

Diskrete Wachstumsmodi in synchroner
kontinuierlicher Kultur von Mikroorganismen:
Erweiterung eines Populations- und Zellzyklusmodelles

Vom Fachbereich Elektrotechnik und Informationstechnik
der Universität Hannover

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor-Ingenieur genehmigte

Dissertation

von Dipl.-Ing. Andreas Kopmann
geboren am 6. Dezember 1966 in Bremen

1. Referent: Prof. Dr.-Ing. Dr. h.c. mult. Manfred Thoma
2. Referent: Prof. Dr.-Ing. Karl-Heinz Bellgardt
3. Referent: Prof. Dr. rer. nat. Hans Diekmann

Tag der Promotion: 21.7.2000

Zusammenfassung

Wie vielfach in der Modellbildung vernachlässigt, besteht die Biomasse aus einzelnen Zellen, die in ihrer Masse zunehmen und sich anschließend bei Erreichen einer bestimmten Größe teilen. Dieser Vorgang wird als Zellzyklus bezeichnet. Die Untersuchungen beschäftigen sich mit dem Wachstumsverhalten von Mikroorganismen in Rührkesselreaktoren in kontinuierlicher Betriebsweise. Die einzelnen Zellen neigen hier unter gewissen Umgebungsbedingungen dazu, ihren Zellzyklus zu synchronisieren. Dieser als synchrone Kultur bezeichnete Wachstumszustand erlaubt es, die Wachstumseigenschaften in Abhängigkeit vom Zellzyklus zu beobachten. Dabei werden die tatsächlichen metabolischen Stoffwechselffade sichtbar. Zur mathematischen Beschreibung derartiger Prozesse dürfen weder die Zellzyklus- noch die Populationsstruktur vernachlässigt werden.

Im stationären Zustand ist es mit Hilfe der Zellbilanz möglich, einen linearen Zusammenhang zwischen der Generationszeit und der mittleren Verdopplungszeit anzugeben. Dabei wird angenommen, daß die Generationszeiten der Zellen ganzzahligen Vielfachen der Periodenlänge entsprechen, um die Zellbilanz im stationären Fall zu erfüllen. Abhängig vom Verhältnis der Generationszeiten der einzelnen Zellklassen — dem Wachstumsmodus der Kultur — ergibt sich für eine feste Verdopplungszeit eine bestimmte Periodenlänge.

Ziel des Projektes ist es, die Gültigkeit dieser Wachstumsmodi durch Experimente und dynamische Simulationen zu prüfen. Die hierzu notwendigen Experimente wurden am Institut für Mikrobiologie der Universität Hannover durchgeführt. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Implementierung und Anwendung eines dynamischen Modells, das sowohl ein Zellzyklus- als auch ein genealogisches Populationsmodell enthält. Die Klasseneinteilung nach Alter und Herkunft geht hierbei über die Unterscheidung von einer Mutter- und einer Tochterzellklasse hinaus. Der Lösung der partiellen Differentialgleichungen geht ein Vergleich mehrerer numerischer Verfahren voraus. Besondere Beachtung findet dabei ein explizit einzustellender Diffusionsterm. Die Diffusion ist ein Effekt, der der Synchronisation entgegenwirkt, die aufgrund stark unterschiedlicher Wachstumsraten im Verlauf des Zellzyklus entsteht. Die Zellen legen in einer ersten Phase Speicherstoffe an, die zum Abschluß des Zellzyklus aktiviert werden. Hierdurch ist es den Zellen möglich, den Zellzyklus weitgehend unabhängig von den Umgebungsbedingungen zu beenden.

Die Simulationsergebnisse bestätigen die mit Hilfe der Zellbilanz gewonnenen Eigenschaften. Die Periodenlänge ändert sich in Abhängigkeit von der Verdünnungsrate und dem Wachstumsmodus. Andere Parameter haben keinen Einfluß, solange sie nicht infolge einer Verschiebung der Konkurrenzsituation zwischen den Zellklassen zu einem neuen Wachstumsmodus führen. Die Ergebnisse zeigen, daß die nach der Zellbilanz gültige Periodenlänge eine gute Approximation darstellt. Über die Eigenschaften des vereinfachten Modells hinaus ist das dynamische Modell in der Lage, auch die Initiierung der synchronen Kultur sowie den Moduswechsel zu beschreiben.

Schlagnorte: Bioverfahrenstechnik, Zellzyklus- und Populationsmodell, diskrete Wachstumsmodi

Abstract

As often being neglected in the model, the biomass consists of single cells. During the cell cycle the cell mass increases and when reaching a certain size the cells divide and start a new cell cycle. The investigation deals with the growth of microorganisms in stirred tank reactors in continuous culture. Here under certain conditions the cells tend to synchronize their cell cycle — the so called synchronous culture. If the cells are in the same phase of the cell cycle, it is possible to observe the real internal metabolic flux of the cells instead of only mean values. In order to consider these effects it is necessary to include the cell cycle state and the genealogical age of the cells.

In the stationary state the cell balance can be used to derive a linear relation between the generation time and mean doubling time. This relation is based on the assumption of integer ratios between the generation time and the observed period length. For each ratio between the generation times of the cell classes — the mode of the growth — there exists exact one period length.

The aim of the project is to examine the applicability of the modes of growth to the synchronous experiments using a dynamic model. The experiments were performed at the institute of microbiology at the University of Hannover. This work presents an implementation of a dynamic model for cell cycle and genealogical cell classes not being restricted to daughter and parent cell class. Solving the partial differential equations several numerical methods are considered. Here the diffusion receives special attention. Through diffusive effects the synchronization of the cells is softened. The synchronization is caused by different growth rates in the phases of the cell cycle: in the first phase the cells store carbohydrates that are consumed with the initiation of the budding phase. Herewith the cells are able to complete their cell cycle independent of the available amount of substrate.

The simulation results with the dynamic model validate the relations derived by the cell balance. The period length is found to be dependent of the dilution rate and the mode of growth. Other parameters do not have an influence as long as they don't effect the competition of the cell classes about the substrate. Major influences here will lead to a new mode of growth. The results show that the predicted period length is an acceptable approximation in most cases. Furthermore the ability of the dynamic model is shown to simulate the initiation of the synchronous culture and the changing of the mode of growth.

Keywords: Biochemical engineering, cell cycle and population model, discrete modes of growth

Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am [Institut für Regelungstechnik](#) der Universität Hannover. Ihr lagen von der [Volkswagen-Stiftung](#) und von der [Deutschen Forschungsgemeinschaft](#) geförderte Vorhaben zugrunde. Beide Projekte beschäftigten sich mit dem Stoffwechsel der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und wurden in enger Zusammenarbeit mit dem [Institut für Mikrobiologie](#) durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr.-Ing. Dr. h. c. mult. M. Thoma für die wohlwollende Förderung dieser Arbeit und die Übernahme des Hauptreferates. Mein Dank gebührt ebenso Herrn Prof. Dr.-Ing. K.-H. Bellgardt und Herrn Prof. Dr. rer. nat. H. Diekmann für die Übernahme der Koreferate, sowie Herrn Prof. Dr.-Ing. W. Gerth für die Mitwirkung im Promotionsverfahren.

Wesentlich zu dem Gelingen des interdisziplinären Vorhaben beigetragen hat die angenehme Zusammenarbeit mit der „Hefegruppe“ des Instituts für Mikrobiologie. Hier möchte ich insbesondere Herrn Prof. H. Diekmann und Dr. Matthias Beuse nennen, ohne deren Hilfe, es mir nicht möglich gewesen wäre auf diesem Gebiet zu arbeiten.

Mein Dank gilt selbstverständlich auch all meinen Kollegen am Institut für Regelungstechnik für die gute und freundschaftliche Zeit dort. Besonders Danken möchte ich Dipl.-Ing. Dipl.-Ök. Amos Albert und Dr.-Ing. Norbert Scherm. Im guter Erinnerung werden mir unsere vielen samstäglichen Diskussionsrunden bleiben.

Zu guter letzt möchte ich meinen Eltern, meiner Familie und meiner Frau Rebekka meinen Dank aussprechen. Sie haben mir in jeder Beziehung den Rückhalt über all die Jahre gegeben, der es mir erst möglich gemacht hat, diese Arbeit anzufertigen.

Karlsruhe im November 2000

Andreas Kopmann

Inhalt

Einleitung	17
1 Biologische Grundlagen	21
1.1 Zellzyklus und -population	22
1.2 Synchrone Kultur	25
2 Zellzyklus- und Populationsmodell	29
2.1 Einfache Wachstumsmodelle	31
2.2 Dynamisches Modell des Zellzyklus	34
2.2.1 Zyklusvariable Zyklusalter	37
2.2.2 Zyklusvariable Masse	40
2.2.3 Eigenschaften der Generationszeit	43
2.2.4 Zusammenfassung	48
2.3 Populationsmodell	54
2.3.1 Modellgleichungen	56
2.4 Stoffwechselmodell	59
2.4.1 Katabole und anabole Stoffwechselfade	61
2.4.2 Regulation der Stoffwechselwege	74
2.4.3 Morphologie	77
2.4.4 Modell der Zyklusphasen	81
2.4.5 Synchronisation des Zellzyklus	89

3	Lösung der Modellgleichungen	93
3.1	Numerische Lösung	95
3.1.1	Zyklusphasen und Kontrollpunkte	95
3.1.2	Diskretisierung des Zellzyklus	96
3.1.3	Lösung mit Diffusion	101
3.1.4	Simulationssprache ACSL	104
3.1.5	Verifizierung der numerischen Lösung	105
3.2	Periodische Lösung	114
3.2.1	Analytische Lösung des Zellzyklusmodells	114
3.2.2	Zellbilanz für das Mehr-Klassen-Modell	118
3.2.3	Asynchrone Kultur	121
3.2.4	Synchrone Kultur	121
3.2.5	Sensitivität der Periodenlänge	124
4	Populationsparameter	127
4.1	Zellzahl einer Klasse	128
4.1.1	Anfangszelldichte	129
4.1.2	Asynchrone Kultur	131
4.1.3	Synchrone Kultur	133
4.2	Zellzahl einer Phase	135
4.2.1	Asynchrone Kultur	135
4.2.2	Synchrone Kultur	136
4.3	Berechnung der Generationszeiten	141
4.4	Schätzung der Verteilungsfunktion	146
4.4.1	Fourierzerlegung	146
4.4.2	Rechteckförmige Verteilung	147
5	Simulationen	151
5.1	Synchrone Batch-Experimente	151
5.2	Asynchrone Kultur	154
5.3	Initiierung der synchronen Kultur	158
5.4	Moduswechsel	162
5.4.1	Modi des Zwei-Klassen-Modells	162
5.4.2	Modi des Mehr-Klassen-Modells	167
5.4.3	Experimente	170

6 Diskussion	175
6.1 Numerik	175
6.2 Stoffwechselmodell	177
6.3 Zellbilanz für synchrones Wachstum	179
6.4 Anwendung des dynamischen Modells	181
6.5 Zusammenfassung und Ausblick	182
A Modellgleichungen	184
A.1 Kinetisches Modell	184
A.2 Reaktormodell	187
Literatur	189

Symbole

Symbole, die nur innerhalb eines Kontextes gelten, sind im Symbolverzeichnis nicht aufgeführt. Matrizen sind durch ein fettes Schriftbild gekennzeichnet (z.B. **A**).

Formelzeichen

α	Drekrement der Oszillation $\alpha = e^{-DT_P}$ [-]
λ	Verlustterm [h^{-1}]
μ	Spezifische Wachstumsrate [h^{-1}]
σ	Diffusionskoeffizient
0	Nullmatrix
A	Genealogische Matrix
$a_{i,j}$	Koeffizienten der genealogischen Matrix [-]
a	Zyklusalter [h]
a_T	Generationszeit [h]
$a_{T,i}$	Generationzeit der Klasse i (siehe Indizierung der Klassen des Populationsmodells) [h]
c_i	Konzentration des Stoffes i (siehe Indizierung der Reaktionen des Stoffwechselnetzes)
D	Verdünnungsrate [h^{-1}]
e	Fehler
e_a	Amplitudenfehler
e_c	Bilanzfehler der normierten Zellbilanz
e_f	Verteilungsfehler
e_m	Bilanzfehler Zellmasse
e_p	Phasenfehler
e_z	Bilanzfehler Zellzahl
F_i	Relativer Anteil der Zellen der Klasse i an der gesamten Population $F_i = N_i/N$ (siehe Indizierung der Klassen des Populationsmodells) [-]
$F_{i,y}$	Relativer Anteil der Zellen in der Phase y und der Klasse i (siehe Indizierung der Klassen des Populationsmodells)

$F_{i,BI}$	Relativer Anteil der sprossenden Zellen der Klasse i an der gesamten Population $F_{i,BI} = N_{i,bud}/N$ (siehe Indizierung der Klassen des Populationsmodells) [-]
g	Maximal im Modell berücksichtigtes genealogisches Alter
I	Einheitsmatrix
I_i, J_j	Moduszahlen für Mutter- und Tochterzellklassen (siehe Indizierung der Klassen des Populationsmodells)
IJ	Modus des Zwei-Klassen-Modell
$I_1J_0J_1$	Modus des Drei-Klassen-Modell ($g=1$)
K_i	Sättigungskonstante einer Reaktion i (siehe Indizierung der Reaktionen des Stoffwechselnetzes) [$g l^{-1}$]
m, m_i	Masse einer einzelnen Zelle, Masse einer Zelle der Klasse i (siehe Indizierung der Klassen des Populationsmodells) [$\cdot 10^{-12}g$]
m_0, m_1	Masse der Zelle zu Beginn, zum Ende des Zyklus [$\cdot 10^{-12}g$]
$m_{0,i}$	Masse zu Beginn des Zyklus der Klasse i (siehe Indizierung der Klassen des Populationsmodells) [$\cdot 10^{-12}g$]
M, M_0	Konzentration der Biomasse [$g l^{-1}$]
n_a	Zelldichte bezüglich des Zyklusalters, $n_a = dN/da$ [h^{-1}]
$n_{a,i}, n_{a,0,i}$	Zelldichte einer Klasse i (siehe Indizierung der Klassen des Populationsmodells) [h^{-1}]
n_p	Zelldichte bezüglich der normierten Zyklusvariablen $n_p = dN/dp$ [-]
$n_t, n_{t,0}$	Zelldichte $n_t = dN/dt$ [h^{-1}]
\mathbb{N}	Menge der natürlichen Zahlen
N	Anzahl der Stützstellen der Diskretisierung des Zellzyklus
N, N_0	Zellzahl, wertkontinuierlich mit $N^* = \lfloor N \rfloor$
N^*	Zellzahl, wertdiskret mit $N \in \mathbb{N}$ [-]
N, N_i	Zellzahl, Zellzahl einer Klasse i , Zellzahl Teilpopulation in der Klasse i und der Phase y (siehe Indizierung der Klassen des Populationsmodells)
$N_{i,y}$	Zellzahl in einer Phase y und der Klasse i (siehe Indizierung der Klassen des Populationsmodells)
$N_{i,bud}$	Zahl der sprossenden Zellen einer Klasse i (siehe Indizierung der Klassen des Populationsmodells)
N_a, N_p	Zellzahl im Intervall $[0,a]$ bzw $[0,p]$ des Zellzyklus
p	Normierte Zellzyklusvariable $p \in [0, 1]$ [-]
r_i	Spezifische Stoffwechselrate einer Reaktion i (siehe Indizierung der Reaktionen des Stoffwechselnetzes) [$mol g^{-1}h^{-1}$]
$r_{i,max}$	Maximale spezifische Stoffwechselrate einer Reaktion i (siehe Indizierung der Reaktionen des Stoffwechselnetzes) [$mol g^{-1}h^{-1}$]
\mathbb{R}	Menge der reellen Zahlen

R_i	Stoffwechselrate einer Reaktion i (siehe Indizierung der Reaktionen des Stoffwechselnetzes) [$mol\ l^{-1}h^{-1}$]
q_p	Zykluswachstumsgeschwindigkeit $q_p = dp/dt$ [h^{-1}]
q_a	Zykluswachstumsgeschwindigkeit $q_a = da/dt$ [-]
q_m	Zykluswachstumsgeschwindigkeit $q_m = dm/dt$ [$\cdot 10^{-12}g\ h^{-1}$]
t	Prozeßzeit [h]
$t_0, t_{0,i}$	Sprossungszeitpunkt [h]
T_B	Länge der Doppelzellphase [h]
T_D	Mittlere Verdopplungszeit [h]
T_P	Periodenlänge der stationären Oszillation [h]
u, u_0	Flußdichte $u = qn$ [h^{-1}]
U	Vektor der Flüsse in den Zellklassen
V, V_i	Volumen einer Zelle, Volumen einer Zelle der Klasse i (siehe Indizierung der Klassen des Populationsmodells) [μm^3]
$V_r, V_{r,i}$	Normiertes Volumen, normiertes Volumen der Zellen einer Klasse i (siehe Indizierung der Klassen des Populationsmodells) [-]

Indizes der Klassen des Populationsmodells

P_i, D_j	Indizes für Mutter- und Tochterzellklassen des Mehr-Klassen-Modells $i \in \{1, \dots, g\}; j \in \{0, \dots, g\}$
P_0	Index für Summe aller Tochterklassen
P, D	Indizes für Mutter- und Tochterzellklasse des Zwei-Klassen-Modells
P_1, D_0, D_1	Indizes für Mutter- und Tochterzellklassen des Drei-Klassen-Modells

Indizes der Reaktionen des Stoffwechselnetzwerkes

adh, pdc	Reaktionen zur Ethanolproduktion
ala, arg, asn, asp	Reaktionen zur Synthese der Aminosäuren
cys, glu, gln, gly	
$his, ile, leu, lys,$	
met, phe, pro, ser	
thr, trp, tyr, val	
$ATP, CTP, GTP,$	Reaktionen zur Synthese der Nucleotide
UTP	
C, CO_2	Kohlendioxid
ch	Reaktion zur Synthese von Speicherstoffen
$E, etoh$	Ethanol

<i>eno, hex, pgk, pk,</i>	Reaktionen der Glykolyse
<i>tp, tpi</i>	
<i>G, gluc</i>	Glucose
<i>g6d, tal</i>	Reaktionen des Pentose-Phosphat-Wegs
<i>glp, lau, pal, ole</i>	Reaktionen zur Synthese der Lipidbestandteile
<i>idh, mdh, pca, pdh</i>	Reaktionen des Tricarbon-Säure-Zyklus (TCC)
<i>mATP</i>	ATP-Bedarf für den Erhaltungsstoffwechsel
<i>mNADP</i>	NADP-Bedarf für den Erhaltungsstoffwechsel
<i>mNAD</i>	NAD-Bedarf für den Erhaltungsstoffwechsel
<i>nad</i>	Phosphorylierung von NAD zu NADP
<i>O, O₂</i>	Sauerstoff
<i>P</i>	Produkt
<i>prot</i>	Proteinsynthese
<i>S</i>	Substrat
<i>T</i>	Trehalose
<i>thp</i>	Reaktion zur Trehaloseaufnahme
<i>X</i>	Biomasse ($r_X = \mu$)
<i>YE</i>	Hefeextrakt

Ertragskoeffizienten des Stoffwechselnetzwerkes

K_{Bi}	Precursorbedarf zur Synthese der Biomasse (Reaktion $r_X = \mu$)
K_{B1}	Glucose-Bedarf zur Synthese der Biomasse (Reaktion $r_X = \mu$)
K_{B3}	AcCoA-Bedarf zur Synthese der Biomasse (Reaktion $r_X = \mu$)
N	ATP-Bedarf bei der Phosphorylierung von NAD zu NADP (Reaktion r_{nad})
N_{prot}	ATP-Bedarf zur Synthese der Proteine (Reaktion r_{prot})
PO	Phosphorylierungsverhältnis, ATP-Ertrag der Atmungskette (Reaktion r_{o_2})
$\frac{1}{Y_{ATP}}$	ATP-Bedarf zur Synthese der Biomasse
Y_{ijk}	Ertragskoeffizient Produkt i / Substrat j, Stoffwechselweg k
Y_{CGO}	Ertragskoeffizient CO_2 / Glucose, oxidativer Stoffwechsel
$Y_{OG(O)}$	Ertragskoeffizient O_2 / Glucose, oxidativer Stoffwechsel
Y_{XGO}	Ertragskoeffizient Biomasse / Glucose, oxidativer Stoffwechsel

Abkürzungen

3PG	3-P-Glycerat, Metabolit der Glykolyse
-----	---------------------------------------

AcCoA	Acetyl-CoA, Metabolit des TCC
adh	Alkohol-Dehydrogenase, Enzym
ADP	Adenosindiphosphat, Nukleotid
aKG	α -Ketoglutarat, Metabolit des TCC
ala	Alanin, Aminosäure
arg	Arginin, Aminosäure
asn	Asparagin, Aminosäure
asp	Asparaginsäure, Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat, Nukleotid, Energiequantum
<i>C</i>	Kohlenstoff
^{13}C	Kohlenstoff Isotop
ch	Polysaccharide, Bausteine der Biosynthese
Ch	Charakteristiken Methode
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CTP	Cytidintriphosphat, Nukleotid
cys	Cystein, Aminosäure
DNA	Desoxyribonucleinsäure, Träger der genetischen Information
E4P	Erythrose-4-P, Metabolit des Pentosephosphat-Weg
eno	Enolase, Enzym der Glykolyse
FD	Finite Differenzen Methode
FV	Finite Volumen Methode
G_0 -, G_1 -, G_2 -Phase	Bezeichnung der Phasen des Zellzyklus: <i>G</i> Gap
g6d	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, Enzym des Pentosephosphat-Weg
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
G6P	Glucose-6-P, Metabolit der Glykolyse
glu	Glutaminsäure, Aminosäure
gln	Glutamin, Aminosäure
glp	Glycerol P, Lipidbestandteil
gly	Glycin, Aminosäure
GTP	Guanosintriphosphat, Nukleotid
<i>H</i>	Wasserstoff
H_2	Wasserstoff Molekül
H_2O	Wasser
hex	Hexokinase, Enzym der Glykolyse
his	Histidin, Aminosäure
idh	Isocitrat-Dehydrogenase, Enzym des TCC

ile	Isoleucin, Aminosäure
lau	Laurinsäure, Lipidbestandteil
leu	Leucin, Aminosäure
lys	Lysin, Aminosäure
<i>M</i> -Phase	Bezeichnung der Phasen des Zellzyklus: <i>M</i> Mitose
mdh	Malat-Dehydrogenase, Enzym des TCC
met	Methionin, Aminosäure
<i>N</i>	Stickstoff
NAD, NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid, Redoxsystem
NAPD, NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat, Redoxsystem
NH_3	Ammonium
NMR	Magnetische Resonanz (Nuclear magnetic resonance)
<i>O</i>	Sauerstoff
O_2	Sauerstoff Molekül
ole	Ölsäure, Lipidbestandteil
OAA	Oxalacetat, Metabolit des TCC
<i>P</i>	Phosphor
pal	Palmitinsäure, Lipidbestandteil
pca	Pyruvat-Carboxylase, Enzym
pcd	Pyruvat-Decarboxylase, Enzym
pdh	Pyruvat-Dehydrogenase, Enzym
PEP	Phosphoenolpyruvat, Metabolit der Glykolyse
pfk	Phosphofruktokinase, Enzym der Glykolyse
pgi	Glucosephosphat-Isomerase, Enzym der Glykolyse
pgk	Phosphoglycerat-Kinase, Enzym der Glykolyse
<i>pH</i> -Wert	Negativer dekadischer Logarithmus der H^+ -Ionenkonzentration
phe	Phenylalanin, Aminosäure
pk	Pyruvat-Kinase, Enzym der Glykolyse
<i>PO</i>	Phosphorylierungsverhältnis, ATP-Ertrag in der Atmungskette
pro	Prolin, Aminosäure
prot	Proteine, Bausteine der Biosynthese
PYR	Pyruvat, Metabolit der Glykolyse
R5P	Ribose-5-P, Metabolit des Pentosephosphat-Weges
<i>S</i> -Phase	Bezeichnung der Phasen des Zellzyklus: <i>S</i> DNA-Synthese
ser	Serin, Aminosäure
START	Genetisches Signal, das die Sprossung einleitet
tal	Transaldolase, Enzym des Pentosephosphat-Weges
TCC	Tricarbonsäure Zyklus

thp	Trehalose-Phosphatase, Enzym der Glykolyse
thr	Threonin, Aminosäure
trp	Tryptophan, Aminosäure
tyr	Tyrosin, Aminosäure
UTP	Uridintriphosphat, Nukleotid
val	Valin, Aminosäure
YE	Hefeextrakt

Einleitung

Der Zusammenhang zwischen genetischer Information sowie Form und Funktion der Organismen ist Thema der aktuellen Forschung. Mit der wachsenden Kenntnis der Zusammenhänge zwischen genetischer Information und physiologischer Funktion ist ein Modell des Stoffwechsels wünschenswert, um auf nachvollziehbare Weise genetische Veränderungen in ihrer Auswirkung auf den Stoffwechsel beurteilen zu können. Ziel der genetischen Veränderung kann dabei sein, den Fluß durch ein Stoffwechselnetzwerk zu beeinflussen oder neue Stoffwechselprodukte in sogenannten Wirtsorganismen zu etablieren.

Wie [Strohmann \(1997\)](#) vermutet, gibt es nur in seltenen Fällen eine direkte Kopplung zwischen den Genen und der Funktion. Beispiel für einen derartigen Zusammenhang stellen die monogenetischen Krankheiten dar, wie etwa die Sichelzellenanämie. Der Großteil z.B. der Krebserkrankungen ist jedoch nicht durch ein einziges Gen zu erklären, vermutlich nicht einmal durch die gesamte genetische Ausstattung allein. Große Teile der Gensequenzen von Menschen und Mäusen sind identisch. Trotzdem entstehen aus diesen äußerst unterschiedliche Kreaturen. Umgekehrt haben Geschwister nicht weniger unterschiedliche Gensätze als andere Menschen und weisen trotzdem größere Ähnlichkeiten auf. Demnach erscheint es als falsch, Organismen als durch ihre Gene programmierte Automaten zu begreifen. Die in der DNA abgelegte Information legt zwar die Proteinstruktur der Organismen fest, zwischen den Proteinen und den Funktionen eines Organismus liegt jedoch ein komplexes epigenetisches Netzwerk. Es bestimmt zum einen Funktion und Form und hat zum anderen die Möglichkeit, die Information der DNA zu maskieren, das heißt bestimmte Bereiche auszublenden ([Strohmann, 1997](#)). Die Verknüpfung der Gene und des epigenetischen Netzwerkes mit Form und Funktion des Organismus sind in den mathematischen Modellen nicht berücksichtigt. Die in der Verfahrenstechnik eingesetzten Modelle der physiologischen Eigenschaften können dies, bedingt durch ihre Struktur, nicht leisten. Ursache hierfür sind unter anderem fehlende biochemische Information und nicht vorhandene morphologische, mit dem Zellzyklus verknüpfte Merkmale in den Modellen.

Von besonderer Bedeutung sind die genetischen Mechanismen, die den Zellzyklus regulieren. Der Zellzyklus beschreibt die Vorgänge, die von einer Zelle über Massenzunahme, Verdopplung des genetischen Materials und Teilung schließlich zu zwei Zellen führen. Es ist jedoch erst dann möglich, den Einfluß der Regulation des Zellzyklus auf das Wachstum im Modell zu berücksichtigen, wenn dieses den Zellzyklus auch enthält. Mit der Flut neuer genetischer Information steigen dabei auch die Anforderungen an die mathematische Modellierung. Es wird deutlich, daß es bei der enorm großen Komplexität des Lebens unmöglich ist, alle Details zu berücksichtigen. Dieses Unterfangen erweist sich zumeist weder als notwendig noch als wünschenswert, da häufig ein gewisser Aspekt im Vorder-

grund steht oder nur eingeschränkte Umgebungsbedingungen von Interesse sind. Um in diesem Fall das Verhalten der Organismen zu verstehen und durch ein mathematisches Modell zu beschreiben, genügt oft die Kenntnis einiger weniger Eigenschaften. Die Systemtheorie lehrt, daß bereits wenige Freiheitsgrade ausreichend sind, um sehr komplexe Verhaltensmuster aufzuweisen. Für das sogenannte deterministische Chaos ist ein kontinuierliches System dritter Ordnung ausreichend (Steeb und Kunick, 1989). Ein mit zu vielen Einzelheiten überfrachtetes Modell verstellt dagegen unter Umständen den Blick auf die wesentlichen Eigenschaften zur Erklärung eines Phänomens. Die Komplexität des zu erstellenden Modells wird in der Praxis von der gewünschten Fragestellung und auch von der über die zu beschreibenden Vorgänge zur Verfügung stehenden Information abhängen.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Beschreibung des Wachstums von Mikroorganismen unter Berücksichtigung des Zellzyklus. Hierzu werden insbesondere der Stoffwechsel und die morphologischen Eigenschaften der Zellen im Verlauf des Zellzyklus sowie die genealogische Struktur der Kultur¹ berücksichtigt. Für typische Experimente ist zu untersuchen, inwieweit vereinfachte Modelle die Beobachtungen wiedergeben können.

Als besonders geeignet für die Untersuchung erscheint der mikrobiologische Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae*. Der Organismus vereint eine gute genetische Manipulierbarkeit und eine gute Handhabbarkeit im Bioreaktor bei einer zufriedenstellenden Wachstumsrate. Sein Genom ist seit einiger Zeit vollständig aufgeklärt und wird in Datenbanken frei zur Verfügung gestellt (Johnston, 1996; Cherry et al., 1997). In den letzten Jahren ist es zudem den in Deutschland mit diesem Organismus arbeitenden Gruppen gelungen, sich auf den Stamm *S. cerevisiae* VW1 zu einigen. Auch bei den dieser Arbeit zugrunde liegenden von Beuse (1998) durchgeführten Experimenten wurde dieser Stamm verwendet. Unter Zugabe von Hefeextrakt zur Nährlösung erreicht der Stamm Wachstumsraten, die in der Größenordnung von Wildtyphefen liegen (Beuse, 1998).

Als Referenzexperiment wurde die synchrone kontinuierliche Kultur ausgewählt, die eine reproduzierbare Beobachtung vieler physiologischer Eigenschaften im Bioreaktor erlaubt. Dieses Experiment ist dadurch ausgezeichnet, daß ein Großteil der Zellen den Zellzyklus synchron durchlaufen. Die Prozeßvariablen, wie z.B. der Sauerstoffgehalt oder der *pH*-Wert, weisen hierbei eine ausgeprägte Periodizität auf, die mit dem Ablauf des Zellzyklus in Verbindung steht. Neben dem Zellzyklus hat auch die Zusammensetzung der Population aus älteren bzw. jüngeren Zellen einen Einfluß auf das Experiment. Abhängig von dem Verhältnis der Generationszeiten dieser Zellen lassen sich aus der Zellbilanz Eigenschaften für die Periodenlänge der synchronen Kultur ableiten. Bellgardt (1994a) postuliert für ein Modell mit zwei Zellklassen ein ganzzahliges Verhältnis zwischen der Dauer des Zellzyklus und der Periodenlänge, den sogenannten Wachstumsmodus. Die Gültigkeit dieser Annahmen hat Beuse (1998) experimentell überprüft. Die Ergebnisse zeigen prinzipiell eine gute Übereinstimmung. Teilweise erscheint jedoch eine Erweiterung der Modellvorstellung notwendig (siehe Kapitel 1). Auch gilt das Modell lediglich für die periodische Lösung. Es beschreibt keine transienten Vorgänge, wie die Synchronisation oder einen Wechsel des Wachstumsmodus. Hierzu ist ein dynamisches Modell des Zellzyklus notwendig. Eine gute Übersicht über die bestehenden Ansätze findet sich ebenfalls bei Bellgardt (1994a).

¹Genealogie — Familien-, Geschlechterforschung; hier ist die Herkunft der Zellen gemeint, ausgedrückt z.B. durch die Anzahl der durchlaufenen Zellzyklen

Das bislang umfangreichste dynamische Modell des Zellzyklus stellt [Strässle \(1988\)](#) vor. Es enthält die unsymmetrische Teilung der Hefe in kleinere Sproß- und größere Mutterzellen. Durch den vom Zellzyklus abhängigen Stoffwechsel ist das Modell in der Lage, eine spontane Synchronisation der Kultur zu erklären. Den synchronisierenden Effekten steht im Modell allerdings eine durch die numerische Approximation der Lösung verursachte Diffusion gegenüber. Die Diffusion sowie die fehlende genealogische Struktur des Modells machen den Vergleich des dynamischen Modells mit den aus der Zellbilanz gewonnenen Eigenschaften unmöglich.

Ziel dieser Arbeit ist es, ein dynamisches Zellzyklus- und Populationsmodell zu erstellen. Grundlage stellt das von [Strässle \(1988\)](#) vorgestellte Modell dar. Das Stoffwechselmodell soll Zusätze zur Nährlösung berücksichtigen können, da diese vielfach für genetisch veränderte Organismen notwendig sind. Desweiteren wird eine allgemeine Populationsstruktur benötigt. Besondere Bedeutung kommt auch den verwendeten numerischen Verfahren zu. Sie sind so zu wählen, daß keine numerische Diffusion auftritt und damit die Bilanzierung der Zellen in der synchronen Kultur möglich wird.

Die Beurteilung möglicher Ursachen für die geschilderten Abweichungen von Modell und Experiment macht eine Erweiterung der von [Bellgardt \(1994a\)](#) für zwei Zellklassen angegebenen Zellbilanz auf ein allgemeineres Populationsmodell notwendig. Weiterer Aufschluß wird von der Analyse der Sensitivität der Periodenlänge gegenüber Parameterschwankungen erwartet.

Abschließend erfolgt ein Vergleich der Ergebnisse der dynamischen Modellrechnung, der aus der Zellbilanz abgeleiteten Eigenschaften und der experimentellen Daten. Besonderes Augenmerk liegt hierbei auf den mit Hilfe des dynamischen Modells berechneten transienten Vorgängen infolge von der Synchronisation und des Moduswechsel.

Die Ausführungen gliedern sich wie folgt: Die biologischen Eigenschaften des Mikroorganismus und insbesondere des Zellzyklus sowie die Eigenschaften der synchronen kontinuierlichen Kultur sind im Detail in Kapitel 1 beschrieben. Anschließend erfolgt in Kapitel 2 in drei Schritten die mathematische Modellbildung: Dynamische Beschreibung des Zellzyklus (Abschnitt 2.2), Definition des Populationsmodells (Abschnitt 2.3) sowie der Kopplung der biologischen Eigenschaften an Umgebung und Zyklus- bzw. Populationsmodell (Abschnitt 2.4).

Die Verteilung der Zellen im Zellzyklus läßt sich mathematisch mit Hilfe einer partiellen Differentialgleichung beschreiben. Werden weitere Eigenschaften der Zellen benötigt, so bestehen die Modellgleichungen aus einem System gekoppelter partieller Differentialgleichungen. Abschnitt 2.2 stellt die verwendeten Gleichungen vor und zeigt die Möglichkeiten auf, die Reife der Zellen bezüglich des Zellzyklus zu definieren. Mit einer Darstellung der Kopplung mit den anderen Modellteilen endet der Abschnitt.

In der synchronen Kultur ist die in Abschnitt 2.3 behandelte Unterscheidung mehrerer genealogischer Teilpopulationen erforderlich. Es ist möglich, den wesentlichen Effekt der unsymmetrischen Teilung bei der sprossenden Hefe bereits mit einem einfachen Modell mit jeweils einer Mutter- und einer Tochterklasse zu berücksichtigen. Generell ist jedoch die Anzahl der Klassen mit voneinander verschiedenen Wachstumseigenschaften im jeweiligen Einzelfall zu prüfen. Bereits im Verlauf derselben Kultivierung kann sich das Wachstums-

verhalten der genealogischen Klassen aufgrund der Prozeßparameter so verändern, daß es notwendig wird, eine, zwei oder auch mehr Klassen zu unterscheiden.

Das in Abschnitt 2.4 vorgestellte biologische Modell besteht aus einem stationären Stoffwechselnetzwerk für metabolen und anabolen Stoffwechsel und der Regulation der möglichen Stoffwechselwege. Die Regulation wird dabei von den äußeren Bedingungen und den Eigenschaften des Zellzyklus bestimmt. Die im Modell getroffenen Annahmen sind in diesem Abschnitt erläutert.

An die Aufstellung der Modellgleichungen zur Beschreibung von Zellzyklus und Population schließt sich in Kapitel 3 eine Betrachtung der Lösung der Gleichungen an. Die Berechnung der allgemeinen Lösung gelingt in der Regel nur mit Hilfe einer numerischen Approximation. In Abschnitt 3.1 werden verschiedene Verfahren vorgestellt, wobei die numerische Diffusion der Verfahren besondere Beachtung findet. Mit Hilfe eines in die Modellgleichungen eingeführten Diffusionsterms wird eine Abschätzung der numerischen Diffusion möglich. Betrachtet man den Spezialfall, die periodische synchrone Kultur, so lassen sich mit Hilfe der Zellbilanz Eigenschaften für die Periodenlänge angeben. In Abschnitt 3.2 erfolgt eine Erweiterung des für zwei Zellklassen bekannten Zusammenhangs für das in Abschnitt 2.3 vorgestellte Modell. Weiterhin wird die Sensitivität der Periodenlänge untersucht.

Die meßtechnische Analyse der synchronen Kultur benötigt Parameter, die Aufschluß über die Zellverteilung liefern. Daher werden in Kapitel 4 Populationsparameter zur Charakterisierung des synchronen Wachstums abgeleitet. Hierbei handelt es sich um die Zellzahl und den Sprossungsindex der verschiedenen genealogischen Klassen des allgemeinen Populationsmodell (siehe Abschnitt 2.3). Desweiteren wird unter Verwendung des gemessenen Verlaufes des Sprossungsindex über eine Periode eine Approximation der Verteilung der Zellen im Zellzyklus angegeben.

Kapitel 5 ist dem Vergleich des dynamischen Verhaltens von Modell und Experiment gewidmet. Besondere Bedeutung kommt dabei der periodischen synchronen Kultur zu, da sie eine kontinuierliche reproduzierbare Beobachtung des Zellzyklus erlaubt. Das Kapitel behandelt im einzelnen die Analyse der Periodizität sowie der transienten Übergänge infolge der Initiierung der synchronen Kultur und des Moduswechsels. Das dynamische Modell bietet dabei den Vorteil, auch zeitliche Verläufe von experimentell nicht zugänglichen Variablen angeben zu können. In Kapitel 6 schließt sich die Diskussion der erzielten Ergebnisse an.

Kapitel 1

Biologische Grundlagen

Für den eukaryontischen¹ Modellorganismus *S. cerevisiae* existieren eine Reihe kinetischer Modelle. Kann die Betrachtung einzelner zellinterner enzymatischer Schritte unberücksichtigt bleiben, ist oft ein vergleichsweise einfaches Modell des Außenverhaltens eines Mikroorganismus ausreichend. Die fundamentale Idee der limitierten respiratorischen Kapazität findet sich in den Modellen von [Bellgardt et al. \(1983\)](#) oder [Sonnleitner und Käppeli \(1986\)](#) wieder. Diese Modelle erklären den Stoffumsatz unter Berücksichtigung von Glucose als Haupt-Kohlenstoff-Quelle sowie Ethanol, Biomasse und Kohlendioxid unter aeroben und anaeroben Bedingungen. Zellintern werden drei Hauptstoffwechselwege berücksichtigt: Die Umwandlungen von Glucose in Biomasse, von Glucose in Ethanol und von Ethanol in Biomasse. [Bellgardt et al. \(1983\)](#) gehen bereits über die rein kinetische Betrachtungsweise hinaus und führen ein stationäres Stoffwechselnetz ein. Das Stoffwechselnetz ermöglicht nicht nur die Berechnung der in den einfachen Modellen verwendeten Ertragskoeffizienten, sondern gibt zusätzlich Auskunft über das Innenverhalten der Hefe. Die Stoffwechselwege des Netzes stellen ein idealisiertes Abbild der biochemischen Vorgänge in der Zelle dar. Die Güte des Modells ergibt sich aus dem Verhältnis der im Modell berücksichtigten Flüsse zu den tatsächlichen Flüssen im Stoffwechselnetzwerk. Generell scheint die Übereinstimmung für anaerobe Kulturen besser gegeben zu sein als für aerobe, in denen eine Reihe von Nebenwegen aktiv sind. Dem gegenüber ist unter aeroben Bedingungen eine größere Wachstumsrate zu beobachten. [Cortassa et al. \(1995\)](#) betrachten differenziert die Bausteine (z.B. Aminosäuren), die für die Biomassesynthese benötigt werden. Sie erweitern das Stoffwechselnetz um die Stoffwechselwege der Aminosäuresynthese. Der jeweilige Aminosäurebedarf, bezogen auf die Biomasseerzeugung, wird als konstant angenommen. Die Mechanismen zur Regulation der Flüsse in dem erweiterten Stoffwechselnetz ist durch eine Reihe zusätzlicher Annahmen festgelegt. Ohne die Messung auch interner Stoffflüsse ist hier allerdings keine tiefere Einsicht in die tatsächliche Aktivität der einzelnen Reaktionen zu erwarten. Ein interessanter Ansatz zur Ermittlung interner Flüsse unter ausschließlicher Verwendung externer Metabolitkonzentrationen wird von [Marx et al. \(1996\)](#) vorgeschlagen. Durch Einsatz von markierten ¹³C-Atomen ist es mit Hilfe von NMR-Messungen möglich, Stoffwechselwege zu bestimmen und die Stoffflüsse von Hin- bzw. Rückreaktion einzelner enzymatischer Schritte zu berechnen. Die hierfür

¹Eukaryonten — Organismen mit einem echten Zellkern; alle höheren Organismen und ein Teil der Mikroorganismen zählen zu den Eukaryonten ([Schlegel, 1992](#)).

benötigten markierten Substrate sowie die NMR-Analyse sind allerdings mit erheblichem Aufwand und Kosten verbunden.

Die stationären Stoffwechselnetze der genannten Modelle berücksichtigen nicht die Dynamik der Stoffumwandlung. Alle Reaktionen berechnen sich als statische Funktionen der äußeren Substratkonzentrationen. Die Dynamik des Gesamtprozesses ist im wesentlichen durch die Zeitkonstanten des Aufnahmesystems gekennzeichnet, so daß diese Vereinfachung gerechtfertigt erscheint. Wie Experimente von [Markus und Hess \(1984\)](#) zeigen, weisen jedoch auch die enzymatischen Reaktionen unter gewissen Bedingungen durchaus eine Dynamik auf. Durch eine periodische Fütterung ist es sogar möglich, das enzymatische System in zellfreier Kultur zu einem chaotischen Verlauf des Produktstromes anzuregen.

Die erwähnten Modelle beschreiben das Wachstumsverhalten einer homogenen Zellmasse. Mit der Aufnahme der biochemischen Stoffwechselwege findet Information über die zellinterne Stoffumwandlung Eingang in die Modelle, ohne dabei Eigenschaften der Zelle, wie ihre Größe oder ihr Alter, zu berücksichtigen. Ein besseres Modell der Biomasse läßt sich hier durch die Einführung von Zellzyklus und genealogischer Struktur in der Population erreichen.

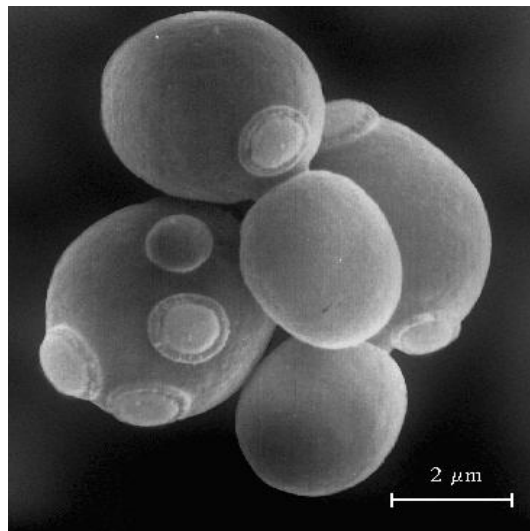


Bild 1.1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von sprossenden Hefezellen ([Bartling, 1996](#)). Die hellen Ringe auf der Zellwand der Mutterzellen sind die bei der Zellteilung entstandenen Sprossnarben. Sie ermöglichen es, das genealogische Alter der Zelle zu bestimmen

1.1 Zellzyklus und -population

Mikroskopisch betrachtet besteht die Biomasse aus einzelnen Zellen, die einen teilweise recht unterschiedlichen Stoffwechsel aufweisen können. Das Wachstum der Biomasse ist verbunden mit einer Vergrößerung der Masse einzelner Zellen und mit einer Vervielfachung der Anzahl der Zellen. Eine einzelne Zelle durchläuft in ihrem Leben eine endliche Anzahl von sogenannten Zellzyklen. Zu Beginn wächst die Masse der Zelle an, bis sie eine bestimmte Größe erreicht hat. Anschließend wird das genetische Material verdoppelt

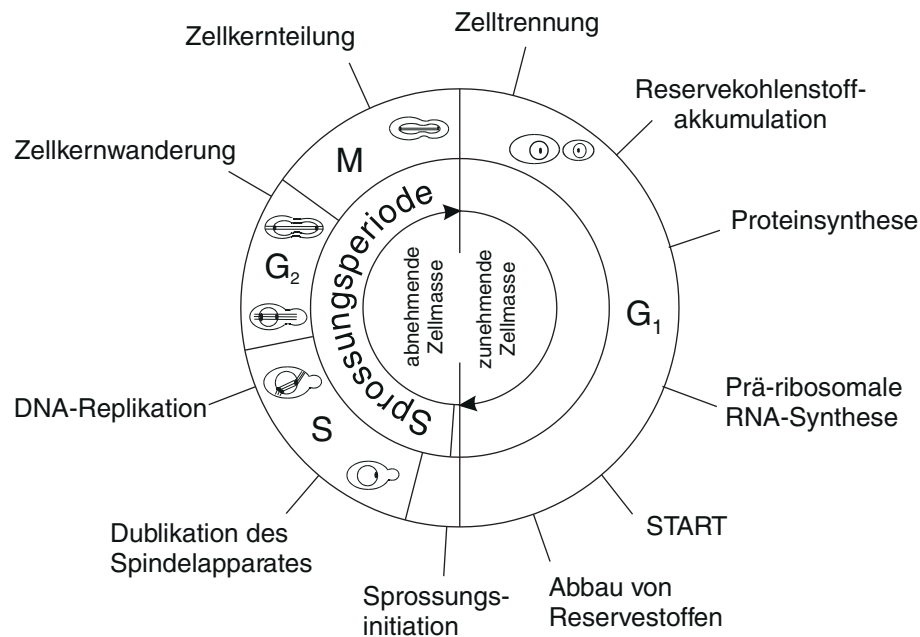


Bild 1.2: Phasen des Zellzyklus (Beuse, 1998)

und eine Knospe an der Zellwand ausgebildet, die sich schließlich von der Mutterzelle abtrennt. Diese Sproßzelle ist kleiner als die Mutterzelle und hinterläßt auf der Zellwand der Mutter eine Sprossungsnarbe. Bild 1.1 zeigt eine Aufnahme von sprossenden Hefezellen. Die angefärbten Sprossungsnarben sind als Ringe auf den Zellwänden der Mutterzellen zu erkennen.

Aus biologischer Sicht werden die vier Phasen G_1 , S , G_2 und M unterschieden. Im Falle der Hefe *S. cerevisiae* ist die G_1 -Phase durch Zellmassenwachstum gekennzeichnet, während in der S -Phase die Ausbildung der Sproßzelle beginnt und die Verdopplung des genetischen Materials erfolgt. Die G_2 und die M -Phase, die in der Regel zusammengefaßt werden, beinhalten die Zellteilung. Bild 1.2 zeigt die morphologischen Veränderungen und die physiologischen Funktionen im Verlauf des Zellzyklus.

Wie zu beobachten ist, sind die Phasen des Zellzyklus mit einem unterschiedlichen Stoffwechselverhalten verbunden. In den kinetischen Modellen haben der Zellzyklus und die unsymmetrische Sprossung keinen Einfluß auf das Modell. Es werden mittlere Wachstumseigenschaften beobachtet. In einer synchronen Kultur, in der sich eine Vielzahl der Zellen gleichzeitig teilen, wird die Abhängigkeit des Stoffwechsels vom Zellzyklus deutlich. Prozeßvariablen, wie die Gelöst-Sauerstoffkonzentration im Medium oder die Abgaswerte, die durch die Aktivität der Zellen beeinflußt werden, zeigen einen periodischen Zeitverlauf. Das Verhältnis der sprossenden Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl, der sogenannte Sprossungsindex, des in Bild 1.3 gezeigten Experiments weist dieselbe Periodizität auf, wie die übrigen Prozeßvariablen. Der langsame Anstieg bzw. Abfall des Sprossungsindex gibt einen Hinweis auf die Verteilung der Zellen im Zyklus. Die Sprossung setzt nicht vollständig synchron ein, sondern vollzieht sich für die gesamte Population in einem Zeitraum von ungefähr 3 h. Das heißt, während der abfallenden Rampe des Sprossungsindex teilt sich immer ein Teil der Zellen. Bei dem gezeigten Experiment schließt sich direkt an die Teilung die nächste Sprossungsphase an.

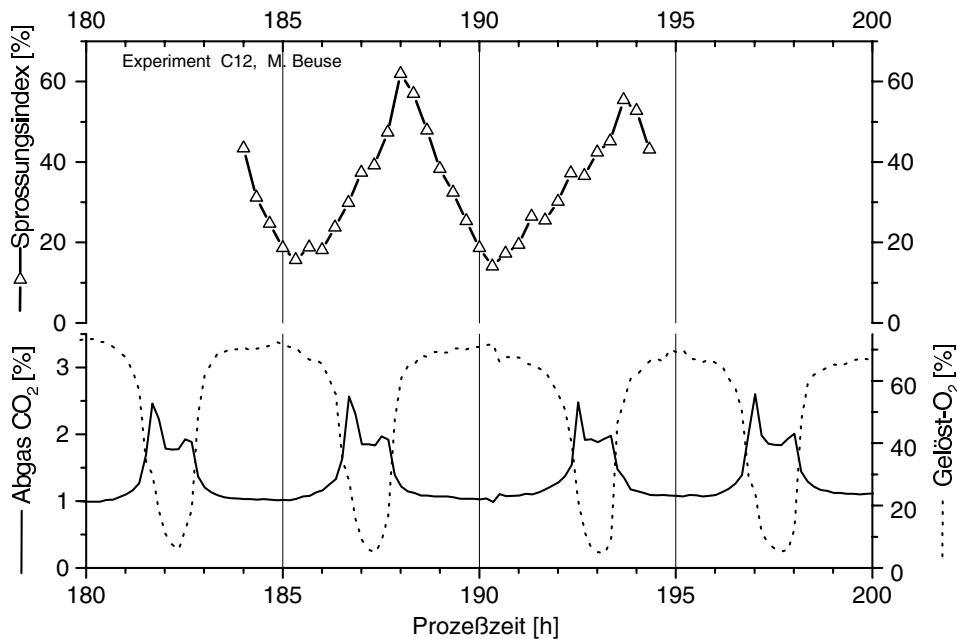


Bild 1.3: Sprossungsindex im Vergleich zu Kohlendioxidgehalt (CO_2) im Abgas und Gelöst-Sauerstoff (O_2) in der Flüssigphase einer kontinuierlichen Kultur (Bartling, 1996)

Der Beginn der Sprossung ist abhängig vom jeweiligen Nährstoffangebot. Bei einem Nahrungsmangel begeben sich die Zellen in eine Ruhephase, die die Einzelzellphase verlängert. Durch Substratüberschuß infolge eines Substrat-Pulses verlassen die Zellen ihre Ruhephase und beginnen mit der Sprossung. Diese läuft danach weitgehend unbeeinflusst von äußeren Einflüssen unter Mobilisation von eingelagertem Reservekohlenstoff ab. Während der Sprossungsphase ist ein Ansteigen der Substratkonzentration und der durch die Abgaswerte zu beobachtenden Aktivität zu verzeichnen. Kommt es in einer kontinuierlichen Kultur zu einer Synchronisation, so bleibt diese in der Regel über einen langen Zeitraum erhalten. Die synchrone Kultur macht deutlich, daß der Stoffwechsel einer einzelnen Zelle durchaus von den in der asynchronen Kultur beobachteten Werten abweicht. Abhängig vom Zellzyklus scheinen verschiedene Stoffwechselffade aktiv zu sein. Diese Information geht in der asynchronen Kultur verloren.

Im Rahmen der mathematischen Beschreibung der Zellpopulation in einer Kultur sind aufgrund der unsymmetrischen Teilung der Hefezellen kleinere und größere Zellen zu unterscheiden. Bedingt durch das Oberfläche/Volumen-Verhältnis und die Größe der Zellen ist die Zeit, die diese bis zum Erreichen der für die erneute Teilung notwendigen Größe benötigen, unterschiedlich. Der Zellzyklus läuft also nicht in allen Zellen mit der gleichen Geschwindigkeit ab.

In einem Populationsmodell ist neben dem Zellzyklus auch eine sogenannte genealogische Klasseneinteilung vorgesehen. Durch die unsymmetrische Teilung entstehen Zellen mit einer Vielzahl von unterschiedlichen Lebensläufen, wobei sich nicht alle in ihren Wachstumseigenschaften unterscheiden. Das einfachste Modell, das der Sprossung Rechnung trägt, ist das in Bild 1.4 dargestellte Zwei-Klassen-Modell, bestehend aus Mutter- und

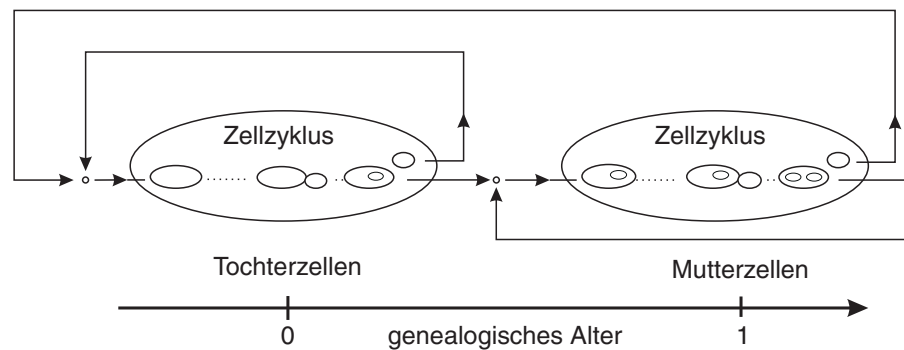


Bild 1.4: Zusammenhang zwischen Zellzyklus- und Populationsmodell am Beispiel des Zwei-Klassen-Modells bestehend aus Mutter- und Tochterzellen. Das genealogische Alter einer Zelle ist durch die Zahl der Sprossungsnarben gekennzeichnet

Tochterzellen. Im Zwei-Klassen-Modell wird angenommen, daß sich die Zellen mit einem durchlaufenem Zellzyklus nicht von denen mit zwei oder mehr Zyklen unterscheiden. Ältere Zellen verbleiben demnach in der Klasse der Mutterzellen. Desweiteren sei vorausgesetzt, daß die bei der Teilung entstehenden Tochterzellen unabhängig vom Alter der sich teilenden Zelle die gleichen Eigenschaften besitzen. Daher entstehen am Ende eines jeden Zyklus jeweils eine neue Mutter- und eine neue Tochterzelle. Ein allgemeinerer Ansatz wird von [Grover und Woldringh \(1995\)](#) angegeben. Hier werden Mutterzellen nach ihrem Alter und Tochterzellen nach dem Alter ihrer Mütter in weiteren Mutter- und Tochterklassen unterschieden. Mutterzellen, die ein gewisses Alter erreicht haben, verbleiben auch hier in der Klasse der ältesten Zellen. Die Tochterzellen seien nach dem ersten Zyklus ebenfalls nicht mehr zu unterscheiden und münden in die Klassen der jüngsten Mutterzellen bzw. deren Sproßzellen ein (siehe Abschnitt [2.3](#)).

1.2 Synchrone Kultur

Während die Synchronität in der industriellen Biomasseproduktion aufgrund ihrer geringeren Produktivität unerwünscht ist und demnach vermieden wird, haben synchrone Kulturen zur Untersuchung von Zellzyklus-Eigenschaften und bei der Erforschung der genetischen Regulation des Zellzyklus eine große Bedeutung. Eine ausschließlich mit Zellen eines Alters gestartete Kultur führt im allgemeinen nur für eine Generationszeit zu dem gewünschten synchronen Wachstum. Nach der ersten Teilung liegen bereits zwei unterschiedliche Klassen von Zellen (Mutter- und Sproßzellen) vor. In der kontinuierlichen Kultur ist es möglich, eine synchrone Kultur für nahezu unbegrenzte Zeit aufrecht zu erhalten. Dabei ändern sich in diesem Fall die Bedingungen von einem Zellzyklus zum darauffolgenden nicht.

Die Zellbilanz in einer synchronen kontinuierlichen Kultur führt auf ein Verhältnis zwischen Zellzahl und Generationszeit. Zellen mit längerer Generationszeit werden stärker ausgewaschen als solche, die sich bereits nach kurzer Zeit teilen. Um periodische Verhältnisse zu gewährleisten, müssen in synchroner Kultur die Generationszeiten der einzelnen Klassen in einem ganzzahligen Verhältnis zur beobachteten Periodenlänge stehen.

Es ergibt sich ein linearer Zusammenhang zwischen Periodenlänge und der durch die Verdünnungsrate gegebenen mittleren Verdopplungszeit. [Bellgardt \(1994a\)](#) zeigt dies für das Zwei-Klassen-Modell, bestehend aus Mutter- und Tochterzellen. Der Proportionalitätsfaktor ergibt sich aus dem ganzzahligen Verhältnis der Generationszeiten, dem sogenannten Wachstumsmodus der synchronen Kultur.

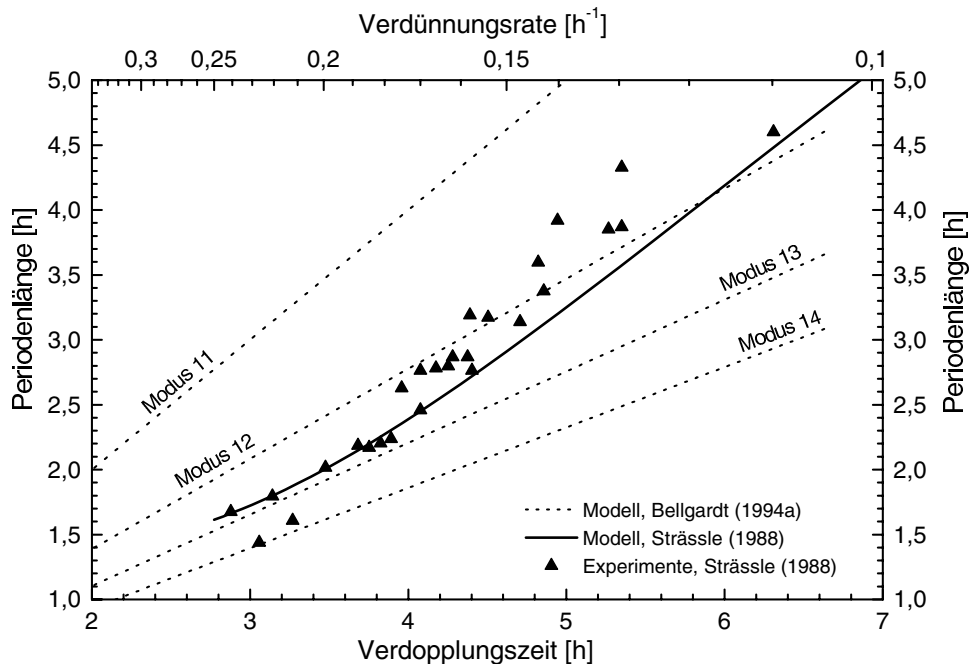


Bild 1.5: Periodenlänge der synchronen Kultur als Funktion der mittleren Verdopplungszeit im Modell ([Bellgardt, 1994a](#); [Strässle, 1988](#)) und Experiment ([Strässle, 1988](#))

[Bellgardt \(1994b\)](#) trägt die von einer Reihe von Autoren beobachteten Periodenlängen über den jeweiligen Verdopplungszeiten auf. Bild 1.5 zeigt beispielhaft die Periodenlänge der von [Strässle \(1988\)](#) durchgeführten Experimente im Vergleich mit der Modellvorhersage. Ein Teil der dargestellten Ergebnisse liegt zwischen den für die Modi des Zwei-Klassen-Modells berechneten Geraden und stellt damit einen Widerspruch zu den angegebenen Eigenschaften der synchronen Kultur dar. Die Meßgenauigkeit von Periodenlänge und Verdünnungsrate ist nicht angegeben, so daß es nicht möglich ist, zwischen Meß- und Modellfehler zu unterscheiden. Die Experimente wurden ohne das Wissen um die postulierten diskreten Wachstumsmodi und damit ohne die Kenntnis der eingeschränkten Zahl der gültigen Periodenlängen durchgeführt. Vor dem Hintergrund des Modells der diskreten Wachstumsmodi erscheint es interessant, folgende Fragestellungen zu untersuchen:

- Ist bei variierender Verdünnungsrate ein *linearer Zusammenhang zwischen Verdopplungszeit und Periodenlänge* zu beobachten?
- Welchen Einfluß haben *weitere Parameter*, wie zum Beispiel die Änderung des Sauerstoffangebotes, auf die Periodenlänge?
- Wovon hängt der sich einstellende *Wachstumsmodus* ab?

Die von [Beuse \(1998\)](#) durchgeführten Versuche scheinen die Hypothese des ganzzahligen Verhältnisses zwischen den Periodenlängen zu bestätigen (Experimente B in Bild 1.6). Bei einer sukzessiven Erhöhung der Verdünnungsrate bleibt die Synchronität erhalten und die Periodenlänge folgt dem vorgeschriebenen linearen Zusammenhang. Die langsame Variation der Verdünnungsrate erlaubt es hier, nicht nur die Lage der Moduslinie sondern auch die Abhängigkeit von der Verdünnungsrate zu prüfen. Bild 1.6 zeigt für diese Experimente das aus den Standardabweichungen berechnete Konfidenzintervall der linearen Regression.

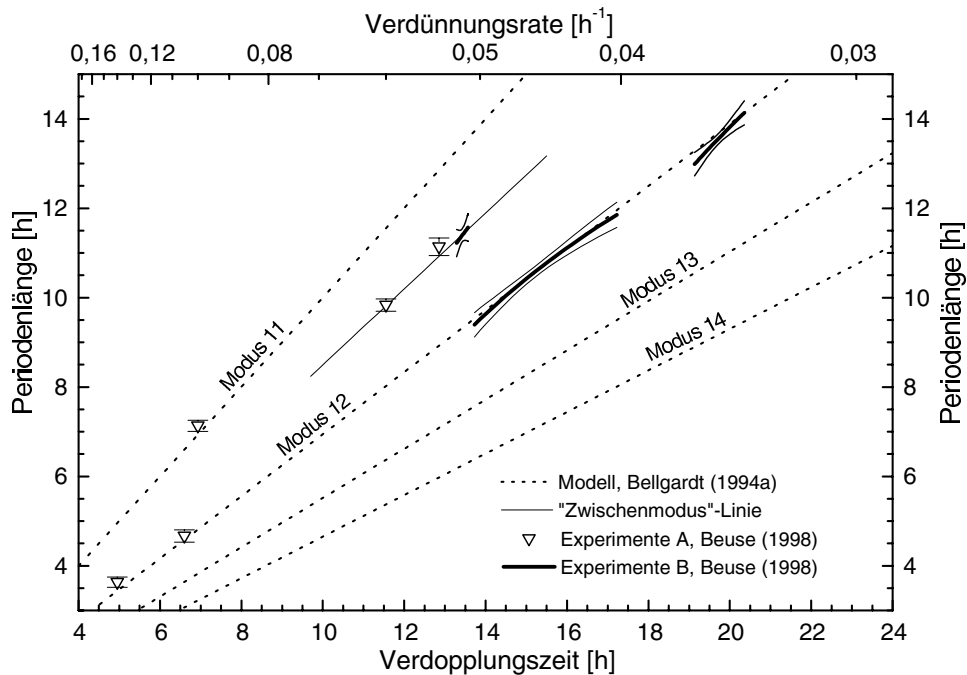


Bild 1.6: Periodenlängen der synchronen Kultur als Funktion der mittleren Verdünnungszeit unter Angabe von Varianz bzw. Konfidenzintervall

Verändert man jedoch die Verdünnungsraten über einen gewissen Bereich hinaus, so wechselt der Modus der synchronen Kultur. Wie in asynchroner Kultur zu beobachten ([Thompson und Wheals, 1980](#)), wirkt sich eine Änderung der Verdünnungsrate auch in synchroner Kultur unterschiedlich auf Mutter- und Tochterzellen aus. Sprünge im Wachstumsmodus sind aber auch infolge einer starken Variation der Sauerstoffversorgung möglich. Dies ist zum Beispiel der Fall, wenn ausgehend von einer ausreichenden Sauerstoffversorgung eine Absenkung auf eine teilweise limitierte Versorgung vorliegt. Der periodischen Lösung zufolge dürfte dies zu keiner Änderung der Periodenlänge führen, da diese starr an die durch die Verdünnungsrate eingestellte Verdopplungszeit gekoppelt ist. Die Versorgung mit Sauerstoff scheint sich also ebenfalls unterschiedlich auf Mutter- und Tochterzellen auszuwirken und führt schließlich zum Moduswechsel.

Das Wachstum der Zellen in den von [Beuse \(1998\)](#) durchgeführten Experimenten bleibt auch bei kleinen Verdünnungsraten synchron. Das Verhältnis zwischen Periodenlänge und Verdopplungszeit stimmt jedoch nicht mit dem Schema der im Zwei-Klassen-Modell möglichen Wachstumsmodi überein. Ein Teil der Experimente zeigt Periodenlängen, die weder auf gleiche Zykluszeiten (Modus 11) noch auf ein Verhältnis 1:2 (Modus 12) hindeuten.

Da die beobachteten Periodenlängen auf einer Geraden liegen (siehe Bild 1.6, „Zwischenmodus“-Linie), ist zu vermuten, daß es für diese Wachstumsmodi eines erweiterten Populationsmodelles bedarf. Dies wird durch die Untersuchungen von [Woldringh et al. \(1993\)](#) bestärkt, die eine Abhängigkeit des Zellvolumens vom genealogischen Alter der Zellen feststellen, die über die Unterscheidung von Tochter- und Mutterzellen hinausgeht.

Durch die experimentelle Verifikation der von [Bellgardt \(1994a\)](#) abgeleiteten Eigenschaften der synchronen periodischen Kultur stehen auch für die Validierung eines dynamischen Modells des Hefewachstums neue Daten zur Verfügung. Von einem dynamischen Modell von Zellzyklus und -population ist zu fordern, daß dieses auch in der Lage ist, die synchrone periodische Kultur zu charakterisieren. Ein geeignetes Modell sollte zudem in der Lage sein, neben synchronem und asynchronem Wachstum auch den Übergang zwischen beiden und den Wechsel zwischen zwei periodischen Lösungen zu beschreiben. Es ist jedoch mit keinem der bekannten dynamischen Modelle ([Strässle, 1988](#); [Hjortso und Nielsen, 1994](#)) derzeit möglich, das komplexe Verhalten beim Wechsel zwischen synchroner und asynchroner Kultur sowie den beobachteten Moduswechsel zu erklären. Zentrale Bedeutung kommt hier der Regulation der Zykluslänge der einzelnen Zellklassen zu. Die von [Hjortso und Nielsen, 1994](#)) angegebene Kinetik koppelt die Zykluszeiten der beiden Klassen starr über das Substratangebot. [Strässle \(1988\)](#) stellt das detaillierteste Modell des Zellzyklus vor. Das Modell mit zwei Zellklassen weist die in Bild 1.5 gezeigte nichtlineare Abhängigkeit zwischen Periodenlänge und Verdopplungszeit auf. Anders als beim Modell nach [Bellgardt \(1994a\)](#) ist der Zusammenhang zwischen Verdünnungsrate und Periodenlänge hier eindeutig. Die experimentellen Daten werden durch das Modell jedoch nur teilweise wiedergegeben.

Das in Kapitel 2 vorgestellte erweiterte Zellzyklus- und Populationsmodell finden in den in Kapitel 5 durchgeführten Simulationen Verwendung, um die Eigenschaften der synchronen Kultur zu untersuchen. Besondere Beachtung findet hierbei die durch die Zellbilanz (Abschnitt 3.2) beschriebene periodische Lösung der synchronen Kultur sowie der Übergang zwischen zwei periodischen Phasen.

Kapitel 2

Zellzyklus- und Populationsmodell

Der Stoffwechsel von Mikroorganismen hängt in starkem Maße von den Umgebungsbedingungen ab. Hierzu zählen zum Beispiel Temperatur, pH -Wert oder Sauerstoffangebot. Für jeden Organismus gibt es eine Reihe von Substraten und Produkten, die am Anfang und am Ende von aufwendigen Stoffwechselketten der Stoffumwandlung stehen. Der jeweils aktive Stoffumsatz hängt erheblich von den äußeren Bedingungen ab. Im folgenden sind mathematische Modelle für das Verhalten der Hefe *S. cerevisiae* in einem Rührkesselreaktor angegeben. Der in Bild 2.1 skizzierte Versuchsaufbau gewährleistet räumlich homogene Verhältnisse und reproduzierbare Umgebungsbedingungen.

Zu Beginn der mathematischen Beschreibung des Wachstums von Mikroorganismen steht, wie bei anderen Systemen auch, die Angabe der Randbedingungen für die das Modell gültig sein soll. Die einfachste Beschreibung stellt das durch die Wachstumsrate $\mu(t) = const$ gekennzeichnete Modell des exponentiellen Wachstums dar. Dieses basiert auf der Beobachtung, daß sich die Biomasse einer Kultur bei unveränderten Umgebungsbedingungen nach einer gewissen Zeit verdoppelt. Aufwendige Reaktor- und Umgebungsmodelle berücksichtigen Umwelteinflüsse auf die Wachstumsrate (Bellgardt, 1984). So weist zum Beispiel das anaerobe Wachstum, das heißt unter Abschluß von Sauerstoff, eine deutlich geringere Wachstumsrate auf, als das Wachstum in aerober Umgebung.

Die Stoffumwandlung durch Mikroorganismen vollzieht sich auf definierten biochemischen Stoffwechselfaden. Der Stoffwechsel teilt sich in einen katabolen Teil, in dem die Substrate in kleinere Bausteine unter Gewinnung von Energie zerlegt werden, und dem anabolen Stoffwechsel, der diese Bausteine verwendet, um Aminosäuren zu synthetisieren, aus denen sich schließlich die Biomasse aufbaut. Für den katabolen Stoffwechsel der Hefe spielt der von vielen Organismen verwendete Stoffwechselweg der Glykolyse eine herausragende Rolle, bei dem der Zucker Glucose zerlegt wird. Die Bilanzierung des Stoffumsatzes über die möglichen Stoffwechselwege erlaubt es, das empirisch bestimmte Wachstumsverhalten zu verifizieren. Auf gleiche Weise sind Versuche unternommen worden, auch den anabolen Stoffwechsel zu beschreiben. Die Verwendung biochemisch basierter Modellteile in der Biophase führt zu einer detaillierten Beschreibung des Wachstumsprozesses. Geeignete Optimierungskriterien ermöglichen es, unter Kenntnis des vorhandenen Enzymsatzes zu entscheiden, welcher Stoffwechselweg aktiv ist (Bonarius et al., 1996).

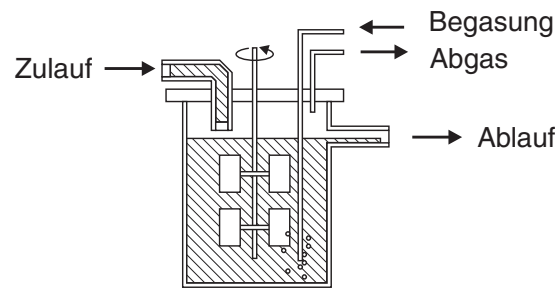


Bild 2.1: Schematische Darstellung eines Rührkesselreaktors

Es ist gebräuchlich, eine homogene Zusammensetzung der Biomasse vorauszusetzen. Dies gilt jedoch nur näherungsweise, da die Biomasse aus einer Vielzahl von einzelnen (autonomen) Zellen besteht. Wie Synchronkulturen zeigen, ist es eine grobe Vereinfachung, von immer gleichen Stoffwechseleigenschaften in allen Zellen auszugehen. Die sich wiederholenden Phasen des Zellzyklus bestimmen das Wachstum der Zellen. Jede Phase des Zyklus ist durch eigene Charakteristika gekennzeichnet. Zunächst wächst die Zelle an. Erreicht sie eine gewisse Reife, so bildet sie eine Sprosszelle aus, verbunden mit einer Teilung des Zellkerns. Das genetische Material verteilt sich auf beide Zellteile bevor sich die Sprosszelle abschnürt. Da während des Zellzyklus verschiedene biochemische Stoffwechselwege aktiv sind, kann die Betrachtung einer großen Zahl von Zellen in verschiedenen Zyklusphasen keine Auskunft über den Stoffwechsel in einer einzelnen Zelle geben (Makroskopisches Modell). Es ist nicht sicher, ob wirklich eine Zelle mit diesen mittleren Eigenschaften existiert.

Bild 2.2 zeigt die Struktur der Modellvorstellung in einem Rührkesselreaktor. Zunächst benötigt man ein Reaktormodell, das die Gas- und die Flüssigphase einschließt. Das biologische Modell ist mit dem Flüssigphasenmodell durch den Transport über die Zellmembran gekoppelt. Gas- und Flüssigphase sind als ideal durchmischt angenommen; mit anderen Worten, es liegt keine räumliche Abhängigkeit vor. Die Gleichungen des Reaktormodells finden sich beispielsweise bei [Bellgardt \(1984\)](#).

Die biologische Phase besteht aus einzelnen Zellen, die sich fortwährend im Zellzyklus befinden. Jede Zelle enthält eine enzymatische Ausstattung, die gewisse biochemische, von der Zelle regulierte Stoffwechselwege im Verlauf des Zellzyklus ermöglicht. Die Zunahme der Zellzahl durch die Teilung der Zellen am Ende des Zellzyklus ist ein diskreter Prozeß, während die Zunahme der Zellmasse kontinuierlich erfolgt.

Eine Beschreibung des Zellzyklus gewinnt im Rahmen der Tumorforschung zunehmend an Bedeutung. Tumorzellen sind gekennzeichnet durch eine gestörte Regulation ihres Wachstums — sie teilen sich unkontrolliert. Die genetische Information sowie die Umgebungsbedingungen bestimmen die Regulation des Zyklus ([Bailey, 1998](#)). Die Hefe *S. cerevisiae* stellt in den Bemühungen um das Verständnis des Zellzyklus einen Modellorganismus dar, da er als einfachster Eukaryont Ähnlichkeiten zu menschlichen oder tierischen, sogenannten roten Zellen aufweist. Die quantitative Berechnung von Modellen kann beim Verständnis der Zellzyklusregulation eine große Rolle spielen. Im folgenden werden mathematische Methoden vorgestellt, die das Wachstum von Mikroorganismen unter Berücksichtigung des Zellzyklus beschreiben.

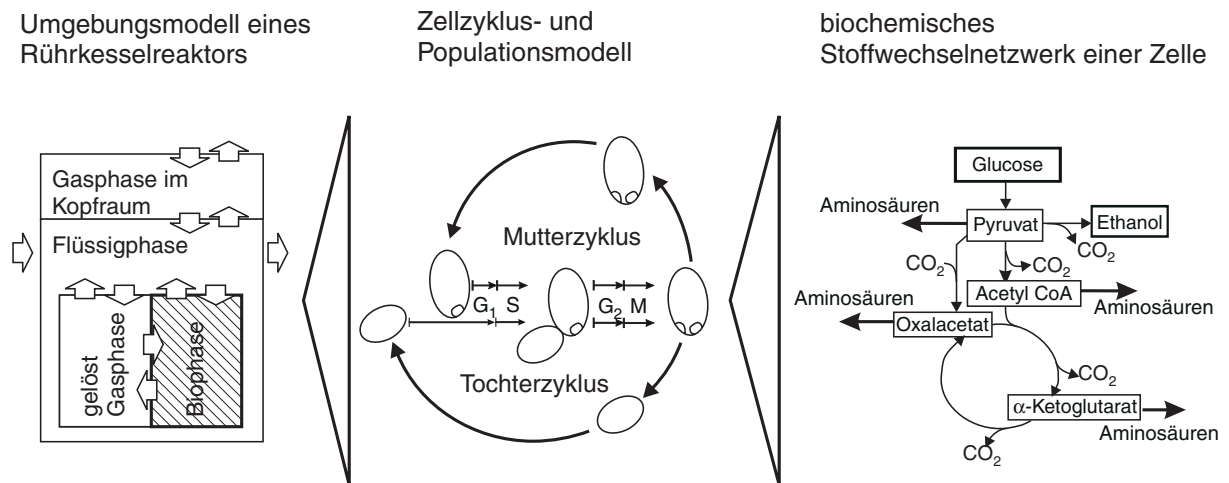


Bild 2.2: Modellstruktur: Die biologische Phase im Rührkesselreaktor setzt sich aus einzelnen Zellen zusammen, die sich fortwährend in einem zyklischen Prozeß, bestehend aus Wachstum und Teilung, befinden. Die biochemische Stoffumwandlung findet in den Zellen statt

2.1 Einfache Wachstumsmodelle

Es gelingt in vielen Fällen, das Wachstum von Mikroorganismen durch die Gleichungen eines autokatalytischen Wachstumsprozesses

$$\frac{d}{dt}M(t) = \mu(t) M(t) \quad (2.1a)$$

$$M(0) = M_0 \quad (2.1b)$$

zu beschreiben, wobei $M(t)$ die Zellmasse darstellt und $\mu(t)$ die in starkem Maße von den Umgebungsbedingungen abhängige Wachstumsrate bezeichnet. Den größten Einfluß auf die Wachstumsrate hat das Angebot der verschiedenen, von der Hefe verwertbaren Substraten. Eine sehr detaillierte Darstellung des Wachstumsverhaltens unter typischen Umgebungsbedingungen findet sich bei [Bellgardt \(1984\)](#). Das reduzierte Modell von [Sonnleitner und Käppli \(1986\)](#) faßt die wesentlichen Eigenschaften der Hefe zusammen. Das biologische System zur Bestimmung der jeweiligen Wachstumsrate ist in Abschnitt [2.4](#) dargestellt.

Derartige Modelle basieren auf der makroskopischen Beobachtung, bei der sich die gesamte Masse der Mikroorganismen mit einer konstanten Wachstumsrate vermehrt. Mikroskopisch betrachtet zerfällt die homogene Masse jedoch in einzelne diskrete unterscheidbare Zellen. Die Gesamtmasse der Zellen berechnet sich aus der Summe

$$M(t) = \sum_{N^*(t)} m_i(t)$$

über alle $N^*(t)$ Zellen mit der Masse $m_i(t)$ einer einzelnen Zelle, wobei $N^*(t)$ eine ganzzahlige Funktion ist. Unter Verwendung der mittleren Zellmasse

$$\bar{m}(t) = \frac{1}{N^*(t)} \sum_{N^*(t)} m_i(t)$$

ergibt sich der Zusammenhang

$$M(t) = \bar{m}(t) N^*(t)$$

zwischen der wertkontinuierlichen Funktion der Zellmasse $M(t)$ und der wertdiskreten Funktion der Zellzahl $N^*(t)$. Zum Zeitpunkt der Teilung einer Zelle vergrößert sich die Zellzahl und die mittlere Zellmasse verringert sich entsprechend, da die Masse aller Zellen während der Teilung unverändert bleibt. Betrachtet man dagegen eine hinreichend große Zahl von Zellen, so bleibt die mittlere Zellmasse \bar{m} bei der Teilung einer einzelnen Zelle nährungsweise konstant. Für das makroskopische Modell des Wachstums ist es daher möglich, von der wertdiskreten Funktion $N^*(t)$ auf die wertkontinuierliche Funktion $N(t)$ durch Abschneiden der Dezimalstellen mit

$$N^*(t) = \lfloor N(t) \rfloor$$

überzugehen. Im weiteren liegt stets die Annahme einer hinreichend großen Zellzahl zugrunde, so daß es möglich ist, die wertkontinuierliche Zellzahl $N(t)$ zu verwenden. Für die Funktion $N(t)$ kann die Differentialgleichung

$$\frac{d}{dt}N(t) = \mu(t)N(t) \quad (2.2a)$$

$$N(0) = N_0 \quad (2.2b)$$

zur nährungsweisen Beschreibung des Wachstums angegeben werden. Für große Zellzahlen sind die Differentialgleichungen (2.1) und (2.2) für Zellmasse und Zellzahl über die mittlere Masse \bar{m} einer Zelle gekoppelt. Während die Biomasse stetig mit der Zeit anwächst, nimmt die Zellzahl nur im Augenblick der Zellteilung zu. Gleichung (2.2) beschreibt das makroskopische Wachstum, sofern sich zu jedem Zeitpunkt der gleiche Anteil der Zellen teilt. Die Population ist dann asynchron über den gesamten Zellzyklus verteilt. Die mikroskopischen Vorgänge des Wachstumsprozesses werden jedoch durch die Gleichung nicht wiedergegeben. Nimmt man an, daß alle Zellen für einen vollständigen Durchlauf durch den Zellzyklus die Zeit a_T benötigen, so beschreibt die Zelldichte

$$n_t(t) = \frac{d}{dt}N(t)$$

den durch die Teilung entstandenen Zuwachs der Zellzahl zum Zeitpunkt t . Die Zellzahl erhöht sich demnach um das Integral über die Verteilungsdichte $n_t(t)$. Es gilt

$$N(t) = \int_{t-a_T}^t n_t(\tau) d\tau.$$

Der Wachstumsprozeß wird durch die Gleichungen

$$n_t(t) = 2 n_t(t - a_T) \quad \text{für} \quad t > 0 \quad (2.3a)$$

$$n_t(t) = n_{t,0}(t) \quad \text{für} \quad -a_T \leq t \leq 0 \quad (2.3b)$$

beschrieben. Jeweils nach der Generationszeit a_T verdoppelt sich die Zahl der sich teilenden Zellen. Vergleicht man die Modelle nach Gleichung (2.2) und (2.3), so wird deutlich,

daß im ersten Fall nur ein Anfangswert, nämlich die Zellzahl N_0 zu Beginn des Beobachtungsintervall, erforderlich ist. Das zweite Modell des diskreten Teilungsprozesses benötigt dagegen die Zelldichte $n(t)$ im Intervall $-a_T \leq t \leq 0$. Diese zusätzliche Information entspricht der Verteilung der Zellen über den Zellzyklus zum Zeitpunkt $t = 0$.

Die Gültigkeit des durch die Gleichungen (2.3) formulierten Modells ist jedoch auf eine konstante Generationszeit a_T eingeschränkt. Desweiteren bereitet es Schwierigkeiten, die Verhältnisse während der kontinuierlichen Kultur zu beschreiben, in der fortwährend ein Teil der Zellen aus dem Reaktor gespült wird. Daher ist es zweckmäßig, eine eigene Variable a für den Zustand des Zellzyklus einzuführen. Die Variable a beschreibt das Zyklusalter, wobei der Zellzyklus mit $a = 0$ beginnt und mit $a = a_T$ endet. Die Zelldichte ist nun abhängig von den beiden Variablen Prozeßzeit t und Zyklusalter a . Die Zelldichte $n(t)$ nach Gleichung (2.3) gibt jeweils die Zelldichte zum Zeitpunkt des beginnenden Zellzyklus an. Die Zelldichte $n_a(t, a)$ im Zykluszustand a zur Zeit t ist also identisch mit der Zelldichte n zur Zeit $t - a$, da die Zellen vor der Zeit $\Delta t = a$ in den neuen Zyklus eingetreten sind. Es gilt der Zusammenhang

$$n_a(t, a) = n_t(t - a) \quad \text{für } 0 \leq a \leq a_T$$

zwischen der Zelldichte $n_a(t, a)$ und $n_t(t)$.

Mit der Beschreibung der Zellpopulation in Abhängigkeit von Prozeßzeit t und Zyklusalter a ist es möglich, die beobachteten Eigenschaften der Zellen genauer anzugeben, als dies durch eine Zeitabhängigkeit allein möglich wäre. Ist die Wachstumsrate jüngerer Zellen größer als diejenige älterer kurz vor der Teilung stehender Zellen, so führt dies zu einer mit dem Zyklusalter a abnehmenden Funktion der Wachstumsrate. In kontinuierlicher Kultur ist unter gewissen Umständen eine Synchronisation des Wachstumsverhaltens zu beobachten, das heißt die Wachstumsbedingungen führen zu einer Akkumulation von Zellen in der gleichen Zyklusphase. Derartige Beobachtungen machen es notwendig, auch den Zykluszustand bei der Beschreibung der Zelldichte zu berücksichtigen. Abschnitt 2.2 stellt daher ein dynamisches Modell des Zellzyklus vor, das es erlaubt, die Wachstumseigenschaften in Abhängigkeit des Zellzykluszustandes anzugeben.

Der Zellzyklus endet mit der Teilung der Zellen. Das Modell in Gleichung (2.3) geht von zwei nahezu gleichen Zellen aus, die den nächsten Zellzyklus beginnen. Die Teilung der Hefe ist jedoch unsymmetrisch, das heißt nach einer Wachstumsphase bildet sich an der Zellwand eine Sproßzelle aus. Hat die Sproßzelle eine gewisse Größe erreicht, schnürt sie sich von der Mutterzelle ab und beide Zellen beginnen einen neuen Zellzyklus (siehe Bild 1.2). Die Sproßzelle ist in der Regel kleiner als die Mutterzelle und benötigt eine längere Zeit für den Zellzyklus. Eine Zellpopulation besteht also aus einer Vielzahl von Zellen, die eine unterschiedliche Entwicklungsgeschichte (Genealogie) aufweisen. Um eine heterogene Population beschreiben zu können, ist es notwendig, Zellen mit gleichen oder ähnlichen Eigenschaften zu einer Klasse zusammenzufassen. Das gewählte Modell sollte mit möglichst wenigen Klassen in der Lage sein, die beobachteten Phänomene wiederzugeben.

Teilt man die Zellzahl $N(t)$ der Population in Gleichung (2.3) in zwei Teilpopulationen mit $N_P(t)$ Mutter- und $N_D(t)$ Tochterzellen, so gilt für die Klasse der Mutterzellen

$$n_{a,P}(t, 0) = n_{a,D}(t, a_{T,D}) + n_{a,P}(t, a_{T,P}) \quad \text{für } t > 0 \quad (2.4a)$$

$$n_{a,P}(0, a) = n_{a,P,0}(a) \quad \text{für } 0 \leq a \leq a_{T,P} \quad (2.4b)$$

und die Zahl der Mutterzellen berechnet sich aus

$$N_P(t) = \int_0^{a_{T,P}} n_{a,P}(t, a) da \quad (2.4c)$$

mit den Generationszeiten $a_{T,P}$ und $a_{T,D}$ für Mutter- und Tochterzellklasse. Die Zelldichte der Mutterzellen bildet sich aus der Summe der sich teilenden Mutter- und Tochterzellen. Eine analoge Gleichung beschreibt das Wachstum der Tochterzellen.

In einer Kultur mit mehreren Teilpopulationen genügt jede Zellklasse einem Gleichungssystem der Form (2.4). Die Kopplung zwischen den Gleichungen entsteht durch die Bilanzierung der Zellen an den Klassenübergängen zum Zeitpunkt der Teilung — das genealogische Populationsmodell. Abschnitt 2.3 stellt ein allgemeines Modell vor, das über dieses äußerst einfache Modell, bestehend aus Mutter- und Tochterzellklasse, hinausgeht.

2.2 Dynamisches Modell des Zellzyklus

Das Zyklusmodell beinhaltet die Vorgänge und Eigenschaften einer Zelle zwischen Geburt und Sprossung. Insbesondere geht es hierbei um die Änderungen des Stoffwechsels und der Morphologie. Um beides beschreiben zu können, ist zunächst festzulegen, wodurch der Zellzyklus charakterisiert sein soll. Der Zellzyklus kann beispielsweise direkt an das Zyklusalter oder die Masse einer einzelnen Zelle gekoppelt sein. Genetische Ansätze begreifen den Zellzyklus als eine Kette von Ereignissen, die determiniert nacheinander ablaufen. Ändern sich die Umgebungsbedingungen, so ist es nicht ausreichend, das in Abschnitt 2.1 eingeführte Zyklusalter a zur Beschreibung des Zustandes des Zellzyklus zu verwenden. Im folgenden wird der Zellzyklus durch eine auf das Intervall $[0, 1]$ normierte Variable p beschrieben. Die Masse der Zellen und das Zyklusalter lassen sich eindeutig durch statische oder dynamische Beziehungen der Variablen p zuordnen. Die Annahme, daß eine Variable zur Beschreibung des Zyklus ausreicht, stellt eine Vereinfachung dar, die es jedoch erlaubt, die wesentlichen Merkmale des Zyklus zu untersuchen. Mit anderen Worten bedeutet dies, daß die Eigenschaften der in den Zellzyklus eintretenden Zellen gemittelt werden müssen. Die im Rahmen des Populationsmodells unterschiedene Herkunft der Zellen hat sicherlich auch Auswirkungen auf Speicherstoffgehalt oder Größe der Zellen. Nach Beginn eines neuen Zyklus wird mit einer Zelle mit mittleren Eigenschaften gerechnet.

Die Geschwindigkeit q , mit der die Zellen den Zellzyklus p durchlaufen, ist durch die Gleichung

$$q_p(t, p) = \frac{dp}{dt} \quad (2.5)$$

gegeben. Die Bilanz über das in Bild 2.3 skizzierte Volumenelement führt auf

$$\frac{n_p(t, p) - n_p(t + \Delta t, p)}{\Delta t} + \frac{q_p(t, p)n_p(t, p) - q_p(t, p + \Delta p)n_p(t, p + \Delta p)}{\Delta p} = -\lambda n_p(t, p)$$

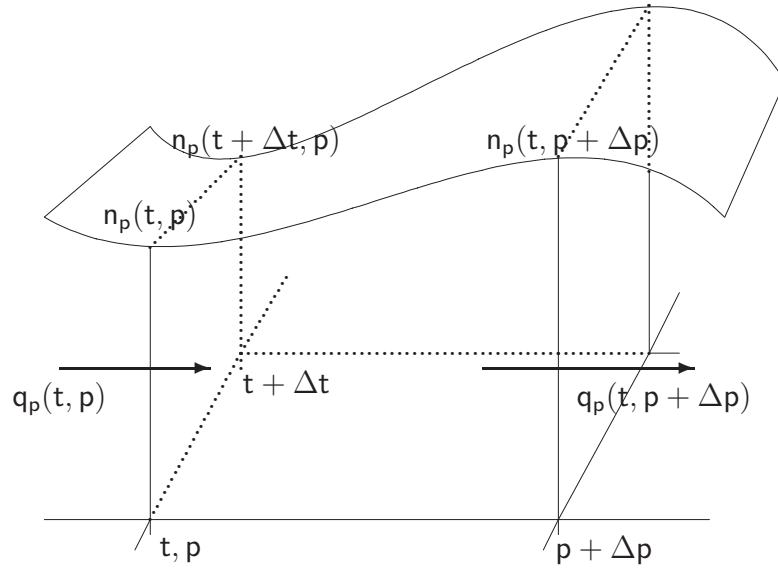


Bild 2.3: Zellbilanz über ein infinitesimales Zellzyklussegment $[p, p + \Delta p]$ im Zeitintervall $[t, t + \Delta t]$.

wobei der Koeffizient λ einen zur Zellzahl proportionalen Verlustterm darstellt. Bei einer kontinuierlichen Kultur ist λ identisch mit der Verdünnungsrate D . Die Größe λ enthält jedoch auch das, wegen des geringen Anteils an dieser Zellklasse in kontinuierlicher Kultur in der Regel vernachlässigbare, Absterben älterer Zellen.

Der Übergang $\Delta t \rightarrow 0$ und $\Delta p \rightarrow 0$ führt auf die partielle Differentialgleichung

$$\frac{\partial n_p(t, p)}{\partial t} + \frac{\partial (q_p(t, p) n_p(t, p))}{\partial p} = -\lambda n_p(t, p) \quad \text{mit } 0 \leq p \leq 1 \quad (2.6a)$$

mit der Anfangsbedingung

$$n_p(0, p) = n_{p,0}(p) \quad (2.6b)$$

sowie der Randbedingung für den Beginn des Zellzyklus ($q_p \geq 0$)

$$q_p(t, 0) n_p(t, 0) = u_0(t) \quad (2.6c)$$

für den allgemeinen Transportprozeß durch den Zellzyklus. Der Zufluß der Zellen $u_0(t)$ zu Beginn des Zellzyklus stellt die Schnittstelle zum Populationsmodell dar. Für ein einfaches Modell mit lediglich einer Zellklasse und einer Teilung in zwei gleiche Zellen ergibt sich der Zufluß mit

$$u_0(t) = 2 q_p(t, 1) n_p(t, 1)$$

jeweils aus der doppelten Anzahl der Zellen am Ende des Zyklus. Auf den Zufluß des allgemeinen Populationsmodells wird in Abschnitt 2.3 eingegangen.

Die durch Gleichung (2.6) beschriebenen Transportprozesse kommen in vielen Systemen in der Natur vor. So wird z.B. auch eine der Grundgleichungen in der Hydrodynamik aus der Massenbilanz gebildet. Die Zelldichte ist mit der Wasserhöhe eines Flusses in eindimensionaler Betrachtung in Fließrichtung vergleichbar. Die Fließgeschwindigkeit wird in der Strömungsmechanik aus einer Impulsbilanz abgeleitet, während die Zellzyklusgeschwindigkeit über das Substratangebot eingeprengt ist. Räumliche Effekte spielen im Gegensatz zur Strömungsmechanik keine Rolle.

Substitution der Zyklusvariablen

Die Beschreibung des Zellzyklus in Abhängigkeit von der normierten Variablen p ist rein willkürlich. Gleichwertige Modelle des Zellzyklus lassen sich auch für andere Variablen angeben. Natürlich ändern sich die Differentialgleichung (2.6) und die Zelldichte bei einer Variablentransformation. Im folgenden gelte für die unterschiedlichen Zyklusvariablen p und a der allgemeine Zusammenhang

$$a = f(p)$$

wobei f eine eindeutige umkehrbare Transformationsvorschrift ist.

Die Zelldichte $n_p(t, p)$ bezüglich der Zyklusvariablen p ist definiert mit Hilfe der Zellzahl $N_p(t, p)$ mit

$$N_p(t, p) = \int_0^p n_p(t, p') dp'.$$

Die Zellzahl $N_p(t, p)$ gibt die Zahl aller Zellen zum Zeitpunkt t an, die im Zellzyklus nicht weiter als p fortgeschritten sind. Für $p = 1$ ergibt sich also die Zellzahl $N(t) = N_p(t, 1)$ der gesamten Population. Die Zellzahl ist unabhängig von der Wahl der Zyklusvariablen, das heißt für den gleichen Zykluszustand, der sowohl durch p als auch durch $a = f(p)$ gekennzeichnet ist, gilt die Identität

$$N_p(t, p) = N_a(t, a(p)).$$

Hieraus leitet sich für die Zelldichte $n_p(t, p)$ unter Verwendung der Kettenregel der Zusammenhang

$$n_p(t, p) = \frac{dN_p(t, p)}{dp} = \frac{dN_a(t, f(p))}{da} = \frac{dN_a(t, a)}{da} \frac{df(p)}{dp}$$

ab. Durch Ersetzen der Zellzahl N_a durch die Zelldichte n_a ergibt sich der Zusammenhang zwischen der Zelldichte $n_p(t, p)$ bezüglich p und der Zelldichte $n_a(t, a)$ bezüglich a zu

$$n_p(t, p) = n_a(t, a(p)) \frac{da}{dp}. \quad (2.7)$$

Diese Beschreibung des Zellzyklus zieht eine durch den Faktor da/dp modifizierte Zelldichte nach sich.

Weist die Definition der neuen Zyklusvariablen a eine Abhängigkeit von t und p mit $a = f(t, p)$ auf, so ist dies bei der partiellen Ableitung der Zelldichte entsprechend

$$\frac{\partial n_a(t, f(p, t))}{\partial t} = \frac{\partial n_a(t, a)}{\partial t} + \frac{\partial n_a(t, a)}{\partial a} \frac{\partial f(t, p)}{\partial t} \quad (2.8)$$

zu berücksichtigen.

In den folgenden Abschnitten werden die beiden am häufigsten verwendeten Beschreibungen des Zellzyklus untersucht. Hierbei handelt es sich um das Zyklusalter a (Bellgardt, 1994a; Hjortso und Nielsen, 1994) und die Masse der einzelnen Zelle m (Strässle, 1988). Anschließend wird eine allgemeine Darstellung basierend auf der normierten Variablen p abgeleitet. Die normierte Darstellung ermöglicht eine einfache und übersichtliche Implementierung des Zellzyklusmodells. Die beiden Variablen Zyklusalter a und Masse m ergeben sich dann in Abhängigkeit von der normierten Variablen p .

2.2.1 Zyklusvariable Zyklusalter

Soll der Zellzyklus diskutiert werden, liegt es nahe, das bereits in Abschnitt 2.1 eingeführte Zyklusalter $a \in [0, a_T]$ einer Zelle zu verwenden. Das Zyklusalter einer Zelle ist durch die seit der letzten Sprossung der Zelle zum Zeitpunkt $t = t_0$ vergangene Zeit

$$a(t) = t - t_0 \quad (2.9)$$

definiert. Da das Zyklusalter a sich nach Gleichung (2.9) direkt aus der Prozeßzeit t ableitet, gilt für die Geschwindigkeit der Zellen im Zellzyklus

$$q_a(t, a) = \frac{da}{dt} = 1. \quad (2.10)$$

Die Zellen teilen sich, wenn das Zyklusalter die Generationszeit a_T erreicht. Der Zellzyklus läßt sich, wie in Abschnitt 2.2 hergeleitet, durch eine eindimensionale partielle Differentialgleichung erster Ordnung der Form

$$\frac{\partial n_a(t, a)}{\partial t} + \frac{\partial n_a(t, a)}{\partial a} = -\lambda n_a(t, a) \quad \text{für } 0 \leq a \leq a_T \quad (2.11a)$$

mit der Anfangsverteilung

$$n_a(0, a) = n_{a,0}(a) \quad (2.11b)$$

und der Randbedingung (Sprossung)

$$n_a(t, 0) = u_0(t) \quad (2.11c)$$

beschreiben. Hierbei bezeichnet $n_a(t, a)$ die Zellzahl, t die Prozeßzeit und a das Zyklusalter der Zellen.

Zur Bestimmung der Randbedingung für $p = 0$ wird auch hier das Populationsmodell herangezogen. Die Funktion $u_0(t)$ charakterisiert die Summe der Zuflüsse aus den verschiedenen Zellklassen des Modells, deren Zellen in dieser Klasse zusammengefaßt werden. Für das Beispiel des Ein-Klassen-Modells mit der Teilung in zwei gleiche Zellen gilt

$$n_a(t, 0) = 2 n_a(t, a_T).$$

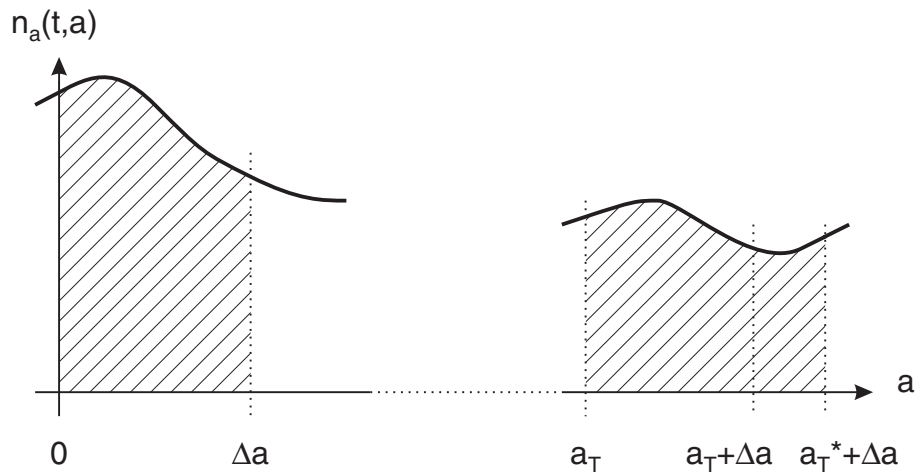


Bild 2.4: Bilanz der sprossenden Zellen im Intervall $t \in [-\Delta a, 0]$ jeweils am Anfang und Ende des Zellzyklus

2.2.1.1 Änderung der Generationszeit

Das Wachstum der Mikroorganismen ist abhängig von dem aktuellen Nährstoffangebot. Bei einem guten Angebot steigt die Wachstumsrate an und die Generationszeit sinkt. Entsprechend führen verschlechterte Wachstumsbedingungen zu einer Verlängerung der Generationszeit. Verändert sich die Generationszeit a_T , so hat dies eine Auswirkung auf den Zellstrom u_0 , der in den neuen Zyklus mündet. Eine Verkürzung der Generationszeit führt zu einer momentanen Erhöhung des Zuflusses, während eine Verlängerung einen geringeren Zufluß zur Folge hat.

Bild 2.4 zeigt schematisch jeweils Anfang und Ende eines Zellzyklus mit der Generationszeit a_T . Die Bilanz über die beiden schraffierten Bereiche führt auf die Abhängigkeit für die Zelldichte bei einer Änderung der Generationszeit. Dargestellt ist eine Verkürzung der Generationszeit von a_T^* auf a_T innerhalb der Zeit Δt . Die Zellen zur Zeit t mit dem Alter Δa sind zur Zeit $t - \Delta t$ mit $\Delta a = \Delta t$ durch Teilung entstanden. Das Alter der sich teilenden Zellen betrug $a_T^* = a_T(t - \Delta t)$. Verlängert man den Zellzyklus wie in Bild 2.4 gezeigt über das Alter a_T hinaus, so muß die Bilanz der Zelldichte über die beiden infinitesimalen Zyklusintervalle $[a_T(t), a_T^* + \Delta a]$ und $[0, \Delta a]$ ausgeglichen sein.

Die Integration über die infinitesimalen Zyklusintervalle ergibt

$$\int_0^{\Delta a} n_a(t, a) da = \int_{a_T(t)}^{a_T(t-\Delta t)+\Delta a} n_a(t, a) da \quad (2.12)$$

mit der Eulerdiskretisierung bei kleinem Δt

$$a_T(t + \Delta t) = a_T(t) + \frac{da_T}{dt} \Delta t \quad (2.13)$$

und für den Übergang auf infinitesimale Größen mit $\lim \Delta a \rightarrow 0$ und $\Delta a = \Delta t$ gelingt es, das Integral durch das Produkt

$$n_a(t, 0) = n_a(t, a_T(t)) \left(1 - \frac{da_T}{dt}\right) \quad (2.14)$$

zu ersetzen. Die Änderung der Generationszeit und damit die Änderung des Substratangebotes wirkt sich auf die Verteilungsdichte in diesem Modell aus. Eine sich periodisch ändernde Generationszeit führt zu einer entsprechend veränderten Verteilungsdichte. Dies muß jedoch nicht allein ausreichend sein, um eine Synchronisation der Verteilungsdichte herbeizuführen, wie in Abschnitt 2.4.5 gezeigt.

2.2.1.2 Normierte Darstellung des Zyklusalters

Sowohl für den Vergleich von verschiedenen Modellen als auch für die numerische Lösung ist es wünschenswert, den Wertebereich der Zyklusvariablen auf ein Intervall mit festen Intervallgrenzen zu normieren.

Die Transformation auf das Intervall $p \in [0, 1]$ gelingt durch

$$p = f(t, a) = \frac{a}{a_T(t)} \quad (2.15)$$

und führt nach Gleichung (2.7) auf die normierte Verteilungsdichte $n_p(t, a)$ mit

$$n_a(t, a) = n_p(t, f(t, a)) \frac{dp}{da} = \frac{1}{a_T(t)} n_p(t, \frac{a}{a_T(t)}).$$

Eingesetzt in die Differentialgleichung (2.11) zur Beschreibung des Zellzyklus durch das Zyklusalter folgt nach Anwendung der Produktregel die Gleichung

$$-\frac{1}{a_T(t)^2} \frac{da_T}{dt} n_p(t, p) + \frac{1}{a_T(t)} \underbrace{\frac{\partial n_p(t, f(t, a))}{\partial t}}_{\star} + \frac{1}{a_T(t)} \underbrace{\frac{\partial n_p(t, f(t, a))}{\partial a}}_{\star} = -D \frac{1}{a_T(t)} n_p(t, p),$$

wobei sich die mit \star gekennzeichneten Terme mit Hilfe von Gleichung (2.8) auflösen lassen. Nach Multiplikation mit $a_T(t)$ ergibt sich die gesuchte Form

$$-\frac{1}{a_T(t)} \frac{da_T}{dt} n_p(t, p) + \left(\frac{\partial n_p(t, p)}{\partial t} + \frac{\partial n_p(t, p)}{\partial p} \frac{\partial f(t, a)}{\partial t} \right) + \frac{\partial n_p(t, p)}{\partial p} \frac{\partial f(t, a)}{\partial a} = -D n_p(t, p)$$

in Abhängigkeit der normierten Zyklusvariablen p . Das Einsetzen der partiellen Ableitung nach der Zeit

$$\frac{\partial p}{\partial t} = -\frac{a}{a_T(t)^2} \frac{da_T}{dt} = -p \frac{1}{a_T(t)} \frac{da_T}{dt}$$

liefert schließlich die normierte Form der Differentialgleichung

$$\frac{\partial n_p(t, p)}{\partial t} + \frac{1}{a_T(t)} \underbrace{\left(1 - p \frac{da_T}{dt}\right)}_{q_a(t, p)} \frac{\partial n_p(t, p)}{\partial p} = \left(\frac{1}{a_T(t)} \frac{da_T}{dt} - D\right) n_p(t, p) \quad (2.16)$$

mit der Randbedingung

$$n_p(t, 0) \frac{1}{a_T} = n_p(t, 1) \frac{1}{a_T(t)} \left(1 - \frac{da_T}{dt}\right).$$

In dieser Darstellung ist die Zyklusgrenze $p = 1$ immer konstant. Die Randbedingungen ähneln denen in Gleichung (2.14). Dieses Ergebnis bestätigt daher die in Abschnitt 2.2.1.1 gemachten Überlegungen, nach denen sich eine Änderung der Generationszeit unmittelbar auf die Verteilungsdichte auswirkt.

2.2.2 Zyklusvariable Masse

Legt man die Zellmasse m als Zyklusvariable zugrunde, so hat dies den Vorzug, daß in den Modellgleichungen die Wachstumsrate unmittelbar auftritt. Dies erleichtert die Kopplung an das Substratangebot, indem man analog zu Gleichung (2.1) auch das Wachstum der Masse einer einzelnen Zelle proportional zu ihrer Masse annimmt. Im Unterschied zu Gleichung (2.1) wird hier allerdings die Wachstumsrate einer einzelnen Zelle benötigt. In Gleichung (2.1) bezeichnet μ die Wachstumsrate der Gesamtmasse M aller Zellen der Kultur. Diese kann von der Wachstumsrate einer einzelnen Zelle abweichen, wenn das Wachstum nicht durch die Zellmasse sondern beispielsweise durch die Oberfläche der Zellen bestimmt ist. In diesem Fall ergibt sich eine Wachstumsrate $\mu(t, m)$, die auch von der Zellmasse m abhängig ist.

Für die Analyse der prinzipiellen Zusammenhänge ist es allerdings in einem ersten Schritt nicht notwendig, eine derartige Abhängigkeit zu berücksichtigen. So führt beispielsweise das oben erwähnte Verhältnis zwischen Oberfläche und Masse lediglich zu einer verzerrten Zellverteilung. Dies hat unter Umständen auch Auswirkungen auf die morphologischen Merkmale, wie den Sprossungsindex. Die mittlere Wachstumsrate in der kontinuierlicher Kultur ist jedoch durch die Verdünnungsrate vorgegeben. Es existiert daher kein Unterschied zwischen der mittleren Wachstumsrate einer Zelle und der Wachstumsrate der gesamten Kultur.

Für die Zyklusgeschwindigkeit q einer Zelle gilt nach obigen Vereinfachungen der Zusammenhang mit der Wachstumsrate $\mu(t)$ entsprechend der Gleichung

$$q_m(t, m) = \frac{dm}{dt} = \mu(t)m(t). \quad (2.17)$$

Die Beschreibung des Wachstums der Zellen in jeweils einem Zyklus gelingt entsprechend Gleichung (2.6) durch die partielle Differentialgleichung

$$\frac{\partial n_m(t, m)}{\partial t} + \frac{\partial(q_m(t, m)n_m(t, m))}{\partial m} = -\lambda n_m(t, m) \quad \text{für } m_0 \leq m \leq m_1 \quad (2.18a)$$

mit der Anfangsverteilung

$$n_m(0, m) = n_{m,0}(m) \quad (2.18b)$$

und der Randbedingung (Sprossung)

$$q_m(t, m_0)n_m(t, m_0) = u_0(t). \quad (2.18c)$$

Hierbei bezeichnet t wiederum die Prozeßzeit und λ den Verlustterm. Eine Zelle beginnt den Zellzyklus mit der Masse m_0 , wächst an und hat mit dem Gewicht m_1 die zur Sprossung notwendige Größe erreicht hat.

Mit Hilfe der Produktregel gelangt man zu der Darstellung

$$\frac{\partial n_m(t, m)}{\partial t} + q_m(t, m) \frac{\partial n_m(t, m)}{\partial m} = -\lambda n_m(t, m) - \frac{\partial q_m(t, m)}{\partial m} n_m(t, m),$$

die einen zur Änderung der Wachstumsrate $q_m(t, m)$ proportionalen Verdünnungsterm aufweist. Die Beziehung vereinfacht sich schließlich bei Berücksichtigung von Gleichung (2.17) zu

$$\frac{\partial n_m(t, m)}{\partial t} + q_m(t, m) \frac{\partial n_m(t, m)}{\partial m} = -(\lambda - \mu(t)) n_m(t, m). \quad (2.19)$$

Der Vorteil dieser Modellgleichungen gegenüber der Altersbeschreibung liegt, neben der expliziten Berücksichtigung der Masse der einzelnen Zelle, insbesondere in den von der Wachstumsrate unabhängigen Intervallgrenzen der Zyklusvariablen. Sinkt infolge eines Substratmangels die Wachstumsrate ab, so bleibt die Form der Zellverteilung zunächst erhalten. Die Wachstumsrate $\mu(t) = 0$ ist gleichbedeutend mit einer im Zellzyklus unveränderlichen Zellverteilung. Im Gegensatz hierzu führt die Beschreibung durch das Zyklusalter für abnehmende Wachstumsraten zu großen, stetig wachsenden Generationszeiten. Das heißt, sowohl das durch die Generationszeit vorgegebene Ende des Zellzyklus als auch das Alter der Zellen nehmen in gleichem Maße zu, ohne das sich die Reife der Zellen ändert. Auch in der normierten Form gibt die auf dem Zyklusalter basierende Darstellung die biologischen Zusammenhänge nur ungenügend wieder.

2.2.2.1 Änderung der minimalen und maximalen Zellmasse

Sind die Massen $m_1(t)$ und $m_2(t)$ zeitabhängig, so wirkt sich dies ähnlich wie in den Betrachtungen der sich ändernden Generationszeit in Abschnitt 2.2.1.1 auf die Verteilungsdichte $n_m(t, m)$ aus. Im allgemeinen Fall mit zeitvariablen Massen $m_0(t)$ und $m_1(t)$ an den Zyklusrändern gilt die Randbedingung

$$q_m(t, m_0)n_m(t, m_0) \left(1 - \frac{1}{q_m(t, m_0)} \frac{dm_0}{dt}\right) = q_m(t, m_1)n_m(t, m_1) \left(1 - \frac{1}{q_m(t, m_1)} \frac{dm_1}{dt}\right), \quad (2.20)$$

wobei die Änderung der Massen $m_0(t)$ und $m_1(t)$ nicht unabhängig voneinander sind. Eine vergrößerte sich teilende Zelle führt zu zwei in der Summe ebenfalls vergrößerten Zellen, die den nächsten Zellzyklus beginnen. Die Klassen, der die beiden neuen Zellen angehören, werden durch das Populationsmodell festgelegt. Die folgenden Beispiele zeigen den Einfluß im Ein- und Zwei-Klassen-Modell auf.

Beispiel: Für eine Klasse mit Teilung in zwei gleiche Zellen gilt das Verhältnis $m_1 = 2m_0$ zwischen den Massen m_0 und m_1 . Bei konstanter Wachstumsrate über den Zellzyklus gilt für die Zyklusgeschwindigkeit $q_m(t, m_1) = 2q_m(t, m_0)$. Hieraus kann man die Randbedingung

$$q_m(t, m_0)n_m(t, m_0) = q_m(t, m_1)n_m(t, m_1)$$

ableiten. Eine veränderte Teilungsgröße hat keine Auswirkung auf die Verteilungsdichte im Ein-Klassen-Modell. ■

Beispiel: Unterscheidet man lediglich zwei Klassen von kleineren Tochterzellen und größeren Mutterzellen aufgrund der initialen Größen $m_{0,D}$ und $m_{0,P}$ der Zellen, so muß in einem geschlossenen System gefordert werden, daß die Zellen beider Klassen am Ende des Zellzyklus die gleiche Größe $m_{1,D} = m_{1,P} = m_1$ aufweisen. Unterschiedliche Zellgrößen würden zu mehr als zwei verschiedenen Zellklassen nach der Teilung führen. Liegt das Verhältnis der ungleichmäßigen Teilung zwischen Sproß- und Mutterzelle mit $c = const$ fest, dann ergibt sich die initiale Masse der Tochterzellen bezogen auf die Endgröße m_1 zu

$$m_{0,D} = c m_1$$

und die der Mutterzellen zu

$$m_{0,P} = (1 - c) m_1.$$

Eingesetzt in Gleichung (2.20) unter Berücksichtigung von der Zyklusgeschwindigkeit in Gleichung (2.17) folgt an allen Rändern und in beiden Klassen die gleiche Abhängigkeit von der sich ändernden maximalen Masse

$$\frac{dm_1}{dt}.$$

In diesem Fall ergibt sich kein Einfluß auf die Verteilungsdichte. ■

Die Annahme eines konstanten Verhältnisses c zwischen Mutter- und Tochterzellen stellt jedoch einen Sonderfall dar, wie die Annahme einer konstanten initialen Größe der Mutterzellen $m_{0,P}$ zeigt. Für diesen Fall ergibt sich eine Teilung entsprechend

$$m_{0,D} = m_1 - m_{0,P}$$

und

$$m_{0,P} = const.$$

Eingesetzt in Gleichung (2.20) erkennt man, daß in diesem Fall die von

$$\frac{dm_1}{dt}$$

abhängigen Terme an den Rändern nicht mehr identisch sind. Bei einer Änderung der Größe der Zellen m_1 kommt es bei diesem Teilungsverhältnis sehr wohl zu einem Einfluß auf die Verteilungsdichte.

2.2.2.2 Normierte Darstellung der Masse

Die normierte Darstellung der Gleichung (2.18) gelingt mit Hilfe einer Funktion, die das Intervall $[m_0, m_1]$ eindeutig auf das Intervall $[0, 1]$ abbildet. Die logarithmische Definition

$$p = \frac{\ln \frac{m}{m_0}}{\ln \frac{m_1}{m_0}} \quad (2.21)$$

erweist sich als günstig, da sie auf eine vom Parameter p unabhängige Zyklusgeschwindigkeit führt. Mit der Differentiation nach m

$$\frac{dp}{dm} = \frac{1}{\ln \frac{m_1}{m_0}} \frac{1}{m}$$

liefert der Vergleich mit Gleichung (2.7) zwischen den Dichtefunktionen $n_m(t, m)$ und $n_p(t, p)$ bezüglich m und p den Zusammenhang

$$n_m(t, m) = \frac{1}{\ln \frac{m_1}{m_0}} \frac{1}{m} n_p(t, p).$$

Somit ist es möglich, in der Differentialgleichung (2.18) die Variable m durch p zu ersetzen. Da in dem Produkt

$$q_m(t, m) n_m(t, m) = \frac{\mu(t)}{\ln \frac{m_1}{m_0}} n_p(t, p)$$

keine explizite Abhängigkeit von m mehr auftritt, kann die Anwendung der Produktregel entfallen. Durch Umformung von n_m in n_p erhält man die normierte Differentialgleichung

$$\frac{\partial n_p(t, p)}{\partial t} + \underbrace{\frac{\mu}{\ln \frac{m_1}{m_0}}}_{q_p(t, p)} \frac{\partial n_p(t, p)}{\partial p} = -\lambda n_p(t, p). \quad (2.22)$$

2.2.3 Eigenschaften der Generationszeit

Die Generationszeit a_T hängt von den Umgebungsbedingungen ab, denen die Zellen ausgesetzt sind. Eine höhere Wachstumsrate führt zu einer verkürzten Generationszeit, während ein Absinken der Wachstumsrate eine Verlängerung des Zellzyklus bedeutet. Bei der Verwendung des Zyklusalters a als Zyklusvariable ist, anders als bei der Beschreibung durch die Masse m einer einzelnen Zelle, zunächst keine Kopplung zwischen Substratangebot und Wachstumsrate enthalten. Um eine äquivalente Beschreibung mit den beiden unabhängigen Veränderlichen zu erhalten, werden im folgenden die sich jeweils ergebenden Ausdrücke für die Generationszeit verglichen. Die Generationszeit berechnet sich dabei als die Zeit, die eine Zelle zu einem vollständigen Durchlauf durch den Zellzyklus benötigt.

Zunächst wird das Wachstum einer Zelle basierend auf der Beschreibung des Zellzyklus durch das Alter der Zellen untersucht. Bild 2.5 stellt die zeitveränderliche Generationszeit

$a_T(t)$, sowie das Alter a mehrerer Zellen A, B, C dar. Das Zyklusalter a einer Zelle A, die zur Zeit t_{01} in den Zyklus eintritt, steigt proportional mit der Prozeßzeit t . Nach Gleichung (2.9) gilt der Zusammenhang

$$a(t) = t - t_{01}$$

zwischen Zyklusalter a und Prozeßzeit t . Hieraus leitet sich die Wachstumsgeschwindigkeit zu

$$q_a(t, a) = \frac{da}{dt} = 1$$

ab. Zum Zeitpunkt t_{04} erreicht das Zyklusalter mit

$$a(t) = t_{04} - t_{01} = a_T(t_{04})$$

die aktuelle Generationszeit und der Zellzyklus endet mit der Teilung der Zelle. Nach der Teilung beginnt das Zyklusalter der Zelle wieder bei $a = 0$.

Es wird deutlich, daß eine fallende Generationszeit zu einem Absinken der Zelldichte führt, wenn man die beiden Zellen B und C, die zu den Zeitpunkten t_{02} und t_{03} in den Zellzyklus eintreten, betrachtet. Der Abstand im Zellzyklus dieser beiden Zellen beträgt

$$\Delta a_1 = t_{03} - t_{02}.$$

Das Ende des Zellzyklus der beiden Zellen liegt in einem Bereich mit sinkender Generationszeit. Der nächste Zellzyklus der beiden Zellen beginnt zu den Zeitpunkten t_{05} und t_{06} . Der Abstand im Zellzyklus zwischen den beiden Zellen hat sich auf

$$\Delta a_2 = t_{06} - t_{05} < \Delta a_1$$

verringert. Anhand der beiden exemplarisch betrachteten Zellen läßt sich erkennen, daß Zellen mit fallender Generationszeit zusammenrücken. Die Zelldichte steigt und führt so zu einer Synchronisation der Zellen im Zellzyklus.

Umgekehrt führt eine steigende Generationszeit zu einer verringerten Zelldichte. Weist die Generationszeit eine Steigung ≥ 1 auf, so kommt die Zellteilung sogar völlig zum Erliegen. Zwischen den Zeitpunkten $t_1 < t < t_4$ tritt keine Teilung auf. Dies wird deutlich, wenn man die Gerade g_1 in Bild 2.5 betrachtet. Die Zelle, deren Alter die Gerade beschreibt, teilt sich zum Zeitpunkt t_{01} . Zu den Zeitpunkten t_2 und t_3 schneidet die Gerade wiederum die Generationszeit ohne daß hier eine Teilung stattfinden kann.

Während bisher der Zellzyklus durch das Zyklusalter a gekennzeichnet wurde, wird jetzt der Zustand des Zellzyklus durch die Zellmasse m definiert. In der Beschreibung des Zellzyklus durch die Zellmasse m läßt sich die Generationszeit a_T nur implizit angeben. Bild 2.6 zeigt die Wachstumsrate $\mu(t)$, sowie die auf die minimale Masse m_0 normierte Zellmasse m . Die Generationszeit einer Zelle, deren Zyklus zur Zeit t_{01} begann, berechnet sich durch Integration über die Zyklusgeschwindigkeit $q_m(t)$. Nach Gleichung (2.17) gilt

$$q_m(t, m) = \frac{dm}{dt} = \mu(t) m(t),$$

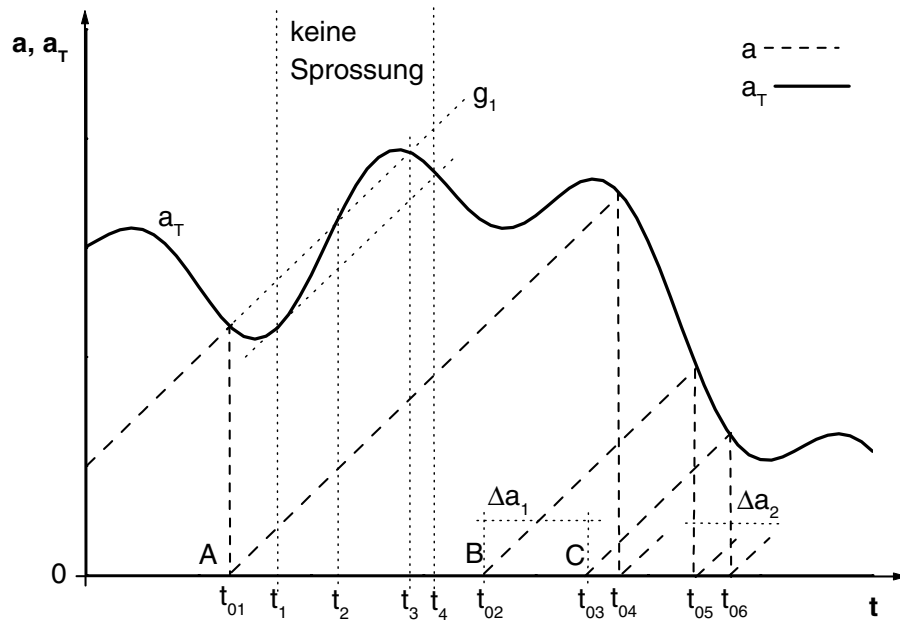


Bild 2.5: Zyklusalter a bei zeitvariablen Generationszeiten $a_T(t)$. Zu den Zeitpunkten t_{01} bis t_{06} erreicht das Zyklusalter a die Generationszeit $a_T(t)$ und die jeweilige Zelle beendet den Zellzyklus durch die Teilung. Das Alter a im darauffolgenden Zellzyklus beginnt wieder mit $a = 0$

woraus sich durch Lösung der Differentialgleichung die normierte Masse zu

$$\ln \frac{m(t)}{m_0} = \int_{t_0}^t \mu(t') dt'$$

berechnet. Der Zyklus ist abgeschlossen, sobald die Identität

$$\ln \frac{m_1}{m_0} \stackrel{!}{=} \int_{t_0}^t \mu(t') dt'$$

erfüllt ist. In Bild 2.6 ist das erstmalig zum Zeitpunkt $t = t_{02}$ der Fall. Die Generationszeit berechnet sich dann zu $a_T(t_2) = t_2 - t_1$. Eine Schwankung der Wachstumsrate führt bei dieser Form der Beschreibung zu einer Änderung der Geschwindigkeit, mit der die Zellmasse zunimmt. Der Abstand zweier Zellen im Zellzyklus bleibt stets konstant. Die Änderungen der Wachstumsrate haben also keinen Einfluß auf die Zelldichte.

Der Zusammenhang zwischen Wachstumsrate $\mu(t)$ und Generationszeit $a_T(t)$ ist allgemein durch die Beziehung

$$\int_{t_0}^{a_T(t)+t_0} \mu(t') dt' \stackrel{!}{=} \ln \frac{m_1}{m_0}$$

gegeben, wobei die Generationszeit in den Integrationsgrenzen auftritt.

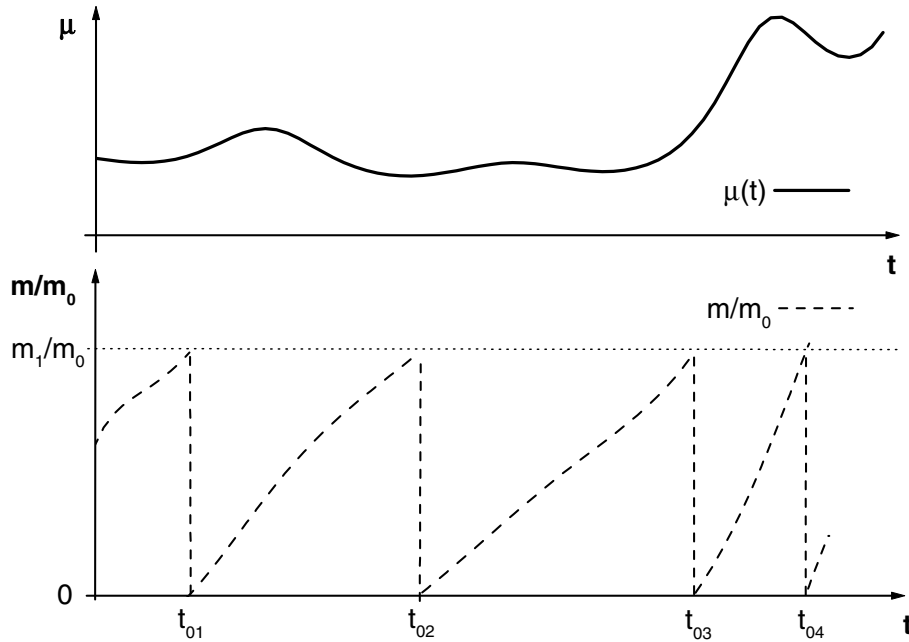


Bild 2.6: Wachstumsrate $\mu(t)$ und normierte Zellmasse $m(t)/m_0$. Zu den Zeitpunkten t_{01} bis t_{04} erreichen die Zellen die maximale Masse m_1 und teilen sich. Der neue Zyklus beginnt wieder mit der Masse $m(t) = m_0$

Für den stationären Fall mit $\mu(t) = const$ ist es möglich, eine analytische Lösung für das Integral anzugeben. In diesem Fall gilt der statische Zusammenhang

$$a_T(t) = \ln \frac{m_1}{m_0} \frac{1}{\mu} = const \quad (2.23)$$

zwischen der Wachstumsrate μ und der Generationszeit a_T . Die für die Wachstumsrate μ gültige Substratkinetik kann somit verwendet werden, um die Generationszeit in Abhängigkeit vom Substratangebot anzugeben. Dieser Zusammenhang wird beispielsweise bei [Hjortso und Nielsen \(1995\)](#) verwendet. Die Gültigkeit ist jedoch auf den stationären Fall beschränkt. Die in [Hjortso und Nielsen \(1995\)](#) abgeleiteten auf der stationären Betrachtung basierenden Eigenschaften sind daher nicht geeignet, die dynamischen Vorgänge zu beschreiben, infolge derer eine Synchronisation der Zellen auftritt. Zwischen der Zyklusvariablen und der Generationszeit bzw. der Wachstumsrate bestehen unterschiedliche dynamische Abhängigkeiten. Daher ist es nicht möglich, äquivalente Beschreibungen des Wachstumsverhaltens zu erhalten, wenn sowohl Wachstumsrate als auch Generationszeit statisch an das Nahrungsangebot gekoppelt sind.

Betrachtet man das Übertragungsverhalten von Generationszeit bzw. Wachstumsrate und der Zyklusvariablen, werden die prinzipiellen Unterschiede des dynamischen Verhaltens klar. Mit dem zugrunde gelegten Zyklusalter a liefert die nach Gleichung (2.15) normierte Zyklusvariable p_a

$$p_a(t) = (t - t_0) \frac{1}{a_T(t)},$$

während sich aus der Beziehung (2.21) die normierte Masse p_m

$$p_m(t) = \frac{1}{\ln \frac{m_1}{m_0}} \int_{t_0}^t \mu(t') dt'$$

ergibt. Bei einer konstanten Wachstumsrate $\mu(t)$ und einer konstanten Generationszeit $a_T(t)$, also stationären Verhältnissen, zeigen beide Modelle das gleiche prinzipielle Verhalten. In diesem Fall ist es möglich, das Integral explizit als

$$p_m(t) = (t - t_0) \frac{\mu}{\ln \frac{m_1}{m_0}}$$

anzugeben. Die Änderung der Wachstumsrate bzw. der Generationszeit rufen jedoch grundsätzlich verschiedene Auswirkungen hervor. Das im Arbeitspunkt linearisierte System $p_a = f(\frac{1}{a_T})$ weist proportionales Verhalten auf, während das System $p_m = f(\mu)$ integralen Charakter hat. Bei einer gewünschten statischen Kopplung zwischen a_T bzw. μ und dem Substratangebot erscheint die zweite Beziehung geeigneter zur Beschreibung des Wachstums, da das gesamte aufgenommene Substrat die Masse der Zellen und damit auch ihre Reife bestimmt. Die Generationszeit direkt an das Substratangebot zu koppeln steht nicht in Übereinstimmung mit dem beobachteten Verhalten. Eine Erhöhung der Substratkonzentration hat hier eine sofortige Sprossung der Zellen zur Folge, wenn sich diese nur lange genug im Zellzyklus befunden haben. Die während dieser Zeit aufgenommene Substratmenge spielt keine Rolle. Zellen, die den Zellzyklus kurz vor einer Ruhephase beginnen, sprossen sobald wieder Substrat vorliegt, obwohl ihr Stoffwechsel während der gesamten Ruhephase inaktiv gewesen ist.

Im Gegensatz hierzu ist in Bild 2.7 der typische Verlauf der Generationszeit nach einer Ruhephase dargestellt, wenn man die Zellmasse als unabhängige Veränderliche verwendet und das Zyklusalter durch eine gekoppelte partielle Differentialgleichung berechnet. Bis $t = 10 h$ wird kein Substrat zugeführt. In der Ruhephase (ab $t = 5 h$), nach Verbrauch des gesamten vorliegenden Substrats, kommt das Wachstum zum Erliegen. Die Generationszeit steigt während dieser Phase mit der Steigung eins. Der Start der kontinuierlichen Kultur ($t = 10 h$) ist am Anstieg der Substratkonzentration im Reaktor zu erkennen. In den ersten Stunden nach dem Beginn der kontinuierlichen Kultur steigt die Generationszeit weiter mit leicht verminderter Steigung an. Erst nachdem alle während der Ruhephase inaktiven Zellen den Zellzyklus beendet haben, sinkt die Generationszeit. Die Länge dieser Phase mit erhöhter Generationszeit entspricht also ungefähr der zu dem neuen Substratangebot gehörenden Generationszeit. Diese Generationszeit ist erst dann meßbar, wenn die erste Zelle einen vollständigen Zellzyklus während der kontinuierlichen Kultur durchlaufen hat. Zwischen Generationszeit $a_T(t)$ und Wachstumsrate $\mu(t)$ bzw. Substratangebot besteht lediglich im stationären Gleichgewicht ein statischer Zusammenhang nach Gleichung (2.23). Bei dynamischen Veränderungen ist dies nicht der Fall.

Wie das Beispiel erkennen läßt, weist die Beschreibung der Population durch das Zyklusalter a mehrere Nachteile auf. Stoppt das Wachstum, steigen das Alter a der Zellen und die Generationszeit $a_T(t)$ linear mit der Prozeßzeit t an. Die auf das Alter bezogene Verteilungsdichte verschiebt sich entsprechend. Die zur Begrenzung des Wertebereiches eingeführte Normierung des Alters auf die Generationszeit, führt in einer Ruhephase zu

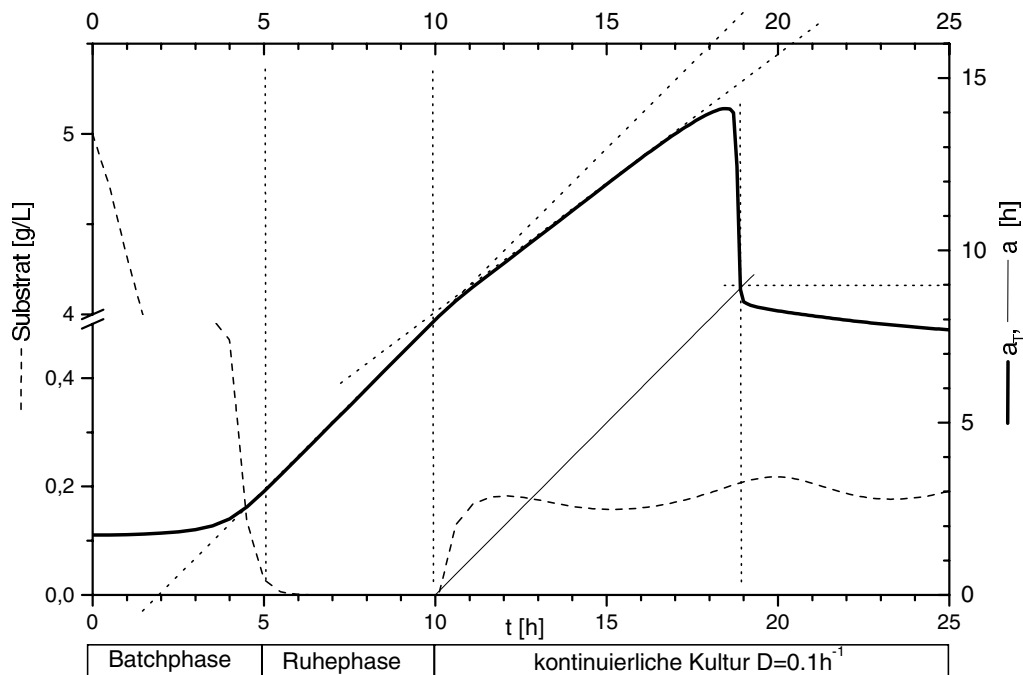


Bild 2.7: Generationszeit $a_T(t)$, Zyklusalter a und Substratkonzentration während einer Batch-Phase (0-5 h), Ruhephase (5-10 h) und anschließender kontinuierlichen Kultur (ab 10 h)

ausgeprägten Spitzen in der Verteilungsdichte. Die Zellen nähren sich aufgrund des steigenden relativen Alters immer weiter dem Intervallende an. Mit den in Abschnitt 3.1 untersuchten numerischen Verfahren lassen sich derartige spitze Verteilungen jedoch nicht berechnen.

Das Zugrundelegen eines statischen Zusammenhanges zwischen Wachstumsrate und Generationszeit würde im Falle einer sprunghaften Erhöhung der Substratkonzentration zu einem starken Abfall der Generationszeit und zur Sprossung einer großen Anzahl von Zellen und damit zu einem falschen Ergebnis führen. Auch eine Zelle, die kurz vor der Ruhephase in den Zyklus eingetreten ist, würde sich bei dieser Betrachtung nach genügend langer Ruhephase erneut teilen. Für eine brauchbare Beschreibung des Zusammenhanges zwischen Generationszeit und Substratangebot ist es also erforderlich, sowohl die Zellmasse als auch das Zyklusalter der Zellen zu berücksichtigen.

2.2.4 Zusammenfassung

Im folgenden sind die dynamischen Gleichungen des Zyklusmodells zusammengefaßt. Der Kern des Modells besteht aus der Beschreibung der Zellverteilung im Zyklus. Um weitere biologische Eigenschaften in das Modell aufzunehmen, ist es jedoch notwendig zusätzliche Größen einzuführen: In erster Linie handelt es sich hierbei um die bereits ausführlich beschriebenen Größen, nämlich die Zellmasse und des Zyklusalter einer einzelnen Zelle.

Für die Zellzahl $n_p(t, p)$ gilt die aus der Massenbilanz abgeleitete Differentialgleichung

(2.6). Im Modell findet die folgende Form entsprechend

$$\frac{\partial n_p(t, p)}{\partial t} + \frac{\partial (q_p(t, p)n_p(t, p))}{\partial p} = -D(t)n_p(t, p) \quad (2.24a)$$

$$n_p(0, p) = n_{p,i}(p) \quad (2.24b)$$

$$q_p(t, 0)n_p(t, 0) = u_0(t) \quad (2.24c)$$

mit der Zyklusgeschwindigkeit $q_p(t, p) = dp/dt$ Verwendung. Die Funktion $n_{p,i}$ beschreibt dabei die Anfangsverteilung der Zellen.

Andere Eigenschaften wie z.B. Zyklusalter, Zellmasse oder Speicherstoffeinlagerung gehorchen in analoger Weise weiteren partiellen Differentialgleichungen. Im folgenden sind diese für die Zellmasse m , die Speicherstoffkonzentration c_T , die Gesamtmasse M und das Zyklusalter a abgeleitet. Hierbei handelt es sich um alle für die vorgestellte Modellrechnung relevanten Eigenschaften der Zellen. Die mit i indizierten Größen bezeichnen auch hier die Anfangsverteilung der betreffenden Eigenschaften in Zellzyklus.

Die Zellmasse m genügt dem in Gleichung (2.17) angegebenen allgemeinen Zusammenhang

$$\frac{d}{dt}m(t, p) = \mu(t) m(t, p).$$

Die totale Differentiation von $m(t, p)$ liefert die Abhängigkeit von Prozeßzeit t und Zellzyklus p entsprechend der Gleichung

$$\frac{\partial m(t, p)}{\partial t} + q_p(t, p) \frac{\partial m(t, p)}{\partial p} = \mu(t) m(t, p) \quad (2.25a)$$

$$m(0, p) = m_i(p) \quad (2.25b)$$

$$m(t, 0) = m_0(t). \quad (2.25c)$$

Bei einem festen Zusammenhang zwischen der Zellmasse m und der normierten Zellzyklusvariablen p ist eine Lösung der partiellen Differentialgleichung (2.25) nicht erforderlich. Statt dessen kann die Beziehung zwischen m und p verwendet werden.

In ähnlicher Weise kann die Beschreibung für beliebige zellinterne Konzentrationen abgeleitet werden. Für die Konzentration der Speicherstoffe c_T gilt beispielsweise die Beziehung

$$\frac{d}{dt}c_T(t, p) = r_T(t) m(t, p),$$

dabei sind sowohl die Speicherstoffkonzentration als auch die Zellmasse auf die einzelnen Zellen bezogen. Die totale Differentiation führt dann auf die gesuchte Form

$$\frac{\partial c_T(t, p)}{\partial t} + q_p(t, p) \frac{\partial c_T(t, p)}{\partial p} = r_T(t) m(t, p) \quad (2.26a)$$

$$c_T(0, p) = c_{T,i}(p) \quad (2.26b)$$

$$c_T(t, 0) = c_{T,0}(t). \quad (2.26c)$$

Sind nicht die auf die einzelne Zelle bezogenen Angaben erwünscht sondern die in der gesamten Kultur vorliegenden Konzentrationen, so ergeben sich diese durch Multiplikation der entsprechenden bezogenen Größen mit der Zellzahl. Es ist jedoch auch möglich, eigene Differentialgleichungen für diese Größen aufzustellen. So gelingt es zum Beispiel unter Verwendung der Differentialgleichungen (2.24) für die Zellzahl n und (2.25) für die Zellmasse m , die Masse aller Zellen M in Abhängigkeit von Prozeßzeit t und Zellzyklus p anzugeben. Die Gesamtmasse M mit

$$M(t, p) = m(t, p) n_p(t, p)$$

erhält man durch Multiplikation der Zellzahl $n_p(t, p)$ mit der Masse der einzelnen Zelle $m(t, p)$. Der Übersichtlichkeit halber wurde auf die Angabe der Abhängigkeiten von t und p in der folgenden Ableitung verzichtet.

Die Addition der mit m multiplizierten Gleichung (2.24) und der mit n_p multiplizierten Gleichung (2.25) liefert die Differentialgleichung

$$\left(\frac{\partial m}{\partial t} + q \frac{\partial m}{\partial p} \right) n_p + m \left(\frac{\partial n_p}{\partial t} + \frac{\partial (q_p n_p)}{\partial p} \right) = (\mu m) n_p - m (D n_p).$$

Die Gleichung enthält Produkte zwischen m und n beziehungsweise deren erste Ableitungen. Durch Umordnung der Produkte läßt sich eine Differentialgleichungen in M ablesen. Das Zusammenfassen zeitlicher und räumlicher Ableitungen liefert

$$\left(\frac{\partial m}{\partial t} n_p + m \frac{\partial n_p}{\partial t} \right) + \left(\frac{\partial m}{\partial p} (q_p n_p) + m \frac{\partial (q_p n_p)}{\partial p} \right) = \mu m n_p - D m n_p,$$

wobei es möglich ist, die Klammerausdrücke unter Beachtung der Produktregel durch die zeitliche bzw. räumliche Ableitung des Produktes $m n_p$ zu ersetzen. Somit ergibt sich der gesuchte Zusammenhang zu

$$\frac{\partial M}{\partial t} + \frac{\partial (q_p M)}{\partial p} = \mu M - D M \quad (2.27a)$$

$$M(0, p) = m_i(p) n_{p,i}(p) \quad (2.27b)$$

$$M(t, 0) = m_0(t) n_p(t, 0). \quad (2.27c)$$

Diese Gleichung verwendet unter anderem auch [Strässle \(1988\)](#). Zur Berechnung der Masse einer Zelle m bei gegebener Gesamtmasse M und Zelldichte n_p ist allerdings eine Division notwendig. Auch die Bestimmung der Anfangbedingung erfordert eine Division, wenn der Fluß $u_0(t)$ und nicht die Zelldichte $n_p(t, 0)$ vorliegt. Benötigt man alle Größen n_p , m und M , so erweist es sich daher als günstiger, die Differentialgleichung (2.25) für die Masse m einer Zelle zu lösen als die Differentialgleichung (2.27) für die Gesamtmasse M .

Wird die Angabe des Zyklusalters a gewünscht, so ist die folgende partielle Differentialgleichung zu lösen. Das Zyklusalter einer Zelle ergibt sich nach Gleichung (2.9) zu

$$a(t, p) = t - t_0,$$

wobei die Ableitung nach der Zeit stets konstant ist. Es gilt

$$\frac{d}{dt} a(t, p) = 1$$

und somit führt die totale Differentiation nach der Prozeßzeit t und der Zyklusvariablen p auf die partielle Differentialgleichung

$$\frac{\partial a(t, p)}{\partial t} + q_p(t, p) \frac{\partial a(t, p)}{\partial p} = 1 \quad (2.28a)$$

$$a(0, p) = a_i(p) \quad (2.28b)$$

$$a(t, 0) = 0, \quad (2.28c)$$

wobei das Zyklusalter zu Beginn des Zyklus stets null ist. Die Generationszeit $a_T(t)$ der Population ist dann am Ende des Intervalls für $a(t, p = 1)$ ablesbar.

2.2.4.1 Änderung der Zyklusgrenzen

Die in Abschnitt 2.2.4 angegebenen dynamischen Gleichungen gelten für feste Grenzen der Zyklusphasen. Ändern sich die Grenzen einer Zyklusphase, so treten die nachfolgend angegebenen zusätzlichen Terme bei der Berechnung der Zyklusgeschwindigkeit $q_p(t, p)$ auf; diese haben einen Einfluß auf die Verteilungsdichte $n_p(t, p)$.

Als Beispiel dient eine Zyklusphase, die durch die Zellmasse m charakterisiert ist. Die minimale Masse ist dabei mit m_0 und die maximale Masse mit m_1 bezeichnet. Die Zyklusvariable p_m berechnet sich durch Normierung der Zellmasse m auf die Grenzen m_0 und m_1 . Eine Änderung dieser Grenzen führt daher auch zu einem veränderten Zusammenhang zwischen der Masse m und der Zyklusvariablen p . Vergrößert sich bei konstanter Masse m_1 die untere Grenze m_0 , so verschiebt sich die einer konstanten Masse entsprechende Zyklusvariable in Richtung $p = 0$ (siehe Bild 2.8). Es entsteht ein fiktiver, dem durch das Wachstum verursachten Fluß $q_{p,\mu} \geq 0$ entgegengesetzter Fluß $q_{p,v}$. Es ist erforderlich, Gleichung (2.29) um einen Term, der die Änderung von $m_0(t)$ berücksichtigt, zu erweitern. Für die Funktion $p = f(m, m_0)$ gilt nun

$$q_p(t, p) = \frac{dp}{dt} = \frac{df(m, m_0)}{dt} = \underbrace{\frac{\partial f(m, m_0)}{\partial m} \frac{dm}{dt}}_{q_{p,\mu}} + \underbrace{\frac{\partial f(m, m_0)}{\partial m_0} \frac{dm_0}{dt}}_{q_{p,v}}$$

wobei sich für $\frac{dm_0}{dt} = 0$ die bekannte Beziehung für feste Grenzen m_0, m_1 ergibt. Die Zyklusgeschwindigkeit q_p teilt sich auf in einen der Wachstumsrate $\mu(t)$ proportionalen Teil $q_{p,\mu}$ und einen durch die Änderung der Normierung hervorgerufenen fiktiven Fluß $q_{p,v}$. Für die Änderung der oberen Grenze $m_1(t)$ ergibt sich ein entsprechender Term.

Beispiel: Im Falle des in Gleichung (2.31) angenommenen linearen Zusammenhangs $p = f_L(m)$ zwischen Masse m und Zyklusvariable p ergibt sich bei der in Bild 2.8 skizzierten Änderung der unteren Grenze $m_0(t)$ der Fluß zu

$$q_p(t, p) = \underbrace{\left(p - \frac{m_0}{m_1 - m_0} \right) \mu(t)}_{q_{p,\mu}} + \underbrace{\frac{1}{m_1 - m_0} (p - 1) \frac{dm_0}{dt}}_{q_{p,v}}.$$

Der Betrag des Flusses $q_{p,v}$ sinkt proportional zum Anstieg der Zyklusvariablen p . Für $p = 1$ gilt schließlich $q_{p,v} = 0$.

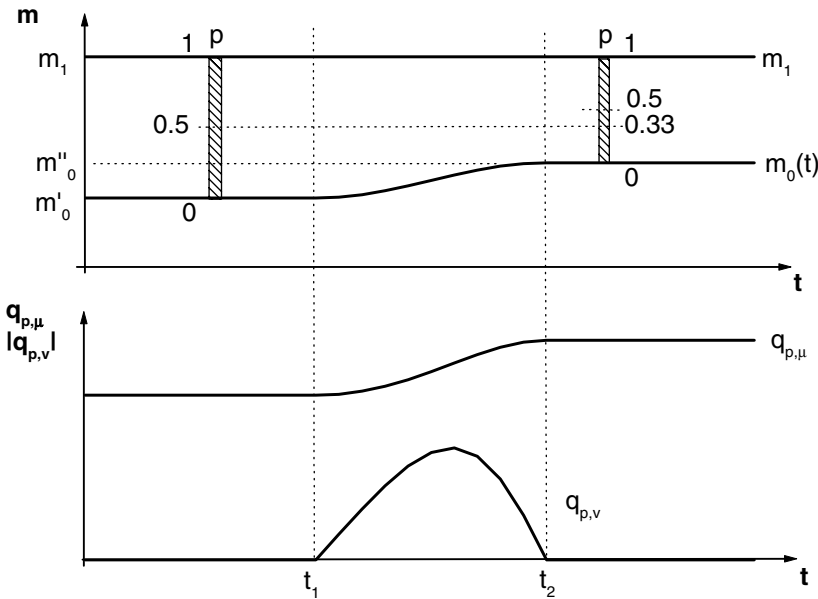


Bild 2.8: Zyklusvariable p und Zyklusgeschwindigkeit $q_p = q_{p,\mu} + q_{p,v}$ bei Änderung der unteren Grenze von $m_0 = m'_0$ auf $m_0 = m''_0$

Nach abgeschlossener Änderung der unteren Grenze von $m_0 = m'_0$ auf $m''_0 > m'_0$ gilt wiederum $\frac{dm_0}{dt} = q_{p,v} = 0$. Die Wachstumsgeschwindigkeit $q_{p,\mu}$ ist jedoch auf

$$q_{p,\mu}(t, f_L(m)) = \frac{m}{m_1 - m''_0} \mu(t) > \frac{m}{m_1 - m'_0} \mu(t)$$

angestiegen, da die Zellen den Zellzyklus bereits mit der größeren Zellmasse m''_0 beginnen. ■

2.2.4.2 Kopplung mit anderen Modellteilen

Das Zyklusmodell ist in das Populationsmodell eingebettet. Das den Zellzyklus charakterisierende Zyklusalter der Zellen steigt an und nach der Teilung beginnen zwei neue Zellen einen weiteren Zellzyklus. In der Regel ist es jedoch erforderlich, neben dem Zyklusalter auch das genealogische Alter der Zellen zu berücksichtigen. In diesem Fall teilt sich die Gesamtzahl der Zellen in mehrere Klassen auf. Jede dieser Klassen erfordert eine unabhängige Berechnung des Zellzyklus. Neben der Zellverteilung können auch einzelne Modellparameter von einer Klasse zur nächsten voneinander abweichen. Zu welcher Klasse eine Zelle nach vollendetem Zyklus gehört, wird schließlich durch das Populationsmodell festgelegt. Die Kopplung zu dem in Abschnitt 2.3 vorgestellten Populationsmodell findet also durch den Zufluß $u_0(t)$ bzw. den Abfluß $q(t, 1)n(t, 1) = u_1(t)$ statt.

Die Wachstumsrate μ bzw. die weiteren Stoffwechselraten, wie z.B. r_T , hängen vom Nährstoffangebot ab. Das im Abschnitt 2.4 vorgestellte Stoffwechselmodell beschreibt die bei den jeweiligen Umgebungsbedingungen möglichen Reaktionsraten. Die Rückwirkung auf die Umgebungsbedingungen erfolgt durch die Aufnahme bzw. die Produktion von Substraten und Produkten sowie der Biomasse. Hierzu ist in der Regel eine Integration über die

verteilten Größen des Zyklusmodells notwendig. Für den Bioreaktor stellt das im Anhang A.2 dargestellte Reaktormodell eine gute Approximation der Umgebungsbedingungen dar.

Durch die Zellmasse, den Speicherstoffgehalt und weitere Größen ist es möglich, beobachtete morphologische Eigenschaften der Zellen in die Modellrechnung aufzunehmen. Die eingeführte Zyklusvariable erfordert gleichzeitig eine Erweiterung des Stoffwechselmodells, da zusätzliche Angaben für die Berechnung notwendig sind. Hierbei handelt es sich beispielsweise um die Anfangszellmasse $m_i(t)$. Desweiteren ist hier die Zyklusgeschwindigkeit $q(t, p)$ festzulegen. Dies kann beispielsweise durch eine Verknüpfung von Zyklus und Zellmasse geschehen. Dabei charakterisiert die Funktion $p = f(m)$ den Zykluszustand p in Abhängigkeit der Masse m . Sie ist monoton wachsend mit den Randbedingungen $p(m = m_0) = 0$ für die untere und $p(m = m_1) = 1$ für die obere Grenze. Durch die feste Abhängigkeit zwischen Masse und Zellzyklus ist auch die Zyklusgeschwindigkeit q_p eindeutig bestimmt. Nach Gleichung (2.5) gilt

$$q_p(t, p) = \frac{dp}{dt} = \frac{df(m)}{dt} = \frac{\partial f(m)}{\partial m} \frac{dm}{dt}. \quad (2.29)$$

Die beiden nachfolgenden Beispiele dienen zur Erläuterung möglicher Funktionen $f(m)$.

Beispiel: Es gelte der lineare Zusammenhang $p := f_L(m)$ entsprechend

$$f_L(m) = \frac{m - m_0}{m_1 - m_0} \quad \text{für } m_0 \leq m \leq m_1 \quad (2.30)$$

mit der minimalen Masse m_0 und der maximalen Masse m_1 . Eingesetzt in Gleichung (2.29) ergibt sich unter Verwendung von Gleichung (2.17) die Beziehung

$$q_p(t, p) = \left(p - \frac{m_0}{m_1 - m_0} \right) \mu(t), \quad (2.31)$$

die einen Zusammenhang zwischen der Zyklusgeschwindigkeit und der Wachstumsrate herstellt. Bei einer linearen Abhängigkeit zwischen der Zyklusvariablen und der Zellmasse steigt also die Wachstumsgeschwindigkeit mit zunehmender Zyklusvariable an. ■

Beispiel: Nimmt die Masse exponentiell im Verlauf des Zellzyklus mit

$$m = m_0 \left(\frac{m_1}{m_0} \right)^p \quad (2.32)$$

zu, so gilt der Zusammenhang $p := f_E(m)$ entsprechend

$$f_E(m) = \frac{\ln \frac{m}{m_0}}{\ln \frac{m_1}{m_0}} \quad \text{für } m_0 \leq m \leq m_1$$

und führt im Gegensatz zum ersten Beispiel auf eine von der Zyklusvariablen p unabhängige Wachstumsgeschwindigkeit

$$q_p(t, p) = \frac{1}{\ln \frac{m_1}{m_0}} \mu(t),$$

hat aber eine aufwendigere Berechnung des Zusammenhanges zwischen der Masse und der Zyklusvariablen zur Folge. ■

In gleicher Weise kann der Zellzyklus durch

$$q_a = \frac{1}{T}$$

auf eine konstante Zeit T festgelegt werden. In diesem Fall ist die Zellmasse mit Hilfe der Differentialgleichung (2.25) zu berechnen.

Die vorgestellten Möglichkeiten zur Definition des Zellzykluszustands finden im Stoffwechselmodell in Abschnitt 2.4 Verwendung.

2.3 Populationsmodell

Das Populationsmodell faßt Zellen mit ähnlichen Eigenschaften in Klassen zusammen. Die Klasseneinteilung orientiert sich dabei am genealogischen Alter der Zellen. Hierbei ist das genealogische Alter i als die Anzahl der von einer Zelle vollständig durchlaufenen Zellzyklen zu verstehen. Mit dem Ende des Zellzyklus einer Zelle entsteht eine neue Tochterzelle mit dem genealogischen Alter $i = 0$, während das Alter der Mutterzelle sich um eins erhöht. Sowohl die Tochterzelle wie auch die Mutterzellen gehören nach der Teilung in der Regel einer anderen Klasse an als die ursprüngliche Zelle. Das Populationsmodell beschreibt diesen Wechsel zwischen den Klassen für alle Zellen.

Das Populationsmodell weist damit, wie auch schon das Zellzyklusmodell, eine größere Komplexität auf, als das in Abschnitt 2.1 vorgestellte einfache Wachstumsmodell. Das drückt sich durch die in den Modellen eingeführten Abhängigkeiten der Biomasse vom Zykluszustand und dem genealogischen Alter aus. Die Berechnung des Wachstums in Abhängigkeit vom Zykluszustand erfordert, wie in Abschnitt 2.2 gezeigt, die Lösung einer partiellen Differentialgleichung erster Ordnung. Das genealogische Alter ist im Gegensatz zum Zellzykluszustand eine ganzzahlige Variable. Die Anzahl der Klassen ist zusätzlich in realen Anwendungen auf einige wenige Klassen beschränkt. Für jede dieser Klassen ist der Zellzyklus separat zu berechnen. Entsprechend der Anzahl der unterschiedenen Klassen vervielfacht sich die Zahl der zu lösenden Differentialgleichungen. Es ist jedoch nicht notwendig, eine partielle Differentialgleichung mit zwei unabhängigen Variablen, nämlich dem Zellzyklus und dem genealogischen Alter, zu lösen.

Das einfachste Populationsmodell enthält nur eine einzige Klasse. Nach der Teilung beginnen alle Zellen den Zellzyklus erneut in derselben Klasse. Dieses Modell ist nur sinnvoll für die Teilung einer Zelle in gleiche Teile. Das einfachste Modell, das eine ungleichmäßige Teilung berücksichtigt, unterscheidet mindestens je eine Klasse von Tochter- und Mutterzellen. In diesem Zwei-Klassen-Modell haben sich die Tochterzellen noch nicht geteilt ($i = 0$); eine Mutterzelle hat sich bereits mindestens einmal geteilt ($i \geq 1$). Zellen, die sich bereits häufiger geteilt haben, gehören im Zwei-Klassen-Modell ebenfalls der Mutterklasse an. Die beiden Klassen sind also gekennzeichnet durch $i \in \{0, 1\}$ und werden mit den Indizes D und P bezeichnet. In einem geschlossenen System ist es notwendig, daß Zellen mit mehr als einer Teilung ebenfalls der Mutterklasse angehören.

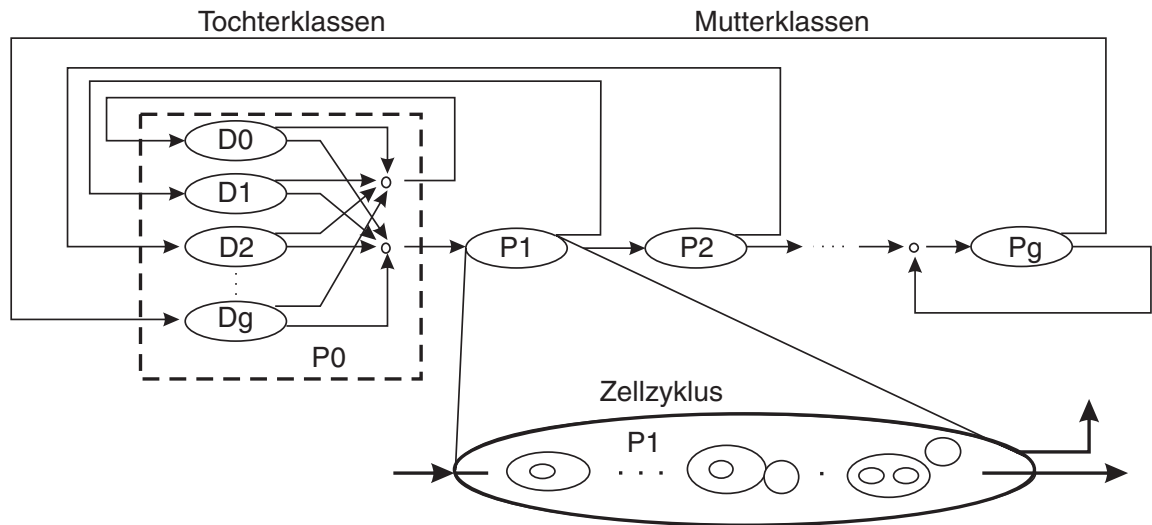


Bild 2.9: Genealogisches Modell einer Zellpopulation mit g Mutter- (P_i) und $g + 1$ Tochterklassen (D_i). Ein vollständiger Zellzyklus ist in einem Oval zusammengefaßt (Grover und Woldringh, 1995)

Zur expliziten Berücksichtigung von Zellen höheren Alters in jeweils einer eigenen Klasse, läßt sich das Modell beispielsweise bis zu einem maximalen Alter g erweitern. Die $g + 1$ Klassen $i = 0$ bis g enthalten dann die Zellen mit dem entsprechenden genealogischen Alter (Anzahl der Zellzyklen). Sie werden durch die Indizes P_0 bis P_g gekennzeichnet, wobei P_0 hier synonym zu D für die Tochterklasse verwendet wird. Durch Teilung einer Zelle des Alters i entstehen jeweils eine Tochterzelle der Klasse $i = 0$ und eine Mutterzelle der Klasse $\min(i + 1, g)$. Das heißt auch hier wird die Klasse der ältesten Zellen mit $i = g$ nicht mehr verlassen. Der Prozeß des genealogischen Alterns ist in Bild 2.9 dargestellt. Experimentell ist es möglich, das Alter der Mutterzellen durch Anfärbung der bei der Teilung entstandenen Sprossungsnarben auf der Zellwand zu bestimmen (siehe Bild 1.1 auf Seite 22).

Nach dem bisher gesagten, gehören alle Tochterzellen unabhängig von ihrer Herkunft zur Klasse $i = 0$. Eine zusätzliche Unterteilung der Tochterzellen nach ihrer Herkunft gelingt durch die Einführung des Alters der Mutterzelle j einer Tochterzelle. Die Klasse der Tochterzellen P_0 bzw. D wird auf diese Weise durch $g + 1$ Tochterklassen D_0 bis D_g ersetzt. Diese genealogisch nützliche Klasseneinteilung ist experimentell nicht aus den Sprossungsnarben abzuleiten, da die Zahl der Sprossungsnarben für alle Tochterklassen unabhängig von ihrer Herkunft $i = 0$ gilt. Bei der Teilung einer Mutterzelle mit i Narben entsteht eine Zelle der Tochterklasse $j = i$. Nach einem weiteren Zellzyklus entstehen aus dieser Tochterzelle der Klasse j eine Zelle der Tochterklasse $j = 0$ und eine Zelle der Mutterklasse $i = 1$. Da die Zellen aller Tochterklassen keine Narbe aufweisen, faßt man die Sproßzellen aller Tochterklassen in der Tochterklasse $j = 0$ zusammen. Die entsprechende Klassenstruktur ist in Bild 2.9 dargestellt.

Auch in dem erweiterten Modell kommt man um die Zusammenfassung von Zellen verschiedener Herkunft nicht herum. Eine weitere Differenzierung ist zwar denkbar, jedoch nicht unbedingt zweckmäßig. Ziel der Modellbildung ist vielmehr, die Struktur der Population mit möglichst wenigen Klassen aber so vielen Klassen wie nötig zu charakteri-

sieren. Konsequenterweise werden Klassen mit gleichen Eigenschaften zu einer einzigen Klasse zusammengefaßt. Die Anzahl der zu berücksichtigenden Klassen hängt hierbei von der Fragestellung ab. Lord und Wheals (1980) und Thompson und Wheals (1980) haben beispielsweise bei der Untersuchung der Generationszeiten in asynchroner Kultur herausgefunden, daß bei ihren Experimenten die Unterscheidung von zwei Klassen ausreichend ist.

Im Rahmen dieser Arbeit liegt das erweiterte Populationsmodell zugrunde, das auf den oben geschilderten Überlegungen für Mutter- und Tochterzellen basiert. Dies ist notwendig, um die erforderliche Struktur für die jeweilige Anwendung beurteilen zu können. Im folgenden Abschnitt werden die allgemeinen Modellgleichungen vorgestellt.

2.3.1 Modellgleichungen

Die folgende Betrachtung gilt dem allgemeinen von Grover und Woldringh (1995) vorgeschlagenen genealogischen Modell. Wie in Bild 2.9 skizziert, unterscheidet das Modell zwischen Mutter- und Tochterzellen, wobei letztere ebenfalls durch das Alter der Mutterzellen charakterisiert werden.

Der Zellzyklus endet mit der Teilung einer Zelle in Mutter- und Tochterzelle. Aufgrund der unsymmetrischen Teilung gehören diese beiden Zellen anschließend verschiedenen Klassen an. Jede Zellklasse ist durch eine Zelldichte $n_i(t, p)$ charakterisiert, wobei $i \in \{Dj, Pi\}$ hier die Indizes aller Zellklassen des Populationsmodells bezeichnet. Zur Berechnung der Zellverteilung jeder Klasse ist die Lösung der Differentialgleichung (2.6) erforderlich (Seite 35). Der Übergang der Zellen nach der Teilung aus ihrer bisherigen Klasse in eine neue Klasse wird durch die Randbedingungen des Zyklusmodells in Gleichung (2.6c) beschrieben. Der Zufluß $u_{i,0}(t)$ einer Klasse i mit

$$u_{i,0}(t) = q_i(t, 0)n_i(t, 0) = \sum_j a_{i,j} q_j(t, 1)n_j(t, 1) \quad (2.33)$$

ist darstellbar in Form einer gewichteten Summe über die Teilungsrate aller Klassen j des Modells. Der Koeffizient $a_{i,j}$ ist genau dann eins, wenn die bei der Teilung einer Zelle der Klasse j entstandene Mutter- oder Tochterzelle im nächsten Zellzyklus der Klasse i angehört. In allen anderen Fällen gilt $a_{i,j} = 0$.

Im folgenden wird die Abkürzung

$$u_i(t, p) = q_i(t, p)n_i(t, p) \quad (2.34)$$

eingeführt, wobei $u_i(t, p)$ den Zellfluß der Klasse i im Zellzyklus bezeichnet. Gleichung (2.33) läßt sich dann schreiben als

$$u_i(t, 0) = \sum_j a_{i,j} u_j(t, 1). \quad (2.35)$$

Der Fluß u_i bezeichnet dabei nur den Fluß in einer Klasse i . Das System aller Klassen läßt sich allgemein durch eine Vektorgleichung formulieren. Hierzu wird die quadratische

Matrix $\mathbf{A} = \{a_{i,j}\}$ und der Vektor $U(t, p) = [\dots u_i(t, p) \dots]^T$ definiert. Die Randbedingungen für alle Klassen des Populationsmodells lassen sich dann ausdrücken durch die Gleichung

$$U(t, 0) = \mathbf{A} U(t, 1), \quad (2.36)$$

wobei die Spaltenvektoren den Fluß u_i aller Klassen des Systems enthalten.

Zunächst sei das Zwei-Klassen-Modell bestehend aus einer Mutterklasse P und einer Tochterklasse D betrachtet. Für die beiden Klassen i mit $i \in \{D, P\}$ gelten die Randbedingungen

$$\begin{aligned} u_D(t, 0) &= u_D(t, 1) + u_P(t, 1) \\ u_P(t, 0) &= u_D(t, 1) + u_P(t, 1) \end{aligned}$$

für den Zellfluß in die Klassen. Der zugehörige Spaltenvektor $U(t, p)$ mit

$$U(t, p) = \left[\begin{array}{c|c} u_D(t, p) & u_P(t, p) \end{array} \right]^T$$

enthält zwei Elemente, wobei der senkrechte Strich dabei den Fluß in Mutter- und Tochterklasse trennt. Mit Hilfe der Vektorschreibweise ergibt sich die Bilanzgleichung des Zwei-Klassen-Modells zu

$$U(t, 0) = \left[\begin{array}{c|c} 1 & 1 \\ \hline 1 & 1 \end{array} \right] U(t, 1).$$

Die Matrix $\mathbf{A} = \{a_{i,j}\}$ ist in diesem Fall voll besetzt, da, unabhängig von der zugehörigen Klasse, bei der Teilung immer eine Mutter- und eine Tochterzelle entstehen. Es ist zu erkennen, daß die erste Zeile der Matrix \mathbf{A} die Zuflüsse in die Tochterklasse, die zweite Zeile entsprechend die Zuflüsse in der Mutterklasse kennzeichnen. In der ersten Spalte ist die Zugehörigkeit einer ehemaligen Zelle der Tochterklasse nach Ende eines Zellzyklus abzulesen. Die zweite Spalte gilt für die Mutterzellen. Auch für Modelle mit mehreren Klassen teilt sich die Matrix \mathbf{A} für Mutter- und Tochterzellen in vier Quadranten.

Im erweiterten Populationsmodell werden die Mutterzellen in Klassen mit steigendem genealogischen Alter, das heißt mit zunehmender Anzahl durchlaufener Zyklen, aufgeteilt. Die jüngsten Zellen, die Tochterzellen, unterscheiden sich untereinander zusätzlich aufgrund des Alters ihrer jeweiligen Mutterzelle. Bei g unterschiedlichen Mutterklassen P_1 bis P_g resultieren hieraus $g + 1$ Tochterzellklassen D_0 bis D_g . Nach Vollendung des ersten Zellzyklus werden die Tochterzellen nicht weiter unterschieden. Es sei angenommen, daß diese nun dieselben Eigenschaften aufweisen. Die Summe über alle Tochterzellklassen ist daher definiert als Klasse P_0 mit

$$u_{P_0}(t, p) = \sum_{j=0}^g u_{D_j}(t, p) \quad (2.37)$$

bestehend aus allen Zellen, die sich im ersten Zellzyklus befinden und keine Sprossungsnahe aufweisen.

Mit dieser Abkürzung läßt sich das genealogische Reifen der $g + 1$ Tochterzellklassen D_j durch die Gleichungen

$$\begin{aligned}
 u_{D_0}(t, 0) &= u_{P_0}(t, 1) \\
 u_{D_1}(t, 0) &= u_{P_1}(t, 1) \\
 &\vdots \\
 u_{D_j}(t, 0) &= u_{P_j}(t, 1) \\
 &\vdots \\
 u_{D_{(g-1)}}(t, 0) &= u_{P_{(g-1)}}(t, 1) \\
 u_{D_g}(t, 0) &= u_{P_g}(t, 1)
 \end{aligned} \tag{2.38a}$$

und das der g Mutterzellklassen durch die Gleichungen

$$\begin{aligned}
 u_{P_1}(t, 0) &= u_{P_0}(t, 1) \\
 u_{P_2}(t, 0) &= u_{P_1}(t, 1) \\
 u_{P_3}(t, 0) &= u_{P_2}(t, 1) \\
 &\vdots \\
 u_{P_i}(t, 0) &= u_{P_{(i-1)}}(t, 1) \\
 &\vdots \\
 u_{P_{(g-1)}}(t, 0) &= u_{P_{(g-2)}}(t, 1) \\
 u_{P_g}(t, 0) &= u_{P_{(g-1)}}(t, 1) + u_{P_g}(t, 1)
 \end{aligned} \tag{2.38b}$$

ausdrücken. Zu Beginn des Zellzyklus ist die Summe der Tochterzellen hierbei stets identisch der Summe der Mutterzellen

$$\sum_{j=0}^g u_{D_j}(t, 0) = \sum_{j=0}^g u_{P_j}(t, 1) = \sum_{i=1}^g u_{P_i}(t, 0).$$

Mit Hilfe des Vektors der Zellflüsse u_i

$$U = [u_{D_0} \ \cdots \ u_{D_g} \mid u_{P_1} \ \cdots \ u_{P_g}]^T$$

ist es möglich, die quadratische Matrix $\mathbf{A} = \{a_{i,j}\}$ aus $\mathbb{R}^{2g+1 \times 2g+1}$ als

$$\mathbf{A} = \left[\begin{array}{c|ccc} \hline 1 & \cdots & 1 & 0 & \cdots & 0 & 0 \\ \hline \mathbf{0} & & & \mathbf{I} & & & \\ \hline 1 & \cdots & 1 & 0 & \cdots & 0 & 0 \\ \hline \mathbf{0} & & & \mathbf{I} & & \vdots & \\ & & & & & 0 & \\ & & & & & 1 & \\ \hline \end{array} \right] \left. \begin{array}{l} \vphantom{\left[\right.} \right\} g+1 \\ \vphantom{\left[\right.} \right\} g \end{array} \right.$$

$\underbrace{\hspace{10em}}_{g+1} \quad \underbrace{\hspace{10em}}_g$

anzugeben. Die Matrix teilt sich wieder in vier Untermatrizen für die Tochter- und Mutterklassen. In der Matrix ist zu erkennen, daß die Summe der Tochterzellen hier ausschließlich in die Mutter-Klasse $P1$ und die Tochter-Klasse $D0$ münden, da in den linken $g + 1$ Spalten jeweils nur die Zeilen für die erste Mutter- und Tochterklasse besetzt sind. Die Matrizen \mathbf{I} sind hierbei Einheitsmatrizen mit der Ordnung g bzw. $g - 1$ und die Matrizen $\mathbf{0}$ stellen jeweils rechteckige Nullmatrizen aus $\mathbb{R}^{g \times g+1}$ bzw. aus $\mathbb{R}^{g-1 \times g+1}$ dar. Die Einheitsmatrix oben links kennzeichnet den Übergang der Sproßzellen aus der Mutterklasse i in die Tochterklasse $j = i$. Die Spur der unteren Einheitsmatrix liegt in der Nebendiagonalen der Teilmatrix unten links, da das Alter der Mutterzellen mit jeder Sprossung zunimmt. Die Zellen der ältesten Klasse bleiben schließlich in derselben Klasse.

Mit Hilfe der in den Abschnitten 2.2 und 2.3 eingeführten Gleichungen ist es möglich, das Wachstum einer Kultur von Mikroorganismen unter Berücksichtigung von Zellzyklus und genealogischem Alter zu beschreiben. Diese Modellgleichungen stellen den Kern des Zellzyklus- und Populationsmodells dar. Für die Beschreibung spezieller biologischer Organismen ist zusätzlich die Kenntnis der Kopplung von Wachstumsrate und Umgebungsbedingungen notwendig. Der folgende Abschnitt stellt daher ein Stoffwechselmodell vor. Desweiteren werden Werte für die biologischen Parameter in allen Modellteilen angegeben.

2.4 Stoffwechselmodell

Die in den Abschnitten 2.2 und 2.3 vorgestellten Modelle des Zellzyklus und der Populationsstruktur erlauben eine detaillierte Beschreibung des Wachstums von Mikroorganismen. Mit der dort eingeführten Erweiterung bezüglich der Variablen für das Zyklusalter und das genealogische Alter steigt jedoch auch der Aufwand, den Zusammenhang zwischen Wachstum und Stoffwechsel herzustellen. Beim einfachen kinetischen Wachstumsmodell in Abschnitt 2.1 war die Wachstumsrate lediglich eine Funktion der Zeit. Die Wachstumsrate im erweiterten Modell berücksichtigt zusätzlich den Zellzyklus und das genealogische Alter. Darüber hinaus hängen weitere Modellparameter, wie zum Beispiel die minimale bzw. maximale Masse zu Beginn und Ende des Zyklus oder das Teilungsverhältnis zwischen Mutter- und Tochterzellen von den Umgebungsbedingungen ab. Zur Beschreibung der Wachstumsrate sind neben den primären Substraten auch Speicherstoffe zu berücksichtigen. Diese können, wie beispielsweise Trehalose oder Ethanol, zellintern oder -extern vorliegen.

Bild 2.10 dient dazu, die Verbindung des Zellzyklus- und Populationsmodells mit dem strukturierten Stoffwechselmodell sowie deren Beziehung zum Reaktormodell schematisch darzustellen. Ziel der Betrachtung ist, die Gesamtbiomasse entsprechend dem genealogischen Alter und dem Zellzykluszustand der Zellen aufzuteilen. Die Unterscheidung mehrerer genealogischer Klassen im Populationsmodell führt auf ein wesentlich komplexeres Stoffwechselmodell. Ist der Stoffwechsel zweier Zellklassen identisch, so kann man die Klassen zusammenfassen, was die genealogische Klassenstruktur vereinfacht.

Die Wachstumsrate hängt von einer großen Zahl von Einflußgrößen ab. Hierbei handelt es sich beispielsweise um das Substrat- und das Sauerstoffangebot, Zusätze von Aminosäuren oder Spurenelementen zur Nährlösung und Temperatur oder pH -Wert. Eine weitere

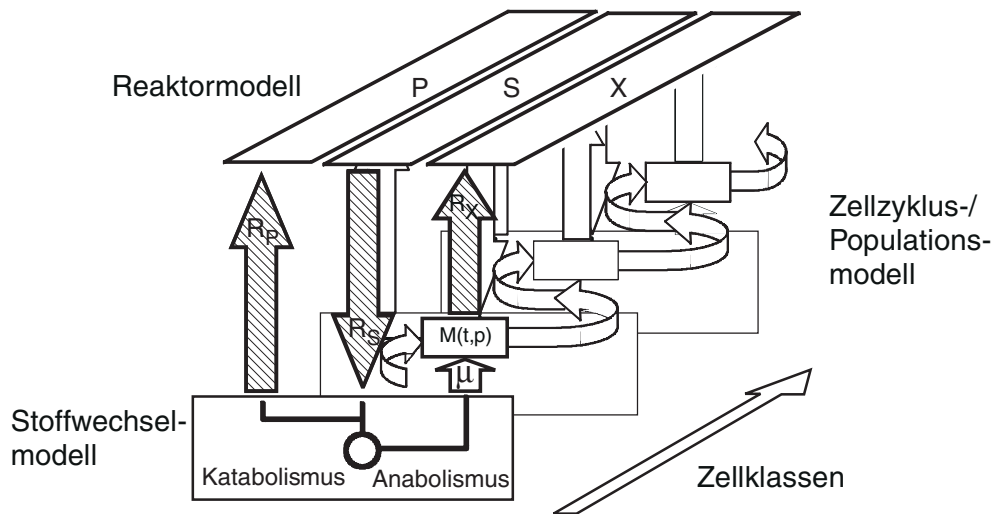


Bild 2.10: Das Populationsmodell führt entsprechend der Anzahl der unterschiedlichen Zellklassen (z.B.: Mutter- und Tochterzellen) zu einer Vervielfachung des Stoffwechselmodells. In der Graphik bezeichnet S Substrat, P Produkt und X Biomasse, sowie R_S die Aufnahme- und R_X und R_P die Produktionsraten. Die Einführung einer Verteilungsdichtefunktion $M(t, p)$ statt der Gesamtbiomasse X ermöglicht es, Zellzyklusereignisse im Modell zu berücksichtigen. Die Wachstumsrate $\mu(t, p)$ hängt ebenfalls vom Zellzyklus ab. Nach vollständig durchlaufenem Zellzyklus teilen sich die Zellen und gehen in eine ihrem Alter entsprechende Zellklasse über

wichtige Einflußgröße ist der biologische Stamm des ausgewählten Organismus. Da die zu betrachtenden Einflußgrößen von derart großer Zahl sind, behilft man sich in der Regel mit sogenannten Standardbedingungen. Die Standardbedingungen können durch einen diskreten Wert oder durch ein zulässiges Intervall einer Prozeßgröße gekennzeichnet sein. Handelt es sich um ein Intervall, dann gilt stets, daß innerhalb der angegebenen Grenze keine signifikante Veränderung des Systemverhaltens zu beobachten ist. Durch die starke Abhängigkeit des Wachstums von den genannten Umgebungsbedingungen ist eine Vergleichbarkeit zwischen Experimenten, denen nicht dieselben Standardbedingungen zu Grunde liegen, bestenfalls qualitativ möglich.

Die Synthese von Zellmaterial steht am Ende einer langen Kette von enzymatisch gesteuerten Reaktionen in einem biochemischen Stoffwechselnetz. Die wesentlichen biochemischen Stoffwechselwege des Organismus *S. cerevisiae* sind bekannt. Bellgardt (1984) verwendete ein vereinfachtes stationäres Stoffwechselnetz, das die für das Wachstum der Hefe wichtigsten Stoffwechselfade enthält. Diese ermöglichen es, die Zerlegung der wichtigsten Substrate, Glucose und Ethanol, zu beschreiben. Dabei ist die Wachstumsrate an die katabolen Flüsse im Netz gekoppelt. Gegenüber einem auf Ertragskoeffizienten basierenden Modell weist das Stoffwechselnetz den Vorteil auf, leichter auf weitere Substrate erweiterbar zu sein. Dies ist möglich, da der Abbau anderer Substrate sich häufig ebenfalls über die im Modell enthaltenen zentralen Stoffwechselwege vollzieht. Die Eigenschaften der Hauptstoffwechselwege sind in der Regel übertragbar. Eine begrenzte Kapazität einzelner enzymatischer Schritte im Stoffwechselnetz, wie z.B. die respiratorische Kapazität, gelten in der Regel für alle Substrate.

Jeder Zellzyklus teilt sich in die in Abschnitt 1.1 beschriebenen Zyklusphasen. Es ist da-

von auszugehen, daß während des gesamten Zellzyklus dieselbe enzymatische Ausstattung in der Zelle vorhanden ist. Das heißt, sowohl in der durch Massenzunahme gekennzeichneten G_1 -Phase als auch während der Umstrukturierung in der S -Phase liegt dasselbe Stoffwechselnetz zugrunde. Die Flüsse in den einzelnen Reaktionen sind jedoch vermutlich unterschiedlich. Der nachfolgende Abschnitt 2.4.1 ist dem zugrunde liegenden Stoffwechselnetz gewidmet. Es schließt sich die Regulation der Flüsse im Stoffwechselnetz in Abschnitt 2.4.2 und die Kopplung der zwischen Stoffwechselnetz und Zellzyklus bzw. genealogischem Alter in Abschnitt 2.4.3 an.

In zunehmenden Maße finden genetisch definierte bzw. veränderte Organismen für die Analyse in der kontinuierlichen Kultur Verwendung. Im Rahmen der fortschreitenden Analyse der Verknüpfung zwischen genetischer Information und physiologischer Funktion ist es wünschenswert, das Wachstum dieser Organismen zu untersuchen. Als Seiteneffekt der genetischen Manipulation sind die Organismen aufgrund fehlender enzymatischer Schritte in der Biosynthese nicht in der Lage, einige essentielle Aminosäuren zu synthetisieren. Um dennoch diese Organismen verwenden zu können, müssen diese Aminosäuren der Nährlösung hinzugefügt werden. Die Hefe kann diese komplexen Bausteine direkt zum Aufbau der Biomasse verwenden. Ein Teil der normalerweise zur Synthese aufzuwendenden Energie und Bausteine wird in diesem Fall nicht benötigt: Die Folge davon ist eine größere Ausbeute bezogen auf das eigentliche Substrat. Andere Zusätze in der Nährlösung, wie z.B. Hefeextrakt, enthalten ebenfalls komplexe Bausteine, die der Zelle die Synthese der Biomasse erleichtern. Will man ein Modell für einen größeren Bereich von Umgebungsbedingungen erstellen, das komplexe Bausteine in der Nährlösung berücksichtigt, so sind auch die Pfade des anabolen Stoffwechsels mit in das Stoffwechselnetz aufzunehmen. Abschnitt 2.4.1 führt ein derartiges Stoffwechselnetzwerk ein, das auf den in Cortassa et al. (1995) enthaltenen Angaben zur Zusammensetzung der Biomasse basiert.

Der Stoffwechsel der Zellen in allen Zyklusphasen und Umgebungsbedingungen genügt stets gewissen Randbedingungen. Bei vollständiger Bilanzierung des elementaren Stoffumsatzes dürfen beispielsweise keine Fehlbeträge in den Stoffströmen der beteiligten chemischen Elemente auftreten. Mengenmäßig am stärksten beteiligt sind dabei die Elemente Kohlenstoff (C), Wasserstoff (H), Stickstoff (N) und Sauerstoff (O). Die sogenannte CHNO-Bilanz kann verwendet werden, die Meßwerte auf Meßfehler aufzuspüren bzw. auszugleichen (Heijden et al., 1994a,b,c). Dies kann zur Erhöhung der Güte der Messung der Prozeßparameter verwendet werden. Darüber hinaus ist eine Aussage möglich, ob alle relevanten Reaktionsprodukte berücksichtigt wurden.

2.4.1 Katabole und anabole Stoffwechselffade

Beim Stoffwechsel von Mikroorganismen unterscheidet man zwischen Katabolismus und Anabolismus. Der katabole Stoffwechsel zerlegt zunächst die komplexen Kohlenstoffquellen in einfachere Verbindungen und dient der Energiegewinnung. Der Organismus *S. cerevisiae* ist beispielsweise in der Lage, Glucose, Glycerin, Pyruvat, Lactat, Acetat oder Ethanol zu verwerten (Cortassa et al., 1995). Aus den Zwischen- und Endprodukten des Katabolismus wird im Anabolismus unter Einsatz der gewonnenen Energie die Zellmasse aufgebaut.

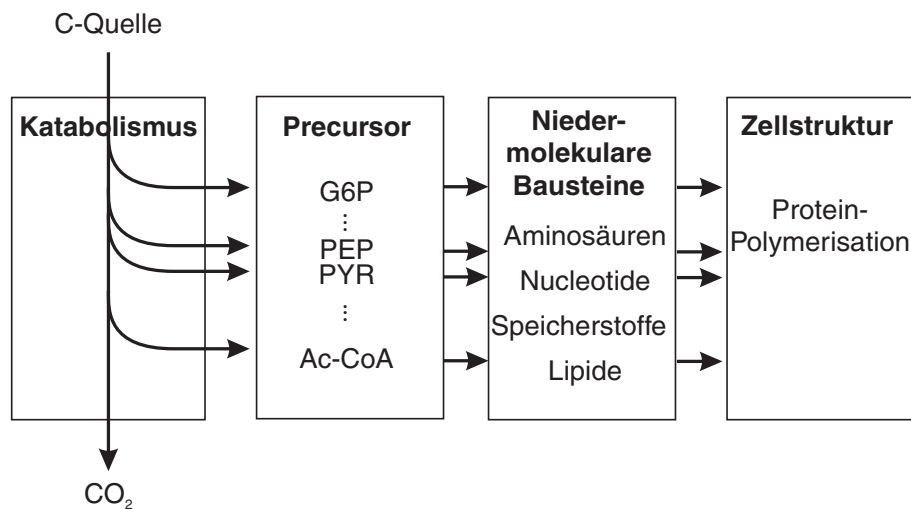


Bild 2.11: Verknüpfung des Katabolismus mit den anabolen Stoffwechselwegen von *S. cerevisiae*. Der Aufbau der Biomasse beginnt mit der Synthese niedermolekularer Bausteine aus Precursor-Elementen des katabolen Stoffwechsels. Die Aminosäuren, Lipide, Nucleotide und Polysaccharide bilden schließlich die funktionalen Einheiten der Zelle (Gottschalk, 1986)

Der Aufbau der Zellmasse geschieht in mehreren Stufen. Bild 2.11 zeigt die Phasen dieses Stoffwechsels. Am Anfang steht die Synthese der Aminosäuren. Diese können auch, falls im Medium vorhanden, von der Zelle direkt aufgenommen werden, wobei auf diese Weise die zur Synthese notwendige Energie eingespart wird. Im Fall genetisch veränderter Zellen, bei denen die Stoffwechselwege zur Synthese einer Aminosäure blockiert sind (auxotrophe Stämme), ist der Zusatz von Aminosäuren stets notwendig.

Der Ertragskoeffizient für das Wachstum der Biomasse unter Verwendung eines Substrates läßt sich häufig nur experimentell bestimmen. Während beispielsweise der Stoffwechselweg zur Zerlegung von Glucose und Ethanol klar durch die Glykolyse und Alkoholdehydrogenase beschrieben ist, fällt es äußerst schwer, die Bildung von Biomasse zu quantifizieren. Bei Verwendung von synthetischen Medien ist es möglich, die Biomasseproduktion an einige wenige, durch die Glykolyse zur Verfügung gestellten Bausteine zu koppeln (Bellgardt, 1984). Zusätze wie Hefeextrakt oder Aminosäuren führen zu einer erheblichen Änderung der Flüsse im Stoffwechselnetz. Will man diese Bestandteile in der Nährlösung berücksichtigen, so ist die Kenntnis der Anteile der Aminosäuren bzw. des Hefeextraktes an der Biomasse notwendig. In Bruinenberg et al. (1983) sind entsprechenden Daten zu finden.

Die in Kapitel 5 vorgestellten Experimente verwenden lediglich die Substrate Glucose, Galactose und Ethanol; als Speicherstoff dient Trehalose. Andere vom Organismus verwertbare Kohlenstoffquellen, wie zum Beispiel Lactat, Acetat oder Glycerin, finden als Substrat keine Beachtung. Ein auf dem biochemischen Stoffwechselnetz beruhendes Modell hat jedoch den Vorteil, das auch diese Substrate leicht in das Modell aufgenommen werden können, da der biochemische Bauplan der Zelle vorhanden ist.

Sind das Stoffwechselnetzwerk einer Zelle sowie die Stoffflüsse über die Zellmembran bekannt, so ist es möglich auf die internen Stoffflüsse zu schließen. Eine eindeutige Lösung für alle unbekannt internen Flüsse läßt sich jedoch nur dann berechnen, wenn die Anzahl

der gemessenen Flüsse der Anzahl der möglichen internen Stoffwechselwege entspricht. Übersteigt die Zahl der Freiheitsgrade im Stoffwechselnetzwerk die Zahl der Messungen, so sind zusätzliche Annahmen über die Regulation der Stoffwechselwege zu treffen. Hierbei sind Energie- und Redoxbilanzen sowie die Kapazitäten der einzelnen enzymatischen Reaktionen zu berücksichtigen. Die für die Modellierung verwendeten Annahmen sind in Abschnitt 2.4.2 zusammengefaßt.

Mit Hilfe von Markierungsexperimenten, in denen jeweils ein bestimmtes Kohlenstoff-Atom des Substrates gekennzeichnet ist, läßt sich der Informationsgehalt der Messungen erhöhen (Marx et al., 1996). Auf diese Weise ist es möglich, nicht nur den Nettofluß einer Reaktion, sondern auch Hin- und Rückreaktion reversibler Reaktionen zu bestimmen. Die in Marx et al. (1996) erzielten Ergebnisse mit dem Organismus *Corynebacterium glutamicum* zeigen, daß durchaus der Nettoflußrichtung entgegengesetzte Flüsse auftreten. Durch den größeren Informationsgehalt dieser Messungen lassen sich ansonsten unerkannte Kreisprozesse detektieren. Nachteil der Markierungsexperimente ist der deutlich höhere meßtechnische Aufwand dieses Verfahrens.

2.4.1.1 Katabolismus

Das Modell des Katabolismus beinhaltet ein an den katabolen Hauptstoffwechselwegen des Organismus orientiertes quasistationäres Stoffwechselnetzwerk. Bild 2.12 zeigt ein erweitertes Schema dieser Stoffwechselwege des Organismus *S. cerevisiae*. Um die Reaktanden zu berücksichtigen, die als Precursor Eingang in den anabolen Stoffwechsel finden, ist das erweiterte Netzwerk stärker an den Einzelschritten orientiert als das von Bellgardt (1984) vorgestellte Netz. Bei den Precursor handelt es sich im Modell um die Stoffe Ribose-5-P (R5P), Erythrose-4-P (E4P) des Pentose-Phosphat-Weges sowie Glucose-6-P (G6P), 3-P-Glycerat (3PG), Phosphoenolpyruvat (PEP) und Pyruvat (PYR) aus der Glykolyse und den Stoffen Acetyl-CoA (AcCoA), α -Ketoglutarat (aKG) und Oxalacetat (OAA) des Tricarbonsäure-Zyklus. Diese Metabolite werden dem katabolen Stoffwechsel in dem Maße entzogen, wie diese zum Aufbau der niedermolekularen Monomere erforderlich sind. Tabelle 2.2 auf Seite 68 enthält die im Modell berücksichtigten Monomere und gibt gleichzeitig ihren Anteil an der Biomasse an.

Mit Hilfe des in Bild 2.12 dargestellten Stoffwechselnetzes sowie der Kenntnis der für die jeweiligen Monomere benötigten Precursor gelingt es, die Gleichungen des vereinfachten katabolen Stoffwechselnetzes aufzustellen. Das Netz läßt sich in die folgenden Schritte unterteilen:

1. Aufnahme von C_6 -Substraten

$$r_{hex} + r_{thp} = r_{pgi} + r_{g6d} + r_{ch};$$

2. Pentose-Phosphat-Weg

$$\begin{aligned} r_{g6d} &= r_{tal} + r_{ATP} + r_{CTP} + r_{GTP} + r_{UTP} + 2 r_{his} + r_{trp}, \\ r_{tal} &= r_{phe} + r_{trp} + r_{tyr}; \end{aligned}$$

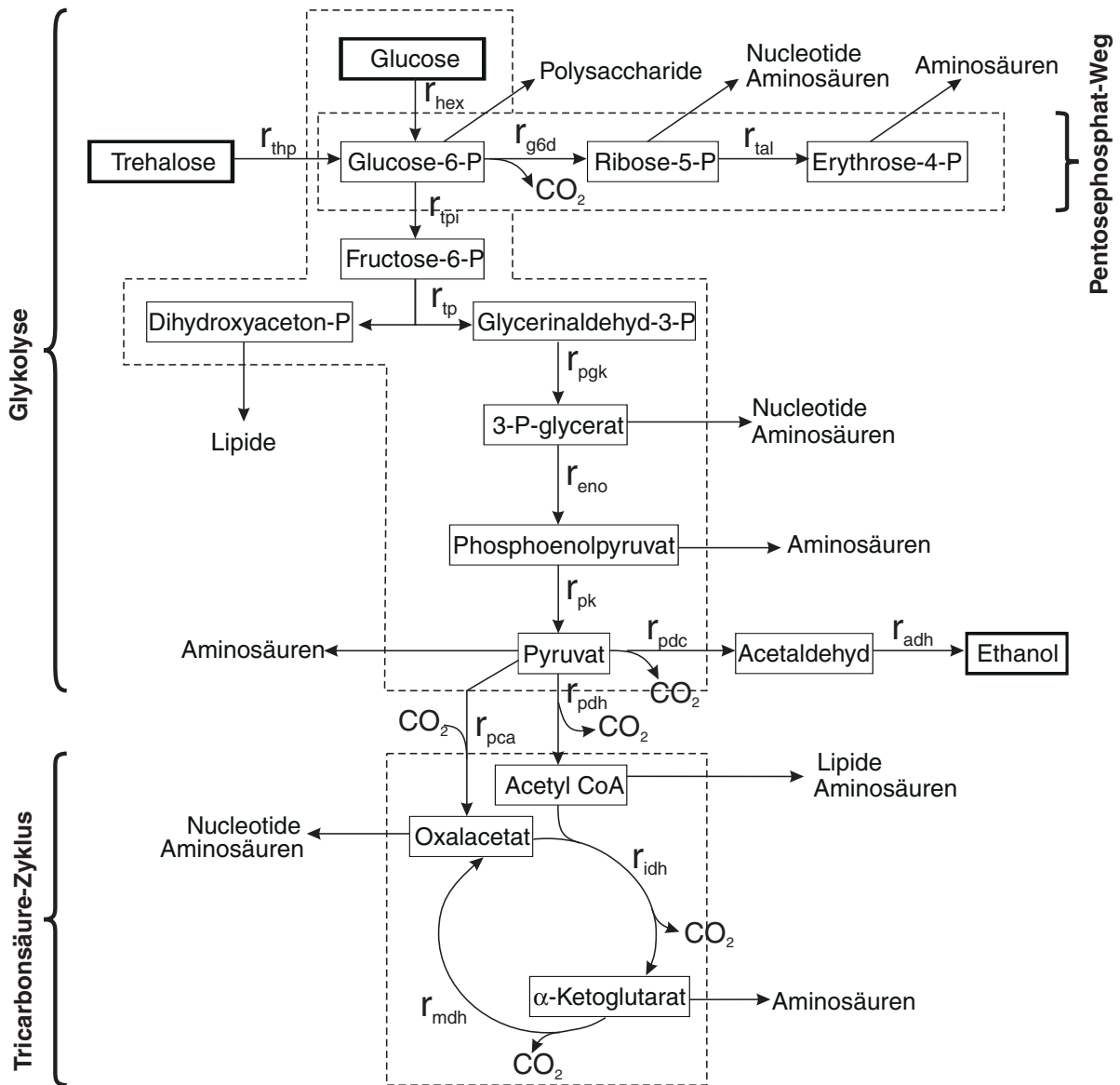


Bild 2.12: Darstellung der wesentlichen katabolen Stoffwechselwege des Organismus *S. cerevisiae* sowie der Hauptabflüsse in den anabolen Stoffwechsel

3. Fructose-1,6 bisphosphat-Weg

$$\begin{aligned}
r_{pgi} &= r_{pjk}, \\
2 r_{pjk} &= r_{pgk} + r_{glp}, \\
r_{pgk} &= r_{eno} + r_{ATP} + r_{GTP} + r_{cys} + r_{gly} + r_{his} + r_{ser}, \\
r_{eno} &= r_{pk} + 2 r_{phe} + r_{trp} + 2 r_{tyr};
\end{aligned}$$

4. Oxidation von Pyruvat

$$\begin{aligned}
r_{pk} &= r_{pca} + r_{pdc} + r_{pdh} + r_{ala} + r_{ile} + 2 r_{leu} + 2 r_{val}, \\
r_{pdc} &= r_{adh};
\end{aligned}$$

5. Tricarbonsäure-Zyklus (TCC)

$$\begin{aligned}
r_{pdh} &= r_{idh} + r_{leu} + r_{lys} + r_{met} + 5 r_{lau} + 8 r_{ole} + 7 r_{pal}, \\
r_{mdh} + r_{pca} &= r_{idh} + r_{CTP} + r_{UTP} + r_{asn} + r_{asp} + r_{ile} + r_{met} + r_{thr}, \\
r_{idh} &= r_{mdh} + r_{arg} + r_{gln} + r_{glu} + r_{lys} + r_{pro};
\end{aligned}$$

6. CO_2 -Bilanz

$$\begin{aligned}
r_{co2} &= +r_{g6d} + r_{idh} + r_{mdh} - r_{pca} + r_{pdc} + r_{pdh} + r_{tal} \\
&\quad - r_{ATP} - r_{GTP} - r_{arg} - r_{his} + r_{ile} + 2 r_{leu} + r_{lys} \\
&\quad + r_{phe} + r_{trp} + r_{tyr} + r_{val}.
\end{aligned}$$

Zur vollständigen Beschreibung fehlen noch die H_2O - und die NH_3 -Bilanz sowie die Metabolite des Energiestoffwechsels. Da die Stoffe H_2O und NH_3 in der Regel nicht als Meßwerte zur Verfügung stehen, ist es nicht erforderlich, diese Gleichungen anzugeben.

Der Tricarbonsäure-Zyklus stellt einen Kreisprozeß dar, in dem Acetyl-CoA unter Energiegewinnung zu CO_2 umgesetzt wird. Der Stofffluß in Abbildung Bild 2.13 a läßt sich in die in Bild 2.13 b gezeigte vereinfachte äquivalente Struktur überführen. Die Abflüsse über Oxalacetat und α -Ketoglutarat zur Synthese der Biomasse werden hierbei dem Pyruvat zugeschlagen. Der Abfluß über Acetyl-CoA bleibt unverändert.

Bei der Aufnahme von Glucose besitzt das angegebene Stoffwechselnetz vier unabhängige Pfade. Drei dieser Pfade sind gekennzeichnet durch ihr Endprodukt, nämlich Ethanol, CO_2 und Biomasse. Desweiteren ist der Sauerstoffbedarf unbekannt. Das bedeutet, das drei weitere Gleichungen notwendig sind, um den Stoffwechsel aller Reaktionen eindeutig bei gegebener Glucoseaufnahme zu bestimmen.

2.4.1.2 Anabolismus

Die Synthese der Biomasse erfordert eine Reihe von Bausteinen, die man in drei Gruppen unterteilt: Aminosäuren, Nucleotide und Lipide. Weiterhin ist stets eine gewisse Menge an Speicherstoffen in allen Zellen vorhanden. Die Zusammensetzung der Biomasse aus diesen vier Gruppen läßt sich als unveränderlich ansehen. In Anlehnung an die Angaben von

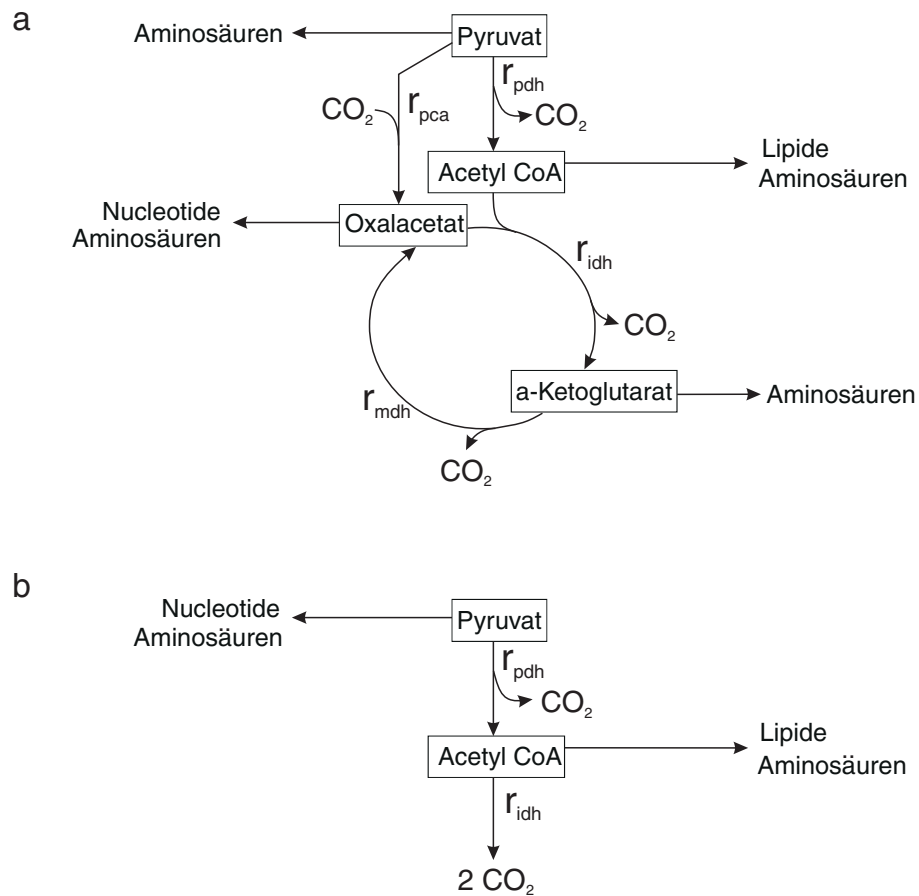


Bild 2.13: Vereinfachte äquivalente Struktur des Tricarbonsäure-Zyklus (TCC)

Cortassa et al. (1995) sind beim Wachstum mit dem Substrat Glucose die Gewichtsanteile der Biomasse zu 51 % Aminosäuren, 12 % Nucleotide, 32 % Speicherstoffe und 5 % Lipide zugrunde gelegt. Ebenfalls dort sind die molaren Zusammensetzungen der einzelnen Gruppen sowie die zu ihrem Aufbau benötigten Bausteine aus dem katabolen Stoffwechsel aufgeführt. Somit sind die für das Wachstum verwendeten Abflüsse aus dem Stoffwechsel abhängig von der Wachstumsrate angebbar. Tabelle 2.2 enthält die zur Berechnung des anabolen Stoffwechsels notwendige Zusammensetzung der Biomasse und die Bestandteile des in den Experimenten verwendeten Hefeextraktes. Dem Wachstum in Nährlösung mit Zusätzen liegt der folgende Sachverhalt zugrunde: Alle zur Verfügung stehenden hochwertigen Verbindungen werden zunächst aufgenommen, bevor die Zelle diese synthetisiert. Die Zugabe dieser Bausteine erhöht also die Wachstumsrate aufgrund des zusätzlichen C-Gehaltes und durch die Energieersparnis bei der Synthese der komplexen Bestandteile. Im Gegensatz zu den Modellen mit geringerer biochemischer Auflösung ist es hier möglich, die Auswirkung beider Effekte abzuschätzen.

Durch die als konstant angenommene Zusammensetzung der Biomasse ist es möglich, die Abflüsse der Precursor aus dem Katabolismus in den Anabolismus in Abhängigkeit der Wachstumsrate anzugeben. Da Tabelle 2.2 alle Anteile zum Aufbau der Biomasse enthält, kann man mit Hilfe dieser Angaben die elementare Zusammensetzung der Biomasse bestimmen. Die in Tabelle 2.1 angegebene stöchiometrische Zusammensetzung bezieht sich

Tabelle 2.1: Elementare Zusammensetzung und molares Gewicht der Biomasse

Zusammensetzung	Gewicht [$g\ molC^{-1}$]	Stamm, Quelle
$CH_{1.82}O_{0.58}N_{0.18}P_{0.0017}S_{0.0016}$	25.74	CH1211, Cortassa et al. (1995)
$CH_{1.83}O_{0.56}N_{0.17}$	25.15	CBS 426, Dekkers et al. (1981)
$CH_{1.79}O_{0.57}N_{0.15}$	25.01	H1022, Sonnleitner und Käppeli (1986)

auf den Kohlenstoffanteil. Die Daten weisen eine ähnliche Größenordnung auf wie die experimentell bestimmte stöchiometrische Zusammensetzung anderer Hefestämme. Die Zusammensetzung der Nucleotide berücksichtigt hierbei lediglich die nicht phosphorylierten Grundverbindungen. Die Verwendung des bei [Cortassa et al. \(1995\)](#) angegebenen Phosphorylierungsgrades führt zu einem gegenüber den Vergleichswerten überhöhten *O*-Anteil und damit zu einem deutlich höheren molekularen Gewicht.

2.4.1.3 Energiebilanzen

Neben der Bilanzierung des *C*-Flusses der in Bild 2.12 dargestellten Reaktionen gelingt es, die Energiebilanzen für die Stoffumwandlung aufzustellen. Während bei einer Anzahl von Reaktionen chemische Bindungsenergie frei wird, benötigen andere Reaktionen eine Aktivierungsenergie. Insbesondere für die Synthese der komplexen Bausteine der Biomasse ist dies der Fall. Als Elementarquantum zur Übertragung der chemischen Bindungsenergie dient der Zelle die Verbindung Adenosintriphosphat (ATP). Durch die Abspaltung einer Phosphatgruppe entsteht aus Adenosin-**tri**-phosphat Adenosin-**di**-phosphat (ADP), wobei gleichzeitig die im ATP gespeicherte Bindungsenergie frei wird. Umgekehrt kommt es bei Reaktionen mit Energieüberschuß zu einer Regeneration von ATP. Zur Bildung der Energiebilanz in der Zelle sind die Reaktionen des Stoffwechsels zu berücksichtigen, an denen ATP bzw. ADP beteiligt sind.

Durch Oxidation von reduzierten Coenzymen (z.B. NADH oder NADPH) ist es der Zelle möglich, zusätzliche Energie in Form von ATP zu gewinnen. Als Reaktionsprodukt entsteht hierbei unter anderem Wasser (H_2O). Die Oxidation ist proportional zu der Sauerstoffaufnahme r_{o_2} , wobei die Zahl der pro *O*-Atom gewonnenen Energieeinheiten durch das sogenannten Phosphorylierungsverhältnis *PO* angegeben werden. Für die Bildung der sogenannten Redoxbilanz sind jeweils die Reaktionen, an denen NAD bzw. NADP beteiligt sind, zu berücksichtigen. In der Zelle wird insbesondere im Tricarbonsäure-Zyklus (TCC) NAD oder NADP zu NADH bzw. NADPH reduziert. Im Stoffwechselmodell ist zusätzlich eine Phosphorylierung von NAD zu NADP vorgesehen. Die mit r_{nad} bezeichnete Reaktion benötigt für die Phosphorylierung $N = 2\ mol\ ATP$.

Die Energiebilanz (*P*) und die Redoxbilanzen (H_2), getrennt nach NAD und NADP, lauten:

Tabelle 2.2: Anteile der einzelnen zur Synthese verwendeten Bausteine in der Biomasse (BTM) sowie deren Anteil im Hefeextrakt (YE) (Quelle: Cortassa et al. (1995), DIFCO Bacto Yeast extract, Typical Analysis, Product code 0127)

Abk.	Monomer	Precursor	BTM [mmol g ⁻¹]	YE [mmol g ⁻¹]
Aminosäuren				
<i>ala</i>	Alanin	1 PY	1.1043	0.6022
<i>arg</i>	Arginin	1 αKG	0.3498	0.17356
<i>asn</i>	Asparagin	1 OAA	0.11146	0
<i>asp</i>	Asparaginsäure	1 OAA	0.8278	0.503
<i>cys</i>	Cystein	1 3PG	0.06869	0.06116
<i>glu</i>	Glutaminsäure	1 αKG	1.2963	0.966
<i>gln</i>	Glutamin	1 3PG	0.11497	0
<i>gly</i>	Glycin	1 AcCoA	0.7506	0.4333
<i>his</i>	Histidin	2 R5P, 1 3PG	0.14972	0.07742
<i>ile</i>	Isoleucin	1 OAA, 1 PY	0.4579	0.24656
<i>leu</i>	Leucin	2 PY, 1 AcCoA	0.6818	0.358
<i>lys</i>	Lysin	1 αKG, 1 AcCoA	0.6655	0.3527
<i>met</i>	Methionin	1 OAA, 1 AcCoA	0.1262	0.07047
<i>phe</i>	Phenylalanin	1 E4P, 2 PEP	0.29994	0.15333
<i>pro</i>	Prolin	1 αKG	0.4068	0.22609
<i>ser</i>	Serin	1 3PG	0.4728	0.27048
<i>thr</i>	Threonin	1 OAA	0.4568	0.2479
<i>trp</i>	Tryptophan	1 E4P, 1 PEP, 1 R5P	0.09729	0.06667
<i>tyr</i>	Tyrosin	1 E4P, 2 PEP	0.17776	0.0663
<i>val</i>	Valin	2 PY	0.6136	0.3239
Nukleotide				
<i>ATP</i>	ATP	1 R5P, 1 3PG	0.11453	0
<i>GTP</i>	GTP	1 R5P, 1 3PG	0.11453	0
<i>UTP</i>	UTP	1 R5P, 1 OAA	0.15189	0
<i>CTP</i>	CTP	1 R5P, 1 OAA	0.1121	0
Lipidbestandteile				
<i>lau</i>	Laurinsäure	5 AcCoA	0.06567	0
<i>pal</i>	Palmitinsäure	7 AcCoA	0.09743	0
<i>ole</i>	Ölsäure	8 AcCoA	0.03926	0
<i>glp</i>	Glycerol P	1 DHAP	0.06498	0
Speicherstoffe				
<i>ch</i>	Polysaccharide	1 G6P	1.9136	0

1. ATP-Bilanz

$$\begin{aligned}
r_{mATP} = & -r_{hex} + r_{mdh} - r_{pca} + r_{pgk} + r_{pk} - r_{pgi} - 2 PO r_{o2} - N r_{nad} \\
& - 2 r_{ch} - 13 r_{ATP} - 8 r_{CTP} - 15 r_{GTP} - 7 r_{UTP} \\
& - 6 r_{arg} - 2 r_{asn} - 3 r_{cys} - r_{gln} - 16 r_{his} - 2 r_{ile} - 2 r_{lys} - 4 r_{met} - r_{phe} \\
& - r_{pro} - 2 r_{thr} - 3 r_{trp} - r_{tyr} - 5 r_{lau} - 8 r_{ole} - 7 r_{pal} \\
& - N_{prot} r_{prot} - \frac{1}{Y_{ATP}^{struc}} \mu;
\end{aligned}$$

2. NADP-Bilanz

$$\begin{aligned}
r_{mNADP} = & 2 r_{g6d} + r_{idh} + 2 r_{tal} + r_{nad} \\
& - 3 r_{ATP} - r_{CTP} - 3 r_{GTP} - r_{UTP} \\
& - r_{ala} - 4 r_{arg} - r_{asn} - 4 r_{cys} - r_{gln} - r_{glu} - r_{gly} - 4 r_{his} - 5 r_{ile} - 2 r_{leu} \\
& - 3 r_{lys} - 5 r_{met} - 2 r_{phe} - 2 r_{pro} - r_{ser} - 3 r_{thr} - 3 r_{trp} - 2 r_{tyr} - 2 r_{val} \\
& - 10 r_{lau} - 16 r_{ole} - 14 r_{pal};
\end{aligned}$$

3. NAD-Bilanz

$$\begin{aligned}
r_{mNAD} = & -r_{adh} + 3 r_{mdh} + r_{pdh} + r_{pgk} + 2 r_{o2} - r_{nad} \\
& + 3 r_{ATP} + 2 r_{GTP} \\
& + r_{arg} - r_{asp} + r_{cys} + r_{gly} + 5 r_{his} + r_{leu} + r_{lys} - r_{pro} \\
& + r_{ser} + 2 r_{trp} + r_{tyr} - r_{glp} - r_{ole} - r_{pal}.
\end{aligned}$$

Durch Verzicht auf die Teilung von NAD- und NADP-Bilanz erreicht man eine Vereinfachung des Gleichungssystems; die Reaktion r_{nad} entfällt dann. Da das erzeugte NADH bzw. NADPH vollständig oxidiert werden muß, bestimmt die NAD(P)-Bilanz die notwendige Sauerstoffaufnahme. Ist nicht genügend respiratorische Kapazität vorhanden, fließt ein Teil des C -Stromes nicht durch den Tricarbonsäure-Zyklus in Richtung CO_2 sondern wird als Ethanol ausgeschieden (anaerobes Wachstum). Der Stoffwechselweg von Glucose zu Ethanol ist NAD(P) neutral — die Bilanz ist daher ausgeglichen.

Die ATP-Bilanz legt das Verhältnis zwischen katabolem und anabolem Stoffwechsel fest. Gelingt es, mehr Energieeinheiten zu gewinnen (z.B. durch eine höhere Ausbeute bei der Atmung, gekennzeichnet durch einen größeren PO -Koeffizienten), so ist eine höhere Wachstumsrate möglich. Die höheren Abflüsse des Katabolismus führen gleichzeitig zu einer Verringerung der Energieausbeute und der Wachstumsrate, bis sich ein Gleichgewicht einstellt.

Die Energie- und die Redoxbilanz sowie die respiratorische Kapazität stellen die drei fehlenden Bedingungen dar, die den Fluß durch das katabole Stoffwechsellnetz eindeutig bestimmen. Liegen neben der Aufnahme rate für Glucose weitere Meßwerte vor, so entsteht ein überbestimmtes Gleichungssystem. Dies kann für eine Ausgleichsrechnung bei

fehlerbehafteten Messwerten oder zu Bestimmung von nur empirisch bekannten Stoffwechselfparametern verwendet werden (z.B. das Phosphorylierungsverhältnis PO oder der Energiebedarf der Biosynthese $N_{prot}, Y_{ATP}^{struc}$).

Der bei der Synthese der niedermolekularen Bausteine erforderliche Energiebedarf findet bei der Energiebilanz entsprechend den Daten von [Cortassa et al. \(1995\)](#) Berücksichtigung. An diese Synthese schließen sich weitere Stufen des anabolen Stoffwechsels an, die neben den Teilprodukten des Stoffwechsels Energie zum Aufbau der Zellen benötigen. Der ATP-Bedarf dieser Schritte läßt sich nur schwer abschätzen, während die Stoffwechselwege zur Synthese der niedermolekularen Bausteine und deren ATP-Aufnahme bekannt sind ([Cortassa et al., 1995](#)). Die Energiebilanz enthält daher N_{prot} mol ATP zur Polymerisation der Proteine aus den Aminosäuren. In [Cortassa et al. \(1995\)](#) ist dieser Bedarf mit $N_{prot} = 4$ angegeben. Für die Bildung der Zellstruktur ist schließlich ein weiterer Term $1/Y_{ATP}^{struc}$ für den ATP-Bedarf eingeführt. Der Bedarf für die gesamte Synthese der Biomasse

$$\frac{1}{Y_{ATP}} = \underbrace{\frac{1}{35.6}}_{\text{Niedermolekulare Monomere}} + \underbrace{\frac{1}{248.1} N_{prot}}_{\text{Protein Polymerisation}} + \underbrace{\frac{1}{Y_{ATP}^{struc}}}_{\text{Strukturbildung}}$$

setzt sich demnach aus drei Teilen zusammen.

Wie aus dem Vergleich mit dem Modell von ([Bellgardt, 1984](#)) hervorgeht, sind in den Energiebilanzen die gleichen katabolen Reaktionen enthalten. Der ATP-Bedarf der Synthese ist im erweiterten Modell den drei Stufen des Anabolismus zugeordnet. In [Bellgardt \(1984\)](#) ist der gesamte ATP-Bedarf mit $Y_{ATP} = 12 \text{ g mol}^{-1}$ angegeben. Der Aufbau der niedermolekularen Monomere benötigt also bereits ein Drittel der gesamten Energie. Für die Polymerisation der Proteine wird bei $N_{prot} = 4 \text{ mol}$ ein weiteres Sechstel der Energie verbraucht, so daß für die Strukturbildung etwa die Hälfte der Energie verbleibt. Der Zahlenwert ergibt sich zu $Y_{ATP}^{struc} = 25.6 \text{ g mol}^{-1}$. Durch die detaillierte Betrachtung des niedermolekularen Anabolismus ist es also möglich, etwa die Hälfte des ATP-Bedarfes bestimmten Reaktionen zuzuordnen.

Durch weitere Vereinfachung des Stoffwechselnetzes gelangt man zu der Struktur

$$\begin{aligned} \text{Glucose} : & & r_{gluc} &= 0.5 r_{pk} + K_{B1} \mu \\ \text{PY} : & & r_{pk} &= r_{pdh} + r_{etoh} \\ \text{AcCoA} : & & r_{pdh} &= r_{tcc} + K_{B3} \mu \\ \text{CO}_2 : & & r_{etoh} + r_{pdh} + 2 r_{tcc} &= r_{co2}, \end{aligned}$$

wie sie in [Bellgardt \(1984\)](#) vorgestellt ist¹. Die Abflüsse in die Biomasse finden konzentriert in den Stoffen Glucose und Acetyl-CoA Berücksichtigung. Die Flüsse werden hierbei proportional zur Wachstumsrate μ mit den Konstanten K_{B1} und K_{B3} angenommen. Durch die Einführung eines theoretischen Flusses r_{tcc} ist es möglich, die im vollständigen Modell vorhandene CO_2 -Produktion dem Stofffluß durch den Tricarbonsäure-Zyklus (TCC) zuzuschlagen. Im vollständigen Stoffwechselnetz ergeben sich die den Precursor-Bedarf bestimmenden Konstanten zu $K_{B1} = 0.0057 \text{ mol g}^{-1}$ und $K_{B3} = 0.00246 \text{ mol g}^{-1}$

¹[Bellgardt \(1984\)](#) verwendet die Symbole $q_S = r_{gluc}$, $r_S = 0.5 r_{pk}$, $r_{Ac} = r_{pdh}$, $r_E = r_{etoh}$

gegenüber den von Bellgardt (1984) angegebenen Werten $K_{B1} = 0.0048 \text{ mol } g^{-1}$ und $K_{B3} = 0.0044 \text{ mol } g^{-1}$ (Bellgardt, 1984, Versuche Gruppe 1). Bild 2.14 enthält einen Vergleich der internen Stoffflüsse des oben vorgestellten Stoffwechselmodells und des vereinfachten Modells. Das vollständige Stoffwechselmodell weist den Vorteil auf, über die angegebenen Schritte hinaus den Stofffluß einzelner Reaktionen zu quantifizieren zu können.

2.4.1.4 Zusätze in der Nährlösung

Auf das erweiterte Stoffwechselnetz muß man insbesondere dann zurückgreifen, wenn Stoffflüsse in den einzelnen enzymatischen Schritten zu berücksichtigen sind. Zum Beispiel kann die Erweiterung dazu dienen, Kapazitätsgrenzen aufzuzeigen, die sonst nicht erkennbar sind. Weitere Anwendung findet das erweiterte Netz, wenn Zusätze in der Nährlösung erforderlich sind.

Für auxotrophe Stämme bedarf es eines abweichenden Stoffwechselnetzes, da Enzyme fehlen, um alle notwendigen Bausteine zur Zellsynthese bereitstellen zu können. Mit anderen Worten: Ohne Zusatz der betreffenden Aminosäuren findet kein Wachstum statt. Enthält jedoch die Nährlösung die notwendigen Aminosäuren in ausreichender Menge, so werden diese aufgenommen und in die Biomasse eingebaut. Auf die aufwendige Synthese der betreffenden Aminosäuren kann dann verzichtet werden. Man erhält hierdurch abweichende Stoffflüsse im Katabolismus. Bild 2.15 zeigt die Stoffflüsse eines auxotrophen Stammes mit der in Bild 2.14 zu Grunde gelegten Wachstumsrate. Der Stamm nimmt die von ihm nicht zu synthetisierenden Aminosäuren Histidin, Leucin, Methionin und Tryptophan aus der Nährlösung auf (Beuse, 1998). Der Glucosebedarf ist daher auf 93.3 % gegenüber dem normalen Wachstum ohne Zugabe der Aminosäuren reduziert. Aufgrund der komplexen Verbindung in der Nährlösung ergibt dies eine leicht verminderte CO_2 -Produktion (42.4 statt 42.9 %). Stehen die notwendigen Aminosäuren nicht in ausreichender Menge zur Verfügung, so reduziert sich die Wachstumsrate entsprechend. Bereits vor Erreichen der maximalen respiratorischen Kapazität kann in diesem Fall eine Ethanolproduktion auftreten, da ein Teil des aufgenommenen Substrates nicht zur Biomassensynthese verwendet werden kann. In diesem Fall sind die Gleichungen der Biomasse Zusammensetzung erforderlich, um die maximal mögliche Wachstumsrate aufgrund der vorhandenen Nährstoffe zu bestimmen.

Ein Organismus mit der Fähigkeit, die benötigten Aminosäuren auf mehreren biochemischen Wegen zu synthetisieren, ist nur dann berechenbar, wenn das Stoffwechselmodell auch die alternativen Stoffwechselwege enthält. Diese alternativen Wege benötigen häufig eine enorme zusätzliche Energie gegenüber den oben angegebene Reaktionen des Anabolismus. Da dieser Stoffwechsel unter normalen Bedingungen keine Bedeutung hat, wird im folgenden ausschließlich das für diese Bedingungen gültige Stoffwechselnetz verwendet.

Der Zusatz von Hefeextrakt entspricht vollständig der Zugabe einzelner Aminosäuren. Hefeextrakt enthält komplexe, für die Synthese benötigte Verbindungen, die der Zelle das Wachstum erleichtern. In Tabelle 2.2 ist die Zusammensetzung des in den Experimenten von Beuse (1998) verwendeten Hefeextraktes angegeben. Bild 2.16 zeigt die Wachstumsrate bei Zusatz von $5 \text{ g } l^{-1}$ Hefeextrakt zu einer Nährlösung mit $20 \text{ g } l^{-1}$ Glucose im Zulauf einer kontinuierlichen Kultur. Diese Werte stellen die Standardbedingungen für die von

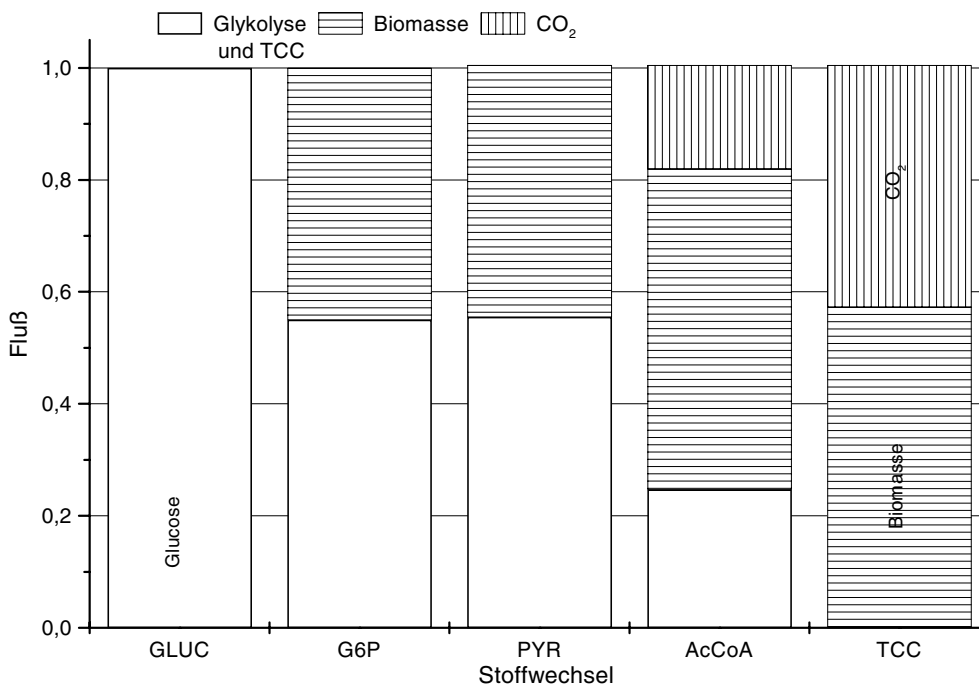
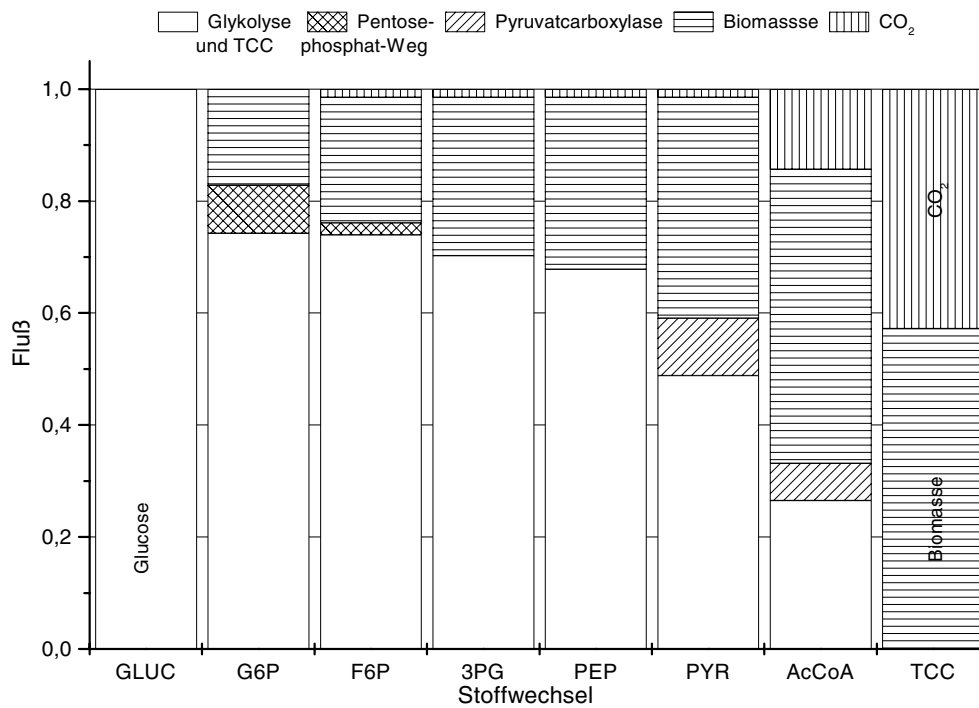


Bild 2.14: Stoffflüsse des erweiterten Stoffwechselmodells nach Cortassa et al. (1995) (oben) und des vereinfachten Stoffwechselmodells nach Bellgardt (1984) (unten). In beiden Diagrammen sind die Flüsse normiert auf den molaren Zustrom an C-Atomen im Glucosefluß angegeben. Auf der Abzisse sind die intermediären Produkte des rein oxidativen Stoffwechsels dargestellt

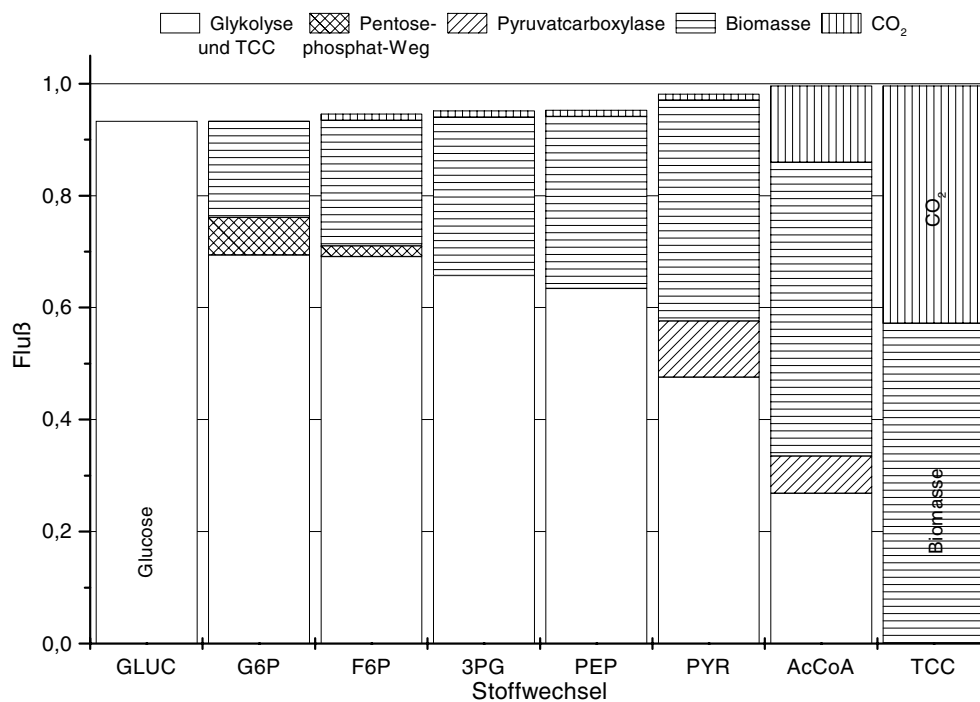


Bild 2.15: Stoffflüsse des erweiterten Stoffwechselmodells eines Aminosäure auxotrophen Stammes (his, leu, met, trp). Die notwendigen Aminosäuren Histidin, Leucin, Methionin und Tryptophan sind der Nährlösung hinzugefügt (vergl. Tabelle 2.2)

Beuse (1998) durchgeführten synchronen Experimente dar. Durch die Zugabe von komplexen Bausteinen, die in der Biosynthese Verwendung finden, sinkt die für eine vergleichbare Wachstumsrate benötigte Glucoseaufnahme auf 80.9% sowie die CO_2 -Produktion auf 40.6%.

Die Reaktionen des Anabolismus sind ausschließlich in einer Richtung angegeben. Die Verwertung von überschüssigem Hefeextrakt im katabolen Stoffwechsel ist unter gewissen Bedingungen möglich. Dieser Fall bleibt jedoch im angegebenen Stoffwechselnetz unberücksichtigt. Das heißt, alle im Stoffwechselnetz enthaltenen Flüsse sind positiv.

Durch die Zusammenfassung aller internen Flüsse gelingt es, den Ertragskoeffizienten zu berechnen. Es entsteht ein kinetisches Modell wie es beispielsweise von Strässle (1988) verwendet wird. Im Gegensatz zu der von Strässle (1988) angegebenen Form erlaubt das aus dem erweiterten Stoffwechselmodell berechnete kinetische Modell, Zusätze in der Nährlösung mit einzubeziehen. Unter Standardbedingungen weisen die Parameter des kinetischen Modells nur geringe Unterschiede auf. Tabelle 2.3 zeigt für diesen Fall die aus dem erweiterten Modell abgeleiteten Ertragskoeffizienten (Cortassa et al., 1995) sowie die der Modelle nach Bellgardt (1984) und nach Strässle (1988).

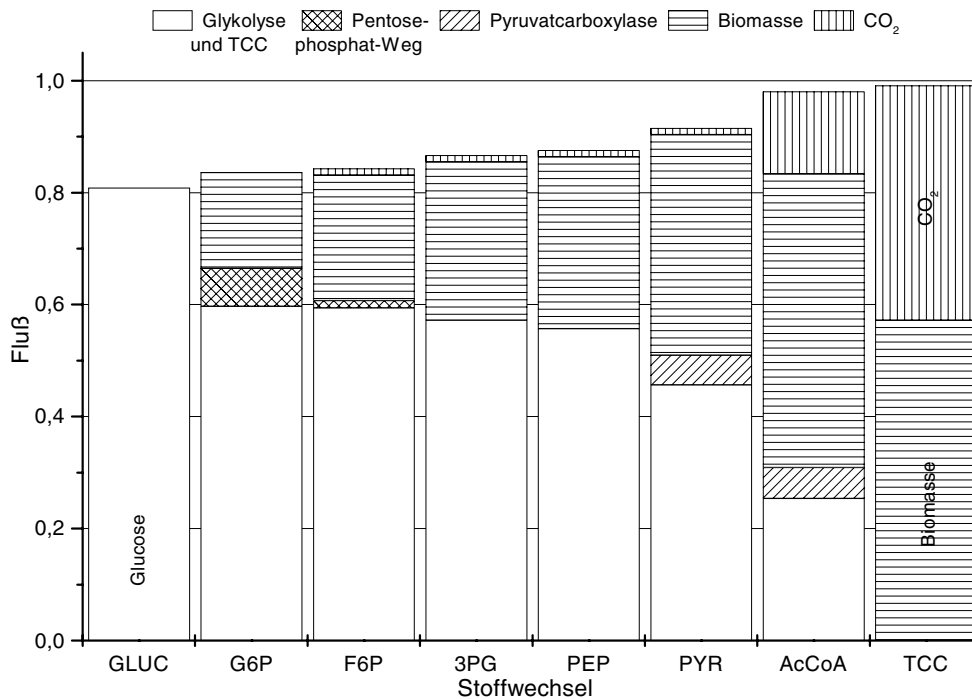


Bild 2.16: Stoffflüsse des erweiterten Stoffwechselmodells mit einem Zusatz von Hefeextrakt in der Nährlösung

Tabelle 2.3: Ertragskoeffizienten der Modelle nach A: [Bellgardt \(1984\)](#), B: [Strässle \(1988\)](#) und C: [Cortassa et al. \(1995\)](#)

Ertrag	A	B	C	Einheit
Y_{XGO}	0.47	0.49	0.50	$g \text{ BTM} / g \text{ Glucose}$
$Y_{OG(O)}$	12.52	12.80	13.09	$mmol \text{ O}_2 / g \text{ Glucose}$
Y_{CGO}	-13.07	-13.70	-13.84	$mmol \text{ CO}_2 / g \text{ Glucose}$

2.4.2 Regulation der Stoffwechselwege

Das in Abschnitt 2.4.1 vorgestellte Stoffwechselnetzwerk faßt die wichtigsten biochemischen Abbauwege zusammen. Die tatsächlich auftretenden Flüsse hängen jedoch von den Umgebungsbedingungen ab. Die Dynamik eines Prozeßmodells für eine Hefekultur beschränkt sich bei [Bellgardt \(1984\)](#) zunächst auf die dynamische Beschreibung der Gas- und Flüssigphase des Reaktors und des Aufnahmesystems der Zellen. Das interne Stoffwechselnetz der Zellen wird dabei als energiefrei angenommen. Das heißt, nach der Aufnahme der Substrate laufen alle Stoffumsätze ohne Zeitverzögerung in der Zelle ab. Die Arbeit von [Bellgardt \(1984\)](#) enthält darüber hinaus ein detailliertes Modell der Adaptionsvorgänge des Atmungsapparats (respiratorische Kapazität) und beschreibt so Umschaltvorgänge zwischen aeroben und anaeroben Reaktorbedingungen. Die Geschwindigkeit der einzelnen Reaktionsschritte ist, verglichen mit der des Aufnahmesystems, relativ hoch und findet dementsprechend im Modell keine Beachtung. In zellfreier Hefesuspension zeigen

sich dagegen sehr wohl dynamische Effekte (Markus et al., 1985). Im Gegensatz zu Versuchen mit ganzen Zellen ist bei diesen Versuchen die Zellmembran zerstört; das ansonsten notwendige Einschleusen des Substrates durch die Zellmembran entfällt. Zudem setzen Markus et al. (1985) der Nährlösung verschiedene Intermediärprodukte der Glykolyse zu. Bei geeigneter Anregung lassen sich dann sogenannte glykolytische Oszillationen beobachten. In Bild 2.12 auf Seite 64 sind die von Markus et al. (1985) modellierten Reaktionen durch die Bezeichnungen r_{pgi} und r_{pk} charakterisiert. Die Experimente zeigen, daß das System der enzymatischen Reaktionen durchaus eine Dynamik besitzt. In Kulturen mit ganzen Zellen treten diese Effekte aufgrund der Dynamik der Transportsysteme nicht auf.

Zur Entscheidung zwischen mehreren alternativen Stoffwechselwegen ist es notwendig, das reale Verhalten der Zelle im Modell nachzubilden. Hierzu bietet es sich an, sowohl die Wachstumsrate als auch die Energiegewinnung (z.B. in Form von ATP oder NADH-Konzentration) als Kriterium zu verwenden. Die sich einstellenden Arbeitspunkte der Zelle fallen je nach gewähltem Kriterium unterschiedlich aus. Bei tierischen Zellen zeigt Bonarius et al. (1996), daß die beste Übereinstimmung mit den Experimenten bei einer Maximierung der NADH-Gewinnung erzielt wird.

Basierend auf dem biochemischen Netzwerk ist es möglich, für die aktiven Stoffwechselwege Ertragskoeffizienten zu bestimmen. Diese geben die erzielbaren Produktströme für die jeweiligen Substrate an. Der Vorteil eines detaillierten biochemischen Netzwerkes besteht in der Möglichkeit, neben den Substraten, wie Glucose oder Ethanol, weitere Bestandteile der Nährlösung, wie z.B. Aminosäuren, quantitativ zu berücksichtigen. So gelingt es, die Ertragskoeffizienten für eine Vielzahl von Nährlösungen abzuschätzen. Das in Kapitel 5 verwendete Populations- und Zellzyklusmodell beinhaltet die in Anhang A.1 aufgeführten Gleichungen zur Beschreibung des Stoffwechsels der Zellen. Da im Rahmen dieser Arbeit lediglich Versuche mit derselben Zusammensetzung der Nährlösung und mit nur einem Stamm des Organismus betrachtet werden, ist auf eine detailliertere Struktur des Stoffwechselmodells für die Simulationen verzichtet worden. Für das Aufnahmesystem, die respiratorische Kapazität und den Speicherstoffhaushalt der Zellen gelten dabei die folgenden Annahmen.

2.4.2.1 Aufnahmesystem

Das Aufnahmesystem der Zelle bewirkt eine Limitierung des Stoffumsatzes. Dabei ist die Aufnahme rate statisch an die Konzentration des Substrates gekoppelt. Die Beschreibung des Aufnahmesystems basiert auf den der Enzymkinetik entlehnten Monod-Termen (Bellgardt, 1984; Strässle, 1988). Die maximale Aufnahme rate weist in der Arbeit von Sonnleitner und Käppeli (1986) den Wert $r_{S,max} = 3.5 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ auf, während bei Bellgardt (1984) $r_{S,max} = 0.018 \text{ mol g}^{-1} \text{ h}^{-1} = 3.24 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ angegeben ist. Die Sättigungskonstante K_S der Glucoseaufnahme liegt dabei in der Größenordnung von $0.1 - 0.5 \text{ g l}^{-1}$ (Sonnleitner und Käppeli, 1986).

Der Abbau des Monosaccharides Galactose erfolgt weitgehend durch dieselben Stoffwechselfade wie der Abbau von Glucose. Die erzielte maximale Wachstumsrate reduziert sich jedoch auf etwa 60 % der von Glucose (Lord und Wheals, 1981; Beuse, 1998).

Die Dynamik der Stoffumwandlung wird durch die Konzentration der Substrate in der Nährlösung bestimmt. Dynamische Effekte bei der Aufnahme der Substrate und dem Fluß durch das Stoffwechselnetzwerk sind nicht berücksichtigt.

2.4.2.2 Respiratorische Kapazität

Die Oxidation von reduzierten Coenzymen (z.B. NADH oder NADPH) ermöglicht es den Zellen, deutlich mehr Energie als bei anaeroben Verhältnissen, also unter Sauerstoffabschluß, zu gewinnen. Die maximal zur Verfügung stehende Atmungskapazität der Zellen ist jedoch begrenzt. Mit Hilfe eines sogenannten Flaschenhals-Modells läßt sich das Zellwachstum gut beschreiben (Bellgardt, 1984; Sonnleitner und Käppeli, 1986). Das heißt, bis zu einer gewissen Substrataufnahmerate ist ein rein oxidativer Stoffwechsel möglich. Für höhere Aufnahmeraten ist die maximale respiratorische Kapazität erreicht und ein Teil des Substrates wird zur Produktion von Ethanol verwendet. Dieser Stoffwechselweg benötigt keine Sauerstoffzufuhr.

Sonnleitner und Käppeli (1986) führen eine maximale Sauerstoffaufnahmerate $r_{O_2,max} = 8 \text{ mmol g}^{-1}\text{h}^{-1}$ ein, während Bellgardt (1984) die Reaktion r_{pdh} als limitierend annimmt. Für $r_{pdh,max} = 3.4 \text{ mmol g}^{-1}\text{h}^{-1}$ ergibt sich die gleiche maximale Sauerstoffaufnahmerate von $r_{O_2,max} = 8 \text{ mmol g}^{-1}\text{h}^{-1}$ bei einem Phosphorylierungsverhältnis (PO) von eins.

Die respiratorische Kapazität der Zellen ist unabhängig von der Art der Substrate in der Nährlösung. Hier zeigt sich ein Vorteil des Stoffwechselmodells gegenüber den kinetischen Modellen: Mit Hilfe des Stoffwechselnetzes ist es möglich, den Sauerstoffbedarf für die einzelnen Substrate anzugeben. Der maximale Stofffluß wird in allen Fällen durch die respiratorische Kapazität begrenzt.

2.4.2.3 Speicherstoffe

Die Zellen lagern während der Einzelzellphase Speicherstoffe ein (Kuenzi und Fiechter, 1969; Sillje et al., 1997). Mit ihrer Hilfe ist es möglich, in der darauf folgenden Sprossungsphase weitgehend unabhängig von den äußeren Bedingungen den Zellzyklus zu beenden. Die Neigung der Zellen, Speicherstoffe einzulagern, steigt mit abnehmender Verdünnungsrate. Die Regulation des Speicherstoffhaushaltes bedarf geeigneter Annahmen über die Größe der Stoffflüsse in und aus den zellinternen Speichern.

Im Modell von Strässle (1988) ist die Einlagerung statisch an die Glucoseaufnahmerate gekoppelt. Bei einer geringen Aufnahmerate in der Einzelzellphase fließt ein maximaler Fluß von $r_T = 0.3 \text{ g g}^{-1}\text{h}^{-1}$. Mit zunehmender Aufnahmerate nimmt die Einlagerung in die zellinternen Speicher ab. In der Doppelzellphase werden die internen Speicher wieder geleert. Die Mobilisierung der Speicherstoffe hat hierbei Vorrang vor der Aufnahme externer Substrate. Der gesamte Aufnahmestrom ist wiederum durch die maximal mögliche Aufnahmerate $r_{S,max}$ begrenzt.

Wie Strässle (1988) zeigt, reicht die Annahme einer durch die Speicherstoffe weitgehend unabhängigen Wachstumsgeschwindigkeit in der Sprossungsphase zur Erklärung der Synchronisation des Wachstums aus. Durch die Wahl der Stoffwechselfparameter steigt die

Konzentration der Speicherstoffe während der Einzelzellphase mit zunehmenden Zyklusalter an. Hierbei gilt, je geringer die Verdünnungsrate desto mehr Speicherstoffe werden eingelagert. Zu Beginn der Doppelzellphase erhöht sich die Wachstumsrate der betreffenden Zellen schlagartig. Bereits weit vor dem Ende der Sprossungsphase sind die Speicherstoffe aufgebraucht, so daß diese bei der Teilung der Zellen eigentlich nicht mehr berücksichtigt werden müßten.

2.4.3 Morphologie

Zur Beschreibung des Wachstumsprozesses durch den sich ständig wiederholenden Zellzyklus ist die Kenntnis der Zellgröße in Abhängigkeit von Zellzyklus und genealogischem Zellalter erforderlich. In jüngster Zeit erlaubt es der Einsatz der Bildverarbeitung, hier neue Erkenntnisse zu gewinnen (Huls et al., 1992; Woldringh et al., 1993). So ist zum Beispiel in Bild 2.17 das volumetrische Wachstum einer Sproßzelle im Verlauf mehrerer Zellzyklen dargestellt. Die kleine Sproßzelle wächst zunächst an, bis sie die für die Sprossung notwendigen Bedingungen erfüllt. Der Mutterzellanteil der sprossenden Zelle nimmt nach Beginn der Sprossung nur noch wenig zu. Der Hauptteil des Wachstums gilt nun der Sproßzelle. Nach der Teilung entsteht eine neue Sproßzelle mit $g = 0$ Narben und eine größere Mutterzelle mit $g = 1$ Narbe. Anschließend wiederholt sich der Zellzyklus für die beiden neuen Zellen nach demselben Schema. Die zur Sprossung notwendigen Bedingungen erreicht die Mutterzelle dabei deutlich früher — die Einzelzellphase verkürzt sich auf wenige Minuten. Die Sprossungsphase bleibt dagegen in ihrer Länge nahezu unverändert. Nach der Teilung entsteht neben einer weiteren Sproßzelle ($g = 0$) eine wiederum in ihrem Volumen vergrößerte Mutterzelle der Klasse $g = 2$. Da die Größe der Mutterzellen der Klasse $g = 4$ in Woldringh et al. (1993) nicht angegeben ist, wird für die weiteren Berechnungen angenommen, daß der Mutterzellanteil der Klasse $g = 3$ nach der Sprossung nicht mehr ansteigt.

2.4.3.1 Volumen

Bild 2.18 zeigt das Zellvolumen in Abhängigkeit vom genealogischen Alter. Es ist zu erkennen, daß die Größe der Zellen mit dem Alter zunimmt (Hartwell und Unger, 1977; Johnston et al., 1979; Woldringh et al., 1993). Die von Johnston et al. (1979) (asynchrone kontinuierliche Kultur) und Woldringh et al. (1993) (synchrone Batchkultur) angegebenen Daten für die Größe der sprossenden Zellen zeigen eine gute Übereinstimmung sowohl in ihrem Betrag als auch im Verlauf über das genealogische Alter. Beide Messungen entstammen Versuchen mit einer Wachstumsrate in der Größenordnung von $\mu \approx 0.3 h^{-1}$. Die von Hartwell und Unger (1977) ermittelten Werte für das mittlere Volumen des Mutterzellanteils sind verglichen mit den beiden anderen Meßreihen um den Faktor zwei zu groß. Die Abweichung ist nicht durch die kleinere Wachstumsrate von $\mu = 0.21 h^{-1}$ erklärbar (vergleiche Bild 2.19). Die Messungen weisen allerdings ebenfalls eine Zunahme des Zellvolumens mit dem Alter auf.

Eine Verringerung der mittleren Wachstumsrate führt gleichermaßen zu einer Abnahme der Größe der Zellen aller Altersstufen. Bild 2.19 zeigt den absoluten Verlauf des Zellvolumens zum Zeitpunkt der Sprossung und die auf die erste Klasse ($g = 0$) bezogene relative

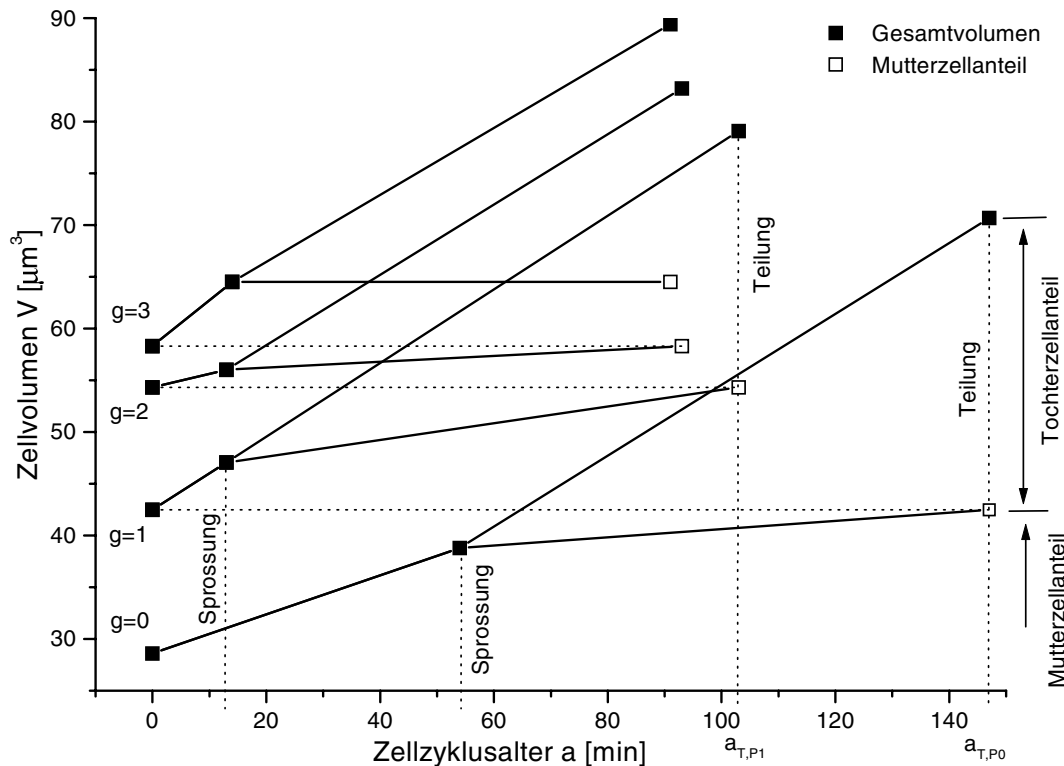


Bild 2.17: Zellvolumen in Abhängigkeit von dem Zellzyklusalter a und dem genealogischen Alter g . Für die beiden ersten Klassen sind der Beginn der Sprossung und der Zeitpunkt der Teilung gekennzeichnet (Daten: [Woldringh et al. \(1993\)](#), synchroner Batchversuch, Wachstumsrate $\mu = 0.32 \text{ h}^{-1}$)

Zellvolumenzunahme. Unter der Annahme der von der Verdünnungsrate unabhängigen relativen Zellvolumina $V_{r,P0} = 1$, $V_{r,P1} = 1.194$ und $V_{r,P2} = 1.428$ ist es möglich, den in Bild 2.19 (oben) eingetragenen standardisierten Verlauf des Zellvolumens in Abhängigkeit von der Verdünnungsrate zu berechnen. Die Abweichungen von den Meßwerten sind so gering, daß es zulässig erscheint, das Verhältnis zwischen den verschiedenen Zellvolumen der Altersklassen als konstant anzunehmen. Die Beschränkung auf kleine Verdünnungsraten mit $D < 0.2 \text{ h}^{-1}$ gestattet die zusätzliche Annahme konstanter Zellvolumen mit $V_{P0} = 30 \mu\text{m}^3$, $V_{P1} = 35.9 \mu\text{m}^3$ und $V_{P2} = 42.9 \mu\text{m}^3$. Nur in diesem Bereich der kleinen Verdünnungsraten tritt im Zellzyklus eine Synchronisation der Zellen auf. Die Vergrößerung des Zellvolumens für hohe Verdünnungsraten hat offenbar weder für die Synchronisation noch deren Erlöschen einen Einfluß.

Über den Zusammenhang zwischen Zellvolumen und Zellmasse sind widersprüchliche Angaben zu finden. Betrachtet man die Zellmasse der frischen Zelle, so dürfte das spezifische Gewicht in der Größenordnung von eins liegen. In [Woldringh et al. \(1993\)](#) ist der Wert mit $1.1 \mu\text{m}^3(10^{-12}\text{g})^{-1}$ angegeben. Verwendet man die Trockenmasse, so liegt das spezifische Gewicht deutlich niedriger. Im folgenden sei, angelehnt an die Daten von [Thompson und Wheals \(1980\)](#), ein Wert von $\frac{1}{2.3} \mu\text{m}^3(10^{-12}\text{g})^{-1}$ angenommen.

Im vorgestellten Modell wird ausschließlich die Zellmasse verwendet. Das spezifische Gewicht der Biomasse ist bei dieser Beschreibung nicht enthalten. Es wird lediglich benötigt, um die Zellmasse im Modell mit den oben gezeigten experimentellen Ergebnissen zu ver-

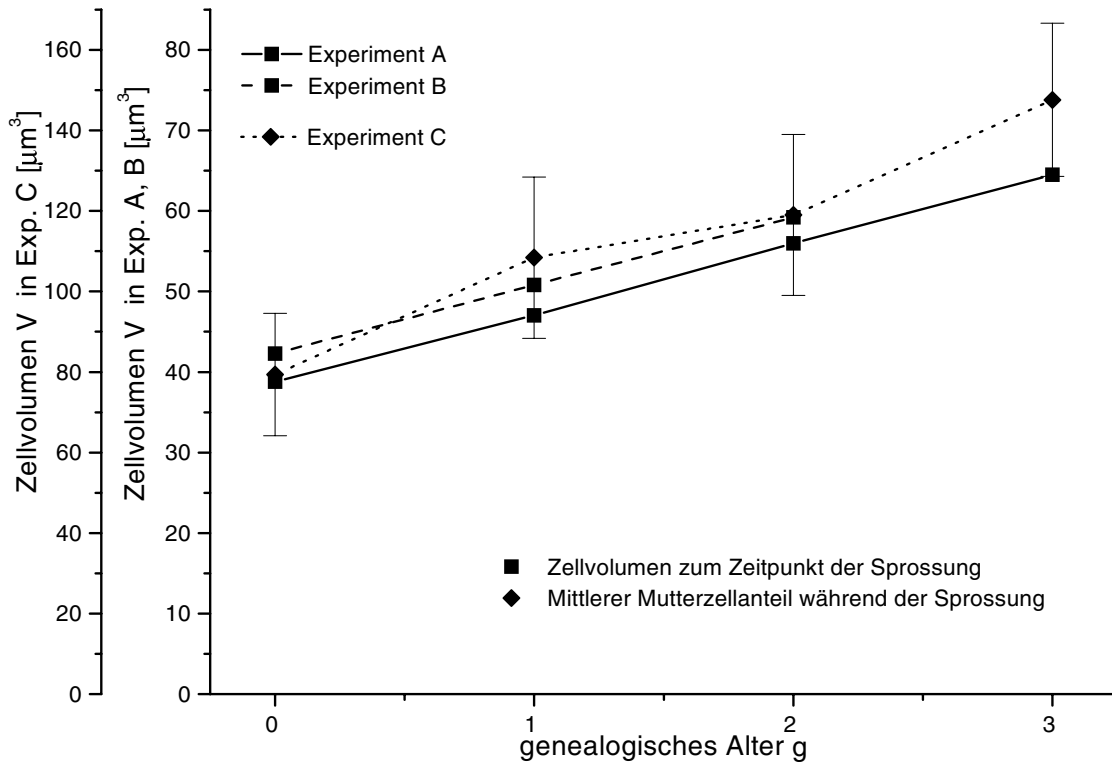


Bild 2.18: Zellvolumen zum Zeitpunkt der Sprossung bzw. mittlerer Mutterzellanteil während der Sprossungsphase. Daten: Experimente A: $\mu = 0.32 h^{-1}$ [Woldringh et al. \(1993\)](#); Experimente B: $\mu = 0.31 h^{-1}$ [Johnston et al. \(1979\)](#); Experimente C: $\mu = 0.21 h^{-1}$ [Hartwell und Unger \(1977\)](#)

gleichem.

2.4.3.2 Länge der Zyklusphasen

Die Generationszeiten der Mutter- und Tochterzellen weisen während der in Bild 2.17 gezeigten synchronen Batch-Kultur einen deutlichen Unterschied auf. Zu gleichem Ergebnis kommen [Thompson und Wheals \(1980\)](#) bei der Ermittlung der Generationszeiten in asynchroner Kultur. Bild 2.20 zeigt die von ihnen angegebenen Generationszeiten sowie die Länge der Sprossungsphase in Abhängigkeit von der in der kontinuierlichen Kultur durch die Verdünnungsrate vorgegebenen mittleren Verdopplungszeit T_D . Bei kurzen Verdopplungszeiten, also bei hoher Wachstumsrate, weisen die Generationszeiten von Mutter- und Tochterzelle etwa gleiche Werte auf, während mit steigender mittlerer Verdopplungszeit die Generationszeit der Mutterzellen weniger stark ansteigt, als die der Tochterzellen.

Wie die Ergebnisse in Bild 2.17 zeigen, ändert sich die Generationszeit im Verlauf des Lebens einer Zelle im wesentlichen nur zwischen dem ersten und zweiten Zyklus. Das heißt nur die Tochterzellen benötigen eine deutlich verlängerte Generationszeit. Mutterzellen, die mindestens einen Zellzyklus durchlaufen haben, unterscheiden sich nur noch wenig in ihrer Generationszeit. Das Volumen der Zellen wächst jedoch mit jedem Zyklus weiter an. Neben der Anzahl der Narben ist das Volumen des Mutterzellanteiles also ein weiteres äußeres Merkmal der fortschreitenden Alterung.

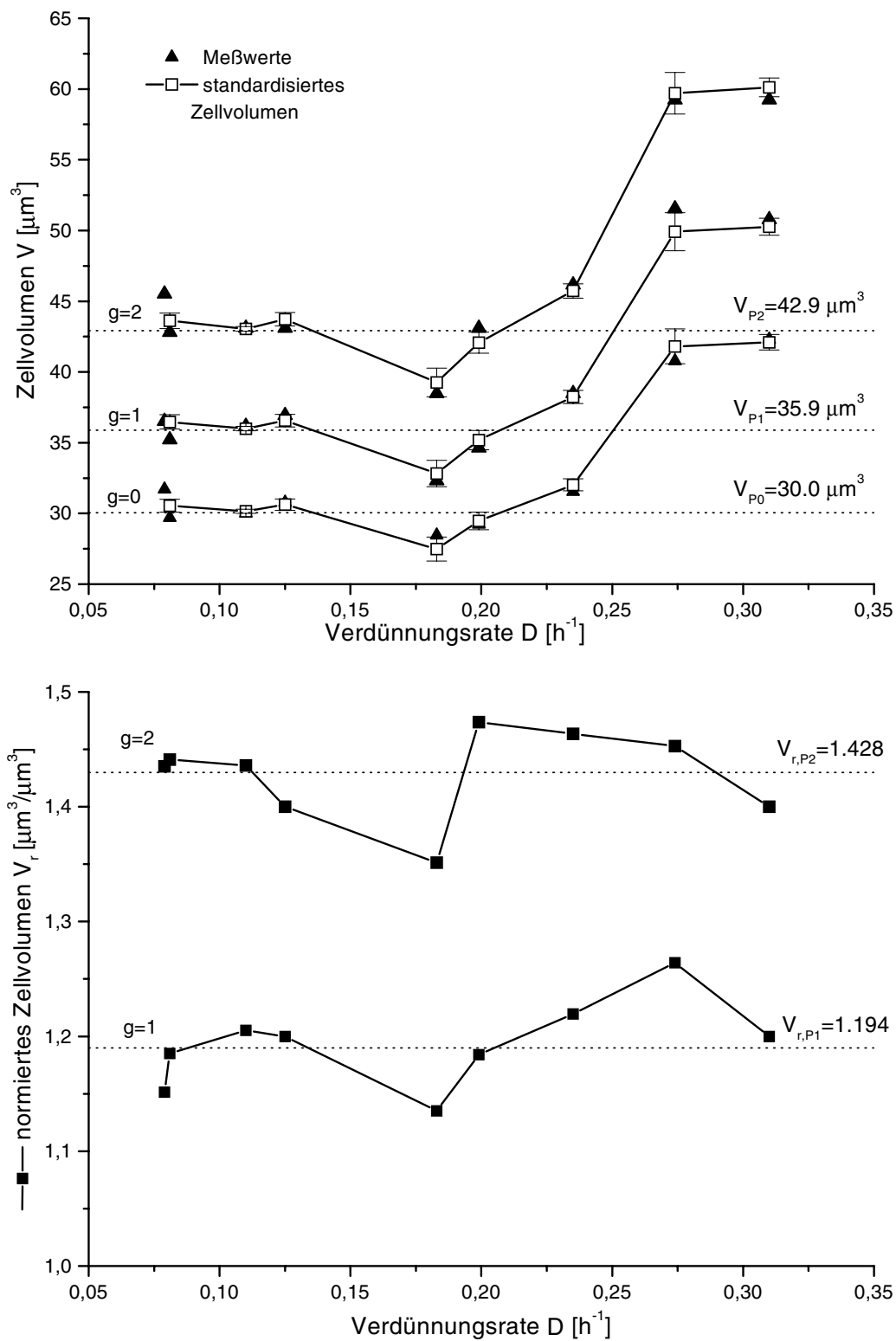


Bild 2.19: Zellvolumen und standardisiertes Zellvolumen zum Zeitpunkt der Sprossung in Abhängigkeit von der Verdünnungsrate und dem genealogischen Alter (oben, Meßwerte: Johnston et al. (1979)). Auf die Klasse $g = 0$ bezogene Zellvolumenzunahme (unten)

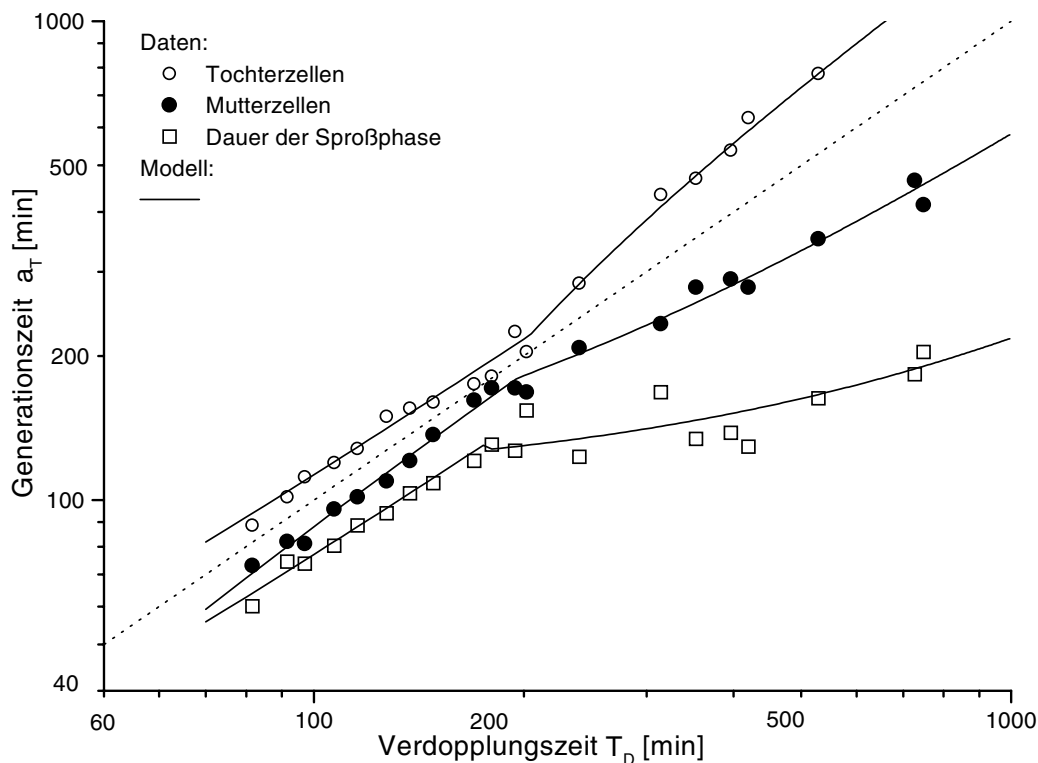


Bild 2.20: Generationszeiten der Mutter- und Tochterzellen sowie die Dauer der Sproßphase (Daten und Modell: [Thompson und Wheals \(1980\)](#))

Die aufgeführten Untersuchungen beziehen sich lediglich auf synchrone Batch Experimente bzw. die asynchrone kontinuierliche Kultur. Für die synchrone kontinuierliche Kultur fehlen leider derartige Ergebnisse. Dies ist insbesondere für die Erstellung eines detaillierten Zellzyklus- und Populationsmodells bedauerlich. Auch für die Analyse der Synchronisation selbst werden umfangreiche Messungen der Verteilung und Massen der Teilpopulationen benötigt. Das im folgenden vorgestellte Modell verwendet daher lediglich die erkennbaren qualitativen Zusammenhänge, obwohl die Struktur des Modells beispielsweise auch präzise Angaben über die Zellmasse der einzelnen Klassen berücksichtigen könnte.

2.4.4 Modell der Zyklusphasen

Der Zellzyklus erscheint nur in erster Näherung als gleichförmiger, durch die Massenzunahme gekennzeichneter Prozeß. Wie bereits in Bild 1.2 zu erkennen, weist der Zellzyklus funktionell unterschiedliche Phasen auf. Diese sind durch ihren Stoffwechsel und auch durch die Morphologie der Zellen gekennzeichnet. Beispielsweise lagern die Einzelzellen Speicherstoffe ein, die der Zelle in der Doppelzellphase wieder zur Verfügung stehen (siehe Abschnitt 2.4.2.3). Darüber hinaus zeigen Experimente mit genetisch veränderten Organismen oder Kulturen unter Zugabe von Hemmstoffen, daß es im Verlauf des Zellzyklus Kontrollpunkte gibt, die unter gewissen Bedingungen den Zellzyklus unterbrechen. Werden die notwendigen Bedingungen an diesen Kontrollpunkten nicht erfüllt, so kommt es zu einer Blockade des Zellzyklus. Die Zellen treten dann nicht in die folgende Zyklusphase

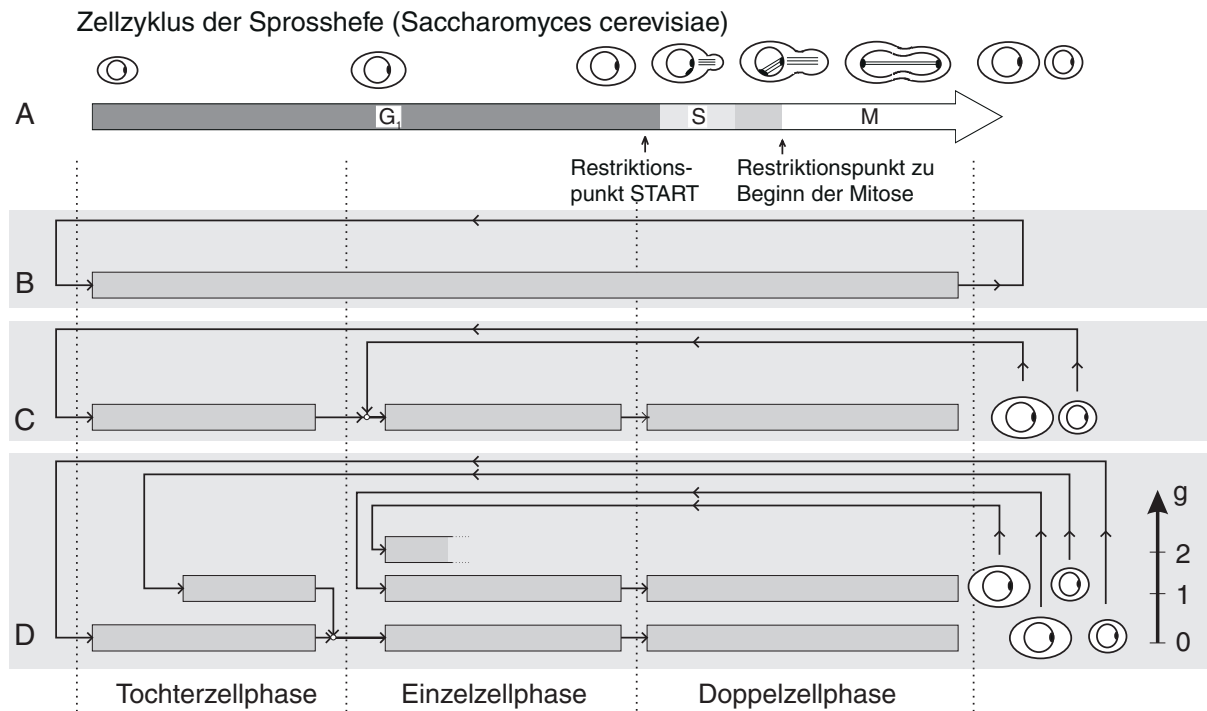


Bild 2.21: Verknüpfung der Zyklusphasen und Zellklassen. A Morphologische Veränderungen im Verlauf des Zellzyklus (Alberts et al., 1995), B Ein-Klassen-Modell, C Zyklusphasenmodell, D Mehr-Klassen-Modell, g kennzeichnet das genealogische Alter der Zellklassen

ein. Hierbei ist zwischen der durch den Zellzyklus ausgedrückten Reife und dem Stoffwechsel der Zellen zu unterscheiden. Eine durch geeignete Maßnahmen blockierte Zelle kann trotzdem in der Lage sein, weiter zu wachsen. Im folgenden ist dieser Zusammenhang mit Hilfe des in Bild 2.21 A aufgeführten Kontrollpunktes START erläutert. Das START-Signal kontrolliert den Übergang von der G_1 -Phase in die S -Phase. Diese Transition ist verbunden mit der Ausbildung der Knospe an der Zellwand der Mutterzelle. Erfolgt kein START-Signal, nimmt die Masse der Zelle zwar weiter zu, es ist jedoch keine morphologische Veränderung zu beobachten. Durch eine gezielte Zugabe von Hemmstoffen bzw. durch genetische Manipulationen können Kulturen erzeugt werden, in denen die natürlichen Bedingungen für das START-Signal verletzt sind. Bei einem vorgezogenen START-Signal ist die Zelle noch sehr klein, wenn die Sprossung eingeleitet wird. Mit jeder Teilung entstehen dann immer kleinere Zellen. Umgekehrt entstehen bei einem verzögerten START-Signal größere Zellen als üblich.

Aus den genannten Gründen erfolgt eine Aufteilung des Zellzyklus im Modell in verschiedene Phasen. Jede Phase läßt sich dabei durch das in Abschnitt 2.2.4 ursprünglich für den gesamten Zellzyklus vorgestellte System von Differentialgleichungen beschreiben. Die Modellstruktur besteht dann aus einer Matrix von biologischen Phasen, die nach ihrem genealogischen Alter und ihrer Reihenfolge im Zellzyklus geordnet sind. Im folgenden sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Modelle vorgestellt.

2.4.4.1 Ein-Klassen-Modell

Einige charakteristische Eigenschaften des diskreten Wachstumsprozesses lassen sich bereits durch das in Bild 2.21 B skizzierte Ein-Klassen-Modell darstellen. Der gesamte Zellzyklus wird in diesem Fall durch eine Zyklusphase charakterisiert. Das einzige diskrete Ereignis stellt dabei die Zellteilung am Ende des Zellzyklus dar. Zur Beschreibung der Verteilung der Zellen wird mindestens eine Größe, z.B. die Zellzahl $n(t,p)$ benötigt, die eine Abhängigkeit von Prozeßzeit t und Zykluszustand p aufweist und damit einer partiellen Differentialgleichung gehorcht.

Im Populationsmodell sind für jede Klasse die minimale Zellmasse zu Beginn des Zellzyklus und die maximale Masse am Ende des Zellzyklus sowie das Teilungsverhältnis zwischen Mutter- und Tochterzellanteil anzugeben. Bei einer endlichen Anzahl von genealogischen Klassen ergeben sich jedoch gewisse Randbedingungen. Die Anzahl der Freiheitsgrade ist hierdurch eingeschränkt. Soll beispielsweise nur eine Klasse Berücksichtigung finden, so sind im Modell beide Zellteile nach der Teilung von gleicher Größe und ihre Zellmasse ist halb so groß wie die Zellmasse der Zellen am Ende des Zellzyklus. Es bleibt lediglich ein Freiheitsgrad: Die Zellmasse am Ende des Zyklus.

Da die prinzipiellen Eigenschaften des Zellzyklus bereits im Ein-Klassen-Modell enthalten sind, wird es insbesondere zu Testzwecken verwendet.

2.4.4.2 Tochter-, Einzel- und Doppelzellphase

Für die sprossende Hefe ist die Annahme einer gleichen Masse von Mutter- und Tochterzelle nicht zulässig. Das einfachste Modell enthält daher zwei Klassen: Mutter- und Tochterzellen. Diese Struktur erlaubt eine unsymmetrische Teilung. Bedingt durch die Wahl von zwei Klassen, weisen Mutter- und Tochterzellen am Ende des Zellzyklus die gleiche Masse und das gleiche Teilungsverhältnis auf. Das heißt, nachdem die Tochterzellen die Größe der Mutterzellen erreicht haben, sind sie im Modell nicht mehr von den Mutterzellen zu unterscheiden. Es bleiben zwei Freiheitsgrade: Die Zellmasse am Ende des Zyklus und das Teilungsverhältnis.

Motiviert durch den gegenüber der Einzelzellphase veränderten Stoffwechsel in der Doppelzellphase unterteilt Strässle (1988) den Zellzyklus in zwei Zyklusphasen. Vor dem Beginn der Sprossung und damit vor dem Eintritt in die Doppelzellphase müssen die Zellen das START-Signal erhalten. Will man das START-Signal zum Beginn der S -Phase berücksichtigen, so ist es notwendig, zwischen den Zyklusphasen einen Kontrollpunkt einzuführen (siehe Bild 2.21 C).

Durch die unsymmetrische Teilung entstehen zwei verschieden große Zellen — kleinere Tochter- und größere Mutterzellen. Strässle (1988) berücksichtigt dies durch eine dritte Phase für die kleineren Tochterzellen. Erreichen die Tochterzellen die Größe der Mutterzellen, findet keine weitere Unterscheidung zwischen den beiden Zellklassen statt. Das Modell berücksichtigt die für Hefezellen charakteristische unsymmetrische Teilung, stellt jedoch kein echtes Zwei-Klassen-Modell dar, da in Einzel- und Doppelzellphase nicht nach dem genealogischen Alter unterschieden wird.

Tabelle 2.4: Zyklusphasen und -eigenschaften der Phasenmodelle im Vergleich. Statische Abhängigkeiten genügen algebraischen Gleichungen, dynamische genügen partiellen Differentialgleichungen bezüglich der unabhängigen Veränderlichen t und p

Phase	Tochterzelle	Einzelzelle	Doppelzelle
Modell n. Strässle (1988)			
Zyklus p	$f(m)^*$	$f(m)$	$f(T)$
statische	Masse	Masse	Zyklusalter
dynamische Abhängigkeit	Zellzahl	Zellzahl Speicherstoff	Zellzahl Speicherstoff Masse

* [Strässle \(1988\)](#) verwendet eine feste Zuordnung von Zyklus und Masse: Je nach Masse der Sproßzellen beginnen diese ihren Zyklus mit $p \neq 0$

Modell A + C			
Zyklus p	$f(m, m_0)$	$f(m)$	$f(T)$
statische	—	Masse	—
dynamische Abhängigkeit	Zellzahl Masse Zyklusalter	Zellzahl Speicherstoff Zyklusalter	Zellzahl Speicherstoff Masse Zyklusalter

Modell B			
Zyklus p	$f(m)$	$f(m)$	$f(m)$
statische	Masse	Masse	Masse
dynamische Abhängigkeit	Zellzahl Zyklusalter	Zellzahl Speicherstoff Zyklusalter	Zellzahl Speicherstoff Zyklusalter

Die Aufteilung in Einzel- und Doppelzellphase ermöglicht es jedoch, die morphologische Veränderung durch die Sprossung zu berücksichtigen. Neben der Zellzahl verwendet [Strässle \(1988\)](#) als verteilte Parameter die Zellmasse, die Zykluszeit (nur in der Doppelzellphase) und den Speicherstoffgehalt der Zellen (in Doppel- und Einzelzellphase), um die spontane Synchronisation der Kultur erklären zu können. In jedem Abschnitt sind so maximal drei partielle Differentialgleichungen zu lösen (siehe Tabelle 2.4).

Die Tochter- und die Einzelzellphase stehen biologisch für die G_1 -Phase, die durch eine Zunahme der Zellmasse gekennzeichnet ist. Konsequenterweise existiert hier eine starre Kopplung zwischen dem Zykluszustand und der Zellmasse. [Strässle \(1988\)](#) beschreibt diese Abhängigkeit durch den exponentiellen Zusammenhang nach Gleichung (2.32). Das Ende beider Phasen ist durch eine als konstant angenommene Zellmasse definiert.

Die Sprossungsphase (Doppelzellphase S -, M -Phase) wird als weitgehend unabhängig von äußeren Einflüssen beschrieben. Dies kann man sowohl durch die Speicherstoffe als auch durch ein genetisches Programm erklären. [Strässle \(1988\)](#) entscheidet sich daher, das Zyklusalter starr an die Zyklusvariable zu koppeln. Die Sprossungszeit wird dabei im

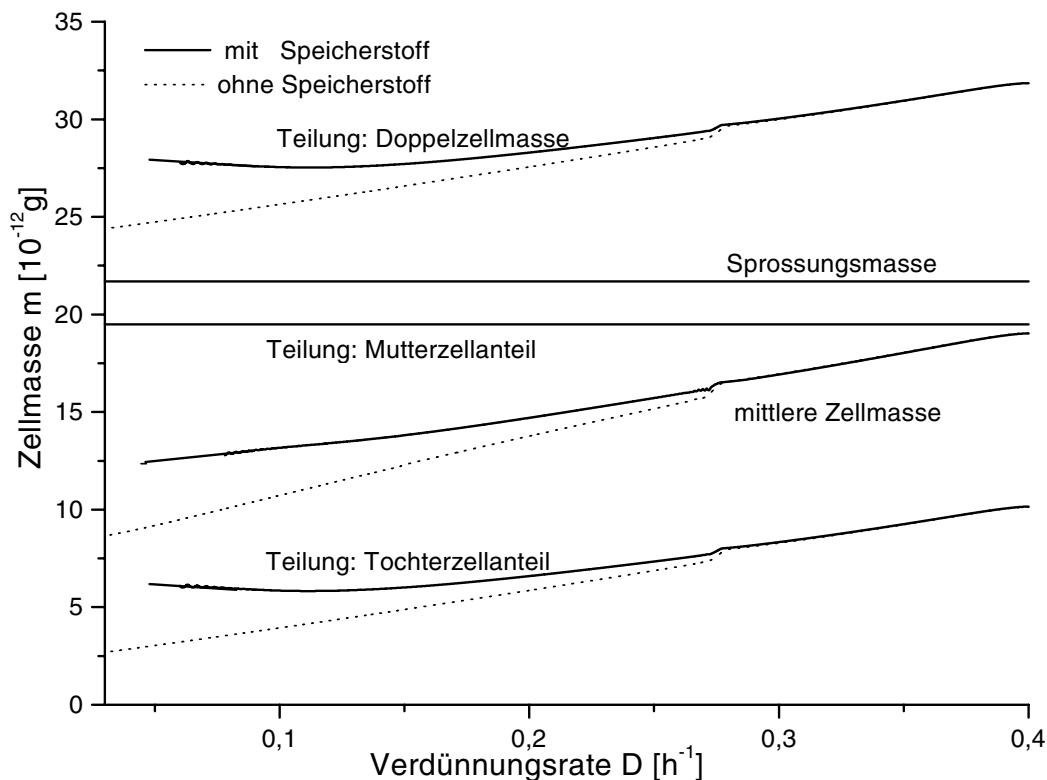


Bild 2.22: Zellmasse der sich teilenden Doppelzelle sowie des Tochter- und des Mutterzellanteils, Zellmasse zum Zeitpunkt der Sprossung und die mittlere Zellmasse in asynchroner stationärer Kultur im Modell nach [Strässle \(1988\)](#)

Modell als konstant angenommen. Am Ende dieser Phase weisen die Zellen eine durch das Angebot an internen und externen Substraten bestimmte Zellmasse auf. Daher muß die Zellmasse während dieser Phase durch die partielle Differentialgleichung (2.25) berechnet werden.

Das Teilungsverhältnis zwischen Mutter- und Tochterzellanteil der Doppelzellen wird durch einen konstanten Mutterzellanteil festgelegt. Der Tochterzellanteil berechnet sich dann aus der Differenz der Zellmasse der sich teilenden Zelle und dem (konstanten) Mutterzellanteil. Bild 2.22 zeigt den Zusammenhang zwischen Verdünnungsrate und Zellmasse in der asynchronen Kultur in diesem Modell. Mit abnehmender Verdünnungsrate sinkt die Zellmasse zum Ende des Zellzyklus und daher auch die Zellmasse der Tochterzellen. Für geringere Verdünnungsraten bleibt die Zellmasse der Tochterzellen ungefähr konstant, da in der Sprossungsphase zusätzliche Speicherstoffe zur Verfügung stehen. Ohne die eingelagerten Speicherstoffe nimmt die Zellmasse weiter ab.

Die Generationszeiten setzen sich dabei aus der Dauer der jeweiligen Zyklusphasen zusammen. Für die Generationszeit der Tochterzellen müssen alle drei Phasen berücksichtigt werden; während sich die Generationszeit der Mutterzellen nur aus der Dauer von Einzel- und Doppelzellphase zusammensetzt. Berechenbar sind die Generationszeiten mit dem Phasenmodell nur für die asynchronen kontinuierliche Kultur, da die Zellverteilung hier stets konstant ist. In der synchronen Kultur ist dies nicht möglich, da Mutter- und Tochterzellen ab der Einzelzellphase nicht mehr unterschieden werden.

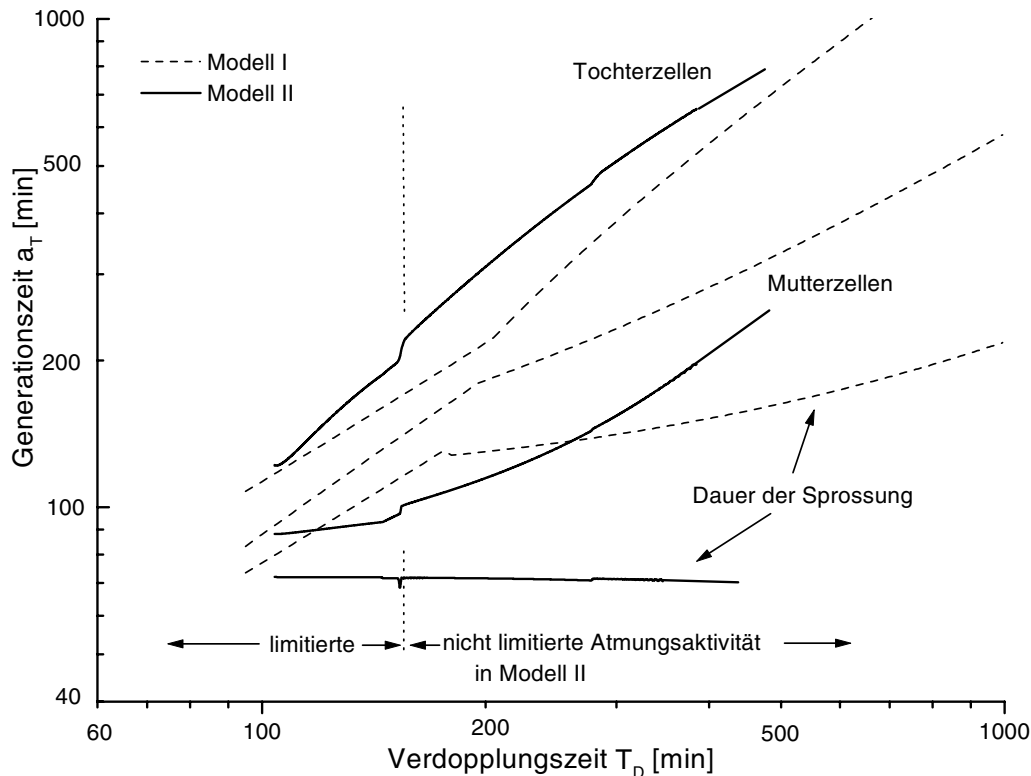


Bild 2.23: Generationszeiten der Mutter- und Tochterzellen sowie die Länge der Sproßphase Modell I: [Thompson und Wheals \(1980\)](#); Modell II: [Strässle \(1988\)](#)

Die Generationszeiten des von [Strässle \(1988\)](#) angegebenen Modells weichen in der asynchronen Kultur erheblich von den Meßdaten ab (Bild 2.23). Das Modell enthält keine Erklärung für das sich mit der mittleren Verdopplungszeit T_D ändernde Verhalten von Mutter- und Tochterzellen. Die im Modell mit $T_B = 72 \text{ min}$ als konstant angenommene Dauer der Sprossungsphase fällt verglichen mit den Meßwerten zu kurz aus. Für eine sehr lange Verdopplungszeit zeigt das Modell eine starke Neigung zur Synchronisation, so daß in diesem Bereich keine Werte für die asynchrone Kultur vorliegen.

Zur Verbesserung der Übereinstimmung der Generationszeiten in Simulation und Experiment wurde die Beschreibung der Doppelzellphase erweitert. Die im folgenden vorgestellten Varianten erlauben zusätzlich eine Analyse ihres Einflusses auf die Synchronisation der Kultur.

Für jede Zyklusphase besteht generell die Möglichkeit, ihre Dauer oder den zu erreichenden Reifezustand festzulegen. Der Reifezustand ist beispielsweise durch die Zellmasse charakterisiert. In Phasen mit konstanter Dauer ist die Zellmasse am Ende der Phase von den äußeren Bedingungen abhängig, also a priori unbekannt. Die umgekehrte Überlegung gilt für den Fall mit fester Zellmasse. Hier ist die benötigte Zeit unbekannt.

Die Dauer der Tochter- und der Einzelzellphase ist weiterhin durch konstante Zellmassen am Ende der Phasen festgelegt. Für die Doppelzellphase ist sowohl die Vorgabe der Zeit als auch der Zellmasse möglich. Das verwendete Modell enthält drei Varianten.

Modell A ist durch eine konstante Sprossungsphase $T_B = 0.8 \text{ h}$ gekennzeichnet. Dies ent-

spricht dem von [Strässle \(1988\)](#) vorgestellten Modell. Die Zellmasse während der Doppelzellphase ist in diesem Fall durch eine separate partielle Differentialgleichung zu berechnen. Die Variation der Zellmasse am Ende des Zyklus bedeutet, daß auch die Zellmasse der Tochterzellen einer ständigen Änderung unterworfen ist. Um die Randbedingung auf einfache Weise zu erfüllen, wird angenommen, daß der Mutterzellanteil stets konstant ist.

Modell B verwendet für die sich teilenden Zellen eine konstante Masse. Damit sind sowohl Mutterzellanteil als auch der Tochterzellanteil bei der Teilung unabhängig von der Verdünnungsrate.

Um eine bessere Übereinstimmung mit den Meßwerten zu erreichen, ist in Modell C die Sprossungszeit T_B abhängig von der Wachstumsrate gewählt. Es wird hierbei das von [Thompson und Wheals \(1980\)](#) für die asynchrone kontinuierliche Kultur angegebene Modell

$$T_B(\mu) = \min \left(0.49 \frac{1}{\mu} + 0.1 h, 0.076 \frac{1}{\mu} + 1.8 h \right) \quad (2.39)$$

verwendet. Dieser Modellansatz ist allerdings nur bedingt auf die synchrone Kultur zu übertragen. Anders als in der asynchronen Kultur ist die Wachstumsrate dort einem ständigen Wechsel unterworfen.

Tabelle 2.4 enthält eine Aufstellung der in den drei Modellen berücksichtigten Variablen; die hierbei verwendeten Parameter finden sich in Bild 2.24. Sofern möglich sind für alle Phasen die minimale und maximale Masse angegeben. Für die Modelle A und C ist die minimale Masse der Tochterzellphase und die maximale Masse der Doppelzellphase zeitvariabel, da die Dauer der Doppelzellphase vorgegeben ist. Zur Bestimmung der Zyklusgeschwindigkeit q in der Tochterzellphase ist die in Abschnitt 2.2.4.1 angegebene Änderung der unteren Zyklusgrenze zu berücksichtigen. Für das Phasenmodell genügen die Parameter der Zeile $g = 0$; die weiteren Zeilen führen die Parameter des Mehr-Klassen-Modells auf.

2.4.4.3 Mehr-Klassen-Modell

Eine echte Populationstruktur erfordert zusätzliche genealogische Klassen gegenüber dem Phasenmodell. Wie bereits erwähnt, ist die Berechnung der Generationszeiten verschiedener Zellklassen erst dann möglich, wenn diese Klassen auch separat im Modell enthalten sind. Es erscheint daher sinnvoll, die Zyklusphasen des in Abschnitt 2.4.4.2 vorgestellten Phasenmodells in jeder genealogischen Klasse einzuführen (Bild 2.21 D). Mit jeder weiteren Altersklasse vervielfacht sich somit die Gesamtzahl der zu berechnenden Zyklusphasen. Verwendet man das in Abschnitt 2.3 vorgestellte Populationsmodell, so wechselt eine Zelle mit jeder Teilung in die nächst höhere Altersklasse. Der Zufluß der Klasse der ältesten Zellen setzt sich aus dem Zustrom der vorhergehenden Klasse und der ältesten Klasse selbst zusammen. Die Eigenschaften der Zuflüsse, wie zum Beispiel die Masse der Zellen, sind daher zu mittleren Eigenschaften zusammenzufassen. Zu jeder Mutterzellklasse existiert eine korrespondierende Tochterzellklasse, die ihre Sproßzellen aufnimmt. Nach dem ersten Zellzyklus gehen alle Tochterzellen in die erste Mutterzellklasse über. Hier ist eine weitere Mittelung der Eigenschaften der Zellen notwendig. Die Summation der Zellflüsse

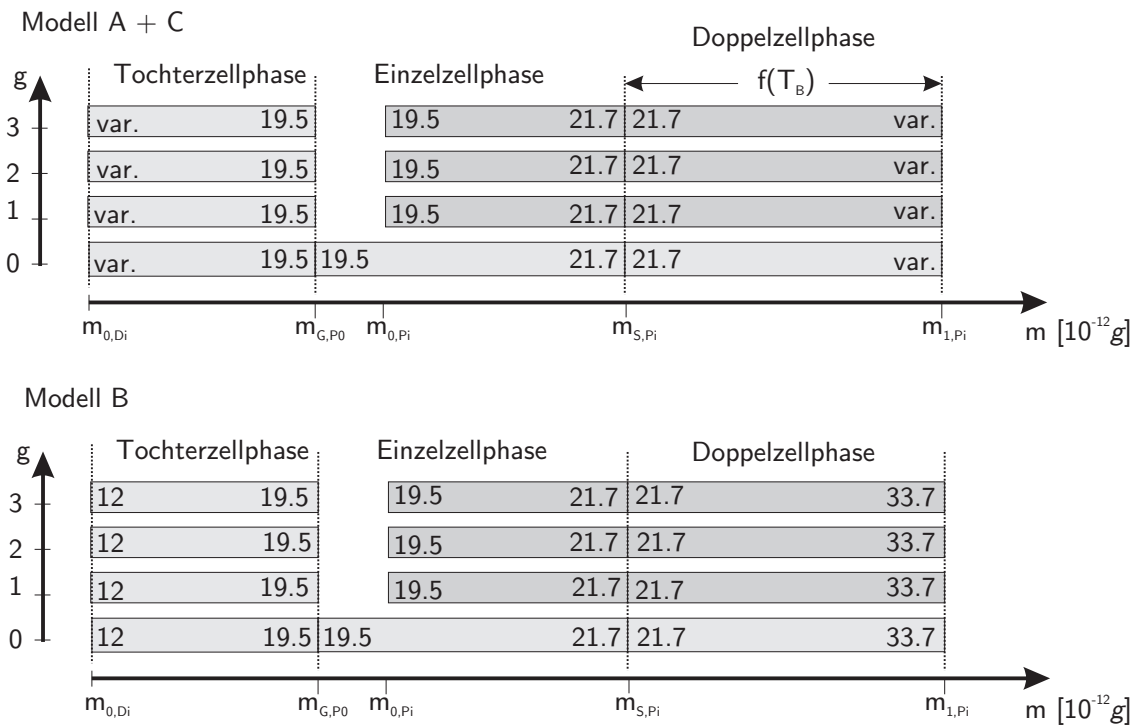


Bild 2.24: Zellmasse zu Beginn und am Ende der Zyklusphasen. In den Modellen A und C wird die bei der Teilung erreichte Masse m_{1,P_i} durch die Länge der Sprossungsphase T_B bestimmt. Daher sind die Massen am Ende der Doppelzellphase und am Beginn der Tochterzellphase variabel. In Modell C weisen alle Phasen eine feste Zuordnung zwischen Zyklus und Zellmasse auf. Von unten nach oben sind jeweils die Zellklassen mit aufsteigendem genealogischem Alter g dargestellt

ist analog zum oben aufgeführten Phasenmodell bereits im Anschluß an die Tochterzellphase vorgesehen. Die Tochterzellklassen sind also in der Einzel- bzw. Doppelzellphase nicht zu unterscheiden. Die vorgestellte Lösung enthält g vollständige Mutterklassen und g lediglich in der Tochterzellphase unterscheidbare Tochterklassen. Da die Tochterklassen einer meßtechnischen Unterscheidung nicht zugänglich sind, ist diese Modellstruktur für die meisten Anwendungen geeignet. Die gewünschte Anzahl der genealogischen Klassen ist dabei beliebig wählbar. Die Parameter des Modells sind in Bild 2.24 angegeben. Sie entstehen durch Vervielfachung der Parameter des einfacheren Phasenmodells. Da keine Messungen der Zellmasse für die synchrone Kultur unter Berücksichtigung der genealogischen Klassen vorliegen, sind hier die gleichen Massen für alle Klassen angenommen worden. Für $g = 0$ entsteht aus dem Mehr-Klassen-Modell das in Bild 2.21 C gezeigte Phasenmodell.

Die für jede genealogische Klasse vorgesehenen verteilten Variablen umfassen jeweils die des Phasenmodells. Zur Berücksichtigung der mit dem genealogischen Alter zunehmenden Masse wurde die Einzelmasse der Zellen ebenfalls als verteilte Variable berechnet. Im Hinblick auf die Analyse der synchronen Kulturen ist es wünschenswert, die Generationszeit zu berechnen. Hierfür wird zusätzlich in allen Abschnitten das Zyklusalter ermittelt.

2.4.5 Synchronisation des Zellzyklus

Wie aus praktischen Untersuchungen hervorgeht, neigen kontinuierliche Hefekulturen bei gewissen Wachstumsraten zu einer Synchronisation der Sprossung. Mit anderen Worten, der Zellzyklus läuft bei einer Vielzahl von Zellen synchron ab. Da der Stoffwechsel in den Zyklusphasen unterschiedlich ist, kommt es im Fall der Synchronisation zu einer periodischen Änderung einer Vielzahl von Prozeßparametern des Bioreaktors. Der Stoffwechsel derjenigen Phase, in der sich die Mehrzahl der Zellen befindet, dominiert dabei das Verhalten der gesamten Kultur. In der durch eine zeitinvariante Zellverteilung gekennzeichneten asynchronen Kultur ist der vom Zellzyklus abhängige Stoffwechsel nicht zu beobachten. Die Prozeßparameter spiegeln hier die mittleren Stoffwechseleigenschaften der Zellen wieder.

Die Mechanismen, die zu einer Synchronisation führen, sind bisher nicht vollständig bekannt. Gesucht wird der Einfluß der Umgebungsbedingungen auf die Verteilung der Zellen im Zellzyklus. Fundamental ist hierbei der Zusammenhang zwischen Wachstumsrate und Substratangebot. Durch eine zeitabhängige Wachstumsrate $\mu(t)$ ist es möglich, unterschiedlichen Umgebungsbedingungen Rechnung zu tragen. Ein Einfluß auf die Zellverteilung ist jedoch nur bei einer zusätzlich vom Zellzyklus abhängigen Wachstumsrate $\mu(t, p)$ zu erwarten. Dies entspricht auch der biologische Vorstellung von den Vorgängen während des Zellzyklus. Hier werden Phasen unterschieden, in denen die Zellmasse zunimmt und solche, in denen es zu Strukturveränderungen im Zellaufbau kommt (siehe Bild 1.2 auf Seite 23). Bereits ein vereinfachtes Modell, bestehend aus Phasen mit umgebungsabhängiger Wachstumsrate $\mu(t)$, und konstanter Wachstumsrate μ ist für eine Synchronisation der Zellverteilung ausreichend (Strässle, 1988; Hoppensteadt, 1989).

Die Zyklusgrenzen der Zyklusvariablen verändern sich ebenfalls mit den Umgebungsbedingungen. Im Fall des Zyklusalters $a \in [a, a_T]$ liegt die untere Grenze $a = 0$ zwar fest, die Generationszeit a_T ist jedoch von der Wachstumsrate abhängig. Bei der Beschreibung durch die Zellmasse m sind sowohl die minimale Masse m_0 als auch die maximale Masse m_1 variabel. Vanoni et al. (1983) beobachten eine Abhängigkeit der Zellgröße von der Qualität des Substrates.

Der folgende Abschnitt zeigt den Einfluß einer Änderung der Zyklusgrenzen am Beispiel der Generationszeit a_T . Zum besseren Verständnis werden anschließend mögliche Einflußfaktoren auf die Wachstumsrate $\mu(t, p)$ in den einzelnen biologischen Phasen diskutiert.

2.4.5.1 Veränderung der Zyklusgrenzen

Der Einfluß einer Änderung der Zyklusgrenzen auf die Verteilungsdichte wird im folgenden exemplarisch mit Hilfe der Darstellung des Zellzyklus durch das normierte Zyklusalter p_a analysiert. Die Variation der Generationszeit $\frac{da_T}{dt}$ verursacht in der Differentialgleichung (2.16) einen von p_a abhängigen Einfluß auf die Zyklusgeschwindigkeit q_a . Das heißt, die Zyklusgeschwindigkeit ist unterschiedlich im Zellzyklus und führt daher zu einem Einfluß auf die Verteilungsdichte. Wie das nachfolgende Beispiel einer Population, bestehend aus einer Klasse von Zellen zeigt, führt eine zeitlich begrenzte Veränderung der Zyklusgrenzen jedoch nicht zwingend zu einer dauerhaften Änderung der Verteilungsdichte.

Bild 2.25 zeigt eine durch das Substratangebot verursachte periodische Wachstumsrate $\mu(t)$. Wie in Abschnitt 2.2.3 demonstriert, wirkt sich die Wachstumsrate auf die Generationszeit $a_T(t)$ aus. Diese weist ebenfalls einen periodischen Zeitverlauf auf. Zu Beginn des Experimentes für $t = 0$ ist die Verteilungsdichte konstant. Um die Änderungen besser beurteilen zu können, wurde die Verdünnungsrate $D = 0$ und die Randbedingung $q_a(t, 0)n_a(t, 0) = q_a(t, 1)n_a(t, 1)$ gewählt. Im unteren Teil von Bild 2.25 wird die Verteilungsdichte $n_a(t, p)$ für verschiedene Zeitpunkte t gezeigt. Bei der periodischen Anregung durch die Wachstumsrate ist eine Synchronisation der Zelldichte zu beobachten. Das Maximum der Verteilungsdichte wandert durch den Zellzyklus.

Ab $t = 60 h$ liegen konstante Umgebungsbedingungen vor und für die Wachstumsrate gilt $\mu = const$. Mit der bereits in Abschnitt 2.2.3 beschriebenen Verzögerung nimmt auch die Generationszeit a_T einen konstanten Wert an. Nach dieser Zeit hat die Verteilungsdichte wieder die gleiche Form wie zu Beginn des Experimentes. Die periodische Anregung durch die Wachstumsrate konnte keinen bleibenden Einfluß auf die Lage einzelner Zellen im Zellzyklus ausüben.

Das Ergebnis erscheint plausibel, wenn man den Zellzyklus durch die auf die Zellmasse bezogene Zyklusvariable p_m beschreibt. Da die zugehörige Differentialgleichung (2.22) keine explizite Abhängigkeit der Zyklusgeschwindigkeit q_m vom Zellzyklus p_m zeigt, ist die Zyklusgeschwindigkeit aller Zellen gleich und ändert sich periodisch mit der Zeit. Mit anderen Worten: Die Zellen bewegen sich mal schneller mal langsamer durch den Zellzyklus. Die Zelldichte $n_m(t, p_m)$ bleibt unverändert. Die synchronisierte Zelldichte $n_a(t, p_a)$ im ersten Fall entsteht lediglich aufgrund der Normierung auf die nichtlineare Verteilung des Zyklusalters $a(t, p_m)$ (Bild 2.25, untere Reihe). In der letzten Phase mit konstanter Wachstumsrate stellt sich wieder eine gleichmäßige Verteilung des Zyklusalters über den Zellzyklus ein und dementsprechend auch die ursprüngliche konstante Verteilungsdichte $n_a(t, p)$.

Die Änderung der Zyklusgrenzen alleine hat keine Veränderung der Form der Verteilung einer anschließenden stationären Phase zur Folge. Die von Hjortso und Nielsen (1995) angegebene Synchronisation durch eine periodische Änderung der Generationszeit ist nur solange vorhanden, wie die periodische Anregung anhält. Ähnliches gilt auch für die Zellmassen m_0 und m_1 der Zellen zu Beginn und am Ende des Zellzyklus. Die durch eine Anpassung an andere Umgebungsbedingungen hervorgerufenen transienten Vorgänge haben letztendlich keine Auswirkung auf die Form der Verteilungsdichte.

2.4.5.2 Wachstumsrate

Ruhephasen sind durch eine Unterbrechung des Wachstums gekennzeichnet. Es ist möglich, eine Ruhephase durch Stoppen der Substratzufuhr zu erreichen. Berücksichtigt man keine zusätzlichen internen Speicherstoffe, trifft eine derartige Ruhephase alle Zellen gleichermaßen. Das heißt, die Form der Verteilungsdichte bleibt unverändert. Wie bereits an dem in Bild 2.7 gezeigten Beispiel für $5 h < t < 10 h$ zu erkennen, ist das erstellte Modell in der Lage, diese Hungerphasen zu berechnen.

Eine andere Möglichkeit für eine Zelle, sich in eine Ruhephase zu begeben, besteht, wenn ein sogenannter Kontrollpunkt im Zellzyklus nicht überwunden wird. Als Kontrollpunkt

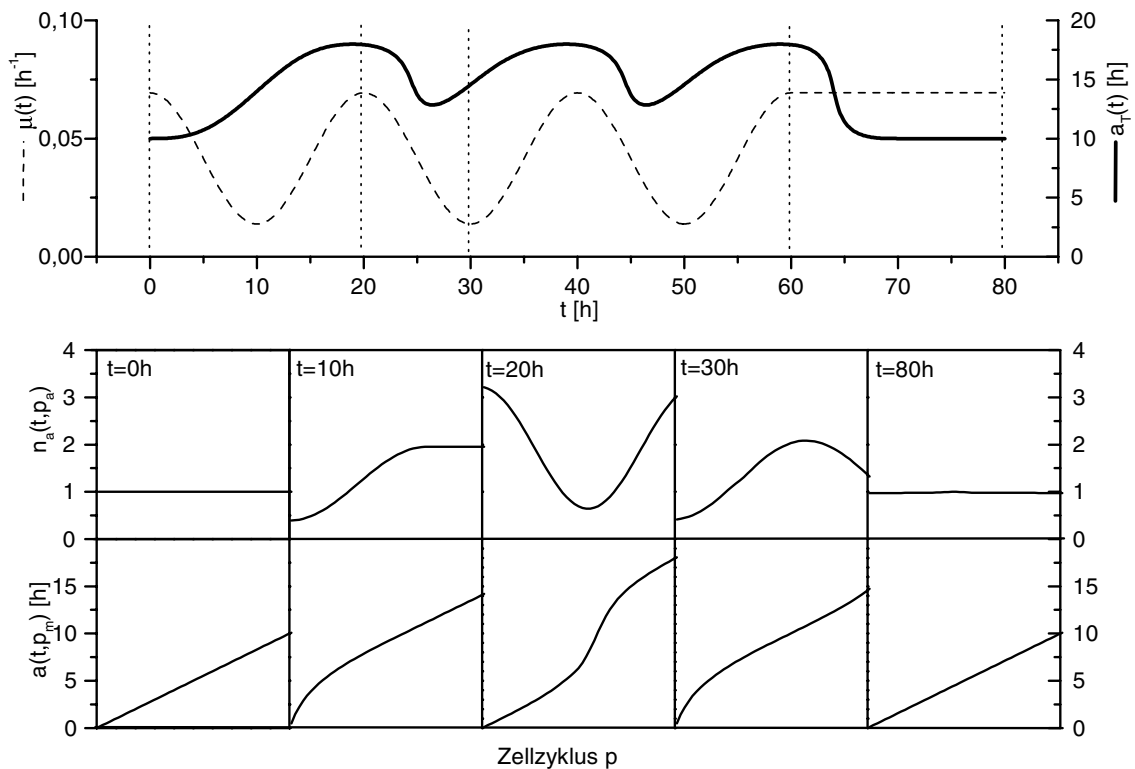


Bild 2.25: Zellverteilung bei einer periodischen Wachstumsrate $\mu(t)$. Der Zellzyklus ist im Intervall $p \in [0, 1]$ dargestellt

wird beispielsweise das START-Signal am Ende der G_1 -Phase bezeichnet, das den Übergang von der G_1 - in die S -Phase steuert. Wird das START-Signal nicht gegeben, so verbleiben die Zellen in der G_1 -Phase (siehe Bild 1.2, Seite 23). Die Kontrollpunkte verursachen nur bei den Zellen eine Unterbrechung des Zellzyklus, die sich im entsprechenden Zellzykluszustand befinden. Ein längeres Ausbleiben eines Signals führt zu einer Anhäufung der Zellen vor dem zugehörigen Kontrollpunkt und damit zu einer Synchronisation.

Das in Abschnitt 2.4.4 vorgestellte Modell erlaubt die Definition von Kontrollpunkten zwischen den Zyklusphasen. In den folgenden Untersuchungen wird jedoch angenommen, daß die Kontrollpunkte stets passiert werden, da die zur Verfügung stehenden experimentellen Daten keine Aufschluß über die Signale zur Steuerung des Zellzyklus liefern.

Speicherstoffe Der Stoffumsatz einzelner biochemischer Reaktionen in den Zellen ist begrenzt. Das maximal mögliche Wachstum wird im wesentlichen durch die maximale respiratorische Kapazität begrenzt (Sonnleitner und Käppeli, 1986). Das heißt, unter Umständen kann ein Teil des aufgenommenen Substrates nicht zum Wachstum verwendet werden und wird in Form von Ethanol wieder ausgeschieden. Das Ethanol ist für die Zellen jedoch nicht verloren, sondern kann zu einem späteren Zeitpunkt, wenn die respiratorische Kapazität es erlaubt, wieder aufgenommen werden.

In der G_1 -Phase verwenden die Zellen einen weiteren Teil der aufgenommenen Substrate zur Bildung zellinterner Reserven. Diese Speicherstoffe verwenden die Zellen, um die Ver-

dopplung des genetischen Materials in der *S*-Phase weitgehend unabhängig durchführen zu können. Anders als das ausgeschiedene Ethanol als externer Speicherstoff, stehen die internen Speicherstoffe nur der einlagernden Zelle zur Verfügung.

Für die Erklärung der Synchronisation von Hefezellen in kontinuierlicher Kultur spielt die Einlagerung von Speicherstoffen und die limitierte respiratorische Kapazität laut [Strässle \(1988\)](#) eine entscheidende Rolle. Mit Beginn der *S*-Phase mobilisieren die Zellen ihre internen Speicherstoffe. Das dann nicht benötigte Substrat sowie das von diesen Zellen produzierte Ethanol steht anderen Zellen zur Verfügung und ermöglicht es diesen, eventuell auch die *S*-Phase zu erreichen. Je größer die Anzahl der Zellen ist, die gemeinsam in die *S*-Phase eintreten, desto größer fällt die Sogwirkung für die nachfolgenden Zellen aus. Dieser Mechanismus liegt dem im folgenden verwendeten Modell zugrunde. Der Zusammenhang zwischen Substratangebot und Wachstumsrate ist im Detail in Abschnitt [2.4.2](#) vorgestellt.

Kapitel 3

Lösung der Modellgleichungen

Im Mittelpunkt der Betrachtungen steht der Bioreaktor in kontinuierlicher Betriebsweise. Der Reaktorinhalt ist durch Zuflüsse und Abflüsse einer ständigen Veränderung unterworfen. Sind die Prozeßparameter konstant, so spricht man vom sogenannten Chemostat. Dieser Betrieb erfordert, daß Zufluß und Abfluß gleich sind und eine homogene Durchmischung des Reaktorvolumens vorliegt. Der Chemostat zeichnet sich durch determinierte Umgebungsbedingungen für die Mikroorganismen aus und erlaubt die Untersuchung stationärer Fließgleichgewichte. Veränderte Prozeßparameter führen dabei zu transienten Vorgängen, bis sich wiederum ein stationäres Fließgleichgewicht einstellt.

In der Regel haben die konstanten Prozeßparameter des Chemostats auch für die unsymmetrisch sprossende Hefe *S. cerevisiae* konstante Verläufe der gemessenen Prozeßvariablen zur Folge. Ein derartiges Verhalten ist jedoch nur bei einem Ausgleich der unterschiedlichen Wachstumseigenschaften im Verlauf des Zellzyklus möglich. In diesem Fall, der sogenannten *asynchronen Kultur*, ist keine Veränderung der genealogischen Zusammensetzung zu beobachten. Das heißt, zu jedem Zeitpunkt ist die Anzahl der sich teilenden Zellen konstant. Eine Vielzahl von kontinuierlichen Kulturen weist dieses asynchrone Wachstum auf, das eine Ruhelage des Fließsystems darstellt. Hierbei handelt es sich jedoch nicht um den einzigen möglichen singulären Zustand des beschriebenen Systems.

Neben dem konstanten Verlauf der gemessenen Prozeßvariablen lassen sich unter gewissen Umständen auch periodische Zeitverläufe beobachten. Diese Oszillationen können verschiedene Ursachen haben. Eine aus der Dynamik einzelner enzymatischer Schritte resultierende periodische Lösung wird als biochemischer Oszillator bezeichnet. Ein Beispiel hierfür stellen die bereits in Abschnitt 2.4.2 erwähnten glykolytischen Oszillationen dar, die ihre Ursache in den konkurrierenden Reaktionen des Stoffwechselweges der Glykolyse haben. [Markus und Hess \(1984\)](#) beschreiben diese in zellfreiem Hefeextrakt beobachteten Oszillationen. Die Periodenlänge der Oszillation liegt im Bereich von einigen Minuten bis zu einer Stunde.

Eine Periodizität ist ebenfalls zu beobachten, wenn es zu einer Synchronisation des Zellzyklus kommt. Dieser Zustand wird als sogenannte *synchrone Kultur* bezeichnet. Die Wachstumsrate und die Aktivität der Zellen ist in den einzelnen Zellzyklusphasen unterschiedlich. Erfolgt das Wachstum der Zellen synchron, spiegelt der Verlauf der Prozeßvariablen den Stoffwechsel während des Zellzyklus wider. In der asynchronen Kultur ist diese

Abhängigkeit vom Zellzyklus nicht zu beobachten, da sich die verschiedenen Wachstumseigenschaften aufgrund der asynchronen Verteilung der Zellen im Zellzyklus ausgleichen. Die Periodenlänge der synchronen Oszillationen liegen je nach eingestellter Verdünnungsrate im Bereich von einigen Stunden bis über zehn Stunden. Die beiden beschriebenen oszillierenden Kulturen, der biochemische Oszillator und die synchrone Kultur, stellen eine periodische Lösung des Fließsystems dar.

Die singulären Lösungen des Fließsystems haben den Vorteil, daß der Zustand des Systems mit Hilfe von vereinfachten Gleichungen charakterisiert werden kann. Im Fall der asynchronen Kultur entfällt beispielsweise die Zeitabhängigkeit, so daß in der Regel einfache algebraische Gleichungen die Biomasse- und Produktkonzentration als Funktion von Verdünnungsrate und Nährstoffangebot beschreiben. Die Lösung des dynamischen Modells ist erst dann erforderlich, wenn Aussagen über den Reaktor während transienter Phasen zu treffen sind. Mit Hilfe der vereinfachten Beschreibung des stationären Zustandes ist dies nicht möglich.

Auch die synchrone Kultur stellt einen besonderen Zustand des Fließsystems dar. Im Gegensatz zur asynchronen Kultur ist sie durch in der gleichen Zellzyklusphase befindliche Teilpopulationen gekennzeichnet. Jede der in Abschnitt 2.3 beschriebenen genealogischen Klassen besteht aus einer oder mehrerer dieser synchronen Teilpopulationen. Eine periodische Lösung ist nur dann möglich, wenn die Sprossung jeweils einer synchronen Teilpopulation in allen genealogischen Klassen zum gleichen Zeitpunkt erfolgt. Die morphologischen Untersuchungen der synchronen Kultur bestätigen dies, da der Sprossungsindex während jeder Periode genau einmal ansteigt. Die Generationszeiten der einzelnen Zellen scheinen also an die Periodenlänge, beziehungsweise an Vielfache von dieser, gebunden zu sein. Das Verhältnis zwischen den Generationszeiten der genealogischen Zellklassen, bezogen auf die beobachtete Periodenlänge, wird als Wachstumsmodus bezeichnet. Unter dieser Annahme leitet Bellgardt (1994a) für ein Modell mit einer Klasse von Mutter- und einer Klasse von Tochterzellen eine Beziehung zwischen der beobachteten Periodenlänge und der Verdünnungsrate ab. Der Wachstumsmodus stellt hierbei einen zusätzlichen Freiheitsgrad der Kultur dar.

Wie bereits für die asynchrone Kultur erwähnt, gilt der Zusammenhang lediglich für die periodische Lösung. Transiente Vorgänge infolge eines Moduswechsels oder veränderter Prozeßparameter lassen sich hierdurch nicht beschreiben. Auch gibt das vereinfachte Modell keine Auskunft über die Synchronisation der Zellen und den Einfluß der Prozeßparameter auf den Wachstumsmodus. Aus diesem Grunde ist es notwendig, die in Kapitel 2 vorgestellten Modellgleichungen für das dynamische Zellzyklus- und Populationsmodell vollständig zu lösen. Der folgende Abschnitt 3.1 stellt zu diesem Zweck eine numerische Approximation der allgemeinen Lösung der Modellgleichungen vor.

In Abschnitt 3.2 erfolgt dann die Erweiterung des von Bellgardt (1994a) vorgestellten Zwei-Klassen-Modells zur Beschreibung der stationären synchronen kontinuierlichen Kultur auf die in Abschnitt 2.3 eingeführte allgemeine Mehr-Klassen-Struktur. Experimentelle Ergebnisse lassen vermuten, daß die Beschränkung auf zwei Klassen nicht für alle beobachteten Kulturen ausreichend ist (Woldringh et al., 1993; Beuse et al., 1998). Es schließt sich eine Analyse der Sensitivität der vorhergesagten Periodenlänge bezüglich kleiner Abweichungen der Generationszeiten von Mutter- und Tochterzellen an.

3.1 Numerische Lösung

Das Wachstum des Organismus *S. cerevisiae* wird in dem in Kapitel 2 vorgestellten Modell sowohl durch gewöhnliche als auch durch partielle Differentialgleichungen beschrieben. Für eine Charakterisierung der Gas- und Flüssigphase des Bioreaktors sind beispielsweise gewöhnliche Differentialgleichungen ausreichend. Unter den in der Mikrobiologie üblichen Versuchsbedingungen im Rührkesselreaktor kann aufgrund der homogenen Durchmischung im Reaktor der Zustand des Systems vollständig durch die mittleren Konzentrationen der Inhaltstoffe wiedergegeben werden. Zur numerischen Approximation der Lösung gewöhnlicher Differentialgleichungen sind eine Vielzahl von Algorithmen bekannt (Press, 1992). Sie stehen in Form von Programm-Bibliotheken zur Verfügung. Im Rahmen dieser Arbeit fand die Simulationssprache ACSL (Advanced continuous simulation language) Verwendung, die eine einfache Verbindung von kontinuierlichen und diskreten Modellteilen erlaubt (Breitenecker et al., 1993).

Die Berechnung des Zellzyklus geschieht stets mit Hilfe von partiellen Differentialgleichungen, in denen neben der Prozeßzeit der Zellzykluszustand als weitere unabhängige Variable auftritt. Die explizite Berücksichtigung des Zellzyklus und des genealogischen Alters ist immer dann notwendig, wenn die betrachteten Eigenschaften signifikant von der Verteilung der Zellen über den Zellzyklus abhängen. Ein Beispiel dafür ist die spontane Synchronisation in kontinuierlichen Kulturen, die an einer anhaltenden Oszillation der Prozeßvariablen erkennbar ist.

Die folgenden Abschnitte gehen auf die numerischen Methoden zur Lösung einer den Zellzyklus beschreibenden partiellen Differentialgleichung ein. Im Anschluß erfolgt eine Validierung der implementierten Methoden. Hierbei ist, wegen des in Abschnitt 3.2 angegebenen Zusammenhanges zwischen Verdünnungsrate und Periodenlänge in der synchronen Kultur, die Zellbilanz von besonderer Bedeutung.

3.1.1 Zyklusphasen und Kontrollpunkte

Die Kontrollpunkte teilen den Zellzyklus in eine Reihe von Zyklusphasen ein. Hierbei sind die Zyklusphasen stets durch einen kontinuierlichen Reifeprozeß gekennzeichnet. Abhängig von den beobachteten biologischen Eigenschaften sind in jeder Zyklusphase die Wachstumsgeschwindigkeit, die Zellmasse, der Speicherstoffinhalt und die aktiven Stoffwechselfade anzugeben. Die Intervallgrenzen einer Zyklusphase werden durch Kontrollpunkte markiert. Im blockierten Zustand weisen die Kontrollpunkte eine Wachstumsgeschwindigkeit von $q = 0$ auf, der Reifeprozeß kommt zum Erliegen und am Kontrollpunkt entsteht eine Anhäufung von Zellen mit gleichem Zellzykluszustand. Im Extremfall, wenn alle Zellen einer Zyklusphase an einem Kontrollpunkt angekommen sind, liegt eine impulsförmige Verteilung vor. Die Berechnung einer derartigen Zellverteilung im Zyklus bereitet numerische Schwierigkeiten, da es nicht möglich ist, die für die Lösung der partiellen Differentialgleichung notwendige Ableitung bezüglich des Zellzyklus zu bestimmen. An den Kontrollpunkten erfolgt daher keine Beschreibung durch die partielle Differentialgleichung. Zwischen den Zyklusphasen wird statt dessen ein zusätzliches Reservoir

eingeführt, um gegebenenfalls den arretierten Zellzyklus zu charakterisieren. Zur Vermeidung eines derartigen Effektes innerhalb einer Zyklusphase muß gefordert werden, daß die Wachstumsgeschwindigkeit an keiner Stelle in der Zyklusphase auf $q = 0$ absinkt. Auch direkt vor einem Kontrollpunkt muß für die Wachstumsgeschwindigkeit $q > 0$ gelten. Die Wachstumsgeschwindigkeit $q = 0$ für die gesamte Phase ist dagegen zulässig. Dies ist notwendig, um auch einen Batch-Zustand (Verdünnungsrate $D = 0 \text{ h}^{-1}$) berücksichtigen zu können.

3.1.2 Diskretisierung des Zellzyklus

Das Wachstum einzelner Zellen besteht aus dem Durchlauf durch die Phasen des Zellzyklus und ist in jeder Phase durch eine partielle Differentialgleichung der Form

$$\frac{\partial n(t, p)}{\partial t} + \frac{\partial (q(t, p) n(t, p))}{\partial p} = -D(t)n(t, p) \quad (3.1)$$

beschreibbar. In der Gleichung stellt $n(t, p)$ die jeweilige Zellzahl und $q(t, p)$ die Wachstumsgeschwindigkeit dar. Zur vollständigen Definition ist die Angabe der Zellzahl zum Beginn des Beobachtungszeitraumes (Anfangsbedingung) sowie die Zahl der neu in den Zellzyklus eintretenden Zellen notwendig (Randbedingung).

Für die Berechnung der periodischen Lösung der synchronen kontinuierlichen Kultur ist es notwendig, daß die zugrunde gelegten numerischen Verfahren die Zellzahl unverändert lassen. Die Bilanz der Zuflüsse und Abflüsse muß ausgeglichen sein, um einen sinnvollen Vergleich zwischen der numerischen und der analytischen Lösung zu ermöglichen. Gleiche Voraussetzungen müssen auch für die Zellmasse gelten. Im einzelnen sind also folgende Anforderungen an die numerische Lösung der dynamischen Modellgleichungen zu stellen:

- Ausgegliche Zellbilanz.
- Massenerhaltend, wobei die Zellmasse innerhalb des Zellzyklus mit der Wachstumsrate $\mu(t, p)$ wächst.
- Bei der Behandlung von synchronen Kulturen ist mit „impulsförmigen“ Verteilungen zu rechnen. Diese Populationen müssen gegenüber der analytischen Lösung phasentreu sein und in ihrer Amplitude erhalten bleiben.
- Durch die Sprossung der Zellen entstehen aus einer Zelle jeweils zwei neue mit voneinander abweichenden Eigenschaften. Eine endliche Klassenzahl erfordert es, mehrere Zuflüsse zusammenführen zu können. Das heißt, die Addition von Zellflüssen muß möglich sein.
- Für den Fall, daß alle mobilisierbaren Substrate in einer Batch-Phase verbraucht sind, müssen die Verfahren auch die ruhende Verteilung berechnen können ($q = 0$).
- Die numerische Stabilität und die Konvergenz der Lösung sind zu gewährleisten.

Für eine Verbindung mit dem durch gewöhnliche Differentialgleichungen beschriebenen Reaktormodell ist eine Integration über die verteilt parametrischen Variablen, wie die Zelldichte $n(t, p)$, erforderlich. Die Zellzahl in einer Zyklusphase ergibt sich beispielsweise durch die Integration

$$N(t) = \int_0^1 n(t, p) dp, \quad (3.2)$$

wobei die Zyklusvariable ohne Einschränkung der Allgemeinheit auf das Intervall $[0, 1]$ normiert ist. Die Biomasse berechnet sich in analoger Weise durch Integration über das Produkt aus der Zellzahl $n(t, p)$ und der Zellmasse $m(t, p)$ entsprechend der Gleichung

$$M(t) = \int_0^1 m(t, p) n(t, p) dp. \quad (3.3)$$

Für die numerische Lösung des Problems sind Routinen vorzusehen, die eine Diskretisierung der partiellen Differentialgleichungen vornehmen. Dabei entsteht ein System von gekoppelten gewöhnlichen Differentialgleichungen. Zur Kopplung an Systemteile mit konzentrierten Parametern ist es notwendig, wie oben für die Zellzahl oder -masse gezeigt, eine numerische Integration über den Zellzyklus durchzuführen. Eine Übersicht verschiedener Integrationsverfahren findet sich z.B. in [Press \(1992\)](#).

Die partielle Differentialgleichung kann man durch Diskretisierung der Zyklusvariablen p auf ein System von gekoppelten gewöhnlichen Differentialgleichungen zurückführen. Hierzu werden im folgenden drei numerische Verfahren betrachtet. Dabei handelt es sich um

- die Finite Differenzen Methode (FD),
- die Finite Volumen Methode (FV) und
- die Charakteristikenmethode (Ch).

Sowohl das hier verwendete FD- als auch das FV-Verfahren verwenden eine up-stream Variante, das heißt der numerischen Berechnung liegen mehr Werte entgegen der Flußrichtung zugrunde, um die räumlichen Ableitungen zu berechnen. Da die Reife der Zellen und damit die Zyklusvariable stets ansteigt, werden mehr Werte mit geringerer Zyklusvariable verwendet. Durch die Normierung auf das feste Intervall $[0, 1]$ treten jedoch Probleme auf, wenn sich die korrespondierenden Intervallgrenzen, z.B. die Massen an den Zyklusrändern, ändern. Während der Anpassung der Verteilung an die neue Normierung sind theoretisch auch Verschiebungen entgegen der Flußrichtung in Teilen des Zellzyklus möglich. In diesem Fall ist die Flußrichtung bei der Auswahl der Stützstellen zur Berechnung der räumlichen Ableitungen zu berücksichtigen. In keinem Fall ist ein Überschreiten der Phasengrenzen entgegen der Wachstumsrichtung zulässig. Biologisch macht dies keinen Sinn, da das Passieren einer Phasengrenze in der Regel nicht reversibel ist. Beispielsweise kann eine Zelle nach erfolgter Teilung diese nicht mehr rückgängig machen.

Die Beschreibung des Zellzyklus durch das feste Intervall $[0, 1]$ stößt bei einem schnellen Anstieg der Zellmasse zu Beginn des Zellzyklus an ihre Grenze. Zellen, die eine kleinere

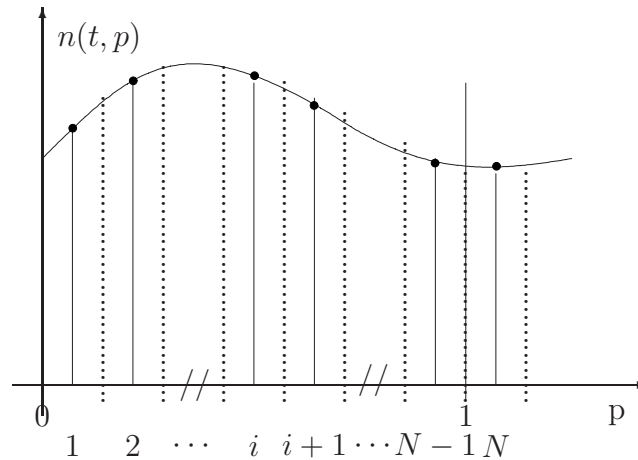


Bild 3.1: Diskretisierung einer Phase des Zellzyklus im Intervall $p \in [0, 1]$ in $(N - 1)$ äquidistante Abschnitte $[(i - 1) \Delta p, i \Delta p]$

Zellmasse aufweisen als diejenigen, die den Zyklus neu beginnen, lassen sich nicht durch einen Zustand im Intervall $[0, 1]$ berücksichtigen. Durch die Normierung auf die neuen Grenzen (sprich die Eintrittsgröße) weisen die älteren aber kleineren Zellen einen negativen (und damit unsinnigen) Wert der Zyklusvariable auf. Die Zell- und Massenbilanz bleibt in diesem Fall nur dann erhalten, wenn diese Zellen in einem Reservoir zwischen den Phasen aufgefangen werden.

Eine Zyklusphase sei aufgeteilt in $N - 1$ äquidistante Abschnitte. Der N te Abschnitt schließt direkt an das Intervall $[0, 1]$ an. Zur Interpolation an den Phasengrenzen ist es nicht zulässig, auf Werte einer nachfolgenden oder vorhergehenden Zyklusphase zurückzugreifen, da in dieser andere Bedingungen gelten und sich damit andere Zahlenwerte einstellen. Teilweise ist die Verwendung der nachfolgenden Werte unmöglich aufgrund mehrerer Zuflüsse aus verschiedenen Zellklassen, wie sie nach der Sprossung entsprechend der genealogischen Matrix auftreten. Der N te Abschnitt wird verwendet, um den weiteren Verlauf der Zellen dieser Zyklusphase abzuschätzen. Am Beginn einer Zyklusphase ist ein derartiges Verfahren nicht möglich, da nicht bekannt ist, welche Zellen in der Zukunft zu dieser Zyklusphase gehören werden. Die Zellzahl in den N Abschnitten wird durch eine Stützstelle in der Mitte des jeweiligen Abschnittes charakterisiert. Damit läßt sich die Zellzahl $n(t, p)$ durch die markierten diskreten Werte $n_i(t)$, wie in Bild 3.1 dargestellt, approximieren.

Die Gesamtzahl der Zellen im Intervall $p \in [0, 1]$ erhält man durch eine numerische Integration der Zelldichte. Im einfachsten Fall kann das Integral durch die Summe über die Produkte aus Zellzahl und Gitterabstand approximiert werden. Es gilt

$$N(t) = \Delta p \sum_{i=1}^{N-1} n_i(t). \quad (3.4)$$

Dieses Verfahren ist bei einer äquidistanten Diskretisierung des Zellzyklus für eine große Zahl von Stützstellen ausreichend. Beim Charakteristikenverfahren sind die Stützstellen

nicht mehr äquidistant verteilt. In diesem Fall müssen die einzelnen Abstände zwischen den Stützstellen berücksichtigt werden. Mit Hilfe einer linearen oder quadratischen Interpolation zwischen den Werten gelingt es, den Fehler der Approximation zu verringern.

3.1.2.1 Finite-Differenzen-Methode

Die Finite-Differenzen-Methode ersetzt die räumliche Ableitung auf dem Zyklusgitter durch den Differenzenquotienten. Die hier gewählte (räumlich) diskrete Form der partiellen Differentialgleichung (3.1) lautet

$$\frac{dn_i(t)}{dt} + \frac{q_i(t)n_i(t) - q_{i-1}(t)n_{i-1}(t)}{\Delta p} = -D(t)n_i(t). \quad (3.5)$$

Hierdurch entsteht ein gekoppeltes System von gewöhnlichen Differentialgleichungen. Die Variable n_i bezeichnet die Zahl der Zellen im Zyklus $p = (i + 1/2) \Delta p$ für $i \in \{1, N\}$ und $\Delta p = 1/(N - 1)$. Das Verfahren verwendet zur Berechnung der räumlichen Ableitung jeweils einen Wert vor dem laufenden Abschnitt. Am Anfang der Zyklusphase für $i = 1$ wird die Differenz abweichend aus den Funktionswerten n_1 und n_2 gebildet, da kein Wert links des Intervalls $[0, 1]$ vorliegt (siehe Bild 3.1).

3.1.2.2 Finite-Volumen-Methode

Die Finite-Volumen-Methode bilanziert den Fluß an den Grenzen der äquidistanten Abschnitte $[(i - 1)\Delta p, i\Delta p]$. Um die Bilanz an den Grenzen zwischen den Abschnitten nicht zu verletzen, muß der Fluß aus dem jeweils laufenden Abschnitt stets identisch dem Fluß in den folgenden Abschnitt sein. Da die Grenzen der Abschnitte genau zwischen zwei Stützstellen liegen, sind die Variablen auf den Grenzen durch die Indizes $i - 0.5$ bzw. $i + 0.5$ bezeichnet. Die Gleichung (3.1) wird entsprechend des gewählten FV-Verfahrens durch

$$\frac{dn_i(t)}{dt} + \frac{q_{i+0.5}(t)n_{i+0.5}(t) - q_{i-0.5}(t)n_{i-0.5}(t)}{\Delta p} = -D(t)n_i(t) \quad (3.6)$$

beschrieben. Bei Verwendung einer quadratischen up-stream Interpolationsformel nimmt der Fluß $u_{i+0.5}$ an den Abschnittsgrenzen die Form

$$u_{i+0.5} = q_{i+0.5} n_{i+0.5} = -\frac{1}{8}u_{i-1} + \frac{3}{4}u_i + \frac{3}{8}u_{i+1} \quad (3.7)$$

an. Das Einsetzen von Gleichung (3.7) für $u_{i+0.5}$ und $u_{i-0.5}$ in Gleichung (3.6) liefert

$$\frac{dn_i(t)}{dt} + \frac{1}{\Delta p} \left(-\frac{1}{8}u_{i-2} + \frac{7}{8}u_{i-1} - \frac{3}{8}u_i - \frac{3}{8}u_{i+1} \right) = -D(t)n_i(t). \quad (3.8)$$

Das Verfahren benötigt also jeweils zwei Werte vor und einen Wert nach dem laufenden Abschnitt. An den Rändern der Zyklusphase liegen die Werte nicht vor und daher ist der Algorithmus dort zu modifizieren. Am Beginn der Phase gilt dies für den Fluß zwischen

den beiden ersten Abschnitten, am Ende der Phase für den Fluß aus dem letzten Abschnitt. Unter Verwendung einer linearen bzw. einer quadratischen Interpolationsformel gelingt es, die benötigten Flüsse durch

$$u_{1.5} = \frac{1}{2}u_1 + \frac{1}{2}u_2 \quad (3.9)$$

$$u_{n+0.5} = \frac{3}{8}u_{n-2} - \frac{5}{4}u_{n-1} + \frac{15}{8}u_n \quad (3.10)$$

zu berechnen.

Die quadratische Interpolation liefert in der Regel eine genauere Approximation der Flüsse zwischen den Stützstellen. Bei steileren Flanken in der räumlichen Verteilungsfunktion, wie dies bei einer Synchronisation der Fall ist, entstehen jedoch teilweise größere Fehler als bei einer linearen Interpolation. Dabei können sogar physikalisch unsinnige negative Werte für die Zellzahl auftreten. Bei der obigen Berechnung ist daher stets zu prüfen, ob überhaupt Zellen in dem betrachteten Abschnitt vorhanden sind. Ist dies nicht der Fall, darf auch kein Fluß aus dem Abschnitt fließen. Die Simulation zeigt, daß auf diese Weise nur äußerst kleine, vernachlässigbare negative Zahlenwerte in den Bereichen entstehen, in denen keine Zellen vorliegen.

3.1.2.3 Charakteristikenverfahren

Während die beiden vorigen Verfahren auf einem räumlich festen Gitternetz arbeiten, berechnet das Charakteristikenverfahren (Ch) die Trajektorie, auf der sich eine Zelle bewegt, die sogenannte Charakteristik. Zur Lösung der Differentialgleichung (3.1) ist eine Umformung notwendig. Die Anwendung der Produktregel liefert

$$\underbrace{\frac{\partial n(t, p)}{\partial t} + q(t, p) \frac{\partial n(t, p)}{\partial p}}_{\frac{dn(t)}{dt}} + \frac{\partial q(t, p)}{\partial p} n(t, p) = -D(t)n(t, p). \quad (3.11)$$

Entlang der Charakteristik

$$\frac{dp}{dt} = q(t, p) \quad (3.12)$$

gilt das totale Differential

$$\frac{dn(t)}{dt} = -D(t)n(t) - \frac{\partial q(t, p)}{\partial p} n(t). \quad (3.13)$$

Für den einfachen Fall einer vom Zykluszustand unabhängigen Wachstumsgeschwindigkeit $q(t)$ ergeben sich räumlich nicht gekoppelte Differentialgleichungen für den Zykluszustand p und die Zellzahl n . Das Charakteristikenverfahren macht jedoch eine Integration über eine Funktion mit nicht äquidistanten Funktionswerten notwendig, um die integralen

Größen zu bestimmen. Die nichtäquidistante Verteilung entsteht, sobald die Wachstumsgeschwindigkeit eine Funktion des Zyklus darstellt. Die Reife von Zellen auf benachbarten Trajektorien nimmt dann nicht mehr gleichmäßig zu und führt zu einer Änderung des Abstands zwischen den Trajektorien. Die Synchronisation der Kultur bewirkt dabei, daß in gewissen Bereichen keine Trajektorien und in anderen Bereichen eine große Häufung der Stützstellen bei einer entsprechend großen Zellzahl $n(t)$ auftreten. Während andere Bereiche mit geringer Zelldichte auch nur sehr wenige Stützstellen aufweisen. Eine gleichmäßige Verteilung der Stützstellen ist nur durch eine Interpolation von Zwischenwerten erreichbar. Das Charakteristikenverfahren ist für diesen Fall um eine Art „Stützstellen-Managements“ zu erweitern: Werden die Löcher in der Verteilung zu groß, ist durch Interpolation von Zwischenwerten eine äquidistante Verteilung wiederherzustellen. Auf der Charakteristik selber berechnet das Verfahren dann weiterhin eine exakte Lösung. Durch die Interpolation zur Erzeugung eines äquidistanten Gitters entstehen allerdings Fehler.

Besonders elegant gelingt das „Stützstellen-Management“ mittels der umgekehrten Berechnung der Charakteristik. Ausgehend von einem äquidistanten Gitter im neuen Zeitschritt wird die Charakteristik zum alten Zeitschritt zurückverfolgt. Auf dem geschätzten nicht äquidistanten Gitter im alten Zeitschritt werden die Funktionswerte der Zellzahl durch Interpolation berechnet. Diese stellen dann die Anfangswerte zur Lösung der Differentialgleichung der Zellzahl dar. Streng genommen müßte man das Rückwärts-Charakteristikenverfahren iterativ verwenden, da die berechneten Anfangswerte sich während der darauf folgenden Integration ändern. Das Verfahren liefert aber bereits ohne die Iteration gute Ergebnisse.

Gegenüber den Verfahren mit ortsfesten Stützstellengittern erfordert das Charakteristiken-Verfahren einen größeren Aufwand durch die Lösung je eines Differentialgleichungssystems für die Trajektorie der Zelle und die Zellzahl auf der Trajektorie.

3.1.3 Lösung mit Diffusion

3.1.3.1 Analytischer Diffusionsterm

Die partielle Differentialgleichung (3.1) charakterisiert das Wachstum einer Zelle im Zellzyklus. Zwei Zellen im gleichen Zustand haben in diesem deterministischen Modell genau das gleiche Schicksal. Sie bewegen sich stets synchron im Zellzyklus. Diese vereinfachte Modellvorstellung erlaubt es, die prinzipiellen Eigenschaften des Zellzyklus zu beschreiben. Für eine bessere Approximation einer realen Population ist ein statistischer Einfluß auf das Wachstum wünschenswert. Dies gelingt beispielsweise mit Hilfe einer Teilungsfunktion, die angibt, welcher Anteil der Zellen bis zu einem gewissen Alter den Zyklus beendet hat. Eine derartige Funktion legt also die Wahrscheinlichkeit für die Teilung einer Zelle in Abhängigkeit des Zellzykluszustandes fest (Hjortso, 1987). Hierdurch ergeben sich weitere Freiheitsgrade in der Beschreibung des Zellzyklus. Der Teilungsprozeß des vorgestellten deterministischen Modells kann als Spezialfall dieser Teilungsfunktion angesehen werden: Mit Erreichen des Zyklusalters $p = 1$ beenden alle Zellen den Zyklus. Das Teilungsverhalten wird also durch einen Einheitsprung an der Stelle $p = 1$ beschrieben.

Eine andere Möglichkeit, nicht deterministische Effekte zu berücksichtigen, besteht in der Einführung eines Diffusionsterms. Die gegenüber Gleichung (3.1) erweiterte kontinuierliche Beschreibung lautet für diesen Fall

$$\frac{\partial n(t, p)}{\partial t} + \frac{\partial (q(t, p) n(t, p))}{\partial p} - \sigma \frac{\partial^2 n(t, p)}{\partial p^2} = -D(t)n(t, p). \quad (3.14)$$

Durch den mit σ parametrisierten Diffusionsterm wird dem statistisch abweichenden Verhalten zweier Zellen im gleichen Zustand Rechnung getragen. Die Diffusion führt dabei zu einem Ausgleich zwischen Bereichen mit hoher und niedriger Zelldichte. Aus einer synchronen Teilpopulation entsteht auf diese Weise nach genügend langer Zeit eine asynchrone Verteilung der Zellen im Zellzyklus. Durch die Erhöhung der Ordnung der Differentialgleichung ist eine zusätzlich Randbedingung erforderlich. Um einen diffusiven Fluß über die Phasengrenze entgegen der Zyklusrichtung zu verhindern, wird hier für $p = 0$ die Krümmung $\partial^2 n / \partial p^2 = 0$ gewählt.

Der Diffusionsterm stellt allerdings nur eine Approximation der gewünschten statistischen Verteilung der Wachstumsparameter dar. Durch die Diffusion werden ausschließlich bei einer ungleichmäßigen Zellverteilung zusätzliche Flüsse induziert. Diese sind dabei unabhängig von der Richtung des Zellzyklus. Für den Spezialfall einer Gleichverteilung treten keine diffusiven Änderungen auf. In diesem Fall haben statistisch schwankende Wachstumsparameter allerdings auch keinen Einfluß auf die Zellverteilung. In der synchronen Kultur wirken beide Mechanismen der Synchronisation entgegen. Lediglich im Batch-Betrieb, das heißt bei einer Wachstumsgeschwindigkeit $q = 0$, können aufgrund der Diffusion entgegen den Zellzyklus gerichtete Flüsse auftreten, die der Modellvorstellung widersprechen. Das Hauptaugenmerk der Betrachtungen liegt allerdings auf den in kontinuierlicher Kultur auftretenden synchronen Oszillationen. Für diesen Fall wird das gewünschte Verhalten zumindest qualitativ auch durch einen Diffusionsterm wiedergegeben.

Die Bestimmung des Diffusionstermes erfordert die Berechnung der zweiten Ableitung (Krümmung) der Zellverteilung bezüglich des Zellzyklus. In allen drei eingeführten numerischen Verfahren ist dies durch zweifache Anwendung eines Differenzenschemas möglich. Für $\sigma > 0$ ist in der diskretisierten Form der partiellen Differentialgleichung (3.1) der Term

$$\sigma \frac{\frac{(n_{i+1} - n_i)}{(p_{i+1} - p_i)} - \frac{(n_i - n_{i-1})}{(p_i - p_{i-1})}}{\frac{1}{2}(p_{i+1} - p_{i-1})} \quad (3.15)$$

zu ergänzen. Die Verwendung eines äquidistanten Gitters führt zu einer Vereinfachung der Beziehung in der Form

$$\sigma \frac{n_{i+1} - 2n_i + n_{i-1}}{(\Delta p)^2}. \quad (3.16)$$

Für die in Kapitel 5 vorgestellten Simulationen hat sich eine geringe Diffusion ($\sigma = 0.001$) als nützlich erwiesen. Der Diffusionsterm beschränkt die Flankensteilheit der synchronen Zellverteilung und erleichtert damit die numerische Approximation der Lösung.

3.1.3.2 Numerische Diffusion

Als numerische Diffusion wird ein durch die Diskretisierung verursachtes und einem Diffusionsterm ähnliches Verschleifen steiler Gradienten in der Verteilung bezeichnet. Die numerische Diffusion läßt sich beispielsweise durch Vergleich mit der analytischen Lösung beurteilen, sofern diese bekannt ist. Das FV-Verfahren und auch das Charakteristikenverfahren zeigen für $\sigma = 0$ eine gute Übereinstimmung mit der analytischen Lösung der partiellen Differentialgleichung (siehe Abschnitt 3.1.5). Der Einfluß der numerischen Diffusion dieser Verfahren auf die Lösung ist also vernachlässigbar gering.

Im Gegensatz hierzu weist das FD-Verfahren auch für $\sigma = 0$ eine von der Anzahl der Gitterpunkte abhängige numerische Diffusion auf. Der Einsatz dieses Verfahrens ist also nur dann möglich, wenn die gewünschte Diffusion die numerische übersteigt. Zur Abschätzung der numerischen Diffusion des FD-Verfahrens wird ein Vergleich zwischen numerischer Lösung ohne und analytischer Lösung mit Diffusion verwendet. Bild 3.2 zeigt die Abweichung der Verteilungsfunktion von der analytischen Lösung bei einer sinusförmigen Verteilung. Als Bewertungskriterium dient der Verteilungsfehler entsprechend

$$e_f(t) = \sum_{i=1}^N (n(t, p(i)) - \hat{n}(t, p(i)))^2,$$

wobei \hat{n} die durch das FD-Verfahren approximierte Verteilung und n die analytische Lösung bezeichnen. Die vergleichbare Diffusion des FD-Verfahrens entspricht näherungs-

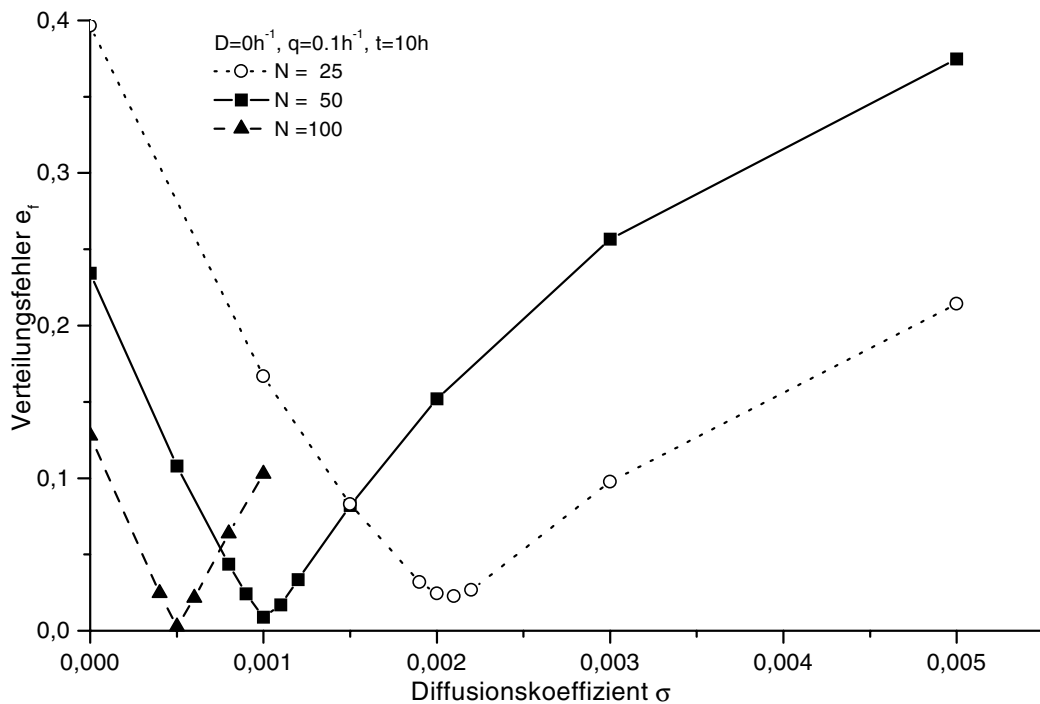


Bild 3.2: Verteilungsfehler e_f des FD-Verfahrens in Abhängigkeit von der Zahl der Diskretisierungsschritte N und des Diffusionskoeffizienten σ der analytischen Lösung. Für minimale e_f ist die äquivalente Diffusion des FD-Verfahrens ablesbar

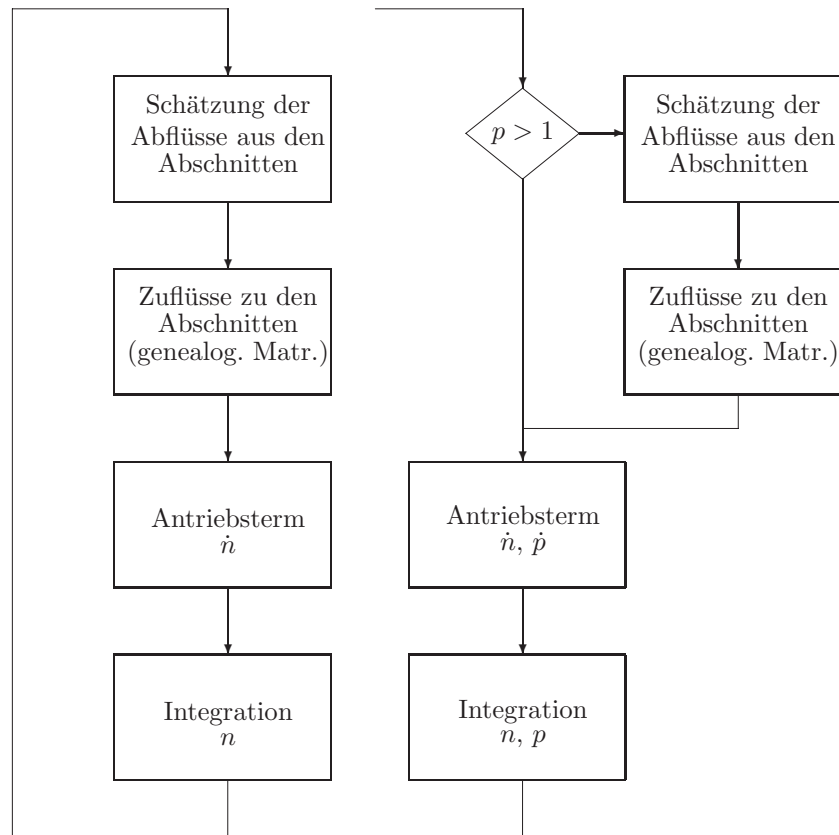


Bild 3.3: Struktur des Algorithmus zur Lösung des durch eine partielle Differentialgleichung beschriebenen Zellzyklus. Das linke Diagramm gilt für FD- und FV-Verfahren. Für das Charakteristikenverfahren (rechtes Diagramm) ist eine zusätzliche Abfrage notwendig. Jedesmal, wenn eine Charakteristik den Zyklusabschnitt verläßt, wird eine neue Charakteristik gestartet

weise dem Diffusionskoeffizienten σ , bei dem der minimale quadratische Fehler auftritt. Hierbei zeigt sich, daß eine Verdopplung der Zahl der Stützstellen auf eine Halbierung des Diffusionskoeffizienten σ führt.

3.1.4 Simulationssprache ACSL

Zur Lösung des Systems gewöhnlicher Differentialgleichungen wurde die Simulationssprache ACSL (Advanced continuous simulation language), der Firma Mitchell & Gauthier Inc., Concord, MA verwendet (Breitenecker et al., 1993). Hauptanwendungsgebiet von ACSL ist die Modellierung und Simulation von dynamischen nichtlinearen Systemen. Die Simulationssprache erlaubt es, neben der Lösung von gewöhnlichen Differentialgleichungen auch feste, diskrete Zeitpunkte zu berücksichtigen. Diese können beispielsweise durch den Nulldurchgang einer Variablen gekennzeichnet sein. Somit ist auch die Berechnung von strukturvariablen Systemen möglich.

Das in ACSL kodierte Modell wird mit Hilfe eines Precompilers in ein FORTRAN Pro-

programm übersetzt und mit den entsprechenden numerischen Bibliotheken verknüpft. Das Programm bietet zur Laufzeit eine zeilenorientierte Eingabeinterface-Oberfläche, das eine beliebige Variation der Parameter des Modells erlaubt.

Für die Lösung einer gewöhnlichen Differentialgleichungen der Form

$$\begin{aligned}\dot{x} &= f(x, t) \\ x(0) &= x_0\end{aligned}$$

ist der Befehl `x=INTEG(f(x,t),x0)` vorgesehen. Hierbei ist die Wahl verschiedener numerischer Verfahren möglich (Breitenecker et al., 1993). Für die Erweiterung auf partielle Differentialgleichungen wurden zusätzliche Funktionen programmiert, die eine Diskretisierung des Zellzyklus vornehmen. Mit Hilfe der im Abschnitt 3.1.2 angegebenen Verfahren gelangt man zu dem in Bild 3.3 angegebenen Algorithmus, der eine partielle Differentialgleichung im ACSL Programmsystem löst. Das zugehörige Programmgerüst der Simulationssprache ACSL zeigt Bild 3.4. Bei der Berechnung der Antriebsterme für die Zellverteilung sind die drei oben erwähnten numerischen Verfahren zur Diskretisierung der partiellen Differentialgleichung verborgen. Hierbei sind die numerischen Routinen zur Lösung der partiellen Differentialgleichungen sowie zur Gewinnung skalarer Größen aus den Verteilungen für die drei Verfahren in separaten Funktionen in den Modulen zusammengefaßt. Alle erstellten Zellzyklusmodelle basieren auf den von diesen Modulen zur Verfügung gestellten Funktionen. Diese Trennung der benötigten numerischen Verfahren von der eigentlichen Modellbeschreibung ermöglicht die schrittweise Verifizierung der Modelle. Die numerischen Eigenschaften des in Abschnitt 3.1.5 untersuchten Ein-Klassen-Modells gelten also in gleicher Weise auch für Modelle mit einer aufwendigeren genealogischen Struktur.

3.1.5 Verifizierung der numerischen Lösung

Zur Verifizierung des Zellzyklusmodells dient ein aus einer Zyklusphase bestehendes Ein-Klassen-Modell (siehe Abschnitt 2.4.4.1). Mit Hilfe der vorgenannten Diskretisierungs-Verfahren werden drei Lösungen berechnet, die einen Vergleich der numerischen Verfahren untereinander und, falls bekannt, mit der analytischen Lösung ermöglichen.

Beim Testverfahren zur Ermittlung der Güte der numerischen Lösungen wurde auf eine Verdopplung der Zellzahl, das heißt auf eine Teilung der Zellen verzichtet. Für die Verdünnungsrate gilt $D = 0 \text{ h}^{-1}$. Dadurch bleibt die Zellzahl im Reaktor stets konstant, da weder Zellen durch Teilung entstehen noch Ausgewaschen werden. Für die Biomasse gilt dies nicht. Die Zellmasse ist an den Zyklus gekoppelt und ändert sich fortwährend. Die Flußgeschwindigkeit beträgt im Testfall $q = 0.1 \text{ h}^{-1}$. Die für den Test verwendete cosinusförmige Verteilung im Intervall $p \in [0, b]$

$$n_0(p) = \begin{cases} 1 - \cos\left(2\pi \frac{p}{b}\right) & : 0 < p < b \\ 0 & : b \leq p < 1 \end{cases} \quad (3.17)$$

stellt ein Beispiel für die Zellverteilung während einer synchronen Kultur dar. Auch noch nach 100 h und 10 vollständigen Zellzyklen stellt sich die ursprüngliche Verteilung der

```

PROGRAM pde
  INITIAL
    ! Deklaration der Felder, Initialisierung
    array p(n),dp(n),p0(n)
    array z(n),dz(n),z0(n)

    p0 = ...
    z0 = ...
  END
  DYNAMIC
    DERIVATIVE
      ! Schaetzung der Fluesse
      u = f(z,q)

      ! Genealogische Matrix
      in = f(out)

      ! Antrieb
      dp = q          ! Nur Ch-Verfahren
      dz = f(z,u)

      ! Integration
      p = INTVC(dp,p0) ! Nur Ch-Verfahren
      z = INTVC(dz,z0)

      SCHEDULE division .xz. (1 - p(n-1))
    END
    DISCRETE division
      ! Umsortieren (evt. Ringspeicher)
      p(i) = p(i-1)
      z(i) = z(i-1)

      ! Schaetzung der Fluesse
      out = f(z,q)

      ! Genealogische Matrix
      p(1) = 0
      z(1) = f(out) * q(n)/q(1)
    END
  END
END

```

Bild 3.4: Gerüst eines ACSL-Programms zur Lösung partieller Differentialgleichungen

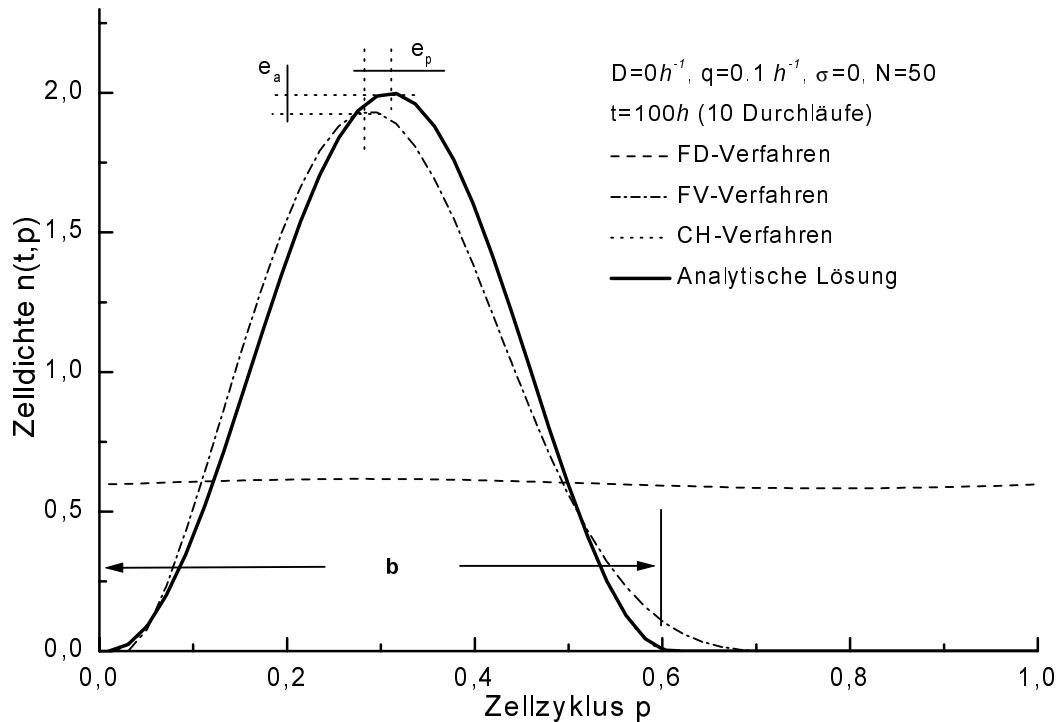


Bild 3.5: Analytische und numerische Lösung für eine synchronisierte cosinusförmige Zellverteilung mit der Breite $b = 0.6$. Nach $100h$ bei einer Wachstumsgeschwindigkeit von $q = 0.1h^{-1}$ wurde der Zellzyklus genau 10mal durchlaufen und es stellt sich wieder die ursprüngliche Verteilung ein

Zellen wieder ein. Bild 3.5 zeigt, daß das Ch-Verfahren keine und das FV-Verfahren nur geringe Abweichungen von der analytischen Lösung aufweist. Beim FD-Verfahren ist die ursprüngliche Verteilung nicht mehr erkennbar. Für $N = 50$ Gitterpunkten ist die numerische Diffusion bereits so groß, daß die sich ergebende Verteilung nur wenig von der Gleichverteilung abweicht.

Zur qualitativen Beurteilung der Güte der numerischen Verfahren sind im folgenden die Zell- und die Massenbilanz, sowie Phasen- und Amplitudenfehler betrachtet. Bild 3.6 zeigt die Zell- und die Massenbilanz der drei Verfahren. Der Bilanzfehler für die Zellzahl ist durch die Gleichung

$$e_z(t) = \frac{\int_{\tau=0}^t u(\tau, 0) - u(\tau, 1) d\tau - (1 + D) \sum_{i=1}^N n(t, p(i))}{\int_{\tau=0}^t u(\tau, 0) d\tau}$$

und für die Masse durch

$$e_m(t) = \frac{\int_{\tau=0}^t u(\tau, 0)m(\tau, 0) - u(\tau, 1)m(\tau, 1) d\tau - (1 + D) \sum_{i=1}^N n(t, p(i))m(t, p(i))}{\int_{\tau=0}^t u(\tau, 0)m(\tau, 0) d\tau}$$

definiert. Bezüglich des Zuflusses weisen alle Verfahren sowohl bei der Zell- als auch bei der Massenbilanz sehr geringe Fehler auf (unter 0.1%). Mit anderen Worten: Die Verfahren sind zur Bilanzierung der Zell- und Massenströme gut geeignet.

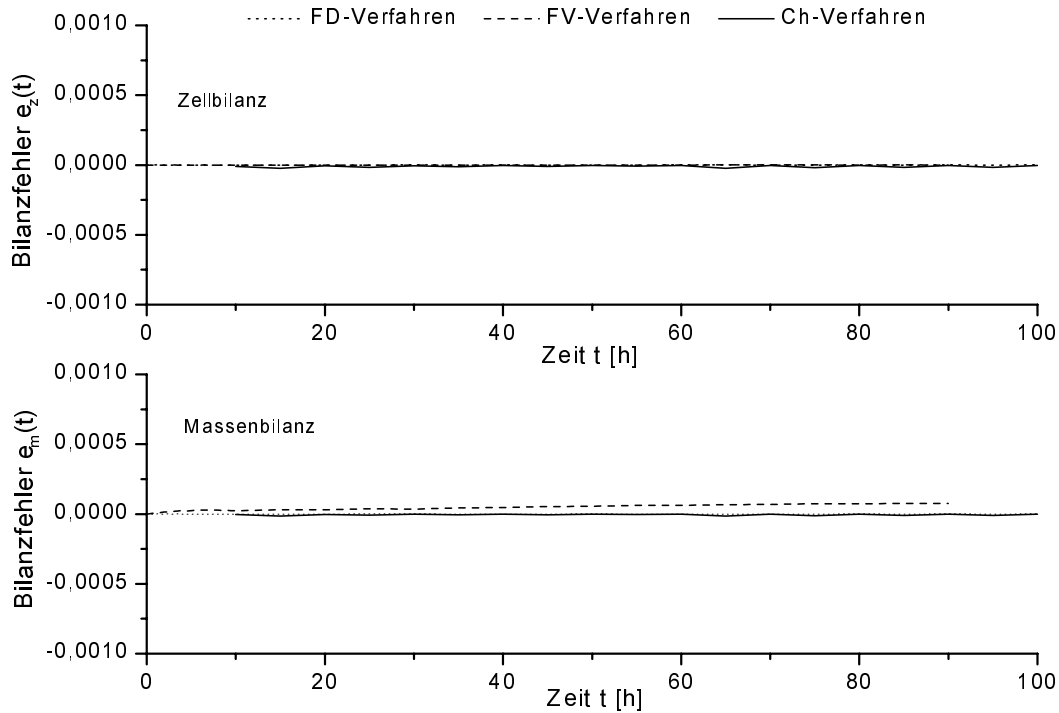


Bild 3.6: Zell- und Massenbilanz für die in Bild 3.5 gezeigte synchronisierte Zellverteilung. Der relative Fehler bezogen auf den Zufluß liegt unter 0.1 %

Neben den vollständigen Bilanzen muß gefordert werden, daß sich eine Verteilung im Zellzyklus zu allen Zeitpunkten mit der vorgegebenen Geschwindigkeit bewegt. Als Gütefunktionen werden hierzu die in Bild 3.5 eingezeichneten Phasen- und der Amplitudenfehler betrachtet. Der Phasenfehler einer cosinusförmigen Verteilung nach Gleichung (3.17) ist hierbei durch

$$e_p(t) = p(n_{max}) - p(\hat{n}_{max}) \quad (3.18)$$

definiert, wobei \hat{n}_{max} das Maximum der numerischen und n_{max} das Maximum der analytischen Lösung bezeichnet. Entsprechend weist der Amplitudenfehler die Form

$$e_a(t) = n_{max} - \hat{n}_{max} \quad (3.19)$$

auf. Sowohl Phasen- als auch Amplitudenfehler steigen linear mit der Prozeßzeit an. Aus diesem Grund wird im folgenden auch der auf die Prozeßzeit t normierte Fehler $e_p(t)/t$ beziehungsweise $e_a(t)/t$ verwendet.

Eine Phasenverschiebung führt zu einem Fehler beim Vergleich der numerisch ermittelten periodischen Lösung mit der in Abschnitt 3.2 angegebenen analytischen Lösung. Das Beispiel des FV-Verfahrens zeigt, daß der Phasenfehler unabhängig von der Zellbilanz ist. Auch bei einer vollständigen Bilanz kann ein Phasenfehler auftreten (vergleiche Bild 3.5 und Bild 3.6).

Der Amplitudenfehler entsteht durch die numerische Diffusion der Verfahren. Die Verbreiterung der ursprünglichen Verteilung führt zu einer Verringerung des Maximums der

Verteilung. Bezüglich der periodischen Lösung der synchronen kontinuierlichen Kultur ist die Bedeutung des Amplitudenfehlers untergeordnet. Eine Lösung mit einem gewissen diffusiven Charakter entspricht zwar nicht der exakten Lösung der Modellgleichungen, stellt allerdings im Hinblick auf die reale Kultur kein prinzipiell falsches Systemverhalten dar. Wie bereits im Abschnitt 3.1.3 erwähnt, ist eine gewisse statistische Abweichung zwischen den Eigenschaften einzelner Zellen des realen biologischen Systems zu erwarten.

Da das Ch-Verfahren, wie bereits erwähnt, weder Phasen- noch Amplitudenfehler aufweist, konzentriert sich die folgende Betrachtung auf die beiden anderen Verfahren. In Bild 3.7 sind der normierte Phasen- und Amplitudenfehler des FV-Verfahrens in Abhängigkeit von der Breite b der Verteilung und Zahl der Gitterpunkte N der Diskretisierung aufgetragen. Der Phasenfehler steigt mit abnehmender Breite b entsprechend $e_p(t)/t \approx b^{-2}$ und sinkender Zahl der Gitterpunkte N entsprechend $e_p(t)/t \approx N^{-2}$. Für den Amplitudenfehler gelten die Proportionalitäten $e_a(t)/t \approx b^{-4}$ und $e_a(t)/t \approx N^{-3}$. Die Amplitude der Verteilung selbst hat keinen Einfluß, während die Fehler linear mit der Wachstumsgeschwindigkeit ansteigen.

Aufgrund der starken numerischen Diffusion des FD-Verfahrens wird nur der Phasenfehler des Verfahrens betrachtet. Bild 3.8 zeigt den Phasenfehler des FD-Verfahrens im Vergleich zu dem aus Bild 3.7 übernommenen Phasenfehler des FV-Verfahrens in doppelt logarithmischer Darstellung. Es ist zu erkennen, daß der Fehler des FD-Verfahrens um den Faktor 4 über dem des FV-Verfahrens liegt. Diese Tatsache stellt einen weiteren Nachteil des FD-Verfahrens gegenüber dem FV-Verfahren dar.

Das angeführte Beispiel basiert auf einer konstanten Wachstumsgeschwindigkeit $q = 0.1 h^{-1}$. Das Modell ist jedoch auch geeignet, eine über das Substratangebot bestimmte Wachstumsgeschwindigkeit q zu verwenden. In diesem Fall ist ein Vergleich mit einer analytischen Lösung nicht mehr möglich. Es bleibt der Vergleich der Lösungen der drei numerischen Verfahren untereinander, sowie eine Überprüfung der Zell- und Massenbilanz. Die Untersuchung mit einer derartigen zeitvariablen Wachstumsgeschwindigkeit ist nicht geeignet, neue Eigenschaften der numerischen Verfahren aufzuzeigen. Daher wird an dieser Stelle auf die Darstellung dieses Falles verzichtet.

Ein weiteres Beispiel dient schließlich dazu, die Effekte infolge einer Änderung der Intervallgrenzen zu untersuchen. Hierzu wird ein konstanter Zellzufluß mit einer periodischen Änderung der Zellmasse verwendet. Zu Beginn des Experimentes sind die Zellen im Intervall $[0,1]$ gleichverteilt. Der Abfluß ist in diesem Fall nicht mit dem Zufluß des Zellzyklus gekoppelt. Die Wachstumsgeschwindigkeit beträgt in diesem Beispiel ebenfalls $q = 0.1 h^{-1}$, die Verdünnungsrate $D = 0 h^{-1}$. Bild 3.9 zeigt den Abfluß des Zellzyklus und die Zellverteilung nach $20 h$. Nach $10 h$ steigt der Abfluß aufgrund der erhöhten Masse der Zellen im Zufluß an. In der Verteilung der Zellen ist ebenfalls eine Synchronisation erkennbar. Das Charakteristikenverfahren zeigt hierbei die ausgeprägteste Verteilung. Im Bereich des Maximums kommt es zu einer Anhäufung der Gitterpunkte. Die durch das FD-Verfahren berechnete Synchronisation fällt deutlich geringer aus. Zwischen den beiden Lösungen liegt das ebenfalls mit einem festen Gitter arbeitende FV-Verfahren.

Zur Berechnung der Lösung kommen zwei Varianten zur Anwendung: Zum einen sind die Intervallgrenzen an die Zellmasse des Zuflusses angepaßt, im anderen Fall handelt es sich um feste Intervallgrenzen. Im ersten Fall mündet der Zufluß stets bei $p = 0$ in das Intervall.

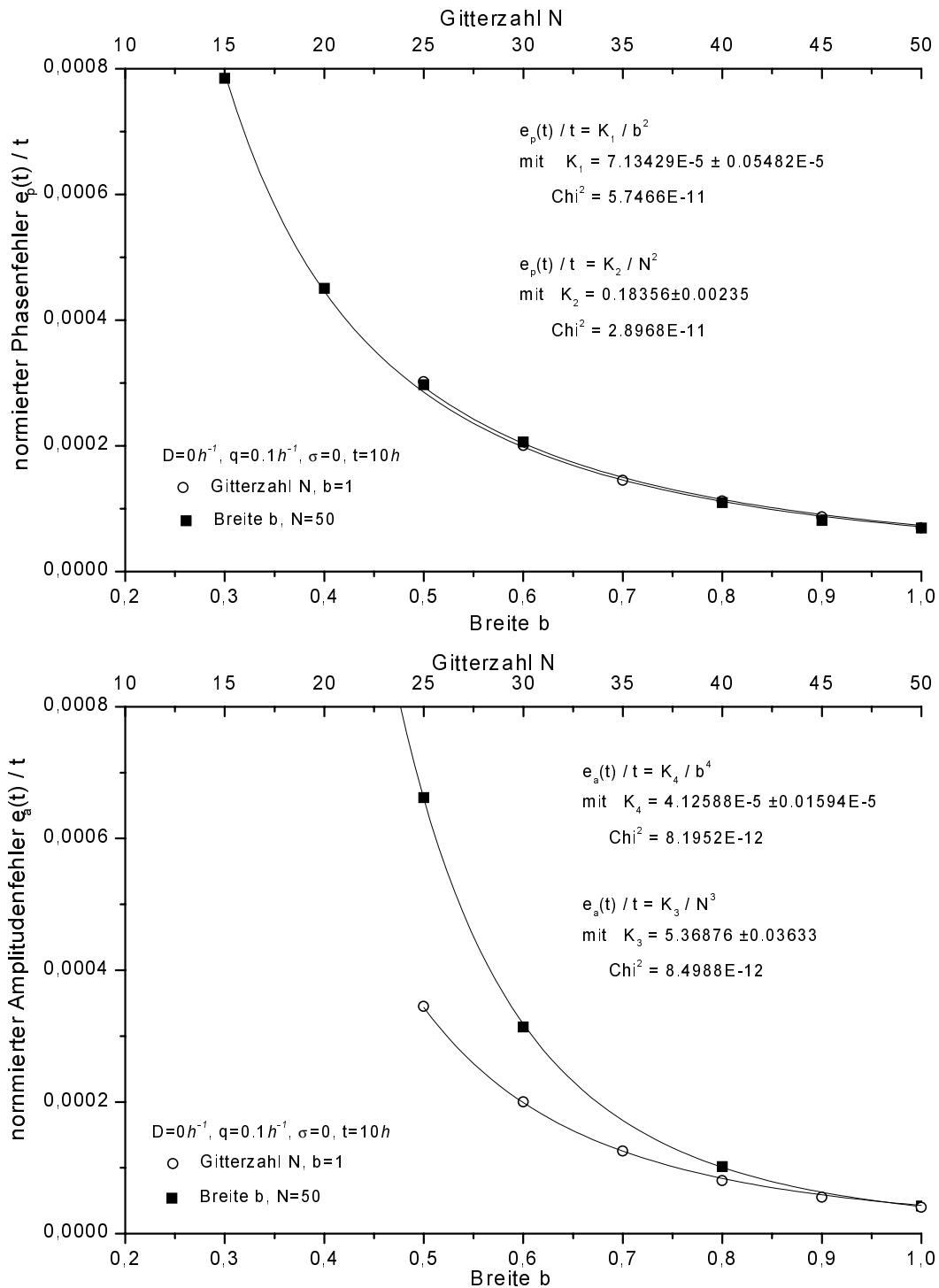


Bild 3.7: Normierter Phasen- und Amplitudenfehler des FV-Verfahrens in Abhängigkeit der Breite b der Testfunktion und der Gitterstellen N der Diskretisierung

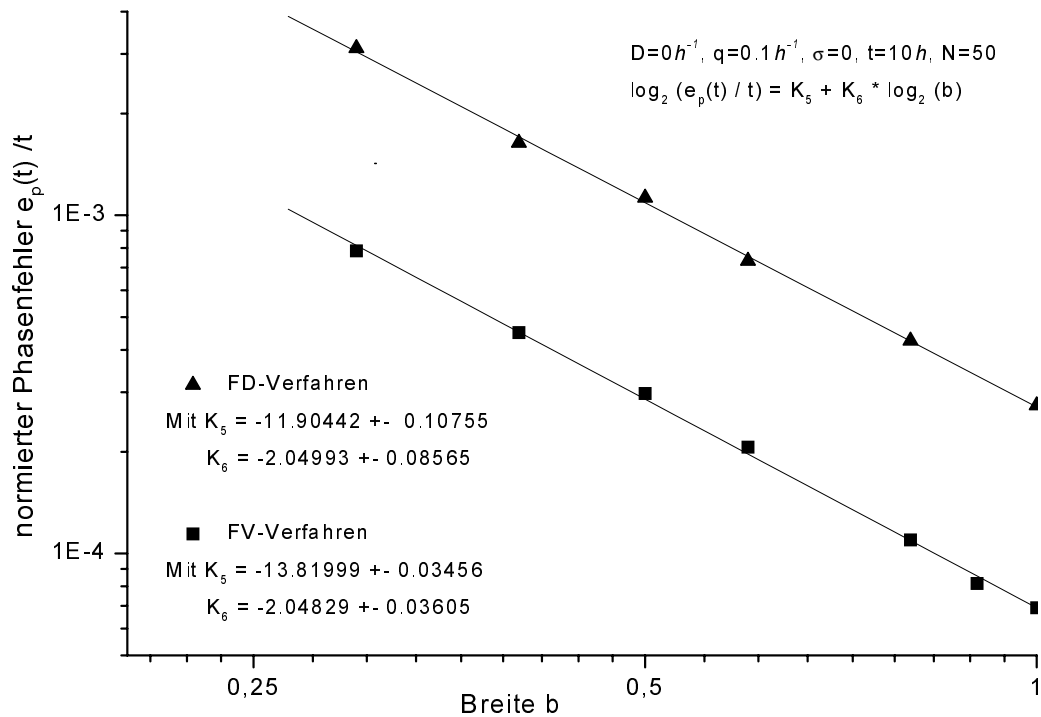


Bild 3.8: Normierter Phasenfehler des FD-Verfahrens und des FV-Verfahrens in Abhängigkeit von der Breite b der Testfunktion

Im anderen Fall ist der Zuflußpunkt p_{zu} durch die jeweilige Zellmasse des Zuflusses zu bestimmen. Die Normierung auf die Zellmasse des Zuflusses weist den Nachteil auf, daß sich die gesamte Verteilung bei einer Variation der Zellmasse im Zufluß ändert. Zudem ist bei dieser Methode die Änderungsgeschwindigkeit der Masse begrenzt. Ist die zufließende Masse zu groß, fallen andere kleinere Zellen, die sich bereits in der Zyklusphase befinden, heraus.

Die für das FD-Verfahren robustere Methode verwendet feste Intervallgrenzen. Der Zufluß erfolgt je nach Masse des Zuflusses mitten im Abschnitt. Verfahren mit größerem Interpolationsradius, wie das FV-Verfahren, können an dieser Stelle aufgrund der entstehenden steilen Flanke in der Verteilungsfunktion Schwierigkeiten bekommen. Dieser Effekt ist für $p = 0$ in Bild 3.9 beim FV-Verfahren und festen Intervallgrenzen zu erkennen. Der Bilanzfehler ist in Bild 3.10 dargestellt. Sowohl für die Zellzahl als auch für die Zellmasse fällt der Fehler im Vergleich zum ersten Beispiel größer aus.

Das Charakteristikenverfahren zeichnet sich durch eine exakte Lösung auf der Trajektorie der betrachteten Zellen aus. Im zweiten Beispiel ist jedoch eine deutliche mit der Synchronisation verbundene Verschiebung der Gitterpunkte zu erkennen. Eine im Verlauf einer Simulation notwendige Berechnung von Werten zwischen den Gitterpunkten führt auch bei diesem Verfahren zu Fehlern. Zudem beeinträchtigt die Interpolation, wie das FV-Verfahren zeigt, unter Umständen die Stabilität des Verfahrens. Das FD-Verfahren zeichnet sich durch Robustheit aus. Es erlaubt auch die Verwendung von festen Intervallgrenzen. Durch die vorhandene numerische Diffusion ist das Verfahren jedoch nicht zur Untersuchung der periodischen Lösung geeignet. Das FV-Verfahren stellt für die Anwen-

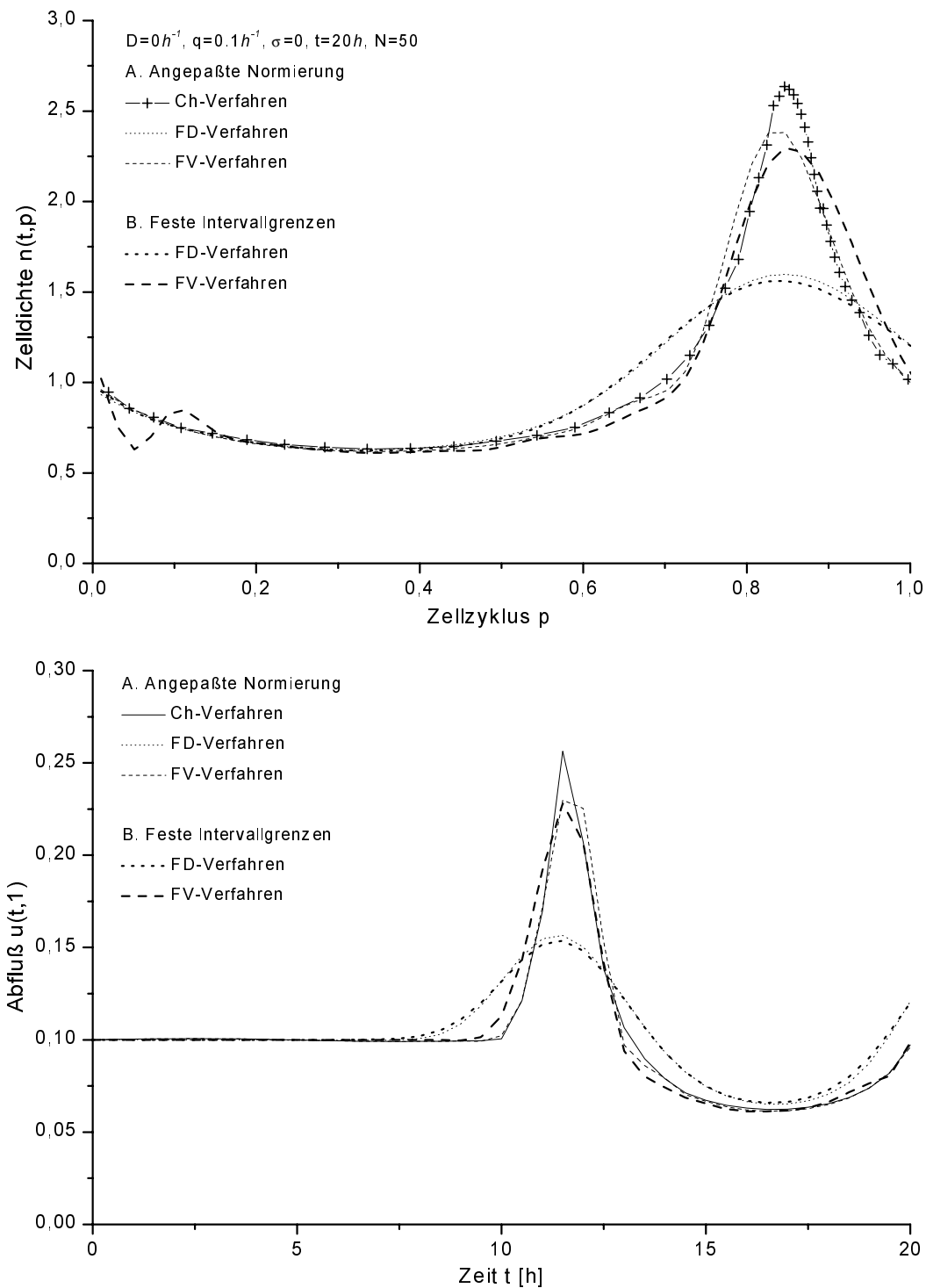


Bild 3.9: Verteilung mit konstantem Zellzufluß und sich periodisch ändernder Masse (oben). Der Abfluß folgt mit einer Verzögerung von $10h$ der periodischen Änderung der Masse des Zuflusses (unten)

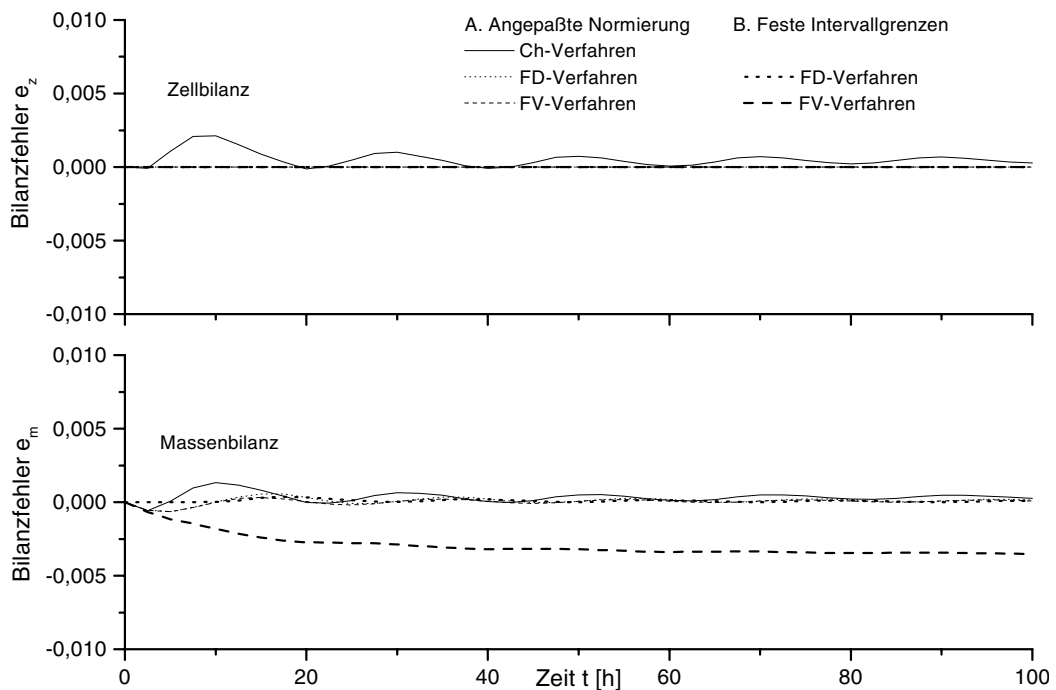


Bild 3.10: Bilanzfehler bei konstantem Zufluß und einer periodischen Änderung der Masse des Zuflusses. Die Darstellung ist gegenüber Bild 3.9 auf $t = 100 \text{ h}$ verlängert

dung im Zellzyklusmodell einen guten Kompromiß bezüglich Diffusion und Konsistenz der Lösung dar. Bei einer angepaßten Normierung ist es (bedingt) in der Lage, eine Änderung der Intervallgrenzen zu berücksichtigen. Die im folgenden gezeigten Simulationen verwenden daher ausschließlich das FV-Verfahren. Es zeigt sich sogar, daß die vorgesehene Analyse der periodischen Lösung auch ohne eine Änderung der Intervallgrenzen möglich ist.

3.2 Periodische Lösung

Weisen alle Prozeßvariablen einen periodischen Verlauf mit einer beobachteten Periodenlänge T_P auf, so spricht man von einer periodischen Lösung. Diese stellt einen Spezialfall der dynamischen Beschreibung des Wachstums der Zellpopulation dar. Beruht die Periodizität auf einer Synchronisation des Zellzyklus, lassen sich für diesen Zustand gewisse Eigenschaften ableiten. So kann beispielsweise für das Zwei-Klassen-Modell ein Zusammenhang zwischen der Periodenlänge und der Verdünnungsrate angegeben werden. Für das in Abschnitt 2.3 angegebene Populationsmodell ist es notwendig, diesen Zusammenhang zu erweitern.

Hierzu sei angenommen, daß auch die Zellzahl nach jeder vollständigen Periode konstant ist, obwohl sie in der Zwischenzeit einer ständigen Änderung unterworfen ist. Bedingt durch den kontinuierlichen Fluß durch den Reaktor nimmt die Zellzahl stetig ab. Kommt es jedoch zur Teilung, so verdoppelt sich die Zahl der betreffenden Zellen. Für eine periodische Lösung ist nun ein Gleichgewicht zwischen der Zahl der innerhalb der Periode ausgewaschenen Zellen auf der einen Seite und der Zahl der Zellteilungen auf der anderen Seite zu fordern. Nachfolgend ist daher in Abschnitt 3.2.1 die analytische Berechnung der Zellzahl während eines Zellzyklus angegeben. Zur Bestimmung des gesuchten Zusammenhangs zwischen Periodenlänge und Verdünnungsrate wird anschließend in den Abschnitten 3.2.2 bis 3.2.4 das die Teilung charakterisierende Populationsmodell herangezogen. Abschließend erfolgt in Abschnitt 3.2.5 eine Sensitivitätsanalyse der vorhergesagten Periodenlänge bezüglich der Generationszeiten der Zellklassen.

3.2.1 Analytische Lösung des Zellzyklusmodells

Der Zustand einer Zellklasse wird beschrieben durch die Verteilungsdichte $n(t, p)$ in Abhängigkeit von der Prozeßzeit t und der Position p im Zellzyklus. Der Zellzykluszustand p beginnt direkt nach der Trennung einer Zelle mit $p = 0$ und endet mit der erneuten Teilung im Zustand $p = 1$. Gesucht ist der Zusammenhang, der den Verlust der Zellen aufgrund der Ausverdünnung zwischen Beginn und Ende des Zellzyklus beschreibt.

Das Wachstum einer Teilpopulation ist gegeben durch die folgende, bereits in Gleichung (2.6) angegebene Form

$$\frac{\partial n(t, p)}{\partial t} + \frac{\partial(q(t, p)n(t, p))}{\partial p} = -\lambda n(t, p) \quad \text{mit } 0 \leq p \leq 1$$

$$n(0, p) = n_0(p)$$

$$q(t, 0) n(t, 0) = u_0(t).$$

Der Verlustterm λ charakterisiert im Chemostat-Betrieb die durch den Zufluß erzeugte Verdünnungsrate D . Das Absterben von Zellen während des Zellzyklus ist im allgemeinen vernachlässigbar.

Die Reife der Zellen, ausgedrückt durch den Zykluszustand p , nimmt mit der Wachstumsgeschwindigkeit $q(t, p) = dp/dt$ zu. Wenn die Zelle den Zustand $p = 1$ erreicht hat, teilt sie

sich. Die Summe der Masse von Mutter- und Tochterzelle bleibt bei der Teilung konstant, während die Anzahl der Zellen zunimmt. Der Zellzykluszustand berechnet sich aus der Integration

$$p(t) = p(t_0) + \int_{t_0}^t q(t', p(t')) dt'. \quad (3.20)$$

Da die Wachstumsgeschwindigkeit $q(t, p)$ neben der Zeit t auch vom jeweiligen Zykluszustand p abhängt, ist eine weitere Vereinfachung der Beziehung nicht möglich, außer die Funktion $q(t, p)$ ist bekannt. Die Generationszeit a_T einer Zelle, die zum Zeitpunkt t_0 den Zellzyklus im Zustand $p = 0$ beginnt, berechnet sich durch die Gleichung $p(a_T + t_0) = 1$ am Zyklusende.

3.2.1.1 Konstante Wachstumsgeschwindigkeit

Für eine konstante Wachstumsgeschwindigkeit $q(t, p) = \text{const.}$ gelingt es, die zur Beschreibung des Zellzyklus erforderliche Differentialgleichung mit Hilfe des Separationsansatzes zu lösen. Mit der Ansatzfunktion für die Verteilungsdichte

$$n(t, p) = n_1(t) n_2(p) \quad (3.21)$$

folgt aus der oben angegebenen Gleichung (2.6)

$$\frac{\partial n_1(t)}{\partial t} n_2(p) + q n_1(t) \frac{\partial n_2(p)}{\partial p} + \lambda n_1(t) n_2(p) = 0. \quad (3.22)$$

Die Trennung nach den Veränderlichen t und p ermöglicht die Lösung von Gleichung (3.22) mit Hilfe von zwei gekoppelten gewöhnlichen Differentialgleichungen

$$\frac{1}{n_1(t)} \frac{\partial n_1(t)}{\partial t} + \lambda = -q \frac{1}{n_2(p)} \frac{\partial n_2(p)}{\partial p} = k = \text{const.}$$

mit den Einzellösungen

$$n_1(t) = n_{0,1} e^{(k-\lambda)t}$$

und

$$n_2(p) = n_{0,2} e^{-\frac{k}{q}p}.$$

Für die allgemeine Lösung der Verteilungsdichte folgt somit durch Einsetzen der Teillösungen in Gleichung (3.21)

$$n(t, p) = n_0 e^{-\lambda t} e^{k(t-\frac{p}{q})}, \quad (3.23)$$

wobei die Anfangsdichte $n_{0,1}$ und $n_{0,2}$ hier zu n_0 zusammengefaßt ist. Der Term $e^{-\lambda t}$ charakterisiert den Zellverlust durch die Verdünnungsrate D . Die zweite Exponentialfunktion beschreibt den Zellzyklus. Für konstante Exponenten kann man die Bahnkurve

einer Zelle im Zellzyklus erkennen. Der Zykluszustand einer Zelle ist gegeben durch die Charakteristik

$$p = (t - t_0) q.$$

Die Gleichung (3.23) löst die partielle Differentialgleichung (3.22) für beliebige Konstanten k . Auch die Summe mehrerer Lösungen der Form von Gleichung (3.23) mit den Konstanten k_i stellt wiederum eine Lösung dar. Bei der Wahl von konjugiert komplexen Paaren der Parameter k_i erhält man sinusförmige periodische Lösungen und durch Zusammenfassung von mehreren sinusförmigen Funktionen sind beliebige periodische Verteilungen $f(p)$ der Zellen im Zellzyklus möglich. Das heißt, eine geeignete Wahl der Konstanten k_i erlaubt es, jede beliebige Verteilung $f(p)$ der Zellen im Zellzyklus einer synchronen Kultur zu beschreiben. Für stationäres synchrones Wachstum lautet die Lösung

$$n(t, p) = n_0 e^{-\lambda t} e^{\mu(t - \frac{p}{q})} f((t - t_0) q - p)$$

mit der Wachstumsrate μ und dem Beginn des Zellzyklus zum Zeitpunkt t_0 . Die Lösung gilt mit unterschiedlichen Parametern für alle Zellklassen. Durch Multiplikation mit q gelangt man zu einer ähnlichen Beziehung für den Fluß im Zellzyklus

$$u(t, p) = u_0 e^{-\lambda t} e^{\mu(t - \frac{p}{q})} f((t - t_0) q - p).$$

Hierbei stellt $u(t, p)$ den Fluß der Zellklasse zur Zeit t und im Zykluszustand p dar.

Für den Chemostat gilt die Identität $\mu = \lambda = D$ und die Verteilungsdichte nimmt die Form

$$u(t, p) = u_0 e^{-D \frac{p}{q}} f(q(t - t_0) - p)$$

an.

Für den Fall $f(p) = \text{const.}$ ist die Lösung im Chemostat zeitunabhängig, das heißt die Zellzahl in einem Zellzykluszustand p ist stets konstant. Die Gleichung beschreibt dann das asynchrone Wachstum. Die Verteilung der Zellen über den Zellzyklus wird in diesem Fall durch eine Exponentialfunktion beschrieben. Bei der periodischen Lösung mit $f(p) \neq \text{const.}$ ist die Zeitabhängigkeit der Zellzahl in der Verteilung $f(p)$ der Zellen im Zellzyklus zusammengefaßt. Jede Abweichung von der Gleichverteilung stellt eine Synchronisation bezüglich des Zellzyklus dar. Meßbar ist die Synchronisation jedoch erst dann, wenn es zu einem signifikanten Einfluß auf die Prozeßgrößen kommt.

3.2.1.2 Zeit- und zyklusabhängige Wachstumsgeschwindigkeit

Die Wachstumsgeschwindigkeit q einer Zelle im Zyklus ist jedoch im allgemeinen nicht konstant. Durch die Aufspaltung in einen von der Prozeßzeit t und einen von der Zyklusposition p abhängigen Teil entsprechend

$$q(t, p) = q_1(t) q_2(p)$$

sowie mit der Abkürzung

$$v(t, p) = q_2(p) n(t, p)$$

gelingt es, die Differentialgleichung (2.6) entsprechend

$$\frac{\partial v(t, p)}{\partial t} + q_1(t)q_2(p) \frac{\partial v(t, p)}{\partial p} = -\lambda v(t, p) \quad \text{mit } 0 \leq p \leq 1$$

umzuformen. In dieser Gestalt ist die Charakteristik des Zellwachstums berechenbar. Durch Vergleich mit dem totalen Differential dv/ds ergeben sich in Abhängigkeit des Bahnparameters $s = t - t_0$ die gewöhnlichen Differentialgleichungen der Charakteristik zu

$$\frac{dt}{ds} = 1 \tag{3.24a}$$

$$\frac{dp}{ds} = \frac{dp}{dt} \frac{dt}{ds} = q_1(t)q_2(p) \tag{3.24b}$$

$$\frac{dv}{ds} = -\lambda v(t, p). \tag{3.24c}$$

Auf der betrachteten Bahnkurve nimmt die Lösung von Gleichung (3.24c) die Form

$$v(t) = q_2(p(t)) n(t, p(t)) = q_2(p(t_0)) n(t_0, p(t_0)) e^{-\lambda(t-t_0)} \tag{3.25}$$

an. Der exponentielle Ausverdünnungsterm gilt lediglich für die eingeführte Funktion $v(t, p)$ und nicht zwingend für die eigentliche Zelldichte $n(t, p)$ oder den Fluß $u(t, p)$. Ist die Wachstumsgeschwindigkeit während des gesamten Zyklus konstant, das heißt $q_2(p) = \text{const}$, so ergibt sich ein identischer Zusammenhang für $v(t, p)$ und $n(t, p)$.

Bei einer periodischen Wachstumsgeschwindigkeit $q_1(t) = q_1(t + a_T)$ mit einer der Generationszeit a_T entsprechenden Periode ist es möglich, den exponentiellen Auswaschterm e^{-Da_T} für den Zellfluß $u(t, p)$ über einen Zellzyklus anzusetzen

$$u(t, p) = u(t - a_T, p) e^{-Da_T}. \tag{3.26}$$

Diese Gleichung wird im folgenden verwendet, um die Zellbilanz des Populationsmodells in der stationären synchronen Kultur zu lösen.

Die Auflösung der Bilanzgleichungen (2.38) erfordert die Kenntnis des Zusammenhanges zwischen der Zellzahl zum Anfang und zum Ende des Zellzyklus. Hierzu kann man im periodischen Fall die spezielle Lösung von Gleichung (2.6) verwenden.

Während der Zeit, in der der Zellzyklus abläuft, wird ein Teil der Zellen ausgewaschen. Von den zur Zeit t_1 im Reaktor befindlichen Zellen sind zur Zeit t_2 entsprechend Gleichung (3.25) nur noch

$$n(t_2, p(t_2)) = n(p(t_1)) \frac{q_2(p(t_1))}{q_2(p(t_2))} e^{-D(t_2-t_1)} \quad \text{für } p(t_2) \geq p(t_1)$$

Zellen vorhanden. Im Fall einer periodischen Lösung mit der Periodenlänge T_P ist die Zellverteilung in jeder Periode gleich. Es gilt

$$n(t, p) = n(t + T_P, p) \quad (3.27)$$

und somit ist das Verhältnis zwischen den Zellen zu Beginn ($p(t_1) = 0$) und am Ende des Zellzyklus ($p(t_2) = 1$) bestimmt durch die Generationszeit $a_T = t_2 - t_1$ entsprechend

$$\begin{aligned} n(t, 1) &= n(t - a_T, 0) \frac{q_2(0)}{q_2(1)} e^{-Da_T} \\ n(t, 1) &= n(t, 0) \frac{q_2(0)}{q_2(1)} e^{-Da_T}. \end{aligned} \quad (3.28)$$

Multipliziert man die Gleichung mit $q_1(t)$ und ersetzt in der Definition des Flusses $u(t, 1)$ in Gleichung (2.34) die Verteilungsdichte $n(t, 1)$ durch den Ausdruck nach Gleichung (3.28), so gilt die Beziehung

$$u(t, 1) = q(t, 0) n(t, 0) e^{-Da_T} = u(t, 0) e^{-Da_T}. \quad (3.29)$$

Unabhängig von der Geschwindigkeit $q(t, p)$ nimmt der Fluß $u(t, p)$ im Verlauf des Zellzyklus exponentiell ab. Dies gilt nur, wenn die Wachstumsrate $q_1(t)$ am Ende des Zellzyklus immer den gleichen Wert aufweist. Im allgemeinen Fall sind jedoch weder $n(t, p)$ noch $u(t, p)$ ausschließlich durch die Verdünnungsrate bestimmt.

3.2.2 Zellbilanz für das Mehr-Klassen-Modell

Das in Abschnitt 2.3 vorgestellte Mehr-Klassen-Modell mit dem maximalen genealogischen Alter g beinhaltet $g + 1$ Tochter- und g Mutterklassen. Mit aufsteigendem genealogischen Alter bezeichnen die Indizes P_1 bis P_g die Mutterklassen. Die Tochterklassen weisen alle das genealogische Alter Null auf. Ihre Bezeichnung mit den Indizes D_0 bis D_g korrespondiert mit der Herkunft der Zellen. Die Gesamtheit aller Klassen bildet ein abgeschlossenes System, das heißt bei der Betrachtung aller Klassenübergänge gehen keine Zellen verloren, und es kommen keine Zellen hinzu, die vorher nicht zu einer Klasse des Systems gehört hätten.

Nach einem durchlaufenen Zellzyklus tritt eine Teilung der Zellen auf, und sie gehen in eine neue Klasse über. Die Randbedingungen des Zellzyklusmodells für den Zellfluß zwischen den Klassen bilden ein lineares Gleichungssystem von $2g + 1$ Gleichungen und der doppelten Anzahl unbekannter Flüsse, da in jeder Gleichung jeweils die Flüsse $u_i(t, 0)$ am Beginn und $u_i(t, 1)$ am Ende des Zyklus enthalten sind (Gleichung (2.38)). Wie bereits vorstehend erwähnt, ist zur Lösung des Gleichungssystems die Kenntnis des Zellverlustes im Verlauf des Zyklus erforderlich. Die in Gleichung (3.29) angegebene Lösung der Differentialgleichung zur Beschreibung des Zellzyklus führt für jede Klasse i auf eine weitere Gleichung der Form

$$u_i(t, 1) = u_i(t, 0) e^{-Da_T, i}. \quad (3.30)$$

Hiernach nimmt der Zellfluß exponentiell mit dem Produkt aus Generationszeit $a_{T,i}$ und Verdünnungsrate D ab. Damit tritt in jeder Zellklasse eine weitere Gleichung hinzu.

Der Anteil der Zellen einer Klasse i an der Gesamtpopulation wird neben der genealogischen Abfolge im Populationsmodell durch die Generationszeit $a_{T,i}$ der Zellen dieser Klasse bestimmt. Eine längere Generationszeit führt zu einem erhöhten Anteil, und umgekehrt verringert sich ihr Anteil durch eine verkürzte Generationszeit. Sind die Generationszeiten aller Klassen bekannt, so ist es möglich, die Zusammensetzung der Population zu bestimmen.

Zur Lösung des Gleichungssystems wird die Herkunft der Zellen sukzessive entsprechend dem Populationsmodell verfolgt. Die ältesten Zellen mit einem Alter $i \geq g$ sind im Modell in der Mutterklasse g zusammengefaßt. Im Unterschied zu allen anderen Klassen verbleiben diese Mutterzellen auch nach der Teilung in derselben Klasse. In Gleichung (2.38) ist es möglich, für die Mutterklasse mit g Narben den Fluß $u_{Pg}(t, 1)$ mit Hilfe der Beziehung (3.30) zu ersetzen

$$u_{Pg}(t, 0) = u_{P(g-1)}(t, 1) + u_{Pg}(t, 0)e^{-Da_{T,Pg}}$$

und nach $u_{Pg}(t, 0)$ aufzulösen

$$u_{Pg}(t, 0) = \frac{1}{(1 - e^{-Da_{T,Pg}})} u_{P(g-1)}(t, 1). \quad (3.31)$$

Die für die Generationszeit der ältesten Klasse notwendige Bedingung einer positiven Generationszeit $a_{T,Pg} > 0$, stellt für reale Populationen keine Einschränkung dar.

Zusammen mit Gleichung (3.31) gibt Gleichung (2.38) nun die Zuflüsse $u_i(t, 0)$ in allen Klassen explizit an und ermöglicht, die Herkunft der Zellen sukzessive zu verfolgen. Beginnend bei der jüngsten Mutterklasse $P1$ ergibt sich die folgende Ableitung. Der Zellfluß in die jüngste Mutterklasse $P1$

$$u_{P1}(t, 0) = u_{P0}(t, 1) = \sum_{j=0}^g u_{Dj}(t, 1) \quad (3.32)$$

setzt sich aus allen $(g + 1)$ Abflüssen $u_{Dj}(t, 1)$ der Tochterzellklassen zusammen. Die Tochterzellen stammen je nach Klasse aus den unterschiedlichen Mutterklassen $P1$ bis Pg . In der Klasse $P0$ sind Sproßzellen aller Tochterzellklassen zusammengefaßt. Es gilt

$$\begin{aligned} u_{P0}(t, 1) &= \sum_{j=0}^g u_{Dj}(t, 0) e^{-Da_{T,Dj}} \\ &= u_{P0}(t, 1) e^{-Da_{T,D0}} + \sum_{j=1}^g u_{Pj}(t, 1) e^{-Da_{T,Dj}}. \end{aligned}$$

Die Herkunft der Mutterzellen der Klasse i kann über i Zyklen bis an den Anfang der ersten Mutterklasse zurückverfolgt werden. Mit jedem Zyklus erhöht sich die Verweildauer der Zellen im Reaktor und damit die Wahrscheinlichkeit, ausgewaschen zu werden. Ersetzt

man, wie in Gleichung (3.32), zusätzlich $u_{P_1}(t, 0)$ durch $u_{P_0}(t, 1)$, so nimmt der Fluß die Gestalt

$$u_{P_0}(t, 1) = u_{P_0}(t, 1) e^{-Da_{T,D_0}} + \sum_{j=1}^{g-1} u_{P_0}(t, 1) e^{-Da_{T,D_j}} \prod_{i=1}^j e^{-Da_{T,P_i}} \\ + \frac{1}{1 - e^{-Da_{T,P_g}}} u_{P_0}(t, 1) e^{-Da_{T,D_g}} \prod_{i=1}^g e^{-Da_{T,P_i}}$$

an. Damit ist die Ausgangsklasse erreicht und der Kreis geschlossen. Die normierte Gleichung

$$1 = \sum_{j=0}^{g-1} e^{-D(a_{T,D_j} + \sum_{i=1}^j a_{T,P_i})} + \frac{1}{(1 - e^{-Da_{T,P_g}})} e^{-D(a_{T,D_g} + \sum_{i=1}^g a_{T,P_i})} \quad (3.33)$$

stellt einen Zusammenhang zwischen den Generationszeiten der einzelnen Klassen her. Die Gleichung resultiert aus der Forderung nach einer konstanten Zellzahl in der periodischen Lösung. Die mittlere Vermehrung der Population muß natürlich den durch die Verdünnungsrate verursachten Zellverlust ausgleichen.

Für einige Anwendungen kann es nützlich sein, zusätzliche Annahmen zu treffen. Weisen beispielsweise alle Sproßzellen die gleiche Generationszeit $a_{T,D_i} = a_{T,P_0}$ auf, so vereinfacht sich Gleichung (3.33) zu

$$1 = \sum_{j=0}^{g-1} e^{-D \sum_{i=0}^j a_{T,P_i}} + \frac{1}{(1 - e^{-Da_{T,P_g}})} e^{-D \sum_{i=0}^g a_{T,P_i}},$$

womit sich die Zahl der Tochterzellklassen des Modells von $g + 1$ auf eine verringert.

Eine endliche Anzahl von maximal möglichen Zellteilungen wird durch eine gegen unendlich strebende Generationszeit a_{T,P_g} beschrieben. Für den Übergang $a_{T,P_g} \rightarrow \infty$ gilt

$$\lim_{a_{T,P_g} \rightarrow \infty} e^{-Da_{T,P_g}} = 0,$$

wobei in Gleichung (3.31) der Nenner zu eins wird und damit der letzte Summand in Gleichung (3.33)

$$1 = \sum_{j=0}^{g-1} e^{-D(a_{T,D_j} + \sum_{i=1}^j a_{T,P_i})}$$

verschwindet. Die Generationszeit a_{T,D_g} spielt bei der Berechnung der Bilanz keine Rolle mehr, da keine Sproßzellen aus der ältesten Klasse der inaktiven Zellen mehr entstehen. Die Tochterklasse D_g enthält dementsprechend keine Zellen mehr.

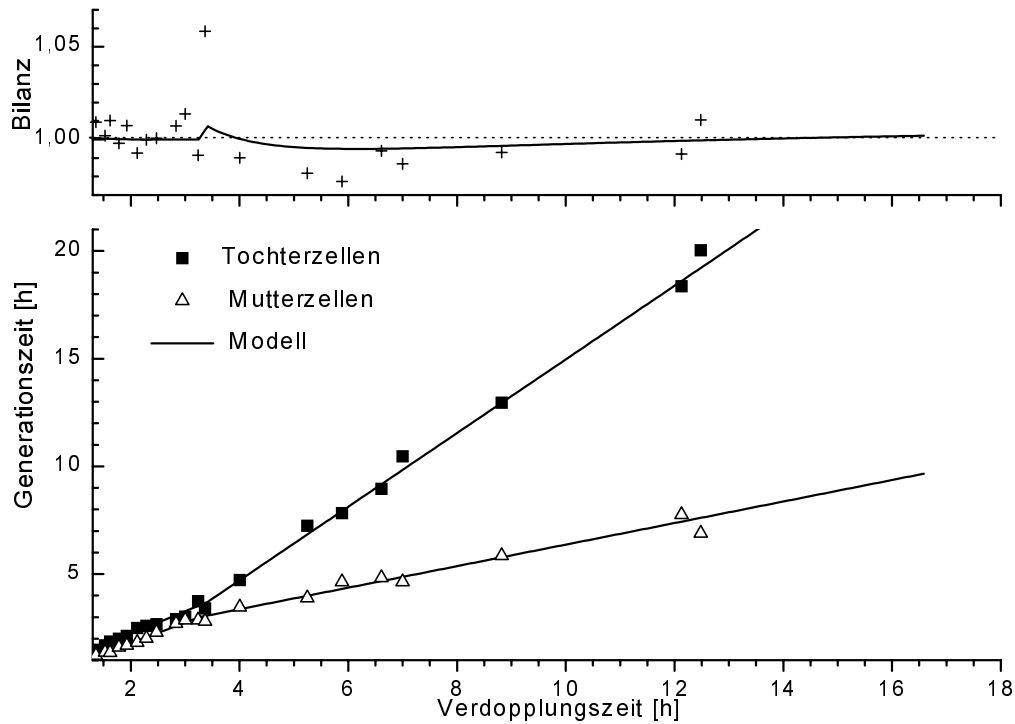


Bild 3.11: Abschnittsweise lineares Modell der Generationszeiten in asynchroner Kultur: Daten [Thompson und Wheals \(1980\)](#) (unten); Bilanzgleichung von Modell und Experiment (oben)

3.2.3 Asynchrone Kultur

Zur Beschreibung des asynchronen Wachstums unterliegen die Generationszeiten der Klassen neben Gleichung (3.33) keinen weiteren Einschränkungen. $2g$ der $(2g + 1)$ Generationszeiten des allgemeinen Modells sind frei wählbar. Für das Zwei-Klassen-Modell zeigen [Thompson und Wheals \(1980\)](#) die experimentell bestimmten Generationszeiten von Mutter- und Tochterzellen. Bild 3.11 stellt die Generationszeiten des Zwei-Klassen-Modells für asynchrones Wachstum dar. Die in der oberen Abbildung angegebene Bilanz für das stückweise lineare Modell der Generationszeiten zeigt, daß Modell und Messungen die Bilanz für $g = 1$ mit einer Tochterklasse

$$1 = e^{-Da_{T,P0}} + e^{-Da_{T,P1}} \quad (3.34)$$

nur näherungsweise erfüllt.

3.2.4 Synchrone Kultur

Im periodischen Fall sind die Randbedingungen nur erfüllbar, wenn die Generationszeit jeder Zellklasse identisch mit der beobachteten Periodenlänge T_P oder einem Vielfachen dieser ist. Für die Periodenlänge T_P und für die Generationszeiten $a_{T,i}$ der Klassen i gelte daher der Zusammenhang

$$T_P = \frac{a_{T,Pg}}{I_g} = \dots = \frac{a_{T,P1}}{I_1} = \frac{a_{T,Dg}}{J_g} = \dots = \frac{a_{T,D0}}{J_0} \quad (3.35)$$

mit den ganzzahligen Moduszahlen $I_i \in \mathbb{N}$ und $J_i \in \mathbb{N}$.

In der synchronen Kultur besteht also ein ganzzahliges Verhältnis zwischen den Generationszeiten. Kleinsten gemeinsamer Teiler ist die Periodenlänge T_P der Oszillation. Mit der Abkürzung

$$\alpha = e^{-DT_P}, \quad (3.36)$$

dem Dekrement der synchronen Kultur, geht Gleichung (3.33) in die charakteristische Gleichung

$$e_c(\alpha) = \sum_{j=0}^{g-1} \alpha^{J_j + \sum_{i=1}^j I_i} + \frac{1}{1 - \alpha^{I_g}} \alpha^{J_g + \sum_{i=1}^g I_i} - 1 = 0 \quad (3.37)$$

über; diese stellt eine gebrochen rationale Gleichung in α dar. Durch Multiplikation mit $(1 - \alpha^{I_g})$ läßt sich die Gleichung in eine Form mit ausschließlich rationalen Summanden umformen.

Die gesuchte Lösung der charakteristischen Gleichung liegt im Intervall $0 < \alpha < 1$, da die Periodenlänge auf den Bereich $0 > T_P > \infty$ begrenzt ist. Wie die Betrachtung des Grenzwertes $\lim_{\alpha \rightarrow 1} c(\alpha) = \infty$ und des Funktionswertes $e_c(\alpha = 0) = -1$ zeigt, existiert mindestens ein reeler Wert für α , der die Gleichung erfüllt. Da alle Summanden positiv und monoton wachsend sind, kann es auch nur genau eine reelle Lösung geben. Legt man zusätzlich den Funktionswert $e_c(\alpha = 0.5) \leq 0$ zugrunde, so ist es möglich das Intervall auf $0.5 \leq \alpha < 1$ einzuschränken. Unter der Voraussetzung $I_i \geq 1$ und $J_j \geq 1$ gilt die Abschätzung

$$e_c(\alpha = 0.5) \leq \left(\frac{1}{2} + \frac{1}{4} + \dots + \frac{1}{2^g} \right) + \frac{1}{\frac{1}{2^{2g+1}}} - 1 = 0.$$

Die beobachtete Periodenlänge ist damit kleiner oder gleich der mittleren Verdopplungszeit. Die Identität $e_c(\alpha = 0.5) = 0$ stellt sich ein, wenn die Generationszeiten aller Klassen der Periodenlänge T_P entsprechen.

Beispiel: Das einfachste Modell besteht aus drei Klassen mit dem maximalen genealogischen Alter $g = 1$. Aus Gleichung (2.38) folgt für den Fluß zwischen den Klassen zu

$$\begin{aligned} u_{P1}(t, 0) &= u_{D0}(t, 1) + u_{D1}(t, 1) + u_{P1}(t, 1) \\ u_{D0}(t, 0) &= u_{D0}(t, 1) + u_{D1}(t, 1) \\ u_{D1}(t, 0) &= u_{P1}(t, 1). \end{aligned}$$

Die charakteristische Gleichung für das einfachste vollständige System mit $g = 1$ nimmt nach Gleichung (3.37) die Form

$$1 = \alpha^{I_1} + \alpha^{J_0} + \alpha^{J_1 + I_1} - \alpha^{I_1 + J_0} \quad (3.38)$$

an. Weisen die beiden Tochterklassen die gleiche Generationszeiten auf, so gilt $J_0 = J_1 = J$ und $I_1 = I$ und das System geht in das Zwei-Klassen-Modell mit der von Bellgardt (1994a) bekannten charakteristischen Gleichung

$$1 = \alpha^J + \alpha^I \quad (3.39)$$

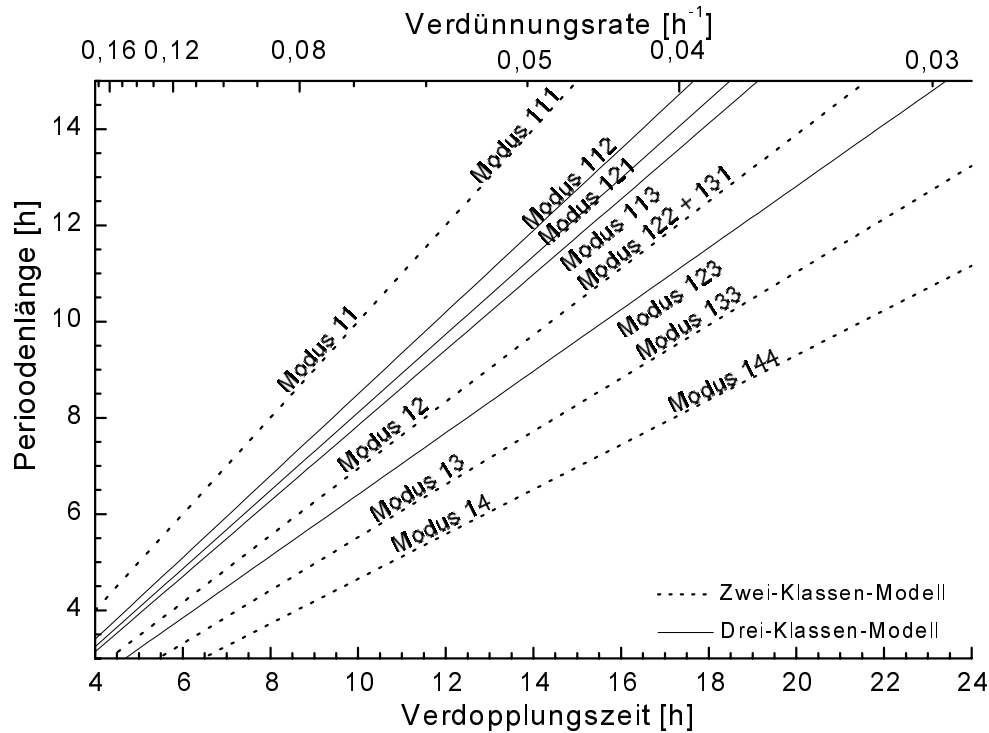


Bild 3.12: Zusammenhang zwischen Verdopplungszeit, Verdünnungsrate und Periodenlänge der synchronen Kultur. Vergleich der Wachstumsmodi im Zwei- und Drei-Klassen-Modell

über.

Im Fall des synchronen Wachstums ist die Gleichung unter Angabe eines Wachstumsmodus (zumindest numerisch) lösbar. Benötigen die Sproßzellen, die von einer jungen Zelle stammen (Klasse D_0), zwei Perioden, während Sproßzellen älterer Zellen (Klasse D_1) sowie die älteren Zellen selber (Klasse P_1) nur eine Periode für einen vollständigen Zellzyklus aufweisen, so erhält man die Moduszahlen $I_1 J_1 J_0 = 112$ und die charakteristische Gleichung für diesen Fall lautet

$$1 = \alpha + 2\alpha^2 - \alpha^3.$$

Die numerische Berechnung liefert für das Drei-Klassen-Modell und die benachbarten Modi des Zwei-Klassen-Modells die Reihenfolge

$$\alpha(11) < \alpha(112) < \alpha(12) \\ 0.5 < 0.555 < 0.618.$$

Die Basis α nimmt also einen Wert zwischen denen des Zwei-Klassen-Modells mit einer Tochterklasse mit einfacher und doppelter Zykluslänge (Modus 11 und 12) an. \square

Bild 3.12 zeigt den durch das Dekrement der Oszillation α gegebenen Zusammenhang zwischen Verdünnungsrate und Periodenlänge. Das Zwei-Klassen-Modell erlaubt in Abhängigkeit der Wachstumsmodi für jede Verdünnungsrate nur definierte Periodenlängen. Für höhere Moduszahlen liegen die Moduslinien enger zusammen. Der größte Abstand liegt zwischen den Dekrementen für Modus 11 und Modus 12. In diesem Bereich führt die

Erweiterung auf das vollständige Populationsmodell der Ordnung $g = 1$ mit zwei Tochterklassen und einer Mutterklasse, also dem Drei-Klassen-Modell mit den Modi 112, 121 und 113, auf mehrere enger benachbarte Moduslinien. Eine im Zwei-Klassen-Modell nicht auftretende Periodenlänge ließe sich demnach unter Umständen durch das unterschiedliche Verhalten der Tochterzellen erklären. Auch bei einer höheren Ordnung des Populationsmodells bleibt die Tatsache erhalten, daß für eine feste Verdünnungsrate nur diskrete Werte für die Periodenlänge erlaubt sind. Zu den Moduslinien kommen weitere hinzu — die Abstände werden durch die Erweiterung allerdings nicht geschlossen. Es ist zu bezweifeln, daß es notwendig ist, beliebig viele Klassen zu unterscheiden, da nur ganzzahlige Vielfache der beobachteten Periodenlänge möglich sind. Der Wechsel der Moduszahl ist also mit einem erheblichen Sprung der Generationszeiten verbunden. Große Unterschiede zwischen den Moduszahlen bedeuten gravierend andere Wettbewerbschancen zwischen den einzelnen Zellklassen bei gleichen Umgebungsbedingungen. Viele theoretisch mögliche Modi sind auszuschließen. Auch in der synchronen Kultur weisen ähnliche Zellen ein vergleichbares Wachstumsverhalten auf und tendieren daher zu den selben Moduszahlen. Die experimentellen Ergebnisse der oszillierenden kontinuierlichen Kultur rechtfertigen die Annahme, daß Mutterzellen im Vergleich zu den Tochterzellen besser oder mindestens gleich gut wachsen (Beuse, 1998).

3.2.5 Sensitivität der Periodenlänge

Die Analyse der Daten zeigt, daß der Sprossungsindex der Tochterzellen mit einer zeitlichen Verzögerung von 40 min nach dem der Mutterzellen ansteigt (Bartling, 1996). Die Abweichung von der zur exakten Synchronität notwendigen Generationszeit führt zu einer verbreiterten Verteilungsfunktion nach erfolgter Zellteilung. Weist die Kultur eine hohe Synchronität auf, so sind sogar bimodale Verteilungsformen nach der Teilung möglich. Die Kulturen befinden sich aber trotz der beobachteten Verzögerung in einem stationären (Fließ-) Gleichgewicht. Man kann daher annehmen, daß die Breite der Verteilung im Verlauf des Zellzyklus abnimmt, bis die ursprüngliche Form vor der nächsten Teilung wieder erreicht ist. Im folgenden wird die Auswirkung der nicht gleichzeitig sprossenden Teilpopulationen am Beispiel des Zwei-Klassen-Modells untersucht. Die Ergebnisse sind in analoger Weise auf das Mehr-Klassen-Modell übertragbar.

Die Generationszeit der Zellklassen weicht, wie in Bild 3.13 skizziert, von den angenommenen ganzzahligen Vielfachen ab. Für die Generationszeiten des Zwei-Klassen-Modells, bestehend aus einer Tochter- und einer Mutterklasse, gilt weiterhin der Zusammenhang

$$e^{-Da_{T,D}} + e^{-Da_{T,P}} = 1 \quad (3.40)$$

zwischen den Generationszeiten $a_{T,D}$ und $a_{T,P}$. Die Gleichung leitet sich aus der Zellbilanz ab und gilt sowohl für die synchrone als auch für die asynchrone Kultur. Die für die synchrone Kultur aufgestellte zusätzliche Bedingung trifft hier jedoch nur näherungsweise zu. Die Generationszeiten weichen um die verhältnismäßig kleinen Zeiten $\Delta a_{T,D}$ und $\Delta a_{T,P}$ von den ganzzahligen Vielfachen der Periodenlänge ab. Wie Bild 3.13 zu entnehmen ist,

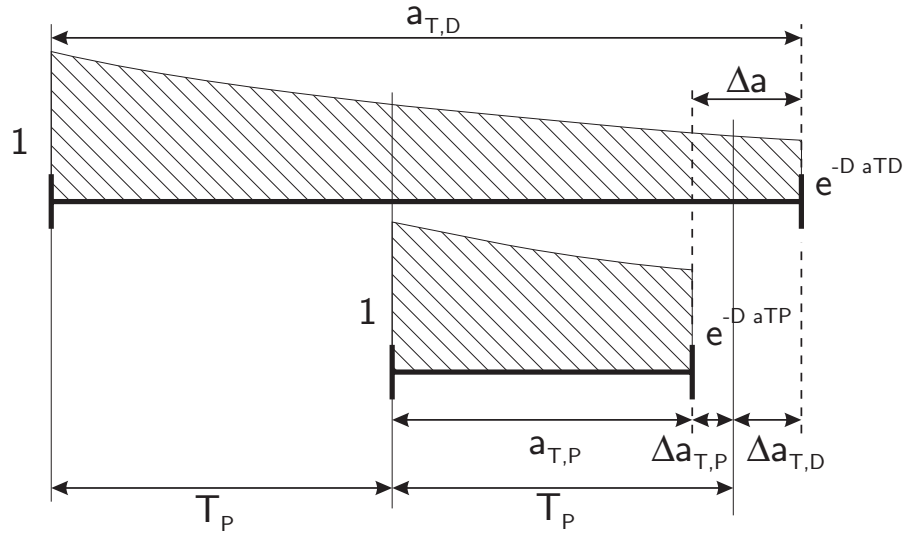


Bild 3.13: Skizze der Zellverteilung von Mutter- und Tochterklasse bei Abweichungen der Generationszeiten von den ganzzahligen Vielfachen der Periodenlänge T_P

lassen sich in diesem Fall die Zusammenhänge

$$JT_P + \Delta a_{T,D} = a_{T,D} \quad (3.41)$$

$$IT_P - \Delta a_{T,P} = a_{T,P} \quad (3.42)$$

angeben. Bild 3.13 zeigt hierbei Verhältnisse, die ungefähr dem Modus $IJ = 12$ entsprechen. Die Addition der Differenzen für Mutter- und Tochterklasse liefert den Abstand Δa mit

$$\Delta a = \Delta a_{T,D} + \Delta a_{T,P} = (I - J)T_P + a_{T,D} - a_{T,P} \quad (3.43)$$

zwischen den beiden in nächsten Zyklus zu verschmelzenden Teilpopulationen. Die Überlagerung führt auf eine neue Population, die im Schwerpunkt zwischen den beiden Teilpopulationen den nächsten Zellzyklus beginnt. Unter dieser Voraussetzung gilt die Beziehung

$$\Delta a_{T,D} e^{-D a_{T,D}} = \Delta a_{T,P} e^{-D a_{T,P}} \quad (3.44)$$

für die beiden Differenzen $\Delta a_{T,D}$ und $\Delta a_{T,P}$. Ersetzt man $\Delta a_{T,P}$ durch $\Delta a - \Delta a_{T,D}$, so führt dies auf

$$\Delta a_{T,D} = \Delta a e^{-D a_{T,P}} \quad (3.45)$$

und eingesetzt in Gleichung (3.41) auf

$$JT_P + \Delta a e^{-D a_{T,P}} = a_{T,D}. \quad (3.46)$$

Die Differenz Δa kann dabei mit Hilfe von Gleichung (3.43) ersetzt werden. Aufgelöst nach der Periodenlänge ergibt sich schließlich der gesuchte Zusammenhang

$$T_P = \frac{a_{T,D} e^{-D a_{T,D}} + a_{T,P} e^{-D a_{T,P}}}{J + (I - J) e^{-D a_{T,P}}} \quad (3.47)$$

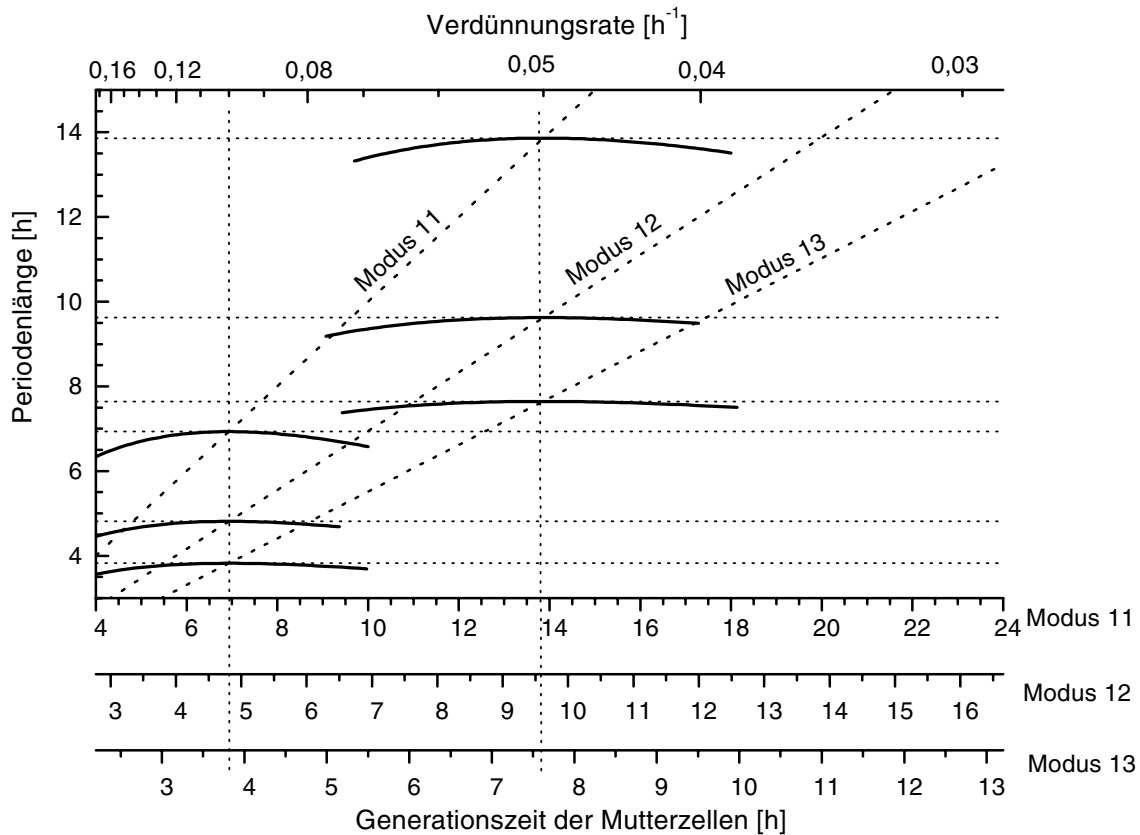


Bild 3.14: Zusammenhang zwischen Generationszeit der Mutterzellen, Verdünnungsrate und Periodenlänge der synchronen Kultur mit nicht gleichzeitiger Sprossung von Mutter- und Tochterzellen für $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$ und $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$

zwischen der Periodenlänge und den Generationszeiten. Die Generationszeiten sind dabei durch die Bilanzgleichung (3.40) gekoppelt. Die Verwendung der Bilanz liefert jedoch keine weitere Vereinfachung der Beziehung.

Bild 3.14 zeigt die Periodenlänge der synchronen Kultur. Die Schnittpunkte der horizontalen und vertikalen Linien markieren die Periodenlänge bei gleichzeitiger Sprossung von Tochter- und Mutterzellen für die Verdünnungsraten $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$ und $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$. Weichen die Sprossungszeitpunkte der Zellklassen voneinander ab, so verringert sich die Periodenlänge der synchronen Kultur. Die Abweichungen der Periodenlänge sind für Verzögerungen bis zu $\Delta a = 1 \text{ h}$ sehr gering. Mit anderen Worten, für eine Kultur mit geringen Abweichungen von den idealen Bedingungen erscheint es zulässig, den Wachstumsmodus der synchronen Kultur unter Verwendung von Periodenlänge der Oszillation und Verdopplungszeit zu bestimmen.

Kapitel 4

Populationsparameter

Im Bioreaktor sind stets eine große Anzahl von Zellen enthalten ($\approx 10^8 \text{ ml}^{-1}$), die alle in Interaktion mit Gas- und Flüssigphase stehen. Unter diesen Bedingungen ist es nicht möglich, das Wachstum einer einzelnen Zelle im Reaktor zu beobachten. Bei den gemessenen Stoffwechselraten handelt es sich stets um die mittleren Eigenschaften aller Zellen. Wie zu beobachten ist, beeinflusst die Zusammensetzung der Population das Wachstumsverhalten der gesamten Kultur. Die Zusammensetzung der Population wird hierbei entscheidend durch den Zellzykluszustand und durch das genealogische Alter bestimmt. Diese beiden Merkmale lassen sich durch Populationsparameter charakterisieren, die man durch Auszählen der in einem Probevolumen enthaltenen Zellen erhält. Dabei dienen Färbetechniken dazu, eine Reihe von spezifischen Merkmalen zu gewinnen (Bartling, 1996). Meßbares Merkmal des genealogischen Alters stellen in diesem Fall die bei der Teilung der Tochterzelle von der Mutterzelle entstandenen sogenannten Sprossungsnarben dar. Die Anzahl der Sprossungsnarben entspricht dabei der Anzahl der vollständig durchlaufenen Zellzyklen und damit dem in Abschnitt 2.3 eingeführten genealogischen Alter. Der Zellzykluszustand einer Zelle drückt sich in der Morphologie der Zellen aus. Die Zugehörigkeit zu den biologischen Phasen (siehe Bild 1.2 auf Seite 23) ist zum Beispiel an der ausgebildeten Sproßzelle und der Verteilung der DNA zwischen Tochter- und Mutterzelle zu erkennen.

Die Populationsparameter sind für den stationären Zustand der kontinuierlichen Kultur aus den Modellgleichungen des Zellzyklus- und des Populationsmodells ableitbar. Für das Zwei-Klassen-Modell haben Hartwell und Unger (1977) die Populationsparameter für asynchrones und Bellgardt (1994b) für synchrones Wachstum angegeben. Wie sich zeigt, ist in beiden Fällen das Verhältnis von Tochter- zu Mutterzellen konstant. Dieses Verhältnis wird durch die Generationszeiten der Zellen bestimmt. Hierbei gilt: Je länger die Generationszeit der Zellen einer Klasse ist, desto größer ist auch der Anteil dieser Klasse an der Population.

Grover und Woldringh (1995) erweitern die entsprechenden Zusammenhänge der asynchronen Kultur für das Mehr-Klassen-Modell. Die folgenden Abschnitte 4.1 und 4.2 sind den Zellzahlen in den Klassen bzw. in den Zyklusphasen des Mehr-Klassen-Modells in synchroner Kultur gewidmet. In Abschnitt 4.3 dient der Zusammenhang zwischen Generationszeit und Zellzahl dazu, die relevante genealogische Struktur einer synchronen

Kultur zu bestimmen. Während sich die Zellzahl einer Mutterklasse stets mit Hilfe der Sprossungsnarben bestimmen läßt, ist dies bei der Zusammensetzung der Tochterzellen nicht der Fall. Die Klasseneinteilung basiert hier auf der Herkunft der Zellen. Unabhängig von ihrer Herkunft weist jedoch keine Tochterzelle eine Sprossungsnarbe auf. Man ist hier auf eine rechnerische Bestimmung der Zellzahl der einzelnen Tochterklassen angewiesen.

Zur Bestimmung der periodischen Lösung der den Zellzyklus charakterisierenden Differentialgleichung in Abschnitt 3.2 wurde die Verteilungsfunktion $f(p)$ eingeführt. In der synchronen Kultur bestimmt die Funktion $f(p)$ den Synchronisationsgrad. Für $f(p) = 1$ ergibt sich als Spezialfall die asynchrone Kultur. Eine vollständig synchrone Kultur ist dagegen durch die sogenannte Dirac-Funktion $f(p) = \delta(p - p_0)$ gekennzeichnet. Eine Approximation der Verteilungsfunktion ist beispielsweise mit Hilfe einer experimentell ermittelten Verteilung des Volumens der Zellen möglich. Dieser Abschätzung liegt die Annahme zugrunde, daß das Volumen mit zunehmender Reife der Zelle zunimmt. Statt die gesamte Zellverteilung zu einem Zeitpunkt zu bestimmen, ist es im Fall der periodischen Lösung ebenfalls möglich, die Zellzahl zu einem festen Zellzykluszustand im Verlauf einer Periode zu betrachten. Diese Zeitreihe enthält ebenfalls die Information über die Zellverteilung $f(p)$. Zur Charakterisierung des Zyklus ist die Einteilung in Zyklusphasen nützlich. Die Zellverteilung wird durch die Zellzahl in diesen Phasen nur an wenigen diskreten Punkten angegeben. Steht beispielsweise nur der Sprossungsindex zur Verfügung, so entsteht durch die Aufteilung in Einzel- und Doppelzellphase eine recht dürftige Approximation des Zellzyklus. Der zeitliche Verlauf des Sprossungsindex enthält dagegen implizit weit mehr Information, da jede zeitliche Änderung durch einen Fluß über die Intervallgrenzen der beiden Phasen verursacht wird. In Abschnitt 4.4 wird ein Verfahren vorgestellt, das die im zeitlichen Verlauf des Sprossungsindex verborgene Information verwendet, um die Zellverteilung im Zyklus abzuschätzen.

4.1 Zellzahl einer Klasse

Das in Abschnitt 2.3 vorgestellte Populationsmodell teilt die Kultur in genealogische Altersklassen ein, wobei man die einzelnen Zellen anhand ihrer Sprossungsnarben einer dieser Klassen zuordnen kann. Die Dynamik des Zellzyklus jeder Klasse wird durch eine Differentialgleichung für die Zelldichte der Form (2.11) charakterisiert. Experimentell ist jedoch in der Regel die Zellzahl und nicht die Zelldichte bestimmbar. Im Modell ergibt sich die Zellzahl $N_i(t)$ einer beliebigen Klasse i durch Integration über die Zelldichte $n_i(t, a)$ zu

$$N_i(t) = \int_0^{a_{T,i}} n_i(t, a) da$$

wobei $a \in [0, a_{T,i}]$ den Zellzyklus darstellt. Das Symbol $a_{T,i}$ kennzeichnet dabei die Generationszeit. Die Summe der Zellzahlen aller Klassen entsprechend

$$N(t) = \sum_i N_i(t)$$

führt schließlich auf die Gesamtzellzahl der Population. Es erweist sich häufig als günstiger, nicht die absolute Zellzahl, sondern die Zellzahl $N_i(t)$ einer Klasse entsprechend

$$F_i(t) = \frac{N_i(t)}{N(t)}$$

auf die Gesamtzahl zu beziehen.

Die Annahme einer konstanten Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen im Zellzyklus erlaubt es, weitere Eigenschaften abzuleiten. Mit der in Abschnitt 3.2.1 vorgestellten Lösung

$$n_i(t, p) = n_{i,0} e^{-Da} f_i((t - t_0) - a)$$

kann man die Zellzahl $N_i(t)$ durch

$$N_i(t) = \int_0^{a_{T,i}} n_{i,0} e^{-Da} f_i((t - t_0) - p) da \quad (4.1)$$

charakterisieren, wobei $f(a)$ die allgemeine Verteilungsfunktion und $n_{i,0}$ die Zelldichte zu Beginn des Zellzyklus darstellt. Für die Spezialfälle des asynchronen und synchronen Wachstums ist das Integral analytisch lösbar. Sowohl in der periodischen synchronen als auch in der stationären asynchronen Kultur gilt dabei $n_{i,0} = \text{const}$, das heißt die Periodizität der synchronen Kultur ist ausschließlich in der Verteilungsfunktion $f(a)$ berücksichtigt. Die Verdünnungsrate D und die Verteilungsfunktion $f(a)$ sind dabei für alle Klassen gleich. Die Zellzahl einer Klasse hängt also von der Anfangszelldichte und der Generationszeit ab. Beide Größen weisen aufgrund des Populationsmodells gegenseitige Abhängigkeiten auf, die im folgenden betrachtet werden.

4.1.1 Anfangszelldichte

Die Zelldichten zu Beginn und zum Ende des Zellzyklus sind verknüpft durch die Gleichungen (2.38) des Populationsmodells. Legt man die in Abschnitt 3.2.1 abgeleitete analytische Lösung der Beschreibung des Zellzyklus zugrunde, so gelingt es, das Populationsmodell ausschließlich unter Verwendung der Anfangszelldichte und der Generationszeiten anzugeben. Damit ergeben sich folgende Abhängigkeiten für die genealogischen Klassen in der periodischen Lösung zwischen der Anfangszelldichte $n_{i,0}$ und der Zelldichte $n_{P0,1}$ zum Ende des Zellzyklus der Klasse $P0$. Es gilt

$$n_{P1,0} = \sum_{j=0}^g n_{Dj,0} e^{-Da_{T,Dj}} = n_{P0,1} \quad \text{für } g > 1, \quad (4.2a)$$

$$n_{Pi,0} = n_{P0,1} \prod_{k=1}^{i-1} e^{-Da_{T,Pk}} \quad \text{für } 2 \leq i \leq g - 1 \quad (4.2b)$$

und entsprechend Gleichung (3.31)

$$n_{Pg,0} = n_{P0,1} \frac{1}{1 - e^{Da_{T,Pg}}} \prod_{k=1}^{g-1} e^{-Da_{T,Pk}}. \quad (4.2c)$$

Die Zelldichte der Tochterzellklassen $1 \leq j \leq g$ ist bedingt durch die Definition der Tochterklassen identisch mit der Zelldichte am Ende der entsprechenden Mutterklasse. Die Zelldichte der jüngsten Tochterklasse $j = 0$ ist identisch mit der Zelldichte der ersten Mutterklasse. Unter Berücksichtigung von Gleichung (4.2) gilt

$$n_{D0,0} = \sum_{j=0}^g n_{Dj,0} e^{-Da_{T,Dj}} = n_{P0,1}, \quad (4.3a)$$

$$n_{Dj,0} = n_{P0,1} \prod_{k=1}^j e^{-Da_{T,Pk}} \quad \text{für } 1 \leq j \leq g-1 \quad (4.3b)$$

und für die älteste Tochterklasse

$$n_{Dg,0} = n_{P0,1} \frac{1}{1 - e^{Da_{T,Pg}}} \prod_{k=1}^g e^{-Da_{T,Pk}}. \quad (4.3c)$$

Damit gelingt es, die Anfangszelldichte aller Klassen auf die Zahl der sprossenden Tochterzellen $n_{P0,1}$ zu beziehen. Die Dichte ist dann nach den Gleichungen (4.2) und (4.3) eine Funktion der Generationszeiten der Kultur.

Im Fall der einfachsten vollständigen Klassenstruktur mit $g = 1$ gilt nach Gleichung (2.38) zwischen der Zelldichte zu Beginn des Zyklus $n_{i,0}$ und den Generationszeiten $a_{T,i}$ der Zusammenhang

$$n_{P1,0} = e^{-Da_{T,D0}} n_{D0,0} + e^{-Da_{T,D1}} n_{D1,0} + e^{-Da_{P1}} n_{P1,0} \quad (4.4a)$$

$$n_{D0,0} = e^{-Da_{T,D0}} n_{D0,0} + e^{-Da_{T,D1}} n_{D1,0} \quad (4.4b)$$

$$n_{D1,0} = e^{-Da_{T,P1}} n_{P1,0}. \quad (4.4c)$$

Die oben angegebenen Gleichungen (4.2) und (4.3) schließen natürlich den einfachsten Fall $g = 1$ mit ein. Die beiden ältesten Klassen $P1$ und $D1$ gehorchen dabei den Gleichungen (4.2c) und (4.3c). Die Anfangszelldichte der Mutterklasse $P1$ nimmt damit die Form

$$n_{P1,0} = \frac{1}{1 - e^{-Da_{T,P1}}} n_{P0,1}$$

an und entsprechend gehorchen die Tochterklassen $D0$ und $D1$ den Gleichungen

$$\begin{aligned} n_{D0,0} &= n_{P0,1} \\ n_{D1,0} &= \frac{e^{-Da_{T,P1}}}{1 - e^{-Da_{T,P1}}} n_{P0,1}. \end{aligned}$$

Die Addition der Zelldichte der beiden Tochterklassen $D0$ und $D1$ führt auf die Zelldichte aller Tochterzellen mit

$$n_{D,0} = n_{D0,0} + n_{D1,0} = \left(1 + \frac{e^{-Da_{T,P1}}}{1 - e^{-Da_{T,P1}}} \right) n_{P0,1},$$

sowie durch Umformung auf

$$n_{D,0} = \frac{1}{1 - e^{-Da_{T,P1}}} n_{P0,1} = n_{P1,0} = n_{P,0},$$

was wiederum der Dichte der Mutterzellen entspricht. Die Zusammenfassung der beiden Tochterklassen reduziert das obige Drei- auf ein Zwei-Klassen-Modell, bestehend aus Mutter- und Tochterzellen.

Mit Hilfe von Gleichung (4.4b) gelangt man zu dem Verhältnis zwischen den Zelldichten der beiden Tochterklassen

$$\frac{n_{D0,0}}{n_{D1,0}} = \frac{e^{-Da_{T,D1}}}{1 - e^{-Da_{T,D0}}}. \quad (4.5)$$

Bei zwei Mutterzellklassen ist in analoger Vorgehensweise Gleichung (4.4a) durch die Beziehungen

$$\begin{aligned} n_{P1,0} &= e^{-Da_{T,D0}} n_{D0,0} + e^{-Da_{T,D1}} n_{D1,0} \\ n_{P2,0} &= e^{-Da_{T,P1}} n_{P1,0} + e^{-Da_{T,P2}} n_{P2,0} \end{aligned}$$

zu ersetzen. Aus der zweiten Gleichung folgt wiederum das Verhältnis zwischen den Zelldichten der beiden Mutterklassen

$$\frac{n_{P1,0}}{n_{P2,0}} = \frac{1 - e^{-Da_{T,P2}}}{e^{-Da_{T,P1}}}.$$

Bezogen auf die Gesamtzahl der Mutterzellen $n_{P,0} = n_{P1,0} + n_{P2,0}$ gilt

$$\begin{aligned} n_{P1,0} &= \frac{1 - e^{-Da_{T,P2}}}{1 + e^{-Da_{T,P1}} - e^{-Da_{T,P2}}} n_{P,0} \\ n_{P2,0} &= \frac{e^{-Da_{T,P1}}}{1 + e^{-Da_{T,P1}} - e^{-Da_{T,P2}}} n_{P,0}. \end{aligned}$$

Bei identischen Generationszeiten, also $a_{T,P1} = a_{T,P2} = a_{T,P}$ gilt schließlich

$$\begin{aligned} n_{P1,0} &= (1 - e^{-Da_{T,P}}) n_{P,0} \\ n_{P2,0} &= e^{-Da_{T,P}} n_{P,0}. \end{aligned}$$

Mit Hilfe der Abhängigkeit zwischen den Zelldichten der einzelnen Klassen gelingt es nun, die Zellzahl in Abhängigkeit von Zelldichte und den Generationszeiten zu berechnen.

4.1.2 Asynchrone Kultur

Die asynchrone Kultur ist durch eine konstante Verteilung $f(a) = 1$ gekennzeichnet. Somit gilt nach Gleichung (4.1) für die Zellzahl

$$N_i(t) = \int_0^{a_{T,i}} n_{i,0} e^{-Da} da \quad (4.6)$$

woraus durch Lösung des Integrals die Beziehung

$$N_i(t) = \frac{n_i(t, 0)}{D} (1 - e^{-Da_{T,i}}) \quad (4.7)$$

folgt. Das heißt, Zellen mit einer längeren Generationszeit sind häufiger im Reaktor enthalten als solche mit einer kürzeren Generationszeit.

Die Berechnung der gesamten Zellzahl erfolgt getrennt für die Mutter- und die Tochterzellen. Die Zahl der Mutterzellen ergibt sich aus der Summation über alle g Mutterklassen zu

$$N_P(t) = \sum_{i=1}^g N_{P_i}(t). \quad (4.8)$$

Mit Gleichung (4.7) ist

$$N_P(t) = \sum_{i=1}^g \frac{n_{P_i,0}}{D} (1 - e^{-Da_{T,P_i}}).$$

Durch Ausmultiplizieren der Klammer und Einsetzen der Zelldichte in Gleichung (2.38) folgt

$$N_P(t) = \frac{1}{D} \left(\sum_{i=1}^g n_{P_i,0} - \sum_{i=2}^g n_{P_i,0} \right).$$

Da wegen der unterschiedlichen Summationsgrenzen alle höheren Terme als $i = 1$ verschwinden, gilt schließlich für die Zahl der Mutterzellen

$$N_P(t) = \frac{n_{P1,0}}{D} = \frac{n_{P0,1}}{D}. \quad (4.9)$$

Die Gesamtzahl der Mutterzellen ist unabhängig von den Generationszeiten der einzelnen Klassen. Kennt man die Anfangszelldichte der ersten Klasse, so ist auch die Gesamtzellzahl angebar, da die Zahl der Mutterzellen auf ihrem Weg durch die genealogische Klassenabfolge erhalten bleibt. Sie hängt ausschließlich von der Verdünnungsrate ab.

Analog zur Berechnung der Mutterzellzahl lautet die Tochterzellzahl

$$N_D(t) = \sum_{j=0}^g N_{D_j}(t). \quad (4.10)$$

Die Integration nach Gleichung (4.7) liefert

$$N_D(t) = \sum_{j=0}^g \frac{n_{D_j,0}}{D} (1 - e^{-Da_{T,D_j}})$$

$$N_D(t) = \frac{1}{D} \left(\sum_{j=0}^g n_{D_j,0} - \sum_{j=0}^g n_{D_j,0} e^{-Da_{T,D_j}} \right),$$

was sich wiederum mit Hilfe der Definitionen (2.37) und (2.38) als Summe

$$N_D(t) = \frac{1}{D} \left(\sum_{j=0}^g n_{Dj,0} - n_{P1,0} \right)$$

schreiben läßt. Unter Verwendung der in Gleichung (2.37) eingeführten Zelldichte n_{P0} gilt für die Zellzahl aller Tochterzellen

$$N_D(t) = \frac{1}{D} (n_{P0,0} - n_{P0,1}) = \frac{1}{D} n_{P0,0} (1 - e^{-Da_{T,P0}}). \quad (4.11)$$

Die Tochterzellen gehören, im Gegensatz zu den Mutterzellen, nur einen Zellzyklus lang einer Tochterzellklasse an und gehen danach in eine Mutterzellklasse über. Die Zahl der Tochterzellen nimmt also mit der Länge der mittleren Generationszeit $a_{T,P0}$ aller Tochterzellen zu.

Die Summe aus Mutter- und Tochterzellen ergibt die Gesamtzahl der Zellen

$$N(t) = \frac{n_{P0,0}}{D}; \quad (4.12)$$

wie man sieht, ist dieser Ausdruck unabhängig von den Generationszeiten. Auf diesen Zusammenhang hat Powell (1956) auch beim Wachstum durch Teilung in zwei gleiche Zellen hingewiesen.

Die relative Zellzahl einer beliebigen Klasse i lautet

$$F_i(t) = \frac{N_i(t)}{N(t)} = \frac{n_{i,0}}{n_{P0,0}} (1 - e^{-Da_{T,i}}). \quad (4.13)$$

Sie ist vollständig durch das Verhältnis der einzelnen Generationszeiten beschrieben, wie man durch Einsetzen der Zelldichte entsprechend den Gleichungen (4.2) und (4.3) erkennt.

4.1.3 Synchroner Kultur

Bei synchronem Wachstum ist ein periodisches Verhalten von Prozeßparametern zu beobachten. Diese Oszillation ist durch eine Synchronisation der Zellen bezüglich des Zellzyklus verursacht. Mit anderen Worten, nach der Periodenlänge T_P teilt sich jeweils die gleiche Zahl von Zellen. Damit weist die Verteilungsfunktion ebenfalls einen periodischen Charakter der Form $f(a) = f(a + T_P)$ auf. Die Generationszeit $a_{T,i}$ aller Zellen ist in der synchronen Kultur stets auf ganzzahlige Vielfache der Periodenlänge T_P festgelegt. Das Verhältnis $I_i = a_{T,i}/T_P$ kennzeichnet die Moduszahl dieser Klassen (siehe Gleichung (3.35)).

Die Zellzahl entsprechend Gleichung (4.1) erhält man wiederum durch Integration über die Zelldichte

$$N_i(t) = \int_0^{a_{T,i}} n_{i,0} e^{-Da} f((t - t_0) - a) da,$$

wobei sich das Integral in I_i durch die Moduszahl vorgegebene Teilstücke zerlegen läßt. Es entsteht eine Summe von I_i Integralen über jeweils eine Periode der Länge T_P

$$N_i(t) = \sum_{i=1}^{I_i} \int_{(i-1)T_P}^{iT_P} n_{i,0} e^{-Da} f((t-t_0) - a) da.$$

Die Substitution $a = a^* + (i-1)T_P$ führt auf

$$N_i(t) = n_{i,0} \sum_{i=1}^{I_i} e^{-D(i-1)T_P} \int_0^{T_P} e^{-Da^*} f((t-t_0) - a^*) da^*.$$

Mit der Abkürzung

$$\mathcal{F}(t) = \int_0^{T_P} e^{-Da^*} f((t-t_0) - a^*) da^*$$

und der Definition des Dekrementes während einer Periode nach Gleichung (3.36) wird daraus

$$N_i(t) = n_{i,0} \mathcal{F}(t) \sum_{i=1}^{I_i} \alpha^{i-1}.$$

Durch eine Erweiterung der geometrischen Reihe mit $(1 - \alpha)$ erhält man die Form

$$N_i(t) = n_{i,0} \frac{\mathcal{F}(t)}{1 - \alpha} (1 - \alpha^{I_i}).$$

Das Ergebnis ist dem in Gleichung (4.7) für die asynchrone Kultur abgeleiteten recht ähnlich, wenn man den Zusammenhang $e^{-Da_{T,i}} = \alpha^{I_i}$ berücksichtigt.

Die Gesamtzahl der Mutterzellen der synchronen Kultur wird analog zu der asynchronen Kultur gebildet. Es gilt hier

$$N_P(t) = n_{P0,1} \frac{\mathcal{F}(t)}{1 - \alpha}. \quad (4.14)$$

Die Gesamtzahl der Tochterzellen der synchronen Kultur ist durch

$$N_D(t) = (n_{P0,0} - n_{P0,1}) \frac{\mathcal{F}(t)}{1 - \alpha}$$

gegeben. Die Addition von Mutter- und Tochterzellen liefert auch hier die Gesamtzahl entsprechend

$$N(t) = n_{P0,0} \frac{\mathcal{F}(t)}{1 - \alpha}.$$

Die Gesamtzahl ist wiederum unabhängig von den Generationszeiten beziehungsweise dem Modus der synchronen Kultur.

Nützlicher als die absoluten Zahlen ist auch in diesem Fall der relative Anteil der Zellen einer Klasse. Das Integral $\mathcal{F}(t)$ ist für alle Zellklassen identisch und tritt daher in den bezogenen Größen F_i der synchronen Kultur nicht auf. Da der Term $\mathcal{F}(t)$ die einzige zeitabhängige Größe ist, ergibt sich eine konstante relative Zellzahl für allen Klassen. Analog zu Gleichung (4.13) gilt für die Klasse i

$$F_i(t) = \frac{N_i(t)}{N(t)} = \frac{n_{i,0}}{n_{P0,0}} (1 - \alpha^{I_i}), \quad (4.15)$$

wobei I_i die Moduszahl dieser Klasse bezeichnet.

Der gesamte Anteil der Tochterzellen ist stets

$$F_D = 1 - \alpha^J, \quad (4.16)$$

wobei der Exponent J in diesem Fall das Verhältnis der mittleren Generationszeit aller Tochterzellen zur Periodenlänge wiedergibt. Existieren mehrere Tochterzellklassen mit unterschiedlichen Generationszeiten, so kann nicht von einem ganzzahligen Exponenten J ausgegangen werden.

Da die Kultur nur aus Mutter- und Tochterzellen besteht, gilt für den Anteil der Mutterzellen entsprechend

$$F_P = \alpha^J. \quad (4.17)$$

4.2 Zellzahl einer Phase

Der Zellzyklus besteht aus einer Abfolge von einzelnen Phasen. Die Zellzahl einer betrachteten Phase des Zellzyklus erhält man durch Integration über die Zelldichte $n_i(t, a)$ der Klasse i innerhalb der für die Phase y festgesetzten Grenzen. Es gilt

$$N_{i,y}(t) = \int_{a_{min}}^{a_{max}} n_i(t, a) da,$$

wobei a_{min} und a_{max} die Grenzen dieser Phase innerhalb des Zellzyklus bezeichnen. Nimmt man eine konstante Wachstumsgeschwindigkeit im Zellzyklus an, ist es möglich, weitere Eigenschaften abzuleiten. Mit der in Abschnitt 3.2.1 berechneten analytischen Lösung nimmt die Zellzahl $N_{i,y}(t)$ die Form

$$N_{i,y}(t) = \int_{a_{min}}^{a_{max}} n_{i,0} e^{-Da} f_i((t - t_0) - a) da$$

an.

4.2.1 Asynchrone Kultur

Da für die asynchrone Kultur $f(a) = 1$ gilt, kann die Zellzahl einer Klasse i in einer Phase y durch

$$N_{i,y} = \frac{n_{i,0}}{D} (e^{-Da_{max}} - e^{-Da_{min}}),$$

angegeben werden, wobei a_{max} das Ende und a_{min} den Anfang dieser Phase kennzeichnet. Mit zunehmenden Werten der Grenzen a_{min} und a_{max} sinkt die Zellzahl ab. Das heißt, Phasen gleicher Länge $\Delta a = a_{max} - a_{min}$ enthalten aufgrund des Auswaschprozesses weniger Zellen, je weiter sie vom Beginn des Zellzyklus entfernt sind.

Beispiel: Die Sprossungsphase liegt unmittelbar am Ende des Zellzyklus. Sie ist durch das Intervall $[a_T - T_B; a_T]$ festgelegt. Hierbei bezeichnen a_T die Generationszeit und T_B die Dauer der Sprossungsphase. Die Zahl der sprossenden Zellen ergibt sich im Fall einer einzigen Klasse mit den Grenzen $a_{min} = a_T - T_B$ und $a_{max} = a_T$ zu

$$N_{bud} = \frac{n_0}{D} e^{-Da_T} (1 - e^{DT_B}).$$

Auf den die Klasse bezeichnenden Index kann bei der aus einer Klasse bestehenden Population verzichtet werden.

Bezogen auf die Gesamtzahl

$$N = \frac{n_0}{D}$$

nimmt der Sprossungsindex der asynchronen Kultur die Form

$$F_{BI} = \frac{N_{bud}}{N} = e^{-Da_T} (1 - e^{DT_B})$$

an. Der Sprossungsindex sinkt mit steigender Generationszeit a_T und steigt mit der Länge der Sprossungsphase T_B . ■

4.2.2 Synchroner Kultur

Während die Zellzahl in allen Phasen der asynchronen Kultur konstant ist, trifft dies auf die synchrone Kultur nicht zu. Wie im folgenden gezeigt, ist es jedoch möglich, obere und untere Schranken für den Verlauf der Zellzahl abhängig vom vorliegenden Wachstumsmodus der synchronen Kultur anzugeben. Bei dieser Abschätzung wird eine ideale vollständig synchrone Kultur zugrunde gelegt. Solange die Länge der betrachteten Phase kürzer als die Periodenlänge der synchronen Kultur ist, kann die untere Grenze leicht angegeben werden. Es existiert stets ein Zeitpunkt, zu dem sich keine der Teilpopulationen in der betreffenden Phase befindet. Daher gilt für die untere Schranke der Zellzahl einer mit y bezeichneten Phase $N_{y,min} = 0$. Die maximale Zellzahl $N_{y,max}$ wird dann erreicht, wenn eine Teilpopulation in die untersuchte Phase y eintritt. Aufgrund der angenommenen Länge der Phase befindet sich immer nur eine Teilpopulation gleichzeitig innerhalb der betreffenden Phase.

Im folgenden wird wiederum, wie bei der asynchronen Kultur, die Sprossungsphase verwendet, um diese Abschätzung für das Zwei- und das allgemeine Mehr-Klassen-Modell durchzuführen. Die Sprossungszeit ist in der Regel kürzer als die beobachtete Periodenlänge.

4.2.2.1 Zwei-Klassen-Modell

Das Wachstum einer synchronen Kultur, bestehend aus Mutter- und Tochterzellen, ist durch den Wachstumsmodus IJ gekennzeichnet. Jede der beiden Klassen teilt sich dabei in I bzw. J gleichmäßig über den Zellzyklus verteilte Teilpopulationen auf. Eine Teilpopulation meint hierbei eine Gruppe von Zellen mit jeweils gleichen Eigenschaften. Innerhalb des Zellzyklus liegen diese Teilpopulationen jeweils im Abstand einer Periodenlänge auseinander. Die Zellzahl der weiter hinten liegenden ist dabei gegenüber der ersten Teilpopulation um α bzw. α^2 , usw. verringert. In der Sprossungsphase befindet sich nur die älteste von ihnen. Das Verhältnis der beiden sprossenden Teilpopulationen zur Gesamtzahl läßt sich durch

$$F_{BI,max} = \frac{n_D \alpha^{J-1} + n_P \alpha^{I-1}}{n_D \sum_{j=0}^{J-1} \alpha^j + n_P \sum_{i=0}^{I-1} \alpha^i} \quad (4.18)$$

ausdrücken, wobei n_D und n_P die Zelldichte in Tochter- bzw. Mutterklasse zu Beginn des Zellzyklus bezeichnen. Da unabhängig von der genealogischen Struktur im Zwei-Klassen-Modell immer die gleiche Zahl von Mutter- und Tochterzellen entstehen, gilt $n_D = n_P$, was zusammen mit der normierten Bilanz $\alpha^J + \alpha^I = 1$ nach Gleichung (3.39) und der Erweiterung der geometrischen Reihe mit $(1 - \alpha)$ (vgl. Abschnitt 4.1.3) für die obere Grenze zu

$$F_{BI,max} = (\alpha^{J-1} + \alpha^{I-1})(1 - \alpha) = \alpha^{-1} - 1 \quad (4.19)$$

führt.

Anstatt die gesamte Population zu betrachten, kann es unter gewissen Bedingungen wünschenswert sein, den Sprossungsindex einer einzelnen Klasse anzugeben. Für den auf die Zahl der Tochterzellen bezogenen Sprossungsindex dieser Klassen ergibt der Ansatz analog zu Gleichung (4.18)

$$F_{D,BI,max} = \frac{n_D \alpha^{J-1}}{n_D \sum_{j=0}^{J-1} \alpha^j}. \quad (4.20)$$

Entsprechend der obigen Vorgehensweise gelingt es durch Erweiterung der geometrischen Reihe mit $(1 - \alpha)$ den Sprossungsindex in die Form

$$F_{D,BI,max} = \frac{\alpha^{J-1}}{1 - \alpha^J} (1 - \alpha)$$

zu überführen. Berücksichtigt man wiederum die normierte Bilanzgleichung, so folgt

$$F_{D,BI,max} = \frac{\alpha^J}{\alpha^I} (\alpha^{-1} - 1)$$

und durch Vergleich mit Gleichung (4.19) gilt schließlich der Ausdruck

$$F_{D,BI,max} = \alpha^{J-I} F_{BI,max}. \quad (4.21)$$

In entsprechender Weise kann für die Mutterzellen der Zusammenhang

$$F_{P,BI,max} = \alpha^{I-J} F_{BI,max} \quad (4.22)$$

abgeleitet werden.

Für eine Vielzahl von Experimenten ist die Generationszeit der Mutterzellen identisch mit der Periodenlänge. Die Moduszahl der Mutterklasse entspricht also $I = 1$. In diesem Fall ist es möglich, den maximalen Sprossungsindex der Mutterzellen mit Hilfe der normierten Zellbilanz zu

$$F_{P,BI,max} = \alpha^{1-J} \frac{\alpha^J}{\alpha} = 1$$

umzuformen. Das bedeutet, daß mit dem Erreichen der Sprossungsphase stets alle Zellen gleichzeitig der Sprossungsphase angehören. Aus der Beziehung (4.22) ist dies nicht unmittelbar zu erkennen.

4.2.2.2 Mehr-Klassen-Modell

Der maximale Sprossungsindex des Mehr-Klassen-Modells gehorcht einem ähnlichen Ansatz. Anstatt einer Mutter- und einer Tochterklasse enthält das Modell nun g Mutter- und $g + 1$ Tochterklassen. Die Zahl der Teilpopulationen der einzelnen Klassen ist wiederum durch die Moduszahlen I_i bzw. J_j der Klassen gegeben. Auch hier befindet sich nur die älteste der I_i bzw. J_j Teilpopulationen in der Sprossungsphase. Der Sprossungsindex der Kultur ist daher gegeben durch die Gleichung

$$F_{BI,max} = \frac{\sum_{l=0}^g \alpha^{J_l-1} n_{Dl} + \sum_{k=1}^g \alpha^{I_k-1} n_{Pk}}{\sum_{l=0}^g \left(n_{Dl} \sum_{j=1}^{J_l} \alpha^{j-1} \right) + \sum_{k=1}^g \left(n_{Pk} \sum_{i=1}^{I_k} \alpha^{i-1} \right)}.$$

Die Zelldichte n_i fällt hier, anders als beim Zwei-Klassen-Modell, in jeder Klasse unterschiedlich aus. Es ist daher beispielsweise die in den Gleichungen (4.2) und (4.3) angegebene Aufteilung der Zellen zwischen den einzelnen Klassen zu berücksichtigen.

Wiederum liefert die Erweiterung mit $(1 - \alpha)$

$$F_{BI,max} = \frac{\sum_{l=0}^g \alpha^{J_l} n_{Dl} + \sum_{k=1}^g \alpha^{I_k} n_{Pk} (\alpha^{-1} - 1)}{\sum_{l=0}^g n_{Dl} (1 - \alpha^{J_l}) + \sum_{k=1}^g n_{Pk} (1 - \alpha^{I_k})}.$$

Berücksichtigt man das Populationsmodell nach (2.38), so ist es möglich, die folgenden Umformungen vorzunehmen. So werden alle Tochterzellen im folgenden Zyklus in der Klasse D_0 zusammengefaßt. Daher gilt für die Summe der Tochterzellen am Zyklusende die Gleichung

$$\sum_{l=0}^g n_{Dl} \alpha^{J_l} = n_{D_0}.$$

Die Mutterzellen wechseln mit jedem weiteren Zellzyklus in die nächst höhere Klasse. Die Summe über alle Mutterklassen zum Ende des Zellzyklus ist identisch mit der Summe zu Beginn des Zellzyklus entsprechend

$$\sum_{k=1}^g n_{Pk} \alpha^{I_k} = \sum_{k=2}^g n_{Pk},$$

wobei hier die jüngste Klasse nicht mehr berücksichtigt wird. Betrachtet man statt der Mutter- die Tochterzellen nach der Teilung, so gilt der Zusammenhang

$$\sum_{k=1}^g n_{Pk} \alpha^{I_k} = \sum_{l=1}^g n_{Dl}.$$

Mit Hilfe dieser Identitäten gelangt man zu der Gleichung

$$F_{BI,max} = \frac{n_{D0} + \sum_{l=1}^g n_{Dl}}{\sum_{l=0}^g n_{Dl} - n_{D0} + \sum_{k=1}^g n_{Pk} - \sum_{k=2}^g n_{Pk}} (\alpha^{-1} - 1),$$

die sich durch weitere Zusammenfassungen zu

$$F_{BI,max} = \frac{\sum_{l=0}^g n_{Dl}}{\sum_{l=0}^g n_{Dl} + n_{P1} - n_{D0}} (\alpha^{-1} - 1)$$

vereinfacht. Aufgrund der Identität $n_{P1} = n_{D0}$ ist die Form

$$F_{BI,max} = (\alpha^{-1} - 1) \tag{4.23}$$

gültig, was dem bereits für das Zwei-Klassen-Modell ermittelten Wert entspricht.

Ist es erwünscht, den Sprossungsindex auf eine Tochterklasse D_j zu beschränken, gilt der Ansatz

$$F_{D_j, BI,max} = \frac{n_{D_j} \alpha^{J_j-1}}{n_{D_j} \sum_{l=0}^{J_j-1} \alpha^l},$$

wobei durch die Erweiterung mit $(1 - \alpha)$ die vereinfachte Form

$$F_{D_j, BI,max} = \frac{\alpha^{J_j}}{1 - \alpha^{J_j}} (\alpha^{-1} - 1)$$

entsteht. Führt man den Gesamtsprossungsindex nach Gleichung (4.23) ein, so gilt die Beziehung

$$F_{D_j, BI,max} = \frac{\alpha^{J_j}}{1 - \alpha^{J_j}} F_{BI,max}.$$

In ähnlicher Weise kann auch der Sprossungsindex einer Mutterklasse angegeben werden.

Für einfache Anordnungen sind Dekrement α und Sprossungsindex analytisch angebar. Allgemein erscheint jedoch eine tabellarische Angabe für ausgewählte Modi sinnvoll. Die

Tabelle 4.1: Maximaler Sprossungsindex und Dekrement α des Drei-Klassen-Modells für ausgewählte Wachstumsmodi

Modus $I_1 J_1 J_0$	Dekrement α	Sprossungsindex $F_{i,BI,max}$					
		gesamt	P1	D1	D0	P	D
111	0.5	1.	1.	1.	1.	1.	1.
112	0.555	0.8019	1.	1.	0.3569	1.	0.6431
121	0.5698	0.7549	1.	0.363	1.	1.	0.5698
122	0.618	0.618	1.	0.382	0.382	1.	0.382
123	0.6414	0.559	1.	0.3908	0.20042	1.	0.31246
132	0.661	0.5129	1.	0.20826	0.398	1.	0.26304
133	0.6823	0.4656	1.	0.21676	0.21676	1.	0.21676
134	0.6952	0.4384	1.	0.22185	0.13363	1.	0.19221
143	0.7125	0.4036	1.	0.14008	0.22864	1.	0.16289
144	0.7245	0.3803	1.	0.14461	0.14461	1.	0.14461

Tabelle 4.1 enthält für eine Reihe ausgewählter Wachstumsmodi des Drei-Klassen-Modells das jeweilige Dekrement und den zugehörigen maximal möglichen Sprossungsindex. Der minimale Sprossungsindex liegt in der Regel bei 0 %.

Diese Einschränkung auf einige wenige Klassen erscheint sinnvoll, da man unter realen Bedingungen nicht von unterschiedlichen Eigenschaften in allen genealogischen Klassen ausgehen kann. Wie Experimente zeigen, genügen oft einfache Wachstumsmodi, um die Konkurrenzsituation zwischen den Zellklassen zu beschreiben. In der Regel sind hierbei drei Klassen ausreichend. In einer Vielzahl von Versuchen sind zudem die Generationszeiten der Mutterzellen stets mit der Periodenlänge identisch ($I=1$). In diesem Fall liegt der maximale Sprossungsindex der Mutterzellen stets bei $F_{P,BI,max} = 1$ (in der Tabelle Spalte P , $P1$). Da die Tochterzellklassen meßtechnisch nicht unterscheidbar sind, ist es zweckmäßig, den maximalen Sprossungsindex für die Gesamtzahl der Tochterzellen anzugeben (siehe Spalte D).

Im Drei-Klassen-Modell gilt für den maximalen Sprossungsindex der Tochterzellen somit

$$F_{D,BI,max} = \frac{n_{D0}\alpha^{J_0-1} + n_{D1}\alpha^{J_1-1}}{n_{D0} \sum_{j=0}^{J_0-1} \alpha^j + n_{D1} \sum_{j=0}^{J_1-1} \alpha^j},$$

woraus wiederum durch Erweiterung mit $(1 - \alpha)$

$$F_{D,BI,max} = \frac{n_{D0}\alpha^{J_0} + n_{D1}\alpha^{J_1}}{n_{D0}(1 - \alpha^{J_0}) + n_{D1}(1 - \alpha^{J_1})}(\alpha^{-1} - 1)$$

folgt. Unter Berücksichtigung des Populationsmodells nach Gleichung (2.38) gelangt man schließlich zu

$$F_{D,BI,max} = \frac{n_{D0}}{n_{D1}}(\alpha^{-1} - 1).$$

Mit Hilfe des Verhältnisses zwischen den Anfangszellichten der beiden Tochterzellklassen D_0 und D_1 nach Gleichung (4.5) wird schließlich

$$F_{D,BI,max} = \frac{\alpha^{J_1}}{1 - \alpha^{J_0}} F_{BI,max}. \quad (4.24)$$

Eingesetzt beispielsweise für Modus 123 liefert mit $I_1 = 1$, $J_0 = 2$ und $J_1 = 3$ die Gleichung

$$F_{D,BI,max} = \frac{\alpha^2}{1 - \alpha^3} F_{BI,max}.$$

Die Verwendung der normierten Bilanzgleichung (3.38) führt hier auf keine weitere Vereinfachung.

4.3 Berechnung der Generationszeiten

Zur Berechnung der Generationszeiten wird üblicherweise die Aufteilung der Population in die genealogischen Klassen verwendet. Wie bereits in Abschnitt 4.1 gezeigt, erhöht sich der Anteil der Zellen einer Klasse mit zunehmender Generationszeit und sinkt demnach bei einer kürzeren Generationszeit ab. Hierbei ist der prinzipielle Zusammenhang zwischen Zellzahl und Generationszeit einer Klasse in der synchronen und asynchronen Kultur gleich. Bei der Berechnung der Generationszeiten der synchronen Kultur muß man allerdings zusätzlich berücksichtigen, daß diese der Populationsbilanz folgend ganzzahligen Vielfachen der Periodenlänge entsprechen müssen. Diese zusätzliche Bedingung läßt sich verwenden, um die Anzahl der relevanten Zellklassen mit unterschiedlichen Eigenschaften zu bestimmen. Neben der Aufteilung der Zellen auf die einzelnen Klassen wird hierzu die Verdünnungsrate und die Periodenlänge der synchronen Kultur benötigt. Die Vorgehensweise lautet dann wie folgt: Zunächst sind die Generationszeiten für zwei Klassen zu bestimmen. Ist das Verhältnis der Generationszeiten zur Periodenlänge ganzzahlig, dann reichen die beide Klassen aus, um das Wachstum zu charakterisieren. Eine Klasse, deren Generationszeit die Bedingung nicht erfüllt, ist vermutlich durch unzulässige Zusammenfassung von mehreren Zellklassen mit unterschiedlichen Eigenschaften entstanden. Dementsprechend ist eine Erweiterung des ursprünglichen Modells solange notwendig, bis alle Klassen die Bedingungen der synchronen Kultur erfüllen.

Die Generationszeiten der Mutterzellklassen und der Gesamttochterzellklasse lassen sich aus der Aufteilung der Population bestimmen. Für den Anteil F_{P_i} einer beliebigen Mutterklasse gilt nach Gleichung (4.13)

$$F_{P_i}(t) = \frac{n_{P_i,0}}{n_{P_0,0}} (1 - e^{-Da_T, P_i}). \quad (4.25)$$

Setzt man nun in der Gleichung $i = 0$ ein, so lautet der Zusammenhang für die Klasse P_0 der Tochterzellen

$$F_{P_0} = (1 - e^{-Da_T, P_0}). \quad (4.26)$$

Dieser Anteil der Tochterzellen F_{P_0} hängt demnach lediglich von der mittleren Generationszeit a_{T,P_0} aller Tochterzellen ab. Durch Umformung erhält man die Generationszeit

$$a_{T,P_0} = -\frac{1}{D} \ln(1 - F_{P_0}). \quad (4.27)$$

Für die Mutterklassen mit dem genealogischen Alter $1 \leq i < g$ enthält Gleichung (4.25) die auf die Tochterklasse P_0 bezogene Anfangszell-dichte. Die Erweiterung mit der Anfangszell-dichte $n_{P(i-1),0}$ des jeweils vorigen Zellzyklus liefert

$$F_{P_i}(t) = \frac{n_{P_i,0}}{n_{P(i-1),0}} \frac{n_{P(i-1),0}}{n_{P_0,0}} (1 - e^{-Da_{T,P_i}}).$$

Nach der Definition des Populationsmodells gilt in diesem Fall der Zusammenhang

$$n_{P_i,0} = n_{P(i-1),0} e^{-Da_{T,P(i-1)}}$$

und somit stellt die Gleichung

$$F_{P_i}(t) = e^{-Da_{T,P(i-1)}} F_{P(i-1)} \frac{1 - e^{-Da_{T,P_i}}}{1 - e^{-Da_{T,P(i-1)}}}, \quad (4.28)$$

einen Zusammenhang zwischen den Anteilen F_{P_i} und $F_{P(i-1)}$ zweier benachbarter Mutterklassen her. Löst man diese entsprechend dem obigen Schema nach der Generationszeit a_{T,P_i} auf, ergibt sich mit

$$a_{T,P_i} = -\frac{1}{D} \ln \left(1 - \frac{F_{P_i}}{F_{P(i-1)}} (e^{Da_{T,P(i-1)}} - 1) \right) \quad \text{mit } 1 \leq i < g \quad (4.29)$$

ein Zusammenhang, in den nur die Zellzahl und die Generationszeit der Klassen i und $i - 1$ eingehen. Beginnend für $i = 0$ mit der Tochterklasse P_0 sind die Generationszeiten der Mutterzellklassen so sukzessive berechenbar.

Die Klasse der ältesten Zellen stellt jedoch einen Spezialfall dar. Im Populationsmodell gilt abweichend der Zusammenhang

$$n_{P_g,0} = n_{P(g-1),0} \frac{e^{-Da_{T,P(g-1)}}}{1 - e^{-Da_{T,P_g}}}$$

und damit folgt für die Zellzahl F_g der Zusammenhang

$$F_{P_g}(t) = e^{-Da_{T,P(g-1)}} F_{P(g-1)} \frac{1}{1 - e^{-Da_{T,P(g-1)}}},$$

in dem die gesuchte Generationszeit der ältesten Klasse gar nicht enthalten ist. Die Generationszeit dieser Klasse ist also auf diese Weise nicht berechenbar, da die Länge des Zellzyklus keinen Einfluß auf die Anzahl der Zellen dieser Klasse hat. Alle Zellen verbleiben nach der Teilung in der letzten Klasse.

Sind jedoch alle Generationszeiten mit Ausnahme dieser einen bekannt, so gelingt es mit der in Abschnitt 3.2 angegebenen normierten Zellbilanz auch diese Generationszeit zu bestimmen. Die dort angegebene Bilanzgleichung entsteht, wenn man im Populationsmodell in der Gleichung

$$n_{P0,0} = \sum_{i=1}^g n_{Pi,0} e^{-Da_{T,Pi}}$$

die Zelldichten $n_{Pi,0}$ jeweils durch die in Gleichung (4.2) angegebene Beziehung ersetzt.

Es ist jedoch auch möglich, mit Hilfe der relativen Zellzahlen F_{Pi} eine entsprechende Beziehung für die fehlende Generationszeit anzugeben. Geht man dazu von vorstehender Gleichung in der auf $n_{P0,0}$ normierten Form

$$1 = \sum_{i=1}^g \frac{n_{Pi,0}}{n_{P0,0}} e^{-Da_{T,Pi}}$$

aus, dann ist die Dichte durch den Anteil F_{Pi} der Zellen an der Population entsprechend ersetzbar. Dies führt auf die Gleichung

$$1 = \sum_{i=1}^g F_{Pi} \frac{e^{-Da_{T,Pi}}}{1 - e^{-Da_{T,Pi}}} = \sum_{i=1}^{g-1} F_{Pi} \frac{e^{-Da_{T,Pi}}}{1 - e^{-Da_{T,Pi}}} + F_{Pg} \frac{e^{-Da_{T,Pg}}}{1 - e^{-Da_{T,Pg}}}$$

und umgeformt auf

$$F_{Pg} \frac{1}{e^{Da_{T,Pg}} - 1} = 1 - \sum_{i=1}^{g-1} F_{Pi} \frac{e^{-Da_{T,Pi}}}{1 - e^{-Da_{T,Pi}}}$$

sowie nach Auflösung auf die gesuchte Generationszeit

$$a_{T,Pg} = \frac{1}{D} \ln \left(1 + \frac{1 - \sum_{i=0}^{g-1} F_{Pi}}{1 - \sum_{i=1}^{g-1} F_{Pi} \frac{e^{-Da_{T,Pi}}}{1 - e^{-Da_{T,Pi}}}} \right). \quad (4.30)$$

Die oben angegebenen Gleichungen erlauben es, sukzessive die Generationszeiten der Mutterklassen der synchronen Kultur zu bestimmen. Die Zahl der berücksichtigten Klassen ist dabei beginnend mit den Klassen $P0$ und $P1$ solange zu erhöhen, bis alle Generationszeiten $a_{T,Pi}$ mit $i > 0$ ganzzahlige Vielfache der Periodenlänge darstellen. Sollte die Generationszeit $a_{T,P0}$ der Tochterzellen kein ganzzahliges Vielfaches der Periodenlänge sein, so muß auch die Tochterzellklasse ebenfalls aufgeteilt werden.

Für die Tochterzellklassen Dj mit $0 \leq j \leq g$ gilt hierbei in ähnlicher Weise für die Anfangsdichte einer Klasse nach Gleichung (4.3) der Zusammenhang

$$n_{Dj,0} = n_{Pj,0} e^{-Da_{T,Pj}}.$$

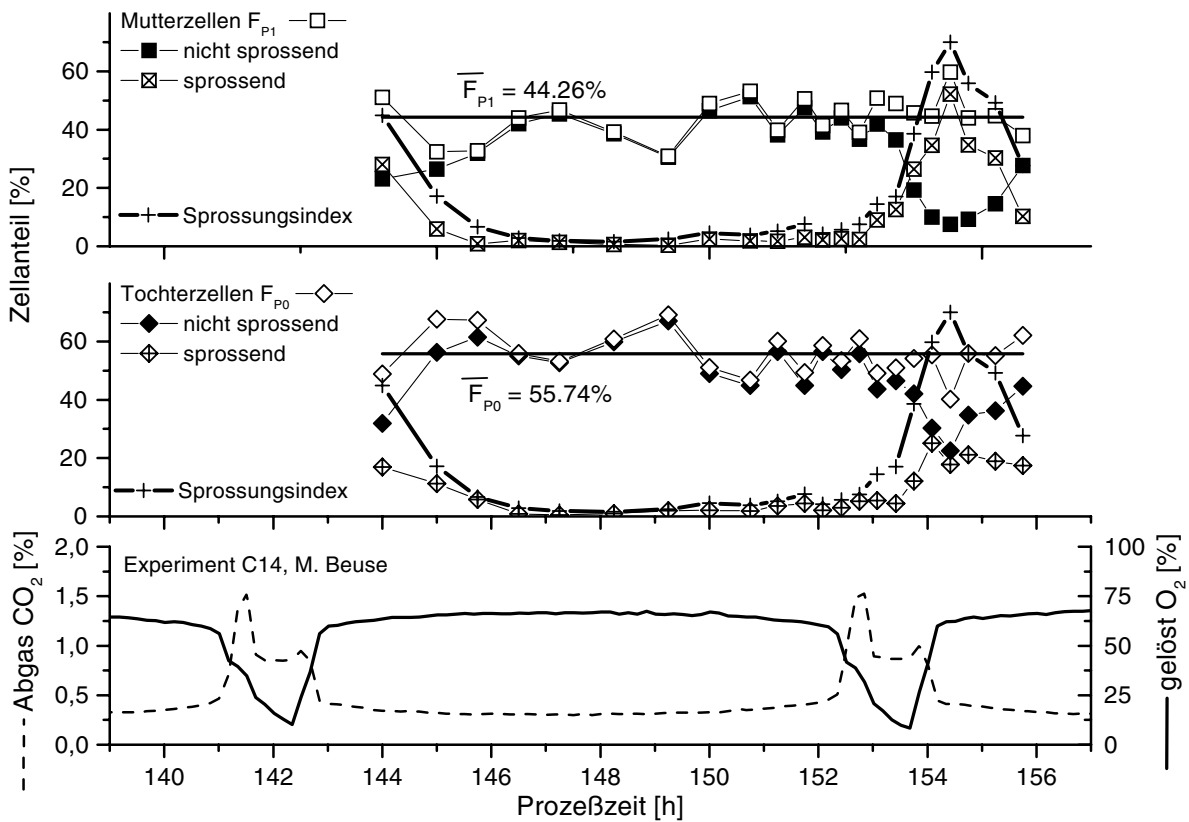


Bild 4.1: Morphologische Parameter einer synchronen Kultur mit $D = 0.05 \text{ h}^{-1}$ für Mutter- und Tochterzellklasse (Beuse, 1998). Zum Vergleich sind der Gesamtsprossungsindex sowie CO_2 -Konzentration im Abgas und die Gelöst-Sauerstoffkonzentration angegeben

Berücksichtigt man die relativen Zellzahlen F_i nach Gleichung (4.25), so folgt die Beziehung

$$\frac{F_{Dj}}{1 - e^{-Da_{T,Dj}}} = \frac{F_{Pj}}{1 - e^{-Da_{T,Pj}}} e^{-Da_{T,Pj}}$$

und nach Umformung entsteht für die Anteile der Tochterklassen

$$F_{Dj} = F_{Pj} \frac{1 - e^{-Da_{T,Dj}}}{e^{Da_{T,Pj}} - 1}. \quad (4.31)$$

Da die Tochterzellanteile in der Regel nicht bekannt sind, ist es auch nicht sinnvoll, hier die nach den Generationszeiten $a_{T,Dj}$ aufgelöste Form der Gleichung anzugeben. Die Generationszeiten der Tochterzellklassen sind vielmehr so zu wählen, daß der Anteil der Tochterzellen dem gemessenen Verhältnis in der Kultur entspricht.

Beispiel: Das in Bild 4.1 dargestellte Experiment dient dazu, die Vorgehensweise zur Bestimmung der Generationszeiten und der Anzahl der relevanten Klassen der synchronen Kultur zu erläutern. Bei einer Verdünnungsrate von $D = 0.05 \text{ h}^{-1}$ wurde eine Periodenlänge von $T_P = 11.2 \text{ h}$ ermittelt. Bild 4.1 zeigt die gemessenen morphologischen Parameter einer synchronen Kultur. Hierbei finden die Anteile von Mutter- bzw. Tochterzellen und die Anteile der sprossenden Zellen beider Klassen Beachtung.

Es ist zu erkennen, daß die Sprossung weitgehend auf einen kurzen Bereich von wenigen Stunden beschränkt ist. Die übrige Zeit ist der Sprossungsindex sehr gering. Im Gegensatz dazu sind über den gesamten dargestellten Bereich dennoch Schwankungen des Mutter- bzw. Tochterzellanteils festzustellen. Diese beruhen vermutlich auf einer fehlerhaften Klassenzuordnung einzelner Zellen. Daher werden im folgenden die zeitlichen Mittelwerte des Mutter- bzw. Tochterzellanteils zugrunde gelegt. Sie weisen wie in Bild 4.1 ersichtlich die Werte

$$F_{P0} = 0.5574 \quad \text{und} \quad F_{P1} = 0.4426$$

auf.

Zunächst sei angenommen, daß lediglich zwischen Mutter- und Tochterzellen unterschieden wird. In diesem Fall mit $g = 1$ nehmen die Bestimmungsgleichungen für die Generationszeit die vereinfachte Form

$$a_{T,P0} = -\frac{1}{D} \ln(1 - F_{P0}) \quad (4.32a)$$

und

$$a_{T,P1} = -\frac{1}{D} \ln(F_{P0}) \quad (4.32b)$$

an. Die berechnete Generationszeit der Mutterzellen $a_{T,P1} = 11.7 h$ zeigt eine gute Übereinstimmung mit der beobachteten Periodenlänge T_P von $11.2 h$. Offensichtlich ist es nicht notwendig, weitere Mutterklassen zu unterscheiden. Alle Mutterzellen weisen hierbei die Moduszahl $I_1 = 1$ auf. Hingegen liefert die Berechnung der Generationszeit der Tochterzellen den Wert $a_{T,P0} = 16.3 h$. Diese Generationszeit unterscheidet sich deutlich sowohl von der Periodenlänge als auch von einem möglichen Vielfachen der Periodenlänge. Die Generationszeit liegt vielmehr im Intervall $[T_P, 2T_P]$. Unterteilt man hingegen die Tochterzellen in zwei Klassen $D0$ und $D1$ mit den Moduszahlen $J_0 = 2$ und $J_1 = 1$, dann weisen wegen

$$F_{D0} = F_{P0} \frac{1 - e^{-Da_{T,D0}}}{e^{Da_{T,P0}} - 1} \quad (4.33a)$$

und

$$F_{D1} = F_{P1} \frac{1 - e^{-Da_{T,D1}}}{e^{Da_{T,P1}} - 1} \quad (4.33b)$$

die Anteile der Tochterzellen die Werte $F_{D0} = 0.305$ und $F_{D1} = 0.247$ auf. Die Summe der Teilpopulation $F_{D0} + F_{D1} = 0.552$ stimmt mit dem gemessenen Anteil aller Tochterzellen $F_{P0} = 0.56$ gut überein. Das Ergebnis bestätigt daher den angenommenen Wachstumsmodus 112 des Drei-Klassen-Modell. In diesem Fall ist es erforderlich, die Population in eine Mutterzellklasse und zwei Tochterzellklassen aufzuteilen. ■

4.4 Schätzung der Verteilungsfunktion

Die morphologischen Merkmale, wie z.B. der Sprossungsindex oder die Verteilung des genetischen Materials auf Mutter- und Tochterzellen, sind geeignet, die Zellen einer Kultur den Phasen des Zellzyklus zuzuordnen. Hierbei liegt in jeder Zyklusphase nur ein Wert für die mittlere Zelldichte in diesem Abschnitt vor. Die Gesamtheit der morphologischen Merkmale liefert also stets nur eine ungenaue Approximation der tatsächlichen Zellverteilung. Ermittelt man diese Merkmale jedoch nicht nur zu einem Zeitpunkt, sondern im Verlauf einer ganzen Periode der synchronen Kultur, enthält die Zeitreihe weitere Informationen über die Verteilung der Zellen im Zyklus. Diese werden im folgenden verwendet, um zu einer besseren Approximation der Zellverteilung zu gelangen.

Hierzu sei der Sprossungsindex betrachtet, der den Zyklus in zwei Phasen, nämlich die Einzel- und die Doppelzellphase, einteilt. Eine zeitliche Änderung des Sprossungsindex bedeutet, in dem betrachteten Zeitraum geht ein Teil der Zellen von der einen Phase in die andere über. Zusätzlich ist die Gesamtzahl der sich in einer Periode der synchronen Kultur teilenden Zellen bekannt. Bei einer periodischen Lösung gleicht das Wachstum stets die Anzahl der ausgewaschenen Zellen aus.

Die folgenden Abschnitte enthalten zwei Ansätze zur Approximation der Zellverteilung. In beiden Ansätzen wird der Versuch unternommen, die Zellverteilung durch eine geeignet gewählte Ansatzfunktion abzuschätzen. Hierzu sind deren freie Parameter zu bestimmen. Zum einen handelt es sich um die Charakterisierung der Zellverteilung durch eine Fourierreihe und zum anderen um die Approximation durch eine abschnittsweise konstante Funktion.

4.4.1 Fourierzerlegung

Zunächst sei die Zerlegung der Zellverteilung in eine Fourierreihe betrachtet. Mit Hilfe der Fourierreihe gelingt es, die Verteilungsfunktion der Zellen im Zellzyklus mit beliebiger Genauigkeit zu approximieren. Mit steigender Anzahl der Glieder der Fourierreihe steigt die Güte der Approximation. Zur Berechnung der Zahl der sprossenden Zellen ist die Lösung des Integrals

$$N_B(t) = \int_{a_T - T_B}^{a_T} n(t, a) da$$

notwendig. Die für die Berechnung der Verteilungsfunktion notwendige Differentiation macht es nahezu unmöglich, aus unsicheren Meßwerten die Koeffizienten für die Glieder höherer Ordnung der Fourierreihe zu bestimmen. Dies ist jedoch für die erwarteten synchronen Zellverteilungen notwendig. Je mehr die Kultur einer vollständig synchronen Kultur gleicht, desto weniger ist es möglich, die Zellverteilung bezüglich des Zyklus durch die Grundwelle zu beschreiben.

Des weiteren erweist es sich als nachteilig, daß die Ansatzfunktion nicht die notwendigen Randbedingungen für eine Verteilungsfunktion erfüllt, da diese beispielsweise keine negativen Werte aufweisen kann. Dies ist bei der Überlagerung der Glieder der Fourierreihe

jedoch nicht auszuschließen. Das Verfahren ist aus den genannten Gründen für praktische Anwendungen nicht geeignet.

4.4.2 Rechteckförmige Verteilung

Zur Approximation der einem Experiment zugrunde liegenden Verteilungsfunktion wird im folgenden eine rechteckförmige Zellverteilung im Zyklus angenommen. In praktischen Fällen ist nicht mit derartigen Verteilungen zu rechnen. Daher stellt diese Annahme eine Einschränkung der möglichen Verteilungsformen dar. Dennoch zeigt die folgende Parametrierung eines Ein-Klassen-Modells, daß die Verteilung einer synchronen Kultur bereits recht gut durch eine rechteckförmige Verteilung beschrieben werden kann.

Da das Modell aus nur einer Zellklasse besteht, ist keine Unterscheidung des genealogischen Alters möglich. Im Verlauf des Zyklus gehen die Zellen mit der Ausbildung der Tochterzelle von der Einzelzellphase in die Doppelzellphase über. Dabei enthalten die Einzelzellphase $N_S(t)$ und die Doppelzellphase $N_B(t)$ Zellen. Die Summe beider Phasen ergibt die Gesamtzellzahl $N(t) = N_S(t) + N_B(t)$ der Population. Die Einzelzellen $N_S(t)$ gehen mit der Sprossungsrate $R(t)$ in die Sprossungsphase über. Die Teilungsrate $Q(t)$ verringert dagegen die Zahl der sprossenden Zellen $N_B(t)$. Aus jeder sprossenden Zelle entstehen dabei zwei Einzelzellen. Die Zellzahl der beiden Phasen ist durch die Gleichungen

$$\frac{dN_B}{dt} = R(t) - Q(t) - DN_B(t) \quad (4.34a)$$

und

$$\frac{dN_S}{dt} = -R(t) + 2Q(t) - DN_S(t) \quad (4.34b)$$

gegeben. Für die Gesamtzellzahl gilt

$$\frac{dN}{dt} = Q(t) - DN(t). \quad (4.34c)$$

Sie erhöht sich lediglich bei der Teilung einer Zelle.

Da die absoluten Größen in der Regel nicht meßbar sind, kommen auch hier die auf die Gesamtzahl bezogenen Größen

$$F_B(t) = \frac{N_B(t)}{N(t)} \quad \text{und} \quad F_S(t) = \frac{N_S(t)}{N(t)}$$

zur Anwendung. Die Differentiation von $F_B(t)$ nach der Zeit liefert

$$\frac{dF_B}{dt} = \frac{\frac{dN_B}{dt} N(t) - N_B(t) \frac{dN}{dt}}{N(t)^2},$$

was schließlich durch Einsetzen der obigen Gleichungen und mit den Abkürzungen $r(t) = R(t)/N(t)$ und $q(t) = Q(t)/N(t)$ auf die Differentialgleichung für den Anteil der sprossenden Zellen

$$\frac{dF_B}{dt} = r(t) - q(t) (1 + F_B(t)) \quad (4.35)$$

führt. Die Gleichung ist unabhängig von der Verdünnungsrate D . Den Anteil der Einzelzellen $F_S(t) = 1 - F_B(t)$ erhält man stets aus dem Anteil der sprossenden Zellen.

Zur Approximation der tatsächlichen Zellverteilung im Zyklus wird, wie bereits erwähnt, von einer rechteckförmigen Verteilung ausgegangen. Durch Vergleich mit den experimentellen Daten sind die Breite der Verteilung, die Phase sowie die Länge der Sprossungsphase zu ermitteln. Eine rechteckförmige Zellverteilung hat zur Folge, daß sowohl die Sprossungsrate $R(t)$ als auch die Teilungsrate $Q(t)$ abschnittsweise konstant sind. Die Breite dieses Abschnittes entspricht der gesuchten Breite der Zellverteilung. Zwischen der Sprossungs- und der Teilungsrate besteht dabei der Zusammenhang

$$Q(t) = R(t - T_B) e^{-DT_B},$$

wobei T_B die Länge der Sprossungsphase bezeichnet. Das Integral über die Sprossungsrate $Q(t)$ muß in der stationären Kultur dabei den Verlust der Zellen infolge des Auswaschprozesses im Reaktor ausgleichen. Die Integration über eine vollständige Periode der synchronen Kultur der Änderung der Zellzahl dN/dt liefert also stets Null. Selbiges gilt, wenn man Gleichung (4.34c) auf die Zellzahl normiert. Es gilt daher die Beziehung

$$\int_0^{T_P} \frac{Q(t)}{N(t)} dt - \int_0^{T_P} D dt = 0,$$

die umgeformt und mit der oben eingeführten Abkürzung $q(t) = Q(t)/N(t)$ auf die Gleichung

$$\frac{1}{T_P} \int_0^{T_P} q(t) dt = D \quad (4.36)$$

führt, was zur Bestimmung der maximalen Teilungsrate verwendet werden kann.

In Bild 4.2 ist die Anpassung des Modells für die bereits in Bild 4.1 gezeigten periodisierten Daten dargestellt. Die Verdünnungsrate der synchronen stationären Kultur während der gezeigten Perioden der Länge $T_P = 11.2 h$ betrug $D = 0.05 h^{-1}$. Es ist zu erkennen, daß neben der weitgehend synchron stattfindenden Sprossung (152.7-154.3 h) der Sprossungsindex nicht vollständig auf Null absinkt. Um dies zu berücksichtigen, wurde daher die Verteilung durch eine Überlagerung eines asynchronen und eines synchronen Anteils zusammengesetzt. Wie sich zeigt, gehören etwa 80 % aller Zellen der synchronen Population an. Die Sprossung der synchronen Teilpopulation wird gut durch eine Verteilung mit einer Breite von 14 % wiedergegeben. Als Länge der Sprossungsphase ergab sich $T_B = 2.5 h$. Der Sprossungsindex der asynchronen Kultur hingegen liegt im Experiment unterhalb der gemessenen Werte. Dies läßt sich dahingehend interpretieren, daß die Zellen der asynchronen Kultur eine längere Sprossungsphase aufweisen. Der Verlauf der Zellzahl wird gut durch die angenommene Verteilung wiedergegeben.

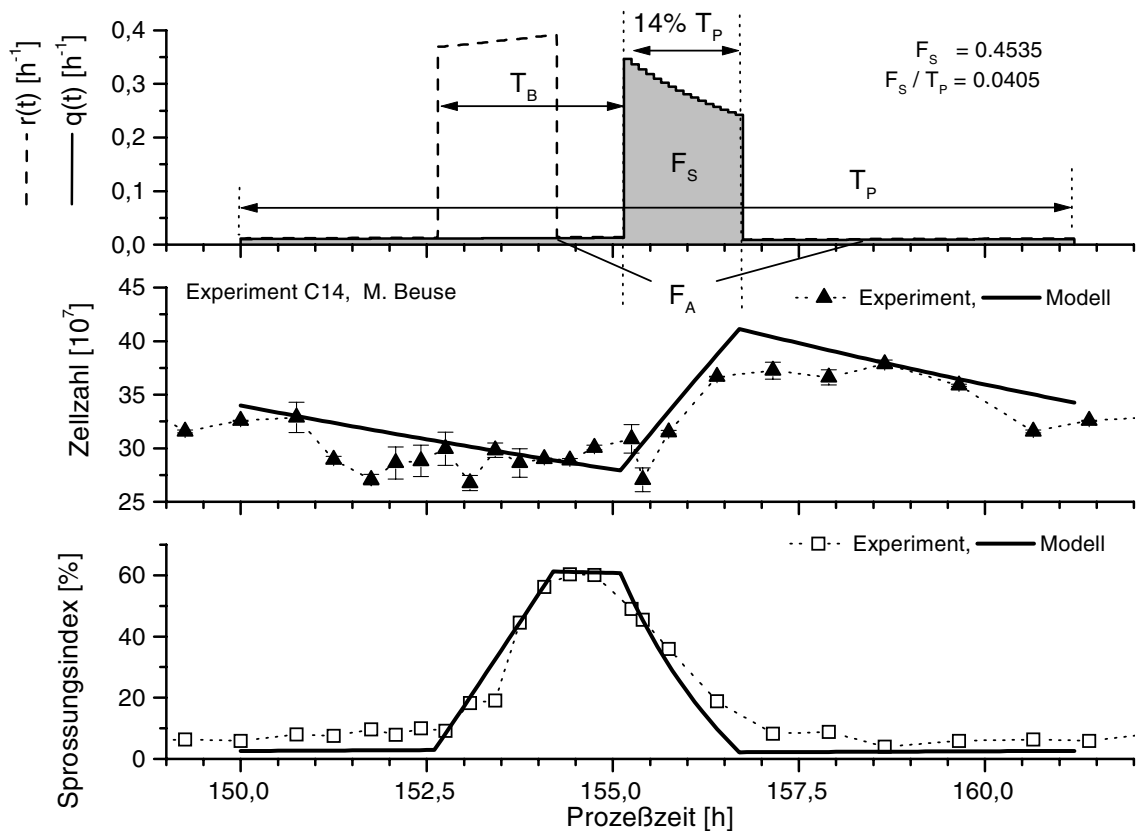


Bild 4.2: Parametrisierung einer abschnittsweise konstanten Verteilungsfunktion für die in Bild 4.1 gezeigten Daten bei einer Verdünnungsrate von $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$. Für die Betrachtung liegen die Daten in einer periodisierten Form vor. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Genauigkeit der Meßwerte für die Zellzahl

In einem weiteren Experiment, deren Meßwerte Bild 4.3 zeigt, liegt, im Vergleich mit dem obigen Experiment, eine höhere Verdünnungsrate von $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$ vor. Dies führt zu einer verkürzten Periodenlänge von $T_P = 5 \text{ h}$. Die Modellrechnung basiert ebenfalls auf einer rechteckförmigen Zellverteilung. Da die Länge der Sprossungsphase als weitgehend unabhängig von den Umgebungsbedingungen beschrieben wird (Thompson und Wheals, 1980), rücken die Sprossungsphase und die Teilungsphase näher zusammen und weisen eine Überlappung auf; daher sinkt der Sprossungsindex nicht auf Null ab. Bei einer Verteilung mit einer Breite von 58% und einer Dauer der Sprossungsphase von $T_B = 2,9 \text{ h}$ liefert die Modellrechnung eine gute Übereinstimmung mit dem gemessenen Verlauf des Sprossungsindex.

Die Meßwerte der Zellzahl zeigen in diesem Experiment, anders als in dem obigen, keinen ausgeprägten Verlauf. Dies ist, wie die Modellrechnung zeigt, verursacht durch den größeren Anteil der Sprossungsphase an einer Periode. Berücksichtigt man zusätzlich die in Bild 4.2 angetragene, nicht unerhebliche Meßunsicherheit bei der Bestimmung der Zellzahl, so wird deutlich, daß hier nur die mittlere Zellzahl Verwendung finden kann. Die berechneten Verläufe liegen im Bereich der gemessenen. Bei diesem Experiment war es nicht notwendig, die Zellverteilung aus einem synchronen und einem asynchronen Teil zu bilden. Durch die angenommene rechteckförmige synchronen Verteilung ist bereits eine

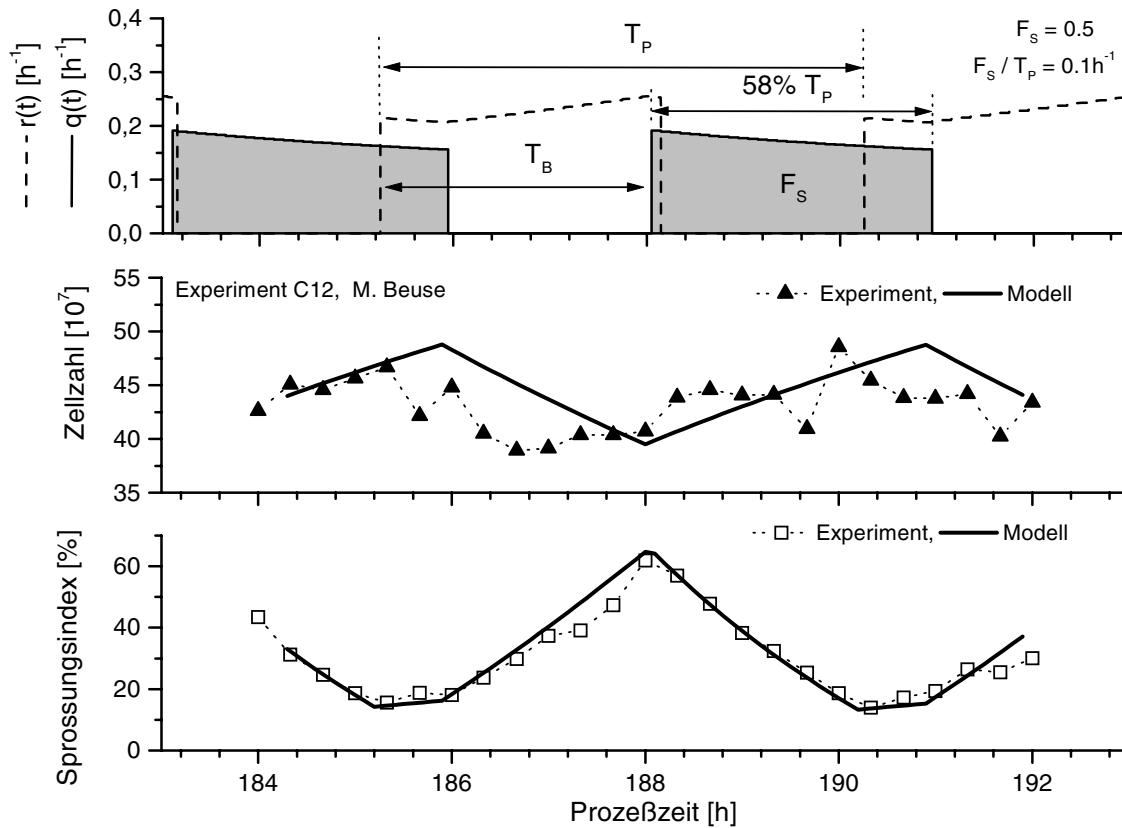


Bild 4.3: Parametrierung einer abschnittsweise konstanten Verteilungsfunktion für die Meßergebnisse eines Experimentes mit einer Verdünnungsrate von $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$

gute Übereinstimmung zwischen der Modellrechnung und den experimentellen Daten zu erzielen.

Das vorgestellte Verfahren ist gut für die Interpretation der gemessenen morphologischen Parameter geeignet. Die rechteckförmige Zellverteilung macht zudem einen Vergleich von Daten möglich, die aus Experimenten mit abweichenden Prozeßparametern stammen. Die gezeigte Methode ist dabei nicht auf das Ein-Klassen-Modell beschränkt. Sind morphologische Daten mehrerer genealogischer Klassen vorhanden, kann die Zellverteilung dieser Klassen ebenfalls bestimmt werden. Voraussetzung ist jedoch ein signifikanter Verlauf der Meßdaten. Die Meßfehler dürfen hierbei nicht in der Größenordnung der Dynamik des Signals liegen. Das abschließende Kapitel ist der dynamischen Simulation des Zellzyklus gewidmet. Die berechnete Zellverteilung könnte hier als Anfangsverteilung der synchronen Kultur dienen.

Kapitel 5

Simulationen

Mit Hilfe eines implementierten dynamischen Modells, das den Zellzyklus und eine genealogische Populationsstruktur berücksichtigt, gelingt es, sowohl synchrone als auch asynchrone Verteilungen der Zellen bezüglich des Zellzyklus zu berechnen. Hierbei findet die in Abschnitt 3.1 vorgestellte und validierte Finite-Volumen-Methode zur Lösung der partiellen Differentialgleichungen Anwendung. Die Modellgleichungen des Stoffwechsel- und Reaktormodells sind im einzelnen im Anhang zusammengefaßt. Damit wird die Analyse der Eigenschaften der periodischen Lösung der synchronen Kultur und transienter Phasen möglich.

Zunächst ist in Abschnitt 5.1 ein synchrones Batch-Experiment vorgestellt. Die Synchronität wird bei diesen Versuchen zu Beginn des Experimentes künstlich hergestellt und nimmt im Verlauf des Versuches ab. Die im Modell enthaltenen genealogischen Klassen ermöglichen es, die Simulationsergebnisse und die experimentellen Daten zu vergleichen. Anschließend findet in Abschnitt 5.2 ein Vergleich des Verhaltens für asynchrone kontinuierliche Kulturen zwischen einem komplexen Modell mit Zellzyklus und einem einfachen Modell, das auf der Annahme einer homogenen Zellverteilung basiert, statt. Abschnitt 5.3 stellt die Mechanismen vor, die zu einer Synchronisation der Zellen im Zellzyklus führen. Schließlich werden in Abschnitt 5.4 die Eigenschaften der in Abschnitt 3.2 vorgestellten Lösung der Populationsbilanz für die periodische Lösung der synchronen Kultur diskutiert. Wie die Betrachtungen zeigen, ist hierbei der durch das ganzzahlige Verhältnis der Generationszeiten definierte Wachstumsmodus von zentraler Bedeutung. Dieser drückt sich insbesondere in der jeweiligen Periodenlänge der synchronen Kultur aus. Daher wird die Übereinstimmung der experimentell ermittelten mit den durch die Modelle vorhergesagten Periodenlängen geprüft.

5.1 Synchroner Batch-Experimente

Tochterzellen unterscheiden sich von Mutterzellen unter anderem durch die fehlenden Sprossungsarben und ihre geringere Größe. Letztere Eigenschaft dient dazu, Tochterzellen von Mutterzellen in einer Lösung durch Zentrifugieren zu trennen. Betrachtet man

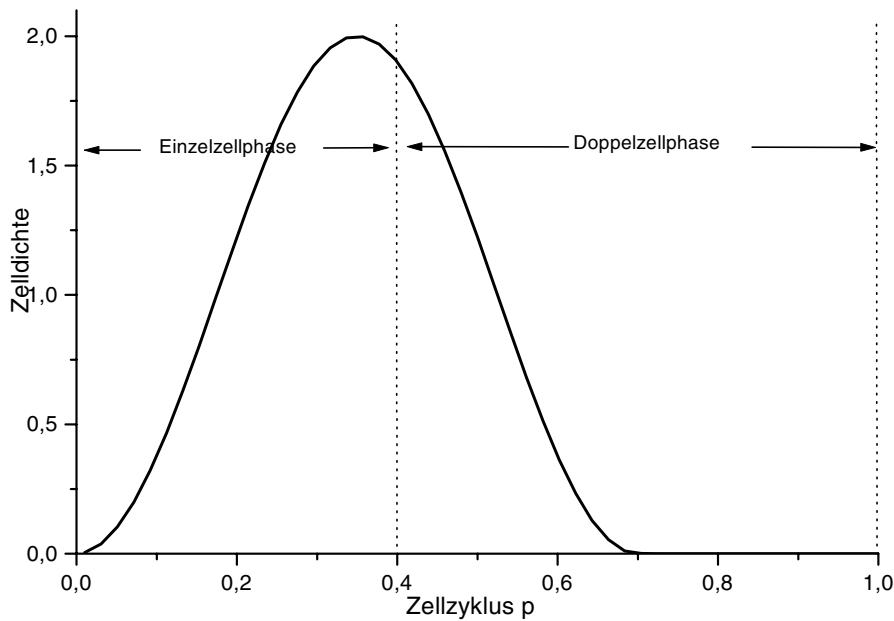


Bild 5.1: Zellverteilung der Tochterzellen für $t = 60 \text{ min}$ zu Beginn der Simulationsrechnung. Der Zellzyklus wird beschrieben durch die Variable $p \in [0, 1]$. Das Intervall $[0, 0.4]$ kennzeichnet die Einzelzellphase, das Intervall $[0.4, 1]$ die Doppelzellphase

anschließend nur einen Teil dieser Zellen, beispielsweise die Tochterzellen, so entsteht eine bezüglich des Zellzyklus synchronisierte Kultur, die es erlaubt, die Eigenschaften der Zellen einer genealogischen Klasse zu untersuchen. Mit jeder Teilung der Zellen entstehen allerdings neben der ursprünglichen weitere Zellklassen und nach wenigen Zellzyklen stellt sich wiederum eine weitgehend asynchrone Verteilung ein. [Woldringh et al. \(1993\)](#) führen ein derartiges Experiment durch und geben den Sprossungsindex der Tochterklasse $P0$ und der drei Mutterklassen $P1$ bis $P3$ während der ersten 500 min nach der Synchronisation an.

Dieses synchronisierte Batch-Experiment kann mit Hilfe des Mehr-Klassen-Modells nachvollzogen werden. Um die transienten Prozesse nach dem Zentrifugieren nicht berücksichtigen zu müssen, beginnt die Simulation $t = 60 \text{ min}$ nach der Synchronisation. Zu diesem Zeitpunkt weist die Verteilung der Tochterzellen die in Bild 5.1 dargestellte Form auf.

Tabelle 5.1: Modellparameter der in Bild 5.2 gezeigten Simulation

Parameter			
Numerisches Verfahren	FV	phys. Zyklusvariable	—
Stützstellen	50	Zyklusgeschw. q	$1/a_{T,i} = \text{const.}$
Diffusion σ	0 h^{-1}	Randbedingung	s. Kap. 2.3
Phasen	1	Anfangsverteilung	s. Bild 5.1
gen. Alter g	4	Verdünnungsrate D	0 h^{-1}
Tochterklassen	1		

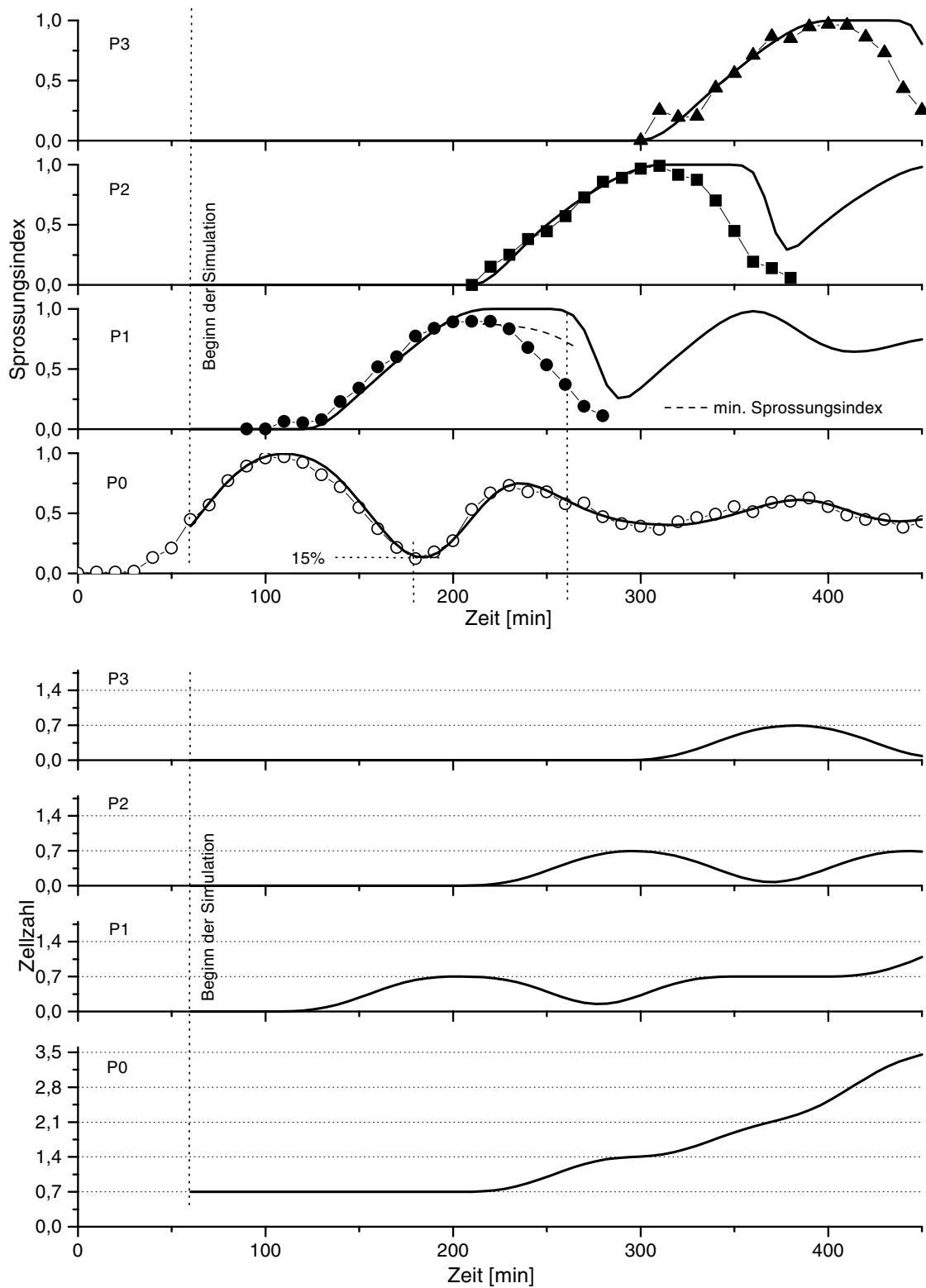


Bild 5.2: Sprossungsindex und Zellzahl der genealogischen Klassen P0-P3. Zu Beginn des Experimentes sind nur Tochterzellen mit $g = 0$ im Reaktor. Die Symbole kennzeichnen experimentelle Daten (Woldringh et al., 1993) und die durchgezogenen Linien die Simulation

Der durch die normierte Variable p dargestellte Zellzyklus beginnt bei $p = 0$ und endet mit $p = 1$. Die Sprossung der Zellen erfolgt bei $p = 0.4$. Im Verlauf des Experimentes entstehende ältere Zellen benötigen eine kürzere Zeit, bis sie in die Doppelzellphase eintreten. Deren Sprossung beginnt bereits bei $p = 0.2$. Die Generationszeit der Tochterzellen beträgt 146 min und die der Mutterzellen 98 min . Ältere Zellen benötigen nur noch 85 min für einen Zellzyklus. Für diese in allen Klassen jeweils als maximal angenommene Wachstumsrate ist es nicht notwendig, die Substrataufnahmekinetiken zu betrachten, da stets von einem nicht limitierten Wachstum ausgegangen wird. Die Daten der Generationszeiten sind den Angaben von [Woldringh et al. \(1993\)](#) entnommen (siehe Bild 2.17). Die mit dem Alter abnehmende Generationszeit ist durch das abnehmende Verhältnis zwischen der Größe der Zelle zum Ende und Anfang des Zellzyklus bedingt. Tabelle 5.1 faßt die Parameter des zur Simulation verwendeten Modells noch einmal zusammen. Die Ergebnisse der Simulation zeigt Bild 5.2. Dargestellt ist der Sprossungsindex für die vier jüngsten Klassen im Modell und im Experiment. Der Verlauf des Sprossungsindex der Tochterzellen $P0$ weist dabei eine gute Übereinstimmung auf. Dies gilt ebenfalls für den ersten ansteigenden Teil des Sprossungsindex der älteren Zellklassen ($P1$ - $P3$). Der berechnete Sprossungsindex bleibt nach einsetzender Teilung der Zellen in der betrachteten Klasse bei 100 %, da die Zellen nach der Teilung der nächst höheren Mutterklasse angehören. Das heißt, die Zellzahl verringert sich zwar, aber es entstehen keine neuen Zellen in der Einzelzellphase, die zu einer Verringerung des Sprossungsindex führen würden. Der Sprossungsindex der Mutterzellklassen $P1$ nimmt daher erst nach dem zweiten Zellzyklus der Tochterzellen $P0$ ab. Dies ist bei $t \approx 260 \text{ min}$ der Fall.

Die Ursache für die Abweichung des Sprossungsindex der Mutterklasse $P1$ in Modell und Experiment im Bereich $180 \text{ h} < t < 260 \text{ h}$ könnten Meßfehler sein. Hierzu seien die folgenden Überlegungen angestellt. Die Unterscheidung der Zellen basiert auf angefärbten Sprossungsnarben. Eine Zelle, die eine Zeit nach der erfolgten Trennung noch keine weitere Narbe aufweist, würde fälschlicherweise zunächst noch zur selben Klasse und erst, wenn die neue Sprossungsnarbe sichtbar ist, zur nächst älteren Klasse gezählt. Diese Vorstellung wird bestärkt durch die in Bild 5.2 vorgenommene Abschätzung eines minimalen Sprossungsindex der Klasse $P1$ im genannten Bereich. Hierbei liegt die folgende Betrachtung zugrunde: Bei $t = 180 \text{ min}$ durchläuft der Sprossungsindex der Tochterzellen ein Minimum mit nur 15 % sprossenden Zellen. Alle später in die Doppelzellphase eintretenden Zellen benötigen entsprechend der Wachstumsgeschwindigkeit in der Tochterklasse mindestens 90 min bis sie den Zeitpunkt der Teilung erreichen und hierdurch Zellen der Klassen $P0$ und $P1$ entstehen. Der Sprossungsindex der Klasse $P1$ kann also nur durch die Teilung der 15 % zum Zeitpunkt $t = 180 \text{ h}$ bereits in der Doppelzellphase befindlichen Zellen absinken. Der so abgeschätzte minimale Verlauf des Sprossungsindex im betrachteten Bereich liegt deutlich über dem der Meßwerte. Es ist also durch die Messungen nicht zu belegen, welche Zellen das schnelle Absinken des Sprossungsindex verursachen.

5.2 Asynchrone Kultur

Das asynchrone Wachstum einer Hefekultur in kontinuierlicher Betriebsweise ist durch stationäre Zustände gekennzeichnet. Diese werden durch die in Bild 5.3 über der Verdün-

nungsrates aufgetragenen Konzentrationen der Biomasse, der Substrate und der Produkte charakterisiert. Im Bereich kleiner Verdünnungsrates ist ein rein oxidatives Wachstum mit maximaler Biomasseausbeute zu beobachten. Die Konzentration der Biomasse im Reaktor ist in dieser Phase weitgehend konstant. Für größere Verdünnungsrates ab $D \approx 0.27 \text{ h}^{-1}$ überschreitet die notwendige die vorhandene Respirationskapazität und es kommt zum respiro-fementativen Wachstum. Infolgedessen entsteht eine zunehmende Menge Ethanol im Reaktor. Gleichzeitig nimmt die Biomassekonzentration ab, da nicht mehr der gesamte Substratstrom zur Synthese der Biomasse zur Verfügung steht. Dieses Verhalten lässt sich durch ein einfaches kinetisches Modell mit konzentrierten Parametern beschreiben (Bellgardt, 1984; Sonnleitner und Käppeli, 1986). Der Zustand der Kultur ist hier im wesentlichen durch Konzentrationen der Biomasse sowie der Substrate und Produkte in der Nährlösung gekennzeichnet. Die verwendeten Modellgleichungen finden sich im Anhang A.1.

Das Wachstumsmodell mit integriertem Zellzyklusmodell zeigt, wenn man die gleichen Parameter zugrunde legt und eine asynchrone Verteilung der Zellen vorsieht, für hohe Wachstumsraten ein mit dem einfachen kinetischen Modell identisches Wachstumsverhalten. Für kleinere Wachstumsraten ist eine geringfügig höhere Biomasse zu verzeichnen. Die ebenfalls im Zyklusmodell berücksichtigten zellinternen Speicherstoffe bleiben bei dieser Berechnung unberücksichtigt; die Modellparameter sind in einzelnen Tabelle 5.2 zu entnehmen. Führt man zusätzlich den zur Erklärung der Synchronisation notwendigen Speicherstoffhaushalt hinzu, so sinkt die erzielte Biomassekonzentration während des oxidativen Wachstums ab. Ein Teil der Substrate liegt nun in Form von internen Speicherstoffen (Trehalose) in den Zellen vor. Im Modell steigt die Menge der eingelagerten Speicherstoffe mit abnehmender Verdünnungsrates. Für kleine Verdünnungsrates zeigt das Zellzyklusmodell stets eine starke Synchronisationsneigung. In diesem Bereich mit $0.05 \text{ h}^{-1} < D < 0.1 \text{ h}^{-1}$ ist daher die mittlere Konzentrationen im Bild dargestellt.

Thompson und Wheals (1980) geben die Generationszeiten der Mutter- und Tochterzellen für die asynchrone kontinuierliche Kultur an (Bild 5.4 mitte). Im Bereich hoher Wachstumsraten sind die Generationszeiten von Mutter- und Tochterzellen nahezu identisch. Die Sprossungsphase im Bild 5.4 (oben) nimmt einen Großteil des gesamten Zellzyklus ein. Bei niedrigen Verdünnungsrates laufen die Generationszeiten von Mutter- und Tochterzellen

Tabelle 5.2: Modellparameter der in Bild 5.3 gezeigten Simulation

Parameter			
Numerisches Verfahren	FV	phys. Zyklusvariable	s. Kap. 2.4.4.2
Stützstellen	40	Zyklusgeschw. q	dp/dt
Diffusion σ	0.001 h^{-1}	Randbedingung	s. Kap. 2.3
Phasen	3	Anfangsverteilung	cosinusförmig
gen. Alter g	0	Stoffwechselmodell	s. Kap. A.1
Tochterklassen	1	Reaktormodell	s. Kap. A.2
		Verdünnungsrates D	$0.05 - 0.4 \text{ h}^{-1}$
		Substrat $c_{G_0}, c_{G,R}$	$20, 30 \text{ g l}^{-1}$

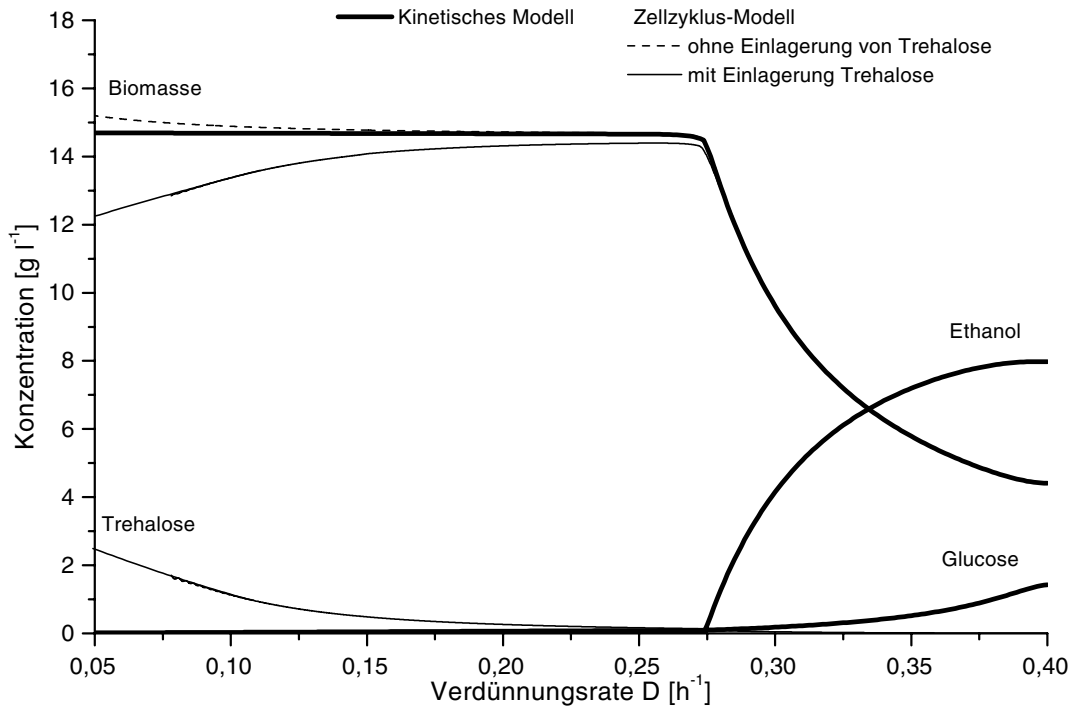


Bild 5.3: Simulation des stationären Zustands der kontinuierlichen asynchronen Kultur mit 30 g l^{-1} Glucose im Zulauf. Vergleich von Wachstumsmodellen mit konzentrierten Parametern und eingebettetem Zellzyklusmodell

auseinander. Die Generationszeit der Tochterzellen wird zunehmend länger, während die Generationszeit der Mutterzellen weniger als die mittlere Verdopplungszeit zunimmt. Die Länge der Sprossungsphase steigt in diesem Bereich nur noch wenig an. Das heißt, die Verlängerung der Generationszeiten ist im wesentlichen auf eine längere Einzelzellphase zurückzuführen. Neben diesen experimentellen Daten enthält Bild 5.4 die Generationszeiten (mitte) und die Tochterzellmasse zu Beginn des Zyklus (unten) für drei Modelle A-C. Die Modelle verwenden die verschiedenen in Abschnitt 2.4.4.2 angegebenen Randbedingungen, um die Dauer der Doppelzellphase zu definieren. Die Masse der Mutterzellen zu Beginn des Zyklus ist dabei in allen Modellen als konstant angenommen.

Modell A in Bild 5.4 basiert unabhängig von der Verdünnungsrate auf einer konstanten Sprossungszeit T_B . In Strässle (1988) findet dieser Ansatz mit einer Sprossungsphase von $T_B = 0.8 \text{ h}$ Verwendung, der deutlich unter den von Thompson und Wheals (1980) experimentell bestimmten Werten liegt. Mit abnehmender Verdünnungsrate nimmt das Volumen der sich teilende Zellen ab und in gleichem Maße sinkt die Masse der Tochterzellen zu Beginn des Zyklus von $10 \cdot 10^{-12} \text{ g}$ auf $6 \cdot 10^{-12} \text{ g}$ ab. Im betrachteten Intervall der Verdünnungsrate fällt die Generationszeit der Mutterzellen bezüglich der Meßwerte zu kurz und die Generationszeit der Tochterzellen zu lang aus. Die Tochterzellen benötigen offensichtlich gegenüber den Messungen eine längere Zeit, um das Gewicht der Mutterzellen zu erreichen.

Modell B verwendet für die sich teilenden Zellen eine konstante Masse. Damit sind sowohl Mutterzellanteil als auch der Tochterzellanteil bei der Teilung unabhängig von der

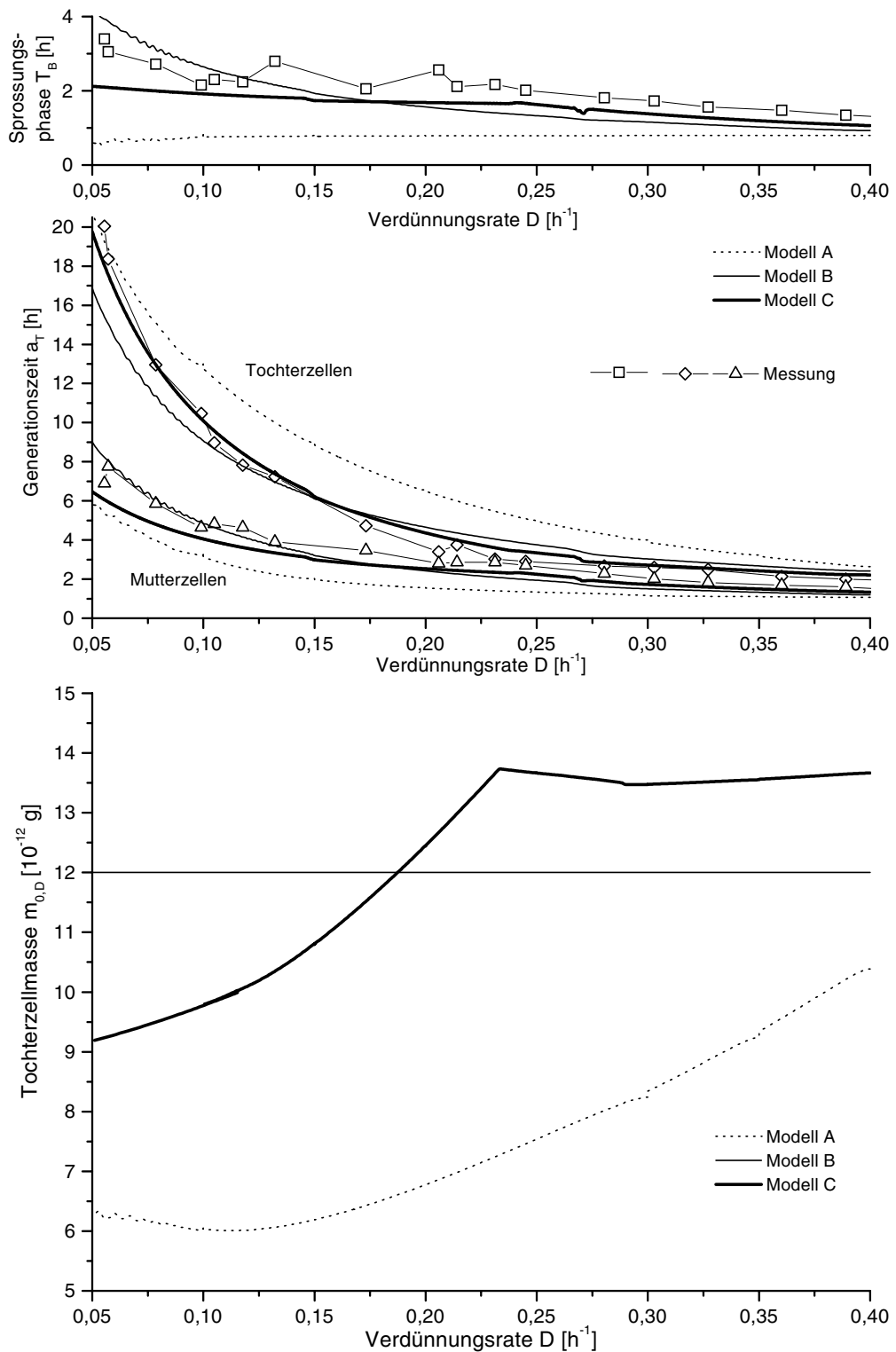


Bild 5.4: Vergleich der Eigenschaften der kontinuierlichen asynchronen Kultur in Simulation und Experiment. Oben: Länge der Sprossungsphase. Mitte: Generationszeiten der Mutter- und Tochterzellen. Unten: Masse der Sproßzelle. Modell A: Konstante Länge der Sprossungsphase $T_B = 0,8 \text{ h}$, Modell B: Konstante Sprossungsgröße $m_{0,D} = 12 \cdot 10^{-12} \text{ g}$, Modell C: Sprossungszeit jeweils von der Wachstumsrate abhängig ($T_B = f(\mu)$), siehe Abschnitt 2.4.4.2

Verdünnungsrate. Die resultierenden Generationszeiten schneiden den Verlauf der gemessenen Werte im Bereich der mittleren Verdünnungsraten bei $D \approx 0.15 h^{-1}$ (Bild 5.4 mitte). Für kleinere Verdünnungsraten fällt die Generationszeit der Tochterzellen im Modell geringer und für größere höher aus als die gemessenen Werte.

Um eine bessere Übereinstimmung der Generationszeiten mit den Meßwerten zu erreichen, ist in Modell C die Sprossungszeit abhängig von der Wachstumsrate. Dies führt insbesondere für die Generationszeit der Tochterzellen zu einer besseren Anpassung. Im Vergleich zu Modell B resultiert für große Verdünnungsraten eine leicht höhere Masse der Tochterzellen, während im Bereich der niedrigen Verdünnungsraten die Masse der Tochterzellen geringer ausfällt.

Im Gegensatz zu dem hier untersuchten stationären Gleichgewicht ist die Wachstumsrate während der synchronen Kultur nicht konstant. Um in diesem Fall eine ständige Variation der Generationszeiten auszuschließen, wird in den folgenden Simulationen der kontinuierlichen Kultur stets das in Abschnitt 2.4.4.2 mit B bezeichnete Modell verwendet. Die Masse einer Tochterzelle beträgt, falls nicht anders angegeben, $m_{0,D} = 12 \cdot 10^{-12} g$.

5.3 Initiierung der synchronen Kultur

Wie die Untersuchungen zeigen, ist bereits das in Bild 2.21 C angegebene Phasenmodell geeignet, die von Beuse (1998) beschriebenen Methoden zur Initiierung einer synchronen Kultur nachzuvollziehen. Die Synchronisation erfolgt in der Regel durch den Start der kontinuierlichen Kultur. Es ist jedoch auch möglich, eine stationäre kontinuierliche Kultur durch eine mehrstündige Unterbrechung der Substratzufuhr zu synchronisieren. Die synchrone Kultur mündet dann nach wenigen Oszillationen in eine periodische Lösung. Bild 5.5 zeigt die Induktion einer synchronen Kultur sowohl für Experiment als auch für Modellrechnung bei identischen Parametern. Die der Simulation zugrunde liegende Modellstruktur ist in Tabelle 5.3 zusammengefaßt. Das Modell berücksichtigt keine Lag-Phasen, weshalb die Modellrechnung erst bei $t = 2.5 h$ beginnt. Auch bleibt die Lag-Phase zwischen dem Verbrauch der Glucose und des Ethanols außer Betracht. Es liegt jedoch eine gute Übereinstimmung sowohl für die Gelöst-Sauerstoff- als auch für die Kohlendioxidkonzentration im Abgas vor. Kurz nach Verbrauch der verwertbaren Substrate, erkennbar durch den Anstieg der Gelöst-Sauerstoffkonzentration bei $t \approx 16 h$, wird die kontinuierliche Substratzufuhr gestartet. Bereits mit der zweiten Oszillation kann man von einer stationären Schwingung sprechen. Auch in diesem Fall stimmen Kurvenform und Größenordnung der beobachteten Größen gut überein. Die Periodenlänge der Oszillation entspricht hier der Modus 12 zugeordneten Periodenlänge.

Das Rechenmodell bietet den Vorteil, über die im Experiment meßbaren Parameter, wie sie in Bild 5.5 aufgetragen sind, hinaus auch interne Parameter bestimmen zu können. Bild 5.6 zeigt hierzu bis $t = 60 h$ einige Wachstumsparameter des in Bild 5.5 betrachteten Experimentes. Anschließend wird die Verdünnungsrate auf $D = 0.1 h^{-1}$ erhöht. Die Wachstumsrate liegt während einer Periode zumeist unterhalb der Verdünnungsrate. Erst mit der einsetzenden Sprossung steigt die Wachstumsrate stark an. Dieses Verhalten beruht auf den in Einzel- und Doppelzellphase unterschiedlich angenommenen Wachstums-

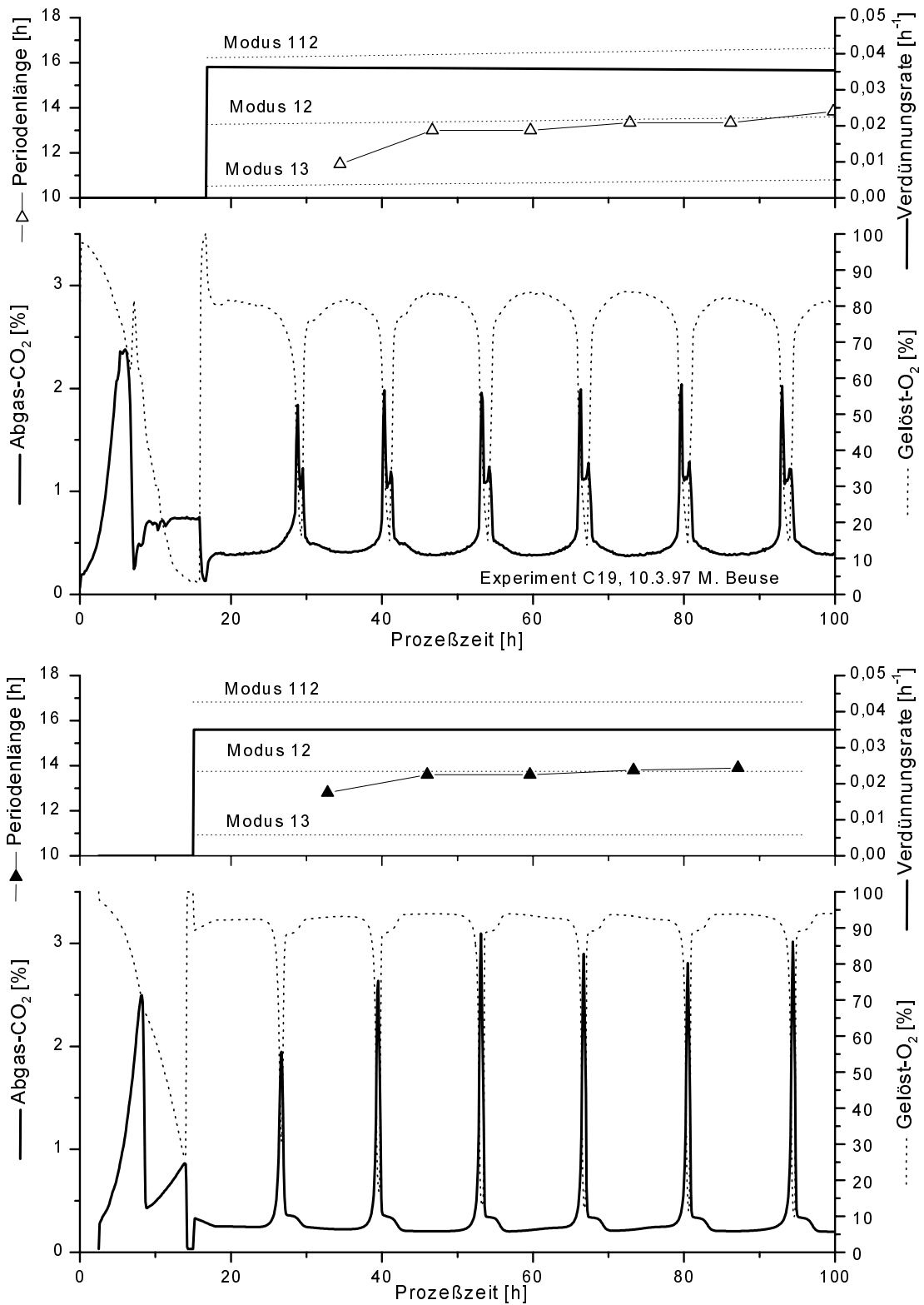


Bild 5.5: Initiierung der synchronen Kultur. Oben: Induktion einer synchronen kontinuierlichen Kultur im Experiment (Beuse, 1998). Unten: Simulation einer kontinuierlichen Kultur mit identischen Parametern: Glucosekonzentration im Zulauf 20 g l^{-1} , Rührerdrehzahl 600 min^{-1} , Begasungsrate 2 l min^{-1} , Temperatur 30°C , pH -Wert 5

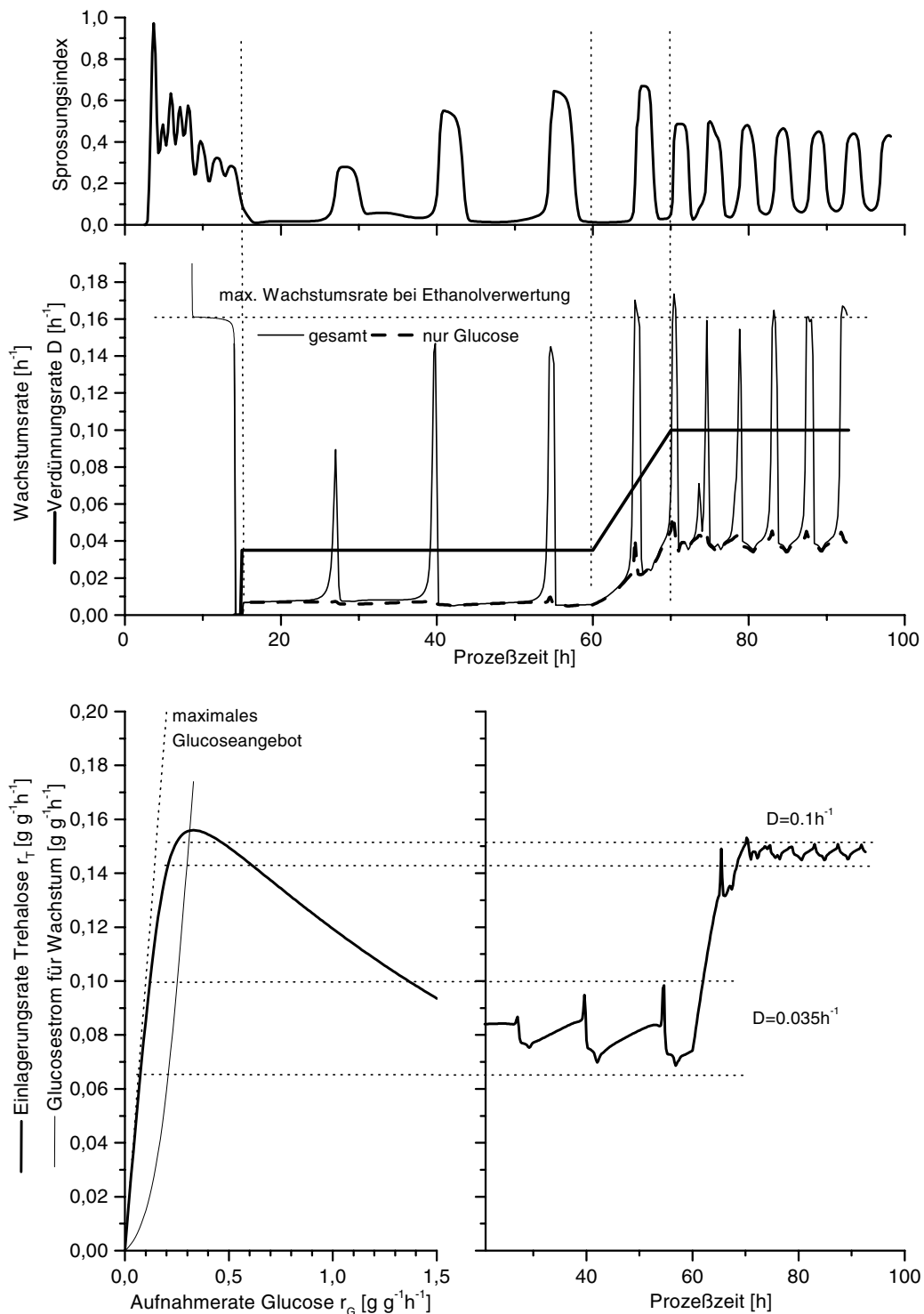


Bild 5.6: Simulation der Wachstumsparameter unter Bedingung wie in Bild 5.5 mit einer zusätzlichen Erhöhung der Verdünnungsrate von $D = 0.035 \text{ h}^{-1}$ auf $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$ zwischen 60 und 70 h. Oben: Sprossungsindex und Wachstumsrate in der Einzelzellphase. Unten: Einlagerungsrate des Speicherstoffes Trehalose r_T als Funktion der Glucoseaufnahme r_G einerseits und der Prozeßzeit andererseits

geschwindigkeiten. Hierbei ist das Wachstum in der Einzelzellphase geringer, wenn man es mit der durch die Verdünnungsrate vorgegebenen Wachstumsrate vergleicht, da ein Teil des Substrates von den Zellen in Form von zellinternen Speicherstoffen angelegt wird. Mit dem Beginn der Doppelzellphase mobilisieren die Zellen die eingelagerten Kohlenhydrate. Durch die geringere Nachfrage steht den Zellen, die sich nicht in der Doppelzellphase befinden, eine größere Menge an dem in der Lösung vorhandenen Substrat zur Verfügung. Das Wachstum nimmt zu und ein Teil der Zellen ist so in der Lage, ebenfalls die Doppelzellphase zu erreichen. Somit erfolgt eine Synchronisation der Population. Begünstigt wird dies bei kleinen Verdünnungsraten, da, wie in Bild 5.6 (unten) zu erkennen, der relative Anteil der eingelagerten Kohlenstoffe im Verhältnis zu dem verfügbaren Kohlenstoffstrom mit höheren Wachstumsraten abnimmt. Kommt es also zu der kurzzeitigen Erhöhung des Glucoseangebotes, so steigt durch die verringerte Neigung Kohlenstoffe einzulagern die Wachstumsgeschwindigkeit überproportional an.

Die synchronisierende Wirkung ist auch auf die Produktion von Ethanol zu Beginn der Doppelzellphase zurückzuführen. Das aus der Mobilisierung der eingelagerten Speicherstoffe entstandene Ethanol verursacht einen Anstieg der Wachstumsrate der in der Einzelzellphase befindlichen Zellen. Die in den Doppelzellen eingelagerten Speicherstoffe kommen nur bis zur maximalen respiratorischen Kapazität den Zellen selbst zu Gute. Überschüssige Speicherstoffe werden in Form von Ethanol ausgeschieden und können so dazu beitragen, das Wachstum der Zellen, die noch über genügend respiratorische Kapazität verfügen, zu beschleunigen. Die in Bild 5.6 (oben) aufgetragene Wachstumsrate zeigt, daß mit dem Anstieg des Sprossungsindex, also dem Eintritt einer Teilpopulation in die Doppelzellphase, eine erhebliche Steigerung der Wachstumsrate in der Einzelzellphase verbunden ist. Diese beruht im wesentlichen auf dem zur Verfügung stehenden Ethanol. Die Steigerung der Wachstumsrate ermöglicht es weiteren, in der Einzelzellphase befindlichen Zellen ebenfalls in die Doppelzellphase einzutreten. Der Mechanismus bleibt auch nach Erhöhung der Wachstumsrate von $D = 0.035 \text{ h}^{-1}$ auf $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$ erhalten. Diese Effekte führen zu einer Synchronisation des Wachstums der verschiedenen Zellklassen. Neben der Synchronisation der Generationszeiten ist jedoch auch mit dem Verschmelzen einzelner Teilpopulationen zu rechnen. Im Gegensatz hierzu basiert die analytische Beschreibung der stationären synchronen Kultur auf der Annahme, daß die Teilpopulationen in ihrer

Tabelle 5.3: Modellparameter der in Bild 5.5 gezeigten Simulation

Parameter			
Numerisches Verfahren	FV	phys. Zyklusvariable	s. Kap. 2.4.4.2 Mod. B
Stützstellen	40	Masse $m_{0,D}$	$12 \cdot 10^{-12} \text{ g}$
Diffusion σ	0.001 h^{-1}	Randbedingung	s. Kap. 2.3
Phasen	3	Anfangsverteilung	cosinusförmig
gen. Alter g	0	Stoffwechselmodell	s. Kap. A.1
Tochterklassen	1	Reaktormodell	s. Kap. A.2
		Verdünnungsrate D	0, 0.035 h^{-1}
		Substrat $c_{G_0}, c_{G,R}$	20, 20 g l^{-1}

Zusammensetzung erhalten bleiben — also unteilbare Einheiten darstellen. Im folgenden ist diese Annahme daher zu prüfen.

Im zweiten Teil der Simulation nach $t = 70 h$ liegt eine erhöhte Verdünnungsrate von $D = 0.1 h^{-1}$ vor. Bild 5.6 (unten) zeigt die von Strässle (1988) vorgeschlagene Kinetik zur Einlagerung der Speicherstoffe in Abhängigkeit der Substrataufnahme. Die zugrunde liegenden Beziehungen sind im Anhang A.1, Gleichung (A.3) aufgeführt. Abweichend von den dort angegebenen Parametern werden hier $r_{T,0} = 0.94$ und $r_{T,max} = 0.2 g g^{-1} h^{-1}$ verwendet. Der für Wachstumsprozesse zur Verfügung stehende Teil des aufgenommenen Substrates ergibt sich aus der Differenz von aufgenommener Glucose und eingelagerten Speicherstoffen (Trehalose). Für beide Verdünnungsraten bleibt die Trehaloseaufnahme im Verlauf einer Periode im ansteigenden Ast der Kennlinie. Übersteigt der Glucosestrom einen kritischen Wert, so wächst die Trehaloseeinlagerungsrate nicht weiter an. Durch das Verhältnis zwischen Wachstumsrate und Akkumulation der Speicherstoffe nimmt die synchronisierende Wirkung schnell ab. Entsprechend den experimentellen Beobachtungen ist oberhalb einer gewissen Verdünnungsrate keine stabile Synchronisation mehr möglich, da den Speicherstoffen dann eine untergeordnete Rolle zukommt.

5.4 Moduswechsel

Die periodische Lösung eines durch Gleichung (2.11) charakterisierten Zwei-Klassen-Modells diskutieren Bellgardt (1994a) und auch Hjortso und Nielsen (1995). Unter der gravierenden Annahme ganzzahliger Teilungsverhältnisse zwischen den Generationszeiten postuliert Bellgardt (1994a) einen proportionalen Zusammenhang zwischen der beobachteten Periodenlänge und der Verdopplungszeit einer synchronen Kultur. Diese Abhängigkeit ist jedoch nicht auf das Zwei-Klassen-Modell beschränkt, sondern auch, wie oben gezeigt, auf das allgemeine Mehr-Klassen-Modell erweiterbar.

Der beschriebene Zusammenhang zwischen Periodenlänge und Verdünnungsrate leitet sich aus der Populationsbilanz für die periodische Lösung ab. Die dynamischen Eigenschaften des Zellzyklusmodells, die die Generationszeit der einzelnen Klassen bestimmen, sind hierbei nicht berücksichtigt. Dabei kommen den Mechanismen, die zu einer Änderung der Generationszeit, also des Sprossungszeitpunktes führen, besondere Bedeutung zu; sie bestimmen, ob eine theoretisch mögliche periodische Lösung eintritt. Entsprechendes gilt für den jeweiligen Wachstumsmodus. Die Existenz einer periodischen Lösung ist nicht ausreichend, um diese in Experiment und Simulation beobachten zu können. Zusätzlich ist zu fordern, daß die gesuchte Lösung einen stabilen Grenzyklus darstellt und eine geeignete Trajektorie existiert, die auf diese Lösung führt. Das heißt, es müssen Versuchsbedingungen bekannt sein, die zu der periodischen Lösung führen.

5.4.1 Modi des Zwei-Klassen-Modells

Zunächst sei von einer Populationsstruktur mit nur zwei Zellklassen, nämlich der Mutter- und Tochterzellklasse, ausgegangen. Die Tochterzellen durchlaufen im Gegensatz zu den

Mutterzellen eine zusätzliche Tochterzellphase (siehe Bild 2.21 C). Nach Erreichen der Größe einer Mutterzelle sind beide Zellklassen nicht mehr zu unterscheiden. Zur Berechnung des Wachstumsverhaltens ist also nur eine Klasse mit den drei Phasen Tochter-, Einzel- und Doppelzellphase notwendig. Nach der Teilung gehen die Tochterzellen in die Tochterzellphase und die Mutterzellen in die Einzelzellphase über (Strässle, 1988). Die gewählte Struktur ist die einfachste, die den Zellzyklus und eine genealogische Klassenaufteilung beinhaltet. Die im einzelnen verwendeten Modellteile sind in Tabelle 5.4 zusammengefaßt. Bedingt durch die Unterscheidung von lediglich Mutter- und Tochterzellklasse sind auch nur die Modi des Zwei-Klassen-Modells berechenbar. In der Simulation erweisen sich hierbei die Modi als günstig, in denen die Periodenlänge der Generationszeit der Mutterzellen entspricht.

Die in Bild 5.7 gezeigten Simulationsergebnisse basieren, bei ansonsten konstanten Prozeßparametern, auf einer Variation der maximalen Glucoseaufnahme $r_{G,max}^I$ der Zellen in der Tochterzellphase. Das hochgestellte I kennzeichnet hierbei die Tochterzellphase. Die geänderten kinetischen Parameter führen zu einer Verschiebung der aufgenommenen Substratmenge in Mutter- und Tochterzellen, das heißt die Wachstumsrate der Mutter- bzw. Tochterzellen erhöht sich zugunsten der jeweils anderen Klassen. Die mittlere Wachstumsrate bleibt hierbei konstant, da diese durch die eingestellte Verdünnungsrate vorgegeben ist. Entsprechend den aus der Populationsbilanz abgeleiteten Eigenschaften darf es bei einer konstanten Wachstumsrate in der synchronen Kultur jedoch nicht zu einer Änderung der Generationszeiten der Zellklassen kommen, es sei denn, es findet ein Moduswechsel statt. Die in Bild 5.7 gezeigte Simulationsrechnung weist beispielsweise bei einer auf 80 % verringerten Aufnahme rate keinen signifikanten Einfluß auf die Periodenlänge auf. Nach Abklingen der transienten Vorgänge stellt sich wieder die dem Modus 12 entsprechende Periodenlänge ein. Dies läßt sich ebenfalls an der hier nicht gezeigten Zellverteilung im Zyklus beobachten, die zu allen Zeiten zwei ausgeprägte Maxima im Zellzyklus aufweist.

Sinkt die maximale Aufnahme rate jedoch stärker ab, so zum Beispiel zwischen 90 und 120 h auf 50 %, ist ein Moduswechsel zu beobachten. Die Periodenlänge entspricht nun dem Modus 13 statt zuvor dem Modus 12. Die Glucoseaufnahme der Tochterzellen ist durch diese Wahl der kinetischen Parameter so stark reduziert, daß die Generationszeit der Tochterzellen sich auf das dreifache der Mutterzellen verlängert. Zwischen den Para-

Tabelle 5.4: Modellparameter der in Bild 5.7 und Bild 5.10 gezeigten Simulationen

Parameter			
Numerisches Verfahren	FV	phys. Zyklusvariable	s. Kap. 2.4.4.2 Mod. B
Stützstellen	40	Masse $m_{0,D} / m_{0,Di}$	$10,12 \cdot 10^{-12} g$
Diffusion σ	$0.001 h^{-1}$	Randbedingung	s. Kap. 2.3
Phasen	3	Anfangsverteilung	cosinusförmig
gen. Alter g	0 / 2	Stoffwechselmodell	s. Kap. A.1
Tochterklassen	1 / 3	Reaktormodell	s. Kap. A.2
		Verdünnungsrate D	$0.1 h^{-1}$
		Substrat $c_{G_0}, c_{G,R}$	20, $20 g l^{-1}$

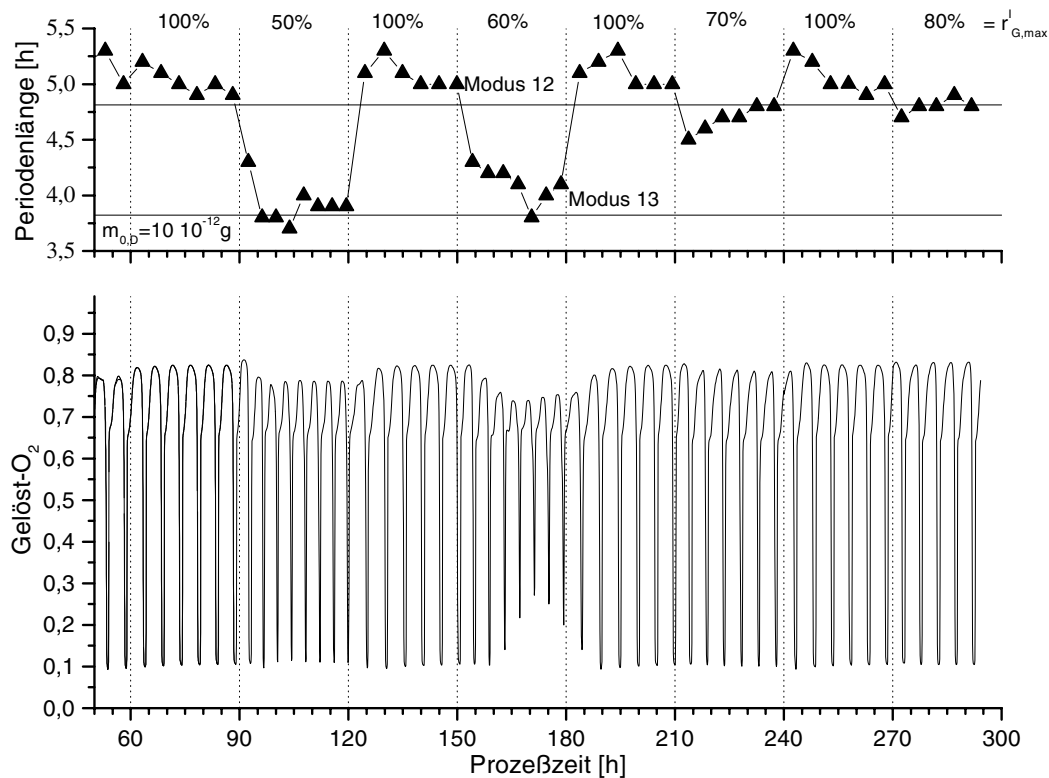


Bild 5.7: Simulation von Periodenlänge und gelöstem Sauerstoff in Abhängigkeit der maximalen Glucoseaufnahme rate $r_{G,max}^I$ in der Tochterzellphase. Die Aufnahme rate wird alle 30 h variiert; die minimale Masse der Tochterzellen beträgt $m_{0,D} = 10 \cdot 10^{-12} g$

metern für die beiden Modi existiert ein Grenzbereich bei einer maximalen Aufnahme rate von etwa 60%. Hier tritt im beobachteten Zeitraum keine periodische Lösung auf. Zusätzlich sinkt die Amplitude des Verlaufes der Gelöst-Sauerstoffkonzentration stark ab. Der reduzierte maximale Sauerstoffbedarf ist auf eine geringere Synchronität der einzelnen Teilpopulationen zurückzuführen. Dies bestätigt ebenfalls der Verlauf der Zellzahl in Bild 5.8 (oben). Die Darstellung enthält ebenfalls den Sprossungsindex und den nach der Populationsbilanz maximal mögliche Sprossungsindex einer Population im Modus 12 und 13. Der maximal mögliche Sprossungsindex wird in Modus 12 nahezu erreicht, während dieser in Modus 13 etwas geringer ausfällt. Das Minimum des Sprossungsindex liegt in Modus 13 ebenfalls etwas oberhalb der theoretisch zulässigen 0%-Grenze. Die Betrachtung von Periodenlänge und Sprossungsindex zeigt insgesamt eine recht gute Übereinstimmung mit der aus der Populationsbilanz abgeleiteten Vorhersage.

Die Zahl der in einer Periode sprossenden Zellen sinkt mit dem Moduswechsel ab, wobei die mittlere Zellzahl der gesamten Population leicht steigt. Mit Hilfe des Modells ist es möglich, aus der Zahl der sprossenden Zellen die minimale und maximale Zellzahl der Population zu berechnen. Die Abschätzung basiert dabei auf der Annahme einer vollständig synchronen Kultur. Im diesem Fall kommt es bei der Sprossung zu einer sprunghaften Erhöhung der Zellzahl. Anschließend nimmt die Zellzahl aufgrund der Auswaschung exponentiell ab, bis es wieder zur Sprossung kommt. Der in Bild 5.8 (oben) dargestellte berechnete Verlauf der Zellzahl liegt innerhalb der berechneten Grenzen. Die für die

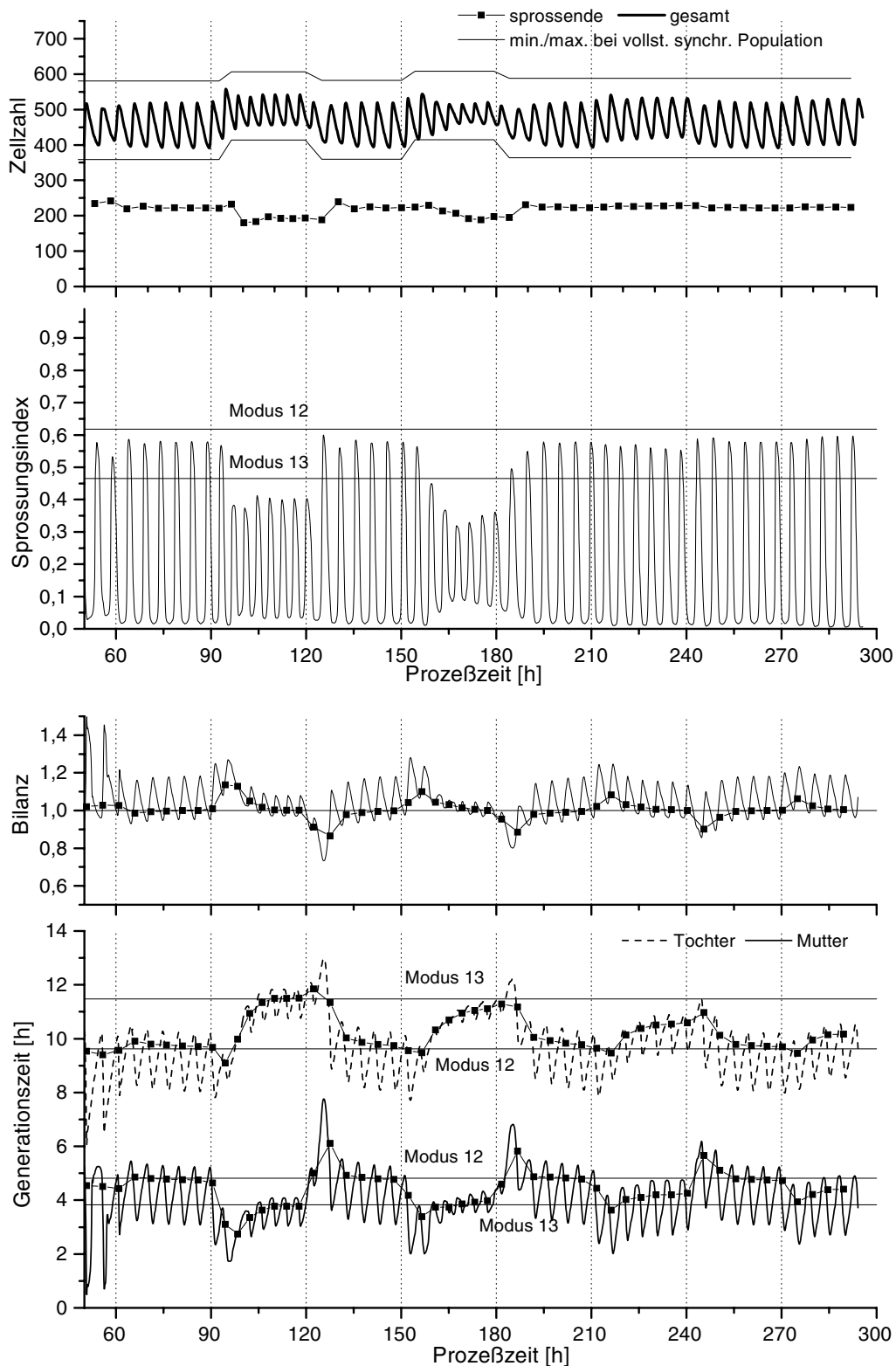


Bild 5.8: Zellzahl, Sprossungsindex und Generationszeit sowie die normierte Zellbilanz $e^{-Da_{T,D}} + e^{-Da_{T,D}} \stackrel{!}{=} 1$ während der Simulation entsprechend Bild 5.7. Zum Vergleich sind die aus der Populationsbilanz stammenden theoretischen Werte in die Diagramme eingetragen. Die Symbole im unteren Diagramm kennzeichnen die mittleren Generationszeiten und die hieraus gebildete normierte Bilanz

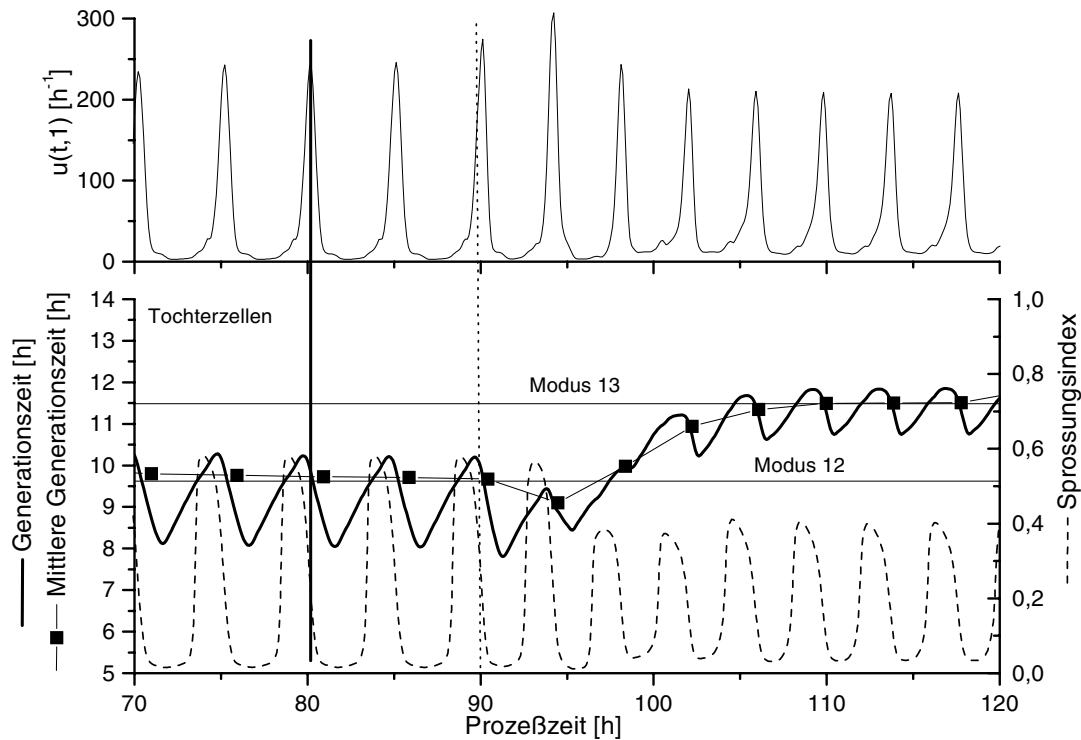


Bild 5.9: Rate der sich teilenden Zellen $u(t,1)$ am Ende des Zellzyklus, Sprossungsindex sowie die Generationszeit im Bereich zwischen 70 und 120 h der in Bild 5.7 gezeigten Simulation. Die durch Symbole gekennzeichnete mittlere Generationszeit ist durch das mit $u(t,1)$ gewichtete Integral über jeweils eine Periode berechenbar

vollständig synchrone Kultur berechneten Grenzen werden jedoch zu keiner Zeit erreicht. Die in der Simulation vorliegende Population ist offensichtlich nur näherungsweise durch eine vollständig synchrone Verteilung beschreibbar.

Bild 5.8 (unten) zeigt die in der Simulation berechnete Generationszeit der Tochter- und der Mutterzellen. Die Generationszeiten der Zellen einer Teilpopulation, das heißt einer Gruppe von Zellen mit gleichen genealogischen und Zellzykluseigenschaften, sind nicht konstant. Durch den beschriebenen Synchronisationsmechanismus sinkt die Generationszeit der Zellen im Verlauf der Sprossung der Teilpopulation. Mit dem Beginn der Sprossung aktivieren die Zellen die eingelagerten Speicherstoffe. Wird hierdurch die respiratorische Kapazität überschritten, so bilden die Zellen Ethanol. Neben dem eigentlichen Substrat haben die Zellen in der Einzelphase dann die Möglichkeit, auch Ethanol aufzunehmen. Sie benötigen daher teilweise eine deutlich kürzere Zeit, um die zur Teilung notwendige Größe zu erreichen. Da die Generationszeit der Zellen nicht konstant ist, kommt es bei der in Bild 5.8 (unten) gezeigten Berechnung der normierten Zellbilanz der stationären Kultur zu größeren Abweichungen. Betrachtet man hingegen die mittleren Generationszeiten der Teilpopulationen des dynamischen Modells, zeigt sich eine gute Übereinstimmung mit den aus der Populationsbilanz abgeleiteten theoretischen Generationszeiten; zudem stimmt die normierte Zellbilanz in beiden Fällen überein. In Bild 5.9 ist hierzu im Bereich zwischen 70 und 120 h der zeitliche Verlauf der Teilungsrate, sowie die Generationszeit der

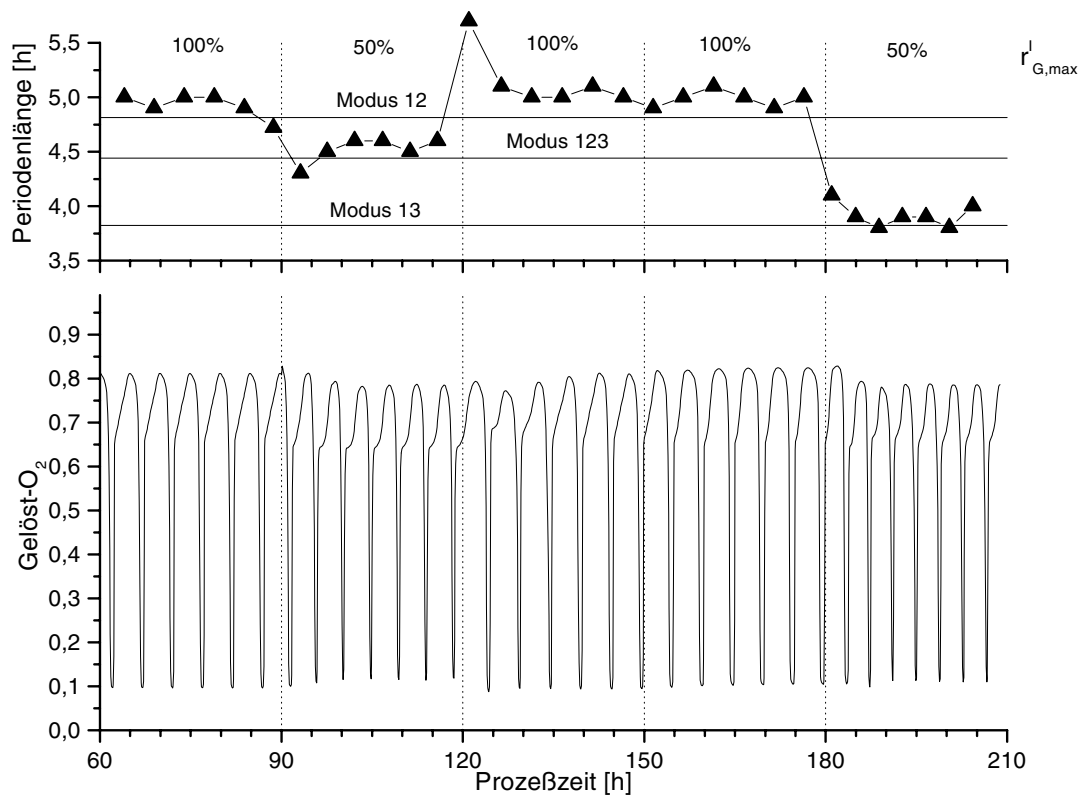


Bild 5.10: Simulation von Periodenlänge und gelöstem Sauerstoff bei Variation der maximalen Glucoaufnahmerate $r_{G,max}^I$ in der Tochterzellphase. Die Aufnahmerate wird alle 30 h variiert; die Masse der drei Tochterzellklassen beträgt zunächst $m_{0,D0} = 10 \cdot 10^{-12}g$, $m_{0,D1} = 12 \cdot 10^{-12}g$ und $m_{0,D2} = 12 \cdot 10^{-12}g$. Nach 150 h verringert sich die Masse aller Tochterklassen auf $m_{0,D} = 10 \cdot 10^{-12}g$

Tochterzellen dargestellt. Das Maximum der Teilungsrates bestimmt den Mittelwert der Generationszeit. Im Minimum des Verlaufes der Generationszeit teilen sich dagegen nur wenige Zellen. Der Verlauf der mittleren Generationszeit gibt die Generationszeiten der Zellklassen offensichtlich gut wieder. Dies wird durch den Moduswechsel zwischen 90 und 100 h von Modus 12 zu Modus 13 dokumentiert. Die exemplarisch durchgeführte Simulationsrechnung zeigt, daß die aus der Populationsbilanz abgeleiteten Eigenschaften gut zur Charakterisierung der synchronen Kultur geeignet sind. Die Annahme ganzzahliger Verhältnisse zwischen den Generationszeiten und der Periodenlänge stellt eine brauchbare Approximation dar, die zum Verständnis der Vorgänge in der synchronen Kultur beiträgt.

5.4.2 Modi des Mehr-Klassen-Modells

Die Analyse der stationären Kultur deutet bei einigen der von Beuse (1998) durchgeführten Experimente auf eine Klassenstruktur hin, in der es notwendig ist, mehr als nur zwei Klassen zu unterscheiden. Aus diesem Grunde ist eine Erweiterung des dynamischen Modells entsprechend der in Kapitel 2.3 vorgestellten genealogischen Klasseneinteilung durchgeführt worden. Das Modell erlaubt es beispielsweise, die unterschiedliche, mit dem genealogischen Alter ansteigende Größe der Zellen zu berücksichtigen (siehe Abschnitt 2.4.3). Die genealogische Struktur ist in Bild 2.21 D angegeben. Hierbei kommt wiederum

das im Anhang angegebene Stoffwechsel- und Reaktormodell zu Einsatz. Eine Zusammenfassung der Modellstruktur befindet sich in Tabelle 5.4.

Im folgenden wird das stationäre Verhalten einer Klassenstruktur mit zwei Mutterklassen sowie drei Tochterklassen untersucht. Die Sproßzellen der Tochterklassen ($P0$) weisen eine Masse von $m_{0,D0} = 10 \cdot 10^{-12}g$ auf, die kleiner als die Massen $m_{0,D1} = m_{0,D2} = 12 \cdot 10^{-12}g$ der Mutterklassen ist. Bild 5.10 zeigt den Verlauf einer Simulation mit einem Wechsel der maximalen Glucoseaufnahme $r_{G,max}^I$ in der Tochterzellphase (aller Klassen). Für hohe Wachstumsraten ist eine dem Modus 12 entsprechende Periodenlänge zu beobachten. Dies entspricht auch der Verteilungsdichtefunktion in den einzelnen Klassen. Eine stärkere Absenkung der Aufnahme ab $t = 90 h$ führt hier nicht auf Modus 13. Die Verteilungsdichtefunktion zeigt, daß nur in der Klasse $D0$ der jüngsten Tochterzellen eine dritte Teilpopulation hinzukommt. Die auftretende Periodenlänge entspricht näherungsweise der für den Modus 123 des Drei-Klassen-Modells. Nach $t = 150 h$ wird auch die Masse der Sproßzellen aller Klassen auf $10 \cdot 10^{-12}g$ abgesenkt. Eine erneute Verringerung der Aufnahme ab $t = 180 h$ führt nun auf den Modus 13. Sowohl das Übergangsverhalten, als auch der stationäre Zustand des Mehr-Klassen-Modells entspricht hier den Ergebnissen des einfachen Phasenmodells im vorangegangenen Abschnitt.

Bild 5.11 gibt Aufschluß über weitere Variablen des Populationsmodells in der Simulation. Der im Bild oben angegebene Sprossungsindex ist hier auf die Zellzahl der jeweiligen Klasse bezogen. Zum Vergleich sind die aus der Populationsbilanz abgeleiteten maximalen Werte des Sprossungsindex für die Modi 12, 123 und 13 angegeben. Wie die Sprossungsindizes der Mutterzellklassen $P1$ und $P2$ erkennen lassen, befinden sich zeitweise nahezu alle Zellen dieser Klassen in der Sprossungsphase. Die Moduszahl der Mutterklassen beträgt daher während der gesamten Simulation $I_1 = I_2 = 1$. Der Sprossungsindex der Tochterzellklasse $P0$ liegt für $t < 90 h$ und von 120 bis $180 h$ zwischen den maximalen Werten für die Modi 123 und 12. Das heißt, in diesen Abschnitten der Simulation betragen die Moduszahlen $J_0 = J_1 = 2$. Zwischen 90 und $120 h$ sowie ab $180 h$ sinkt der berechnete Sprossungsindex gegenüber den Modus 12 charakterisierenden Verhältnissen ab. Im ersten Abschnitt deutet der Verlauf auf den Modus 123, während sich später der Modus 13 einstellt.

Des weiteren ist die Zahl der sprossenden Zellen in den Klassen $P0$ bis $P2$ angegeben. Auch hier ist zusätzlich das aus der Populationsbilanz berechnete theoretische Verhältnis zwischen den einzelnen Klassen angegeben. In der ersten Phase der Simulation (bis $t = 150 h$) weisen die Tochterzellklassen eine unterschiedliche Masse auf. In diesem Abschnitt sind für den Modus 12 leichte Abweichungen der berechneten Zellzahl von der theoretischen Vorhersage für die Klassen $P0$ und $P2$ zu beobachten; während für den Modus 123 dagegen eine gute Übereinstimmung vorliegt. Nach der Symmetrierung des Systems (ab $t = 150 h$) ist sowohl für den Modus 12 als auch für den Modus 13 eine gute Übereinstimmung vorhanden.

Die Betrachtung der Generationszeiten der Tochter- und Mutterzellen zeigt keine konstanten Werte für die Zellen einer Teilpopulation. Dies entspricht dem oben gezeigten Ergebnis mit dem einfachen Zwei-Klassen-Modell. Betrachtet man die mittleren Generationszeiten, so ist eine gute Übereinstimmung mit den durch das Modus-Modell vorhergesagten Zeiten festzustellen. Die Differenz zwischen der Länge der Einzelzellphase der Klassen $D0$ auf

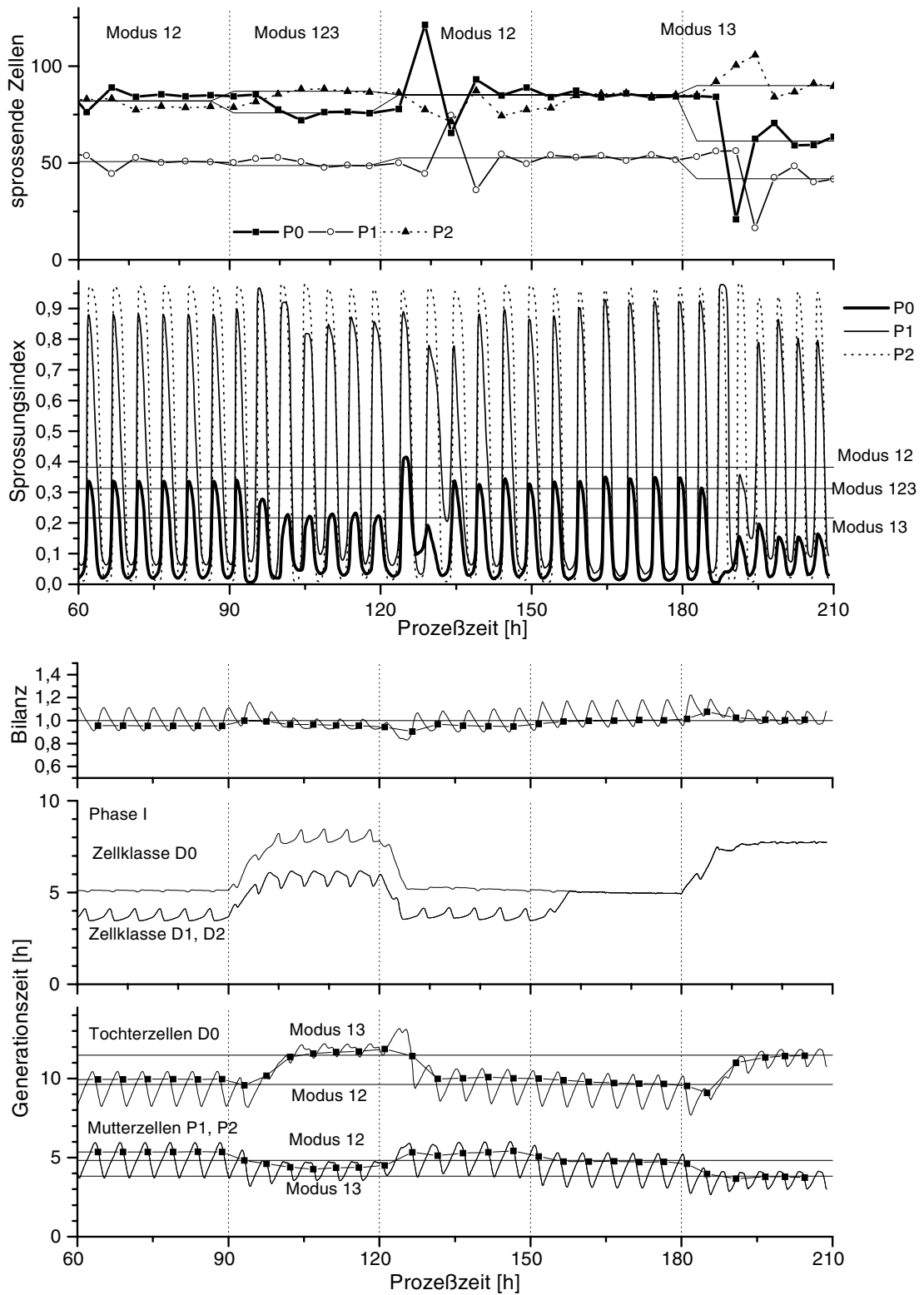


Bild 5.11: Zellzahl, Sprossungsindex und Generationszeit während der Simulation aus Bild 5.10. Zum Vergleich sind die theoretischen Werte des stationären Mehr-Klassen-Modells in die Diagramme eingetragen. Die Symbole kennzeichnen die mittleren Generationszeiten

der einen und $D1$ bzw. $D2$ auf der anderen Seite entsprechen, wie aus Bild 5.11 (unten) hervorgeht, dem Anstieg der Generationszeit der Tochterzellen von Modus 12 auf Modus 13.

Die Ergebnisse lassen folgendes erkennen: Die unter vorgenannten Voraussetzungen abgeleiteten Eigenschaften der Periodenlänge sind auch bei der dynamischen Simulation erkennbar. Es scheinen Bedingungen zu existieren, bei denen die Verhältnisse zwischen den Generationszeiten ohne Synchronisierung erfüllt sind (natürliche Bedingungen). Treten Abweichungen von diesen Bedingungen auf, so wird die periodische Lösung durch die Wirkung der Synchronisationsmechanismen erreicht. Immer dann, wenn eine Synchronisation notwendig ist, sind teilweise Abweichungen von der theoretischen Periodenlänge infolge variierender Generationszeiten innerhalb einer Teilpopulation erkennbar. Bei größeren Abweichungen von den natürlichen Bedingungen ist jedoch eine ausgeglichene Populationsbilanz nur durch einen Moduswechsel zu erreichen. Die Bilanzgleichungen erleichtern das Verständnis der Eigenschaften der synchronen Kultur, obwohl die zugrunde liegenden Annahmen nicht vollständig erfüllt sind. Dies betrifft im wesentlichen die Homogenität sowie Unteilbarkeit der Teilpopulationen.

5.4.3 Experimente

Aus den von Bellgardt (1994a) formulierten Annahmen leiten sich vorgenannte Eigenschaften einer aus Mutter- und Tochterzellen bestehenden synchronen Kultur ab. Zur Überprüfung führte Beuse (1998) eine Reihe von Experimenten durch. An Hand des dynamischen Modells sollen die in kontinuierlicher Kultur beobachteten periodischen Lösungen untersucht werden. Führt eine Parameteränderung zum Moduswechsel, so ist dies auf eine starke Änderung der Wachstumsbedingungen der einzelnen Klassen zurückzuführen. In der oben genannten Arbeit weist Beuse auf eine Vielzahl dieser Einflußgrößen hin, die einen Moduswechsel verursachen können. Es sind dies die Verdünnungsrate, die Gelöst-Sauerstoffkonzentration, der pH -Wert oder auch die Qualität der Substratquelle. Die Verdünnungsrate hat unter den genannten eine besondere Stellung: Sie ist in den Bilanzgleichungen enthalten und hat daher stets einen Einfluß auf die Periodenlänge. Eine Variation der Verdünnungsrate kann zusätzlich auch einen Moduswechsel verursachen. Eine Änderung der nicht in der Bilanzgleichung explizit berücksichtigten Parameter, wie zum Beispiel der Gelöst-Sauerstoffkonzentration, des pH -Wert haben dagegen nur dann einen Einfluß auf die Periodenlänge, wenn diese einen Moduswechsel zur Folge hat.

Der Moduswechsel ist nur dann durch das Modell beschreibbar, wenn bekannt ist, in welcher Weise diese Parameter die Wachstumsbedingungen der einzelnen Klassen beeinflussen. Vorstehende Ausführungen lassen erkennen, daß eine ausreichende Verschlechterung der Wachstumsbedingungen einer Klasse auch zum Moduswechsel führen kann. Der Einfluß der genannten Prozeßparameter auf den Stoffwechsel der Zellklassen ist jedoch zumeist nicht bekannt. Eine Ausnahme stellt auch hier die Verdünnungsrate dar: Abschnitt 2.4.3 enthält die Generationszeiten der asynchronen Kultur in Abhängigkeit von der Verdünnungsrate. Die anderen Prozeßparameter bleiben im folgenden außer acht, um keine Vermutungen über ihren quantitativen physiologischen Einfluß anstellen zu müssen.

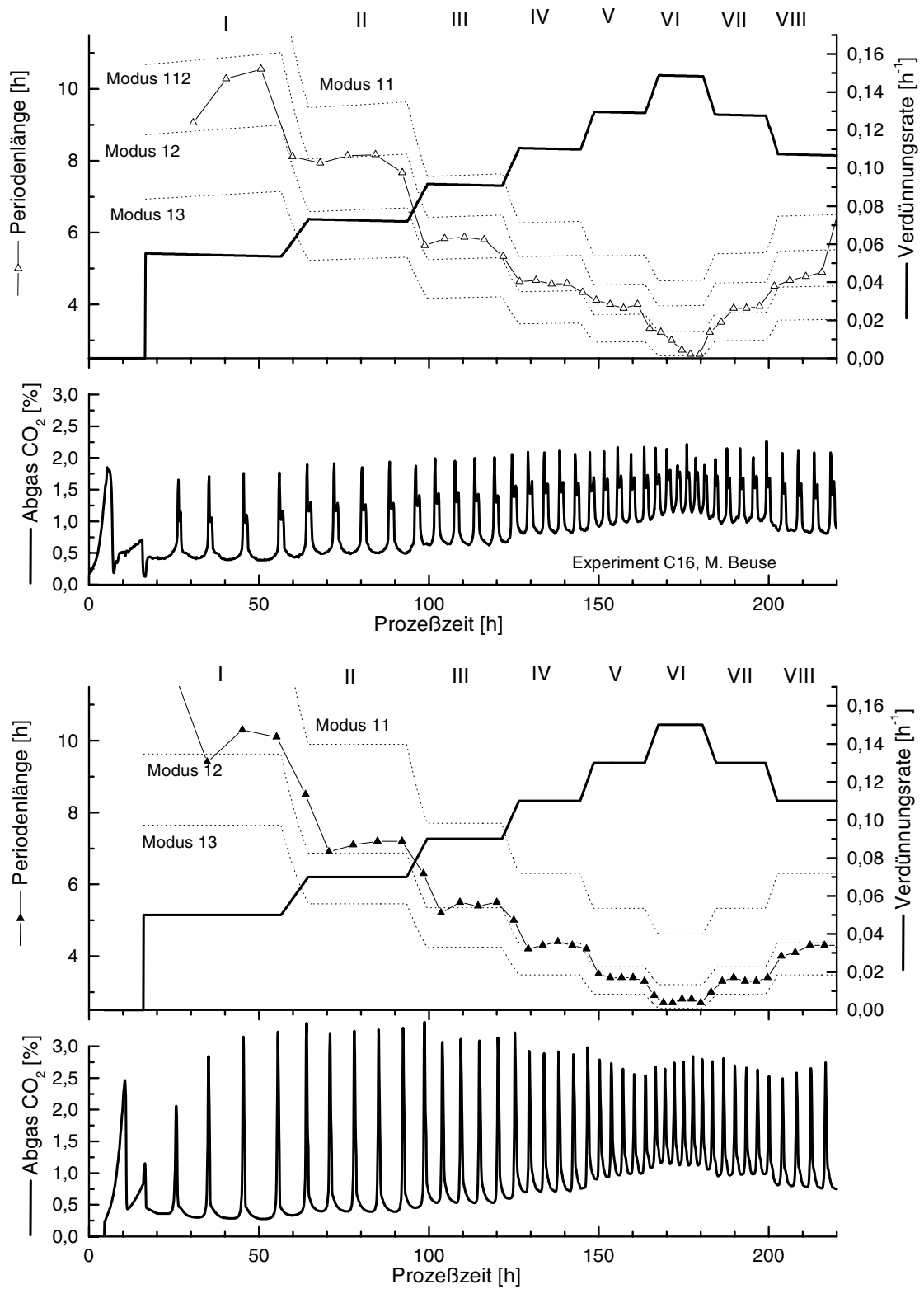


Bild 5.12: Periodenlänge und CO_2 -Gehalt im Abgas bei Variation der Verdünnungsrate. Oben: Experiment; unten: Simulation, die minimale Masse der Tochterzellen beträgt hier $m_{0,D} = 8 \cdot 10^{-12} \text{g}$

Bild 5.12 (oben) zeigt die Ergebnisse eines Experimentes zur Untersuchung des Einflusses der Verdünnungsrate auf die Periodenlänge der synchronen Kultur. Hierzu wurde die Verdünnungsrate ausgehend von $D = 0.05 h^{-1}$ schrittweise um $\Delta D = 0.02 h^{-1}$ auf $D = 0.15 h^{-1}$ erhöht. Aufgetragen sind die Verläufe der experimentell ermittelten sowie der theoretischen Periodenlänge für die Modi 11, 112, 12 und 13. Die Periodenlänge deutet zunächst auf Modus 112 des Drei-Klassen-Modells hin (Bereiche I+II). Danach erfolgen Modiwechsel von Modus 112 auf Modus 12, auf Modus 13 und zurück auf Modus 12. Die in der unteren Grafik dargestellten Simulationsergebnisse sind mit Hilfe des in Bild 2.21 C dargestellten Zwei-Klassen-Modells entstanden. Die Struktur des verwendeten Modells ist in Tabelle 5.5 zusammengefaßt. Obwohl die Prozeßparameter denen im Experiment entsprechen, ist das Modell nicht in der Lage, die Modi des Drei-Klassen-Modells zu berechnen. Die Kultur befindet sich daher in der Simulation in den Bereichen I und II im Modus 12. Verursacht durch den Wechsel auf die höchste im Experiment gewählte Verdünnungsrate tritt ein Wechsel von Modus 12 auf Modus 13 auf (Bereich VI). Dabei zeigen Modell und Experiment ein qualitativ ähnliches Verhalten. Mit anderen Worten, in beiden Fällen ist ein Moduswechsel infolge einer veränderten Verdünnungsrate beobachtbar.

Bild 5.13 zeigt die Generationszeiten von Mutter- und Tochterzellen sowie die Zellverteilung für die drei angegebenen Zeitpunkte. Die Generationszeiten einer Teilpopulation sind, wie auch bei den vorangegangenen Simulationsbeispielen, nicht konstant. Die mittlere Generationszeit weist in dem hier betrachteten Beispiel keine eindeutige Tendenz zu den theoretischen Werten des Zwei-Klassen-Modells auf. Anhand der Anzahl der Maxima der Verteilungsdichtefunktion in Bild 5.13 (unten) ist es jedoch möglich, den Wechsel von Modus 12 zu Modus 13 abzulesen. Die Zellverteilung zwischen den einzelnen Phasen ist unstetig, da aufgrund der Normierung in jeder Phase eine andere Wachstumsgeschwindigkeit q vorliegt. Zu Beginn der Einzelzellphase findet zudem eine Addition der Flüsse aus Mutter- und Tochterzellklasse statt (vergleiche Bild 2.21 C).

Für eine bessere Anpassung des Modells an die Realität sind weitere Informationen über die tatsächlichen Zusammenhänge im Verlauf des Zellzyklus notwendig. Beispielsweise wäre ein Vergleich der berechneten Zellverteilungen mit gemessenen Verläufen wünschenswert. Eine zeitlich hohe Auflösung derartiger Verteilungen würde es erlauben, das Wachs-

Tabelle 5.5: Modellparameter der in Bild 5.12 gezeigten Simulation

Parameter			
Numerisches Verfahren	FV	phys. Zyklusvariable	s. Kap. 2.4.4.2 Mod. B
Stützstellen	40	Masse $m_{0,D}$	$8 \cdot 10^{-12} g$
Diffusion σ	$0.001 h^{-1}$	Randbedingung	s. Kap. 2.3
Phasen	3	Anfangsverteilung	cosinusförmig
gen. Alter g	0	Stoffwechselmodell	s. Kap. A.1
Tochterklassen	1	Reaktormodell	s. Kap. A.2
		Verdünnungsrate D	$0-0.15 h^{-1}$
		Substrat $c_{G_0}, c_{G,R}$	$20, 20 g l^{-1}$

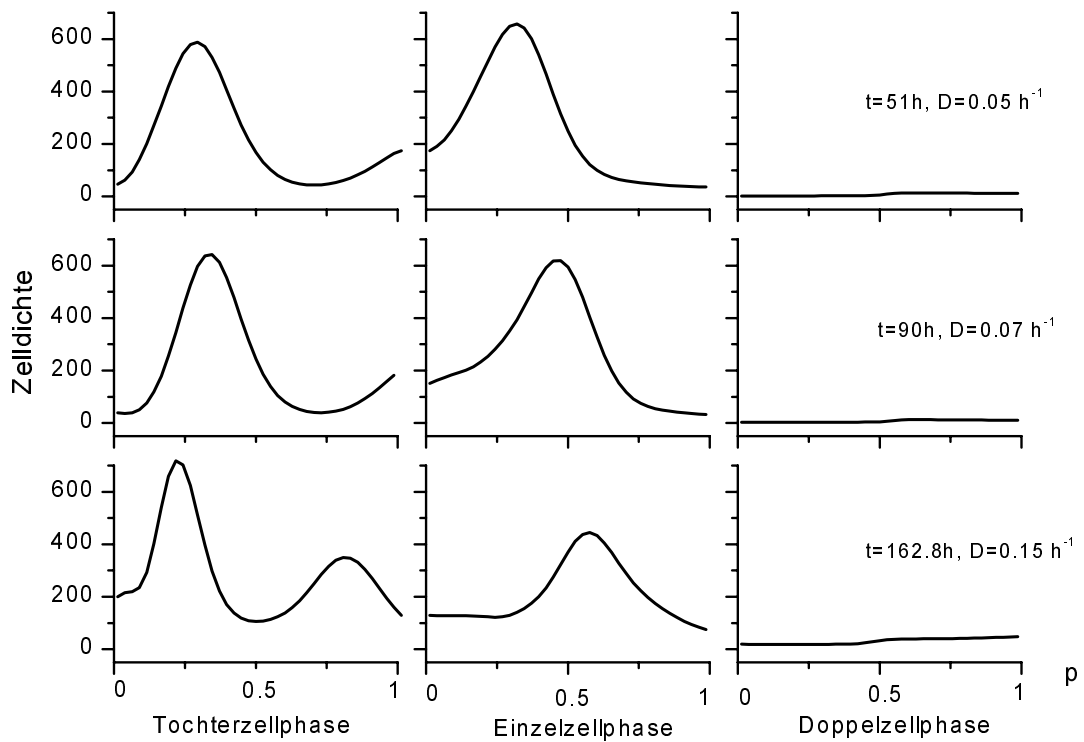
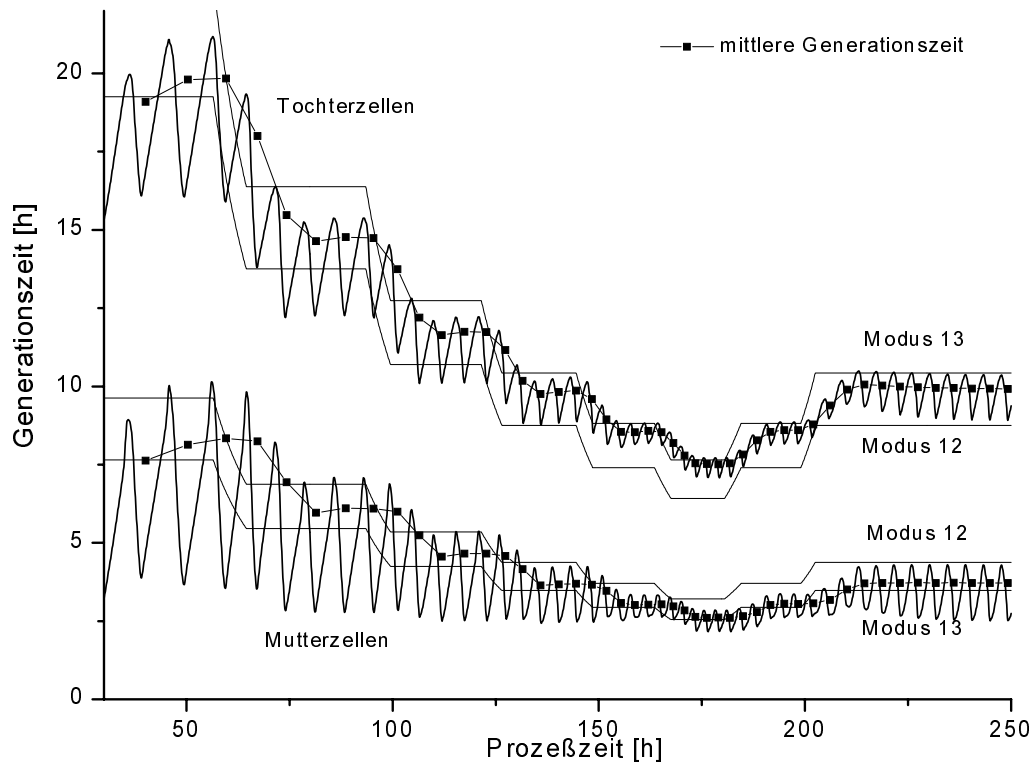


Bild 5.13: Generationszeit und Zelldichte während der Simulation aus Bild 5.12. Zum Vergleich sind die theoretischen Werte des stationären Zwei-Klassen-Modells in die Diagramme eingetragen.

tums und die Synchronisation der Zellpopulation zu beobachten. Die von [Beuse \(1998\)](#) identifizierten, den Wachstumsmodus beeinträchtigenden Parameter können nur dann in das Modell aufgenommen werden, wenn deren Einfluß auf die unterschiedlichen Zellklassen und -phasen bekannt ist. Ohne dieses Wissen muß die Analyse der synchronen Kultur auf die qualitativen Eigenschaften des Wachstumsmodus beschränkt bleiben.

Kapitel 6

Diskussion

Bei dem Versuch Stoffflüsse im Bioreaktor zu bestimmen wird häufig übersehen, daß die auftretenden Stoffumsätze nicht von einer großen Zahl gleicher Zellen erbracht werden. Vielmehr besteht eine Kultur aus einer Vielzahl von Zellen mit sehr unterschiedlichen Eigenschaften. Dies wird deutlich, wenn man beispielsweise die Oszillation der Prozeßparameter in Anschluß an eine Synchronisation der Zellen bezüglich ihres Zellzyklus betrachtet. Bei steigenden qualitativen Ansprüchen an die Bilanzierung der Stoffflüsse dürfen Parameter wie das genealogische Alter und der Zyklus nicht unberücksichtigt bleiben. Zum besseren Verständnis dieser Vorgänge und auch zur Prozeßführung ist es daher wünschenswert, den Zellzyklus und die Populationsstruktur in die dynamischen Wachstumsmodelle aufzunehmen. Es ist dabei nicht ausreichend, ein kinetisches Modell um ein schwingfähiges System von zellinternen Speicherstoffen zu erweitern, wie beispielsweise von [Heinzle et al. \(1983\)](#) angegeben. Auch das von [Jones und Kompala \(1999\)](#) vorgestellte kybernetische Modell beschreibt nur die asynchrone Kultur in zufriedenstellender Weise. Die Periodenlänge der synchronen Kultur muß bei derartigen Modellen für jeden Arbeitspunkt neu kalibriert werden, da das Modell den ursächlich für die Periodizität verantwortlichen Zellzyklus nicht enthält.

Das bislang detaillierteste Modell des Zellzyklus wurde von [Strässle \(1988\)](#) vorgestellt. Es beschreibt die synchrone und die asynchrone Kultur. Der Zellzyklus ist explizit durch eine partielle Differentialgleichung im Modell enthalten. Es stellt eine konsequente Weiterentwicklung früherer kinetischer Modelle dar ([Bellgardt, 1984](#); [Sonnleitner und Käppeli, 1986](#)). Anstatt das biochemische Stoffwechselnetz zu erweitern, wurde große Aufmerksamkeit dem Zellzyklus gewidmet. Die folgenden Abschnitte diskutieren die in dieser Arbeit erzielten Fortschritte gegenüber dem in [Strässle \(1988\)](#) enthaltenen Modell.

6.1 Numerik

In dem von [Strässle \(1988\)](#) vorgestellten Modell ist bedingt durch die numerische Diffusion des gewählten Verfahrens zur Diskretisierung des Zellzyklus stets ein systematischer Fehler bei der Berechnung der Zellverteilung enthalten. Die berechnete Lösung gleicht eher einer partiellen Differentialgleichung zweiter Ordnung mit Diffusionsterm als der

gewünschten partiellen Differentialgleichung erster Ordnung. Die Diffusion führt dabei zu einer Desynchronisation der Zellverteilung. Aus diesem Grund ist das Verfahren nur bedingt zur Analyse der Synchronisation geeignet. Beeinflusst wird die Diffusion durch die Zahl der Stützstellen und nicht durch einen explizit in den Modellgleichungen enthaltenen unabhängigen Diffusionsterm. Auch die für die synchrone periodische Kultur vorgestellte Zellbilanz basiert auf den Modellgleichungen ohne Diffusion. All diese Faktoren führen zu dem Wunsch, andere numerische Verfahren einzusetzen, die keine Diffusion aufweisen.

Zur Lösung der den Zellzyklus beschreibenden Differentialgleichungen sind daher in Abschnitt 3.1 drei numerische Verfahren untersucht worden. Hierbei handelt es sich um das auch von Strässle (1988) verwendete Verfahren der Finiten Differenzen (FD). Alternativen hierzu stellen die Finite Volumenmethode (FV) sowie das Charakteristikenverfahren dar. Letzteres bietet den Vorteil einer exakten Lösung an den Stützstellen. In diesem Fall tritt innerhalb eines Zellzyklus keine numerische Diffusion auf. Eine Interpolation zwischen den Stützstellen ist jedoch immer dann erforderlich, wenn mehrere Zellflüsse addiert werden müssen oder infolge einer starken Synchronisation der Zellen. Durch die Synchronisation der Zellen kommt es zu großen Lücken zwischen den Stützstellen, die durch eine Neuordnung beseitigt werden müssen, um die integralen Größen wie die Zellzahl bestimmen zu können.

Im Gegensatz zum Charakteristikenverfahren weist das FD-Verfahren, wie bereits erwähnt, abhängig von der Anzahl der Stützstellen eine starke numerische Diffusion auf. Diese bewirkt eine Desynchronisierung und führt daher auf eine asynchrone Verteilung der Zellen. Das heißt im Fall einer zu lösenden partiellen Differentialgleichung erster Ordnung, die beispielsweise den Zellzyklus beschreibt, weicht die numerische Approximation deutlich von der exakten Lösung ab.

Das dritte, nämlich das FV-Verfahren, stellt einen Kompromiß zwischen der Güte der numerischen Lösung einerseits und der Handhabbarkeit des Modells andererseits dar. Der größere Interpolationsradius des in Abschnitt 3.1.2.2 vorgestellten FV-Verfahrens bedingt jedoch im Vergleich zum FD-Verfahren eine geringere numerische Stabilität. Dies gilt insbesondere für steile Gradienten in der Verteilungsfunktion.

Das FD- und das FV-Verfahren lassen sich gut in die Standardprogramme zur Lösung gewöhnlicher Differentialgleichungen integrieren. Die hierfür notwendigen Routinen sind im Rahmen der Arbeit entstanden. Für das gewöhnliche Charakteristikenverfahren ist dies mit etwas größerem Aufwand ebenfalls möglich. Die bei diesem Verfahren sinnvolle zeitlich umgekehrte Berechnung der Charakteristik gelingt jedoch nicht. Für eine Lösung unabhängig von bestehenden Programmteilen sollte diese Variante in Betracht gezogen werden, da sie insbesondere für partielle Differentialgleichungen erster Ordnung Vorteile aufweist. Aufgrund der starken Kopplung von Modellteilen mit konzentrierten und verteilten Parametern wurde hier jedoch eine Variante gewählt, die auf Standardprogrammen aufsetzt.

Ein zusätzlich eingeführter Diffusionsterm ermöglicht es, statistische Abweichungen zwischen der Wachstumsrate einzelner Zellen zu berücksichtigen. Im Gegensatz zu der unerwünschten numerischen Diffusion stellt dieser Term eine Erweiterung der Modellgleichung dar und keine fehlerhafte Approximation. Mit Hilfe dieses Termes ist es unter den in Abschnitt 3.1.3 dargestellten Bedingungen möglich, statistische Effekte in der Kultur

zu beschreiben. Die vorgestellten Methoden erlauben auch die Verwendung einer echten statistischen Teilungsfunktion. Der höhere numerische Aufwand ist allerdings erst dann gerechtfertigt, wenn umfangreichere Messungen der Zellverteilung im Experiment vorliegen.

Die Normierung des Zellzyklus auf feste Intervallgrenzen erleichtert die Implementierung des Zellzyklusmodells. Dies hat zur Folge, daß beispielsweise bei einer Vergrößerung der Masse der Tochterzellen diese nicht mehr am Anfang des Intervalls sondern auch an jedem beliebigen Punkt in der Mitte des Intervalls zufließen kann. An der Zuflußstelle entsteht dabei eine Unstetigkeit in der Zellverteilung. Stellt dies für das FD-Verfahren kein Problem dar, so entstehen aufgrund des größeren Interpolationsradius des FV-Verfahrens hier numerische Instabilitäten. Aus diesem Grund finden sich in Kapitel 2.2 neben den Modellgleichungen auch Abschnitte, die eine Variation der Intervallgrenzen betrachten. Ziel hierbei ist es, die Intervallgrenzen so anzupassen, daß der Zufluß stets am Beginn des Intervalls erfolgt. Die beiden vorgestellten Verfahren weisen jedoch auch Nachteile auf: Bei Verwendung der festen Intervallgrenzen muß gewährleistet sein, daß die Masse der zufließenden Zellen sich stets im Intervall befindet. Für die an den Zufluß angepaßten Intervallgrenzen ist dagegen die Änderungsgeschwindigkeit der zufließenden Zellmasse begrenzt, sollen keine Zellen verloren gehen. Die vorliegende Arbeit bietet für dieses Problem keine endgültige Lösung an. Es hat sich gezeigt, daß eine Synchronisation der Zellen in der kontinuierlichen Kultur auch für feste Zellmassen in allen Phasen auftritt. Für diesen Fall kann das FV-Verfahren ohne Einschränkungen eingesetzt werden. Sollen jedoch Veränderungen der Zellmasse beschrieben werden, so ist dies nur unter Beachtung der Randbedingungen möglich.

Die zeitliche Abhängigkeit der Zellmasse des Zuflusses hat auch Auswirkungen auf die Aufteilung des Zellzyklus in einzelne Phasen. Besonders für ältere Zellklassen wird beschrieben, daß die Zellen sehr bald nach der Teilung wieder mit der Sprossung beginnen. Bereits kleinere Variationen der Zellmasse können in diesem Fall bei einer ohnehin sehr verkürzten Einzelzellphase dazu führen, daß die Zellmasse des Zuflusses auch die maximale Zellmasse dieser Phase übersteigt. Ähnliches gilt für die Tochterzellen: Entstehen während einer langen Sprossungsdauer relativ große Zellen, so müssen diese weiterhin die zusätzliche Tochterzellphase durchlaufen. Für hohe Wachstumsraten stellen [Thompson und Wheals \(1980\)](#) aber nahezu gleiche Generationszeiten für Mutter- und Tochterzellen fest. Es ist daher zu überlegen, ob auf die zwar recht übersichtliche Aufteilung in die einzelnen Phasen verzichtet werden sollte.

6.2 Stoffwechselmodell

Aufgrund der Anforderungen, die sich durch die Verwendung von genetisch veränderten Organismen ergeben, sind Stoffwechselnetze für Katabolismus und Anabolismus erstellt worden. Die Aufnahme der komplexen Stoffwechselnetze in das dynamische Modell war jedoch für die im Rahmen der Arbeit behandelten Fragestellungen nicht notwendig. Dies ist durch die bezüglich des Nährstoffangebotes und des biologischen Stammes weitgehend konstanten Bedingungen in den Experimenten begründet. Daher war es möglich,

die Hauptstoffwechselwege durch die aus dem vollständigen Stoffwechselnetz gewonnenen Ertragskoeffizienten zu charakterisieren.

Des Weiteren wurden die Eigenschaften des von [Strässle \(1988\)](#) angegebenen biologischen Modells analysiert. Das Interesse lag dabei auf den von Zyklus bzw. Population abhängigen Parametern. Für die asynchrone Kultur liegen beispielsweise Messungen der Generationszeiten von Mutter- und Tochterzellen sowie der Dauer der Doppelzellphase vor. Die Generationszeit einer Zelle ist in dem von [Strässle \(1988\)](#) angegebenen Modell nicht explizit enthalten. Daher mußte das Modell zunächst um das Zyklusalter erweitert werden. Die Generationszeit der Zellen einer Klasse ergibt sich dann aus dem Zyklusalter zum Zeitpunkt der Zellteilung, also am Ende des Zyklus. Der Vergleich der mit dem um die Generationszeiten erweiterten Modell von [Strässle \(1988\)](#) durchgeführten Simulationen und der Meßergebnisse wies erhebliche Abweichungen auf. Dies betraf die Generationszeiten aber auch die Länge der Sprossungsphase. Die durchgeführte Anpassung der Modellparameter an die Messungen zeigte, daß sowohl mit einer Definition der Dauer der Sprossungsphase als auch mit der Vorgabe der maximalen Zellmasse sich eine qualitative Verbesserung der Übereinstimmung erzielen läßt. Die Synchronisation der Kultur ist ebenfalls mit beiden Varianten möglich. Wie bereits im Zusammenhang mit den numerischen Lösungen erwähnt, verwenden die dynamischen Simulationen die Variante mit festen Intervallgrenzen, das heißt einer starren Kopplung von Zellzyklus und Zellmasse. Zumindest in dem für die synchronen Kulturen interessanten Bereich der Verdünnungsraten erscheint diese Annahme zulässig (siehe Abschnitt [2.4.3](#)).

Die Kopplung des Zellzyklus an die Umgebungsbedingungen geschieht, wie bei [Strässle \(1988\)](#) über die Wachstumsrate. Wie in Abschnitt [2.2.3](#) gezeigt, ist die Angabe einer festen Beziehung zwischen dem Substratangebot und der Generationszeit nur für Sonderfälle, wie z.B. für die asynchrone stationäre Kultur, zulässig. Im allgemeinen Fall kann die Generationszeit erst dann angegeben werden, wenn die Zelle die notwendige Größe erreicht hat und sich teilt. Hierzu ist jedoch das Integral der Wachstumsrate über den gesamten Zellzyklus zu berücksichtigen. Es ist also auch nicht zulässig, die Synchronisation mit Hilfe einer derartigen Kopplung zwischen Substratangebot und Generationszeit, wie sie bei [Hjortso und Nielsen \(1994\)](#) zu finden ist, zu erklären.

Die Synchronisation im dynamischen Modell entsteht vielmehr durch einen Wechsel der Wachstumsrate zwischen der G_1 - und der S -Phase. Die in der ersten Phase angelegten Speicherstoffe werden anschließend in der Sprossungsphase mobilisiert. Infolge der überschränkten respiratorischen Kapazität kommt es zu einer Produktion von Ethanol, das wiederum dazu beiträgt, das Wachstum der Zellen in der G_1 -Phase zu beschleunigen. Einem Teil dieser Zellen ist es auf diese Weise möglich, ebenfalls die Sprossungsphase zu erreichen. Die nichtlineare Kinetik zur Bestimmung der eingelagerten Speicherstoffe ([Strässle, 1988](#)) spielt bei der Synchronisation jedoch keine Rolle. Sie bestimmt lediglich die maximale Wachstumsrate bei der eine Synchronisation auftritt, da mit zunehmender Glucoseaufnahmerate nicht mehr genügend Speicherstoffe gebildet werden. Die Sprossung wird in der Simulation in der Regel von einer einzelnen Zellklasse initiiert. Durch die beschriebene Synchronisation folgen mit einer zeitlichen Verzögerung die anderen Zellklassen. Die Experimente von [Bartling \(1996\)](#) enthalten ebenfalls diese Verschiebung der einsetzenden Sprossung. Der Anstieg des Sprossungsindex der Tochterzellen erfolgt dort etwa 40 min nach dem der Mutterzellen. Das vorgestellte Modell der periodischen syn-

chronen Kultur ist demnach geeignet, auch diesen realitätsnahen Fall zu behandeln. Das Beispiel führt darüber hinaus die Notwendigkeit von morphologischen Meßwerten zur Validierung des Zellzyklusmodells vor Augen.

6.3 Zellbilanz für synchrones Wachstum

Gegenüber einer synchronisierten Batchkultur hat eine kontinuierliche synchrone Kultur den Vorteil, daß sie über mehrere Zellzyklen periodisches Verhalten aufweist. Mit Hilfe der Zellbilanz gibt [Bellgardt \(1994a\)](#) Eigenschaften dieser periodischen Lösung an: Abhängig vom Verhältnis der Generationszeiten besteht ein linearer Zusammenhang zwischen Periodenlänge und Verdopplungszeit. Das heißt, bei einer festen Verdopplungszeit ist für jeden Wachstumsmodus genau eine Periodenlänge vorgeschrieben. Für diese Überlegungen muß allerdings gefordert werden, daß die Generationszeiten ganzzahligen Vielfachen der Periodenlänge entsprechen. Dabei werden lediglich zwei Zellklassen, nämlich Tochter- und Mutterzellen unterschieden.

Basierend auf diesem Modell wurde im Rahmen der Arbeit ein Katalog von Versuchen erarbeitet, mit dem Ziel, die Gültigkeit der getroffenen Annahmen und der gefundenen Zusammenhänge zu prüfen. Von besonderem Interesse war dabei die Abhängigkeit der Periodenlänge der synchronen Kultur von der Verdünnungsrate und von weiteren Parametern, die nicht explizit im Modell enthalten sind (z.B. dem Sauerstoffangebot). Parallel zu der Erstellung des dynamischen Modells sind von [Beuse \(1998\)](#) zahlreiche Experimente mit synchronen Kulturen durchgeführt worden. Die entstandene Versuchsreihe ist die erste, die mit Kenntnis der besonderen Eigenschaften der synchronen periodischen Kultur geplant wurde.

Generell wird der Verlauf synchroner Experimente durch eine theoretisch beliebig komplexe genealogische Struktur der Population beeinflusst. Aus diesem Grund erschien es sinnvoll, die von [Bellgardt \(1994a\)](#) vorgestellte Bilanz für eine allgemeine Populationsstruktur zu erweitern. Die Erfahrung mit der Meßreihe von [Beuse \(1998\)](#) zeigt, daß zumindest drei Klassen mit unterschiedlichen Wachstumsverhalten auftreten können. Dies gilt insbesondere für den Modus 112. Die Tochterzellen verhalten sich in diesem Fall nicht homogen; abhängig vom Alter ihrer Mütter besitzen sie unterschiedliche Eigenschaften. Durch Experimente mit verschiedenen Verdünnungsraten konnte die Annahme eines Modus des Drei-Klassen-Modells bestätigt werden. Die in [Bild 1.6](#) eingezeichneten Zwischenmoduslinie entspricht Modus 112.

Abschnitt [3.2](#) enthält die im Rahmen der Arbeit erstmalig abgeleitete erweiterte Zellbilanz für die vorgestellte allgemeine genealogische Klassenstruktur. Es zeigt sich, obwohl für Systeme mit mehreren Klassen weitere Wachstumsmodi und weitere Proportionalitätsfaktoren hinzukommen, daß die lineare Abhängigkeit zwischen Periodenlänge und Verdopplungszeit bestehen bleibt. Voraussetzung für die periodische Lösung ist, daß die Zahl der Teilpopulationen jeder Zellklasse dem Verhältnis aus Generationszeit und Periodenlänge, also der Moduszahl, entspricht. Für eine Zellklasse, deren Generationszeit das Doppelte der Periodenlänge beträgt, sind demnach genau zwei Teilpopulationen notwendig, die sich phasenverschoben im Zellzyklus befinden. Auf diese Weise gelangt nach

jeder Periode genau eine der Teilpopulationen in die Sprossungsphase und beendet schließlich den Zellzyklus. Die Unteilbarkeit der Teilpopulationen stellt dabei eine grundlegende Voraussetzung dar.

Unter realen Bedingungen ist es allerdings denkbar, daß auch bei leichten Abweichungen von den theoretischen Generationszeiten die Teilpopulationen nach der Teilung wieder zu neuen Teilpopulation verschmelzen. Die Untersuchungen von [Bartling \(1996\)](#) und auch der bei einigen synchronen Experimenten zu beobachtende Doppelpeak im Verlauf der Abgaswerte deutet auf eine verzögerte Sprossung in den einzelnen Zellklassen hin. Für diesen Fall zeigt die in dieser Arbeit in Abschnitt [3.2.5](#) vorgestellte Sensitivitätsanalyse, daß nur eine verhältnismäßig geringe Abweichung der Periodenlänge auftritt.

Von großer Bedeutung für die Beurteilung synchroner Experimente ist die Meßgenauigkeit bei der Ermittlung der Verdünnungsrate. Die Versuchsbedingungen machen es notwendig, eine sehr geringe Verdünnungsrate (Größenordnung $0.05\text{--}0.1\text{ h}^{-1}$) über einen langen Zeitraum von einigen Wochen konstant zu halten. Die Experimente zeigen, daß eine Drift der Verdünnungsrate zu einer entsprechenden, langsamen Verschiebung der Periodenlänge führen. Kurzzeitige Schwankungen können die Sprossung auslösen und zu einem Verlust der Periodizität führen.

Die vorhandenen Messungen Zellzyklus relevanter Parameter beinhalten zumeist Zellzahl oder Sprossungsindex der verschiedenen Zellklassen. Kapitel [4](#) trägt dem Rechnung und gibt die theoretische Zellzahl und den Sprossungsindex für die synchrone kontinuierliche Kultur entsprechend dem erweiterten Mehr-Klassen-Modell an. Neben der Periodenlänge bieten die beiden Parameter eine weitere Möglichkeit, durch Vergleich mit den theoretischen Werten auf den Wachstumsmodus der Kultur zu schließen. Darüber hinaus stellt diese Arbeit ein Verfahren vor, aus dem zeitlichen Verlauf des Sprossungsindex eine Approximation der Zellverteilung zu bestimmen. Die gewonnene Verteilung gibt einerseits einen Anhaltspunkt für die als Ergebnis der dynamischen Modellrechnung zu erwartende Verteilung, kann aber auch zur Definition eines Maßes für die erzielte Synchronisation dienen.

Ergänzend zu dem in [Bellgardt \(1994a\)](#) vorgestellten Modell sind in dieser Arbeit Erweiterungen entstanden, die sich für die Anwendung in synchronen Experimenten als notwendig erwiesen. Die Arbeit bietet dabei Erklärungen für die Ursachen an, die zu einer Abweichung von der Modellvorhersage führen. In diesem Zusammenhang wurde das Modell für eine allgemeinere Populationsstruktur erweitert und die Sensitivität der Parameter untersucht. Einen großen Einfluß hat hierbei die Meßgenauigkeit der Verdünnungsrate. Stärker als im Rahmen des gemeinsamen Projektes möglich, werden für weitere Untersuchungen Messungen der morphologischen Merkmale benötigt. Ziel muß es hierbei sein, auch die Zellverteilung genauer zu bestimmen. Steht lediglich der Sprossungsindex zur Verfügung, so bietet das hier vorgestellte Verfahren zumindest die Möglichkeit, die Zellverteilung abzuschätzen.

6.4 Anwendung des dynamischen Modells

Zur Überprüfung der von [Bellgardt \(1994a\)](#) postulierten ganzzahligen Vielfachen zwischen den Generationszeiten und der Periodenlänge der synchronen Kultur kann das von [Strässle \(1988\)](#) konzipierte Modell nicht herangezogen werden. Zwar ist der Zellzyklus und auch die asymmetrische Teilung enthalten, aber aufgrund der gemeinsamen Einzel- und Doppelzellphase sind die Zellklassen nicht sauber zu trennen. Daher wurde das Modell um eine klare Populationsstruktur erweitert und die numerische Lösung, wie bereits oben erwähnt, überarbeitet.

Das implementierte Modell ist in der Lage, eine beliebige genealogische Klassenstruktur zu berechnen. Das hier verwendete Populationsmodell entspricht dabei dem auch schon für die Zellbilanz in der periodischen synchronen Kultur verwendeten. Die Masse der Mutterzellanteile an der sprossenden Zelle sind in allen Klassen frei wählbar. Daten für die Größe der Zellen in Abhängigkeit ihres Alter werden beispielsweise in [Woldringh et al. \(1993\)](#) angegeben. Weiterhin war es durch die Klassenstruktur des dynamischen Modells möglich, zum Beispiel das dort angegebene synchrone Batch-Experiment nachzuvollziehen (siehe Abschnitt [5.1](#)).

Erstmalig konnten mit Hilfe des erstellten dynamischen Wachstumsmodells die stabilen Oszillationen im Experiment, die periodische Lösung des dynamischen Modells und die aus der Populationsbilanz gewonnenen Ergebnissen verglichen werden. Letztere geben nur über gewisse Eigenschaften der periodischen Lösung Auskunft. Nicht enthalten sind Informationen über die Synchronisation oder die transienten Prozesse infolge einer Parameteränderung. Auch welcher Wachstumsmodus sich einstellt, kann nicht vorhergesagt werden. Gelten die getroffenen Annahmen, so sind die abgeleiteten Eigenschaften sowohl für das Experiment als auch für die dynamische Simulation verbindlich, sobald sich die synchrone periodische Lösung einstellt.

Sowohl Experiment als auch die mit dem vollständigen Modell durchgeführten dynamischen Simulationen folgen der theoretisch vorgeschriebenen Periodenlänge. Teilweise zeigen sich jedoch auch leichte Abweichungen. In Bezug auf die Experimente ist schwer zu entscheiden, ob die beobachteten Abweichungen auf fehlerhaften Messungen oder aber einer Verletzung der eingangs getroffenen Annahmen beruhen. Aufschluß über die Vorgänge in der synchronen Kultur würde letztendlich nur die Messung der Zellverteilung bringen. Ein starkes Indiz für die zumindest bedingte Gültigkeit des vereinfachten Modells liefern Experimente, bei denen über verschiedene Prozeßparameter die Umgebungsbedingungen beeinflußt werden. Die Periodenlänge in der synchronen Kultur ist dabei lediglich von der Verdünnungsrate und dem durch den Wachstumsmodus gekennzeichneten Zustand der Population abhängig. Für die Gültigkeit des vereinfachten Modells sprechen die folgenden Beobachtungen:

1. Trägt man die Periodenlänge über der Verdopplungszeit auf, so liegen die Meßwerte wie vorhergesagt auf Geraden mit verschiedener Steigung ([Beuse et al., 1998](#)).
2. Tritt durch veränderte Umgebungsbedingungen eine starke Verschiebung der Konkurrenzsituation zwischen den Zellklassen auf, so kommt es zu einem Wechsel des

Wachstumsmodus. Hierbei gilt, kleine Abweichungen eines Parameters haben keine Wirkung, ändert sich der Parameter weiter, so kann es zu einem plötzlichen Moduswechsel kommen. Beispiele für Umgebungsparameter, die einen derartigen Einfluß ausüben, sind der pH -Wert, die Sauerstoffversorgung oder die verwendete C -Quelle (Beuse et al., 1999). Nach einer Änderung der betreffenden Parameter stellt sich innerhalb kurzer Zeit die neue Periodenlänge ein. Ein Moduswechsel ist auch bei einer Variation der Verdünnungsrate zu beobachten.

Durch die im Rahmen der Arbeit erfolgte Erweiterung des dynamischen Wachstumsmodells sind die aus der Zellbilanz abgeleiteten Eigenschaften nun auch in der Simulation der synchronen kontinuierlichen Kultur erkennbar. Es zeigt sich allerdings auch, daß die getroffene Annahme unteilbarer Teilpopulationen mit gleichen Eigenschaften nicht immer erfüllt ist: Im Verlauf der Teilung ist, bedingt durch den Mechanismus der Synchronisation im Modell, ein starker Abfall der Generationszeit zu beobachten. Dennoch stellt unter den getroffenen Annahmen die Zellbilanz ein nützliches Hilfsmittel zum Verständnis der Vorgänge in der synchronen Kultur dar.

Über die Simulation der periodischen Vorgänge hinaus gelingt es, mit dem Modell auch die transienten Vorgänge, wie Initiierung der synchronen Kultur oder den Moduswechsel zu beschreiben. Ähnlich wie in den von Beuse (1998) beschriebenen Experimenten stellt sich auch in der Simulation mit dem Start der kontinuierlichen Kultur im Anschluß an die Batch-Phase innerhalb weniger Perioden eine synchrone periodische Kultur ein. Gleiches gilt für den Moduswechsel.

6.5 Zusammenfassung und Ausblick

Diese Arbeit enthält somit ein dynamisches Modell des Zellzyklus, das sehr flexibel dessen Eigenschaften beschreibt. Es erlaubt zudem eine Aufteilung der Kultur in genealogische Klassen. Die Synchronisation entsteht durch die Kombination von einer substratabhängigen Zyklusphase und einer weitgehend substratunabhängigen Zyklusphase. Synchronen Kulturen zeigen, daß die Berücksichtigung des Zellzyklus notwendig ist, wenn man die internen Stoffwechselwege der Zelle untersuchen will, da im Verlauf des Zellzyklus verschiedene biologische Phasen existieren. Die Analyse der asynchronen Kultur erlaubt es hingegen, lediglich mittlere Eigenschaften zu beobachten. Ein Ziel der Untersuchungen war es, die Zusammenhänge in der synchronen periodischen Kultur besser zu verstehen. Dies ist beispielsweise für die von Bellgardt (1994a) angegebenen Eigenschaften bereits mit diesem biologisch recht einfachen dynamischen Modell möglich. Die quantitative Beschreibung der des Stoffwechsels in Abhängigkeit des Zellzyklus erfordert jedoch noch weitere Kenntnis der biologischen Eigenschaften. Von zentraler Bedeutung ist hierbei die Bestimmung der Populationsstruktur mit Hilfe der morphologischen Parameter der Zellen. Bei einigen der oben erwähnten Experimente von Beuse (1998) wurden die Anteile der sprossenden und der Einzelzellen der Zellklassen bestimmt. Derartige Messungen lassen sich verwenden, um die Zellverteilung zu bestimmen, wie in Kapitel 4 gezeigt werden konnte. Weitere Erkenntnisse über die Vorgänge bei Synchronisation, Desynchronisation

und während der Oszillationen sowie eine Bestätigung der Wachstumsmodi erfordern jedoch die automatische Auswertung größerer Datenmengen. Hier können Bildverarbeitung oder Zell-Counter zur Bestimmung der Volumenverteilung und anderer morphologischer Merkmale hilfreich sein.

Im Anschluß ist es möglich, den Stoffwechsel in Abhängigkeit des Zellzyklus zu untersuchen. Einen ersten Schritt stellen erweiterte Online-Meßtechniken dar. [Beuse \(1998\)](#) erprobte den Einsatz von Biosensoren kombiniert mit einem Fließinjektionssystem. Weitere Möglichkeiten stellen Markierungsexperimente und intrazelluläre Analytik dar. Erst mit dieser erweiterten Analytik gewinnt auch das Stoffwechselmodell an Bedeutung. Kapitel 2.4 stellt hierzu bereits eine quantitative Abschätzung des Einflusses von Zusätzen zum Substrat in der Nährlösung vor. Will man die synchrone kontinuierliche Kultur verwenden, so wird man stets Hefeextrakt oder ähnliche Zusätze benötigen. [Beuse \(1998\)](#) zeigt, daß nur bei einem ausreichend hohen Ertrag mit der Existenz stabiler Oszillationen zu rechnen ist. Das vorliegende Modell enthält lediglich die prinzipiellen Stoffwechselwege. Sobald Online-Messungen vorhanden sind, erscheint es sinnvoll, auch das Stoffwechselmodell anzupassen bzw. zu erweitern. Die Stoffwechselwege könnten hier beispielsweise um die Dynamik ihrer Schlüsselenzyme ergänzt werden, wie dies beispielsweise [Jones und Kompala \(1999\)](#) vorstellen.

Von besonderer Bedeutung ist die Messung der Zellverteilung im Verlauf der synchronen Kultur. Die zur Zeit im Modell enthaltenen Mechanismen zur Regulation des Zellzyklus stellen nur eine qualitative Vorstellung der Vorgänge dar. Sie basieren zum Teil auf Informationen, die mit Hilfe von asynchronen Kulturen gewonnen wurden. Hier sind mit erweiterter Meßtechnik für das Verständnis der synchronen Kultur Fortschritte zu erwarten. Die synchrone Kultur stellt dann ein geeignetes Werkzeug dar, die Alterung einer Zelle zu beobachten. Besonders nützlich ist dies beispielsweise zur Beurteilung des physiologischen Verhaltens von genetisch veränderten Organismen.

Anhang A

Modellgleichungen

A.1 Kinetisches Modell

Die Regulation der Aktivität der Stoffwechselwege ist in Abschnitt 2.4.2 beschrieben. Das Stoffwechselmodell ist hierbei im wesentlichen an dem von Strässle (1988) vorgestellten orientiert. Die genealogischen Klassen unterscheiden sich dabei nicht durch das Stoffwechselmodell, sondern durch nur durch ihre Größe (siehe Bild 2.24).

Die prinzipiellen Stoffwechselfade zeigt Bild A.1. Als Hauptkohlenstoffquellen dienen Glucose und der Speicherstoff Trehalose. Diese werden je nach vorhandener respiratorischer Kapazität zu CO_2 oxidiert oder in Form von Ethanol ausgeschieden. Wird die zur Verfügung stehende respiratorische Kapazität nicht vollständig benötigt, so besteht die Möglichkeit auch Ethanol aufzunehmen. Die respiratorische Kapazität ist dabei im Modell ausschließlich vom Sauerstoffangebot abhängig. Es gilt der Zusammenhang

$$r_{G,krit}(t) = \frac{1}{Y_{OG}} r_{O,krit}(t) = -\frac{1}{Y_{OG}} r_{O,max} \frac{c_{O,l}(t)}{K_O + c_{O,l}(t)}. \quad (A.1)$$

Glucose stellt in der Einzel- und Doppelzellphase das bevorzugte Substrat dar. In der Doppelzellphase werden hingegen die zellinternen Trehalosespeicher zunächst verbraucht. Für die Glucoseaufnahme ist daher die Fallunterscheidung

$$r_G(t, p) = \begin{cases} -r_{G,max} \frac{c_G(t)}{K_S + c_G(t)} & \text{Tochter- und Einzelzellphase} \\ (-r_{G,max} - r_T(t, p)) \frac{c_G(t)}{K_S + c_G(t)} & \text{Doppelzellphase} \end{cases} \quad (A.2)$$

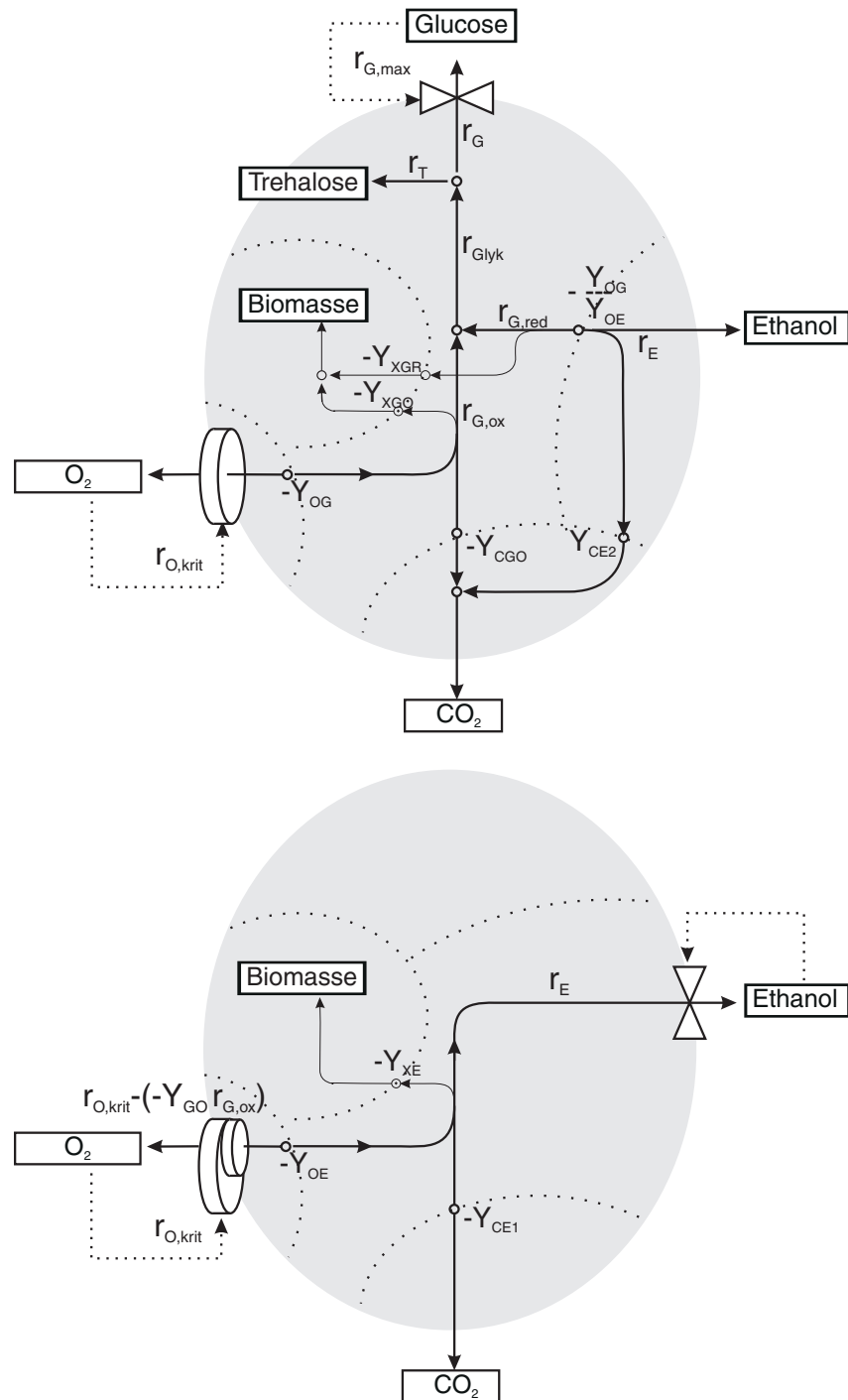


Bild A.1: Vereinfachtes Modell der Stoffwechselwege in *S. cerevisiae*. Flüsse in Zählpfeilrichtung werden positiv gewertet. Oben: Aufnahme von Glucose als Substrat. Unten: Sobald die respiratorische Kapazität es zuläßt, wird zusätzlich zum oben dargestellten Glucosefluß auch Ethanol aufgenommen

notwendig. Dies gilt ebenso für die Beschreibung des Speicherstoffhaushaltes entsprechend

$$r_T(t, p) = \begin{cases} 0 & \text{Tochterzellphase} \\ \frac{1}{2} e^{K_{T,inh}} r_G(t) \left(\frac{r_{T,max}}{r_{T,0}} - r_G(t) \right) & \text{Einzelzellphase} \\ -r_{G,max} \frac{\frac{c_T(t,p)}{M(t,p)}}{K_T + \frac{c_T(t,p)}{M(t,p)}} & \text{Doppelzellphase.} \end{cases} \quad (\text{A.3})$$

Die in der Einzelzellphase eingelagerte Trehalose erhöht später die Wachstumsrate in der Doppelzellphase.

Anschließend teilt die zur Verfügung stehende respiratorische Kapazität den Stoffwechsel in oxidativen und fermentativen Stoffwechsel auf. Wie in Bild A.1 (oben) skizziert gelten die Zusammenhänge

$$r_{Glyk}(t, p) = r_G(t, p) + r_T(t, p) \quad (\text{A.4})$$

$$r_{G,ox}(t, p) = \max(r_{G,krit}(t), r_{Glyk}(t, p)) \quad (\text{A.5})$$

$$r_{G,red}(t, p) = r_{Glyk}(t, p) - r_{G,ox}(t, p). \quad (\text{A.6})$$

Der fermentative Stoffwechsel führt zu einer Ethanolproduktion, während eine überschüssige respiratorische Kapazität auch die Aufnahme von Ethanol erlaubt (Bild A.1 unten). Zusammengefaßt ergeben sich die Gleichungen

$$r_E(t, p) = \begin{cases} -\frac{Y_{OG}}{Y_{OE}} r_{G,red}(t, p) & \text{für } -r_{G,red}(t, p) > 0 \\ \frac{Y_{OG}}{Y_{OE}} (r_{G,krit}(t) - r_{G,ox}(t, p)) \frac{c_E(t)}{K_E + c_E(t)} & \text{für } r_{G,red}(t, p) = 0. \end{cases} \quad (\text{A.7})$$

Die Wachstumsrate ergibt sich aus der Summe der Biomasseproduktion in den aktiven Stoffwechselwegen

$$\mu(t, p) = -Y_{XGO} r_{G,ox}(t, p) - Y_{XGR} r_{G,red}(t, p) + \max(-Y_{XE} r_E(t, p), 0). \quad (\text{A.8})$$

Bedingt durch die in Bild A.1 gewählte Zählpfeilrichtung weisen die zum Wachstum beitragenden Reaktionen bei Substrataufnahme ein negatives Vorzeichen auf. Die folgende Tabelle führt die Parameter des Modells auf.

Ertragskoeffizienten			Kinetische Parameter		
Y_{CE1}	14.7	$mmol g^{-1}$	K_E	0.01	$g l^{-1}$
Y_{CE2}	21.9	$mmol g^{-1}$	K_G	0.5	$g l^{-1}$
Y_{CGO}	13.7	$mmol g^{-1}$	K_O	0.001	$mmol l^{-1}$
Y_{OE}	35.0	$mmol g^{-1}$	K_T	0.2	$g g^{-1}$
Y_{OG}	12.8	$mmol g^{-1}$	$r_{G,max}$	3.5	$g g^{-1} h^{-1}$
Y_{XE}	0.72	$g g^{-1}$	$r_{O,max}$	7.9	$mmol g^{-1} h^{-1}$
Y_{XGO}	0.49	$g g^{-1}$	$K_{T,inh}$	0.5	$g g^{-1} h$
Y_{XGR}	0.05	$g g^{-1}$	$r_{T,max}$	0.4	$g g^{-1} h^{-1}$
			$r_{T,0}$	0.98	-

A.2 Reaktormodell

Für die Inhaltstoffe in der Nährlösung ergeben sich die folgenden Gleichungen

$$\frac{dc_G}{dt} = (c_{G,R} - c_G(t))D + R_G(t) \quad c_G(0) = c_{G,0} \quad (\text{A.9})$$

$$\frac{dc_E}{dt} = -c_E(t)D + R_E(t) \quad c_E(0) = c_{E,0} \quad (\text{A.10})$$

$$\frac{dc_O}{dt} = R_{O,g}(t) + R_{O,l}(t) \quad c_O(0) = c_{O,0} \quad (\text{A.11})$$

$$\frac{dc_C}{dt} = R_{C,g}(t) + R_{C,l}(t) \quad c_C(0) = c_{C,0}. \quad (\text{A.12})$$

Hierbei finden Glucose (c_G), Ethanol (c_E) sowie Sauerstoff (c_O) und Kohlendioxid (c_C) Berücksichtigung.

Die Gasphase wird durch die Molenbrüche x_O für Sauerstoff und x_C für Kohlendioxid beschrieben. Unter der Annahme unveränderlicher Temperatur und Druck der durch den Reaktor strömenden Begasung gelten die Gleichungen

$$\frac{dx_O}{dt} = \left(\frac{\dot{V}_{in}}{V_f} x_{O,in} - \frac{\dot{V}_{out}(t)}{V_f} x_O(t) - \frac{RT}{p} R_{O,g}(t) \right) \frac{V_f}{V_g} \quad x_O(0) = x_{O,in} \quad (\text{A.13})$$

$$\frac{dx_C}{dt} = \left(\frac{\dot{V}_{in}}{V_f} x_{C,in} - \frac{\dot{V}_{out}(t)}{V_f} x_C(t) - \frac{RT}{p} R_{C,g}(t) \right) \frac{V_f}{V_g} \quad x_C(0) = x_{C,in}. \quad (\text{A.14})$$

Das Volumen der Begasungsluft ändert sich durch die Aufnahme von Sauerstoff und die abgegebene Menge an Kohlendioxid im Reaktor. Für den Volumenstrom des Abgases gilt daher unter der Annahme stationärer Verhältnisse die Gleichung

$$\dot{V}_{out}(t) = \frac{1 - x_{O,in} - x_{C,in}}{1 - x_O(t) - x_C(t)} \dot{V}_{in}. \quad (\text{A.15})$$

Der Transfer von Sauerstoff und Kohlendioxid in die Gasphase läßt sich durch die Gleichungen

$$R_{O,g}(t) = kla (c'_O x_O(t) - c_O(t)) \quad (\text{A.16})$$

$$R_{C,g}(t) = kla (c'_C x_C(t) - c_C(t)) \quad (\text{A.17})$$

beschreiben (Bellgardt, 1984; Strässle, 1988). Der Transfer wird also durch die Differenz der Konzentrationen in beiden Phasen verursacht.

Für den Massentransfer aus der Biophase in die Flüssigphase ist dagegen die Aktivität der Biomasse verantwortlich. Zur Berechnung der Biomassekonzentration eines einfachen kinetischen Modells kann die Gleichung

$$\frac{dM}{dt} = (\mu(t) - D(t)) M(t) \quad M(0) = M_0 \quad (\text{A.18})$$

herangezogen werden. Die Abhängigkeit der Wachstumsrate μ und aller Reaktionsraten vom Zellzyklus entfällt, da das Modell den Zellzyklus nicht enthält. Für die Reaktionsrate r_T gilt stets $r_T = 0$. Der Massentransfer kann proportional zur Biomasse M und der jeweiligen spezifischen Produktionsrate r_i angenommen werden. Es gelten daher die Zusammenhänge

$$R_G(t) = r_G(t) M(t) \quad (\text{A.19})$$

$$R_E(t) = r_E(t) M(t) \quad (\text{A.20})$$

$$R_C(t) = (-Y_{CGO} r_{G,ox}(t) + \max(-Y_{CE1} r_E(t), Y_{CE2} r_E(t))) M(t) \quad (\text{A.21})$$

$$R_O(t) = (Y_{OG} r_{G,ox}(t) - \max(-Y_{OE} r_E(t), 0)) M(t). \quad (\text{A.22})$$

Bei der Beschreibung des Wachstums durch das in Kapitel 2.2 vorgestellte Zellzyklusmodell sind alle Reaktionsraten abhängig von der Zellmassenverteilung $M(t, p)$ und der Zellzyklusvariablen p . Zur Bestimmung der Zellmassenverteilung $M(t, p)$ wird lediglich die Wachstumsrate $\mu(t, p)$ benötigt. Die Stofffluß in die Flüssigphase ergibt sich nun durch eine Integration. Ist der gesamte Zyklus hierbei auf das Intervall $[0, 1]$ normiert, so gelten die Gleichungen

$$R_G(t) = \int_0^1 q_G(t, p) M(t, p) dp \quad (\text{A.23})$$

$$R_E(t) = \int_0^1 q_E(t, p) M(t, p) dp \quad (\text{A.24})$$

$$R_C(t) = \int_0^1 (-Y_{CGO} r_{G,ox}(t, p) + \max(-Y_{CE1} r_E(t, p), Y_{CE2} r_E(t, p))) M(t, p) dp \quad (\text{A.25})$$

$$R_O(t) = \int_0^1 (Y_{OG} r_{G,ox}(t, p) - \max(-Y_{OE} r_E(t, p), 0)) M(t, p) dp. \quad (\text{A.26})$$

Die im Reaktormodell verwendeten Parameter sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Prozeßparameter			Physikalische Parameter		
$c_{G,R}$	20	$g l^{-1}$	c'_O	1.0416	$mmol l^{-1}$
$c_{G,0}$	20	$g l^{-1}$	c'_C	27.2727	$mmol l^{-1}$
$c_{E,0}$	0	$g l^{-1}$	$x_{O,in}$	0.20946	-
$c_{O,0}$	$c'_O x_{O,in}$	$mmol l^{-1}$	$x_{C,in}$	0.00033	-
$c_{C,0}$	$c'_C x_{C,in}$	$mmol l^{-1}$	$\frac{RT}{p}$	0.0224	$l mmol^{-1}$
M_0	0.2	$g l^{-1}$			
\dot{V}_{in}	120.0	$l l^{-1}$			
V_f	2	l			
$\frac{V_g}{V_f}$	0.25	$l l^{-1}$			
kla	400	h^{-1}			

Literatur

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Watson, J. D. (1995). Molekularbiologie der Zelle. VCH, Weinheim.
- Bailey, J. E. (1998). Mathematical modeling and analysis in biochemical engineering: Past accomplishments and future opportunities. *Biotechnol. Prog.* 14, 8–20.
- Bartling, R. (1996). Bestimmung von Populationsverteilung und Produktbildung bei *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit, Univ. Hannover.
- Bellgardt, K.-H. (1984). Modellbildung des Wachstums von *Saccharomyces cerevisiae* in Rührkesselreaktoren. Dissertation, Univ. Hannover.
- Bellgardt, K.-H. (1994a). Analysis of synchronous growth of baker's yeast. Part I: Development of a theoretical model for sustained oscillations. *J. Biotechnol.* 35, 19–33.
- Bellgardt, K.-H. (1994b). Analysis of synchronous growth of baker's yeast. Part II: Comparison of model prediction and experimental data. *J. Biotechnol.* 35, 35–49.
- Bellgardt, K.-H., Kuhlmann, W. und Meyer, H. D. (1983). Deterministic growth model of *Saccharomyces cerevisiae*, parameter identification and simulation. In: A. Halme, Ed., 1st IFAC Workshop on Modelling and Control of Biotechnological Processes, Helsinki 1982, Pergamon Press, Oxford.
- Beuse, M. (1998). Populationsverteilung und Wachstumsmodi bei *Saccharomyces cerevisiae* in synchronen Chemostatkulturen. Dissertation, Univ. Hannover. Shaker, Aachen.
- Beuse, M., Kopmann, A., Diekmann, H. und Thoma, M. (1998). Effect of the dilution rate on the mode of oscillation in continuous culture of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.* 61, 15–31.
- Beuse, M., Kopmann, A., Diekmann, H. und Thoma, M. (1999). Oxygen, pH and carbon source induced changes of the mode of oscillation in synchronous continuous culture of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 63, 410–417.
- Bonarius, H. P. J., Hatzimanikatis, V., Meesters, K. P. H., de Gooijer, C. D., Schmid, G. und Tramper, J. (1996). Metabolic flux analysis of hybridoma cells in different culture media using mass balances. *Biotechnol. Bioeng.* S. 299–318.
- Breitenecker, F., Ecker, H. und Bausch-Gall, I. (1993). Simulation mit ACSL: Eine Einführung in die Modellbildung, numerische Methoden und Simulation. Fortschritte in der Simulationstechnik, Band 2, Vieweg, Braunschweig/Wiesbaden.

- Bruinenberg, P. M., van Dijken, J. P. und Scheffers, W. A. (1983). A theoretical analysis of NADPH production and consumption in yeast. *J. Gen. Microbiol.* 129, 953–964.
- Cherry, J. M., Ball, C., Weng, S., Juvik, G., Schmidt, R., Adler, C., Dunn, B., Dwight, S., Riles, L., Mortimer, R. und Botstein, D. (1997). Genetic and physical maps of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat.* 387, 67–73.
- Cortassa, S., Aon, J. C. und Aon, M. A. (1995). Fluxes of carbon, phosphorylation, and redox intermediates during growth of *Saccharomyces cerevisiae* on different carbon sources. *Biotechnol. Bioeng.* 47, 193–208.
- Dekkers, J. G., Kok, H. E. und Roels, J. A. (1981). Energetics of *Saccharomyces cerevisiae* CBS 426: comparison of anaerobic and aerobic glucose limitation. *Biotechnol. Bioeng.* 23, 1023–1035.
- Gottschalk, G. (1986). *Bacterial Metabolism*. Springer Verlag.
- Grover, N. B. und Woldringh, C. L. (1995). Relationship between the fraction of cells of different genealogical ages and their cycle times in *Saccharomyces cerevisiae*: A theoretical analysis. *J. Theor. Biol.* 174, 223–225.
- Hartwell, L. H. und Unger, M. W. (1977). Unequal division in *Saccharomyces cerevisiae* and its implications for the control of the cell division. *J. Cell Biol.* 75, 422–435.
- Heijden, R. T. J. M. v. d., Heijnen, J. J., Hellinga, C., Romein, B. und Luyben, K. C. A. M. (1994a). Linear constraint relations in biochemical reaction systems: I. Classification of the calculability and the balanceability of conversion rates. *Biotechnol. Bioeng.* 43, 3–10.
- Heijden, R. T. J. M. v. d., Heijnen, J. J., Hellinga, C., Romein, B. und Luyben, K. C. A. M. (1994b). Linear constraint relations in biochemical reaction systems: II. Diagnosis and estimation of gross errors. *Biotechnol. Bioeng.* 43, 11–20.
- Heijden, R. T. J. M. v. d., Heijnen, J. J., Hellinga, C., Romein, B. und Luyben, K. C. A. M. (1994c). Linear constraint relations in biochemical reaction systems: III. Sequential application of data reconciliation for sensitive detection of systematic errors. *Biotechnol. Bioeng.* 43, 781–791.
- Heinzle, E., Furukawa, K., Tanner, R. D. und Dunn, I. J. (1983). Modelling of sustained oscillations observed in continuous culture of *Saccharomyces cerevisiae*. In: A. Halme, Ed., *Modelling and Control of Biotechnical Processes*, Pergamon Press, New York, S. 57–65.
- Hjortso, M. A. (1987). Periodic forcing of microbial cultures: A model for induction synchrony. *Biotechnol. Bioeng.* 30, 825–835.
- Hjortso, M. A. und Nielsen, J. (1994). A conceptual model of autonomous oscillations in microbial cultures. *Chem. Eng. Sci.* 49, 1083–1095.
- Hjortso, M. A. und Nielsen, J. (1995). Population balance models of autonomous microbial oscillations. *J. Biotechnol.* 42, 225–269.
- Hoppenstead, F. C. (1989). Synchronization of bacterial culture growth. In: C. Castillo-Chavez, Ed., *Mathematical Approaches to Problems in Resource Management and Epidemiology*, Lecture Notes in Biomath. 81, S. 16–22.

- Huls, P. G., Nanninga, N., van Spronsen, E. A., Valkenburg, J. A. C., Vischer, N. O. E. und Woldring, C. L. (1992). A computer-aided measuring system for the characterization of yeast populations combining 2D-image analysis, electronic particle counter and flow cytometry. *Biotechnol. Bioeng.* 39, 343–350.
- Johnston, G. C., Ehrhardt, C. W., Lorincz, A. und Carter, B. L. A. (1979). Regulation of cell size in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 137, 1–5.
- Johnston, M. (1996). The complete code for a eukaryotic cell. *Genome sequencing. Curr. Biol.* 6, 500–503.
- Jones, K. D. und Kompala, D. S. (1999). Cybernetic model of the growth dynamics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch and continuous cultures. *J. Biotechnol. S.* 105–131.
- Kuenzi, M. T. und Fiechter, A. (1969). Changes in carbohydrate composition and trehalase activity during the budding cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Mikrobiol.* 64, 396–407.
- Lord, P. G. und Wheals, A. E. (1980). Asymmetrical division of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 142, 808–818.
- Lord, P. G. und Wheals, A. E. (1981). Variability in the individual cell cycles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* 50, 361–376.
- Markus, M., Müller, S. C. und Hess, B. (1985). Observations of entrainment, quasiperiodicity and chaos in glycolyzing yeast extracts under periodic glucose input. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 89, 651–654.
- Markus, M. und Hess, B. (1984). Transitions between oscillatory modes in a glycolytic model system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 4394–4398.
- Marx, A., de Graaf, A. A., Wiechert, W., Eggeling, L. und Sahm, H. (1996). Determination of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* by nuclear magnetic resonance spectroscopy combined with metabolite balancing. *Biotechnol. Bioeng.* 49, 111–129.
- Powell, E. O. (1956). Growth rate and generation time of bacteria, with special reference to continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* 15, 492–511.
- Press, W. H. (1992). *Numerical recipes in FORTRAN: the art of scientific computing*. Cambridge Univ. Press.
- Schlegel, H. G. (1992). *Allgemeine Mikrobiologie*. Thieme, Stuttgart, New York.
- Sillje, H. H. W., ter Schure, E. G., Rommens, A. J. M., Huls, P. G., Woldring, C. L., Verkleij, A. J., Boonstra, J. und Verrips, C. T. (1997). Effects of different carbon fluxes on G₁ phase duration, cyclin expression, and reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 179, 6560–6565.
- Sonnleitner, B. und Käppeli, O. (1986). Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiratory capacity: Formulation and verification of a hypothesis. *Biotechnol. Bioeng.* 28, 927–937.
- Steeb, W.-H. und Kunick, A. (1989). *Chaos in dynamischen Systemen*. BI-Wiss.-Verl.

- Strässle, C. A. (1988). Modell zur Spontansynchronisation von *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation, ETH Zürich.
- Strohmann, R. C. (1997). The coming kuhnian revolution in biology. *Nat. Biotechnol.* 15, 194–200.
- Thompson, P. W. und Wheals, A. E. (1980). Asymmetrical division of *Saccharomyces cerevisiae* in Glucose-limited chemostat culture. *J. Gen. Microbiol.* 121, 401–409.
- Vanoni, M., Vai, M., Popolo, L. und Alberghina, L. (1983). Structural heterogeneity in populations of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 156, 3, 1282–1291.
- Woldringh, C. L., Huls, P. G. und Vischer, N. O. E. (1993). Volume growth of daughter and parent cells during cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae* \mathbf{a}/α as determined by image cytometry. *J. Bacteriol.* 175, 10, 3174–3181.