

**Adaption inline mikroskopischer Verfahren an die
Überwachung und Charakterisierung biotechnologischer
Kristallisationsprozesse**

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Chem. Arne Bluma

geboren am 06. September 1979 in Hannover

Hannover, 2009

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper
Korreferent: Prof. Dr. Bernd Hitzmann
Tag der Promotion: 03.07.2009

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst habe und die benutzten Hilfsmittel sowie eventuell zu Hilfsleistungen herangezogene Institutionen vollständig angegeben habe. Ferner versichere ich, dass die Dissertation nicht bereits als Diplomarbeit oder andere Prüfungsleistung verwendet worden ist.

Hannover, Juli 2009

Arne Bluma

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde im Zeitraum von März 2006 bis Februar 2009 am Institut für Technische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Thomas Scheper angefertigt. Ihm möchte ich herzlich für die stets freundliche Unterstützung bei einer interessanten Aufgabenstellung und für die gebotenen Möglichkeiten danken.

Professor Dr. Bernd Hitzmann danke ich für die Übernahme des Korreferats und für seine Ideen zur Charakterisierung des Reaktorsystems.

Bei der DFG bedanke ich mich für die Finanzierung dieses Projektes.

Für eine anregende und produktive Zusammenarbeit im Rahmen des ISM Projektes möchte ich mich bei meinem ehemaligen Betreuer Dr. Guido Rudolph (Anton Paar OptoTec, Seelze-Letter) sowie bei Dr. Klaus Joeris (Roche, Penzberg), Dr. Reinhard Baumfalk (Sartorius, Göttingen) und Professor Dr. Geovanni Martines (Universität, Costa Rica) bedanken.

Bei Dr. Sascha Beutel bedanke ich mich für die unzähligen Diskussionen über nicht nur wissenschaftliche Themen sowie für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Vielen Dank für deine Freundschaft und deine Kochkünste!

Ein großes Dankeschön geht an Martina Weiss, die mir bei sämtlichen Versuchsproblemen mit Rat und Tat zur Seite stand.

Der Feinmechanikwerkstatt unter der Leitung von Wilhelm Behnsen danke ich für die schnelle und unkomplizierte Anfertigung der Reaktorsysteme sowie für diverse Hilfestellungen bei allen kleinen und großen Problemen. Bei Herrn Friedbert Gellermann möchte ich mich für das Anfertigen der technischen Zeichnungen bedanken.

Vielen Dank auch an die Elektronikwerkstatt unter der Leitung von Thorleif Hentrop.

Allen Mitgliedern des TCI danke ich herzlich für die tolle Arbeitsatmosphäre und die ständige Hilfsbereitschaft. Danke für die vielen Freundschaften, die entstanden sind und über den Unialltag hinausgingen.

An dieser Stelle möchte ich mich bei einigen Personen speziell bedanken; leider kann ich nicht alle aufzählen - man möge es mir verzeihen.

Bei Tim Höpfner und Jessica Scharff bedanke ich mich für ihre wissenschaftliche Unterstützung im Rahmen ihrer Diplom- bzw. ihrer Schwerpunktarbeit. Besonders dir, Tim, danke ich für deinen unermüdlichen Einsatz beim Kampf gegen die amorphen Strukturen; ohne dich hätten sich Teile dieser Arbeit nicht so positiv entwickelt.

Dr. Patrick Lindner möchte ich für die Entwicklung diverser Algorithmen zur Auswertung der Kristallisationsprozesse und für eine unvergessliche Zeit in Boston danken. "There goes the dog in the pan crazy".

Vielen Dank auch an Anne Glindkamp und Alain Graf, den beiden anderen As aus dem „A-Team“, für die ständige Hilfsbereitschaft und viele wissenschaftliche Diskussionen. Unsere gemeinsame Zeit wird mir immer in Erinnerung bleiben.

Nicht unerwähnt bleiben sollen Florian Taft und Rouven Scheffler, die mich durch mein Studium begleitet haben, auch gerade an ihrer Dissertation arbeiten und mir zwei gute Freunde geworden sind. Geteiltes Leid ist halbes Leid!

Meinen Freunden Bastian Heuer und Stephan Feller danke ich für die abwechslungsreichen Stunden neben dem Unialltag.

Meinen Großeltern Martha und Ruprecht Palfner sowie meiner Mutter Annegret Bluma danke ich herzlich für ihre Liebe und ihren Rückhalt. Ohne euch wären mein Studium und das Anfertigen dieser Dissertation nicht möglich gewesen.

Ein herzliches Dankeschön geht an Catrin Wende für ihre liebevolle Unterstützung und das Ertragen diverser Gefühlsschwankungen während des Schreibens dieser Arbeit.

Zusammenfassung

Arne Bluma

Adaption inline mikroskopischer Verfahren an die Überwachung und Charakterisierung biotechnologischer Kristallisationsprozesse

Die Kristallisation ist heute als Aufarbeitungsschritt biotechnologischer Produkte wieder eine intensiv erforschte Technik. Zur Charakterisierung und Dokumentation dieses Prozessschrittes ist der Einsatz von inline Sonden essentiell.

Diese Arbeit beschreibt die Adaption inline mikroskopischer Verfahren an die Überwachung von Kristallisationsprozessen. Auf der Basis der In-situ Mikroskopie (ISM) wird ein In-situ Videomikroskop (ISVM) entwickelt und als prozessbegleitendes, nicht-invasives Messsystem zur inline Analyse von Kristallisationen eingesetzt. Für die Durchführung und Überwachung der Kristallisationsprozesse wird ein spezielles Reaktorsystem angefertigt und charakterisiert. Eine gute Durchmischung bei einer geringen Rührerdrehzahl und die Wahl der richtigen Rührblätter sind für eine erfolgreiche Kristallisation im Reaktor immanent.

In offline Voruntersuchungen wird zunächst das Kristallisationsverhalten verschiedener Substanzen getestet, bevor die Überwachung an Modellsubstanzen wie Aspirin[®] und Paracetamol[®] erfolgt. Das Auffinden der optimalen Kristallisationsparameter für eine erfolgreiche Kristallisation von Proteinen wird in Screenings ermittelt. Dazu werden Parameter wie Temperatur, pH-Wert, Kristallisationsmittel (Salze), deren Konzentration sowie die Proteinkonzentration in Dampfdiffusions-Experimenten variiert. Nachdem alle relevanten Einflussgrößen erfasst wurden, wird das Messsystem an den Kristallisationsprozess von Lysozym adaptiert. Dabei wird die Kristallisation von Lysozym in einem Scale up-Prozess vom Mikroliter- in den Litermaßstab überführt.

Des Weiteren wird das ISVM zur Überwachung industrieller Kristallisationen eingesetzt. Es werden das Kristallwachstum von Human-Insulin und die Kristallgrößenverteilung von Laktose-Kristallen näher beschrieben.

Zur Auswertung der generierten Kristallbilder werden Algorithmen entwickelt und in die Analysesoftware des Mikroskops implementiert. Die Algorithmen erlauben die Detektion und Klassifikation der Kristalle und ermöglichen somit Aussagen über das Kristallwachstum und die Kristallgrößenverteilung während des Kristallisationsprozesses.

Schlagwörter: In-situ Videomikroskop (ISVM), Kristallgrößenverteilung (KGV), Kristallwachstum, Kristallmorphologie, Lysozym, Aspirin[®], Paracetamol[®]

Abstract

Arne Bluma

Adaptation of inline Microscopic Techniques for the Monitoring and Characterization of Biotechnological Crystallization Processes

The crystallization as a unit operation in downstream processing is today an intensively investigated procedure, especially in biotechnology. The use of inline sensor systems is essential for the characterization and documentation of this process step. Within this PhD-thesis the adaptation of inline microscopic techniques for the monitoring of crystallization processes is presented. Based on the concept of In-situ microscopy (ISM) a new In-situ video microscope (ISVM) was developed and applied for the inline analysis of crystallizations. The microscope works non-invasively and continuously. For inline monitoring of crystallizations a special 0.5 L stirred tank reactor was developed and characterized. A successful crystallization in the reactor system depends on a good intermixture and a slow stirrer speed. Therefore the choice of the right impeller is important.

In offline experiments the crystallization properties of different chemical compounds are tested before the monitoring of model substances like Aspirin[®] and Paracetamol[®] are performed. The optimal crystallization parameters for an effective crystallization of proteins are carried out in screenings. For these purpose parameters like temperature, pH-value, precipitant (salts), their concentration as well as the protein concentration are varied in vapor diffusion experiments. Having determined all relevant influencing variables the measurement system is adapted to the crystallization process of lysozyme. Hence the crystallization process is scaled up from a micro liter scale to a liter scale.

Furthermore the ISVM is used to characterize industrial crystallization processes. The crystal growth of human insulin and the crystal size distribution of lactose crystals are described in this work.

For the data evaluation image analysis algorithms are developed and implemented in the microscope analysis software. The algorithms allow the detection and classification of the crystals and facilitate information about the crystal growth and crystal size distribution during the crystallization process.

Keywords: In situ Video Microscope (ISVM), Crystal Size Distribution (CSD), Crystal Growth, Crystal Morphology, Lysozyme, Aspirin[®], Paracetamol[®]

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	
1. Einleitung und Zielsetzung	1
2. Prozessanalytische In-situ Sonden	3
2.1 Etablierte inline Technologien zur Partikelmessung	3
2.1.1 Spektroskopische Methoden	3
2.1.1.1 Nephelometrie / Turbidimetrie.....	4
2.1.1.2 ATR-FTIR Spektroskopie.....	4
2.1.2 FBRM® (Focused Beam Reflectance Measurement)	5
2.1.3 PVM® (Particle Vision Microscope)	6
2.1.4 Parsum IPP-Systeme	7
2.2 Bildgebende inline Sensoren zur Partikelcharakterisierung	8
2.2.1 PIA (Particle Image Analyzer)	8
2.2.2 Envirocam™	9
2.3 Zusammenfassung	10
3. In-situ Mikroskopie	12
3.1 In-situ Mikroskop Typ III XTF	12
3.2 Aufbau des In-situ Mikroskops Typ III XTF	13
3.3 Messprinzip	14
3.4 Modifikationen	15
3.4.1 Adaption eines neuen Kameramoduls.....	15
3.4.1.1 Bestimmung der optischen Eigenschaften	16
3.4.2 Test diverser LEDs	17
3.4.3 Integration von Polarisationsfiltern	18
3.5 Etablierte Anwendungen	19
4. Softwarekomponenten des In-situ Mikroskops	21
4.1 In-situ Control	21
4.2 In-situ Analysis 1.2	23
5. Entwicklung eines Messsystems zur offline Analyse für Partikel > 1 mm	25
5.1 Aufbau und Messprinzip des LPMIS	25
5.2 Voruntersuchungen	26
5.2.1 Bestimmung der optischen Eigenschaften des LPMIS	27
5.2.2 Untersuchungen an Partikeln	27
5.3 Offline Analyse eines biotechnologischen Prozesses	28

5.3.1	Charakterisierung der Carrier	28
5.3.2	Zusammenfassung und Diskussion.....	31
6.	Entwicklung von Kristallisationsreaktoren	34
6.1	Aufbau des Reaktorsystems Prototyp A	34
6.2	Reaktionstechnische Charakterisierung	35
6.2.1	Bestimmung der Verweilzeit	35
6.2.1.1	Ermittlung grundlegender Kenngrößen.....	37
6.2.2	Einfluss der mechanischen Beanspruchung auf die Kristallisation	38
6.2.3	Erstellen von Temperaturprofilen	40
6.3	Entwicklung des Prototypen B	41
6.3.1	Aufbau des Reaktorsystems Prototyp B.....	41
6.4	Reaktionstechnische Charakterisierung	43
6.4.1	Bestimmung der Verweilzeit	43
6.4.1.1	Ermittlung grundlegender Kenngrößen.....	44
6.4.2	Einfluss der mechanischen Beanspruchung auf die Kristallisation	44
6.4.3	Erstellen von Temperaturprofilen	46
6.5	Zusammenfassung und Diskussion	47
7.	Proteinkristallisation	49
7.1	Allgemeines.....	49
7.2	Screening ausgewählter Proteine	52
7.3	Dampfdiffusionsexperimente	53
7.3.1	Kristallisationsverhalten von Lysozym.....	54
7.4	Scale up des Kristallisationsprozesses von Lysozym.....	55
7.4.1	Batch-Versuche in 1 mL Reaktionsgefäßen.....	55
7.4.2	Batch-Versuche in einem 50 mL Rührkesselreaktor	56
7.4.3	Zusammenfassung und Diskussion.....	58
8.	Voruntersuchungen an Modellsystemen.....	60
8.1	Modellkristallstrukturen	60
8.1.1	Zusammenfassung und Diskussion.....	61
9.	Online Überwachung von Kristallisationsprozessen	63
9.1	Online Überwachung pharmazeutischer Kristallisationsprozesse.....	63
9.1.2	Charakterisierung des Kristallisationsprozesses von Aspirin®	63
9.1.3	Charakterisierung des Kristallisationsprozesses von Paracetamol®	67
9.1.3.1	Bestimmung der Kristallgrößenverteilung	69
9.1.4	Zusammenfassung und Diskussion.....	70

9.2	Online Überwachung von Lysozym-Kristallisationen	71
9.2.1	Charakterisierung des Kristallisationsprozess.....	71
9.2.2	Charakterisierung des Lösungsvorgangs.....	74
9.2.3	Zusammenfassung und Diskussion.....	76
9.3	Online Überwachung industrieller Kristallisationsprozesse	79
9.3.1	Inhalatives Human-Insulin	79
9.3.2	Überwachung von Insulin-Kristallisationsprozessen	79
9.3.2.1	Strategie zur Segmentation und Klassifizierung der Kristalle.....	80
9.3.2.2	Charakterisierung des Kristallisationsprozesses	81
9.3.2.3	Zusammenfassung und Diskussion.....	82
9.3.3	Charakterisierung von Lactose-Kristallen.....	83
9.3.3.1	Voruntersuchungen der Kristalle	83
9.3.3.2	Bestimmung der Kristallgrößenverteilung.....	84
9.3.3.3	Zusammenfassung und Diskussion.....	88
10.	Fazit und Ausblick	91
11.	Literaturverzeichnis.....	95
12.	Anhang.....	100
12.1	Abkürzungsverzeichnis.....	100
12.2	Verwendete Chemikalien und Materialien	102
12.2.1	Chemikalien.....	102
12.2.2	Materialien.....	103
12.3	Verwendete Geräte	104
12.4	Verwendete Kalibrationsgeraden	104
12.4.1	Kalibration der Rührgeschwindigkeit (Prototyp B)	104
12.4.2	Spektroskopische Messungen	105
12.5	Reaktorcharakterisierung	106
12.5.1	Prototyp A.....	106
12.5.2	Prototyp B.....	107
12.6	Bildverarbeitungsparameter	107
12.6.1	In-situ Analysis-Modul <i>G. Project</i>	107
12.6.2	In-situ Analysis-Modul <i>Crystal</i>	108
12.6.3	In-situ Analysis-Modul <i>Crystal 2</i>	108
12.7	Protokolle zur Kristallisation von Lysozym.....	109
12.7.1	Lysozym (hexagonal).....	109
12.7.2	Lysozym (tetragonal).....	109
12.7.3	Lysozym (monoklin)	110
12.7.4	Lysozym (orthorhombisch).....	110

12.7.5	Lysozym (triklin)	110
12.8	Aufbau der Kristallisationsreaktoren	111
12.8.1	Prototyp A.....	111
12.8.2	Prototyp B.....	112
12.9	Lebenslauf	115
12.9.1	Publikationsliste.....	116

1. Einleitung und Zielsetzung

Escherichia Coli und Säugetierzelllinien wie CHO-Zellen (*chinese hamster ovary*) und BHK-Zellen (*baby hamster kidney*) sind heute die meist genutzten Zelltypen in der biotechnologischen Produktion [Walsh, 2006]. Vergleicht man einen biotechnologischen Produktionsprozess der frühen 80er Jahre mit aktuellen Industrieprozessen, erhält man einen Einblick in die kontinuierlich optimierte Prozessführung und die enorme Verbesserung der Produktivität der Zelllinien. In den letzten 20 Jahren erhöhte sich die Produktausbeute um das 100-fache und die spezifische Produktivität wurde um den Faktor 9 gesteigert [Wurm, 2004].

Im Bereich des Downstream Processing werden dabei zunehmend anspruchsvollere Anforderungen an die Aufarbeitungstechniken und deren Dokumentation gestellt, um eine kostengünstige und effiziente Qualitätssicherung zu realisieren. Für eine optimale Prozessführung mit hoher Produktausbeute ist eine zeitnahe und zuverlässige Dokumentation der relevanten Prozess- und Regelgrößen durch Sensoren unerlässlich [Dremel et al., 1992]. Die FDA (*Food and Drug Administration*) sowie die für den europäischen Bereich zuständige Aufsichtsbehörde EMEA (*European Medicines Agency*) stellen durch verschiedene Aktivitäten immer strengere Auflagen an die Prozesserfassung. So hat die PAT-Initiative (*Process Analytical Technology*) der FDA einen erheblichen Beitrag zur verstärkten Entwicklung von prozessanalytischen Inline-Sonden geleistet, um eine robuste, exakte sowie automatisierte Prozesskontrolle zu erreichen [Scheper et al., 1984], [Reardon et al., 1995], [Schügerl et al., 1986].

Bei der Aufarbeitung biotechnologischer Produkte fallen heutzutage durchaus Proteinkonzentrationen von über 5 g/L an. Schon jetzt ist abzusehen, dass dieser Wert in den nächsten Jahren drastisch steigen wird [Castilho et al., 2008]. Da die Aufarbeitung im Vergleich zum Upstream Processing der kostenintensivere Faktor ist, muss so verlustarm und selektiv wie möglich gearbeitet werden. Im Einzelfall kann die Aufarbeitung des Produktes bis zu 80 % der Gesamtkosten ausmachen [Lowe et al. 2001]. Für hohe Produktkonzentrationen stellt die Kristallisation als Unit Operation eine hervorragende und heute wieder intensiv erforschte Aufarbeitungstechnik dar. Die Attraktivität dieses Prozessschrittes liegt, verglichen mit konkurrierenden Verfahren wie der Chromatographie, vor allem in der Kostenreduzierung [Schmidt et al. 2005]. Zudem werden durch kristalline Reaktionsprodukte die weiteren Aufarbeitungsschritte wie Filtration, Wasch- und Trocknungsprozesse verkürzt. Dadurch verringert sich die Gesamtprozessdauer und die Produktqualität wird erhöht [Riesen, 1999]. Der Schlüsselparameter für einen Kristallisationsprozess ist die Kristallgrößenverteilung (KGV), da die physikalischen und

chemischen Eigenschaften eines Kristalls stark von der Größe und Form abhängen [Barrett et al., 1999]. Zur Analyse der Partikelgröße und -form werden häufig Methoden angewandt, die auf den optischen Eigenschaften des zu untersuchenden Systems basieren. Bisher werden Kristallisationen überwiegend durch Trübungsmessungen beschrieben und charakterisiert. Typische Kurvenverläufe definieren dabei den Start- und Endpunkt und somit das Voranschreiten des Prozesses. Neben Verfahren, die auf Trübungsmessungen oder auf der Erfassung von rückwärtigem Laser-Streulicht basieren, werden auch bildgebende Technologien für die Bestimmung der Prozessparameter eingesetzt. Ein Nachteil der meisten am Markt etablierten bildgebenden Verfahren ist, dass sie nur offline zur Verfügung stehen und somit keine direkte Beobachtung des Prozesses erlauben [Rudolph et al., 2007].

Thema und Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines In-situ Videomikroskops, das zur prozessbegleitenden nicht-invasiven online Analyse von Proteinkristallisationen eingesetzt werden kann. Für den experimentellen Einsatz des In-situ Videomikroskops wird ein spezieller Kristallisationsreaktor entwickelt, in dem die Kristallisationsprozesse näher untersucht werden können. Das Reaktorsystem muss dabei diverse Spezifikationen aufweisen (z. B. Ports für Messsonden, Anschlüsse für die Substratzugabe). Die Untersuchung der Kristallisationsprozesse erfolgt zunächst an Modellsubstanzen; dabei werden in Screenings alle relevanten Einflussgrößen der Kristallisationsprozesse charakterisiert. Nach dem Auffinden der geeigneten Parameter und dem erfolgreichen Einsatz an Modelkristallstrukturen wird das Messsystem an die Überwachung und Analyse eines Modellproteins adaptiert. Zur Auswertung der generierten Bilder von den Kristallisationsprozessen werden Auswertungsalgorithmen entwickelt und in die bestehende In-situ Mikroskop Software implementiert. Die Algorithmen erlauben die Detektion und Klassifikation der Kristalle und ermöglichen so die Charakterisierung der Prozesse.

2. Prozessanalytische In-situ Sonden

Einführend wird ein Überblick über prozessanalytische In-situ Sonden zur Beobachtung und Charakterisierung von Prozessen, bei denen sich Partikel bilden, gegeben. Solche Prozesse werden häufig durch spektroskopische Verfahren wie z. B. der ATR-FTIR-Spektroskopie und turbidimetrischen Methoden zur Bestimmung der optischen Dichte charakterisiert. Ein Nachteil dieser Verfahren ist, dass sie nur eine indirekte Aussage über den Prozess zulassen. Der Trend geht eindeutig zu Technologien, die sowohl quantitative als auch qualitative Informationen erlauben. Zurzeit erobern Sensoren, die auf der Erfassung von rückwärtigem Streulicht basieren und eine Partikelgrößenverteilung ermöglichen, den Markt. Dieser Parameter ist gerade bei der Beobachtung von biotechnologischen Kristallisationen von großem Interesse, da nur durch eine einheitliche Kristallgrößenverteilung auch eine gleichbleibende Produktqualität gewährleistet ist.

Die Zukunft der Analyse von Kristallisationsprozessen liegt in der Entwicklung von bildgebenden inline Sensoren. Nur durch mikroskopische Untersuchungen können neben Parametern wie der Partikelzahl bzw. der Partikelgrößenverteilung auch exakte Angaben über die Morphologie der Partikel erhalten werden. Nach einer Vorstellung bereits etablierter Technologien werden neue bildgebende inline Sonden beschrieben.

2.1 Etablierte inline Technologien zur Partikelmessung

Bis heute ist eine effektive und kostengünstige inline Charakterisierung dispergierter und bewegter Partikel eine Herausforderung für die Messtechnik [Suhr et al., 1995]. Neben indirekten spektroskopischen Methoden haben sich mittlerweile drei inline Verfahren zur Bestimmung von Partikeln auf dem Markt etabliert. Dabei handelt es sich um das patentierte FBRM[®]-Verfahren (Focused Beam Reflectance Measurement) und das bildgebende PVM[®] (Particle Video Microscope). Beide Messsysteme wurden von der Firma Mettler Toledo / Lasentec (Lasentec Inc, Redmond WA, USA) entwickelt.

Eine weitere bereits industriell genutzte Sonde ist das Parsum IPP System der Firma Malvern (Malvern Instruments GmbH, Herrenberg, Deutschland).

2.1.1 Spektroskopische Methoden

Indirekte Informationen über den Konzentrationsverlauf von Partikeln während eines Prozesses können durch die optische Dichte erhalten werden. Zur Messung der optischen

Dichte werden Sensoren verwendet, die basierend auf Glasfasersystemen mit dem Bioreaktor gekoppelt sind. Dabei ist die In-situ Sonde räumlich vom Transmitter getrennt, wodurch der Detektor geschützt ist. Die optischen Signale sind unempfindlich gegenüber elektromagnetischer Strahlung wie sie zum Beispiel die RührerMotoren von Bioreaktoren abstrahlen [Rehbock et al., 2008]. Es können sowohl Transmissions- als auch Reflektionsmessungen durchgeführt werden. Bei spektroskopischen Analysen können UV-, IR,- und die VIS-Spektroskopie zur indirekten Prozessbeobachtung genutzt werden [Scheper et al., 1999].

2.1.1.1 Nephelometrie / Turbidimetrie

Bei der Überwachung von Kristallisationen werden häufig Trübungsmessungen (Nephelometrie / Turbidimetrie) verwendet. Die Konzentration suspendierter Partikel wird dabei nach dem Prinzip der Lichtrückwärtsstreuung gemessen. Über Lichtwellenleiter wird nahes infrarotes Licht in das Medium eingeleitet. Trifft das Licht auf Partikel wird es in alle Richtungen gestreut. Das rückwärtige Streulicht (180°) wird wiederum auf einem Lichtwellenleiterkabel zurück zu einer im Transmitter installierten Photodiode geleitet und messtechnisch aufbereitet. Trübungsmessungen basieren also auf dem Prinzip der Reflektionsmessungen. Der Messbereich für kleine Konzentrationen wird oft in FTU (Formazine Turbidity Units) angegeben. Für große Konzentrationen wird der Messbereich meistens in Gramm suspendierter Feststoffe pro Liter Probenvolumen dargestellt. Durch charakteristische Kurvenverläufe beschreiben sie somit den Start- und den Endpunkt einer Kristallisation [Riesen, 1999].

2.1.1.2 ATR-FTIR Spektroskopie

Immer häufiger wird die ATR-FTIR (attenuated total reflectance-fourier transform infrared) Spektroskopie zur Charakterisierung von Kristallisationsprozessen eingesetzt. Sie basiert auf dem Phänomen, dass bei der Totalreflektion von Licht an der Grenze zwischen einem optisch dichten (ATR-Kristall) und optisch dünnen Medium (Probe) der Lichtstrahl in das optisch dünnere Medium eindringt (siehe Abb. 01). Diese Verschiebung und Ausbreitung des Lichtstrahls wird als evaneszente Welle (lat. evanescere: dahinschwinden) bezeichnet, da die Amplitude der eindringenden Welle exponentiell mit der Entfernung von der Kristallgrenzfläche abnimmt. ATR-Kristalle sind häufig trapez- oder prismenförmig aufgebaut und bestehen aus Germanium, Zinkselenid oder Diamant. Befinden sich in dem optisch dünnen Medium IR-aktive Analyten wird Strahlung absorbiert und die Intensität des reflektierten Strahls sinkt [Lewiner et al., 2001].

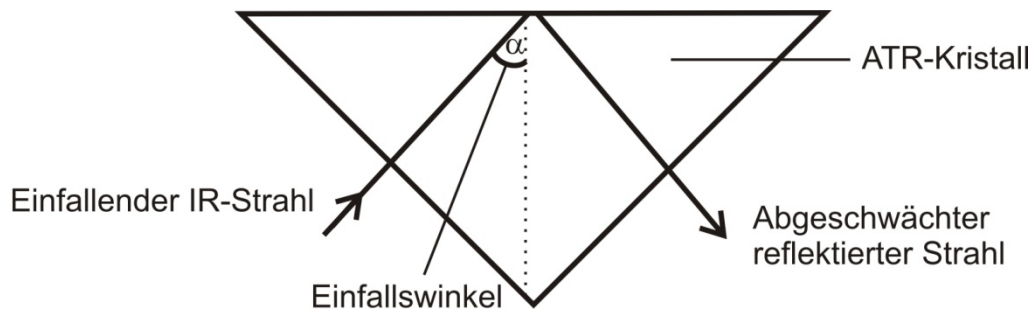


Abb. 01: Schematische Darstellung der abgeschwächten Totalreflexion (ATR). Bei der Totalreflexion von Licht an der Grenze zweier Phasen unterschiedlicher Brechungsindizes ($n_1 > n_2$) dringt der Lichtstrahl in das optisch dünnere Medium ein.

Durch Scannen eines ganzen Bandes von Wellenlängen erhält man ein IR-Reflektionsspektrum und somit eine indirekte Aussage über die Zusammensetzung des Prozessmediums.

2.1.2 FBRM[®] (Focused Beam Reflectance Measurement)

Dieses Messsystem dient zur Bestimmung von Feststoffteilchen in hochkonzentrierten Lösungen. Dabei wird die Partikelgrößenverteilung nicht direkt, sondern indirekt über die Sehnenlängenverteilung der detektierten Partikel berechnet. Das Messprinzip der Sonde beruht auf der Erfassung von rückwärtigem Laserstreulicht (180° Streulicht). Mittels Glasfasern wird das erzeugte Laserlicht in die Sonde geleitet, bevor es durch eine exzentrisch angeordnete und rotierende Linse außerhalb des Sondenfensters fokussiert wird (siehe Abb. 02) [Greaves et al., 2008].

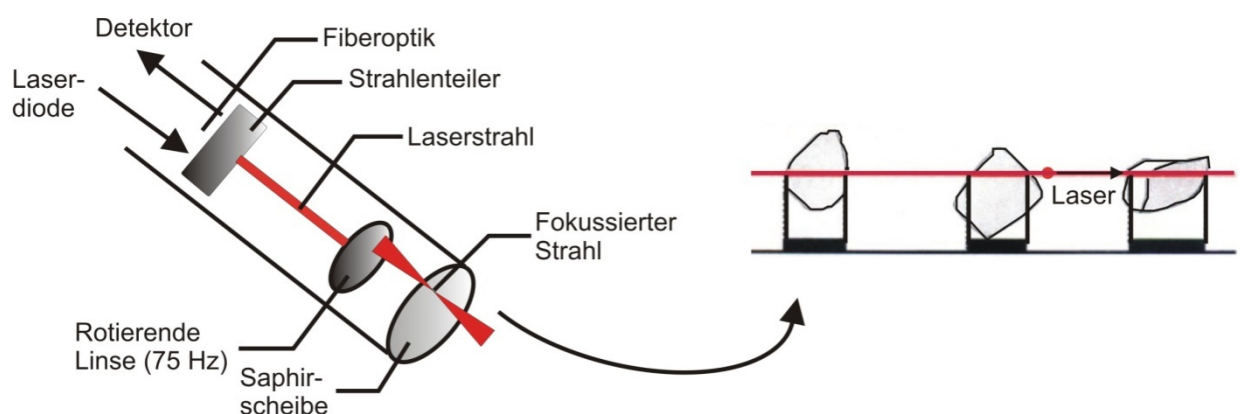


Abb. 02: Schematische Darstellung des Messprinzips einer FBRM[®]-Sonde (Mettler Toledo). Die Abtastung der Partikel erfolgt durch einen rotierenden, fokussierten Laserstrahl. Aus der Dauer der Rückstrahlung bei der Partikelabtastung wird die Sehnenlänge berechnet.

Durch die rotierende Optik resultiert eine Rotationsgeschwindigkeit des Laserlichtes von $2 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$. Trifft der Laserstrahl auf einen Partikel wird Licht in alle Richtungen gestreut, aber nur das direkt zurückgestreute Licht läuft durch einen Strahlenteiler zu einem Photodetektor. Je länger ein Partikel durch den Laserstrahl abgetastet wird, desto größer ist die Zeit der Rückstreuung.

Die Sehnenlänge der Partikel errechnet sich aus der Rückstreuzeit multipliziert mit der Tangentialgeschwindigkeit des Laserlichtes. Pro Sekunde werden mehrere tausend Partikel erfasst und diese elektronisch in Längeneinheiten ($0,8 - 1.000 \mu\text{m}$) sortiert [Barret et al., 1999]. Ein Impulsunterscheider gewährleistet, dass nur sich in der Fokusebene befindende Partikel in die Berechnung der Sehnenlängenverteilung einbezogen werden. Der Applikationsbereich von FBRM[®]-Sonden umfasst u. a. die Überwachung von Kristallisationsprozessen anorganischer und organischer Reaktionen [Heath et al., 2002], [Schirg et al., 2001]. Des Weiteren wurde diese Technologie zur Messung des Absatzverhaltens von Klärschlamm [Clercq et al., 2004] und in der Meeresbiologie [Law et al., 1997] eingesetzt.

2.1.3 PVM[®] (Particle Vision Microscope)

Das PVM[®] ist ein prozessinternes Aufsicht-Mikroskop und Bildanalysesystem. Die Beleuchtungseinheit der Sonde ist aus sechs, in einem Winkel von 60° , ringförmig angeordneten LEDs konstruiert (siehe Abb. 03).

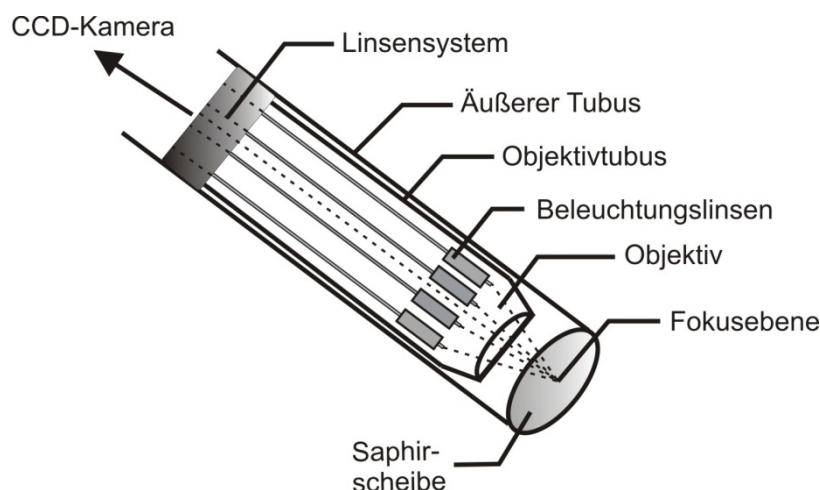


Abb. 03: Schematische Darstellung des Messprinzips einer PVM[®]-Sonde (Mettler Toledo). Beleuchtungslinsen fokussieren das Licht innerhalb des Prozessmediums. Eine CCD-Kamera generiert die Bilder.

Beleuchtungslinsen fokussieren das Licht durch Saphirscheiben auf eine Ebene innerhalb des Prozessmediums. Das Gesichtsfeld der CCD-Kamera umfasst eine Fläche von

860 · 645 µm. Daraus resultiert eine Bildauflösung von 3 – 5 µm. Eine Software mit der ca. 10 Bilder/s gespeichert werden können, komplettiert das PVM[®]-System [Barret, 2003]. PVM[®]-Sonden und FBRM[®]-Sonden werden oft in Kombination angewandt, hauptsächlich zur Beobachtung von Kristallisationsprozessen und Multiphasensystemen in der organischen Chemie und der Pharmazie [Barret et al., 2002].

2.1.4 Parsum IPP-Systeme

Der neueste inline Sensor Parsum IPP 70-S der Firma Malvern (Herrenberg, Deutschland) wurde speziell für die Erfassung von größeren Partikeln entwickelt. Ausgelegt ist der Sensor für das Messen von Partikeln mit einer durchschnittlichen Größe von 50 – 6.000 µm. Eine interne Druckluftzufuhr ermöglicht den Einsatz der Sonde in Prozessen bei denen mit Verschmutzung oder Benetzung der optischen Fenster (Saphir) zu rechnen ist. Durch zusätzliche Module wie Spülzellen, Dispergierer und Entnahmevorrichtungen ist eine optimale Anpassung an den Prozess und die zu untersuchenden Partikel gewährleistet. Das Messprinzip der Sonde beruht auf der Methode der faseroptischen Ortsfilteranemometrie, welche die gleichzeitige Messung der Partikelgröße und der Partikelgeschwindigkeit ermöglicht (siehe Abb. 04). Dabei wird ausgenutzt, dass Partikel beim Passieren eines Laserstrahls auf eine geradlinige Anordnung von optischen Fasern einen Schatten werfen.

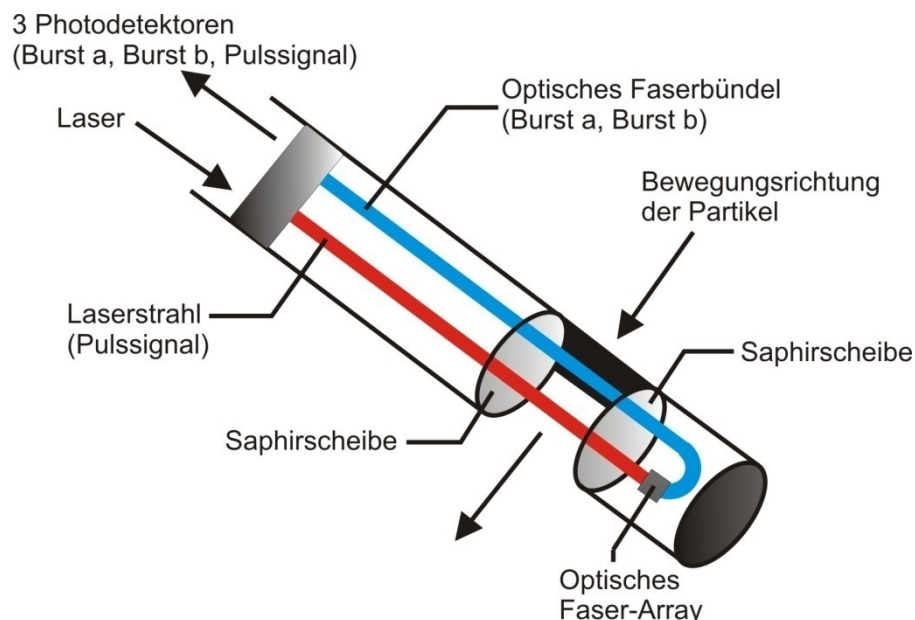


Abb. 04: Schematische Darstellung des Messprinzips einer IPP 70-S Sonde (Malvern). Die Partikel durchlaufen bei ihrer Bewegung durch die Messzone einen Laserstrahl und ein Faserbündel. Die so detektierten Signale erlauben die Bestimmung der Partikelgröße und – geschwindigkeit.

Die Partikel erzeugen dabei ein Burstsinal, welches von zwei Faserbündeln detektiert wird. Die Frequenz des erhaltenden Signals wird über Photodetektoren gemessen und ist proportional zur Partikelgeschwindigkeit. Beim Durchqueren des Laserstrahls wird ein Pulssignal in einer einzelnen optischen Faser erzeugt. Die Berechnung der Sehnenlänge erfolgt aus der bekannten Zeit des Pulssignals und der Partikelgeschwindigkeit. Typischerweise werden 3.000 – 10.000 Partikel in einer Zeit von 30 – 120 s gemessen. Parsum Sondensysteme werden u. a. in der Lebensmittelindustrie zur Beobachtung einer ausbalancierten Kaffeemahlung und zur Überwachung von Pulver und Granulaten für Instant-Produkte eingesetzt. Ein weiteres Anwendungsgebiet ist die Charakterisierung der Granulierung von Arzneimitteln bei der Bayer Schering Pharma AG.

2.2 Bildgebende inline Sensoren zur Partikelcharakterisierung

Im folgenden Abschnitt wird der Stand der Technik von neuen bildgebenden In-situ Sensoren zur Charakterisierung von dispergierten Partikeln wiedergegeben. Eine Beschreibung des in dieser Arbeit genutzten In-situ Mikroskops (ISM) als bildgebendes Verfahren wird gesondert in Kapitel 3 vorgestellt.

Durch die rasante Entwicklung von CCD-Kameras und immer leistungsfähigeren Computern erhält diese zukunftsweisende Prozessanalysetechnik enormes Potential und trägt zu einem besseren Verständnis von Kristallisationsprozessen bei. Der Informationsgehalt der in Echtzeit generierten Bilder übertrifft durch die Visualisierung alle anderen Analysemethoden. Die Integration und Entwicklung von modular aufgebauten Bildauswertungsprogrammen erlaubt nicht nur quantitative, sondern auch qualitative Aussagen über die Partikel. So können neben Parametern wie der Kristallzahl und -größe auch morphologische Eigenschaften näher untersucht werden.

2.2.1 PIA (Particle Image Analyzer)

Mit der Partikel Image Analyzer-Serie der Firma MTS (Messtechnik Schwarz GmbH, Düsseldorf, Deutschland) können Morphologie, Größe und Form von dispergierten Partikeln und Kristallen gemessen werden. Das PIA-System besteht aus einem IVM (Inline Video Microscope) und einer modular aufgebauten Bildanalysesoftware. Verschiedene optionale Module ermöglichen eine auf das zu untersuchende System angepasste Auswertung. Das Messprinzip des IVM beruht auf der Erfassung von Partikeln mit einer innerhalb im Sensor integrierten CCD-Kamera (siehe Abb. 05). Als Beleuchtungskomponente dient eine

Faseroptik. Die sichtbar gemessenen Partikel befinden sich bei dieser Sonde immer auf der Fokusebene zwischen CCD-Kamerasystem und der Beleuchtungseinheit.

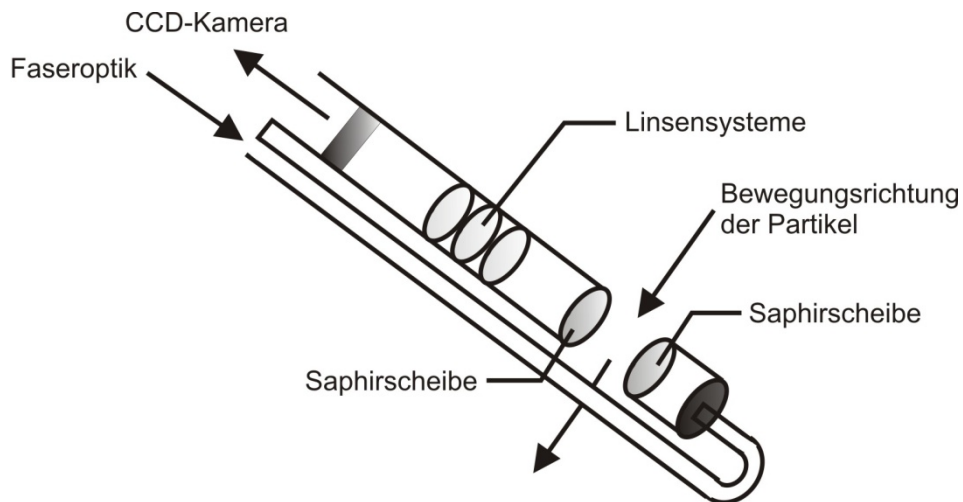


Abb. 05: Schematische Darstellung des Messprinzips einer IVM Sonde (Messtechnik Schwarz). Die Partikel befinden sich beim Durchqueren der Messzone immer in der Fokusebene und werden von einer CCD-Kamera erfasst.

Bei einer Bildaufnahme rate von 25 fps und einer Bildfläche von $768 \cdot 576$ Pixeln können Partikel in einem Größenbereich von $40 - 425 \mu\text{m}$ zuverlässig gemessen werden. Polarisationsfilter erlauben die Untersuchung von klaren, durchsichtigen Kristallen. Optional einsetzbare Farbfilter ergänzen das Beleuchtungssystem. Die Sensorfenster sind in einem speziellen elektronischen Verfahren poliert und erhitzt, um das Anhaften von Partikeln zu vermeiden. Die Anwendungsgebiete des PIA-System liegen in der Forschung und Entwicklung sowie in der Prozesskontrolle. Es wurde schon erfolgreich bei der Beobachtung zur Ermittlung der Kristallform, bei der Entstehung und Bildung von Partikeln und bei der Herstellung von Granulaten wie Zuckerkristallen und Medikamenten eingesetzt.

2.2.2 Envirocam™

Ein relativ neues System zur Charakterisierung von Partikeln ist das Envirocam™-Verfahren der Firma Enviroptics (Colmar, USA). Das Messsystem wurde entwickelt, um Beobachtungen, Analysen und Untersuchungen hinsichtlich physikalischer Änderungen in einem Prozess zu ermitteln.

Das Envirocam™-System besteht aus einer Sonde mit einer Messzone, die durch zwei Saphirscheiben begrenzt wird, einer abnehmbaren CCD-Kamera und einer LED als Beleuchtungseinheit (siehe Abb. 06). Bei einem Gesichtsfeld von $1.024 \cdot 1.024$ Pixel erlaubt das verwendete Kamerasystem eine Bildauflösung von $6,45 \mu\text{m}$ Kantenlänge pro Pixel. Um

die Höhe der Messzone zwischen 2,54 cm und 0,64 cm zu variieren, wurden diverse Prototypen entwickelt [Junker et al., 2007].

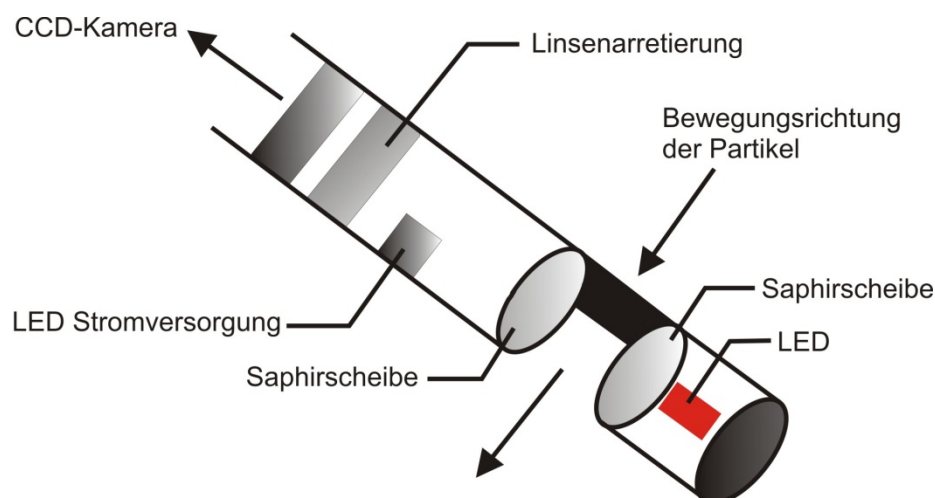


Abb. 06: Schematische Darstellung des Messprinzips einer Envirocam™ Sonde (Enviroptics). Beim Passieren der Messzone werden die Partikel von einer CCD-Kamera erfasst.

Verschiedene Kameramodule und Beleuchtungseinheiten (LED, Wellenlängenbereich 640 – 720 nm) werden eingesetzt, um das System an die zu untersuchende Applikation anzupassen. Zuverlässig detektierbare Partikelgrößen liegen zwischen 40 μm – 2 mm. Eine Bildanalysesoftware basierend auf der LabVIEW-Plattform (National Instruments) komplettiert das Messsystem. Es können sowohl Einzelbilder als auch Videosequenzen der zu analysierenden Partikel aufgenommen werden. Bis auf die Beleuchtungseinheit ist die Sonde durch Heißdampf sterilisierbar.

Am Institut für Korrosion und Mehrphasentechnik der Universität Ohio, USA wird die Sonde eingesetzt, um Kondensations- und Korrosionsprozesse an der Innenseite von Rohrleitungen zu analysieren. Die Sonde kann permanent in ein Reaktor- oder Rohrleitungssystem integriert werden, um einen Prozess kontinuierlich über einen langen Zeitraum näher zu untersuchen. Des Weiteren dient sie zur Charakterisierung von unterschiedlichen Strömungszonen in Reaktorsystemen. So werden Aussagen über die Größe und das Größenverhältnis von auftretenden Blasen in Abhängigkeit der Rührgeschwindigkeit und Luftzufuhr ermöglicht [Junker et al., 2007].

2.3 Zusammenfassung

Alle vorgestellten prozessanalytischen inline Sonden tragen zu einem besseren Verständnis von Prozessen, bei denen Feststoffe entstehen, bei. Basierend auf unterschiedlichen Technologien ermöglichen sie die Beobachtung und Charakterisierung von Partikeln in

einem Größenbereich von 1 – 6.000 μm . Durch den resultierenden analytischen Informationsgehalt erhöhen sie die Prozesstransparenz und erleichtern eine kontinuierliche Qualitätskontrolle. In Tabelle 01 sind die wichtigsten Eigenschaften der beschriebenen inline Sonden zusammengefasst.

Tab. 01: Prozessanalytische inline Sonden zur Charakterisierung von Partikeln.

Sonde	Messprinzip	Messbereich	Messzone	Informationsgehalt
FBRM [®]	Rückwärts-Streulicht (180°)	1 - 1.000 μm	außerhalb der Sonde	Partikelgrößenverteilung
PVM [®]	Auflicht-Mikroskopie	3 - 800 μm	außerhalb der Sonde	Partikelgrößenverteilung und Morphologie
IPP 70-S	Ortsfilteranemometrie	50 - 6.000 μm	definierte Messzonenhöhe (wechselbare Module)	Partikelgrößenverteilung und Geschwindigkeit der Partikel
IVM	Durchlicht-Mikroskopie	40 - 425 μm	feste Zohnenhöhe, Partikel befinden sich immer in der Fokusebene	Partikelgrößenverteilung und Morphologie
Envirocam [™]	Durchlicht-Mikroskopie	40 - 2.000 μm	definierte Messzonenhöhe (wechselbare Module)	Partikelgrößenverteilung und Morphologie

Ihr Anwendungsgebiet erstreckt sich über einen weiten Bereich in der Analyse biotechnologischer Prozesse; es reicht von der Überwachung kristalliner Produkte bis hin zur Analyse von Granulaten und Luftblasen.

Der große Vorteil von bildgebenden In-situ Sonden gegenüber den anderen Verfahren liegt in der Echtzeit-Generierung von Bild- und / oder Videodateien. Durch eine kontinuierliche Visualisierung und Kontrolle des Prozesses ist es möglich, Kontaminationen und / oder unerwünschte Nebenreaktionen frühzeitig zu erkennen. Dadurch können Reaktionszeiten verkürzt und Fehlchargen verhindert werden. Die generierten Bilder geben neben Informationen über die Partikelzahl und Partikelgröße auch Aufschluss über den morphologischen Zustand der zu untersuchenden Substanz. So können Aussagen über die Form und Struktur der Partikel und damit auch über die Reinheit des Feststoffes dokumentiert werden. Zudem bieten entsprechende Bildverarbeitungsprogramme eine Vielzahl von Analysemöglichkeiten. Die zumeist modular aufgebauten Softwareprogramme ermöglichen so eine Charakterisierung der Partikel auf unterschiedlichste Art und Weise.

3. In-situ Mikroskopie

Das Konzept der In-situ Mikroskopie wurde erstmals 1990 in der Offenlegungsschrift von Suhr vorgestellt [Suhr et al., 1991]. Es handelt sich dabei um ein nicht-invasives Verfahren, bei dem biotechnologische Prozesse direkt (In-situ) in einem Fermenter mikroskopisch beobachtet werden können. Das Mikroskop wird seitlich über einen 25 mm Standardport in das Prozessmedium integriert. Aus dem laufenden Prozess werden Bilder generiert und einer automatischen Bildverarbeitung zugeführt, die dann die Bestimmung prozessrelevanter Parameter ermöglicht.

In diesem Kapitel werden das verwendete ISM-System, das Messprinzip und die vorgenommenen Modifikationen beschrieben. Anschließend erfolgt ein Überblick über das Applikationsspektrum dieser bildgebenden inline Sonde.

3.1 In-situ Mikroskop Typ III XTF

In dieser Arbeit wurde das ISM System Typ III XTF (siehe Abb. 07) verwendet. Es ist eine modifizierte Version der Vorgängermodelle Typ III XT [Rudolph, 2004] und Typ III P [Brückerhoff, 2006].

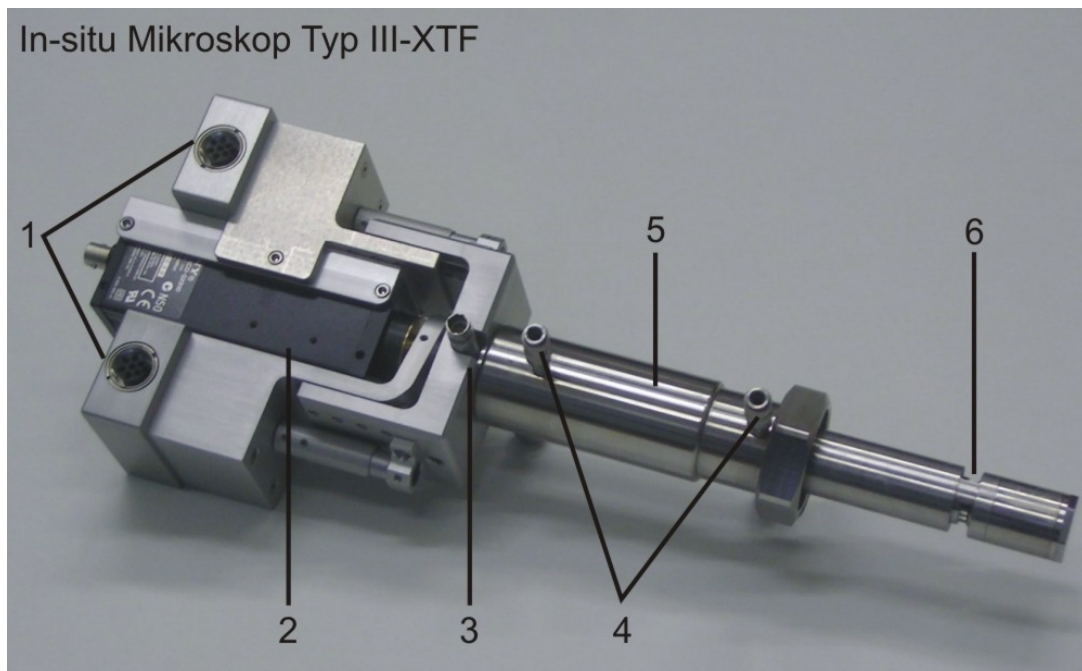


Abb. 07: In-situ Mikroskop Typ III-XTF; 1) Anschlüsse für Controller; 2) CCD-Kamera; 3) LED Stromversorgung; 4) Anschlüsse für Heißdampf; 5) Mikroskopbody; 6) Durchfluss-Messzone [Bluma, 2006].

Durch eine kontinuierliche Verbesserung hinsichtlich der Robustheit und der Langzeitstabilität entspricht es den Anforderungen einer industriellen Umgebung und wurde u. a. bei der Firma Bayer HealthCare (Berkeley, USA) und einem weiteren Industriepartner zur online Überwachung biotechnologischer Prozesse eingesetzt.

3.2 Aufbau des In-situ Mikroskops Typ III XTF

Alle bisher entwickelten ISM-Sonden unterscheiden sich bezüglich ihrer Beleuchtung und ihrer Konstruktion und sind in der Literatur eingehend beschrieben. Als Beleuchtungsvarianten stehen das Auflicht-Verfahren [Schneider 1995], [Suhr et al., 1995] und das Durchlicht-Verfahren [Bittner 1994], [Frerichs 2000], [Frerichs et al., 2002], [Camisard et al., 2002], [Brückerhoff 2006], [Rudolph 2007], [Wei et al., 2007a], [Rudolph et al., 2007] zur Verfügung. Ein weiterer Unterschied zu den bisher entwickelten In-situ Mikroskopsonden liegt in der Konstruktion der Messzone. Hier wird zwischen einer optischen und einer mechanischen Messzone differenziert.

Das ISM Typ III XTF ist ein modular aufgebautes Durchlicht-Hellfeld-Mikroskop (DH-ISM) mit endlich korrigierter Optik. Je nach Größe der zu untersuchenden Partikel kann das In-situ Mikroskop mit 4-fach, 10-fach oder 20-fach vergrößernden Objektiven bestückt werden. Im Strahlengang ist eine CCD-Kamera platziert, auf die das reelle Zwischenbild projiziert wird. Das ISM lässt sich in zwei Segmente unterteilen (siehe Abb. 08).

Das untere Segment bildet den autoklavierbaren Teil und besteht aus dem Mikroskopbody und der Durchfluss-Messzone. Dieser Teil des Mikroskops wird über einen seitlichen 25 mm Fermenterport in den Reaktor integriert und mit einer Überwurfmutter befestigt. Die Durchfluss-Messzone befindet sich am unteren Ende des Mikroskopbodys und taucht permanent in das Medium ein. Begrenzt wird die Durchfluss-Messzone durch zwei Saphirglasscheiben (künstlicher Al_2O_3 Einkristall), die senkrecht zum Strahlengang positioniert sind. Der Messzonenschlitz lässt sich durch einen Außentubus öffnen und schließen. Dadurch kann das Durchflussvolumen variiert werden. Das Durchflussvolumen der Zone ergibt sich aus dem Abstand der Saphirscheiben multipliziert mit dem Gesichtsfeld der Kamera bei der jeweiligen Vergrößerung. Die Beleuchtungseinheit des Mikroskops sitzt unter der Messzone und besteht aus einer Leuchtdiode (LED) und einer Kondensorlinse.

Das obere Segment besteht aus einem U-Trägerprofil, an dem zwei fahrbare Linearschlitten montiert sind, die über Schrittmotoren und Mikrometerschrauben in bestimmte Stellungen gebracht werden können. Der erste Schlitten ist mit dem Außentubus verbunden und dient dem Öffnen und Schließen der Messzone. An dem zweiten Schlitten ist die CCD-Kamera mit Objektivtubus befestigt. Er dient zur Objektfokussierung.

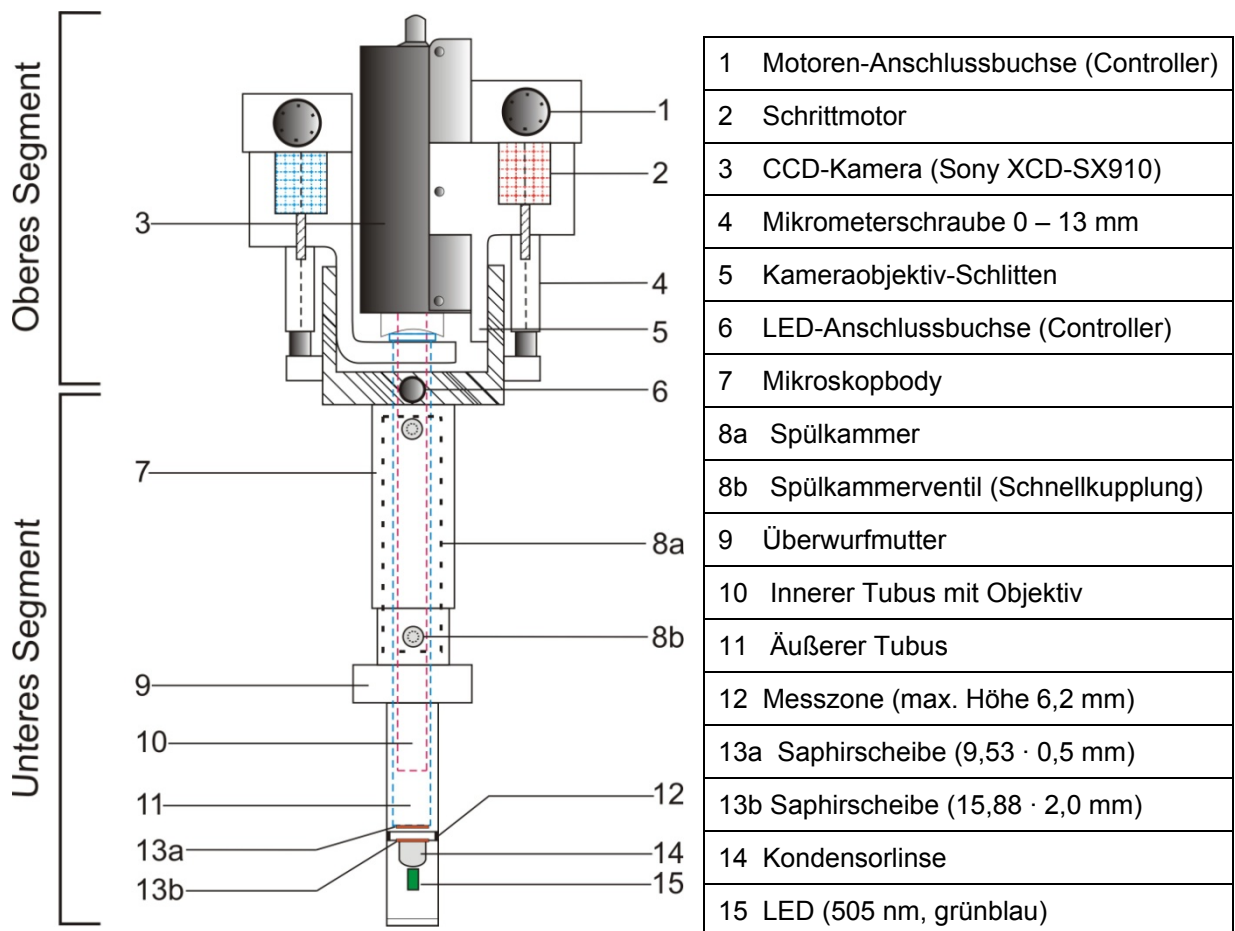


Abb. 08: Detailansicht des In-situ Mikroskops Typ III XTF.

3.3 Messprinzip

Das Messprinzip der Sonde beruht darauf, dass durch Konvektion ein kontinuierlicher Strom von Partikeln durch die Durchfluss-Messzone des Mikroskops transportiert wird. Sobald die richtige Zonenhöhe gefunden ist und die Partikel sich in der Fokusebene befinden, kann mit der Bildaufnahme begonnen werden (siehe Abb. 09). Die Generierung der Bilder erfolgt mit einer CCD-Kamera. Die beiden Saphirscheiben, welche die Messzone begrenzen, dienen dabei als Objektträger und Deckglas. Während der Akquirierung der Bilder wird davon ausgegangen, dass die Zusammensetzung des Mediums innerhalb der Messzone identisch mit dem übrigen Kulturmedium im Reaktor ist. So können unter der Annahme, dass beim Durchqueren der Partikel durch die Messzone keine Veränderungen auftreten, prozessanalytische Parameter wie Partikelzahl oder Partikelgröße bestimmt werden. Die Fließgeschwindigkeit der Objekte wird durch die Rührgeschwindigkeit und die Messzonenhöhe definiert. Je schneller sich die Objekte durch die Messzone bewegen, desto kürzer muss die Belichtungszeit sein, um scharfe Konturen abzubilden. Da bei der

Beobachtung von Kristallisationen grundsätzlich niedrige Rührgeschwindigkeiten gewählt werden, können als Lichtquelle LEDs unterschiedlicher Wellenlänge verwendet werden. Entscheidend bei der Charakterisierung von dreidimensionalen Strukturen ist eine schnelle Bildaufnahmezeit, um möglichst viele Informationen über die Struktur der Partikel zu erhalten.

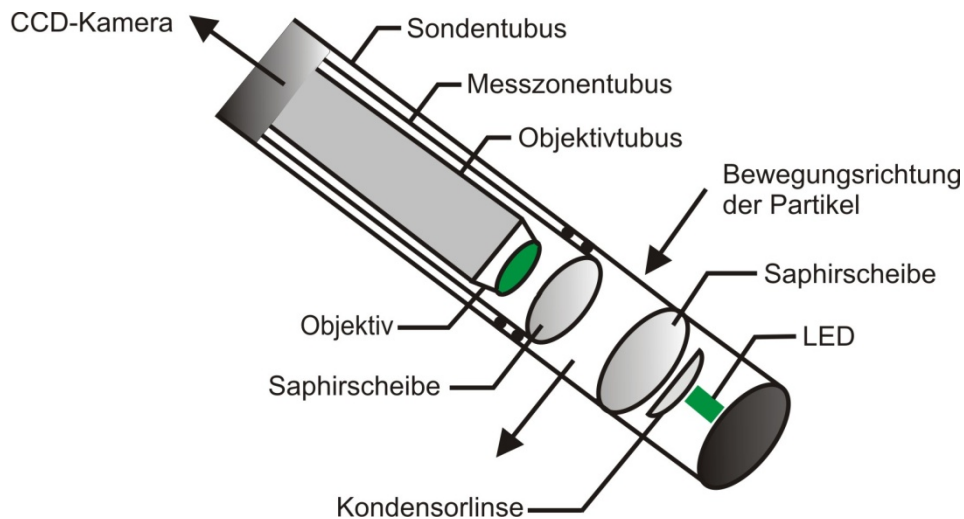


Abb. 09: Schematische Darstellung des Messprinzips des In-situ Mikroskops Typ III XTF. Durch Konvektion tritt ein kontinuierlicher Partikelstrom durch die Messzone des Mikroskops. Mittels der justierbaren Messzone und dem beweglichen Objektivtubus werden die Partikel fokussiert, bevor sie von einer CCD-Kamera erfasst werden.

3.4 Modifikationen

Für eine geeignete Adaption an die Überwachung von Kristallisationsprozessen wurde das bestehende ISM System Typ III XTF um verschiedene Module erweitert. Die vorgenommenen Veränderungen betreffen vor allem die Adaption einer neuen Videokamera, die neben Farbinformationen auch eine schnellere Bildaufnahmezeit als das bisherige Kamerasystem erlaubt. Des Weiteren wurden die Beleuchtungseinheit und die Optik des Mikroskops an die Überwachung von Kristallisationen angepasst.

3.4.1 Adaption eines neuen Kameramoduls

Um die Kristalle auf dem Weg durch die Messzone möglichst lange verfolgen zu können, wurde eine neue CCD-Kamera (AVT Pike F-210C) an das Sondensystem adaptiert. Dafür wurde der bisher verwendete Kameraschlitten leicht modifiziert, so dass ein Wechsel zwischen beiden Kamerasystemen (AVT Pike F-210C und Sony XCD SX910) während des

laufenden Prozesses möglich ist. Die neue Kamera erlaubt durch eine hohe Bildaufnahmezeit von bis zu 31 fps bei maximaler Auflösung und ihren Farbmodus die bestmögliche Analyse der generierten Bilder und ist für die Charakterisierung von Kristallisationsprozessen die Methode der Wahl.

3.4.1.1 Bestimmung der optischen Eigenschaften

Das ISM-System besitzt keine nach DIN 58887 genormte Tubuslänge von 160 mm, sondern eine Tubuslänge von 190 mm. Dies liegt darin begründet, dass ein Eintauchen der Messzone in das zu untersuchende Medium im Reaktor gewährleistet sein muss.

Da aber mit nach DIN 58887 genormten 4-fach und 10-fach Objektiven gearbeitet wird, müssen die optischen Eigenschaften wie Gesichtsfeld, Vergrößerungsfaktor und die Kantenlänge eines Bildpixels ermittelt werden, um zuverlässige Aussagen über die Partikelgröße zu erhalten.

Die Berechnung des Gesichtsfeldes $G_{(H), (V)}$ erfolgt mit einem Objektträger, auf dem parallele Linien in definierten Abständen (50 μm bzw. 100 μm) eingeritzt sind, der in der Messzone des Mikroskops platziert wurde. Durch Auszählen der definierten Abstände in horizontaler und vertikaler Richtung ergibt sich das Gesichtsfeld für die verschiedenen Vergrößerungen.

Der optische Vergrößerungsfaktor $V_{\text{Obj.}}$ berechnet sich aus der Deckfläche des CCD-Chips der Kamera dividiert durch das Gesichtsfeld.

$$V_{\text{Obj.}} = \frac{\text{Deckfläche CCD-Chip}_{(H), (V)}}{G_{(H), (V)}} \quad (1)$$

Anschließend wurde die Kantenlänge eines Bildpixels $B_{\text{kl.}}$ bestimmt, indem die Kantenlänge einer CCD-Chipzelle durch den optischen Vergrößerungsfaktor dividiert wird.

$$B_{\text{kl.}} = \frac{\text{Kantenlänge CCD-Chipzelle}}{V_{\text{Obj.}}} \quad (2)$$

Die technischen Details der Kamerasysteme sowie die unter der Beachtung des jeweiligen Objektivs resultierenden Gesichtsfelder $G_{(H), (V)}$ sind in Tabelle 02 zusammengestellt. Die Bestimmung des Gesichtsfeldes erfolgt jeweils bei der maximalen Auflösung der verwendeten Kamera. Zudem wird in Tabelle 03 ein Überblick über die resultierenden optischen Eigenschaften des In-situ Mikroskopsystems gegeben.

Tab. 02: Kameraeigenschaften und Berechnung der Gesichtsfelder $G_{(H),(V)}$ für die jeweiligen Vergrößerungen bei der maximalen Auflösung der beiden verwendeten Kamerasysteme.

Eigenschaften	Sony XCD SX910	AVT Pike F210 C
Max. Auflösung [Pixel]	1.280 (H) · 960 (V)	1.920 (H) · 1.080 (V)
Bildaufnahmezeit bei max. Auflösung [fps]	15	31
Zellgröße CCD-Chip [μm]	4,65 (H) · 4,65 (V)	7,40 (H) · 7,40 (V)
Deckfläche [mm]	5,95 (H) · 4,46 (V)	14,21 (H) · 7,99 (V)
$G_{4\text{-fach}}$ [μm] $\pm 5 \mu\text{m}$	1.050 (H) · 787 (V)	2.538 (H) · 1.427 (V)
$G_{10\text{-fach}}$ [μm] $\pm 5 \mu\text{m}$	474 (H) · 355 (V)	1.155 (H) · 650 (V)

Tab. 03: Optische Eigenschaften des Mikroskopsystems unter Berücksichtigung der jeweiligen Kamera.

Eigenschaften	Sony XCD SX910		AVT Pike F210 C	
Objektiv (DIN 58887)	4-fach	10-fach	4-fach	10-fach
Opt. Vergrößerungsfaktor $V_{\text{Obj.}}$	5,7	12,6	5,6	12,3
Kantenlänge Bildpixel $B_{\text{Kl.}}$ [μm]	0,82	0,37	1,32	0,60

3.4.2 Test diverser LEDs

Bisher wurden als Beleuchtungsquelle des Mikroskops ausschließlich LEDs einer Wellenlänge von 505 nm (grünblau) verwendet. Der Grund dafür liegt in der Verwendung des Sony XCD SX910 Kamerasystems, welches in diesem Wellenlängenbereich am sensitivsten ist. Die entscheidenden Faktoren für eine gute Bildqualität sind die Lichtstärke [cd], der Abstrahlwinkel [°] und die Wellenlänge [nm] der verwendeten LEDs. Diese Parameter sind so zu wählen, dass eine subjektiv gute Bildqualität bei einer geringen Beleuchtungszeit erhalten wird. Die Lichtstärke ist definiert als Strahlungsleistung pro Raumwinkel, d. h. sie gibt die Helligkeit an, mit der eine Lichtquelle in eine definierte Richtung strahlt. Im Allgemeinen besitzt eine LED mit kleinem Abstrahlwinkel eine höhere Lichtstärke als eine gleicheffiziente LED mit größerem Abstrahlwinkel. Es ist zu konstatieren, dass für eine gute Bildbeleuchtung eine LED mit ausreichendem Abstrahlwinkel und hoher Lichtstärke verwendet werden muss. Die bisher genutzten LEDs (grünblau) wurden angeschliffen, um eine homogene Bildausleuchtung zu gewährleisten. Dieses Verfahren wirkt sich jedoch negativ auf die Lichtstärke aus. Tabelle 04 zeigt einen Ausschnitt der getesteten LEDs und ihre Eigenschaften. Neben der geschliffenen Variante der NSPE590s LED hat sich die weiß leuchtende LED (NSPW500CS) als besonders geeignet herausgestellt. Ihre Lichtstärke von 18 cd und ein Abstrahlwinkel von 15° ermöglichen eine Beleuchtungszeit im Bereich von 100 – 200 μs . Zudem erlaubt sie den Zugang zu spektralen Informationen und realisiert ein

Mehrfarbensystem ohne die Beleuchtungseinheit umzubauen. Durch den Einsatz der weißen LED wird zwar die Bildschärfe durch die chromatische Aberration etwas verschlechtert; dieser Nachteil ist aber im Vergleich zu dem Erhalt von Farbinformationen zu vernachlässigen.

Tab. 04: Getestete LEDs und ihre Eigenschaften [Höpfner, 2007].

LED Bezeichnung	Wellenlänge [nm]	Abstrahlwinkel [°]	Lichtstärke [cd]	Beleuchtungszeit 4x Obj. / 10x Obj.	Ausleuchtung
WU-2-220 GC-UR-6	525 (grün)	6	15-23	256 µs / 354 µs	inhomogen
WU-2-220 GC-UR-6 (geschliffen)	525 (grün)	-	15 -23	900 µs / 900 µs	homogen
NSPE590s	505 (blaugrün)	10	12	144 µs / 256 µs	inhomogen
NSPE590s (geschliffen)	505 (blaugrün)	-	12	784 µs / 1,6 ms	homogen
NSPW500CS	weiß (superhell)	15	18	81 µs / 169 µs	homogen
185875	warmweiß	20	9,2	298 µs / 625 µs	homogen

3.4.3 Integration von Polarisationsfiltern

Um weitere Informationen über die Kristalle zu erhalten, wurden Polarisationsfilter ($\lambda/2$ Plättchen) in die Objektive (Analysator) und die Beleuchtungseinheit (Polarisator) des Mikroskops integriert. Durch den Einbau von Polarisationsfiltern ist einerseits ein stärkerer Kontrast zwischen den Kristallkanten und dem Hintergrund gegeben. Andererseits verändert sich je nach räumlicher Lage des Kristalls die Helligkeit bzw. das Farbspektrum der Kristallinnenflächen, so dass sich dadurch eine Aussage über die räumliche Lage des Kristalls zum Objektiv bzw. zu der Kamera treffen lässt. Durch den Einsatz von polarisiertem Licht ist also die Möglichkeit gegeben Kristallumwandlungserscheinungen zu beobachten. Dieses Phänomen ergibt sich dadurch, dass anisotrope Substanzen auf Grund der Doppelbrechung Interferenzfarben zeigen und sich von der isotropen, nicht doppelbrechenden Umgebung durch ein leuchtendes Farbenspiel abgrenzen.

In Abbildung 10 wird ein Ausschnitt aus der online Überwachung eines Aspirin-Kristallisationsprozesses gezeigt. Die Gesamtdauer des gezeigten Ausschnitts (Bild 1 – 10) beträgt 1,67 s. Auf Grund der Rotationsbewegung der Kristalle durch die Durchfluss-Messzone ist der sich verändernde Farbverlauf der Kristallinnenflächen eindeutig zu erkennen.

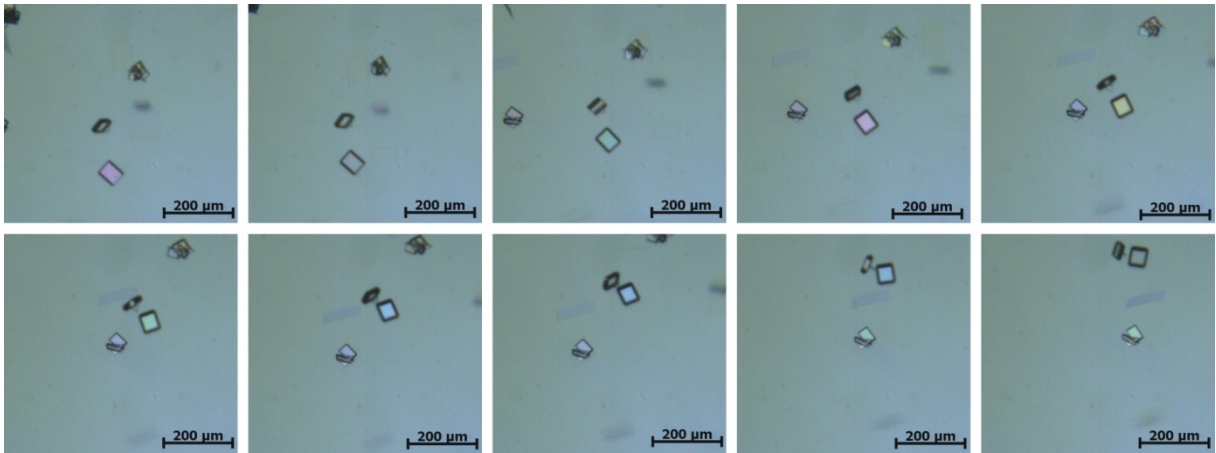


Abb. 10: Rotationsbewegung von Aspirin Kristallen durch die Durchfluss-Messzone des In-situ Videomikroskops (4-fach Objektiv, LED: NSPW500CS), aufgenommen mit der AVT Pike F-210C unter der Verwendung von Polarisationsfiltern. Je nach räumlicher Lage zu der Kamera erscheinen die Innenflächen der Kristalle in unterschiedlichen Farben. Die Zeitspanne zwischen den einzeln generierten Bildern liegt bei 0,167 s.

3.5 Etablierte Anwendungen

Das Applikationsspektrum der In-situ Mikroskopie umfasst einen weiten Bereich in der Beobachtung biotechnologischer Prozesse. Das Hauptanwendungsgebiet dieser bildgebenden Sonde liegt in der Beobachtung und Charakterisierung von Suspensionszellen.

Es wurde erfolgreich zur Überwachung bei der Fermentation von BHK-Zellen bei der Firma Bayer Healthcare (Berkeley, USA) eingesetzt [Rudolph, 2007]. Ein eigens für diese Anwendung entwickelter Algorithmus zur Auswertung der generierten Zellbilder stellt verglichen mit offline Analysemethoden zufriedenstellende Ergebnisse dar. So konnten zuverlässige Aussagen über die Morphologie der Zellen und die Zellzahl ermittelt werden.

An die Überwachung von CHO-Zellen wurde das ISM-System ebenfalls erfolgreich adaptiert. Die ermittelte Zellzahl der Kultur mit offline Analysegeräten zeigte dabei eine gute Korrelation verglichen mit der durch die In-situ Mikroskopie kalkulierten Zellzahl [Joeris et al., 2002], [Frerichs et al., 2002].

Neben diesen Einsatzgebieten wurde das Messsystem auch zur Charakterisierung des Zellwachstumprozesses von Hefezellen des Stammes *Saccharomyces cerevisiae* benutzt [Brückerhoff, 2006], [Bluma, 2006] [Rudolph, 2007]. In diversen Fermentationen wurde gezeigt, dass in einem automatisierten Prozess exakte Aussagen über die Zellzahl, das Zellwachstum und die Biomasse getroffen werden können.

Des Weiteren wurde das Messsystem an die Überwachung von adhärent wachsenden Zellen angepasst. So konnte das Wachstum von NIH 3T3 Zellen auf Cytodex 1 Microcarriern näher untersucht werden. Für die Auswertung der generierten Bilder diente ein Algorithmus,

der auf einem neuronalen Netz basiert. Das neuronale Netz wurde zunächst trainiert, bevor die Analyse der generierten Bilder folgte. Durch dieses Verfahren wurden Aussagen über die Besiedlungsdichte der Zellen auf den Microcarriern über eine Kultivierungsdauer von 120 h ermöglicht [Rudolph et al., 2007].

Ein vollkommen neues Anwendungsgebiet der In-situ Mikroskopie liegt in der Überwachung von biotechnologischen Kristallisationsprozessen. Durch die in Kapitel 3.3 beschriebenen Modifikationen wurde basierend auf dem Konzept der In-situ Mikroskopie ein In-situ Videomikroskop entwickelt, das im Verlauf dieser Arbeit an die Analyse von Kristallisationen adaptiert wird.

4. Softwarekomponenten des In-situ Mikroskops

Neben der Hardware besteht das ISM-System aus der Steuer- und Bildaufnahmesoftware In-situ Control (ISC) sowie aus der Analysesoftware In-situ Analysis (ISA). Die modular aufgebaute Analysesoftware enthält verschiedene Bildauswertungsalgorithmen und erlaubt die Implementierung weiterer Algorithmen zur Auswertung der generierten Bilder. Gesteuert wird das Mikroskop über einen Microcontroller, der über eine RS-232 Schnittstelle mit einem Computer verbunden ist (siehe Abb. 11). Das Live-Bild wird von einer CCD-Kamera über ein IEEE-1394 (FireWire) Interface an den PC gesendet.

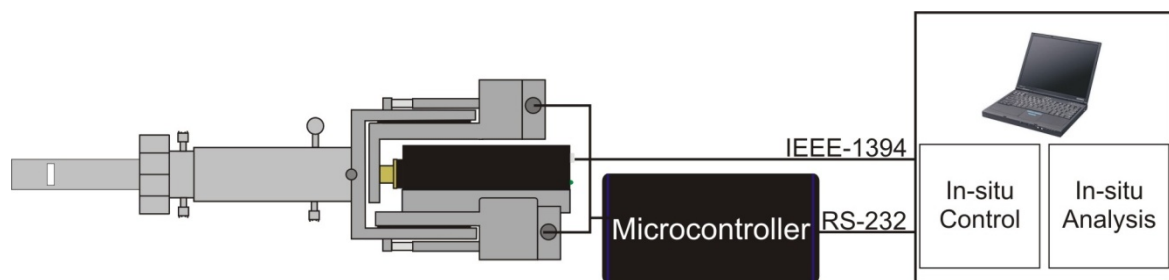


Abb. 11: Hard- und Softwarekomponenten des ISM-Systems. Die Steuerung des Mikroskops erfolgt über einen Microcontroller (RS-232 Schnittstelle). Die Kamera kommuniziert direkt mit dem Rechner (IEEE-1394). Steuerungs- und Auswertungssoftware (ISC und ISA) befinden sich auf dem Computer (Abbildung: Rudolph, 2007).

4.1 In-situ Control

Für die Steuerung des In-situ Mikroskops bzw. des In-situ Videomikroskops werden in Abhängigkeit der benutzten Kamerasysteme die Softwareversionen In-situ Control 2.0 (Sony XCD SX910) und In-situ Control 2.2 (AVT Pike F-210C) verwendet. Bei diesen Programmen handelt es sich um eine kontinuierliche Optimierung des von Lindner entwickelten und von Rudolph benutzten und beschriebenen Programms In-situ Control 1.3 [Lindner, 2006], [Rudolph, 2007]. Da die Funktionsweise sowie die Programmstruktur der beiden Software Versionen (ISC 2.0 und ISC 2.2) weitestgehend mit der Version ISC 1.3 identisch sind, wird auf eine ausführliche Beschreibung dieser Eigenschaften verzichtet. Im folgenden Abschnitt werden kurz die wichtigsten Funktionen und Weiterentwicklungen beschrieben.

Programmiert wurde die Software in der Programmiersprache Delphi 7.0 (Borland, Austin, USA). Die Steuerung der Sony XCD SX910 Kamera erfolgt über die Software IC Imaging Control 1.41 (The Imaging Source Europe, Bremen). Bei Verwendung der AVT Pike F-210C Kamera wird das Kamerasystem über die Software AVT Active Fire Package 1.1 (Allied

Vision Technologies, Ahrensburg) in Delphi integriert. Beide Softwaresysteme werden in Delphi als Active X Control eingebunden.

Nach dem Starten des Programms ISC wird automatisch nach einem angeschlossenen Mikroskop-Microcontroller gesucht. Bei Erfolg wird dieser angezeigt und die Bildaufnahme kann nach Einstellen aller relevanten Parameter begonnen werden. Zur Einstellung der Parameter dient die Hauptmenüleiste mit ihren fünf Menüpunkten (<File>, <Acquisition>, <Settings>, <Extras> und <?>). Für eine bessere Übersicht wird die Benutzeroberfläche von ISC in Abbildung 12 gezeigt. Die wichtigsten Funktionen des Programms sind die Visualisierung des Live-Bildes, die Datenaufnahme und Speicherung sowie die Steuerung des In-situ Videomikroskops.

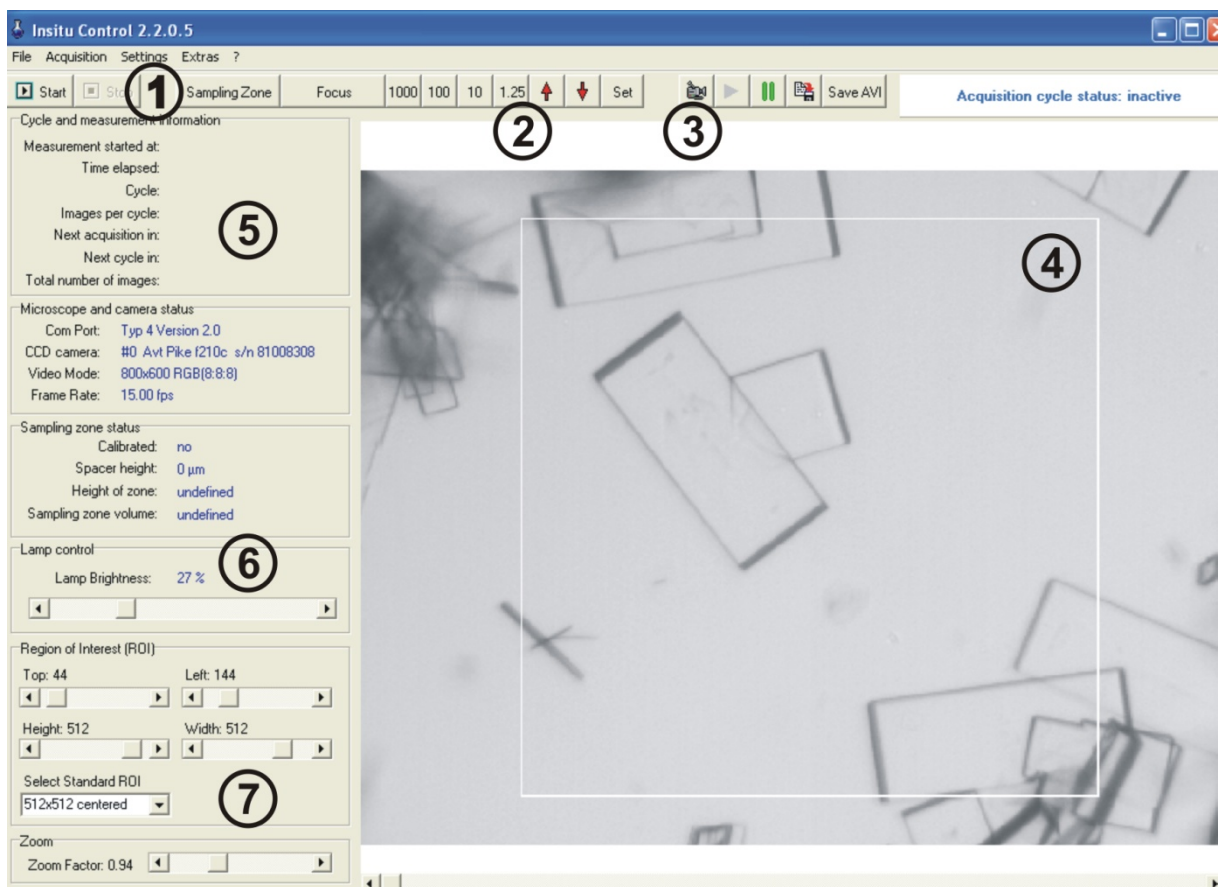


Abb. 12: Benutzeroberfläche der Aufnahmesoftware In-situ Control 2.2. (1) Start- und Stop-Taste, (2) Schrittmotorensteuerung, (3) Kameraeinstellungen, (4) Kamera-Display (Live-Bild), (5) Hauptanzeigenfenster, (6) Regler für die Beleuchtung, (7) Zoom, ROI (Region of Interest).

Neben einem neuen optischen Design wurden als weitere Optimierungsmaßnahmen eine Autofokusfunktion und die Aufnahme von Videosequenzen (avi-Datei) in die Programmstruktur eingebettet. Beim Bedienen der Autofokusfunktion wird automatisch die am besten geeignete Fokussierung (stärkstes Kontrastverhältnis zwischen dem zu untersuchenden Objekt und dem Hintergrund) bei einer definierten Messzonenhöhe

eingestellt. Dazu wird der Objektivtubus über die RS-232 Schnittstelle von den Schrittmotoren so lange verschoben, bis das stärkste Kontrastverhältnis gefunden ist. Eine ebenfalls neue Funktion ist durch die Generierung von Videosequenzen gegeben. Dieses Aufnahmeverfahren ermöglicht gerade bei der Beobachtung von Kristallen eine optimale Analyse, da die dreidimensionalen Körper durch die hohe Aufnahmezeit aus verschiedenen Perspektiven bei ihrem Weg durch die Messzone betrachtet werden können.

4.2 In-situ Analysis 1.2

Die Software In-situ Analysis 1.2 dient zur Auswertung der mit dem In-situ Videomikroskop generierten Bilder. Sie ist modular aufgebaut und enthält neben den beiden Algorithmen zur Auswertung von Kristallisationsprozessen (*Crystal* und *Crystal 2*) noch weitere Algorithmen, mit denen biotechnologische Prozesse charakterisiert werden können. Durch die flexible Gestaltung der Software hat der Benutzer die Möglichkeit weitere DLL's hinzuzufügen oder bereits bestehende Algorithmen zu ändern. Der Vorteil dieses modularen Aufbaus ist es, dass das Hauptprogramm nicht *mehr* verändert werden muss, wenn weiterentwickelte oder neu programmierte Algorithmen zur Verfügung stehen. Für eine fehlerfreie Kommunikation zwischen Hauptprogramm und DLL müssen die Algorithmen einer DLL definierten Strukturierungen folgen. So ist ein Informationsfluss über die Anzahl und Art der vom Algorithmus erzeugten Ergebnisse in das Hauptprogramm gewährleistet. Diese Informationen können dann im Hauptprogramm visualisiert und exportiert werden [Lindner, 2006].

Die Programmierung der Software wurde wie ISC ebenfalls in der Programmiersprache Delphi 7.0 durchgeführt. In Abbildung 13 ist die Benutzeroberfläche von ISA dargestellt. Das Hauptmenü beinhaltet die Menüpunkte <File>, <Options> und <Help>. Durch Auswählen dieser Menüpunkte können bereits analysierte Experimente geladen, Analysendurchläufe gestartet bzw. abgebrochen und Einzelbilder ausgewertet werden. Nach dem Laden eines Auswertungsalgorithmus können die Parameter (Schwellenwerte) auf den zu untersuchenden Prozess angepasst werden. Der Hauptteil des Anzeigenfensters ist für Graphiken und Tabellen reserviert. Das Originalbild (aufgenommen mit dem ISVM-System), das Ergebnisbild und die Analyseergebnisse des ausgewerteten Bildes können als Tabelle dargestellt werden. Das Logbuch der während der Auswertung aufgetretenen Fehler und die Ergebnisse der Auswertung können als Diagramm oder Histogramm angezeigt werden. Die rechte Seite des Programms enthält diverse Funktionen zur Visualisierung der Diagramme bzw. Histogramme. Des Weiteren sind zurzeit drei Filtertypen in die Software integriert. Dabei handelt es sich um den Mittelwert-, Median- und Savatzky Golay-Filter. Die

fertiggestellten Analysegraphiken können als Bitmap-Grafik exportiert, in der Zwischenablage abgelegt oder als Textdatei gespeichert werden.

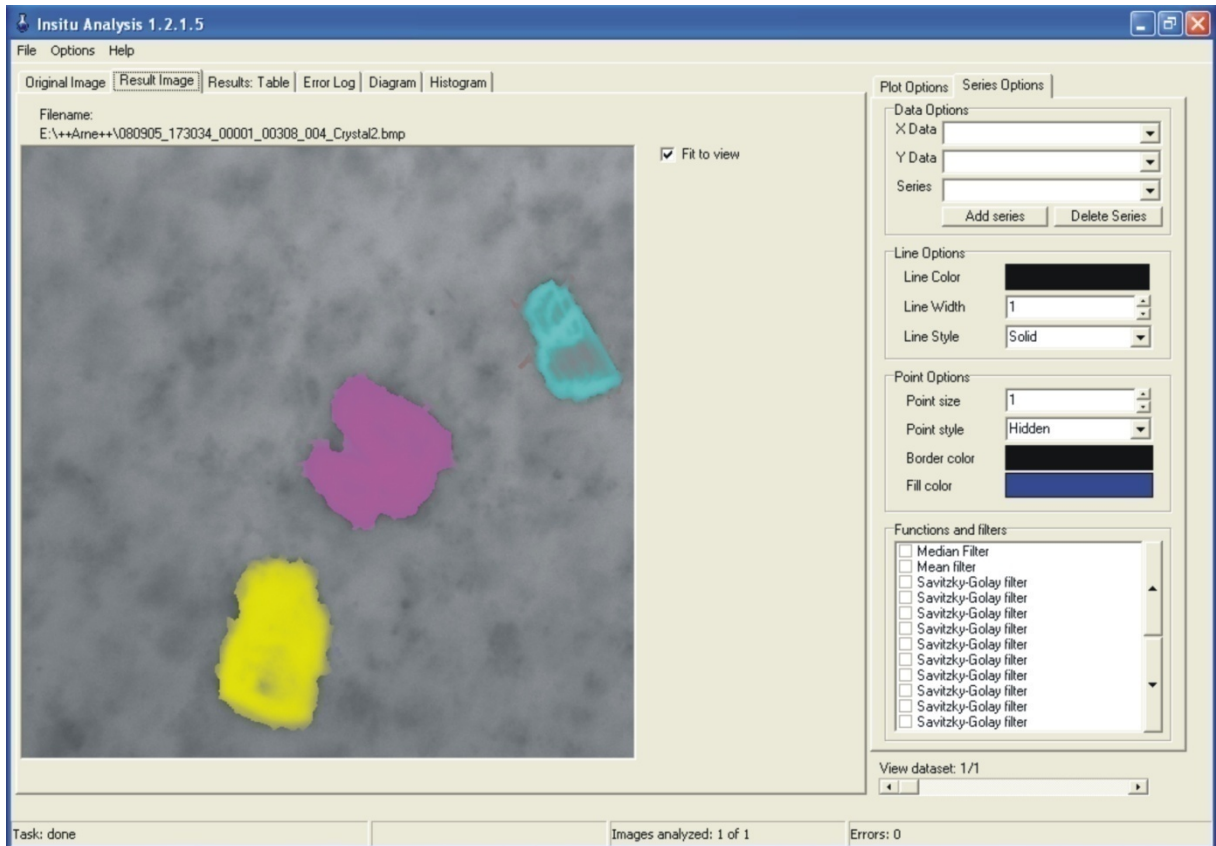


Abb. 13: Benutzeroberfläche von In-situ Analysis 1.2. Im Anzeigenfenster ist ein mit dem Algorithmus *Crystal 2* ausgewertetes Bild von Lactose-Kristallen zu sehen. Von dem Algorithmus detektierte Kristalle werden farbig markiert.

5. Entwicklung eines Messsystems zur offline Analyse für Partikel > 1 mm

Viele biotechnologische Prozesse, auch Kristallisationen, beinhalten als Zwischen- oder Endprodukte Partikel, die in einem Größenbereich von über 1 mm (Durchmesser) liegen. In diesem Kapitel wird die Entwicklung eines offline Analysegerätes vorgestellt, mit dem Partikel charakterisiert werden können und mit dem eine Aussage über die Größe von Partikeln vorgenommen werden kann. Im Folgenden wird der Aufbau und das Messprinzip des Large Particle Microscopic Image System (LPMIS) erläutert. In Voruntersuchungen erfolgen die Charakterisierung der optischen Eigenschaften des Messsystems und die Überprüfung dieser Ergebnisse an Partikeln mit definierten Größen. Abschließend wird der Einsatz des Systems zur Analyse eines biotechnologischen Prozesses bei einem Industriepartner (USA) beschrieben. Die erhaltenen Ergebnisse werden mit einer alternativen offline Methode verglichen und diskutiert.

5.1 Aufbau und Messprinzip des LPMIS

Die Grundidee bei der Entwicklung des LPMIS besteht darin ein offline Analysegerät zu konstruieren, das die Charakterisierung von dispergierten, großen Partikeln (> 1 mm)

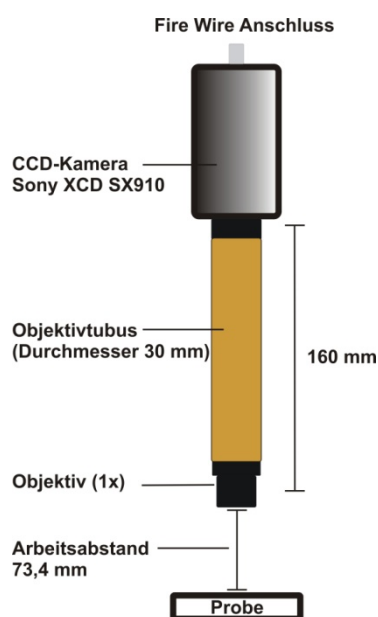


Abb. 14: Schematische Darstellung der optischen Komponenten des Systems.

erlaubt. Die Untersuchung der Partikel soll dabei in einer Reaktor entsprechenden Umgebung ablaufen, d. h. während der Messung befinden sich die Partikel in einem gerührten System. Um Partikel dieser Größenordnung mikroskopisch zu beobachten, ist die Verwendung eines 1-fach Objektivs die Methode der Wahl. Abbildung 14 zeigt schematisch die Anordnung des Kamerasystems, des Objektivtubus und des Objektivs. Unter Verwendung des 1-fach Objektivs ist zu berücksichtigen, dass ein großer Arbeitsabstand (73,4 mm) gewählt werden muss, um die Partikel zu fokussieren. Als Reaktionsgefäß werden zwei zylindrisch geformte Glaskörper benutzt. In dem ersten Gefäß wird die Probe vorgelegt; ein Magnetrührfisch sorgt für die Durchmischung der Probe. Das zweite Glasgefäß wird in das erste Glasgefäß gehängt. Durch unterschiedliche Wandstärken des zweiten Gefäßes ist ein

definierter Spalt zwischen beiden Glaskörpern gewährleistet (1 – 3 mm). Mittels des Rührfisches wird die zu untersuchende flüssige Probe zwischen die Außenseite des ersten Glaskörpers und die Innenseite des zweiten Glaskörpers gedrückt. Innerhalb dieses Fensters wird die Probe gemessen. Detektiert werden die Partikel mit einer CCD-Kamera (Sony XCD SX910). Als Beleuchtungseinheit dient eine LED (505 nm) mit einem Abstrahlwinkel von 5°. In Abbildung 15 wird der komplette Aufbau des LPMIS dargestellt.

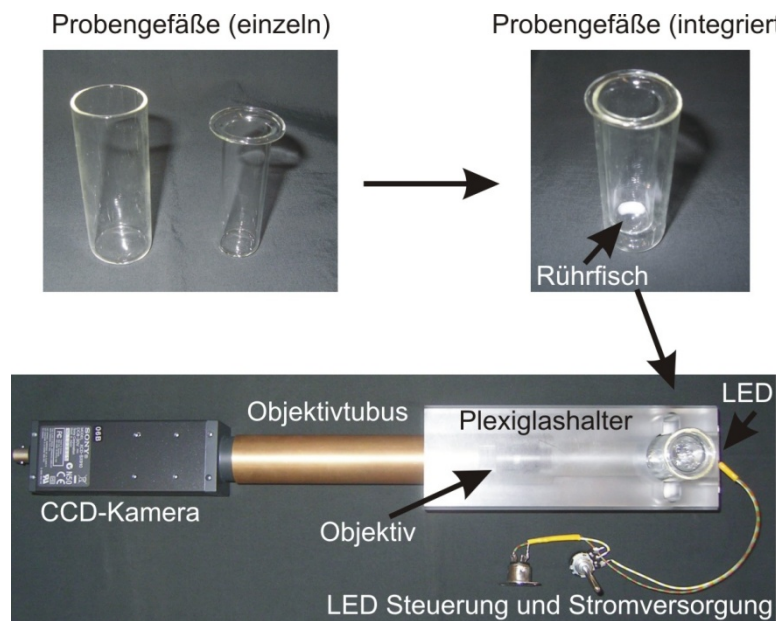


Abb. 15: Aufbau des Large Particle Microscopic Image System (LPMIS). Durch das Rühren wird die Lösung mit den suspendierten Partikeln in den Zwischenraum der beiden Glasgefäße gedrückt. Die Beleuchtung der Probe erfolgt mit einer LED (505 nm). Der Objektivtubus lässt sich in dem Plexiglashalter mechanisch verschieben; sobald die Partikel fokussiert sind, kann mit der Bildaufnahme begonnen werden. Die Datenspeicherung der generierten Bilder erfolgt mit der Software In-situ Control 2.0 (Bildaufnahmeprogramm des In-situ Mikroskops).

5.2 Voruntersuchungen

Um zuverlässige Aussagen über die Partikelgröße zu erhalten, muss das Messsystem zunächst hinsichtlich der optischen Eigenschaften charakterisiert werden. Es wird zwar eine nach DIN 58887 genormte Tubuslänge von 160 mm verwendet; entscheidend ist aber der exakte Abstand vom CCD-Chip der Kamera zur Linse des Objektivs. Aus diesem Grund wird, wie in Kapitel 3.3.1.1 vorgestellt, eine Ermittlung des Gesichtsfeldes $G_{(H), (V)}$ und die Berechnung der Kantenlänge eines Bildpixels B_{kl} durchgeführt. Im Anschluss daran erfolgt die Adaption des Systems an die Überwachung der von dem Industriepartner gelieferten Partikel (Carrier).

5.2.1 Bestimmung der optischen Eigenschaften des LPMIS

Für die Bestimmung des Gesichtsfeldes $G_{(H), (V)}$ wurde der in Abbildung 14 dargestellte Versuchsaufbau gewählt. Die Berechnung des optischen Vergrößerungsfaktors $V_{Obj.}$ erfolgt nach Formel 1. Die Ermittlung der Kantenlänge eines Bildpixels $B_{Kl.}$ resultiert aus Formel 2 (siehe Kap. 3.3.1.1). Die Bestimmung des Gesichtsfeldes wurde mit der Sony XCD SX910 Kamera bei einer Auflösung von $768 \cdot 768$ Bildpixeln durchgeführt. In Tabelle 05 sind die Ergebnisse der Berechnungen zusammengefasst.

Tab. 05: Optische Eigenschaften des LPMIS-Systems bei der Verwendung eines 1-fach Objektivs und der Sony XCD SX910 Kamera.

Eigenschaften	Sony XCD SX910
Verwendete Auflösung [Pixel]	768 (H) · 768 (V)
Zellgröße CCD-Chip [μm]	4,65 (H) · 4,65 (V)
Deckfläche [mm]	3,57 (H) · 3,57 (V)
$G_{1\text{-fach}}$ [μm] $\pm 5 \mu\text{m}$	3.968 (H) · 3.968 (V)
Objektiv (DIN 58887)	1-fach
Opt. Vergrößerungsfaktor $V_{Obj.}$	0,9
Kantenlänge Bildpixel $B_{Kl.}$ [μm]	5,26

5.2.2 Untersuchungen an Partikeln

Zur Überprüfung der optischen Eigenschaften wurden Partikel der Firma Polyscience mit dem LPMIS untersucht. Die Partikel (Poly Balls) haben dabei eine durchschnittliche Größe von $1.600 \mu\text{m}$. Die Partikel wurden mit dem vereinfachten Aufbau (siehe Abbildung 14) untersucht. In Abbildung 16 ist exemplarisch eines der generierten Bilder dargestellt; gemessen wurde es mit der Software AxioVision Rel. 4.6.3. Unter Verwendung der in Tabelle 05 ermittelten Daten wird der Durchmesser der untersuchten Partikel bestimmt. Die experimentell ermittelten Werte von $1.605,23 \mu\text{m}$ und $1.599,97 \mu\text{m}$ stimmen gut mit dem erwarteten Wert überein. Sie liegen innerhalb einer Fehlertoleranz von $\pm 5 \mu\text{m}$. Auch bei dem Vermessen kleiner Partikel in einem Größenbereich von $200 - 600 \mu\text{m}$ korrelierten die ermittelten Werte gut mit den Angaben des Herstellers. Somit kann von einer zuverlässigen Aussagekraft bezüglich der Partikelgröße des LPMIS ausgegangen werden.

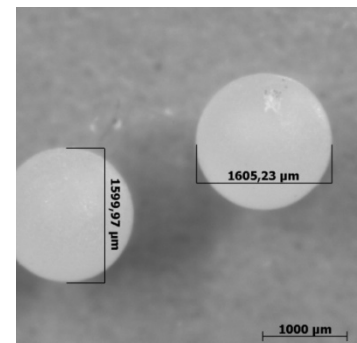


Abb. 16: Mit dem LPMIS aufgenommene Partikel.

5.3 Offline Analyse eines biotechnologischen Prozesses

Im folgenden Abschnitt wird das LPMIS an die Überwachung eines biotechnologischen Prozesses adaptiert. Es handelt sich dabei um die Beobachtung der Größenzunahme von Carriern während der Kultivierung von adhärent wachsenden Zellen. Diese Information ist für den Zeitpunkt der Zellernte essentiell, um eine zu lange Produktionsdauer oder eine zu kurze Prozesszeit zu vermeiden. Des Weiteren soll überprüft werden, ob eine homogene Verteilung der Carrier im Reaktor vorliegt. Die Akquirierung der Bilder erfolgt mit der Software In-situ Control 2.0. Für die Auswertung der generierten Bilder wird ein eigens für diese Anwendung entwickelter Algorithmus benutzt, der in die Auswertungssoftware In-situ Analysis 1.2 des In-situ Mikroskops implementiert wurde.

5.3.1 Charakterisierung der Carrier

Zunächst werden die nackten Carrier (ohne Zellbewuchs) mit dem LPMIS untersucht. Eine suspendierte Lösung der Carrier wird in das Probengefäß des LPMIS gegeben; nach Fokussierung der Partikel wird die automatische Bildaufnahme mittels der Software In-situ Control 2.0 gestartet. Die generierten Bilder werden mit dem Algorithmus *G. Project* hinsichtlich der Partikelzahl und Größe (Pixelzahl und Fläche in μm^2) ausgewertet. In Abbildung 17 wird exemplarisch ein aufgenommenes und ausgewertetes Bild gezeigt. Die Einstellungen der Schwellenwerte des Algorithmus befinden sich im Anhang (Kap. 12.6.1).

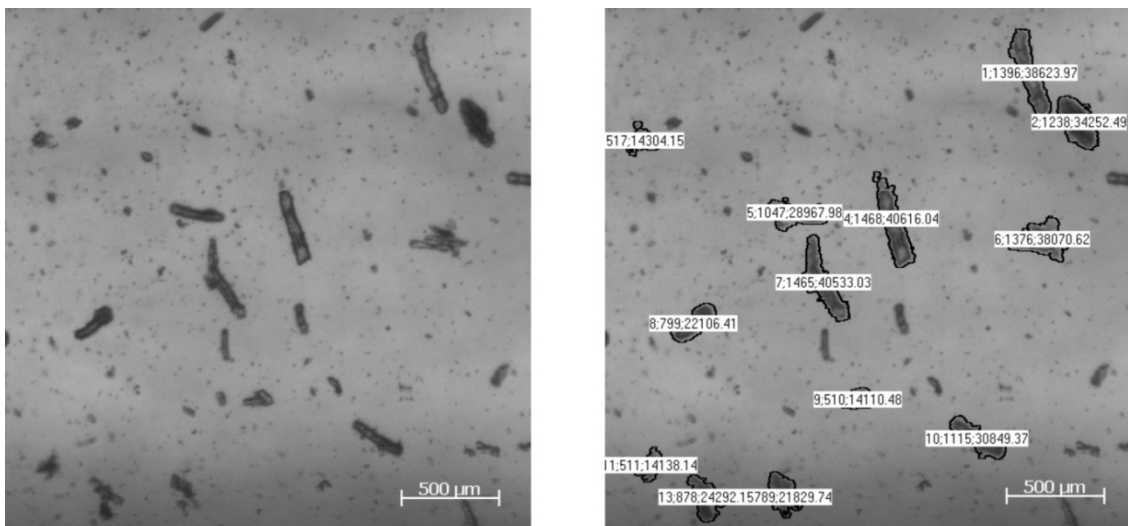


Abb. 17: Links: Mit dem LPMIS aufgenommenes Bild der nackten Carrier (Auflösung: 512 · 512 Pixel). Rechts: Mit dem Algorithmus *G. Project* ausgewertetes Bild. Alle detektierten Carrier sind mit einer Zahlenkolonne (1. Objektnummer; 2. Fläche des Objektes in Pixel; 3. Fläche des Objektes in μm^2) zur Charakterisierung markiert.

Nach der erfolgreichen Adaption des LPMIS an die Beobachtung der Partikel und der Ermittlung der richtigen Schwellenwerte des Auswertungsalgorithmus werden bewachsene Carrier näher untersucht. Wegen der hohen Partikeldichte müssen die aus dem Reaktor gezogenen Proben im Verhältnis 1 : 19 verdünnt werden, um auswertbare Bilder zu generieren. Zudem empfiehlt es sich auf Grund der Größe der Carrier die Beobachtung bei einer Bildauflösung von $1.024 \cdot 512$ durchzuführen. Des Weiteren können durch den Erhalt eines größeren Sichtfensters (ROI = Region of Interest) bei dieser Auflösung mehrere Carrier zugleich ausgewertet werden. In Abbildung 18 werden jeweils zwei akquirierte und zwei ausgewertete Bilder von bewachsenen Carriern dargestellt.

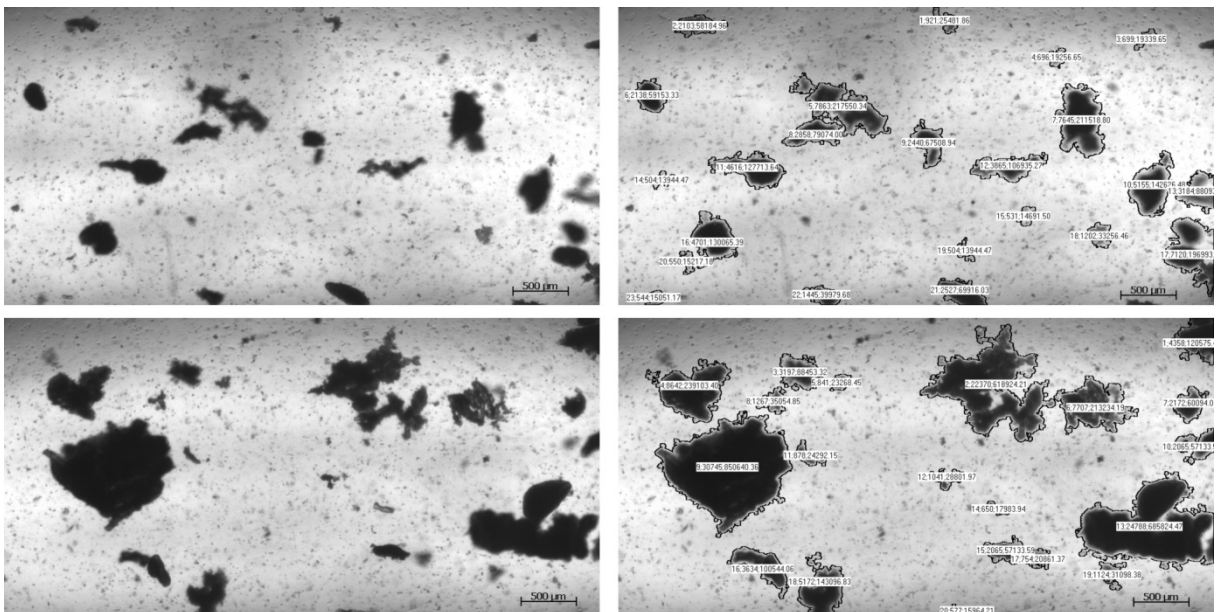


Abb. 18: Links: Mit dem LPMIS aufgenommene Bilder von bewachsenen Carriern (Auflösung: $1.024 \cdot 512$ Pixel). Rechts: Mit dem Algorithmus *G. Project* ausgewertete Bilder. Die detektierten Partikel werden bezüglich ihrer Größe charakterisiert. Der inhomogene Hintergrund resultiert zum Einen aus der Lichtbrechung und zum Anderen aus abgetrennten Zellen, die sich im Medium befinden. Diese unerwünschten Nebenerscheinungen haben aber keinen Einfluss auf die Auswertung der Bilder.

Um Aussagen über die Größenhomogenität der bewachsenen Carrier im Reaktor treffen zu können, werden jeweils zwei Proben aus der oberen und unteren Region des Reaktors genommen. Zur Konservierung der Zellen in den Lösungen werden zwei von den vier Proben mit Methanol behandelt. Dieses Verfahren soll den Wachstumsprozess der Zellen stoppen und eine spätere Analyse ermöglichen. Die Untersuchung der Lösungen erfolgt 24 h nach der Probennahme aus dem Reaktor. Der Einfluss der unterschiedlich positionierten Probennahmezone der Carrier im Reaktor sowie die Versetzung der Proben mit Methanol sind in Abbildung 19 zusammengefasst. Die vier Fraktionen werden einzeln mit dem LPMIS

beobachtet Dazu werden in den Experimenten 006c und 007c 9.000 Bilder und in den Experimenten 008 und 009 3.500 Bilder generiert und die Partikel anschließend hinsichtlich ihrer Größe ausgewertet.

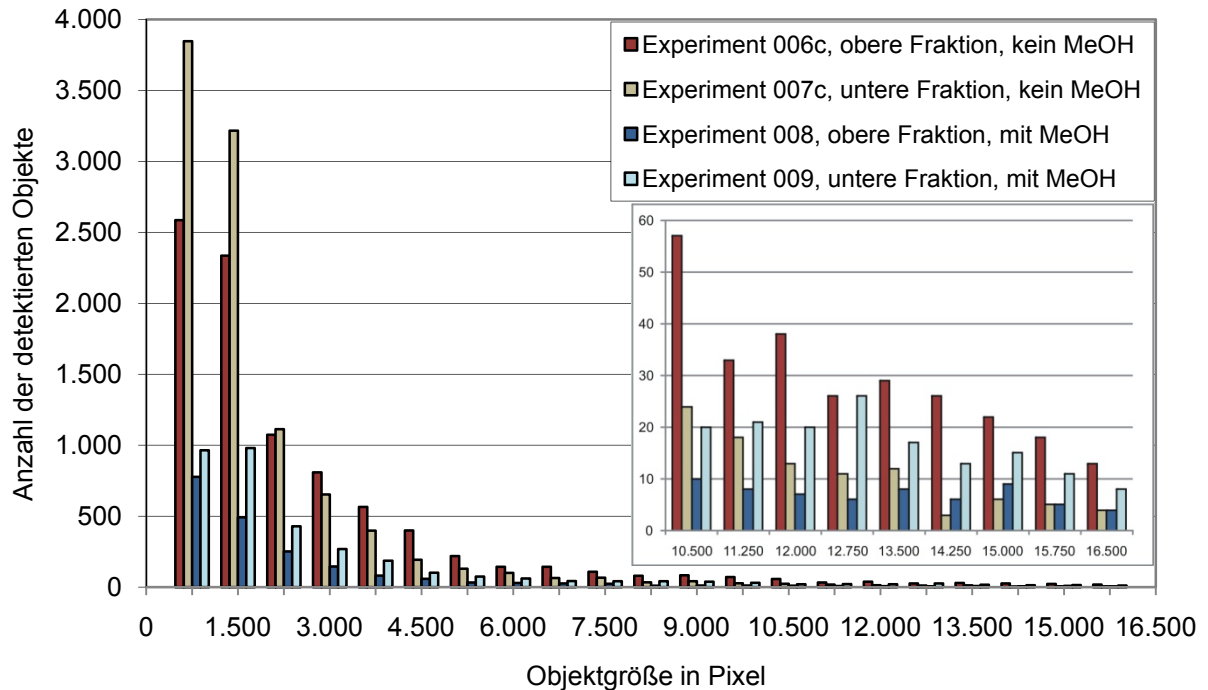


Abb. 19: Darstellung der Größenverteilung der einzelnen Objekte aus den unterschiedlichen Fraktionen, ausgewertet mit dem Algorithmus *G. Project*. Es ist deutlich zu erkennen, dass ein Großteil der Partikel in einem Größenbereich von 750 – 4.500 Pixeln liegt. Die kleinsten gemessenen Objekte haben eine durchschnittliche Größe von 500 Pixeln und sind in allen 4 Fraktionen zu finden. Das größte ermittelte Objekt liegt in einem Größenbereich von 45.096 Pixeln (nicht in der graphischen Darstellung zu sehen) und ist in Fraktion 009 enthalten. Zur besseren Übersicht sind alle ab einer Objektgröße von 10.500 Pixeln detektierten Objekte vergrößert als zweites Diagramm dargestellt.

Die Größenverteilungen der mit Methanol behandelten Lösungen entsprechen den Erwartungen. In der Nähe des Reaktorbodens befinden sich mehr große Partikel als in der Nähe des Reaktordeckels. Bei den unbehandelten Proben tritt dieser Fall nicht ein. Hier sind in der unteren Fraktion mehr kleine Partikel vorhanden als in der oberen. Die Ursache für diesen Befund könnte darin liegen, dass die Proben erst 24 h nach der Entnahme vermessen wurden. Es ist nicht auszuschließen, dass sich in dieser Zeit auf Grund einer Nährstoffunterversorgung, die Größe der Carrier drastisch verändert hat. Um die Messgenauigkeit des LPMIS zu überprüfen, wurde erneut eine Probe vermessen und ausgewertet. Die Ergebnisse der Auswertung werden mit einer alternativen Analyseverfahren verglichen, die bei dem Industriepartner angewandt wird. Die Anzahl der mit dem LPMIS ausgewerteten Bilder beträgt 8.456. Bei der Referenzmethode wurden 768 Bilder erzeugt

und analysiert. In Abbildung 20 ist der Vergleich der Ergebnisse der beiden Analysemethoden zu sehen.

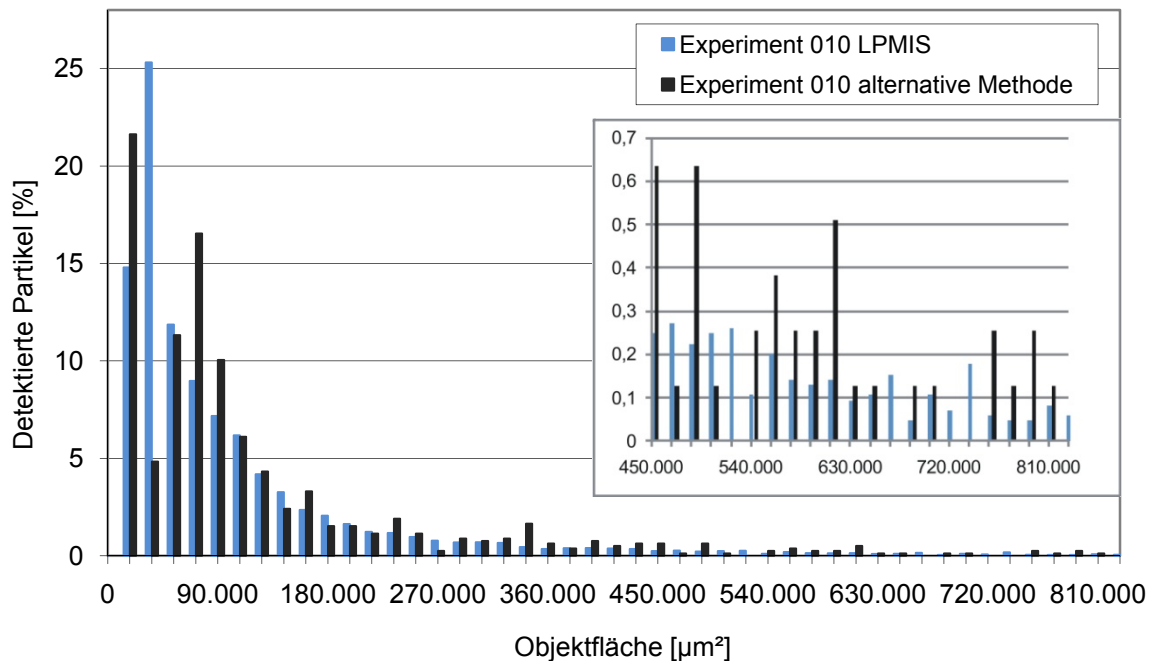


Abb. 20: Vergleich der ermittelten Partikelgrößenverteilung mit dem LPMIS und dem Auswertungsalgorithmus sowie einer alternativen Analysemethoden des Industriepartners. Alle detektierten Objekte mit einer Objektfläche von über 450.000 µm² sind vergrößert als zweites Diagramm dargestellt.

Der Vergleich der beiden offline Analysemethoden zeigt eine gute Übereinstimmung der ermittelten Partikelgrößenverteilung. Für kleine (< 9.000 Pixel) Partikel beträgt die durchschnittliche Abweichung 8 %. Nur bei der zweiten Reihe der Objektklassifizierung liegt eine maximale Abweichung von 20 % vor. Bei der Detektion der mittelgroßen und großen (> 360.000 Pixel) Objekte ist die prozentuale Abweichung zu vernachlässigen.

5.3.2 Zusammenfassung und Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, dass eine offline Analyse dispergierter, großer Partikel grundsätzlich mit dem LPMIS möglich ist. Entscheidend für die Erfassung der Partikel ist neben der CCD-Kamera, die Verwendung eines 1-fach Objektivs, da nur so ein ausreichend großes Gesichtsfeld gewährleistet ist. Mit der Aufnahmesoftware In-situ Control 2.0 können maximal fünf Bilder pro Sekunde generiert werden. Dadurch wird eine Vielzahl von Daten innerhalb kürzester Zeit gesammelt, die in die Auswertung miteinbezogen werden. Durch die Vielzahl der aufgezeichneten Bilder ist eine zuverlässige Charakterisierung der Partikel garantiert. Die Implementierung des Algorithmus *G. Project* in die Auswertungssoftware In-situ Analysis

1.2 ermöglicht die Detektion der Partikel und erlaubt die Ermittlung der Größenverteilung (siehe Abbildung 19, 20). Mittels verschiedener Schwellenwerte des Algorithmus (siehe Kap. 12.6.1) wird sicher gestellt, dass keine Zellen oder Zelltrümmer in die Auswertung mit einfließen und das Ergebnis verfälschen.

Ein Nachteil des entwickelten offline Messsystems liegt darin, dass die Proben vor der Messung verdünnt werden müssen. Dieses Verfahren muss durchgeführt werden, da sich auf Grund der hohen Partikeldichte die einzelnen Partikel berühren oder Agglomerate bilden und somit keine Einzelcharakterisierung zulassen.

Die relativ hohe Abweichung der kleinen Partikel im Vergleich zu den großen Partikeln (siehe Abb. 19), kann zum Teil durch das Auswertungsverfahren des Algorithmus erklärt werden. Um die Partikel detektieren zu können und vollständig vom Hintergrund abzutrennen, wird u. a. mit einem Kantenverstärkungsverfahren gearbeitet. Dabei werden die Außenlinien der Objekte verstärkt, wodurch die Fläche des Objektes geringfügig vergrößert wird. Gerade bei kleinen Objekten wirkt sich dieses Verfahren stark auf die Gesamtpixelzahl und somit auch auf die berechnete Fläche in μm^2 aus. Für eine zuverlässige Detektion der Partikel muss dieses Verfahren jedoch durchgeführt werden; ansonsten würden manche Partikel unerkant bleiben und somit erheblich größere Fehler in die Untersuchung miteinbringen.

Des Weiteren ist nicht auszuschließen, dass die abweichenden Größenangaben für kleine Partikel durch den Rührer entstehen. Zur Überprüfung wurden 5.632 Bilder in 22 Zyklen über einen Zeitraum von 220 min aufgenommen (265 Bilder pro Zyklus). Abbildung 21 veranschaulicht den Einfluss des Rührens auf die Partikelgröße.

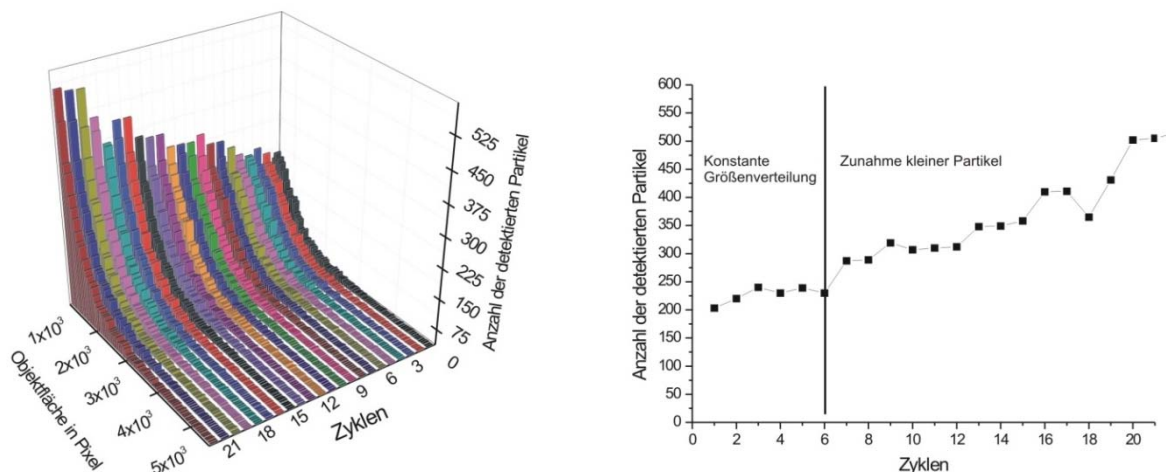


Abb. 21: Links: Dargestellt ist die Änderung der Größenverteilung der Partikel über einen Zeitraum von 220 min. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich die Anzahl der kleinen Partikel ab Zyklusnr. 6 bis Zyklusnr. 21 um 45 % erhöht. Um die Zunahme der kleinen Partikel zu verdeutlichen ist in dem Diagramm auf der rechten Seite ein Schnitt durch die Werte der Histogramme (linke Seite) bei einer Objektgröße von 550 Pixeln gezeigt.

Bei einer gewählten Zyklusdauer von 10 min nimmt die Anzahl der kleinen Partikel ab einer Überwachungszeit von ca. 60 min drastisch zu (siehe Abb. 18). Diese Zunahme ist durch das Zerstören der Partikel durch den Rührer zu erklären.

Da die Analyse der Partikel in den Experimenten 006c bis 010 in einem Zeitfenster von 20 – 45 min durchgeführt wurden, ist die Ursache für die erhöhte Anzahl kleiner Partikel eher durch das Kantenverstärkungsverfahren des Algorithmus bedingt.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass das LPMIS mit dem entwickelten Algorithmus *G. Project* ein zuverlässiges offline Analysegerät ist, das eine Aussage über die Größenverteilung von dispergierten, großen Partikeln ermöglicht.

6. Entwicklung von Kristallisationsreaktoren

Dieses Kapitel befasst sich mit der Entwicklung, Charakterisierung und Optimierung eines geeigneten Kristallisationsreaktorsystems, in dem die Experimente durchgeführt werden können. Vor der Auslegung eines Kristallisators muss grundsätzlich geklärt werden, ob dieser kontinuierlich oder absatzweise betrieben wird. Beide Grundtypen sind in der Literatur eingehend beschrieben [Mersmann et al., 1985], [Wöhlk et al., 1985]. Oft entscheidet die Einbindung in den Gesamtprozess über die Betriebsweise des Reaktors.

Die in dieser Arbeit entwickelten Reaktoren werden diskontinuierlich betrieben. Der Fokus liegt auf der Beobachtung des Prozesses und nicht auf einem hohen Durchsatz, zudem ist die Produktmenge (Kristallisat) relativ gering. Folgende Kriterien sind bei der Entwicklung des Reaktorsystems zu berücksichtigen:

- Die Adaption des In-situ Mikroskops zur Prozessbeobachtung muss gewährleistet sein. Zur Erfassung der einzelnen Kristalle muss ein kontinuierlicher Durchfluss durch die Messzone des Mikroskops vorliegen.
- Im Reaktorsystem muss eine kontrollierbare Übersättigung eingestellt werden können.
- Eine gute Makro- und Mikrovermischung zum gleichmäßigen Stoffübergang und zur Verhinderung von lokalen Übersättigungsspitzen ist anzustreben.
- Das gewählte Rührwerk darf keinen starken mechanischen Einfluss auf den Kristallisationsprozess haben und muss die Kristalle in der Schwebelage halten, d. h. die Strömungsgeschwindigkeit der Lösung muss größer als die Sinkgeschwindigkeit der Kristalle sein.

6.1 Aufbau des Reaktorsystems Prototyp A

Für den experimentellen Einsatz des In-situ Mikroskops wird ein spezieller Kristallisationsreaktor (Prototyp A) entwickelt (siehe Abb. 22). Der Prototyp A ist aus einem austenitischen Edelstahl (X5CrNi18-10, Werkstoff-Nr. 1.4301, V2A) gefertigt. Der Reaktorboden besitzt eine konische Form, wobei das ISM über einen leicht geneigten Winkel (15°) direkt an der Grenze zwischen der Reaktorinnenwandseite und dem Boden über einen 25 mm Seitenport integriert wird. Zusätzlich gibt es einen 12,5 mm Seitenport für den Anschluss einer pH-Sonde oder einer Trübungssonde. In den Reaktordeckel sind diverse Anschlüsse für die Säure/Base-Zufuhr (pH-Wert-Regelung) sowie weitere Anschlüsse für

Reagenzien (Lösemittelzugabe, Fällungsmittel usw.) eingelassen. Zudem befindet sich in dem Deckel ein Port für einen Temperatursensor. Die Temperaturregelung wird durch einen integrierten Doppelmantel verwirklicht. Das Reaktorvolumen wird mit einem Mindestfüllvolumen von 400 mL und einem maximalen Füllvolumen von 500 mL so gering wie möglich gehalten. Die Rührereinheit wird mit einem zweiblättrigen Propellerrührer realisiert. Die technische Zeichnung des kompletten Reaktorsystems ist im Anhang (Kapitel 12.8.1) gezeigt.

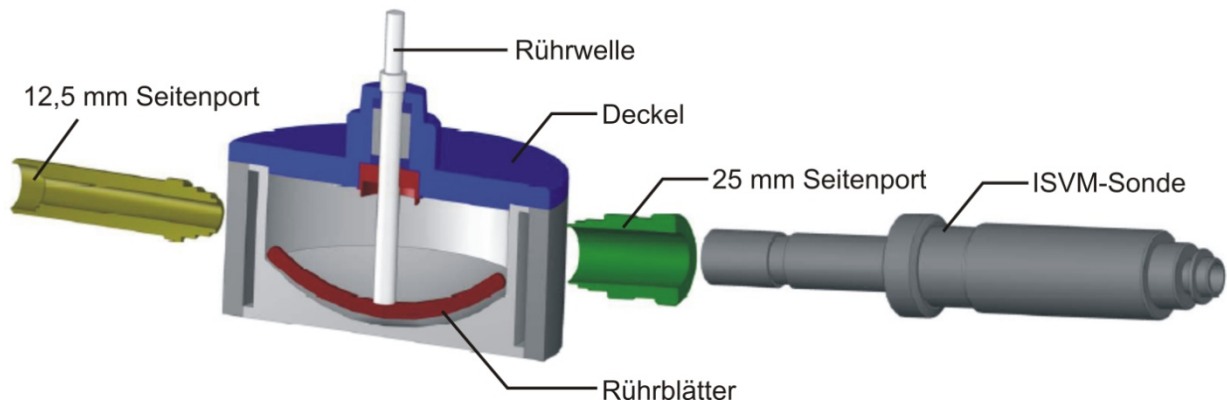


Abb. 22: Querschnittsansicht des entwickelten Reaktorsystems Prototyp A mit angelegter Integration der ISVM-Sonde.

6.2 Reaktionstechnische Charakterisierung

Für einen erfolgreichen Einsatz des Reaktorsystems ist eine reaktionstechnische Charakterisierung des entwickelten Systems sinnvoll. Dabei wird in erster Linie die schrittweise Optimierung des Kristallisationsreaktors überprüft und bewertet. Zudem werden grundlegende technische Daten und Kennzahlen für das System ermittelt. Um Aussagen über die Durchmischung im Reaktor treffen zu können, werden Messungen zur Bestimmung der Verweilzeit bei unterschiedlichen Rührgeschwindigkeiten durchgeführt. Des Weiteren werden Untersuchungen ausgearbeitet, wie die mechanische Beanspruchung der Kristalle durch das Rührwerk so gering wie möglich gehalten werden kann. Um den Wärmeübergang des Systems zu charakterisieren, werden verschiedene Temperaturprofile erstellt, die Aufschluss über das Kühl- bzw. Heizverhalten erteilen.

6.2.1 Bestimmung der Verweilzeit

Die Verweilzeit ist eine der wichtigsten reaktionstechnischen Kenngrößen eines Prozesses. So ist die Bestimmung des Verweilzeitverhaltens meistens der erste Schritt bei der

Charakterisierung eines Reaktorsystems. Im Allgemeinen wird die Zeit, die ein Volumenelement zum Durchlaufen eines Reaktors benötigt, als Verweilzeit bezeichnet. Es werden also Informationen über die Güte der Durchmischung des Systems erhalten. Da in realen Reaktoren gleichzeitig injizierte Volumenelemente unterschiedlich lange Wegstrecken vom Reaktoreingang bis zum Reaktorausgang zurücklegen, resultieren verschiedene Aufenthaltsdauern der Teilchen. Die Wahl des Tracers ist dabei von entscheidender Bedeutung. Neben der Verwendung von Farbstoffen, die durch Absorptionsmessungen nachgewiesen werden können, ist die Ermittlung der Verweilzeit durch Leitfähigkeitsmessungen eine ebenfalls gängige Methode. Letztere wird in dieser Arbeit zur Untersuchung der Durchmischung im Reaktor angewandt. Es gibt verschiedene Möglichkeiten der Tracerzugabe. Am häufigsten werden das Stufensignal und das in dieser Arbeit benutzte Impulssignal verwendet. Bei dem Stufensignal wird der Tracer zu einem Zeitpunkt t_0 mit konstanter Konzentration kontinuierlich dem Volumenstrom zugesetzt und die Konzentrationsänderung in Abhängigkeit der Zeit am Reaktorausgang gemessen. Die Zugabe des Impulssignals in den Volumenstrom erfolgt in einem unendlich kleinen Zeitfenster; auch hier wird die Konzentrationsänderung in Abhängigkeit der Zeit gemessen. Aus dem Antwortsignal des Impulssignals lässt sich die Verweilzeitdichtefunktion $E(\Theta)$ ableiten. Abbildung 23 zeigt die experimentell bestimmte Verweilzeitdichtefunktion $E(\Theta)$ sowie die daraus berechnete Verweilzeitsummenfunktion $F(\Theta)$ für den Prototypen A bei unterschiedlichen Rührgeschwindigkeiten. Um die Reaktoren miteinander vergleichen zu können, wird die normierte Zeit Θ ($\theta = t / \tau$) eingeführt.

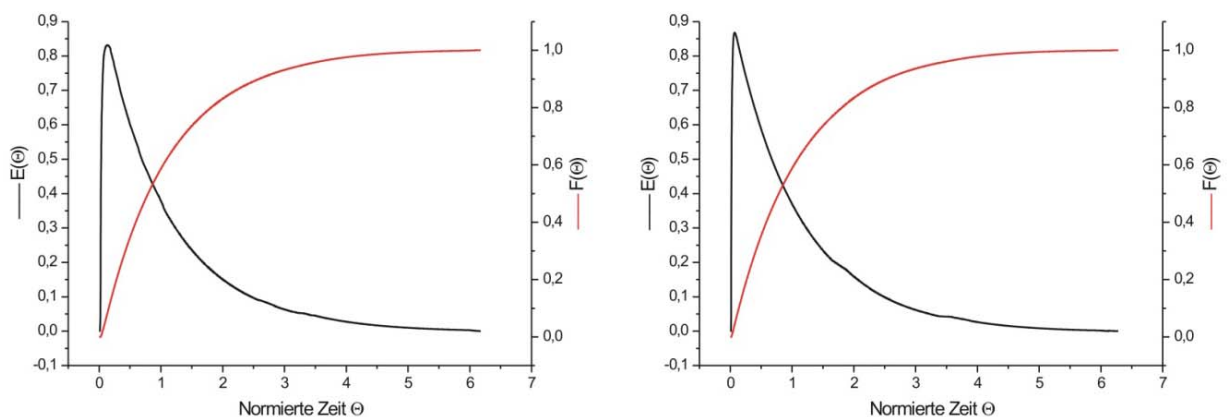


Abb. 23: Experimentell gemessene Verweilzeitdichtefunktion $E(\Theta)$ durch Zugabe eines Impulssignals sowie die theoretisch berechnete Verweilzeitsummenfunktion $F(\Theta)$. Links: 40 rpm, rechts: 120 rpm. Als Tracer wird 1 mL einer 0,02 molaren Kaliumnitratlösung injiziert. Die Änderung der Leitfähigkeit wird mit der Leitfähigkeitselektrode Tetra Con 325 (Nova Analytics Deutschland GmbH und Co. KG, Weilheim) am Reaktorausgang gemessen. Der eingestellte Volumenstrom beträgt 0,17 mL/s.

Der Zusammenhang beider Funktionen ist durch folgende Formel gegeben:

$$E(\theta) = \frac{dF(\theta)}{d\theta} \quad (3)$$

Weitere experimentell bestimmte Verweilzeitdichtefunktionen $E(\Theta)$ und theoretisch ermittelte Verweilzeitsummenfunktionen $F(\Theta)$ für Rührgeschwindigkeiten von 50 rpm, 80 rpm und 100 rpm befinden sich im Anhang (siehe Kap. 12.5.1).

Bei Kristallisationen muss möglichst langsam gerührt werden, damit die Kristalle nicht durch den Rührer zerstört werden; aber trotzdem muss eine homogene Durchmischung der Lösung vorliegen. Daraus resultiert die Wahl der Rührgeschwindigkeiten von 40 rpm bzw. 120 rpm. Mit dem Prototypen A und der verwendeten Biostat B Einheit ist die minimal einstellbare Rührgeschwindigkeit auf 40 rpm begrenzt. Ab einer Rührgeschwindigkeit von über 120 rpm sind die auftretenden Scherkräfte zu groß und die Kristalle werden deformiert. Anhand der graphischen Darstellung in Abbildung 23 wird deutlich, dass die Erhöhung der Rührgeschwindigkeit von 40 rpm auf 120 rpm keinen signifikanten Einfluss auf die Antwortfunktion hat. Demzufolge ist festzuhalten, dass in dem Reaktorsystem Prototyp A die Variation der Rührgeschwindigkeit zwischen 40 rpm und 120 rpm keinen bedeutsamen Einfluss auf die Durchmischung des Systems zeigt.

6.2.1.1 Ermittlung grundlegender Kenngrößen

Zur weiteren Charakterisierung des Prototypen A erfolgt die Berechnung von grundlegenden Kenngrößen. Es werden die dimensionslose Bodensteinzahl Bo und die Kesselzahl N des Systems bestimmt. Die Bodensteinzahl Bo beschreibt das Verhältnis der Geschwindigkeiten von Konvektion und Dispersion im Reaktorsystem. Durch die Ermittlung der Bodensteinzahl lassen sich demnach Aussagen über die vorliegende Rückvermischung der Volumenelemente treffen. Die Berechnung der Bodensteinzahl ergibt sich aus folgender Formel:

$$Bo = \frac{1}{\sigma_{\theta}^2} + \sqrt{\frac{1}{(\sigma_{\theta}^2)^2} + \frac{8}{\sigma_{\theta}^2}} \quad (4)$$

$\sigma_{\theta}^2 = \text{Varianz}$

Für die Berechnung der Kesselzahl N werden zwei Methoden angewandt. Zum Einen erfolgt die Bestimmung der Kesselzahl N aus der Bodensteinzahl Bo bzw. der Varianz. Der Zusammenhang ist durch Formel (5) dargestellt.

$$N = \frac{1}{\sigma_{\theta}^2} = \left(\frac{2}{Bo} + \frac{8}{Bo^2} \right)^{-1} \quad (5)$$

Zum Anderen wird die Kesselzahl über die Formel des Kaskadenmodells (siehe Formel 6) ermittelt. Dazu wird die Formel in ein Tabellenkalkulationsprogramm eingegeben und mit Hilfe des Solvers gelöst. Dabei ist die Kesselzahl N als veränderbare Zelle definiert. Durch Minimierung der kleinsten Fehlerquadrate und Einsatz des Newton-Verfahrens werden die Werte für die Kesselzahl N optimiert.

$$E(\theta) = \frac{N(N \cdot \theta)^{N-1}}{(N-1)!} e^{(-N\theta)} \quad (6)$$

Ein Überblick über die ermittelten Kenngrößen bei unterschiedlichen Rührgeschwindigkeiten ist in Tabelle 06 dargestellt.

Tabelle 06: Reaktionstechnische Kenngrößen für den Prototypen A bei unterschiedlichen Rührgeschwindigkeiten.

Rührgeschwindigkeit	Kesselzahl N (Kaskadenmodell)	Kesselzahl N (Formel 5)	Bodensteinzahl Bo
40 rpm	1,25	0,91	3,76
50 rpm	1,18	0,97	3,93
80 rpm	1,24	0,93	3,82
100 rpm	1,23	0,94	3,83
120 rpm	1,18	0,95	3,85

Die in Tabelle 06 gezeigten Werte bestätigen die Aussage, die bei der Messung der Verweilzeitdichtefunktion $E(\Theta)$ erhalten wurde (siehe Kapitel 6.2.1). Es ist kein signifikanter Unterschied der Kenngrößen in Abhängigkeit der verwendeten Rührgeschwindigkeiten festzustellen. Die aus dem Kaskadenmodell berechneten Werte für die Kesselzahl N liegen oberhalb der Werte, die aus Formel 5 ermittelt wurden. Anhand der kalkulierten Daten lässt sich festhalten, dass sich der Prototyp A reaktionstechnisch annähernd wie ein kontinuierlich betriebener Rührkesselreaktor verhält.

6.2.2 Einfluss der mechanischen Beanspruchung auf die Kristallisation

Eine weitere wichtige Einflussgröße auf Kristallisationsprozesse ist die mechanische Beanspruchung der Kristalle durch das Rührwerk. Die minimale Beanspruchung der Kristalle

liegt vor, wenn die Rührerdrehzahl S und die Umfangsgeschwindigkeit W eines Rühr- oder Umwälzsystems gerade ausreichend sind, um die Kristalle in Schwebelage und den Kristallisor ausreichend durchmischen zu halten [Mersmann et al., 1982].

$$W = d \cdot \pi \cdot S \quad (7)$$

In Kapitel 6.2.1 wurde gezeigt, dass sich die Durchmischung des Reaktorsystems bei einer Rührgeschwindigkeit von 40 – 120 rpm konstant verhält. Zur Bestimmung der optimalen Rührgeschwindigkeit bzw. Umfangsgeschwindigkeit wird eine gesättigte Lösung mit Aspirin®-Kristallen im Prototypen A untersucht. Das Verhalten der Kristalle wird bei Rührgeschwindigkeiten in einem Bereich von 40 – 120 rpm genauer analysiert. Dazu werden die Kristalle mit dem ISVM-System in dem Reaktor überwacht und anschließend hinsichtlich der Kristallzahl und Kristallgröße ausgewertet. Für jede eingestellte Rührgeschwindigkeit erfolgt die Generierung von 500 Bildern. Die graphische Darstellung in Abbildung 24 veranschaulicht das Verhalten der Kristalle bei den gewählten Rührgeschwindigkeiten.

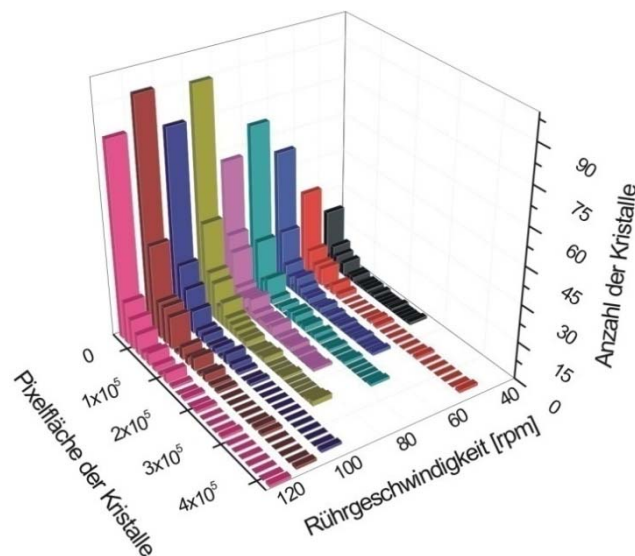


Abb. 24: Anzahl der detektierten Kristalle bei unterschiedlichen Rührgeschwindigkeiten. Rührgeschwindigkeiten von 40 – 80 rpm reichen nicht aus, um alle Kristalle in der Schwebelage zu halten. Besonders größere Kristalle ab einer Pixelfläche $3 \cdot 10^5$ Pixeln können nicht von der CCD-Kamera erfasst werden, da ihre Sinkgeschwindigkeiten bei diesen Rührerdrehzahlen überwiegen. Ab einer Rührgeschwindigkeit von 90 rpm erhöht sich die Anzahl der kleinen Kristalle. Des Weiteren verhält sich auch die Größenverteilung der größeren Kristalle ($>3 \cdot 10^5$ Pixel) bei diesen Rührgeschwindigkeiten konstant. Diese Daten wurden anhand von Aspirin®-Kristallen erhalten.

Unter der Verwendung des Prototypen A mit einem zweiblättrigen Propellerrührer (Länge: 84 mm, Breite: 9,5 mm, Wandstärke: 1,5 mm) kann konstatiert werden, dass eine Rührgeschwindigkeit von 90 – 120 rpm ideal für die Überwachung von Aspirin®-Kristallen ist. Der ermittelte Bereich der Rührgeschwindigkeiten gilt als Richtwert. Bei Variation der Rührblätter oder bei der Kristallisation anderer Moleküle ist es sinnvoll vor jeder Überwachung das Sinkverhalten der Kristalle bzw. die optimale Rührgeschwindigkeit neu zu ermitteln.

6.2.3 Erstellen von Temperaturprofilen

Eine gute Möglichkeit, die Löslichkeit eines Stoffes herabzusetzen und damit die gewünschte Kristallisation zu starten, ist u. a. durch Kühlen der zu untersuchenden Lösung gegeben. Da diese Methode in den in Kapitel 9 beschriebenen Experimenten zur Kristallisation von pharmazeutischen Verbindungen und zur Kristallisation von Proteinen eingesetzt werden soll, ist es sinnvoll den Wärmeübergang des Reaktorsystems zu charakterisieren. Dazu werden verschiedene Temperaturprofile für den Prototypen A aufgestellt, die das Kühl- bzw. Heizverhalten des Systems beschreiben. In Abbildung 25 wird gezeigt, wie sich der Wärmeübergang des Prototypen A auf die eingestellten Temperaturprofile auswirkt.

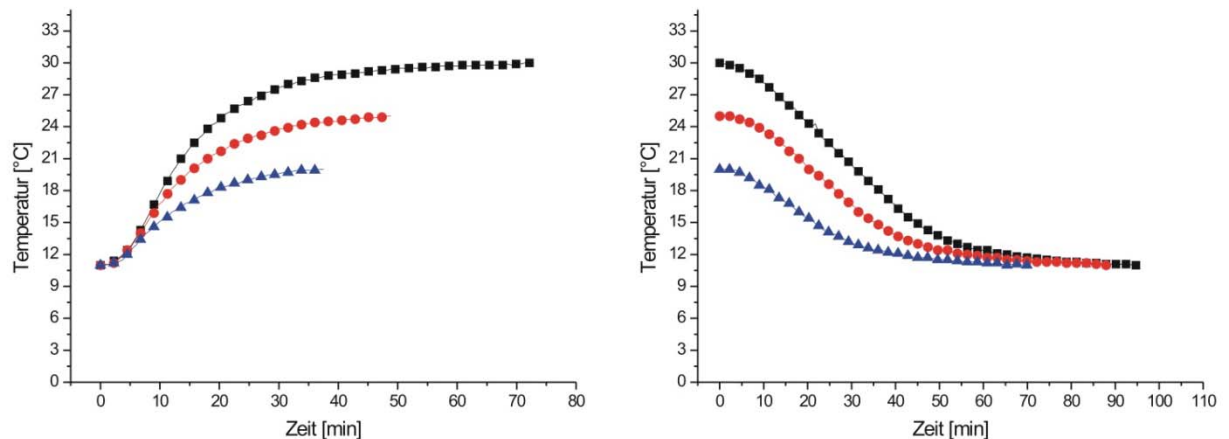


Abb. 25: Aufnahme von Temperaturprofilen zur Charakterisierung des Wärmeübergangs für den Prototypen A. Links: Darstellung der Temperaturprofile beim Heizen des Systems von 11°C auf 20°C, 25°C und 30 °C. Rechts: Ermittelte Temperaturprofile beim Kühlen des Systems von 30°C, 25°C und 20°C auf 11°C. Der eingestellte Volumenstrom der Kühl- bzw. Heizlösung zur Aufnahme der Profile beträgt 750 mL/min. Die benutzte Rührgeschwindigkeit beim Erstellen der Profile ist 90 rpm.

Als Medium wird deionisiertes Wasser verwendet. Die gewählten Temperaturen umfassen einen Bereich von 11 – 30°C. Die Wahl dieses Temperaturbereiches ist darin begründet,

dass als Startpunkt, der in den folgenden Kapiteln durchgeführten Kristallisationen von Proteinen, ein Wert von ca. 30°C nicht überschritten wird. Vielmehr wird versucht eine gesättigte Lösung bei ca. 25°C ± 5°C zu erzeugen, um dann durch Kühlen der Lösung die Löslichkeit herabzusetzen. Da auch das Lösungsverhalten der Kristalle beschrieben werden soll, ist die Aufnahme des Heizverhaltens immens wichtig.

Die gezeigten Temperaturprofile entsprechen den Erwartungen. Unter der Verwendung eines definierten Volumenstroms wird beim Heizen der eingestellte Sollwert früher erreicht als beim Kühlen. Alle experimentell ermittelten Profile zeigen ähnliche Kurvenverläufe. Zu Beginn des Kühlens oder Heizens ist eine langsame Annäherung der Profile an den eingestellten Wert zu erkennen, bevor sie in einen linearen Verlauf übergehen. Zum Erreichen des Sollwertes nähern sich die Kurven schließlich asymptotisch dem jeweiligen Wert an. Um eine bestimmte Temperatur langsam anzusteuern, ist das gezeigte Verfahren die Methode der Wahl.

Für das Erhalten eines linearen Temperaturgradienten muss eine Solltemperatur über bzw. unter der gewünschten Temperatur eingegeben werden. Beim Erreichen des gewünschten Wertes kann dann die Solltemperatur auf den gewünschten Wert eingestellt werden, um die Temperatur konstant zu halten.

6.3 Entwicklung des Prototypen B

Diese Kapitel befasst sich mit der Weiterentwicklung und Optimierung des vorgestellten Reaktorsystems Prototyp A. Die Optimierungsmaßnahmen betreffen neben einem neuen Design des Reaktors vor allem die Integration eines Probennahmemoduls und den Einbau weiterer Ports für Sonden. Zudem werden neue Rührereinheiten verwendet und der Doppelmantel des Reaktors neu konzipiert, um eine homogenere Temperatur in dem Reaktorsystem zu gewährleisten. Des Weiteren wird eine Strategie entwickelt, um die Rührgeschwindigkeit bis auf 6 rpm herabzusetzen. Zur Realisierung dieser Maßnahmen wird ein komplett neuer Kristallisationsreaktor entwickelt und charakterisiert. Das neue System wird in dieser Arbeit als Prototyp B bezeichnet.

6.3.1 Aufbau des Reaktorsystems Prototyp B

Der Aufbau des Prototypen B entspricht hinsichtlich seiner Form und den verwendeten Werkstoffen dem Prototypen A (siehe Abb. 26). Die Integration eines zweiten 25 mm Seitenports ermöglicht die Adaption eines zusätzlichen In-situ Videomikroskops oder einer weiteren Sonde. Der 12,5 mm Port ist aus Platzgründen in den Deckel eingelassen. Des

Weiteren wurden Glasfenster in den Deckel eingefügt, die zu jeder Zeit einen Blick auf die Messzone des ISVM-Systems zulassen. Der Doppelmantel des Reaktorsystems umfasst nicht mehr nur die Seitenwände des Reaktors, sondern umschließt auch den Reaktorboden. Dadurch wird ein besseres Kühl- bzw. Heizverhalten erhalten. Eine weitere wichtige Weiterentwicklung des Systems besteht durch den Einbau eines Probenahmemoduls. Das Modul ist im Zentrum des Reaktorbodens eingelassen. Durch einen Drehmechanismus können während eines laufenden Prozesses Kristalle über ein Sieb aus dem Reaktor gezogen werden und separat analysiert werden. Nach der Entnahme wird das Modul in seine ursprüngliche Position zurückgestellt und verschließt den Reaktor vollständig. Zur Verringerung der Rührgeschwindigkeiten wird ein zusätzlicher Aufsatz in den Deckel integriert, an den der Rührermotor einer Biostat B Einheit angeschlossen wird. Ein O-Ring verbindet den Rührermotor mit einem Rad, welches in der Mitte des Reaktordeckels sitzt und die Antriebswelle bewegt. Durch das Übersetzungsverhältnis von 1 : 7 lassen sich so Rührgeschwindigkeiten von bis zu 6 rpm realisieren. Die neue Rührereinheit besteht aus einem dreiblättrigen Propellerrührer. Die technischen Zeichnungen des kompletten Reaktorsystems und der Einzelteile sind im Anhang (Kapitel 12.8.2) gezeigt.

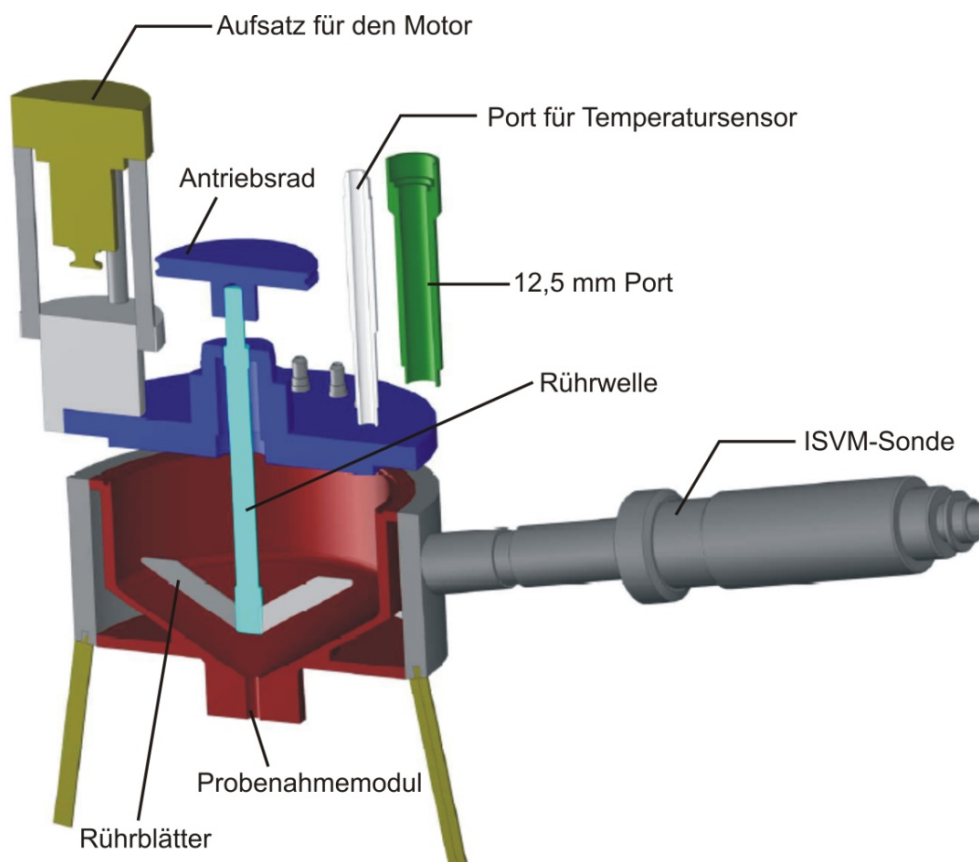


Abb. 26: Querschnittsansicht des entwickelten Reaktorsystems Prototyp B mit angedeuteter Integration der ISVM-Sonde.

6.4 Reaktionstechnische Charakterisierung

Um einen Vergleich beider Reaktorsysteme vornehmen zu können, wird der Prototyp B ebenfalls hinsichtlich des Verweilzeitverhaltens und seiner reaktionstechnischen Kenngrößen charakterisiert. Zudem werden der Einfluss des dreiblättrigen Propellerrührers auf die mechanische Beanspruchung der Kristalle und das Verhalten des Wärmeübergangs des neuen Doppelmantels beschrieben.

6.4.1 Bestimmung der Verweilzeit

Die Bestimmung des Verweilzeitverhaltens wird wie in Kapitel 6.2.1 beschrieben durchgeführt. Durch Zugabe eines Impulssignals in den Volumenstrom wird am Reaktorausgang die Änderung der Konzentration in Abhängigkeit der Zeit detektiert. Die graphische Darstellung in Abbildung 27 veranschaulicht die experimentell ermittelte Verweilzeitdichtefunktion $E(\Theta)$ und die theoretisch berechnete Verweilzeitsummenfunktion $F(\Theta)$ für den Prototypen B.

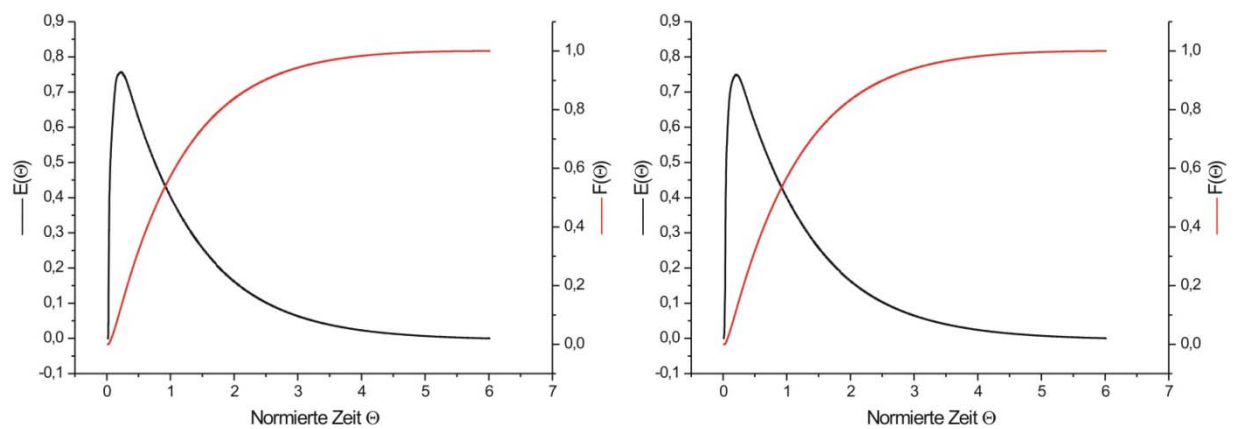


Abb. 27: Experimentell gemessene Verweilzeitdichtefunktion $E(\Theta)$ durch Zugabe eines Impulssignals sowie die theoretisch berechnete Verweilzeitsummenfunktion $F(\Theta)$. Links: 15 rpm, rechts: 80 rpm. Als Tracer wird 1 mL einer 0,02 molaren Kaliumnitratlösung injiziert. Die Änderung der Leitfähigkeit wird mit der Leitfähigkeitselektrode Tetra Con 325 (Nova Analytics Deutschland GmbH und Co. KG, Weilheim) am Reaktorausgang gemessen. Der eingestellte Volumenstrom beträgt 0,17 mL/s.

Weitere gemessene Verweilzeitdichtefunktionen $E(\Theta)$ und theoretisch berechnete Verweilzeitsummenfunktionen $F(\Theta)$ für Rührgeschwindigkeiten von 20 rpm, 30 rpm und 50 rpm befinden sich im Anhang (siehe Kap. 12.5.2). Anhand der in Abbildung 27 gezeigten Darstellung wird veranschaulicht, dass das Verhalten der Antwortkurven identisch ist. Unter

der Verwendung eines dreiblättrigen Propellerrührers hat eine Erhöhung der Rührgeschwindigkeit von 15 rpm auf 80 rpm keinen signifikanten Einfluss auf die Durchmischung im Reaktorsystem. Ein Vergleich des Verweilzeitverhaltens des Prototypen B mit den in Abbildung 23 dargestellten Funktionen für den Prototypen A zeigt übereinstimmende Ergebnisse. Dieser Befund ist essentiell. Auch mit einer gedrosselten Rührgeschwindigkeit von 15 rpm wird unter Verwendung eines dreiblättrigen Propellerrührers eine gute Durchmischung erreicht.

6.4.1.1 Ermittlung grundlegender Kenngrößen

Die Berechnungen der Bodensteinzahl Bo und der Kesselzahl N erfolgen nach den in Kapitel 6.2.1.1 gezeigten Formeln 4 – 6. In Tabelle 07 werden die berechneten reaktionstechnischen Kenngrößen zusammengefasst.

Tab. 07: Reaktionstechnische Kenngrößen für den Prototypen B bei unterschiedlichen Rührgeschwindigkeiten.

Rührgeschwindigkeit	Kesselzahl N (Kesselmodell)	Kesselzahl N (Formel 5)	Bodensteinzahl Bo
15 rpm	1,40	1,08	4,20
20 rpm	1,44	1,05	4,14
30 rpm	1,39	1,03	4,07
50 rpm	1,41	1,04	4,10
80 rpm	1,38	1,04	4,11

Die ermittelten reaktionstechnischen Daten entsprechen den Erwartungen. Die Variation der Rührgeschwindigkeiten in einem Bereich von 15 – 80 rpm haben keinen bedeutsamen Einfluss auf Werte der Kenngrößen. Im Vergleich zu den ermittelten Werten für den Prototypen A liegen die Werte für den Prototypen B vernachlässigbar höher. Dieser Befund basiert zum Einen auf niedrigeren Rührgeschwindigkeiten und zum Anderen auf Messungenauigkeiten. Es kann konstatiert werden, dass das reaktionstechnische Verhalten des Prototypen B ebenfalls dem eines kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktors sehr nahe kommt. Entscheidend ist, dass auch bei niedrigen Rührgeschwindigkeiten eine gute Rückvermischung vorliegt. Bestätigt wird dieser Befund durch die relativ kleinen Bodensteinzahlen von ca. 4.

6.4.2 Einfluss der mechanischen Beanspruchung auf die Kristallisation

In diesem Kapitel wird untersucht, wie hoch die maximale Rührgeschwindigkeit des Prototypen B sein muss, um Kristalle in der Schwebelage zu halten. Da das Rührwerk des

Prototypen B aus einem dreiblättrigen Propellerrührer besteht, wird erwartet, dass auch bei kleineren Rührgeschwindigkeiten die Strömgeschwindigkeit der Lösung größer als die Sinkgeschwindigkeit der Kristalle ist. Im Hinblick auf die in Kapitel 9 folgenden Untersuchungen zu Proteinkristallisationsprozessen wird eine suspendierte Lösung von Lysozym Kristallen als zu untersuchendes System gewählt. In Abbildung 28 wird das Verhalten der Kristalle bei unterschiedlichen Rührgeschwindigkeiten mit Hilfe des ISVM-Systems charakterisiert.

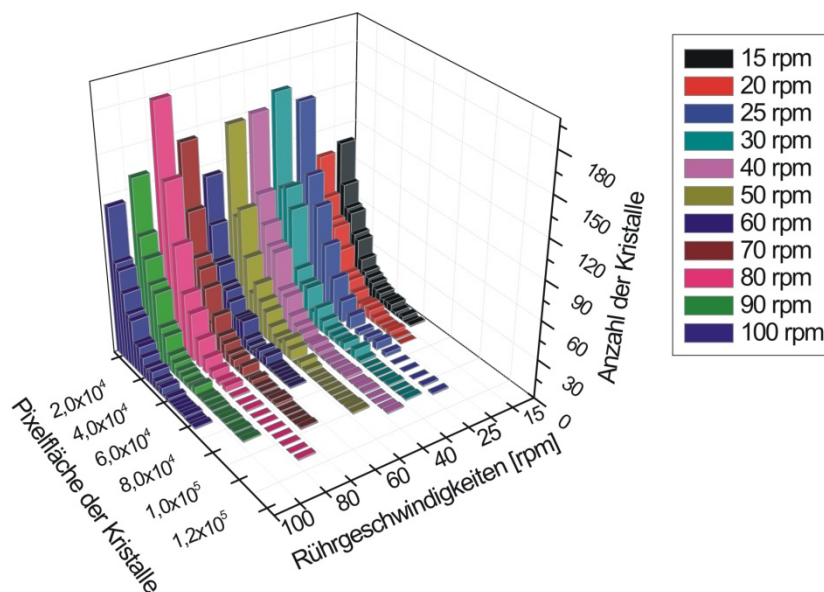


Abb. 28: Anzahl der detektierten Kristalle bei unterschiedlichen Rührgeschwindigkeiten. Niedrige Rührgeschwindigkeiten von 15 – 20 rpm reichen nicht aus, um alle Kristalle in der Schwebelage zu halten. Besonders größere Kristalle ab einer Pixelfläche $5 \cdot 10^4$ Pixeln können nicht von der CCD-Kamera erfasst werden, da ihre Sinkgeschwindigkeiten bei diesen Rührerdrehzahlen überwiegen. Ab einer Rührgeschwindigkeit von 25 rpm erhöht sich die Anzahl der kleinen Kristalle. Des Weiteren verhält sich auch die Größenverteilung der größeren Kristalle ($>5 \cdot 10^4$ Pixel) bei diesen Rührgeschwindigkeiten konstant. Diese Daten wurden anhand von Lysozym-Kristallen erhalten.

Jede Datenreihe des Histogramms entspricht der Auswertung von 500 Bildern. Es wird veranschaulicht, dass unter der Verwendung des Prototypen B und einem dreiblättrigen Propellerrührer (Länge: 114 mm, Breite: 9 mm, Wandstärke: 1 mm) eine Rührgeschwindigkeit von ca. 25 rpm ausreichend ist, um die zu untersuchenden Kristalle in der Schwebelage zu halten und erfolgreich zu detektieren.

6.4.3 Erstellen von Temperaturprofilen

Wie in Kapitel 6.2.3 beschrieben, werden auch für den Prototypen B Temperaturprofile erstellt, die das Kühl- bzw. Aufheizverhalten des Reaktorsystems kennzeichnen. Als Medium wird deionisiertes Wasser verwendet. Um einen Vergleich beider Reaktoren zu ermöglichen, werden die identischen Temperaturprofile gefahren. In der graphischen Darstellung in Abbildung 29 sind die experimentell ermittelten Werte gezeigt.

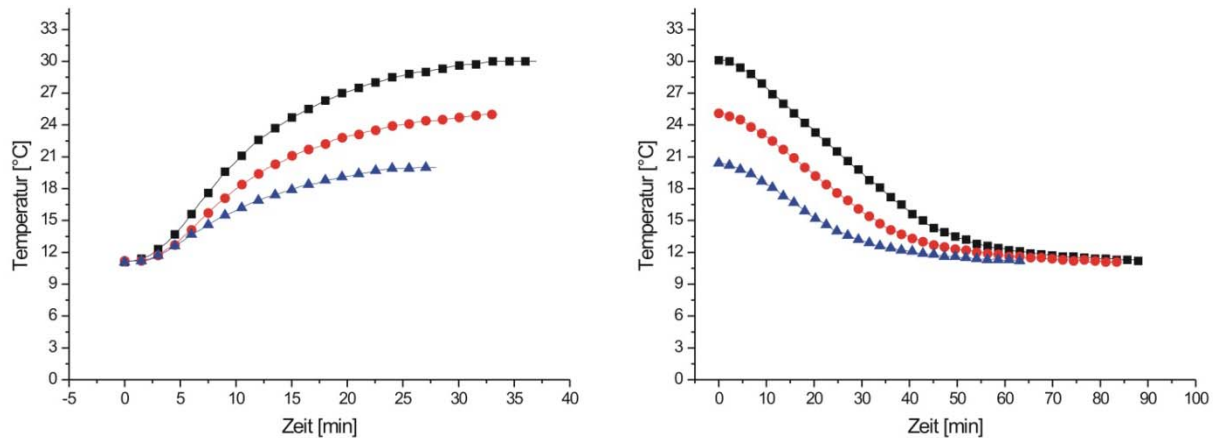


Abb. 29: Aufnahme von Temperaturprofilen zur Charakterisierung des Wärmeübergangs für den Prototypen B. Links: Darstellung der Temperaturprofile beim Heizen des Systems von 11°C auf 20°C, 25°C und 30°C. Rechts: Ermittelte Temperaturprofile beim Kühlen des Systems von 30°C, 25°C und 20°C auf 11°C. Der eingestellte Volumenstrom der Kühl- bzw. Heizlösung zur Aufnahme der Profile beträgt 750 mL/min. Die benutzte Rührgeschwindigkeit beim Erstellen der Profile ist 40 rpm.

Die dargestellten Temperaturprofile des Prototypen B entsprechen in ihren Verläufen den Profilen, die mit dem Prototypen A ermittelt wurden. Der entscheidende Unterschied der Profile liegt in der verkürzten Zeit, die zur Einstellung der gewünschten Temperatur benötigt wird. Auf Grund des optimierten Kühlmantels des Prototypen B ist ein besserer Wärmeübergang des Reaktorsystems gewährleistet.

Verdeutlicht wird die auftretende Zeitdifferenz beim Kühlen bzw. Heizen der Reaktorsysteme in der graphischen Abbildung 30.

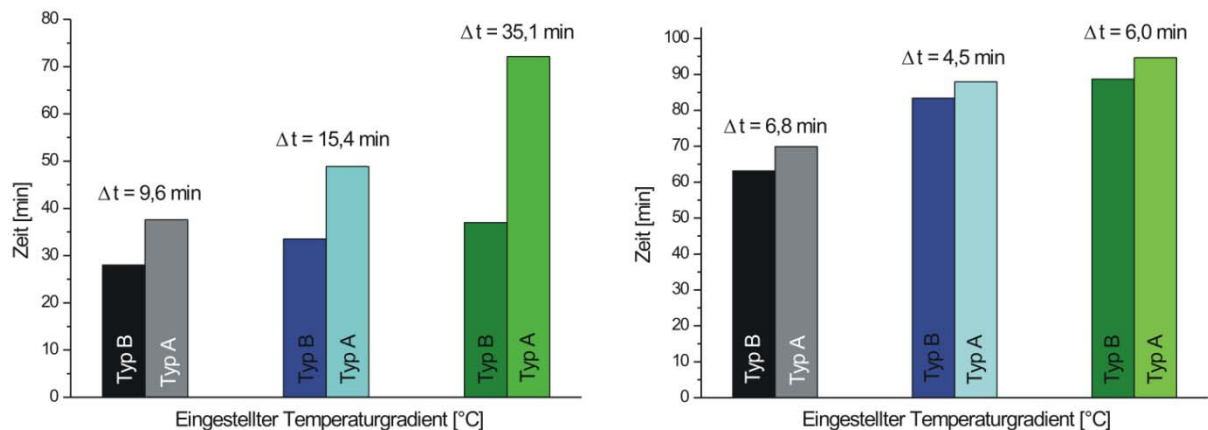


Abb. 30: Vergleich der zeitlichen Dauer der Temperaturprofile beim Kühlen bzw. Heizen der Reaktorsysteme A und B. Links: Heizen der Systeme von 11°C auf 20°C, 25°C und 30°C. Rechts: Kühlen von 30°C, 25°C und 20°C auf 11°C. Es wird deutlich, dass durch den optimierten Kühlmantel des Prototypen B die Dauer des Kühl- bzw. Heizvorgangs zur Einstellung der Solltemperatur verkürzt werden kann.

6.5 Zusammenfassung und Diskussion

Die Entwicklung von geeigneten Reaktorsystemen für die Durchführung der Kristallisationsexperimente konnte erfolgreich realisiert werden. Sowohl der entwickelte Prototyp A als auch die optimierte Version (Prototyp B) eignen sich für die Überwachung von Kristallisationsprozessen. Das In-situ Videomikroskopsystem lässt sich problemlos über die 25 mm Seitenports in die Reaktoren integrieren. Dadurch ist die online Überwachung suspendierter Lösungen in einem möglichst kleinen Gesamtvolumen von 400 – 500 mL verwirklicht worden. Zudem erlauben weitere Ports und Anschlüsse die Integration diverser Messsonden.

Beide Systeme wurden im Verlauf dieser Arbeit in Bezug auf ihr Verweilzeitverhalten und hinsichtlich der vorliegenden Rückvermischung reaktionstechnisch charakterisiert. In umfangreichen Analysen konnten Kenngrößen wie die Bodensteinzahl Bo und die Kesselzahl N ermittelt werden. Aus den gewonnenen Ergebnissen ist festzuhalten, dass sich beide Reaktorsysteme annähernd wie ein idealer, kontinuierlich betriebener Rührkesselreaktor verhalten.

Des Weiteren wurden verschiedene Rührereinheiten getestet; hier stellte sich die Verwendung eines dreiblättrigen Propellerrührers als die Methode der Wahl heraus. Die Benutzung des dreiblättrigen Rührers ermöglicht auch bei niedrigen Rührgeschwindigkeiten von 15 rpm eine vergleichbar gute Durchmischung, wie sie mit dem zweiblättrigen Rührer bei höheren Rührgeschwindigkeiten erreicht wird. Zudem verleiht er den zu untersuchenden Partikeln einen größeren Auftrieb. So wird schon bei geringen Rührgeschwindigkeiten eine homogene

Durchmischung der suspendierten Lösung bewirkt und die mechanische Beanspruchung der Partikel kann gering gehalten werden. Durch die homogene Verteilung ist ein kontinuierlicher Durchfluss durch die Messzone des ISVM-Systems gewährleistet. Somit können zu jedem Zeitpunkt während einer Messung charakteristische Parameter der Partikel reproduzierbar aufgenommen werden.

Das Einstellen einer kontrollierbaren Übersättigung kann durch Zugabe von Fällungsmittellösungen durch diverse Anschlüsse im Reaktordeckel realisiert werden. Auch ist die Möglichkeit gegeben, über die integrierten Doppelmäntel verschiedene Temperaturprofile einzustellen. Dabei weist der Prototyp B mit seinem optimierten Doppelmantel Vorteile gegenüber dem Prototypen A auf, da die Dauer bis zum Erreichen der Solltemperatur verkürzt werden konnte. Ein weiterer Vorteil der optimierten Version ist durch den Einbau eines Probennahmemoduls gegeben. Dadurch können während der Experimente im Reaktor Partikel entnommen und mittels offline Analysetechniken charakterisiert werden.

Der Antrieb der Rührwelle wurde für den Prototypen B mit einem separaten Aufsatz, der mittels eines O-Rings mit einem Rad (Übersetzung 1 : 7) verbunden ist, ermöglicht. In einem Langzeittest wurde festgestellt, dass es sich empfiehlt den O-Ring nach ca. 170 h Belastung auszuwechseln, da er in seiner Spannkraft nachlässt und somit keine einheitliche Rührgeschwindigkeit halten kann.

7. Proteinkristallisation

In diesem Kapitel wird nach einer kurzen Beschreibung der wichtigsten Grundlagen der Proteinkristallisation ein Screening geeigneter Proteine vorgestellt, die für Kristallisationsexperimente in den Reaktorsystemen in Frage kommen. Dazu wird das Kristallisationsverhalten ausgewählter Proteine in Dampfdiffusionsexperimenten näher untersucht und verifiziert. Im Anschluss daran werden die erhaltenden Reaktionsparameter auf batch-Versuche im Reaktorsystem übertragen.

Bei der Kristallisation von Proteinen muss grundsätzlich zwischen zwei Zielsetzungen unterschieden werden. Zum Einem findet die Technik Anwendung, um die dreidimensionale Struktur eines Proteins zu klären. Für die Strukturaufklärung werden ausreichend große Einkristalle benötigt, die ein eindeutiges Röntgenbeugungsmuster aufweisen. Der Wachstumsprozess für einen gut analysierbaren Proteinkristall kann sich dabei über Tage und Wochen bis zu Monaten hinziehen.

Zum Anderen wird die Technik der Proteinkristallisation als Aufarbeitungsschritt in industriellen Prozessen genutzt. Hier ist die Motivation eine schnelle und quantitative Kristallisation, wobei durch eine möglichst einheitliche Kristallgrößenverteilung eine hohe Prozesseffektivität und Produktspezifikation gewährleistet wird. Auch wenn die Zielsetzung beider Kristallisationsvarianten unterschiedlich ist, liegen identische Anfangsschritte vor. Die Grundlage einer erfolgreichen Kristallisation basiert auf dem Auffinden geeigneter Kristallisationsbedingungen und -parameter. Erst bei der späteren Optimierung muss differenziert werden.

7.1 Allgemeines

Die Kristallisation von Makromolekülen ist - wie jede Kristallisation - ein Prozess, der durch viele Parameter beeinflusst wird. Um von der flüssigen Form in die kristalline Form zu gelangen, muss die Löslichkeit des Proteinmoleküls verringert werden. Dieses kann z. B. durch Zugabe von Salzen, Verdunsten oder Kühlen der Lösung sowie durch die Änderung des pH-Wertes hervorgerufen werden. Dabei kommt es in der Regel zur Bildung eines amorphen Niederschlags. Von diesem Punkt an gilt es, die gewählten Bedingungen so zu optimieren, dass zueinander komplementäre Bereiche auf der Oberfläche des Proteins vorliegen. Durch die spezifischen Wechselwirkungen der einzelnen Proteinmoleküle kommt es dann bei einer geometrisch günstigen Lage zur Kristallisation. Kristallisationsprozesse sind in die drei Schritte der Keimbildung (Nukleation), des Kristallwachstums und des

Wachstumsstillstandes unterteilt [Ducruix, 1992]. Die graphische Darstellung in Abbildung 31 beschreibt schematisch die Löslichkeitskurve eines Proteins in Abhängigkeit der Fällungsmittelkonzentration.

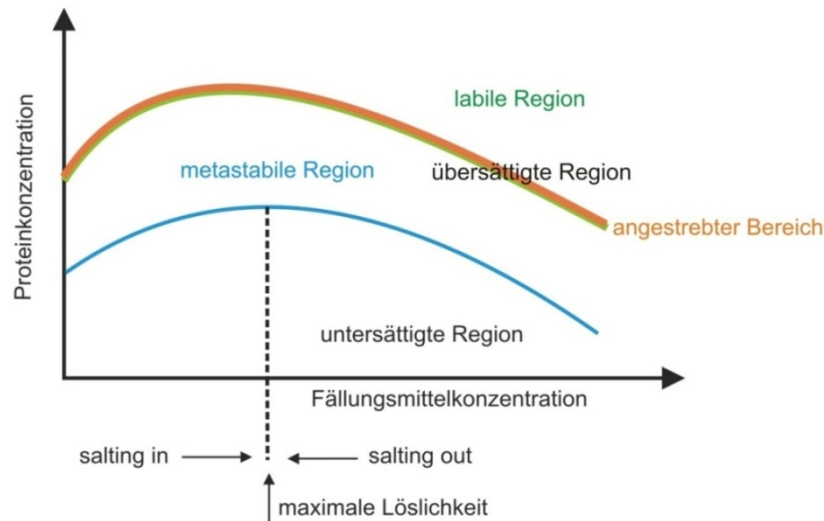


Abb. 31: Schematische Darstellung des Phasendiagramms eines Proteinfällungsmittel-Gemisches [Höpfner, 2007].

Sowohl die Keimbildung als auch das Kristallwachstum erfolgen in dem Bereich der übersättigten Lösung. Dabei benötigt die Keimbildung eine höhere Übersättigung als das Kristallwachstum; dieser Vorgang findet in der labilen Region statt. Der Wachstumsprozess der Keime ist durch den metastabilen Bereich definiert. Die Schwierigkeit bei der Kristallisation von Proteinen liegt darin, den richtigen Grad der Übersättigung zu finden. Der optimale Übersättigungsgrad für den Erhalt großer Kristalle ($> 200 \mu\text{m}$ Kantenlänge) liegt in einem infinitesimalen Bereich genau oberhalb der labilen Region. Wird eine zu hohe Übersättigung gewählt, kommt es auf Grund der großen thermodynamischen Triebkraft zur Bildung vieler winziger Kristalle oder amorpher Strukturen. Für eine erfolgreiche Kristallisation muss also eine langsame Annäherung an den Keimbildungsbereich erfolgen, damit den Kristallen genug Zeit zum Wachsen bleibt.

Zudem resultiert bei steigender Fällungsmittelkonzentration zunächst eine Zunahme der Löslichkeit des Proteins (salting in). Dieser Vorgang wird durch die Debye-Hückel Theorie zur Löslichkeit von Elektrolyten beschrieben.

$$\ln S - \ln S_0 = \frac{A \cdot z_+ \cdot z_- \cdot \sqrt{\mu}}{1 + a \cdot B \cdot \sqrt{\mu}} \quad (8)$$

a = Ionendurchmesser, A, B = temperaturabhängige Konstanten, z_+, z_- = Kationen- und Anionenladung, S_0 = Löslichkeit des Salzes bei der Ionenstärke $\mu = 0$.

Die Definition der Ionenstärke μ ist in Gleichung (9) angegeben.

$$\mu = \frac{1}{2} \cdot \sum_j c_j \cdot z_j^2 \quad (9)$$

C_j = Konzentration der Ionen in der Lösung.

Ist die maximale Löslichkeit des Proteins erreicht (siehe Abbildung 31), überwiegt der salting out-Effekt, der eine Herabsetzung der Löslichkeit des Proteins bewirkt. Dieser Effekt kann näherungsweise durch folgende Gleichung beschrieben werden.

$$\ln S - \ln S_0 = \frac{A \cdot z_+ \cdot z_- \cdot \sqrt{\mu}}{1 + a \cdot B \cdot \sqrt{\mu}} - K_S \cdot \mu \quad (10)$$

K_S = empirisch ermittelter Parameter.

Durch den Term $(-K_S \cdot \mu)$ wird der salting out-Effekt beschrieben, der bis heute nicht genau verstanden wird. Eine mögliche Erklärung für das Sinken der Proteinlöslichkeit bei zunehmender Salzkonzentration könnte aus einer Konkurrenzsituation der Salz- und Proteinmoleküle um das vorhandene Wasser resultieren [Ducruix, 1992]. Die Fällungsmittel besitzen eine stärkere Wasseraffinität zur Ausbildung ihrer Hydrathülle und entziehen so den Proteinmolekülen das Wasser.

Die Art des Fällungsmittels spielt bei der Kristallisation von Proteinen eine entscheidende Rolle. Bereits 1888 wurde die sogenannte Hofmeister-Reihe eingeführt. Sie klassifiziert den Einfluss verschiedener Salze (Kationen und Anionen) auf die Löslichkeit von Proteinen. Abbildung 32 zeigt einen Überblick der Hofmeister-Reihe für ausgewählte Kationen und Anionen.

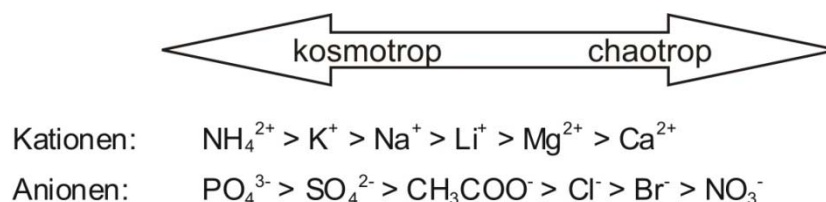


Abb. 32: Darstellung der Hofmeister-Reihe. Kosmotrope Salze sind gute und schonende Fällungsmittel, sie vergrößern hydrophobe Effekte. Chaotrope Salze halten Proteine in Lösung, sie vermindern hydrophobe Effekte.

Die Hofmeister-Reihe ist zur Orientierung gedacht, kann aber keinesfalls auf alle Makromoleküle in dieser Form angewandt werden, wie im Verlauf dieser Arbeit noch gezeigt wird.

7.2 Screening ausgewählter Proteine

In diesem Abschnitt werden diverse Proteine vorgestellt, die auf ihre Kristallisationseigenschaften untersucht werden. Es handelt sich dabei um kommerziell erhältliche und technisch relevante Proteine. Da die Kristallisation von Proteinen auf Grund der vielen unbekannt Parameter äußerst anspruchsvoll ist und nicht immer reproduzierbare Resultate erzielt werden können, wird ein umfangreiches Screening durchgeführt. Ziel dieses Verfahrens ist es, mögliche Kandidaten für die in Kapitel 9.2 folgenden batch-Versuche in den Reaktorsystemen zu finden. In Tabelle 08 sind alle Proteine sowie ihre Eigenschaften, die für erste Kristallisationsexperimente ausgewählt wurden, zusammengefasst.

Tab. 08: Verwendete Proteine und ihre Eigenschaften.

Protein	Bemerkung	E.C.-Nummer	Größe / Gewicht	Isoelektrischer Punkt
Lysozym	Pulver	3.2.1.17	129 Aminosäuren, 14,4 kDa	9,0 - 11,0
Ovalbumin	Pulver	-	386 Aminosäuren, 42,8 kDa	4,5
α -Chymotrypsin	Plättchen	3.4.21.1	245 Aminosäuren, 26,6 kDa	4,0 - 5,0
Savinase®	flüssig	3.4.21.62	275 Aminosäuren, 27,4 kDa	6,5
HSA	fest	-	608 Aminosäuren, 69,2 kDa	5,8
BSA	fest	-	607 Aminosäuren, 69,3 kDa	4,6
Patatin	sprühgetrocknet	3.1.1.-	366 Aminosäuren, 42,3 kDa	4,5 - 5,2
Lipozyme	flüssig	3.1.1.3	270 Aminosäuren, 29,4 kDa	5,0
Alkalase 2,4 L	technische Reinheit	3.4.21.62	275 Aminosäuren, 27,4 kDa	6,5
Esperase	flüssig	3.4.21.62	275 Aminosäuren, 27,4 kDa	6,5
Proteinase K	fest	3.4.21.64	384 Aminosäuren, 40,3 kDa	8,9
Insulin	fest	-	51 Aminosäuren, 5,8 kDa	5,3 - 5,4

7.3 Dampfdiffusionsexperimente

Dampfdiffusionsexperimente nach der hanging drop-Methode sind als erste Screening-Methode für das Auffinden geeigneter Kristallisationsbedingungen sinnvoll. In Abbildung 33

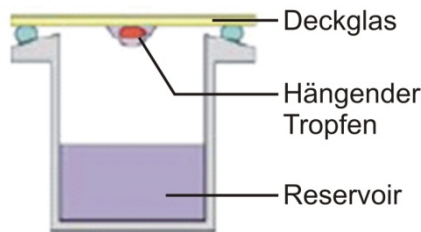


Abb. 33: Versuchsaufbau eines hanging drop-Experiments.
(Abbildung: Klink, 2006)

ist schematisch der Versuchsaufbau dargestellt. Ein Tropfen (5 μL – 20 μL) mit einem Gemisch aus Protein in wässriger Lösung und Fällungsmittel befindet sich auf der Unterseite eines Deckgläschens. Das Deckgläschen wird luftdicht über dem Kopfraum einer Mikrotiterplatte platziert.

Die Vertiefung (Reservoir) ist mit einer Lösung mit höherem Fällungsmittelgehalt als im Tropfen gefüllt. Zur Gleichgewichtseinstellung diffundiert das Wasser aus dem Tropfen in das Reservoir. Durch diese Diffusion steigt die

Protein- und Fällungsmittelkonzentration. Bei richtig gewählten Bedingungen kommt es nach einigen Tagen bis Wochen zur Kristallisation des Proteins in dem Tropfen.

Alle in Tabelle 08 vorgestellten Proteine werden nach der hanging drop Methode ausführlich auf ihre Kristallisationseigenschaften untersucht. Dazu werden Parameter wie pH-Wert, Temperatur, Kristallisationsmittel (Salze), deren Konzentration und die Konzentrationen der Proteine variiert. Um den Bereich dieser relevanten Parameter einzuengen, wird größtenteils auf die Biological Macromolecule Crystallization Database (BMCD) von Gilliland zugegriffen [Gilliland, 2002].

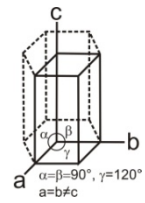
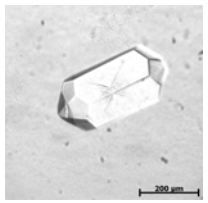
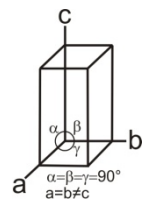
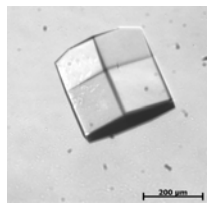
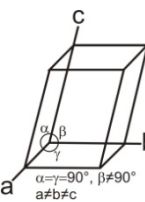
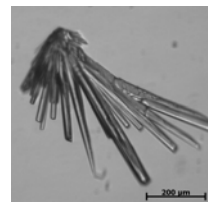
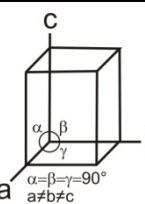
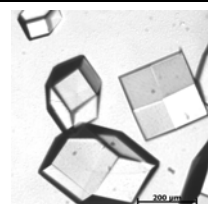
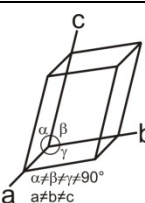
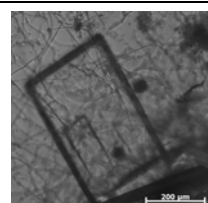
Bei McPherson wird beschrieben, dass das hen egg white Lysozym (HEWL) das wohl am besten untersuchte Protein hinsichtlich seiner Kristallisationseigenschaften ist [McPherson, 1998]. Aus diesem Grund wird bei den Dampfdiffusionsexperimenten besonderes Augenmerk auf diese Verbindung gelegt.

Die Untersuchung der Kristallisationsparameter erfolgt zunächst in einem weitgefächerten Raster. Nach dem Auffinden geeigneter Bedingungen werden die Parameter so lange optimiert, bis reproduzierbare Kristallisationen der ausgewählten Proteine erhalten werden. Im Verlauf dieses Verfahrens hat sich Lysozym als vielversprechendster Kandidat für reproduzierbare Kristallisationsexperimente herausgestellt. Zudem besitzt es polymorphe Eigenschaften, die durch Variation der Kristallisationsmittel, den Zusatz von organischen Lösemitteln oder durch Änderung des pH-Wertes nachgewiesen werden konnten. Auf Grund dieser experimentell ermittelten Eigenschaften werden im folgenden Abschnitt die verwendeten Kristallisationsrezepte sowie die daraus resultierenden Kristallstrukturen für Lysozym vorgestellt.

7.3.1 Kristallisationsverhalten von Lysozym

In zahlreichen hanging drop-Experimenten werden die unterschiedlichen Kristallisationsparameter für Lysozym getestet. Tabelle 09 zeigt einen Überblick der verwendeten Lösungen im Reservoir, der eingestellten pH-Werte sowie der benutzten Lysozymkonzentrationen, die zu einer erfolgreichen Kristallisation führen. Exemplarisch werden - zur Verdeutlichung von Tracht und Habitus - zu jeder kristallisierten Form ein Beispielbild und eine schematische Zeichnung des Kristallsystems dargestellt.

Tab. 09: Überblick der verwendeten Parameter und Lösungen, die eine Kristallisation von Lysozym in Dampfdiffusionsexperimenten zulassen.

Reservoirlösung	Puffer	Lysozymkonzentration	pH-Wert	Kristallsystem	Beispielbild
NaNO ₃ (gesättigt) 10 % Aceton	0,30 M NaHCO ₃	30 mg/mL	8,4	 $\alpha=\beta=90^\circ, \gamma=120^\circ$ $a=b \neq c$	
1,50 M NaCl	0,05 M NaAc	15 mg/mL	5,0	 $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ $a=b \neq c$	
1,75 M KSCN	0,05 M NaAc	20 mg/mL	4,6	 $\alpha=\gamma=90^\circ, \beta \neq 90^\circ$ $a \neq b \neq c$	
0,90 M NaCl	dest. H ₂ O	15 mg/mL	9,9	 $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ $a \neq b \neq c$	
0,30 M NaNO ₃	0,05 M NaAc	20 mg/mL	4,5	 $\alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$ $a \neq b \neq c$	

Weitere Parameter, die ebenfalls zu einer erfolgreichen Kristallisation vom Lysozym in einem der gezeigten Kristallsysteme führen, sind im Anhang zusammengefasst (siehe Kap. 12.7). Durch Variation der verwendeten Parameter konnte das Kristallisationsverhalten von

Lysozym charakterisiert werden. Die Wachstumszeit der Kristalle erstreckt sich je nach Modifikation über einen Zeitraum von ca. 12 – 144 h. Tetragonale Kristalle bilden sich unter den gewählten Bedingungen bereits nach 12 h. Die monokline und orthorhombische Kristallstruktur hingegen benötigt eine erhebliche längere Wachstumszeit; hier werden erste Kristalle nach ca. 144 h erhalten. Auf Grund der diversen Möglichkeiten, die zu einer Überführung von der gelösten in die kristalline Form führen, wird Lysozym als Modellprotein für batch-Experimente ausgewählt. Dazu werden die aus den hanging drop-Experimenten gewonnenen Parameter auf batch-Kristallisationsexperimente übertragen.

7.4 Scale up des Kristallisationsprozesses von Lysozym

Thema dieses Kapitels ist die Überführung der aus den Dampfdiffusionsexperimenten gesammelten Parameter in batch-Experimente.

Bei der batch-Methode handelt es sich um die älteste Technik der Proteinkristallisation [McPherson, 1999]. Sie ist wegen ihrer Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit eine äußerst attraktive Methode zur Kristallisation von Proteinen. Durch direktes Mischen einer untersättigten Proteinlösung mit Fällungsmittel wird die Löslichkeit des Proteins herabgesetzt, so dass eine übersättigte Mutterlösung entsteht. Alternativ können auch andere Parameter wie die Temperatur oder der pH-Wert variiert werden, um die Löslichkeit des Proteins zu verringern.

Die Überführung der Parameter ist nicht trivial, da sich die Konzentration des Proteins nicht wie in den Dampfdiffusionsexperimenten über mehrere Stunden der labilen Region nähern kann; vielmehr erfolgt eine spontane Gleichgewichtseinstellung. Es kann also nicht davon ausgegangen werden, dass die in Tabelle 09 dargestellten Bedingungen auch zu einer erfolgreichen Kristallisation in den batch-Experimenten führen. Es ist aber auszuschließen, dass nicht zur Kristallisation geführte Parameter bei den hanging drop-Versuchen eine Kristallisation bei der batch-Methode zeigen werden.

7.4.1 Batch-Versuche in 1 mL Reaktionsgefäßen

Im ersten Schritt des Scale up-Verfahrens wird der Lysozym-Kristallisationsprozess vom μL -Maßstab in den mL- Maßstab überführt. Die Durchführung der Kristallisationsexperimente erfolgt in 1 mL, nicht gerührten Reaktionsgefäßen der Firma Eppendorf. Da die gewonnenen Parameter aus der Dampfdiffusionsmethode nicht direkt übernommen werden können (siehe Kap. 7.4), werden in einem weiteren Screening mögliche Techniken getestet, die zu einer

erfolgreichen Kristallisation führen können, Zur Herabsetzung der Lysozym-Löslichkeit in den batch-Versuchen werden folgende Methoden angewandt:

- **Änderung des pH-Wertes**

Die geringste Löslichkeit eines Proteins liegt am isoelektrischen Punkt (pI) vor. Daher wird durch Zugabe von Natronlauge zu einer gesättigten Lysozymlösung bei pH 5,0 in Intervallen der pH-Wert zum isoelektrischen Punkt ($pI_{\text{Lysozym}} \approx 9 - 11$) verschoben. Die Dauer der Intervalle bis zum Erreichen des isoelektrischen Punktes wird bei den Experimenten variiert und liegt in einem Zeitraum von Sekunden bis Tagen.

- **Zugabe von hochkonzentrierten Fällungsmittellösungen**

Durch die Zugabe von NaCl-, PEG-, NaNO_3 oder KSCN-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen wird eine direkte Übersättigung der gesättigten Lysozymlösung erzeugt.

- **Temperaturshift**

Die Temperaturabhängigkeit von Lysozym ist besonders bei geringer Ionenstärke, d. h. bei niedriger Salzkonzentration, enorm groß [Jones et al., 2001]. Zudem bietet die temperaturkontrollierte Erniedrigung der Löslichkeit den Vorteil, dass sich sehr langsam dem labilen Reich genähert werden kann, um dann die gebildeten Keime in der metastabilen Zone wachsen zu lassen.

Die drei vorgestellten Varianten werden in diversen Experimenten getestet. Dabei haben sich die Methode des Temperaturshifts und der Zugabe von Fällungsmitteln als besonders geeignet herausgestellt. Beide Verfahren ermöglichen die Kristallisation von Lysozym in 1 mL Reaktionsgefäßen, wobei die Morphologie, die Anzahl und die Größe der Kristalle stark variieren. Durch Verschieben des pH-Wertes zum isoelektrischen Punkt wurden keine Kristalle erhalten. Aus diesem Grund wird bei dem nächsten Scale up-Schritt im folgenden Kapitel die Methode der pH-Wert Veränderung vernachlässigt.

7.4.2 Batch-Versuche in einem 50 mL Rührkesselreaktor

Thema dieses Kapitels ist die Übertragung des Lysozym-Kristallisationsprozesses in einen Rührkesselreaktor. Der technische Aufbau wird durch einen 50 mL Reaktor mit Doppelmantel, einem Titrator (Mettler Toledo GmbH, Gießen) und einem Thermostat (Cary PCB-159, Varian, Darmstadt) realisiert. Der Titrator dient zur Regulierung der

Rührgeschwindigkeit sowie zur Messung der Temperatur. Die Temperaturregung übernimmt das Thermostat. Als Rühreinheit wird ein zweiblättriger Rührer verwendet. Während der Experimente wird kontinuierlich filtrierte Kristallisationslösung über einen Bypass durch eine Durchflussküvette geleitet, um die Absorption der Lösung zu messen. Damit werden Informationen über die im Reaktorsystem verbleibende Lysozymkonzentration generiert. Im Verlauf der Experimente wurden folgende Parameter für eine reproduzierbare Kristallisation von Lysozym festgestellt (siehe Tab. 10).

Tab. 10: Parameter, die zu einer Kristallisation von Lysozym im 50 mL Rührkesselreaktor führen.

Lysozym-konzentration	Puffer-system	Fällungs-mittel	pH-Wert	Start -temperatur	End-temperatur	Rührge-schwindigkeit
5 mg/mL	0,05 M NaAc	0,2 M NaNO ₃	4,5	22°C	17 - 12°C	30 - 50 rpm

In Abbildung 34 sind exemplarisch zwei Bilder von Lysozymkristallen, offline aufgenommen mit einem Lichtmikroskop (BH2, Olympus GmbH, Hamburg), bei 50-facher und 100-facher Vergrößerung gezeigt.

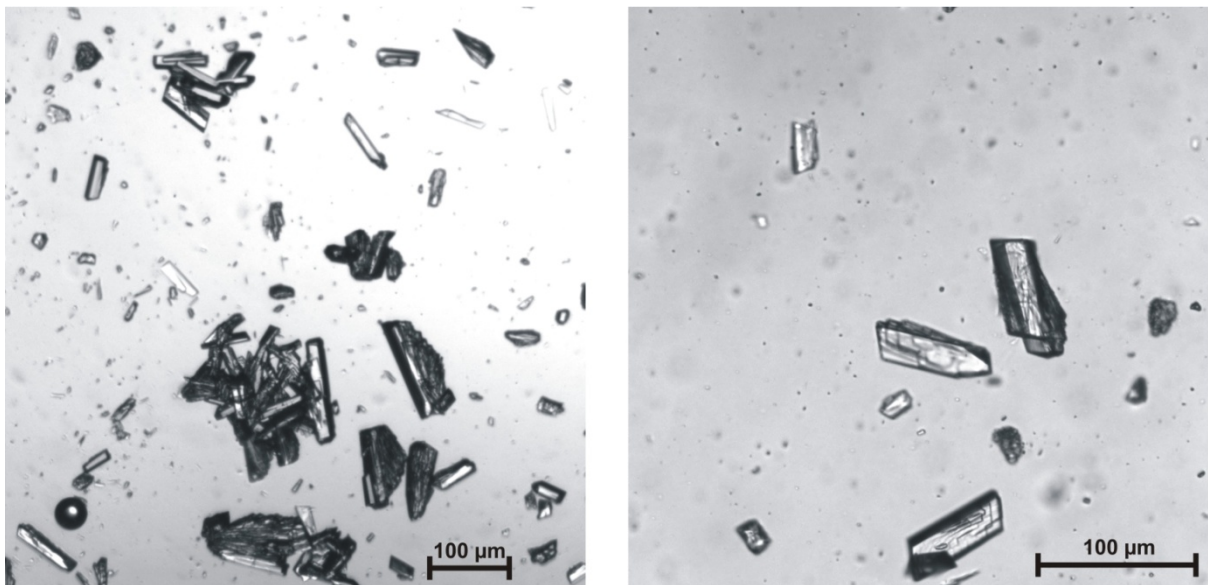


Abb. 34: Mikroskopische Aufnahmen von Lysozym-Kristallen. Links: 50-fache Vergrößerung. Rechts: 100-fache Vergrößerung [Höpfner, 2007].

Die Kristallisationsprozesse werden über eine Dauer von 60 – 70 h verfolgt. Die graphische Darstellung in Abbildung 35 veranschaulicht exemplarisch die Abnahme der Lysozymkonzentration während des Kristallisationsprozesses. Bereits nach 24 h sind 80 % des Lysozyms auskristallisiert. Nach 67 h sind 4,5 g/L in die kristalline Form übergegangen; dies entspricht einer Ausbeute von 90 %.

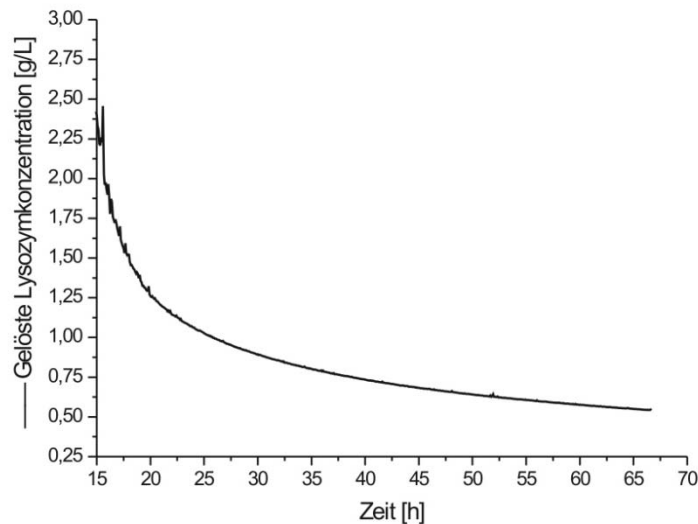


Abb. 35: Zeitlicher Verlauf der gelösten Lysozymkonzentration [g/L] während des Kristallisationsprozesses.

7.4.3 Zusammenfassung und Diskussion

Trotz eines umfangreichen Screenings konnte lediglich Lysozym zuverlässig in Dampfdiffusionsexperimenten kristallisiert werden. Die graphische Darstellung in Abbildung 36 fasst den Scale up-Prozess schematisch zusammen.

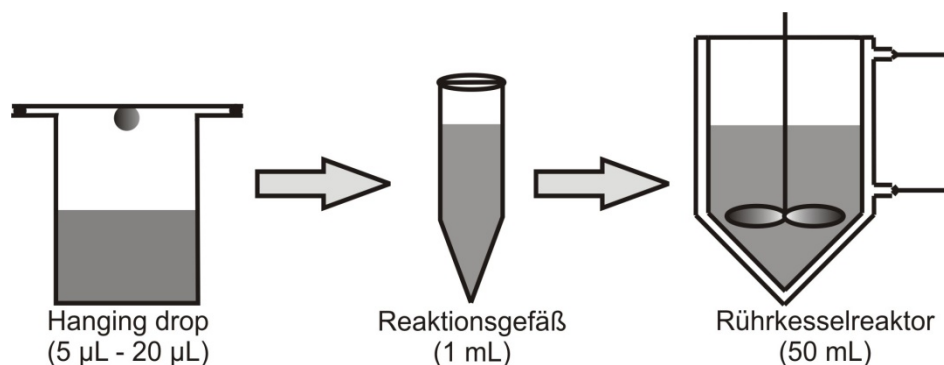


Abb. 36: Schematische Darstellung der Scale up-Schritte des Lysozym-Kristallisationsprozesses. Der Prozess wurde von einem μ L-Maßstab in den mL-Maßstab übertragen. Als Kristallisationsmethoden wurden das Verfahren der Dampfdiffusion und die temperaturkontrollierte Kristallisation in einem ungerührten Reaktionsgefäß und in einem Rührkesselreaktor erfolgreich durchgeführt.

Bei der Untersuchung der anderen Proteine wurden zwar Kristalle erhalten, die Experimente konnten aber nicht reproduzierbar wiederholt werden. Aus diesem Grund wurde Lysozym als Modellprotein für weitere Analysen ausgewählt. In Kapitel 7.3.1 wurden die polymorphen Eigenschaften von Lysozym näher charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass sich

durch Variation des pH-Wertes, des Fällungsmittels und durch Zugabe von organischen Lösemitteln unterschiedliche Kristallstrukturen bilden. Des Weiteren konnten durch ein weiteres Screening die für eine Kristallisation relevanten Parameter aus den Dampfdiffusionsexperimenten in batch-Experimente übertragen werden. Dabei stellte sich heraus, dass eine temperaturkontrollierte Kristallisation die Methode der Wahl ist.

Es kann konstatiert werden, dass Lysozym ein ideales Modellprotein für Kristallisationsprozesse ist. Das Auffinden geeigneter Parameter und Methoden, die zu einer Kristallisation führen, ist immens wichtig für die in Kapitel 9 folgenden Kristallisationsexperimente in den entwickelten Reaktorsystemen Prototyp A und Prototyp B.

8. Voruntersuchungen an Modellsystemen

In diesem Abschnitt wird das Kristallisationsverhalten ausgewählter chemischer Modellsysteme getestet und charakterisiert. Zweck dieses Verfahrens ist es, Modellsystemen für die online Überwachung in den Reaktorsystemen zu finden. Des Weiteren soll überprüft werden, ob unterschiedliche Kristallformen mit dem ISVM-System differenziert werden können. Dieses Evaluierungsverfahren dient demnach zur Parameterfindung und ist für die in Kapitel 9 folgenden Kristallisationsversuche im Reaktorsystem erforderlich.

8.1 Modellkristallstrukturen

Als Modellsysteme werden unterschiedliche chemische Verbindungen ausgewählt. Es handelt sich dabei um anorganische und organische Salze sowie um biotechnologisch relevante Substanzen.

- **Anorganische / organische Salze**
Ammoniumsulfat, Kaliumsulfat, Kaliumnitrat, Kaliumnatriumtartrat
- **Pharmazeutische Verbindungen**
Acetylsalicylsäure, 4-Acetamidophenol
- **Aminosäuren / Aminosulfonsäure**
Alanin, Glycin, Cystein, Taurin
- **Zucker**
Laktose
- **Proteine**
Lysozym

Alle Verbindungen werden aus einer gesättigten Lösung kristallisiert. Als Kristallisationsmethode wird ein Temperaturshift vorgenommen. Dazu wird die noch heiße Lösung in die Durchfluss-Messzone des ISVM-Systems pipettiert. Auf Grund der Temperaturerniedrigung kristallisieren die Modellsysteme. Der Wachstumsprozess der Kristalle wird während des Kühlvorgangs offline verfolgt. Abbildung 37 gibt einen Überblick über die erhaltenen Kristalle und ihre unterschiedlichen Formen.

Neben den Kristalleigenschaften wie Größe, Form und Wachstumsgeschwindigkeit sind die Einstellungsparameter des In-situ Videomikroskops von großer Bedeutung. Die generierten Bilder müssen eine hohe Qualität hinsichtlich des Kontrastes (Kristall – Hintergrund) sowie

eine gewisse Schärfentiefe aufweisen, um eine zuverlässige Auswertung (Detektion und Klassifikation) der Kristalle zu gewährleisten.

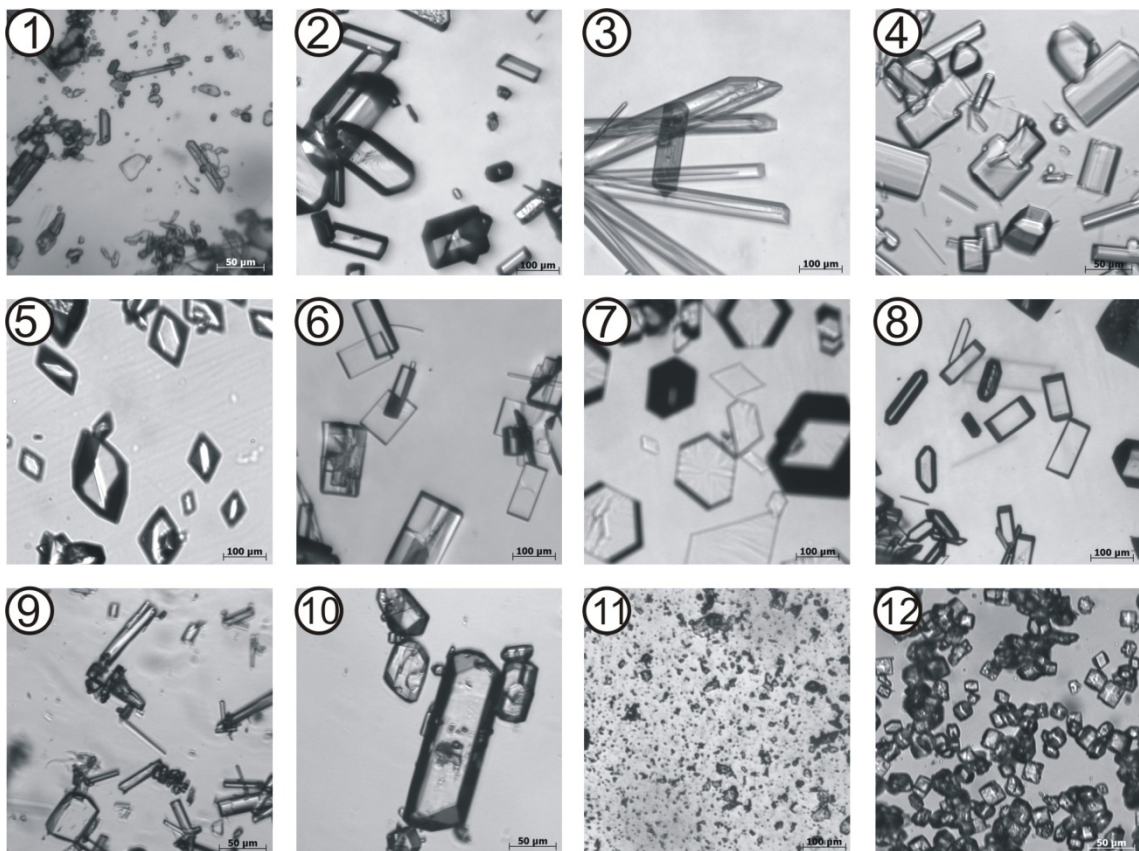


Abb. 37: Überblick verschiedener kristallisierter Modellsubstanzen, offline aufgenommen mit dem ISVM-System. 1) Ammoniumsulfat; 2) Kaliumsulfat; 3) Kaliumnitrat; 4) Kaliumnatriumtartrat; 5) Paracetamol[®]; 6) Aspirin[®]; 7) Alanin; 8) Glycin; 9) Cystein; 10) Taurin; 11) Lactose; 12) Lysozym.

Abbildung 37 veranschaulicht, dass eine prinzipielle Überwachung von Kristallen mit dem ISVM-System möglich ist. Die Kristallstrukturen heben sich deutlich vom Hintergrund durch eine zumeist schwarze Kontur ab. Des Weiteren ist festzuhalten, dass die gezeigten Kristallbilder eine ausreichende Schärfentiefe haben, die eine problemlose Detektion und Klassifikation der Kristalle erlauben. Zudem sind in den Bildnummern 6 und 10 Einschlüsse zu erkennen. Hierbei handelt es sich entweder um Verunreinigungen und / oder um Kristalle / Kristalleinschlüsse.

8.1.1 Zusammenfassung und Diskussion

Bei den Kristallisationsexperimenten konnten offline mit dem ISVM-System Bilder in einer guten Qualität generiert werden. Die unterschiedlichen Kristallstrukturen sowie

morphologische Besonderheiten wie Einschlüsse sind in den erzeugten Bildern eindeutig zu erkennen. Bei der Bildqualität ist zu beachten, dass die Kristalle in den offline Untersuchungen genug Zeit hatten, sich in der Messzone des ISVM-Systems auszurichten, d. h. die Kristalle befinden sich bei der Bildaufnahme alle in einer Ebene. Dieser Vorgang ist bei den in Kapitel 9 folgenden Kristallisationsprozessen in den Reaktorsystemen nicht realisierbar. Auf Grund der Konvektion bewegen sich die Kristalle kontinuierlich durch die Messzone; gerade eine stark variierende Größenverteilung der Kristalle könnte sich dabei negativ auf die Bildqualität auswirken. Dieses Phänomen wird im nächsten Kapitel ausführlich beschrieben und untersucht.

Des Weiteren ist festzuhalten, dass Kristallagglomerate, wie sie in Abbildung 37 bei den Bildnummern 1, 2, 4, 9, 11 und 12 zu sehen sind, die Auswertung extrem erschweren. Aus diesem Grund werden für erste Kristallisationen in den Reaktorsystemen die pharmazeutischen Verbindungen Aspirin® (Acetylsalicylsäure, monokline Kristallstruktur) und Paracetamol® (4-Acetamidophenol, hexagonale Kristallstruktur) ausgesucht.

9. Online Überwachung von Kristallisationsprozessen

Thema dieses Kapitels ist die online Überwachung von Kristallisationsprozessen mittels des ISVM-Systems. Zunächst erfolgt die Adaption des In-situ Videomikroskops an die Beobachtung und Analyse der Kristallisationsprozesse von Modellsubstanzen (Kap. 9.1). In Kapitel 9.2 wird erstmalig das Kristallisationsverhalten von Lysozym online mikroskopisch überwacht und charakterisiert. Dafür wird der Kristallisationsprozess des Proteins in einem weiteren scale up-Schritt in den 400 mL Maßstab übertragen. Abschließend werden in Kapitel 9.3 die Grenzen des Messsystems bei der Anwendung in industrieller Umgebung aufgezeigt.

9.1 Online Überwachung pharmazeutischer Kristallisationsprozesse

Die online Untersuchungen der Kristallisationsprozesse erfolgen zunächst an den Modellsystemen Aspirin[®] und Paracetamol[®]. Diese beiden Modellsysteme haben sich in den Voruntersuchungen (siehe Kap. 8) als besonders geeignet für erste Versuche in den Kristallisationsreaktoren herausgestellt. Im folgenden Abschnitt wird der Einfluss von Prozessparametern wie Temperatur, Rührgeschwindigkeit und das verwendete Lösemittel auf die Kristallisation der pharmazeutischen Verbindungen analysiert und quantifiziert. Die Einstellungen der Schwellenwerte der verwendeten Algorithmen befinden sich im Anhang (siehe Kap. 12.6.2).

9.1.2 Charakterisierung des Kristallisationsprozesses von Aspirin[®]

Aspirin[®] (Wirkstoff: Acetylsalicylsäure, ASS) gehört zur Gruppe der nicht opioiden Analgetika / Antiphlogistika. Die polymorphen Eigenschaften von Aspirin[®] sind bis heute nicht eindeutig geklärt. Sicher ist aber die Existenz der Form I von Aspirin[®] (monokline Kristallstruktur). Es ist wissenschaftlich noch nicht ausreichend untersucht, ob es auch eine Form II gibt oder ob diese evtl. nur durch Manipulation der Strukturparameter der Form I erhalten wird [Bond et al., 2007].

In diesem Abschnitt wird das ISVM-System an die Überwachung von Aspirin[®]-Kristallisationsprozessen adaptiert. Zunächst werden zwei Kristallisationsprozesse in dem Prototypen A vorgestellt. Zur weiteren Charakterisierung des Prozesses wird der Rückwärtsstreulicht-Sensor InPro 8100/S/120 (Mettler Toledo) in den Reaktor integriert. Die

Kristallisation wird mittels eines Temperaturshifts von 50°C auf 36°C ausgelöst. Tabelle 11 gibt einen Überblick über die eingestellten Kristallisationsparameter.

Tab. 11: Eingestellte Parameter bei den Kristallisationsexperimenten AB07 und AB08.

Aspirin®-konzentration	Lösungsmittel	pH-Wert	Start-temperatur	End-temperatur	Rührgeschwindigkeit
320 g/L	Ethanol	2,9	50°C	36°C	90 rpm

Bei dem Experiment AB07 werden über einen Zeitraum von 13,8 min 1.659 Bilder im Abstand von 0,5 s mit dem ISVM-System aufgenommen (10-fach Objektiv, Auflösung 768 · 768 Pixel). Die graphische Darstellung in Abbildung 38 zeigt die Zunahme der Kristallzahl und der Kristallfläche während des Kristallisationsprozesses.

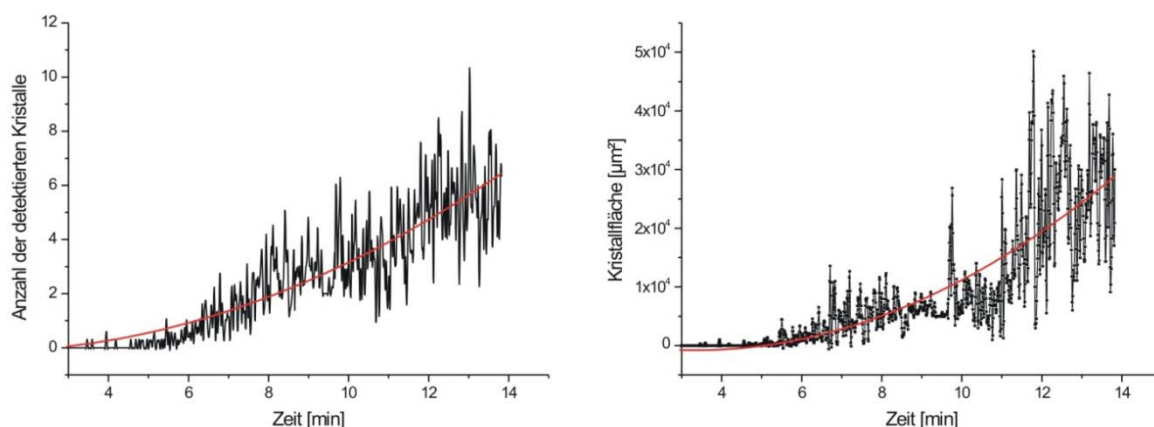


Abb. 38: Ergebnisse der Überwachung des Kristallisationsprozesses AB07. Die generierten Bilder werden mit ISA und dem Algorithmus *Crystal* ausgewertet. Links: Zunahme der Kristalle während des Wachstumsprozesses. Rechts: Zunahme der Kristallfläche im Verlauf der Kristallisation. Die einzelnen Messpunkte (1.659) werden durch eine polynomische Ausgleichskurve (rot) zusammengefasst.

Anhand der Diagramme kann der Wachstumsprozess von Aspirin®-Kristallen beschrieben werden. Ab dem Zeitpunkt $t = 4,5$ min ist eine Temperatur von 36°C erreicht. Unter den genannten Bedingungen (siehe Tab. 11) beginnt bei dieser Temperatur die Kristallbildung. Innerhalb von 13,8 min ist der Kristallisationsvorgang beendet und es wird eine durchschnittliche Kristallzahl von etwa 6 Kristallen/Bild erhalten. Am Ende des Prozesses haben die detektierten Kristalle eine durchschnittliche Größe von ca. $3,5 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$. In der graphischen Darstellung in Abbildung 39 sind das eingestellte Temperaturprofil und die ermittelten Werte durch den Rückwärtsstreulicht-Sensor dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass bei einer Temperatur von 36°C die experimentell gemessenen Werte rasant

von etwa 10 % Trübung auf einen Wert von ca. 65 % ansteigen und sich in dieser Region einpendeln.

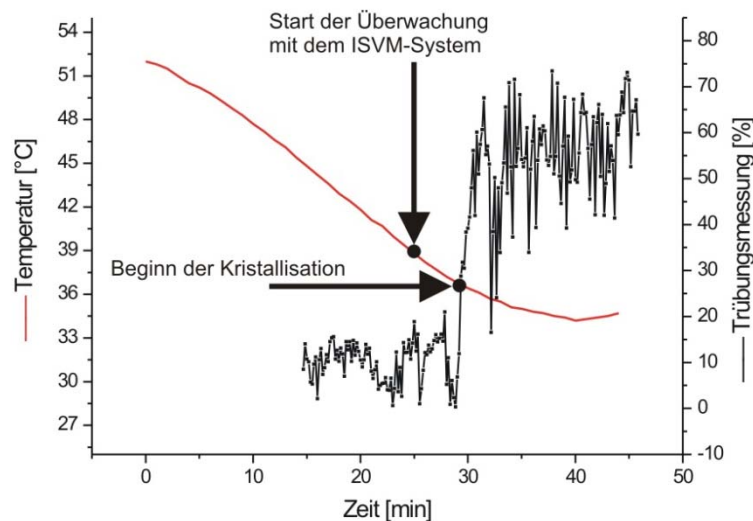


Abb. 39: Charakterisierung des Kristallisationsprozesses AB07 mittels weiterer online Analytik. Die Überwachung des Prozesses mit dem ISVM-System beginnt bei einer Temperatur von 39°C. Die Kristallisation des Aspirins® erfolgt unter den gewählten Bedingungen bei einer Temperatur von 36°C. An diesem Punkt steigen die Werte der Trübungsmessung rasant an und erhalten ein Maximum bei ca. 65 %.

Es ist festzuhalten, dass der Zeitpunkt der ersten detektierten Kristalle mit dem ISVM-System nahezu identisch mit dem Anstieg der Werte bei der Trübungsmessung ist. Auf Grund der Tatsache, dass beide Datensätze gut miteinander korrelieren, ist eine hohe Messgenauigkeit - den Beginn der Kristallisation betreffend - garantiert.

Im folgenden Abschnitt wird der Kristallisationsprozess AB08 beschrieben. Im Vergleich zu dem Prozess AB07 erfolgt die Überwachung des Experimentes AB08 mittels des ISVM in Zyklen (10-fach Objektiv, Auflösung 768 · 768 Pixel). Der Vorteil einer Zyklenaufnahme liegt darin, dass präzisere Informationen über den Kristallisationsprozess erhalten werden können. Durch Anwendung von verschiedenen Filtern wie z. B. dem Mittelwert-Filter kann so zu jedem Zeitpunkt des Prozesses aus einer Vielzahl von Bildern ein Datenpunkt generiert werden. Es werden 500 Bilder in 25 Zyklen akquiriert und ausgewertet. Das Zeitintervall zwischen zwei generierten Bildern beträgt 0,5 s. Nach der Aufnahme von 20 Bildern (10,0 s) erfolgt eine Wartezeit von 50 s, bevor der nächste Zyklus gestartet wird. In Abbildung 40 wird die Zunahme der Kristallzahl und die damit einhergehende Flächenvergrößerung der Kristalle während des Kristallisationsprozesses vorgestellt.

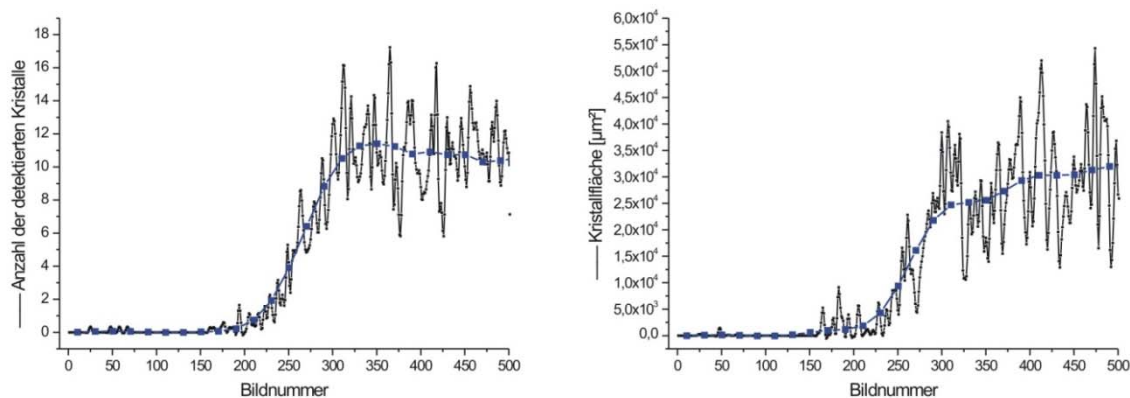


Abb. 40: Ergebnisse der Überwachung des Kristallisationsprozesses AB08. Die generierten Bilder werden mit ISA und dem Algorithmus *Crystal* ausgewertet. Links: Zunahme der Kristalle während des Wachstumsprozesses. Rechts: Zunahme der Kristallfläche im Verlauf der Kristallisation. Die einzelnen Messpunkte sind durch den in ISA integrierten Mittelwertfilter (blau) zusammengefasst.

Die Zunahme der detektierten Kristallzahl während ihres Wachstumsprozesses ist dem Kurvenverlauf des Kristallisationsprozesses AB07 sehr ähnlich. Bei Bildnummer 200 (Prozessdauer: 10 min) beginnt die Phase des Wachstums, hervorgerufen durch das Erreichen einer Temperatur in der Lösung von 36°C . Nach 17,5 min (Bildnummer 350) ist mit einer durchschnittlichen Kristallzahl von 11 Kristallen/Bild der Wachstumsstillstand erreicht und die ermittelte Kristallzahl verhält sich für die verbleibende Überwachungszeit (bis Bildnummer 500 = 25 min) konstant. Die von ISA kalkulierten Daten für die Größe der Kristallflächen stimmen mit dem Verlauf der Zunahme der Kristallzahl überein. Es ist zu erkennen, dass bei einer Prozessdauer von 10 min die ermittelte durchschnittliche Kristallfläche bis zu einer Prozesszeit von etwa 15 min (Bildnummer 300) linear ansteigt. Ab diesem Zeitpunkt treten nur geringe Variationen in der Größe der detektierten Kristallflächen auf. Hier divergieren die Werte in einem Größenbereich von $2,50 \cdot 10^4 - 3,25 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$. Die Ursache für diese Größenunterschiede resultiert zum Einen aus der Anzahl der detektierten Kristalle und zum Anderen aus der unterschiedlichen Größenverteilung der Kristalle. Abbildung 41 zeigt einige ausgewählte Bilder von Lysozym-Kristallen aus dem Prozess AB08.

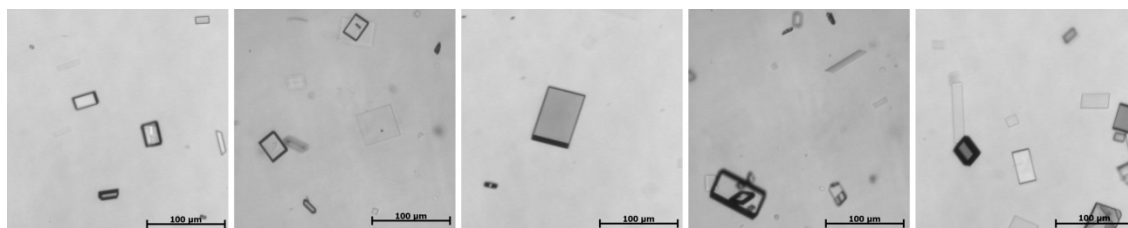


Abb. 41: Bilder von Aspirin[®]-Kristallen aus dem Prozess AB08, online aufgenommen mit dem ISVM-System.

9.1.3 Charakterisierung des Kristallisationsprozesses von Paracetamol®

Paracetamol® gehört wie Aspirin® zur Gruppe der nicht opioiden Analgetika. Es wurde 1956 als Arzneimittel zugelassen und ist seitdem in Tablettenform erhältlich. In der pharmazeutischen Produktion ist die Kristallisation als Vorstufe zur Herstellung der Tabletten ein immens wichtiger Prozessschritt, um eine gleichbleibende chemische Reinheit zu gewährleisten und die physikalischen Eigenschaften wie die Kristallform, Kristallgrößenverteilung und die Kristallstruktur zu steuern.

Im folgenden Abschnitt wird der Kristallisationsprozess von Paracetamol® mit dem ISVM-System näher untersucht (4-fach Objektiv, Auflösung 768 · 768 Pixel). Dazu wird das Modellsystem aus drei Lösemitteln (Wasser, Isopropanol und Ethanol) kristallisiert. Die Beobachtung der Prozesse erfolgt in Zyklen. Jeder Zyklus enthält 75 Bilder, die in einem Zeitintervall von 0,5 s aufgenommen werden. Der Abstand zwischen zwei Zyklen beträgt 1 min. Zur weiteren Überwachung des Kristallisationsprozesses wird online die Trübung der Lösung bestimmt. Zur Auslösung der Kristallisation in den Lösemitteln Ethanol und Isopropanol wird wie in den vorherigen Versuchen ein Temperaturshift angewandt. Der Kristallisationsprozess der wässrigen Lösung wird durch die Zugabe von Impfkristallen hervorgerufen. Alle Experimente werden in dem entwickelten Prototypen B durchgeführt. Die Rührgeschwindigkeit bei den einzelnen Experimenten liegt bei 45 rpm. Die Höhe der Messzone des ISVM-Systems beträgt in allen Experimenten 500 µm. In Tabelle 12 sind die Ausgangskonzentrationen in Abhängigkeit des verwendeten Lösemittels und die eingestellten Temperaturprofile zusammengefasst.

Tab. 12: Überblick über die verwendeten Parameter bei den Kristallisationsexperimenten von Paracetamol®.

Modellsystem	Lösemittel	Konzentration	Temperaturprofil
Paracetamol®	Ethanol	185,0 g/L	38°C → 13°C
Paracetamol®	Isopropanol	157,5 g/L	34°C → 10°C
Paracetamol®	Wasser	17,5 g/L	40°C → 11°C

Die graphischen Darstellungen in Abbildungen 42 zeigen, wie die Zunahme der Kristallbildung verläuft, die eingestellten Temperaturprofile und die Veränderung der Trübung der Lösung während des Kristallisationsprozesses. Unter den gewählten Bedingungen beginnt die Kristallisation von Paracetamol® in Ethanol bei ca. 18°C und in Isopropanol bei ca. 11°C. Bei dem Kristallisationsversuch aus bidest. Wasser konnte durch eine Temperaturniedrigung von 40°C auf 11°C keine ausreichende Übersättigung erzeugt werden, um den Übergang des gelösten Paracetamols® in die kristalline Phase zu erreichen.

Hier wurde die Kristallisation durch die Zugabe von Impfkristallen bei einer Temperatur von 13°C ausgelöst.

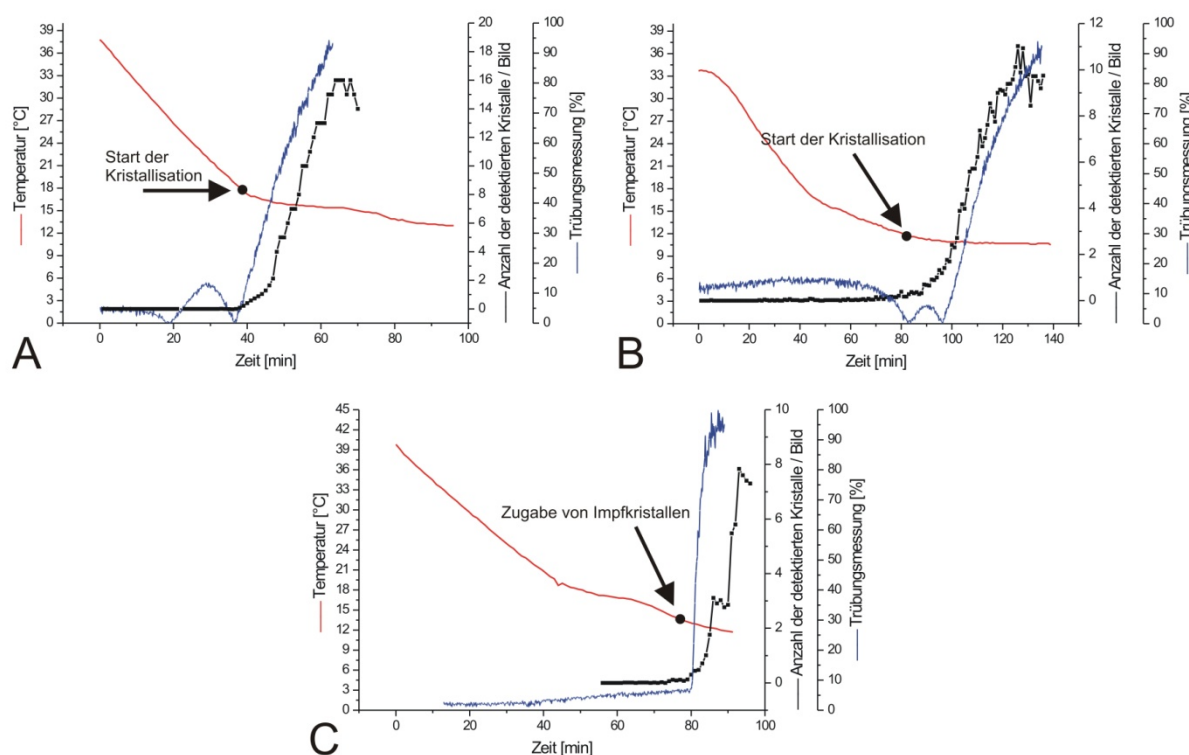


Abb. 42: Ergebnisse der Überwachung von Paracetamol[®]-Kristallisationsprozessen (Scharff, laufende Diplomarbeit). Dargestellt sind das eingestellte Temperaturprofil, die Anzahl der detektierten Kristalle/Bild und die relative Veränderung der Trübung der Lösung. Die Kristallzahl/Bild ergibt sich aus der Mittelwertberechnung von 75 Bildern.

A: Kristallisiert aus Ethanol, Beginn der Kristallisation bei ca. 18°C.

B: Kristallisiert aus Isopropanol, Beginn der Kristallisation bei ca. 11°C.

C: Kristallisiert aus bidest. Wasser durch Zugabe von Impfkristallen bei 13°C.

In allen drei Diagrammen in Abbildung 41 ist zu erkennen, dass die experimentell gemessenen Werte der Trübungssonde gut mit den Daten des ISVM-Systems korrelieren. Die durchschnittliche Anzahl der detektierten Kristalle variiert am Ende der Beobachtungsdauer zwischen 16 Kristallen/Zyklus (Ethanol), 11 Kristallen/Zyklus (Isopropanol) und 7,5 Kristallen/Zyklus (bidest. Wasser). Auf Grund einer starken Bildung von Kristallclustern wurde die Überwachung der Experimente bei der jeweils gezeigten Prozessdauer abgebrochen. Durch die Bildung der Cluster ist kein kontinuierlicher Durchfluss durch die Messzone des ISVM-Systems möglich. Des Weiteren können die Kristalle in den Clustern mit der Auswertungssoftware ISA nicht differenziert werden. Dadurch ist keine zuverlässige Aussage über den Prozess garantiert. Es ist aber festzuhalten, dass die Kristallisationen bis zu dem Zeitpunkt der Clusterbildung valide mit dem ISVM-System überwacht und analysiert werden kann.

9.1.3.1 Bestimmung der Kristallgrößenverteilung

Die Kristallgrößenverteilung ist einer der wichtigsten Parameter bei der Analyse von Kristallisationsprozessen. Nur durch eine einheitliche Größenverteilung kann eine einheitliche chemische Reinheit garantiert und die Produktqualität konstant gehalten werden. In Abbildung 43 wird die Größenverteilung der Paracetamol[®]-Kristalle bei den durchgeführten Experimenten gezeigt. Die Bestimmung des Durchmessers erfolgt durch ISA. Zur Berechnung des Durchmessers der Kristalle wird die von dem Algorithmus ermittelte Kristallfläche in einen Kreis mit gleicher Fläche umgewandelt und dann der Durchmesser des Kreises bestimmt. Bei diesem Verfahren handelt es sich um eine übliche Methode, die zur Ermittlung von Partikeldurchmessern angewandt wird.

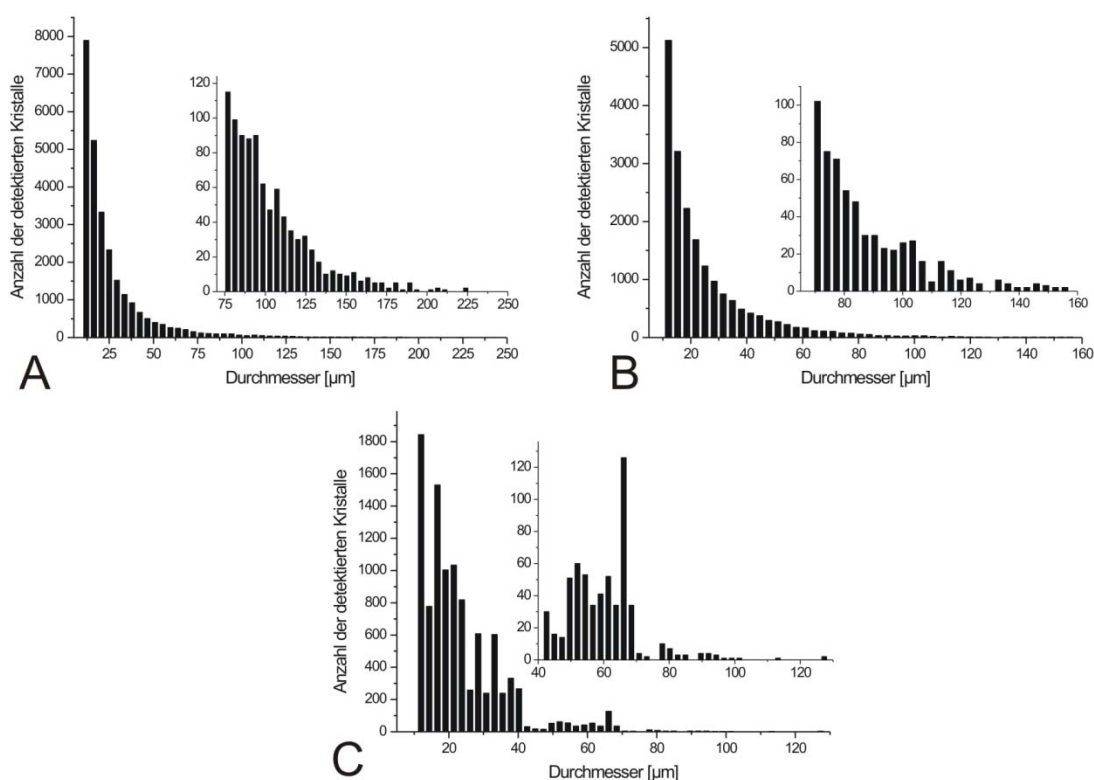


Abb. 43: Bestimmung der Kristallgrößenverteilung von Paracetamol[®]-Kristallen in Abhängigkeit des verwendeten Lösemittels (**A** = Ethanol, **B** = Isopropanol, **C** = bidest. Wasser) .

Zur besseren Übersicht sind die ermittelten Durchmesser in **A** ab einem Durchmesser von 75 µm, in **B** ab einem Durchmesser von 70 µm und in **C** ab einem Durchmesser von 43 µm vergrößert dargestellt.

Anhand der dargestellten Histogramme in Abbildung 43 ist zu erkennen, dass die Kristalle in Abhängigkeit des benutzten Lösemittels unterschiedliche Größen aufweisen. Die durchschnittlich größten Kristalle mit einem Durchmesser von bis zu 225 µm werden bei dem Kristallisationsversuch mit Ethanol als Lösemittel erhalten. Unter der Verwendung von

Isopropanol konnten Kristalle mit einem maximalen Durchmesser von ca. 160 µm generiert werden. Die kleinsten Kristalle sind in dem Medium bidest. Wasser durch Zugabe von Impfkristallen mit einem maximalen Durchmesser von etwa 130 µm entstanden. Des Weiteren wird deutlich, dass die Anzahl der detektierten und somit die gebildeten Kristalle je nach Medium variiert. Die höchste Kristalldichte wird in Ethanol erzeugt, die niedrigste Kristalldichte entsteht bei der Kristallisation aus bidest. Wasser. Diese Werte verhalten sich proportional zur eingesetzten Anfangskonzentration des Paracetamols® (siehe Tab. 12). Zudem zeigen die Histogramme A und B in Abbildung 43 einen nahezu identischen Verlauf. Die Anzahl der detektierten Kristalle nimmt mit zunehmendem Durchmesser ab. Bei Histogramm C ist kein eindeutiger Trend der Kristallgrößenverteilung zu erkennen. In der graphischen Darstellung in Abbildung 44 werden exemplarisch Bilder von Paracetamol®-Kristallen dargestellt.

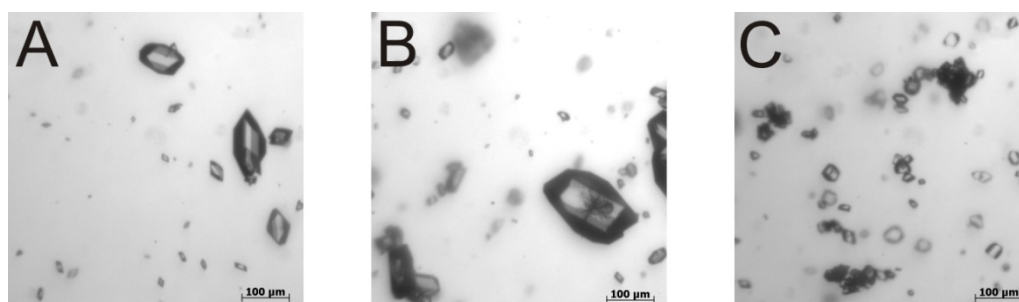


Abb. 44: Online aufgenommene Bilder von Paracetamol®-Kristallen, generiert mit dem ISVM-System.
A: Lösemittel (Ethanol), B: Lösemittel (Isopropanol), C: (bidest. Wasser).

9.1.4 Zusammenfassung und Diskussion

Die Kristallisationsprozesse von Aspirin® und Paracetamol® können mit dem ISVM-System überwacht und charakterisiert werden. Um möglichst präzise Aussagen über die durchschnittliche Kristallzahl und Kristallfläche treffen zu können, muss die Beobachtung der Prozesse in Zyklen mit einer hohen Bilderzahl erfolgen. Da die Kristallisationen der Modellsubstanzen sehr schnell ablaufen (10 – 20 min), ist es wichtig, einen kurzen Zeitabstand der Zyklen zu wählen, um eine kontinuierliche Dokumentation der Prozesse zu gewährleisten. Die ermittelten Werte der online Trübungsmessung korrelieren bei allen Experimenten gut mit den generierten Daten des ISVM-Systems. Auf Grund einer starken Kristallclusterbildung konnten die Paracetamol®-Kristallisationsprozesse nur bis zur gezeigten Prozessdauer zuverlässig überwacht werden. Zurzeit erlauben die verwendeten Algorithmen keine Differenzierung der Kristalle in den Clustern. Des Weiteren konnte für die Kristallisation von Paracetamol® eine Größenverteilung der detektierten Kristalle ermittelt werden.

9.2 Online Überwachung von Lysozym-Kristallisationen

In diesem Kapitel wird die online Überwachung des Kristallisationsprozesses von Lysozym sowie der Lösungsvorgang der Kristalle vorgestellt. Mittels des ISVM-Systems werden wichtige Prozessparameter wie die Kristallzahl und die Kristallgröße online verfolgt und charakterisiert. Dadurch soll gezeigt werden, dass diese Prozessparameter erstmalig bestimmt werden können, ohne eine Probe aus dem Reaktor zu entnehmen. Die Durchführung der Experimente erfolgt in dem entwickelten Prototypen A. Die Einstellungen der Schwellenwerte des Algorithmus befinden sich im Anhang (siehe Kap. 12.6.2).

9.2.1 Charakterisierung des Kristallisationsprozess

Im folgenden Abschnitt werden zwei Kristallisationsprozesse von Lysozym (B07 und B12) vorgestellt. Als Kristallisationsbedingungen werden die in Tabelle 10 (siehe Kap. 7.4.2) dargestellten Parameter verwendet. Zudem wird in einem Bypass kontinuierlich die Absorption (280 nm) der Lösung gemessen. Anschließend wird die Lösung zurück in den Reaktor geleitet. Um zu gewährleisten, dass während der Messung keine Kristalle den Strahlengang des Photospektrometers blockieren, wird ein Eluentenfiltersystem (Last-Drop-Filter, Porengröße 2,5 µm) in den Reaktordeckel integriert. Die Temperaturregung erfolgt mit dem Kältethermostat RM6 (mgw Lauda, Lauda-Königshofen). Der eingestellte Volumenstrom beträgt 750 ml/min.

Der Kristallisationsprozess B07 wird über 35 h mit dem ISVM-System überwacht (4-fach Objektiv, Auflösung 768 · 768 Pixel). Dabei werden in 144 Zyklen 7.200 Bilder generiert. In jedem Zyklus werden 50 Bilder im Abstand von 1,0 s aufgenommen (Gesamtdauer eines einzelnen Aufnahmezyklus 50 s). Nach jedem Zyklus erfolgt eine Wartezeit von 10 min, bevor der nächste Zyklus gestartet wird. Die Höhe der Messzone des ISVM-Systems beträgt während der Messung 500 µm. Diese Höhe übersteigt die Tiefenschärfe des Objektivs, d. h. kleinere Kristalle werden nur unscharf abgebildet, wenn sie sich außerhalb der Fokusebene durch die Messzone bewegen. Es darf aber keine geringere Zonenhöhe gewählt werden, da sonst größere Kristalle die Messzone nicht passieren können und somit keine zuverlässige Aussage über den Wachstumsprozess der Kristalle getroffen werden kann. Die graphische Darstellung in Abbildung 45 veranschaulicht die mit dem ISVM gemessenen Parameter. Zudem werden die Daten der Absorptionsmessung und der Verlauf des eingestellten Temperaturprofils gezeigt.

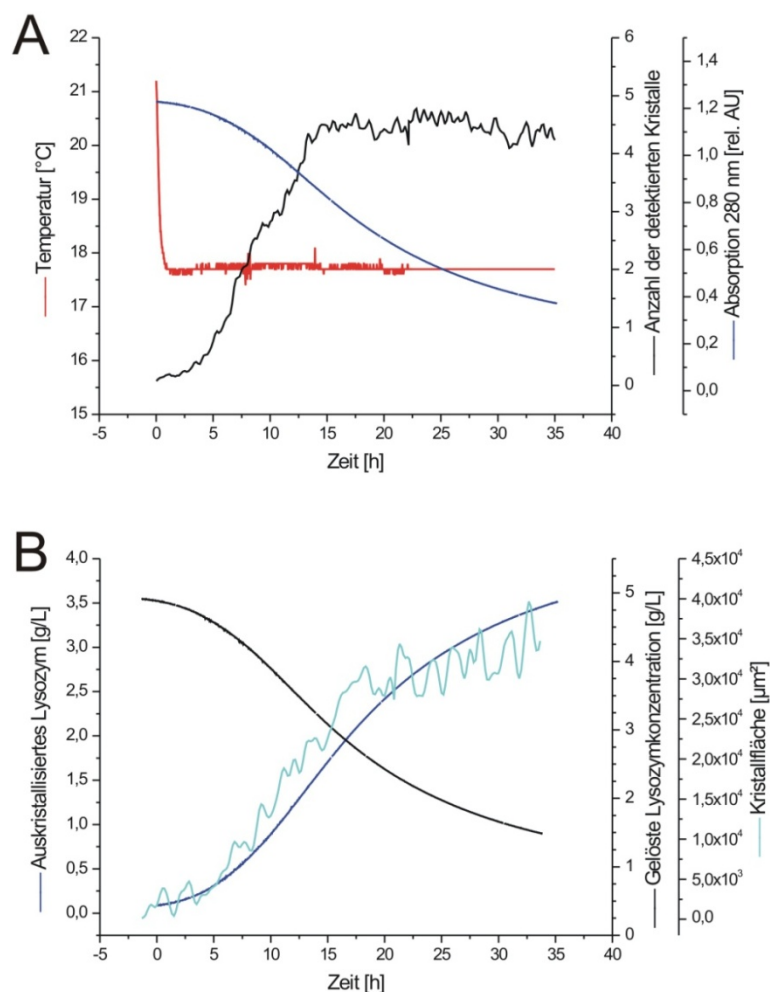


Abb. 45: Ergebnisse der Überwachung des Kristallisationsprozesses B07. Die Messung der Kristallanzahl erfolgt mit dem ISVM-System und ISC 2.2, ausgewertet werden die Daten mit ISA und dem Algorithmus *Crystal*.

A: Temperaturprofil (online), Absorptionsmessung (atline), Anzahl der detektierten Kristalle (online).

B: Konzentration des auskristallisierten Lysozyms, Konzentration des gelösten Lysozyms, durch ISA berechnete Kristallfläche.

Unter den gewählten Bedingungen bewirkt ein Temperaturshift von 21,5 °C auf 17,5 °C die Kristallisation von Lysozym. Die Kristalle werden während ihres Wachstumsprozesses kontinuierlich durch die Messzone des ISVM-Systems getragen und von der CCD-Kamera erfasst. Die durchschnittliche Kristallzahl pro Aufnahmezyklus erhöht sich dabei von 5 detektierten Kristallen (Zyklusnr. 1) auf bis zu ca. 200 detektierte Kristalle (Zyklus 144). Durch die Messung der Absorption bei 280 nm lassen sich Aussagen über die gelöste Lysozymkonzentration und die auskristallisierte Lysozymkonzentration treffen. Es ist zu erkennen, dass sich am Ende des Prozesses (35 h) 1,5 g/L Lysozym in Lösung befinden, daraus resultiert eine kristallisierte Masse von 3,5 g/L. Dies entspricht einer Ausbeute von 70 %. Mit Hilfe des Auswertungsmoduls ISA und dem Algorithmus *Crystal* wird die Fläche

der Kristalle in μm^2 bestimmt. Der Verlauf der Kurve zeigt eine gute Korrelation mit der berechneten Kristallmasse.

Die Überwachungsdauer des Kristallisationsprozesses B12 beträgt 25 h (4-fach Objektiv, Auflösung $768 \cdot 768$ Pixel). In 96 Zyklen werden insgesamt 2.880 Bilder akquiriert. Pro Zyklus werden 30 Bilder in einem Zeitintervall von 0,8 s aufgenommen (Gesamtdauer des einzelnen Aufnahmezyklus 24 s). Zwischen den jeweiligen Zyklen erfolgt eine Bildaufnahmepause von 15 min. Die Höhe der Messzone beträgt wie bei dem Kristallisationsversuch B07 $500 \mu\text{m}$. Abbildung 46 zeigt die experimentell bestimmten Ergebnisse des Kristallisationsprozesses B12.

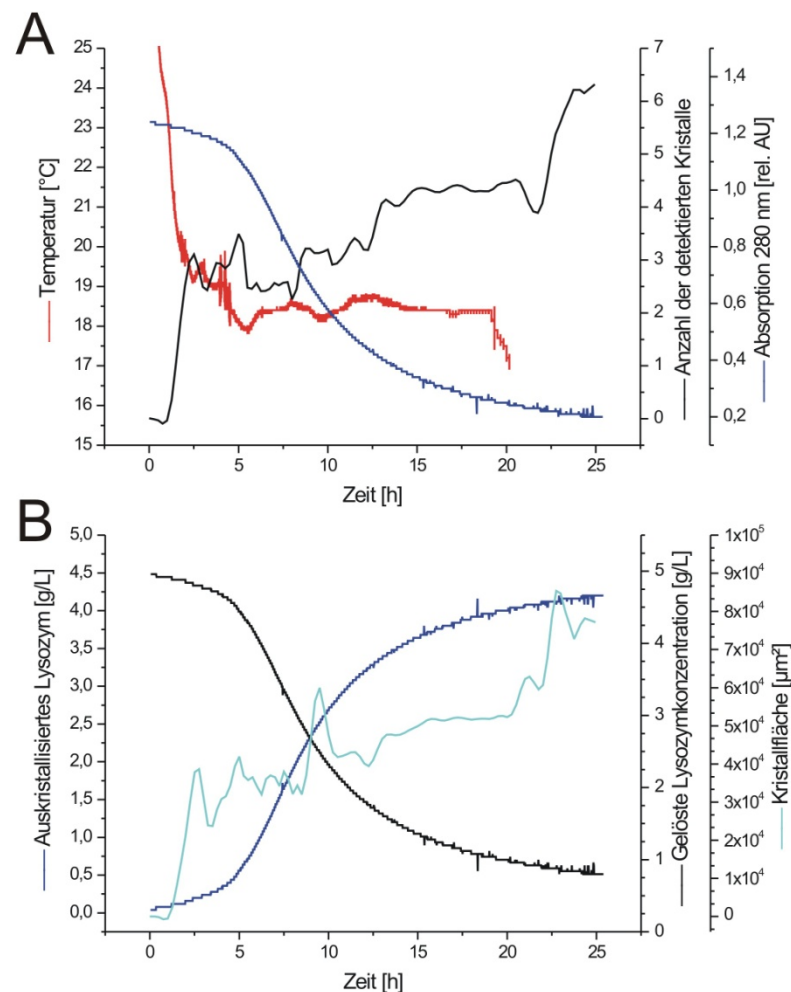


Abb. 46: Ergebnisse der Überwachung des Kristallisationsprozesses B12. Die Messung der Kristallanzahl erfolgt mit dem ISVM-System und ISC 2.2, ausgewertet werden die Daten mit ISA und dem Algorithmus *Crystal*.

A: Temperaturprofil (online), Absorptionsmessung (atline), Anzahl der detektierten Kristalle (online).

B: Konzentration des auskristallisierten Lysozims, Konzentration des gelösten Lysozims, durch ISA berechnete Kristallfläche.

Der Kristallisationsprozess wird wie bei dem Versuch B07 durch einen Temperaturshift ausgelöst. Die durchschnittliche Kristallzahl liegt in dem ersten Zyklus bei 1 und erhöht sich im Verlauf des Prozesses auf 190 detektierte Kristalle in Zyklusnr. 96. Hier werden, verglichen mit dem Experiment B07, fast identische Werte erhalten. Nach einer Prozessdauer von 25 h ist die durch die Absorption gemessene gelöste Lysozymkonzentration von 5,0 g/L auf 0,8 g/L gesunken, daraus resultiert eine kristallisierte Lysozymkonzentration von 4,2 g/L. Die entspricht einer Ausbeute von 84 %. Die höchste Kristallzahl wird in Zyklusnr. 96 mit einem Durchschnittswert von 6,3 Kristallen/Bild gemessen. Dieser Wert ist um 29 % größer als die höchsten Kristallzahl in dem Experiment B07 (Zyklusnr. 137, Durchschnittswert: 4,5 Kristalle/Bild). Die durch ISA kalkulierte Kristallfläche hat ihren Maximalwert in Zyklusnr. 88 und liegt bei einem Wert von $8,4 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$. Bei dem Prozess B07 wurde der höchste Wert der gemessenen Kristallflächen in Zyklusnr. 137 mit einem Wert von $4,0 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$ erhalten.

9.2.2 Charakterisierung des Lösungsvorgangs

In diesem Abschnitt werden zwei Lösungsvorgänge (L07 und L12) der gebildeten Lysozymkristalle vorgestellt. Es handelt sich dabei um die Umkehrprozesse der in Kapitel 9.2.1 gezeigten Kristallisationsprozesse. Der Lösungsvorgang der Kristalle wird durch eine Temperaturerhöhung von 17°C auf ca. 33°C hervorgerufen. Die Überwachung erfolgt mit dem ISVM-System (4-fach Objektiv, Auflösung $768 \cdot 768$ Pixel).

Die graphische Darstellung in Abbildung 47 zeigt die Verläufe der ermittelten Kurven beim Lösungsvorgang (L07).

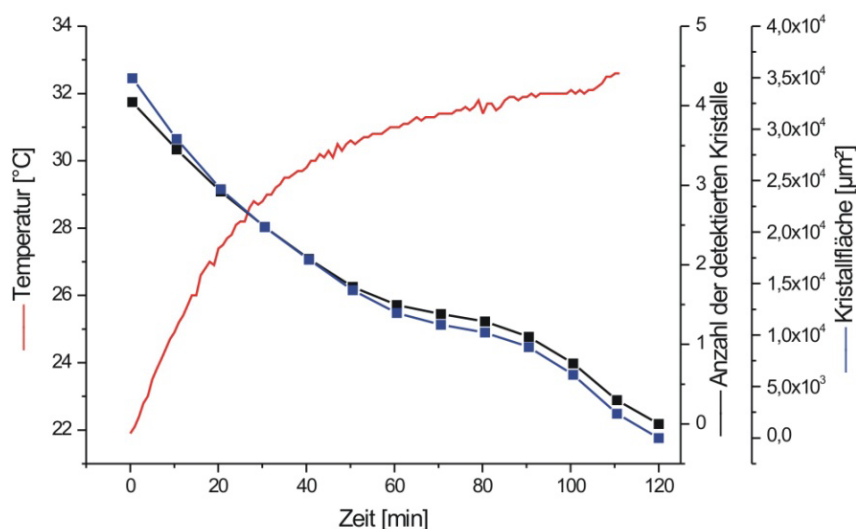


Abb. 47: Ergebnisse der Überwachung des Lösungsvorgangs L07. Dargestellt sind das eingestellte Temperaturprofil sowie die Abnahme der durchschnittlichen Kristallzahl/Zyklus und die Abnahme der Kristallfläche/Zyklus in μm^2 .

Zur Charakterisierung des Experiments L07 werden 13 Zyklen im Abstand von 10 min aufgenommen. In jedem Zyklus werden 50 Bilder im Abstand von 1,0 s akquiriert (Gesamtdauer eines einzelnen Aufnahmezyklus 50 s). Insgesamt stehen also 600 Bilder zur Beschreibung des Lösungsvorgangs zur Verfügung.

Es wird gezeigt, dass durch eine Temperaturerhöhung auf 33 °C der Lösungsvorgang der Kristalle eintritt. Die durch ISA berechnete Kristallzahl nimmt in einem Zeitraum von 120 min von ca. 200 Kristallen (Zyklusnr. 1) auf 0 Kristalle (Zyklusnr. 12) ab. Die graphische Darstellung der berechneten Kristallflächen korreliert dabei gut mit der Abnahme der Kristallzahl.

Zur Beschreibung des Lösungsvorgangs von Versuch L12 werden in 11 Zyklen 550 generierte Bilder mit ISA ausgewertet. Die Zeit zwischen zwei Zyklen beträgt 15 min. Bei der Bildaufnahme wird ein Intervall von 1,0 s gewählt. In Abbildung 48 sind die experimentell ermittelten Kurvenverläufe veranschaulicht.

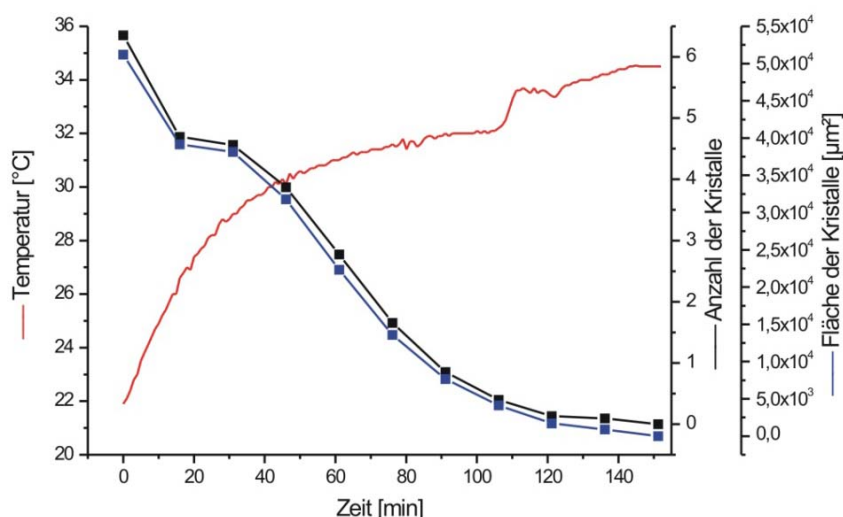


Abb. 48: Ergebnisse der Überwachung des Lösungsvorgangs L12. Dargestellt sind das eingestellte Temperaturprofil sowie die Abnahme der durchschnittlichen Kristallzahl/Zyklus und die Abnahme der Kristallfläche/Zyklus in μm^2 .

Die erhaltenen Kurvenverläufe des Lösungsvorgangs (L12) stimmen mit den Werten, die in dem Experiment L07 erzeugt wurden, gut überein. Bei dem Experiment L12 dauert es ca. 30 min länger eine klare Lösung zu erhalten. Der Grund für die längere Dauer der Gleichgewichtseinstellung ist nicht in den eingestellten Temperaturprofilen zu suchen, da diese in beiden Experimenten nahezu identisch sind. Eine mögliche Ursache dieses Phänomens könnte in der Größe der Kristalle liegen. In Kapitel 9.2.1 wurde am Ende des Kristallisationsprozesses B07 eine durchschnittliche Fläche von $4,0 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2/\text{Zyklus}$ der Kristalle erhalten. Bei dem Kristallisationsprozess B12 konnten durchschnittliche Kristallflächen von $8,4 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2/\text{Zyklus}$ detektiert werden. Auf Grund dieses auftretenden

Größenunterschiedes von 53 % wird angenommen, dass der Lösungsvorgang bei dem Experiment L12 länger dauert als bei dem Versuch L07.

9.2.3 Zusammenfassung und Diskussion

In einem weiteren Scale up-Schritt konnte der Kristallisationsprozess des Proteins Lysozym in einen 400 mL Maßstab übertragen werden. Dadurch konnte die Kristallisation von Lysozym erstmalig in einem batch-Prozess online mit dem ISVM-System beobachtet und charakterisiert werden. Abbildung 49 zeigt schematisch den vollständigen Scale up-Prozess und die Integration der einzelnen Sonden, die bei der Überwachung eingesetzt wurden.

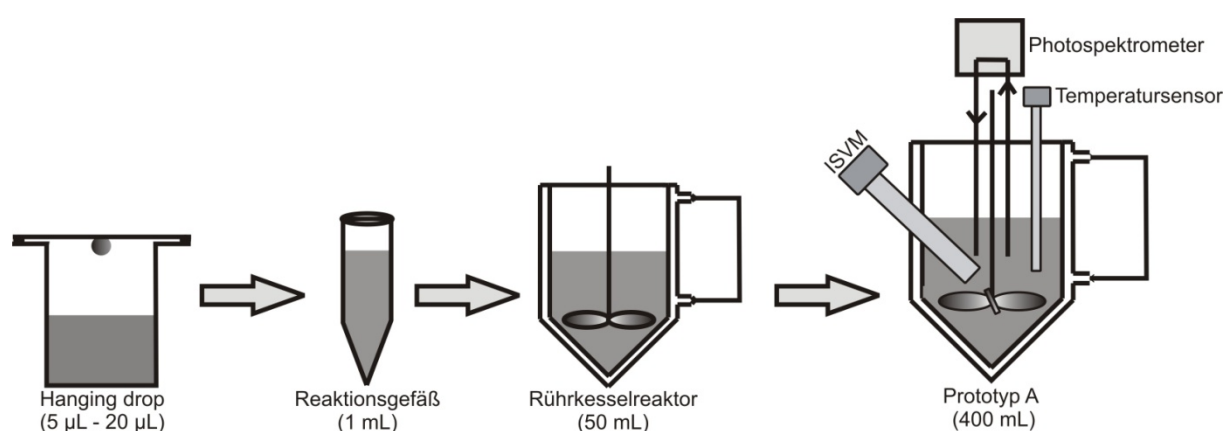


Abb. 49: Schematische Darstellung des vollständigen Scale up-Prozesses der Kristallisation von Lysozym. Durch die Übertragung der Parameter in den 400 mL Maßstab konnte der Kristallisationsprozess von Lysozym erstmalig online in einem batch-Versuch überwacht werden. Als Referenzmessung wurde die Konzentrationsänderung der Lösung mittels der UV-Absorptionsmessung (280 nm) in einem Bypass verfolgt.

Um den Kristallisationsprozess auszulösen, d. h. die Löslichkeit des Proteins herabzusetzen, ist ein Temperaturshift die Methode der Wahl. Dies wurde bereits in Kapitel 7.4.2 anhand des 50 mL Ansatz gezeigt. Die Variante der Fällungsmittelzugabe führte bei den Experimenten in dem Prototypen A überwiegend zu amorphen Strukturen. Sie eignet sich für kleinere Ansätze (< 50 mL), ist aber im größeren Maßstab schwierig zu kontrollieren.

Mittels des ISVM-Systems wurde während der Kristallisationsprozesse eine Vielzahl von Bildern generiert. Die Aufnahme in Zyklen mit anschließender Mittelwertbildung der detektierten Kristalle erlaubt sichere Aussagen über das Kristallwachstum und die Kristallbildung. Dadurch kann zu jedem Zeitpunkt der Kristallisation das Voranschreiten des Prozesses charakterisiert werden.

Trotz der unterschiedlichen Größenverteilung der Kristalle konnten Bilder in einer ausreichenden Qualität generiert werden. Kleinere Kristalle ließen sich mit dem Algorithmus

Crystal problemlos detektieren und klassifizieren, obwohl sie beim Durchqueren der Messzone z. T. nicht in der Fokusebene waren und deshalb unscharf abgebildet wurden. In Abbildung 50 sind einige ausgewählte Bilder von Lysozymkristallen, online aufgenommen mit ISC sowie deren Auswertung durch ISA, dargestellt.

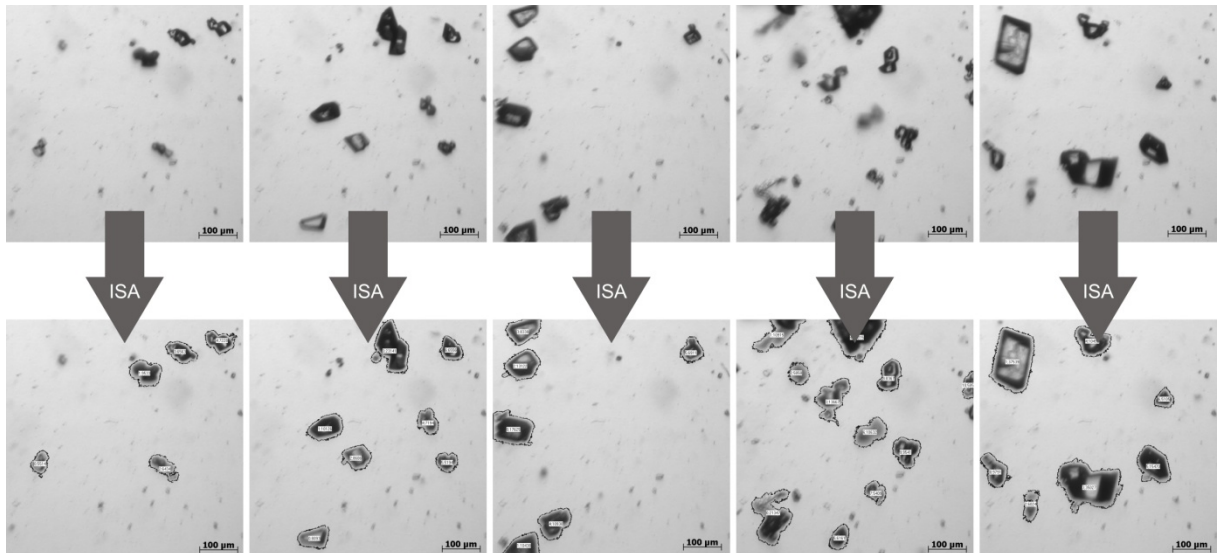


Abb. 50: Online aufgenommene Bilder von Lysozym-Kristallen aus dem Kristallisationsversuch B12 (obere Reihe). Die Auswertung der Bilder erfolgt mit ISA (Algorithmus: *Crystal*). Sie sind in der unteren Reihe dargestellt. Alle detektierten Kristalle sind durch eine Umrandung markiert und fließen in die Klassifikation mit ein. Unter Verwendung des Algorithmus *Crystal* werden auch Kristalle in die Analyse miteinbezogen, die den Rand des Bildes berühren.

Da die Kristalle während ihres Wachstumsprozesses zur Bildung von Agglomeraten neigen, besteht bei der Auswertung noch Optimierungsbedarf. Abbildung 50 veranschaulicht zwar eine unproblematische Detektion der Kristalle, allerdings können einzelne Kristalle in den Agglomeraten nicht differenziert werden. Zum Einen kann die Agglomeration durch Zugabe von Hilfsstoffen verhindert werden, zum Anderen würde die Entwicklung eines entsprechenden Algorithmus das beschriebene Problem lösen. Ziel fortgeschrittener Versionen der Analysealgorithmen sollte sein, Informationen bei der Wanderung und Drehung der Kristalle durch die Messzone des ISVM-Systems zu sammeln. Dadurch können Parameter wie z. B. Kantenlängen und Winkel der Kristallkörper zugänglich gemacht werden, um die dreidimensionale Struktur zu rekonstruieren. Als Anhaltspunkt für die Bestimmung der Winkel der Kristalle zur Abbildungsoptik kann die in Kapitel 3.3.3 beschriebene Integration von Polarisationsfiltern genutzt werden. Mit Hilfe dieser Daten wäre auch eine Differenzierung der einzelnen Kristalle in den Kristallclustern möglich.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass eine Überwachung und Charakterisierung des Kristallisationsprozesses von Lysozym sowie die Beschreibung des Lösungsvorgangs

der Kristalle mit dem ISVM-System realisiert werden konnten. Da Kristallagglomerate von ISA nur als ein Objekt erkannt werden, ist die durchschnittliche Kristallzahl der beobachteten Prozesse eher höher anzusehen. Bei der Ermittlung der durchschnittlichen Kristallflächen/Zyklus ist die Auswirkung der Clusterbildung zu vernachlässigen, da nur ein insignifikanter Unterschied beim Summieren der einzelnen Kristallflächen im Vergleich zu einem gebildeten Cluster besteht. Dies basiert auf der Tatsache, dass sich bei der Entstehung von Clustern einzelne Kristalle überlagern (Verkleinerung der Fläche) oder Hohlräume entstehen (Vergrößerung der Fläche).

9.3 Online Überwachung industrieller Kristallisationsprozesse

Im diesem Abschnitt werden die Beobachtung und Charakterisierung von zwei industriellen Kristallisationsprozessen vorgestellt. Zum Einen handelt es sich dabei um die Überwachung des Kristallisationsprozesses von Human-Insulin bei einem Industriepartner, zum Anderen werden Lactose-Kristalle der Firma Biolac GmbH & Co. KG (Harbarnsen, Deutschland) hinsichtlich ihrer Größenverteilung analysiert.

9.3.1 Inhalatives Human-Insulin

Im Juni 1999 wurde in einem Joint Venture von zwei Pharmaunternehmen mit dem Bau einer industriellen Insulinanlage begonnen. Ziel des Baus dieser Anlage war die Entwicklung eines neuartigen inhalativen Insulins.

Im Januar 2006 wurde das Produkt „inhalatives Human-Insulin“ durch die EMEA zugelassen. Wenige Tage später erfolgte die amerikanische Zulassung durch die FDA. Bereits am 18. Oktober 2007 wurde das Produkt vom Markt zurückgezogen. Grund für die Rücknahme war der geringe Absatz des inhalativen Peptidhormons. Somit befindet sich zurzeit kein inhalatives Insulin auf dem Markt.

Inhalatives Human-Insulin wurde durch einen aufwändigen biotechnologischen Prozess hergestellt. Ausgangspunkt der Produktion war die Kultivierung von gentechnisch veränderten K 12-Stämmen von *Escherichia Coli*. Nach diversen Aufarbeitungsschritten erfolgte als ein Schlüsselprozess die Kristallisation des Peptidhormons. Die Herabsetzung der Löslichkeit des Insulins und der damit verbundene Übergang in die kristalline Phase wurden mittels eines pH-Shifts durchgeführt.

9.3.2 Überwachung von Insulin-Kristallisationsprozessen

Im folgenden Abschnitt wird der Einsatz des ISVM-Systems zur Überwachung von Insulin-Kristallisationsprozessen beschrieben. Ziel dieser Untersuchungen war das Aufzeigen der prinzipiellen Möglichkeit Kristalle mit dem ISVM-System in einer industriellen Umgebung zu charakterisieren. Zur Beobachtung der Prozesse wurde das ISVM-System in einen 2.000 L Kristallisationsreaktor integriert. Die Höhe der Messzone wurde zwischen 300 - 440 μm variiert, um einen homogenen Durchfluss durch die Messzone und das Erfassen aller Kristallgrößen zu gewährleisten. Die graphische Darstellung in Abbildung 51 zeigt zwei Bilder von Insulin-Kristallen, online aufgenommen mit dem ISVM-System bei 4-facher und 10-facher optischer Vergrößerung während des Kristallisationsprozesses.

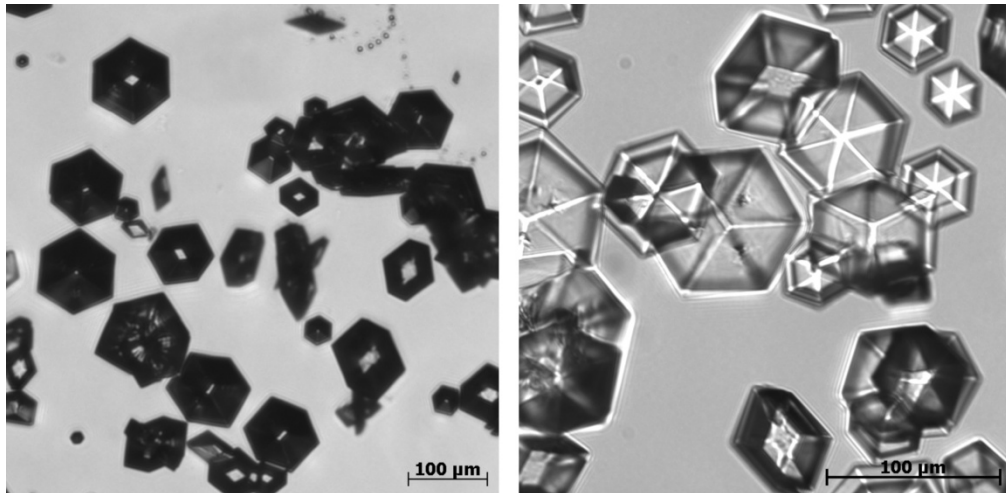


Abb. 51: Insulin-Kristalle, online aufgenommen mit dem ISVM-System. Links: 4-fache Vergrößerung; rechts: 10-fache Vergrößerung.

Es ist zu erkennen, dass unter Verwendung eines 10-fach Objektivs eine deutlich bessere Bildqualität erhalten wird. Zudem wird die dreidimensionale Struktur der Kristalle stärker hervorgehoben, was für eine Segmentierung und Klassifikation der Kristalle entscheidend ist. Im nächsten Kapitel 9.3.2.1 wird gezeigt, dass die hellen Lichtreflexe, die entlang der Kristallkanten verlaufen, als erster Ansatzpunkt zur Entwicklung eines entsprechenden Analysealgorithmus verwendet werden können.

Bei den mit dem 4-fach Objektiv generierten Kristallbildern tritt die Schwierigkeit der klaren Abgrenzung der einzelnen Kanten und Ecken auf. Hier scheinen die charakteristischen Parameter (Kantenlänge, Winkelgröße) der Kristalle ineinander zu verlaufen, was eine Analyse hinsichtlich der Kristallgröße extrem erschwert.

9.3.2.1 Strategie zur Segmentierung und Klassifizierung der Kristalle

Zur Segmentierung und Klassifikation der Insulin-Kristalle wurde in Kooperation mit der Universität Costa Rica ein Algorithmus basierend auf der LabVIEW-Plattform (National Instruments) entwickelt. In Abbildung 51 wird die graphische Benutzeroberfläche des Programms gezeigt. An einem Beispielbild wird exemplarisch die Segmentierung und Klassifikation der Kristalle anhand der auftretenden Lichtreflexe an den Kristallkanten veranschaulicht. Das Originalbild (Input Image), aufgenommen mit dem ISVM-System, stammt aus dem Ende der Überwachung des Kristallisationsprozesses. Es lässt sich festhalten, dass zu diesem Zeitpunkt die Anzahl der Kristalle sicher kalkuliert werden kann.

Der gesamte Wachstumsprozess der Kristalle kann mit diesem Algorithmus jedoch nicht dokumentiert werden. Der Grund hierfür liegt im Vorgang der Kristallbildung. Zu Beginn der Kristallisation bilden sich überwiegend amorphe Strukturen, aus denen dann die Kristalle entstehen. Am Ende des Prozesses haben sich die amorphen Strukturen zurückgebildet und

es liegen nur noch Kristalle vor. Während des Wachstumsprozesses sind die entstehenden Kristalle in die amorphen Strukturen eingebettet, so dass eine klare Abgrenzung der einzelnen Kristallkanten nahezu unmöglich wird. Hier müssen alternative Analysestrategien entwickelt werden, um den Wachstumsverlauf der Kristalle online zu charakterisieren.

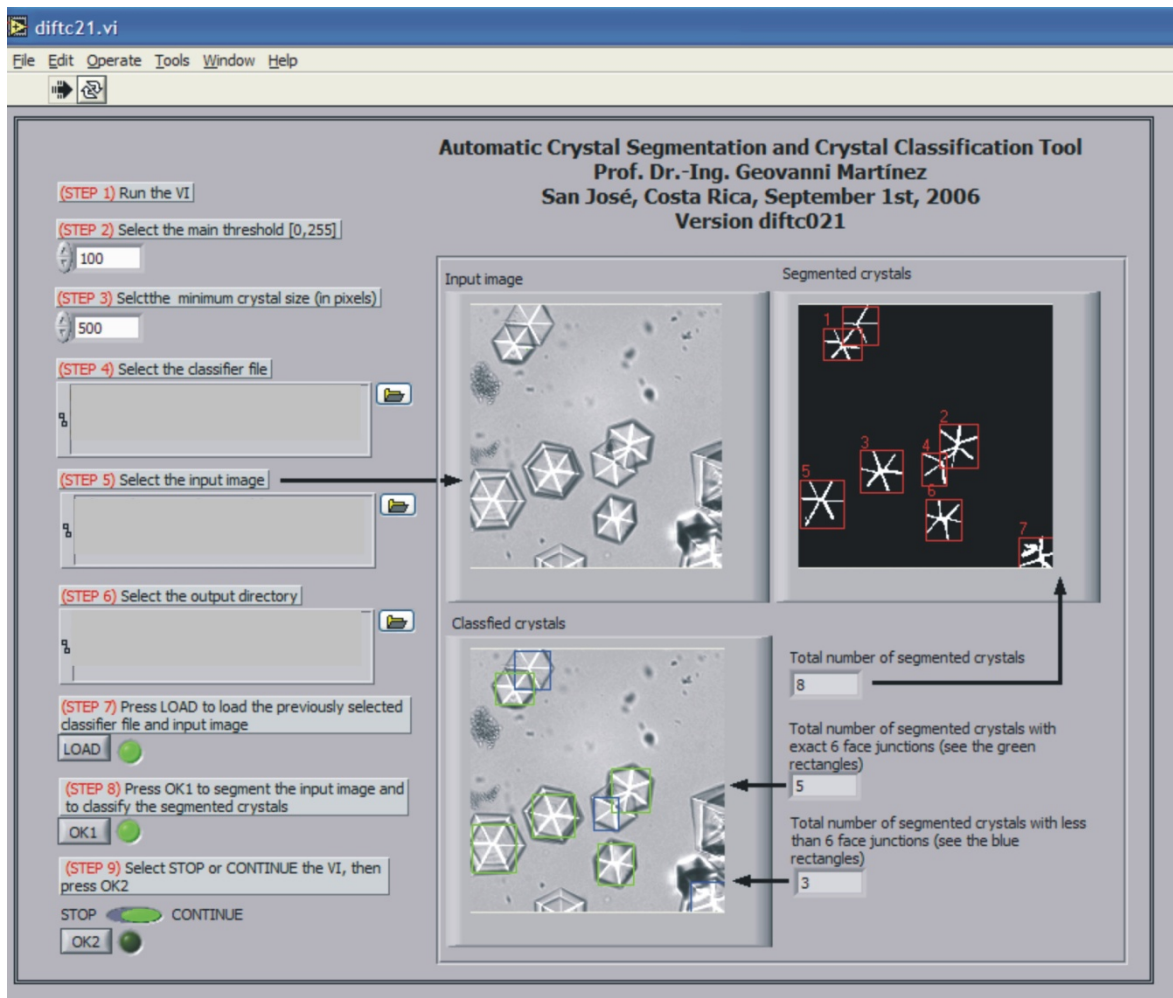


Abb. 52: Screenshot der Benutzeroberfläche des Auswertungsalgorithmus diftc021 zur Segmentation und Klassifikation von Insulin-Kristallen [Abbildung: Martinez, 2006].

9.3.2.2 Charakterisierung des Kristallisationsprozesses

Im folgenden Abschnitt wird der Vorgang der Kristallbildung eines Insulin-Kristallisationsprozesses vorgestellt. Die Beobachtung des Prozesses erfolgt mit dem ISVM-System (10-fach Objektiv, Auflösung $768 \cdot 768$ Pixel). Über einen Zeitraum von 33 min werden Bilder im Abstand von 2,0 s generiert. Da aktuell kein Algorithmus zur Analyse des Prozesses vorliegt, werden die Kristalle auf den akquirierten Bildern manuell ausgezählt. Typisch für den Beginn des Kristallisationsprozesses ist zunächst die Bildung amorpher Strukturen. Im Verlauf der Kristallisation bilden sich diese zurück und Insulin-Kristalle

entstehen. In der graphischen Darstellung in Abbildung 53 werden die Zunahme der Kristalle und der Rückgang der amorphen Strukturen während des Kristallisationsprozesses veranschaulicht.

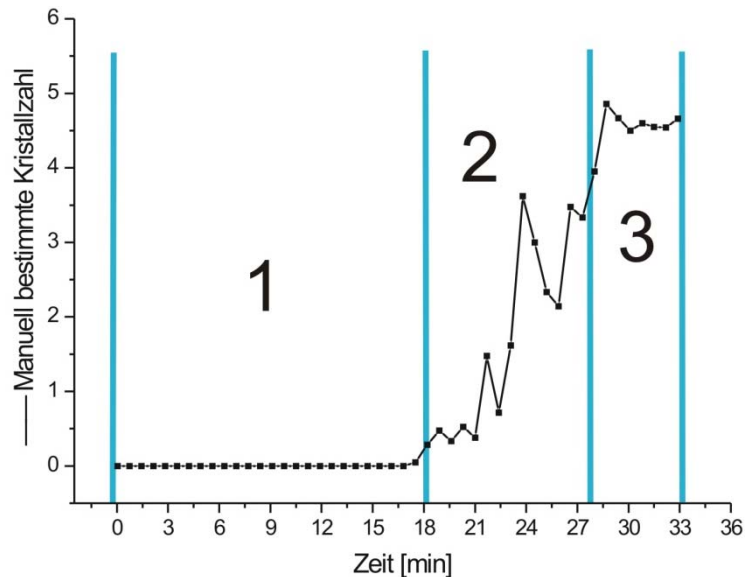


Abb. 53: Ergebnisse der Überwachung eines Insulin-Kristallisationsprozesses. Der Kristallisationsprozess lässt sich in drei Bereiche unterteilen: 1) Bildung amorpher Strukturen; 2) Rückgang der amorphen Strukturen und Bildung einzelner Kristalle; 3) Wachstumsstillstand der Kristalle.

9.3.2.3 Zusammenfassung und Diskussion

Anhand der in Abbildung 51 dargestellten Bilder von Insulin-Kristallen konnte gezeigt werden, dass ein Einsatz des ISVM-System zur Überwachung industrieller Kristallisationsprozesse prinzipiell möglich ist. Es konnten Bilder in einer hervorragenden Qualität generiert werden. Die Schwierigkeit bei der Analyse dieses Kristallisationsprozesses ist durch den Wachstumsprozess der Kristalle bedingt. Gerade zu Beginn der Kristallisation ist eine Detektion der Kristalle durch die auftretenden amorphen Strukturen extrem erschwert. Am Ende des Prozesses können die Kristalle problemlos detektiert werden. Zur Charakterisierung des gesamten Prozesses müssen weitere Algorithmen, die z. B. durch diverse Filtersysteme ein Ausblenden der amorphen Strukturen ermöglichen, entwickelt werden.

9.3.3 Charakterisierung von Lactose-Kristallen

In Kooperation mit der Firma Biolac GmbH & Co. KG werden Lactose-Kristalle hinsichtlich ihrer Größe und Größenverteilung mit dem In-situ Videomikroskop charakterisiert. Lactose (Milchzucker) ist ein natürlicher Zucker und gehört zur Gruppe der Disaccharide. Er ist in Milch- und Milchprodukten enthalten. Bei den zu untersuchenden Kristallen handelt es sich um gelbe und weiße Lactose. Die leicht gelbe Farbe der Kristalle ist auf das in der Milch vorhandene Riboflavin zurückzuführen. Die weißen Lactose-Kristalle haben eine höhere Reinheit als die gelben Kristalle. Sie werden einer zusätzlichen Raffination unterzogen und weitestgehend durch den Entzug des Riboflavins entfärbt. Einsatz finden die gelben und weißen Lactose-Kristalle vor allem in der Nahrungsmittelindustrie wie z. B. der Gewürz-, Süßwaren- und Backmittelindustrie.

9.3.3.1 Voruntersuchungen der Kristalle

Alle in diesem Abschnitt beschriebenen Experimente werden in dem Kristallisationsreaktor (Prototyp B) durchgeführt. Auf Grund der hohen Kristalldichte, sowohl bei der gelben als auch bei der weißen Lactose, werden die von der Firma Biolac & Co. KG erhaltenden Kristallsuspensionen schrittweise mit destilliertem Wasser (11°C) verdünnt. Die Löslichkeit von Lactose in Wasser ist zwar geringer als bei anderen Zuckern; dennoch ist ein eintretender Lösungsvorgang der Kristalle bei der Verdünnung nicht auszuschließen. Die Analyse der Kristalle in verdünnter Umgebung wird unter der Annahme durchgeführt, dass sich die Kristallgrößen bei einer Analysezeit von 15 min nicht verändern. Tabelle 13 gibt einen Überblick über die eingestellten Konzentrationen, die für eine online Überwachung im Reaktorsystem benutzt werden.

Tab. 13: Überblick über die eingestellten Lactosekonzentrationen.

Lactose [mL]	Dest. Wasser (11°C) [mL]	Konzentration v/v [%]
25	350	6,7
35	350	9,1
50	350	12,5
65	350	15,7
80	350	18,6

Eine Analyse der reinen Kristalllösung ist nicht möglich, da sich die einzelnen Kristalle überlagern. Unter diesen Bedingungen ist keine zuverlässige Analyse der generierten Kristallbilder möglich. Des Weiteren wurden in den Experimenten die Rührgeschwindigkeiten variiert. Die Wahl der richtigen Rührgeschwindigkeit ist essentiell, um zu gewährleisten, dass alle in der Suspension vorliegenden Kristallgrößen in der Schwebe gehalten werden und

somit ein homogener Durchfluss durch die Messzone des ISVM-Systems vorliegt. Zudem muss die mechanische Beanspruchung möglichst gering gehalten werden, um eine Scherung der Kristalle zu vermeiden. Abbildung 54 veranschaulicht, dass eine Rührgeschwindigkeit von 27 – 35 rpm die Methode der Wahl zur Untersuchung der Kristalle darstellt. Die Einstellungen der Schwellenwerte der verwendeten Algorithmen befinden sich im Anhang (siehe Kap. 12.6.3).

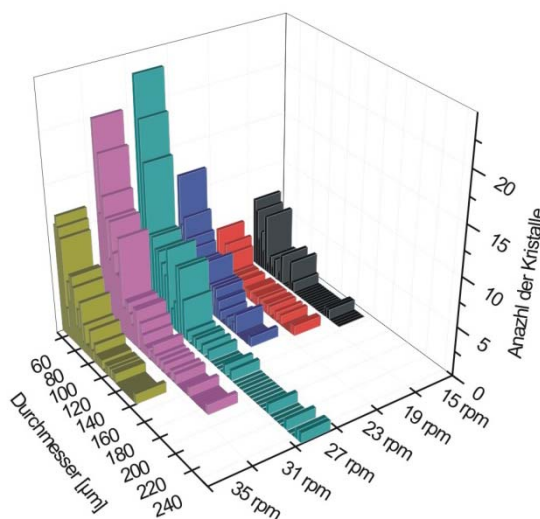


Abb. 54: Dargestellt ist die detektierte Anzahl von gelben Lactose-Kristallen (9,1 % v/v) und deren durch In-situ Analysis (Algorithmus: *Crystal 2*) berechneter Durchmesser in Abhängigkeit der Rührgeschwindigkeit. Jede Versuchsreihe besteht aus 350 ausgewerteten Bildern, die im Abstand von 0,5 s aufgenommen wurden. Bei niedrigen Rührgeschwindigkeiten (15 – 23 rpm) werden größere Kristalle (Durchmesser > 120 μm) nicht in der Schwebe gehalten und können somit nicht von der CCD-Kamera erfasst werden. Bei höheren Rührgeschwindigkeiten (27 – 35 rpm) passieren auch größere Kristalle die Messzone des ISVM und es werden Kristalldurchmesser von bis zu 247 μm erhalten.

Die Berechnung des Durchmessers der Kristalle erfolgt wie in Kapitel 9.1.3.1 beschrieben. Die von dem Algorithmus ermittelte Kristallfläche wird in einen Kreis mit gleicher Fläche umgewandelt und dann der Durchmesser des Kreises bestimmt. Auf Grund der Tatsache, dass bei Rührgeschwindigkeiten unter 27 rpm die größeren Kristalle nicht in der Schwebe gehalten werden können, wird bei der Vorstellung der folgenden Ergebnisse auf die Messung der niedrigen Rührerdrehzahlen verzichtet.

9.3.3.2 Bestimmung der Kristallgrößenverteilung

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der ermittelten Größenverteilungen für gelbe und weiße Lactose-Kristalle beschrieben und diskutiert. Die Kristallgrößenverteilung (KGV) ist

einer der wichtigsten Parameter eines Kristallisationsprozesses. Nur durch eine homogene Größenverteilung der Kristalle kann eine gleichbleibende Produktqualität und Reinheit gewährleistet werden. Zudem können bei Kenntnis der Größenverteilung Kristallisationen gezielt gestoppt werden, um Einschlüsse zu vermeiden.

Jede Datenreihe der im folgenden Abschnitt dargestellten Diagramme besteht aus 300 generierten Bildern, die in einem Abstand von 0,5 s aufgenommen wurden. Die Auswertung der Bilder erfolgt mit dem Algorithmus *Crystal 2*. Auf Grund der großen Datenmenge werden nur ausgewählte Diagramme gezeigt und nicht auf alle Verdünnungen (siehe Tab. 13) eingegangen.

Abbildung 55 zeigt die Anzahl detektierter gelber Lactose-Kristalle und deren berechneter Durchmesser in Abhängigkeit der Rührgeschwindigkeit.

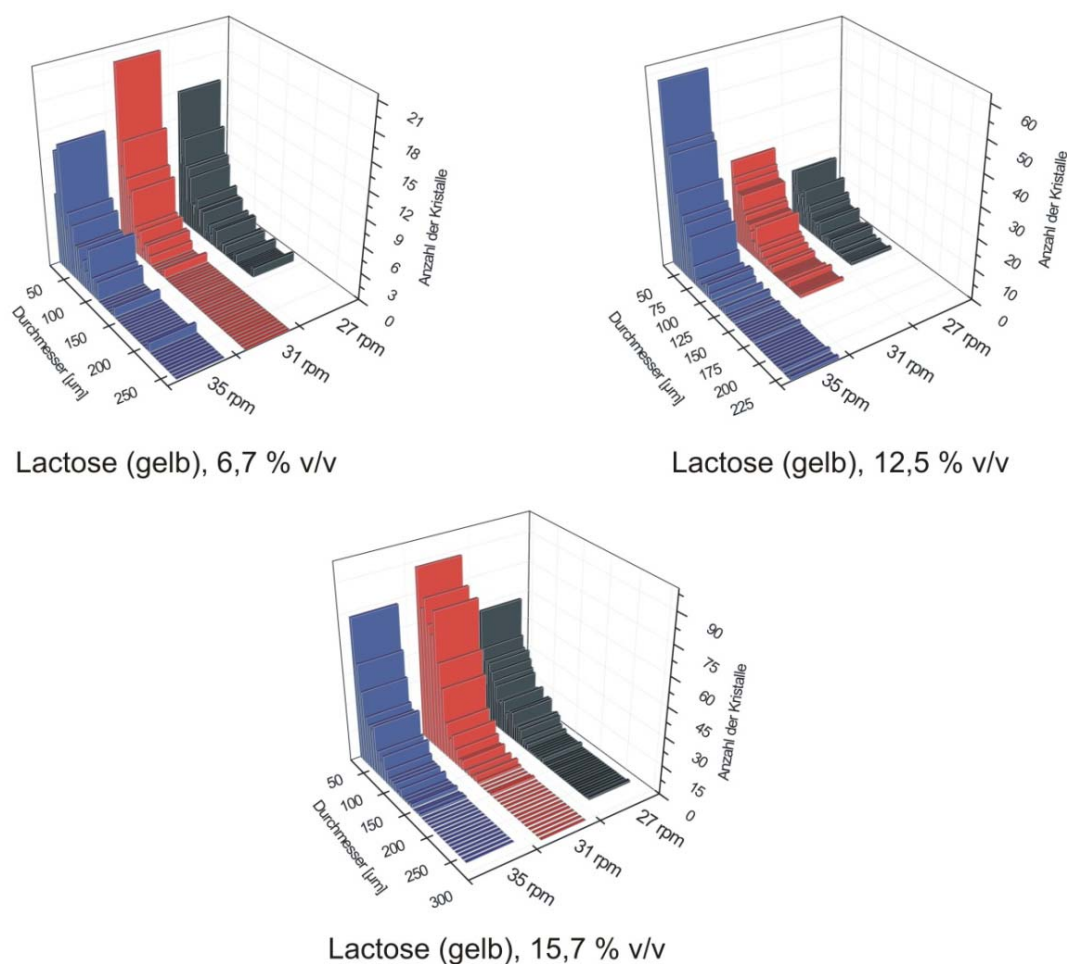


Abb. 55: Dargestellt ist die Anzahl von gelben Lactose-Kristallen und deren durch In-situ Analysis (Algorithmus: *Crystal 2*) berechneter Durchmesser in Abhängigkeit der Rührgeschwindigkeit.

Der Durchmesser der detektierten Kristalle variiert von 40 – 270 µm. Ein Großteil der analysierten Kristalle (ca. 85 %) liegt in einem Bereich von 40 – 150 µm. Größere Kristalle mit einem Durchmesser von 150 – 270 µm wurden nur vereinzelt detektiert. Eine mögliche

Ursache für dieses Phänomen könnte die Verdünnung mit dest. Wasser sein. Für den Zeitraum der Untersuchungen (ca. 15 min) sollten die Kristalle in kaltem dest. Wasser (11 °C) stabil sein; dennoch ist nicht auszuschließen, dass der eintretende Lösungsvorgang sich negativ auf die Messung der tatsächlichen Kristallgröße auswirkt.

Die gemessenen maximalen und minimalen Durchmesser der Kristalle in Abhängigkeit der Rührgeschwindigkeit und der Verdünnung sind in Tabelle 14 zusammengestellt.

Tab. 14: Vergleich der maximalen und minimalen ermittelten Kristalldurchmesser von Lactose (gelb) bei unterschiedlichen Rührgeschwindigkeiten und Konzentrationen.

Rührge- schwindigkeit	Lactose 6,7 % v/v		Lactose 12,5 % v/v		Lactose 15,7 % v/v	
	maximal Durchmesser	minimal Durchmesser	maximal Durchmesser	minimal Durchmesser	maximal Durchmesser	minimal Durchmesser
27 rpm	188,94 µm	43,59 µm	140,30 µm	42,58 µm	270,68 µm	43,92 µm
31 rpm	134,54 µm	44,46 µm	155,85 µm	42,75 µm	199,68 µm	45,21 µm
35 rpm	232,95 µm	45,00 µm	243,09 µm	43,67 µm	186,49 µm	44,79 µm

Der größte berechnete Durchmesser von 270,68 µm wurde bei einer Lactosekonzentration von 15,7 % v/v und einer Rührgeschwindigkeit von 27 rpm detektiert. Der kleinste gemessene Durchmesser liegt in einem Größenbereich von 42,85 µm und wurde bei einer Lactosekonzentration von 12,5 % v/v und einer Rührgeschwindigkeit von 31 rpm gefunden. Die prozentuale Größenabweichung der kleinsten detektierten Kristalle liegt bei einem Wert von unter 6 %. Diese geringe Abweichung der Größe von 2,63 µm lässt darauf schließen, dass kleine Kristalle sicher analysiert und klassifiziert werden können.

Bei der Analyse des maximalen Durchmessers der Kristalle treten starke Schwankungen auf. Hier variiert die Größe von 134,54 – 270,68 µm. Dies entspricht einer prozentualen Abweichung von 50 %.

Die Charakterisierung der Kristallgrößenverteilung für die weißen Lactose-Kristalle erfolgt nach dem gleichen Verfahren wie für die gelben Kristalle. In Abbildung 56 wird ein Überblick über die gemessenen Parameter gegeben.

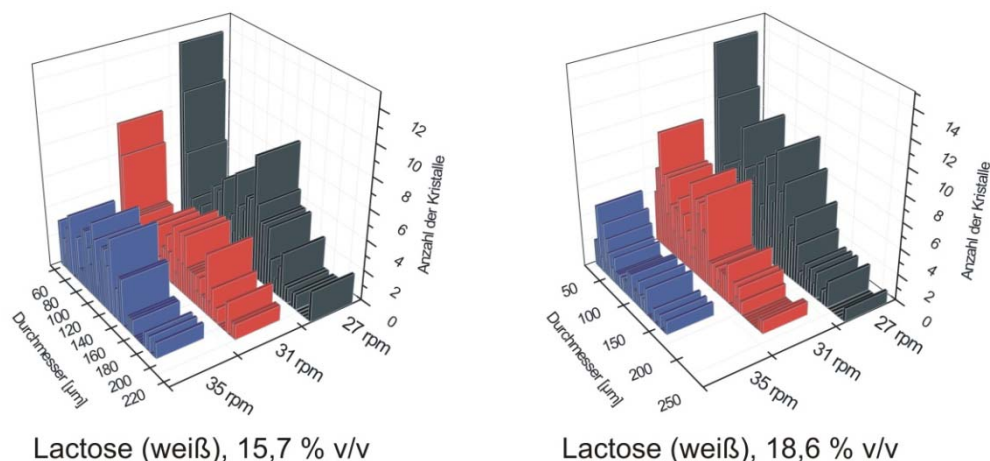


Abb. 56: Dargestellt ist die Anzahl von weißen Lactose-Kristallen und deren durch In-situ Analysis (Algorithmus: *Crystal 2*) berechneter Durchmesser in Abhängigkeit der Rührgeschwindigkeit.

Im Vergleich zu den in Abbildung 55 vorgestellten Ergebnissen verdeutlicht die graphische Darstellung in Abbildung 56 dass sich das Maximum (Anzahl der Kristalle) der Histogramme zu Kristallen mit einem Durchmesser von über 100 μm verschiebt. Die berechneten Durchmesser der Kristalle variieren wie bei der gelben Lactose in einem Größenbereich von 40 – 270 μm . Ca. 40 % der detektierten Kristalle besitzen einen Durchmesser, der zwischen 150 und 270 μm liegt. In Tabelle 15 werden die Eckdaten dieser Versuchsreihe zusammengefasst.

Tab. 15: Vergleich der maximalen und minimalen ermittelten Kristalldurchmesser von Lactose (weiß) bei unterschiedlichen Rührgeschwindigkeiten und Konzentrationen.

Rührge- schwindigkeit	Lactose 15,7 % v/v		Lactose 18,6 % v/v	
	maximal Durchmesser	minimal Durchmesser	maximal Durchmesser	minimal Durchmesser
27 rpm	234,93 μm	44,22 μm	267,59 μm	44,62 μm
31 rpm	218,51 μm	43,70 μm	237,77 μm	43,73 μm
35 rpm	202,26 μm	46,06 μm	186,97 μm	47,48 μm

Der größte gemessene Kristalldurchmesser der weißen Lactose liegt bei 267,59 μm . Damit tritt eine maximale Schwankung von 30 % bei der Messung der größten Durchmesser auf. Wie auch bei der gelben Laktose liegen die kleinsten ermittelten Durchmesser der weißen Lactose bei ca. 40 μm . Hier unterscheiden sich die experimentell berechneten Werte um 8 %, dies entspricht einer Abweichung von 3,78 μm . Vergleicht man die erhaltenden Daten der gelben und weißen Lactose, lässt sich festhalten, dass beide Kristallsuspensionen in nahezu exakt gleichen Größenbereichen liegen. Jedoch ist ein deutlicher Unterschied in der Kristallgrößenverteilung gegeben.

9.3.3.3 Zusammenfassung und Diskussion

Durch die Bestimmung der Kristallgrößenverteilung von Lactose-Kristallen konnte aufgezeigt werden, dass die Charakterisierung eines industriellen Prozesses mit dem In-situ Videomikroskop grundsätzlich möglich ist. Die mit dem Algorithmus *Crystal 2* kalkulierten Ergebnisse korrelieren gut mit den Angaben des Herstellers (Biolac GmbH & Co. KG). Für eine möglichst zuverlässige Aussage über die Größe der Kristalle ist die Aufnahme einer hohen Datenmenge erforderlich. Je mehr generierte Bilder von Kristallen vorliegen, desto genauer lassen sich die Kristalle in verschiedene Größenbereiche klassifizieren und analysieren.

Auf Grund der hohen Kristalldichte muss die suspendierte Lösung vor der online Beobachtung mit dem In-situ Videomikroskop im Prototypen A verdünnt werden. Das Überlagern und gegenseitige Berühren der Kristalle beim Durchqueren durch die Durchfluss-Messzone erlaubt zwar die Beobachtung des Prozesses, gewährleistet aber keine sichere Auswertung und Charakterisierung der Kristalle. Das Verdünnen von Proben, bevor sie analytisch untersucht werden, ist eine gängige Methode. Es bedeutet aber auch, dass eine direkte online Analyse des Kristallisationsprozesses von Lactose mit dem bisherigen optischen Aufbau des Mikroskops nicht möglich ist.

In Abbildung 57 werden Originalbilder, online aufgenommen mit dem ISVM-System (obere Reihe), und deren Auswertung durch den Algorithmus *Crystal 2* (untere Reihe) gezeigt.

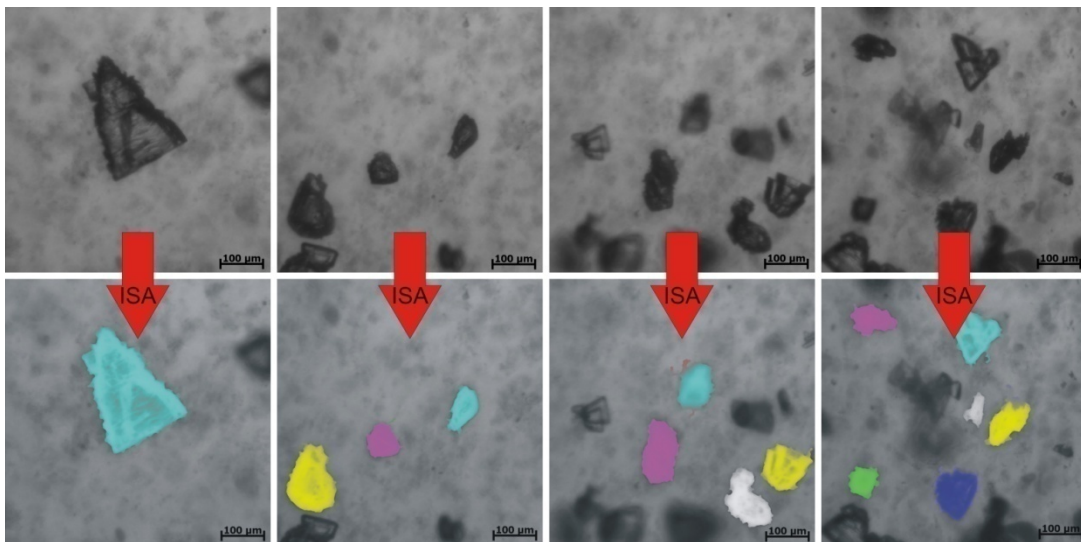


Abb. 57: Online aufgenommene Bilder von Lactose-Kristallen und deren Auswertung mit In-situ Analysis 1.2 (Algorithmus: *Crystal 2*). In der oberen Reihe sind die Originalbilder (4-fach Objektiv) und in der unteren Reihe die analysierten Bilder dargestellt. Detektierte Kristalle werden farblich markiert und fließen in die Klassifizierung mit ein. Kristalle, die den Rand des Bildes berühren, werden nicht in die Analyse der Größenverteilung miteinbezogen. Es ist deutlich zu erkennen, dass auf Grund der unterschiedlichen Tiefenschärfe manche Kristalle von dem Algorithmus nicht detektiert werden.

Die ermittelten Durchmesser der Kristalle variieren in einem Größenbereich von 42,58 µm (gelbe Lactose, 12,5 % v/v) bis 270,68 µm (gelbe Lactose, 15,7 % v/v). Dies entspricht einer Größendifferenz von 84 %. Auf Grund dessen ist es nicht möglich, dass alle Kristalle mit der gleichen Tiefenschärfe abgebildet werden. Dadurch wird die Detektion aller Kristalle äußerst anspruchsvoll.

Zudem ist in der graphischen Darstellung in Abbildung 56 deutlich zu erkennen, dass einige Kristalle – obwohl sie auf den generierten Bildern sichtbar sind – nicht von dem Algorithmus detektiert werden. Dies liegt darin begründet, dass in die Berechnung der Größenverteilung nur Kristalle einbezogen werden, die sich mit vollem Umfang auf dem Bild befinden. Berührt ein Kristall die Außenwand des Bildes wird dieser bei der Analyse nicht berücksichtigt.

Um die Zuverlässigkeit des Algorithmus *Crystal 2* zu überprüfen, wurden in einem separaten Experiment Kristalle aus einer Datenreihe mit 750 Bildern manuell ausgezählt und mit der von dem Algorithmus berechneten Kristallzahl verglichen. Durch die Variation der einstellbaren Schwellenwerte des Algorithmus wurde versucht, die optimalen Einstellungsparameter zu finden. Dabei stellte sich die Variation des Susan Schwellenwertes (S. T.) als wichtigste Regelgröße heraus. Das Resultat der Auszählungsverfahren wird in Abbildung 58 vorgestellt.

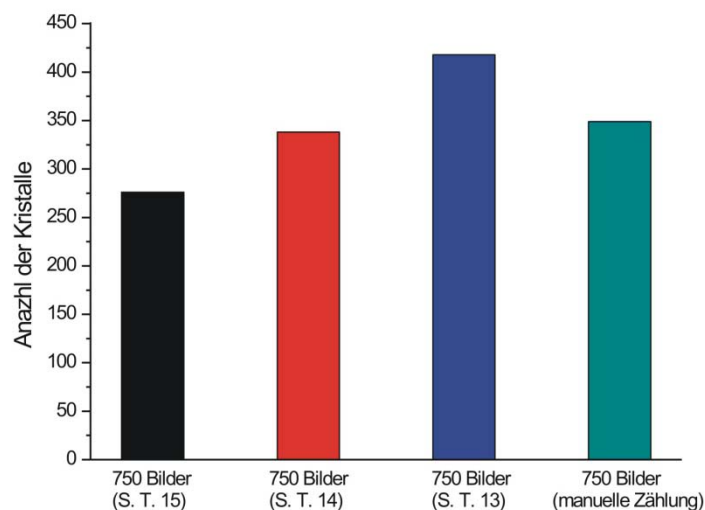


Abb. 58: Vergleich der Gesamtkristallzahl einer Versuchsreihe mit 750 ausgewerteten Bildern. Bei der manuellen Auswertung der Bilder werden 349 Kristalle gezählt. Unter Verwendung des Algorithmus *Crystal 2* und Variation des Susan Schwellenwertes werden 276 Kristalle (S. T. 15), 338 (S. T. 14) und 418 Kristalle (S. T. 13) detektiert.

Unter der Annahme, dass bei der manuellen Auszählung alle Kristalle erkannt wurden, wird die erhaltende Kristallzahl von 349 Kristallen einem Wert von 100 % zugeordnet. Auf den ersten Blick scheint die Verwendung des Susan Schwellenwertes mit dem Wert 14 (338 detektierte Kristalle) die Methode der Wahl zu sein. Ein Vergleich der Bilder zeigt aber,

zu viele Hintergrundstrukturen fälschlicher Weise als Kristalle detektiert werden und zu viele Kristalle unerkant bleiben. Daher kann der eingestellte Susan Schwellenwert von 14 nicht verwendet werden. Die Ergebnisse der anderen beiden Schwellenwerte von 13 und 15 zeigen eine prozentuale Abweichung von ca. 20 % im Vergleich zur manuellen Auswertung. Dabei liegt die detektierte Kristallzahl zum Einen unter der manuell ermittelten Kristallzahl (S. T. 15, 276 Kristalle) und zum Anderen über der manuell kalkulierten Kristallzahl (S. T. 13, 418 Kristalle). Es werden entweder zu wenig Kristalle erkannt oder amorphe Hintergrundstrukturen fälschlicher Weise als Kristalle detektiert. Um in die Berechnung der Kristallgrößenverteilung keine Hintergrundstrukturen mit einzubeziehen, wurden alle generierten Bilder mit dem Susan Schwellenwert 15 ausgewertet. Dabei werden zwar nicht alle Kristalle von dem Algorithmus detektiert, es ist aber gewährleistet, dass nur Kristalle und keine Hintergrundstrukturen in die Berechnung mit einfließen.

Abschließend lässt sich festhalten, dass durch die Aufnahme einer großen Datenmenge zuverlässige Ergebnisse mit dem ISVM-System bei der Charakterisierung von Lactose-Kristallen in verdünnter Lösung erhalten werden können.

10. Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die Entwicklung und Adaption eines In-situ Videomikroskops (ISVM) zur mikroskopischen Analyse von Partikeln realisiert (siehe Kap. 3). Das ISVM-System basiert auf dem Konzept des In-situ Mikroskops (ISM) und kann zur prozessbegleitenden, nicht-invasiven, inline Analyse von Partikeln / Kristallen eingesetzt werden. Der Mikroskopkörper wird in einen 25 mm Seitenport eines Reaktors eingebaut, so dass die Durchflussmesszone permanent in die zu untersuchende Suspension eintaucht. Aufgrund des modularen Aufbaus der Sonde können während eines laufenden Prozesses ein Objektivwechsel und ein Austausch der Kamera erfolgen, ohne den Prozess zu beeinflussen. Die Integration von Polarisationsfiltern in die Mikroskopoptik erlaubt die Beobachtung und Charakterisierung von klaren, durchsichtigen Partikeln oder Kristallen. Gesteuert wird das ISVM mit der Software In-situ Control 2.2 (Weiterentwicklung der Software ISC 2.0). Die Software besitzt eine graphische Bedienoberfläche, über die der Anwender alle relevanten Mikroskopparameter (LED-Helligkeit, Messzonenhöhe, Fokusebene usw.) festlegen kann. Während einer Messung wird kontinuierlich ein Live-Bild auf der Benutzeroberfläche visualisiert (siehe Kap. 4).

Die Überwachung und Analyse größerer Partikel (Durchmesser > 1 mm) wurde durch die Entwicklung eines offline Messgerätes (Large Particle Microscopic Image System, LPMIS) verwirklicht (siehe Kap. 5). Das System wurde ausführlich hinsichtlich seiner optischen Eigenschaften untersucht und getestet. Die Fokussierung der Objekte erfolgt bei dem LPMIS manuell. Die Bildaufnahme wird durch die Software In-situ Control 2.0 realisiert. Eingesetzt wurde das LPMIS-System zur Charakterisierung eines industriellen Prozesses. Dabei konnten in umfangreichen Versuchen Aussagen über die Größenzunahme von Carriern während eines Kultivierungsprozesses von adhärent wachsenden Zellen getroffen werden. Die ermittelten Daten korrelieren gut mit alternativen offline Analysetechniken.

Für den experimentellen Einsatz des ISVM-Systems wurden Kristallisationsreaktorsysteme konstruiert und schrittweise optimiert (siehe Kap. 6). Sowohl der entwickelte Prototyp A als auch die optimierte Version Prototyp B eignen sich für die Durchführung von Kristallisationsexperimenten. Beide Reaktorsysteme wurden ausführlich reaktionstechnisch charakterisiert. Es konnten relevante Kenngrößen wie die Bodensteinzahl Bo und die Kesselzahl N ermittelt werden. Des Weiteren wurden durch Experimente zum Verweilzeitverhalten Daten über die Güte der Durchmischung erhalten. Durch die Bestimmung von Temperaturprofilen wurde der Wärmeübergang der Systeme beschrieben. Hier zeigte der Prototyp B durch einen optimierten Kühlmantel deutliche Vorteile gegenüber seinem Vorgängermodell. Zudem konnte bei dem Prototypen B durch einen externen Aufbau

auf dem Deckel des Reaktors eine indirekte Ansteuerung der Rührwelle realisiert werden. Daher lässt sich bei dem Prototypen B unter der Verwendung einer Biostat B-Einheit die Rührgeschwindigkeit bis auf 6 rpm drosseln. Dieser Optimierungsschritt ist immens wichtig, um die mechanische Beanspruchung der Kristalle / Partikel durch den Rührer möglichst gering zu halten. Als optimales Rührelement für die Beobachtung kristalliner Verbindungen hat sich ein dreiblättriger Propellerrührer herausgestellt. Er verleiht den Partikeln / Kristallen schon bei niedrigen Rührgeschwindigkeiten genug Auftrieb, um sie in der Schwebe zu halten. Ein am Reaktorboden platziertes Probenahmemodul ergänzt den Prototypen B. Durch das Modul können während eines laufenden Prozesses Kristalle aus dem Reaktor entnommen und offline analysiert werden.

Optimierungsbedarf der Reaktorsysteme besteht an den Reaktorinnenseiten. Kleinste Unebenheiten in den Seitenwänden verhalten sich wie Kristallisationskeime. Es wurde versucht die Innenseiten durch verschiedene Verfahren zu ummanteln. Als subjektiv beste Lösung stellte sich die Verwendung von Teflon-Spray heraus. Daher wäre es sinnvoll die komplette Innenwand der Reaktorsysteme mit Teflon auszukleiden, um eine möglichst glatte und abweisende Oberfläche zu erhalten.

In Kapitel 7 wurde ein umfangreiches Screening zum Auffinden geeigneter Proteine für Kristallisationsexperimente in den Reaktorsystemen vorgestellt. Dabei stellte sich Lysozym als einziges Protein heraus, das hinsichtlich seiner Kristallisationseigenschaften reproduzierbar charakterisiert werden konnte. In diversen Dampfdiffusionsexperimenten konnten so entscheidende Parameter wie pH-Wert, Temperatur, Fällungsmittel (Salze), deren Konzentration und die Lysozymkonzentration für eine erfolgreiche Kristallisation erarbeitet werden. Zudem konnten durch Variation der Parameter die polymorphen Eigenschaften des Proteins beschrieben werden. In einem Scale up-Prozess wurden die ermittelten Parameter auf batch-Versuche in die entwickelten Reaktorsysteme übertragen und mittels des In-situ Videomikroskops analysiert. Um die Kristallisation in den Reaktorsystemen zu injizieren, stellte sich ein Temperaturshift als Methode der Wahl heraus. In den Kapiteln 5 und 8 – 9 wurden umfassende Untersuchungen zur Beobachtung und Charakterisierung von Partikeln und von Kristallisationsprozessen beschrieben. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl das LPMIS-System als auch das ISVM-System robuste und flexible Messsysteme sind, mit denen neben Aussagen über die Partikelzahl auch weitere prozessanalytische Parameter bestimmt werden können.

Das Anwendungsspektrum der In-situ Mikroskopie konnte durch die Entwicklung des In-situ Videomikroskops auf die Überwachung von Kristallisationsprozessen erweitert werden. Entscheidend für eine zuverlässige Analyse der in Kapitel 5 und 8 – 9 beschriebenen Prozesse ist neben der Hardwareentwicklung und -optimierung die Entwicklung neuer Auswertungsalgorithmen. Durch die Implementierung der Algorithmen *Crystal*, *Crystal 2* und

G. *Project* in die Software In-situ Analysis 1.2, ist es möglich, Kristalle oder Partikel hinsichtlich ihrer Anzahl, Größe und Größenverteilung zu analysieren. Variabel einstellbare Schwellenwerte ermöglichen dabei eine optimale Anpassung an den auszuwertenden Prozess. Auf Grund der unterschiedlichen Kristall- / Partikelgrößen ist es mit der bisher verwendeten Optik des ISVM-Systems nicht realisierbar, dass alle Partikel / Kristalle eine identische Tiefenschärfe aufweisen. Dieses Problem wurde in Kapitel 9 bei der online Beobachtung von Kristallisationsprozessen verdeutlicht. Auch unter Verwendung von optimierten Schwellenwerten werden nicht alle Objekte von den Algorithmen detektiert und klassifiziert. Deshalb muss eine Vielzahl von Bildern generiert werden, um den Prozess zuverlässig zu charakterisieren.

Hier besteht also weiterer Optimierungsbedarf bezgl. der Optik des ISVM-Systems. Zurzeit ist der Aufbau der Optik relativ einfach durch eine LED und eine Kondensorlinse konstruiert. Eine Möglichkeit der Optimierung ist die Entwicklung von mehreren Beleuchtungseinheiten mit unterschiedlichen Kondensorlinsen, deren Apertur auf die des integrierten Objektivs exakt abgestimmt wird. Die Berechnung der optischen Parameter ist nicht trivial und kann nicht ohne weitere Hilfsmittel wie der Verwendung diverser Software-Programme (C-MAX) durchgeführt werden. Die verwendeten Objektive des ISVM-Systems sind endlich korrigiert, d. h. es muss eine exakte Tubuslänge von 160 mm eingehalten werden (Abstand von der Linse des Objektivs bis zum CCD-Chip der Kamera). Da aber ein Eintauchen der Messzone in das Prozessmedium gewährleistet sein muss, wurden die Objektive auf 190 mm verlängert. Daraus resultieren Verluste der optischen Eigenschaften. Aus diesem Grund sollte der Wechsel von endlich zu unendlich korrigierten Objektiven überdacht werden. Die Veränderungen betreffen vor allem die Integration komplexer Linsensysteme in den Objektivtubus.

Als weitere Schwierigkeit bei der Überwachung von Kristallisationsprozessen stellte sich die Bildung von Kristallclustern heraus (siehe Kap. 9). Die Cluster werden zwar von den Algorithmen detektiert, können aber nur als ein Objekt klassifiziert werden. Zur vollständigen Differenzierung der Kristalle in den Clustern müssen die Auswertungsalgorithmen optimiert werden. Ein möglicher Ansatzpunkt zur Lösung dieses Problems wäre eine Rekonstruktion der dreidimensionalen Struktur der detektierten Kristalle. Dazu müssen Bilder der Kristalle auf ihrem Weg durch die Messzone in möglichst kleinen Zeitabständen (0,05 s) mittels der CCD-Kamera generiert werden. So lassen sich Informationen über die Kantenlängen und Winkel der Körper sammeln, die in einer Datenbank abgelegt werden können. Sind ausreichende Informationen vorhanden, kann mit der Analyse der Cluster begonnen werden. Durch Realisierung dieser Punkte könnte das ISVM-System zur Kristallisationsüberwachung eines Proteingemisches eingesetzt werden. Bei einer unterschiedlichen Löslichkeit der Proteine kann das Kristallisationsverhalten der einzelnen Komponenten analysiert werden.

Die Aufgabe des ISVM-Systems sollte dabei sowohl in der Überwachung des Trennungsvorgangs als auch in der qualitativen und quantitativen Analyse des Prozesses liegen.

Ein weiteres potentielles Anwendungsgebiet der In-situ Videomikroskopie liegt in der Überwachung von Fermentationsprozessen, in denen Mikroalgen kultiviert werden. Mikroalgen gehören zu den Energiequellen der Zukunft. Bei der Kultivierung können z. B. CO₂-Abgase aus Kraftwerken genutzt werden. So ist die gewonnene Energie (Biogas) aus der Algenbiomasse schon während der Produktion positiv. Zudem produzieren Algen eine Vielzahl wertvoller Substanzen wie Fettsäuren, Lipide und Pigmente, die sich in der Pharmazie, Nahrungsmittelindustrie oder Kosmetik einsetzen lassen. Hier könnte das ISVM-System als sinnvolle nicht-invasive Messtechnik eingesetzt werden. Dadurch ist die Möglichkeit gegeben, Parameter wie die Zellzahl und das Zellvolumen der Prozesse zu bestimmen. Zudem müssen neue Algorithmen für die Auswertung der generierten Bilder entwickelt werden, um beispielsweise anhand der ermittelten Messwerte die Lichtzufuhr in den Reaktoren optimal zu steuern. Der Einsatz des ISVM würde also zu einer erhöhten Produktivität bei der Kultivierung der Mikroorganismen beitragen. In der graphischen Abbildung 59 sind erste Voruntersuchungen zur Überwachung von Mikroalgen der Gattung *Chlamydomonas* bei unterschiedlichen optischen Vergrößerungen gezeigt.

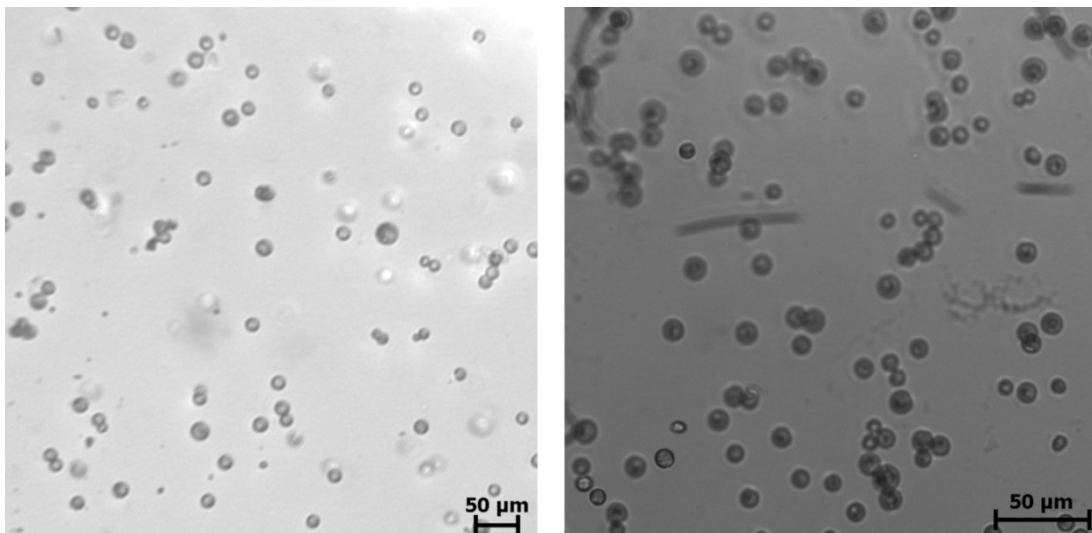


Abb. 59: Mit dem ISVM-System online akquirierte Bilder von Mikroalgen der Gattung *Chlamydomonas* in einem Photobioreaktor. Links: 4-fache optische Vergrößerung; rechts: 10-fache optische Vergrößerung.

Diese Bilder belegen die Eignung des ISVM-Systems zur Überwachung von Mikroalgen. Zur Auswertung der Bilder müssen Algorithmen entwickelt werden, welche die Detektion und Klassifikation der Zellen erlauben. Dadurch könnte der Wachstumsverlauf während der Kultivierung online verfolgt und charakterisiert werden.

11. Literaturverzeichnis

Barret P.: Selecting In-Process Particle-Size Analyzers, 2003. Chemical Engineering Progress.

Barret P., Glennon B.: In-line FBRM monitoring of particle size in dilute agitated suspensions, 1999. Particle & Particle Systems Characterization 16 (5): 207 - 211.

Bluma A.: Überwachung und Validierung von biotechnologischen Prozessen mit neuen Bildverarbeitungstools der In-situ Mikroskopie, 2006. Diplomarbeit: Leibniz Universität Hannover.

Bittner C.: In-situ-Mikroskopie - Ein neues Verfahren zur On-line-Bestimmung der Biomasse bei Kultivierungsprozessen, 1994. Dissertation: Leibniz Universität Hannover.

Bond A.D., Boese R., Desiraju G.R.: Zur Polymorphie von Aspirin, 2007. Angewandte Chemie 119: 621 - 624.

Brückerhoff T.: Bildbasiertes Inline-Monitoring von Kultivierungsprozessen mit einem optimierten In-situ Mikroskopsystem, 2006. Dissertation: Leibniz Universität Hannover.

Camisard V., Brienne J.P., Baussart H., Hammann J., Suhr H.: Inline characterization of cell concentration and cell volume in agitated bioreactors using in situ microscopy: application to volume variation induced by osmotic stress, 2002. Biotechnology and Bioengineering 78 (1): 73 - 80.

Castilho L., Moraes A., Augusto E., Butler M.: Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy, 2008.

Clercq B. De., Lant P.A., Vanrolleghem P. A.: Focused beam reflectance technique for in situ particle sizing in wastewater treatment settling tanks, 2004. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 79 (6): 610 - 618.

Cornel J., Lindenberg C., Mazzotti M.: Quantitative Application of in Situ ATR-FTIR and Raman Spectroscopy in Crystallization Processes, 2008. Industrial & Engineering Chemistry Research 47: 4870 - 4882.

Dremel B.A., Schmid R.D.: Optische Sensoren für die Bioprozess-Kontrolle, 1992. Chemie Ingenieur Technik 64 (6): 510 - 517.

Ducruix A., Giege R.: Crystallization of Nucleic Acids and Proteins (A practical approach), second ed., 1992.

Frerichs J.G.: Entwicklung eines In-situ Mikroskops zur bildgestützten Online-Überwachung von Bioprozessen, 2000. Dissertation: Leibniz Universität Hannover.

Frerichs J.G., Joeris K., Konstantinov K., Scheper T.: Einsatz eines In-situ-Mikroskops zur Online-Beobachtung von Tierzellkultivierungen, 2002. Chemie Ingenieur Technik 74 (11): 1629 - 1633.

Gilliland G.L., Tung M., Ladner, J.E.: The Biological Macromolecule Crystallization Database: crystallization procedures and strategies, 2002. Acta Crystallographica D58: 916-920.

Greaves D., Boxall J., Mulligan J., Montesi A., Creek J., Dendy Sloan E., Koh C.A.: Measuring the particle size of a known distribution using the focused beam reflectance measurement technique, 2008. Chemical Engineering Science 63 5410 – 5419.

Heath A.R., Fawell P.D., Bahri P.A, Swift J.D.: Estimating Average Particle Size by Focused Beam Reflectance Measurement (FBRM), 2002. Particle & Particle System Characterisation 19: 84 – 95.

Höpfner T.C.: Beobachtung und Charakterisierung von Kristallisationsprozessen mittels der In-situ Mikroskopie, 2007. Diplomarbeit: Leibniz Universität Hannover.

Joeris K., Frerichs J.G., Konstantinov K., Scheper T.: In-situ microscopy: Online process monitoring of mammalian cell cultures, 2002. Cytotechnology 38: 129 - 134.

Jones W.F., Wiencek J.M., Darcy P.A.: Improvements in lysozyme crystal quality via temperature-controlled growth at low ionic strength, 2001. Journal of Crystal Growth 232 (1-4): 221 - 228.

Junker B., Maciejak W., Darnell B., Lester M., Pollack M.: Feasibility of an in situ measurement device for bubble size and distribution, 2007. *Bioprocess Biosystem Engineering* 30: 313 - 326.

Klink B.U.: Entwicklung eines Fluoreszenzspektrometers zur Untersuchung von intermediären Zuständen in der Röntgenkristallographie, 2006. Dissertation: Universität Dortmund.

Law D.J., Bale A.J., Jones S.E.: Adaptation of focused beam reflectance measurement to In-situ particle sizing in estuaries and coastal waters, 1997. *Marine Geology* 140 (1-2): 47 - 59.

Lewiner F., Klein J.P., Puel F., Fevotte G.: On-line ATR FTR measurement of supersaturation during solution crystallization processes. Calibration and applications on three solute/solvens systems, 2001. *Chemical Engineering Science* 56 2069 – 2084.

Lindner P.: Entwicklung von Software-Systemen zur Planung, Datenaufnahme und –auswertung von Bioprozessen. 2006. Dissertation: Leibniz Universität Hannover.

Lowe C.R., Lowe A.R., Gupta G.: New developments in affinity chromatography with potential application in the production of biopharmaceuticals, 2001. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 49: 561 - 574.

Mersmann A., Kind M.: Auslegungsgrundlagen von Kristallisatoren, 1985. *Chemie Ingenieur Technik* 57 (3): 190 - 200.

Reardon K., Scheper T.: Bioprocess analysis, *Encyclopaedia of Analytical Science*, Acad. Press Ltd., 1995. 358 - 365.

Riesen R.: „Industrielle Kristallisationsprozesse – Verfahrensoptimierung durch den Einsatz eines automatischen Laborreaktors“, 1999. Firmenschrift, Mettler-Toledo GmbH, Schwerzenbach, Schweiz.

Rudolph G.: Entwicklung und Einsatz inline-mikroskopischer Verfahren zur Beobachtung biotechnologischer Prozesse, 2007. Dissertation: Leibniz Universität Hannover.

Rudolph G., Brückerhoff T., Bluma A., Korb G., Scheper T.: Optische Inline-Messverfahren zur Zellzahl- und Zellgrößenbestimmung in der Bioprozesstechnik, 2007. Chemie Ingenieur Technik 79(1-2): 42 - 51.

Rudolph G., Lindner P., Gierse A., Bluma A., Martinez G., Hitzmann B., Scheper T.: Online Monitoring of Microcarrier Fibroblast Cultivations With In Situ Microscopy, 2008. Biotechnology and Bioengineering 99 (1): 136 - 145.

Scheper T., Gebauer A., Sauerbrei A., Niehoff A., Schügerl K.: Measurement of biological parameters during fermentation processes, 1984. Analytica Chimica Acta 163: 111 - 118.

Scheper T., Hitzmann B., Stärk E., Ulber R., Faurie R., Sosniza P., Reardon K.F.: Bioanalytics: detailed insight into bioprocesses, 1999. Analytica Chimica Acta 400: 121 - 143.

Schirg P., Wissler P.: Verfolgung und Optimierung der Kühlungskristallisation von Vitamin C mit einer Lasentec FBRM In-line-Partikelmesssonde, 2001. Chemie Ingenieur Technik 73 (4): 377 - 381.

Schmidt S., Havekost D., Kaiser K., Kauling J., Henzler H.J.: Crystallization for the Downstream Processing of Proteins, 2005. Engineering in Life Sciences 5 (3): 273 - 267.

Schneider, K. In-situ-Mikroskopie – Entwicklung und Einsatz eines Auflicht-Fluoreszenzensors zur Bestimmung der Zellkonzentration in Bioprocessen, 1995. Dissertation: Leibniz Universität Hannover.

Schöll J., Barret P.: Optimierung von Kristallisationsprozessen mittels In-situ Messtechnik, 2007. Kolloquium Prozessanalytik, 16 November 2007.

Schügerl K., Lorenz T., Lübbert A., Niehoff J., Scheper T., Schmidt W.: Pros and cons: on-line versus off-line analysis of fermentations, 1986. Trends in Biotechnology 4: 11 - 15.

Strachan C.J., Rades T., Gordon K.C., Rantanen J.: Raman Spectroscopy for quantitative analysis of pharmaceutical solids, 2007. Journal of Pharmacy and Pharmacology 59 (2): 179.

Suhr H., Speil P., Wehnert G., Storhas W.: In situ Mikroskopsonde und Messverfahren, 1991. Offenlegungsschrift: DE 40 32 002 A1 (Anmeldetag 09.10.1990).

Suhr H., Speil P., Wehnert G., Storhas W.: In situ Mikroskopsonde und Messverfahren, 1997. Patentschrift: DE 40 32 002 C2 (Anmeldetag 09.10.1990).

Suhr H., Wehnert G., Schneider K., Bittner C., Scholz T., Geissler P., Jähne B., Scheper T.: In-situ Microscopy For On-Line Characterization of Cell-Populations in Bioreactors, Including Cell-Concentration Measurements by Depth From Focus, 1995. *Biotechnology and Bioengineering* 47 (1): 106 - 116.

Walsh G.: Biopharmaceutical benchmarks 2006, 2006. *Nature Biotechnology* 24 (7): 769 - 778.

Wei N., You J., Friehs K., Flaschel E., Nattkemper T.W.: In situ dark field microscopy for on-line monitoring of yeast cultures, 2007a. *Biotechnology Letters* 29 (3): 373 - 378.

Wöhlk W., Hofmann G.: Bauarten von Kristallisatoren, 1985. *Chemie Ingenieur Technik* 57 (4): 318 - 327.

Wurm F.M.: Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells, 2004. *Nature Biotechnology* 22 (11): 1393 - 1398.

12. Anhang

12.1 Abkürzungsverzeichnis

[cd]	Candela
[d]	Tag
[g]	Gramm
[h]	Stunde
[L]	Liter
[μ L]	Mikroliter
[mL]	Milliliter
[mm]	Millimeter
[μ m]	Mikrometer
[μ m ²]	Quadratmikrometer
[nm]	Nanometer
[min]	Minute
[rpm]	rounds per minute
[s]	Sekunde
Abb.	Abbildung
ATR	attenuated total reflectance-fourier transform infrared
AU	Absorptionseinheit
B	Bildpixel
BHK	<i>baby hamster kidney</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
bidest.	bidestilliert
bmp	Dateinamen-Kennung einer Windows Bitmap-Datei
Bo	Bodensteinzahl
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCD	Charge Coupled Device
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
d	Durchmesser
d.h.	das heißt
DH	Durchlicht-Hellfeld
DIN	Deutsche Industrienorm
DLL	Dynamic Link Library
EMA	European Medicines Agency
EPDM	Ethylen-Propylen-Dien-Kautschuk
et al.	<i>et alli</i> / und andere
etc.	<i>et cetera</i> / und so weiter
evtl.	eventuell
exe	Dateinamen-Kennung einer ausführbaren Datei
FBRM	Focused Beam Reflectance Measurement
FDA	Food and Drug Administration
FTU	Formazine Turbidity Units
fps	Frames per second
G	Gesichtsfeld
H	horizontal
HSA	Humanes Serum Albumin

HEWI	Hen Egg White Lysozym
ISA	In-situ Analysis (Software)
ISC	In-situ Control (Software)
ISM	In-situ-Mikroskop
ISVM	In-situ Videomikroskop
k. A.	keine Angabe
Kap.	Kapitel
KGV	Kristallgrößenverteilung
Kl	Kantenlänge
Kond	Kondensor
LED	Light Emitting Device
LPMIS	Large Particle Microscopic Image System
M	molar
N	Kesselzahl
Nr.	Nummer
o.ä.	oder ähnliches
Obj	Objektiv
opt.	optisch
pl	Isoelektrischer Punkt
PIA	Particle Image Analyzer
PVM	Particle Vision & Measurement
R ²	Korrelationskoeffizient
ROI	Region of Interest
s.	siehe
S	Rührerdrehzahl
Tab.	Tabelle
txt	Dateinamen-Kennung einer Textdatei
u.a.	unter anderem
usw.	und so weiter
UV	ultraviolett
v/v	Volumen/Volumen
V	Vergößerungsfaktor
vgl.	vergleiche
W	Umfangsgeschwindigkeit
z. B.	Zum Beispiel
z. T.	zum Teil
λ	Wellenlänge

12.2 Verwendete Chemikalien und Materialien

12.2.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders benannt, von Fluka (Buchs, Schweiz) oder Sigma-Aldrich (Seelze, Deutschland) bezogen.

A-Alanin, $C_3H_7NO_2$

α -Chymotrypsin (EC 3.4.21.1)

4-Acetamidophenol, $C_8H_9NO_2$

Aceton, C_3H_6O

Acetylsalicylsäure, $C_9H_8O_4$

Alkalase[®] 2,4 L (EC 3.4.21.62) Novo Nordisk

2-Aminoethansulfonsäure (Taurin), $C_2H_7NO_3S$

Ammoniumacetat, $C_2H_7NO_2$

Ammoniumsulfat, $(NH_4)_2SO_4$

Cystein, $C_3H_7NO_2S$

1,4 Dioxan, $C_4H_8O_2$

Essigsäure, $C_2H_4O_2$

Esperase[®] (EC 3.4.21.62) Novo Nordisk

Ethanol, C_2H_6O

Glycin, $C_2H_5NO_2$

Insulin (Peptidhormon)

Kaliumnatriumtetrat Tetrahydrat, $C_4H_4O_6NaK \cdot 4 H_2O$

Kaliumnitrat, KNO_3

Kaliumphosphat, K_3PO_4

Kaliumsulfat, K_2SO_4

Kaliumthiocyanat KSCN

Kupfersulfat, $CuSO_4$

Lactose, $C_{12}H_{22}O_{11}$

Lipozym (EC 3.1.1.3) Novo Nordisk

Lysozym (EC 3.2.1.17)

2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES), $C_6H_{13}NO_4S$

Methanol, CH_4O

Natriumacetat-Trihydrat, $C_2H_3NaO_2 \cdot 3 H_2O$

Natriumcarbonat, Na_2CO_3
Natriumchlorid, NaCl
Natriumcitrat, $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$
Natriumhydrogencarbonat, NaHCO_3
Natriumhydroxid, NaOH
Natriumnitrat, NaNO_3
Natriumphosphat, Na_3PO_4
Ovalbumin
2-Propanol, $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$
Phosphorsäure, H_3PO_4
Polyethylenglycol (PEG), $\text{C}_{2n}\text{H}_{4n+2}\text{O}_{n+1}$
Proteinase K (EC 3.4.21.64)
Saccharose, $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$
Salzsäure, HCl
Savinase[®] (EC 3.4.21.62)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$
Zinksulfat Heptahydrat, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
Zitronensäure, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$

12.2.2 Materialien

Deckgläser, rund, Durchmesser 22 mm, VWR International GmbH, Darmstadt
Durchflussquarzglasküvette 1 mm, 1 cm, UV, VWR International GmbH, Darmstadt.
Einmalspritzen, Chirana-Premier Deutschland, Aachen.
Lösemittelfilter `Last Drop`, 2,5 μm , PTFE Filter, Tripod, Chromatographie Handel Müller GmbH, Fridolfing.
Optischer Kleber, Epo-Tek 353ND, Polytec PT, Waldbronn
Pipettenspitzen, Eppendorf AG, Hamburg
Schläuche (Silikon, Teflon), VWR, Darmstadt
Sterilfilter 0,2 μm Minisart, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Weicon Teflon Spray, P.H. Brauns, Eisen und Stahl GmbH & Co. KG, Hannover
Wellplatten (24, 96), VWR International GmbH, Darmstadt.

12.3 Verwendete Geräte

Analysenwaage Analytik AC 210S, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen.

CCD-Kamera Sony XCD-SX910CR, JenCam GmbH, Jena-Göschwitz.

CCD Kamera AVT Pike F-210C, Allied Vision Technologies GmbH, Stadtroda.

Kältethermostat RM6, mgw Lauda, Lauda-Königshofen.

Lichtmikroskop BH2, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg.

Lichtmikroskop Leitz DMRX, Leica Camera AG, Solms.

Leitfähigkeitsmessgerät inolab cond 730, WTW, Nova Analytics, Deutschland.

Leitfähigkeitselektrode Tetra Con 325, WTW, Nova Analytics, Deutschland.

pH-Elektrode InLab422, Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz.

pH-Meter, Metrohm, Filderstadt.

Photospektrometer Cary 50, Varian, Darmstadt.

Photospektrometer Genesys™ Serie 10, VWR International GmbH, Darmstadt.

Pipetten und Reaktionsgefäße, Eppendorf AG, Hamburg.

Pumpe IPC-N, Ismatec GmbH, Wertheim Mondfeld.

Rückwärtsstreulicht-Sensor InPro 8100/S/120, Mettler Toledo GmbH, Gießen

Steuereinheit Biostat B, Sartorius BBI Systems GmbH, Melsungen.

Temperatursensoren, Sartorius BBI Systems GmbH, Melsungen.

Thermostat Cary PCB-159, Varian, Darmstadt

Thermoschüttler, Eppendorf AG, Hamburg.

Titratoren, Mettler Toledo GmbH, Gießen

Trockenschrank, WTB Binder, Tuttlingen.

Trübungstransmitter Trb 8300, Mettler Toledo GmbH, Gießen

Vortex Mixer Raex top, Heidolph, Kelheim.

Wasseraufbereitungsanlage Arium 611, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen.

12.4 Verwendete Kalibrationsgeraden

12.4.1 Kalibration der Rührgeschwindigkeit (Prototyp B)

Die Steuerung der Rührgeschwindigkeit erfolgt über eine Biostat B-Einheit. Dabei wird der Antriebsmotor nicht direkt auf die Rührwelle, sondern separat auf einen Aufsatz gesetzt. Der Antrieb erfolgt indirekt über ein Übersetzungsrad (Verhältnis 1 : 7), das mit der Rührwelle des Reaktors verbunden ist. Für die Einstellung einer exakten Rührgeschwindigkeit wird eine Kalibration erstellt.

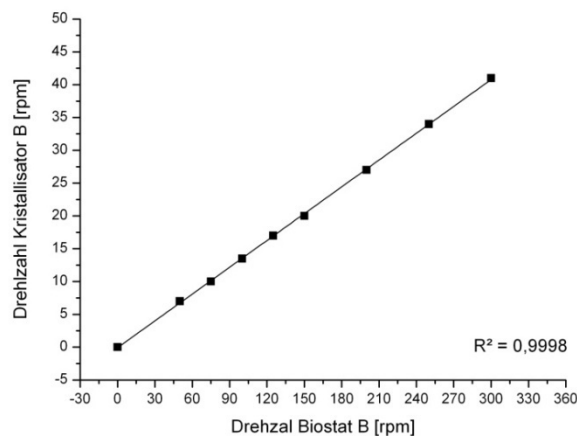


Abb. 60: Kalibrationsgerade zur Einstellung der Rührgeschwindigkeit [rpm] für den Prototypen B.

12.4.2 Spektroskopische Messungen

Die Bestimmung der Lysozymkonzentration in den batch-Experimenten ist durch UV-spektroskopische Messungen (Photospektrometer Genesys™, Serie 10; Photospektrometer Cary 50) erfolgt. Die Ermittlung der Absorption wird bei einer Wellenlänge von 260 nm, 270 nm und 280 nm durchgeführt. Dabei wird die Lösung über Filtersysteme (Last Drop, 2,5 µm) kontinuierlich durch eine Durchflussquarzglasküvette (1 mm, 1 cm) und zurück in das Reaktorsystem geleitet. In Abbildung 61 und 62 sind die verwendeten Kalibrationen dargestellt, die zur Berechnung der Lysozymkonzentration verwendet werden.

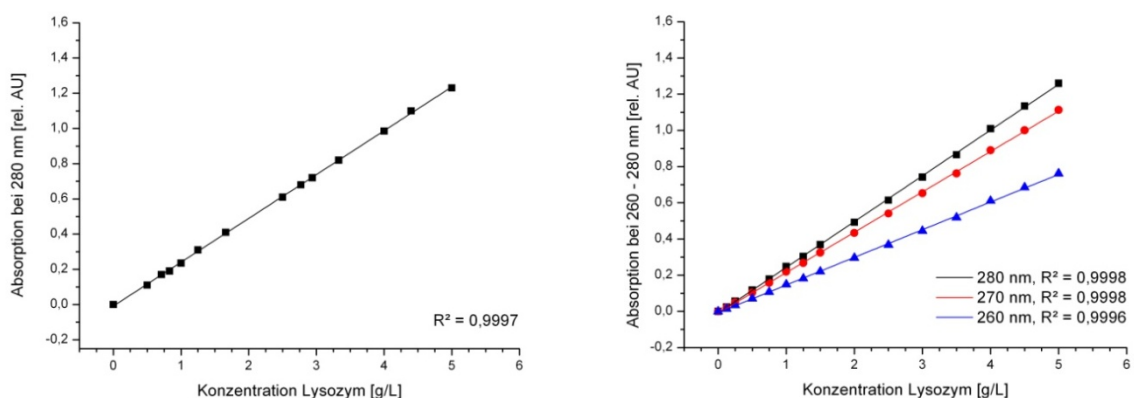


Abb. 61: Kalibrationsgeraden zur Bestimmung der Lysozymkonzentration in den batch-Experimenten (Prototyp A, Prototyp B).

Links: 1 mm Durchflussquarzglasküvette, Photospektrometer Genesys™, Serie 10.

Rechts: 1 mm Durchflussquarzglasküvette Photospektrometer Cary 50.

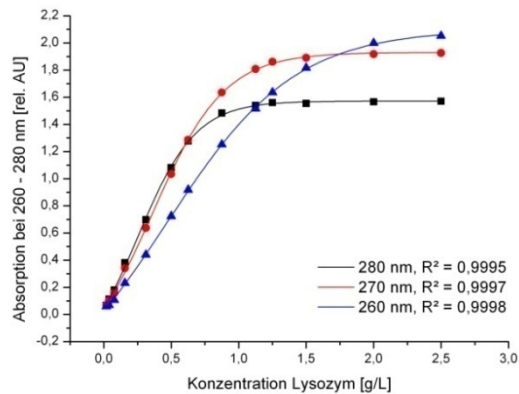


Abb. 62: Kalibrationsgeraden zur Bestimmung der Lysozymkonzentration in den batch-Experimenten. (50 mL Ansatz), 1 cm Durchflussquarzglaszuvette Photospektrometer Cary 50.

12.5 Reaktorcharakterisierung

12.5.1 Prototyp A

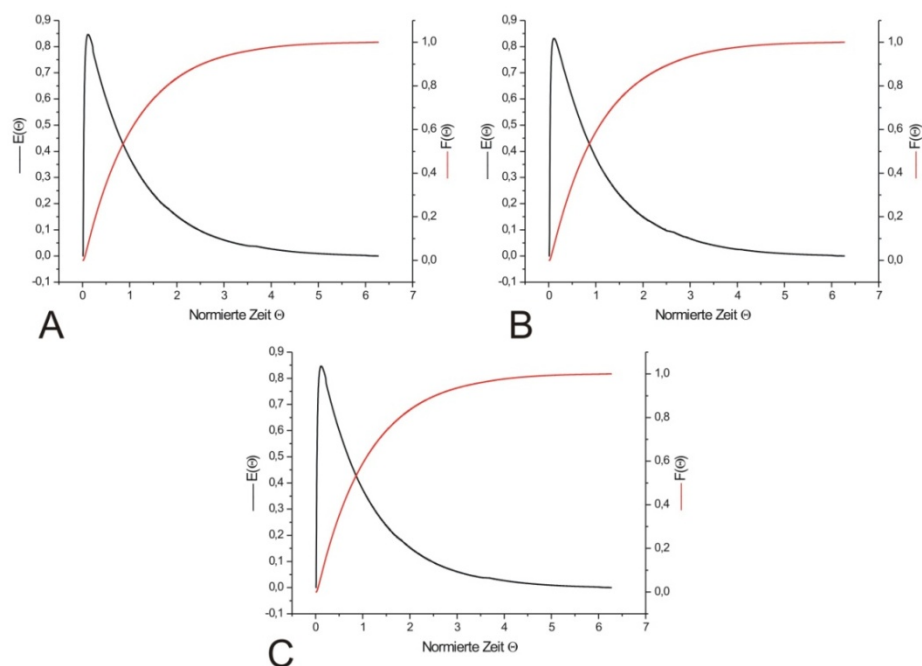


Abb. 63: Experimentell gemessene Verweilzeitdichtefunktion $E(\Theta)$ durch Zugabe eines Impulssignals sowie die theoretisch berechnete Verweilzeitsummenfunktion $F(\Theta)$.

A: 50 rpm, **B:** 80 rpm, **C:** 100 rpm

Als Tracer wird 1 mL einer 0,02 molaren Kaliumnitratlösung injiziert. Die Änderung der Leitfähigkeit wird mit der Leitfähigkeitselektrode Tetra Con 325 (Nova Analytics Deutschland GmbH und Co. KG, Weilheim) am Reaktorausgang gemessen. Der eingestellte Volumenstrom beträgt 0,17 mL/s.

12.5.2 Prototyp B

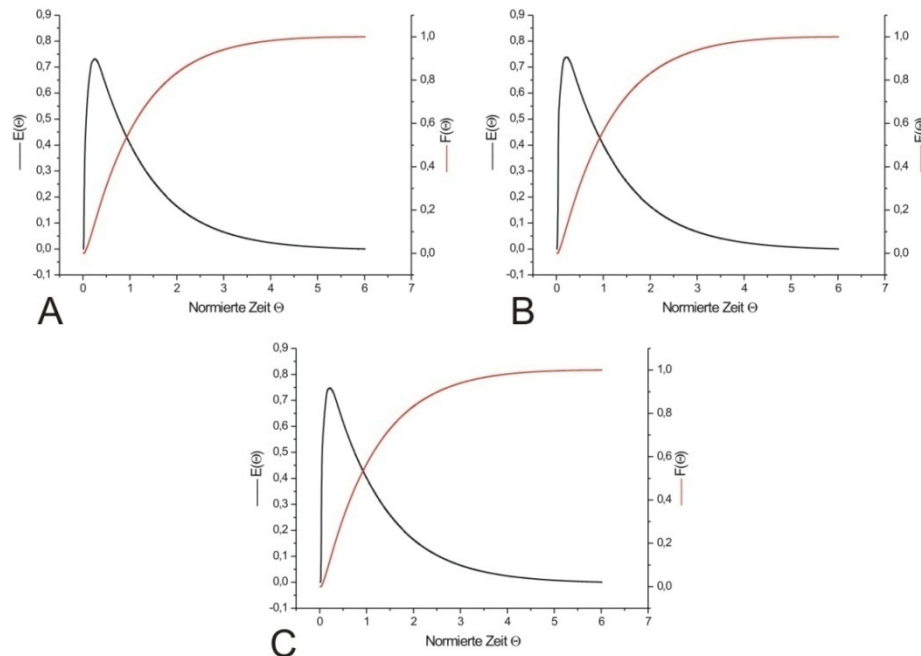


Abb. 64: Experimentell gemessene Verweilzeitdichtefunktion $E(\Theta)$ durch Zugabe eines Impulssignals sowie die theoretisch berechnete Verweilzeitsummenfunktion $F(\Theta)$.

A: 20 rpm, **B:** 30 rpm, **C:** 50 rpm

Als Tracer wird 1 mL einer 0,02 molaren Kaliumnitratlösung injiziert. Die Änderung der Leitfähigkeit wird mit der Leitfähigkeitselektrode Tetra Con 325 (Nova Analytics Deutschland GmbH und Co. KG, Weilheim) am Reaktorausgang gemessen. Der eingestellte Volumenstrom beträgt 0,17 mL/s.

12.6 Bildverarbeitungsparameter

12.6.1 In-situ Analysis-Modul *G. Project*

Bei dem Algorithmus *G. Project* sind folgende Standardschwellenwerte gesetzt:

Kantenverstärkungsfaktor	(Edge Enhance Factor)	0,7915
Unterer Hysterese Schwellenwert	(Hysteresis Threshold Lower)	20,6231
Oberer Hysterese Schwellenwert	(Hysteresis Threshold Upper)	116,642
Loch Eliminationstoleranz	(Hole Elimination Tolerance)	50
Objektgrößen Schwellenwert	(Object Size Threshold)	589

Clustergrößen Schwellenwert	(Cluster Size Threshold)	2000
Verhältnis von Pixel zu Mikrometer	(Pixel to Micrometer Ratio)	5,26
Objekttiefe	(Object Depth)	20

Schwellenwerte zur Auswertung der Experimente 006c: 0,8/30/125/k. A./k. A

Schwellenwerte zur Auswertung der Experimente 007c: 0,8/30/125/k. A./k. A

Schwellenwerte zur Auswertung der Experimente 008: 0,8/30/125/30/550

Schwellenwerte zur Auswertung der Experimente 009: 0,8/30/125/28/550

12.6.2 In-situ Analysis-Modul *Crystal*

Folgende Standardschwellenwerte sind bei dem Algorithmus gesetzt:

Pixelmenge Schwellenwert	(Pixel Amount Threshold)	5000
Sobel Schwellenwert	(Sobel Threshold)	30

Schwellenwerte zur Auswertung des Kristallisationsversuchs AB07: 2500/30

Schwellenwerte zur Auswertung des Kristallisationsversuchs AB08: 3500/30

Schwellenwerte zur Auswertung des Kristallisationsversuchs B07: 5000/30

Schwellenwerte zur Auswertung des Kristallisationsversuchs B12: 5000/30

Schwellenwerte zur Auswertung des Lösungsvorgangs L07: 5000/30

Schwellenwerte zur Auswertung des Lösungsvorgangs L12: 4800/30

12.6.3 In-situ Analysis-Modul *Crystal 2*

Der Algorithmus *Crystal 2* hat folgende Standardschwellenwerte:

Kantenverstärkungsfaktor	(Edge Enhance Factor)	0,5
Susan Schwellenwert	(Susan Schwellenwert)	15
Objektgrößen Schwellenwert	(Object Size Threshold)	3000
Grauwert-Differenz Schwellenwert	(Grey value Threshold)	150

Schwellenwerte zur Auswertung des Kristallisationsprozesses von Paracetamol® aus Ethanol: 0,5/15/250/160

Schwellenwerte zur Auswertung des Kristallisationsprozesses von Paracetamol® aus Isopropanol: 0,5/14/220/150

Schwellenwerte zur Auswertung des Kristallisationsprozesses von Paracetamol® aus bidest. Wasser: 0,5/15/200/170

Schwellenwerte zur Beschreibung der Kristallgrößenverteilung von Lactose: 0,5/15/300/160

12.7 Protokolle zur Kristallisation von Lysozym

Es werden relevante Parameter, die zu einer Kristallisation von Lysozym führen, vorgestellt. Alle Experimente werden bei Raumtemperatur ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) durchgeführt.

12.7.1 Lysozym (hexagonal)

Tab. 16: Kristallisationsparameter (hexagonal)

Reservoirlösung	Puffer	Lysozym-konzentration	pH-Wert	Elementarzelle	Dauer
NaNO ₃ (gesättigt) 5 % Aceton	0,30 M NaHCO ₃	30 mg/mL	8,4	hexagonal	2 d - 3 d
NaNO ₃ (gesättigt) 5 % Aceton	0,30 M NaHCO ₃	20 mg/mL	8,4	hexagonal	2 d - 3 d
NaNO ₃ (gesättigt) 10 % Aceton	0,30 M NaHCO ₃	15 mg/mL	8,4	hexagonal	2 d - 3 d

12.7.2 Lysozym (tetragonal)

Tab. 17: Kristallisationsparameter (tetragonal)

Reservoirlösung	Puffer	Lysozym-konzentration	pH-Wert	Elementarzelle	Dauer
0,5 - 2,1 M NaCl *	0,05 M NaAc	5 - 30 mg/mL **	4,0	tetragonal	1 d
0,5 - 2,1 M NaCl *	0,05 M NaAc	5 - 30 mg/mL **	4,5	tetragonal	1 d
0,5 - 2,1 M NaCl *	0,05 M NaAc	5 - 30 mg/mL **	5,0	tetragonal	1 d
0,5 - 2,1 M NaCl *	0,05 M NaAc	5 - 30 mg/mL **	5,5	tetragonal	1 d

* Konzentrationserhöhung der NaCl-Lösung in 0,2 M Schritten;

** Konzentrationserhöhung der Lysozym-Lösung in 0,5 mg/mL Schritten.

12.7.3 Lysozym (monoklin)

Tab. 18: Kristallisationsparameter (monoklin)

Reservoirlösung	Puffer	Lysozym-konzentration	pH-Wert	Elementarzelle	Dauer
1,0 M KSCN	0,05 M NaAc	10 - 30 mg/mL *	4,6	monklin	13 - 21 d
1,5 M KSCN	0,05 M NaAc	10 - 30 mg/mL *	4,6	monklin	4 - 5 d
2,0 M KSCN	0,05 M NaAc	10 - 30 mg/mL *	4,6	monklin	1 - 3 d

*Konzentrationserhöhung der Lysozym-Lösung in 0,5 mg/mL Schritten.

12.7.4 Lysozym (orthorhombisch)

Tab. 19: Kristallisationsparameter (orthorhombisch)

Reservoirlösung	Puffer	Lysozym-konzentration	pH-Wert	Elementarzelle	Dauer
0,88 M NaCl	dest. H ₂ O	30 mg/mL	9,9	orthorhombisch	1 d
0,88 M NaCl	dest. H ₂ O	10 - 15 mg/mL	9,9	orthorhombisch	5 d

12.7.5 Lysozym (triklin)

Tab. 20: Kristallisationsparameter (triklin)

Reservoirlösung	Puffer	Lysozym-konzentration	pH-Wert	Elementarzelle	Dauer
0,3 M NaNO ₃	0,05 M NaAc	15 - 20 mg/mL	4,5	triklin	1 - 3 d
0,25 M NaNO ₃	0,05 M NaAc	15 - 20 mg/mL	4,5	triklin	2 - 5 d

12.8 Aufbau der Kristallisationsreaktoren

12.8.1 Prototyp A

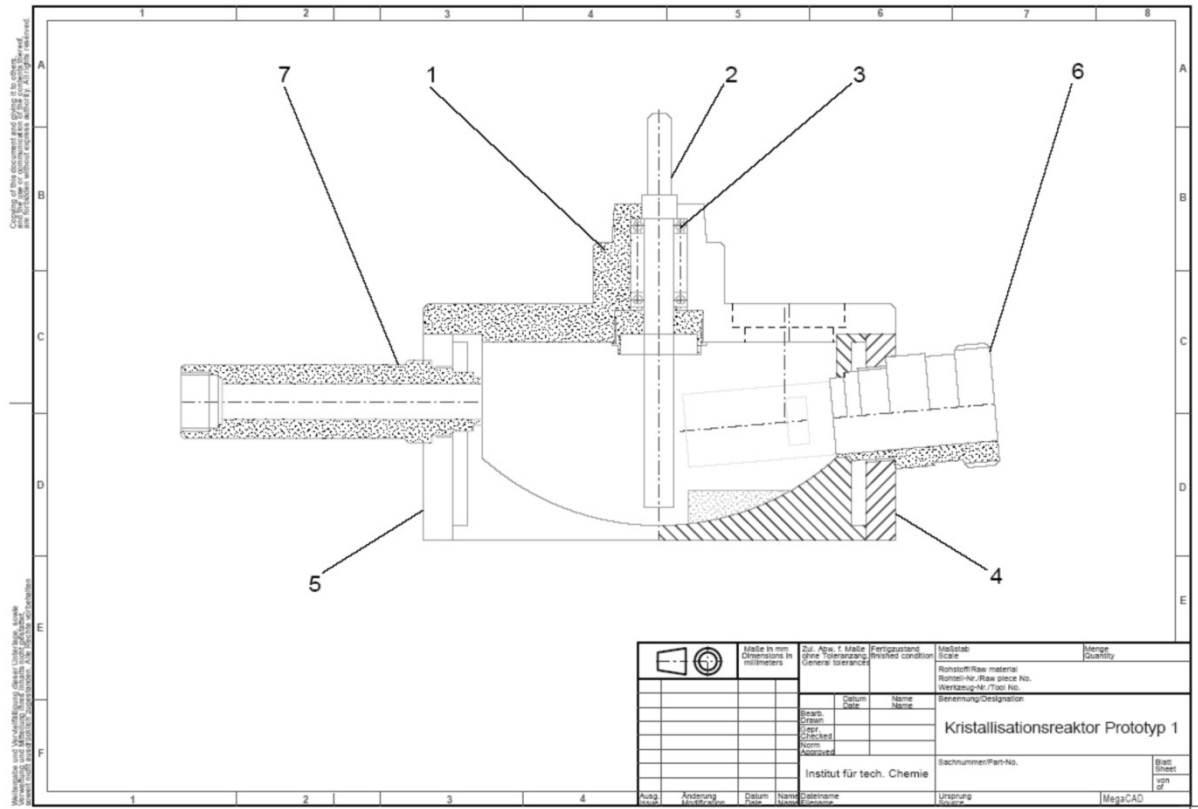


Abb. 65: Technische Zusammenbauzeichnung des Prototypen A.

- | | | |
|-----------------------------|---------------------|----------------------------|
| 1) Reaktordeckel | 2) Rührwelle | 3) Lager |
| 4) Innenmantel (Kühlmantel) | 5) Reaktoraußenwand | 6) 25 mm Seitenport (ISVM) |
| 7) 12,5 mm Seitenport | | |

12.8.2 Prototyp B

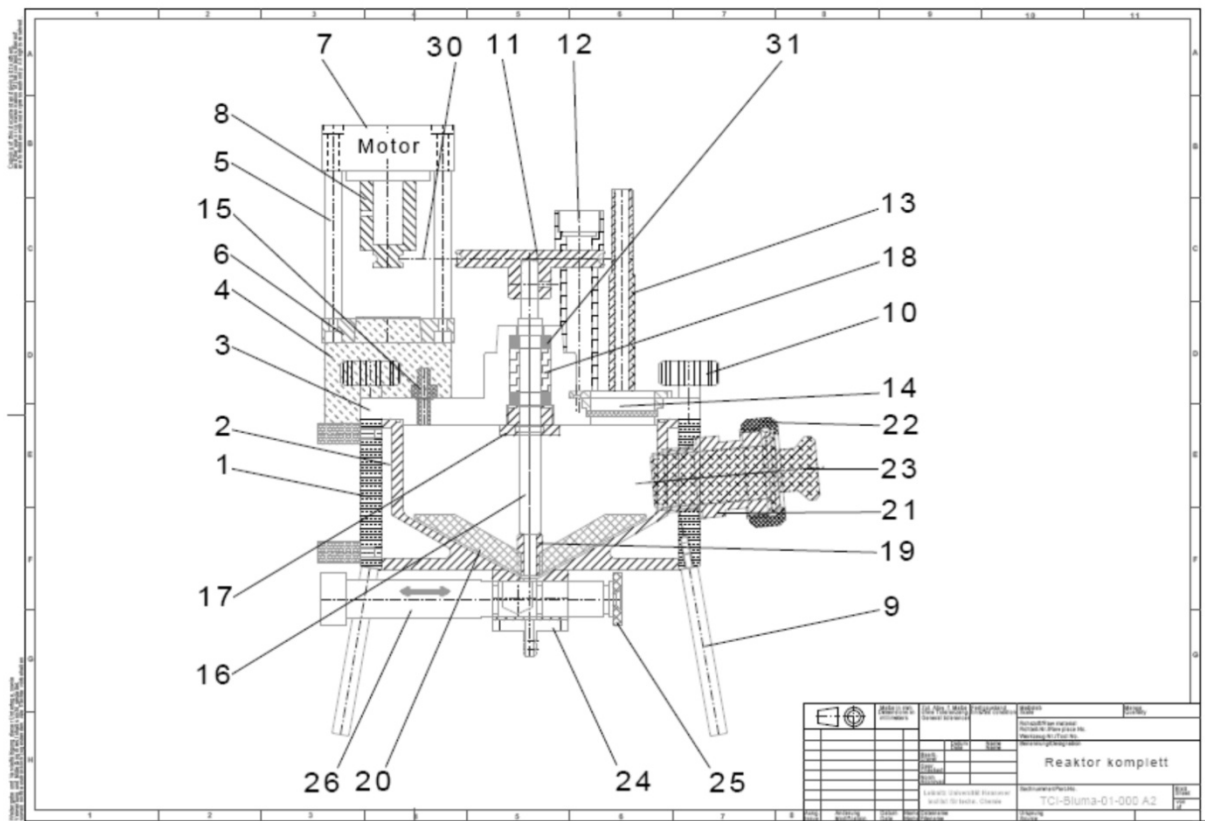


Abb. 66: Technische Zusammenbauzeichnung des Prototypen B.

- | | | |
|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| 1) Reaktoraußenwand | 10) Deckelschrauben | 19) Rührerhalterung |
| 2) Reaktorinnenwand | 11) Antriebsrad | 20) Rührer |
| 3) Deckel | 12) Führungsschiene | 21) 25 mm Port |
| 4) Motorhalterung | 13) 12,5 mm Port | 22) Überwurfmutter |
| 5) Motordistanzwelle | 14) Glasfenster | 23) Blindstutzen (25 mm) |
| 6) Halteplatte für den Motor | 15) Anschluss (Schlauchtülle) | 24) Auslauf (Probennahmemodul) |
| 7) Motor | 16) Rührwelle | 25) Sicherungsscheibe |
| 8) Adapter | 17) Lagerverschluss | 26) Probenahmemodulstutzen |
| 9) Reaktorfuß | 18) Distanzlager | 30) O-Ring (EPDM) |

Im weiteren Verlauf werden nicht alle Einzelkomponenten des Systems Prototyp B dargestellt, sondern nur ausgewählte Komponenten. Im Einzelnen sind das der Deckel (3), die Motorhalterung (4), das Antriebsrad (11), das Probenahmemodul (26) und der Auslaufstutzen des Probennahmemoduls (24).

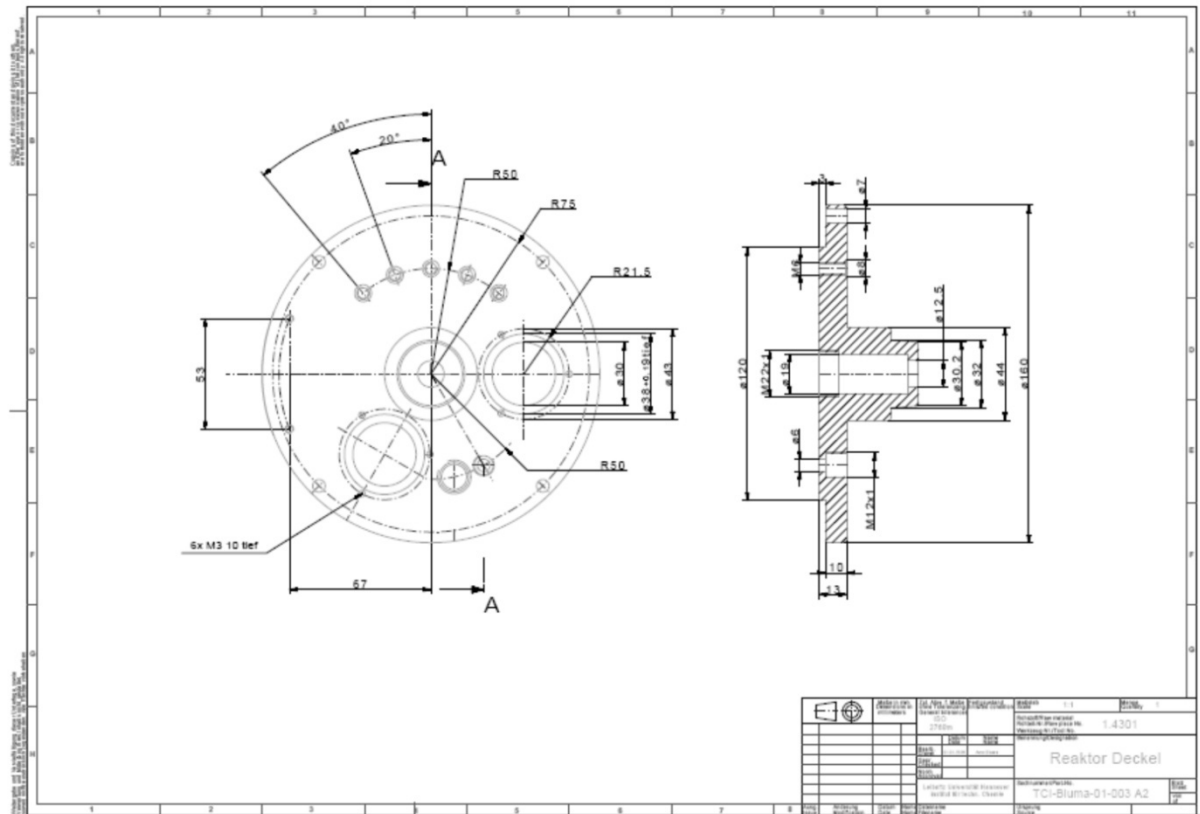


Abb. 67: Technische Zeichnung des Reaktordeckels inklusive Glasfenster und Schlauchtüllenanschlüsse.

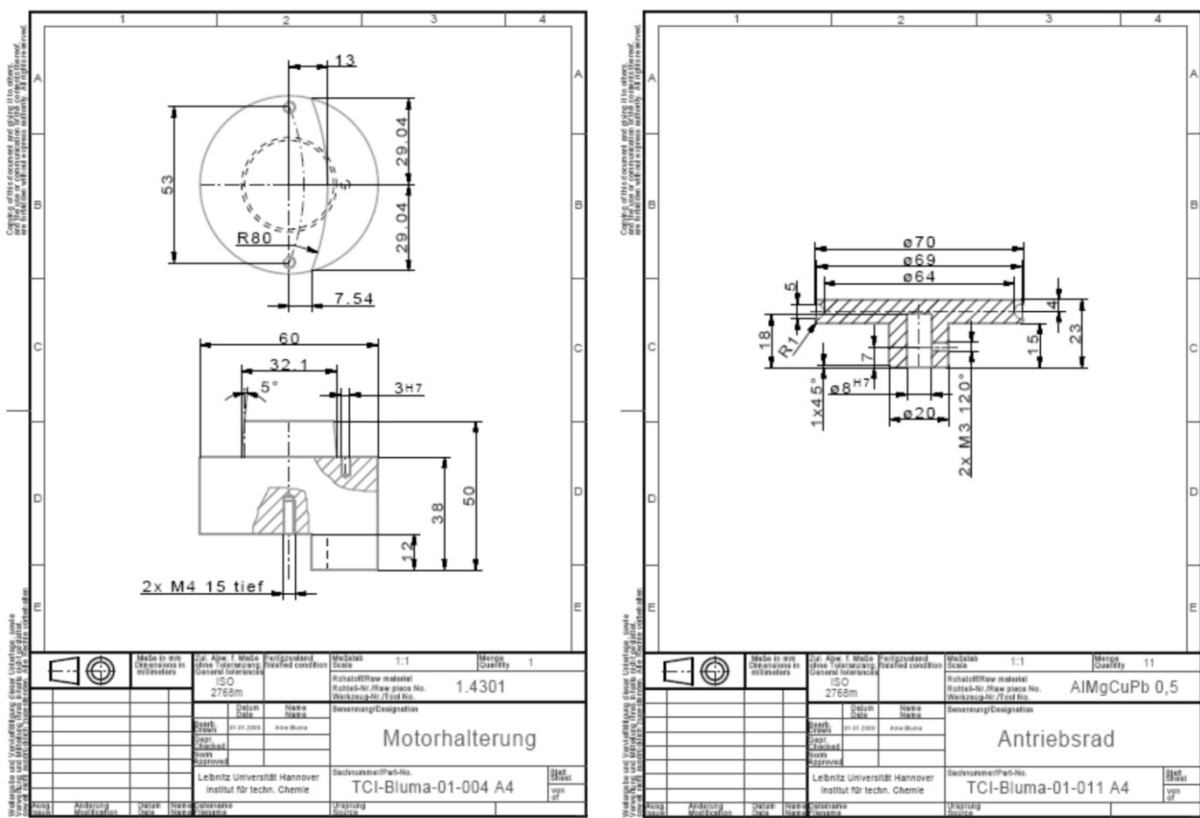


Abb. 68: Technische Zeichnung der Motorhalterung (links) und des Antriebsrads (rechts).

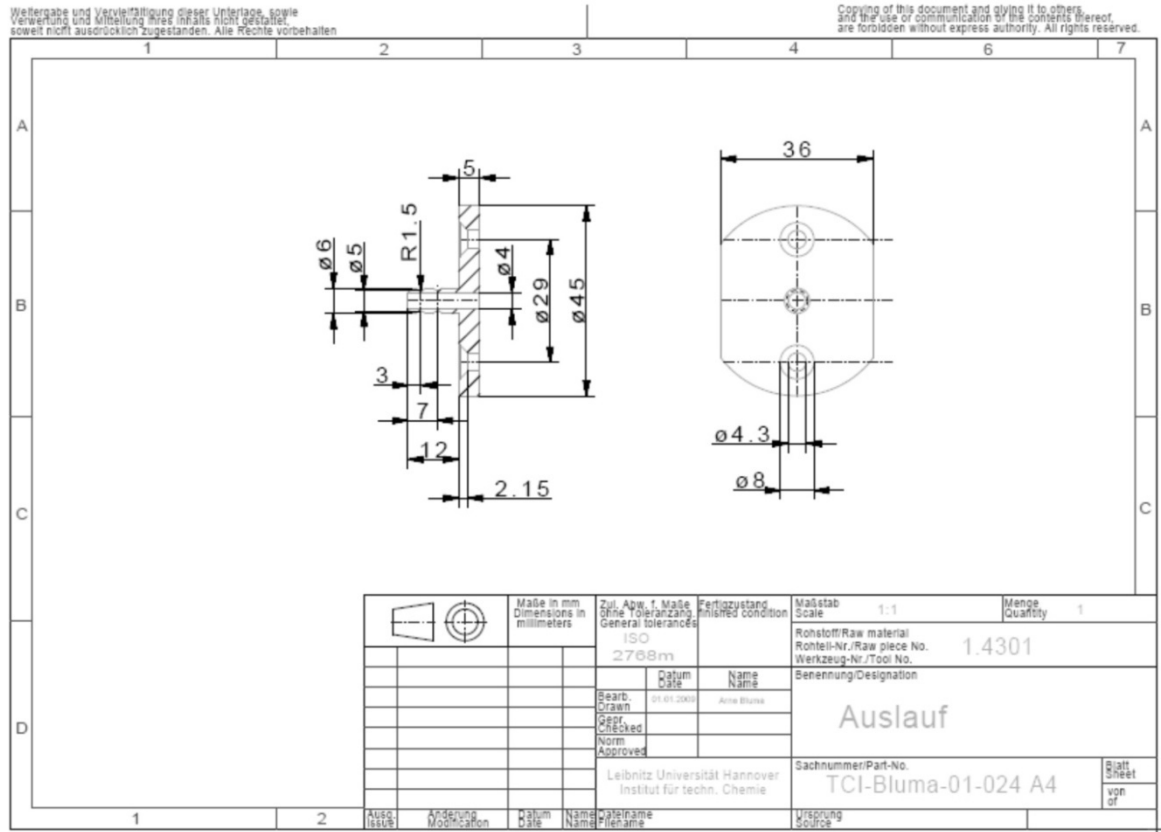


Abb. 69: Technische Zeichnung des Auslaufs des Probennahmemoduls.

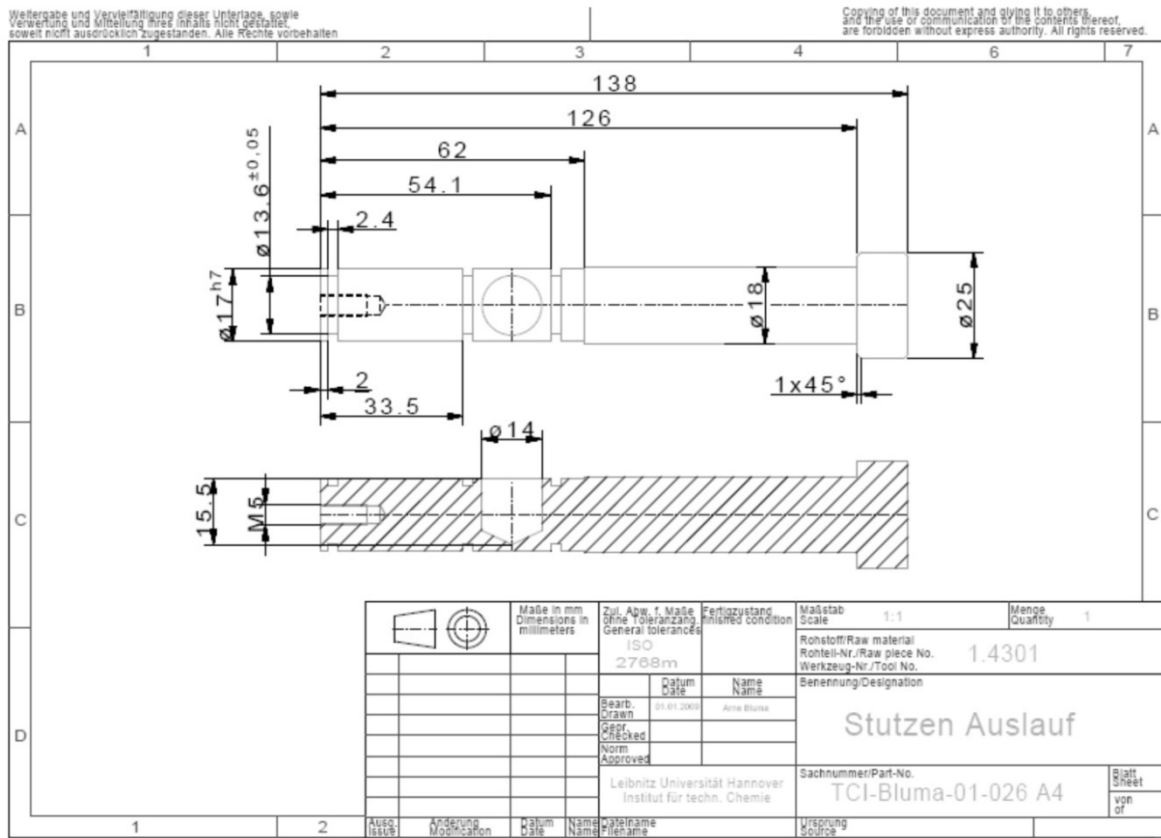


Abb. 70: Technische Zeichnung des Probennahmemoduls.

12.9 Lebenslauf

Persönliche Informationen

Name:	Arne Bluma
Geburtsdatum:	6. September 1979
Geburtsort:	Hannover
Adresse:	Ifflandstr. 37, 30169 Hannover, Tel.: 0511-6421561 E-Mail: ArneBluma@web.de
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

Schulbildung

1986 – 1990	Grundschule, Barnten
1990 – 1997	Gymnasium Josephinum, Hildesheim
1997 – 1999	Scharnhorstgymnasium, Hildesheim Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

Nov 2000 – Jan 2006	Chemiestudium an der Universität Hannover, Schwerpunkt Technische Chemie
Juni 2005 – Jan 2006	Diplomarbeit „Überwachung und Validierung von biotechnologischen Prozessen mit neuen Bildverarbeitungstools der In-situ Mikroskopie“ unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper
Seit März 2006	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Technische Chemie der Leibniz-Universität Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper

Qualifikationen

Sprachen	Deutsch, Englisch
EDV-Kenntnisse	MS Office, Origin, Chem Office, Adobe Photoshop, Corel Draw,
Zertifikate	1) Theoretische und praktische Aspekte des Marketing für biotechnologische Produkte und Märkte 2) Verfahrenstechnische und betriebswirtschaftliche Grundlagen biotechnologischer Prozesse

12.9.1 Publikationsliste

- [1] Rudolph G., Lindner P., Gierse A., Bluma A., Martinez G., Hitzmann B., Scheper T. 2008. Online Monitoring of Microcarrier Based Fibroblast Cultivations with In-situ Microscopy. *Biotechnology and Bioengineering* 99(1): 136 - 145.
- [2] Rudolph G., Brückerhoff T., Bluma A., Korb G., Scheper T. 2007. Optische Inline-Messverfahren zur Zellzahl- und Zellgrößenbestimmung in der Bioprozesstechnik. *Chemie Ingenieur Technik* 79(1-2): 42 - 51.
- [3] Rudolph G., Lindner P., Gierse A., Bluma A., Hitzmann B., Scheper T. 2007. Einsatz der In-situ Mikroskopie in Zellkultur und im Downstream Processing. *Chemie Ingenieur Technik* 78(9): 1375 - 1376 (Tagungsband GVC/DECHEMA-Jahrestagungen 2006).
- [4] Bluma A., Rudolph G., Behr L., Glindkamp A., Scheper T. 2006. Optische Bioprozessmesstechnik: In-situ Mikroskopie und 2D-Fluoreszenzspektroskopie. In: Niedersächsisches Ministerium für Wissenschaft und Kultur (Hrsg.) *Optische Technologien aus niedersächsischen Hochschulen – Innovation für die Wirtschaft* (Informationsbroschüre).
- [5] Rudolph G., Lindner P., Gierse A., Bluma A., Martinez G., Hitzmann B., Scheper T. 2006. Use of In-situ Microscopy in Mammalian Cell Cultivation and Downstream Processing. *GVC/DECHEMA Jahrestagungen*, 26. – 28., Wiesbaden (Vortrag).
- [6] Bluma A., Behr L., Rudolph G., Scheper T., Hitzmann B.. 2007. Online Sensor Systems, Applications for In-situ Microscopy and Fluorescence Spectroscopy for Process Analysis. Universität Bielefeld, 09. Februar (Vortrag).
- [7] Scheper T., Glindkamp A., Riechers D., Hitzmann B., Rudolph G., Bluma A., Anton F., Behr L. 2007. Disposable Sensors: Status quo and Development Trends. *Biotech*, 15. May – 16. May Hochschule Wädenswil, Schweiz (Vortrag).
- [8] A. Bluma, T. Höpfner, P. Lindner, G. Rudolph, S. Beutel, B. Hitzmann, G. Martinez, R. Baumfalk and T. Scheper. 2008. In-situ Video Microscopy for inline Monitoring of Crystallization Processes. 4th international Congress on Biocatalysis. 31. August – 04. September, Hamburg (Vortrag).

-
- [9] A. Bluma, T. Höpfner, P. Lindner, G. Rudolph, S. Beutel, B. Hitzmann, G. Martinez, and T. Scheper. 2008. Inline Monitoring of Crystallization Processes with In-situ Video Microscopy. European BioPerspectives. 07. Oktober. – 09. Oktober, Hannover (Vortrag).
- [10] Bluma A., Rudolph G., Lindner P., Höpfner T., Beutel S., Hitzmann B., Martinez G., Scheper T. 2007. Monitoring of Crystallisation Processes with In-situ Microscopy. European BioPerspectives, 30. Mai – 1. Juni, Köln (Poster).
- [11] Bluma A., Rudolph G., Gierse A., Lindner P., Hitzmann B., Scheper T. 2006. New Applications for In-situ Microscopy: Inline Monitoring of Cultivations and Crystallisation Processes. Cell Culture Engineering X (ECI 2006), 23. – 28. April, Whistler, BC, Kanada (Poster).
- [12] Rehbock C., Rudolph G., Bluma A., Beutel S., Scheper T. 2007. Design of a flow microscope with FIA based sampling for monitoring of cell parameters in shake flask fermentations. European BioPerspectives, 30. Mai – 1. Juni, Köln (Poster).
- [13] T. Höpfner, A. Bluma, P. Lindner, C. Rehbock, G. Rudolph, S. Beutel, B. Hitzmann, T. Scheper. 2008. Viability-Analysis of Human Leukemia-Cell Cultivations with In-situ Microscopy. European BioPerspectives. 07. Oktober – 09. Oktober, Hannover (Poster).