Modellierung des Wachstums- und Produktbildungsverhaltens von Actinomyceten

Von der Fakultät Maschinenbau der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktors der
Ingenieurwissenschaften (Dr.–Ing.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von
Christine Kammerer
aus Stuttgart

Hauptberichter: Prof. Dr.-Ing. Dr. h.c. mult. E. D. Gilles
Mitberichter: Prof. Dr.-Ing. habil. R. King

Tag der mündlichen Prüfung: 03.05.2005

Institut für Systemdynamik und Regelungstechnik
der Universität Stuttgart
2006

Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Systemdynamik und Regelungstechnik der Universität Stuttgart. Sie wurde im Rahmen des *Zentralen Schwerpunktprojekts (ZSP) Bioverfahrenstechnik* der Universität Stuttgart und des Frauenhofer–Instituts für Grenzflächen– und Bioverfahrenstechnik in Stuttgart vom Land Baden-Württemberg und vom Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft , Forschung und Technologie gefördert.

Dem damaligen Institutsleiter, Herrn Prof. Dr.–Ing. Dr. h. c. mult. E. D. Gilles, danke ich herzlich für die Ermöglichung und Förderung dieser Arbeit sowie für die Bereitstellung des guten und anregenden Forschungsumfelds. Herrn Prof. Dr.–Ing. habil. R. King danke ich für sein Interesse an der Arbeit, für die konstruktive Durchsicht und die freundliche Übernahme des Mitberichts. Für die Durchsicht des Manuskripts möchte ich auch Dr.–Ing. Thomas Sauter und Prof. Dr.-Ing. Richard Biener sehr herzlich danken.

Danken möchte ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für das sehr gute Arbeitsklima. Insbesondere danke ich auch allen Kolleginnen und Kollegen der biologischen Arbeitsgruppe am Institut, die durch Ihre Unterstützung und anregenden Diskussionen sehr zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Bei Frau M. Fleischer möchte ich mich für die zuverlässige Vorbereitung und Durchführung der zahlreichen Fermentationsexperimente bedanken.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern und meinem Mann Ulrich für die unermüdliche Unterstützung und das Verständnis in diesen Jahren.

Münchingen, im Dezember 2005 Christine Kammerer

Inhaltsverzeichnis

Symbolverzeichnis **viii**

Kurzfassung **xi**

Abstract **xiii**

1 Einleitung **1**

1.1 Problemstellung 2

1.2 Gliederung der Arbeit 3

2 Grundlagen **5**

2.1 Biologische Grundlagen 5

2.1.1 Primärmetabolismus 6

2.1.2 Sekundärmetabolismus 6

2.1.3 Produktsynthese 10

2.1.3.1 Nikkomycin 10

2.1.3.2 Balhimycin 12

2.2 Mathematische Modellbildung in der Biotechnologie 14

2.2.1 Unstrukturierte Modelle 15

2.2.2 Strukturierte Modelle 16

3 Material und Methoden **20**

3.1 Zellinien 20
3.2 Medien 20
3.3 Schüttelkolbenversuche 21
3.4 Durchführung der Fermentationen 22
3.5 Repeated Fed–Batch–Fermentationen 23
3.6 Analytische Methoden 23
3.6.1 Probenahme 23
3.6.2 Trockengewicht 24
3.6.3 Medienbestandteile 24
3.6.3.1 Fructose und Glucose 24
3.6.3.2 Ammonium 24
3.6.3.3 Phosphat 24
3.6.3.4 Pyruvat 25
3.6.4 Zellbestandteile 25
3.6.4.1 DNA 25
3.6.4.2 RNA 25
3.6.4.3 Proteine 26
3.6.4.4 Nukleotide und ppGpp 26
3.6.5 Produkte 26
3.6.5.1 Nikkomycin 26
3.6.5.2 Juglomycin 26
3.6.5.3 Balhimycin 27
3.6.6 Spezifische Wachstumsraten 27
3.6.7 Sauerstoffaufnahmerate 27

4 Experimentelle Ergebnisse 29

4.1 Allgemeiner Wachstums– und Produktionsverlauf 29

4.2 Einfluß einzelner Größen auf die Produktbildung 31

4.2.1 Phosphat 32

4.2.2 Ammonium 33

4.2.3 Kohlenstoff– und Energiequelle 35

4.2.4 Sauerstoff 38

4.2.5 Pyruvat bei *S. tendae* 41

4.2.6 Juglomycin bei *S. tendae* 43

4.3 ppGpp–Messungen 45

4.4 Ende der Produktbildung 48

4.5 Zusammenfassung der experimentellen Ergebnisse 51

5 Modellbildung mit kinetischen Ansätzen 53

5.1 Einleitung 53

5.2 Modellgleichungen 53

5.2.1 Wachstum 56

5.2.1.1 RNA Synthese 60

5.2.1.2 Aufnahmerate von Ammonium in den Speicher 63

5.2.1.3 Aufnahmerate von Glucose und Fructose in den Speicher . . 64

5.2.1.4 Verbrauchsrate für Erhaltungsstoffwechsel 65

5.2.1.5 Aufnahmerate von Phosphat in den Speicher 65

5.2.2 Regulation Sekundärmetabolismus 65

5.2.2.1 Bildungsrate von ppGpp 66

5.2.2.2 Bildungsrate der Sekundärmetabolite 67

5.2.3 Quasistationaritätsannahme für ppGpp 68

5.3 Simulationsergebnisse 69

6 Hybride Modellbildung **91**

6.1 Einleitung 91

6.2 Vorgehensweise 95

6.3 Ergebnisse 100

7 Parameteridentifikation **104**

7.1 Parameterschätzproblem 104

7.2 Sensitivitätsanalyse 105

7.3 Vorgehensweise bei der Modell- und Parameteridentifikation 107

8 Zusammenfassung und Ausblick **111**

A Übersicht Fermentationsdaten **114**

B Parameterwerte **116**

C Weitere Simulationsergebnisse **118**

Literaturverzeichnis **127**

Symbole

c_i	Konzentration der Komponente i [g l^{-1}]
c_{ie}	Konzentration der Komponente i im Zulauf [g l^{-1}]
c^*_{O2}	Sauerstoffsättigungskonzentration [g l^{-1}]
g_i	intrazelluläre Konzentration des Stoffes [g gX^{-1}]
$k_l a$	Sauerstoffübergangskoeffizient [h^{-1}]
K_i	Michaelis-Menten Konstante
m_i	Masse der Komponente i [g]
OUR	Sauerstoffaufnahmerate, [mmol l^{-1} h^{-1}]
pH	pH-Wert
p_{O2}	relative Konzentration des gelösten Sauerstoffs im Medium [%]
qv_i	zugeführter Feedstrom [l h^{-1}]
t	Zeit [h]
T	Temperatur [K]
V	Fermenterarbeitsvolumen [l]
V_F	Flüssigkeitsvolumen [l]
$\dot{V}_G$	Gasvolumenstrom [l h^{-1}]
Y_{dij}	Zerfallskoeffizienten (Masse m_i, die bei Zerfall von Masse m_j frei wird) [g g^{-1}]
Y_{ij}	Ausbeutekoeffizienten (Masse m_i, die für Bildung von Masse m_j benötigt wird) [g g^{-1}]
ρ_{OH}	Dichte des Laugenzustroms [kg l^{-1}]
μ_i	spezifische Reaktionsrate der Komponente i, [g gx^{-1} h^{-1}]
μ_{sNm}	spezifische Nikkomycinbildungsrate [mg gX^{-1} h^{-1}]
ψ	Affinität
Λ_A	Diagonalmatrix der Parameterwerte

Indizes

ab	Abfluß
Am	Ammonium
Bal	Balhimycin
C	Kohlenstoffquelle
E	Erhaltung
EOH	Laugenzulauf

Fru	Fructose
G	Signalstoff
Glc	Glucose
Jug	Juglomycin
Nm	Nikkomycin
O_2	Sauerstoff
Ph	Phosphat
Pr	Proteine
SM	Sekundärmetabolite
SpA	Ammoniumspeicher
SpC	Glucosespeicher
SpP	Phosphatspeicher
Str	Strukturelemente
TPr	Turnover Protein
TR	Turnover RNA
ver	Verdampfung
X	Trockengewicht der Biomasse

Hochgestellte Zeichen

G,aus	Ausgangsgasstrom
G,ein	Eingangsgasstrom
L	Flüssigphase

Abkürzungen

AB	Anfangsbedingung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FIA	Flüssig–Injektions–Analyse
G	Großer Fermenter (50 l)
GDP	Guanosindiphosophat
GTP	Guanosintriphsophat
HPHT	Hydroxypyridylhomothreonin
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie
KNN	Künstliches Neuronales Netz
M	Mittlerer Fermenter (12 l)

NdK	Nukleosiddiphosphatkinase
PEP	Phosphophenolpyruvat
ppGpp	Guanosintetraphosphat
pppGpp	Guanosinpentaphosphat
RNA	Ribonukleinsäure
SK	Schüttelkolben
TSB	Tryptic Soy Broth
VK	Vorkultur
WT	Wildtyp

Kurzfassung

Bei der Herstellung von Antibiotika werden in großem Umfang Bakterien eingesetzt. Dabei handelt es sich vor allem um Bakterien der Gattung Actinomyceten. Daher sind diese Organismen heute in der Biotechnologie von großer Bedeutung. Actinomyceten kommen im Gegensatz zu anderen Bakterien nicht als Einzeller vor, sondern bilden ein fadenförmiges Geflecht, ein Myzel, aus. Dieses kann als Substrat- oder Luftmyzel ausgeprägt sein. Bei ihren Produkten handelt es sich meist um Sekundärstoffe mit antibiotischer Wirkung, welche für das Wachstum der Organismen nicht notwendig sind. Die Regulation des Sekundärstoffwechsels von Actinomyceten ist sehr komplex und es sind noch nicht alle Einzelheiten der ablaufenden Stoffwechselvorgänge und vor allem deren Regulation aufgeklärt.

Um eine Optimierung des Herstellungsprozesses zu erreichen, ist es sinnvoll, heutige Methoden der Systemtheorie anzuwenden. Eine Voraussetzung ist dabei die Erstellung eines mathematischen Modells zur Beschreibung des Wachstums- und Produktbildungsverhaltens der Mikroorganismen. Dieses Modell kann dann eingesetzt werden, um eine optimierte Prozeßführung durchzuführen. Die Erstellung und Anpassung eines solchen mathematischen Modells für einen bestimmten Stamm kann sehr zeitaufwendig sein. Daher ist es wünschenswert, ein möglichst allgemeingültiges Modell zu entwickeln, welches schnell auf andere Stämme und Produkte angepaßt werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wird auf der Basis bereits vorhandener experimenteller Ergebnisse und Modelle für das Wachstumsverhalten, sowie eigener experimenteller Ergebnisse ein verallgemeinertes, strukturiertes mathematisches Modell erstellt. Die Modellparameter werden an die beiden untersuchten Actinomyceten Stämme *Streptomyces tendae* und *Amycolatopsis mediterranei* angepaßt. Damit wird die Grundlage geschaffen, um bei verschiedenen Stämmen von Actinomyceten eine modellgestützte Optimierung der Prozeßführung zu erreichen.

King stellt in [40, 42] ein strukturiertes mathematisches Modell für das Wachstum verschiedener Stämme von Streptomyceten vor. Ausgehend von diesem Kompartimentmodell für *S. tendae* wird in der vorliegenden Arbeit ein Modell zur Beschreibung des Wachstums- und Produktbildungsverhaltens von Actinomyceten formuliert. Es wird eine Modellstruktur hergeleitet, die

für zwei unterschiedliche Mikroorganismen *A. mediterranei* und *S. tendae* verwendet werden kann [35, 36, 34]. Dieses Modell liefert die Basis für eine Prozeßoptimierung.

Bei der Modellbildung wird der Verbrauch von Nährstoffen für die Produktbildung berücksichtigt, um zu verhindern, daß eine Stagnation der Produktbildung aufgrund mangelnder Nährstoffe bei einer späteren Optimierung erfolgt. Der Schwerpunkt der Modellierung liegt auf der Beschreibung der Regulation der Produktbildung und des Wachstums. Bei der Wachstumsmodellierung wird die Regulation des RNA-Gehalts berücksichtigt. Die Ergebnisse der Anpassung zeigen, daß damit zur Beschreibung des exponentiellen Wachstums nur wenige Modellparameter benötigt werden. Der Anpassungsaufwand an weitere Stämme wird somit gering gehalten.

Die spezifische Produktbildung ist ein zentraler Punkt bei der Modellierung der Produktbildung. Aber gerade in diesem Bereich liegen keine vollständigen Informationen über die biologische Regulation vor. Daher wird untersucht, ob eine hybride Modellierung in diesem Fall sinnvoll ist. Die hybride Modellierung bietet durch die Kombination von kinetischen Gleichungen und Neuronalen Netzen die Möglichkeit, die in Form von Meßdaten vorliegenden Informationen direkt in die Modellierung einzubinden. Es stellt sich allerdings heraus, daß die Meßdaten, welche für die Identfikation des Neuronalen Netzes verwendet werden können, die Modelleigenschaften eindeutig repräsentieren müssen. Da dies aber bei den vorhandenen Fermentationsdaten für den Stamm *S. tendae* nicht immer der Fall ist, ist es schwer, mit den vorhanden Meßdaten ein Neuronales Netz zu entwickeln, welches das Produktbildungsverhalten in ausreichendem Maße nachbildet. Ein weiterer Nachteil einer solchen Modellierung ist, daß für die Identifikation der Netzparameter eine große Anzahl von Trainingsdaten erforderlich sind. Daher ist ein kinetisches Modell im vorliegenden Fall zu bevorzugen.

Die Regulation der Produktbildung erfolgt im resultierenden kinetischen Modell in Abhängigkeit der stringenten Kontrolle. Um die biologischen Zusammenhänge zu verifizieren, werden entsprechende Versuche mit Mutantenstämmen von *A. mediterranei* vorgenommen.

Das entwickelte Modell ist ein sehr guter Kompromiß zwischen dem Aufwand für die Modellentwicklung und dem Nutzen für die Optimierung der Produktbildung. Durch die erfolgreiche Anpassung für den Stamm *A. mediterranei* kann das Modell für die Optimierung der Produktbildung eingesetzt werden.

Abstract

A large variety of bacteria are currently used for the production of antibiotics. Most of the bacteria are of the species Actinomyces. Therefore, Actinomyces play an important role in biotechnology today. Since they are mycelial organisms, their morphology is more complex than the morphology of single cell organisms. The mycelia can be divided into substrate and airial mycelia. Their products are mostly secondary metabolites with antibiotic effects, they are not necessary for their own growth. The regulation of the secondary metabolism is very complex and some of the details of the metabolic pathways and especially their regulation are still unknown.

System theory including process modelling can be used in order to optimize the manufacturing process. Therefore, one prerequisite is the existance of a mathematical model for the description of the growth and product formation of the organism. The way to obtain such a model can be very time consuming. This clearly indicates the need for a general model description which can be used for different strains and products, only by changing the model parameters.

In the present work, a general structured mathematical model is obtained on the basis of already available experimental results and a model for the growth, as well as new experimental results which are obtained during the work for the thesis. The model parameters are fitted for the two examined actinomyces strains *Streptomyces tendae* and *Amycolatopsis mediterranei*. The products and the morphology of both strains are different.

King [40, 42] proposed a structured mathematical model for the growth of different Streptomyces strains. In the present work a model description for the growth and product formation is formulated on the basis of this compartment model for *S. tendae*. A model structure is found which can be applied for the two different strains *A. mediterranei* and *S. tendae* [35, 36, 34]. On the basis of the resulting model a process optimization of the production is possible.

The consumption of nutrients for the product formation process is covered in the model to avoid a stagnation in the later production phase during optimization due to a lacking nutrient supply. The emphasis of the modeling work is on the control of the product formation and growth. For

the growth model the control of the internal RNA concentration is considered. The result of the parameter identification shows that with this approach only a few parameters are needed for the description of the exponential growth. This keeps the effort for the adaption of the model to other strains low.

Another key point of the model is the specific production rate. But unfortunately the knowledge, especially about the control of the specific production rate is not sufficient to explain all obtained data. Therefore it is examined if a hybride modeling approach is capable to represent the data better than a mechanistic model. In a hybride model kinetic equations are combined with neural networks. This has the advantage to directly include the measurement data for the identification of the neural network. But the research shows that in this case it is difficult to identifiy a neural network, because the available data for the identification is not repesenting the product formation behavior clearly enough. Another drawback is the big amount of training data which has to be used to identify a neural network. The work shows that in this case a mechanistic model including kinetic equations is more suitable for modeling the product formation behavior.

The regulation of the product formation in the resulting model is dependent on the stringent regulation. To validate the biological background of the model different experiments with mutants of *A. mediterranei* are performed.

A good compromise between the effort for model development and the use for the optimization of the product formation is found with the developed model. With the successful adaption of the model for the strain *A. mediterranei* it can be used for the optimization of the product formation.

Kapitel 1

Einleitung

Bei der Herstellung von Antibiotika werden in großem Umfang Bakterien eingesetzt. Dabei handelt es sich vor allem um Bakterien der Gattung Actinomyceten. Daher sind diese Organismen heute in der Biotechnologie von großer Bedeutung. Actinomyceten kommen im Gegensatz zu anderen Bakterien nicht als Einzeller vor, sondern bilden ein fadenförmiges Geflecht, ein Myzel, aus. Dieses kann als Substrat– oder Luftmyzel ausgeprägt sein. Bei ihren Produkten handelt es sich meist um Sekundärstoffe mit antibiotischer Wirkung, welche für das Wachstum der Organismen nicht notwendig sind. Die Regulation des Sekundärstoffwechsels von Actinomyceten ist sehr komplex und es sind noch nicht alle Einzelheiten der ablaufenden Stoffwechselvorgänge und vor allem deren Regulation aufgeklärt.

Um eine Optimierung des Herstellungsprozesses zu erreichen, ist es sinnvoll, heutige Methoden der Systemtheorie anzuwenden. Eine Voraussetzung ist dabei die Erstellung eines mathematischen Modells zur Beschreibung des Wachstums- und Produktionsverhaltens der Mikroorganismen. Dieses Modell kann dann eingesetzt werden, um eine optimierte Prozeßführung durchzuführen. Die Erstellung und Anpassung eines solchen mathematischen Modells für einen bestimmten Stamm und sein Hauptprodukt kann sehr zeitaufwendig sein. Deshalb ist es wünschenswert, ein möglichst allgemeingültiges Modell zu entwickeln, welches schnell auf andere Stämme und Produkte angepaßt werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wird auf der Basis bereits vorhandener experimenteller Ergebnisse und Modelle für das Wachstumsverhalten, sowie eigener experimenteller Ergebnisse ein verallgemeinertes, strukturiertes mathematisches Modell erstellt. Die Modellparameter werden an die beiden untersuchten Actinomyceten Stämme *Streptomyces tendae* und *Amycolatopsis mediterranei* angepaßt. Damit wird die Grundlage geschaffen, um bei verschiedenen Stämmen von Actinomyceten eine modellgestützte Optimierung der Prozeßführung zu erreichen.

1.1 Problemstellung

Myzelförmig wachsende Mikroorganismen, wie Actinomyceten, weisen meist eine komplexe Morphologie auf. Die Ausprägung der unterschiedlichen morphologischen Erscheinungen (Myzel, Pellet, Myzelflocken) hängt in großem Maße von den Kultivierungsbedingungen ab. Für die mathematische Modellierung des myzelförmigen Wachstums solcher Organismen liegen schon eine Reihe von Beschreibungen vor [86, 70, 11, 111]. Unter den hier untersuchten Fermentationsbedingungen sind die morphologischen Besonderheiten allerdings nicht so stark ausgeprägt [101]. Die vorkommenden Pellets besitzen nur eine geringe Größe, daher kann von einer durchschnittlichen Biomasse mit gleichen Eigenschaften ausgegangen werden.

Sekundärmetabolite, wie Antibiotika, werden von den Zellen nur unter bestimmten Umweltbedingungen gebildet. Bei einer guten Versorgungslage mit Nährstoffen ist dies nicht der Fall. Erst wenn ein oder mehrere Substrate aus dem Nährmedium limitiert sind, werden diese Stoffe von den Organismen gebildet. Zu diesem Zeitpunkt finden in den Zellen große physiologische Veränderungen statt, welche sich in einer Veränderung der prozentualen Aufteilung der Zellbestandteile widerspiegelt. Um eine ausreichend genaue Abbildung der Stoffwechselvorgänge zu erreichen, ist es notwendig, die Biomasse bei der mathematischen Modellierung nicht als Gesamtes zu betrachten, sondern in Einzelkompartimente aufzuteilen.

Ein allgemeingültiges Modell für das Wachstum und für die Produktbildung von Actinomyceten ist erstrebenswert, um den Aufwand für die Modellierung der einzelnen Stämme zu reduzieren. King [40, 42] stellte ein strukturiertes mathematisches Modell für das Wachstum verschiedener Stämme von Streptomyceten vor. Dieses Modell wurde von King am Institut für Systemdynamik und Regelungstechnik (ISR) für den Stamm *Streptomyces tendae* [39] entwickelt. Das Ziel dieser Arbeit ist es, auf der Basis neuer Erkenntnisse über die Regulation des Primär– und Sekundärmetabolismus eine Weiterentwicklung dieses Modells vorzunehmen. Die Modellstruktur soll dabei anhand experimenteller Untersuchungen hinsichtlich der Regulation des Sekundärmetabolismus der beiden Stämme *S. tendae* und *A. mediterranei* validiert werden. Dabei wird im Zusammenhang mit der Regulation des Sekundärstoffwechsels vor allem die stringente Kontrolle [12, 73, 74, 75, 76, 98, 5, 82] mit dem Signalstoff ppGpp untersucht. Zu diesem Zweck wurde dem ISR von Prof. Wohlleben aus Tübingen (Lehrstuhl für Mikrobiologie/Biotechnologie) der Stamm *A. mediterranei* mit einer *relA* Mutante zur Verfügung gestellt. Bei dieser *relA* Mutante ist das *relA* Gen, welches für die Bildung des Signalstoffes ppGpp zuständig ist, ausgeschaltet. Die Ergebnisse aus diesen experimentellen Untersuchungen sollen in die mathematische Modellbildung einfließen.

Die beiden zur Modellbildung zu untersuchenden Stämme weisen Unterschiede sowohl in morphologischer Hinsicht, als auch bei der Produktbildung auf. Diese Unterschiede sind in Ta-

belle 1.1 aufgeführt. Vor allem in der Morphologie sind einige Unterschiede, wie z.B. bei der Sporenbildung und der Fragmentierung, zu beobachten. Der Stamm *A. mediterranei* bildet im Laufe einer Fermentation Fragmente, d.h. schon vorhandene Pellets und Myzelflocken zerfallen dann in sehr kleine Myzelteile. Diese Unterschiede werden bei der Modellbildung nicht berücksichtigt. Hier soll der Schwerpunkt auf der gemeinsamen Regulation des Primär- und Sekundärmetabolismus liegen.

	A. mediterranei	***S. tendae***
Gruppe	*Pseudonocadiaceae*	*Streptomycetaceae*
Morphologie	Myzel (Substrat) Pellets keine Sporen Fragmentierung	Myzel (Luft, Substrat) Pellets Sporenbildner
Hyphendurchmesser	max 1 μm	0.5-1 μm
Hauptprodukte	Balhimycin: - Glucopeptidantibiotikum - Synthese nicht–ribosomal	Nikkomycin: - Nukleosidpeptidantibiotikum - Synthese nicht–ribosomal

Tabelle 1.1: Unterschiede der beiden betrachteten Stämme

Für beide Stämme waren schon die verantwortlichen Gene für die Produktsynthese identifiziert [7, 81]. Diese Ergebnisse sollen in die mathematische Modellierung eingearbeitet werden. Es wird gezeigt, wie diese Art von Information auch bei der Modellierung anderer Stämme einfließen kann. Dazu erscheint eine modulare Modellstruktur besonders geeignet.

Das auf diesem Wege erhaltene strukturierte Modell muß anschließend mit Hilfe einer Parameteridentifikation an die beiden untersuchten Stämme angepaßt werden. Dadurch kann gezeigt werden, daß es möglich ist, für beide Stämme mit einer Modellstruktur und unterschiedlichen Parametersätzen das Verhalten während einer Fermentation zu beschreiben. Damit ist die Grundlage für eine Prozeßoptimierung, wie sie schon in [108, 37] für *S. tendae* durchgeführt wurde, auch für *A. mediterranei* geschaffen.

1.2 Gliederung der Arbeit

In Kapitel 2 wird zunächst auf die biologischen Grundlagen und auf den Stoffwechsel (Primärmetabolismus, Sekundärmetabolismus) von Actinomyceten eingegangen. Der Schwerpunkt liegt dabei auf den vorhandenen Untersuchungen, Erkenntnissen und Hypothesen zur Regulation des Sekundärmetabolismus. Im Speziellen wird dabei die Produktsynthese der beiden hier untersuchten Stämme *S. tendae* und *A. mediterranei* dargestellt. Neben den biologischen Grundlagen werden in Kapitel 2 auch die Grundlagen der mathematischen Modellbildung in

der Biotechnologie vorgestellt. Dabei werden die unterschiedlichen mathematischen Modelle, welche in der Biologie verwendet werden, kurz diskutiert.

Die Materialien und Methoden, die bei der Durchführung der Experimente und Datenanalyse verwendet wurden, sind in Kapitel 3 zusammengefaßt.

Eine ausführliche Diskussion der experimentellen Ergebnisse, im Hinblick auf die Modellbildung, erfolgt in Kapitel 4. Wichtig sind dabei die Einflüsse der Medienbestandteile auf die Produktbildung, aber auch die Untersuchungen und Ergebnisse der Messungen des Signalstoffes ppGpp werden hier dargestellt. Abschließend werden die Fermentationsergebnisse diskutiert.

Der wichtigste Teil der Arbeit, die mathematische Modellbildung, wird in Kapitel 5 vorgestellt. Dabei wird auf die biologischen Grundlagen und auf die Ergebnisse in Kapitel 4 zurückgegriffen, um die Zusammenhänge der Stoffwechselwege zu modellieren. Zur Modellierung wird die Biomasse in einzelne Kompartimente wie RNA, DNA, Proteine und eine Strukturkomponente unterteilt. Die Modellierung umfaßt auch einen Signalstoff, welcher bei der Regulation des Sekundärstoffwechsels eine Rolle spielt. Dieser Signalstoff liegt zellintern in sehr geringen Mengen vor und wird deshalb nicht in die Massenbilanz der Biomasse mit einbezogen. Die Bilanz dieses Signalstoffes kann in einem vereinfachten Ansatz wegen der geringen Stoffmengen auch als quasi-stationär angesetzt werden. Die Simulationsergebnisse dieser beiden Ansätze werden im Vergleich mit den experimentellen Ergebnissen vorgestellt und diskutiert.

Bei Unkenntnis der biologischen Details der Stoffwechselvorgänge und Regulationswege ist es sinnvoll, vorhandene Meßinformation so gut als möglich zu nutzen. Dazu bieten sich neuronale Netze in Verbindung mit kinetischen Modellen an, um die Meßinformation direkt in das Modell einzubinden. Ob eine solche Lösung für den Anwendungsfall *S. tendae* zielführend sein kann, wird in Kapitel 6 überprüft. Dazu wird ein hybrider Modellansatz diskutiert.

Um das in Kapitel 5 erhaltene mathematische Modell auf verschiedene Stämme anzupassen, muß eine Parameteridentifikation durchgeführt werden. Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde das Modell an die beiden Stämme *S. tendae* und *A. mediterranei* angepaßt. Das prinzipielle Vorgehen bei der Parameteridentifikation und die theoretischen Grundlagen zur Parameteridentifikation und zur Parameteranalyse sind in Kapitel 7 dargestellt.

Abschließend werden in Kapitel 8 die Ergebnisse der Arbeit kurz zusammengefaßt.

Eine Auflistung der bei der Identifikation des neuronalen Netzes aus Kapitel 6 und zur Datenanalyse in Kapitel 4 verwendeten Fermentationsdaten ist in Anhang A zu finden. Die Parameterwerte für die beiden verwendeten Stämme sind in Anhang B angegeben. Weitere Simulationsdaten im Vergleich mit experimentellen Daten, welche nicht in Kapitel 5 gezeigt wurden, sind in Anhang C aufgeführt.

Kapitel 2

Grundlagen

2.1 Biologische Grundlagen

Unter den Mikroorganismen kommt den Actinomyceten eine sehr große Bedeutung zu, da sie eine Vielzahl unterschiedlicher, biologisch aktiver Sekundärmetabolite herstellen. Ein Großteil aller produzierten Sekundärmetabolite sind Antibiotika. Von der Gattung *Streptomyces*, eine Untergruppe der Actinomyceten, wurde zwischen 1945 und 1978 über 55% aller eingesetzten Antibiotika produziert [109]. Inzwischen wurden aus Actinomyceten über 100.000 mikrobielle Sekundärstoffe isoliert, wobei die Hälfte von der Gattung *Streptomyces* stammt [50]. Durch ihren großen Anteil an der Produktion wichtiger mikrobiologisch aktiver Naturstoffe sind sie heute von großer wirtschaftlicher und wissenschaftlicher Bedeutung.

Actinomyceten, gram-positive Bakterien, sind nicht nur für ihren Sekundärmetabolismus bekannt, sondern auch für ihre komplexe Morphologie. Ihr Lebenszyklus beginnt mit der Sporenkeimung, woraus ein Substratmyzel entsteht, welches sich durch die morphologische Differenzierung in ein Luftmyzel wandelt und schließlich mit der Sporulation diese Myzels endet. Die morphologische Differenzierung ist meist an die metabolische Differenzierung gekoppelt, welche oft durch die Bildung von Sekundärmetaboliten gekennzeichnet ist. Es wird angenommen, daß diese zelluläre Differenzierung durch Änderungen in der extrazellulären Umgebung, wie z.B. einer Limitation von Nährstoffen, ausgelöst wird.

Actinomyceten wachsen in der Natur als Oberflächenkulturen meist im Boden. Für industrielle Anwendungen werden die Zellen jedoch als Submerskultur in einem Rührkesselreaktor kultiviert. In solchen Flüssig–Kulturen kann das Wachstum vielfältige Formen annehmen. Es können Pellets, Myzelfragmente und gleichmäßig verteiltes Myzel auftreten. Die Pelletgröße ist dabei abhängig u.a. von der Animpfmenge, der Gelöstsauerstoffkonzentration, der Scherkraft und dem pH Wert.

2.1.1 Primärmetabolismus

Der Primärmetabolismus stellt eine Serie von enzymkatalysierten Reaktionswegen dar. Er beinhaltet katabolische, amphibolische und anabolische Stoffwechselwege. Dabei werden biosynthetische Intermediate bereitgestellt, Precurser werden zu essentiellen Makromolekülen verstoffwechselt, wie z.B. in Desoxyribonukleinsäure (DNA) und Ribonukleinsäure (RNA), Proteine, Fettsäuren und Polysaccharide. Der Primärmetabolismus ist bei allen lebenden Organismen ähnlich wichtig. Seine Stoffwechselreaktionen sind sehr genau abgestimmt und metabolische Intermediate, welche nicht für das Zellwachstum benötigt werden, häufen sich sehr selten in den Zellen an. Manche Bakterientypen sind bekannt dafür, zusätzlich zu diesem primären Stoffwechsel noch weitere spezifische Metabolite zu synthetisieren. Manchmal werden dazu dieselben Enzyme wie im Primärmetabolismus verwendet. Aber öfter werden unter bestimmten Bedingungen, wie z.B. einer Nährstofflimitation, dafür spezifische Synthetasen von den Zellen produziert. Dies bezeichnet man als Sekundärmetabolismus.

Über den Primärmetabolismus von Actinomyceten gibt es nur wenige Untersuchungen [21, 23, 22, 45]. Durch das große Interesse an den Produkten des Sekundärstoffwechsels kam dem Primärstoffwechsel in den Untersuchungen immer eine untergeordnete Rolle zu. Die meisten Studien bei Actinomyceten beschränkten ihre Untersuchungen auf die genetischen Hintergründe der Antibiotikaproduktion und auf dessen Regulation [32, 14]. Untersuchungen zur Regulation der Primärstoffwechselwege in Actinomyceten, welche die Precurser für den Sekundärstoffwechsel stellen (z.B. Zucker, organische Säuren, Aminosäuren und Nukleotide) gibt es nur wenige, obwohl die Regulationsebenen und Regulationsarten sich in manchen Bereichen des Primärstoffwechsels stark von anderen Bakterien unterscheiden [31]. Untersuchungen mit *Streptomyces coelicolor* A3(2) und *Streptomyces clavuligerus* zeigen eine Regulation von Precursern aus dem Primärstoffwechsel für die Biosynthese der Antibiotika durch die Wachstumsrate. Durch ein unbalanciertes Wachstum liegen die Precurser, welche nicht durch Feedback–Inhibierung reprimiert werden, bei geringer Wachstumsrate in größerer Menge vor. Der Pool wird dann durch den Abfluß in die Antibiotikabiosynthese wieder verringert [31, 33, 38]. Diese Ergebnisse sind ein weiterer Hinweis auf die komplexe, mehrfach überlagerte Regulation des Sekundärmetabolismus. Weiterhin bleibt offen, ob die Aminosäuren, welche zur Biosynthese als Precurser benötigt werden, während der Produktionsphase wieder neu synthetisiert werden, oder aus dem Peptidzerfall stammen [33].

2.1.2 Sekundärmetabolismus

Als Precurser für Sekundärmetabolite fungieren meist nur ein geringe Anzahl von Stoffen: Koenzym A, Derivate von kurzen Fettsäuren, Aminosäuren, Zucker und Nukleotide. Diese Pre-

curser werden auch im Primärmetabolismus zur Synthese von Zellbausteinen, wie z.B. Proteinen, Nukleinsäuren, Zellwandbestandteilen und Membranlipiden benötigt [107]. Aus diesen Precurser werden durch eine Vielzahl von enzymatisch gesteuerten Reaktionen die Sekundärmetabolite gebildet.

Die Bildung von Sekundärmetaboliten wurde in Modellfällen wie z.B. bei Surfactin (*B. subtilis*), Streptomycin (*S. griseus*) oder Penicillin (*A. nidulans* und *P. chrysogenum*) im Detail untersucht. Sie wird reguliert durch überlagerte Regulationsnetzwerke oder -kaskaden. Solche Netzwerke umfassen intra- und extrazelluläre Komponenten, ebenso mögliche Regulatoren, Umformer, Aktivatoren, sich gegenseitig beeinflussende Repressoren sowie Modifikations- und Expressionssysteme. Trotz dieser Komplexität konnten in manchen Fällen durch die Manipulation einzelner Gene erhebliche Auswirkungen auf das Produktionsniveau erreicht werden. Die unterschiedlichen physiologischen Faktoren, welche den Beginn der Antibiotikaproduktion in Streptomyceten beeinflussen können, passen nicht in ein einfaches allgemeingültiges Modell. In Chater und Bibb [13] werden eine Reihe möglicher Regulationsmechanismen für die Synthese von Sekundärmetaboliten aufgezeigt (siehe Abb. 2.1). Es erscheint jedoch sinnvoll, einen

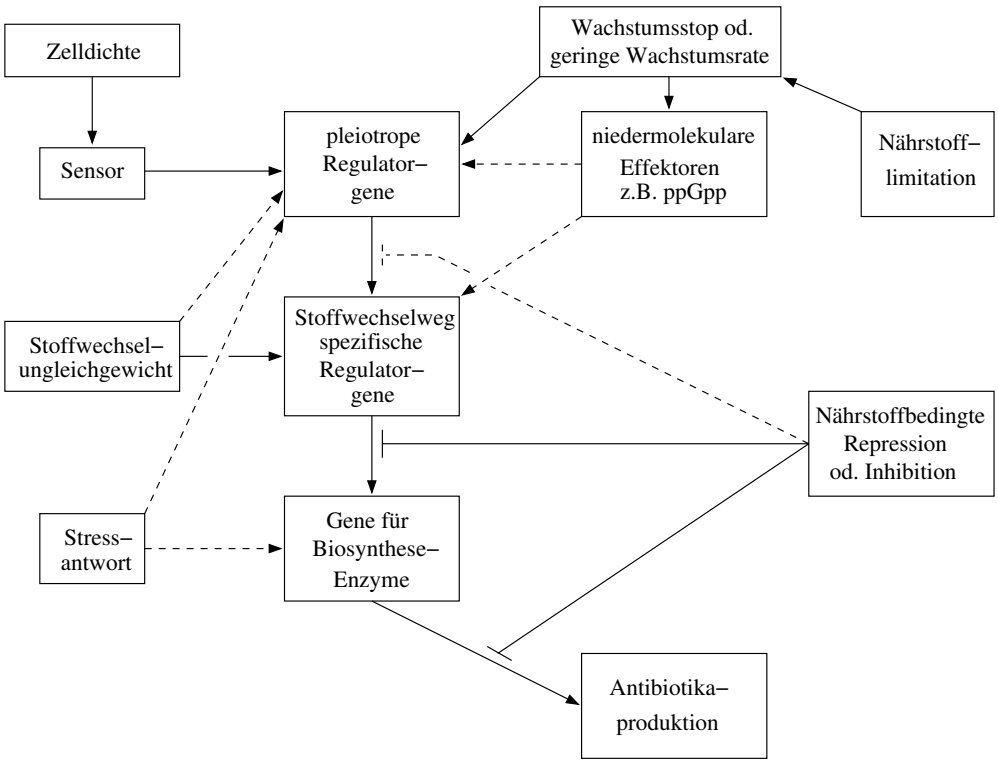

Abbildung 2.1: Hypothetische Regulation des Sekundärmetabolismus nach Chater und Bibb [13],- mögliche Faktoren für den Beginn der Antibiotikaproduktion bei Streptomyceten, - - plausible, aber noch nicht bewiesene Interaktionen

allumfassenden regulatorischen Einfluß der Wachstumsrate mit überlagerten stoffwechselspezifischen Regulationseffekten zu berücksichtigen, welcher die Produktion einzelner Antibiotika beeinflußt. Solch ein Effekt könnte die Reaktion auf eine Katabolitenrepression, einen unbalancierten Stoffwechsel, umweltbedingte Signale oder Stressfaktoren sein. Ob diese Faktoren als Konsequenz der verminderten Wachstumsrate folgen oder als Antwort auf von außen wirkende Faktoren, auf selbstregulierende Kreisläufe oder auf ppGpp als möglichen intrazellulären Signalstoff bleibt noch zu klären.

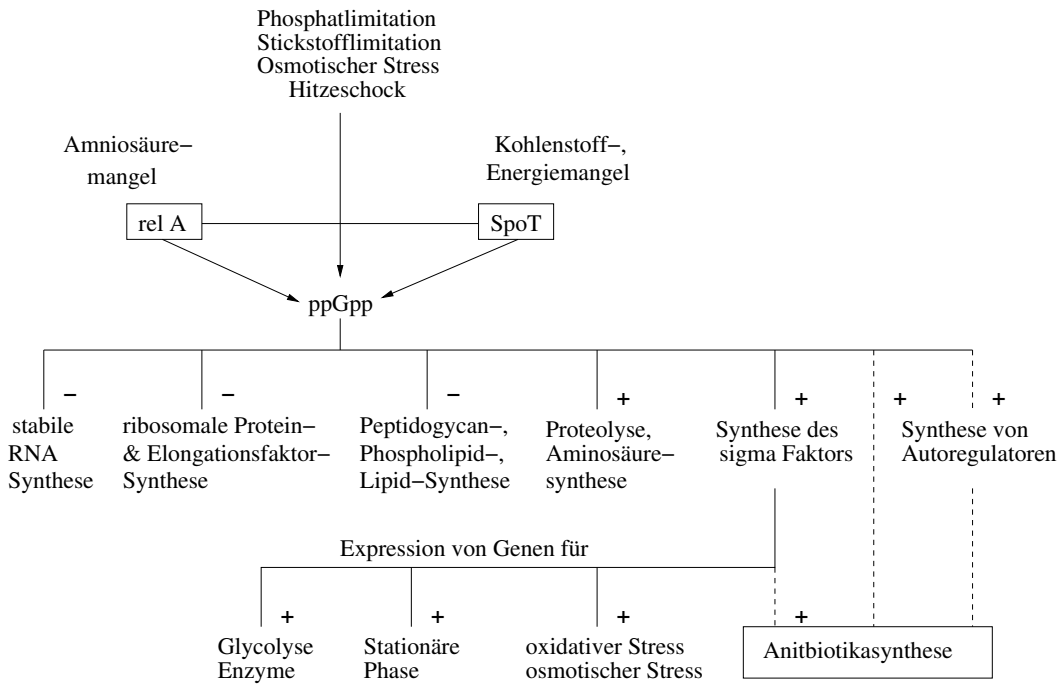

Abbildung 2.2: Auslösung der stringenten Kontrolle (modifiziert nach Nyström [72]).

Die stringente Kontrolle, welche stark mit dem zellinternen Gehalt des Signalstoffes ppGpp verknüpft ist, wird als ein globaler Regulationsmechanismus diskutiert (siehe Abb. 2.2). In *E. coli* steigt der ppGpp–Gehalt in den Zellen an, wenn Aminosäuren, anorganischer Stickstoff oder Kohlenstoff limitiert sind. Dies ist möglicherweise auch bei einer Phosphatlimitation der Fall [12]. Somit könnte ppGpp einen möglichen Regulator für den Eintritt in die stationäre Phase darstellen.

Auf molekularer Ebene laufen bei einem Aminosäuremangel folgende Prozesse ab: Die Transkription der DNA und die darauf folgende Translation können nicht mehr reibungslos ablaufen. Im Normalfall lagert sich die RNA–Polymerase bei der DNA an eine entsprechende Promotorsequenz des Gens an, welches abgelesen werden soll. Durch die entsprechende Elongation der Ribonukleinsäuren wandert die RNA–Polymerase weiter und der Promotor steht für weitere Bindungen zur Verfügung. Der Ablesevorgang wird solange fortgesetzt, bis eine Terminatorse-

quenz auf der DNA erkannt wird. Die entstandene RNA wird in vielen Fällen noch enzymatisch modifiziert und liegt schließlich in der Zelle in drei Arten vor:

- Messenger RNA (mRNA), welche die Information der Aminosäurenabfolge des zu synthetisierenden Proteins enthält.
- Ribosomen, welche zur Proteinsynthese benötigt werden, bestehen aus ribosomaler RNA (rRNA).
- Transfer RNA (tRNA), die notwendig ist, um die zur Synthese benötigten Aminosäuren an das angefangene Protein am Ribosom anzulagern.

Unter Aminosäuremangel kann die tRNA nicht mehr mit Aminoacyl–Molekülen beladen werden. Damit stehen für die Proteinbiosynthese beim Übersetzen der mRNA keine Bausteine mehr zur Verfügung. Durch die Anlagerung unbeladener tRNA an das Ribosom, wird das RelA Protein ((p)ppGpp Synthetase I) aktiviert, welches am Ribosom assoziiert ist. Dadurch kann die Umsetzung von GTP oder GDP zu (p)ppGpp unter Verbrauch von ATP erfolgen, siehe Abb. 2.3.

Unter dem Einfluß von ppGpp erfolgt eine weitgehende Umgestaltung der Genexpression der Zellen, welche als Anpassung des Stoffwechsels an die verschlechterten Wachstumsbedingungen zu deuten ist. Die Wirkung von ppGpp beruht auf einer Veränderung der Initiationsfrequenz der Transkription. Durch welchen Mechanismus eine solche Änderung hervorgerufen wird, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es ändert sich jedoch wahrscheinlich die Promotorselektivität der RNA–Polymerase durch Anlagerung von ppGpp an die Polymerase.

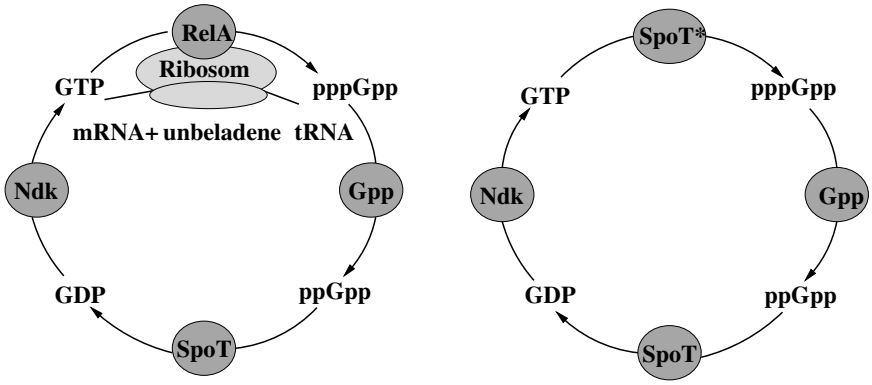

Abbildung 2.3: Synthesewege der an dem Netzwerk der stringenten Kontrolle beteiligten Guanosinnukleotide [69]: Gpp, pppGpp 5–Phosphohydrolase; Ndk, Nukleosid–diphosphatkinase.

Wenn das Wachstum durch Erschöpfung der primären Kohlenstoff- und Energiequelle abnimmt, wird die stringente Kontrolle durch einen Weg aktiviert, der unabhängig von RelA ist. Dazu existiert in *E. coli* noch ein weiteres (p)ppGpp synthetisierendes Enzym ((p)ppGpp Synthetase II), welches als SpoT bezeichnet wird. Das SpoT Protein besitzt strukturelle Ähnlichkeit

mit dem RelA Protein. Es kann in zwei unterschiedlichen Konformationen auftreten. Eine Form (SpoT*) katalysiert die Biosynthese von pppGpp, während die andere Form (SpoT) den Abbau von (p)ppGpp katalysiert. Durch eine Veränderung der Aktivität dieses Proteins, z.B. nach einer Erschöpfung der Energiequelle, wird die stringente Reaktion ausgelöst (Abb. 2.3).

Die Möglichkeit der Regulation der Antibiotikabiosynthese durch (p)ppGpp und die stringente Kontrolle wurde auch bei Streptomyceten diskutiert [73, 74, 75, 76, 98]. Derzeit gibt es dazu noch keine eindeutigen Nachweise, es ist ein Bedarf an weiteren Untersuchungen vorhanden.

2.1.3 Produktsynthese

Die beiden in der Arbeit untersuchten Actinomyceten-Stämme produzieren zwei unterschiedliche Hauptprodukte (Nikkomycin bei *S. tendae* und Balhimycin bei *A. mediterranei*). Für die Modellierung wurde nur die Bildung dieser Hauptprodukte betrachtet, andere Produkte blieben unberücksichtigt. Auf die Produktsynthese und bisher bekannte Biosynthesecluster dieser Hauptprodukte soll in den beiden folgenden Abschnitten näher eingegangen werden. Ein weiteres Produkt von *S. tendae* ist Juglomycin. Dieses wird zwar in Kapitel 4 gemessen, da aber über dessen Regulation und Bildung zu wenig bekannt ist, kann hier darauf nicht näher eingegangen werden. Auch von *A. mediterranei* werden außer Balhimycin noch das nicht–ribosomal synthetisierte Peptid–Siderophor Amycolachrom produziert, sowie mindestens zwei noch unbekannte nicht–ribosomal synthetisierte Peptide [80].

2.1.3.1 Nikkomycin

Nikkomycine gehören zu der Gruppe der Nukleosidpetid–Antibiotika, welche eine Untergruppe der Nukleosid–Antibiotika darstellt. Diese Zuordnung zu den stickstoffhaltigen, heterozyklischen Antibiotika erfolgt aufgrund ihrer chemischen Struktur.

Aus dem Kulturfiltrat von *S. tendae* werden neben den Hauptkomponenten Nikkomycin X und Z eine Reihe weiterer biologisch aktiver und inaktiver Nikkomycine isoliert. In dieser Arbeit wird für die Modellierung die Summe der vier Nikkomycine X, I, Z und J betrachtet. In Abb. 2.4 sind die Strukturformeln dieser 4 Nikkomycine abgebildet. Die Nikkomycine X und Z bestehen aus Nukleosiden, welche als Nikkomycin C_x und C_z bezeichnet werden. Diese sind über eine Peptidbindung mit der seltenen aromatischen Aminosäure Hydroxypyridylhomothreonin (HPHT), auch Nikkomycin D genannt, verknüpft. Die Nikkomycine C_x und C_z setzen sich aus einer Aminohexuronsäure (5–Amino–5–desoxy–β–D–allo–furanuronsäure), welche mit der Base 4–Formyl–4–imidazolin–2–on (C_x) oder Uracil (C_z) N–glycosidisch ver-

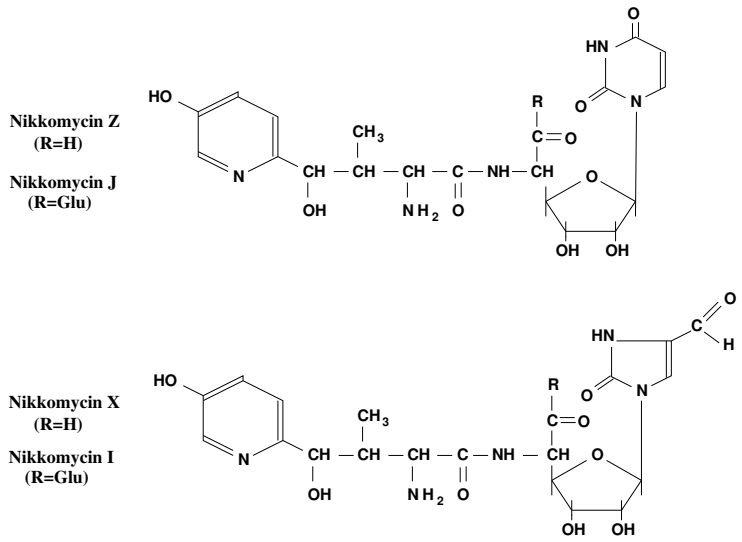

Abbildung 2.4: Strukturformeln der Nikkomycine Z,J mit Uracilbasis und X,I mit Histidinbasis

bunden ist, zusammen. Die Nikkomycine I und J sind Tripeptid–Analoge der Nikkomycine X und Z. Sie enthalten zusätzlich einen Glutaminsäure–Rest, welcher ebenfalls über eine Peptid Bindung mit der 5–Aminohexuronsäure verknüpft ist.

Die Nikkomycin–Biosynthesegene von *S. tendae* sind in einem Gencluster angeordnet [8, 65]. Die genetische Organisation des bisher nachgewiesenen offenen Leserahmens des Biosyntheseclusters ist in Abb. 2.5 dargestellt.

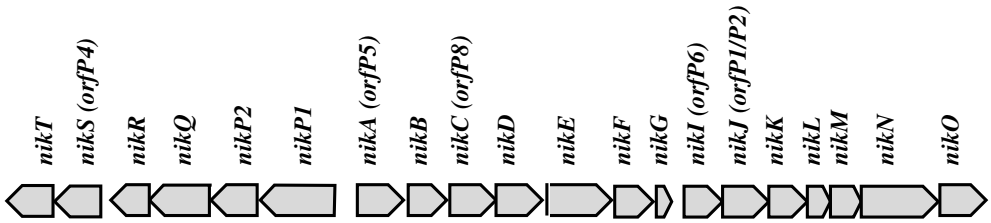

Abbildung 2.5: Genetische Organisation des bisher bekannten offenen Leserahmens des Nikkomycin–Biosyntheseclusters von *S. tendae*

Bisher konnte einem Teil der Gene bzw. den entsprechenden Genprodukten die Katalyse einzelner Reaktionsschritte des Biosyntheseweges zugewiesen werden. Dadurch ist der Biosyntheseweg teilweise aufgeklärt, die Regulation der Biosynthese ist aber noch ungeklärt, da von den untersuchten Genen des Clusters bisher noch kein spezifisches Regulatorgen für den Syntheseweg gefunden wurde.

In Abb. 2.6 sind die bisher bekannten Synthesewege mit den entsprechenden katalysierenden Genprodukten und den benötigten Ausgangsstoffen aus dem Primärmetabolismus zusammen-

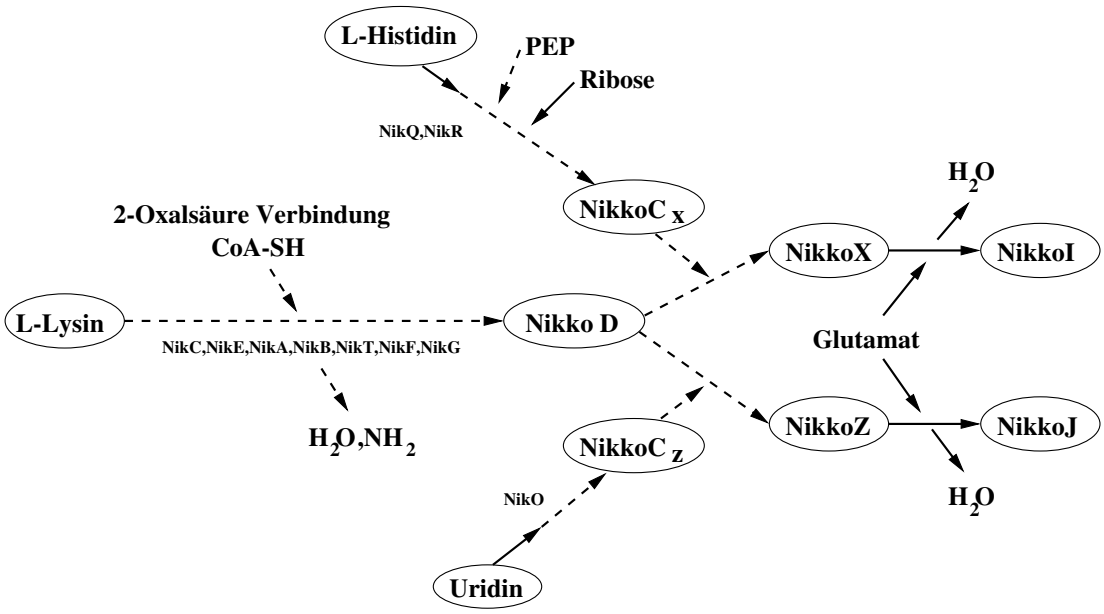

Abbildung 2.6: Nikkomycin–Biosynthese

gefaßt. Die Biosynthese von Nikkomycin D (HPHT) geht von L–Lysin aus, welches zuerst transanimiert und dann in Picolinsäure umgewandelt wird. CoA-SH wird benötigt, um die Picolinsäure über Picolinsäure-CoA Pyrimidin-2-carboaldehyd zu erzeugen. Für die weitere Umformung zu POHIV (2–hydroxy–3–methyl–2–oxo–4–(2'pyridyl)) wird noch eine 2–Oxalsäure Verbindung benötigt. Für die Biosynthese der Nikkomycine C_z und C_x ist Uridin und L-Histidin aus dem Primärstoffwechsel der Ausgangsstoff. Durch die Verbindung mit phosphorylierter Ribose (PRPP) entstehen die beiden Nikkomycine. Um nun Nikkomycin X und Z zu erhalten, muß nur noch Nikkomycin C_x und C_z mit Nikkomycin D verbunden werden. Glutamat wird im letzten Schritt verbraucht, wenn aus Nikkomycin X und Z die Nikkomycine I und J entstehen.

2.1.3.2 Balhimycin

Balhimycin ist ein Glykopeptid–Antibiotika, aus der Gruppe der Vancomycine, die als Notfallantibiotikum Verwendung finden. Es ist Vancomycin in der Struktur sehr ähnlich. Ebenso wie Vancomycin besteht es aus einem Heptapeptid–Rückgrat (Aglycon), welches für diese Gruppe (Vancomycin–Gruppe, d.h. aliphatische Aminosäuren an Position eins und drei) von Glykopeptid–Antibiotika charakteristisch (und identisch) ist. Das Aglycon leitet sich aus Azetat und Tyrosin ab. Charakteristisch für Balhimycin sind der Aminozucker Dehydrovancosamin an der Aminosäure (AS) 6 des Aglycons und die D-Glucose an der phenolischen OH–Gruppe der aromatischen Seitenkette der AS 4 des Aglycons. Es unterscheidet sich zusätzlich noch von Vancosamin durch die Positionierung des Chloratoms an dem aromatischen Rest der AS

6. Der Wildtyp *A. mediterranei* kann neben Balhimycin zusätzlich noch mindestens neun weitere Balhimycin–Derivate synthetisieren, wobei Balhimycin allerdings das Hauptprodukt darstellt. Zwei der natürlich vorkommenden Derivate (Balhimycin V und Dechloro–Balhimycin V) besitzen drei Zuckerreste, bestehend aus einem Dehydrovancosamin–Molekül an AS 6, sowie einem Glucose–Dehydrovancosamin–Disaccarid an AS 4. Balhimycin besitzt damit die Summen-Formel $C_{66}H_{73}Cl_2N_9O_{24}$ und ein Molekulargewicht von 1447 Da (Abb. 2.7).

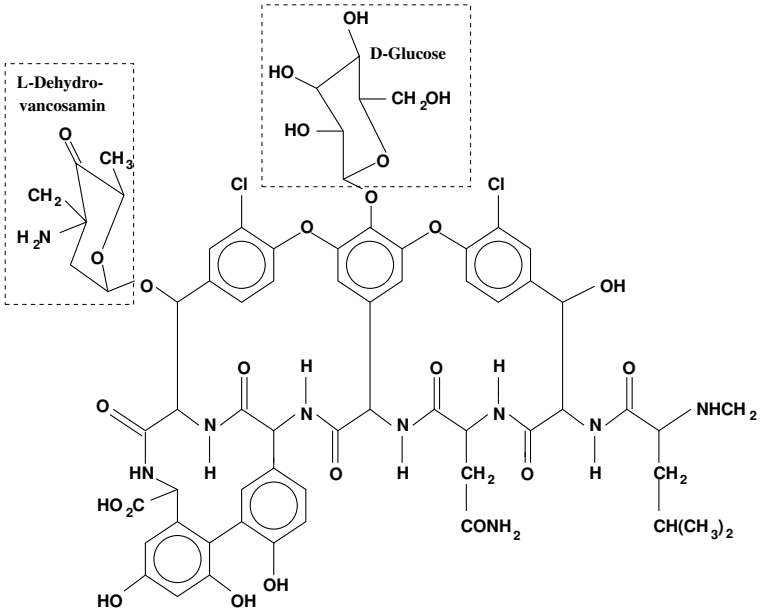

Abbildung 2.7: Balhimycin

Die Synthese des Heptapeptid–Rückgrat kann ribosomal oder nicht–ribosomal durch multifunktionelle Peptid–Synthetasen ablaufen, wobei bei ribosomaler Synthese der Energieaufwand 36 ATP pro Peptidbindung beträgt und bei nicht–ribosomaler Synthese 1 ATP pro Peptidbindung. Es ist anzunehmen, daß das Heptapeptid–Rückgrat des Glykopeptid–Antibiotika vom Typ Vancomycin nicht–ribosomal mit Hilfe multifunktioneller Peptid Synthetasen nach dem Thiotemplate–Mechanismus synthetisiert wird. Die einzubauende Aminosäure wird unter ATP–Verbrauch als Aminoacyladenylat aktiviert und anschließend als Thioester auf einen beweglichen 4'Phosphopantethein–Arm (4'PP) übertragen und kovalent gebunden. Unter Mitwirkung dieses beweglichen Cofaktors findet durch das Zusammenspiel mit weiteren Peptid Synthetasen die Peptid–Elongation satt. Die Freisetzung des fertigen Peptidproduktes erfolgt schließlich über Hydrolyse, Zyklisierung oder spezifischen Transfer zu einer funktionellen Gruppe. Die Peptid Synthetasen bestehen aus mehreren Domänen, welche bis zu 1300 AS groß sein können.

Die Biosynthese des Desoxyzuckers wird in Analogie zur Synthese anderer 6–Desoxy–Zucker ebenfalls über ein dNDP–4–Keto–6–Desoxy–Hexose–Intermediat erfolgen. Es wird deshalb eine Dehydratase–Aktivität postuliert. Die Gene für die Dehydratase befinden sich oft innerhalb

des entsprechenden Antibiotika–Biosynthesegen–Clusters [99, 78, 27].

Für die Übertragung der Zucker an das Heptapeptid–Rückgrat werden Glykosyltransferasen benötigt, wobei diese meist für jeden Zucker spezifisch sind. Die Substratspezifität für das Aglycon kann evtl. eine gewisse Flexibilität zeigen (z.B. Erkennung auch wenn das Rückgrat deglykosiliert vorliegt). Hinsichtlich der Reihenfolge der Glykosilierung existieren keine Daten. Zwei Glykosyltransferasen (*gtfD* und *gtfE*) aus dem Vancomycin–Produzenten *A. orientalis* sowie drei Glykosyltransferasen (*gtfA, gtfB* und *gftC*) für die Chloroeremomycinsynthese aus *A.orientalis* wurden bereits identifiziert. In *A. mediterranei* wurden drei Glykosyltransferasen, welche evtl. bei der Biosynthese beteiligt sind, gefunden (*BgtfA, BgtfB* und *BftgC*). Durch die HD1 Mutante, bei der eine Glykosyltransferase *BgtfB* inaktiviert wurde, konnte bestätigt werden, daß hier nur noch Produkte ohne Glykosilierung entstehen, d.h. nur solche mit modifiziertem Heptapeptid–Rückgrat [27].

Bei den Genen konnte bis jetzt noch kein Regulator gefunden werden, deshalb liegt die Vermutung nahe, daß sie gemeinsam reguliert werden. *BgtfA* ist vermutlich für die Glykosilierung mit Dehydrovancosamin (AS6) zuständig, *BgtfB* für die Addition von Glucose an das Aglycon (AS4) und *BgtfC* für die Addition von Dehydrovancosamin an den Glucose Rest (AS4) bei Balhimycin V und Dechloro–Balhimycin V. Ebenso könnten aber auch die Funktionen von *BgtfA* und *BgtfB* vertauscht sein. Die Gene weisen große Ähnlichkeit mit den Genen *GtfA, GtfB* und *GtfC* auf, welche die entsprechenden Funktionen in *A. orientalis* bei der Produktion von Chloroeremomycin besitzen.

Die weiteren Genprodukte von *oxyA-C* haben große Ähnlichkeit mit P450 Oxygenase, wobei *oxyB* und/oder *oxyC* wahrscheinlich beim Anhängen der aromatischen Seitenketten beteiligt ist.

2.2 Mathematische Modellbildung in der Biotechnologie

Die mathematische Modellierung ist ein sehr leistungsfähiges Werkzeug zur Interpretation und Vorhersage von natürlichen Phänomenen und experimentellen Ergebnissen. Ein mathematisches Modell liefert immer eine vereinfachte Beschreibung des aktuellen Phänomens. Deshalb ist es möglich, verschiedene mathematische Modelle zur Beschreibung eines Phänomens zu erstellen, abhängig von der Intention des Modells und den zur Verfügung stehenden Messungen [1].

Biologische Systeme, auch der einfachsten Art, sind meist von sehr komplexer Natur, die jede mathematische Beschreibung als eine extrem bescheidene Approximation erscheinen lassen. Die Intention der Modellierung kann auf der einen Seite sein, die Daten und das Wissen über

die biologischen Zusammenhänge über einen bestimmten Prozeß in eine Struktur zu fassen, mit welcher es anschließend möglich ist, den Prozeß zu regeln und zu optimieren. Eine andere Intention der mathematischen Modellierung kann es sein, das Verständnis der biologischen Systeme zu verbessern und eine sinnvolle Strukturierung der Vorgänge in den Zellen zu finden, um damit in Kooperation mit der Biologie das Verständnis über die Regulationsvorgänge in den Zellen weiter zu entwickeln.

Da mit zunehmender Komplexität beim Übergang von Black–Box–Modellen hin zu strukturierten Modellen normalerweise eine gleichzeitige, kontinuierliche Abnahme der Robustheit und Identifizierbarkeit des Modells auftritt, ist es wichtig im Vorfeld festzulegen, welchen Zweck das Modell nachher erfüllen soll und welches Problem damit gelöst werden soll. Die Erstellung umfassender Modelle erfordert einen sehr hohen Aufwand. Zunächst müssen die wichtigen Vorgänge des betrachteten Prozesses erfaßt werden und danach alle Parameter der Modellgleichungen bestimmt werden und letztendlich muß das Modell noch validiert werden. Durch die wachsende Anzahl an Modellparametern bei komplexeren Modellen ist meist eine iterative Vorgehensweise bei der Modellerstellung notwendig.

Die Parameteridentifikation ist ebenfalls ein iterativer Prozeß. Eine Sensitivitätsanalyse der Parameter ist notwendig, um die Parameter selektiv zu identifizieren. Wenn nicht alle Parameter mit den vorhandenen Daten identifizierbar sind, werden weitere Experimente benötigt. Wenn beim anschließenden Schritt der Modellvalidierung keine zufriedenstellenden Ergebnisse erreicht werden, sind strukturelle Veränderungen im Modell notwendig, um den Prozeß ausreichend genau zu beschreiben. Damit steht man wieder am Anfang und muß mit Hilfe der experimentellen Messungen und dem biologischen Wissen über die zu modellierenden Vorgänge das Modell entsprechend verändern. Der Prozeß der Parameteridentifikation muß danach erneut durchlaufen werden. Alle Schritte des Modellbildungsprozesses müssen solange wiederholt werden, bis eine Modellvalidierung zufriedenstellende Ergebnisse liefert. Erst dann ist der Prozeß abgeschlossen.

2.2.1 Unstrukturierte Modelle

Unstrukturierte Modelle sind die einfachste Art von biologischen Modellen. In unstrukturierten Modellen wird angenommen, daß die betrachteten Organismen mit ausreichender Genauigkeit durch die Zellanzahl oder die Größe des Biomassetrockengewichts bestimmt sind. Systeme mit unstrukturierten Modellen sind meist leichter experimentell zu validieren und die Auslegung der Regelung ist meist einfacher. Deshalb werden sie bevorzugt bei Anwendungen genutzt, bei denen die Genauigkeit der Beschreibung für das betrachtete Problem ausreicht. Die Monod–Gleichung [66] zur Beschreibung von substratlimitiertem Wachstum ist ein Beispiel eines er-

folgreichen unstrukturierten Modells [26]. Ursprünglich wurde die Gleichung empirisch von den Ergebnissen einer Batchkultivierung von Mikroorganismen abgeleitet. Unstrukturierte Modelle können im allgemeinen in zwei Fällen eine gute Annäherung darstellen. Wenn die Zusammensetzung der Biomasse keinen Einfluß auf das Verhalten hat, oder wenn die Zusammensetzung unabhängig von der Zeit ist, wie z. B. bei balanciertem Wachstum. Diese Art von Modellen ist bei einer großen Anzahl von Anwendungen nicht ausreichend zur Beschreibung. Probleme ergeben sich z.B. wenn sich die Zusammensetzung der Biomasse im Verlauf der Kultivierung entscheidend verändert, wie z.B. bei Fed–Batch Prozessen, beim anfänglichen Wachstum in der Anpassungsphase, oder wenn ein bestimmter Zellbestandteil modelliert werden muß. In diesen Fällen müssen strukturierte Modelle eingesetzt werden.

2.2.2 Strukturierte Modelle

Bei strukturierten Modellen wird die Biomasse nicht nur als eine Zustandsgröße aufgefaßt, sondern es werden mehrere Zustandsgrößen verwendet, um die Biomasse zu beschreiben. Damit können auch Regulationsvorgänge innerhalb der Zellen modelliert werden.

- Stöchiometrische Modelle
  Stöchiometrische Modelle basieren auf den zeitunabhängigen Charakteristiken von metabolischen Netzwerken. Die metabole Flußanalyse wird schon in großem Rahmen zur Berechnung der stationären intrazellulären Stoff-Flüsse für den Stoffwechsel von Bakterien, Hefen, filamentösen Pilzen und tierischen Zellen eingesetzt. Mit der Stoff-Flußanalyse werden durch Massenbilanzen über die intrazellulären Metabolite die Stoff-Flüsse durch die verschiedenen Zweige des Netzwerkes bestimmt. Damit ist es möglich, zu einem bestimmten stationären Zustand einen Einblick in den Stoffwechsel zu bekommen [105, 104].

  Stöchiometrische Modelle sind sehr leistungsfähig, ein großer Nachteil ist allerdings ihre begrenzte vorausschauende Aussagekraft bei Veränderungen. Dies ist zum großen Teil durch das Fehlen von Information über die Regulation der Zelle in der Modellformulierung begründet.

- Kompartmentmodelle
  Bei Kompartmentmodellen wird der unstrukturierte Ansatz dahingehend erweitert, daß die Menge und die Eigenschaften der Biomasse durch mehrere Kompartments beschrieben werden. Die Wahl der Kompartments richtet sich meist nach sinnvollen Molekül– oder Markromoleküleinheiten der Zellen (z.B. RNA, DNA, Proteine) [3, 71]. Sie können

eine bessere Beschreibung des betrachteten Systems bei nur geringfügig höherer Komplexität liefern.

- Kybernetische Modelle
  Eine andere Möglichkeit regulatorische Aspekte des Zell-Stoffwechsels bei der Modellierung zu berücksichtigen, bieten kybernetische Modelle [16, 43, 103]. In diesem Falle werden kybernetische Variablen in Form von Gütefunktionalen in die kinetischen Gleichungen eingeführt, um mit diesen Variablen unbekannte mechanistische Details der zellulären Regulation zu ersetzen. Dabei wird angenommen, daß der Stoffwechsel der Zelle unter der Zielsetzung der Optimierung des Wachstums arbeitet. Kybernetische Modelle wurden schon erfolgreich zur Modellierung von Wachstum auf gemischten Substraten [87] und zur Modellierung der Funktionsweise von Speicherstoffwechselwegen [106] angewandt. Ein Nachteil ist allerdings, daß es durch die künstlichen Katalysatoren keine Möglichkeit gibt, das Verhalten der Zellen basierend auf einer physiologischen Erklärung, wie z.B. ablaufender Reaktionen, die für das Überleben der Zellen wichtig sind, vorherzusagen.

- Metabolisch und genetisch strukturierte Modelle
  Metabolische Modelle beinhalten sehr viel Information über die zellulären Vorgänge. Die Stöchiometrie, wie auch der mechanistische Ablauf von Reaktionen, wird als Grundlage für solche Modelle verwendet. Zur Erstellung eines Modelle ist es notwendig, von den biologischen Hintergründen mehr zu wissen als im Modell abgebildet wird. Damit wird es dem Modellierer ermöglicht, begründete Annahmen zu treffen [96]. In vielen Fällen ist daher das Fehlen des detaillierten biologischen Wissens ein Hindernis für die metabolische Modellierung. Um dies zu verbessern, ist eine enge Zusammenarbeit der Systemwissenschaft mit der Biologie erforderlich.

  Modelle mit sehr hohem Detaillierungsgrad bis auf die genetische Ebene mit Promotor und Operatorfunktionen werden als genetisch strukturierte Modelle bezeichnet. Solche Modelle sind nur für gut bekannte Teil–Systeme der Zellen wie z.B. das *lac* Promotor-Operator System möglich [53, 52, 110]. Zu den metabolisch strukturierten Modellen gehören auch die signalorientierten Modelle, welche die Organisation des metabolischen Netzwerkes in den Vordergrund stellen [54, 48, 47, 46].

  Werkzeuge zur Genomanalyse klären die gesamte genetische Sequenz einer immer größer werdenden Anzahl von Mikroorganismen auf. Es stellt sich die Frage, ob man aus der genetischen Struktur direkt ableiten kann, wie sich der Organismus verhält. Aber durch hierarchische Regulationssysteme in den Zellen, welche häufig genetische Fehler kompensieren, ist dies nicht möglich. Das Zusammenwirken dieses epigenetischen oder regulatorischen Netzwerkes ist noch nicht geklärt [96].

- Morphologisch strukturierte Modelle
  Bei den metabolisch strukturierten Modellen werden die Stöchiometrie und die kinetischen Zusammenhänge des Stoffwechsels in einer Zelle modelliert. Zur Aufstellung eines Gesamtmodells wird angenommen, daß in allen Zellen der Kultur derselbe Stoffwechsel abläuft, d.h. daß die Zellpopulation sich homogen verhält. Diese Annahme ist für einen Großteil der meisten Bakterienkulturen gerechtfertigt, aber für Hefepilze oder für filamentös wachsende Mikroorganismen können die Unterschiede in der Morphologie der einzelnen Zellen einen Einfluß auf das Verhalten der Kultur haben. Bei Hefepilzen sind die innerhalb des Zellzyklus gebildeten Mutter- und Tochterzellen zu unterscheiden, die einen unterschiedlichen Metabolismus aufweisen. Bei filamentösen Mikroorganismen kann ein unterschiedlicher Metabolismus in den einzelnen multizellulären Strukturen auftreten. Um diesen innerhalb eines Populationsmodells beschreiben zu können, ist es notwendig, die Stoffwechselmodelle jeder einzelnen morphologischen Form mit einem geeigneten Populationsparameter, z.B. dem geometrischen Ort, zu kombinieren. Diese Modelle bezeichnet man dann als morphologisch strukturierte Modelle [41, 44, 71].

- Hybride Modelle
  Bei der hybriden Modellbildung werden verschiedene Modellierungsmethoden, durch eine Synthese von Teilmodellen, kombiniert. Diese Modelle werden meist als Grundlage zur Optimierung eines vorhandenen Produktionsprozesses verwendet. Dabei wird nicht nur strukturelles Wissen über den Prozeß und die benötigten Stoffwechselwege zur Modellbildung genutzt, sondern auch vorhandene Meßdaten gehen direkt in die Modellbildung ein.
  Neuronale Netze, die den Prozeß ohne physikalische Basis beschreiben und als Black-Box-Modelle bezeichnet werden, können dazu in die Modellbildung integriert werden. Ebenso besteht die Möglichkeit, Prozeßwissen, welches durch Erfahrung und als Expertenwissen vorhanden ist, z.B mit Hilfe von Fuzzy Regeln in das Modell einzubringen. Die Vorteile der neuronalen Netze liegen darin, daß kein physikalisches Prozeßwissen notwendig ist, sondern nur vorhandene Meßdaten zur Modellierung genutzt werden. Neue Meßdaten können anschließend dazu genutzt werden, das Modell iterativ zu verbessern und an Prozeßveränderungen anzupassen. Die Identifikation kann mit geringem Aufwand relativ automatisiert durchgeführt werden. Die Hauptarbeit besteht in der Auswahl und Bereinigung einer großen Menge von Datensätzen, welche zur Identifikation erforderlich sind. Ein Nachteil ist die fehlende physikalische Grundlage, welche eine Extrapolierbarkeit des Modells zuläßt. Wenn es sich um schon etablierte Produktionsprozesse handelt, die sich innerhalb definierter Rahmenbedingungen bewegen und das Modell mit vertretbarem Aufwand bereitgestellt werden soll, kann diese Art der Modellierung durchaus zur

Optimierung nutzbringend eingesetzt werden [64, 67, 57, 77, 89].
Bei der hybriden Modellierung geht es darum, verschiedene Modelltypen zu kombinieren, um damit den höchstmöglichen Nutzen für die Prozeßmodellierung und damit auch die Prozeßoptimierung mit möglichst geringem Aufwand zu erreichen. Dabei werden bekannte physikalische Grundlagen, wie z.B. Massenbilanzen berücksichtigt. Neuronale Netze können dabei z.B. dazu dienen, die Kinetiken der Stoffumwandlungen zu modellieren, wenn kein ausreichendes Prozeßwissen vorhanden ist. Hybride Modellierung wurde schon bei verschiedenen Prozessen, wie z.B. der Hefe-Produktion [93], Penicillin-Erzeugung [85] und bei tierischen Zellkulturen [17] eingesetzt.

Kapitel 3

Material und Methoden

3.1 Zellinien

Im Rahmen der Arbeit wurden zwei unterschiedliche Actinomycetenstämme untersucht, *S. tendae* Tü901 (Prof. Zähner, Tübingen) und *A. mediterranei* DSM5908 (Prof. Wohlleben, Tübingen). Von dem Stamm *A. mediterranei* DSM5908 wurde zusätzlich eine *relA* Mutante (*A. mediterranei* HDR4) und ein entsprechender Kontrollstamm zur Verfügung gestellt. Durch Integrationsmutagenese wurde bei der *relA* Mutante das *relA* Gene inaktiviert. D.h. an der entsprechenden Stelle der DNA des *relA* Gens wurde dieses unterbrochen. Um die Reinheit der Mutante über einen längeren Kultivierungszeitraum zu sichern, wurde dabei gleichzeitig ein Resistenz-Gen für Erythromycin integriert. Zur Kontrolle über die Veränderung des Wachstums durch die Erythromycin-Resistenz wurde ein Kontrollstamm konstruiert, bei welchem das Erythromycin-Resistenz-Gen durch Integrationsmutagenese eingebaut wurde, aber ohne das *relA* Gen zu inaktivieren.

3.2 Medien

Für die erste Vorkultur VK1 von *S. tendae* wurde ein Medium mit 30 g l^{-1} Glucose, 20 g l^{-1} Sojamehl und 5 g l^{-1} Hefe-Extrakt verwendet. Für *A. mediterranei* wurde in der ersten Vorkultur das Sojamehl durch 5 g l^{-1} Sojapepton ausgetauscht. Die anderen Medienzusammensetzungen sind in Tabelle 3.1 aufgelistet. Beide Vorkulturmedien wurden autoklaviert. Das chemisch definierte Medium für den Fermenter wurde sterilfiltriert. Eine Medienoptimierung [15] ergab eine bessere Produktion für *A. mediterranei* DSM5908 bei Wachstum auf Fructose, anstatt Glucose. Deshalb wurde in Fermentationen mit *A. mediterranei* Fructose statt Glucose als Kohlenstoff–

und Energiequelle verwendet.

Bei den beiden Mutantenstämmen, *A. mediterranei* HDR4 und dem Kontrollstamm wurde Erythromycin mit einer Konzentration von 50 mg/l in den Vorkulturen und im Fermentationsmedium zugegeben, um die Erythromycin-Resistenz und damit die Reinheit der Stämme zu gewährleisten.

3.3 Schüttelkolbenversuche

Um zu testen, ob bei der *relA* Mutante tatsächlich die ppGpp–Bildung verhindert wird, wurden Schüttelkolbenversuche vorgenommen. Dabei wurde ein Vergleich von Wildtyp und *relA* Mutante bei dem Stamm *A. mediterranei* vorgenommen. Für die erste Vorkultur des Schüttelkolbens wurde Tryptic Soy Broth (TSB) Medium in einer Konzentration von 30 g l^{-1} verwendet. Eine homogenisierte Agarplatte diente zum Animpfen. Diese erste VK (100ml) wurde ca. 6-7 Tage in einem 0.5 l Erlenmeyerkolben mit Spirale bei 27 °C und 140 rpm kultiviert. Für die zweite VK wurde das Schüttelkolbenmedium (siehe Tab. 3.1) mit 50 mM MES verwendet. Zum Animpfen von 100ml Medium dienten dabei 10 ml der ersten VK. Nach weiteren 7 Tagen

	S. tendae			*A. mediterranei*			
Medienbestandteile	VK2[a]	N-lim.	P-lim.	VK2[a]	N-lim.	P-lim.	SK
Glucose (g l^{-1})	30	40	40	-	-	-	-
Fructose (g l^{-1})	-	-	-	30	40	40	40
$(NH_4)_2SO_4$ (mM)	25	20	50	75	20	75	75
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ (mM)	2.5	6	2.5	1.5	12	1.5	1.5
MES[b] (mM)	50	-	-	10	-	-	-
NaCl (g l^{-1})	1	1	1	1.5	1.5	1.5	1
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (g l^{-1})	1	1	1	1	1	1	2
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (mg l^{-1})	20	20	20	20	20	20	20
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (mg l^{-1})	10	10	10	20	20	20	20
$MnSO_4 \cdot H_2O$ (mg l^{-1})	7	7	7	10	10	10	10
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (mg l^{-1})	100	100	100	10	10	10	10
$Na_3Citrat \cdot H_2O$ (mg l^{-1})	230	230	230	230	230	230	230
Temperatur (°C)	27	27	27	27	27	27	27
pH	7[c]	6	6	7[c]	6	6	7[c]

[a] 2.Vorkultur
[b] 2-(N-Morpholino) ethane sulfonic acid
[c] Anfangswert

Tabelle 3.1: Medienbestandteile und Kultivierungsbedingungen

wurde die dritte VK mit demselben Medium wie die VK2 angesetzt und im Verhältnis 1:1 mit der VK2 gemischt. Eine Menge von 130 ml wurde unter gleichen Bedingungen wie bei den anderen Vorkulturen drei Tage kultiviert. Danach wurde ein 2 l Erlenmeyerkolben mit 1.95 l Füllmenge mit 129 g der dritten VK angeimpft. Der 2 l Kolben wurde zusätzlich zur Spirale mit einer externen Luftversorgung über einen Sterilfilter ausgestattet, um auch bei großen Trockengewichtsmengen eine ausreichende Belüftung gewährleisten zu können.

3.4 Durchführung der Fermentationen

Die erste Vorkultur von *S. tendae* in einem 1 l Erlenmeyerkolben mit Belüftungsspirale wurde mit 200 ml VK1 Medium und mit 0.5 ml Sporensuspension angeimpft. Da *A. mediterranei* keine Sporen ausbildet, wurde zum Animpfen der ersten Vorkultur Myzel von einer Agarplatte (Glucose, Hefe-Extrakt und Sojapepton) zum ersten Vorkulturmedium in den 1 l Erlenmeyerkolben zugegeben. Nach 48 h Kultivierung bei 140 rpm in einem Rundschüttler wurden 45 ml der ersten Vorkultur in einen 2 l Erlenmeyerkolben mit 900 ml VK2 Medium transferiert. Nach weiteren 48 h wurde die zweite Vorkultur für das Animpfen des Fermenters benutzt. Dabei wurden jeweils 5% des Fermenterarbeitsvolumen zum Animpfen benötigt. Für Fermentationen mit *S. tendae* wurde ein Fermenter mit 50 l Arbeitsvolumen verwendet, bei *A. mediterranei* ein Fermenter mit 12 l Arbeitsvolumen. Die Fermentationen wurden jeweils durchnumeriert und der Buchstabe G oder M vor der Fermentationsnummer gibt an, in welchem Fermenter sie durchgeführt wurden (50 l $\rightarrow$ G, 12 l $\rightarrow$ M). In den folgenden Kapiteln wird diese Bezeichnung für die einzelnen Fermentation dann entsprechend angegeben.

Der pH–Wert und die Temperatur wurden automatisch vom Prozeßleitsystem (Siemens S7) geregelt. Der pH–Wert wurde mit 3 NaOH auf pH 6 geregelt. Bei dem 50 l Fermenter wurde mit einer Belüftungsrate von 12.5 l min^{-1} und einer Umdrehungszahl von 350 rpm fermentiert. Bei manchen Fermentationen wurde die Rührerdrehzahl auch bis zu 450 rpm erhöht, um einen Abfall der Gelöstsauerstoffkonzentration unter 20 % zu verhindern. Bei dem Stamm *A. mediterranei* wurde eine erhöhte Schaumbildung während der Fermentation festgestellt. Um ein Überschäumen des 12 Liter Fermenters zu verhindern, wurde hier eine variable Belüftung und Rührerdrehzahl zwischen 1-2 l min^{-1} und 200-450 rpm eingestellt, um eine Gelöstsauerstoffkonzentration von mind. 60% zu erreichen [37]. Bei allen Fermentationen mit *S. tendae* wurde ein Glucosefeeding (250 g l^{-1}) und bei *A. mediterranei* ein Fructosefeeding (500 g l^{-1}) nach ca. 70–100 h angeschlossen, um einen Glucose- bzw. Fructosemangel in den Zellen zu verhindern.

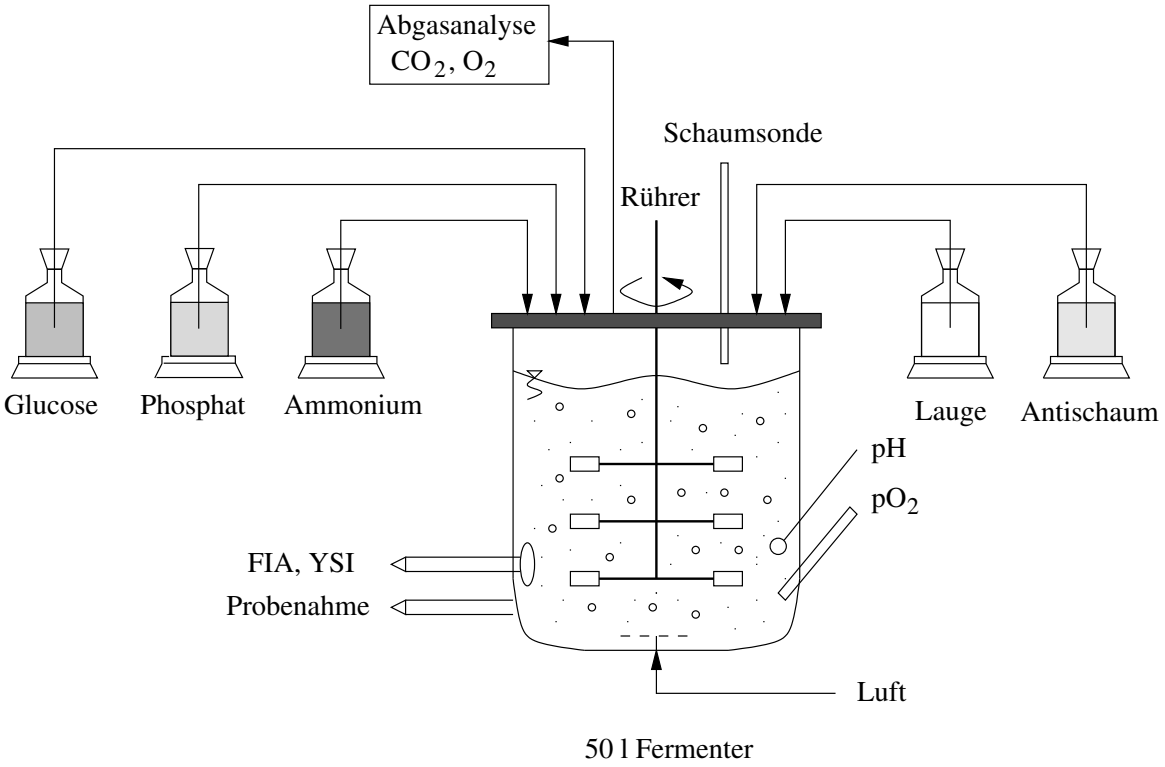

Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der 50 l Fermentationsanlage am ISR

3.5 Repeated Fed–Batch–Fermentationen

Die Repeated Fed–Batch–Fermentationen mit dem Stamm *S. tendae* wurden im mittleren Fermenter mit einem Anfangsvolumen von 12 l durchgeführt. Dazu wurden die Anfangsbedingungen für eine Phosphatlimitation (siehe Tab. 3.1) verwendet. Nach ca. 138 h wurde der Inhalt des Fermenters entleert. Um Zeitverzögerungen zu vermeiden, wurde der Fermenter zur Reinigung nur mit destilliertem Wasser gespült. Es erfolgte keine erneute Sterilisierung. Danach wurde mit neuem Medium aufgefüllt und mit 300 ml der letzten Probe angeimpft. Dadurch wurden wieder dieselben Anfangsbedingungen, wie zum Beginn der Fermentation erreicht.

3.6 Analytische Methoden

3.6.1 Probenahme

Für Analysezwecke wurde 2-3 mal täglich, in besonderen Fällen auch in kürzeren Zeitabständen, aus dem Fermenter eine sterile Probe entnommen. Ein entsprechender Vorlauf gewährleistete eine repräsentative Probenmasse. Die Biomasse für die Trockengewichtsbestimmung

wurde abfiltriert und der pH-Wert wurde gemessen. Der restlichen Analysen wurden später durchgeführt.

3.6.2 Trockengewicht

Zur Bestimmung des Trockengewichts wurden je 5 bzw. 10 ml Probe durch vorgewogenes Filterpapier unter Vakuum filtriert und mit dest. Wasser nachgespült. Nach anschließender Trocknung über Nacht bei 100°C wurden die Filter im Exsikkator wieder auf Raumtemperatur gebracht und abgewogen. Das Trockengewicht ergibt sich aus der Differenz zum Leergewicht. Es wurden immer Dreifachbestimmungen durchgeführt.

3.6.3 Medienbestandteile

3.6.3.1 Fructose und Glucose

Die als C-Quelle eingesetzten Monosaccharide Glucose und Fructose wurden über einen enzymatischen Test von Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) erfaßt.

3.6.3.2 Ammonium

Zur Ammoniumbestimmung im Medium wurde der Harnstoff-Test der Fa. Merck (Darmstadt) verwendet. Dabei wurden Ammoniumionen mit Phenol-Nitroperussid und alkalischer Hypochloridlösung zu einem blauen Indol-Farbstoff umgesetzt, welcher photometrisch bei 620 nm gemessen wird. Die Intensität des Farbstoffes ist proportional zur Ammoniumkonzentration.

3.6.3.3 Phosphat

Die Phosphatbestimmung wurde mit dem Phosphattest der Fa. Merck durchgeführt. Anorganisches Phosphat reagiert dabei mit Natriummolybdat zu Phosphomolybdat. Dieses wird mit Methylaminophenolsulfat zu Molybdänblau reduziert. Die Farbintensität ist proportional zum Gehalt von Phosphationen und wurde durch Extinktionsmessung bei 750 nm bestimmt.

3.6.3.4 Pyruvat

Pyruvat im Kulturüberstand wurde durch einen enzymatischen Test gemessen. Das Testprinzip ist aus der nachfolgenden Reaktion mit der Lactat–Dehydrogenase ersichtlich.

$$\mathrm{Pyruvat} + \mathrm{NADH} + \mathrm{H}^+ \overset{\mathrm{LDH}}{\rightarrow} \mathrm{Lactat} + \mathrm{NAD}^+ \tag{3.1}$$

Zur Messung wurden 400 μl Probe mit 600 μl Puffer (0.5 M Triethanolamin-EDTA-Puffer, 7.6 pH) und 20 μl NADH–Lösung (6 mM) gemischt. Anschließend wurde bei Raumtemperatur zweimal im Abstand von 3 min die Extinktion bei 334 nm gemessen. Danach wurde 10 μl LDH–Lösung (0.52 mg ml^{-1}) zugemischt und die Extinktion nach 15 min im Abstand von 3 min zweimal gemessen. Durch die gemessene NADH–Abnahme wurde dann die Pyruvatkonzentration berechnet.

3.6.4 Zellbestandteile

3.6.4.1 DNA

Ein Sediment aus 5-10 ml Probe wurde mit 5 ml eiskalter 0.25 N Perchlorsäure versetzt und für 20–25 min im Eisbad inkubiert. Die Probe wurde dann erneut zentrifugiert und das Sediment mit 0.5 N Perchlorsäure versetzt und für 15 min im Wasserbad bei 70°C inkubiert. Die zweite Extraktion wurde insgesamt dreimal durchgeführt und die Extrakte anschließend vereinigt. Die Bestimmung des DNA-Gehalts der Zellen erfolgt nach der Methode von Burton (1955), dazu wurden 0.5 ml des Extraktes mit 0.5 ml Reagenz (1.5 g Diphenylamin, 100 ml Eisessig, 3 ml konz. $\mathrm{H_2SO_4}$, 1.6 % Acetaldehyd) versetzt und 18 h bei 37°C inkubiert. Die Extinktion der Proben wurde dann bei 623 nm gegen 0.5 N Perchlorsäure gemessen.

3.6.4.2 RNA

Die Extraktion der RNA aus den Zellen erfolgte wie bei der DNA Bestimmung mit Perchlorsäureextraktion. Danach wurde die RNA Bestimmung, nach Meybaum [63], durchgeführt.

Dabei wird die Eigenschaft von Pentosen, mit Orcinol unter Mitwirkung von $\mathrm{FeCl_3}$ und HCl einen beständigen grünen Farbkomplex zu bilden, ausgenutzt. 67 μl Probe wurden mit 200 ml Reaktionslösung (90 mg $FeCl_3 \cdot H_2O$, 100 ml konz. HCL und 1% Orcinollsg.) für 18 min bei 90°C inkubiert. Die Reaktion wurde nach dem Abkühlen im Wasserbad durch Zugabe von 1 ml n-Butanol gestoppt und die Extinktion der Probe gegen 0.5 N Perchlorsäure bei 672 nm gemessen. Als Standard diente in Perchlorsäure gelöste RNA aus Bäckerhefe.

3.6.4.3 Proteine

Die Probe wurde vor der Analyse mit 1 N NaOH verdünnt. Die Extraktion erfolgte durch Resuspension von 5 ml Probe mit 5 ml 1 N NaOH, und anschließender Inkubation bei $90°C$ für 30 min. Nach dem Abzentrifugieren wurden 50 μl des Überstandes mit 1 ml Reagenzlösung A (2g NaOH, 26.98 g $Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$, 0.1g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.2g KNa–Tartrat in 520 ml A.dest.) 5-10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde mit 100 μl Reagenzlösung B (Folin–Ciocalteus–Phenolreagenz 1:1 mit A.dest. verdünnt) gut gemischt und bei 30-45 min erneut bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung erfolgte bei 585 nm. Als Standard wurde Albumin in 1 N NaOH 30 min bei $90°C$ inkubiert.

3.6.4.4 Nukleotide und ppGpp

Für die Zellextraktion wurden jeweils 50-100 ml Fermentationsbrühe mit einem Papierfilter (*S. tendae*) oder Glasfaserfilter (*A. mediterranei*) abfiltriert, und das Myzel mit Filter in 10 ml 1N Ameisensäure resuspendiert und 30 min bei $4°C$ inkubiert. Anschließend wurden 5 ml des Ameisensäureextraktes lyphilisiert und der Rückstand in 300 μl deionisiertem Wasser aufgenommen. Unlösliche Bestandteile wurden bei 1300 Upm 5 min abzentrifugiert und der Überstand mittels HPLC (wie bei Grammel [25]) analysiert.

3.6.5 Produkte

3.6.5.1 Nikkomycin

Die Bestimmung der Nikkomycine bei *S. tendae* im Kulturüberstand erfolgte nach der bei Fiedler [20] beschriebenen Methode mit HPLC. Bei der Auswertung der Konzentrationen wurden die Nikkomycine I, J, X und Z als Gesamt–Nikkomycinkonzentration zusammengefaßt. Die Elutionsmittel und Gradienten sind bei Grammel [25] nachzulesen.

3.6.5.2 Juglomycin

Die Messung der Juglomycine erfolgte bei *S. tendae* mit derselben HPLC Methode wie auch die Messung der Nikkomycine. Die Juglomycine konnten mit demselben Elutionsgradienten erfaßt werden.

3.6.5.3 Balhimycin

Bei *A. mediterranei* wurde das Balhimycin aus den Kulturüberständen durch HPLC bestimmt. Zur Elution wurden als Laufmittel 0.1% Trifluoressigsäure (A) und Acetonitril (B) eingesetzt. Gradient: 0min, 90% A, 10% B, 4.5 min, 85% A, 15% B, 8min, 70% A, 30% B, 8.1min, 90% A, 10% B, 10min, 90% A, 10% B. Die UV–Detektion erfolgte bei 280 nm.

3.6.6 Spezifische Wachstumsraten

Die Berechnung der spezifischen Wachstums– und Verbrauchsraten erfolgte nach einer zweifachen Glättung der Meßwerte. Diese Glättung wurde nach einer Evaluierung mit anderen Methoden, wie z.B. auch Spline–Verfahren, ausgewählt. Zur Glättung wurden drei aufeinanderfolgende Meßwertpaare ((x_{i-1},y_{i-1}),(x_i,y_i),(x_{i+1},y_{i+1})) mit folgender Formel gemittelt:

$$y_{i_{glatt}} = \frac{1}{3}\left(2y_{i-1}\frac{x_{i+1}-x_i}{x_{i+1}-x_{i-1}} + y_i + 2y_{i+1}\frac{x_i - x_{i-1}}{x_{i+1}-x_{i-1}}\right) \tag{3.2}$$

Damit wird bei der Glättung der vorhergehende und der nachfolgende Wert berücksichtigt. Bei Fermentationsbeginn und –ende wird nur der nachfolgende bzw. der vorhergehende Wert berücksichtigt. Damit ist die Güte der Glättung in diesem Bereich schlechter als bei den anderen Fermentationsdaten. Mit Hilfe der geglätteten Meßwerte wurden dann unter Berücksichtigung der Verdünnung durch Feed und Probenahme die spezifischen Verbrauchs–, Wachstums– und Produktionsraten berechnet. Bei Fermentationen mit Pulsen wurde die Glättung abschnittsweise über den Fermentationszeitraum durchgeführt. Eine Glättung des Pulses hätte in diesem Fall die Ergebnisse stark verfälscht.

3.6.7 Sauerstoffaufnahmerate

Die Sauerstoffaufnahmerate (OUR) wird bei Fermentationen mit dem Organismus *S. tendae* zu Analysezwecken berechnet. Die Berechnung der Sauerstoffaufnahmerate zur Datenanalyse kann dabei über eine Sauerstoffbilanz der Flüssigphase [19] erfolgen:

$$\frac{dc^L_{O_2}}{dt} = k_l a\left(c^\star_{O_2} - c^L_{O_2}\right) - OUR \tag{3.3}$$

Für die zur Berechnung benötigten Werte des Sauerstoffübergangskoeffizienten $k_l a$ und der Sauerstoffsättigungskonzentration $c^\star_{O_2}$ konnten die in [2] berechneten Werte ($k_l a = 50.9\ \mathrm{l\ h^{-1}}$) und $c^\star_{O_2} = 0.0073\ \mathrm{g\ l^{-1}}$) verwendet werden. Da die dynamischen Vorgänge in der Flüssigphase

aufgrund des Stoffüberganges wesentlich schneller ablaufen als die dynamischen Veränderungen des Zellwachstums, ist die Quasistationaritätsannahme der Gleichung gerechtfertigt [19]. Damit war es möglich, die Sauerstoffaufnahmerate mit Hilfe der vorliegenden Messung des Sauerstoffpartialdruckes im Fermenter in der Flüssigphase zu berechnen.

Eine andere Möglichkeit der Berechnung der Sauerstoffaufnahmerate erfolgte über die Bilanzierung der Gasphase:

$$OUR = \frac{\dot{V}_G}{V_F}\left(c_{O_2}^{G,ein} - c_{O_2}^{G,aus}\right) \tag{3.4}$$

Dabei wurde der Gasvolumenstrom $\dot{V}_G$, das Flüssigkeitsvolumen V_F, die Sauerstoffkonzentrationen des Eingangsgasstroms $c_{O_2}^{G,ein}$ (Konzentration von Sauerstoff in Luft) und die Sauerstoffkonzentration des Abgases $c_{O_2}^{G,aus}$ benötigt. Zur Vereinfachung wird in dieser Gleichung angeommen, dass die Gasströme am Fermentereintritt und –austritt gleich sind. Bei einem Großteil der Fermentationen liegen Abgasmessungen vor. Daher war es möglich, auf diesem Wege die Sauerstoffaufnahmerate zu berechnen. Diese Art der Berechnung wurde bei den Fermentationen mit dem Stamm *A. mediterranei* verwendet, da hier durch die variable Rührerdrehzahl und Belüftung kein konstanter $k_l a$ Wert angenommen werden konnte.

Kapitel 4

Experimentelle Ergebnisse

4.1 Allgemeiner Wachstums– und Produktionsverlauf

Die Produktion von Nikkomycin erfolgt bei *S. tendae* nach einer Ammonium– und/oder einer Phosphatlimitation. Bei *A. mediterranei* kann eine Produktion nur in Verbindung mit einer Phosphatlimitation beobachtet werden. Im folgenden Abschnitt werden die typischen Wachstums- und Produktionsphasen anhand exemplarischer Fermentationsdaten unter diesen Limitationsbedingungen dargestellt. In Abb. 4.1 sind die Fermentationsdaten einer Ammoniumlimitation für die beiden betrachteten Mikroorganismen *S. tendae* und *A. mediterranei* aufgetragen. Dabei wird eine Einteilung in die verschiedenen Wachstumsphasen vorgenommen. Diese Einteilung wird auch durch die Betrachtung von hier zunächst nicht dargestellten Meßgrößen, wie z.B. der Abgaswerte, unterstützt.

Es läßt sich erkennen, daß zu Anfang eine Lag-Phase entstehen kann, in welcher sich die Zellen an die neuen Umweltbedingungen im Fermenter anpassen. Die Lag-Phase wird durch Verwendung desselben Mediums für die 2.VK und den Fermenter auf ein Minimum reduziert. Darauf folgt die exponentielle Wachstumsphase, welche anhält bis ein wichtiges Substrat, in diesem Fall Ammonium, im Medium erschöpft ist. Danach befinden sich die Zellen in einer Übergangsphase, in der noch kurzzeitig ein normales Wachstum durch Replikation der DNA erfolgt. In dieser Phase beginnt auch die Produktbildung. Im Falle einer Ammoniumlimitation kann aber nur bei dem Stamm *S. tendae* eine Bildung des Produkts beobachtet werden. Bei *A. mediterranei* findet keine Bildung des Antibiotikums Balhimycin statt. Nach der Übergangsphase ist eine Abnahme der Biomassekonzentration festzustellen. Diese Abnahme läßt sich zum Teil durch den Verdünnungseffekt, welcher durch den Feedstrom von Glucose bzw. Fructose hervorgerufen wird, und durch die Probenahme erklären. Die Produktbildung wird auch nach der Übergangsphase noch fortgesetzt, bis es zu einer Stagnation kommt.

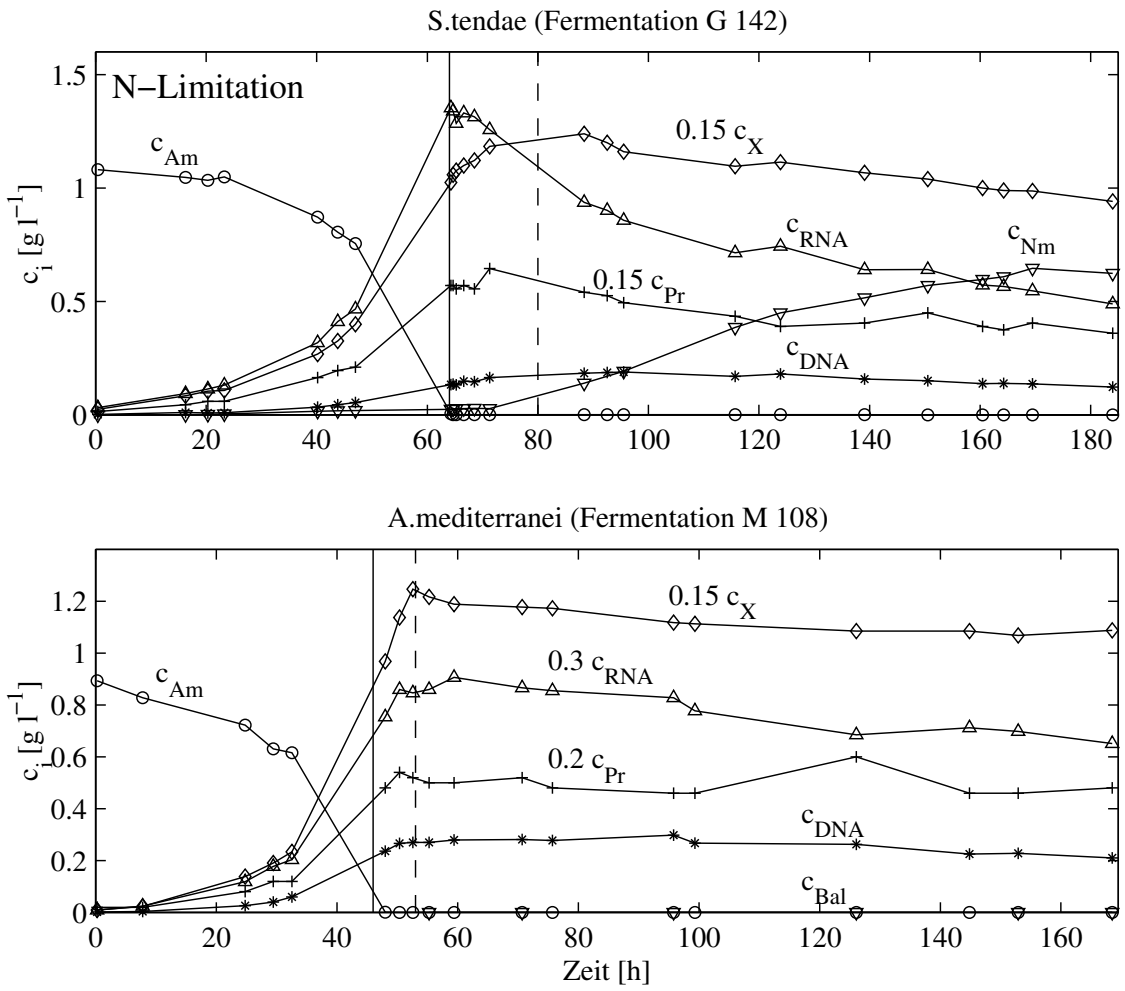

Abbildung 4.1: Experimentelle Daten einer Ammoniumlimitation von *S. tendae* und *A. mediterranei*. Der Limitationszeitpunkt ist durch die durchgezogenen Linien markiert, das Ende der Übergangsphase jeweils durch eine gestrichelte Linie.

Die experimentellen Daten im Falle einer Phosphatlimitation sind in Abb. 4.2 dargestellt. Bis zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase ist das Verhalten vergleichbar zur Ammoniumlimitation. In der Übergangsphase reduziert sich auch hier die Wachstumsgeschwindigkeit und es findet noch eine DNA Replikation statt. Nach der Übergangsphase wird weiterhin noch die Zunahme der Biomasse beobachtet, die DNA hingegen steigt nicht mehr weiter an. Es ist anzunehmen, daß in diesem Fall weiter Stoffe in die Zelle aufgenommen und gespeichert werden, auch wenn dadurch keine echte Zellvermehrung erfolgt, da die DNA–Masse stagniert. Ammonium, welches noch im Medium vorhanden ist, wird ebenso wie Glucose bzw. Fructose weiter aufgenommen. Nach einer gewissen Zeit ist aber auch Ammonium im Medium erschöpft und eine Stagnation der Biomasse erfolgt. Bei beiden Stämmen läßt sich nach einer Phosphatlimitation eine Bildung des Antibiotikums feststellen, welche aber auch in diesem Fall gegen Ende der Fermentationen stagniert.

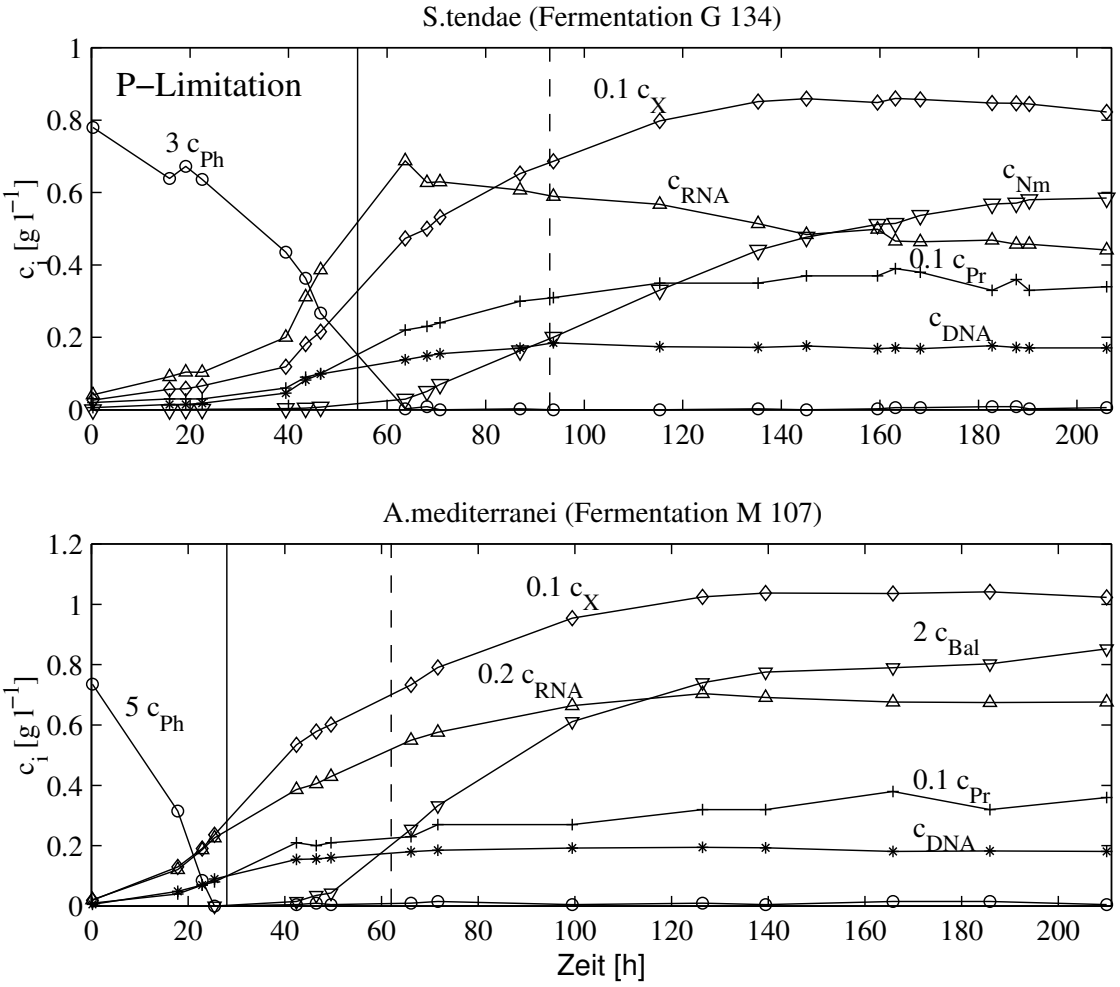

Abbildung 4.2: Experimentelle Daten einer Phosphatlimitation von *S. tendae* und *A. mediterranei*. Der Limitationszeitpunkt ist durch die durchgezogenen Linien markiert, das Ende der Übergangsphase jeweils durch die gestrichelte Linie.

4.2 Einfluß einzelner Größen auf die Produktbildung

Im folgenden Abschnitt soll die Produktbildung näher untersucht werden. Dabei wird analysiert, in welchem Rahmen sich eine Variation der einzelnen Größen, wie z.B Medienbestandteile oder Nebenprodukte, auf die Produktbildung auswirkt. Zur Verfügung stehen dabei die Daten einer Vielzahl von Fermentationen, die im Laufe dieser Arbeit durchgeführt wurden oder aus früheren Arbeiten vorlagen.

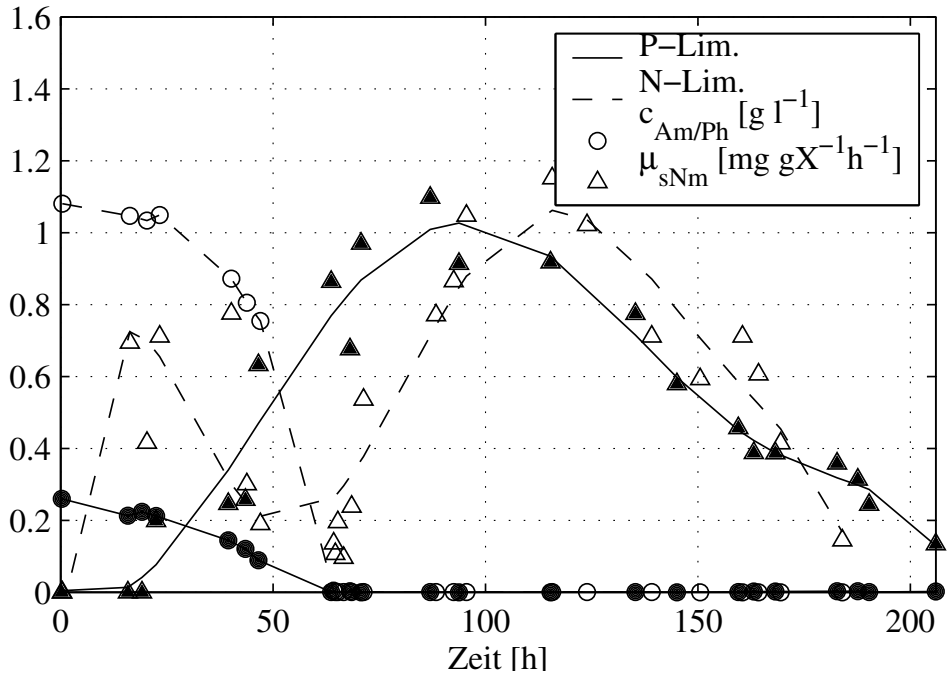

Abbildung 4.3: Spezifische Produktivität μ_{sNm} von *S. tendae* bei einer Ammoniumlimitation (G142) – ●, ▲ und einer Phosphatlimitation (G134) - - ○, △ im Vergleich

4.2.1 Phosphat

S. tendae

Bei kontinuierlichen Fermentationen mit *S. tendae* wird bei einer Reduktion der Phosphatkonzentration im Feed eine Erhöhung der Produktivität von Nikkomycin festgestellt [28, 29]. Zusätzlich ist im Biosynthesecluster von Nikkomycin bei dem Protein NikL eine Ähnlichkeit mit dem aktiven Zentrum von Phosphatasen zu finden [65]. Eine Phosphatase–Aktivität von Protein NikL ist deshalb im Bereich der Regulation durch Aktivierung oder Deaktivierung von Enzymen der Nikkomycin–Biosynthese denkbar. Auch bei anderen Stämmen von Streptomyceten wird eine Repression durch Substrate, speziell Phosphat, festgestellt, ebenso wie phosphatregulierte Promotoren der Biosynthesewege von Sekundärmetaboliten [18, 30, 61, 62, 102, 112].

Bei den Batch– und Fed–Batch–Fermentation von *S. tendae* erfolgt auch im Falle einer reinen Ammoniumlimitation eine Bildung von Nikkomycin. Bei Phosphatlimitationen wird im Gegensatz zu Ammoniumlimitationen während den ersten Fermentationen immer eine höhere Produktivität festgestellt. Dies kann aber auch durch unterschiedliche Glucosegehalte im Medium verursacht sein, auf welche später noch eingegangen wird. Bei neueren Fermentationen liegt

die spezifische Produktivität bei einer Ammoniumlimitation in etwa im gleichen Rahmen wie bei einer Phosphatlimitation. In Abb. 4.3 ist die spezifische Produktivität über den Fermentationszeitraum für beide Limitationsarten aufgetragen. In beiden Fällen wird eine maximale spezifische Produktivität von etwa 1.1 mg $g^{-1}h^{-1}$ erreicht. Der zeitlich verschobene Anstieg der Produktivität ist durch den um etwa 10 h späteren Limitationszeitpunkt zum Teil zu erklären. Es läßt sich in diesem Falle also keine Abhängigkeit von der Phosphatkonzentration im Medium oder evtl. vom zellinternen Phosphatspeicher erkennen. Die Phosphataseaktivität innerhalb des Biosyntheseclusters deutet zwar auf eine Abhängigkeit hin, allerdings ist es auch möglich, daß diese Abhängigkeit an bestimmte Kultivierungsbedingungen gekoppelt ist, welche in diesem Fall nicht auftreten.

A. mediterranei

Bei Fermentationen mit *A. mediterranei* kann keine Produktion von Balhimycin nach einer Ammoniumlimitation gefunden werden (siehe Abb. 4.1). Eine Produktion erfolgt nur nach einer Phosphatlimitation (Abb. 4.2). Dies kann bedeuten, daß sich Phosphat, welches sich noch im Medium befindet oder in großer Menge zellintern vorliegt, bei diesem Organismus auf die Produktbildung inhibierend auswirkt. Dies wird noch durch die Beobachtung verstärkt, daß die Produktbildung nach einer Phosphatlimitation erst nach einer gewissen Zeit einsetzt, siehe Abb. 4.2. Es ist durchaus möglich, daß in diesem Zeitraum der interne Phosphatgehalt durch das Restwachstum auf ein nicht mehr inhibierendes Maß verringert wird. Durch das teilweise bekannte Biosynthesecluster von Balhimycin lassen sich noch keine Rückschlüsse auf phosphatregulierte Biosyntheseproteine schließen. Allerdings sind nicht alle beteiligten Gene und Syntheseschritte vollständig identifiziert. Auch über die Regulation der Transkription des Biosyntheseclusters können noch keine Aussagen gemacht werden. Daher ist es durchaus denkbar hier noch weitere Hinweise eines Phosphateinflusses zu finden.

4.2.2 Ammonium

S. tendae

In frühen Fermentationen mit *S. tendae* wurden Untersuchungen mit unterschiedlichen Ammoniumkonzentrationen durchgeführt. Dazu wurde die Ammoniumkonzentration auf ein bestimmtes Niveau geregelt und jeweils dieselbe Anfangsbedingung für Phosphat und Glucose gewählt. In Abb. 4.4 sind für diese Fermentationen die Ammoniumkonzentration im Nährmedium, die Biomassekonzentration, die Nikkomycinkonzentration und die spezifische Produktivitätsrate

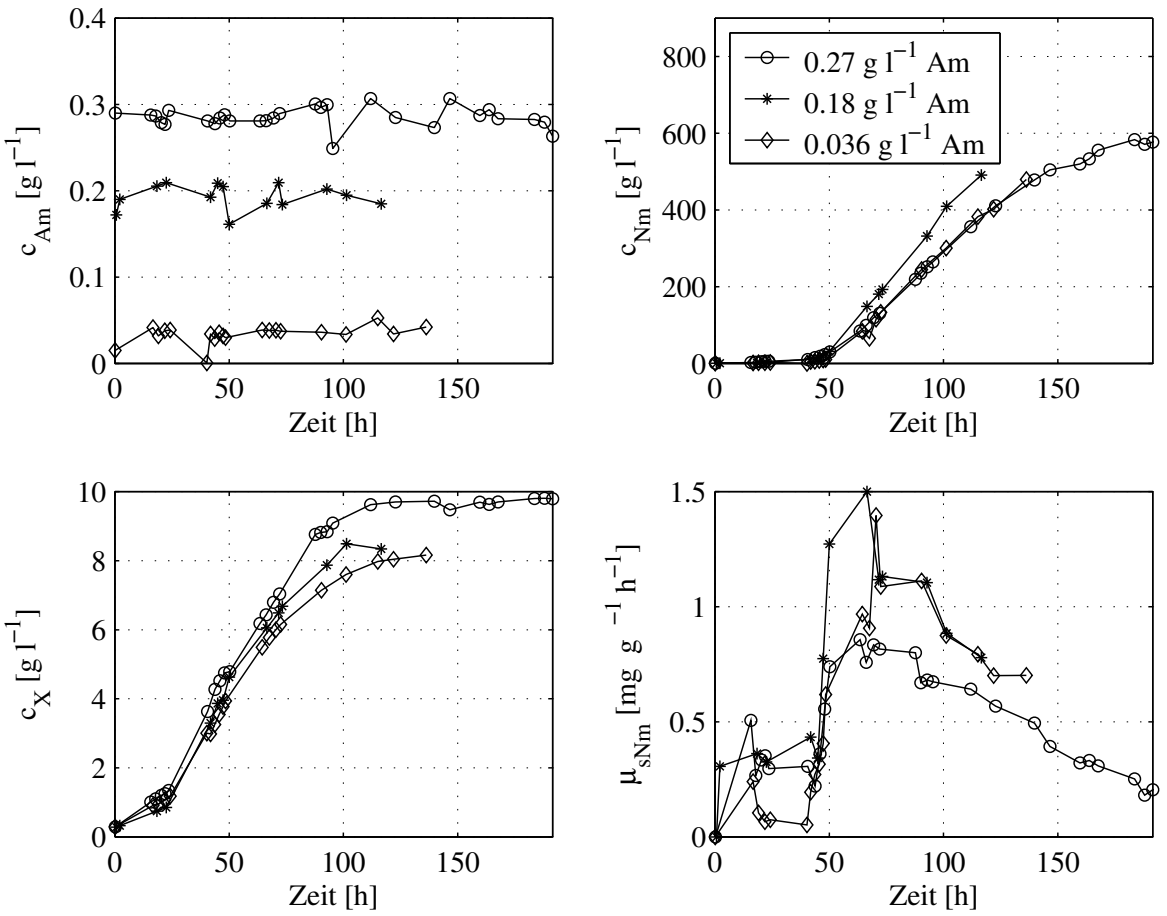

Abbildung 4.4: Spezifische Produktivität μ_{sNm} von *S. tendae* bei drei unterschiedlichen Ammoniumkonzentrationen 0.27 g l^{-1} '-o-' , 0.18 g l^{-1} '-*-' und 0.036 g l^{-1} '-◇-'

von Nikkomycin aufgetragen. Die Biomassekonzentration verläuft sehr ähnlich, allerdings ist zu erkennen, daß sich bei geringeren Ammoniumkonzentrationen eine etwas geringere Biomassekonzentration einstellt. Phosphat war in allen Fällen nach ca. 41 h vollständig aufgenommen. Die spezifische Produktivität fällt bei den Fermentationen mit einer Ammoniumkonzentration unter 0.2 g l^{-1} höher aus als bei der Fermentation mit einer Konzentration von 0.27 g l^{-1}. Anfangs ist die spezifische Produktivität bei der Fermentation mit der Ammoniumkonzentration von 0.18 g l^{-1} am höchsten, dies betrifft aber nur ein bis zwei Messpunkte. Die Unterschiede zwischen den Fermentationen sind aber nicht gravierend. Es läßt sich deshalb nur bedingt als eine tatsächliche Abhängigkeit von der Ammoniumkonzentration auslegen.

A. mediterranei

Im Falle von *A. mediterranei* kann nach einer Ammoniumlimitation keine Produktbildung festgestellt werden (Abb. 4.1). Diese ausbleibende Produktion kann auch an einer fehlenden Versorgung von Ammonium liegen. Allerdings werden im Falle einer Ammoniumlimitation zellintern Proteine und RNA abgebaut, um eine Versorgung mit Ammonium für die Aufrechterhaltung der wichtigen Zellfunktionen und zum Aufbau neuer Proteine zur Verfügung zu stellen. Dieser Zerfall sollte ausreichen, um eine Versorgung mit Ammonium für die Produktbildung zu gewährleisten, damit kann eine Unterversorgung ausgeschlossen werden.

4.2.3 Kohlenstoff– und Energiequelle

***S. tendae* (Glucose)**

Bei einer Glucoselimitation wird bei *S. tendae* eine Zell-Lyse beobachtet, eine Produktion findet danach nicht mehr statt [56]. Die Zellen lysieren unabhängig davon, in welcher Wachstumsphase sie sich zu Beginn der Glucoselimitation befinden. Dies kann bedeuten, daß für Glucose kein intrazellulärer Energiespeicher vorhanden ist. Glucosekonzentrationen von 12-42 g l^{-1} haben keinen Einfluß auf das exponentielle Wachstum. Eine zu hohe Glucosekonzentration ($>$ 80 g l^{-1}) und damit auch ein höherer osmotischer Druck bewirkt in der exponentiellen Phase eine Ausscheidung von Pyruvat, welches nach einer Phosphatlimitation wieder aufgenommen wird. Dabei wird allerdings die Nikkomycinproduktion deutlich reduziert. Bei den kontinuierlichen Fermentationen mit *S. tendae* wird bei ammoniumlimitierter Kultur eine höhere Produktivität für Nikkomycin erreicht, indem die Glucosekonzentration von 29 g l^{-1} auf 15 g l^{-1} reduziert wird [28].

Unter den durchgeführten Fermentationen sind auch eine Anzahl von Ammonium–Puls–Fermentationen. Bei diesen Fermentationen ist Ammonium nach der ersten exponentiellen Wachstumsphase das limitierende Substrat. Um ein erneutes exponentielles Wachstum mit dem verbleibenden Phosphat zu ermöglichen, wird nach einem gewissen Zeitraum wieder eine bestimmte Menge Ammonium ins Nährmedium zugegeben. Dadurch kann kurzzeitig eine zweite exponentielle Wachstumsphase beobachtet werden, welche solange andauert, bis das Phosphat im Nährmedium verbraucht ist. Bei diesen mit *S. tendae* durchgeführten Ammonium–Puls–Fermentationen ist die spezifische Produktivität nach der ersten exponentiellen Wachstumsphase sehr gering. Daher wurde zunächst vermutet, daß die spezifische Produktivität nach einer Ammoniumlimitation durch eine Repression von Phosphat, welches noch im Nährmedium vorhanden ist, geringer ausfällt. Die Wiederholung von Fermentationen mit reiner Ammoniumlimi-

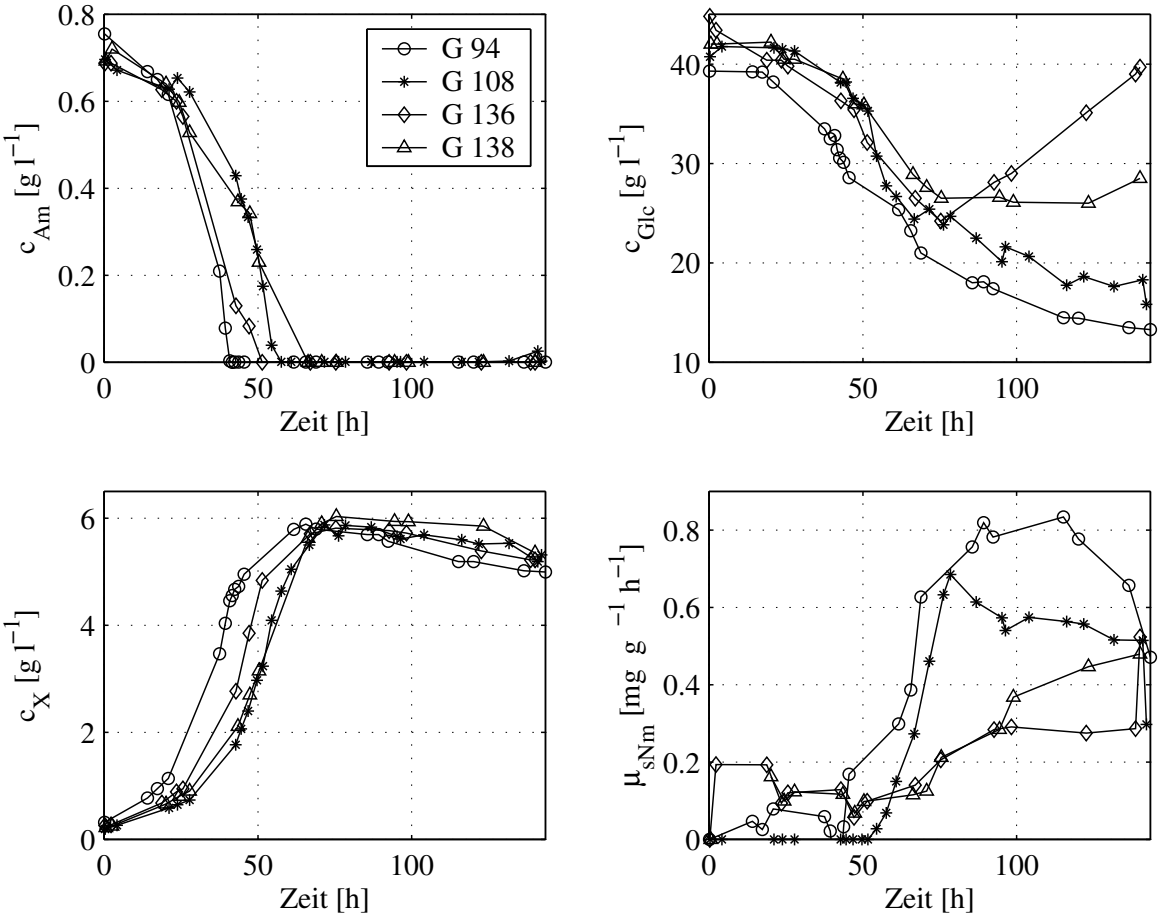

Abbildung 4.5: Spezifische Produktivität μ_{sNm} von *S. tendae* bei vier Ammoniumlimitationen (G94, G108, G136 und G138) mit unterschiedlichen Glucosekonzentrationen

tation ergab aber durchaus mit Phosphatlimitationen vergleichbare Werte, siehe auch Abb. 4.3. Allerdings hält hier das Wachstum in der ersten exponentiellen Wachstumsphase im Vergleich zu den Ammoniumlimitationen mit Ammonium-Puls durch die erhöhte Anfangskonzentration von Ammonium länger an. Deshalb sinkt auch die Glucosekonzentration in dieser Phase tiefer ab (< 20 g l^{-1}) als bei den Puls–Fermentationen. Die Glucosekonzentration ist zu diesem Zeitpunkt bei den Puls–Fermentationen noch sehr hoch (> 25 g l^{-1}), da noch kein allzu großes Wachstum der Biomasse stattgefunden hat, bei dem in hohem Maße Glucose verbraucht wird. Um dies darzustellen, ist in Abb. 4.5 von vier Ammonium–Puls–Fermentationen nur die erste Wachstums– und Produktbildungsphase, ohne den anschließenden Ammoniumpuls, aufgetragen. Die Fermentationsbedingungen der Fermentationen sind den Tabellen 5.1, 5.2 und A.2 auf den Seiten 70, 82 und 115 zu entnehmen. Bei der Fermentation G 94 kann im Gegensatz zu den drei anderen Fermentationen noch eine relativ hohe Produktivität festgestellt werden. Die Glucosewerte im Medium sind im Vergleich zu den anderen Fermentationen geringer. Ein Wert nur

knapp über 20 g l^{-1} ist schon nach etwa 70 h erreicht. Bei der Fermentation mit den höchsten Glucosewerten ($>$ 25 g l^{-1}) ist die geringste spezifische Produktivität zu beobachten. Die Anfangsbedingung der Glucosekonzentration wurde daraufhin bei weiteren Fermentationen mit Ammoniumlimitation auf 30 g l^{-1} herabgesetzt, damit während der Produktionsphase eine geringere Glucosekonzentration ($<$ 20 g l^{-1}) vorliegt. Es konnten damit wiederholbar spezifische Produktionswerte erzielt, die mit denen bei Phosphatlimitationen vergleichbar sind.

Eine Untersuchung der spezifischen Produktion bei phosphatlimitierten Fermentationen in Abhängigkeit der Glucosekonzentration ergibt in diesem Fall keine eindeutigen Zusammenhänge. Hier kann auch bei deutlich unterschiedlichen Glucosekonzentrationen während der Produktionsphase keine signifikanten Unterschiede der spezifischen Produktivität festgestellt werden. Damit hat eine erhöhte Glucosekonzentration ($>$ 25 g l^{-1}) im Medium nur im Falle einer Ammonium–Limitation eine repressive Wirkung auf die Produktbildung.

A. mediterranei (Fructose)

Im Nährmedium von *A. mediterranei* wird als Kohlenstoff– und Energiequelle Fructose verwendet (siehe Kap. 3). Da bei diesem Stamm eine Produktbildung nur unter phosphatlimitierten Bedingungen stattfindet, wird hier die spezifische Produktivität während einer Phosphatlimitation untersucht. In Abb. 4.6 ist das Ergebnis von drei phosphatlimitierten Fermentation (M99, M107, M129) dargestellt. Die Fructosekonzentration verändert sich im Verlauf der Fermentation. Der Verlauf der spezifischen Produktivität der beiden Fermentation M99 und M129 ist sehr ähnlich, der Verlauf der Fructosekonzentration allerdings unterschiedlich. Bei der Fermentation M129 wird nach ca. 70 h die geringste Fructosekonzentration, ca. 11 g l^{-1}, während der Fermentationsdauer erreicht, danach nimmt die Konzentration bis zum Fermentationsende durch die Zufütterung von Fructose kontinuierlich wieder bis auf 24 g l^{-1} zu. Zum Zeitpunkt der niedrigsten Fructosekonzentration, ist die spezifische Produktivität am höchsten. Bei der Fermentation M 99 ist bei ca. 70 h auch die höchste spezifische Produktivität zu beobachten, allerdings ist zu diesem Zeitpunkt die Fructosekonzentration noch bei 25 g l^{-1}. Bei der Fermentation M107 ist allgemein eine niedrigere spezifische Produktivität als bei den anderen beiden Fermentationen zu beobachten. Die Fructosekonzentration dieser Fermentation sinkt im Verlauf der Fermentation zwischenzeitlich auf bis zu 3 g l^{-1} ab, damit wird hier die geringste Fructosekonzentration im Vergleich mit den beiden anderen Fermentationen erreicht. Durch die unterschiedlichen Verläufe der Fructosekonzentration der Fermentation M99 und M129 läßt sich in diesem Rahmen (10 - 25 g l^{-1}) keine eindeutige Auswirkung auf die Produktbildung feststellen. Die Daten der Fermentation M107 lassen auf den ersten Blick vermuten, daß eine zu geringe Fructosekonzentration einen negativen Einfluß auf die Produktbildung hat, wobei

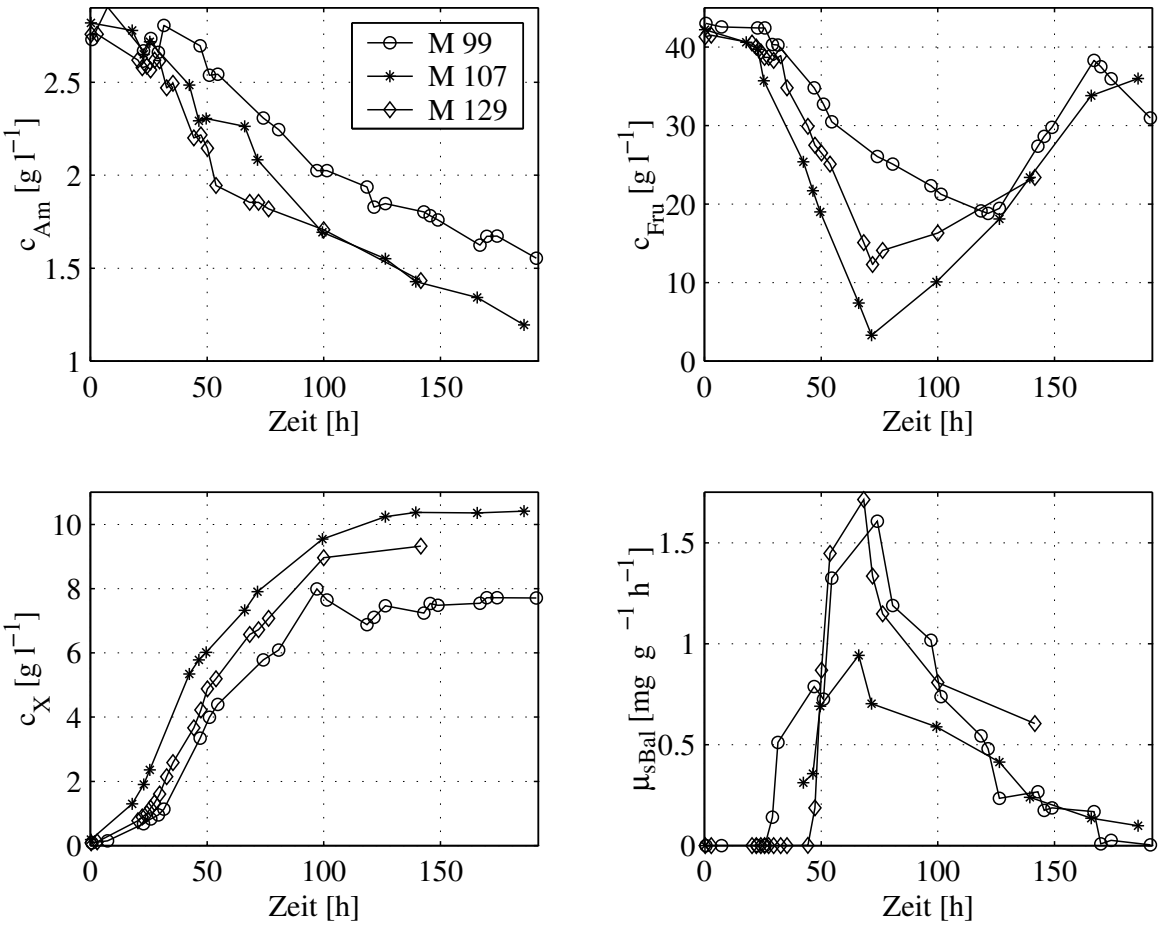

Abbildung 4.6: Spezifische Produktivität μ_{sBal} von *A. mediterranei* bei drei Phosphatlimitationen (M99, M107, M129) mit unterschiedlichen Fuctosekonzentrationen

auch hier keine keine eindeutige Auswirkung auf die Produktbildung festgestellt werden kann, da im Verlauf der Fermentation die Produktbildung trotz der geringen Konzentration von ca. 3 g l^{-1} innerhalb dieser Fermentation am höchsten ist.

4.2.4 Sauerstoff

S. tendae

Wie sich eine ungenügende Sauerstoffversorgung auf die Produktbildung auswirkt, kann bei zwei durchgeführten Fermentationen sehr gut beobachtet werden. Bei beiden Fermentationen ist Phosphat das limitierende Substrat. Ammonium ist bis ca. 150 h in beiden Fermentationen vorhanden. In Abb. 4.7 sind die verschiedenen Konzentrationsverläufe dieser beiden Fermen-

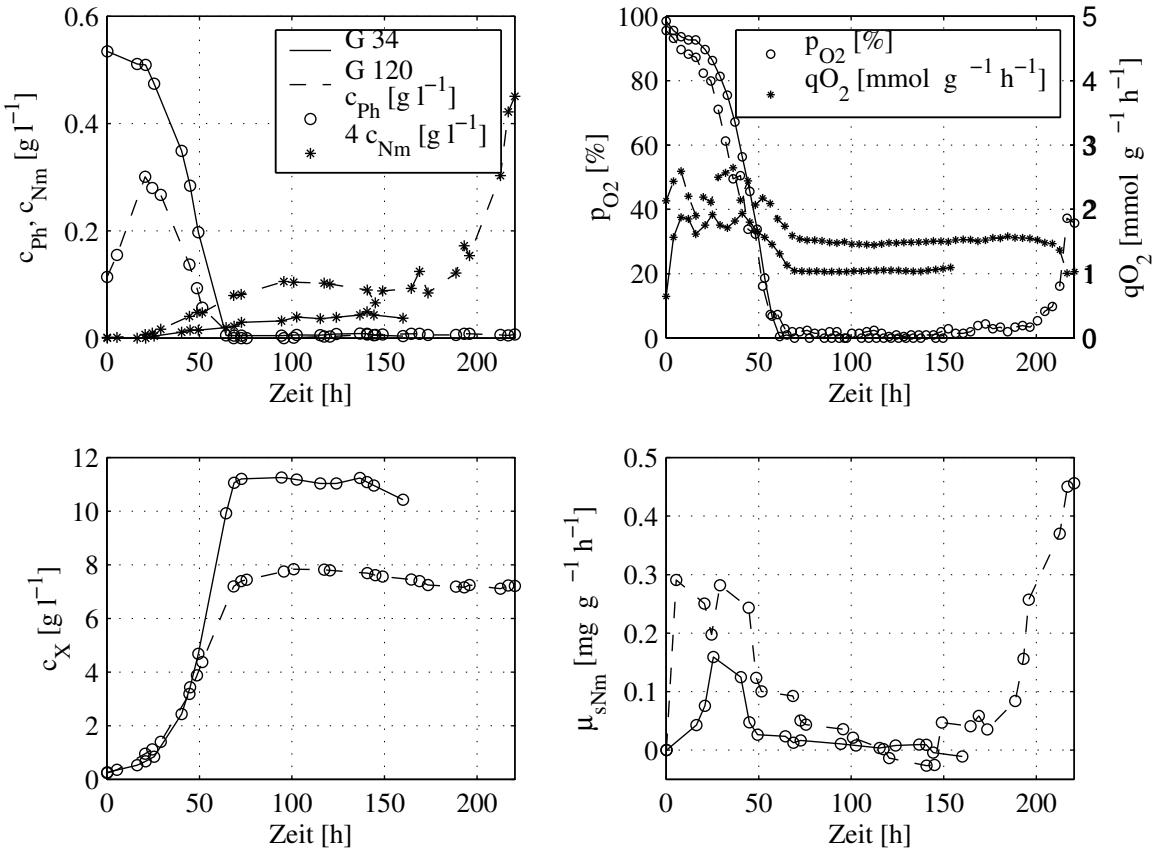

Abbildung 4.7: Spezifische Produktivität μ_{sNm} und das Wachstum von *S. tendae* unter Sauerstofflimitation

tationen G34 und G120 dargestellt. Der $\mathrm{p_{O2}}$–Gehalt im Fermenter ist nach etwa 60 h in beiden Fällen unter einen Wert von 5 % gefallen. Zu diesem Zeitpunkt ist auch das Phosphat im Medium erschöpft.

Am Nikkomycinverlauf kann man erkennen, daß die Nikkomycinbildung in nur sehr geringem Maße vorhanden ist. Da der Fermenter ständig mit 12.5 $\mathrm{l\,min^{-1}}$ Zuluft belüftet wird, wird noch Sauerstoff verbraucht, z.B. zur Zellerhaltung. Bei der Fermentation G34 sinkt die Konzentration des Gelöstsauerstoffs im Fermenter auf Null und wirkt sich in der gegen Null gehenden spezifischen Produktbildungsrate aus. Bei der Fermentation G120 sinkt die Gelöstsauerstoffkonzentration auf 0.5-3 %. Während dieser Zeit sinkt die spezifische Produktivität langsam auf Null ab. Bei einer Gelöstsauerstoffkonzentration zwischen 2-6 % ist wieder eine geringe Produktbildung festzustellen, welche sich mit der weiteren Erhöhung der Gelöstsauerstoffkonzentration auf über 40 % auf bis zu 0.5 mg $\mathrm{l^{-1}h^{-1}}$ steigert. Es läßt sich an dem Vergleich dieser beiden Fermentationen erkennen, daß die Sauerstoffversorgung sehr wichtig für die Produktbildung ist. Wenn man die spezifische Sauerstoffaufnahmerate ($\mathrm{qO_2}$) in diesen beiden Fällen betrachtet,

welche ebenfalls in Abb. 4.7 dargestellt ist, erkennt man, daß sich die Werte trotz der geringen Gelöstsauerstoffkonzentration noch in einem normalen Bereich bei 1-2 $\mathrm{mmol\,g^{-1}h^{-1}}$ bewegen. Dieser Bereich wird auch bei anderen Fermentationen mit durchschnittlicher bis guter Produktivität nicht überschritten. D.h. die Sauerstoffversorgung ist noch ausreichend, aber die geringe Gelöstsauerstoffkonzentration wirkt sich negativ auf die Produktbildung aus. Bei der Untersuchung der Nikkomycinsynthesegene wurden bei dem Syntheseprotein für die Nikkomycin D Synthese Ähnlichkeiten zu Monooxygenasen festgestellt [51]. Für die Synthese der Seitenketten mit der Imidazolin–Base sind die einzelnen Schritte noch nicht vollständig aufgeklärt, aber in der hypothetischen Abfolge [10] wird Sauerstoff benötigt. Dies unterstützt die These einer Abhängigkeit der Produktion von der Gelöstsauerstoffkonzentration.

Fermentationen mit konstanten Gelöstsauerstoffkonzentrationen bei 40, 10 und 5% ergaben keine sehr großen Unterschiede in der Produktbildung. Damit ergibt sich, daß schon bei einer Gelöstsauerstoffkonzentration von $\mathrm{p_{O2}} > 5\%$ die Produktbildung uneingeschränkt stattfindet [101].

Untersuchungen zur Abhängigkeit des Wachstums von der Gelöstsauerstoffkonzentration zeigen, daß in der Flüssigphase erst unterhalb eines Sauerstoffanteils von 20% eine deutliche Beeinträchtigung des Wachstums stattfindet, bei manchen Stoffwechselvorgängen sogar erst unter 1% [2].

A. mediterranei

Bei den Fermentationen mit *A. mediterranei* mußte wegen des starken Schäumens bei konstanter Begasung die Fermentationsführung angepaßt werden (siehe auch Kapitel 3). Die Gelöstsauerstoffkonzentration wurde in allen Fermentationen durch Veränderung der Begasungsrate und Rührerdrehzahl auf 60 % geregelt. Dadurch konnte die Begasungsrate möglichst gering gehalten werden (0.8-1.2 $\mathrm{l\,min^{-1}}$) und damit ein Überschäumen verhindert werden. Durch diese Fermentationsführung liegen keine Versuche mit einer geringen Gelöstsauerstoffkonzentration vor.

Bei Betrachtung des spezifischen Sauerstoffverbrauches von zwei Fermentationen unter Phosphatlimitation kann man feststellen, daß dieser nach Beendigung der exponentiellen Wachstumsphase langsam absinkt. Auch die spezifische Produktbildung sinkt im Laufe der Fermentationen nach einem kurzzeitigen Anstieg wieder ab, allerdings erst nachdem der spezifische Sauerstoffverbrauch absinkt. Der spezifische Sauerstoffverbrauch ist bei beiden Fermentationen fast gleich, die spezifische Produktbildungsrate ist aber durchaus unterschiedlich (siehe Abb. 4.8). Daher ist hier kein direkter Zusammenhang zwischen den beiden Größen festzustellen.

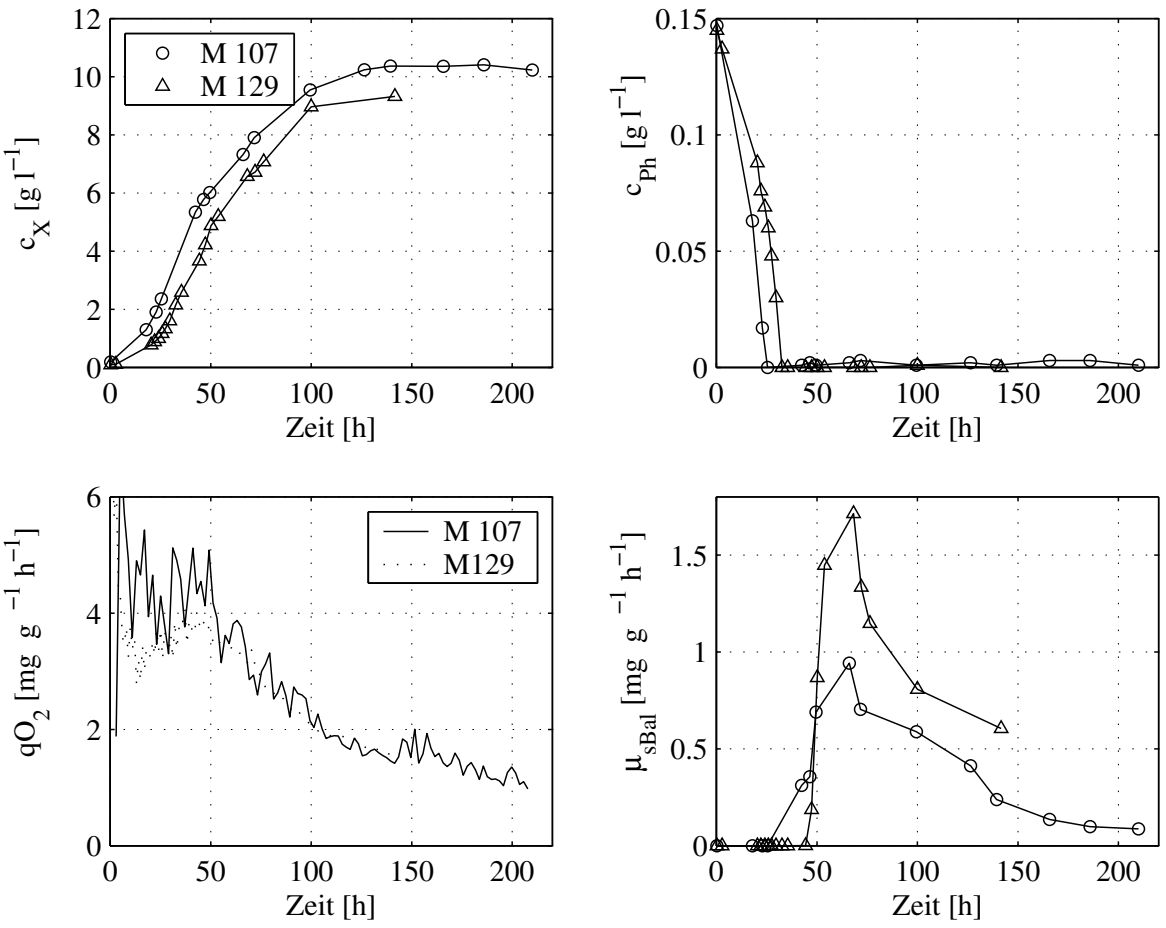

Abbildung 4.8: Spezifische Produktivität μ_{sBal} und spezifischer Sauerstoffverbrauch $\mathrm{qO_2}$ bei *A. mediterranei*

4.2.5 Pyruvat bei *S. tendae*

Um zu ermitteln, ob Pyruvat unter bestimmten Stoffwechselbedingungen vermehrt von den Zellen ausgeschieden wird und damit den Produktbildungsprozeß beeinflußt, wurden bei dem Stamm *S. tendae* Messungen von Pyruvat bei mehreren Fermentationen durchgeführt. In der Literatur wird bei anderen *Streptomyceten* –Stämmen eine Ausscheidung von Pyruvat und anderen α–Ketoglutaraten berichtet. Dies hat in diesen Fällen auch Einfluß auf die Morphologie [58, 100, 24, 9].

Die Messungen ergaben für die Fermentationen Werte in einem Bereich von 10–100 $\mathrm{mg\,l^{-1}}$ Pyruvat. Es zeigte sich jedoch, daß bei den meisten Fermentationen 50 $\mathrm{mg\,l^{-1}}$ nicht überschritten wurden. Größere Mengen bis zu 1000 $\mathrm{mg\,l^{-1}}$ Pyruvat wurden dagegen bei Phosphatlimitationen mit einer größeren Restmenge an Ammonium im Medium gemessen. Die Angaben in der Literatur liegen zum Teil bei dem 100-fachen der hier gemessenen Mengen [58]. Bei den Fermentationen mit den höchsten gemessenen Pyruvat–Werten wurde untersucht, ob eine

Korrelation mit der Produktbildung oder dem Wachstum festzustellen ist. In Abb. 4.9 sind die Meßwerte von Pyruvat in Verbindung mit der spezifischen Produktbildungsrate, den Glucose–, Ammonium– und Phosphatwerten und der Biomasse aufgetragen.

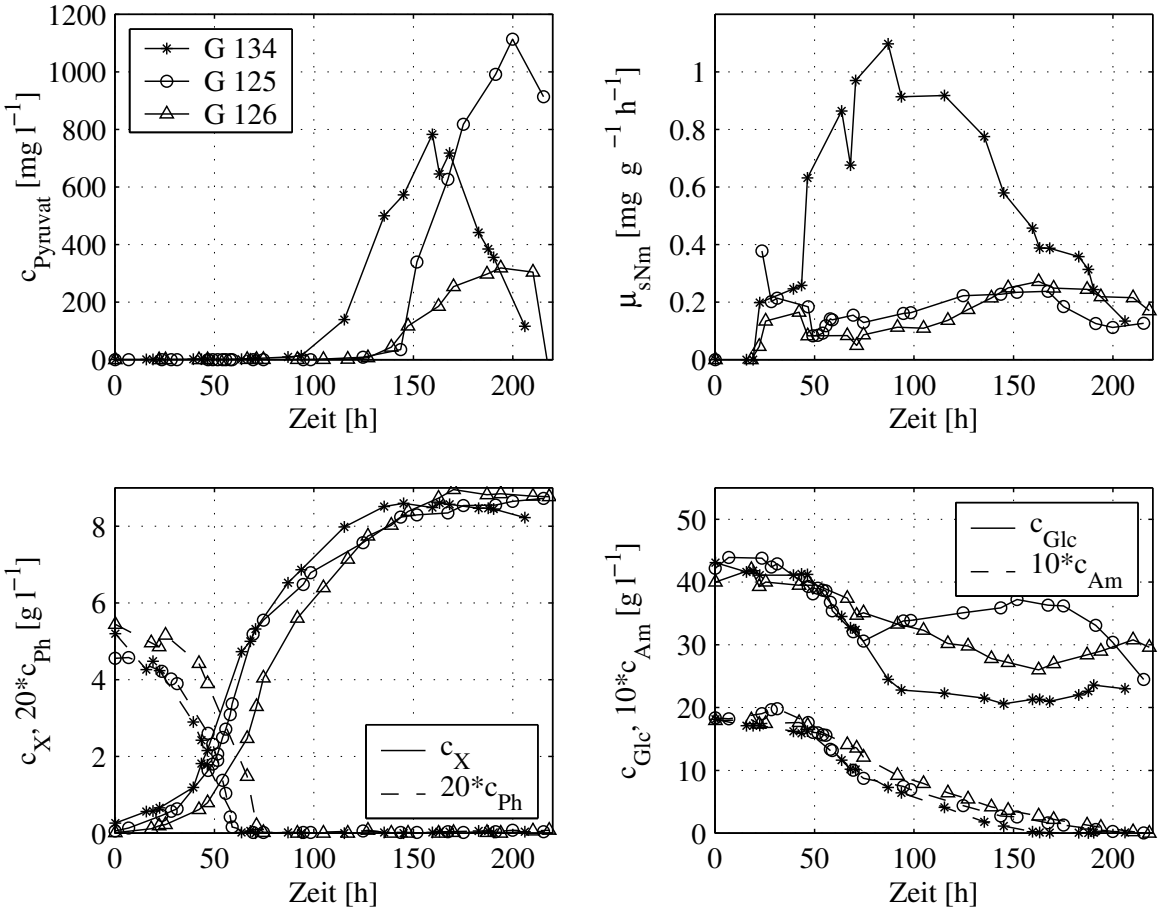

Abbildung 4.9: Pyruvatmessung, Produktbildung und Wachstum bei den drei phosphatlimitierten Fermentationen G125, G126 und G134

Die Pyruvatausschleusung ins Medium setzt bei allen drei Fermentationen erst weit nach der Phosphatlimitation ein. Durch Analyse der DNA-Masse läßt sich eine leichte Korrelation des Beginns der Pyruvatausschleusung mit dem Ende der Übergangsphase feststellen (siehe z.B. Fermentationsdaten G134 in Abb. 4.2). Die Wachstumsrate hat zu diesem Zeitpunkt schon begonnen abzunehmen und die Produktbildung hat bereits eingesetzt. Bei der Fermentation G134 nimmt die spezifische Produktbildungsrate zu diesem Zeitpunkt schon wieder ab, wobei die Abnahme nicht mit der Erhöhung des Pyruvatgehalts im Nährmedium korreliert. Der Pyruvatgehalt im Medium nimmt im weiteren Verlauf der Fermentationen wieder etwas ab. Eventuell wird das ausgeschleuste Pyruvat wieder als Nährstoff von den Zellen verwendet. Auch mit der Juglomycinbildung, dem weiteren Produkt von *S. tendae* (welches nicht aufgetragen ist) ist kein Zusammenhang zu erkennen, ebensowenig wie beim Laugen– und Glucoseverbrauch. Es liegt

daher nahe, daß kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Ausschleusung von Pyruvat aus den Zellen und der Produktbildung vorhanden ist. Dies zeigt sich auch in der Tatsache, daß die Menge an ausgeschleustem Pyruvat bei der Fermentation G134 zwischen den beiden Fermentationen G125 und G126 liegt, die spezifische Produktbildungsrate der beiden Fermentationen aber deutlich geringer ist als die von Fermentation G134. Der deutlich geringer Wert ist in diesem Fall eventuell auf die sehr geringe Animpfmenge zurückzuführen (0,05 und 0,037 g l^{-1} im Vergleich zu 0,205 g l^{-1}), welche in diesem Fall nicht nur einen verzögerte exponentielle Wachstumsphase bewirkt, sondern auch eine verminderte Produktbildung. Dies ist zu Vermuten, da die Animpfmenge als einziger gravierender Unterschied zwischen den Fermentationen gefunden werden konnte. Die Animpfmenge lag im Normalfall bei den Fermentationen zwischen 0,15-0,25 g l^{-1}.

4.2.6 Juglomycin bei *S. tendae*

Außer den verschiedenen Nikkomycinen wird von *S. tendae* noch Juglomycin als weiteres Produkt produziert. Für Juglomycin wurde eine antibiotische Wirkung auf andere Bakterien und den Produzentenstamm nachgewiesen [92]. Diese wird als bakteriostatisch bezeichnet, da das Wachstum zwar gehemmt wird, die Zellen aber nicht zerstört werden. Die Hemmwirkung im Komplexmedium ist wesentlich geringer als auf Minimalmedium, d.h. das Komplexmedium enthält möglicherweise eine Substanz, welche die antibiotische Wirkung aufhebt. Als minimale Hemmkonzentrationen ergibt sich bei Untersuchungen mit aufgereinigtem Juglomycin ein Wert von 8-13 mg l^{-1}. Bei dem Juglomycin–Rohprodukt kann dies allerdings etwas anders aussehen, da dies neben Juglomycin weitere biologische Substanzen enthält. Juglomycin wird nur produziert, wenn genügend Sauerstoff im Kulturbehälter bereitgestellt werden konnte. Ein Zerfall erfolgt bei Erwärmung und hohen Sauerstoffkonzentrationen, sowie bei hohen pH-Werten (pH > 7) [92].

Zusammenhänge von Nährmedium und Nikkomycin– oder Juglomycinproduktion konnten bei kontinuierlicher Fermentationsführung beobachtet werden [29]. Es wurde festgestellt, daß Nikkomycin und Juglomycin sich meist gegenläufig verhalten, so daß bei Bedingungen, welche die Juglomycinproduktion fördern, die Nikkomycinproduktion geringer ausfällt. Bei ammoniumlimitierten Fermentationen wird durch eine niedrigere Glucosezufuhr eine höhere Nikkomycinproduktivität und eine niedrigere Juglomycinproduktivität erreicht. Bei einem Durchfluß von 0.03 h^{-1} wurde die Glucosekonzentration im Zulauf von 40 g l^{-1} auf 30 g l^{-1} reduziert. Dies wirkt sich in der Medienkonzentration mit einer Verringerung der Glucosekonzentration von ca. 29 g l^{-1} auf 15 g l^{-1} aus. Durch eine Verringerung der Phosphatkonzentration im Feedmedium von 2.5 mM auf 1.5 mM wird auch hier eine höhere Produktivität von Nikkomycin und eine

Verringerung der Produktivität von Juglomycin erreicht.

Bei einer phosphatlimitierten Kultur wurde die Durchflußrate von 0.03 h^{-1} langsam auf 0.17 h^{-1} erhöht. Die Nikkomycinproduktivität reduziert sich dabei von 1.7 mg $g^{-1}h^{-1}$ auf fast Null. Bei Juglomycin kann der gegenläufige Effekt beobachtet werden. Hier erhöht sich die Produktivität gegen Ende auf 10 mg $g^{-1}h^{-1}$.

Bei den Fed–Batch Fermentationen werden bei Ammoniumlimitationen nur sehr geringe Juglomycinkonzentrationen von maximal 20 mg l^{-1} festgestellt (G7), bei Phosphatlimitationen mit Phosphat–Puls nur maximal 14 mg l^{-1} (G109). Wenn die Ammoniumkonzentration geregelt wird, wird als höchster Wert 115 mg l^{-1} bei der auf 10 mM (0.18 g l^{-1}) geregelten Fermentation G47 erreicht. Bei reinen Phosphatlimitationen werden maximal 265 mg l^{-1} Juglomycin gemessen (G40, pO_2 auf 5% geregelt). Höhere Juglomycinwerte werden bei einigen produktmaximierten Fermentationen beobachtet. Dort werden teilweise bis zu 900 mg l^{-1} gemessen (G131).

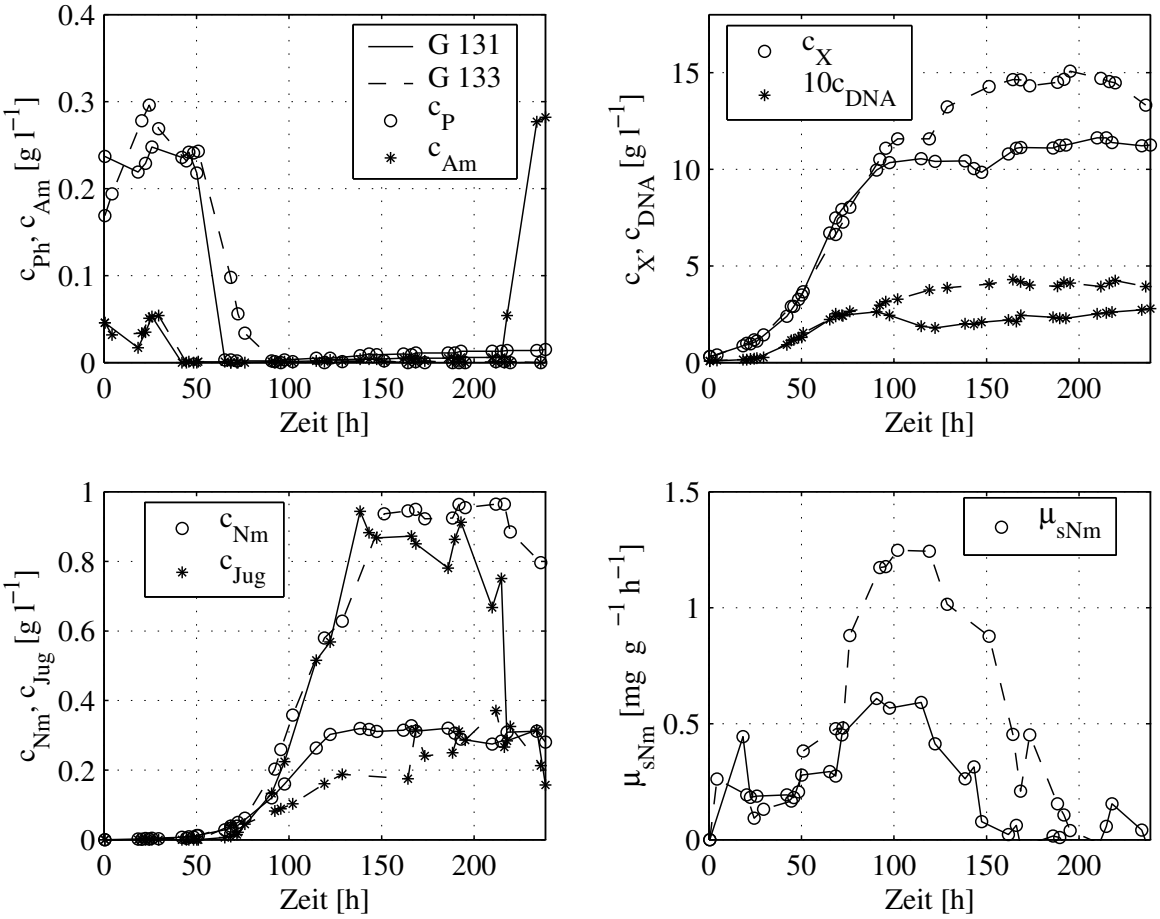

Abbildung 4.10: Produktbildung von G131 und G133 im Vergleich

In Abb. 4.10 ist ein Vergleich der beiden ähnlichen produktmaximierten Fermentationen G131 und G133 dargestellt. Es zeigt sich, daß bei der Fermentation G131 die Juglomycinkonzentration nach der Phosphatlimitation in sehr viel stärkerem Maße als bei der Fermentation G133 ansteigt. Bei der Fermentation wird ein Maximalwert von Juglomycin von ca. 900 mg l^{-1} erreicht, wobei dafür die Nikkomycinkonzentration deutlich geringer ausfällt (max. 320 mg l^{-1}) als bei der Fermentation G133 (max. 950 mg l^{-1}), bei welcher die maximale Juglomycinkonzentration knapp unter 400 mg l^{-1} liegt. Dies läßt die Schlußfolgerung zu, daß die Juglomycinkonzentration einen nicht zu vernachlässigenden Einfluß auf das Wachstum haben kann, denn in diesem Fall (G131) wird das Wachstum sehr rasch eingestellt. Auch die Produktbildung von Nikkomycin stagniert bei hohen Konzentrationen von Juglomycin im Medium ($>$ 200 mg l^{-1}) sehr schnell (G131,G133).

4.3 ppGpp–Messungen

Da vermutet wird, daß ppGpp als Signalstoff für die Produktbildung bei beiden Actinomycetenstämmen eine wichtige Rolle spielt, wurden bei beiden Stämmen Messungen von ppGpp durchgeführt. Bei dem Stamm *A. mediterranei* wurde zusätzlich bei Fermentationen mit der zugehörigen *relA* Mutante und dem Kontrollstamm (siehe Kapitel 3) Messungen von ppGpp vorgenommen.

In Abb. 4.11 sind die Ergebnisse der Messungen für die beiden Wildtypen bei einer Ammoniumlimitation und einer Phosphatlimitation dargestellt.

S. tendae

Die Ergebnisse zeigen, daß bei *S. tendae* eine Zunahme des ppGpp–Gehalts nach einer Ammoniumlimitation stattfindet. Nach dem Anstieg von ppGpp erfolgt die Bildung von Nikkomycin. Bei der Phosphatlimitation ist auch ein Anstieg des ppGpp–Gehalts kurz vor der Limitation zu beobachten. In diesem Fall erfolgt nach dem schnellen und kurzen Anstieg und dem anschließenden Abfall des ppGpp–Gehalts die Produktbildung. Obwohl der Anstieg und Abfall unterschiedlich sind, läßt es den Schluß zu, daß ppGpp durchaus einen wichtigen Signalstoff für die Produktbildung darstellt.

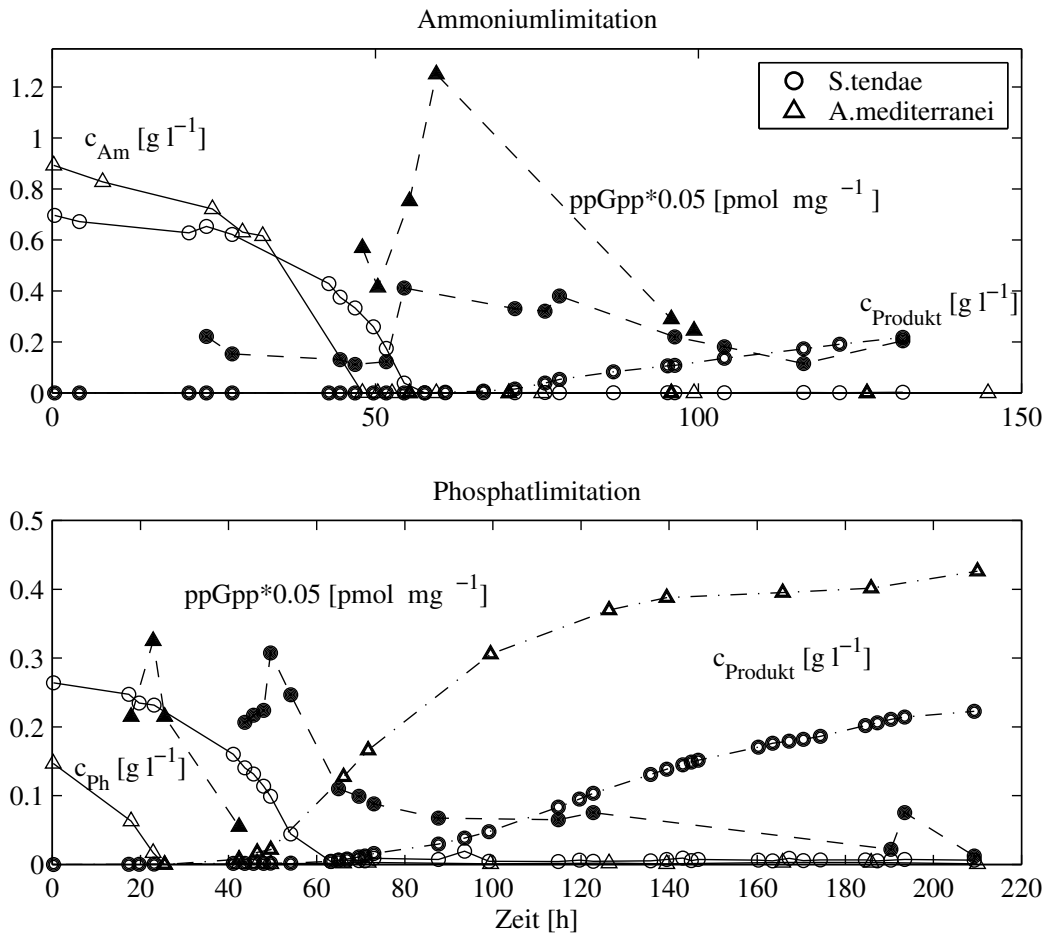

Abbildung 4.11: Messungen des ppGpp–Gehalts bei *S. tendae* (●) und *A. mediterranei* (▲) bei einer Ammonium– und einer Phosphatlimitation

A. mediterranei

Auch bei *A. mediterranei* findet eine Zunahme des ppGpp–Gehalts nach einer Ammoniumlimitation statt. Dieser Zunahme folgt aber keine Bildung des Produkts Balhimycin. Bei der Phosphatlimitation ist ein Anstieg des ppGpp–Gehalts nach der Limitation zu beobachten. Auch hier erfolgt wie bei *S. tendae* nach der Limitation und dem schnellen und kurzen Anstieg des ppGpp–Gehalts die Produktbildung.

Auch bei der *relA* Mutante und dem Kontrollstamm (siehe Kapitel 3) wurden ppGpp–Messungen vorgenommen. Bei Fermentationen des Kontrollstamms zeigen sich im Vergleich zum Wildtyp keine großen Unterschiede. Obwohl der Kontrollstamm das Resistenzgen für Erythromycin zusätzlich replizieren mußte, sind auch im Wachstum keine deutlichen Unterschiede erkennbar. Die *relA* Mutante hingegen weist ein sehr langsames Wachstum auf (etwa die fünffache Verdopplungszeit). Die Morphologie ist im Vergleich zum Wildtyp stark verändert. Der Wildtyp

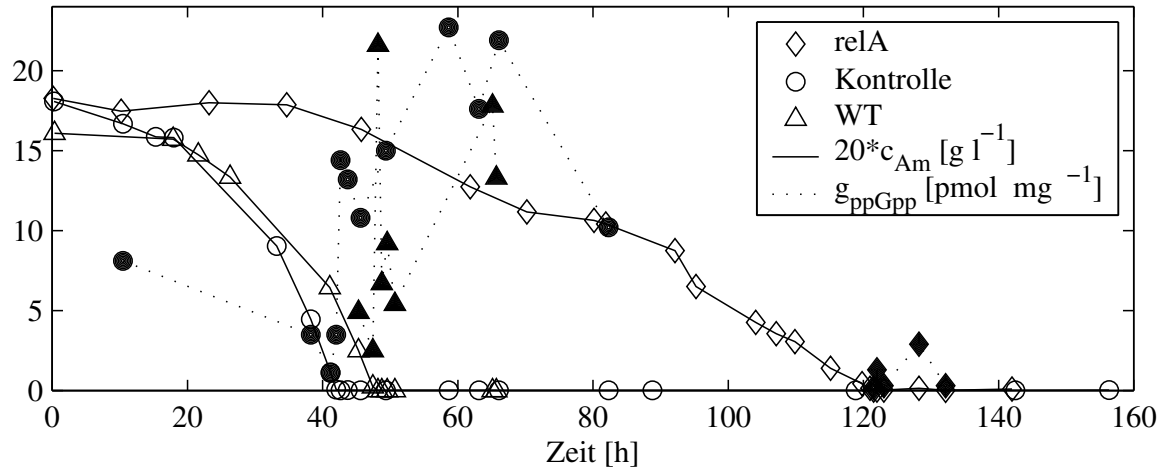

Abbildung 4.12: Messungen des ppGpp-Gehalts, bei dem Wildtyp (WT) (▲), der Kontrollmutante (●) und der *relA* Mutante (♦) von *A. mediterranei* bei einer Ammoniumlimitation. Bei der *relA* Mutante wurde zur besseren Darstellung die Zeitachse mit dem Faktor 0.5 multipliziert.

bildet kein Luftmyzel und ist nicht in der Lage, Sporen zu bilden. Im Gegensatz dazu besitzt die *relA* Mutante weißes Luftmyzel und graue Sporen. In Flüssigkultur werden von der *relA* Mutante nicht die relativ feinen Myzelkugeln des Wildtyps gebildet, sondern stattdessen flachere und größere, scheibenförmige Myzelien. Die Hyphen des Myzels sind dabei etwa doppelt so dick und kürzer als die des Wildtyps. Bei der *relA* Mutante konnte keine Balhimycinbildung mehr festgestellt werden. In Abb. 4.12 sind die Ergebnisse einer ppGpp–Messung bei einer Fermentation mit Ammoniumlimitation von allen drei untersuchten *A. mediterranei* Stämmen dargestellt. In allen Fällen wird nach der Ammoniumlimitation kein Balhimycin gebildet. Trotzdem ist eine ppGpp–Akkumulation nach der Ammoniumlimitation bei dem Wildtyp und der Kontrollmutante erkennbar. Die maximalen ppGpp–Konzentrationen sind dabei ähnlich. Bei der *relA* Mutante ist nach der Limitation kein nennenswerter ppGpp Anstieg zu beobachten. Die Meßwerte befinden sich dabei im Bereich der Nachweisgrenze der Meßmethode (3 pmol mg^{-1}). Es läßt sich dadurch zeigen, daß bei der *relA* Mutante keine nennenswerte Produktion von ppGpp mehr stattfinden kann. Es ist davon auszugehen, daß infolgedessen auch das Wachstum, vor allem im definierten Nährmedium, stark verlangsamt ist. Der Grundgehalt an ppGpp ist in diesem Falle erniedrigt. Dies verursacht eine Verringerung der Produktionsrate von Aminosäuren. Infolgedessen wird die Proteinbildung und das Zellwachstum verlangsamt. Unter diesen Bedingungen ist die Bildung von Signalnukleotiden nicht ausreichend, um die Balhimycinsynthese zu initiieren [25].

4.4 Ende der Produktbildung

S. tendae

Die Produktbildungsrate nimmt meist sehr schnell nach dem Erreichen der maximalen Produktivität wieder ab. Bei einigen Fermentationen verläuft sie über einen längeren Zeitraum auch nahezu konstant. Dann allerdings nicht mit maximalen Werten. In manchen Fällen läßt sich ein Zusammenhang zwischen Juglomycinwerten und dem Abbruch der Nikkomycinbildung feststellen (siehe Abb. 4.10). Manchmal bleibt die Produktkonzentration schon nach ca. 150 h konstant. Das Ende der Produktbildung festzustellen ist sinnvoll, um die Fermentation nicht unnötig lange laufen zu lassen, was einen erhöhten Aufwand bezüglich Kosten und Zeit darstellt.

In der Literatur wird für *S. lividans* eine starke Abhängigkeit der Produktbildung von der Morphologie festgestellt, welche sich bei unterschiedlichen Fermentationsführungen (Batch, Fed–Batch, Repeated Batch und Kontinuierlichen Fermentationen) einstellt [91]. Bei Repeated Batch Versuchen, bei welchem der Fermenter für den zweiten Batch mit frischem Medium aufgefüllt wird und mit schon vorhandener Biomasse aus dem ersten Batch angeimpft wird, wurde festgestellt, daß schon mit dem zweiten Batch die Produktbildung nur noch 30% vom ersten Batch beträgt und beim dritten Batch findet keine Produktbildung mehr statt. Das Wachstum ist in allen Fällen vergleichbar. Auch bei *S. tendae* bleibt die Produktbildung über einen längeren Zeitraum bei den Fed–Batch Fermentationen nicht konstant. Um ausschließen zu können, daß sich die Zellen durch die Limitation so verändern, daß eine erneute Produktbildung auch unter Produktionsbedingungen zu einem späteren Zeitraum in der Fermentationsphase nicht mehr möglich ist, wurde auch hier ein Repeated Fed–Batch Experiment durchgeführt. Bei zwei aufeinanderfolgenden Fed–Batch Versuchen von jeweils 140 h kann kein signifikanter Unterschied im Wachstum und in der Nikkomycinbildung festgestellt werden (siehe Abb. 4.13). Damit können Veränderungen des Zellverhaltens über den üblichen Fermentationszeitraum (bis ca. 260 h) ausgeschlossen werden. Eine Anreicherung der Produkte Nikkomycin und Juglomycin scheint daher eine weit wichtigere Rolle bei der Stagnation der Produktbildung zu spielen, als eine Veränderung des Zellverhaltens.

Eine mögliche Ursache in der Stagnation der Produktbildung könnte eine fehlende Ammoniumversorgung sein. Durch den Zerfall von Proteinen und RNA nach der Limitation sollte aber eine genügend große Menge an N–Quellen zur Produktbildung vorhanden sein. Um herauszufinden, ob dies trotzdem eine Ursache für die Stagnation ist, wurde bei der Fermentation G146 nach etwa 97 h ein geringer Ammoniumfeed angesetzt. Damit kann die Produktionsphase mit hoher Produktbildungsrate im Vergleich zur Fermentation G145 zumindest etwas verlängert werden. Die gesamte Menge an Produkt, welche während der Fermentation gebildet wird, ist

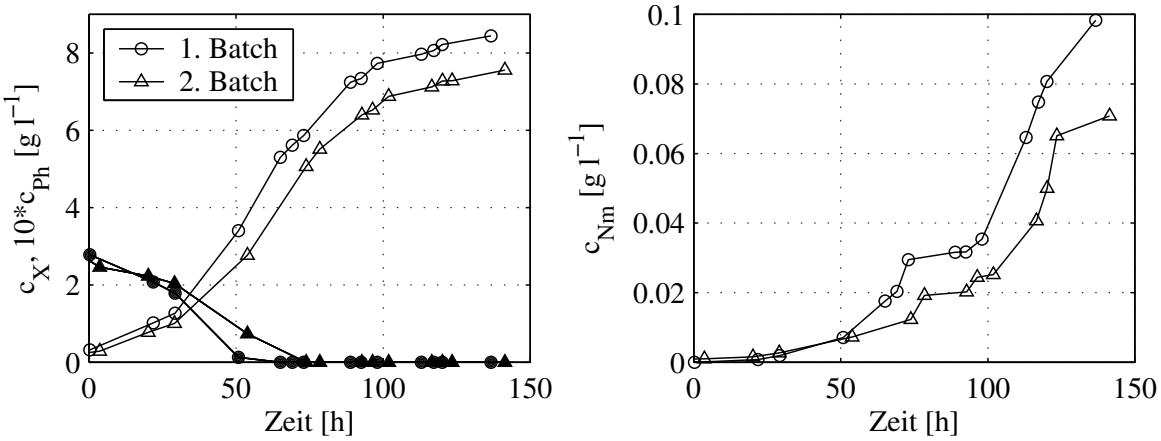

Abbildung 4.13: Phosphatkonzentration (●, ▲), Trockengewicht (○, △) und Nikkomycinkonzentration (○, △) des ersten und zweiten Batches einer Repeated Fed–Batch Fermentation

aber vergleichbar mit der Menge in Fermentation G145, siehe Abb. 4.14. D.h. die Stagnation der Produktbildung tritt etwas früher ein als bei G145. Wenn man nur den Produktionsverlauf betrachtet und nicht die spezifische Produktion, hält dieser bei der Fermentation G146 im Vergleich mit der Fermentation G133 und G145 noch länger an. Bei Betrachtung der spezifischen Produktivität wird sogar ein höherer Wert als bei der produktmaximierten Fermentation G133 festgestellt. Die Produktbildung fällt aber auch hier wieder früh ab und wird fast ganz beendet. Dies läßt sich durch einen zu hohen Ammoniumfeed erklären, der wieder eine echte Zellvermehrung ermöglicht. Dies ist auch an der steigenden DNA Konzentration abzulesen. Damit wird eine Reduzierung der Signalstoffproduktion verursacht, infolgedessen die Produktbildung reduziert oder eingestellt wird.

Als höchste Produktkonzentration werden Werte zwischen 900-1000 mg l^{-1} gemessen. Es stellt sich die Frage, ob es überhaupt möglich ist, eine höhere Produktkonzentration zu erzielen oder ob man von einer maximalen Produktkapazität für die einzelnen Fermentationstypen ausgehen kann. Dafür sprechen die Ergebnisse der produktmaximierten Fermentationen. Hier wird meist keine höhere Produktkonzentration als 1000 mg l^{-1} erreicht. Bei den ammoniumlimitierten Fermentationen G145 und G146 wird gegen Ende eine etwa gleich hohe Produktkonzentration erzielt, die sich aber auf unterschiedlichem zeitlichen Verlauf einstellt. Die Konzentration ist zwar geringer, als die der produktmaximierten Fermentation, aber sie unterstützt dennoch die These einer maximalen Produktkapazität für den ammoniumlimitierten Fermentationstyp.

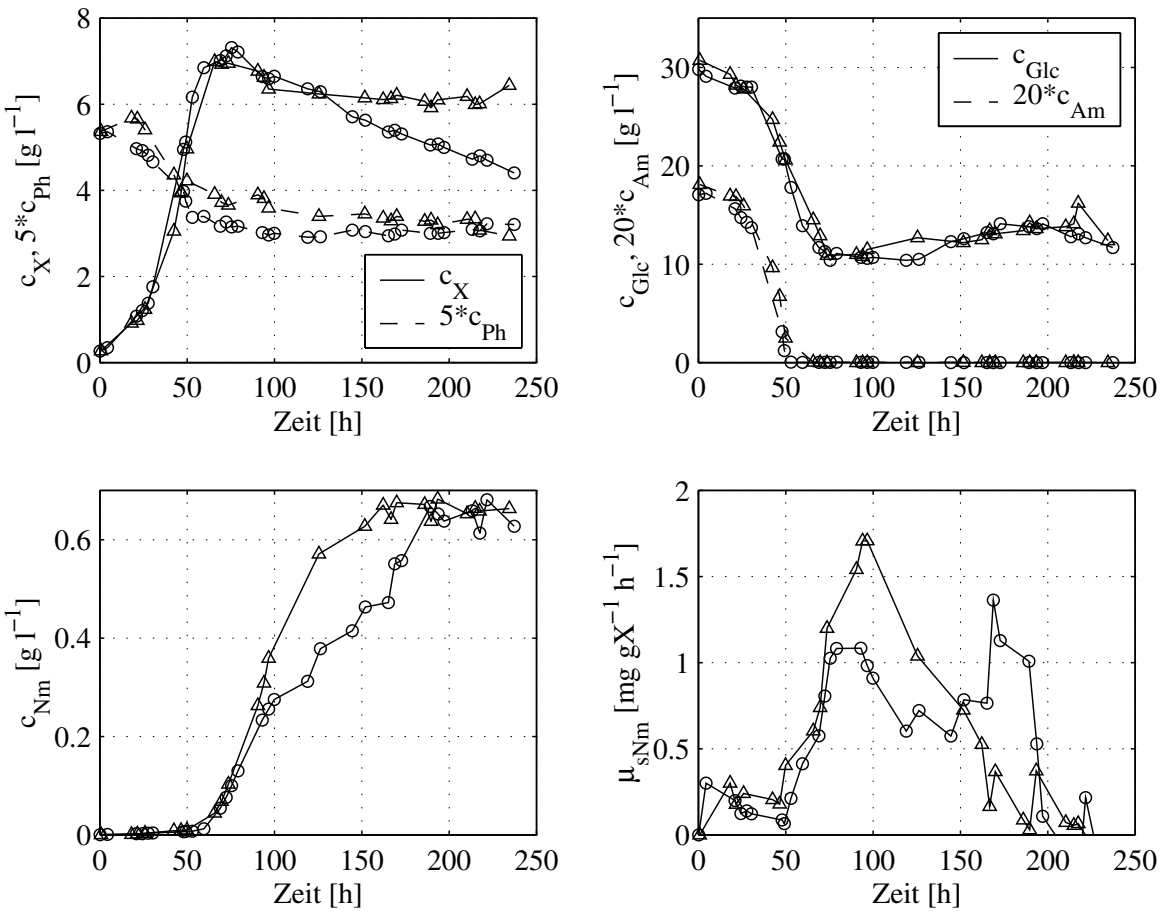

Abbildung 4.14: Meßergebnisse der Fermentationen G145 (○) und G146 (△) im Vergleich, bei G146 wird ab 97,4 h Ammonium in geringen Mengen zugegeben

A. mediterranei

Eine Bildung von Balhimycin findet bei *A. mediterranei* nur unter einer phosphatlimitierten Fermentationsführung statt, damit ist die Anzahl der zur Analyse zur Verfügung stehenden Fermentation eingeschränkt. Allerdings läßt sich auch hier eine Stagnation der Produktbildung erkennen (siehe Abb. 4.2). Hinweise auf Gründe der Stagnation gibt es in diesem Falle keine, da zu diesem Stamm auch z.B. in Verbindung mit den weiteren Produkten von *A. mediterranei* noch keine ausreichenden Daten und Untersuchungen zur Verfügung stehen.

Weitere Stämme

Die Stagnation der Produktbildung im Verlauf einer Fermentation könnte auch mit der sinkenden Lebensfähigkeit bzw. Aktivität der einzelnen Zellen zusammenhängen. Aktivitätsunter-

suchungen von myzelförmig wachsenden Mikroorganismen wie Actinomyceten gestalten sich durch die komplexe Morphologie schwierig. Es war daher bei dieser Arbeit nicht möglich, auf eine solche Untersuchung zurückzugreifen. Die in der Literatur vorliegenden Daten [94, 79], welche mit Hilfe von Bildverarbeitungsanalysen gewonnen wurden, deuten darauf hin, daß die Lebensfähigkeit (Anteil der stoffwechselaktiven und damit lebensfähigen Zellen) der Myzelien durchaus schwankt. Allerdings wird bei *Streptomyces clavuligerus* [94] die Lebensfähigkeit schon während der exponentiellen Wachstumsphase einer Batch–Fermentation auf 64% reduziert, im weiteren Verlauf der Fermentation stabilisierte sich der Wert auf 75% um gegen Ende auf 93% anzusteigen. Der Anstieg am Ende wird allerdings nicht durch eine Verbesserung der Lebensfähigkeit hervorgerufen, sondern durch einen Zerfall der nicht mehr lebensfähigen Zellen. Während der Produktionsphase von *Streptomyces clavuligerus* bleibt die Lebensfähigkeit in etwa konstant. Dadurch kann kein direkter Zusammenhang zwischen Produktbildung und Lebensfähigkeit bei diesem Stamm hergestellt werden. Die Fermentationsdauer betrug bei den Untersuchungen 100 h. Es ist nicht auszuschließen, daß sich die Lebensfähigkeit über einen längeren Fermentationszeitraum verändert, vor allem, wenn Veränderungen der Umgebungsbedingungen wie Limitationen oder erneutes Wachstum auftreten. Um darüber eine genauere Aussage zu erhalten, sind noch eine Reihe von Untersuchungen notwendig, die über den Rahmen dieser Arbeit hinaus gehen.

4.5 Zusammenfassung der experimentellen Ergebnisse

Die fehlende Produktion bei ammoniumlimitierten Fermentationen mit dem Stamm *A. mediterranei* gibt Hinweise auf einen inhibierenden Einfluß des Phosphats auf die Produktbildung. Dieser Einfluß ist bei *S. tendae* in den Versuchen nicht so stark wiederzufinden, allerdings gibt es auch hier im Biosynthesecluster deutliche Abhängigkeiten, die auf eine solche Wirkung hinweisen.

Ammonium wird bei beiden untersuchten Stämmen für die Produktbildung benötigt. Insofern ist es wichtig, daß auch nach einer Ammoniumlimitation noch genügend Ammonium zellintern bereitgestellt werden kann, um die Produktbildung aufrecht zu erhalten. Warum bei den älteren ammoniumlimitierten Fermentationen von *S. tendae* die Produktivität meist sehr schlecht ausfiel, läßt sich durch den hohen Glucosegehalt während der Produktionsphase erklären (siehe Einfluß Glucose).

Eine geringe Gelöstsauerstoffkonzentration ($p_{O2} < 5\%$) bewirkte bei *S. tendae* definitiv eine verringerte Produktbildung. Diese Wirkung ist auch aufgrund des Biosyntheseclusters zu erwarten. Bei beiden Stämmen läßt sich kein direkter Zusammenhang zwischen dem spezifischen

Sauerstoffverbrauch und der Produktbildung oder gar dem Ende der Produktbildung herstellen.

Pyruvat konnte bei *S. tendae* in größeren Mengen (bis zu 1000 mg l^{-1}) nur unter phosphatlimitierten Bedingungen gemessen werden, wenn noch Ammonium im Medium vorhanden war. Einen Hinweis auf die Produktbildung (Beginn oder Stagnation) konnte dabei aber nicht gefunden werden.

Bei *S. tendae* zeigt die Produktion von Juglomycin und Nikkomycin gegensätzliches Verhalten bei den Fermentationen G131 und G133 (Abb. 4.10). Eine größere Menge von Juglomycin im Medium hemmt das Wachstum und auch vor allem die Produktbildung (> 200 mg l^{-1}). Für eine Modellierung von Juglomycin und damit dessen Einfluß auf die Produktbildung ist das vorhandene Wissen über die Regulation und Bildung dieses Stoffes leider noch nicht ausreichend. Deshalb kann darauf in Kapitel 5 nicht eingegangen werden.

Die maximalen Gehalte von ppGpp sind für die beiden Stämme unterschiedlich, ein Anstieg der Konzentration nach einer Ammoniumlimitation ist jeweils erkennbar. Bei *A. mediterranei* folgt dieser Zunahme aber nicht eine Bildung des Produkts Balhimycin, wohingegen bei *S. tendae* danach eine Produktion von Nikkomycin erfolgt. Auch kurz vor der Phosphatlimitation ist in beiden Fällen ein Anstieg des ppGpp–Gehalts zu beobachten. Anschließend erfolgt bei beiden Stämmen die Produktbildung. Damit läßt sich aus den Meßergebnissen ablesen, daß ppGpp durchaus einen wichtigen Signalstoff für die Produktbildung darstellen kann, daß er allein aber möglicherweise nicht ausreicht, um die Produktbildung zu initiieren, oder aber daß die Produktbildung noch durch andere Stoffe, wie z.B. Phosphat, inhibiert werden kann.

Im folgenden Kapitel werden die hier dargestellten Ergebnisse bei der Modellierung so weit wie möglich berücksichtigt.

Kapitel 5

Modellbildung mit kinetischen Ansätzen

5.1 Einleitung

Im folgenden wird das erstellte strukturierte Modell zur Beschreibung des Wachstums- und Produktbildungsverhaltens der beiden Stämme *S. tendae* und *A. mediterranei* vorgestellt. Die Modellierung erfolgte zunächst vorwiegend unter Berücksichtigung der experimentellen Daten von *S. tendae*. Die Parameter des entwickelten Modells wurden später für *S. tendae* und *A. mediterranei* angepaßt.

5.2 Modellgleichungen

Die Biomasse des strukturierten Modells ist unterteilt in Speicher für die verschiedenen Nährstoffe und Makromoleküle. Es sind 3 intrazelluläre Speicher für die Hauptnährstoffe Ammonium, Phosphat und Glucose modelliert. Die Synthese wichtiger Makromoleküle wie DNA, RNA und Proteine wird berücksichtigt. Alle anderen Zellbestandteile werden als Strukturelemente zusammengefaßt. Die Massen–Bilanzgleichung 5.1 zeigt die Stofflüsse zwischen den einzelnen Zustandsgrößen.

Zur Bilanzierung werden die Gesamtmassen der einzelnen Größen herangezogen. Eine Volumenbilanz, welche die Volumenänderung durch Feed und Probenahme erfaßt, ist zusätzlich erforderlich. Die Zustandsvariablen, welche die jeweiligen Gesamtmassen darstellen, sind mit entsprechenden Indizes versehen: DNA, RNA, Pr-Proteine, Str-Strukturelemente, SpA-Ammoniumspeicher, SpP-Phosphatspeicher, SpC-Glucosespeicher, G-Signalstoff, Am-Ammonium im Medium, Ph-Phosphat im Medium, C-Kohlenstoffquelle (Glucose bzw. Fructose) im Medium, SM-Sekundärmetabolite (Produkte) und X-Trockengewicht der Biomasse. Die Ausbeutekoeffizienten Y_{ij} geben an, wieviel Substrat m_i für die Bildung der Makromoleküle m_j

$$
\frac{d}{dt}\begin{pmatrix} m_{DNA}(t) \\ m_{RNA}(t) \\ m_{Pr}(t) \\ m_{Str}(t) \\ m_{SpA}(t) \\ m_{SpP}(t) \\ m_{SpC}(t) \\ m_G(t) \\ m_{Am}(t) \\ m_{Ph}(t) \\ m_C(t) \\ m_{SM}(t) \end{pmatrix}
=
\underbrace{\begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ qv_{Am}(t)c_{Ame}(t) \\ qv_{Ph}(t)c_{Phe}(t) \\ qv_C(t)c_{Ce}(t) \\ 0 \end{pmatrix}}_{\text{Zulauf}}
-\frac{Q_a(t)}{V(t)}
\underbrace{\begin{pmatrix} m_{DNA}(t) \\ m_{RNA}(t) \\ m_{Pr}(t) \\ m_{Str}(t) \\ m_{SpA}(t) \\ m_{SpP}(t) \\ m_{SpC}(t) \\ m_G(t) \\ m_{Am}(t) \\ m_{Ph}(t) \\ m_C(t) \\ m_{SM}(t) \end{pmatrix}}_{\text{Ablauf}}
-\mu_d(t)
\underbrace{\begin{pmatrix} m_{DNA}(t) \\ m_{RNA}(t) \\ m_{Pr}(t) \\ m_{Str}(t) \\ m_{SpA}(t) \\ m_{SpP}(t) \\ m_{SpC}(t) \\ m_G(t) \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix}}_{\text{Absterben}}
-
\underbrace{\begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ \mu_E(t)m_x(t) \\ mu_{dSM}(t)m_{SM}(t) \end{pmatrix}}_{\text{Erhaltung und Zerfall}}
$$

$$
\underbrace{+\,m_x(t)
\begin{pmatrix}
0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 \\
0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 \\
0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
1 & 0 & 0 & -Y_{AmDNA} & -Y_{ARNA} & -Y_{AmPr} & -Y_{AmStr} & 0 & -Y_{AmSM} & Y_{AmRNA} & Y_{AmPr} & 0 \\
0 & 1 & 0 & -Y_{PhDNA} & -Y_{PhRNA} & 0 & 0 & 0 & 0 & Y_{PhRNA} & 0 & 0 \\
0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & Y_{dCRNA} & Y_{dCPr} & 0 \\
0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & -1 \\
-1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
0 & 0 & -Y_{CX} & -Y_{CDNA} & -Y_{CRNA} & -Y_{CPr} & -Y_{CStr} & 0 & -Y_{CSM} & 0 & 0 & 0 \\
0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0
\end{pmatrix}
\begin{pmatrix} \mu_{Am}(t) \\ \mu_{Ph}(t) \\ \mu_C(t) \\ \mu_{DNA}(t) \\ \mu_{RNA}(t) \\ \mu_{Pr}(t) \\ \mu_{Str}(t) \\ \mu_G(t) \\ \mu_{SM}(t) \\ \mu_{dRNA}(t) \\ \mu_{dPr}(t) \\ \mu_{dG}(t) \end{pmatrix}}_{\text{Baustoffwechsel}}
\tag{5.1}
$$

benötigt wird. Für den Abbau der RNA und der Proteine wird der Ausbeutekoeffizient für die dadurch frei werdende Glucose mit Y_{dCj} bezeichnet. Es wird dabei die Annahme getroffen, daß die Summe der Ausbeutekoeffizienten eins ergibt. Damit läßt sich Y_{dCj} durch $Y_{dCj} = 1 - Y_{Amj} - Y_{Phj}$ berechnen. Die spezifischen Reaktionsraten μ_i sind abhängig von den intrazellulären Konzentrationen und den Mediumskonzentrationen

$$
g_i(t) = \frac{m_i(t)}{m_X(t)} \quad \text{und} \quad c_i(t) = \frac{m_i(t)}{V(t)}. \tag{5.2}
$$

Die Masse eines Stoffes i und das Reaktorvolumen werden mit m_i und V bezeichnet. Bei der Volumenbilanz werden die zugeführten Feedströme, für Ammonium qv_{Am}, Phosphat qv_{Ph} und die C–Kohlenstoffquelle qv_C, in [l h^{-1}] berücksichtigt, ebenso der Zulauf von Lauge q_{EOH} in [kg h^{-1}]. Die Probenahme wird als diskretes Ereignis zu den entsprechenden Zeitpunkten abgezogen (q_{ab}). Ein Vergleich der gemessenen Reaktormasse mit der über die Bilanz berechneten Reaktormasse wies eine sich mit der Fermentationszeit vergrößernde Diskrepanz auf. Bei dem Vergleich wurde angenommen, daß die Dichte der Fermentationsbrühe 1 kg l^{-1} beträgt. Diese Annahme wurde durch Messungen zu verschiedenen Fermentationszeitpunkten bestätigt. Es

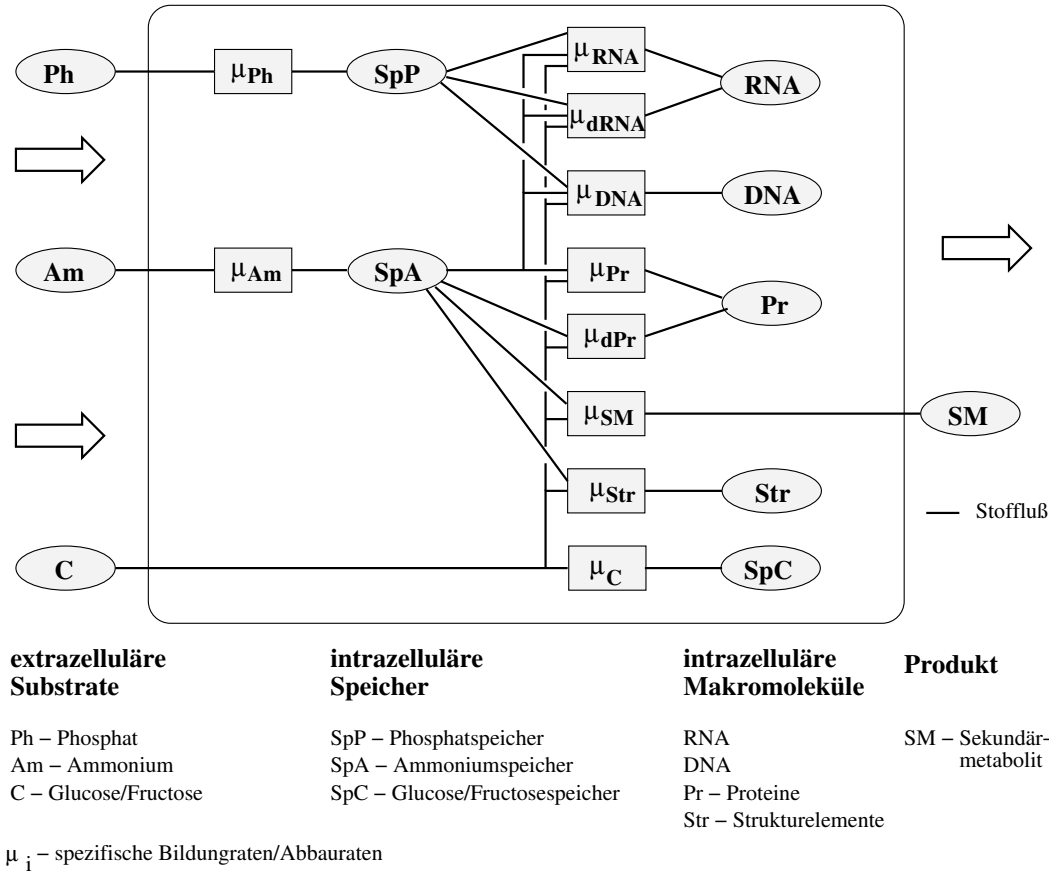

Abbildung 5.1: Stofflußdiagramm

wird angenommen, daß die Diskrepanz durch einen Abzug an Feuchtigkeit durch die Abluft entsteht. Die Abluft wird gekühlt, um diese Störung möglichst gering zu halten. Der Vergleich von Messungen und Berechnung ergab, daß es sinnvoll ist, bei der Berechnung des Volumens einen konstanten Wert q_{ver} für die Verdampfung anzunehmen. Damit ergibt sich als Bilanz für das Reaktorvolumen:

$$\frac{dV}{dt} = qv_{Am} + qv_{Ph} + qv_C + \frac{q_{EOH}}{\rho_{OH}} - q_{ab} - q_{ver}. \tag{5.3}$$

Die resultierende Modellstruktur wird durch das Stofflußdiagramm in Abb. 5.1 repräsentiert. Im Stofflußdiagramm sind die Verbindungen durch die Materialflüsse markiert, nicht aber durch die Signalflüsse, welche zusätzlich auftreten, um die Stofflüsse zu regulieren. Die Regulation der Stofflüsse ist gesondert im Signalflußdiagramm in Abb. 5.2 dargestellt. Die Regulation des Wachstums und der Produktbildung durch den Signalstoff ppGpp ist dabei besonders hervorgehoben. Die Materialbilanz des Signalstoffes ppGpp wird wegen der geringen Menge vernachlässigt, weshalb der Signalstoff im Stofflußdiagramm nicht auftaucht.

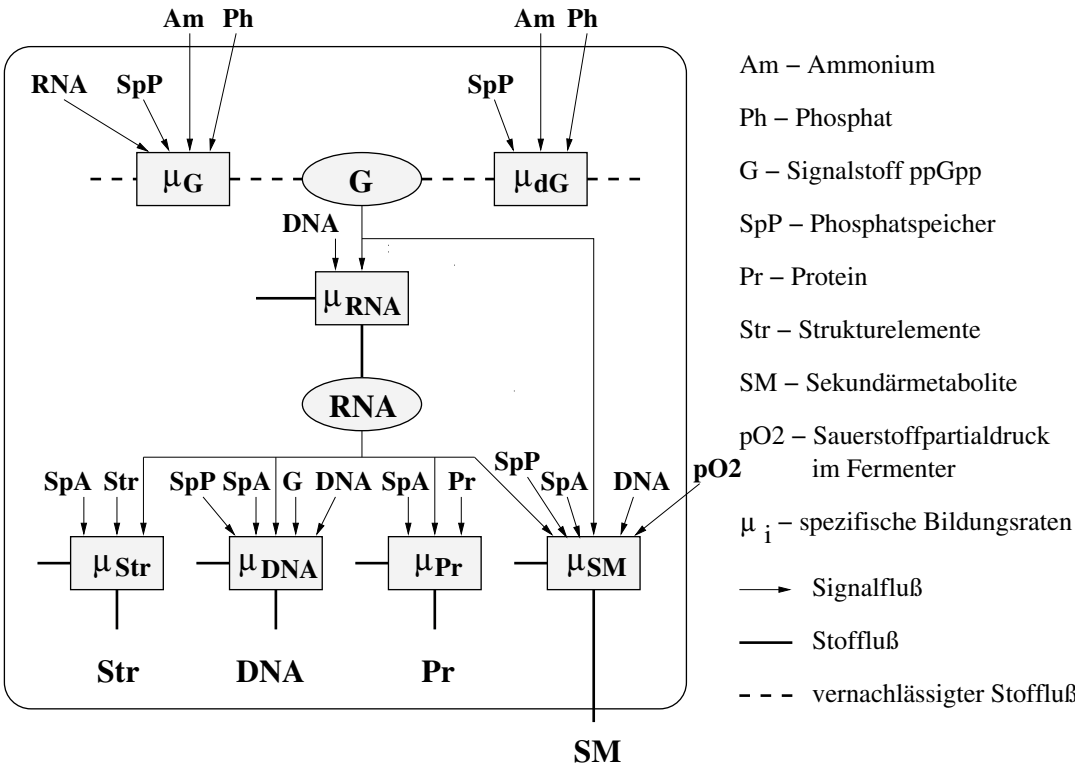

Abbildung 5.2: Signalflußdiagramm

5.2.1 Wachstum

Ein linearer Zusammenhang zwischen Wachstumsrate und RNA–Gehalt unter stationären Bedingungen ähnlich zu *E. coli* wurde für *S. coelicolor* A3(2) gefunden [60, 95]. Bergter und Riesenberg [4] fanden in stationärer Kultur von *S. hygroscopicus* einen konstanten DNA–Gehalt, welcher sich durch die Wachstumsrate nicht veränderte. Der RNA–Gehalt hingegen veränderte sich stark bei Änderungen der Wachstumsrate. Bei dem Proteingehalt dagegen wurden nur geringe Veränderungen gemessen.

Bei shift–up und shift–down Experimenten mit *E. coli* reagiert der RNA–Gehalt bevor sich der DNA– oder Proteingehalt verändert [69]. Nach einer gewissen Adaptationszeit können die Zellen bei diesen Experimenten dann mit einer neuen Wachstumsgeschwindigkeit weiterwachsen.

Die in der Arbeit analysierten und durchgeführten Fermentationen für beide Stämme sind größtenteils Fed–Batch–Fermentationen. Bei dieser Fermentationsführung sind die Phasen des Wachstums nicht stationär, sondern unterliegen einem fließenden Wechsel. Es mag zwar während der Wachstumsphase einen kurzen Zeitraum geben, in dem sich die Zellen im Fließgleichgewicht befinden. Spätestens wenn ein Substrat nicht mehr im Medium vorhanden ist, gerät das Wachstum aber aus dem Gleichgewicht. Der oben ausgeführte, unter stationären Bedingungen gemessene, abschnittsweise lineare Zusammenhang zwischen RNA–Gehalt und Wachstumsrate

soll nun benutzt werden, um den Anteil des Wachstums mit DNA–Replikation zu modellieren. Dieses Wachstum soll im folgenden als echtes Wachstum der Biomasse bezeichnet werden. Die dadurch gebildete Biomasse wird als aktive Biomasse X_a bezeichnet.

Zusätzlich zu diesem echten Wachstum kann ein Wachstum der Biomasse stattfinden, bei welchem keine DNA–Replikation zu beobachten ist. Diese Vermehrung der Biomasse kann als Speicherstoffanhäufung angesehen werden. Welche Stoffe genau als Speicherstoffe fungieren, ist noch nicht geklärt. Ammonium und Glucose werden während des Wachstums ohne DNA–Replikation aufgenommen. LL–Diaminopimelinsäure könnte ein möglicher Speicherstoff sein, da dieser Stoff der Zellwand nicht als Bestandteil von Proteinen gemessen wird. Messungen von LL–Diaminopimelinsäure bei *S. tendae* zeigen aber, daß eine Zunahme der Biomasse nicht durch eine Vermehrung dieses Zellwandbestandteils erfolgt [25], obwohl eine Verdickung der Hyphen, welches auf einen derartigen Effekt hindeutet, von Hege–Treskatis [28] in kontinuierlicher Kultur beobachtet wurde. Daher läßt sich die Frage noch nicht klären, welche Stoffe nun tatsächlich als Speicherstoffe benutzt werden. Dieses Wachstum wird deshalb durch eine Zunahme der Speicher von internem Ammonium und Phosphat und interner Glucose modelliert.

Die streckenweise lineare Korrelation zwischen der echten Wachstumsrate und dem RNA–Gehalt wird im Modell durch eine Sättigungskinetik des Hill–Typs approximiert. Eine Approximation des Zusammenhangs durch eine stetige Funktion erleichtert eine spätere Optimierung der Produktion mit Hilfe des Modells. Damit ergibt sich für das Wachstum der aktiven Biomasse folgende Gleichung:

$$\mu(t) = \mu_m \cdot \frac{g_{RNAa}^{n_\mu}(t)}{g_{RNAa}^{n_\mu}(t) + g_{R0}} \quad \text{mit} \quad g_{RNAa}(t) = \frac{m_{RNA}(t)}{m_{Xa}(t)} \tag{5.4}$$

und

$$m_{Xa}(t) = m_{DNA}(t) + m_{RNA}(t) + m_{Pr}(t) + m_{Str}(t). \tag{5.5}$$

Das Ergebnis dieser Gleichung (mit dem Parametersatz für *S. tendae* aus dem Anhang) ist in Abb. 5.3 aufgetragen. Es ist über einen großen Bereich dadurch ein fast linearer Zusammenhang gewährleistet. Für sehr kleine RNA–Gehalte gilt dieser Zusammenhang nicht mehr, hier ergibt sich durch die Approximation, daß die Wachstumsrate bei Unterschreitung eines Grundwerts des RNA–Gehalts gegen Null geht. Durch den Vergleich mit experimentellen Daten kann man feststellen, daß die Approximation durchaus mit den Daten der Fed-Batch Fermentationen korreliert. Unter einer Ammoniumlimitation kann die berechnete Wachstumsrate in etwa mit der Wachstumsrate der aktiven Biomasse verglichen werden, da in diesem Fall nach der Limitation keine Speicherstoffe mehr aufgenommen werden. Bei einer Phosphatlimitation ist dieser Vergleich nicht so leicht möglich, da hier nach der Limitation noch Speicherstoffe aufgenommen werden.

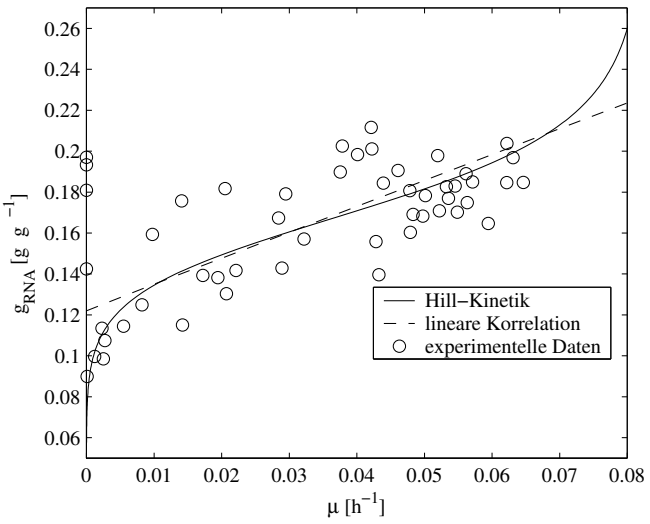

Abbildung 5.3: Zusammenhang zwischen Wachstumsrate und RNA–Gehalt modelliert mit Hilfe der Hill Kinetik (experimentelle Daten 'o' von 4 Ammoniumlimitationsfermentationen)

Die somit berechnete Wachstumsrate (5.4) der aktiven Biomasse wird verwendet, um das Wachstum der DNA, der Proteine und Strukturelemente zu modellieren. Alle spezifischen Biosyntheseraten dieser Makromoleküle werden der Wachstumsrate der aktiven Biomasse gleich gesetzt, wenn keine Limitation vorliegt, da ihr Gehalt sich durch das echte Wachstum nicht verändert. Die Biosynthesegeschwindigkeiten werden proportional zu ihrem internen Gehalt angesetzt. Da mit diesem Ansatz der Modellierung nicht nur das exponentielle Wachstum, sondern auch das Wachstum unter Substratlimition abgebildet werden soll, muss dies auch entsprechend berücksichtigt werden. Dazu müssen zusätzlich die notwendigen Substrate, wie Ammonium und für die DNA und RNA auch Phosphat, vorhanden sein. Glucose wird für den Aufbau aller intrazellulären Makromoleküle benötigt. Es wird als Modelleinschränkung vorausgesetzt, daß immer genügend Glucose im Medium vorhanden ist, da eine Glucoselimitation einen negativen Effekt auf das Biomassewachstum und die Produktbildung hat [56]. Es wird daher angenommen, daß Glucose immer in Sättigungskonzentration vorliegt und damit die Abhängigkeit des Wachstums von der Glucosekonzentration vernachlässigt werden kann. Dadurch setzt sich die Berechnung der spezifischen Wachstumsraten für die Makromoleküle DNA, Proteine und Strukturelemente wie folgt zusammen.

Biosyntheserate DNA:

$$\mu_{DNA}(t) = \mu(t)\frac{g_{SpA}(t)}{g_{SpA}(t) + K_{SpA}} \cdot \frac{g_{SpP}(t)}{g_{SpP}(t) + K_{SpP}} \cdot g_{DNA}(t) \tag{5.6}$$

Biosynthese der Strukturelemente:

$$\mu_{Str}(t) = \mu(t) \cdot \frac{g_{SpA}(t)}{g_{SpA}(t) + K_{SpA}} \cdot g_{Str}(t) \tag{5.7}$$

Translation, Biosynthese der Proteine:

$$\mu_{Pr}(t) = \mu(t) \cdot \frac{g_{SpA}(t)}{g_{SpA}(t) + K_{SpA}} \cdot g_{Pr}(t) \tag{5.8}$$

Da sich der RNA–Gehalt bei Wachstumsänderungen im Vergleich zu dem Gehalt der DNA, den Proteinen und den Strukturelementen verändert, unterscheidet sich die Modellierung dieses Gehaltes von den anderen Anteilen der aktiven Biomasse (siehe Kapitel 5.2.1.1). Für die Proteine wird eine geringe Turnoverrate μ_{TPr} berücksichtigt. Zusätzlich zu diesem ständigen Turnover wird aber ein aktiver Zerfall bei einer Ammoniumlimitation modelliert. In diesem Fall wird ein Teil der nicht mehr notwendigen Proteine abgebaut, damit Ammonium wieder frei wird, um andere und in dieser Situation wichtige Proteine zu bilden. Zusätzlich wird ribosomales Protein abgebaut. Es wird angenommen, daß dieser Zerfall gegen Null geht, wenn nur noch ein geringer Protein–Gehalt vorhanden ist. Diese Verhalten des Zerfalls läßt sich am besten durch eine Hill–Kinetik [6] beschreiben, welche durch einen hohen Wert im Exponent als Schalter verwendet wird. Da ein solches Schalterverhalten im folgenden noch mehrmals zur Modellierung verwendet wird, ist in Abb. 5.4 dieses Verhalten ($\mu_i = \frac{g_i}{g_i + K_M}$) für unterschiedliche Exponenten aufgetragen. Der Zerfall ist proportional zum Protein–Gehalt. Damit ergibt sich folgende

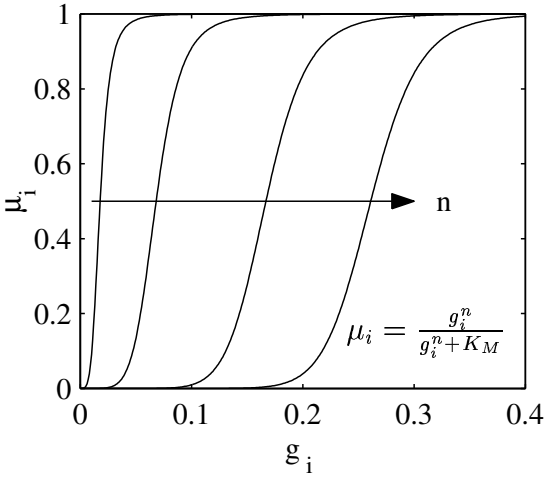

Abbildung 5.4: Darstellung von μ_i bei einer Hill–Kinetik mit unterschiedlichen Potenzen von g_i ($n = 4, 6, 9, 12$, $K_M = 10^{-7}$) bei steigendem Stoffgehalt (g_i).

Gleichung für die Zerfallsrate der Proteine:

$$\mu_{dPr}(t) = \left(\mu_{dPrm} \cdot \frac{K_{PrA}}{c_A(t) + K_{PrA}} \cdot \frac{g^8_{Pr}(t)}{g^8_{Pr}(t) + K_{dPr}} + \mu_{TPr}\right) \cdot g_{Pr}(t) \tag{5.9}$$

Nach einer Ammoniumlimitation tritt ein Zerfall der Biomasse auf, welcher durch eine Sterberate in Abhängigkeit von der Ammoniumkonzentration im Medium modelliert wird. Es wird angenommen, daß das dadurch frei werdende Zellmaterial nicht von den noch lebenden Zellen verwendet werden kann.

$$\mu_d(t) = \mu_{dm} \cdot \frac{K_A}{c_A(t) + K_A} \tag{5.10}$$

5.2.1.1 RNA Synthese

Die Transkriptionsrate der RNA, die als proportional zur Syntheserate der RNA angenommen werden kann, ist zum einen abhängig von der Versorgung mit Nukleotiden, die für die Kettenverlängerung der RNA benötigt werden. Zum anderen ist die Initiationsfrequenz des Transkriptionsvorgangs, bei ausreichender Versorgung mit Nukleotiden, entscheidend für die Bestimmung der Syntheserate. Diese wird durch die Affinität (ψ) der RNA–Polymerase (P) zum Promotor mitbestimmt.

Wenn wenig Aminosäuren für die Beladung der tRNAs zur Verfügung stehen, kann die Bindung unbeladener tRNA die stringente Kontrolle und damit verbunden die Bildung des Signalstoffes (p)ppGpp auslösen. Eine überwiegende Anzahl von Untersuchungen deutet darauf hin, daß diese hochphosphorylierten Nukleotide direkt die Transkription der tRNA und rRNA–Gene inhibieren, möglicherweise durch eine direkte Bindung an die β–Untereinheit der RNA-Polymerase [69]. Damit ergibt sich für die Bindung der RNA Polymerase (P) zur DNA der stabilen RNA (D^{sRNA}), zur DNA der messenger RNA (D^{mRNA}) und zum Signalstoff ppGpp folgendes Reaktionsschema.

$$P_{ak} + D^{sRNA} \overset{K_1}{\rightleftharpoons} PD^{sRNA} \quad \text{mit} \quad K_1 = \frac{[PD^{sRNA}]}{[P_{ak}] \cdot [D^{sRNA}]} \tag{5.11}$$

$$P_{ak} + D^{mRNA} \overset{K_2}{\rightleftharpoons} PD^{mRNA} \quad \text{mit} \quad K_2 = \frac{[PD^{mRNA}]}{[P_{ak}] \cdot [D^{mRNA}]} \tag{5.12}$$

$$P_{ak} + ppGpp \overset{K_3}{\rightleftharpoons} P_{in} \quad \text{mit} \quad K_3 = \frac{[P_{in}]}{[P_{ak}] \cdot [ppGpp]} \tag{5.13}$$

mit den Gesamtkonzentrationen:

$$
\begin{aligned}
P_0 &= P_{ak} + P_{in} + PD^{sRNA} + PD^{mRNA} && (5.14)\\
D_0^{sRNA} &= D^{sRNA} + PD^{sRNA} && (5.15)\\
D_0^{mRNA} &= D^{mRNA} + PD^{mRNA} && (5.16)\\
ppGpp_0 &= ppGpp + P_{in} && (5.17)
\end{aligned}
$$

Die ppGpp Moleküle blockieren in diesem Fall die aktive RNA–Polymerase (P_{ak}) für die anderen Bindungen (inaktive RNA-Polymerase P_{in}). Versucht man das damit erhaltene Gleichungssystem zu lösen, erhält man für $[P_{ak}]$ eine Gleichung dritter Ordnung. Wenn man hierbei die einfachste Lösung, für den Fall gleicher Bindungsgeschwindigkeiten $K_1 = K_2 = K_3 = K$, betrachtet ergibt sich

$$
\begin{aligned}
[P_{ak}] &= -\frac{1}{2}([ppGpp_0] + \left[D_0^{sRNA}\right] + \left[D_0^{mRNA}\right] - [P_0] - \frac{1}{K}) \\
&\quad + \frac{1}{2}\sqrt{([ppGpp_0] + [D_0^{sRNA}] + [D_0^{mRNA}] - [P_0] - \frac{1}{K})^2 + 4\,[P_0]\,\frac{1}{K}}.
\end{aligned} \tag{5.18}
$$

Die Konzentration der aktiven Polymerase ist darin im abhängig von der ppGpp-Gesamtkonzentration. Je höher die ppGpp-Gesamtkonzentration desto geringer die Konzentration der aktiven Polymerase. Um die weiteren Betrachtungen zu vereinfachen, wird die Konzentration der aktiven Polymerase in Abhängigkeit von der ppGpp–Gesamtkonzentration durch den folgenden formalkinetischen Ansatz approximiert:

$$
[P_{ak}] = K_P \cdot \frac{K_G}{K_G + [ppGpp_0]} \tag{5.19}
$$

Die Affinität ψ der RNA–Polymerase zu den DNA–Bindungsstellen zum Ablesen der stabilen RNA berechnet sich als Quotient der tatsächlich vorhandenen Bindungen der Polymerase an die DNA–Bindungsstellen zum Ablesen der sRNA zu der Gesamtzahl an möglichen Bindungsstellen der RNA–Polymerase. Damit ergibt sich für die Affinität

$$
\psi(t) = \frac{\left[PD^{sRNA}\right]}{[D_0^{sRNA}] + [D_0^{mRNA}]}. \tag{5.20}
$$

Durch Einsetzen der Gleichung 5.15 und der Gleichgewichtsbedingung von 5.11 in 5.20 ergibt sich

$$
\psi(t) = \frac{K_1\,[P_{ak}]}{K_1\,[P_{ak}] + 1} \cdot \underbrace{\frac{\left[D_0^{sRNA}\right]}{[D_0^{sRNA}] + [D_0^{mRNA}]}}_{K_\psi}. \tag{5.21}
$$

Wenn man nun den formalkinetischen Ansatz für P_{ak} aus Gleichung 5.19 einsetzt und als ppGpp-Gesamtkonzentration den Signalstoffgehalt (g_G) verwendet, erhält man

$$\psi(t) = \underbrace{K_P \cdot K_\psi \cdot K_1 \cdot \frac{1}{K_1 K_P + 1}}_{K_\psi^*} \cdot \frac{K_G\,(K_P K_1 + 1)}{g_G + \underbrace{K_G\,(K_P K_1 + 1)}_{K_4}}. \tag{5.22}$$

Dies kann man vereinfacht schreiben als

$$\psi(t) = K_\psi^* \cdot \frac{K_4}{g_G + K_4}. \tag{5.23}$$

Die Bildungsrate der stabilen RNA ist proportional zur Affinität der RNA–Polymerase zu den DNA–Bindungsstellen zum Ablesen der stabilen RNA ($\mu_{RNA} \sim \psi$). Da die stabile RNA den Großteil der RNA ausmacht (98%), wird für die Gleichung der RNA–Syntheserate im Modell eine Abhängigkeit des Signalstoffgehalts (g_G) berücksichtigt. Es ergab sich allerdings im Laufe der Anpassung, daß hierfür der hyperbolische Ansatz nach 5.23 nicht ausreicht. Die Reaktion der RNA-Syntheserate auf Änderungen des Signalstoffgehalts erfolgte immer zu langsam. Deshalb erwies sich hier eine sigmoidaler Ansatz als sinnvoll:

$$\mu_{RNA} = \frac{K_G}{{g_G}^n + K_G} \tag{5.24}$$

Die Anpassung ergab einen Koeffizienten von $n = 4$. Dadurch ist es möglich, daß sich schon kleine Konzentrationsänderungen im Signalstoffgehalt schnell in der RNA–Syntheserate bemerkbar machen (siehe Abb. 5.5).

Unter Berücksichtigung der notwendigen Substrate für die RNA Synthese und einer proportionalen Abhängigkeit vom DNA–Gehalt (g_{DNA}) gilt damit folgende Gleichung für die RNA–Syntheserate:

$$\mu_{RNA}(t) = \mu_{Rm} \cdot \frac{K_G}{K_G + g_G^4(t)} \cdot \frac{g_{SpP}(t)}{g_{SpP}(t) + K_{SpP}} \cdot \frac{g_{SpA}(t)}{g_{SpA}(t) + K_{SpA}} \cdot g_{DNA}(t) \tag{5.25}$$

Die Abhängigkeit von der Wachstumsrate $\mu(t)$ wie bei der DNA, den Proteinen und den Strukturelementen taucht hierbei nicht mehr auf. Sie wurde quasi durch die zuvor hergeleitet Abhängigkeit des Signalstoffgehaltes g_G ersetzt, um sehr schnell auf Umgebungsveränderungen zu reagieren. Damit kann die Zusammensetzung der aktiven Biomasse bezüglich der RNA nur in etwa als konstant betrachtet werden. Infolge der stringenten Kontrolle im Falle einer Ammoniumlimitation tritt bei der RNA zusätzlich zur normalen Turnoverrate ein aktiver Zerfall

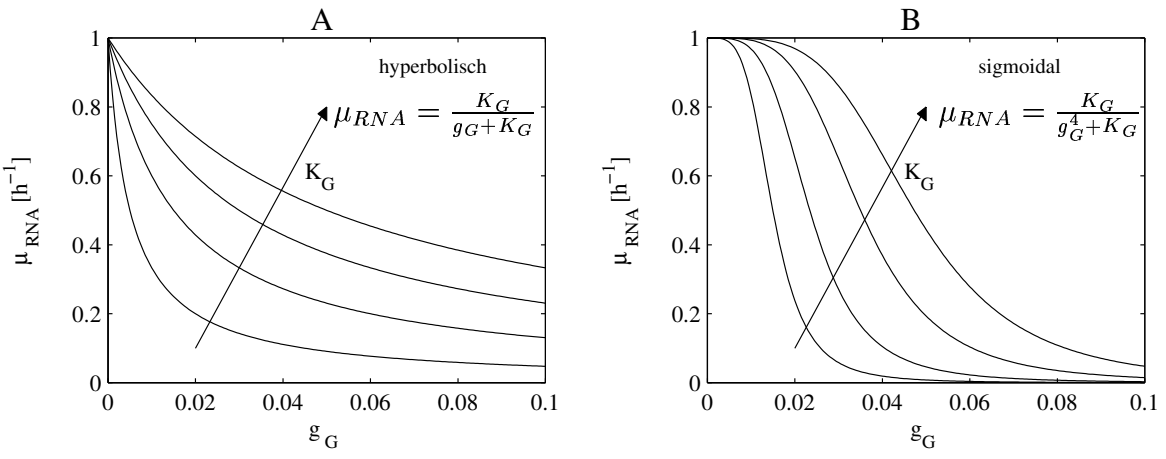

Abbildung 5.5: Darstellung von μ_{RNA} bei einem hyperbolischen Ansatz ($n = 1$, A) und einem sigmoidalen Ansatz ($n = 4$, B) bei steigendem Signalstoffgehalt (g_G)

ein. Dieser wird bei geringem RNA-Gehalt durch die Modellierung mit einer Hill-Kinetik begrenzt. Während einer Phosphatlimitation wurde ein geringerer aktiver RNA Zerfall festgestellt, der bald einer Sättigung unterliegt. Dieser wird mit einem hyperbolischen Term (Abb. 5.5), abhängig von der internen Phosphatkonzentration, modelliert. Die RNA–Zerfallsrate setzt sich damit wie folgt zusammen:

$$\begin{aligned} \mu_{dRNA}(t) &= \left(\mu_{dRm1} \cdot \frac{K_{RA}}{c_A(t) + K_{RA}} \cdot \frac{g_{RNA}^8(t)}{g_{RNA}^8(t) + K_{RSpA}}\right. \\ &\quad \left. + \mu_{dRm2} \cdot \frac{K_{RP}}{c_{Ph}(t) + K_{RP}} + \mu_{TR}\right) \cdot g_{RNA}(t) \end{aligned} \tag{5.26}$$

5.2.1.2 Aufnahmerate von Ammonium in den Speicher

Es wird angenommen, daß die Ammoniumaufnahmerate der Zellen abhängig von der Ammoniumkonzentration im Medium ist. Auch nach einer Phosphatlimitation wird Ammonium noch weiter in die Zellen aufgenommen. Während der exponentiellen Wachstumsphase (d.h. wenn ausreichend Substrate vorhanden sind) wird Ammonium meist in gleichem Maße in die Zellen transportiert, wie es in den Zellen verstoffwechselt wird. Dies liegt in der Ökonomie der Zelle, wodurch sich möglichst wenig Metabolite anhäufen. Wenn sich Metabolite oder Speicherstoffe in der Zelle anhäufen, endet damit meist das balancierte Wachstum. In dem Fall der Ammoniumaufnahme wird aber auch nach einer Phosphatlimitation noch Ammonium in die Zellen als Speicherstoff aufgenommen. Hier erfolgt auch nach der Limitation über einen längeren Zeitraum ein Zuwachs des Trockengewichts. Da noch nicht geklärt werden konnte, welche Spei-

cherstoffe mit dem aufgenommenen Ammonium gebildet werden, erscheint es zweckmäßig, das aufgenommene Ammonium nach dem Ende des exponentiellen Wachstums weiterhin in den allgemeinen Ammoniumspeicher fließen zu lassen.

Durch die Aufnahmeraten μ_{Am1} und μ_{Am2} wird die maximale Aufnahme während der exponentiellen Wachstumsphase beschrieben. Wenn sich nach der Phosphatlimitation Ammonium aufgrund der weiteren Aufnahme anhäuft, wird durch den hyperbolischen Sättigungsterm bei μ_{A1} in Gl. 5.27 die Aufnahme von Ammonium auf die geringere Rate μ_{Am2} reduziert.

Weiter ist die gesamte Aufnahme von Ammonium proportional zum Proteingehalt der Zellen angesetzt.

$$\mu_{Am}(t) = \frac{c_A(t)}{c_A(t) + K_{ASpA}} \cdot \left(\underbrace{\mu_{Am1} \cdot \frac{K_{ASpA2}}{g_{SpA}^2(t) + K_{ASpA2}}}_{\mu_{A1}} + \mu_{Am2} \right) \cdot g_{Pr}(t) \tag{5.27}$$

5.2.1.3 Aufnahmerate von Glucose und Fructose in den Speicher

Da während der Wachstumsphase die Annahme gilt, daß die aufgenommene Glucose oder Fructose schnell verstoffwechselt wird, tritt hier keine Anhäufung innerhalb des Glucose- bzw. Fructosespeichers auf. Daher kann der Speicher als quasistationär angenommen werden. Dies wird in der Bilanzgleichung 5.1 berücksichtigt, indem der Verbrauch für das Wachstum der Zellen, für die Stofferhaltung und die Produktbildung direkt in der Bilanzierung der Kohlenstoffquelle im Medium berücksichtigt wird. Der Glucose- bzw. Fructoseverbrauch ist damit durch die spezifischen Bildungsraten bestimmt. Da sich eine Glucose- bzw. Fructoselimitation negativ auf das Wachstum und die Produktbildung der Zellen auswirkt [56], wird im Modell vorausgesetzt, daß immer genügend Glucose bzw. Fructose im Medium vorhanden ist. Eine Limitation von Glucose bzw. Fructose wird durch das Modell daher nicht beschrieben.

Die Glucose- bzw. Fructoseaufnahmerate μ_C in den Speicher beschreibt die Aufnahme im Falle einer Speicherstoffanhäufung. Dies tritt ein, wenn noch Ammonium aber kein Phosphat mehr im Medium vorhanden ist. Daraus ergibt sich für die Aufnahmerate in den Speicher folgende Gleichung:

$$\mu_C(t) = \mu_{Cm} \cdot \frac{c_C(t)}{c_C(t) + K_{CS}} \cdot \frac{c_A(t)}{c_A(t) + K_{AA2}} \cdot \frac{K_{Ph}}{c_{Ph}(t) + K_{Ph}} \tag{5.28}$$

5.2.1.4 Verbrauchsrate für Erhaltungsstoffwechsel

Wie aus Gleichung 5.1 ersichtlich, wird für die Stofferhaltung Energie und damit auch Glucose bzw. Fructose verbraucht. Diese Aufnahmerate der Glucose und Fructose, welche für die Stofferhaltung verwendet wird, wird mit μ_E modelliert. Dabei wird eine einfache Michaelis–Menten Kinetik in Abhängigkeit der Glucose im Medium benutzt.

$$\mu_E(t) = \mu_{Em} \cdot \frac{c_C(t)}{c_C(t) + K_{EC}} \tag{5.29}$$

5.2.1.5 Aufnahmerate von Phosphat in den Speicher

Das mehrphasige Wachstum nach einer Phosphatlimitation (siehe Abb. 4.2) deutet darauf hin, daß die Zellen zusätzlich zur RNA einen Phosphatspeicher besitzen. Dieser Phosphatspeicher kann für das Wachstum der DNA nach der Limitation verwendet werden. Im Falle einer Ammoniumlimitation wird Phosphat nur noch geringfügig aufgenommen. Dies zeigt, daß der Speicher einer Sättigung unterliegt. Um diese Sättigung richtig modellieren zu können, wurde für die Phosphataufnahme eine Abhängigkeit vom Phosphat im Medium in Michaelis-Menten Form gewählt. Für die Sättigung war eine Kinetik dieser Form in Abhängigkeit des Phosphatspeichers allerdings nicht ausreichend. Hier muß eine Inhibierung in sigmoidaler Form gewählt werden, um die Phosphataufnahme ausreichend zu verringern, wenn genügend Phosphat im Speicher vorliegt. Der hohe Exponent in der Kinetik ist dabei für ein Abschalten der Aufnahme verantwortlich (siehe auch Abb. 5.5). Damit ergibt sich folgender Term für die Aufnahmerate von Phosphat.

$$\mu_{Ph}(t) = \mu_{Phm} \cdot \frac{c_{Ph}(t)}{c_{Ph}(t) + K_{PhPh}} \cdot \frac{K_{PhSpP}}{g^{12}_{SpP}(t) + K_{PhSpP}} \tag{5.30}$$

5.2.2 Regulation Sekundärmetabolismus

Für die Regulation des Sekundärmetabolismus wurde wie oben dargestellt der Signalstoff ppGpp ausgewählt, um die stringente Kontrolle zu modellieren und dadurch das Wachstum und auch die Produktbildung zu beeinflussen.

5.2.2.1 Bildungsrate von ppGpp

Die ppGpp Bildung erfolgt im Normalfall unter einem Aminosäuremangel oder einer Glucoselimitation. Da Aminosäuren im Modell nicht als Zustandsgrößen betrachtet werden, steht der Ammoniummangel, welcher unweigerlich einen Aminosäuremangel in der Zelle hervorruft, in diesem Fall stellvertretend für den Aminosäuremangel.

Eine Bildung unter Phosphatmangel ist nicht auszuschließen. Die Messungen in Kapitel 4 zeigen, daß bei beiden Stämmen eine Erhöhung der ppGpp–Konzentration auftritt, wenn eine Ammonium- oder Phosphatlimitation stattfindet. Allerdings war im Falle einer Phosphatlimitation der Anstieg in der ppGpp–Konzentration geringer. Die Messung kann hier eher als qualitativ statt quantitativ bewertet werden, da der Zellaufschluß mit der Meßmethode wahrscheinlich nicht vollständig erfolgt und auch die Meßwerte teilweise an der Nachweisgrenze liegen. Es läßt sich aber in beiden Fällen zeigen, daß ppGpp nach der Limitation in den Zellen vorliegt.

In Abb. 5.2 ist eine Möglichkeit zur hypothetischen Regulation des Wachstums und des Sekundärmetabolismus mit Hilfe von ppGpp als Signalstoff dargestellt. In diesem Fall löst zusätzlich zu einer Ammoniumlimitation eine Phosphatlimitation die Bildung von ppGpp aus. ppGpp fungiert in diesem Falle als alleiniger Signalstoff, welcher das Wachstum und auch die Produktbildung reguliert. Es können aber auch noch andere Effektoren auftreten, wie auch in Kapitel 2 bei der Abbildung 2.1 von Chater und Bibb angedeutet. Dies kann z.B. eine nährstoffbedingte Repression oder Inhibition sein. Da bei *A. mediterranei* nach einer Ammoniumlimitation kein Balhimycin gebildet wird, liegt es nahe, daß der Fall einer Phosphatrepression vorliegen kann. Bei *S. tendae* ist diese Repression nicht so stark ausgeprägt.

Im Modell ist diese Vorstellung umgesetzt, indem die Bildungsrate von ppGpp entsprechend der Nährstoffsituation berechnet wird. Die Bildungsrate von ppGpp wird immer proportional zum RNA-Gehalt angenommen, da die ppGpp–Synthetase an die ribosomale RNA gebunden ist. Eine Bildung von ppGpp erfolgt im Modell, wenn

- kein Ammonium mehr im Nährmedium vorhanden ist,
- Phosphat weder im Nährmedium noch im Speicher vorhanden ist.

Damit ergibt sich für die Syntheserate als einfachster Term:

$$\mu_G(t) = \mu_{Gm} \cdot \left(\frac{K_{GA}}{c_A(t) + K_{GA}} + \frac{K_{GPh}}{c_{Ph}(t) + K_{GPh}} \cdot \frac{K_{GSpP}}{g_{SpP}(t) + K_{GSpP}} \right) \cdot g_{RNA}(t) \qquad (5.31)$$

Falls sich die Zusammensetzung der Substratquellen durch Zufütterung (z.B. Puls eines Sub-

strats) oder internen Zerfall verändert, kann neben dem konstitutiven Turnover ein aktiver Zerfall des ppGpps auftreten. Dieser Zerfall muß im Falle einer Pulsfermentation sehr schnell gehen, damit wieder ein erneutes Wachstum stattfinden kann. Dies zeigen die experimentellen Ergebnisse. Dieser aktive Zerfall erfolgt, wenn

- Phosphat und Ammonium wieder im Medium auftauchen,
- Ammonium im Medium vorhanden ist und Phosphat im Speicher, aber nicht im Medium auftaucht.

Der gesamte Zerfall (aktiver Zerfall und Turnover) ist proportional zum ppGpp-Gehalt. Damit ergibt sich die Zerfallsrate des ppGpp's folgendermaßen.

$$\begin{aligned}\mu_{dG}(t) &= \left(\mu_{dGm} + \mu_{dG2m} \cdot \frac{c_A(t)}{c_A(t) + K_{GA}} \cdot \left(\frac{c_{Ph}^2(t)}{c_{Ph}^2(t) + Y_{ASP}}\right.\right. \\ &\left.\left. + \frac{g_{SpP}(t)}{g_{SpP}(t) + K_{ZGSpP}}\right)\right) \cdot g_G(t)\end{aligned} \tag{5.32}$$

5.2.2.2 Bildungsrate der Sekundärmetabolite

Wie in Abb. 4.11 zu sehen ist, spielt ppGpp bei der Produktbildung eine wichtige Rolle. Es muß vorhanden sein, um die Produktbildung auszulösen. Zusätzlich dazu gibt es aber noch verschiedene Effektoren, wie z.B. Phosphat und die Gelöstsauerstoffkonzentration, welche die Produktbildung beeinflussen (siehe auch Ergebnisse aus Kapitel 4). Unter folgenden Annahmen zur Produktion der Sekundärmetabolite wurde der kinetische Ansatz gewählt:

- Produktion abhängig vom ppGpp-Gehalt,
- Produktion abhängig vom internen Ammoniumspeichergehalt als Nährstoffversorger,
- Produktion abhängig vom internen Phosphatspeichergehalt, bei hohem Gehalt wird die Produktion reduziert,
- Substratinhibierende Kinetik für die Abhängigkeit von der Wachstumsrate ($\mu_{ges} = \mu_A + \mu_{Ph} + \mu_C + Y_{CRNA} \cdot \mu_{RNA} + Y_{CDNA} \cdot \mu_{DNA} + Y_{CPr} \cdot \mu_{Pr} + Y_{CStr} \cdot \mu_{Str}$),
- Produktion abhängig vom p_{O2}– Gehalt, ein sehr niedriger p_{O2} verringert die Produktion.

$$\begin{aligned}\mu_{SM}(t) &= \mu_{SMm} \cdot \frac{g_G^3(t)}{g_G^3(t) + K_{SMG}} \cdot \frac{g_{SpA}(t)}{g_{SpA}(t) + K_{SMSpA}} \cdot \frac{K_{PhA}}{g_{SpP}^8(t) + K_{PhA}} \\ &\cdot \frac{\mu_{ges}(t)}{K_{Str} + \mu_{ges}(t) + \frac{\mu_{ges}^2(t)}{K_{GSpA}}} \cdot \frac{p_{O2}^2(t)}{p_{O2}^2(t) + K_{PO2}} \cdot g_{DNA}(t)\end{aligned} \tag{5.33}$$

Bei Nikkomycin wurde die Modellierung des Zerfalls von King [39] übernommen. Es wurden dort aus gesonderten Versuchen der Zerfall der Nikkomycine in Abhängigkeit der Temperatur T und des pH–Wertes pH als eine Kinetik erster Ordnung ermittelt.

$$\mu_{dSM}(t) = \mu_{dSMm} \cdot e^{K_{dSM1} \cdot pH(t) - \frac{K_{dSM2}}{T(t)}} \tag{5.34}$$

Dieser Zerfallsterm wurde im Modell *S. tendae* beibehalten. Für den Stamm *A. mediterranei* wurde die Zerfallsrate $\mu_{dSMm} = 0$ gesetzt, da ein Zerfall von Balhimycin nicht beobachtet werden konnte. Die Massenbilanz der Sekundärmetabolite ergibt sich mit den berechneten Bildungs– und Zerfallsraten zu:

$$\frac{d}{dt} m_{SM}(t) = \mu_{SM}(t) \cdot m_X(t) - \mu_{dSM}(t) \cdot m_{SM}(t) \tag{5.35}$$

5.2.3 Quasistationaritätsannahme für ppGpp

Der ppGpp–Gehalt beeinflußt die RNA–Biosynthese (5.25) und die Produktbildung (5.33). Die Biosynthese und der Zerfall von ppGpp erfolgen sehr schnell. Deshalb sollte eine Quasistationaritätsannahme für ppGpp keine allzu großen Unterschiede in der Simulation ergeben.

Dies wurde überprüft, indem die Quasistationaritätsannahme

$$\frac{d}{dt} m_G(t) = 0 \tag{5.36}$$

in Gleichung 5.1 eingesetzt wurde. Es ergibt sich dadurch für die Berechnung von $g_G(t)$ ein algebraischer Zusammenhang folgender Form:

$$g_G(t) = \frac{\mu_G(t) - \mu_{dG}(t)}{\frac{Q_A}{V} + \mu_d(t)} \tag{5.37}$$

Das Modell mit der Quasistationaritätsannahme für den ppGpp–Gehalt wurde mit den aus der Anpassung des Modells mit dynamischer Simulation des ppGpp–Gehalts erthaltenen Parametern simuliert und mit dessen Simulationsergebnissen verglichen. Exemplarisch ist das Ergebnis beider Simulationen, für die Fermentation G142, im Vergleich in Abbildung 5.6 dargestellt. Der Verlauf des ppGpp–Gehalts weist wie zu erwarten durch die Entfernung der Dynamik steilere Flanken auf als der des Modells mit dynamisch simuliertem ppGpp–Gehalt. Trotz dieser großen Unterschiede in der Simulation des ppGpp–Gehalts bleiben die Verläufe der einzelnen Zustandsgrößen sehr ähnlich. Dies läßt den Schluß zu, daß das Modell bzgl. ppGpp äußerst unempfindlich ist. Für die Modellierung und auch die Parameteridentifikation ergeben sich durch die Quasistationaritätsannahme keine besonderen Vorteile, da die Parameteranzahl dadurch nicht verringert wird, um eine einfachere Anpassung zu ermöglichen.

5.3 Simulationsergebnisse

Auf den folgenden Seiten sind die Anpassungsergebnisse des Modells mit dem Stamm *S. tendae* gezeigt. Die Anpassung erfolgte für fünf verschiedene Fermentationen. Es wurden eine Ammoniumlimitation, eine Phosphatlimitation, eine Ammoniumlimitation mit anschließendem Ammoniumpuls, eine Phosphatlimitation mit Phosphatpuls und eine Fermentation mit produktoptimierter Fermentationsführung [37] dazu herangezogen. Die Verifikation erfolgte durch die Simulation von weiteren Fermentationsdaten, welche nicht zur Anpassung herangezogen wurden. In den Abbildungen 5.7-5.11 sind die Simulationsdaten des vorgestellten Modells mit dem identifizierten Parametersatz im Vergleich mit den Fermentationsdaten dargestellt. In Tabelle 5.1 sind die Anfangsbedingungen (AB) der zur Anpassung verwendeten Fermentationen von *S. tendae* und *A. mediterranei* dargestellt. Dabei wurden für alle Fermentationen die Anfangsbedingungen für alle Speicher im Modell (c_{SpA}, c_{SpP}, c_{SpC}) auf 0.001 g l^{-1} gesetzt und die Anfangsbedingung für die Konzentration des Signalstoffes g_G auf $2 \cdot 10^{-8}$ g l^{-1}.

Die Validierung des Modells mit den durch die Anpassung erzielten Parametern wurde durch die Simulation von weiteren Fermentationen, die nicht zur Parameteridentifikation verwendet wurden, durchgeführt. Für die hier vorgestellten Ergebnisse wurde dazu beispielhaft zu jeder angepaßten Fermentationen, eine Fermentation mit ähnlichen Anfangsbedingungen zur Validierung ausgewählt. Validierungen mit weiteren Fermentationen ergaben vergleichbare Ergebnisse. In Tabelle 5.2 sind die Anfangsbedingungen (AB) der zur Validierung herangezogenen Fermentationen für *S. tendae* und *A. mediterranei* dargestellt. Auf das Vorgehen bei der Parameteridentifikation und die Auswahl der Fermentationen zur Anpassung wird in Kapitel 7 näher eingegangen.

Stamm	*S. tendae*					*A. mediterranei*		
	G142	G134	G138	G109	G133	M107	M108	M115
Dauer [h]	185	206	235	168	236	210	168	250
AB [g l^{-1}]								
Phosphat	1.17	0.26	0.56	1.8	0.044	0.154	1.15	0.158
Ammonium	1.05	1.89	0.68	0.23	0.17	2.89	0.84	0.34
Glucose	40	42	41.8	40	20	-	-	-
Fructose	-	-	-	-	-	42.2	43.7	42.3
Biomasse	0.145	0.205	0.2	0.134	0.298	0.018	0.049	0.2
DNA	0.0058	0.0082	0.008	0.0053	0.0119	0.0072	0.002	0.008
RNA	0.0232	0.0328	0.032	0.0214	0.0477	0.0288	0.007	0.032
Proteine	0.0792	0.1127	0.11	0.0738	0.1642	0.099	0.027	0.11
Strukturel.	0.0288	0.041	0.04	0.0268	0.597	0.036	0.010	0.04
Volumen [l]	50	50	50	50	42	12	12	12
Glu/Fructose–feeding ab	93.4 h	91.3 h	70.2 h	67 h	0 h	70 h	78 h	78h
Phosphat–feeding	-	-	-	-	0 - 56 h	-	-	-
Ammonium–feeding	-	-	-	-	0 - 177 h	-	-	-
Phosphat–puls bei	-	-	-	139.7 h	-	-	-	-
Ammonium–puls bei	-	-	140.6 h	-	-	-	-	56.9 h 143.5 h 191.5 h

Tabelle 5.1: Übersicht über Anfangsbedingungen (AB) und Fermentationsführung der Fermentationen von *S. tendae* und *A. mediterranei*, welche zur Parameteridentifikation verwendet wurden

Die Ergebnisse der Parameteridentifikation zeigen im Durchschnitt eine gute Abbildung des Wachstums und auch der Produktbildung. Die Schwierigkeiten bei der Beschreibung der Produktivität zeigen sich hier aber deutlich, z.B. bei der Simulation der Fermentation G109. Diese ist von den Fermentationsbedingungen für den ersten Zeitabschnitt bis zum Puls vergleichbar mit der Fermentation G134. Die spezifische Produktbildung der Fermentation G109 ist in diesem Zeitraum aber etwa nur halb so groß wie bei der Fermentation G134. Anhand der Messungen konnten aber keine Unterschiede festgestellt werden. Unter gleichen Fermentationsbedingungen wurden auch in anderen Fällen unterschiedliche Resultate bei der Produktbildung

erzielt. So fällt die Produktbildung von den Fermentationen G125 und G126 mit *S. tendae* sehr viel geringer aus als die der vergleichbaren Fermentation G134 (siehe auch Abb. 4.9). Dabei konnte als wesentlicher Unterschied eine erhöhte Glucosekonzentration (> 25 g l^{-1}) im Vergleich zur Fermentation G134 identifiziert werden (siehe auch Untersuchungen in Kapitel 4). Da dieser Effekt aber nicht in der Modellbildung berücksichtigt ist, ist dieses Ergebnis der Anpassung nachvollziehbar. Für eine spätere Optimierung mit Hilfe des Modells muß daher als Randbedingung gelten, daß die Glucosekonzentration den Wert von 25 g l^{-1} möglichst nicht überschreitet.

Im Anhang C sind in den Abbildungen C.1-C.5 noch weitere Simulationen von Fermentationen mit *S. tendae* dargestellt. Die größten Diskrepanzen zwischen Simulation und experimentellen Daten zeigen sich dabei bei den produktmaximierten Fermentationen. Da sich bei diesen Fermentationen in den Analysen der Daten Unterschiede ergaben, welche zum Teil durch die hohe Juglomycinkonzentration begründet werden konnte (siehe Kapitel 3 Abb. 4.10 von G131 und G133), sind die Ergebnisse der Simulation nicht überraschend. Aufgrund fehlender Information über die Juglomycinproduktion konnte diese nicht im Modell berücksichtigt werden, daher ist es nicht möglich, dieses Verhalten mit dem Modell zu simulieren.

Die Simulationsergebnisse nach der Parameteridentifikation für den Stamm *A. mediterranei* sind in den Abbildungen 5.12-5.14 und 5.21-5.22 gezeigt. Weitere Simulationsergebnisse für *A. mediterranei* sind im Anhang C in den Abbildungen C.6 und C.7 dargestellt. Es wurden für diesen Stamm drei Fermentationen für die Parameteridentifikation verwendet, eine Phosphatlimitation, eine Ammoniumlimitation und Ammoniumpulsfermentation (siehe Tab. 5.1). Bei der Anpassung ergaben sich Probleme für die Ammoniumpulsfermentation. Um hier eine bessere Anpassung erreichen zu können, muß noch mehr Information über die genaue Regulation der Produktbildung bekannt sein. Bei einer Ammoniumlimitation mit mehreren Ammoniumpulsen unterliegt der Stoffwechsel ständigen Veränderungen durch den extremen Wechsel der Umgebungsbedingungen. Daher stellt dieser Fall besondere Ansprüche an das Modell.

Bei der Anpassung der Produktbildung für den Stamm *A. mediterranei* mußten Kompromisse gemacht werden, da hier die spezifische Produktivität der beiden phosphatlimitierten Fermentationen (M107 und M129) Unterschiede zeigen (Abb. 4.8). Die anderen Meßergebnisse dieser Fermentation sind vergleichbar. Die Umgebungsbedingungen unterscheiden sich bis auf die Animpfmenge der Fermentationen nicht. Die Animpfmenge für 12 Liter Fermentationsvolumen der Fermentation M107 beträgt 2.15 g und die der Fermentation M129 0.95 g Biomasse. Die durchschnittliche Animpfmenge der Fermentationen betrug ca. 1.5-2.5 g. Die Produktivität bei der Fermentation M129 ist höher als bei der Fermentation M107, deren Animpfmenge geringer ist. Eine geringere Animpfmenge der Biomasse hat im Modell nur eine zeitliche Verschiebung zur Folge. Falls hier tatsächlich ein Zusammenhang zwischen der Produktivität und

der Animpfmenge bestehen sollte, wird dies im Modell nicht abgebildet. Um über einen möglichen Zusammenhang genauere Aussagen machen zu können, müßten noch weitere Fermentation durchgeführt werden. Da über phosphatlimitierte Fermentationen mit *A. mediterranei* keine weiteren Daten vorliegen, mußten diese beiden zur Anpassung bzw. Validierung herangezogen werden. Es entsteht dadurch das Ergebnis, daß die Simulation der Produktbildung bei der Fermentation M129 unter den Meßwerten liegt, da die Anpassung an die Fermentation M107 erfolgte.

Die Simulationsergebnisse zeigen, daß eine Modellstruktur gefunden wurde, die für die beiden unterschiedlichen Mikroorganismen *A. mediterranei* und *S. tendae* verwendet werden kann. Damit liefert das Modell die Basis für eine Prozeßoptimierung.

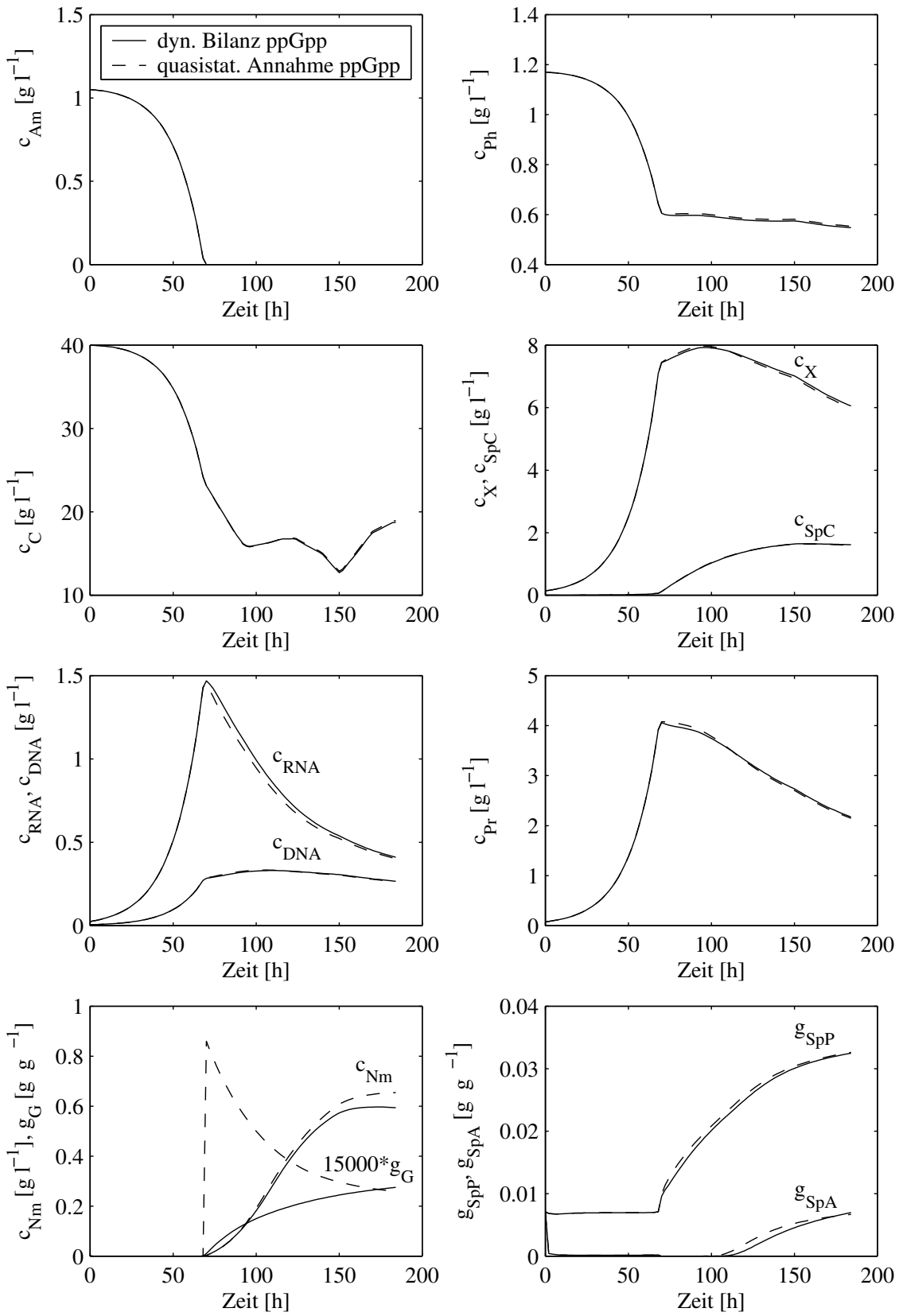

Abbildung 5.6: Vergleich einer Simulation mit dynamischer Bilanz von ppGpp (-) und einer Simulation mit Quasistationaritätsannahme für ppGpp (- -) am Beispiel der Fermentation G142 (Ammoniumlimitation mit *S.tendae*)

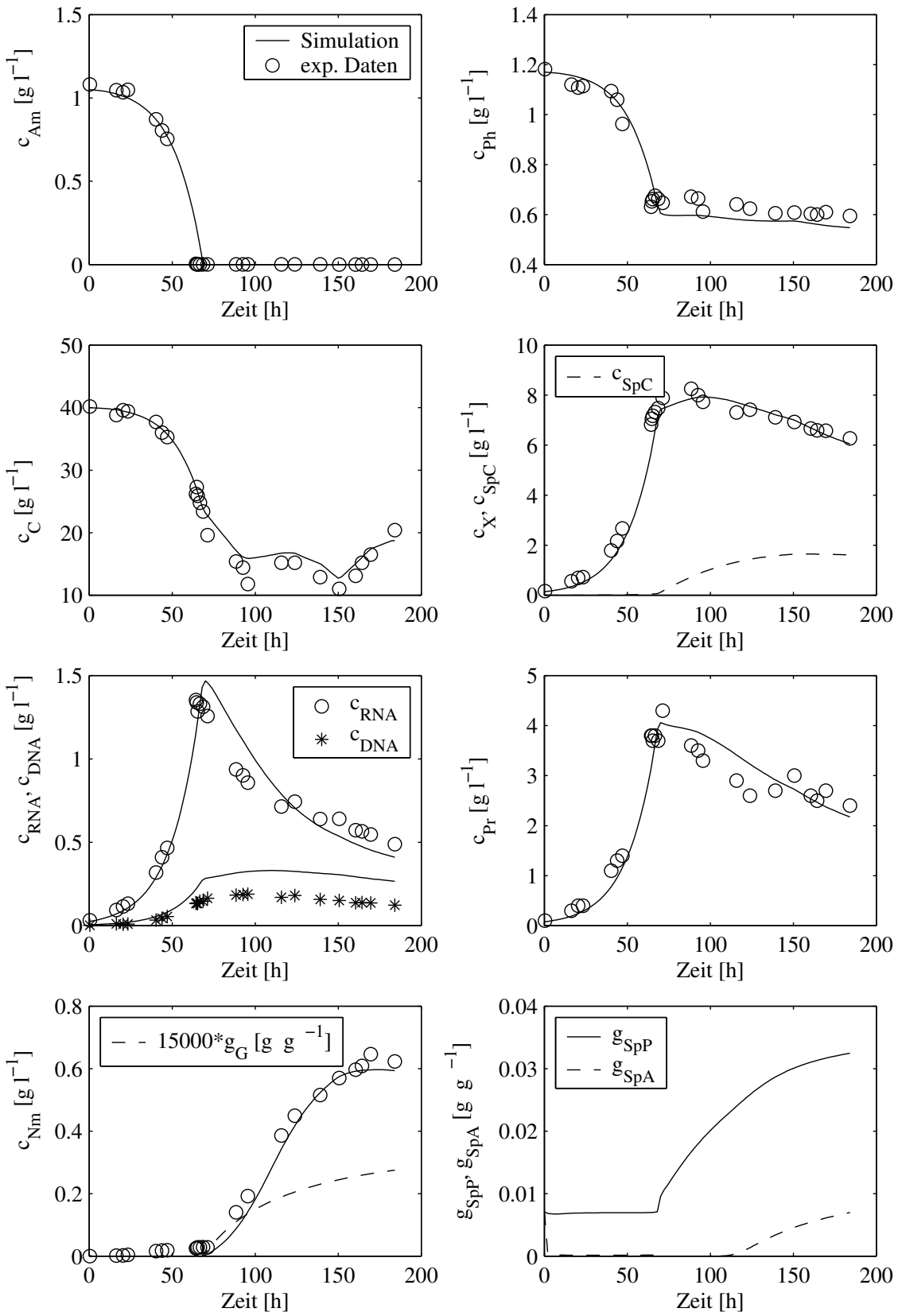

Abbildung 5.7: Vergleich von Simulation und experimentellen Daten der Fermentation G142 (Ammoniumlimitation mit *S. tendae*), welche zur Anpassung verwendet wurde

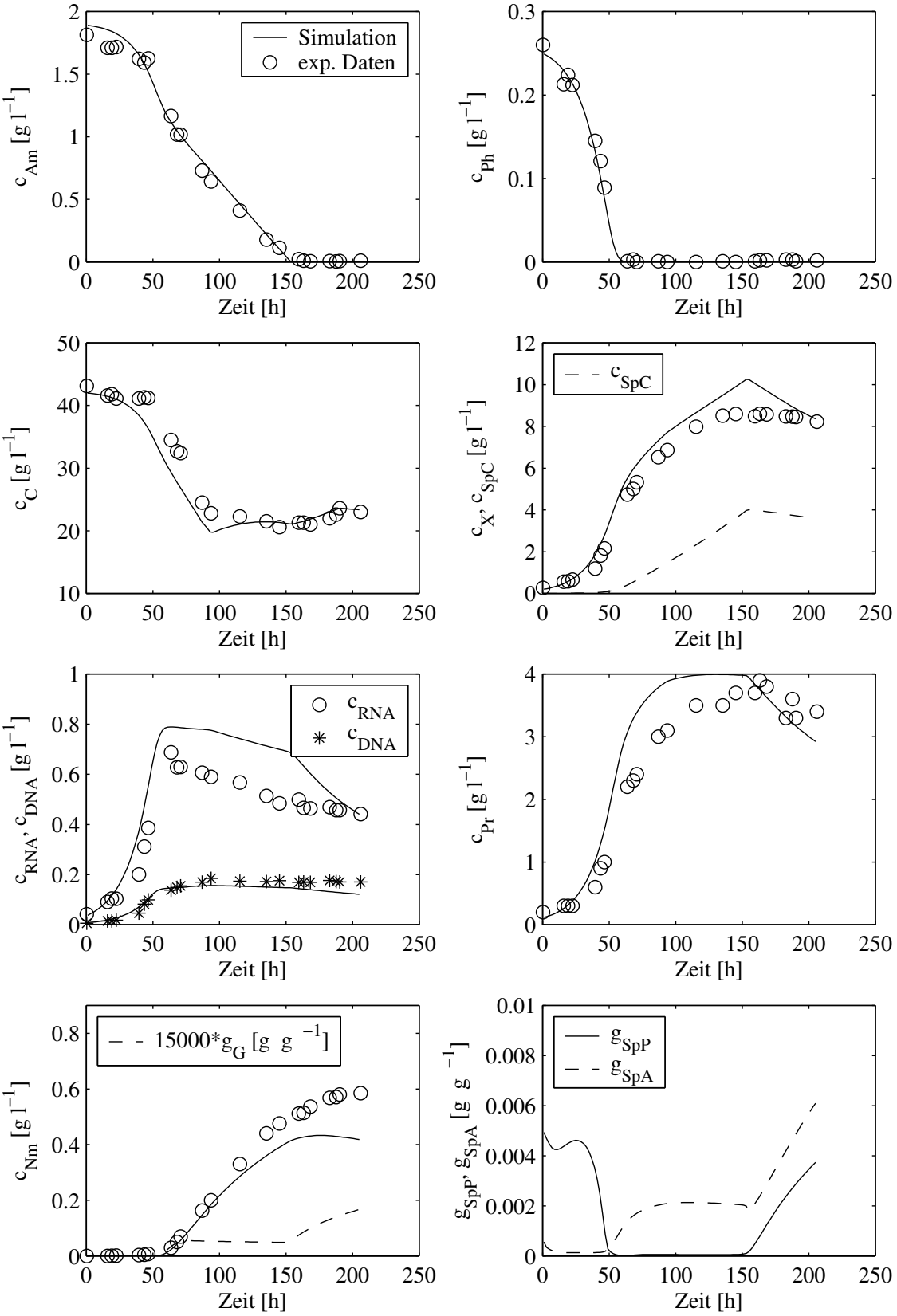

Abbildung 5.8: Vergleich von Simulation und experimentellen Daten der Fermentation G134 (Phosphatlimitation mit *S. tendae*), welche zur Anpassung verwendet wurde

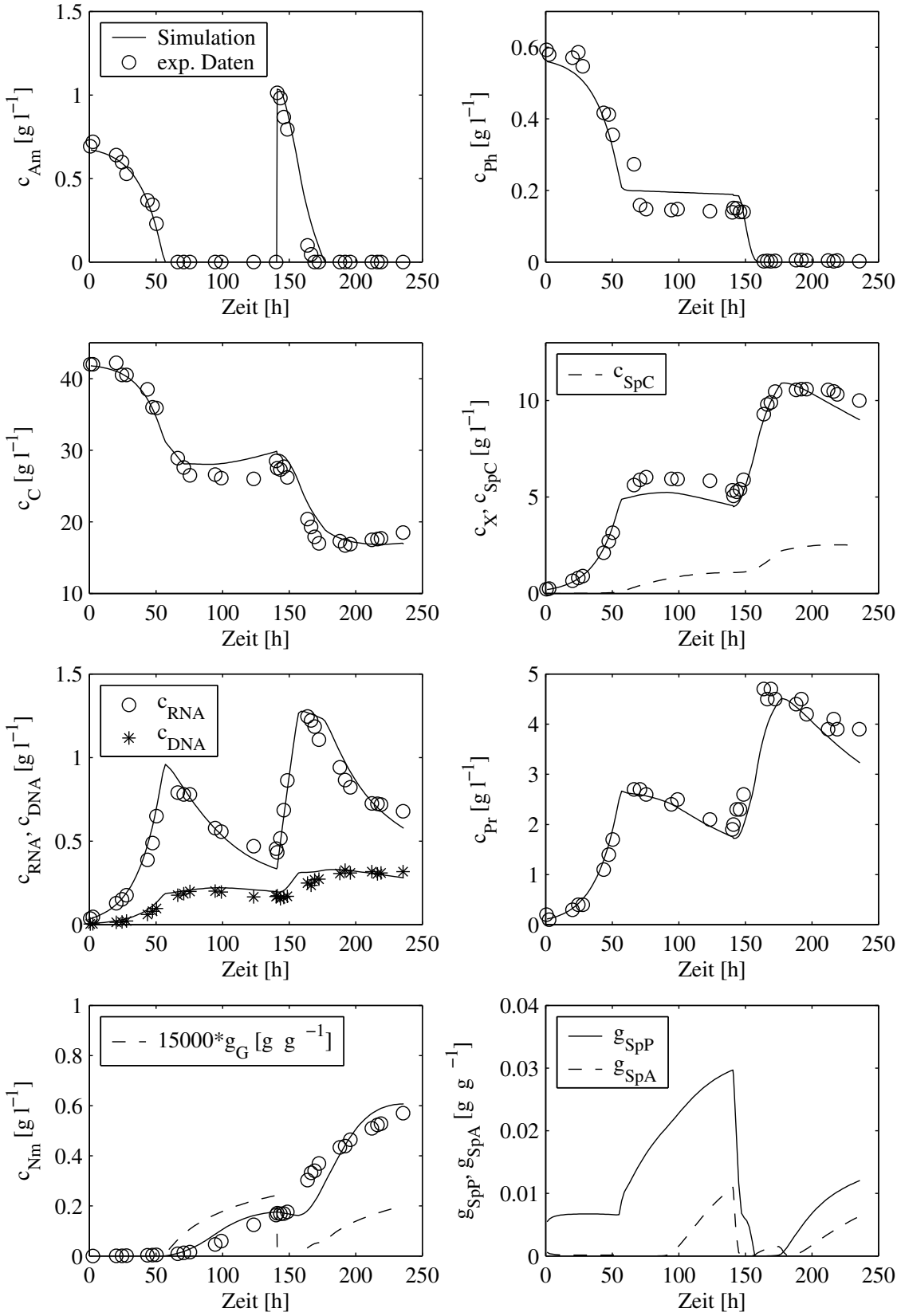

Abbildung 5.9: Vergleich von Simulation und experimentellen Daten der Fermentation G138 (Ammoniumlimitation mit Ammoniumpuls mit *S. tendae*), welche zur Anpassung verwendet wurde

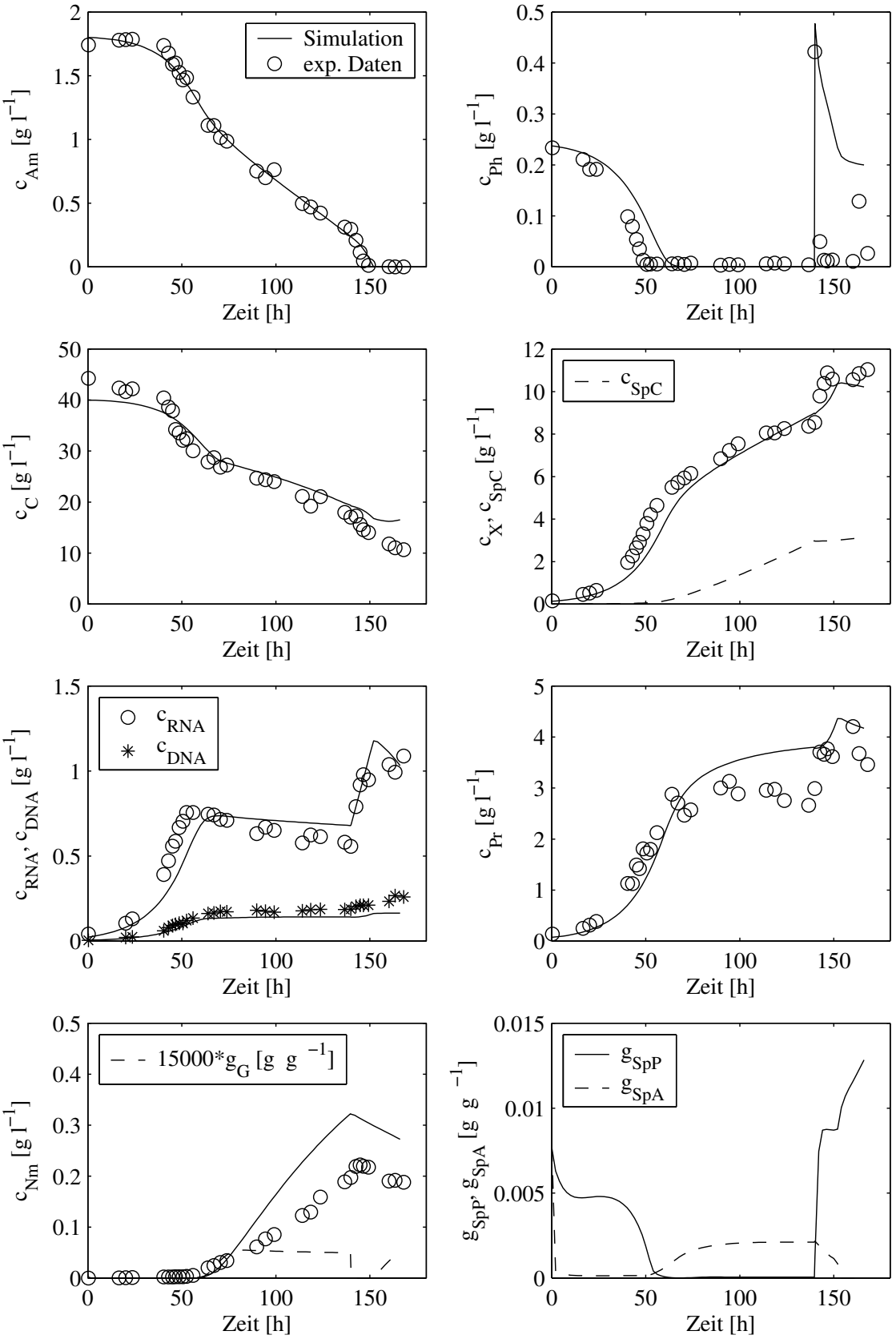

Abbildung 5.10: Vergleich von Simulation und experimentellen Daten der Fermentation G109 (Phosphatlimitation mit Phosphatpuls mit *S. tendae*), welche zur Anpassung verwendet wurde

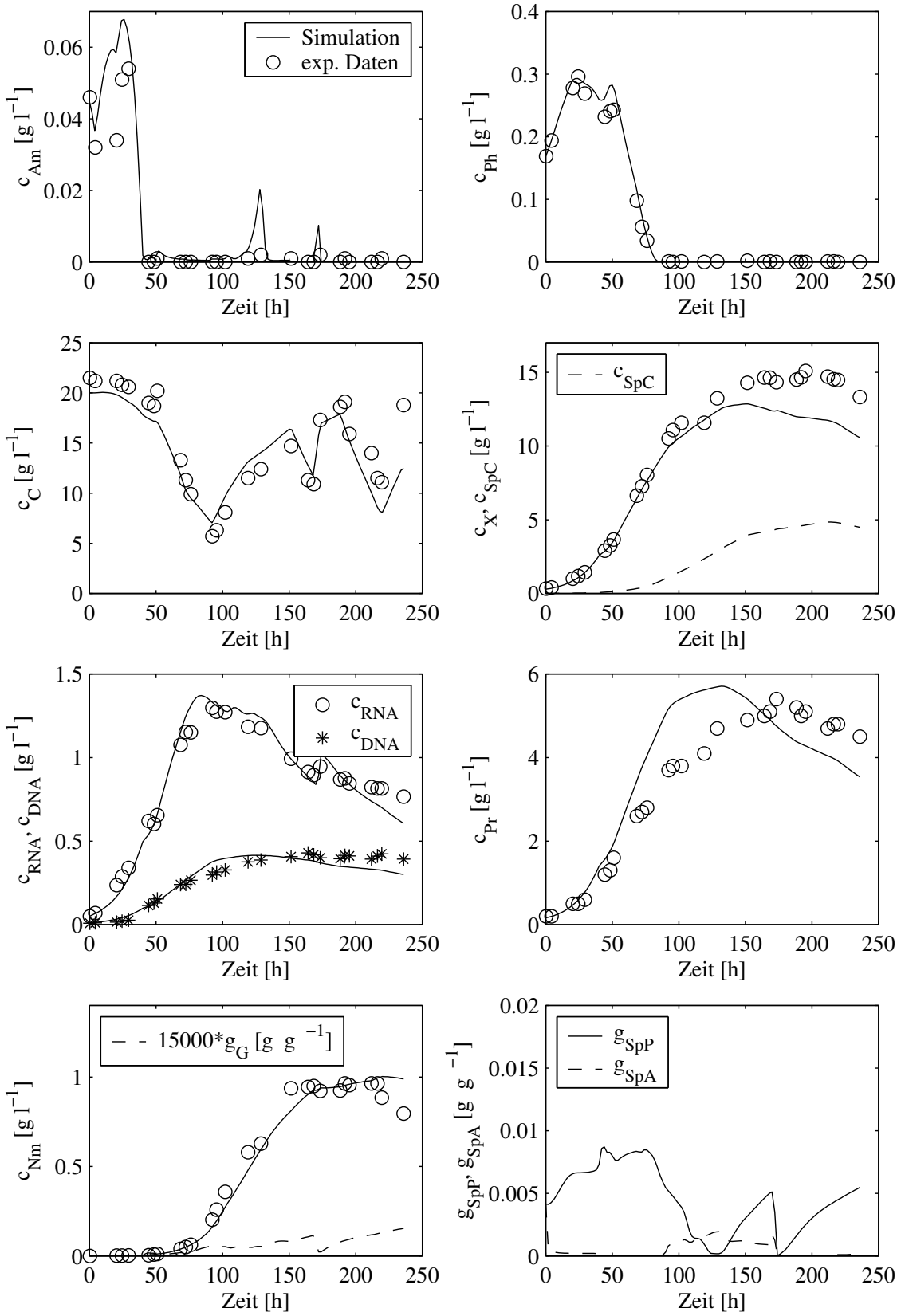

Abbildung 5.11: Vergleich von Simulation und experimentellen Daten der Fermentation G133 (Produktmaximierung mit *S. tendae*), welche zur Anpassung verwendet wurde

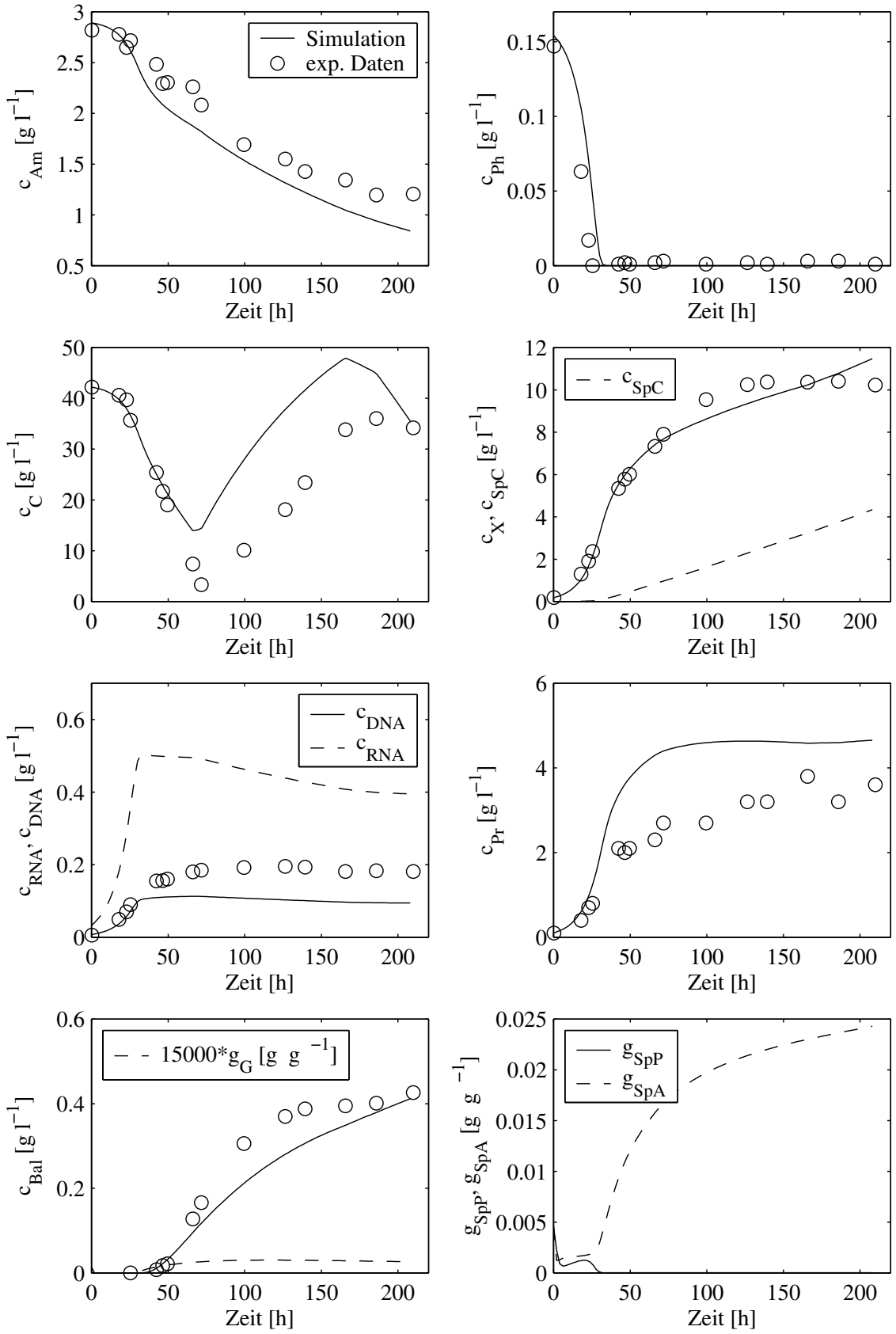

Abbildung 5.12: Vergleich von Simulation und experimentellen Daten der Fermentation M107 (Phosphatlimitation mit *A. mediterranei*), welche zur Anpassung verwendet wurde

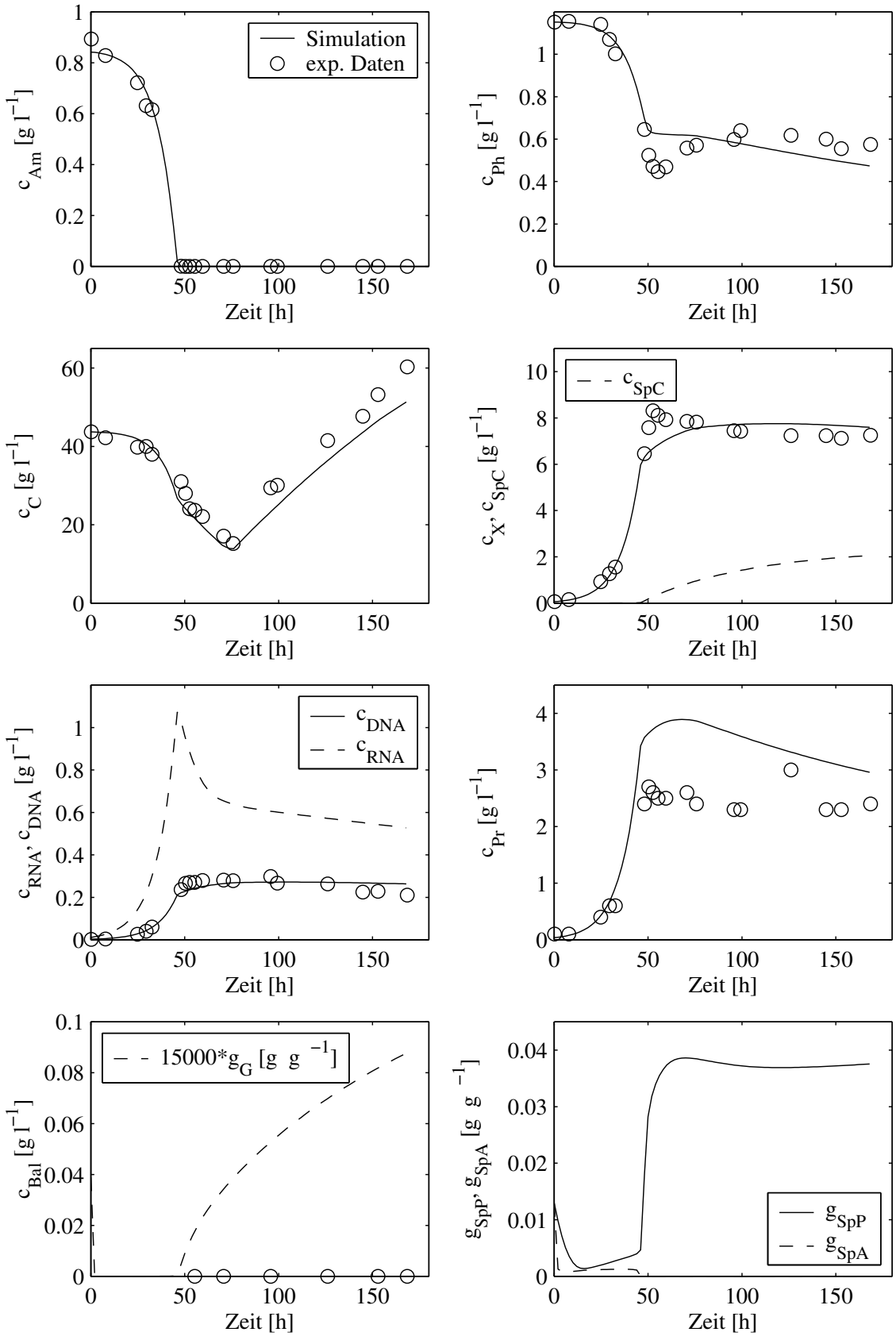

Abbildung 5.13: Vergleich von Simulation und experimentellen Daten der Fermentation M108 (Ammoniumlimitation mit *A. mediterranei*), welche zur Anpassung verwendet wurde

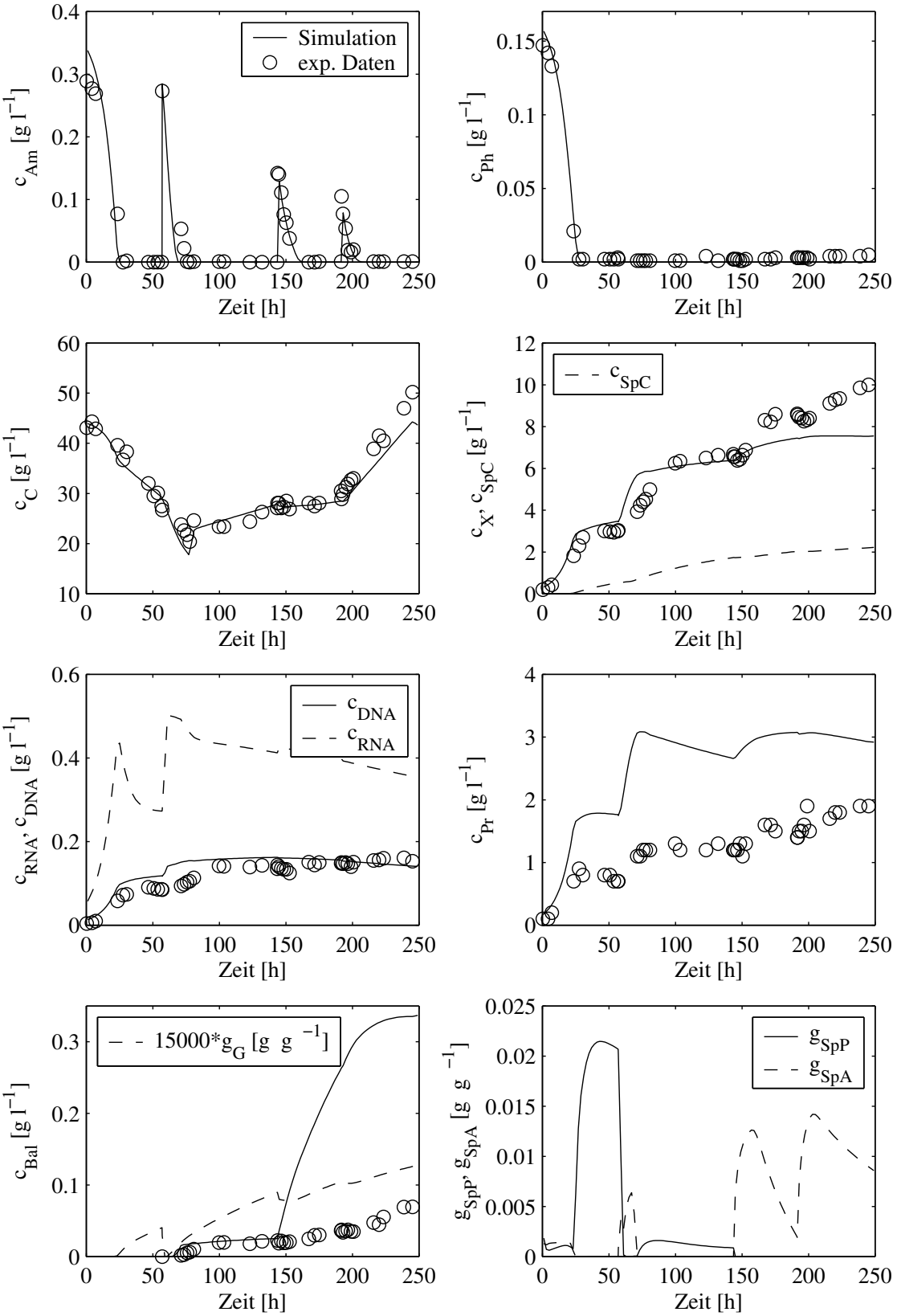

Abbildung 5.14: Vergleich von Simulation und experimentellen Daten der Fermentation M115 (Ammoniumlimitation mit Ammoniumpulsen mit *A. mediterranei*), welche zur Anpassung verwendet wurde

Stamm	*S. tendae*						*A. mediterranei*	
	G145	G26	G94	G108	G111	G83	M127	M129
Dauer [h]	237	167	230	215	168	217	95	142
AB [g l^{-1}]								
Phosphat	1.08	0.24	0.57	0.56	0.14	0	1.09	0.14
Ammonium	0.85	1.82	0.72	0.67	1.9	0.02	0.81	2.76
Glucose	30	41	40	41.8	40	1.5	-	-
Fructose	-	-	-	-	-	-	41.5	41.7
Biomasse	0.25	0.194	0.267	0.159	0.18	0.287	0.115	0.079
DNA	0.01	0.0077	0.0106	0.0095	0.0072	0.114	0.004	0.003
RNA	0.04	0.031	0.0427	0.0255	0.0288	0.046	0.018	0.012
Proteine	0.137	0.1068	0.147	0.0878	0.099	0.158	0.063	0.043
Strukturel.	0.05	0.0388	0.053	0.032	0.036	0.057	0.023	0.015
Volumen [l]	50	50	50	50	50	39	12	12
Glu./Fru.–feeding ab	70.1 h	96.7 h	91.4 h	71.6 h	75.2 h	0 h	-	71 h
Phosphat–feeding	-	-	-	-	-	0 - 52 h	-	-
Ammonium–feeding	-	-	-	-	53-148 h	0 h	-	-
Ammonium–puls bei	-	-	158.1 h 165 h	142.6 h 143.3 h	-	-	-	-
Phosphat–puls bei	-	-	-	-	71.6 h	-	-	-

Tabelle 5.2: Übersicht über Anfangsbedingungen (AB) und Fermentationsführung der Fermentationen von *S. tendae* und *A. mediterranei* zur Modellvalidierung

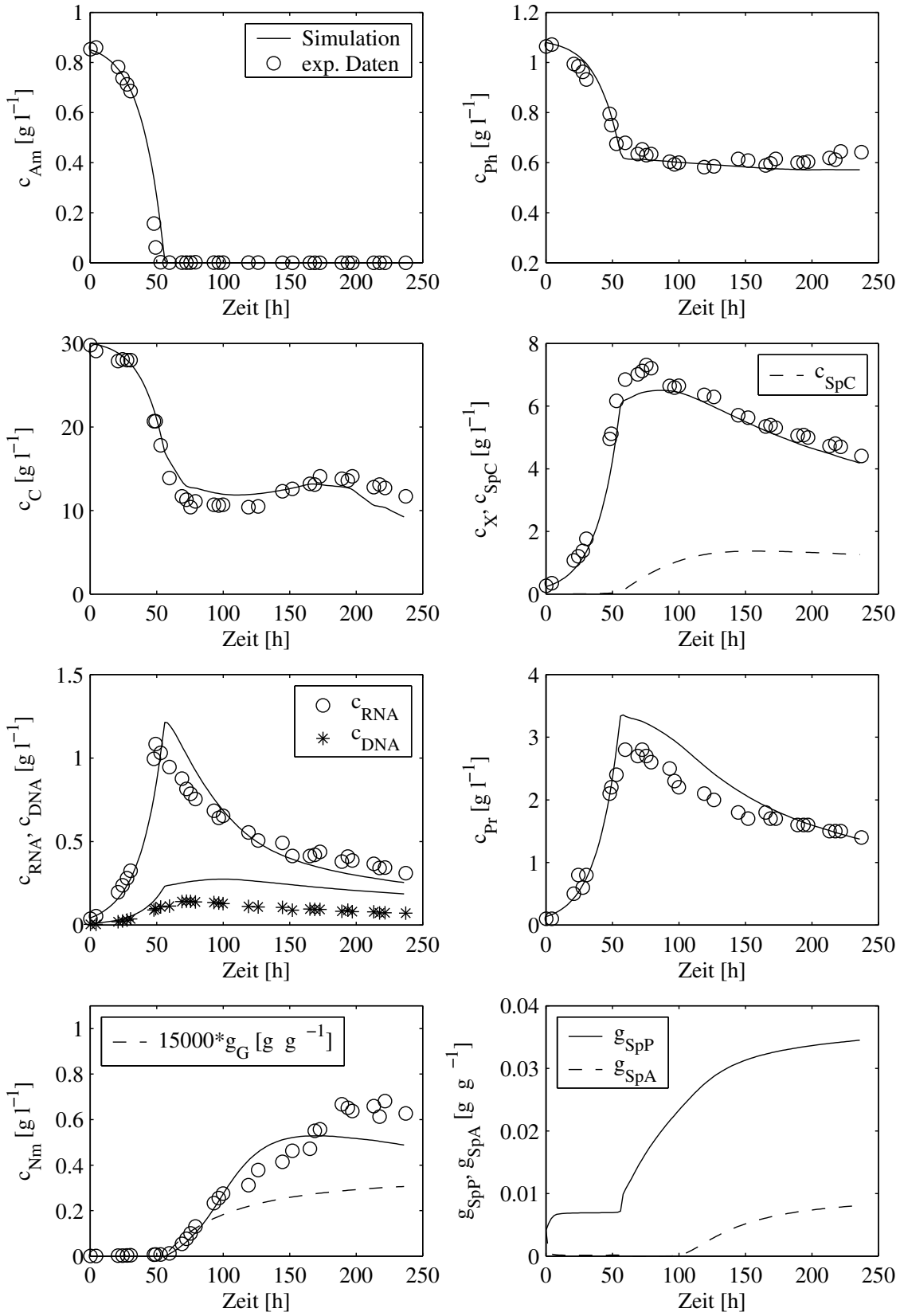

Abbildung 5.15: Vergleich von Simulation und experimentellen Daten der Fermentation G145 (Ammoniumlimitation mit *S.tendae*) zur Modellvalidierung

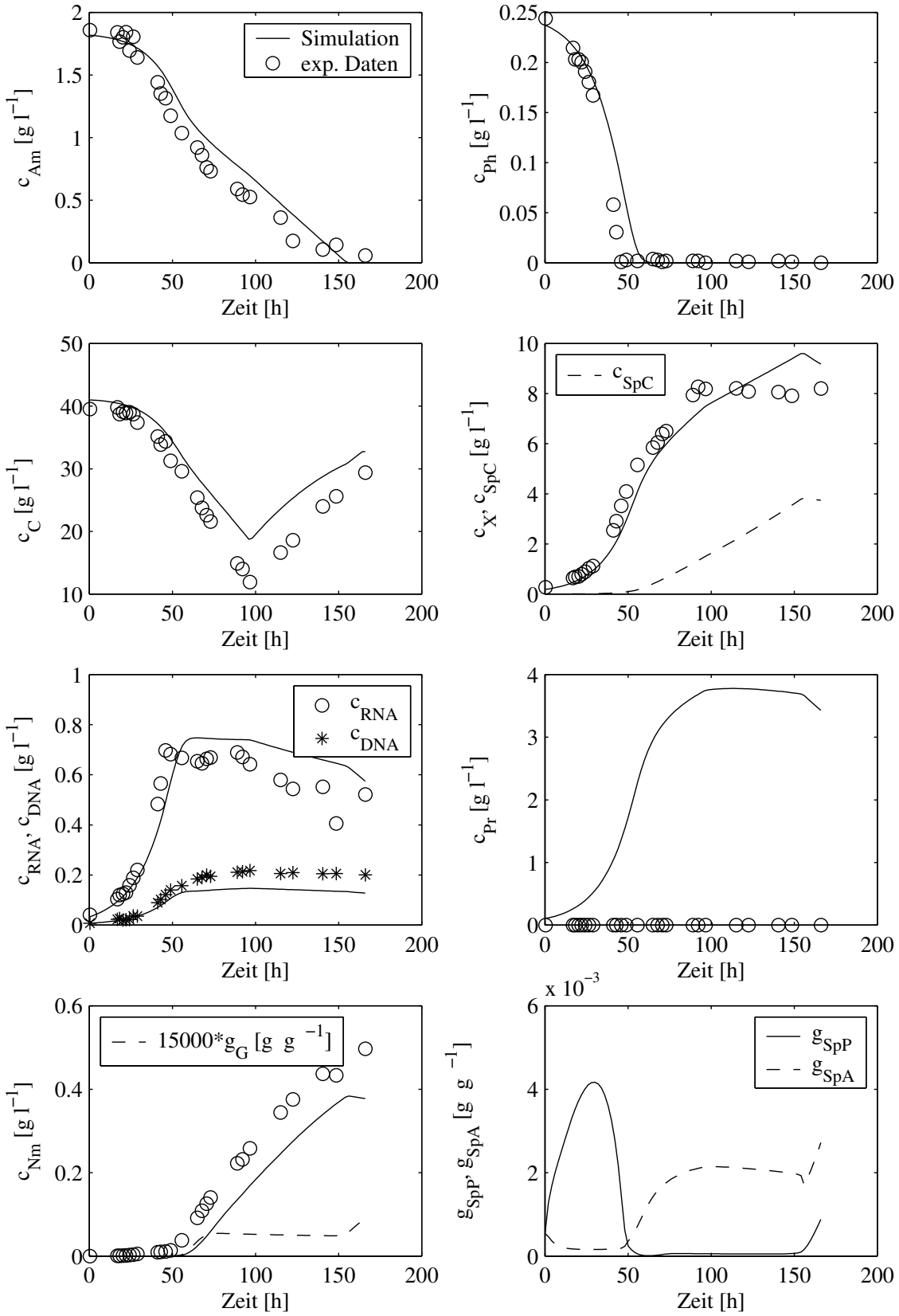

Abbildung 5.16: Vergleich von Simulation und experimentellen Daten der Fermentation G26 (Phosphatlimitation mit *S.tendae*) zur Modellvalidierung

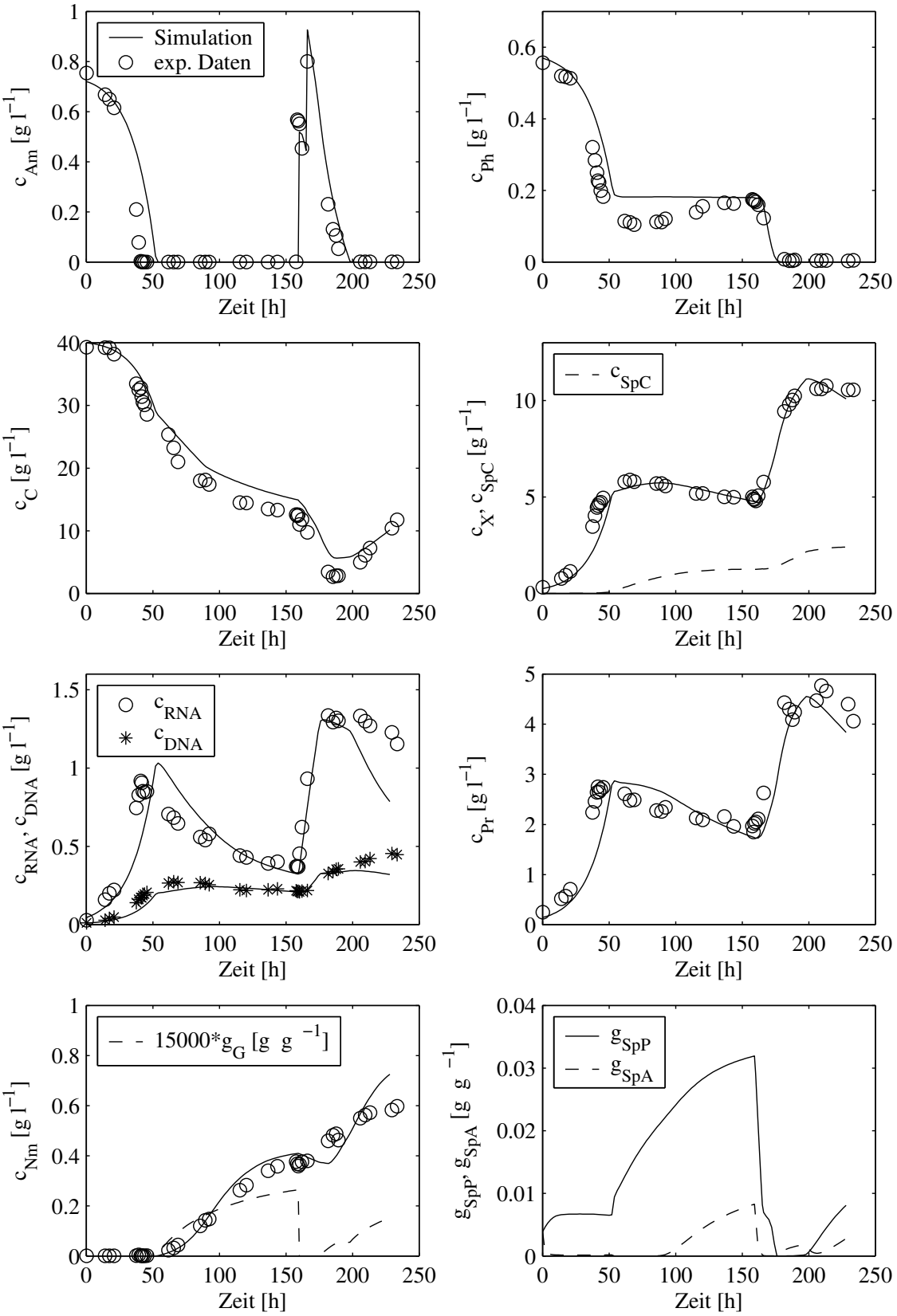

Abbildung 5.17: Vergleich von Simulation und experimentellen Daten der Fermentation G94 (Ammoniumlimitation mit Ammoniumpuls mit *S.tendae*) zur Modellvalidierung

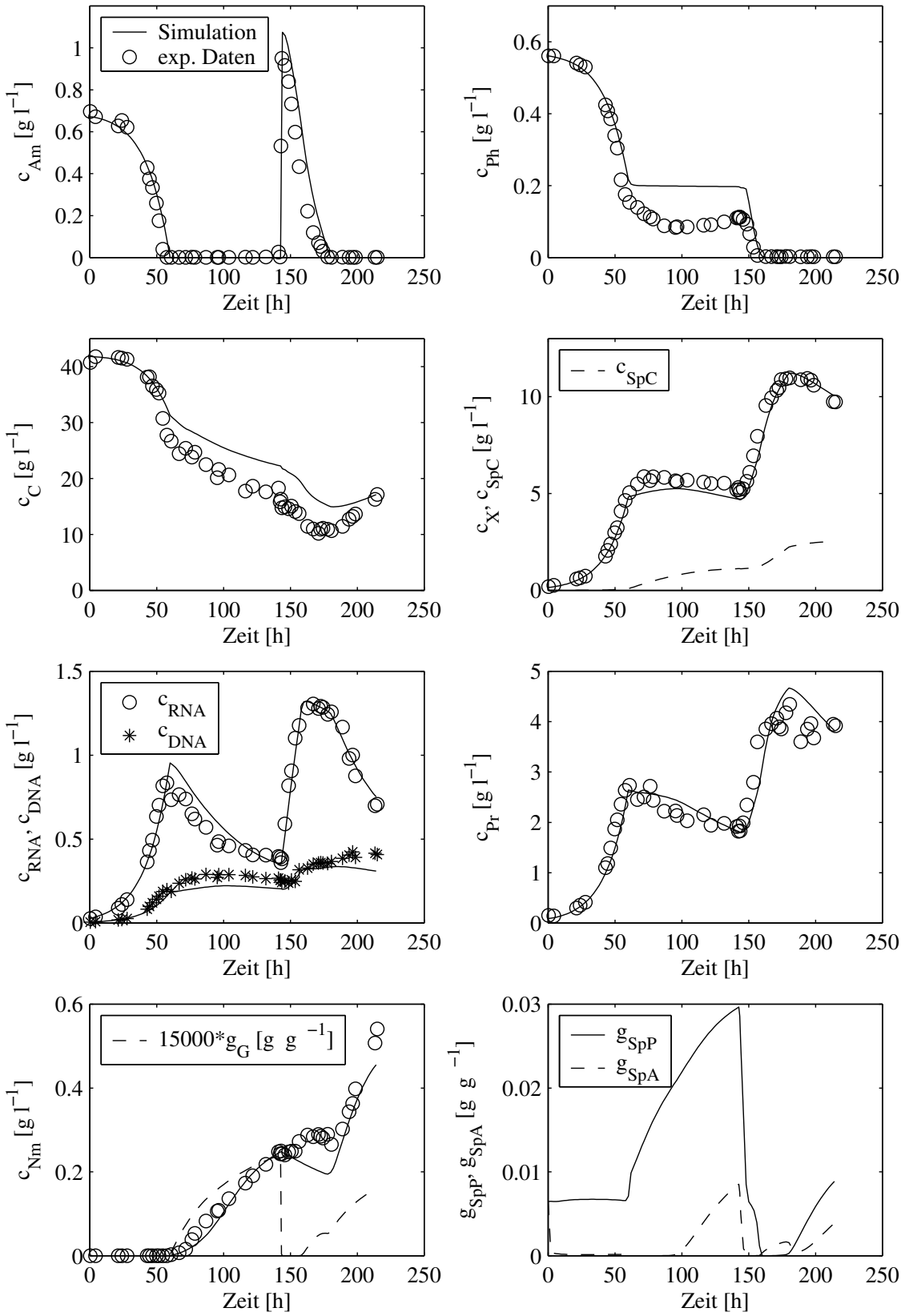

Abbildung 5.18: Vergleich von Simulation und experimentellen Daten der Fermentation G108 (Ammoniumlimitation mit Ammoniumpuls mit *S.tendae*) zur Modellvalidierung

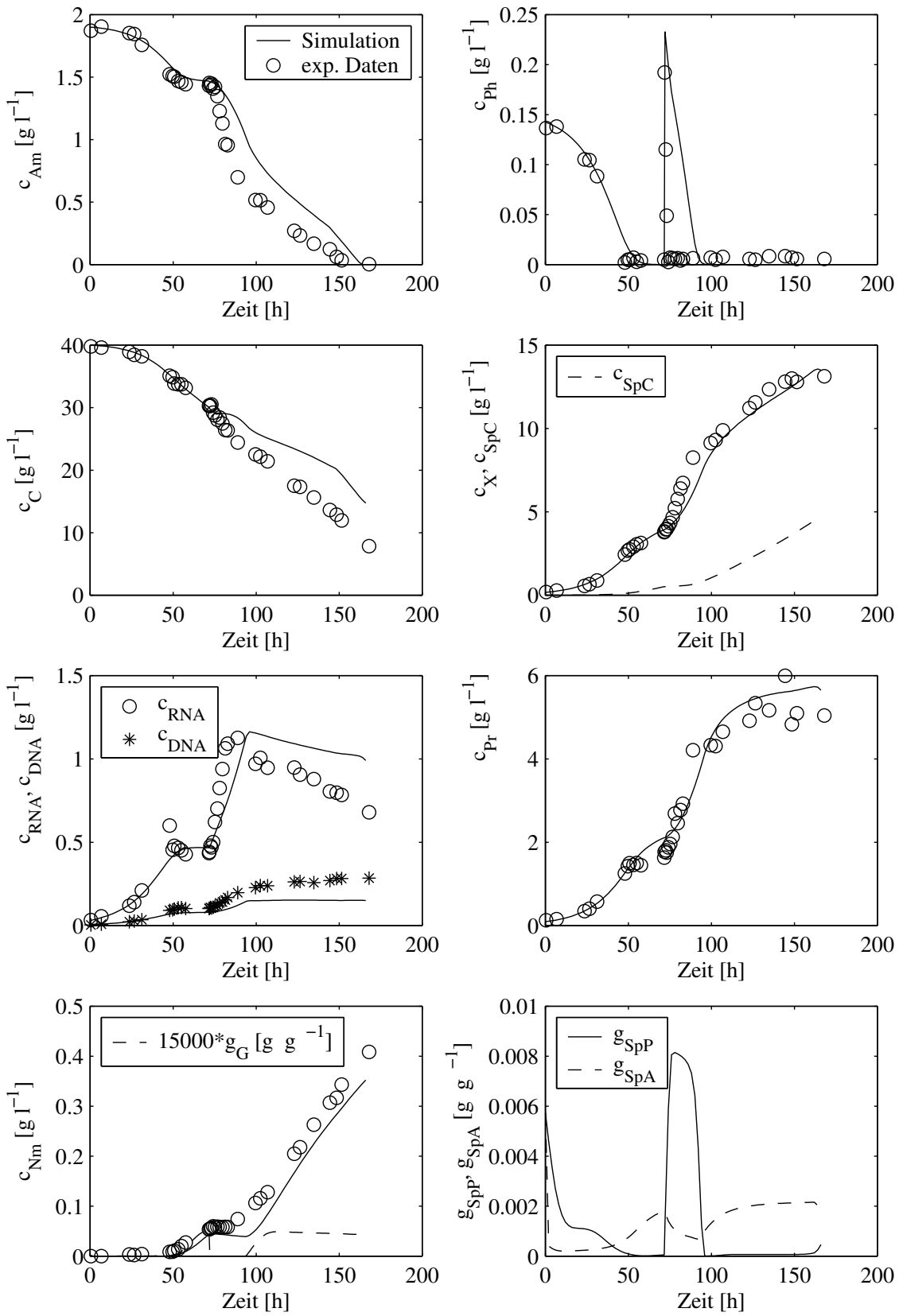

Abbildung 5.19: Vergleich von Simulation und experimentellen Daten der Fermentation G111 (Phosphatlimitation mit Phosphatpuls mit *S.tendae*) zur Modellvalidierung

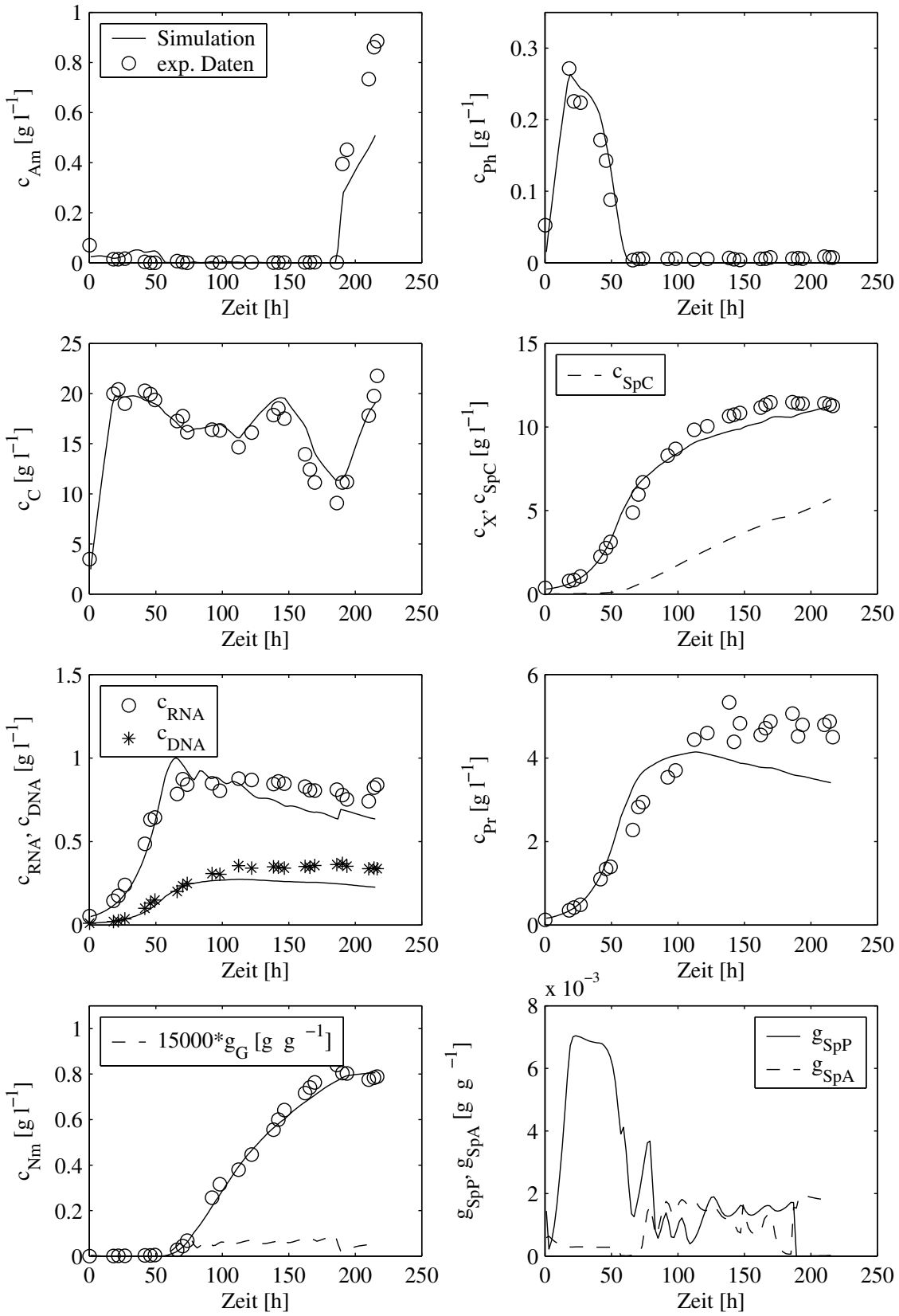

Abbildung 5.20: Vergleich von Simulation und experimentellen Daten der Fermentation G83 (Produktmaximierung mit *S. tendae*) zur Modellvalidierung

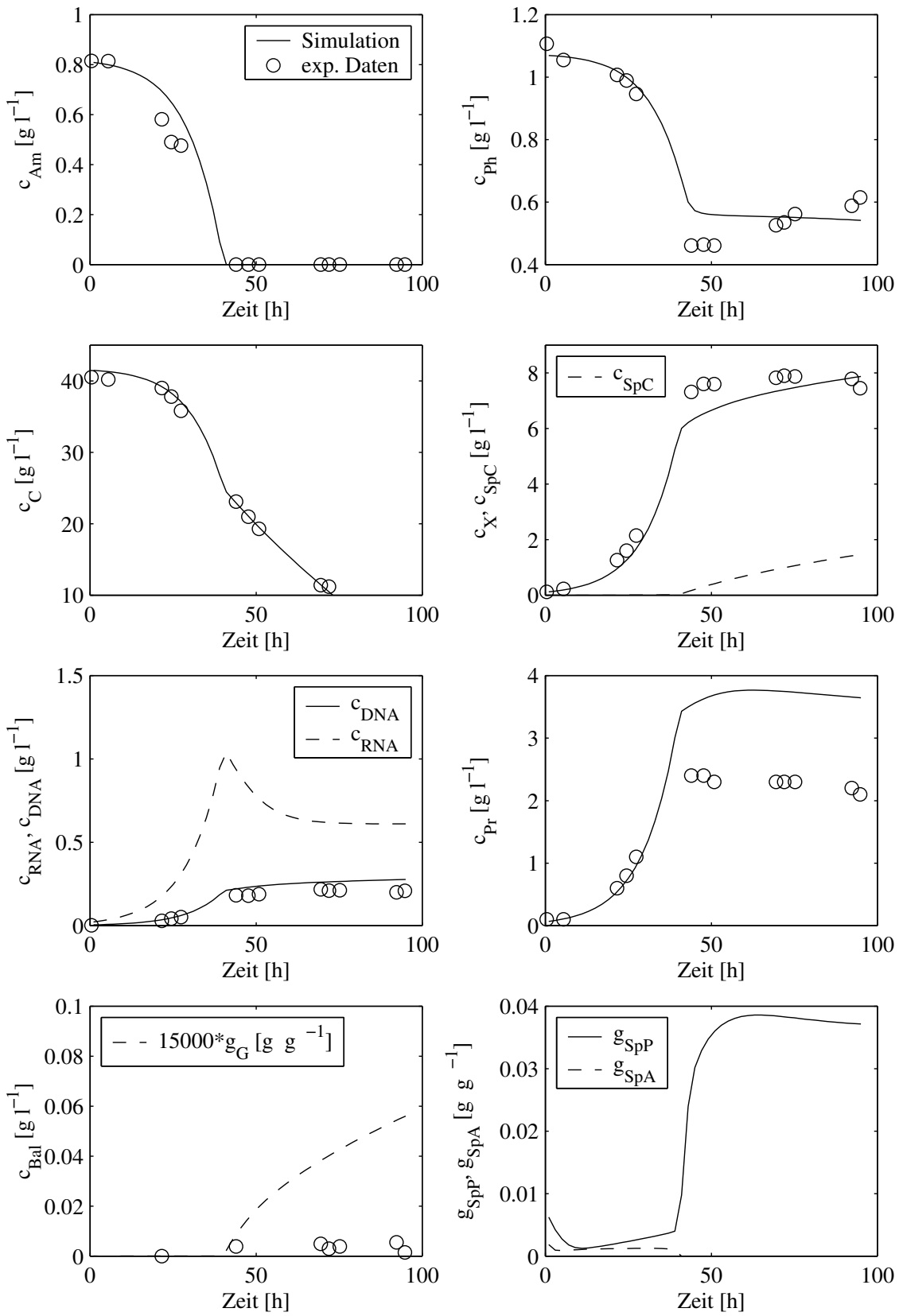

Abbildung 5.21: Vergleich von Simulation und experimentellen Daten der Fermentation M127 (Ammoniumlimitation mit *A. mediterranei*) zur Modellvalidierung

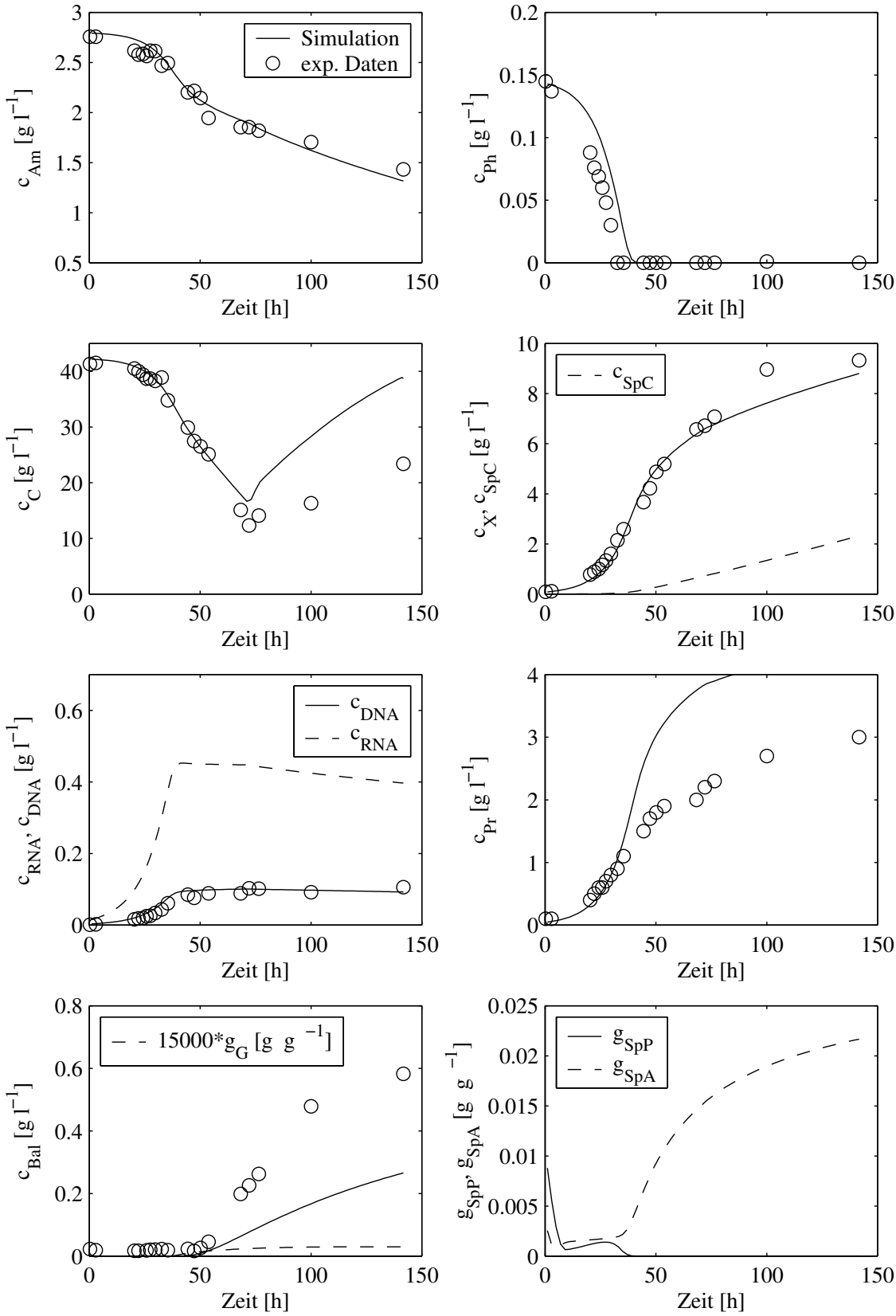

Abbildung 5.22: Vergleich von Simulation und experimentellen Daten der Fermentation M129 (Phosphatlimitation mit *A. mediterranei*) zur Modellvalidierung

Kapitel 6

Hybride Modellbildung

6.1 Einleitung

Quantitative Prozeßmodelle sind wünschenswert, um Prozesse auf einfache Weise zu optimieren. Die klassische mathematische Modellierung erweist sich bei komplexen Prozessen meist als schwierig, wenn nicht ausreichend Detailwissen über die Stoffwechselwege und deren Regulation bekannt ist oder dieses Detailwissen sich nur mit großem Aufwand in mathematische Gleichungen umsetzen läßt.

Da für die strukturierte Modellierung, welche auf der Kenntnis der physikalischen Zusammenhänge und benötigten Stoffwechselwege basiert, nicht immer ausreichend Information zur Verfügung steht, wurde zusätzlich die Möglichkeit der hybriden Modellierung untersucht. Dabei werden die nicht vollständig bekannten Kinetiken der Produktbildung durch neuronale Netze abgebildet.

Die Stoffbilanz stellt meist kein großes Problem dar. Schwieriger ist die Quantifizierung der erforderlichen Reaktionsraten. Meist werden formalkinetische Ansätze verwendet, welche aufgrund von vorhandenen Daten und Detailwissen ausgewählt und erstellt wurden. Diese werden dann durch den iterativen Prozeß der Parameteridentifikation (siehe auch Kapitel 7) noch verfeinert. Dieses Vorgehen wurde auch im vorherigen Kapitel dieser Arbeit zur Erstellung des mathematischen Modells für *S. tendae* und *A. mediterranei* angewendet.

Wenn ein Modell erstellt wird, um einen existierenden Prozeß zu optimieren, dient das Modell als Mittel zum Zweck der Optimierung. Der Aufwand zur Erstellung muß in einem günstigen Verhältnis zum Nutzen liegen. Daher wird bei der hybriden Modellierung vorhandenes Wissen in der vorliegenden Form integriert. Unterschiedliche Teilaspekte von Prozessen lassen sich oftmals mit verschiedenen Modellierungsmethoden darstellen, Transformationen in andere

Darstellungen führen in der Regel zu Verlusten. Die Synthese dieser Teilmodelle wird hybride Modellierung genannt [77].

In Abb. 6.1 sind mögliche Verkopplungen verschiedener Modelltypen zu einem hybriden Modell dargestellt. Wenn bei einem Prozeß konkretes Wissen über die Zusammenhänge zwischen den Prozeßvariablen fehlt, kann man Zusammenhänge zunächst experimentell ermitteln, um damit einfache Black–Box–Modelle zu erstellen.

Für den Einsatz von künstlichen neuronalen Netzen (KNN) im biotechnologischen Bereich gibt es bereits einige Beispiele [64, 67, 57, 77]. Die neuronalen Netze werden mit vorhandenen Prozeßdaten trainiert. Wichtig dabei ist eine ausreichende Menge an Datensätzen zum Training bereitzustellen, die das ganze Spektrum des Prozeßverlaufs abdecken, damit die Dynamik des Prozesses hinreichend gut beschrieben werden kann. Bei der Auswahl der Daten muß darauf geachtet werden, daß nicht stark fehlerbehaftete Messungen zum Training verwendet werden, um beim Training der Netze keine falschen Dynamiken anzulernen. Künstliche neuronale Netze allein als Alternative zu klassischen mathematischen Modellen einzusetzen, bringt keinen Vorteil. Vorgänge welche durch ein mathematisches Modell hinreichend genau beschrieben werden können, lassen sich durch neuronale Netze nicht besser oder genauer beschreiben. Damit würde man an Extrapolierbarkeit einbüßen und das Training der neuronalen Netze würde zu einem Mehraufwand führen. Künstliche neuronale Netze sind daher nur in den Fällen von Vorteil, wenn eine mathematische Modellierung noch nicht möglich oder wirtschaftlich nicht vertret-

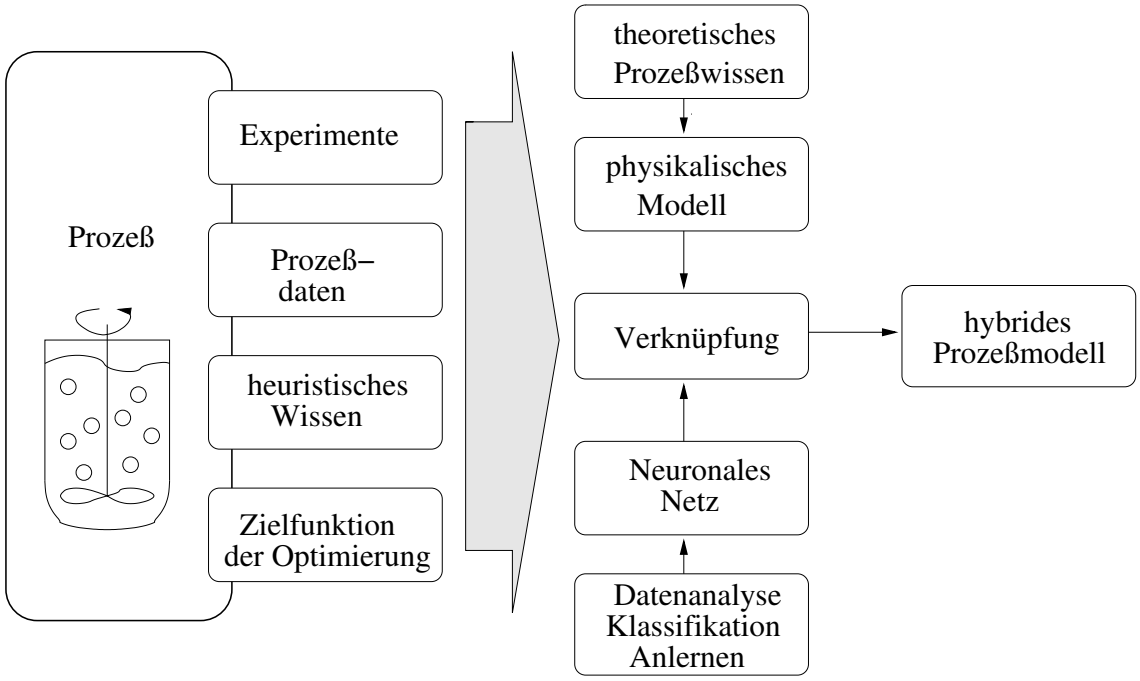

Abbildung 6.1: Elemente der hybriden Modellierung und ihre Verkopplung

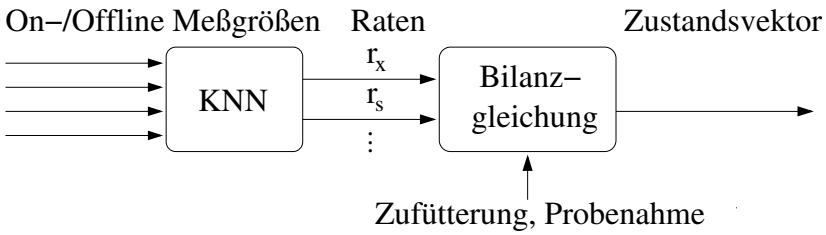

Abbildung 6.2: Hybride Modellstruktur zur Kombination gewöhnlicher Differentialgleichungen und künstlichen neuronalen Netz

bar ist. Mit einer Kombination der unterschiedlichen Modelltypen bei der hybriden Modellierung (siehe Abb. 6.1) kann man die Vorteile der einzelnen Modelltypen günstig nutzen, um die Zielfunktion des Prozesses zu verbessern. Bei der konkreten Anwendung kann man dabei drei Kombinationsmöglichkeiten unterscheiden.

Zunächst wird eine einfache Kombination von gewöhnlichen Differentialgleichungen und künstlichen neuronalen Netzen betrachtet. Dies bietet sich an, wenn die Ratenberechnung durch ein neuronales Netz erfolgen soll, die Bilanzgleichung aber weiterhin zur Modellierung verwendet wird. Damit werden also nur die im Modell berechneten Kinetiken durch die von dem neuronalen Netz berechneten Raten ersetzt. Das Hauptproblem hierbei ist eine geeignete Trainingsmethodik für das Netzwerk zu finden, da hinreichend genaue Daten für die Raten in der Regel nicht vorliegen. Beim Training ist es wichtig, zuerst das Netz mit den signifikanten Variablen zu trainieren, die den größten Einfluß auf die Zielgrößen besitzen. Erst wenn das Netz grundlegende Zusammenhänge erlernt hat, ist es sinnvoll, auf feinere Details zu trainieren. In Abb. 6.2 ist eine mögliche Kombination eines solchen Modells schematisch dargestellt. Die Eingänge für das KNN stellen dabei On– und Offline Meßgrößen dar. Die durch das KNN berechneten Wachstumsraten (r_X,r_S,...) werden dann für die Berechnung der einzelnen Zustandsgrößen durch die Bilanzgleichungen verwendet.

Die Darstellung der Kinetik mit Hilfe künstlicher neuronaler Netze führt zu Problemen, wenn die Modelle Bereiche des Zustandraumes beschreiben sollen, in denen keine Daten zum Training zur Verfügung stehen. Die Extrapolationsfähigkeit ist im Gegensatz zur Interpolationsfähigkeit von neuronalen Netzen sehr gering. In diesen Fällen muß die Möglichkeit bestehen, auf Alternativen zurückzugreifen, z.B. durch die simultane Verwendung klassischer kinetischer Modelle und neuronaler Netze. Die Ergebnisse von KNN und Kinetik werden dabei für bestimmte Punkte im Zustandsraum gewichtet. Um die Gewichtung vorzunehmen, kann man sich z.B. an der Menge und Qualität der Meßdaten orientieren, die zum Training des KNN verwendet wurden. Eine schematische Darstellung des Prinzips eines solchen hybriden Modells ist in Abb. 6.3 zu sehen [77].

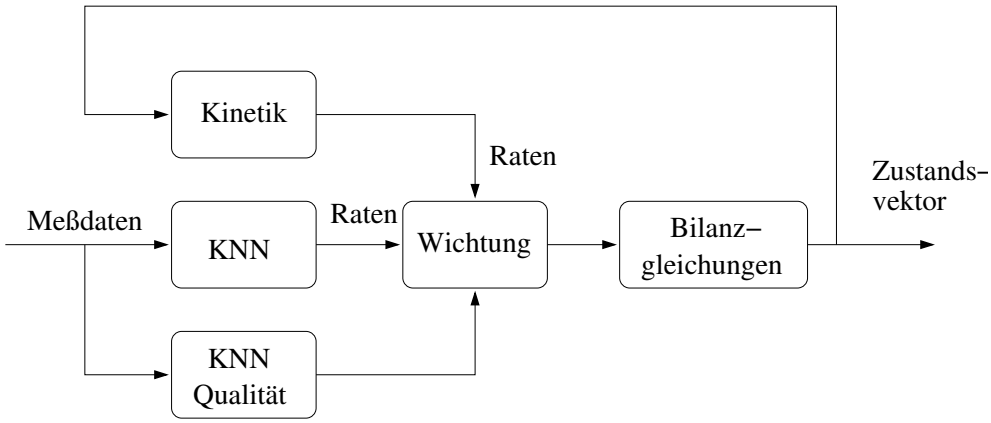

Abbildung 6.3: Hybride Modellstruktur zur simultanen Verwendung von kinetischen Ausdrücken und künstlichem neuronalen Netz (KNN)

Die Erweiterung der beiden schon genannten Kombinationen um Fuzzy–Systeme führt zu weiteren Möglichkeiten zur Realisierung hybrider Modellsysteme. Dabei wird es möglich, heuristisches Wissen, welches in Form von *Wenn...dann...* Regeln vorliegt, in die Modellierung zu integrieren. Dabei werden Fuzzy Variablen definiert (unscharfe Werte) und mit Fuzzy Logik ausgewertet. Ein Beispiel eines solchen Modellsystems ist in Abb. 6.4 dargestellt. Anwendung findet diese Art der Modellierung, wenn das Wissen über einen Prozeß nicht ausreicht, um ein physikalisch begründetes mathematisches Modell zu erstellen, das vorhandene Prozeßwissen aber in die Modellierung integriert werden soll.

Bei dem vorangegangen Kapitel der Modellbildung mit kinetischen Ansätzen wurde deutlich, daß die Modellierung der Produktbildung noch nicht vollständig aufgeklärt ist. Daher kann man keine vollständige, physikalisch begründete Modellierung in diesem Bereich vornehmen, sondern stützt sich bei der Modellierung auch auf formalkinetische Ansätze. Die Modellierung der

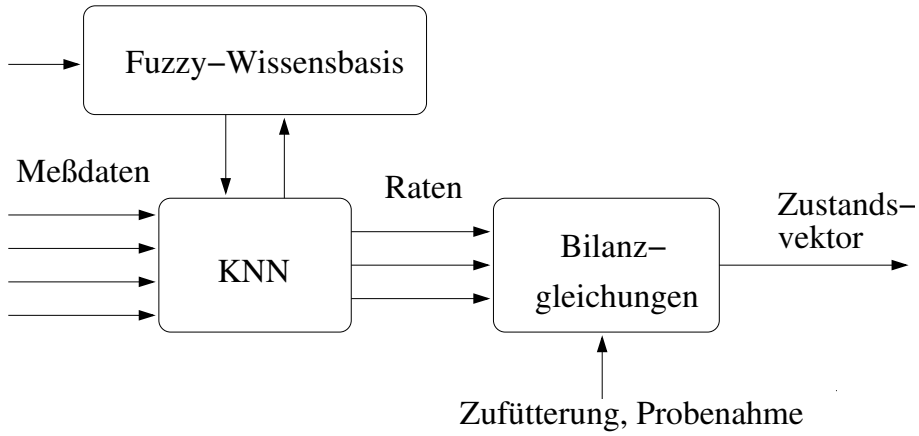

Abbildung 6.4: Hybride Modellstruktur mit Fuzzy–System

Produktbildung spielt in Bezug auf die Nutzung des Modells zur Optimierung der Produktbildung eine wichtige Rolle. Es stellt sich daher die Frage, ob man in diesem Fall nicht die Daten aus den vorhandenen Fermentationen zur Modellierung der Produktbildungsrate durch ein KNN nutzen kann. Da bei *S. tendae* die meisten Fermentationsdaten vorhanden sind, wurde für diesen Stamm ein Hybrides Modell nach dem Vorbild von Abb. 6.2 aufgestellt. Es soll dabei untersucht werden, ob es möglich ist, für diesen Fall die Produktbildungsrate durch ein neuronales Netz ausreichend genau zu modellieren. Die Vorgehensweise bei der Netzidentifikation wird im folgenden Abschnitt dargestellt.

6.2 Vorgehensweise

Das neuronale Netz zur Beschreibung der Produktbildung von *S. tendae* wurde mit Hilfe der in MATLAB zur Verfügung stehenden Toolbox für neuronale Netze entwickelt. Der erste Schritt war dabei die Auswahl und Aufarbeitung geeigneter Fermentationsdaten zur Identifikation des neuronalen Netzes. In diesem Zusammenhang wurden gleichzeitig auch Fermentationsdaten zur Validierung des neuronalen Netzes festgelegt. Da es bei der Identifikation wichtig ist, möglichst viele Fermentationsdaten zur Verfügung zu stellen, welche das gesamte Spektrum der Fermentationen abdecken, wurden hier mehr Daten verwendet als zur Parameteridentifikation des im vorherigen Kapitel vorgestellten strukturierten kinetischen Modells. Zusätzlich zu den in Tabelle 5.1 genannten Fermentationen wurden die Fermentationen G147 (Ammonium–Limitation), G3 (Phosphat–Limitation), G10 und G94 (Ammonium-Puls), G63, G84 und G131 (Produktmaximierung) verwendet. Eine Übersicht dieser zusätzlichen Fermentationen ist der Tabelle A.1 im Anhang A zu entnehmen. Damit standen 12 Fermentationen zur Netzidentifikation zur Verfügung. Zur Validierung wurden die gleichen Fermentationen wie bei der Validierung der Parameteridentifikation des strukturierten kinetischen Modells (siehe Tabelle 5.2) herangezogen, bis auf die Fermentation G94, welche in diesem Fall schon zur Netzidentifikation verwendet wurde.

Bevor die ausgewählten Fermentationsdaten zur Identifikation des neuronalen Netzes verwendet wurden, war es notwendig, eine Bereinigung der Daten vorzunehmen. Die Ausreißer der Eingangsdaten wurden wie bei der Identifikation des kinetischen Modells in Kapitel 7 eliminiert. Zusätzlich wurden die Daten, wie in Gleichung 3.2 aus Kapitel 3 angegeben, geglättet. Als Eingangsgrößen wurden vorwiegend Konzentrationen verwendet, es war deshalb nicht notwendig, eine zusätzliche Differenzierung dieser geglätteten Daten vorzunehmen. Pulsfermentationen wurden bei der Glättung gesondert behandelt, denn eine vollständige Glättung dieser Daten würde diese verfälschen. Ebenso wurde mit den spezifischen Produktbildungsraten, den Ausgangsdaten des Netzes, verfahren.

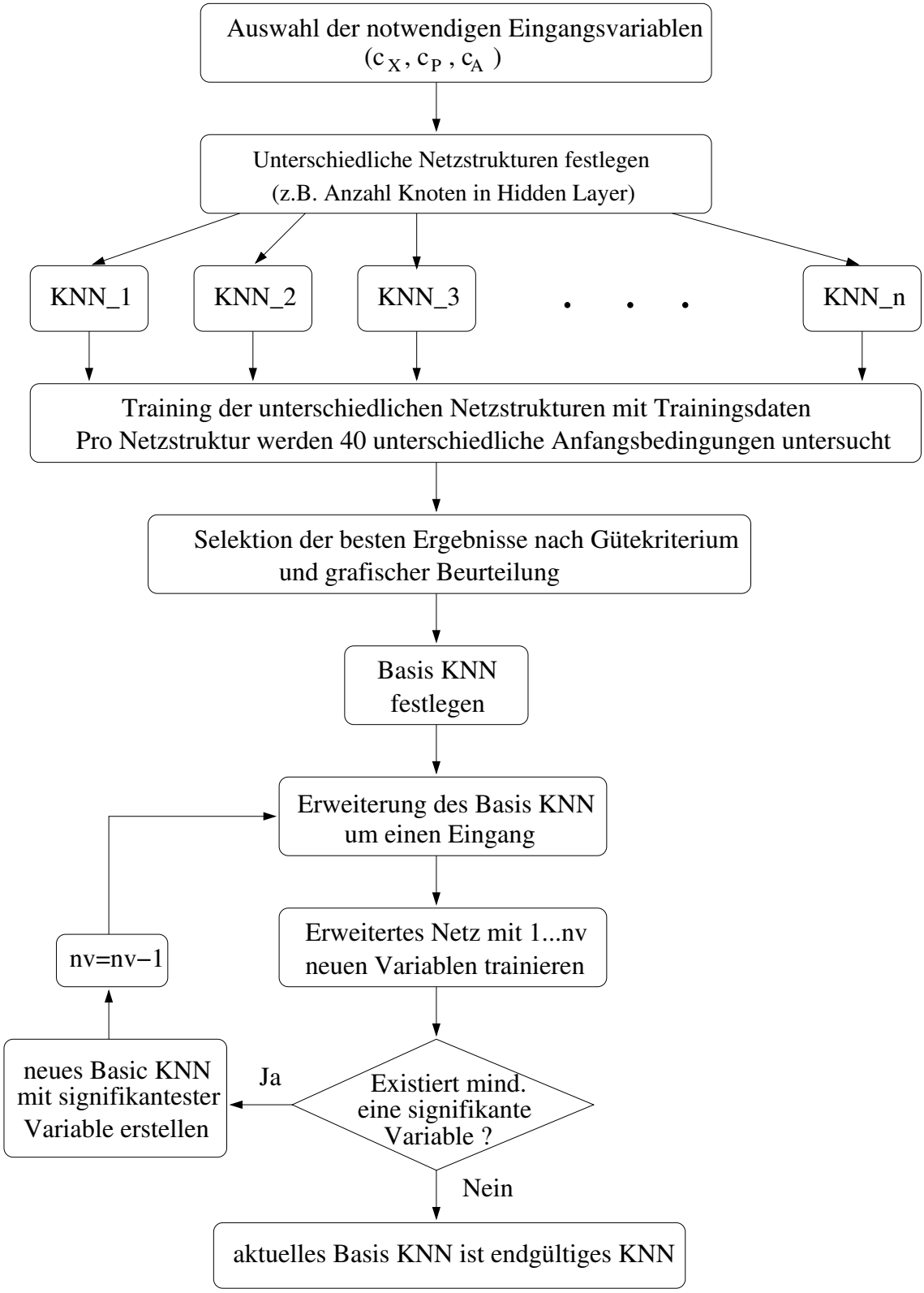

Abbildung 6.5: Vorgehensweise bei der Identifikation des neuronalen Netzes zur Modellierung der Produktbildung von *S. tendae*

Mit der Methode der Kreuzvalidierung [83] kann eine bessere Netzauswahl erfolgen. Dazu wird das sich ergebende Netz jeweils mit den Validierungsdaten getestet und daraufhin die Auswahl getroffen, welches Netz weiter zur Identifikation herangezogen werden soll. Dieser Ansatz wurde auch in dieser Arbeit verwendet.

Die allgemeine Vorgehensweise der Netzidentifikation ist in Abb. 6.5 dargestellt. Bei der Auswahl der Variablen bzw. der Eingangsgrößen, welche für das neuronale Netz verwendet werden, ist es wichtig, nicht alle zur Verfügung stehenden Eingangsgrößen zur Identifikation hinzuzuziehen, sondern mit einer Auswahl von notwendigen Signalen zu beginnen. Anschließend kann in weiteren Untersuchungen festgestellt werden, ob weitere Signale zusätzlich zur Identifikation herangezogen werden können. Eingangssignale die keinen großen Zusammenhang zu den Zielgrößen aufweisen, können keine weiteren Informationen für das Netz bereitstellen, dafür aber durchaus das Rauschen des entstehenden Modells beträchtlich erhöhen [77]. Dadurch stellt sich die Identifikation des passenden neuronalen Netzes als iterativer Prozeß dar, bei welchem die Eingangsgrößen des Netzes sukzessive bestimmt werden. Das neuronale Netz wird zunächst mit den wichtigsten Variablen (Eingangsgrößen) trainiert, welche dann die Struktur der Beziehungen dominant bestimmen. Erst wenn diese grundlegenden Zusammenhänge gelernt sind, werden Details durch zusätzliche Eingangsgrößen trainiert.

Im Allgemeinen werden bei hybriden Prozeßmodellen in der Biotechnologie die neuronalen Netze zur Modellierung spezifischer Bildungs– und Verbrauchsraten verwendet. Dabei handelt es sich um Netze mit einer Eingangsschicht, einer verdeckten Schicht (Hidden Layer) und einer Ausgangsschicht. Diese werden als vollständig verbundene Feed–Forward Netze eingesetzt. Die Anzahl der Knoten der Eingangsschicht entspricht dabei der Anzahl der Eingangsgrößen, ebenso wie die Anzahl der Knoten in der Ausgangsschicht der Anzahl der Ausgangsgrößen entspricht. Die Anzahl der Knoten in der verdeckten Schicht wird dabei unterschiedlich gewählt. Durch eine Anzahl von 10-15 Knoten in der verdeckten Schicht ist es möglich, die meisten in der Biotechnologie typischen funktionalen Zusammenhänge darzustellen [97]. Bei der Netzidentifikation zur Modellierung der Produktbildung von *S. tendae* wurde im ersten Schritt eine Untersuchung von Netzstrukturen mit verschieden großen versteckten Schichten durchgeführt, um damit eine passende Strukturbasis zu finden.

Als Basisstruktur wurde für *S. tendae* eine Eingangsschicht gewählt, die aus drei Knoten besteht, wobei als Basiseingangsvariablen die Konzentration der Biomasse c_X und der Substrate Ammonium und Phosphat c_{Am} und c_{Ph} ausgewählt wurden. Als zu modellierende Ausgangsgröße wurde nur die spezifische Produktbildungsrate gewählt. Dadurch ergibt sich die in Abb. 6.6 dargestellte Basisnetzstruktur.

Als Aktivierungsfunktion der einzelnen Knoten in den verschiedenen Schichten wurde die in

MATLAB zur Verfügung stehende Tan-Sigmoid Funktion ausgewählt, die in Abb. 6.6 dargestellt ist. Bei der Ausgangsschicht wurde dabei allerdings als Maximalwert 1.5 statt 1.0 und als Minimalwert 0.0 statt -1.0 ausgewählt, um eine Identifikation der spezifischen Produktbildungsrate im Bereich bis ca. 1.5 mg $g^{-1}h^{-1}$ zu ermöglichen.

Zur Bestimmung der optimalen Knotenanzahl in der verdeckten Schicht wurden Netze mit 5, 10, 15, 20 und 25 Knoten in dieser Schicht getestet. In der ersten Identifikationsphase wurden für jede Netzstruktur 40 Identifikationen basierend auf zufällig gewählten Anfangswerten der Gewichtungsmatrizen durchgeführt. Dafür wurde die in MATLAB zur Verfügung gestellte Funktion für eine zufällige Anfangsinitialisierung verwendet. Diese Anfangsnetze wurden anschließend innerhalb von 2400 Trainingsschritten identifiziert.

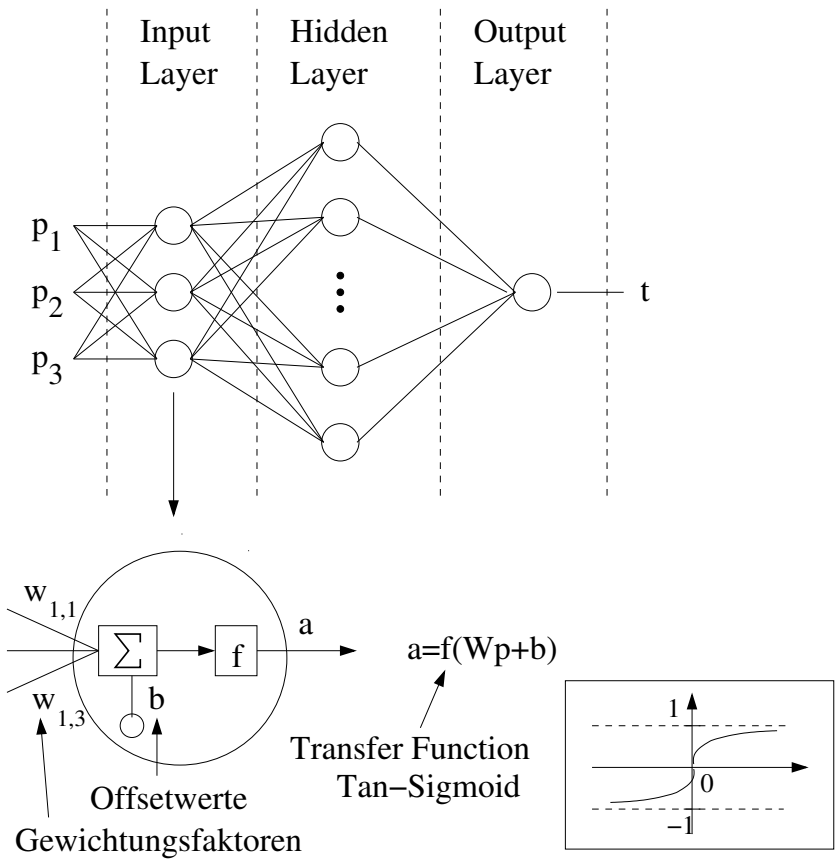

Abbildung 6.6: Struktur des neuronalen Netzes

Während des Trainings werden die Gewichtungsfaktoren und die Offsetvektoren iterativ angepaßt, um den mittleren quadratischen Fehler zwischen der Ausgangsgröße des Netzwerks und den Trainingsdaten zu minimieren. Bei der einfachsten Implementierung des Lernens werden die Gewichtungsfaktoren und die Offsetwerte in der Richtung geändert, in der die größte Abnahme des Gütekriteriums (mittlerer quadratischer Fehler zwischen Trainingsausgangsdaten und Netzausgangsdaten) auftritt. Damit ergibt sich der Iterationsalgorithmus wie folgt:

$$x_{k+1} = x_k - \alpha_k g_k \tag{6.1}$$

Dabei stellt x_k den Vektor der aktuellen Gewichtungsfaktoren und Offsetwerte dar, g_k den aktuellen Gradienten und α_k die Lernrate. Bei einer Suche entlang des negativen konjugierten Gradienten erhält man in der Regel schnellere Konvergenzergebnisse, als bei einer Suche entlang des größten negativen Gradienten. Daher wurde zum Training eine konjugierte Gradienten–Methode eingesetzt. Dafür wurde der in MATLAB zur Verfügung stehende Trainingsalgorithmus *trainlm* angewendet. Hierbei wird x_{k+1} für einen Lernschritt mit Hilfe der Hesse–Matrix H_k ermittelt. Damit ergibt sich für die Gleichung zur Berechnung der neuen Gewichtungsfaktoren und Offsetwerte:

$$x_{k+1} = x_k - H_k^{-1} g_k \tag{6.2}$$

Da die Berechnung der Hesse-Matrix sehr zeitintensiv ist, wird die Hesse–Matrix bei dem verwendeten Levenberg–Marquardt Algorithmus *trainlm* approximiert. Diese Approximation durch die Jakobi–Matrix J,

$$H = J^T J \tag{6.3}$$

ist gültig, wenn das Gütekriterium aus einer Summe von Quadraten gebildet wird, was im Falle von Feed–Forward–Netzen immer gegeben ist. Der Gradient berechnet sich in diesem Fall durch

$$g = J^T e. \tag{6.4}$$

Die Jakobi–Matrix setzt sich aus den ersten Ableitungen der Netzwerkfehler zusammen und e stellt den Vektor der Netzwerkfehler dar. Es ergibt sich damit zur Berechnung der neuen Gewichtungsfaktoren und Offsetwerte folgende Gleichung:

$$x_{k+1} = x_k - \left[J^T J + \mu I^{-1}\right] J^T e \tag{6.5}$$

Der daraus resultierende Lernalgorithmus *trainlm* hat sich im Vergleich mit anderen Lernalgorithmen der neuronalen Netze Toolbox von MATLAB als sehr effizient erwiesen und wurde deshalb in dieser Arbeit zum Training der Netze verwendet.

Die Auswahl eines Netzes mit der geeigneten Anzahl von Knoten in der verdeckten Schicht erfolgt anschließend auf Grundlage der Ergebnisse des Gütekriteriums mit den Validierungsdaten

(Kreuzvalidierung) und dem graphischen Vergleich von Netzausgangsdaten und Ausgangsdaten des Validierungsdatensatzes. Damit liegt dann die Basisnetzstruktur des neuronalen Netzes fest.

Die Erweiterung erfolgt danach sukzessive, indem dieses Basisnetz um einen Eingangsknoten in der Eingangsschicht erweitert wird. Damit kann eine zusätzliche Eingangsgröße zum Training der Netzes herangezogen werden. Bei der Erweiterung des Basisnetzes werden die Gewichtungsfaktoren und Offsetwerte des Ergebnisnetzes beibehalten. Die durch den weiteren Knoten hinzukommenden Werte werden auf einen geringen Startwert (0.001) gesetzt, um möglichst nahe am ausgewählten Basisnetz zu sein. Für jede zusätzliche Eingangsgröße wird ausgehend vom Basisnetz eine Netzidentifikation mit der erweiterten Struktur durchgeführt. Alle Netze starten in diesem Fall mit den gleichen Gewichtungsfaktoren und Offsetwerten. Für jedes erweiterte Netz wird wie schon im Vorversuch mit 2400 Trainingsschritten gearbeitet. Anschließend werden die Ergebnisse der Gütekriterien (Trainings– und Testdaten) miteinander verglichen. Es wird jeweils die Eingangsgröße mit der größten Verbesserung des Gütekriteriums ausgewählt. Ergebnis ist ein erweitertes Basisnetz, das wiederum erweitert werden kann, wenn noch Eingangsgrößen vorliegen, die noch eine signifikante Verbesserung der Identifikation versprechen. Erst wenn keine Eingangssignale mit signifikantem Einfluß mehr vorliegen, ist die Netzidentifikation abgeschlossen.

6.3 Ergebnisse

Die Ergebnisse der Netzidentifikation sind in Tabelle 6.1 dargestellt. Dort ist das nach 2400 Lernschritten minimale, maximale und durchschnittlich erreichte Gütekriterium für die 40 zufällig gewählten Anfangsnetze berechnet. Dieses Gütekriterium wurde für den Trainingsdatensatz und für den Testdatensatz ermittelt. Es ist deutlich sichtbar, daß mit steigender Knotenzahl in der verdeckten Schicht eine bessere Identifikation auf Basis der Trainingsdaten erfolgen kann. Eine Simulation der Netze mit dem Testdatensatz zeigt aber, daß die bessere Anpassung an den Trainingsdatensatz mit einer schlechteren Anpassung an den Testdatensatz erkauft wird. Deshalb ist es nicht sinnvoll, eine zu hohe Knotenanzahl zu wählen. Zur Untersuchung der Netzidentifikation wurde im weiteren Schritt von allen vier untersuchten Kategorien (5,10,15 und 20 Knoten) das jeweils beste Ergebnis für die Testdaten ausgewählt und damit die zweite Stufe der Identifikation durchgeführt.

In der zweiten Stufe der Identifikation wurden als neue Eingangsgrößen die Glucosekonzentration in [g l^{-1}], die Laugenzugabe, die Ammoniumzugabe und die Phosphatzugabe in [g $l^{-1}h^{-1}$] getestet. Die Netzerweiterungen und zugehörigen Identifikationen wurden dann basierend auf den vier besten Ergebnissen des ersten Schritts durchgeführt.

Anzahl Knoten Hidden Layer	Gütekriterium Trainingsdaten			Gütekriterium Testdaten		
	Min	Max	Durchschnitt	Min	Max	Durchschnitt
5	0,0397	0,0705	0,0592	0,0841	0,1657	0,1149
10	0,0321	0,0915	0,0484	0,1025	0,2089	0,1451
15	0,0184	0,0566	0,0369	0,1246	0,2448	0,1640
20	0,0151	0,0609	0,0329	0,1246	0,2884	0,1804

Tabelle 6.1: Gütekriterium nach erster Netzidentifikation des Basisnetzes mit Trainingsdatenset und Testdatenset bei 5,10,15 und 20 Knoten in der verdeckten Schicht

Die Ergebnisse des zweiten Identifikationsschritts sind in Tabelle 6.2 dargestellt. Dafür wurde das sich ergebende Gütekriterium für den Trainings– und Testdatensatz nach diesem Identifikationsschritt berechnet. Damit läßt sich die prozentuale Veränderung der Identifikation im Vergleich zum Basisnetz aus der ersten Stufe berechnen. Diese prozentuale Veränderung ist für den Testdatensatz in der Tabelle 6.2 angegeben. Die in Abb. 6.5 dargestellte Vorgehensweise bei der Netzidentifikation schreibt vor, daß anhand dieses Ergebnisses entschieden wird, ob es sich bei den getesteten Signalen zur Netzerweiterung um signifikante Signale (d.h. Veränderung $> +5\%$ [97]) handelt. Die Ergebnisse zeigen in diesem Fall, daß bei keinem der gewählten Eingangssignale eine signifikante positive Veränderung erreicht wird. Damit ist keine weitere Netzerweiterung mit einer der getesteten Eingangsgrößen sinnvoll. Das deutet darauf hin, daß der Einfluß der getesteten Größen auf die Produktbildung zu vernachlässigen ist. Dies kann aber auch daran liegen, daß sich der Einfluß mancher Eingangsgrößen nur bei einem Teil der Fermentationen auswirkt und sich diese Wirkung nicht über den gesamten Fermentationszeitraum erstreckt. Damit ist es sehr schwer, mit Hilfe der eingeschränkten Meßdaten diese Abhängigkeit festzustellen. Ein neuronales Netz benötigt für jedes weitere Eingangssignal eine Reihe von Fermentationen, in welchen diese Verkopplung auftritt. Anhand nur einer Fermentation ist es nahezu unmöglich herauszufiltern, ob eine Eingangsgröße tatsächlich einen Einfluß hat. Daher kann die geringe Anzahl von Trainingsdaten (12 Fermentationen) mit ein Grund für das Ergebnis des zweiten Identifikationsschritts sein. Insgesamt liegen für den Stamm *S. tendae* noch eine größere Anzahl von Fermentationen vor, die Auswahl der Trainingsdaten sollte aber nicht alle vorhandenen Daten umfassen, da auch noch Daten zur Validierung benötigt werden. Des weiteren sollen möglichst typische Fermentationen ausgewählt werden, um ein unnötiges Rauschen der Meßdaten zu verhindern, denn dies würde eine Identifikation des neuronalen Netzes erschweren.

Als Ergebnis der Netzidentifikation bleiben damit die Ergebnisse aus der ersten Stufe der Identifikation erhalten. Die Untersuchung der unterschiedlichen Netzstrukturen innerhalb der ersten Identifikationsstufe ergab mit steigender Knotenanzahl in der verdeckten Schicht eine Verbesserung der Anpassung der Trainingsdaten, welche aber mit einer Verschlechterung der Anpassung der Testdaten einherging. Daher ist es sinnvoll, eine mittlere Knotenzahl im Hidden Layer zu wählen. Hierbei zeigen sich die Ergebnisse der Knotenanzahl von 10 als guter Kompromiß. Die Ergebnisse einer Simulation der Produktbildungsraten für den Trainings- und den Testdatensatz eines solchen Netzes sind in den Abb. 6.7 und 6.8 dargestellt. Das Ergebnis zeigt, daß die Trainingsdaten deutlich besser abgebildet werden konnten als die Testdaten. Es zeigt sich auch, daß in diesem Fall zu wenig Trainingsdaten zur Verfügung stehen, um eine ausreichend genaue Darstellung der Testdaten zu erreichen. Des weiteren deutet dies auf die schlechte Extrapolierbarkeit von Modellen mit neuronalen Netzen hin. Nach einer Optimierung ergeben sich meist neue Fermentationsbedingungen, welche durch dieses Modell aber nicht ausreichend korrekt extrapoliert werden können. Damit eignet sich ein solches hybrides Modell nur eingeschränkt als Basis für eine Optimierung. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

Knoten	Daten	Basis	Gluc.	Lauge	Am.–feed	Pho.–feed
5	Gütekriterium Training	0,0487	0,04507	0,03918	0,03607	0,04048
	Gütekriterium Test	0,0895	0,08961	0,08949	0,08949	0,08949
	Veränderung in % Test	–	-0,12	-0,01	-0,01	-0,01
10	Gütekriterium Training	0,0368	0,02528	0,03318	0,03123	0,03511
	Gütekriterium Test	0,115	0,11424	0,115	0,115	0,115
	Veränderung in % Test	–	+0,66	0,0	0,0	0,0
15	Gütekriterium Training	0,0372	0,02415	0,0263	0,02328	0,02544
	Gütekriterium Test	0,1082	0,12383	0,1083	0,10821	0,1082
	Veränderung in Test	–	-14,44	-0,1	-0,01	0,0
20	Gütekriterium Training	0,0217	0,00986	0,01071	0,01287	0,01754
	Gütekriterium Test	0,1283	0,19784	0,12843	0,12833	0,12829
	Veränderung in % Test	–	-54,2	-0,1	-0,02	-0,01

Tabelle 6.2: Gütekriterium nach erster erweiterter Netzidentifikation für die unterschiedlichen zusätzlichen Eingangsgrößen des Basisnetzes mit Trainings- und Testdatensatz

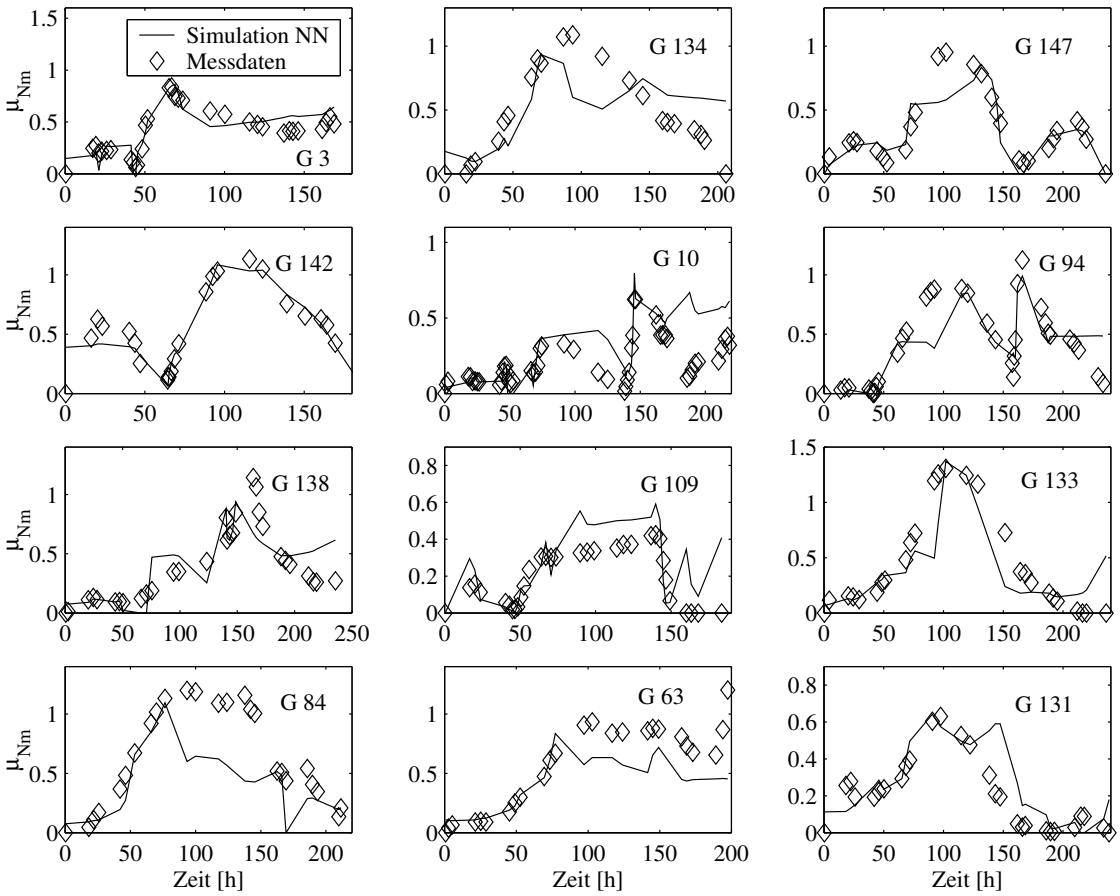

Abbildung 6.7: Ergebnis der Simulation der Produktbildungsrate des finalen Netzes (10 Knoten) im Vergleich mit den Meßwerten für den Trainingsdatensatz

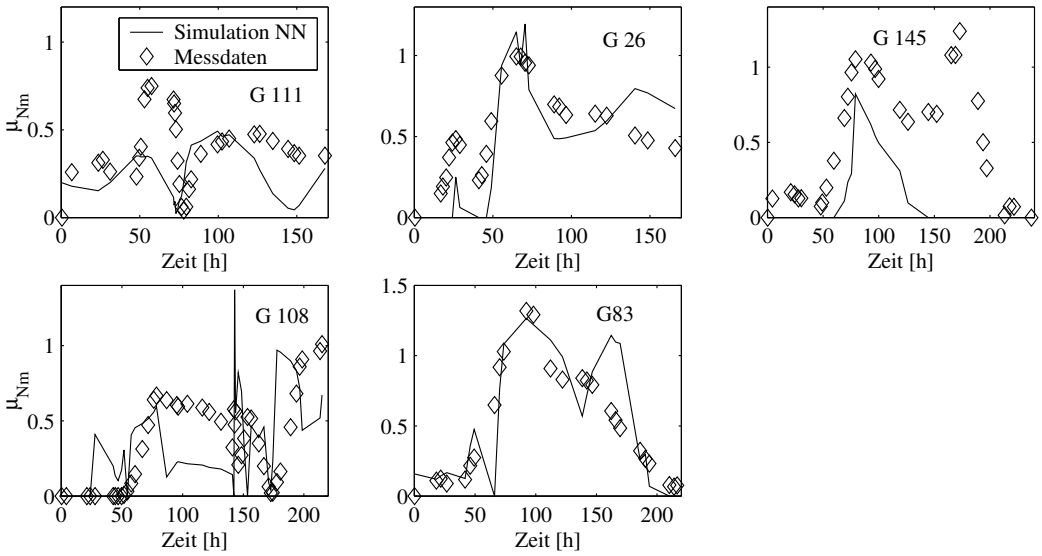

Abbildung 6.8: Ergebnis der Simulation der Produktbildungsrate des finalen Netzes (10 Knoten) im Vergleich mit den Meßwerten für den Testdatensatz

Kapitel 7

Parameteridentifikation

Bei der Modellierung eines dynamischen Prozesses ist die Parameteridentifikation ein wichtiger Schritt, um noch unbekannte Modellparameter zu bestimmen. Dabei ist das Ziel, die Parameter möglichst so zu bestimmen, daß die Ergebnisse der Simulation des mathematischen Modells möglichst genau mit den experimentell ermittelten Meßdaten zusammenpassen. Dies stellt in der Biotechnologie ein meist nichttriviales Problem dar, da die hier verwendeten Modelle oft nichtlinear sind. Ein Problem ist dabei auch die Meßgenauigkeit der Daten. Hinzu kommt, daß nicht alle gewünschten bzw. modellierten Größen aufgrund mangelnder Meßverfahren gemessen werden können. Bei einem komplexen Modell können meist nicht alle Parameter gleichzeitig angepaßt werden. Auch lassen sich manche Parameter nur bei bestimmten Fermentationsverläufen anpassen. Deshalb ist vor der Identifikation eine Parameteranalyse sinnvoll. Auf Grundlage der Fisher–Informationsmatrix kann eine solche Sensitivitätsanalyse der Parameter durchgeführt werden. Das Parameterschätzproblem und die Sensitivitätsanalyse sind dazu im folgenden beschrieben.

7.1 Parameterschätzproblem

Nichtlineare, dynamische Prozeßmodelle können allgemein durch folgende Gleichungen beschrieben werden:

$$\begin{aligned} \dot{\mathbf{x}} &= \mathbf{f}(\mathbf{x}, \mathbf{u}, \mathbf{p}, t), \quad \mathbf{x}(t_0) = \mathbf{x}_0, \\ \mathbf{y}(t_i) &= \mathbf{g}(\mathbf{x}(\mathbf{u}, \mathbf{p}, \mathbf{x}_0, t_i), \mathbf{x}, t_i). \end{aligned} \tag{7.1}$$

Bei dieser Beschreibung stellt $\mathbf{x} \in I\!R^n$ den Vektor der Systemzustände, $\mathbf{u} \in I\!R^q$ den Eingangsgrößenvektor und $\mathbf{p} \in I\!R^{n_p}$ den zu ermittelnden Parametervektor dar. Der Vektor $\mathbf{y} \in I\!R^m$ beschreibt die Ausgangsgrößen, welche zu den diskreten Zeitpunkten t_i gemessen wurden.

Berücksichtigt man, daß die gemessenen Ausgangsgrößen mit einer Störung überlagert sind, ergibt sich :

$$\mathbf{y}^M(t_i) = \mathbf{y}(t_i) + \mathbf{w}(t_i), \qquad i = 1, ..., N \tag{7.2}$$

mit der Voraussetzung, daß es sich bei der Störung um einen mittelwertfreien, weißen Rauschprozeß handelt:

$$E[\mathbf{w}(t_i)] = 0 \qquad i = 1, ..., N \tag{7.3}$$

$$E[\mathbf{w}(t_i)\mathbf{w}^T(t_j)] = \delta_{ij} \cdot \mathbf{C}(t_i), \quad i, j = 1, ..., N \tag{7.4}$$

Dabei stellt **C** die Kovarianzmatrix des Meßfehlers dar. Unter der Annahme, daß die Meßfehler unterschiedlicher Meßgrößen nicht korrelieren, ergibt sich **C** als Diagonalmatrix.

Um die unbekannten Parameter des Modells zu bestimmen, betrachtet man den Fehler **e**, der die Differenz zwischen den Ausgangsgrößen des Modells und den Meßwerten $\mathbf{y}^M$ an den diskreten Zeitpunkten t_i darstellt:

$$\mathbf{e}_i = \mathbf{e}(\mathbf{u}, \mathbf{p}, \mathbf{x}_0, t_i) = \mathbf{y}(\mathbf{u}, \mathbf{p}, \mathbf{x}_0, t_i) - \mathbf{y}^M(t_i). \tag{7.5}$$

Das Ziel des Identifikationsalgorithmus ist es einen Parametersatz $\hat{\mathbf{p}}$ zu finden, welcher das Identifikationsfunktional

$$J(\hat{\mathbf{p}}) = \sum_{i=1}^{N} \mathbf{e_i}^T \mathbf{Q_i} \mathbf{e_i} \qquad \mathbf{Q_i} \geq 0 \tag{7.6}$$

minimiert, wobei die Gewichtungsmatrix $\mathbf{Q_i}$ die inverse Kovarianzmatrix des Meßfehlers darstellt [55].

Zur Lösung dieses Minimierungsproblems können verschiedene numerische Optimierungsmethoden eingesetzt werden. Im vorliegenden Fall wurden zur Lösung die beiden SQP-Optimierungsalgorithmen E04UPF und E04UCF aus der NAG-Library [68] und die Evolutionsstrategie EVA [88] eingesetzt.

7.2 Sensitivitätsanalyse

Eine Möglichkeit, Informationen über die Genauigkeit der Parameterschätzung und die Identifizierbarkeit der Parameter zu erhalten, stellt die Fisher–Informationsmatrix **F** dar [84]. Diese Matrix kann wie folgt berechnet werden [59]:

$$\mathbf{F}(\mathbf{p}) = \sum_{i=1}^{N} \left(\frac{\partial \mathbf{y}(t_i)}{\partial \mathbf{p}} \right)^T \mathbf{C}^{-1}(t_i) \left(\frac{\partial \mathbf{y}(t_i)}{\partial \mathbf{p}} \right). \tag{7.7}$$

Die partiellen Ableitungen stehen dabei für die Sensitivitäten der Ausgänge bezüglich der Parameter. Nach dem Satz von Cramér-Rao stellt die Inverse der Fisher–Informationsmatrix $\mathbf{F}^{-1}$ am optimalen Punkt $\mathbf{p}^*$ eine untere Schranke für die Parameterschätzfehler–Kovarianzmatrix $\mathbf{S}$ dar

$$\mathbf{S}(\mathbf{p}^*) \geq \mathbf{F}^{-1}(\mathbf{p}^*). \tag{7.8}$$

Die normierte Streuung γ_i jedes Parameters p_i, $i = 1, 2, ..., m$ des Parametervektors $\mathbf{p}$ ist definiert als:

$$\gamma_i = \frac{\sqrt{\sigma_{ii_p}}}{p_i} \qquad i = 1, ...m, \tag{7.9}$$

mit den Elementen σ_{ii_p} der Hauptdiagonalen aus der Parameterschätzfehler–Kovarianzmatrix $\mathbf{S}$. Ziel der Parameteranalyse ist es, einen Satz von Parametern des Modells zu erhalten, der mit dem anschließenden Schätzverfahren mit einer vorgegebenen Streuung γ_r geschätzt werden kann. Die Wahl der Schranke γ_r hängt dabei von der Genauigkeit der zur Verfügung stehenden Meßdaten und den Anforderungen an das mathematische Modell ab. Um in Gl. 7.9 die Parameterabhängigkeit zu eliminieren, rechnet man mit der skalierten Form der Fisher–Informationsmatrix:

$$\bar{\mathbf{F}} = \Lambda_A \cdot \mathbf{F} \cdot \Lambda_A, \quad \bar{\mathbf{F}}^{-1} = \Lambda_A^{-1} \cdot \mathbf{F}^{-1} \cdot \Lambda_A^{-1}. \tag{7.10}$$

Damit ergibt sich die Beziehung zwischen den Eigenwerten λ_i der Fischer–Informationsmatrix und der Streuung der Parameter zu:

$$\gamma_i = \sqrt{\frac{1}{\lambda_i}} \qquad i = 1, ...m. \tag{7.11}$$

Die Sensitivitätsanalyse der Parameter erfolgt nach [90] mit der Vorgehensweise nach Abb. 7.1. Hierbei werden nach der Berechnung der Fisher–Informationsmatrix die Eigenwerte λ_i mit zugehörigen Eigenvektoren ermittelt. Man vergleicht nun den kleinsten Eigenwert λ_{min} mit $\frac{1}{{\gamma_r}^2}$, wobei γ_r die maximale, vorgegebene Streuung darstellt. Ist $\lambda_{min} \geq \frac{1}{{\gamma_r}^2}$, dann kann dieser Parameter zu den identifizierbaren Parametern hinzugenommen werden. Ist die Bedingung allerdings nicht erfüllt, dann wird der Parameter mit der betragsmäßig größten Komponente im Eigenvektor von λ_{min} eliminiert. Dieser Parameter kann dann nicht identifiziert werden. Die zugehörigen Zeilen und Spalten in der Fisher–Informationsmatrix werden gestrichen und man erhält somit einen reduzierten Parametersatz. Für die reduzierte Matrix werden wiederum die Eigenwerte und –vektoren berechnet und erneut wird der kleinste vorkommende Eigenwert untersucht. Dies wiederholt sich bis alle Parameter analysiert sind. Dadurch werden Parameter von der Schätzung ausgeschlossen, die mit den vorhandene Datensätzen nicht mit der gewünschten Genauigkeit geschätzt werden können. Zusätzlich werden nicht gemeinsam schätzbare Parameterkombinationen identifiziert.

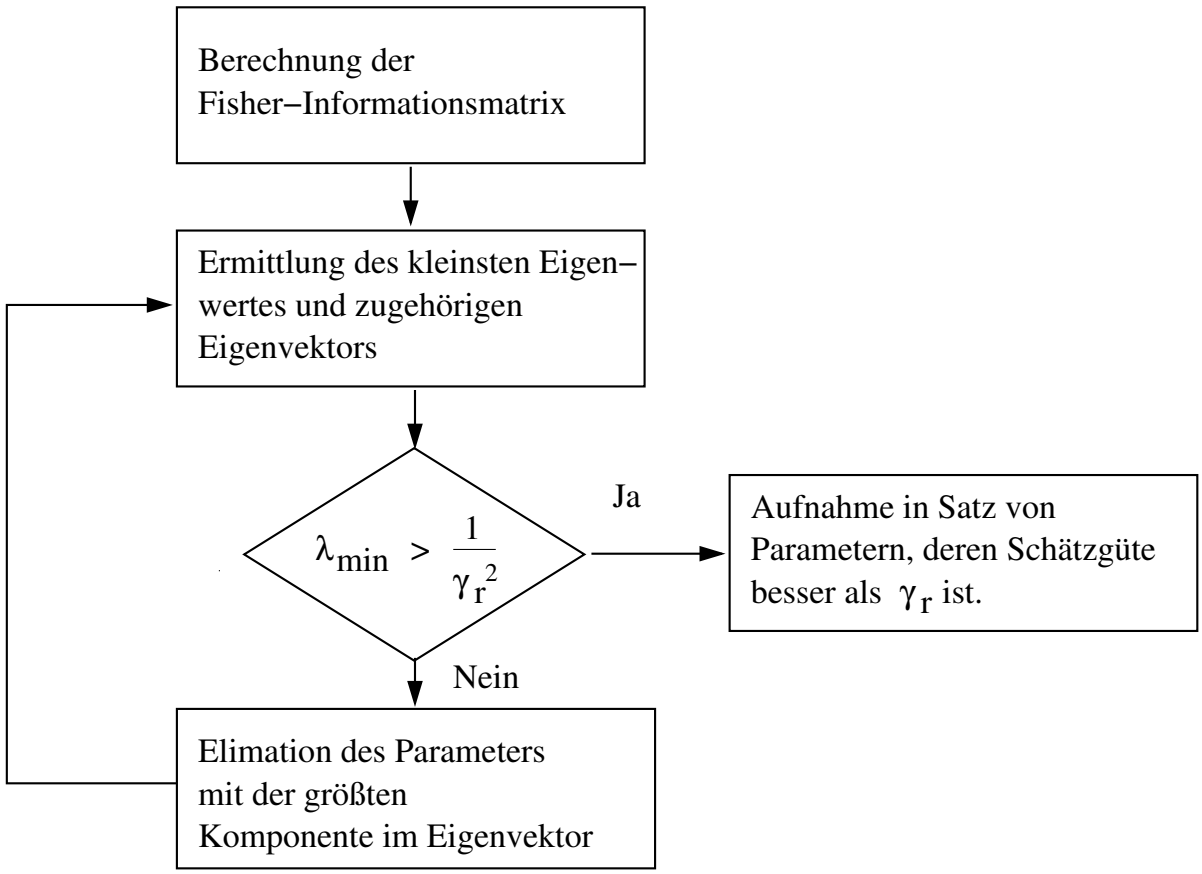

Abbildung 7.1: Sensitivitätsanalyse mit Hilfe der Fisher–Informationsmatrix

7.3 Vorgehensweise bei der Modell- und Parameteridentifikation

Die vorangestellten Betrachtungen zur Parameterschätzung und zur Parameteranalyse werden nun in den Modellbildungs– und Parameteridentifikationsprozeß einbezogen. Bei der Modellbildung und der Parameteridentifikation handelt es sich nicht um zwei separat hintereinander ablaufende Vorgänge, sondern eher um eine iterative Vorgehensweise, welche diese beiden Identifikationsschritte verbindet. Das prinzipielle Vorgehen dazu ist in Abb. 7.2 dargestellt.

Die Modellbildung beginnt mit einer Analyse vorhandener Fermentationsdaten, sowie einer Sammlung bekannter Untersuchungen zur Regulation des Wachstums und der Produktbildung von Actinomyceten. Dieses biologische Wissen, die Information aus den experimentellen Daten und das Wissen über den Fermentationsprozeß bilden die Grundlage für das zu erstellende Modell. Damit können Modellhypothesen bzw. Modellbausteine aufgestellt werden, die dann als Grundlage für das Simulationsmodell dienen. Um erste Startwerte der Parameter für das Simulationsmodell zu erhalten, empfiehlt sich eine Analyse der experimentellen Fermentationsdaten,

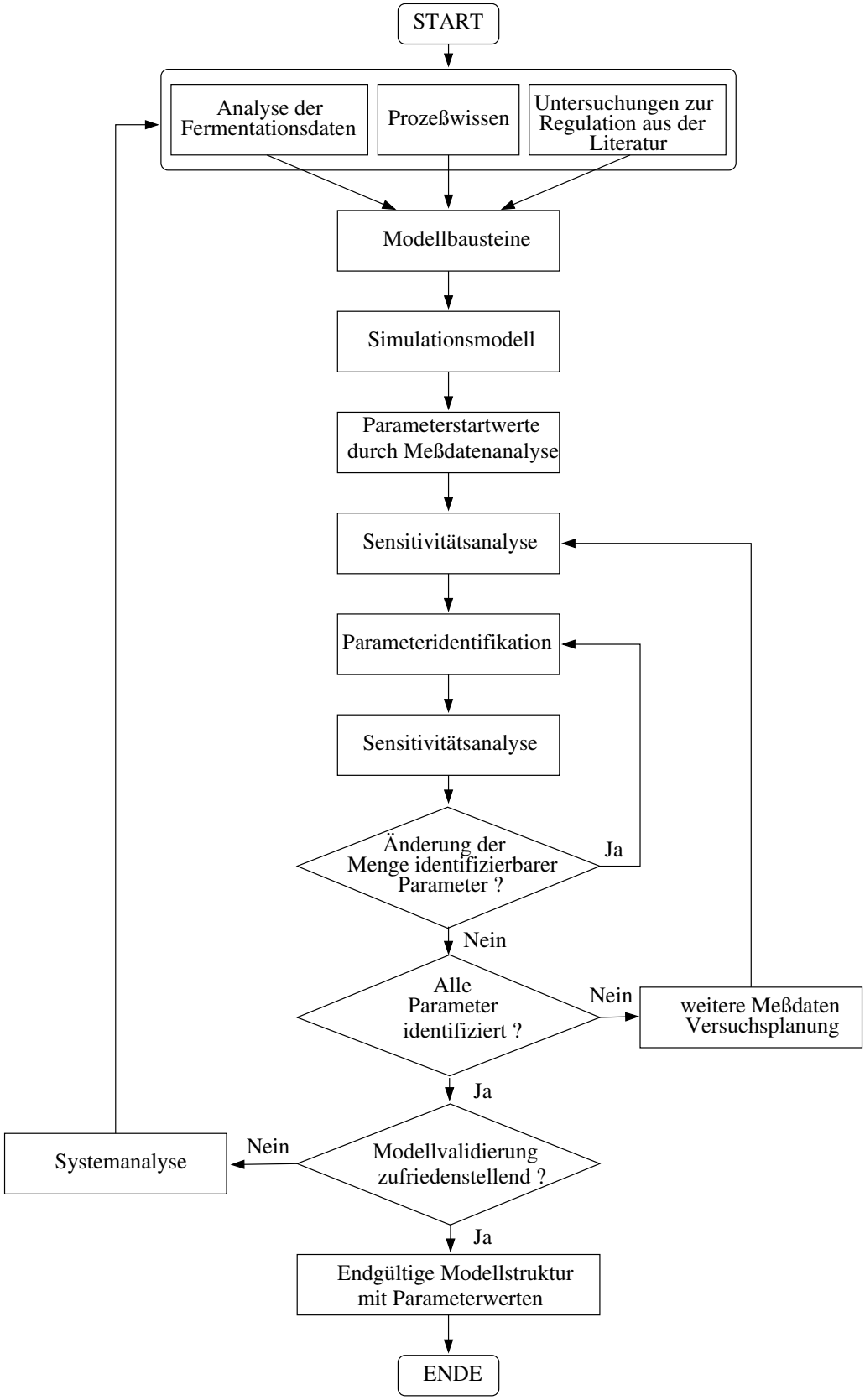

Abbildung 7.2: Vorgehensweise bei der Modellbildung und Parameteridentifikation

wie z.B. Untersuchungen zur Wachstumsrate in Kapitel 4. Die Startwerte der Ausbeutekoeffizienten können mit Hilfe der experimentellen Daten und Daten aus der Literatur gut abgeschätzt werden. Die Startwerte für Michaelis–Menten– und Hill–Konstanten hingegen lassen sich aus den experimentellen Daten nur grob abschätzen.

Mit dem Startdatensatz kann nun als erster Schritt der rechnergestützten Parameteridentifikation eine Sensitivitätsanalyse durchgeführt werden. Durch diese Analyse erhält man eine erste Auswahl an Parametern, die im nächsten Schritt durch die verschiedenen zur Verfügung stehenden Optimierungsalgorithmen (E04UCF, E04UPF aus NAG Library und Evolutionsstrategie EVA) identifiziert werden können. Wichtig ist bei diesem Schritt eine sinnvolle Gewichtung der einzelnen Ausgangsgrößen für das Identifikationsfunktional zu treffen. Nach Beendigung der Parameteridentifikation durch Erreichen des lokalen Optimums sollte eine erneute Sensitivitätsanalyse erfolgen, um zu sehen, ob jetzt weitere Parameter im sensitiven Bereich liegen, die anschließend identifiziert werden können. Dies wird solange durchgeführt, bis sich keine weitere Veränderung bei der Parameterauswahl zur Identifikation ergibt. Falls dann noch nicht alle Parameter identifiziert sind, kann man weitere Fermentationsdaten hinzuziehen oder eine gezielte Versuchsplanung durchführen, um mit neuen experimentellen Daten noch nicht sensitive Parameter identifizieren zu können.

Letztendlich sollten alle unbekannten Parameter identifiziert sein. Die Modellvalidierung erfolgt anhand eines Vergleichs von Simulationsdaten und experimentellen Daten, welche nicht zur Identifikation herangezogen wurden. Falls die Validierung zufriedenstellende Ergebnisse liefert, ist damit die Modellbildung und Identifikation der Parameter abgeschlossen. Andernfalls sollte man analysieren, warum eine Anpassung nicht erfolgen kann und aufbauend auf dieser Analyse und dem vorhandenen biologischen und experimentellen Wissen eine Modellveränderung vornehmen, um eine bessere Anpassung zu ermöglichen.

Um die Parameteridentifikation zu verbessern, wurden im vorliegenden Fall zunächst die Meßdaten bereinigt, um durch Meßausreißer nicht den Identifikationsprozeß zu erschweren. Ein wichtiger Punkt in diesem Zusammenhang war wie oben schon erwähnt die Festlegung der Gewichtungsfaktoren. Diese Gewichtungsfaktoren wurden zunächst rechnerisch ermittelt, indem das Integral der einzelnen Größen über der Zeit gebildet wurde und auf eine Referenzgröße normiert wurde. Diese Gewichtungsfaktoren wurden allerdings nach der ersten Anpassung verändert, falls dies notwendig war, um die Anpassung der Kurven in die richtige Richtung zu lenken. Wichtig war dies vor allem bei unsicheren Meßwerten. Hier wurde die Gewichtung für die jeweilige Größe herabgesetzt.

Eine andere Möglichkeit, gezielt Parameter zu identifizieren, ergibt sich durch eine partielle Identifikation. Hierbei wird nicht immer der gesamte Datensatz einer Fermentation verwendet,

um Parameter anzupassen. Es werden z.B. nur die Daten bis zum Limitationszeitpunkt verwendet, welche für die Identifikation des exponentiellen Wachstums eine wichtige Rolle spielen.

Die Parameteranalyse bestätigte, daß vor allem die Wachstumsraten in einem sensitiven Bereich liegen. Die anderen kinetische Konstanten sind weit weniger sensitiv und liegen teilweise im nicht identifizierbaren Bereich. Man kann versuchen, die nicht identifizierbaren Parameter durch Versuchsplanung in den sensitiven Bereich zu führen, um auch hier ein Anpassung zu ermöglichen. Dies gelang aber nicht in allen Fällen. Eine andere Möglichkeit wäre, die obere Schranke der zugelassenen Parameterstreuung soweit zu erhöhen, daß mehr Parameter identifiziert werden können. Dies wurde in [49] bei der Parameteridentifikation eines Chromatographieprozesses untersucht. Es führte aber nicht zu den gewünschten Ergebnissen, da statt einer besseren Anpassung eine schlechtere bzw. sogar falsche Anpassung erreicht wurde.

Kapitel 8

Zusammenfassung und Ausblick

Ausgehend von dem Kompartimentmodell von King [39] für *S. tendae* wurde in der vorliegenden Arbeit ein Modell zur Beschreibung des Wachstums- und Produktbildungsverhaltens von Actinomyceten formuliert. Ziel dieses Modells ist es, die Prozeßoptimierung zur Maximierung der Produktbildung zu unterstützen. Die Modellierung des Wachstums und der Produktbildung eines Mikroorganismenstammes ist in der Regel ein sehr aufwendiger Prozeß. Es ist daher wünschenswert, Modellstrukturen zu entwickeln, die zur Beschreibung mehrerer Mikroorganismenstämme eingesetzt werden können. In dieser Arbeit konnte eine Modellstruktur gefunden werden, die für zwei unterschiedliche Mikroorganismen, *A. mediterranei* und *S. tendae*, verwendet werden kann [35, 36, 34]. Dieses Modell liefert die Basis für eine Prozeßoptimierung.

Der Weg zur Modellfindung führte über eine Reihe von Analysen der Fermentationsdaten unter unterschiedlichen Fermentationsbedingungen. Die Ergebnisse dieser Analysen flossen sukzessive bei der Modellbildung des mathematischen kinetischen Modells ein. Informationen aus den teilweise bekannten Stoffwechselwegen der Produktbildung konnten integriert werden, indem die kinetischen Ausdrücke der spezifischen Produktbildung bzw. deren Parameter angepaßt wurden. Bei der Modellbildung wurde auch der Verbrauch von Nährstoffen für die Produktbildung berücksichtigt, um zu verhindern, daß eine Stagnation der Produktbildung aufgrund mangelnder Nährstoffe bei einer späteren Optimierung erfolgen kann.

Da bei der Modellierung der Schwerpunkt auf der Beschreibung der Regulation der Produktbildung und des Wachstums lag, wurde in Bezug auf das Wachstum die Regulation des RNA-Gehalts in die Modellierung miteinbezogen. Die Ergebnisse der Anpassung sind recht vielversprechend und zur Beschreibung des exponentiellen Wachstums werden nur wenige Modellparameter benötigt. Mit der Zahl der zur Anpassung erforderlichen Parameter steigt auch die benötigte Zeit zur Durchführung der Anpassung. Für die Anpassung an den Stamm *A. mediterranei* mußte gegenüber *S. tendae* nur ein Teil der Parameter verändert werden. Vor allem

die Parameter zur Regulation der Produktbildung über die stringente Kontrolle, welche dem Modell zugrunde liegt, wurden beibehalten. Auch einige andere kinetische Parameter blieben unverändert. Dadurch wurde die Anpassung an den neuen Stamm erleichtert. Dies wird vermutlich auch bei einer Anpassung an weitere Stämme der Fall sein.

Bei der Modellierung der Produktbildung spielt die Modellierung der spezifischen Produktbildungsrate eine wichtige Rolle. Aber gerade in diesem Bereich liegen keine vollständigen Informationen über die biologische Regulation vor. Daher wurde untersucht, ob eine hybride Modellierung in diesen Fall sinnvoll ist. Die hybride Modellierung bietet durch die Kombination von kinetischen Gleichungen und Neuronalen Netzen die Möglichkeit, die in Form von Meßdaten vorliegenden Informationen direkt in die Modellierung einzubinden. Es stellte sich allerdings heraus, daß die Meßdaten, welche für die Identfikation des Neuronalen Netzes verwendet werden können, die Modelleigenschaften eindeutig repräsentieren müssen. Da dies aber bei den vorhandenen Fermentationsdaten für den Stamm *S. tendae* nicht immer der Fall ist, ist es schwer, mit den vorhandenen Meßdaten ein Neuronales Netz zu entwickeln, welches das Produktbildungsverhalten in ausreichendem Maße nachbildet. Ein weiterer Nachteil einer solchen Modellierung ist, daß für die Identifikation der Netzparameter eine große Anzahl von Trainingsdaten erforderlich sind. Zusätzlich kann die schlechte Extrapolierbarkeit für eine geplante Optimierung ein Problem darstellen, da sich nach einer Optimierung meist neue Fermentationsbedingungen ergeben, welche durch dieses Modell aber nicht ausreichend korrekt extrapoliert werden können. Daher ist ein kinetisches Modell im vorliegenden Fall zu bevorzugen.

Der hier modellierte Prozeß des Wachstums und der Produktbildung von Sekundärmetaboliten behandelt einen komplexen Stoffwechselvorgang. Eine detaillierte Modellbildung in Form einer genetischen Modellierung ist zu diesem Zeitpunkt nicht möglich, da noch zuwenig konkrete Information über die vielfältigen Regulationsmechanismen vorliegen. Ebenso ist die erforderliche Validierung nur mit einem deutlich erhöhten Meßaufwand und einer Anzahl von weiteren Untersuchungen mit entsprechenden Mutantenstämmen zu leisten.

Um zum jetzigen Zeitpunkt eine weitere Verbesserung der Modellierung zu erreichen, ist es notwendig, mehr Detailinformationen über die Regulationsvorgänge in der Zelle zu erhalten, z.B. durch gezielte Versuche mit genetisch veränderten Mutanten. Durch diese Informationen läßt sich ein genetisch strukturiertes Modell entwickeln. Allerdings ist ein erhöhter Aufwand bei der Identifikation der Parameter erforderlich, wenn diese nicht direkt durch Messungen bestimmt werden können. Ein genetisch strukturiertes Modell kann zur genauen Darstellung der einzelnen Regulationsmechanismen des Stoffwechsels unter Limitationsbedingungen dienen. Ein solches Modell ist aufgrund der Komplexität aber nicht zur Optimierung der Produktion bei einer laufenden Fermentation geeignet. Daher ist es wichtig, von dem detaillierten Modell auf eine Modellstruktur überzugehen, welche die Regulationsmechanismen ausreichend genau ab-

bildet, um eine Optimierung erreichen zu können. Wichtig bei der Reduzierung des komplexen Modells ist es, aussagekräftige Modellparameter zu finden, welche mit Hilfe von Fermentationsdaten leicht bestimmt werden können, um damit auch die Anpassung des Modells an die einzelnen Stämme zu vereinfachen.

Die Parameteridentifikation ist ein wichtiger Schritt bei der Modellidentifikation und die Sensitivität der Parameter ist entscheidend für eine richtige Identifikation. Daher sollte schon bei der Bildung eines reduzierten Modells darauf geachtet werden, die Struktur so aufzubauen, daß der Aufwand für eine Parameteridentifikation möglichst gering ist. Dazu sollten die Parameter hohe Sensitivitäten aufweisen und schon durch einfache Analysen der Meßwerte im voraus in einem gewissen Rahmen bestimmt werden können. Die zur Parameteridentifikation zur Verfügung stehenden Methoden, wie z.B. genetische Algorithmen, bieten eine schnelle und gute Möglichkeit ein globales Optimum zu finden, wenn man sich mit den Parametern schon im richtigen Bereich befindet. Es ist wichtig, deshalb schon zu Beginn der Anpassung mit guten Startwerten zu arbeiten.

Mit den zur Verfügung stehenden Mitteln ist das erhaltene Modell ein sehr guter Kompromiß zwischen dem Aufwand für die Modellentwicklung und dem Nutzen für die Optimierung der Produktbildung. Durch die erfolgreiche Anpassung für den Stamm *A. mediterranei* kann das Modell für die Optimierung der Produktbildung diese Stammes eingesetzt werden.

Anhang A

Übersicht Fermentationsdaten

Tabelle A.1 gibt eine Übersicht über die zusätzlich zu den in Tabelle 5.1 und 5.2 zusammengestellten Fermentationen, welche zur Identifikation des neuronalen Netzes in Kapitel 6 verwendet wurden.

	G147	G3	G10	G63	G84	G131
Dauer [h]	235	190	220	215	217	217
AB [g/l]						
Phosphat	1.14	2.37	0.57	0.0	0.0	0.24
Ammonium	1.35	1.8	0.72	0.014	0.02	0.04
Glucose	30	40	40	1.35	1.7	18.71
Biomasse	0.184	0.257	0.254	0.287	0.288	0.285
Volumen [l]	50	50	50	44.8	38	42
Glucose–feeding ab	69.2 h	100 h	139 h	0 h	0 h	0 h
Phosphat–feeding	-	-	-	0-49 h	0-65 h	0-50 h
Ammonium–feeding	-	-	-	0-165 h	0-210 h	0-239 h
Ammonium–puls bei	-	-	139 h	-	-	-

Tabelle A.1: Übersicht über Anfangsbedingungen (AB) und Fermentationsführung der Fermentationen von *S. tendae* zur Identifikation des neuronalen Netzes

Tabelle A.2 gibt eine Übersicht über die zusätzlich zu den in Tabelle 5.1, 5.2 und A.1 zusammengestellten Fermentationen, welche zur Datenanalyse in Kapitel 4 verwendet wurden.

Stamm	*S. tendae*						*A. mediterranei*
	G125	G126	G136	G146	G34	G120	M99
Dauer [h]	215	234	234	234	160	236	191
AB [g/l]							
Phosphat	0.236	0.236	0.57	1.14	0.57	0.136	0.145
Ammonium	1.836	1.836	0.72	0.91	0.297	0.09	2.73
Glucose	41.6	41.6	41.1	31.1	41.5	14.8	-
Fructose	-	-	-	-	-	-	43
Biomasse	0.05	0.037	0.25	0.228	0.149	0.24	0.085
Volumen [l]	50	50	50	50	50	42.5	12
Glucose–feeding ab	74 h	72.5 h	74.3 h	71.2 h	71.1 h	0 h	55 h
Phosphat–feeding	-	-	-	-	-	0 h	-
Ammonium–feeding	-	-	-	97.4 h	0 h	0 h	-
Ammonium–puls bei	-	-	140.3 h	-	-	-	-

Tabelle A.2: Übersicht über Anfangsbedingungen (AB) und Fermentationsführung der Fermentationen von *S. tendae* und *A. mediterranei* zur Datenanalyse

Anhang B

Parameterwerte

Parameterwerte und Ausbeutekoeffizienten (Einheit [g g^{-1}]) des Modells für die Simulation der Fermentationsdaten von *S. tendae* :

Sub–system	Para-meter	Wert	Einheit
μ	μ_m	0.08387	1 h^{-1}
	g_{RO}	$0.786 \cdot 10^{-6}$	$g^8\ l^{-8}$
	n_μ	7.99	
	K_{SpA}	0.00001	g g^{-1}
	K_{SpP}	0.0001	g g^{-1}
μ_{dPr}	μ_{dPrm}	0.0092	h^{-1}
	K_{PrA}	0.0001	g $(gh)^{-1}$
	K_{dPr}	0.001	$g^8\ g^{-8}$
	μ_{TPr}	0.0001	h^{-1}
μ_R	μ_{Rm}	0.322	h^{-1}
μ_{dR}	μ_{dRm1}	0.0121	h^{-1}
	K_{RA}	0.05	g h^{-1}
	K_{RSpA}	$0.4 \cdot 10^{-9}$	$g^8\ l^{-8}$
	μ_{dRm2}	0.003	h^{-1}
	K_{RPh}	0.09	g l^{-1}
	μ_{TR}	0.0001	h^{-1}
μ_A	K_{ASpA}	0.001	g l^{-1}
	μ_{Am1}	0.0008	h^{-1}
	μ_{Am2}	0.0157	h^{-1}
	K_{ASpA2}	$0.1 \cdot 10^{-5}$	$g^2\ l^{-2}$
μ_{Ph}	μ_{Pm}	0.0052	g $(gh)^{-1}$
	K_{PhPh}	0.05	g l^{-1}
	K_{PhSpP}	$0.1 \cdot 10^{-24}$	$g^{12}\ g^{-12}$

Sub–system	Para–meter	Wert	Einheit
μ_C	μ_{Cm}	0.005	1 h^{-1}
	K_{CS}	5.159	g l^{-1}
	K_{AA2}	0.0001	g g^{-1}
	K_{Ph}	0.05	g g^{-1}
μ_E	μ_{Em}	0.035	g h^{-1}
	K_{EC}	2.54	g l^{-1}
μ_G	μ_{Gm}	$0.244 \cdot 10^{-5}$	h^{-1}
	K_{GA}	0.022	g l^{-1}
	K_{GPh}	0.08	g l^{-1}
	K_{GSpP}	0.001	g g^{-1}
μ_{dG}	μ_{dGm}	0.005	h^{-1}
	μ_{dGm2}	4.747	h^{-1}
	Y_{ASp}	0.0005	$g^2\ l^{-2}$
	K_{dGSpP}	0.005	g l^{-1}
μ_{SM}	μ_{SMm}	0.047	h^{-1}
	K_{SMG}	$0.17 \cdot 10^{-20}$	$g^3\ l^{-3}$
	K_{SMSpA}	$0.26 \cdot 10^{-5}$	g g
	K_{SMSpP}	$0.31 \cdot 10^{-10}$	$g^8\ g^{-8}$
	K_{Str}	0.00036	h^{-1}
	K_{GSpA}	0.00031	h^{-2}
	$K_{P_{O2}}$	30	%

Y_{AmDNA}	Y_{AmRNA}	Y_{AmPr}	Y_{AmStr}	Y_{AmSM}	Y_{PhDNA}
0.2	0.216	0.139	0.081	0.145	0.29
Y_{PhRNA}	Y_{CDNA}	Y_{CRNA}	Y_{CPr}	Y_{CStr}	Y_{CSM}
0.292	2.0	2.02	1.39	2.02	2.0

Parameterwerte und Ausbeutekoeffizienten (Einheit g g^{-1}) für *A. mediterranei* :

Sub—system	Parameter	Wert	Einheit
μ	μ_m	0.1091	1 h^{-1}
	g_{RO}	$0.2 \cdot 10^{-5}$	$g^8\ l^{-8}$
	n_μ	5.85	
	K_{SpA}	0.00001	g g^{-1}
	K_{SpP}	0.0001	g g^{-1}
μ_{dPr}	μ_{dPrm}	0.00303	h^{-1}
	K_{PrA}	0.01	g $(gh)^{-1}$
	K_{dPr}	0.001	$g^8\ g^{-8}$
	μ_{TPr}	0.0001	h^{-1}
μ_R	μ_{Rm}	0.497	h^{-1}
μ_{dR}	μ_{dRm1}	0.0538	h^{-1}
	K_{RA}	0.008	g h^{-1}
	K_{RSpA}	$0.4 \cdot 10^{-9}$	$g^8\ l^{-8}$
	μ_{dRm2}	0.0136	h^{-1}
	K_{RPh}	0.05	g l^{-1}
	μ_{TR}	0.0001	h^{-1}
μ_A	K_{ASpA}	0.01	g l^{-1}
	μ_{Am1}	0.0008	h^{-1}
	μ_{Am2}	0.0229	h^{-1}
	K_{ASpA2}	$0.1 \cdot 10^{-5}$	$g^2\ l^{-2}$
μ_{Ph}	μ_{Phm}	0.0058	g $(gh)^{-1}$
	K_{PhPh}	0.0156	g l^{-1}
	K_{PhSpP}	$0.1 \cdot 10^{-18}$	$g^{12}\ g^{-12}$

Sub–system	Para–meter	Wert	Einheit
μ_C	μ_{Cm}	0.0027	1 h^{-1}
	K_{CS}	5.159	g l^{-1}
	K_{AA2}	1.0	g g^{-1}
	K_{Ph}	0.05	g g^{-1}
μ_E	μ_{Em}	0.0589	g h^{-1}
	K_{EC}	4.177	g l^{-1}
μ_G	μ_{Gm}	$0.1 \cdot 10^{-6}$	h^{-1}
	K_{GA}	0.05	g l^{-1}
	K_{GPh}	0.05	g l^{-1}
	K_{GSpP}	0.001	g g^{-1}
μ_{dG}	μ_{dGm}	0.005	h^{-1}
	μ_{dGm2}	4.747	h^{-1}
	Y_{ASp}	0.0005	$g^2\ l^{-2}$
	K_{dGSpP}	0.005	g l^{-1}
μ_{SM}	μ_{SMm}	0.0662	h^{-1}
	K_{SMG}	$0.17 \cdot 10^{-20}$	$g^3\ l^{-3}$
	K_{SMSpA}	$0.93 \cdot 10^{-4}$	g g
	K_{SMSpP}	$0.1 \cdot 10^{-17}$	$g^8\ g^{-8}$
	K_{Str}	0.00156	h^{-1}
	K_{GSpA}	0.0162	h^{-2}
	$K_{P_{O2}}$	1	%

Y_{AmDNA}	Y_{AmRNA}	Y_{AmPr}	Y_{AmStr}	Y_{AmSM}	Y_{PhDNA}
0.2	0.206	0.131	0.933	0.145	0.276
Y_{PhRNA}	Y_{CDNA}	Y_{CRNA}	Y_{CPr}	Y_{CStr}	Y_{CSM}
0.283	2.0	2.02	2.49	2.02	2.0

Anhang C

Weitere Simulationsergebnisse

Als Ergebnis der Anpassung sind hier weitere Simulationen und experimentelle Daten im Vergleich dargestellt. In Tabelle C.1 sind die Fermentationsbedingungen für die noch nicht in den Tabellen 5.1, 5.2 und A.1 aufgeführten Fermentationen angeben.

Stamm	*S. tendae*		*A. mediterranei*	
	G135	G141	M111	M113
Dauer [h]	209	185	234	239
AB [g l^{-1}]				
Phosphat	0.38	0.19	0.475	0.275
Ammonium	1.8	0.918	0.475	0.46
Glucose	41.1	41.2	-	-
Fructose	-	-	41.6	41.8
Biomasse	0.205	0.199	0.153	0.183
DNA	0.0082	0.008	0.0061	0.0073
RNA	0.0328	0.0318	0.0245	0.0293
Proteine	0.1127	0.1095	0.0842	0.1007
Strukturel.	0.041	0.0398	0.0306	0.0366
Volumen [l]	50	50	12	12
Glu/Fructose–feeding ab	69.5 h	94.4 h	70 h	77 h
Phosphat–feeding	-	-	-	-
Ammonium–feeding	-	-	-	-
Phosphat–puls bei	65 h	91.2 h	-	-
Ammonium–puls bei	88.2 h	-	41.8 h 163 h	71 h 168 h

Tabelle C.1: Übersicht über Anfangsbedingungen (AB) und Fermentationsführung der Fermentationen von *S. tendae* und *A. mediterranei*, welche zusätzlich zu den in Kapitel 5 gezeigten Fermentationen simuliert wurden

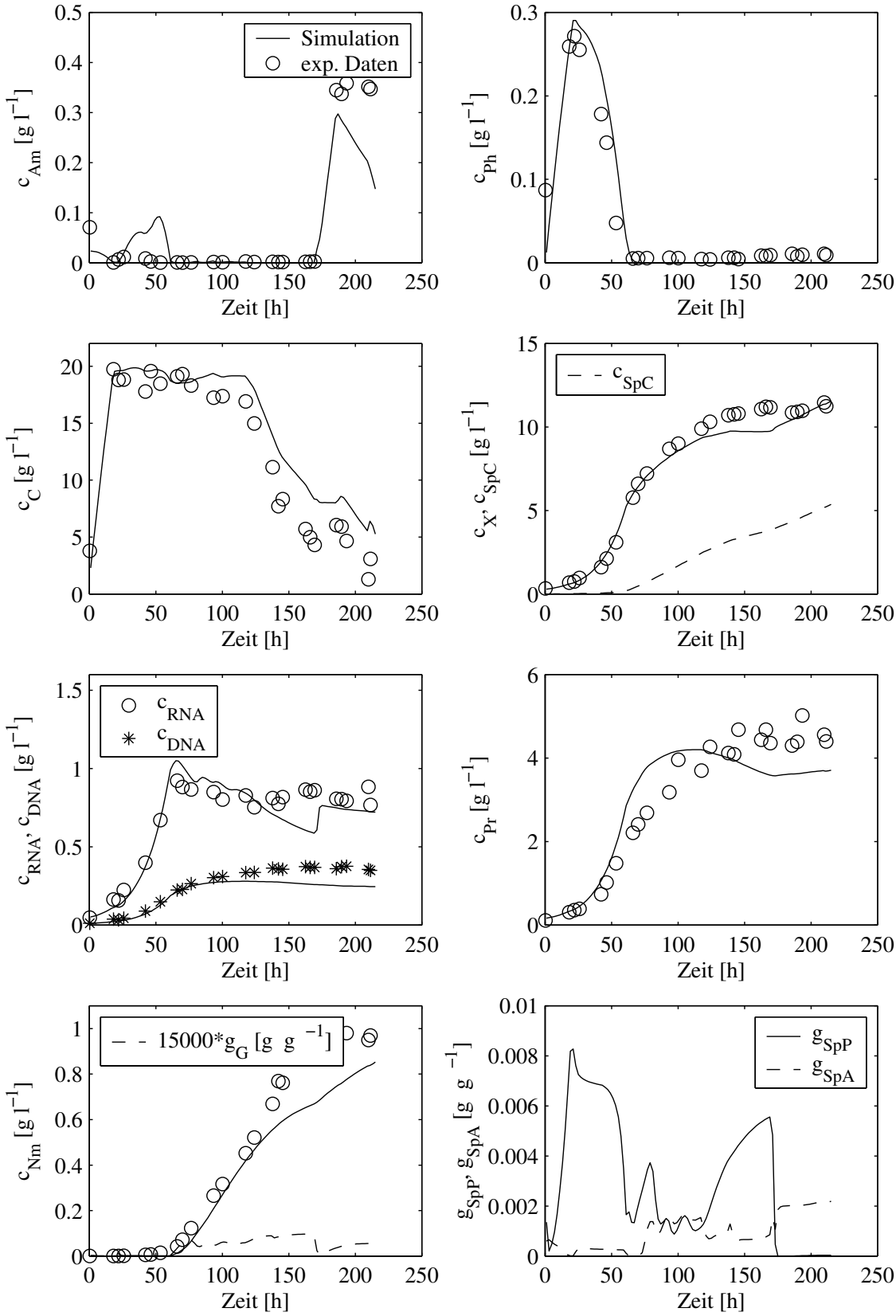

Abbildung C.1: Vergleich von Simulation und experimentellen Daten der Fermentation G84 (Produktmaximierung mit *S. tendae*)

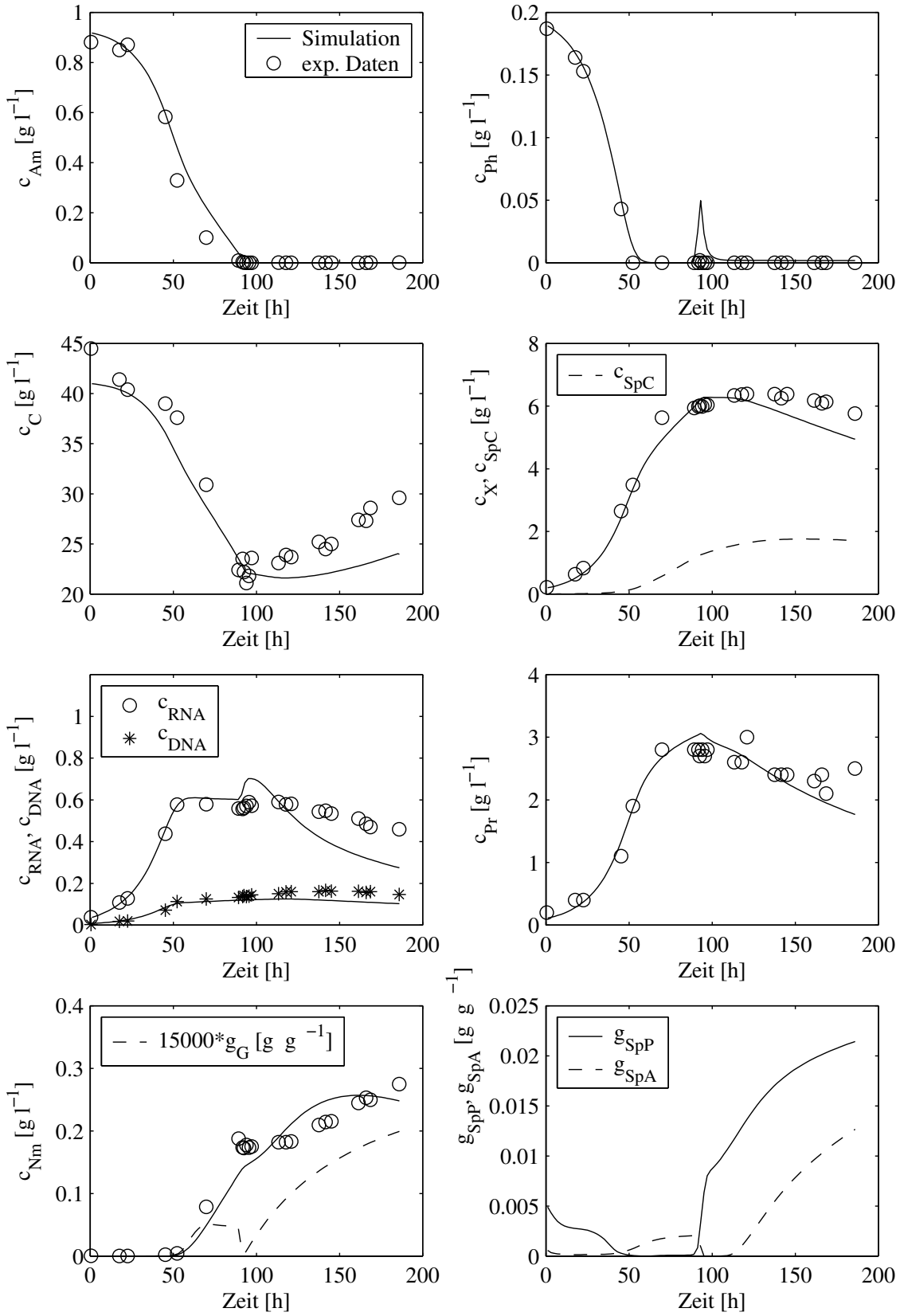

Abbildung C.2: Vergleich von Simulation und experimentellen Daten der Fermentation G141 (Phosphatlimitation mit Phosphatpuls mit *S. tendae*)

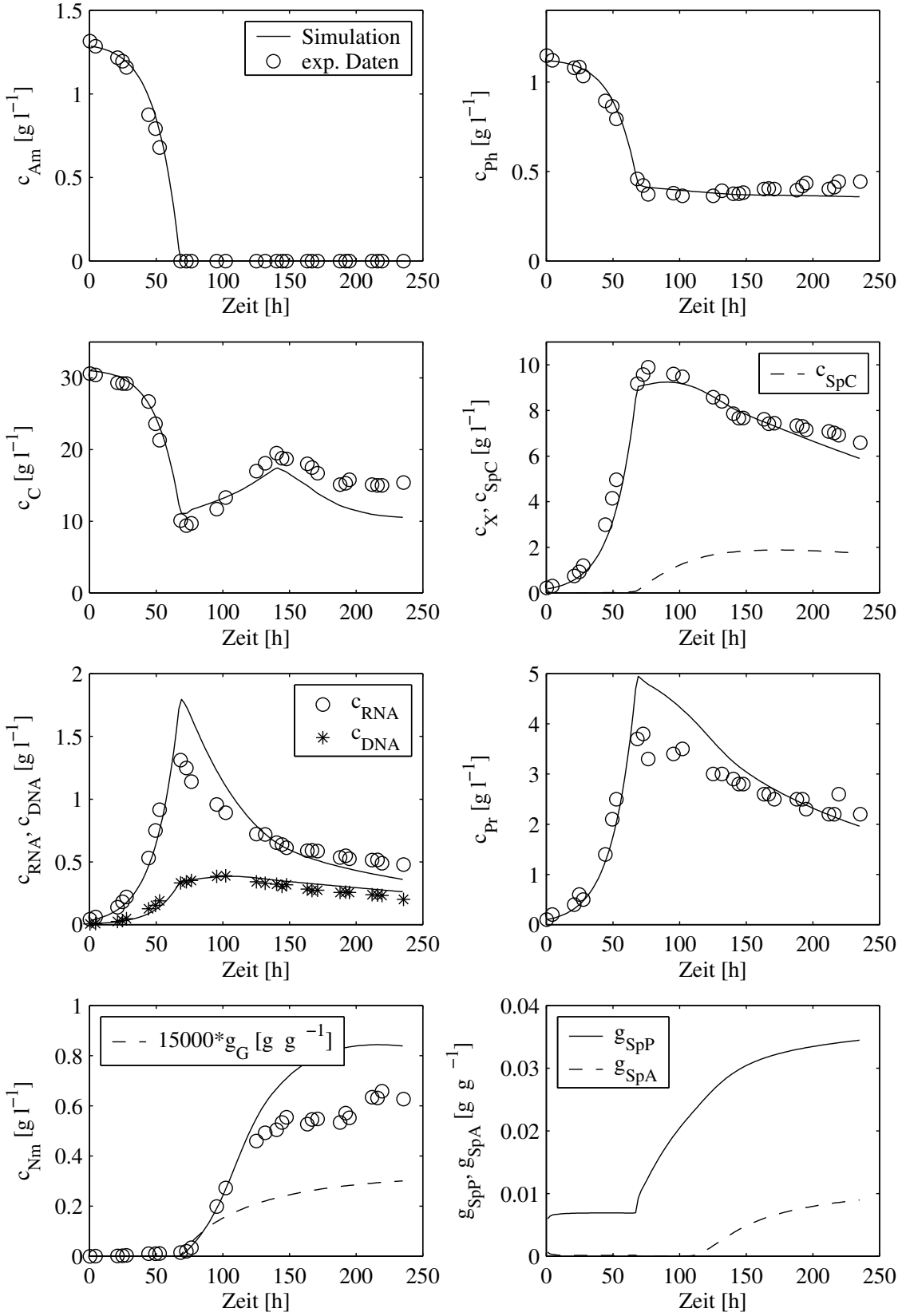

Abbildung C.3: Vergleich von Simulation und experimentellen Daten der Fermentation G147 (Ammoniumlimitation mit *S. tendae*)

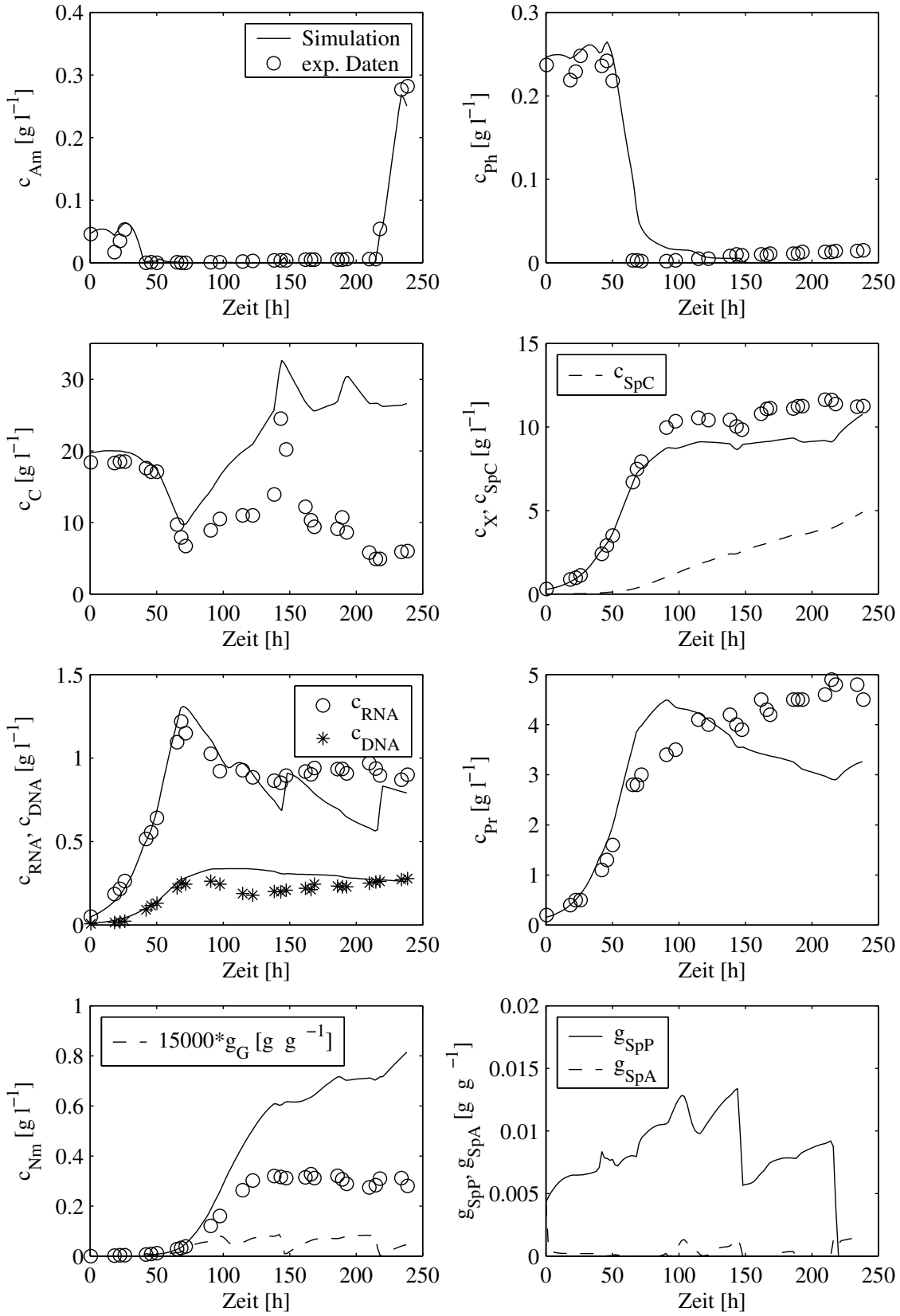

Abbildung C.4: Vergleich von Simulation und experimentellen Daten der Fermentation G131 (Produktmaximierung mit *S. tendae*)

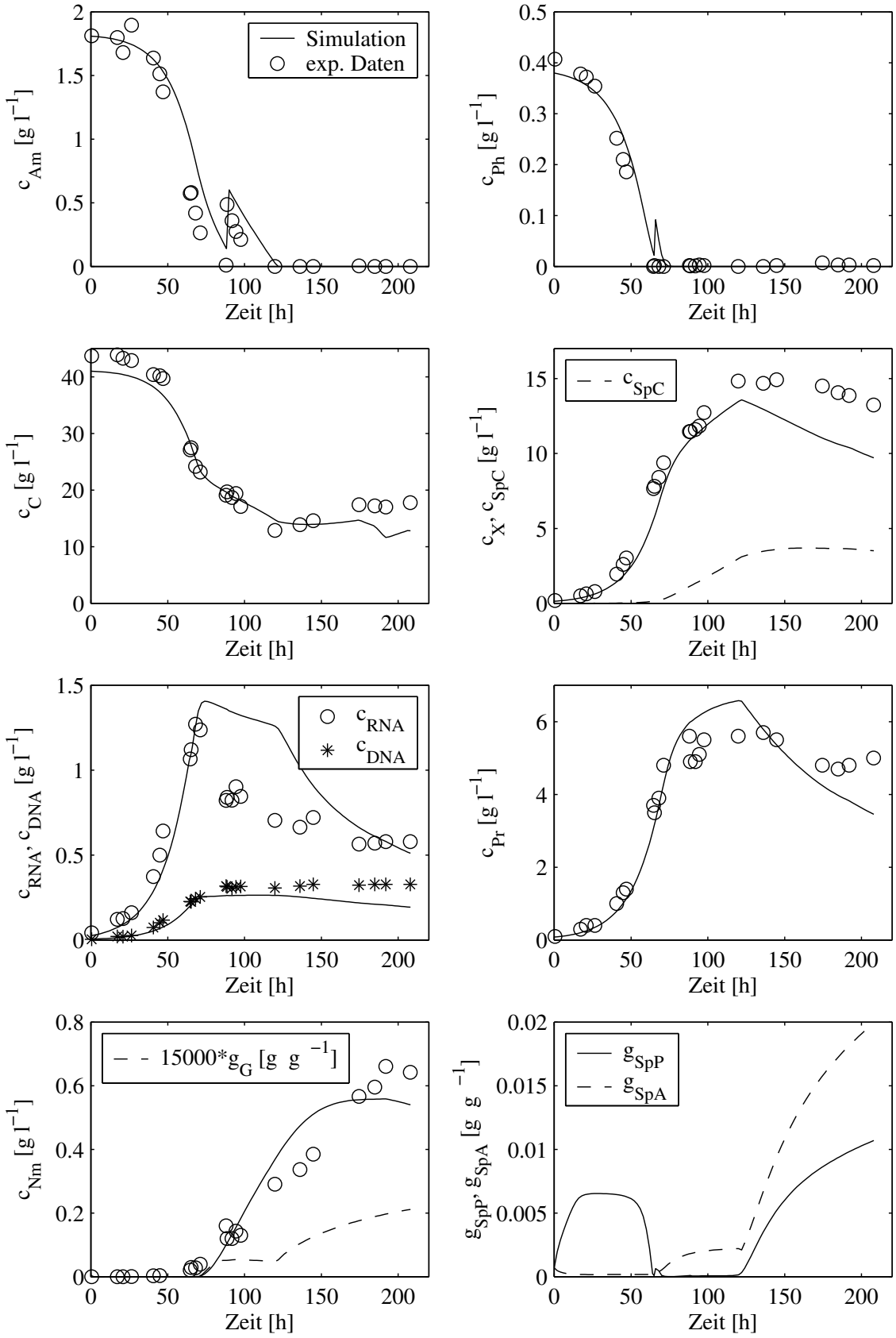

Abbildung C.5: Vergleich von Simulation und experimentellen Daten der Fermentation G135 (Phosphatlimitation mit Phosphatpuls mit *S. tendae*)

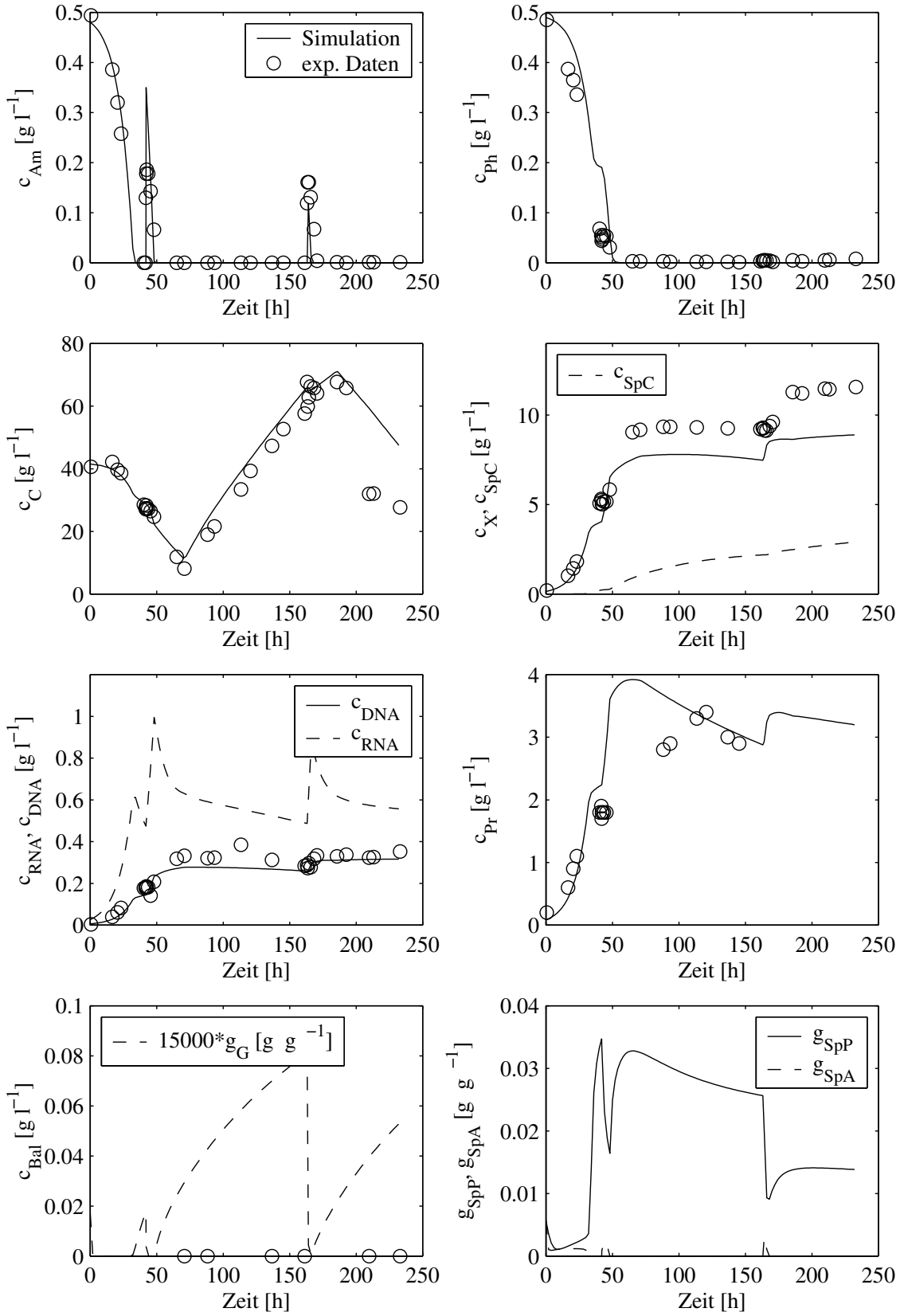

Abbildung C.6: Vergleich von Simulation und experimentellen Daten der Fermentation M111 (Ammoniumlimitation mit Ammoniumpuls mit *A. mediterranei*)

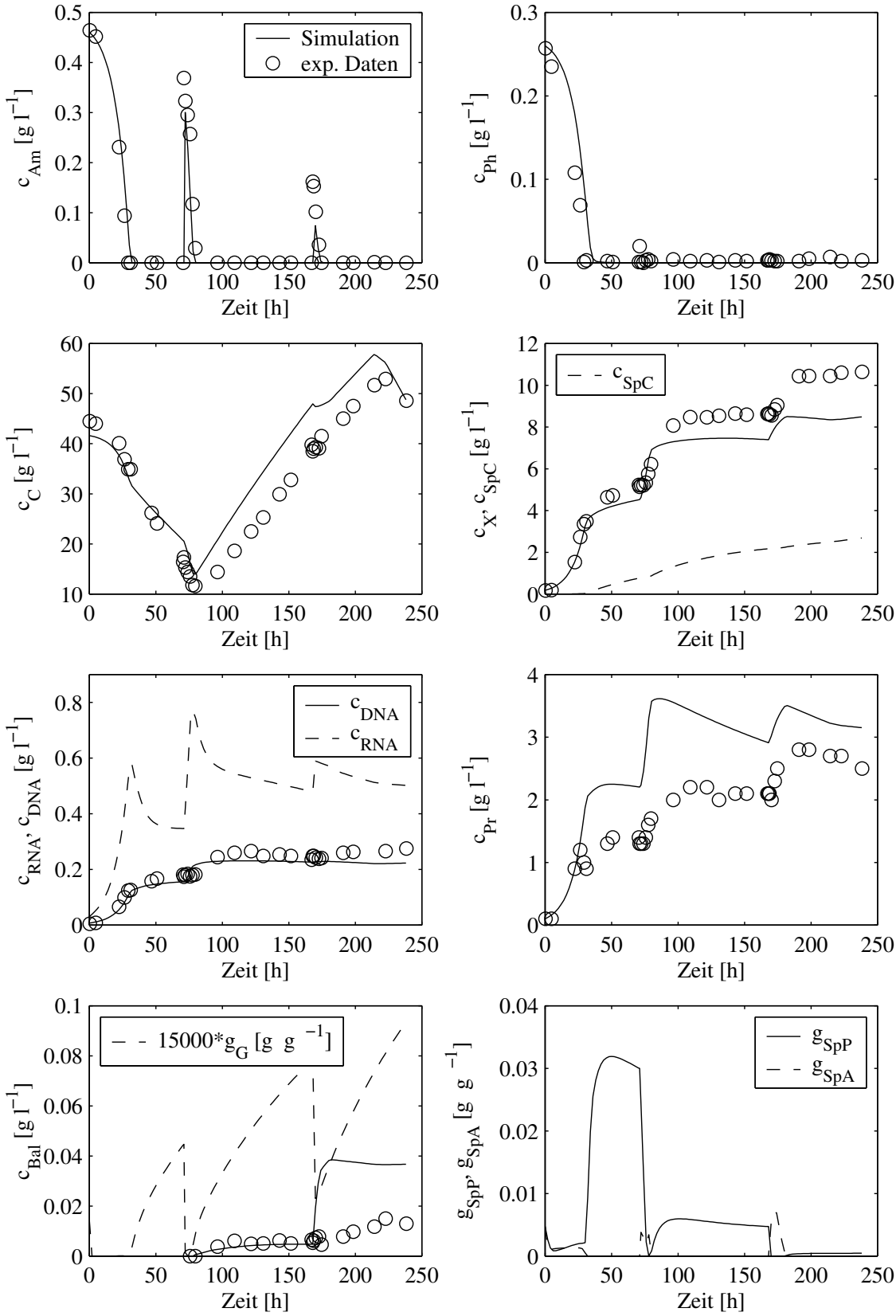

Abbildung C.7: Vergleich von Simulation und experimentellen Daten der Fermentation M113 (Ammoniumlimitation mit Ammoniumpuls mit *A. mediterranei*)

Literaturverzeichnis

[1] BAILEY, J.E.: Mathematical Modeling and Analysis in Biochemical Engineering: Past Accomplishments and Future Opportunities. *Biotechnol. Prog.*, 14:8–20, 1998.

[2] BANDUR, M.: *Modellierung des Einflusses von Sauerstoff auf das Wachstumsverhalten von Streptomyces tendae*. Studienarbeit, Universität Stuttgart, Institut für Systemdynamik und Regelungstechnik, 1992.

[3] BELLGARDT, K.-H. UND YUAN, J.: Process Models: Optimization of Yeast Production – A Case Study. In Rehm, H.-J., Reed, G., Pühler, A. und Stadler, P. (Hrsg.), *Biotechnology*, 4, Seiten 385–406. VCH, Weinheim, 1991.

[4] BERGTER, F. UND RIESENBERG, D.: Morphological and biochemical properties of *Streptomyces hygroscopicus* grown in chemostat. *Folia Microbiol.*, 27:303–307, 1982.

[5] BIBB, M.: The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiol.*, 142:1335–1344, 1996.

[6] BISSWANGER, H.: *Theorie und Methoden der Enzymkinetik*. Verlag Chemie, Weinheim, 1979.

[7] BORMANN, C., ABERLE, K., MATTERN, S. UND SCHREMPF, H.: Cloning genes from *Streptomyces tendae* involved in biosynthesis. *J. of Cellul. Biochem., Suppl.*, 14 Part A:114, 1990.

[8] BORMANN, C., MÖHRLE, V. UND BRUNTNER, C.: Cloning and heterologous expression of the entire set of structural genes for nikkomycin synthesis from *Streptomyces tendae* Tü901 in *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.*, 178(4):1216–1218, 1996.

[9] BORMANN, E.J. UND HERMANN, R.: Zur Pyruvat– und α–Ketoglutaratausscheidung durch *Streptomyces rimosus*. *Arch. Microbiol.*, 63:41–52, 1968.

[10] BRUNTNER, C., LAUER, B., SCHWARZ, W., MÖHRLE, V. UND BORMANN, C.: Molecular characterization of co–transcribed genes from *Streptomyces tendae* Tü901 involved

in the biosynthesis of the peptidyl moiety of the peptidyl nucleoside antibiotic nikkomycin. *Mol. Gen. Genet.*, 262(1):102–114, 1999.

[11] BUSCHULTE, T.K.: *Mathematische Modellbildung und Simulation von Zellwachstum, Stofftransport und Stoffwechsel in Pellets aus Streptomyceten*. Dissertation, Universität Stuttgart, 1992.

[12] CASHEL, M., GENTRY, D.R., HERNANDEZ, V.J. UND VINELLA, D.: The stringent response. In Neidhardt, F.C. et al. (Hrsg.), *Escherichia coli and Salmonella, Cellular and molecular biology*, Seiten 1458–1496, Washington D.C., 1996. ASM Press.

[13] CHATER, K.F. UND BIBB, M.J.: Regulation of bacterial antibiotic production. In Kleinkauf, H. und von Döhren, H. (Hrsg.), *Biotechnology Vol.7: Products of Secondary Metabolism*, Seiten 57–105. VCH, Weinheim, 1997.

[14] CHONG, P.P., PODMORE, S.M., KIESER, H.M., REDENBACH, M., TURGAY, K. UND MARAHIEL, M.: Physical Identification of a chromosomal locus encoding biosynthetic genes for the lipopeptide calcium-dependent antibiotic (CDA) of *streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiol.*, 144:193–199, 1998.

[15] DABAGHIAN, A.R.H.: *Medienoptimierung mittels Evolutionsstrategien*. Studienarbeit, Universität Stuttgart, Institut für Systemdynamik und Regelungstechnik, 1996.

[16] DHURJATI, P., RAMKRISHNA, D., FLICKINGER, M.C. UND TSAO, G.T.: A cybernetic view of microbial growth: Modeling of cells as optimal strategists. *Biotechnol. Bioeng.*, 27:1–9, 1985.

[17] DORS, M., SIMUTIS, R. UND LÜBBERT, A.: Hybrid Process Modeling for Advanced Process State Estimation, Prediction, and Control exemplified in a Production–Scale Mammalian Cell Culture. In Rogers, K.R., Chandani, A.M. und Zhou, W. (Hrsg.), *Biosensor and Chemical Sensor Technology*, Seiten 144–154. ACS, Oxford Press, 1995.

[18] DOULL, J.L. UND VINING, L.C.: Nutritional control of actinorhodin production by *Steptomyces coelicolor* A3(2): suppressive effects of nitrogen and phosphate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 32:449–454, 1990.

[19] EYER, K., OEGGERLI, A. UND HEINZLE, E.: On–Line Gas Analysis in Animal Cell Cultivation: II. Methods for Oxygen Uptake Rate Estimation and its Application to Controlled Feeding of Glutamine. *Biotechnol. Bioeng.*, 45:54–62, 1999.

[20] FIEDLER, H.-P.: Quantization of nikkomycins in biological fluids by ion–pair reversed phase high–performance liquid chromatography. *J. Chromatog.*, 201:313–318, 1981.

[21] FISHER, S.H.: Nitrogen assimilation in *Streptomycetes*. In Okami, Y., Beppu, T. und Ogawara, H. (Hrsg.), *Biology of Actinomycetes*, Seiten 47–51. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1988.

[22] FISHER, S.H.: Glutamine synthesis in *Streptomyces* - a review. *Gene*, 115:13–17, 1992.

[23] FISHER, S.H. UND SONENSHEIN, A.L.: Control of carbon and nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*. *Ann. Rev. Microbiol.*, 45:107–135, 1991.

[24] GRÄFE, U., REINHARDT, G. UND THRUM, H.: Induzierbare Akkumulation von α–Ketogutarsäure in Kulturen des Makrolidantibiotikum–bildenden Stammes von *Streptomyces hygroscopius* JA 6599. *Z. Allg. Mikrobiol.*, 15:575–583, 1975.

[25] GRAMMEL, H.: *Untersuchungen zur Regulation der Antibiotikaproduktion in Fermentationskulturen von Streptomyces tendae und Amycolatopsis mediterranei*. Dissertation, Universität Tübingen, 2000.

[26] HARDER, A. UND ROELS, J.A.: Application of simple structured models in bioengineering. *Adv. in Biochem. Eng.*, 21:56–107, 1982.

[27] HECKMANN, D.: *Immobilisierung von Amycolatopsis mediterranei auf Sinterglas und Untersuchungen zur kontinuierlichen Nikkomycinbildung mit trägerfixierten Zellen*. Dissertation, Universität Tübingen, 2000.

[28] HEGE-TRESKATIS, D.: *Untersuchungen zur Regulation der Nikkomycin- und der Juglomycinproduktion des Produzentenstammes Streptomyces tendae Tü 901/8c: Kontinuierliche Fermentationen und Batch-Fermentationen unter Verwendung eines definierten Nährmediums*. Dissertation, Universität Tübingen, 1993.

[29] HEGE-TRESKATIS, D., KING, R., WOLF, H. UND GILLES, E.D.: Nutritional control of nikkomycin and juglomycin production by *Streptomyces tendae* in continuous culture. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.*, 36:440–445, 1992.

[30] HOBBS, G., FRAZER, C.M., GARDNER, D.C.J., FLETT, F. UND OLIVER, S.G.: Pigmented antibiotic production by *Strepomyces coelicolor* A3(2): kinetics and the influence of nutrients. *J. Gen. Microbiol.*, 136:2291–2296, 1990.

[31] HOOD, D.W., HEIDSTRA, R., SWOBODA, U.K. UND HODGSON, D.A.: Molecular genetic analysis of proline and tryptophan biosynthesis in *streptomyces coelicolor* A3(2): interaction between primary and secondary metabolism - a review. *Gene*, 115:5–7, 1992.

[32] HOPWOOD, D.A., CHATER, K.F. UND BIBB, M.J.: Genetics of antibiotic production in *streptomyces coelicolor* A3(2). In Vining, L.C. und C.Stuttard (Hrsg.), *Genetics and Biochemistry of Antibiotic Production*, Seiten 65–102. Butterworth-Heinemann, Newton, MA, 1995.

[33] HU, D.S.-J., HOOD, D.H., HEIDSTRA, R. UND HODGSON, D.A.: The expression of the trpD, trpC and trpBA genes of *streptomyces coelicolor* A3(2) is regulated by growth rate and growth phase but not by feedback repression. *Mol. Microbiol.*, 32(4):869–880, 1999.

[34] KAMMERER, C. UND GILLES, E. D.: A structured model for growth and product formation of *Streptomyces tendae*. In *9th European Congress on Biotechnology, Brussels (Belgium) , July 11-15*, 1999.

[35] KAMMERER, C. UND GILLES, E. D.: Modeling secondary metabolite production of *Actinomyces*. In *Biotechnology 2000, Berlin (Germany), 3.-8.Sept.*, 2000.

[36] KAMMERER, C. UND GILLES, E. D.: Modeling the growth and product formation of *Actinomyces*. In *4th International Congess on Biochemical Engineering, Stuttgart (Germany), February 17-18*, 2000.

[37] KENDLBACHER, T.: *Trajektorenoptimierung von Fermentationsprozessen*. Dissertation, Universität Stuttgart, 2001.

[38] KHETAN, A., MALMBERG, L.-H., KYUNG, Y.S., SHERMAN, D.H. UND HU, W.-S.: Precursor and cofactor as a check valve for cephamycin biosynthesis in *streptomyces clavuligerus*. *Biotechn. Progr.*, 15(6):1020–1027, 1999.

[39] KING, R.: *Mathematische Modelle myzelförmig wachsender Mikroorganismen*. Habitilationsschrift, VDI Fortschrittsberichte Nr. 17/103, 1993.

[40] KING, R.: A structured mathematical model for a class of organisms: I. Development of a model for *Streptomyces tendae* and application of model-based control. *J. Biotechnol.*, 52(3):219–234, 1997.

[41] KING, R.: Mathematical Modeling of the Morphology in Streptomyces Species. *Adv. in Biochem. Eng./Biotechn.*, 60:95–124, 1998.

[42] KING, R. UND BÜDENBENDER, C.: A structured mathematical model for a class of organisms: II. Application of the model to other strains. *J. Biotechnol.*, 52(3):235–244, 1997.

[43] KOMPALA, D.S., RAMKRISHNA, D. UND TSAO, G.T.: Cybernetic modeling of microbial growth on multiple substrates. *Biotechnol. Bioeng.*, 26:1272–1281, 1984.

[44] KRABBEN, P. UND NIELSEN, J.: Modeling the Mycelium Morphology of *penicillium* Species in Submerged Cultures. *Adv. in Biochem. Eng./Biotechn.*, 60:125–152, 1998.

[45] KRABBEN, P., ROUBOS, J.A., BRUINS, M.E., R.BABUŠKA, VERBRUGGEN, H.B. UND HEIJNEN, J.J.: Metabolic flux analysis of the growth of *S. clavuligerus* in batch-cultivations with different n-sources. In *Metabolic Engineering II*, Schloss Elmau, Germany, Oktober 1998.

[46] KREMLING, A., BETTENBROCK, K., LAUBE, B., JAHREIS, K., LENGELER, J.W. UND GILLES, E.D.: The organization of metabolic reaction networks: III. Application for diauxic growth on glucose and lactose. *Metabol. Eng.*, 3(4):362–379, 2001.

[47] KREMLING, A. UND GILLES, E.D.: The organization of metabolic reaction networks: II. Signal processing in hierarchical structured functional units. *Metabol. Eng.*, 3(2):138–150, 2001.

[48] KREMLING, A., JAHREIS, K., LENGELER, J.W. UND GILLES, E.D.: The organization of metabolic reaction networks: A signal–oriented approach to cellular models. *Metabol. Eng.*, 2(3):190–200, 2000.

[49] KRUMMEL, M.: *Parameteridentifikation bei Chromatographieprozessen*. Studienarbeit, Universität Stuttgart, Institut für Systemdynamik und Regelungstechnik, 1998.

[50] LAATSCH, H.: Antibase 2.0, a natural products database for rapid structure determination. *Chemical Concepts*, 1997.

[51] LAUER, B.: *Charakterisierung von Nikkomycin–Biosynthesegenen und genetische Manipulation des Biosysntheseweges in Streptomyces tendae Tü901*. Dissertation, Universität Tübingen, 1997.

[52] LEE, S.B. UND BAILEY, J.E.: Genetically structured models for *lac* Promoter-Operator Function in the chromosome and in multicopy plasmids: *lac* Promoter function. *Biotechnol. Bioeng.*, 26:1383–1389, 1984.

[53] LEE, S.B. UND BAILEY, J.E.: Genetically structured models for *lac* Promoter-Operator Function in the *Escherichia coli* chromosome and in multicopy plasmids. Part I: *lac* Operator function. Part II: *lac* Promoter function. *Biotechnol. Bioeng.*, 26:1372–1382, 1984.

[54] LENGELER, J.W.: Metabolic Networks: a signal oriented approach to cellular models . *Biol. Chem.*, 381:911–920, 2000.

[55] LJUNG, L.: *System Identification: Theory for the User*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, 1987.

[56] LOHR, D.: *Untersuchungen zum Wachstum und zur Nikkomycinbildung des Bakteriums Streptomyces tendae Tü 901/8c im Hinblick auf eine mathematische Modellbildung*. Dissertation, Universität Stuttgart, 1989.

[57] LÜBBERT, A. UND SIMUTIS, R.: Using measurement data in bioprocess modelling and control. *Trends in Biotechnol.*, 12:304–311, 1994.

[58] MADDEN, T., WARD, J.M. UND ISON, A.P.: Organic acid excretion by *streptomyces lividans* TK21 during growth on defined carbon and nitrogen sources. *Microbiol.*, 142:3181–3185, 1996.

[59] MAJER, C.: *Parameterschätzung, Versuchsplanung und Trajektorenoptimierung für verfahrenstechnische Prozesse*. Dissertation, Universität Stuttgart, 1998.

[60] MARR, A.G.: Growth rate of *Escherichia coli*. *Microbiol. Reviews*, 55(2):316–333, 1991.

[61] MARTIN, J.F., DAZA, A., ASTURIAS, J.A., GIL, J.A. UND LIRAS, P.: Transcriptional control of antibiotic biosynthesis at phosphate-regulated promoters and cloning of a gene involved in the control of the expression of multiple pathways in *Streptomyces*. In Okami, Y., Beppu, T. und Ogawara, H. (Hrsg.), *Biology of Actinomycetes*, Seiten 424–430. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1988.

[62] MATSUMOTO, A., HONG, S.-K., H. ISHIZUKA, S. HORINOUCHI UND BEPPU, T.: Phosphorylation of the AfsR protein involved in secondary metabolism in *Streptomyces* species by a eukaryotic-type protein kinase. *Gene*, 146:47–56, 1994.

[63] MEYBAUM, W.: Über die Bestimmung kleiner Pentosemengen insbesondere Derivaten der Adenylsäure. *Hoppe–Seyler Z. Physiol. Chem.*, 258:117–120, 1939.

[64] M.L.THOMPSON UND KRAMER, MARK A.: Modeling Chemical Processes using Prior Knowledge and Neural Networks. *AIChE J.*, 40/8:1328–1340, 1994.

[65] MÖHRLE, V.: *Klonierung und Charakterisierung von Nikkomycin–Biosynthesegenen aus S. tendae Tü901*. Dissertation, Universität Tübingen, 1995.

[66] MONOD, J.: *Recherches sur la croissance des cultures bacteriennes*. Hermann et Cie, Paris, 1942.

[67] MONTAGUE, GARY UND MORRIS, JULIAN: Neural–network contributions in biotechnology. *Trends in Biotechnol.*, 12:312–324, 1994.

[68] NAG LTD.: *NAG Fortran Library*. Oxford, England, UK, 1993.

[69] NEIDHARDT, F.C., INGRAHAM, J.L. UND SCHÄCHTER, M.: *Physiology of the Bacterial Cell, A Molecular Approach*. Sinauer, Sunderland, 1990.

[70] NIELSEN, J.: Modelling of filamentous fungi. *Adv. Biochem. Eng.*, 46:187–223, 1992.

[71] NIELSEN, J. UND VILLADSEN, J.: *Bioreaction Engineering Principles*. Plenum Press New York and London, 1994.

[72] NYSTRÖM, T.: To be or not to be: the ultimate decision of the growth–arrested cell. *FEMS Microbiol. Rev.*, 21:283–290, 1998.

[73] OCHI, K.: Occurence of the Stringent Response in *streptomyces* sp. and its Significance for the Initiation of Morphological and Physiological Differentiation. *J. Gen. Microbiol.*, 132:2621–2631, 1986.

[74] OCHI, K.: Metabolic initiation of differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*: Significance of the stringent response (ppGpp) and GTP content in relation to A Factor. *J. Bacteriol.*, 169(8):3608–3616, 1987.

[75] OCHI, K.: Nucleotide pools and stringent response in regulation of *streptomyces* differentiation. In Okami, Y., Beppu, T. und Ogawara, H (Hrsg.), *Biology of Actinomyces*, Seiten 330–337. Japan Scientific Press, Tokio, 1988.

[76] OCHI, K.: A relaxed (*rel*) mutant of *streptomyces coelicolor* A3(2) with a missing ribosomal protein lacks the ability to accumulate ppGpp, A-factor and prodigiosin. *J. Gen. Microbiol.*, 136:2405–2412, 1990.

[77] OLIVEIRA, R., VOLK, N., SIMUTIS, R. UND LÜBBERT, A.: Hybride Methoden zur Optimierung biotechnischer Produktionsprozesse. *Automatsierungstechn. Praxis*, 41/3:12–24, 1999.

[78] OTTEN, S.L., GALLO, M.A., MADDURI, K., LIU, X. UND HUTCHINSON, R.: Cloning and characterization of the *Streptomyces peucetius dnmZUV* genes encoding three enzymes required for the biosynthesis of daunorubicin precursor thymidine diphospho–L–daunosamine. *J. Bacteriol.*, 179:4446–4449, 1997.

[79] PARK, Y., TAMURA, S., KOIKE, Y., TORIYAMA, M. UND OKABE, M.: Mycelial pellet intrastructure visualization and viability prediction in a culture of *streptomyces fradiae* using confocal scanning laser microscopy. *Microbiol.*, 143:3573–3579, 1997.

[80] PELZER, S.: *Etablierung eines Wirts–Vektor–Systems und genetische Analyse des Balhimycin–Produzenten Amycolatopsis mediterranei DSM5908*. Dissertation, Universität Tübingen, 1997.

[81] PELZER, S., HUPPERT, W., HECKMANN, D. UND WOHLLEBEN, W.: Cloning and analysis of peptide systhetase gene of the balhimycin producer *Amycolatopsis mediterranei* DSM5908 and deveploment of a gene disruption/replacement system. *J. Biotechnol.*, 56:115–128, 1997.

[82] PFEFFERLE, U., OCHI, K. UND FIEDLER, H.-P.: The stringent response an the induction of nikkomycin production in *Streptomyces tendae*. *Actinomycetol.*, 9:118–123, 1995.

[83] POLLARD, J.F., BROUSSARD, M.R., GARRISON, D.B. UND SAN, K.Y.: Process identification using neural networks. *Comput. Chem. Eng.*, 16:253–270, 1992.

[84] POSTEN, C. UND MUNACK, A.: On–line application of parameter estimation accuracy to biotechnological processes. In *Proceedings of the 1990 American Control Conference,3*, Seiten 2181–2186, 1990.

[85] PREUSTING, H., NOORDOVER, J., SIMUTIS, R. UND LÜBBERT, A.: The Use of Hybrid Modelling for the Optimization of the Penicillin Fermentation Process. *CHIMIA*, 50:416–417, 1996.

[86] PROSSER, J.I.: Mathematical modelling of mycelial growth. In Burnett, J.H. und Trinci, A.P.J. (Hrsg.), *Fungal walls and hyphal growth*, Seiten 359–384. Cambridge University Press, 1979.

[87] RAMKRISHNA, R., RAMKRISHNA, D. UND KONOPKA, A.: Cybernetic Modeling of Mixed Substitutable Substrate Environments. Preferential and Simulataneous Utilisation. *Biotechnol. Bioeng.*, 52:144–154, 1996.

[88] RETTINGER, A.: *Parameteroptimierung mittels Evolutionsstrategien*. Studienarbeit, Universität Stuttgart, Institut für Systemdynamik und Regelungstechnik, 1995.

[89] ROUBOS, J.A., R.BABUŠKA, KRABBEN, P. UND HEIJNEN, J.J.: Hybrid model development for fed-batch bioprocesses; combining physical equations with the metabolic network and black-box kinetics. *J. A*, 41:17–23, 2000.

[90] R.SCHNEIDER, C. POSTEN UND MUNACK, A.: Application of linear balance equations on an on-line observation system for fermentation processes. In *IFAC Modeling and Control of Biotechnological Processes*, Seiten 319–322. Colorado, USA, 1992.

[91] SARRA, M., PEREZ-PONS, J.A., GODIA, F. UND ALVERO, C.C.: Importance of Growth Form and Production of Hybrid Antibiotic by *streptomyces lividans* TK21 by Fed–Batch and Continuous Fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 75:235–248, 1998.

[92] SCHIERHOLZ, K.: *Produktion, Isolierung und biologische Charakterisierung von Juglomycin*. Studienarbeit, Universität Stuttgart, Institut für Systemdynamik und Regelungstechnik, 1998.

[93] SCHUBERT, J., SIMUTIS, R., DORS, M., HAVLIK, I. UND LÜBBERT, A.: Hybrid Modelling of Yeast Production Processes. *Chem. Eng. Technol.*, 17:10–20, 1994.

[94] SEBASTINE, I.M., STOCKS, S.M., COX, P.W. UND THOMAS, C.R.: Characterisation of percentage viability of *streptomyces clavuligerus* using image analysis. *Biotechnol. Techn.*, 13:419–423, 1999.

[95] SHAHAB, N., FLETT, F., OLIVER, S.G. UND BUTLER, P.R.: Growth rate control of protein and nucleic acid content in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Escherichia coli* B/r. *Microbiol.*, 142:1927–1935, 1996.

[96] SHULER, M.L.: Single cell models: promise and limitations. *J. Biotechnol.*, 71:225–228, 1999.

[97] SIMUTIS, R. UND LÜBBERT, A.: Exploratory Analysis of Bioprocesses Using Artificial Neural Network-Based Methods. *Biotechnol. Prog.*, 13:479–487, 1997.

[98] STRAUCH, E., TAKANO, E., BAYLIS, H. A. UND BIBB, M.J.: The stringent response in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.*, 5(2):289–298, 1991.

[99] SUMMERS, G.R., DONADIO, S., STAVER, M. J., WENDT-PEINKOWSKI, E., HATCHINSON, R. UND KATZ, L.: Sequencing and mutagenesis of genes from the erythromycin biosynthetic cluster of *Saccharopolyspora erythraea* that are involved in L–mycarose and D–desoamine production . *Microbiol.*, 143:3251–3262, 1997.

[100] SUROWITZ, K.G. UND PFISTER, R.M.: Glucose metabolism and pyruvate excretion by *streptomyces alboniger*. *Can. J. Microbiol.*, 31:702–706, 1985.

[101] TRESKATIS, S.: *Wachstum, Morphologie und Antibiotikaproduktion von Streptomyceten in Submerskultur. Einsatz der digitalen Bildanalyse bei Wachstumskammerversuchen*

sowie Batch- und kontinuierlichen Fermentationen. Dissertation, Universität Tübingen, 1995.

[102] TÜCK, H.U., CHMIEL, H., HAMMES, W.P. UND TRÖSCH, W.: A study of N- and P-dependence of nikkomycin production in continuous culture with immobilized cells . *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 33:139–144, 1990.

[103] TURNER, B.G., RAMKRISHNA, D. UND JANSEN, N.B.: Cybernetic modeling of bacterial cultures at low growth rates: Single substrate systems. *Biotechnol. Bioeng.*, 34:252–261, 1989.

[104] VALLINO, J.J. UND STEPHANOPOULOS, G.: Flux determination in cellular bioreaction networks: applications to lysine fermentations. In Sikdar, S.K., Bier, M. und Todd, P. (Hrsg.), *Frontiers in Bioprocessing*, Seiten 205–219. CRC Press, 1990.

[105] VARMA, A. UND PALSSON, B.O.: Metabolic flux balancing: basic concepts, scientific and practical use. *Bio-Technol.*, 12:994–998, 1994.

[106] VARNER, J. UND RAMKRISHNA, D.: Application of Cybernetic Models in Metabolic Engineering. Investigation of Storage Pathways. *Biotechnol. Bioeng.*, 58:282–291, 1998.

[107] VON DÖHREN, H. UND GRÄFE, U.: General aspects of secondary metabolism. In Kleinkauf, H. und von Döhren, H. (Hrsg.), *Biotechnology Vol.7: Products of Secondary Metabolism*, Seiten 1–56. VCH, Weinheim, 1997.

[108] WALDRAFF, W.: *Modellgestützte Überwachung und Führung von Fed-Batch-Bioreaktoren*. Dissertation, Universität Stuttgart, 1996.

[109] WILLIAMS, S.T. UND VICKERS, J.C.: The ecology of antibiotic production. *Microb. Ecol.*, 12:43–52, 1986.

[110] WONG, P., GLAGNEY, S. UND KEASLING, J.D.: Mathematical model of the *lac* operon: Inducer exclusion, catabolite repression and diauxic growth on glucose and lactose. *Biotechn. Prog.*, 13:132–143, 1997.

[111] YANG, H.: *Mathematische Modellierung des Wachstums myzelbildender Mikroorganismen*. Dissertation, Universität Stuttgart, 1995.

[112] YOUNG, M.D., KEMPE, L.L. UND BADER, F.G.: Effects of phosphate, glucose, and ammonium on cell growth and lincomycin production by *Streptomyces lincolnensis* in chemically defined media. *Biotechnol. Bioeng.*, 27:327–333, 1985.