



EIT

FAKULTÄT FÜR
ELEKTROTECHNIK UND
INFORMATIONSTECHNIK

Multiskalen-Modellierung der Polyhydroxyalkanoat-Biopolymer- und Influenza-A-Impfstoffproduktion

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktoringenieurin
(Dr.-Ing.)**

von M.Sc. Stefanie Duvigneau
geb. am 01. November 1989 in Halberstadt

genehmigt durch die Fakultät für Elektrotechnik und Informationstechnik
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg.

Gutachter:

Prof. Dr-Ing. habil. Achim Kienle

Prof. Dr-Ing. habil. Andreas Kremling

Prof. Dr-Ing. Robert Dürr

Promotionskolloquium am 27. März 2023

Kurzreferat

Die Entwicklung und Verbesserung biotechnologischer Prozesse gehören zu den zentralen Maßnahmen zum Erreichen der Ziele des europäischen grünen Deals von 2019. In der vorliegenden Arbeit werden mit der Herstellung von Biopolymeren und der Produktion von Grippeimpfstoff zwei biotechnologische Anwendungsbeispiele betrachtet. Ein besonderer Fokus liegt dabei auf der Entwicklung und Anwendung von Multiskalen-Modellen. Mit der Multiskalen-Modellierung ist es möglich, die unterschiedlichen Detailebenen eines Prozesses in einem Ansatz zu verknüpfen und so die Verwendungsmöglichkeiten sowie den Informationsgehalt von mathematischen Modellen zu steigern.

Im ersten Teil der Arbeit werden Multiskalen-Modelle für die Herstellung von Polyhydroxyalkanoaten (PHAs) in *Cupriavidus necator* entwickelt und mithilfe eigens durchgeführter Experimente kalibriert und validiert. PHAs sind Biopolymere, die in einem mikrobiellen Prozess aus biobasierten Rohstoffen hergestellt werden können und stellen demzufolge eine Alternative zu erdölbasierten Polymeren dar. Darüber hinaus degradieren PHAs rückstandsfrei unter natürlichen Bedingungen und sind somit keine Belastung für unsere Ökosysteme. Trotz der vielen Vorteile ist der Anteil an industriell produzierten PHAs noch immer gering, da deren Herstellung im Vergleich zur Produktion von konventionellen Polymeren relativ teuer ist. Ein wesentliches Ziel ist demzufolge die Kostenreduktion, beispielsweise durch den Einsatz von kostengünstigen Rest- oder Abfallstoffen als Substrate. Darüber hinaus ist es wünschenswert, auf den finalen Verwendungszweck angepasste Polymere durch gezielte Einstellung von Prozessparametern zu produzieren.

Mithilfe der in dieser Arbeit entwickelten Multiskalen-Ansätze für die zwei Beispielpolymere Poly-(3-hydroxybutyrat) (PHB) und Poly-(3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyvalerat) (PHBV) ist es möglich, sowohl die Produktivität als auch Zusammensetzung und Kettenlängenverteilung der Polymere nach Änderung ausgewählter Prozessparameter *in silico* zu untersuchen. Damit wird ein wichtiges Werkzeug zur Verfügung gestellt, um die beiden vorab definierten Ziele, Kostenreduktion und maßgeschneiderte Biopolymerproduktion, zu erreichen.

Beim PHB-Produktionsprozess werden mit Fruktose und Acetat zwei Kohlenstoffquellen genutzt, die häufig in Reststoffen aus der Lebensmittelindustrie vorkommen. Durch die Kopplung eines hybrid kybernetischen Ansatzes mit einer Polymerisierungskinetik kann die Dynamik der Produktkonzentration und die Veränderung der Kettenlängenverteilung in einem Ansatz beschrieben werden. Dabei werden die Einflüsse der Sauerstoffverfügbarkeit und Kohlenstoff-zu-Stickstoff-Verhältnisse auf die Produktivität und Kettenlängenverteilung untersucht.

Für die Produktion des Copolymers PHBV wird ein Fed-Batch-Prozess unter Verwendung von Fruktose und Propionsäure untersucht und ein entsprechendes Multiskalen-Modell entwickelt. Der Anteil an 3-Hydroxyvalerat (HV) im PHBV Copolymer ist dabei eine wichtige Kenngröße, denn durch Steigerung dieses Anteils kann die Flexibilität im Vergleich zu PHB erhöht und das Prozessierungsfenster bei der Weiterverarbeitung vergrößert werden. Als relevante Prozessgrößen werden die Zuflussrate für Propionsäure und der Kohlenstoffdioxidgehalt im Abgas betrachtet. Mithilfe des

Multiskalen-Ansatzes wird der Einfluss dieser Prozessgrößen auf die Polymerausbeute und -zusammensetzung sowie Kettenlängenverteilung untersucht.

Im zweiten Teil der Arbeit wird ein Multiskalen-Modell für den Influenza-A-Impfstoff-Prozess entwickelt. Die Produktion von Influenza-A-Viren (IAVs), welche einen wesentlichen Bestandteil von aktuellen Grippeimpfstoffen bilden, wird vermehrt mit Zellkulturen als Produktionssystem umgesetzt. Die Steigerung der Virusausbeute bei Verwendung von Zellkulturen ist ein zentrales Ziel, um plötzlichem Mehrbedarf an Grippeimpfstoff flexibel gegenüber treten zu können. Genetische Modifikation ausgewählter Schlüsselfaktoren der Wirtszellen (sogenannter Wirtszellfaktoren) ist eine Möglichkeit dieses Ziel zu erreichen. Die hier betrachteten Genveränderungen mittels lentiviraler Transduktion führen jedoch zu einem Anstieg der Heterogenität der Zellpopulation. Mit einem Multiskalen-Ansatz wird es möglich, die durch genetische Modifikation erzeugte Heterogenität, unter Anwendung einer hochdimensionalen Populationsbilanz zu berücksichtigen. Im Rahmen der hier entwickelten Methodologie kann nicht nur der Einfluss von Einzelgenmodifikationen hinsichtlich der Virusausbeute untersucht werden, sondern auch der Einfluss von mehreren Genmodifikationen. Damit kann auf Basis weniger experimenteller Daten ein modellbasierter Vorschlag für vorteilhafte Kombinationen von genetischen Veränderungen gemacht werden.

Abstract

The development and improvement of biotechnological processes are central measures to achieve the goals of the European Green Deal of 2019. In the present work, the production of biopolymers and influenza vaccine are chosen to develop mathematical models and investigate possible behavior *in silico* and experimentally. A special focus is on the development and application of multiscale models. With multiscale modeling, it is possible to link different levels of detail in one approach, thus increasing the usability and information content of mathematical models.

In the first part of the work, multiscale models for the production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) in *Cupriavidus necator* are developed. Those models are identified and validated using own experimental data. PHAs are biopolymers that can be produced from bio-based raw materials in a microbial process and thus, represent an alternative to petroleum-based polymers. In comparison to petroleum-based polymers, PHAs are environmentally friendly, since they degrade under natural conditions without leaving any residue. Despite the many advantages, the microbial production of PHAs is still relatively expensive compared to the production of conventional polymers. Therefore, the main objective is cost reduction, for example through the use of inexpensive residues or waste materials as substrates. In addition, it is desirable to produce polymers that are adapted to the final application by adjusting process parameters. With the help of the multiscale approaches developed in this work for the production of two example polymers poly-(3-hydroxybutyrate) (PHB) and poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxy-valerate) (PHBV) it is possible to investigate productivity as well as composition and chain length distribution of the polymers after changing selected process parameters *in silico*. This provides an important tool to achieve the previously defined goals, cost reduction and tailor-made biopolymer production.

The PHB production process was investigated using fructose and acetate. These two carbon sources are often found in residues from the food industry. By coupling a hybrid cybernetic approach with polymerization kinetics, the dynamics of the product concentration and the change in the chain length distribution can be described in one approach. With that, the influences of oxygen availability and carbon-to-nitrogen ratios on productivity and chain length distribution is examined.

For the production of the copolymer PHBV, a fed-batch process using fructose and propionic acid was investigated and a corresponding multiscale model was developed. PHBV is mainly defined by the proportion of 3-hydroxyvalerate (HV), which makes the copolymer more flexible than PHB and increases the processing window of the polymer. The composition of PHBV can be predicted using the macroscopic model developed here. The dynamics of the chain length distribution can be observed through the coupling with polymerization kinetics. The inflow rate for propionic acid and the carbon dioxide content in the exhaust gas are included as relevant process variables. With the help of the multiscale approach, the influence of these process variables on the polymer yield and composition as well as chain length distribution can be investigated.

In the second part of the work, a multiscale model for the influenza A vaccine production process is developed. Influenza A viruses (IAVs), which are an essential part

of current influenza vaccines, is increasingly produced using cell cultures. Increasing the virus yield when using cell cultures is a central goal in order to be able to flexibly counteract a sudden increase of influenza vaccine demand. Genetic modification of selected key factors of the host cells (so-called host cell factors) is one way to achieve this goal. However, the gene modifications considered here using lentiviral transduction lead to an increase in the heterogeneity of the cell population. With a multiscale approach, it becomes possible to account for the heterogeneity generated by genetic modification using a high-dimensional population balance. Within the framework of the methodology developed here, not only the influence of single gene modifications with regard to virus yield can be examined, but also the influence of multiple gene modifications. Using the methodology, a model-based suggestion for advantageous combinations of genetic changes can be made on the basis of experimental data sets after single gene modification.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Motivation und Zielsetzung	1
1.2. Aufbau der Arbeit	3
2. Produktion von Polyhydroxyalkanoaten	7
2.1. Biotechnologische Grundlagen	7
2.1.1. Herstellung von Polyhydroxyalkanoaten	8
2.1.2. Eigenschaften und Einflussmöglichkeiten zur Herstellung maßgeschneiderter Biopolymere	9
2.1.3. Polyhydroxyalkanoate in Industrie und Forschung	13
2.2. Experimentelle Methoden	14
2.2.1. Mikroorganismus und Kultivierungsbedingungen	14
2.2.2. Analyse der Substrate	15
2.2.3. Analyse der Produkte	16
2.2.4. Bestimmung der Biotrockenmasse	17
2.3. Theoretische Grundlagen	18
2.3.1. Prozessmodelle	18
2.3.2. Hybrid kybernetische Modellierung	22
2.3.3. Modellierung von Polymerisierungsprozessen	33
2.3.4. Parameterschätzung	36
2.4. Poly(3-hydroxybutyrat)-Produktion unter Verwendung von Fruktose und Acetat als Kohlenstoffquellen	37
2.4.1. Hybrid kybernetisches Modell für den PHB Produktionsprozess	37
2.4.2. Darstellung der zeitlichen Dynamik und Vergleich mit experimentellen Daten	44
2.4.3. Simulationsstudie - Auswahl des CN-Verhältnisses bei verschiedenen Sauerstoffverfügbarkeiten	48
2.4.4. Multiskalen-Modellierung - Kopplung des PHB-Modells mit einer Polymerisierungskinetik	49
2.5. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Produktion unter Verwendung von Fruktose und Propionsäure als Kohlenstoffquellen	60
2.5.1. Metaboles Modell	61
2.5.2. Parameteridentifikation und Darstellung der zeitlichen Dynamik	68
2.5.3. Validierung	71
2.5.4. Simulationsstudie	72
2.5.5. Multiskalen-Modellierung - Kopplung des PHBV-Modells mit einer Polymerisierungskinetik	77
2.6. Zusammenfassung und Schlussfolgerung	80

3. Influenza-A-Impfstoffproduktion	83
3.1. Biotechnologische Grundlagen	83
3.1.1. Klassifizierung und Aufbau von Influenza-A-Viren	83
3.1.2. Replikationszyklus von Influenza-A-Viren	84
3.1.3. Auswahl und Zusammensetzung des Impfstoffs	87
3.1.4. Produktionssysteme	88
3.1.5. Zelluläre Faktoren zur Steigerung der Virusreplikation	89
3.2. Theoretische Grundlagen	91
3.2.1. Replikationskinetik auf Einzelzellebene nach Heldt et al. [62, 63]	91
3.2.2. Multiskalen-Modell	95
3.3. Analyse des Einflusses von Genmodifikationen	98
3.3.1. Methodologie und Umsetzung	99
3.3.2. Einfluss von Einzelgenüberexpressionen	101
3.3.3. Einfluss von Mehrfachgenüberexpressionen	102
3.4. Zusammenfassung und Schlussfolgerung	112
4. Ausblick	114
Appendix	115
A. PHA-Experimente	116
B. Metaboles Modell des PHB-Produktionsprozesses	118
C. Metaboles Modell des PHBV-Produktionsprozesses	124
D. Polymerisierungskinetik für PHB und PHBV	127
E. Modellierung des Influenza-A-Impfstoffprozesses	129
Abbildungsverzeichnis	134
Tabellenverzeichnis	138
Abkürzungsverzeichnis	139
Nomenklatur	143
Literaturverzeichnis	149
Ehrenerklärung	167

1. Einleitung

1.1. Motivation und Zielsetzung

Mathematische Modelle spielen eine wichtige Rolle bei der modellgestützten Analyse, Gestaltung und Führung biotechnologischer Prozesse. Bei genauerer Betrachtung sind häufig unterschiedliche Detailebenen dieser Prozesse von Bedeutung, welche auf geschickte Weise miteinander verknüpft werden müssen, um zu handhabbaren mathematischen Modellbeschreibungen zu kommen. Im Rahmen der Arbeit werden Ansätze der fortgeschrittenen Multiskalen-Modellierung anhand zweier typischer biotechnologischer Anwendungsbeispiele untersucht.

Das erste Anwendungsbeispiel beschäftigt sich mit der Herstellung von Polyhydroxyalkanoaten (PHAs) in Mikroorganismen. In vielen Fällen werden PHAs unter nicht ausbalancierten Wachstumsbedingungen (z. B. Limitation von Stickstoff oder Phosphat) als Kohlenstoff- und Energiespeicher akkumuliert [19, 101, 170]. PHAs sind Biopolymere, die je nach Zusammensetzung und Kultivierungsbedingungen ähnliche Eigenschaften wie erdölbasierte Polymere haben können. Im Gegensatz zu den erdölbasierten Polymeren sind PHAs unter natürlichen Bedingungen biologisch abbaubar und können somit einen wesentlichen Beitrag zur Reduktion der Umweltverschmutzung durch Plastikabfälle leisten. Des Weiteren können sie aus nachwachsenden Rohstoffen, Kohlenstoffdioxid sowie biogenen Rest- und Abfallstoffen hergestellt werden [9, 55, 86, 140, 166]. Je nach Zusammensetzung des Substrates können unterschiedliche Homo- und auch Copolymere gebildet werden.

Trotz aller Vorteile ist der Anteil an industriell produzierten PHAs noch immer gering [119]. Zur Steigerung des Marktanteils von PHAs müssen zwei wesentliche Herausforderungen überwunden werden. Zum einen sollten die Produktionskosten soweit reduziert werden, dass diese ein zur konventionellen Polymerherstellung vergleichbares Level erreichen. Zum anderen wäre es wünschenswert, wenn, ähnlich wie bei den erdölbasierten Polymeren, die mechanischen und thermischen Polymereigenschaften durch zielgerichtete Veränderung der Prozessbedingungen an den jeweiligen Verwendungszweck der Polymere flexibel angepasst werden könnten. Die Polymereigenschaften hängen im Wesentlichen von der Zusammensetzung und Kettenlängenverteilung der Polymere ab [163]. Zur Vorhersage der Kettenlängenverteilung und Zusammensetzung in Abhängigkeit der Prozessbedingungen wird im Rahmen der Arbeit ein Multiskalen-Ansatz entwickelt, der eine Polymerisationskinetik mit einer geeigneten mathematischen Beschreibung der metabolen Prozesse koppelt. Dieser Multiskalen-Ansatz wird anhand der Produktionsprozesse zur Herstellung des Homopolymers Poly-(3-hydroxybutyrat) (PHB) und des Copolymers Poly-(3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyvalerat) (PHBV) aus der Gruppe der PHAs entwickelt.

Eine wesentliche Stellschraube zur Reduktion der Kosten ist die Verwendung von Abfall- und Reststoffen als Kohlenstoffquelle für die Produktion von PHAs [86, 140]. Neben unterschiedlichen Zuckern, wie Glukose und Fruktose, sind darin oft auch kurzkettige Fettsäuren, wie Essig- und Propionsäure enthalten, die einen wesentlichen Einfluss auf die Produktbildung haben [157, 181]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde dieser Einfluss mit Hilfe definierter Substrate aus Fruktose, Acetat und Propionsäure experimentell und theoretisch untersucht. Dazu wurden unterschiedliche erweiterte Modellierungsansätze zur Beschreibung der metabolen Prozesse entwickelt.

Das zweite Anwendungsbeispiel beschäftigt sich mit der Herstellung von Influenza-Impfstoffen. Dabei werden in einem ersten Schritt Inflenzaviren in einem Kultivierungssystem produziert und dann zum finalen Impfstoff weiterverarbeitet. Die Vermehrung von Inflenzaviren in Hühnereiern gilt hierbei als klassisches Verfahren. Zellkulturbasierte Produktionssysteme kommen allerdings immer mehr zum Einsatz, da mit diesen leichter auf einen erhöhten Impfstoffbedarf reagiert werden kann [148]. Die Anzahl der erforderlichen Dosen hängt dabei stark von der Entwicklung der saisonalen Grippewelle ab. Folglich ist die Steigerung der Produktivität eine wesentliche Herausforderung bei der Verwendung von Zellkulturen zur Herstellung von Influenza-Impfstoffen.

Forschungsarbeiten zeigen, dass genetische Veränderungen der Wirtszellen zu einer gesteigerten Virusausbeute führen können [74, 90]. Mit der Einbringung von genetischen Modifikationen steigt jedoch auch die Variabilität zwischen den Wirtszellen, da viele Methoden nicht zielgerichtet und nur mit unterschiedlicher Effizienz in Bezug auf die gesamte Zellpopulation möglich sind. Mit Hilfe mathematischer Modelle kann der Einfluss der Unterschiede zwischen den genetisch modifizierten Wirtszellen auf die Virusausbeute untersucht werden. Zur Beschreibung der Heterogenität in multizellulären Systemen werden üblicherweise stochastische Monte-Carlo-Ansätze verwendet, die je nach Anwendung aber sehr rechenintensiv sein können [97]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein neuartiger deterministischer Ansatz verwendet. Dessen Ausgangspunkt ist eine detaillierte virale Replikationskinetik auf Einzelzellebene [63], die in eine populationsdynamische Beschreibung des Gesamtprozesses einfließt. Neben einzelnen genetischen Veränderungen der Wirtszellen können auch mehrere Gene modifiziert und mit dem hier vorgestellten Multiskalen-Ansatz im Vorfeld analysiert werden. Somit wird die modellbasierte Auswahl geeigneter Genmodifikationen im Hinblick auf die Produktivität ermöglicht und damit ein Werkzeug zur Verfügung gestellt, welches bei der Planung von Experimenten zu Rate gezogen werden kann.

1.2. Aufbau der Arbeit

Die folgende Arbeit besteht aus vier Kapiteln. Nachdem im ersten Kapitel die generelle Motivation und die wichtigsten Ziele dieser Arbeit definiert worden, behandeln die zwei folgenden Kapitel die Produktion von PHAs und den Influenza-A-Virus (IAV)-Impfstoffprozess. Im Kapitel vier wird schließlich ein Ausblick über weitere Anwendungen und Entwicklungsmöglichkeiten der hier entwickelten Multiskalen-Ansätze in biotechnologischen Prozessen gegeben.

Im Kapitel zwei werden zunächst die biotechnologischen Grundlagen für die Produktion von PHAs erläutert. In Abschnitt 2.1 liegt dabei der Fokus auf der Darstellung der vielfältigen Möglichkeiten zur Beeinflussung von Polymereigenschaften. Obwohl nicht alle Einflussmöglichkeiten im Rahmen der Arbeit betrachtet werden, liefert das Kapitel einen wichtigen Überblick, welcher als Diskussionsgrundlage für die weitere Anwendung, der in Abschnitt 2.4 und 2.5 entwickelten Modelle, genutzt wird. Im Anschluss daran werden im Abschnitt 2.2 die experimentellen Methoden für die Erhebung der Daten im Rahmen der Produktion von PHAs erklärt. Neben der Beschreibung der Kultivierungsbedingungen für die Durchführung von Bioreaktorexperimenten im Schüttelkolben- und Reaktormaßstab mit *Cupriavidus necator* (*C. necator*), werden vor allem Methoden zur Messung der Zusammensetzung und Kettenlängenverteilung mittels Flüssigchromatografie beschrieben. Die Etablierung einer Messmethode, die die Anteile von 3-Hydroxybutyrat (HB) und 3-Hydroxyvalerat (HV) im Copolymer PHBV mittels HPLC (engl. *high performance liquid chromatography*) bestimmen kann, wurde eigens für diese Arbeit entwickelt [46] und ist in Abschnitt 2.2.3 beschrieben.

Im Abschnitt 2.3 werden die theoretischen Grundlagen der betrachteten Modellierungsansätze für die Herstellung von PHAs eingeführt. Dabei werden zunächst die Prinzipien für die Entwicklung eines einfachen Prozessmodells zur Beschreibung der Dynamik von Produkt- und Substratkonzentrationen anhand eines Beispiels gezeigt. Ein besonderer Fokus liegt hier auf der Einführung und Einbeziehung grundlegender Enzymkinetiken, wie beispielsweise Produktinhibierung, in die Modellgleichungen. Anschließend werden die Grundlagen zur Entwicklung von hybrid kybernetischen Modellen (HCMs) anhand eines Minimalbeispiels demonstriert (Abschnitt 2.3.2). Eine Einführung relevanter Bausteine zur Beschreibung der Polymerisierungskinetik von PHAs wird im darauffolgenden Abschnitt 2.3.3 gegeben.

Die Abschnitte 2.4 und 2.5 beschäftigen sich mit der Entwicklung und Anwendung von Multiskalen-Ansätzen zur Beschreibung ausgewählter PHA-Produktionsprozesse. Zunächst wird dabei auf den am häufigsten untersuchten Vertreter aus der Gruppe der PHAs eingegangen: PHB. Als Beispielprozess wird in Abschnitt 2.4 die PHB-Produktion unter Verwendung von Fruktose und Acetat gewählt. Damit werden zwei Kohlenstoffquellen verwendet, die häufig in Reststoffen aus der Lebensmittelindustrie vorkommen. Für den genannten Prozess wird ein hybrid kybernetisches Modell (HCM) zur Beschreibung der Produktausbeuten bei unterschiedlichen Substratzusammensetzungen und Sauerstoffverfügbarkeiten entwickelt. Darüber hinaus wird ein Verknüpfungsansatz dieses HCMs mit einer Polymerisierungskinetik vorgestellt. Mit Hilfe dieses Multiskalen-Ansatzes kann die Dynamik der Verteilung

von Polymerketten gekoppelt an wichtige Prozessgrößen beschrieben werden. Dies wird am Beispiel einer modellgestützten Analyse der Auswirkung unterschiedlicher Kohlenstoff-zu-Stickstoff-Verhältnisse und Sauerstoffverfügbarkeiten auf die Kettenlängenverteilung demonstriert.

Im Abschnitt 2.5 wird die Fed-Batch-Produktion von PHBV aus Fruktose und Propionsäure untersucht. Auch für diesen Anwendungsfall wird ein Multiskalen-Modell vorgestellt, welches die Kettenlängenverteilung unter Verwendung der o. g. kostengünstigen Kohlenstoffquellen beschreiben kann. Im Vergleich zur Modellierung für die Beschreibung des PHB-Produktionsprozesses muss bei der Modellbildung für den PHBV-Produktionsprozess das Verhältnis zwischen HB und HV berücksichtigt werden. Dieses ist für die Bewertung der Produktqualität entscheidend, da die unterschiedlichen Monomeranteile im Copolymer die Polymereigenschaften maßgeblich beeinflussen können. Die Anteile an HB und HV im Polymer können mit dem metabolen Modell zur Beschreibung der Dynamik von Substrat- und Produktkonzentrationen bestimmt werden, welches im ersten Teil des Abschnitts 2.5 beschrieben wird. Neben der Zuflussrate für Propionsäure konnte durch Analyse der experimentellen Prozessdaten der Kohlenstoffdioxidgehalt im Abgas als charakteristische Größe evaluiert und für den Modellansatz verwendet werden. Das metabolische Modell wird schließlich an die in Abschnitt 2.4.4 vorgestellte Polymerisationskinetik gekoppelt, um den Einfluss dieser Prozessgrößen auf die Kettenlängenverteilung untersuchen zu können. In Abschnitt 2.6 werden schließlich die Ergebnisse beider PHA-Produktionsprozesse resümiert, gegenübergestellt und bewertet.

Das Kapitel 3 beschäftigt sich mit der Produktion von IAVs. Diese werden in Abschnitt 3.1 zunächst klassifiziert. Da die virale Replikationskinetik für den in Abschnitt 3.3 verwendeten Multiskalen-Ansatz eine zentrale Rolle spielt, werden die molekularbiologischen Vorgänge zur Vermehrung von IAVs in Säugerzellen in Abschnitt 3.1.2 beschrieben. Zur besseren Einordnung des hier behandelten Produktionsprozesses wird in den Abschnitten 3.1.3 und 3.1.4 ein Überblick über die Zusammensetzung saisonaler Grippeimpfstoffe und die möglichen Produktionssysteme gegeben. Im letzten Abschnitt wird der Einfluss ausgewählter Wirtszellfaktoren auf den viralen Replikationszyklus genauer beleuchtet, da die modellgestützte Bewertung bzgl. der Produktivität nach Änderungen bzw. Einbringung von wirtszellspezifischen Genen ein zentrales Ziel dieser Arbeit ist.

Im anschließenden Abschnitt 3.2 werden die erforderlichen Kinetiken zur Bildung eines Multiskalen-Modells eingeführt. Zunächst wird die Replikationskinetik von IAV auf Einzelzellebene beschrieben. Diese Replikationskinetik kann genutzt werden, um die Dynamik von Zell- und Virusspezies genauer zu beschreiben. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Kopplung mit einer kontinuierlichen Populationsbilanz für infizierte Zellen. Das resultierende Multiskalen-Modell ist in Abschnitt 3.2.2 beschrieben. Damit ist es möglich, Varianzen zwischen Zellen zu berücksichtigen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten infiziert worden. Unter Hinzunahme von ausgewählten kinetischen Parametern der Replikationskinetik wird zusätzlich der Einfluss von genetischen Modifikationen auf die Virusausbeute berücksichtigt.

Im Abschnitt 3.3 liegt der Fokus auf der Analyse des Einflusses von Genmodifikationen auf den IAV-Impfstoffproduktionsprozess. Dafür wird zunächst eine allgemeine

Methodologie für die Bewertung des Einflusses von genetisch veränderten Zelllinien auf Produktausbeuten vorgestellt. Der Nutzen der Methodologie wird anschließend am Anwendungsbeispiel der IAV-Impfstoffproduktion demonstriert. Dabei spielt das zuvor beschriebene Multiskalen-Modell eine zentrale Rolle, denn durch dieses wird es möglich, die durch genetische Modifikation entstandene Variabilität innerhalb der Zellpopulation zu berücksichtigen. Neben einzelnen Genmodifikationen werden auch Mehrfachgenmodifikationen in Zellkulturen hinsichtlich der theoretisch möglichen Virusausbeute untersucht.

In dem letzten Kapitel wird ein Ausblick über zukünftige Anwendungen von Multiskalen-Ansätzen für die behandelten biotechnologischen Beispielprozesse gegeben.

Alle während der Promotion entstandenen Artikel sind nachfolgend nach Anwendungsbeispielen geordnet und zusammengefasst. Die eigenen Beiträge sind jeweils in runden Klammern angegeben.

Herstellung von Polyhydroxyalkanoaten

- **Duvigneau, S., Dürr, R., Carius, L., Kienle, A. (2020).**
Hybrid cybernetic modeling of polyhydroxyalkanoate production in *Cupriavidus necator* using fructose and acetate as substrates
IFAC PapersOnLine, 53(2), 16872–16877. (Schreiben, Simulation, Visualisierung, Analyse, Auswertung)
- **Duvigneau, S., Dürr, R., Kranert, L., Wilisch-Neumann, A., Carius, L., Findeisen, R., Kienle, A. (2021).**
Hybrid cybernetic modeling of the microbial production of polyhydroxyalkanoates using two carbon sources
Computer Aided Chemical Engineering, 50, 1969–1974. (Schreiben, Simulation, Visualisierung, Analyse, Auswertung)
- **Dürr, R., Duvigneau, S. and Kienle, A. (2021).**
Microbial production of polyhydroxyalkanoates – Modeling of chain length distribution
Computer Aided Chemical Engineering, 50, 1975–1981. (Simulation, Schreiben, Korrekturlesen)
- **Duvigneau, S., Kettner, A., Carius, L., Griehl, C., Findeisen, R., Kienle, A. (2021).**
Fast, inexpensive, and reliable HPLC method to determine monomer fractions in poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)
Applied Microbiology and Biotechnology, 105, 4743–4749. (Konzept, Schreiben, Visualisierung, Experimente, Simulation, Analyse, Auswertung)
- **Duvigneau, S., Dürr, R., Behrens, J., Kienle, A. (2021).**
Advanced kinetic modeling of bio-co-polymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production using fructose and propionate as carbon sources.

Processes, 9(8), 1-19. (Schreiben, Visualisierung, Experimente, Simulation, Analyse, Auswertung)

- Dürr, R., **Duvigneau, S.**, Seidel, C., Kienle, A., Bück, A. (2021).
Multi-rate data fusion for state and parameter estimation in (bio-) chemical process engineering
Processes, 9(11), 1–16. (Simulation, Schreiben, Korrekturlesen)
- **Duvigneau, S.**, Dürr, R., Wulkow, M., Kienle, A. (2022).
Multiscale modeling of the microbial production of polyhydroxyalkanoates using two carbon sources
Computers and Chemical Engineering, 160. (Schreiben, Visualisierung, Experimente, Simulation, Analyse, Auswertung)

Influenza-A-Impfstoffproduktion

- Dürr, R., **Duvigneau, S.**, Laske, T., Bachmann, M., Kienle, A. (2016).
Analyzing the impact of heterogeneity in genetically engineered cell lines for influenza vaccine production using population balance modeling
IFAC-PapersOnLine, 49(26). (Simulation, Visualisierung, Korrekturlesen)
- Dürr, R., Müller, T., **Duvigneau, S.**, Kienle, A. (2017).
An efficient approximate moment method for multi-dimensional population balance models – Application to virus replication in multicellular systems
Chemical Engineering Science, 160. (Simulation, Visualisierung, Korrekturlesen)
- **Duvigneau, S.**, Dürr, R., Laske, T., Bachmann, M., Dostert, M., Reichl, U., Kienle, A. (2018).
Mathematical modeling as a tool to improve influenza vaccine production processes
IFAC-Papers-OnLine, 51(19). (Schreiben, Visualisierung, Simulation, Datenanalyse, Auswertung)
- **Duvigneau, S.**, Dürr, R., Laske, T., Bachmann, M., Dostert, M., Kienle, A. (2020).
Model-based approach for predicting the impact of genetic modifications on product yield in biopharmaceutical manufacturing - Application to influenza vaccine production.
PLoS Computational Biology, 16(6), 1–22. (Schreiben, Simulation, Visualisierung, Konzept, Analyse, Auswertung)

2. Produktion von Polyhydroxyalkanoaten

2.1. Biotechnologische Grundlagen

Im europäischen Wirtschaftsraum werden jährlich 49.1 Mt verarbeitete Kunststoffe benötigt [130]. Dabei benötigen die sechs größten europäischen Länder, darunter Deutschland, bereits 70 % dieses Bedarfs. Die drei größten Sektoren in denen Kunststoffe benötigt werden, sind die Verpackungsindustrie, das Baugewerbe und der Automotiv-Bereich. Hier werden vor allem Polyethylen und Polypropylen verarbeitet. Diese zwei Gruppen von Thermoplasten lassen sich sehr flexibel verarbeiten und zeichnen sich insbesondere durch Eigenschaften wie gute Gasdurchlässigkeit und Wasserbarrierefunktion aus, welche besonders im Verpackungsbereich von hoher Wichtigkeit sind. Beide Polymertypen werden aus Kohlenstoffverbindungen hergestellt, die aus Erdöl oder Erdgas gewonnen werden. Die hohe Beständigkeit gegenüber Umweltfaktoren ist eine weitere vorteilhafte Eigenschaft dieser konventionellen Polymere. Gelangen diese jedoch in die Umwelt, können sie durch die hohe Persistenz nicht durch Mikroben abgebaut werden und unterliegen somit keinerlei Zerfall. Einzig UV-Strahlung sorgt für die Kettenspaltung der Polymere, was zur Entstehung von Mikroplastik führt. Große und kleine Plastikpartikel in unterschiedlichsten Habitaten unserer Welt sind nicht nur für das dort ansässige Tier- und Pflanzenreich ein ernstes Problem, sondern auch für die Menschheit selbst [58, 70]. Neben der schwerwiegenden Umweltbelastung wird die Produktion von sogenanntem konventionellem Plastik, durch die Knappheit fossiler Rohstoffe, zu einer immer größeren Herausforderung. Aus diesem Grund wurden in den letzten Jahrzehnten Produktionsprozesse für eine Reihe biobasierter Alternativen entwickelt und vorangetrieben [113]. Von diesen Alternativen sind jedoch nicht alle unter natürlichen Bedingungen degradierbar. Neben thermoplastischer Stärke bildet die Gruppe der PHAs eine Ausnahme, da diese unter verschiedensten Bedingungen biologisch degradiert werden kann (Tabelle 2.1). Dieser lineare Polyester ist, ebenso wie Polyethylen und Polypropylen, ein Thermoplast und zeichnet sich neben seiner Degradierbarkeit durch eine gute Biokompatibilität aus. Des Weiteren sind PHAs nicht-toxisch und können aus einer ganzen Reihe von nachwachsenden Rohstoffen, Reststoffen oder sogar CO₂ produziert werden. Strukturell werden PHAs entsprechend ihrer Seitenkettenlänge in kurz-kettige (3-5), mittelkettige (6-14) und langkettige Polymere (>15) eingeteilt [107]. Ein besonders gut untersuchter Vertreter aus der Gruppe der PHAs ist das Homopolymer PHB, welches aus HB Monomeren besteht. Neben der Produktion von Homopolymeren ist es je nach Substratzusammensetzung möglich Copolymere in zufälliger oder block-

Tabelle 2.1.: Abbauverhalten biobasierter Polymere [113].

	Kontrollierte Bedingungen			Umweltbedingungen			
	Industriell 50-70 °C	Anaerob 50-54 °C	Haushalt 28 °C	Ozean 30 °C	Frischwasser 21 °C	Anaerob 35 °C	Böden 25 °C
PLA	✓	✓					
PHB	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
PBS	✓						
TPS	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Legende: PLA, Polymilchsäure; PHB, Polyhydroxybutyrate; PBS, Polybutylensuccinat; TPS, thermoplastische Stärke

weiser Anordnung zu erzeugen, wodurch eine Erhöhung der Prozessierbarkeit des Rohstoffs erreicht wird [122].

In den folgenden Absätzen werden zunächst die generellen biologischen Vorgänge zur Produktion von PHAs erklärt. Anschließend wird auf die Vielseitigkeit bei der Herstellung von PHAs sowie mögliche Einflussparameter eingegangen. Weiterhin wird eine Auswahl von industriell hergestellten PHAs charakterisiert und ein Überblick der Forschungsaktivität der letzten Jahrzehnte, mit Fokus auf der Entwicklung und Verwendung mathematischer Modelle, gegeben.

2.1.1. Herstellung von Polyhydroxyalkanoaten

Die Herstellung von PHAs kann chemisch, in Pflanzen oder mikrobiell erfolgen [107]. Beispielsweise kann bei der chemischen Polymerisation zur Herstellung von PHB entweder 4-Hydroxybutyrate durch Kondensation polymerisieren oder es erfolgt eine Ringöffnungspolymerisation von β -Butyrolacton [142, 168]. Alternativ können PHAs auch in gentechnisch-veränderten Pflanzen wie Flachs synthetisiert werden [26, 176]. Die mikrobielle Fermentation ist die verbreitetste Art PHAs zu produzieren [159]. Derzeit sind ca. 300 Bakterien bekannt, die in der Lage sind PHAs zu synthetisieren und intrazellulär in sogenannten Granula, auch Carbosome genannt, zu speichern [107]. Der am häufigsten untersuchte und auch industriell verwendete Stamm ist *C. necator*, welcher auch in dieser Arbeit verwendet wird. PHAs dienen als Kohlenstoff- und Energiespeicher, welche häufig unter limitierten Wachstumsbedingungen gebildet werden. Faktoren, die die Bildung von PHAs katalysieren, sind u.a. Limitierungen des Stickstoffs, Phosphats, der Spurenelemente oder des Sauerstoffs im Medium [19, 69, 101, 170].

Die Biosynthese für den am besten untersuchten Vertreter PHB kann in drei wesentliche Reaktionen eingeteilt werden [28] (siehe auch Abbildung 2.1):

1. Zwei Moleküle Acetyl-CoA reagieren mittels β -Ketothiolase (PhaA, BktB) zu Acetoacetyl-CoA.
2. Die Acetoacetyl-CoA-Reduktase reduziert Acetoacetyl-CoA und bildet das Monomer (R)-3-Hydroxybutyryl-CoA.

3. Das Monomer wird in einer weiteren enzymatischen Reaktion an der PHA Synthase (PhaC) an eine Polymerkette angefügt.

Neben der Akkumulation von PHB ist der Wildtyp von *C. necator* in der Lage noch weitere Polymere mit einem Anteil kurzer Seitenketten zu produzieren. Die Art der verfügbaren Monomere, hängt von der externen Kohlenstoffquelle ab. Zum einen kann durch 4-Hydroxybuttersäure als Kohlenstoffquelle im Medium Poly-(4-Hydroxybutyrate) erzeugt werden [27, 164]. Bei Aufnahme einer Kohlenstoffquelle mit ungerader Anzahl an Kohlenstoffatomen können auch HV Monomere in die Polymerkette eingebaut werden und so das Copolymer PHBV bilden. Typische ungerade Kohlenstoffquellen sind Lävulinsäure, Valeriansäure, Propionsäure oder deren Salze [7]. Der metabolische Pfad von Propionyl-CoA zu Acetyl-CoA unter Decarboxylierung ebenso möglich [8]. Demzufolge kann ohne genetische Modifikation kein reines Poly(3-Hydroxyvalerate) akkumulieren, sondern immer nur das Heteropolymer PHBV bestehend aus beiden Monomeren (HB und HV).

Neben der Synthese von PHAs in Bakterien ist auch die Degradation des Kohlenstoffspeichers möglich. Dies geschieht insbesondere nach Wiederherstellung geeigneter Wachstumsbedingungen. In *C. necator* sind die PHA Depolymerasen (PhaZ) und die im Cytosol vorhandenen Oligomerhydrolasen (PhaZb und PhaZc) für den Abbau verantwortlich [71].

2.1.2. Eigenschaften und Einflussmöglichkeiten zur Herstellung maßgeschneiderter Biopolymere

Die Eigenschaften von PHAs aus verschiedenen Produktionsverfahren variieren sehr stark. Viele fundierte Review-Arbeiten stellen die verschiedenen Polymere gegenüber, kommen aber zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen für typische Bereiche bei Materialparametern wie Kristallinität, Bruchdehnung oder Schmelztemperatur [88, 107, 159]. Dies kann mit der Flexibilität der Produktion selbst begründet werden. Denn neben unterschiedlichen Organismen und Prozessführungsweisen sind darüber hinaus auch verschiedene Formen der Produktaufarbeitung möglich. Ein Überblick über die verschiedenen Stellschrauben, die einen Einfluss auf Materialparameter haben, ist in Abbildung 2.2 zu sehen und wird im Folgenden detailliert erläutert.

Die Produktion von PHAs in *C. necator* kann mittels unterschiedlicher Kultivierungstypen erfolgen [84]. Durch die intrazelluläre Akkumulation des Produktes kommen zweistufige Prozesse am häufigsten vor. Dabei wird im ersten Reaktionsgefäß Biomasse erzeugt, um diese dann in einem zweiten Reaktor zur PHA Produktion anzuregen. Im zweiten Reaktor wird in der Regel ein Substrat wie Stickstoff oder Phosphat aus dem Medium entzogen. Dieses Hintereinanderschalten unterschiedlicher Reaktoren kann sowohl im Batch-Modus als auch kontinuierlich betrieben werden, wobei die kontinuierliche Betriebsweise ökonomisch günstiger ist [107]. Die Hinzunahme weiterer Reaktoren im kontinuierlichen Prozess zur Steigerung der Verweilzeiten

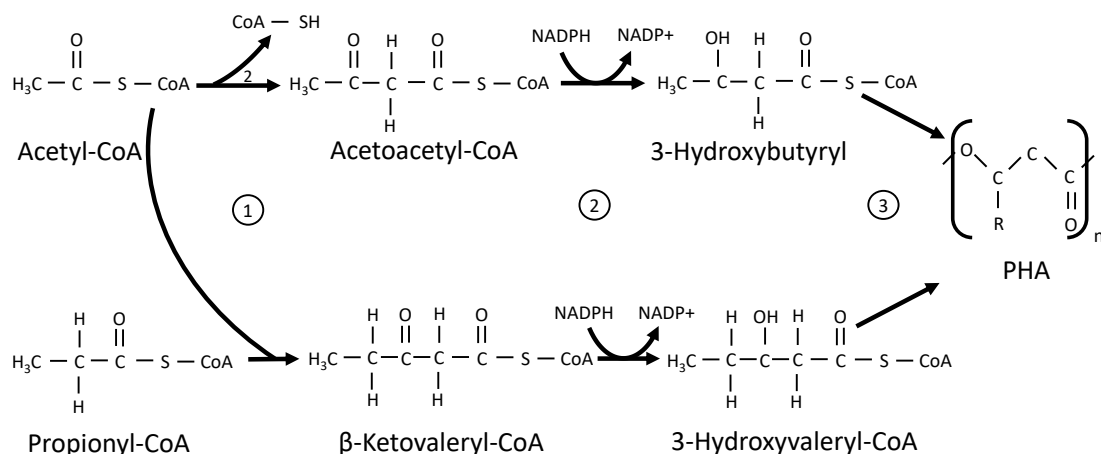


Abbildung 2.1.: Metaboler Reaktionspfad für die Produktion von PHA (z.B. PHBV) ausgehend von Acetyl-CoA und Propionyl-CoA nach [8] und [12]. Die Seitenkette R kann im dargestellten Schema eine Methyl- oder Ethylgruppe sein. Beteiligte Enzyme: 1, β -Ketothiolase (PhaA, BktB); 2, Acetoacetyl-CoA-Reduktase (PhaB); 3, PHA Synthase (PhaC).

für die Produktion von PHAs wurde ebenfalls erprobt [3]. Bei der Produktion von Copolymeren unter Verwendung von Kohlenstoffquellen, die sich bereits in kleinen Mengen inhibitorisch auf das Wachstum und Produktbildung auswirken, kann auf Fed-Batch-Strategien zurückgegriffen werden [78]. Auch die Produktion in einem Reaktor mit zyklischem Ernten und Wiederauffüllen ist in der Literatur zu finden [77]. Damit erübrigt sich die nochmalige Sterilisation zwischen den einzelnen Batches und es kann kostengünstiger produziert werden. Weiterhin hängt die Produktqualität und die Ausbeute vom Reaktordesign und dem Einsatz der verbauten Komponenten, wie z.B. der Verwendung des Rührers zur Verteilung von Sauerstoff im Medium ab [59,94,107]. Studien zeigen eine Veränderung der Kristallinität bei der Verwendung unterschiedlich großer Reaktoren im *scale-up* eines Batchprozesses mit *Alcaligenes latus* [59].

Neben der Art der Kultivierung hängt das Molekulargewicht und die Kristallinität des Polymers vom ausgewählten Produzentenstamm ab [107,123]. In einer Studie von 2018 wurde in *C. necator* und *Bacillus megaterium* produziertes PHB bezüglich der Kristallinität untersucht und gegenübergestellt. Trotz gleicher Kultivierungsbedingungen hatte das mit *C. necator* produzierte PHB 23 % Kristallinität, während das in *Bacillus megaterium* produzierte Polymer bei einer Kristallinität von 44 % lag. Weiterhin ist es möglich durch die Wahl eines extremophilen Stammes, die Kosten zu reduzieren. Beispielsweise entfällt die kostenintensive Sterilisation bei Verwendung halophiler Mikroorganismen, welche durch genetischen Modifikationen in der Lage sind PHA zu produzieren. Denn durch die nötige hohe Salzkonzentration im Medium

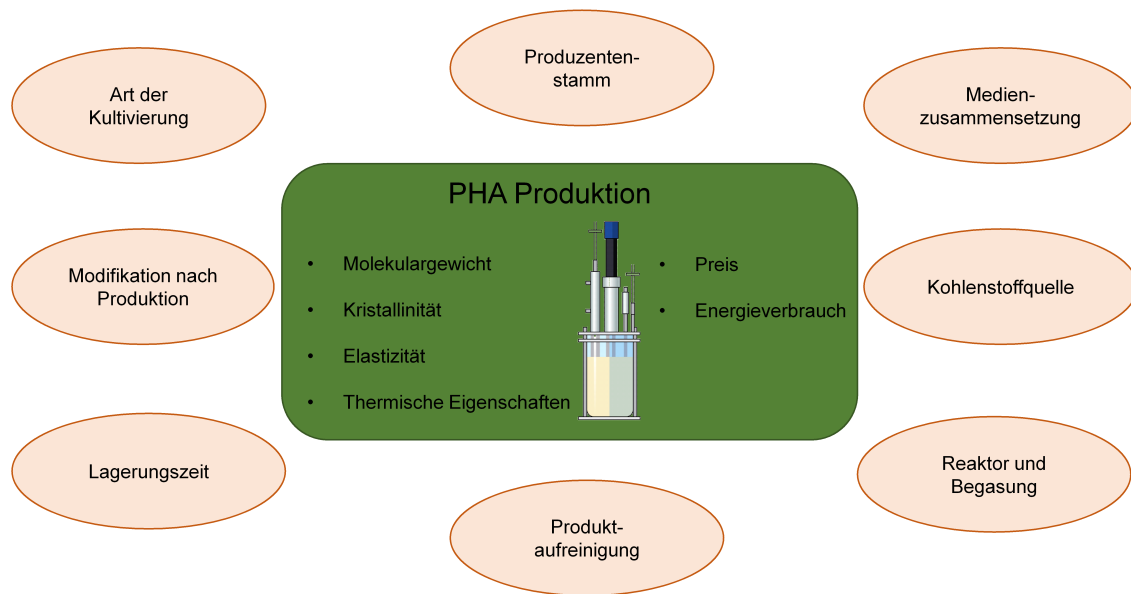


Abbildung 2.2.: Einflussfaktoren auf Eigenschaften und Prozessbedingungen der PHB-Produktion [107].

bei Verwendung solcher Organismen werden Kontaminationen mit anderen Bakterienstämmen verhindert [18]. Ebenso kann durch den Einsatz von Mischkulturen eine Reduktion der Kosten erreicht werden, da auch hier der Sterilisationsschritt entfallen kann [141].

Die Wahl der Kohlenstoffquelle stellt einen wichtigen Kostenfaktor im PHA Produktionsprozess dar. Neben den Kosten für die Aufarbeitung des Produktes (engl. *downstream*) und für die Vorbehandlung der Abfälle macht der Preis für die Kohlenstoffquelle ca. 50 % der Prozesskosten aus [107]. Aus diesem Grund beschäftigen sich viele Forschungsgruppen mit der PHA-Produktion aus Reststoffen anfallend in Industrie und Haushalten. Beispiele für untersuchte Reststoffe sind Molkepermeat aus der Käseherstellung [86], Sägespäne aus der Holzverarbeitung [83], Reste aus der Wein- und Essigproduktion [9], Nebenprodukte aus der Biodieselproduktion [53] sowie Schlachtabfälle [140] oder gebrauchtes Frittierfett aus Großküchen [166].

Neben der heterotrophen Ernährung der Bakterienstämme ist eine Vielzahl von Organismen, wie auch *C. necator*, in der Lage autotroph, unter Verwendung von CO_2 als Kohlenstoff und H_2 als Energiequelle, zu wachsen [55]. Letztere Studie zeigt eine erhöhte Schmelz- (T_m) und Glasübergangstemperatur (T_g) sowie Kristallinität (X_c) bei herabgesenkter Degradationstemperatur (T_d) beim autotrophen Wachstum im Vergleich zur heterotrophen Fütterungsstrategie.

Weiterhin hängen die thermischen und mechanischen Polymereigenschaften von der Art des produzierten Polymers ab. Das am häufigsten untersuchte Homopolymer

PHB ist ohne zusätzliche Additive hochkristallin und demzufolge ein sehr steifes und brüchiges Material [107]. Weiterhin ist das Prozessierungsfenster durch den nur geringen Unterschied zwischen T_m und T_d sehr schmal. Dies macht die Verarbeitung des Materials schwierig [5, 168]. Um diese Prozessierungsherausforderungen zu überwinden, wird PHB in der Regel in Mischungen oder sogenannten Blends eingesetzt. Ein gutes Beispiel ist die Mischung von PHB mit Polymilchsäure (engl. *polylactic acid*; PLA) unter Einsatz des natürlichen Weichmachers Limonen (Vorkommen in Zitrusfrüchten) mit dem sich ein durchsichtiger Film produzieren lässt, welcher sauerstoffdurchlässiger ist und darüber hinaus die guten Barriereigenschaften von PHB gegenüber Flüssigkeiten beibehält [2].

Neben der Entwicklung von Polymermischungen zur Erhöhung der Prozessierbarkeit, kann das Einfügen einer weiteren Monomereinheit, wie z.B. HV, zur Absenkung der Schmelztemperatur führen, ohne dabei T_d oder T_g signifikant zu beeinflussen [107]. Zusätzlich hat der zeitliche Einsatz bzw. die Kombinatorik der unterschiedlichen Kohlenstoffquellen einen großen Einfluss auf das Produkt [122]. Unter Anwendung von geschickter, zeitlich begrenzter Zugabe ungerader Kohlenstoffquellen können in *C. necator* PHBV Block-Copolymere hergestellt werden, die sich durch eine höhere Zugfestigkeit und Elastizität im Vergleich zur zufälligen Anordnung der gleichen Monomere auszeichnen.

Nach der mikrobiellen Produktion des Polymers muss dieses von der Biomasse getrennt werden. Dies stellt eine besondere Herausforderung dar, da viele natürlich vorkommende PHA-Produzenten das Polymer intrazellulär akkumulieren. Die Kosten für die Extraktion sind in der Regel sehr hoch, da häufig Lösungsmittel-basierte Methoden eingesetzt werden, um hohe Produktreinheiten zu erreichen [85]. Dafür werden vor allem grüne Lösungsmittelalternativen intensiv bzgl. Reinheit, Ausbeute und Produkteigenschaften untersucht, um bereits etablierte aber umweltschädliche und teure Extraktionsverfahren zu ersetzen. In einer Studie, bei der PHB mit nicht-halogenierten Lösungsmitteln extrahiert wurde, konnte ein elastischeres Polymer im Vergleich zur Standardextraktion mit Chloroform gewonnen werden [1]. Weiterhin hat die Temperatur während der Extraktion einen großen Einfluss auf das Molekulargewicht. Mit steigender Höhe und Dauer degradiert immer mehr Polymer und führt zu kleineren Molekulargewichten. Darüber hinaus konnte durch den Einsatz von Extraktionsmitteln wie Propylencarbonat gezeigt werden, dass sich der Polydispersitätsindex verringert und demzufolge ein homogeneres Produkt entsteht [102]. Neben den Lösungsmittel-basierten Methoden wird auch an Lösungsmittel-freien Alternativen wie der Trennung unter Einsatz von Flotationsverfahren oder Luftströmen geforscht [103, 165]. Für letzteres muss das PHA-reiche Zellmaterial zunächst getrocknet, aufgebrochen und zu einem Pulver verarbeitet werden [117]. Durch die geringen Ausbeuten bei hoher Reinheit, ist dieses Verfahren bislang ungeeignet [103]. Schließlich spielt auch noch die Lagerungszeit des produzierten Rohmaterials eine wichtige Rolle [107]. So wurde in einer Studie gemessen, dass die Kristallinität von sieben Tage gelagertem PHB bereits um ca. 8 % zugenommen hat im Vergleich zur Messung einen Tag nach der Extraktion [100]. Eine gute Organisation der Transportkette und damit verbundene schnelle Verarbeitung ist demzufolge für die Nutzung von PHAs ebenfalls ein wichtiger Faktor.

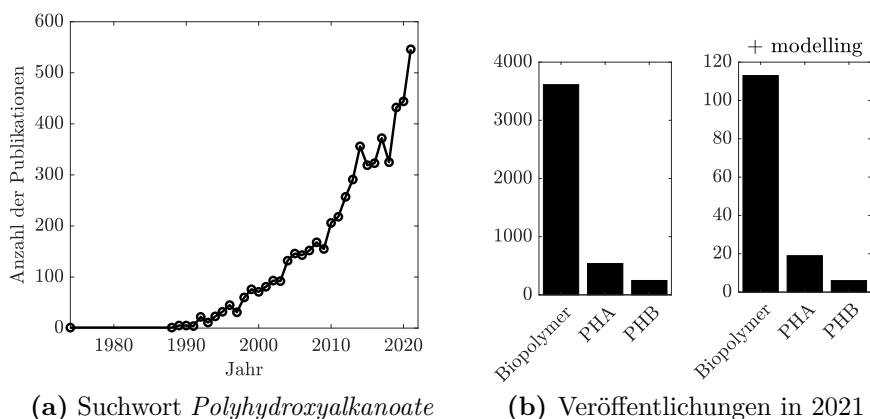


Abbildung 2.3.: Literaturanalyse mit *Scopus* (Zugriff am 20.07.2022). Die Suchwörter wurden jeweils voll ausgeschrieben: Biopolymer, Polyhydroxyalkanoate, Polyhydroxybutyrate, modeling.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die bakterielle Produktion von PHAs sehr vielseitig umsetzbar ist. Die vielfältigen Möglichkeiten sollten auch mit Modellen abgebildet werden, um Zeit und Kosten für aufwendige experimentelle Studien zur optimalen Prozessgestaltung zu sparen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Art der Kultivierung, die Begasung und die Medienzusammensetzung als Stellschrauben ausgewählt, um mit Hilfe der entwickelten Modellansätze den Einfluss auf Produktivität und Qualität zu analysieren.

2.1.3. Polyhydroxyalkanoate in Industrie und Forschung

Aus der Gruppe der PHAs werden bisher fünf Polymere in industriellem Maßstab produziert. Dazu zählen neben dem Homopolymer PHB und dem Copolymer PHBV auch Poly(4-Hydroxybutyrat) (P4HB), Poly(3-Hydroxybutyrat-co-3-Hydroxyhexanoat) (PHHx) und Poly(3-Hydroxybutyrat-co-4-Hydroxybutyrat) (P-(3HB-co-4HB)) [88]. Einige verfügbare Materialeigenschaften von industriell hergestellten PHAs sind in Tabelle 2.2 zusammengefasst. Trotz der Möglichkeit mit PHAs langfristig unabhängig von fossilen Rohstoffen zu werden und den durch Plastik verursachten Fußabdruck in der Umwelt zu verringern, betrug der Marktanteil von PHAs im Bereich „Bioplastik“ in 2021 nur 1.8 % [119]. Zur Steigerung dieses Anteils müssen die Produktionskosten herabgesenkt werden. Dies kann durch Verbesserung einzelner Prozessschritte, wie der Aufarbeitung, oder durch die Verwendung kostengünstiger Substrate erreicht werden [112].

Die Forschung im Bereich der Herstellung von PHAs ist ein wichtiger Stützpfeiler für den langfristigen Ausbau der Produktionskapazitäten. Die Anzahl der verfügbaren Literatur im Bereich der PHA-Forschung ist sehr groß und hat in den letzten Jahren durch gesellschaftspolitische Themen, wie die Klimakrise, nochmals zugenommen (siehe Abbildung 2.3a). Dies belegt eine Literaturrecherche mit einschlägigen Schlüsselbegriffen in *Scopus*, deren Ergebnis in Abbildung 2.3b dargestellt ist.

Obwohl das Potential von mathematischen Modellen im biotechnologischen Bereich

Tabelle 2.2.: Auswahl industriell hergestellter PHAs sowie Materialeigenschaften nach [85], erweitert mit [88, 106, 173]. Die Zahlen hinter den Polymernamen geben den Copolymergehalt in % an. Legende: X_c , Kristallinität; M_w , Gewichtsmittel; σ , Zugfestigkeit; ε , Bruchdehnung.

Polymer	Firma	X_c [%]	M_w [g/mol]	σ [MPa]	ε [%]
P3HB	Biomer	50	211 368	12-17	4
P4HB	Tepha Inc.	k.A.	>800 000	580–800	25-90
P3HBV3	Tianan Biologic Material	67	233 270	35-39	3
P3HBV7	PHB Industrial	64	233 370	23-30	3
PHBV11	Nature Plast	65	203 018	17-23	3
P3HB4HB13	Shandong Ecomman Technol.	16	166 126	41-49	5
P3HB4HB18	Shandong Ecomman Technol.	15	158 295	39-40	4

als hoch eingestuft wird [114, 162], ist die Nutzung von Modellen auf dem Forschungsfeld der Produktion von PHAs vergleichsweise gering (siehe Abbildung 2.3b, rechts). Zukünftig können durch die Entwicklung und Verwendung solcher Modelle Produktausbeuten und Polymereigenschaften besser abgeschätzt werden und experimentelle Untersuchungen unterschiedlicher Produktionsverfahren unterstützen. Weiterhin können diese Modelle in Regelungskonzepten eingesetzt werden, um eine konstante Produktqualität abzusichern [111, 149]. Wesentliche Grundlage einer zielgerichteten Modellierung sind solide experimentelle Daten. Die Methoden, welche im Rahmen dieser Arbeit zur Erhebung experimenteller Daten verwendet worden, werden im nächsten Kapitel beleuchtet.

2.2. Experimentelle Methoden

Die experimentellen Daten aus den Abschnitten 2.4 und 2.5 wurden im Rahmen dieser Arbeit eigenständig erhoben. Dafür wurden Experimente im Bioreaktor und Schüttelkolben durchgeführt. Für alle Experimente wurde Ammoniumchlorid als Stickstoffquelle genutzt, aber die Kohlenstoffquelle variiert. In Experiment I wurde Fruktose als alleinige Kohlenstoffquelle eingesetzt, während in den Experimenten III, IV und V jeweils noch Acetat bzw. Propionsäure hinzu gegeben wurde. Im Experiment II wurde mit Acetat als alleinige Kohlenstoffquelle gearbeitet. Ein Überblick über die verwendeten Experimente ist in Tabelle 2.3 gegeben. In den folgenden Abschnitten wird beschrieben, wie die Experimente vorbereitet worden. Außerdem werden die Messverfahren für die Konzentrationsmessung der Produkte und Substrate sowie der Kettenlängenverteilung der Polymere erläutert.

2.2.1. Mikroorganismus und Kultivierungsbedingungen

Die Experimente wurden mit *C. necator* (H16, DSM428, DSMZ, Braunschweig) in M81 Kulturmedium durchgeführt. Die Stickstoff- und Kohlenstoffquellen, welche

zusätzlich dem Medium beigefügt worden, sind der Tabelle 2.3 zu entnehmen. Alle weiteren Komponenten des M81 Mediums sind in den Tabellen A.2 und A.3 im Appendix zusammengefasst [34]. Bis auf Experiment II wurden die Experimente im Bioreaktor (*DASGIP parallel bioreactor system*, Eppendorf, Jülich) mit einem Arbeitsvolumen von ca. 1 L durchgeführt. Das Experiment II wurde im Schüttelkolben-Maßstab mit einem Startvolumen von 200 mL angesetzt. Die Experimente im Bioreaktor wurden bei 30 °C und einem konstanten pH-Wert von 6.8 durchgeführt. Sofern nicht anders beschrieben, wurden als Säure und Base für den pH-Wert-Ausgleich 2 M H₂SO₄ bzw. 2 M NaOH verwendet. Weiterhin wurden Rührerdrehzahl und Begasungsrate genutzt, um den Gelöstsauerstoffanteil im Medium (engl. *dissolved oxygen*, DO) auf konstantem Niveau zu halten. Im Experiment II wurde eine konstante Schüttelgeschwindigkeit von 150 rpm bei 30 °C verwendet.

Die Bakterien wurden in LB-Medium vorkultiviert (siehe Tabelle A.1 im Appendix) [32] und in der späten exponentiellen Wachstumsphase in einen weiteren Schüttelkolben überführt. Beide Schüttelkolben wurden dabei mit 10%vol gefüllt. Der zweite Kolben aus der Vorkultur hatte die gleiche Zusammensetzung wie der Ansatz im Bioreaktor. Für das Animpfen im Bioreaktor wurde die Kultur aus dem zweiten Kolben in der späten Phase des exponentiellen Wachstums verwendet. Die optische Dichte (OD) beim Start der Hauptkultivierung ist Tabelle 2.3 zu entnehmen.

2.2.2. Analyse der Substrate

Die Konzentrationen der Kohlenstoffquellen Natriumacetat und Propionsäure wurden mit einer Agilent 1260 Infinity II HPLC (engl. *high performance liquid chromatography*) Anlage bestimmt. Dafür wurden 10 µL des gefilterten Kulturüberstands mit einer Umkehrphasensäule (Inertsil 100A ODS-3, 5 µm Porengröße, 250x4.6 mm, MZ-Analysentechnik GmbH, Mainz, Deutschland) bei 40 °C getrennt und quantifiziert. Als Laufmittel für den Trennprozess wurde 0.1 M NH₄H₂PO₄ bei einem pH-Wert von 2.6 verwendet. Die Trennung erfolgte isokratisch bei einer Flussrate von 1 mL·min⁻¹. Die Detektion der Komponenten erfolgte mit einem Dioden-Array-Detektor (Spaltbreite 4 nm) bei 210 nm.

Tabelle 2.3.: Überblick über alle PHA-Experimente dieser Arbeit. Die Startbedingungen sind in folgender Reihenfolge angegeben: [Fruktose, Acetat, Propionsäure, Ammoniumchlorid].

Model	Nr.	Startbedingung [g/L] ¹	DO [%]	OD(0)	Modus
PHB, PHBV	I	[22, 0, 0, 1.7]	70	0.6	Batch
PHB	II	[0, 9.94, 0, 1.4]	70	0.4	Batch ²
PHB	III	[26, 4.4, 0, 1.4]	5		Batch
PHBV	IV	[21.7, 0, 0.5, 1.4]	70	0.6	Fed-Batch
PHBV	V	[21.2, 0, 0.5, 1.7]	5	0.4	Fed-Batch

¹ Fruktose, Natriumacetat und Ammoniumchlorid wurden von Carl Roth (Deutschland) bezogen. Propionsäure wurde bei Sigma Aldrich (USA) beschafft.

² Der Schüttelkolbenversuch wurde als aerobe Kultivierung mit 70 % Gelöstsauerstoff (DO) angenommen.

Für die Experimente II und V wurde Fruktose ebenfalls mittels HPLC quantifiziert. Mit einer RHM Monosaccharid-Säule (Phenomenex, USA) und deionisiertem Wasser als Eluenten wurden weitere 10 μL des filtrierten Kulturüberstandes isokratisch bei einer Flussgeschwindigkeit von $0.6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ aufgetrennt und analysiert. Der Säulenofen war dabei auf $80 \text{ }^\circ\text{C}$ temperiert. Die Detektion erfolgte mit einem Brechungsindex Detektor bei $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Die Fruktosekonzentrationen der Experimente I, III und IV sowie die Ammoniumchloridkonzentrationen aller Experimente wurden mit einem enzymatischen Testkit (R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland) unter Anwendung der Gebrauchsanweisung bestimmt.

2.2.3. Analyse der Produkte

Konzentrationsbestimmung mittels HPLC

Für die Bestimmung der totalen Polymerkonzentration wurden 0.5 mL 2 M NaOH Lösung zu 1 mL Kulturbrühe hinzugegeben und gemischt [143]. Nach einer Stunde Inkubationszeit bei $105 \text{ }^\circ\text{C}$, wurden die abgekühlten Proben mit 0.5 mL 1 M H_2SO_4 versetzt und anschließend bei 10 000 rpm und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Nach der alkalinen Hydrolyse der Kulturbrühe wurde diese zur Vorbereitung der HPLC Messung durch eine $0.2 \mu\text{L}$ Nylonmembran filtriert. Die HPLC Messung erfolgte mit einer Agilent 1260 Infinity II HPLC Anlage (Agilent, Deutschland). Dafür wurden 10 μL des gefilterten Kulturüberstands mit einer Umkehrphasensäule (Inertsil 100A ODS-3, $5 \mu\text{m}$ Porengröße, $250 \times 4.6 \text{ mm}$, MZ-Analysentechnik GmbH, Mainz, Deutschland) bei $40 \text{ }^\circ\text{C}$ getrennt und quantifiziert. Das Laufmittel bestand aus einer Mischung aus 0.025 %iger H_2SO_4 Lösung (Carl Roth, Karlsruhe) und Acetonitril (Carl Roth, Karlsruhe) im Verhältnis 92:8 vol%. Die Trennung erfolgte bei einer Flussrate von $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Die Detektion der Komponenten erfolgte mit einem Dioden-Array-Detektor (Spaltbreite 4 nm) bei 210 nm.

Mit der alkalinen Hydrolyse wird erreicht, dass die Polymere in deren Monomere zerlegt werden. Im Fall von PHB erfolgt eine Umwandlung zu Crotonsäure. Im Fall von PHBV findet die Umwandlung zu Crotonsäure (Aldrich, USA) und Pentensäure (Sigma Aldrich, USA) statt. Es ist allerdings davon auszugehen, dass die Hydrolyse mittels Base keine 100 %ige Umwandlung darstellt. Aus diesem Grund wird, neben den Proben der Kultivierungen, zusätzlich eine PHB (Sigma Aldrich, USA) oder PHBV Probe (Sigma Aldrich, USA) bekannter Konzentration mitprozessiert. Mithilfe dieser Probe kann die Umwandlungsausbeute für PHB (Y_{HB}) oder auch PHBV (Y_{HB} , Y_{HV}) berechnet werden [143];

$$Y_{HB} = \frac{c_{CA}}{c_{HB}} \cdot D, \quad (2.2.1)$$

$$Y_{HV} = \frac{c_{PA}}{c_{HV}} \cdot D. \quad (2.2.2)$$

Dabei wurde eine Verdünnungsrate D von 2 angenommen, da durch die Zugabe

der Base und Säure die Probe 2:1 v/v verdünnt wurde. Die Konzentrationen c_{HB} und c_{HV} sind die Monomerkonzentrationen aus der bekannten PHBV Probe. Die Crotonsäure- (c_{CA}) und Pentensäurekonzentrationen (c_{PA}) wurden mit der oben beschriebenen HPLC-Messung bestimmt. Hierfür wurde zusätzlich eine Standardreihe mit bekannten Konzentrationen dieser Stoffe vermessen.

Die Entwicklung der beschriebenen analytischen Methode war für die Umsetzung der vorliegenden Dissertation essentiell und wurde in [46] veröffentlicht.

Messung der Kettenlängenverteilung mittels GPC

Für die Messung der Molmassen- bzw. Kettenlängenverteilung wurden die Polymere unverändert (d.h. ohne Kettenabbau) von der Biomasse separiert. Dafür wurde je nach Verfügbarkeit ein festes Probenvolumen lyophilisiert und mit 5 mL Chloroform (Carl Roth, Deutschland) extrahiert. Das Gemisch wurde für 48 h bei 37 °C und 150 rpm inkubiert [1] und anschließend durch einen 0.45 μm PTFE-Filter in 5 mL eiskaltes Ethanol (Carl Roth, Deutschland) filtriert. Das Glasgefäß blieb unverschlossen bis das Lösungsmittelgemisch komplett verdampft war. Das ausgefallene Polymer wurde ausgewogen und für die Messung mittels Größenausschlusschromatographie (GPC) mit Chloroform (Carl Roth, Deutschland) auf eine Konzentration von 0.4 g/L gebracht.

100 μL des nochmals filtrierten gelösten Polymers wurden mit vier hintereinander geschalteten Säulen (Vorsäule und drei Trennsäulen) gefüllt mit Poly(styrol-co-divinylbenzol) (Trennbereich: 100 - 30 000 000 Da, 3 Säulen á 8x300mm, Partikelgröße 3,5 und 10 μm , Artikel-Nr.: 202-0001, Polymer Standard Service, Deutschland) bei einer Temperatur von 40 °C aufgetrennt. Als Eluent wurde mit Amylen stabilisiertes Chloroform (Carl Roth, Deutschland) bei einer Flussrate von 0.5 mL \cdot min⁻¹ eingesetzt. Die Detektion der unterschiedlichen Molmassen erfolgte über den Brechungsindex-Detektor (G7162A, Agilent 1260 Infinity II) bei 35 °C.

Für die konventionelle Auswertung wurden 12 eng verteilte Polystyrol-Standards (Artikel-Nr.: PSS-pskitr1h, PSS-ps560, PSS-ps10m und PSS-ps15m, Polymer Standard Service, Deutschland) zwischen 576 Da und 1.42 \cdot 10⁷ Da vermessen und daraus eine Kalibriergerade erstellt. Mit der Kalibriergerade konnte die Molmasse der Proben über das Elutionsvolumen abgeschätzt werden. Die Auswertung erfolgte mit der WinGPC UniChrom Software (Polymer Standard Service, Deutschland).

Die Berechnung des Zahlenmittels (M_n), des Gewichtsmittels (M_w) und des Polydispersitätsindex (PDI) erfolgte über die differentielle Verteilung $w(\log M)$, die mithilfe des Elugramms von der o.g. Software bestimmt wurde. Details zur Berechnung sind in [61] zu finden.

2.2.4. Bestimmung der Biotrockenmasse

Zur Bestimmung der totalen Biomasse wurde das Trockengewicht (Biotrockenmasse, BTM) der Kultur gravimetrisch bestimmt. Dafür wurde 1 mL der Kultur in vorab gewogenen Reaktionsgefäßen für 10 min bei 9600xg und 4 °C (VWR MicroStar 17R, USA) zentrifugiert. Das resultierende Zellpellet wurde über Nacht bei 80 °C

getrocknet und anschließend gewogen.

2.3. Theoretische Grundlagen

Im Folgenden werden die Modellierungsansätze vorgestellt, welche zur Beschreibung der Produktionsprozesse von PHB und PHBV genutzt werden. Dabei werden zunächst Modelle zur Darstellung der Dynamik von Substrat- und Produktkonzentrationen eingeführt, sowie der Einbau und die Funktion einiger grundlegender Kinetiken anhand eines Beispiels erläutert. Anschließend werden die Grundlagen zur Erstellung hybrid kybernetischer Modelle (HCMs) eingeführt. Durch die Nutzung kybernetischer Variablen und die Anwendung metaboler Flussanalyse ist es mit diesem Modellansatz möglich metabolische Netzwerke und Enzymregulation mit einer allgemeinen Prozessbeschreibung zu verknüpfen. Im Prinzip repräsentieren die HCMs somit ebenfalls einen Multiskalen-Ansatz.

Im Anschluss an die Einführung der HCMs wird ein Überblick über die Beschreibung von Polymerisierungsprozessen gegeben. Dabei werden relevante Teilschritte näher erläutert, aus denen sich die in dieser Arbeit entwickelte Kinetik zusammensetzt. Die Kopplung der Polymerisierungskinetik mit Prozessmodellen oder HCMs führt auf einen weiteren Multiskalen-Ansatz, der in dieser Arbeit von zentraler Bedeutung ist. Im letzten Abschnitt wird schließlich die Herangehensweise bei der Identifikation der kinetischen Parameter aus den Abschnitten 2.4.1 und 2.5.1 erklärt.

2.3.1. Prozessmodelle

Biotechnologische Prozessmodelle beschreiben den Auf- und Abbau von Substraten, Produkten und Biomasse in unterschiedlichen Bioreaktoren. Ein häufig verwendeter Reaktortyp ist der Rührkesselreaktor. Die allgemeine Ausgangsgleichung für die Akkumulation eines Stoffes im Rührkesselreaktor lautet (vereinfacht nach [116]):

$$\frac{dV c_i}{dt} = V \sum_{j=1}^{N_j} (q_{i,gen,j}) - V \sum_{k=1}^{N_k} (q_{i,con,k}) + F_{in} c_{i,in} - F_{out} c_{i,out}. \quad (2.3.1)$$

Die linke Seite der Gleichung beschreibt die Akkumulation eines Stoffes mit der Konzentration c_i . Dabei kann die Konzentration c_i in g/L und das Volumen V in L gegeben sein. Die Konzentration erhöht sich durch N_j generierende Raten $q_{i,gen,j}$ und verringert sich durch N_k verbrauchende Raten $q_{i,con,k}$. Beide Raten können in g/Lh angegeben werden. Die letzten beiden Terme auf der rechten Seite beschreiben den Zufluss des Stoffes mit der Konzentration $c_{i,in}$ und der Zuflussrate F_{in} sowie den Abfluss mit der Austrittskonzentration $c_{i,out}$ und der Abflussrate F_{out} . Die Größen sind nochmals in der Abbildung 2.4 dargestellt.

In einem Rührkesselreaktor wird häufig angenommen, dass die Kultur ideal durchmischt ist. Aus diesem Grund entspricht die Konzentration im Ausgang der Konzentration des Stoffes im Reaktor ($c_{i,out} = c_i$). Ein klassisches Zustandsraummodell für einen Batch-Prozess mit konstantem Volumen für ein Produkt der Konzentration c_P ,

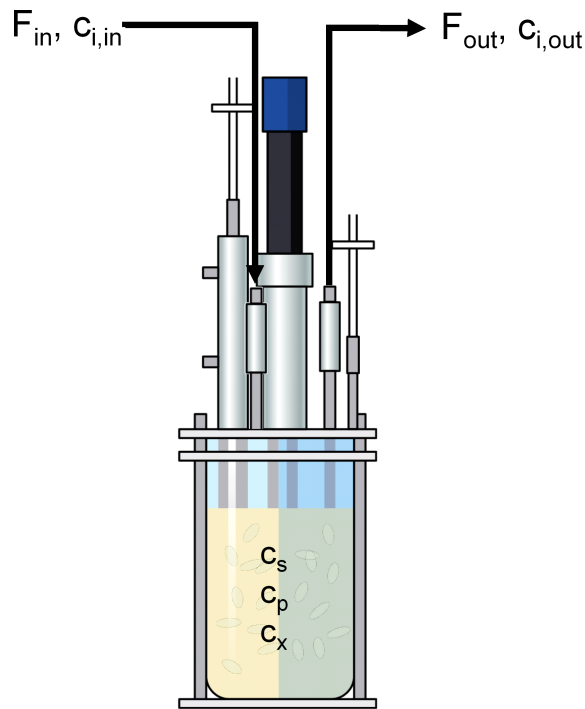


Abbildung 2.4.: Übliche Ein- und Ausgänge am Bioreaktor.

ein Substrat der Konzentration c_s und Biomasse der Konzentration c_x ist wie folgt definiert:

$$\frac{dc_s}{dt} = -q_s, \quad \frac{dc_p}{dt} = q_p, \quad \frac{dc_x}{dt} = q_x. \quad (2.3.2)$$

Eine Besonderheit von Bioprozessen ist, dass im Gegensatz zu chemischen Prozessen der Katalysator „Zelle“ nicht konstant bleibt, sondern durch Wachstum mit der Prozesszeit ansteigt [20]. Aus diesem Grund ist eine Abhängigkeit der generierenden und verbrauchenden Raten von der Biomassekonzentration unabdingbar. Wenn biotechnologische Produktionsprozesse mit einfachen Reaktionsgleichungen beschrieben werden sollen, besteht das System bei einem Substrat und einem Produkt aus folgenden Reaktionsgleichungen:



Aus dem Reaktionsschema ergibt sich neben der Abhängigkeit von der Biomasse X auch die Abhängigkeit vom limitierenden Substrat S bei der Bildung der Biomasse und des Produkts P . Zusätzlich wird das Substrat noch für die Aufrechterhaltung des Erhaltungsstoffwechsels mit der kinetischen Konstante m_E verbraucht. Für die Beschreibung der Dynamik von Biomasse- und Produktkonzentrationen kann also im einfachsten Fall von Reaktionen zweiter Ordnung ausgegangen werden. Unter

Anwendung der Massenwirkungskinetik ergeben sich folgende Zustandsgleichungen für die Produkt- und Biomassekonzentration:

$$\frac{dc_P}{dt} = k_P c_S c_x, \quad \frac{dc_x}{dt} = k_X c_S c_x. \quad (2.3.4)$$

Die Rate für den Substratabbau ergibt sich aus den produzierenden Termen:

$$q_S = \overbrace{(k_P + k_X + m_E)}^{k_S} c_S c_x. \quad (2.3.5)$$

Folglich ergibt sich für die Substratdynamik:

$$\frac{dc_S}{dt} = -k_S c_S c_x. \quad (2.3.6)$$

Die Abbildung 2.5/Modell I zeigt den Substratverbrauch, den Biomasseaufbau und die Produktbildung für die soeben eingefügte Modellstruktur mit frei gewählten kinetischen Ratenkonstanten $k = [k_S, k_P, k_X]$. Die Ratenkonstante k_X entspricht für das Modell I in der Abbildung 2.5 dem Wert μ_{max} .

Das Biomassewachstum ist in der Regel abhängig von limitierenden Substraten. Es existieren eine Reihe von empirischen Ansätzen zur Beschreibung der Wachstumsrate μ in Abhängigkeit des limitierenden Substrates [20]. Für die Beschreibung des Biomasseaufbaus in einem Batchprozess gilt allgemein:

$$\frac{dc_x}{dt} = \mu c_x. \quad (2.3.7)$$

Eine häufig verwendete Beschreibung der Wachstumsrate geht auf die von Monod eingeführte Sättigungskinetik zurück [110]:

$$\mu = \mu_{max} \frac{c_S}{K_S + c_S}. \quad (2.3.8)$$

Der Zusammenhang wird im Rahmen dieser Arbeit für das HCM in der Beschreibung der kinetischen Raten für den Substratverbrauch und Produktaufbau verwendet. Der genaue Aufbau eines HCMs wird im nächsten Abschnitt beschrieben.

Die Sättigungskonstante K_S gibt die Substratkonzentration bei halbmaximaler Wachstumsgeschwindigkeit an. Sie kann als konstant betrachtet werden, wenn nur ein Aufnahmesystem für das limitierende Substrat in den Zellen bzw. Mikroorganismen existiert [20]. Durch die Einführung des mathematischen Terms kann die Rate zwischen der maximal möglichen Rate $\mu = \mu_{max}$ und kleinsten Rate $\mu = \frac{\mu_{max}}{K_S} c_S$ variieren. In Abbildung 2.5 ist der Einfluss auf die Konzentrationsverläufe unter Verwendung der Wachstumskinetik nach Monod dem ersten rein auf Massenwirkungskinetik basierenden Ansatz gegenübergestellt (Modell I vs. II). Wie in der Abbildung zu sehen ist, ist der Anstieg der Produktkonzentration und der Abfall der Substratkonzentration viel langsamer als bei einer reinen Massenwirkungskinetik. Weiterhin wächst die Biomasse weniger stark durch die Kopplung mit dem Monod-Term. Es gibt eine Reihe weiterer Ansätze zur Beschreibung der Wachstumskinetik

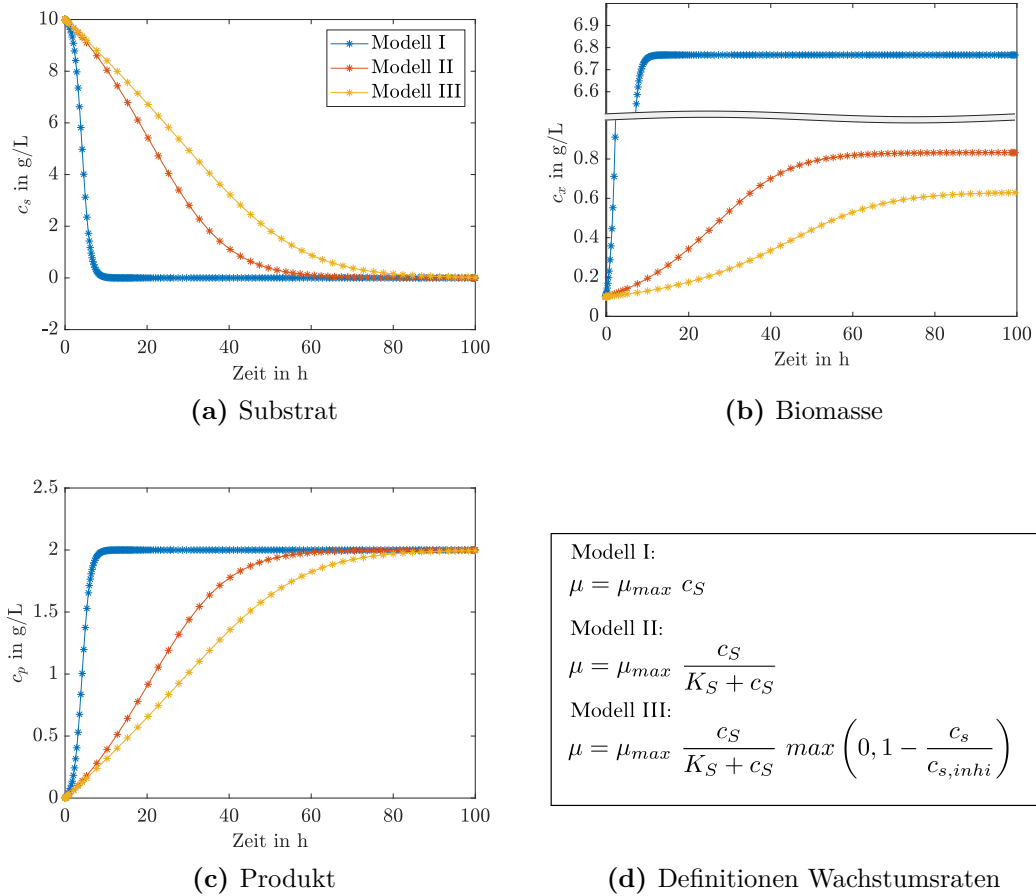


Abbildung 2.5.: Einfluss der Modellstruktur auf die Dynamik von Substrat (a), Biomasse (b) und Produkt (c) am Beispiel der Definitionen der Wachstumsrate μ (d). Als kinetische Konstanten wurde folgende Werte gewählt: $k_s = 0.15$ 1/h; $k_p = 0.03$ 1/h; $\mu_{max} = 0.1$ 1/h; $K_S = 5$ g/L; $c_{s,inhi} = 15$ g/L;

in Abhängigkeit vom limitierenden Substrat, wie der Wachstumskinetik nach Moser oder Teissier [20]. Diese sollen hier jedoch nur erwähnt sein, da sie in dieser Arbeit keine Anwendung finden.

Zusätzlich zur Abhängigkeit von limitierenden Substraten, wirken hohe Substratkonzentrationen häufig inhibierend auf Zellen. Eine Möglichkeit der Beschreibung dieses Effektes besteht in der Erweiterung der Monod-Kinetik um einen inhibitorischen Term [20]:

$$\mu = \mu_{max} \frac{c_S}{K_S + c_S + \frac{c_S}{K_{in}}} \quad (2.3.9)$$

Die Inhibierungskonstante K_{in} entspricht der Substratkonzentration bei der erneut die halbmaximale Wachstumsrate erreicht ist.

Zusätzlich zur Substratinhibierung kann das Biomassewachstum auch durch eine

maximale Produktkonzentration $c_{P,inhi}$ begrenzt werden [87]:

$$\mu = \mu_{max} \frac{c_S}{K_S + c_S} \max \left(0, 1 - \frac{c_P}{c_{P,inhi}} \right). \quad (2.3.10)$$

Eine solche obere Grenze bei dem das Biomassewachstum inhibiert wird, kann analog für Substrate definiert werden:

$$\mu = \mu_{max} \frac{c_S}{K_S + c_S} \max \left(0, 1 - \frac{c_s}{c_{s,inhi}} \right). \quad (2.3.11)$$

Dies ist besonders zu empfehlen, wenn die Inhibierungskonstante K_I unbekannt ist, jedoch die inhibitorische Substratkonzentration $c_{s,inhi}$ bekannt ist.

Soll der Effekt der inhibitorischen Terme verstärkt werden, empfiehlt es sich die Ordnung n des Terms anzuheben:

$$\mu = \mu_{max} \frac{c_S}{K_S + c_S} \max \left(0, \left(1 - \frac{c_s}{c_{s,inhi}} \right)^n \right). \quad (2.3.12)$$

Ebenso kann der Effekt der Produktinhibierung oder des substratabhängigen Biomassenwachstums auf diese Weise verstärkt werden. Der Einsatz solcher höheren Ordnungen hängt jedoch vom jeweiligen Anwendungsfall ab. Die Wachstumsinhibition eines Substrates mit der Ordnung $n = 1$ ist in der Abbildung 2.5 (Modell III) gezeigt. Die Terme sind hier für die möglichst genaue Beschreibung des Wachstums eingeführt worden, können aber in gleicher Weise für die Verfeinerung der kinetischen Raten zur Beschreibung der Produktbildung und des Substratverbrauchs verwendet werden. In Kapitel 2.5.1 dieser Arbeit sind sowohl Substrat- als auch Produktinhibierung im Modell zur Beschreibung des PHBV-Produktionsprozesses verwendet worden .

2.3.2. Hybrid kybernetische Modellierung

Mit kybernetischen Modellen ist es möglich Regulation von Enzymaktivitäten und Genen durch idealisierte Mechanismen auszudrücken. Für die Definition solcher idealisierten Mechanismen gilt die Grundannahme, dass jeder Organismus bei der Aufnahme und Umsetzung der Substrate eine bestimmte Strategie verfolgt, um so beispielsweise optimal wachsen zu können. Erste kybernetische Modelle wurden in den 80er Jahren von Ramkrishna und Kollegen entwickelt, um diauxisches Wachstum unter Verwendung sogenannter kybernetischer Variablen für Enzymaktivität und -synthese besser beschreiben zu können [89]. In den darauffolgenden Jahren wurde dieser Ansatz kontinuierlich weiterentwickelt, um unter anderem die Elementarmoden (EMen) metaboler Netzwerke in den Modellansatz miteinzubeziehen [179]. EMen sind definiert als die minimale Menge von Reaktionen oder metabolen Routen, die Substrate und Produkte miteinander verbinden. Mit ihnen kann jeder mögliche Fluss durch das metabolische Netzwerk im Fließgleichgewicht durch Linearkombination dargestellt werden [145]. Mit der Annahme, dass intrazelluläre Reaktionen eine viel schnellere Dynamik besitzen als extrazelluläre Reaktionen, wurde der Modellansatz

von Young aus [179] um eine Gleichgewichtsannahme für intrazelluläre Metaboliten modifiziert und der Begriff des hybrid kybernetischen Modells (HCM) eingeführt [79]. Die Gültigkeit dieser Annahme wurde in [152] erfolgreich überprüft.

Im Jahr 2011 wurde erstmalig ein HCM für die Produktion von PHB in *C. necator* mit Fruktose als Kohlenstoffquelle veröffentlicht [51]. Das Modell wurde an einen Referenzdatensatz angepasst und eignet sich sehr gut zur Vorhersage experimenteller Verläufe, die nicht zur Parameteranpassung verwendet worden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der HCM-Ansatz für die mikrobielle Produktion von PHB in *C. necator* unter Verwendung zweier Kohlenstoffquellen erweitert (Kapitel 2.4.1). Für die Bildung eines HCMs sind drei wesentliche Bausteine erforderlich:

- Metaboles Netzwerk und Analyse sowie Reduktion der EMen im Ausbeuteraum nach [151]
- Zustandsraummodell, um das dynamische Verhalten von Substraten und Produkten zu beschreiben.
- Kybernetische Variablen, um die enzymatische Regulation im Metabolismus zu berücksichtigen.

Die Bildung eines HCMs wird in den folgenden Absätzen an einem einfachen Beispiel erläutert.

Metaboles Netzwerk und Elementarmodenanalyse im Ausbeuteraum Wie in der vorherigen Einführung erwähnt, muss zunächst ein geeignetes metaboles Stoffwechselnetzwerk gefunden werden. Hierfür können bereits vorhandene Netzwerke aus der Literatur herangezogen werden oder die Rekonstruktion erfolgt mithilfe von Datenbanken wie KEGG oder MetaCyc [73, 93].

Die Verwendbarkeit eines Netzwerkes muss auf verschiedene Kriterien hin geprüft werden: Zum einen müssen mit dem metabolen Netzwerk alle Substrate und Produkte darstellbar sein. Dabei sollten die experimentell bestimmten sekretierten Metaboliten ebenfalls berücksichtigt werden. Zum anderen wird im nächsten Schritt eine EMen-Analyse durchgeführt. Dafür sollte das Netzwerk eine moderate Größe aufweisen (ca. 120 Reaktionsgleichungen) [82], da die EM-Analyse durchführbar sein muss und die Anzahl der Zustandsgleichungen für das HCM mit der Anzahl der ausgewählten EMen linear ansteigt.

Die Abbildung 2.6 zeigt ein einfaches fiktives metaboles Netzwerk bestehend aus zwei Substraten S_i , zwei Produkten P_j und vier intrazellulären Metaboliten Me_k .

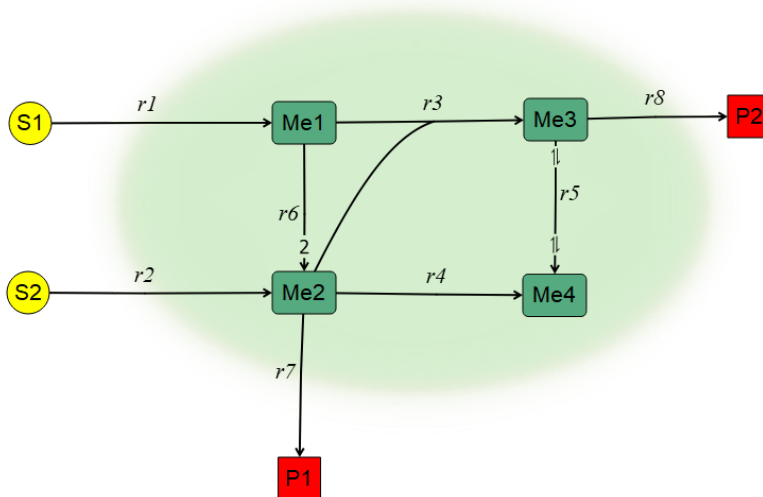


Abbildung 2.6.: Beispiel für ein stöchiometrisches Netzwerk mit zwei Substraten und zwei Produkten. Die Visualisierung erfolgte mit Omix [31].

Die dazugehörige stöchiometrische Matrix \mathbf{N} kann wie folgt definiert werden:

$$\mathbf{N} = \begin{array}{c} \begin{array}{c} S1 \\ S2 \\ Me1 \\ Me2 \\ Me3 \\ Me4 \\ P1 \\ P2 \end{array} \begin{array}{c} r1 \\ r2 \\ r3 \\ r4 \\ r5a \\ r5b \\ r6 \\ r7 \\ r8 \end{array} \begin{bmatrix} -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & -1 & -1 & 0 & 0 & 2 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & -1 & 1 & 0 & 0 & -1 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \end{array}. \quad (2.3.13)$$

Die Matrix \mathbf{N} beinhaltet die stöchiometrische Information für jede intra- und extrazelluläre Reaktion (Spalten der Matrix) und alle Metaboliten (Zeilen der Matrix). Die stöchiometrische Matrix bezogen auf die extrazellulären Metaboliten \mathbf{N}_{ex} ist Teil der Matrix \mathbf{N} :

$$\mathbf{N}_{\text{ex}} = \begin{array}{c} \begin{array}{c} S1 \\ S2 \\ P1 \\ P2 \end{array} \begin{array}{c} r1 \\ r2 \\ r3 \\ r4 \\ r5a \\ r5b \\ r6 \\ r7 \\ r8 \end{array} \begin{bmatrix} -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \end{array}. \quad (2.3.14)$$

Nach erfolgreicher Auswahl eines geeigneten Stoffwechselnetzwerkes werden die metabolen Wege analysiert, um die EMen zu ermitteln. Ein EM ist ein Reaktionsratenvektor \mathbf{z} mit folgenden drei Eigenschaften [146]:

- Fließgleichgewicht liegt vor

$$\mathbf{N} \cdot \mathbf{z} = \mathbf{0}, \quad (2.3.15)$$

- alle Reaktionen laufen in die gleiche Richtung

$$\mathbf{z} \geq 0, \quad (2.3.16)$$

- nicht zerlegbar, da ein EM bereits minimalen Satz von Reaktionsflüssen darstellt.

Für die Berechnung der EMen stehen verschiedene Methoden und Programme zur Verfügung [160]. Neben COPASI [65] und dem CellNetAnalyzer [81] können die EMen, wie auch in dieser Arbeit, mit dem Programm METATOOL [129] berechnet werden. Die EMen-Matrix \mathbf{Z} mit den EMen in jeder Spalte gibt an, wie groß der Fluss jeder einzelnen Reaktion im jeweiligen minimalen Set ist. Für das Beispielnetzwerk ist \mathbf{Z} wie folgt berechnet worden:

$$\mathbf{Z} = \begin{array}{c} \\ r1 \\ r2 \\ r3 \\ r4 \\ r5b \\ r6 \\ r7 \\ r8 \end{array} \begin{array}{c} e1 \quad e2 \quad e3 \quad e4 \quad e5 \quad e6 \\ \left[\begin{array}{cccccc} 0 & 0.5 & 1 & 0 & 0.5 & 1.5 \\ 1 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 1 \\ 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0.5 & 0 & 0 & 0.5 & 0.5 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 \\ 1 & 1 & 1 & 0 & 0 & 1 \end{array} \right] \end{array}. \quad (2.3.17)$$

Für eine vereinfachte Elementarmodenberechnung wurde beim reversiblen Fluss $r5$ die Reaktion von Me4 zu Me3 ausgewählt ($r5b$). Geometrisch sind EMen die Kanten eines polyedrischen konvexen Flusskegels im Flussraum [137]. Bei Überführung der EMen in den Ausbeuteraum ($\mathbf{Z}_{\mathbf{YS}}$) werden die EMen im Flussraum (\mathbf{Z}) mit der stöchiometrischen Matrix der externen Metaboliten $\mathbf{N}_{\mathbf{ex}}$ multipliziert:

$$\mathbf{Z}_{\mathbf{YS}} = \mathbf{N}_{\mathbf{ex}} \cdot \mathbf{Z}. \quad (2.3.18)$$

Für das Beispielnetzwerk ist die EMen-Matrix im Ausbeuteraum $\mathbf{Z}_{\mathbf{YS}}$ wie folgt definiert:

$$\mathbf{Z}_{\mathbf{YS}} = \begin{array}{c} S1 \\ S2 \\ P1 \\ P2 \end{array} \begin{array}{c} e1 \quad e2 \quad e3 \quad e4 \quad e5 \quad e6 \\ \left[\begin{array}{cccccc} 0 & -0.5 & -1 & 0 & -0.5 & -1.5 \\ -1 & 0 & -1 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 \\ 1 & 1 & 1 & 0 & 0 & 1 \end{array} \right] \end{array}. \quad (2.3.19)$$

Für das eingeführte Beispiel reduziert sich die Dimension EMen-Matrix im Ausbeuteraum $\mathbf{Z}_{\mathbf{YS}}$ auf die Produkte und Substrate. Zusätzlich werden die EMen im Ausbeuteraum mit dem aufgenommenen Substrat normalisiert. Sind es mehrere Substrate kann mit der Menge an aufgenommenen Kohlenstoff in mmolC normalisiert werden. Alternativ können auch direkt die produzierenden Flussraten aus jedem EM mit den Aufnahmeflussraten normalisiert werden, um eine Darstellung im Ausbeuteraum

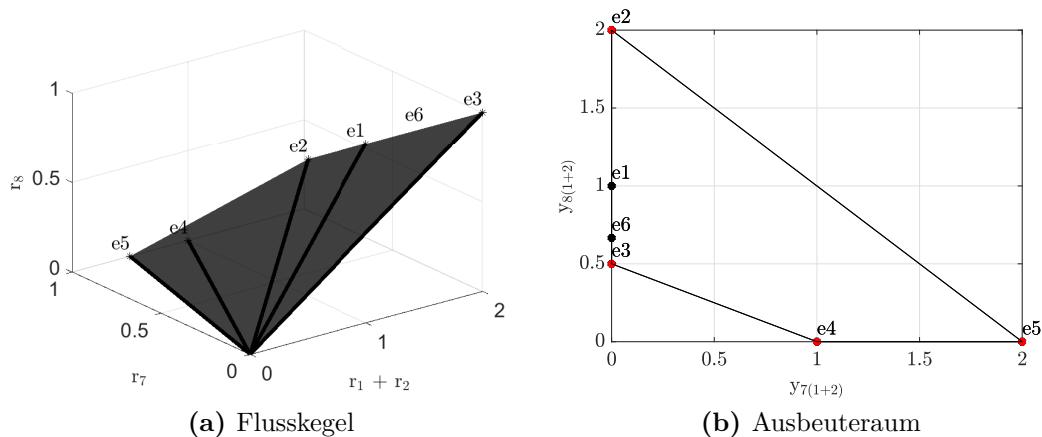


Abbildung 2.7.: Darstellung der EMen im Fluss- und Ausbeuteraum. Links sind die EMen im Flussraum im Bezug auf die Flussraten r_7 , r_8 und $r_1 + r_2$ dargestellt (a). Im Ausbeuteraum werden die produzierenden Flüsse mit den Aufnahmeffüssen normalisiert (b). Die rot gekennzeichneten EMen bilden die konvexe Hülle und werden GMen genannt.

zu erzeugen. Im Ausbeuteraum sind besonders die EMen von Bedeutung, die die sogenannte konvexe Hülle bilden und so den Ausbeuteraum komplett umschließen. Diese ausgewählten EMen werden generierende Moden (GM) genannt. Die Abbildung 2.7 zeigt den Flusskegel (links) und die konvexe Hülle im Ausbeuteraum (rechts) für das Beispielnetzwerk. Die Flüsse für die Substrataufnahme r_1 und r_2 wurden im Beispiel gemeinsam betrachtet. Auch die Normalisierung im Ausbeuteraum wurde mit beiden Flussraten für die Aufnahme von S_1 und S_2 vorgenommen. Nach Bildung einer solchen Hülle können GMen *á priori* oder unter Hinzunahme von experimentellen Daten weiter reduziert werden, um sogenannte aktive Moden (AMen) zu bilden [151]. Schließlich wird diese reduzierte Elementarmodenmatrix in die Raten der Zustandsgleichungen integriert. Die Definition dieser wird im nächsten Kapitel beschrieben.

Zustandsgleichungen Für die Simulation der zeitlichen Änderungen eines biologischen Systems kann zwischen unterschiedlichen Spezies unterschieden werden, die im folgendem Zustandsvektor zusammengefasst sind:

$$y = \begin{bmatrix} \mathbf{c}_S \\ \mathbf{c}_P \\ \mathbf{x}_m \\ c_x \end{bmatrix} \quad \begin{array}{l} \mathbf{c}_S \in \mathbb{R}^{(n_S \times 1)} \\ \mathbf{c}_P \in \mathbb{R}^{(n_P \times 1)} \\ \mathbf{m} \in \mathbb{R}^{(n_m \times 1)} \\ c_x \in \mathbb{R}^{(1 \times 1)} \end{array} \quad (2.3.20)$$

Die Veränderung der externen Substratkonzentrationen \mathbf{c}_S , externen Produktkonzentrationen \mathbf{c}_P und der Biomasse c_x lassen sich mit folgenden Differentialgleichungen (DGLn) beschreiben:

$$\frac{d\mathbf{c}_S}{dt} = \mathbf{N}_S \cdot \mathbf{r} \cdot c_x \quad \text{mit} \quad \mathbf{N}_S \in \mathbb{R}^{(n_S \times n_r)}, \quad (2.3.21)$$

$$\frac{d\mathbf{c}_P}{dt} = \mathbf{N}_P \cdot \mathbf{r} \cdot c_x \quad \text{mit} \quad \mathbf{N}_P \in \mathbb{R}^{(n_P \times n_r)}, \quad (2.3.22)$$

$$\frac{dc_x}{dt} = \underbrace{\mathbf{N}_x \cdot \mathbf{r}}_{\mu} \cdot c_x \quad \text{mit} \quad \mathbf{N}_x \in \mathbb{R}^{(1 \times n_r)}. \quad (2.3.23)$$

Im Vergleich zum Prozessmodell aus Kapitel 2.3.1 werden hier die stöchiometrische Information und die Flüsse der Elementarmoden für die Definition der Raten verwendet. Die Matrix \mathbf{N}_S definiert die Stöchiometrie bezüglich n_S Substraten und \mathbf{N}_P ist die stöchiometrische Matrix im Bezug auf n_P Produkte bei jeweils n_r metabolen Reaktionen. Werden für das Beispiel beide Matrizen vereinigt, erhält man die stöchiometrische Matrix des Netzwerkes aus Gleichung (2.3.14). In dem vorab eingeführten Minimalbeispiel fehlt eine Gleichung zur Bildung der Biomasse, die in der Regel sehr komplex ist [75]. Die Matrix \mathbf{N}_x beinhaltet die stöchiometrischen Faktoren aller an der Biomassenbildung beteiligten Metaboliten. Im HCM-Ansatz wird die Rate \mathbf{r} zur Beschreibung der Dynamik der Biomasse c_x mit der Stöchiometrie-Information \mathbf{N}_x zur Gesamtrate μ zusammengefasst.

Der Vektor \mathbf{r} beinhaltet die Raten, welche in der metabolen Netzwerkanalyse auch als Flüsse bezeichnet werden. Die Änderung des Anteils an intrazellulären Metaboliten bezogen auf die Gesamtbiomasse \mathbf{x}_m in mol/g_{Bio} ist definiert durch:

$$\frac{d\mathbf{x}_m}{dt} = \mathbf{N}_m \cdot \mathbf{r} - \mu \cdot \mathbf{x}_m. \quad (2.3.24)$$

Neben dem ersten Term, der durch die Einträge der stöchiometrische Matrix der intrazellulären Metaboliten \mathbf{N}_m mit der Dimension $(n_m \times n_r)$ und den intrazellulären Flüssen \mathbf{r} definiert ist, wird zusätzlich die Verdünnung durch den Aufbau von Biomasse mit der Wachstumsrate μ berücksichtigt.

Unter der Annahme, dass sich intrazelluläre Metaboliten im stationären Zustand befinden (d.h. $\frac{d\mathbf{x}_m}{dt} = 0$) und Verdünnungseffekte durch Wachstum der Biomasse vernachlässigbar klein sind, reduziert sich Gleichung (2.3.24) zu

$$\mathbf{N}_m \cdot \mathbf{r} = \mathbf{0} \quad \text{mit} \quad \mathbf{r} \geq \mathbf{0}. \quad (2.3.25)$$

Wobei sich die Reaktionsraten \mathbf{r} mithilfe der EMen und den kinetischen Raten \mathbf{r}_M bestimmen lassen:

$$\mathbf{r} = \mathbf{Z} \cdot \mathbf{r}_M \quad (2.3.26)$$

Als EMen in \mathbf{Z} werden bei der Modellierung von HCMs AMen verwendet, die mittels metaboler Flussanalyse (vorheriger Absatz) ausgewählt worden. Der Ratenvektor \mathbf{r}_M ist als Gewichtsvektor für die EMen-Matrix im Ausbeuteraum zu betrachten. Für die Definition dieses Vektors muss zunächst die Bilanzgleichung für kybernetische Enzymlevel \mathbf{e} eingeführt werden. Für jeden der ausgewählten AMen wird das dynamische Verhalten eines Schlüsselenzymlevels modelliert, welches stellvertretend für die Enzyme aller Reaktionsgleichungen des dazugehörigen AM steht. Die Bilanz kann wie folgt beschrieben werden:

$$\frac{d\mathbf{e}}{dt} = \boldsymbol{\alpha} + \mathbf{r}_{EM} \cdot b - \text{diag}(\boldsymbol{\beta}) \cdot \mathbf{e} - \mu \cdot \mathbf{e} \quad (2.3.27)$$

Der Ratenvektor $\boldsymbol{\alpha}$ beschreibt die konstitutive und \mathbf{r}_{EM} die induzierbare Enzymsynthese. Der Term $\text{diag}(\boldsymbol{\beta}) \cdot \mathbf{e}$ repräsentiert die Degradation der Enzyme und der Term $\mu \cdot \mathbf{e}$ Verdünnungseffekte durch Biomassewachstum. Durch den Faktor b in der Beschreibung der induzierbaren Enzymsynthese wird berücksichtigt, dass der Anteil an katalytisch aktiver Biomasse bei der Bilanzierung von Speicherstoffen wie z.B. bei PHAs nicht konstant ist:

$$b = 1 - \sum_{i=1}^{n_m} (x_{m,i,slow}) \quad (2.3.28)$$

Dabei werden alle Anteile von Metaboliten mit langsamer Dynamik $x_{m,i,slow}$ aufaddiert, um so den Anteil an katalytisch aktiver Biomasse zu berechnen. An dieser Stelle sei anzumerken, dass für die Anteile der Metaboliten mit langsamer Dynamik (z.B. PHAs) die Stationaritätsannahme aus (2.3.25) nicht gilt.

Der Ratenvektor für die induzierbare Enzymsynthese \mathbf{r}_{EM} ist wie folgt aufgebaut:

$$\mathbf{r}_{EM} = \text{diag}(\mathbf{u}) \cdot \mathbf{r}_{EM}^{\text{kin}} \quad (2.3.29)$$

Mit dem Vektor der kybernetischen Variablen \mathbf{u} wird die Synthese der Enzyme genauer beschrieben. Die möglichen Berechnungsvorschriften für die kybernetischen Variablen sind im nächsten Abschnitt zusammengefasst. Der Ratenvektor $\mathbf{r}_{EM}^{\text{kin}}$ beinhaltet eine vom Substrat abhängige Monod-Kinetik und ist wie folgt definiert:

$$\mathbf{r}_{EM}^{\text{kin}} = \text{diag}(\mathbf{k}_e) \cdot \mathbf{r}_{\text{core}} \quad (2.3.30)$$

Der Vektor \mathbf{k}_e besteht aus konstanten Parametern, während in Vektor \mathbf{r}_{core} die Monod-Kinetiken definiert sind. Der i -te Eintrag des Vektors \mathbf{r}_{core} ist eine Kinetik aus multiplizierten Monod-Termen:

$$r_{\text{core},i} = \frac{c_{S1}}{K_{S1} + c_{S1}} \cdot \dots \cdot \frac{c_{Sn}}{K_{Sn} + c_{Sn}} \quad (2.3.31)$$

Der Index n hängt von der Anzahl aufgenommenen Substrate im jeweiligen AM ab. Die Konstante $K_{c_{s_n}}$ ist die Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit. Der Ratenvektor \mathbf{r}_M aus Gleichung (2.3.26) ist analog zum Ratenvektor \mathbf{r}_{EM} aus Gleichung (2.3.29) aufgebaut:

$$\mathbf{r}_M = \text{diag}(\mathbf{v}) \cdot \text{diag}(\mathbf{e}^{\text{rel}}) \cdot \mathbf{r}_M^{\text{kin}}. \quad (2.3.32)$$

Mit dem Vektor der kybernetischen Variablen \mathbf{v} wird die Aktivität der Enzyme beschrieben, die die Änderung der Substrat-, Produkt- und Biomassekonzentrationen beeinflussen. Der Term wird durch den Vektor relativer Enzymlevel (\mathbf{e}^{rel}) skaliert. Das relative Enzymlevel des i -ten AM wird wie folgt berechnet:

$$e_i^{\text{rel}} = \frac{e_i}{e_i^{\text{max}}} \text{ mit } e_i^{\text{max}} = \frac{\alpha_i + k_{e,i}}{\beta_i + k_{r,i}(\mathbf{N}_x \cdot \mathbf{Z})_i}. \quad (2.3.33)$$

Der Vektor $\mathbf{r}_M^{\text{kin}}$ aus Gleichung (2.3.32) beschreibt die Aufnahmearten, die wie folgt definiert sind:

$$\mathbf{r}_M^{\text{kin}} = \text{diag}(\mathbf{k}_r) \cdot \mathbf{r}_{\text{core}}. \quad (2.3.34)$$

Der Vektor \mathbf{k}_r beinhaltet die konstanten Parameter, welcher die Aufnahme der Substrate skaliert.

Definition kybernetischer Variablen Ein Kernmerkmal der kybernetischen Modelle ist die Möglichkeit der Beschreibung von Regulationsvorgängen unter der Annahme von optimaler Verteilung der vorhandenen Ressourcen. Dabei kann auf die Anwendung komplexer kinetischer Terme oder detaillierter Beschreibung von metabolischen Reaktionen in Mikroorganismen verzichtet werden. Beginnend mit Forschungsarbeiten aus den 80er Jahren wurden verschiedene Mechanismen erprobt, um die Schaltvorgänge bei diauxischem Wachstum abbilden zu können [23, 89]. Zu Beginn der Forschungsarbeiten wurden Regeln entwickelt, welche zunächst die Enzymsynthesen (Vektor der Variablen \mathbf{u}) als Schalter zwischen 0 und 1 wechseln lassen können [23]. Diese *bang-bang* Strategie war bereits in der Lage das diauxische Wachstum in einem aeroben Batch-Versuch von *Klebsiella pneumoniae* unter Verwendung von Glucose und Xylose zu beschreiben. Diese Betrachtungsweise hat jedoch den Nachteil, dass eine Änderung der Ressourcenverteilung in den Mikroorganismen nicht berücksichtigt werden kann. Weiterhin ist die einfache *bang-bang* Strategie nicht in der Lage zuerst das bevorzugte Substrat zu metabolisieren, wenn zu Beginn hohe Enzymlevel für das weniger attraktive Substrat vorliegen [89]. Aus diesem Grund wurde zusätzlich zum Vektor \mathbf{u} ein kybernetischer Vektor \mathbf{v} für die Beschreibung der Enzymaktivitäten eingeführt, sowie Strategien für die Definition dieser evaluiert. Definitionen der Vektoren für \mathbf{u} und \mathbf{v} sind in [179] sowie im Kapitel 4.6 im 2019 veröffentlichten Buch von Ramkrishna zusammengefasst [134]. Die Formulierung für die Variablen basierend auf dem Anpassungs- und Proportionalitätsgesetz ist ebenfalls in [179] zu finden. Dabei ist es möglich auch transiente Übergänge im

Aktivitäts- und Syntheseelevel der einzelnen Enzyme darzustellen. Die allgemeinen Definitionen für die Vektoren lauten:

$$\mathbf{u} = \frac{\mathbf{p}_u}{\|\mathbf{p}_u\|_1}, \quad \mathbf{v} = \frac{\mathbf{p}_v}{\|\mathbf{p}_v\|_\infty} \quad . \quad (2.3.35)$$

Die Berechnung der Rentabilitäten (engl. *return on investment*, ROI) \mathbf{p}_u und \mathbf{p}_v kann mit zwei wesentlichen Methoden erfolgen, die in Tabelle 2.4 zusammengefasst sind [180].

Tabelle 2.4.: Berechnungsmethoden für die Rentabilitäten.

	<i>temperate</i>		<i>greedy</i>	
	nicht gewichtet	gewichtet	nicht gewichtet	gewichtet
\mathbf{p}_u	$\mathbf{B}_u \cdot e^{A\Delta t} \cdot \mathbf{q}$	$\mathbf{R}^{-1} \cdot \mathbf{B}_u \cdot e^{A\Delta t} \cdot \mathbf{q}$	$\mathbf{B}_u \cdot \mathbf{q}$	$\mathbf{R}^{-1} \cdot \mathbf{B}_u \cdot \mathbf{q}$
\mathbf{p}_v	$\mathbf{B}_v \cdot e^{A\Delta t} \cdot \mathbf{q}$	$\mathbf{B}_v \cdot e^{A\Delta t} \cdot \mathbf{q}$	$\mathbf{B}_v \cdot \mathbf{q}$	$\mathbf{B}_v \cdot \mathbf{q}$

Bei der *temperate* Methode ist eine Angabe über die Zeitspanne Δt erforderlich, in der die Verteilung der Ressourcen optimiert werden soll. Da solche Zeitspannen in der Regel schwierig festzulegen sind, wird in der *greedy* Methode darauf verzichtet. Beide Berechnungsmethoden können in ungewichteter oder gewichteter Form formuliert werden. Die Wichtung erfolgt mit einer Gewichtsmatrix \mathbf{R} :

$$\mathbf{R} = \begin{bmatrix} \frac{e_1^\circ}{e_1} & 0 & \dots & 0 \\ 0 & \ddots & & \vdots \\ \vdots & & \ddots & 0 \\ 0 & \dots & 0 & \frac{e_{n_r}^\circ}{e_{n_r}} \end{bmatrix} \quad . \quad (2.3.36)$$

Mit Hilfe dieser Matrix werden die Variablen für die Synthese skaliert. Das Referenzenzymlevel e° entspricht dem Level im Ruhezustand unter gegebenen äußeren Bedingungen (Substratkonzentrationen). Durch die Nutzung der gewichteten Form werden die Ressourcen bevorzugt auf Pfade mit hohem Enzymlevel verteilt. Die Matrizen \mathbf{B}_u , \mathbf{B}_v und \mathbf{A} können mithilfe der Linearisierung des DGL Systems $\mathbf{f} = \frac{d\mathbf{y}}{dt}$ berechnet werden:

$$\mathbf{B}_u = \frac{\partial \mathbf{f}}{\partial \mathbf{u}}(\mathbf{y}(t), \mathbf{u}^\circ, \mathbf{v}^\circ), \quad (2.3.37)$$

$$\mathbf{B}_v = \frac{\partial \mathbf{f}}{\partial \mathbf{v}}(\mathbf{y}(t), \mathbf{u}^\circ, \mathbf{v}^\circ), \quad (2.3.38)$$

$$\mathbf{A} = \frac{\partial \mathbf{f}}{\partial \mathbf{y}}(\mathbf{y}(t), \mathbf{u}^\circ, \mathbf{v}^\circ). \quad (2.3.39)$$

Die Variablen \mathbf{u}° und \mathbf{v}° entsprechen hier den Referenzwerten für die Regelvariablen. Der Vektor \mathbf{q} aus Tabelle 2.4 kann mithilfe einer metabolen Zielfunktion ϕ berechnet werden

$$\mathbf{q} = \frac{\partial \phi(\mathbf{y})}{\partial \mathbf{y}} \quad . \quad (2.3.40)$$

In der Definition der metabolen Zielfunktion steckt eine der Hauptannahmen für kybernetische Modelle: Die Zelle verfolgt mit der Verstoffwechslung von Substraten ein bestimmtes Ziel. Die Maximierung von Biomasse ist eine häufig verwendete Annahme für die Definition der Zielfunktion:

$$\phi(\mathbf{y}) = c_x \quad . \quad (2.3.41)$$

Wenn zwischenzeitlich die maximale Biomasseproduktion nicht favorisiert wird, da bestimmte Substrate zur Herstellung von beispielsweise Aminosäuren fehlen und eine Umstellung auf die Einlagerung von Kohlenstoff erfolgt, kann eine metabolische Zielfunktion gewählt werden, die die Maximierung der Kohlenstoffaufnahme beschreibt [51]. Für das metabolische Netzwerk aus Abbildung 2.6 mit zwei Substraten wird im Folgenden eine Zielfunktion zur Maximierung der Kohlenstoffaufnahme entwickelt. Als Substrat S1 soll hier Acetat (zwei Kohlenstoffatome) angenommen werden und als Substrat S2 Fruktose (sechs Kohlenstoffatome). Unter der Annahme, dass Acetat das bevorzugte Substrat ist, kann folgende Zielfunktion definiert werden [51]:

$$\phi(\mathbf{y}) = - \frac{\left(\frac{2}{M_{S1}} c_{S1} + \frac{6}{M_{S2}} c_{S2} \right)}{\frac{2}{M_{S1}}} \quad (2.3.42)$$

$$\text{mit } \mathbf{y} = \left[c_{S1} \quad c_{S2} \quad e_2 \quad e_3 \quad e_4 \quad e_5 \quad c_{P1} \quad c_{P2} \quad c_x \right]^T .$$

Die Anzahl der Kohlenstoffatome im Zähler und die molaren Massen M_{S1} und M_{S2} wurden entsprechend der Substrate Fruktose und Acetat gewählt. Da Acetat das bevorzugte Substrat ist, wird Zielfunktion mit $\frac{2}{M_{S1}}$ skaliert. Mithilfe des Zusammenhangs aus Gleichung (2.3.40) kann der Vektor \mathbf{q} für die Berechnung der Rentabilitäten berechnet werden:

$$\mathbf{q} = \left[-1 \quad -0.98 \quad 0 \quad 0 \quad 0 \quad 0 \quad 0 \quad 0 \quad 0 \right]^T . \quad (2.3.43)$$

In dieser Arbeit wird die Berechnung gemäß der gewichteten *greedy* Vorschrift durchgeführt. Dafür ist es nötig die partiellen Ableitung des Differentialgleichungssystems gemäß der Gleichungen (2.3.37) bis (2.3.38) zu berechnen. Das Differentialgleichungssystem \mathbf{f} ist wie folgt definiert:

$$\mathbf{f} = \frac{d}{dt} \left[c_{S1} \quad c_{S2} \quad e_2 \quad e_3 \quad e_4 \quad e_5 \quad c_{P1} \quad c_{P2} \quad c_x \right]^T \quad (2.3.44)$$

Die Enzyme regulieren die AMen, die den Ausbeuteraum aus Abbildung 2.7b definieren. Die Indices der Enzyme entsprechen den ausgewählten AMen. Im Folgenden spielen bloß noch die Differentialgleichungen für die Substrate eine Rolle, da die metabolische Zielfunktion nur diese berücksichtigt und auch die partielle Ableitung \mathbf{q} nach den Zuständen \mathbf{y} nur an diesen Stellen Einträge besitzt. Die Differentialgleichungen für die zwei Substrate unter Berücksichtigung der Stöchiometrie und der Enzymregulation sind wie folgt definiert:

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} c_{S1} \\ c_{S2} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -0.5 & -1 & 0 & -0.5 \\ 0 & -1 & -1 & 0 \end{bmatrix} \cdot \text{diag}(\mathbf{v}) \cdot \text{diag}(\mathbf{e}^{rel}) \cdot \mathbf{r}_M^{\text{kin}} \cdot c_x . \quad (2.3.45)$$

Zunächst wird \mathbf{f} nach v_i abgeleitet, um \mathbf{B}_v zu erhalten. Da durch den Vektor \mathbf{q} in der Berechnungsvorschrift für die Rentabilitäten nur noch die ersten beiden Spalten eine Rolle spielen, sind alle weiteren Einträge durch ein * gekennzeichnet:

$$\mathbf{B}_v = \begin{bmatrix} -0.5 e_2^{\text{rel}} r_2^{\text{kin}} c_x & 0 & * & * & * & * & * & * & * \\ -1 e_3^{\text{rel}} r_3^{\text{kin}} c_x & -1 e_3^{\text{rel}} r_3^{\text{kin}} c_x & * & * & * & * & * & * & * \\ 0 & -1 e_4^{\text{rel}} r_4^{\text{kin}} c_x & * & * & * & * & * & * & * \\ -0.5 e_5^{\text{rel}} r_5^{\text{kin}} c_x & 0 & * & * & * & * & * & * & * \end{bmatrix}. \quad (2.3.46)$$

Wenn das Differentialgleichungssystem \mathbf{f} nach u_i abgeleitet wird sind alle Einträge der Matrix \mathbf{B}_u null:

$$\mathbf{B}_u = \begin{bmatrix} 0 & 0 & * & * & * & * & * & * & * \\ 0 & 0 & * & * & * & * & * & * & * \\ 0 & 0 & * & * & * & * & * & * & * \\ 0 & 0 & * & * & * & * & * & * & * \\ 0 & 0 & * & * & * & * & * & * & * \end{bmatrix}. \quad (2.3.47)$$

Dies ist ein Nachteil bei der Verwendung der *greedy* Methode, in der Δt keine Rolle spielt. Alternativ kann \mathbf{B}_u am quasi-stationären Zustand der Enzymlevel ausgewertet werden [180]. Die Enzymlevel in der Berechnung des relativen Enzyms nach Gleichung (2.3.33) können am *quasi steady state* wie folgt berechnet werden:

$$e_i := e_i^{\text{qss}} = \frac{\alpha_i}{\beta_i + \mu} + \underbrace{\left(\frac{r_{\text{EM},i} b}{\beta_i + \mu} \right)}_{e_i^\circ} u_i. \quad (2.3.48)$$

Mit diesem Zusammenhang berechnet sich die Matrix \mathbf{B}_u wie folgt:

$$\mathbf{B}_u = \begin{bmatrix} -0.5 v_2^\circ \frac{e_2^\circ}{e_2^{\text{max}}} r_2^{\text{kin}} c_x & 0 & * & * & * & * & * & * & * \\ -1 v_3^\circ \frac{e_3^\circ}{e_3^{\text{max}}} r_3^{\text{kin}} c_x & -1 v_3^\circ \frac{e_3^\circ}{e_3^{\text{max}}} r_3^{\text{kin}} c_x & * & * & * & * & * & * & * \\ 0 & -1 v_4^\circ \frac{e_4^\circ}{e_4^{\text{max}}} r_4^{\text{kin}} c_x & * & * & * & * & * & * & * \\ -0.5 v_5^\circ \frac{e_5^\circ}{e_5^{\text{max}}} r_5^{\text{kin}} c_x & 0 & * & * & * & * & * & * & * \end{bmatrix}. \quad (2.3.49)$$

Die Referenzaktivität v_i° kann wie in [180] entsprechend dem unregulierten Netzwerk mit $v_i^\circ = 1 \forall i$ angenommen werden. Mithilfe dieser Annahme und der Definition für die Wichtung aus (2.3.36) können die Rentabilitäten nach der gewichteten *greedy* Methode berechnet werden:

$$\mathbf{p}_u = \mathbf{R}^{-1} \cdot \mathbf{B}_u \cdot \mathbf{q} = \text{diag}(\mathbf{f}_c) \cdot \text{diag}(\mathbf{e}^{\text{rel}}) \cdot \mathbf{r}_M c_x, \quad (2.3.50)$$

$$\mathbf{p}_v = \mathbf{B}_v \cdot \mathbf{q} = \text{diag}(\mathbf{f}_c) \cdot \text{diag}(\mathbf{e}^{\text{rel}}) \cdot \mathbf{r}_M c_x. \quad (2.3.51)$$

Der Vektor \mathbf{f}_c beschreibt nun die Anzahl der aufgenommenen Kohlenstoffeinheiten und ist für das vorliegende Beispiel wie folgt definiert:

$$\mathbf{f}_c = [0.5 \quad 1.98 \quad 0.98 \quad 0.5]^\text{T}. \quad (2.3.52)$$

Wie bereits in [51] gezeigt wurde, ist der Einsatz eines HCMs mit der hier eingeführten metabolen Zielfunktion und der Berechnungsmethode für die Rentabilitäten für die Beschreibung der mikrobiellen PHB Produktion geeignet. Aus diesem Grund wird auch in dieser Arbeit für die Modellierung der Dynamik des PHB-Produktionsprozesses auf Basis von zwei Kohlenstoffquellen auf diesen Ansatz zurückgegriffen.

2.3.3. Modellierung von Polymerisierungsprozessen

Die Änderung der Kettenlängenverteilung von PHAs kann mit Populationsbilanzen in kontinuierlicher oder diskreter Form modelliert werden [80]. Die Dynamik der Kettenlängenverteilung von PHB wurde bereits 2001 mit einer kontinuierlichen Populationsbilanz für die Polymerketten beschrieben [105]. Damit konnte unter anderem der Einfluss der Rate zur Beschreibung der Kettenverlängerung auf die Bildung von Block-Copolymeren untersucht werden. In der Publikation [105] und auch in der darauf folgenden Erweiterung für die Beschreibung der Kettenlängenverteilung des Copolymers PHBV [104] wurde zunächst nur der Polymerisationsvorgang in einer nicht mehr wachsenden *C. necator* Kultur beschrieben. Die Degradation der Polymere bzw. Änderungen in der Substratzusammensetzung hin zu ausbalancierten Wachstumsbedingungen wurden nicht berücksichtigt.

Eine alternative Polymerisierungskinetik zur Beschreibung der Dynamik von PHB-Ketten liefert das kombinierte „Metabolismus-Polymerisierungs-Modell“ von 2010 [126]. Dabei werden die Polymerketten mit einer Populationsbilanz in diskreter Form beschrieben und an ein Modell zur Beschreibung des Metabolismus gekoppelt. Dadurch ist es möglich die Dynamik der Kettenlängenverteilung während unterschiedlicher metaboler Zustände (Wachstumsphase, Akkumulation und Degradation) abzubilden. Im Rahmen dieser Arbeit wird ebenfalls eine diskrete Populationsbilanz zur Beschreibung der Kettenlängenverteilung genutzt und an unterschiedliche metabolische Modelle gekoppelt, die die Dynamik der Gesamtpolymerkonzentration unter Einsatz mehrerer Kohlenstoffquellen beschreiben können. Details werden in den Abschnitten 2.4.4 und 2.5.5 genauer beschrieben.

Für die Entwicklung einer Populationsbilanz in diskreter Form ist es zunächst erforderlich den Polymerisationsprozess einzuordnen. Bei der Bildung von PHAs handelt es sich um eine Kettenwachstums-Polymerisation, bei der immer ein neues Monomer M an eine Kette P der Länge i angefügt wird. Initiiert wird die Polymerisation durch die Bindung eines Monomers M an ein Enzym E (z.B. Synthase PhaC auf der Oberfläche der intrazellulären Granula). Dabei entsteht das Polymer P der Länge $i = 1$. Die zwei elementaren Schritte der Initiation und Propagation/Kettenverlängerung können mit einem einfachen Reaktionsschema wie folgt beschrieben werden [67]:



Die Initiation aus Gleichung (2.3.53), mit dem Enzym E (z.B. Synthase PhaC) und dem Monomer M (z.B. HB) zu dem Polymer P der Länge $i = 1$, kann mit folgenden

Raten beschrieben werden:

$$q_{in,E} = -k_{in} M E, \quad (2.3.55)$$

$$q_{in,M} = -k_{in} M E, \quad (2.3.56)$$

$$q_{in,P_1} = k_{in} M E. \quad (2.3.57)$$

Die Raten für die Propagation eines Polymers der Länge i kann aus der Reaktion (2.3.54) gebildet werden und wie folgt zu einem Term zusammengefasst:

$$q_{prop,P_i} = k_{prop} M (P_{i-1} - P_i). \quad (2.3.58)$$

Das Polymer der Länge i wird durch Anlagerung eines Monomers M an das Polymer der Länge $i - 1$ mit der Ratenkonstante k_{prop} gebildet. Die Ratenkonstante k_{prop} wird hier zunächst als längenunabhängig angenommen. In gleicher Weise wie bei der Bildung verschwindet dieses Polymer wieder aus der Bilanz, da durch Anlagerung eines Monomers an das Polymer P_i das Polymer der Länge $i + 1$ entsteht. Die Rate für die Propagation des Polymers der Länge $i = 1$ ist demzufolge:

$$q_{prop,P_1} = -k_{prop} M P_1. \quad (2.3.59)$$

Die Rate für die Monomere bei der Propagation lautet:

$$q_{prop,M} = -k_{prop} M P_1 - k_P M P_2 - \dots - k_P M P_i - \dots \quad (2.3.60)$$

$$= -k_{prop} M \sum_{i=1}^{\infty} P_i \quad (2.3.61)$$

Zusätzlich zu den ersten beiden Schritten spielt die Termination aktiv synthetisierter Ketten und der Kettenabbau eine Rolle. Bei der Termination der Synthese von PHAs werden weder Teile von Ketten abgespalten, noch ein zusätzliches Enzym benötigt. Deshalb kann das Ende der Synthese durch einen einfachen Wechsel von aktiven zu inaktiven Polymerketten beschrieben werden:



Inaktive Polymerketten D_i werden nicht weiter verlängert und solange im Granula eingelagert, bis diese abgebaut werden. Die zugehörigen Raten für aktive und inaktive Spezies lauten:

$$q_{c,P_i} = -k_c P_i, \quad (2.3.63)$$

$$q_{c,D_i} = k_c P_i. \quad (2.3.64)$$

Bei der Depolymerisation gibt es unterschiedliche Möglichkeiten der Darstellung. Der Kettenabbau kann entweder durch Depropagation erfolgen, d.h. die Synthese wirkt umgekehrt oder die Depolymerisation findet an einem weiteren Enzym statt. In *C. necator* werden PHAs hauptsächlich über die Depolymerasen *PhaZ* abgebaut [71]. Depolymerisation kann wie folgt ausgedrückt werden:



Mit diesem Zusammenhang können die Raten inaktiver Ketten D_i bei einer Depolymerisierung hergeleitet und zu einem Term zusammengefasst werden:

$$q_{dep,D_i} = k_{dep} (D_{i+1} - D_i) . \quad (2.3.66)$$

Dabei baut sich das Polymer der Länge i mit der Depolymerisationskonstante k_{dep} ab und wird durch die Depolymerisation des Polymers mit der Länge $i + 1$ gebildet. Analog dazu kann die Rate für die Depolymerisation des Polymers der Länge $i = 1$ definiert werden:

$$q_{dep,D_1} = k_{dep} (D_2 - D_1) . \quad (2.3.67)$$

Die Rate für die Monomere bei der Depolymerisation lautet:

$$q_{dep,M} = k_{dep} \sum_{i=1}^{\infty} D_i . \quad (2.3.68)$$

Die Gesamtbilanz der definierten Spezies für die vier beschriebenen Teilprozesse lautet:

$$\begin{aligned} \frac{dE}{dt} &= q_{in,E} \\ &= -k_{in} M E , \end{aligned} \quad (2.3.69)$$

$$\begin{aligned} \frac{dM}{dt} &= q_{in,M} + q_{prop,M} + q_{dep,M} \\ &= -k_{in} M E - k_{prop} M \sum_{i=1}^{\infty} P_i + k_{dep} \sum_{i=1}^{\infty} D_i , \end{aligned} \quad (2.3.70)$$

$$\begin{aligned} \frac{dP_1}{dt} &= q_{in,P_1} + q_{prop,P_1} + q_{c,P_1} \\ &= k_{in} M E - k_{prop} M P_1 - k_c P_1 , \end{aligned} \quad (2.3.71)$$

$$\begin{aligned} \frac{dP_i}{dt} &= q_{prop,P_i} + q_{c,P_i} \\ &= k_{prop} M (P_{i-1} - P_i) - k_c P_i , \end{aligned} \quad (2.3.72)$$

$$\begin{aligned} \frac{dD_1}{dt} &= q_{c,D_1} + q_{dep,D_1} \\ &= k_c P_1 - k_{dep} (D_1 - D_2) , \end{aligned} \quad (2.3.73)$$

$$\begin{aligned} \frac{dD_i}{dt} &= q_{c,D_i} + q_{dep,D_i} \\ &= k_c P_i - k_{dep} (D_i - D_{i+1}) . \end{aligned} \quad (2.3.74)$$

Die Polymerisationskinetik dieser Arbeit weist einige Besonderheiten auf, die bei der Beschreibung des Polymerisationsmodells im Abschnitt 2.4.4 gesondert erläutert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit werden die charakteristischen Größen Zahlenmittel (M_n), Gewichtsmittel (M_w) und Polydispersität (PDI) der Kettenlängenverteilung mit

experimentellen Daten abgeglichen. Für die Berechnung dieser Kenngrößen muss das nullte, erste und zweite Moment zum Zeitpunkt t berechnet werden:

$$\lambda_k^p(t) = \sum_{i=1}^{\infty} i^k (P_i(t) + D_i(t)). \quad (2.3.75)$$

Die Definitionen zur Berechnung der charakteristischen Größen sind:

$$M_n(t) = \frac{\lambda_1^p(t)}{\lambda_0^p(t)} M_M^P, \quad (2.3.76)$$

$$M_w(t) = \frac{\lambda_2^p(t)}{\lambda_1^p(t)} M_M^P, \quad (2.3.77)$$

$$\text{PDI} = \frac{M_w(t)}{M_n(t)}. \quad (2.3.78)$$

Die durchschnittliche molare Masse je Monomer M_M^P , entspricht dem Molekulargewicht eines Monomers, falls es sich bei dem Polymer um ein Homopolymer handelt (z.B. PHB). Im Falle des Copolymers PHBV wird im Rahmen dieser Arbeit eine angepasste Strategie angewandt, welche in Abschnitt 2.5.5 beschrieben ist.

2.3.4. Parameterschätzung

Für die Entwicklung der Modelle zur Beschreibung des PHB- (Kapitel 2.4) und PHBV-Produktionsprozesses (Kapitel 2.5) wurden Parameter an die erhobenen Daten angepasst. Hierfür wurde mit verschiedenen Optimierungswerkzeugen gearbeitet. Zunächst wurde mit Hilfe eines Multistart-Verfahrens mit $N = 1000$ Startwerten für die zu schätzenden Parameter und einer lokalen Optimierung mit dem Innere-Punkte-Verfahren ein geeigneter Parametersatz geschätzt. Die Parameteranpassung wurde in *MATLAB 2019b* unter Verwendung des Algorithmus *fmincon* umgesetzt. Anschließend wurde dieser Parametersatz nochmals überprüft. Dafür wurde der globale *Differential evolution* (DE)-Algorithmus mit dem Parametersatz aus der *fmincon*-Schätzung als Startwerte verwendet [154]. Da es sich beim DE-Algorithmus um einen genetische Optimierungsmethode handelt, muss eine Stopp-Bedingung für das Ende der Suche hinterlegt werden. Hier wurde die Suche nach verbesserten Parametern nach 60 Stunden beendet. Sofern sich das Ergebnis aus der DE-Optimierung verbessert hat, wurde dieses nochmals als Startwert für eine erneute *fmincon* Optimierung hinterlegt und erneut optimiert. Als Zielfunktion für beide Verfahren wurde folgende Fehlerquadratsumme *FQS* gewählt:

$$FQS = \sum_{i=1}^n \left(\frac{\mathbf{x}_{\text{exp}}(t_i) - \mathbf{x}_{\text{sim}}(t_i)}{\max(\mathbf{x}_{\text{exp}})} \right)^2. \quad (2.3.79)$$

Dabei wird die Abweichung zwischen simulierten Punkten \mathbf{x}_{sim} und experimentellen Daten \mathbf{x}_{exp} zu den gegebenen Zeitpunkten t_i bestimmt und mit dem Maximum der jeweiligen experimentellen Datenreihe gewichtet.

Die numerische Lösung der ODE-Systeme wurde mit dem Algorithmus *ode15s* (*MATLAB 2019b*) unter Anwendung einer relativen Toleranz von 10^{-9} bestimmt.

2.4. Poly(3-hydroxybutyrat)-Produktion unter Verwendung von Fruktose und Acetat als Kohlenstoffquellen

Im folgenden Abschnitt werden die entwickelten Modelle für den PHB-Produktionsprozess vorgestellt. Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf der Nutzung mehrerer Substrate, wie sie häufig bei der Verwendung von Abfällen oder Reststoffen vorkommen. Aus diesem Grund wurden hier Fruktose und Acetat als Substrate gewählt. Zur Beschreibung der totalen Polymerausbeuten wurde im Rahmen dieser Arbeit ein HCM-Ansatz gewählt. Frühere Arbeiten konnten bereits zeigen, dass HCMs geeignet sind, um Co-Substrate zu untersuchen [150]. Darüber hinaus konnte in der Vergangenheit der HCM-Ansatz bereits erfolgreich für die Beschreibung der PHB-Produktion mit Fruktose als alleiniger Kohlenstoffquelle angewendet werden [51].

Das im folgenden Unterkapitel präsentierte HCM stellt eine Erweiterung des Modells aus [51] dar. Neben der Berücksichtigung von zwei Kohlenstoffquellen wurde zusätzlich noch der Einfluss des verfügbaren Sauerstoffs in den Modellansatz integriert, um optimierte Produktausbeuten vorhersagen zu können. In einer anschließenden Simulationsstudie werden verschiedene Sauerstoffverfügbarkeiten und Substratzusammensetzungen in Bezug auf die PHB-Ausbeute untersucht.

Schließlich wird eine Polymerisierungskinetik eingeführt und das HCM mit dieser verknüpft, um so Kettenlängenverteilungen bei unterschiedlichen Prozessbedingungen simulieren zu können. Der Abgleich der Kettenlängenverteilung sowie zugehörigen charakteristischen Größen erfolgt mit experimentellen Daten.

Die Modelle dieses Kapitels wurden bereits in Konferenzartikeln zum *IFAC World Congress 2020* [41] und *31. European Symposium on Computer Aided Process Engineering* veröffentlicht [42]. Die Kopplung des HCMs an das Polymerisierungsmodell wurde in einem weiteren Artikel im Journal *Computers and Chemical Engineering* beschrieben [45].

2.4.1. Hybrid kybernetisches Modell für den PHB Produktionsprozess

Metaboles Netzwerk

Das verwendete metabolische Netzwerk in Abbildung 2.8 basiert auf Modellversionen aus den Publikationen [51] und [181]. Letzterer Artikel beschreibt die Aufnahme und den Verbrauch verschiedener kurzkettiger Fettsäuren wie Essigsäure bzw. Acetat. Durch die Vereinigung beider Versionen besitzt das Netzwerk nun drei Substrateingänge für Fruktose, Acetat und Ammoniumchlorid. Weiterhin wurde die Reversibilität der Reaktionsgleichungen mithilfe der Datenbank KEGG überprüft und entsprechend angepasst (siehe Tabelle B.1 im Appendix und rote Pfeile in Abbildung 2.8).

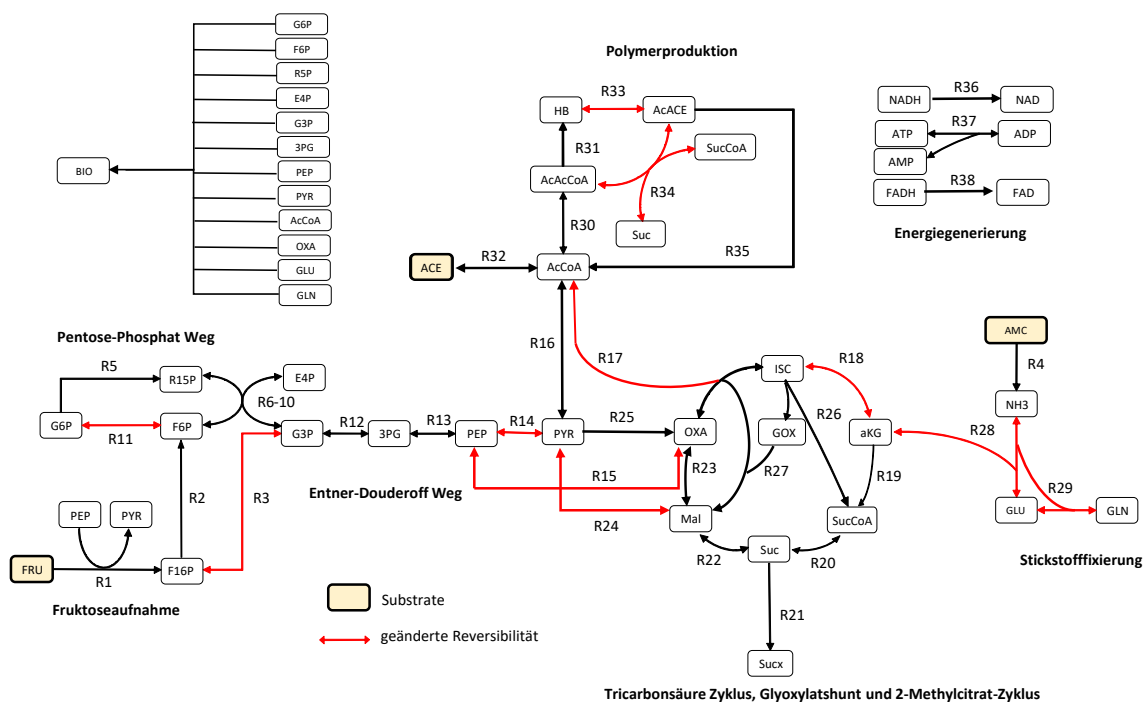


Abbildung 2.8.: Metaboles Modell auf Basis von [51] und [181] mit überprüfter Reversibilität (rote Pfeile) und den Substraten Fruktose (FRU), Acetat (ACE) und Ammoniumchlorid (AMC). Eine Liste der Kürzel ist dem Abkürzungsverzeichnis zu entnehmen.

Analyse des PHB Netzwerkes im Ausbeuteraum

Für das ermittelte metabolische Netzwerk mit 39 Reaktionen wurden 4857 EMen unter Anwendung der Software METATOOL berechnet [129]. Für die Aufstellung des HCMs muss eine geeignete Anzahl an Moden reduziert werden. Hierzu erfolgte die Einteilung in unterschiedliche EMen Gruppen im Bezug auf deren Kohlenstoffquelle [153]. Für das Modell mit Fruktose und Acetat wurden sieben unterschiedliche Gruppen je nach aufgenommenen Substraten gebildet. Hierbei wurde auch unterschieden ob der Speicherstoff PHB verbraucht oder gebildet wurde:

- Fruktose
- Fruktose und PHB
- Acetat
- Acetat und PHB
- Fruktose und Acetat
- Fruktose, Acetat und PHB
- PHB

Tabelle 2.5.: Gruppen für die Einteilung der GMen. Legende: FRU - Fruktose; AMC - Ammoniumchlorid; ACE - Acetat; PHB - Poly(3-hydroxybutyrat); RES - residuale Biomasse.

Gruppe		Anzahl GMs
1	FRU + AMC → PHB + RES	1
2	FRU + AMC + PHB → RES	2
3	FRU → PHB	2
4	FRU + ACE + AMC → RES	2
5	FRU + ACE + AMC + PHB → RES	3
6	FRU + ACE → PHB	2
7	ACE + AMC + PHB → RES	2
8	ACE + AMC → RES	2
9	ACE → PHB	2
10	AMC + PHB → RES	5
11	FRU + AMC → RES	1
12	AMC + PHB → RES + ACE	5
13	FRU + AMC → RES + ACE	2
14	FRU + AMC + PHB → RES + ACE	4
15	FRU → ACE	3

Darüber hinaus wurde berücksichtigt, ob Acetat ein Produkt oder Substrat ist. Unter Verwendung der Vorgehensweise aus Abschnitt 2.3.2 wurde für die einzelnen Untermodelle je eine konvexe Hülle im Ausbeuteraum für Biomasse, PHB oder Acetat gebildet, um so die GMs zu erhalten. Hierfür werden die Einträge in der EMen-Matrix mit den Substraten in $\frac{gC}{g_{bio-h}}$ zu $\frac{g_{Produkt}}{gC}$ normiert. Die Hüllen für die Ausbeuteräume der oben angegebenen Gruppen für Biomasse und PHB oder Acetat sind in den Abbildungen B.1 bis B.6 im Appendix gezeigt. Dabei wurde nach extern aufgenommenen Substraten sortiert und die Fälle für den gleichzeitigen Verbrauch von PHB in die Abbildung miteinbezogen. Nach Reduktion der Fläche auf 90 % wurden 38 GMs identifiziert, die im Folgenden auf Basis der Daten weiter eingegrenzt werden. Dafür werden die GMs nochmals in 15 funktionelle Gruppen unterteilt (Tabelle 2.5). Die Gruppen 12 bis 15 aus Tabelle 2.5 zeigen, dass Acetat nicht nur als Substrat dient sondern auch produziert werden kann. Die Produktion von Acetat aus Fruktose kann bei *C. necator* unter anaeroben Bedingungen erfolgen. Da die vorliegenden experimentellen Daten allerdings nur bei einem DOs ≥ 5 % ermittelt worden, können die AMs 13 bis 15 zunächst vernachlässigt werden.

Im Falle mehrerer GMen für eine funktionelle Gruppe muss der am besten geeignete GM ermittelt werden. Deshalb wurden alle möglichen Kombinationen von GMen parallel zu der Parameterschätzung (siehe Abschnitt 2.3.2) für die kinetischen Parameter k_r variiert und ausgewertet. Die Auswahl mit der kleinsten normalisierten Fehlerquadratsumme wurde schließlich für die Beschreibung der Zustandsgleichungen des HCM gewählt. Die 12 ausgewählten AMen sind in Tabelle 2.6 dargestellt. Die AMen 2, 5, 7, 10 und 12 aus Tabelle 2.6 beschreiben die Umwandlung von PHB

Tabelle 2.6.: Werte für die normalisierte AM-Matrix unterteilt in unterschiedliche Untergruppen: Substrate ($\mathbf{N}_S \cdot \mathbf{Z}$), HB ($\mathbf{N}_m \cdot \mathbf{Z}$) und Gesamtbiomasse ($\mathbf{N}_x \cdot \mathbf{Z}$); der normalisierte Kohlestoffaufnahmevektor (\mathbf{f}_c) und die Einteilung der AMen zu unterschiedlichen experimentellen Datensätze: Fruktose als Einzelkohlenstoffquelle (FRU), Acetat als Einzelkohlenstoffquelle (ACE) und Fruktose+Acetat als Kohlenstoffquellen (both).

AM	1	2	3	4	5	6	
Y_{Fru}	-2.50	-0.28	-2.50	-2.44	-0.40	-1.29	
Y_{Ace}	0.00	0.00	0.00	-0.06	-0.09	-1.19	$\mathbf{N}_S \cdot \mathbf{Z}$
Y_{AMC}	-0.64	-0.73	0.00	-0.75	-0.50	0.00	
Y_{HB}	0.31	-1.59	1.19	0.00	-1.44	0.25	$\mathbf{N}_m \cdot \mathbf{Z}$
Y_{Bio}	1.66	-0.05	1.19	1.58	-0.38	0.25	$\mathbf{N}_x \cdot \mathbf{Z}$
\mathbf{f}_c	1.00	0.75	1.00	1.00	0.83	0.99	
Daten	FRU	FRU	FRU	both	both	both	
AM	7	8	9	10	11	12	
Y_{Fru}	0.00	0.00	0.00	0.00	-2.50	0.00	
Y_{Ace}	-0.01	-2.46	-2.46	0.00	0.00	0.43	$\mathbf{N}_S \cdot \mathbf{Z}$
Y_{AMC}	-0.33	-0.51	0.00	-0.001	-0.77	-0.18	
Y_{HB}	-1.78	0.00	1.19	-0.021	0.00	-1.79	$\mathbf{N}_m \cdot \mathbf{Z}$
Y_{Bio}	-1.08	1.08	1.19	-0.018	1.63	-1.42	$\mathbf{N}_x \cdot \mathbf{Z}$
\mathbf{f}_c	0.72	0.98	0.98	0.01	1.00	0.72	
Daten	ACE	ACE	ACE	FRU	FRU	ACE	

zu Biomasse und Energie. Dabei wird auch CO_2 produziert. CO_2 als Produkt wird im Rahmen dieser Modellbildung nicht berücksichtigt, da das metabolische Modell dann um ein Vielfaches komplexer sein müsste und eine Reduktion der EMen nicht mehr ohne weiteres möglich ist. Die Umwandlung von Speichermaterial wie PHB zur Aufrechterhaltung des Energiestoffwechsels kann entweder ohne die zusätzliche Aufnahme von externen Kohlenstoffverbindungen (AM 10, 12) oder bei reduzierter Substrataufnahme (AMen 2, 5, 7) erfolgen. Die GMen und die auf Basis der Daten ausgewählten AMen sind in Abbildung 2.9 im gesamten Ausbeuteraum gezeigt. Die experimentellen Ausbeuten können ebenfalls im Ausbeuteraum dargestellt werden. In den Abbildungen 2.10a bis 2.10d ist dies für die Identifikationsdatensätze gemeinsam mit der konvexen Hülle und den *a priori* reduzierten GMen dargestellt. Für die Darstellung im Ausbeuteraum wurden die experimentellen Daten wie folgt unterteilt:

- Phase I: exponentielles Wachstum
- Phase II: PHB Akkumulation
- Phase III: PHB Abbau

Bei dem Experiment III (siehe Tabelle 2.3) mit beiden Kohlenstoffquellen muss die oben beschriebene Unterteilung differenziert betrachtet werden. In Abbildung

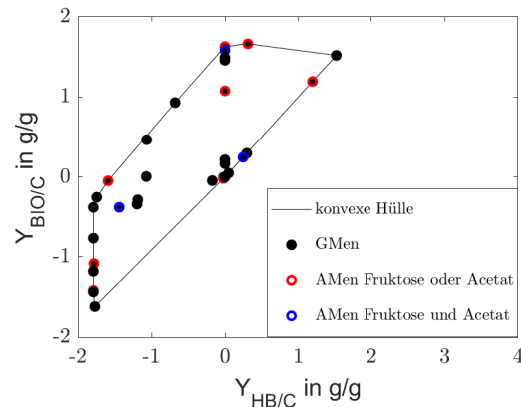


Abbildung 2.9.: Gesamter Ausbeuteraum mit GMen (schwarze Kreise) und ausgewählte Moden für Einzelsubstrate (rote Kreise) und Cosubstrate (blaue Kreise).

2.10d beschreiben die Ausbeutewerte aus Phase Ia das exponentielle Wachstum bei Aufnahme von Acetat und Phase Ib das exponentielle Wachstum bei Aufnahme von Fruktose. Die PHB Produktion kann ebenfalls nochmals unterteilt werden. In Phase IIa wird PHB aus Acetat produziert und in Phase IIb erfolgt die PHB-Produktion mit Acetat und Fruktose in Anwesenheit von Ammoniumchlorid. Wie bei den Experimenten mit Einzelsubstraten, beschreibt der Ausbeutekoeffizient von Phase III den Abbau von PHB.

Die Position der experimentellen Ausbeutekoeffizienten gibt einen ersten Hinweis darüber, wie gut das Modell die experimentellen Daten abbilden wird. Die größten Herausforderungen liegen hierbei in der Abbildung des dynamischen Verhaltens unter Verwendung von Acetat während des exponentiellen Wachstums (Phase IIa, Abbildung 2.10c) und der Verwendung von Acetat bei der Produktion von PHB bei Aufnahme beider Kohlenstoffquellen (Abbildung 2.10d), denn diese experimentellen Ausbeuten liegen leicht außerhalb der Hülle. Unter Berücksichtigung der statistischen Fehler für die Bestimmung von Biomasse und PHB und in Anbetracht der Möglichkeit die kinetischen Parameter des HCMs an die Datensätze anzupassen, sollte der HCM-Ansatz dennoch in der Lage sein, das dynamische Verhalten abzubilden.

Modellstruktur und Parameteridentifikation

Für das Modell zur Beschreibung des PHB-Prozesses wurden mehrstufig Parameteranpassungen vorgenommen. Zunächst wurde die klassische Modellstruktur, wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben, verwendet und an Datensätze mit Fruktose oder Acetat als alleinige Kohlenstoffquelle angepasst. In einem ersten Schritt wurde für Fruktose ein Datensatz aus der Literatur gewählt [51]. Bei Verwendung von Acetat als Kohlenstoffquelle wurde auf die Daten aus Experiment II zurückgegriffen (siehe Tabelle 2.3). Bei der Anpassung wurden die AMen zunächst vernachlässigt, die sowohl Fruktose als auch Acetat gleichzeitig metabolisieren (AM 4 bis 6 aus Tabelle 2.6). Die Parameter in \mathbf{k}_r nach Anpassung an die experimentellen Daten aus den genannten

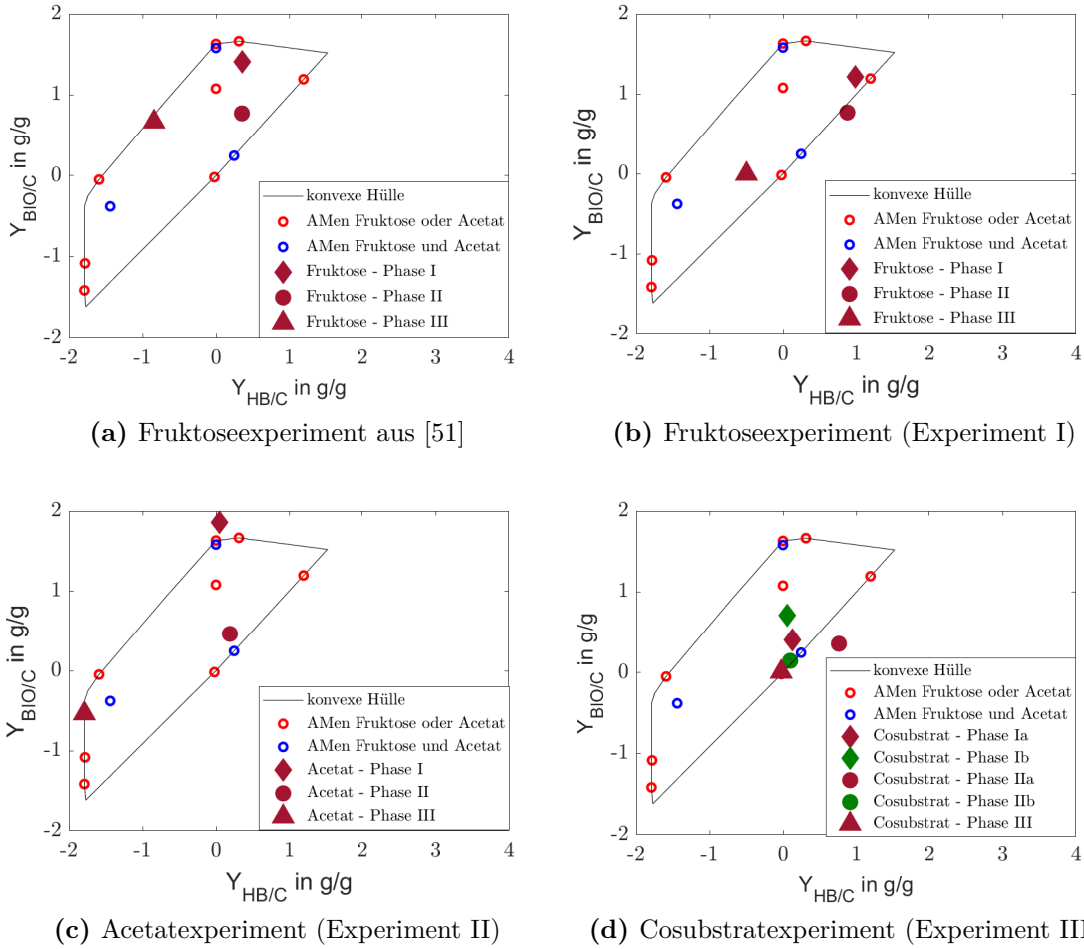


Abbildung 2.10.: Ausbeuten der verschiedenen Experimente in Bezug auf die ermittelte konvexe Hülle.

Experimenten mit Fruktose oder Acetat als Einzelkohlenstoffquellen ergeben sich wie folgt [41]:

$$\mathbf{k}_r = [0.26, 3.71, 0.07, 0, 0, 0, 1.51, 0.44, 0.44, 0.44, 0.25, 3.44]^T. \quad (2.4.1)$$

Die Simulationsverläufe für die klassische Modellstruktur unter Verwendung des Parametervektors aus (2.4.1) sowie die verwendeten experimentellen Daten sind in den Abbildungen B.7 und B.8 im Appendix gezeigt.

Unter Hinzunahme eines weiteren Datensatzes (Experiment III) wurden die kinetischen Raten angepasst, welche im Bezug zu den AMen vier bis sechs aus Tabelle 2.6 stehen. Bei diesem zusätzlichen Datensatz wurden Fruktose und Acetat gleichzeitig als Kohlenstoffquellen eingesetzt. Im Zuge der Parameteranpassung wurde hier jedoch der fünfte Modus zu $\mathbf{AM5} = [-1.00, -0.01, -0.72, -1.07, 0.47]^T$ mit $\mathbf{f}_c(5) = 0.83$

gewählt. Der Vektor \mathbf{k}_r lautet nach erneuter Anpassung:

$$\mathbf{k}_r = [0.26, 3.71, 0.07, 0.04, 28.48, 0.67, 1.51, 0.44, 0.44, 0.44, 0.25, 3.44]^T . \quad (2.4.2)$$

Das Modell mit klassischer Modellstruktur, welches an die Datensätze der Experimente II, III und dem Batch-Versuch mit Fruktose aus [51] angepasst wurde, wird im folgenden Modell A genannt.

Im Verlauf der Modellbildung wurde auch ein Experiment mit Fruktose als Einzelsubstrat mit dem gleichen Fermentationssystem wie bei Experiment III durchgeführt (Experiment I) und für die Parameteranpassung verwendet, um die Unterschiede zwischen den Datensätze so gering wie möglich zu halten. Abgesehen von der verfügbaren Kohlenstoffquelle liegt der einzige Unterschied zwischen den Experimenten mit Fruktose als Einzelsubstrat (Experiment I) und dem Experiment mit beiden Substraten (Experiment III) in der Sauerstoffverfügbarkeit (DO).

Die unterschiedlichen DOs sind direkt mit dem Biomassewachstum verknüpft [92]. Aus diesem Grund wurde der klassische HCMAnsatz um einen sauerstoffabhängigen Faktor K_μ in der Wachstumsrate μ erweitert:

$$\mu = K_\mu (\mathbf{N}_x \cdot \mathbf{Z} \cdot \mathbf{r}_M) . \quad (2.4.3)$$

Der sauerstoffabhängige Faktor K_μ beschreibt den Zusammenhang zwischen dem Wachstum bei einem bestimmten DO und dem Wachstum unter typisch aeroben Bedingungen bei DO 70 %. Die Wachstumsrate bei gewähltem DO kann mit einer Geradengleichung beschrieben werden:

$$K_\mu = \frac{\mu(DO)}{\mu(70\%)} \quad \text{with} \quad \mu(DO) = -0.151 \text{ DO} + 0.256 . \quad (2.4.4)$$

Die Geradengleichung wurde mithilfe des Datensatzes aus [92] entwickelt. Mit der Einführung des Faktors K_μ ist es möglich Datensätze mit unterschiedlichen DOs abzubilden und damit unterschiedliches Prozessverhalten bei verschiedenen DOs zu untersuchen.

Zusätzlich zur Modifikation der Wachstumsrate wurden Verdünnungseffekte durch Biomassewachstum vernachlässigt, welche in den Zustandsgleichungen (2.3.24) und (2.3.27) aus Abschnitt 2.3.2 gezeigt wurden. Die neuen Gleichungen für den Anteil an PHB und die Enzymlevel ergeben sich wie folgt:

$$\frac{dx_{\text{PHB}}}{dt} = \mathbf{N}_P \cdot \mathbf{Z} \cdot \mathbf{r}_M , \quad \frac{d\mathbf{e}}{dt} = \alpha + \mathbf{r}_{EM}b - \beta \cdot \mathbf{e} . \quad (2.4.5)$$

Die Parameter in \mathbf{k}_r wurden für die modifizierte Modellstruktur erneut angepasst und ergeben sich zu:

$$\mathbf{k}_r = [0.08, 0.89, 0.04, 0.09, 0.15, 0.61, 1.45, 0.43, 0.43, 3.15, 0.2, 0]^T . \quad (2.4.6)$$

Das modifizierte Modell mit den oben genannten Parameterwerten wird im Folgenden Modell B genannt. Die Zielfunktion für alle Anpassungen sowie die verwendeten

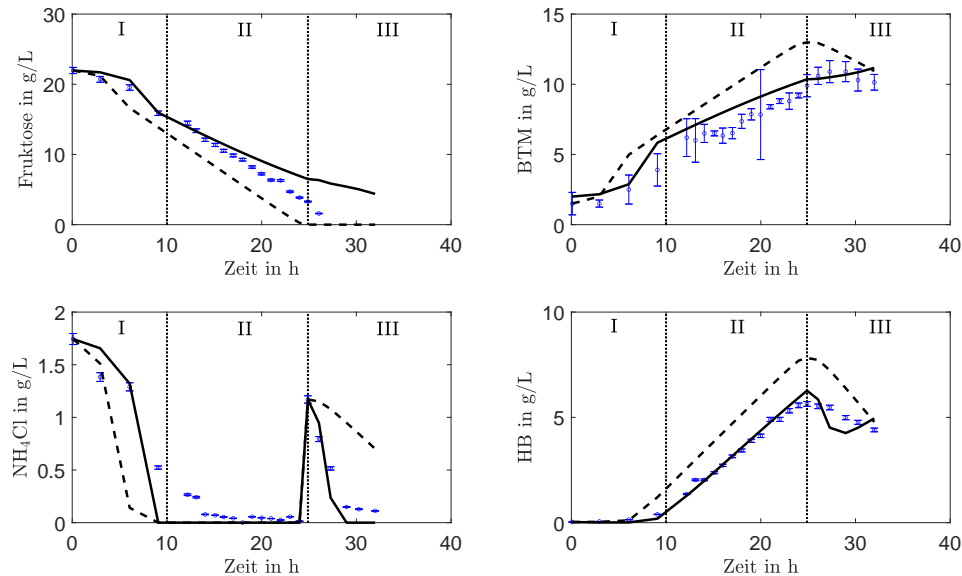


Abbildung 2.11.: Simulierter Zeitverlauf und experimentelle Daten der Substrate und Produkte für Fructose als Einzelkohlenstoffquelle (Experiment I). Legende und Abkürzungen: blaue Kreise, Daten aus Experiment I; gestrichelte Linie, Simulation unter Verwendung des Modells A; durchgezogene Linie, Simulation unter Verwendung des Modells B; BTM, Biotrockenmasse; NH_4Cl , Ammoniumchlorid; HB, 3-Hydroxybutyrat.

Optimierungsverfahren sind in Abschnitt 2.3.4 beschrieben. Alle anderen Parameter wurden auf Basis der vorangegangenen Arbeit in [51] konstant gehalten. Die Werte für die konstanten Raten sind in Tabelle B.2 im Appendix zusammengefasst. Die Halbwertkonstante für die Monodkinetik, die den Verbrauch von Acetat beschreibt, wurde halb so hoch wie die von Fructose angenommen ($K_{\text{FRU}}/2$). Diese Annahme wurde getroffen, da bereits bekannt ist, dass Acetataufnahme den Metabolismus positiv beeinflusst [54].

2.4.2. Darstellung der zeitlichen Dynamik und Vergleich mit experimentellen Daten

In diesem Absatz werden die Simulationsergebnisse für die zwei unterschiedlichen Modellstrukturen miteinander verglichen. Im Modell A wurde der klassische HCM Ansatz verwendet und an unterschiedliche Datensätze aus Experimenten mit Einzelkohlenstoffquellen und aus einem Experiment mit zwei Kohlenstoffquellen angepasst. Der Datensatz für die Fructose als alleinige Kohlenstoffquelle wurde zunächst aus Literaturdaten entnommen und für die Anpassung verwendet [51].

Im Modell B wurde die Struktur des Modells angepasst, sodass die Einbeziehung des DOs aus den Experimenten möglich wird und Verdünnungseffekte durch Biomassenwachstum vernachlässigbar sind. Darüber hinaus wurde ein neuer Datensatz aus

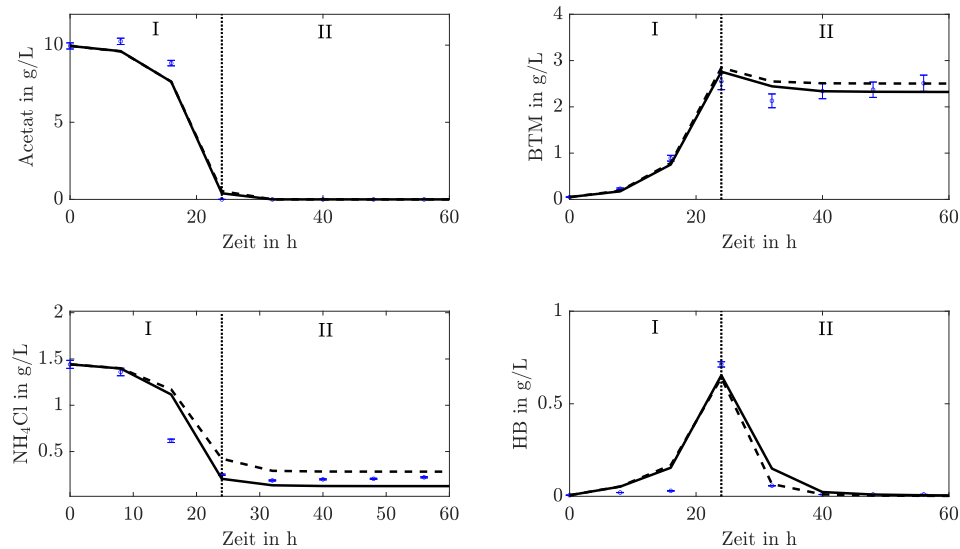


Abbildung 2.12.: Simulierter Zeitverlauf und experimentelle Daten der Substrate und Produkte für Acetat als Einzelkohlenstoffquelle (Experiment II).

Legende: gestrichelte Linie, Simulation unter Berücksichtigung der AMen mit einzelner Kohlenstoffquelle und klassischer Modellstruktur (Modell A); durchgezogene Linie, Simulation unter Berücksichtigung der AMen mit zwei aufgenommenen Kohlenstoffquellen und modifizierter Modellstruktur (Modell B).

einem Experiment mit Fruktose (Experiment I) für die Anpassung herangezogen. Die erhobenen Daten dieses Experimentes sowie die Simulationen der Modelle A und B sind in Abbildung 2.11 gezeigt.

In Experiment I wurden gezielt Störungen der PHB- und Biomassenbildung vorgenommen, um unterschiedliches dynamisches Verhalten beobachten zu können. In der ersten Phase von Experiment I ist der Biomasseaufbau aus Fruktose und Ammoniumchlorid zu sehen. In der anschließenden Phase II setzt die PHB-Produktion ein, diese wird durch die geringe Ammoniumchloridkonzentration ausgelöst. In Phase III wird dieser Prozess gestört, indem die Ammoniumchloridkonzentration im Medium wieder auf ca. 1 g/L angehoben wird. Dadurch fällt die PHB-Konzentration leicht ab, da der Speicherstoff für den Aufbau von Biomasse wieder abgebaut wird.

Das Modell A kann den qualitativen Verlauf des Experimentes widerspiegeln, obwohl keine Anpassung an diesen Datensätzen vorgenommen wurde. In Phase III ist das Modell jedoch nicht in der Lage den hohen Verbrauch von Ammoniumchlorid zu erklären, da Fruktose im Modell bereits komplett verbraucht war. Nach Änderung der Modellstruktur und erneuter Anpassung an alle drei Datensätze werden die Produktkonzentrationen für das Experiment I mit Fruktose als Kohlenstoffquelle sehr gut wiedergespiegelt (Abbildung 2.11). Trotz der gut abgebildeten Produktkonzentrationen, zeigt die Simulation der Dynamik der Fruktosekonzentration einen geringeren Verbrauch als im Experiment gemessen. Eine mögliche Erklärung für

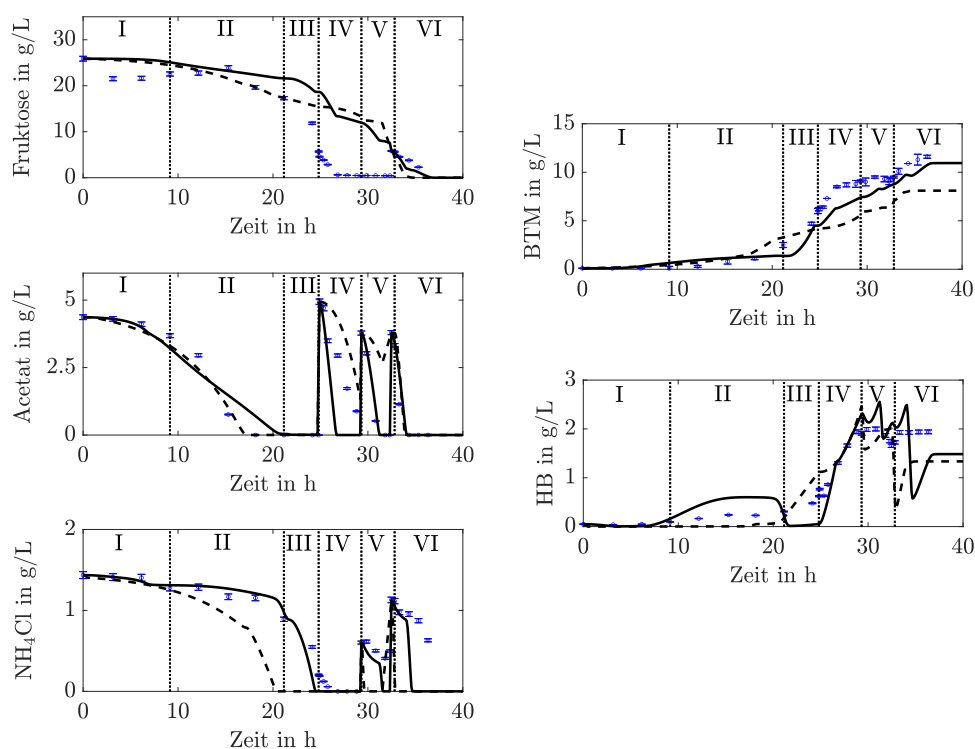
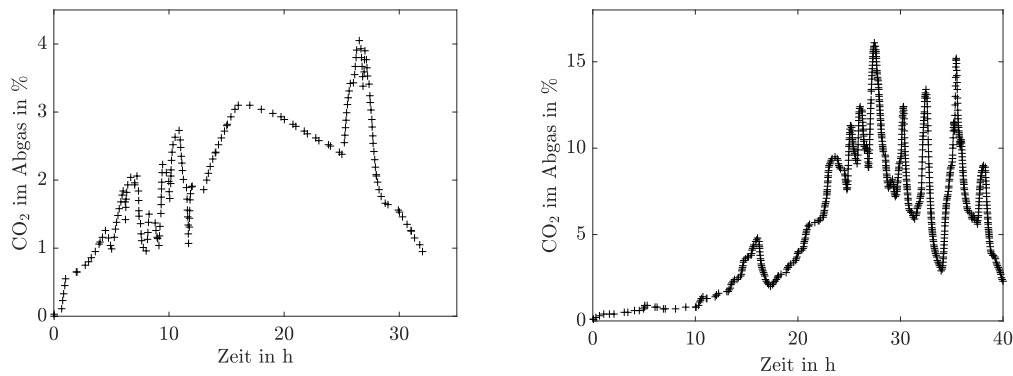


Abbildung 2.13.: Simulierter Zeitverlauf und experimentelle Daten der Substrate und Produkte für Fruktose und Acetat als Kohlenstoffquellen (Experiment III). Legende: gestrichelte Linie, Simulation unter Berücksichtigung der AMen mit einzelner Kohlenstoffquelle und klassischer Modellstruktur (Modell A); durchgezogene Linie, Simulation unter Berücksichtigung der AMen mit zwei aufgenommenen Kohlenstoffquellen und modifizierter Modellstruktur (Modell B).

diese Diskrepanz ist die fehlende CO₂-Bilanz als zusätzliches Produkt während der Kultivierung. Der gemessene Anteil an CO₂ im Abgas steigt mit der Prozessdauer immer weiter an, wie aus Abbildung 2.14a ersichtlich wird. Das Hinzufügen von CO₂ ist jedoch aus zweierlei Gründen problematisch. Zum einen würde die Analyse des erweiterten metabolischen Netzwerks sehr viele EMen ergeben, deren Reduktion zu einem geeigneten Satz an GMen sehr komplex ist. Zum anderen wird ein zusätzliches Modell zur Beschreibung des Gasübergangs notwendig, um die verfügbaren Messdaten aus der Abgasanalytik verwenden zu können.

In Abbildung 2.12 sind die zeitlichen Verläufe der Substrat- und Produktkonzentrationen bei Verwendung von Acetat als alleinige Kohlenstoffquelle zu sehen. Obwohl in Experiment II keine äußeren Störungen vorgenommen wurden, kann das Experiment dennoch in zwei Phasen eingeteilt werden. In der ersten Phase findet der Biomasse- und PHB-Aufbau statt, während in der zweiten Phase der Abbau detektiert wurde. Beide Modelle können den Verlauf sehr gut beschreiben, wobei mit Modell B die



(a) Experiment I mit Fruktose als Kohlenstoffquellen

(b) Experiment III mit Fruktose und Acetat als Kohlenstoffquellen

Abbildung 2.14.: CO₂-Anteile im Abgas für das Experiment I und III.

Ammoniumchlorid- und Biomassekonzentration ab 24 h besser dargestellt werden können. Modell A beschreibt den PHB-Abbau jedoch etwas besser.

Größere Unterschiede sind beim Datensatz von Experiment III zu erkennen (Abbildung 2.13). Wie bereits beim Experiment I, wurden auch hier einige Störungen vorgenommen, um unterschiedliche Dynamiken anzuregen. In Phase I des Experiments III ist zunächst eine Lag-Phase zu erkennen, in der noch keine wesentlichen Änderungen der Substrate und Produkte detektiert worden. In Phase II wird PHB aus Acetat gebildet, obwohl noch ausreichend Ammoniumchlorid vorhanden war. Fruktose wird in dieser Phase weniger verbraucht als Acetat und auch die Ammoniumchloridkonzentration bleibt vorerst konstant. Ab ca. 20 h beginnt die Biomassenbildung aus Fruktose und Ammoniumchlorid (Phase III). Zu diesem Zeitpunkt steht kein Acetat mehr als Kohlenstoffquelle zur Verfügung. In der darauffolgenden Phase IV wird Acetat hinzugegeben, um den Einfluss dieser Kohlenstoffquelle auf den laufenden Prozess begutachten zu können. Wie in Abbildung 2.13 zu sehen, wird Acetat sofort für den PHB-Aufbau verbraucht. In Phase V des Experiments wird die Acetat- und Ammoniumchloridkonzentration gleichzeitig erhöht. Diese Änderung hat zunächst kaum einen Einfluss auf das gebildete PHB. Erst am Ende dieser Phase, wenn Acetat verbraucht ist, ist eine Degradation von PHB zu erkennen. In einer letzten Phase (Phase VI) des Experiments wird nochmals die Konzentration beider Kohlenstoffquellen sowie Ammoniumchlorid im Medium erhöht. Wie in Phase II, ist auch hier deutlich zu erkennen, dass Acetat die bevorzugte Kohlenstoffquelle ist, da diese wesentlich schneller verbraucht wird als Fruktose.

Beide Modelle sind an diesen Datensatz angepasst und zeigen den gleichzeitigen Abbau beider Kohlenstoffquellen. Mit dem Modell B können jedoch die experimentellen Werte für die totale Biomasse besser wiedergegeben werden. Weiterhin ist eine deutlich verbesserte Dynamik beim Abbau von Acetat zu erkennen. Ein Schwachpunkt beider Modelle bei gleichzeitiger Verwendung von zwei Kohlenstoffquellen bleibt der Verbrauch von Fruktose, denn beide Modelle unterschätzen die Aufnahme dieser Kohlenstoffquelle. Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz zwischen Simulation

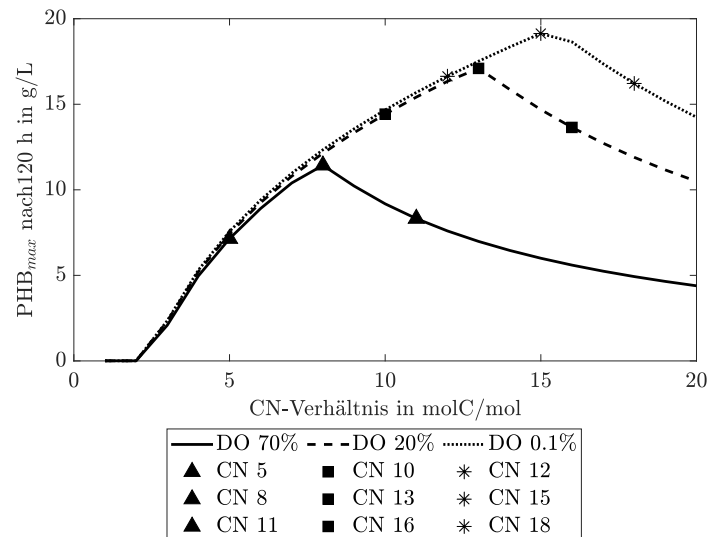


Abbildung 2.15.: PHB-Konzentration nach 120 Stunden in Abhängigkeit des Kohlenstoff-Ammoniumchlorid (CN)-Verhältnisses und ausgewählten DOs. Die im nächsten Abschnitt verwendeten Bedingungen für die Simulation der Kettenlängenverteilung sind mit Symbolen gekennzeichnet.

und Experiment könnte durch fehlende Metaboliten erklärt werden. Komponenten wie CO_2 oder andere organische Säuren müssen in zukünftigen Arbeiten berücksichtigt werden, um auch hier einen genauen Verlauf abbilden zu können. Ein Hinweis für die fehlende Bilanzierung von CO_2 liefern die Auswertung der Abgasanalytik des Experiments III mit Fruktose und Acetat welche in Abbildung 2.14b dargestellt ist. Hier sind zum Teil prozentuale Anteile von CO_2 $>10\%$ detektiert worden.

2.4.3. Simulationsstudie - Auswahl des CN-Verhältnisses bei verschiedenen Sauerstoffverfügbarkeiten

Durch die Berücksichtigung der Abhängigkeit des Biomassenwachstums vom DO (Gleichung 2.4.3) im Modell B, ist es möglich verschiedene Kohlenstoff-Ammoniumchlorid-Verhältnisse (CN-Verhältnisse) bei unterschiedlichen DOs simulativ zu evaluieren. Hierbei wird nur der PHB-Aufbau betrachtet, d.h. kein Abbau simuliert. In Abbildung 2.15 sind die PHB-Konzentrationsmaxima bei unterschiedlichen CN-Verhältnissen für einen aeroben DO von 70%, eine mittleren DO von 20% und einen quasi-anaeroben Prozess mit 0.1% DO aufgetragen. Kurven für weitere DOs sind in den Abbildungen B.9 bis B.11 im Appendix gezeigt, weisen aber die gleiche Dynamik für unterschiedliche CN-Verhältnisse auf, wie die in Abbildung 2.15 präsentierten Beispiele. Der mittlere DO-Wert von 20 % wurde entsprechend des Maximums bezüglich des PHB-Gehalts bei unterschiedlichen DOs aus der Publikation [17] gewählt.

Zwei Hauptschlussfolgerungen können aus der Simulationsstudie gezogen werden:

1. Je kleiner der Gelöstsauerstoffanteil eingestellt wird, umso mehr PHB kann nach 120 Stunden mit den entsprechenden Substratkonzentrationen gebildet werden.
2. Mit geringerer Sauerstoffverfügbarkeit kann die Ammoniumchloridkonzentration entsprechend reduziert werden, sodass mehr Kohlenstoff für die Akkumulation von PHB vorhanden ist. Dabei ist das optimale Verhältnis abhängig vom DO, da die Verfügbarkeit von Sauerstoff den Biomasseaufbau stark beeinflusst.

Mit den beiden Stellschrauben „Sauerstoffverfügbarkeit“ und „Substratverhältnis“ kann also eine optimale Balance zwischen Biomassenbildung, welche für die Produktbildung unabdingbar ist, und PHB Akkumulation gefunden werden. Die Forschergruppe um Kiparissides hat dies mit einem anderen *C. necator* Stamm im Jahr 2013 untersucht [17]. Auch hier ist bei Variation von Ammoniumsulfat (Stickstoffquelle) bei gleichbleibender Kohlenstoffverfügbarkeit ein ähnlicher Verlauf experimentell ermittelt worden. Die Ergebnisse unterscheiden sich durch den Einfluss der Verfügbarkeit von Sauerstoff. In [17] kann ein eindeutiges Optimum bei ca. 20 % DO gefunden werden, während Modell B mit kleineren DOs immer höhere PHB Konzentrationen erreicht. Dies kann zum einen an den unterschiedlichen Stämmen liegen, oder daran, dass die Bildung von anaeroben Stoffwechselprodukten, wie beispielsweise Acetat, Succinat und Fumarat vernachlässigt wird. Es ist bereits bekannt, dass es einen Wechsel zwischen PHB-Produktion und der Produktion anaerober Stoffwechselprodukte gibt [92]. Dieser liegt allerdings in Bereichen bei dem Standardsonden einen DO von null anzeigen.

2.4.4. Multiskalen-Modellierung - Kopplung des PHB-Modells mit einer Polymerisierungskinetik

Neben der Auswertung der möglichen PHB-Ausbeuten in Abhängigkeit von Sauerstoffverfügbarkeit und Substratverhältnissen kann durch eine Kopplung mit einer Polymerisierungskinetik auch die Kettenlängenverteilung und deren charakteristischen Werte evaluiert werden. Ansätze, die die Dynamik der Kettenlängenverteilungen für PHB beschreiben, wurden in den Arbeitsgruppen Srienc und Kiparissides unter Verwendung von Populationsbilanzen beschrieben [105, 126].

Die Polymerisierungskinetik, welche im Rahmen dieser Arbeit verwendet wird, orientiert sich an den Veröffentlichungen von Penloglou [124–127] und wurde so modifiziert, dass die Einbindung der Dynamik von detaillierten kinetischen Modellen, wie dem HCM aus dem Abschnitt 2.4.1, möglich ist. Dadurch wird ein Multiskalen-Ansatz kreiert, der intrazelluläre Regulationsvorgänge in die Dynamik von Kettenlängenverteilungen miteinbezieht.

Im Folgenden wird die Modellstruktur der Polymerisierungskinetik gezeigt, welche 2021 in einem Beitrag zum *31. European Symposium on Computer Aided Process Engineering* (ESCAPE31) das erste Mal beschrieben wurde [36]. In einem weiteren Journalartikel wurde unter Verwendung der Polymerisierungskinetik und des vorab

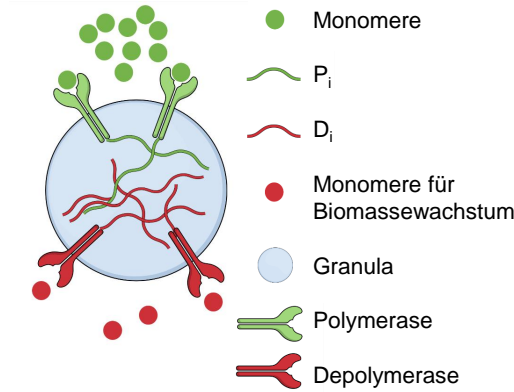


Abbildung 2.16.: Allgemeines Schema für die modellierten Prozesse im Polymerisierungsansatz.

beschriebenen HCMs (Modell B), die Dynamik der Kettenlängenverteilung von PHB mit Fruktose und Acetat als Kohlenstoffquellen untersucht [45]. Mit Hilfe der simulierten Kettenlängenverteilungen können das Zahlenmittel (M_n), das Gewichtsmittel (M_z) und die Polydispersität (PDI) bestimmt werden. Die Ergebnisse werden in diesem Absatz gezeigt und mit experimentellen Werten verglichen.

Schließlich wird das Modell genutzt, um für verschiedene DOs und CN-Verhältnisse die Kettenlängenverteilungen und die oben genannten charakteristischen Größen zu simulieren und auszuwerten.

Polymerisierungskinetik

Die Polymerisierungskinetik wird im Rahmen dieser Arbeit als diskrete Populationsbilanz dargestellt. Wesentliche Merkmale des modularen Aufbaus des Modells wurden bereits in Abschnitt 2.3.3 eingeführt. Im Folgenden erfolgt die Unterteilung der Polymere in aktive (lebende, P_i) und inaktive (tote, D_i) Spezies. Die Dynamik der beiden Polymerspezies lautet:

$$\frac{d P_i}{d t} = \underbrace{\delta(i-1)k_{in} [HB-Syn]}_{\text{Initiation}} + \underbrace{k_{m2} [HB] (P_{i-1} - P_i)}_{\text{Propagation}} - \underbrace{k_c P_i}_{\text{Wechsel}}, \quad (2.4.7)$$

$$\frac{d D_i}{d t} = \underbrace{k_c P_i}_{\text{Wechsel}} - \underbrace{k_{dep} (D_i - D_{i+1})}_{\text{Abbau}}. \quad (2.4.8)$$

Dabei beschreiben P_i und D_i die Anzahl der Ketten jeder Gruppe mit einer bestimmten Monomeranzahl i . Aktive Polymerketten (P_i) sind an Polymerasekomplexe gebunden und können durch die Anlagerung eines weiteren Monomers $M = [HB]$ mit der Rate k_{m2} verlängert werden. Die Bildung eines aktiven Polymers mit einer

Kettenlänge von $i = 1$ erfolgt durch die Initiation mit der Rate k_{in} , bei der sich ein Monomer an einen Polymerasekomplex anlagert und das aktive Polymer bildet. Die Ablösung des aktiven Polymers vom Polymerasekomplex ist unabhängig von der Länge und erfolgt mit der Rate k_c . Nach der Ablösung kann dieses nicht weiter wachsen und wird zur Gruppe der inaktiven Polymerketten (D_i) gezählt. Wie in Abschnitt 2.3.3 eingeführt, kann dieser Vorgang mathematisch durch einen 'Wechsel' beschrieben werden. Die inaktiven Ketten können im Gegensatz zu aktiven Polymerketten durch eine Depolymerase mit der Rate k_{dep} abgebaut werden. Durch den Polymerabbau freigesetzte Monomere, werden direkt zu residualer Biomasse verstoffwechselt und tauchen nicht in der Bilanz für die Monomere $[HB]$ auf. Die Bildung von weiteren Intermediaten, die bei der Ausbildung eines aktiven Polymerase-Polymerkomplexes entstehen, wird hier nicht genauer betrachtet. Eine schematische Übersicht des modellierten Vorgangs ist in Abbildung 2.16 gezeigt. Die Dynamik der Monomere und des Monomersynthesekomplexes können durch folgende DGLn beschrieben werden:

$$\begin{aligned} \frac{d [HB]}{d t} &= -\bar{k}_{m1} [HB] [Syn] - k_{m2} [HB] \sum_{i=1}^{\infty} P_i + M^+, \\ \frac{d [HB-Syn]}{d t} &= \bar{k}_{m1} [HB] [Syn] - k_{in} [HB-Syn]. \end{aligned} \quad (2.4.9)$$

Die jeweils ersten Terme der Gleichungen beschreiben die initiale Anbindung eines Monomers $[HB]$ mit einem Polymerasekomplex $[Syn]$ mit der Rate \bar{k}_{m1} . Nach erfolgreicher Anlagerung wird der Monomer-Polymerasekomplex mit der Ratenkonstante k_{in} zu einer aktiven Kette (P_i) mit der Länge $i = 1$. Weiterhin werden Monomere benötigt, um die aktiven Ketten zu verlängern. Dies erfolgt mit der Rate k_{m2} . Schließlich wird eine Monomerproduktionsrate M^+ benötigt, um die Bildung neuer Monomere durch aufgenommenes und verstoffwechseltes Substrat in das Polymerisierungsmodell miteinfließen zu lassen. Auf die Definition der Monomerproduktionsrate und die damit im Zusammenhang stehende Kopplung zum metabolen Modell wird im nächsten Absatz genauer eingegangen.

Unter der Annahme, dass der Polymerasekomplex $[Syn]$ im Überschuss vorliegt, reduziert sich der erste Term der beiden letzten DGLn zu

$$\bar{k}_{m1} [HB] [Syn] = k_{m1} [HB]. \quad (2.4.10)$$

Wie bereits erwähnt, entstehen durch die Depolymerisation der inaktiven Ketten auch wieder Monomere. Bei einer klassischen chemischen Polymerisation würden diese, wie in Gleichung (2.3.70) gezeigt, wieder zurück in den Monomerpool wandern. Bei der Polymerisation von PHB werden abgebaute Monomere allerdings direkt weiter zu anderen Biomassekomponenten verstoffwechselt, sodass diese Monomere nicht mehr in der Differentialgleichung bilanziert werden. Diese Monomere können als „tote“ Monomere $[HB_{BIO}]$ bilanziert werden:

$$\frac{d [HB_{BIO}]}{d t} = k_{dep} \sum_{i=1}^{\infty} D_i. \quad (2.4.11)$$

Kopplung der Polymerisierungskinetik mit dem metabolen Modell

Die Dynamik der Polymerisierungskinetik ist mit der des metabolen HCM-Modells aus Abschnitt 2.4.1 verknüpft. Die beiden Modelle sind über die Monomerproduktion M^+ miteinander gekoppelt. Diese Verknüpfung folgt aus der Bedingung, dass die Summe aller HB-Monomere der Polymerisierungskinetik der Gesamtmenge an HB im metabolen Modell entsprechen muss, gemäß

$$\frac{1}{M_{HB}^P} m_{HB} = \sum_{i=1}^{\infty} i (P_i + D_i) . \quad (2.4.12)$$

Durch die Ableitung dieser algebraischen Zwangsbedingung, sowie das Einsetzen der Ableitungen für P_i und D_i aus den Gleichungen (2.4.7) und (2.4.8) ergibt sich folgender Ausdruck:

$$\begin{aligned} \frac{1}{MW_{HB}} \frac{d m_{HB}}{d t} &= \frac{d}{d t} \left\{ \sum_{i=1}^{\infty} i (P_i + D_i) \right\} \\ &= k_{in} [HB-Syn] + k_{m2} [HB] \sum_{i=1}^{\infty} P_i - \underbrace{k_{dep} \sum_{i=1}^{\infty} D_i}_{r_{HB}^- M_{HB}^{P-1}} . \end{aligned} \quad (2.4.13)$$

Der letzte Term beschreibt den Abbau von PHB, welcher für beide Modelle gleich sein muss. Die Abbaurate r_{HB}^- kann aus dem HCM bestimmt und unter Hinzunahme des Molekulargewichts des Monomers HB ($M_{HB}^P=86$ g/mol) für die Berechnung der Depolymerisierungsvariable k_{dep} verwendet werden:

$$k_{dep} = \frac{r_{HB}^-}{M_{HB}^P \sum_{i=1}^{\infty} D_i} . \quad (2.4.14)$$

Für die Produktionsrate der Monomere M^+ wird ein von Wulkow vorgeschlagener Ansatz angewendet [45], der einfach in die verwendete Software PREDICI implementiert werden kann. Dabei wird die algebraische Zwangsbedingung aus Gleichung (2.4.12) relaxiert und durch eine Regelung ersetzt. Das Regelungsgesetz mit der Monomerproduktionsrate als Stellgröße lautet:

$$M^+ = F(e_{HB}) . \quad (2.4.15)$$

Dabei ist der Fehler e_{HB} die Differenz zwischen der Gesamtmasse an HB (m_{HB}) aus dem HCM und der Masse aller PHB-Ketten, welche mit der Polymerisierungskinetik simuliert werden:

$$e_{HB} = m_{HB} - M_{HB}^P \sum_{i=1}^{\infty} i (P_i + D_i) . \quad (2.4.16)$$

Tabelle 2.7.: Reaktionsschritte für die Implementierung in *PREDICI*.

Bezeichnung	Reaktion	Parameter	Wert [126]
Initiation (1)	HB → HB-Syn	k_{m1}	$1.1 \cdot 10^4 \frac{1}{h}$
Initiation (2)	HB-Syn → LP(1)	k_{in}	$6.2 \cdot 10^3 \frac{1}{h}$
Propagation	LP(i) + HB → LP(i+1)	k_{m2}	$8.6 \cdot 10^6 \frac{L}{mol \cdot h}$
Wechsel	LP(i) → DP(i)	k_c	$1.4 \frac{1}{h}$
Abbau (1)	DP(i) → DP(i-1) + HB _{bio}	k_{dep}	Gleichung (2.4.14)
Abbau (2)	DP(1) → HB _{bio}	k_{dep}	

Für die Regelung kann ein klassischer PID-Regler genutzt werden:

$$M^+(t) = K_P e_{HB}(t) + K_I \int_0^t e_{HB}(\tau) d\tau + K_D \dot{e}_{HB}(t). \quad (2.4.17)$$

Auch ein einfacher PI-Regler oder sogar P-Regler kann hier das gewünschte Regelziel erzielen. Die Anwendung des jeweiligen Reglers hängt von der Dynamik der Simulation des metabolen Modells ab und sollte individuell gewählt werden. Durch geeignetes Tuning der Reglerparameter kann eine akkurate Lösung erreicht werden, welche allerdings bei jeder neuen Simulation überprüft werden sollte.

Da das Polymerisierungsmodell von dem metabolen Modell abhängt, ergibt sich für die Simulation von Kettenlängenverteilungen im PHB-Produktionsprozess folgende Implementierungsroutine:

1. Simulation mit dem HCM Modell B
2. Abspeichern der totalen PHB Massen über die Zeit, sowie der Abbaurrate r_{HB}^-
3. Export der Daten in die Lösungssoftware für das Polymerisationsmodell mit der implementierten Regelung
4. Simulation der Polymerisation und Abgleich der totalen Polymermassen

Das Polymerisierungsmodell wurde mittels der Software PREDICI (Version 11) simuliert [177]. Die Kettenlängenverteilungen werden entlang der Kettenlängen (x-Achse) mit einer Galerkin-hp-Methode approximiert. Bei dieser Methode wird zunächst die Zeitachse schrittweise und im Anschluss entlang der Eigenschaftsachse (hier: Kettenlänge) diskretisiert. Die Diskretisierungsschritte für die Eigenschaftsachse wird von Zeitschritt zu Zeitschritt adaptiert. Für die Lösung in PREDICI müssen die oben beschriebenen Gleichungen in Form modularer Reaktionen integriert werden. Diese modularen Reaktionen sind in Tabelle 2.7 gezeigt.

Kettenlängenverteilung unter Verwendung von Fruktose und Acetat als Kohlenstoffquellen

In diesem Abschnitt sind die Simulationsergebnisse für das Multiskalen-Modell, bestehend aus HCM (Modell B) und Polymerisierungskinetik, gezeigt. Der Abgleich der

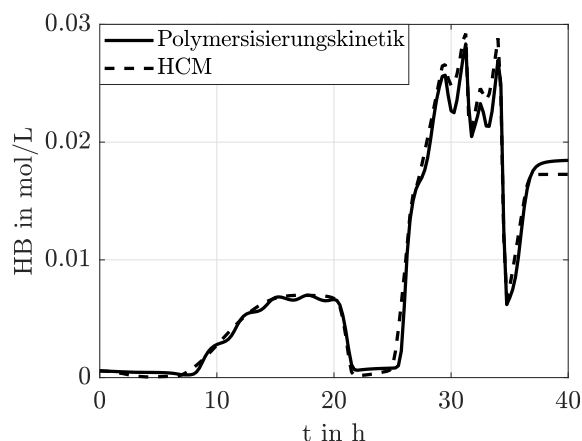


Abbildung 2.17.: Abgleich der totalen PHB-Polymerkonzentrationen zwischen Polymerisierungsmodell und dem HCM Modell B.

simulierten Verteilungen erfolgt über die experimentellen charakteristischen Größen Zahlenmittel (M_n), Gewichtsmittel (M_w) und Polydispersitätsindex (PDI). Für die Experimente aus Tabelle 2.3 kann davon ausgegangen werden, dass nach der Vorkultur bereits eine kleine Menge an PHA akkumuliert wurde. Aus diesem Grund wurde als Startverteilung der Simulation für die aktiven Polymere (Gleichung 2.4.7) eine Normalverteilung mit einem Mittelwert $\mu = 86 \cdot 10^4$ g/mol und einer Standardabweichung $\sigma = 10^2$ g/mol gewählt. Die Startverteilung ist in Abbildung D.3 im Appendix zu finden. Wie im vorherigen Absatz beschrieben, sollen die PHB-Massen der beiden Modelle in Übereinstimmung gebracht werden. Der Abgleich der totalen Molmasse ist in Abbildung 2.17 gezeigt. Für die Anpassung wurde ein P-Regler mit einem Verstärkungsfaktor von 5 eingesetzt. Dabei handelt es sich um einen Kompromiss zwischen stationärer Genauigkeit (kleiner Regelfehler) und Stabilität.

Die Änderung der Kettenlängenverteilung über die Zeit und des Molekulargewichts ist in Abbildung 2.18a gezeigt. Für eine bessere Übersichtlichkeit wurden die Kettenlängenverteilungen über das Molekulargewicht der Ketten für ausgewählte gemessene Zeitpunkte in Abbildung 2.18b illustriert. Vergleicht man die ausgewählten Zeitpunkte mit den dazugehörigen totalen PHB-Molmassen des Modells (Abbildung 2.17), ist zu erkennen, dass nach 12 Stunden bereits eine erste PHB-Produktion eingesetzt hat. Ein interessantes Verhalten, welches auch in den experimentellen Daten wiedergegeben ist und so einen Hinweis darauf liefert, dass die zellulären Polymerasen bereits synthetisiert und aktiv waren, obwohl noch ausreichend Ammoniumchlorid im Medium vorhanden war. Acetat war in dieser Phase das bevorzugte Substrat, wie in der Abbildung 2.13 aus Abschnitt 2.4.2 zu sehen ist. Der Peak bei der Kettenlängenverteilung nach 12 Stunden bei einem Molekulargewicht von ca. $2.1 \cdot 10^5$ g/mol ist der im Modell hinterlegten Anfangsverteilung mit einem Mittelwert von $8.6 \cdot 10^5$ g/mol geschuldet, da diese Ketten nach 12 Stunden noch nicht komplett durch die Depolymerase abgebaut worden. Nach weiteren 4.5 h, d.h. bei einer Prozesszeit von 16.5 h, ist die maximale PHB Konzentration vom ersten Plateau erreicht. Die Verteilung ist zu diesem Zeitpunkt etwas breiter geworden und besitzt einen höheren maximalen Wert (siehe Abbildung 2.18a).

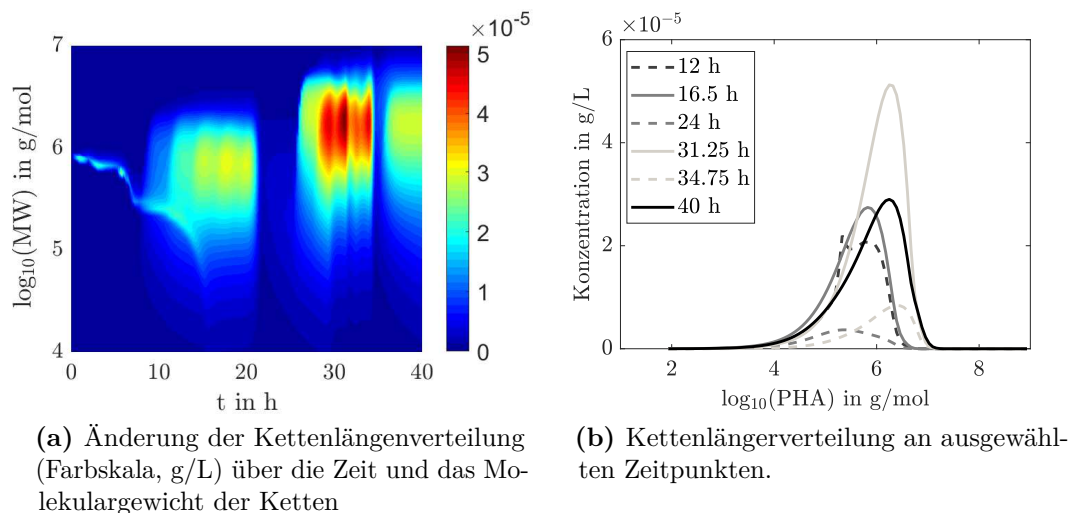


Abbildung 2.18.: Simulierte Kettenlängenverteilung für das Experiment III mit Fruktose und Acetat als Kohlenstoffquellen unter Verwendung des HCM Modell B.

Neben der Kettenlängenverteilung selbst, ist es möglich die charakteristischen Werte der Verteilung zu berechnen, welche zur Abschätzung möglicher Materialeigenschaften herangezogen werden können. Aus diesem Grund wurden M_n und M_w der Molmassenverteilung sowie der PDI der Kettenlängenverteilung jedes Zeitpunktes bestimmt und in Abbildung 2.19 als schwarze Kurven dargestellt. Weiterhin wurden ab 12 Stunden auch Messungen für die experimentelle Kettenlängenverteilung mittels GPC vorgenommen und die charakteristischen Größen, wie in [61] beschrieben, berechnet. Das Ergebnis der Berechnung ist in Abbildung 2.19 als rote Kreise dargestellt. Die differentielle Massenverteilung $W(\log M)$ ist für die einzelnen Zeitpunkte in Abbildung D.1 im Appendix gezeigt. Als Grundlage für die Auswertung der GPC-Daten ist in dieser Arbeit die konventionelle Kalibrierung unter Verwendung von eng verteilten Polystyrolstandards (Molekulargewicht eines Polystyrol-Monomers ist $M_{PS}^P = 104.2$ g/mol) gewählt worden. Dabei wird angenommen, dass Polyesterol und PHB gelöst in Chloroform das gleiche hydrodynamische Volumen aufweisen. Da Polystyrol ein höheres Molekulargewicht des Monomers im Vergleich zum gemittelten Molekulargewicht des Monomers in PHB aufweist und darüber hinaus eine aromatische Seitenkette besitzt, ist davon auszugehen, dass die Molekulargewichte der Ketten nur einen groben Abgleich darstellen. Für die Bestimmung realer Molekulargewichtsverteilungen sollte mit eng verteilten PHB-Standards kalibriert werden. Da solche allerdings nicht verfügbar sind, ist eine Messung mit einem molmassensensitiven Detektor, wie zum Beispiel einem Viskosimeter oder Lichtstredetektor, eine geeignete Alternative, um die wahren Molmassen der Polymere zu ermitteln. Solche Verfahren standen im Rahmen der vorliegenden Arbeit leider nicht zur Verfügung und bleiben zukünftigen Untersuchungen vorbehalten.

Die simulierten mittleren Werte für die Molmassen zeigen im Bereich zwischen 10-20 Stunden kaum eine Veränderung, während die experimentellen Mittelwerte abfallen. Besonders der Abfall des Zahlenmittels weist auf eine Degradation während dieser

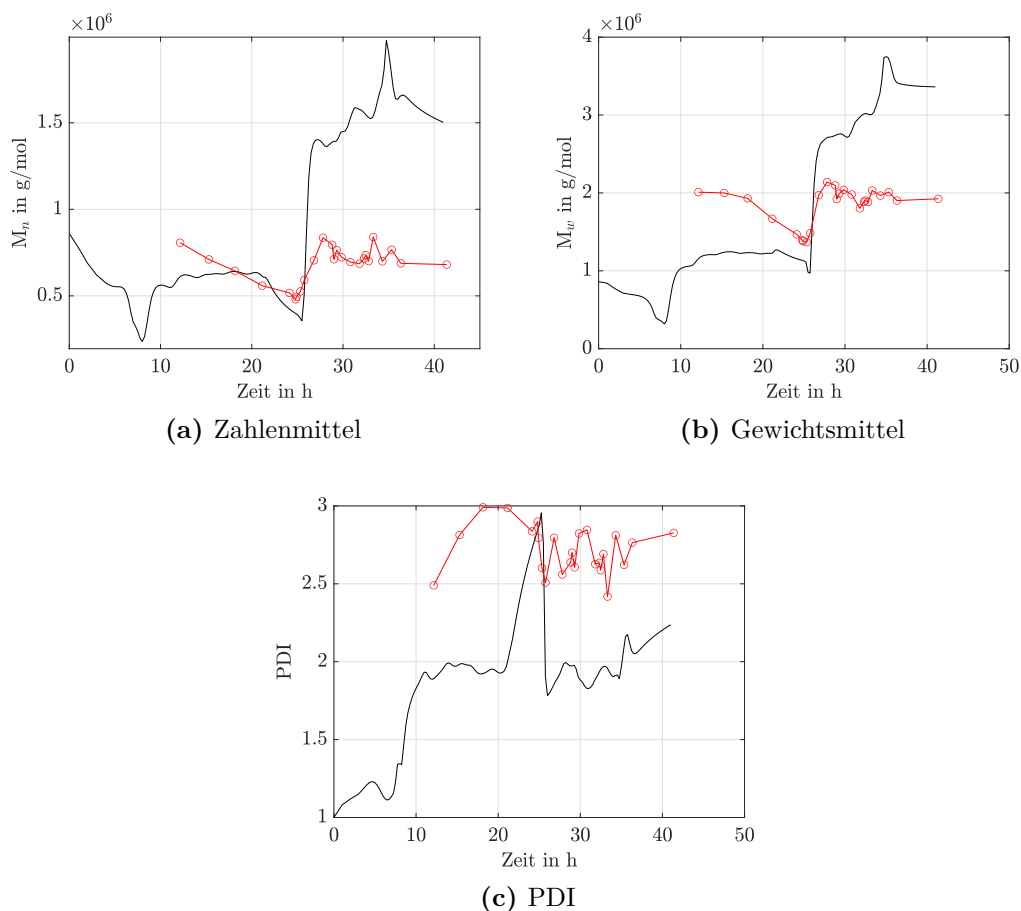


Abbildung 2.19.: Charakteristische Werte der Verteilung des Experiments III mit Fruktose und Acetat als Kohlenstoffquellen. Die simulierten Werte sind als schwarze Kurven und die experimentellen Daten als rote Kreise dargestellt.

Phase hin. Das Modell ist zwar in der Lage die ungefähre Größenordnung der charakteristischen Größen zwischen 10 bis 20 Stunden widerzuspiegeln, kann die Degradation der Polymere in diesem Zeitbereich allerdings nicht abbilden. Dies kann mit der Konstanz der totalen Molmasse des metabolen Modells begründet werden (Abbildung 2.17).

Mit der Verteilung bei 24 Stunden wurde eine Momentaufnahme festgehalten, mit der das PHB-Konzentrationsminimum zwischen den beiden Anstiegen dargestellt werden kann. Der Verbrauch von PHB findet bereits etwas früher, genau zwischen dem Ende der Acetataufnahme und dem Beginn der Fruktoseaufnahme statt (Phase III, Abbildung 2.13). Zu diesem Zeitpunkt ist die simulierte Verteilung sehr dispers (PDI bei fast 3), da alle Ketten dem Abbau unterliegen und das Zahlenmittel des Molekulargewichts zunächst deutlich stärker abnimmt als das Gewichtsmittel. Die Reduktion der Mittelwerte bei 24 h ist auch im Experiment zu erkennen. Der Anstieg des experimentellen PDIs bleibt jedoch aus, da die Zahlen- und Gewichtsmittel im gleichen Maße reduziert werden. Durch die erneute Hinzugabe der Kohlenstoffquelle

Acetat nach 24 h (Phase IV, Abbildung 2.13) wird der weitere Verbrauch von PHB gestoppt und dieses wieder aufgebaut. Der beschriebene Effekt ist ebenfalls bei experimentellen und simulierten Molmassen aus Abbildung 2.19 zu erkennen.

Die weiteren ausgewählten Zeitpunkte in Abbildung 2.18b zeigen die Kettenlängenverteilungen beim Konzentrationsmaximum nach 31.25 h und beim erneuten Abbau nach 34.75 h ausgelöst durch die erneute Zugabe von Fruktose und Stickstoff (Phase V+VI, Abbildung 2.13). Die simulierte Verteilung nach dem Abbau zeigt mehr hochmolekulare Ketten, wodurch die Verteilung unsymmetrisch erscheint. Im Vergleich zu den vorherigen Verteilungen, besitzt die letzte Verteilung bei 40 h viele Polymerketten die größer als 10^6 g/mol sind. Wie in Abbildung D.1 im Appendix zu sehen ist, bleibt die Verschiebung der experimentellen Verteilungen in Richtung größerer Polymerketten aus. Vermutlich spielen hier sterische Effekte eine Rolle, die im metabolen Modell zwar berücksichtigt ist, aber zunächst keinen Einfluss auf die Polymerisierungskinetik haben.

Abschließend lässt sich sagen, dass sich mit der Simulation der Kettenlängenverteilung die Größenordnungen der charakteristischen Größen abschätzen lassen. Die Aktivität der Enzyme, die für den Polymeraufbau und -abbau verantwortlich sind, wurden hier über kinetische Ratenkonstanten aus der Literatur beschrieben [126]. Es ist davon auszugehen, dass das Modell durch Parameteranpassung der Konstanten der Polymerisierungskinetik signifikant verbessert werden kann. Zudem können dynamische Aktivitätsvariablen eingeführt werden, um zukünftig auch quantitative Modellaussagen treffen zu können.

Untersuchung der Auswirkung unterschiedlicher CN-Verhältnisse und DOs auf die Kettenlängenverteilung

Wie bereits für das Experiment III mit Fruktose und Acetat gezeigt wurde, kann die Kettenlängenverteilung und deren charakteristische Größen mit dem Multiskalen-Modell simuliert werden. Weiterhin wurde in Abschnitt 2.4.3 die maximale PHB-Konzentration für unterschiedliche CN-Verhältnisse und DOs mit dem HCM Modell B simulativ untersucht. Dieses Modell wird im Folgenden verwendet, um in einer weiteren Simulationsstudie die Kettenlängenverteilung bei unterschiedlichen Substratverhältnissen und verschiedenen Sauerstoffverfügbarkeiten zu simulieren und miteinander vergleichen zu können. Für ausgewählte CN-Verhältnisse bei den DOs 70 %, 20 % und 0.1 % wurde die Kettenlängenverteilung simuliert und in eine Molmassenverteilung umgerechnet. Die ausgewählten Verhältnisse sind in Abbildung 2.15 mit Symbolen gekennzeichnet. Mit der Molmassenverteilung kann M_n , M_w und der PDI für die einzelnen Fälle mit den Gleichungen (2.3.76) bis (2.3.78) berechnet werden. In den Abbildungen 2.20 bis 2.22 sind die Ergebnisse dafür dargestellt. Darüber hinaus zeigt die Abbildung 2.23 die Änderung der Kettenlängenverteilung über der Zeit und das Molekulargewicht für die CN-Verhältnisse bei ausgewählten DOs mit den höchsten totalen Polymermassen. Unabhängig vom DO ist eine Abhängigkeit vom CN-Verhältnis zu erkennen. Denn je kleiner das CN-Verhältnis, umso höher sind nach 120 h das Zahlen- und Gewichtsmittel der Molekulargewichtsverteilung.

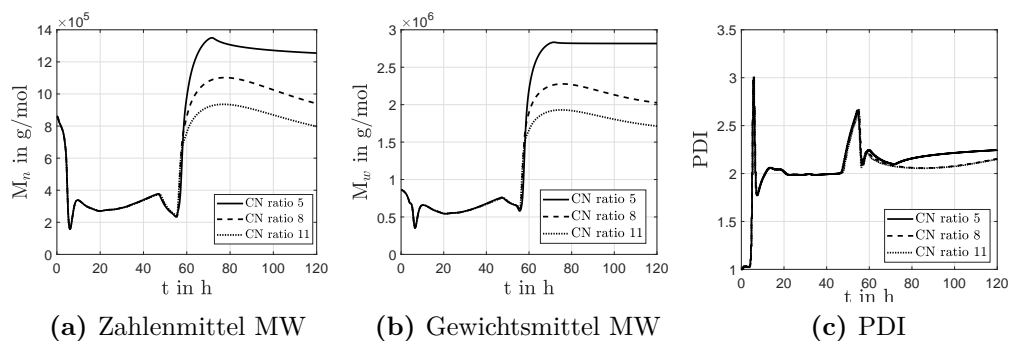


Abbildung 2.20.: Charakteristische Werte der Verteilungen bei einem DO von 70 % und unterschiedlichen CN-Verhältnissen.

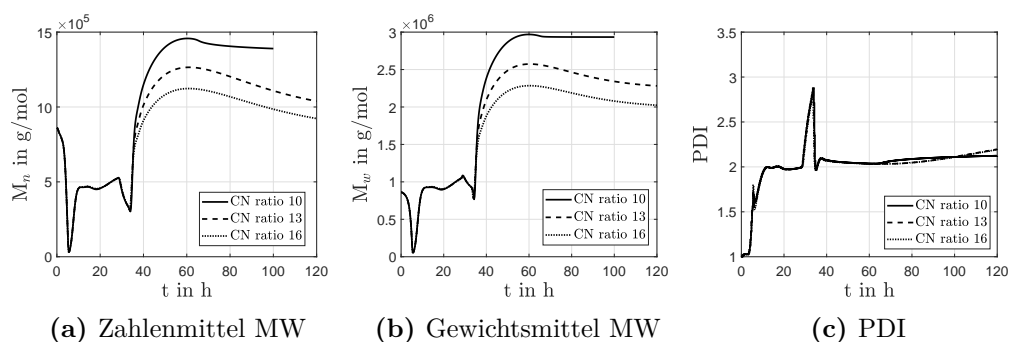


Abbildung 2.21.: Charakteristische Werte der Verteilungen bei einem DO von 20 % und unterschiedlichen CN-Verhältnissen.

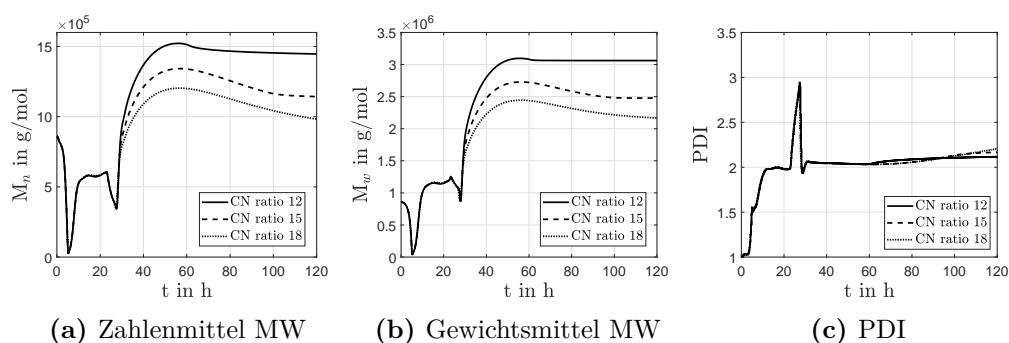


Abbildung 2.22.: Charakteristische Werte der Verteilungen bei einem DO von 0.1 % und unterschiedlichen CN-Verhältnissen.

Der PDI pegelt sich bei einem für PHB typischen Wert von ca. zwei ein [157], unabhängig vom Sauerstoffangebot und CN-Verhältnis. Werden die Ergebnisse der unterschiedlichen DOs untereinander verglichen, steigen die Werte für M_n und M_w

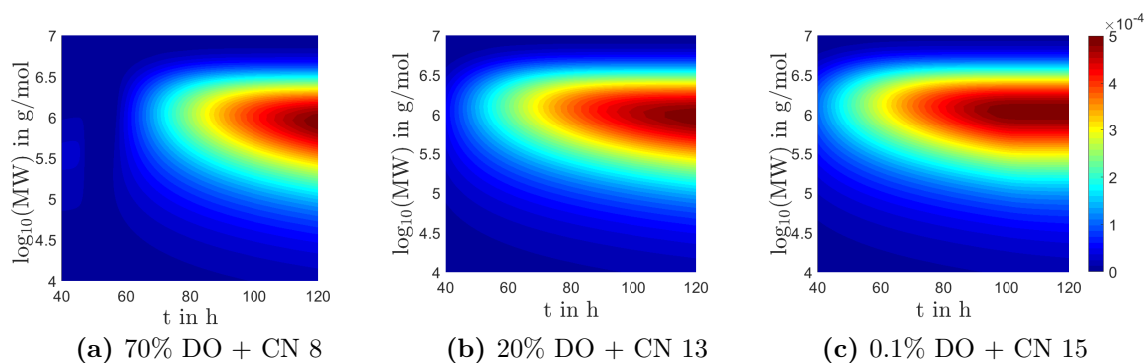


Abbildung 2.23.: Kettenlängenverteilung bei unterschiedlichen DOs und CN-Verhältnissen. Legende: MW, Molekulargewicht der Polymere.

der Molekulargewichtsverteilung je weniger Sauerstoff verfügbar ist. Wie in Abbildung 2.23 zu sehen, verzögert sich die PHB Akkumulation umso mehr, je höher der DO und je kleiner das CN Verhältnis eingestellt sind. Dies lässt sich biologisch einfach erklären: Durch eine hohe Sauerstoffverfügbarkeit und mehr Ammoniumchlorid im Medium, kann mehr und vor allem länger Kohlenstoff in residuale Biomasse umgesetzt werden. Diese nicht-PHB Biomasse wird benötigt, um auch ausreichend PHB zu bilden, da diese unter anderem die Bausteine der Enzyme für die zugrundeliegenden metabolen Reaktionen zur Verfügung stellt. Hierbei handelt es sich jedoch um ein empfindliches Gleichgewicht, das z.B. mit dem hier präsentierten Modell genau untersucht werden kann. Mit Hilfe der Polymerisierungskinetik kann neben umfangreichen experimentellen Bioreaktorversuchen zum Finden des optimalen DO und CN-Verhältnisses auch auf kosten- und zeitintensive Analytik, wie z. B. der Auswertung des produzierten Polymers mittels GPC, verzichtet werden.

2.5. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Produktion unter Verwendung von Fruktose und Propionsäure als Kohlenstoffquellen

Die Beschreibung des Auf- und Abbaus der Gesamtpolymerkonzentration aus den zur Verfügung gestellten Substraten ist in der mikrobiellen PHA-Produktion ein wichtiger Baustein für die Analyse des kompletten Produktionsprozesses. Für die Bildung von PHB gibt es bereits eine Reihe von Modellkandidaten [25, 51, 87, 120], die die zeitliche Entwicklung der Polymerkonzentration gut wiedergeben können. Im Vergleich zu dem Homopolymer PHB, weist das Copolymer PHBV deutlich verbesserte Verarbeitungseigenschaften auf (siehe Kapitel 2.1 und [155]). Allerdings gibt es für die Bildung der HB- und HV-Anteile in PHBV bisher nur einfache kinetische Ansätze [24, 169].

Das folgende Modell beschreibt die Bildung und den Abbau der HB- und HV-Konzentrationen des Polymers unter Aufnahme von Fruktose und Propionsäure, zwei Kohlenstoffquellen, die in Reststoffen aus der Lebensmittelindustrie und Nebenprodukten aus Biogasanlagen häufig vorkommen. Im Gegensatz zum vorherigen Kapitel, das die PHB-Modellierung behandelt, wird hier auf die Anwendung eines HCM-Ansatzes verzichtet. Voruntersuchungen zur Generierung eines HCMs für die Beschreibung der Produktion von PHBV aus Fruktose und Propionsäure haben gezeigt, dass die Elementarmodenreduktion eine große Herausforderung darstellt [6]. Alternativ kann ein metabolisches Modell mit detaillierter Kinetik auf Basis von *à priori* Wissen konstruiert werden. Ein weiterer Grund für die Auswahl dieses Modelltyps ist das charakteristische CO₂-Abgasprofil, das bei der Produktion von PHBV aus Propionsäure und Fruktose entsteht. Dieses Profil kann auf einfache Weise in das metabolische Modell integriert werden und steht stellvertretend für die metabolische Aktivität der Bakterienkultur. Mit diesem Ansatz kann der Einfluss unterschiedlicher Zuflussraten und Abgaswerte auf die Zusammensetzung und Ausbeute des Copolymers PHBV untersucht werden. Das Modell und die dazugehörigen Simulationsstudien wurden in [40] veröffentlicht.

Für die Parameteridentifikation des Modells wurden Daten aus zwei unabhängigen Experimenten verwendet. Eines der unabhängigen Experimente ist das Experiment I. Bei diesem Experiment handelt es sich um ein Batch-Experiment mit Fruktose als alleinige Kohlenstoffquelle. Zusätzlich zu Experiment I wird ein Fed-Batch-Experiment mit Fruktose und Propionsäure als Kohlenstoffquelle genutzt (Experiment IV). In diesem Experiment wurde Propionsäure zugefüttert, um einen den pH-Wert auf einem konstanten Wert von 6.8 zu halten [78]. Dadurch kann sichergestellt werden, dass eine inhibitorische Konzentration von Propionsäure im Medium niemals erreicht wird. Der Modellansatz wurde mit den Daten von Experiment V validiert. Experiment V ist ebenfalls ein Fed-Batch-Experiment mit Fruktose und Propionsäure, jedoch wurde für den Propionsäure-Zufluss zu Beginn der PHBV-Produktion eine feste Flussrate gewählt.

Das validierte metabolische Modell wird schließlich um die bereits eingeführte Polymerisationskinetik aus Abschnitt 2.4.4 erweitert. Mit diesem Multiskalen-Ansatz ist es

möglich, die Kettenlängenverteilung sowie deren Mittelwerte und PDI zu simulieren. Ein Abgleich erfolgt über gemessene GPC Verteilungen des Experiments IV. Der Multiskalen-Ansatz zur Beschreibung der Kettenlängenverteilung des Copolymers PHBV und der experimentelle Abgleich wurde bisher noch in keiner Fachzeitschrift veröffentlicht.

2.5.1. Metaboles Modell

Modellstruktur

Im Folgenden wird ein Differentialgleichungssystem zur Beschreibung der Dynamik der Substrate Fruktose, Propionsäure und Ammoniumchlorid sowie der Produkte HB, HV und der residualen Biomasse beschrieben. Im Gegensatz zu klassischen chemischen Polymerisationsprozessen ist bei der mikrobiellen Produktion von PHAs kein Monomerpool vorhanden. Denn Vorläufermoleküle, wie Hydroxybutyryl oder Hydroxyvaleryl, werden nicht akkumuliert, sondern sofort durch die PHA-Synthasen an die Polymerketten angefügt. Die generellen Schritte der Biosynthese sind in Abbildung 2.1 aus Abschnitt 2.1.1 dargestellt. Demzufolge handelt es sich auch in der folgenden Modellbeschreibung bei den Monomeren HB und HV immer um Bestandteile der PHBV-Ketten.

Zunächst wird eine Modelldiskriminierung durchgeführt und dabei vier Modellkandidaten (A-D) miteinander verglichen. Folgende generelle Annahmen wurden für alle Modellkandidaten getroffen:

- Propionsäure wirkt inhibierend und verlangsamt das Wachstum der Bakterien [78]
- Die Umwandlung von PHAs in enzymatisch aktive Biomasse (residuale Biomasse) ist von der Inhibition durch Propionsäure nicht betroffen, da es sich beim Verbrauch von PHB um einen internen Prozess handelt.
- *C. necator* beginnt bereits unter ausgeglichenen Wachstumsbedingungen PHA produzieren [120]. Diese Eigenschaft ist im Modell über einen inhibitorischen Term mit Ammoniumchlorid in einer Michaelis-Menten-Kinetik berücksichtigt.
- Sterische Effekte in den Granula verhindern die weitere Produktion von PHA ab einem Anteil von 89 % von der Gesamtbiomasse ($P_{t,max}$) [87, 159].

Die Gleichung für Fruktose in den Modellkandidaten A und B ist

$$\begin{aligned}
 \frac{dc_{fru}}{dt} = & -k_1 b_{CO_2}(t) c_{res} c_{fru} c_n inh_1 \\
 & -k_4 c_{res} c_{fru} inh_1 inh_2 inh_3 \\
 & -k_7 b_{CO_2}(t) c_{fru} c_{res} \\
 & -D c_{fru} .
 \end{aligned} \tag{2.5.1}$$

Die in der Differentialgleichung vorkommenden inhibitorischen Terme sind wie folgt definiert:

$$\begin{aligned} inh_1 &= \max\left(0, 1 - \frac{c_p}{c_{p,inh}}\right), \\ inh_2 &= \max\left(0, 1 - \frac{c_n}{c_n + c_{n,sw}}\right), \\ inh_3 &= \max\left(0, 1 - \frac{P_t}{P_{t,max}}\right). \end{aligned}$$

Wie in der Gleichung zu sehen ist, kann Fruktose für die Biomasseproduktion mit der Ratenkonstante k_1 eingesetzt werden. Darüber hinaus wird Fruktose auch für die Akkumulation von HB mit k_4 oder die Bildung von CO_2 mit k_7 verwendet. Das Biomassenwachstum aus Fruktose wird durch die metabolische Aktivitätsvariable $b_{CO_2}(t)$ beeinflusst und durch den von Propionsäure abhängigen Term inh_1 inhibiert. Bei einer Konzentration von 1.5 g/L für Propionsäure ($c_{p,inh}$) wird die Substrataufnahme für die Bildung von Biomasse komplett inhibiert [78].

Für die Modellkandidaten C und D ist auch die HB-Produktion aus Fruktose mit der kinetischen Ratenkonstante k_4 von den metabolischen Aktivitätskoeffizienten $b_{CO_2}(t)$ abhängig, da auch hierfür Fruktose über den Entner-Doudoroff-Weg heruntergebrochen werden muss:

$$\begin{aligned} \frac{dc_{fru}}{dt} &= -k_1 b_{CO_2}(t) c_{res} c_{fru} c_n inh_1 \\ &\quad - k_4 b_{CO_2}(t) c_{res} c_{fru} inh_1 inh_2 inh_3 \\ &\quad - k_7 b_{CO_2}(t) c_{fru} c_{res} \\ &\quad - D c_{fru}. \end{aligned} \tag{2.5.2}$$

Für die Definition der zeitabhängigen metabolischen Aktivitätsvariable $b_{CO_2}(t)$ wurden die CO_2 -Anteile in der Zu- und Abluft während der Fermentation zurate gezogen. Für die Modellvarianten A und C ist die Variable der Quotient von $CO_{2,out}$ im Abgas und $CO_{2,in}$ in der Zuluft:

$$b_{CO_2}(t) = \frac{CO_{2,out}(t)}{CO_{2,in}}. \tag{2.5.3}$$

Für die Modellvarianten B und D wurde die metabolische Aktivitätsvariable mit dem aktuell vorhandenen residualen Biomasseanteil $P_{res}(t)$ normalisiert:

$$b_{CO_2}(t) = \frac{CO_{2,out}(t)}{P_{res}(t)}. \tag{2.5.4}$$

Der residuale Biomasseanteil P_{res} ergibt sich aus dem Quotienten der residualen Biomassekonzentration c_{res} und der Gesamtbiomassekonzentration bestehend aus HB, HV und residualer Biomasse:

$$P_{res} = \frac{c_{res}}{c_{hb} + c_{hv} + c_{res}}. \tag{2.5.5}$$

Da es sich bei *C. necator* um einen PHA-Produzenten der Gruppe zwei nach Novak und Koller handelt [120], beginnt der Aufbau von HB aus Fruktose bereits, wenn

noch eine geringe Konzentration an Ammonium im Medium vorliegt. Dieser Effekt wird durch den Term inh_2 modelliert.

Die Inhibition durch sterische Effekte inh_3 kann mit dem Quotienten aus totaler Polymerkonzentration und der Gesamtbiomassekonzentration berechnet werden:

$$P_t = \frac{(c_{hb} + c_{hv})}{(c_{hb} + c_{hv} + c_{res})}. \quad (2.5.6)$$

Der Verdünnungsfaktor D im Fed-Batch Prozess

$$D = \frac{F_{in}}{V}, \quad (2.5.7)$$

ist das Verhältnis von der Zuflussrate F_{in} und dem Reaktorvolumen V .

Für die Verwendung des Modells in Simulationsstudien wird eine Volumenbilanz benötigt:

$$\frac{dV}{dt} = F_{in}. \quad (2.5.8)$$

Alternativ kann während des Prozesses auf den tatsächlichen Wert für das Volumen zurückgegriffen werden. Das hat den Vorteil, dass auch Probenahmeaktionen berücksichtigt werden können. Für die Datensätze aus Fed-Batch-Prozessen (Experiment IV und V) wurde das Volumenprofil abgespeichert und bei der Simulation verwendet. Ebenso wie für Fruktose kann für Propionsäure eine Differentialgleichung aufgestellt werden. Hier wird auf unterschiedliche Strukturen für die Modellvarianten A-D verzichtet, da der Anteil an produziertem CO_2 bei der Aufnahme und Metabolisierung von Propionsäure im Vergleich zum Herunterbrechen von Zuckern wie Fruktose vernachlässigbar klein ist. Die Differentialgleichung zur Beschreibung des dynamischen Verhaltens der Propionsäurekonzentration kann wie folgt definiert werden:

$$\begin{aligned} \frac{dc_p}{dt} = & -k_2 b_{CO_2}(t) c_{res} c_p c_n inh_1 \\ & - (k_5 + k_6) c_{res} c_p inh_1 inh_2 inh_3 \\ & - k_8 b_{CO_2}(t) c_p c_{res} \\ & + D (c_{p,in} - c_p). \end{aligned} \quad (2.5.9)$$

Darin wird der Abbau von Propionsäure zu Biomasse, HB und CO_2 beschrieben. Neben dem Aufbau von HB kann mit Propionsäure auch HV produziert werden. Im Fed-Batch Modus wird Propionsäure mit der Konzentration $c_{p,in}$ über den Zufluss dem System zugeführt.

Für das Wachstum der Bakterien benötigt der Organismus eine Stickstoffquelle (z.B. Ammoniumchlorid), dessen zeitliche Dynamik wie folgt wiedergegeben werden kann:

$$\begin{aligned} \frac{dc_n}{dt} = & -c_{res} c_n b_{CO_2}(t) (k_1 c_{fru} + k_2 c_p) inh_1 \\ & - k_3 c_{res} c_n (c_{hb} + c_{hv}) \\ & - D c_n. \end{aligned} \quad (2.5.10)$$

Neben der Aufnahme für Biomassewachstum aus externen Kohlenstoffquellen mit den Ratenkonstanten k_1 und k_2 , kann HB oder HV bei Anwesenheit von Ammonium zu katalytisch aktiver Biomasse c_{res} mit der Ratenkonstante k_3 umgewandelt werden. Die Dynamik der residualen Biomassekonzentration kann wie folgt beschrieben werden:

$$\frac{dc_{res}}{dt} = c_{res} c_n [inh_1 (k_1 c_{fru} + k_2 c_p) b_{CO_2} + k_3 (c_{hb} + c_{hv})] - D c_{res}. \quad (2.5.11)$$

Residuale Biomasse kann aus aufgenommenen Kohlenstoffquellen wie Fruktose und Propionsäure oder aus HB oder HV der Polymerketten in Anwesenheit von Ammonium gebildet werden.

Die Dynamik der HB-Konzentration wird in den Modellkandidaten A und B wie folgt beschrieben:

$$\frac{dc_{hb}}{dt} = c_{res} inh_1 inh_2 inh_3 (k_4 c_{fru} + k_5 c_p) - k_3 c_{res} c_n c_{hb} - D c_{hb}. \quad (2.5.12)$$

Dabei wird zunächst angenommen, dass der Auf- und Abbau unabhängig vom CO_2 -Anteil im Abgas ist. HB im Polymer kann sowohl mit Fruktose als auch mit Propionsäure als Kohlenstoffquelle mit den Ratenkonstanten k_4 bzw. k_5 gebildet werden. Der Abbau erfolgt mit der Ratenkonstante k_3 .

Für die Modellkandidaten C und D ist die Produktion von HB unter Aufnahme von Fruktose abhängig vom CO_2 -Anteil im Abgas:

$$\frac{dc_{hb}}{dt} = c_{res} inh_1 inh_2 inh_3 (k_4 b_{CO_2}(t) c_{fru} + k_5 c_p) - k_3 c_{res} c_n c_{hb} - D c_{hb}. \quad (2.5.13)$$

HV kann nur unter Aufnahme von Propionsäure gebildet werden:

$$\frac{dc_{hv}}{dt} = k_6 c_{res} c_p inh_1 inh_2 inh_3 - k_3 c_{res} c_n c_{hv} - D c_{hv}. \quad (2.5.14)$$

Im Gegensatz zu HB ist die HV-Bildung bei allen Modellkandidaten unabhängig vom CO_2 -Gehalt. Denn im Vergleich zum Abbau von Zuckern und organischen Säuren zu HB oder katalytisch aktiven Bestandteilen der Gesamtbiomasse wird bei den hier beteiligten metabolen Reaktionen nur wenig CO_2 produziert.

Interpolation für das Volumen, CO_2 im Abgas und Zufütterungsrate

Für die Auswahl eines geeigneten Modellkandidaten sowie dessen weiterer Nutzung werden Zeitverläufe des CO_2 -Anteils im Abgas aus den Reaktorexperimenten benötigt. Da die Onlinemessung häufig schwankt und keine glatte Kurve liefert, muss eine Interpolation der Daten durchgeführt werden, um diese in das Modell einzubinden. Zu

diesem Zweck wurde eine *smoothing spline* Interpolation mit dem Matlabbefehl *csaps* durchgeführt. Als Glättungsparameter für das Experiment mit Fruktose als einzige Kohlenstoffquelle (Experiment I) wurde 0.02 als Zahlenwert ausgewählt, während die CO₂-Werte vom

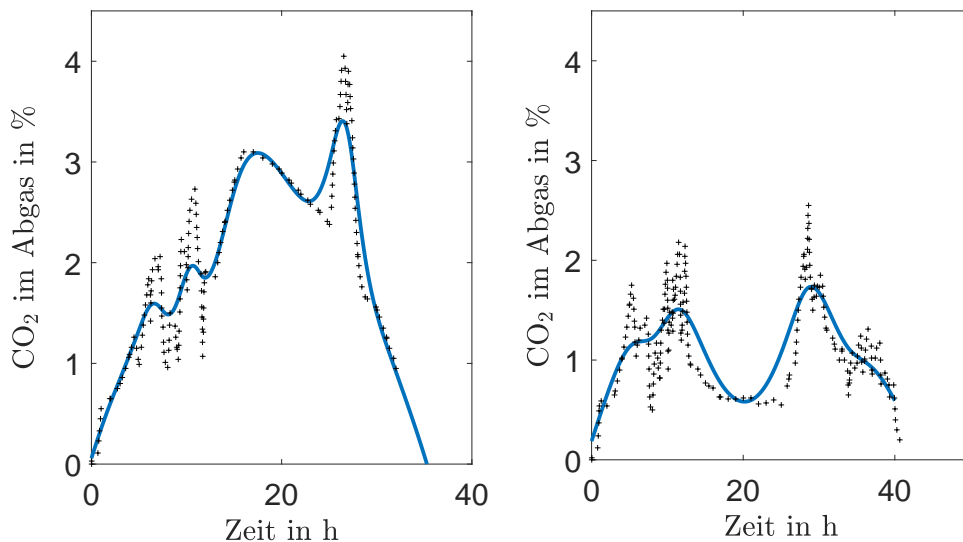


Abbildung 2.24.: CO₂-Gehalt im Abgas aus **Experiment I** (Fruktose als Kohlenstoffquelle, links, +) und **Experiment IV** (Fruktose und Propionsäure als Kohlenstoffquellen und pH-gekoppelte Zufussrate, rechts, +) und die dazugehörigen Interpolationen (blaue Kurven).

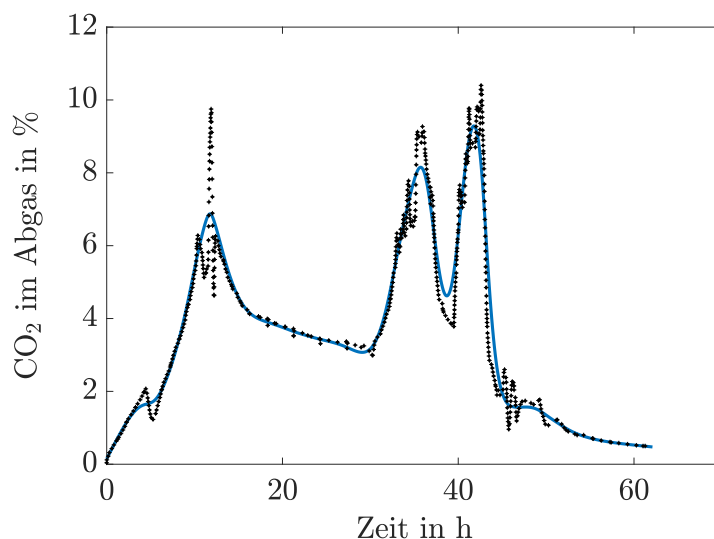


Abbildung 2.25.: CO₂-Gehalt im Abgas bei **Experiment V** (Fruktose und Propionsäure als Kohlenstoffquellen und feste Zufussrate, +) und die dazugehörigen Interpolation (blaue Kurve).

Reaktorexperiment mit Fruktose und Propionsäure als Kohlenstoffquellen (Experiment IV) bereits bei einem Glättungsparameter von 0.2 gut durch die *smoothing spline* Interpolation dargestellt werden können. Im Anschluss an die Interpolation werden die Splines an den Probenahmepunkten ausgewertet. Die Evaluation erfolgt

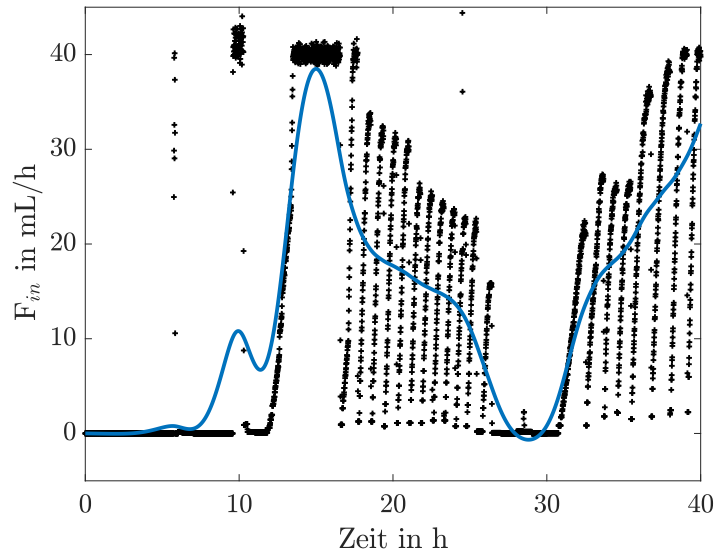


Abbildung 2.26.: Zufütterungsrate bei pH-abhängiger Regelung (+) und das dazugehörige Polynom (blaue Kurve) für die Zugabe von Propionsäure beim **Experiment IV** (Fruktose und Propionsäure als Kohlenstoffquellen).

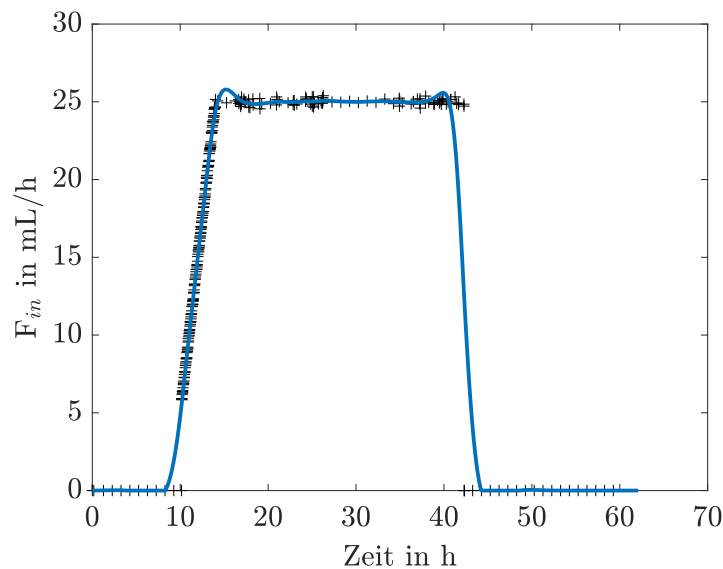


Abbildung 2.27.: Vorgegebene Zufütterungsrate (+) und das dazugehörige Polynom (blaue Kurve) für die Zugabe von Propionsäure für das **Experiment V** (Fruktose und Propionsäure als Kohlenstoffquellen).

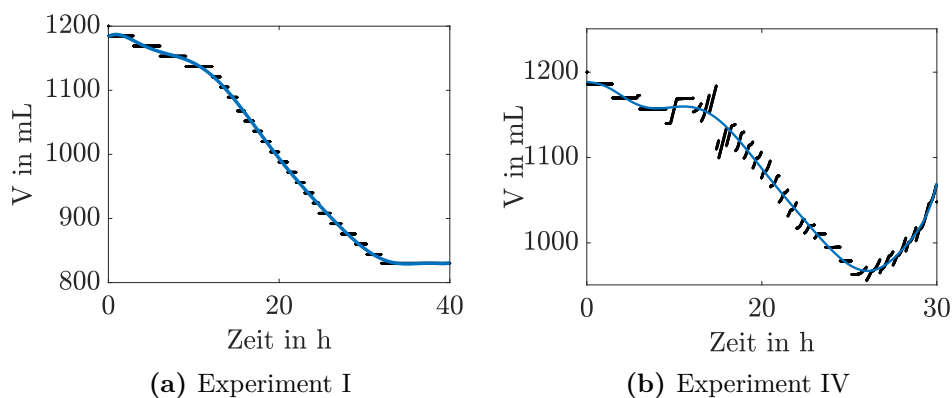


Abbildung 2.28.: Veränderliches Reaktorvolumen aus den Experimenten I und IV. Legende: durch das Reaktorsystem aufgezeichnete Werte, schwarze Symbole; Interpolation; blaue Linie.

mit dem Matlabbefehl *ppval*. Die Kurvenverläufe und Online-Daten sind in der Abbildung 2.24 für beide Datensätze aus den Experimenten I und IV dargestellt. Die Interpolation des CO_2 -Profils für den Datensatz aus Experiment V ist in Abbildung 2.25 zu sehen. Auch hier ist wieder die Reduktion des CO_2 -Anteils während der PHBV-Produktionsphase und ein Anstieg des CO_2 -Gehaltes bei erneuter Hinzugabe von Ammoniumchlorid zu sehen. Als Glättungsfaktor für die *smoothing spline* Interpolation wurde 0.2 gewählt.

Für das Experiment IV wurde die Zufütterung der ungeraden Kohlenstoffquelle Propionsäure für die Bildung des HV-Anteils an die pH-Regelung der Reaktoranlage gekoppelt. Durch den Verbrauch von Propionsäure in der Kulturbrühe steigt der pH-Wert. Um den pH-Wert wieder auf den Sollwert von 6.8 einzustellen, wird ein entsprechendes Volumen der Propionsäure mit einer Konzentration von 20 g/L hinzu gepumpt. Wie hoch die Flussrate zur Einstellung des pH-Wertes ist, wird durch einen vorinstallierten PI-Regler im Prozessleitsystem der Reaktoranlage (DASGIP parallel Bioreaktorsystem, Eppendorf AG, Jülich, Deutschland) vorgegeben. Durch die an den pH-Wert-gekoppelte Zufütterungsstrategie können für den Zufluss starke Fluktuationen beobachtet werden und daher wurde für die Simulation mit dem Modell eine Interpolation der Flussrate für Propionsäure verwendet. Die Interpolation und Evaluation erfolgte analog zu der von den CO_2 -Werten. Hier lieferte ein Glättungsparameter von 0.02 das gewünschte Ergebnis. Die experimentellen Flussraten und die interpolierte Kurve sind in Abbildung 2.26 dargestellt. Beim Experiment V wurde eine feste Zuflussrate ca. 10 h nach Beginn des Versuchs bei 25 mL/h eingestellt. Der Verlauf der Zuflussrate wurde mit einem Glättungsfaktor von 0.5 interpoliert (Abbildung 2.27).

Eine Interpolation des Volumens war nur für die Fed-Batch-Versuche mit Fruktose und Propionsäure als Kohlenstoffquellen nötig (Experiment IV und V). Hierfür wurde ein Polynom der Ordnung 10 mit dem Matlabbefehl *polyfit* bestimmt und zu den Probenahmezeitpunkten mit *polyval* ausgewertet. Diese Vorgehensweise hat den Vorteil, dass Probenahmen während der Versuche berücksichtigt werden können.

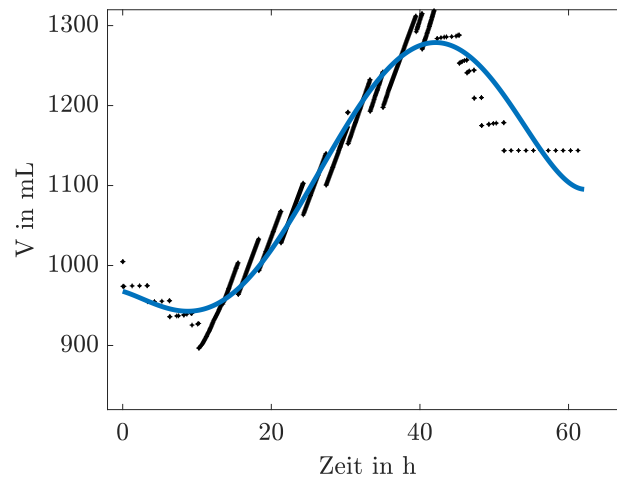


Abbildung 2.29.: Veränderliches Reaktorvolumen durch Probenahme und Zufütterung von Propionsäure (schwarze Symbole) und die Approximation (blaue Linie) für das **Experiment V** (Fructose und Propionsäure als Kohlenstoffquellen bei fester Zufütterung).

Denn wie in Abbildung 2.28b für Experiment IV zu sehen ist, sinkt das Volumen trotz einer mittleren Flussrate von ca. 20 ml/h zwischen 15 und 25 h in diesem Bereich. Beim Experiment V (Abbildung 2.29) wurden die Probenahmeintervalle größer gewählt, sodass zwischen 10 und 40 h ein Anstieg des Volumens aufgezeichnet wurde.

Bei dem Experiment I mit Fructose als einzige Kohlenstoffquelle wurde der Reaktor im Batch-Modus betrieben. Wie in Abbildung 2.28a zu erkennen ist, wird das Reaktorvolumen auch hier durch Probenahmen reduziert. Die Volumenreduktion wird beim Experiment I jedoch vernachlässigt, da das System als ideal durchmischt angesehen und die Konzentrationsänderungen bilanziert werden.

2.5.2. Parameteridentifikation und Darstellung der zeitlichen Dynamik

Mit den Interpolationen sowie Offline-Messdaten für Gesamtbiomasse, HB, HV, Ammoniumchlorid, Fructose und Propionsäure der Experimente I und IV können die Parameter der Modellkandidaten aus Abschnitt 2.5.1 angepasst werden. Zum besseren Abgleich der Substrat- und Produktdynamik zwischen den Experimenten sind die Daten in den Abbildungen 2.30 und 2.31 nach Substraten und Produkten aufgeteilt. Wie dort zu sehen, kann Experiment I in drei experimentelle Phasen eingeteilt werden. Nach einer Biomasseaufbau-Phase (Phase I) folgte eine PHB-Produktionsphase (Phase II), ausgelöst durch die geringe Ammoniumchloridkonzentration im Medium. Schließlich wurde die Produktion in Phase III durch die Zugabe von Ammoniumchlorid gestört.

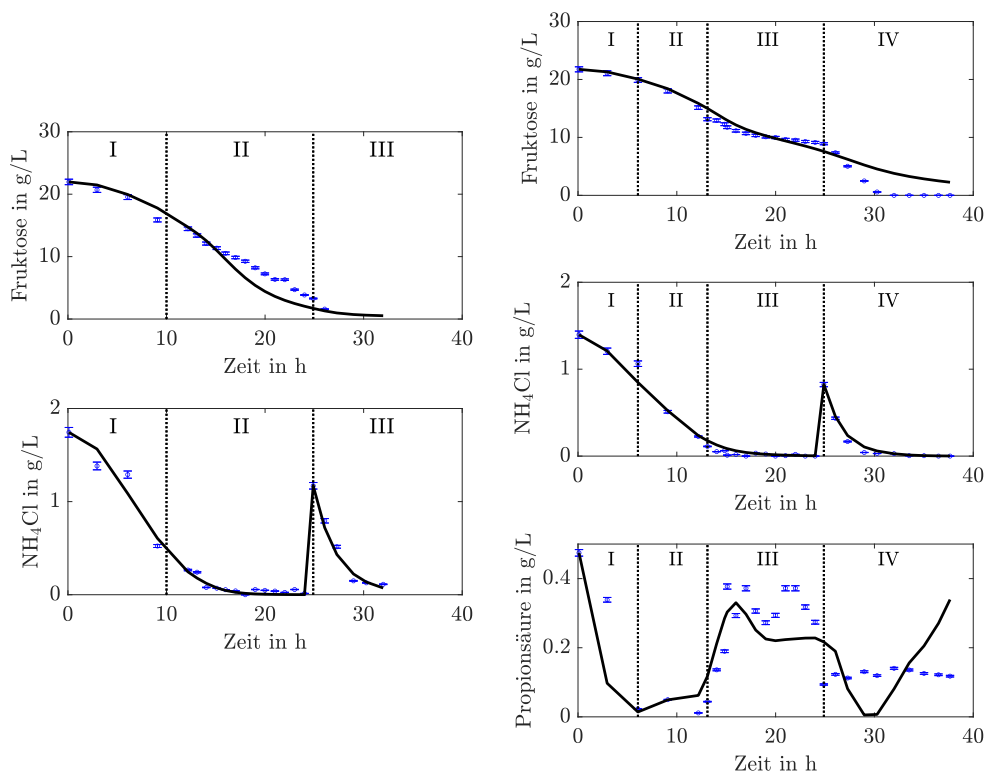
Im Experiment IV wurden Fructose und Propionsäure zunächst gemeinsam ver-

Tabelle 2.8.: Fehlerquadratsummen (FQS) für die Identifikations- und Validierungsdatensätze bei Verwendung der Modelle A-D.

Modell	Identifikation FQS Experiment I+IV	Validierung FQS Experiment V
A	2.8975	8.2770
B	2.8207	6.4248
C	3.2997	6.0401
D	2.7212	4.2423

braucht (Phase I), um mit Ammoniumchlorid Biomasse zu bilden. Nach dem Verbrauch von Propionsäure wurde in Phase II nur Fruktose unter Aufnahme von Ammoniumchlorid zu Biomasse umgewandelt. In Phase III begann die pH-Wert-gesteuerte Propionsäurezugabe. Während dieser Phase wurde kaum Fruktose aufgenommen, da Propionsäure das bevorzugte Substrat war. Da Ammoniumchlorid zu diesem Zeitpunkt verbraucht war, wurde die Propionsäure zur Produktion von PHBV verwendet. In Phase IV wurde dieser Prozess durch das Abschalten der pH-Wert-Regelung mit Propionsäure und die Zugabe von Ammoniumchlorid gestört. Wie zu sehen, wurden Propionsäure und Fruktose sehr schnell verbraucht. Dabei sanken zeitgleich die HB- und HV-Konzentrationen aus dem Polymer, da hier ein Degradationsprozess einsetzt. Mit den Daten der beschriebenen Experimente wurden die kinetischen Konstanten k_1 bis k_8 für alle Modellvarianten A-D entsprechend Abschnitt 2.3.4 identifiziert. Alle anderen Variablen und Konstanten konnten aus Literaturwerten bestimmt werden oder stehen im direkten Bezug zu den zur Verfügung stehenden Online-Daten bzw. deren Interpolationen. In Tabelle 2.8/links sind die Werte der Zielfunktion nach erfolgreicher Parameteridentifikation mit den Daten aus Experiment I und IV dargestellt. Die Zielfunktion wurde, wie in Abschnitt 2.3.4 definiert, berechnet. Weiterhin wurden die Daten aus dem Experiment V für die Validierung der Modellkandidaten genutzt und die Zielfunktion bestimmt (2.8/rechts). Dabei ist das Modell D am besten zur Beschreibung aller Datensätze geeignet, da hier die kleinste Fehlerquadratsumme vorliegt. Die Modellvariante D beinhaltet eine metabolische Aktivität, die auf den residualen Biomasseanteil normalisiert ist.

Die Tabelle C.1 im Appendix zeigt die ermittelten Parameterwerte für alle vier Modellvarianten. Das Ergebnis der Anpassung der Parameter von Modell D an die beiden Identifikationsdatensätze ist in den Abbildungen 2.30 und 2.31 dargestellt. Das dynamische Verhalten für den Abbau der Substrate aus Experiment I (nur Fruktose) kann das Modell sehr gut abbilden (Abbildung 2.30a). Größere Abweichungen zeigt das Modell bei den Substraten des Experiment IV, insbesondere im letzten Zeitabschnitt ab 25 h (Phase IV, Abbildung 2.30b) für Fruktose und Propionsäure. Dies ist zum einen der Approximation der Zuflussrate für Propionsäure geschuldet (siehe Abbildung 2.26), zum anderen wird die Auswertung der Propionsäure schwieriger, da sich immer mehr Apoptose-Fragmente im Kulturüberstand befinden, die das Signal stören (Abbildung A.1 im Appendix).



(a) Experiment I

(b) Experiment IV

Abbildung 2.30.: Konzentrationsverläufe der Substrate für Experiment I und IV: (a) Fruktose als Einzelsubstrat ohne zusätzliche Fütterung (Batch-Prozess), (b) Fruktose und Propionsäure als Kohlenstoffquellen mit pH-abhängigem Propionsäure-Zufluss (Fed-batch Prozess). Die angegebenen Fehlerbalken entsprechen den Gerätefehlern. Legende: schwarze Kurve, Simulation Modell D; blaue Sterne, experimentelle Daten.

Für das Experiment I mit Fruktose als einzelne Kohlenstoffquelle kann das Modell sowohl die Produktion als auch den Abbau von Biomasse und HB gut reproduzieren (Abbildung 2.31a). Gleiches gilt für das Experiment IV mit Fruktose und Propionsäure als Kohlenstoffquellen (Abbildung 2.31b). Auch der Abbau von HB und HV nach Zugabe von Ammoniumchlorid bei 24 h kann gut durch das Modell abgebildet werden. Diese Eigenschaft ist von besonderem Interesse, wenn der Modellansatz für die Abschätzung der Verläufe unter Nutzung von kostengünstigen Reststoffen verwendet werden soll. Reststoffe sind sehr heterogen zusammengesetzt und beinhalten häufig Stickstoffquellen, die zu einem anderen Aufbauverhalten von Polymeren führen können. Da das Modell sehr gut die Produktkonzentrationen wiedergibt, kann es im Weiteren für Simulationsstudien eingesetzt werden.

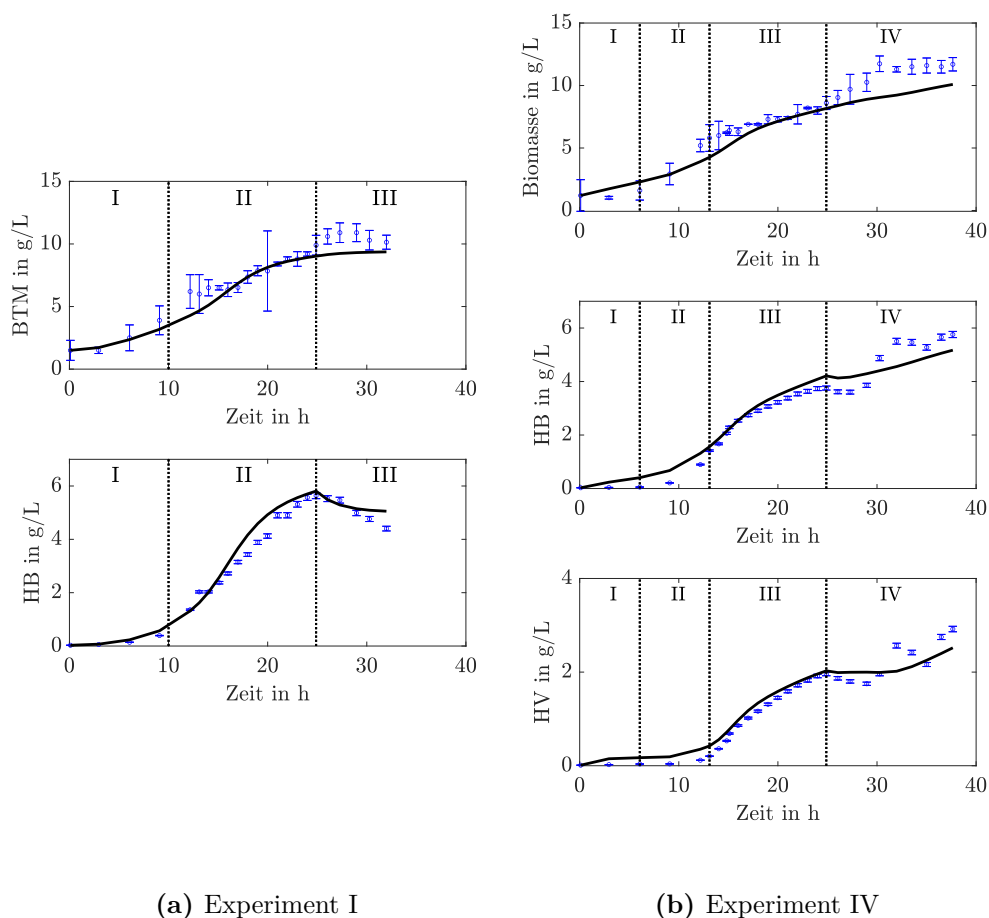


Abbildung 2.31.: Produktion und Degradation von HB, HV und Biomasse ($c_{\text{res}} + c_{\text{hb}} + c_{\text{hv}}$) für Experiment I und IV: (a) Fruktose als Einzelsubstrat ohne zusätzliche Fütterung (Batch-Prozess), (b) Fruktose und Propionsäure als Kohlenstoffquellen mit pH-abhängigem Propionsäure-Zufluss (Fed-batch Prozess). Die Fehlerberechnung der Biomasse erfolgte aus der Berechnung des Standardfehlers von Dreifachmessungen, bei allen anderen Messungen wurde der Gerätefehler angenommen. Legende: schwarze Kurve, Simulation Modell D; blaue Sterne, experimentelle Daten.

2.5.3. Validierung

Für die Validierung des metabolischen PHBV-Modells wurde ein weiteres Experiment mit Fruktose und Propionsäure durchgeführt (Experiment V). Die Startbedingungen entsprechen den Werten des Versuches mit beiden Kohlenstoffquellen (Experiment IV). Im Unterschied zum Experiment IV, bei dem die Propionsäurezugabe pH-Wert-abhängig entsprechend [78] erfolgte, wurde hier die Flussrate für Propionsäure beginnend bei 10 h um je 5 mL/h bis zu einem Endwert von 25 mL/h erhöht und für ca. 30 h gehalten (siehe Abbildung 2.27). Der CO_2 -Anteil im Abgas und der Verlauf für das Volumen des Experiments V wurden, wie bereits bei den anderen beiden Datensätzen, interpoliert (Abbildungen 2.25 und 2.29) und die Polynome

für die Simulation verwendet. Konzentrationsmessungen für Fruktose, Ammoniumchlorid, HB, HV und Gesamtbiomasse, wurden für die Berechnung der FQS für jede der Modellvarianten zu Rate gezogen (Tabelle 2.8). Die Konzentrationsmessung für Propionsäure mittels HPLC ist durch vorhandene Zellbruchstücke sehr unsicher und wurde nicht in die Berechnung miteinbezogen. Die Konzentrationsverläufe für das Experiment V sind in Abbildung 2.32 dargestellt. Der Prozess kann wie auch die anderen Experimente in unterschiedliche Phasen eingeteilt werden. In der Phase I erfolgte die Biomasseproduktion aus Fruktose und Propionsäure bis zu einer Konzentration von 5 g/L. In Phase II wurde die Zuflussrate für die Propionsäure langsam auf 25 ml/h hochgefahren. Ammoniumchlorid war zu diesem Zeitpunkt bereits verbraucht und die PHBV-Produktion setzte ein. Durch das Hinzuschalten einer weiteren Kohlenstoffquelle verringerte sich der Verbrauch von Fruktose. In Phase III bei 30 h wurde das System durch die Anhebung der Ammoniumchloridkonzentration auf 2 g/L gestört. Damit wurde der Abbau von Fruktose, Propionsäure und PHBV zu Biomasse ausgelöst. Die Umwandlung zu Biomasse erfolgte in dieser Phase, solange Ammoniumchlorid vorhanden war. Nach dem Verbrauch der Stickstoffquelle setzte ein erneuter Aufbau von HB und HV ein. Überraschenderweise verringerte sich die HV-Konzentration ab ca. 35 h im Gegensatz zur konstanten HB-Konzentration. Ab 40 h wurde der Prozess nochmals gestört, indem die Fruktose- und Ammoniumchloridkonzentrationen ein weiteres Mal auf 5 g/L bzw. 1 g/L erhöht wurden. Dadurch konnte der Biomasseaufbau bei konstanten Polymerkonzentrationen beobachtet werden.

Dieses Experiment wurde mit allen Modellkandidaten simuliert und mit den experimentellen Daten aus Experiment V verglichen. Modell D, welches bereits das beste FQS-Ergebnis für die Parameteranpassung an die Daten der Experimente I und IV geliefert hat, zeigt für die Daten des Experiments V ebenfalls ein zufriedenstellendes Ergebnis. Zwar weist die Modellsimulation eine andere Dynamik für Fruktose im Vergleich zu den experimentellen Daten auf, aber die Simulation der Biomasse- sowie die Produktkonzentrationen zeigen größere Übereinstimmungen als bei den anderen Modellkandidaten. Größere Abweichungen zeigt das Modell in Phase IV beim Abbau von HV nach Störung der Polymerisierung durch externe Stickstoffzugabe. Die experimentellen Daten zeigen hier eine viel stärkere Degradation der HV-Anteile als der HB-Anteile. Dieses Verhalten ist im metabolen Modell nicht berücksichtigt, da zunächst angenommen wurde, dass HB und HV mit gleicher Effizienz abgebaut werden. Im realen System hängt der Abbau der Monomere von der Polymerzusammensetzung ab: Beispielsweise verringert sich der Anteil an HV stärker als der HB-Anteil, je mehr HV im Vorfeld hintereinander in das Polymer eingebaut wurde. Auf mögliche Lösungsansätze soll in der Schlussfolgerung nochmals eingegangen werden.

2.5.4. Simulationsstudie

Im Folgenden wurde das identifizierte Modell genutzt, um die Produktausbeuten bei konstantem CO₂ und Propionsäureflussraten zu simulieren. Die Einstellung der Flussrate ist an Bioreaktoren mit kontinuierlichen Pumpen einfach umsetzbar, während die Einstellung eines konstanten CO₂-Anteils im Abgas, ausgelöst durch bakterielle

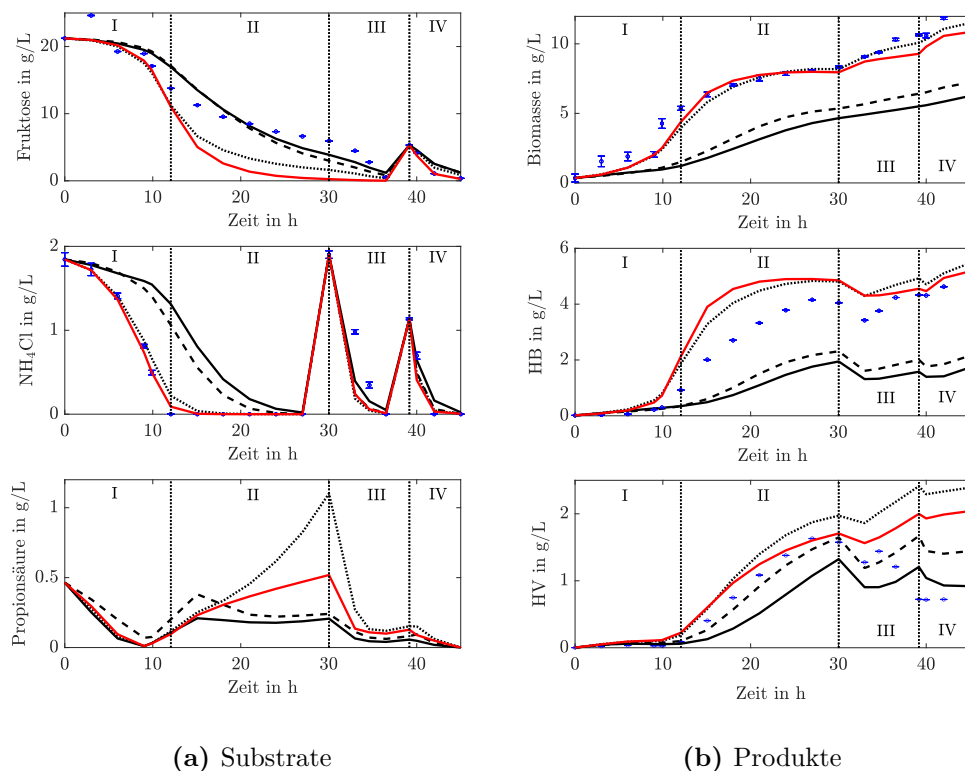


Abbildung 2.32.: Experimentelle und simulierte Verläufe für Substrate (a) und Produkte (b) aus Experiment V unter Verwendung der Modellkandidaten für die PHBV Produktion. Legende: Experimentelle Daten, blaue Kreise; durchgezogene schwarze Linie, Modell A; gestrichelte schwarze Linie, Modell B; gepunktete schwarze Linie, Modell C; rote durchgezogene Linie, Modell D.

Aktivität, selten geregelt wird. Experimentelle Ergebnisse aus dem Jahr 2003 zeigen, dass die Einstellung eines konstanten sogenannten autogenen CO_2 -Anteils möglich ist [147]. Hier wurde durch die Variation der Begasungsrate das von *C. necator* produzierte autogene CO_2 auf einem konstanten Level gehalten. Bei gleichbleibendem CO_2 in der Zuluft und konstantem pH-Wert ist demzufolge auch der CO_2 -Anteil im Abgas konstant. Unter der Annahme einer solchen CO_2 -Regelung wurde die folgende Simulationsstudie durchgeführt. Die Propionsäurekonzentration im Zufluss wurde hierfür wie in den Datensätzen der Experimente IV und V auf 20 g/L gesetzt.

Die Simulationen mit unterschiedlichen konstanten Flussraten und CO_2 -Anteilen wurden zum Zeitpunkt der maximalen Polymerkonzentrationen P_{HA} und Polymermasse P_{HA}^* ausgewertet. Eine Auswertung bezüglich maximaler HV-Menge führt zu ähnlichen Ergebnissen, die in Abbildung C.1 im Appendix dargestellt sind.

Abbildung 2.33a zeigt die maximale gesamte Konzentration P_{HA} in Abhängigkeit von CO_2 im Abgas und der Flussrate für Propionsäure für den gesamten getesteten Bereich ($F_{in} \in [0, 200]$, $\text{CO}_{2,out} \in [0, 20]$). Deutlich sichtbar ist der inhibitorische, dunkelblaue Bereich im Diagramm. In diesem Bereich wird die Propionsäurekon-

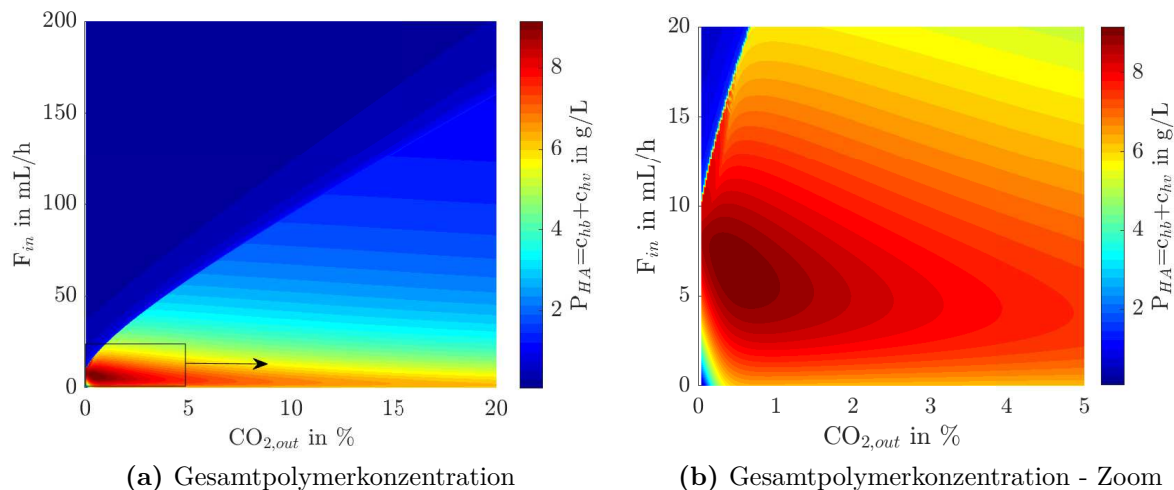


Abbildung 2.33.: Optimale Gesamtpolymerkonzentration bei verschiedenen konstanten Anteilen für CO₂ im Abgas und die Flussrate für Propionsäure F_{in} . Die Box in Abbildung (a) markiert den gezoomten Bereich aus Abbildung (b).

zentration im Medium zu hoch, sodass eine Wachstumsinhibierung eintritt. Bei erhöhten CO₂-Werten im Abgas können höhere Flussraten gewählt werden, ohne die Wachstumsinhibierung auszulösen. Dieses Verhalten kann wie folgt begründet werden: Ein höherer CO₂-Anteil im Abgas, geht mit einer erhöhten metabolen Aktivität der Bakterien einher und bedeutet eine erhöhte Aufnahme von Substraten, insbesondere Zuckern, aus dem Medium. Der Abbau von Pentosen und Hexosen erfolgt in *C. necator* über den Entner-Doudoroff-Weg. Für die Energiegewinnung und die Generierung von Vorläufermolekülen für die Biomassensynthese aus heruntergebrochenen Zuckern und auch organischen Säuren ist in *C. necator* u.a. der Citratzyklus verantwortlich. Sowohl bei dem Entner-Doudoroff-Weg als auch im Citratzyklus wird als Nebenprodukt CO₂ generiert und ausgeschleust. Ein erhöhter Anteil an CO₂ im Abgas ohne Änderung der Zusammensetzung der Luft für die Begasung, ist demzufolge auf die metabolen Aktivität der Bakterien zurückzuführen und bedeutet stärkeres Biomassenwachstum oder HB-Produktion.

Alternativ zur Abbildung der Gesamtpolymerkonzentration P_{HA} kann die Gesamtpolymermasse P_{HA}^* betrachtet werden (Abbildung 2.34a). Mit Erhöhung der Flussrate entsteht mehr Gesamtpolymer, bis schließlich die inhibitorische Grenze überschritten wird. Wie jedoch in Abbildung 2.34b zu sehen ist, steigt das Volumen proportional zur Flussrate. Wird die Gesamtmasse beurteilt, ist eine Produktion von ca. 19.9 g Gesamtpolymer möglich, allerdings wird dabei ein Volumen von 5 L benötigt. Am Punkt der optimalen Gesamtpolymerkonzentration bei 9.15 g/L sind nur 1.7 L nötig (siehe Abbildung 2.33b). Wie aus der Betrachtung der Gesamtpolymermasse hervorgeht, erscheint die Konzentration als der geeignetere Bewertungsparameter. Neben der Gesamtpolymerkonzentration sollte allerdings auch die Konzentration an HV betrachtet werden, da Erhöhung des HV-Anteils zu vorteilhaften Materialeigenschaften

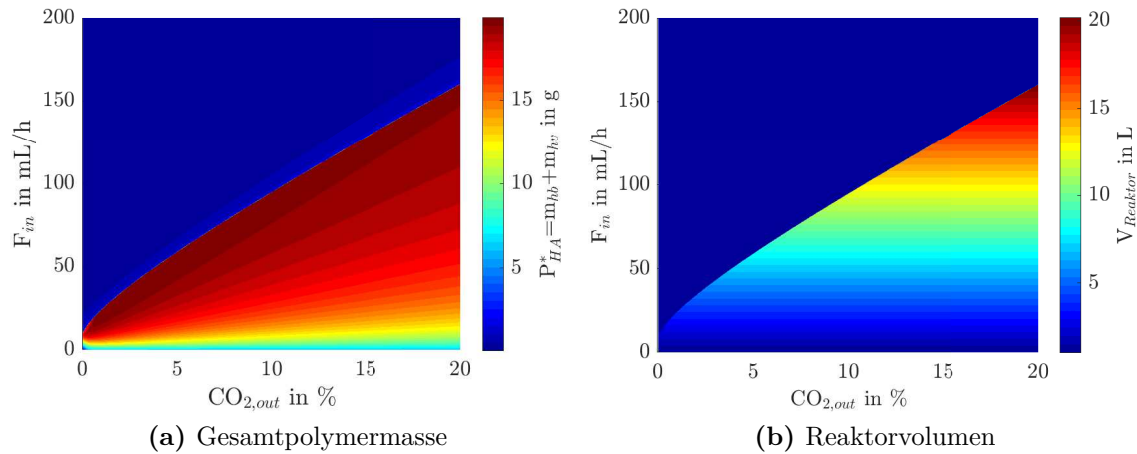


Abbildung 2.34.: Optimale Gesamtpolymermasse (a) und das zugehörige Reaktorvolumen (b) bei verschiedenen konstanten Werten für CO_2 im Abgas und die Flussrate für Propionsäure F_{in} .

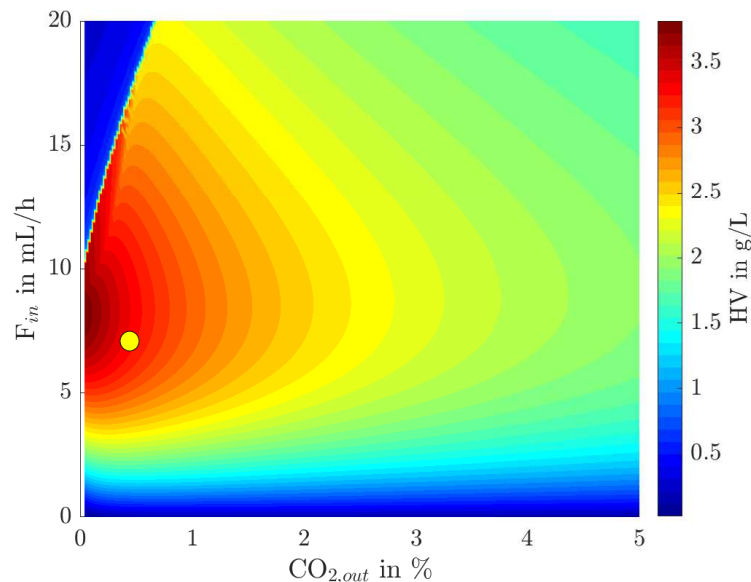


Abbildung 2.35.: HV-Konzentration ausgewertet bei optimaler Gesamtpolymerkonzentration bei konstanten Werten für CO_2 im Abgas und die Flussrate für Propionsäure F_{in} . Der gelbe Kreis kennzeichnet die Einstellungen für die maximale Gesamtkonzentration (HB + HV).

führt (siehe Kapitel 2.1.2). Die Abbildung 2.35 zeigt die HV Konzentrationen zum Zeitpunkt der maximalen Gesamtpolymerausbeute. Die Werte für die optimale Gesamtpolymerkonzentration sind als gelber Kreis in der Abbildung 2.35 markiert. Für eine gesteigerte HV Konzentration müsste die Flussrate noch leicht auf ca. 8 mL/h angehoben und der CO_2 -Gehalt im Abgas so gering wie möglich gehalten werden. Durch die Anpassung der Prozessbedingungen an optimale HV Konzentrationen

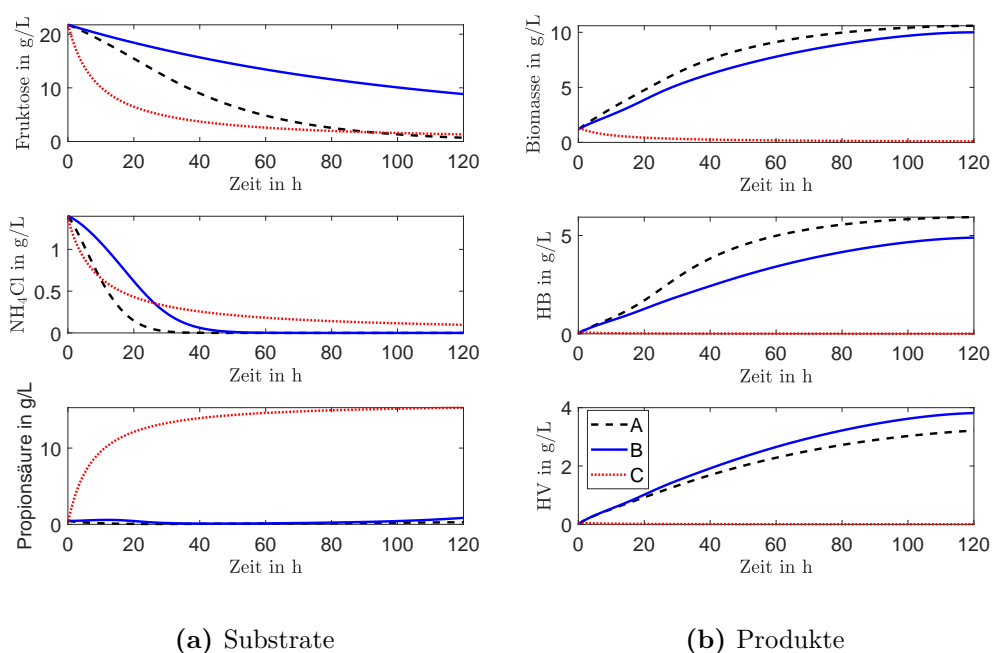


Abbildung 2.36.: Drei Beispielverläufe bei konstanten Werten für CO_2 im Abgas und die Flussrate für Propionsäure F_{in} . Legende: A, maximale Gesamtpolymerkonzentration (HB + HV); B, hohe HV Konzentration; C, Inhibition durch Propionsäure.

kommt es wiederum zu leichten Verlusten bei der Gesamtpolymerkonzentration (um ca. 0.4 g/L). Folglich ist es also wichtig, im Vorfeld festzulegen, welches Produktionsziel erreicht werden soll und welche Produktionsbedingungen möglich sind. Weitere wichtige Werte, wie der HV-Anteil im Gesamtpolymer, die residuale Biomasse, der Anteil an Gesamtpolymer in Bezug auf die totale Biomasse und der Auswertungszeitpunkt sind in Abbildung C.2 im Appendix dargestellt und können für die Auswahl der Prozessbedingungen herausgezogen werden.

In Abbildung 2.36 sind drei Beispiel-Zeitverläufe bei unterschiedlichen Flussraten für Propionsäure und CO_2 Anteilen im Abgas dargestellt. Szenario A zeigt den dynamischen Verlauf, mit dem Ziel eine maximale Polymerkonzentration (HB + HV) zu erreichen. Zu diesem Zweck wurde die Flussrate für die Propionsäure auf 6.4 mL/h gesetzt und das CO_2 im Abgas konstant bei 0.46 % angenommen. Für das Szenario B wurde 0.04 % für CO_2 im Abgas und eine Flussrate von 8.2 mL/h angenommen, um ein Beispiel für eine gesteigerte HV-Konzentration zu zeigen. Zusätzlich zu den zwei günstigen Einstellungsvarianten wird mit Szenario C ein Fall konstruiert, der eine Wachstumsinhibition bei einer Flussrate von 105 mL/h und 1 % CO_2 im Abgas zeigt.

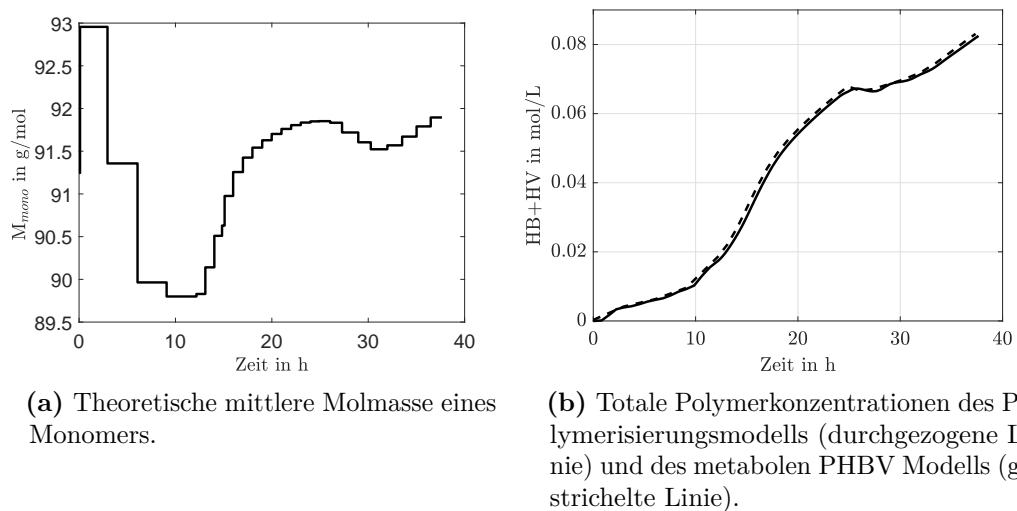


Abbildung 2.37.: Mittlere Monomerkonzentration (a) und Abgleich der totalen Polymerkonzentrationen (b) für das Experiment IV.

2.5.5. Multiskalen-Modellierung - Kopplung des PHBV-Modells mit einer Polymerisierungskinetik

Für die Modellierung und Simulation der Kettenlängenverteilung von Copolymeren wie PHBV wurden in der Vergangenheit Modelle entwickelt, die mithilfe von eindimensionalen Populationsbilanzen den Aufbau solcher Polymerketten untersuchen [68,104,105]. Alternativ kann für die Darstellung der Kettenlängenverteilung der Modellansatz aus dem PHB Modellierungskapitel 2.4.4 verwendet werden, um zusätzlich zur Synthese auch Degradation durch wechselnde Substratzusammensetzungen betrachten zu können. Die Simulation der Kettenlängenverteilung des Copolymers PHBV ist jedoch komplexer als die Simulation für das Polymer PHB. So hat beispielsweise eine variierende Kettenzusammensetzung bzgl. des HV-Anteils zur Folge, dass Ketten mit gleicher Gesamtanzahl an Monomeren unterschiedliche Molekulargewichte aufweisen. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass bei bekannten Molekulargewichten der Polymerketten die Zusammensetzung und die Monomeranzahl der einzelnen Ketten nicht mehr eindeutig bestimmt werden können. Im Rahmen dieser Arbeit soll die Annahme getroffen werden, dass der HV-Anteil in allen Ketten dem gemessenen (oder mit dem metabolen Modell simulierten) integralen HV-Anteilen des Gesamtpolymeren entspricht. Durch die Einführung einer dynamischen mittleren molekularen Masse für das Monomer, kann die Polymerisierungskinetik aus Abschnitt 2.4.4 ohne weitere Änderungen angewendet werden:

$$M_{HA}^P = x_{HB} M_{HB}^P + x_{HV} M_{HV}^P. \quad (2.5.15)$$

Die Anteile an HB und HV (x_{hb} und x_{hv}) können aus dem metabolen Modellansatz bestimmt werden. Die Molekulargewichte für HB und HV sind aus der Literatur bekannt. In Abbildung 2.37a ist für das Experiment IV das theoretische mittlere

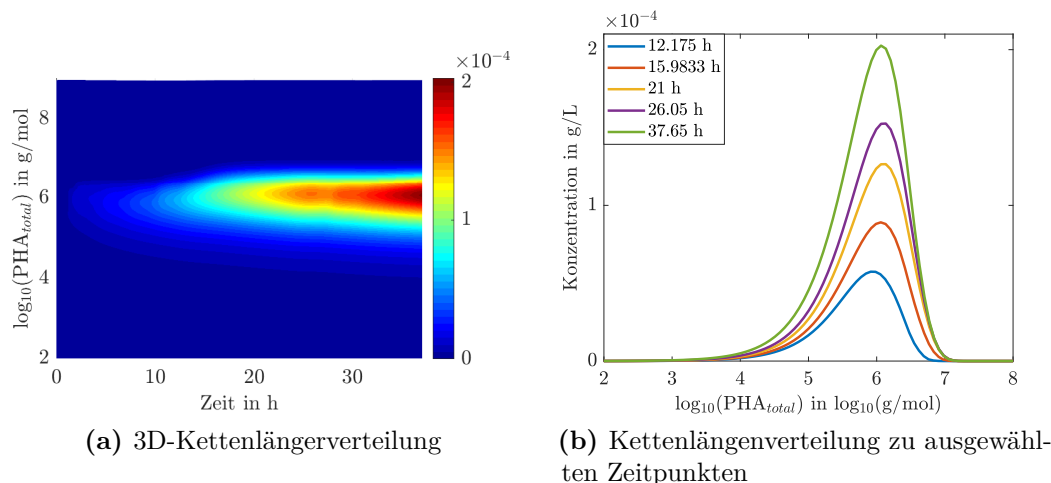


Abbildung 2.38.: Änderung der Kettenlängenverteilung (Farbskala, g/L) über die Zeit und das Molekulargewicht der Ketten für das Experiment IV unter Verwendung des metabolen PHBV Modells und mittleren Molekulargewichten aus Abbildung 2.37a.

Molekulargewicht der Monomere dargestellt. Weiterhin zeigt die Abbildung 2.37b den Abgleich der totalen Polymerkonzentrationen der Polymerisationskinetik und dem metabolen Ansatz mit guter Übereinstimmung. Wie bereits im vorherigen Abschnitt zur PHB-Modellierung dargestellt, kann auch hier die Kettenlängenverteilung für den gesamten Zeitraum als 3D-Grafik dargestellt werden (Abbildung 2.38a). Die Abbildung 2.38b zeigt die Kettenlängenverteilung zu ausgewählten Zeitpunkten aus dem Experiment IV.

Die charakteristischen Werte wie M_n und M_w der Kettenlängenverteilung können über den gesamten Zeitraum dargestellt werden (Abbildung 2.39). Aus diesen zwei charakteristischen Größen wird der PDI bestimmt, welcher in Abbildung 2.40a dargestellt ist.

Neben den theoretischen charakteristischen Größen wurde die Verteilung der Ketten für die Messzeitpunkte ebenfalls experimentell mittels GPC bestimmt. Die differentiellen Massenverteilungen $W(\log M)$ der Proben sind für alle Zeitpunkte in Abbildung D.2 im Appendix dargestellt. Mithilfe dieser Verteilungen können die charakteristischen Größen des Prozesses berechnet werden (rote Kreise in den Abbildungen 2.39 und 2.40a). Als Grundlage für die Auswertung der Messung ist in dieser Arbeit die konventionelle Kalibrierung unter Verwendung von eng verteilten Polystyrolstandards (Molekulargewicht eines Polystyrol-Monomers ist $M_{PS} = 104.2$ g/mol) gewählt worden. Diese Art der Auswertung ist relativ ungenau und sollte in zukünftigen Messungen verbessert werden. Wie bereits im Abschnitt 2.4.4 ausgeführt, können zu diesem Zweck molmassensensitiven Detektoren, wie zum Beispiel einem Viskosimeter oder Lichtstreuendetektor, eingesetzt werden.

Der Vergleich der experimentellen Werte mit der Simulation zeigt, dass mit dem Polymerisierungsmodell die ungefähren Größenordnungen der charakteristischen Werte

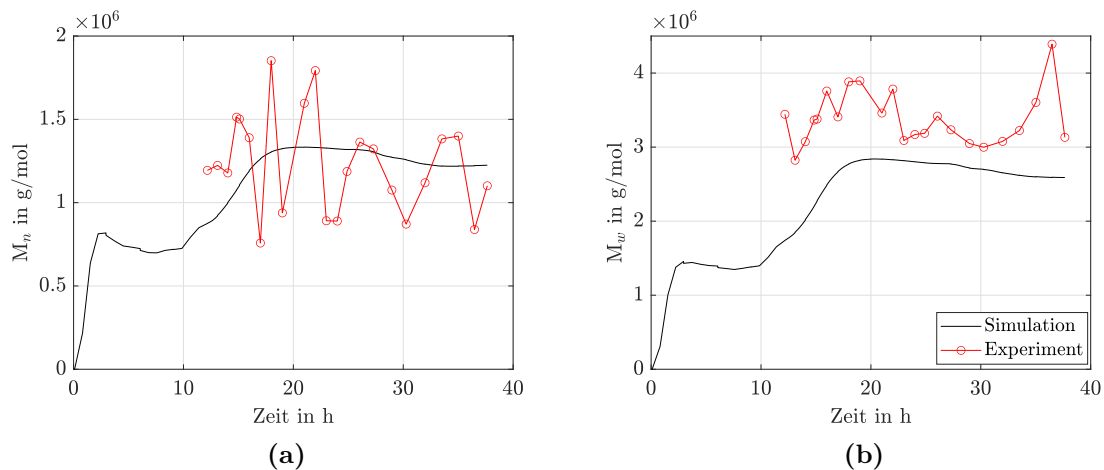
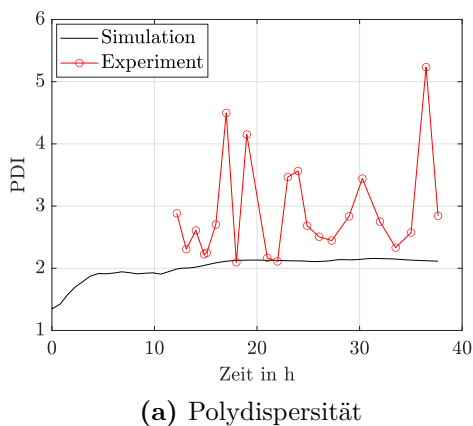
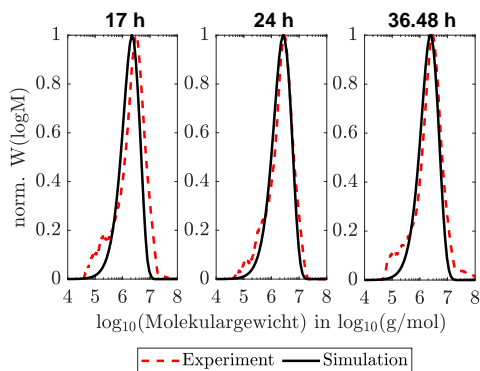


Abbildung 2.39.: M_n und M_w für das Experiment IV.



(a) Polydispersität



(b) Ausgewählte normierte differentielle Verteilung bei hohem PDI

Abbildung 2.40.: Polydispersität und ausgewählte Verteilungen für das Experiment IV.

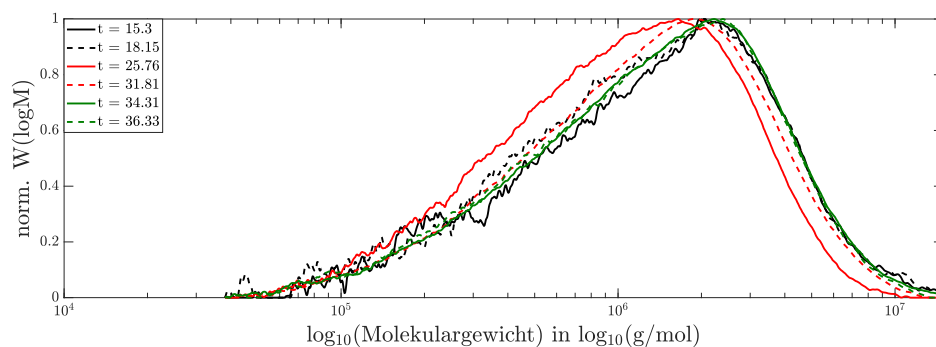
abgeschätzt werden können. Für ein genaueres modellbasiertes Monitoring sollten zunächst die konstanten Parameter der Polymerisierungskinetik an die GPC-Daten angepasst werden, da diese bisher auf Literaturdaten beruhen. Die experimentellen Kettenlängenverteilungen weisen zu einigen Messzeitpunkten sehr viele Ketten mit kleinerem Molekulargewicht (ca. 10^5 g/mol) auf. Messungen, die ca. eine Stunde darauf getätigt wurden, besitzen im Schnitt wieder ein höheres Molekulargewicht. Dieses Phänomen zeigt sich auch in Abbildung 2.39 bei den Mittelwerten der Verteilung. In Abbildung 2.40b ist die experimentelle Verteilung für einige Zeitpunkte dargestellt, bei denen die Polydispersität sehr hoch war. Möglicherweise hängt dies mit der Aktivität der Enzyme zusammen, die am Auf- und Abbau der Ketten beteiligt sind. Deshalb sollten zukünftige Modellerweiterungen auch die Modellierung von Enzymaktivitäten berücksichtigen.

2.6. Zusammenfassung und Schlussfolgerung

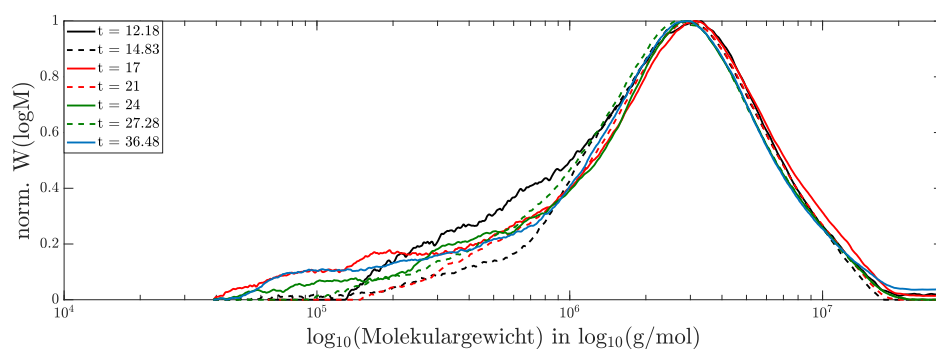
Zur Beschreibung der Herstellungsprozesse von PHB und PHBV wurden im Rahmen dieser Arbeit unterschiedliche Multiskalen-Ansätze entwickelt, experimentell validiert und in simulativen Analysen verwendet. Dabei wurde für die PHB-Produktion ein Batch-Prozess mit Fruktose und Acetat als Kohlenstoffquellen betrachtet. Bei Fruktose und Acetat handelt es sich um kostengünstige Kohlenstoffquellen, da diese häufig in Reststoffen aus der Lebensmittelindustrie vorkommen. Darüber hinaus steigert Acetat die PHB-Produktion in *C. necator* [4]. Bei der PHBV-Produktion wurde ein Fed-Batch-Prozess mit Fruktose und Propionsäure als Anwendungsbeispiel untersucht. Auch diese Kohlenstoffquellen sind in Reststoffen aus der Industrie zu finden und sind aus diesem Grund eine geeignete Wahl für die Untersuchung des PHBV-Produktionsprozesses. Die Propionsäure ist dabei essentiell für die Bildung des HV-Anteils, kann dem Prozess allerdings nur in kleinen Mengen zugeführt werden, da bereits geringe Konzentrationen Wachstums-inhibierend sein können [78].

Zunächst wurde sowohl für PHB als auch für PHBV je ein Modell zur Beschreibung der Dynamik von Produkt- und Substratkonzentrationen präsentiert. Für die PHB-Produktion aus Fruktose und Acetat als Kohlenstoffquellen hat sich ein HCM-Ansatz als vorteilhaft erwiesen. Zusätzlich zur Einbeziehung von metabolen Informationen in Form von EMen, wird beim HCM die Enzymregulation in Bezug auf die optimale Nutzung vorhandener Substrate berücksichtigt. Zudem konnte ein einfacher Weg gefunden werden, mit dem sich die Gelöstsauerstoffverfügbarkeit als wichtige Prozessgröße integrieren lässt. Durch die Modellerweiterung konnten nicht nur unterschiedliche Substratzusammensetzungen, sondern auch die Auswirkung verschiedener DOs auf die Produktausbeute untersucht werden.

Für den zweiten Anwendungsfall, der PHBV-Produktion aus Fruktose und Propionsäure, wäre das zugrunde liegende metabolische Netzwerk durch die Einbeziehung neuer Substrate und eines weiteren Produkts viel komplexer. Im Rahmen einer Bachelorarbeit, in der mit einem stark reduzierten Netzwerk mit 42 Reaktionsgleichungen gearbeitet wurde, wurden über 14 000 EMen identifiziert [6]. Zusätzlich zu der erhöhten Komplexität durch die Erweiterung des metabolischen Netzwerkes,



(a) Experiment III



(b) Experiment IV

Abbildung 2.41.: Vergleich ausgewählter experimenteller GPC-Verteilungen. Die Molmassenverteilung von PHB unter Nutzung von Fruktose und Acetat als Kohlenstoffquellen (a) ist breiter als die Molmassenverteilung von PHBV mit Fruktose und Propionsäure als Kohlenstoffquellen (b). Bei der Produktion von PHBV gibt es zudem mehr Ketten mit höherem Molekulargewicht.

wurde bei der PHBV-Produktion ein sehr charakteristisches CO_2 -Profil im Abgas detektiert. Demzufolge sollte CO_2 im Modellansatz nicht vernachlässigt werden und müsste als weiteres Produkt und auch Substrat bei der metabolen Netzwerkanalyse berücksichtigt werden. Mit diesem Wissen ist die Reduktion der EMen auf eine moderate Anzahl nicht mehr möglich. Deshalb wurde für die PHBV-Produktion ein makroskopisches Modell entwickelt, welches die Hauptmerkmale des Prozesses durch verschiedene Kinetiken abbildet. Das experimentelle CO_2 -Profil aus der Abgasmessung wurde genutzt, um das Maß der metabolen Aktivität beim Fruktoseabbau für die Biomasse- und HB-Produktion abbilden zu können. Durch die Einbeziehung von Online-Messdaten bietet sich die Anwendung dieses Modellansatzes als Softsensor oder als Bestandteil einer Regelungsstrategie an [38]. Weiterhin können simulative Analysen zur Ermittlung der optimalen Flussraten und Abgaswerte für die maximale Ausbeute sowie gezielte Zusammensetzung von PHBV durchgeführt werden. Solche Studien wurden im Rahmen dieser Arbeit vorgenommen.

Neben der totalen Produktkonzentration für PHB und PHBV sowie der Zusammensetzung im Falle der Copolymer-Produktion ist auch die Qualität und die damit

verknüpften Verwendungsmöglichkeiten des Produkts von Interesse. Wie bereits in Abschnitt 2.1.2 beschrieben, hängen die thermischen und mechanischen Eigenschaften von unterschiedlichen Prozessfaktoren ab und können zum Teil stark variieren. Aus diesem Grund ist es von großer Wichtigkeit, die Modellansätze um eine Polymerisierungskinetik zu erweitern. Damit kann eine Kettenlängen- bzw. Molmassenverteilung für die Prozesse simuliert und die dazugehörigen Verteilungsmittelwerte sowie die Polydispersität berechnet werden. Die Verteilung und die dazugehörigen charakteristischen Werte sind wiederum stark korreliert mit den thermischen und mechanischen Materialeigenschaften des Polymers.

In dieser Arbeit wird eine erste Anbindung einer Polymerisierungskinetik an die Dynamik von Konzentrationsverläufen vorgestellt. Die Verknüpfung erfolgt über eine algebraische Zwangsbedingung, welche die totale Masse der Polymere aus einem Modell zur Beschreibung der Konzentrationsverläufe mit den Polymermassen aus der Polymerisierungskinetik in Einklang bringt. Der entstehende Multiskalen-Ansatz ist für beide Polymertypen angewendet worden. Die Parameter der Polymerisierungskinetik wurden zunächst aus der Literatur entnommen [80] und nicht an experimentelle Kettenlängenverteilungen angepasst. Aus diesem Grund kann der Abgleich der simulierten und experimentellen Verteilungen nur qualitativ erfolgen. Für eine quantitative Vorhersage sollten zukünftig sowohl das Messverfahren verbessert als auch die Parameter der Polymerisierungskinetik angepasst werden. Bei der Messung mittels GPC sollten die „wahren“ Molmassen der Polymere durch die Hinzunahme einer molmassensensitiven Messung mit einem Viskosimeter oder einem Lichtstreuendetektor bestimmt werden, um eine exakte Kettenlängenverteilung zu erhalten. Für die Anpassung der Parameter sollte zunächst eine Identifikation dieser auf Basis von vorhandenen Daten vorgenommen werden. Da bereits in einer früheren Arbeit gezeigt wurde, dass die Ratenkonstanten von den Substratkonzentrationen im Medium abhängig sind [76], sollte zukünftig überprüft werden, ob weitere Konstanten der Polymerisierungskinetik variabel gestaltet werden müssen. Nach entsprechender Anpassung ist die Onlineverfolgung oder sogar Regelung von der Polymerzusammensetzung sowie der Molmassenverteilung der Ketten möglich. Die in dieser Arbeit entwickelten Multiskalen-Modelle liefern somit einen wichtigen Baustein für die Gestaltung einer optimalen, auf die Anwendung angepassten Produktion von PHAs. Ein Vergleich der experimentellen Kettenlängenverteilungen aus dem Prozess mit Fruktose und Acetat zur PHB-Produktion und dem PHBV-Produktionsprozess mit Fruktose und Propionsäure zeigt, dass die Molekulargewichtsverteilung in beiden Fällen im Bereich zwischen 10^6 und 10^7 g/mol geschätzt wird (Abbildung 2.41). Die experimentellen PHBV-Verteilungen besitzen jedoch mehr hochmolekulare Polymerketten. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Kohlenstoffquelle eine wichtige Prozessgröße zur Einstellung von Polymereigenschaften darstellt. Zukünftige Arbeiten sollten sich mit der Identifikation von weiteren sensitiven Prozessgrößen beschäftigen, um während der Produktion von PHAs gezielt die Kettenlängenverteilung beeinflussen zu können.

3. Influenza-A-Impfstoffproduktion

In diesem Kapitel wird eine Methodologie zur Vorhersage der Produktivität von genetisch modifizierten Zellkulturen am Beispiel der IAV-Herstellung für Impfstoffe entwickelt. Im folgenden Abschnitt wird zunächst ein Überblick über die Produktion von Influenza-Impfstoffen gegeben. Darin wird auf die Klassifikation von Influenzaviren sowie die bekannten molekularbiologischen Vorgänge der Virusvermehrung in Wirtszellen eingegangen. Im Anschluss daran werden Influenza-Impfstoffe und mögliche Produktionssysteme genauer beschrieben und verglichen. Schließlich werden ausgewählte zelluläre Wirtszellfaktoren und deren Einfluss auf den viralen Replikationszyklus näher erläutert.

Im anschließenden Abschnitt werden die Grundlagen zur Bildung des verwendeten Multiskalen-Modells eingeführt. Dabei wird besonders auf das intrazelluläre Modell der Virusreplikation und die verwendete Populationsbilanz in kontinuierlicher Form eingegangen.

Im Abschnitt 3.3 wird zunächst die allgemeine simulationsbasierte Methodologie zur Untersuchung des Einflusses von Genveränderungen auf die Produktivität von zellkulturbasierten Prozessen vorgestellt. Schließlich wird der Einfluss von einfachen und mehrfachen Genüberexpressionen in A549-Wirtszelllinien auf die IAV-Ausbeute untersucht. In einer abschließenden Zusammenfassung wird auch auf zukünftige Anwendungsfelder der Methodologie unter Verwendung von Multiskalen-Ansätzen eingegangen.

Die Ergebnisse dieses Teils wurden in einem Konferenzartikel zur *7th International Conference on the Foundations of Systems Biology in Engineering* [44] und einem weiteren Journalartikel in der Zeitschrift *PLoS Computational Biology* [43] veröffentlicht.

3.1. Biotechnologische Grundlagen

3.1.1. Klassifizierung und Aufbau von Influenza-A-Viren

Influenzaviren gehören zur Familie der *Orthomyxoviridae*. Sie besitzen ein einzelsträngiges segmentiertes Genom bestehend aus Ribonukleinsäuren mit negativer Polarität und werden in die Suptypen A, B, C und D eingeteilt [91]. Im Fokus dieses Abschnitts stehen Influenza-A-Viren (IAVs), welche für den Impfstoffproduktionsprozess von hoher Wichtigkeit sind und anhand der viralen Oberflächenproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) noch in weitere Untergruppen eingeteilt werden können. Bisher sind 18 HA- und 11 NA-Varianten bekannt [29]. Demzufolge werden IAV-Isolate wie folgt benannt: Virustyp/Wirt/Standort/Isolatnummer/Jahr/HA- und NA-Subtyp [10]. IAVs sind besonders für die Impfstoffproduktion relevant, da

eine Vielzahl unterschiedlicher Wirte, wie zum Beispiel Schweine, Pferde, Vögel oder Menschen, infiziert werden können und diese häufig schwere Verläufe auslösen. Somit tragen IAVs erheblich zur Entstehung saisonaler Grippe-Epidemien und -Pandemien bei, denen mit einer jährlich angepassten Impfstoffproduktion begegnet wird (siehe Abschnitt 3.1.3) [139].

IAVs sind ca. 100 nm groß und besitzen eine Lipiddoppelschicht mit drei Transmembranproteinen: HA, NA und dem Ionenkanal M2 (Matrixprotein 2, siehe Abbildung 3.1A). Unter der äußeren Hülle befindet sich eine weitere Abgrenzung zum Virionkern bestehend aus dem Matrixprotein 1 (M1 Protein) [29]. Wie in Abbildung 3.1A zu sehen ist, besteht das Genom aus acht viralen Ribonukleoprotein-Komplexen (vRNPs). Zusätzlich zu den vRNP-Komplexen sind geringe Mengen des nukleären Exportproteins (NEP) im Virionkern zu finden. Der Aufbau eines vRNPs ist im Detail in Abbildung 3.1B dargestellt. Ein vRNP besteht aus einem der acht viralen RNAs (vRNA, Abbildung 3.1C), daran angelagerten Nukleoproteinen (NPs) und einer RNA-Polymerase (RdRP). Die RNA-Polymerase setzt sich aus zwei basischen Untereinheiten (PB1, PB2) und einer sauren Untereinheit (PA) zusammen. In Abbildung 3.1B ist ein vRNP im Detail dargestellt. Aufnahmen mit einem Elektronenmikroskop zeigen, dass die vRNPs in der Virushülle in einer 7+1 Formation angeordnet sind [118]. Die Anordnung ist schematisch in Abbildung 3.1B/rechts dargestellt. Die acht vRNA-Segmente für die Bildung von vRNPs sind der Länge nach nummeriert und codieren zehn essentielle Virusproteine sowie mehrere Stamm-spezifische zusätzliche Virusproteine. Durch alternative Leserahmen und Spleiß-Varianten können auf einem Genomsegment mehrere Virusproteine codiert sein. Welche unterschiedlichen mRNAs aus den acht Gensegmenten transkribiert werden, ist in Abbildung 3.1C durch die Farbgebung gekennzeichnet. Details der viralen Replikation werden im folgenden Abschnitt schrittweise erläutert.

3.1.2. Replikationszyklus von Influenza-A-Viren

Ein Überblick über die virale Replikation liefert die Abbildung 3.2, deren Schritte im Folgenden genauer erläutert werden. Für die Vermehrung eines Influenzavirus muss das Viruspartikel zunächst in die Wirtszelle gelangen, um dort die zelluläre Transkriptions- und Translationsmaschinerie ausnutzen zu können. Für die erfolgreiche Anlagerung eines Virus an die Wirtszelle binden die HA-Proteine auf der Oberfläche des Virus an Sialinsäure-Rezeptoren auf der Wirtszelloberfläche. Nach erfolgreicher Anlagerung wird das Viruspartikel durch Endozytose aufgenommen. Die Freisetzung der vRNPs ins Zytoplasma der Wirtszelle erfolgt durch Ansäuerung des endosomalen Vesikels auf einen pH-Wert zwischen 5 und 6 [13]. Dies hat zur Folge, dass die HA-Proteine ihre Konformation ändern und die M2-Ionenkanäle geöffnet werden. Durch die Konformationsänderung der HA-Moleküle können die virale und endosomale Membran fusionieren. Der Anstieg der Protonenkonzentration innerhalb des Virus löst die Dissoziation der vRNPs zur Virionenmatrix aus. Beide Effekte sorgen schließlich für die Freisetzung des vRNPs ins Zytoplasma der Zelle. Der anschließende Import in den Zellkern erfolgt über einen Importin- α -Importin- β 1-abhängigen Weg [10].

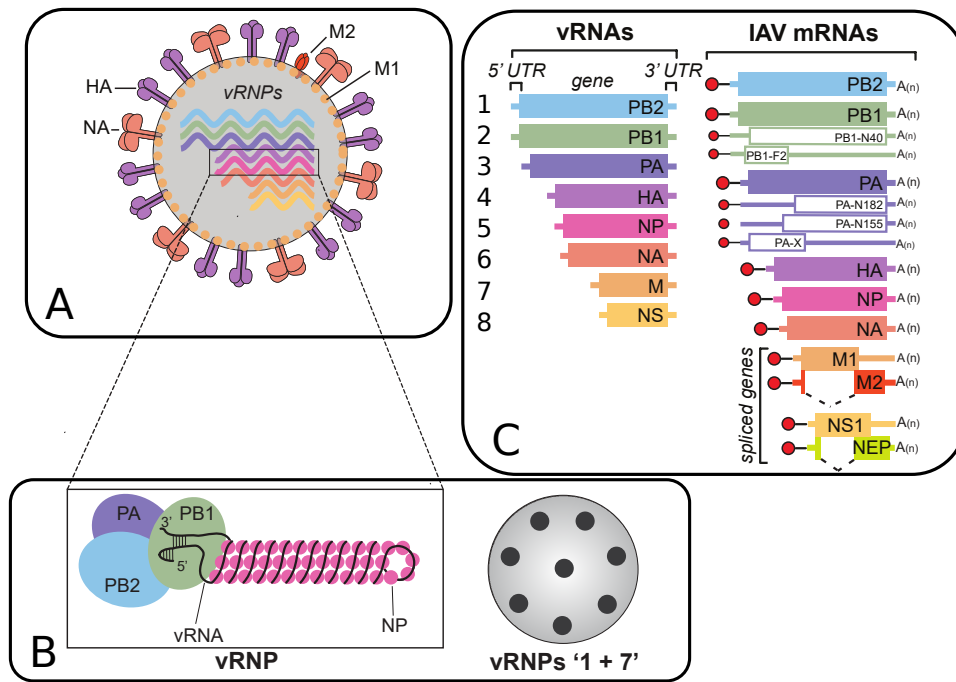


Abbildung 3.1.: Aufbau eines IAVs sowie Einteilung der Segmente. Die Abbildung wurde aus [29] adaptiert.

Im Zellkern angelangt, wird die vRNA aus dem vRNP als Vorlage zur Synthese von mRNA und cRNA genutzt. Das Virus verwendet hierfür die trimere virale Polymerase RdRp. Für die Transkription bindet die PB2-Untereinheit der RdRp an das 5'-Ende vorhandener Wirtszell-mRNA. Die saure Untereinheit PA schneidet 10-15 Nukleotide vom 5'-Ende entfernt einen Teil der zellulären mRNA ab. Dieser Vorgang wird als *Cap Snatching* bezeichnet [136]. Die kurzen zelleigenen Nukleotid-Sequenzen dienen im Folgenden als Primer für die Synthese der viralen mRNA [48] und sind bei den mRNAs in der Abbildung 3.1C als rote Kugeln dargestellt. Zusätzlich zum *Cap Snatching* benötigt die virale mRNA eine Polyadenylierung (A(n)), um später am Ribosom effizient translatiert zu werden. Diese wird durch die Umschreibung einer Uracil-reichen Region in der vRNA erzeugt und ist Teil jeder viralen mRNA. Nach erfolgreicher Transkription finden noch weitere posttranskriptionale Modifikationen wie z.B. das Spleißen der mRNA statt [48, 136]. Schließlich wird die mRNA aus dem Nukleus exportiert und zu den zellulären Ribosomen transportiert. Dort findet die Translation neuer Virusproteine statt. Nach der Synthese der viralen Proteine werden die an der Bildung der Virionhülle und der vRNPs beteiligten Proteine wieder zurück zum Zellkern transportiert. Die Hüllproteine HA, NA und M2 werden über das endoplasmatische Retikulum (ER) und den Golgi-Apparat zur Zellmembran transportiert. Am ER finden dabei noch Faltungsprozesse und posttranslationale Modifikationen statt.

Neben der Synthese der mRNA findet im Zellkern die Synthese der cRNA statt, einer komplementären Variante der vRNA. Die cRNA dient als Vorlage für neue

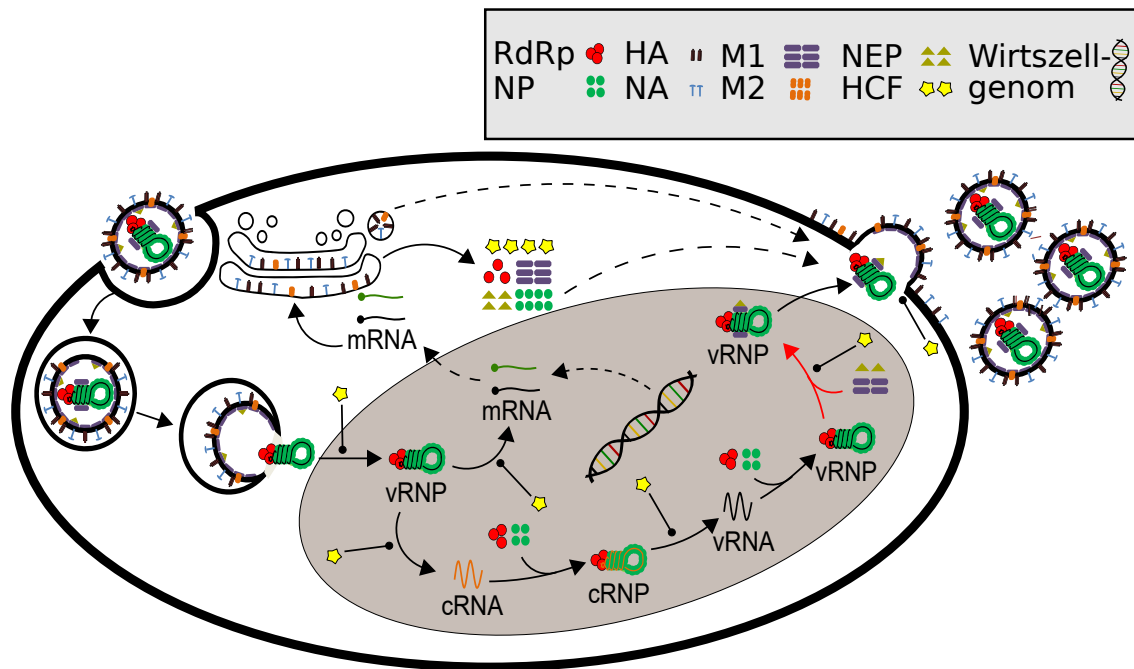


Abbildung 3.2.: Replikationszyklus eines IAVs angepasst nach [63]. Die Beschreibung der einzelnen Schritte sind dem Text zu entnehmen.

vRNA, deren Synthese Primer-unabhängig stattfindet und keiner Polyadenylierung bedarf. Wie die zeitliche Abfolge bei der Synthese der mRNA und cRNA gestaltet ist, ist noch nicht gänzlich geklärt. Vreede und Kollegen postulieren einen parallel ablaufenden Prozess, wobei synthetisierte cRNAs solange durch zelluläre Nukleasen abgebaut werden, bis ausreichend neue Virusproteine für die vRNP-Bildung im Zellkern vorhanden sind [167]. Die viralen Proteine stabilisieren und schützen die cRNA (cRNP in der Abbildung 3.2), sodass eine Transkription zu vRNA möglich wird. Eine andere Forschungsarbeit konnte die Existenz kleiner regulatorischer viraler RNAs nachweisen, die ein Umschalten zwischen Transkriptase- und Replikaseaktivität der RdRp steuern. Diese Entdeckung unterstützt die Theorie, dass zunächst die mRNA-Synthese und erst im Anschluss die cRNA-Synthese stattfindet [128]. Schließlich wird der Abtransport neuer vRNPs aus dem Zellkern über das zelluläre *chromosomal maintenance 1* Exportprotein durch nukleäre Transportsequenzen in M1 und NEP eingeleitet. Nach erfolgreichem Export findet der Transport durch die zytoplasmatische Matrix hin zu *lipid-raft* Domänen der Zellmembran statt. Dieser Transport ist ein hochkomplexer Vorgang, dessen Schlüsselfaktoren noch Bestandteil aktueller Forschungen sind [29]. Sobald alle Komponenten an der Zellmembran angekommen sind, ist es wichtig, dass jedes neue Viruspartikel alle acht vRNPs enthält. Möglicherweise wird die Selektion der vRNPs über die spezifischen, nicht-codierten Sequenzen an beiden Ende jedes Segments koordiniert, sodass jedes neue Viruspartikel ein komplettes Genom erhält [52]. Nach dem Assemblieren aller Virusbestandteile wird der Knospungsprozess durch die Krümmung der Wirtszellmembran eingeleitet.

Damit eine Wiederanlagerung des Virus durch die Interaktion der viralen HA-Proteine mit zellulären Sialinsäuren vermieden wird, werden die Sialinsäuren durch das virale NA-Protein gespalten und es kommt zur Freisetzung neuer Viruspartikel [138]. Während der viralen Replikation wird unter anderem auch das Nichtstrukturprotein 1 (NS1). Diese besitzt regulatorische Funktionen, um beispielsweise zelluläre Interferonantworten während der Virusvermehrung abzuwehren [66].

3.1.3. Auswahl und Zusammensetzung des Impfstoffs

Impfung ist die kosteneffizienteste und einfachste Methode zur Vermeidung von Influenzainfektionen. Generell soll eine erfolgreiche Impfung die Produktion von neutralisierenden Antikörpern gegen das Virus anregen, sodass im Fall einer Infektion eine schnelle Aktivierung des Immunsystems erfolgen kann. Für die Produktion der heutzutage üblichen Influenzaimpfstoffe gibt die *World Health Organisation* (WHO) eine jährliche Empfehlung heraus, gegen welche Stämme der saisonale Grippeimpfstoff schützen soll. Die Empfehlung wird auf Grundlage klinischer Patientenproben, mit Symptomen ausgelöst durch Influenza, getroffen. Aktuell sind trivalente (Schutz gegen zwei IAV-Varianten und eine Influenza-B-Virus (IBV)-Variante) und quadrivalente (Schutz gegen zwei IAV-Varianten und zwei IBV-Varianten) auf dem Markt erhältlich. Der Trend geht jedoch in Richtung der Vierfach-Impfstoffe, da seit 1985 zwei unabhängige IBV-Varianten kursieren, die sehr gefährlich für den Menschen sind. Die Stämme C und D werden bei der Zusammensetzung des Impfstoffs nicht berücksichtigt. Der Subtyp C bewirkt im Menschen in der Regel nur sehr milde Verläufe und sind aus diesem Grund unerheblich für die Entwicklung saisonaler Grippe-Epidemien und -Pandemien. Gleiches gilt für den Subtyp D, der erst 2011 entdeckt und bisher nur in einigen wenigen Serumproben im Menschen nachgewiesen wurde [156, 161].

Die Zusammensetzung des Impfstoffs muss jährlich neu bewertet werden, da sich Influenzaviren rasend schnell verändern. Dies liegt zum einen an der Populationsgröße und der kurzen Generationszeit der Viren, aber auch an der hohen Mutationsrate durch die fehlende Korrekturfunktion der viralen Polymerase. Im Schnitt tritt pro repliziertem Genom eine Mutation auf, was bei einer infizierten Zelle ca. 10 000 mutierte Nachkommen bedeutet [30]. Durch Mutationen der HA- und NA-Proteine verändert sich die äußere Erkennungsstruktur des Virus. Dadurch werden Antikörper wirkungslos, die gegen „veraltete“ bzw. andere Strukturen gebildet wurden. Diese Art von Mutation wird als *antigenic drift* bezeichnet. Wie bereits erwähnt, können Influenzaviren eine Vielzahl unterschiedlicher Wirte befallen. In Zwischenwirten wie Schweinen oder Hühnern ist eine Mischung von Sequenzen verschiedener Influenzavarianten sehr wahrscheinlich. Denn auf der Zelloberfläche dieser Wirtszellen befinden sich sowohl α -2,3- als auch α -2,6-Sialinsäureverbindungen. Damit können unterschiedliche Subtypen Zugang zur Wirtszelle finden. Der Effekt der Vermischung von Segmenten unterschiedlicher Influenzastämme wird als *antigenic shift* bezeichnet. Zusätzlich zum *antigenic drift* und *shift* finden immer wieder Rekombinationen von RNA-Fragmenten statt, wodurch zusätzlich neue virulente Stämme entstehen können. Die übliche Herangehensweise bei heutigen Influenzaimpfstoffen beruht auf der Gabe

von Spalt- bzw. Untereinheiten von Antigenen. Hierbei erfolgt nach der Produktion von passenden Viruspartikeln die Aufspaltung durch Diethylether oder andere Detergenzien. Ein Spaltprodukt-Impfstoff umfasst alle viralen Proteine, allerdings keine vRNA. Durch die Zerstörung der Virusstruktur und Entfernung der vRNA wird die Immunogenität des Impfstoffs leicht abgeschwächt, ist jedoch noch ausreichend für die Induktion der Antikörperproduktion nach Verabreichung. Bei Impfstoffen aus Untereinheiten werden die HA- und NA-Proteine von den restlichen Spaltprodukten getrennt und für die Induktion der Immunantwort verwendet. Hier müssen in der Regel Adjuvantien hinzugesetzt werden, um eine ausreichende Antikörperproduktion auszulösen. Neben den üblichen Impfstoffen aus Spalt- und Untereinheiten des Virus ist es auch möglich, Virosomen oder inaktivierte vollständige Viren als Impfstoff einzusetzen [172]. Einige wenige verfügbare Impfstoffe nutzen sogar nur abgeschwächte Stämme (engl. *live attenuated*) als Impfstoff, welche intranasal verabreicht werden und so eine Immunantwort am natürlichen Infektionsort hervorrufen. Neuartige Impfansätze beschäftigen sich mit der Antikörperbildung gegen konservierte Epitope des Virus, wie z.B. der Hals-Region des HA-Proteins [148]. Diese Regionen werden weniger häufig bei der Veränderung des Virus ausgetauscht und können so als Bestandteile universeller Impfstoffe verwendet werden.

Für die Weiterverarbeitung der Viruspartikel zum Impfstoff müssen diese zunächst in einem biotechnologischen Prozess in ausreichender Menge produziert werden. Die unterschiedlichen industriell relevanten Produktionssysteme werden im nächsten Abschnitt genauer beleuchtet.

3.1.4. Produktionssysteme

Die zwei wichtigsten Plattformen für die Influenzavirus-Produktion sind Hühnereier und Zellkulturen. Im Vorfeld zum eigentlichen Produktionsprozess wird durch klassisches Reassortment oder Methoden der reversen Genetik ein saisonales Saatvirus mit guten Wachstumseigenschaften erzeugt. Im Anschluss kann das Saatvirus zur Infektion von verschiedensten Wirtszellen verwendet werden, um so neue Viren zu produzieren.

Die Produktion in Hühnereiern wurde bereits 1945 in den USA lizenziert [50] und gilt als klassische Methode zur Herstellung von Influenzaviren. Dabei wird die Allantois von 11 bis 12 Tagen befruchteten Eiern mit dem zu vermehrenden Virusstamm infiziert und 48 h inkubiert. Nach Abkühlung auf 4 °C erfolgt die Entnahme und Aufarbeitung der infizierten Flüssigkeit. Bei der Durchführung dieser klassischen Methode ergeben sich jedoch eine Reihe von Nachteilen. Hühnereier sind anfällig für andere Pathogene und aus diesem Grund dürfen nur die Eier speziell zertifizierter und engmaschig überprüfter Hühnerherden für die Impfstoffproduktion verwendet werden. Influenzaviren, die Geflügel infizieren, gelten als besondere Bedrohung für solche Herden. Des Weiteren ist eine hohe Anzahl an Eiern erforderlich, da pro Impfdosis ein bis zwei Eier benötigt werden [60]. Aus diesem Grund kann mit dem Verfahren basierend auf Hühnereiern nur langsam mehr Impfstoff im Falle einer plötzlich gestiegenen Nachfrage produziert werden. Weiterhin kann es bei der Gabe des Impfstoffs trotz intensiver Aufreinigungsverfahren zu Unverträglichkeiten gegenüber

Ei-Proteinen kommen.

Die Produktion basierend auf Zellkulturen ist eine geeignete Alternative zum klassischen Verfahren mit vielen Vorteilen. So weist die zellkulturbasierte Impfstoffproduktion eine hohe Flexibilität bzgl. der Steigerung von Produktionskapazitäten auf, da hier keine Hühnereier zur Vermehrung benötigt werden [148]. Weiterhin kann mit Impfstoffen, produziert in Säugerzellen, eine vergleichsweise höhere Schutzwirkung erzielt werden [175]. Zusätzlich zeigen in Zellkultur produzierte Viren keine Veränderung nach dem Passagieren, während es beim klassischen Verfahren vermehrt zu Veränderungen im HA-Protein kommt [115]. Bisher sind zwei Zellkulturen für die Influenzaimpfstoff-Produktion zugelassen: Madin-Darby Canine Kidney (MDCK, Ursprung: Hundeniere)- und Vero-Zellen (Ursprung: Affeniere). MDCK-Zellen sind vielseitig anwendbar, da viele Influenzavarianten sich gut in diesen Zellen vermehren können. Die Virustiter von Virusvarianten adaptiert in Hühnereiern und vermehrt mit MDCK als Wirtszelle erreichen ähnliche Werte wie beim hühnereibasierten Verfahren. Vero-Zellen sind geeignet, da mit dieser Zellkultur bereits viel Erfahrung aus anderen Impfstoffprozessen (z.B. Impfstoff gegen Tollwut oder Polio) gesammelt werden konnte. Hier sind allerdings Adaptionsprozesse notwendig, da sich nicht alle Influenzavarianten gut in Vero Zellen vermehren. Weitere Zellkulturkandidaten in der Entwicklungsphase, wie EB66, PER.C6 oder CAP, werden die zukünftige Flexibilität der zellkulturbasierten Impfstoffproduktion noch weiter erhöhen [57]. Zellkulturen wie A549 spielen in der industriellen Impfstoffproduktion kaum eine Rolle, stellen aber eine wichtige Forschungsplattform bei der Untersuchung zellulärer Einflussfaktoren während der Vermehrung von Influenzaviren dar [74].

3.1.5. Zelluläre Faktoren zur Steigerung der Virusreplikation

Der virale Replikationszyklus hängt stark von der Transkriptions- und Translationsmaschinerie der Wirtszelle ab. Bis auf einige bereits erforschte Zusammenhänge, wie beispielsweise der Interaktion des viralen NPs mit dem zellulären Importin- α [108], ist nur wenig über den Beitrag von Wirtszellproteinen zur Virusreplikation bekannt [66]. Mit der Entwicklung der RNAi-Technik ist es möglich geworden, genomweite Analysen zur Identifikation von zellulären Faktoren auf die Virusausbeute vorzunehmen [11, 74, 90]. Die Entwicklung von antiviralen Therapien stand dabei zunächst im Vordergrund. Bei der RNAi-Technik wird mithilfe von *small interfering RNAs* (siRNAs) die gezielte Spaltung von mRNA durch Bindung an den Enzymkomplex RISC (*RNA-induced silencing complex*) herbeigeführt [15].

Auf Basis eines RNAi-Screenings aus [74] sowie weiterer verfügbarer Untersuchungen wie zum Beispiel in [56] und [158] wurden in dieser Arbeit fünf vielversprechende Wirtszellfaktoren für die Generierung von Überexpressionszelllinien ausgewählt [99]. Diese Überexpressionszelllinien werden im Rahmen dieser Arbeit für die modellbasierte Analyse genutzt. Das bekannte Wissen über die Funktionalität der Wirtszellfaktoren während der Influenza-Replikation soll im Folgenden kurz beleuchtet werden.

Nach Infektion von A549-Zellen mit IAV interagiert das Zelladhäsions-Protein **CEA-CAM6** (*Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 6*) mit viralem NA und aktiviert Signalwege, die eine anti-apoptotische Wirkung besitzen [56]. Neue-

re Untersuchungen zeigen, dass CEACAM6 ebenso als Rezeptor für die Anlagerung neuer Viruspartikel fungieren kann [131].

Der Faktor **FANCG** (*Fanconi anemia complementation group G*) ist in zelluläre Prozesse zur Reparatur von DNA involviert [22]. Während der viralen Replikation nach Infektion von A549-Zellen mit IAV wurde eine Interaktion des Faktors mit den Untereinheiten der viralen Polymerase nachgewiesen [158]. Dabei konnte der direkte Einfluss dieses Faktors auf die Aktivität der Polymerase sowohl durch *knock out* als auch durch Überexpression des codierenden Gens gezeigt werden. Wie FANCG ist auch **XAB2** (*XPA-binding protein 2*) an DNA-Reparaturmechanismen beteiligt. Bisher gibt es für diesen Faktor kaum Studien, die den Einfluss von XAB2 während IAV Infektionen genauer beleuchten. Lediglich das RNAi-Screening in [74] weist auf eine Schlüsselrolle von XAB2 in der viralen Replikation hin.

Der Rezeptor **NXF1** (*Nuclear RNA Export Factor 1*) ist am Transport viraler mRNA vom Zellkern in das Zytosol beteiligt [135]. Eine Studie in der NXF1 in A549 inhibiert wurde, zeigt einen beeinträchtigten Transport der viralen mRNAs für NP, HA und NA [98]. Weiterhin konnte im RNAi-Screening in [74] nach dem Einbringen von siRNA für das NXF1 Gen ein deutlich reduzierter Virustiter verzeichnet werden. Die **PLD2** (*Phospholipase D2*) ist ein Enzym, welches eine Schlüsselrolle bei Reorganisation des Zytoskeletts einnimmt, um beispielsweise den Transport zellulärer Komponenten zur Membran zu gewährleisten [21]. In [121] konnte nach Infektion mit IAV eine erhöhte PLD2 Aktivität in A549 Zellen nachgewiesen werden. Demzufolge scheint auch der Transport viraler Komponenten von PLD2 abzuhängen. In der gleichen Studie konnten eine deutlich verzögerte Virusaufnahme sowie reduzierte Virustiter detektiert werden, wenn A549-Zellen mit inhibierten PLD2 als Wirtszellen verwendet wurden.

Wie der Überblick zeigt, unterstützen die ausgewählten Wirtszellfaktoren die virale Replikation an sehr unterschiedlichen Stellen, wie zum Beispiel bei der Anheftung, der Transkription oder beim intrazellulären Transport. Demzufolge sind die Gene dieser Wirtszellfaktoren sehr gute Kandidaten für die Entwicklung von Überexpressionszelllinien und anschließende Untersuchungen derer bezüglich der Virusausbeute nach Infektion mit IAV. Eine gute Zusammenfassung über die experimentellen Ergebnisse bei Verwendung dieser Überexpressionszelllinien, welche auch in dieser Arbeit genutzt wurden, ist in [99] gegeben.

3.2. Theoretische Grundlagen

3.2.1. Replikationskinetik auf Einzelzellebene nach Heldt et al. [62, 63]

Der in dieser Arbeit entwickelte Multiskalen-Ansatz zur Beschreibung der Populationsdynamik von heterogenen Zellkulturen basiert auf einem Modell zur Beschreibung der Replikationskinetik auf Einzelzellebene von Heldt et al. [62, 63]. Die Modellgleichungen sowie Beschreibungen der modellierten Vorgänge werden im Folgenden dargestellt. Ein Überblick liefert die Abbildung 3.3.

Für die Produktion von IAV in Zellkulturen ist es nötig, ein komplettes Virusgenom in Form von vRNPs in die Wirtszelle einzubringen. Die zelleigene Synthesemaschinerie wird anschließend genutzt, um neue Viruspartikel zu generieren. Der Vorgang, beginnend mit der Anheftung und Endozytose der Viren und endend mit der Freilassung neuer Viren, wird auch als viraler Lebenszyklus bezeichnet. Da die Anheftung und Einbringung in die Wirtszelle außerhalb der Zelle stattfinden und auf unterschiedliche Weise modelliert werden kann [39, 62, 63], wird hier nur der Teil innerhalb der Zelle vorgestellt. Die vRNPs im Zytosol können wie folgt beschrieben werden:

$$\frac{dV_p^{cyt}}{dt} = -k^{Imp} V_p^{cyt}. \quad (3.2.1)$$

Sobald die vRNPs V_p^{cyt} , bestehend aus vRNA, RdRp und NPs im Zytosol angelangt sind, werden diese mit der Ratenkonstante k^{Imp} in den Nukleus transportiert. Die Differentialgleichung für vRNP im Nukleus ist:

$$\frac{dV_p^{nuc}}{dt} = k^{Imp} V_p^{cyt} + k_{NP}^{Bind} P_{NP} R_{RdRp}^V - \left(k_{M1}^{Bind} P_{M1} + k_{Rnp}^{Deg} \right) V_p^{nuc}. \quad (3.2.2)$$

Nach erfolgreichem Transkribieren der vRNA werden im Nukleus neue vRNPs durch Anlagerung von NP (P_{NP}) an die virale Polymerase gekoppelt mit vRNA (R_{RdRp}^V) mit der Ratenkonstante k_{NP}^{Bind} zur Verfügung gestellt. Die Menge an vRNP im Nukleus nimmt durch die Assoziation mit dem M1-Protein (P_{M1}) mit der Ratenkonstante k_{M1}^{Bind} ab. Darüber hinaus degradiert ein geringer Anteil an vRNP im Nukleus mit k_{Rnp}^{Deg} .

Weiterhin ist die Synthese von mRNA und vRNA im Nukleus erforderlich, um neue Viruspartikel zu generieren. Die Gleichungen zur Beschreibung der vRNA-Synthese lauten:

$$\frac{dR^C}{dt} = k_C^{Syn} V_P^{nuc} - k_{RdRp}^{Bind} P_{RdRp} R^C - k_R^{Deg} R^C, \quad (3.2.3)$$

$$\frac{dR^V}{dt} = k_V^{Syn} C_P - k_{RdRp}^{Bind} P_{RdRp} R^V - k_R^{Deg} R^V. \quad (3.2.4)$$

Zunächst wird eine Kopie der vRNA mit k_C^{Syn} transkribiert; die komplementäre positiv-strängige RNA (cRNA, R^C). Die cRNA wird mit der Ratenkonstante k_{RdRp}^{Bind} an einen neuen Polymerasekomplex (P_{RdRp}) gebunden und kann mit der Ratenkonstante k_R^{Deg} abgebaut werden. Analog erfolgt dies auch mit der vRNA (R^V). Die

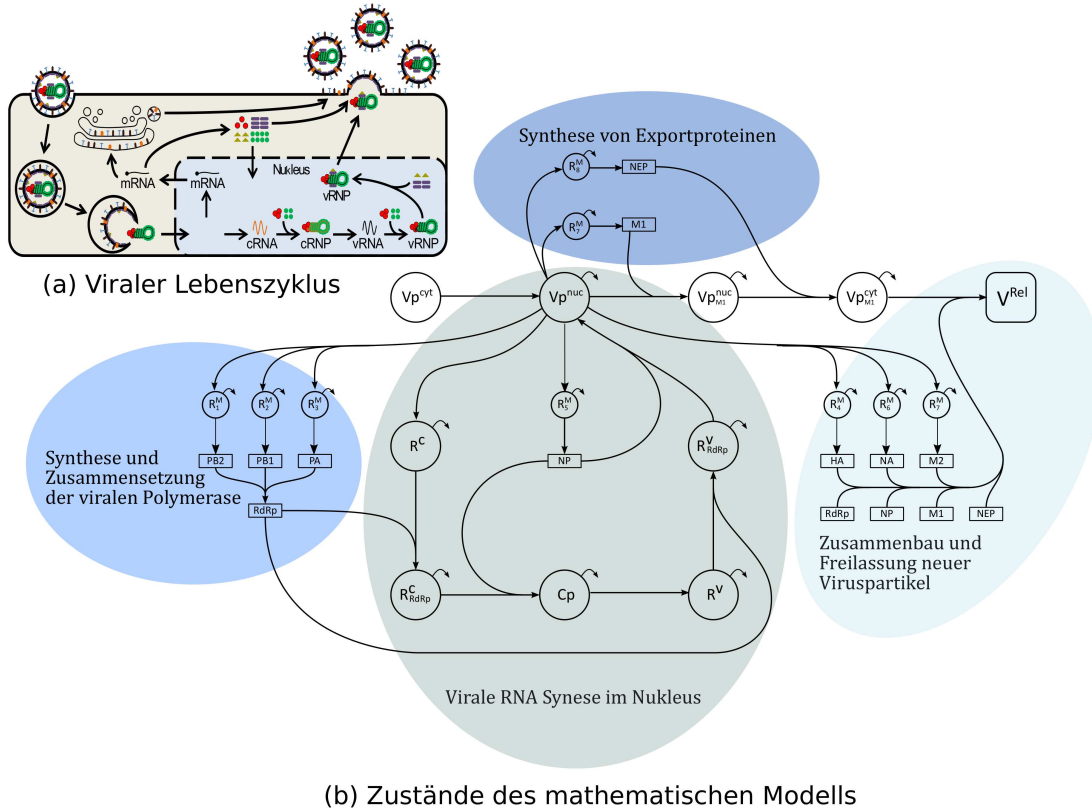


Abbildung 3.3.: Viraler Replikationszyklus von IAVs basierend auf [63]. Nach der Anheftung und Aufnahme der infektiösen Viruspartikel wird das virale Genom in Form von vRNPs ins Zytoplasma abgegeben und gelangt auf diesem Weg in den Nukleus. Im Nukleus wird die virale mRNA, cRNA und vRNA synthetisiert. Während die virale mRNA aus dem Nukleus transportiert wird um regulatorische Proteine zu synthetisieren, wird die cRNA und vRNA von der heterotrimeren viralen Polymerase und einigen NP Proteinen umschlossen. Sie formen somit cRNP und vRNP. Die Translation der viralen Proteine aus der mRNA findet im Zytoplasma statt. Schließlich werden alle Bestandteile an der Plasmamembran assembliert und ein neues Viruspartikel wird in die Kultur abgegeben.

Synthese von vRNA mit k_V^{Syn} erfolgt nach der Komplexbildung bestehend aus cRNA, der Polymerase RdRp und NP (C_P). Dafür muss die cRNA zunächst an einen Polymerasekomplex binden und anschließend an NP. Folgende zwei Differentialgleichungen beschreiben diesen Vorgang:

$$\frac{dR_{RdRp}^C}{dt} = k_{RdRp}^{Bind} P_{RdRp} R^C - k_{NP}^{Bind} P_{NP} R_{RdRp}^C - k_{RRdRp}^{Deg} R_{RdRp}^C, \quad (3.2.5)$$

$$\frac{dC_P}{dt} = k_{NP}^{Bind} P_{NP} R_{RdRp}^C - k_{Rnp}^{Deg} C_P. \quad (3.2.6)$$

Nach erfolgreicher Synthese von vRNA erfolgt das Assemblieren von vRNP. Auch hier lagert sich zunächst die Polymerase RdRp an:

$$\frac{dR_{RdRp}^V}{dt} = k_{RdRp}^{Bind} P_{RdRp} R^V - k_{NP}^{Bind} P_{NP} R_{RdRp}^V - k_{RRdRp}^{Deg} R_{RdRp}^V. \quad (3.2.7)$$

Nach der Anlagerung von NP mit der Ratenkonstante k_{NP}^{Bind} ist ein vRNP (V_P^{nuc}) gebildet worden. Analog zur Anlagerung an cRNA ist auch hier eine Degradation mit k_{RRdRp}^{Deg} berücksichtigt.

Nun wird zunächst das Matrixprotein M1 an vRNP gebunden und im Anschluss das Protein NEP assembliert, um die Freilassung ins Zytosol zu veranlassen:

$$\frac{dV_{P,M1}^{nuc}}{dt} = k_{M1}^{Bind} P_{M1} V_P^{nuc} - \left(k^{Exp} P_{NEP} + k_{Rnp}^{Deg} \right) V_{P,M1}^{nuc}, \quad (3.2.8)$$

$$\frac{dV_{P,M1}^{cyt}}{dt} = k^{exp} P_{NEP} V_P^{nuc} - 8 r^{Rel} - k_{Rnp}^{Deg} V_{P,M1}^{cyt}. \quad (3.2.9)$$

Die Bildung des Komplexes aus vRNA, M1 und NEP löst den Export ins Zytosol mit der Ratenkonstante k^{Exp} aus. In der Rate r^{Rel} wurden die Vorgänge für die Assemblierung und die Freilassung zusammengefasst. Es wird angenommen, dass jedes Viruspartikel 8 vRNPs erhält [66]. Die Differentialgleichung für neue/freie Viruspartikel lautet wie folgt:

$$\frac{dV_f}{dt} = r^{Rel}. \quad (3.2.10)$$

Die Freilassungsrate r^{Rel} ist wie folgt definiert [62]:

$$r^{Rel} = k^{Rel} \frac{V_{P,M1}^{cyt}}{V_{P,M1}^{cyt} + 8 K_{Vrel}} \prod_j \frac{P_j}{P_j + N_{P_j} K_{Vrel}} \quad (3.2.11)$$

mit $jj \in \{RdRp, P_{HA}, P_{NP}, P_{NA}, P_{M1}, P_{M2}, P_{NEP}\}$.

Für die Freilassung eines neuen Viruspartikels sind neben dem vRNP auch Virusproteine notwendig. Demzufolge gehen sowohl vRNP assembliert mit M1 als auch die Virusproteine multiplikativ als Michaelis-Menten-Terme in die Definition der Freilassungsrate ein. Die Anzahl der Viren K_{Vrel} für eine halbmaximale Freilassungsrate wird dabei mit den durchschnittlichen Proteinabundanz N_j bzw. der vRNP-Anzahl pro Viruspartikel skaliert. Die unterschiedlichen Funktionen der Virusproteine PB1, PB2, PA, NP, M1, NEP, HA, NA und M2 sind im Abschnitt 3.1.2 beschrieben und können aus der im Nukleus gebildeten mRNA synthetisiert werden:

$$\frac{dR_i^M}{dt} = \frac{k_M^{Syn}}{L_i} \frac{V_P^{nuc}}{8} - k_M^{Deg} R_i^M \quad \text{mit } i = 1, \dots, 8. \quad (3.2.12)$$

Der nukleare Export von mRNA sowie der Transport zu den zytoplasmatischen Ribosomen gilt als schneller Prozess [49]. Deshalb wird angenommen, dass neu synthetisierte mRNA sofort für die Translation zur Verfügung steht. Die Ratenkonstante für die Synthese der mRNA k_M^{Syn} wird mit der Länge der einzelnen Segmente i (L_i) skaliert. Somit hat ein großes Segment eine langsamere Syntheserate als ein kleines. Weiterhin wird angenommen, dass die mRNA aller Segmente i mit der gleichen Ratenkonstante k_M^{Deg} abgebaut werden. Die Gleichungen für die Synthese der Untereinheiten der viralen Polymeraseeinheit RdRp können wie folgt definiert werden:

$$\frac{dP_{PB1}}{dt} = \frac{k_P^{Syn}}{D_{Rib}} R_2^M - k^{RdRp} P_{PB1} P_{PB2} P_{PA}, \quad (3.2.13)$$

$$\frac{dP_{PB2}}{dt} = \frac{k_P^{Syn}}{D_{Rib}} R_1^M - k^{RdRp} P_{PB1} P_{PB2} P_{PA}, \quad (3.2.14)$$

$$\frac{dP_{PA}}{dt} = \frac{k_P^{Syn}}{D_{Rib}} R_3^M - k^{RdRp} P_{PB1} P_{PB2} P_{PA}. \quad (3.2.15)$$

Die virale Polymeraseeinheit RdRp wird aus den drei Untereinheiten PB1, PB2 und PA mit der Ratenkonstante k^{RdRp} gebildet:

$$\begin{aligned} \frac{dP_{RdRp}}{dt} &= k^{RdRp} P_{PB1} P_{PB2} P_{PA} - k_{RdRp}^{Bind} P_{RdRp} (R^V + R^C) \\ &\quad - (N_{P_{RdRp}} - 8) r^{Rel}. \end{aligned} \quad (3.2.16)$$

Neben den RdRp Einheiten, die aktiv an der Synthese von cRNA und vRNA beteiligt sind, werden acht weitere Polymeraseeinheiten für die Freilassung eines Viruspartikels benötigt (Term $8 r^{Rel}$). Denn es wird angenommen, dass jedes neue Viruspartikel acht vRNPs besitzt. Zusätzlich dazu wird postuliert, dass weitere nicht an vRNA gebundene Polymerasen in einem Viruspartikel vorkommen ($N_{P_{RdRp}}$). Gleiches gilt für die Anzahl N_j der anderen viralen Proteine. Die Differentialgleichungen für die weiteren Proteine lauten:

$$\begin{aligned} \frac{dP_{NP}}{dt} &= \frac{k_P^{Syn}}{D_{Rib}} R_5^M - \frac{L_V}{N_{NP}^{nuc}} k_{NP}^{Bind} P_{NP} (R_{RdRp}^V + R_{RdRp}^C) \\ &\quad - \left(N_{P_{NP}} - 8 \frac{L_V}{N_{NP}^{nuc}} \right) r^{Rel}, \end{aligned} \quad (3.2.17)$$

$$\begin{aligned} \frac{dP_{M1}}{dt} &= \frac{k_P^{Syn}}{D_{Rib}} (1 - F_{Spl7}) R_7^M - \frac{L_V}{N_{M1}^{nuc}} k_{M1}^{Bind} P_{M1} V_P^{nuc} \\ &\quad - \left(N_{P_{M1}} - 8 \frac{L_V}{N_{M1}^{nuc}} \right) r^{Rel}, \end{aligned} \quad (3.2.18)$$

$$\begin{aligned} \frac{dP_{NEP}}{dt} &= \frac{k_P^{Syn}}{D_{Rib}} F_{Spl8} R_8^M - \frac{L_V}{N_{NEP}^{nuc}} k^{Exp} P_{NEP} V_{P,M1}^{nuc} \\ &\quad - \left(N_{P_{NEP}} - 8 \frac{L_V}{N_{NEP}^{nuc}} \right) r^{Rel}, \end{aligned} \quad (3.2.19)$$

$$\frac{dP_{HA}}{dt} = \frac{k_P^{Syn}}{D_{Rib}} R_4^M - N_{P_{HA}} r^{Rel}, \quad (3.2.20)$$

$$\frac{dP_{NA}}{dt} = \frac{k_P^{Syn}}{D_{Rib}} R_6^M - N_{P_{NA}} r^{Rel}, \quad (3.2.21)$$

$$\frac{dP_{M2}}{dt} = \frac{k_P^{Syn}}{D_{Rib}} F_{Spl7} R_7^M - N_{P_{M2}} r^{Rel}. \quad (3.2.22)$$

Die Translation der viralen mRNA erfolgt durch Anbindung mehrerer Ribosome an eine mRNA. Die Bildung sogenannter Polysome und deren Einfluss auf die Proteinsynthese wurde im mathematischen Modell durch eine längenabhängige Ratenkonstante für die Translation k_P^{Syn} und die Einführung eines mittleren Abstandes zwischen

zwei benachbarten Ribosomen D_{Rib} realisiert. Weiterhin wurde das Splicing der Segmente 7 und 8 für die Bildung der mRNA zur Synthese von M1, M2 und NEP durch die Faktoren F_{Spl7} und F_{Spl8} berücksichtigt. Um die Anzahl der NP, M1 und NEP Proteine für die Bildung des NEP-M1-vRNP-Komplexes in der Dynamik für die jeweiligen Proteine zu berücksichtigen, wurde mit der mittleren Länge der vRNA L_V und der Anzahl der vom Protein im Komplex gebundenen Nukleotide N_{NP}^{nuc} , N_{M1}^{nuc} und N_{NEP}^{nuc} skaliert.

Wie bereits erwähnt, kann die vorgestellte Replikationskinetik im Rahmen einer Multiskalen-Modellierung genutzt werden, um die Dynamik der intrazellulären Zustände zu beschreiben. Für die Kopplung der intrazellulären Dynamik mit den extrazellulären Zell- und Virusspezies kann eine deterministische Beschreibung mittels Populationsbilanzen verwendet werden. Diese wird im nächsten Abschnitt eingeführt.

3.2.2. Multiskalen-Modell

Durch die Verwendung von Multiskalen-Modellen zur Beschreibung von Virusausbeuten in Zellkulturen wird es möglich, Varianzen von Zelle zu Zelle hinsichtlich der Gehalte an produzierten Viruskomponenten, wie beispielsweise viralem NP-Protein (P_{NP}) oder vRNA (R^V), zu berücksichtigen. Ausgelöst wird diese Varianz durch Infektion der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten bei niedriger Multiplizität der Infektion (engl. *multiplicity of infection*) (MOI), die üblicherweise in Produktionsprozessen angewandt wird. Zusätzlich zu der Varianz, die durch unterschiedliche Infektionszeitpunkte entsteht, kann die Varianz durch imperfekte genetische Veränderungen bei lentiviralen Transfektionen durch verteilte kinetische Parameter der Replikationskinetik beschrieben werden. Wenn von einer perfekten Transfektion und einer Infektion mit hohem MOI ausgegangen wird und zusätzlich die natürliche Heterogenität von Zellen vernachlässigt wird, kann das Verhalten von infizierten Zellen mithilfe der Replikationskinetik auf Einzelzellebene [63] aus dem vorangegangenen Abschnitt beschrieben werden.

Weil reale Produktionsprozesse aber durch zelluläre Unterschiede gekennzeichnet sind, wird im Folgenden eine Populationsbilanz zur Beschreibung dieser Varianzen verwendet. Geeignete Einführungen in populationsdynamische Systeme sind in den Büchern von Ramkrishna [132] und Villadsen, Nielsen und Lidén [116] zu finden. Bei der hier verwendeten Populationsbilanz werden die Anzahldichten der infizierten Zellen mit einer partiellen Differentialgleichung (PDE) beschrieben. Diese Anzahldichte hängt von den oben beschriebenen Gehalten der Viruskomponenten pro Zelle und den variablen kinetischen Parametern der Replikationskinetik infolge imperfekter Transfektionen ab. Die genannten Größen bilden die internen Koordinaten der Populationsbilanz. Externe Koordinaten, die die Position der Anzahldichte bezüglich der drei Raumrichtungen beschreiben, werden nicht berücksichtigt, da von einem ideal durchmischten System ausgegangen wird.

Das Multiskalen-Modell bestehend aus der PDE für die infizierten Zellen, in die die Dynamik der viralen Replikationskinetik und verteilte kinetische Parameter infolge lentiviraler Transfektion einfließen. Das Modell wird durch Bilanzen der uninfizierten und apoptotischen Zellen sowie unterschiedlicher Virusspezies im Medium komplet-

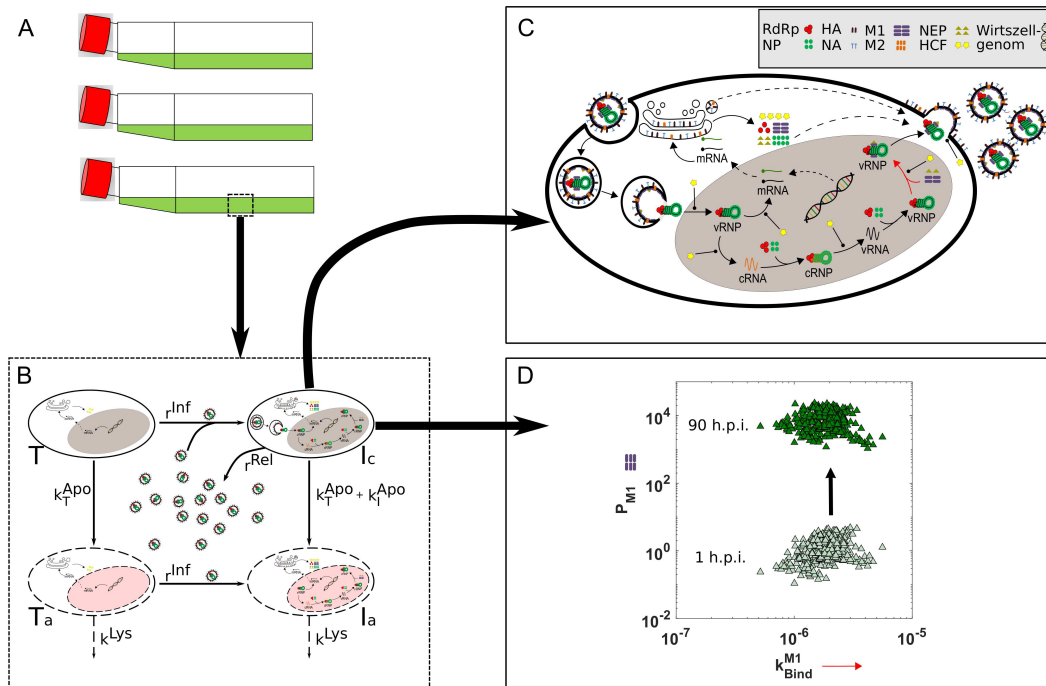


Abbildung 3.4.: Multiskalen-Modell basierend auf [39,62] Die Produktion von Viruspartikeln in Säugerzellen kann mittels Daten aus T-Flaschen-Experimenten untersucht werden (A). Die unterschiedlichen Zellspezies werden in der gestrichelten Box gezeigt (B). Uninfizierte Zellen (T) können durch das Eindringen von Viruspartikeln infiziert werden (I). Sowohl infizierte als auch uninfizierte Zellen können apoptotisch werden (T_a , I_a). In der Box rechts oben wird die virale Replikationskinetik abgebildet (C). Die mathematische Beschreibung beginnt mit dem Viruspartikel im Endosom und ist im Abschnitt 3.2.1 eingeführt wurden. Wirtszellfaktoren (*engl. host cell factor*, HCF) beeinflussen unterschiedliche Schritte des viralen Lebenszyklus (Abschnitt 3.1.5). Nach Transkription und Translation des viralen Genoms können neue Viruspartikel in die Kultur abgegeben werden. Die Raten der viralen Replikationskinetik, die durch Wirtszellfaktoren signifikant beeinflusst werden, entsprechen den Pfeilen mit den gelben Sternen. Sowohl Zustände (z.B. virale Proteine) als auch Parameter des Modells werden im Multiskalen-Modell als verteilt angenommen. Als Beispiel für die Dynamik der Verteilung ist hier das Matrixprotein M1 (P_{M1}) und der Parameter k_{M1}^{Bind} gewählt wurden und zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion (*engl. hour post infection*, h.p.i) aufgetragen (D).

tiert. Im Gegensatz zu den infizierten Zellen wird angenommen, dass diese weiteren Zell- und Virusspezies alle gleich sind und durch gewöhnliche Differentialgleichungen beschrieben werden können. Ein Überblick über das Multiskalen-Modell und deren Verknüpfung liefert die Abbildung 3.4.

Wie bereits beschrieben, kann die zeitliche Änderung der Anzahldichte der infizierten Zellen i_c mit den internen Koordinaten \mathbf{x}^* charakterisiert werden. Diese internen Koordinaten beinhalten die internen Zustände (virale Proteine, mRNA Spezies etc.)

und die verteilten Parameter \mathbf{k} . Die PDE für die infizierten Zellen lautet:

$$\frac{\partial i_c}{\partial t} + \nabla_{\mathbf{x}^*} (\mathbf{h}^* i_c) = -(k_T^{\text{Apo}} + k_I^{\text{Apo}}) i_c + r^{\text{Inf}} T \mathcal{I}(\mathbf{x}^*). \quad (3.2.23)$$

Unter der Annahme, dass die imperfekte Transfektion durch die virale Replikation nicht beeinflusst wird, kann die Verteilung der kinetischen Parameter \mathbf{k} über die Zeit als konstant angenommen werden, das heißt die Änderungsgeschwindigkeit ist null. Aus diesem Grund kann die Dynamik der Replikationskinetik \mathbf{h} gemäß Abschnitt 3.2.1 wie folgt erweitert werden: $\mathbf{h}^* = [\mathbf{h}, \mathbf{0}]^T$. Um diesen Effekt zu verdeutlichen, ist in Abbildung 3.4D ein Beispiel für die zeitliche Änderung der Zellcharakteristik bezüglich des viralen Proteins P_{M1} und des kinetischen Parameters k_{M1}^{Bind} gezeigt. Die Verteilung der Zellen ändert sich zeitlich nur in Bezug auf das virale Protein, während die Verteilung über den kinetischen Parameter konstant bleibt.

Auf Basis von Pertubationsstudien aus [99] wird angenommen, dass infizierte genetisch modifizierte Zellen nur in Bezug auf die Parameter für den vRNP-Import in den Nukleus, die Synthese der viralen mRNA, cRNA und vRNA, die Bindung des M1-Proteins an vRNP im Nukleus und die Freilassungsrate des Virus verteilt sind. In [99] wurde gezeigt, dass die Änderung dieser Parameter einen besonders großen Einfluss auf die Dynamik der Virusausbeute haben. Der Vektor mit den Parametern für die Verteilung kann folglich definiert werden als:

$$\mathbf{k} = [k^{\text{Imp}}, k_M^{\text{Syn}}, k_C^{\text{Syn}}, k_V^{\text{Syn}}, k_{M1}^{\text{Bind}}, k^{\text{Rel}}]. \quad (3.2.24)$$

Die Anzahl infizierter Zellen erhöht sich durch Infektion nicht infizierter Zellen mit der Rate r^{Inf} (siehe Gleichung 3.2.33). Darüber hinaus repräsentiert die Verteilung $\mathcal{I}(\mathbf{x}^*)$ die normalisierte *á priori* Zell-zu-Zell-Variabilität neu infizierter Zellen. Die Population infizierter Zellen nimmt aufgrund von Apoptose ab. Dabei wird die Apoptose in durch Infektion verursachte Apoptose (k_I^{Apo}) und eine natürliche Apoptose (k_T^{Apo}) unterteilt.

Die Dynamik infizierter Zellen ist mit der zeitliche Entwicklung von apoptotischen infizierten Zellen I_a

$$\frac{dI_a}{dt} = \int_{\mathbf{x}} (k_T^{\text{Apo}} + k_I^{\text{Apo}}) i_c d\mathbf{x} + r^{\text{Inf}} T_a - k^{\text{Lys}} I_a, \quad (3.2.25)$$

uninfizierten Zellen T

$$\frac{dT}{dt} = \mu T - r^{\text{Inf}} T - k_T^{\text{Apo}} T, \quad (3.2.26)$$

und apoptotischen uninfizierten Zellen T_a

$$\frac{dT_a}{dt} = k_T^{\text{Apo}} T - r^{\text{Inf}} T_a - k^{\text{Lys}} T_a, \quad (3.2.27)$$

gekoppelt.

Das Wachstum der uninfizierten Zellen ist wie folgt definiert [62, 109]:

$$\mu = \left[\frac{\mu_{\text{max}}}{T_{\text{max}}} \left(T_{\text{max}} - T - \int_{\mathbf{x}} i_c d\mathbf{x} \right) \right]. \quad (3.2.28)$$

Die Viruspartikel werden entsprechend ihrer Lokalisation an, in oder außerhalb der Zelle unterschieden. Es gibt freie Viruspartikel V_f , die sich außerhalb der Zellen im Kulturmedium befinden, Viruspartikel, die an der Oberfläche der Wirtszelle haften V_n^{Att} und Viren in Endosomen der infizierten Zellen V_n^{En} . Die DGLn zur Beschreibung der Dynamik dieser Viren lauten:

$$\frac{dV_f}{dt} = \int_{\mathbf{x}} r^{\text{Rel}} i_c d\mathbf{x} - k_V^{\text{Deg}} V_f + \sum_n \left[k_n^{\text{Dis}} V_n^{\text{Att}} - k_n^{\text{Att}} B_n V_f \right], \quad (3.2.29)$$

$$\frac{dV_n^{\text{Att}}}{dt} = k_n^{\text{Att}} B_n V_f - \left(k_n^{\text{Dis}} + k^{\text{En}} \right) V_n^{\text{Att}} - \left(r^{\text{Inf}} + r^{\text{Lys}} \right) V_n^{\text{Att}}, \quad (3.2.30)$$

$$\frac{dV_n^{\text{En}}}{dt} = k^{\text{En}} \left(V_{hi}^{\text{Att}} + V_{lo}^{\text{Att}} \right) - k^{\text{Fus}} V_n^{\text{En}} - \left(r^{\text{Inf}} + r^{\text{Lys}} \right) V_n^{\text{En}}, \quad (3.2.31)$$

mit

$$B_n = B_n^{\text{tot}} (T + T_a) - V_n^{\text{Att}} \quad k_n^{\text{Dis}} = \frac{k_n^{\text{Att}}}{k_n^{\text{Equ}}} \quad n \in \{lo, hi\}. \quad (3.2.32)$$

Es werden zwei Arten von Bindungsstellen für die Viruspartikel auf der Oberfläche betrachtet: Bindungsstellen mit niedriger Affinität (*lo*) und Bindungsstellen mit hoher Affinität (*hi*). Eine detaillierte Beschreibung der beteiligten kinetischen Prozesse ist in [63] zu finden.

Infektion (r^{Inf}) und Zelllyse (r^{Lys}) können wie folgt definiert werden:

$$r^{\text{Inf}} = \frac{F_{\text{inf}} k^{\text{Fus}} V_n^{\text{En}}}{T + T_a}, \quad r^{\text{Lys}} = \frac{k^{\text{Lys}} T_a}{T + T_a} \quad (3.2.33)$$

Die Beschreibung der freien Viruspartikel (Gleichung 3.2.29) ersetzt Gleichung (3.2.10) aus der zuvor beschriebenen intrazellulären Replikationskinetik. Die Definition der Freilassungsrate r^{Rel} wurde dort ebenfalls bereits definiert und wird hier wiederholt:

$$r^{\text{Rel}}(\mathbf{x}) = k^{\text{Rel}} \frac{V P_{M1}^{\text{cyt}}}{V P_{M1}^{\text{cyt}} + 8 K_{Vrel}} \prod_j \frac{P_j}{P_j + N_j K_{Vrel}}, \quad (3.2.34)$$

$$j \in \{RdRp, P_{HA}, P_{NP}, P_{NA}, P_{M1}, P_{M2}, P_{NEP}\}.$$

Alle kinetischen Parameter sind in der Tabelle E.1 im Appendix zu finden.

3.3. Analyse des Einflusses von Genmodifikationen

Im Folgenden wird das eingeführte Multiskalen-Modell genutzt, um den Einfluss von modifizierten Genen auf die Virusausbeute beim IAV-Produktionsprozess zu untersuchen. Die Genmanipulation in Form von Genüberexpression ausgewählter

Wirtszellfaktoren wurde experimentell mittels lentiviraler Transduktion von A549-Zellen erreicht. Bei der lentiviralen Transduktion handelt es sich um eine nicht-zielgerichtete Genmodifikationsmethode. Dabei entsteht Heterogenität innerhalb der Zellpopulation durch die variierende Anzahl der lentiviral eingebrachten Genkonstrukte und der möglichen Integrationsstellen im Wirtszellgenom [14]. Für die modellbasierten Untersuchungen wurden die in Abschnitt 3.1.5 beschriebenen Wirtszellfaktoren ausgewählt. Der Fokus der folgenden Untersuchungen liegt auf der Vorhersage der Virusausbeuten nach mehrfachen Genüberexpressionen der Zelllinie (Mehrfachgenüberexpressionszelllinie (engl. *multiple gene overexpression cell line*) (MGO)) auf Basis von verfügbaren Messungen nach Einzelgenüberexpression der Zelllinie (Einzelgenüberexpressionszelllinie (engl. *single gene overexpression cell line*) (SGO)). Durch Anwendung des Multiskalen-Ansatzes ist es möglich, die Virusausbeute solcher genetisch modifizierten Zelllinien unter realen Bedingungen, das heißt bei niedrigem MOI und imperfekter Transfektion zu untersuchen.

Das Multiskalen-Modell ist ein hochdimensionales Populationsbilanzsystem, da die Anzahldichte infizierter Zellen neben den 27 internen Zuständen aus der Replikationsdynamik zusätzlich noch von sechs weiteren Parameter (siehe Gleichung (3.2.24)) zur Beschreibung der genetischen Modifikation abhängt. Die Lösung eines solchen mathematischen Modells ist komplex und ist unter Verwendung von Standarddiskretisierungsmethoden nicht möglich. Für eine schnelle und zuverlässige Lösung des Modells wurde hier die approximative Momentenmethode aus [39] angewandt.

Im folgenden Abschnitt wird zunächst ein Überblick über die nötigen Schritte und erforderlichen Experimente zur Untersuchung der Produktivität von genetisch modifizierten Zelllinien gegeben. Anschließend wird die vorgestellte Methodologie auf das Beispiel der Influenza-A-Impfstoffproduktion angewandt. Hierfür wird zunächst der Einfluss von einzelnen lentiviralen Genüberexpressionen auf die Virusausbeute untersucht. Im Anschluss daran folgt die Beschreibung unterschiedlicher Strategien zur Darstellung von Parameterverteilungen für mehrfach modifizierte Genüberexpressionszelllinien. Die Strategiewahl wird über den Abgleich experimenteller Virusausbeuten mit den simulierten Werten ausgewählter Genüberexpressionszelllinien getroffen. Schließlich wird eine Simulationsstudie durchgeführt, mit dem Ziel, vielversprechende Kombinationen von Genmodifikationen im Hinblick auf die Virusausbeute aufzudecken. In einer finalen Zusammenfassung wird nochmals auf den Nutzen der entwickelten Methodologie für den IAV-Impfstoffprozess eingegangen.

3.3.1. Methodologie und Umsetzung

Zunächst werden der allgemeine Arbeitsablauf und die erforderlichen Bausteine der Methodologie zur Untersuchung des Einflusses von genetisch veränderten Zellkulturen auf die Produktivität vorgestellt. Eine Übersicht darüber liefert die Abbildung 3.5. Zunächst muss ein kinetisches Modell (Abbildung 3.5, Box 1.1) festgelegt werden, auf dessen Basis Parameterverteilungen ermittelt werden können.

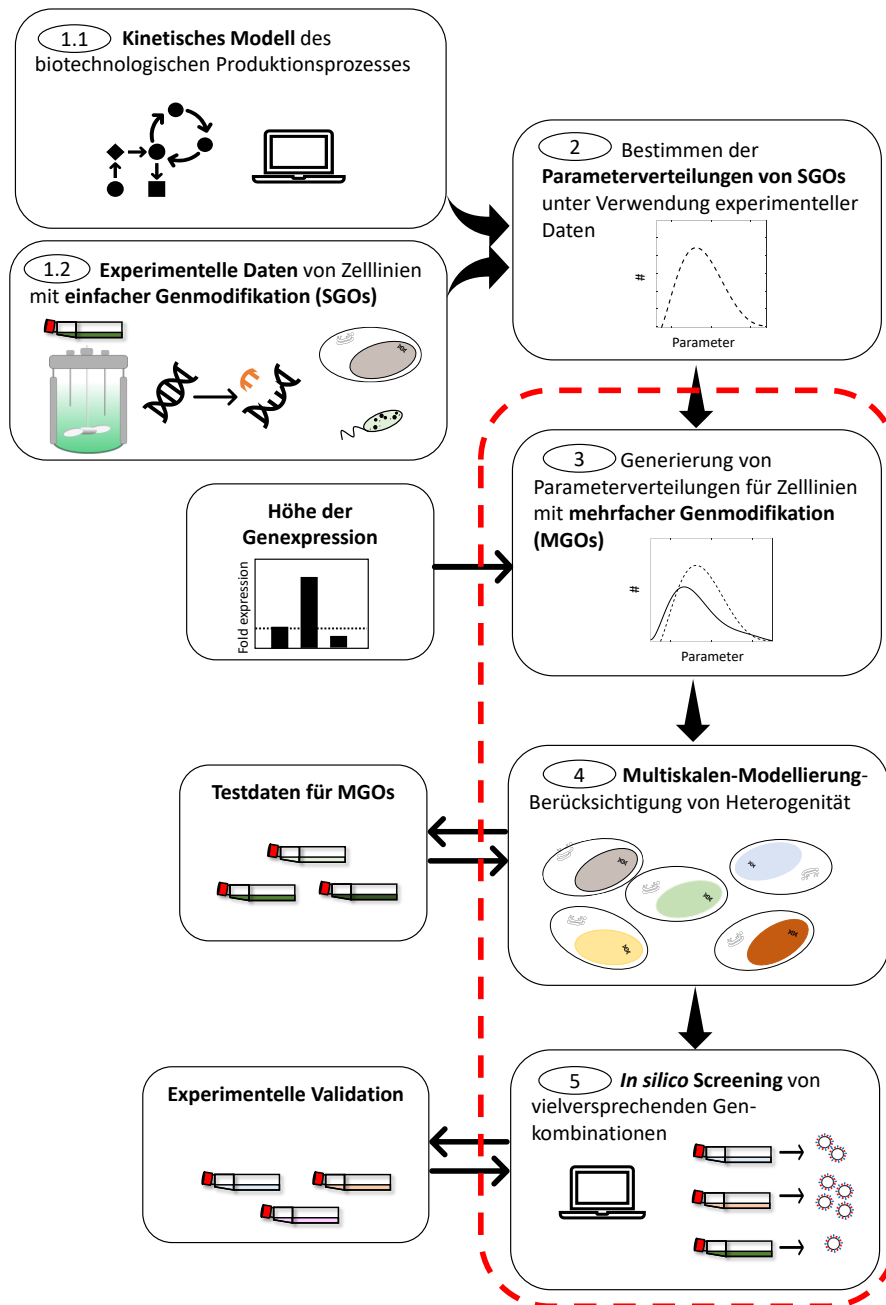


Abbildung 3.5.: Darstellung des Arbeitsablaufs für die Anwendung der Methodologie aus [43]. Die Eigenanteil ist durch die rot gestrichelte Box gekennzeichnet.

Neben dem Modell werden möglichst umfangreiche Daten über die Auswirkung von einzelnen Genmodifikationen auf die Produktivität benötigt (Abbildung 3.5, Box 1.2). Für die IAV-Produktion wurden Daten aus Experimenten mit SGOs aus einer früheren Studie genutzt, welche im nächsten Abschnitt genauer benannt werden [99]. Die Experimente mit den SGOs wurden mit einem hohen MOI durchgeführt, sodass von einer zeitgleichen Infektion aller Zellen ausgegangen werden kann. Aus diesem Grund ist für die Generierung der Parameterverteilungen auch die Replikationskinetik

auf Einzelzellebene aus Abschnitt 3.2.1 geeignet. Welche und wie viele Parameter verteilt werden, kann im Vorfeld durch Perturbationsstudien definiert werden [99]. Die resultierenden Parameterverteilungen (Abbildung 3.5, Box 2) werden schließlich genutzt, um zusammen mit dem Expressionslevel nach Einzelgenmodifikation Parameterverteilungen zur Vorhersage des Verhaltens bei mehrfachen Genüberexpressionen zu generieren (Abbildung 3.5, Box 3). Die entstehenden Verteilungen können, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, in einen Multiskalen-Ansatz integriert werden, um den Einfluss der Heterogenität nach mehrfachen Genmodifikationen auf die Produktausbeute zu berücksichtigen (Abbildung 3.5, Box 4). Für den IAV-Produktionsprozess wurde das vorgestellte Multiskalen-Modell aus Abschnitt 3.2.2 verwendet. Je nach anfänglich untersuchten Einzelgenmodifikationen ergeben sich $\sum_k \frac{n!}{(n-k)!}$ mögliche Mehrfachgenmodifikationen, mit n möglichen Genmodifikationen und k (mit $k \leq n$) Genänderungen in der Kombination. Demzufolge kann mit dem Ansatz eine ganze Reihe von möglichen Kombinationen bzgl. ihrer Produktausbeute untersucht werden (Abbildung 3.5, Box 5). Die vielversprechenden Kombinationen verschiedener Genmodifikationen, d.h. die mit erhöhter Produktausbeute, können schließlich im Labor erzeugt und getestet werden. Unter der Voraussetzung, dass passende Modelle und ausreichend Daten vorhanden sind, kann die Methodologie auch auf andere zellkulturbasierte Produktionssysteme übertragen werden.

3.3.2. Einfluss von Einzelgenüberexpressionen

In einem ersten Schritt wurden experimentelle Daten unterschiedlicher genetisch veränderter A549-Zelllinien aus einer früheren Studie zur Optimierung der Influenza-Impfstoffproduktion [99] verwendet, um eine Verteilung der kinetischen Parameter aus Gleichung (3.2.24) mit der Replikationskinetik aus Abschnitt 3.2.1 durchzuführen. Der vollständige Satz intrazellulärer Daten umfasst durchflusszytometrische Messungen des vRNP-Imports in den Nukleus und intrazelluläre Konzentrationen viraler RNA (mRNA, cRNA, vRNA) des viralen Genomsegments 5 nach Infektion bei einem MOI von 50. Darüber hinaus wurden zellspezifische Virusausbeuten nach Infektion von Zellen bei einem MOI von 1 gemessen. Für die Einzelgenüberexpression der A549-Zelllinie wurden die Wirtzellgene CEACAM6, FANCG, NXF1, PLD2 und XAB2 ausgewählt. Die kompletten Datensätze für die genetisch veränderten Zelllinien sind in [99] zu finden. Die Verteilungen der sechs ausgewählten Parameter bei den Einzelgenüberexpressionszelllinien wurden von Tanja Laske vom MPI Magdeburg im Rahmen eines gemeinsamen Forschungsprojektes unter Verwendung eines global stochastischen Optimierungsalgorithmus fSSm ermittelt [47]. Die resultierenden Verteilungen für jede SGO der cRNA-Syntheserate k_C^{Syn} sind in Abbildung 3.6 dargestellt. Die anderen Parameterverteilungen sind in den Abbildungen E.2 bis E.6 im Appendix zu finden.

Als Machbarkeitsnachweis wird das Multiskalen-Modell aus Abschnitt 3.2.2 mit den erhaltenen Parameterverteilungen, einer Startanzahl von $7 \cdot 10^5$ anfänglichen Zielzellen und einem MOI von 1 simuliert (Abbildung 3.7). Die Verwendung der Parameterverteilung in der Populationsbilanz zeigt eine gute Übereinstimmung mit den Virustiter. In Abbildung E.1 im Appendix ist zu sehen, dass durch Anwendung

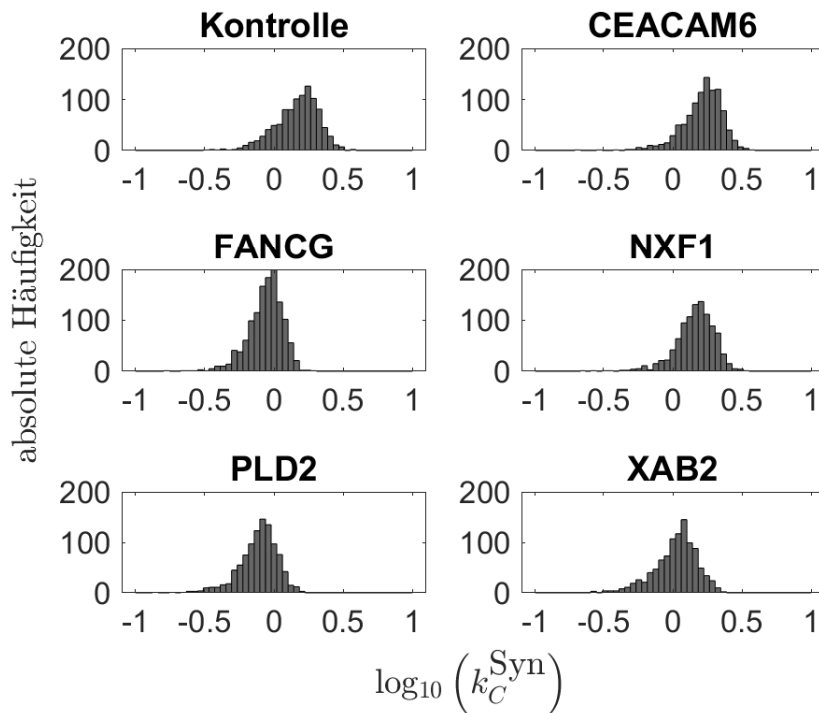


Abbildung 3.6.: Parameterverteilung für den kinetischen Parameter $\log_{10}(k_C^{\text{Syn}})$ nach einem parametrischen Bootstrap mit $n = 1000$.

der Populationsbilanz eine schrittweise Infektion der Wirtszellen erreicht wird. Dieses Infektionsverhalten ist bei dem MOI von 1 zu erwarten.

3.3.3. Einfluss von Mehrfachgenüberexpressionen

Experimentelle Mehrfachgenüberexpressionen

Zelllinien mit Mehrfachgenüberexpressionen (MGOs) wurden auf Basis der generierten SGOs entwickelt. Dafür wurden die Zelllinien mit der einfachen Genüberexpression an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit einer Mischung transduziert, die jeweils zwei bis drei verschiedene lentivirale Stämme enthielten. Die resultierenden MGOs exprimierten unterschiedliche Kombinationen und Mengen der ausgewählten Gene. Die Kombination der Gene kann in Tabelle 3.1 nachvollzogen werden. Alle Überexpressionzelllinien wurden am Helmholtz-Institut für Infektionsforschung in Braunschweig von der Arbeitsgruppe „Modellsysteme für Infektion und Immunität“ erzeugt und am Max-Planck-Institut in Magdeburg von der Arbeitsgruppe Bioprozesstechnik in Infektionsversuchen weiter untersucht. Die resultierenden Daten werden im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

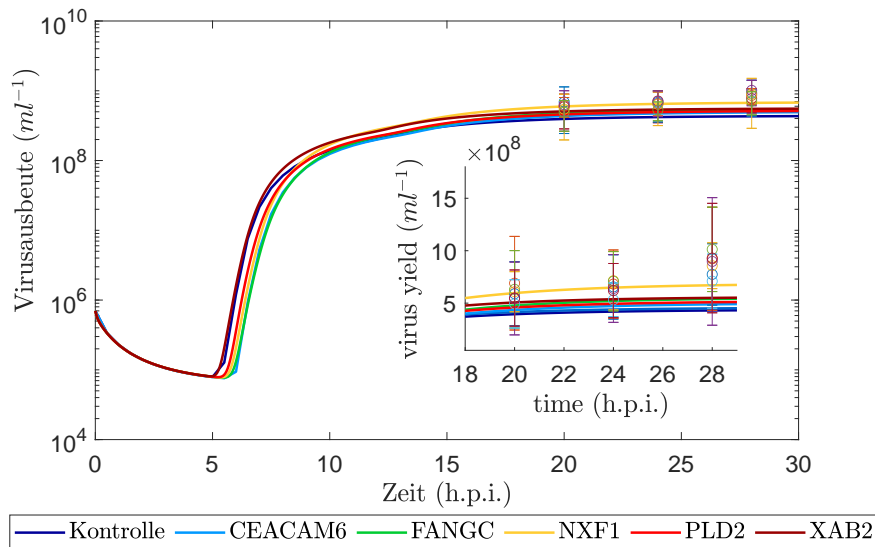


Abbildung 3.7.: Dynamik der Virusfreisetzung bei $7 \cdot 10^5$ uninfizierten SGOs mit einer MOI von 1. Experimentelle Daten sind als Kreise mit Fehlerbalken dargestellt, während die simulierten Werte als Line für fünf SOGs und die parentale Zelllinie dargestellt sind.

Strategien zur Darstellung der Parameterverteilungen

Der hier präsentierte Multiskalen-Ansatz kann dafür verwendet werden, Kombinationen von Genüberexpressionen für eine gesteigerte Virusausbeute vorherzusagen und so ein umfangreiches experimentelles Screening zu vermeiden. In einer früheren Studie unserer Kooperationspartner wurden Medianwerte der Parameterverteilungen zufällig für die sechs Parameter kombiniert (siehe Gleichung (3.2.24)) und die neuen Parametersätze anschließend für die Simulation der Virusdynamik unter Verwendung der viralen Replikationskinetik (Abschnitt 3.2.1) verwendet [99]. Alternativ wird im Folgenden ein komplexerer Ansatz vorgestellt, bei dem MGO-Parameterverteilungen basierend auf den gesamten Parameterverteilungen der zugrunde liegenden SGOs generiert werden. Hierfür muss zunächst eine geeignete Strategie zur Konstruktion von Parameterverteilungen für MGOs gefunden werden. Aus diesem Grund werden zunächst vier unterschiedliche Strategien vorgestellt. Die resultierenden Parameterverteilungen werden im Anschluss genutzt, um die Virusdynamik unter Verwendung des Multiskalen-Ansatzes zu simulieren und anhand gemessener Viruskonzentrationen ausgewählter MGOs zu validieren (siehe Tabelle 3.1).

Low impact-Strategie

Diese Strategie basiert auf der Annahme, dass die erste Genüberexpression den stärksten Einfluss hat, während weitere Modifikationen nur einen geringen Einfluss auf die virale Replikation haben. Somit liegen die neuen Parameterverteilungen zwischen den Medianwerten der ersten SGO (Basis) und den Medianwerten der SGO

Tabelle 3.1.: Genkombination in experimentellen MGOs. Die Häkchen markieren das zuerst überexprimierte Gen der Einzelgenüberexpressionszelllinie. Die anschließend eingebrachten Genkonstrukte sind grau hinterlegt.

	CEACAM6	XAB2	FANCG	PLD2	NXF1
MGO 1	✓				
MGO 2			✓		
MGO 3					✓
MGO 4		✓			

mit dem geringsten Abstand zum Basismedianwert. Die Parameterverteilung wird durch Überlagerung von fünf logarithmischen Gauß-Operatoren in einer gewichteten Summe erzeugt:

$$k_i \sim \sum_{l=1}^5 a_l m_l e^{\mathcal{N}(0, \sigma_l)}. \quad (3.3.1)$$

Die Mittelwerte m_l für die Konstruktion der neuen Verteilung liegen zwischen dem Median der ersten Parameterverteilung der SGO und dem Median der Verteilung mit dem geringsten Abstand zum ersten Median. Die Form einer Parameterverteilung kann durch den Skalierungsparameter a_l beeinflusst werden. Der Einfluss der Breite der Parameterverteilung wurde bereits in [37] untersucht. Als realistisches Szenario für eine Parameterverteilung nach lentiviraler Transduktion wird hier eine breite Endverteilung gewählt. Die entsprechenden Skalierungsfaktoren sind: $[a_1, a_2, a_3, a_4, a_5] = [0.05, 0.3, 0.3, 0.3, 0.05]$. Eine repräsentative Verteilung für den Parameter k_{Bind}^{M1} ist in Abbildung 3.8a dargestellt.

High impact-Strategie

Dieses Verfahren zur Generierung der Parameterverteilungen ähnelt der *low impact*-Strategie. Im Vergleich zur bisherigen Methode wird davon ausgegangen, dass weitere Genveränderungen einen ebenso hohen Einfluss haben. Aus diesem Grund werden Parameter der MGOs zwischen den Medianwerten der Basis und den Medianwerten der SGO verteilt, die die größte Änderung in der Parameterverteilung bewirken. Die Parameterverteilungen werden wie zuvor mit fünf Gaußverteilungen rekonstruiert, sind jedoch breiter als bei der *low impact* Strategie. Eine repräsentative Verteilung für den Parameter k_{Bind}^{M1} ist in Abbildung 3.8b dargestellt.

Überlagerungs-Strategie

Für die Überlagerungs-Strategie werden nicht nur die Medianwerte, sondern die gesamten Parameterverteilungen der SGOs genutzt. Diese können durch einen parametrischen Bootstrap unter Verwendung experimenteller Daten aus SGOs geschätzt werden. Die Bildung von 150 Bins zwischen dem Minimal- und Maximalwert für

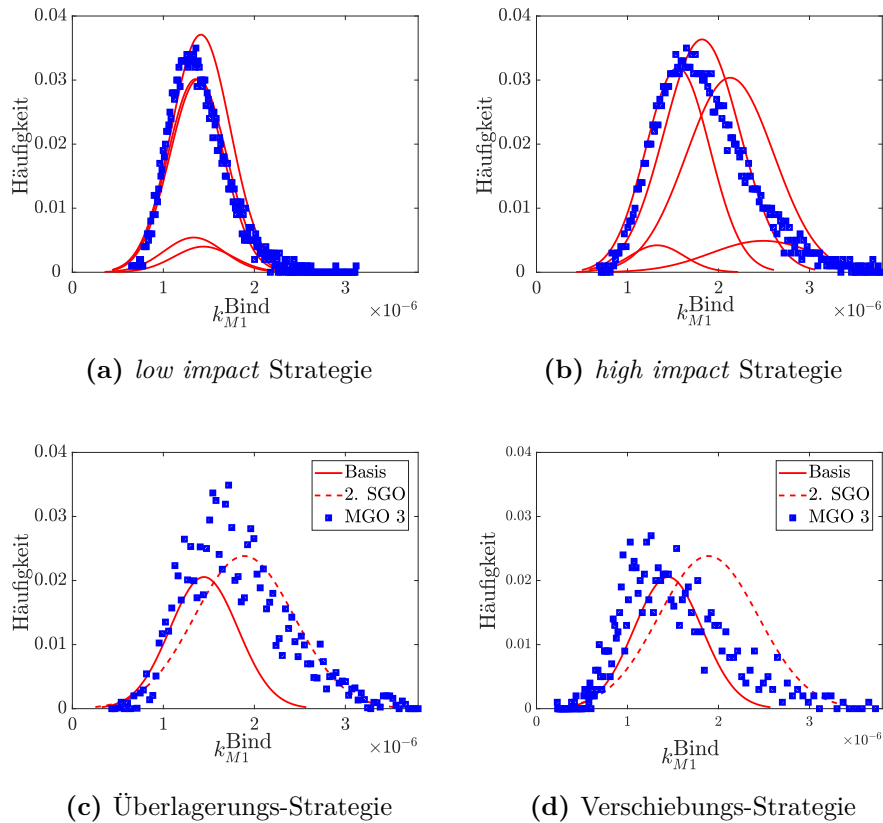


Abbildung 3.8.: Verteilung des Parameters k_{Bind}^{M1} für die MGO 3 (blaue Rechtecke) bei Anwendung der unterschiedlichen Strategien. Für die *low* und *high impact* Strategien wurde die Verteilung mit fünf Gauß-Verteilungen generiert (rote Kurven). Die Positionierung der Kurven wurde in den jeweiligen Paragraphen erläutert. Für die Überlagerungs- und Verschiebungs-Strategie wurden Parameterverteilung auf Basis eines parametrischen Bootsstraps (durchgezogene und gestrichelte rote Kurven) genutzt, um die Verteilung für die MGOs zu erzeugen. Alle Verteilungen sind mit der totalen Anzahl infizierter Zellen normalisiert.

jeden Parameter erleichtert den Vergleich der Parameterverteilungen der Basis mit den Parameterverteilungen, die nach einer zweiten Genmodifikation erreicht werden. Der zweite Satz von Parameterverteilungen wird wie in der *high impact*-Strategie hinsichtlich ihres maximalen absoluten Abstands zu den Medianwerten der Basis ausgewählt. Für jede von ihnen wurde die Anzahl der Zellen mit dem gleichen Parameterwert wie der entsprechende Bin gezählt. Die resultierenden Verteilungen werden im Anschluss mit dem MATLAB-Befehl *interp1* (Standardeinstellung) linear interpoliert. Um die MGO-Parameterverteilungen zu erhalten, wird eine Überlagerung der Basis-SGO-Parameterverteilung und der zweiten SGO-Parameterverteilung durchgeführt, um die höchste absolute Häufigkeit für jeden der sechs Parameter auszuwählen. Die Abbildung 3.8c zeigt die Verteilung für den Parameter k_{Bind}^{M1} bei Anwendung der Überlagerungs-Strategie.

Verschiebungs-Strategie

In der Verschiebungs-Strategie werden die Parameterverteilungen der SGOs aus den parametrischen Bootstraps mit dem Überexpressionslevel (*engl. fold overexpression*, FOE), gemessen mittels RT-qPCR, skaliert (siehe Tabelle E.2 im Appendix), um Parameterverteilungen der MGOs zu generieren. Im Gegensatz zur vorherigen Strategie wurden gemischte Gauß-Verteilungen bestimmt, indem die logarithmischen parametrischen Bootstraps von jedem SGO und die MATLAB-Funktion *fitgmdist* verwendet wurde. Für die Validierung mit den gemessenen Viruskonzentrationen von MGO 1-4 (Tabelle 3.1, Abbildung 3.10) ist eine Auswahl der zweiten Parameterverteilung erforderlich, um die Verschiebung durchzuführen. Wie zuvor, ist der maximale absolute Abstand zu den Medianwerten des Basis-SGO das Auswahlkriterium für den zweiten Satz von SGO-Parameterverteilungen.

Die relative Häufigkeit wird für jeden SGO berechnet, um die Überexpressionslevel miteinander zu korrelieren:

$$EL_{i,Rel} = \frac{FOE_i}{\sum_i FOE_i},$$

mit $i = \{CEACAM6, XAB2, PLD2, NXF1, FANCG\}$. (3.3.2)

Die neuen gemischten Gauß-Verteilungen für die MGOs können mit dem MATLAB-Befehl *gmdistribution* konstruiert werden. Dafür werden die relativen Abstände $\Delta_{i,Rel}$ berechnet. Der Abstand des Medianwertes der Basis von dem Median der zweiten SGO Δ_i wird hierfür mit dem relativen Expressionslevel $EL_{i,Rel}$ multipliziert:

$$\Delta_{i,Rel} = EL_{i,Rel} \cdot \Delta_i,$$

mit $i = \{CEACAM6, XAB2, PLD2, NXF1, FANCG\}$. (3.3.3)

Für die Verschiebung der Parameterverteilung der Basis werden auf die Bootstrap-Schätzungen der Basis ($n = 1000$) der relative Abstand $\Delta_{i,Rel}$ zwischen Median der Basis und der zweiten SGO aufsummiert (Abbildung 3.8d). Die Kovarianz jedes Elements der neuen gemischten Gaußschen-Verteilung ist die Standardabweichung der zweiten Parameterverteilung, die für die Verschiebung der Basisparameterverteilung genutzt wurde.

Für die Durchführung der kombinatorischen Studie wurden MGOs *in silico* generiert, indem angenommen wurde, dass jede Genüberexpression mit einer individuellen lentiviralen Transduktion erreicht wird. Daher erfolgte die Verschiebung der Verteilung für jeden Parameter schrittweise unter Berücksichtigung der Reihenfolge der Genmodifikationen in der resultierenden MGO.

Strategieauswahl auf Basis von experimentellen Virusausbeuten mit Mehrfachgenüberexpressionszelllinien

Die generierten Parameterverteilungen (Abbildung 3.11) werden nun verwendet, um die Virusdynamik für die experimentell untersuchten MGOs zu simulieren. Als

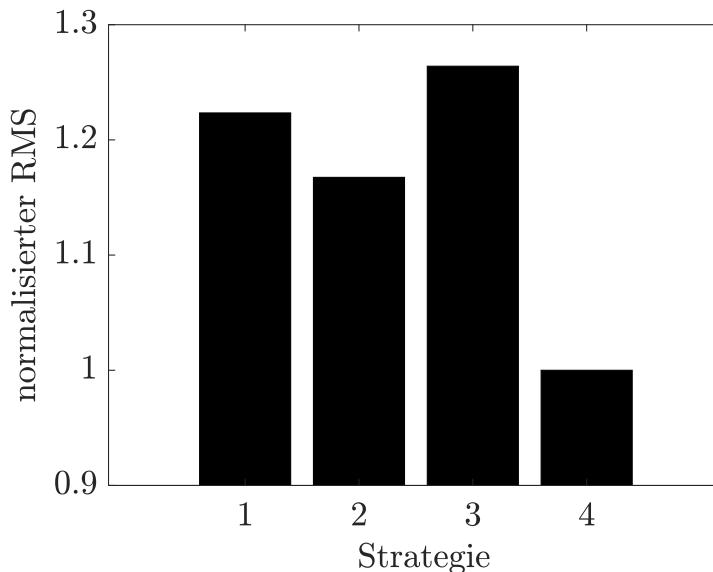


Abbildung 3.9.: RMS-Werte für alle experimentell untersuchten MGOs. Verglichen werden die Parameterverteilungsstrategien *low impact* (1), *high impact* (2), Überlagerungs- (3) und Verschiebungs-Strategie (4). Die RMS-Werte sind mit dem kleinsten RMS normalisiert.

Vergleichskriterium wurde ein RMS-Wert (engl., *root mean square*) berechnet:

$$RMS = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^m (\log(x_{exp}(t_i)) - \log(x_{sim}(t_i)))^2} \quad (3.3.4)$$

Dabei wurde die Summe der Differenzen zwischen den logarithmierten experimentellen ($\log(x_{exp}(t_i))$) und simulierten Datenpunkten ($\log(x_{sim}(t_i))$) bestimmt, durch die Gesamtanzahl der Datenpunkte n geteilt und die Wurzel gebildet.

Basierend auf den RMS-Berechnungen kann eine Strategiewahl getroffen werden. In Abbildung 3.9 sind die RMS-Werte für die einzelnen Strategien gegenübergestellt. Die Gegenüberstellung der RMS-Werte aufgeteilt nach experimentellen MGOs ist in Abbildung E.7 im Appendix zu finden. Die Verläufe für die Virusausbeute bei Anwendung der Überlagerungs- und Verschiebungs-Strategie sind in Abbildung 3.10 gezeigt, während die Verläufe bei Anwendung der *low* und *high impact* Strategie in Abbildung E.8 im Appendix dargestellt sind. Hieraus wird ersichtlich, dass alle Strategien ein sehr ähnliches Verhalten zeigen. Im Folgenden wird jedoch die Verschiebungs-Strategie verwendet, da diese den geringsten RMS-Wert aufweist. Wie in Abbildung 3.11 zusehen ist, folgen einige der Parameterverteilungen nach Anwendung der Verschiebungs-Strategie einer Gammaverteilung. Beispielsweise führt die Gammaverteilung von k_V^{Syn} und k^{Rel} zu einer Zellpopulation, in der die Mehrheit der Zellen Viren mit niedriger Syntheserate für die virale RNA und langsamer Freisetzung replizieren. Nur ein kleiner Teil der Zellen vermehrt Viren mit hohen Werten für k_V^{Syn} und k^{Rel} , was zu einer geringfügigen Erhöhung der Viruskonzentration für die MGOs 1–4 im Vergleich zu den SGOs führt.

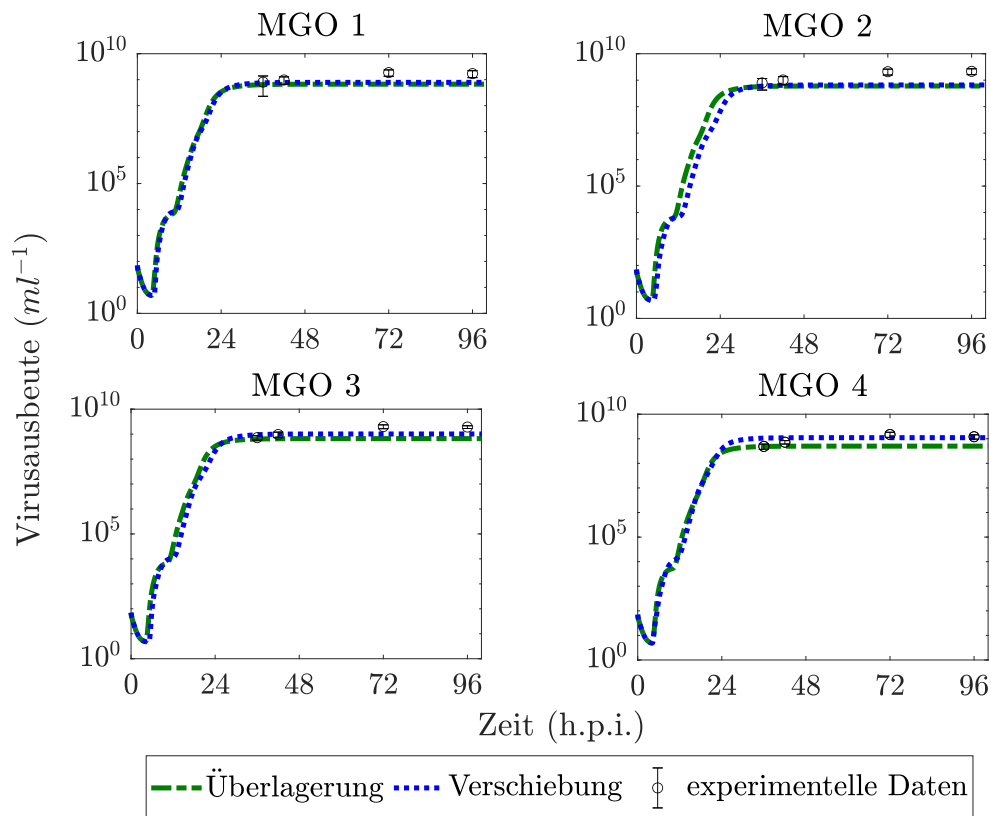


Abbildung 3.10.: Dynamik der Virusausbeute für eine Infektion von $7 \cdot 10^5$ Zellen bei einer MOI von 10^{-4} für die Überlagerungs- und die Verschiebungs-Strategie und alle MGOs, die experimentell untersucht wurden. Experimentelle Daten sind als Kreise mit Fehlerbalken dargestellt. Die Simulationsergebnisse sind als grün gestrichelte bzw. blau gepunktete Linie gezeigt.

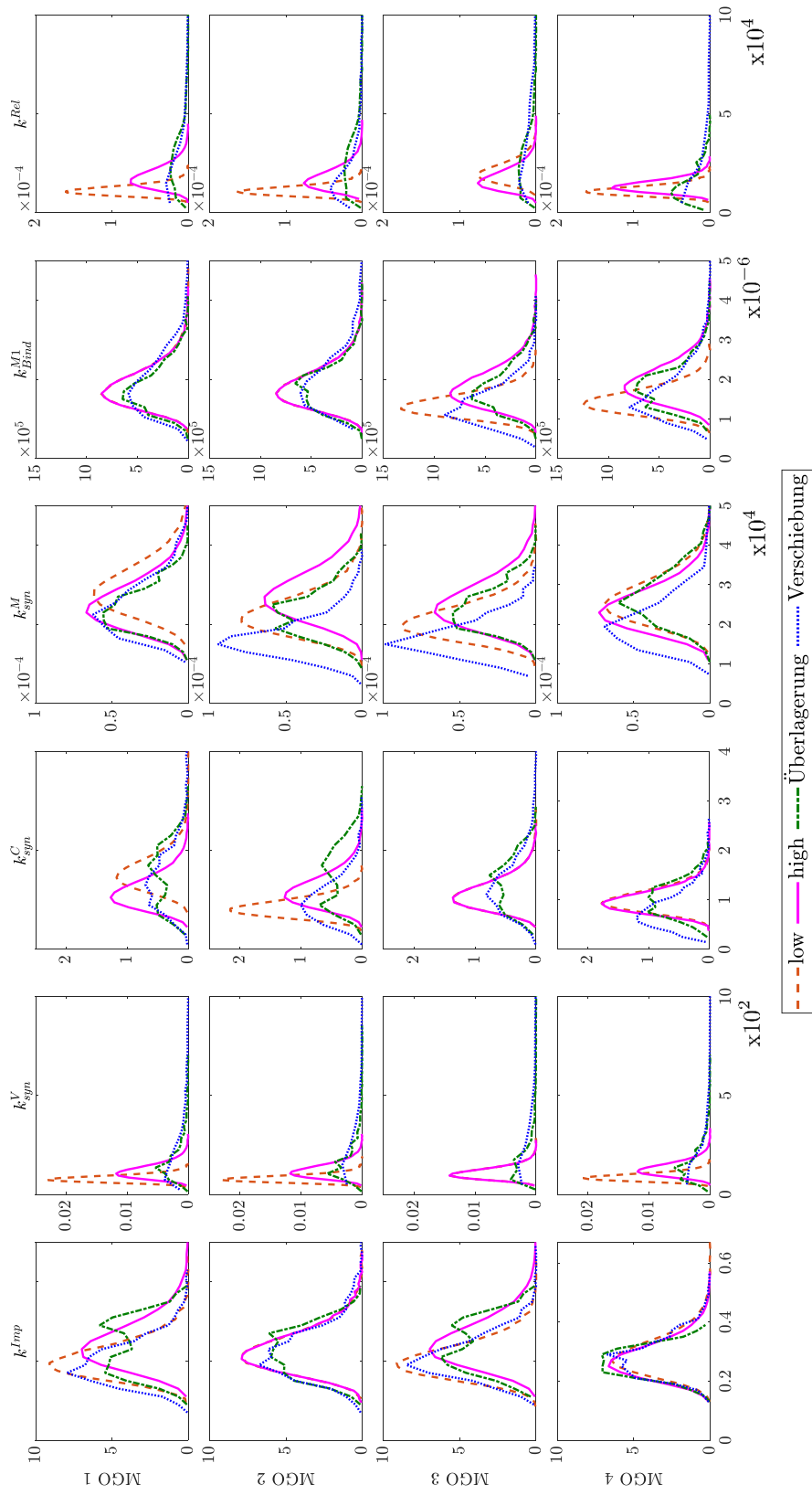


Abbildung 3.11.: Parameterverteilung für experimentell untersuchte MGOs.

Simulationsstudie zu Mehrfachgenüberexpressionen

In diesem Abschnitt wird ein modellbasiertes Verfahren zur Vorhersage vielversprechender MGO-Kandidaten als Alternative zu einem teuren experimentellen Zelllinien-Screening gezeigt. Hierbei kommt die vorab ausgewählte Verschiebungs-Strategie zum Einsatz. Insgesamt wurden 320 theoretisch mögliche Genkombinationen auf Basis der fünf bekannten SGOs konstruiert. Unter Verwendung der resultierenden Parameterverteilungen wird mit dem Multiskalen-Modell die Virusausbeute 72 h.p.i. simuliert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.12 und Abbildung E.9 gezeigt. Im Gegensatz zur Bewertung der Verschiebungs-Strategie im vorherigen Abschnitt steht nun die Bestimmung der Anzahl und Reihenfolge der Genveränderungen im Fokus. Die Reihenfolge ist wichtig, da die lentivirale Transduktion, die hier verwendet wurde, eine nicht-zielgerichtete Gen-Editierungsmethode, aber dennoch kein völlig zufälliger Prozess ist [16, 96]. Bei der lentiviralen Genintegration werden Loci mit hoher Transkriptionsaktivität bevorzugt. Das zelluläre Genom weist nur eine endliche Anzahl von Integrationsstellen mit hoher Transkriptionsaktivität auf [144]. Je mehr Gene transduziert werden, desto weniger geeignete Integrationsstellen sind daher verfügbar, d.h. je später ein Genkonstrukt während der MGO-Erzeugung transduziert wird, desto unwahrscheinlicher ist es, dass es an einer aktiven Stelle integriert wird. Folglich wird eine Gesamtabnahme des Expressionsniveaus von Genkonstrukten während einer Sequenz multipler Transduktionen erwartet. Darüber hinaus hängt der Erfolg der lentiviralen Transduktion auch von zellulären Faktoren ab, z.B. vom nukleären Kernkomplex, der für den Transport und die Perforation der Hülle verantwortlich ist, die das Genkonstrukt enthält [96]. Diese Effekte werden in der Verschiebungs-Strategie berücksichtigt, indem die SGO-Parameterverteilungen mit der relativen Überexpression gemäß Gleichung (3.3.2) gewichtet werden. Im Hinblick auf die Reihenfolge integrierter Genkonstrukte bedeutet dies, dass der Produktionsphänotyp einer Zelllinie eher von früher transduzierten als von später eingebrachten Genen während des MGO-Engineerings beeinflusst wird. Im Gegensatz zu den experimentell untersuchten MGOs ist die Auswahl nur einer Verteilung für die Verschiebung der Basisparameterverteilung nicht notwendig, da davon ausgegangen wird, dass jede Genmodifikation mit einer separaten lentiviralen Transduktion eingebracht wird.

Die Analyse der besten drei Kombinationen aus drei bzw. vier Genüberexpressionen zeigt, dass die Überexpression von NXF1 eine gute Ausgangsmodifikation für die Generierung von MGOs ist (Abbildung 3.12). Eine Studie aus dem Jahr 2014 zeigte die Wirkung von NXF1 durch die Analyse von Influenza-mRNAs ohne Introns nach Inhibierung von NXF1 in A549-Zellen [98]. Die Inhibierung führt zu weniger Hämagglutinin (HA), Neuraminidase (NA) und Nukleoprotein (NP) mRNAs im Zytoplasma. Die Untersuchung der Auswirkung nach Hemmung der NXF1-Synthese gibt Hinweise darauf, wie eine Überexpression von NXF1-Genen auf den viralen Lebenszyklus wirken könnte: Unter der Annahme einer robusten Translation führen mehr virale mRNAs im Zytoplasma zu einer erhöhten Menge der viralen Proteine HA und NA, die die Hauptbestandteile der Virushülle bilden. Die erhöhte Menge dieser viralen Oberflächenproteine könnte ein Schlüsselmechanismus für eine erhöhte Produktion von Viruspartikeln sein. Neben der verstärkten Produktion von HA und NA ist auch

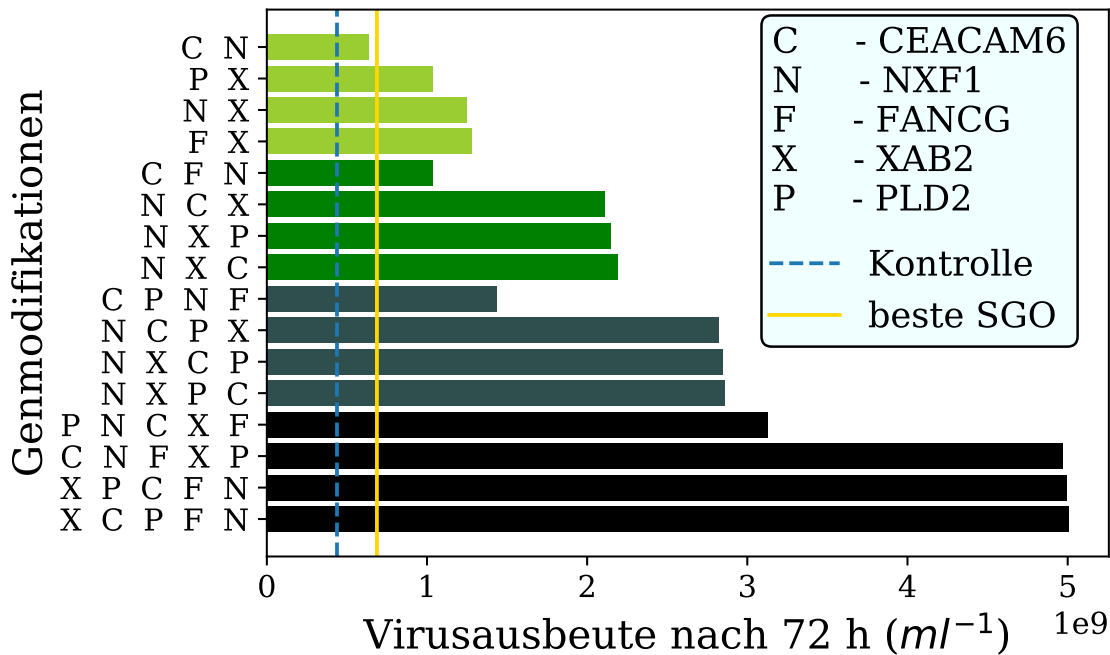


Abbildung 3.12.: Virusausbeute nach 72 Stunden für die drei besten Genkombinationen und die Kombination, die am wenigsten vielversprechend ist. Die Parameterverteilungen wurden aus zwei bis fünf Einzelgenüberexpressionsverteilungen ermittelt. Die Farbe der Balken klassifiziert die Anzahl der Gene, die in der jeweiligen Zelllinie modifiziert wurden. Die Reihenfolge der Genmodifikation entspricht der Reihenfolge der Buchstaben auf der y-Achse von links nach rechts. Die mittleren Virusausbeuten der unmodifizierten Kontrollzelllinie A549 und die Zelllinie mit der besten Einzelgenüberexpression ist als gestrichelte blaue bzw. durchgezogene gelbe Linie dargestellt.

eine erhöhte NP-Produktion nach Überexpression von NXF1 möglich. NP ist Teil des vRNP, welches das virale Genom enthält. Mehr vRNPs und Virushüllproteine bieten verbesserte Bedingungen, um die limitierte Virusfreisetzung zu überwinden, die in der modellbasierten Studie aus [99] bereits als Engpass identifiziert wurde. Zudem scheint die Überexpression von XAB2 in einer MGO-Kombination vorteilhaft für die resultierende Virusausbeute zu sein (Abbildung 3.12). XAB2 ist ein wichtiger Faktor, der beim Spleißen von prä-mRNA, der zellulären Transkription und der transkriptionsgekoppelten Reparatur beteiligt ist [95]. Die nukleare Transkriptionsmaschinerie wird vom IAV verwendet, beispielsweise im Fall des 5'-*Cap-Snatchings* von zellulären prä-mRNAs. Daher ist es für das Virus vorteilhaft, das virale Genom mit einer effizienten zellulären Transkription zu replizieren und freizusetzen. Eine Überexpression von XAB2 könnte diese Prozesse verstärken. Darüber hinaus ist zelluläres alternatives Spleißen wichtig für die Ausbildung von viralen mRNAs, die für den Ionenkanal M2 (gespleißtes Transkript des Segments 7) oder das nukleare Exportprotein (NEP; gespleißtes Transkript des Segments 8) kodieren [35]. Das bedeutet, dass das Virus allein ohne Interaktion mit dem zellulären Splicisom nicht

in der Lage ist, alle notwendigen Proteine zu transkribieren. Folglich kann gesteigertes XAB2 die Menge an viralen Transkripten positiv beeinflussen und damit mehr Virusnachkommen freisetzen.

3.4. Zusammenfassung und Schlussfolgerung

In diesem Kapitel wurde eine neue modellbasierte Methodologie präsentiert, welche die Auswirkungen genetischer Modifikationen unter Berücksichtigung zellulärer Heterogenität auf die Gesamtausbeute in biopharmazeutischen Produktionsprozessen vorhersagen kann. Die Methodologie wurde für die Bewertung der Produktivität von IAV in A549-Zellen angewendet. Insbesondere wurde der Einfluss genetischer Modifikationen in Form von Genüberexpressionen ausgewählter Wirtszellfaktoren mittels lentiviraler Transduktion untersucht. Da die lentivirale Transduktion eine nicht-zielgerichtete Methode ist und die Anzahl der Genintegrationen innerhalb der Zellpopulation variiert, wird die natürliche Heterogenität zwischen Zellen noch weiter gesteigert. Die entstehende Variabilität wird hier im Rahmen einer populationsdynamischen Modellierung durch die Verteilung intrazellulärer viraler Komponenten und kinetischer Parameter ausgedrückt [39, 133]. Die Parameterverteilungen für SGOs wurden durch Bootstrap-Schätzungen unter Verwendung experimenteller Daten bestimmt und angewendet, um die Virusdynamik für jede SGO zu simulieren. Darüber hinaus kann mit dem Ansatz die Virusdynamik von MGOs auf der Grundlage einiger weniger SGO-Datensätze dargestellt werden. Dazu wurden vier verschiedene Strategien zur Kombination von SGO-Parameterverteilungen evaluiert, um die Parameterverteilungen von MGOs zu erhalten. Schließlich wurde mit der besten Strategie ein *in silico*-Screening möglicher MGOs durchgeführt, um so vielversprechende modifizierte Zelllinien bzgl. der Virusausbeute zu ermitteln. Die Ergebnisse können verwendet werden, um die Planung von Experimenten durch Vorauswahl von Genkonstrukten für die Kombination genetischer Modifikationen zu unterstützen. Der am Beispiel der IAV-Impfstoffproduktion durchgeführte Machbarkeitsnachweis wurde mithilfe von Daten durchgeführt, die im Rahmen des Projektes CellSys (Fördernummer 031 6189 A) erhoben wurden. Die experimentell untersuchten modifizierten Zelllinien weisen jedoch einen schwachen Einfluss auf die endgültige Virusausbeute auf. Wie bereits in einer Einführung zu diesem Kapitel erwähnt, ist die Auswahl möglicher Faktoren noch Bestandteil aktueller Forschung. Demzufolge sind auch die Maßnahmen des Virus auf veränderte Wirtszellen zu reagieren bisher weitestgehend unbekannt. Bekannte Antagonisten wie das NS1 oder PB1-F2 Protein könnten hierbei eine Rolle spielen [66]. Mit diesem Wissen und SGOs, die einen größeren Einfluss auf die Produktausbeute im Vergleich zur Kontrollzelllinie aufweisen, kann und sollte der Modellansatz zukünftig validiert und erweitert werden. Darüber hinaus kann die Vorgehensweise aus der Methodologie dargestellt in Abbildung 3.5 auf weitere biopharmazeutische Produktionsprozesse übertragen werden. Dabei stellen Produktionsprozesse zur Herstellung nicht-zytotoxischer Biopharmazeutika, wie z.B. therapeutische Antikörper, ein mögliches Anwendungsgebiet dar.

Die vorgestellte Methodik bleibt auch bei verbesserten genetischen Modifikationsmethoden weiterhin wichtig. Beispielsweise kann die zielgerichtete Integration der Genkonstrukte in die Zelle durch den Einsatz der CRISPR/Cas9 [171] oder Rekombinasevermittelten Kassettenaustauschmethode [174] gesteuert werden, aber die durch Transduktion verursachte Heterogenität innerhalb der genetisch modifizierten Zellpopulation sollte dennoch nicht gänzlich vernachlässigt werden [72]. Die natürliche Heterogenität der Zellen führt zu unterschiedlich ausgeprägter translationaler und transkriptioneller Aktivität, die auch bei gezielten, stabilen Genintegrationen eine Rolle spielt. Der Effekt dieser natürlichen Heterogenität wurde am Beispiel von IAV-infizierten Zellen gezeigt, welche auf Einzelzellniveau untersucht wurden [64]. Hier konnte herausgefunden werden, dass die Produktivität dieser Zellen ungefähr drei Größenordnungen umfasst.

Alles in allem wurde hier eine Methode vorgestellt, welche unter Verwendung geeigneter Multiskalen-Modelle den Einfluss der Heterogenität ausgelöst durch die Einbringung sowie Transkription und Translation von Genkonstrukten auf biopharmazeutische Produktionsprozesse beschreiben kann.

4. Ausblick

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Entwicklung und Anwendung von Multiskalen-Modellen für unterschiedliche biotechnologische Prozesse. Je nach Art des biotechnologischen Prozesses sind verschiedene Zielstellungen und demnach unterschiedliche Modellansätze von Bedeutung. Wie hier gezeigt werden konnte, sind Multiskalen-Modelle nützlich, um interessante Produkteigenschaften abbilden zu können (Produktion von PHAs). Darüber hinaus ermöglicht die Kopplung unterschiedlicher Detailebenen über hochdimensionale Populationsbilanzen die Untersuchung des Einflusses von heterogenen Prozessänderungen, die so detailliert in einem „Einzelebenen“-Modell nicht wiedergegeben werden können (Produktion von IAVs).

Für das Multiskalen-Modell zur Darstellung der Molmassenverteilung von Biopolymeren wurden die Parameter der Polymerisierungskinetik zunächst aus der Literatur entnommen. Zukünftig sollten diese Parameter mit eigenen experimentellen Daten identifiziert werden, um die Molmassenverteilung und deren charakteristische Größen noch besser abbilden zu können. Dafür ist die Berechnung der exakten experimentellen Molmassenverteilungen unter Hinzunahme der Messinformationen eines molmassensensitiven Detektors nötig. Wie in [76] gezeigt wurde, ist beispielsweise die Ratenkonstante für die Propagation der Ketten während der Akkumulation von PHB abhängig von der Medienzusammensetzung. Dieses Wissen sollte in zukünftigen Modellerweiterungen durch die Einführung dynamischer Variablen der Polymerisierungskinetik ebenfalls berücksichtigt werden. Auch reduzierte Betrachtungsweisen, wie die Darstellung der charakteristischen Größen über Momentenmodelle, sollten zukünftig getestet werden.

Weiterhin sollte der Einsatz des hier entwickelten metabolen Modells für die Darstellung der PHBV-Ausbeute und -Zusammensetzung als Werkzeug zur Online-Überwachung evaluiert werden. Zudem sollte an einem Regelungskonzept gearbeitet werden, welches die Zellen nicht mehr als Störgröße, sondern als das zu regelnde System betrachtet. Im Falle der Produktion von PHAs sollten hierfür Prozessparameter identifiziert werden, welche die Regelung des autogenen produzierten CO₂ ermöglichen. Schließlich sollte die Möglichkeit der Einflussnahme auf die Produktqualität beim Einsatz solcher Regelungsstrategien untersucht werden.

Auch für die Produktion anderer Biopolymere birgt das entwickelte Multiskalen-Modell großes Potential, die Produktqualität zu steigern und so beispielsweise auf kostenintensive weitere Formulierungsschritte zu verzichten oder ein breiteres Anwendungsspektrum zu erzeugen. Von besonderem Interesse ist hier Poly(4-Hydroxybutyrate) (P4HB), da dieses Polymer für medizinische Anwendungen zugelassen ist [164]. Schlussendlich sollte die entwickelte Methodologie aus Kapitel 3 auf andere zellkulturbasierte Verfahren übertragen werden. Ein industriell relevanter, aber extrem kostspieliger Prozess, der von genetischer Modifikation der Zellkultur profitieren würde, ist die Produktion von monoklonalen Antikörpern in Zellkulturen [178].

Appendix

A. PHA-Experimente

Tabelle A.1.: Zusammensetzung des Luria-Bertani-Mediums (LB-Medium) [32].

Name ¹	Chemische Formel	Konzentration
Trypton		10 g/L
Hefeextrakt		5 g/L
Natriumchlorid	NaCl	5 g/L

¹ Alle Chemikalien wurden von Carl Roth (Deutschland) bezogen.

Tabelle A.2.: Zusammensetzung des definierten Mediums für *C. necator* [34]. Konzentration der Kohlenstoff und Stickstoffquellen sind im Haupttext separat angegeben.

Name ¹	Chemische Formel	Konzentration
Kaliumdihydrogenphosphat	KH_2PO_4	2.30 g/L
Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	2.90 g/L
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0.50 g/L
Calciumchlorid-Dihydrat	$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0.01 g/L
Ammonium Eisen(III)-citrat	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times x\text{Fe} \times x\text{H}_3\text{N}$	0.05 g/L
Spurenelemente-Lösung SL-6	siehe Tabelle A.3	5.00 mL/L

¹ Alle Chemikalien wurden von Carl Roth (Deutschland) bezogen.

Tabelle A.3.: Zusammensetzung der Spurenelementelösung SL-6 [33].

Name ¹	Chemische Formel	Konzentration
Zinksulfat-Heptahydrat	$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0.10 g/L
Manganchlorid-Tetrahydrat	$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	0.03 g/L
Borsäure	H_3BO_3	0.30 g/L
Kobaltchlorid-Hexahydrat	$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	0.20 g/L
Kupfer(II)chlorid-Dihydrat	$\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0.01 g/L
Nickel(II)chlorid-Hexahydrat	$\text{NiCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	0.02 g/L
Natriummolybdat-Dihydrat	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0.03 g/L

¹ Alle Chemikalien wurden von Carl Roth (Deutschland) bezogen.

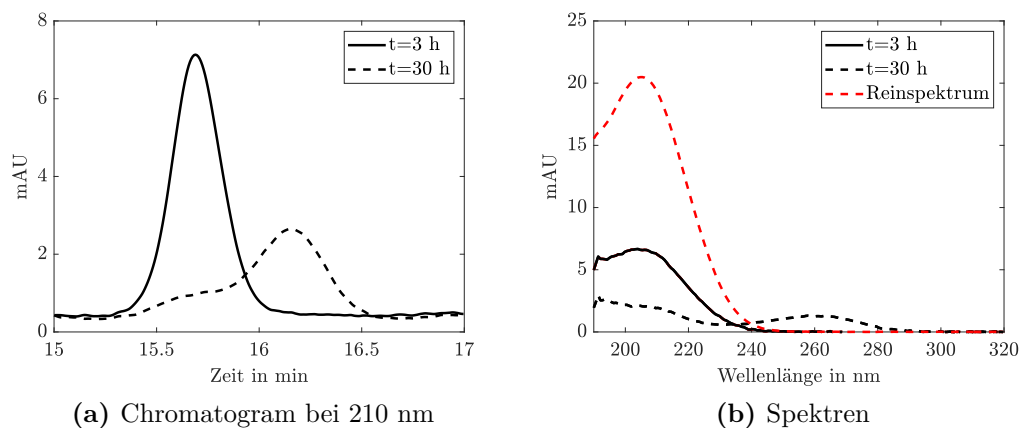


Abbildung A.1.: Peaks für Propionsäure aus dem Experiment IV bei 3 und 30 h. Gezeigt sind die Chromatogramme für beide Proben zum Elutionszeitpunkt von Propionsäure bei einer Wellenlänge von 210 nm (a) und die Überlagerung der dazugehörigen Spektren (schwarze Kurven) (b). Zusätzlich ist das Reinstoffspektrum von Propionsäure bei 1 g/L gezeigt (rot gestrichelte Kurve).

B. Metaboles Modell des PHB-Produktionsprozesses

Tabelle B.1.: Metaboles Netzwerk für den PHB-Prozess basierend auf den Publikationen [51] und [181].

Nr.	Reaktion
1	$\text{FRU} + \text{PEP} + \text{ATP} \longrightarrow \text{F16P} + \text{PYR} + \text{ADP}$
2	$\text{F16P} \longrightarrow \text{F6P}$
3	$\text{F16P} \longleftrightarrow 2 \text{G3P}$
4	$\text{AMC} \longrightarrow \text{NH}_3$
5	$\text{G6P} + 2 \text{NADP} \longrightarrow \text{R15P} + \text{CO}_2 + 2 \text{NADPH}$
6	$\text{R15P} \longleftrightarrow \text{R5P}$
7	$\text{R15P} \longleftrightarrow \text{X5P}$
8	$\text{X5P} + \text{R5P} \longleftrightarrow \text{S7P} + \text{G3P}$
9	$\text{S7P} + \text{G3P} \longleftrightarrow \text{E4P} + \text{F6P}$
10	$\text{X5P} + \text{E4P} \longleftrightarrow \text{G3P} + \text{F6P}$
11	$\text{F6P} \longleftrightarrow \text{G6P}$
12	$\text{G3P} + \text{NAD} + \text{ADP} \longleftrightarrow 3\text{PG} + \text{NADH} + \text{ATP}$
13	$3\text{PG} \longleftrightarrow \text{PEP}$
14	$\text{PEP} + \text{ADP} \longleftrightarrow \text{PYR} + \text{ATP}$
15	$\text{OXA} + \text{ATP} \longleftrightarrow \text{PEP} + \text{ADP} + \text{CO}_2$
16	$\text{PYR} + \text{NAD} \longleftrightarrow \text{AcCoA} + \text{NADH} + \text{CO}_2$
17	$\text{AcCoA} + \text{OXA} \longleftrightarrow \text{ISC}$
18	$\text{ISC} + \text{NADP} \longleftrightarrow \alpha\text{KG} + \text{NADPH} + \text{CO}_2$
19	$\alpha\text{KG} + \text{NAD} \longrightarrow \text{SucCoA} + \text{NADH} + \text{CO}_2$
20	$\text{SucCoA} + \text{ADP} \longleftrightarrow \text{SUC} + \text{ATP}$
21	$\text{SUC} \longrightarrow \text{SUCx}$
22	$\text{SUC} + \text{FAD} \longleftrightarrow \text{MAL} + \text{FADH}$
23	$\text{MAL} + \text{NAD} \longleftrightarrow \text{OXA} + \text{NADH}$
24	$\text{MAL} + \text{NADP} \longleftrightarrow \text{PYR} + \text{CO}_2 + \text{NADPH}$
25	$\text{PYR} + \text{ATP} \longrightarrow \text{OXA} + \text{ADP}$
26	$\text{ISC} \longrightarrow \text{SUC} + \text{GOX}$
27	$\text{AcCoA} + \text{GOX} \longrightarrow \text{MAL}$
28	$\text{NH}_3 + \alpha\text{KG} + \text{NADPH} \longleftrightarrow \text{GLU} + \text{NADP}$
29	$\text{GLU} + \text{NH}_3 + \text{ATP} \longleftrightarrow \text{GLN} + \text{ADP}$
30	$2 \text{AcCoA} \longleftrightarrow \text{AcAcCoA}$
31	$\text{AcAcCoA} + \text{NADPH} \longrightarrow \text{HB} + \text{NADP}$

Tabelle B.1 Fortsetzung: Metaboles Netzwerk für den PHB-Prozess basierend auf den Publikationen [51] und [181].

32	$\text{ACE} + \text{ATP} \longleftrightarrow \text{AcCoA} + \text{AMP}$
33	$\text{HB} + \text{NAD} \longleftrightarrow \text{AcACE} + \text{NADH}$
34	$\text{AcACE} + \text{SucCoA} \longleftrightarrow \text{AcAcCoA} + \text{SUC}$
35	$\text{AcACE} + \text{ATP} \longrightarrow \text{AcCoA} + \text{AMP}$
36	$2 \text{NADH} + \text{O}_2 + 4 \text{ADP} \longrightarrow 2 \text{NAD} + 4 \text{ATP}$
37	$\text{ATP} + \text{AMP} \longleftrightarrow 2 \text{ADP}$
38	$2 \text{FADH} + \text{O}_2 + 2 \text{ADP} \longrightarrow 2 \text{FAD} + 2 \text{ATP}$
39	$0.21 \text{G6P} + 0.07 \text{F6P} + 0.9 \text{R5P} + 0.36 \text{E4P} + 0.13 \text{G3P} + 1.5 \text{3PG} + 0.52 \text{PEP} + 2.83 \text{PYR} + 3.74 \text{AcCoA} + 1.79 \text{OXA} + 8.32 \text{GLU} + 0.25 \text{GLN} + 41.1 \text{ATP} + 8.26 \text{NADPH} + 3.12 \text{NAD} \longrightarrow \text{BIO} + 7.51 \alpha\text{KG} + 2.61 \text{CO}_2 + 41.1 \text{ADP} + 8.26 \text{NADP} + 3.12 \text{NADH}$ [75]

Alle stöchiometrischen Koeffizienten sind in mmol angegeben. Eine Ausnahme bildet der Koeffizient vor BIO in g.

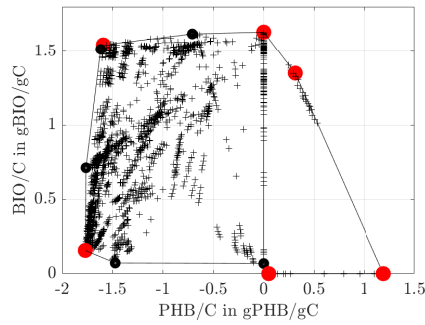


Abbildung B.1.: Ausbeuteraum für Biomasse und PHB beim Verbrauch von Fruktose. Legende: schwarzer Strich - konvexe Hülle, rote und schwarze Kreise - alle GMs, rote Kreise - GMs für die Bildung der reduzierten konvexen Hülle

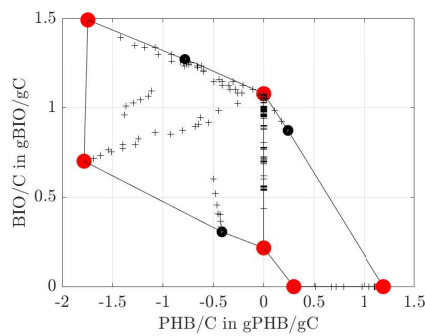


Abbildung B.2.: Ausbeuteraum für Biomasse und PHB beim Verbrauch von Acetat. Legende: schwarzer Strich - konvexe Hülle, rote und schwarze Kreise - alle GMs, rote Kreise - GMs für die Bildung der reduzierten konvexen Hülle

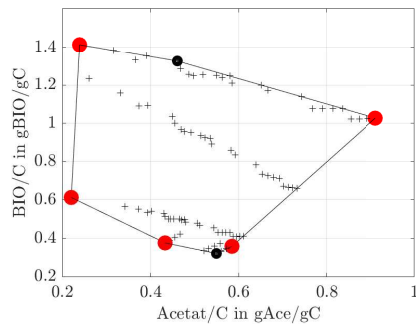


Abbildung B.3.: Ausbeuteraum für Biomasse und Acetat beim Verbrauch von PHB. Legende: schwarzer Strich - konvexe Hülle, rote und schwarze Kreise - alle GMs, rote Kreise - GMs für die Bildung der reduzierten konvexen Hülle

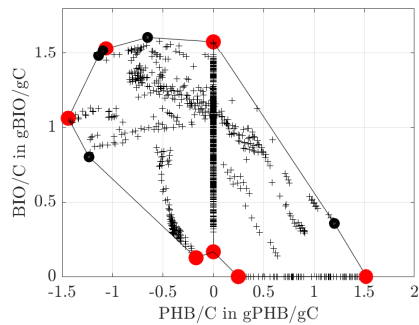


Abbildung B.4.: Ausbeuteraum für Biomasse und PHB beim Verbrauch von Acetat und Fruktose. Legende: schwarzer Strich - konvexe Hülle, rote und schwarze Kreise - alle GMs, rote Kreise - GMs für die Bildung der reduzierten konvexen Hülle

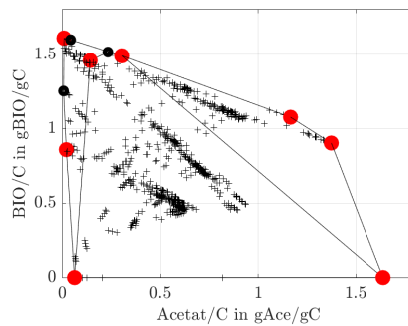


Abbildung B.5.: Ausbeuteraum für Biomasse und Acetat beim Verbrauch von Fruktose. Legende: schwarzer Strich - konvexe Hülle, rote und schwarze Kreise - alle GMs, rote Kreise - GMs für die Bildung der reduzierten konvexen Hülle

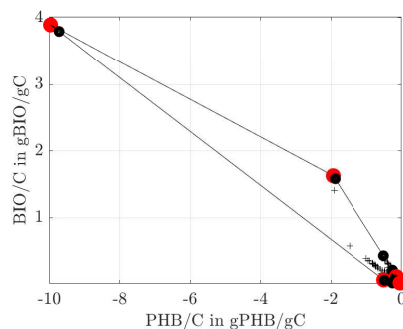


Abbildung B.6.: Ausbeuteraum für die Produktion von Biomasse und dem Verbrauch von PHB. Legende: schwarzer Strich - konvexe Hülle, rote und schwarze Kreise - alle GMs, rote Kreise - GMs für die Bildung der reduzierten konvexen Hülle

Tabelle B.2.: Feste Parameter für das HCM zur Beschreibung des PHB-Produktionsprozesses

Konstante	Wert
k_e [1/h]	$0.1^{12 \times 1}$
α [1/h]	$0.01 k_e$
β [1/h]	$5^{12 \times 1}$
K_N [g/L]	0.01
K_{FRU} [g/L]	0.06
K_{ACE} [g/L]	0.03
K_{HB} [g/L]	0.05

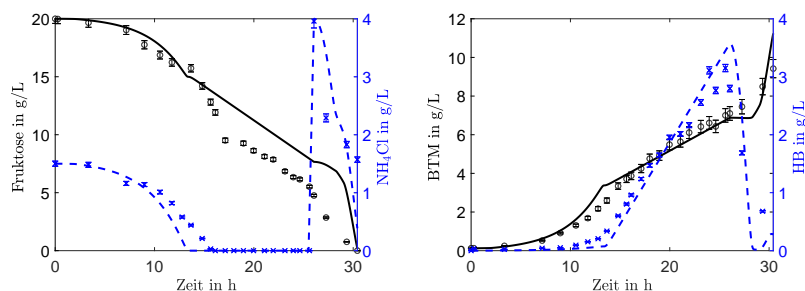


Abbildung B.7.: Konzentrationsverläufe des Experiments aus [51] unter Verwendung der kinetischen Parameter aus Vektor (2.4.1). Experimentelle Daten (Kreise und Kreuze) und die simulierten Verläufe (durchgezogene und gestrichelte Linien) von Fructose (schwarz, links), Ammoniumchlorid (NH₄Cl, blau, links), Gesamtbiomasse (BTM, schwarz, rechts) und PHB (HB, blau, rechts) Konzentrationen sind gezeigt.

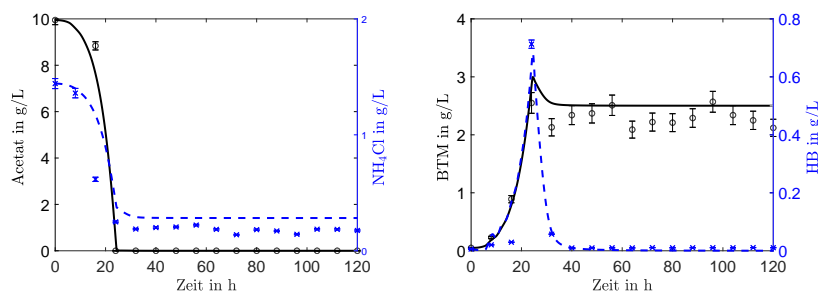


Abbildung B.8.: Dynamisches Verhalten für Experiment III unter Verwendung der kinetischen Parameter aus dem Vektor in Gleichung (2.4.1). Experimentelle Daten (Kreise und Kreuze) und die simulierten Verläufe (durchgezogene und gestrichelte Linien) von Fructose (schwarz, links), Ammoniumchlorid (NH₄Cl, blau, links), Gesamtbiomasse (BTM, schwarz, rechts) und PHB (HB, blau, rechts) Konzentrationen sind gezeigt.

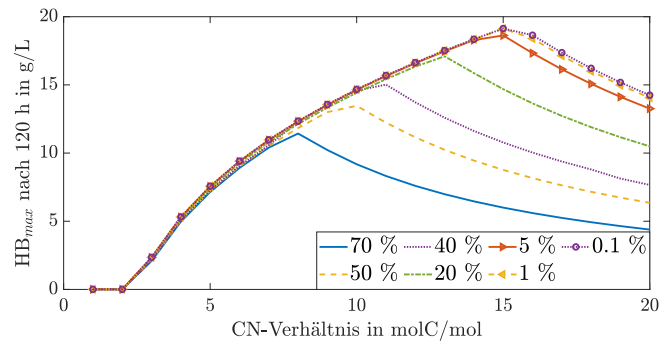


Abbildung B.9.: PHB-Konzentration nach 120 h für unterschiedliche DOs (Legende) und CN-Verhältnisse. Als Startwerte für Substrate, PHB und Biomasse wurde die Bedingungen aus dem Versuch in Abbildung 2.13 gewählt.

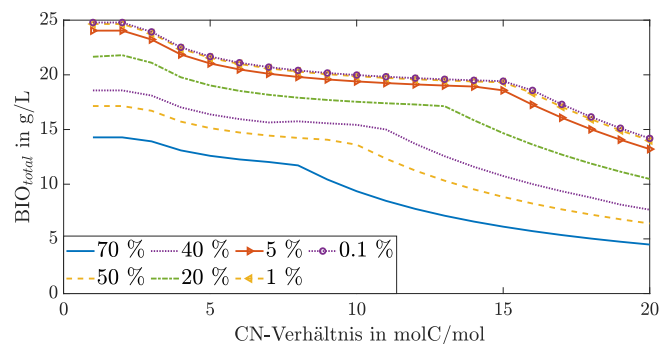


Abbildung B.10.: Gesamtbiomasse nach 120 h für unterschiedliche DOs (Legende) und CN-Verhältnisse. Als Startwerte für Substrate, PHB und Biomasse wurde die Bedingungen aus dem Versuch in Abbildung 2.13 gewählt.

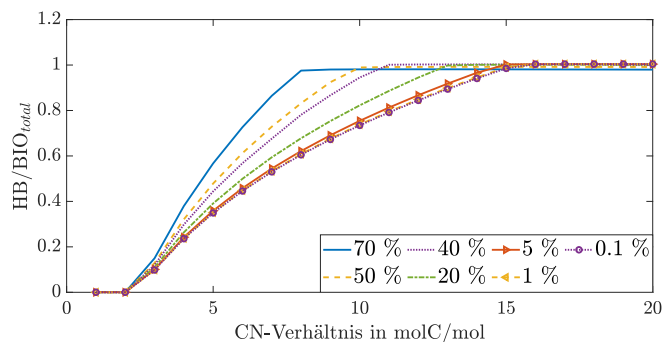


Abbildung B.11.: Anteil von PHB in der Gesamtbiomasse nach 120 h für unterschiedliche DOs (Legende) und CN-Verhältnisse. Als Startwerte für Substrate, PHB und Biomasse wurde die Bedingungen aus dem Versuch in Abbildung 2.13 gewählt.

C. Metaboles Modell des PHBV-Produktionsprozesses

Tabelle C.1.: Kinetische Parameter, Startwerte und Variablen für das makroskopische PHBV-Modell.

Parameter	Einheit	Beschreibung	Wert
angepasst			
k_1	$[L^2/g^2h]$	Verbrauch von Fruktose und Ammonium für Wachstum	
k_2	$[L^2/g^2h]$	Verbrauch von Propionsäure und Ammonium für Wachstum	
k_3	$[L^2/g^2h]$	HA Verbrauch	
k_4	$[L/g h]$	Abbau von Fruktose zur HB Akkumulation	siehe (C.2)
k_5	$[L/g h]$	Abbau von Propionsäure zur HB Akkumulation	
k_6	$[L/g h]$	Abbau von Propionsäure zur HV Akkumulation	
k_7	$[L^2/g^2h]$	Fruktoseabbau für Maintenance	
k_8	$[L^2/g^2h]$	Propionsäureabbau für Maintenance	
fixiert			
$c_{p,inh}$	$[g/L]$	inhibitorische Propionsäurekonzentration	1.5 [78]
$c_{n,sw}$	$[g/L]$	Michalis-Menten Konstante für Ammoniumchlorid	0.2
$c_{p,in}$	$[g/L]$	Propionsäurekonzentration im Zufluss	20
$c_{fru}(0)$	$[g/L]$	initiale Fruktosekonzentration	
		Datenset 1/ Datenset 2	21.96 / 21.75
$c_p(0)$	$[g/L]$	initiale Propionsäurekonzentration	
		Datenset 1/ Datenset 2	0 / 0.48
$c_n(0)$	$[g/L]$	initiale Ammoniumchloridkonzentration	
		Datenset 1/ Datenset 2	1.74 / 1.40
$c_{res}(0)$	$[g/L]$	initiale residuale Biomasse	
		Datenset 1/ Datenset 2	1.47 / 1.16

Tabelle C.1 Fortsetzung: Kinetische Parameter, Startwerte und Variablen für das makroskopische PHBV-Modell.

$c_{hb}(0)$	[g/L]	initiale HB Konzentration	
		Datenset 1/ Datenset 2	0.03 / 0.03
$c_{hv}(0)$	[g/L]	initiale HV Konzentration	
		Datenset 1/ Datenset 2	0 / 0.01
P_t	[g/L]	HA (HB+HV) Konzentration	zeitabhängig
$CO_{2,out}$	[%]	CO ₂ im Abgas	Messung
$CO_{2,in}$	[%]	CO ₂ in der Zuluft	Messung
b_{CO_2}	[-]	CO ₂ abhängige metabolische Aktivität	zeitabhängig
D	[-]	Verdünnungsrate	zeitabhängig
F_{in}	[%]	Flussrate für Propionsäure	pH-abhängig [78]
$P_{t,max}$	[-]	maximaler PHA Gehalt	0.89 [159]

Tabelle C.2.: Geschätzte Parameter für die Modellvarianten A bis D des makroskopischen PHBV-Modells

Parameter	Einheit	Modell A	Modell B	Modell C	Modell D
k_1	[L ² /g ² h]	$4.34 \cdot 10^{-6}$	$4.75 \cdot 10^{-4}$	$9.74 \cdot 10^{-5}$	0.0022
k_2	[L ² /g ² h]	0.0048	0.0280	0.0048	0.0851
k_3	[L ² /g ² h]	0.0713	0.0775	0.0253	0.0165
k_4	[L/g h]	0.0563	0.0417	$8.08 \cdot 10^{-4}$	0.0092
k_5	[L/g h]	0.6803	1.2003	2.5953	2.3024
k_6	[L/g h]	2.0208	1.7730	2.0526	1.8790
k_7	[L ² /g ² h]	$3.42 \cdot 10^{-4}$	0.0044	$3.95 \cdot 10^{-4}$	0.0056
k_8	[L ² /g ² h]	0.0125	0.0696	0.0014	0.0202

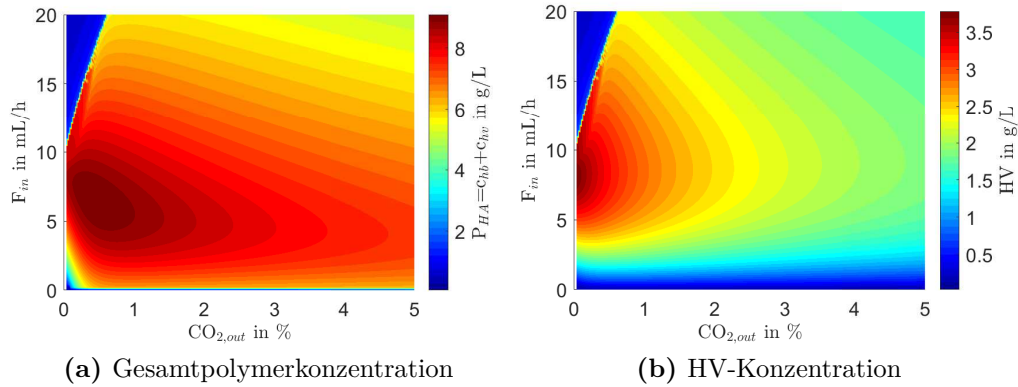


Abbildung C.1.: Simulationsstudie ausgewertet bei maximaler HV-Masse - Gesamtpolymerkonzentration (a) und HV-Konzentrationen (b) bei verschiedenen konstanten Werten für CO₂ im Abgas und die Flussrate für Propionsäure F_{in} .

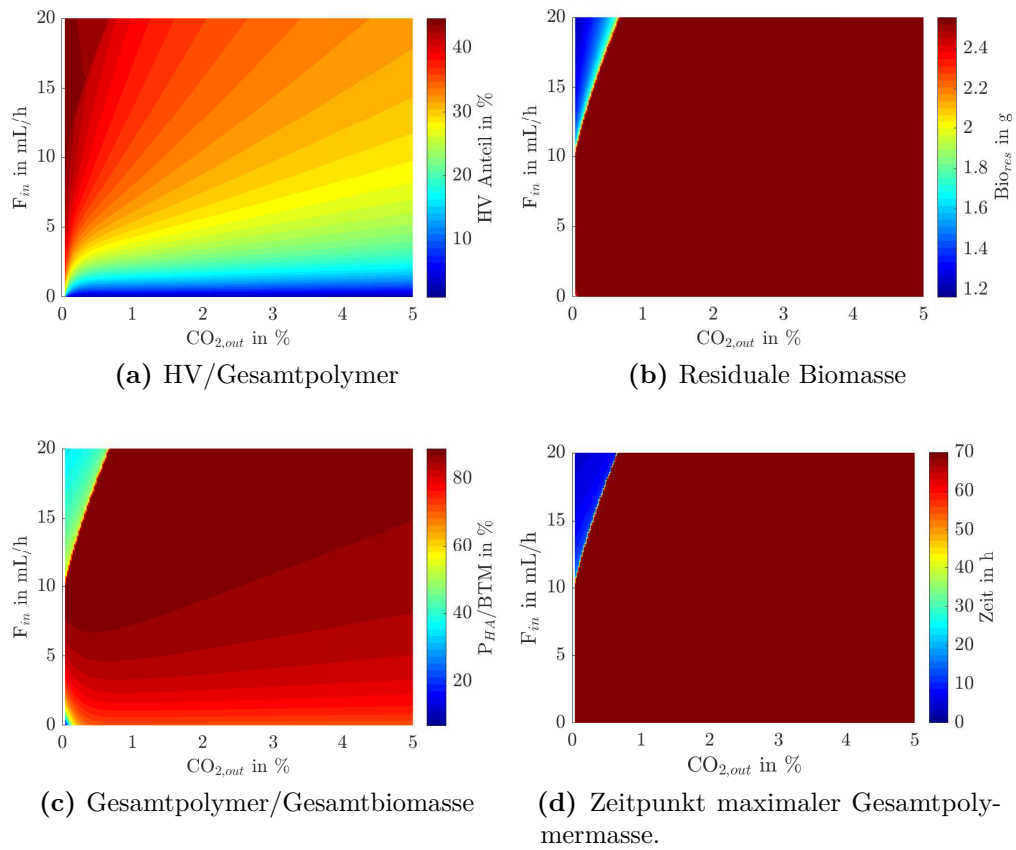


Abbildung C.2.: Simulationsstudie ausgewertet bei maximaler Gesamtpolymermasse unter Verwendung von verschiedenen konstanten Werten für CO_2 im Abgas und die Flussrate für Propionsäure F_{in} - weitere charakteristische Werte.

D. Polymerisierungskinetik für PHB und PHBV

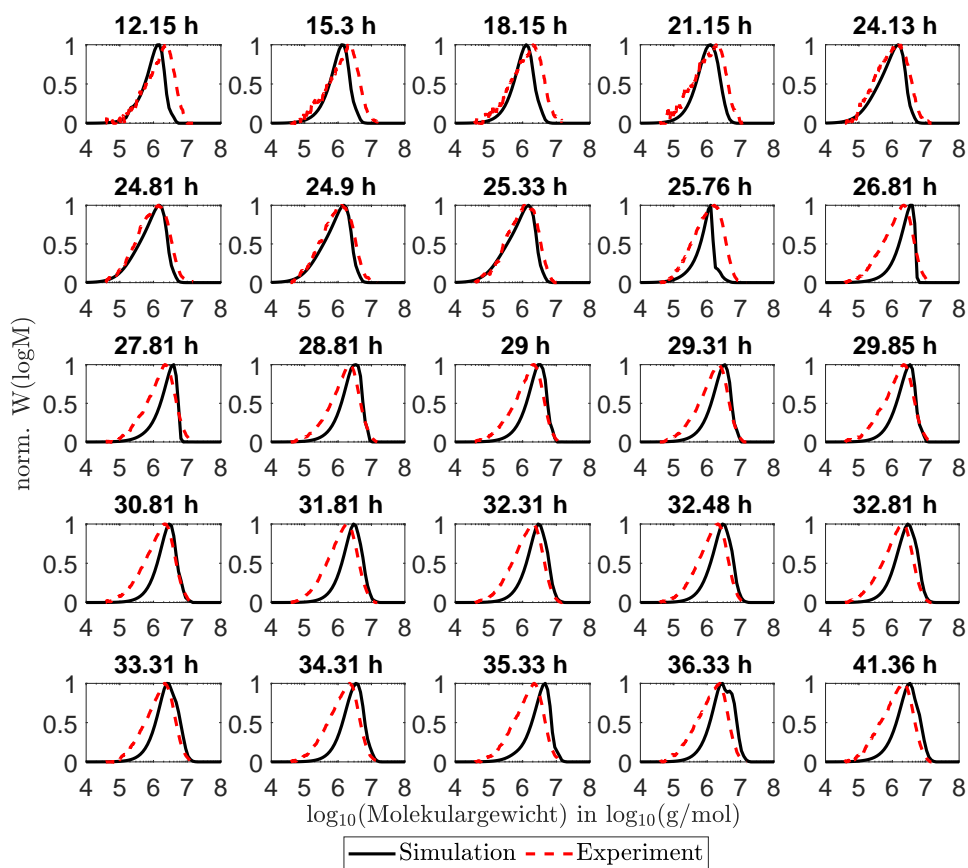


Abbildung D.1.: $W(\log M)$ für das Experiment III. Experimentelle (rot gestrichelte Kurven) und simulierte (schwarze Kurven) normierte differentielle Verteilungen $W(\log M)$ für die einzelnen Zeitpunkte. Fruktose und Acetat sind Kohlenstoffquellen.

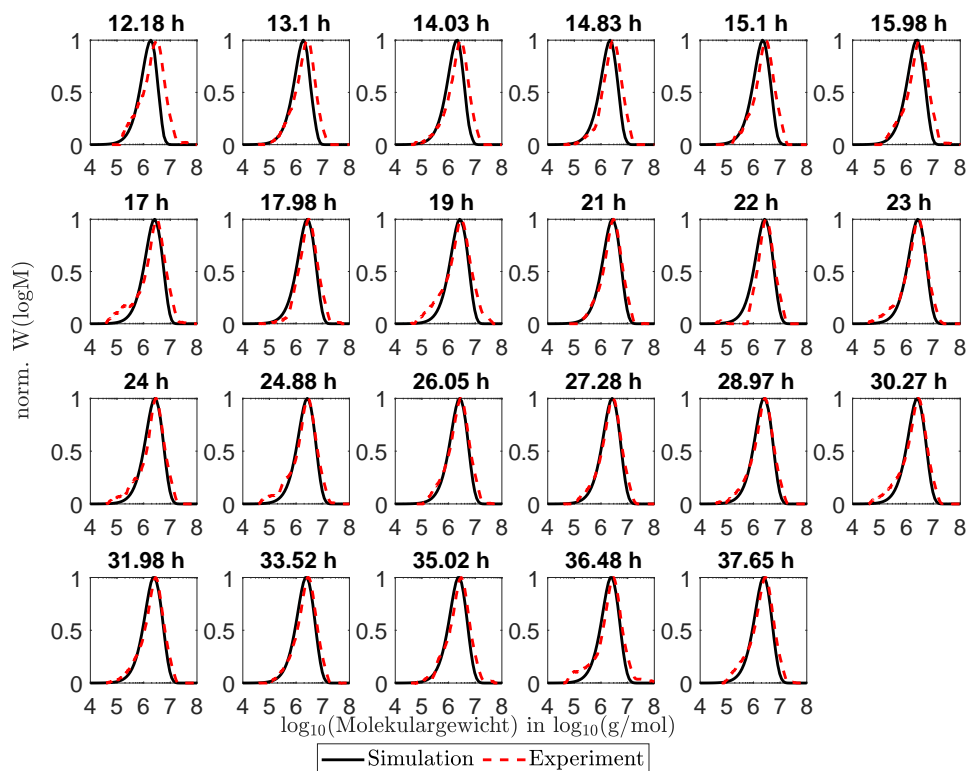


Abbildung D.2.: $W(\log M)$ -Verteilungen für das Experiment IV. Experimentelle (rot gestrichelte Kurven) und simulierte (schwarze Kurven) normierte differentielle Verteilungen $W(\log M)$ für die einzelnen Zeitpunkte. Fruktose und Propionsäure sind Kohlenstoffquellen.

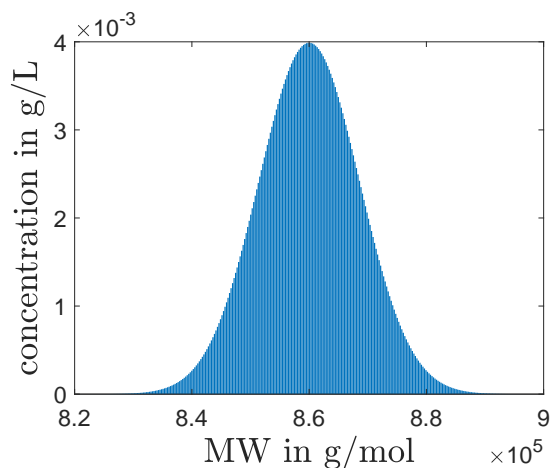


Abbildung D.3.: Startverteilung für aktive Polymere entspricht einer Normalverteilung mit dem Mittelwert $\mu = 86 \cdot 10^4$ g/mol und einer Standardabweichung $\sigma = 10^2$ g/mol.

E. Modellierung des Influenza-A-Impfstoffprozesses

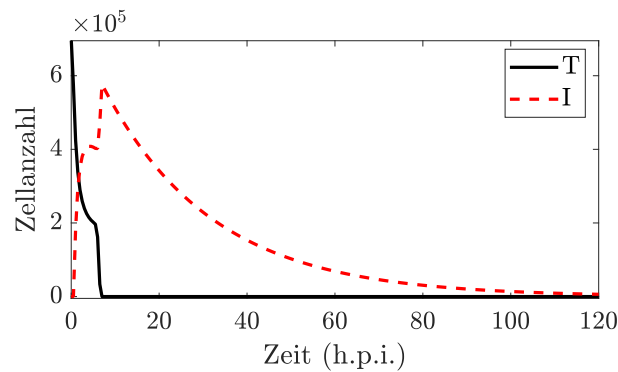


Abbildung E.1.: Zeitliche Entwicklung der uninfizierten und infizierten Zellen nach Infektion mit einer MOI von 1. Die Parameterverteilungen der Kontrollzelllinie (A549) wurde für die Simulation genutzt.

Tabelle E.3.: RMS-Werte für die Simulation unter Verwendung der Parameterverteilungen von SGOs. Die Daten der Infektionsexperimente der Einzelgenüberexpressionen aus Abbildung 3.7 wurden für die Berechnung verwendet.

	A549	EMCV	CEACAM6	FANCG	NXF1	PLD2	XAB2
RMS	0.58	0.54	0.52	0.36	0.32	0.49	0.50

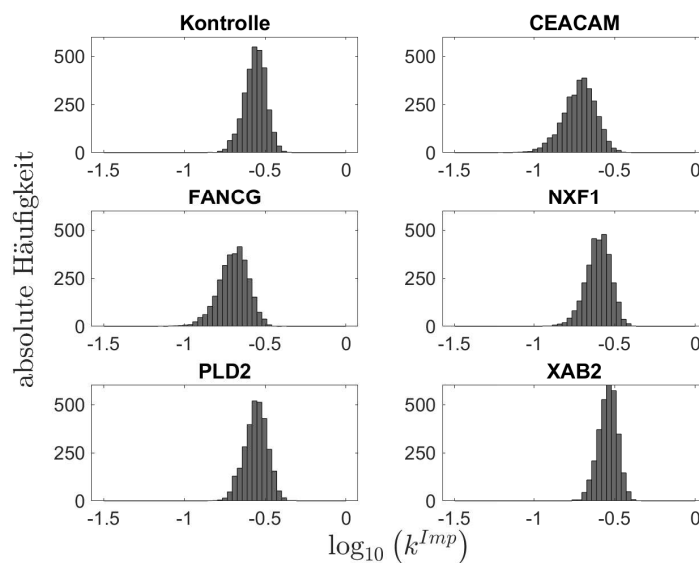


Abbildung E.2.: Parameterverteilung für den kinetischen Parameter $\log_{10}(k^{Imp})$. Ein parametrischer Bootstrap wurde zur Generierung der Verteilungen durchgeführt [47]. Dafür wurden die Parameter an 1000 zufällig generierte Messdatensets auf Basis der Datenpunkte und deren Standardabweichung mehrfach angepasst.

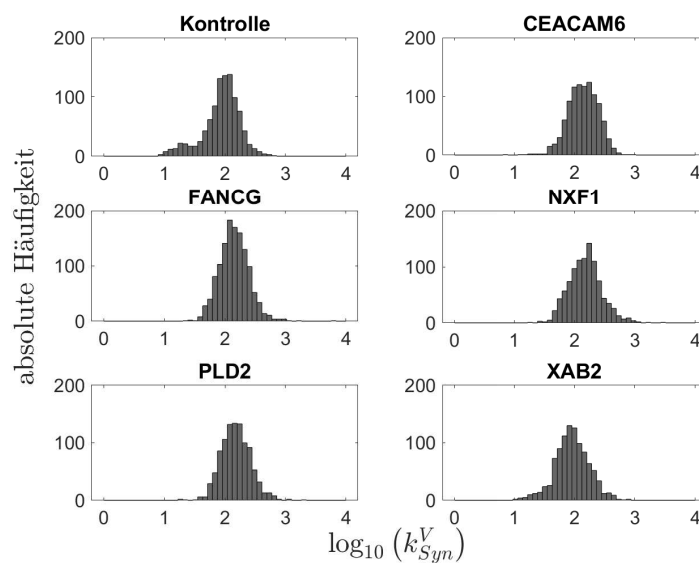


Abbildung E.3.: Parameterverteilung für den kinetischen Parameter $\log_{10}(k_{Syn}^V)$. Details für die Generierung der Verteilung kann der Abbildungsunterschrift von Abbildung E.2 entnommen werden.

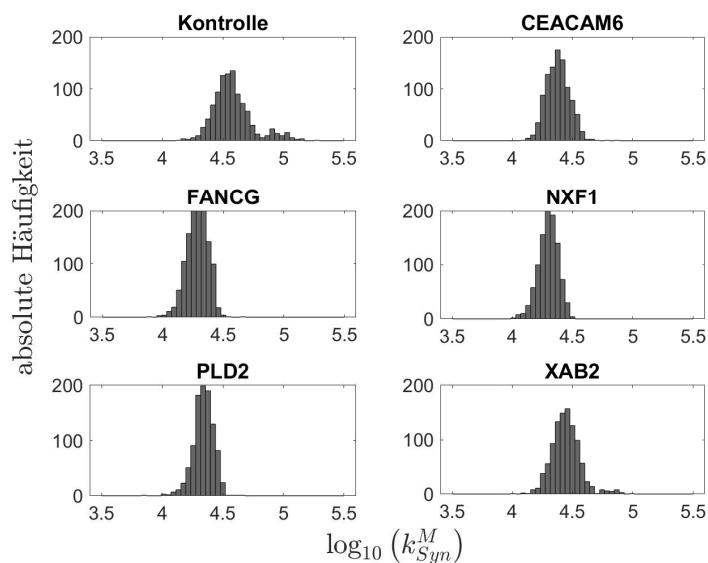


Abbildung E.4.: Parameterverteilung für den kinetischen Parameter $\log_{10}(k_{M}^{Syn})$. Details für die Generierung der Verteilung kann der Abbildungsunterschrift von Abbildung E.2 entnommen werden.

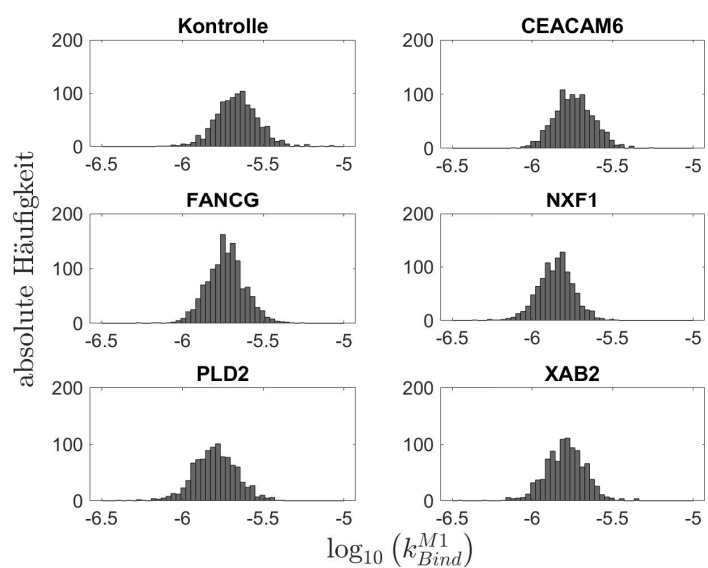


Abbildung E.5.: Parameterverteilung für den kinetischen Parameter $\log_{10}(k_{M1}^{Bind})$. Details für die Generierung der Verteilung kann der Abbildungsunterschrift von Abbildung E.2 entnommen werden.

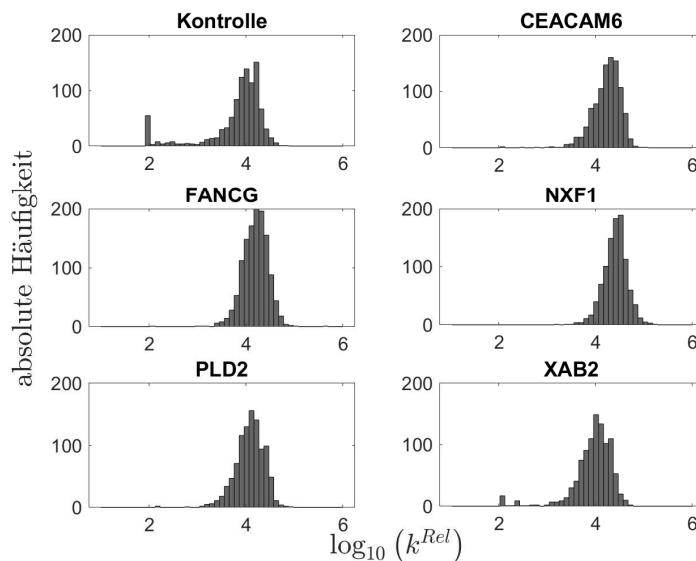


Abbildung E.6.: **Parameterverteilung für den kinetischen Parameter $\log_{10}(k^{Rel})$.** Details für die Generierung der Verteilung kann der Abbildungsunterschrift von Abbildung E.2 entnommen werden.

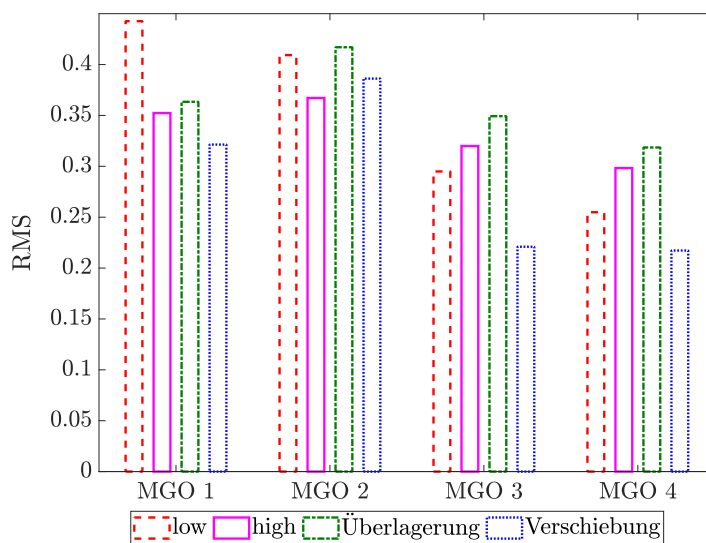


Abbildung E.7.: **RMS-Werte aufgeteilt nach MGO und Strategie zur Generierung der Verteilung.** Die Werte für jede Strategie wurde wie in Kapitel 3.3 beschrieben berechnet. Details über die modifizierten Gene sind in Tabelle 3.1 zu finden.

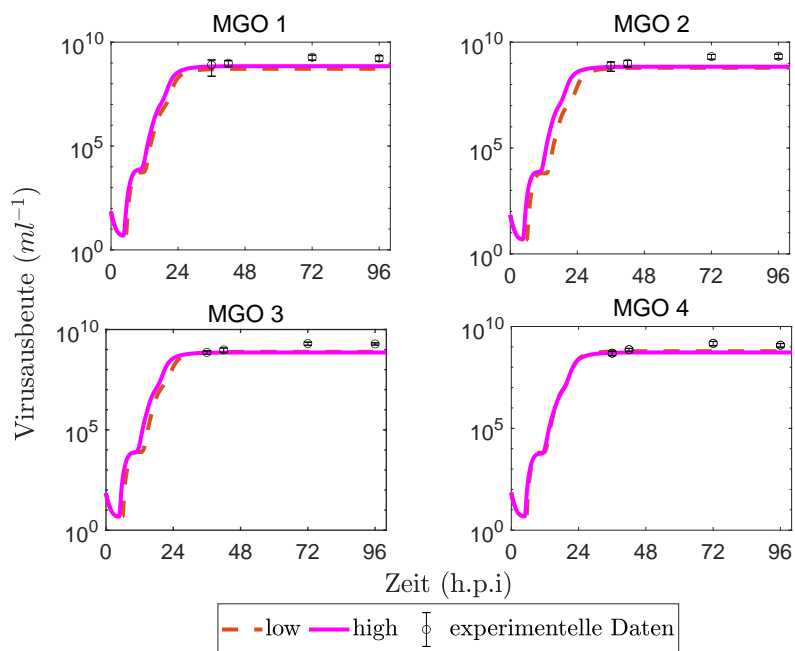


Abbildung E.8.: Experimentelle Daten und Modellsimulation unter Verwendung der Parameterverteilungen generiert mit der *low* und *high impact* Strategie. Alle validierten MGOs wurden bei einer MOI von 10^{-4} infiziert. Details über die modifizierten Gene sind in Tabelle 3.1 zu finden.

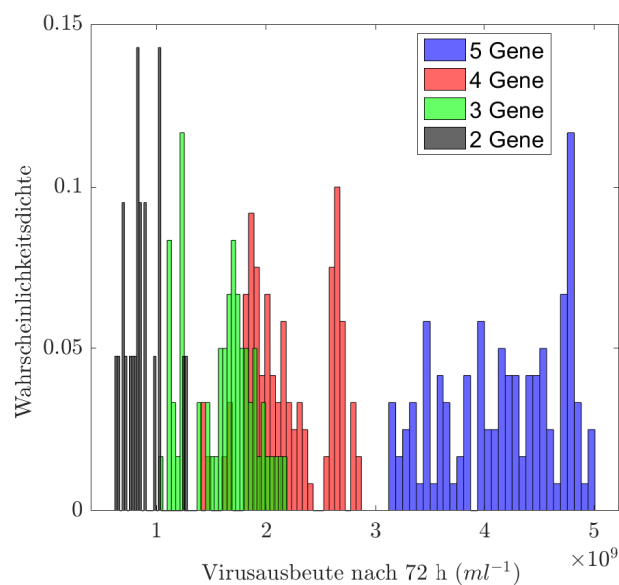


Abbildung E.9.: Histogramm für die Virusausbeute aller MGO-Kombinationen sortiert nach Anzahl der modifizierten Gene. Für die Modifikation ausgewählte Gene sind CEACAM6, FANCG, NXF1, PLD2 und XAB2.

Tabelle E.1.: Kinetische Parameter für das Multiskalen-Modell zur Beschreibung der IAV-Produktion

Parameter	Wert	Einheit	Parameter	Wert	Einheit
intrazelluläres Modell (Kapitel 3.2.1) [62, 63]					
D_{Rib}	160	Anzahl	k_P^{Syn}	64800	Nukleotide·h ⁻¹
F_{Spl7}	0.02	-	k_V^{Syn}	verteilt	h ⁻¹
F_{Spl8}	0.125	-	K_{Vrel}	300	Virionen
k_{M1}^{Bind}	verteilt	Moleküle·h ⁻¹	L_1	2320	Nukleotide
k_{NP}^{Bind}	3.01 10 ⁻⁴	Moleküle·h ⁻¹	L_2	2320	Nukleotide
k_{RdRp}^{Bind}	1	Moleküle/h	L_3	2211	Nukleotide
k_M^{Deg}	0.33	h ⁻¹	L_4	1757	Nukleotide
k_R^{Deg}	36.36	h ⁻¹	L_5	1540	Nukleotide
k_{Rnp}^{Deg}	0.09	h ⁻¹	L_6	1392	Nukleotide
k_{RRdRp}^{Deg}	4.25	h ⁻¹	L_7	1005	Nukleotide
k^{Exp}	1.00 10 ⁻⁶	Moleküle·h ⁻¹	L_8	868	Nukleotide
k^{Imp}	verteilt	h ⁻¹	L_v	2320	Nukleotide
k^{RdRp}	1	Moleküle ⁻² ·h ⁻¹	N_{M1}^{Nuc}	200	Nukleotide
k^{Rel}	verteilt	Virion·h ⁻¹	N_{NEP}^{Nuc}	1700	Nukleotide
k_C^{Syn}	verteilt	h ⁻¹	N_{NP}^{Nuc}	24	Nukleotide
k_M^{Syn}	verteilt	Nukleotide·h ⁻¹			
extrazelluläres Modell (Kapitel 3.2.2) [62]					
B_{hi}^{tot}	150	Bindestelle/Zelle	k^{Rel}	586	Viren/h
B_{lo}^{tot}	1000	Bindestelle/Zelle	k_T^{Apo}	7.35 10 ⁻³	h ⁻¹
F_{inf}	1	Zellen/Virion	k_V^{Deg}	0.1	h ⁻¹
g_{max}	0.03	h ⁻¹	K_{Vrel}	300	virions
k_{hi}^{Att}	8.09 10 ⁻²	Bindestellen h	T_{max}	7 10 ⁵	cells/mL
k_{lo}^{Att}	4.55 10 ⁻⁴	Bindestellen h	N_{PHA}	500	Moleküle/Virus
k_{hi}^{Equ}	1.13 10 ⁻²	Bindestellen	N_{PNA}	100	Moleküle/Virus
k_{lo}^{Equ}	8.33 10 ⁻⁵	Bindestellen	N_{NEP}	165	Moleküle/Virus
k^{En}	4.8	h ⁻¹	N_{PNP}	1000	Moleküle/Virus
k^{Fus}	3.21	h ⁻¹	N_{PM1}	3000	Moleküle/Virus
k_I^{Apo}	3.28 10 ⁻²	h ⁻¹	N_{PM2}	40	Moleküle/Virus
k^{Lys}	6.39 10 ⁻²	h ⁻¹	N_{RdRp}	45	Moleküle/Virus

Tabelle E.2.: Relatives Überexpressionslevel (engl. *fold overexpression level*, FOE) der Einzelgenüberexpressionen in A549-Zellen nach lentiviraler Transduktion.

	CEACAM6	FANCG	NXF1	PLD2	XAB2
FOE	18.63	6.86	1.50	14.00	3.30

Abbildungsverzeichnis

2.1. Metaboler Reaktionspfad für die Produktion von PHA (z.B. PHBV) ausgehend von Acetyl-CoA und Propionyl-CoA	10
2.2. Einflussfaktoren auf Eigenschaften und Prozessbedingungen der PHB-Produktion.	11
2.3. Literaturanalyse mit <i>Scopus</i>	13
2.4. Übliche Ein- und Ausgänge am Bioreaktor.	19
2.5. Einfluss der Modellstruktur auf die Dynamik von Substrat, Biomasse und Produkt am Beispiel der Definitionen der Wachstumsrate μ	21
2.6. Beispiel für ein stöchiometrisches Netzwerk mit zwei Substraten und zwei Produkten.	24
2.7. Darstellung der EMen im Fluss- und Ausbeuteraum.	26
2.8. Metaboles Modell auf Basis von [51] und [181].	38
2.9. Gesamter Ausbeuteraum	41
2.10. Ausbeuten der verschiedenen Experimente.	42
2.11. Simulierter Zeitverlauf und experimentelle Daten der Substrate und Produkte für Fruktose als Einzelkohlenstoffquelle (Experiment I).	44
2.12. Simulierter Zeitverlauf und experimentelle Daten der Substrate und Produkte für Acetat als Einzelkohlenstoffquelle (Experiment II).	45
2.13. Simulierter Zeitverlauf und experimentelle Daten der Substrate und Produkte für Fruktose und Acetat als Kohlenstoffquellen (Experiment III).	46
2.14. CO ₂ -Anteile im Abgas aus Experiment I und III.	47
2.15. PHB-Konzentration nach 120 Stunden in Abhängigkeit des CN-Verhältnisses und ausgewählten DOs.	48
2.16. Allgemeines Schema für die modellierten Prozesse im Polymerisierungsansatz.	50
2.17. Abgleich der totalen PHB-Polymerkonzentrationen	54
2.18. Simulierte Kettenlängenverteilung für das Experiment III.	55
2.19. Charakteristische Werte der Verteilung des Experiments III	56
2.20. Charakteristische Werte der Verteilungen bei einem DO von 70 % und unterschiedlichen CN-Verhältnissen.	58
2.21. Charakteristische Werte der Verteilungen bei einem DO von 20 % und unterschiedlichen CN-Verhältnissen.	58
2.22. Charakteristische Werte der Verteilungen bei einem DO von 0.1 % und unterschiedlichen CN-Verhältnissen.	58
2.23. Kettenlängenverteilung bei unterschiedlichen DOs und CN-Verhältnissen.	59
2.24. CO ₂ -Gehalt im Abgas aus Experiment I und IV.	65
2.25. CO ₂ -Gehalt im Abgas aus Experiment V	65

2.26.	Zufütterungsrate bei pH-abhängiger Regelung aus Experiment IV . . .	66
2.27.	Vorgegebene Zufütterungsrate aus Experiment V	66
2.28.	Veränderliches Reaktorvolumen aus den Experimenten I und IV. . . .	67
2.29.	Veränderliches Reaktorvolumen aus Experiment V	68
2.30.	Konzentrationsverläufe der Substrate aus Experiment I und IV. . . .	70
2.31.	Produktion und Degradation von HB, HV und Biomasse aus Experiment I und IV.	71
2.32.	Experimentelle und simulierte Verläufe für Substrate und Produkte aus Experiment V unter Verwendung der Modellkandidaten A-D. . .	73
2.33.	Optimale Gesamtpolymerkonzentration bei verschiedenen konstanten Anteilen für CO ₂ im Abgas und die Flussrate für Propionsäure F_{in} . . .	74
2.34.	Optimale Gesamtpolymermasse und das zugehörige Reaktorvolumen bei verschiedenen konstanten Werten für CO ₂ im Abgas und die Flussrate für Propionsäure F_{in}	75
2.35.	HV-Konzentration ausgewertet bei optimaler Gesamtpolymerkonzentration bei konstanten Werten für CO ₂ im Abgas und die Flussrate für Propionsäure F_{in}	75
2.36.	Drei Beispielverläufe bei konstanten Werten für CO ₂ im Abgas und die Flussrate für Propionsäure F_{in}	76
2.37.	Mittlere Monomerkonzentration und Abgleich der totalen Polymerkonzentrationen für das Experiment IV.	77
2.38.	Änderung der Kettenlängenverteilung über die Zeit und das Molekulargewicht der Ketten für das Experiment IV	78
2.39.	M_n und M_w für das Experiment IV.	79
2.40.	Polydispersität und ausgewählte Verteilungen für das Experiment IV. . .	79
2.41.	Vergleich ausgewählter experimenteller GPC-Verteilungen	81
3.1.	Aufbau eines IAVs sowie Einteilung der Segmente.	85
3.2.	Replikationszyklus eines IAVs angepasst nach [63].	86
3.3.	Viraler Replikationszyklus von IAVs basierend auf [63].	92
3.4.	Multiskalen-Modell basierend auf [39, 62]	96
3.5.	Darstellung des Arbeitsablaufs für die Anwendung der Methodologie aus [43].	100
3.6.	Parameterverteilung für den kinetischen Parameter $\log_{10}(k_C^{Syn})$. . .	102
3.7.	Dynamik der Virusfreisetzung bei $7 \cdot 10^5$ uninfizierten SGOs mit einer MOI von 1.	103
3.8.	Verteilung des Parameters k_{Bind}^{M1} für die MGO 3 bei Anwendung der unterschiedlichen Strategien.	105
3.9.	RMS-Werte für alle experimentell untersuchten MGOs.	107
3.10.	Dynamik der Virusausbeute für eine Infektion von $7 \cdot 10^5$ MGOs bei einer MOI von 10^{-4}	108
3.11.	Parameterverteilung für experimentell untersuchte MGOs.	109
3.12.	Virusausbeute nach 72 Stunden für die drei besten Genkombinationen und die Kombination, die am wenigsten vielversprechend ist.	111

A.1. Peaks für Propionsäure aus dem Experiment IV bei 3 und 30 h. . . .	117
B.1. Ausbeuteraum für Biomasse und PHB beim Verbrauch von Fruktose.	120
B.2. Ausbeuteraum für Biomasse und PHB beim Verbrauch von Acetat. .	120
B.3. Ausbeuteraum für Biomasse und Acetat beim Verbrauch von PHB. .	120
B.4. Ausbeuteraum für Biomasse und PHB beim Verbrauch von Acetat und Fruktose.	121
B.5. Ausbeuteraum für Biomasse und Acetat beim Verbrauch von Fruktose.	121
B.6. Ausbeuteraum für die Produktion von Biomasse und den Verbrauch von PHB.	121
B.7. Konzentrationsverläufe des Experiments aus [51].	122
B.8. Dynamisches Verhalten für Experiment III unter Verwendung der kinetischen Parameter aus dem Vektor in Gleichung (2.4.1).	122
B.9. PHB-Konzentration nach 120 h für unterschiedliche DOs und CN- Verhältnisse.	123
B.10. Biomasse nach 120 h für unterschiedliche DOs und CN-Verhältnisse. .	123
B.11. Anteil von PHB in der Gesamtbiomasse nach 120 h für unterschiedliche DOs und CN-Verhältnisse.	123
C.1. Simulationsstudie ausgewertet bei maximaler HV-Masse	125
C.2. Simulationsstudie ausgewertet bei maximaler Gesamtpolymermasse .	126
D.1. W(logM)-Verteilungen für das Experiment III.	127
D.2. W(logM)-Verteilungen für das Experiment IV.	128
D.3. Startverteilung für aktive Polymere	128
E.1. Zeitliche Entwicklung der uninfizierten und infizierten Zellen nach Infektion mit einer MOI von 1.	129
E.2. Parameterverteilung für den kinetischen Parameter $\log_{10} \left(k^{Imp} \right)$	130
E.3. Parameterverteilung für den kinetischen Parameter $\log_{10} \left(k_V^{Syn} \right)$	130
E.4. Parameterverteilung für den kinetischen Parameter $\log_{10} \left(k_M^{Syn} \right)$	131
E.5. Parameterverteilung für den kinetischen Parameter $\log_{10} \left(k_{M1}^{Bind} \right)$	131
E.6. Parameterverteilung für den kinetischen Parameter $\log_{10} \left(k^{Rel} \right)$	132
E.7. RMS-Werte aufgeteilt nach MGO und Strategie zur Generierung der Verteilung.	132
E.8. Experimentelle Daten und Modellsimulation unter Verwendung der Parameterverteilungen generiert mit der <i>low</i> und <i>high impact</i> Strategie.	133
E.9. Histogramm für die Virusausbeute aller MGO-Kombinationen sortiert nach Anzahl der modifizierten Gene.	133

Tabellenverzeichnis

2.1. Abbauverhalten biobasierter Polymere [113].	8
2.2. Auswahl industriell hergestellter PHAs sowie Materialeigenschaften. . .	14
2.3. Überblick über alle PHA-Experimente dieser Arbeit.	15
2.4. Berechnungsmethoden für die Rentabilitäten.	30
2.5. Gruppen für die Einteilung der GMen.	39
2.6. Werte für die normalisierte AM-Matrix unterteilt in unterschiedliche Untergruppen.	40
2.7. Reaktionsschritte für die Implementierung in <i>PREDICI</i>	53
2.8. Fehlerquadratsummen (FQS) für die Identifikations- und Validierungs- datensätze bei Verwendung der Modelle A-D.	69
3.1. Genkombination in experimentellen MGOs.	104
A.1. Zusammensetzung des Luria-Bertani-Mediums (LB-Medium).	116
A.2. Zusammensetzung des definierten Mediums für <i>C. necator</i>	116
A.3. Zusammensetzung der Spurenelementlösung SL-6.	116
B.1. Metaboles Netzwerk für den PHB-Prozess.	118
B.2. Feste Parameter für das HCM	122
C.1. Kinetische Parameter, Startwerte und Variablen für das makroskopi- sche PHBV-Modell.	124
C.2. Geschätzte Parameter für die Modellvarianten A bis D des makrosko- pischen PHBV-Modells	125
E.3. RMS-Werte für die Simulation unter Verwendung der Parameterver- teilungen von SGOs.	129
E.1. Kinetische Parameter für das Multiskalen-Modell zur Beschreibung der IAV-Produktion	134
E.2. Relatives Überexpressionslevel der Einzelgenüberexpressionen in A549- Zellen nach lentiviraler Transduktion.	134

Abkürzungsverzeichnis

3PG	3-Phosphoglycerat
αKG	α -Ketoglutarat
AcACE	Acetoacetat
AcAcCoA	Acetoacetyl-CoA
ACE	Acetat
AcCoA	Acetyl-CoA
AM	aktiver Modus
AMC	Ammoniumchlorid
AMP	Adenosin-Monophosphat
ADP	Adenosin-Diphosphat
ATP	Adenosine-Triphosphat
BIO	Biomasse
BTM	Biotrockenmasse
CEACAM6	engl. <i>Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 6</i>
CN	Kohlenstoff-Ammoniumchlorid
cRNA	komplementäre virale Ribonukleinsäuren
cRNP	komplementäre virale Ribonukleinsäuren stabilisiert mit viralen Proteinen RdRp und NP
<i>C. necator</i>	<i>Cupriavidus necator</i>
DE	<i>Differential evolution</i>
DGL	Differentialgleichung
DO	Gelöstsauerstoff
E4P	Erythrose-4-phosphat

F16P	Fruktose-1,6-Bisphosphat
F6P	Fruktose-6-Phosphat
EM	Elementarmodus
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid, oxidiert
FADH	Flavin-Adenin-Dinucleotid, reduziert
FANCG	engl. <i>Fanconi anemia complementation group G</i>
FQS	Fehlerquadratsumme
FRU	Fruktose
G3P	Glyceraldehyde-3-Phosphat
G6P	Glucose-6-Phosphat
GM	generierender Modus
GPC	Größenausschlusschromatographie
GLN	Glutamin
GLU	Glutamat
GOX	Glyoxylat
HA	virales Hämagglutinin
HCM	hybrid kybernetisches Modell
HB	3-Hydroxybutyrat
HPLC	engl. <i>high performance liquid chromatography</i>
HV	3-Hydroxyvalerat
IAV	Influenza-A-Virus
IBV	Influenza-B-Virus
ISC	Isocitrat
M1	virales Matrixprotein 1
M2	virales Matrixprotein 2
MAL	Malat

MGO	Mehrfachgenüberexpressionszelllinie (engl. <i>multiple gene overexpression cell line</i>)
MOI	Multiplizität der Infektion (engl. <i>multiplicity of infection</i>)
NA	virale Neuraminidase
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (ox.)
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (red.)
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (ox.)
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (red.)
NEP	virales nukleäres Exportprotein
NP	virales Nucleoprotein
NS1	Nichtstrukturprotein 1
NXF1	engl. <i>Nuclear RNA Export Factor 1</i>
OD	Optische Dichte
OXA	Oxaloacetat
PA	saure Untereinheit der viralen Polymerase
PB1	basische Untereinheit 1 der viralen Polymerase
PB2	basische Untereinheit 2 der viralen Polymerase
PBS	Polybutylensuccinat
PDE	partielle Differentialgleichung
PDI	Polydispersitätsindex
PEP	Phosphoenol-Pyruvat
PHA	Polyhydroxyalkanoat
PHB	Poly-(3-hydroxybutyrat)
PHBV	Poly-(3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyvalerat)
PLA	Polymilchsäure
PLD2	Phospholipase D2
PYR	Pyruvat

R5P	Ribose-5-Phosphat
R15P	Ribulose-5-Phosphat
RdRp	virale RNA-Polymerase
RES	residuale Biomasse
RMS	engl. <i>root mean square</i>
ROI	Rentabilitäten für hybrid kybernetische Variablen (engl. <i>return on investment</i>)
S7P	Sedoheptulose-7-Phosphat
SGO	Einzelgenüberexpressionszelllinie (engl. <i>single gene overexpression cell line</i>)
SUC	Succinat
SucCoA	Succinyl-CoA
SUCx	externes Succinat
TPS	thermoplastische Stärke
vRNA	virale Ribonukleinsäuren
vRNP	viraler Ribonucleoprotein-Komplex
X5P	Xylulose-5-Phosphat
XAB2	engl. <i>XPA-binding protein 2</i>

Nomenklatur

Produktion von PHAs

λ_k	k tes Moment einer Polymerverteilung
$[HB]$	Anzahl für das Monomer HB
$[HB-Syn]$	Anzahl für den Komplex aus HB und Synthase
$[HB_{BIO}]$	Anzahl der Monomere nach Degradation
$[k_{m1}]$	Ratenkonstante für die Bindung eines HB-Monomers an die Synthase
$[k_{m2}]$	Ratenkonstante für die Propagation bei der PHA Polymerisierung
$[Syn]$	Anzahl für die Synthase
α	Ratenvektor für die konstante Enzymsynthese
β	Ratenvektor mit Konstanten für die Enzymdegradation
\mathbf{A}	Matrix nach Linearisierung des DGL Systems \mathbf{f} nach \mathbf{y}
\mathbf{B}_u	Matrix nach Linearisierung des DGL Systems \mathbf{f} nach \mathbf{u}
\mathbf{B}_v	Matrix nach Linearisierung des DGL Systems \mathbf{f} nach \mathbf{v}
\mathbf{e}^{\max}	Vektor des maximalen Enzymlevel
\mathbf{e}^{rel}	Vektor der relativen Enzymlevel
\mathbf{E}_{YS}	Elementarmodenmatrix im Ausbeuteraum
\mathbf{e}	Vektor der hybrid kybernetischen Enzyme
\mathbf{f}_c	Anzahl der aufgenommenen Kohlenstoffeinheiten
\mathbf{f}	DGL System
\mathbf{k}_e	Vektor der Konstanten für die Monod-Kinetiken
\mathbf{k}_r	Vektor der Konstanten zur Skalierung der Substrataufnahme
\mathbf{N}_{ex}	stöchiometrische Matrix der externen Metabolite
\mathbf{N}_m	stöchiometrische Matrix der intrazellulären Metaboliten
\mathbf{N}_P	stöchiometrische Matrix der Produkte
\mathbf{N}_S	stöchiometrische Matrix der Substrate
\mathbf{N}_x	stöchiometrische Matrix der Biomasse
\mathbf{N}	stöchiometrische Matrix
\mathbf{p}_u	Rentabilitäten für die Enzymsynthese
\mathbf{p}_v	Rentabilitäten für die Enzymaktivität
\mathbf{q}	Vektor nach Ableitung der metabolen Zielfunktion $\phi(\mathbf{y})$ nach \mathbf{y}
$\mathbf{r}_{EM}^{\text{kin}}$	Ratenvektor der Kinetik für \mathbf{r}_{EM}
\mathbf{r}_{EM}	Ratenvektor mit Konstanten für die induzierbare Enzymsynthese
$\mathbf{r}_M^{\text{kin}}$	Ratenvektor der Kinetik für \mathbf{r}_M
\mathbf{r}_M	Ratenvektor zur Wichtung der EMen-Matrix im Ausbeuteraum
\mathbf{r}_{core}	Ratenvektor zur Beschreibung der Monod-Kinetik

\mathbf{r}	Flussratenvektor
\mathbf{u}	Vektor der kybernetischen Variablen zur Beschreibung der Enzymsynthese
\mathbf{v}	Vektor der kybernetischen Variablen zur Beschreibung der Enzymaktivität
\mathbf{x}_m	Vektor der Anteile intrazellulärer Metaboliten
\mathbf{x}_{exp}	Experimentelle Datenpunkte
\mathbf{x}_{sim}	Simulierte Datenpunkte
\mathbf{y}	Zustandsvektor
\mathbf{Z}	Elementarmodenmatrix
\mathbf{z}	Elementarmodus
μ	Wachstumsrate
μ_{max}	maximale Wachstumsrate
$\phi(\mathbf{y})$	Metabole Zielfunktion
σ	Zugfestigkeit
ε	Bruchdehnung
b	Anteil katalytisch aktiver Biomasse
b_{CO_2}	Metabole Aktivitätsvariable
c_P	Produktkonzentration
c_S	Substratkonzentration
c_X	Biomassekonzentration
c_i	Konzentration des i -ten Stoffes
c_{fru}	Fruktosekonzentration
c_{hb}	Totale Konzentration an HB im Polymer
c_{hv}	Totale Konzentration an HV im Polymer
$c_{i,in}$	Konzentration des i -ten Stoffes im Zufluss
$c_{i,out}$	Konzentration des i -ten Stoffes im Abfluss
$c_{P,inhi}$	inhibitorische Produktkonzentration
$c_{p,in}$	Propionsäurekonzentration im Zulauf
c_p	Propionsäurekonzentration
c_{res}	Konzentration der residualen Biomasse
$c_{S,inhi}$	inhibitorische Substratkonzentration
c_{S1}	Konzentration des Stoffes S1
c_{Sn}	Konzentration des Stoffes Sn
$CO_{2,in}$	Kohlenstoffdioxidanteil in der Zuluft
$CO_{2,out}$	Kohlenstoffdioxidanteil im Abgas
D	Verdünnungsrate
D_i	Konzentration eines inaktiven Polymers der Länge i
e_{HB}	Regelfehler für die Kopplung des metabolen Modells mit der Polymerisierungskinetik
F_{in}	Zuflussrate
F_{out}	Abflussrate
FQS	Fehlerquadratsumme
inh_i	Inhibitorischer Term i mit $i = 1, \dots, 3$
K_μ	Sauerstoffabhängiger Faktor

k_P	Ratenkonstante für ein Produkt
k_S	Ratenkonstante für ein Substrat
k_x	Ratenkonstante für Biomasse
K_D	D-Glied des Reglers
K_I	I-Glied des Reglers
k_i	Ratenkonstanten für das metabolische PHBV-Modell mit $i=1,\dots,8$
K_P	P-Glied des Reglers
K_S	Sättigungskonstante, Substratkonzentration bei halbmaximaler Wachstumsgeschwindigkeit für den Stoff S
k_c	Ratenkonstante für den Wechsel zwischen Polymerspezies
k_{dep}	Ratenkonstante für die Depolymerisierung
K_{in}	Inhibierungskonstante, Substratkonzentration beim erneuten Erreichen der halbmaximalen Wachstumsgeschwindigkeit
k_{in}	Ratenkonstante für die Initiation einer Polymerisierung
k_{prop}	Ratenkonstante für die Propagation einer Polymerisierung
K_{S1}	Sättigungskonstante, Substratkonzentration bei halbmaximaler Wachstumsgeschwindigkeit für den Stoff S1
K_{Sn}	Sättigungskonstante, Substratkonzentration bei halbmaximaler Wachstumsgeschwindigkeit für den Stoff Sn
M	Monomerkonzentration
M^+	Monomerproduktionsrate
m_E	Ratenkonstante für Erhaltungsstoffwechsel
M_M^P	Durchschnittliche molare Masse für ein Monomer im Polymer
M_n	Zahlenmittel einer Polymerverteilung
M_w	Gewichtsmittel einer Polymerverteilung
M_{HA}^P	Mittlere molare Masse eines HA-Monomers im Polymer
m_{HB}	Totale Masse aller HB-Monomere in allen Polymeren
M_{HB}^P	Molare Masse eines HB-Monomers im Polymer
M_{HV}^P	Molare Masse eines HV-Monomers im Polymer
M_{S1}	Molare Masse des Stoffes S1
M_{S2}	Molare Masse des Stoffes S2
$me_{i,slow}$	Anteil des i -ten Metaboliten mit langsamer Dynamik
N_j	Anzahl der generierenden Raten
N_k	Anzahl der verbrauchenden Raten
n_m	Anzahl der internen Metaboliten
n_P	Anzahl der Produkte
n_r	Anzahl der metabolischen Reaktionen
n_S	Anzahl der Substrate
P_i	Konzentration eines aktiven Polymers der Länge i
P_{HA}	Totale Polymerkonzentration
P_{HA}^*	Totale Polymermasse
P_{res}	Anteil der residualen Biomasse an der Gesamtbiomasse
$P_{t,max}$	Maximal möglicher Polymeranteil in der Gesamtbiomasse
P_t	Polymeranteil in der Gesamtbiomasse
q_P	Produktionsrate für ein Produkt

q_S	Verbrauchsrate für ein Substrat
q_x	Produktionsrate für Biomasse
$q_{c,o}$	Rate für den Wechsel zwischen Polymerspezies
$q_{dep,o}$	Rate für die Depolymerisierung
$q_{i,gen,j}$	j generierende Raten des i -ten Stoffes
$q_{i,gen,k}$	k verbrauchende Raten des i -ten Stoffes
$q_{in,o}$	Rate für die Initiation einer Polymerisierung
$q_{prop,o}$	Rate für die Propagation einer Polymerisierung
r_{HB}^-	Abbaurrate von PHAs aus dem metabolen Modell
T_g	Glasübergangstemperatur
T_m	Schmelztemperatur
V	Volumen
$W(\log M)$	differentielle Polymerverteilung
X_c	Kristallinität
x_{PHB}	Intrazellulärer PHB-Anteil
x_{HB}	Anteil an HB im Copolymer
x_{HV}	Anteil an HV im Copolymer
Y_{ace}	Verbrauchsrate für Acetat
Y_{amc}	Verbrauchsrate für Ammoniumchlorid
Y_{BIO}	Produktionsrate für totale Biomasse
Y_{fru}	Verbrauchsrate für Fruktose
Y_{HB}	Produktionsrate für PHB

IAV-Impfstoffproduktion

$\Delta_{i,Rel}$	Relativer Abstand des Medianwertes der Basis vom Median der zweiten SGO
Δ_i	Abstand des Medianwertes der Basis vom Median der zweiten SGO
\mathbf{h}^*	Vektor der erweiterten internen Dynamik
\mathbf{h}	Vektor der Dynamik der Replikationskinetik
\mathbf{x}^*	Vektor erweiterter interner Zustände
\mathbf{x}_{exp}	Experimentelle Datenpunkte
\mathbf{x}_{sim}	Simulierte Datenpunkte
\mathbf{x}	Vektor interner Zustände
$\mathcal{I}(\mathbf{x}^*)$	Anzahldichteverteilung neu infizierter Zellen bezüglich der internen Zustände in \mathbf{x}
\mathcal{N}	Normalverteilung
a_l	Skalierungsfaktoren der Gauß-Verteilung l
B_n	Anzahl der mit Virus besetzten Bindungsstellen mit Affinität n , $n = [\text{hoch, niedrig}]$
B_n^{tot}	Totale Anzahl der Bindungsstellen mit Affinität n , $n = [\text{hoch, niedrig}]$
C_P	Viraler Komplex aus cRNA, Polymerase und NP
D_{Rib}	mittlerer Abstand zwischen zwei benachbarten Ribosomen
$EL_{i,Rel}$	Relatives Expressionslevel

F_{inf}	Verhältnis zwischen infizierten Zellen zu aufgenommenen Viruspartikeln.
F_{Spl7}	Anteil der gespleißten mRNA aus Segment 7 zur Bildung von M2
F_{Spl8}	Anteil der gespleißten mRNA aus Segment 8 zur Bildung von NEP
I_a	Infizierte apoptotische Zellen
i_c	Anzahldichteverteilung infizierter Zellen
k^{En}	Ratenkonstante für Endozytose
k^{Fus}	Ratenkonstante für die Fusion von Viruspartikeln mit dem Endosom
k^{Lys}	Ratenkonstante für die Lyse apoptotischer Zellen
k^{Exp}	Ratenkonstante für den Export des Komplexes bestehend aus vRNA, M1 und NEP aus dem Nukleus
k^{Imp}	Ratenkonstante für den Import von Viruspartikeln
k^{RdRP}	Ratenkonstante für die Bildung des Polymerasekomplexes
k^{Rel}	Ratenkonstante für die Freilassung neuer Viruspartikel ins Medium
k_I^{Apo}	Ratenkonstante für die Apoptose durch virale Infektion
k_M^{Deg}	Ratenkonstante für die Degradation von mRNA
k_M^{Syn}	Ratenkonstante für die Synthese von mRNA
k_n^{Dis}	Ratenkonstanten für die Dissoziation von Viruspartikeln mit Affinität n , $n = [\text{hoch, niedrig}]$
k_P^{Syn}	Ratenkonstante für die Synthese von viralem Protein
k_T^{Apo}	Ratenkonstante für die natürliche Apoptose uninfizierter Zellen
k_V^{Deg}	Ratenkonstante für die Degradation von freien Viren
k_C^{Syn}	Ratenkonstante für die Synthese von cRNA
k_{M1}^{Bind}	Ratenkonstante für die Bindung von M1 Protein an vRNP
k_{NP}^{Bind}	Ratenkonstante für die Bindung von NP Protein an den Polymerase-vRNA-Komplex
k_n^{Att}	Ratenkonstanten für die Anlagerung von Viruspartikeln mit Affinität n , $n = [\text{hoch, niedrig}]$
k_n^{Equ}	Gleichgewichtskonstante von Bindungsstellen mit Affinität n , $n = [\text{hoch, niedrig}]$
$k_{\text{RdRp}}^{\text{Bind}}$	Ratenkonstante für die Bindung der cRNA an einen Polymerasekomplex
$k_{\text{Rnp}}^{\text{Deg}}$	Ratenkonstante für die Degradation von vRNP im Nukleus
$k_{\text{RRdRp}}^{\text{Deg}}$	Ratenkonstante für die Degradation von Komplex aus Polymerase und vRNA bzw. cRNA
k_R^{Deg}	Ratenkonstante für die Degradation der RNA-Spezies im Nukleus
$K_{V^{\text{rel}}}$	Virenanzahl für halbmaximale Freilassung
k_V^{Syn}	Ratenkonstante für die Synthese von vRNA
L_i	Länge des Segments i , $i = 1, \dots, 8$
L_V	Mittlere Länge der vRNA
m_l	Mittelwerte der Gauß-Verteilung l
N_j^{nuc}	Anzahl der Nukleotide gebunden durch Protein j ,

	$j \in \{P_{NP}, P_{M1}, P_{NEP}\}$.
N_{P_j}	Anzahl des Proteins P_j für neue Viruspartikel, $j \in \{RdRp, P_{HA}, P_{NP}, P_{NA}, P_{M1}, P_{M2}, P_{NEP}\}$.
P_{HA}	Virales HA Protein
P_{M1}	Virales M1 Protein
P_{M2}	Virales M2 Protein
P_{NA}	Virales NA Protein
P_{NEP}	Virales NEP Protein
P_{NP}	Virales NP Protein
P_{PA}	Virales PA Protein
P_{PB1}	Virales PB1 Protein
P_{PB2}	Virales PB2 Protein
P_{RdRp}	Viraler Polymerasekomplex
R_{RdRp}^C	Virale Polymerase gekoppelt mit cRNA
R_{RdRp}^V	Virale Polymerase gekoppelt mit vRNA
r^{Inf}	Variable zur Beschreibung der Infektion
r^{Lys}	Variable zur Beschreibung der Lyse apoptotischer Zellen
R^C	Virale cRNA
r^{Rel}	Freilassungsrate neuer Viruspartikel ins Medium
R^V	Virale vRNA
R_i^M	Virale mRNA des Segments i , $i = 1, \dots, 8$
RMS	Engl. <i>root mean square</i>
T	Uninfizierte Zellen
T_a	Uninfizierte apoptotische Zellen
T_{max}	Maximale Anzahl uninfizierter Zellen
V^{En}	Viruspartikel im Endosom infizierter Zellen
V_f	Freie Viruspartikel
V_n^{Att}	Angelagerte Viruspartikel mit Affinität n , $n = [\text{hoch}, \text{niedrig}]$
V_p^{cyt}	vRNP im Zytoplasma
V_P^{nuc}	vRNP im Nukleus
$V_{P,M1}^{cyt}$	vRNP-M1 Komplex im Zytoplasma
$V_{P,M1}^{nuc}$	vRNP-M1 Komplex im Nukleus

Literaturverzeichnis

- [1] A. Aramvash, F. Moazzeni Zavareh, and N. Gholami Banadkuki. Comparison of different solvents for extraction of polyhydroxybutyrate from *Cupriavidus necator*. *Engineering in Life Sciences*, 18(1):20–28, 2018. doi:10.1002/elsc.201700102.
- [2] M. P. Arrieta, J. López, A. Hernández, and E. Rayón. Ternary PLA-PHB-Limonene blends intended for biodegradable food packaging applications. *European Polymer Journal*, 50(1):255–270, 2014. doi:10.1016/j.eurpolymj.2013.11.009.
- [3] A. Atlić, M. Koller, and D. Scherzer. Continuous production of poly([R]-3-hydroxybutyrate) by *Cupriavidus necator* in a multistage bioreactor cascade. *Biotechnological products and process engineering*, 91:295–304, 2011. doi:10.1007/s00253-011-3260-0.
- [4] M. S. Baei, G. D. Najafpour, H. Younesi, F. Tabandeh, and H. Eisazadeh. Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis by *Cupriavidus necator* DSMZ 545 utilizing various carbon sources. *World Applied Sciences Journal*, 7(2):157–161, 2009. URL: [http://www.idosi.org/wasj/wasj7\(2\)/5.pdf](http://www.idosi.org/wasj/wasj7(2)/5.pdf).
- [5] P. J. Barham and A. Keller. The relationship between microstructure and mode of fracture in polyhydroxybutyrate. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 24(1):69–77, 1986. doi:10.1002/polb.1986.180240108.
- [6] J. Behrens. Hybride kybernetische Modellierung der P(HB-co-HV)-Produktion in *Cupriavidus necator*. Bachelorarbeit, Otto-von-Guericke Universität, 2020.
- [7] N. Berezina. Enhancing the 3-hydroxyvalerate component in bioplastic PHBV production by *Cupriavidus necator*. *Biotechnology Journal*, 7(2):304–309, 2012. doi:10.1002/biot.201100191.
- [8] K. Bhubalan, W. H. Lee, C. Y. Loo, T. Yamamoto, T. Tsuge, Y. Doi, and K. Sudesh. Controlled biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) from mixtures of palm kernel oil and 3HV-precursors. *Polymer Degradation and Stability*, 93(1):17–23, 2008. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2007.11.004.
- [9] F. G. Blanco, N. Hernández, V. Rivero-Buceta, B. Maestro, J. M. Sanz, A. Mato, A. M. Hernández-Arriaga, and M. A. Prieto. From residues to added-value bacterial biopolymers as nanomaterials for biomedical applications. *Nanomaterials*, 11(6):1–41, 2021. doi:10.3390/nano11061492.

- [10] N. M. Bouvier and P. Palese. The biology of influenza viruses. *Vaccine*, 26(4):49–53, 2008. doi:10.1016/j.vaccine.2008.07.039.
- [11] A. L. Brass, I. Huang, Y. Benita, S. P. John, N. Manoj, E. M. Feeley, B. Ryan, J. L. Weyer, L. van der Weyden, E. Fikrig, D. J. Adams, R. J. Xavier, M. Farzan, and S. J. Elledge. IFITM proteins mediate the innate immune response to influenza A H1N1 virus, West Nile Virus and Dengue Virus. *Cell*, 139(7):1243–1254, 2009. doi:10.1016/j.cell.2009.12.017.
- [12] C. J. Brigham, N. Zhila, E. Shishatskaya, T. G. Volova, and A. J. Sinskey. Manipulation of *Ralstonia eutropha* carbon storage pathways to produce useful bio-based products. In *Reprogramming Microbial Metabolic Pathways*, pages 343–366. Springer Dordrecht, 2012. doi:10.1007/978-94-007-5055-5.
- [13] M. Bui, G. Whittaker, and A. Helenius. Effect of M1 protein and low pH on nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins. *Journal of Virology*, 70(12):8391–8401, 1996. doi:10.1128/jvi.70.12.8391-8401.1996.
- [14] F. Bushman, M. Lewinski, A. Ciuffi, S. Barr, J. Leipzig, S. Hannenhalli, and C. Hoffmann. Genome-wide analysis of retroviral DNA integration. *Nature Reviews Microbiology*, 3(11):848–858, 2005. doi:10.1038/nrmicro1263.
- [15] A. J. Cann. Chapter 6 - Infection. In *Principles of molecular virology (fifth edition)*, pages 169–213. Academic Press, Boston, 2012. doi:10.1016/B978-0-12-384939-7.10006-7.
- [16] S. Carteau, C. Hoffmann, and F. Bushman. Chromosome structure and human immunodeficiency virus type 1 cDNA integration: Centromeric alphoid repeats are a disfavored target. *Journal of Virology*, 72(5):4005–4014, 1998. doi:10.1128/JVI.72.5.4005-4014.1998.
- [17] C. Chatzidoukas, G. Penloglou, and C. Kiparissides. Development of a structured dynamic model for the production of polyhydroxybutyrate (PHB) in *Azohydromonas lata* cultures. *Biochemical Engineering Journal*, 71:72–80, 2013. doi:10.1016/j.bej.2012.11.015.
- [18] X. Chen, J. Yin, J. Ye, H. Zhang, X. Che, Y. Ma, M. Li, L. Wu, and G. Chen. Engineering *Halomonas bluephagenesis TD01* for non-sterile production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Bioresource Technology*, 244:534–541, 2017. doi:10.1016/j.biortech.2017.07.149.
- [19] S. Chinwetkitvanich, C. W. Randall, and T. Panswad. Effects of phosphorus limitation and temperature on PHA production in activated sludge. *Water Science and Technology*, 50(8):135–143, 2004. doi:10.2166/wst.2004.0507.
- [20] H. Chmiel, R. Takors, and D. Weuster-Botz. *Bioprozesstechnik*, volume 4. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, 2018. doi:10.1007/978-3-662-54042-8.

- [21] S. Cockcroft. Signalling roles of mammalian phospholipase D1 and D2. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58(11):1674–1687, 2001. doi:10.1007/PL00000805.
- [22] J. S. Deakyne and A. V. Mazin. Fanconi anemia: At the crossroads of DNA repair. *Biochemistry (Moscow)*, 76(1):36–48, 2011. doi:10.1134/S0006297911010068.
- [23] P. Dhurjati, D. Ramkrishna, M. C. Flickinger, and G. T. Tsao. A cybernetic view of microbial growth: Modeling of cells as optimal strategists. *Biotechnology and Bioengineering*, 27(1):1–9, 1985. doi:10.1002/bit.260270102.
- [24] J. M. L. Dias, A. Oehmen, L. S. Serafim, P. C. Lemos, M. A. M. Reis, and R. Oliveira. Metabolic modelling of polyhydroxyalkanoate copolymers production by mixed microbial cultures. *BMC Systems Biology*, 2:1–21, 2008. doi:10.1186/1752-0509-2-59.
- [25] J. M. L. Dias, L. S. Serafim, P. C. Lemos, M. A. M. Reis, and R. Oliveira. Mathematical modelling of a mixed culture cultivation process for the production of polyhydroxybutyrate. *Biotechnology and Bioengineering*, 92(2):209–222, 2005. doi:10.1002/bit.20598.
- [26] J. Dobrogojski, M. Spsychalski, R. Luciński, and S. Borek. Transgenic plants as a source of polyhydroxyalkanoates. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40(162):1–17, 2018. doi:10.1007/s11738-018-2742-4.
- [27] Y. Doi, M. Kunioka, Y. Nakamura, and K. Soga. Nuclear magnetic resonance studies on unusual bacterial copolyesters of 3-Hydroxybutyrate and 4-Hydroxybutyrate. *Macromolecules*, 21:2722–2727, 1988. doi:10.1021/ma00187a012.
- [28] A. J. dos Santos, L. V. Oliveira Dalla Valentina, A. A. Hidalgo Schulz, and M. A. Tomaz Duarte. From obtaining to degradation of PHB: Material properties. Part I. *Ingeniería y Ciencia*, 13(26):269–298, 2017. doi:10.17230/ingciencia.13.26.10.
- [29] D. Dou, R. Revol, H. Östbye, H. Wang, and R. Daniels. Influenza A virus cell entry, replication, virion assembly and movement. *Frontiers in Immunology*, 9(1581):1–17, 2018. doi:10.3389/fimmu.2018.01581.
- [30] J. W. Drake. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(9):4171–4175, 1993. doi:10.1073/pnas.90.9.4171.
- [31] P. Droste, S. Miebach, S. Niedenführ, W. Wiechert, and K. Nöh. Visualizing multi-omics data in metabolic networks with the software Omix - A case study. *BioSystems*, 105(2):154–161, 2011. doi:10.1016/j.biosystems.2011.04.003.

- [32] DSMZ GmbH. LB (Luria-Bertani) medium. https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium381.pdf, 2001.
- [33] DSMZ GmbH. Rhodospirillaceae medium (modified). http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium27.pdf, 2007.
- [34] DSMZ GmbH. Mineral medium for chemolithotrophic growth (h-3). http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium81.pdf, 2011.
- [35] J. Dubois, O. Terrier, and M. Rosa-Calatrava. Influenza Viruses and mRNA Splicing: Doing More with Less. *mBio*, 5(3), 2014. doi:10.1128/mBio.00070-14.
- [36] R. Dürr, S. Duvigneau, and A. Kienle. Microbial production of polyhydroxyalkanoates – Modeling of chain length distribution. *Computer Aided Chemical Engineering*, 50:1975–1981, 2021. doi:10.1016/B978-0-323-88506-5.50306-5.
- [37] R. Dürr, S. Duvigneau, T. Laske, M. Bachmann, and A. Kienle. Analyzing the impact of heterogeneity in genetically engineered cell lines for influenza vaccine production using population balance modeling. *IFAC-PapersOnLine*, 49(26), 2016. doi:10.1016/j.ifacol.2016.12.130.
- [38] R. Dürr, S. Duvigneau, C. Seidel, A. Kienle, and A. Bück. Multi-rate data fusion for state and parameter estimation in (Bio-)chemical process engineering. *Processes*, 9(11):1–16, 2021. doi:10.3390/pr9111990.
- [39] R. Dürr, T. Müller, S. Duvigneau, and A. Kienle. An efficient approximate moment method for multi-dimensional population balance models - Application to virus replication in multi-cellular systems. *Chemical Engineering Science*, 160:321–334, 2017. doi:10.1016/j.ces.2016.11.015.
- [40] S. Duvigneau, R. Dürr, J. Behrens, and A. Kienle. Advanced kinetic modeling of bio-co-polymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production using fructose and propionate as carbon sources. *Processes*, 9(8), 2021. doi:10.3390/pr9081260.
- [41] S. Duvigneau, R. Dürr, L. Carius, and A. Kienle. Hybrid cybernetic modeling of polyhydroxyalkanoate production in *Cupriavidus necator* using fructose and acetate as substrates. *IFAC PapersOnLine*, 53(2):16872–16877, 2020. doi:10.1016/j.ifacol.2020.12.1211.
- [42] S. Duvigneau, R. Dürr, L. Kranert, A. Wilisch-Neumann, L. Carius, R. Findeisen, and A. Kienle. Hybrid cybernetic modeling of the microbial production of polyhydroxyalkanoates using two carbon sources. *Computer Aided Chemical Engineering*, 50:1969–1974, 2021. doi:10.1016/B978-0-323-88506-5.50305-3.
- [43] S. Duvigneau, R. Dürr, T. Laske, M. Bachmann, M. Dostert, and A. Kienle. Model-based approach for predicting the impact of genetic modifications on product yield in biopharmaceutical manufacturing-application to influenza

- vaccine production. *PLoS Computational Biology*, 16(6):1–22, 2020. doi:10.1371/journal.pcbi.1007810.
- [44] S. Duvigneau, R. Dürr, T. Laske, M. Bachmann, M. Dostert, U. Reichl, and A. Kienle. Mathematical modeling as a tool to improve influenza vaccine production processes. *IFAC-PapersOnLine*, 51(19):1–4, 2018. doi:10.1016/j.ifacol.2018.09.004.
- [45] S. Duvigneau, R. Dürr, M. Wulkow, and A. Kienle. Multiscale modeling of the microbial production of polyhydroxyalkanoates using two carbon sources. *Computers and Chemical Engineering*, 160:107740, 2022. doi:10.1016/j.compchemeng.2022.107740.
- [46] S. Duvigneau, A. Kettner, L. Carius, C. Griehl, R. Findeisen, and A. Kienle. Fast, inexpensive, and reliable HPLC method to determine monomer fractions in poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105:4743–4749, 2021. doi:10.1007/s00253-021-11265-3.
- [47] B. Efron and R. Tibshirani. Bootstrap methods for standard errors, confidence intervals, and other measures of statistical accuracy. *Statistical Science*, 1(1):54–75, 1986. doi:10.1214/ss/1177013815.
- [48] A. J. Einfeld, G. Neumann, and Y. Kawaoka. At the centre: influenza A virus ribonucleoproteins. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1):28–41, 2015. doi:10.1038/nrmicro3367.
- [49] M. Enami, R. Fukuda, and A. Ishihama. Transcription and replication of eight RNA segments of influenza virus. *Virology*, 142(1):68–77, 1985. doi:10.1016/0042-6822(85)90423-4.
- [50] T. Francis. Vaccination against influenza. *Bulletin of the World Health Organization. World Health Organization*, 8:725–741, 1953. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2554195/pdf/bullwho00626-0133.pdf>.
- [51] A. Franz, H.-S. Song, D. Ramkrishna, and A. Kienle. Experimental and theoretical analysis of poly(-hydroxybutyrate) formation and consumption in *Ralstonia eutropha*. *Biochemical Engineering Journal*, 55(1):49–58, 2011. doi:10.1016/j.bej.2011.03.006.
- [52] Y. Fujii, H. Goto, T. Watanabe, T. Yoshida, and Y. Kawaoka. Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(4):2002–2007, 2003. doi:10.1073/pnas.0437772100.
- [53] I. L. García, J. A. López, M. P. Dorado, N. Kopsahelis, M. Alexandri, S. Papanikolaou, M. A. Villar, and A. A. Koutinas. Evaluation of by-products from the biodiesel industry as fermentation feedstock for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by *Cupriavidus necator*. *Bioresource Technology*, 130:16–22, 2013. doi:10.1016/j.biortech.2012.11.088.

- [54] L. Garcia-Gonzalez and H. De Wever. Acetic acid as an indirect sink of CO₂ for the synthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA): Comparison with PHA production processes directly using CO₂ as feedstock. *Applied Sciences (Switzerland)*, 8(9), 2018. doi:10.3390/app8091416.
- [55] L. Garcia-Gonzalez, M. S. I. Mozumder, M. Dubreuil, E. I. P. Volcke, and H. De Wever. Sustainable autotrophic production of polyhydroxybutyrate (PHB) from CO₂ using a two-stage cultivation system. *Catalysis Today*, 257(2):237–245, 2015. doi:10.1016/j.cattod.2014.05.025.
- [56] P. Gaur, P. Ranjan, S. Sharma, J. R. Patel, J. B. Bowzard, S. K. Rahman, R. Kumari, S. Gangappa, J. M. Katz, N. J. Cox, R. B. Lal, S. Sambhara, and S. K. Lal. Influenza A virus neuraminidase protein enhances cell survival through interaction with carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (CEACAM6) protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(18):15109–15117, 2012. doi:10.1074/jbc.M111.328070.
- [57] Y. Genzel. Designing cell lines for viral vaccine production: Where do we stand? *Biotechnology Journal*, 10(5):728–740, 2015. doi:10.1002/biot.201400388.
- [58] R. Geyer, J. R. Jambeck, and K. L. Law. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, 3(7):25–29, 2017. doi:10.1126/sciadv.1700782.
- [59] K. Hammel Berwig, C. Baldasso, and A. Dettmer. Production and characterization of poly(3-hydroxybutyrate) generated by *Alcaligenes latus* using lactose and whey after acid protein precipitation process. *Bioresource Technology*, 218:31–37, 2016. doi:10.1016/j.biortech.2016.06.067.
- [60] N. R. Hegde. Cell culture-based influenza vaccines: A necessary and indispensable investment for the future. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 11(5):1223–1234, 2015. doi:10.1080/21645515.2015.1016666.
- [61] D. Held and P. Kilz. GPC/SEC as a key tool for assessment of polymer quality and determination of macromolecular properties. In *Monitoring polymerization reactions: From fundamentals to applications*, chapter 9, pages 171–199. John Wiley & Sons, Ltd, 2013. doi:10.1002/9781118733813.ch9.
- [62] F. S. Heldt, T. Frensing, A. Pflugmacher, R. Gröpler, B. Peschel, and U. Reichl. Multiscale modeling of influenza A virus infection supports the development of direct-acting antivirals. *PLoS Computational Biology*, 9(11), 2013. doi:10.1371/journal.pcbi.1003372.
- [63] F. S. Heldt, T. Frensing, and U. Reichl. Modeling the intracellular dynamics of influenza virus replication to understand the control of viral RNA synthesis. *Journal of Virology*, 86(15):7806–7817, 2012. doi:10.1128/JVI.00080-12.

- [64] F. S. Heldt, S. Y. Kupke, S. Dorl, U. Reichl, and T. Frensing. Single-cell analysis and stochastic modelling unveil large cell-to-cell variability in influenza A virus infection. *Nature communications*, 6:8938, 2015. doi:10.1038/ncomms9938.
- [65] S. Hoops, R. Gauges, C. Lee, J. Pahle, N. Simus, M. Singhal, L. Xu, P. Mendes, and U. Kummer. COPASI - A COmplex PATHway SIMulator. *Bioinformatics*, 22(24):3067–3074, 2006. doi:10.1093/bioinformatics/bt1485.
- [66] P. M. Howley, D. M. Knipe, and S. P. J. Whelan. *Fields virology: Volume 1: Emerging viruses*. Wolters Kluwer Health, 2020. URL: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlabk&AN=2966877>.
- [67] K.-D. Hungenberg and M. Wulkow. *Modeling and simulation in polymer reaction engineering - A modular approach*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2018.
- [68] S. Iadevaia and N. V. Mantzaris. Genetic network driven control of PHBV copolymer composition. *Journal of Biotechnology*, 122(1):99–121, 2006. doi:10.1016/j.jbiotec.2005.08.030.
- [69] A. Ishizaki and K. Tanaka. Production of poly- β -hydroxybutyric acid from carbon dioxide by *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697^T. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 71(4):254–257, 1991. doi:10.1016/0922-338X(91)90277-N.
- [70] J. R. Jambeck, R. Geyer, C. Wilcox, T. R. Siegler, M. Perryman, A. Andrady, R. Narayan, and K. L. Law. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*, 347(6223):768–771, 2015. doi:10.1126/science.1260352.
- [71] D. Jendrossek. Carbosomes. In A. Steinbüchel and D. Jendrossek, editors, *Bacterial organelles and organelle-like inclusions*, pages 243–275. Springer Nature Switzerland, 2020. doi:<https://doi.org/10.1007/978-3-030-60173-7>.
- [72] A. M. Kabadi, D. G. Ousterout, I. B. Hilton, and C. A. Gersbach. Multiplex CRISPR/Cas9-based genome engineering from a single lentiviral vector. *Nucleic Acids Research*, 42(19):1–11, 2014. doi:10.1093/nar/gku749.
- [73] M. Kanehisa, S. Goto, M. Furumichi, M. Tanabe, and M. Hirakawa. KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs. *Nucleic Acids Research*, 38:355–360, 2009. doi:10.1093/nar/gkp896.
- [74] A Karlas, N. Machuy, Y. Shin, K.P. Pleissner, A. Artarini, D Heuer, D. Becker, H. Khali, Ogilvie L.A., S. Hess, A.P. Mürer, E. Müller, T. Wolff, T. Rudel, and T.F. Meyer. Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. *Nature*, 463:818–822, 2010. doi:10.1038/nature08760.

- [75] T. Katoh, D. Yuguchi, H. Yoshii, H. D. Shi, and K. Shimizu. Dynamics and modeling on fermentative production of poly(β -hydroxybutyric acid) from sugars via lactate by a mixed culture of *Lactobacillus delbrueckii* and *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of Biotechnology*, 67(2-3):113–134, 1999. doi:10.1016/S0168-1656(98)00177-1.
- [76] Y. Kawaguchi and Y. Doi. Kinetics and mechanism of synthesis and degradation of poly(3-hydroxybutyrate) in *Alcaligenes eutrophus*. *Macromolecules*, 25(9):2324–2329, 1992. doi:10.1021/ma00035a007.
- [77] S. Khanna and A. K. Srivastava. Repeated batch cultivation of *Ralstonia eutropha* for poly(β -hydroxybutyrate) production. *Biotechnology Letters*, 27(18):1401–1403, 2005. doi:10.1007/s10529-005-0689-1.
- [78] J. H. Kim, B. G. Kim, and C. Y. Choi. Effect of propionic acid on poly(β -hydroxybutyric-co- β -hydroxyvaleric) acid production by *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnology Letters*, 14(10):903–906, 1992. doi:10.1007/BF01020626.
- [79] J. I. Kim, J. D. Varner, and D. Ramkrishna. A hybrid model of anaerobic *E. Coli* GJT001: Combination of elementary flux modes and cybernetic variables. *Biotechnol Prog*, 24(5):993–1006, 2008. doi:10.1002/btpr.73.
- [80] C. Kiparissides. Challenges in polymerization reactor modeling and optimization: A population balance perspective. *IFAC Proceedings Volumes (IFAC-PapersOnline)*, 37(9):137–154, 2004. doi:10.1016/S1474-6670(17)31805-0.
- [81] S. Klamt, J. Saez-Rodriguez, and E. D. Gilles. Structural and functional analysis of cellular networks with CellNetAnalyzer. *BMC Systems Biology*, 1(2):1–13, 2007. doi:10.1186/1752-0509-1-2.
- [82] S. Klamt and J. Stelling. Combinatorial complexity of pathway analysis in metabolic networks. *Molecular Biology Reports*, 29(1-2):233–236, 2002. doi:10.1023/A:1020390132244.
- [83] M. Koller, , M. M. d. S. Dias, M. Kunaver, E. Žagar, A. Kržan, and G. Braunnegg. Liquefied wood as inexpensive precursor-feedstock for bio-mediated incorporation of (R)-3-Hydroxyvalerate into polyhydroxyalkanoates. *Materials*, pages 6543–6557, 2015. doi:10.3390/ma8095321.
- [84] M. Koller. A review on established and emerging fermentation schemes for microbial production of polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters. *Fermentation*, 4(2), 2018. doi:10.3390/fermentation4020030.
- [85] M. Koller. Established and advanced approaches for recovery of microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters from surrounding microbial biomass. *The EuroBiotech Journal*, 4(3):113–126, 2020. doi:10.2478/ebtj-2020-0013.

- [86] M. Koller, R. Bona, G. Braunegg, C. Hermann, P. Horvat, M. Kroutil, J. Martinz, J. Neto, L. Pereira, and P. Varila. Production of polyhydroxyalkanoates from agricultural waste and surplus materials. *Biomacromolecules*, 6(2):561–565, 2005. doi:10.1021/bm049478b.
- [87] M. Koller, P. Horvat, P. Hesse, R. Bona, C. Kutschera, A. Atlić, and G. Braunegg. Assessment of formal and low structured kinetic modeling of polyhydroxyalkanoate synthesis from complex substrates. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 29:367–377, 2006. doi:10.1007/s00449-006-0084-x.
- [88] M. Koller and A. Mukherjee. A new wave of industrialization of PHA biopolyesters. *Bioengineering*, 9(2), 2022. doi:10.3390/bioengineering9020074.
- [89] D. S. Kompala, D. Ramkrishna, and G. T. Tsao. Cybernetic modeling of microbial growth on multiple substrates. *Biotechnology and Bioengineering*, 26(11):1272–1281, 1984. doi:10.1002/bit.260261103.
- [90] R. König, S. Stertz, Y. Zhou, A. Inoue, H. Hoffmann, S. Bhattacharyya, J. G. Alamares, D. M. Tscherne, M. B. Ortigoza, Y. Liang, Q. Gao, S. E. Andrews, S. Bandyopadhyay, P. De, B. P. Tu, L. Pache, C. Shih, A. Orth, G. Bonamy, T. Ideker, A. García-sastre, J. A. T. Young, P. Palese, M. L. Shaw, and S. K. Chanda. Human host factors required for influenza virus replication. *Nature*, 463(7282):813–817, 2010. doi:10.1038/nature08699.
- [91] F. Krammer, G. J.D. Smith, R. A.M. Fouchier, M. Peiris, K. Kedzierska, P. C. Doherty, P. Palese, M. L. Shaw, J. Treanor, R. G. Webster, and A. García-Sastre. Influenza. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1):1–21, 2018. doi:10.1038/s41572-018-0002-y.
- [92] L. Kranert, J. Pohlodek, S. Duvigneau, A. Rose, L. Carius, A. Kienle, and R. Findeisen. Step experiments enable efficient exploration of microbial microaerobic steady-states. *Biotechnology and Bioengineering*, in preparation, 2022.
- [93] C. J. Krieger, P. Zhang, L. A. Mueller, A. Wang, S. Paley, M. Arnaud, J. Pick, S. Y. Rhee, and P. D. Karp. MetaCyc: A multiorganism database of metabolic pathways and enzymes. *Nucleic Acids Research*, 32:438–442, 2004. doi:10.1093/nar/gkh100.
- [94] P. Kshirsagar, R. Suttar, S. Nilegaonkar, S. Kulkarni, and P. Kanekar. Scale up production of polyhydroxyalkanoate (PHA) at different aeration, agitation and controlled dissolved oxygen levels in fermenter using *Halomonas campisalis* MCM B-1027. *Journal of Biochemical Technology*, 4(1):512–517, 2012.
- [95] I. Kuraoka, S. Ito, T. Wada, M. Hayashida, L. Lee, M. Saijo, Y. Nakatsu, M. Matsumoto, T. Matsunaga, H. Handa, J. Qin, Y. Nakatani, and K. Tanaka. Isolation of XAB2 complex involved in pre-mRNA splicing, transcription, and

- transcription-coupled repair. *Journal of Biological Chemistry.*, 283(2):940–950, 2008. doi:10.1074/jbc.M706647200.
- [96] M. Kvaratskhelia, A. Sharma, R. C. Larue, E. Serrao, and A. Engelman. Molecular mechanisms of retroviral integration site selection. *Nucleic Acids Research*, 42(16):10209–10225, 2014. doi:https://doi.org/10.1093/nar/gku769.
- [97] B. Lambert, D. J. Gavaghan, and S. J. Tavener. A monte carlo method to estimate cell population heterogeneity from cell snapshot data. *Journal of Theoretical Biology*, 511:110541, 2021. doi:https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2020.110541.
- [98] S. Larsen, S. Bui, V. Perez, A. Mohammad, H. Medina-Ramirez, and L.L Newcomb. Influenza polymerase encoding mRNAs utilize atypical mRNA nuclear export. *Virology Journal*, 11(154), 2014. doi:10.1186/1743-422X-11-154.
- [99] T Laske, M. Bachmann, M. Dostert, A. Karlas, D. Wirth, T. Frensing, F. T. Meyer, H. Hauser, and U. Reichl. Model-based analysis of influenza a virus replication in genetically engineered cell lines elucidates the impact of host cell factors on key kinetic parameters of virus growth. *PLoS Comput Bio*, 15(4):e1006944, 2019. doi:https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006944.
- [100] A. Lopera-Valle, J. V. Caputo, R. Leão, D. Sauvageau, S. M. Luz, and A. Elias. Influence of epoxidized Canola Oil (eCO) and Cellulose Nanocrystals (CNCs) on the mechanical and thermal properties of polyhydroxybutyrate (PHB)-Poly(lactic acid) (PLA) blends. *Polymers*, 11(6), 2019. doi:10.3390/polym11060933.
- [101] W. D. Luzier. Materials derived from biomass/biodegradable materials. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(3):839–842, 1992. doi:10.1073/pnas.89.3.839.
- [102] M. L. Fiorese, F. Freitas, J. Pais, A. M. Ramos, G. M. F. de Aragão, M. A. M. Reis. Recovery of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Cupriavidus necator* biomass by solvent extraction with 1,2-propylene carbonate. *Eng. Life Sci.*, 9:454–461, 2009. doi:10.1002/elsc.200900034.
- [103] M. H. Madkour, D. Heinrich, M. A. Alghamdi, I. I. Shabbaj, and A. Steinbüchel. PHA recovery from biomass. *Biomacromolecules*, 14(9):2963–2972, 2013. doi:10.1021/bm4010244.
- [104] N. V. Mantzaris, A. S. Kelley, P. Daoutidis, and F. Sreenc. A population balance model describing the dynamics of molecular weight distributions and the structure of PHA copolymer chains. *Chemical Engineering Science*, 57(21):4643–4663, 2002. doi:10.1016/S0009-2509(02)00370-6.

- [105] N. V. Mantzaris, A. S. Kelley, F. Srienc, and P. Daoutidis. Optimal carbon source switching strategy for the production of PHA copolymers. *AIChE Journal*, 47(3):727–743, 2001. doi:10.1002/aic.690470319.
- [106] D. P. Martin and S. F. Williams. Medical applications of poly-4-hydroxybutyrate: a strong flexible absorbable biomaterial. *Biochemical Engineering Journal*, 16(2):97–105, 2003. doi:10.1016/S1369-703X(03)00040-8.
- [107] B. McAdam, M. Brennan Fournet, P. McDonald, and M. Mojicevic. Production of polyhydroxybutyrate (PHB) and factors impacting its chemical and mechanical characteristics. *Polymers*, 12(12):1–20, 2020. doi:10.3390/polym12122908.
- [108] K. Melén, R. Fagerlund, J. Franke, M. Köhler, L. Kinnunen, and I. Julkunen. Importin α nuclear localization signal binding sites for STAT1, STAT2, and influenza A virus nucleoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, 278(30):28193–28200, 2003. doi:10.1074/jbc.M303571200.
- [109] L. Möhler, D. Flockerzi, H. Sann, and U. Reichl. Mathematical model of influenza a virus production in large-scale microcarrier culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 90(1):46–58, 2005. doi:10.1002/bit.20363.
- [110] J Monod. The growth of bacterial cultures. *Annual Review of Microbiology*, 3:371–394, 1949. doi:10.1146/annurev.mi.03.100149.002103.
- [111] B. Morabito, A. Kienle, R. Findeisen, and L. Carius. Multi-mode model predictive control and estimation for uncertain biotechnological processes. *IFAC-PapersOnLine*, 52(1):709–714, 2019. doi:10.1016/j.ifacol.2019.06.146.
- [112] J. Możejko-Ciesielska and R. Kiewisz. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? *Microbiological Research*, 192:271–282, 2016. doi:10.1016/j.micres.2016.07.010.
- [113] T. Narancic, S. Verstichel, S. Reddy Chaganti, L. Morales-Gamez, S. T. Kenny, B. De Wilde, R. Babu Padamati, and K. E. O’Connor. Biodegradable plastic blends create new possibilities for end-of-life management of plastics but they are not a panacea for plastic pollution. *Environmental Science and Technology*, 52(18):10441–10452, 2018. doi:10.1021/acs.est.8b02963.
- [114] H. Narayanan, M. F. Luna, M. von Stosch, M. N. Cruz Bournazou, G. Polotti, M. Morbidelli, A. Butté, and M. Sokolov. Bioprocessing in the Digital Age: The Role of Process Models. *Biotechnology Journal*, 15(1):1–10, 2020. doi:10.1002/biot.201900172.
- [115] K. Nerome, H. Kumihashi, R. Nerome, Y. Hiromoto, R. Yokota, Y. amd Ueda, K. Omoe, and M. Chiba. Evaluation of immune responses to inactivated influenza vaccines prepared in embryonated chicken eggs and MDCK cells in a

- mouse model. *Dev Biol Stand.*, 98:53–63, 1999. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10494959/>.
- [116] J. Nielsen, J. Villadsen, and G. Lidén. *Bioreaction engineering principles*. Springer, Boston, MA, 2003. doi:10.1007/978-1-4615-0767-3.
- [117] I. Noda. Process for recovering polyhydroxyalkanoates using air classification, 1998. URL: <https://patents.google.com/patent/US5849854A/en>.
- [118] T. Noda, S. Murakami, S. Nakatsu, H. Imai, Y. Muramoto, K. Shindo, H. Sagarra, and Y. Kawaoka. Importance of the 1+7 configuration of ribonucleoprotein complexes for influenza A virus genome packaging. *Nature Communications*, 9(1):1–10, 2018. doi:10.1038/s41467-017-02517-w.
- [119] nova Institut. Bioplastics market data, 2021. URL: <https://www.european-bioplastics.org/market/#>.
- [120] M. Novak, M. Koller, G. Braunegg, and P. Horvat. Mathematical modelling as a tool for optimized PHA production. *Chem. Biochem. Eng.*, 29(2):183–220, 2015.
- [121] T.H. Oguin, S. Sharma, A.D. Stuart, S. Duan, S.A. Scott, C.K. Jones, J.S. Daniels, C.W. Lindsley, P.G. Thomas, and H.A. Brown. Phospholipase D facilitates efficient entry of influenza virus, allowing escape from innate immune inhibition. *Journal of Biological Chemistry.*, 289(37):25405–25417, 2014. doi:10.1074/jbc.M114.558817.
- [122] E. N. Pederson, C. W. J. McChalicher, and F. Srienc. Bacterial synthesis of PHA block copolymers. *Biomacromolecules*, 7(6):1904–1911, 2006. doi:10.1021/bm0510101.
- [123] C. Peña, T. Castillo, A. García, M. Millán, and D. Segura. Biotechnological strategies to improve production of microbial poly-(3-hydroxybutyrate): A review of recent research work. *Microbial Biotechnology*, 7(4):278–293, 2014. doi:10.1111/1751-7915.12129.
- [124] G. Penloglou, C. Chatzidoukas, and C. Kiparissides. Microbial production of polyhydroxybutyrate with tailor-made properties: An integrated modelling approach and experimental validation. *Biotechnology Advances*, 30(1):329 – 337, 2012. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.06.021.
- [125] G. Penloglou, E. Kretza, C. Chatzidoukas, S. Parouti, and C. Kiparissides. On the control of molecular weight distribution of polyhydroxybutyrate in *Azohydromonas lata* cultures. *Biochemical Engineering Journal*, 62:39 – 47, 2012. doi:10.1016/j.bej.2011.12.013.

- [126] G. Penloglou, A. Roussos, C. Chatzidoukas, and C. Kiparissides. A combined metabolic/polymerization kinetic model on the microbial production of poly(3-hydroxybutyrate). *New Biotechnology*, 27(4):358–367, 2010. doi:10.1016/j.nbt.2010.02.001.
- [127] G. Penloglou, A. Vasileiadou, C. Chatzidoukas, and C. Kiparissides. Model-based intensification of a fed-batch microbial process for the maximization of polyhydroxybutyrate (PHB) production rate. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40(8):1247–1260, 2017. doi:10.1007/s00449-017-1784-0.
- [128] J. T. Perez, A. Varble, R. Sachidanandam, I. Zlatev, M. Manoharan, A. García-Sastre, and B. R. tenOever. Influenza A virus-generated small RNAs regulate the switch from transcription to replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(25):11525–11530, 2010. doi:10.1073/pnas.1001984107.
- [129] T. Pfeiffer, I. Sánchez-Valdenebro, J. C. Nuño, F. Montero, and S. Schuster. METATOOL: For studying metabolic networks. *Bioinformatics*, 15(3):251–257, 1999. doi:10.1093/bioinformatics/15.3.251.
- [130] Plastics Europe. Plastics - the Facts 2021. An analysis of European plastics production, demand and waste data. <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2021/>.
- [131] S. K. Rahman, M. A. Ansari, P. Gaur, I. Ahmad, C. Chakravarty, D. K. Verma, A. Sharma, S. Chhibber, N. Nehal, D. Wirth, and S. K. Lal. The immunomodulatory CEA cell adhesion molecule 6 (CEACAM6/CD66c) is a protein receptor for the influenza A virus. *Viruses*, 13(5):1–23, 2021. doi:10.3390/v13050726.
- [132] D. Ramkrishna. *Population balances theory and applications to particulate systems in engineering*. Academic Press, 2000. doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-12-576970-9.X5000-0.
- [133] D. Ramkrishna and M. R. Singh. Population balance modeling: Current status and future prospects. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 5:123–146, 2014. doi:10.1146/annurev-chembioeng-060713-040241.
- [134] D. Ramkrishna and H.S. Song. *Cybernetic modeling for bioreaction engineering*. Cambridge University Press, Cambridge, 2019. doi:10.1017/9780511731969.
- [135] E. K. C. Read and P. Digard. Individual influenza A virus mRNAs show differential dependence on cellular NXF1/TAP for their nuclear export. *Journal of General Virology*, 91(5):1290–1301, 2010. doi:10.1099/vir.0.018564-0.
- [136] S. Reich, D. Guilligay, A. Pflug, H. Malet, I. Berger, T. Crepin, D. Hart, T. Lunardi, M. Nanao, R. W. H. Ruigrok, and S. Cusack. Structural insight into cap-snatching and RNA synthesis by influenza polymerase. *Nature*, 516(7531):361–366, 2014. doi:10.1038/nature14009.

- [137] R. T. Rockafellar. *Convex analysis*. Princeton University Press 1970, 2015. doi:10.1515/9781400873173.
- [138] J. S. Rossman and R. A. Lamb. Influenza Virus Assembly and Budding. *Virology*, 411(2):229–236, 2011. doi:10.1016/j.viro1.2010.12.003.
- [139] A. P. Rubio and J. María Eiros. Cell culture-derived flu vaccine: Present and future. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 14(8):1874–1882, 2018. doi:10.1080/21645515.2018.1460297.
- [140] V. Saad, B. Gutschmann, T. Grimm, T. Widmer, P. Neubauer, and S. L. Riedel. Low-quality animal by-product streams for the production of PHA-biopolymers: fats, fat/protein-emulsions and materials with high ash content as low-cost feedstocks. *Biotechnology Letters*, 43(3):579–587, 2021. doi:10.1007/s10529-020-03065-y.
- [141] P. C. Sabapathy, S. Devaraj, K. Meixner, P. Anburajan, P. Kathirvel, Y. Ravikumar, H. M. Zabed, and X. Qi. Recent developments in polyhydroxyalkanoates (PHAs) production – A review. *Bioresource Technology*, 306:123132, 2020. doi:10.1016/j.biortech.2020.123132.
- [142] V.R. Sastri. *Plastics in medical devices: Properties, requirements and applications*. Elsevier Inc., Amsterdam, 2014. doi:https://doi.org/10.1016/C2012-0-05946-7.
- [143] H. Satoh, T. Sakamoto, Y. Kuroki, Y. Kudo, and T. Mino. Application of the alkaline-digestion-HPLC method to the rapid determination of polyhydroxyalkanoate in activated sludge. *J Water Environ Technol*, 14:411–421, 2016. doi:10.2965/jwet.16-027.
- [144] A. R. W. Schröder, P. Shinn, H. Chen, C. Berry, J. R. Ecker, and F. Bushman. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell*, 110(4):521 – 529, 2002. doi:10.1016/S0092-8674(02)00864-4.
- [145] S. Schuster, D.A. Fell, and T. Dandekar. A general definition of metabolic pathways useful for systematic organization and analysis of complex metabolic networks. *Nature Biotechnology*, 18(3):326–332, 2000. doi:10.1038/73786.
- [146] S. Schuster and C. Hilgetag. On elementary flux modes in biochemical reaction systems at steady state. *Journal of Biological Systems*, 2(2):165–182, 1994. doi:10.1142/S0218339094000131.
- [147] L. Shang, M. Jiang, C. H. Ryu, H. N. Chang, S. H. Cho, and J. W. Lee. Inhibitory effect of carbon dioxide on the fed-batch culture of *Ralstonia eutropha*: Evaluation by CO₂ pulse injection and autogenous CO₂ methods. *Biotechnology and Bioengineering*, 83(3):312–320, 2003. doi:10.1002/bit.10670.

- [148] P. C. Soema, R. Kompier, J. P. Amorij, and G. F.A. Kersten. Current and next generation influenza vaccines: Formulation and production strategies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 94:251–263, 2015. doi:10.1016/j.ejpb.2015.05.023.
- [149] W. Sommeregger, B. Sissolak, K. Kandra, M. von Stosch, M. Mayer, and G. Striedner. Quality by control: Towards model predictive control of mammalian cell culture bioprocesses. *Biotechnology Journal*, 12(7):1–7, 2017. doi:10.1002/biot.201600546.
- [150] H.-S. Song, J. A. Morgan, and D. Ramkrishna. Systematic development of hybrid cybernetic models: application to recombinant yeast co-consuming glucose and xylose. *Biotechnology and Bioengineering*, 103(5):984–1002, 2009a. doi:10.1002/bit.22332.
- [151] H.-S. Song and D. Ramkrishna. Reduction of a set of elementary modes using yield analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(2):554–568, 2009. doi:10.1002/bit.22062.
- [152] H.-S. Song and D. Ramkrishna. When is the quasi-steady-state approximation admissible in metabolic modeling? When admissible, what models are desirable?. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48(17):7976–7985, 2009. doi:10.1021/ie900075f.
- [153] H.-S. Song and D. Ramkrishna. Prediction of metabolic function from limited data: Lumped hybrid cybernetic modeling (L-HCM). *Biotechnology and Bioengineering*, 106(2):271–284, 2010. doi:10.1002/bit.22692.
- [154] R. Storn and K. Price. Differential evolution – A simple and efficient heuristic for global optimization over continuous spaces. *Journal of Global Optimization*, 11(4):341–359, 1997. doi:10.1023/A:1008202821328.
- [155] P. Strong, B. Laycock, S. Mahamud, P. Jensen, P. Lant, G. Tyson, and S. Pratt. The opportunity for high-performance biomaterials from methane. *Microorganisms*, 4(1):11, 2016. doi:10.3390/microorganisms4010011.
- [156] S. Su, X. Fu, G. Li, F. Kerlin, and M. Veit. Novel influenza D virus: Epidemiology, pathology, evolution and biological characteristics. *Virulence*, 8(8):1580–1591, 2017. doi:10.1080/21505594.2017.1365216.
- [157] K. Sudesh, H. Abe, and Y. Doi. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 25(10):1503–1555, 2000. doi:10.1016/S0079-6700(00)00035-6.
- [158] L. Tafforeau, T. Chantier, F. Pradezynski, J. Pellet, P.E. Mangeot, P. Vidalain, P. Andre, C. Roubourdin-Combe, and V. Lotteau. Generation and comprehensive analysis of an influenza virus polymerase cellular interaction network. *Journal of Virology*, 85(24):13010–13018, 2011. doi:10.1128/JVI.02651-10.

- [159] G. Y. A. Tan, C. L. Chen, L. Li, L. Ge, L. Wang, I. M. N. Razaad, Y. Li, L. Zhao, Y. Mo, and J. Y. Wang. Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): A review. *Polymers*, 6(3):706–754, 2014. doi:10.3390/polym6030706.
- [160] C. T. Trinh, A. Wlaschin, and F. Sreenc. Elementary mode analysis: a useful metabolic pathway analysis tool for characterizing cellular metabolism. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(5):813–826, 2009. doi:10.1007/s00253-008-1770-1.
- [161] C. M. Trombetta. Influenza D virus: a potential threat for humans? *European Journal of Public Health*, 30(5), 2020. doi:10.1093/eurpub/ckaa165.1097.
- [162] A. Tsopanoglou and I. Jiménez del Val. Moving towards an era of hybrid modelling: advantages and challenges of coupling mechanistic and data-driven models for upstream pharmaceutical bioprocesses. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 32, 2021. doi:10.1016/j.coche.2021.100691.
- [163] T. Tsuge. Fundamental factors determining the molecular weight of polyhydroxyalkanoate during biosynthesis. *Polymer Journal*, 48(11):1051–1057, 2016. doi:10.1038/pj.2016.78.
- [164] C. Utsunomia, Q. Ren, and M. Zinn. Poly(4-Hydroxybutyrate): Current state and perspectives. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(257):1–18, 2020. doi:10.3389/fbioe.2020.00257.
- [165] P. van Hee, A. C. M. R. Elumbaring, R. G. J. M. van der Lans, and L. A. M. Van der Wielen. Selective recovery of polyhydroxyalkanoate inclusion bodies from fermentation broth by dissolved-air flotation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 297(2):595–606, 2006. doi:10.1016/j.jcis.2005.11.019.
- [166] R. A. J. Verlinden, D. J. Hill, M. A. Kenward, C. D. Williams, Z. Piotrowska-Seget, and I. K. Radecka. Production of polyhydroxyalkanoates from waste frying oil by *Cupriavidus necator*. *AMB Express*, 1(11):1–8, 2011. doi:10.1186/2191-0855-1-11.
- [167] F. T. Vreede, T. E. Jung, and G. G. Brownlee. Model suggesting that replication of influenza virus is regulated by stabilization of replicative intermediates. *Journal of Virology*, 78(17):9568–9572, 2004. doi:10.1128/jvi.78.17.9568-9572.2004.
- [168] I. Vroman and L. Tighzert. Biodegradable polymers. *Materials*, 2(2):307–344, 2009. doi:10.3390/ma2020307.
- [169] I. V. Špoljarić, M. Lopar, M. Koller, A. Muhr, A. Salerno, A. Reiterer, K. Malli, H. Angerer, K. Strohmeier, S. Schober, M. Mittelbach, and P. Horvat. Mathematical modeling of poly[(R)-3-hydroxyalkanoate] synthesis by *Cupriavidus necator* DSM 545 on substrates stemming from biodiesel production. *Bioresource Technology*, 133:482–494, 2013. doi:10.1016/j.biortech.2013.01.126.

- [170] F. Wang and S. Y. Lee. Poly(3-hydroxybutyrate) production with high productivity and high polymer content by a fed-batch culture of *Alcaligenes latus* under nitrogen limitation. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(9):3703–3706, 1997. doi:10.1128/aem.63.9.3703-3706.1997.
- [171] H. Wang, M. La Russa, and L. S. Qi. CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. *Annual Review of Biochemistry*, 85(1):227–264, 2016. doi:10.1146/annurev-biochem-060815-014607.
- [172] C. J. Wei, M. C. Crank, J. Shiver, B. S. Graham, J. R. Mascola, and G. J. Nabel. Next-generation influenza vaccines: opportunities and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*, 19(4):239–252, 2020. doi:10.1038/s41573-019-0056-x.
- [173] S. F. Williams, S. Rizk, and D. P. Martin. Poly-4-hydroxybutyrate (P4HB): A new generation of resorbable medical devices for tissue repair and regeneration. *Biomedizinische Technik*, 58(5):439–452, 2013. doi:10.1515/bmt-2013-0009.
- [174] D. Wirth, L. Gama-Norton, P. Riemer, U. Sandhu, R. Schucht, and H. Hauser. Road to precision: recombinase-based targeting technologies for genome engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(5):411–419, 2007. doi:10.1016/j.copbio.2007.07.013.
- [175] J. M. Wood, J. S. Oxford, U. Dunleavy, R. W. Newman, D. Major, and J. S. Robertson. Influenza A (H1N1) vaccine efficacy in animal models is influenced by two amino acid substitutions in the hemagglutinin molecule. *Virology*, 171(1):214–221, 1989. doi:10.1016/0042-6822(89)90528-X.
- [176] M. Wróbel-Kwiatkowska, K. Kostyn, L. Dymińska, J. Hanuza, A. Kurzawa, M. Żuk, and W. Rymowicz. Spectroscopic and biochemical characteristics of flax transgenic callus cultures producing PHB. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 141(3):489–497, 2020. doi:10.1007/s11240-020-01806-5.
- [177] M. Wulkow. Computer aided modeling of polymer reaction engineering - The status of Predici, I-Simulation. *Macromolecular Reaction Engineering*, 2(6):461–494, 2008. doi:10.1002/mren.200800024.
- [178] W. Yang, J. Zhang, Y. Xiao, W. Li, and T. Wang. Screening strategies for high-yield chinese hamster ovary cell clones. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10(June):1–11, 2022. doi:10.3389/fbioe.2022.858478.
- [179] J. D. Young, K. L. Henne, J. A. Morgan, A. E. Konopka, and D. Ramkrishna. Integrating cybernetic modeling with pathway analysis provides a dynamic, systems-level description of metabolic control. *Biotechnol Bioeng*, 100(3):542–559, 2008. doi:10.1002/bit.21780.
- [180] J. D. Young and D. Ramkrishna. On the matching and proportional laws of cybernetic models. *Biotechnology Progress*, 23(1):83–99, 2007. doi:10.1021/bp060176q.

- [181] J. Yu and Y. T. Si. Metabolic carbon fluxes and biosynthesis of polyhydroxyalkanoates in *Ralstonia eutropha* on short chain fatty acids. *Biotechnology Progress*, 20(4):1015–1024, 2004. doi:10.1021/bp034380e.

Ehrenerklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters habe ich nicht in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Verwendete fremde und eigene Quellen sind als solche kenntlich gemacht. Ich habe insbesondere nicht wissentlich:

- Ergebnisse erfunden oder widersprüchliche Ergebnisse verschwiegen,
- statistische Verfahren absichtlich missbraucht, um Daten in ungerechtfertigter Weise zu interpretieren,
- fremde Ergebnisse oder Veröffentlichungen plagiiert,
- fremde Forschungsergebnisse verzerrt wiedergegeben.

Mir ist bekannt, dass Verstöße gegen das Urheberrecht Unterlassungs- und Schadensersatzansprüche des Urhebers sowie eine strafrechtliche Ahndung durch die Strafverfolgungsbehörden begründen kann.

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass die Dissertation ggf. mit Mitteln der elektronischen Datenverarbeitung auf Plagiate überprüft werden kann.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form als Dissertation eingereicht und ist als Ganzes auch noch nicht veröffentlicht.

Magdeburg, den 26. Mai 2023

Stefanie Duvigneau