

Abschlussbericht

**Förderschwerpunkt Biotechnologie: ICBio: Optimierung von Biokatalysatoren im  
Parallelansatz zur Herstellung chiraler Feinchemikalien mit rekombinanten  
*Saccharomyces cerevisiae***

AZ 13124

Hauptteil

Förderbereich II.4.3 Angewandte Umweltforschung:  
Biotechnologische Verfahren und Produkte

01.08.2004 – 31.12.2006

**Projektpartner:**

Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, Technische Universität München (TUM):

Dipl.-Ing. Andreas Kusterer, Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz (Koordinator)

H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim (H+P):

Dr.-Ing. Klaus Kaufmann

Precision Sensing GmbH, Regensburg (PreSens):

Dr. Christian Krause, (Dr. Gernot John), Dr. Damian Andrzejewski

DASGIP AG, Jülich (DASGIP) :

Dr.-Ing. Falk Schneider, Dr.-Ing. Matthias Arnold

Consortium für elektrochemische Industrie GmbH, München (Wacker):

Dr. Günter Wich



# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Abbildungsverzeichnis.....	2
Tabellenverzeichnis:.....	3
1 Zusammenfassung.....	4
2 Anlass und Zielsetzung.....	5
3 Methoden.....	7
3.1 Parallele pH- und pO <sub>2</sub> -Messung.....	7
3.2 Parallele pH-Kontrolle.....	10
3.3 Parallele Drehzahlüberwachung.....	10
3.4 Parallele Trübungsmessung.....	11
3.5 Verfahrensoptimierung zur Herstellung von rekombinanten <i>Saccharomyces cerevisiae</i> für enantioselektive Reduktionen.....	12
3.6 Vergleichende ökonomische und ökologische Bilanzierung.....	17
4 Ergebnisse.....	19
4.1 Parallele pH- und pO <sub>2</sub> -Messung.....	19
4.2 Parallele pH-Kontrolle.....	21
4.3 Parallele Drehzahlüberwachung.....	27
4.4 Parallel Trübungsmessung.....	30
4.5 Verfahrensoptimierung zur Herstellung von rekombinanten <i>Saccharomyces cerevisiae</i> für enantioselektive Reduktionen.....	35
4.6 Vergleichende ökonomische und ökologische Bilanzierung.....	37
5 Soll – Ist Vergleich.....	42
6 Ausblick.....	45
7.1 Projekttreffen mit den Projektpartnern.....	46
7.2 Austausch von Mitarbeitern.....	46
8 Öffentlichkeitsarbeit.....	46

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1: gebrauchsfertig verpackte und sterilisierte Einwegbioreaktoren .....	7
Abbildung 3.2: mL-Einwegbioreaktoren mit am Boden immobilisierten Sensoren.....	8
Abbildung 3.3: Sensorblock mit LEDs und Photodioden zur online Messung von pH und pO <sub>2</sub> ; der Kreis markiert die Position eines Reaktors.....	9
Abbildung 3.4: Reduktion von 4-Cl-ACE zu S-CHBE.....	12
Abbildung 3.5: Schema der Biotransformation mit zellinterner Cofaktor-Regenerierung .....	12
Abbildung 3.6: Ablauf des gesamten Prozesses der Herstellung von S-CHBE.....	14
Abbildung 3.7: experimenteller Aufbau für Parallelkultivierungen .....	16
Abbildung 3.8: experimenteller Aufbau zur parallelen Biotransformation .....	17
Abbildung 4.1: graphische Darstellung eines Teils der Ergebnisse der Charakterisierung der pO <sub>2</sub> -Messung.....	20
Abbildung 4.2: graphische Darstellung eines Teils der Ergebnisse der Charakterisierung der pH-Messung .....	21
Abbildung 4.3: Simulationsumgebung mit simuliertem Fermentationsverlauf bei intermittierender einseitiger pH-Regelung.....	22
Abbildung 4.4: zeitlicher Verlauf des Ist- und Soll-pH sowie der Volumenflüsse Titrationsmittel und der Volumina intermittierenden Zugabe von Säure und Base bei der Kultivierung von Hefen.....	24
Abbildung 4.5: Diagramm der adaptiven nichtlinearen Regelung.....	24
Abbildung 4.6: zeitlicher Verlauf des pH und weiterer wichtiger Prozessparameter .....	25
Abbildung 4.7: Darstellung von online identifizierten Parametern der Regelstrecke.....	26
Abbildung 4.8: Bioreaktorblock mit einer von sechs Hallelement-Messplatten (links).....	27
Abbildung 4.9: Messsignale eines Hallelements: Phasenspannung Induktivantrieb (oben) und korrespondierendes Signal der Hallsonde (unten) .....	28
Abbildung 4.10: Messprinzip der Biomassekonzentrationsbestimmung durch Messung der Lichtstreuung.....	30
Abbildung 4.11: technischer Versuchsaufbau zur optischen Dichtemessung mittels Reflektion .....	31
Abbildung 4.12: Messsignal der Streulichtmessung beider Photodioden .....	32
Abbildung 4.13: Signal der Reflexionsmessung einer Zellsuspension mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	33
Abbildung 4.14: Signal der Reflexionsmessung einer Zellsuspension mit <i>E. coli</i> .....	34
Abbildung 4.15: Vergleich der Reflexionsmessung von Zellsuspensionen mit <i>E. coli</i> und <i>S. cerevisiae</i> .....	34

Abbildung 4.16: externe Population der sieben erzeugten Generationen .....	36
Abbildung 4.17: Prozessschema der bilanzierten Prozesse .....	38

## **Tabellenverzeichnis:**

Tabelle 3.1: CSL-Medium zur Charakterisierung der pH- und pO <sub>2</sub> -Messung.....	9
Tabelle 3.2: variable Parameter der Bioprozessoptimierung .....	15
Tabelle 3.3: Parametrisierung des genetischen Algorithmus GAME.opt .....	15
Tabelle 4.1: Vergleich des Optimierungsergebnisses im mL- und Litermaßstab .....	37
Tabelle 4.2: Basisdaten der bilanzierten Prozesse .....	39
Tabelle 4.3: Aufstellung der bilanzierten Reingewinne der drei betrachteten Prozesse .....	40
Tabelle 4.4: variable und fixe kosten der drei betrachteten Prozesse .....	40
Tabelle 4.5: Zusammenfassung der ökologischen Bilanzierung.....	41

# 1 Zusammenfassung

Zur Gewinnung chiraler Bausteine werden heute überwiegend chemisch katalysierte Reduktionen eingesetzt. Die technische Durchführung erfolgt in der Regel unter extremen, energieintensiven Reaktionsbedingungen, Einsatz giftiger und Umwelt belastender Schwermetallkatalysatoren und Verwendung großer Mengen organischer Lösungsmittel. Auf der anderen Seite zeigen einige Prozessbeispiele, dass die Biokatalyse unter ökonomischen Gesichtspunkten mit der chemischen asymmetrischen Synthese durchaus konkurrieren und dabei ökologische Vorteile aufweisen kann. Zielsetzung dieses Forschungs- und Entwicklungsvorhabens war die Entwicklung eines effektiven Produktionsverfahrens zur Herstellung von rekombinanten Bäckerhefen für enantioselektive Reduktionen am Beispiel der asymmetrischen Reduktion von 4-Cl-Acetessigsäureethylester (4Cl-ACE) zu (S)-4-Cl-3-Hydroxy-Buttersäureethylester (S-CHBE). Da zur Optimierung der Herstellung dieses Biokatalysators zahlreiche Experimente im pH-kontrollierten Rührkesselreaktor erforderlich waren, wurde zunächst für einen Bioreaktorblock mit 48 Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab eine parallele pH-Messung und eine parallele Drehzahlüberwachung entwickelt. Die dazugehörige parallele pH-Kontrolle wurde implementiert und validiert. Das Grundprinzip für eine einfach integrierbare parallele Trübungsmessung wurde gezeigt. Diese weiterentwickelte neue Paralleltechnik wurde zur parallelen Optimierung von rekombinanten Hefezellen für Bioreduktionen genutzt. Hierzu wurde der Laborprozess zur Herstellung der Biokatalysatoren in den 10 Milliliter-Maßstab übertragen. Auch die Biokatalyse wurde miniaturisiert, parallelisiert und automatisiert. Die parallele Optimierung der Biokatalysator-Herstellung für asymmetrische Synthesen ist im pH-kontrollierten Satzverfahren im 10 Milliliter-Maßstab mit Hilfe einer neuartigen stochastischen Suchstrategie erfolgt. Hierbei konnten mit 7 Parallelexperimenten die Biotrockenmassekonzentration von  $20 \text{ g L}^{-1}$  auf über  $35 \text{ g L}^{-1}$  und die S-CHBE-Konzentration von  $90 \text{ mM}$  auf  $125 \text{ mM}$  gesteigert werden. Allerdings zeigte sich auch, dass kein Reaktionsmedium gefunden werden konnte, bei dem alle 3 Zielgrößen gleichzeitig maximiert waren. Ein hoher S-Enantiomerenüberschuß von über 99 % war nur bei niedrigen Produktkonzentrationen von unter  $20 \text{ mM}$  S-CHBE möglich. Nachfolgend konnte eine ausgewählte enantioselektive Reduktion von 4Cl-ACE zu S-CHBE mit optimal hergestellten rek. *Saccharomyces cerevisiae* exemplarisch in den 23 Liter Maßstab übertragen werden. Eine ökonomische und ökologische Bilanzierung dieses Verfahrens zur Biohydrierung im Vergleich zu anderen Biohydrierungsverfahren ist erfolgt.

## 2 Anlass und Zielsetzung

Zur Gewinnung chiraler Bausteine werden heute überwiegend chemisch katalysierte Reduktionen eingesetzt. Die technische Durchführung erfolgt in der Regel unter energieintensiven Reaktionsbedingungen, Einsatz giftiger und umweltbelastender Schwermetallkatalysatoren und Verwendung großer Mengen organischer Lösungsmittel. Beispielhaft sei hier die chemisch katalysierte enantioselektive Reduktion von 4-Cl-Acetessigsäureethylester (4Cl-ACE) zu (S)-4-Cl-3-Hydroxy-Buttersäure-ethylester (S-CHBE) genannt. S-CHBE wird industriell beispielsweise zur Synthese von Cholesterinsenkern eingesetzt. Als Maß für die Bedeutung dieses chiralen Alkohols kann der Umsatz von Atorvastatin (Lipitor<sup>®</sup>, Pfizer) betrachtet werden, der 2003 über 9,4 Mrd. US\$ betrug. Das Marktvolumen von S-CHBE wird zur Zeit auf mehrere 100 jato geschätzt. Die chemisch katalysierte Reduktion von 4Cl-ACE zu S-CHBE erfolgt industriell bei einem Druck von 100 bar und einer Temperatur von 95 °C unter Verwendung von Rutheniumkatalysatoren im Lösungsmittelgemisch Ethanol-Dichlorethan. Die Kosten für den Schwermetallkatalysator belaufen sich auf rund 40000 US\$/kg. Die Bedeutung der asymmetrischen Synthese wird durch folgende Zahlen belegt: Nach einer Studie von Frost&Sullivan ist die Chiraltechnologie der „leuchtende Stern am Firmament des Europamarktes für pharmazeutische Zwischenprodukte“. Der Markt im Bereich Chiralchemie zeigte in den vergangenen Jahren bereits überdurchschnittliche Zuwachsraten verglichen mit dem gesamten Chemiemarkt. Das Umsatzvolumen im Gesamtmarkt für Chiraltechnologie soll weltweit von rund 7,7 Mrd. US\$ (2003) auf fast 15 Mrd. US\$ im Jahr 2009 wachsen.

Die chemische asymmetrische Synthese (mit all ihren ökologischen Nachteilen) ist nicht zuletzt aufgrund massiver Investitionen von Forschungsinstitutionen und Industrie im letzten Jahrzehnt heute dominierend. Auf der anderen Seite zeigen einige Prozessbeispiele, dass die Biokatalyse unter ökonomischen Gesichtspunkten mit der chemischen asymmetrischen Synthese konkurrieren und dabei ökologische Vorteile aufweisen kann. Besonders das Potential der Bäckerhefe zur stereoselektiven Reduktion vieler (strukturell einfacher) prochiraler Ketone ist auch im präparativen Maßstab gut dokumentiert. Den Vorteilen von Hefereduktionen stehen jedoch auch eine ganze Reihe von Nachteilen gegenüber: niedrige zellspezifische Produktivität, geringe Ausbeuten und oftmals nicht ausreichende Enantioselektivitäten. Zur effektiveren Durchführung von Hefereduktionen wurde daher vor Projektbeginn ein rekombinanter Hefestamm entwickelt (Coexpression einer

Carbonylreduktase und eines Cofaktor-Regenerierungsenzyms). Im Vergleich zu Wildtyp-Zellen konnten damit Biotransformationsgeschwindigkeiten und Ausbeuten effektiv gesteigert werden (eigene Vorarbeiten). Allerdings zeigte sich, dass die erzielbaren Enantioselektivitäten sehr von den Kultivierungsbedingungen bei der Herstellung des Biokatalysators abhängen: Beispielsweise wurden mit Zellen aus Schüttelkolben hohe Enantioselektivitäten ( $ee > 98\%$ ) erzielt, mit Zellen aus dem Rührkesselreaktor (Standard Hochzelldichte-Verfahren) dagegen sehr viel niedrigere Enantioselektivitäten.

Zielsetzung dieses Forschungs- und Entwicklungsvorhabens war daher die Entwicklung eines effektiven Produktionsverfahrens zur Herstellung von rekombinanten Bäckerhefen für enantioselektive Reduktionen. Da hierfür zahlreiche Experimente im pH-kontrollierten Rührkesselreaktor erforderlich waren, wurde eine neue Paralleltechnik weiterentwickelt und eingesetzt, die es erlaubt, bis zu 48 pH-kontrollierte Experimente im Satzverfahren in parallelen Rührkesselreaktoren automatisiert durchführen zu können.

Im methodischen Teil wurden im Einzelnen für einen Bioreaktorblock mit 48 Rührkesselreaktoren parallele pH-Kontrolle, parallele Drehzahlüberwachung und eine Trübungsmessung entwickelt. Diese weiterentwickelte neue Paralleltechnik wurde nachfolgend zur parallelen Optimierung von rekombinanten Hefezellen für Bioreduktionen genutzt, indem der Laborprozess in den 10 mL-Maßstab übertragen wurde (down-scaling), eine parallele Optimierung der Biokatalysator-Herstellung im pH-kontrollierten Satzverfahren im 10 mL-Maßstab erfolgte und nachfolgend die enantioselektive Reduktion von 4Cl-ACE zu S-CHBE mit optimal hergestellten rek. *Saccharomyces cerevisiae* im Liter-Maßstab realisiert wurde.

Die asymmetrische Synthese mit optimal hergestellten rek. *Saccharomyces cerevisiae* wurde außerdem ökonomisch und ökologisch bilanziert und mit anderen Verfahren zur Biohydrierung von 4Cl-ACE verglichen.



## 3 Methoden

### 3.1 Parallele pH- und pO<sub>2</sub>-Messung

Die im parallelen Bioreaktorblock verwendete Sensorik zur Messung von pH und pO<sub>2</sub> in den Reaktoren wurde im Rahmen eines früheren Projekts „Entwicklung neuartiger Parallelverfahren zur effektiven Etablierung biokatalytischer Prozesse dargestellt am Beispiel der NAD(H)-Gewinnung für Biotransformationen“ (AZ 13065) entwickelt.

Mittlerweile sind Messeinheiten für alle 48 Reaktoren des Parallelbioreaktors verfügbar. Ebenso werden die dazu gehörigen Reaktoren mit am Boden immobilisierten Sensoren in Kleinserien hergestellt und werden gebrauchsfertig sterilisiert geliefert.

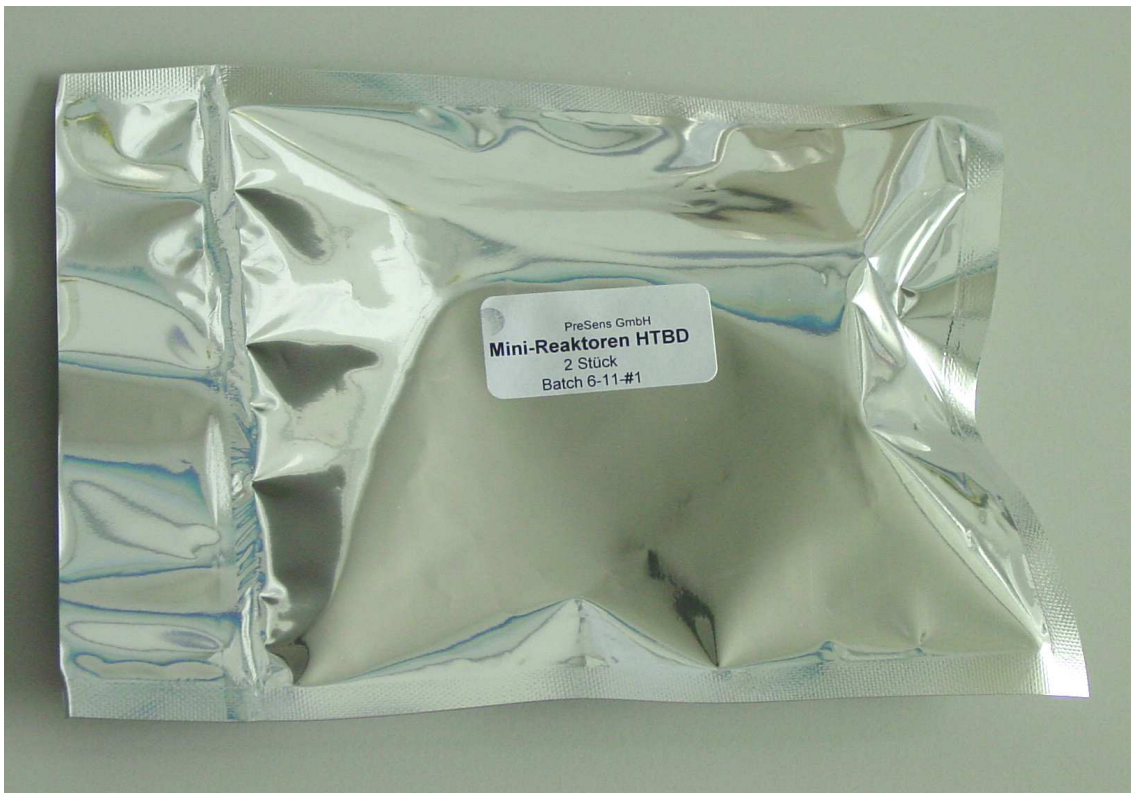


Abbildung 3.1: gebrauchsfertig verpackte und sterilisierte Einwegbioreaktoren



**Abbildung 3.2: mL-Einwegbioreaktoren mit am Boden immobilisierten Sensoren**

## **Sensorik**

Zur parallelen Messung von pH und  $pO_2$  werden die von PreSens entwickelten Sensoreinheiten verwendet. Diese bedienen jeweils acht der  $6 \times 8$  Reaktoren des Bioreaktorblocks. Für jeden Reaktorplatz ist eine LED mit spezifischem Filter zur Anregung der immobilisierten Sensoren im Reaktorinneren und eine Photodiode zur Auslesung der Sensorantwort vorhanden. Die sechs Sensoreinheiten des Bioreaktorblocks werden gleichzeitig parallel angesprochen wobei alternierend erst alle pH- und anschließend alle  $pO_2$ -Sensoren sequentiell angesprochen werden.



**Abbildung 3.3: Sensorblock mit LEDs und Photodioden zur online Messung von pH und pO<sub>2</sub>; der Kreis markiert die Position eines von 8 Reaktoren**

## Medien

Zur Charakterisierung der pH- und pO<sub>2</sub>-Sensoren wurde folgendes organisch-komplexe CSL-Medium verwendet:

**Tabelle 3.1: CSL-Medium zur Charakterisierung der pH- und pO<sub>2</sub>-Messung**

Medienbestandteil	Konzentration
Pepton	20 g L <sup>-1</sup>
Hefeextrakt	10 g L <sup>-1</sup>
Maisquellwasser	20 mL L <sup>-1</sup>

Als definiertes mineralisches Medium wurde ein Phosphatpuffer mit einer Konzentration von 150 mmol L<sup>-1</sup> verwendet.

## Messmethodik

Der Bioreaktorblock wurde mit 48 zufällig ausgewählten Reaktoren bestückt, das jeweilige Medium eingefüllt, auf 30°C temperiert und die Messung gestartet.

Zur Charakterisierung der pH-Messung wurden sechs verschiedene pH eingestellt und in allen Reaktoren nach Erreichen eines stationären Zustands vermessen. Die Messwerte wurden mit

den bekannten pH über eine die physikalischen Zusammenhänge beschreibende Stern-Volmer-Gleichung in Beziehung gebracht:

$$Phase = \frac{\phi_{\min} - \phi_{\max}}{1 + e^{\left(\frac{pH - pH_0}{\Delta pH}\right)}} + \phi_{\max}$$

Diese Parameter definieren die jeweilige Kalibrierung.

Die Anpassung der einzelnen Parameter der Gleichung erfolgte mit Hilfe der Solver-Funktion in Microsoft Excel.

Zur pO<sub>2</sub>-Messung wurden die jeweiligen Flüssigkeiten zusätzlich mit Cobaltsulfat bis zu einer Zielkonzentration von 1 mmol L<sup>-1</sup> versehen und bei einer Rührerdrehzahl von 2800 rpm mit Luft begast. Nach Erreichen eines stationären Zustands der maximalen Sauerstoffsättigung von 100% wurde eine ausreichende Menge an Natriumsulfit zugesetzt um sämtlichen bereits gelösten und weiterhin zugeführten Sauerstoff zu verbrauchen und zuverlässig einen Sauerstoffsättigung von 0% zu erreichen. Die Signale der beiden extremen Zustände legen dann eine Kalibriergerade fest.

### **3.2 Parallele pH-Kontrolle**

Eine effektive Kultivierung von Mikroorganismen ist nur mit einer funktionierenden pH-Regelung möglich. Da die pH-Messung im Bereich von 5,5 – 8 zuverlässige Werte liefert, sollte eine individuelle pH-Regelung implementiert werden. Zunächst wurde das für einen einseitigen Regler mit Base und später für einen zweiseitigen mit Säure und Base bewerkstelligt. Die Regelung erfolgt über einen modifizierten PI-Regler, der die technischen Begebenheiten wie z.B. die intermittierende Zugabe von Titrationsmittel berücksichtigt.

### **3.3 Parallele Drehzahlüberwachung**

Im parallelen Bioreaktorblock erfolgt die Kraftübertragung vom Antrieb auf die Rührer magnetisch-induktiv. Das bedeutet, dass auf Grund der nicht vorhandenen starren mechanischen Kopplung der Ausfall eines Rührorgans möglich ist. Das muss zur Aufrechterhaltung eines optimalen Betriebs des Reaktors zuverlässig detektiert werden um entsprechende Maßnahmen zur Behebung einer solchen Störung einleiten zu können.

Die magnetisch-induktiven Vielfach-Rührantriebe generieren in den einzelnen Gefäßen am Ort der Rührorgane magnetische Drehfelder, deren Ausrichtung das mit Dauermagneten

bestückte Rührorgan nachfolgt. Aus dem Stand heraus kann das Rührorgan entsprechend seinem Massenträgheitsmoment und dem aufgebracht, begrenzten Drehmoment nur bei niedrigen Drehzahlen synchronisieren bzw. anlaufen (Startdrehzahlen beim Bioreaktorblock bis ca. 1500 rpm). Die Drehzahl wird danach in einer Beschleunigungsphase kontinuierlich bis zur vorgegebenen Solldrehzahl erhöht, wobei der Schlupf zwischen dem Rührorgan und dem Erregerfeld ansteigt. An der Leistungsgrenze angelangt, sinkt durch zu großen Schlupf das aufgebrachte Drehmoment ab und das Rührorgan bleibt stehen.

Die turbulenten Strömungsverhältnisse am Rührorgan stellen eine stark schwankende Last dar. Ein sicherer Langzeitbetrieb für alle 48 Rührorgane, wie er im vorliegenden Fall unabdingbar ist, kann daher bisher nur für einen mittleren Drehzahlbereich (bis ca. 2500 rpm) gewährleistet werden. Zusätzlich kann sich die Viskosität der Rührmedien während eines laufenden Prozesses erhöhen und dadurch ebenfalls zum Stillstand der Rührorgane führen. Der Ausfall eines oder mehrerer Rührorgane konnte bisher nicht detektiert werden. Auf der anderen Seite liegt die Leistungsgrenze des Antriebssystems mit ca. 4000 rpm weit oberhalb des aus obigen Gründen bisher nur nutzbaren Bereiches.

H+P hatte die Aufgabe, eine parallele Drehzahlüberwachung aller 48 Rührorgane zu entwickeln. Damit kann – im Falle eines Stillstandes eines der Rührorgane – automatisch ein Neustart durchgeführt werden.

### **3.4 Parallele Trübungsmessung**

Neben der bereits entwickelten und gut etablierten Sensorik zur online Messung von pH und  $pO_2$  ist auch eine Technik zur Bestimmung der Zelldichte in den Reaktoren wünschenswert. Der dabei verfolgte Ansatz versucht die in der pH- und  $pO_2$ -Messeinheit bereits vorhandene Optik und Elektronik zur Auswertung zu nutzen.

### **Relevanz der Biomassebestimmung**

Neben den bei allen Kultivierungen gewonnenen Daten über den pH und  $pO_2$  im Inneren eines Reaktors ist die Kenntnis von der Konzentration der Biomasse ein weiteres wichtiges Instrument zur Beurteilung eines Prozesses. So kann sie ein Werkzeug zur Beurteilung des Verlaufs zu Beginn einer Kultivierung sein. Allerdings kann die Messung der optischen Dichte oder einer vergleichbaren Größe die Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration mit Hilfe von Proben aus dem Reaktor nicht ersetzen.

## Optische Messung der Biomasse

Biomassebestimmungen erfolgen in aller Regel über die Bestimmung der optischen Dichte. Diese wird als zerstörungsfreie Standard online-Methode von versch. Herstellern angeboten (z.B: Mettler,...) bzw. durch Messung einer gewonnenen Probe in einem Photometer etabliert.

Nahezu alle herkömmlichen Ansätze benutzen dabei die Messung der Absorption von Licht. Eine Alternative ist die Messung des reflektierten Lichts (Samorski M., Müller-Newen G., Büchs J (2005) *Biotechnol Bioeng* 92(1): 61-68) Diese Methode ist vor allem bei der Verwendung von Einweg-Reaktoren sowie in sehr kleinen Reaktoren zu bevorzugen, da keine zusätzlichen Sensoren eingebracht werden müssen.

### 3.5 Verfahrensoptimierung zur Herstellung von rekombinanten *Saccharomyces cerevisiae* für enantioselektive Reduktionen

Das Ziel der vorliegenden Arbeiten war die Durchführung einer Prozessoptimierung zur Herstellung von rekombinanten Hefezellen als Ganzzellbiokatalysator zur stereoselektiven Reduktion eines prochiralen Ketons zu seinem S-Enantiomeren reinen Alkohol.

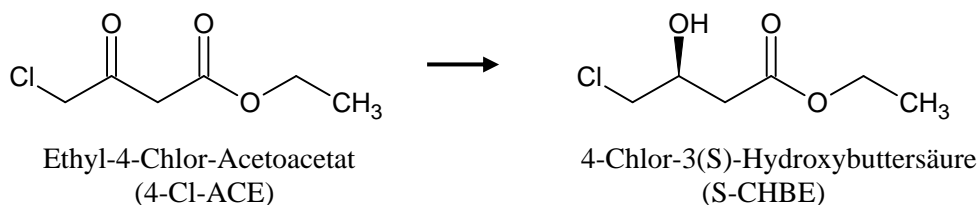


Abbildung 3.4: Reduktion von 4-Cl-ACE zu S-CHBE

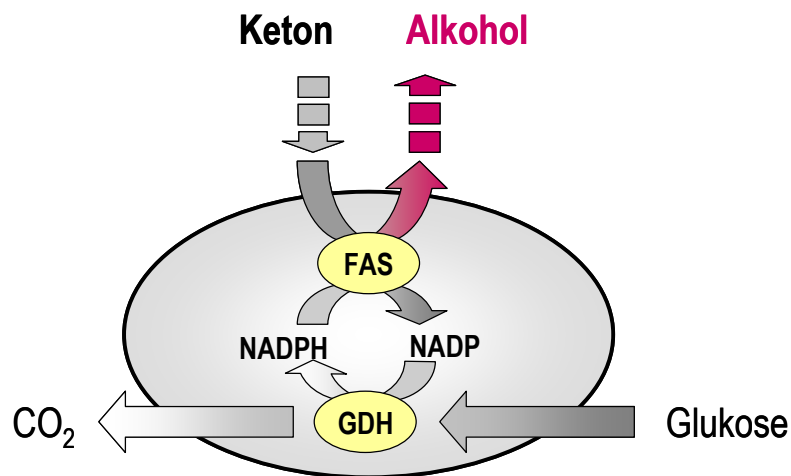
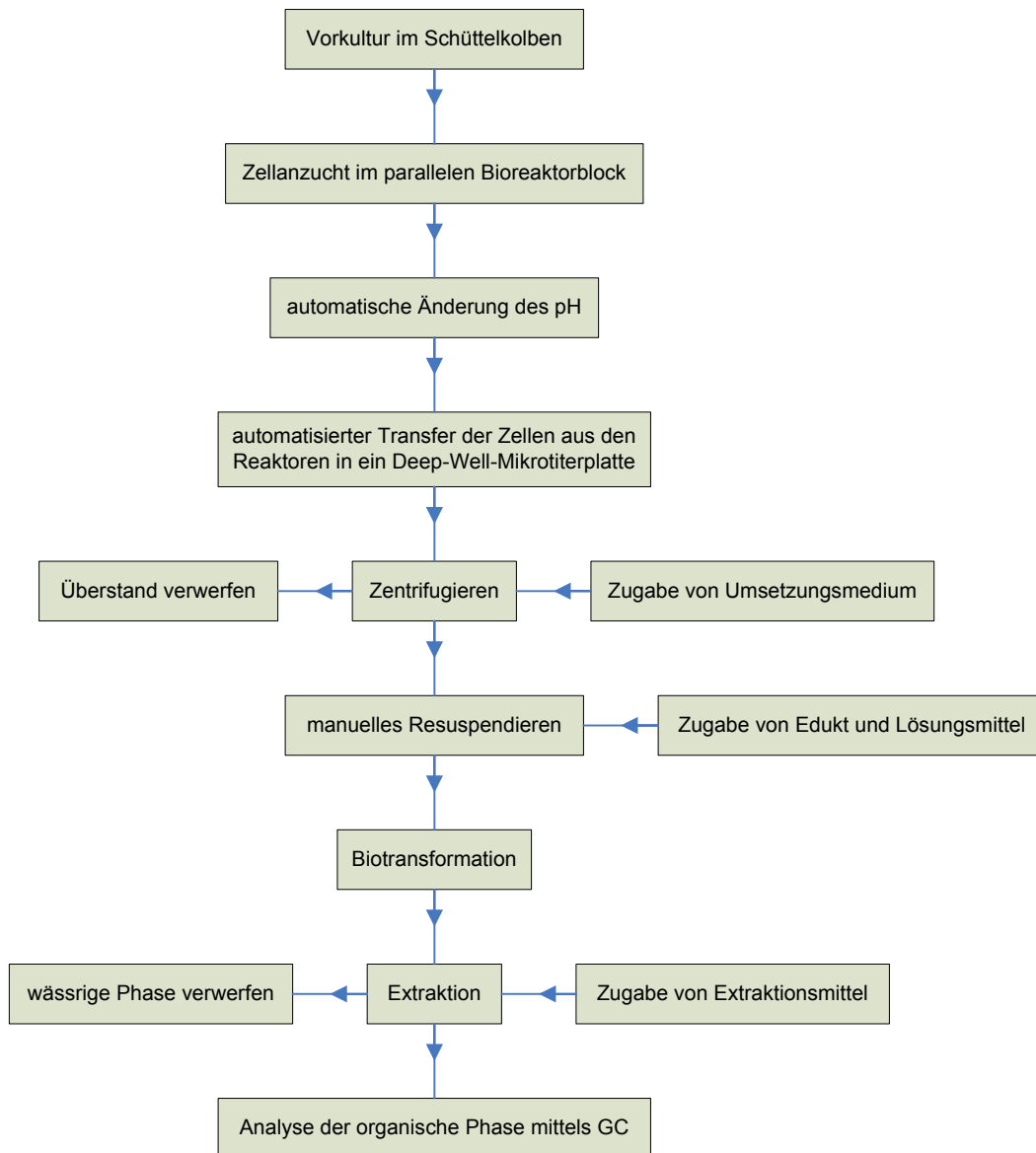


Abbildung 3.5: Schema der Biotransformation mit zellinterner Cofaktor-Regenerierung

Der Vorgang der eigentlichen Biotransformation wurde in früheren Arbeiten bereits ausführlich untersucht (Engelking H, Pfaller R, Wich G, Weuster-Botz D (2006): Reaction engineering studies on  $\beta$ -ketoester reductions with whole cells of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Enz Microb Technol* **38**: 536-544) und wird nur in einem Standardverfahren verwendet. Die Optimierung umfasst ausschließlich den Prozess der Biokatalysatorherstellung.

Der rekombinante Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 wird in einem Satzverfahren mit zweiseitiger pH-Kontrolle angezogen. Die variablen Parameter der Optimierung umfassen neben den Medienkomponenten auch den pH während des Zellwachstums und den pH zur Konditionierung der Zellen für die spätere Biotransformation.

Der gesamte Prozess der Biokatalysatoranzucht und Biotransformation folgt einem festen Schema:



**Abbildung 3.6: Ablauf des gesamten Prozesses der Herstellung von S-CHBE**

Die Optimierung erfolgt in einem iterativen Verfahren mit Hilfe einer stochastischen Suchstrategie (Genetischer Algorithmus), der speziell zur experimentellen Versuchsplanung entwickelt wurde. Das dazu verwendete Softwarewerkzeug GAME.opt integriert sämtliche Schritte von der Erzeugung der ersten Generation über die Auswertung der Ergebnisse bis hin zur Erzeugung der nachfolgenden Generation (Link H, Weuster-Botz D (2006): Genetic algorithm for multi-objective experimental optimization. *Bioprocess Biosyst Eng* **29**: 385-390).

Die der Optimierung zugänglichen Parameter betreffen das Medium und die jeweiligen Sollwerte der pH-Regelung:



**Tabelle 3.2: variable Parameter der Bioprozessoptimierung**

Komponente / Parameter	min.	max.	Einheit	Niveaus
Pepton aus Casein (Carl Roth GmbH)	0	50	g L <sup>-1</sup>	32
Hefeextrakt (Deutsche Hefewerke GmbH)	0	50	g L <sup>-1</sup>	32
Corn Steep Powder (Solulys 095 E, Roquette GmbH)	0	50	g L <sup>-1</sup>	32
Phosphat	0	30	g L <sup>-1</sup>	32
Magnesium	0	2	g L <sup>-1</sup>	16
Kalium	0	2	g L <sup>-1</sup>	16
pH Anzucht	5,5	7,5	-	8
pH Konditionierung	5,5	7,5	-	8

Die absoluten Mengen an Phosphat, Magnesium und Kalium wurden in entsprechende Mengen der Salze  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  umgerechnet. Bei Ansätzen ohne Phosphat wurde das  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  durch  $\text{K}_2\text{SO}_4$  ersetzt.

Die 3 gleichzeitig verfolgten Zielgrößen der Optimierung waren (1) maximale Biomassekonzentration bei der Zellanzucht, (2) maximaler Enantiomerenüberschuss an S-CHBE und (3) maximale Produktkonzentration bei der nachfolgenden Biotransformation.

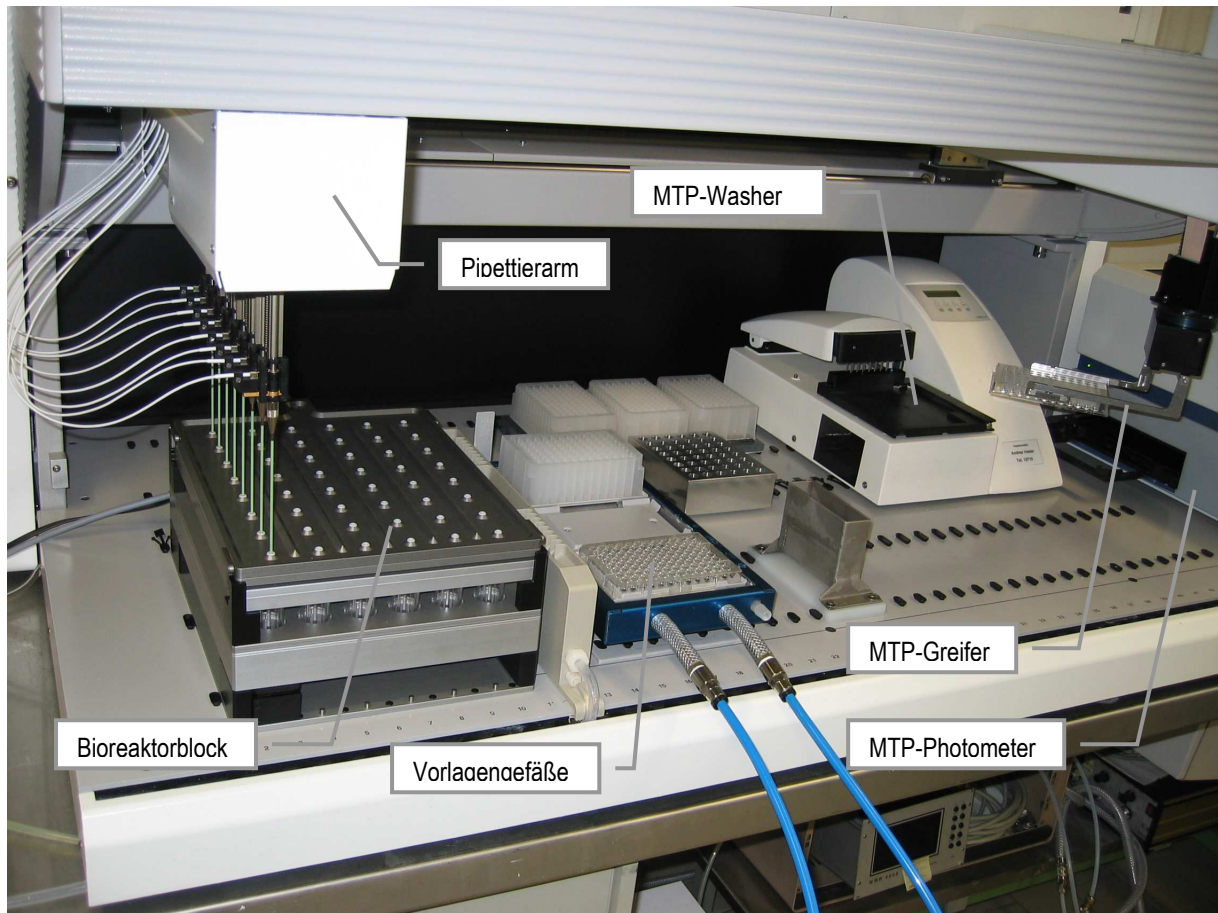
Der genetische Algorithmus benötigt neben der Angabe der zu variierenden Variablen und deren Niveaus weitere Angaben:

**Tabelle 3.3: Parametrisierung des genetischen Algorithmus GAME.opt**

Parameter	Wert
Mutationsrate	3
Crossover	2
max. Größe der externen Population	8
min. Größe nach Clusterbildung	8

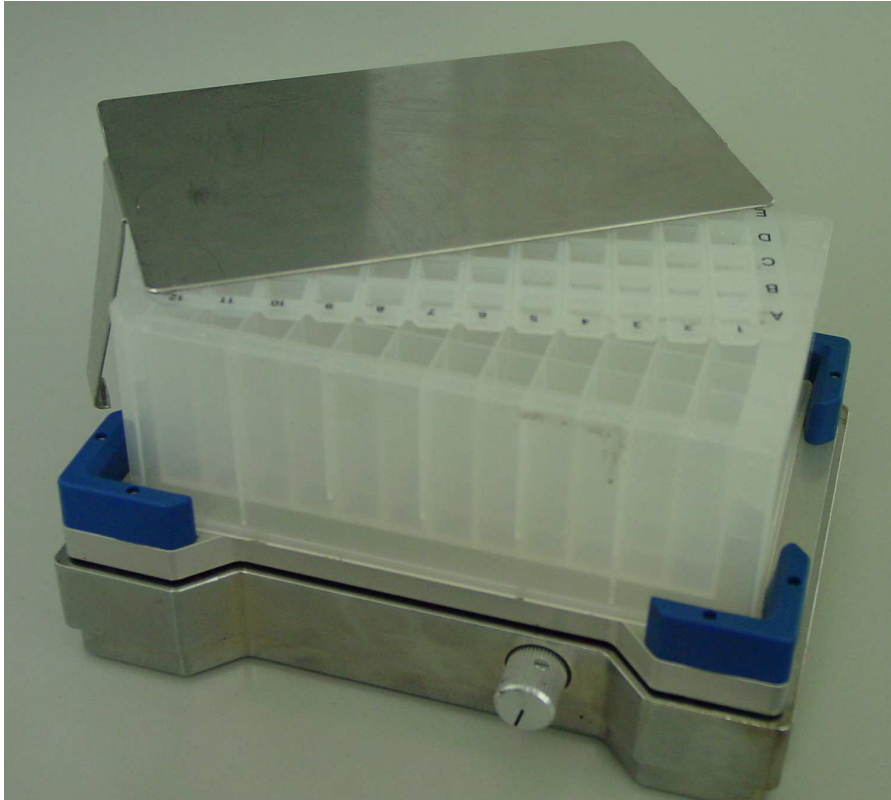
Je Generation wurden 15 verschiedene Medien sowie ein Standardmedium im dreifachen Ansatz bei einem Anfangsvolumen von 12 mL verwendet. Die Gesamtdauer der

Biokatalysatoranzucht beträgt 44 Stunden wobei die letzten 24 Stunden zur weiteren Konditionierung der Biokatalysatoren ohne Substratzugabe dienen.



**Abbildung 3.7: experimenteller Aufbau für Parallelkultivierungen**

Die parallelen Biotransformationen wurden in einer Deep-Well-Mikrotiterplatte durchgeführt. Zur Durchmischung diente ein MTP-Schüttler, ein all zu großer Verlust an eingesetztem Lösungsmittel verhinderte eine Kunststoffmembran die durch einen Edelstahldeckel fixiert wird.



**Abbildung 3.8: experimenteller Aufbau zur parallelen Biotransformation**

Alles zusammen benötigte ein Parallelansatz (Generation) damit fünf Tage für Biokatalysatoranzucht mit anschließender Biotransformation.

Die Validierung der Optimierung und die Maßstabsvergrößerung erfolgte in einem 42 L Rührkesselbioreaktor Techfors der Firma Infors. Alle relevanten Größen wurden 1:1 auf das Arbeitsvolumen von 23 L skaliert.

### **3.6 Vergleichende ökonomische und ökologische Bilanzierung**

Neue biotechnologische Prozesse stehen natürlicherweise in direkter Konkurrenz zu bestehenden biologischen und kombinatorisch chemischen Verfahren. Daher ist eine ökonomische und ökologische Bilanzierung zur Einordnung der Verfahren erstrebenswert. Nur dadurch können Faktoren wie die Wirtschaftlichkeit objektiv eingeschätzt werden.

Im vorliegenden Fall soll die biokatalysierte Reduktion von 4Cl-ACE zu S-CHBE untersucht werden. Da zu den klassischen chemisch durchgeführten Prozessen keine Daten verfügbar sind, konnte nur ein Vergleich zu biotechnologischen Verfahren durchgeführt werden.

Der äußerst komplexe Vorgang der ökonomischen und ökologischen Bilanzierung wurde mit Hilfe der von der Firma ifu Hamburg GmbH vertriebenen Software „Sabento“ ermöglicht. Dieses Werkzeug erfasst alle beteiligten Stoffe, Prozessschritte sowie Stoff- und Energieströme. Dabei werden auch die Einflüsse von Stoffeigenschaften auf z.B. den Energiebedarf und die Auswirkungen auf die Umwelt mit einbezogen.

Die ökonomische Bilanzierung wurde für einen Produktionszeitraum von 10 Jahren bei einer jährlichen Menge von 50 t des Produkts S-CHBE durchgeführt. Dabei wurde auch die Anschaffung neuer Reaktoren für die jeweiligen Prozesse berücksichtigt.

Die ökologische Bilanzierung liefert als Endergebnis einen Satz Kennzahlen, die sog. Umweltbewertungszahlen (UBZ). Diese werden aus den einzelnen unterschiedlich gewichteten Wirkungskategorien der Eingangs- und Ausgangsseite berechnet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Parallele pH- und pO<sub>2</sub>-Messung

Die Charakterisierung der pH- und pO<sub>2</sub>-Messung lieferte wertvolle Daten über das System für den praktischen Einsatz. So zeigte sich, dass die herstellerseitig mitgelieferten Kalibrierdaten einer gefertigten Charge Reaktoren nicht allein ausreichend sind für eine zuverlässige pH- und pO<sub>2</sub>-Messung.

Es genügt jedoch, basierend auf den mitgelieferten Daten einer Lieferung an Einwegreaktoren, eine individuelle Anpassung in der DASGIP Software FedBatch XP durchzuführen. Dabei wird eine 1-Punkt Kalibrierung des pH bzw. pO<sub>2</sub> durchgeführt. Für den pH ist dabei der anfängliche, extern gemessene Wert des Mediums maßgeblich, für den pO<sub>2</sub> wird eine Korrektur des Werts für 100 % Luftsättigung durchgeführt.

In der Praxis funktionierte die Optosensorik zur online Messung des pH und pO<sub>2</sub> in verschiedenen Kultivierungen sehr zufrieden stellend. Die typischen Abweichungen des pH liegen im Bereich von bis zu 0,2 pH-Einheiten sowie 5-10 % Luftsättigung für den pO<sub>2</sub>.

Damit konnte die Implementierung einer pH-Regelung der Reaktoren basierend auf der online Messung durchgeführt werden.

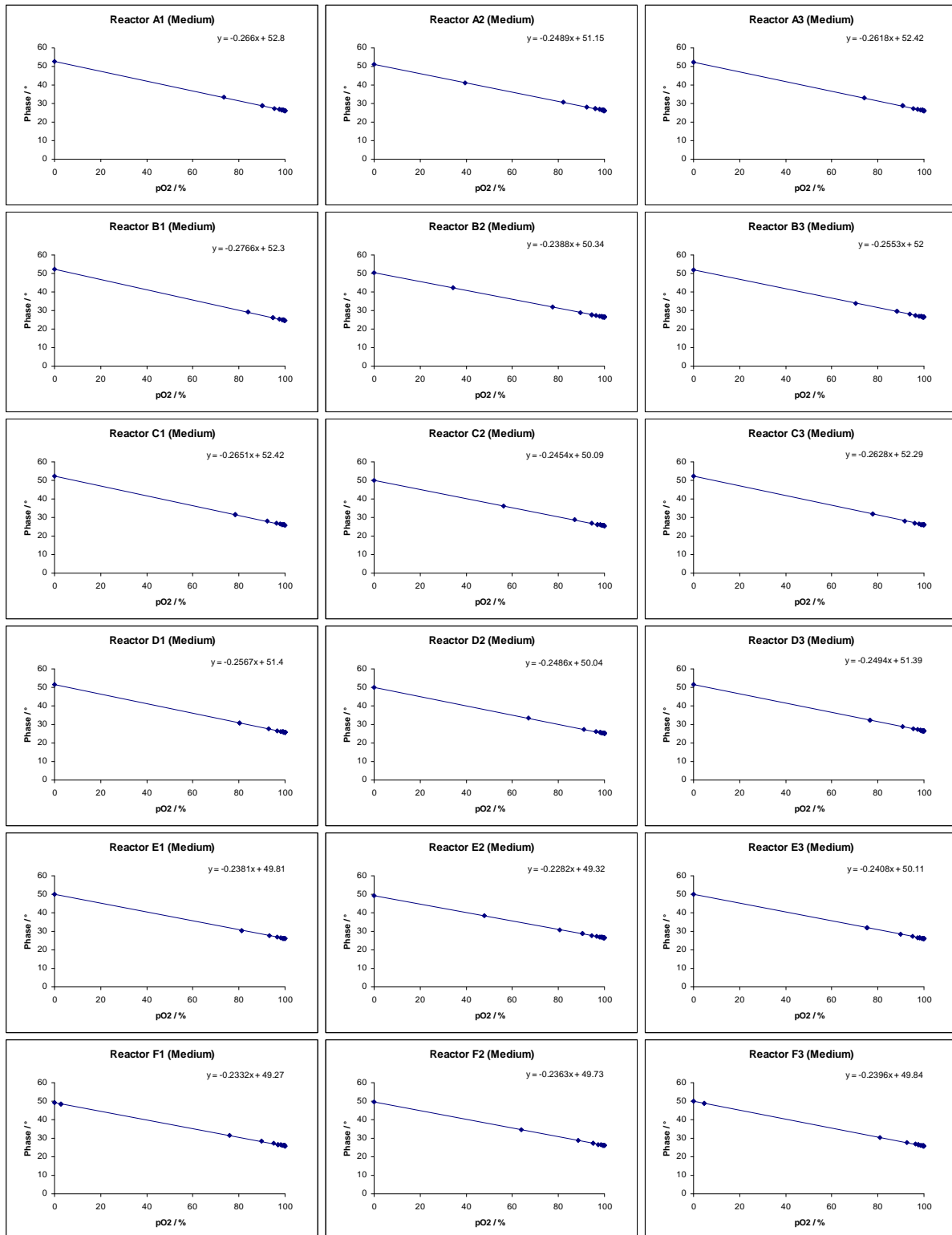


Abbildung 4.1: graphische Darstellung eines Teils der Ergebnisse der Charakterisierung der pO<sub>2</sub>-Messung

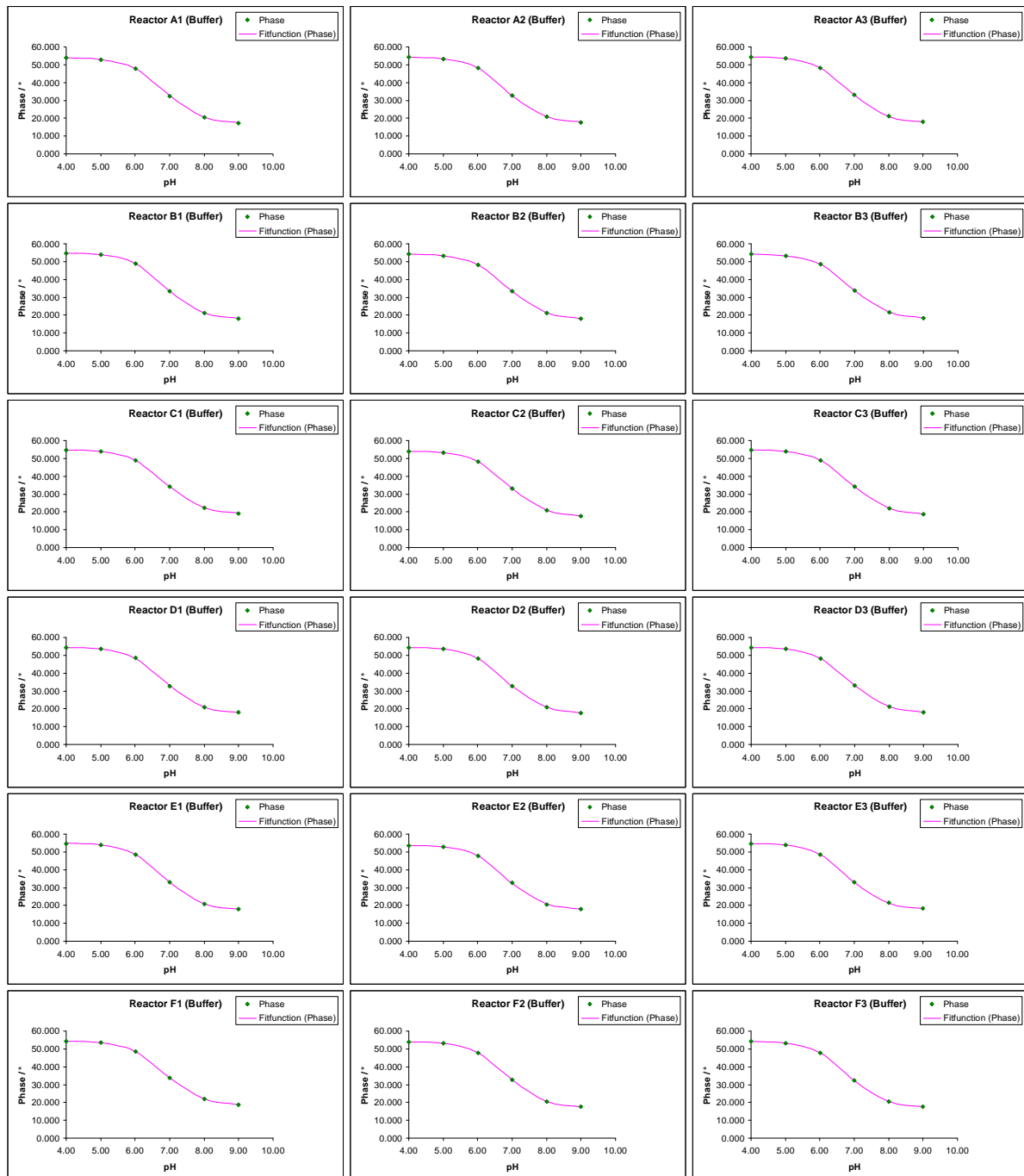


Abbildung 4.2: graphische Darstellung eines Teils der Ergebnisse der Charakterisierung der pH-Messung

## 4.2 Parallele pH-Kontrolle

### Ausgangslage

In der ersten Projektphase wurde ein nichtlineares Simulationsmodell erstellt, welches den Fermentationsprozess, die nichtlinearen Puffereigenschaften und das spezielle Verhalten der intermittierenden Dosiersteuerungen für Lauge und Säure über einen Pipettierroboter abbildet.

Mit Hilfe des Simulationsmodells konnte experimentell gezeigt werden, dass die den Prozess bestimmenden Nichtlinearitäten verbunden mit den Anforderungen der nichtdeterministischen Stellgliedeigenschaften keine mathematische Beschreibung zulassen, die den Zugang zu bekannten prädiktiven, modellbasierten Reglerentwurfsmethoden zulassen.

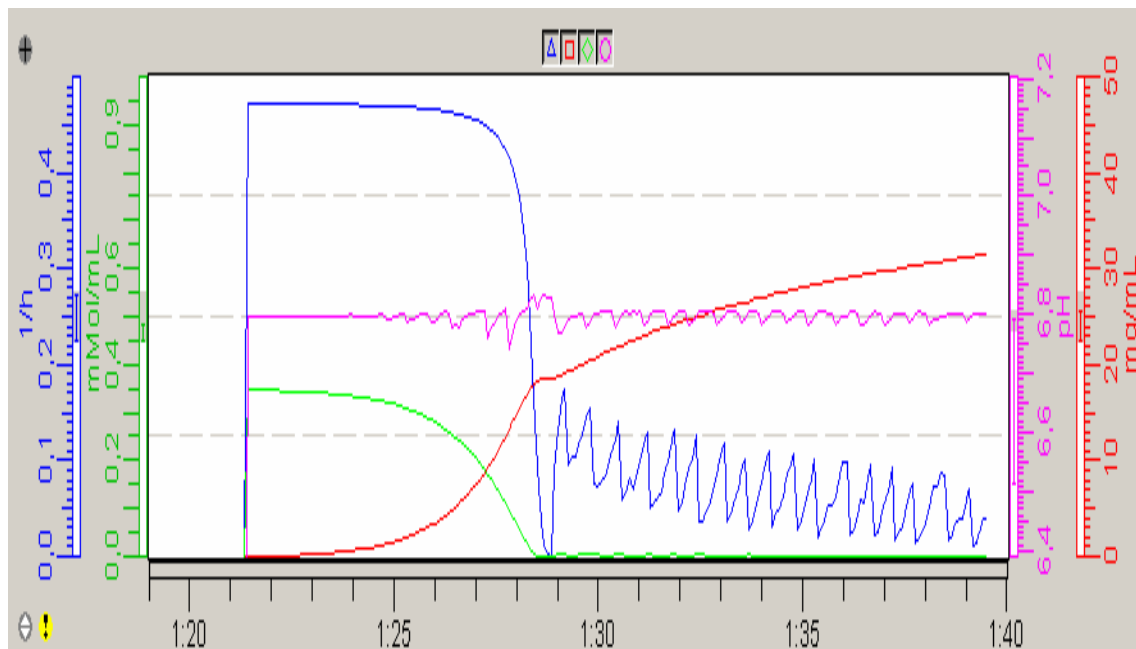
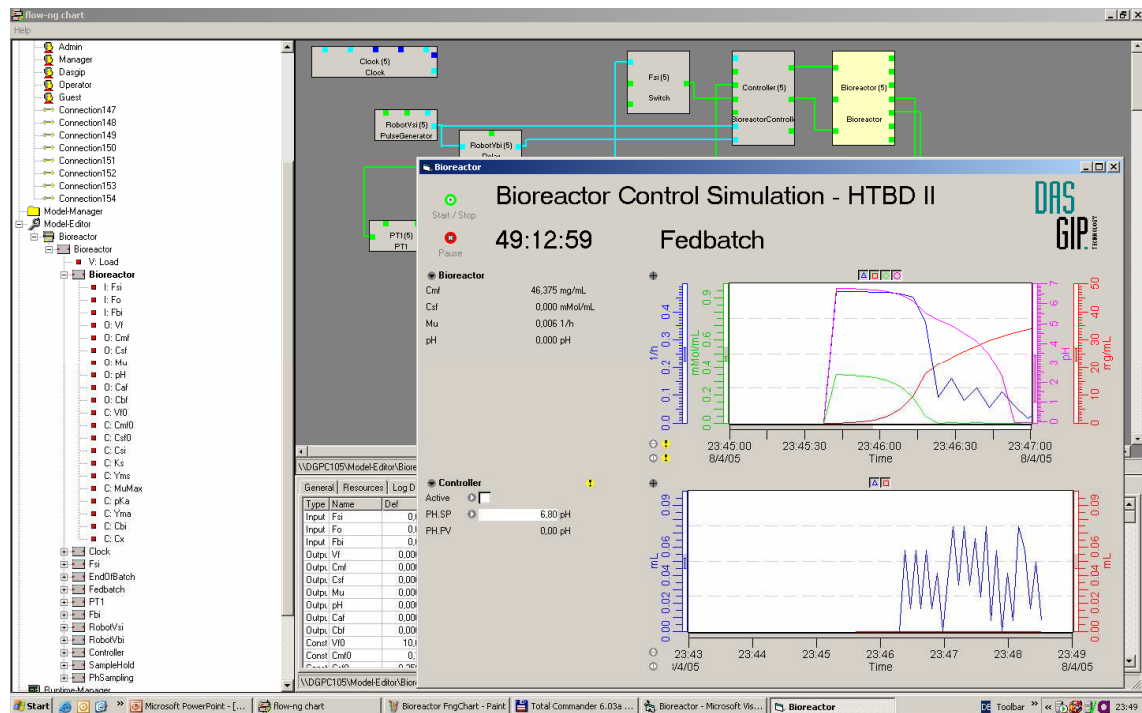


Abbildung 4.3: Simulationsumgebung mit simuliertem Fermentationsverlauf bei intermittierender einseitiger pH-Regelung

Allerdings konnte in Simulationsläufen eine hohe Sensitivität des pH-Wertes gegenüber den intermittierenden Volumenstößen der Dosiersteuerung sogar bei dispensierten Volumina von



ca. 20  $\mu\text{L}$  nachgewiesen werden. Systemdynamisch betrachtet lassen sich im pH-Signal die Impulsantworten der nichtlinearen Regelstrecke ablesen. Hier ergibt sich eine Parallele zu Industrie erprobten Verfahren zur Reglerselbsteinstellung. Hierbei wird das „unbekannte“ System im Arbeitspunkt mit kleinen Anregungen beaufschlagt und aus der gemessenen Regelgröße eine Identifikation der Regelstrecke in diesem Arbeitspunkt anhand eines meist stark vereinfachten und linearen Prozessmodells vorgenommen. Prinzipiell ist dieses Verfahren jedoch nur anwendbar, wenn die Auflösung des realen pH-Messsignals ausreicht, um die Impulsantworten gegenüber dem Messrauschen sowie Störungen zu identifizieren und die Zeitintervalle zwischen den Dosierstößen mindestens in der Größenordnung der dominierenden Systemzeitkonstante liegen, so dass Überlagerungseffekte vernachlässigt werden können.

Im weiteren Projektverlauf stand eine weiterentwickelte und stark verbesserte zweite Generation der pH-Messung zur Verfügung. Damit konnten erstmals zweiseitig pH-geregelte Kultivierungen durchgeführt werden. Die ersten praktischen Versuche haben mehrere wesentliche Ergebnisse gezeigt:

- Bei geeigneter Parametrierung eines PID-Reglers ließ sich eine zufrieden stellende zweiseitige pH-Regelung mit intermittierenden Stellgliedern erzielen.
- Bei der zur Optimierung der Biokatalysatoren notwendigen Vielzahl von Prozessläufen mit unterschiedlichsten Puffereigenschaften des Mediums und verschiedenen während des Prozesses veränderlichen pH-Arbeitspunkten ist es nicht zu verhindern, dass einige Regler je nach Arbeitspunkt schwingen. Auch wenn die Abweichungen vom Sollwert vielfach zu tolerieren sind, führt dies zu einem sehr hohen Säure- und Laugeverbrauch durch fortlaufende Gegentitration, die zu Volumenproblemen führt und die Fermentation negativ beeinflusst.

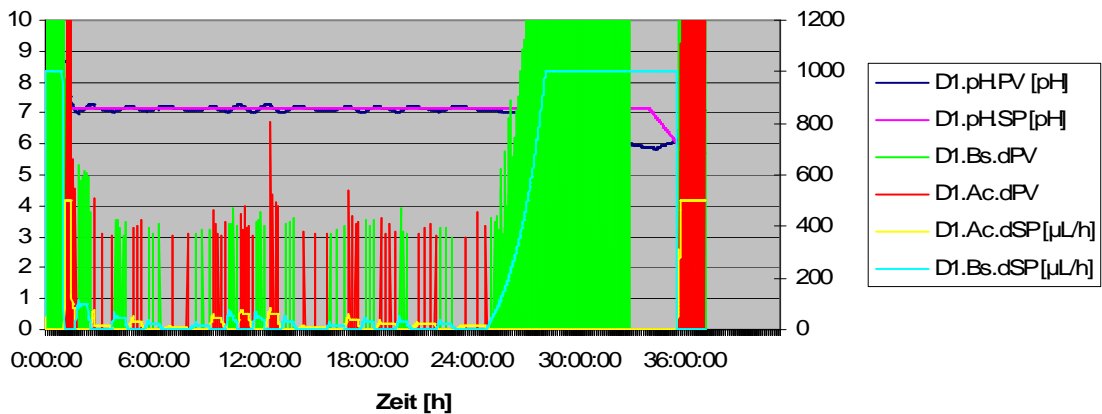


Abbildung 4.4: zeitlicher Verlauf des Ist- und Soll-pH sowie der Volumenflüsse Titrationsmittel und der Volumina intermittierender Zugabe von Säure und Base bei der Kultivierung von Hefen

- Die in der Simulation ermittelten Impulsantworten des pH aufgrund der intermittierenden Dosierung lassen sich überraschend gut durch die realen Messdaten bestätigen. Zudem lässt sich das nichtlineare Pufferverhalten deutlich aus der pH-abhängigen Base-Titration ablesen.

Im weiteren Projektverlauf wurden daher zwei Ziele verfolgt, erstens die Regleroptimierung zur Mengenreduktion der dispensierten Korrekturmedien und zweitens die Entwicklung eines Verfahrens zur fortlaufenden Online-Adaptierung des o.g. Reglers auf Basis einer Modellidentifikation (MIAC=Model Identification Adaptive Control). Im Idealfall genügt diese Kombination aus speziellem nichtlinearem Regler und Selbsteinstellungsverfahren sowohl den speziellen prozesstechnischen Anforderungen (intermittierende zweiseitige Titration) als auch den Anforderungen der einfachen Parametrierung oder gar Parametrierungsfreiheit.

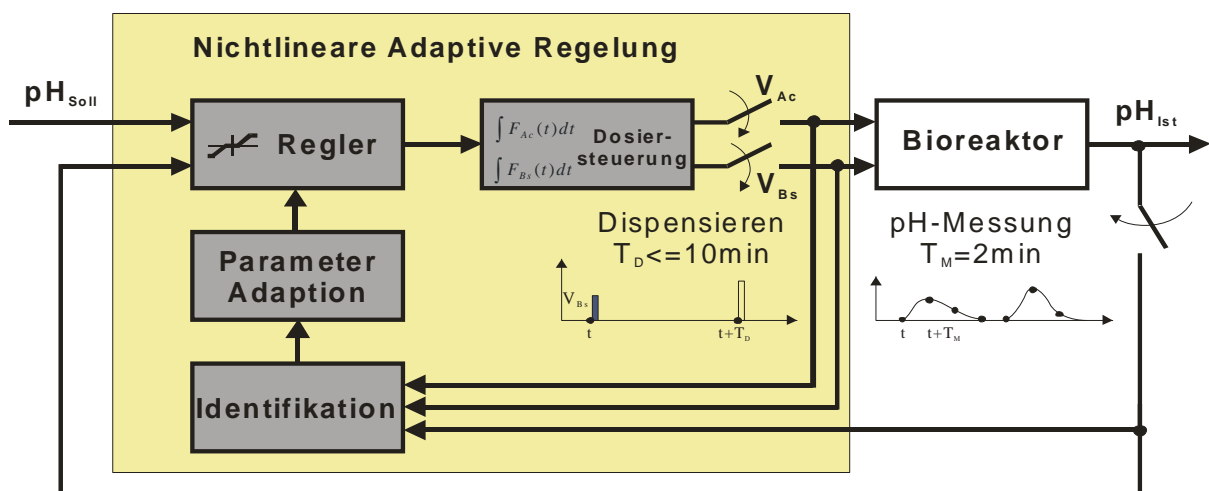


Abbildung 4.5: Diagramm der adaptiven nichtlinearen Regelung

## Regleroptimierung

Eine erste einfache Maßnahme zur Reduktion des dispensierten Volumens wurde durch die Einführung einer Totzone (Deadband) in den Regelalgorithmus umgesetzt. Dies verhindert wirksam das fortlaufende Gegentitrieren im eingeschwungenen Zustand des Reglers.

Das Ergebnis war jedoch nicht zufriedenstellend, da das integrierende Verhalten der intermittierenden Stellglieder dazu führt, dass eine akkumulierte aber noch nicht dispensierte Menge Korrekturmittel zu einem späteren Zeitpunkt zugegeben wird, auch wenn die Regelung bereits das gegensätzliche Stellglied anspricht. Diese unerwünschte speichernde Funktion der Stellglieder konnte durch einen beschleunigten Abbau der Integratoren in den Stellgliedern nach einem Vorzeichenwechsel der Reglerstellgröße wirksam verhindert werden.

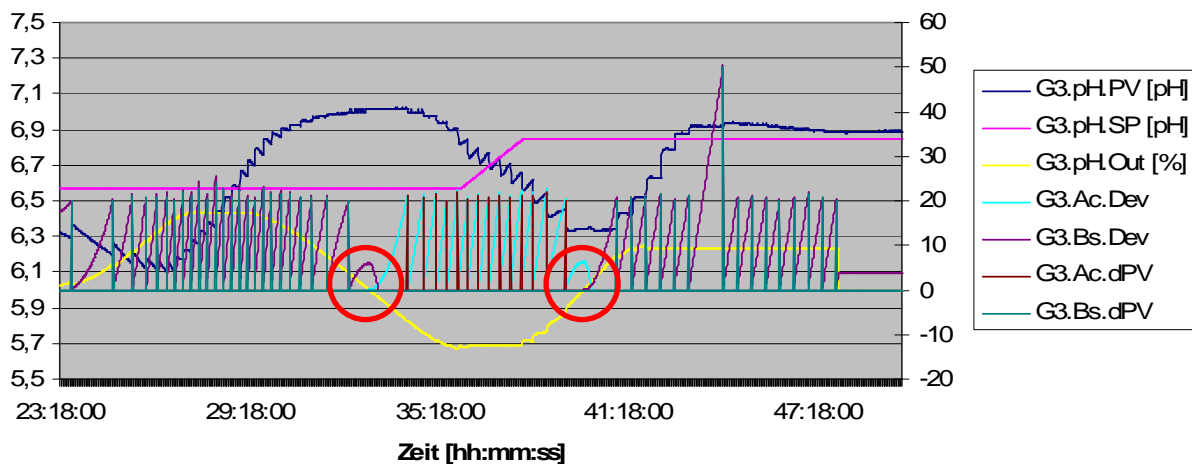


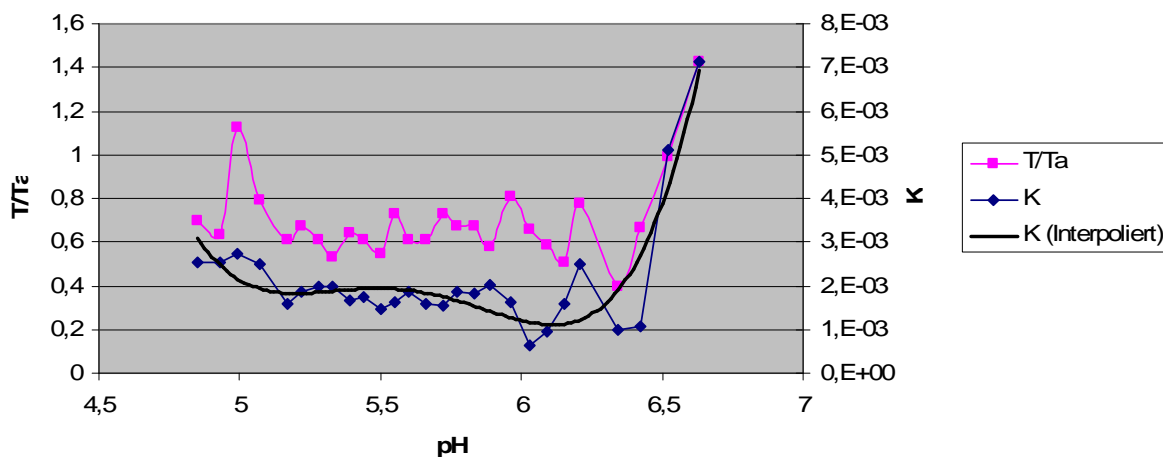
Abbildung 4.6: zeitlicher Verlauf des pH und weiterer wichtiger Prozessparameter

Eine Begrenzung der Reglereingangsgröße sowie der Einsatz von „anti reset windup“ Mechanismen verbesserte die Robustheit der Regelung zusätzlich. Die Anpassung der Parameter der Dosiersteuerung, speziell das Einstellen eines relativ kleinen zulässigen Bereichs des Dosiervolumens pro Dispensiervorgang von 20 – 50  $\mu\text{L}$  konnte den Verbrauch an Korrekturmittel ebenfalls deutlich senken.

## Online-Parameteradaption

Systemtechnisch betrachtet besitzt die Regelstrecke grob vereinfacht PT1-Verhalten (Verzögerungsglied erster Ordnung mit den Parametern Verstärkungsfaktor K und Zeitkonstante T). Da der Zeitpunkt des Dosierimpulses bekannt ist und über einen hinreichend langen Zeitraum keine weitere Anregung stattfindet, lassen sich die beiden Modellparameter

direkt aus den Messdaten z.B. mit Hilfe eines Regressionsverfahrens ermitteln. Wie die exemplarisch errechneten Modellparameter zeigen, gibt der Verstärkungsfaktor  $K$  die Nichtlinearität der Regelstrecke direkt wieder. Er ist damit prinzipiell gut geeignet die Reglerverstärkung zu adaptieren („gain scheduling“). Eine erste Implementierung zeigt mit Messdaten vielversprechende Ergebnisse.



**Abbildung 4.7: Darstellung von online identifizierten Parametern der Regelstrecke**

Die weitergehende Analyse anhand der vielfältigen Prozessdaten zeigt, dass je nach Kultur und Prozessphase nicht das Pufferverhalten dominiert, sondern die Säure- bzw. Laugeproduktion des Organismus, so dass der sich ergebende integrierende Zusammenhang im Prozessmodell berücksichtigt und identifiziert werden muss. Nur dann kann der Regler robust adaptiert werden. Um eine ausreichende Robustheit im laufenden Prozess sicherzustellen, muss der Algorithmus also noch weiter verfeinert werden.

Zusammenfassend konnte mit der vorgestellten Reglerimplementierung und den verschiedenen Modifikationen ein robust arbeitender Regler erarbeitet werden, der in den zahlreichen Parallelfementationen einen geregelten pH bei optimiertem Säure- und Laugenverbrauch sichergestellt hat. Das vorgestellte Konzept zur Erweiterung der Regelung um eine Online Streckenidentifikation mit Parameteradaptierung ist vielversprechend und hinsichtlich seiner Integration in industrielle Steuerungen aufgrund der moderaten Ressourcenanforderungen unproblematisch. Eine Finalisierung bis zum industriellen Produkt lässt auf einen signifikant reduzierten Parametrierungsaufwand hoffen.

### 4.3 Parallele Drehzahlüberwachung

H+P entwickelte Messplatten mit je 8 Messstellen, von denen insgesamt 6 an der Unterseite des Bioreaktorblocks montiert werden um alle 48 Rührorgane zu überwachen (siehe Abb. 4.7). Die Messplatten besitzen 8 Hallelemente als Sensoren für 8 Bioreaktoren und Elektronik zum Multiplexen der Signale und sind wasserdicht vergossen.

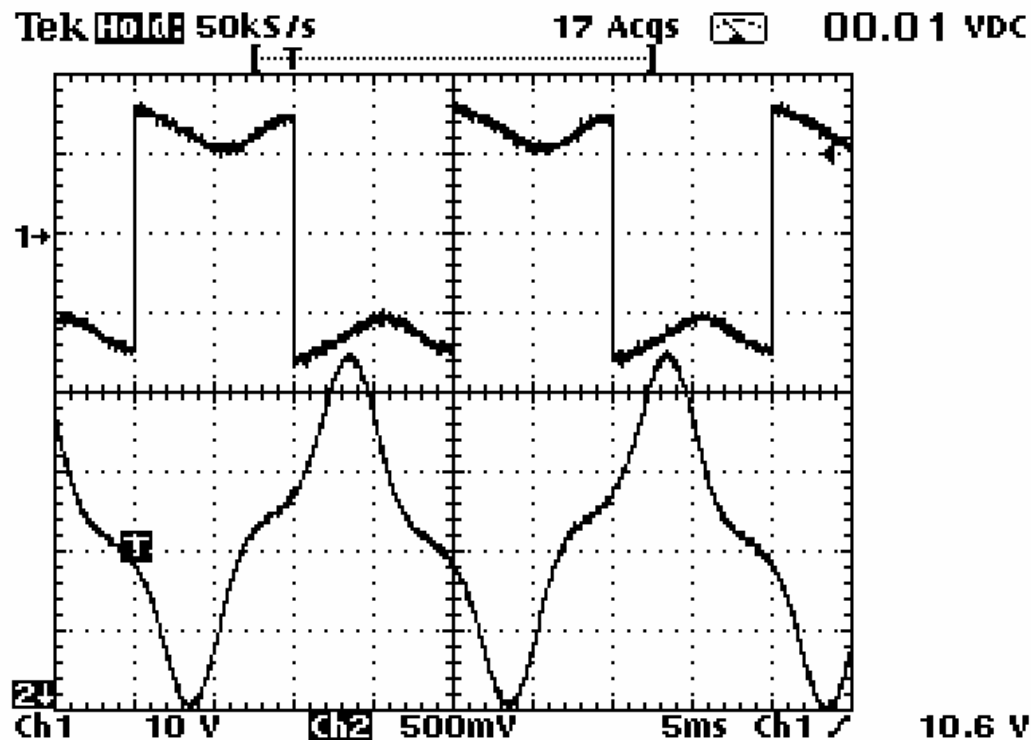


**Abbildung 4.8: Bioreaktorblock mit einer von sechs Hallelement-Messplatten (links)**

Die Position und Orientierung der Hallelemente konnte so gewählt werden, dass das magnetische Erregerfeld des Induktivantriebs weitestgehend unterdrückt wurde, das überlagerte Feld des Dauermagneten im Rührorgan jedoch zu einem Messsignal mit ausreichend hoher Amplitude führte (siehe Abb. 4.8).

Die analogen Messsignale der 6 x 8 Hallsonden werden über 6 Kabelverbindungen dem Steuergerät zur Verfügung gestellt. Hier werden sie digitalisiert und von einem Prozessor mit einer dafür entwickelten Firmware ausgewertet. Pro Rührstelle werden zwei Statusbits generiert, die über eine RS 232 – Schnittstelle ausgelesen werden können. Ein Bit steht für „Rührorgan läuft/steht“ und ein weiteres für „Rührorgan-Schlupf kritisch/unkritisch“. Für die Messungen wird pro Rührstelle die Zeit von zwei Umdrehungen benötigt, was bedeutet, dass

z.B. bei 3000 rpm die aktuellen Informationen über alle 48 Rührorgane spätestens nach 2 Sekunden zur Verfügung stehen.



Mit drehendem Rührorgan ca. 3000 rpm

Abbildung 4.9: Messsignale eines Hallelements: Phasenspannung Induktivantrieb (oben) und korrespondierendes Signal der Hallsonde (unten)

Es konnte gezeigt werden, dass je nach Viskosität des Reaktorinhalts und voreingestellter Antriebsleistung 3 Drehzahlbereiche unterschieden werden können, in denen die Auswertestrategie zu schnellen, aber dennoch sicheren Ergebnissen führt. Der erste Bereich (ca. 100 – 1500 rpm) ist dadurch gekennzeichnet, dass die Rührorgane spontan starten können und nur durch mechanische Blockade zum Stehen kommen.

Im zweiten Bereich (ca. 1500 – 2500 rpm) vollziehen die „stehen gebliebenen“ Rührorgane – bedingt durch das induktive Erreger-Drehfeld – weiterhin eine starke Schwenkbewegung. Es gelang erst mit einer nachträglich modifizierten Hardware die Signale dieser Schwenkbewegung von den Signalen der Drehbewegung des Rührorgans zu unterscheiden.

Im oberen Drehzahlbereich (ca. 2500 – 4000 rpm) vereinfachen sich die Verhältnisse wieder, da hier das Rührorgan im Störfall tatsächlich mehr oder weniger „steht“ und daher im Messsignal nur eine Gleichspannungskomponente produziert.

Für alle drei Bereiche konnte der Störfall eines, mehrerer oder aller 48 Rührstellen innerhalb der Zeit von jeweils zwei Umdrehungen sicher detektiert und das Statusbit entsprechend online gesetzt werden.

Zusätzlich wird vom Prozessor der individuelle Schlupfwinkel aller 48 Rührorgane zur Phasenlage des Erregerfeldes gemessen. Da dieser Schlupf tatsächlich – besonders stark im oberen Drehzahlbereich – variiert, erscheint eine Auswertung nur über eine Mittelung über viele Umdrehungen sinnvoll. Das Statusbit „Schlupf größer ca. 70 Grad, kritischer Bereich“ kann dann für eine übergeordnete Steuersoftware als Kriterium zur Verminderung der Drehzahl herangezogen werden. Damit konnte ein sicherer Rührbetrieb erreicht werden.

Auf Basis der beschriebenen parallelen Drehzahlüberwachung wurden von DASGIP in das Prozessleitsystem verschiedene Methoden implementiert, welche den Ausfall eines oder mehrerer Rührorgane geeignet behandeln bzw. mit deren Hilfe versucht wird einen Ausfall zu vermeiden. Zu den Methoden zählen

- der automatische Wiederanlauf nach dem Ausfall einer bestimmten Anzahl von Rührorganen,
- die automatische präventive Reduktion der Rührerdrehzahl sobald an einer definierten Anzahl von Rührstellen ein kritisches Drehmoment vorliegt sowie
- der automatische Ausschluss bestimmter Rührstellen, welche eine besonders hohe Ausfallsrate aufweisen, aus den Bewertungsmethoden.

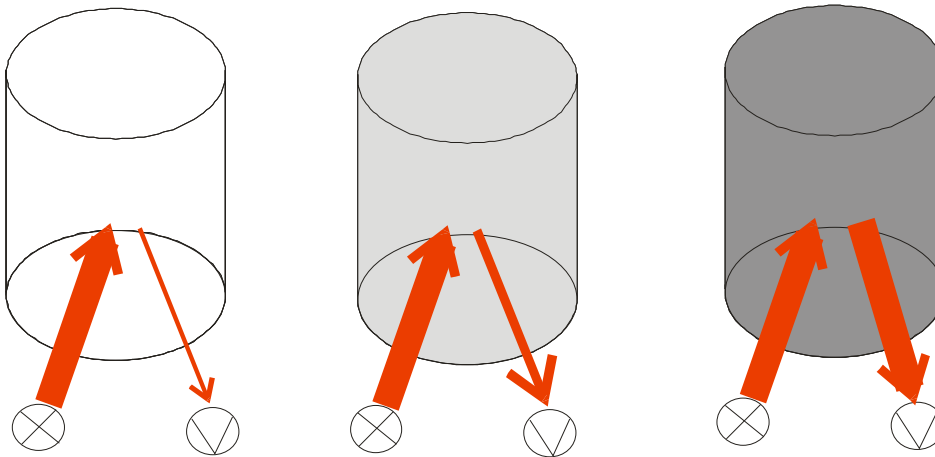
Das Verhalten dieser Strategien ist im weiten Umfang durch den Anwender parametrierbar. Sie ermöglichen einen robusten Betrieb der Rührorgane über den Zeitraum einer Kultivierung.

Auch bei der parallelen Kultivierung von Mikroorganismen konnte ein sicherer Rührbetrieb über den jeweiligen Beobachtungszeitraum (bis zu 3 Tagen) bestätigt werden. Für den Endanwender gestaltet sich die Anwendung der Drehzahlüberwachung sehr einfach. Zum einen wird in einer symbolischen Darstellung des Bioreaktorblocks mit farbigen Markierungen der Zustand eines jeden Rührers gekennzeichnet. Zum anderen kann auf die Charakteristik der Rührersteuerung Einfluss genommen werden. Bei Ausfall eines oder mehrerer Rührer kann das System einen Neustart des magnetischen Antriebs initiieren. Sollte dieser bei einzelnen Rührern wiederholt fehl schlagen, so werden diese Rührer bei folgenden Ausfällen nicht weiter beachtet und als Totalausfall behandelt.

## 4.4 Parallele Trübungsmessung

### Technische Durchführung

Die unten stehende Skizze verdeutlicht das angewandte Messprinzip:



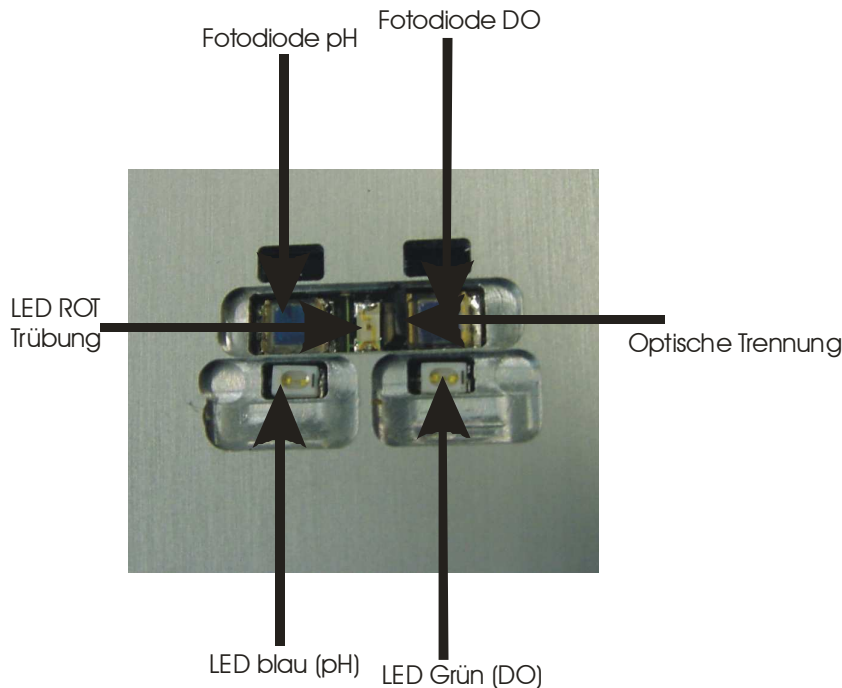
**Abbildung 4.10: Messprinzip der Biomassekonzentrationsbestimmung durch Messung der Lichtstreuung**

Mit steigender Biomasse steigt die Menge an gestreutem Licht und damit an detektiertem Signal. Hierbei unterscheidet das System nicht zwischen Licht das an Bakterien gestreut wird oder an der Reaktorwand bzw. an optischen Unregelmäßigkeiten.

Da aufgrund der Einweg-Reaktoren keine Kalibrierung der einzelnen Reaktoren bzw. ihrer optischen Wege möglich ist, muss sichergestellt sein, dass jeder Reaktor die gleiche Kennlinie ergibt. Die Messung der Intensität des reflektierten Lichts erfordert eine präzise und reproduzierbare Positionierung der Reaktoren über der Lichtquelle und dem Detektor. Die optische Qualität des transparenten Teils des Reaktors darf keinen großen Schwankungen unterworfen sein. Durch das robuste Design der Halterungen sowie die präzisen Spritzguss-Reaktoren sind diese Voraussetzungen erfüllt worden. Die Charakteristik einzelner Messkanäle kann dagegen unterschiedlich sein, falls diese Unterschiede in der Firmware hinterlegt und konstant sind.

Systembedingt müssen sowohl Lichtquelle als auch Detektor am Boden der einzelnen Reaktoren angebracht werden. Jeder Reaktor besitzt eine optische Ausleseinheit, die aus 3 LEDs und zwei Photodetektoren besteht.





**Abbildung 4.11: technischer Versuchsaufbau zur optischen Dichtemessung mittels Reflektion**

Das Foto zeigt die Optik ohne die optischen Filter: Vor der blauen LED sitzt ein 490 nm Kurzpass Filter, vor der grünen LED ein 520 nm Kurzpassfilter. Die Fotodioden sind mit Langpassfiltern (540 bzw. 590 nm) abgedeckt. Die rote LED wird ohne Filter betrieben.

Die bisher nur zur Referenzierung der Phasenmessung verwendete rote LED wird nun zur Trübungsmessung benutzt. Dazu wurde der optische Aufbau verändert: Die direkte optische Verbindung zwischen der roten LED und den beiden Photodioden wurde unterbrochen. Ein optisches Fenster für die rote LED wurde eingeführt, so dass die LED direkt in den Reaktor einstrahlt. Das zurückreflektierte Licht wird durch die beiden Photodioden detektiert. Auf einen optischen Filter vor der roten LED wurde verzichtet, die optischen Filter vor den Photodioden wurden als 540 nm Langpass bzw. 590 nm Langpass ausgeführt, so dass das rote Licht ausreichend gut detektiert werden kann. Die LED wird sinusförmig moduliert (45 kHz), so dass Fremdlichteinflüsse effektiv eliminiert werden konnten. Da die rote LED weiterhin zur Referenzierung der Phasenmessung der Sensoren verwendet wird, musste die Amplitude erhöht werden um auch bei kleinen optischen Dichten (und damit kleinen Amplituden) eine ausreichend genaue Phasenmessung durchführen zu können. Es wurde versucht aus der Intensitätsmessung eine dynamische Anpassung der Intensität der roten LED zu installieren. Eine kleine Amplitude aufgrund kleiner Biomasse sollte für die Referenzierung durch einen höheren Strom an der LED ausgeglichen werden. Diese Versuche erwiesen sich jedoch als nicht Ziel führend, da der Phasengang der verwendeten Referenz-LEDs eine starke

Abhängigkeit vom eingestellten Strom aufweist. Diese Abhängigkeit ist von LED zu LED individuell verschieden und konnte auch nicht in der Firmware als kanalspezifischer Parameter hinterlegt werden.

Der angedachte Weg, mögliche Intensitätsschwankungen in der LED durch eine vergleichende Messung mit einer der beiden Photodioden auf direktem Weg (ohne den optischen Umweg über den Reaktor) durchzuführen scheiterte ebenfalls an den hierfür benötigten unterschiedlichen Intensitätseinstellungen der LED und damit verbunden Schwankungen im Phasengang. Deshalb muss das Gerät in regelmäßigen Intervallen mit Trübungstandards abgeglichen werden und eine neue Kalibrationskurve erstellt werden.

Die unten stehende Abbildung zeigt eine erste Messung der Reflektion an weissen Streuern (hochdisperses Titandioxid in Wasser):

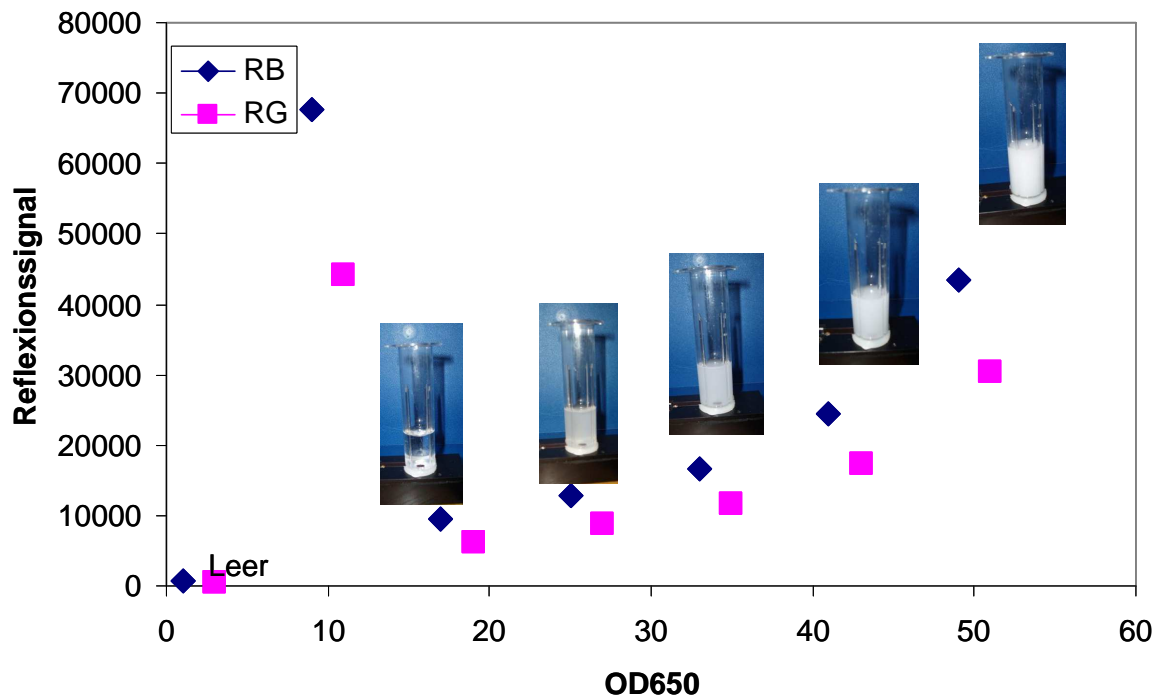


Abbildung 4.12: Messsignal der Streulichtmessung beider Photodioden

Aufgetragen sind die Signale beider Photodioden. Die Form der Kurve ist identisch, beide können zur Messung herangezogen werden.

## Erste Messungen im biologischen System und Vergleich optische Dichte Messung – Reflektionsmessung:

Die Messung wurde mit zwei wichtigen biologischen Systemen durchgeführt.

- *Saccharomyces cerevisiae*
- *Escherichia coli*

Die mit einem Einstrahl-Küvettenphotometer bestimmten optischen Dichten  $OD_{650}$  der Zellsuspensionen bewegten sich im Bereich bis über 100 und decken damit einen Bereich bis gut  $60 \text{ g L}^{-1}$  ab. Es wurden vorkultivierte Ansätze verdünnt und mit der Reflexionsmethode untersucht. Dabei wurde für Hefe folgenden Daten gemessen:

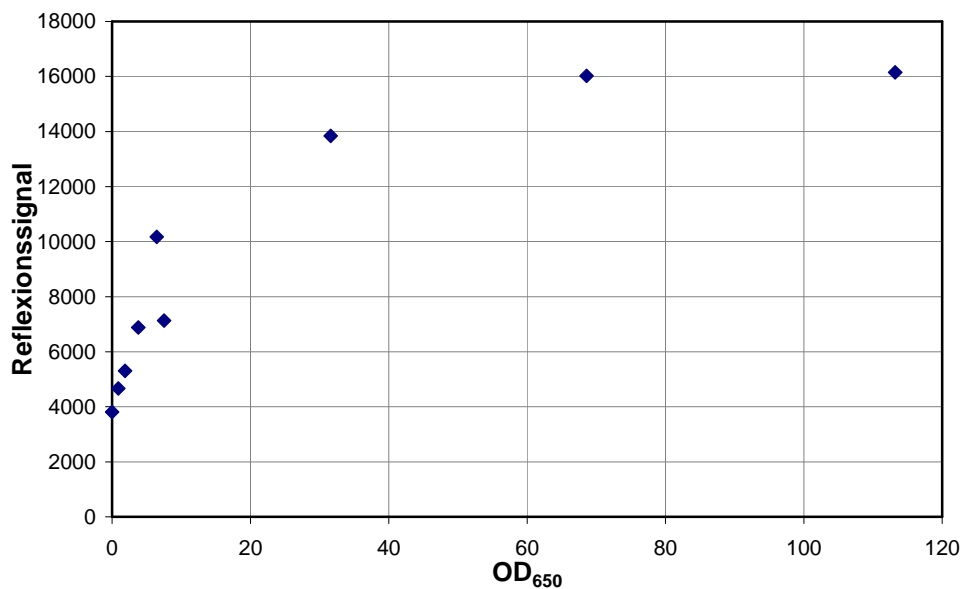
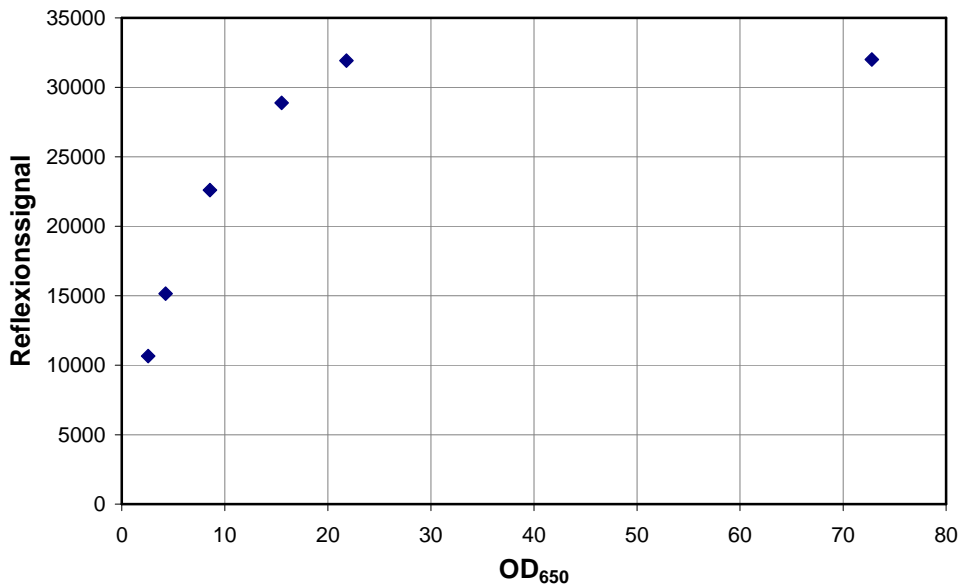


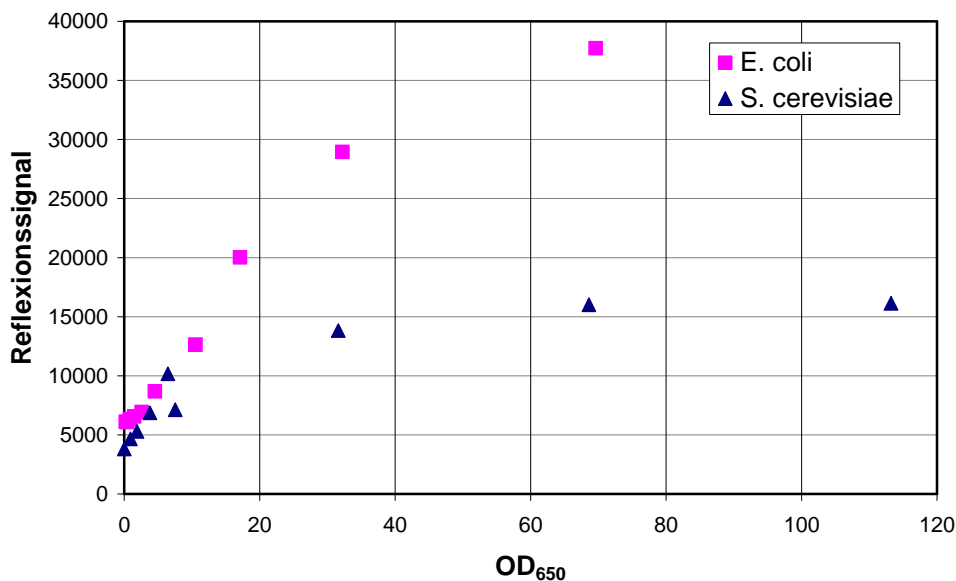
Abbildung 4.13: Signal der Reflexionsmessung einer Zellsuspension mit *Saccharomyces cerevisiae*

Die Messung einer *E. coli* Suspension ergab einen ähnlichen Verlauf:



**Abbildung 4.14:** Signal der Reflexionsmessung einer Zellsuspension mit *E. coli*

Eine Gegenüberstellung der Reflexion mit den Messungen der optischen Dichte von den verschiedenen Ansätzen ergibt folgendes Bild:

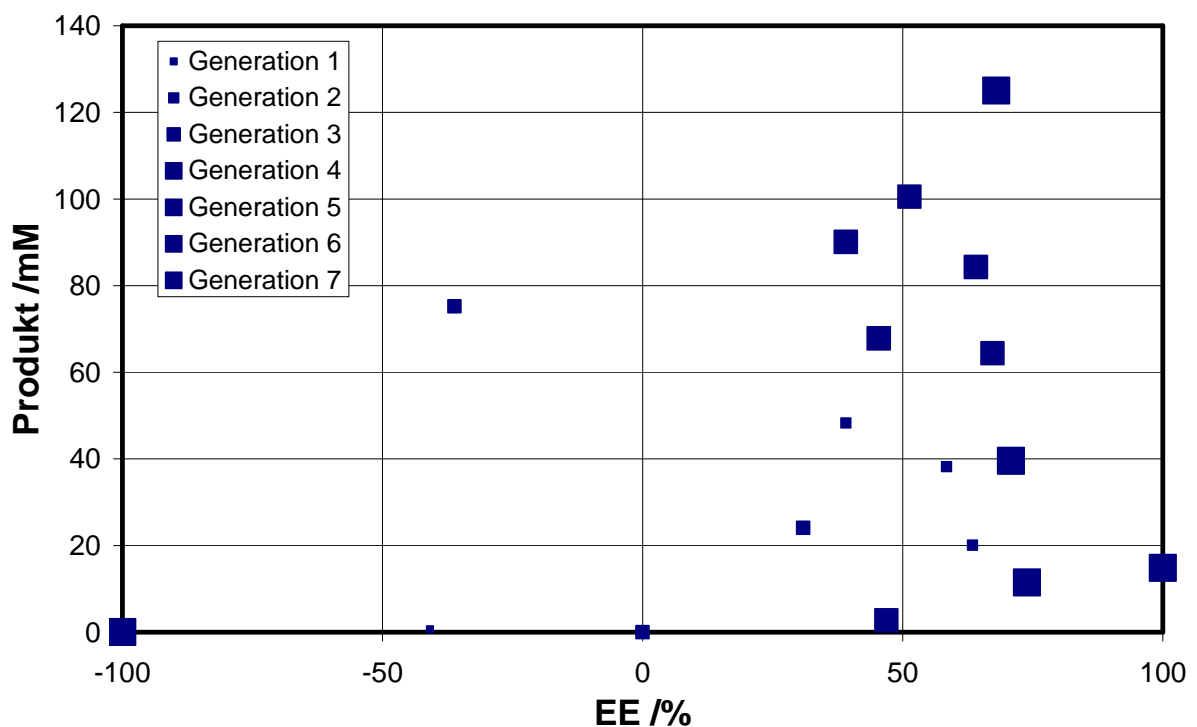


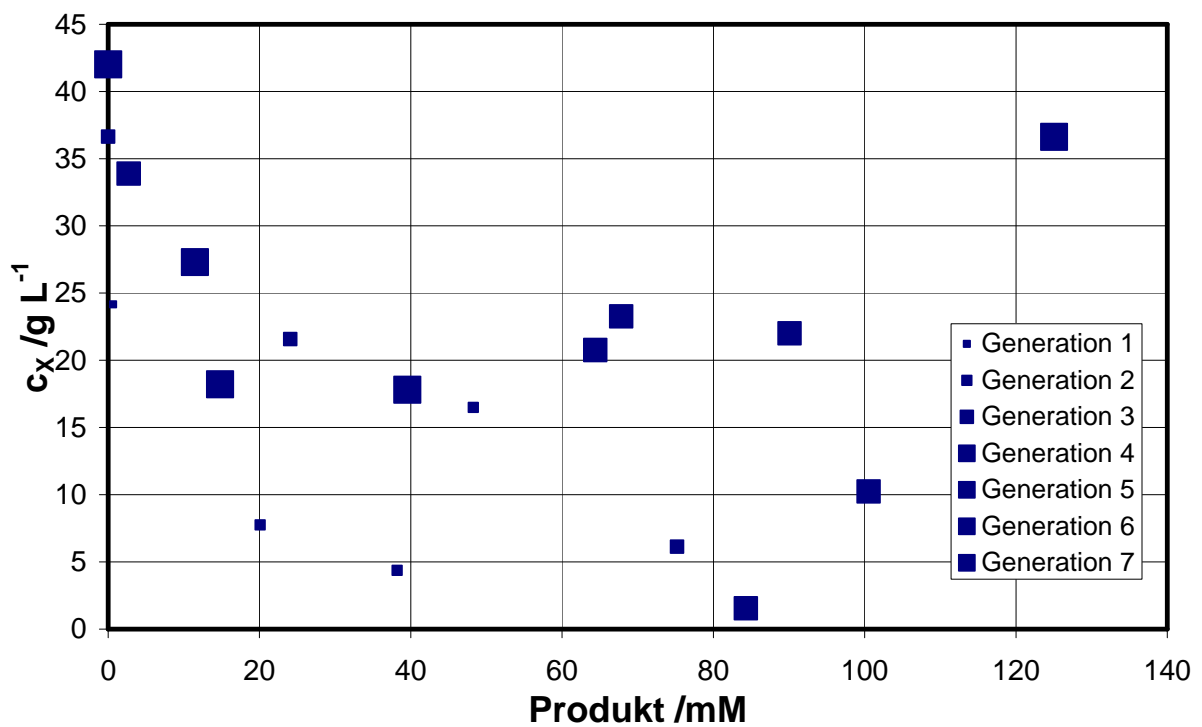
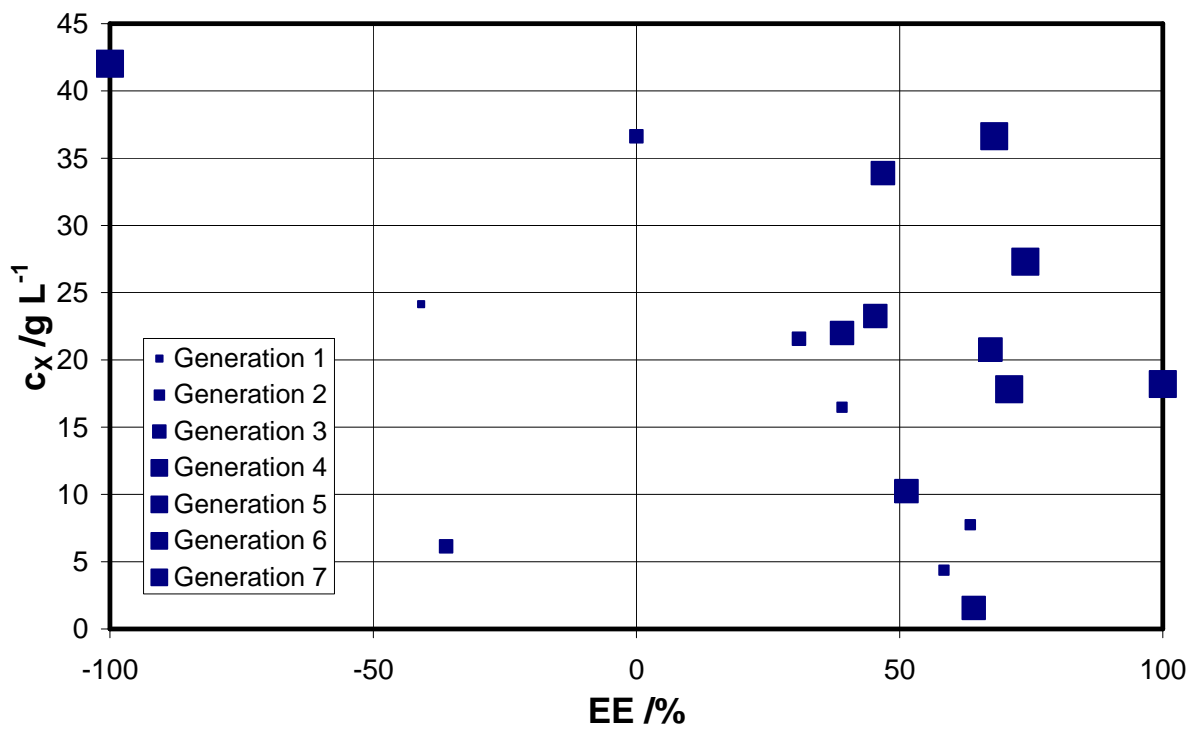
**Abbildung 4.15:** Vergleich der Reflexionsmessung von Zellsuspensionen mit *E. coli* und *S. cerevisiae*

Die Abweichungen speziell bei hohen optischen Dichten können durch unterschiedliche Morphologien der Zellen und ihre jeweiligen typischen Größen verursacht sein. So sind die eher stäbchenförmigen *E. coli* etwa 1 - 2  $\mu\text{m}$  lang und die kugelförmigen *Saccharomyces cerevisiae* haben einen Durchmesser von 4 – 10  $\mu\text{m}$ . Daraus kann sich ein abweichendes Reflexions- und Streuverhalten ergeben.

#### 4.5 Verfahrensoptimierung zur Herstellung von rekombinanten *Saccharomyces cerevisiae* für enantioselektive Reduktionen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeiten wurden sieben erfolgreiche Iterationsstufen der Optimierung mittels Genetischem Algorithmus durchlaufen. Das dabei verwendete Werkzeug GAME.opt generiert unter anderem eine sog. externe Population. Diese fasst die jeweils besten Ergebnisse der zu optimierenden Zielgrößen des jeweiligen Parallelansatzes (Generation) zusammen. In der folgenden Abbildung sind jeweils die Ergebnisse von zwei der drei Optimierungsziele der externen Populationen gegeneinander aufgetragen.





**Abbildung 4.16: externe Population der sieben erzeugten Generationen**

Der Fortschritt während der experimentellen Optimierung ist bei gewünschter Maximierung der Zielgrößen durch ein Wandern der Datenpunkte in die rechte obere Ecke jedes Diagramms beobachtbar. Dieses Verhalten zeigt sich im vorliegenden Fall. Mit jeder

Generation verschiebt sich die Front der Datenpunkte weiter entlang der Winkelhalbierenden. So konnte die maximal erreichte Biotrockenmassekonzentration von anfänglichen etwa 20 g L<sup>-1</sup> auf über 35 g L<sup>-1</sup> gesteigert werden. Ebenso wurde die erzielbare Produktkonzentration von 90 mM auf 125 mM erhöht. Die erzielte Enantioselektivität war ebenfalls sehr stark von den Reaktionsbedingungen bei der Zellanzucht abhängig. Es wurden Bedingungen gefunden, bei denen nahezu ausschließlich das unerwünschte R-Enantiomer und nahezu ausschließlich das erwünschte S-Enantiomer produziert wurde. Allerdings zeigte sich auch, dass kein Reaktionsmedium gefunden werden konnte, bei dem alle 3 Zielgrößen gleichzeitig maximiert waren. Ein hoher S-Enantiomerenüberschuß von über 99 % war nur bei niedrigen Produktkonzentrationen von unter 20 mM S-CHBE möglich.

Ein ausgewähltes Medium wurde im 23 L-Maßstab validiert.

**Tabelle 4.1: Vergleich des Optimierungsergebnisses im mL- und Litermaßstab**

	mL-Maßstab	Litermaßstab
Enantiomerenüberschuß /%	68,0	65,2
Produktkonzentration /mM	125,1	150,6
BTM /g L <sup>-1</sup>	36,6	34,3

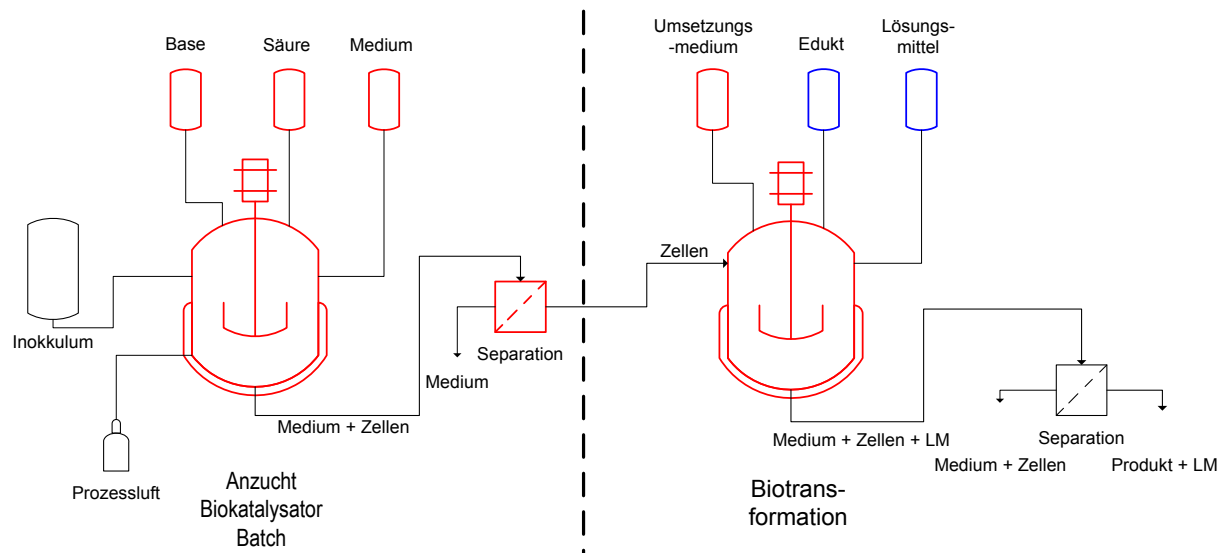
Es konnte gezeigt werden, dass der Übergang vom mL- in den 23 L-Maßstab direkt möglich ist. Die Ergebnisse der der maximalen Biotrockenmassekonzentration sowie der erzielbaren Produktkonzentration und des Enantiomerenüberschusses können reproduziert werden.

## **4.6 Vergleichende ökonomische und ökologische Bilanzierung**

### **Grundlagen**

Die einzelnen Schritte des gesamten Prozesses wurden in einem Gesamtprozessschema eingearbeitet. Dieses ermöglichte die einfache Erfassung und Behandlung der Daten für die ökonomische und ökologische Bilanzierung.

Die wichtigste Einteilung ist die Auftrennung des Gesamtprozesses in die Biokatalysatorherstellung und die davon entkoppelte Biotransformation. Bei allen Prozessen werden die Kosten für die finale Isolierung des Produktes in hochreiner Form nicht berücksichtigt.



**Abbildung 4.17: Prozessschema der bilanzierten Prozesse**

Für die Kalkulation der ökonomischen Parameter mussten Preise für die einzelnen Chemikalien festgelegt werden, die den marktüblichen Preisen entsprechen sollten. Die realen branchenüblichen Marktpreise für die jeweiligen Substanzmengen waren nicht in Erfahrung zu bringen. Aus diesem Grund wurde der niedrigste Preis aus üblichen Chemikalienkatalogen entnommen und mit einem Faktor von 0,07 gewichtet. Es wurde also angenommen, dass der tatsächliche Marktpreis bei etwa 7 % des Katalogpreises liegt.

Neben dem optimiertem Verfahren zur Herstellung von S-CHBE mit rekombinanten *Saccharomyces cerevisiae* als Biokatalysator wurden zwei weitere Verfahren mit rekombinanten *Escherichia coli* (Kizaki, N., Yasohara, Y., Hasegawa, J., Wada, M., Kataoka, M., Shimizu, S. (2001): Synthesis of optically pure ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate by *Escherichia coli* transformant cells coexpressing the carbonyl reductase and glucose dehydrogenase genes; *Appl Microbiol Biotechnol* **5**: 590-595) bzw. *Lactobacillus kefir* (Pfruender H, Amidjojo M, Hang F, Weuster-Botz D (2005): Production of *Lactobacillus kefir* cells for asymmetric synthesis of a 3,5-dihydroxycarboxylate. *Appl Microbiol Biotechnol* **67**: 619-622) bilanziert. Für den in Japan durchgeführten Prozess mit rekombinanten *E. coli* sind kaum detaillierte Angaben verfügbar, weshalb in Bezug auf die Biokatalysatorherstellung und die anschließende Biotransformation weitreichende Annahmen getroffen werden mussten. Diese orientierten sich an üblichen *E. coli* - Prozessen für biokatalytische Verfahren. Der *L. kefir*-Prozess wurde am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik untersucht so dass hier eine gute Datenbasis vorhanden ist.



**Tabelle 4.2: Basisdaten der bilanzierten Prozesse**

	rek. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	rek. <i>E. coli</i>	<i>L. kefir</i>
<b>Biokatalysatorherstellung</b>			
Prozessdauer	44 h	11 h	71 h
$c_{X,max}$	20 g L <sup>-1</sup>	15 g L <sup>-1</sup>	11 g L <sup>-1</sup>
Temperatur	30°C	37°C	30°C
<b>Biotransformation</b>			
Eduktkonzentration	33 g L <sup>-1</sup>	250 g L <sup>-1</sup>	204 g L <sup>-1</sup>
Produktselektivität	61%	85 %	97 %
Prozessdauer	8 h	34 h	16 h
$c_{X,0}$	20 g L <sup>-1</sup>	20 g L <sup>-1</sup>	50 g L <sup>-1</sup>
Anteil Lösungsmittel	10 %	10 %	-

Die Produktselektivität fasst mehrere Prozessgrößen zusammen:

- Enantiomerenüberschuss
- Produktbildungskapazität
- Umsatz

Die kommerziell erworbene Version der Software Sabento (ifu Hamburg) konnte ausschließlich einstufige biotechnologische Prozesse modellieren, bei denen während der Kultivierung ein intra- oder extrazelluläres Produkt gebildet wird. Eine Aufarbeitung oder ein nach geschalteter zweiter Prozess waren nicht vorgesehen und daher auch nicht möglich. Selbst ein Prozess, der nur die Bildung von Biomasse als Produkt zum Ziel hat, war nicht nachzubilden. Ebenso konnten keine biokatalytischen Prozesse mit ganzen Zellen modelliert werden, da ein einseitiger Stoffstrom von Biomasse nicht vorgesehen war. Damit war es unmöglich auch nur ansatzweise eine ökologische und ökonomische Bilanzierung durchzuführen.

Nach intensiver Rücksprache und vielen Kontakten mit ifu Hamburg wurde eine spezielle Version zur Verfügung gestellt, mit der zumindest eine rudimentäre Bilanzierung möglich schien. Diese enthält nicht nur die Biokatalysatorherstellung sondern auch eine nachfolgende Biotransformation. Allerdings berücksichtigte sie noch bei weitem nicht alle Gegebenheiten eines zweistufigen Prozesses. So gibt es beispielsweise keine Möglichkeit eine definierte Biomassekonzentration für die Biotransformation vorzugeben. Auch ist das Durchspielen verschiedener Szenarien nicht möglich. Dazu muss in einer langwierigen Prozedur jede

Prozessvariante als neuer Prozess aufgesetzt werden. Selbst dann können jedoch nicht direkt die bestimmenden Einflussgrößen identifiziert werden.

Zusammenfassend stellt sich Sabento lediglich als Werkzeug dar, das bei kritischer Betrachtung der Ergebnisse nur eine sehr grobe und praktisch nicht validierbare Schätzung zur Beurteilung und dem Vergleich von biotechnologischen Prozessen zulässt.

## Ökonomische Bilanzierung

Der mit Hilfe der Software Sabento ermittelte Gewinn / kg S-CHBE unter Einbeziehung von Investitionen für neue Anlagen bei den verschiedenen betrachteten Prozessen zur Herstellung von 50 jato S-CHBE zeigt, dass alle drei betrachteten Prozesse prinzipiell rentabel erscheinen:

**Tabelle 4.3: Aufstellung der bilanzierten Reingewinne der drei betrachteten Prozesse**

	Gewinn / kg S-CHBE
rek. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	152,50 €
<i>L. kefir</i>	181,68 €
rek. <i>E. coli</i>	202,45 €

Die variablen und fixen Kosten /kg S-CHBE setzen sich dabei wie folgt zusammen:

**Tabelle 4.4: variable und fixe Kosten der drei betrachteten Prozesse**

	rek. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>L. kefir</i>	rek. <i>E. coli</i>
variable Kosten			
Materialkosten	56,77 €	21,63 €	8,53 €
Energiekosten	0,23 €	0,20 €	0,03 €
Entsorgungskosten	0,39 €	0,54 €	0,06 €
Betriebsstoffkosten	0,05 €	0,05 €	0,05 €
fixe Kosten			
Personalkosten	0,75 €	0,75 €	0,75 €
investitionsabhängige Kosten	14,90 €	36,39 €	10,30 €

Es zeigt sich, dass der in Japan industriell realisierte Prozess mit *E. coli* in allen Bereichen die niedrigsten Kosten verursacht.

Der industriell nicht genutzte *L. kefir*-Prozess verursacht höhere Kosten. Seine Materialkosten liegen im Mittelfeld, die Investitionskosten sind die höchsten des gesamten Vergleichs.

Der betrachtete *Saccharomyces*-Prozess erwirtschaftet mit 152,5 €/kg S-CHBE den geringsten Gewinn im Vergleich zu 181,7 €/kg S-CHBE beim *L. kefir*-Prozess oder 202,45 €/kg S-CHBE beim *E. coli* - Prozess. Allerdings sind die Materialkosten deutlich höher.

## Ökologische Bilanzierung

Das Endergebnis der ökologischen Bilanzierung stellen die Umweltbewertungszahlen (UBZ) dar. Je niedriger diese sind, desto umweltfreundlicher ist der Prozess. Die Gesamt-UBZ dient der Vergleichbarkeit verschiedener Prozesse. Die Eingangs- und Ausgangs-UBZ geben Auskunft über das Umweltwirkungspotential. Übersteigen insbesondere die Eingangs-UBZ die Ausgangs-UBZ, so besteht noch ökologisches Optimierungspotential.

**Tabelle 4.5: Zusammenfassung der ökologischen Bilanzierung**

	Input	Output	Gesamt
	Umweltbewertungszahl		
rek. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8106	5848	6751
<i>L. kefir</i>	2448	1480	1866
rek. <i>E. coli</i>	1098	755	892

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der *Saccharomyces*-Prozess das bei weitem höchste Umweltwirkungspotential hat. Die beiden anderen Prozesse scheinen „umweltfreundlicher“ zu sein. Insbesondere der bereits industriell realisierte *E. coli*-Prozess bietet das niedrigste Umweltwirkungspotential des Vergleichs. Allen Prozessen ist jedoch gemein, dass es noch eingangsseitige Verbesserungsmöglichkeiten gibt.

Bei diesem Vergleich von Biohydrierungsverfahren bedeutet interessanterweise eine bessere Wirtschaftlichkeit auch eine geringeres Umweltwirkungspotential.

## 5 Soll – Ist Vergleich

Ziel	Bearbeiter	Soll	Ist
1	PreSens	Bereitstellung eines Sensorblocks (48xpH, 48xpO <sub>2</sub> )	<b>Erfüllt:</b> Um 48 Messstellen zu bedienen wurden 6 ‚Sensorstäbe‘ mit jeweils 2x8 Ausleseeinheiten zur Verfügung gestellt.
2	DASGIP	Entwicklung und Implementierung einer parallelen pH-Kontrolle in das Prozessleitsystem	<b>Erfüllt:</b> Die vollständige und robuste Systemintegration ist erfolgt.
3	TUM	Experimentelle Validierung der Parallelsensorik	<b>Erfüllt:</b> Sowohl pH- als auch pO <sub>2</sub> -Optosensorik sind zuverlässig und reproduzierbar am Bioprozess einsetzbar.
4	H+P	Entwicklung einer parallelen Drehzahlüberwachung	<b>Erfüllt:</b> Die parallele Drehzahlüberwachung mit Hallelementen ist voll funktionsfähig und in den Bioreaktorblock integriert.
5	DASGIP	Integration der Drehzahlüberwachung in das Prozessleitsystem.	<b>Erfüllt:</b> Es wurden verschiedene Methoden zum sicheren Rührbetrieb der Parallelreaktoren implementiert.

Ziel	Bearbeiter	Soll	Ist
6	TUM	Experimentelle Validierung der Drehzahlüberwachung	<b>Erfüllt:</b> Drehzahlüberwachung und automatisches Wiederanfahren erlauben einen sicheren Parallelbetrieb.
7	PreSens	Entwicklung einer parallelen Trübungsmessung	<b>Teilweise erfüllt:</b> Ein Prototyp einer einzelnen Messstelle wurde gebaut.
8	DASGIP	Integration der Trübungsmessung in das Prozessleitsystem.	<b>Nicht erfüllt:</b> Die Integration wurde aus technischen Gründen nicht durchgeführt.
9	TUM	Experimentelle Validierung der parallelen Trübungsmessung	<b>Teilweise erfüllt:</b> Für zwei verschiedene Organismen konnte die Funktion gezeigt werden.
10	TUM	Maßstabsverkleinerung der Biokatalysator-Herstellung	<b>Erfüllt:</b> Die Biokatalysatorherstellung mit zweiseitiger pH-Regelung im mL-Maßstab ist etabliert.
11	TUM	Maßstabsverkleinerung der Biotransformation	<b>Erfüllt:</b> Sowohl Biokatalyse, als auch Probenvorbereitung für die GC-Analyse sind automatisiert.

Ziel	Bearbeiter	Soll	Ist
12	TUM	Parallele Optimierung Biokatalysator-Herstellung	<b>Erfüllt:</b> Im Rahmen der Optimierung der Biokatalysatorherstellung mit Hilfe eines genetischen Algorithmus wurden sieben Parallelansätze (Generationen) durchgeführt.
13	TUM	Verifizierung des optimierten Prozesses im Liter-Maßstab	<b>Erfüllt:</b> Die Verifizierung im Litermaßstab wurde erfolgreich durchgeführt.
14	Wacker	Verifizierung des optimierten Prozesses im m <sup>3</sup> -Maßstab	<b>Nicht erfüllt:</b> Die Verifizierung im m <sup>3</sup> -Maßstab wurde nicht durchgeführt, da keine wirtschaftlichen Prozessbedingungen (Enantiomerenüberschuss > 98 % bei hoher Produktkonzentration) gefunden werden konnten.
15	TUM	Vergleichende ökonomische und ökologische Bilanzierung	<b>Erfüllt:</b> Die vergleichende Bilanzierung wurde für drei biotechnologische Prozesse durchgeführt.

## 6 Ausblick

Die bei der intensiven Arbeit mit dem gesamten System des Bioreaktorblocks gemachten Erfahrungen zeigen, dass die maximale Anzahl an Pipettiervorgängen pro Zeit, die der Pipettierroboter durchführen kann, den am meisten limitierenden Faktor darstellt. Zusätzlich verschärft sich die Situation bei der Durchführung von Kultivierungen im Zulaufverfahren oder weiterführender aufwändiger at-line Analytik. Ein Ansatz zur Lösung des Problems ist die Entkopplung von Routine- und Sonderpipettieraufträgen durch die Entwicklung einer neuen Technologie zur individuellen Substrat- und Titrationsmittelzugabe (Mikrodosierblock). Dieser könnte als weiteres Modul den Bioreaktorblock ergänzen und die Zugabe von Titrationsmittel und Nährlösung übernehmen. Der Pipettierarm des Laborroboters wäre dann frei für z.B. die Probenahme und –aufbereitung oder Zugabe von Induktionsmittel.

Eine weitere Herausforderung stellt die immense Datenmenge dar, die das System liefert. Jeder Reaktor ‚produziert‘ neben den on-line gemessenen Daten für pH und pO<sub>2</sub> sowie systeminternen Prozessdaten wie z.B. Titrationsflüsse auch die at-line gewonnenen Analytikdaten. Mit den heute im Labor üblichen Mitteln der Datenverarbeitung kann diese Datenflut kaum mehr bewältigt werden. Auf Grund der guten Erfahrungen bei der Nutzung von relationalen Datenbanken bietet sich in Zukunft der Einsatz einer SQL-Datenbank im ‚back-end‘ an. Zur Verfügbarmachung und Auswertung könnten bewährte ‚data-mining‘ Produkte eingesetzt werden.

## 7 Zusammenarbeit mit Kooperationspartnern

### 7.1 Projekttreffen mit den Projektpartnern

30. Juli 2004	1. Projekttreffen mit allen Partnern in Garching
30. November 2004	„Kick-off“ der 4. Antragsrunde ICBio in Hamburg
04. März 2005	2. Projekttreffen mit allen Partnern in Regensburg
05. August 2005	3. Projekttreffen mit allen Partnern in Jülich
30. März 2006	Statusseminar der 4. Antragsrunde ICBio in Hamburg
30. März 2006	4. Projekttreffen mit allen Partnern in Hamburg

### 7.2 Austausch von Mitarbeitern

13. Juni 2006	Dr. Krause (PreSens) in Garching
---------------	----------------------------------

## 8 Öffentlichkeitsarbeit

Vortrag	Weuster-Botz D, Puskeiler R, Kusterer A, Kaufmann K, John G, Arnold M (2004): Methods and devices for high-throughput bioprocess design (HTBD). Internationaler Informationstag Mikro-Bioverfahrenstechnik der DECHEMA, Frankfurt, 11.11.2004.
Exponat	Weuster-Botz D, Kusterer A, Kaufmann K, John GT, Arnold M: Personal Biotechnikum. Forum Life Science 2005, Garching, 16.-17.02.2005.
Vortrag	Weuster-Botz D, Puskeiler R, Kusterer A, Kaufmann K, John G, Arnold M (2005): High-throughput bioprocess design. Forum Life Science 2005, Garching, 16.-17.02.2005.
Publikation	Weuster-Botz D (2005): High-throughput bioprocess design for a faster time to market. Interview in: Etterer T, Konrad M, Nassauer J: Bayern Innovativ Special Report Forum Life Science 2005: Bioengineering.



Publikation	Kusterer A, Kaufmann K, Weuster-Botz D (2005): Parallele Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> im Bioreaktorblock. GIT 4/2005: 308-309.
Poster	Weuster-Botz D, Puskeiler R, Kusterer A, Kaufmann K, John GT, Arnold M (2005): Parallel bioreactors on a milliliter-scale for high-throughput bioprocess design. Biochemical Engineering XIV, July 10-14, 2005, Harrison Hot Springs, BC, Canada.
Publikation	Puskeiler R, Kusterer A, John GT, Weuster-Botz D (2005): Miniature bioreactors for automated high-throughput bioprocess design (HTBD): reproducibility of parallel fed-batch cultivations with <i>Escherichia coli</i> . <i>Biotechnol Appl Biochem</i> <b>42</b> : 227-235.
Publikation	Weuster-Botz D, Puskeiler R, Kusterer A, Kaufmann K, John GT, Arnold M (2005): Methods and milliliter scale devices for high-throughput bioprocess design. <i>Bioprocess Biosyst Eng</i> <b>28</b> : 109-119.
Exponat	Arnold M: High Throughput Bioprocessing System. Exponat auf dem Messestand der DASGIP AG, BioTechnica 2005 (Hannover)
Publikation	Weuster-Botz D (2006): Mikro-Bioverfahrenstechnik. <i>Chem Ing Tech</i> <b>78</b> : 256-260.
Vortrag	A. Kusterer, K. Kaufmann, Ch. Krause, M. Arnold, D. Weuster-Botz: „Automation of Disposable Stirred-Tank Bioreactors“. GVC/DECHEMA Jahrestagungen 2006 mit 24. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, Wiesbaden, 26.-28.09.2006