Metrohm Deutschland

Gefördert durch:

Bundesministerium für Forschung, Technologie und Raumfahrt

Schlussbericht

Allianz Biotenside: Funktionsoptimierte Biotenside auf Basis von regional verfügbaren Rohstoffen durch optimierte biotechnologische Verfahren (Phase 2)

Teilprojekt 5: Entwicklung und Integration der Inline Raman Spektroskopie

gefördert im Rahmen der

Innovationsinitiative Industrielle Biotechnologie

Förderkennzeichen:

031B1059E

Zuwendungsempfänger:

Metrohm Deutschland GmbH & Co. KG

Ausführende Stelle:

Metrohm Deutschland GmbH & Co. KG

Projektleitung:

Michael Feige

Projektlaufzeit:

01.07.2021 bis 30.06.2025

Bearbeiter und Autoren:

Yvonne, Wörner, Martin Farkas, Verena Hasert, Michael Feige

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Forschung, Technologie und Raumfahrt unter dem Förderkennzeichen 031B1059E gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei der Autorin/beim Autor.

Projektpartner der Innovationsallianz und Bezeichnung der Teilprojekte (Phase 2)

Teilprojekt	FKZ	Projektpartner	Abkürzung	Bezeichnung
1	031B1059A	DALLI-WERKE GmbH & Co. KG	Dalli	Bewertung der industriellen Anwendungen von Biotensiden im Bereich Reinigungsmittel und Kosmetik
2	031B1059B	FESTO SE & Co. KG	FESTO	Automatisierung der Biotensid-Herstellung und Untersuchung auf die Nutzung der Biotenside als Reinigungsmittel in der Lebensmittelindustrie
3	031B1059C	Karlsruher Institut für Technologie (KIT) - BLT 2: Technische Biologie (bis 31.03.2023) / Elektrobiotechnologie (seit 01.04.2023)	KIT	Optimierung und Skalierung der Herstellung der Biotenside Xylitol- und Sorbitolllipide
4	031B1059D	Fabrik chemischer Präparate von Dr. Richard Sthamer GmbH & Co. KG	Dr. Sthamer	Untersuchung der Biotenside auf die Nutzung im Bereich Löschmittel
5	031B1059E	Metrohm Deutschland GmbH & Co. KG	Metrohm	Entwicklung und Integration der Inline Raman Spektroskopie
6	031B1059F	Universität Hohenheim, Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Fg. Bioverfahrenstechnik (150k)	Uni Hohenheim	Optimierung und Skalierung der Surfactinherstellung
7	031B1059G	oelheld GmbH	Oelheld	Untersuchung der Biotenside auf die Nutzung im Bereich Schmierstoffe
8	031B1059H	Universität Stuttgart, Institut für Akustik und Bauphysik IABP Abt. Ganzheitliche Bilanzierung GaBi	Uni Stuttgart IABP	Nachhaltigkeitsbewertung der Prozesse zur Biotensideherstellung und der Nutzung der Produkte
9	031B1059I	Henkel AG & Co. KGaA	Henkel	Untersuchung der Biotenside auf die Nutzung im Bereich Waschmittel
11	031B1059K	MyBiotech GmbH	MyBiotech	Entwicklung und Integration der Mikrojetaufarbeitungs Technologie
12	031B1059L	BASF SE	BASF	Untersuchung der Biotenside auf die Nutzung im Bereich Reinigungsmittel, Personal Care Produkte und Agronomie
13	031B1059M	Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB	Fraunhofer IGB	Herstellung von Mannosylerythritollipiden und Hochskalierung von Biotensiden
14	031B1059N	ifm group services GmbH	ifm	Entwicklung und Integration von Sensoren zur Detektion von Füllständen incl. Schaumerkennung in Bioreaktoren
15	031B1059O	Hermetia Baruth GmbH	Hermetia	Optimierung und Hochskalierung der Herstellung von Insektenfett
16	031B1059P	Universität Stuttgart, Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie IGVP	Uni Stuttgart IGVP	Herstellung von Cellobioselipiden und die Entwicklung einer Schaumfraktionierung

Inhaltsverzeichnis

1 Kurze Darstellung 4

1.1 Aufgabenstellung der Gesamtallianz und des Teilprojekts 4

1.2 Voraussetzungen und Vorarbeiten 5

1.3 Planung und Ablauf der Gesamtallianz und des Teilprojekts 6

1.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde 8

1.5 Zusammenarbeit im Konsortium 8

2 Eingehende Darstellung 10

2.1 Erzielte wissenschaftlich-technische Ergebnisse 10

2.2 Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises 25

2.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit 25

2.4 Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans 25

2.5 Während der Durchführung des Vorhabens bekanntgewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen 26

2.6 Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen 26

1 Kurze Darstellung

1.1 Aufgabenstellung der Gesamtallianz und des Teilprojekts

Ziel der Innovationsallianz Biotenside war es, erstmals in Deutschland eine strategische Allianz zwischen renommierten Firmen und Forschungseinrichtungen einzugehen, um Biotenside mit biotechnologischen Methoden aus heimischen nachwachsenden Roh- und Reststoffen gemeinsam wirtschaftlich herzustellen und deren Anwendungspotentiale systematisch zu untersuchen.
Es sollte hierzu im Konsortium die Herstellung und Aufreinigung der Biotenside aus verschiedenen nachwachsenden Rohstoffen so optimiert werden, dass diese in den Anwendungsbereichen Wasch- und Reinigungsmittel, Geschirrspülmittel, Kosmetik, Personal Care, Agronomie, Lebensmittel, Schmierstoffadditive und Löschmittel alternativ zu chemischen synthetisierten Tensiden eingesetzt werden können. Dabei waren auch Firmen in der Allianz involviert, die zuvor kaum oder gar nicht mit biotechnologischen Prozessen und Produkten in Berührung gekommen waren. Eine verstärkte Biologisierung der Tensidherstellung ist dabei nur mit Schlüsselinnovationen und strategischen Kooperationen von Rohstoffherstellern, Prozesstechnikern, Tensidherstellern und -anwendern mit den Forschungseinrichtungen möglich.

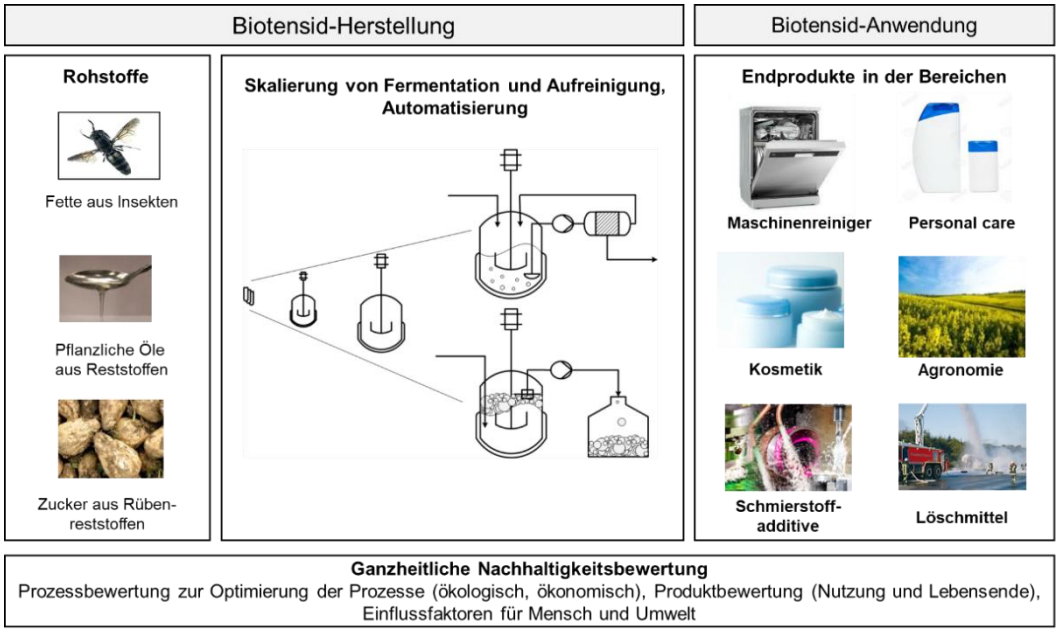

Abbildung 1: Wertschöpfungskette vom heimischen nachwachsenden Rohstoff hin zu Biotensid-haltigen Endprodukten für verschiedene Anwendungsbereiche innerhalb der Innovationsallianz Biotenside (Phase 2).

In der Innovationsallianz wurden hierzu in der ersten Projektphase unterschiedliche Biotenside – Rhamnolipide, Mannosylerythritollipide, Cellobioselipide, Surfactin und neue mikrobielle Biotenside – fermentativ aus nachwachsenden Rohstoffen hergestellt und auf ihre spezifischen Anwendungseigenschaften hin untersucht. Durch den Einsatz von unterschiedlichen Mikroorganismen und Rohstoffen, wie z.B. Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge, konnten die Eigenschaften der Biotenside über einen weiten Bereich variiert und somit die funktionellen Eigenschaften optimiert werden. Neben der fermentativen Herstellung wurde in der Allianz auch die enzymatische Synthese von Zuckertensiden untersucht. Durch Variation von verschiedenen Zuckern und Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge wurden neue Biotensidmoleküle mit an die Anwendung angepassten funktionellen Eigenschaften definiert und produziert (strukturbasierte Entwicklung). Begleitend wurde die gesamte Wertschöpfungskette hinsichtlich ökologischer und ökonomischer Gesichtspunkte ganzheitlich bewertet und so Handlungsempfehlungen für die jeweiligen Partner abgeleitet.
Für die zweite Projektphase wurden dann die zu untersuchenden Biotenside auf die vielversprechendsten Kombinationen aus der ersten Projektphase reduziert und somit auf die

Herstellung von Mannosylerythritollipiden MEL (3 Strukturvarianten), Cellobioselipiden CL (3 Varianten), Surfactin (1 Variante) und enzymatische Biotenside (2 Varianten) fokussiert. Die Herstellungsprozesse wurden zudem durch verschiedene Firmen mit technischen Weiterentwicklungen und Automatisierung sowie durch eine ganzheitliche Prozessbewertung unterstützt (Tabelle 1). Auch bei den Anwendungen wurde für die zweite Projektphase auf die vielversprechenden Ansätze aus der ersten Phase aufgebaut sowie neue Partner und Anwendungsbereiche hinzugewonnen (Tabelle 2).

Tabelle 1: Im Fokus stehende Biotenside und Prozesse sowie jeweils beteiligte Partner.

Biotenside und Prozesse	Verantwortlichkeiten
Mannosylerytritolliopid-Herstellung	Fraunhofer IGB
Cellobioselipid-Herstellung, Schaumfraktionierung	Universität Stuttgart IGVP
Surfactin- Herstellung	Universität Hohenheim
Xylitol-, Sorbitollipid-Herstellung	KIT
Automatisierung, Begasungsmodule	Festo
Raman-Sensorik	Metrohm
Füllstand-, Schaumsensorik	Ifm
Mikrojetaufarbeitung	MyBiotech
Prozessbewertung	Universität Stuttgart IABP

Tabelle 2: Untersuchung verschiedener Anwendungsbereiche und Beteiligung der Partner.

Anwendungsbereiche	Verantwortlichkeiten
Maschinengeschirrreiniger, Handgeschirrspülmittel, Allzweckreiniger, Duschgele, Shampoo	Dalli
Waschmittelformulierungen	Henkel
Reiniger für schäumende, nichtschäumende Anwendung, Industriereiniger, reinigende und Pflegende Personal Care Anwendungen,chemisch- technische Anwendungen, Agronomie	BASF
Löschmittel	Dr.Sthamer
Schmierstoffadditive	Oelheld
Reinigbarkeit von Industrieanlagen in der Lebensmittelherstellung	Festo

Im Rahmen des Teilprojekts 5: „Entwicklung und Integration der Inline-Raman-Spektroskopie“ entwickelte Metrohm ein Inline-Raman-Analysesystem zur Integration in biotechnologische Prozesse, um die Echtzeitüberwachung der Fermentation von MEL und CL zu ermöglichen. Der Schwerpunkt lag auf der präzisen Überwachung des Fermentationsprozesses zur Bestimmung der Biomassekonzentration. Dies ermöglichte eine gezielte Prozessoptimierung, beispielsweise die Entwicklung geeigneter Fütterungsstrategien während der Entwicklungsphase und die Steigerung der Produktionsraten in der Produktionsphase. Darüber hinaus wurde die Raman-Spektroskopie als selektive Methode eingesetzt, um Scale-up-Prozesse effizienter zu überwachen, zu optimieren und zu beschleunigen. Ein weiterer wichtiger Aspekt war die Entwicklung einer robusten, prozessstabilen Sensortechnologie sowie die Übertragung laborbasierter Raman-Erkenntnissen in die industrielle Anwendung.

1.2 Voraussetzungen und Vorarbeiten

Zu Beginn der ersten Phase des Vorhabens im Jahr 2017 waren die in der Allianz betrachteten Biotenside im industriellen Maßstab auf dem Markt noch nicht erhältlich und standen der Industrie daher nicht in größeren Mengen zur Verfügung. Nur durch die gemeinsamen Forschungs- und Entwicklungsarbeiten der strategischen Partner konnte somit die Vision verfolgt werden, neue biotechnologisch hergestellte Biotenside für den Markt und damit für den Konsumenten zu erschließen.

In der ersten Projektphase wurden zunächst mehrere Molekülvarianten der jeweiligen Biotenside untersucht. Dies wurde durch Verwendung unterschiedlicher Stämme und Fütterungsstrategien sowie Enzyme und deren Substrate realisiert. So wurden über 15 Mikroorganismen, mehrere Enzyme (15 Lipasen und 2 Glucosidasen), 13 zuckerhaltige Rohstoffe- und über 10 Öl- bzw. Fettsäure(alkohol)-varianten kombiniert und charakterisiert. Neben klassischen Pflanzenölen wurde auch Insektenfett verwendet. Dieses enthält unter den aktuellen Herstellungsbedingungen mittelkettige, gesättigte Fettsäuren und stellt eine heimische Alternative zu tropischen Ölen dar. Ausgehend von den verschiedenen nachwachsenden Rohstoffen konnten mehrere Struk-turvarianten unserer Biotenside hergestellt werden, nämlich 6 MEL-, 5 CL-, 1 ArLa, 1 XyLa, 3 SorL-Varianten sowie 2 verschiedene Surfactin- und 3 RL –Qualitäten und -Formulierungen. Dieses große Portfolio an Molekülvarianten eröffnete uns erstmals die Möglichkeit neben den grundlegenden Charakterisierungen, wie Strukturanalyse (HPTLC, NMR, GC, MALDI-TOF-MS, LC-MS) und tensidchemische Eigenschaften (Oberflächenspannung, CMC; Kontaktwinkel, HLB, Netzverhalten, Schaumverhalten, Fischdiagramm) auch die Eignung für die Bereiche Wasch- und Reinigungsmittel, Kosmetik, Pflanzenschutz und Lebens-mittel zu untersuchen. Die Ziele hierbei waren die Nachhaltigkeit in bestehenden Produkten zu verbessern und neue Produkte zu entwickeln. Vor allem sollten fossilbasierte Tenside durch Biotenside ausgetauscht werden. So wurde bereits in der ersten Phase festgestellt, dass einige MEL-, RL-, CL- und SorL- Varian-ten für den Wasch- und Reinigungsmittelbereich und den Kosmetikbereich geeignet sind. Surfactin zeigte vielversprechende Eigenschaften im Bereich der Schaumbildung und wurde daher für den Einsatz im Kosmetik- und Pflegeprodukten in Betracht gezogen.
Die Forschungs- und Entwicklungsarbeiten aus der ersten Phase waren zusammenfassend in jedweder Hinsicht sehr erfolgreich, dennoch waren diese noch nicht so weit fortgeschritten, dass die Prozesse und Biotenside in die freie Wirtschaft transferiert werden konnten. Die Fermentations- und Aufarbeitungsprozesse mussten hinsichtlich robuster, regel- und steuerbarer Prozesse und vor allem vereinfachter Aufarbeitungsmethoden mit weniger Prozessschritten weiterentwickelt werden. Nur so ist eine schrittweise Skalierung in die nächsten Größenordnungen sinnvoll. Auch ließen die vorherigen Performanceprofile in der Anwendungstestung noch zahlreiche Fragen offen, die durch die in der zweiten Phase verfügbaren größeren Mengen im Detail betrachtet und beantwortet werden konnten.

Metrohm Deutschland mit Sitz in Filderstadt unterstützt mit seinem breit auf gestellten Produktportfolio Kunden im Bereich der chemischen Analyse in der Labor- und Prozessanalytik. Metrohm Deutschland projektiert und fertigt maßgeschneiderte Prozessanalysensysteme, die für die Überwachung und Steuerung chemischer Prozesse in unterschiedlichsten Branchen, wie z. B. der Chemie, der Halbleitertechnik, der Stahl- und Automobilindustrie sowie der Leiterplattenherstellung eingesetzt werden. Metrohm Deutschland verfügt über mehr als 40 Jahre Erfahrung in der Online-Prozessanalytik. Die Produktpalette reicht von Analysengeräten für Einzelparameterbestimmungen bis zum höchstentwickelten Ex-sicheren Analysator für Multiparameter-Bestimmungen in den gefährlichsten Umgebungen. Mit den NIR-Prozessanalysatoren setzt Metrohm Deutschland den Standard für Echtzeit-Spektroskopie mit unvergleichlicher Stabilität und Leistung. Unsere Prozessanalysatoren-Familie führt Laboranalytik und Online-Überwachung und -Kontrolle zusammen. Die Prozessanalytik der Metrohm Deutschland wird von Herrn Dipl.-Ing. Michael Feige vertreten. Herr Feige verfügt über umfangreiche Expertise im Bereich Prozessanalytik und ist bei Metrohm seit über 30 Jahren in verschiedenen Funktionen tätig.

1.3 Planung und Ablauf der Gesamtallianz und des Teilprojekts

Die wissenschaftliche und technische Zusammenarbeit in der zweiten Phase der Allianz Biotenside war in sechs Arbeitspaketen entlang der Prozesskette vom nachwachsenden Rohstoff über die Prozessoptimierung bis hin zum Endprodukt bzw. der Anwendung geplant. In einem siebten Arbeitspaket wurde das Management des Gesamtprojektes definiert (Tabelle 3). Die Verknüpfung der einzelnen

Arbeitspakete, die damit verbundene Kooperation zwischen den einzelnen Projektteilnehmern und die jeweils beteiligten Partner sind im Detail in Abschnitt 1.5 dargestellt.

Tabelle 3: Arbeitsplan für die zweite Projektphase.

		Jahr 1		Jahr 2		Jahr 3	
		HJ1	HJ2	HJ3	HJ4	HJ5	HJ6
1	**Insektenfett-Herstellung**						
1.1	Optimierung und Skalierung der Insektenkultivierung						
1.2	Optimierung der Separation zur Fettgewinnung						
2	**Optimierung und Skalierung von Fermentations- und Enzymkonversionsprozessen**						
2.2	Fermentation von Mannosylerythritollipiden						
2.3	Fermentation von Cellobioselipiden						
2.4	Fermentation von Surfactin						
2.5	Enzymatische Konversion zu Xylitollipiden und Sorbitollipiden						
3	**Optimierung und Skalierung von Aufreinigungskonzepten**						
3.2	Aufreinigung von Mannosylerythritollipiden						
3.3	Aufreinigung von Cellobioselipiden						
3.4	Aufreinigung von Surfactin						
3.5	Aufreinigung von Xylitollipiden und Sorbitollipiden						
4	**Technische Weiterentwicklung und Automatisierung der Prozesse**						
4.1	Entwicklung und Integration von neuen Begasungsmodulen						
4.2	Entwicklung und Integration einer Schaumfraktionierung						
4.3	Entwicklung und Integration von Füllstands- und Schaumsensorik						
4.4	Entwicklung und Integration von Ramanspektroskopie						
4.5	Entwicklung und Integration der Mikrojetaufarbeitungs-Technologie						
4.6	Entwicklung und Integration der Automatisierung (BioBasics)						
4.7	Integration und Evaluierung des Softsensors zur Biomasse- und Produktbestimmung (BioMaRe)						
5	**Anwendungstechnische Untersuchungen und Formulierungen**						
5.1	Maschinengeschirrreiniger, Handgeschirrspülmittel, Allzweckreiniger, Badreiniger						
5.2	Waschmittelformulierungen						
5.3	Reiniger für schäumende- und nicht-schäumende Anwendungen, Industriereiniger						
5.4	Duschgele, Shampoo						
5.5	reinigende und pflegende Personal Care Anwendungen						
5.6	Agronomie: Herbizide, Pflanzenschutz, Fungizide						
5.7	Brandbekämpfung: Löschmittel						
5.8	Schmierstoffadditive						
5.9	Reinigbarkeit von industriellen Flächen der Lebensmittelindustrie						
6	**Ganzheitliche Nachhaltigkeitsbewertung**						
6.1	Ökologische Prozessbewertung zur Optimierung der Prozesse						
6.2	Ökonomische Prozessbewertung zur Prozessoptimierung						
6.3	Produktbewertung (Nutzung und Lebensende)						
6.4	Einflussfaktoren für Mensch und Umwelt						
7	**Projektmanagement**						
7.1	Wissenschaftliches Management						
7.2	Öffentlichkeitsarbeit						

Auf den Arbeitsplan aufbauend wurden 16 verschiedene Meilensteine definiert, die den Fortschritt der Allianz zu festgelegten Zeitpunkten während der 3-jährigen Laufzeit der zweiten Projektphase abbilden sollten (Tabelle 4).

Tabelle 4: Geplante Meilensteine innerhalb der zweiten Projektphase.

		Monat
M1	Biologische Kenndaten für den Scale-up generiert	6
M2	Begasungsmodule integriert	12
M3	Prozessbewertung durch Nachhaltigkeitsanalyse erfolgt (Cradle-to-Gate)	12
M4	Softsensor integriert (BioMaRe)	12
M5	1. Ergebnisse der Anwendungen liegen vor; 1. Feedback und Selektion	12
M6	Schaumfraktionierung bewertet	18
M7	Titer und Produktivität verbessert	18
M8	Vereinfachte DSP-Strategien entwickelt und bewertet	18
M9	1. Scale-up erfolgt	21
M10	Neue Sensorik implementiert	24
M11	2. Ergebnisse der Anwendungen liegen vor; 2. Feedback und Selektion	24
M12	Cradle-to-Grave Bewertung erfolgt	24
M13	Bioreaktor Uni Hohenheim mit BioBasics umgerüstet	30
M14	2. Scale-up erfolgt	30
M15	Bewertung der Einflussfaktoren für Mensch und Umwelt dargestellt	36
M16	Bioreaktor Fraunhofer mit BioBasics umgerüstet	36

AP4: Technische Weiterentwicklung und Automatisierung der Prozesse

Die Fermentationen und Aufarbeitungen sollen durch neue Sensoren, Begasungsmodule, Automatisierung, neue Aufarbeitungsmöglichkeiten mit Schaumfraktionierung und Mikrojettechnologie optimiert und verbessert werden. So können stabilere Prozesse erreicht werden.

AP4.4: Entwicklung und Integration von Ramanspektroskopie

Im Rahmen des Projekts wurde zunächst ein Raman-Spektrometer mit integrierter XTR-Fluoreszenzunterdrückung bereitgestellt, um störende Signale zu minimieren und eine präzise Analyse zu ermöglichen. Daraufhin wurde die Prozessintegration einer geeigneten Sonde entwickelt, die den Anforderungen des biotechnologischen Fermentationsprozesses entspricht. Zunächst wurden prozessanalytische Messungen von CL und MEL in kleinem Maßstab in einem Laborfermenter durchgeführt und anschließend die erarbeiteten Methoden auf einen 42-Liter-Fermenter für MEL übertragen, um die Skalierbarkeit zu überprüfen. Parallel dazu wurde die Datenbasis für MEL-Prozesse erweitert, einschließlich Scale-up-Versuchen auf 42 Liter. Die Robustheit der Methode wurde durch eine erhöhte Datenmenge, die Auswahl geeigneter Datenvorbehandlungen sowie die Evaluierung der XTR-Fluoreszenzunterdrückung sichergestellt. Eine Prozesschnittstelle zur Anbindung an das Regelsystem wurde entwickelt, um eine spätere Integration in die Prozesssteuerung zu ermöglichen. Zudem erfolgte die Übertragung von Kalibriermodellen auf Fremdsysteme. Nach ausreichender Validierung der Datenbasis wurde die Einbindung in das Regelsystem realisiert. Zuletzt erfolgte die finale Datenauswertung.

1.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Das STZ (HS Reutlingen) hat in der ersten Phase bereits evaluiert, dass Raman-Spektroskopie für die Messungen des Biotensids MEL und der Fettsäuren aus dem Substrat möglich ist. Metrohm möchte die Prozess-Raman-Spektrometerhardware und -software inklusive notwendiger Fluoreszenz-Unterdrückung für die Prozessüberwachung von Bioprozessen weiterentwickeln. Die Optimierung des Systems hinsichtlich der Anforderungen für Bioprozesse (Sterilisierbarkeit), die simultane Erfassung mehrerer Prozessparameter stehen hierbei im Vordergrund. In diesem Zusammenhang soll die Weiterentwicklung geeigneter Sondentechnologie (inerte, schmutzabweisende, sterilisierbare Oberfläche, Funktionsüberwachung) vorangebracht werden.

1.5 Zusammenarbeit im Konsortium

Die Koordination und Konsortialführung der Allianz wurde durch Herrn Dr. Müller der Firma Dalli übernommen. Daneben war Frau Dr. Susanne Zibek am Fraunhofer IGB als wissenschaftliche Koordinatorin und Verantwortliche für die Öffentlichkeitsarbeit tätig.
Ausgehend von heimischen nachwachsenden Rohstoffen wurden die für die zweite Phase ausgewählten Biotenside durch verbesserte biotechnologische Prozesse für die Anwendung in innovativen Produkten hergestellt. Die Industriepartner arbeiteten hierzu mit den Forschungseinrichtungen entlang der gesamten Wertschöpfungskette in mehreren Teilbereichen eng zusammen: Rohstoffherstellung, Skalierung der Prozesse und deren technische Weiterentwicklung, der Biotensid-Anwendung und die Nachhaltigkeitsbewertung für Prozess und Produkt
Von Hermetia sowie verschiedenen assoziierten Partnern wurden hierbei unterschiedliche zucker- und ölhaltige Roh- und Reststoffe ausgewählt und bereitgestellt.
Die Umsetzung zu den jeweiligen Biotensiden wurde durch optimierte fermentative und enzymatische Prozesse mit anschließender Aufreinigung bei den wissenschaftlichen Einrichtungen des Fraunhofer IGB, des KIT, der Uni Hohenheim und Uni Stuttgart IGVP durchgeführt.
Unterstützt wurde die Prozessentwicklung außerdem durch die technische Weiterentwicklung und Automatisierung der Prozesse bei den Industriepartnern Festo, ifm, Metrohm, MyBiotech sowie dem Steinbeis-Transferzentrum Innovative Prozessanalytik (IPAT) im Unterauftrag des Fraunhofer IGB.

Die Biotensid-Formulierung und Anwendung adressierte die Herstellung von Formulierungen mit den hergestellten Biotensiden in den Bereichen Wasch- und Reinigungsmittel, Kosmetik, Bioremediation, Pflanzenschutz, Schmiermittel und Feuerlöschmittel. Durch die Kompetenzen der Industriepartner Henkel, Dalli, BASF, FESTO, Oelheld und Dr. Sthamer konnten verschiedene unterschiedliche Anwendungsbereiche erschlossen werden und so die Wahrscheinlichkeit erhöht werden, dass für die hergestellten Biotenside eine marktfähige Anwendung gefunden werden kann.
Über die gesamte Prozesskette hinweg wurde abschließend eine ganzheitliche Nachhaltigkeitsbewertung der Biotensid-Herstellung hinsichtlich ökologischer, ökonomischer und sozialer Gesichtspunkte durchgeführt. Dies umfasste die Lebenszyklusanalyse (LCA) vom Rohstoff zum Biotensid bis zum Endprodukt durch die Uni Stuttgart IABP, sowie die techno-ökonomische Bewertung (TEE) und die Bewertung der technologischen Reife von Prozessen (TRL) durch die jeweiligen Hersteller der Biotenside.

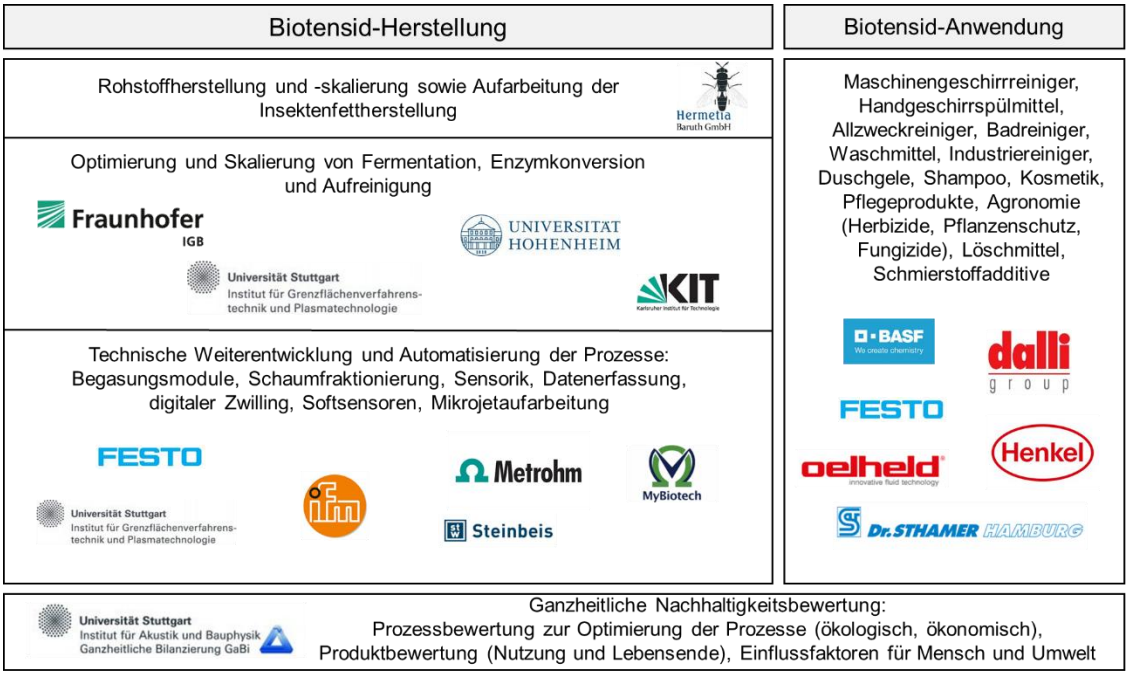

Abbildung 2: Wissenschaftliche und technische Zusammenarbeit innerhalb der zweiten Prozessphase entlang der Prozesskettemit den beteiligten Projektteilnehmern.

Als ein entscheidender Schlüssel für die Kooperation zwischen Herstellern und Anwendern und damit den Erfolg der Allianz als Ganzes wurde wie schon in der ersten Projektphase ein Bemusterungsplan definiert. Dieser legte fest, welche Mengen an Biotensiden von den jeweiligen Herstellern an die Anwender für deren Untersuchungen geliefert werden sollten. Es wurden zu Projektbeginn Mengen definiert und dann während der Projektlaufzeit in unterschiedlichen Chargen in Absprache zwischen Hersteller und Anwendern geliefert.

Als sehr positiv in der gesamten Zusammenarbeit wurde gesehen, dass es auch in der zweiten Förderphase zu keinen redundanten Messungen kam. Zu Beginn des Projekts wurden Messgeräte und Kriterien ermittelt und die Messungen untereinander aufgeteilt. Beispielsweise erklärte sich BASF bereit die klassischen physiko-chemischen Tensidmessungen durchzuführen und die Messergebnisse mit dem Konsortium zu teilen. So konnte auch eine effiziente Mustermengennutzung gewährleistet werden. Zudem wurden Anwendungstest so aufgeteilt, dass ergänzende Ergebnisse für alle Partner erzielt wurden.

Zum regelmäßigen persönlichen Austausch und zur Sicherstellung des Projektfortschritts und der Zusammenarbeit wurden von den Koordinatoren Dalli und Fraunhofer IGB halbjährige Konsortial-meetings organisiert. Beginnend mit einem Kick-Off-Meeting wurden weitere Projektmeetings sowohl als

Online-Treffen als auch, nachdem dies wieder möglich war, bei den Partnern vor Ort abgehalten. Die regelmäßigen Treffen dienten einerseits dem persönlichen Austausch zwischen den Partnern, zum anderen wurde auch der aktuelle Fortschritt in Form von 10-minütigen Präsentationen mit anschließender Diskussion durch jeden Partner dargestellt.

Im Verlauf des Projektes arbeitete Metrohm eng mit dem Fraunhofer IGB zusammen. Die vom Fraunhofer IGB durchgeführten Fermentationen wurden dabei mit den Raman-Spektrometern von Metrohm überwacht und in regelmäßigen Intervallen Spektren aufgenommen. Parallel dazu wurden vom Fraunhofer IGB Proben aus dem Reaktor gezogen und im Labor vermessen. Die Messwerte konnte Metrohm nutzen, um Kalibriermodelle zur Vorhersage verschiedener Reaktionsparameter zu erstellen, die in den darauffolgenden Fermentationen Echtzeitwerte für diese Parameter liefern.
Die Prüfung der Übertragbarkeit von Datensätzen, die mit unterschiedlichen Spektrometern aufgenommen wurden, erfolgte in enger Zusammenarbeit zwischen dem Fraunhofer IGB und dem Steinbeis Transferzentrum Innovative Prozessanalytik IPAT erfolgt. Dafür wurden Datensätze mit STZ ausgetauscht und besprochen. Es erfolgte eine Auswertung der Datensätze von Metrohm und ein Vergleich untereinander.

2 Eingehende Darstellung

2.1 Erzielte wissenschaftlich-technische Ergebnisse

AP4.4.1 Weiterentwicklung eines RAMAN-Prozess-Spektrometers

Folgende Punkte sind aus AP4.4.1 hinsichtlich der Vorhabensbeschreibung, aber auch im Hinblick auf eine industrielle Anwendung abgeschlossen:

- Entwicklung einer invasiven Tauchsonde
    - mit Kugellinse für maximale Raman-Ausbeute bei Fermentationsprozessen.
    - Die Tauchsonde lässt sich über Standard-Anschlüsse/Adapter in Bioreaktoren einbringen.
    - SIP- und CIP-Fähigkeit ist gegeben.
    - Hardwareseitige Übertragung von Labor-Fermentern auf einen größeren Maßstab ist gegeben und möglich.
- Raman-Prozess-Spektrometer
    - XTR-Fluoreszenzunterdrückung kann angewendet werden, um die relevante Raman-Information aus den Spektren zu selektieren.
    - Die Fluoreszenzunterdrückung kann auch dafür genutzt werden, um bei Bedarf zur Auswertung der Biomasse und optischen Dichte (die fluoreszenzabhängig ist) für die Auswertung heranzuziehen.
- Integration in Prozesskommunikations- und Anlagensteuerungen
    - Das Prozessbild für die Konzentrationsmessung steht zur Verfügung. Über verschiedene standardisierte Prozesskommunikationsprotokolle können Resultate an eine Steuerung übertragen werden und zur Regelung genutzt werden.

Zum Erreichen einer besseren Plug&Play-Fähigkeit wurde neben der Tauchsonde ein spezieller Sondenadapter entwickelt, der sich nahtlos in einen Schott-ViewPort® integrieren lässt. Dieser Adapter ist ein Standard in der biotechnologischen Industrie und ermöglicht eine komplett noninvasive Analytik. Die Messung erfolgt kontaktlos durch ein Schauglas, das hinsichtlich der Reinheit für die Raman-Messung optimiert wurde. Im Laborumfeld kann somit schnell zwischen verschiedenen Reaktoren gewechselt werden. Im großindustriellen Maßstab gelten häufig GMP- Bedingungen oder aufwendige Validierungsverfahren für die Implementierung einer neuen Messstelle. Durch den Schott ViewPort® Adapter müssen Messstellen in der Regel nicht neu validiert werden. CIP-/SIP-Prozeduren sind ebenso wie inerte Zustände aufgrund des Verzichts auf O-Ring-Dichtungen und Totraum möglich.

Mit der Lösung ist nun auch die Unabhängigkeit der Messtechnik / Sonde hinsichtlich der Variabilität von Reaktorgrößen, Wandstärken und Materialien gegeben. Das Sondenmaterial kann zudem günstiger aufgebaut sein, da kein direkter Medienkontakt vorhanden ist.

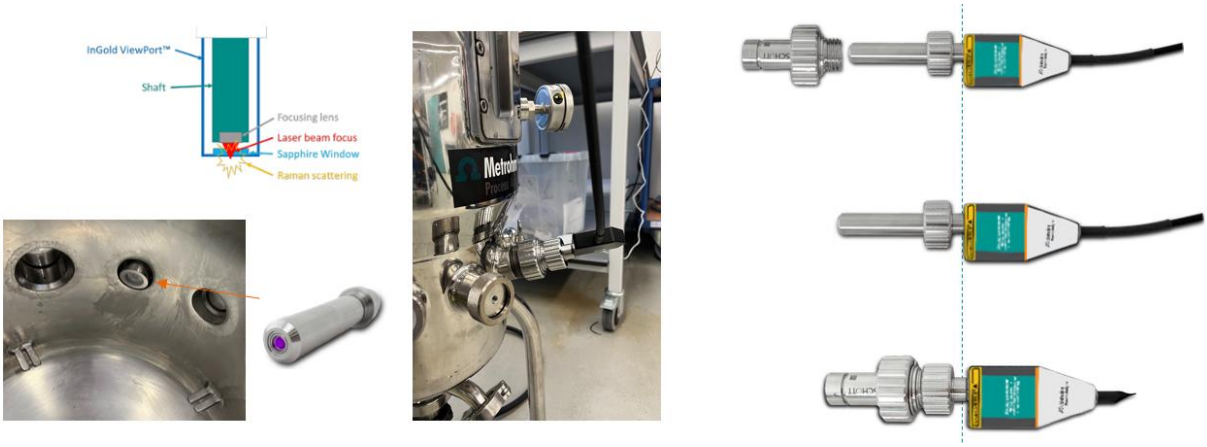

Abbildung 3 Schott ViewPort® mit Metrohm Raman Adapter für die non-invasive Online-Messung durch ein Schauglas. Integration in den Reaktor durch Standard-Anschlüsse (Ingold-Verschraubung).

AP4.4.2 Neu-Entwicklung bzw. Transfer bestehender Kalibriermodelle

- **Übertragbarkeit von Kalibriermodellen zwischen verschiedenen Spektrometern (Steinbeis Transferzentrum Innovative Prozessanalytik IPAT (STZ))**

Um die Übertragbarkeit von Datensätzen mit verschiedenen Spektrometern zu überprüfen, wurden die gemessenen Spektren und Datensätze in Zusammenarbeit mit dem STZ untersucht. Dafür wurden die Daten von Metrohm und dem STZ unabhängig ausgewertet und die Ergebnisse anschließend verglichen. Da alle Datensätze mit unterschiedlichen hardwareseitigen Parametern durchgeführt wurden (Integrationszeit, Mittelwertbildung) und gleichzeitig auch die Fermentationsparameter jeweils zeitliche Fortschritte gemacht haben, konnte eine direkte Methodenübertragung aufgrund der hohen Variabilität der Messparameter nicht erfolgen. Aus dem Bericht des STZ: „Dies schließt die Übertragbarkeit für verschiedene Spektrometer aber nicht aus. Es muss darauf geachtet werden, dass bei Verwendung unterschiedlicher Hardware die Messparameter weitestgehend identisch sind und eine geänderte Prozessführung nicht Ergebnisse außerhalb des Modells liefert.“ Eine Übertragung von Datensätzen aus Phase I für die MEL-Fermentation mit Datensätzen aus Phase II des Projekts konnte daher nicht durchgeführt werden, jedoch wurden alle erforderlichen Erkenntnisse erbracht, die eine prinzipielle Eignung nicht ausschließen.

- **Entwicklung von Kalibriermodellen für CL-Prozesse, Skalierung auf größere Maßstäbe und Erhöhung der Robustheit sowie Evaluierung geeigneter mathematischer Vorbehandlungen**

Skalierung

Nachdem die CL-Fermentationen im Labormaßstab (10-L- Reaktor) mittels Raman-Spektroskopie inline und parallel als Bypass-Messung durchgeführt wurden, erfolgt im nächsten Schritt die Skalierung auf den 42-L-Maßstab.
Abbildung 4 zeigt die Spektren zu den Zeitpunkten der Probenentnahme für die Referenzanalytik. Die spektralen Eigenschaften variieren sehr stark von Batch zu Batch. Dies liegt zum einen an der Weiterentwicklung und Optimierung der CL-Fermentation an sich, wodurch es unter anderem zu einer

Erhöhung der Ausbeute und damit Erhöhung der Biomassekonzentration und optischen Dichte kommt. Zum anderen wurden hardwareseitig Optimierungen durchgeführt, sodass die CL-Fermentation aus 2024 die repräsentativste Messung darstellte. Bei früheren CL-Fermentationen kam es im Laufe der Zeit aufgrund der Biomasse-Zunahme zu einer starken Übersteuerung des Detektors, sodass zu den Zeitpunkten die Spektren für die Modellbildung nicht genutzt werden konnten und eine Vorhersage der Konzentrationen unsicher sind.

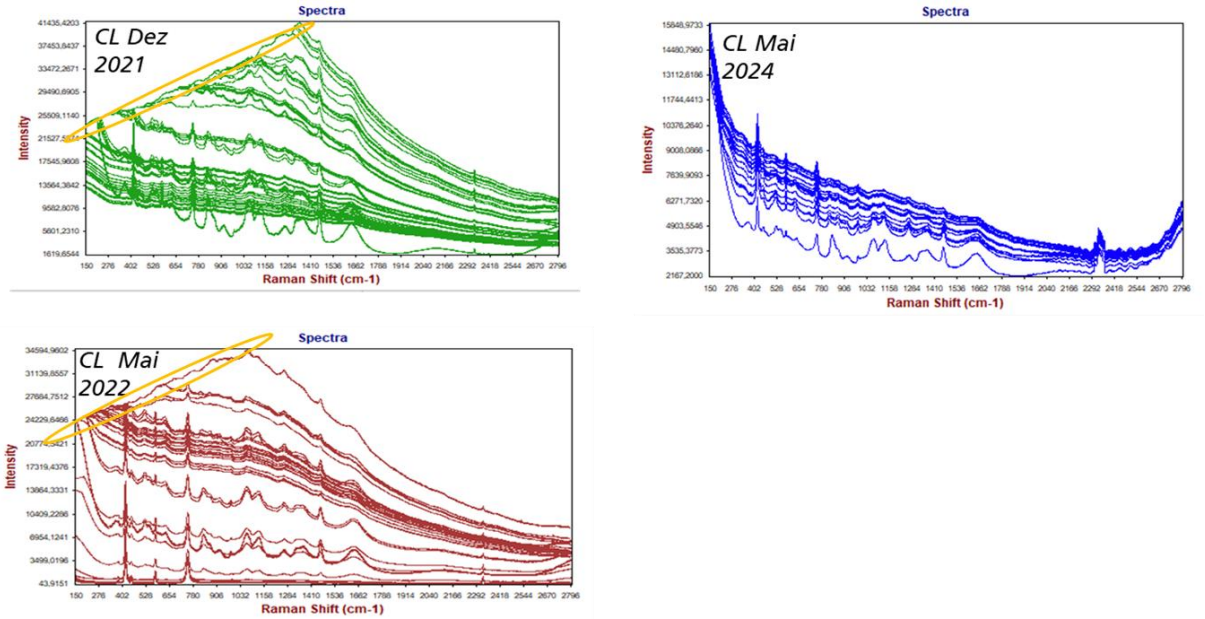

Abbildung 4 ausgewählte Spektren aus den CL-Fermentationen zwischen 2021 und 2024. Die CL-Fermentationen zeigen zu späten Zeitpunkten der Fermentation starke Übersättigung des Detektors (orange) im Jahr 2021 und 2022.

Gerade für Anwendungen der Raman-Spektroskopie an Fermentationen im Forschungs- und Entwicklungsbereich ist es wichtig, abschätzen zu können, welche Biomassekonzentrationen am Ende des Fermentationsprozesses erwartet werden, um die passende Integrationszeit des Spektrometers festzulegen. Eine Alternative ist die Wahl einer Autointegrationszeit. Diese Wahl bedeutet allerdings, dass die maximale Integrationszeit sich an der Fluoreszenz orientiert. Dadurch kann es zu einer derart niedrigen Integrationszeit und damit auch geringen Signalintensität kommen, dass der Analyt nicht mehr nachweisbar ist. Im Laufe der Projektzeit wurden Erkenntnisse gewonnen, die ermöglichen, die optimalen Hardwareeinstellungen hinsichtlich Integrationszeit, Averaging und Laserintensität in Abhängigkeit der Biomassekonzentration festzulegen.

Modellerstellung und Vorhersage der Konzentrationen

Trotz der Skalierung von einem 10-L-Glasreaktor auf einen 42-L-Edelstahlreaktor mit unterschiedlichen Scherkräften, Strömungsgeschwindigkeiten sowie Fermentations- und Hardwareparametern, lassen sich die CL-Kalibrierspektren gut in einem Kalibriermodell vereinen (Inline-Messungen 2021, Mai 2022, Mai 2024). Es bestätigt sich für CL ebenfalls, dass die Vorhersage der Kalibriermodelle dann am besten ist, wenn die Variation in den Fermentationen und besonders in den Parametern der Hardware nicht zu groß ist. Dies ist für den Forschungs- und Entwicklungsbereich wichtig, da dort in der frühen Phase der Methodenentwicklung viel Optimierungsbedarf in den Fermentationen vorhanden ist. Die nachfolgende Abbildung 5 zeigt die Kalibriermodelle für die Vorhersage der Konzentrationen während der CL-Fermentationen.

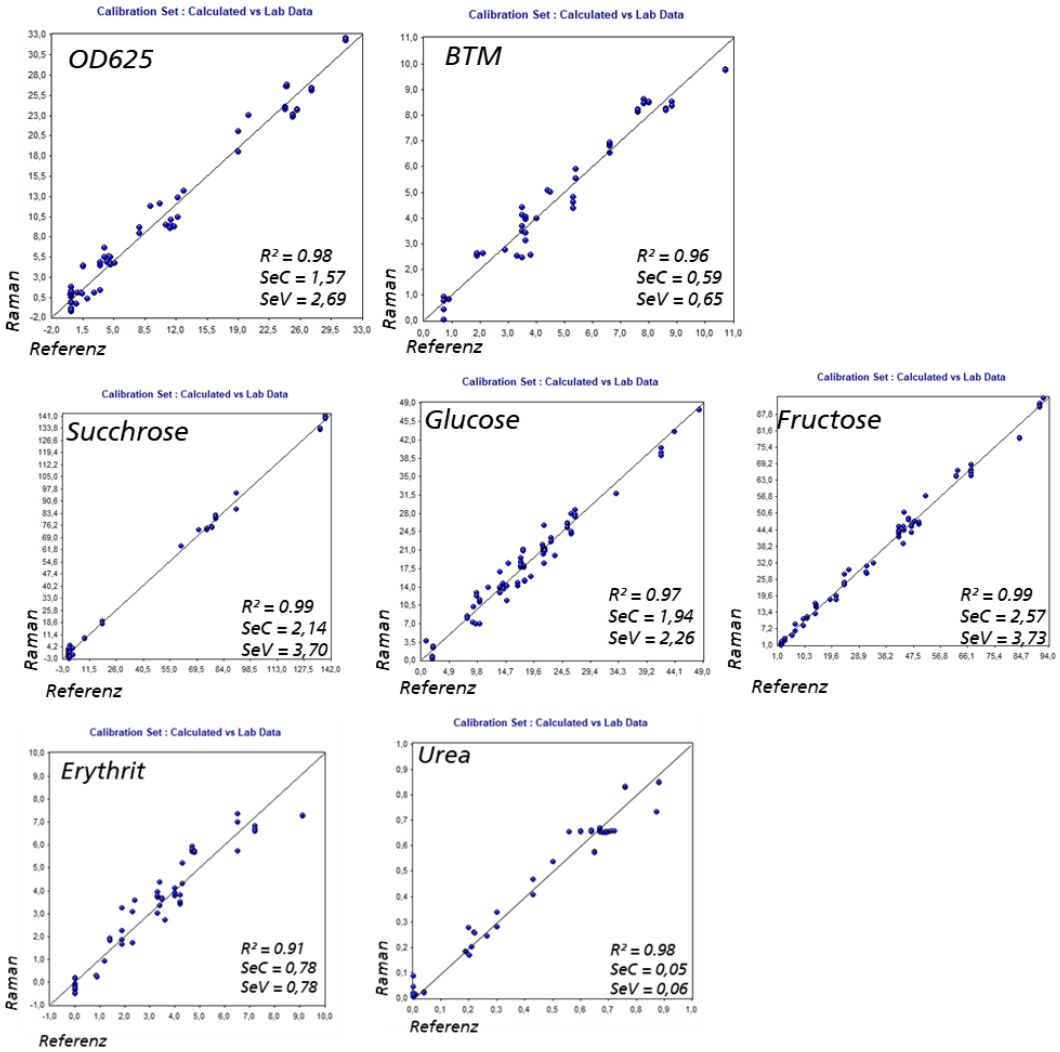

Abbildung 5 Kalibriermodelle für qualitätsrelevante Parameter der CL-Fermentationen 2021, 2022, 2024

Die Regressionskoeffizienten R^2 liegen bei > 0,9 in einem sehr guten Bereich. Die Kalibrier- und Validierfehler (SEC und SEV) geben eine gute Abschätzung, wie hoch der Vorhersagefehler bei einer Fermentation sein wird, die gleiche Prozessbedingungen und Probenzusammensetzungen aufweist wie die Proben, die sich in den Kalibriermodellen befinden.
Die Datenpunktdichte über den gesamten Messbereich verteilt ist ebenfalls bereits gut. Bei Succhrose werden einige weitere Datenpunkte benötigt, um den gesamten Messbereich besser vorhersagen zu können.

Nachfolgende Abbildung 6 zeigt die nachträglich berechneten Konzentrationsverläufe aus den Modellen in Form von Trendcharts. Auf eine Darstellung der Vorhersage der Fermentation vom Mai 2024 mit Daten lediglich aus 2021 und 2023 wird verzichtet, da die Trends aufgrund der oben genannten Punkte wie Hardwareeinstellungen und Fermentationsparameter sehr stark abweichen.

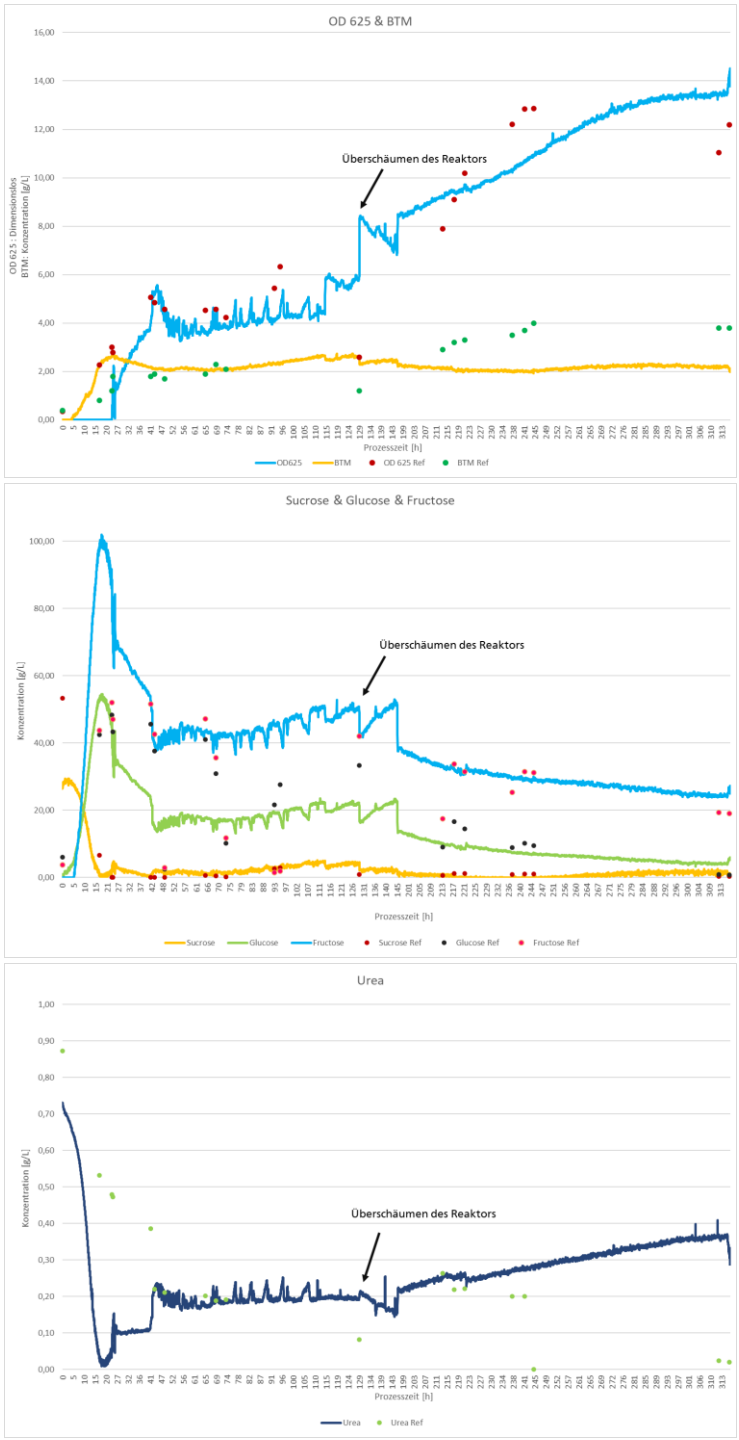

Abbildung 6 Trendcharts der CL-Fermentation Mai 2024 aus den Raman-Messungen. Gegenübergestellt sind die Konzentrationen aus den Referenzmethoden zu sehen.

Der Verlauf des Trends stimmt im Vergleich zu den ersten Messungen aus 2021 und 2023 sehr gut mit dem Verlauf der Referenzdaten überein. Teilweise werden sogar die tatsächlichen Werte korrekt vorhergesagt. Es ist allerdings zu erkennen, dass die Abweichung in manchen Bereichen höher ist als der Validierfehler angibt. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Prozessbedingungen in den Modellen noch nicht abgebildet sind (z.B., wenn Spektren mit Referenzwerte während der Methodenerstellung in dem jeweiligen Bereich als Ausreißer identifiziert wurden). Jedoch ist hervorzuheben, dass der Trend ersichtlich ist, obwohl Daten aus nur drei Batches in die Betrachtung einflossen und die Bedingungen jedes Mal sehr unterschiedlich waren. Dies zeigt auch, dass die CL-Fermentation an sich bereits sehr

reproduzierbar verlief. Vorausschauend auf industrielle Anwendungen kann man daher davon ausgehen, dass sehr robuste Methoden entwickelt werden können.

Erythrit zeigt trotz des guten Kalibriermodells zunächst eine sehr schlechte Vorhersage des Trends. Es zeigt sich, dass in dem Kalibriermodell eine Co-Korrelation von Erythrit mit einem weiteren Bestandteil vorhanden war oder die Prozessbedingungen im Jahr 2024 so stark unterschiedlich waren, dass eine Vorhersage nicht möglich war. Die Information zu Erythrit liegt zudem in einem Konzentrationsbereich, der bei Messungen 2021-2023 teilweise übersteuert war. Das Kalibriermodell war mit zu vielen Faktoren der PLS wahrscheinlich überfittet und damit nur scheinbar gut. Der Trendchart für Erythrit ist in Abbildung 7 zu sehen.

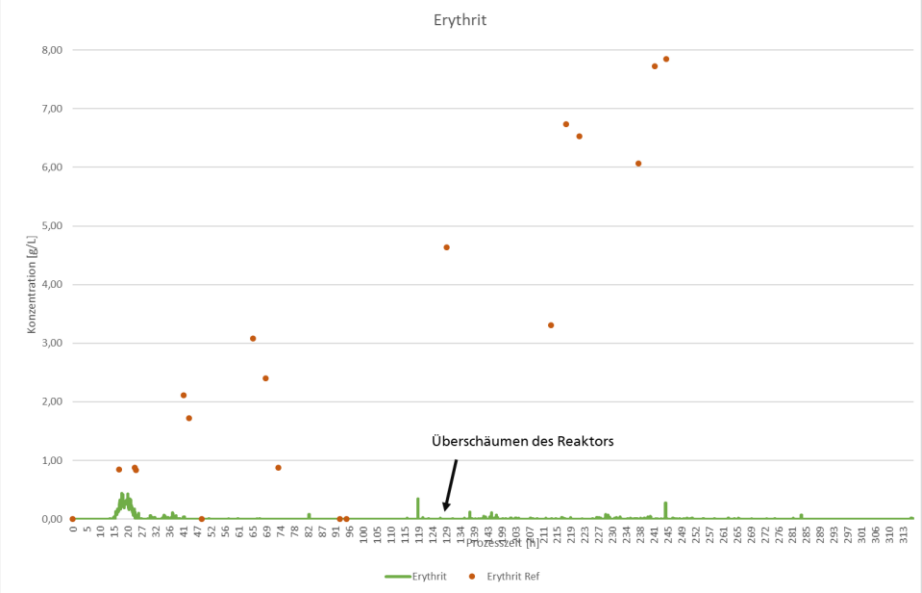

Abbildung 7 Trendchart von Erythrit. Die Vorhersage erfolgt mit einem überfitteten Modell, welches mit zu vielen Faktoren gut aussah, jedoch in der Validierung nicht funktionierte.

Durch eine weitere Optimierung ist es gelungen, ein Modell zu erstellen, das den Trend von Erythrit gut beschreibt. Es wurden dafür alle Daten aus 2021-2023 entfernt. Die Schlussfolgerung: Jedes Modell muss auf Funktionalität geprüft werden (Validierung) und besonders bei schwer zu detektierenden Komponenten wie Erythrit sollten die Prozessbedingungen konstant sein.

Abbildung 8 zeigt die unterschiedlichen Kalibriermodelle und die Vorhersage der Spektren zum Zeitpunkt der Probenentnahme. Einzig die erste und letzte Probe wird nicht exakt vorhergesagt, da sich der Konzentrationsbereich am Rand des Messbereichs des Modells befindet.

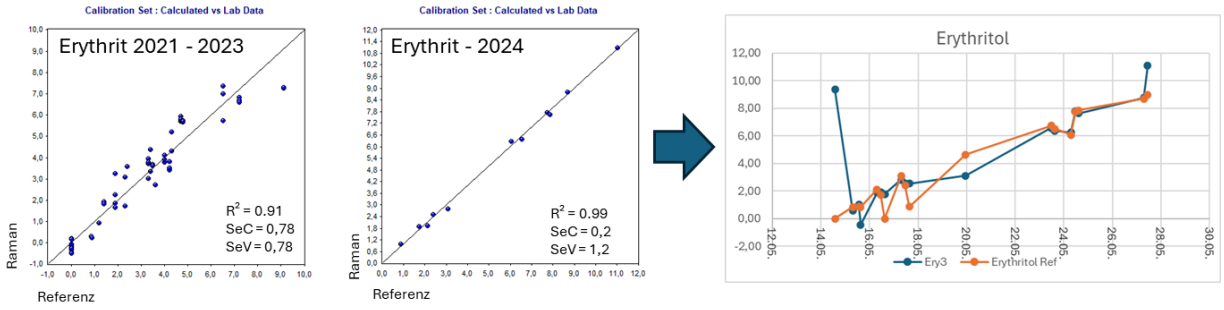

Abbildung 8 Bisheriges und optimiertes Kalibriermodell für Erythrit. Rechts: Neuberechnung der Prozessdaten (Raman-Vorhersage) im Vergleich zu den Referenzdaten ergibt optimale Ergebnisse.

- **Entwicklung von Kalibriermodellen für MEL-Prozesse, Skalierung auf größere Maßstäbe und Erhöhung der Robustheit sowie Evaluierung geeigneter mathematischer Vorbehandlungen**

Betrachtet man, ähnlich wie bei CL, alle bisher aufgenommenen MEL-Fermentationen, ergibt sich ebenfalls eine große Varianz zwischen verschiedenen Batches (Abbildung 9). Für eine robuste Methodenentwicklung im Labormaßstab müssen geeignete Spektrometereinstellungen gefunden werden. Integrationszeit, Laserleistung und Mittelwertbildung wirken sich auf die Qualität der Spektren aus. Die Herausforderung besteht darin, einen Kompromiss zu erreichen zwischen hoher Signalstärke, um den Analyten messen zu können und der Vermeidung einer Übersteuerung des Detektors aufgrund der zu Beginn nicht absehbaren Fluoreszenzmenge durch Biomasse. Gleichzeitig wurden über die Batches hinweg die Fermentationen an sich weiterentwickelt und teilweise die Produktionsweise, der Stamm oder auch die Proteinzugabe (Öl, Insektenfett) verändert.

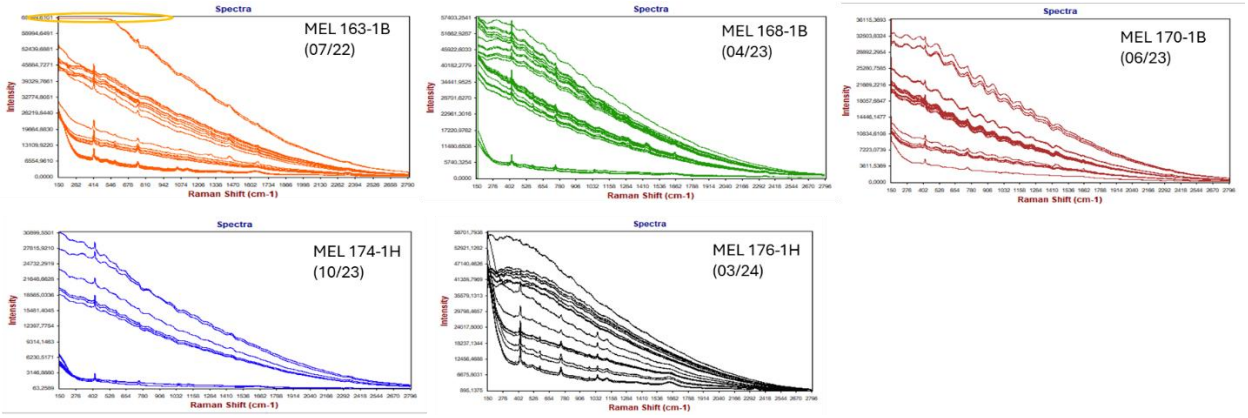

Abbildung 9 ausgewählte Spektren aus den MEL-Fermentationen zwischen 2021 und 2024. Eine MEL-Fermentation zeigt zu späten Zeitpunkten der Fermentation eine Übersättigung des Detektors (orange). In mehreren Fällen sind Interferenzen vorhanden, deren Ursprung nicht sicher ist.

Abbildung 10 zeigt die Kalibriermodelle für die Parameter aus den MEL-Fermentationen 170-1B (42-L-Fermenter), 163-1B (7-L-Reaktor), 168-1B (7-L-Reaktor) und 174-1H (42-L-Fermenter).

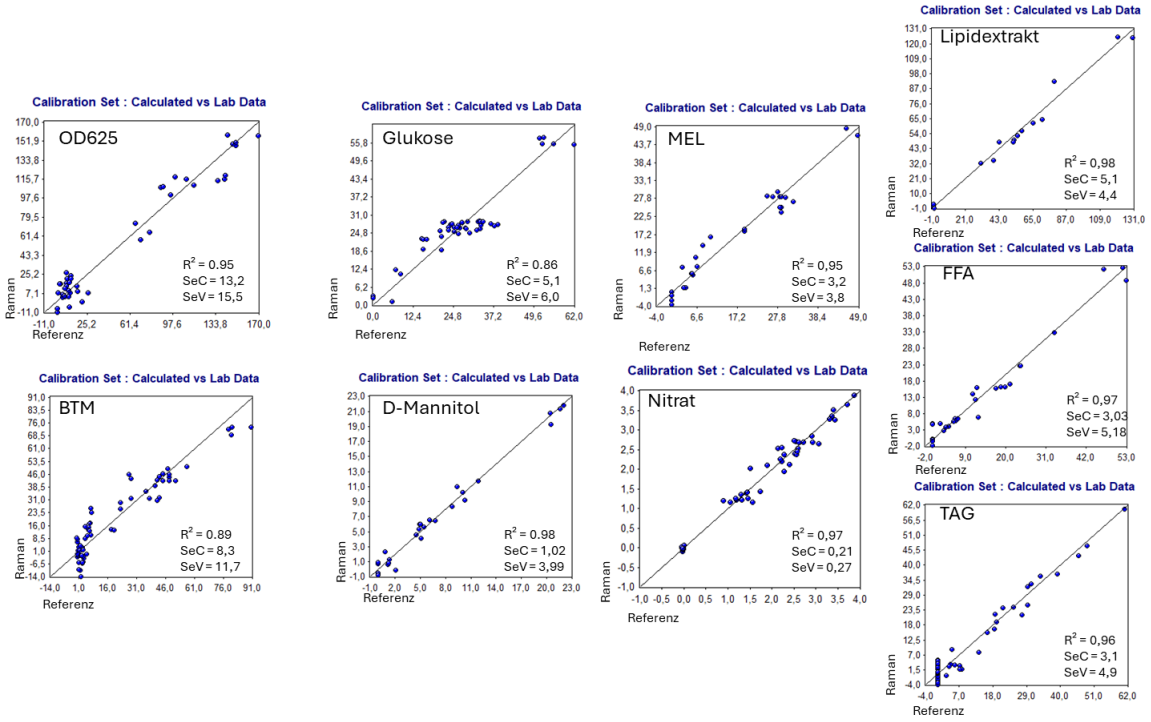

Abbildung 10 Die Kalibriermodelle für Parameter der MEL-Fermentationen zeigen teilweise eine gute Korrelation ($R^2 > 0.9$). BTM und Glukose weisen starke Varianz auf. OD625, TAG, MEL zeigt vor allem in geringen Konzentrationen starke Streuung.

Die schlechten Regressionskoeffizienten (R^2) von Glukose und BTM und die allgemein hohen Fehler der Validierung aller Komponenten zeigen, dass man die Varianz zwischen den einzelnen Batches aufgrund der Hardwareanpassungen hinsichtlich Integrationszeit, Laserleistung, Mittelwertbildung sowie der Fermentationsparameter nicht in einem einzigen Modell abbilden kann. Ein grober Trend lässt sich jedoch erkennen. Ebenso lässt sich die prinzipielle Eignung der Raman-Spektroskopie für die Erfassung aller Parameter feststellen. Die Ergebnisse sind an dieser Stelle auch so gut, dass man eine Skalierung für MEL als machbar beurteilen kann.

Abbildung 11 zeigt die Trendcharts der 174-1H-Fermentation, die mit den Modellen aus Abbildung 10 berechnet wurden. Die Trends bilden den Verlauf der Referenzwerte aus den Laboranalysen bis auf wenige Ausnahmen gut ab. Für einen bisher unbekannten Batch (z.B. 176-1H) sind die Abweichungen allerdings noch zu groß. Zusammenfassend muss die Variation in den hardwareseitigen Einstellgrößen ausgeschlossen werden, Interferenzen in den Spektren durch ggf. unsaubere Lichtleiter müssen vermieden werden und die Variation in den Fermentationen selbst sollte gering sein. Wenn sich letzteres nicht ausschließen lässt, da sich der Prozess noch nicht im produzierenden, Scale-Up oder industriellen Maßstab (mit optimalen Fermentationsparametern) befindet, werden sehr viel mehr Batches benötigt, die in die Modelle eingearbeitet werden, um die Robustheit zu erhöhen.

Abbildung 11 Trendcharts für die Konzentrationsmessung verschiedener Parameter von 174-1H

Abbildung 12 zeigt die Kalibriermodelle von 174-1H (a), 176-1H (b) und 174-1H + 176-1H (c). Qualitativ sind alle Modelle der einzelnen Batches besser hinsichtlich R^2, SEC und SEV als die Vielzahl der Daten, die in einem Modell zusammengefasst wurden. Dies ist plausibel, da keine Prozessvariationen abgebildet sind, wodurch die Modelle etwas schlechter, dafür aber robuster werden würden.

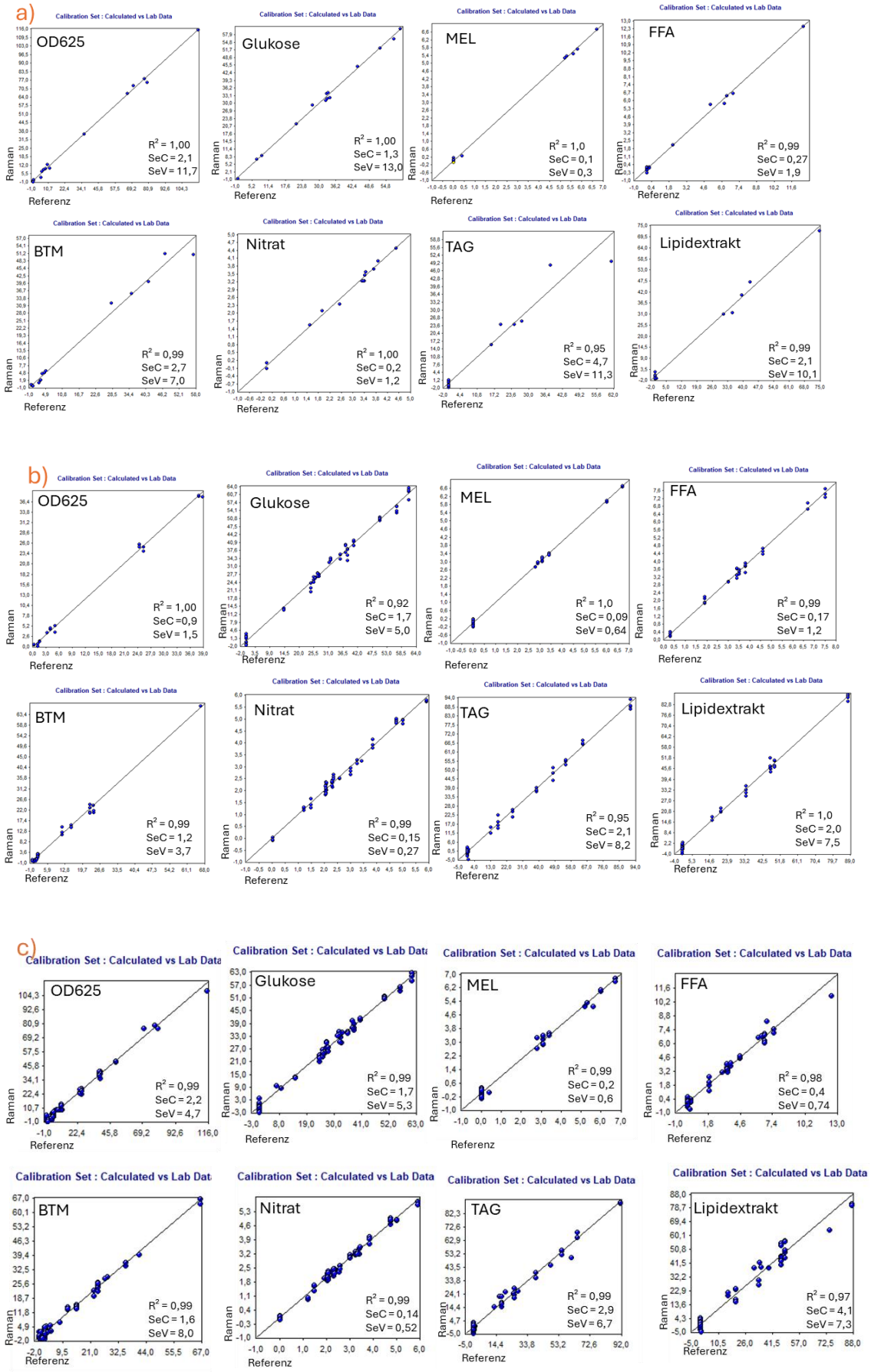

Abbildung 12 Kalibriermodelle für die Parameter der MEL-Fermentation 174-1H (a), 176-1H (b) sowie 174-1H + 176-1H (c)

Fasst man die Spektren von 174-1H und 176-1H zusammen in ein Modell für jeden Parameter, sieht man ebenfalls qualitative Verbesserungen. Es zeigt sich, dass einheitliche Prozessbedingungen und Hardwareeinstellungen die Robustheit der Modelle verbessern und damit auch eine Übertragung auf größere Maßstäbe und Anwendung auf unbekannte Batches möglich machen.

Der Verlauf der Konzentrationen über den Fermentationszeitraum ist dementsprechend ebenfalls optimiert (Abbildung 13, hier der Einfachheit halber nur die Zeitpunkte der Referenzanalytik dargestellt).

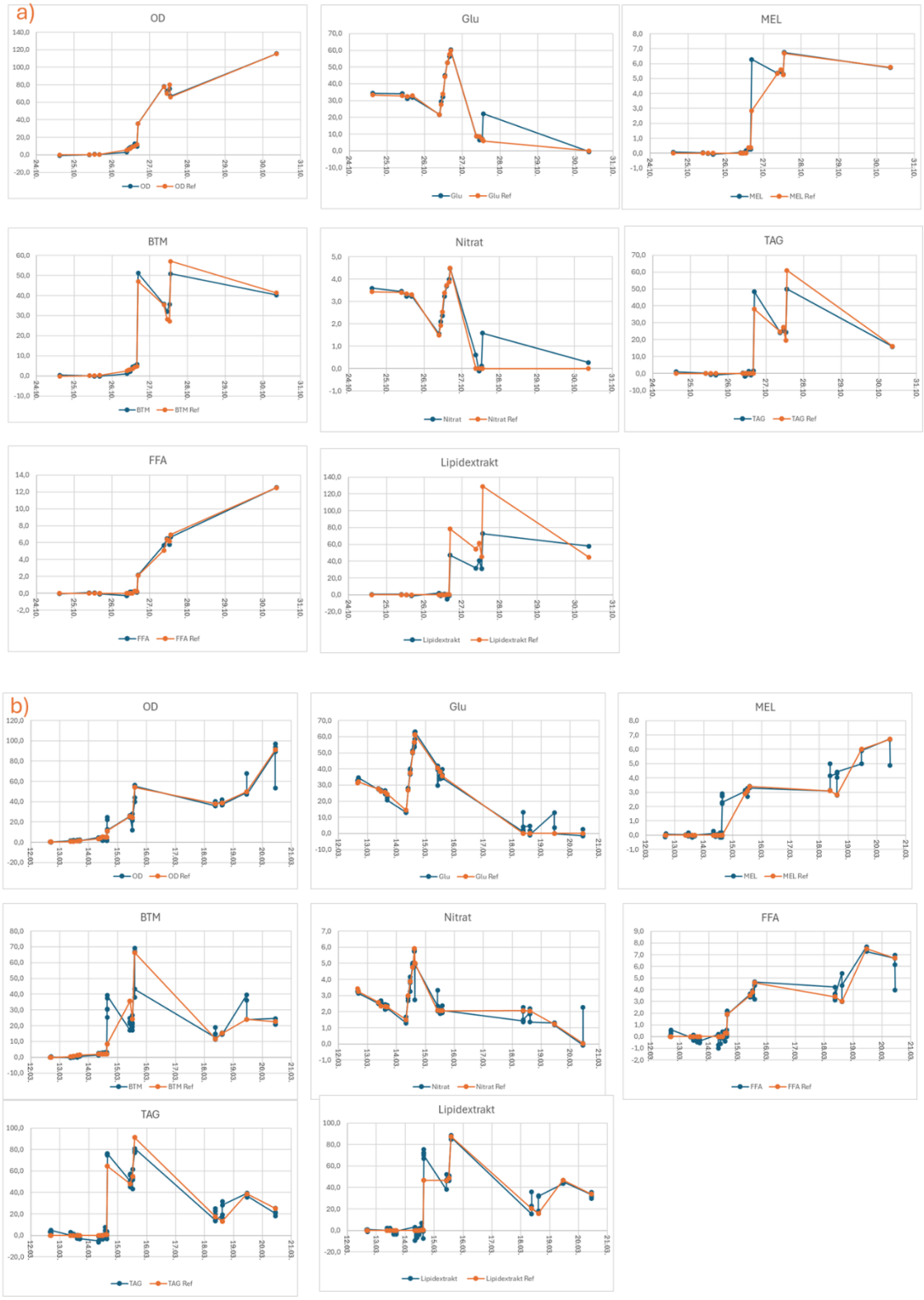

Abbildung 13 Gegenüberstellung der Referenzanalysenergebnisse und Raman-Vorhersagewerte für 174-1H (a) und 176-1H (b) mit Kalibriermodellen 174-1H bzw. 176-1H.

Der Trend stimmt an den Stellen mit großer Lücken oder wenn der Wert außerhalb des Kalibrierbereichs liegt, nicht mit dem Modell überein. Abgesehen davon werden die Konzentrationen aus der Raman-Vorhersage gut dargestellt.

Zusätzlich wurde in Abbildung 13b die Reproduzierbarkeit der Messung betrachtet. Es ist erkennbar, dass die Varianz der Messung in manchen Bereichen höher ist, als in anderen. Dafür wurden zu einem Entnahmezeitpunkt der Probe für die Referenzanalytik mehrere Raman-Vorhersagen dargestellt. In den meisten Fällen ist die Varianz sehr gering (gute Reproduzierbarkeit), während andere Bereiche etwas stärker rauschen. Dies kann z. B. auf eine etwas größere, momentane Blasenbildung zurückzuführen sein. Gerade der letzte Datensatz 176-1H wurde mit einer sehr hohen Datenpunktdichte aufgenommen (ca. alle 5 Sekunden ein Spektrum). Dies sollte in zukünftigen Messungen vermieden werden. Daher bietet es sich an, alle 5 Sekunden zu messen, aber eine Mittelwertbildung über 1-5 Minuten durchzuführen. Angebunden an eine Prozesssteuerungssoftware kann dies auch variabel frei einstellbar sein.

Abbildung 14 zeigt die Trends der 176-1H Fermentation mit den Modellen aus 174-1H und 176-1H.

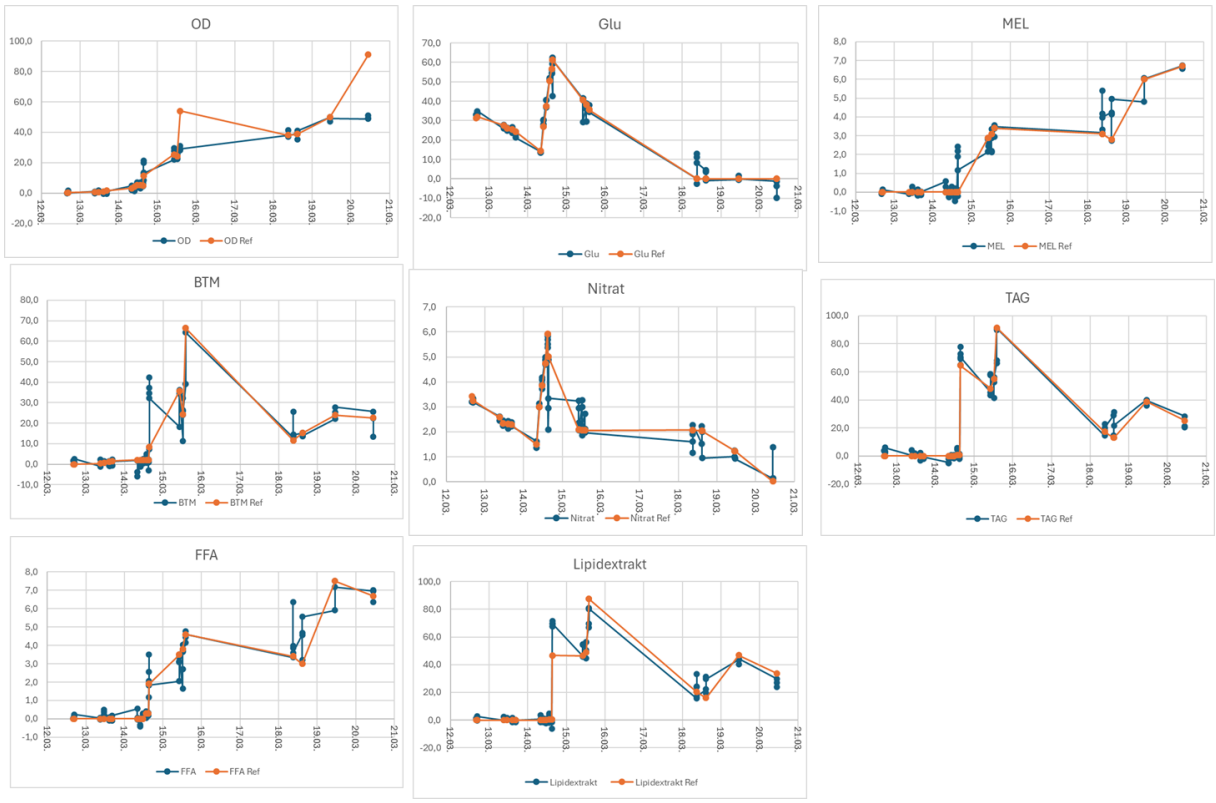

Abbildung 14 Gegenüberstellung der Referenzanalysenergebnisse und Raman-Vorhersagewerte für 176-1H mit Kalibriermodellen 174-1H + 176-1H.

Bereits zwei reproduzierbare Datensätze reichen aus, um einen besseren Trend darzustellen (Vergleich Abbildung 14 und Abbildung 13b). Reproduzierbarkeit bezieht sich in diesem Fall auf die Ähnlichkeit der Prozessbedingung und Raman-Spektrometereinstellungen. Nur bei starken Prozessveränderungen und geringerer Datendichte gibt es etwas stärkere Abweichungen.

- **Betrachtung der Erythrit-Bildung**

Bei der MEL-Fermentation 176-1H kam es zur Bildung von Erythrit – einem Nebenprodukt, das normalerweise nur bei CL-Fermentationen auftritt und im MEL-Prozess unerwünscht ist.

Der Anteil an Erythrit wurde nachträglich mit dem Modell für CL nachberechnet. Es zeigt sich, dass prinzipiell ein Trend vorhergesagt werden kann, dieser aber einen großen Offset besitzt. Dies ist

plausibel, da die beiden Fermentationen sehr unterschiedlich sind. Dennoch könnte man für einen allgemeinen Trend das Modell verwenden, um Erythrit in MEL zu bestimmen. Eine Slope- und Bias-Anpassung wäre ebenso möglich, um die Vorhersage zu optimieren.

Abbildung 15 zeigt die beiden Erythrit-Trends gegenüber der Referenzanalytik und das aus der MEL-Fermentation erstellte Kalibriermodell.

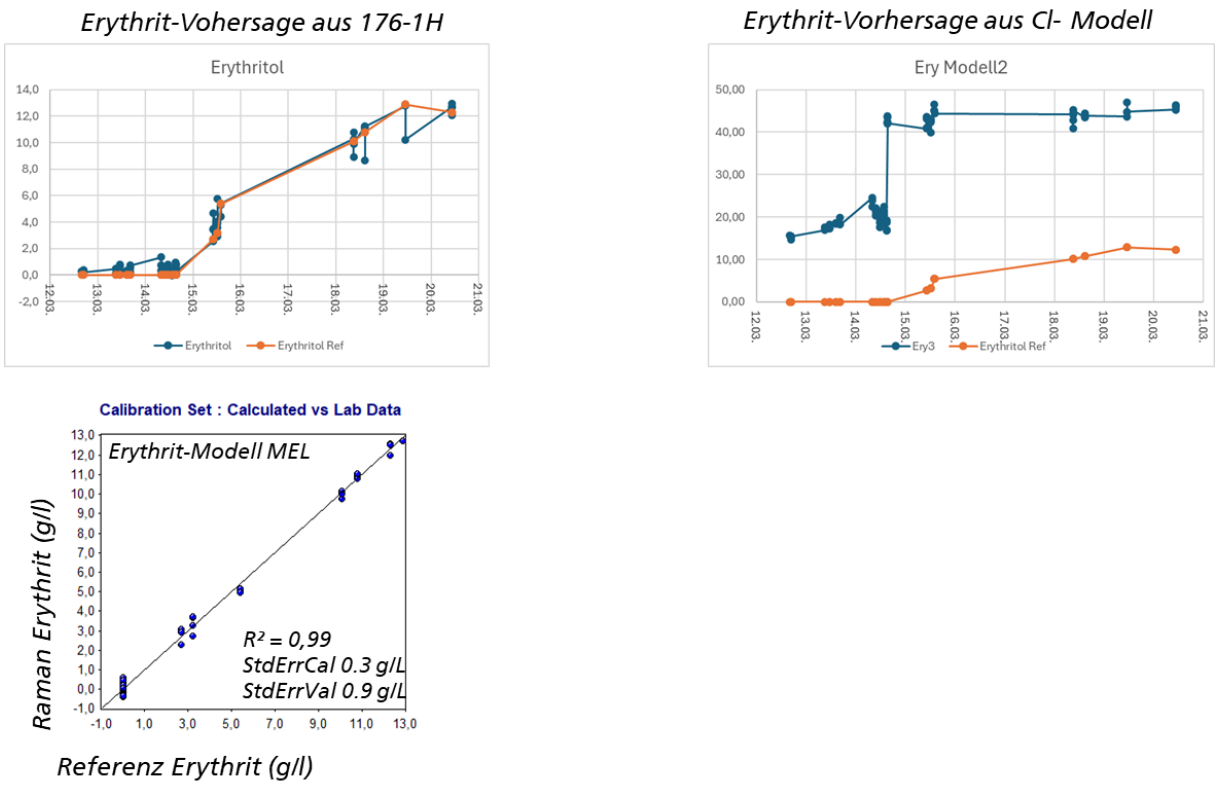

Abbildung 15 Erythrit-Verlauf für 176-1H aus dem Erythrit-Modell von 176-1H und als Vergleich aus dem Modell der CL-Fermentation.

- **Nähere Betrachtung der XTR-Fluoreszenzkorrektur für Glukose und Nitrat**

XTR ist eine Methode zur „eXTRaktion“ der Information aus den Spektren. Fluoreszenz äußert sich vor allem bei farbigen oder biologischen Proben, da diese zum einen durch Proteine, Nukleinsäuren und Pigmente zur natürlichen Fluoreszenz neigen und damit leichter durch Raman-Laser zur Fluoreszenz angeregt werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die relevante Information über die Parameterkonzentrationen unter der Verwendung von XTR extrahiert werden kann. Dies kann so lange erfolgen, wie keine Übersättigung des Detektors stattfindet.

Abbildung 16 zeigt exemplarisch den Verlauf der Fluoreszenz bei Zunahme der Biomasse und optischen Dichte. Durch XTR konnten für die stärksten Raman-Streuer Nitrat und Glukose die Raman-Peaks sehr gut separiert und eindeutig den Parametern zugeordnet werden.

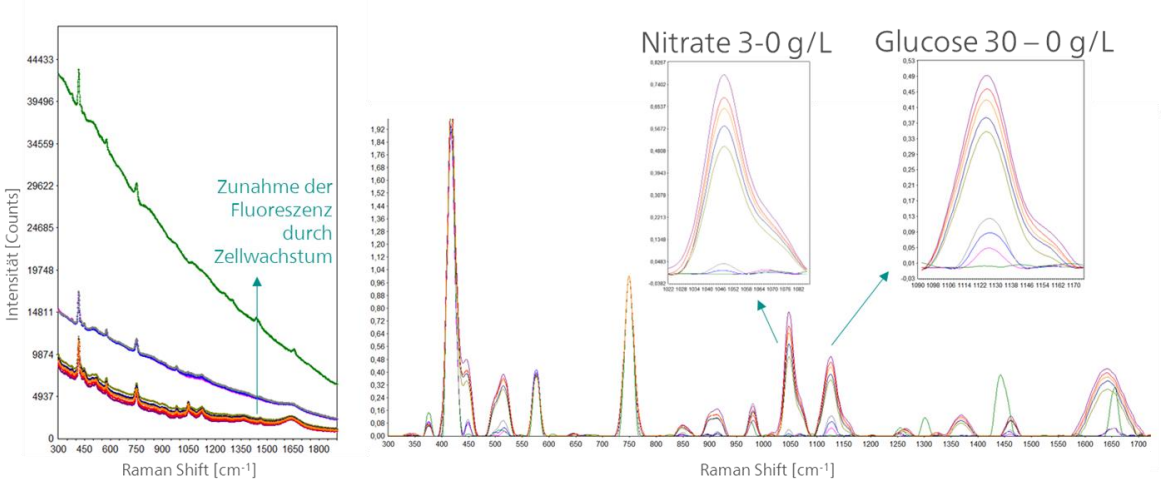

Abbildung 16 Veränderung der Spektren hinsichtlich der Fluoreszenzeigenschaften bei Zunahme der Biomasse (links) und Extraktion der Glukose- und Nitratpeaks bei Verwendung der XTR-Korrektur (rechts).

Es gibt immer wieder den kundenseitigen Wunsch, Kalibrierungen direkt über die Peakhöhen- oder Peakflächenauswertung vorzunehmen anstelle der multivariaten Datenanalyse über Partial-Least-Squares-Regression (PLS), die in mehreren Faktoren die Korrelation zwischen spektraler Information und Konzentration findet.

Es konnte durch XTR gezeigt werden, dass ein direkter funktionaler Zusammenhang zwischen Peakhöhe und Fläche erreicht werden kann. Allerdings muss man beachten, dass die Glukosekonzentration nicht mehr linear mit der Peakhöhe verläuft, sobald höhere Biomassekonzentrationen vorliegen, sodass zwei Modelle für die unterschiedlichen Konzentrationsbereiche erstellt werden müssen. Mit Nutzung einer Prozesskontrollsoftware kann ein automatischer Wechsel zwischen den Modellen auf Grundlage der Biomassekonzentration einfach erfolgen. Die Verwendung verschiedener Modelle gilt nicht für die PLS-Regression, da sie diesen Einfluss in einem Faktor darstellen kann. XTR kann somit ein einfaches Pre-/Postprocessing ermöglichen und zusätzlich die Datenkomplexität auch ohne multivariate Datenanalyse reduzieren, sodass unter gewissen Umständen auch eine univariate Auswertung ermöglicht wird.

Eine Einschränkung besteht jedoch, wenn in den Spektren Interferenzen durch nicht optimale Bedingungen auftreten (z. B. unreine Lichtleiter, besondere Flockenbildung oder Belagbildung). In der Fermentation 174-1H wurden diese Interferenzen zeitweise sichtbar, sodass die direkte Auswertung allein über XTR nicht konsistent möglich war (Abbildung 17).

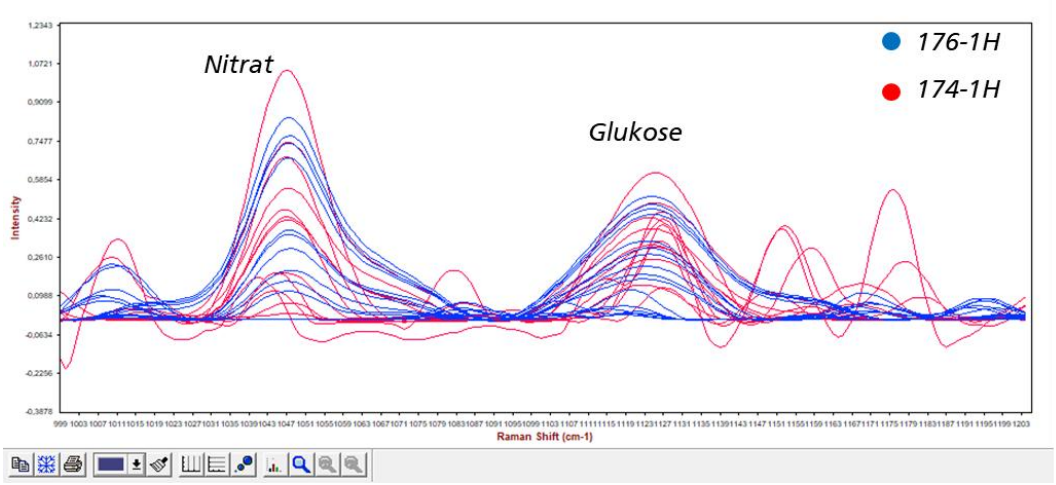

Abbildung 17 Interferenzen in den Spektren beeinflussen die XTR-Korrektur, sodass der lineare Zusammenhang zwischen Peakhöhe und Konzentration verloren geht.

Eine Lösung an dieser Stelle kann eine längere Mittelwertbildung sein, oder aber die Ausreißerdetektion, sodass Spektren mit Interferenzen aufgrund von unter anderem Flockenbildung oder Unregelmäßigkeiten nicht berücksichtigt werden.

2.2 Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Innerhalb der Förderzeit vom 01.07.2021 bis 30.06.2025 wurden von Metrohm Deutschland folgende Positionen beantragt:

Mann-Monate	Personal-kosten in €	Material-kosten in €	Investition/ Software in €	Reise-kosten in €	Fremd-dienst-leistung in €	Gesamt-kosten in €	Eigen-anteil in €	Zuwen-dung in €	FQ in %
9,5	65.000	9.600	0	1.300	0	75.900	60.720	15.180	20

Begründung:

- Personal: Es wurden für die Projektlaufzeit 9,5 Mannmonate für zwei Produktspezialisten für Development, Planung und Durchführung der Versuche, sowie Auswertungen eingesetzt.
- Materialkosten: Verbrauchsmaterial, Komponenten und Material für Prozessadaption, Protoypen Sondenadapter
- Investition: keine notwendig
- Reisekosten Projektbesprechungen
- Fremdleistungen: nichts
- Unteraufträge: keine

2.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die geleistete Arbeit war sowohl notwendig als auch angemessen, um die Projektziele zu erreichen. Die Entwicklung einer zuverlässigen Inline-Überwachung für komplexe Fermentationsprozesse erfordert eine Kombination aus Hardwareoptimierung, Softwareanpassung und Prozessvalidierung, da Standardlösungen für biotechnologische Anwendungen bislang nicht verfügbar sind. Die Anpassungen an Raman-Spektrometer, die Integration sterilisierbarer Sonden

und die Implementierung von Fluoreszenzkorrekturen waren entscheidend, um die hohen Anforderungen an Sterilität, Robustheit und Skalierbarkeit zu erfüllen. Ebenso war die Erstellung und Validierung von Kalibriermodellen unter variierenden Prozessbedingungen notwendig, um die Übertragbarkeit auf industrielle Maßstäbe sicherzustellen. Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass die eingesetzten Ressourcen zielgerichtet verwendet wurden und die Arbeit einen klaren Mehrwert für die Etablierung nachhaltiger Produktionsverfahren bietet.

2.4 Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Die erzielten Ergebnisse unterstützen den Verwertungsplan in zentralen Punkten und schaffen die Grundlage für eine erfolgreiche industrielle Umsetzung. Die nachgewiesene Übertragbarkeit funktionaler Modelle reduziert das Risiko und den Aufwand bei der Skalierung vom Labor in den Produktionsprozess sowie bei einem Systemwechsel, was die Implementierung erheblich beschleunigt. Die entwickelte Fluoreszenz-Unterdrückung ist ein entscheidender technologischer Fortschritt, da sie die Anwendbarkeit der Raman-Spektroskopie in komplexen biotechnologischen Prozessen ermöglicht und damit den Einsatzbereich deutlich erweitert. Ebenso trägt die optimierte Sonden-Technologie mit einfacher Reinigung, Sterilisierbarkeit und Funktionsüberwachung zur Prozesssicherheit und Effizienz bei. Die prinzipielle Möglichkeit, Kalibriermodelle zwischen Labor-, Handheld- und Prozess-Spektrometern zu übertragen, bietet erhebliche wirtschaftliche Vorteile für Anwender durch Zeit- und Kostenersparnis. Schließlich erlaubt die Anbindung des Raman-Spektrometers an Regelungssysteme ein tieferes Verständnis der biotechnologischen Infrastruktur und Kundenanforderungen, was die Entwicklung eines maßgeschneiderten Spektrometer-Systems für den Biotechnologie-Markt unterstützt. Damit sind wesentliche Schritte zur Verwertung und Markteinführung der Technologie erfolgreich vorbereitet.

2.5 Während der Durchführung des Vorhabens bekanntgewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Während der Projektlaufzeit sind dem Zuwendungsempfänger keine relevanten Veröffentlichungen auf dem Gebiet des Vorhabens bekannt geworden.

2.6 Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen

Für die Öffentlichkeitsarbeit wurde die Allianz Biotenside 2024 auf dem 19. Herbstkolloquium Prozessanalytik bei Merck in Darmstadt als Ausrichtungslokalisation vorgestellt. Bei dem PAT-Kolloquium handelt es sich um einen Trialog zwischen Herstellern, Anwendern und Wissenschaftlern im Bereich Prozessanalysentechnologie und gilt als wichtigste PAT-Veranstaltung in Deutschland. Die Allianz Biotenside mit den Raman-spektroskopischen Anwendungen wurde im Bereich PAT in der Biotechnologie vorgestellt (Titel: Inline-Raman-Spektroskopie zur simultanen Überwachung prozessrelevanter Parameter in Bioprozessreaktoren am Beispiel der Biotensidherstellung).