

Schlussbericht

zur zweiten Förderphase
der strategischen Allianz

prot P.S.I. - *protein Pressure Specific Activity Impact*

***„Modulation der Reaktivität von Proteinen und
Thermodynamik durch Druck“ (Phase II, TP A)***

FKZ: 031B1080 (A-D)

Berichtszeitraum: 01.04.2021 – 30.09.2024

PreSens Precision Sensing GmbH

Dr. Gregor Liebsch

(Kordinator)

Inhalt

I. Kurze Darstellung zur Allianz protP.S.I. - protein Pressure Specific Activity Impact (Phase II, TP A).....	iii
1. Aufgabenstellung.....	iii
2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde	iii
3. Planung und Ablauf des Vorhabens	v
4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde.....	vii
5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen.....	vii
6. Wichtigste Positionen der zahlenmäßigen Nachweise	viii
7. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit.....	viii
8. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit der Ergebnisse im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans	viii
9. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen.....	viii
10. Erfolgte oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 11	viii
IV. „Kurzfassung“ (Berichtsblatt).....	xiv

Schlussbericht zu Nr. 8.2

Förderkennzeichen: 031B1080 (A-D)
Vorhabenbezeichnung: Allianz protP.S.I. – protein Pressure Specific Activity Impact: „„Modulation der Reaktivität von Proteinen und Thermodynamik durch Druck““ (Phase II, TP A)
Laufzeit des Vorhabens: 01.04.2021 – 30.09.2024

I. Kurze Darstellung zur Allianz protP.S.I. - protein Pressure Specific Activity Impact (Phase II, TP A)

1. Aufgabenstellung

Die Innovationsallianz protP.S.I. verfolgt das Ziel, den Prozessparameter Druck gezielt für verfahrenstechnische Prozesse, insbesondere in der Feinchemie, nutzbar zu machen. Dadurch soll sowohl die Effizienz der Produktentwicklung als auch die Wirtschaftlichkeit der Herstellungsprozesse optimiert werden. Grundlage hierfür ist die Erforschung und Identifizierung kritischer Proteinstabilitätsgrenzen sowie der relevanten Druckbereiche, die aktivierend oder deaktivierend wirken. Diese wissenschaftliche Basis wurde bereits erfolgreich in der ersten Förderphase geschaffen.

Darüber hinaus konnte die Allianz technologische Grundlagen für kontinuierliche und *batch*-basierte Produktionsverfahren im Labormaßstab entwickeln. Dabei wurde nicht nur der Prozessparameter Druck für Prozessmodifikationen genutzt, sondern auch eine integrierte Sensorik implementiert, die eine inline- und online-Überwachung des Prozessverlaufs ermöglicht. Zudem wurden neuartige Ventile zur Entnahme kleinvolumiger Proben während des Betriebs entwickelt.

In der zweiten Phase der Allianz wurden diese Erkenntnisse gezielt in der Feinchemie sowie weiteren Industriebranchen zur Anwendung gebracht. Die einzelnen Teilprojekte der Allianz untersuchten dabei konkrete Umsetzungsmöglichkeiten mit dem übergeordneten Ziel, den Transfer von der Laborforschung in die industrielle Praxis zu realisieren. Das erworbene Know-how wurde in Form von Veröffentlichungen in wissenschaftlichen Journalen sowie auf Messen und Kongressen geteilt. Dadurch werden Interessenten befähigt werden, Kontakte herzustellen und fundierte Entscheidungen darüber zu treffen, ob eine Biologisierung ihrer Prozesse sinnvoll ist. Die erfolgreiche Zusammenarbeit zwischen Wirtschaft und Wissenschaft soll unter Einbindung neuer Impulsgeber mit dem Ziel des Transfers auch nach Ende der Förderphase der Innovationsallianz fortgeführt werden.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

In der zweiten Förderphase baute das Konsortium der Innovationsallianz protP.S.I. auf den Erkenntnissen und Ergebnissen der ersten Phase auf und entwickelt diese gezielt weiter. Während die erste Phase einer linearen Forschungs- und Wertschöpfungskette folgte – von der Proteinstrukturanalyse (Projektbereich A; dieser Projektbereich ist nicht in der Förderung der zweiten Phase) über die Prozessanalytik (Projektbereich B; **B1: Inline Analytik begaster Systeme**) bis hin zur Prozessentwicklung und -implementierung (Projektbereich C; **C1: Biokatalyse unter Druck** und **C2: Prozessführungsstrategien**) – orientierte sich die Struktur der zweiten Phase an den hierarchischen Ebenen der Proteine selbst. Diese dynamische Struktur erlaubte es den Teilprojekten, flexibel auf neue

Erkenntnisse zu reagieren und sowohl im Detail als auch im Gesamtkontext zur Weiterentwicklung der Methode der Biokatalyse unter Druck beizutragen. Im Mittelpunkt standen dabei der Transfer dieser Technologie aus dem Labor in die industrielle Anwendung – ein Ziel, das alle Partner gleichermaßen verfolgen. Die Teilprojekte der zweiten Förderphase übernahmen dabei folgende Rollen:

i) **Primärstruktur** – Die Teilprojekte bilden grundlegende Bausteine aus Werkzeugen und Wissen.

-> Möglichkeit diese in Labormustern und Forschungsreaktoren konkret auszuprobieren, in Betrieb zu nehmen, Funktions- und Leistungstests durchzuführen und (Vor)Untersuchungen für weitere Schritte in kleinem Maßstab zu machen.

ii) **Sekundärstruktur** – Die Teilprojekte vernetzen sich zu einem technologischen Rückgrat, das einen regel- und steuerbaren Gesamtprozess ermöglicht.

-> Schnittstellen und Kommunikation, um einen Prozess unter Druck so unter Kontrolle zu bringen, dass konkrete Prozessführungsstrategien in Testreaktoren angewendet werden können. Anbindung von Sensoren an ein Prozessleitsystem, Daten-Austausch zum Festlegen von Betriebsdaten und Reaktorauslegungen oder zur Auswahl von eventuellen Enzymvarianten anhand realer Testläufe im Mikromaßstab. Realisierung eines definierten Betriebsmodus in einem Reaktor durch Prozessleitsystem, das sowohl Steuerung und Regelung von Aktuatoren und Sensoren zusammenbringt als auch das Know-how hinsichtlich tatsächlich sinnvoller und getesteter (*in silico* und real). In der „Sekundärstruktur“ wird die Biokatalyse unter Druck für konkrete Anwendungen erstmals real durchführbar.

iii) **Tertiärstruktur** – Die Teilprojekte übernehmen eine spezifische biotechnologische Funktion, indem sie sich individuell an den jeweiligen Prozess anpassen und diesen steuern.

-> Wissen und Werkzeuge aus den einzelnen Teilprojekten werden zusammen in zielgerichtete biotechnologische Funktion gebracht. Pilotanlagen werden möglich mit allen technischen und intellektuellen Ergebnissen und Erkenntnissen. Konkrete Anwendung im Sinne der Herstellung von Produkten. Im Ergebnis entsteht hier auf Allianzebene und damit in höherer Ebene als in den Teilprojekten Know-How hinsichtlich der „Modulation der Reaktivität von Proteinen und Thermodynamik durch Druck“ und damit Informationen zur generellen Anwendbarkeit der Methode über die Allianz(partner) hinaus.

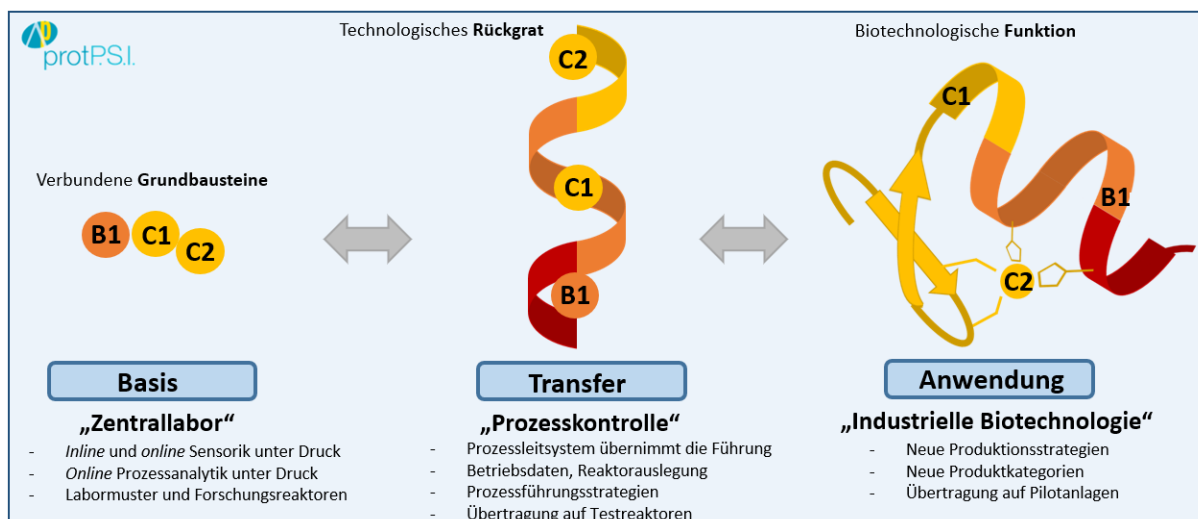


Abbildung 1: Darstellung des Zusammenwirkens in der zweiten Förderphase. B1: Inline Analytik begaster Systeme, TUHH, Prof. Liese, TUHH, Prof. Schlüter, Eurotechnica GmbH, PreSens GmbH. C1: Biokatalyse unter Druck, GALAB Laboratories GmbH, TUHH, Prof. Liese. C2: Prozessführungsstrategien, TUHH, Prof. Pörtner, GALAB Laboratories GmbH, Ingenieurbüro Dr.-Ing. Schoop GmbH, HS Furtwangen, Prof. Hass

Langfristige Perspektiven und Nachhaltigkeit

Die Innovationsallianz protP.S.I. strebt an, konventionelle chemische Produktionsverfahren, in denen Druck eine Rolle spielt, durch biotechnologische Alternativen zu ersetzen. Damit leistet sie einen Beitrag zur Umsetzung der Vision einer nachhaltigen, bio-basierten Wirtschaft (Bioökonomie), wie sie von der Bundesregierung angestrebt wird. Konkret sollen durch den Einsatz spezifischer Enzyme und eine gezielte Steuerung des Drucks in Feinchemikalien-Produktionsprozessen sowohl die Produktausbeute und -qualität erhöht als auch die Produktionskosten gesenkt werden. Bereits in der ersten Förderphase wurden hierfür wichtige Grundlagen gelegt.

Ein besonderer Fokus liegt auf der ökologischen Nachhaltigkeit: Die neuen Verfahren sollen Ressourcenschonung, Abfallvermeidung und Energieeinsparung ermöglichen. Dies trägt nicht nur zur ökonomischen Effizienz bei, sondern wirkt sich auch positiv auf soziale Nachhaltigkeitsaspekte aus. In der zweiten Förderphase sollen diese Ansätze auf weitere Branchen – etwa die Lebensmittelindustrie – übertragen werden, um durch die gezielte Nutzung des Prozessparameters Druck weitere nachhaltige und effiziente Produktionsmethoden zu etablieren.

Innovationstransfer und wirtschaftliche Verwertung

Neben der Weiterentwicklung und Anwendung der Forschungsergebnisse innerhalb der Allianz sollen auch externe Partner von den gewonnenen Erkenntnissen profitieren. Durch Publikationen und Präsentationen auf Messen und Kongressen wird das Wissen gezielt verbreitet, sodass Unternehmen aus verschiedenen Industriezweigen prüfen können, inwieweit sich eine Anpassung ihrer Produktionsprozesse unter Nutzung des Drucks als Prozessparameter lohnt.

Das übergeordnete Ziel ist der wissenschaftlich fundierte Transfer eines anwendungsorientierten Know-hows in die Industrie, um langfristig hochinnovative Produkte und Verfahren zu ermöglichen. Der wachsende Bedarf an nachhaltigen Produktionsmethoden – getrieben durch politische Vorgaben und das allgemeine Bewusstsein für die Klimaproblematik – verstärkt die Relevanz dieses Projekts. Die Erweiterung des Konsortiums um zahlreiche assoziierte und interessierte Partner unterstreicht das Potenzial der Innovationsallianz protP.S.I. aus wissenschaftlicher, wirtschaftlicher und bioökonomischer Perspektive.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Tabelle 1: Partner und Assoziierte der Forschungs- und Entwicklungs-Allianz protP.S.I. in der zweiten Förderphase

Forschungs- und Entwicklungsallianz "prot P.S.I." in der zweiten Förderphase							
Partner	Institut	Zuordnung	Funktion	Kontakt			
				Vormane	Name	Email	Telefon
Agrano		Assoziierter	Assoziierter	Pflimlin	Marc	marc.pflimlin@agrano.de	07642 67262
AOT		Assoziierter	Assoziierter	Breisinger	Fabian	fabian.breisinger@aot.com	08370 922 80-0
Hochschule Furtwangen	Medical and Life Sciences	C2, UA	Partner	Volker	Hass	volker.claus.hass@hfueu	0421 17230947
Ingenieurbüro Dr.- Ing. Schoop GmbH		C2; Antragsteller	Partner	Karl Michael	Schoop	info@schoop.de	040 754922-30
PreSens – Precision Sensing GmbH		B1; Antragsteller	Partner	Gregor	Liebsch	Gregor.Liebsch@presens.de	0941 942 72 117
Technische Universität Hamburg	Technische Biokatalyse	B1, C1; UA	Partner	Andreas	Liese	liese@tuhh.de	040 428 78-3018
Technische Universität Hamburg	Bioprozess-Biosystemstechnik	C2; UA	Partner	Ralf	Pörtner	poertner@tuhh.de	040 42878-2886
Technische Universität Hamburg	Mehrphasenströmungen	B1; UA	Partner	Michael	Schlüter	michael.schlueter@tu-harburg.de	040 42878-3293
TuTech Innovation GmbH		Dienstleistung	Assoziierter	Thomas	Sperling	sperling@tutech.de	040 76629-6344

Die Partner sind organisiert in den Teilprojekten **B1**: Inline Analytik begaster Systeme, TUHH, Prof. Liese, TUHH, Prof. Schlüter, Eurotechnica GmbH, PreSens GmbH, **C1**: Biokatalyse unter Druck, GALAB Laboratories GmbH, TUHH, Prof. Liese und **C2**: Prozessführungsstrategien, TUHH, Prof. Pörtner, GALAB

Laboratories GmbH, Ingenieurbüro Dr.-Ing. Schoop GmbH, HS Furtwangen, Prof. Hass. Verbunden sind sie über den Konsortialvertrag, der Koordinator ist PreSens. Innerhalb der Teilprojekte fungiert die TuTech als Kooperationsvertragspartner des jeweiligen Antragstellers, die Institute sind an die TuTech als Unterauftrag bzw. F&E Auftrag gebunden. Die TuTech übernimmt zusätzlich die Aufgabe PR und Kommunikation nach außen. Innerhalb der Allianz läuft der Austausch auf Projekt(gruppen)ebene und/oder im Rahmen der jeweiligen Rolle mit allen anderen Partnern.

Mit einer kostenneutralen Verlängerung um 6 Monate konnten die Arbeiten wie geplant durchgeführt werden, wobei die Verlängerung hauptsächlich Arbeiten von B1 betraf. Die Teilprojekte C1 und C2 verlängerten ebenfalls mit der Absicht die Ergebnisse der noch durchzuführenden Arbeiten in Teilprojekt B1 (Scale-up Reaktor) mit Hinblick auf die bereits erfolgreich abgeschlossenen eigenen Arbeitspakete in C1/C2 im noch durchzuführenden bzw. anzufertigenden gemeinsamen Allianz-Abschlussmeeting und -bericht zu diskutieren und zu bewerten mit dem Ziel, das erreichte Gesamtergebnis und den Erfolg der Allianz protP.S.I. nach Abschluss aller Arbeiten zu quantifizieren und zu dokumentieren.

Die Notwendigkeit der Verlängerung für das Teilprojekt B1 ergab sich aus dem 5. Arbeitspaket. Dies sah die Fertigung und die Inbetriebnahme des HD-Plattformreaktorsystems in der Form eines Treibstrahlschlaufenreaktors (Scale-Up) vor. Das Institut für Technische Biokatalyse (Prof. Liese) war für die Bereitstellung und Charakterisierung des immobilisierten Enzyms zur Anwendung im Hochdruckreaktor zuständig. Die Lieferzeit des Trägermaterials betrug entgegen den Erwartungen 10 Wochen. Ergänzend fanden Versuche zur vollständigen prozesstechnischen Charakterisierung des Reaktionssystems mit dem Enzym Glucose Oxidase im kleinen Maßstab statt. Dabei wurde die Enzymaktivität bei unterschiedlichen Druckstufen aufgenommen und im Hinblick auf die Prozessintensivierung durch die Druckvariation untersucht. Um die Versuche im HD-Plattformreaktorsystems zu starten, wurde parallel eine Untersuchung der Stabilität charakterisiert durch die Halbwertszeit des immobilisierten Enzyms durchgeführt. Basierend auf diesen Systemstudien ergänzt um zusätzlichen Druckstufen wurde das gesamte Betriebsfenster des Reaktorsystems unter den gegebenen hydrodynamischen und anlagenspezifischen Bedingungen festgelegt. Das Institut für Mehrphasenströmungen (Prof. Schlüter) hatte mit Festlegung des enzymatischen Modellreaktionssystems Glucose Oxidase zu Jahresbeginn 2023 mit der Konzeptionierung und Planung eines Scale-Ups begonnen. Im 1. Quartal 2023 wurde anhand der Erkenntnisse aus dem Versuchsaufbau im Labormaßstab ein Skalierungsansatz basierend auf einem Treibstrahlschlaufenreaktor entwickelt. Für das Scale-Up-Konzept wurde im 2. und 3. Quartal 2023 in Kooperation mit den Projektpartnern ein Basic- und Detailengineering durchgeführt. Während der Beschaffung wurde deutlich, dass die benötigte Mess- und Pumpentechnik, entsprechend der Spezifikation, nur im Rahmen eines Sondergeräte- bzw. Sondermaschinenbaus verfügbar wären. Die spezifische Fertigung der Bauteile hätte sowohl die Kosten als auch den Zeitrahmen des Projekts gesprengt. Das Konzept der Anlage musste entsprechend überarbeitet und angepasst werden. Im Zuge dieser Anpassung wurde die Druckstufe der Anlage auf 100 bar reduziert. Durch diese Änderung konnten die Kosten sowie die Lieferzeiten deutlich reduziert werden, dennoch hatten einige spezifische Komponenten eine Lieferzeit von knapp 3 Monaten.

Alle notwendigen Peripheriegeräte waren Februar 2024 geliefert, sodass eine Fertigung des Aufbaus entsprechend des noch offenen Arbeitspakets 5.2 bei der Firma Eurotechnica in Bargteheide forciert werden konnte. Die Integration der Steuerungs- und Regelungstechnik erfolgt hierbei in enger Zusammenarbeit mit dem Ingenieurbüro Schoop. Die Integration und finale Inbetriebnahme der Sensorik erfolgte in enger Abstimmung mit dem Partner PreSens Precision Sensing GmbH.

Durch eine kostenneutrale Verlängerung vom 01.04.2024 bis 30.09.2024, um 6 Monate, d.h. eine kostenneutrale Verlängerung für die Projektmonate 37 bis 42, konnten die Arbeiten abgeschlossen werden.

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

In der Phase I (1.-3. Jahr) wurden

- Untersuchungen zu den kritischen Stabilitätsgrenzen von Proteinen durch Identifizierung von Strukturdeskriptoren unter Druck (Projektbereich A - Proteinstrukturanalyse),
- die Etablierung von analytischen Methoden zur online und in situ Reaktionskontrolle der biokatalytischen Synthese unter Druck (Projektbereich B - Prozessanalytik),
- sowie die Etablierung und Optimierung von beispielhaften Labormustern und Laborprozessen in der Industriebranche Feinchemie (Projektbereich C - Prozessentwicklung)

durchgeführt.

Die Umsetzung der einzelnen Projektbereiche bzw. Teilprojekte erfolgte zwar hinsichtlich der jeweiligen Projektpartner hochspezialisiert und fokussiert, jedoch im Rahmen der Allianz nicht für sich alleinstehend: neu erarbeitete Kenntnisse von kritischen Proteinstabilitäten unter Druck wurden zur industriellen Nutzung direkt in ausgewählte Prozesse integriert und unter Verwendung neuer analytischer Methoden gegen den jeweiligen Erwartungswert getestet. In der sich anschließenden Phase II (4.-6. Jahr) sollten die in Phase I erworbenen Kenntnisse, Methoden, Muster und Prozesse in funktionellen Demonstrationsanlagen zum Einsatz kommen.

Als Basis für die weiteren Arbeiten standen die folgenden Entwicklungen aus Phase I bereits zu Beginn der Phase II mindestens als Know-How oder Prototyp zur Verfügung:

1. Hochdruckzelle zur Analytik von Struktur und Aktivität unter Druck (A1)
2. Software für in-silico protein engineering mit Verhaltensvorhersage (A2)
3. inline-O₂-Sensorik (B1)
4. Probenahmeventil für die online Analytik von Reaktionen unter Druck (B2)
5. Batch-Reaktoren (B1)
6. kontinuierliche Reaktoren (C1) zusammen mit Know-How der Reaktor-Integration von an Mesh- oder Partikel-gebundenen Enzymen (B1, C1)
7. Ansteuer- und Regelmöglichkeiten von Reaktoren, Prozessleitsystem (C2)
8. Prozessentwicklung in-silico (C2)
9. Druck-Fällungsreaktor (C5)

Im Rahmen der ersten Phase wurden über 40 wissenschaftliche Publikationen und Präsentationen veröffentlicht oder zu Veröffentlichung vorbereitet sowie zusätzlich Promotions-, Master-, Bachelor- und eine Projektarbeiten durchgeführt.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die Bearbeitung und Umsetzung der Arbeitspakete der einzelnen Teilprojekte erfolgte gemäß der unter „3. Planung und Ablauf des Vorhabens“ gelisteten Tabelle „Partner und Assoziierte der Forschungs- und Entwicklungs-Allianz protP.S.I. in der zweiten Förderphase“.

6. Wichtigste Positionen der zahlenmäßigen Nachweise

Alle Kosten im geförderten Projekt wurden von den Partnern in den jeweiligen Mittelabrufen gelistet und der Planung zugeordnet. Auf diese Mittelabrufe sei hier verwiesen.

7. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die geleistete Arbeit entspricht den in Projektanträgen dargestellten Vorhaben.

8. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit der Ergebnisse im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Durch die neuartigen apparativen, sensorischen und modellbasierten Lösungen und Werkzeuge zur Prozessentwicklung und -optimierung können enzymatische Prozesse unter Beachtung aller Prozessparameter inklusive (Hoch)Druck wirtschaftlicher und nachhaltiger gestaltet werden. Durch die Anbindung neuer Lösungen zur Überwachung, Steuerung und Regelung an das industriell etablierte Prozessleitsystem (WinErs der Firma IB Schoop) wird die Nutzung dieser Technologien in der industriellen Produktion ermöglicht. Die Ergebnisse der Allianz protP.S.I. helfen, neue biotechnische Prozesse schneller zu entwickeln und ermöglichen einen schnelleren Marktzugang mit neuartigen, effizient und wirtschaftlich produzierten Produkten.

Die wirtschaftlichen Projektpartner und assoziierten Partner beabsichtigen die Ergebnisse in ihre jeweiligen Angebote und Prozesse zu integrieren. Die AGRANO GmbH & Co beabsichtigt die Nutzung der modellbasierten Werkzeuge, zur Optimierung der enzymatischen Produktion von Bio-Nährmedien und so die Wirtschaftlichkeit der Herstellung von fermentativen Produkten in Bio-Qualität zu verbessern.

9. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Es sind keine Fortschritte bei anderen Stellen bekannt geworden.

10. Erfolgte oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 11

Im Rahmen der zweiten Phase der Allianz protP.S.I. sind folgende Publikationen, Präsentationen und Master- und Doktorarbeiten entstanden:

Teilprojekt B1

Publikationen in wissenschaftlichen Zeitschriften:

Niehaus, D.; Lyberis, A.; Houssaini, S. I.; Peccin, Z.; Liebsch, G.; Bubenheim, P.; Hoffmann, M.; Liese, A.; Schlüter, M. (2025). High-Pressure Reactor Technology for Aerated Biotransformations. *Chemical Engineering & Technology*, 48(1). DOI: 10.1002/ceat.202400043.

Vorträge/Poster auf wissenschaftlichen Fachtagungen:

Niehaus, D.; Johannsen, M.; Ohde, D.; Perz, F.; Bubenheim, P.; Liebsch, G.; Liese, A.; Schlüter, M. (2021), Enzyme catalysed reactions under high pressure in aerated bioreactors, ECCE/ ECAB, Online conference

Lyberis, A.; Percin, Z.; Niehaus, D.; Liebsch, G.; Bubenheim, P.; Schlüter, M.; Liese, A. (2022), Technical Applicability of Aerated Biocatalytic Systems Under Pressure, Biocat 2022, Hamburg, Germany.

Niehaus, D.; Johannsen, M.; Ohde, D.; Perz, F.; Bubenheim, P.; Liebsch, G.; Liese, A.; Schlüter, M. (2021), Design of aerated high pressure reactors for enzyme catalysed reactions, Himmelfahrtstagung on Bioprocess Engineering, Online conference.

Masterarbeiten:

Selma Iraqi Houssaini, Calibration of Optical Sensors under Pressure for Precise Monitoring of Oxygen Concentration in Biotechnological Processes, external Master Thesis at Eurotechnica GmbH in Bargeheide, Germany, 2023

Lisa Katharina Hahn, Optimisation and hydrodynamic characterisation of single-phase flow-through periodic open-cell structures for the immobilisation of enzymes, Master Thesis in Cooperation with the Institute of Technical Biocatalysis (ITB, TUHH), 2023

Jeswin Kannampuzha Francis, Review and Implementation: Extended Reality in Process Engineering, Master Project, 2023

Saad Abdul Samad Posharkar, Development and validation of a mathematical model for a high pressure multiphase bioreactor with MATLAB, Master Thesis, 2022

Doktorarbeiten:

Daniel Niehaus, Development of an Aerated High-Pressure Reactor for Biotechnological Applications, 2025

Teilprojekt C1

Publikationen in wissenschaftlichen Zeitschriften:

Reich, J. A.; Aßmann, M.; Hölting, K.; Bubenheim, P.; Kuballa, J.; Liese, A.; Liese, A. (2022). Shift of reaction equilibrium at high pressure in the continuous synthesis of neuraminic acid. In: Beilstein *J. Org. Chem.* 2022, 18, 567–579. <https://doi.org/10.3762/bjoc.18.59>.

Hölting, K.; Aßmann, M.; Bubenheim, P.; Liese, A.; Kuballa, J. (2024). Modelling approach for the Continuous Biocatalytic Synthesis 2 of *N*-Acetylneuraminic Acid in Packed Bed Reactors. In: *Processes* 12 (10), 2191. <https://doi.org/10.3390/pr12102191>.

Hölting, K.; Götz, S.; Aßmann, M.; Bubenheim, P.; Liese, A.; Kuballa, J. (2024). Resilient Enzymes through Immobilisation: Stable NDP Polyphosphate Phosphotransferase from *Ruegeria pomeroyi* for Nucleotide Regeneration. In: *Catalysts* 14 (165). <https://doi.org/doi.org/10.3390/catal14030165>.

Vorträge/Poster auf wissenschaftlichen Fachtagungen:

Hölting, K.; Aßmann, M.; Andrich, J.; Bubenheim, P.; Liese, A.; Kuballa, J. (2021): *A complex reaction cascade for the biocatalysis of sialyllactose*. European Federation of Biotechnology 2021. Virtually.

Hölting, K.; Götz, S.; Aßmann, M.; Andrich, J.; Haro, F. L.; Bubenheim, P.; Liese, A.; Kuballa, J. (2021): *A complex reaction cascade for the biocatalysis of sialyllactose*. 13th European Congress of Chemical Engineering and 6th European Congress of Applied Biotechnology. Virtually.

Lopez Haro, F.; Reich, J. A.; Aßmann, M.; Hölting, K.; Andrich, J.; Götz, S.; Cangöz C.; Bubenheim, P.; Liese, A. (2022): *Effect of High Pressure on Polyphosphate Kinase Activity and Stability*. 10th International Congress on Biocatalysis 2022, Hamburg, Germany

Lopez Haro, F.; Reich, J. A.; Aßmann, M.; Hölting, K.; Andrich, J.; Götz, S.; Cangöz C.; Bubenheim, P.; Liese, A. (2022): *Effect of High Pressure on Polyphosphate Kinase Activity and Stability*. Summer School Biotransformations 2022, Bad Herrenhalb, Germany

Hölting, K.; Götz, S.; Aßmann, M.; Bubenheim, P.; Liese, A.; Kuballa, J. (2023): *Polyphosphate Kinase – Enzyme Stabilization Through Immobilization*. 14th European Congress of Chemical Engineering and 7th European Congress of Applied Biotechnology. Berlin, Germany.

Lopez Haro, F.; Reich, J. A.; Schmale, M.; Sharma, S.; Aßmann, M.; Hölting, K.; Andrich, J.; Bubenheim, P.; Liese, A. (2023): *Development of a Multi-Enzyme Reaction Cascade for the Production of Sialyllactose Under High Pressure*. Forschungsschwerpunkte (FSP) der TUHH Seminar 2023, Hamburg, Germany

Lopez Haro, F.; Reich, J. A.; Schmale, M.; Aßmann, M.; Hölting, K.; Andrich, J.; Bubenheim, P.; Liese, A. (2023): *Development of a Multi-Enzyme Reaction Cascade for the Synthesis of Sialyllactose Under High Hydrostatic Pressure*. DECHEMA Himmelfahrtstagung on Bioprocess Engineering 2023, Weimar, Frankfurt am Main, Germany

Lopez Haro, F.; Reich, J. A.; Schmale, M.; Sharma, S.; Hölting, K.; Aßmann, M.; Andrich, J.; Bubenheim, P.; Liese, A.; (2023): *Piezo-Bioprocesses: A Multi-Enzyme Reaction Cascade for the Production of Sialyllactose Under High Pressure*. Nordic-Irish Process Chemistry Conference 2023, Belfast, Northern Ireland

Lopez Haro, F.; Reich, J. A.; Schmale, M.; Sharma, S.; Hölting, K.; Aßmann, M.; Andrich, J.; Bubenheim, P.; Liese, A.; (2023): *Towards the Continuous Enzymatic Production of Sialyllactose under High Hydrostatic Pressure*. 14th European Congress of Chemical Engineering and 7th European Congress of Applied Biotechnology, Berlin, Germany.

Hölting, K.; Aßmann, M.; Bubenheim, P.; Liese, A.; Kuballa, J. (2024): *Modelling of an Immobilised Enzyme Cascade in Packed Bed Reactors for Continuous N-Acetylneuraminic Acid Synthesis*. Himmelfahrtstagung on Bioprocess Engineering 2024. Regensburg, Germany.

Hölting, K.; Aßmann, M.; Bubenheim, P.; Liese, A.; Kuballa, J. (2024): *Multi-Enzyme Cascade in Packed bed Reactors for Sialyllactose Synthesis*. 11th International Congress on Biocatalysis 2024. Hamburg, Germany.

Lopez Haro, F.; Reich, J. A.; Schmale, M.; Hölting, K.; Aßmann, M.; Bubenheim, P.; Liese, A.; (2024): *Use of High Hydrostatic Pressure for the Intensification of Multi-Enzyme Reaction Cascades*. DECHEMA Himmelfahrtstagung on Bioprocess Engineering 2024, Regensburg, Germany

Lopez Haro, F.; Reich, J. A.; Schmale, M.; Hölting, K.; Aßmann, M.; Bubenheim, P.; Liese, A.; (2025): *High Pressure as and Intensification Parameter for the Synthesis of Sialyllactose*. GlycoBioTech 2025. Berlin, Germany.

Lopez Haro, F.; Reich, J. A.; Schmale, M.; Hölting, K.; Aßmann, M.; Kuballa, J.; Bubenheim, P.; Liese, A.; (2025): *Synthesis Under Pressure: Multi-Enzyme Cascade for the Production of Sialyllactose*. Jahrestreffen DECHEMA/VDI-Fachgruppen Mischvorgänge, Hochdruckverfahrenstechnik und Mehrphasenströmungen. Hamburg, Germany.

Masterarbeiten:

Körtje, F. (2021): *Heterologous production of CMP-Neu5Ac-Synthetase and α 2,3-Sialyltransferase in recombinant E. coli and the impact of different antibiotic resistances*. Masterarbeit.

Stellwag, D. (2024): *Immobilisierung, Co-Immobilisierung und kinetische Analyse im Festbettreaktor verschiedener Enzyme zum Einsatz in einer Multi-Enzymkaskade zur kontinuierlichen Herstellung von Sialyllactose*. Masterarbeit.

Sachau, J. (2024): *Characterisation of immobilised enzymes in packed bed reactors for the development of a multi-enzyme cascade for the production of sialyllactose*. Masterarbeit.

Vashisht, A. (2024): *Effect of high hydrostatic pressure on the stability of enzymes*. Masterarbeit

Teilprojekt C2:

Publikationen in wissenschaftlichen Zeitschriften:

Appl, C.; Moser, A.; Baganz, F.; Hass, V. C. (2020): Digital Twins for Bioprocess Control Strategy Development and Realisation. In: *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 177, S. 63–94. DOI: 10.1007/10_2020_151.

Moser, A.; Appl, C.; Brüning, S.; Hass, V. C. (2020): Mechanistic Mathematical Models as a Basis for Digital Twins. In: *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 176, S. 133–180. DOI: 10.1007/10_2020_152.

Appl, C.; Baganz, F.; Hass, V. C. (2021): Development of a Digital Twin for Enzymatic Hydrolysis Processes. In: *Processes* 9 (10), S. 1734. DOI: 10.3390/pr9101734.

Reich, J. A.; Aßmann, M.; Hölting, K.; Bubenheim, P.; Kuballa, J.; Liese, A.; Liese, A. (2022). Shift of reaction equilibrium at high pressure in the continuous synthesis of neuraminic acid. In: *Beilstein J. Org. Chem.* 2022, 18, 567–579. <https://doi.org/10.3762/bjoc.18.59>.

Hölting, K.; Aßmann, M.; Bubenheim, P.; Liese, A.; Kuballa, J. (2024). Modelling approach for the Continuous Biocatalytic Synthesis 2 of N-Acetylneuraminic Acid in Packed Bed Reactors. In: *Processes* 12 (10), 2191. <https://doi.org/10.3390/pr12102191>.

Hölting, K.; Götz, S.; Aßmann, M.; Bubenheim, P.; Liese, A.; Kuballa, J. (2024). Resilient Enzymes through Immobilisation: Stable NDP Polyphosphate Phosphotransferase from *Ruegeria pomeroyi* for Nucleotide Regeneration. In: *Catalysts* 14 (165). <https://doi.org/doi.org/10.3390/catal14030165>.

Moser, A.; Appl, C.; Pörtner, R.; Baganz, F.; Hass, V. C. (2024): A New Concept for the Rapid Development of Digital Twin Core Models for Bioprocesses in Various Reactor Designs. In: *Fermentation* 10 (9), S. 463. DOI: 10.3390/fermentation10090463.

Vorträge auf wissenschaftlichen Fachtagungen:

Appl, C.; Baganz, F.; Hass, V. C. (2021): *Modelling of enzymatic hydrolysis processes for control strategy development*. ESBES - 13th European Symposium on Biochemical Engineering Sciences. Virtually.

Hass, V. C.; Appl, C.; Baganz, F. (2021): *Simultaneous development of an enzymatic process and the associated Digital Twin for advanced process planning and optimisation*. ECCE 13 & ECAB 6 - 13th European Congress of Chemical Engineering and 6th European of Applied Biotechnology. Virtually.

Hölting, K.; Aßmann, M.; Andrich, J.; Bubenheim, P.; Liese, A.; Kuballa, J. (2021): *A complex reaction cascade for the biocatalysis of sialyllactose*. European Federation of Biotechnology 2021. Virtually.

Hölting, K.; Götz, S.; Aßmann, M.; Andrich, J.; Haro, F. L.; Bubenheim, P.; Liese, A.; Kuballa, J. (2021): *A complex reaction cascade for the biocatalysis of sialyllactose*. 13th European Congress of Chemical Engineering and 6th European Congress of Applied Biotechnology. Virtually.

Appl, C.; Moser, A.; Fittkau, C.; Baganz, F.; Hass, V. C. (2022): *Towards a Digital Twin for Enzymatic Hydrolysis Processes in a Packed Bed Reactor*. Himmelfahrtstagung on Bioprocess Engineering 2022. Mainz, Germany.

Hass, V. C.; Appl, C.; Schoop-Zipfel, J.; Baganz, F. (2022): *Teaching control in biochemical engineering using a dynamic enzymatic hydrolysis process model and the control and automation software WinErs*. CHISA - 26th International Congress of Chemical and Process Engineering. Prague, Czech Republic.

Schoop-Zipfel, J.; Pörtner, R.; Hass, V. C.; Schoop, K.-M. (2022): *WinErs: A process control system for complex automations utilizing model-based control strategies*. ACHEMA 2022. Frankfurt.

Appl, C.; Baganz, F.; Hass, V. C. (2023): *A new digital twin for enzymatic hydrolysis processes applied to model-based process operation design*. ECCE 14 & ECAB 7 - 14th European Congress of Chemical Engineering and 7th European of Applied Biotechnology. Berlin, Germany.

Hölting, K.; Götz, S.; Aßmann, M.; Bubenheim, P.; Liese, A.; Kuballa, J. (2023): *Polyphosphate Kinase – Enzyme Stabilization Through Immobilization*. 14th European Congress of Chemical Engineering and 7th European Congress of Applied Biotechnology. Berlin, Germany.

Appl, C.; Fittkau, C.; Baganz, F.; Hass, V. C. (2024): *BioRefineryTrainer - A new training simulator for biorefineries*. CHISA - 27th International Congress of Chemical and Process Engineering. Prague, Czech Republic.

Hölting, K.; Aßmann, M.; Bubenheim, P.; Liese, A.; Kuballa, J. (2024): *Modelling of an Immobilised Enzyme Cascade in Packed Bed Reactors for Continuous N-Acetylneuraminic Acid Synthesis*. Himmelfahrtstagung on Bioprocess Engineering 2024. Regensburg, Germany.

Hölting, K.; Aßmann, M.; Bubenheim, P.; Liese, A.; Kuballa, J. (2024): *Multi-Enzyme Cascade in Packed bed Reactors for Sialyllactose Synthesis*. 11th International Congress on Biocatalysis 2024. Hamburg, Germany.

Schoop-Zipfel, J.; Appl, C.; Moser, A.; Niehaus, D.; Schlüter, M.; Pörtner, R.; Hass, V. C. (2024): *A new type of process control system for enzymatic processes utilizing multiple-input/multiple-output control strategies*. ACHEMA 2024. Frankfurt.

Schoop-Zipfel, J.; Appl, C.; Moser, A.; Niehaus, D.; Schlüter, M.; Pörtner, R.; Hass, V. C. (2024): *A new type of process control system for enzymatic processes utilizing multiple-input/multiple-output control strategies*. DECHEMA Forum 2024. Ludwigshafen, Germany.

Arndt, L.; Schmale, M.; Aßmann, M.; Hölting, K.; Kuballa, J.; Bubenheim, P.; Liese, A.; Pörtner, R. (2024): *Model-assisted Design and Optimization of a Biocatalytical Cofactor Regeneration Process in a Pressurized Packed-Bed Reactor*. Himmelfahrtstagung on Bioprocess Engineering 2024. Mainz, Germany.

Masterarbeiten:

Stellwag, D. (2024): *Immobilisierung, Co-Immobilisierung und kinetische Analyse im Festbettreaktor verschiedener Enzyme zum Einsatz in einer Multi-Enzymkaskade zur kontinuierlichen Herstellung von Sialyllactose*. Masterarbeit.

Sachau, J. (2024): *Characterisation of immobilised enzymes in packed bed reactors for the development of a multi-enzyme cascade for the production of sialyllactose*. Masterarbeit.

Doktorarbeiten:

Arndt, L. (2024): Model-assisted design and optimization of biotechnological processes. Dissertation, TUHH (Technische Universität Hamburg). Einreichung 2024.

Moser, A. (2024): Development of a model-based tool for the design of biotechnological processes under consideration of scale-dependent effects. Dissertation, TUHH (Technische Universität Hamburg). Einreichung 2024.

Körtje, F. (2021): *Heterologous production of CMP-Neu5Ac-Synthetase and α 2,3-Sialyltransferase in recombinant E. coli and the impact of different antibiotic resistances*. Masterarbeit.

Appl, C. (2023): *A new digital twin for enzymatic hydrolysis processes applied to model-based process design*. Dissertation, UCL (University College London). Verteidigung: London, 08.06.2023. Verleihung: 08.08.2023.

IV. „Kurzfassung“ (Berichtsblatt)

Berichtsblatt

<p>1. ISBN oder ISSN</p> <p>---</p>	<p>2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung)</p> <p>Schlussbericht</p>
<p>3. Titel</p> <p style="text-align: center;">protP.S.I. - protein Pressure Specific Activity Impact „Modulation der Reaktivität von Proteinen und Thermodynamik durch Druck“ (Phase II, TP A)</p>	
<p>4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)]</p> <p>Dr. Liebsch, Gregor (Koordinator der Allianz)</p> <p>PreSens Precision Sensing GmbH Am BioPark 11 93053 Regensburg</p>	<p>5. Abschlussdatum des Vorhabens</p> <p>30.09.2024</p>
	<p>6. Veröffentlichungsdatum</p> <p>01.04.2025</p>
	<p>7. Form der Publikation</p> <p>Online-Publikation</p>
<p>8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse)</p> <p>PreSens Precision Sensing GmbH Am BioPark 11 93053 Regensburg</p> <p>Ingenieurbüro Dr. – Ing. Schoop GmbH Riechelmannweg 4 21109 Hamburg</p> <p>GALAB Laboratories GmbH Am Schleusengraben 7 21029 Hamburg</p> <p>Eurotechnica An den Stücken 55 22941 Bargteheide</p>	<p>9. Ber. Nr. Durchführende Institution</p>
	<p>10. Förderkennzeichen</p> <p>FKZ: 031B1080 (A-D)</p>
	<p>11. Seitenzahl</p> <p>73</p>
<p>12. Fördernde Institution (Name, Adresse)</p> <p>Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF)</p> <p>53170 Bonn</p>	<p>13. Literaturangaben</p>
	<p>14. Tabellen</p>
	<p>15. Abbildungen</p>
<p>16. Zusätzliche Angaben</p>	
<p>17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)</p>	

18. Kurzfassung

Der Schlussbericht der Innovationsallianz protP.S.I. beschreibt Arbeiten, um konventionelle chemische Produktionsverfahren, in denen Druck eine Rolle spielt, durch biotechnologische Alternativen zu ersetzen. Konkret wurden durch den Einsatz spezifischer Enzyme und eine gezielte Steuerung des Drucks in Feinchemikalien-Produktionsprozessen sowohl die Produktausbeute und -qualität erhöht als auch die Produktionskosten gesenkt. Bereits in der ersten Förderphase wurden hierfür wichtige Grundlagen gelegt.

Ein besonderer Fokus lag auf der ökologischen Nachhaltigkeit: Die neuen Verfahren sollen Ressourcenschonung, Abfallvermeidung und Energieeinsparung ermöglichen. Dies trägt nicht nur zur ökonomischen Effizienz bei, sondern wirkt sich auch positiv auf soziale Nachhaltigkeitsaspekte aus. In der zweiten Förderphase wurden diese Ansätze auf weitere Branchen – etwa die Lebensmittelindustrie – übertragen, um durch die gezielte Nutzung des Prozessparameters Druck weitere nachhaltige und effiziente Produktionsmethoden zu etablieren.

Die Ziele des Teilprojekts B1 umfassten den Bau und die Inbetriebnahme einer Demonstrations-Reaktoranlage im Technikumsmaßstab, die Immobilisierung von Enzymen sowie die Erweiterung der Reaktorsensorik für Sauerstoff, pH und CO₂. Ein innovatives Reaktorkonzept basierend auf dem Jet-Loop-Prinzip wurde entwickelt und konstruktiv umgesetzt. Ein zentraler Aspekt war die räumliche Trennung von Enzymimmobilisierung und Begasung, um unerwünschte Effekte durch direkten Gaskontakt mit dem Biokatalysator zu vermeiden. Das Konzept umfasst zwei Strömungsschleifen: Die innere sorgt für intensive Durchmischung und Stoffaustausch, während die äußere mehrere Bioreaktoren um den zentralen Reaktor anordnet. Dies erleichtert die Skalierung und ermöglicht mehrstufige enzymatische Reaktionen. Am Beispiel der Glucoseoxidation zeigt sich das Prinzip: In einem Reaktor oxidiert Glucoseoxidase Glucose, während in einem zweiten immobilisierte Katalase Wasserstoffperoxid abbaut. Ein zentraler Energieeintrag über eine Treibdüse steigert die Effizienz und reduziert den apparativen Aufwand. Bewährte Konzepte aus dem Labormaßstab, wie elektro-optische Sensorik, wurden in den großtechnischen Aufbau übernommen. Zur Integration in das Prozessleitsystem WinErs wurden Anpassungen vorgenommen, sodass Messwerte nun in Echtzeit erfasst und ausgewertet werden.

Das Teilprojekt C1 fokussierte sich auf eine Reaktionskaskade im Festbettreaktor zur Synthese von Sialyllactose. In der ersten Projektphase wurde eine zweistufige Kaskade zur Synthese von N-Acetylneuraminsäure etabliert. In der zweiten Phase erfolgte die Erweiterung um zwei Enzyme zur Sialyllactose-Synthese. Die benötigten Enzyme wurden bei GALAB hergestellt, isoliert, lyophilisiert und für längere Lagerung stabilisiert. Ein Screening verschiedener Trägermaterialien führte zur erfolgreichen Immobilisierung der Enzyme, die anschließend in Edelstahl-Säulen integriert wurden. Die Optimierung erfolgte durch Untersuchungen zur Druckabhängigkeit von Aktivität, Stabilität und Selektivität. Einige Enzyme zeigten unter Hochdruck eine erhöhte Aktivität, was die Prozessbedingungen erweiterte und die Nutzungsdauer verlängerte.

In Teilprojekt C2 wurden reaktionskinetische Modelle für den Festbett-Strömungsreaktor entwickelt und zur experimentellen Versuchsplanung genutzt. Die gewonnenen Daten flossen in die Modellüberarbeitung und die Entwicklung einer Standard Operating Procedure (SOP) für die Prozessautomatisierung ein. Ziel war die Pilotversion eines neuen Prozessleitsystems (PLS) „WinErs-Enzyme“ mit Hochdruck-Funktionalität. GALAB etablierte eine zweistufige enzymatische Sialyllactose-Synthese im Festbettreaktor. Die Enzyme wurden produziert, immobilisiert und kinetisch charakterisiert. Parallel dazu entwickelte die AG Hass ein erweitertes enzymatisches Prozessmodell für WinErs, während IB Schoop die erste Pilotversion des PLS realisierte. Die Optimierung des Hochdruck-Festbettreaktors erfolgte durch den Einsatz digitaler Zwillinge (DT), die Stabilitäts-, Leistungs- und Funktionsanalysen der Regelungsstrategien ermöglichten. Erweiterte Schnittstellen für neue Sensoren wurden integriert. Zudem optimierte AGRANO in Kooperation mit der AG Hass die industrielle Produktion von Bio-Nährmedien mittels adaptiver Prozessführungsstrategien. Durch die Verknüpfung mit dem PLS WinErs wird eine erhebliche Reduktion von Aufwand und Kosten in der biotechnologischen Prozessentwicklung erwartet. Die modellgestützte Prozessoptimierung soll auch kleinen Unternehmen zugänglich gemacht werden. Das Projekt leistete einen Beitrag zur Vereinfachung dieses Verfahrens, um es zeitgleich mit Pilotexperimenten durchzuführen. Eine neue adaptive, modellgestützte Prozessstrategie für die at-line-Prozessoptimierung unter Druck soll die Entwicklungszeit biotechnologischer Prozesse deutlich verkürzen.

19. Schlagwörter

Druckbasierte Produktionsverfahren, biotechnologische Prozesse, Enzymeinsatz, Immobilisierung von Enzymen, Druckabhängigkeit der Enzymaktivität, Sialyllactose-Synthese, Reaktorsensorik, Modellgestützte Prozessoptimierung, Enzymatisches Prozessmodell, Demonstrator-Reaktoranlage, Digitale Zwillinge, Prozessleitsystem

20. Verlag

21. Preis