

BENJAMIN RADEL

**KLEINSKALIGE
CHARAKTERISIERUNG DER
FEST-FLÜSSIG-TRENNUNG
UND BETRACHTUNG
DES SCHERBRUCHS VON
PROTEINKRISTALLEN**

Benjamin Radel

Kleinskalige Charakterisierung der Fest-Flüssig-Trennung und
Betrachtung des Scherbruchs von Proteinkristallen

Kleinskalige Charakterisierung der Fest-Flüssig-Trennung und Betrachtung des Scherbruchs von Proteinkristallen

von
Benjamin Radel

Karlsruher Institut für Technologie
Institut für Mechanische Verfahrenstechnik und Mechanik (MVM)

Kleinskalige Charakterisierung der Fest-Flüssig-Trennung und Betrachtung des
Scherbruchs von Proteinkristallen

Zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Ingenieurwissen-
schaften von der KIT-Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) genehmigte Dissertation

von Dipl.-Ing. Benjamin Radel

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Juni 2022
Erstgutachter: Prof. Dr.-Ing. Hermann Nirschl
Zweitgutachter: Prof. Dr.-Ing. Carsten Schilde

Diese Publikation wurde im Rahmen des Fördervorhabens 16TOA022 mit Mitteln
des Bundesministeriums für Bildung und Forschung im Open Access bereitgestellt.

Impressum



Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
KIT Scientific Publishing
Straße am Forum 2
D-76131 Karlsruhe

KIT Scientific Publishing is a registered trademark
of Karlsruhe Institute of Technology.
Reprint using the book cover is not allowed.

www.ksp.kit.edu



*This document – excluding parts marked otherwise, the cover, pictures and graphs –
is licensed under a Creative Commons Attribution-Share Alike 4.0 International License
(CC BY-SA 4.0): <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/deed.en>*



*The cover page is licensed under a Creative Commons
Attribution-No Derivatives 4.0 International License (CC BY-ND 4.0):
<https://creativecommons.org/licenses/by-nd/4.0/deed.en>*

Print on Demand 2022 – Gedruckt auf FSC-zertifiziertem Papier

ISBN 978-3-7315-1230-1

DOI 10.5445/KSP/1000149442

Nichts auf dieser Welt, das sich zu haben lohnt, fällt einem in den Schoß.

Dr. Bob Kelso

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in den Jahren 2016 bis 2022 am Institut für Mechanische Verfahrenstechnik und Mechanik des Karlsruher Instituts für Technologie. Ohne die Unterstützung zahlreicher Personen wäre ein erfolgreicher Abschluss der Dissertation nicht möglich gewesen. Nachfolgend möchte ich mich daher bei allen bedanken, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Besonders möchte ich Herrn Prof. Dr.-Ing. Hermann Nirschl für das über die Jahre entgegengebrachte Vertrauen, die großen Freiheiten und die vielen hilfreichen fachlichen Diskussionen danken. Herrn Prof. Dr.-Ing. Carsten Schilde gilt mein Dank für die Übernahme des Koreferats und die stets freundlichen Gespräche auf und nach den Projekttreffen. Bei Michael Barros Groß und Phillip Grob bedanke ich mich für die erfolgreiche Zusammenarbeit in der ersten Projektphase und die unterhaltsame Abendgestaltung bei den Projekttreffen.

Zudem trugen zahlreiche Kolleginnen und Kollegen am Institut zum Gelingen dieser Arbeit maßgeblich bei. Die PMT mit Klaus Hirsch, Astrid Huber und Regina Mall hat durch zahlreiche Messungen von Partikelgrößenverteilungen und Stoffeigenschaften einen großen Anteil zu dieser Arbeit beigesteuert. Die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der mechanischen und elektrischen Werkstätten sowie der Verwaltung haben durch ihre Hilfsbereitschaft viele Probleme schnell und unkompliziert gelöst. Hans Guigas und Thomas Reutter gilt mein Dank für die Unterstützung bei der Küvettenentwicklung, die vor allem Thomas einige Nerven gekostet hat. Andreas Baum danke ich für seine Unterstützung bei allen IT Fragen und die Geduld, die er bei meinen „Speziellösungen“ aufgebracht hat. Besonders hervorzuheben ist der gute kollegiale Zusammenhalt unter den Doktorandinnen und Doktoranden am Institut, für den ich sehr dankbar bin. Der gegenseitige Austausch beim Kaffee, gemeinsame Freizeitaktivitäten, Sport und Spaß auf Konferenzen haben auch in schwierigen Zeiten geholfen neue Motivation zu finden. Diesbezüglich gilt mein Dank auch dem CoT und meinen zahlreichen Bürokollegen in chronologischer Reihenfolge: Alexander Gutsche, Jan-Hendrik Sommerling, Susanne Kespe, Steffen Schmelzle, Philipp Menesklou und Timo Dobler. Mit euch hat die Zeit im Büro viel Spaß gemacht. Timo danke ich zudem dafür, dass er meine immer kürzer werdende Zündschnur während dem Anfertigen dieser Arbeit mit stoischer Geduld ertragen hat.

Ich hatte das Glück einige erfolgreiche studentische Arbeiten betreuen zu dürfen, deren Erkenntnisse auch Eingang in diese Arbeit gefunden haben. Mein Dank gilt: Johannes Burger, Wenhan Deng, Marina Funck, Christian Geier, Judith Günther, Jessica Juritsch und Tu Hoang Nguyen.

Meinen Korrekturleserinnen und -lesern: Timo Dobler, Marco Gleiß, Barbara Schmiege und Angela Zluhan-Radel danke ich für das sorgfältige Lektorat, das zu einer deutlichen Verbesserung der Lesbarkeit und Verringerung der Fehlerdichte beigetragen hat. Meiner Mutter Angela danke ich insbesondere für das Setzen zahlreicher Kommas.

Abschließend möchte ich meiner Mutter Angela und Tante Eva herzlich für die Unterstützung über die vielen Jahre danken. Auf euch konnte ich mich immer verlassen und ohne euren Rückhalt in den schwierigen Phasen wäre das Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Filtration von Proteinen im Kleinstmaßstab zur Charakterisierung von Materialverhalten, Ermittlung der Prozessfunktionen und zur Prozessauslegung. Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Arbeit ist die Betrachtung des Kristallbruchs bei einer überlagerten Scher- und Druckbeanspruchung. Bei dieser Beanspruchungsart ist ein deutlich verstärkter Bruch im Vergleich zu einer reinen Druckbeanspruchung festzustellen, der sich nachteilig auf die nachgelagerten Verfahrensschritte auswirken kann.

Proteine sind aus Aminosäuren aufgebaute Makromoleküle, die für eine Vielzahl biologischer Stoffwechselfvorgänge essenziell sind. Auch in der technischen Anwendung kommen Proteine, beispielsweise zur Katalyse von Reaktionen, zum Einsatz. In der Pharmazie sind Antikörper, das sind Proteine des Immunsystems, ein wichtiges Therapeutikum. Die großtechnische Herstellung von Proteinen findet mit Bakterien oder Zellen in einem Bioreaktor statt. Für eine hohe Reinheit sind im Anschluss zahlreiche Aufarbeitungsschritte notwendig. Ein möglicher Aufarbeitungsschritt ist die selektive Kristallisation des Zielproteins. Kristallines Protein hat im Vergleich zu amorphem die Vorteile einer höheren Lagerstabilität, anderer Freisetzungseigenschaften und einer einfacheren Handhabung. Außerdem ist durch die Beeinflussung der Kristallform und -größe über den Kristallisationsprozess auch ein Formulierungsschritt möglich.

Eine besondere Herausforderung liegt darin, bereits früh in der Prozessentwicklung eine Aussage zur Filtrierbarkeit zu ermöglichen. Die Entwicklung von kristallinen Proteinprodukten findet wegen der hohen Kosten und des signifikanten Ressourcenbedarfs in einem sehr kleinen Maßstab vom Tropfen bis hin zu wenigen Millilitern statt. Die Auslegung der Filtration auf der anderen Seite benötigt mit den üblichen Laborapparaten eine im Vergleich große Menge – üblicherweise einige Liter – Suspension. Das bedeutet, die Auslegung der Fest-Flüssig-Trennung ist erst im Anschluss an das Protein- und Kristallengineering möglich, was zu einer insgesamt längeren Entwicklungsdauer und einer späteren Markteinführung führt. Eventuell nachteilige Effekte durch die vorangegangenen Entwicklungsschritte auf die Filtrationsleistung sind entweder nicht oder nur mit hohen Kosten behebbar.

Eine in dieser Arbeit entwickelte modulare, transparente und 3D gedruckte Filtrationszelle für eine optische Zentrifuge ermöglicht es, im Gegensatz zum aktuellen kommerziellen Stand

der Technik, die Filtration in einem kleinen Maßstab zu charakterisieren. Weil die Messung des Filtrationsfortschritts auf der Kuchen Seite erfolgt, ist die Kuchenhöhe aus dem Filtrationsexperiment ablesbar. Die Porosität ist über die direkt messbare Kuchenhöhe berechenbar. Der notwendige Materialbedarf verringert sich deutlich auf etwa 200–500 μL im Gegensatz zu mehreren hundert Millilitern bei der Drucknutsche. Die Auswertung der Filtration erfolgt anhand des Transmissionsprofils, das an den Phasengrenzen charakteristische Merkmale aufweist.

Der verkleinerte Filtrationsaufbau erlaubt es, bereits früh in der Produkt- und Prozessentwicklung den Fest-Flüssig Trennschritt zu charakterisieren und zu bewerten. Damit geht eine Verringerung der Entwicklungszeit und das Einsparen von Ressourcen einher. Als Modellsysteme kommen in dieser Arbeit isometrisch, stäbchenförmig und nadelförmig kristallisierte Lysozymkristalle sowie stäbchenförmige Alkoholdehydrogenasekristalle zum Einsatz. Für die untersuchten Systeme zeigt sich ein großer Einfluss der Kristallform und Partikelgrößenverteilung auf die Sedimentationsgeschwindigkeit sowie auf die Kompressibilität und Permeabilität der entsprechenden Filterkuchen. Aus den gemessenen Daten erfolgt die Ableitung von Prozessfunktionen zur Beschreibung der Kompressibilität und der Sedimentationsgeschwindigkeit. Mithilfe der im kleinen Maßstab ermittelten Prozessfunktionen ist die Übertragung der Batchvakuumkristallisation auf ein integriertes Apparatekonzept im Labormaßstab erfolgreich möglich. Dabei entstehen Kristalle mit gleicher Größenverteilung und ähnlichen Filterkuchenwiderständen wie im klassischen Batchverfahren.

Die nachgelagerte weitere Prozessierung des Kristallisats durch mechanische Verfahren erfordert besondere Sorgfalt. Da Proteinkristalle aus großen Molekülen und einem hohen Anteil an Kristallwasser aufgebaut sind, weisen sie im Vergleich zu konventionellen anorganischen oder organischen Kristallen eine geringe mechanische Festigkeit auf. Für die Fest-Flüssig-Trennung bedeutet dies, dass die Filtration und Zentrifugation des Kristallisats häufig zu Kristallbruch führt. Auftretender Kristallbruch verändert die Produkteigenschaften und verschlechtert im Allgemeinen die Trennleistung.

Bei einer kombinierten Normal- und Scherbelastung von Lysozymkristallen mit einer modifizierten Ringscherzelle, die es erlaubt, die Kristalle im feuchten Zustand zu untersuchen, tritt stets eine Zerkleinerung auf. Dies trifft auch auf Normalspannungen zu, für die ohne Scherbeanspruchung keine Reduktion der Partikelgrößen feststellbar ist. Bei der kombinierten Beanspruchung führt eine Zunahme der Normalspannung zu einer deutlich stärkeren Zerkleinerung. Mit μCT Daten, die eine scharfe Grenze zwischen unbeschädigten und zerstörten Kristallen zeigen, lassen sich die Beschädigungen des Haufwerks lokal beschreiben.

Abstract

The present work deals with the microscale filtration of proteins for characterization of material behavior, determination of process functions and for process design. Another aspect of the present work is the consideration of crystal fracture under superimposed shear and compression loading. With this type of stress, a significantly increased fracture is observed compared to pure compressive stress, which can have a detrimental effect on the downstream process steps.

Proteins are macromolecules consisting of amino acids, which are essential for many biological metabolic processes. Proteins are also used in technical applications, for example to catalyze reactions. In the pharmaceutical industry, antibodies, which are proteins of the immune system, are an important therapeutic agent. The large-scale production of proteins takes place with bacteria or cells in a bioreactor. To achieve a high degree of purity, numerous subsequent purification steps are necessary. One possible purification step is the selective crystallization of the target protein. Crystalline protein has the advantages of higher shelf life, different release properties and easier handling compared to amorphous protein. In addition, by influencing the crystal shape and size via the crystallization process, a formulation step is also possible.

A particular challenge is to enable a statement on filterability early in the process development. The development of crystalline protein products takes place on a very small scale, from droplets to a few milliliters, due to the high cost and significant resource requirements. The design of the filtration on the other hand requires a comparatively large amount – usually a few liters – of suspension with the usual laboratory apparatus. This means that the design of the solid-liquid separation is only possible after the protein and crystal engineering, which leads to an overall longer development time and a later market launch. Possible adverse effects of the preceding development steps on the filtration performance are either not remediable or can only be remedied at high cost.

A modular, transparent, and 3D printed filtration cell for an optical centrifuge developed in this work makes it possible to characterize filtration on a small scale, in contrast to the current commercial state of the art. Because the filtration progress is measured on the cake side, the cake height can be read from the filtration experiment. The porosity can be

calculated from the directly measurable cake height. The necessary material requirement is significantly reduced to about 200–500 μL in contrast to several hundred milliliters for the pressure nutsche. The evaluation of the filtration is based on the transmission profile, which shows characteristic features at the phase boundaries.

The downsized filtration setup allows characterization and evaluation of the solid-liquid separation step early in product and process development. This is accompanied by a reduction in development time and savings in resources. Isometric, rod-shaped and needle-shaped crystallized lysozyme crystals as well as rod-shaped alcohol dehydrogenase crystals are used as model systems in this work. For the investigated systems, a large influence of the crystal shape and particle size distribution on the sedimentation velocity, as well as on the compressibility and permeability of the corresponding filter cakes is shown. From the measured data, process functions are derived to describe the compressibility and sedimentation velocity. With the aid of the process functions determined on a small scale, the transfer of batch vacuum crystallization to an integrated apparatus concept on a laboratory scale is successfully possible. Crystals with the same size distribution and similar filter cake resistances as in the classical batch process are produced.

The further downstream processing of the crystallizate by mechanical methods requires special care. Since protein crystals are composed of large molecules and have a high proportion of crystal water, they exhibit low mechanical strength compared to conventional inorganic or organic crystals. For solid-liquid separation, this means that filtration and centrifugation of the crystallizate often leads to crystal breakage. Occurring crystal fracture changes the product properties and generally worsens the separation performance.

When lysozyme crystals are subjected to a combined normal and shear stress using a modified ring shear cell, which allows the crystals to be examined in the wet state, crushing always occurs. This is also true for normal stresses, for which no reduction in particle sizes can be detected without shear stress. For combined stress, an increase in normal stress results in significantly more comminution. With μCT data showing a sharp boundary between undamaged and destroyed crystals, the damage to the sediment can be described locally.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	i
Zusammenfassung	iii
Abstract	v
Abkürzungen und Symbole	xi
1 Einleitung und Zielsetzung	1
1.1 Zielsetzung	3
2 Theoretische Grundlagen	5
2.1 Filtration	5
2.1.1 Kuchenfiltration	5
2.1.2 Zentrifugalfiltration	9
2.2 Sedimentation	12
2.3 Prozessfunktionen	15
2.4 Kristallisation	21
2.5 Proteine	26
2.6 Zerkleinerung und Scherbeanspruchung	29
2.6.1 Druckbeanspruchung	30
2.6.2 Scherbeanspruchung	30
2.6.3 Zerkleinerung	30
3 Material & Methoden	33
3.1 Bildgebung	33
3.1.1 Mikroskopie	33
3.1.2 Mikrocomputertomographie	35
3.2 Kristallisation	40
3.2.1 Verdrängungskristallisation	40
3.2.2 Verdampfungskristallisation	41
3.3 Filtration	44
3.3.1 Nutschenfilter	44
3.3.2 Kleinskalige Zentrifugalfiltration	45

3.4	Sedimentation	45
3.5	Konzentrationsbestimmung	47
3.5.1	Kristallkonzentration	47
3.5.2	Konzentration von gelöstem Protein	48
3.6	Scherbelastung	48
4	Kleinskalige Zentrifugalfiltration	55
4.1	Stand der Technik	55
4.2	Filterzelle zur Charakterisierung von Proteinproben mit geringen Volumina	58
4.2.1	Anforderungen	58
4.2.2	Konstruktive Umsetzung	58
4.2.3	Charakterisierung der Filtrationszelle	61
4.2.4	Filtermittelwiderstände	64
4.2.5	Filtrationswiderstände und Haufwerkscharakterisierung	66
4.3	Bewertung der Filtrationszelle	69
5	Sedimentationsanalyse und Flussdichtefunktion	71
5.1	Stand der Technik	71
5.2	Partikelsysteme	73
5.3	Permeation	75
5.3.1	Kuchenwiderstände	75
5.3.2	Entwicklung der Kuchenhöhen	77
5.3.3	Berechnung des Feststoffvolumenanteils	78
5.4	Sedimentation	80
5.5	Berechnung der Flussdichtefunktion	82
5.6	Schlussfolgerungen	84
6	Übertragung auf einen integrierten Apparat	85
6.1	Stand der Technik	85
6.2	Konstruktive Umsetzung	87
6.3	Prozesstransfer	88
6.3.1	Übertragung vom Batch in den neuen Verfahrensraum	88
6.3.2	Übertragung der Filtration	90
6.3.3	Ersetzen der Membran durch ein Filtertuch	92
6.3.4	Übertragung auf ein integriertes Apparatekonzept im Labormaßstab	94
6.3.5	Homogenität des Filterkuchens	95
6.4	Schlussfolgerungen	100
7	Kristallbruch unter Schereinwirkung	103
7.1	Stand der Technik	103
7.2	Scherbruch	104
7.2.1	Einfluss von Zentrifugation und Verdichtung	107

7.2.2 Einfluss der Normalspannung	108
7.2.3 Einfluss der Schergeschwindigkeit	110
7.3 Schlussfolgerungen	112
8 Zusammenfassung und Ausblick	115
8.1 Ausblick	118
A Analysezertifikate	121
B Summenverteilungen bei Veränderung der Normalspannung	125
C Summenverteilungen bei Veränderung der Schergeschwindigkeit	127
Abbildungsverzeichnis	129
Tabellenverzeichnis	133
Eigene Veröffentlichungen	135
Literaturverzeichnis	139

Abkürzungen und Symbole

Abkürzungen

ADH	Alkoholdehydrogenase
FFT	Fest-Flüssig-Trennung
KNN	Künstliches Neuronales Netz
PGV	Partikelgrößenverteilung
SNR	Signal-Rausch-Verhältnis
μCT	Microcomputertomographie

Symbolverzeichnis

Lateinische Symbole und Variablen

<i>A</i>	Fläche	(mm ²)
<i>B</i>	Stoßfrequenz	(m ⁻³ s ⁻¹)
<i>C</i>	relative Zentrifugalbeschleunigung	(-)
<i>c</i>	Konzentration	(g L ⁻¹)
<i>c_w</i>	Widerstandsbeiwert	(-)
<i>E</i>	Energie	(J)
<i>E_λ</i>	Extinktion	(-)
<i>F</i>	Kraft	(N)
<i>f</i>	Feststofffluss	(m s ⁻¹)
<i>f_{bk}</i>	Flussdichtefunktion	(m s ⁻¹)
<i>G</i>	geometrische Vergrößerung	(-)
<i>g</i>	Gravitation	(m s ⁻²)
ΔG^*	kritische Keimbildungsenthalpie	(J)
<i>h</i>	Höhe	(mm)

J	Keimbildungsrate	$(\text{m}^{-3} \text{s}^{-1})$
K	spezifische Permeabilität	(m^2)
k_B	Boltzmannkonstante $\approx 1,380 \times 10^{-23}$	(J K^{-1})
m	Masse	(g)
P	Bruchwahrscheinlichkeit	$(-)$
p	Druck	(Pa)
p_0	Bezugsdruck	(Pa)
p_s	Feststoffgerüstdruck	(Pa)
\bar{P}	Bruchanteil	$(-)$
Q	Partikelgrößenverteilung	$(-)$
q	Partikelgrößendichtevertelung	(μm^{-1})
\bar{q}	volumengemittelte Geschwindigkeit	$(-)$
R	Widerstand	(m^{-1})
r	radialer Abstand vom Rotationszentrum	(mm)
Re	Reynoldszahl	$(-)$
S	Sättigung	$(-)$
T	Temperatur	$(^\circ\text{C})$
t	Zeit	(s)
\bar{R}	universelle Gaskonstante $\approx 8,314$	$(\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1})$
V	Volumen	(m^3)
v	Geschwindigkeit	(m s^{-1})
X	Massenbeladung	$(-)$
x	Durchmesser	(μm)
Z	Ordnungszahl	$(-)$
z	Schleudertzahl	$(-)$

Griechische Symbole und Variablen

α_m	massenspezifischer Widerstand	(m kg^{-1})
α_h	höhenspezifischer Widerstand	(m^{-2})
ϵ	Porosität	$(-)$
ϵ_λ	Extinktionskoeffizient	$(\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1})$
η	dynamische Viskosität	(Pa s)
γ	Oberflächenspannung	(N m^{-1})
κ	Kuchenkonzentrationsfaktor	$(-)$
ω	Winkelgeschwindigkeit	(s^{-1})
ϕ	Feststoffvolumenanteil	$(-)$
φ	Massenanteil	$(-)$

ρ	Dichte	(kg m^{-3})
σ	Normalpannung	(N m^{-2})
τ	Schubspannung	(N m^{-2})

Allgemeine Tiefindizes

0	Initialwert	(-)
c	Filterkuchenbezogen	(-)
g	Gelpunktbezogen	(-)
l	Flüssigkeitsbezogen	(-)
m	Filtermediumsbezogen	(-)
s	Suspensions- oder Feststoffbezogen	(-)

1 Einleitung und Zielsetzung

Der Marktbedarf an Proteinen für die Katalyse von Reaktionen steigt weltweit. Ein häufiger Vorteil bei der Verwendung von Proteinen zur Katalyse chemischer Reaktionen ist ihre Fähigkeit, Stoffe enantiomerenrein umzusetzen. Im Jahr 2015 lag der von Novozymes geschätzte weltweite Umsatz bei 3,3 Milliarden Euro. [1] Das Portal BioSpace veröffentlichte einen Bericht von Emergen Research, wonach der Umsatz im Jahr 2020 bereits 10,47 Milliarden US-Dollar betrug. Bis zum Jahr 2028 wird ein Anstieg auf 17,84 Milliarden US-Dollar prognostiziert. [2] Auch der Bedarf an Proteinen für die allgemeine technische Anwendung in den Bereichen der Lebensmitteltechnik, Industrie (Waschmittel, Katalysatoren, ...) [1] und für die Pharmazie wächst kontinuierlich. Im Bereich der Lebensmittel steigt die Nachfrage nach Alternativen zu Fleischprotein. In der technischen Lebensmittelproduktion gewährleisten Proteine bei der Brot-, Käse- und Weinherstellung sowie bei der Fabrikation von Fleischprodukten eine konstante und verlässliche Produktqualität. In Waschmitteln sind Proteine enthalten, die Stärke und Fette spalten und somit eine hochwirksame Reinigung gewährleisten. In der Pharmazie sind Proteine als Therapeutika relevant. Sie kommen in Impfstoffen und Medikamenten zum Einsatz. Pharmazeutische Proteine zur Krebstherapie, die monoklonalen Antikörper, sind besonders hochpreisige Proteine mit steigender Nachfrage. Unerwünschte oder schädliche Nebenprodukte sind somit vermeidbar. Da Proteine komplexe Makromoleküle mit einer dreidimensionalen Struktur sind, ist ihre Herstellung nur in Organismen möglich. Einfachere Proteine sind über Bakterien produzierbar, wohingegen komplexere Proteine wie Antikörper den Einsatz tierischer Zellen erfordern. Neben dem Zielprotein entstehen bei der Verwendung von Bakterien oder tierischen Zellen zur Produktion stets auch Nebenprodukte. Dabei handelt es sich beispielsweise um weitere Proteine, die die Zelle für ihren eigenen Stoffwechsel benötigt. Die kostengünstige Aufarbeitung des Zielproteins mit hoher Reinheit ist daher eine Herausforderung der Trenntechnik.

Die Fest-Flüssig-Trennung (FFT) umfasst wichtige Verfahrensschritte zur Aufarbeitung von Proteinen. Sie hat als verfahrenstechnische Grundoperation die Separation von Partikeln aus einer kontinuierlichen Phase zur Aufgabe. Die Umsetzung der FFT findet mit einer Vielzahl an Verfahren und Apparaten statt, die jeweils unterschiedliche physikalische Eigenschaften des Stoffsystems ausnutzen. Bekannte Anwendungen der FFT sind das Klären, das Eindicken,

das Klassieren, das Flotieren oder das mechanische Entfeuchten. Physikalisch wichtige Trennprinzipien sind der Dichte- und Größenunterschied. Verfahren wie die Sedimentation und Zentrifugation nutzen den Dichteunterschied zwischen partikulärer und kontinuierlicher Phase für die Trennung aus. Ein Verfahren, das primär die Partikelgröße zur Abscheidung nutzt, ist die Filtration. Sowohl die Sedimentation/Zentrifugation als auch die Filtration kommen bei der Aufarbeitung von Proteinen zum Einsatz.

Auch Methoden der thermischen Verfahrenstechnik wie die Kristallisation kommen zur Aufarbeitung von Proteinen zum Einsatz. Ziel der Kristallisation ist die Überführung eines gelösten Stoffes in einen Feststoff mit periodisch aufgebautem Gitter. In der technischen Anwendung dient die Kristallisation zur Erhöhung der Reinheit, selektiven Abtrennung eines Wertproduktes und zur Produktformulierung. Sie steht bei der Prozessierung von Proteinen dabei an der Schnittstelle zwischen Aufarbeitung und Formulierung. Die Herausforderung besteht darin, geeignete Kristallisationsbedingungen für das Zielprotein zu finden, ohne dass die biologische Aktivität eine Beeinträchtigung erfährt. Viele native Proteine sind schwierig zu kristallisieren, weshalb mit den Methoden der Biotechnologie eine gezielte Verbesserung der Kristallisationseigenschaften angestrebt wird. Die technischen Verfahren zur Proteinkristallisation sind ebenfalls an die besonderen Gegebenheiten der Proteine anzupassen, damit die biologische Aktivität erhalten bleibt. Insbesondere hohe und tiefe Temperaturen sowie hohe Ionenstärken können eine irreversible Denaturierung des Proteins bewirken. Etablierte Verfahren der Proteinkristallisation, wie das sogenannte „Aussalzen“ durch Zugabe eines Verdrängungsmittels, sind schwierig in einem großen technischen Maßstab umsetzbar. Alternative Methoden zur Proteinkristallisation stehen daher im Fokus der Entwicklung.

Die nachgelagerte weitere Prozessierung des Kristallisats durch mechanische Verfahren erfordert besondere Sorgfalt. Da Proteinkristalle aus großen Molekülen und einem hohen Anteil an Kristallwasser aufgebaut sind, weisen sie im Vergleich zu konventionellen anorganischen oder organischen Kristallen eine geringe mechanische Festigkeit auf. Für die FFT bedeutet dies, dass die Filtration und Zentrifugation des Kristallisats häufig zu Kristallbruch führt. Auftretender Kristallbruch verändert die Produkteigenschaften und verschlechtert im Allgemeinen die Trennleistung. Eine Möglichkeit zur Erhöhung der Festigkeit besteht in der Modifikation der Kristalle, zum Beispiel durch Quervernetzung.

Die besondere Herausforderung liegt darin, bereits früh in der Prozessentwicklung eine Aussage zur Filtrierbarkeit zu ermöglichen. Die zuvor beschriebenen Maßnahmen zur Verbesserung der Kristallisierbarkeit durch Proteinmodifikation und die Erhöhung der Festigkeit durch Modifikationen des Kristalls finden in der Entwicklungsphase wegen der hohen Kosten und des signifikanten Ressourcenbedarfs in einem sehr kleinen Maßstab vom Tropfen bis hin zu wenigen Millilitern statt. Auch das Ermitteln geeigneter Kristallisationsbedingungen ist automatisiert mit geringem Materialeinsatz möglich. Die Auslegung der Filtration auf der

anderen Seite benötigt mit den üblichen Laborapparaten eine im Vergleich große Menge – üblicherweise einige Liter – Suspension. Das bedeutet, die Auslegung der FFT ist erst im Anschluss an das Protein- und Kristallengineering möglich, was zu einer insgesamt längeren Entwicklungsdauer und einer späteren Markteinführung führt. Eventuell nachteilige Effekte durch die vorangegangenen Entwicklungsschritte auf die Filtrationsleistung sind entweder nicht oder nur mit hohen Kosten behebbar.

1.1 Zielsetzung

Die Zielsetzung der Arbeit untergliedert sich in vier Teilaspekte, mit denen den zuvor festgestellten Herausforderungen begegnet wird.

Filtration im verkleinerten Maßstab

Um die Filtration parallel zu der Proteinprozessentwicklung bewerten zu können, bedarf es der Möglichkeit, Filtrationsexperimente mit deutlich verringertem Materialeinsatz durchzuführen. Dazu ist die Filtration zu miniaturisieren und der Probenbedarf auf wenige Milliliter zu reduzieren.

Bei der Umsetzung ist daher ein geeigneter verkleinerter Filtrationsaufbau für die Kuchenfiltration samt zugehöriger Analytik und Auswertung zu entwickeln. Dieser Aufbau ist in einem ersten Schritt an einem Modellsystem zu erproben. Die hierbei erzielten Ergebnisse sind mit konventionellen Methoden zur Auslegung der Filtration zu vergleichen. Eine wünschenswerte Anforderung an die zu entwickelnde Methode ist es, die notwendigen Kennzahlen *Permeabilität*, *Kuchenhöhe* und *Porosität* mit einem einzigen Versuch zu ermitteln. Damit ist eine weitere Reduktion der benötigten Probenmenge erzielbar. Nach der erfolgreichen Validierung an einem Modellsystem ist die Küvette für die Betrachtung verschiedener Proteinkristallsysteme einzusetzen und damit die Filtrierbarkeit dieser Systeme zu beurteilen.

Durch die Umsetzung dieser Ziele ist es letztendlich möglich, bereits früh im Entwicklungsstadium von Kristallisationsprozesses für Proteine eine Aussage zur Filtrierbarkeit zu treffen. Ferner ist eine synchronisierte Beeinflussung der Prozessparameter bei der Kristallisation hinsichtlich einer optimalen Filtration denkbar. Das frühe Ermitteln von geeigneten Filtrationsparametern erlaubt es, die Entwicklungszeit, Kosten und Marktreife zu verkürzen.

Bestimmen der Prozessfunktionen

Neben den klassischen Filtrationsparametern sind auch die Prozessfunktionen von Interesse. Diese erlauben eine Beschreibung des Materialverhaltens in Abhängigkeit von Konzentration

bzw. Druck. Die Kenntnis der Prozessfunktionen ist hilfreich, um bestimmte Prozesseigenschaften zu berechnen. Ferner sind sie für die Prozesssimulation essenziell.

Das Ziel besteht demzufolge darin, mit dem zuvor entworfenen Filtrationsaufbau zusätzlich die Prozessfunktionen in einem kleinen Maßstab zu ermitteln. Neben der Filtration ist dazu auch die Sedimentation für eine umfassende Beschreibung der Prozessfunktionen zu betrachten. Deshalb ist ein weiteres Ziel, die Sedimentation ebenfalls mit einer geringen Probenmenge akkurat zu charakterisieren. Nach der Etablierung einer Methode zur Ermittlung der Prozessfunktionen ist diese für verschiedene Kristallsysteme anzuwenden. Anhand der Ergebnisse ist das Materialverhalten für die verschiedenen Kristallsysteme zu bewerten.

Die so ermittelten Prozessfunktionen erlauben es, das Materialverhalten für unterschiedliche Prozessbedingungen zu berechnen. Dadurch ist eine weitere Reduktion der Experimente und somit eine zusätzliche Verringerung des Materialbedarfs möglich.

Übertragung der Erkenntnisse aus dem kleinen Maßstab auf eine Laboranlage

Die im kleinen Maßstab gewonnenen Erkenntnisse in Bezug auf die Filtration und die Prozessfunktionen dienen nun dazu, die Filtration auf einem Laborapparat auszulegen.

Diese Übertragung erfordert ein mehrstufiges Vorgehen, um die verschiedenen Effekte zu betrachten. Zunächst ist zu gewährleisten, dass Kristalle, die in einem größeren Maßstab produziert werden, ähnliche Eigenschaften und Größen wie Kristalle aus dem kleinen Maßstab aufweisen. Zudem sind die Effekte von unterschiedlichen Filtermedien zu betrachten. Letztendlich ist das Ziel, mit den Daten aus dem verkleinerten Filtrationsaufbau die Trennleistung auf einem größeren Laborapparat korrekt vorherzusagen.

Untersuchung des Bruchverhaltens bei der Scherbeanspruchung

Weil die mechanische Stabilität von Proteinkristallen geringer als bei organischen Kristallen ist, hat das Bruchverhalten einen besonderen Stellenwert. Auftretender Bruch verschlechtert im Allgemeinen die Filtrationsleistung und verändert die Eigenschaften des Partikelkollektivs. Es existieren bereits Betrachtungen zum Bruch bei reiner Druckbeanspruchung. In industriellen Apparaten und zugehörigen Aggregaten findet allerdings zumeist eine Überlagerung von Scher- und Druckbeanspruchungen statt.

Die Zielsetzung besteht daher darin, das Bruchverhalten von Proteinkristallen bei einer Überlagerung von Druck- und Scherkräften aufzuklären. Aufgrund des hohen Kristallwasseranteils im Proteinkristall verändern sich die mechanischen Eigenschaften bei einer Trocknung erheblich. Es ist deshalb ein geeignetes Verfahren zu implementieren, das es erlaubt, diese Charakterisierung im feuchten Zustand durchzuführen.

2 Theoretische Grundlagen

Gegenstand der Arbeit ist die Betrachtung der Filtration und der mechanischen Beanspruchung von Proteinkristallen. Aus diesem Grund sind im Folgenden die theoretischen Grundlagen der Filtration, Sedimentation, Bildanalyse und der Kristallisation dargestellt.

2.1 Filtration

Die Filtration ist in der FFT neben der Dichteseparation und der elektrostatischen bzw. Magnetseparation ein Trennverfahren, das Partikel aus einer kontinuierlichen Phase primär aufgrund der Partikelgröße abtrennt. Die treibende Kraft der Filtration ist eine Druckdifferenz. Neben der Partikelgröße sind auch elektrostatische oder hydrophobe Wechselwirkungen für die Abscheidung nutzbar. Bei der Filtration ist zwischen der Tiefenfiltration, der Oberflächenfiltration und der Querstromfiltration zu unterscheiden. Das Funktionsprinzip dieser drei Filtrationsvarianten ist in Abb. 2.1 anschaulich dargestellt. Bei der Tiefenfiltration (Abb. 2.1 links) findet die Abscheidung der Partikel im Filtermedium statt. Aus dem Bereich der Oberflächenfiltration ist vor allem die Kuchenbildende Filtration bekannt, die in zahlreichen technischen Prozessen, wie beispielsweise der Abwasseraufbereitung, zum Einsatz kommt.

2.1.1 Kuchenfiltration

Die Funktionsweise der Kuchenfiltration besteht in der Abscheidung der Partikel an einem porösen Filtermittel (siehe auch Abb. 2.1 Mitte). Voraussetzung für eine erfolgreiche Kuchenfiltration ist ein hinreichend hoher Feststoffgehalt in der Suspension und eine ausreichend große Partikelgröße, damit der Durchströmungswiderstand nicht zu stark ansteigt [4]. Henry Darcy entwickelte empirisch das nach ihm benannte Gesetz zur Durchströmung von Packungen, das eine spezielle Lösung der Navier-Stokes Gleichungen darstellt [5]. Im Darcy Gesetz

$$\dot{V} = \frac{dV}{dt} = \frac{\Delta p A}{R \eta} \quad (2.1)$$

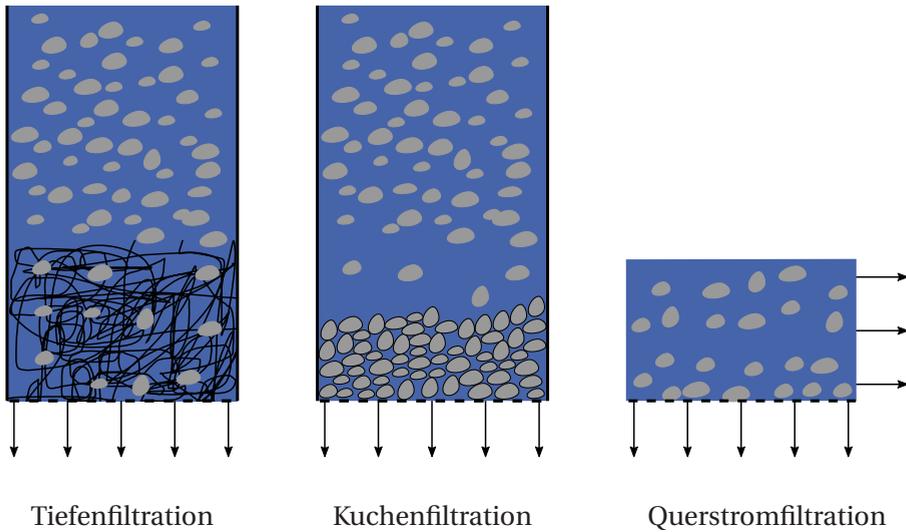


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Tiefenfiltration (links), Kuchenfiltration (Mitte) und Querstromfiltration (rechts); nach [3]

sind der Volumenstrom (\dot{V}), die Querschnittsfläche (A), die dynamische Viskosität (η) und der Durchströmungswiderstand (R) miteinander verknüpft [4]. Der Durchströmungswiderstand wiederum setzt sich additiv aus dem Widerstand des Filtermittels (R_m) und dem Widerstand des Filterkuchens (R_c) zusammen. Der Kuchenwiderstand hängt von der Höhe des Filterkuchens (h_c) ab. Um diesen Wert vergleichbar und aussagekräftiger zu machen, ist eine Normierung des Kuchenwiderstands mit der Kuchenhöhe (α_h) oder Kuchenmasse (α_m) üblich:

$$\alpha_h = \frac{R_c}{h_c} = K^{-1} \quad (2.2)$$

$$\alpha_m = \frac{\alpha_h}{\phi_c \rho_s}. \quad (2.3)$$

Der Kehrwert des höhenspezifischen Kuchenwiderstands ist die höhenspezifische Permeabilität (K). Die Größe ρ_s bezeichnet dabei die Feststoffdichte und ϕ_c steht für den Feststoffvolumenanteil im Filterkuchen. Letzterer ist definiert als

$$\phi_c = 1 - \epsilon = \frac{V_s}{V_s + V_p}, \quad (2.4)$$

mit dem Volumen des Feststoffs (V_s) und dem Porenvolumen (V_p). Das Gegenstück zum Feststoffvolumenanteil ist die Porosität (ϵ). Sowohl der normierte Widerstand als auch der

Feststoffvolumenanteil sind für inkompressible Partikelsysteme über die Höhe konstant. [4, 5]

Unter der Annahme einer konstanten Druckdifferenz (Δp) bei der kuchenbildenden Filtration ergibt sich durch Umformung von Gleichung (2.1) der Zusammenhang

$$\frac{dt}{dV} = \frac{(\alpha_h h_c + R_m)\eta}{\Delta p A} = \frac{\alpha_h h_c \eta}{\Delta p A} + \frac{R_m \eta}{\Delta p A}. \quad (2.5)$$

Mit der Beziehung für die Kuchenhöhe

$$h_c = \frac{V_c}{A} \quad (2.6)$$

und durch das Einführen der Kuchenkonzentrationszahl

$$\kappa = \frac{V_c}{V_l} = \frac{\phi_s}{1 - \phi_s - \epsilon} \quad (2.7)$$

ist es möglich, die zeitabhängige Kuchenhöhe durch die zeitunabhängige Kuchenkonzentrationszahl und durch das einfach zu messende zeitabhängige Filtratvolumen zu ersetzen. Die Integration der Gleichung

$$\int_0^t dt = \int_0^V \frac{\alpha_h \kappa \eta}{\Delta p A^2} V + \frac{R_m \eta}{\Delta p A} dV \quad (2.8)$$

führt dann zur klassischen Filtrationsgleichung

$$t = \frac{\alpha_h \kappa \eta}{2\Delta p A^2} V^2 + \frac{R_m \eta}{\Delta p A} V \quad (2.9)$$

$$\frac{t}{V} = \underbrace{\frac{\alpha_h \kappa \eta}{2\Delta p A^2}}_{=a} V + \underbrace{\frac{R_m \eta}{\Delta p A}}_{=b}. \quad (2.10)$$

In der linearisierten Form dient Gleichung (2.10) zur Auswertung von Kuchen- und Filtermediumswiderständen. Der entscheidende Vorteil der Linearisierung liegt in der einfachen Auswertung über eine normale Geradengleichung, in der die Steigung den Kuchenwiderstand und die Ordinate den Mediumswiderstand abbildet. Die zugrunde liegenden Annahmen und Voraussetzungen für die Gültigkeit dieser Darstellung der Darcy Gleichung sind:

1. Schleichende Umströmung
2. Inkompressibler Filterkuchen
3. Konstante Druckdifferenz
4. Newtonsches Fließverhalten

Ist der Widerstand des Filtermediums deutlich kleiner als der Widerstand des Kuchens, ist er vernachlässigbar. Der entstehende Filterkuchen wirkt als zusätzliches Filtermittel und hält auch Partikel zurück, die aufgrund ihrer Größe das Filtermedium passieren könnten. Um ein Verblocken der Poren des Filtermediums zu verhindern, ist die Porengröße entweder deutlich kleiner oder größer als die vorliegenden Partikelgrößen zu wählen. Andernfalls besteht die Gefahr von Klemmkörnern. Übersteigt die Porengröße den Partikeldurchmesser, so ist zu Beginn der Filtration mit Feststoffdurchschlag, dem sogenannten Trübstoß, zu rechnen. Erst wenn sich Feststoffbrücken gebildet haben, hält der Filterkuchen auch die feineren Partikel zurück. [4, 6]

Bei kompressiblen Filterkuchen existiert eine Abhängigkeit des Filterkuchenwiderstands, der Kuchenhöhe und der Porosität von der angelegten Druckdifferenz. In diesen Fällen ist das Haufwerk nicht homogen über die Kuchenhöhe aufgebaut, sodass eine Porositäts- und Widerstandsverteilung vorliegt. Der Vergleich zwischen kompressiblen und inkompressiblen Haufwerken ist in Abb. 2.2 schematisch dargestellt. Die unterste Schicht im Filterkuchen hat demnach den höchsten Widerstand und die geringste Porosität. Zur Filterkuchenoberseite nimmt der Widerstand kontinuierlich ab und die Porosität steigt an. [3, 4, 7]

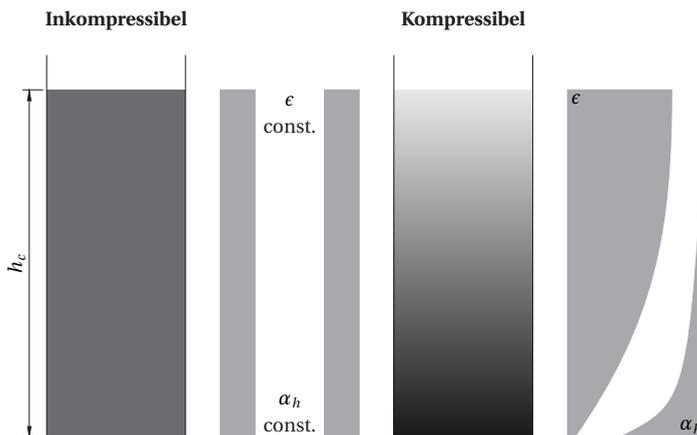


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des Porositäts- und Widerstandsverlaufs über die Kuchenhöhe für inkompressible (links) und kompressible (rechts) Haufwerke; nach Anlauf [4]

Alles [7] erwähnt verschiedene Mechanismen, die ein kompressibles Verhalten verursachen. Darunter fällt die Umlagerung und Kompaktierung von Partikeln im Filterkuchen. Ein Beispiel für diesen Mechanismus ist das Zusammenbrechen von Kartenhausstrukturen bei länglichen Partikeln. Als weitere Mechanismen kommen Wechselwirkungen zwischen feinen Partikeln, die Deformation von Partikeln (z. B. bei Fasern und Zellen) oder bei Überschreiten der Materialfestigkeit auftretender Partikelbruch und plastische Deformation infrage.

Im t/V - V Diagramm zeigt sich die Kompressibilität und anderes nicht ideales Verhalten, wie beispielsweise überlagerte Sedimentation als Abweichung von der Geradenform. Dennoch ist, trotz der Voraussetzung von Inkompressibilität, auch für kompressible Systeme eine Bestimmung über Gleichung (2.10) durchführbar. Dann sind aber nur der über die Höhe gemittelte Widerstand und die gemittelte Porosität darstellbar. Es ist in diesem Fall zudem nicht zulässig, den Beginn der Filtration auszuwerten.

Neben der reinen Filtration lässt sich auch über Permeation eines bereits bestehenden Filterkuchens der Gesamtwiderstand ermitteln. Die Kuchenhöhe ist dabei konstant und bekannt. Es ergibt sich daher gemäß Gleichung (2.1) ein linearer Zusammenhang zwischen Filtratvolumen und Filtrationszeit. Ist zudem der Filtermediumswiderstand bekannt, ist es möglich, den Kuchenwiderstand aus dem erhaltenen Gesamtwiderstand zu bestimmen. Es gilt:

$$\alpha_h = \left(\frac{\Delta p A}{\eta \dot{V}} - R_m \right) h_c^{-1}. \quad (2.11)$$

2.1.2 Zentrifugalfiltration

Die Druckdifferenz als treibende Kraft der Filtration resultiert bei der Zentrifugalfiltration aus dem angelegten Zentrifugalfeld. Für eine Betrachtung des Druckverlaufs ist es zweckmäßig, die Gesamtdruckdifferenz (Δp) nach dem Superpositionsprinzip in einzelne Komponenten aufzuspalten.

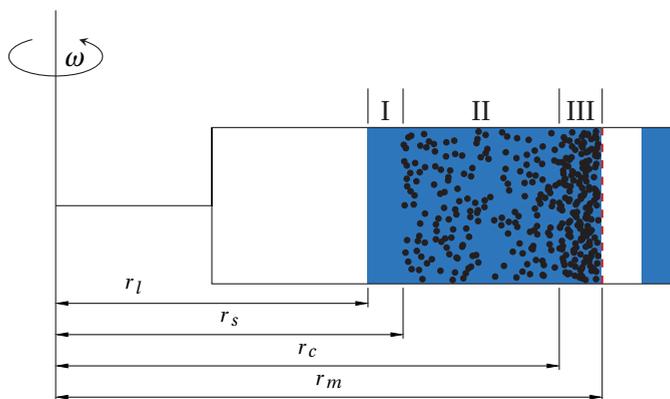


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der Zentrifugalfiltration

Abbildung 2.3 zeigt schematisch das Prinzip der Zentrifugalfiltration. Rechts des Filtermediums befindet sich das Filtrat. Der Bereich links des Filtermediums ist in drei Bereiche aufgeteilt. Der erste Bereich (I) besteht aus bereits geklärteter Flüssigkeit, da hier Filtration und

Sedimentation überlagert sind. Der zweite Bereich (II) ist der Suspensionsbereich, der sich bis zur Kuchenkonzentrationszone (ab r_c) erstreckt. Im dritten Bereich (III) ist der Filterkuchen lokalisiert. Diese Zone endet mit dem Filtermedium. Die Positionen der Flüssigkeitsoberseite (r_l), der Suspensionsoberseite (r_s) und der Filterkuchenoberseite (r_c) ändern sich mit der Zeit. Die Position des Filtermediums (r_m) bleibt konstant. Diese einzelnen Positionen sind als Abstand vom Rotationszentrum zu verstehen. Das bedeutet aber auch, dass bei der Zentrifugalfiltration der Druck nicht konstant ist, sondern im Verlauf der Filtration abnimmt. [4, 8, 9]

Der Gesamtdruck

$$\Delta p = \Delta p_l + \Delta p_s + \Delta p_c \quad (2.12)$$

setzt sich daher aus dem hydrostatischen Druck der Klar- und Suspensionsphase zusammen. Im Filterkuchen wirkt zudem noch der Feststoffgerüstdruck. Für die einzelnen Komponenten gilt:

$$\Delta p_l = \frac{\rho_l \omega^2}{2} (r_s^2 - r_l^2) \quad (2.13)$$

$$\Delta p_s = \frac{(\phi \rho_s + (1 - \phi) \rho_l) \omega^2}{2} (r_c^2 - r_s^2) \quad (2.14)$$

$$\Delta p_c = \frac{(\phi_c \rho_s + (1 - \phi_c) S \rho_l) \omega^2}{2} (r_m^2 - r_c^2). \quad (2.15)$$

Die Dichte der Suspension ist dabei mithilfe des Feststoffvolumenanteils aus der Feststoff- und Flüssigkeitsdichte berechnet. Analog ist die Vorgehensweise im Filterkuchen. Die Sättigung (S) im Filterkuchen beschreibt, zu welchem Anteil der Porenraum mit Flüssigkeit gefüllt ist, und liegt zwischen null und eins.

Die Ermittlung von Filtrationswiderständen findet vereinfacht durch ein Permeationsexperiment statt, sodass der idealisierte Bereich (II) aus Abb. 2.3 entfällt. Zudem ist während der Permeation der Porenraum des Filterkuchens stets mit Flüssigkeit gefüllt, weshalb die Sättigung 1 beträgt.

Der Druckabfall im Filterkuchen ist über die differentielle Darcy Gleichung

$$\frac{dp}{dr} = -\eta \alpha_h v + \rho_l \omega^2 r \quad (2.16)$$

mit der Leerrohrgeschwindigkeit (v) beschrieben. Diese Geschwindigkeit ist äquivalent zur zeitlichen Abnahme der Flüssigkeitshöhe über dem Filterkuchen

$$v = -\frac{dh}{dt}. \quad (2.17)$$

Einsetzen, Umformen und Integration über den Filterkuchen liefert den Zusammenhang:

$$\int_{p_c}^{p_m} dp = \int_{r_c}^{r_m} \eta \alpha_h \frac{dh}{dt} + \rho_l \omega^2 r dr \quad (2.18)$$

$$p_m - p_c = \eta \alpha_h (r_m - r_c) \frac{dh}{dt} + \frac{\rho_l \omega^2}{2} (r_m^2 - r_c^2). \quad (2.19)$$

Die Drücke an der Kuchenoberseite und an dem Filtermedium sind nicht direkt zugänglich. Für den Druck am Filtermedium ist jedoch eine Beziehung über die Darcy Gleichung

$$p_m = -R_m \eta \frac{dh}{dt} \quad (2.20)$$

gegeben, und der Druck an der Kuchenoberseite ist gemäß Gleichung (2.21) über den hydrostatischen Druck der Flüssigkeit über dem Filterkuchen beschreibbar. An der Flüssigkeitsoberseite an Position r_l beträgt der Referenzdruck definitionsgemäß null.

$$p_c - \underbrace{p_l}_{=0} = \frac{\rho_l \omega^2}{2} (r_c^2 - r_l^2) \quad (2.21)$$

Zur finalen Beschreibung der Zentrifugalfiltration ist die vorab eingeführte Position der Flüssigkeitsoberseite durch die Höhe der Flüssigkeit über dem Filterkuchen und der konstanten Position der Filterkuchenoberseite gemäß

$$h = r_c - r_l \quad (2.22)$$

zu ersetzen. Durch Einsetzen, Umformen und Integration ergibt sich

$$\int_{h_{l,0}}^{h_l} \frac{dh}{(r_c - h)^2 - r_m^2} = \int_0^t \frac{\rho_l \omega^2}{2\eta(\alpha_h(r_m - r_c) + R_m)} dt \quad (2.23)$$

$$\underbrace{\ln \frac{r_m + r_c - h_l}{r_m - r_c + h_l} \frac{r_m - r_c + h_{l,0}}{r_m + r_c - h_{l,0}}}_{=Y} = \underbrace{\frac{\rho_l \omega^2 r_m}{\eta(\alpha_h(r_m - r_c) + R_m)}}_{=k} t, \quad (2.24)$$

wobei h_0 der Ausgangshöhe der Flüssigkeit über dem Filterkuchen entspricht. Diese Gleichung ist analog zur Filtergleichung wie eine Gerade der Form

$$Y = kt \quad (2.25)$$

zu interpretieren. Die linke Seite dieser Gleichung enthält dabei die messbaren Positionen der Phasengrenzen. Auf der rechten Seite sind in der Steigung Material- und Prozessgrößen sowie der gesuchte Kuchenwiderstand enthalten. [8]

Die bei der Herleitung getroffenen Annahmen sind eine konstante Position des Filtermediums, der Filterkuchenoberseite sowie zusätzlich die Voraussetzungen für die Gültigkeit des Darcy Gesetzes. Da der maximale Druck zu Beginn der Filtration anliegt, ist die Position der Kuchenoberseite konstant, solange kein elastisches Materialverhalten vorliegt. Andernfalls käme es zu einem „Wiederaufstehen“ des Filterkuchens bei abfallendem Druck, und eine Auswertung nach Gleichung (2.24) ist nicht möglich.

2.2 Sedimentation

Sedimentation ist das Absinken einer dispersen festen Phase aufgrund eines Dichteunterschieds zur kontinuierlichen flüssigen Phase.

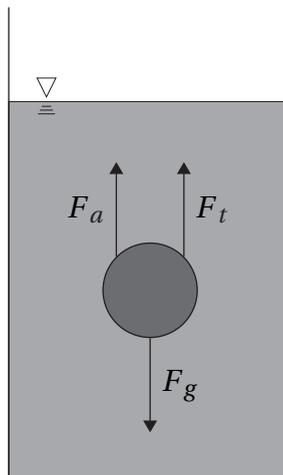


Abbildung 2.4: Kräftegleichgewicht bei der Einzelkornsedimentation

Zur Beschreibung der Sedimentation ist es zweckmäßig, zunächst nur ein einzelnes Partikel zu betrachten und daran ein Kräftegleichgewicht aufzustellen. Dieser Fall ist schematisch in Abb. 2.4 dargestellt. Auf das Partikel wirken die Gewichtskraft (F_g), die Auftriebskraft (F_a) und die Trägheitskraft (F_t). Das Kräftegleichgewicht ergibt sich somit zu

$$F_g = F_a + F_t. \quad (2.26)$$

Die Beiträge der einzelnen Kräfte ergeben sich zu

$$F_g = mgz = \rho_s V_s g z, \quad (2.27)$$

$$F_a = V_s \rho_l g z, \quad (2.28)$$

$$F_t = \frac{\rho_l}{2} v^2 A c_w (Re_p) \quad (2.29)$$

mit den Größen A als Projektionsfläche, z für die Schleuderzahl und c_w als Widerstandsbeiwert. Die Schleuderzahl ermöglicht die Übertragung des Kräftegleichgewichts vom Erdschwere- in das Zentrifugalfeld und ist das Verhältnis der Zentrifugal- zur Erdbeschleunigung. Im Erdschwerefeld beträgt die Schleuderzahl 1. Es gilt:

$$z = \frac{\omega r^2}{g}. \quad (2.30)$$

Der Widerstandsbeiwert ist abhängig von der Partikelreynoldszahl (Re_p). Für eine Kugel berechnet sich die Partikelreynoldszahl gemäß

$$Re_p = \frac{v x \rho_l}{\eta}. \quad (2.31)$$

Unter der Annahme eines kugelförmigen Partikels mit Durchmesser x und schleichender Umströmung ($Re < 0,2$) ergibt sich der Widerstandsbeiwert zu [10]

$$c_w = \frac{24}{Re_p}. \quad (2.32)$$

Das Einsetzen der Kräfte und des Kugelvolumens in das Kräftegleichgewicht liefert dann die Stokes'sche Sinkgeschwindigkeit

$$v_{st} = \frac{(\rho_s - \rho_l) x^2 g z}{18\eta}. \quad (2.33)$$

Neben den Voraussetzungen von kugelförmigen Partikeln und schleichender Umströmung liegen zudem die Annahmen von newtonschem Fließverhalten und der sogenannten Einzelsedimentation zugrunde. Das bedeutet, die Partikelkonzentration ist so gering, dass ein gegenseitiges Beeinflussen der Partikel nicht stattfindet. Der Feststoffvolumenanteil, bei dem keine gegenseitige Beeinflussung vorliegt, ist vom eingesetzten Partikelsystem abhängig und individuell zu ermitteln. [4] Trotz dieser in der Realität oft verletzten Voraussetzungen ist die Stokes'sche Sinkgeschwindigkeit eine der fundamentalsten Gleichungen der mechanischen Verfahrenstechnik. Sie findet Anwendung zur Auslegung von Zentrifugen, Klärbecken und in

der Analytik. Die Abweichung realer Partikel von der Kugelform wird häufig durch die Einführung des Kugeläquivalentdurchmessers kompensiert. Reale Stoffsysteme sind bezüglich der Partikelgröße zudem dispers verteilt. Dies führt zu einer Sinkgeschwindigkeitsverteilung und somit in der Regel zu einer Verschiebung der Feststoffvolumenanteile während der Sedimentation.

Bei höheren Feststoffvolumenanteilen zeigen reale Partikelsysteme ein verändertes Sedimentationsverhalten. Zunächst entstehen Partikelcluster, die eine größere Sinkgeschwindigkeit als Einzelpartikel aufweisen. Für polydisperse Partikelsysteme besteht zudem die Möglichkeit von Segregationseffekten. Dieser Bereich trägt die Bezeichnung Schwarmsedimentation. Bei weiterer Erhöhung des Feststoffvolumenanteils findet eine gegenseitige Behinderung der Partikel statt, was zu einer stärker ausgeprägten entgegengerichteten Strömung führt. Hier weisen alle Partikel die nahezu gleiche Sinkgeschwindigkeit auf, und es kommt zur Ausbildung einer Klarphase sowie eines scharfen, absinkenden Trennspiegels. Dieser Bereich heißt Zonensedimentation.

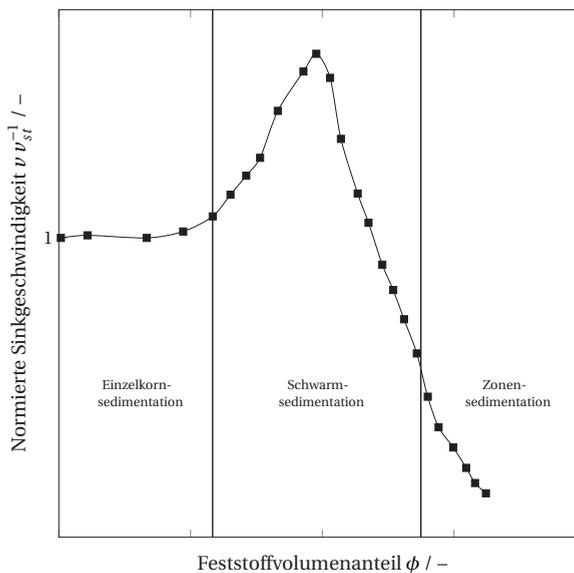


Abbildung 2.5: Einfluss des Feststoffvolumenanteils auf die normierte Sinkgeschwindigkeit; nach Bhatti [11]

Der Quotient der tatsächlichen Sinkgeschwindigkeit in Bezug zur Stokes'schen Sinkgeschwindigkeit zeigt die Abweichungen vom Stokes'schen Gesetz besonders anschaulich. In Abb. 2.5 ist dieser Quotient anhand eines von Bhatti [11] publizierten Beispielsystems über dem Feststoffvolumenanteil aufgetragen. Zu sehen ist eine Zunahme der Sinkgeschwindigkeit im Bereich der Schwarmsedimentation, die über die Stokes'sche Sinkgeschwindigkeit hinausgeht.

Nach Erreichen eines Maximalwertes nimmt die Geschwindigkeit wieder ab und fällt unter die Stokes Geschwindigkeit. Im letzten Abschnitt liegen Zonen- und gehinderte Sedimentation vor, was sich in einer deutlich geringeren Sedimentationsgeschwindigkeit auswirkt.

Zur Berücksichtigung des Feststoffvolumenanteils existieren in der Literatur mehrere Ansätze. Richardson und Zaki [12] führten das nach ihnen benannte Gesetz

$$v_{rz} = v_{st} (1 - \phi)^N \quad (2.34)$$

ein, das die Abhängigkeit der Sinkgeschwindigkeit vom Feststoffvolumenanteil berücksichtigt. Der Exponent N ist abhängig von der Reynoldszahl und beträgt im laminaren Stokesbereich 4,65. Eine Bedingung des Modells von Richardson und Zaki ist, dass alle Partikel kugelförmig und monodispers sind und dieselbe Sinkgeschwindigkeit aufweisen, weswegen dieses Modell im Bereich der Schwarmsedimentation häufig ungültig ist.

2.3 Prozessfunktionen

Prozessfunktionen dienen zur Modellierung des Materialverhaltens in Abhängigkeit einer bestimmten Stoffgröße, wie beispielsweise dem Feststoffvolumenanteil. In der Literatur sind verschiedene Modelle, die zumeist einen empirischen Ursprung haben, publiziert. Im Bereich der Filtration mit kompressiblen Kuchen veröffentlichten Tiller und Kwon [13] eine Korrelation zwischen Kuchenwiderstand und Druck

$$\alpha = \alpha_0 \left(1 + \frac{p}{p_0} \right)^N, \quad (2.35)$$

die die drei Parameter α_0 , p_0 und N enthält. Zur Bestimmung dieser drei Parameter erfolgt entweder eine Anpassung an vorhandene Messwerte, oder es werden α_0 und p_0 als Stützstelle bei dem niedrigsten Druck gewählt und lediglich N an die restlichen Messergebnisse angepasst.

Analog zu Gleichung (2.35) existiert ebenfalls von Tiller und Kwon [13] ein Potenzansatz für die Berechnung des Feststoffvolumenanteils in Abhängigkeit vom Feststoffgerüstdruck

$$\phi = \phi_0 \left(1 + \frac{p_s}{p_0} \right)^\beta. \quad (2.36)$$

Umgeformt für den Feststoffgerüstdruck ergibt sich daraus

$$p_s = p_0 \left(\left(\frac{\phi}{\phi_0} \right)^{\frac{1}{\beta}} - 1 \right) \quad (2.37)$$

mit den Parametern ϕ_0 und β .

Der Feststoffgerüstdruck ist definitionsgemäß null für Feststoffvolumenanteile, die geringer als der Gelpunkt sind. Der Gelpunkt ist der Feststoffvolumenanteil, an dem der Übergang von einer Suspension zu einem Haufwerk stattfindet, und dadurch charakterisiert, dass über das ausgebildete Partikelnetzwerk Normal- und Schubspannungen übertragbar sind [14]. Er trägt in der Literatur auch die Bezeichnung: kritischer Feststoffvolumenanteil.

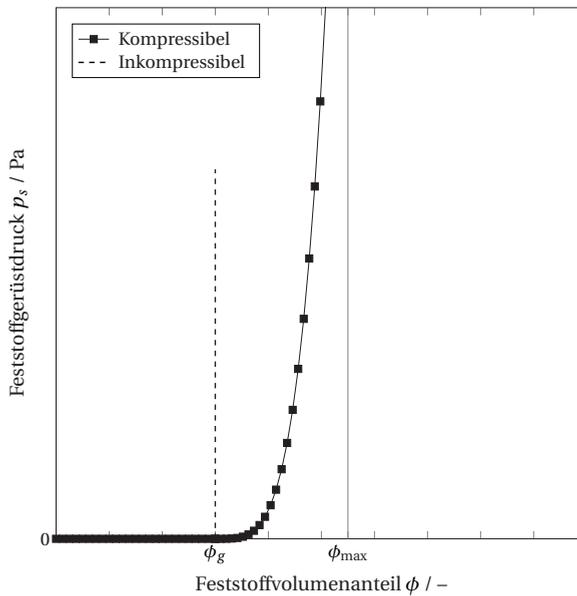


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung des Feststoffgerüstdrucks für ein kompressibles und ein ideal inkompressibles Stoffsystem

Abbildung 2.6 zeigt exemplarisch den Verlauf des Feststoffgerüstdrucks für ein ideal inkompressibles System. In diesem Fall springt der Feststoffgerüstdruck von null auf unendlich, sobald der Feststoffvolumenanteil den Gelpunkt erreicht. Bei einem kompressiblen System kommt es zu einer sukzessiven Zunahme des Feststoffgerüstdrucks beginnend vom Gelpunkt bis zu einem maximalen Feststoffgerüstdruck ϕ_{max} . Dieser Verlauf ist in Abb. 2.6 durch die schwarzen Quadrate dargestellt. Neben dem Ansatz von Tiller [15] zur Beschreibung des Feststoffgerüstdrucks in Gleichung (2.37) existieren in der Literatur noch weitere Modelle,

mit denen sich Stoffgrößen wie der Gelpunkt oder die maximale Packungsdichte bestimmen lassen. Landman et al. [16] beispielsweise verwenden zwei empirische Parameter a und b und berücksichtigen den Gelpunkt

$$p_s = a \left(\frac{\phi}{\phi_g} - 1 \right)^b. \quad (2.38)$$

Usher et al. [17] verwenden einen deutlich komplexeren empirischen Ansatz

$$\left(\frac{a(\phi_{\max} - \phi)(b + \phi - \phi_g)}{\phi - \phi_g} \right)^{-c}, \quad (2.39)$$

der neben drei empirischen Parametern a , b und c noch den Gelpunkt und die maximale Packungsdichte miteinbezieht. Insbesondere Modelle mit Berücksichtigung der maximalen Packungsdichte sind in der Lage, das physikalische Verhalten bei höheren Feststoffgerüstdrücken gut abzubilden. Aber auch das einfachere Modell von Tiller [15] liefert für viele Systeme über einen breiten Bereich des Feststoffvolumenanteils passende Ergebnisse. Letztendlich erfolgt die Auswahl eines passenden Modells anhand der verfügbaren Stoffgrößen und der Genauigkeit der Anpassung an Messdaten.

Eine weitere wichtige Prozessfunktion ist die sogenannte Kynch Flussdichtefunktion (f_{bk}) [18], deren Herleitung im Folgenden kurz skizziert ist. Für eine ausführliche Betrachtung sei an dieser Stelle auf Tiller [15], Kynch [18] und Concha und Bustos [19] verwiesen.

Zunächst betrachten wir die Sedimentation und Haufwerksbildung im inkompressiblen Fall. Die Suspension besteht aus zwei Phasen: dem Feststoff und der kontinuierlichen flüssigen Phase. Für die Massenbilanz ergibt sich nach Kynch [18] für den Feststoff der Zusammenhang

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} + \nabla \cdot (\phi \vec{v}_s) = 0, \quad (2.40)$$

und entsprechend für die Flüssigkeit

$$\frac{\partial(1-\phi)}{\partial t} + \nabla \cdot ((1-\phi) \vec{v}_l) = 0. \quad (2.41)$$

Im eindimensionalen Fall vereinfacht sich Gleichung (2.40) zu

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} + \frac{\partial \phi v_s}{\partial r} = 0 \quad (2.42)$$

mit der Koordinate r in radialer Richtung. Entsprechend gilt für die Flüssigkeit

$$-\frac{\partial \phi}{\partial t} + \frac{\partial(1-\phi)v_l}{\partial r} = 0. \quad (2.43)$$

Durch Addition der zwei Gleichungen erhält man gemäß Concha und Bustos [19] die Kontinuitätsgleichung für die Mischphase

$$\frac{\partial \bar{q}}{r} = 0 \quad (2.44)$$

mit \bar{q} als volumengemittelte Geschwindigkeit. Diese ist definiert als

$$\bar{q} = \phi v_s + (1-\phi)v_l \quad (2.45)$$

und lässt sich mit der Relativgeschwindigkeit zwischen Feststoff und Flüssigkeit $v_{\text{rel}} = v_s - v_l$ auch ausdrücken als

$$\bar{q} = v_s - (1-\phi)v_{\text{rel}}. \quad (2.46)$$

Das Einsetzen von \bar{q} in den Feststofffluss (f)

$$f = \phi v_s \quad (2.47)$$

führt zur folgenden Gleichung und der Definition der Kynch Batch Flussdichte [15, 18]

$$f = \phi \bar{q} + \underbrace{\phi(1-\phi)v_{\text{rel}}}_{=f_{\text{bk}}}. \quad (2.48)$$

In einem geschlossenen System ohne Zu- und Ablauf ist $\bar{q} = 0$ und die Flussdichtefunktion entspricht in diesem Fall dem Feststofffluss

$$f = f_{\text{bk}} = \phi v_s. \quad (2.49)$$

Der Herleitung der Flussdichtefunktion liegen folgende Annahmen zugrunde:

1. Die Feststoffpartikel sind klein im Vergleich zum Behälter.
2. Es liegt Zonensedimentation vor.
3. Die Feststoffpartikel und die Flüssigkeit sind inkompressibel.
4. Es gibt keinen Massenaustausch zwischen den Komponenten.
5. Die Sedimentationsgeschwindigkeit an irgendeinem Punkt in der Suspension ist nur von dem lokalen Feststoffvolumenanteil abhängig.

Ist das Haufwerk inkompressibel, gilt für die Feststoffgeschwindigkeit die Dirichlet Randbedingung $v_s = 0$ am Boden bzw. am Filtermedium. Somit erhöht sich der Feststoffvolumenanteil, bis der maximale Feststoffvolumenanteil erreicht ist. Die Lösung der Differenzialgleichung für den Feststoffvolumenanteil ist nicht trivial, da es mehrere Diskontinuitäten gibt, an denen sich der Feststoffvolumenanteil sprunghaft ändert. Eine dieser Diskontinuitäten liegt beispielsweise am Gelpunkt, wie auch in Abb. 2.7 dargestellt.

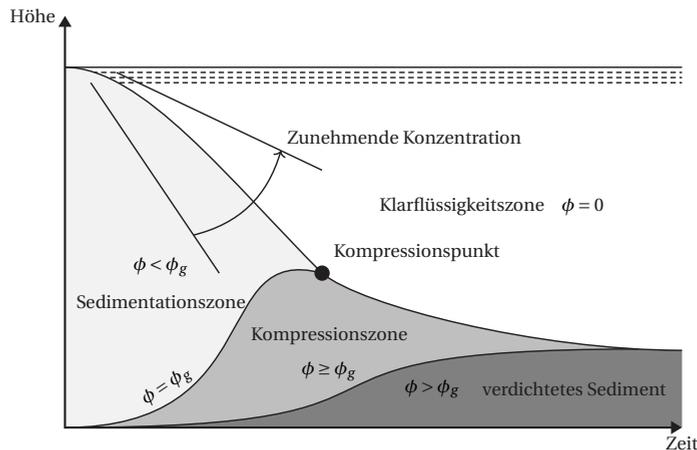


Abbildung 2.7: Zeitlicher Verlauf der Zonensedimentation und die sich dabei ausbildenden Bereiche; nach Stieß [5]

Abbildung 2.7 zeigt die Zonensedimentation ausführlich im zeitlichen Verlauf. Zunächst entsteht ein scharfer Trennspegel, der im Laufe der Zeit absinkt. Gleichzeitig wächst von unten das Haufwerk an. Dieses Haufwerk weist einen Feststoffvolumenanteil auf, der am oder oberhalb des Gelpunktes (ϕ_g) liegt. Unter dem Eigengewicht der Partikel findet dann eine Verdichtung des Sediments statt, die sich ebenfalls von unten nach oben ausbreitet. Im Gleichgewicht liegt das Sediment vollständig verdichtet vor. Diskontinuitäten im Feststoffvolumenanteil liegen daher an der Sedimentationsfront, am Übergang von der Sedimentationszone zur Kompressionszone und am Übergang zum verdichteten Sediment. Zusätzlich sind auch weitere Sprünge im Feststoffvolumenanteil möglich, die sich wellenförmig ausbreiten.

Zur besseren Beschreibung kompressibler Sedimente führten Tiller [15] und auch Holdich und Butt [20] eine Erweiterung der Kynch [18] Theorie ein. Die Grundannahme beruht darauf, dass sich die Sedimentationsgeschwindigkeit für Feststoffvolumenanteile oberhalb des Gelpunktes zusätzlich verringert. Die dafür verantwortliche Kraft resultiert aus der Durchströmung der Poren des Partikelnetzwerks und ist über das Darcy Gesetz beschreibbar. Somit

ergibt sich für eine differentielle Kräftebilanz unter Vernachlässigung der Trägheitskraft für Feststoffvolumenanteile oberhalb des Gelpunktes zu

$$-\rho_s \phi g + \rho_l \phi g - \frac{\eta}{K(\phi)} v_s = 0. \quad (2.50)$$

Ein Umstellen nach v_s und die Multiplikation der Gleichung mit ϕ führt zu einem weiteren Ausdruck für den Feststofffluss. Da in einem geschlossenen System die volumengemittelte Geschwindigkeit null beträgt, ist dieser Ausdruck gemäß Gleichung (2.49) analog zur Flussdichtefunktion und folgt:

$$\phi v_s = f_{bk} = -\frac{K(\phi) \Delta \rho g \phi^2}{\eta}. \quad (2.51)$$

Auf Basis dieser Erweiterung simulierten beispielsweise Bürger et al. [21] die Sedimentation und Konsolidierung geflockter Suspensionen und konnten eine gute Übereinstimmung mit publizierten experimentellen Daten erreichen.

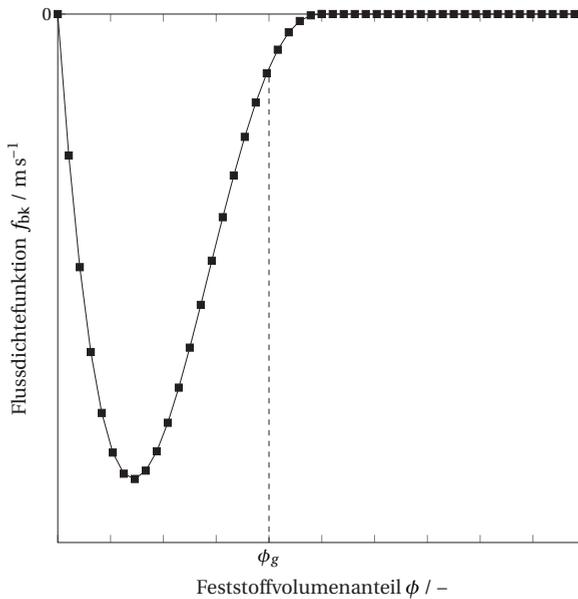


Abbildung 2.8: Schematischer Verlauf der Flussdichtefunktion in Abhängigkeit vom Feststoffvolumenanteil

Ein charakteristischer Verlauf der Flussdichtefunktion ist in Abb. 2.8 dargestellt. Typisch für die Flussdichtefunktion ist, dass für $f_{bk}(0) = f_{bk}(\phi_{\max}) = 0$ gilt. Zudem existiert ein Minimum im Bereich $\phi \in [0, \phi_g]$ und $f_{bk} < 0$ für $\phi \in (0, \phi_{\max})$. Je nach zugrunde liegendem Sedimentationsmodell gibt es außerdem Verläufe der Flussdichtefunktion mit ein oder zwei Wendepunkten [19]. Ist das Sedimentationsverhalten beispielsweise durch Richardson und Zaki [12]

beschreibbar, weist die Flussdichtefunktion einen Wendepunkt auf. Experimentell konnten Shannon et al. [22] eine Flussdichtefunktion mit zwei Wendepunkten bei der Sedimentation von Glaskugeln nachweisen. Die komplette Flussdichtefunktion ist somit darstellbar als:

$$f_{bk} = \begin{cases} -v_{St}\phi(1-\phi)^N & 0 \leq \phi < \phi_g \\ -\frac{K(\phi)\Delta\rho g\phi^2}{\eta} & \phi_g \leq \phi. \end{cases} \quad (2.52)$$

Bei Kenntnis der hier diskutierten Prozessfunktionen ist es möglich, das Sedimentations-, Kompressions- und Permeationsverhalten eines Partikelkollektives ausschließlich als Funktion des Feststoffvolumenanteils anzugeben. Dazu dienen verschiedene Sedimentationsmodelle, wobei das Modell von Richardson und Zaki [12] das verbreitetste ist. Auch für die Permeation und für den Feststoffgerüstdruck existieren in der Literatur Modelle, wie beispielsweise von Tiller und Kwon [13], die gemeinsam mit dem Sedimentationsmodell in der Flussdichtefunktion zusammengeführt werden können.

2.4 Kristallisation

Die Kristallisation ist laut Mersmann et al. [23] „das Überführen eines Stoffes oder mehrerer Stoffe aus dem amorph-festen, flüssigen oder gasförmigen Zustand in den kristallinen Zustand.“ Kristalle sind Festkörper mit einer geordneten dreidimensionalen periodischen Struktur. In der hohen Ordnung des Kristallgitters liegt auch der Unterschied zu amorphen Feststoffen, die ungeordnet vorliegen. Die Kristallisation dient in der Analytik zur Strukturaufklärung und Beurteilung der Reinheit eines Stoffes. In der thermischen Verfahrenstechnik findet die Kristallisation Anwendung zur Abtrennung, Erhöhung der Reinheit sowie zur Rückgewinnung nicht umgesetzter Wertstoffe [24]. Das anfallende Kristallisat kann sowohl End- als auch Zwischenprodukt für weitere Aufarbeitungsschritte sein [24, 25].

Die Kristallbausteine und die wirkenden Kräfte legen die Kristallart fest. Tabelle 2.1 listet die verschiedenen Kristallarten auf. Ein Idealgitter ist vollkommen regelmäßig aus Elementarzellen aufgebaut. Das Koordinatensystem ist durch die Elementarzelle mit den Achsen x , y und z sowie den zugehörigen Winkeln α , β und γ festgelegt. Die Gitterbausteine sitzen an den Ecken, teilweise aber auch an deren Flächen und in den Raumzentren.

Die Elementarlängen und die Beträge der Winkel der Koordinatenachsen unterscheiden sich bei Kristallen verschiedener Stoffe. Die sieben verschiedenen vorkommenden Kristallsysteme sind in Abb. 2.9 dargestellt. Das Koordinatensystem ist beispielhaft für die trikline Elementarzelle angedeutet.

Tabelle 2.1: Kristallarten und wirkende Gitterkräfte nach [23]

Kristallart	Baustein	Gitterkräfte
Metallgitter	Atomrumpf	metallische Bindung
Ionengitter	Ionen	Ionenbindung
Atomgitter	Atome	Atombindung
Molekülgitter	Moleküle	Van-der-Waals-Kräfte, feste Dipole

Bei einer triklinen Gitterstruktur sind alle Elementarlängen und Winkel beliebig. Ein monoklines Gitter weist zwei Winkel mit 90° auf. Ein rhombisches Gitter hat nur rechte Winkel. Für das tetragonale Kristallsystem gilt, dass zwei Elementarlängen gleich sind und alle Winkel 90° betragen. Analog dazu hat das hexagonale System zwei Winkel von 90° und einen Winkel von 120° . In trigonal-rhomboedrischen Systemen sind alle Elementarlängen gleich lang und es existieren zwei rechte Winkel. Das kubische Kristallsystem entspricht einem Würfel. Einige Stoffe sind in der Lage, verschiedene Kristallgitter aufzubauen. Dieses Phänomen bezeichnet man als Polymorphie, die einzelnen Gitter heißen Polymorphe [26].

Das Kristallgitter allein ist nicht entscheidend für die Form des ausgewachsenen Kristalls. Diese wird durch Wachstumsbedingungen, Begrenzungsflächen und Gitterfehler maßgeblich mitbeeinflusst [23]. Die äußere Kristallform, auch Morphologie genannt, setzt sich zusammen aus dem Kristallhabitus und der Kristalltracht. Die Tracht beschreibt die Anzahl und Kombination der Flächentypen der äußeren Begrenzungsflächen. Der Habitus bezeichnet das relative Größenverhältnis der Begrenzungsflächen zueinander. [26] Zur Beschreibung des Habitus dienen anschauliche Begriffe wie nadelförmig, dendritisch, tafelig oder isometrisch. Für die industrielle Kristallisation sind die Kristallgrößenverteilung und der Habitus wichtige Qualitätsparameter, die nachgelagerte Prozessschritte beeinflussen [23, 24]. Unerwünschter Habitus ist häufig durch geeignete Kristallisationsbedingungen wie Temperatur, Übersättigung, Lösemittel und Zusatzstoffe vermeidbar. Die Anwesenheit von Verunreinigungen begünstigt den Einbau von Fremdmolekülen in das Kristallgitter und das Entstehen von Gitterfehlern. Auch die Bildung von Hydraten, also das Einlagern von Flüssigkeit im Kristallgitter, ist ein häufig beobachtetes Phänomen.

Die treibende Kraft der Kristallisation ist die Übersättigung. Die Konzentration an gelöstem Stoff im Medium ist somit höher als das thermodynamische Gleichgewicht, was einen Phasenübergang bewirkt. Das Herstellen einer Übersättigung ist durch verschiedene Prozesswege erreichbar, die im Folgenden kurz skizziert sind. Das Phasengleichgewicht eines Systems ist temperaturabhängig. Die *Kühlungskristallisation* nutzt das Absinken der Löslichkeit bei Verringerung der Temperatur. Ist die Löslichkeitsgrenze unterschritten, führt dies

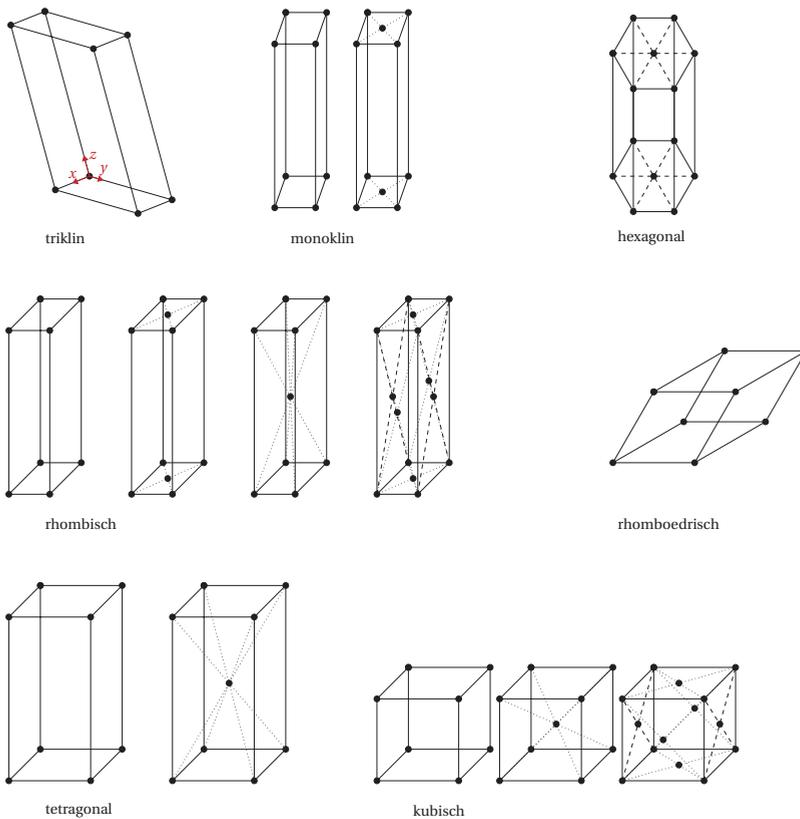


Abbildung 2.9: Die sieben verschiedenen Kristallsysteme für den Gitteraufbau; nach [23]

zur Übersättigung und zur anschließenden Kristallisation. Die *Verdampfungskristallisation* entzieht dem System durch Verdampfen Lösemittel, was ein Ansteigen der Konzentration des Zielproduktes bewirkt. Steigt diese Konzentration über die Löslichkeitsgrenze, ist das System übersättigt, und die Kristallisation setzt ein. Ein ähnliches Verfahren ist die *Vakuumverdampfungskristallisation*. Sie findet jedoch bei deutlich kleineren Temperaturen statt, da das Vakuum zu einer Verringerung der Siedetemperatur führt. Sie eignet sich daher auch für temperaturempfindliche Produkte. Findet keine Energiezufuhr statt, sinkt die Temperatur des Kristallisationsansatzes aufgrund der dem System entzogenen Verdampfungsenthalpie. In diesem Fall liegt eine Kombination aus *Kühlungs- und Verdampfungskristallisation* vor. Alternativ findet die Kristallisation unter Energiezufuhr bei konstanter Temperatur statt. Ein Vorteil dieser Verfahrensweise ist die einfache Steuerung der Verdampfungsrate über die Energiezufuhr. Als *Verdrängungskristallisation* wird die Reduktion der Löslichkeit durch die Zugabe von weiteren Substanzen bezeichnet. Substanzen, die zu einer Verringerung der

Löslichkeit des Zielstoffes führen, tragen auch die Bezeichnung Antisolvent. Häufig genutzte Antisolvente sind Salze oder organische Lösemittel.

Der Verlauf der Löslichkeit in Abhängigkeit des Antisolvents und die verschiedenen Keimbildungszonen sind schematisch in Abb. 2.10 dargestellt. Die durchgezogene Linie stellt das Löslichkeitsgleichgewicht dar. Ähnlich dazu ist bei der *Reaktionskristallisation* das Produkt einer Reaktion im Reaktionsmedium schlecht löslich und erreicht daher rasch die Löslichkeitsgrenze und damit die Übersättigung. [23]

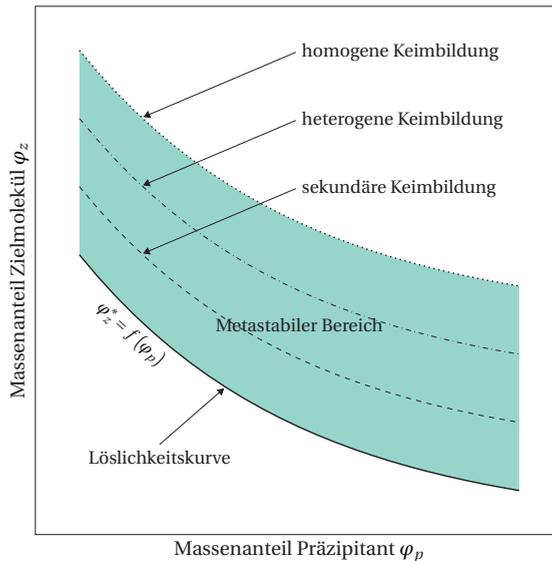


Abbildung 2.10: Schematische Darstellung der verschiedenen Keimbildungsmechanismen am Beispiel der Verdrängungskristallisation; nach [23, 25]

Die Übersättigung allein führt noch nicht direkt zur Entstehung von Kristallen, da es sich um ein instabiles Gleichgewicht handelt. Zunächst kommt es zur Bildung von Clustern. Erst wenn ein kritischer Keimradius erreicht ist, setzt Kristallwachstum bis zum Abbau der Übersättigung ein. Der kritische Keimdurchmesser x^* ist über die für einen Reinstoff und einen kugelförmigen Keim vereinfachte Kelvingleichung

$$x^* = 4 \frac{\gamma \tilde{V}}{\tilde{R} T \ln S} \quad (2.53)$$

mit der Grenzflächenspannung γ , dem molaren Volumen \tilde{V} und der Sättigung S , berechenbar. Cluster unterhalb dieses Keimdurchmessers lösen sich wieder auf, da dies thermodynamisch begünstigt ist. Oberhalb des kritischen Keimdurchmessers ist ein weiteres Anwachsen des

Keims begünstigt. Der kritische Keimdurchmesser verringert sich bei zunehmender Übersättigung. Dadurch erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass Keime durch statistische Vorgänge wie Molekülstöße entstehen. Eine Populationsbilanz der Clusterbildung führt zur klassischen Keimbildungstheorie und ihrer zentralen Formel

$$J = B \exp\left(-\frac{\Delta G^*}{k_B T}\right), \quad (2.54)$$

in der J die Keimbildungsrate und k_B die Boltzmannkonstante darstellt. Der Faktor B entspricht einer Stoßfrequenz, für die in der Literatur verschiedene Ansätze publiziert sind. Der Term ΔG^* ist die zu überwindende Keimbildungsenthalpie. Sie ist analog zu einer Aktivierungsenergie zu interpretieren, und lautet

$$\Delta G^* = \frac{1}{3} \pi \gamma x^{*2}. \quad (2.55)$$

Der Exponentialterm aus Gleichung (2.54) ist deutbar als die Wahrscheinlichkeit zur Bildung eines Keims. Das Einsetzen von Gleichungen (2.53) und (2.55) in Gleichung (2.54) zeigt die hohe Abhängigkeit der Keimbildung von der Temperatur. Während die Sättigung sich quadratisch auf den Exponenten auswirkt, ist die Abhängigkeit von der Temperatur kubisch. Bei Erhöhung der Temperatur nimmt daher die Keimbildungsrate zu. Eine hohe Übersättigung führt zu einer höheren Keimbildungsrate und somit zum Entstehen vieler kleinerer Kristalle.

Die Entstehung neuer Keime ist in drei Mechanismen unterteilbar, die am Beispiel der Verdrängungskristallisation schematisch in Abb. 2.10 dargestellt sind. Bei der homogenen Keimbildung entstehen Keime durch die Übersättigung ohne Wechselwirkung mit Fremdstoffen. Für diesen Mechanismus ist eine hohe Übersättigung notwendig. Die heterogene Keimbildung bezeichnet die Entstehung von Keimen durch Interaktion mit Fremdstoffen. Dies sind unter anderem Verunreinigungen oder auch gezielt zugesetzte Partikel. Die Fremdpartikel senken die Potentialbarriere ΔG^* zur Entstehung stabiler Keime. Die dritte Variante ist die häufig in industriellen Prozessen genutzte sekundäre Keimbildung. Hier erfolgt die Bereitstellung der Kristallisationskeime durch Zugabe von arteigenen Kristallen oder durch Zerkleinerung bereits entstandener Kristalle an Rührwerken oder der Behälterwand. [23, 27] Die Zugabe von Impfkristallen zur sekundären Keimbildung dient dazu, die entstehenden Kristallgrößen und die Breite der Größenverteilung zu beeinflussen und reproduzierbar zu gestalten.

2.5 Proteine

Proteine, umgangssprachlich auch Eiweiße genannt, sind aus Aminosäuren aufgebaute Makromoleküle. Sie kommen in jeder Zelle vor und sind dort für bis zur Hälfte des Trockengewichts verantwortlich und für eine Vielzahl wichtiger biologischer Funktionen wie die Strukturgebung, Katalyse, Stofftransport, Immunreaktion, Bewegung oder Teil von Regulationsvorgängen essenziell. [28–30] Strukturproteine wie Kollagene bestimmen den Aufbau einer Zelle oder eines Gewebes. Transportproteine regulieren den Stoffhaushalt einer Zelle oder sind wie beispielsweise Hämoglobin für die Verteilung von Sauerstoff verantwortlich. Zur Gruppe der Proteine, die an Immunreaktionen beteiligt sind, gehören die Antikörper. Sie beteiligen sich direkt an der Abwehr von Erregern. Technisch besonders relevant sind Proteine, die für die Katalyse von Reaktionen verantwortlich sind. Diese Proteine heißen Enzyme und sind ein wichtiger Bestandteil des Metabolismus. [31]

Proteine sind linear aus Aminosäuren, die über eine Peptidverbindung verknüpft sind, aufgebaut und haben Peptidkettenlängen ab etwa 100 Aminosäuren. Die Peptidbindung besteht aus einer Verknüpfung der Aminogruppe und der Carboxylgruppe von Aminosäuren. In Abb. 2.11 ist die Peptidbindung zweier Aminosäuren dargestellt und farblich hervorgehoben.

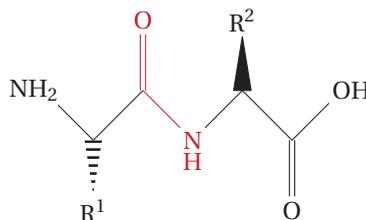


Abbildung 2.11: Peptid aus zwei Aminosäuren mit hervorgehobener Peptidbindung

Die Sequenz der Aminosäuren eines Proteins ist im Erbgut kodiert und heißt Primärstruktur. Es kommen je nach Definition 20–22 verschiedene Aminosäuren für den Aufbau der Proteine zum Einsatz [31]. Die verschiedenen Aminosäuren unterscheiden sich in den Restgruppen (vgl. R^1 und R^2 in Abb. 2.11). Aufgrund von Wasserstoffbrückenbildung von benachbarten Molekülen innerhalb der Peptidkette entstehen verschiedene, sich wiederholende Motive, die als Sekundärstruktur bezeichnet werden. Die bekanntesten Elemente der Sekundärstruktur sind die α -Helix [32] und das β -Faltblatt [33]. Die Tertiärstruktur ist die räumliche Anordnung der Sekundärstruktur und beruht auf Wasserstoffbrücken, van-der-Waals-Kräften, ionischen Bindungen und Disulfidbrücken. Sie ist für die biologische Funktion eines Proteins maßgeblich verantwortlich. Bei der Synthese eines Proteins in der Zelle unterstützen Chaperone (ebenfalls Proteine) die Faltung und damit die Ausbildung der korrekten Tertiärstruktur. Die

irreversible Zerstörung der Tertiärstruktur aufgrund des Einflusses von pH-Wert Änderungen, Salzen, hohen oder niedrigen Temperaturen und von Schwermetallen heißt Denaturierung. Die Funktion des Proteins geht mit der Denaturierung verloren. Neben der Tertiärstruktur existiert übergeordnet noch die Quartärstruktur. Damit wird die Zusammenlagerung mehrerer Peptide zu einer funktionellen Einheit bezeichnet. Abbildung 2.12 zeigt beispielhaft die Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins Lysozym aus Hühnereiweiß, das aus 129 Aminosäuren aufgebaut ist. [31]

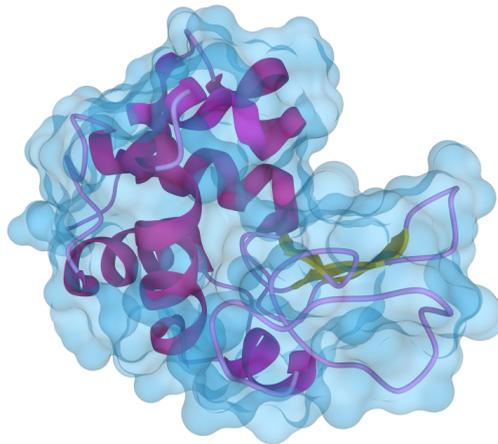


Abbildung 2.12: Dreidimensionale Struktur von Lysozym aus Hühnereiweiß; erstellt mit [34] aus Strukturdaten von Weiss et al. [35]

Lysozyme gehören zur Gruppe der Enzyme und kommen in den Sekreten (Speichel, Tränenflüssigkeit, Blutserum, ...) vieler Tiere und im Menschen vor. Sie finden sich aber auch in Pflanzen, Pilzen, Bakterien und Viren. Lysozym katalysiert als Bestandteil des Immunsystems selektiv die Hydrolyse einer Zuckerverbindung, die in Murein, einer Komponente von bakteriellen Zellwänden, vorkommt. Es wirkt somit antibakteriell. Technische Anwendungen dieser Reaktion finden sich in der Lebensmitteltechnik (Zusatzstoff E 1105) zum Haltbarmachen von Käse und nicht pasteurisiertem beziehungsweise sterilisiertem Bier [36].

Enzyme katalysieren Reaktionen äußerst selektiv. Das bedeutet, dass sie auf sehr wenige Substratmoleküle beschränkt sind, die wiederum, je nach Reaktionsbedingungen sehr spezifisch zu wenigen Produktmolekülen reagieren. Von besonderer technischer Bedeutung ist hierbei die Fähigkeit, die Katalyse von Enantiomeren durchzuführen. Enantiomermoleküle sind spiegelbildliche Moleküle, die eine identische Molekülmasse, jedoch unterschiedliche

räumliche Orientierungen von Seitengruppen um ein Zentralatom haben. Während anorganische (Metall) Katalysatoren keine Unterscheidung der Enantiomere erreichen, katalysieren Enzyme jeweils die Produktion (oder die Reaktion) eines Enantiomers mit hohem Überschuss. Da Enantiomere aufgrund des identischen Molekulargewichts nur sehr schwierig zu separieren sind, aber sich ihre Funktion unterscheidet, liefert der Einsatz von Enzymen in technischen Setups einen großen Mehrwert. Großtechnische Anwendung finden Enzyme in der Waschmittel- und Lebensmitteltechnik, wo durch den Abbau von Kohlenhydraten und Fetten eine Einsparung von Tensiden oder die Verbesserung der Prozessierbarkeit von Convenience-Produkten durch die Modifikation von Stärke erreichbar ist. In der Pharmazie finden Antikörper in der Krebstherapie und Diagnostik Anwendung.

Die Herstellung solcher Proteine erfolgt mit Bakterien oder tierischen Zellen. Komplexere Proteine, wie Antikörper, benötigen zusätzlich noch Zuckerketten an den Aminosäureresten und sind daher nur in tierischen Zellen herstellbar. Das Protein liegt entweder intrazellulär oder extrazellulär vor und muss anschließend aufgearbeitet werden. Intrazelluläre Proteine setzen einen Zellaufschluss voraus, der neben dem Zielprotein auch weitere Zellproteine freisetzt. [31] Dadurch ist das anschließende Downstream Processing aufwändiger.

Die Aufarbeitung von Proteinen findet in mehreren Schritten statt. Das Abtrennen von Zellen und Zellresten erfolgt üblicherweise durch Zentrifugation. Zur selektiven Abtrennung des Proteins aus der verbleibenden Lösung sind mehrere Verfahrensschritte erforderlich, die ganz bestimmte physikochemische Eigenschaften des Proteins nutzen. Verbreitete Verfahren sind die Affinitätschromatographie, die Ionenaustauschchromatographie, die Hydrophobe Interaktionschromatographie und die Größenausschlusschromatographie. Für eine hohe Reinheit sind mehrere dieser Verfahren orthogonal zu kombinieren. Auch die Ultra- und Diafiltration sind ein wesentlicher Bestandteil der Proteinaufarbeitung, da hierdurch eine Größenfraktionierung durchführbar ist. [31]

Um den Einsatz von kosten- und ressourcenintensiven Chromatographieschritten zu verringern, ist die selektive Kristallisation des Proteins aus der Lösung als Alternative von zunehmender Bedeutung [37]. Auch in Bezug auf das Freisetzungsverhalten ist die Proteinkristallisation besonders im therapeutischen Bereich relevant, sodass Potential im Bereich der Formulierung besteht [38]. Für das Oligopeptid Insulin, das in der Behandlung von Diabetes Einsatz findet, ist das Verfahren der Kristallisation für eine langsamere Freisetzung im Körper schon seit 1936 bekannt und findet seitdem in vielen Medikamenten Anwendung [39–41].

2.6 Zerkleinerung und Scherbeanspruchung

Bei Überschreiten der Materialfestigkeit tritt Partikelbruch auf [7]. Der Bruch ist – neben einer einmaligen hohen mechanischen Belastung – auch aufgrund von mehreren geringeren Belastungszyklen denkbar. In diesem Fall ist die Belastungsvorgeschichte des Partikels zu berücksichtigen. Für Zerkleinerungsvorgänge wie beispielsweise Mahlen ist das Auftreten von Partikel- oder Aggregatbruch die Grundvoraussetzung. Bei den meisten Anwendungen der FFT ist Partikelbruch nicht erwünscht und führt in der Regel zu einer Verschlechterung des Prozessergebnisses [42]. Grundsätzlich ist zwischen den in Abb. 2.13 dargestellten Beanspruchungsarten sowie der Belastung in einem Haufwerk und am Einzelkorn zu unterscheiden. Im Folgenden liegt der besondere Fokus auf der Druck- und der Scherbeanspruchung.

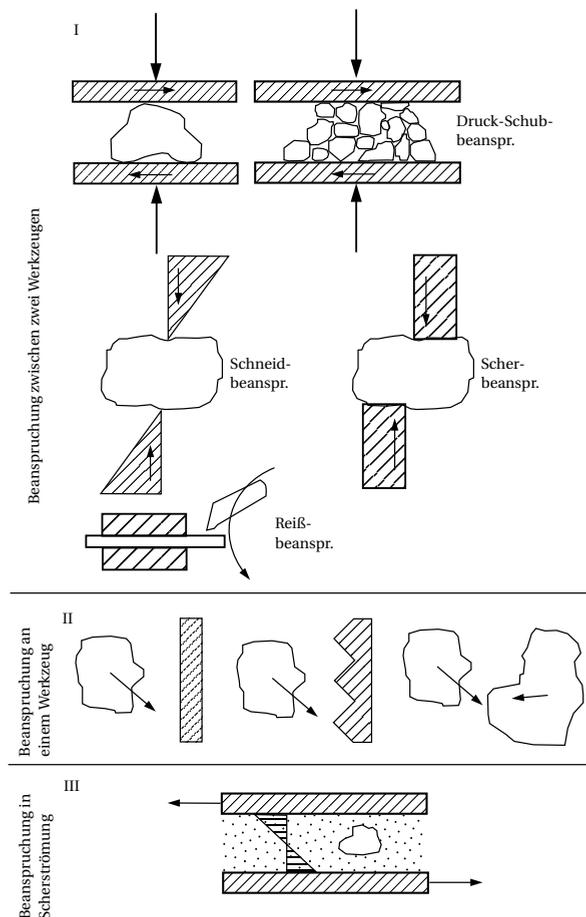


Abbildung 2.13: Verschiedene auftretende Beanspruchungsarten; aus Schönert [43]

2.6.1 Druckbeanspruchung

In einem Haufwerk unter Druckbeanspruchung ist die aufgeprägte mechanische Belastung durch Umordnungsvorgänge, Deformation und Bruch der Partikel abbaubar. Für eine ein-dimensionale axiale Belastung, wie beispielsweise durch einen Pressstempel, führen die erwähnten Effekte dazu, dass die höchste Belastung in der näheren Umgebung des Stempels anliegt und mit zunehmender Entfernung vom Pressstempel im Haufwerk abnimmt. Ist das Haufwerk kompressibel, ist die größte Verdichtung in Umgebung des Pressstempels zu erwarten. [44] In den oberen Partikelschichten findet die Absorption der eingetragenen mechanischen Energie durch elastische sowie plastische Deformation und Partikelbruch statt. Infolgedessen nimmt die über Kontaktpunkte weitergeleitete mechanische Energie ab. Bei dem größten Abstand von der Stempelmitte und an der Unterseite liegen somit die geringsten Spannungen an. [42, 45]

2.6.2 Scherbeanspruchung

Scherbeanspruchungen treten in der Verfahrenstechnik beispielsweise durch Interaktion von Partikeln mit Rührwerken, Ventilen und in Pumpen auf. In einer Suspension tritt aufgrund der vorhandenen Strömung fluidinduzierter mechanischer Stress auf. Zusätzlich zum fluidinduzierten Stress finden noch Kollisionen zwischen Partikeln sowie von Partikeln mit Rührorganen oder Wänden statt. Diese Kollisionen führen zu Partikelabrieb und bei hohen Belastungen auch zu Partikelbruch. Bei der Kristallisation ist ein solcher Abrieb teilweise erwünscht, da so neue Kristallisationskeime für die sekundäre Keimbildung entstehen.

Scherbelastungen sind zudem auch in Haufwerken möglich. Das trifft sowohl auf den Transport von fließfähigen Sedimenten in Apparaten wie der Röhrenzentrifuge und dem Dekanter zu als auch auf das gezielte Einsetzen von kombinierter Normal- und Scherbelastung zur mechanischen Entfeuchtung. Bei der Überlagerung von Normal- und Scherkräften sind deutlich höhere Verdichtungen und damit geringere Restfeuchten erzielbar. [46, 47] In solchen Szenarien reiben die Partikel aneinander, und es entsteht Abrieb oder Bruch.

2.6.3 Zerkleinerung

Die Partikelgrößenverteilung (PGV), die Partikelform und die Haufwerksstruktur haben einen großen Einfluss auf die Energieabsorption und Spannungsverteilung im Haufwerk. Des Weiteren wirken sich die Normal- und Scherspannung sowie die Schergeschwindigkeit auf die Beanspruchung aus. Bei zunehmender Beanspruchung tritt neben der Verdichtung auch Zerkleinerung auf. Die Zerkleinerung führt zu neuen Bruchflächen und Umlagerungsvorgängen.

Je kleiner die Partikel sind, desto höhere Energien sind notwendig, um eine Zerkleinerung zu bewirken. Der Verlauf der Partikelfestigkeit in Abhängigkeit des Durchmessers ist für fünf verschiedene Beispielsysteme in Abb. 2.14 aufgetragen. Die Zunahme der Festigkeit bei abnehmender Partikelgröße ist hierbei deutlich zu erkennen.

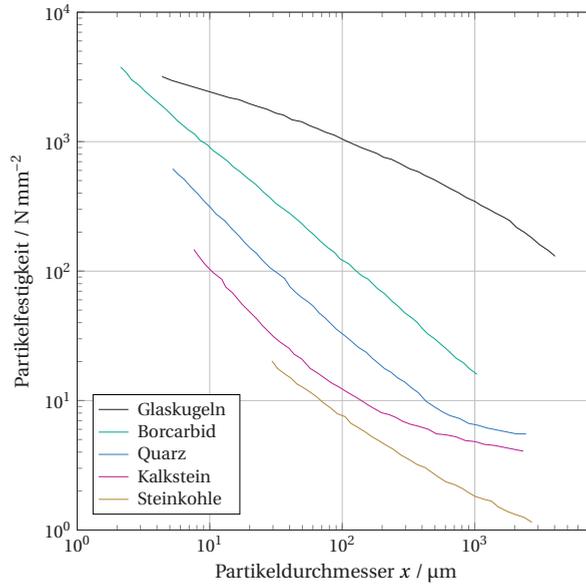


Abbildung 2.14: Partikelfestigkeit als Funktion der Partikelgröße; aus [43]

Mit Populationsbilanzen ist die Zerkleinerung modellierbar. Die Bruchwahrscheinlichkeit P bei der Prallbeanspruchung ist für viele Materialien durch die e-Funktion

$$P = 1 - \exp(-f x k (E_M - E_{M,\min})) \quad (2.56)$$

mit f als Materialparameter, k als Anzahl der Beanspruchungen und E_M als massenbezogene Beanspruchungsenergie mit $E_{M,\min}$ als Schwellwert der massenbezogenen Beanspruchungsenergie gegeben [43]. Der Bruchanteil \bar{P} ist für ein Einzelkorn mit der Bruchwahrscheinlichkeit identisch. In einem Kollektiv ist der Bruchanteil durch Normierung über eine Masterkurve

$$\frac{\bar{P}}{\bar{P}_\infty} = 1 - \exp\left(-\left(\frac{E_M}{E_{M,c}}\right)^\beta\right) \quad (2.57)$$

beschreibbar. Die Größe \bar{P}_∞ ist der obere Grenzwert von \bar{P} und β ist ein Kurvenparameter. $E_{M,c}$ ist ein charakteristischer Wert von E_M , für den verschiedene Ansätze, mit Berücksichtigung der Partikelgröße, existieren. [48]

An einem Einzelkorn ist über Press- oder Indentationsversuche eine Bruchkraft bestimmbar. Für kleine Partikel, die wie bei Proteinkristallen feucht zu untersuchen sind, ist die Nanoindentation ein geeignetes Verfahren. Je nach Partikelform sind unterschiedliche Belastungen denkbar. Für ein längliches Partikel ist beispielsweise ein Dreipunkt-Biegeversuch möglich. Um in einem Haufwerk Partikelbruch zu bewirken, ist eine höhere Kraft als die Bruchkraft des Einzelpartikels notwendig. Das liegt an der Absorption der mechanischen Spannung durch Umlagerungs- und Deformationsvorgänge. Der Partikelbruch unterteilt sich in folgende Phasen:

1. Rissbildung
2. Risseinleitung
3. Rissausbreitung

Die Rissbildung setzt ein, sobald die Materialfestigkeit überwunden ist. Risse entstehen deshalb bevorzugt an Orten, die bereits unter Spannung stehen oder an denen Fehlstellen vorliegen. Fehlstellen können beispielsweise Gitterfehler in einem Kristall sein. Bei geringer Energie entsteht so ein ruhender Riss. Findet keine weitere Belastung statt, breitet sich der Anriss nicht aus und es entsteht kein Bruch. Erst bei einer ausreichend hohen Energie kommt es zur Risseinleitung und der anschließenden Rissausbreitung. Die zur Rissausbreitung benötigte Energie an der Bruchfront muss kontinuierlich nachgeführt werden.

Für den Partikelbruch gelten somit zwei Bedingungen. Das ist zum einen die Kraftbedingung, das heißt die Überwindung der Bindungskräfte für die Bildung eines Anrisses und zum anderen die Energiebedingung. Diese besagt, dass an der Rissfront verbrauchte Energie kontinuierlich weiter zuzuführen ist. [49]

3 Material & Methoden

3.1 Bildgebung

3.1.1 Mikroskopie

Das Lichtmikroskop erlaubt es, kleine Strukturen vergrößert darzustellen. Mit einem klassischen Lichtmikroskop sind Auflösungen bis zu 500 nm realisierbar. Der Aufbau für die Durchlichtmikroskopie ist in Abb. 3.1 dargestellt.

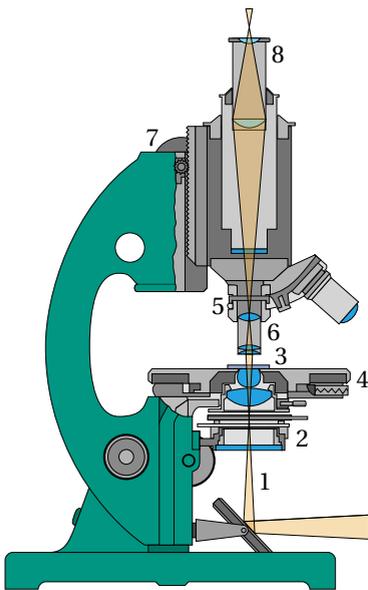


Abbildung 3.1: Aufbau eines Lichtmikroskops; Adaptiert (Farben) von Tomia [50]

Von unten tritt das Licht einer Lampe (1) in das Mikroskop ein und durchstrahlt einen Kondensator (2), der ein gleichmäßiges Ausleuchten der Probe gewährleistet, und die Probe. Die auf einem Objektträger (3) vorbereitete Probe wird auf den Probentisch (4) platziert und mit Licht durchstrahlt. Der Probentisch ist in x und y Richtung verstellbar, um mehrere Ausschnitte der Probe betrachten zu können. Oberhalb des Probentischs ist der Objektivrevolver (5) lokalisiert. Eine im Objektiv (6) angebrachte Linsengruppe führt zu einem optisch vergrößerten Zwischenbild. Zum Fokussieren der gewünschten Struktur in der Probe ist entweder der Probentisch oder der optische Aufbau oberhalb der Probe in der Höhe verstellbar (7). Das Okular (8) vergrößert das vom Objektiv erzeugte Zwischenbild ein weiteres Mal und erlaubt nach dem manuellen Fokussieren das Betrachten des vergrößerten Bildes mit dem Auge oder einer Kamera.

Mithilfe der Lichtmikroskopie im Hellfeld sind die Kristallform und die Kristallgrößen bestimmbar. Zur Ermittlung der Kristallgrößen ist es erforderlich, dass die Kristalle in der Aufnahme einzeln vorliegen. Um

das zu gewährleisten, ist es notwendig, die Lösung vor der Aufnahme mit Überstand zu verdünnen. Die entstandenen Kristallformen sind direkt aus den Bildaufnahmen zu ersehen. Mit dem Mikroskop (Orthoplan, Leitz) und einer integrierten Kamera erfolgt die Aufnahme von Mikroskopbildern mit einer $100\times$ Gesamtvergrößerung.

Zur Ermittlung der Kristallgrößen anhand der Aufnahmen dient die Software Fiji [51, 52]. Der erste Schritt ist das Konvertieren von farbigen RGB Bildern in 8 bit Graustufenbilder. Anschließend dient die Funktion *Enhance Contrast* dazu, den Kontrast in den Bildaufnahmen zu verstärken. Schließlich wird das Bild über das Standardschwellwertverfahren in ein Binärbild umgewandelt. Mit dem Plugin *Analyze Particles* sind sowohl die Projektionsflächen (A_p) als auch die maximalen Feretdurchmesser der einzelnen Kristalle bestimmbar. Um ein systematisches Unterschätzen der Partikelgrößen auszuschließen, sind Kristalle, die den Bildrand berühren, von der Auswertung ausgeschlossen. Die Berücksichtigung von mindestens 8000 Kristallen gewährleistet erfahrungsgemäß die statistische Absicherung der Ergebnisse.

Zur Berechnung der PGV (Q_2) wird bei isometrischen Kristallen der Äquivalentdurchmesser einer Kugel (x_{eq}) mit gleicher Projektionsfläche herangezogen. Im Falle von stäbchenförmigen Kristallen ist der Äquivalentdurchmesser kein geeignetes Maß. Deshalb findet die Auswertung anhand des maximalen Feretdurchmessers ($x_{F,max}$) statt. Um dennoch eine Q_2 Verteilung zu erhalten, erfolgt die Berechnung der PGV mit den Projektionsflächen, die den einzelnen maximalen Feretdurchmessern zugeordnet sind. Final ergibt sich die Q_2 Verteilung für n diskrete Klassen von Partikelgrößen x_i zu

$$Q_2(x_i) = \frac{\sum_{j=0}^i a_j}{\sum_{j=0}^n a_j} \quad (3.58)$$

mit der kumulierten Fläche a_j

$$a_j = \begin{cases} \sum A_p \text{ für } \frac{1}{4}\pi x_{j-1}^2 \leq A_p < \frac{1}{4}\pi x_j^2 & \text{für isometrische Kristalle,} \\ \sum A_p \text{ für } x_{j-1} \leq x_{\max} \rightarrow A_p < x_j & \text{für stäbchenförmige Kristalle.} \end{cases} \quad (3.59)$$

Um die PGV zu bewerten und verschiedene Proben zu vergleichen, kommen häufig der Mediandurchmesser und der Span zum Einsatz. Der Mediandurchmesser x_{50} ist der Durchmesser, bei dem die Summenverteilung den Wert 0,5 hat. Er stellt den Medianwert der Verteilung dar. Der Span ist definiert als

$$\text{Span} = \frac{x_{90} - x_{10}}{x_{50}} \quad (3.60)$$

und ist somit ein dimensionsloses Maß für die Verteilungsbreite.

3.1.2 Mikrocomputertomographie

Die Microcomputertomographie (μ CT) ermöglicht die dreidimensionale und zerstörungsfreie Strukturaufklärung einer Probe. Die Messgröße ist dabei die Transmission von Röntgenstrahlung durch ein Probenmaterial. Hierbei finden bei den in der Tomographie typischerweise verwendeten Energien zwei überlagerte Streueffekte statt. Bei niedrigen Energien E der Röntgenquanten ist der von Einstein [53] beschriebene Photoelektrische Effekt dominant. Dieser Effekt ist bei Materialien mit hoher Ordnungszahl Z stärker ausgeprägt und proportional zu

$$\text{Photoelektrischer Effekt} \propto \frac{Z^{3,8}}{E^3}. \quad (3.61)$$

Bei zunehmender Energie und bei Materialien mit geringer Elektronendichte, wie beispielsweise biologische Substrate, überwiegt die Compton Streuung [54]. Bei diesem Streueffekt wechselwirkt das Photon mit einem Elektron, wobei ein Teil der Energie des Photons übertragen wird. Beide Effekte bewirken beim Durchgang der Röntgenstrahlung durch die Probe eine Signalabschwächung, wobei die Compton Streuung im Vergleich zum Photoelektrischen Effekt zu einer deutlich geringeren Absorption führt.

Die schematische Funktionsweise eines μ CT ist Abb. 3.2 zu entnehmen. Der Detektor ist auf derselben Achse wie die Röntgenquelle angebracht und nimmt zweidimensionale Röntgentransmissionsbilder, sogenannte Projektionen, auf. Dabei rotiert die Probe, sodass pro 360° Drehung Projektionen aus verschiedenen Drehwinkeln resultieren. Das Messsignal besteht jeweils aus den Integralen der Signalabschwächung entlang mehrerer Geraden und entspricht somit der Radontransformierten. Die dreidimensionale Rekonstruktion erfolgt entsprechend mit der inversen Radontransformation. Nach der Rekonstruktion liegen über die Höhe gestapelte 16 bit Graustufenschnittbilder der Probe vor.

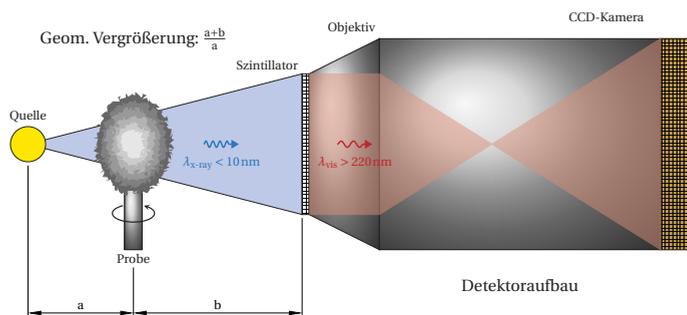


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips und Aufbaus eines Röntgenmikroskops

Eine Vergrößerung ist dabei geometrisch über den Strahlensatz möglich. Sie ergibt sich aus dem Abstand von Röntgenquelle zu Probe a und Probe zu Detektor b über die Beziehung

$$G = \frac{a+b}{a}. \quad (3.62)$$

Moderne μ CTs verfügen in der Detektionseinheit zusätzlich über einen Szintillator, der die Röntgenstrahlung in sichtbares Licht übersetzt. Dadurch ist der Einsatz von Mikroskopobjektiven für eine weitere optische Vergrößerung möglich. Solche Geräte tragen häufig die Bezeichnung Röntgenmikroskop.

Das in dieser Arbeit eingesetzte Röntgenmikroskop (Xradia 520 Versa[®], Zeiss) ist mit vier Objektiven (0,4; 4; 20 und 40 \times) ausgestattet und erreicht eine theoretische maximale Auflösung von 700 nm und eine minimale Voxelgröße von 70 nm. Die Röntgenquelle nutzt ein Wolframtarget und strahlt ein Spektrum von Licht im Röntgenbereich in Kegelstrahlgeometrie ab. Die Leistung der Quelle ist im Bereich von 2–10 W mit zugehörigen Röhrenspannungen von 30–160 kV einstellbar. Um den Effekt des *Beam hardenings* zu verringern, sind zudem über ein Filtrerrad zwölf Filter an der Quelle einstellbar, die das abgestrahlte Spektrum beschneiden. *Beam hardening* bezeichnet das Phänomen, dass die Röntgenstrahlung hinter der Probe eine höhere Energie als vor der Probe aufweist. Dieses Phänomen beruht darauf, dass Röntgenquanten geringerer Energie mit einer größeren Wahrscheinlichkeit streuen. In der Rekonstruktion wirkt sich dieser Effekt durch einen ungleichmäßigen, zum Rand der Probe hin heller werdenden Grauwertverlauf aus.

Die linke Seite von Abb. 3.3 zeigt ein Foto des kompletten μ CT Aufbaus mit der Röntgenquelle, dem Filtrerrad und dem Detektor mit den einzelnen Objektiven. In der Mitte befindet sich der XYZ-Drehtisch, der zur korrekten Positionierung und Drehung der Probe bei der Aufnahme

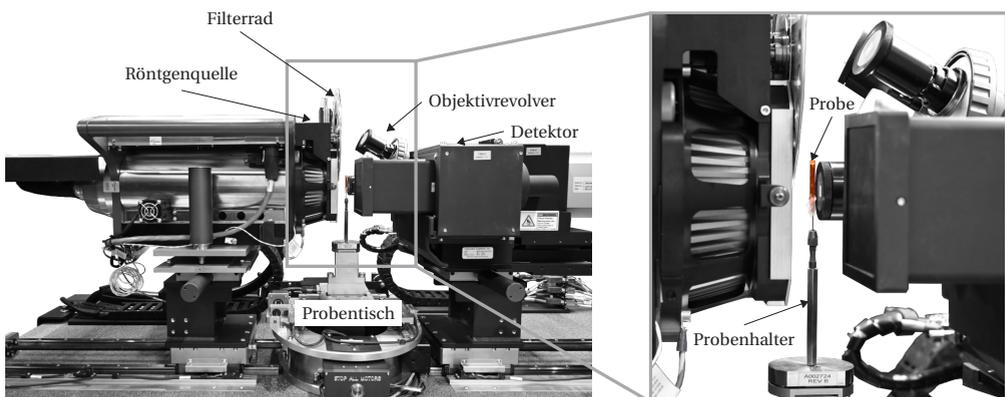


Abbildung 3.3: Fotografie des CT Aufbaus mit Vergrößerung (rechts) des Probenhalters

der einzelnen Projektionen dient. Auf der rechten Seite ist der Probenhalter und eine Probe vergrößert dargestellt. Wie aus der Abbildung bereits zu ersehen, besitzt die Probe einen geringen Durchmesser. Die angestrebten kleinen Voxelgrößen von ungefähr 800 nm erfordern Proben von weniger als 5 mm Durchmesser, um ein ausreichendes Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) und akzeptable Messzeiten zu realisieren. Das SNR ist in diesem Kontext der Quotient aus Signalamplitude und Standardabweichung des Rauschens.

Die Probenpräparation erfolgt in mehreren Schritten. Der erste Schritt besteht im Ausstechen der Probe aus einem Filterkuchen mit einem Polyimidröhrchen (Kapton[®], Goodfellows GmbH) mit 3,48 mm Innendurchmesser. Polyimid ist ein Kunststoff, der für Röntgenstrahlung annähernd transparent ist und somit das Messergebnis nur marginal beeinflusst. Es ist darauf zu achten, dass sich die Probe gleichmäßig und eben im Probenröhrchen befindet. Da das ausgestochene Haufwerk in der Regel noch Porenflüssigkeit aufweist, welche den Kontrast durch die geringe Elektronendichtedifferenz zur Probe verschlechtert, bedarf es einer Lyophilisation. Ursächlich dafür ist, dass in der Porenflüssigkeit dasselbe Protein wie im Kristall vorliegt. Durch das sehr schnelle Einfrieren der Probe mit flüssigem Stickstoff ist das weitere Auskristallisieren von Bestandteilen der Porenflüssigkeit wirksam unterbunden. Nach der dreitägigen Trocknung erfolgt das Versiegeln des Röhrchens mit einem Zweikomponentenepoxidharz (UHU Plus Schnellfest[®], UHU GmbH & Co. KG) und das Aufkleben auf eine Stecknadel oder ein Aluminiumröhrchen. Die Nadel beziehungsweise das Aluminiumröhrchen dient dazu, einen ausreichenden Abstand zwischen Probenhalter und Probe herzustellen. Die fertig präparierte und in den Halter eingespannte Probe ist in Abb. 3.4 dargestellt.



Abbildung 3.4: Präparierte Probe eines Lysozymfilterkuchens für das μ CT

Die Messung der Probe im μ CT erfolgt mit einer Voxelgröße von etwa $0,75\ \mu\text{m}$ mit dem $4\times$ oder $20\times$ Objektiv. Die Anzahl aufgenommener Projektionen beträgt mindestens 2001, was in Verbindung mit einer Belichtungszeit von ungefähr 5–8 Sekunden zu einer Messzeit von 3–5 Stunden führt. Da es sich bei Proteinkristallen um ein biologisches Material mit entsprechend geringer Absorption für Röntgenstrahlung handelt, ist die Einstellung der Energie auf 4 W bei einer Beschleunigungsspannung von 50 kV ein Kompromiss aus ausreichend gutem SNR und akzeptabler Messzeit.

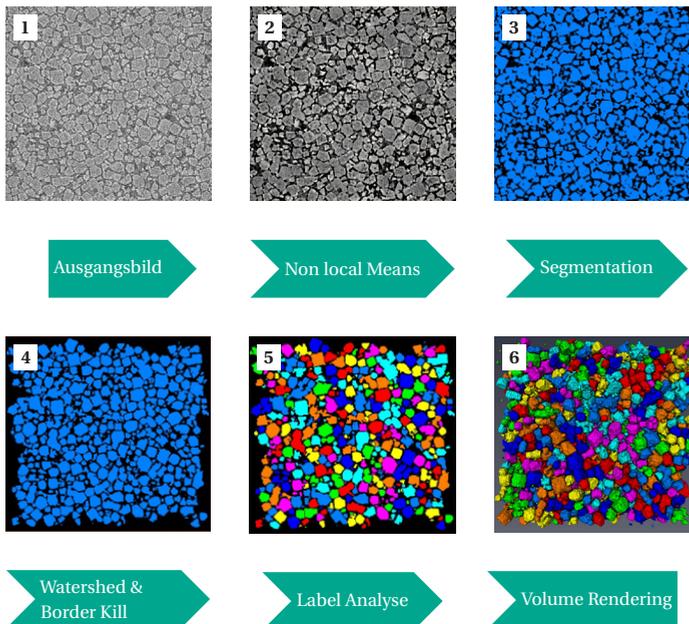


Abbildung 3.5: Darstellung der einzelnen Postprocessing Schritte; 1: Originalbild, 2: das Bild nach Anwendung des non local means Filters, 3: das segmentierte Bild, 4: das Bild mit getrennten Kristallen und nach Entfernen von angeschnittenen Kristallen, 5: Auswertung der einzelnen Kristalle, 6: 3D Rendering

Nach der Rekonstruktion der gemessenen Projektionen liegen horizontal gestapelte 16 bit Schnittbilder der Probe vor, die einer aufwendigen Nachbearbeitung für die Quantifizierung zu unterziehen sind. Abbildung 3.5 zeigt die notwendigen Schritte anschaulich an einem Beispielbild. In dem ersten Schritt ist es erforderlich, den Kontrast der Bilder zu verbessern. Dazu dient die Funktion *Enhance contrast* der Software Fiji [51, 52]. Die meisten Bildbearbeitungsprogramme setzen zur korrekten Quantifizierung und Bearbeitung rechteckige Bilder voraus. Daher ist es notwendig, aus dem zylinderförmigen Bild des μ CTs einen Quader auszuschneiden. Aufgrund des geringen SNR ist der Einsatz eines Bildfilters nötig, um die anschließende Segmentation, d. h. die Trennung des Vordergrundes vom Hintergrund, über einen Schwellwert zu ermöglichen. Bei Verwendung des Filters ist zu gewährleisten, dass die

Kanten im Bild erhalten bleiben. Der *non local means* Filter [55] zeichnet sich durch eine hohe Rauschreduktion bei gleichzeitiger Erhaltung der Kanten aus. Im Gegensatz zu einem Standardmeanfilter berechnet der eingesetzte Filter den Wert eines Zielpixels nicht mit der lokalen Umgebung, sondern anhand aller Pixel im Bild, gewichtet nach Ähnlichkeit zum Zielpixel. Als Eingangsparameter für den Filter ist die Standardabweichung des Bildrauschens zu verwenden. Anschließend ist das Bildrauschen reduziert und der Kontrast ausreichend groß, um die Kristalle anhand des Grauwertes über einen Schwellwert zu segmentieren. Dabei entsteht ein binäres Schwarz-Weiß Bild. In diesem Bilderstapel erfolgt nun die Identifikation der einzelnen Kristalle. Zum Trennen sich berührender Kristalle ist die Wasserscheidentransformation (watershed) ein geeignetes Verfahren. Anhand des Binärbildes erfolgt die euklidische Distanztransformation über den Borgefors Algorithmus und mehrere morphologische Operationen wie Opening und Closing. Anschaulich sind bei der Wasserscheidentransformation die Grauwerte wie ein Höhenprofil zu interpretieren. In dem Komplementärbild der Distanztransformation bilden die Kristalle Bassins mit dem Kristallzentrum als tiefstem Punkt. Von verschiedenen Seedpunkten wird das Bild „geflutet“, sodass sich das Wasser in den Bassins sammelt. Der Algorithmus findet dann äquidistante Linien zwischen den Minima der einzelnen Regionen und schneidet sich berührende Kristalle entlang dieser Linien. [56] Daraus resultiert ein gelabeltes Graustufenbild, in dem jeder einzelne Kristall einen individuellen Grauwert aufweist. Um die Auswertung der Partikelgrößen nicht zu verfälschen, ist zudem das Entfernen von Kristallen, die den Rand berühren und somit angeschnitten sind, notwendig. Für die Visualisierung und nachfolgende Auswertung der μ CT Messung kommt die Software Dragonfly (Dragonfly[®], Object Research Systems) zum Einsatz. Die Quantifizierung erfolgt anhand des gelabelten Bildes mit der Ausgabe des Partikelvolumens, Aspektverhältnisses und des minimalen sowie maximalen Feretdurchmessers in eine Textdatei.

Bei der Berechnung der PGV anhand der μ CT Aufnahmen ist zwischen isometrischen und stäbchenförmigen Partikeln zu unterscheiden. Im Falle der isometrischen Kristalle erfolgt die Berechnung anhand des Äquivalentdurchmessers einer volumengleichen Kugel. Für die Stäbchen basiert die Berechnung der PGV auf dem per Bildauswertung bestimmten maximalen Durchmesser und der Zuordnung des entsprechenden zugehörigen Volumens. Somit ergeben sich jeweils Q_3 Verteilungen.

Die Porosität ist aus den Schnittbildern ermittelbar. In jedem Schnittbild wird dafür das Verhältnis aus Hohlraum- zu Gesamtfläche berechnet und der Durchschnitt dieses Verhältnisses für den Bilderstapel gebildet.

Bei manchen Aufnahmen ist das Segmentieren über einen Schwellwert aufgrund von zu hohem Bildrauschen nicht durchführbar. Experimentell trat dieser Fall im Rahmen dieser Arbeit vorrangig bei stäbchenförmigen Lysozymkristallen auf. Eine Alternative stellt dann das Segmentieren mithilfe eines Künstlichen Neuronalen Netzes (KNN) dar. Ein Vorteil dieses

Verfahrens ist der Verzicht auf den Einsatz zeitaufwendiger Bildfilter. Der Nachteil liegt in der zunächst erforderlichen manuellen Klassifikation von Kristallen für das Training des KNN. Ronneberger et al. [57] entwickelten speziell für Bildaufnahmen im biomedizinischen Bereich das sogenannte *U-Net*. Dieses KNN ist so konzipiert, dass es bereits mit einem geringen Trainingsaufwand gute Ergebnisse bezüglich der Segmentierung aus den Rohdaten liefert. Das *U-Net* wurde in Dragonfly mit manuell klassifizierten Aufnahmen von stäbchenförmigen Kristallen trainiert und anschließend erfolgreich bei der Segmentierung eingesetzt. Ein direktes Übertragen des Modells auf andere Kristallformen ist nicht möglich, sondern erfordert ein erneutes Trainieren des Modells mit geeigneten Trainingsdaten. Die anschließende Quantifizierung erfolgt analog zur Segmentierung über einen Schwellwert.

3.2 Kristallisation

3.2.1 Verdrängungskristallisation

Die Kristallisation von isometrischem und nadelförmigem Lysozym erfolgt bei 20 °C nach dem Prinzip der Verdrängungskristallisation in einem 25 mmol L⁻¹ Essigsäurepuffer. Der zugehörige Versuchsaufbau ist schematisch in Abb. 3.6 dargestellt. Das Einstellen des Puffers auf pH 4,5 findet mit NaOH statt. Nach Vorlage von 125 mL Kristallisationspuffer in ein 600 mL Becherglas werden darin 12,5 g L⁻¹ Lysozym aus Hühnereiweiß (Lysozym granuliert, Ovobest GmbH) aufgelöst. Das entspricht einer Konzentration von 100 g L⁻¹. Nach dem Auflösen pumpt eine Membranpumpe 125 mL Präzipitationspuffer mit einer Rate von 1 mL min⁻¹ zu dem Ansatz. Der Präzipitationspuffer ist ein 25 mmol L⁻¹ Essigsäurepuffer mit 80 g L⁻¹ Kochsalz bei pH 4,5. Die Zugabe erfolgt unter Rühren mit einem Rührwerk (RW 20 digital, IKA®) bei 350 rpm und einem Blattrührer als Turbine. Das Zugeben des Präzipitationspuffers bewirkt zum einen eine Verdünnung des Kristallisationsansatzes, zum anderen setzt das Kochsalz die Löslichkeit von Lysozym herab und erzeugt somit eine Übersättigung. Der Prozessweg

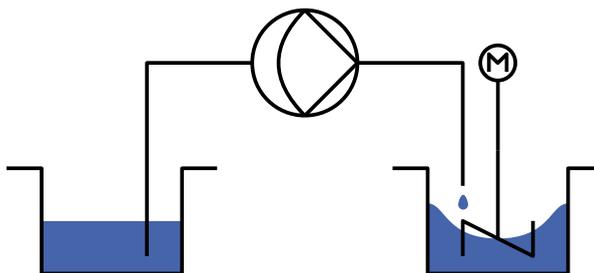


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für die Verdrängungskristallisation

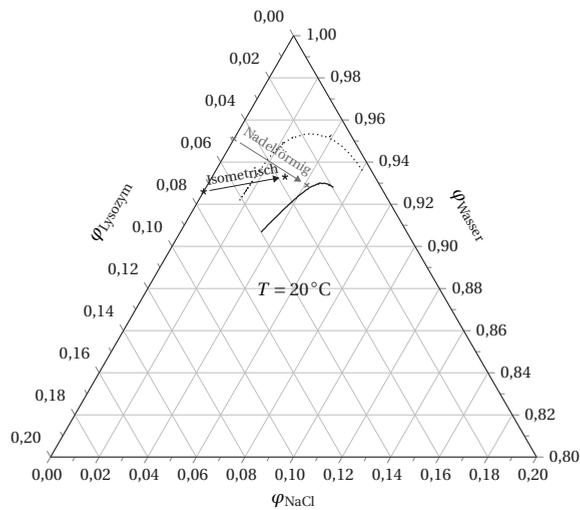


Abbildung 3.7: Dreiecksdiagramm mit Prozesswegen für isometrische und nadelförmige Lysozymkristalle über Verdrängungskristallisation bei 20°C ; Gleichgewichtsdaten aus Hekmat et al. [58]

der Verdrängungskristallisation für isometrische Kristalle ist in Abb. 3.7 dargestellt. An den Achsen sind die Massenanteile (φ) aufgetragen. Die gepunktete Linie stellt das von Hekmat et al. [58] beschriebene Phasengleichgewicht für das System dar. Die durchgezogene Linie ist eine mögliche Präzipitationskurve. Bei Überschreiten dieser Linie ist das Ausfallen von unerwünschtem amorphem Lysozym möglich.

Nadelförmiges Lysozym ist ebenfalls über eine Verdrängungskristallisation herstellbar (Abb. 3.7, grau), erfordert aber höhere Salzkonzentrationen als isometrisches Lysozym. Daher ist für die Produktion von nadelförmigem Lysozym das Mischungsverhältnis aus Kristallisationspuffer und Präzipitationspuffer 3:5, das bedeutet zu 150 mL Kristallisationspuffer mit einer Lysozymkonzentration von $66,6\text{ g L}^{-1}$ sind 100 mL Präzipitationspuffer mit 220 g L^{-1} NaCl hinzuzufügen. Die erreichbare finale Kristallkonzentration liegt für beide Ansätze mit Verdrängungskristallisation zwischen 30 und 40 g L^{-1} .

3.2.2 Verdampfungskristallisation

Um höhere Kristallkonzentrationen zu realisieren, ist die von Groß und Kind [59] beschriebene und in Abb. 3.8 dargestellte Niedrigtemperaturvakuumkristallisation ein geeignetes Verfahren. In einem gerührten und temperierten Vakuumbehälter liegt die Kristallisationslösung vor. Das angelegte Vakuum bewirkt eine Herabsetzung der Siedetemperatur, sodass das Wasser aus der Lösung verdunstet. In einem Kühler kondensiert das verdunstete Wasser

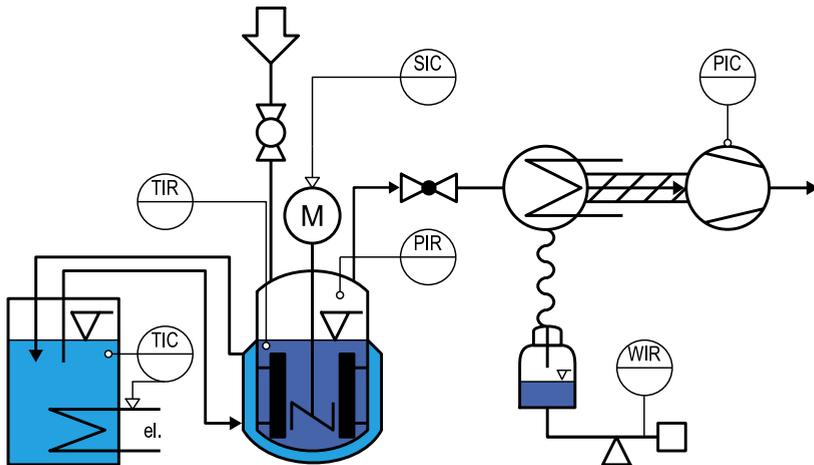


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für die Vakuumverdampfungskristallisation; adaptiert von [59]

und wird in einem Behälter aufgefangen. Eine Waage bestimmt die Masse des verdampften Wassers. Über den Zulauf ist in dem dargestellten Aufbau auch die Zugabe von Impfkristallen während des Prozesses möglich.

Die Kristallisation findet hier in einem 50 mmol L^{-1} Zitronensäurepuffer bei pH 4,5 statt. Durch das Verdampfen von Wasser unter Vakuum erhöht sich die Konzentration des Lysozims und der Pufferbestandteile, was zur Übersättigung führt. Nachdem die Hälfte der Masse verdampft ist, liegt eine 100 mmol L^{-1} Pufferlösung vor. Die Prozesswege sind in Abb. 3.9a für die Herstellung von nadelförmigen (mit zusätzlich NaCl) und isometrischen Kristallen bei 24°C dargestellt. Das zugehörige Vakuum beträgt 2500 Pa . Abbildung 3.9b zeigt das Phasengleichgewicht bei 35°C und dem zugehörigen Druck von 5500 Pa . [60]

Die von Barros Groß und Kind [60] bestimmten Kristallformen bei bestimmten Zusammensetzungen sind in Abb. 3.9 durch die Punkte dargestellt. Bei 24°C entstehen hauptsächlich isometrische und bei höheren Salzkonzentrationen auch nadelförmige Lysozymkristalle. Im Übergangsbereich entstehen Mischformen dieser zwei Kristallmodifikationen. Wie auch bei der Verdrängungskristallisation führen zu hohe Protein- oder Salzkonzentrationen zur Präzipitation. Eine weitere Kristallform, die stäbchenförmigen Lysozymkristalle, entsteht bei höheren Temperaturen (35°C). Der in Abb. 3.9 eingezeichnete Prozessweg führt weit in die Übersättigung und damit zu hohen Kristallkonzentrationen von etwa 300 g L^{-1} .

Die Durchführung der Verdampfungskristallisation erfolgt analog zu [59], allerdings in kleinerem Maßstab. In Reinstwasser sind zunächst $\varphi = 0,211$ Lysozym aufzulösen. Nach dem

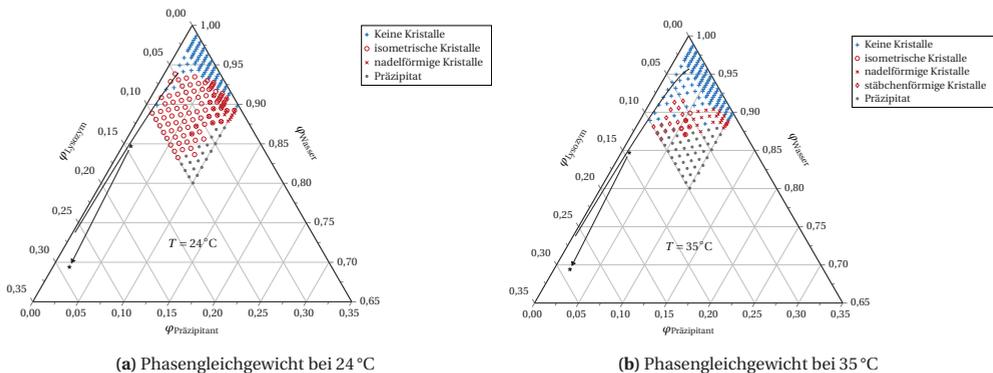


Abbildung 3.9: Phasengleichgewichts- und Prozessverläufe bei der Verdampfungskristallisation; Gleichgewichtsdaten von Barros Groß und Kind [60]

Auflösen wird die entstandene Suspension mit einem $1,5\ \mu\text{m}$ Glasfilter über eine Vakuumnutsche filtrieren. Danach beträgt der Massenanteil von Lysozym noch $\varphi \approx 0,185$. Zu 77,66 g dieser Lösung sind 15,96 g eines zweiten Puffers mit den Massenanteilen $\varphi_{\text{Cit}} = 0,057$ und $\varphi_{\text{NaOH}} = 0,025$ zuzugeben. Der pH Wert der entstandenen Mischung ist mit Wasser und $0,01\ \text{mol L}^{-1}$ NaOH Lösung auf 4,5 und die Gesamtmasse auf 100 g einzustellen. Damit ergibt sich der Ausgangspunkt in den Mischungsdiagrammen in Abb. 3.9 von $\varphi_{\text{Lysozym}} = 0,144$ und $50\ \text{mmol L}^{-1}$ Zitronensäure. An diesem Punkt ist die Lösung bereits leicht übersättigt. Es entstehen aber noch keine Kristalle, da hier noch die metastabile Zone vorliegt. Anschließend ist das Vakuum in Abhängigkeit von der gewünschten Siedetemperatur einzustellen. Dabei ist es wichtig, Pausen bei 50 000 Pa und 10 000 Pa einzulegen, um ein langsames Entgasen zu gewährleisten und übermäßiges Schäumen zu verhindern. Nach Erreichen des gewünschten Drucks erfolgt die Temperierung über eine Heizplatte, um die erforderliche Verdampfungsenthalpie einzubringen. Mit einer Rate von etwa $25\ \text{g h}^{-1}$ verdampfen 50 g des Wassers. Während des Verdampfens gewährleistet ein Rührwerk eine homogene Durchmischung des Ansatzes. Durch das der Lösung entzogene Wasser entsteht ein $100\ \text{mmol L}^{-1}$ Zitronensäurepuffer mit einem Gesamtmassenanteil an Lysozym von $\varphi = 0,288$. Gleichzeitig sinkt die Löslichkeit des Lysozyms auf $\varphi = 0,022$. In einer Reifezeit von etwa 8 h wachsen die Kristalle bei weiterhin konstanter Temperatur, bis die Übersättigung abgebaut ist.

Ein weiterer Unterschied zur Verdrängungskristallisation ist, dass durch die Vakuumkristallisation die Salzkonzentration gering bleibt, da mit Ausnahme von nadelförmigem Lysozym die Zugabe von NaCl entfällt. Barros Groß und Kind [60] nutzten das Verfahren der Vakuumkristallisation neben Lysozym auch für das Enzym Alkoholdehydrogenase (ADH) erfolgreich.

3.3 Filtration

3.3.1 Nutschenfilter

In der Drucknutsche nach VDI 2762 [6] findet das Zurückhalten der Partikel über ein Filtermittel statt. Die treibende Kraft ist dabei die Druckdifferenz zwischen der Filterober- und -unterseite. Für die Filtration von Proteinkristallen ist das Filtermittel eine Membran (Ultipor[®], Pall Corporation) mit einer Porengröße von 0,2 μm . Die Druckdifferenz ist vorgegeben und bleibt während des Filtrationsvorgangs konstant. Eine Waage zeichnet die anfallende Filtratmasse zeitaufgelöst auf. Eine schematische Darstellung des Aufbaus ist Abb. 3.10 zu entnehmen. Anhand der aufgenommenen Daten ist bei bekannter Dichte der Filtermittel- und Filterkuchenwiderstand über das t/V - V Diagramm berechenbar. Die Höhe des Filterkuchens ist nach dem Ausbau aus der Nutsche über ein Laserdistanzmessgerät (LK-G157, Keyence, Japan) messbar.

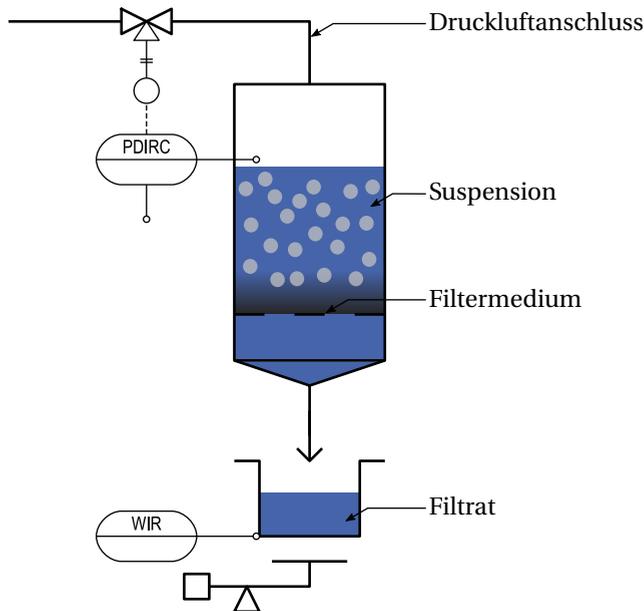


Abbildung 3.10: Schematische Darstellung der Drucknutsche

Ist der Membranwiderstand bekannt, besteht zudem die Möglichkeit, anstatt eines Filtrationsversuchs ein Permeationsexperiment durchzuführen. Um ein Aufwirbeln oder Beschädigen des Filterkuchens zu verhindern, erfolgt die Zugabe von kontinuierlicher Phase nach der eigentlichen Filtration vorsichtig auf den vorab gebildeten Filterkuchen. Zum Schutz des

Kuchens ist auch der Einsatz eines von oben in die Drucknutsche eingeführten Stempels möglich. Anhand des zeitlichen Verlaufs der Filtratmasse ist der Gesamtwiderstand ermittelbar. Durch Subtraktion des separat bestimmten Filtermittelwiderstands ergibt sich der Kuchenwiderstand. Bei den Permeationsversuchen ist darauf zu achten, dass keine Untersättigung des Kuchens ($S < 1$) eintritt. Das bedeutet, die Filtration ist gemäß VDI 2762 [6] dann abzubrechen, wenn die eine Hälfte der Kuchenoberseite matt und die andere Hälfte glänzend ist.

3.3.2 Kleinskalige Zentrifugalfiltration

Um Stoffsysteme, die nur in geringer Menge vorliegen, zu charakterisieren, ist die Zentrifugalfiltration in einer optischen Zentrifuge (LUMiSizer[®], LUM GmbH) eine Alternative zum Nutschenfilter. Eine spezielle lichtdurchlässige Filtrationszelle enthält die Suspension und ein Filtermedium sowie ein Reservoir, um das Filtrat aufzufangen. Anhand der zeitaufgelösten Transmissionsprofile sind die Phasengrenzen in der Filtrationszelle beobachtbar.

Um die Auswertung zu vereinfachen, erfolgt die Bestimmung des Kuchenwiderstands nicht über einen Filtrations-, sondern über einen Durchströmungsversuch. Der erste Schritt dazu ist der Kuchenaufbau in der Filtrationszelle. Das anfallende Filtrat wird verworfen und auf die Kuchenoberseite vorsichtig etwa 300 μL Überstand aufgegeben. Dann findet die eigentliche Durchströmung des Filterkuchens bei einer vorab gewählten Drehzahl im Bereich von 500–4000 rpm statt, bis die komplette Flüssigkeit die Kuchenoberseite passiert hat. Durch diese Vorgehensweise entfällt die Notwendigkeit, die Sedimentationsfront bzw. den Kuchenaufbau zu verfolgen. Allerdings ist so nur der Gesamtwiderstand berechenbar. Um vom Gesamtwiderstand auf den Kuchenwiderstand zu schließen, ist daher die separate Ermittlung des Filtermittelwiderstands notwendig.

Bei der Bestimmung des Filtermittelwiderstands mit Wasser oder partikelfreiem Überstand kommt es zu einer Unterschätzung des realen Widerstands, da die Bildung einer ersten Partikelschicht und Partikelbrücken fehlen. Ist jedoch der Kuchenwiderstand deutlich höher (1–2 Größenordnungen) als der Mediumswiderstand, so ist es auch möglich, den Filtermittelwiderstand komplett zu vernachlässigen. Als Filtermittel dient wie auch bei dem Nutschenfilter eine Membran (Ultipor[®], Pall Corporation) mit 0,2 μm Porengröße.

3.4 Sedimentation

Zur Analyse der Sedimentationsgeschwindigkeit kommen sowohl Methoden im Erdschwere- als auch im Zentrifugalfeld zum Einsatz. Die Vorgehensweise besteht darin, ein definiertes

Volumen einer Suspension mit bekanntem Feststoffvolumenanteil (ϕ) in eine Küvette einzufüllen und die Sedimentationsgeschwindigkeit des Trennsiegels zu verfolgen.

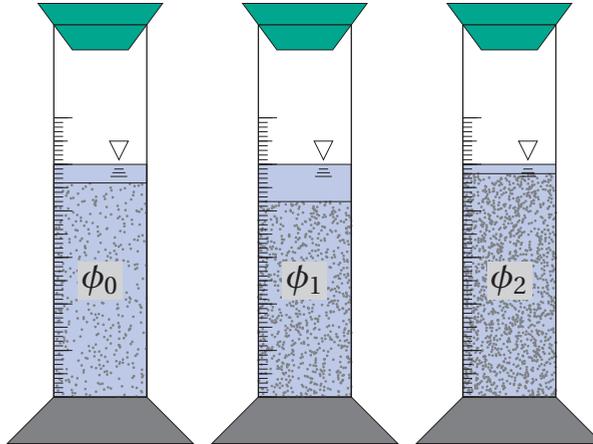


Abbildung 3.11: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus zur Sinkgeschwindigkeitsbestimmung

Abbildung 3.11 zeigt schematisch den experimentellen Aufbau am Beispiel von drei Standzylindern nach derselben Sedimentationszeit mit von links nach rechts steigendem Feststoffvolumenanteil. Wie aus Abb. 3.11 zu entnehmen, ist die Position der Sedimentationsfront abhängig von dem eingefüllten Feststoffvolumenanteil. Da bei polydispersen Partikelsystemen häufig Segregationseffekte bei der Sedimentation auftreten, ist es wichtig, die Sedimentationsgeschwindigkeit möglichst zu Beginn des Sedimentationsvorgangs auszuwerten, wenn der eingefüllte Feststoffvolumenanteil bekannt und homogen ist.

Für schnell sedimentierende Partikelsysteme erfolgt die Messung mit dem Gerät LUMiReader[®] (LUM GmbH) im Erdschwerefeld. Die Probe ist dabei in einer Küvette vorgelegt und die Bestimmung der Sedimentationsgeschwindigkeit erfolgt über Lichttransmission. Um die Messzeit bei langsam sedimentierenden Partikeln gering zu halten, findet die Messung solcher Stoffsysteme im Zentrifugalfeld mit dem Messgerät LUMiSizer[®] (LUM GmbH) statt. Auch hier dient die Lichttransmission zur Bestimmung der Sedimentationsgeschwindigkeit. Um die Ergebnisse der zwei verschiedenen Methoden vergleichbar zu machen, ist es erforderlich, die Sinkgeschwindigkeit aus dem Zentrifugalfeld (v_z) gemäß

$$v_g = v_z \underbrace{\left(\frac{1}{2} (r_1 + r_2) \omega^2 g^{-1} \right)^{-1}}_{c^{-1}} \quad (3.63)$$

in die entsprechende Sinkgeschwindigkeit im Erdschwerefeld (v_g) umzurechnen. In Gleichung (3.63) stellt der Ausdruck in der Klammer die relative mittlere Zentrifugalbeschleunigung (C) dar und r bezeichnet den Rotorabstand des Trennspiegels zu Beginn und am Ende der Auswertung.

3.5 Konzentrationsbestimmung

3.5.1 Kristallkonzentration

Eine direkte gravimetrische Messung der Kristallmasse ist nicht möglich, da bei der Trocknung der Probe die in der kontinuierlichen Phase gelösten Salze und Protein ebenfalls ausfallen und es somit zu einer Überschätzung der Kristallkonzentration kommt.

Aus diesem Grund ist 1 mL der Suspension in ein Reaktionsgefäß zu überführen und für 10 min zu zentrifugieren. Anschließend ist der Überstand vorsichtig abzunehmen und in ein zweites Reaktionsgefäß zu überführen. Das Sediment in dem Reaktionsgefäß hat nach dieser Prozedur eine Sättigung von eins. Beide Reaktionsgefäße sind anschließend für mindestens drei Tage bei 50 °C zu trocknen. Aus der feuchten ($m_{\ddot{u},f}$) und getrockneten Masse ($m_{\ddot{u},tr}$) des Überstands ist die Beladung (X_S) nach

$$X_S = \frac{m_{\ddot{u},tr}}{m_{\ddot{u},f} - m_{\ddot{u},tr}} \quad (3.64)$$

zu berechnen. Die Beladung bezieht dabei die während der Trocknung ausfallenden festen Bestandteile (m_S) auf die Menge an entferntem Wasser und dient im Folgenden dazu, die Kristallkonzentration zu korrigieren. Die Kristallkonzentration (c_K) ergibt sich somit aus der korrigierten Masse des getrockneten Sediments bezogen auf das Probenvolumen (V_P) gemäß

$$c_K = \frac{m_{tr} - m_S}{V_P} = \frac{m_{tr} - (m_f - m_{tr}) X_S}{V_P}. \quad (3.65)$$

Die Porosität (ϵ) oder der Feststoffvolumenanteil ist analog zu bestimmen. Um die Porosität eines Filterkuchens oder eines Sediments über Wägung festzustellen, ist es essenziell, dass die Sättigung bei eins liegt. Die Ermittlung der Porosität folgt dann mit:

$$\epsilon = \frac{\frac{m_f - m_{tr}}{\rho_l}}{\frac{m_f - m_{tr}}{\rho_l} + \frac{m_{tr} - (m_f - m_{tr}) X_S}{\rho_s}} = 1 - \phi = 1 - \frac{c_K}{\rho_s}. \quad (3.66)$$

3.5.2 Konzentration von gelöstem Protein

Die meisten Proteine absorbieren UV Licht bei 280 nm, da sie in ihrer Primärstruktur die Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin enthalten, die über aromatische Seitenketten mit delokalisierten Elektronen verfügen. Über das Gesetz von Lambert-Beer

$$E_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \tilde{c} x, \quad (3.67)$$

das die Extinktion (E_{λ}) mit der molaren Konzentration (\tilde{c}), dem stoff- und wellenlängen-abhängigen Extinktionskoeffizienten (ϵ_{λ}) und dem Probendurchmesser (x) korreliert, lässt sich über eine einfache photometrische Messung die Proteinkonzentration ermitteln. Der erforderliche Extinktionskoeffizient für beliebige Proteine in reinem Wasser ist direkt aus der Aminosäuresequenz des Proteins mithilfe von Diensten wie ExPASy [61] berechenbar. Für das Protein Lysozym aus Hühnereiweiß beträgt der Extinktionskoeffizient in Wasser bei einer Wellenlänge von 280 nm $\epsilon_{\lambda} = 37970 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [61]. Es ist zulässig, den Extinktionskoeffizienten für das Lösungsmittel Wasser heranzuziehen, da für die photometrische Messung die Proteinlösung stark verdünnt vorliegen muss. Die Verdünnung sollte eine Extinktion im Bereich von 0,1–0,7 gewährleisten, um im Gültigkeitsbereich des Gesetzes von Lambert-Beer zu sein.

3.6 Scherbelastung

Die kombinierte Normal- und Scherbelastung findet an Haufwerken aus isometrischen Lysozymkristallen statt. Die mechanischen Eigenschaften von getrockneten und feuchten Kristallen unterscheiden sich stark. Deshalb ist es für eine realistische Beurteilung des Materialverhaltens wichtig, die Kristalle möglichst nah an den tatsächlichen Prozessbedingungen, also feucht, zu vermessen. Um die Kristalle in einem gesättigten Haufwerk zu belasten, kommt ein Ringschergerät (RST-01.pc, Dr. Dietmar Schulze) zum Einsatz. Dieses Gerät findet im Bereich der Schüttgutmechanik zur Charakterisierung der Fließeigenschaften von trockenen Pulvern Anwendung. Das Schüttgut befindet sich in einer Scherzelle. Auf das Schüttgut wird ein Scherzellendeckel, an dem Mitnehmer angebracht sind, aufgesetzt und an ein Gewicht eingehängt. Über das angelegte Gewicht ist die Normalspannung des Systems vorgegeben. Zur Scherung rotiert die Scherzelle, der Deckel der Scherzelle ist dabei aber über Zugstangen mit Biegebalken verbunden und fixiert. An den Biegebalken ist daher die Schubspannung abgreifbar.

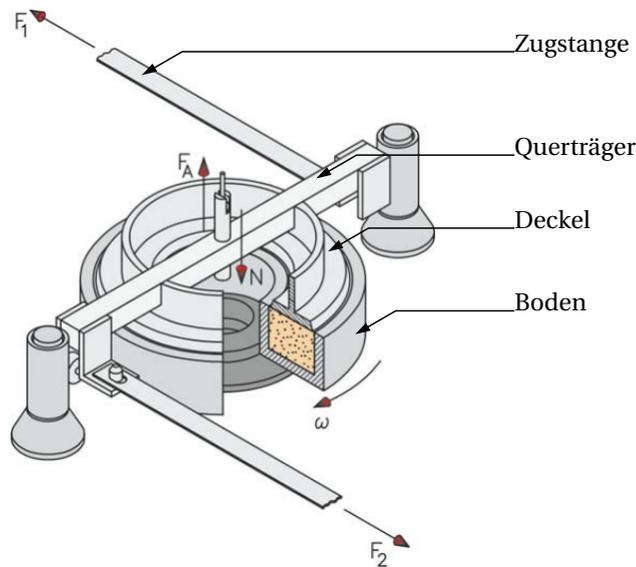


Abbildung 3.12: Darstellung einer Scherzelle; aus [62]

Der Aufbau der klassischen Scherzelle ist in Abb. 3.12 dargestellt. Die am Querträger aufgelegten Zugstangen sind mit den in Abb. 3.12 nicht dargestellten Biegebalken zur Schubspannungsmessung verbunden. Der Querträger ist über einen Haken auf der Unterseite mit dem verstellbaren Gegengewicht verbunden, das die Normalspannung bewirkt. Auf der Oberseite des Querträgers ist ein Gegengewicht einzuhängen, mit dessen Hilfe die vertikale Position des Scherzellendeckels bestimmt wird. Damit ist eine Verdichtung und Rückdehnung des Haufwerks feststellbar.

Für die Messung von feuchten Haufwerken sind Modifikationen an der Scherzelle notwendig. Eine ausführliche Erläuterung der modifizierten Scherzelle ist Hammerich et al. [63] und Hammerich [64] zu entnehmen. Die Modifikationen sind deshalb im Folgenden nur grob skizziert. Bei der Belastung von feuchten Haufwerken kommt es bei der Verdichtung zu einer Verdrängung von Flüssigkeit, die aus dem System entweichen muss. Im Gegensatz dazu ist bei einer Rückdehnung des Haufwerks zu gewährleisten, dass keine Untersättigung entsteht.

Die bauliche Umsetzung der modifizierten Scherzelle ist als Schnittdarstellung in Abb. 3.13 dargestellt. Der Scherzellendeckel besteht aus zwei Bauteilen, die über Teflonringe gegeneinander abgedichtet sind. Um das Entweichen von Flüssigkeit zu erlauben, aber gleichzeitig die Partikel zurückzuhalten, sind auf der Ober- und Unterseite der Scherzelle Filtermedien mit Stützstruktur eingebaut, die in Abb. 3.13 in Grün dargestellt sind. Die Mitnehmer und die Bodenplatte der Scherzelle sind in Grau visualisiert. Auf der Unterseite der Scherzelle ist

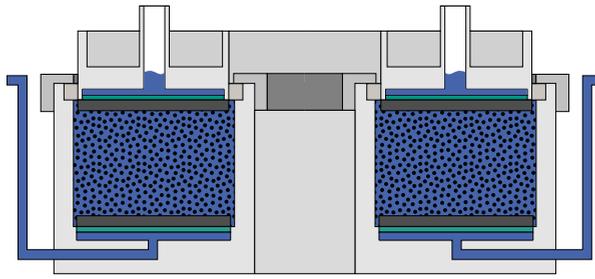


Abbildung 3.13: Schnittdarstellung der modifizierten Scherzelle; nach [63]

unterhalb des Filtermediums ein Drainagekanal lokalisiert, über den verdrängte Flüssigkeit abfließt. Durch das L-förmige Profil ist gewährleistet, dass der Drainagekanal stets mit Flüssigkeit gefüllt ist und somit bei einer Rückdehnung das Haufwerk nicht untersättigt. In ähnlicher Art ist auch am Scherzellendeckel ein Steigrohr für die verdrängte Flüssigkeit vorhanden, das dieselbe Funktion erfüllt.

Aufgrund der zusätzlich eingesetzten Teflondichtungen und der im Vergleich zur kommerziellen Standardscherzelle etwas anderen Konstruktion sind die gemessenen Werte für die Normal- und Schubspannung nicht direkt bestimmbar. Es ist eine Korrektur um die Reibungsbeiträge der Dichtungen erforderlich. Dazu hat Hammerich [64] eine Variante der Scherzelle mit Dehnmessstreifen zur Belastungsmessung entwickelt und darüber die folgenden Korrekturfunktionen bestimmt. Für die Normalspannung ergibt sich die Korrekturfunktion zu

$$\sigma_{n, \text{kor}} = (1 - 0,1964)\sigma_n. \quad (3.68)$$

Die Korrektur der Schubspannung ist von der Normalspannung abhängig und über das Polynom

$$k = -8,16 \times 10^{-13}\sigma_n^6 + 3,96 \times 10^{-10}\sigma_n^5 - 7,93 \times 10^{-8}\sigma_n^4 + 8,49 \times 10^{-6}\sigma_n^3 - 5,27 \times 10^{-4}\sigma_n^2 + 1,94 \times 10^{-2}\sigma_n + 1,02 \quad (3.69)$$

$$\tau_{\text{kor}} = \frac{\tau}{k} \quad (3.70)$$

realisiert. In Gleichung (3.69) ist die Normalspannung in 10^3 Pa einzusetzen. Kleine Normalspannungen führen zu einer höheren Ungenauigkeit bei der korrigierten Schubspannung. Die Korrekturfunktionen sind abhängig vom verwendeten Dichtungssatz und deshalb bei einem Austausch der Dichtungen neu zu kalibrieren.

Ein Experiment mit dem Ringschergerät und der modifizierten Scherzelle unterteilt sich in die Phasen

1. Probenvorbereitung,
2. Scherzellenzusammenbau,
3. Scherzellenvorbereitung,
4. Scherversuch.

Die Probenvorbereitung besteht im Herstellen von isometrischen Lysozymkristallen über Verdrängungskristallisation. Um eine ausreichende Menge an Kristallinat bereitzustellen und um kleinere Schwankungen zwischen den verschiedenen Batches auszugleichen, sind drei individuelle Kristallisationsansätze herzustellen und zu vermischen. Über Nacht sedimentieren die Kristalle und ermöglichen das Dekantieren des Überstandes am Folgetag. Dadurch erhöht sich die Konzentration an Kristallinat bei der Resuspendierung des Sediments und verhindert Segregation aufgrund von Zonensedimentation.

Bei dem Zusammenbau der Scherzelle sind das Filtermedium (Trakedge 0,2µm, Sabeu GmbH), die Stützstrukturen sowie die Bodenplatte im Unterteil einzubauen und über Schrauben zu fixieren. Die Drainagekanäle sind zunächst über Schrauben zu verschließen, damit in der Zentrifuge keine Flüssigkeit austritt. Das Unterteil ist im Anschluss in einen Zentrifugeneinsatz für die Becherzentrifuge (ZK 630, Berthold Hermle GmbH & Co.) einzubauen. Dieser Einsatz erlaubt es, ein Sediment durch Zentrifugation direkt im Unterteil der Scherzelle aufzubauen. In die obere Öffnung des Einsatzes erfolgt die Zugabe von Suspension, sodass der Verfahrensraum des Scherzellenbodens leicht überfüllt ist. Der Einsatz wird über einen Standardbecher in die Zentrifuge eingebaut. Auf der gegenüberliegenden Seite ist ein entsprechend präparierter Ausgleichsbecher einzusetzen, damit keine Unwucht entsteht. Weil für die Zentrifugation niedrige Beschleunigungen zum Einsatz kommen und die Dichte der Lysozymkristalle nicht sehr hoch ist, ist es ausreichend, den Ausgleichsbecher mit Wasser aufzufüllen. Bei einer Drehzahl von 1500 min^{-1} ist die Probe für 10 min zu zentrifugieren. Das entspricht einer maximalen relativen Zentrifugalbeschleunigung von $C = 500$. Durch die vergleichsweise geringe Zentrifugalbeschleunigung ist die Normalbelastung des Haufwerks gering und eine Veränderung der PGV aufgrund der Zentrifugation durch Vorversuche ausgeschlossen. Nach dem Ausbau aus der Zentrifuge befindet sich das Sediment im Scherzellenboden. Der Überstand ist vorsichtig zu verwerfen. An die zuvor mit Schrauben verschlossenen Drainagebohrungen des Unterteils sind die L-förmigen Drainagekanäle zu montieren und das Unterteil über diese Kanäle mit Überstand zu befüllen. Um stets eine definierte Sedimenthöhe zu gewährleisten, wird mit einem Schaber mit fest eingestellter Länge überschüssiges Sediment vorsichtig abgenommen. Im Anschluss sind die Teflondichtungen einzubauen und mit Messingmuttern zu fixieren.

An den Scherzellendeckel sind ebenfalls die gleiche Filtermembran, Stützstrukturen sowie die Mitnehmer zu montieren. Der Scherzellendeckel ist zweigeteilt aufgebaut und erfordert daher auch eine Abdichtung mit Teflon O-Ringen. Auf der Oberseite des Deckels sind final die Steigrohre für die Flüssigkeit aufzuschrauben. Der zusammengebaute Deckel wird mittig ausgerichtet und auf die Scherzelle mit Sediment aufgesetzt. Leichtes Andrücken des Deckels fixiert den Deckel in der richtigen Orientierung.



Abbildung 3.14: Links: Zusammengebaute Scherzelle; Mitte: Scherzellendeckel mit Mitnehmern und Scherzelle; Rechts: In das Ringschergerät eingebaute Scherzelle; aus [64]

Im Anschluss findet die Scherzellenvorbereitung statt. Die zusammengebaute Scherzelle ist in Abb. 3.14 dargestellt. Auf der linken Seite ist die Scherzelle komplett zusammengebaut. Das mittlere Foto zeigt den Scherzellendeckel mit den Mitnehmern und die das Sediment enthaltende Scherzelle. Auf dem rechten Foto ist die im Ringschergerät montierte Scherzelle zu sehen. Zur Montage ist die Scherzelle im Ringschergerät einzusetzen und der Biegebalcken aufzulegen sowie das Gegengewicht einzuhängen. Um den Scherzellendeckel richtig zu positionieren, wird eine Normalspannung, die deutlich geringer als bei den späteren Scherversuchen ist, angelegt. Dadurch rutscht der Deckel in die richtige Position und verdrängt etwas Flüssigkeit aus dem Sediment. Anschließend sind die oberen Steigrohre mit gesättigter Lösung zu befüllen und darauf ist die anliegende Normalspannung wieder auf null zu reduzieren. Die Scherzelle ist nun für den eigentlichen Scherversuch vorbereitet.

Der Scherversuch besteht im Anlegen der definierten Normalspannung und anschließendem Scheren der Probe durch Rotation des Unterteils. Die einstellbaren Einflussgrößen sind die Schergeschwindigkeit, die Normalspannung und die Scherdauer. Die Scherdauer ist bei den Experimenten so gewählt, dass der Schwerweg konstant bleibt. Ein schematischer Verlauf der Schubspannung über der Scherdauer ist in Abb. 3.15 dargestellt. Das in der Schüttgutmechanik übliche An- und Abscheren in mehreren Zyklen ist hier nicht durchgeführt, da dann der Einfluss auf die Zerkleinerung nicht mehr eindeutig zuordenbar ist. Nach dem Ausbau des gescherten Sediments aus der Scherzelle erfolgt die Probennahme für die Vermessung im μCT .

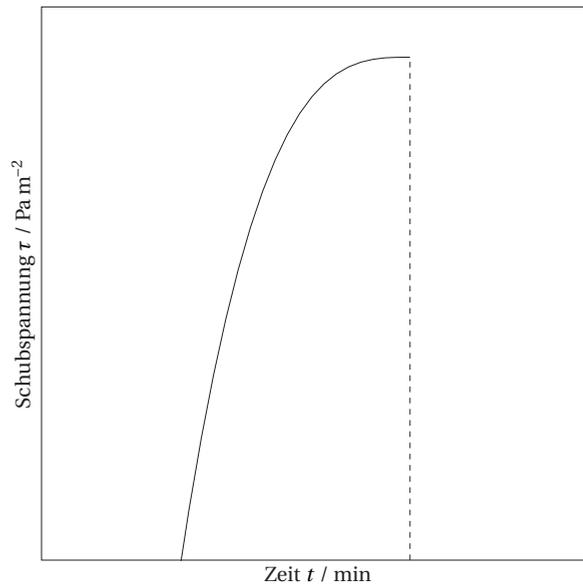


Abbildung 3.15: Schematische Darstellung des zeitlichen Schubspannungsverlaufs bei einem Scherversuch

Diese findet analog zur Probennahme bei den Filtrationsexperimenten mit anschließender Lyophilisation statt. Zur Beurteilung der PGV mit der Laserbeugung wird eine Haufwerksprobe in partikelfreiem Überstand resuspendiert. Um den Einfluss der Zentrifugation und der reinen Verdichtung zu beurteilen, sind ebenfalls Proben der Ausgangslösung, nach der Zentrifugation und nach der Verdichtung ohne Scherung im Ringschergerät zu analysieren.

4 Kleinskalige Zentrifugalfiltration¹

Zur Analyse des Filtrationsverhaltens von kristallinen Proteinen ist es erforderlich, den Maßstab des Filtrationsaufbaus deutlich zu verkleinern. Damit ist es möglich, bereits früh in der Entwicklungsphase eines Proteins Rückschlüsse zum späteren Separationsverhalten zu ziehen. Die Prozessentwicklung erfolgt dann nicht mehr komplett linear, sondern teilweise parallel, was die erforderliche Entwicklungszeit und Time-to-Market drastisch reduziert.

In diesem Kapitel steht die Entwicklung und Erprobung einer Filtrationszelle für die Zentrifugalfiltration im Vordergrund. Das Hauptziel dabei ist, das erforderliche Probenvolumen stark zu reduzieren und dabei alle wichtigen Größen mit möglichst wenigen Messungen zu bestimmen.

4.1 Stand der Technik

Proteine finden breite Anwendung im Bereich der pharmazeutischen, biotechnologischen und in der Lebensmittelindustrie [66]. Weiterentwicklungen in der Biotechnologie und Bioverfahrenstechnik verbessern die Reaktoren und Prozesse stetig und erzielen somit immer höhere Produkttiter. Die nachfolgenden Prozessschritte, in denen die Aufarbeitung des Proteins stattfindet, bestehen typischerweise aus mehreren Chromatographieschritten und sind ressourcenintensiv und teuer [66–68]. Farid [69] schätzte die Kosten für über Zellkultur produzierte monoklonale Antikörper auf 300–3000 USD/g.

Als Alternative schlagen Schmidt et al. [68] die selektive Kristallisation des Zielproteins aus der Lösung vor, um somit einen Aufarbeitungs- und Formulierungsschritt zu kombinieren und einen Chromatographieschritt zu ersetzen. Hekmat et al. [58] demonstrierten die Möglichkeit zur präparativen Proteinkristallisation am Beispiel von Lysozym. Kristalline Proteine weisen im Vergleich zu amorphem oder gelöstem Protein verschiedene vorteilhafte Eigenschaften

¹ Teile dieses Kapitels sind in Radel et al. (2019) [65] veröffentlicht

auf. Dazu gehören eine höhere Lagerstabilität, einfachere Handhabung und bei therapeutischen Proteinen ein verändertes Freisetzungsverhalten [38, 70]. Hubbuch et al. [71] skizzierten die komplette Prozesskette vom Screening geeigneter Kristallisationsbedingungen über die präparative Proteinkristallisation bis hin zur abschließenden FFT.

Für die Beurteilung der Filtrationsleistung sind Kenntnisse über den Kuchenwiderstand, die Porosität und das Kompressionsverhalten notwendig. Um diese Parameter zu ermitteln, sind experimentelle Untersuchungen für jedes Material, jede PGV und Partikelform erforderlich. Bei der kuchenbildenden Filtration ist für die Charakterisierung der Standard VDI 2762 [6] maßgeblich. Zur Beurteilung der Kompressibilität dient häufig eine Kompressions-Permeabilitätszelle, die es erlaubt, den Kuchenwiderstand und den Feststoffvolumenanteil abhängig von verschiedenen Kompressionsdrücken zu bestimmen [7].

Beide Methoden setzen jedoch ausreichend große Probenvolumina im Bereich mehrerer Milliliter bis hin zu einigen Litern voraus. Für die Kompressions-permeabilitätszelle existiert außerdem eine Untergrenze für den Stempeldruck von 1×10^5 Pa. Daher ist es im Hinblick auf Proteine interessant, wegen der hohen Produkt- und Entwicklungskosten das erforderliche Probenvolumen zu reduzieren. Die Zentrifugalfiltration ist dazu besonders geeignet, da moderne Zentrifugen über ausreichend genaue Analytik verfügen, um auch im miniaturisierten Aufbau aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Bereits 1987 untersuchten Sambuichi et al. [9] die Filtration im Zentrifugalfeld mit einer Zentrifuge, bestehend aus horizontal rotierenden transparenten Bechern, die das Filtermedium enthalten. Mit einem Stroboskop, das auf die Drehzahl der Zentrifuge abgestimmt ist, wird ein scheinbar stehendes Bild erzeugt und analysiert. Die so erzeugte Zentrifugalbeschleunigung ist aber eher gering und die Filtrationsdrücke somit klein, da andernfalls das Verfolgen der Grenzflächen schwierig wäre. Bei den experimentellen Untersuchungen beobachteten Sambuichi et al. [9] die Ausbildung einer klaren, partikelfreien Schicht oberhalb der Suspension, was an der überlagerten Sedimentation liegt.

Das Prinzip von Sambuichi et al. [9] wurde von Loginov et al. [8, 72] auf eine optische Laborzentrifuge übertragen. Bei der optischen Laborzentrifuge handelt es sich um eine analytische Becherzentrifuge (LUMiSizer[®], LUM GmbH). Licht der Wellenlänge 865 nm durchstrahlt die einzelnen Küvetten während der Rotation und ein Detektor misst die Transmission ortsaufgelöst über die Küvettenhöhe. Die genaue Funktionsweise der Zentrifuge ist detailliert in Lerche und Sobisch [73] dargestellt. Der Ansatz von Loginov et al. [8] besteht aus einem in die Küvette integrierten Filterelement, in das verschiedene Filtermedien einsetzbar sind. Der Filtrations-einsatz, der die Suspension enthält, und der Filterkuchen sind in diesem Aufbau intransparent und somit im Transmissionsprofil nicht sichtbar. Stattdessen erfolgt die Auswertung anhand der Höhenänderung des Flüssigkeitsspiegels im Filtratreservoir. Das bedeutet aber auch, dass die Parameter Kuchenhöhe und Feststoffvolumenanteil im Kuchen nicht direkt bestimmbar

sind. Insbesondere für Partikelsysteme mit kompressiblem Materialverhalten ist dadurch die Interpretation der Ergebnisse erschwert.

Cornehl et al. [74] stellten für Lysozymkristalle ein labileres mechanisches Verhalten im Vergleich zu konventionellen organischen oder anorganischen Kristallen fest. Bereits geringer mechanischer Stress führt dabei zu Kristallbruch oder -abrasion. Dies zeigt sich auch in den mikromechanischen Eigenschaften wie dem geringen Elastizitätsmodul oder der geringen Härte.

Tabelle 4.1: Literaturwerte zu den mikromechanischen Eigenschaften von Lysozymkristallen

Material	Härte	Elastizitätsmodul
	MPa	GPa
Lysozym (feucht) [75]	15	0,49
Lysozym (2 Tage getrocknet) [75]	96	1,9
Lysozym (10 Tage getrocknet) [75]	200	4,2
Lysozym (quervernetzt, feucht) [76]	11,4	1,08

Tabelle 4.1 zeigt die in der Literatur verfügbaren Daten für die mikromechanische Charakterisierung von Lysozymkristallen. Besonders deutlich geht daraus hervor, dass feuchte Kristalle komplett andere mechanische Eigenschaften als angetrocknete oder ganz getrocknete Kristalle aufweisen. Zudem besteht die Möglichkeit, die Kristalle durch Zugabe von Glutaraldehyd quervernetzen. Dabei reagieren die Amine der Lysin- und Arginin-Seitenketten mit Glutaraldehyd und es entstehen Kristalle, die eine deutlich höhere mechanische Stabilität und eine ganz andere Löslichkeit aufweisen. Für das Verhalten der Kristalle bei der Filtration sind offensichtlich die Eigenschaften der feuchten Kristalle maßgeblich, da sie als Suspension in einer Lösung vorliegen. Koizumi et al. [77] stellten außerdem eine Temperaturabhängigkeit der Kristallhärte von Lysozym fest. Die Härte sank von 20 MPa bei 17 °C auf etwa 10 MPa bei 32 °C.

Cornehl et al. [74] untersuchten den Kristallbruch, die Porosität und die Bruchkinetik mit einer Kompressions-Permeationszelle bei unterschiedlichen Stempeldrücken. Dabei stellten die Autoren fest, dass der Bruch sehr schnell stattfindet, da bereits nach einer Minute keine weitere Zerkleinerung detektierbar ist. Agglomerierte Kristalle zerbrechen bereits bei Drücken zwischen $0,25 \times 10^5$ – $1,01 \times 10^5$ Pa.

4.2 Filterzelle zur Charakterisierung von Proteinproben mit geringen Volumina

4.2.1 Anforderungen

Zur Beurteilung der Filtrierbarkeit ist es erforderlich, die Parameter Kuchenwiderstand und Porosität mit geringem Materialeinsatz zu ermitteln. Dafür bietet sich eine optische analytische Laborzentrifuge an, die über das Zentrifugalfeld die erforderliche Druckdifferenz erzeugt. Das notwendige Probenvolumen sollte pro Permeation nicht mehr als 500 μL betragen, um einen geringen Probeneinsatz zu gewährleisten. Damit die Anzahl notwendiger Experimente so klein wie möglich bleibt, ist es außerdem erforderlich, den Filterkuchen und den klaren Überstand im Transmissionsprofil beobachten zu können. Somit sind der Feststoffvolumenanteil im Kuchen und der Filtrationsdruck direkt berechenbar und erfordern keine zusätzlichen Experimente. Weiterhin ist es sinnvoll, das Filtermedium austauschbar zu gestalten und somit die Verwendung von beliebigen Filtermedien zuzulassen. Anfallendes Filtrat darf nicht aus dem Versuchsraum austreten und die Zentrifuge verunreinigen, sondern ist sicher aufzufangen. Damit die optische Transmissionsmessung funktioniert, ist es notwendig, dass die Filtrationszelle transparent ist. Jedoch ist darauf zu achten, dass die mechanische Stabilität der Filterzelle auch bei der höchsten Drehzahl gewährleistet bleibt. Die wahrscheinlich wichtigste Anforderung ist aber, dass die interessanten Parameter trotz des geringen Materialeinsatzes hinreichend genau bestimmbar sind.

4.2.2 Konstruktive Umsetzung

Die konstruktive Umsetzung der Filterzelle erfolgte mit zwei verschiedenen Konzepten, die beide mit der optischen Zentrifuge kompatibel sind. Das erste Konzept besteht aus einem dreigeteilten, runden Plexiglasbauteil. Das Oberteil enthält die Suspension, das Mittelteil ein Filterelement aus kommerziellen Eppendorf Filtern für Eppendorf Reaktionsgefäße und das Unterteil ist für das anfallende Filtrat. Die Anwendung dieses Aufbaus hat den Nachteil, dass oberhalb des Filterkuchens nur noch eine geringe Strecke im optischen Messbereich der Zentrifuge LUMiSizer[®] liegt. Außerdem zeigten Vorversuche, dass die Filterelemente uneben sind und sich zur Mitte hin durchbiegen. Das führt zu unregelmäßigen Filterkuchen, verringerter Reproduzierbarkeit und verhindert ein akkurates Messen der Kuchenhöhe. Die Auswahl des Filtermediums ist durch die Festlegung auf die Eppendorf Filterelemente zudem beschränkt. Aus diesen Gründen ist dieses Konzept zu verwerfen und eine andere Umsetzung zu wählen.

Das zweite Konzept zur Umsetzung der Filterzelle basiert auf einer zweigeteilten Bauart. Ein Teil enthält die Suspension und den Filterkuchen, das andere Teil fängt das anfallende Filtrat auf. Das Filtermedium wird zwischen beide Teile positioniert. Durch diesen Aufbau ist es möglich, beliebige Filtermedien zu verwenden. Die Konstruktion der einzelnen Teile erfolgt so, dass sich die Küvette direkt in die Halterung der Zentrifuge LUMiSizer[®] einbauen lässt. Diese Form ist den kommerziell erhältlichen geometrisch komplexen Küvetten nachempfunden und lässt sich gut über 3D Druckverfahren herstellen. Durch die Wahl eines geeigneten Kunststoffes ist mit manueller Nachbearbeitung auch die Transparenz gewährleistet. Für die Nachbearbeitung ist der Sichtbereich der Küvette mit Schleifpapier zu polieren, um die Oberflächenrauigkeiten zu entfernen und damit die Transparenz zu erhöhen. Jedoch ist insbesondere auf der Innenseite der Küvette, das gleichmäßige Polieren aufgrund des geringen Durchmessers schwierig und sehr zeitaufwendig. Erste Experimente zeigten, dass im besonders sensiblen Bereich des Filterkuchens die erreichbare Transmission und Ortsauflösung nicht optimal sind. Zur Verbesserung enthält eine zweite Generation der Filterzelle ovale Aussparungen auf der Vorder- und Rückseite, in die passgenaue Einsätze aus Fensterglas verklebt sind. Durch diese Einsätze steigt die Transmission im Bereich des Filterkuchens und erlaubt eine genauere Auswertung der Flüssigkeits- und Kuchenposition. Da somit auch das zeitintensive Polieren entfällt, ist diese Variante die bevorzugte Bauart. Die bauliche Umsetzung der Filterzelle ist Abb. 4.1 zu entnehmen.

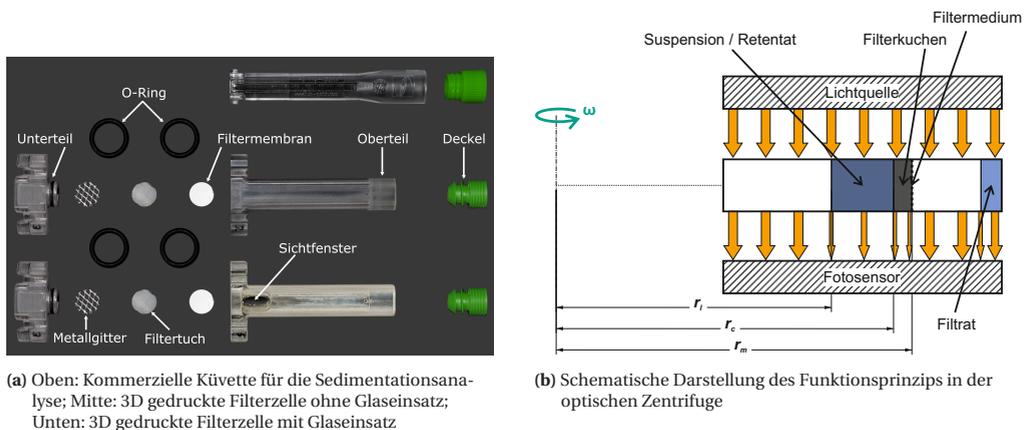


Abbildung 4.1: Links: Standardküvette und 3D gedruckte Filtrationszelle für die Verwendung in der optischen Zentrifuge; Rechts: Schematische Darstellung der Funktionsweise der Filtrationseinheit

Oben in Abb. 4.1a ist eine kommerzielle Standardküvette für die Sedimentationsanalyse dargestellt. Die mittlere Filterzelle in Abb. 4.1a enthält kein Sichtfenster und hat deshalb ein etwas unschärferes Transmissionsprofil. Das links von ihr zu sehende Unterteil fängt das Filtrat auf. Das Metallgitter und das Filtertuch dienen als Stützstruktur für die austauschbare

Filtermembran. Die Suspension oder der klare Überstand werden in das Oberteil eingefüllt. Dort bildet sich der Filterkuchen und ragt bis in das Sichtfenster. An der Oberseite verschließt ein Deckel die Küvette. Das Unterteil enthält kleine Schrägbohrungen, um das Entweichen verdrängter Luft zu ermöglichen. Analog dazu enthält das Oberteil eine kleine Bohrung, um den Druckausgleich zu gewährleisten. Für das Unterteil sind diese Bohrungen in der technischen Zeichnung in Abb. 4.2 in Rot hervorgehoben und frontal sowie in einem Schnitt dargestellt. Unten in Abb. 4.1a ist die verbesserte 3D gedruckte Filterzelle mit Glaseinsatz für die Filtrationsexperimente abgebildet. Bei dem Sichtfenster handelt es sich um wasserstrahlgeschnittenes Fensterglas, das mit Epoxidklebstoff fixiert ist. Die schwarzen O-Ringe in Abb. 4.1a dienen dazu, die Verbindung zwischen Ober- und Unterteil zu stabilisieren. Ein kleinerer O-Ring dichtet das Unterteil gegenüber dem Oberteil ab und verhindert somit einen Flüssigkeitsaustritt in die Zentrifuge.

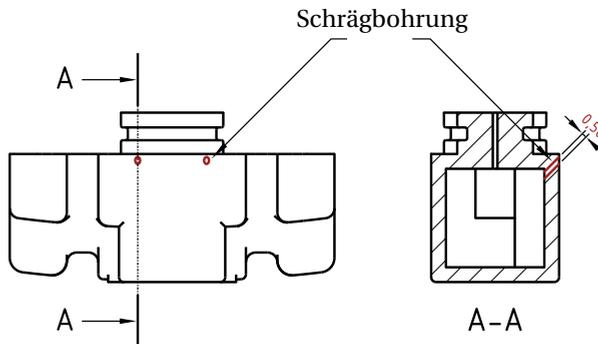


Abbildung 4.2: Technische Zeichnung des Unterteils mit in Rot hervorgehobenen Schrägbohrungen

Abbildung 4.1b zeigt schematisch die Funktionsweise der Filterzelle. Während der Rotation wird die Küvette mit Licht durchstrahlt. Zusammen mit einem Fotosensor auf der gegenüberliegenden Seite erfolgt die Messung der Transmission. Die verschiedenen Phasengrenzen ergeben dann ein deutliches Signal im über den Rotorabstand aufgetragenen Transmissionsverlauf. Dabei sind die Gas/Flüssig-, die Flüssig/Fest- und die Membranpositionen von besonderem Interesse für die Auswertung.

Die verfügbare Filterfläche beträgt $51,65 \text{ mm}^2$. Als Filtermedium sind verschiedene Membranen denkbar, die sich mit einem Stanzwerkzeug passgenau aus einem größeren Bogen erzeugen lassen. Voraussetzung ist allerdings, dass im Erdschwerefeld keine Flüssigkeit durch das Filtermedium dringt, da sonst der Filtrationsvorgang schon vor dem Einbau in die Zentrifuge beginnt. Für Experimente bei höheren Drücken und damit größeren Drehzahlen ist die Anlaufzeit der Zentrifuge zu berücksichtigen. Bis die gewünschte Drehzahl erreicht ist,

dauert es einige Sekunden, und es ist erforderlich, dass zu diesem Zeitpunkt noch ausreichend Flüssigkeit im Oberteil der Küvette vorhanden ist. Das sich im Unterteil befindende Filtratreservoir nimmt bis zu 1 mL Flüssigkeit auf.

4.2.3 Charakterisierung der Filtrationszelle

4.2.3.1 Transmissionssignal

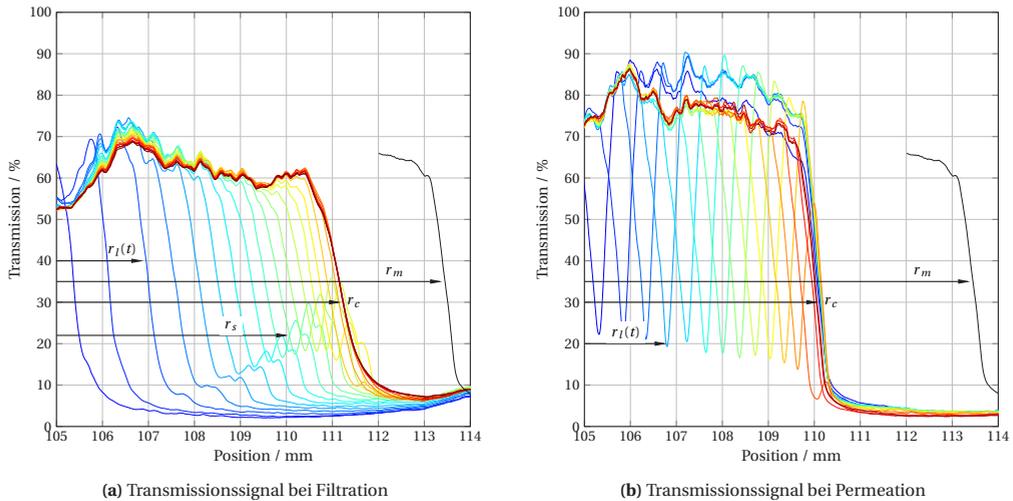


Abbildung 4.3: Transmissionsverläufe bei Filtration (links) und Permeation (rechts); Die Pfeile zeigen die relevanten Abstände vom Zentrum der Zentrifuge an, die Farben stehen für unterschiedliche Zeitschritte.

Typische Signalverläufe der Transmission sind in Abb. 4.3 dargestellt. Die Farben kodieren unterschiedliche Zeitpunkte (von Blau über Gelb zu Rot) und die schwarze Kurve zeigt die Messung einer leeren Küvette (enthält nur Stützstrukturen und Filtermedium). Auf der linken Seite ist das Transmissionsprofil einer Filtration abgebildet. Zunächst befindet sich ausschließlich lichtundurchlässige Suspension in der Küvette. Deshalb ist bei den ersten Zeitschritten die Transmission bei knapp über 0%. Ein starker vertikaler Abfall von hoher zu niedriger Transmission zeigt die Position der Gas/Flüssig-Grenzfläche (r_I) an. Diese Position verschiebt sich im Laufe des Prozesses nach rechts. Nach einer gewissen Zeit ist ungefähr bei Position 109 mm die Ausbildung eines Peaks im Transmissionsprofil zu beobachten. Dabei handelt es sich um die Ausbildung einer Sedimentationsfront (r_s) aufgrund von überlagerter Sedimentation. Die in der Suspension enthaltenen Partikel weisen somit eine etwas höhere Geschwindigkeit als die kontinuierliche Phase auf, weshalb sich während des Prozesses eine Klarphase ausbildet. Das Kuchenwachstum selbst ist nicht sichtbar, da in diesem Bereich die

Transmission nahe bei null liegt. Es ist somit nur die Endposition der Filterkuchenoberseite (r_c) bestimmbar. Unter der Annahme eines homogenen Kuchenaufbaus ist aber der zeitliche Verlauf der Kuchenhöhe berechenbar. Die Position des Filtermediums lässt sich basierend auf der Messung einer leeren Küvette, die nur die Stützstrukturen und das Filtermedium enthält, bestimmen (schwarze Kurve). Diese Position ist zeitlich konstant, hängt aber in einem geringen Maß aufgrund von Materialstauchung von der Zentrifugalbeschleunigung ab. Dieser Effekt ist jedoch so marginal ($< 1\%$), dass eine Vernachlässigung gerechtfertigt ist. Dennoch ist die Position des Filtermediums nach jedem neuen Zusammenbau von Ober- und Unterteil neu zu ermitteln.

Die rechte Seite von Abb. 4.3 zeigt analog den Transmissionsverlauf für ein Permeationsexperiment. Hier ist der Filterkuchen vorab bereits aufgebaut und wird mit klarem Überstand durchströmt. Zunächst fällt im direkten Vergleich auf, dass sich anstatt eines steilen Abfalls von hoher zu niedriger Transmission ein lokales Minimum ausbildet. Dieses Minimum zeigt die Position der Gas/Flüssig-Grenzfläche an und verschiebt sich mit jedem Zeitschritt nach rechts. Da der Überstand klar und partikelfrei ist, steigt die Transmission nach dem Minimum wieder auf Werte über 70 % an. Die Position der Filterkuchenoberseite ist in jedem Profil sichtbar und annähernd konstant. Die Position des Filtermediums ist wie bei einem Filtrationsexperiment zu bestimmen. Ein entscheidender Vorteil der Permeation ist die deutlich einfachere Versuchsauswertung und die Möglichkeit, denselben Filterkuchen bei mehreren Drehzahlen zu durchströmen, was die benötigte Produktmenge weiter reduziert.

Anhand der Signalverläufe sind zusammen mit den Prozess- und Stoffparametern unter Verwendung von Gleichung (2.24) die Werte für Y zu berechnen und über der Zeit darzustellen, wie beispielhaft in Abb. 4.4 gezeigt. Die in Abb. 4.4 gezeigten Kurven weisen einen linearen Verlauf auf. Lediglich am Anfang gibt es kleinere Nichtlinearitäten, die mit Einlaufeffekten zu erklären sind. Aufgrund des linearen Verlaufs der Kurve ist eine Rückdehnung des Filterkuchens durch abnehmenden Druck auszuschließen. Aus der Steigung dieser Kurven ist – zusammen mit der Zentrifugalbeschleunigung sowie den Stoffdichten und der Filterkuchenhöhe – der Gesamtwiderstand bestimmbar. Für die Berechnung des Filterkuchenwiderstands ist zusätzlich noch der Betrag des Filtermittelwiderstands notwendig. Dieser ist durch ein Permeationsexperiment nicht direkt berechenbar. Mithilfe der Filtrationszelle ist es aber möglich, den Filtermittelwiderstand bei Durchströmung mit Wasser oder Überstand zu ermitteln. Anhand dieser Werte ist die ungefähre Größenordnung des Filtermittelwiderstands abschätzbar.

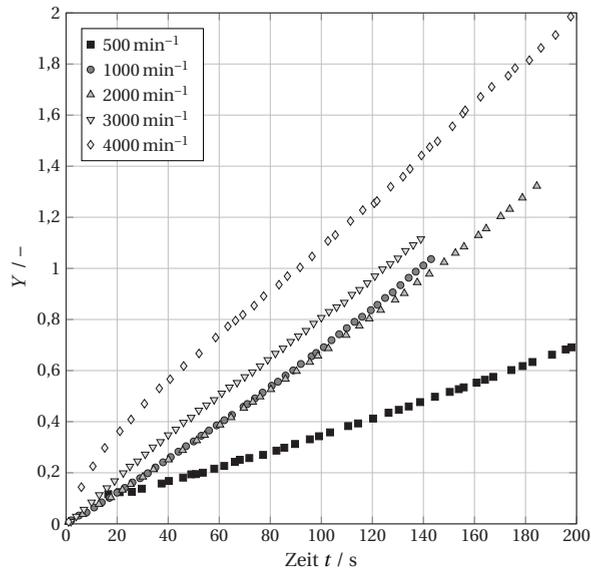


Abbildung 4.4: Aus den Signalverläufen berechnete Werte Y für einen Permeationsversuch

4.2.3.2 Druckverlauf

Mithilfe der aus dem Transmissionsprofil bestimmten Abstände ist es möglich, die Drücke, die auf das Filtermedium wirken, zu berechnen. Dieser Druck trägt die Bezeichnung Gesamtdruck und ist von der Flüssigkeitshöhe und der Filterkuchenhöhe abhängig. Mit fortschreitender Zeit verringert sich der Gesamtdruck, weil die Flüssigkeitshöhe und damit der Beitrag des hydrostatischen Druckes abnimmt.

Abbildung 4.5 zeigt charakteristische Druckverläufe über der Zeit für ein Filtrationsexperiment mit Kuchenaufbau (Abb. 4.5a) und für ein Permeationsexperiment (Abb. 4.5b). Im Falle der Filtrationsversuche setzt sich der Druck aus einem hydrostatischen Anteil der geklärten Flüssigkeit, der Suspension, der Porenflüssigkeit und dem Feststoffgerüstdruck zusammen. Diese ändern sich alle in Abhängigkeit der Zeit, bis der Filtrationsvorgang beendet ist. Dann ist der Druckverlauf konstant und besteht nur noch aus den Beiträgen der Porenflüssigkeit und des Feststoffgerüsts. Bei der Permeation sind die Beiträge zum Gesamtdruck sowohl der Feststoffgerüstdruck als auch der hydrostatische Druck der Porenflüssigkeit, die aber im Unterschied zur Filtration zeitlich konstant sind. Daher ändert sich ausschließlich der Anteil des hydrostatischen Druckes der Flüssigkeitssäule über dem Filterkuchen, der mit der Zeit abnimmt. Beide Vorgehensweisen haben gemeinsam, dass der Druck mit höherer Zentrifugalbeschleunigung quadratisch zunimmt. Es lassen sich kurzzeitig Drücke von etwa 2×10^5 Pa realisieren. Höhere Drücke benötigen eine größere Befüllung der Küvette. Das hat

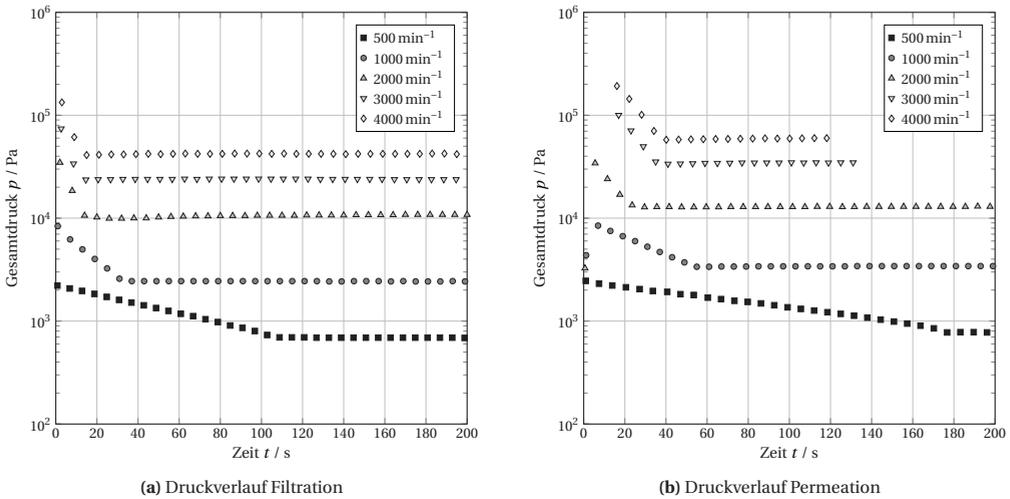


Abbildung 4.5: Druckverläufe bei Nutzung der Filtrationszelle; Links: Filtration mit Kuchenbildung; Rechts: Permeation

dann zur Folge, dass die Position der Flüssigkeitsoberseite nicht mehr im Transmissionsprofil sichtbar ist.

4.2.4 Filtermittelwiderstände

Neben der Filtration von Suspensionen ist auch die Ermittlung von Filtermittelwiderständen möglich. In Abb. 4.6 sind die Widerstände von verschiedenen Filtermedien bei Durchströmung mit Überstand dargestellt. Es handelt sich daher streng genommen nicht um die Filtermittelwiderstände, sondern um die Widerstände bei Durchströmung mit Überstand. Der tatsächliche Filtermittelwiderstand bei Verwendung einer Suspension ist etwas höher, da die erste Partikelschicht mit dem Filtermedium interagiert. Dennoch eignet sich der Wert, um eine Membran zu charakterisieren und für die gewünschte Anwendung auszuwählen.

Ein Blick auf Abb. 4.6 zeigt, dass die betrachteten Drücke eher klein sind. Das liegt daran, dass bei höheren Drücken die Permeation zu schnell abläuft und deshalb keine Auswertung mehr möglich ist. Die dargestellten Maximaldrücke entsprechen einer Drehzahl der Zentrifuge von 2000 min^{-1} .

Die Membran mit einer Porengröße von 0,45 μm hat den geringsten Widerstand, der zudem über den gemessenen Druckbereich annähernd konstant bleibt. Der durchschnittliche Widerstand dieser Membran beträgt $5,6 \times 10^9 \text{ m}^{-1}$. Bei einer Porengröße von 0,22 μm liegt der Widerstand etwas höher bei $2,7 \times 10^{10}$ – $1,4 \times 10^{10} \text{ m}^{-1}$. Der höhere Widerstand ist aufgrund

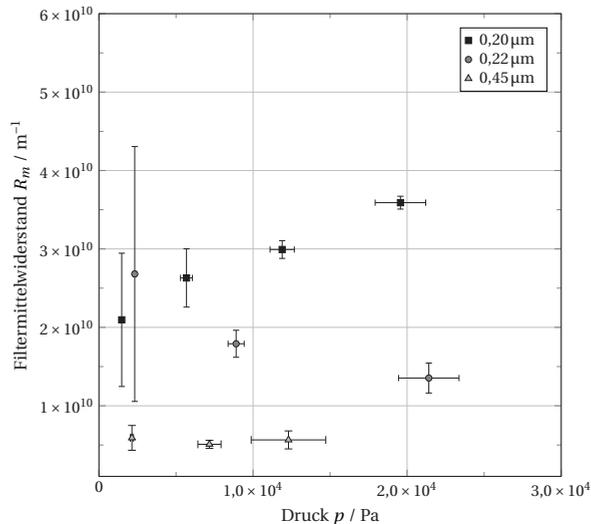


Abbildung 4.6: Mit der Küvette bestimmte Filtermittelwiderstände bei Durchströmung mit gesättigter Lösung

der kleineren Poren zu erwarten. Größere Drücke bewirken einen schwachen Abfall des Widerstands für diese Membran. Die Membran mit einer Porengröße von $0,20 \mu m$ weist die höchsten Widerstände in einem Bereich von $2,1 \times 10^{10}$ – $3,6 \times 10^{10} m^{-1}$ auf. Der Widerstand steigt mit zunehmendem Druck leicht an, was möglicherweise durch das andere Material erklärbar ist. Diese Membran ist aus Nylon gefertigt, wohingegen die anderen Membranen aus Polysulfon bestehen. Auffällig ist die hohe Streuung der Widerstände bei sehr kleinen Drücken. Bei diesen geringen Drücken bildet sich offensichtlich noch keine gleichmäßige Durchströmung aus.

Die Membran mit einem Porendurchmesser von $0,20 \mu m$ eignet sich für die Durchführung der Filtrationsversuche, da die Poren deutlich kleiner als die Kristalle sind. Somit gibt es keinen Feststoffdurchschlag in das Filtrat und die Gefahr einer Verblockung der Membran ist gering. Vergleichsmessungen mit der Drucknutzschleife in einem größeren Maßstab ergaben für diese Membran einen Widerstand von etwa $5 \times 10^{10} m^{-1}$, dieser ist somit sehr ähnlich zu den mit der Küvette ermittelten Werten (etwa $3 \times 10^{10} m^{-1}$). Allgemein ist festzustellen, dass alle detektierten Widerstände nahe beieinander liegen. Vergleichsmessungen unter Berücksichtigung der Kuchenbildung zeigten nur eine geringe Zunahme des Filtermittelwiderstands.

4.2.5 Filtrationswiderstände und Haufwerkscharakterisierung

Zur Evaluation der Filtrationszelle dient als Modellsystem eine Suspension aus kleinen aggregierten Lysozymkristallen mit isometrischer Konformation. Als kontinuierliche Phase kommt eine gesättigte Lösung zum Einsatz.

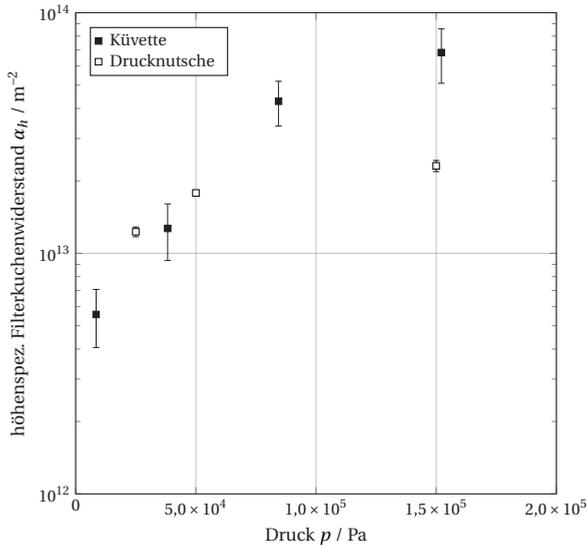


Abbildung 4.7: Höhenspezifischer Kuchenwiderstand für aggregierte isometrische Lysozymkristalle bei verschiedenen Filtrationsdrücken

Abbildung 4.7 zeigt den mit der Filtrationszelle bestimmten Verlauf des höhenspezifischen Kuchenwiderstands für aggregierte isometrische Lysozymkristalle bei verschiedenen Filtrationsdrücken. Zum Vergleich sind zudem Messungen des Kuchenwiderstands mit einer Standarddrucknutsche nach VDI 2762 [6] aufgeführt. Aus der Abbildung ist zu ersehen, dass der Kuchenwiderstand mit zunehmendem Druck leicht ansteigt. Zunächst beträgt der Widerstand $5,6 \times 10^{12} \text{ m}^{-2}$ und nimmt dann bei einem Maximaldruck von etwa $1,5 \times 10^5 \text{ Pa}$ auf einen Wert von $6,8 \times 10^{13} \text{ m}^{-2}$ zu. Die Zunahme des Widerstandes deutet auf eine Materialkompression hin. Diese Materialkompression kann sowohl durch Umlagerung von Partikeln im Filterkuchen als auch durch Aggregatbruch hervorgerufen werden. Auch bei den Ergebnissen mit der Drucknutsche gibt es einen Anstieg des Kuchenwiderstands mit zunehmendem Druck, der jedoch etwas schwächer ausgeprägt ist. Der maximale Widerstand beträgt $2,3 \times 10^{13} \text{ m}^{-2}$.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die mit der Filtrationszelle erzielten Widerstände und die Abweichungen etwas höher als die mit der Drucknutsche bestimmten Widerstände

sind. Dennoch sind die Kuchenwiderstände mit ausreichender Genauigkeit ermittelbar, um eine Bewertung hinsichtlich der Filtrierbarkeit und auch der Filtrationsleistung in einem größeren Maßstab vorzunehmen. Oft unterscheiden sich verschiedene Partikelsysteme im Widerstand um einige Größenordnungen, sodass die hier vergleichsweise geringen Abweichungen nicht stark ins Gewicht fallen.

Die Position der Filterkuchenoberseite ist aus den Transmissionsprofilen direkt zu entnehmen, da durch die hohe räumliche Auflösung im Transmissionsspektrum die Position der Kuchenoberseite mit hoher Genauigkeit detektierbar ist. Der Verlauf der normierten Kuchenhöhe ($h_c h_{c,0}^{-1}$) für aggregierte isometrische Lysozymkristalle ist in Abb. 4.8 dargestellt. Mit steigendem Druck gibt es die Tendenz zur Abnahme der Kuchenhöhe. Das deckt sich auch mit den Ergebnissen aus den Kuchenwiderständen, die bereits ein kompressibles Materialverhalten angedeutet haben. Bei der höchsten Druckstufe beträgt die Kuchenhöhe nur noch etwa 80 % der Ausgangshöhe. Die Konsolidierung des Filterkuchens ist ebenfalls auf Partikelumlagerung und eventuell auftretenden Aggregatbruch zurückzuführen.

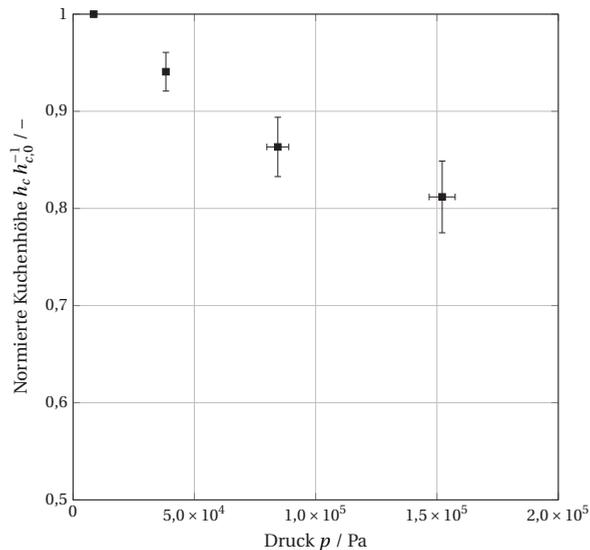


Abbildung 4.8: Relative Kuchenhöhe aggregierter Lysozymkristalle in Abhängigkeit vom Druck

Die direkte Bestimmung der Kuchenhöhe stellt einen Vorteil gegenüber den zuvor in der Literatur publizierten Ansätzen [8, 78] dar, da keine zusätzlichen Experimente, Annahmen oder Modelle erforderlich sind. Mit der Filtrationszelle für die optische Zentrifuge ist es hingegen möglich, die Permeation und die Kuchenhöhe im selben Experiment zu ermitteln. Dadurch wird der erforderliche Versuchsumfang und die benötigte Materialmenge reduziert.

Unter der Annahme, dass das Filtermedium alle Partikel zurückhält, ist es möglich, aus der gemessenen Kuchenhöhe den durchschnittlichen Feststoffvolumenanteil in dem Filterkuchen (ϕ_c) zu berechnen. Dazu ist die Kenntnis des Feststoffvolumenanteils der Ausgangssuspension (ϕ_s) erforderlich. Dieser ist über einen einfachen Trocknungsversuch messbar. Der durchschnittliche Feststoffvolumenanteil ergibt sich mit dem Suspensionsvolumen (V_s) und der Querschnittsfläche (A) zu

$$\phi_c = \phi_s \frac{V_s}{h_c A}. \quad (4.71)$$

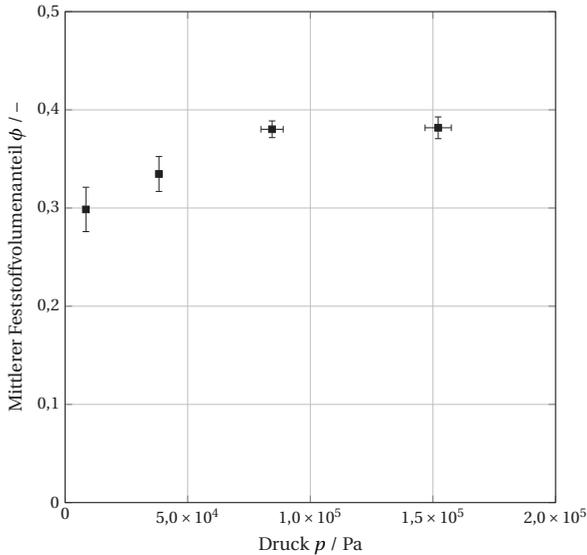


Abbildung 4.9: Mittlerer Feststoffvolumenanteil für aggregierte isometrische Lysozymkristalle

Die Entwicklung des Feststoffvolumenanteils mit zunehmendem Druck ist in Abb. 4.9 abgebildet. Aufgrund der leichten Kompaktierung des Filterkuchens kommt es auch zu einer Zunahme des Feststoffvolumenanteils. Die Zunahme beträgt für die aggregierten Kristalle etwa 10 Prozentpunkte und nimmt einen Endwert von 0,39 an. Das Verhältnis zwischen End- und Anfangswert ist 1,3. Zusammenfassend ist festzustellen, dass für dieses Stoffsystem der Kuchenwiderstand eher gering und der Feststoffvolumenanteil ausreichend hoch ist, um eine effiziente Filtration zu realisieren. Jedoch zeigt sich ein leicht kompressibles Materialverhalten, das auf die in der Suspension vorhandenen Aggregate und die breite PGV zurückzuführen ist.

4.3 Bewertung der Filtrationszelle

Durch das 3D-Druck-Verfahren und eine anschließende Nachbearbeitung ist es möglich, eine transparente Filtrationszelle für den Einsatz in einer optischen Zentrifuge herzustellen. Die Phasengrenzen in der Filtrationszelle ergeben ein deutliches Signal im räumlich aufgelösten Transmissionsspektrum. Die dabei erzielbaren Filtrationsdrücke liegen im Bereich von $0,02 \times 10^5$ – 2×10^5 Pa, wobei der Maximaldruck nur kurzzeitig anliegt und im Anschluss abfällt, da sich der hydrostatische Druck der Flüssigkeitssäule über dem Filterkuchen verringert.

Die modulare Bauweise bietet die Möglichkeit, beliebige Filtermedien zu verwenden und diese auch mit der Filtrationszelle zu charakterisieren. Die verbauten Dichtungen und Drainagekanäle gewährleisten zum einen, dass keine Flüssigkeit in den Verfahrensraum der Zentrifuge gelangt, und zum anderen, dass die verdrängte Luft entweichen kann.

Die Filtrationszelle ist in der Lage, die relevanten Parameter Filterkuchenwiderstand und Kuchenhöhe ausreichend genau zu messen. Vergleichsmessungen an einer VDI 2762 [6] Drucknutsche ergaben nur geringe Abweichungen hinsichtlich des Filterkuchenwiderstands für das betrachtete Modellsystem. Aufgrund der hohen räumlichen Auflösung in der Zentrifuge ist die Kuchenhöhe genau bestimmbar. Mit dieser ist darüber hinaus der mittlere Feststoffvolumenanteil im Filterkuchen berechenbar. Damit sind zwei wesentliche Parameter für die Beurteilung der FFT direkt aus einer Messung erzielbar. Auch die Anforderung eines geringen Probenvolumens ist erreicht, da pro Versuch etwa 200–500 μ L Suspension beziehungsweise Überstand notwendig sind. Das ist eine deutliche Reduktion gegenüber dem Materialeinsatz an einem Nutschenfilter (etwa 100 mL pro Versuch), die zwar zu einer etwas höheren Schwankung bei den ermittelten Größen führt, aber immer noch reproduzierbare Ergebnisse liefert.

5 Sedimentationsanalyse und Flussdichtefunktion²

Die Ermittlung von Prozessfunktionen zur Beschreibung des Materialverhaltens ermöglicht es, sowohl die Sedimentation als auch die Filtration über einen großen Bereich des Feststoffvolumenanteils zu berechnen. Mögliche Einsatzgebiete so bestimmter Prozessfunktionen sind einerseits Computersimulationen von Filtrationsapparaten, die beispielsweise die Flussdichtefunktion nutzen [21, 80–82]. Andererseits ist die Berechnung der Prozesszeit oder des zu erwartenden Filterkuchenwiderstands bei der Auslegung von Produktionsanlagen eine denkbare Anwendung.

Die Zielsetzung ist, die Prozessfunktionen für verschiedene Proteinkristalle in einem kleinen Maßstab mit der Filtrationsküvette zu ermitteln, da bei der Prozessentwicklung zur Herstellung solcher Kristalle nur kleine Mengen verfügbar sind.

5.1 Stand der Technik

Um den erfolgreichen Einsatz eines Kristallisationsschrittes zur Aufarbeitung und Formulierung zu ermöglichen, ist es erforderlich, sowohl die Proteinkristallisation als auch die mechanischen Eigenschaften der Kristalle gezielt zu beeinflussen. Dazu haben Nowotny et al. [83] und Hermann et al. [84] relevante Aminosäuren für die Kristallisation in der Sequenz des Proteins ADH von *Levilactobacillus brevis* mittels Molecular dynamics Simulationen identifiziert. Durch gezielte Mutationen dieser Aminosäuren konnten sie die Kristallisation verbessern und dies auch für drei verschiedene Mutanten experimentell nachweisen. Grob et al. [85] zeigten anschließend die Anwendbarkeit der technischen Kristallisation im Downstream für das Protein ADH.

Kubiak et al. [76] nutzten das Quervernetzen der Kristalle mit Glutaraldehyd, was die mechanische Stabilität der Kristalle deutlich erhöht. Quervernetzte Kristalle sind außerdem nicht

² Teile dieses Kapitels sind in Radel et al. (2021) [79] veröffentlicht

mehr in Wasser löslich. Kubiak et al. [86] stellten zudem fest, dass quervernetzte Halohydrin-dehalogenase Kristalle Anisotropie bezüglich der mechanischen Eigenschaften aufweisen und untersuchten den Einfluss der Vernetzungszeit auf die Kristallhärte und den E-Modul.

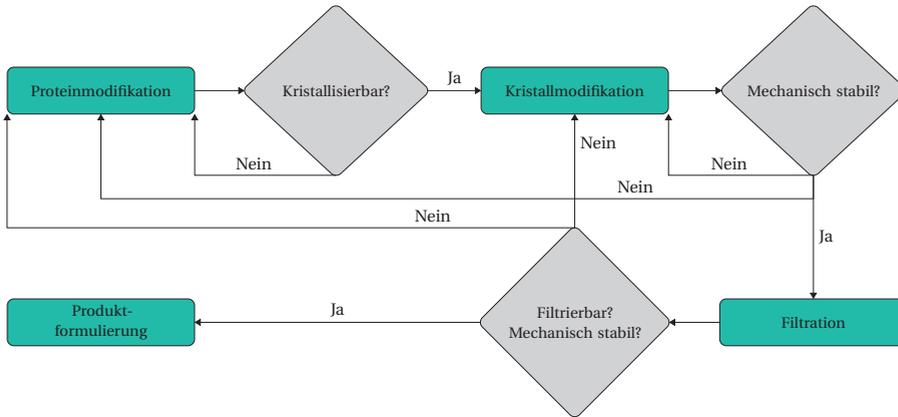


Abbildung 5.1: Prozessentwicklungsschritte für Proteinkristalle

Zur Charakterisierung der Filtration mit Standardlaborexperimenten nach VDI 2762 [6] sind üblicherweise mehrere Liter an Produktsuspension notwendig. Solche Mengen stehen bei Proteinen in der frühen Produktentwicklung wie der Protein- oder Kristallmodifikation in der Regel nicht zur Verfügung. Um der Filtration dennoch bereits früh in der Prozessentwicklung Beachtung zu schenken, bietet sich der verkleinerte experimentelle Aufbau mit der Filtrationszelle an [65]. Dieser erlaubt die Charakterisierung einer Suspension mit wenigen Millilitern. Abbildung 5.1 zeigt schematisch die Reihenfolge der verschiedenen Entwicklungsschritte bei der Herstellung neuer Proteinkristalle. Mit dem verkleinerten Filtrationsaufbau ist es möglich, die Filtration nicht erst ganz am Ende der Entwicklung zu beurteilen, sondern schon nach den jeweiligen Zwischenschritten. Damit wird erreicht, dass die Produktentwicklung insgesamt schneller und kostengünstiger durchführbar ist.

Zur Modellierung des Sedimentations- und des Filtrationsverhaltens bietet sich die Flussdichtefunktion an. Für die Sedimentation wurde diese Funktion von Kynch [18] eingeführt und von Tiller [15] für kompressible Sedimente erweitert. He et al. [87] analysierten und modellierten die gehinderte Sedimentation von scheibenförmigen Kolloiden. Sie stellten einen konzentrationsabhängigen Einfluss der Partikelorientierung auf die Sedimentationsgeschwindigkeit fest. Tiller [15] und Bürger et al. [21] veröffentlichten einen Ansatz, um die Flussdichtefunktion für Feststoffvolumenanteile oberhalb des Gelpunktes aus Permeabilitätsdaten zu berechnen. Der Gelpunkt beschreibt dabei den Übergang von einer Suspension zu

einem Haufwerk und ist in der Literatur auch als kritischer Feststoffvolumenanteil bezeichnet. Die Flussdichtefunktion ist nur vom Feststoffvolumenanteil abhängig und beschreibt das Sedimentations- und das Permeationsverhalten eines Partikelsystems. Eine besonders übersichtliche Zusammenfassung zur Flussdichtefunktion und zu den Prozessfunktionen ist Erk [14] und Gleiß [88] zu entnehmen.

5.2 Partikelsysteme

Betrachtet werden vier sich unterscheidende Partikelsysteme. Da Lysozym polymorph kristallisiert, sind je nach Prozessbedingungen verschiedene Kristallformen erzeugbar. Im Rahmen dieser Arbeit kommen isometrische, stäbchenförmige und nadelförmige Lysozymkristalle von Lysozym aus Hühnereiweiß sowie das kommerziell nicht verfügbare, rekombinante Protein ADH aus *Levilactobacillus brevis* zum Einsatz. Die isometrischen Lysozymkristalle sind über Verdrängungskristallisation, alle anderen Kristallformen über Vakuumverdampfungskristallisation nach Groß und Kind [59] hergestellt. Das Protein ADH wurde von Prof. Weuster-Botz und Mitarbeitern hergestellt und von Barros Groß und Kind [60] kristallisiert.³

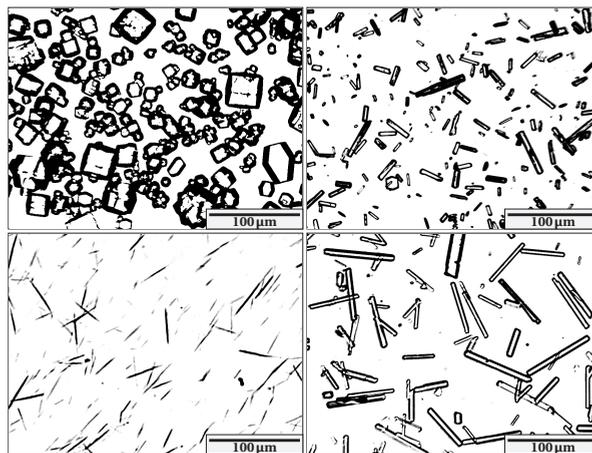


Abbildung 5.2: Mikroskopaufnahmen der betrachteten Kristallsysteme; Oben links: isometrische Lysozymkristalle, oben rechts: stäbchenförmige Lysozymkristalle, unten links: nadelförmige Lysozymkristalle, unten rechts: Alkoholdehydrogenasekristalle

³ Das Kristallinat wurde freundlicherweise für die Versuche überlassen.

Abbildung 5.2 zeigt Mikroskopaufnahmen der verschiedenen Kristallsysteme. Oben links sind isometrische, oben rechts stäbchenförmige und unten links nadelförmige Lysozymkristalle abgebildet. Die stäbchenförmigen ADH Kristalle sind unten rechts zu sehen.

Der Tabelle 5.1 sind die zugehörigen Stoffparameter für diese Kristallsysteme zu entnehmen. Für die Versuchsauswertung sind die Dichten und Viskositäten wichtig. Die Dichte für kristallines Lysozym ist Kundrot und Richards [89] entnommen. Die Bestimmung der Flüssigkeitsdichten und Viskositäten erfolgt mit einem Densitometer (Densito 30PX, Mettler Toledo) nach der Biegeschwingermethode. Zur Messung der Feststoffdichte für ADH dient das Gaspyknometer (MP 1305, Micromeritics GmbH). Die Analysezertifikate sind dem Anhang zu entnehmen.

Tabelle 5.1: Stoffparameter der verschiedenen Kristallsysteme

Partikelsystem	Feststoffdichte	Flüssigkeitsdichte	Dynamische Viskosität
	$\rho_s / \text{kg m}^{-3}$	$\rho_l / \text{kg m}^{-3}$	$\eta / \text{mPa s}$
Lysozym isometrisch	1236	1023	1,19
Lysozym stäbchenförmig	1236	1023	1,19
Lysozym nadelförmig	1236	1023	1,19
Alkoholdehydrogenase	1250	1026	1,92

Neben den Form- und Stoffparametern ist auch die PGV für das Sedimentations- und Filtrationsverhalten relevant. Zur Messung der Größenverteilungen kommt die Laserbeugung (Helos H0309, Sympatec) zum Einsatz. Die Auswertung der Partikelgrößen findet dabei immer anhand des Äquivalentdurchmessers einer volumengleichen Kugel statt. Dies führt für nadel- und stäbchenförmige Partikel zwangsläufig zu Abweichungen von der „realen“ Partikelgröße, weshalb die in Abb. 5.3 gezeigten Verläufe der PGV eher als qualitativ vergleichend zu verstehen sind. In Abb. 5.3 ist zu erkennen, dass die Partikeldurchmesser mit Ausnahme der nadelförmigen Kristalle in einem ähnlichen Größenbereich liegen. Die nadelförmigen Kristalle haben durchweg kleinere Partikeldurchmesser. Die Fehlerbalken in Abb. 5.3 zeigen hier den Minimal- und Maximalwert der Wiederholungsmessungen an.

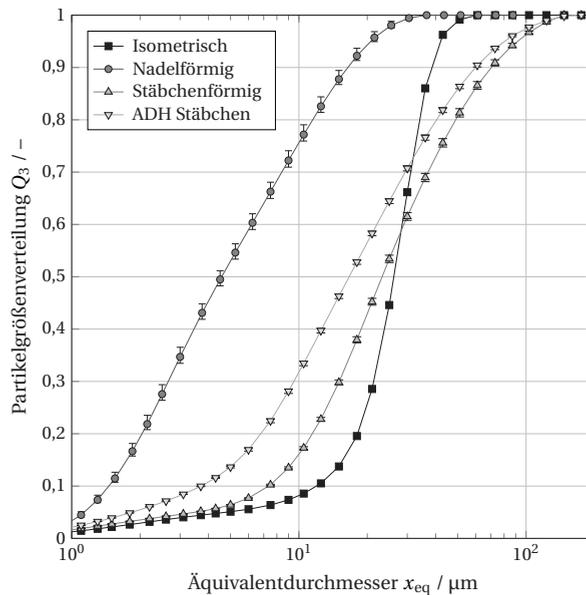


Abbildung 5.3: Summenverteilung der Partikelgrößen für die Kristallsysteme; gemessen mittels Laserbeugung

5.3 Permeation

5.3.1 Kuchenwiderstände

Mithilfe der Filtrationszelle findet die Messung der Kuchenwiderstände für die in Abschnitt 5.2 vorgestellten Partikelsysteme statt. Die Ergebnisse der Kuchenwiderstände sind in Abb. 5.4 dargestellt, wobei die linke Abbildung die massenspezifischen (Abb. 5.4a) und die rechte Seite die höhenspezifischen Widerstände (Abb. 5.4b) beinhaltet.

Abbildung 5.4a verdeutlicht, dass die isometrischen und die stäbchenförmigen Lysozymkristalle die geringsten Widerstände mit etwa $2,5 \times 10^{10}$ und $5 \times 10^{10} \text{ m kg}^{-1}$ aufweisen. Diese beiden Systeme zeigen auch nur eine schwach ausgeprägte Abhängigkeit des Kuchenwiderstands vom Druck, was auf eine geringe Kompressibilität hinweist. Bei den isometrischen Kristallen ist der höchste mögliche Druck bei $0,5 \times 10^5 \text{ Pa}$. Wegen des geringen Kuchenwiderstands läuft der Permeationsprozess so schnell ab, dass bei höheren Drehzahlen der Zentrifuge der gesamte Überstand bereits während des Anlaufvorgangs, vor Erreichen der finalen Drehzahl, den Kuchen durchströmt hat. Daher sind nur drei Datenpunkte dieser Messreihe abgebildet. Zum Vergleich sind Ergebnisse für dieselben Kristalle mit einer VDI 2762 [6] Labordrucknutsche dargestellt (Isometrisch DN). Die Übereinstimmung der Ergebnisse von der Filtrationsküvette und der Drucknutsche ist hoch, was die Eignung des verkleinerten

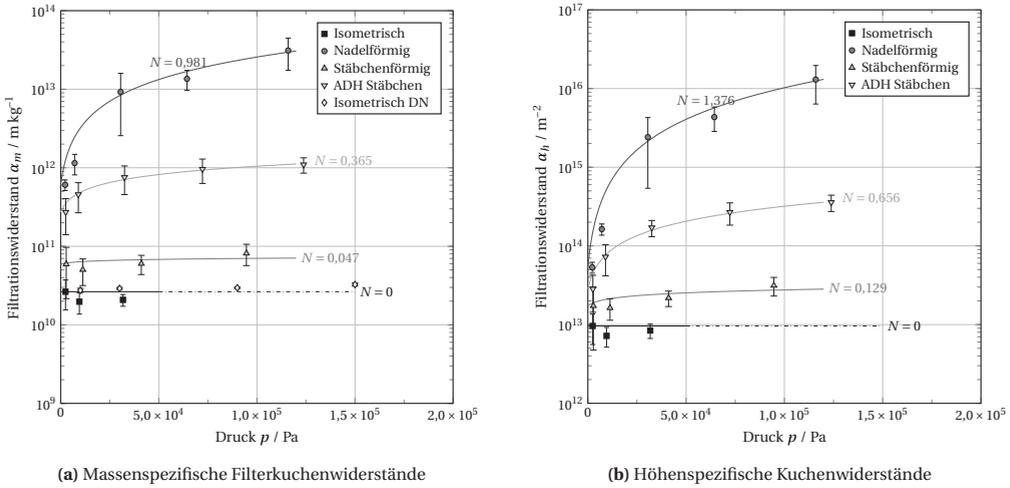


Abbildung 5.4: Filterkuchenwiderstände bei Permeation für die Partikelsysteme isometrisches, nadelförmiges und stäbchenförmiges Lysozym sowie für das Protein ADH

Filtrationsaufbaus für die Bestimmung des Kuchenwiderstands nochmals verdeutlicht. Auch wenn der Widerstand der stäbchenförmigen im Vergleich zu den isometrischen Kristallen erhöht ist, so haben doch beide Kristallsysteme einen vergleichsweise geringen Widerstand und sind leicht filtrierbar. Für stäbchenförmige ADH Kristalle liegt der Widerstand bereits eine Größenordnung höher und reicht von $2,7 \times 10^{10}$ – $1,1 \times 10^{12} \text{ m kg}^{-1}$. Hier ist eine Zunahme des Widerstands bei steigendem Druck zu beobachten. Das deutet auf kompressibles Materialverhalten und weniger effiziente Filtration hin.

Die nadelförmigen Kristalle zeigen den höchsten Widerstand im Bereich von $6,1 \times 10^{11}$ – $3,1 \times 10^{13} \text{ m kg}^{-1}$. Somit erstreckt sich der Widerstand über zwei Größenordnungen. Im Vergleich zu den anderen Kristallsystemen bedeutet das einen deutlich langsameren Filtrationsvorgang. Aufgrund der Zunahme des Widerstands bei höheren Drücken führen diese nicht zwangsläufig zu einer schnelleren Filtration. Eine Zunahme des Widerstands in dieser Größenordnung ist auf einen Zusammenbruch von Kartenhausstrukturen im Haufwerk, aber auch auf Partikelbruch zurückzuführen [7, 42].

Die durchgezogenen Linien zeigen Modellierungen des Filterkuchenwiderstands gemäß Gleichung (2.35) und den Anpassungsparameter N . Für die isometrischen Kristalle sind extrapolierte Werte als strichpunktierte Linie dargestellt. Es ist zu sehen, dass das Modell den Verlauf der Widerstände gut abbilden kann. Der Exponent N reicht von 0 für die isometrischen Kristalle bis zu Werten von 0,981 für die nadelförmigen Kristalle. Auch dies zeigt die großen Unterschiede hinsichtlich der Kompressibilität für die verschiedenen Haufwerke.

Zur Charakterisierung der Kompressibilität und auch für die Berechnung der Flussdichtefunktion findet in der Literatur häufig der in Abb. 5.4b dargestellte höhenspezifische Kuchenwiderstand Anwendung. Bei geringeren Drücken liegen in dieser Auftragung die Widerstände näher beieinander, aber der weitere Verlauf und die Tendenz sind sehr ähnlich. Um die Kompressibilität zu beurteilen, ist der Exponent N aus Gleichung (2.35) für den höhenspezifischen Widerstand ein wichtiges Kriterium [90]. Dieser reicht in diesem Fall von 0 für isometrische bis zu 1,376 für nadelförmige Lysozymkristalle.

5.3.2 Entwicklung der Kuchenhöhen

Die Filterkuchenhöhe der Kristallsysteme ist direkt aus den Messungen mit der Filtrationszelle bestimmbar, da der Filterkuchen ein charakteristisches Signal im Transmissionsspektrum aufweist [65].

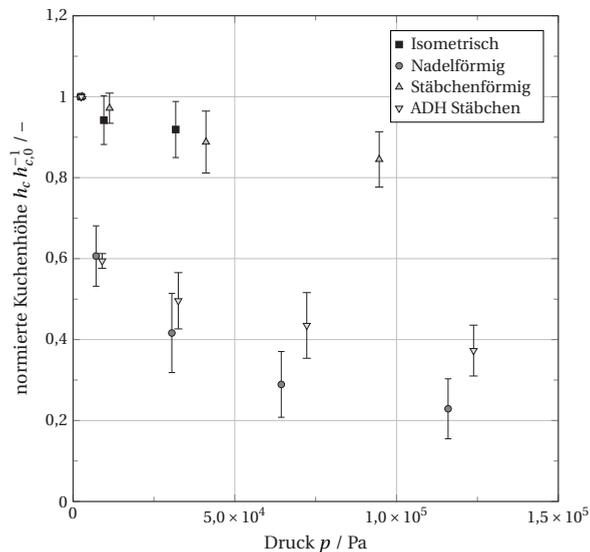


Abbildung 5.5: Normierte Filterkuchenhöhen für die drei Lysozymkristallsysteme und ADH

Abbildung 5.5 stellt die mit der Ausgangshöhe normierten Kuchenhöhen in Abhängigkeit des Filtrationsdrucks dar. Es ist zu sehen, dass bei den stäbchenförmigen Lysozymkristallen eine Tendenz zur Abnahme der Kuchenhöhe bei steigendem Druck auftritt. Bei den stäbchenförmigen ADH Kristallen ist ein ähnliches Verhalten vorhanden, das aber stärker ausgeprägt ist. Am deutlichsten ist die Abnahme der Kuchenhöhe bei den nadelförmigen Lysozymkristallen zu sehen. Für dieses Kristallsystem nimmt die Kuchenhöhe von 1,8 mm bei $0,22 \times 10^5$ Pa auf

0,39 mm bei $1,16 \times 10^5$ Pa ab. Das entspricht einer Reduktion der ursprünglichen Kuchenhöhe um 79 %.

Der Verlauf der Kurven aus Abb. 5.5 bestätigt die bereits zuvor sichtbare Tendenz der Kompressibilität aus den Verläufen des Kuchenwiderstands in Abb. 5.4. Die isometrischen Lysozymkristalle zeigen eine nur schwach ausgeprägte Kompressibilität und eine entsprechend geringe Abnahme der Kuchenhöhe. Bei den stäbchenförmigen Lysozymkristallen verhält sich die Kompressibilität ähnlich. Die deutlich stärkere Abnahme der Kuchenhöhe bei den stäbchenförmigen ADH Kristallen und bei den nadelförmigen Lysozymkristallen spricht für eine hohe Kompressibilität.

5.3.3 Berechnung des Feststoffvolumenanteils

Aus der Information der druckabhängigen Kuchenhöhe lässt sich der entsprechende Feststoffvolumenanteil berechnen. Die dabei zugrunde liegende Annahme ist, dass das Filtermittel alle Partikel zurückhält. Zudem ist die Kenntnis der Ausgangskonzentration der Suspension notwendig. Die Berechnung erfolgt mittels Gleichung (4.71). Es handelt sich dabei um den durchschnittlichen Feststoffvolumenanteil. Der lokale Feststoffvolumenanteil ist über eine Höhenbestimmung nicht zugänglich.

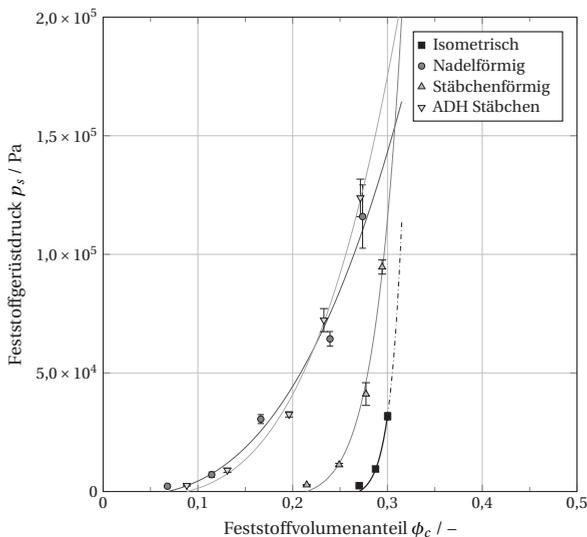


Abbildung 5.6: Feststoffgerüstdruck in Abhängigkeit des Feststoffvolumenanteils

Abbildung 5.6 zeigt den Druck in Abhängigkeit der Feststoffvolumenanteile für die diskutierten Kristallsysteme. Die zwei kompressiblen Systeme nadelförmiges Lysozym und ADH weisen einen moderaten Anstieg des Drucks mit zunehmendem Feststoffvolumenanteil auf. Für die beiden anderen Kristallsysteme ist dieser Anstieg deutlich steiler. Bei einem ideal inkompressiblen System käme es zu einem sprunghaften Anstieg des Druckes in der Nähe des Gelpunkts.

Die durchgezogenen Linien sind analog zu Abb. 5.4 modellierte Verläufe, die aus Gleichung (2.37) resultieren. Die berechneten Verläufe können die Messergebnisse gut wiedergeben. Im Falle der isometrischen Lysozymkristalle zeigt die strichpunktierte Linie den extrapolierten Verlauf. Mit der Summe der Exponenten aus Gleichung (2.35) und Gleichung (2.37) ist nach Alles und Anlauf [90] eine Bewertung und Klassifizierung hinsichtlich der Kompressibilität möglich. Die Zahlenwerte für die Exponenten N und b sind in Tabelle 5.2 aufgelistet.

Tabelle 5.2: Exponenten der Modelle von Tiller und Kwon [13] aus den Gleichungen (2.35) und (2.37)

Kristallsystem	$N(\alpha_h)$	b	$N(\alpha_h) + b$
Isometrisch	0	0,038	0,04
Nadelförmig	1,376	0,356	1,73
Stäbchenförmig	0,129	0,089	0,22
ADH	0,656	0,288	0,94

Gemäß Alles und Anlauf [90] und Tiller und Hsyung [91] sind Haufwerke, die eine Exponentensumme von null haben, ideal inkompressibel. Für Werte zwischen null und eins wird das Haufwerk als kompressibel, zwischen eins und zwei als hochkompressibel und für Werte über zwei als superkompressibel bezeichnet. Basierend darauf ist der Filterkuchen aus isometrischen Lysozymkristallen als inkompressibel einzustufen. Das Haufwerk aus stäbchenförmigen Lysozymkristallen ist schwach kompressibel mit einer Summe von 0,22. Das Kristallsystem ADH ist kompressibel mit einem Wert von 0,94. Die höchste Kompressibilität zeigen die nadelförmigen Lysozymkristalle mit einer Summe von 1,73. Dieses System ist somit hoch kompressibel und schon nahe an der Superkompressibilität.

Die durchgeführten Experimente verdeutlichen, dass die Kristallform und die PGV einen sehr hohen Einfluss auf die Filtrierbarkeit ausüben. Das beste Filtrationsergebnis erzielen die isometrischen und stäbchenförmigen Lysozymkristalle, da sie einerseits einen geringen Widerstand und andererseits einen hohen Feststoffvolumenanteil aufweisen. Der geringe Widerstand bewirkt eine schnelle Filtration und der hohe Feststoffvolumenanteil eine geringere Restfeuchte im Filterkuchen und eine einfachere Entfeuchtung. Nadelförmiges Lysozym

und ADH auf der anderen Seite bilden kompressible Filterkuchen, haben hohe Widerstände und vergleichsweise geringe Feststoffvolumenanteile. Das wirkt sich negativ auf die Filtrationsdauer und die Entfeuchtung des Filterkuchens aus. Auftretender Kristallbruch verändert die PGV und somit die eingestellten Partikeleigenschaften wie beispielsweise das Auflösungsverhalten der Kristalle.

5.4 Sedimentation

Die Sedimentationsanalyse erfolgt für die stäbchenförmigen Lysozymkristalle im Erdschwerefeld und für die nadelförmigen Lysozymkristalle im Zentrifugalfeld. Die verfügbare Menge des Proteins ADH ist zu gering, um das Sedimentationsverhalten zu studieren. Die Suspension aus isometrischen Kristallen bildet auch bei hohen Feststoffvolumenanteilen keinen klaren Trennspiegel aus. Deshalb ist hier keine eindeutige Bestimmung der Sedimentationsgeschwindigkeit möglich. Im Erdschwerefeld erfolgt die Sinkgeschwindigkeitsbestimmung in einer Küvette mit Messung der Transmission über die Küvettenhöhe. Im Zentrifugalfeld ist die Vorgehensweise analog. Hier findet die Messung in einer optischen Zentrifuge statt. Die Küvetten enthalten Suspension mit unterschiedlichen initialen Feststoffvolumenanteilen. Über die Beobachtung der zeitlichen Veränderung des Trennspiegels entlang der Küvettenhöhe ist dann die Sedimentationsgeschwindigkeit in Abhängigkeit des Feststoffvolumenanteils bestimmbar. Um die Ergebnisse vergleichbar zu machen, ist es zweckmäßig, die Sinkgeschwindigkeit aus dem Zentrifugalfeld in die Geschwindigkeit im Erdschwerefeld mit der relativen Zentrifugalbeschleunigung über Gleichung (3.63) umzurechnen.

Abbildung 5.7 zeigt auf der linken Seite die Sedimentationsgeschwindigkeiten für stäbchen- und nadelförmige Lysozymkristalle bei verschiedenen Feststoffvolumenanteilen. Auf der rechten Seite der Abb. 5.7 ist der Verlauf der nadelförmigen Kristalle vergrößert dargestellt. Bei beiden Stoffsystemen verringert sich die Sedimentationsgeschwindigkeit mit zunehmendem Feststoffvolumenanteil. Im Fall der stäbchenförmigen Kristalle beträgt die maximale Sinkgeschwindigkeit $17,7 \times 10^{-6} \text{ m s}^{-1}$ für den geringsten Feststoffvolumenanteil von 0,003. Die Sinkgeschwindigkeit nimmt dann rasch auf Werte um $4,0 \times 10^{-6} \text{ m s}^{-1}$ für Feststoffvolumenanteile oberhalb von 0,014 ab und fluktuiert um diesen Wert bis zu Feststoffvolumenanteilen von 0,146.

Im Gegensatz dazu ist bei den nadelförmigen Lysozymkristallen die Abnahme der Sinkgeschwindigkeit deutlich stärker ausgeprägt. Die Ausgangssinkgeschwindigkeit beträgt etwa $1,45 \times 10^{-6} \text{ m s}^{-1}$ bei einem initialen Feststoffvolumenanteil von 0,0004. Die Sinkgeschwindigkeit verringert sich dann stark auf einen Endwert von $0,001 \times 10^{-6} \text{ m s}^{-1}$ bei einem Feststoffvolumenanteil von 0,038. Die geringste Sinkgeschwindigkeit der Lysozymstäbchen tritt

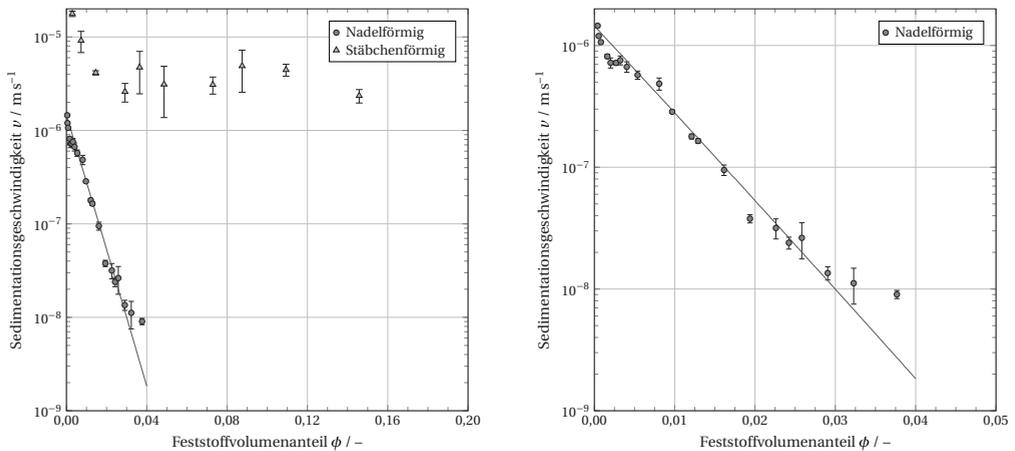


Abbildung 5.7: Sedimentationsgeschwindigkeiten für stäbchen- und nadelförmige Lysozymkristalle; Auf der rechten Seite ist der Verlauf der nadelförmigen Kristalle vergrößert gezeigt.

bei einem Feststoffvolumenanteil von 0,003 auf. Die entsprechende Sedimentationsgeschwindigkeit der nadelförmigen Kristalle bei diesem Feststoffvolumenanteil ist $0,74 \times 10^{-6} \text{ m s}^{-1}$. Das sind lediglich 4,1 % der Sinkgeschwindigkeit der Stäbchen bei dem gleichen Feststoffvolumenanteil.

Die Abnahme der Sedimentationsgeschwindigkeit ist in beiden Fällen durch gehinderte Sedimentation innerhalb des Partikelkollektivs erklärbar. Bei sehr kleinen Feststoffvolumenanteilen liegt die Einzelkornsedimentation nach Stokes vor. Der maximale Feststoffvolumenanteil, der durch Konzentration der Ausgangssuspension erreichbar ist, liegt bei den stäbchenförmigen Kristallen bei 0,146 und ist damit fast viermal so groß wie bei den nadelförmigen Kristallen (0,038). Das zeigt sich auch bei den großen Unterschieden der Feststoffvolumenanteile im Haufwerk aus Abb. 5.6. Der Gelpunkt des nadelförmigen Lysozymkristallsystems ist daher kleiner als bei den stäbchenförmigen Kristallen. Die Verringerung der Sinkgeschwindigkeit ist für das nadelförmige Lysozym mit einem Faktor von 161 größer als für die stäbchenförmigen Kristalle. Für diese findet lediglich eine Reduktion um den Faktor von 7,5 statt. Der Einfluss des Feststoffvolumenanteils auf die Sinkgeschwindigkeit ist daher bei den nadelförmigen Kristallen deutlich stärker ausgeprägt.

Die durchgezogene Linie in Abb. 5.7 zeigt die Modellierung mit einem modifizierten Richardson und Zaki [12] Ansatz nach Gleichung (2.34). Die Bestimmung des Exponenten erfolgt durch Anpassung an die Messdaten und beträgt hier 163,4. Das ist deutlich höher als bei dem klassischen Richardson und Zaki [12] Modell, jedoch sind hier auch einige Grundannahmen des Originalmodells nicht erfüllt. Richardson und Zaki [12] gehen von monodispersen kugelförmigen Partikeln in schleichender Umströmung aus, was in diesem Fall nur eingeschränkt

zutritt. Die Abweichung von der Geradenform bei den letzten Datenpunkten in Abb. 5.7 rechts deutet den Kompressionspunkt an. Es ist daher zu vermuten, dass der Gelpunkt im Bereich zwischen 0,03–0,036 liegt.

Bei der Verwendung von stäbchenförmigen Partikeln ist es aufgrund der fluktuierenden Geschwindigkeiten im Bereich des Feststoffvolumenanteils von 0,04–0,147 nicht möglich, ein Modell nach Richardson und Zaki [12] oder He et al. [87] anzupassen. Eine mögliche Erklärung dafür ist das Vorliegen eines unorientierten und zufällig verteilten Partikelkollektivs bei geringen Feststoffvolumenanteilen, das bei höheren Konzentrationen aufgrund von sterischer Hinderung in eine bestimmte Partikelorientierung gezwungen wird. He et al. [87] zeigten einen ähnlichen Effekt bei der Modellierung der Sinkgeschwindigkeit von scheibenförmigen Partikeln.

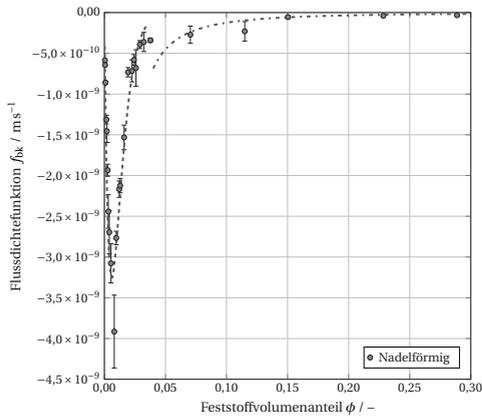
5.5 Berechnung der Flussdichtefunktion

Aus den zuvor ermittelten Ergebnissen ist die Flussdichtefunktion für die kompressiblen Stoffsysteme darstellbar. Durch Einsetzen der Modelle von Richardson und Zaki [12] und Tiller und Kwon [13] in Gleichung (2.52) ergibt sich

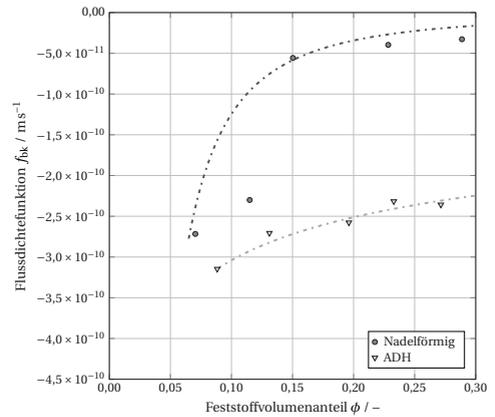
$$f_{bk} = \begin{cases} -v_{St}\phi(1-\phi)^N & 0 \leq \phi < \phi_g \\ -\frac{\Delta\rho g\phi^2}{\alpha_0\left(\frac{\phi}{\phi_0}\right)^{\frac{N}{\beta}}\eta} & \phi_g \leq \phi. \end{cases} \quad (5.72)$$

Für den kompletten Bereich des Feststoffvolumenanteils ist die Flussdichtefunktion nur für die nadelförmigen Lysozymkristalle gegeben, da hier Messdaten im Sedimentations- und im Durchströmungsbereich verfügbar sind. Der Verlauf dieser Flussdichtefunktion ist in Abb. 5.8a vollständig dargestellt. Die gestrichelte Linie in Abb. 5.8a zeigt das modifizierte Richardson und Zaki [12] Modell aus Gleichung (5.72). Die strichpunktierte Linie aus Abb. 5.8a entspricht dem Modell von Tiller und Kwon [13] für Feststoffvolumenanteile oberhalb des Gelpunkts aus den Permeationsdaten.

Abbildung 5.8b stellt die Flussdichtefunktion für Feststoffvolumenanteile oberhalb des Gelpunkts für die nadelförmigen Lysozymkristalle und die stäbchenförmigen ADH Kristalle aus den Permeationsdaten dar. Wie aus der Abbildung zu ersehen, ist die Flussdichte für die ADH Kristalle deutlich kleiner als für die nadelförmigen Kristalle, was auf die höhere Permeabilität des ADH Filterkuchens zurückzuführen ist. Das Modell gibt die gemessenen Datenpunkte gut wieder. Eine Ausnahme ist der zweite Punkt bei den nadelförmigen Lysozymkristallen,



(a) Flussdichtefunktion für nadelförmige Lysozymkristalle



(b) Flussdichtefunktion für nadelförmige Lysozym- und stäbchenförmige ADH-Kristalle bei Permeation

Abbildung 5.8: Flussdichtefunktionen für nadelförmige Lysozymkristalle und stäbchenförmige ADH-Kristalle

der etwas überschätzt wird. Hier sind aber auch Bruchvorgänge im Haufwerk nicht auszuschließen, sodass aus diesem Grund eine Abweichung vom modellierten Verhalten möglich ist.

5.6 Schlussfolgerungen

Die Detektion des Sedimentations- und Permeationsverhaltens für verschiedene Proteinkristalle ist mit einer optischen Zentrifuge und einem verkleinerten Filtrationsaufbau mit geringem Probeneinsatz möglich. Der verkleinerte Aufbau erlaubt es, bereits früh in der Produkt- und Prozessentwicklung den Fest-Flüssig Trennschritt zu charakterisieren und zu bewerten. Damit erfolgt neben der Verringerung der Entwicklungszeit auch das Einsparen von Ressourcen. Für die untersuchten Systeme zeigt sich ein großer Einfluss der Kristallform und PGV auf die Sedimentationsgeschwindigkeit sowie auf die Kompressibilität und Permeabilität der entsprechenden Filterkuchen. Aus den gemessenen Daten sind in einem ersten Schritt Prozessfunktionen zur Beschreibung der Kompressibilität und der Sedimentationsgeschwindigkeit ableitbar. Das Zusammenführen dieser Prozessfunktionen zur Flussdichtefunktion erlaubt es, die Sedimentation, den Haufwerksaufbau und die Permeation allein als Funktion des Feststoffvolumenanteils zu beschreiben.

Vor allem die isometrischen und stäbchenförmigen Lysozymkristalle zeigen in Bezug auf die FFT wünschenswerte Eigenschaften. Zum einen sind die Kuchenwiderstände vergleichsweise gering, was eine schnelle Filtration ermöglicht. Zum anderen sind die Feststoffvolumenanteile im Haufwerk höher und demzufolge ist weniger Restfeuchte im Filterkuchen enthalten. Ebenfalls vorteilhaft ist ein im betrachteten Druckbereich nahezu inkompressibles Materialverhalten. Die stäbchenförmigen ADH Kristalle und die nadelförmigen Lysozymkristalle zeigen kompressibles Materialverhalten und haben sowohl höhere Widerstände als auch geringere Feststoffvolumenanteile im Filterkuchen.

6 Übertragung auf einen integrierten Apparat⁴

In diesem Kapitel steht die Übertragung der gewonnenen Erkenntnisse hinsichtlich des Material- und Filtrationsverhaltens auf einen quasi-kontinuierlichen und integrierten Apparat im Labormaßstab im Vordergrund. Dazu ist es zum einen notwendig, die Kristallisation des Proteins auf einen neuen Apparat zu übertragen und zum anderen mit den Ergebnissen der bereits vorgestellten Filtrationszelle die Filtration auf diesem Apparat auszulegen. Das Ziel ist, Kristalle quasikontinuierlich mit ähnlicher PGV und Form wie im Batchverfahren herzustellen. Da die Produktion, Reifung und Filtration auf demselben Apparat erfolgt, ist auch die FFT ausführlich zu untersuchen, um Inhomogenitäten im Filterkuchen und ein mögliches Verblocken des Filtermediums zu detektieren oder auszuschließen.

6.1 Stand der Technik

Die Kristallisation von Proteinen dient zumeist der Strukturaufklärung per Röntgenbeugung. In solchen Fällen steht das Erzeugen möglichst perfekter und großer Einkristalle im Vordergrund, die sich zum Beispiel nach der Hanging-Drop-Methode produzieren lassen. Um jedoch die Kristallisation als Aufarbeitungsschritt zu nutzen, ist es erforderlich, viele Kristalle reproduzierbar herzustellen. Es stehen nicht so sehr die Einzelkristalle im Vordergrund, sondern die Anforderung, viel Kristall mit einer bestimmten PGV und Kristallform herzustellen. Die Kristallisationslösung enthält dabei häufig auch Verunreinigungen, die aber den Kristallisationsprozess nicht nachteilig beeinflussen dürfen. Für diese Aufgabe sind neue Apparatkonzepte und Vorgehensweisen vonnöten.

Eine Herausforderung bei der Kristallisation von Proteinen ist ihre Empfindlichkeit gegenüber hohen Temperaturen und Schwankungen des pH-Werts oder der Ionenstärke. Verändern sich

⁴ Teile dieses Kapitels sind in Dobler et al. (2021) [92] veröffentlicht

diese Parameter zu stark, denaturiert das Protein. Bei diesem Vorgang geht die funktionsgebende Tertiärstruktur des Proteins irreversibel verloren. Im Gegensatz zur analytischen Kristallisation für die Gewinnung von Einkristallen ist bei der präparativen Kristallisation die Verdrängungskristallisation weit verbreitet [71, 93]. Bei diesem Verfahren verringert die Zugabe eines Verdrängungsmittels die Löslichkeit des Proteins und erzeugt damit die initiale Übersättigung für die Kristallisation. Diese Vorgehensweise hat jedoch einige Nachteile. Wegen der Zugabe des Verdrängungsmittels, das im Allgemeinen aus Salzen, organischen Lösemitteln oder Polymeren besteht, findet immer auch eine Verdünnung des Kristallisationsansatzes statt. Deshalb sind die erreichbaren Kristallkonzentrationen limitiert. Weiterhin ist dieses Verfahren nicht einfach zu skalieren. Die Konzentration des Präzipitantes ist nach oben hin limitiert, da zu hohe Salzkonzentrationen das Protein denaturieren. Außerdem entstehen an der Stelle, an der die Fällungslösung den Kristallisationsansatz erreicht, lokal hohe Übersättigungen, die das Erzielen einer engen PGV erschweren und zu Präzipitat führen können. [59] Alternative Verfahren wie die Kühlungskristallisation oder die Verdampfungskristallisation sind wegen der erforderlichen Temperaturen bei Proteinen bis auf wenige Ausnahmen nicht nutzbar. Groß und Kind [59] entwickelten daher ein Niedertemperaturkristallisationsverfahren, das sich auch für thermisch empfindliche Produkte einsetzen lässt und gleichzeitig das Problem der lokalen hohen Übersättigungen vermeidet. Ein weiterer Vorteil besteht in der höheren Konzentration an Kristallinat, was einen nachgelagerten FFT Schritt vereinfacht. Das Funktionsprinzip beruht auf einer Reduktion der Siedetemperatur durch ein angelegtes Vakuum.

Stand der Technik bei der Vakuumkristallisation von Proteinen ist die Produktion in Batches. Diese Verfahrensweise hat gegenüber einer kontinuierlichen Produktionsweise jedoch einige Nachteile. Diese sind laut Löbnitz [25] und Behr et al. [94] beispielsweise die Rüst- und Reinigungszeiten zwischen den einzelnen Batches, in denen keine Produktion erfolgt. Außerdem sind An- und Abfahrprozesse energieintensiv. Vorteile einer kontinuierlichen Produktionsweise sind dagegen eine konstantere Produktqualität, höhere Produktionskapazität und einfacher zu kontrollierende Prozessbedingungen [94–96].

Konventionelle Produktionsanlagen zeichnen sich dadurch aus, dass die Durchführung fast jeder Grundoperation auf einem eigenen Apparat stattfindet. Das erfordert Transportvorrichtungen wie Pumpen und Rohrleitungen sowie Zwischentanks, aber erhöht auch den Platzbedarf und die Gefahr von Kontamination bei dem Produkttransfer [97]. Gerade in der Lebensmitteltechnik und in der Pharmazie ist die Vermeidung von Produktkontamination von höchster Relevanz. Aus diesen Gründen ist die Industrie bestrebt, eine Integration ihrer Anlagen herbeizuführen. Das bedeutet das Zusammenführen mehrerer Grundoperationen auf einem Apparat, was das Überführen von Produkt und die Zwischenlagerung obsolet macht. [25] Beispiele für integrierte Apparate sind der Titus-Nutschen-Trockner [98], Konfiflro

[99], die integrierte Filtration, Trocknung und mechanische Bearbeitung von Wirkstoffen [100] sowie der Bandkristallisor [97]. Letzterer arbeitet quasi-kontinuierlich, nutzt als Basis einen Taktbandfilter und kombiniert darauf die Verfahrensschritte der Kühlungskristallisation, der FFT und der Kontakttrocknung. Der Apparat ist modular aufgebaut und daher einfach an verschiedene Prozessbedingungen anpassbar. Die funktionellen Einheiten für die verschiedenen Grundoperationen sind modular, aber ortsfest auf der Unterseite des Filtertuchs lokalisiert und ermöglichen die Temperierung oder die Filtration. Somit ist das Band in unterschiedliche Zonen für die jeweilige Grundoperation aufgeteilt. Auf der Oberseite des Filtertuchs befinden sich Verfahrensräume, in denen die Lösung oder Suspension vorliegt. Diese bewegen sich gemeinsam mit dem Filtertuch und durchschreiten die Verfahrenszonen.

Das existierende Apparatekonzept von Dobler et al. [97] erlaubt die quasi-kontinuierliche und integrierte Produktion von Kristallisat. Das dabei zum Einsatz kommende Verfahren der Kühlungskristallisation ist jedoch für die meisten Proteine nicht geeignet. Ziel ist es daher, das von Groß und Kind [59] etablierte Verfahren der Vakuumverdampfungskristallisation im Batch auf den integrierten Apparat von Dobler et al. [97] zu übertragen. Dabei sollen Kristalle mit ähnlichen Eigenschaften wie im Batch entstehen und die FFT nicht nachteilig beeinflusst werden.

6.2 Konstruktive Umsetzung

Die detaillierte konstruktive Umsetzung zur Übertragung der Vakuumverdampfungskristallisation ist in Dobler et al. [92] dargestellt und daher im Folgenden nur kurz skizziert. Die neue Hauptkomponente besteht in einem nach oben geschlossenen Vakuumbehälter, der den bisherigen Batchrührkessel ersetzt und auf der Oberseite des Filtermediums angebracht ist. Dieser Behälter bewegt sich zusammen mit dem Filterband durch die Verfahrenszonen. In den Vakuumbehälter ist eine Temperatursonde zur Steuerung und Überwachung der Verdampfung sowie ein Rührwerkzeug für die Durchmischung eingebracht. Um den Behälter zu evakuieren, ist ein Anschluss für die Vakuumpumpe und eine vorgeschaltete Kühlfalle vorgesehen. Die notwendige Wärmezufuhr ist über die bereits vorhandenen Temperiermodule auf der Unterseite des Filterbands realisiert. Die Abdichtung des Vakuumbehälters zum Filtermedium ist über eine Flachdichtung und durch auf das Filterband aufgebrachtes Flüssiggummi gewährleistet.

Auf dem integrierten Apparat sind drei Verfahrenszonen umgesetzt. In der ersten Zone findet die Verdampfung der kontinuierlichen Phase unter Wärmezufuhr statt. Nachdem die vorgesehene Menge an Lösemittel verdampft ist, schließt eine Reifezone an. In diesem Bereich liegt

weiter Vakuum an, der Druck ist hier aber deutlich oberhalb des Dampfdrucks, um ein weiteres Verdampfen des Lösemittels zu verhindern. Die Temperatur in der Reifezone entspricht der Temperatur bei der Verdampfung. Diese Zone dient dem Kristallwachstum und dem Abbau der Übersättigung. Die Filtration findet in der dritten Zone über eine Vakuumfiltration statt. Im Vakuumbehälter herrscht in diesem Bereich Normaldruck, während das Vakuum an der Unterseite des Filterbands über ein Filtrationsmodul erzeugt wird.

6.3 Prozesstransfer

Die Übertragung der Vakuumverdampfungskristallisation auf den quasi-kontinuierlichen Apparat erfolgt in mehreren Schritten. Diese Schritte sind

1. Übertragung vom Batch in den neuen Verfahrensraum
2. Übertragung der Filtration aus dem Kleinstmaßstab auf den Labormaßstab
3. Ersetzen der Membran durch ein Filtertuch
4. Übertragung auf das integrierte Apparatekonzept im Labormaßstab.

Durch diese schrittweise Vorgehensweise ist eine erfolgreiche Übertragung bei Beibehaltung der Kristalleigenschaften für jeden Schritt individuell überprüf- und gegebenenfalls korrigierbar.

6.3.1 Übertragung vom Batch in den neuen Verfahrensraum

Zur Überprüfung der Eignung des neuartigen Verfahrensraums für eine gleichbleibende Qualität der Kristalle bei apparaturbedingt leicht unterschiedlichen Bedingungen dient die Herstellung isometrischer und stäbchenförmiger Lysozymkristalle. Die Prozesswege sind analog zu Abb. 3.9a für die isometrischen, beziehungsweise wie in Abb. 3.9b für die stäbchenförmigen Kristalle gewählt. Der in dem Verfahrensraum vorherrschende Druck ist geregelt, wodurch sich die entsprechende Siedetemperatur ergibt. Die Durchmischung erfolgt mit einem Rührwerkzeug bei 300 min^{-1} . Es ist eine Verdampfungsrate von 25 gh^{-1} angestrebt, um eine vergleichbare Übersättigungsrate zu erhalten.

Abbildung 6.1 zeigt die aus Mikroskopaufnahmen ermittelte PGV der entstandenen Kristalle. Zum Vergleich sind auch die Verteilungen für im klassischen Batchverfahren hergestellte Kristalle eingezeichnet. In Abb. 6.1a ist das Ergebnis für die bei 24°C hergestellten isometrischen Kristalle dargestellt. Es ist deutlich zu sehen, dass die isometrischen Kristalle etwas kleinere

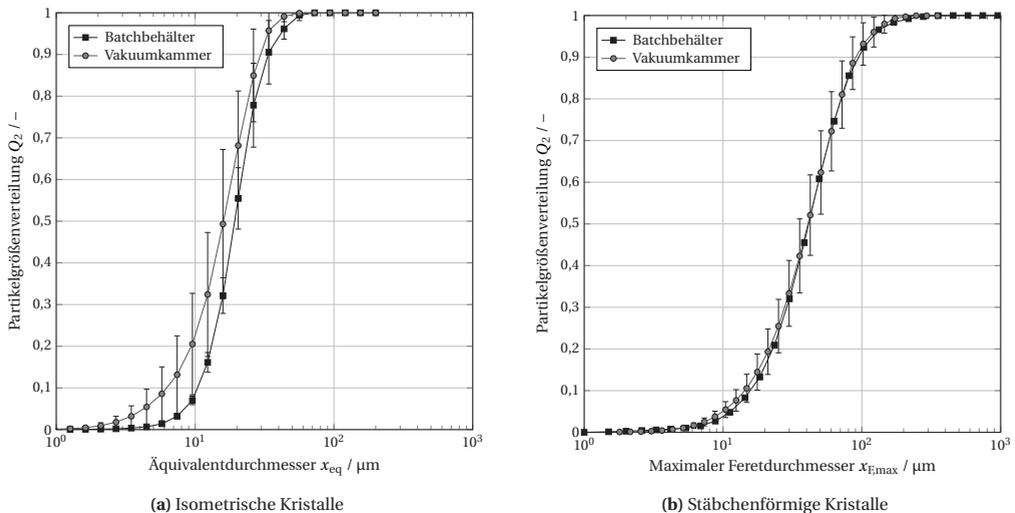


Abbildung 6.1: Partikelgrößenverteilungen für im Batchverfahren sowie in der neuen Vakuumkammer hergestellte isometrische und stäbchenförmige Lysozymkristalle

Äquivalentdurchmesser aufweisen. Zudem ist die Streuung der erhaltenen PGV deutlich größer. Im Batch liegt der Mediandurchmesser bei $19,63 \pm 1,41 \mu\text{m}$ und der zugehörige span beträgt $1,18 \pm 0,21$. Im Vergleich dazu ist der Mediandurchmesser in der Vakuumkammer $17,42 \pm 3,61 \mu\text{m}$ und der span $1,21 \pm 0,16$. Die geringere Reproduzierbarkeit bei den Kristallen aus der Vakuumkammer ist auf die Bildung von Agglomeraten und auf den Verzicht von Impfkristallen zurückzuführen. Seeding bezeichnet die Zugabe einer definierten Masse von Kristallinat, um die Größe der entstehenden Kristalle zu beeinflussen. Mit dieser Technik ist es möglich, die PGV zu steuern. [101] Um jedoch die Übertragung simpel zu halten und um auf zuvor hergestelltes Kristallinat verzichten zu können, ist das Seeding für Ansätze im Vakuumbehälter nicht vorgesehen und auch kein Zugabeport realisiert.

Abbildung 6.1b zeigt die entsprechenden PGV für die bei 35°C hergestellten stäbchenförmigen Kristalle. Hier erfolgt die Auftragung über dem maximalen Feretdurchmesser, da dies für längliche Partikel ein geeigneteres Maß darstellt. Es ist deutlich zu sehen, dass bei diesem Partikelsystem die PGV zwischen dem Batchbehälter und der Vakuumkammer kaum zu unterscheiden ist. Lediglich die Streuung der einzelnen Versuche ist etwas größer, was wie bei den isometrischen Kristallen auf den Verzicht von Seeding zurückzuführen ist. Der Mediandurchmesser liegt bei $41,40 \pm 0,22 \mu\text{m}$ im Batchverfahren und bei $41,76 \pm 7,56 \mu\text{m}$ in der Vakuumkammer. Die Verteilungsbreiten betragen $1,89 \pm 0,02$ im Batch und $1,81 \pm 0,19$ in der Vakuumkammer. Ein Erklärungsansatz für die bessere Übereinstimmung ist die etwas

einfachere Prozesskontrolle aufgrund der höheren Siedetemperatur bei den stäbchenförmigen Kristallen. Die Kinetik des Kristallwachstums ist zudem etwas geringer als bei den isometrischen Kristallen, was der Bildung von Aggregaten entgegenwirkt.

Somit zeigt sich, dass sich der Prozess von einem klassischen Batchkristallisator auf die Vakuumkammer übertragen lässt. Insbesondere bei den stäbchenförmigen Kristallen ist die Übereinstimmung der PGV sehr gut. Die isometrischen Kristalle haben kleinere Partikelgrößen bei der Produktion in der Vakuumkammer. Im nächsten Schritt ist zu überprüfen, wie sich die Filtrationseigenschaften der Kristalle unterscheiden. Dazu dienen Filtrationsexperimente mit den Kristallen aus der Vakuumkammer mit einer VDI 2762 [6] Drucknutsche und der Vergleich mit Daten aus der Filtrationszelle von Radel et al. [65]. Idealerweise zeigt sich kein Unterschied im Filterkuchenwiderstand. Dies ist vor allem für die stäbchenförmigen Kristalle aufgrund der ähnlichen PGV zu erwarten. Bei den isometrischen Kristallen ist, wegen der geringeren Partikelgrößen bei den Kristallen aus der Vakuumkammer, ein Anstieg des Widerstands plausibel.

6.3.2 Übertragung der Filtration

Die Untersuchung der Filtrationseigenschaften findet mit einer VDI 2762 [6] Drucknutsche statt. Die Kristalle werden dazu in der Vakuumkammer hergestellt und anschließend als Suspension in die Drucknutsche überführt und filtriert. Die Bestimmung des Kuchenwiderstands findet dann analog zur Filtrationszelle durch Permeation mit Überstand bei verschiedenen Druckstufen statt. Als Benchmark dienen die mit der Filtrationszelle erzielten Widerstände von Kristallen aus dem klassischen Batchverfahren.

Die Ergebnisse für isometrische Lysozymkristalle sind aus Abb. 6.2 zu ersehen. Dargestellt sind die Widerstände von Kristallen aus klassischer Batchproduktion, deren Bestimmung sowohl mit der Filtrationszelle (schwarze Quadrate) als auch mit der Drucknutsche (schwarze Kreise) erfolgt. Die Widerstände von Kristallen aus der Vakuumkammer sind durch graue Kreise dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Widerstände der isometrischen Kristalle aus der Vakuumkammer mit $3,72 \times 10^{13}$ – $5,55 \times 10^{13} \text{ m}^{-2}$ höher liegen als die Widerstände der Kristalle aus dem Batchverfahren. Bei diesen sind die Widerstände im Bereich von $7,19 \times 10^{12}$ – $1,42 \times 10^{13} \text{ m}^{-2}$ angesiedelt. Die etwas höheren Widerstände sind durch die kleineren Partikelgrößen und die vorhandene Agglomeration zu erklären. Auch wenn sich die Widerstände nicht stark unterscheiden, ist die Zunahme und stärkere Schwankung dennoch feststellbar.

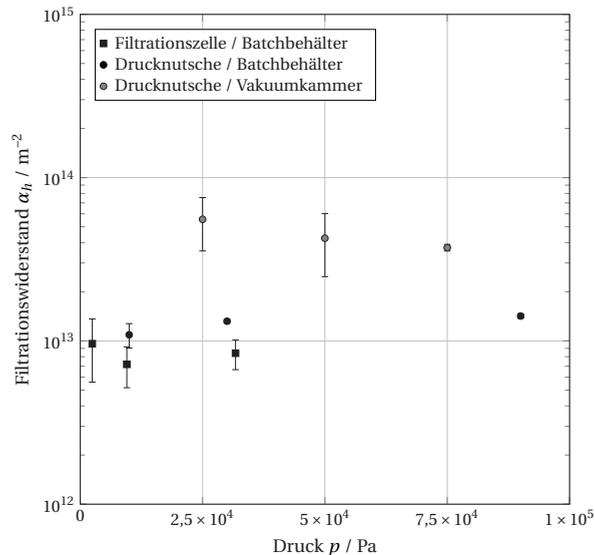


Abbildung 6.2: Höhengspezifischer Filterkuchenwiderstand isometrischer Lysozymkristalle von Permeationsexperimenten mit der Filtrationszelle (Batchverfahren) und der Drucknutsche (Vakuumkammer)

Abbildung 6.3 zeigt die Ergebnisse für die stäbchenförmigen Lysozymkristalle. Es ist zu erkennen, dass die Kuchenwiderstände bei den verschiedenen Verfahren gut übereinstimmen. Bei der Filtrationszelle und den Kristallen aus dem Batchverfahren liegt der Widerstand im Bereich $1,73 \times 10^{13}$ – $3,14 \times 10^{13} m^{-2}$ für Filtrationsdrücke zwischen $0,03 \times 10^5$ – $0,95 \times 10^5$ Pa. Im Vergleich dazu sind die mit der Drucknutsche und den Kristallen aus der Vakuumkammer ermittelten Ergebnisse der Widerstände als sehr ähnlich einzuordnen. Sie befinden sich in einem Bereich von $1,93 \times 10^{13}$ – $2,44 \times 10^{13} m^{-2}$ bei den drei Filtrationsdrücken $0,25 \times 10^5$; $0,5 \times 10^5$ und $0,75 \times 10^5$ Pa. Bezogen auf die Widerstände der isometrischen Kristalle aus der Vakuumkammer sind die Widerstände der stäbchenförmigen Kristalle geringfügig kleiner.

Für die weitere Übertragung auf den integrierten Bandkristallisator sind hinsichtlich des Widerstands beide Partikelsysteme geeignet. Im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit der PGV und der Kristallform sind die stäbchenförmigen Kristalle allerdings vorteilhaft. Sie zeigen eine bessere Übereinstimmung der PGV, der Kristallform und des Kuchenwiderstands mit den Kristallen aus dem Batchverfahren. Die Kristallisation der stäbchenförmigen Kristalle ist aufgrund der höheren Siedetemperatur zudem leichter steuerbar. Daher erfolgt die weitere Übertragung anhand dieses Stoffsystems und nicht mit den isometrischen Lysozymkristallen.

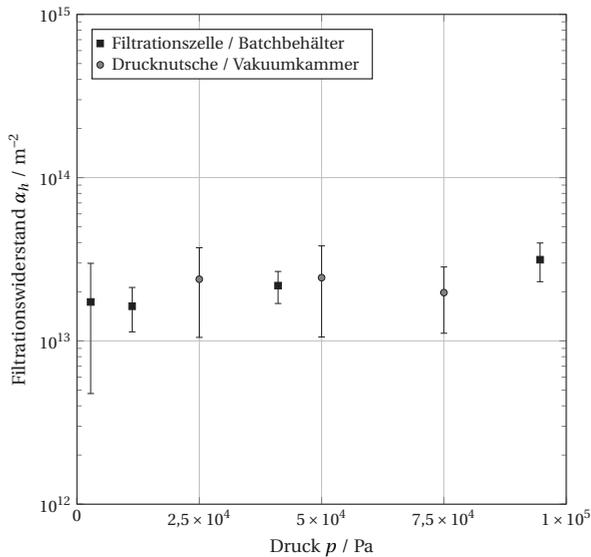


Abbildung 6.3: Höhengenspezifischer Filterkuchenwiderstand stäbchenförmiger Lysozymkristalle von Permeationsexperimenten mit der Filtrationszelle (Batchverfahren) und der Drucknutsche (Vakuunkammer)

Die bisherigen Experimente nutzten für die Filtration eine Membran als Filtermedium. Für die Filtrationsküvette bietet der Einsatz einer Membran als Filtermedium zahlreiche Vorteile, die detailliert in Kapitel 4 erläutert sind. Für einen Bandkristallisator ist eine Membran jedoch nicht geeignet. Das Filtermedium ist auf diesem Apparat höheren mechanischen und thermischen Belastungen ausgesetzt, die eine Membran beschädigen würden. Zudem ist der Einsatz von Membranen mit deutlich höheren Kosten verbunden. Aus diesem Grund steht im nächsten Schritt das Ersetzen der Membran durch ein Filtertuch mit größerem Porendurchmesser im Vordergrund. Dabei sollte sich der Kuchenwiderstand nicht wesentlich verändern und der Feststoffdurchschlag in das Filtrat gering bleiben.

6.3.3 Ersetzen der Membran durch ein Filtertuch

Ein ideales Filtertuch hat einen geringen Widerstand und hohe mechanische Stabilität. So lässt es sich auch über mehrere Zyklen wiederverwenden. Ein geringerer Widerstand ist über eine größere offene Filterfläche erreichbar, die in der Regel mit größeren Poren einhergeht. Das führt zu einer erhöhten Gefahr von Feststoffdurchschlag in das Filtrat zu Beginn der Kuchenfiltration. Üblicherweise ist in der technischen Anwendung der Widerstand eines Filterkuchens deutlich höher als der des Filtermediums, was ein Vernachlässigen des Filtermediumwiderstands erlaubt.

Um die Eignung eines Filtertuchs zu untersuchen, dienen Filtrationsexperimente an einer VDI 2762 [6] Drucknutsche. Bei einem erfolgreichen Ersatz der Membran durch das Filtertuch sind ein ähnlicher Kuchenwiderstand und eine ähnliche Filterkuchenhöhe zu erwarten. Bei dem gewählten Filtermedium handelt es sich um ein gewebtes Filtertuch mit einer nominalen Porengröße von $12\ \mu\text{m}$. Es hat somit den 60-fachen Porendurchmesser der zuvor genutzten Membran.

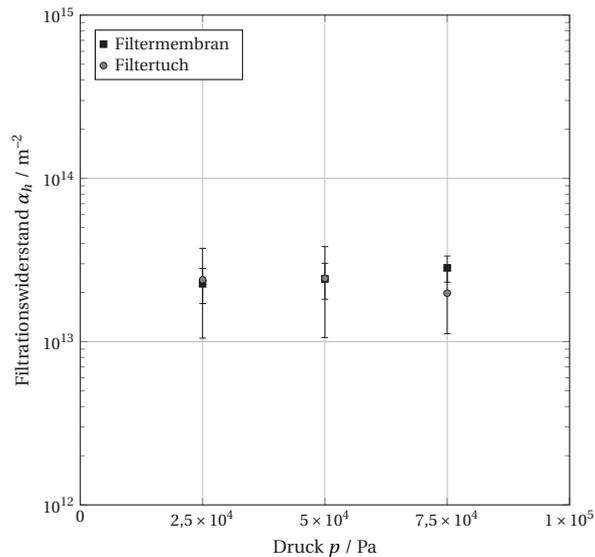


Abbildung 6.4: Höhenspezifischer Kuchenwiderstand von stäbchenförmigem Lysozym mit einer Membran und einem Filtertuch als Filtermittel

Die Filtrationswiderstände eines Kuchens aus stäbchenförmigen Lysozymkristallen mit der Membran sowie dem Filtertuch als Filtermedien sind in Abb. 6.4 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich die Kuchenwiderstände durch den Austausch des Filtermediums nicht signifikant verändern. Die Widerstände der zwei Filtermittel bei Permeation mit Überstand betragen $5,00 \pm 0,03 \times 10^{10}\ \text{m}^{-1}$ für die Membran und $2,60 \pm 0,26 \times 10^8\ \text{m}^{-1}$ für das Filtertuch. Die Permeation mit Überstand führt zu einer leichten Unterschätzung des Filtermittelwiderstands, da dieser sich in Anwesenheit von Partikeln nochmals erhöht. Dennoch ist festzustellen, dass das Filtertuch einen deutlich geringeren Widerstand als die Membran aufweist. Wegen des geringen Widerstands des Filtertuchs gegenüber dem aufgebauten Filterkuchen ist es zudem zulässig, den Filtermittelwiderstand zu vernachlässigen. Die Filterkuchenhöhen betragen bei der Filtration mit der Membran $9,6 \pm 0,6\ \text{mm}$ und bei der Verwendung des Filtertuchs $9,4 \pm 0,6\ \text{mm}$. Somit wirkt sich der Ersatz des Filtermittels weder auf den Kuchenwiderstand noch auf die Filterkuchenhöhe aus. Auch zeigt das Filtrat keine Trübung

zu Beginn der Filtration, was auf keinen oder nur einen sehr geringen Feststoffdurchschlag hindeutet.

Die erfolgreiche Substitution der Membran durch ein Filtertuch ist eine zwingende Voraussetzung für den Transfer auf den Bandkristallisor. In diesem finalen Setup finden die Grundoperationen Kristallisation, Reifung und Filtration quasi-kontinuierlich auf einem Apparat statt. Die Herausforderung besteht daher darin, dass nun die Kristallisation und die Reifung direkt auf dem Filtermedium erfolgt. Das Filtertuch darf bei diesem Vorgang nicht verblocken und der entstehende Filterkuchen muss homogen aufgebaut sein, damit die gleichen Parameter wie in den Vorversuchen erreichbar sind.

6.3.4 Übertragung auf ein integriertes Apparatekonzept im Labormaßstab

Bei der finalen Übertragung auf den Laborapparat findet die Kristallisation und Reifung direkt auf dem Filtermedium statt. Bei der anschließenden Filtration bleibt der Filterkuchen auf dem Filtermedium zurück. Um den Kuchenwiderstand auf dem Laborapparat zu charakterisieren, erfolgt analog zur Drucknutsche eine Durchströmung des Kuchens mit Überstand. Die anliegende Druckdifferenz beträgt $0,5 \times 10^5$ Pa, das Permeationsvolumen etwa 50 mL und die verfügbare Filterfläche ist $4,8 \times 10^{-3} \text{ m}^2$. Messgrößen sind die Kuchenhöhe und die Permeationsdauer. Aus den Vorversuchen ist ein Kuchenwiderstand von $2,5 \times 10^{13} \text{ m}^{-2}$ zu erwarten. Anhand dieses Wertes ist eine theoretische Filtrationsdauer t_{Theo} über Gleichung (2.1) berechenbar, die mit der experimentell bestimmten Filtrationsdauer zu vergleichen ist. Außerdem ist die Berechnung des Filterkuchenwiderstands aus den Prozessparametern und den gemessenen Größen möglich.

Die Ergebnisse der drei Wiederholungsversuche sind in Tabelle 6.1 aufgeführt. Zunächst ist festzustellen, dass die experimentell bestimmten und die aus dem erwarteten Kuchenwiderstand berechneten theoretischen Filtrationszeiten sehr ähnlich zueinander sind. Die experimentellen Zeiten sind zwar etwas geringer, was auf einen kleineren Kuchenwiderstand hinweist. Der sich ergebende Kuchenwiderstand liegt bei $2,38 \pm 0,01 \times 10^{13} \text{ m}^{-2}$ und ist damit sehr nah bei den zuvor im Laborversuch ermittelten Ergebnissen. Eine Erklärung für die etwas geringere Filtrationsdauer ist die nicht an jeder Stelle des Filterkuchens gleiche Höhe. Die in Tabelle 6.1 angegebene Höhe ist ein Mittelwert aus an mehreren Positionen des Filterkuchens gemessenen Höhen. Außerdem liegen auch leichte Schwankungen im Feststoffvolumenanteil der Suspension vor, die sowohl die Filterkuchenhöhe als auch den Filterkuchenwiderstand beeinflussen.

Tabelle 6.1: Theoretische und experimentell bestimmte Filtrationszeiten sowie Filterkuchenwiderstände

Versuch	1	2	3
V / m^3	$50,8 \times 10^{-6}$	$49,9 \times 10^{-6}$	$48,9 \times 10^{-6}$
h_c / m	$7,4 \times 10^{-3}$	$6,4 \times 10^{-3}$	$7,3 \times 10^{-3}$
α_h / m^{-2}	$2,37 \times 10^{13}$	$2,39 \times 10^{13}$	$2,38 \times 10^{13}$
t_{Exp} / s	44,2	37,8	42,3
t_{Theo} / s	46,7	39,7	44,5

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Implementation der Vakuumkristallisation auf den Laborapparat im Vergleich zur klassischen Batchproduktion im Fall der stäbchenförmigen Lysozymkristalle zu sehr ähnlichen Ergebnissen bei der PGV und den Filtrationseigenschaften führt. Diesbezüglich ist also die Übertragung auf den integrierten Apparat ohne Qualitätseinbußen möglich. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, ein Verblocken des Filtermediums durch die Kristallisation zu vermeiden. Da sich keine signifikante Erhöhung des Kuchenwiderstands bei der Filtration feststellen lässt, ist dieses Szenario unwahrscheinlich. Aufnahmen des unbenutzten und benutzten Filtertuchs mit einem Laser-Scanning-Mikroskop zeigen leichte Verunreinigungen, aber keine starken Verblockungen bei dem benutzten Filtermedium. Abschließend ist noch zu prüfen, ob sich ein homogener Filterkuchen aufbaut, da die Kristallisation direkt auf dem Filtertuch stattfindet.

6.3.5 Homogenität des Filterkuchens

6.3.5.1 Validierung der μCT Analytik

Die Beurteilung der Homogenität des Filterkuchens erfolgt anhand von μCT Aufnahmen. Voraussetzung für eine Anwendbarkeit des μCT zur Bestimmung der PGV ist die Überprüfung der Messgenauigkeit an einem bekannten Partikelsystem. Die Validierung erfolgt anhand von drei verschiedenen Glaskugelsystemen mit bekannter Größenverteilung. Laut Hersteller liegen die Partikelgrößen für die drei Systeme in den Bereichen 40–70 μm , 70–110 μm und 190–220 μm . Da die Partikel kugelförmig sind, ist auch ein Vergleich mit anderen Messverfahren möglich. Bei der Laserbeugung (LB) wird aus dem Beugungsmuster des Partikelkollektivs auf die volumenbasierte PGV zurückgerechnet. Das Qicpic[®] (Sympatec GmbH) ist ein optisches Verfahren, bei dem eine Kamera Bilder der Partikel aufnimmt. Aus den Projektionsflächen der identifizierten Partikel erfolgt analog zur Auswertung bei Mikroskopaufnahmen die Berechnung der PGV. Bei diesem Verfahren ist es zusätzlich möglich, Formfaktoren mit auszuwerten.

Bei der Auswertung von μ CT Scans liegen zunächst Graustufenbilder vor. Aus diesen sind die Kugeln über einen Schwellwert vom Hintergrund zu separieren. Da sich die separierten Kugeln berühren, ist zudem noch eine Watershed Transformation notwendig. Für die detaillierte Vorgehensweise sei auf Abschnitt 3.1.2 verwiesen. Sind die Kugeln erfolgreich separiert, ist die Berechnung der PGV aus dem Partikelvolumen möglich. Das Partikelvolumen ergibt sich direkt über die Anzahl der einer Kugel zugeordneten Voxel.

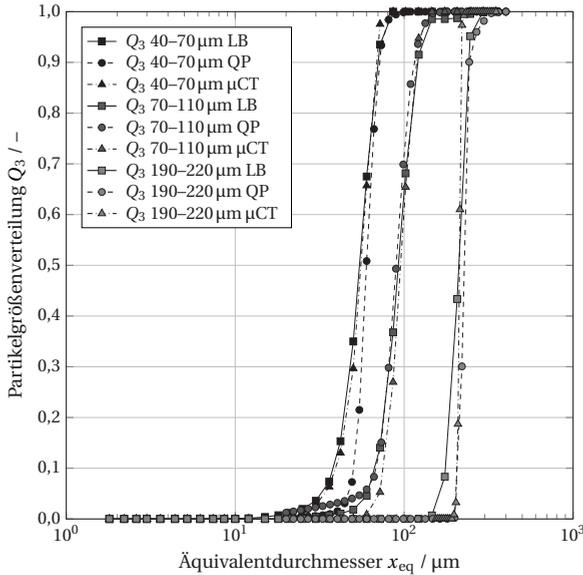


Abbildung 6.5: Partikelgrößenverteilungen verschiedener Messverfahren für drei unterschiedliche Glaskugelsysteme

Abbildung 6.5 zeigt die PGV für die drei Glaskugelsysteme und die drei unterschiedlichen Messverfahren. Es ist zu erkennen, dass vor allem die Ergebnisse aus der Laserbeugung und dem μ CT für alle drei Systeme eine sehr gute Übereinstimmung zeigen. Geringe Abweichungen ergeben sich hingegen bei den mit dem Qicpic ermittelten Verteilungen. Ein möglicher Grund dafür ist das Messprinzip mit der Kamera. Wenn ein Partikel nicht in der richtigen Fokusebene liegt, führt das zu Verfälschungen bei den Projektionsflächen. Ein weiterer möglicher Grund ist, dass zwei dicht beieinander liegende Partikel als ein einzelnes Partikel erkannt werden. Diese Fälle treten bei der Laserbeugung nicht auf, weswegen dieses Messprinzip bei kugelförmigen Partikelsystemen sehr genau ist. Die gute Übereinstimmung mit den Daten aus dem μ CT bestätigt die erfolgreiche Validierung der in Abschnitt 3.1.2 aufgeführten Bildbearbeitungsschritte und Algorithmen für die Auswertung der PGV.

Die Herausforderung bei der Übertragung der Auswertemethodik auf Lysozymkristalle liegt in dem geringen Kontrast zwischen Kristall und Hintergrund. Dies bedingt zusätzliche Post-

Processing Schritte und Bildfilter, um eine erfolgreiche Segmentation der Kristalle vom Hintergrund zu gewährleisten. Um die sich berührenden isometrischen Kristalle zu trennen, ist ebenfalls das Watershed-Verfahren geeignet. Bei stäbchenförmigen Kristallen führt es jedoch zu einigen Fehlern. Stattdessen ist für solche Bilder die Segmentation mit einem KNN eine gute Alternative. Das Modell ist an manuell klassifizierte Bilder anzulernen, wobei das geschickte Design des U-Net [57] eine moderate Anzahl an Trainingsdaten für eine erfolgreiche Segmentation ermöglicht.

Um die Auswertung auch für Kristalle zu validieren, dient eine Vergleichsmessung der PGV mit der Laserbeugung und dem μ CT am Beispiel von isometrischen Kristallen. Bei stäbchenförmigen Kristallen ergibt ein Vergleich mit der Laserbeugung keinen Sinn, da aufgrund der großen Abweichung von der Kugelform mit größeren Fehlern bezüglich des Äquivalentdurchmessers bei der Laserbeugung zu rechnen ist. Das Qicpic ist für Proteinkristallsysteme nicht geeignet, da die im Gerät integrierte Pumpe die Kristalle zerkleinert.

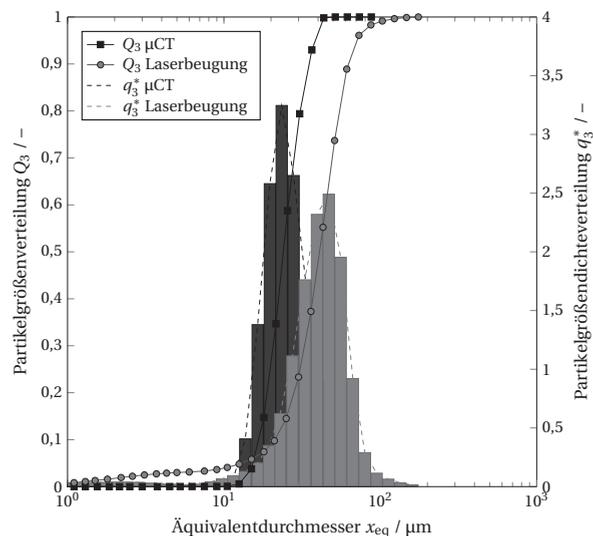


Abbildung 6.6: Vergleichsmessung isometrischer Lysozymkristalle mit der Laserbeugung (LB) und dem Qicpic (QP)

Abbildung 6.6 zeigt die sich ergebenden PGVs und zusätzlich die entsprechenden Dichteverteilungen. Die mit dem μ CT ermittelten Partikelgrößen sind etwas kleiner als die aus der Laserbeugung. Da hier keine kugelförmigen Partikel mehr vorliegen, ist mit Unterschieden bei verschiedenen Messverfahren zu rechnen. Es ist letztendlich nicht möglich, festzustellen, welches Messverfahren die „reale“ Partikelgröße wiedergibt. Da die Auswertung der μ CT Aufnahmen anhand des gemessenen Partikelvolumens durchgeführt wird, resultiert aus diesem Verfahren direkt der Äquivalentdurchmesser. Bei der Laserbeugung liegt der Auswertung das

Modell der Fraunhofer-Streuung zugrunde, das opake, kugelförmige Partikel voraussetzt. Auffällig ist bei der Summenverteilung aus der Laserbeugung in Abb. 6.6 das Vorkommen vieler kleiner Partikel in einem Größenbereich von 1–10 μm im Vergleich zur Verteilung aus dem μCT . Dieser hohe Feingutanteil ist für die gewählte Auswertemethodik der Fraunhofer-Streuung nicht ungewöhnlich und ein Messartefakt. Dieser entsteht bei den transparenten und nicht kugelförmigen Kristallen im vorliegenden Größenbereich durch die zusätzliche Lichtbeugung im Kristall. Auch ein Blick auf die Partikelgrößendichteverteilung q_3^* zeigt nur äußerst geringe Anteile von Partikeln in diesem Größenbereich. In der Dichteverteilung ist für die Ergebnisse aus der Laserbeugung eine leichte Verschiebung in Richtung zu kleineren Partikelgrößen und einem geringeren Modalwert zu erkennen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die PGV für viele Proteinkristallformen mit dem μCT erfolgreich bestimmbar ist. Ein großer Vorteil der μCT Analytik ist die Möglichkeit Haufwerke zu vermessen und dabei neben der Partikelgröße auch Formparameter auswerten zu können. Im Gegensatz zur Laserbeugung sind keine a priori Annahmen (opake Kugeln) über die Partikel notwendig. Um auch kleine Kristalle erfassen zu können, ist eine ausreichend hohe Auflösung zu wählen. Aus dem Nyquist-Shannon Abtasttheorem ergibt sich die Bedingung, dass die Voxelgröße mindestens um den Faktor 2,3 kleiner als die erforderliche optische Auflösung sein muss. In der Praxis ist aufgrund von Bildrauschen eine Überabtastung um mindestens den Faktor 3 ratsam. Bei der optischen Auflösung ist nicht nur die Partikelgröße zu berücksichtigen, sondern auch die Abstände zwischen Kristallen, die ausreichend aufgelöst sein müssen, damit eine Unterscheidung zwischen Einzelkristall und Agglomerat möglich ist. Eine höhere Auflösung bedingt einen kleineren Bildausschnitt, weswegen sich auch die Anzahl der aufgenommenen Kristalle verringert. Bei einer zu geringen Anzahl von Kristallen im Scan sind daher zur statistischen Absicherung zusätzliche Tomographieaufnahmen notwendig.

6.3.5.2 Beurteilung der Kristallgrößenverteilung im Filterkuchen

Zur Beurteilung der Homogenität der PGV im Filterkuchen sind Scans aus mehreren Schichten erforderlich. Die Segmentation der μCT Aufnahme erfolgt über ein KNN und die Auswertung der PGV analog zur Mikroskopie anhand des maximalen Feretdurchmessers. Das dreidimensionale Bild einer Schicht des Filterkuchens ist exemplarisch in Abb. 6.7 dargestellt.

Die Stäbchenform der Kristalle ist in der μCT Aufnahme gut zu erkennen. Über die Schichthöhe sind in der Aufnahme keine Inhomogenitäten feststellbar. Den Rand berührende Objekte sind bereits entfernt, weshalb keine angeschnittenen Kristalle zu sehen sind. Drei Scans analog zu Abb. 6.7 an verschiedenen Kuchenhöhen (oben, Mitte und unten) dienen zur Beurteilung der Kuchenhomogenität. Die zugehörigen PGVs sind Abb. 6.8 zu entnehmen.

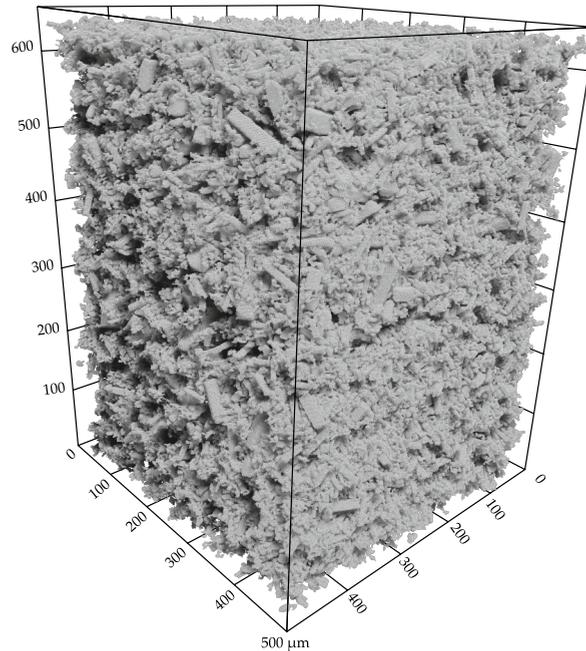


Abbildung 6.7: 3D Rendering eines Ausschnitts des Filterkuchens

Es ist zu erkennen, dass die PGV in den drei untersuchten Schichten nahezu identisch ist, was das Vorliegen eines homogenen Filterkuchens bestätigt. Zudem sind die Verläufe in den Schichten sehr ähnlich zur Ausgangssuspension. Diese PGV stammt aus der Transformation der Q_2 Verteilung von Mikroskopaufnahmen der Kristallsuspension zu einer Q_3 Verteilung gemäß

$$Q_r(x) = \int_{x_0}^x \frac{x^{r-l} q_l(x)}{\int_{x_0}^{x_{\max}} x^{r-l} q_l(x) dx} dx. \quad (6.73)$$

Die geringen Abweichungen der Verläufe aus den Mikroskopaufnahmen und aus dem μ CT sind durch das unterschiedliche Messprinzip zu erklären. Das Lichtmikroskop erfasst nur die Projektionsflächen der Kristalle, wohingegen im μ CT das komplette Partikel vermessen wird. Demzufolge findet bei der Filtration auf dem integrierten Laborapparat keine Zerkleinerung oder Segregation der Kristalle statt. Somit ist es möglich, das aus mehreren Schritten bestehende konventionelle Batchverfahren erfolgreich auf ein integriertes, quasi-kontinuierliches Apparatekonzept zu übertragen.

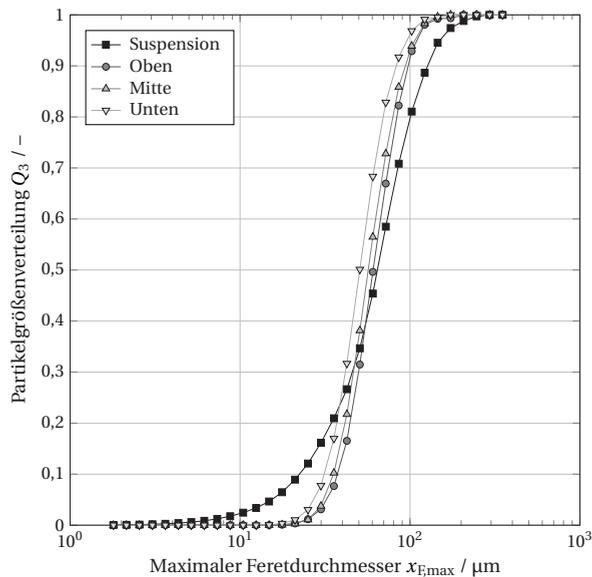


Abbildung 6.8: Partikelgrößenverteilungen aus dem μCT an drei Stellen des Filterkuchens; zum Vergleich ist die Partikelgrößenverteilung der Suspension aus Mikroskopaufnahmen dargestellt (transformiert zu Q_3)

6.4 Schlussfolgerungen

Für die Herstellung und Reinigung temperaturempfindlicher Produkte ist die Vakuumkristallisation, gefolgt von einem FFT Trennschritt, ein geeignetes Verfahren. Typischerweise finden die verschiedenen Grundoperationen im Batch auf dedizierten Apparaten statt. Um die Gefahr von Kontaminationen zu minimieren, den Energiebedarf zu verringern und um die Effizienz zu erhöhen, ist der Einsatz von modularisierten, quasi-kontinuierlichen Apparaten eine interessante Alternative.

Für die Übertragung der Vakuumkristallisation auf ein integriertes Apparatekonzept ist eine sequentiellen Vorgehensweise ratsam. Im ersten Schritt erfolgte der erfolgreiche Ersatz des Batchkristallisators durch einen neuartigen Verfahrensraum, der sich auf einem Bandkristallisor verwenden lässt. Mit dem neuen Verfahrensraum sind im Fall von stäbchenförmigem Lysozym Kristalle mit ähnlichen Eigenschaften wie im Batchkristallisator erzeugbar. Bei den isometrischen Kristallen ist eine höhere Schwankung und eine in Richtung kleinere Partikelgrößen verschobene PGV zu beobachten. Die Kuchenwiderstände bei der Filtration sind ähnlich zu den Widerständen aus der klassischen Batchproduktion, wobei auch hier die beste Übereinstimmung für die stäbchenförmigen Lysozymkristalle erreichbar ist. Die Widerstände sind zudem sowohl bei der Filtration mit der Filterzelle als auch bei einem größeren Filtrationsaufbau wie der Drucknutsche sehr ähnlich zueinander. Somit ist die

Filterzelle geeignet, in einem kleinen Maßstab die Filtrationseigenschaften zu bestimmen und die Filtration ist anhand der Ergebnisse auf einen größeren Apparat übertragbar. Der Ersatz der Membran durch ein technisch geeignetes Filtertuch bewirkt keine signifikante Veränderung des Kuchenwiderstands und auch keinen Feststoffdurchschlag. Der letzte Schritt umfasste die Übertragung des kompletten Prozesses auf das integrierte Apparatekonzept im Labormaßstab. Permeationsexperimente zeigen, dass der Kuchenwiderstand dem erwarteten und zuvor bestimmten Wert weitestgehend entspricht. Die experimentelle Permeationszeit liegt um wenige Sekunden unter der vorhergesagten Zeit. Die Vergleichbarkeit der wichtigsten Prozesskennzahlen zeigt, dass die Lysozymproduktion auf einen quasi-kontinuierlichen Apparat übertragbar ist und die damit einhergehenden Vorteile nutzbar sind. Das Verfahren ist prinzipiell auch für andere temperaturempfindliche Produkte geeignet.

7 Kristallbruch unter Schereinwirkung⁵

Dieses Kapitel betrachtet den Partikelbruch von Proteinkristallen aufgrund von kombinierter Druck- und Scherbelastung. Zur Beanspruchung der Partikel dient ein modifiziertes Ringschergerät, das es erlaubt, flüssigkeitsgesättigte Sedimente zu belasten. Die Betrachtung des Kristallbruchs erfolgt über die Analyse von resuspendierten Proben des Haufwerks mit der Laserbeugung und über die Vermessung von ausgestochenen Proben des belasteten Sediments mit dem μ CT. Ziel ist es, den Einfluss von kombinierter Normalbelastung und Schereinwirkung auf den Kristallbruch aufzuklären.

7.1 Stand der Technik

Eine Besonderheit von Proteinkristallen im Vergleich zu konventionellen Kristallen ist ihre geringere mechanische Festigkeit. Ein Grund dafür ist, dass das Kristallgitter aus Makromolekülen mit großen Zwischenräumen aufgebaut ist. Ein Großteil des Kristalls besteht aus Kristallwasser, dessen Anteil bis zu 30–80 % beträgt. Nur ein geringer Anteil der Proteinoberfläche im Kristall interagiert miteinander, was die Kristalle weich und verhältnismäßig leicht zerstörbar macht. [31] Dies führt dazu, dass bereits geringe mechanische Beanspruchungen, die in der Verfahrenstechnik in zahlreichen Apparaten auftreten, zu potenziellem Kristallbruch führen. Cornehl et al. [74] zeigten bereits den auftretenden Kristallbruch von aggregierten und nadelförmigen Lysozymkristallen bei einer Druckbeanspruchung. Eine Druckbeanspruchung tritt in der Verfahrenstechnik beispielsweise bei der Press- oder der Kuchenfiltration auf. Andere Apparate zur Filtration, wie beispielsweise der Querstromfilter (BoCross Dynamic, BOKELA GmbH) für die Querstromfiltration, zeichnen sich durch hohe Scherbelastungen aufgrund integrierter Rührer aus. Auch in diesen Fällen stellten Cornehl et al. [103] eine Kristallzerkleinerung fest. Bei der Kristallisation selbst ist die Zerkleinerung teilweise ein wünschenswerter Effekt. So entstehen durch Kollision der Kristalle miteinander sowie mit Einbauten, Wänden und Rührern neue Kristallisationskeime, die anschließend zu größeren

⁵ Teile dieses Kapitels sind in Radel et al. (2022) [102] veröffentlicht

Kristallen anwachsen. Bei der Nutzung der Kristallisation als Formulierungsschritt zur Aufarbeitung von Proteinen [70, 93] ist eine an die Kristallisation anschließende Zerkleinerung in der Regel nicht gewollt, da sich mit einer Änderung der PGV auch die Produkteigenschaften verändern.

Sowohl durch Normal- als auch durch Scherbeanspruchung lassen sich Haufwerke verdichten. Liegen beide Beanspruchungsarten kombiniert vor, ist die erreichbare Verdichtung nochmals deutlich stärker ausgeprägt, wie beispielsweise von Illies [46] für die Entfeuchtung von Filterkuchen genutzt. Höfgen et al. [47] nutzten für die Filtration und Entfeuchtung einen Apparat mit Hochdruck-Entwässerungswalzen. Mit diesem System sind die Scherung und die Normalkräfte individuell einstellbar und auf die vorliegende Anwendung anpassbar. In der Schüttgutmechanik sind für die Scherbeanspruchung die Jenike Scherzelle und das Schulze Ringschergerät bekannt [64]. Diese Apparate dienen dazu, die Fließeigenschaften einer Schüttung zu charakterisieren. Hammerich et al. [63] modifizierten eine Scherzelle für das Schulze Ringschergerät, um das Vermessen von flüssigkeitsgesättigten Haufwerken zu ermöglichen. Somit ergibt sich die Möglichkeit, die Rheologie und das Fließverhalten von gesättigten Sedimenten zu untersuchen. Die höheren erzielbaren Verdichtungen durch die kombinierten Beanspruchungen deuten auf eine höhere mechanische Belastung hin. Aus den zuvor ausgeführten Gründen ist in diesem Fall eine stärker ausgeprägte Zerkleinerung für Proteinkristalle zu erwarten. Der Aufbau mit der modifizierten Scherzelle ist daher nutzbar, um in einem Haufwerk die Zerkleinerung bei einer definierten Normalspannung und Schergeschwindigkeit zu betrachten.

Eine Partikelzerkleinerung findet bei Überschreiten der Materialfestigkeit statt. Für eine gewollte Zerkleinerung von Partikeln dienen Apparate wie Kugel- oder Schwingmühlen. Die Zerkleinerung ist dabei von der Beanspruchungsintensität abhängig, die mit dem Energieeintrag korreliert. Breitung-Faes [104] leitet aus dem Energieeintrag die produktbezogene Energie ab. Diese Energie ist dann in Anlehnung an das Spannungsmodell optimierbar und geeignet, eine Maßstabsvergrößerung bzw. die Übertragung auf andere Apparate mit idealen Parametern bei geringem experimentellem Aufwand zu realisieren. Da die benötigte Bruchenergie für kleinere Partikel zunimmt, ist bei der Zerkleinerung eine Abnahme des Grobgradanteils festzustellen. Die anderen, kleineren Partikelteilkollektive werden mit den Bruchstücken aufgefüllt.

7.2 Scherbruch

Die Scherbeanspruchung mit dem modifizierten Schulze Ringschergerät ermöglicht es, in einem Haufwerk aus Lysozymkristallen Kristallbruch zu erzeugen. Die Scherbelastung in der

Scherzelle ist nicht an allen Orten gleich groß, sondern weist einen Gradienten auf. Direkt am Scherzellendeckel, zwischen den in die Probe ragenden Mitnehmern, ist die Scherbelastung null. Unterhalb der Mitnehmer tritt die höchste Belastung auf, die dann in Richtung des Scherzellenbodens abnimmt. Dadurch ergeben sich auch Unterschiede hinsichtlich der lokal auftretenden Zerkleinerung. Direkt zwischen den Mitnehmern des Deckels findet keine Zerkleinerung statt. Am Scherzellenboden ist die Zerkleinerung deutlich schwächer ausgeprägt als auf der Oberseite des Haufwerks.

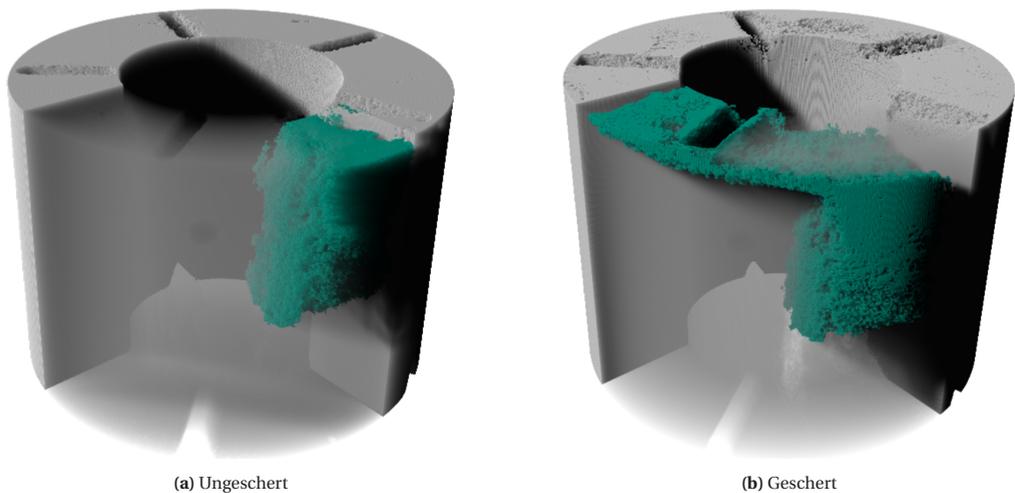


Abbildung 7.1: Computertomographieaufnahme eines Haufwerks (grau) mit Tracer Partikeln (grün eingefärbt) im ungescherten und gescherten Zustand

Diese Tatsache belegen auch μ CT Aufnahmen eines Haufwerks im ungescherten und gescherten Zustand. Die Visualisierung dieser Aufnahmen ist in Abb. 7.1 dargestellt. Bei den grün eingefärbten Partikeln handelt es sich um ein zugegebenes Modellsystem mit geringerer Dichte als im restlichen Filterkuchen. Dieses weist deswegen in der Tomographie einen anderen Grauwert auf. Damit ist die Ausgangs- und die Endposition dieser Partikel markierbar. Die auf der Oberseite des Haufwerks zu sehenden Rillen stammen von den Mitnehmern. Um die grünen Partikel besser sehen zu können, ist das andere, graue Material im vorderen Bereich verblasst dargestellt. Im Ausgangszustand in Abb. 7.1a liegen die grünen Tracerpartikel in einem vertikalen Streifen im Haufwerk vor. Nach einem Scherweg von etwa 45° ergibt sich die rechts dargestellte Verteilung der Tracerpartikel. Ein Großteil der Partikel ist nach wie vor in der Ausgangsposition verblieben. Im oberen Bereich in der Nähe des Deckels hingegen zeigt sich eine deutliche Verteilung des Tracermaterials entlang des Scherwegs. In diesem Bereich erfahren die Partikel die Scherbelastung, die im Falle von mechanisch empfindlichen Materialien auch eine Zerkleinerung bewirkt. Die dargestellte Verteilung der Partikel erklärt

auch, wieso nicht alle großen Partikel zerkleinert werden. Im unteren Bereich des Haufwerks sind die Scherkräfte viel geringer, sodass der Energieeintrag nicht zur Zerkleinerung ausreicht.

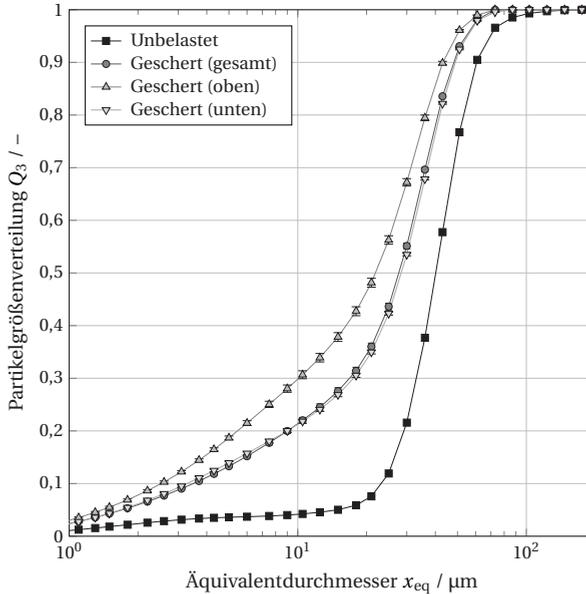


Abbildung 7.2: Partikelgrößenverteilungen in den verschiedenen Haufwerksschichten nach der Scherung

Abbildung 7.2 zeigt die PGV der ungescherten Suspension und von zwei Schichten des Haufwerks nach der Scherung. Es ist eine deutliche Zerkleinerung der gescherten Proben im Vergleich zur unbelasteten Ausgangssuspension zu erkennen. Ferner ist aus Abb. 7.2 zu ersehen, dass die PGV der oberen Haufwerksschicht nochmals kleinere Partikel als die untere Schicht und das gesamte Haufwerk aufweisen. Zwischen der unteren Schicht und dem gesamten Haufwerk ist bezüglich der PGV nur ein marginaler Unterschied zu erkennen. Besonders stark ist die Zerkleinerung für den x_{10} Durchmesser ausgeprägt, der nur noch zwischen 10–15 % liegt. Der x_{90} Durchmesser zeigt eine geringere Abnahme und ist im Bereich zwischen 75–85 % angesiedelt. Das ist durch die bereits erwähnte ungleichmäßige Scherbelastung im Haufwerk erklärbar. Große Partikel bleiben an der Unterseite des Haufwerks erhalten und gleichzeitig ist eine Zunahme an sehr kleinen Partikeln zu beobachten. Es findet somit eine Verbreiterung der PGV statt.

Verschiedene Einflussgrößen auf die Zerkleinerung sind denkbar. Insbesondere die anliegende Normalspannung und die Schergeschwindigkeit haben vermutlich eine Auswirkung auf den Scherbruch. Im Folgenden sind daher diese beiden Einflussgrößen näher betrachtet. Der zurückgelegte Scherweg beträgt dabei konstant 15 mm, um einen Einfluss dieser Größe

auszuschließen. Zur Beurteilung der PGV dient der Vergleich zwischen der jeweiligen unbelasteten Suspension und einer resuspendierten Probe des Haufwerks über die gesamte Höhe, da das manuelle Unterteilen des Haufwerks in gescherte Ober- und weitestgehend unbelastete Unterseite nicht für jede Probe zuverlässig möglich ist.

7.2.1 Einfluss von Zentrifugation und Verdichtung

Es ist denkbar, dass auch die reine Zentrifugation zur Probenvorbereitung und die reine Verdichtung im Ringschergerät eine Zerkleinerung der Partikel bewirkt. Um diesen Einfluss zu beurteilen, sind die PGVs von unbelasteten, zentrifugierten und verdichteten Proben in Abb. 7.3 dargestellt. Verdichtet bedeutet in diesem Kontext, eine Normalbelastung des Haufwerks im Ringschergerät mit $\sigma_n = 40\ 180\ \text{Pa}$, ohne anliegende Scherbelastung.

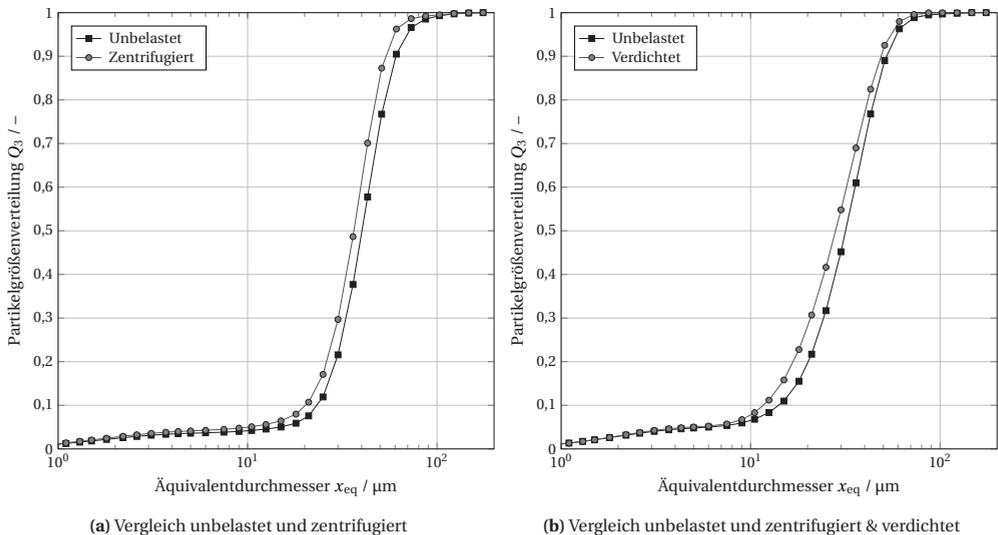


Abbildung 7.3: Vergleich der Partikelgrößenverteilung für die unbelastete Suspension und für zentrifugierte sowie verdichtete Haufwerke

Die sich ergebenden PGVs sind aus Abb. 7.3 zu ersehen. Die bei einer Drehzahl von $1500\ \text{min}^{-1}$ zentrifugierten und anschließend resuspendierten Kristalle aus Abb. 7.3a zeigen eine geringe Verschiebung in Richtung kleiner Partikelgrößen. Dabei ist die gesamte PGV verschoben und keine Zunahme an Feingut zu beobachten. Die Verschiebung ist dabei so schwach ausgeprägt, dass die Zerkleinerung im Vergleich zu den gescherten Proben vernachlässigbar ist. Diese geringe Veränderung der PGV ist auch durch leichte Temperaturschwankung bei der Messung erklärbar und nicht zwangsläufig auf die Zentrifugation zurückzuführen.

Ein ähnlicher Sachverhalt ergibt sich bei der zentrifugierten und anschließend im Ringschergerät mit 40 180 Pa verdichteten Probe, deren PGV in Abb. 7.3b dargestellt ist. Auch in diesem Fall ist eine geringe Verschiebung in Richtung kleinerer Partikelgrößen festzustellen. Der Unterschied ist aber nicht größer als bei reiner Zentrifugation, sodass die zusätzliche Verdichtung keine Auswirkung auf die Partikelgrößen hat. Auch zeigt sich, dass die Vorbereitung der Scherzelle und die anschließende Probennahme die PGV nicht beeinträchtigt. Zusammenfassend ist daher festzustellen, dass weder die Belastung in der Zentrifuge noch die zusätzliche Normalbelastung in der Scherzelle eine signifikante Zerkleinerung der Partikel bewirkt.

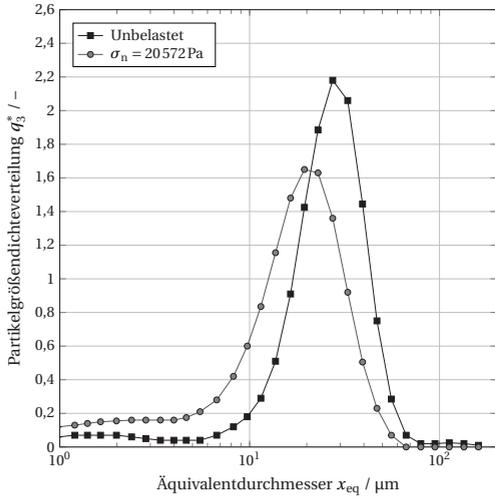
7.2.2 Einfluss der Normalspannung

Zur Beurteilung des Einflusses der anliegenden Normalspannung auf die Zerkleinerung dienen Scherversuche bei einer konstanten Schergeschwindigkeit von $1,5 \text{ mm min}^{-1}$ unter variierenden Normalspannungen. Zur Visualisierung der Zerkleinerung ist die logarithmisch transformierte Partikelgrößendichteverteilung q_3^* für verschiedene Normalspannungen dargestellt. Da es sich um ein biologisches System handelt, das bei der Kristallisation natürlichen Schwankungen unterliegt, ist für jede Normalspannung auch die zugehörige Ausgangsverteilung abgebildet.

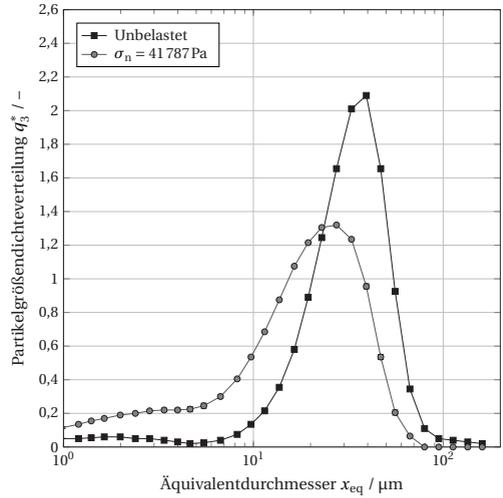
Die Ergebnisse der PGV sind in Abb. 7.4 dargestellt. Bereits bei einer geringen Normalbelastung von 20 572 Pa ist eine Zerkleinerung sowie Verschiebung der Partikelgrößen zu beobachten, und die Verteilungsbreite nimmt um etwa 40 % zu. Die x_{90} und x_{50} Durchmesser nehmen bereits bei dieser geringen Belastung auf (78 ± 1) und (68 ± 2) % der unbelasteten Größen ab. Die deutlichste Abnahme ist für den x_{10} Durchmesser festzustellen. Dieser Durchmesser reduziert sich nach der Belastung auf 30 ± 3 %.

Bei einer höheren Normalspannung von 41 787 Pa treten dieselben Effekte verstärkt auf. Die Verteilungsbreite erhöht sich gegenüber der unbelasteten Probe um 62 %. Die charakteristischen Durchmesser x_{90} und x_{50} betragen nur noch 74 und 58 % der Ausgangsgrößen. Der x_{10} Durchmesser verringert sich ebenfalls auf 19 %. In der Dichteverteilung ist eine Zunahme an Feingut und eine Verringerung des Anteils an großen Partikeln zu erkennen. Vergleichend zu einer Normalspannung von 20 572 Pa ist die Zerkleinerung bei 41 787 Pa stärker ausgeprägt und die PGV breiter. In der Dichteverteilung zeigt sich dieser Sachverhalt durch die Verringerung und Verbreiterung des Peaks.

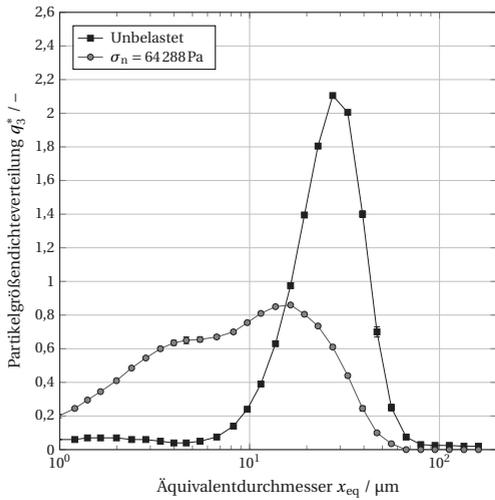
Eine weitere Erhöhung der Normalspannung auf 64 288 Pa führt zu einer deutlichen Veränderung in der Partikelgrößendichteverteilung. Der in der unbelasteten Probe noch erkennbare Peak ist nahezu komplett verschwunden. Es ist eine starke Zunahme sehr kleiner Partikel



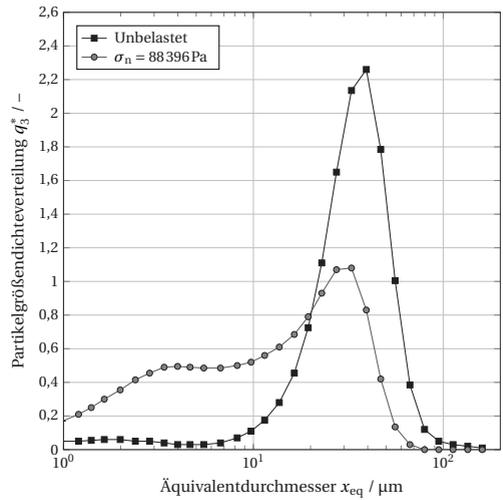
(a) Normalspannung 20572 Pa



(b) Normalspannung 41787 Pa



(c) Normalspannung 64288 Pa



(d) Normalspannung 88396 Pa

Abbildung 7.4: Einfluss verschiedener Normalspannungen auf die Partikelgrößendichtevertellung

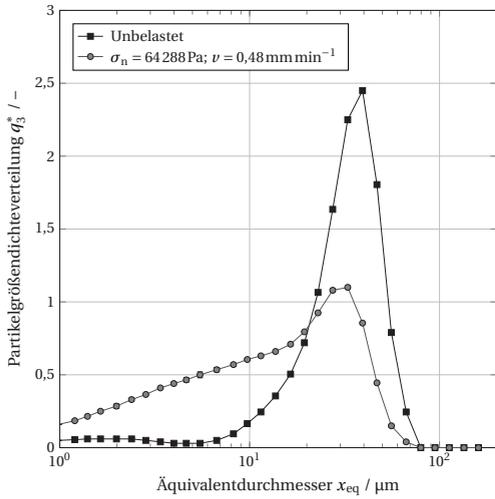
zu beobachten und darüber hinaus eine starke Verbreiterung der Verteilung. Die Menge größerer Partikel verringert sich etwas, ein Grobanteil ist aber noch in der scherbelasteten Probe vorhanden. Die Verteilungsbreite ist im Vergleich zur unbelasteten Probe um 147 % höher. Der x_{90} Durchmesser nimmt auf 63 % ab. Auch der Mediandurchmesser verringert sich und beträgt noch 32 % des Ausgangsdurchmessers. Das ist im Vergleich zu den geringeren Normalbelastungen eine deutlich stärkere Abnahme. Der x_{10} Durchmesser beträgt noch 15 % des Ausgangsdurchmessers.

Eine darüber hinausgehende Steigerung der Normalspannung auf 88 396 Pa, deren resultierende Verteilung in Abb. 7.4d dargestellt ist, bewirkt keine weitere signifikante Zerkleinerung der Partikel. Die Zunahme der Verteilungsbreite um 136 % ist vergleichbar zur vorherigen Normalspannung. Der x_{90} Durchmesser liegt bei 68 % des Ausgangsdurchmessers. Analog sind der Median- und der x_{10} Durchmesser auf 38 und 12 % verringert. Diese Werte sind ebenfalls ähnlich zur vorherigen Normalspannungsstufe. Es liegt eine deutliche Zunahme kleiner Partikel vor.

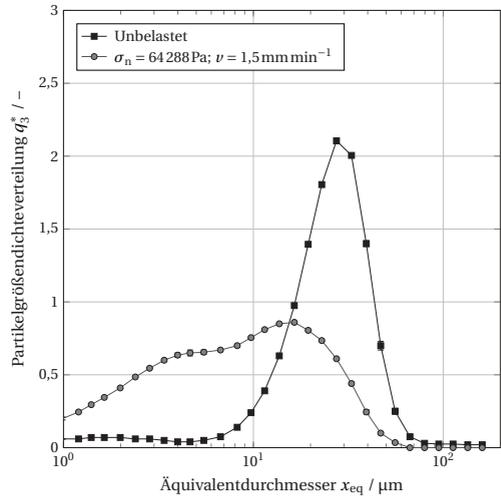
Der Vergleich der verschiedenen Normalspannungen zeigt einen großen Einfluss der anliegenden Spannung auf die auftretende Zerkleinerung. Geringe Normalspannungen haben eine weniger starke Zerkleinerung zur Folge. Aber auch kleine Spannungen bewirken bereits eine Verbreiterung der PGV und eine signifikante Abnahme des x_{10} Durchmessers. Mit Erhöhung der Normalspannung verstärkt sich die Zerkleinerung, und die Verteilungsbreite steigt deutlich an. Der Mediandurchmesser reduziert sich stark. Da nicht das komplette Haufwerk eine Scherbelastung erfährt, bleiben immer auch große Partikel erhalten, was sich in einer weniger starken Reduktion des x_{90} Durchmessers zeigt. Ab einer Normalspannung von 64 288 Pa hat eine Erhöhung der Normalspannung keine weitere Zunahme der Zerkleinerung zur Folge. Die Abnahme der charakteristischen Durchmesser, die Zunahme der Verteilungsbreite sowie die Zerkleinerung sind vergleichbar. Dies deutet auf eine Obergrenze hin, ab der die Normalspannung ihren Einfluss verliert. Die Zerkleinerung ist vermutlich nicht nur auf Partikelbruch, sondern auch auf Abrieb zurückzuführen. Der Abrieb entsteht durch die im Haufwerk auftretende Reibung der Kristalle aneinander, durch die sich beispielsweise die Ecken der Kristalle abreiben.

7.2.3 Einfluss der Schergeschwindigkeit

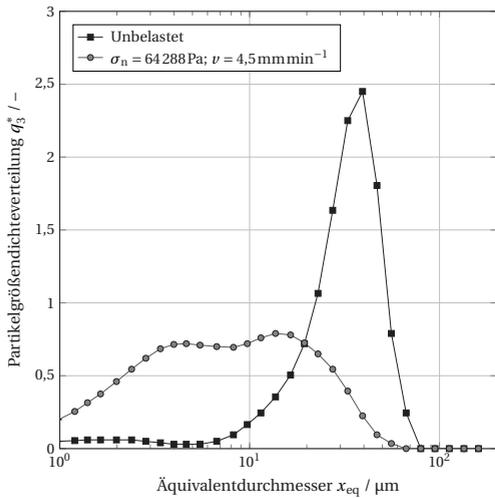
Neben der Normalspannung ist auch ein Einfluss der Schergeschwindigkeit auf die Zerkleinerung denkbar. Um diesen Einfluss aufzuklären, erfolgt die Belastung der Haufwerke aus isometrischen Lysozymkristallen mit den drei Schergeschwindigkeiten 0,48; 1,5 und 4,5 mm min⁻¹ bei einer konstanten Normalspannung von 64 288 Pa und einem konstanten Schwerweg. Die



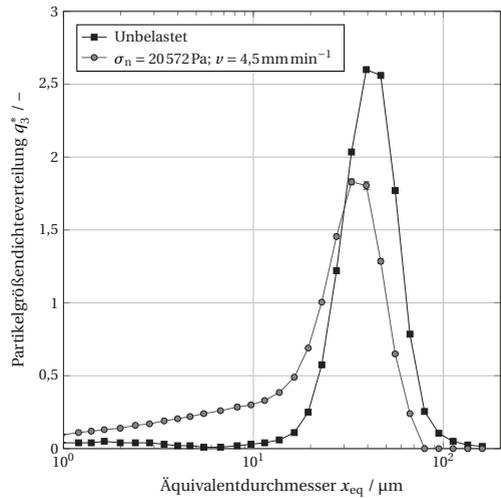
(a) Normalspannung 64 288 Pa; Schergeschwindigkeit $0,48 \text{ mm min}^{-1}$



(b) Normalspannung 64 288 Pa; Schergeschwindigkeit $1,5 \text{ mm min}^{-1}$



(c) Normalspannung 64 288 Pa; Schergeschwindigkeit $4,5 \text{ mm min}^{-1}$



(d) Normalspannung 20 572 Pa; Schergeschwindigkeit $4,5 \text{ mm min}^{-1}$

Abbildung 7.5: Einfluss verschiedener Schergeschwindigkeiten auf die Partikelgrößendichteverteilung

Partikelgrößendichteverteilungen der ungescherten und gescherten Proben mit unterschiedlichen Schergeschwindigkeiten sind in Abb. 7.5 dargestellt.

Bereits bei der geringsten Schergeschwindigkeit (Abb. 7.5, oben links) zeigt sich eine starke Zerkleinerung des Partikelkollektivs. Die Verteilungsbreite nimmt um 138 % zu und der x_{90} sowie der Mediandurchmesser nehmen auf 75 und 41 % ab. Der x_{10} Durchmesser reduziert sich deutlich auf 15 % im Vergleich zur unbelasteten Suspension. Eine Erhöhung der Schergeschwindigkeit auf $1,5 \text{ mm min}^{-1}$ ergibt eine verstärkte Zerkleinerung im Bereich des x_{90} und x_{50} Durchmessers sowie eine Zunahme der Verteilungsbreite. Die jeweiligen Werte sind analog zu Abb. 7.4 bei der entsprechenden Normalbelastung von 64 288 Pa. Eine weitere Steigerung der Schergeschwindigkeit auf $4,5 \text{ mm s}^{-1}$ führt im Vergleich zur vorherigen Schergeschwindigkeit zu einer sehr ähnlichen Partikelgrößendichteverteilung der gescherten Kristalle. Die Reduktion der charakteristischen Durchmesser ist für den Median- und den x_{90} Durchmesser um wenige Prozentpunkte stärker ausgeprägt.

In dem unteren rechten Diagramm in Abb. 7.5 ist die Partikelgrößendichteverteilung eines Haufwerks nach Scherung mit einer Geschwindigkeit von $4,5 \text{ mm min}^{-1}$ und einer Normalspannung von $\sigma_n = 20572 \text{ Pa}$ dargestellt. Hier zeigt sich, dass die Normalspannung einen stärkeren Einfluss auf die Zerkleinerung als die Schergeschwindigkeit hat. Bei der hohen Schergeschwindigkeit und geringen Normalbelastung ist die Zerkleinerung schwächer ausgeprägt. Der x_{90} Durchmesser beträgt noch 80 % der Ausgangspartikelgröße. Der Mediandurchmesser verringert sich auf 69 % und der x_{10} Durchmesser nimmt auf 15 % ab. Die Abnahme des Median- und x_{90} Durchmessers entspricht somit fast genau den Werten bei einer Normalbelastung von 20 572 Pa und einer Schergeschwindigkeit von $1,5 \text{ mm min}^{-1}$ aus Abb. 7.4. Die Verringerung des x_{10} Durchmessers ist jedoch bei der höheren Schergeschwindigkeit stärker ausgeprägt.

7.3 Schlussfolgerungen

Zusammenfassend ist festzustellen, dass bei der kombinierten Normal- und Scherbelastung von Lysozymkristallen stets eine Zerkleinerung auftritt. Dies trifft auch auf Normalspannungen zu, für die ohne Scherbeanspruchung keine Reduktion der Partikelgrößen feststellbar ist. Bei der kombinierten Beanspruchung führt eine Zunahme der Normalspannung zu einer stärkeren Zerkleinerung, die ab einer Spannung von etwa 64 288 Pa in eine Sättigung übergeht. Die Schergeschwindigkeit auf der anderen Seite hat eine deutlich geringere Auswirkung auf die Zerkleinerung und ist im Vergleich zur Normalspannung eine vernachlässigbare Einflussgröße. Die hohe Zunahme an Feingut ist neben dem reinen Kristallbruch auch durch Kristallabrieb erklärbar. Eine höhere Normalspannung verstärkt die Reibung im Haufwerk,

weshalb sich Kristallecken und Kanten abreiben, was zu der starken Zunahme an Feingut beiträgt.

Die sich ausbildenden Scherzonen sind auch in μ CT Aufnahmen des Haufwerks sichtbar. Abbildung 7.6 zeigt eine Aufnahme von der Haufwerksobenseite nach Scherung mit einer Normalspannung von 88 396 Pa. In der obersten Haufwerksschicht findet keine Zerkleinerung statt. Dies ist der Bereich zwischen den etwa 6 mm langen Mitnehmern, der keine Scherung erfährt. In der rot kolorierten Schicht direkt darunter, die scharf abgegrenzt ist, findet eine starke Zerkleinerung der Kristalle statt, sodass die Kristallstruktur mit dem μ CT nicht mehr darstellbar ist. Dies zeigt sich dadurch, dass praktisch keine Kristallkanten mehr erkennbar sind.

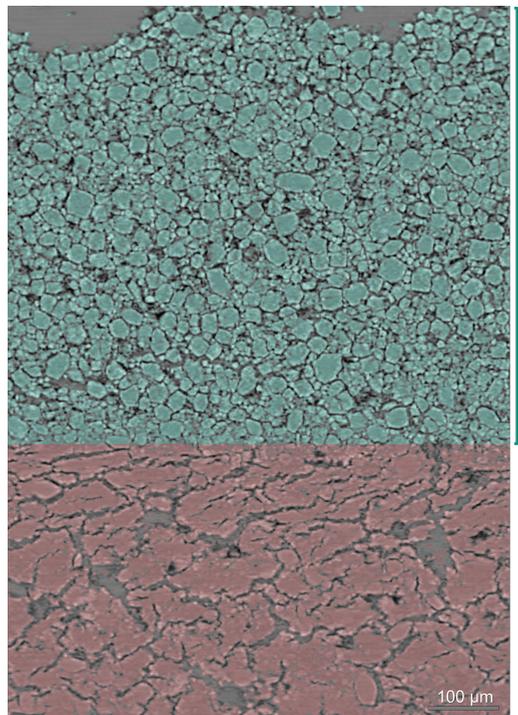


Abbildung 7.6: Schichtung im Haufwerk; Oben in Grün: Unbeschädigte Partikel im Bereich zwischen den Mitnehmern, unten in Rot: Zerstörte und nicht mehr auflösbare Kristalle

Eine Überlagerung von Druck- und Scherbeanspruchung tritt in vielen technischen Apparaten auf und ist daher zu minimieren, um eine unerwünschte Zerkleinerung von Proteinkristallen zu vermeiden. Beispiele für Apparate mit überlagerter Beanspruchung sind Pumpen, Röhrenzentrifugen, Dekantierzentrifugen und Querstromfilter. Insbesondere bei hohen

Kristallkonzentrationen, wie sie bei der Vakuumkristallisation auftreten, ist die Gefahr einer Zerkleinerung aufgrund von Partikelabrieb oder Partikelkollision gegeben. Ein anderer Ansatz ist eine Erhöhung der mechanischen Stabilität der Kristalle, wie sie durch Quervernetzung zu erzielen ist. Durch die stärkeren Bindungskräfte im Kristall ist die mechanische Festigkeit deutlich erhöht.

8 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Filtration im Kleinstmaßstab zur Charakterisierung von Materialverhalten, Ermittlung der Prozessfunktionen und zur Prozessauslegung. Mit den im Kleinstmaßstab bestimmten Prozessfunktionen erfolgte die erfolgreiche Übertragung der Vakuumkristallisation und -filtration auf ein integriertes Apparatekonzept.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Arbeit ist die Betrachtung des Kristallbruchs bei einer überlagerten Scher- und Druckbeanspruchung. Bei dieser Beanspruchungsart ist ein deutlich verstärkter Bruch im Vergleich zu einer reinen Druckbeanspruchung festzustellen, der sich nachteilig auf die nachgelagerten Verfahrensschritte auswirken kann.

Entwicklung einer Filterzelle für die Filtration im Kleinstmaßstab

Eine in dieser Arbeit entwickelte modulare, transparente und 3D gedruckte Filtrationszelle für eine optische Zentrifuge ermöglicht es, im Gegensatz zum aktuellen kommerziellen Stand der Technik, die Filtration in einem kleinen Maßstab zu charakterisieren. Weil die Messung des Filtrationsfortschritts auf der Kuchen Seite erfolgt, ist die Kuchenhöhe aus dem Filtrationsexperiment ablesbar. Die Porosität ist über die direkt messbare Kuchenhöhe berechenbar. Der notwendige Materialbedarf verringert sich deutlich auf etwa 200–500 μL im Gegensatz zu mehreren hundert Millilitern bei der Drucknutsche. Das Ziel einer hohen Reduktion der erforderlichen Probenmenge ist damit erreicht. Zudem besteht die Möglichkeit, mehrere Filtrationsexperimente parallelisiert durchzuführen. Die Zentrifuge bietet Platz für bis zu zwölf Filterzellen. Die Auswertung der Filtration erfolgt anhand des Transmissionsprofils, das an den Phasengrenzen charakteristische Merkmale aufweist. Da es sich bei diesem Aufbau um eine Zentrifugalfiltration handelt, findet die Filtration nicht bei einem konstanten Druck statt. Der maximal erreichbare Druck von etwa 2×10^5 Pa liegt nur zu Beginn des Experiments an und nimmt anschließend ab. Das erfordert eine angepasste Auswertemethodik, die diesen Druckabfall berücksichtigt.

Anhand eines Modellsystems aus aggregierten, isometrischen Lysozymkristallen fand die Charakterisierung der Filterzelle für die Bestimmung der Kennwerte Kuchenwiderstand, Porosität und Kuchenhöhe statt. Im Vergleich zu einer Labordrucknutsche, die standardmäßig für die Charakterisierung der Filtration zum Einsatz kommt, zeigen sich nur geringe Unterschiede

bezüglich des Kuchenwiderstands bei der Verwendung aggregierter Lysozymkristalle. Das aggregierte Kristallsystem unterliegt allerdings bereits prinzipbedingt höheren Schwankungen bezüglich der Partikelgröße und der Partikelfestigkeit. Durchgeführte Vergleichsmessungen mit nicht aggregierten isometrischen und stäbchenförmigen Lysozymkristallen zeigen eine sehr gute Übereinstimmung der mit der Filtrationszelle und Drucknutsche ermittelten Widerstände.

Vergleich verschiedener Kristallsysteme und Prozessfunktionen

Der verkleinerte Filtrationsaufbau bietet den Vorteil, bereits zu einem frühen Zeitpunkt in der Produkt- und Prozessentwicklung eine Charakterisierung und Bewertung des Fest-Flüssig-Trennschritts vornehmen zu können. Damit einher geht eine Reduzierung der Entwicklungszeit, das Einsparen von Ressourcen und infolgedessen eine Maximierung der Wirtschaftlichkeit.

Im Fokus der Arbeit stehen isometrisch, stäbchenförmig und nadelförmig kristallisierte Lysozymkristalle sowie stäbchenförmige ADH Kristalle. Für die untersuchten Systeme zeigt sich ein großer Einfluss der Kristallform und PGV sowohl auf die Sedimentationsgeschwindigkeit als auch auf die Kompressibilität und Permeabilität der entsprechenden Filterkuchen. Aus den gemessenen Daten erfolgt die Ableitung von Prozessfunktionen zur Beschreibung der Kompressibilität und der Sedimentationsgeschwindigkeit. Das Zusammenführen dieser Prozessfunktionen zur Flussdichtefunktion erlaubt es, die Sedimentation, den Haufwerksaufbau und die Permeation allein als Funktion des Feststoffvolumenanteils zu beschreiben.

Vor allem die isometrischen und stäbchenförmigen Lysozymkristalle zeigen in Bezug auf die FFT wünschenswerte Eigenschaften. Zum einen sind die Kuchenwiderstände mit Werten von ungefähr $1 \times 10^{13} \text{ m}^{-2}$ vergleichsweise gering, was eine schnelle Filtration ermöglicht. Zum anderen sind die Feststoffvolumenanteile mit Werten von über 25 % im Haufwerk höher, und somit ist weniger Restfeuchte im Filterkuchen enthalten. Ebenfalls vorteilhaft ist ein im betrachteten Druckbereich nahezu inkompressibles Materialverhalten. Die stäbchenförmigen ADH Kristalle und die nadelförmigen Lysozymkristalle weisen kompressibles Materialverhalten auf und haben sowohl höhere Widerstände als auch geringere Feststoffvolumenanteile im Filterkuchen. Besonders stark ist die Kompression für das nadelförmige Kristallsystem ausgeprägt. Der Kuchenwiderstand steigt um mehrere Größenordnungen von knapp $1 \times 10^{14} \text{ m}^{-2}$ auf über $1 \times 10^{16} \text{ m}^{-2}$ an. Die ebenfalls hohe Zunahme des Feststoffvolumenanteils ist ein Indiz für auftretenden Kristallbruch.

Das Sedimentationsverhalten der nadelförmigen Kristalle folgt dem Modell von Richardson-Zaki mit einem angepassten Exponenten. Die stäbchenförmigen Kristalle zeigen mit zunehmendem Feststoffvolumenanteil zunächst eine Abnahme der Sedimentationsgeschwindigkeit. Ab einem bestimmten Feststoffvolumenanteil ändert sich bei einer weiteren Zunahme die Sinkgeschwindigkeit jedoch nicht mehr signifikant. Dieses Verhalten ist durch gegenseitige Beeinflussung der länglichen Partikel erklärbar, die bei höheren Konzentrationen zu einer Orientierung im Partikelkollektiv führt.

Das Materialverhalten ist mit dem verkleinerten Filtrations- und Sedimentationsaufbau erfolgreich charakterisierbar. Die ermittelten Prozessfunktionen beschreiben die Sedimentationsgeschwindigkeit und den Filterkuchenwiderstand als eine vom Feststoffvolumenanteil abhängige Funktion.

Auslegung der Filtration auf einem integrierten Apparatkonzept mit Daten aus dem Kleinmaßstab

Für die Herstellung und Reinigung temperaturempfindlicher Produkte ist die Vakuumkristallisation, gefolgt von einem FFT Trennschritt, ein geeignetes Verfahren. Typischerweise finden die verschiedenen Grundoperationen im Batch auf dedizierten Apparaten statt. Um die Gefahr von Kontaminationen und den Energiebedarf zu verringern sowie um die Effizienz zu erhöhen, ist der Einsatz von modularisierten, quasi-kontinuierlichen Apparaten eine interessante Alternative.

Im ersten Schritt erfolgte die erfolgreiche Substitution des Batchrührkessels durch einen neuartigen Verfahrensraum, der sich auf einem Bandkristallisator verwenden lässt. Mit dem neuen Verfahrensraum sind im Fall von stäbchenförmigem Lysozym Kristalle mit ähnlichen Eigenschaften erzeugbar. Bei den isometrischen Kristallen ist eine höhere Schwankung und eine in Richtung kleinere Partikelgrößen verschobene PGV zu beobachten. Die Kuchenwiderstände bei der Filtration sind ähnlich zu den Widerständen aus der klassischen Batchproduktion, wobei auch hier die beste Übereinstimmung für die stäbchenförmigen Lysozymkristalle erreichbar ist. Die Widerstände sind zudem sowohl bei der Filtration mit der Filterzelle als auch bei einem größeren Filtrationsaufbau wie der Drucknutsche sehr ähnlich zueinander. Somit ist die Filterzelle geeignet, in einem kleinen Maßstab die Filtrationseigenschaften zu bestimmen. Anhand der Ergebnisse der Experimente ist die Filtration auf einen größeren Apparat übertragbar. Der Austausch der Membran durch ein technisch geeignetes Filtertuch bewirkte nur eine marginale Veränderung des Kuchenwiderstands und auch keinen Feststoffdurchschlag. Im letzten Schritt fand die Übertragung des kompletten Prozesses auf den integrierten Laborapparat statt. Permeationsexperimente zeigen, dass der Kuchenwiderstand dem erwarteten und zuvor bestimmten Wert weitestgehend entspricht. Die experimentelle

Permeationszeit liegt um wenige Sekunden unter der vorhergesagten Zeit. Somit ist die Lysozymproduktion erfolgreich auf einen quasi-kontinuierlichen Apparat übertragen und die damit einhergehenden Vorteile sind nutzbar. Das Verfahren ist prinzipiell auch für andere temperaturempfindliche Produkte geeignet.

Kristallbruch unter kombinierter Scher- und Druckbeanspruchung

Bei einer kombinierten Normal- und Scherbelastung von Lysozymkristallen tritt stets eine Zerkleinerung auf. Dies trifft auch auf Normalspannungen zu, für die ohne Scherbeanspruchung keine Reduktion der Partikelgrößen feststellbar ist. Bei der kombinierten Beanspruchung führt eine Zunahme der Normalspannung zu einer deutlich stärkeren Zerkleinerung. Die Schergeschwindigkeit auf der anderen Seite hat eine erheblich geringere Auswirkung auf die Zerkleinerung und ist im Vergleich zur Normalspannung eine vernachlässigbare Einflussgröße. Die hohe Zunahme an Feingut bei der Zerkleinerung ist neben dem reinen Kristallbruch auch durch Kristallabrieb erklärbar. Eine höhere Normalspannung verstärkt die Reibung im Haufwerk, weshalb sich Kristallecken und Kanten abreiben, was zu der starken Zunahme an Feingut beiträgt. Mit μ CT Daten, die eine scharfe Grenze zwischen unbeschädigten und zerstörten Kristallen zeigen, lassen sich die Beschädigungen des Haufwerks lokal beschreiben.

Die auftretende Zerkleinerung bei der überlagerten Beanspruchung ist so groß, dass eine massive Verschlechterung der FFT zu erwarten ist. Da solche überlagerten Belastungszustände in vielen technischen Apparaten auftreten, ist für Proteinkristalle auf eine geeignete Prozessführung zur Vermeidung der Zerkleinerung zu achten. Dies erfordert besonderes Augenmerk bei der Auswahl von Pumpen, Filtern und Zentrifugen.

8.1 Ausblick

Die hier dargestellten Arbeiten betrachten die Filtration von chemisch komplexen Proteinkristallen und den Kristallbruch unter kombinierter Scher- und Druckbeanspruchung. Aufgrund des bei Proteinen allgemein hohen Produktpreises und der geringen verfügbaren Mengen für eine Prozessauslegung sind durchzuführende Charakterisierungsversuche teuer. Der vorgestellte Aufbau eignet sich prinzipiell auch für andere Produkte, die nur in geringer Menge vorliegen oder teuer sind. Dies können andere Proteinsysteme oder beispielsweise seltene Erden sein. Ein weiterer Aspekt für zukünftige Arbeiten ist die automatisierte Regelung der Zentrifugendrehzahl, um während der Filtration eine konstante Druckdifferenz zu erzielen. Damit ist die Auswertung des Transmissionssignals erleichtert, und hohe Drücke liegen über

einen längeren Zeitraum an. Bei Beobachtung der Filtratmenge ist in diesem Fall neben einem Permeationsversuch auch ein Filtrationsversuch auswertbar.

Um bei zukünftigen Arbeiten eine weitere Reduktion der benötigten Versuchsanzahl zu erzielen, ist eine zusätzliche simulative Betrachtung der Filtration und des Kristallbruchs sinnvoll. Hierfür stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, die auf Daten dieser Arbeit anwendbar sind. Mit der Mikrostruktursimulation ist die Durchströmung eines Haufwerks berechenbar. Die Struktur für das Haufwerk ist zum einen aus experimentellen μ CT Aufnahmen ableitbar, aber auch durch künstliche Strukturen mit ähnlichen Eigenschaften erzeugbar. Vorarbeiten zur Mikrostruktursimulation mit Filterkuchen aus Glaskugeln zeigten die prinzipielle Möglichkeit, den Kuchenwiderstand akkurat aus der Durchströmungssimulation eines Haufwerks abzuleiten. Dies gelang sowohl für μ CT Aufnahmen des Haufwerks als auch für ein „künstliches“ Haufwerk aus einer Simulation mit der Diskrete Elemente Methode. Für komplex geformte Partikel ist die gitterlose Simulationemethode Smoothed Particle Hydrodynamics geeignet. Die Eignung dieser Methode für die Simulation eines Filterkuchens wurde in Vorversuchen auf Basis von Glaskugeln bereits erfolgreich demonstriert. Sind die Prozessfunktionen, beispielsweise aus der Charakterisierung mit der Filtrationszelle, bekannt, ist es mit simulativen Strategien möglich, die FFT auf einem größeren Apparat zu simulieren. In der wissenschaftlichen Literatur existieren bereits Modelle, die unter Berücksichtigung der Flussdichtefunktion zur Simulation von Trennvorgängen nutzbar sind.

Für die Simulation von auftretendem Partikelbruch, der ein limitierender Faktor bei der Prozessierung in Pumpen und Filtern ist, ist ein geeignetes Bruchkriterium festzulegen. Im Bereich der Druckbeanspruchung sind dazu zunächst Indentations- oder Dreipunktbiegeversuche an Einzelkristallen geeignet. Für die Scherbelastung ist eine Miniaturisierung der Scherzelle eventuell in Kombination mit der μ CT Analytik ein interessanter Ansatz. Die Kombination der Mikrostruktursimulation mit dem Partikelbruch bietet dann eine umfassende simulative Beschreibung der auftretenden Effekte und erlaubt nach einer erfolgreichen Materialcharakterisierung die Berechnung des Filtrations- und Bruchverhaltens für eine Vielzahl praktischer Anwendungsfälle.

A Analysezertifikate

 Karlsruher Institut für Technologie	Institut für MM Labor für Partikelmesstechnik										
Dichtebestimmung: Densito 30PX Biegeschwinger-Methode											
Probe:	Lysozymstäbchen										
Datum:	06.03.2018										
Auftraggeber:	Herr B. Radel/ Herr Nguyen										
Bearbeiterin:	A. Huber										
<table border="1"><thead><tr><th>Probenbezeichnung</th><th>Analysennummer</th><th>Flüssigkeitsdichte ρ_s in g/cm³ *)</th><th>Proben-temperatur in °C</th></tr></thead><tbody><tr><td>Lysozymstäbchen gesättigte Lösung</td><td>5483</td><td>1,0229 ± 0,0000</td><td>20,0 ± 0,5</td></tr></tbody></table>				Probenbezeichnung	Analysennummer	Flüssigkeitsdichte ρ_s in g/cm ³ *)	Proben-temperatur in °C	Lysozymstäbchen gesättigte Lösung	5483	1,0229 ± 0,0000	20,0 ± 0,5
Probenbezeichnung	Analysennummer	Flüssigkeitsdichte ρ_s in g/cm ³ *)	Proben-temperatur in °C								
Lysozymstäbchen gesättigte Lösung	5483	1,0229 ± 0,0000	20,0 ± 0,5								
*) Mittelwert und absolute Abweichung aus Dreifachbestimmung.											
Messgenauigkeit laut Hersteller: ± 0,001 g/cm ³											

Viskositätsbestimmung: Höppler - Kugelfall - Viskosimeter

Auftraggeber : B. Radel
 Bearbeiter : A. Huber
 Datum : 23.03.2018
 Material : gesättigte Lösungen
 Analysen-Nr. : 5487-5488
 Temperatur : (20,0 ± 0,1)°C

Probe	Analysen-Nr.:	Dichte ρ in g/cm ³	dyn. Viskosität η in mPas
ADH-Stäbchen	5487	1,0261 ± 0,0000	1,92 ± 0,00
Lysozymstäbchen	5488	1,0229 ± 0,0000	1,19 ± 0,00

- Messzeit für die dyn. Viskosität η Mittelwert und Standardabweichung aus Fünffachbestimmung
- Dichte ρ_l gemessen mittels Densitometer 30PX (Biegeschwinger-Methode), Mittelwert und absolute Abweichung aus Dreifachbestimmung (siehe A.Nr.:5464, 5483)

Dichtebestimmung im Multivolume Gaspyknometer Modell MP 1305

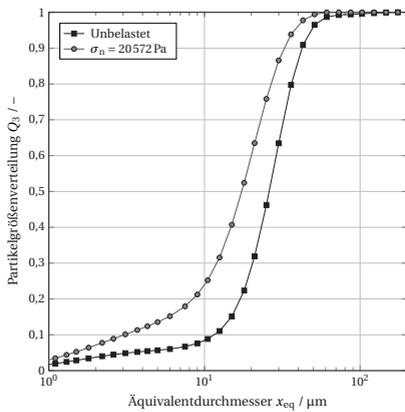
Auftraggeber: Herr B. Radel
 Bearbeiterin: A. Huber
 Datum: 29.03.2018
 Messgas: Helium 5.0
 Temperatur: 20°C

Probenbezeichnung	Analysennummer	Feststoffdichte ρ_s in g/cm^3 *)
Alkoholdehydrogenase verunreinigt	5519	$1,25 \pm 0,02$

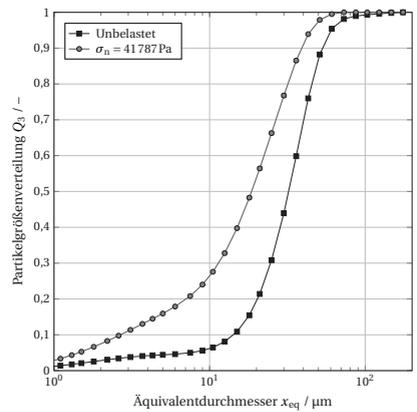
*) Mittelwert und absolute Abweichung aus Zweifachbestimmung

Proben zuvor bei 60°C mittels Infrarottrocknung ausgeheizt
 Verwendung der Scheibe ($V=5,66\text{cm}^3$, $m=44,9584\text{g}$) als Zusatzvolumen

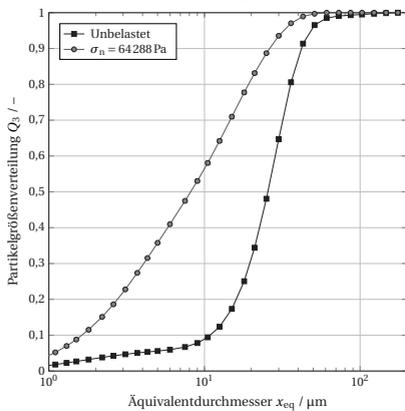
B Summenverteilungen bei Veränderung der Normalspannung



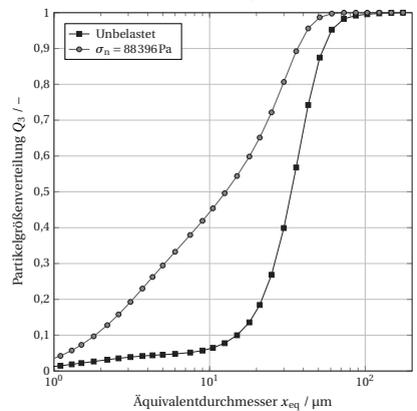
(a) Normalspannung 20 572 Pa



(b) Normalspannung 41 787 Pa



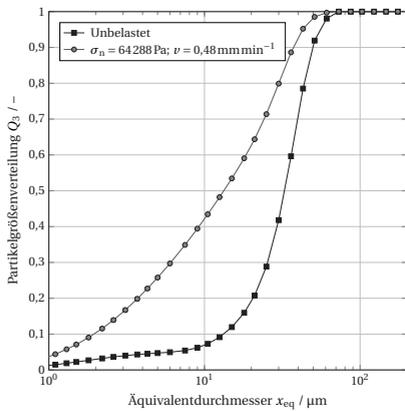
(c) Normalspannung 64 288 Pa



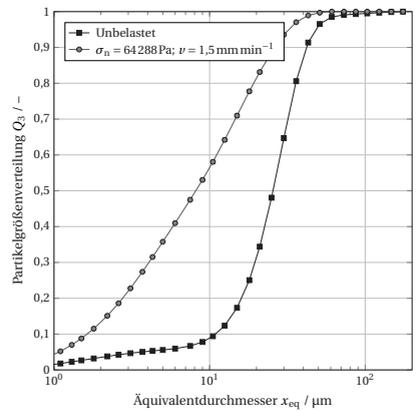
(d) Normalspannung 88 396 Pa

Abbildung B.1: Einfluss verschiedener Normalspannungen auf die Partikelgrößenverteilung

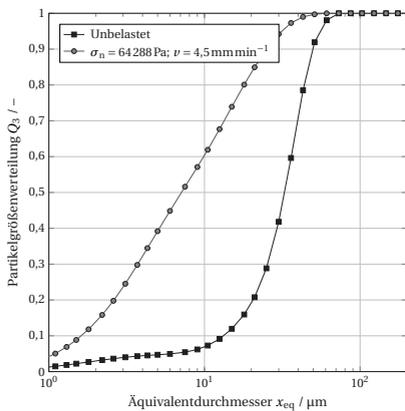
C Summenverteilungen bei Veränderung der Schergeschwindigkeit



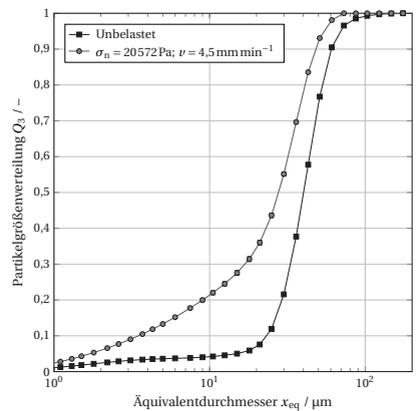
(a) Normalspannung 64 288 Pa; Schergeschwindigkeit $0,48 \text{ mm min}^{-1}$



(b) Normalspannung 64 288 Pa; Schergeschwindigkeit $1,5 \text{ mm min}^{-1}$



(c) Normalspannung 64 288 Pa; Schergeschwindigkeit $4,5 \text{ mm min}^{-1}$



(d) Normalspannung 20 572 Pa; Schergeschwindigkeit $4,5 \text{ mm min}^{-1}$

Abbildung C.1: Einfluss verschiedener Schergeschwindigkeiten auf die Partikelgrößenverteilung

Abbildungsverzeichnis

2.1	Schematische Darstellung der Tiefenfiltration, Kuchenfiltration und Querstromfiltration	6
2.2	Schematische Darstellung des Porositäts- und Widerstandsverlaufs über die Kuchenhöhe	8
2.3	Schematische Darstellung der Zentrifugalfiltration	9
2.4	Kräftegleichgewicht bei der Einzelkornsedimentation	12
2.5	Einfluss des Feststoffvolumenanteils auf die normierte Sinkgeschwindigkeit	14
2.6	Schematische Darstellung des Feststoffgerüstdrucks für ein kompressibles und ein ideal inkompressibles Stoffsystem	16
2.7	Zeitlicher Verlauf der Zonensedimentation	19
2.8	Schematischer Verlauf der Flussdichtefunktion in Abhängigkeit vom Feststoffvolumenanteil	20
2.9	Die sieben verschiedenen Kristallsysteme für den Gitteraufbau	23
2.10	Schematische Darstellung der verschiedenen Keimbildungsmechanismen	24
2.11	Peptid aus zwei Aminosäuren mit hervorgehobener Peptidbindung	26
2.12	Dreidimensionale Struktur von Lysozym aus Hühnereiweiß	27
2.13	Verschiedene auftretende Beanspruchungsarten	29
2.14	Partikelfestigkeit als Funktion der Partikelgröße	31
3.1	Aufbau eines Lichtmikroskops	33
3.2	Schematische Darstellung eines Röntgenmikroskops	35
3.3	Fotografie des CT Aufbaus	36
3.4	Präparierte Probe eines Lysozymfilterkuchens für das μ CT	37
3.5	Darstellung der einzelnen Postprocessing Schritte	38
3.6	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für die Verdrängungskristallisation	40
3.7	Dreiecksdiagramm mit Prozesswegen für isometrische und nadelförmige Lysozymkristalle	41
3.8	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für die Vakuumverdampfungskristallisation	42
3.9	Phasengleichgewichts- und Prozessverläufe bei der Verdampfungskristallisation	43
3.10	Schematische Darstellung der Drucknutsche	44
3.11	Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus zur Sinkgeschwindigkeitsbestimmung	46

3.12	Darstellung einer Scherzelle	49
3.13	Schnittdarstellung der modifizierten Scherzelle	50
3.14	Zusammengebaute und eingebaute Scherzelle	52
3.15	Schematische Darstellung des zeitlichen Schubspannungsverlaufs bei einem Scherversuch	53
4.1	Standardküvette und 3D gedruckte Filtrationszelle für die Verwendung in der optischen Zentrifuge	59
4.2	Technische Zeichnung des Unterteils mit in Rot hervorgehobenen Schrägbohrungen	60
4.3	Transmissionsverläufe bei Filtration und Permeation	61
4.4	Aus den Signalverläufen berechnete Werte Y für einen Permeationsversuch	63
4.5	Druckverläufe bei Nutzung der Filtrationszelle	64
4.6	Mit der Küvette bestimmte Filtermittelwiderstände bei Durchströmung mit gesättigter Lösung	65
4.7	Höhenspezifischer Kuchenwiderstand für aggregierte isometrische Lysozymkristalle bei verschiedenen Filtrationsdrücken	66
4.8	Relative Kuchenhöhe aggregierter Lysozymkristalle in Abhängigkeit vom Druck	67
4.9	Mittlerer Feststoffvolumenanteil für aggregierte isometrische Lysozymkristalle	68
5.1	Prozessentwicklungsschritte für Proteinkristalle	72
5.2	Mikroskopaufnahmen der betrachteten Modellkristallsysteme	73
5.3	Summenverteilung der Partikelgrößen für die Kristallsysteme	75
5.4	Filterkuchenwiderstände bei Permeation für die Partikelsysteme isometrisches, nadelförmiges und stäbchenförmiges Lysozym sowie für das Protein ADH	76
5.5	Normierte Filterkuchenhöhen für die drei Lysozymkristallsysteme und ADH	77
5.6	Feststoffgerüstdruck in Abhängigkeit des Feststoffvolumenanteils	78
5.7	Sedimentationsgeschwindigkeiten für stäbchen- und nadelförmige Lysozymkristalle	81
5.8	Flussdichtefunktionen für nadelförmige Lysozymkristalle und stäbchenförmige ADH-Kristalle	83
6.1	Partikelgrößenverteilungen für im Batchverfahren sowie in der neuen Vakuumkammer hergestellte isometrische und stäbchenförmige Lysozymkristalle	89
6.2	Höhenspezifischer Filterkuchenwiderstand isometrischer Lysozymkristalle von Permeationsexperimenten mit der Filtrationszelle (Batchverfahren) und der Drucknutsche (Vakuumkammer)	91
6.3	Höhenspezifischer Filterkuchenwiderstand stäbchenförmiger Lysozymkristalle von Permeationsexperimenten mit der Filtrationszelle (Batchverfahren) und der Drucknutsche (Vakuumkammer)	92
6.4	Höhenspezifischer Kuchenwiderstand von stäbchenförmigem Lysozym mit einer Membran und einem Filtertuch als Filtermittel	93

6.5	Partikelgrößenverteilungen verschiedener Messverfahren für drei unterschiedliche Glaskugelsysteme	96
6.6	Vergleichsmessung isometrischer Lysozymkristalle mit der Laserbeugung (LB) und dem Qicpic (QP)	97
6.7	3D Rendering eines Ausschnitts des Filterkuchens	99
6.8	Partikelgrößenverteilungen aus dem μ CT an drei Stellen des Filterkuchens	100
7.1	Computertomographieaufnahme eines Haufwerks mit Tracer Partikeln	105
7.2	Partikelgrößenverteilungen in den verschiedenen Haufwerksschichten nach der Scherung	106
7.3	Vergleich der Partikelgrößenverteilung für die unbelastete Suspension und für zentrifugierte sowie verdichtete Haufwerke	107
7.4	Einfluss verschiedener Normalspannungen auf die Partikelgrößendichtevertelung	109
7.5	Einfluss verschiedener Schergeschwindigkeiten auf die Partikelgrößendichtevertelung	111
7.6	Zerstörte Kristallschicht im Haufwerk	113
B.1	Einfluss verschiedener Normalspannungen auf die Partikelgrößenverteilung . . .	125
C.1	Einfluss verschiedener Schergeschwindigkeiten auf die Partikelgrößenverteilung .	127

Tabellenverzeichnis

2.1	Kristallarten und wirkende Gitterkräfte	22
4.1	Literaturwerte zu den mikromechanischen Eigenschaften von Lysozymkristallen .	57
5.1	Stoffparameter der verschiedenen Kristallsysteme	74
5.2	Exponenten der Modelle von Tiller und Kwon [13]	79
6.1	Theoretische und experimentell bestimmte Filtrationszeiten sowie Filterkuchenwiderstände	95

Eigene Veröffentlichungen

Journalartikel

- Schmelzle, S., Asylbekov, E., Radel, B. und Nirschl, H.: Modelling of partially wet particles in DEM simulations of a solid mixing process. *Powder Technol.* **2018**, 338, 354–364. DOI: 10.1016/j.powtec.2018.07.028.
- Radel, B., Funck, M., Nguyen, T. H. und Nirschl, H.: Determination of filtration and consolidation properties of protein crystal suspensions using analytical photocentrifuges with low volume samples. *Chem. Eng. Sci.* **2019**, 196, 72–81. DOI: 10.1016/j.ces.2018.12.019.
- Radel, B., Hardy, E. H., Djuric, Z., Mahlbacher, M., Haist, M. und Müller, H. S.: Regularized inversion of the Laplace transform for series of experiments. *Magn. Reson. Chem.* **2019**, 57.10, 836–844. DOI: 10.1002/mrc.4836.
- Hammerich, S., Stickland, A. D., Radel, B., Gleiss, M. und Nirschl, H.: Modified shear cell for characterization of the rheological behavior of particulate networks under compression. *Particuology* **2020**, 51, 1–9. DOI: 10.1016/j.partic.2019.10.005.
- Dobler, T., Radel, B., Gleiss, M. und Nirschl, H.: Quasi-Continuous Production and Separation of Lysozyme Crystals on an Integrated Laboratory Plant. *Crystals* **2021**, 11.6, 713. DOI: 10.3390/cryst11060713.
- Radel, B., Nguyen, T. H. und Nirschl, H.: Calculation of the flux density function for protein crystals from small scale settling and filtration experiments. *AIChE J.* **2021**, 67, e17378. DOI: 10.1002/aic.17378.
- Radel, B., Gleiß, M. und Nirschl, H.: Crystal Breakage due to Combined Normal and Shear Loading. *Crystals* **2022**, 12.5, 644. DOI: 10.3390/cryst12050644.

Konferenzbeiträge

- Djuric, Z., Haist, M., Hardy, E., Sester, J., Radel, B., Spinnler, V. und Müller, H. S.: Quantification of water transport induced by cyclic freeze-thaw actions using NMR techniques. *Proceedings of the 3rd International RILEM Conference on Microstructure Related Durability of Cementitious Composites* (Nanjing, China, 24.–26. Okt. 2016). 2016, 750–758.
- Radel, B. und Nirschl, H.: Investigation on the filterability of mechanical instable protein crystals. *LUM International Conference and Workshop Dispersion Analysis & Materials Testing* (Berlin, 29.–30. Jan. 2018). 2018.
- Radel, B. und Nirschl, H.: Untersuchung der Kuchenfiltration im Zentrifugalfeld von mechanisch labilen Proteinkristallen. *Jahrestreffen der Fachgruppen Mechanische Flüssigkeitsabtrennung, Trocknungstechnik und Grenzflächenbestimmende Systeme und Prozesse* (Merseburg, 26.–28. Feb. 2018). 2018.
- Radel, B. und Nirschl, H.: Analysis of Mechanically Labile Protein Crystals. *FILTECH* (Köln, 13.–15. März 2018). 2018.
- Radel, B. und Nirschl, H.: Analyzing Mechanical Labile Protein Crystals with a Special Filtration Cuvette. *8th World Congress on Particle Technology* (Orlando, FL, USA, 22.–26. Apr. 2018). 2018.
- Radel, B. und Nirschl, H.: Untersuchung der Filtrationseigenschaften mechanisch labiler Proteinkristalle im Zentrifugalfeld. *ProcessNet-Jahrestagung und 33. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen* (Aachen, 10.–13. Sep. 2018). 2018.
- Böhm, L., Bliatsiou, C., Panckow, R., Waldherr, P., Schestkowa, H., Oechsle, A., Drusch, S., Kraume, M., Pommerehne, K., Kampen, I., Krull, R., Kwade, A., Schmideder, S., Nowotny, P., Sedlmeier, S., Briesen, H., Kulozik, U., Weuster-Botz, D., Seidel, J., Lode, A., Steingroewer, J., Barros-Groß, M., Radel, B., Kind, M., Nirschl, H., Schmidt, M.-P., Hirsch, S., Maaß, S., Veiter, L. und Herwig, C.: Partikelcharakterisierung und -messtechniken in lebensmittel- und biotechnologischen Systemen. *ProcessNet-Jahrestagung und 33. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen* (Aachen, 10.–13. Sep. 2018). 2018. DOI: 10.1002/cite.201871204.
- Radel, B. und Nirschl, H.: Einfluss der Kristallmorphologie auf die Filtrationseigenschaften von Proteinkristallen bei der Kuchenfiltration. *Jahrestreffen der ProcessNet Fachgruppen Mechanische Flüssigkeitsabtrennung und Gasreinigung* (Bamberg, 14.–15. März 2019). 2019.
- Radel, B. und Nirschl, H.: The Influence of Protein Crystal Shape and Breakage on the Filtration Behavior Using a Downscaled Filtration Cell. *PARTEC* (Nürnberg, 9.–11. Apr. 2019). 2019.

- Radel, B., Nguyen, T. H. und Nirschl, H.: Determining the filtration properties of different protein crystals in the centrifugal field using low volume samples. *FILTECH* (Köln, 22.–24. Okt. 2019). 2019.
- Radel, B. und Nirschl, H.: Filtration von Proteinkristallen im Zentrifugalfeld und Strukturanalyse von Filterkuchenmittels Computertomographie. *Jahrestreffen der ProcessNet-Fachgruppen Mechanische Flüssigkeitsabtrennung, Zerkleinern und Klassieren sowie Agglomerations- und Schüttguttechnik* (Online, 15.–16. März 2021). 2021.
- Radel, B. und Nirschl, H.: Characterization of Sedimentation and Filtration of Mechanically Labile Protein Crystals on a Small Scale. *AIChE Annual Meeting* (Boston, MA, USA, 7.–11. Nov. 2021). 2021.
- Dobler, T., Radel, B., Gleiß, M. und Nirschl, H.: Quasi-kontinuierliche Herstellung und Abtrennung von Lysozymkristallen auf einer integrierten Laboranlage. *Jahrestreffen der ProcessNet Fachgruppen Mehrphasenströmungen, Mechanische Flüssigkeitsabtrennung sowie Zerkleinern und Klassieren* (Online, 22.–23. Feb. 2022). 2022.
- Radel, B., Dobler, T., Gleiß, M. und Nirschl, H.: Integrierte Produktion und Filtration von Proteinkristallen – Übertragung aus dem Kleinstmaßstab auf eine Laboranlage. Poster. *Jahrestreffen der ProcessNet Fachgruppen Mehrphasenströmungen, Mechanische Flüssigkeitsabtrennung sowie Zerkleinern und Klassieren* (Online, 22.–23. Feb. 2022). 2022.
- Dobler, T., Radel, B., Gleiß, M. und Nirschl, H.: Production and separation of temperature-sensitive crystals on an integrated, quasi-continuous laboratory plant. *FILTECH* (Köln, 8.–10. März 2022). 2022.

Literaturverzeichnis

- [1] Graf, P.: *Enzyme – die Supertalente der Bioindustrie*. 2016. URL: <https://biooekonomie.de/themen/dossiers/enzyme-die-supertalente-der-bioindustrie> (besucht am 24.02.2022).
- [2] Emergen Research: Enzymes Market Size to Reach USD 17.84 Billion in 2028 | Industry Trend – Rising Demand for High-Quality Pharmaceutical, Food & Beverage and Personal Care Products. *BioSpace* **2022**.
- [3] Ripperger, S., Gösele, W., Alt, C. und Loewe, T.: Filtration, 1. Fundamentals. In: *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*. 7. Aufl. Weinheim und Wiley online library: Wiley-VCH, 2010, 1–38. DOI: 10.1002/14356007.b02_10.pub3.
- [4] Anlauf, H.: *Wet Cake Filtration. Fundamentals, equipment, strategies*. Weinheim: Wiley VCH, 2020.
- [5] Stieß, M.: *Mechanische Verfahrenstechnik - Partikeltechnologie 1*. 3. Aufl. Springer-Lehrbuch. Berlin, Heidelberg: Springer, 2008. 499 S.
- [6] VDI 2762: *Mechanical solid-liquid separation by cake filtration*. Standard VDI 2762. Verein Deutscher Ingenieure, 2010.
- [7] Alles, C. M.: *Prozeßstrategien für die Filtration mit kompressiblen Kuchen*. Institut für Mechanische Verfahrenstechnik und Mechanik. Diss. Karlsruhe: Universität Karlsruhe, 2000. 202 S.
- [8] Loginov, M., Lebovka, N. und Vorobiev, E.: Multistage centrifugation method for determination of filtration and consolidation properties of mineral and biological suspensions using the analytical photocentrifuge. *Chem. Eng. Sci.* **2014**, 107, 277–289. DOI: 10.1010/j.ces.2013.12.011.
- [9] Sambuichi, M., Nakakura, H., Osasa, K. und Tiller, F. M.: Theory of batchwise centrifugal filtration. *AIChE J.* **1987**, 33.1, 109–120. DOI: 10.1002/aic.690330113.
- [10] Kürten, H., Raasch, J. und Rumpf, H.: Beschleunigung eines kugelförmigen Feststoffteilchens im Strömungsfeld konstanter Geschwindigkeit. *Chem. Ing. Tech.* **1966**, 38.9, 941–948. DOI: 10.1002/cite.330380905.

- [11] Bhatti, J. I.: Clusters Formation during Sedimentation of Dilute Suspensions. *Sep. Sci. Technol.* **1986**, 21.9, 953–967. DOI: 10.1080/01496398608058389.
- [12] Richardson, J. F. und Zaki, W. N.: Sedimentation and fluidisation: Part I. *Chem. Eng. Res. Des.* **1997**, 75.1 SUPPL.
- [13] Tiller, F. M. und Kwon, J. H.: Role of porosity in filtration: XIII. Behavior of highly compactible cakes. *AIChE J.* **1998**, 44.10, 2159–2167.
- [14] Erk, A.: *Rheologische Eigenschaften feindisperser Suspensionen während ihrer Fest-Flüssig-Trennung in Filtern und Zentrifugen*. Diss. Karlsruhe: Universität Karlsruhe, 2006. 231 S.
- [15] Tiller, F. M.: Revision of Kynch sedimentation theory. *AIChE J.* **1981**, 27.5, 823–829. DOI: 10.1002/aic.690270517.
- [16] Landman, K. A., White, L. R. und Eberl, M.: Pressure filtration of flocculated suspensions. *AIChE J.* **1995**, 41.7, 1687–1700. DOI: 10.1002/aic.690410709.
- [17] Usher, S. P., Studer, L. J., Wall, R. C. und Scales, P. J.: Characterisation of dewaterability from equilibrium and transient centrifugation test data. *Chem. Eng. Sci.* **2013**, 93, 277–291. DOI: 10.1016/j.ces.2013.02.026.
- [18] Kynch, G. J.: A theory of sedimentation. *Trans. Faraday Soc.* **1952**, 48, 166. DOI: 10.1039/tf9524800166.
- [19] Concha, F. und Bustos, M. C.: Settling velocities of particulate systems, 6. Kynch sedimentation processes: batch settling. *Int. J. Miner. Process.* **1991**, 32.3-4, 193–212. DOI: 10.1016/0301-7516(91)90068-T.
- [20] Holdich, R. G. und Butt, G.: Experimental and Numerical Analysis of a Sedimentation Forming Compressible Compacts. *Sep. Sci. Technol.* **1997**, 32.13, 2149–2171. DOI: 10.1080/01496399708000761.
- [21] Bürger, R., Concha, F. und Tiller, F. M.: Applications of the phenomenological theory to several published experimental cases of sedimentation processes. *Chem. Eng. J.* **2000**, 80.1-3, 105–117. DOI: 10.1016/S1383-5866(00)00090-3.
- [22] Shannon, P. T., Stroupe, E. und Tory, E. M.: Batch and Continuous Thickening. Basic Theory. Solids Flux for Rigid Spheres. *Ind. Eng. Chem. Fund.* **1963**, 2.3, 203–211. DOI: 10.1021/i160007a008.
- [23] Mersmann, A., Stichlmair, J. und Kind, M.: *Thermische Verfahrenstechnik. Grundlagen und Methoden*. 2. Aufl. Chemische Technik/Verfahrenstechnik. Berlin, Heidelberg: Springer, 2005. 664 S.
- [24] Kind, M.: Industrielle Kristallisation. *Chem. Ing. Tech.* **2003**, 75.10, 1487–1490. DOI: 10.1002/cite.200303292.

- [25] Löbnitz, L.: *Auslegung des Separationsprozesses und Entwicklung neuer Verfahrenskonzepte zur integrierten Produktion und Separation kristalliner Aminosäuren*. Institut für Mechanische Verfahrenstechnik und Mechanik (MVM). Diss. Karlsruhe: Karlsruher Institut für Technologie, 2020. 172 S. DOI: 10.5445/IR/1000118655.
- [26] Hoffmann, E.: *Faszination Kristalle und Symmetrie. Einführung in die Kristallographie*. SpringerLink Bücher. Wiesbaden: Springer Spektrum, 2016. 321 S. DOI: 10.1007/978-3-658-09581-9.
- [27] Hofmann, G.: *Kristallisation in der industriellen Praxis*. Hoboken: Wiley-VCH, 2007. 288 S.
- [28] Campbell, N. A.: *Biologie*. 2. Aufl. Der Bio-Trainer. Heidelberg: Spektrum Akadem. Verl., 2000. 1440 S.
- [29] Müller-Esterl, W.: *Biochemie*. 3. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer, 2018. 740 S.
- [30] *Struktur und Funktion der Proteine*. 2022. URL: <https://bildungsserver.hamburg.de/von-der-dna-zum-protein/2333816/struktur-der-proteine/> (besucht am 10.03.2022).
- [31] Walsh, G.: *Proteins. Biochemistry and Biotechnology*. 2. Aufl. Chichester West Sussex: John Wiley & Sons Inc, 2014. 448 S.
- [32] Pauling, L., Corey, R. B. und Branson, H. R.: The structure of proteins: two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *PNAS* **1951**, 37.4, 205–211. DOI: 10.1073/pnas.37.4.205.
- [33] Eisenberg, D.: The discovery of the alpha-helix and beta-sheet, the principal structural features of proteins. *PNAS* **2003**, 100.20, 11207–11210. DOI: 10.1073/pnas.2034522100.
- [34] Sehnal, D., Bittrich, S., Deshpande, M., Svobodová, R., Berka, K., Bazgier, V., Velankar, S., Burley, S. K., Koča, J. und Rose, A. S.: Mol* Viewer: modern web app for 3D visualization and analysis of large biomolecular structures. *Nucleic Acids Res.* **2021**, 49.W1, W431–W437. DOI: 10.1093/nar/gkab314.
- [35] Weiss, M. S., Palm, G. J. und Hilgenfeld, R.: Crystallization, structure solution and refinement of hen egg-white lysozyme at pH 8.0 in the presence of MPD. *Acta Crystallogr. D* **2000**, 56, 952–958. DOI: 10.1107/s0907444900006685.
- [36] Europäische Kommission: Verordnung (EU) Nr. 471/2012 der Kommission vom 4. Juni 2012 zur Änderung von Anhang II der Verordnung (EG) Nr. 1333/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich der Verwendung von Lysozym (E 1105) in Bier Text von Bedeutung für den EWR. *Amtsblatt der Europäischen Union* **2012**.

- [37] Schmidt, S., Havekost, D., Kaiser, K., Kauling, J. und Henzler, H.-J.: Kristallisation für die Aufarbeitung von Proteinen. *Chem. Ing. Tech.* **2004**, 76.6, 819–822. DOI: 10.1002/cite.200403360.
- [38] Basu, S. K., Govardhan, C. P., Jung, C. W. und Margolin, A. L.: Protein crystals for the delivery of biopharmaceuticals. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2004**, 4.3, 301–317. DOI: 10.1517/14712598.4.3.301.
- [39] Hagedorn, H. C., Norman Jensen, B., Krarup, N. B. und Wodstrup, I.: Protamine Insulate. *JAMA* **1936**, 106.3, 177–180. DOI: 10.1001/jama.1936.02770030007002.
- [40] Hallas-Møller, K., Petersen, K. und Schlichtkrull, J.: Crystalline and amorphous insulin-zinc compounds with prolonged action. *Science* **1952**, 116.3015, 394–398. DOI: 10.1126/science.116.3015.394.
- [41] Brader, M. L., Sukumar, M., Pekar, A. H., McClellan, D. S., Chance, R. E., Flora, D. B., Cox, A. L., Irwin, L. und Myers, S. R.: Hybrid insulin cocrystals for controlled release delivery. *Nat. Biotechnol.* **2002**, 20.8, 800–804. DOI: 10.1038/nbt722.
- [42] Cornehl, B.: *Bruch von Proteinkristallen im mechanischen Trennprozess*. MVM. Diss. Karlsruhe: Karlsruher Institut für Technologie, 2014.
- [43] Schönert, K.: Zerkleinern. In: *Mechanische Verfahrenstechnik*. Bohnet, M. (Hrsg.). Weinheim: Wiley-VCH, 2007, 149–180.
- [44] Tiller, F. M. und Lu, W.-M.: The role of porosity in filtration VIII: Cake nonuniformity in compression-permeability cells. *AIChE J.* **1972**, 18.3, 569–572. DOI: 10.1002/aic.690180317.
- [45] Schönert, K.: The influence of particle bed configurations and confinements on particle breakage. *Int. J. Miner. Process.* **1996**, 44-45, 1–16. DOI: 10.1016/0301-7516(95)00017-8.
- [46] Illies, S.: *Darstellungen zur Entfeuchtung von zu Rissbildung neigenden Filterkuchen*. Institut für Mechanische Verfahrenstechnik und Mechanik. Diss. Karlsruhe: Karlsruher Institut für Technologie, 2017. DOI: 10.5445/IR/1000072902.
- [47] Höfgen, E., Collini, D., Batterham, R. J., Scales, P. J. und Stickland, A. D.: High pressure dewatering rolls: Comparison of a novel prototype to existing industrial technology. *Chem. Eng. Sci.* **2019**, 205, 106–120. DOI: 10.1016/j.ces.2019.03.080.
- [48] Liu, J. und Schönert, K.: Modelling of interparticle breakage. *Int. J. Miner. Process.* **1996**, 44-45, 101–115. DOI: 10.1016/0301-7516(95)00022-4.
- [49] Rumpf, H.: Grundlegende physikalische Probleme bei der Zerkleinerung. *Chem. Ing. Tech.* **1962**, 34.11, 731–741. DOI: 10.1002/cite.330341104.

- [50] Tomia: *Microscope blank*. Lizenz: CC-BY-2.5. 2008. URL: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Microscope-blank.svg> (besucht am 17.01.2022).
- [51] Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P. und Cardona, A.: Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **2012**, 9.7, 676–682. DOI: 10.1038/nmeth.2019.
- [52] Schneider, C. A., Rasband, W. S. und Eliceiri, K. W.: NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **2012**, 9.7, 671–675. DOI: 10.1038/nmeth.2089.
- [53] Einstein, A.: Über einen die Erzeugung und Verwandlung des Lichtes betreffenden heuristischen Gesichtspunkt. *Ann. Phys.* **1905**, 322.6, 132–148. DOI: 10.1002/andp.19053220607.
- [54] Compton, A. H.: A Quantum Theory of the Scattering of X-rays by Light Elements. *Phys. Rev.* **1923**, 21.5, 483–502. DOI: 10.1103/PhysRev.21.483.
- [55] Buades, A., Coll, B. und Morel, J.-M.: A Non-Local Algorithm for Image Denoising. In: *Proceedings / 2005 IEEE Computer Society Conference on Computer Vision and Pattern Recognition, CVPR 2005*. 2005 IEEE Computer Society Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR'05) (San Diego, CA, USA, 20.–26. Juni 2005). Schmid, C. (Hrsg.). IEEE Computer Society. Los Alamitos, Calif.: IEEE Computer Society, 2005, 60–65. DOI: 10.1109/CVPR.2005.38.
- [56] Sundararajan, D.: *Digital image processing*. Singapore: Springer, 2017. 468 S. DOI: 10.1007/978-981-10-6113-4.
- [57] Ronneberger, O., Fischer, P. und Brox, T.: U-Net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation. In: *Medical image computing and computer-assisted intervention. Proceedings Part III*. 18th International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention (Munich, 5.–9. Okt. 2015). Navab, N., Hornegger, J., Wells, W. M. und Frangi, A. F. (Hrsg.). Bd. 9351. Lecture Notes in Computer Science 9351. MICCAI Society. Cham u. a.: Springer, 2015, 234–241. DOI: 10.1007/978-3-319-24574-4_28.
- [58] Hekmat, D., Hebel, D., Schmid, H. und Weuster-Botz, D.: Crystallization of lysozyme. From vapor diffusion experiments to batch crystallization in agitated ml-scale vessels. *Process Biochem.* **2007**, 42.12, 1649–1654. DOI: 10.1016/j.procbio.2007.10.001.
- [59] Groß, M. und Kind, M.: Bulk Crystallization of Proteins by Low-Pressure Water Evaporation. *Chem. Eng. Technol.* **2016**, 39.8, 1483–1489. DOI: 10.1002/ceat.201500582.
- [60] Barros Groß, M. und Kind, M.: From microscale phase screening to bulk evaporative crystallization of proteins. *J. Cryst. Growth* **2018**, 498, 160–169. DOI: 10.1016/j.jcrysgro.2018.06.010.

- [61] Duvaud, S., Gabella, C., Lisacek, F., Stockinger, H., Ioannidis, V. und Durinx, C.: Expasy, the Swiss Bioinformatics Resource Portal, as designed by its users. *Nucleic Acids Res.* **2021**, 49.W1, W216–W227. DOI: 10.1093/nar/gkab225.
- [62] Schulze, D.: *Scherzelle*. Dr. Dietmar Schulze. 2018. URL: https://www.dietmar-schulze.de/flyer/rst01pc_d.pdf (besucht am 26.01.2022).
- [63] Hammerich, S., Stickland, A. D., Radel, B., Gleiss, M. und Nirschl, H.: Modified shear cell for characterization of the rheological behavior of particulate networks under compression. *Particuology* **2020**, 51, 1–9. DOI: 10.1016/j.partic.2019.10.005.
- [64] Hammerich, S.: *Numerische Simulation des Fest-Flüssig-Trennprozesses in Vollmantel-zentrifugen: Simulationsmethode und Bestimmung des Materialverhaltens*. Institut für Mechanische Verfahrenstechnik und Mechanik. Diss. Karlsruhe: Karlsruher Institut für Technologie, 2020. DOI: 10.5445/IR/1000120803.
- [65] Radel, B., Funck, M., Nguyen, T. H. und Nirschl, H.: Determination of filtration and consolidation properties of protein crystal suspensions using analytical photocentrifuges with low volume samples. *Chem. Eng. Sci.* **2019**, 196, 72–81. DOI: 10.1016/j.ces.2018.12.019.
- [66] Walsh, G.: *Proteins. Biochemistry and biotechnology*. Chichester: Wiley, 2002. 547 S.
- [67] Kayser, O., (Hrsg.): *Pharmaceutical biotechnology. Drug discovery and clinical applications*. 1. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH, 2005. 311 S.
- [68] Schmidt, S., Havekost, D., Kaiser, K., Kauling, J. und Henzler, H.-J.: Crystallization for the Downstream Processing of Proteins. *Eng. Life Sci.* **2005**, 5.3, 273–276. DOI: 10.1002/e1sc.200500116.
- [69] Farid, S. S.: Process economics of industrial monoclonal antibody manufacture. *J. Chromatogr. B* **2007**, 848.1, 8–18. DOI: 10.1016/j.jchromb.2006.07.037.
- [70] Jen, A. und Merkle, H. P.: Diamonds in the rough. Protein crystals from a formulation perspective. *Pharm. Res.* **2001**, 18.11, 1483–1488.
- [71] Hubbuch, J., Kind, M. und Nirschl, H.: Preparative Protein Crystallization. *Chem. Eng. Technol.* **2019**, 42.11, 2275–2281. DOI: 10.1002/ceat.201800627.
- [72] Loginov, M., Samper, F., Gésan-Guiziou, G., Sobisch, T., Lerche, D. und Vorobiev, E.: Centrifugal ultrafiltration for determination of filter cake properties of colloids. *J. Membr. Sci.* **2017**, 536, 59–75. DOI: 10.1016/j.memsci.2017.04.064.
- [73] Lerche, D. und Sobisch, T.: Consolidation of concentrated dispersions of nano- and microparticles determined by analytical centrifugation. *Powder Technol.* **2007**, 174.1-2, 46–49. DOI: 10.1016/j.powtec.2006.10.020.

- [74] Cornehl, B., Overbeck, A., Schwab, A., Büser, J.-P., Kwade, A. und Nirschl, H.: Breakage of lysozyme crystals due to compressive stresses during cake filtration. *Chem. Eng. Sci.* **2014**, 111, 324–334. DOI: 10.1016/j.ces.2014.02.016.
- [75] Tait, S., White, E. T. und Litster, J. D.: Mechanical Characterization of Protein Crystals. *Part. Part. Syst. Charact.* **2008**, 25.3, 266–276. DOI: 10.1002/ppsc.200701112.
- [76] Kubiak, M., Solarczek, J., Kampen, I., Schallmeyer, A., Kwade, A. und Schilde, C.: Micro-mechanics of Anisotropic Cross-Linked Enzyme Crystals. *Cryst. Growth Des.* **2018**, 18.10, 5885–5895. DOI: 10.1021/acs.cgd.8b00637.
- [77] Koizumi, H., Tachibana, M., Kawamoto, H. und Kojima, K.: Temperature dependence of microhardness of tetragonal hen-egg-white lysozyme single crystals. *Philos. Mag.* **2004**, 84.28, 2961–2968. DOI: 10.1080/14786430410001716791.
- [78] Loginov, M., Zierau, A., Kavianpour, D., Lerche, D., Vorobiev, E., Gésan-Guiziou, G., Mahnic-Kalamiza, S. und Sobisch, T.: Multistep centrifugal consolidation method for characterization of filterability of aggregated concentrated suspensions. *Sep. Purif. Technol.* **2017**, 183, 304–317. DOI: 10.1016/j.seppur.2017.03.067.
- [79] Radel, B., Nguyen, T. H. und Nirschl, H.: Calculation of the flux density function for protein crystals from small scale settling and filtration experiments. *AIChEJ.* **2021**, 67, e17378. DOI: 10.1002/aic.17378.
- [80] Garrido, P., Bürger, R. und Concha, F.: Settling velocities of particulate systems. *Int. J. Miner. Process.* **2000**, 60.3-4, 213–227. DOI: 10.1016/S0301-7516(00)00014-4.
- [81] Bürger, R. und Concha, F.: Settling velocities of particulate systems: 12. *Int. J. Miner. Process.* **2001**, 63.3, 115–145. DOI: 10.1016/S0301-7516(01)00038-2.
- [82] Bürger, R., Concha, F. und H. Karlsen, K.: Phenomenological model of filtration processes: 1. Cake formation and expression. *Chem. Eng. Sci.* **2001**, 56.15, 4537–4553. DOI: 10.1016/S0009-2509(01)00115-4.
- [83] Nowotny, P., Hermann, J., Li, J., Krautenbacher, A., Klöpfer, K., Hekmat, D. und Weuster-Botz, D.: Rational Crystal Contact Engineering of *Lactobacillus brevis* Alcohol Dehydrogenase to Promote Technical Protein Crystallization. *Cryst. Growth Des.* **2019**. DOI: 10.1021/acs.cgd.9b00067.
- [84] Hermann, J., Nowotny, P., Schrader, T. E., Biggel, P., Hekmat, D. und Weuster-Botz, D.: Neutron and X-ray crystal structures of *Lactobacillus brevis* alcohol dehydrogenase reveal new insights into hydrogen-bonding pathways. *Acta Crystallogr. F* **2018**, 74.12, 754–764. DOI: 10.1107/S2053230X18015273.

- [85] Grob, P., Huber, M., Walla, B., Hermann, J., Janowski, R., Niessing, D., Hekmat, D. und Weuster-Botz, D.: Crystal Contact Engineering Enables Efficient Capture and Purification of an Oxidoreductase by Technical Crystallization. *Biotechnol. J.* **2020**, e2000010. DOI: 10.1002/biot.202000010.
- [86] Kubiak, M., Storm, K.-E., Kampen, I. und Schilde, C.: Relationship between Cross-Linking Reaction Time and Anisotropic Mechanical Behavior of Enzyme Crystals. *Cryst. Growth Des.* **2019**, 19.8, 4453–4464. DOI: 10.1021/acs.cgd.9b00232.
- [87] He, P., Mejia, A. F., Cheng, Z., Sun, D., Sue, H.-J., Dinair, D. S. und Marquez, M.: Hindrance function for sedimentation and creaming of colloidal disks. *Phys. Rev. E* **2010**, 81.2 Pt 2, 026310. DOI: 10.1103/PhysRevE.81.026310.
- [88] Gleiß, M.: *Dynamische Simulation der Mechanischen Flüssigkeitsabtrennung in Vollmantelzentrifugen*. Institut für Mechanische Verfahrenstechnik und Mechanik. Diss. Karlsruhe: Karlsruher Institut für Technologie, 2018. DOI: 10.5445/KSP/1000086086.
- [89] Kundrot, C. E. und Richards, F. M.: Effect of hydrostatic pressure on the solvent in crystals of hen egg-white lysozyme. *J. Mol. Biol.* **1988**, 200.2, 401–410. DOI: 10.1016/0022-2836(88)90249-5.
- [90] Alles, C. M. und Anlauf, H.: Filtration mit kompressiblen Kuchen: Effiziente Konzepte für eine anspruchsvolle Trennaufgabe. *Chem. Ing. Tech.* **2003**, 75.9, 1221–1230. DOI: 10.1002/cite.200303268.
- [91] Tiller, F. M. und Hsyung, N. B.: Unifying the theory of thickening, filtration, and centrifugation. *Water Sci. Technol.* **1993**, 28.1, 1–9. DOI: 10.2166/wst.1993.0004.
- [92] Dobler, T., Radel, B., Gleiss, M. und Nirschl, H.: Quasi-Continuous Production and Separation of Lysozyme Crystals on an Integrated Laboratory Plant. *Crystals* **2021**, 11.6, 713. DOI: 10.3390/cryst11060713.
- [93] Hekmat, D.: Large-scale crystallization of proteins for purification and formulation. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* **2015**, 38.7, 1209–1231. DOI: 10.1007/s00449-015-1374-y.
- [94] Behr, A., Brehme, V. A., Ewers, C. L. J., Grön, H., Kimmel, T., Küppers, S. und Symietz, I.: New Developments in Chemical Engineering for the Production of Drug Substances. *Eng. Life Sci.* **2004**, 4.1, 15–24. DOI: 10.1002/elsc.200406127.
- [95] Lier, S., Paul, S., Ferdinand, D. und Grünewald, M.: Modulare Verfahrenstechnik: Apparatentwicklung für wandlungsfähige Produktionssysteme. *Chem. Ing. Tech.* **2016**, 88.10, 1444–1454. DOI: 10.1002/cite.201600015.
- [96] Bieringer, T., Buchholz, S. und Kockmann, N.: Future Production Concepts in the Chemical Industry: Modular - Small-Scale - Continuous. *Chem. Eng. Technol.* **2013**, 36.6, 900–910. DOI: 10.1002/ceat.201200631.

- [97] Dobler, T., Buchheiser, S., Gleiß, M. und Nirschl, H.: Development and Commissioning of a Small-Scale, Modular and Integrated Plant for the Quasi-Continuous Production of Crystalline Particles. *Processes* **2021**, 9.4, 663. DOI: 10.3390/pr9040663.
- [98] Thurner, F.: Der Titus-Nutsch-Trockner - Neue Wege der Produktisolierung. *Chem. Ing. Tech.* **1990**, 62.9, 753–755. DOI: 10.1002/cite.330620914.
- [99] Gehrman, D. und Schweigler, N.: Device for continuous filtration and drying of a solid suspension. U.S. Patent No. 5,527,458. 1996.
- [100] Capellades, G., Neurohr, C., Azad, M., Brancazio, D., Rapp, K., Hammersmith, G. und Myerson, A. S.: A Compact Device for the Integrated Filtration, Drying, and Mechanical Processing of Active Pharmaceutical Ingredients. *J. Pharm. Sci.* **2020**, 109.3, 1365–1372. DOI: 10.1016/j.xphs.2019.12.011.
- [101] Barros Groß, M. und Kind, M.: Comparative Study on Seeded and Unseeded Bulk Evaporative Batch Crystallization of Tetragonal Lysozyme. *Cryst. Growth Des.* **2017**, 17.6, 3491–3501. DOI: 10.1021/acs.cgd.7b00456.
- [102] Radel, B., Gleiß, M. und Nirschl, H.: Crystal Breakage due to Combined Normal and Shear Loading. *Crystals* **2022**, 12.5, 644. DOI: 10.3390/cryst12050644.
- [103] Cornehl, B., Grünke, T. und Nirschl, H.: Mechanical Stress on Lysozyme Crystals during Dynamic Cross-Flow Filtration. *Chem. Eng. Technol.* **2013**, 1665–1674. DOI: 10.1002/ceat.201300178.
- [104] Breitung-Faes, S.: Estimation of product relating energy of wet operated stirred media mills in terms of process transfer to other mill geometries and sizes. *Miner. Eng.* **2017**, 103–104, 33–42. DOI: 10.1016/j.mineng.2016.08.008.

Proteine sind aus Aminosäuren aufgebaute Makromoleküle, die für eine Vielzahl biologischer Stoffwechselvorgänge essenziell sind. Auch in der technischen Anwendung kommen Proteine, beispielsweise zur Katalyse von Reaktionen, zum Einsatz. Ein möglicher Aufarbeitungsschritt ist die selektive Kristallisation des Zielproteins mit anschließender Filtration. Ziel dieser Arbeit ist es, bereits früh in der Prozessentwicklung eine Aussage zur Filtrierbarkeit zu ermöglichen. Die Entwicklung von kristallinen Proteinprodukten findet in einem kleinen Maßstab vom Tropfen bis hin zu wenigen Millilitern statt. Die Auslegung der Filtration auf der anderen Seite benötigt mit den Standardverfahren eine vergleichsweise große Menge Suspension. Eine in dieser Arbeit entwickelte Filtrationszelle ermöglicht die Charakterisierung der Filtration in kleinem Maßstab. Der Materialbedarf reduziert sich auf etwa 200–500 μL , was zu einer Verringerung der Entwicklungszeit führt.

