

9 Anhang

Anhang 1: Herstellungsvorschrift für das synthetische Nährmedium nach Trager. Chemikalien wurden von Carl Roth, SIGMA oder Fluka in analytischer Reinheit verwendet.

Komponenten	Konzentration [mg/l]	Konz.- Faktor	Einwaage [mg]	Endvolumen [l] {Stammlösung}	Lösungsmittel/ Sterilisierungsart
Aminosäuren					
Glycin	100	2	100	0,5	Wasser/ autoklavieren
L-Alanin	700				
L-Arginin-Hydrochlorid	300				
L-Histidin-Hydrochlorid- H ₂ O	162				
L-Isoleucin	600				
L-Leucin	1500				
L-Lysin-Hydrochlorid	1250				
L-Methionin	300				
L-Phenylalanin	400				
L-Prolin	500				
L-Serin	400				
L-Threonin	500				
L-Tryptophan	200				
L-Valin	500				
L-Asparaginsäure	1200				
L-Glutaminsäure	1900				
L-Tyrosin	400	100	1000	0,025	1M NaOH/ sterilfiltrieren
Vitamine					
	[mg/l]				
Folsäure	1,6	1000	16	0,01	1M NaOH/ sterilfiltrieren
Biotin	0,2				
Riboflavin	2				
Cholinchlorid	3	100	30	0,1	Wasser/ sterilfiltrieren
i-Inositol	3				
Niacinamid/ Nicotinamid	5				
Pyridoxa-Hydrochlorid	2				
Pyridoxin-Hydrochlorid	2				
Thiamin-Hydrochlorid	2				
Pyridoxamin-2 HCL	2				
Para-Aminobenzoessäure	3	2000	60	0,01	96% Ethanol / -
D-Calciumpantothenat	8	2000	160	0,01	Wasser/ sterilfiltrieren
Nukleotide					
	[mg/l]				
Adeninsulfat	2,317	500	11,585	0,01	7,2 ml 25% HCl + 2,8 ml H ₂ O/ sterilfiltrieren
Guanin-Hydrochlorid	1,7		8,5		
Uracil	1,7	1000	17	0,01	1M NaOH/ sterilfiltrieren
Xanthin-Na	1,96		19,6		
Cytidin-3'(+2')- Monophosphat (Cytidylic Acid)	0,5	1000	5	0,01	Wasser/ sterilfiltrieren

Anhang

Komponenten	Konzentration [mg/l]	Konz.- Faktor	Einwaage [mg]	Endvolumen [l] {Stammlösung}	Lösungsmittel/ Sterilisierungsart
Anorganische Salze					
Calciumchlorid (CaCl ₂) (anhyd.)	26	269	700	0,1	Wasser/ autoklavieren
Magnesiumsulfat (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	1000	20	2000	0,1	Wasser/ autoklavieren
Kaliumphosphat monobasic (KH ₂ PO ₄)	500	} 10	500	} 0,1	Wasser/ autoklavieren
Natriumchlorid (NaCl)	2000		2000		
Natriumphosphat dibasic (Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O)	1250 (ohne H ₂ O)		1562,5		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	10	} 100	100	} 0,1	Lösung 1: FeSO ₄ +800mg EDTA +6g Zitronensäure in 40ml H ₂ O lösen. Mit KOH pH auf 5,5 stellen. Lösung 2: Restlichen Salze in 40ml H ₂ O in Reihenfolge lösen. Lösung 1 und 2 vereinen und pH mit KOH auf 6,5 stellen / sterilfiltrieren
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	22		220		
H ₃ BO ₃	0,11		1,1		
MnSO ₄ ·H ₂ O	3		30		
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,57 µM		3,74		
CuSO ₄	3,125 µM		7,8125		

Anhang 2: Anleitung für den Western Blot zur Detektion von His₆-getagten Proteinen

Puffer und Lösungen

Transferpuffer:	39 mM Glycin (Carl Roth), 48 mM TRIS (Merck), 0,037% (w/v) SDS (Merck), 20% (v/v) Methanol (Merck)
TBST-Puffer:	50 mM TRIS, 150 mM NaCl (Carl Roth), ⇒ pH auf 7,5 mit 10%iger HCl (Carl Roth) einstellen, 0,1% (v/v) Tween ^R 20 (Carl Roth) zugeben
TBS-Puffer:	50 mM TRIS, 150 mM NaCl, ⇒ pH auf 7,5 mit 10%iger HCl einstellen
Blockpuffer:	50 ml TBST-Puffer mit 1% (w/v) BSA (Sigma-Aldrich)
1. Antikörper:	0,2 µg/ml Anti-His ₆ -Antikörper, (Mouse IgG1) (Roche Diagnostics GmbH), 1% BSA in TBS-Puffer
2. Antikörper:	Fertiglösung Anti-Mouse IgG – konjugiert mit alkalischer Phosphatase (in der Ziege hergestellt) (Sigma-Aldrich) 1:30000 verdünnt, 1% BSA in TBS-Puffer gelöst
Substrat:	BCIP/NBT Liquid Substrate System (Sigma-Aldrich)

Durchführung

- 12,5 %iges SDS-PAGE-Gel unter reduzierenden Bedingungen prozessieren
- Gel, Membran (0,2 µm Nitrozellulosemembran, Kisker Biotech), 2xFilterpapier und Fiber pads 15 min in Transferpuffer äquilibrieren und anschließend die Blotapparatur zusammenbauen
- Prozessierung des Transfers bei 280 mA für 1 h
- Markierung der Membran nach Entnahme

Anhang

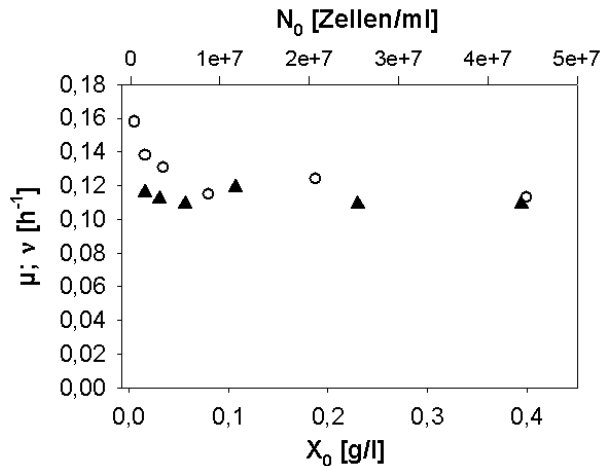
- Membran für 1 h in Blockpuffer
- Membran 3x5min mit TBST-Puffer waschen
- 1 h mit 1. Antikörper inkubieren
- 3x10min in TBST-Puffer waschen
- 1 h mit 2. Antikörper inkubieren
- 3x10 min in TBST-Puffer waschen
- 1x10min in TBS-Puffer waschen
- Membran trocknen lassen
- In Schale legen und Substrat mit Pasteurpipette tropfenweise auftragen
- 10 min bei Dunkelheit entwickeln

Anhang 3: Experimentelle Ergebnisse des Versuchsplanes 3 (Tab. 3-10, S. 32) mit der PA_{korr} als Antwortvektor. Die Versuche Nr. 2, 13, 14, 17 und 18 wurden nicht experimentiert, da ohne Hemin kein Absorptionspeak in der Chloroformphase messbar war.

Versuchs- nummer		Versuchsmatrix			Antwortvektor
		e_1	e_2	e_3	\check{Y}
1	Sternpunkte	1	0	0	36,26
2		-1	0	0	0
3		0	1	0	14,91
4		0	-1	0	15,56
5		0	0	1	14,79
6		0	0	-1	24,17
7	Eckpunkte 1	0	1	1	15,70
8		0	1	-1	23,50
9		0	-1	1	14,06
10	Eckpunkte 2	0	-1	-1	23,40
11		1	1	0	36,13
12		1	-1	0	39,65
13		-1	1	0	0
14	Eckpunkte 3	-1	-1	0	0
15		1	0	1	35,18
16		1	0	-1	53,81
17		-1	0	1	0
18		-1	0	-1	0
19	Zentralpunkt	0	0	0	15,86

Anhang

Anhang 4: Ablehnung der Hypothese einer partiellen GLC-Inhibition, d.h. die Glukose (11 g/l = konst.) wirkt nicht inhibierend auf die Anfangskonzentration der Zellen. (O) $\mu = f(X_0)$ und (\blacktriangle) $v = f(N_0)$, Raten im Bereich von 0 - 8 h ermittelt. Schüttelkolbenmaßstab A (siehe 3.2, S. 21), YE-Medium, 26°C.



Anhang 5: Programm für Berkeley Madonna zur Modellierung des Chemostaten mit Heminlimitation.

METHOD EULER

{Modellierung der Konti mit Heminlimitation ohne Speicherterm für Hemin}

{Berücksichtigung, dass sich Hemin in der Vorlageflasche abbaut}

STARTTIME = 0

STOPTIME=200

DT = 0.01

INIT X=0.326

INIT H=0.003 ;laut Referenzanalytik in Nährmedien/Zudosage getan

INIT S=2.57

Vr=93

D=0.061

muemax=0.109 ; gemittelte spezifische Wachstumsrate für YE-Medium

Yhs=834 ; Ertragskoeffizient für Hemin, siehe Dissertation

Hzu=if (TIME<=110) then 0.00153 else 0.0017 ; laut Analytik in der Zudosage bestimmt

Kh=3.1e-5 ; mit Parameteranpassung des Modells bestimmt

Yxs=0.93 ;gemittelter Ertragskoeffizient, siehe Dissertation

szu=if(TIME>110) then 2.27 else 2.57 ; erfasst dass GLC unterschiedlich zwischen den zwei Vorratsflaschen

Ks=0.046 ;Ks-Wert für Glukose, siehe Dissertation

d/dt(x)=-D*X+mue*X

mue=muemax*H/(Kh+H)*S/(Ks+S)

d/dt(H)=D*(Hzu-H)-(1/Yhs)*mue*X-a

a =if(TIME>=70 and Time<=110) or (TIME>=164 and TIME<=200) then 0.00007*EXP(-0.000024*(TIME-70)) else 0 ; Modell erweitert um einen Abbau von Hemin im YE-Medium

d/dt(s)=D*(szu-s)-(1/Yxs)*mue*X

Anhang 6: Programm für MATLAB® zur Modellierung des FedBatch-Prozesses mit mehrfacher Zugabe von Nährmedienkonzentrat [116].

```
clear all, tim=cputime;
fprintf('\n\nZyklischer FedBatch %s %s\n',date,datestr(rem(now,1)));
% Messwerte
```

Anhang

```
t_MW = xlsread('Messdaten_ZFedBatch_01',6,'(C19:C74)');
cX_MW = xlsread('Messdaten_ZFedBatch_01',6,'(I19:I74)');
cS_MW = xlsread('Messdaten_ZFedBatch_01',6,'(K19:K74)');
V_MW = xlsread('Messdaten_ZFedBatch_01',6,'(R19:R74)');
m_MW = xlsread('Messdaten_ZFedBatch_01',6,'(S19:S74)');
% Parameterwerte (Konstanten)
% Kinetik
muem = 0.1268; % maximale Wachstumsrate [1/h]
K_I = 90; % Inhibitionskonstante [g/l] des unbekanntes
Substrates
% Biomasse
K_XD = 0.0025; % Biomassezerfallskoeffizient [1/h]
% Substrat
Y_XS2 = 0.3; % Biomasseertragskoeffizient [g_Biomasse/g_Substrat]
des unbekanntes Substrates
m = 0; % Maintenancekoeffizient [1/h]
Y_PS = 0.5; % Produktertragskoeffizient [g_Produkt/g_Substrat]
cS_EIN1= 500; % Zulaufende Substratkonzentration [g/l] --> Glucose
cS_EIN2= 20; % Zulaufende Substratkonzentration [g/l] --> Y
% Produkt
alpha = 0.00; % Koeffizient der wachstumsgekoppelten Produktbildung
beta = 0.00; % Koeffizient der teilweise wachstumsgekoppelten
% Produktbildung [1/h]
K_PD = 0; % Produktzerfallskoeffizient [1/h]
% Volumen
V_EIN1 = 172.31; % Zulaufrate der Pumpe [ml/h] --> Glucose
V_EIN2 = 7463; % Zulaufrate der Pumpe [ml/h] --> Yeast
V_AUS1 = 7463; % Ablaufrate der Pumpe [ml/h] --> Zellsuspension
V_AUS2 = 5000; % Probenahme
T_EIN1 = 138; % Zulaufzeit [s]
T_EIN2 = 240; % Zulaufzeit [s]
T_AUS = 240; % Ablaufzeit [s]
% Fermentationszeit
t_max = 71; % [h]
% Intergrationsschritte des Eulerverfahrens
dt = 0.001; % [h]
% Produktivität
t_R = 52; % Rüstzeit Fermenter [h]
t_F = t_max; % Fermentationszeit [h]
V_R = 2; % Bruttovolumen Fermenter [l]
% Vorabberechnungen
% Umrechnung der Zu- und Ablaufzeit in Intergrationsschritte
t_EIN1 = T_EIN1/3600/dt;
t_EIN2 = T_EIN2/3600/dt;
t_AUS = T_AUS/3600/dt;
% Anzahl der Intergrationsschritte
i_max = t_max/dt+1;
% Initialisierung der Feldvariablen
t = zeros(i_max,1);
cX = zeros(i_max,1);
cS = zeros(i_max,1);
cP = zeros(i_max,1);
V = zeros(i_max,1);
F_IN1 = zeros(i_max,1);
F_IN2 = zeros(i_max,1);
F_OUT1 = zeros(i_max,1);
F_OUT2 = zeros(i_max,1);
mue = zeros(i_max,1);
K_S = zeros(i_max,1);
cSY = zeros(i_max,1);
cS_EIN2_Faktor = zeros(i_max,1);
Y_XS1 = zeros(i_max,1);
```

Anhang

```
t_d          = zeros(i_max,1);
mX           = zeros(i_max,1);
mX_OUT      = zeros(i_max,1);
% Zuweisen der Anfangswerte
t(1)        = 0;          % Startzeitpunkt der Fermentation [h]
cX(1)       = 0.3217;    % Startbiomassekonzentration [g/l]
cS(1)       = 2.798;    % Startsubstratkonzentration [g/l]
cP(1)       = 0;        % Startproduktkonzentration [g/l]
V(1)        = 1145;     % Startvolumen [ml]
F_IN1(1)    = 0;        % Substratzulauf zum Fermentationsbeginn
                    [ml/h]
F_IN2(1)    = 0;        % Substratzulauf zum Fermentationsbeginn
                    [ml/h]
F_OUT1(1)   = 0;        % Ablauf zum Fermentationsbeginn [l/h]
F_OUT2(1)   = 0;        % Probenahme
cSY(1)      = 1.50;     % Startsubstratkonzentration des
                    unbekanntes Substrates [g/l]
cS_EIN2_Faktor(1) = 4; % Konzentrationsfaktor des Yeast-
                    Konzentrates
Y_XS1(1)    = 1.1405; % Biomasseertragskoeffizient
                    [g_Biomasse/g_Substrat]
K_S(1)      = 0.046; % MONOD-Konstante [g/l]
% Berechnung des Startwertes von  $\mu$ 
mue(1)      = muem*(cS(1)/(K_S(1) + cS(1)))*(K_I/(cSY(1)+K_I));
% Berechnung der Generationen zum Zeitpunkt t=0
t_d(1)      = log(2)/mue(1);
% Berechnung der Masse (Biomasse) zum Zeitpunkt t=0
mX(1)       = cX(1)*V(1)/1000;
mX_OUT(1)   = (F_OUT1(1)/1000)*cX(1);
% Berechnung
for i=1:i_max-1;
    for n=0:t_AUS
        F_OUT1(23501+n)=V_AUS1; % 23.50h Entnahme von 500ml Zellsuspension
    end
    for n=0:107
        F_OUT1(33334+n)=V_AUS1; % 33.33h Entnahme von 800ml Zellsuspension
    end
    for n=0:2.8
        F_OUT1(54301+n)=V_AUS1; % 54.30h Probenahme von 20.00ml Zellsuspension
    end
    for n=0:191
        F_OUT1(70001+n)=V_AUS1; % 70.00h Entnahme von Gesamtvolumen
        Zellsuspension
    end
    for n=0:68
        F_IN2(15501+n)=V_EIN2; % 15.50h Zugabe von 500ml Yeast Konzentrat
        F_IN2(23584+n)=V_EIN2; % 23.50h Zugabe von 500ml Yeast Konzentrat
    end
    for n=0:28
        F_IN2(33501+n)=V_EIN2; % 33.50h Zugabe von 200ml Yeast Konzentrat
        cS_EIN2_Faktor(33501)=6.25;
    end
    for n=0:33.33
        F_IN2(41834+n)=V_EIN2; % 41.83h Zugabe von 250ml Yeast Konzentrat
    end
    for n=0:41.60
        F_IN2(50834+n)=V_EIN2; % 50.83h Zugabe von 312ml Yeast Konzentrat
    end
    for n=0:t_EIN1
        F_IN1(16667+n)=V_EIN1; % 16.6h Zugabe von 6.72ml Glucose
    end
    for n=0:34.72
```

Anhang

```
F_IN1(25918+n)=V_EIN1; % 25.92h Zugabe von 6.08ml Glucose
end
for n=0:35.55
F_IN1(32918+n)=V_EIN1; % 31.92h Zugabe von 6.20ml Glucose
F_IN1(51334+n)=V_EIN1; % 51.33h Zugabe von 6.16ml Glucose
F_IN1(58334+n)=V_EIN1; % 58.33h Zugabe von 6.20ml Glucose
end
for n=0:23.61
F_IN1(38918+n)=V_EIN1; % 38.92h Zugabe von 4.10ml Glucose
end
for n=0:28.74
F_IN1(43834+n)=V_EIN1; % 43.83h Zugabe von 5.00ml Glucose
end
for n=0:37.24
F_IN1(63667+n)=V_EIN1; % 63.66h Zugabe von 6.48ml Glucose
end
for n=0:40.23
F_IN1(68084+n)=V_EIN1; % 68.08h Zugabe von 7.00ml Glucose
end
for n=0:0.001
F_OUT2(1+n) =V_AUS2; % 0.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(3001+n) =V_AUS2; % 3.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(6001+n) =V_AUS2; % 6.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(13001+n)=V_AUS2; % 13.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(14001+n)=V_AUS2; % 14.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(15001+n)=V_AUS2; % 15.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(15501+n)=V_AUS2; % 15.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(16001+n)=V_AUS2; % 16.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(17001+n)=2000; % 17.00h Probenahme 2.00ml Zellsuspension
F_OUT2(18501+n)=V_AUS2; % 18.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(19501+n)=V_AUS2; % 19.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(21501+n)=10000; % 21.50h Probenahme 10.00ml Zellsuspension
F_OUT2(22501+n)=V_AUS2; % 22.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(23501+n)=V_AUS2; % 23.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(24171+n)=V_AUS2; % 24.17h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(25001+n)=V_AUS2; % 25.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(26001+n)=3000; % 26.00h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(27501+n)=3000; % 27.50h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(28501+n)=3000; % 28.50h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(29501+n)=3000; % 29.50h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(31001+n)=V_AUS2; % 31.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(32001+n)=V_AUS2; % 32.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(33001+n)=V_AUS2; % 33.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(34001+n)=3000; % 34.00h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(35501+n)=3000; % 35.50h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(37001+n)=3000; % 37.00h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(38001+n)=3000; % 38.00h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(39001+n)=3000; % 39.00h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(40001+n)=3000; % 40.00h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(41001+n)=V_AUS2; % 41.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(41751+n)=V_AUS2; % 41.75h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(42501+n)=3000; % 42.50h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(43501+n)=3000; % 43.50h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(45001+n)=V_AUS2; % 45.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(46001+n)=V_AUS2; % 46.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(49001+n)=V_AUS2; % 49.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(50001+n)=V_AUS2; % 50.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(50751+n)=V_AUS2; % 50.75h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(51501+n)=V_AUS2; % 51.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(52501+n)=V_AUS2; % 52.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(53501+n)=V_AUS2; % 53.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(54301+n)=V_AUS2; % 54.30h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
```

Anhang

```

F_OUT2(55501+n)=3000; % 55.50h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(56501+n)=3000; % 56.50h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(57501+n)=3000; % 57.50h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(58501+n)=3000; % 58.50h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(59501+n)=V_AUS2; % 59.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(60501+n)=V_AUS2; % 60.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(61501+n)=V_AUS2; % 61.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(62501+n)=V_AUS2; % 62.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(63501+n)=V_AUS2; % 63.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(65501+n)=V_AUS2; % 65.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(66501+n)=V_AUS2; % 66.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(67501+n)=V_AUS2; % 67.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(68501+n)=V_AUS2; % 68.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(69501+n)=V_AUS2; % 69.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
end
Y_XS1(i+1) = 0.002*Y_XS1(i)*dt + Y_XS1(i);
K_S(i+1) = 0.055*K_S(i)*dt + K_S(i);
mue(i+1) = muem*(cS(i)/(K_S(i) + cS(i)))*(K_I/(cSY(i)+K_I));
t_d(i+1) = log(2)/mue(i);
t(i+1) = t(i) + dt;
cX(i+1) = (mue(i) - K_XD - (F_IN1(i) + F_IN2(i))/V(i))*cX(i)*dt +
cX(i);
mX(i+1) = (cX(i)*V(i)/1000);
mX_OUT(i+1)=(F_OUT1(i)/1000)*cX(i)*dt + mX_OUT(i);
pi = alpha*mue(i) + beta;
cS(i+1) = ((-mue(i)./Y_XS1(i) - m - pi/Y_PS)*cX(i) - ((F_IN1(i)...
+ F_IN2(i))/V(i))*cS(i) + (F_IN1(i)/V(i))*cS_EIN1)*dt +
cS(i);
cSY(i+1) = ((-mue(i)./Y_XS2)*cX(i) - ((F_IN1(i)...
+ F_IN2(i))/V(i))*cSY(i) + (F_IN2(i)/V(i))*...
cS_EIN2_Faktor(i)*cS_EIN2)*dt + cSY(i);
if cSY(i)<=0
cSY(i)=0;
end
cS_EIN2_Faktor(i+1) = cS_EIN2_Faktor(i);
cP(i+1) = (pi*cX(i) - K_PD - ((F_IN1(i) +F_IN2(i))/V(i))*cP(i))*dt
+ cP(i);
V(i+1) = (F_IN1(i) + F_IN2(i) - F_OUT1(i) - F_OUT2(i))*dt + V(i);
end
% Bewertung des Modells
cX_Modell = [cX(1) cX(3001) cX(6001) cX(13001) cX(14001)...
cX(15001) cX(15501) cX(16001) cX(17001) cX(18501)...
cX(19501) cX(21501) cX(22501) cX(23501) cX(24171)...
cX(25001) cX(26001) cX(27501) cX(28501) cX(29501)...
cX(31001) cX(32001) cX(33001) cX(34001) cX(35501)...
cX(37001) cX(38001) cX(39001) cX(40001) cX(41001)...
cX(41751) cX(42501) cX(43501) cX(45001) cX(46001)...
cX(49001) cX(50001) cX(50751) cX(51501) cX(52501)...
cX(53501) cX(54301) cX(55501) cX(56501) cX(57501)...
cX(58501) cX(59501) cX(60501) cX(61501) cX(62501)...
cX(63501) cX(65501) cX(66501) cX(67501) cX(68501)...
cX(69501)];
cS_Modell = [cS(1) cS(3001) cS(6001) cS(13001) cS(14001)...
cS(15001) cS(15501) cS(16001) cS(17001) cS(18501)...
cS(19501) cS(21501) cS(22501) cS(23501) cS(24171)...
cS(25001) cS(26001) cS(27501) cS(28501) cS(29501)...
cS(31001) cS(32001) cS(33001) cS(34001) cS(35501)...
cS(37001) cS(38001) cS(39001) cS(40001) cS(41000)...
cS(41751) cS(42501) cS(43501) cS(45001) cS(46001)...
cS(49001) cS(50001) cS(50751) cS(51501) cS(52501)...
cS(53501) cS(54301) cS(55501) cS(56501) cS(57501)...
cS(58501) cS(59501) cS(60501) cS(61501) cS(62501)...

```


Anhang

```

                cS(63501) cS(65501) cS(66501) cS(67501) cS(68501)...
                cS(69501) ];
resid_X = cX_MW - cX_Modell';
resid_S = cS_MW - cS_Modell';
SSE_X   = sum(resid_X.^2);
SSE_S   = sum(resid_S.^2);
SSyy_X  = sum((cX_MW - mean(cX_MW)).^2);
SSyy_S  = sum((cS_MW - mean(cS_MW)).^2);
R_X     = sqrt(1 - SSE_X/SSyy_X);
R_S     = sqrt(1 - SSE_S/SSyy_S);
STD_X   = sqrt((resid_X.^2)/(length(cX_MW)-1));
STD_S   = sqrt((resid_S.^2)/(length(cS_MW)-1));
Pr      = mX_OUT(i_max)/(V_R*(t_R+t_F));
fprintf('\n Die Übereinstimmung der Modellwerte für die Biomasse mit den
Messwerten beträgt: %6.4f \n',R_X)
fprintf('\n Die Übereinstimmung der Modellwerte für das Substrat mit den
Messwerten beträgt: %6.4f \n',R_S)
fprintf('\n Die Produktivität beträgt: %6.4f [g Biomasse/(l
Fermentervolumen * h)] \n',Pr);
% grafische Ausgabe
figure;
subplot(2,1,1)
    plot(t,cX,'g',...
         t,cS,'b',...
         t,cP,'r',...
         t,cSY/5,'c',...
         t_MW,cX_MW,'*g',...
         t_MW,cS_MW,'+b',...
         'LineWidth',1);
    title ('Zyklische Zufütterung am Fed-Batch-Reaktor');
    xlabel('t [h]');
    ylabel(' ');
    legend('c_X [g/l]', 'c_S, _G_L_C [g/l]', 'c_P [g/l]', 'c_S, _Y:5
[g/l]', 2)
    set(gca, 'XLim', [0 t_max], 'YLim', [0 15]);
subplot(2,1,2)
    plot(t,V,'k',...
         t,F_IN1*2,'b',...
         t,F_IN2/10,'c',...
         t,-F_OUT1/10,'r',...
         t_MW,V_MW,'-sk',...
         'LineWidth',1);
    xlabel('t [h]');
    ylabel(' ');
    legend('V [ml]', 'F_I_N, _G_L_C*2 [ml/h]', 'F_I_N, _Y:10
[ml/h]', 'F_O_U_T:10 [ml/h]', 3);
    set(gca, 'XLim', [0 t_max], 'YLim', [-(V_EIN2/10)-100 max(V)+300]);
set(gcf, 'Color', [1 1 1]);
figure;
subplot(3,1,1)
    t_d_Modell = [t_d(1)      t_d(15540) t_d(25955) t_d(38943)
t_d(43864)...
                t_d(50835) t_d(58330) t_d(63668) t_d(68080)];
    t_Modell11 = [t(1)      t(15540)  t(25995)  t(38943)  t(43864)...
                t(50835)  t(58330)  t(63668)  t(68080)];
    plot(t_Modell11,t_d_Modell,...
         'LineWidth',1);
    xlabel('t [h]');
    ylabel('Anzahl der Generationen');
    set(gca, 'XLim', [0 t_max], 'YLim', [0 23]);
subplot(3,1,2)
```

Anhang

```
mue_Modell = [mue(1)      mue(15490) mue(15540) mue(23570)
mue(23610)...
              mue(41800) mue(41868) mue(43820) mue(51330)
mue(58330)...
              mue(63668) mue(68080)];
t_Modell2 = [t(1)      t(15490)  t(15540)  t(23570)  t(23610)...
             t(41800)  t(41868)  t(43820)  t(51330)  t(58330)...
             t(63668)  t(68080)];
plot(t_Modell2,mue_Modell*20,'r',...
     t,Y_XS1,'g',...
     t,K_S,'b',...
     'LineWidth',1);
xlabel('t [h]');
legend('μ [1/h]*20','Y_X,_G_L_C','K_S,_G_L_C [g/l]',2);
set(gca,'XLim',[0 t_max],'YLim',[0 2.5]);
subplot(3,1,3)
mX_OUT_Modell = [mX_OUT(1) mX_OUT(23570) mX_OUT(33441) mX_OUT(70192)];
t_Modell3 = [t(1)      t(23570)      t(33441)      t(70192)];
plot(t,mX,'g',...
     t,mX_OUT,'c',...
     t_Modell3,mX_OUT_Modell,'b',...
     t_MW,m_MW,'*g',...
     'LineWidth',1);
xlabel('t [h]');
legend('m_X [g]',2);
set(gca,'XLim',[0 t_max],'YLim',[0 27]);
set(gcf,'Color',[1 1 1]);
fprintf('\nCPU-time needed %6.2f [s]\n',cputime-tim)
```

Anhang 7: Programm für MATLAB® zur Modellierung des FedBatch-Prozesses mit mehrfacher Zugabe von SFP(III)-Medium [117].

```
clear all, tim=cputime;
fprintf('\n\nZyklischer FedBatch %s %s\n',date,datestr(rem(now,1)));
% Messwerte
t_MW = xlsread('2007-09-20 Fermentation SAG2 mit SFP(III)-
Medium_1',4,'(C19:C61)');
cX_MW = xlsread('2007-09-20 Fermentation SAG2 mit SFP(III)-
Medium_1',4,'(I19:I61)');
cS_MW = xlsread('2007-09-20 Fermentation SAG2 mit SFP(III)-
Medium_1',4,'(K19:K61)');
cRNA_MW = xlsread('2007-09-20 Fermentation SAG2 mit SFP(III)-
Medium_1',4,'(S19:S61)');
V_MW = xlsread('2007-09-20 Fermentation SAG2 mit SFP(III)-
Medium_1',4,'(R19:R61)');
m_MW = xlsread('2007-09-20 Fermentation SAG2 mit SFP(III)-
Medium_1',4,'(P19:P61)');
% Parameterwerte (Konstanten)
% Kinetik
muem = 0.0717; % maximale Wachstumsrate [1/h]
% Biomasse
K_XD = 0.0000; % Biomassezerfallskoeffizient [1/h]
% Substrat
m = 0; % Maintenancekoeffizient [1/h]
Y_PS = 0.5; % Produktertragskoeffizient [g_Produkt/g_Substrat]
cS_EIN1= 5; % Zulaufende Substratkonzentration [g/l] --> Glucose
cS_EIN2= 0.077; % Zulaufende Substratkonzentration [g/l] --> RNA
cS_EIN3= 8; % Zulaufende Substratkonzentration [g/l] --> RNA (für
letzte Zugabe)
cS_EIN4= 500; % Zulaufende Substratkonzentration [g/l] --> Glucose
(für 1. Zugabe)
```

Anhang

```
% Produkt
alpha = 0.00; % Koeffizient der wachstumsgekoppelten Produktbildung
beta  = 0.00; % Koeffizient der teilweise wachstumsgekoppelten
                    % Produktbildung [1/h]
K_PD  = 0;     % Produktzerfallskoeffizient [1/h]
% Volumen
V_EIN1 = 172.31; % Zulauftrate der Pumpe [ml/h] --> Glucose/RNA
V_EIN2 = 7463;  % Zulauftrate der Pumpe [ml/h] --> Nährmedium
V_AUS1  = 7463; % Ablauftrate der Pumpe [ml/h] --> Zellsuspension
V_AUS2  = 10000; % Probenahme
T_EIN1  = 138;  % Zulaufzeit [s]
T_EIN2  = 240;  % Zulaufzeit [s]
T_AUS   = 240;  % Ablaufzeit [s]
% Fermentationszeit
t_max = 73.5; % [h]
% Intergrationsschritte des Eulerverfahrens
dt = 0.001; % [h]
% Produktivität
t_R    = 52;    % Rüstzeit Fermenter [h]
t_F    = t_max; % Fermentationszeit [h]
V_R    = 2;     % Bruttovolumen Fermenter [l]
% Vorabberechnungen
% Umrechnung der Zu- und Ablaufzeit in Intergrationsschritte
t_EIN1 = T_EIN1/3600/dt;
t_EIN2 = T_EIN2/3600/dt;
t_AUS  = T_AUS/3600/dt;
% Anzahl der Intergrationsschritte
i_max = t_max/dt+1;
% Initialisierung der Feldvariablen
t      = zeros(i_max,1);
cX     = zeros(i_max,1);
cS     = zeros(i_max,1);
cP     = zeros(i_max,1);
V      = zeros(i_max,1);
F_IN1  = zeros(i_max,1);
F_IN2  = zeros(i_max,1);
F_IN3  = zeros(i_max,1);
F_OUT1 = zeros(i_max,1);
F_OUT2 = zeros(i_max,1);
mue    = zeros(i_max,1);
K_S1   = zeros(i_max,1);
K_S2   = zeros(i_max,1);
cS_EIN1_Faktor = zeros(i_max,1);
cS_RNA = zeros(i_max,1);
Y_XS1  = zeros(i_max,1);
Y_XS2  = zeros(i_max,1);
t_d    = zeros(i_max,1);
mX     = zeros(i_max,1);
mX_OUT = zeros(i_max,1);
% Zuweisen der Anfangswerte
t(1)      = 0; % Startzeitpunkt der Fermentation [h]
cX(1)     = 0.3072; % Startbiomassekonzentration [g/l]
cS(1)     = 4.920; % Startsubstratkonzentration [g/l]
cP(1)     = 0; % Startproduktkonzentration [g/l]
V(1)      = 1000; % Startvolumen [ml]
F_IN1(1)  = 0; % Substratzulauf zum Fermentationsbeginn
                    [ml/h]
F_IN2(1)  = 0; % Substratzulauf zum Fermentationsbeginn
                    [ml/h]
F_IN3(1)  = 0; % Substratzulauf zum Fermentationsbeginn
                    [ml/h]
F_OUT1(1) = 0; % Ablauf zum Fermentationsbeginn [l/h]
```

Anhang

```
F_OUT2(1)          = 0;          % Probenahme
cS_RNA(1)          = 0.077;     % Startsubstratkonzentration des
                               unbekanntes Substrates [g/l]

cS_EIN1_Faktor(1) = 1;
Y_XS1(1)           = 1.998;     % Biomasseertragskoeffizient
                               [g_Biomasse/g_Substrat]
Y_XS2(1)           = 15;       % Biomasseertragskoeffizient
                               [g_Biomasse/g_Substrat] der RNA
K_S1(1)            = 0.046;     % MONOD-Konstante [g/l]
K_S2(1)            = 0.005;     % Limitationskonstante [g/l] der RNA
% Berechnung der Masse (Biomasse) zum Zeitpunkt t=0
mX(1)              = cX(1)*V(1)/1000;
mX_OUT(1)          = (F_OUT1(1)/1000)*cX(1);
% Berechnung
for i=1:i_max-1;
    % Zugaben/Entnahmen aus dem Fermenter
    for n=0:40.2
        F_OUT1(30417+n)=V_AUS1; % 30.42h Entnahme von 300ml Zellsuspension
        F_OUT1(48501+n)=V_AUS1; % 48.50h Entnahme von 300ml Zellsuspension
    end
    for n=0:53.6
        F_OUT1(40251+n)=V_AUS1; % 40.25h Entnahme von 400ml Zellsuspension
    end
    for n=0:138
        F_OUT1(73001+n)=V_AUS1; % 73.00h Entnahme von Gesamtvolumen
                               Zellsuspension
    end
    for n=0:66
        F_IN2(30501+n)=V_EIN2; % 30.50h Zugabe von 500ml Nährmedium
        F_IN2(40334+n)=V_EIN2; % 40.33h Zugabe von 500ml Nährmedium
        cS_EIN1_Faktor(40334)=1.2;
        F_IN2(48584+n)=V_EIN2; % 48.58h Zugabe von 500ml Nährmedium
        cS_EIN1_Faktor(48584)=1.0;
    end
    for n=0:29
        F_IN3(56501+n)=V_EIN1; % 56.50h Zugabe von 5.000ml RNA
        Y_XS2(56501) =Y_XS2(1);
        K_S2(56501)  =K_S2(1);
    end
    for n=0:42
        F_IN1(21917+n)=V_EIN1; % 21.90h Zugabe von 7ml Glucose
    end
    for n=0:0.001
        F_OUT2(1+n)      =20000; % 0.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
        F_OUT2(2001+n)   =7000;  % 3.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
        F_OUT2(7001+n)   =12000; % 6.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
        F_OUT2(8501+n)   =V_AUS2; % 13.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
        F_OUT2(16001+n)  =V_AUS2; % 14.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
        F_OUT2(18001+n)  =9000;  % 15.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
        F_OUT2(20001+n)  =V_AUS2; % 15.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
        F_OUT2(21501+n)  =2000;  % 16.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
        F_OUT2(22001+n)  =V_AUS2; % 17.00h Probenahme 2.00ml Zellsuspension
        F_OUT2(23001+n)  =7000;  % 18.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
        F_OUT2(24501+n)  =12000; % 19.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
        F_OUT2(25501+n)  =11000; % 21.50h Probenahme 10.00ml Zellsuspension
        F_OUT2(27001+n)  =13000; % 22.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
        F_OUT2(28001+n)  =11000; % 23.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
        F_OUT2(29001+n)  =8000;  % 24.17h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
        F_OUT2(30001+n)  =11000; % 25.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
        F_OUT2(31001+n)  =16000; % 26.00h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
        F_OUT2(32501+n)  =V_AUS2; % 27.50h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
        F_OUT2(34001+n)  =13000; % 28.50h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
    end
end
```

Anhang

```

F_OUT2(35501+n)=9000;      % 29.50h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(37001+n)=13000;    % 31.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(39001+n)=5000;     % 32.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(40001+n)=V_AUS2;   % 33.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(40501+n)=V_AUS2;   % 34.00h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(42001+n)=11000;    % 35.50h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(43501+n)=V_AUS2;   % 37.00h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(45001+n)=V_AUS2;   % 38.00h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(47001+n)=11000;    % 39.00h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(48001+n)=11000;    % 40.00h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(49251+n)=V_AUS2;   % 41.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(50751+n)=V_AUS2;   % 41.75h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(52601+n)=14000;    % 42.50h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(53501+n)=12000;    % 43.50h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
F_OUT2(54001+n)=V_AUS2;   % 45.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(55001+n)=12000;    % 46.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(56001+n)=12000;    % 49.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(65001+n)=11000;    % 50.00h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(66501+n)=11000;    % 50.75h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(68001+n)=11000;    % 51.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(69001+n)=12000;    % 52.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(70501+n)=V_AUS2;   % 53.50h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(72001+n)=V_AUS2;   % 54.30h Probenahme 5.00ml Zellsuspension
F_OUT2(73001+n)=V_AUS2;   % 55.50h Probenahme 3.00ml Zellsuspension
end
% Änderungen von Yxs und Ks
Y_XS1(i+1) = Y_XS1(1);
Y_XS2(i+1) = 0.015*Y_XS2(i)*dt + Y_XS2(i);
K_S1(i+1) = K_S1(1);
K_S2(i+1) = 0.00001*K_S2(i)*dt + K_S2(i);
Y_XS2(20001) = 40;
K_S2(22001) = 0.045;
Y_XS2(30501) = Y_XS2(1);
K_S2(30501) = K_S2(1);
K_S2(35501) = 0.045;
Y_XS2(34001) = 100;
Y_XS2(40334) = Y_XS2(1);
K_S2(40334) = K_S2(1);
Y_XS2(45001) = 5;
K_S2(45001) = 0.045;
Y_XS2(48584) = Y_XS2(1);
K_S2(48584) = K_S2(1);
Y_XS2(52581) = 5;
K_S2(52581) = 0.045;
Y_XS2(61681) = 25;
K_S2(61681) = 0.045;
K_S2(66501) = 0.065;
% Differentialgleichungen für die Kinetik, Biomasse, Substrate und
Reaktorvolumen
mue(i+1) = muem*(cS(i)/(K_S1(i) + cS(i)))*(cS_RNA(i)/(K_S2(i) +
cS_RNA(i)));
t_d(i+1) = log(2)/mue(i+1);
t(i+1) = t(i) + dt;
cX(i+1) = (mue(i) - K_XD - (F_IN1(i) + F_IN2(i) +
F_IN3(i))/V(i))*cX(i)*dt + cX(i);
mX(i+1) = (cX(i)*V(i)/1000);
mX_OUT(i+1) = (F_OUT1(i)/1000)*cX(i)*dt + mX_OUT(i);
pi = alpha*mue(i) + beta;
cS(i+1) = ((-mue(i)./Y_XS1(i) - m - pi/Y_PS)*cX(i) - ((F_IN1(i)...
+ F_IN2(i) + F_IN3(i))/V(i))*cS(i) +
(F_IN2(i)/V(i))*cS_EIN1_Faktor(i)*cS_EIN1...
+ (F_IN1(i)/V(i))*cS_EIN4)*dt + cS(i);

```

Anhang

```
cS_EIN1_Faktor(i+1) = cS_EIN1_Faktor(i);
cS_RNA(i+1) = ((-mue(i)./Y_XS2(i))*cX(i) - ((F_IN1(i)
+ F_IN2(i) + F_IN3(i))/V(i))*cS_RNA(i) +
+ (F_IN2(i)/V(i))*cS_EIN2
+ (F_IN3(i)/V(i))*cS_EIN3)*dt + cS_RNA(i);
cP(i+1) = (pi*cX(i) - K_PD - ((F_IN1(i) + F_IN2(i)
+ F_IN3(i))/V(i))*cP(i))*dt + cP(i);
V(i+1) = (F_IN1(i) + F_IN2(i) + F_IN3(i) - F_OUT1(i) - F_OUT2(i))*dt
+ V(i);
end
% Bewertung des Modells
cX_Modell = [cX(1)      cX(2001)  cX(7001)  cX(8501)  cX(16001)...
cX(18001) cX(20001) cX(21501) cX(22001) cX(23001)...
cX(24501) cX(25501) cX(27001) cX(28001) cX(29001)...
cX(30001) cX(31001) cX(32501) cX(34001) cX(35501)...
cX(37001) cX(39001) cX(40001) cX(40501) cX(42001)...
cX(43501) cX(45001) cX(47001) cX(48001) cX(49251)...
cX(50751) cX(52601) cX(53501) cX(54001) cX(55001)...
cX(56001) cX(65001) cX(66501) cX(68001) cX(69001)...
cX(70501) cX(72001) cX(73001)];
cS_Modell = [cS(1)      cS(2001)  cS(7001)  cS(8501)  cS(16001)...
cS(18001) cS(20001) cS(21501) cS(22001) cS(23001)...
cS(24501) cS(25501) cS(27001) cS(28001) cS(29001)...
cS(30001) cS(31001) cS(32501) cS(34001) cS(35501)...
cS(37001) cS(39001) cS(40001) cS(40501) cS(42001)...
cS(43501) cS(45001) cS(47001) cS(48001) cS(49251)...
cS(50751) cS(52601) cS(53501) cS(54001) cS(55001)...
cS(56001) cS(65601) cS(66501) cS(68001) cS(69001)...
cS(70501) cS(72001) cS(73001)];
resid_X = cX_MW - cX_Modell';
resid_S = cS_MW - cS_Modell';
SSE_X = sum(resid_X.^2);
SSE_S = sum(resid_S.^2);
SSyy_X = sum((cX_MW - mean(cX_MW)).^2);
SSyy_S = sum((cS_MW - mean(cS_MW)).^2);
R_X = sqrt(1 - SSE_X/SSyy_X);
R_S = sqrt(1 - SSE_S/SSyy_S);
STD_X = sqrt((resid_X.^2)/(length(cX_MW)-1));
STD_S = sqrt((resid_S.^2)/(length(cS_MW)-1));
Pr = mX_OUT(i_max)/(V_R*(t_R+t_F));
fprintf('\n Die Übereinstimmung der Modellwerte für die Biomasse mit den
Messwerten beträgt: %6.4f \n',R_X)
fprintf('\n Die Übereinstimmung der Modellwerte für das Substrat mit den
Messwerten beträgt: %6.4f \n',R_S)
fprintf('\n Die Produktivität beträgt: %6.4f [g Biomasse/(l
Fermentervolumen * h)] \n',Pr);
% grafische Ausgabe
figure;
subplot(2,1,1)
plot(t,cX*2,'g',...
t,cS,'b',...
t,cS_RNA*100,'c',...
t_MW,cX_MW*2,'*g',...
t_MW,cS_MW,'+b',...
t_MW,cRNA_MW*100,'.c',...
'LineWidth',1);
xlabel('Zeit [h]');
ylabel(' ');
legend('X [g/l]', 'GLC [g/l]', 'RNA (x100) [g/l]',2)
set(gca,'XLim',[0 t_max],'YLim',[0 10]);
subplot(2,1,2)
plot(t,V,'k',...
```

Anhang

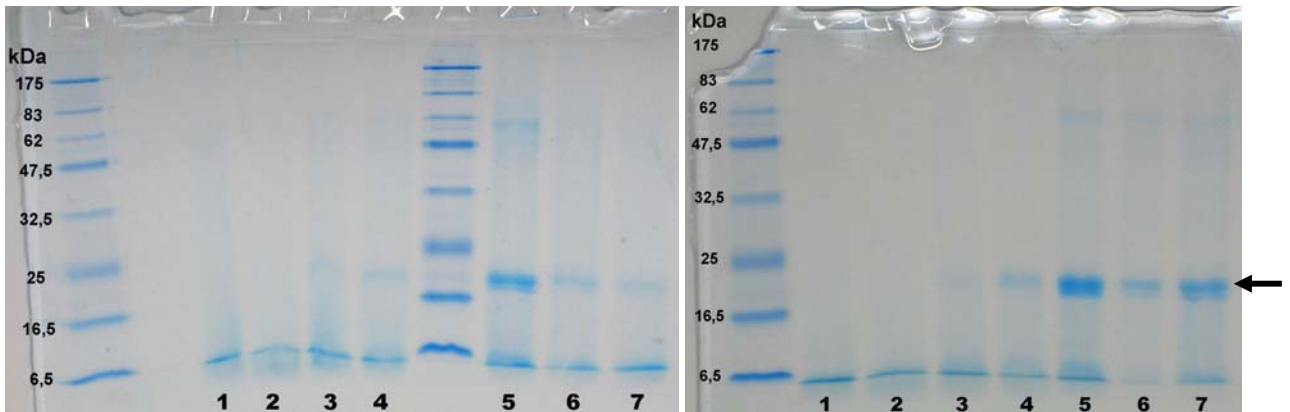
```
t,F_IN1*2,'b',...
t,F_IN3*2,'c',...
t,F_IN2/10,'k',...
t,-F_OUT1/10,'r',...
t_MW,V_MW,'-sk',...
'LineWidth',1);
xlabel('Zeit [h]');
ylabel(' ');
legend('V [ml]', 'F_I_N_,_G_L_C (x2)[ml/h]', 'F_I_N_,_R_N_A
(x2)[ml/h]',...
'F_I_N_,_S_F_P (1/10)[ml/h]', 'F_O_U_T (1/10)[ml/h]',2);
set(gca,'XLim',[0 t_max], 'YLim',[-(V_EIN2/10)-100 max(V)+300]);
set(gcf,'Color',[1 1 1]);
figure;
subplot(2,1,1)
plot(t,mue*20,'r',...
t,Y_XS2/100,'g',...
t,K_S2*10,'b',...
'LineWidth',1);
xlabel('t [h]');
legend('μ(x20) [1/h]', 'Y_X/_R_N_A (1/100)', 'K_S_,_R_N_A (x10)
[g/l]',2);
subplot(2,1,2)
mX_OUT_Modell = [mX_OUT(1) mX_OUT(23570) mX_OUT(33441) mX_OUT(70192)];
t_Modell3 = [t(1) t(23570) t(33441) t(70192)];
plot(t,mX,'g',...
t,mX_OUT,'c',...
t_MW,m_MW,'*g',...
'LineWidth',1);
xlabel('Zeit [h]');
legend('m_X [g]',2);
set(gcf,'Color',[1 1 1]);
fprintf('\nCPU-time needed %6.2f [s]\n',cputime-tim)
```

Anhang 8: Demonstration der RNA-Konzentrationsbestimmung an einem Agarosegel, gefärbt mit Ethidiumbromid. Der Grauwert der Bande „Max.“ entspricht 77 mg/l (Start der Fermentation) und der Bande „Min.“ 0 mg/l (Nährmedium ohne RNA). Die Grauwerte der Fermentationsproben wurden dazu ins Verhältnis gesetzt. Bestimmung der Grauwerte mit Adobe Photoshop CS3 Extended v10.0 Deutsch. Markierung der RNA-Bande mit Pfeil.

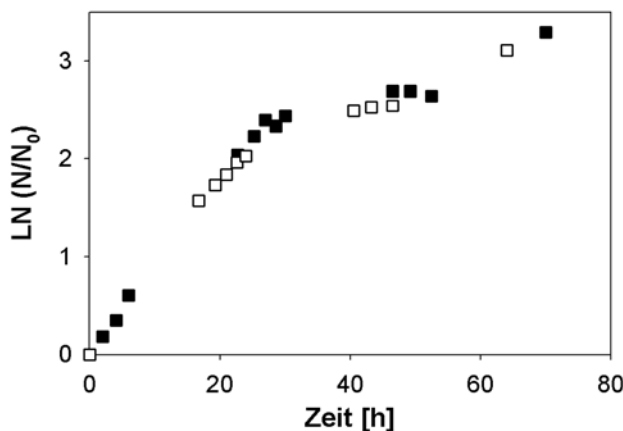


Anhang

Anhang 9: SDS-PAGE mit Expression von SAG2 im Nährmedienüberstand von BHI-Medium (linkes Bild) und YE-Medium (rechtes Bild). Überstand wurde 100x aufkonzentriert durch TCA-Fällung. Lane 1) Nährmedium vor der Beimpfung; 2) nach 4,5 h Kultivierungszeit; 3) nach 20,5 h; 4) nach 24,5 h; 5) nach 29 h; 6) nach 44 h und 7) nach 48h Kultivierung. Die Kultivierung von *L. tarentolae* erfolgte in 100 ml Nährmedium in 500 ml Schüttelkolben ohne Schikane. SAG2 Bande ist durch einen Pfeil markiert.



Anhang 10: Logarithmische Auswertung der Zellzahl bei der Kultivierung des SAG2-Stammes im SFP(III)-Medium in den Kolben A (■) und B (□). Der Anstieg der Kurven entspricht der spezifischen Zellteilungsrate v. Messpunkte >60 h sind stark fehlerbehaftet.



Anhang 11: Protokoll zum Downstream Processing des SAG2

- 100 ml SFP(III)-Medium vorbereitet, Proben für Analytik entnommen
- Beimpfung mit gewaschenen Zellen einer exponentiell wachsenden Vorkultur
- Startkonzentration: 0,25 g/l TBM bzw. $2,84 \times 10^7$ Zellen/ml
- Teilung des Volumen zu 2x50 ml in 250 ml Kolben mit Schikane
- Ernte nach 29 h, Vereinigung beider Kolben ($1,1$ g/l TBM bzw. $1,58 \times 10^8$ Zellen/ml)
- Zellpellet von 1 ml Suspension gewonnen, gewaschen und durch Desintegration aufgeschlossen nach Resuspension in Aufschlusspuffer
- Abzentrifugation der Zellen und Gewinnung von 92 ml Überstand
- Proben der Überstandes für die Analytik entnommen

Anhang

- Zugabe von 0,0297 g Imidazol (5 mM, Merck) zu 85 ml Überstand, Proben für Analytik entnommen
- Affinitätschromatographie:
 - Säule: HisTrap-Säule FF crude (GE Healthcare), gepackt mit Ni Sepharose™ Fast Flow, Säulenvolumen (CV) = 1 ml
 - Flussrate: 1 ml/min
 - Equilibrierung mit 5 CV mit Equilibrierungspuffer (20 mM Natriumphosphat, 500 mM NaCl, 5 mM Imidazol)
 - Beladung von 70 ml Überstand mit 5 mM Imidazol, Proben des Durchlaufes zurückgestellt
 - Waschen der Säule mit 15 CV Equilibrierungspuffer, Proben für Analytik gewonnen
 - Einspülen von Elutionspuffer in das Äkta-System (15 ml)
 - Stufenelution für 10 CV mit Elutionspuffer (20 mM Natriumphosphat, 500 mM NaCl, 300 mM Imidazol), Proben für Analytik gewonnen
 - Equilibrierung der Säule mit 5 CV Equilibrierungspuffer
 - Lagerung der Säule in 20 % Ethanol
- Die Analytik erfolgte wie im Kapitel 3.6 beschrieben, nach Anwendung der TCA-Fällung, siehe 3.5.

Anhang 12: Gentechnische Konstruktion des Hyal-1-Stammes: *L. tarentolae* T7TR::6071#8-3

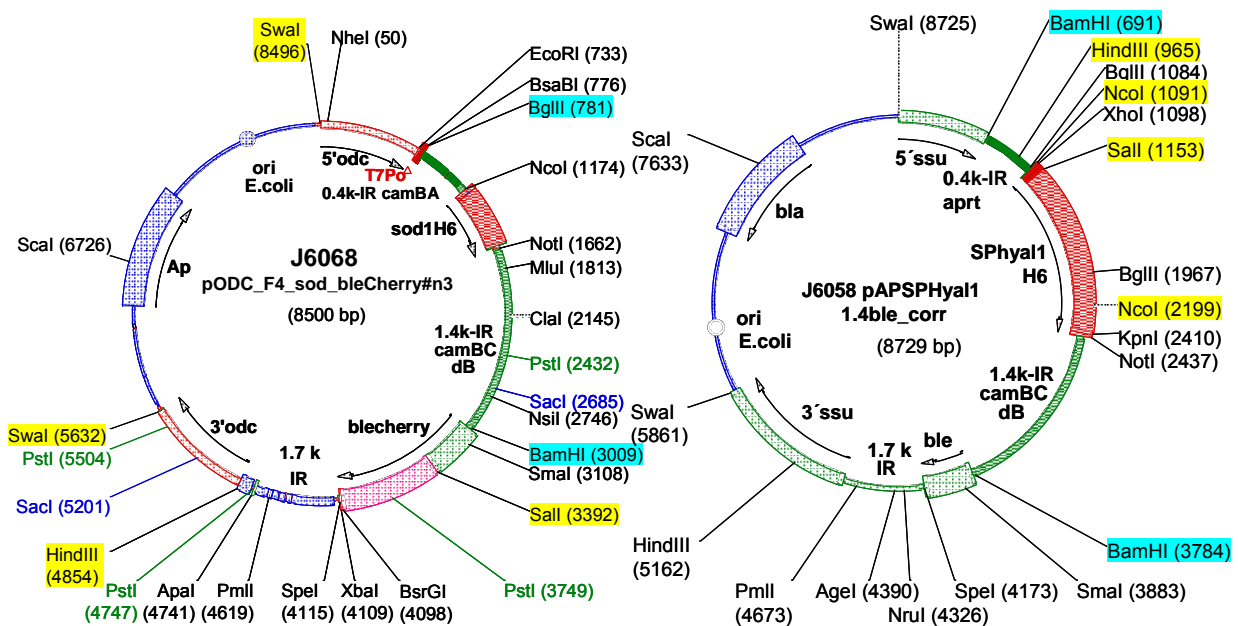


Abb. 9-1: Genkarte der Vektoren J6068 (links) und J6058 (rechts) mit Markierung der verwendeten Restriktionsschnittstellen.

Anhang

Die Konstruktion des Vektors J6071 erfolgte aus Teilstücken der Vektoren J6068 und J6058 nach gezieltem Verdau mit Restriktionsenzymen. Die verwendeten Vektoren, Enzyme, Kits und Puffer stammten von Jena Bioscience, Abweichungen werden entsprechend genannt. Der Vektor J6058 enthielt das Insert mit dem Gen für *hyal1* (J6058 pAPSPHyal1 1.4ble_corr; insgesamt 8729 bp groß) und der Vektor J6068 stellte den Zielvektor dar, aus dem das Insert mit dem Gen für *sod1* (pODC_F4_sod_bleCherry#n3; 8500bp groß) entfernt werden musste, siehe Abb. 9-1.

Der Vektor J6058 wurde mit *Bam*HI verdaut, indem 10 µl gelöster J6058-Vektor, 10 µl Puffer B3 (10x konzentriert), 10 µl BSA (10x konzentriert), 65 µl A. dest und 5 µl *Bam*HI gemischt und für 1 h bei 37°C inkubiert wurden. Der Ansatz war identisch bei dem Vektor J6068, außer das dieser mit *Bam*HI und *Bg*II geschnitten wurde, nach 1 h 0,5 µl SAP (Shrimps Alkaline Phosphatase, Fermentas) zugeben und für weitere 30 min inkubiert wurde.

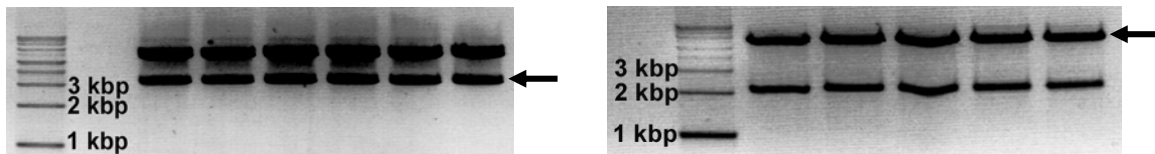


Abb. 9-2: Agarose-Gelelektrophorese zur Trennung der Fragmente von J6058 (linkes Bild), geschnitten mit *Bam*HI, und der Fragmente von J6068 (rechtes Bild), geschnitten mit *Bam*HI und *Bg*II. Das extrahierte Insert und der Vektor sind mit Pfeilen markiert.

Die Ansätze wurden nach Konditionierung mit dem Gelladepuffer bei 180 V in einem 1%igen Agarosegel nach Molekulargewicht aufgetrennt (1 g Agarose pro 100 ml TAE-Puffer (4,84 g/l TRIS, 1,142 ml/l Essigsäure, 0,5 M EDTA, pH 8,5) durch Erhitzen gelöst, Zugabe von 10 mg/ml Ethidiumbromid). Aus den Gelen, siehe Abb. 9-2, wurden die Fragmente des Inserts (mit *hyal1*) und des Vektorfragmentes mit Hilfe des „Agarose Gel Extraction Kit“ gewonnen und die Reinheit der isolierten DNA im Agarosegel überprüft.

Tab. 9-1: Ligationsansätze des Vektorfragmentes von J6068 und des Inserts von J6058 mit Auswertung der Transformation von *E. coli*.

Komponenten	Ligationsansatz-Nr. ($\Sigma=20 \mu\text{l}$)				
	1	2	3	4	5
Insert (J6058)	1 µl	3 µl	5 µl	-	-
Vektor (J6068)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Puffer T4 Ligase (10x)	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
T4 DNA Ligase (Fermentas)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	-
A. dest	15 µl	13 µl	11 µl	16 µl	17 µl
Auswertung der Transformation von <i>E. coli</i>					
Anzahl der Kolonien	≈ 100	≈ 100	≈ 100	≈ 10	keine

Anhang

Der nächste Schritt beinhaltete die Ligation von Vektor und Insert, wofür verschiedene Ansätze hergestellt (siehe Tab. 9-1) und über Nacht bei 16°C inkubiert wurden. Anschließend erfolgte die Transformation von kompetenten *E. coli* Zellen (10Z) durch Zugabe von je 10 µl Ligationsansatz zu 120 µl Zellen, der Inkubation auf Eis für 40 min, Zugabe von 1 ml SOD-Medium (Komplexmedium mit Trypton, Yeast Extract, NaCl, Glukose, KCl) und der geschüttelten Inkubation für 45 min bei 30°C. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert und das resuspendierte Pellet auf BHI-Agarplatten ausplattiert. Zur Selektion diente Ampicillin. Die Platten wurden über Nacht bei Raumtemperatur kultiviert und die Anzahl der gebildeten Kolonien bewertet, siehe Tab. 9-1 und Abb. 9-3.

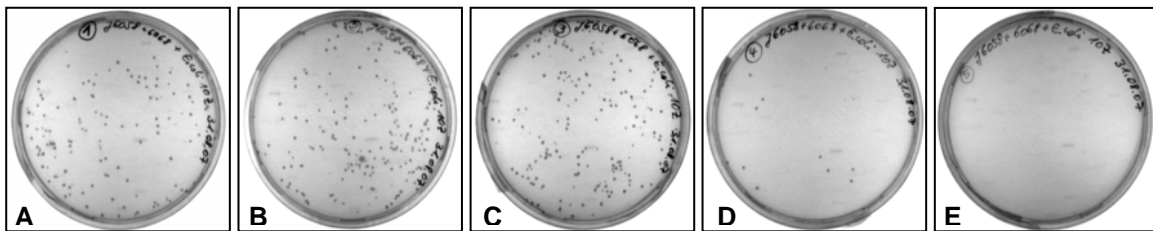


Abb. 9-3: Transformation von *E. coli* nach Ausplattieren auf BHI-Platten mit Ampicillin. A - C) Ligationsansätze 1 - 3, D) Kontrolle der SAP-Behandlung (Ansatz 4), E) Negativkontrolle.

Die Ligationsansätze 1-3 erzeugten die meisten transformierten Klone. Der Ansatz D diente zur Überprüfung der Effektivität der SAP-Behandlung, denn die SAP entfernte die Phosphatreste der endständigen Nukleotide des linearisierten Vektors. Durch die Behandlung wird der Einbau des *hyal1*-Inserts gefördert, da die Ligase Phosphatgruppen als Startpunkt benötigt. Der reine Vektor kann nur dann ligiert werden, wenn Phosphatreste nicht vollständig abgespalten wurden. Im Vergleich zu den Ansätzen 1-3 war die Phosphatase-Behandlung zu 90% erfolgreich. Erwartungsgemäß entstanden keine Klone in der Negativkontrolle.

Von der Platte mit dem Ansatz 3 wurden 12 einzelne Klone entnommen und 2 ml LB-Medium (mit Ampicillin) beimpft. Nach Kultivierung über Nacht wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe des „Plasmid Mini-Prep Kit“ gewonnen und die Reinheit und Größe im Agarosegel überprüft. Die Plasmidgröße der Klone #1-#11 entsprach der erwarteten Größe von ca. 9 kbp (Abb. 9-4). Das Plasmid von Klon #12 war eindeutig zu klein, somit ohne Insert und wurde verworfen.

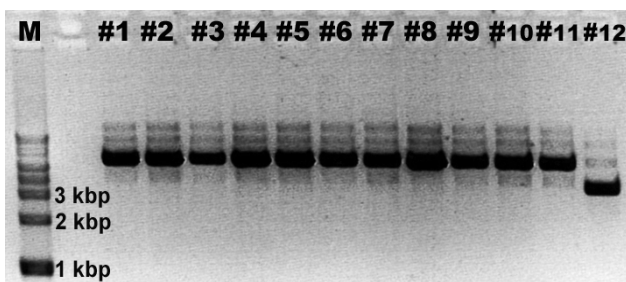


Abb. 9-4: Plasmid-Präparation (Mini-Prep) aus transfizierten und selektierten *E. coli* Zellen. M) Marker, 1kbp-Leiter; #1 bis #12) die selektierten Klone.

Anhang

Im Weiteren war die Orientierung des eingebauten Inserts zu prüfen, was durch den Verdau mit *SaI* erfolgte. Jeweils 4 µl Plasmid-DNA der Klone #1-#11 wurden mit 2 µl Puffer B4 (10x), 2 µl BSA (10x), 0,5 µl Enzym und 12 µl A. dest gemischt und bei 37°C für 1 h inkubiert. Als Negativkontrollen dienten die Ausgangsvektoren J6068 und J6058.

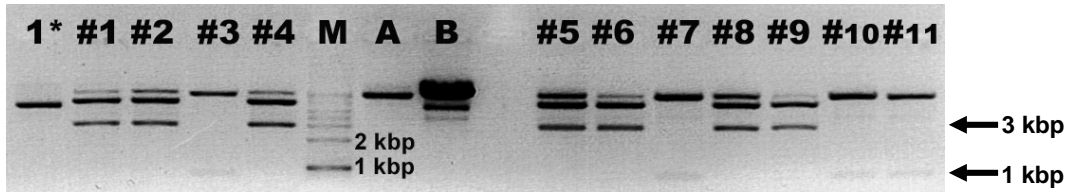


Abb. 9-5: Fragmentmuster des Verdau der Plasmid-DNA der Klone #1 - #11 mit *SaI*. 1*) unverdauter Klon #1, M) Marker, 1kbp-Leiter; A) J6068; B) J6058.

Bei dem Verdau mit *SaI* entsteht bei korrekter Insertorientierung ein 3kbp-Fragment, bei falscher nur ein 1 kbp Fragment, siehe Abb. 9-1. Wie in der Abb. 9-5 zu erkennen ist, war das Insert bei den Klonen #3, #7, #10 und #11 in der falschen Orientierungsrichtung. Weitere Testverdaue, siehe Abb. 9-6, unterstützten diese Ergebnisse.

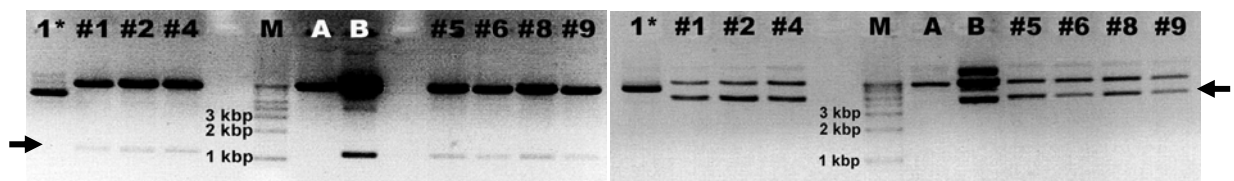


Abb. 9-6: Weitere Kontrollen der Insertintegration. Durch *NcoI*-Verdau (linkes Bild) wurde ein 1 kbp-Fragment bei korrektem Insert erzeugt, bei *HindIII* (rechtes Bild) ein 4,6 kbp Fragment. #1 - #11 bezeichnen die getesteten Klone, M) Marker, 1kbp-Leiter; A) J6068; B) J6058.

Die Klone #4 und #8 wurden im Schüttelkolben mit LB-Medium kultiviert und die Plasmid-DNA mittels des „Pure Yield™ Plasmid Midiprep System“ (Promega, USA) gereinigt. Die Überprüfung im Agarosegel ergab ca. 100 ng/µl DNA-Konzentration. Vor der Transfektion von *L. tarentolae* wurde der Vektor linearisiert durch *SwaI*-Verdau (New England Biolabs, UK) bei 26°C für 2,5 h. Nach Trennung im Agarosegel wurde die obere Bande (linearisierter Vektor) extrahiert, siehe Abb. 9-7, und die *E.coli*-spezifischen Sequenzen entfernt.

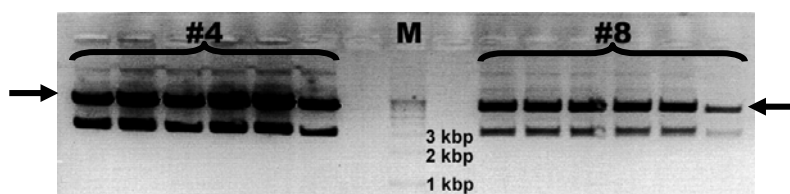


Abb. 9-7. Linearisierung Vektors J6071 Klone #4 und #8 durch Verdau mit *SwaI*. M) Marker, 1kbp-Leiter. (←) Markierung der herausgeschnittenen Bande (linearisierter Vektor).

Anhang

Zur Transfektion wurden *L. tarentolae* Zellen einer exponentiell wachsenden Standkultur (BHI-Medium) mit einer OD von 1,0 (Messwert bei Jena Bioscience, entspricht ca. $4 \cdot 10^7$ Zellen/ml) verwendet. 1,5 ml Zellsuspension wurden abzentrifugiert, in 0,5 ml Überstand resuspendiert und 10 min auf Eis gestellt. Die Zellen wurden mit der gereinigten Vektor-DNA J6071 #4 (Ansatz 1) und #8 (Ansatz 2) vermischt. Als Negativkontrolle diente A. dest (Ansatz 3). Anschließend wurden die Ansätze in gekühlte Spezialküvetten (Biorad) überführt und die Elektroporation bei 450 V und 450 μ F mit dem Gene Pulser[®] II (Biorad) durchgeführt (Zeitkonstante τ (bei $\frac{1}{2}$ Vmax) = 5,2 - 5,5 ms). Nach weiteren 10 min auf Eis wurden die Zellen in eine BHI-Standkultur mit den Antibiotika Hygromycin (0,1 g/l) und Nourseothricin (0,1 g/l) überführt und über Nacht kultiviert. Das Ausplattieren der transformierten *L. tarentolae* erfolgte auf Nitrozellulosemembranen (Whatman), die auf 1%igen Nähragarplatten (12,95 g/l BHI, 10% fötalem Kälberserum, 40 mM HEPES, 10 ml/l PenStrep, 5 mg/l Hemin) mit den Antibiotika Nourseothricin (0,1 g/l), Hygromycin (0,1 g/l) und Bleomycin (0,1 g/l) gelegt wurden. 2 ml der jeweiligen Standkultur wurden abzentrifugiert und die Zellpellets in 100 μ l Überstand resuspendiert. Ausplattiert wurden 4mal #8, 3mal #4 und eine Platte für die Negativreferenz. Die Platten wurden 7 Tage bei 26°C inkubiert, bis sich farblose Kolonien bildeten. Die Nitrozellulosemembranen mit den Kolonien wurden anschließend auf neue Agarplatten umgesetzt, die neben den obengenannten Bestandteilen zusätzlich Tetracyclin (10 mg/l) zur Induktion der Produktbildung enthielten. Bei einer erfolgreichen Integration des Vektors in das Genom von *L. tarentolae* wurde neben der Hyaluronidase auch das Blecherry-Protein gebildet, welches die Kolonien rot färbte und eine sehr leichte Selektion der Klone ermöglichte, siehe Abb. 9-8.



Abb. 9-8: Kolonien von *L. tarentolae* J6071pODC_APHya.4blecherry#4, drei Tage nach Induktion mit Tetracyclin. Die Rotfärbung resultiert aus dem exprimierten Fluoreszenzfarbstoff.

Einzelne *L. tarentolae* Kolonien wurden zur Beimpfung von je 1 ml BHI-Medium (mit den Antibiotika Nourseothricin, Hygromycin und Bleomycin) verwendet. Am nächsten Tag dienten diese Zellen zur Inokulation von 2x10 ml BHI-Medium (mit obengenannten Antibiotika). Eine der Standkulturen wurde mit Tetracyclin induziert. Insgesamt wurden 4 Klone der #8 und 8 Klone der #4 selektiert. Nach 3 Tagen wurden die vier Klone mit der höchsten, absoluten Fluoreszenz bezüglich ihrer Hyal-1-Expression im Western Blot kontrolliert.