows 7 bereits verfügbar, die damalige Version von MFCS/win aber noch nicht offiziell dafür freigegeben; daher wurde das 2001 veröffentlichte Microsoft Windows XP als Betriebssystem verwendet.

Das Zielsystem vom Typ DELL OptiPlex 7040 bietet gegenüber dem Ausgangssystem mehr Leistung bei gleichzeitig kleineren Abmessungen und einer besseren Energieeffizienz. Die Ausstattung ist nachfolgend in **Tabelle 3.2** angegeben.

Tabelle 3.2: Hardware des neuen Prozessleitrechners

Modell	DELL OptiPlex 7040
Betriebssystem	Microsoft Windows 7
CPU	Intel i5-6600, 4x 3,30 GHz (3,90 GHz), 65 W TDP
RAM	16 GiB, 2133 MHz DDR4, Non-ECC
Systemdatenträger	512 GB SSD (NVMe), Samsung PM951
Sekundärer Datenträger	1 TB HDD, 7200 rpm

3.1.4 Bedienkonzept

Das Nutzungsprinzip des MFCS/win-Systems vor dem Upgrade ist in **Abbildung 3.2** dargestellt. Die Möglichkeit, MFCS/win als Client-Variante auf weiteren Computern zu installieren und das System von dort aus zu bedienen, wurde nicht genutzt. Eine Alternative dafür wurde durch die Remote-Desktop-Software *TeamViewer* realisiert, durch die der Desktop des Servers von jedem TeamViewer-fähigen Gerät betrachtet und bedient werden konnte. Dadurch bestand zwar eine flexible und ortsunabhängige Möglichkeit, um auf MFCS/win zuzugreifen, da MFCS/win aber nicht das Öffnen mehrerer Instanzen des selben Prozesses erlaubt, wurde auf jedem der verbundenen Geräte die selbe Oberfläche gezeigt. Auch die lokale Bedienung im Labor war auf diese eine Instanz von MFCS/win beschränkt. Bei mehreren parallel ablaufenden Kultivierungen konnte dies schnell zu unübersichtlichen Situationen führen und beim Starten von Rezepten, Eingeben von Prozessvariablen und dem Monitoring der Messwerte zu Verwechslungen führen. Der mit dem neuen Prozessleitreehner angeschaffte Doppelmonitor wurde bereits an den alten Prozessleitreehner angeschlossen, um mehr Platz für und mehr Übersicht über die verschiedenen

MFCS/win-Module sowie die zusätzlichen Treiberprogramme zu schaffen. Zum Auswerten der Daten wurden diese meist auf USB-Laufwerke oder Netzwerkfreigaben exportiert. Am gleichen Ort wie der Server befindet sich ein weiterer Computer (PBVT12), der auch zur Auswertung und Aufbereitung der Daten diente.

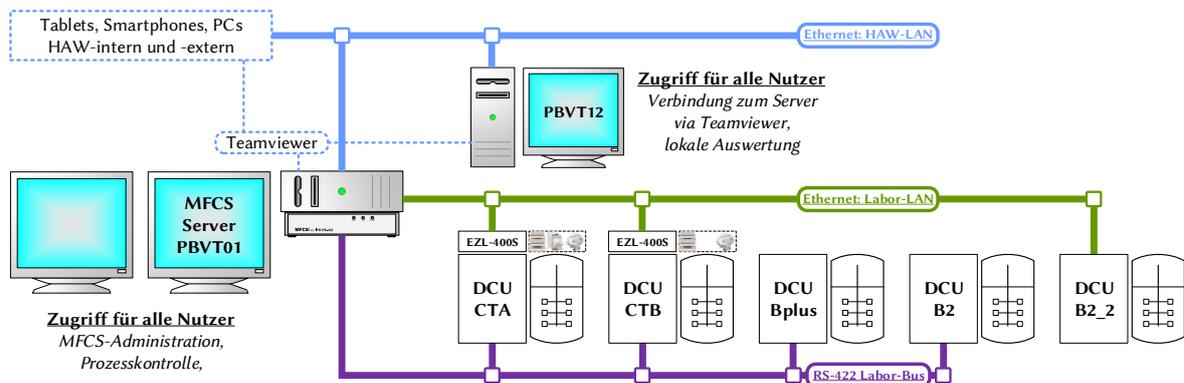


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des Nutzungsszenarios vor Upgrade des Systems

3.1.5 Risikoeinschätzung

Das veraltete Betriebssystem und damit auch die veraltete Anwendungssoftware stellte im Zusammenspiel mit der aktiven Bedienung des mit dem Internet verbundenen Servers ein Sicherheitsrisiko dar. Auch ohne dass eine Cyber-Attacke stattfindet, kann es durch Fehlbedienung oder einen dadurch hervorgerufenen Systemabsturz zum Datenverlust kommen. Der entscheidende Faktor ist hier also der freie Zugang aller Nutzer zum Prozessleitreechner, der aufgrund der fehlenden Clients zwingend zum computergestützten Kultivieren notwendig ist. Zugängliche USB-Ports bergen die Gefahr, dass Schadsoftware wissentlich oder unwissentlich von USB-Speichermedien auf den Computer gelangt. Zudem begünstigen sie den Einsatz von *Keystroke Injection Tools*, um unbemerkt eine Hintertür auf dem Computer zu einrichten. Den direkten Zugriff auf das Notwendige zu limitieren und die meisten Aktivitäten auf andere Geräte auszulagern, reduziert das Risiko eines Ausfalls – ob durch einen Angriff oder einen Bedienungsfehler – signifikant.

3.2 Entwicklung eines neuen Bedienkonzepts

Das bestehende Bedienkonzept bot über *TeamViewer* zwar ortsflexible Möglichkeiten der Nutzung an, schränkte den Komfort jedoch wiederum insofern ein, dass keine parallele Nutzung mehrerer MFCS/win-Instanzen über das Server-Client-Prinzip realisiert wurde. Das neue Konzept sieht die ausschließliche Bedienung über MFCS/win-Clients vor. Dies erhöht die Sicherheit des MFCS/win-Servers und den Nutzungskomfort innerhalb des Labors, unterbindet jedoch den Zugriff von außerhalb des kabelgebundenen Hochschulnetzes. Mögliche Lösungsansätze dafür werden in *Kapitel 5 (Zusammenfassung und Ausblick)* diskutiert.

3.2.1 Virtuelle Testumgebungen

Zum Erproben verschiedener Lösungsansätze wurde die Software VMware Workstation 12 (siehe *Tabelle 3.1*) auf dem Zielsystem unter Microsoft Windows 7 eingesetzt. Die *Snapshot-* und *Branching-*Funktionen ermöglichen das parallele Testen mehrerer Szenarien, ohne den Speicher der virtuellen Maschine jedes Mal vollständig zurückzusetzen. Es wurden zwei virtuelle Maschinen mit Microsoft Windows 10 als Betriebssystem angelegt, auf denen MFCS/win in der Server- bzw. Clientversion eingerichtet wurde. Dadurch konnte gleichzeitig gezeigt werden, dass MFCS/win auch unter Microsoft Windows 10 lauffähig ist, obwohl die höchste offiziell von Sartorius freigegebene Windows-Version 8.1 ist. Es bedarf jedoch eines ausführlicheren Tests, um zu bestätigen, dass MFCS/win als Server in allen Punkten mit Microsoft Windows 10 kompatibel ist. Den virtuellen Systemen wurden jeweils 4 Prozessorkerne sowie 4 GB Arbeitsspeicher zugewiesen. Wurden die Netzwerk- und die RS-232-Schnittstelle sowie der USB-Dongle für MFCS/win vom Host an das virtuelle System weitergeleitet, war es möglich, die DCUs vom virtuellen MFCS/win-Servers aus anzusteuern. Aus Performance-Gründen war ein gleichzeitiger Betrieb beider virtueller Systeme nicht möglich.

3.2.2 Schema für Benutzerkonten

Die in *Tabelle 3.3* aufgeführten Benutzerkonten basieren auf einer Unterteilung, wie sie bereits vor dieser Arbeit entworfen wurde. Die Neuerung besteht hier in einer strikteren Trennung der Aufgaben, Rechte und Verfügbarkeit der Benutzerkonten sowie der Anwendung dieses Schemas auf die neuen MFCS/win-Clients.  BVTadmin hat keinen Zugriff auf MFCS/win und wird auf jedem Computer ausschließlich zum Verwalten von Windows und der Anwendersoftware verwendet.  MFCS ist ebenfalls auf jedem Computer vertreten, ist aber wiederum nur für das Verwalten von MFCS/win zuständig, auch wenn theoretisch ebenfalls ein administrativer Zugriff auf Windows besteht. Die Benutzerkonten  Projekte und  Praktikum werden von einem weiten Personenkreis genutzt und sind deswegen ausschließlich auf Clients verfügbar.

Tabelle 3.3: Benutzerkonten des MFCS-Systems

Konto/PW	Beschreibung	Zugriffslevel		Verfügbarkeit	
		Windows	MFCS	Server	Client
 BVTadmin  ██████████	Lokales Administratorkonto im BVT-Labor, kein Domänenadministrator; Wird genutzt, um neue Software zu installieren und Windows zu verwalten.	Admin	-	•	•
 MFCS  ██████████	Administratorkonto für MFCS/win und Windows; Wird nur genutzt, um die MFCS/win-Konfiguration zu ändern.	Admin	Admin	•	•
 Projekte  ██████████	Benutzerkonto für Studienprojekte. Wird von Studierenden genutzt, die bereits Erfahrung mit MFCS/win haben und zur Durchführung ihres Projekts erweiterte Rechte benötigen.	User	Erweitert		•
 Praktikum  ██████████	Benutzerkonto mit reduzierten Rechten für Praktikumsteilnehmer. Wird von Studierenden genutzt, die möglicherweise das erste Mal mit MFCS/win in Kontakt kommen.	User	Einfach		•

3.2.3 Client-basierte Bedienung

Die gesamte Benutzerinteraktion wurde auf Clients ausgelagert. Der Prozessleitreehner/Server läuft dauerhaft im Hintergrund und stellt den Clients zu jedem Zeitpunkt die Funktionalität von MFCS/win zur Verfügung, ohne dass er direkt bedient werden muss. Es entfällt dadurch die Notwendigkeit, auf dem Prozessleitreehner Anwendersoftware mit eventuellen Sicherheitslücken zu installieren, sodass die nutzungsabhängigen Sicherheitsrisiken (siehe **Abschnitt 3.1.5**) nur noch die Clients betreffen und nicht mehr die Datenerfassungs- und Steuerungsaufgaben gefährden. Dies ist insbesondere dann nützlich, wenn mehrere Reaktoren von verschiedenen Personen gleichzeitig betrieben werden, da auf diese Weise niemand den Prozess des Anderen beeinträchtigen kann. Eine grafische Übersicht der neuen Struktur ist in **Abbildung 3.3** dargestellt.

Neben Aspekten der Prozess- und IT-Sicherheit konnte auch der Bedienkomfort verbessert werden.  PBVT12 wurde mit dem zuvor für den neuen Prozessleitreehner angeschafften Doppelmonitor ausgestattet und stellt einen fest installierten Zugriffspunkt auf MFCS/win dar, der für Monitoring- und Auswertungsaufgaben genutzt wird. Zusätzlich wurden drei Notebooks auf die neueste Version von Microsoft Windows 10 aktualisiert und mit der Client-Version von MFCS/win ausgestattet. Diese können beim Kultivieren in der Nähe des genutzten Bioreaktors aufgestellt werden und

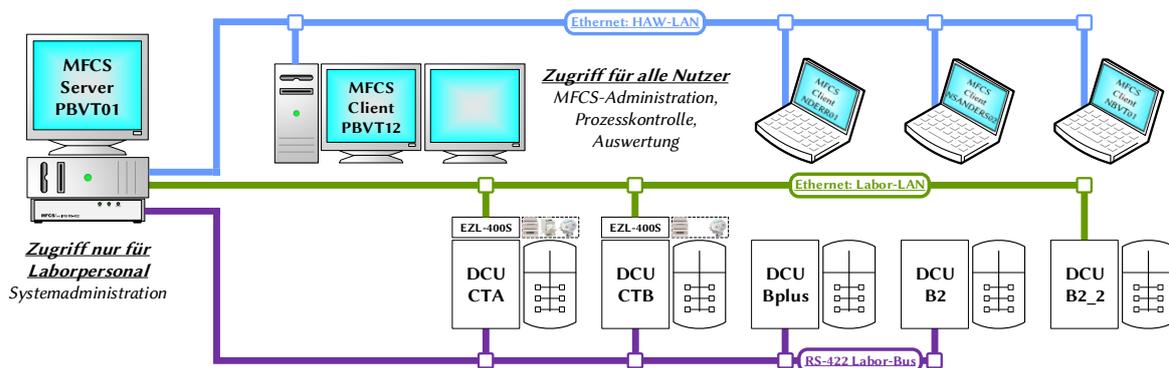


Abbildung 3.3: Das überarbeitete Bedienkonzept basiert auf der ausschließlichen Bedienung des Servers über Client-Systeme, um die Steuerung und Datenerfassung der Bioreaktoren vom Einflussbereich der Benutzer zu trennen.

ermöglichen so eine komfortablere Eingabe von Variablenwerten in MFCS/win und Messwerten in die eigenen Auswertungstabellen. Da das kabellose Netzwerk der HAW Hamburg keinen Zugriff auf das kabelgebundene Netzwerk ermöglicht, ist eine Ethernet-Anbindung der Mobilgeräte zwingend erforderlich.

Auch die Administration von MFCS/win erfolgt gemäß dem neuen Konzept ausschließlich durch  MFCS über Client-Computer. Auf die serverseitige Variante dieses Benutzerkontos sollte dafür nur in Ausnahmefällen zurückgegriffen werden.

Aufgrund des Dauerbetriebs des Servers entfällt für die regulären Nutzer des MFCS-Systems die Startprozedur, bei der die zusätzlichen Gerätetreiber für Pumpen und Abgassensoren gestartet und ggf. konfiguriert werden müssen. Dies wird vom geschulten Laborpersonal übernommen und ist nur erforderlich, wenn der Server zu Wartungszwecken heruntergefahren wurde. Auf diese Weise können Fehler reduziert und der Fokus auf die Kultivierung gerichtet werden.

3.3 Einrichten des MFCS-Servers und Migration der Datenbanken

Die in diesem Abschnitt getroffenen Maßnahmen folgen größtenteils den von Sartorius im *System Manager Handbook* [8] empfohlenen Schritten zum Upgrade eines MFCS/win-Servers. Sie wurden in einigen Punkten ergänzt oder abgewandelt, sofern es sinnvoll war. Ziel dieses Abschnitts ist es, den von Sartorius allgemein empfohlenen Weg am konkreten Fall mit den entsprechenden Änderungen nachvollziehbar darzustellen.

3.3.1 Hardware-Sicherheit

Um die physische Sicherheit des Prozessleitrechners zu verbessern, wurden Sicherheitsmaßnahmen auf Hardwareebene getroffen. Die Funktion *Chassis Intrusion Detection* wurde im BIOS aktiviert, sodass eine Benachrichtigung erscheint, wenn das Gehäuse des Geräts seit der letzten Anmeldung geöffnet wurde. Ein unbemerktes Einbauen von Spionagehardware kann dadurch erschwert werden. Zum Schutz vor *Keystroke Injection Tools* und anderen schädlichen USB-Geräten wurden die vorderen, dem Nutzer zugewandten USB-Schnittstellen im BIOS deaktiviert. Eine physische/elektrische Trennung im Inneren des Geräts war nicht möglich, da die Anschlüsse fest mit dem Mainboard verlötet sind.

3.3.2 Systemeinstellungen

Im Manual *IT Requirements* [9] werden die Anforderungen an die Hard- und Software des MFCS/win-Servers beschrieben, die durch die im Folgenden dargestellten Maßnahmen erfüllt werden. Die detaillierten Schritte zum Reproduzieren der Systemeinstellungen sind im *Installation Handbook* [10] auf S. 24 ff. zu finden.

Computername

Die Server-Variante von MFCS/win wird bei der Installation mit dem Computernamen (hier PBVT01) verknüpft und eine nachträgliche Änderung ist nicht möglich. Es ist zwar möglich, die Datenbanken auf ein System mit einem anderen Computernamen zu migrieren (*System Manager Handbook*, S. 103), bei der gewählten Migrationsstrategie bot es sich jedoch an, den Namen des Zielsystems an den des Ausgangssystems anzupassen. Ein gleichzeitiger Betrieb beider Systeme im selben Netzwerk führt zu Namenskonflikten und ist zu vermeiden. Der Name des Zielsystems wurde zu Beginn der Arbeiten über +  `control.exe sysdm.cpl,,1` und  auf  festgelegt.

Betriebsbereitschaft

Einige Energiespareinstellungen und die Installation von Updates können den Betriebszustand des Computers beeinflussen (Standby, Neustart) und dadurch die Datenerfassung unterbrechen. Im Fall der Windows-Updates ist es zudem – wenn auch unwahrscheinlich – möglich, dass von MFCS benötigte Komponenten oder Einstellungen überschrieben werden. Die automatischen Updates wurden dementsprechend über `Systemsteuerung >> Windows Update` deaktiviert. Die Einstellungen für den automatischen Ruhezustand der Festplatte und des gesamten Systems wurden über die erweiterten Energieoptionen (`([Windows]+[R]) control.exe powercfg.cpl,,3`) angepasst. Außerdem wurde dort die Funktion des Geräte-Hauptschalters deaktiviert, um ein Herunterfahren des Servers durch versehentliches Drücken zu verhindern. Die Energieeinstellungen wurden in einem eigenen Energiesparplan *MFCS* gespeichert, der zuvor auf Basis des von Microsoft vordefinierten *Höchstleistung*-Plans erstellt wurde.

Systemleistung

In den o.g. Energieoptionen wurde sichergestellt, dass der maximale Leistungszustand des Prozessors bei 100% liegt, der minimale Leistungszustand wurde von 100% (aus der Vorlage *Höchstleistung*) auf 5% reduziert, um in Phasen geringer CPU-Last mehr Energie einsparen zu können. Da die Kernelmodule von MFCS/win als Hintergrundprozesse laufen, empfiehlt Sartorius, die Systemleistung auf diese zu fokussieren. Diese Option wurde über die erweiterten Systemeinstellungen (`([Windows]+[R]) control.exe sysdm.cpl,,3`) im Untermenü `Leistung >> Einstellungen >> Erweitert` gesetzt. Die ebenfalls empfohlene Defragmentierung des Systemlaufwerks zur Leistungsverbesserung wurde nicht eingerichtet, da diese Maßnahme bei SSD-Datenträgern deren Lebensdauer verringert und keinen Geschwindigkeitsvorteil bietet.

Sicherheit

Die Windows-Benutzerkontensteuerung (UAC) musste für den MFCS/win-Server deaktiviert werden, damit die Funktionen von MFCS/win nicht möglicherweise durch das Warten auf eine Bestätigung durch den Nutzer blockiert werden. Damit wird jedoch eine der wichtigsten Sicherheitsfunktionen von Windows umgangen, wodurch es umso wichtiger ist, keinen unautorisierten Personen Zugang zum Prozessleitreechner zu verschaffen.

Die Benutzerkonten wurden gemäß ***Tabelle 3.3*** eingerichtet. Die Empfehlung zur Aktivierung der *sicheren Anmeldung*³ wurde umgesetzt, die Benutzerkonten der Computer werden im vorliegenden Fall jedoch zum Teil in den neben dem Gerät ausliegenden Bedienhinweisen genannt. Das Wechseln der Benutzer ohne vorherige Abmeldung (*fast user switching*) wurde wie empfohlen

³Bei Verwendung der *sicheren Anmeldung* muss neben dem Passwort auch der Benutzername eingegeben werden.

deaktiviert, da ansonsten die Benutzerverwaltung von MFCS/win gestört werden könnte. Der Bildschirmschoner wurde so konfiguriert, dass beim Reaktivieren des Bildschirms das Passwort des angemeldeten Benutzers eingegeben werden muss. Die einfache Dateifreigabe wurde deaktiviert, sodass immer eine gültige Kombination aus Nutzernamen und Passwort für den Zugriff auf freigegebene Verzeichnisse notwendig ist. Die Zugriffsberechtigungen der Nutzer werden von Windows über das NTFS-Dateisystem verwaltet⁴. Die Funktionen zur automatischen Wiedergabe beim Anschluss von Speichermedien wurde in Systemsteuerung >> Automatische Wiedergabe deaktiviert.

Der Windows Defender wurde wie empfohlen deaktiviert. Stattdessen wurde die durch die Hochschule bereitgestellte und vorinstallierte Sicherheitslösung Sophos AntiVirus verwendet. Sartorius schlägt vor, .MDB-Dateien (ein Microsoft Access Datenbankformat; genutzt für MFCS/win-Datenbanken) vom Virenschutz der verwendeten Sicherheitssoftware auszuschließen. Aufgrund der knapp 20 Jahre alten DBMS-Version (Access 2000) und den seitdem bekannt gewordenen Sicherheitslücken [11] wurde dies jedoch nicht umgesetzt. In der Windows-Firewall wurden Ausnahmen für die Datei- und Druckerfreigabe eingerichtet, um den Zugriff auf den Server über die dafür verwendeten Ports zu erlauben. Dies ist wichtig, da die Kommunikation zwischen Server und Client prinzipiell über Dateifreigaben (genauer SMB) abläuft.

⁴Diese Rechteverwaltung funktioniert nur zuverlässig unter Windows. Andere Betriebssysteme können diese Berechtigungen unter Verwendung alternativer NTFS-Treiber ignorieren.

3.3.3 Installation von MFCS/win (Server)

Alle MFCS/win-Installationspakete lagen als entpackte Datenträgerabbilder vor. Die Installation wurde dem neuen Nutzungsschema entsprechend als Benutzer  BVTadmin durchgeführt. Es wurde die Installation der Version *3.0 Service Pack 3 Patch A* über  MFCS_V30 ▶ CD-Image 3.0_SP3a ▶ MFCS_30 ▶ setup.exe gestartet und die Anweisungen des Setup-Assistenten befolgt. Die eingegebenen Daten und die gewählten Optionen sind in **Tabelle 3.4** dargestellt.

Tabelle 3.4: Übersicht über die Angaben bei der Installation von MFCS/win-Server
Auflistung in chronologischer Reihenfolge. Für eine bessere Übersicht wurden einige Abfragen und Auswahlmöglichkeiten ggf. sinnvoll gekürzt.

Menüpunkt/Abfrage	Angabe/Auswahl
Setup Type	MFCS/win Server Installation
Customer Information	
User Name	MFCS
Company Name	HAW Hamburg
Serial Number	
Destination Location	C:\MFCS_win
Documentation Language	German
Network Configuration Disk	C:\MFCS_win\NETWDISK
Create directory and new, empty Network Disk?	Ja
Create specific node ID?	Nein
Microsoft Access 2000 Runtime	Install Now
Customer specific configuration disk?	Nein
Restart computer	No, restart later

3.3.4 Treiberinstallation und -konfiguration

Alle hier aufgeführten Installationen wurden unter dem Benutzerkonto  BVTadmin direkt nacheinander ohne Neustart des Systems durchgeführt. Eine Beschreibung zu den Treibern ist in **Tabelle 3.1** zu finden, die detaillierten Installationsschritte sind den jeweiligen Handbüchern zu entnehmen.

Um die Sartorius-Waagen ansprechen zu können, wurde der separat erworbene *Serial Balance Driver* von Sartorius installiert. Die Treiber für die Feedpumpen und die Abgasanalytik kommunizieren über *OPC* mit dem MFCS/win-Kernel, daher wurden nach dem Waagentreiber zunächst das OPC-Modul von MFCS/win und anschließend die Treiber *Reglo Pumps* und *BlueInOne* installiert.

Die Anbindung der RS-232-Geräte über das Netzwerk erfolgt über *ezVSP* (Sollae Systems). Es wurde die Version 5.0A von der Webseite des Herstellers heruntergeladen und installiert, da die in den Installationsverzeichnissen vorhandene Version stark veraltet war. Für diese neue Version wird entgegen der alten kein Lizenzschlüssel benötigt.

Nach Fertigstellung aller Installationen wurde das System neu gestartet und mit der Konfiguration der Treiber begonnen. Für den Waagentreiber und das OPC-Modul war eine Konfiguration nicht erforderlich. Es ist möglich, *ezVSP*-Konfigurationen zu exportieren und importieren, die Verbindungen wurden jedoch aufgrund des Unterschiedes zwischen der vorherigen und der neu installierten Version manuell gemäß **Tabelle 3.5** eingerichtet.

Tabelle 3.5: Konfigurationsübersicht der *ezVSP*-Software

Virtual Port	Comment	Netw. Conf.	Host IP	Host Port
COM2	FEEDW CTA	TCP Client	192.168.178.31	14700
COM3	BASEW CTA	TCP Client	192.168.178.31	14701
COM4	Abgasanalytik CTA	TCP Client	192.168.178.31	14702
COM5	FRrel CTA	TCP Client	192.168.178.31	14703
COM6	FEEDW CTB	TCP Client	192.168.178.41	14700
COM7	BASEW CTB	TCP Client	192.168.178.41	14701
COM9	FRrel CTB	TCP Client	192.168.178.41	14703

Da die Abgas- und Pumpentreiber auf benutzerdefinierte und noch nicht verfügbare Variablen von MFCS/win zurückgreifen, können sie erst nach der erfolgreichen Migration der Datenbanken (siehe nächster Abschnitt) konfiguriert werden.

3.3.5 Datenmigration

Das grundsätzliche Prinzip der Datenmigration ist das Kopieren der Datenbankdateien vom Ausgangs- auf das Zielsystem. Die zu kopierenden .MDB-Dateien sind mit ihrem vollständigen Pfad in **Tabelle 3.6** aufgelistet. Zusätzlich sind die Datenbanken mit den aufgezeichneten Daten der Kultivierungen aus **C:\MFCS_win\BATCHES** auf das Zielsystem zu kopieren. Das Hauptproblem bei diesem Vorgang ist die Inkompatibilität der Datenbanken beim Wechsel der Softwareversion von MFCS/win. Im *Installation Handbook* [10] wird auf S. 103 das Verfahren beschrieben, um die Datenbanken auf einen neuen Computer mit einer neueren Version von MFCS/win zu übertragen. Das dort genannte manuelle Ausführen des Datenbanken-Konvertierungstools führte im virtuellen Test zu Fehlern, daher wurde ein alternativer Weg gewählt, der die automatische Konvertierung beim Update von MFCS/win ausnutzt.

Tabelle 3.6: Bei der Migration zu berücksichtigende Datenbanken

Datenbank/Dateipfad	Inhalt
Configuration C:\MFCS_win\DATABASE\MFCSCONF.MDB	Alle definierten Reaktoren, Formeln, Variablen und sonstige Einstellungen.
Batch Directories C:\MFCS_win\DATABASE\MFCSBDIR.MDB	Eckdaten zu allen durchgeführten Kultivierungen und die Verweise zu den dafür angelegten Batch-Datenbanken mit den Prozessdaten.
User Templates C:\MFCS_win\DATABASE\MFCSUSER.MDB	Benutzerdefinierte Vorlagen für Plots und Reports.
Audit Trail C:\MFCS_win\DATABASE\MFCSAUDI.MDB	Systemprotokolle; alle Konfigurationsänderungen werden hier protokolliert.
Configuration Templates C:\MFCS_win\DATABASE\MFCSUST.MDB	Vorlagen für Konfigurationen, möglicher Speicherort für momentan nicht benötigte Konfigurationen.

Im ersten Schritt musste eine versionsgleiche Installation von MFCS/win auf dem Zielsystem eingerichtet werden. Da für die auf dem Ausgangssystem vorhandene Version *3.0 Service Pack 3 Patch B* kein vollständiges Installationsprogramm verfügbar war, wurde stattdessen wie in **Abschnitt 3.3.3** beschrieben die Version *3.0 Service Pack 3 Patch A* installiert. Anschließend wurde ein Update auf Version *3.0 Service Pack 3 Patch B* über  MFCS Updates ▶ Install_MFCS30_SePa3B.exe durchgeführt.

Da MFCS/win nun auf beiden Systemen in der gleichen Version vorlag, konnten die Datenbanken ohne Versionskonflikte auf das Zielsystem übertragen werden. Dazu wurde auf beiden Systemen zuerst der Kernel heruntergefahren, um Übertragungsfehler zu vermeiden und nach Abschluss des Kopiervorgangs neu gestartet. Durch Aufrufen des Configuration Managers auf dem Zielsystem konnte bestätigt werden, dass die Definitionen der Geräte und Prozessvariablen korrekt übernommen wurden.

Schließlich wurde nach erneutem Herunterfahren des Kernels auf dem Zielsystem das Setup der neuesten verfügbaren Version *3.0 Support Pack 1 Patch A* über  MFCS_V30_SupPa1A ▶ CD-Image 3.0_SupPa1A ▶ MFCS_30 ▶ setup.exe gestartet. Das Programm erkannte die bereits installierte Version und führte statt einer Neuinstallation ein Update durch. Hierbei wurden die bereits migrierten Datenbanken erfolgreich auf die neue Version aktualisiert.

Konfigurieren der Treiber für Feedpumpen und Abgasanalytik

Da der Pumpentreiber *Reglo Pumps* nur einen COM-Port pro Instanz anspricht, ist für jeden durch Pumpen genutzten Port eine Instanz zu starten. Die verwendeten Pumpen können kaskadiert werden, sodass je COM-Port bis zu acht Pumpen angesteuert werden können; im vorliegenden Fall wurde jedoch zur übersichtlicheren Verkabelung je COM-Port nur eine Pumpe angeschlossen.

Für die eingesetzten Feedpumpen waren nach einem Neustart des Zielsystems also zwei Instanzen von *Reglo Pumps* zu starten und zu konfigurieren. Zum Starten des Treibers muss die MFCS-Shell geöffnet sein. Die in *ezVSP* angelegten virtuellen COM-Ports können den Instanzen über die Registerkarte **Common Settings** zugewiesen werden. Es müssen zusätzlich in jeder der Instanzen die Werte für die Fermenter ID (Process Unit) und den MFCS/win Controller (Variable mit steuerndem Charakter) zum Steuern der Pumprate eingestellt werden. Die Benutzeroberfläche des Treibers ist in **Abbildung 3.4** zu sehen.

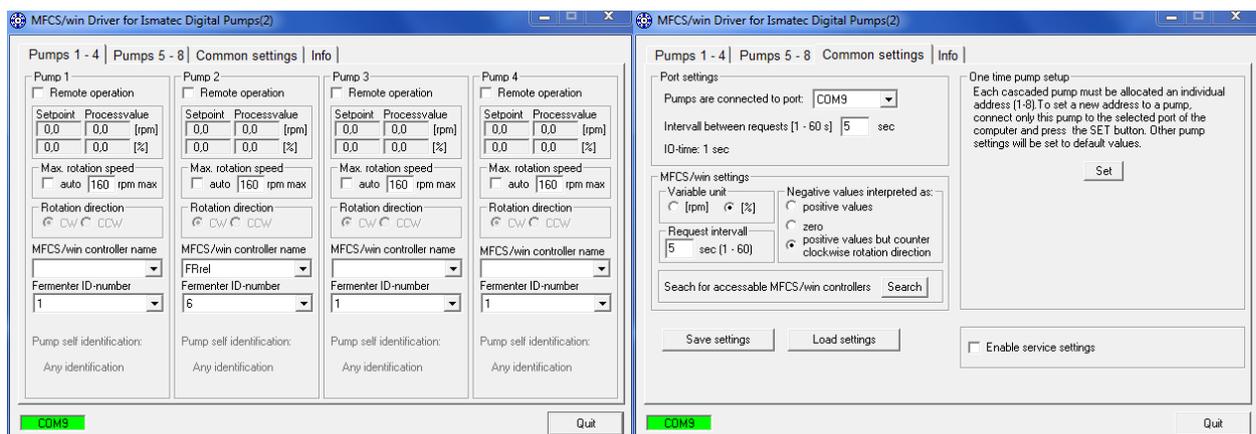


Abbildung 3.4: Benutzeroberfläche des *RegloPumps*-Treibers

Gezeigt sind zwei Registerkarten der selben Instanz, in denen die notwendigen Einstellungen vorgenommen werden

Tabelle 3.7 zeigt die zu setzenden Einstellungen der Pumpentreiber als Übersicht. Hierbei ist zu beachten, dass die gleich benannten Variablen *FRrel* zu der jeweils eingestellten Control Unit gehören und unabhängig voneinander existieren. Der Treiber *BlueInOne* für den Abgassensor wurde gemäß **Tabelle 3.8** eingerichtet.

Tabelle 3.7: Konfiguration des Treibers für die digitalen Feedpumpen *Reglo Digital*

	Instanz 1 (CTA)	Instanz 2 (CTB)
Porteinstellungen		
serieller Port	COM5	COM9
Abfrageintervall	2 sec	2 sec
MFCS/win-Einstellungen		
Variableneinheit	%	%
Abfrageintervall	5 sec	5 sec
Negative Werte interpretieren als	positive Werte	positive Werte
Pumpeneinstellungen		
Konfigurierte Pumpe	Pump 1	Pump 2
Maximale Drehzahl	160 rpm	160 rpm
Drehrichtung	CW (Uhrzeigersinn)	CW (Uhrzeigersinn)
MFCS/win controller name	FRrel	FRrel
Fermenter ID	3 (PU3 = CTA)	6 (PU6 = CTB)

Tabelle 3.8: Konfiguration des Treibers für den Abgas-Analysator *BlueInOne*

Interface Settings	Value	Variable Settings	Value
Protocol	none	Fermenter Number	3 (BIOSTAT CTA)
COM-Port	Com4	xCO2 Variable Name	CO2out
Baudrate	19200	xO2 Variable Name	O2out
Databits	8	Pressure Variable Name	PRESSOffgas
Parity	None	Request Interval (dT)	10 s
Stopbits	1	Send Error Messages	ja
Buffer Size (bytes)	1024		
Bytes before read out	10		
Type of Analyser	BlueSens : BlueInOne		

3.4 Setup und Anbindung eines MFCS-Clients

3.4.1 Voraussetzungen

Um einen Client einzurichten, muss sich das Gerät im selben Netzwerk wie der Server befinden. Da dieser sowohl mit dem LLAN als auch mit dem HAW-LAN verbunden ist, wären theoretisch beide Netze für die Verbindung nutzbar. Das LLAN wurde vom Internet getrennt, um die Geräte darin besser zu schützen, daher stünde es den Benutzern der Clients in diesem Netz nicht zur Verfügung. Da das Internet ein wichtiges Instrument für Kommunikation und Recherche ist, wurde stattdessen das HAW-LAN gewählt. Vor der Installation von MFCS/win muss ein Computernamen feststehen, der im Anschluss nicht mehr geändert werden sollte. Vorgaben seitens der Netzwerkadministratoren sollten dabei eingehalten werden. Eine nachträgliche Änderung ist möglich⁵, allerdings muss der neue Computernamen auch in der Benutzerverwaltung im Configuration Manager (■ TASKS ▶ MFCSMA.EXE) angepasst⁶ werden, da dort die berechtigten Nutzer im Format  Computernamen \Benutzer gespeichert sind und ansonsten kein Zugriff mehr möglich ist. Für diese Änderung ist kein Configuration Update notwendig.

3.4.2 Zugriff auf den Server einrichten

Die Benutzerkonten, unter denen die Nutzung des MFCS-Clients möglich sein soll, sind im Vorfeld anzulegen. Zum Anlegen lokaler Benutzerkonten wird  +  `lusrmgr.msc` genutzt. Für die in dieser Arbeit relevanten Systeme sind die Konten in **Tabelle 3.3** zusammengefasst. Für jedes der Konten muss einmalig der Zugriff auf das im Netzwerk freigegebene MFCS-Verzeichnis des Prozessleitrechners eingerichtet werden. Dazu wird der Windows-Dateiexplorer geöffnet und über die Adressleiste der UNC-Pfad  PBVT01 ▶ MFCS_win angesteuert. Es öffnet sich ein Fenster, in dem der Benutzername ( MFCS oder bei Domänen-Computern  PBVT01 \MFCS) und das zugehörige Kennwort eingegeben werden. Es muss die Option `Passwort speichern` aktiviert werden, damit der Zugriff auch nach einem Neustart bestehen bleibt. Bei korrekten Zugangsdaten wird nun das MFCS-Hauptverzeichnis des Servers angezeigt. Aus Sicherheitsgründen sollte dieser Pfad niemals als Verknüpfung gespeichert oder anderweitig für die Nutzer des Clients offensichtlich zugänglich gemacht werden, da selbst die Nutzer mit den niedrigsten MFCS-Privilegien einen vollen Schreibzugriff auf das MFCS-Hauptverzeichnis des Prozessleitrechners besitzen. Dieser Punkt wird in **Kapitel 5 (Zusammenfassung und Ausblick)** noch näher betrachtet.

⁵Dies gilt ausschließlich für Clients

⁶Der Vorgang ist ähnlich zum Neuanlegen eines Benutzers. Siehe dazu *System Manager Handbook* [8] S. 159 ff.

3.4.3 Installation von MFCS/win (Client)

Die Installation von MFCS/win wird ebenso wie beim Server als Benutzer  BVTadmin durchgeführt. Der Verlauf ist ähnlich, jedoch entfällt die (automatische) Installation des Dongle-Treibers sowie die Eingabe der Seriennummer. Die während der Installation notwendigen Angaben sind folgend aufgeführt.

Tabelle 3.9: Übersicht über die Angaben bei der Installation von MFCS/win-Workstation (Client)
Auflistung in chronologischer Reihenfolge. Für eine bessere Übersicht wurden einige Abfragen und Auswahlmöglichkeiten ggf. sinnvoll gekürzt.

Menüpunkt/Abfrage	Angabe/Auswahl
Setup Type	MFCS/win Workstation Installation
Customer Information	
User Name	MFCS (oder persönlicher Name)
Company Name	HAW Hamburg
Destination Location	C:\MFCS_win
Documentation Language	German
Network Configuration Disk	\\PBVT01\MFCS_win\NETWDISK
Microsoft Access 2000 Runtime	Install Now
Restart computer	No, restart later

3.4.4 Verbinden des Clients mit dem MFCS-Server

Nach Abschluss der Installation kann die Client-Version von MFCS/win mit dem Server verbunden werden. Dazu wird clientseitig die Anwendung  C: ▶ MFCS_win ▶ Systools ▶ NetConf ▶ NETCONF.EXE ausgeführt. Im sich öffnenden Fenster führen ein Klick auf und anschließend auf zur Auswahl des Servers im Netzwerk. Dabei ist zu beachten, dass nicht der Server selbst definiert wird, sondern der Pfad zu dessen freigegebenen MFCS-Verzeichnis. Da die Netzwerkerkennung mitunter langsam oder in einigen Fällen trotz entsprechender Einstellungen gar nicht funktioniert, sollte der UNC-Pfad zum MFCS-Server-Hauptverzeichnis direkt angegeben werden. Für den vorliegenden Fall ist dies  PBVT01 ▶ MFCS_win. Nach erfolgreicher Verbindung kann die MFCS-Shell gestartet werden. Entsprechend den Berechtigungen des angemeldeten Benutzers werden nun Schaltflächen zum Starten von Modulen angeboten.

3.4.5 Installation weiterer Software

Um den Benutzern verschiedene Möglichkeiten zur Auswertung und Aufbereitung der Daten zu geben und gleichzeitig der unerwünschten Installation von ungeprüfter Software vorzubeugen, ist es sinnvoll, die Client-Computer bereits im Vorfeld mit vertrauenswürdigen Anwendungen auszustatten. Zu den wichtigsten Tools zählen Microsoft Office zum Erstellen und Bearbeiten von Dokumenten, Mozilla Firefox für einen robusten und sicheren Internetbrowser sowie eine Software zum Anzeigen, Erstellen und Bearbeiten von PDF-Dateien. Eine Liste der verwendeten Anwendungen ist in *Tabelle 3.1* zu finden.

3.5 Funktionstest

Nach Abschluss der Migrationsarbeiten wurde die korrekte Kommunikation zwischen MFCS/win und den DCUs der Bioreaktoren geprüft. Dazu wurden über alle Verbindungen (Ethernet, RS-232 via Ethernet, RS-422) exemplarisch Daten von der DCU oder einem Peripheriegerät abgefragt bzw. dorthin gesendet. Um den Aufwand gering zu halten, wurden lediglich Werte der Temperatursensoren abgefragt und Setpoints für die Drehzahlregelung des Rührers und der externen Feedpumpen gesetzt. Es wurden Werte empfangen, die mit denen der DCUs übereinstimmten und auch Rührer und Pumpe arbeiteten einwandfrei, daher wurde die grundsätzliche Kommunikation für korrekt befunden.

4 | Exemplarische Hochzelldichte-Kultivierung nach der Datenmigration

Nach erfolgreichem Überprüfen der grundsätzlichen Funktionalität wurde eine Hochzelldichte-Kultivierung nach dem i²HCDC-Verfahren gestartet, um das neue Prozessleitsystem in der Praxis zu erproben und eventuelle Anomalien zu erkennen, deren Ursache tiefer liegt als ein funktionsloser Kommunikationsweg. Aufgrund zeitlicher Beschränkung wurde zunächst ein Reaktor getestet; das Szenario von mehreren parallelen Kultivierungsprozessen konnte erst später realisiert werden und wird nicht mehr in dieser Arbeit erfasst.

4.1 Material und Methoden

4.1.1 Stamm und Stammhaltung

Zur Kultivierung wurde der Stamm *E. coli* BL21 (DE3) mit dem von Novagen Inc. entwickelten pET-Expressionssystem [12] verwendet. Durch seine Optimierung für hohe Proteinexpressionsraten eignet es sich gleichermaßen gut für industrielle Anwendungen und Forschungsarbeiten. Der in dieser Arbeit genutzte Vektor pET-28a besitzt ein dem T7-Promotor nachgeschaltetes *lac*-Operon, sodass die Expression des heterologen Proteins durch Zugabe von IPTG induziert und mit Lactose auch reguliert werden kann. Die Vorkultur wurde mit der Working Cell Bank (WCB) *E. coli* BL21 (DE3) pET-28a Rab11a BB vom 17.09.2015 beimpft.

4.1.2 Kulturmedium

Es wurde ein synthetisches Medium basierend auf dem Medium für Hochzelldichte-Kultivierungen nach Korz et al. [6] eingesetzt. Die hier verwendete modifizierte Variante für den i²HCDC-Prozess zeichnet sich durch ihre geringe Anzahl an Komponenten aus [5]. Die Herstellungsschritte sind in **Tabelle 4.1** beschrieben.

Phosphatpuffer

Die Basis bildet eine Lösung von Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4), deren pH-Wert mit Ammoniak auf 6,6 eingestellt wird. Dieser Puffer versorgt die Zellen über den gesamten Prozess mit Phosphat. Im Verlauf des Prozesses wird durch die pH-Regelung der DCU NH_3 nachdosiert,

Tabelle 4.1: Herstellung der Kulturmedien und Feedlösung

	Herstellungsschritt	Komponente	Konz./Qualität	Menge	Endkonz.
Feed (A+B) 1500 mL	Feed A (1425 mL)	H ₂ O	aq. dem.	593,0 mL	
	lösen, autoklavieren	Glc · 1 H ₂ O	909,1 g Glc kg ⁻¹	1237,5 g	750 g Glc L ⁻¹
	Feed B (75 mL)	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	500 g l ⁻¹	60,0 mL	20 g L ⁻¹
	mischen, autoklavieren	Trace	100 x	15,0 mL	1 x
Vorkultur 300 mL	Phosphatpuffer	H ₂ O	aq. dem.	297,0 mL	
	ansetzen (Flasche)	KH ₂ PO ₄	n. a.	5,23 g	17,43 g L ⁻¹
	Sterilisation (Autoklav)	H ₂ O (Verlust)	n. a.	-2,97 mL	
	Zugabe unter Abzug	NH ₃	25 %	2,64 mL	0,22 %
	Zugabe an Swb	Feed	750 g Glc L ⁻¹	3,20 mL	8 g Glc L ⁻¹
	Animpfen an Swb	WCB	ΔOD _{WCB}	0,3 mL	ΔOD _{VK, start}
Hauptkultur 3000 mL	Phosphatlösung	H ₂ O	aq. dem.	2840,5 mL	
	ansetzen (Reaktor)	KH ₂ PO ₄	n. a.	47,04 g	17,43 g L ⁻¹
	Sterilisation (in-situ)	H ₂ O (Verlust)	n. a.	-150,0 mL	
	Zugabe über SK	NH ₃	25 %	9,48 mL	0,079 %
	Animpfen über SK	Vorkultur	ΔOD _{VK, end}	300,0 mL	ΔOD _{start}

sodass der metabolisierte Ammonium-Stickstoff ständig ersetzt wird. Da die Vorkultur als Batch-Prozess bereits zu Beginn die gesamte benötigte Menge an Ammonium-Stickstoff enthalten muss, wird das Medium dafür separat mit zwar gleicher Konzentration an KH₂PO₄, aber einer erhöhten NH₃-Konzentration hergestellt.

Feedlösung

Die Feedlösung dient als Quelle für Kohlenstoff, Schwefel und Spurenelemente. Sie wird durch Vereinigung von Feed A und Feed B gewonnen, nachdem diese zur Vermeidung von Maillard-Reaktionen separat thermisch sterilisiert wurden. Feed A ist die C-Quelle in Form einer hochkonzentrierten Glucoselösung mit $c_{\text{Glc}} = 750 \text{ g L}^{-1}$. Die S-Quelle Magnesiumsulfat und ein Konzentrat von Spurenelementen bilden zusammen Feed B.

4.1.3 Geräte und Material

Neben den üblichen Laborgeräten und Verbrauchsmaterialien wurden für diese Arbeit die nachfolgend aufgeführten Geräte verwendet.

Tabelle 4.2: Verwendete Bioreaktoren und Laborgeräte

Gerätetyp	Hersteller	Modell	Seriennummer
Bioreaktor CTA			
Rührkessel 5 L	B.Braun Biotech International	CT 5-2	1163
DCU	B.Braun Biotech International	Biostat C	04264/03
RS232-Ethernet-Konverter	Sollae Systems	EZL-400S-E	n.a.
Feedwaage	Sartorius Weighing Technology	TE 6101	26390926
Basenwaage	Sartorius Weighing Technology	TE 6101	26390928
Feedpumpe	Ismatec	ISM831C	257025-3
Abgasanalytik	BlueSens gas sensor GmbH	BlueInOne FERM	10F192Q1410000BB
Weitere Laborgeräte			
Analysewaage	Sartorius	BP 221 S	
Zentrifuge	Heraeus	Biofuge pico	
Trockenschrank	Heraeus	vacutherm	
Inkubator/Brutschüttler	GFL	3033	
Photometer	Pharmacia	LKB Ultrospec III	

4.1.4 Probenahme

Beprobung des Bioraktors

Das Reaktormodell CT verfügt über ein dampfsterilisierbares Probenahmeventil. Vor der ersten und nach jeder Entnahme eines Probenvolumens von ca. 10-20 mL wird dieses für mindestens 5 min mit Schleichdampf entkeimt und dann abkühlen gelassen, bis es handwarm ist.

4.1.5 Off-line-Analytik

Es wurde lediglich die optische Dichte als off-line-Größe ermittelt, da der Fokus bei der Kultivierung primär auf den Werten der on-line-Sensoren lag. Umrechnungen in Biotrockenmassekonzentrationen erfolgten ggf. über den Faktor $f_{X/OD} = 0,45$, wie er für *E. coli* BL21 (DE3) pET-28a Rab11a BB in den Arbeiten von Beckmann (2018) [5] ermittelt wurde.

4.1.5.1 Messung der optischen Dichte

Die optische Dichte der Zellsuspension wird bei $\lambda = 600\text{ nm}$ im Photometer bestimmt. Das Lambert-Beer'sche Gesetz gilt prinzipiell nur für verdünnte klare Lösungen. Bleibt die Extinktion unter $0,6^1$, ist ΔOD hinreichend proportional zur Konzentration der Zellsuspension. Da gerade bei Hochzelldichte-Kultivierungen schnell Trübungen erreicht werden, deren Wert weit über dieser Grenze liegt, ist eine Verdünnung der Probe erforderlich.

Der Verdünnungsprozess ist in SOP 320101-04 definiert. Die Teilvolumina werden dabei so gewählt, dass immer ein Gesamtvolumen von $1,0\text{ mL}$ entsteht. In höheren Konzentrationsbereichen wird eine mehrstufige Verdünnung angewendet, um mit den verfügbaren Kolbenhubpipetten in sinnvollen Bereichen zu arbeiten.

Da bei der Probenverdünnung das in der Zellsuspension enthaltene Medium ebenfalls mitverdünnt wird, wird die optische Dichte des Mediums bei Kultivierungsbeginn einmalig für jede Verdünnungsstufe bestimmt. Diese Methode lässt eventuell auftretende Veränderungen der optischen Eigenschaften des Mediums im Verlauf der Kultivierung außer Acht. Die optische Dichtedifferenz der Probe ergibt sich aus

$$\Delta OD_{600} = f_d \cdot (OD_{\text{smp}} - OD_{\text{med}}) \quad (4.1)$$

¹Je nach Suspension und Publikationen werden auch andere Obergrenzen angenommen

4.1.6 On-line-Analytik

Zur Regulierung der Wachstumsbedingungen werden Messwerte von verschiedenen Sensoren abgefragt und entweder direkt im Regler der DCU verwertet und/oder in einer MFCS-Variable gespeichert, die in definierten Formeln zum Berechnen weiterer Mess- oder Steuergrößen verwendet werden können. Alle Sensoren sind mit den Bedingungen der in-situ-Sterilisation kompatibel. Das Abfrageintervall von MFCS/win beträgt 15 Sekunden, wodurch sich eine minimale Reaktionszeit für softwareseitig implementierte Regler ergibt. Folgend werden die on-line ermittelten Größen sowie das Messprinzip und die abhängigen Regler angegeben.

Temperatur

Die Temperatur wird über eine Pt100-Stabsonde im Stutzenkranz des Rührkessels ermittelt. Der Messwert wird DCU-seitig vom Temperaturregler in Stellgrößen für die elektrische Heizung und das Ventil des Kühlwasserzulaufs umgesetzt.

pH-Wert

Der pH-Wert wird über eine pH-Einstabmesskette (Mettler-Toledo) im Stutzenkranz des Rührkessels ermittelt. Die Kalibrierung wird für den sauren Bereich und vor der Befüllung des Rührkessels mit Kalibrierlösungen von $\text{pH} = 4,01$ und $\text{pH} = 7,00$ durchgeführt. Nach der Sterilisation wird extern der pH-Wert einer Probe zur Nachkalibrierung bestimmt, um bei der Sterilisation entstandene Abweichungen zu korrigieren. Der pH-Wert wird vom pH-Regler zum Ein- und Ausschalten der Basenpumpe genutzt.

Gelöstsauerstoffkonzentration

Als Sensor dient eine polarografische Messeinheit mit integriertem Temperatursensor (Mettler-Toledo). Der im Stutzenkranz montierte Stabsensor wird während der Sterilisation bei $\vartheta = 121\text{ °C}$, $F_{\text{air}} = 0\text{ L min}^{-1}$, $N_{\text{stirr}} = 1000\text{ min}^{-1}$ auf $\text{pO}_2\% = 0\%$ kalibriert. Die Kalibrierung für $\text{pO}_2\% = 100\%$ erfolgt bei $\vartheta = 30\text{ °C}$, $F_{\text{air}} = 3\text{ L min}^{-1}$, $N_{\text{stirr}} = 1000\text{ min}^{-1}$. Die Gelöstsauerstoffkonzentration wirkt über eine $\text{pO}_2\%$ -Reglerkaskade zuerst auf die Rührerdrehzahl und anschließend auf das Luft- O_2 -Mischungsverhältnis des MFC.

Abluft- O_2 und $-\text{CO}_2$

Der Abgasanalysator *BlueInOne Ferm* (Blue Sens gas sensor GmbH) vereint zwei Messinstrumente in einem Gerät. Der Partialdruck von CO_2 wird mithilfe des integrierten IR-Spektrometers über die Absorption bestimmter Wellenlängen(-bereiche) gemessen. Die zweite Messkomponente dient der O_2 -Messung und nutzt die Sauerstoffdurchlässigkeit von Zirkoniumoxid bei hohen

Temperaturen von 300 - 650 °C. Als Referenzwert dient die Außenluft; der Unterschied dazu wird in Form einer Potentialdifferenz gemessen. Zum Erreichen und Stabilisieren der Arbeitstemperatur der Zirkoniumoxid-Membranen muss der Abgas-Analysator bereits eine Stunde vor seinem Einsatz eingeschaltet werden. Die Kalibrierung erfolgt als 1-Punkt-Kalibrierung bei trockener Druckluft vor Beginn der Kultivierung. Es sind keine Regler von den Messwerten abhängig.

Schaumbildung

Eine übermäßige Schaumbildung wird durch eine Leitfähigkeits-Sonde im Deckel des Rührkessels bei direktem Kontakt detektiert. Daraufhin wird die Zugabe eines Antischaummittels ausgelöst, um zu verhindern, dass der Schaum die Abluftstrecke erreichen kann.

4.2 i²HCDC-Kultivierung und Ergebnisse

Die Kultivierung von *E. coli* BL21 (DE3) pET-28a Rab11a BB erfolgte im Biostat CT (CTA) bei $\vartheta = 30\text{ °C}$ und $pO_2\% = 20\%$. Die Animpfzellichten und spezifischen Wachstumsraten wurden so gewählt, dass der Übergang von der zweiten Wachstumsphase (G₂) zur Produktionsphase (P) tagsüber stattfindet, um eine vorherige Überprüfung der optischen Dichte zu ermöglichen. Da die Kultivierung nur zu Testzwecken durchgeführt wurde, wurde auf die Induktion mit IPTG zu Beginn der Produktionsphase verzichtet. Es wurden hohe Zelldichten von $\Delta OD \approx 280$ erreicht, was für sich als Erfolg zu bewerten ist. Im Ablauf des verwendeten S88-Rezepts konnten keine offensichtlichen Abweichungen festgestellt werden, bei Betrachtung der Variablen-Verläufe im Detail fielen jedoch einige unerwartete Ereignisse auf, die größtenteils interpretiert werden konnten und nicht durch die Aktualisierung von MFCS/win zustande kamen.

Die aufgezeichneten Daten wurden zur Auswertung in einer Kreuztabelle zusammengefügt. Da MFCS/win nur Werte aufzeichnet, die sich ausreichend vom zuvor aufgezeichneten Wert unterscheiden (*System Manager Handbook* [8] S. 156), sind nicht zu jedem Zeitpunkt für jede Variable Daten verfügbar. Zur einfacheren Erstellung von Grafiken wurden die fehlenden Zwischenwerte linear interpoliert.

4.2.1 Verlauf des Zellwachstums

Als Kenngröße für das Zellwachstum dient die optische Dichtedifferenz zwischen zellfreiem Medium und Zellsuspension, die nach **Abschnitt 4.1.5.1** off-line bestimmt wurde. Für den Bereich zwischen 5 h und 23 h Prozesszeit sind keine Messwerte verfügbar, da dieser Zeitraum auf den Abend und die Nacht zwischen den beiden Versuchstagen fiel und währenddessen keine Proben entnommen wurden. Der charakteristische exponentielle Verlauf ist anhand der wenigen Messpunkte nicht erkennbar, daher wurde zum einen das verbrauchte Basenvolumen (V_{Base}) als Näherung verwendet und zum anderen rechnerisch ein plausibler Verlauf modelliert. Ein Vergleich der beiden Näherungen ist in **Abbildung 4.1** dargestellt.

Zur Modellierung durch eine andere Prozessgröße wurde V_{Base} gewählt, da das geförderte Ammoniak-Volumen nicht wie das Feed-Volumen einem hinterlegten exponentiellen Profil folgt, sondern über den pH-Regler vom pH-Wert im Bioreaktor und damit vom Metabolismus der Zellen beeinflusst wird. Hierbei ist zu beachten, dass nicht ausschließlich die Zellkonzentration auf den Verbrauch einwirkt, jedoch den größten Einfluss hat.

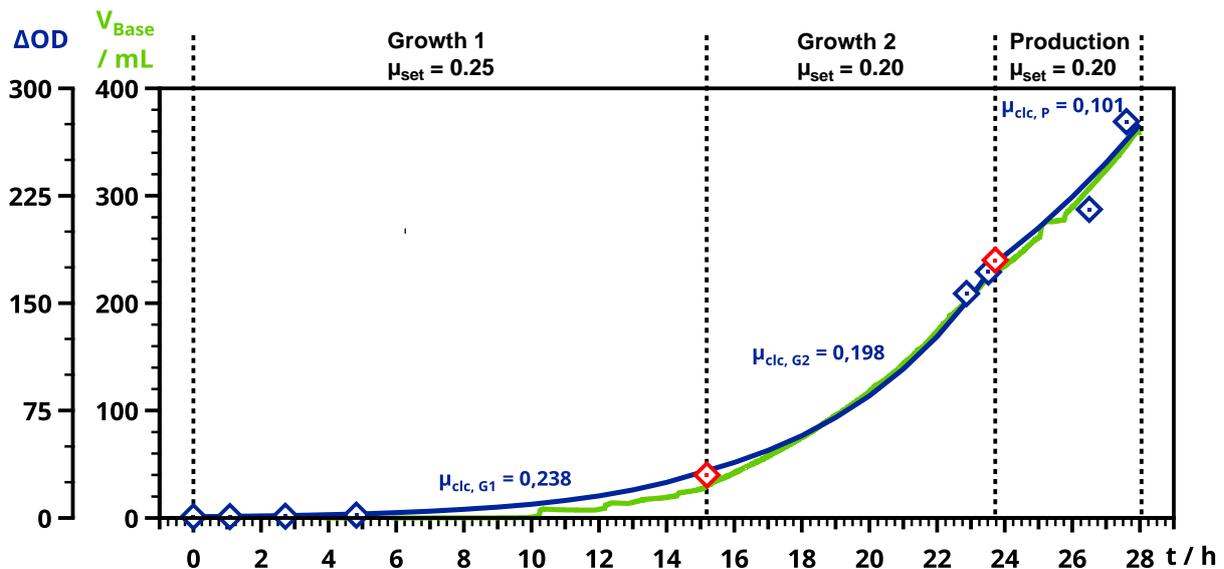


Abbildung 4.1: Verlauf von ΔOD und Modellierung der Zwischenwerte
 Zwischen $t = 5$ h und $t = 23$ h sind keine Werte verfügbar, daher wurde der fehlende Verlauf möglichst realistisch modelliert.

Die Werte von V_{Base} (grüne Linie) wurden um den Anfangswert 20,5 reduziert, um den Verlauf bei 0 beginnen zu können und das Maximum der Ordinate wurde mit 400 so gewählt, dass sich der maximale Wert von V_{Base} auf gleicher Höhe mit dem maximalen Wert von ΔOD befindet.. Die Modellierung von ΔOD_{clc} (blaue Linie) erfolgte für jede Phase einzeln. Als zusätzliche Anhaltspunkte mussten zwei anhand von V_{Base} abgeschätzte Werte (rot) zu den Zeitpunkten des Phasenwechsels eingefügt werden. Der Startwert des modellierten Verlaufs wurde auf $\Delta OD_{clc, 0} = \Delta OD_0 = 0,89$ festgelegt.

Für die Zeitpunkte der Probenahmen (und der zusätzlichen Fixpunkte) wurden rechnerische ΔOD -Werte bestimmt. Für jede Phase wurde eine eigene (rechnerische) spezifische Wachstumsrate genutzt. Die Fehlerquadrate gegenüber dem tatsächlich gemessenen (bzw. bei den Fixpunkten abgeschätzten) Wert wurden berechnet und summiert. Anschließend wurden mithilfe einer numerischen Zielwertsuche die rechnerischen spezifischen Wachstumsraten so optimiert, dass die Summe der Fehlerquadrate möglichst gering ausfällt. Mithilfe der optimierten Werte dieser Wachstumsraten wurde schließlich der Verlauf von ΔOD_{clc} mit stündlichen Intervallen berechnet.

Beim Vergleich von V_{Base} mit ΔOD_{clc} wird deutlich, dass beide Näherungsmethoden in G2 und P sehr ähnlich ausfallen und auch die Messwerte insbesondere in G2 gut treffen. In Phase G1 ist nur die rechnerische Näherung brauchbar, da der pH-Regler erst bei ca. 10 h beginnt, NH_3 nachzudosieren. Die Werte von μ_{clc} stimmen beim Betrachten von **Abbildung 4.2** gut mit der

Steigung von $\ln(V_{\text{Base}})$ überein und in G1 und G2 auch mit μ_{set} . In der Produktionsphase weichen jedoch beide spezifischen Wachstumsraten deutlich von μ_{set} ab. Als Grund hierfür kann das Überschreiten der maximalen Pumprate ab ca. 26 h vermutet werden, welches in **Abschnitt 4.2.2** näher betrachtet wird.

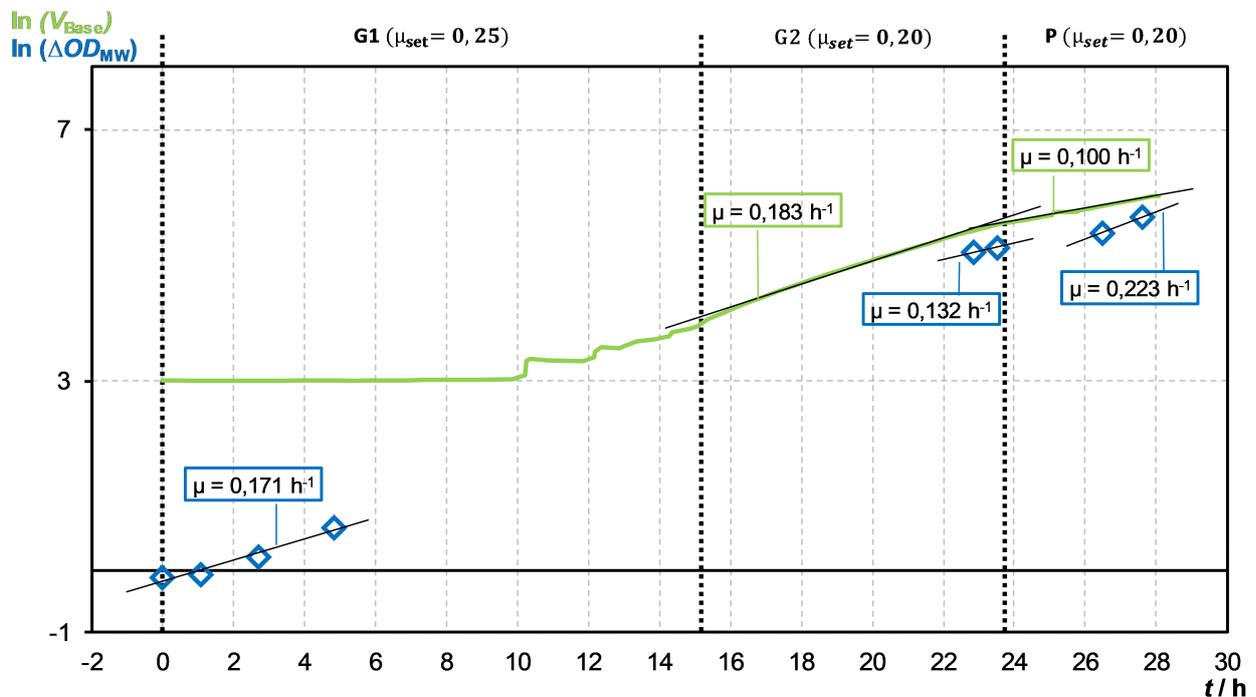


Abbildung 4.2: Halblogarithmische Darstellung von V_{Base} und ΔOD .

Die Steigungen der Regressionsgeraden wurden für jede Phase einzeln bestimmt. V_{Base} liefert in G2 und P einen auswertbaren Verlauf, liegt mit in G2 jedoch leicht und in der Produktionsphase deutlich unter der vorgegebenen spezifischen Wachstumsrate. Die anhand von ΔOD berechneten spezifischen Wachstumsraten sind aufgrund der wenigen Messpunkte nicht aussagekräftig genug.

4.2.2 Analyse des Systemverhaltens

Beim Vergleich der von MFCS/win protokollierten Messdaten mit dem theoretischen Verlauf eines i²HCDC-Prozesses (siehe **Abbildung 2.4**) fällt auf, dass beim Übergang von Phase G1 zu G2 mit einer Reduktion von μ_{set} nicht wie erwartet N_{stirr} und $F_{\text{R, rel}}$ verringert, sondern erhöht werden. Die Drehzahl hängt ausschließlich vom pO₂-Regler der DCU ab und ist unabhängig von MFCS/win. Die durch eine höhere Glucose-Zugaberate erhöhte Stoffwechselaktivität der Zellen hat einen höheren O₂-Verbrauch zur Folge, dem vom pO₂-Regler mit einer Erhöhung der Rührerdrehzahl entgegengesteuert wird. Die Erhöhung von $F_{\text{R, rel}}$ hätte beim Übergang zur nächsten Phase jedoch nicht stattfinden sollen, da eine Verringerung von μ_{set} bei unveränderter Konzentration (Annahme, dass sich die Zellkonzentration im kurzen Zeitraum des Übergangs nicht signifikant ändert) zu einer Verringerung der Nachfütterrate führen muss.

Die Phase G1 endet bei $t = 15,189$ h mit $F_{\text{R, rel}} = 9,9\%$, während die Phase G2 mit $F_{\text{R, rel}} = 14,0\%$ startet. Ein ähnliches Verhalten konnte beim Vergleich mit anderen Kultivierungen festgestellt werden, in denen μ_{set} nach Start des Rezepts verändert wurde. Hier liegt die Vermutung nahe, dass bei der Berechnung der initialen Feedrate einer Phase i nicht der tatsächliche Verlauf der Nachfütterung in Phase $i - 1$ berücksichtigt wird, sondern lediglich der Anfangswert. Bei der Korrektur von μ_{set} von 0,3 auf 0,25 in G1 wurde auch $F_{\text{R, rel}}$ automatisch von 0.3 auf 0.2 herabgesetzt, sodass sich je nach Ausgangswert bei exponentiellem Wachstum eine höhere oder eine niedrigere Feedrate am Ende des Zeitraums ergibt.

Bei Approximation der theoretischen Feedrate durch

$$F_{\text{R, end}} = f(F_{\text{R, start}}) = F_{\text{R, start}} \cdot e^{\mu_{\text{set}} (t_{\text{end}} - t_{\text{start}})} \quad (4.2)$$

mit

$$\mu_{\text{set}} = 0,25 \text{ h}^{-1} \quad t_{\text{start}} = 0 \text{ h} \quad t_{\text{end}} = 15,189 \text{ h}$$

ergibt sich

$$f(0, 2) = 8,92$$

$$f(0, 3) = 13,37$$

was den tatsächlichen Werten nahe kommt und die These stützt.

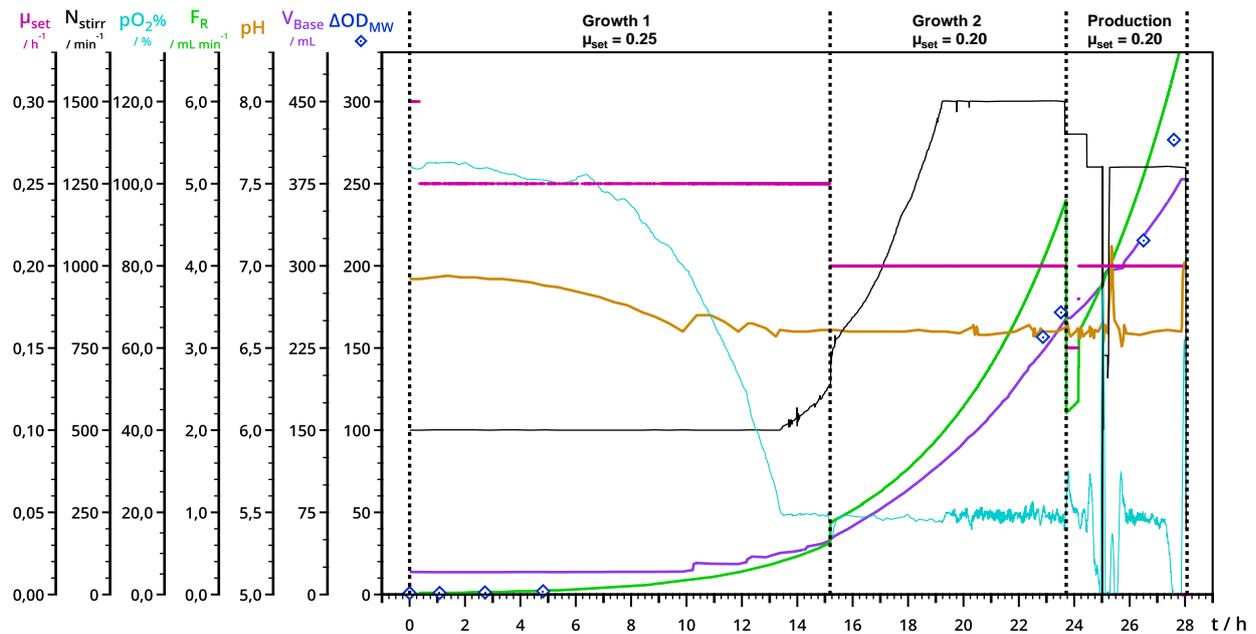


Abbildung 4.3: Verlauf der wichtigsten Parameter des i²HCDC-Prozesses.

Zur besseren Übersicht wurden die Messwerte für pO₂% per Savitzky-Golay-Verfahren geglättet ($m = 51$). Zu Beginn der G1-Phase wurde μ_{set} nachträglich von 0,30 auf 0,25 und in der P-Phase von 0,15 auf 0,20 geändert.

Die in **Abbildung 4.3** dargestellte Nachfütterrate F_R wird mithilfe von $F_{R, \text{max}}$ in den Wert $F_{R, \text{rel, set}}$ umgerechnet, der als Stellgröße für die Feedpumpe dient. Anders als zu erwarten, sendet die Pumpe mit $F_{R, \text{rel}}$ jedoch nicht die tatsächlich erreichte relative Drehzahl zurück an MFCS/win, sondern den zuvor empfangenen Sollwert. Aus diesem Grund ist es möglich, dass bei einem Sollwert von mehr als 100% der maximalen Drehzahl auch ein Wert von über 100% zurückgegeben wird, obwohl die tatsächliche Drehzahl nicht die maximale Drehzahl übersteigt, sondern dort stagniert.

In **Abbildung 4.4** zeichnen sich einige Ausreißer im Verlauf von $F_{R, \text{rel}}$ ab, während der grundsätzliche Verlauf jedoch dem Profil von $F_{R, \text{rel, set}}$ folgt. Bei näherer Betrachtung scheint ein Zusammenhang zwischen den von der Feedpumpe zurückgemeldeten Werten und den Ausreißern zu bestehen. Deutlich wird diese Abhängigkeit beim Logarithmieren der Ordinate (siehe **Abbildung 4.5**), sodass die Veränderungen innerhalb einer Größenordnung äquidistant sind. Der Großteil der Ausreißer liegt bei einem Wert, der der ersten Ziffer des tatsächlichen Wertebereichs entspricht. Es treten einige Ausreißer mit einem Wert von 0 auf, weitere Ausnahmen mit einem anderen einstelligen Zahlenwert jedoch nicht. Dies legt nahe, dass bei der Übertragung der Daten in einzelnen Fällen nur das erste Zeichen empfangen und aufgezeichnet wird.

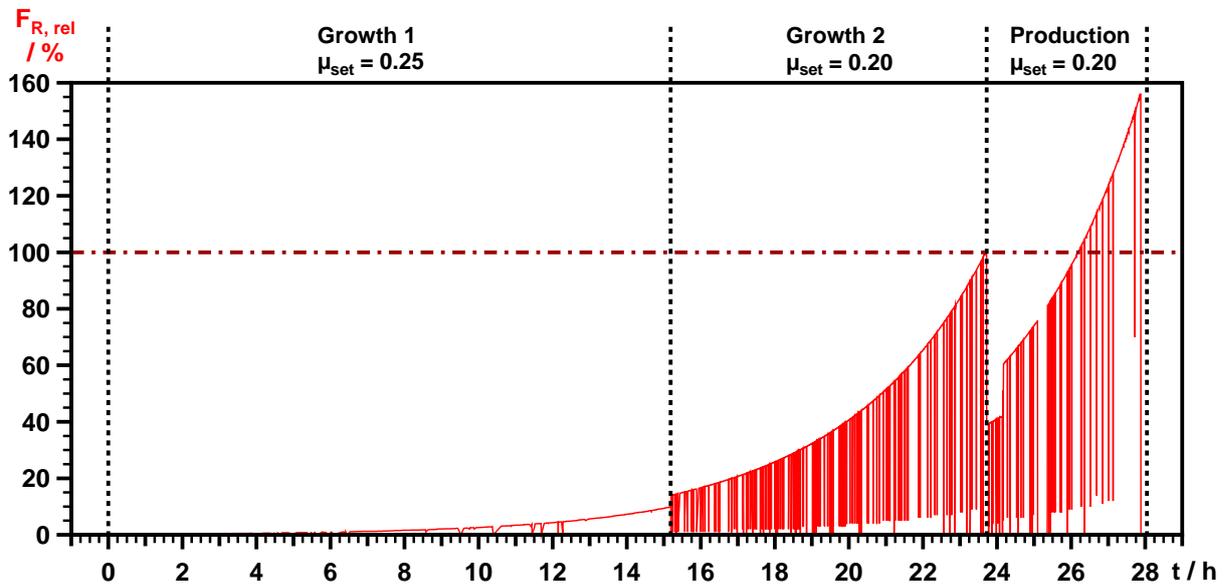


Abbildung 4.4: Verlauf der relativen Feedrate $F_{R, rel}$.
 Es treten sporadische Abweichungen vom Sollwert auf, das durch μ_{set} bestimmte Profil ist jedoch deutlich zu sehen.

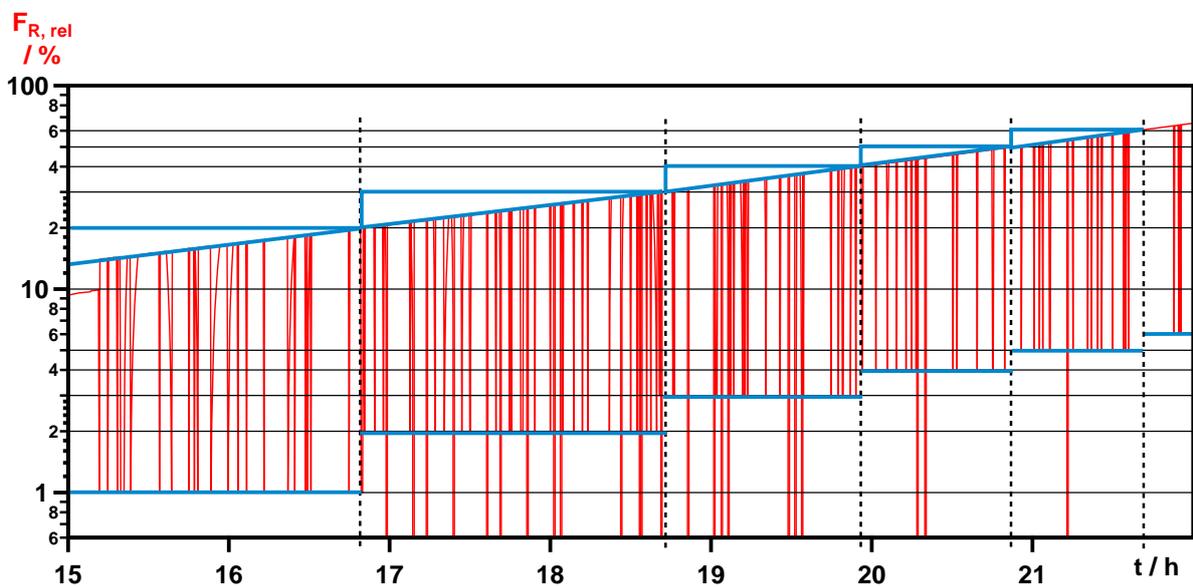


Abbildung 4.5: Übersichtsansicht der $F_{R, rel}$ -Abweichungen.
 Zur Verdeutlichung des Zusammenhangs zwischen den größtenteils korrekt übertragenen Werten von $F_{R, rel}$ und den Abweichungen wurde die Ordinate logarithmiert dargestellt. Entlang der Zeitachse wurden entsprechend den Dekaden von $F_{R, rel}$ vertikale Markierungen gesetzt.

Die ungeglätteten Daten von pO₂% weisen eine Schwingung mit einer Frequenz von ca. 32,5 h⁻¹ und einer Amplitude von bis zu 100% des Sollwerts auf. Bei gleichzeitiger Betrachtung des O₂-Setpoints für den MFC der Zuluftstrecke in **Abbildung 4.6** wird deutlich, dass die Schwingung zeitgleich mit den ersten Veränderungen von x_{O₂, in} einsetzt.

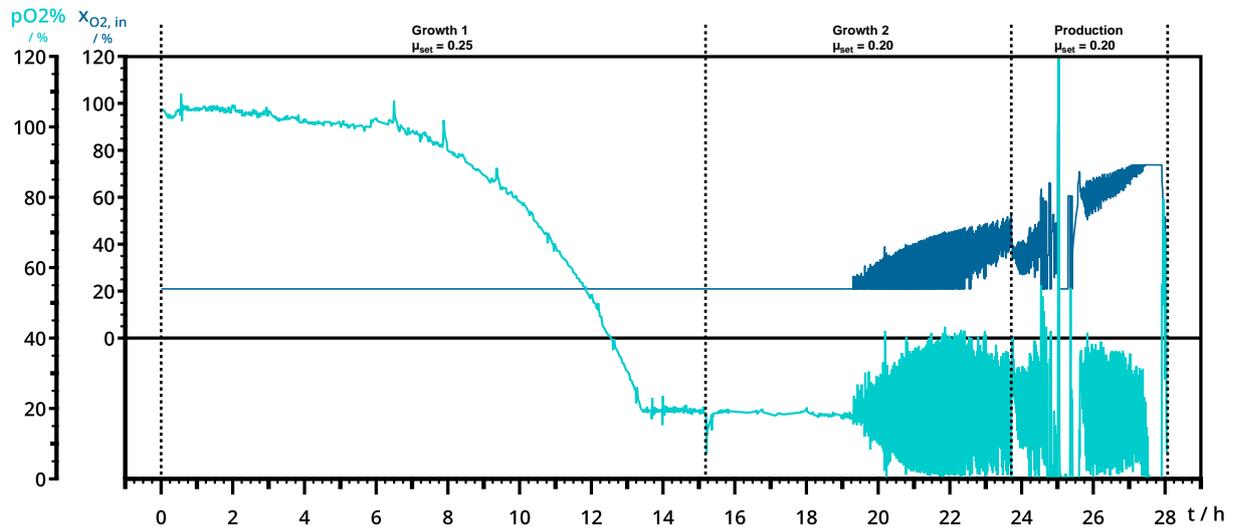


Abbildung 4.6: Vergleich von pO₂% und x_{O₂, in} im Gesamtverlauf.
 Ab ca. 19,5 h beginnt die Beimischung von O₂ in die Zuluftversorgung.

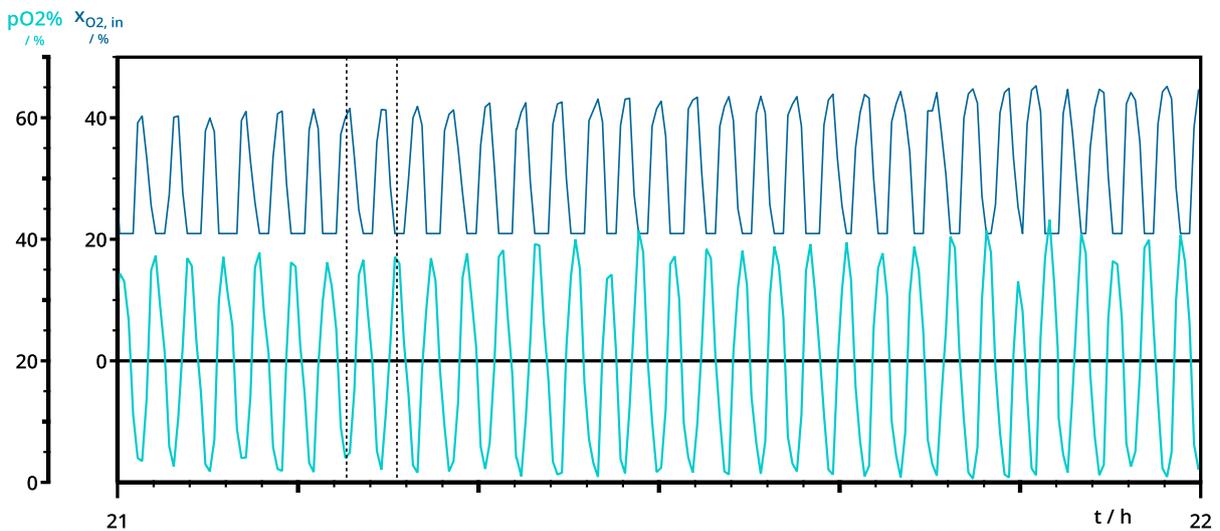


Abbildung 4.7: Vergleich der Schwingung von pO₂% und x_{O₂, in}.
 Im dargestellten Zeitraum von 1 h werden je Kurve ca. 32,5 Zyklen durchlaufen. Die Phasen der Schwingungen sind ca. 180° zueinander versetzt.

Anhand von **Abbildung 4.7** lassen sich Frequenz und Phasenverschiebung der beiden Schwingungen ermitteln. Die instabilen pO₂%-Werte werden vermutlich durch ein Zusammenspiel des MFC-bedingten minimalen O₂-Stroms von 2-4%, die für das Reaktorvolumen von ca. 5 L recht hohe maximale Begasungsrate von 20 L min⁻¹ (entspricht ca. 4 vvm) und eine zu schnell rea-

gierende Regelung der Sauerstoffbeimischung im MFC hervorgerufen. Um die Schwingungen zu reduzieren, könnte $F_{O_2, in}$ des MFC bereits zu Beginn der Kultivierung auf 4% der maximal möglichen 20 L min^{-1} , also $0,8 \text{ L min}^{-1}$ eingestellt werden, was der pO₂-Regler durch ein langsames Erhöhen von N_{stirr} ausgleichen kann.

4.2.3 Einfluss des neuen Bedienkonzepts

Nach dem Animpfen und dem Start der exponentiellen Nachfütterung läuft die Kultivierung automatisiert ab. Die Hauptaufgabe besteht währenddessen aus dem Entnehmen und Analysieren von Proben. Wichtig für ein gutes Ergebnis ist dabei neben sorgfältigem Arbeiten während der Verdünnung jedoch auch die korrekte Zuordnung des Messwerts zum Zeitpunkt der Entnahme. Dementsprechend ist möglichst zeitnah das entnommene Probenvolumen in MFCS/win zu verzeichnen, wodurch auch das durch mehrere Formeln genutzte Reaktorvolumen korrigiert wird. Die zu diesem Zeitpunkt aktuellen Werte für das Reaktorvolumen, das geförderte Substratvolumen, das geförderte Basenvolumen sowie die Förderrate der Feedpumpe sind wiederum in die Dokumentationsvorlage einzutragen.

Das Eingeben des Probenvolumen in MFCS/win wurde zuvor direkt am Server am anderen Ende des Labors vorgenommen. Zur Verdeutlichung der teilweise notwendigen Laufwege ist in **Abbildung 4.8** ein Grundriss des Labors mit den Standorten der Reaktor-Arbeitsplätze dargestellt. Dabei war es möglich, dass in der Zwischenzeit die Oberfläche durch parallel arbeitende Gruppen verändert wurde, sodass das Fenster zum Setzen der Variablen für den eigenen Prozess zuerst wieder gesucht oder ggf. neu geöffnet werden musste.

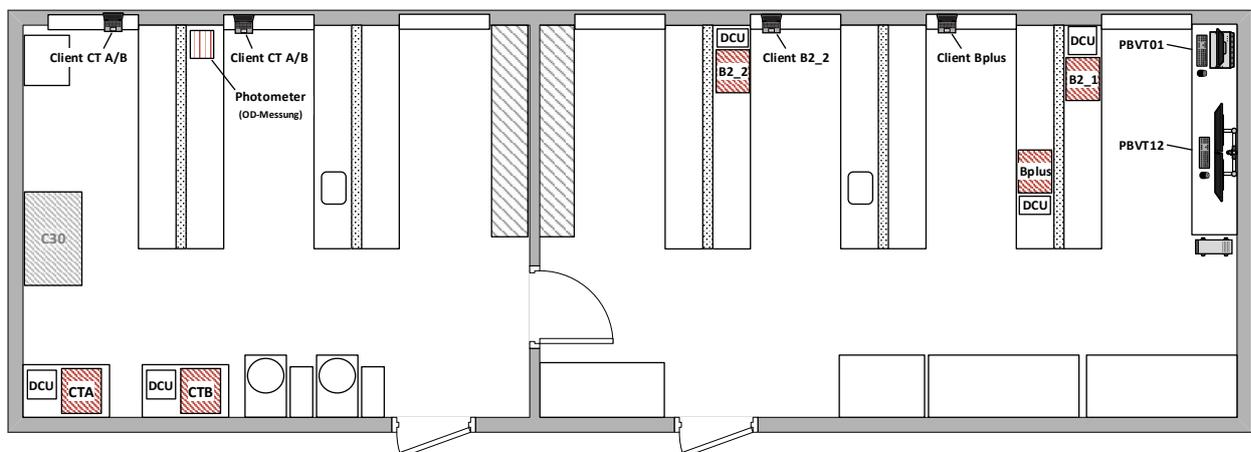


Abbildung 4.8: Standorte der Bioreaktoren, Arbeitsplätze und MFCS-Geräte

Dank des neuen Bedienkonzepts können nun alle Schritte komfortabel am selben Ort oder zumindest deutlich näher durchgeführt werden, ohne dass es zu Überschneidungen oder Missverständnissen mit den Arbeiten der anderen Benutzer des Labors kommt. Die on-line-Daten des Prozesses können nun jederzeit vor Ort überwacht werden, ohne den Arbeitsplatz verlassen zu müssen. Ferner werden vom S88-Rezept ausgelöste Alarmer oder Abfragen wesentlich schneller bemerkt und können lokal bestätigt werden.

Da jeder Client sich am Server mit seinem Computer- und Benutzernamen anmeldet, kann jederzeit zurückverfolgt werden, welche Interaktionen mit welchem Prozess von welchem Gerät ausgingen, was zuvor bei der gemeinsamen Benutzung eines Geräts nicht möglich war.

Der fest installierte Computer  PBVT12 neben dem neuen Server eignete sich gut als dauerhafter, stationärer Zugriffspunkt auf den Server, um beispielsweise schon vor dem Verbinden eines mobilen Geräts eine Übersicht über die Prozessdaten (z. B. während der Sterilisation) zu erhalten. Aufgrund seines Doppelbildschirms können dort auch die Daten mehrerer Prozesse gleichzeitig übersichtlich dargestellt werden. Auch die Konfiguration von MFCS/win lässt sich über  PBVT12 komfortabel durchführen, ohne den Server direkt bedienen zu müssen. Beim Erstellen oder Bearbeiten von Formeln oder Rezepten kann der zweite Bildschirm gut zum Betrachten notwendiger Informationen genutzt werden.

5 | Zusammenfassung und Ausblick

Nach Abschluss der Testkultivierung und Auswertung der Daten konnten keine Einflüsse des aktualisierten MFCS/win auf das Ergebnis der Kultivierung festgestellt werden. Die beobachteten Anomalien konnten auf das verwendete Rezept oder Eigenschaften der bestehenden Hardware zurückgeführt werden und traten bereits vor der Aktualisierung auf.

Im Zusammenhang mit dem verwendeten Rezept steht der Einfluss durch manuelles Eingreifen in den automatisierten Prozess durch Ändern von Variablen wie μ_{set} . Eine Änderung von μ_{set} führt zwar zu einer direkten Änderung der aktuellen relativen Nachfütterungsrate, der Startwert von $F_{R, \text{rel}}$ für die nächste Phase wird allerdings scheinbar auf Basis des ersten $F_{R, \text{rel}}$ -Werts der aktuellen Phase bestimmt, ohne nachträgliche Änderungen zu berücksichtigen. Durch Anpassen der betreffenden Formeln und Rezeptabschnitte kann das System möglicherweise dazu befähigt werden, Änderungen von μ_{set} im laufenden Betrieb zu erlauben.

Die sporadischen Ausreißer in den von der Feedpumpe zurückgelieferten Werten traten bereits vor der Aktualisierung von MFCS/win auf, wurden bisher aber noch nicht bemerkt. Sie sind vermutlich auf einen Kommunikationsfehler zurückzuführen, es konnte aber nicht abschließend geklärt werden, ob dies der Grund ist und an welcher Stelle der Übertragungskette der Fehler auftritt. Auf die grundsätzliche Funktion des Systems scheinen diese Abweichungen keine Auswirkungen zu haben.

Das Schwingen der Gelöstsauerstoffkonzentration war bereits zuvor bekannt, es konnten nun jedoch mehr Hinweise auf die Ursache ermittelt werden. Es wird angenommen, dass die (für das Reaktorvolumen) hohe maximale Begasungsrate des MFC bei einer relativen Mindestbegasungsrate von 2-4% für mehr O₂-Eintrag sorgt, als das System benötigt, wodurch der pO₂-Regler die Zugabe wieder vollständig stoppt. Eine geringe, jedoch konstante O₂-Beimischung mit einer zunächst nur durch N_{stirr} realisierten pO₂-Regelung könnte die Schwingung zumindest reduzieren.

In Bezug auf die Handhabung von MFCS/win fiel lediglich das Plotting-Modul auf, welches im aktualisierten MFCS/win keine Möglichkeit mehr bot, während des live-Plottings eigene Einstellungen für den anzuzeigenden Zeitbereich festzulegen. Es konnten keine weiteren nennenswerten Unterschiede in der Bedienung festgestellt werden.

Die Umstellung des Nutzungsprinzips auf das Server-Client-Schema konnte den Nutzungskomfort und gleichzeitig die Sicherheit des Prozessleitrechners deutlich verbessern. Eine vollständige Trennung vom Internet wäre zwar wünschenswert gewesen, ließ sich aber nicht ohne signifikante Einschränkungen in der Benutzbarkeit umsetzen.

Im Folgenden werden einige Kernpunkte der durchgeführten Arbeit aufgegriffen und Szenarien für eine Weiterentwicklung dargestellt.

5.1 Server-Client-Prinzip und Flexibilität der Bedienung

Ein Punkt mit weiterem Optimierungspotential ist die Positionierung der mobilen Clients. Aufgrund der notwendigen Verbindung über ein Ethernet-Kabel und der geringen Verfügbarkeit von entsprechenden Anschlüssen können die Geräte bei den verfügbaren Kabellängen nicht direkt neben dem genutzten Bioreaktor aufgestellt werden. Zudem muss das Kabel nach jeder Benutzung wieder entfernt werden. Eine Lösung bestünde darin, das Labor mit einem kabellosen Netzwerk zu versorgen, das die Kommunikation mit den kabelgebundenen Geräten ermöglicht. Für das bestehende, hochschulweit verfügbare Netzwerk *eduroam* ist dies nicht möglich. Ein solches neu angelegtes Netzwerk kann durch *Whitelisting* von MAC-Adressen sowie die Nutzung des im Dezember 2018 fertiggestellten WPA3-Authentifizierungs-Standards abgesichert werden.

Bei Verfügbarkeit eines mobilen Netzwerks sind als nächster Schritt Tablet-Computer auf Windows-Basis als Clients denkbar, die beispielsweise in (offenen) Halterungen am Metallgestell des Reaktors abgelegt werden können. Dadurch können Live-Plots und Variablen direkt am Gerät im Blick behalten werden. Bei der Probenahme notwendige Eingaben können dann sofort und ohne Laufwege getätigt werden. Für die off-line-Analyse der Probe kann das Gerät aus der Halterung heraus- und zu den Messgeräten mitgenommen werden, um die Ergebnisse direkt vor Ort zu dokumentieren. Es sollte bei der Verwendung von Mobilgeräten aus Hygienegründen darauf geachtet werden, dass diese stets im Labor bleiben.

Eine noch weiter gehende Möglichkeit zur Verbesserung der Flexibilität ist die vollständige Virtualisierung der Clients. Da die erworbene Lizenz die Benutzung von fünf Clients erlaubt, wären auf einem ausreichend leistungsstarken Server im Rechenzentrum der Hochschule fünf virtuelle Maschinen mit je einer Client-Installation von MFCS/win einzurichten. Nach aktuellem Stand sind fünf Reaktoren nutzbar, also kann jeder Client genau einem Reaktor zugeordnet werden. Diese virtuellen Clients sind dann ohne Unterbrechung verfügbar und können über eine Remote-Desktop-Software wie z. B. *TeamViewer* von jedem beliebigen Gerät aus gesteuert werden.

Diese Methode kombiniert die vor der Aktualisierung mögliche Flexibilität des Remote-Desktops mit der danach erreichten Verbesserung der Sicherheit des Prozessleitrechners. Die vor der Aktualisierung bei der Verwendung von *TeamViewer* gegebene Limitierung auf eine Instanz von MFCS/win wäre hier nicht der Fall. Im Gegenteil könnten auf diese Weise gleich alle fünf Clients

in Form von Remote-Desktop-Sessions auf einem Gerät vereint werden; bei gleichzeitiger (jedoch nicht unabhängiger) Verfügbarkeit auf allen anderen Geräten. Sollen zwei Personen unabhängig voneinander auf einen Prozess zugreifen können, kann die *Operator Service*-Oberfläche eines zweiten Clients (temporär) dafür genutzt werden. Da die Oberfläche danach wieder für den eigentlich zugeordneten Bioreaktor eingerichtet werden sollte, ist diese Möglichkeit nicht als dauerhafte Lösung zu empfehlen. Bei häufig benötigtem parallelem und unabhängigem Zugriff auf den selben Prozess können die Möglichkeiten durch Erwerben einer Lizenz für mehr Clients erweitert werden. Durch die Verwendung von virtuellen Desktops (seit Windows 10 auch von Microsoft unterstützt) können diese Sessions jeweils auf einem eigenen Desktop laufen, wodurch auch bei vielen parallel betreuten Prozessen die Übersicht weiterhin gewährleistet wird.

Die während dieser Arbeit eingerichteten Client-Geräte würden in diesem Szenario statt mit einer eigenen MFCS/win-Installation nur noch mit *TeamViewer* ausgestattet sein und auf die virtuellen Clients zugreifen. Dies erspart die Einrichtung von MFCS/win auf jedem neuen oder ausgetauschten Gerät. Bei entsprechender Konfiguration durch die Mitarbeiter des Rechenzentrums können die dort virtualisierten Clients auch über das *eduroam*-Netz verfügbar gemacht werden, wodurch das zuvor angedachte kabellose Labor-Netzwerk nicht benötigt würde. Wird der Zugriff auf die virtuellen Clients nur für Geräte im Netz der HAW Hamburg gestattet, ist dies ein effektiver Schutz gegen einen Zugriff über das offene Internet, wie er zuvor via *TeamViewer* möglich war. Um dennoch einen Zugriff von außerhalb zu erhalten kann das VPN der Hochschule genutzt werden.

5.2 Benutzerkonten

Die in dieser Arbeit angelegten Benutzerkonten (**Tabelle 3.3**) basieren auf einer zuvor bereits vorhandenen Struktur. Daher ist  MFCS ein Windows-Administrator, obwohl dies nicht notwendig ist und  BVTadmin theoretisch überflüssig macht. Möglicherweise wurde bei dieser Festlegung der Hinweis, Administratorrechte seien zur Installation von MFCS/win notwendig (*IT Requirements* [9], S. 10), fehlinterpretiert. Im Abschnitt *Security* auf der selben Seite wird jedoch bestätigt, dass die Konten zur *Benutzung* von MFCS/win keine Administrator-Rechte benötigen. Zur Verbesserung der Sicherheit ist es daher zu empfehlen,  MFCS auf allen Geräten zu einem regulären Benutzer zu machen. Auf diese Weise sind die Aufgabenbereiche von  MFCS und  BVTadmin sinnvoller getrennt.

5.3 Weitere Sicherheitsmaßnahmen

Um den Prozessleitrechner seiner wichtigen Rolle entsprechend noch besser zu schützen, könnte das Gerät physisch gesichert unter der Tischplatte angebracht werden. Werden dabei die rückseitigen Anschlüsse unzugänglich gemacht, kann neben einem Diebstahl des Geräts auch der Anschluss weiterer Hardware verhindert werden, was z. B. die Benutzung von *Keyloggern* und *Keystroke Injection Tools* effektiv verhindert. Die bereits deaktivierten vorderen USB-Schnittstellen können durch die Befestigung einer abdeckenden Metallplatte auch elektrisch geschützt werden.

Neben der Sicherheit gegenüber Angriffen ist für einen Prozessleitrechner ebenso die Datensicherheit essentiell. In dieser Hinsicht ist der neue Server bisher noch nicht geschützt. Die Verwendung eines *RAID* gewährleistet die Verfügbarkeit und Konsistenz der Daten im Falle eines Datenträgerausfalls, bietet allerdings noch keinen Schutz gegen beschädigte oder unbeabsichtigt gelöschte Dateien.

Ein lokales Backup stellt den ersten Schritt in Richtung Datensicherheit dar. Es befindet sich im selben Gerät auf einem separaten Datenträger und ist damit grundsätzlich on-line und on-site. Im Falle eines Datenverlusts können von dort die betroffenen Dateien und Verzeichnisse ohne großen Aufwand und in kurzer Zeit wiederhergestellt werden.

Ein *off-site-Backup* befindet sich an einem anderen Standort als das gesicherte Gerät und kann genutzt werden, wenn sowohl die originalen Daten als auch das lokale Backup nicht mehr verfügbar sind. Da das Rechenzentrum und das Labor in verschiedenen Gebäuden untergebracht sind, kann man eine Duplizierung der lokal angelegten Backups auf einen Server im Rechenzentrum bereits als *off-site-Backup* betrachten. Je nach Sicherheitsstrategie des Rechenzentrums sind dadurch bereits weitere Sicherheitsmaßnahmen integriert.

Im oben genannten Fall befindet sich das *off-site-Backup* im selben Netzwerk wie das zu sichernde Gerät, daher ist es zumindest theoretisch möglich, dass beide Orte durch eine netzwerkweite Bedrohung ausfallen. Dem kann durch Anfertigen eines oder mehrerer *off-line-Backups* in regelmäßigen Abständen vorgebeugt werden. Dafür eignet sich jeder transportable Datenträger mit ausreichender Kapazität. Nach Erstellung/Aktualisierung des Backups wird der Datenträger stromlos (*off-line*) und nach Möglichkeit auch *off-site* gelagert. Die Wiederherstellung von einem *off-line-Backup* kommt in der Regel nur zum Einsatz, wenn auf keines der anderen Backups zurückgegriffen werden kann, da die dort gesicherten Daten meist weniger aktuell sind und der Wiederherstellungsaufwand größer ist.

Durch Verschlüsselung der Backups können die gesicherten Daten vor Unbefugten geschützt werden. Inkrementelle Backups sind nützlich, da nur die Änderungen gegenüber der vorherigen Version übertragen werden müssen. Diese Art des Backups eignet sich insbesondere für Verzeichnisse, in denen typischerweise nur Daten hinzukommen, was auf die Verzeichnisse von MFCS/win zutrifft.

Mögliche Umsetzung

Ein Vorschlag zur Realisierung dieses Konzepts ist folgend beschrieben. Zur Verbesserung der Ausfallsicherheit sollte der System-Datenträger als RAID konfiguriert werden. Eine einfache Spiegelung (RAID1) ist hier ausreichend. Beim derzeitigen System-Datenträger handelt es sich um einen via M.2-Steckplatz angeschlossenen NVMe-Solid-State-Speicher. Stellt das Mainboard einen zweiten M.2-Anschluss bereit, kann ein baugleiches Speichermodul (Samsung PM951) angeschafft werden, ansonsten sollte auf zwei neu zu beschaffende SATA-SSDs mit einer Kapazität von je 512 GB ausgewichen werden. Beim Erstellen eines RAID werden die beteiligten Datenträger vollständig gelöscht, daher muss ggf. vorher ein Backup angelegt werden. Das RAID-Array kann bei Bedarf mittels *Full Disk Encryption* geschützt werden.

Die Sicherheit der Daten wird in mehreren Schritten gewährleistet. Ein lokales Backup des MFCS/win-Verzeichnisses und ggf. anderer Verzeichnisse wird in einem kurzen Intervall von 30 min inkrementell auf der bereits vorhandenen SATA-HDD (Laufwerk D:) abgelegt. Das einfache Duplizieren der Daten kann mit dem in Windows integrierten Tool *robocopy* ( +  `cmd.exe /k robocopy`) und geeigneten Parametern durchgeführt werden. Drittanbietersoftware wie z. B. *SyncBack Professional* erlaubt meist auch das Verwalten von Versionen und – wenn gewünscht – das Verschlüsseln des Backups und ist daher zu empfehlen.

Dieses lokale Backup wird nun auf einen oder mehrere der Server der HAW Hamburg synchronisiert, beispielsweise mittels *IBM Tivoli Storage Manager* oder *rsync*. Je nach Häufigkeit der Kultivierungen sollte außerdem in regelmäßigen Abständen von 2-8 Wochen ein off-line-Backup angefertigt werden, das außerhalb des Labors gelagert wird.

5.4 MFCS/win-Server und Windows 10

Da der Support des momentan auf dem neuen Prozessleitnehmer eingesetzten Betriebssystems Microsoft Windows 7 bereits sehr bald (14.01.2020) endet, ist eine Aktualisierung zum weiteren Gewährleisten der Sicherheit dringend notwendig. Eine Kompatibilität von *MFCS/win 3.0 Service Pack 1 Patch A* mit Windows 10 ist sehr wahrscheinlich, da diese Version offiziell für Windows 8.1 freigegeben wurde und die größten Unterschiede zwischen Windows 7 und 10 bereits mit Windows 8 eingeführt wurden.

Das wichtigste Argument gegen die Nutzung von Microsoft Windows 10 für SCADA-Systeme sind die unumgänglichen und kaum kontrollierbaren Neustarts nach nicht deaktivierbaren Windows-Updates. Während erzwungene Updates im Heimnutzer- und sogar noch im Büro-Umfeld sinnvoll sein können, sind SCADA-Systeme auf einen unterbrechungsfreien Betrieb angewiesen. Eine Lösung dafür bieten sog. *LTSC-Versionen*¹ von Windows 10. Diese werden alle 2-3 Jahre veröffentlicht und erhalten von diesem Zeitpunkt an lediglich Sicherheits-Updates. Ein erzwungener Neustart nach diesen Updates findet nicht statt. Ein Großteil der in normalen Versionen enthaltenen, für einen MFCS/win-Server jedoch nicht benötigten Software wird in Windows 10 LTSC nicht mitgeliefert.

¹LTSC = Long Term Servicing Channel

Quellenverzeichnis

1. Produktseite der MFCS/win-Software. Aufgerufen am 29.04.2019. Sartorius Stedim Systems GmbH. <https://www.sartorius.de/sartoriusDE/de/EUR/products/process-control-tools-software/biopatmfcs>.
2. KAZAN, D.; ÇAMURDAN, A. & HORTAÇSU, A. The effect of glucose concentration on the growth rate and some intracellular components of a recombinant *E. coli* culture. *Process Biochemistry* **30**, 269–273 (1995).
3. RIESENBERG, D. High-cell-density cultivation of *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology* **2**, 380–384 (1991).
4. RIESENBERG, D.; SCHULZ, V; KNORRE, W. A.; POHL, H. D.; KORZ, D. J.; SANDERS, E. A.; ROSS, A & DECKWER, W.-D. High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate. *Journal of Biotechnology* **20**, 17–27 (1991).
5. BECKMANN, B. Entwicklung neuer Strategien für die Hochzelldichte-Kultivierung verschiedener Derivate von *Escherichia coli*. Diss. (Leibnitz Universität Hannover, 2018).
6. KORZ, D. J.; RINAS, U; HELLMUTH, K; SANDERS, E. A. & DECKWER, W.-D. Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* **39**, 59–65 (1995).
7. EL MANSI, E. M. & HOLMS, W. H. Control of carbon flux to acetate excretion during growth of *Escherichia coli* in batch and continuous cultures. *Journal of General Microbiology* **135**, 2875–2883 (1989).
8. System Manager Handbook. Sartorius Stedim Systems GmbH (Robert-Bosch-Strasse 5-7, D-34302 Guxhagen, Juli 2015).
9. IT Requirements. Sartorius Stedim Systems GmbH (Robert-Bosch-Strasse 5-7, D-34302 Guxhagen, Sep. 2015).
10. Installation Handbook. Sartorius Stedim Systems GmbH (Robert-Bosch-Strasse 5-7, D-34302 Guxhagen, Jan. 2015).
11. Microsoft Access Security Vulnerabilities. Aufgerufen am 24.05.2019. CVE Details. https://www.cvedetails.com/vulnerability-list/vendor_id-26/product_id-328/Microsoft-Access.html.
12. Novagen pET system manual. Aufgerufen am 29.04.2019. Novagen Inc. http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/Novagen_petsystem.pdf.