

Michael Berg

**Mikroreaktorentwicklung und  
-charakterisierung zur Erschließung  
physikalisch-chemischer Parameter  
in der Proteinkristallisation**



Dissertation, Universität Karlsruhe (TH), Fakultät für Chemieingenieurwesen  
und Verfahrenstechnik, 2004

### **Impressum**

Universitätsverlag Karlsruhe  
c/o Universitätsbibliothek  
Straße am Forum 2  
D-76131 Karlsruhe

[www.uvka.de](http://www.uvka.de)

© Universitätsverlag Karlsruhe 2004  
Print on Demand

ISBN 3-937300-22-8

# **Mikroreaktorentwicklung und -charakterisierung zur Erschließung physikalisch-chemischer Parameter in der Proteinkristallisation**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.)  
an der Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik  
der Universität Karlsruhe (TH)  
genehmigte

Dissertation  
von  
Dipl.-Ing. Michael Berg, MBE  
geb. in Pirmasens

Tag des Kolloquiums: 15.Juli 2004  
Referent: Prof. Dr.-Ing. Clemens Posten  
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. J. Michael Köhler

## **Vorwort**

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Zeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Physikalische Hochtechnologie e.V., Jena (IPHT) und Institut für Mechanische Verfahrenstechnik und Mechanik (MVM) der Universität Karlsruhe (TH). Sie wurde zu großen Teilen im Rahmen des Verbundprojektes „Jena BioCrystallogensis Centre“ vom Land Thüringen (TMWFK) gefördert. Die Entwicklung und Charakterisierung der Mikroreaktoren erfolgte hierbei am IPHT, die Arbeiten zur Proteinkristallisation fanden am Institut für Molekulare Biotechnologie e.V., Jena (IMB) statt.

Mein Dank gilt meinem Erstgutachter und langjährigen Begleiter Prof. Dr.-Ing. Clemens Posten, Leiter der Bioverfahrenstechnik am MVM, für den Freiraum bei Themenwahl und Ausarbeitung. Ebenso bedanke ich mich bei Prof. Dr. J. Michael Köhler, Leiter der Mikroreaktionstechnik am Institut für Physik der Technischen Universität Ilmenau, für die Übernahme des Coreferates und den nie versiegenden Strom an wertvollen Anregungen in jeder Projektphase.

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Projektleiter Dr. Günter Mayer. Seine kontinuierliche Unterstützung war mir ein starker fachlicher und persönlicher Rückhalt. Dr. Helmut Dintner, Bereichsleiter Mikrosysteme, und Dr. Wolfgang Fritzsche, Abteilungsleiter Biotechnische Mikrosysteme, danke ich für das hervorragende Arbeitsklima. Durch die außergewöhnliche fachliche Heterogenität kamen Impulse aus unterschiedlichsten Wissenschaftsdisziplinen. Meinen Kolleginnen und Kollegen am IPHT danke ich für die angenehme und konstruktive Zusammenarbeit. Hervorheben möchte ich Dr. Thomas Henkel für viele motivierende Gespräche sowie praktische Tipps und Hilfen sowie Matthias Urban, Mark Kielpinski, Dr. Jörg Reichert, Dr. Ulrich Dillner, Dr. Ernst Kessler und Benita Göbel. Ein Dankeschön gilt der Reinraum-Crew um Wolfgang Morgenroth und Dr. Albrecht Lerm. Ganz herzlich danke ich meinen studentischen Projektarbeitern Hendrik Schramm, Dirk Wenzel, Christian Seiler, Michaela Kramer und Céline Waegell für ihre engagierte Mitarbeit.

Den Projektpartnern am IMB der Abteilung Strukturbiologie und Kristallographie um Prof. Dr. Rolf Hilgenfeld danke ich für die initiierenden Gespräche und enge Kooperation. Besonders bedanke ich mich bei Herrn Peter Mühlig, Dr. Thomas Klupsch, Dr. Axel Walter, Dr. Jeroen Mesters und Silke Schulz für die theoretische und praktische Einführung in die Welt der Proteinkristallisation. Sebastian Kaufhold vom Institut für Bioprocess- und Analysenmesstechnik e.V., Heiligenstadt (IBA) sei für die geduldige Ausarbeitung der CFD-Simulationen gedankt. Dr. Mike Günther und Jörg Wagner von der TU Ilmenau danke ich für die Verweilzeitexperimente. An dieser Stelle ein großes Dankeschön an Anette Berg, Dr. Günter Mayer und Dr. Gerd Ebert für die kritische Durchsicht der Arbeit.

Meinen Eltern, meiner Schwester Beatrice und meinen engsten Freunden und Verwandten danke ich für ihre Begleitung. Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Anette. Ohne ihren Rückhalt, die stetige Ermutigung und den liebevollen Zuspruch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Die Freude auf unsere Tochter Florence war dabei eine besondere Quelle der Motivation und Kraft.

Für meine beiden Mädels.

Jena im August 2004

Michael Berg

## Zusammenfassung

Inhalt dieser Arbeit ist die Entwicklung und Charakterisierung von Mikroreaktoren für die Kristallisation biologischer Makromoleküle, einem der Schlüsselprozesse in der aktuellen biotechnischen Forschung. Hauptziele waren die Bereitstellung neuartiger Technologieplattformen als kompakte wiederverwendbare Mikroreaktoren, deren physikalische und verfahrenstechnische Charakterisierung sowie die Überprüfung, inwieweit sich mikrostrukturierte Komponenten für den Einsatz in der Biokristallisation eignen. Die Entwicklung wurde hierbei in zwei Arbeitsabschnitte unterteilt: I) *Batch-Mikroreaktor* zur temperaturkontrollierten Kristallisation im Batch-Betrieb; II) *Fluss-Mikroreaktor* zur temperatur- und konvektionskontrollierten Kristallisation im kontinuierlichen Betrieb. Die thermische Charakterisierung der Mikroreaktoren umfasste die Analyse der Temperaturfelder und Erfassung dynamischer Parameter mithilfe von Pt-Dünnschichtsensoren und thermografischen Messungen. Die fluidischen Parameter wurden in Messungen zum Druckverlust, zur Verweilzeit- und Geschwindigkeitsverteilung ermittelt. 3D-FEM- bzw. CFD-Rechnungen dienten im Zuge der Designoptimierung zur Variantenstudie und Analyse experimentell unzugänglicher Bereiche. Experimente und Simulationen wurde anhand analytischer 1D-Modelle validiert. Untersuchungen zum temperaturkontrollierten Kristallwachstum von Modellproteinen zielten auf die Evaluierung des Mikroreaktorkonzepts und dessen Charakterisierung ab.

Ein Ergebnis der Arbeit ist der Prototyp eines voll funktionsfähigen *Batch-Mikroreaktors* auf der Basis von Silizium-Mikrosystemtechnik und Dünnschichttechnologie zur temperaturkontrollierten Kristallisation kleiner Proteinmengen. Weiterhin gelang es durch Integration (mikro-) fluidischer Strukturen, das Mikroreaktorkonzept für den kontinuierlichen Betrieb zum *Fluss-Mikroreaktor* zu erweitern. Die Mikroreaktorsysteme erfüllen die thermischen und fluidischen Anforderungen der Biokristallisation. Die Temperierung ist im Bereich  $\vartheta = 5^{\circ}\text{C} \dots 50^{\circ}\text{C}$  exakt ( $\Delta T < \pm 0,1 \text{ K}$ ) und langzeitstabil (mehrere Tage). Die Einschwingzeiten ( $\tau < 10 \text{ s}$ ) und Temperierraten ( $dT/dt > \pm 3 \text{ s}$ ) erlauben Studien mit dynamischen Temperaturprotokollen. Im gesamten Flusssystem liegen laminare Bedingungen vor. Verweilzeitverhalten und Druckverlust ( $\Delta p \approx 100 \text{ mbar}$ ) des Mikroreaktors werden dominiert durch die fluidische Peripherie. Im Chipreaktor als dem eigentlichen Reaktionsraum herrschen homogene Strömungsverhältnisse ohne Totvolumina und Rückströmungen. Erste Untersuchungen zur Proteinkristallisation im Batch-Mikroreaktor zeigen, dass die Mikroreaktoren unmittelbar einsetzbar sind. Der Einfluss der Temperatur als sensibler Parameter in der Proteinkristallisation konnte mithilfe verschiedener Temperaturprotokolle nachgewiesen werden. Die Kristallqualität reicht an die am weitesten verbreitete Standardmethode, die Dampfdiffusion „Hängender Tropfen“, heran. Durch ihre homogenen und gut zu charakterisierenden fluidischen und thermischen Betriebsparameter eignen sich die Mikroreaktoren hervorragend als Sekundärverfahren im Parameterscreening sowie für physiko-chemische Untersuchungen der Kristallogenese zur Erstellung von Phasendiagrammen. In Perspektive bedeutet die Integration weiterer fluidischer und analytischer Komponenten eine beträchtliche Erweiterung des Parameterraums und eröffnet neue Möglichkeiten zur *in situ*-Analyse physiko-chemischer Prozesse.

|  |           |
|--|-----------|
| <b>0. Inhaltsverzeichnis .....</b>   | <b>I</b>  |
| Verwendete Formelzeichen und Abkürzungen .....   | III       |
| <b>1. Einleitung .....</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1. Wissenschaftliche Einordnung der Arbeit .....   | 1         |
| 1.1.1. Methodik in der Kristallisation biologischer Makromoleküle .....                    | 3         |
| A) Besonderheiten der Kristallisation biologischer Makromoleküle .....                     | 4         |
| B) Thermodynamische Aspekte .....  | 7         |
| C) Kinetische Aspekte .....  | 9         |
| 1.1.2. Mikroreaktionstechnik für Chemie und Life Sciences .....                            | 11        |
| A) Charakterisierung von Mikroreaktoren .....  | 13        |
| B) Werkstoffe und Herstellungsverfahren für Mikroreaktoren .....                           | 16        |
| C) Anwendungsfelder .....  | 19        |
| 1.2. Aufgabenstellung und Lösungsansatz .....  | 24        |
| <b>2. Verwendete Verfahren und Charakterisierungsmethoden .....</b>                        | <b>27</b> |
| 2.1. Konstruktive Anforderungen und Vorüberlegungen zur Entwicklung der Chipreaktoren .... | 27        |
| 2.2. Präparationstechnologien .....  | 32        |
| 2.2.1. Mikrosystemtechnik .....  | 33        |
| A) Lithografische Verfahren .....  | 35        |
| B) Dünnschichttechnologie und Dimensionierung der Transducer .....                         | 36        |
| C) Trocken- und Nassätztechniken .....   | 38        |
| 2.2.2. Mikromaterialbearbeitung .....  | 40        |
| 2.2.3. Aufbau- und Verbindungstechnik .....  | 41        |
| A) Elektrische Kontaktierung .....   | 41        |
| B) Thermische und mechanische Kopplung .....   | 42        |
| C) Fluidische Komponenten .....  | 42        |
| 2.3. Temperierung .....  | 43        |
| 2.3.1. Interne Komponenten: Dünnschichttransducer .....                                    | 43        |
| 2.3.2. Externe Komponenten: PELTIER-Element, Kapillarheizung und Kompaktofen .....         | 46        |
| 2.3.3. Temperaturregelung .....  | 48        |
| 2.4. Oberflächentechnologie .....  | 50        |
| 2.4.1. Chemische Modifikation zur Einstellung des Benetzungsverhaltens .....               | 50        |
| 2.4.2. Aufbau und Präparation der Deckelung .....  | 51        |
| A) Deckelung des Batch-Mikroreaktors .....   | 51        |
| B) Deckelung des Fluss-Mikroreaktors .....   | 52        |
| 2.5. Charakterisierungsmethoden .....  | 54        |
| 2.5.1. Thermisches Verhalten .....   | 54        |
| A) Analytische 1D-Modelle .....  | 55        |
| B) Numerische 3D-FEM-Simulationen .....  | 58        |
| C) Experimente .....   | 61        |
| 2.5.2. Fluidisches Verhalten .....   | 65        |
| A) Analytische Modell zu Druckverlust, Strömungsprofil und Verweilzeitverhalten ...        | 66        |
| B) Numerische 3D-FEM-Simulationen der Strömungsfelder .....                                | 72        |
| C) Experimente zu Druckverlust, 3D-Strömungsprofil, Verweilzeitverhalten .....             | 73        |
| 2.5.3. Oberflächentechnologie .....  | 79        |
| A) Verfahren und Geräte zur Oberflächeninspektion .....                                    | 79        |
| B) Regeneration der Oberflächen des Batch-Mikroreaktors .....                              | 79        |
| 2.5.4. Temperaturkontrollierte Proteinkristallisation in Mikroreaktoren .....              | 80        |
| A) Temperaturprotokolle .....  | 81        |
| B) Modellproteine .....  | 81        |
| C) Screening-Experimente .....   | 82        |
| D) Physiko-chemische Untersuchungen .....  | 84        |

|   |            |
|---|------------|
| <b>3. Entwicklung und Charakterisierung der Mikroreaktoren .....</b>                      | <b>86</b>  |
| 3.1. Entwicklung des Batch-Mikroreaktors .....  | 86         |
| 3.1.1. Mikrostrukturierung – Weiterentwicklung des PCR-Chips .....                        | 86         |
| 3.1.2. Realisierung der Batch-Mikroreaktoren .....  | 87         |
| A) Temperierung .....   | 87         |
| B) Deckelung .....  | 88         |
| C) Aufbau Gesamtsystem .....  | 89         |
| 3.2. Charakterisierung des Batch-Mikroreaktors .....                                      | 89         |
| 3.2.1. Thermisches Verhalten .....  | 89         |
| A) Langzeitstabilität und Genauigkeit .....   | 89         |
| B) Thermografie und 3D-FEM-Simulation .....   | 90         |
| C) Laterale Temperaturprofile .....   | 91         |
| D) Vertikale Temperaturprofile .....  | 93         |
| E) Dynamische Parameter .....   | 94         |
| 3.2.2. Reinigungsprozedur .....   | 95         |
| 3.3. Entwicklung des Fluss-Mikroreaktors .....  | 96         |
| 3.3.1. Mikrostrukturierung – Weiterentwicklung des Batch-Mikroreaktors .....              | 97         |
| A) Design der Mikrofluidstrukturen .....  | 97         |
| B) Design der aktiven thermischen Komponenten .....                                       | 99         |
| 3.3.2. Realisierung der Fluss –Mikroreaktoren .....                                       | 100        |
| A) Temperierung .....   | 100        |
| B) Deckelung .....  | 101        |
| C) Fluidischer Aufbau .....   | 102        |
| D) Aufbau Gesamtsystem .....  | 106        |
| 3.4. Charakterisierung des Fluss-Mikroreaktors .....                                      | 107        |
| 3.4.1. Druckverlustbestimmung – Befüllvorgang und Betrieb .....                           | 107        |
| 3.4.2. Strömungsprofile .....   | 109        |
| A) $\mu$ -PIV-Experiment und CFD-Simulation .....   | 109        |
| B) Bestimmung des optimalen Modells .....   | 111        |
| C) Einfluss des Kristallwachstums .....   | 116        |
| 3.4.3. Verweilzeituntersuchungen .....  | 117        |
| 3.4.4. Thermisches Verhalten .....  | 121        |
| A) Langzeitstabilität und Genauigkeit .....   | 121        |
| B) Thermografie und 3D-FEM-Simulation .....   | 121        |
| C) Laterale Temperaturprofile .....   | 122        |
| D) Vertikale Temperaturprofile .....  | 125        |
| E) Einfluss der Strömungsgeschwindigkeit .....  | 127        |
| F) Dynamische Parameter .....   | 128        |
| 3.5. Applikation – Temperaturkontrollierte Proteinkristallisation in Mikroreaktoren ..... | 129        |
| 3.5.1. Anwendung im Screening-Prozess .....   | 129        |
| A) Übertragbarkeit der Kristallisationsbedingungen .....                                  | 129        |
| B) Qualitätsuntersuchungen mittels Röntgenstrukturanalyse .....                           | 132        |
| 3.5.2. Anwendung in der physiko-chemischen Untersuchung .....                             | 134        |
| A) Wachstumscharakteristik Insulin .....  | 134        |
| B) Wachstumskinetik HEWL zur Erstellung von Phasendiagrammen .....                        | 135        |
| <b>4. Zusammenfassende Diskussion und Ausblick .....</b>                                  | <b>138</b> |
| 4.1. Batch-Mikroreaktor .....   | 139        |
| 4.2. Fluss-Mikroreaktor .....   | 140        |
| 4.3. Kristallisation von Modellproteinen .....  | 143        |
| 4.4. Ausblick .....   | 144        |
| <b>5. Literaturverzeichnis .....</b>  | <b>147</b> |
| <b>6. Verzeichnisse .....</b>   | <b>158</b> |
| 6.1. Abbildungen .....  | 158        |
| 6.2. Tabellen .....   | 162        |
| <b>7. Anhang .....</b>  | <b>163</b> |

## Verwendete Formelzeichen

| Symbol                                 | Einheit              | Bedeutung   |
|--|----------------------|---|
| A                                      | m <sup>2</sup>       | Fläche  |
| b                                      | m                    | Breite, hier: Strukturbreite  |
| c                                      | mol/m <sup>3</sup>   | molare Konzentration  |
| c ; c <sub>p</sub>                     | (W s)/(kg K)         | spezifische Wärmekapazität; c bei p = const                         |
| d                                      | m                    | Dicke   |
| d <sub>p</sub>                         | m                    | Partikeldurchmesser   |
| D                                      | m <sup>2</sup> /s    | Diffusionskoeffizient   |
| D <sub>ax</sub>                        | m <sup>2</sup> /s    | axiale Dispersion   |
| E(t)                                   | 1/s                  | Verweilzeitverteilung   |
| g                                      | m/s <sup>2</sup>     | Erdbeschleunigung   |
| GR                                     | m/s                  | Wachstumsrate ("growth rate")                                       |
| Δh <sub>sol</sub>                      | J/(mol K)            | spezifische Lösungsenthalpie  |
| J <sub>max</sub>                       | A/m <sup>2</sup>     | elektrische Stromdichte, maximal                                    |
| k <sub>ij</sub>                        | W/(m <sup>2</sup> K) | Wärmedurchgangskoeffizient von i → j                                |
| k <sub>ij</sub>                        | J/K                  | BOLTZMANN Konstante k = 1,381 10 <sup>-23</sup> J/K                 |
| l                                      | m                    | Länge   |
| l                                      | m                    | Kantenlänge von Kristallen  |
| L                                      | m                    | charakteristische Länge   |
| n <sub>□</sub>                         | 1                    | Anzahl der Quadratwiderstände                                       |
| p                                      | Pa                   | Druck   |
| P <sub>el</sub>                        | W                    | Leistung, elektrisch  |
| Q <sub>v</sub>                         | W/(m <sup>3</sup> s) | volumenbezogener Wärmestrom   |
| r                                      | m                    | Radius  |
| R                                      | Ω                    | Widerstand, elektrisch  |
| R <sub>□</sub>                         | Ω                    | Quadratwiderstand, elektrisch                                       |
| r <sub>etch</sub>                      | m/s                  | Ätzrate   |
| R <sub>th, ij</sub>                    | (m <sup>2</sup> K)/W | thermischer Widerstand  |
| s                                      | m                    | Längenkoordinate, hier: Proximityabstand                            |
| T                                      | K                    | absolute Temperatur   |
| ΔT                                     | K                    | Temperaturdifferenz   |
| ΔT <sub>lat</sub> ; ΔT <sub>vert</sub> | K                    | laterale, vertikale Temperaturdifferenz                             |
| t                                      | s                    | Zeit  |
| Δt                                     | s                    | Zeitintervall   |
| TK <sub>a</sub> <sup>b</sup>           | 1/K                  | Temperaturkoeffizient zwischen T <sub>a</sub> und T <sub>b</sub>    |
| t <sub>Regler</sub> ; t <sub>95</sub>  | s                    | Zeit, hier: Einschwingzeit der PID-Regelung; 95% des stat. Zustands |
| t <sub>illum</sub>                     | s                    | Illuminationszeit bei μ-PIV-Messungen                               |
| u                                      | m/s                  | Geschwindigkeitskomponente in i-Richtung                            |
| U                                      | V                    | Spannung  |
| V                                      | m <sup>3</sup>       | Volumen   |
| V <sub>tot</sub>                       | m <sup>3</sup>       | Totvolumen  |
| $\vec{w}_i$                            | m/s                  | Geschwindigkeitsvektor  |
| x                                      | m                    | Ortskoordinate x-Richtung (Länge)                                   |
| y                                      | m                    | Ortskoordinate y-Richtung (Breite)                                  |
| z                                      | m                    | Ortskoordinate z-Richtung (Höhe)                                    |



| <b>Symbol</b>                  | <b>Einheit</b>    | <b>Bedeutung</b>                                |
|--------------------------------|-------------------|---|
| $\alpha$                       | 1/K               | thermischer Längenausdehnungskoeffizient        |
| $\alpha$                       | 1/K               | Temperaturkoeffizient (Norm)                    |
| A                              | 1                 | Absorptionsgrad                                 |
| $\beta$                        | 1/K               | räumlicher (thermischer) Ausdehnungskoeffizient |
| $\chi$                         | 1/ $\Omega$       | elektrische Leitfähigkeit                       |
| $\varnothing_i; \varnothing_a$ | m                 | Innen-, Außendurchmesser                        |
| $\varepsilon$                  | 1                 | Fehler  |
| E                              | 1                 | Emissionsgrad                                   |
| $\kappa$                       | m <sup>2</sup> /s | Temperaturleitfähigkeit                         |
| $\lambda$                      | m                 | Wellenlänge                                     |
| $\lambda$                      | m                 | mittlere freie Weglänge                         |
| $\lambda$                      | W/(m K)           | Wärmeleitfähigkeit                              |
| $\mu$                          | Pa s              | dynamische Viskosität                           |
| $\nu$                          | m <sup>2</sup> /s | kinematische Viskosität                         |
| $\rho$                         | kg/m <sup>3</sup> | Dichte  |
| $\rho_{el}$                    | $\Omega$ m        | spezifischer Widerstand, elektrisch             |
| $\mathfrak{R}$                 | 1                 | Reflexionsgrad                                  |
| $\sigma^2$                     | s <sup>2</sup>    | Varianz (der Verweilzeitsummenfunktion)         |
| $\tau$                         | s                 | Zeitkonstante                                   |
| $\tau_{therm}$                 | s                 | thermische Relaxation                           |
| $\tau_{Verweil}$               | s                 | Verweilzeit                                     |
| $\tau_{Diff}$                  | s                 | Diffusionszeit                                  |
| $\vartheta$                    | °C                | Temperatur                                      |
| T                              | 1                 | Transmissionsgrad                               |

## Indizes

| <b>Indexsymbol</b> | <b>Bedeutung</b>                        |
|--------------------|---|
| a                  | außen                                   |
| Auflösung          | Auflösung (Auflösungstemperatur)        |
| ax                 | axial                                   |
| Diff               | Diffusion                               |
| el                 | elektrisch                              |
| em                 | Emission                                |
| etch               | Ätz (-rate)                             |
| exc                | Excitation, Anregung                    |
| ges                | gesamt                                  |
| h                  | hydraulisch (hydraulischer Durchmesser) |
| Halt               | Halt (Haltezeit)                        |
| i                  | innen                                   |
| i, j               | Laufvariablen                           |
| illum              | Illumination                            |
| lat                | lateral                                 |
| Linse              | Linse (Linsentemperatur)                |
| max                | maximal                                 |

| <b>Indextsymbol</b> | <b>Bedeutung</b>                       |
|---------------------|--|
| mess                | Messung, Mess (Messstrom o.ä.)         |
| min                 | minimal                                |
| RK                  | Reaktionskammer                        |
| sol                 | Solvatation, Lösung (Lösungsenthalpie) |
| soll                | Soll (Sollwert)                        |
| therm               | thermisch                              |
| tot                 | tot (Totvolumen)                       |
| V                   | Volumen                                |
| vert                | vertikal                               |
| Verweil             | Verweil (Verweilzeit)                  |
| Wachstum            | Wachstum (Wachstumstemperatur)         |

### Dimensionslose Kennzahlen

|    |  |                |
|----|--|----------------|
| Bo | $Bo = \frac{u \cdot L}{D_{ax}}$  | BODENSTEINZahl |
| Gr | $Gr = \frac{L^3 \cdot g \cdot \beta \cdot \Delta T}{\nu^2}$            | GRASHOFZahl    |
| Kn | $Kn = \frac{\lambda}{L}$   | KNUDSENZahl    |
| Pr | $Pr = \frac{\nu}{\kappa}$  | PRANDTLZahl    |
| Ra | $Ra = \frac{L^3 \cdot g \cdot \beta \cdot \Delta T}{\kappa \cdot \nu}$ | RAYLEIGHZahl   |
| Re | $Re = \frac{u \cdot L}{\nu}$   | REYNOLDSZahl   |

## Verwendete Abkürzungen

|                   |   |
|-------------------|---|
| 1D/ 3D            | eindimensional/ dreidimensional   |
| AD/DA             | Analog-Digital/Digital-Analog   |
| AFM               | Atomic Force Microscope bzw. Raster-Kraft-Mikroskop                                       |
| ASE               | Advanced Silicon Etching  |
| AVT               | Aufbau- und Verbindungstechnik  |
| BE                | Barrel Etching  |
| BMBF              | Bundesministerium für Bildung und Forschung   |
| Bsp.              | Beispiel  |
| CAD               | Computer Aided Design   |
| CAGR              | Cumulative (Average) Annual Growth Rate   |
| CAPS              | 3-cyclo-Hexamino-1-Propan-Sulfonsäure   |
| CE                | Capillary Electrophoresis   |
| CFD               | Computational Fluid Dynamics  |
| CLSM              | Confocal Laser Scanning Microscope  |
| CNC               | Computer Numerical Control  |
| CVD (LP~/PE~/LI~) | Chemical Vapor Deposition (Low Pressure~/ Plasma Enhanced~/ Laser Induced~)               |
| DC                | Direct Current  |
| DECHEMA           | Gesellschaft für Chemische Technik und Biotechnologie e.V. Frankfurt/M                    |
| DEMiS             | Demonstrationsprojekt zur Evaluierung der Mikroreaktionstechnik in industriellen Systemen |
| DLS/ SLS          | Dynamic/ Static Light Scattering  |
| DNA               | Desoxy-Ribonucleic Acid   |
| EBCI              | European Bio-Crystallogenes Initiative  |
| EDTA              | Ethylen-Diamino-tetra-Essigsäure  |
| EM                | Elektronenstrahl-Mikroskopie  |
| EOR               | Enforced OSTWALD Ripening   |
| EU-CORDIS         | European Union – Research and Development Information System                              |
| FEM               | Finite Element Method   |
| FITC              | Fluorescein-Isothiocyanat   |
| GUI               | Graphical User Interface  |
| HCS               | High-Content Screening  |
| HEWL              | Hen Egg-White Lysozyme  |
| HMDS              | Hexamethyl-Disilazan  |
| HPLC              | High Pressure (Performance) Liquid Chromatography   |
| (u)HTS            | (ultra) High-Throughput Screening   |
| IBE               | Ion Beam Etching  |
| IE                | Ion Etching   |
| IMB               | Institut für Molekulare Biotechnologie e.V. Jena  |

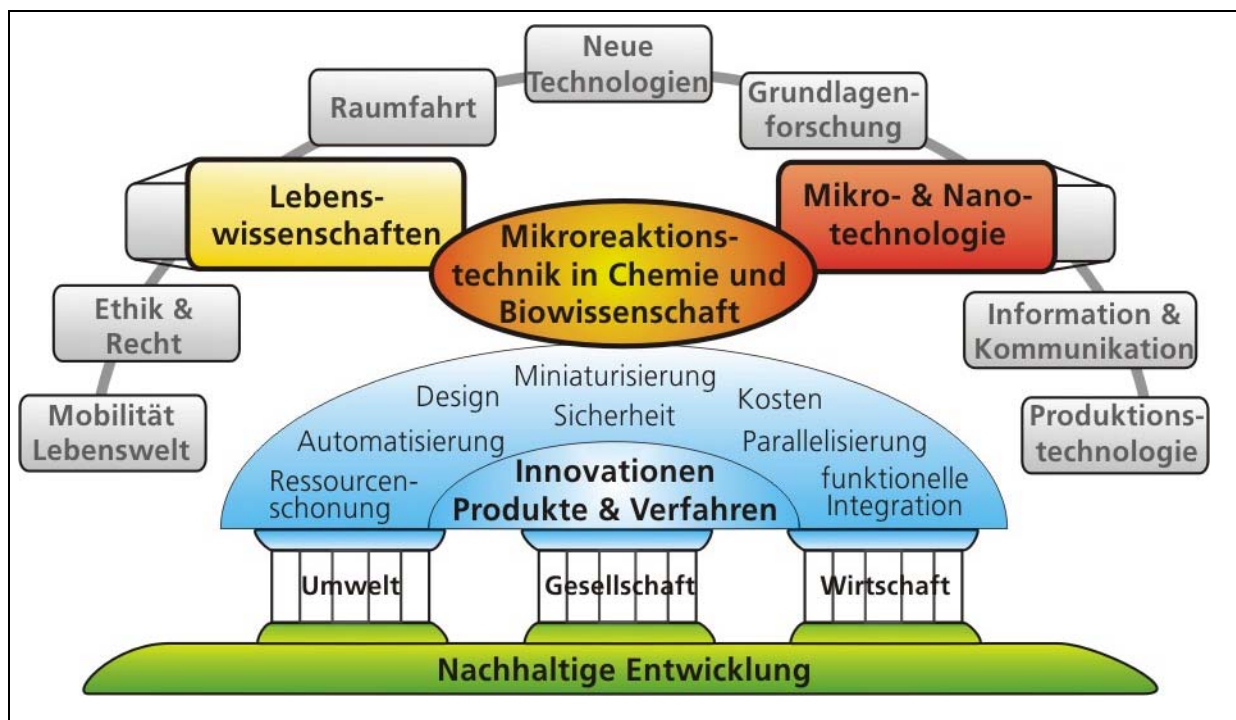
---

|       |   |
|-------|---|
| IPHT  | Institut für Physikalische Hochtechnologie e.V. Jena                        |
| IMM   | Institut für Mikrotechnik Mainz e.V. Mainz                                  |
| IMRET | International Conference on Microreaction Technology                        |
| IR    | Infrarot  |
| IT    | Informationstechnologie   |
| JBCC  | Jena BioCrystallogeneses Center   |
| LiGA  | Lithographie, Galvanoformung, Abformung                                     |
| MB    | Megabyte  |
| MEMS  | Micro Electro Mechanical Systems  |
| MVM   | Institut für Mechanische Verfahrenstechnik und Mechanik, Uni Karlsruhe (TH) |
| MST   | Mikrosystemtechnik/ Micro Systems Technology                                |
| μ-PIV | Micro Particle Image Velocimetry  |
| μ-PTV | Micro Particle Trace Velocimetry  |
| μ-TAS | Micro Total-Analysis Systems  |
| NMR   | Nuclear Magnetic Resonance  |
| ODTS  | n-Octadecyl-trichlorosilan  |
| PC    | Personal Computer   |
| PCR   | Polymerase Chain Reaction   |
| PDA   | Personal Digital Assistant  |
| PDMS  | Poly-Dimethylsiloxan  |
| PE    | Plasma Etching  |
| PEEK  | Poly-Ether-etherketon   |
| PID   | Proportional – Integral – Differential Regelkreis                           |
| PMMA  | Poly-Methyl-methacrylat   |
| PTFE  | Poly-Tetrafluorethylen  |
| PVD   | Physical Vapor Deposition   |
| r-GFP | recombinant Green Fluorescent Protein                                       |
| RF    | Radio Requency  |
| RIBE  | Reactive Ion Beam Etching   |
| RIE   | Reactive Ion Etching  |
| SDS   | Natrium-dodecyl-Sulfat  |
| TMWFK | Thüringer Ministerium für Wissenschaft, Forschung und Kunst                 |
| USB   | Universal Serial Bus  |
| USD   | US Dollar   |
| UV    | Ultraviolett  |
| VDMA  | Verein Deutscher Maschinen- und Anlagenbauer                                |

# 1 Einleitung

## 1.1 Wissenschaftliche Einordnung der Arbeit

Die Mikro- und Nanotechnologie gelten als Schlüsseltechnologien dieses Jahrhunderts. Die hier entwickelten Methoden und Verfahren haben Eingang in verschiedenen Querschnittsdisziplinen gefunden. Zu diesen vom Bundesministerium für Bildung + Forschung (BMBF) und der Europäischen Kommission geförderten Forschungsschwerpunkten gehören u.a. die Informations- und Kommunikationstechnik, die Bereiche Mobilität & Lebenswelt, Raumfahrt oder die Lebenswissenschaften (Life Sciences). (EU-CORDIS 2003b, BMBF 2000, BMBF 2003) (s. Abb. 1) Die hieraus entstandenen Produktinnovationen sind aus dem heutigen Alltag nicht mehr wegzudenken. Durch die Kombination dieser Disziplinen entstehen neuartige Arbeitsfelder wie beispielsweise die Mikroreaktionstechnik in der chemischen und biowissenschaftlichen Anwendung. Hier verschmelzen Wissen und Erfahrung aus ganz unterschiedlichen Bereichen miteinander.



**Abb. 1:** Die Mikoreaktionstechnik in Chemie und Biowissenschaft – Querschnittsdisziplin im Kontext der aktuellen Forschungsschwerpunkte des BMBF bzw. EU zur Entwicklung innovativer Produkte und Verfahren im Sinne einer Nachhaltigen Entwicklung

Kreative Interdisziplinarität bietet dabei den Nährboden, unerforschtes Terrain zu betreten und neuartige Lösungen zu erschließen. So entstandene Produkt- und Verfahrensinnovationen zeichnen sich durch einen hohen Grad an integrierter Funktionalität, Miniaturisierung, Parallelisierung und Automatisierbarkeit aus. Die hieraus gewonnenen Erkenntnisse werden heute beispielsweise in der pharmazeutischen und biotechnischen Industrie bei der Suche nach neuen Wirkstoffen eingesetzt. Auch die moderne Biomedizin bedient sich der hochauflösenden und Kosten sparenden Applikationen für Diagnostik und Therapie auf dem Weg zur individualisierten Medizin. Parallel

entwickeln ingenieurwissenschaftliche Disziplinen wie Prozess-, Energie- oder Umwelttechnik sicherere und Ressourcen schonendere Verfahren. Den Anforderungen einer nachhaltigen Entwicklung wird durch den Einsatz der Mikroreaktionstechnik im biologischen und chemischen Umfeld in besonderem Maße Rechnung getragen. Das Zusammenspiel birgt enormes Potenzial, den ökologischen, soziologischen und ökonomischen Ansprüchen nachzukommen: die Forschungs- und Produktionsverfahren werden sicherer, sauberer und effizienter im Ressourcenverbrauch. (*Köhler 1999, van den Berg 2000, Ehrfeld 2000, Werner 2000, Matlosz 2003*)

Die große Herausforderung der heutigen Life Science-Forschung besteht darin, dem immer größer werdenden Druck aus Gesellschaft und Politik (Gefahr globaler Epidemien, Ausbreitung von Erbkrankheiten etc.) sowie aus der Industrie (kürzere Lebenszyklen von Produkten, auslaufende Patente etc.) mit innovativen Lösungen zu begegnen. Gleichzeitig gilt es, der rasant steigenden Anzahl und der Komplexität der zu bewältigenden Aufgaben Herr zu werden. (*Grabley 1999, Drews 1998, Gwynne 2002a, b, 2003a, May 2002a, Baal 2004*) In diesem Kontext steht die Erforschung biologischer Makromoleküle, wie der DNA als Trägerin der Erbinformation sowie den Proteinen, die als Hauptakteure hoch-dynamische Prozesse in Lebewesen regulieren. (*Schena 1999, Lottspeich 1999*) Die kausalen Zusammenhänge zwischen Genen und Proteinfunktion werden mithilfe der sog. Functional Genomics-Forschung erschlossen, um so neuartige Therapieansätze und Wirkstoffe zu entwickeln. (*Maurer 2000, May 2002b, Gwynne 2003b*) Innerhalb der Proteinforschung kommt der Strukturbiologie eine der Schlüsselrollen zu. Die makromolekularen Schlüsselbausteine des Lebens wie z.B. die Proteine werden hier strukturell aufgeklärt und so ein Zugang zum Verständnis von Funktion und Wirkung eröffnet. (*Rosenberger 1996, Hilgenfeld 2001*) Aufgrund der aufwändigen Herstellungsverfahren therapeutisch interessanter Proteine besteht heute eine der Hauptforderung darin, so ökonomisch als möglich mit den zur Verfügung stehenden Zielmolekülen zu arbeiten. Entsprechend sind Methoden gefordert, die kleinste Probenmengen darstellen und in multiparametrischen *in situ*-Analysen hochaufgelöst charakterisieren. (*Vekilov 1999, Mühlig 2003*) In diesem Kontext empfiehlt sich die Mikroreaktionstechnik als technologischer Partner. Durch ihre intrinsischen physikalischen und verfahrenstechnischen Eigenschaften (Thermik, Fluidik etc.) und den damit verbundenen Möglichkeiten Vorgänge im  $\mu$ l-Maßstab zu beherrschen, bieten sich Lösungsansätze für die aktuellen Fragestellungen in den Lebenswissenschaften. Denn gerade in dem für biologische Aufgaben interessanten Volumenbereich von wenigen Mikrolitern bis hin zu Nano- und Picolitern wird die Integration von Mikro- bzw. Chipreaktoren erst sinnvoll und entfaltet ihre Stärken. Für derartig kleine Abmessungen stehen beispielsweise in der Prozessierung und Analyse einzelner Zellen oder Molekülverbände geeignete mikrotechnische Substrate und entsprechende Bearbeitungsverfahren zur Verfügung. Der Einsatz von Chipbauelementen schließt die Lücke zwischen stofflicher und elektronischer Information. Dies ermöglicht, die im Zuge der massiven Miniaturisierung und Parallelisierung generierten Daten effizient zu verarbeiten und in Perspektive über Feed-back-Schleifen zur Selbstoptimierung wieder einzukoppeln. (*Henze 1999, Manz 1999, Zeisel 2002, Renken 2003b*)

Vor dem Hintergrund einer knappen Einführung in die Methodik der Kristallisation biologischer Makromoleküle wird nun die Notwendigkeit zur Entwicklung eines neuartigen Analyseverfahrens diskutiert. Zur Einschätzung, ob die Anforderungen durch den Einsatz von Mikroreaktoren erfüllt werden können, wird die Mikroreaktionstechnik bezüglich ihrer Charakteristika und möglicher Applikationsfelder beleuchtet. Aus der konkretisierten Aufgabenstellung leitet sich die prinzipielle Vorgehensweise ab.

### **1.1.1 Methodik in der Kristallisation biologischer Makromoleküle**

Die Struktur biologischer Makromoleküle wie z.B. Proteine und Nukleinsäuren oder deren Kombination in Viren ist ein Schlüssel zum Verständnis ihrer physiologischen Funktion und Wirkung. Aufgrund ihrer zentralen Stellung innerhalb der biochemischen und biotechnischen Forschung stehen sie im Zusammenhang mit der Functional Genomics-Forschung im Mittelpunkt internationaler Forschungstätigkeiten. (*EU-CORDIS 2003a, Chayen 2002, Gwynne 2003b*) Neben NMR-Techniken ist die Analyse der Proteine mittels Röntgenbeugung ein anerkannter und vielversprechender Weg zur Aufklärung ihrer 3D-Struktur. Mehr als 80% der heute bekannten Proteinstrukturen wurden mithilfe der Röntgenstrukturanalyse bestimmt. Hierzu ist es notwendig, die Moleküle aus ihrer nativen gelösten Phase in qualitativ hochwertige Kristalle zu überführen, ohne dabei ihre Primär- oder Tertiärstruktur zu verändern. Dies gelang aufgrund ihrer Komplexität bislang lediglich bei 1% der Proteine des Menschen und oft nur unter erheblichem Zeit- und Kostenaufwand. Die unterschiedlichen Ansätze zur Proteinkristallisation lassen sich prinzipiell zwei Hauptrichtungen unterscheiden: die trial-and-error-Methoden z.T. im Hochdurchsatz sowie Verfahren unter Erforschung und Anwendung der physiko-chemischen Grundprinzipien. (*Wienczek 1999, Rosenberger 1996a*)

Weltweit sind Bestrebungen im Gange, mittels Hochdurchsatz- bzw. High-Throughput-Methoden nach dem trial-and-error-Prinzip zu Kristallen hoher Qualität zu gelangen. Neben den Aktivitäten großer pharmazeutischer Konzerne (Pfizer Inc., USA, Glaxo SmithKline Inc., GB, Roche Pharma AG, Schweiz etc.) wurden öffentlich geförderte Großprojekte lanciert, wie z.B. die Proteinstrukturfabrik in Berlin. (*Cachau 2000, Müller 2001, Juárez-Martínez 2002, Moran 2001*) Bislang konnte jedoch selbst durch massive Automatisierung und Parallelisierung und die Integration der Bioinformatik noch nicht der erhoffte Ausstoß an neuen Proteinstrukturen erzielt werden. Als eine der Hauptursachen werden meist die derzeit unzureichende Flexibilität und Qualität automatisierter Analytik und Datenevaluierung angesehen, was zu einer Vielzahl falsch-positiver oder –negativer Ergebnisse führt. (*Brzozowski 2002, Rupp 2002*)

Parallel hierzu bietet die systematische Erforschung physikalisch-chemischer Eigenschaften sowie die molekulare Wechselwirkungsanalyse der Proteine einen alternativen Weg. Deshalb hat die Rückkehr zu den Grundlagen der Biokristallisation in den vergangenen Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. (*Roth 1996, Gripon 1997, Drenth 1998, Vekilov 1998, Ruppert 2001, Budayova-Spano 2002*) Die Entwicklung von Phasendiagrammen analog zu den Werkstoffwissenschaften ist dabei von besonderer Bedeutung, um die an der Kristallogenie, dem Entstehungs- und Wachstumsprozess

der Kristalle, beteiligten Vorgänge zu verstehen. (Haas 1998, Mühlig 2001) So ist u.a. auch ein Ziel der Mikrosystemtechnik, die Erfolgsquote der Kristallisationsversuche durch den Einsatz derart miniaturisierter Technologien beträchtlich zu erhöhen und verbesserte Methoden zu deren Vorhersage zu entwickeln.

### **A) Besonderheiten der Kristallisation biologischer Makromoleküle**

Die Kristallisation als thermisches Trennverfahren zur Aufkonzentrierung oder zur Reindarstellung von Stoffen in der Prozessindustrie oder als Methode zur Gewinnung hochreiner Einkristalle für die Elektronikindustrie wird seit Jahrhunderten angewandt. Die grundsätzlichen mechanistischen Abläufe dieser Unit operation sind entsprechend gut verstanden. (Gnielinski 1993, Elwell 1975b) Heute gilt als gesichert, dass die meisten grundsätzlichen Effekte und Mechanismen, welche die Kristallisation kleiner (anorganischer) Moleküle bestimmen, auch auf komplexe makromolekulare Systeme übertragbar sind. Die Vorgänge basieren in beiden Fällen auf dem Wechselspiel zwischen kinetischen (Stofftransport, Einbaureaktion) und thermodynamischen (Löslichkeit, Phasenübergang) Prozessen, welche Keimbildung und Kristallwachstum steuern. Die Prinzipien und Charakteristika der Kristallisation biologischer Makromoleküle sind in einer Fülle von Übersichtsbeiträgen und Lehrbüchern ausführlich besprochen. (Boistelle 1988, McPherson 1995, Rosenberger 1996, Luft 1997, Bergfors 1999, Blagova 1999, Tsekova 1999, Wiencek 1999) Trotz der Gemeinsamkeiten der anorganischen und biologischen Kristallisation existieren, im Detail betrachtet, einige Unterschiede. Diese sind vornehmlich beim praktischen Umgang mit derartigen Systemen relevant. Proteinkristalle sind, anders als anorganische Kristalle, keineswegs mit hochgeordneten Einheiten oder exakt angeordneten Blöcken zu vergleichen. Vielmehr bestehen sie aus einer mehr oder weniger geordneten Ansammlung von Lagen, Taschen oder Molekülclustern. Neben den Proteinmolekülen selbst bestehen die Kristalle bis zu 80% aus ungeordnetem Wasser, Salzen (Präzipitanten) und Verunreinigungen. Entsprechend sind sie äußerst fragil gegenüber mechanischem Stress und ionisierender Strahlung. Ferner unterscheiden sich biologische Makromoleküle gegenüber anorganischen Systemen im Betrag maßgebender thermodynamischer und kinetischer Größen, wie z.B. Lösungsenthalpien, Reaktionsgeschwindigkeits- oder Diffusionskoeffizienten. Dies kommt zum Ausdruck in ihrer Sensitivität gegenüber Störungen des thermischen und stofflichen Gleichgewichtes der Kristalle mit der Umgebung.

Im Gegensatz zur anorganischen Kristallisation findet die Kristallisation von Biopolymeren i.A. unter annähernd physiologischen Bedingungen statt. In etwa bei Raumtemperatur ( $5^{\circ}\text{C} < \vartheta < 50^{\circ}\text{C}$ ) und unter atmosphärischem Druck gehen sie aus der wässrigen in die kristalline Phase über. Dies erlaubte die Entwicklung zahlreicher experimenteller Methoden, in denen die Kristallisationsbedingungen in einer Vielzahl parallel durchgeführter Experimente variiert werden. Entsprechend führt dies schließlich zu einem geeigneten Parametersatz bezüglich der zugesetzten Substanzen, Konzentration, Temperatur und Druck. In einem derartigen Screening-Prozess nach optimalen



Kristallisationsbedingungen zielt darauf ab, einen oder mehrere „saubere“ Einkristalle von einigen Zehntel Millimetern Größe ernten zu können und der Röntgenstrukturanalyse zuzuführen. Diese Vorgehensweise beansprucht jedoch nicht selten Monate oder Jahre, wobei i.d.R. mehrere Methoden zum Einsatz kommen. Die Dampfdiffusionskristallisation (vapor diffusion) in ihren Ausführungen als „Hängender Tropfen“ und „Sitzender Tropfen“ ist die in der Praxis am häufigsten und erfolgreichsten eingesetzte Technik. Ca. 60% aller Proteinkristalle wurde mittels einer der beiden Dampfdiffusionsmethoden erhalten. Das 3-Phasen-System bewegt sich durch Verdunstung des Lösungsmittels in Richtung des dynamischen Gleichgewichts. Durch die Aufkonzentrierung der Proteinlösung kommt es zu deren Übersättigung und u.U. schließlich zur Kristallisation. Da 3 Phasen an diesem Prozess beteiligt sind, ist eine gezielte Beeinflussung von außen schwierig zu bewerkstelligen. Bei der sog. (Micro-)Batch- und Dialyse-Kristallisation sind nur noch die Phasen fest und flüssig beteiligt und vereinfachen damit prinzipiell die Kontrolle der Versuchsparameter. Diese 2-Phasen-Methoden rangieren mit Anteilen von 15% bzw. 10% auf Platz 2 und 3. Des weiteren sind zu nennen die Kristallisation mithilfe der sog. Free-Interface-Diffusion in Kapillaren, die Bulk-Kristallisation oder die mittels Keimen induzierte Kristallisation. (Gilliland 1994, 2003, Rosenberger 1996, McPherson 1999, Bergfors 1999)

Um den Zustand der Kristalle entlang ihres Entstehungsprozesses verfolgen und ggfs. beeinflussen zu können, ist eine geschlossene Kette an *in situ* Beobachtungstechniken erforderlich. Zu den Wichtigsten gehören die Dynamische und Statische Lichtstreuung (DLS und SLS) (Phillies 1990, Bergfors 1997, Delboni 2002), interferometrische Methoden (Chernov 1988, Pusey 1988, Vekilov 1995), sowie verschiedene hochauflösende Ultra-Mikroskopietechniken wie die Atom-Kraft-Mikroskopie (AFM) (Astier 2001, McPherson 2000, Durbin 1992), Elektronenstrahl-Mikroskopie (EM) (Durbin 1990) und die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) (Mühlig 2001, 2003). Für weniger detaillierte Untersuchungen und zur Probenvorbereitung kommt die gewöhnliche Lichtmikroskopie zum Einsatz. Mithilfe der DLS und SLS werden i.A. Keimbildungsprozesse untersucht. Interferometrische Methoden sowie AFM eignen sich zur Beobachtung von Kristallen ab 100 µm Größe, der Dicke von Wachstumsschichten oder von Konzentrationsgradienten in der Lösung. Obwohl konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie bislang nur selten zum Einsatz gekommen ist, füllt sie die Lücke für Mikrokristalle bis zu 1 µm. Durch ihr Konfokalität können Kristalle mit einer vertikaler Auflösung von ca. 100 nm durchgerastert werden und somit morphologische Defekte sowohl an der Oberfläche als auch im Volumen nicht-invasiv detektiert werden.

### **Jena BioCrystallogensis Center - JBCC**

2001 wurde auf dem Beutenberg Campus in Jena das „Jena BioCrystallogensis Center“ (JBCC) ins Leben gerufen, welches direkt mit der „European Bio-Crystallogensis Initiative“ (EBCI) verknüpft ist. Ziel ist es, physiko-chemische Eigenschaften der Proteinkristallisation zu erforschen und so einen Beitrag für ein besseres Verständnis der grundlegenden Prozesse und Parameter der Biokristallisation zu leisten. Durch die Erstellung von Phasendiagrammen ausgewählter Proteine sollen unbekannte

Systeme charakterisiert werden und letztendlich der Prozess der Strukturaufklärung biologischer Makromoleküle beschleunigt werden. Im Rahmen des JBCC arbeiten Biochemiker und Molekularbiologen aus dem Institut für Molekulare Biotechnologie e.V. Jena (IMB) mit den Physikern und Ingenieuren des Institutes für Physikalische Hochtechnologie e.V. Jena Hand in Hand. Dieses Verbundprojekt, durch das Land Thüringen (TMWFK) gefördert, (JBCC 2001) verkörpert in bislang einmaliger Weise den Leitgedanken des Beutenberg Campus „life science meets physics“. (s. Abb. 2) JBCC ermöglicht damit die Bündelung der Expertise auf den Gebieten der Biokristallisation und optischen Mikroskopie, dem Kristallwachstum sowie der Mikroreaktionstechnik zur Verfolgung neuartiger Ansätze. (Hilgenfeld 2001, Klupsch 2001)

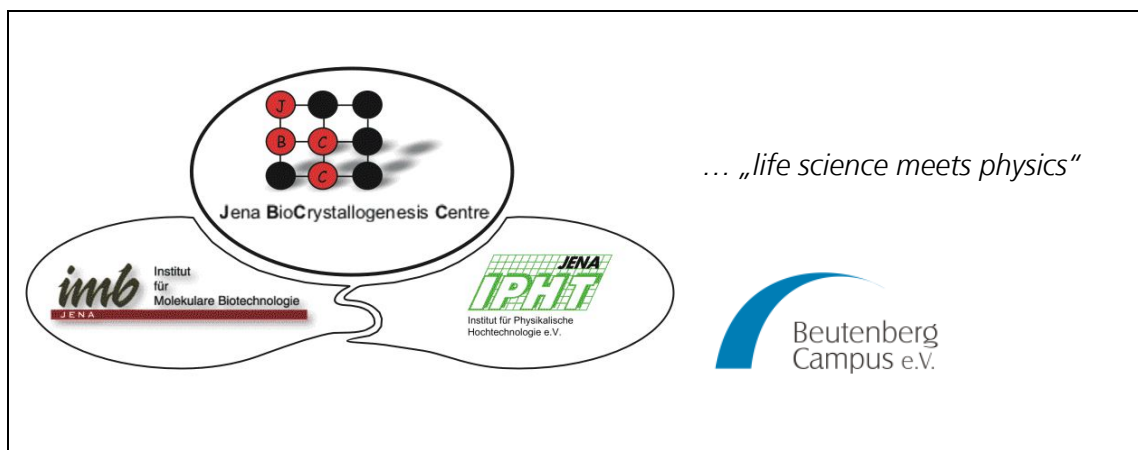
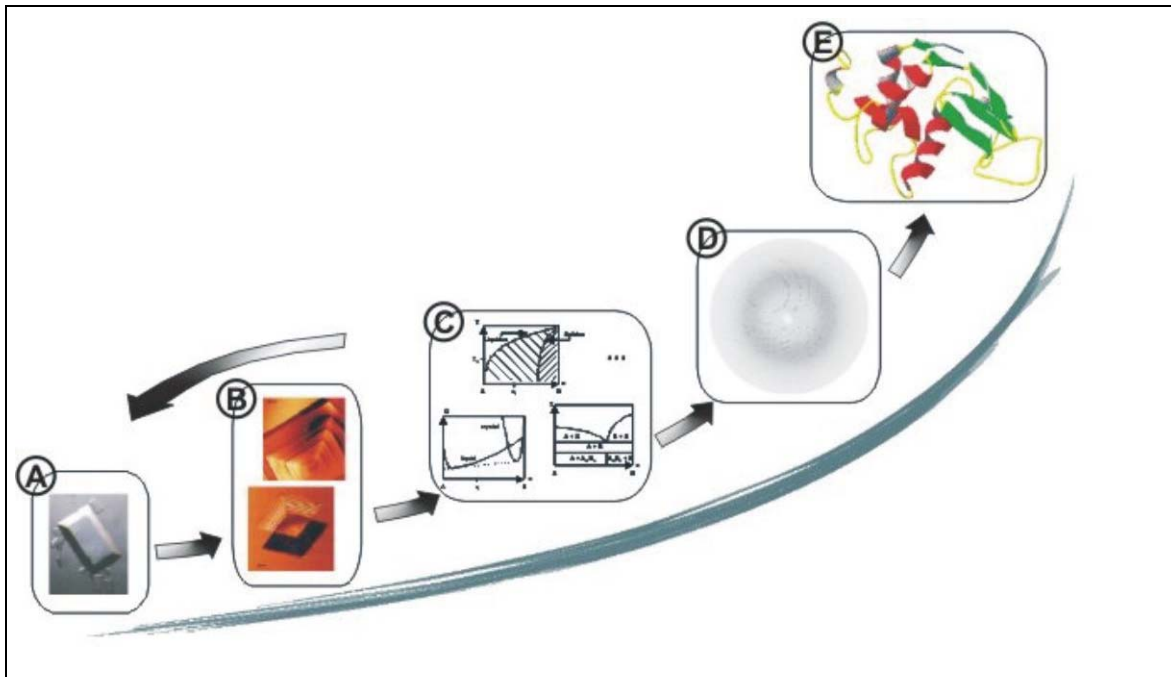


Abb. 2: Das Jena BioCrystallogensis Center (JBCC) auf dem Beutenberg Campus Jena

Der Weg vom Proteinkristall zur 3D-Struktur des Moleküls besteht schematisch betrachtet aus folgenden Schritten (s. Abb. 3): ein primärer Screeningprozess dient der Ermittlung vorläufiger Kristallisationsbedingungen mittels Standardmethoden („Hängender Tropfen“ oder Sitzender Tropfen“, „Free-Interface Kapillardiffusion“ o.ä.). Mit diesem Parametersatz werden die Proteinkristalle *in situ* anhand hochauflösender konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie und Wägetechniken beobachtet und analysiert. Die hierfür bereits angewendeten oder noch in der Entwicklung befindlichen Methoden variieren Parameter wie Temperatur, Flussgeschwindigkeit, Zusammensetzung der Lösung oder der Luftfeuchtigkeit der Umgebung. (Mühlig 2001, 2003, Berg 2002, 2003) Die Erkenntnisse fließen in die Erstellung von Phasendiagrammen und werden in einem iterativen Feed-back Prozess zur weiteren Optimierung der Kristallisationsparameter genutzt. Liegen Proteinkristalle in ausreichender Qualität und Größe vor, kommt die Röntgenstrukturanalyse zum Einsatz. Die hieraus ermittelten Datensätze werden schließlich mithilfe numerischer Verfahren zum Aufbau der 3D-Struktur des Moleküls verwendet. Die Arbeiten im JBCC tragen demnach dazu bei, Voraussetzungen für anschließende Studien zur Funktion und Wirkung biologischer Makromoleküle in Organismen zu schaffen.



**Abb. 3:** Skizze des Prozessablaufs im JBCC zur Erlangung der 3D-Proteinstruktur: Proteinkristall (A) → *in situ* CLSM-Analyse (B) → Phasendiagrammpunkte (C) → iteratives Feed-back der Information zur Optimierung des Kristalls ... → Röntgenstrukturanalyse (D) → 3D-Struktur des Proteins (E)

## B) Thermodynamische Aspekte

Sowohl im Screening nach optimalen Kristallisationsbedingungen als auch bei der Untersuchung physikalisch-chemischer Mechanismen zur Erstellung von Phasendiagrammen ist die Kenntnis und Kontrolle thermodynamischer und kinetischer Größen Voraussetzung.

Im Allgemeinen kommen kommerziell erhältliche Screens zum Einsatz, in denen die Zusammensetzung der Lösung im Mikroplattenformat variiert wird. Hierbei liegt der Fokus neben der Übersättigung des Proteins selbst v.a. auf der Ionenstärke. Diese manifestiert sich in Art und Konzentration der zugegebenen Salze, dem sog. „salting in“ bzw. „salting out“, (Ries-Kautt 1997, Iyer 2000, McPherson 2001) sowie dem pH-Wert (Hodgson 2002, McPherson 1995). Der Grund für die große Variabilität der Proteinmoleküle wird auf ihr polyionisches Verhalten zurückgeführt, da sowohl basische als auch saure Aminosäuren an der Oberfläche sitzen. Diese Residuen wechselwirken über COULOMBSche als auch VAN-DER-WAALSSche Kräfte mit der sie umgebenden Elektrolytlösung. Dies führt zu einer Änderung der Verteilung der Oberflächenladung und beeinflusst damit die Kristallisation entscheidend. Zur Charakterisierung des Wechselwirkungspotenzials von biologischen Makromolekülen wird der sog. Osmotische Zweite Virialkoeffizient  $B_{22}$  herangezogen. Diese kumulative Größe gibt an, ob die attraktiven oder die repulsiven Wechselwirkungen das Verhalten des Systems dominieren. Experimentelle Studien mithilfe der SLS zeigten, dass die Biokristallisation dann besonders hohe Erfolgsaussichten hat, wenn  $B_{22}$  gerade sein Vorzeichen ins Negative gewechselt hat. Dies ist in unmittelbarer Nachbarschaft zum sog. isoelektrischen Punkt des Protein-Elektrolyt-Systems der Fall, also wenn die Nettoladung auf der Proteinoberfläche verschwindet. (Rosenberger 1996, George 1997, Ruppert 2001, Klupsch 2001)

Die Abhängigkeit der Kristallgenese von der molekularen Proteinzusammensetzung liefert den Ansatzpunkt molekularbiologische Methoden einzusetzen. Durch genetische Manipulation werden gezielt die Sequenz und Anordnung der Aminosäuren und damit die physiko-chemischen Eigenschaften der Proteine verändert. (Longenecker 2001, McElroy 1992) Im Routinebetrieb spielen weitere thermodynamische Parameter wie Druck (Suzuki 2002, Kundrot 1988) und Temperatur (Rosenberger 1986, Lorber 1992, de Mattei 1993, Nadarajah 1995, Christopher 1998) deutlich untergeordnete Rollen, obwohl deren Einfluss identifiziert und allgemein anerkannt ist. Zahlreiche Studien zeigen den Effekt der Temperatur auf morphologisch selektive Proteinkristallisation. (Ataka 1986, Jolles 1992, Delboni 2002) HAAS & DRENTH demonstrierten anhand des Modellproteins Hen Egg-White Lysozyme (HEWL), dass bereits kleine Fluktuationen in der Größenordnung von  $\Delta T < 1$  K ausreichen, um einen Effekt auf die Kristallstruktur und folglich ihrer Mosaizität zu haben. Weitere systematische Untersuchungen zeigten, dass ein Phasenübergang flüssig-kristallin schon durch Temperaturänderungen von  $\Delta T \approx 0,5$  K hervorgerufen werden kann. (Drenth 1998, Hass 1999) Somit bietet sich die Temperatur als Optimierungsparameter an, um die Kristallbildung und -qualität sowohl bei retrograden (spezifische Lösungsenthalpie  $\Delta h_{\text{sol}} < 0$ ) als auch bei nicht-retrograden ( $\Delta h_{\text{sol}} > 0$ ) Proteinen durch Annäherung an die Liquiduslinie im Phasendiagramm (s. Abb. 4) zu beeinflussen. (Rosenberger 1986, Hass 1999, Klupsch 2002) Dennoch wurde lediglich bei etwa 1% aller erfolgreich kristallisierten Proteine gezielt die Temperatur als Parameter variiert. (McPherson 1995, Gilliland 2003)

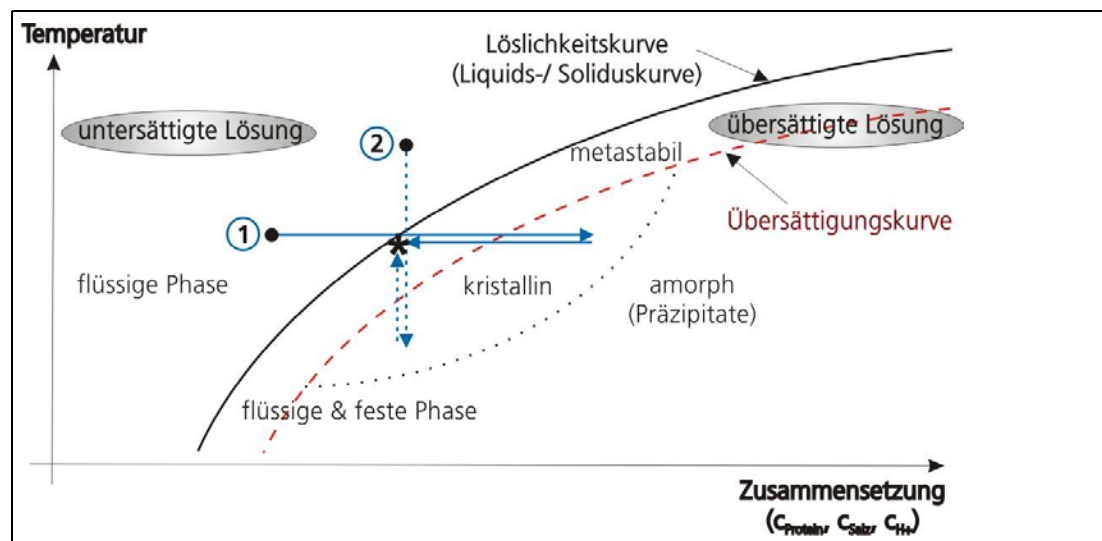


Abb. 4: Schematische Darstellung von Reaktionspfaden in einem Phasendiagramm bei der Proteinkristallisation (lückenlose Mischkristallbildung): Variation der Zusammensetzung (1) oder der Temperatur (2)

Phasendiagramme bilden eines der zentralen Elemente bei thermodynamischen Untersuchungen. Die Phasen flüssig, kristallin und amorph sowie die Liquidus- bzw. Soliduslinie sind in Abbildung 4 für ein Phasendiagramm mit lückenloser Mischkristallbildung angedeutet. Die Reaktionspfade 1) und 2) zeigen schematisch den Weg optimaler Kristallisationsbedingungen für biologische Makromoleküle.

Pfad 1) variiert die Zusammensetzung der Lösung, Pfad 2) steuert Keimbildung (Nukleation) und Kristallwachstum über die Temperatur. Zur Induktion der Nukleation wird die Lösung stark übersättigt, um dann durch allmähliche Änderung der Lösungsparameter nahe an die Liquiduslinie heran zu kommen. Je näher der Arbeitspunkt (\*) der Kristallisation an dieser Linie liegt, desto langsamer und defektfreier wächst ein Kristall. Dabei verschwimmen die Grenzen zwischen metastabiler und stabiler Zone, in denen die Proteine präzipitieren bzw. geordnet kristallisieren. Voraussetzung für die effiziente und reproduzierbare Erstellung von Phasendiagrammen sind exakt kontrollierbare experimentelle Bedingungen sowie hochauflösende Methoden.

Aus der Kristallisation kleiner (anorganischer) Moleküle ist bekannt, dass eine annähernd konstante Temperatur mit einer Ungenauigkeit  $\Delta T < \pm 0,1$  K eine der Hauptvoraussetzungen für defektarmes Kristallwachstum ist. Insbesondere bei polymorphen Systemen mit sich überschneidenden Löslichkeitskurven entscheiden derart kleine Temperaturunterschiede über die Kristallform. (Astier 2001, Delboni 2002, Aquilano 2003) Dies deckt sich mit den Erkenntnissen u.a. von HAAS und DRENTH. (Hass 1999) Kontrollierte periodische Zyklen zwischen zwei oder mehreren Temperaturniveaux zeigen jedoch, dass die Kristallgenese positiv beeinflusst wird. Dieses unter der Bezeichnung „Enforced OSTWALD Ripening“ bekannte Verfahren bewirkt, dass in entsprechend prozessierten Lösungen oder Schmelzen nur wenige große „reine“ Kristalle entstehen. (Scholz 1967, Jones 1974, Elwell 1975b, Heinrichs 1992) HEINRICHS *et al.* führten dieses Verfahren in die Proteinkristallisation ein und bestätigten für das Modellprotein HEWL die Erkenntnisse aus der anorganischen Kristallisation. Gerade im Hinblick auf die Röntgenstrukturanalyse besitzt das „Enforced OSTWALD Ripening“ großes Potenzial für optimiertes Kristallwachstum, fand jedoch nach unserem Kenntnisstand in der Literatur zur Biokristallisation bislang keine weitere Beachtung.

#### **D) Kinetische Aspekte**

Kinetische Aspekte der Biokristallisation wurden beispielsweise hinsichtlich der physikalischen Wechselwirkung der Proteine bei der heterogenen Nukleation an chemisch modifizierten Oberflächen untersucht. Diese stehen im Einklang mit klassischen Theorien anorganischer Moleküle. (Nanev 2000, Sanjoh 2001, Tsekova 1999) Die Kristallisation biologischer Makromoleküle ist ein relativ langsamer Prozess mit Wachstumsraten GR in der Größenordnung von  $GR = dr/dt \approx 1$  nm/s. (Klupsch 2002) Typischerweise liegen die Zeiten für das Wachstum von Proteinkristallen im Bereich mehrerer Tage. Dies hat erhebliche Konsequenzen bzgl. der apparativen Gestaltung der Analysewerkzeuge. Ein weiterer Schwerpunkt kinetischer Untersuchungen liegt auf dem Einfluss der natürlichen Konvektion auf die Wachstumsinstabilitäten, die Defektdichte und somit auf die Kristallqualität. Die sich durch Diffusion ausbildenden Konzentrationsgradienten um den Kristall rufen einen bei höheren Wachstumsgeschwindigkeiten nicht mehr zu vernachlässigenden Konvektionsstrom hervor. Dieser transportiert aus dem Innern der Lösung nicht nur Proteinmoleküle sondern auch Verunreinigungen an die Kristalloberfläche. Aufgrund dieser Effekte kann so das

Kristallwachstum zum Erliegen kommen bzw. es wird irreversibel. In der Literatur wird dies unter der Bezeichnung „cessation of growth“ diskutiert. Durch das Kristallwachstum verarmt die Lösung an Protein. Damit gewinnen Konkurrenzreaktionen gegenüber dem Einbau der Protein in die Kristallstruktur zunehmend an Bedeutung und überkompensieren die Hauptreaktion schließlich. Zu diesen Konkurrenzprozessen zählen beispielsweise der Einbau von Verunreinigungen oder die Adsorption von Proteinaggregaten und Verunreinigungen an der Oberfläche. (Vekilov 1998a, Grant 1995, Pusey 1988, Blagova 1999) Zur Charakterisierung und Unterdrückung dieses Effekts wurden Kristallisationsexperimente unter Schwerelosigkeit im All (z.B. International Space Station, Space Lab) durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Defektdichte vermindert wird und die Kristalle bei höheren Geschwindigkeiten wachsen. (Benz 2002, Pletzer 2001, Long 1996, DeLucas 1994) In jüngster Vergangenheit ist jedoch eine kontroverse Diskussion darüber entbrannt, ob der finanzielle und materiellen Aufwand durch den erbrachten Nutzen gerechtfertigt wird. Im Zuge dessen wurde die Frage nach Alternativmethoden wieder laut, um den prinzipiellen Effekt der Schwerelosigkeit auf die Biokristallisation auch unter dem Einfluss des Erdfeldes zu erzielen. (Minster 2003, Nature 2000) Der Zusammenhang zwischen Kristallwachstum und Konvektion wurde bei anorganischen Systemen beschrieben, für die Proteinkristallisation jedoch nur ansatzweise studiert. (Elwell 1975a, 1975b) Systematisch wurde dieser Sachverhalt in der Arbeitsgruppe um VEKILOV und ROSENBERGER untersucht. Proteinkristallen wurde dabei in ihrer Wachstumsphase ein kontinuierlicher Konvektionsstroms aufgeprägt. Dadurch wurden die kinetischen Fluktuationen vermindert und mithin die Defektdichte innerhalb der Kristalle reduziert. (Vekilov 1996, Vekilov 1998a, b, c)

Aus den vorangegangenen Überlegungen wird ersichtlich, dass prinzipiell kleine Mengen biologischer Makromoleküle unter definierten thermischen und konvektiven Bedingungen zur Kristallisation gebracht werden und gleichzeitig non-invasiv beobachtet werden können. Durch die Beteiligung von nur 2 Phasen z.B. in der Batch-Kristallisation wird das System kontrollierbar und damit prinzipiell eine automatisierte Anpassung der Kristallisationsbedingungen möglich. In der wissenschaftlichen Fach- und Patentliteratur wurden miniaturisierte Systeme zur Kristallisation beschrieben. (s. Anhang A, Tabelle A1) Jedoch vereint keine der genannten Methoden alle wesentlichen Anforderungen. Ferner sind sie bis auf wenige Ausnahmen (Hansen 2002, Weigl 2001) bislang nicht am Markt verfügbar. Vielmehr existieren Einzellösungen, welche im Rahmen von Forschungsprojekten meist lediglich bis zum Status von Labormustern entwickelt wurden. (DeLucas 1994, Vekilov 1998, Mao 2002) Beim Bestreben nach immer weiterer Miniaturisierung von Kristallisationsmodulen rücken Mikrosysteme in den Vordergrund. Vereinzelt wurden erste Versuche unternommen, die Vorzüge mikrostrukturierter Komponenten zu nutzen. (Juárez-Martinez 2002, Sanjoh 1999, Hansen 2002) Aus diesem Grund werden im folgenden Abschnitt Mikroreaktoren näher beleuchtet.

### 1.1.2 Mikroreaktionstechnik für Chemie und Life Sciences

Mikroreaktoren unterscheiden sich von makroskopischen Systemen in ihren physikalisch-chemischen und verfahrenstechnischen Charakteristika sowie durch die in Frage kommenden Werkstoffe und Herstellungsverfahren. Per definitionem bezeichnen Mikroreaktoren „Komponenten und Systeme, welche gefertigte Strukturen, Oberflächeneffekte und Dimensionen ausnutzen, die typischerweise Mikrometer oder hunderte oder tausende Mikrometer messen und die mikroelektronische Komponenten als integralen Bestandteil einschließen können.“ (Wegeng 1996) (s. Abb. 5) Derartige Systeme sind beispielweise in der Elektro- und Fahrzeugindustrie oder im Maschinenbau unter der Bezeichnung micro electro-mechanical systems bzw. MEMS bekannt. (s. Abb. 6, S. 12)

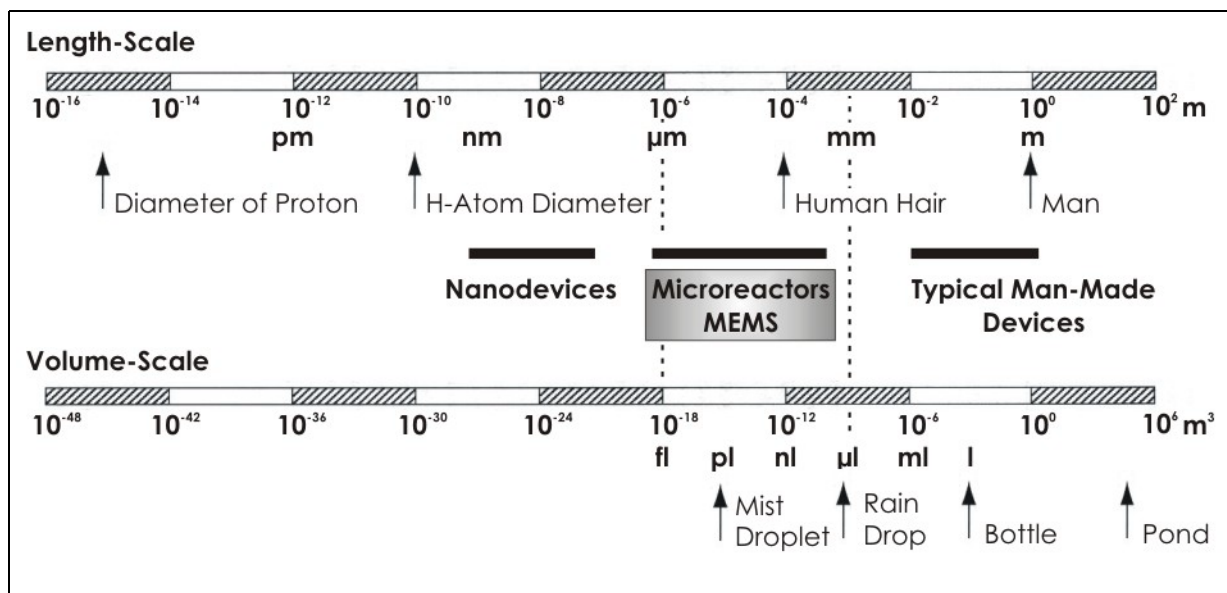
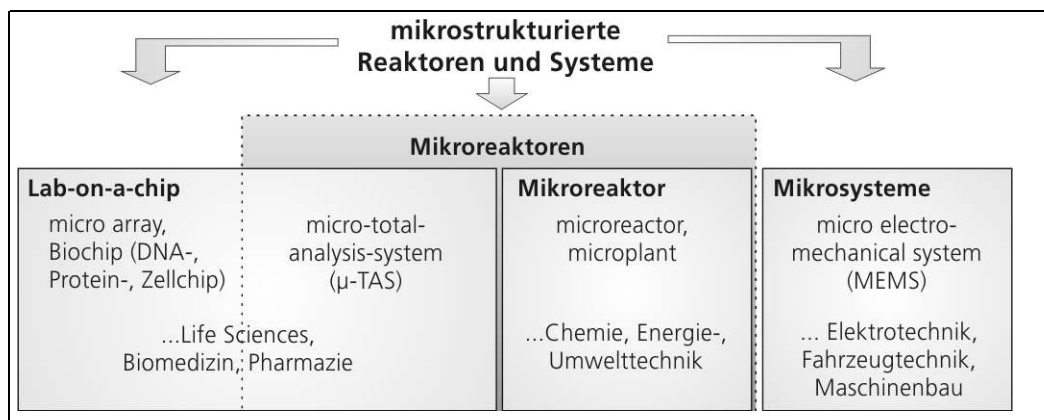


Abb. 5: Größenverhältnisse kleiner Dimensionen nach GAD-EL-HAK (Gad-el-Hak 2002)

Bereits Ende der siebziger Jahre wurden erste Mikroreaktorsysteme auf der Basis von Siliziumchips vorgeschlagen. (Terry 1979) In der Folge wurden eine Vielzahl an Einzellösungen verfolgt und die prinzipielle Eignung der Mikroreaktionstechnologie für die Chemie und Life Sciences für Spezialanwendungen gezeigt. Das Konzept der micro-total-analysis-systems bzw.  $\mu$ -TAS, also von Mikroreaktoren für die Life Sciences, Pharmazie und Medizin, wurde zu Beginn der neunziger Jahre geprägt. (Manz 1990) Seitdem erfuhr diese noch recht junge Disziplin ein rasantes Wachstum. Die Mikrosystemtechnik als übergeordnetes Feld wurde von der „NEXUS Task Force Market Analysis“ in Kooperation mit der Wicht Technologie Consult AG, München in einer umfassenden Marktstudie (Microsystems World Market Analysis II: 2000-2005) analysiert. (Flören 2003) Gemäß dieser Studie steigt das Marktvolumen der MEMS-Produkte von etwa 30 Mio. USD im Jahr 2000 auf etwa 68 Mio. USD. Dies entspricht einer jährlichen Wachstumsrate CAGR > 20%. Unter Berücksichtigung der Hebelwirkung mikrosystemtechnischer Produkte auf die Machbarkeit, Optimierung und Wettbewerbsfähigkeit von Produkten im Makrobereich erhöht sich das Marktvolumen auf mehrere Mrd. USD. Die Studie umfasste die Bereiche Informationstechnik (IT) & Peripherie, (Bio-)Medizin, Automobil, Telekommunikation und Haushalt. Die Reihenfolge entspricht gleichzeitig den

Marktanteilen an mikrosystemtechnischen Produkten. Hierbei liegt das Marktvolumen von Produkten für den biomedizinischen Bereich bei etwa 15 Mio. USD. (Flören 2003, Teunissen 2003, Zengerle 2002) Basis für diese Entwicklung sind die Erforschung der technologischen Machbarkeit und die Ausweitung in immer neue Anwendungsbereiche. Begrifflich kristallisierten sich neben den MEMS zwei Hauptbezeichnungen für mikrostrukturierte Reaktoren heraus, was Abbildung 6 illustriert. Diese Kategorisierung orientiert sich dabei am jeweiligen Applikationsfeld. Mikroreaktoren für die Life Sciences, Pharmazie und Medizin rangieren auch unter dem Synonym micro-total-analysis-systems bzw.  $\mu$ -TAS. Diese bilden gleichzeitig zusammen mit den micro arrays bzw. Biochips (DNA-, Protein- oder Zellchips) die Gruppe der Labs-on-a-chip. In der chemischen Industrie bzw. Energie- und Umwelttechnik ist die Bezeichnung Mikroreaktor erhalten geblieben und drückt die Nähe zur klassischen Reaktionstechnik aus. Dies manifestiert sich auch in der Entwicklung der Mikroverfahrens- oder Mikroreaktionstechnik zu einer eigenen Forschungsdisziplin. In Anlehnung an den Begriff Miniplant wird bei integrierten Reaktorsystemen zuweilen auch von microplants gesprochen. (van den Berg 2000, Hessel 2002a)



**Abb. 6:** Begriffsbildung mikrostrukturierter Reaktoren und Systeme: Orientierung am Applikationsfeld

Zu Beginn der 1990er Jahre bestand das Hauptinteresse in der Erarbeitung von Konzepten und einzelnen Modulen. Heute geht es vielfach bereits um die Vermarktung von z.T. hochintegrierten Systemen oder von mikrostrukturierten Komponenten zur Implementierung in bestehenden Produktionsverfahren. Die frühe Definition nach WEGENG (Wegeng 1996) beinhaltet die Erkenntnis, dass nicht alle charakteristischen Längen entlang des Fluidvolumens entsprechend klein sein müssen. Vielmehr ist nur dort der Einsatz mikrostrukturierter Elemente sinnvoll, wo der neue Prozess deutliche Vorteile gegenüber dem klassischen Verfahren aufweisen kann. (Matlosz 2003, Garman 2001, Schubert 2001, Ehrfeld 2000, Baal 2004)

Im Zuge der Prozessintensivierung, also der Effizienzsteigerung von Prozessen auf den Gebieten der Biologie, Chemie und Energietechnik im Sinne der Nachhaltigen Entwicklung, eröffnet die Mikroreaktorik ein enormes Potenzial. Sie schafft durch ihre technologischen Wurzeln Zugang zu den hochentwickelten Verfahren der Halbleiterindustrie sowie der Feinwerktechnik. (Stankiewicz 2000, Ehrfeld 2003, Benson 1989) Während das Hauptaugenmerk in den Lebenswissenschaften auf



kostengünstigen Verfahren und Endprodukten liegt und auf Einweg-Artikel abzielt, muss sich die Mikroreaktorik im Bereich der produzierenden Industrie in die gegebenen Systeme und Strukturen einfügen. Dem Industriechemiker oder Verfahreningenieur bietet sich hier für die Produktionssteigerung bzw. die Übertragung der Prozesse vom Laborreaktor in den (großtechnischen) Produktionsmaßstab eine echte Alternative zum klassischen „Scaling-up“. (Zlokarnik 2003, Zlokarnik 2000) Das sog. „Numbering-up“, also die einfache Parallelisierung der Komponente, ist dem sog. „Equaling-up“ gewichen. Anstatt den gesamten Prozess zu miniaturisieren, geht es hierbei um die Multiplikation nur der mikrostrukturierten Komponenten, welche für den Gesamtprozess die notwendige technische Verbesserung besitzen. Im Labormaßstab genügt es je nach Anwendungsfall, die Realisierbarkeit eines Verfahrens mit einem einzigen Modul zu evaluieren oder durch simples „Numbering-up“ eine kleine Produktlinie aufzubauen. Für die Synthese im mittleren Maßstab erscheint das Konzept des „Equaling-up“ notwendig zu werden. Die Kombination beider Konzepte, also die Parallelisierung der Komponenten aus dem mittleren Maßstab, erlaubt damit sogar großtechnische Produktionsvolumina. (Markowicz 2003, Ehrfeld 2003, Wochner 2002) Somit können die „economy-of-scale“ und zugleich die Vorteile mikrostrukturierter Bauelemente ausgenutzt werden. Diese Entwicklungsdynamik findet ihre Entsprechung in der Welt der Mikroelektronik. Auch hier war es die Realisierung des integrated circuits (IC), der die technische Revolution auslöste, und nicht der Transistor an sich. (Jensen 2001)

### **A) Charakterisierung von Mikroreaktoren**

Mikroreaktoren sind qualitativ durch folgende physiko-chemische und verfahrenstechnische Hauptmerkmale gekennzeichnet:

- großes Verhältnis Oberfläche-zu-Volumen
- große Gradienten physikalischer Systemparameter (Temperatur, Konzentration, Druck, Dichte etc.) realisierbar
- hohe Systemdynamik zur Einstellung neuer dynamischer Gleichgewichte
- homogene Verteilung von Systemparametern (Geschwindigkeit, Temperatur etc.), i.d.R. laminare Strömungsverhältnisse
- kleine Reaktions- und Reaktorvolumina (Prozessintensivierung), aber kleiner absoluter Gesamtdurchsatz
- große funktionelle Integrationsfähigkeit, notwendig da ungünstige spezifische Kapazität

Im analytischen Umfeld eingesetzte Mikroreaktoren, also  $\mu$ -TAS, zeichnen sich im Vergleich zu Makrosystemen aus durch eine höhere Effizienz in Bezug auf das Probenvolumen. Dies kommt in einem Preisvorteil pro Analyse und u.U. einer verbesserten Leistungsfähigkeit zum Ausdruck. Durch konsequente Miniaturisierung und Parallelisierung sinken der Energie- und Platzbedarf, v.a. aber muss weniger Probenmenge eingesetzt werden. Kürzere Antwortzeiten des Systems und Automatisierungslösungen erlauben einen höheren Probendurchsatz, womit die Informationsdichte pro Zeit und Raum deutlich drastisch werden kann. (Manz 1990, van den Berg 2000, Ehrfeld 2000)

Aus verfahrenstechnischer Sicht zielen Mikroreaktoren auf die Nutzung verbesserter Stoff- und Wärmetransporteigenschaften sowie gleichmäßigerer Strömungsverhältnisse ab, ohne dabei Einfluss auf die molekularen Abläufe selbst zu nehmen.

Im Anhang B sind Mikro- und Makroreaktoren in ihren typischen Abmaßen gegenübergestellt. Der Vergleich dient einer größenordnungsmäßigen Abschätzung der Effekte in den verschiedenen Längendimensionen. Es wurden sowohl geometrische Größen als auch reaktionstechnische und betriebliche Parameter betrachtet. Im Zuge der Verkleinerung der charakteristischen Längendimension  $L$  ergeben sich eine Reihe von Vorteilen, welche durch funktionale Zusammenhänge quantifiziert werden können:

Der Gradient der physikalischen Größen Druck, Temperatur, Konzentration oder Dichte korreliert mit der reziproken charakteristischen Länge  $L$  des Systems. Somit sind in Mikroreaktoren erhöhte spezifische Wärme- und Stofftransportraten sowie größere Diffusionsraten zu erwarten. Durch die Verkleinerung der Strukturen sinkt das innere Reaktor- bzw. Probenvolumen und damit bei kontinuierlichen Prozessen die Verweilzeit. Gleichzeitig steigt das Verhältnis Oberfläche-zu-Volumen proportional zu  $1/L$ . Dies ermöglicht einen schnelleren Energieaustausch. Die thermische Relaxation eines Systems korreliert mit dem Quadrat der charakteristischen Länge  $L^2$ . Damit können beispielsweise Mikroelemente aus Silizium, mit Abmessungen im Bereich von  $100\ \mu\text{m}$ , Frequenzen in der Größenordnung von  $5\ \text{kHz}$  folgen. Mithin wird es möglich, z.B. ein konstantes Temperaturregime selbst bei stark exo- oder endothermen Reaktionen im explosiven Bereich zu fahren oder oszillierende Reaktionen herrschen. Die Mischzeit besitzt die gleiche funktionelle Abhängigkeit von der Längendimension wie die thermische Relaxation. In Mikrostrukturen werden somit extrem kurze Mischzeiten realisiert, z.B. ca.  $100\ \text{ms}$  für Flüssigkeiten in  $10\ \mu\text{m}$  weiten Kanälen. Die Abmessungen rangieren hierbei z.T. bereits in der Größenordnung der Abmessungen der für die Mischung verantwortlichen diffusiven Mikromischzellen. (Pagel 2001, Ehrfeld 2000, 2003b, Jensen 2001, Renken 2003a)

Die fluidischen Charakteristika von Flüssigkeiten in Mikrostrukturen gehorchen selbst mit Strukturdimensionen weit unterhalb von  $1\ \mu\text{m}$  den klassischen hydrodynamischen Kontinuummodellen. In Kanälen mit einem hydraulischen Durchmesser  $d_h = 10\ \mu\text{m}$  ist für wässrige Medien die äquivalente KNUDSENZahl  $\text{Kn} \approx 3 \cdot 10^{-5} \ll 10^{-3}$ . Sie liegt damit weit im kontinuierlichen Flussbereich. So bleibt z.B. die Dichte konstant trotz erheblicher Druckgradienten, welcher bei konstantem Volumenstrom  $Q$  mit  $L^{-4}$  korreliert. Auch die Haftbedingung für wandnahe Strömungen (no-slip boundary condition) behält für Flüssigkeiten selbst in Mikrokanälen mit  $d_h < 5\ \text{nm}$  noch ihre Gültigkeit. Bei Gasen hingegen muss bereits bei Strukturen  $d_h < 1\ \mu\text{m}$  allmählich mit Wandschlupf gerechnet werden. In Spalten von wenigen nm Höhe konnten an der Grenzfläche fest-flüssig jedoch sowohl Schlupf als auch diskontinuierliche Temperatursprünge experimentell beobachtet werden. Obwohl die Scherrate bei  $Q = \text{const}$  proportional zu  $L^{-3}$  skaliert, ist erst in Strukturen mit  $d_h < 10\ \mu\text{m}$  mit signifikanten

Abweichungen von den Makromodellen zu rechnen. Dies äußert sich beispielsweise in der Erhöhung der Viskosität. Plastisch ausgedrückt wird Wasser dort allmählich zu Honig.

In Mikrostrukturen dominieren Oberflächenkräfte gegenüber den Kräften elektrischer Felder oder Schwerefelder. Flüssigkeiten bilden an der Grenzfläche zu Feststoffen elektrische Doppelschichten aus. Neben einem druckgetriebenen Transport von Fluiden oder Partikeln kann ein Fluss in Mikrokanälen auch unter Ausnutzung elektroosmotischer und elektrophoretischer Kräfte erfolgen. Aufgrund der kleinen hydraulischen Durchmesser ergeben sich auch für relativ hohe Strömungsgeschwindigkeiten noch verhältnismäßig kleine REYNOLDSzahlen  $Re < 10^3$  (s. Anhang B, Tabelle B4). Für die meisten praktischen Fälle kann also von laminaren Strömungsprofilen ausgegangen werden. Zur experimentellen Untersuchung des (mikro-) fluidischen Strömungsverhaltens hat sich die Methode der micro particle image velocimetry ( $\mu$ -PIV) als probates Mittel erwiesen. Aufgrund der Kleinheit der Kanäle ergeben sich trotz der ausgeprägten Laminarität gleichmäßige Strömungsprofile und damit enge Verweilzeitverteilungen, was wiederum definierte und optimierbare Kontaktzeiten erlaubt. (*Mala 1999, Gad-el-Hak 2002, Karniadakis 2002, Gravesen 1993*)

Die dargelegten verfahrenstechnischen Eigenschaften von Mikroreaktoren haben direkte Konsequenzen auf die Qualitätsmerkmale und Kostenstruktur darin prozessierter Stoffe. Diese Charakteristika führen zu signifikanten Verbesserungen beim Umgang mit Ressourcen im Sinne der Nachhaltigen Entwicklung:

- schnelle und kontrollierte Reaktionsführung durch kleinere Zeitkonstanten  
⇒ höhere Sicherheit und Selektivität, was bei gleichem Umsatz die Ausbeute steigert
- Reaktionen kinetisch, thermodynamisch und strömungstechnisch unter extremeren Bedingungen möglich  
⇒ höherer Umsatz durch erhöhte Raum-Zeit-Ausbeute und Selektivität
- höhere Reinheit durch weniger Nebenreaktionen oder engere Korngrößenverteilung  
⇒ homogenere Produkte
- geringerer thermischer und mechanischer Energieverbrauch  
⇒ kostengünstigere Prozessführung

Als nachteilig ist allerdings anzusehen, dass sich durch die Verkleinerung der Strukturen mikrofluidischer Reaktoren das Störungsrisiko erhöht. Verunreinigungen, Fouling, Korrosion oder Blasen können die Prozesse beeinträchtigen. Dies kann im Extremfall zum Ausfall des Moduls führen. Der absolute Durchsatz ist im Vergleich zu makroskopischen Systemen entsprechend geringer. Der Volumenstrom  $Q$  liegt für chemische Applikationen typischerweise in der Größenordnung  $Q \approx 1$  l/h, im Falle biologischer und analytischer Anwendungen darunter. Die Beschickung der Mikrostrukturen mit einem katalysatorbeschichteten Trägermaterial ist auf konventionellem Wege nicht mehr zu bewerkstelligen, weshalb die Entwicklung alternativer Methoden zur *in situ* Beschichtung notwendig

wurde. Ferner steigt der Einfluss der Oberflächenwechselwirkungen, was sich z.B. im Anfahrverhalten negativ bemerkbar machen kann. Bislang existieren zwar noch keine allgemein gültigen Lösungen für diese Schwierigkeiten. Es zeichnen sich jedoch bereits entsprechende Lösungsvorschläge ab: KOCH *et al.* gibt dem Anwender von Mikrofluidreaktoren praktische Hinweise an die Hand, um Partikelverunreinigung (Filter, Druckstöße) und Blasenbildung (Priming mit Ethanol oder CO<sub>2</sub>) zu vermeiden. Ferner kann mit der Anzahl an mikrostrukturierten Komponenten in einem System der Aufwand zur Datenerfassung und -verarbeitung ansteigen. Dies verlangt nach einer entsprechend dimensionierten und damit kostspieligen Rechnerperipherie. Eine weitere Implikation besteht in relativ teuren Produktionsverfahren für den Mikroreaktor, was jedoch teilweise durch die Wahl geeigneter Werkstoffe kompensiert werden kann. (Koch 2000, Renken 2003b, Northrup 2003, Hessel 2002,a-c)

### **B) Werkstoffe und Herstellungsverfahren für Mikroreaktoren:**

Die Bandbreite der zur Verfügung stehenden Materialien erlaubt es, je nach Prozess den für die Mikrokomponente geeigneten Werkstoff zu wählen. Folgende Kriterien werden bewertet:

- chemische und biologische Inertheit
- mechanische Festigkeit und Duktilität
- thermische Leitfähigkeit und Wärmeausdehnungskoeffizienten
- geometrische Restriktionen (Kristallstrukturen) und Gewicht
- Möglichkeit zur Oberflächenmodifikation
- optische Transparenz und Zugänglichkeit
- Integrierbarkeit elektronischer Schaltungen und Regelstrecken
- Preis des Rohmaterials und Kosten des Herstellungsverfahrens

Die Mikroreaktionstechnik greift hauptsächlich auf die klassischen Werkstoffe im Reaktorbau wie Edelstahl (Burns 1997, Brandner 1999) und Glas (Dietrich 2002, Schwesinger 2002) zurück. Daneben finden aber auch Silizium (Mayer 1999, Srinivasan 1997, Poser 1997, Woias 2001), galvanische Materialien und Keramiken (Ritzhaupt-Kleissl 1996, Knitter 2001, Bauer 2002) Verwendung. Im biowissenschaftlichen Umfeld gewinnen technische Polymere wie PTFE, PEEK, PMMA oder PDMS mehr und mehr an Bedeutung. (Xia 1998, de Mello 2002a, Becker 2002, Boone 2002) Der Einsatz von Polymerwerkstoffen bedeutet im Vergleich zu klassischen Materialien eine drastische Senkung der Herstellungskosten. Hier liegen die Nachteile in den hohen Investitions- und Betriebskosten der erforderlichen Anlagen, welche zudem bilanziell mit einem großen Anlagevermögen zu Buche schlagen.

Zur Herstellung oder Präparation von Mikroreaktoren dienen zum einen konventionelle mechanische oder thermische Fertigungsverfahren, wie z.B. spanabhebende Verfahren, Schweißen oder Löten, die aber an die Erfordernisse von Mikrostrukturen angepasst wurden. Zum anderen kommen die Verfahren zum Einsatz, welche speziell für diesen Größenordnungsbereich entwickelt und in der

Halbleiterindustrie perfektioniert wurden. Dazu gehören u.a. Dünnschichttechnologien, Ätzverfahren und spezielle Techniken zur Aufbau- und Verbindungstechnik. Daraus resultierend steht heute eine beträchtliche Anzahl verschiedener Fertigungstechnologien zur Verfügung, welche in der Literatur besprochen wurden. (*Madou 1997, Köhler 1999b, Menz 1997*) Methodisch lassen sich die Herstellungsverfahren grundsätzlich in A) direkte Methoden und B) Replikationsmethoden einordnen.

### **A) Direkte Methoden**

Hierzu zählen sowohl die Mikromaterialbearbeitung als auch die eigentliche Mikrosystemtechnik, was gelegentlich unter dem Begriff Mikromechanik zusammengefasst wird. Zur **Mikromaterialbearbeitung** zählen zerspanende Verfahren wie Mikrobohren, -drehen, -fräsen oder -sägen. Es kommen miniaturisierte Werkzeuge i.d.R. aus gehärteten Metallen oder Diamant auf rechnergesteuerten Präzisionsmaschinen (CNC-Fräsen u.a.) zum Einsatz. Diese erlauben die Bearbeitung von Bauteilen mit charakteristischen Längen von einigen hundert Mikrometern mit Ungenauigkeiten kleiner als 1  $\mu\text{m}$ . Zu den direkten Herstellungsverfahren werden auch die Mikrofunkenerosion, Mikrosandstrahlen und laserinduzierte Methoden wie Ablation, Abscheidung und Ätzen gezählt. Zur Erzeugung tiefer Strukturen (mehrere Millimeter) und hoher Aspektverhältnisse (Strukturtiefe zu -breite) werden i.A. metallische Werkstoffe bearbeitet, aber auch Gläser, ausgehärtete Polymere und keramische Grünkörper.

Um ebene Formen von einigen hundert Mikrometern bis in den sub-Mikrometerbereich mit hoher Strukturtreue zu präparieren eignen sich die Planar- und Tiefenätzverfahren der **Mikrosystemtechnik**. Dies umfasst klassische Lithographieverfahren wie Photo-, Röntgenstrahl- und Elektronenstrahlolithographie. Sie dienen der parallelen Strukturübertragung durch Bestrahlung von Resistschichten über Schattenprojektion. Bei seriellen lithografischen Verfahren werden die Strukturen direkt in die Schicht eingeschrieben. Die letztgenannten Methoden dienen beispielsweise der Herstellung von Belichtungsmasken, welche bei der parallelen Strukturierung mehrerer Module auf demselben Substrat zum Einsatz kommen.

Dünnschichttechnologien werden bei der Abscheidung von Schichten im Nanometer-Bereich benötigt. Dazu zählen neben der galvanischen Abscheidung und der thermischen Oxidation die Familien der PVD- (physical vapor deposition) und CVD- (chemical vapor deposition) Prozesse. Diese Verfahren können in ihrer Abscheidungseffizienz z.B. durch elektrische Gleichfelder (DC-Sputtern), hochfrequente Wechselfelder (RF-Sputtern) und Magnetfelder (Magnetron Sputtern), Vakua (Low Pressure CVD), Plasmen (Plasma Enhanced CVD) oder Laseranregung (Laser Induced CVD) erhöht werden.

Um die gewünschten Strukturen aus dem Substratmaterial herauszuarbeiten, werden chemische und physikalische Ätztechniken eingesetzt. Im Gegensatz zu Planarätztechniken lassen sich mit Tiefenätzprozessen Substrate dreidimensional strukturieren. Zentrales Charakteristikum bei der Vielzahl an Trocken- und Nassätzverfahren ist der Transport von Material aus einem Festkörper durch eine Phasengrenze in eine beweglichen Phase. Dabei wird die Leistungsfähigkeit des Ätzprozesses im Wesentlichen durch Ätzrate und Selektivität sowie die formbestimmenden Parameter

Anisotropiegrad und Flankenprofilausbildung bestimmt. Die Trockenätzverfahren verlaufen typischerweise isotrop also richtungsunabhängig. Beim nasschemischen Ätzen sind sowohl isotrope als auch anisotrope Verfahren etabliert. Dies wird zum einen durch die Art des Ätzbades bestimmt, zum anderen durch die Orientierung des Kristallgitters in dem zu bearbeitenden Material. Beispielsweise gelingt es beim isotropen Silizium-Tiefenätzen, runde Kanten zu strukturieren. Hingegen können durch anisotropes Ätzen Strukturen mit geraden Flanken präpariert werden, die sich durch Aspektverhältnisse größer 1 auszeichnen.

Analog zu den planaren Beschichtungsverfahren (CVD- bzw. PVD) werden auch Trockenätzverfahren durch Hilfsttechnologien unterstützt. Dies beinhaltet reaktive Gase, Plasmen, Laserstrahlen und Elektronenstrahlen. Weit verbreitet sind physikalische Ätzprozesse mit Inertionen wie Sputterätzen (IE, ion etching) und konventionelles Ionenstrahlätzen (IBE, ion beam etching). Das Reaktive Ionenätzen (RIE, reactive ion etching), chemisch unterstütztes Ionenstrahlätzen (Chemically Enhanced IBE), Reaktives Ionenstrahlätzen (RIBE reactive IBE) und Plasmaätzen (PE, plasma etching) zählen zu den gemischt physikalisch-chemische Verfahren. Das Barrel-Ätzen (BE, barrel etching) ist als rein chemische Trockenätzverfahren zu nennen.

Die Mikrosystemtechnik befasst sich historisch begründet hauptsächlich mit Silizium in seinen Verbindungen  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Si}_3\text{N}_4$ ,  $\text{Si}_x\text{O}_y\text{N}_z$  sowie verschiedenen Metallen (Al, Ni, Cr, Au, Ag etc.) und Metalloxiden ( $\text{TiO}_2$ ,  $\text{SnO}_2$ , ZnO etc.). Zur Strukturierung in photostrukturierbaren Gläsern kommen ebenfalls Mikrosystemtechniken in Frage. Speziell für Silizium wurden zur Erzeugung von Strukturiefen bis in den Millimeterbereich mit Aspektverhältnissen in der Größenordnung von 10:1 komplexe Methoden wie das Advanced Silicon Etching (ASE) oder die LiGA-Technologie entwickelt. Letztere bildet die Brücke zu den Replikationsmethoden, da sie einen Abformschritt enthält, mit der vorgeschalteten Lithographie und Galvanofornung aber auch Elemente der Mikromechanik. (Madou 1997, Ehrfeld 2000, Köhler 1999b, Menz 1997, Büttgenbach 1994)

## B) Replikationsmethoden

Im Gegensatz zu den direkten Methoden werden bei den Replikationsmethoden die eigentlichen Strukturen mithilfe eines mikrostrukturierten Werkzeugs hergestellt. Hierbei ist der kosten- und zeitintensive Prozess der Mikromechanik nur zur Herstellung eines sog. Masters notwendig. Die eigentlichen Strukturen werden dann mithilfe dieses negativen Abformwerkzeugs erzeugt - vornehmlich in Polymeren, aber auch in keramischen Grünlingen. Neben der erwähnten LiGA-Technologie sind Mikrospritzgießen, Heißprägen und Druckgießen heute etablierte Verfahren. Hiermit sind auch Strukturen mit hohen Aspektverhältnissen möglich. Zur kostengünstigen und schnellen Erzeugung von Mikrofluidstrukturen im Sinne eines Rapid Prototypings eignet sich besonders die Soft-Lithographie unter Verwendung von Poly-Dimethylsiloxan (PDMS). (Becker 2000, Duffy 1998, Xia 1998)

Zur **Konstruktion** von lithographischen Masken oder Datensätzen für CNC-gesteuerte Maschinen hat sich der Einsatz von CAD-Tools bewährt. Der Gebrauch von Simulationswerkzeugen bei der

Optimierung mikrosystemtechnischer Bauteile kann zu einer weiteren Effizienzsteigerung beitragen, da Modifikationen oder Neukonstruktionen bewertet werden können. Hierbei liefern Softwarepakete mit FEM- (finite element method) oder CFD-Codes (computational fluid dynamics) auch für Größenordnungen im unterem Mikrometerbereich bereits unter Verwendung konventioneller Rechenmodelle sehr gute Ergebnisse (s. S. 14). (*Madou 1997, Koch 2000*)

In der **Aufbau- und Verbindungstechnik** (AVT) kommen irreversible und reversible Fügeverfahren zum Einsatz. Dabei gehören z.B. (Hart-) Löten, (Elektronenstrahl-) Schweißen, Kleben sowie Diffusions-Bonden bei Materialien mit ähnlichen linearen Wärmeausdehnungskoeffizienten zu den irreversiblen Methoden. Zur elektro-mechanischen Kopplung kommen Methoden aus dem Packaging-Bereich in der Mikroelektronik zum Einsatz, wie z.B. das Drahtbonds oder u.U. die Flip-Chip-Technik. Zu den reversiblen Verfahren zählen klassische Flanschverbindungen über Dichtmaterialien, Laminieren oder formschlüssige Verbindungen über Grenzflächen-Adhäsionskräfte.

### **C) Anwendungsfelder:**

Die Vielzahl der Herstellungs- und Bearbeitungstechnologien und die entsprechend breite Palette einsetzbarer Werkstoffe in der Mikroreaktionstechnik eröffnet den Zugang zu einem weitgefächerten Anwendungsfeld, welches von der Chemie über die Energietechnik bis zu den Life Sciences reicht. Nach EHRFELD lässt sich dieses Spektrum in 3 Hauptrubriken kategorisieren: (*Ehrfeld 2003a, 2003b*)

1. Gewinn an Information
2. Entwicklung neuer Prozesse
3. Einsatz in der Produktion

Innerhalb der Rubrik 1 bilden die sog. Labs-on-a-chip, also micro arrays und mikrofluidische  $\mu$ -TAS für Anwendungen in den Life Sciences die größte und bekannteste Gruppe. (vgl. Abb. 6, S. 12) Während micro arrays der massiv parallelisierten Analyse selektiver Wechselwirkungsereignisse auf planaren Trägern mit einer Größe weniger  $\text{cm}^2$  im batch-Modus dienen, handelt es sich bei den Anwendungen von  $\mu$ -TAS häufig um kontinuierlich ablaufende Prozesse. In diesen hochintegrierten Systemen übernehmen Sensoren, Aktuatoren und mikrofluidischer Kanäle Aufgaben wie Probenvorbereitung, Stofftransport, Misch- und Trennoperationen sowie die Detektion. In diese Rubrik fallen beispielsweise auch High-Throughput-Methoden in der Chemie- und Materialentwicklung. Im weiteren Sinne werden diesen Systemen auch Anwendungen zur Energiegewinnung in der Informationstechnologie zugeordnet.

Für die verfahrenstechnische Prozessentwicklung oder die Prozessintensivierung (Rubrik 2) stehen Komponenten aus Baukastensystemen der modularen Mikroverfahrenstechnik zur Verfügung. Sie ermöglichen kürzere Entwicklungszeiten, wodurch bei kommerzieller Vermarktung Wettbewerbsvorteile erreicht werden können. Aus produktionstechnischer Sicht (Rubrik 3) bietet die Anwendung der Mikroreaktorik in ihren verschiedenen Konzepten („Numbering up“, „Equaling up“, s. S. 13) Möglichkeiten für klein-, mittel- und großtechnische Produktionsmengen. Sie kann ihre

Vorzüge jedoch am besten in der Herstellung von Fein- und Spezialchemikalien oder Pharmazeutika ausspielen.

Die nachfolgende Ausführung spannt den Bogen über die möglichen Applikationsgebiete für Mikroreaktoren. Sie erhebt dabei keinen Anspruch auf Vollständigkeit, sondern dient vielmehr zur groben Orientierung.

### 1) Gewinn an Information

Die Life Sciences sind dominiert von einer Vielzahl aufwändiger und kostenintensiver Verfahren. Besonders die **Bioanalytik** stellt heute hohe Anforderungen und Erwartungen an Miniaturisierung, Parallelisierung und Qualität der Ergebnisse. Die Mikroreaktionstechnik bietet in Kombination mit moderner Informationstechnologie eine mannigfaltige Auswahl an Methoden, um diesem Anspruch zu genügen. Beim Einsatz von Chipreaktoren auf Silizium-, Glas- oder Polymer-Basis kommen die physiko-chemischen und verfahrenstechnischen Vorteile (s. S. 13ff) mikrostrukturierter Komponenten besonders zum Tragen. Hierbei bilden die DNA-micro arrays die Produkte mit der höchsten Marktreife. Diese hoch integrierten planaren Probenträger dienen der hochparallelen und schnellen Analyse biomolekularer Interaktionen und deren Transformation in digitale Information. Hierbei binden die Analyten über chemische, biochemische und physikalische Mechanismen selektiv an entsprechende Oberflächenspots. Durch Integrationsdichten von bis zu  $10^3$  Proben/cm<sup>2</sup>, die in einem Rastermaß von ca. 500 µm dargestellt werden können, werden heute mehrere tausend Experimente in kurzer Zeit realisiert. Zur Detektion kommen optische Methoden wie Fluoreszenz-, Extinktions- und Reflexionsmessungen ebenso zum Einsatz wie nicht-optische Methoden, z.B. elektrische Verfahren via Goldnanopartikeln. (*Packer 1999, Heller 2002, Csaki 2003, Brüggemeier 2003*) Neben den DNA-Biochips gewinnen die Protein-micro arrays immer mehr an Bedeutung. Die hochspezifischen Antigen-Antikörper-Interaktionen werden hierbei zur Wechselwirkungsanalyse für Expressionsstudien, Target-Identifizierung oder toxikologische Untersuchungen ausgenutzt. (*Cahill 2001, Kodadek 2001, Reichert 2003, Brüggemeier 2003*) Auch in der Systembiologie und Proteom-Analytik gibt es Entwicklungen, in denen Mikroreaktoren im Chipformat eingesetzt werden. Durch den Anspruch, den Expressionszustand aller Proteine eines Organismus' oder Gewebes qualitativ und quantitativ zu einer bestimmten Zeit und unter bestimmten Bedingungen zu analysieren, bedarf es in besonderem Maße effizienter Methoden wie der Mikroreaktorik zur Lösung bestimmter Teilaufgaben. (*Kitano 2002, Lottspeich 1999, Becker 1999*) Aufgrund ihrer zentralen Bedeutung in der Bioanalytik wurde bereits Anfang der 90er Jahre an der Übertragung der DNA-Amplifikation über die sog. polymerase chain reaction (PCR) auf Chipbauelemente gearbeitet. Für PCR-Chipreaktoren existieren sowohl Batch- als auch als Konti-Reaktoren. Dabei werden in den integrierten mikrofluidischer Elemente Flussraten von wenigen µl/min erreicht. (*Northrup 1993, Schneegaß 2001*) Ein Bindeglied zwischen Analyse- und **Trennsystemen** bildet die Kapillarelektrophorese (CE). Auf diesem Gebiet wurde in der Miniaturisierung molekularer Trennvorgänge auf Chipbauteile Pionierarbeit geleistet. (*Harrison 1993, Manz 1996*) Die Aufspaltung von Zellgemischen oder die Auszählung von Zellen in Suspensionen nutzt ebenfalls



(di-)elektrophoretische Effekte, aber auch optische Methoden (z.B. „Laserpinzette“). In mikrofluidischen Chipbauteilen kann dieses Zellhandling in effizienter Weise erfolgen. (Li 1997, Quake 2000) Seit Mitte der 90er Jahre befinden sich Zell-Chip-Hybridsysteme in der Erforschung. Hierbei verschwimmen die Grenzen zwischen belebter Natur und technischem System immer mehr. (Frommherz 1991, Offenhäuser 2000)

In der **pharmazeutischen Wirkstoffforschung** sind Biochips für den Einsatz im ultra-High-Throughput Screening (uHTS) oder High-Content Screening (HCS) im Zusammenhang mit sog. ADMET-Studien (absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity) der bei Target-Identifizierung und -Optimierung zu nennen. Bereits in den 80er Jahren wurde aus Kostengründen die Forderung nach immer kleinern Probenvolumina und massiver Parallelisierung laut. Neben der Miniaturisierung der Mikroplattenformate bis hin zur sog. Nanotiterplatte werden auch in diesem Bereich mikrostrukturierter Probenträger oder allgemein  $\mu$ -TAS z.T. bereits im Routinebetrieb eingesetzt. (May 2002a, 2002b, Köhler 1999a, Grabley 1999, Baal 2004)

In der modernen **Medizin** setzte die Mikroreaktionstechnik zunächst bei Anwendungen in der klinischen Praxis an. Dazu gehören z.B. minimalinvasive Operationstechniken, intravaskuläre Instrumente oder Diagnosechips zur Medikamentenverträglichkeit und Blutschnelltests. *In vitro*-Anwendungen weisen heute in Richtung einer dezentralisierten Diagnose, der sog. Point-of-Care Diagnostik. (Baal 2004, Schüle 2002, Werner 2000, Jakeway 2000, Teunissen 2003) Im Sinne einer individualisierten Therapie sollen zukünftig maßgeschneiderte Therapieformen an den Anforderungen des jeweiligen Patienten ausgerichtet werden. Hauptsächlich der *in vivo*-Einsatz aktueller therapeutischer Anwendungen zielt auf unterschiedlichste Massenmärkte ab. Beispiele hierfür sind die geregelte Wirkstoffdosierung vor Ort (Drug Delivery), Herzschrittmacher oder Implantate für Sehschwache oder Gehörlose. Im medizinischen Alltag haben sich z.B. Inhalatoren für die extrakorporale Medikamentendosierung etabliert. (Jolly 2003, Fatz 2000, Santini 1999, Pinget 1995) Applikationen in der **Umweltanalytik** zeichnen sich durch den Einsatz mikrofluidischer Elemente v.a. als universelle und damit hochintegrierte Analysengeräte aus. Diese vereinen eine Vielzahl sensorischer Elemente beispielsweise zur selektiven Messung verschiedener Gase und Ionen oder der Messung von Temperatur und Druck. (Henze 1999, Koch 2000) Mikro-Kalorimeter schlagen die Brücke zur **chemischen Analytik**, da hier neben biochemischen Abläufen auch klassische chemische Aufgabenstellungen wie die Bestimmung von Reaktionsenthalpien analysiert werden können. (van Herwaarden 1994, Köhler 1998)

In der **kombinatorische Chemie** kommen ebenfalls Mikrosysteme zum Einsatz. Hierbei werden durch sog. building blocks und Reaktionsmechanismen Substanzbibliotheken hoher struktureller Diversität für die Wirkstoffsuche synthetisiert. Zur Derivatisierung dienen hochparallele Mikroreaktorsysteme. Die hierbei entstehenden potenziellen Wirkmoleküle (sog. leads) werden in biologischen uHTS-Verfahren auf ihre physiologische Wirksamkeit gegenüber Targetmolekülen getestet. (Eichler 2003, Grabley 1999) Analoge Ansätze zum biochemischen bzw. biologischen uHTS finden sich in der massiv parallelen kombinatorischen Materialentwicklung sowie im Screening nach

neuen Katalysatoren und deren Vorevaluierung. Die Anforderungen an die Mikroreaktoren sind hier jedoch bedeutend höher, da bei hohen Drücken und Temperaturen sowie unter Verwendung aggressiver Chemikalien gearbeitet werden muss. (*Hönicke 1995, Jandeleit 1999, Claus 2001*)

Mikroreaktoren für den Einsatz in der Informations- und Kommunikationstechnologie zählen im weiteren Sinn ebenfalls zur Rubrik „Gewinn an Information“. Obgleich sie ihrem Wesen nach eher in die Rubrik 3 „Einsatz in der Produktion“ gehören, dienen sie letztendlich ebenfalls der Generierung und Verarbeitung von Information. Die größte Familie bilden Brennstoffzellen für die dezentralisierte Produktion elektrischer Energie. Es wurden große Fortschritte in der Entwicklung von Brennstoffzellenantrieben für Fahrzeuge und die stationäre Energiegewinnung in Kraftwerken im Bereich von 50 bis 1000 kW gemacht. Hier stehen erste Lösungen kurz vor der Markteinführung. Daneben hat sich ein neues Applikationsfeld für Brennstoffzellen mit einer Nennleistung  $p < 100$  W entwickelt. Diese sollen als Erzeuger elektrischer Energie in IT- und Telekommunikationsprodukten der neuesten Generation zum Einsatz kommen. Prototypen von Laptop Computern, PDAs (personal digital assistants, z.B. Palm™-Organizers) und Mobiltelefonen befinden sich derzeit in der finalen Erprobungsphase. Die Markteinführung wurde bereits für die kommenden Monate angekündigt. Aber auch hocheffiziente Prozessorkühler zur Integration in Großrechnern basieren auf der Mikroreaktionstechnologie. (*Ehrfeld 2003, Pattekar 2003*)

## 2) Entwicklung neuer Prozesse

Für die Prozessentwicklung und Prozessintensivierung sind in der stoffumwandelnden Industrie Bestrebungen im Gange, die physikalischen Schnittstellen zur Makrowelt zu definieren und entsprechend zu vereinheitlichen. Ziel ist die Entwicklung eines einheitlichen Industriestandards analog zur Einführung eines Mikroplattenformats im Bereich der HTS-Technologien in der Wirkstoffentwicklung. In mehreren Verbundprojekten und Initiativen werden universitäre als auch industrielle Kompetenzen gebündelt, beispielsweise:

- „MicroChemTec – Industriplattform Modulare Mikroverfahrenstechnik IPuVT“ unter Federführung der DECHEMA (*Zeisel 2002, Müller 2003*)
- „Fraunhofer Alliance for Modular Microreaction Systems FAMOS“ der Fraunhofer Gesellschaft (*Löbbecke 2003*)
- „Arbeitsgemeinschaft Match-X“ des VDMA (*Zimmer 2003*)

Die hierbei anvisierten Baukastensysteme für Mikroreaktoren dienen der Effizienzsteigerung in Entwicklung und Produktion. Durch integrierte Elektronik und Analytik wird es möglich, innerhalb kürzester Zeit Modellreaktionen in die Praxis umzusetzen und zu modifizieren. Im Gegensatz zum anschließenden Scale-up-Prozess in der klassischen Verfahrensentwicklung bleiben die charakteristischen Längen der entscheidenden Strukturen und damit auch das grundsätzliche Systemverhalten erhalten. Die Übertragung der Systeme auf andere Maßstabbereiche ist damit weniger risikobehaftet.

In den vergangenen 15 Jahren sind zahlreiche Mikroreaktorsysteme für den Labormaßstab entwickelt worden. Typische Komponenten sind miniaturisierte Wärmetauscher, Mikromischer, -pumpen und -ventile, Mikroextraktoren und -separatoren. Daneben befinden sich spezielle Mikrosysteme für Reaktionen in flüssiger und gasförmiger Phase in der Erprobung und wurden für Zwei- und Mehr-Phasenprozesse wie z.B. Fallfilm- oder Mikroblasensäulenreaktoren optimiert. Für eine Vielzahl katalytisch ablaufende Prozesse sind sowohl homogene als auch heterogene Katalysatoren im Einsatz.

Bedingt durch ihre Charakteristika (s. S. 13ff) zeichnen sich die Mikroreaktormodule neben ihrer kompakten Baugröße von wenigen  $\text{cm}^3$  durch außergewöhnlich große volumenspezifische Oberflächen von bis zu  $50\,000\ \text{m}^2/\text{m}^3$  oder Wärmeübergangskoeffizienten bis  $25\,000\ \text{W}/\text{m}^2\ \text{K}$  aus. (Ehrfeld 1999) Dabei strömen die Fluide in Mikroreaktoren für prozesstechnische Anwendungen durchaus mit Flussraten in Größenordnungen von einigen  $10\ \text{l}/\text{min}$ .

### 3) Einsatz in der Produktion

Trotz der fehlenden Anknüpfungspunkte zur vorliegenden Arbeit soll der Vollständigkeit halber auch diese Rubrik nicht unerwähnt bleiben. Der Einsatz der Mikroreaktionstechnik in der Produktion ist dort sinnvoll, wo eindeutig Vorteile gegenüber bestehenden Verfahren existieren oder Prozesse mithilfe dieser Komponenten erst ermöglicht werden. Dies führt i.d.R. zu sog. „multi-scale“ Prozessen, in denen Mikrostrukturen in eine makroskopisch dimensionierte Peripherie eingebettet sind. Durch konsequente Anwendung und Kombination der Konzepte des Numbering-up und Equaling-up (s. S. 13) lässt sich eine Produktion im kleinen, mittleren und großtechnischen Maßstab realisieren. durch die modulare Konzeption und die damit verbundene Flexibilität kann in schnelleren Zyklen auf eine veränderte Nachfragesituation auf dem Markt reagiert werden kann („design-to-market“). Gegenüber Wettbewerbern mit herkömmlichen Konzepten könnte so ein zeitlicher Vorsprung („first-to-market“) erarbeitet werden. Hieraus erwachsende Zugewinne von Marktanteilen könnte demnach in Form gesteigerter Umsätze zu Buche schlagen. Das Potenzial derartiger Konzepte zeichnet sich besonders in dynamischen Märkten wie der Fein- und Spezialchemie oder der Pharmazeutika aus. Derzeit laufen öffentlich geförderte Großprojekte mit dem Ziel, Mikrosysteme in die industrielle Produktionspraxis zu überführen, wie beispielsweise „DEMiS“ (Demonstrationsprojekt zur Evaluierung der Mikroreaktionstechnik in industriellen Systemen). Hierbei arbeiten das MPI für Kohleforschung, Mühlheim/ Ruhr, die TU Chemnitz, die Universität Erlangen/Nürnberg sowie die Unternehmen Uhde und Degussa federführend. So soll mit der Gasphasenepoxidierung von Propen zu dampfförmigem Wasserstoffperoxid als Modellreaktion der Nachweis der Betriebstauglichkeit mikrotechnischer Komponenten in der Prozesschemie unter wirtschaftlichen Randbedingungen erbracht werden. (Markowz 2003, Wochner 2002) Durch ihre verfahrenstechnischen Vorzüge lassen sich Reaktionspfade beschreiten und Prozesse fahren, welche z.B. im explosiven Regime liegen oder wegen störender Nebenprodukte bislang unwirtschaftlich waren. Eindrucksvolle Beispiele hierfür sind direkte Fluorierungen und Nitrierungen aromatischer und aliphatischer Verbindungen sowie

katalytische Gas- und Flüssigphasenreaktionen (direkte Oxidation oder (De-)Hydrogenierung). In jüngster Vergangenheit wurde die Mikroreaktionstechnik auch im Bereich der Photochemie und zur Herstellung von Feststoffen (Pigmente) erfolgreich eingesetzt. (*Ehrfeld 1999, de Mello 2002b, Wagner in press*)

Trotz der dargelegten potenziellen Vorteile beim Einsatz mikrostrukturierter Komponenten gegenüber klassischen Bauteilen ist der oft beschworene Paradigmenwechsel in der Chemie- und Energietechnik hin zu einer dezentralen Produktion mithilfe von Mikroreaktoren noch nicht vollzogen. Es lässt sich aber feststellen, dass seit dem Ende der 90er Jahre zwischen der Wirtschafts- und der Wissenschaftsgemeinschaft ein lebhafter Dialog über den ökonomischen Nutzen der Mikroreaktorik entbrannt ist. Dies kommt beispielsweise in weiter steigenden Besucherzahlen auf Tagungen, Messen und Konferenzen zum Ausdruck. Als die bedeutendsten Plattformen in diesem Bereich sind die „International Conference on Microreaction Technology, IMRET“ und die „International Conference on Miniaturized total Analysis Systems  $\mu$ TAS“ zu nennen. Das wachsende Interesse an der Mikroreaktionstechnik spiegelt sich auch in der zunehmenden Anzahl wissenschaftlicher Beiträge und Erfahrungsberichte wider. Neben einer Vielzahl an Periodika anverwandter Fachgebiete erscheinen einige auf die Mikroreaktionstechnik fokussierte Fachzeitschriften, wie „Lab on a Chip“ (Royal Society of Chemistry), „MSTnews“ (BMBF) oder „Sensors & Actuators B: Chemical“ (Elsevier B.V.).

Die Mikroreaktionstechnik scheint im Begriff zu sein, die Schwelle zu überschreiten von der grundlagenorientierten Forschungsdisziplin hin zu einer am Markt etablierten Technologie.

## 1.2 Aufgabenstellung und Lösungsansatz

Die voranstehenden Überlegungen erlauben folgendes Fazit: die Biokristallisation fordert eine langzeitstabile thermische und fluidische Kontrolle bei gleichzeitiger Kompaktheit und einem Arbeitsvolumen im Mikroliterbereich. Dies scheint besonders vorteilhaft in Mikroreaktoren auf Silizium-Basis zu realisieren zu sein. Mikroreaktoren wurden für die Proteinkristallisation bei konsequenter Fortsetzung der Miniaturisierungsbestrebungen als Chance erkannt, was erste Entwicklungen in dieser Richtung belegen. Die in diesem Umfeld publizierten und patentierten Anordnungen dieser Systeme schöpfen das Potenzial mikrostrukturierter Komponenten bislang jedoch nur unzureichend aus. Ferner erfüllt bislang keiner der miniaturisierten Apparate und Mikroreaktoren alle als wesentlich erachteten Anforderungen wie thermische und fluidische Kontrolle oder Kompaktheit zufriedenstellend. (s. Anhang A, Tabelle A1) Hierbei würde die Kombination der Kriterien eine neue Dimension in der Kristallisation biologischer Makromoleküle eröffnen.

Hieraus leiten sich folgende **Anforderungsprofile** für Mikroreaktoren zur Erschließung physikalisch-chemischer Parameter in der Kristallisation von Proteinmengen im Mikrolitermaßstab ab:

- kompaktes, leichtes und wiederverwendbares System auf der Basis von Silizium-Mikrosystemtechnik und Dünnschichttechnologie
- langzeitstabile (mehrere Tage) und exakte ( $\Delta T < \pm 0,1 \text{ K @ } 5^\circ\text{C} < \vartheta < 50^\circ\text{C}$ ) Temperierung
- Unterdrückung der natürlichen Konvektion durch laminaren Fluss mit homogener, totvolumenfreier Geschwindigkeitsverteilung in der Reaktionskammer
- erschütterungsfreier und rechnergesteuerter Betrieb
- Ausschluss von Luft bzw. Blasen analog zur Methode der Micro-Batch-Kristallisation (2-Phasen-System)
- reversible Deckelung zur Ernte der Kristalle für anschließende Röntgenstrukturanalyse und Reinigung der Reaktionskammer nach Gebrauch
- nicht-invasive *in situ* Beobachtung, z.B. mittels hochauflösender (CLS-) Mikroskopie
- Variationsmöglichkeit der Zusammensetzung der Lösung *in situ*

Das **Ziel** dieser Arbeit ist es, Mikroreaktoren gemäß den Anforderungsprofilen zu entwickeln und zu charakterisieren sowie erste Applikationsexperimente durchzuführen. Damit soll die Eignung der Mikroreaktionstechnik für den Einsatz in der Kristallisation biologischer Makromoleküle bewertet werden.

Die Lösung dieser Aufgabe erfordert interdisziplinäre Ansätze, da sie an der Schnittstelle von Mikroreaktionstechnik und Strukturbiochemie angesiedelt ist. Das vom TMWFK geförderte Verbundprojekt JBCC (Förderkennzeichen B 378-00024) bildet hierfür eine geeignete Plattform. Konsequenterweise wurden die applikativ-orientierten Arbeiten zur Proteinkristallisation vorwiegend am IMB in der Abteilung Strukturbiochemie und Kristallographie (Prof. Dr. Rolf HILGENFELD) durchgeführt. Die Entwicklung und Charakterisierung der Mikroreaktoren fand hauptsächlich am IPHT in der Abteilung Biotechnische Mikrosysteme (Dr. Wolfgang FRITZSCHE) statt.

Zur Bewältigung des Aufgabenkatalogs wurde die Entwicklung der Mikroreaktoren zur *in situ*-Analyse der Kristallisation kleiner Mengen biologischer Makromoleküle in zwei Phasen unterteilt:

- I. **Batch-Mikroreaktor** zur temperaturkontrollierten Kristallisation im Batch-Betrieb
- II. **Fluss-Mikroreaktor** zur temperatur- und konvektionskontrollierten Kristallisation sowie Vorarbeiten zur Änderung der Lösungszusammensetzung im kontinuierlichen Betrieb

Für die Bearbeitung der einzelnen Aspekte wurden die weiter konkretisierten Teilaufgaben zu Arbeitspaketen gebündelt. Die prinzipielle **Vorgehensweise** bei der Verfolgung der Zielstellung gliedert sich folgendermaßen:

- 1) Realisierung des Batch-Mikroreaktors durch Adaption eines am IPHT entwickelten Silizium-Chipreaktors zur miniaturisierten DNA-Vervielfältigung (PCR) (Poser 1997)
- 2) Charakterisierung des thermischen Verhaltens mit einem vereinfachenden analytischen Modell, numerischen statischen 3D-FEM-Simulationen sowie statische und dynamische Messungen mittels Thermografie und thermischen Sensoren

- 3) Erweiterung des Konzepts zur Entwicklung und verfahrenstechnischen Optimierung eines Fluss-Mikroreaktors
- 4) Untersuchung des fluidischen Verhaltens mit numerischen 3D-CFD-Simulationen sowie Diskussion der Korrelation mit  $\mu$ -PIV-Messungen und analytischen Modellen
- 5) Messungen zum Druckverlust und der Verweilzeitverteilung im Chipreaktor
- 6) Charakterisierung des thermischen Verhaltens durch gekoppelte thermische und fluidische 3D-CFD-Simulationen sowie dem Vergleich mit Experimenten mittels Thermografie und thermischen Sensoren
- 7) erste Kristallisationsexperimente mit Modellproteinen (HEWL und Insulin) zum Funktionsnachweis, Eruierung der Applikationsfelder sowie erste röntgenografische Qualitätsuntersuchungen

## 2 Verwendete Verfahren und Charakterisierungsmethoden

Zur Entwicklung der Mikroreaktoren für die Proteinkristallisation wurden verschiedene Verfahren und Charakterisierungsmethoden verwendet. Neben dem Einsatz von Standardmethoden und Materialien waren spezielle Verfahren zu entwickeln. Die hierfür notwendigen theoretischen und praktischen Überlegungen sind im folgenden Kapitel dargelegt. Aus den konstruktiven Anforderungen und grundsätzlichen Vorüberlegungen werden die entsprechenden Maßnahmen hinsichtlich Präparation, Temperierung und Oberflächentechnologie abgeleitet und die Methoden zur Charakterisierung der Mikroreaktoren besprochen.

### 2.1 Konstruktive Anforderungen und Vorüberlegungen zur Entwicklung der Chipreaktoren

Zentrales Element von Batch- und Fluss-Mikroreaktor ist jeweils ein mittels Mikrosystemtechnik entwickelter temperierbarer Chipreaktor auf Silizium-Basis. Ausgehend vom Anforderungsprofil der Mikroreaktorsysteme (s. Kap. 1.2, S. 24f) wurden für die Chipreaktoren Spezifikationen abgeleitet:

1. Temperierung
  - exakt und langzeitstabil zwischen  $5^{\circ}\text{C} < \vartheta < 50^{\circ}\text{C}$  mit Abweichungen  $\Delta T < \pm 0,1 \text{ K}$
  - dynamische Temperaturprotokolle mit maximalen Temperierraten  $(dT/dt)_{\text{max}} = \pm 2 \text{ K/s}$  und Einschwingzeiten  $t_{\text{max}} = 30 \text{ s}$
  - vibrationsfreie und in den geometrischen Abmessungen flache aktive Heizung und Kühlung
  - homogenes Temperaturprofil in der Reaktionskammer mit lateralen und vertikalen Temperaturdifferenzen  $\Delta T < 1 \text{ K}$
2. Geometrische Randbedingungen
  - Volumen der Reaktionskammer zur Kristallisation  $V_{\text{RK}} < 20 \mu\text{l}$
  - maximale Bauhöhe  $Z_{\text{max}} = 25 \text{ mm}$ , Kompatibilität zum Standardaufbau von Mikroskopen
  - Leichtbauweise zur Montage auf Mikroskoptischen
3. Chipdeckelung
  - luftdicht und blasenfrei über mehrere Tage im geforderten Temperaturbereich
  - flach und optisch transparent für den Einsatz von *in situ* Analytik (z.B. CLSM)
  - reversibel für Kristallernte und Reinigung der Reaktionskammer

Für Entwicklungsphase II kommen noch folgende fluidische Anforderungen hinzu:

4. Fluidik
  - homogenes Strömungsprofil in der Reaktionskammer ohne Totbereiche und Kurzschlussströmungen für enge Verweilzeitverteilungen
  - unidirektionaler und pulsationsfreier Fluss mit minimalem Gesamtvolumen  $V_{\text{ges}} < 250 \mu\text{l}$
  - vollständige thermische Kontrolle der fluidischen Elemente

Wesentliche Kriterien für den Batch-Mikroreaktor werden durch einen am IPHT entwickelten Silizium-Chipreaktor zur miniaturisierten DNA-Vervielfältigung erfüllt (s. Abb. 7). Sie bilden die technologische Grundlage zur Entwicklung der Mikroreaktoren zur Proteinkristallisation. (Poser 1997,

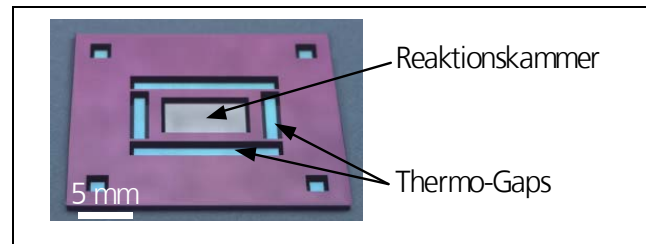


Abb. 7: PCR-Chip nach POSER *et al.* (Poser 1997)

(Schneegaß 2001) Dieser sog. PCR-Chip (polymerase chain reaction) ist charakterisiert durch schnelle Heiz- bzw. Kühlraten ( $dT/dt$  (Heizen) = 80 K/s bzw.  $dT/dt$  (Kühlen) = -40 K/s) im Temperaturbereich  $50^{\circ}\text{C} < \vartheta < 100^{\circ}\text{C}$  und vergleichsweise geringer elektrischer Leistungsaufnahme  $P_{el} < 2,5 \text{ W}$ . Das Volumen der Reaktionskammer  $V_{RK}$  und damit das Probenvolumen beträgt etwa  $V_{RK} \approx 15 \mu\text{l}$ . Die Temperierung erfolgt mittels Widerstandsheiz- und -sensoren aus Pt-Dünnschichten sowie einem passiven Kühlblock aus Messing. Der Chip selbst besteht aus einem Siliziumsubstrat, welches aus technologischen Erwägungen und aus Gründen der elektrischen Isolation beidseitig mit einer dünnen Silizium-Nitrid-Membran ( $< 1 \mu\text{m}$ ) beschichtet ist. Die Dünnschichttransducer werden direkt auf die Chipunterseite präpariert. Die hohe Dynamik wird dadurch erreicht, dass die Reaktionskammer durch freigeätzte Spalte, sog. Thermo-Gaps, vom Rest des Silizium-Chips thermisch weitgehend entkoppelt ist. Die thermische Masse der „region of interest“ (Reaktionskammer) ist damit deutlich reduziert. Dies wirkt sich günstig auf das dynamische Verhalten von Chipreaktoren aus. (Erickson 2003)

Wesentliche thermische Merkmale der Mikroreaktoren für die Proteinkristallisation sind Langzeitstabilität und Homogenität des Temperaturprofils. Aus diesem Grund wurde auf vollständig durchgeätzte Spalte zugunsten eines vereinfachten mikrotechnischen Präparationsprozesses verzichtet. Die Reaktionskammer ist demnach mit der Chipumgebung über eine Siliziumbrücke verbunden, welche die Dicke des Kammerbodens ( $d \approx 60 \mu\text{m}$ ) besitzt. Damit werden eine niedrigere Dynamik des Systems und ein erhöhter Energieverbrauch in Kauf genommen. Die gute thermische Kopplung der Reaktionskammer mit dem übrigen Chip sollte jedoch für eine homogenere Temperaturverteilung in der Reaktionskammer sorgen. Zur Abschätzung des thermischen Verhaltens kann die Temperaturleitfähigkeit  $\kappa$  herangezogen werden, welche einem thermischen Diffusionskoeffizienten entspricht. Dieser Materialwert erscheint als Koeffizient in der instationären Wärmebilanz unter Vernachlässigung der Konvektion und bei konstanter innerer Energie (keine chemische Reaktion). Gemäß der Ableitung im Anhang D2a) ergibt sich folgender Ausdruck G1:

$$\frac{\partial T}{\partial t} - \kappa \cdot \frac{\partial^2 T}{\partial z^2} = 0, \quad \text{mit } \kappa = \frac{\lambda}{\rho \cdot c}; \quad (\text{G1})$$

Die Temperaturleitfähigkeit  $\kappa$  eines Stoffes setzt also dessen Wärmeleitvermögen  $\lambda$  ins Verhältnis zum thermischen Speichervermögen  $\rho c$  ( $\rho$  Dichte,  $c$  spezifische Wärmekapazität). (Schlünder 1995) In Tabelle 1 sind Stoffdaten für einige für die Entwicklung der Mikroreaktoren relevante Stoffe gegenübergestellt.



**Tabelle 1:** Temperaturleitfähigkeit  $\kappa$  von Wasser, (Borosilikat-) Glas, Silizium und LPCVD-Silizium-Nitrid (LP-Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>) bei Raumtemperatur (Kuchling 1991, Schneider 2003)

|  |                   | <b>Wasser</b>          | <b>Glas</b>            | <b>Si</b>              | <b>LP-Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub></b> |
|--|-------------------|------------------------|------------------------|------------------------|---------------------------------------|
| Wärmeleitfähigkeit $\lambda$                       | W/(m K)           | 0,6                    | 1,0                    | 156                    | 2                                     |
| Dichte $\rho$                                      | kg/m <sup>3</sup> | 1,0 · 10 <sup>3</sup>  | 2,5 · 10 <sup>3</sup>  | 2,3 · 10 <sup>3</sup>  | 3,7 · 10 <sup>3</sup>                 |
| spez. Wärmekapazität $c$                           | J/(kg K)          | 4,2 · 10 <sup>3</sup>  | 0,8 · 10 <sup>3</sup>  | 703                    | 460                                   |
| <b>Temperaturleitfähigkeit <math>\kappa</math></b> | m <sup>2</sup> /s | 1,4 · 10 <sup>-7</sup> | 5,0 · 10 <sup>-7</sup> | 9,6 · 10 <sup>-5</sup> | 1,2 · 10 <sup>-6</sup>                |

Hieraus wird ersichtlich, dass ein Temperatursgleich unter Vernachlässigung von Konvektion in Silizium sehr viel schneller stattfindet als in LPCVD-Silizium-Nitrid (Low Pressure Chemical Vapor Deposition, s. Kap. 2.2.1, S. 33ff), Wasser oder Glas. Das Verhältnis z.B. von  $\kappa_{\text{Silizium}} / \kappa_{\text{Wasser}} \approx 700$  bedeutet demnach anschaulich, dass sich eine thermische Störung in Silizium 700 mal schneller ausbreitet und zum dynamischen Gleichgewichtszustand strebt als dies in Wasser der Fall ist. Die Dynamik der Ausbreitung einer thermischen Störung ohne konvektiven Einfluss kann nach SOMMERFELD (Sommerfeld, 1954) aus Gleichung G1 über die sog. thermische Relaxation  $\tau_{\text{therm}}$  abgeschätzt werden:

$$\tau_{\text{therm}} = \frac{z^2}{\kappa} \quad (\text{G2})$$

Hierin repräsentiert  $z$  die charakteristische Länge des jeweiligen Bauteils. Für den Batch-Mikroreaktor sind dies beispielsweise die Dicke des Bodens der Reaktionskammer ( $z = 50 \mu\text{m}$ ) bzw. die Höhe der Wasserschicht in der Kammer ( $z = 450 \mu\text{m}$ ). Mit Geometriedaten des Batch-Mikroreaktors ergibt sich ein Verhältnis der thermischen Relaxation für die wässrige Lösung in der Reaktionskammer gegenüber dem Silizium-Boden der Reaktionskammer  $\tau_{\text{therm}}(\text{Siliziumboden}) / \tau_{\text{therm}}(\text{Wasser}) < 2 \cdot 10^{-5}$ . Für eine  $1,1 \mu\text{m}$  dicke Silizium-Nitridschicht ergibt sich ein Verhältnis  $\tau_{\text{therm}}(\text{Silizium-Nitridschicht}) / \tau_{\text{therm}}(\text{Wasser}) < 7 \cdot 10^{-7}$ . Daraus wird ersichtlich, dass sich konstruktionsbedingten Änderungen der Längendimensionen, wie z.B. eine Verstärkung des Chipbodens oder dickere Isolationsschichten (Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>), im Vergleich zu den darauf befindlichen fluidischen Strukturen in thermischer Hinsicht vernachlässigt werden können.

Eine der wesentlichen Voraussetzungen bei der Untersuchung physiko-chemischer Parameter bei der Proteinkristallisation ist die Reproduzierbarkeit und Konstanz der Bedingungen in der freien Lösung. Während des Kristallisationsvorgangs verarmt diese jedoch an Protein, wodurch sich die treibenden Konzentrationsgradienten verkleinern. Der Kristallisationsreaktor ist demnach so zu dimensionieren, dass die Konzentration  $c_i$  der Komponente  $i$  im Verlauf des Experimentes annähernd konstant bleiben. Hierzu kann als Richtwert eine relative Änderung gegenüber  $c_0$  als Ausgangskonzentration  $\Delta c = (c_i - c_0)/c_0 < 10\%$  angesetzt werden. (Klupsch 2001) Hierzu im Gegensatz erfordern die geometrischen Randbedingungen eine kompakte Bauweise der Mikroreaktoren, insbesondere der Reaktionskammer. Ein Kompromiss bestand in den Abmessungen der Reaktionskammer von  $4 \times 7 \times$

0,45 mm<sup>3</sup>, womit sich ein Volumen von 12,6 µl ergibt. Zur Verifizierung der Konstanz der Konzentrationsbedingungen wurde folgende Abschätzung mit realistischen Beispielparametern für ein Modellprotein (Hen Egg-White Lysozyme) durchgeführt:

- Proteinkonzentration in der Startlösung 10 mg/ml <  $c_0$  < 50 mg/ml
- Protein angenommen als Kugel mit Durchmesser  $d \approx 2$  nm
- 10 Kristalle annähernd kubischer Gestalt mit einer Kantenlänge  $l = 100$  µm und einem Proteingehalt von etwa 30%

Mithilfe einer Massenbilanz konnte die Konzentrationsänderung für den Gleichgewichtszustand abgeschätzt werden zu  $0,56\% < \Delta c < 3,10\%$ .

Es ist denkbar, dass die Reaktorwandung mit einer Proteinschicht belegt wird. Im ungünstigen Fall könnte sich mehrlagige Schicht in Form einer hexagonal dichtesten Packung mit einem Feststoffanteil von 74% ausbilden. Für eine stark überhöhte Schichtdicke von 100 nm (~ 70 Moleküllagen) würde somit eine Konzentrationsminderung von  $3,75\% < \Delta c < 15,72\%$  ergeben. Die Voraussetzungen für vergleichbare physiko-chemische Studien sind also auch in diesem Grenzfall u.U. noch gegeben. Der physiko-chemisch plausible Fall einer Monolage ergibt eine Konzentrationsminderung von  $0,27\% < \Delta c < 1,99\%$

Für die Kristallisationsreaktoren ist im Gegensatz zum PCR-Chip aus Gründen der thermischen Stabilität sowie wegen Betriebstemperaturen unter der Raumtemperatur eine aktive Kühlung notwendig. Zur Temperierung von Chipreaktoren wurden in der Literatur mehrere Prinzipien vorgestellt bzw. realisiert:

- Heizung und Kühlung mit *externen* Komponenten: z.B. statische und dynamische Wärmetauscher; Module auf Basis des thermoelektrischen Effekts, sog. PELTIER-Elemente (*Wilding 1994, Kopp 1998*)
- Heizung und Kühlung mit *internen* Komponenten: z.B. Mikrofluidkanäle mit endo- bzw. exothermen chemischen Reaktionen in unmittelbarer Nachbarschaft auf Chip (*Gujit 2003*)
- nur Heizen: z.B. Integration von (mikrostrukturierten) Widerstandsschichten unter Nutzung des JOULEschen Effektes (*Srinivasan 1997, Schneegaß 2001*)
- nur Kühlen: z.B. Nutzung der Konvektionskühlung (*Srinivasan 1997, Lagally 2000*)

Für die thermische Kontrolle der Chipreaktoren zur Proteinkristallisation bietet sich eine Hybridbauweise aus internen (mikrostrukturierte Widerstandsschichten) und externen (PELTIER-Element mit Wärmetauscher) Komponenten an. Dies ermöglicht eine kompakte Bauweise und eine gute Ansteuerbarkeit zur Temperaturregelung.

Die Chipreaktoren werden mit einem transparenten Deckel versehen und auf Objektträgern montiert. Abbildung 8 zeigt den prinzipiellen Aufbau der Mikroreaktoren für den Batch-Betrieb und den kontinuierlichen Betrieb.

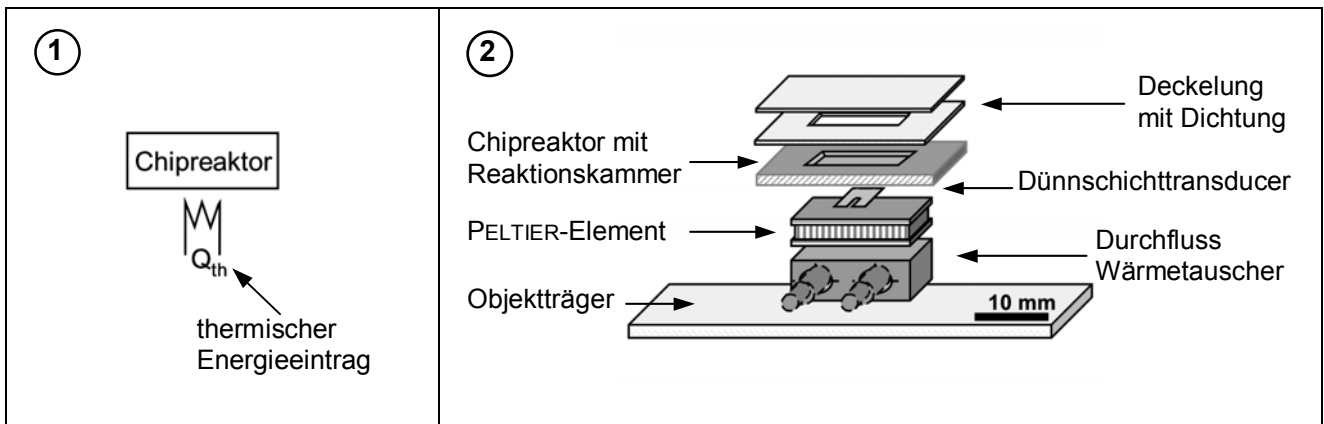


Abb. 8a: Schematische Darstellung des Batch-Mikroreaktors:

1) Prinzipskizze; 2) Explosionsdarstellung

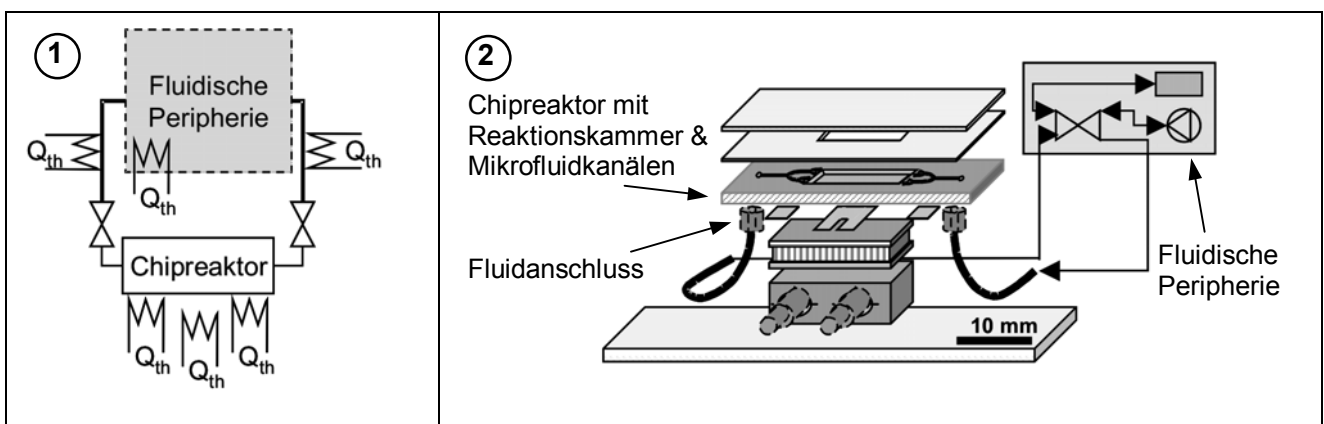


Abb. 8b: Schematische Darstellung des Fluss-Mikroreaktors – analog zu 8a mit Erweiterung:

1) Prinzipskizze; 2) Explosionsdarstellung

Ein Merkmal des Fluss-Mikroreaktors ist eine möglichst große Homogenität der Temperaturverteilung in der Reaktionskammer. Die gute Temperaturleitfähigkeit  $\kappa_{Si}$  des Siliziumsubstrates und die vergleichsweise schlechte Isolationswirkung dünner Glasdeckel (s. Kap. 3.4.4 D, S. 126) sorgen besonders in den Mikrokanälen für einen schnellen Ausgleich der Fluidtemperatur mit der Umgebung. Für einen Kanaldurchmesser  $d < 200 \mu\text{m}$  ist das Verhältnis von wärmeübertragender Fläche  $O$  zum Fluidvolumen  $V$ , also  $O / V > 30$  und verhält sich umgekehrt proportional zum Durchmesser  $d$ . In den Mikrokanälen besitzt das Verhältnis Oberfläche-zu-Volumen beispielsweise das 6-fache des Wertes der Reaktionskammer. Daher ist auf dem Chipreaktor für das Fluid, bevor es in die Kammer einströmt, eine Vortemperierstrecke vorzusehen. Somit sind beheizte Zulaufkanäle mit ausreichender Länge zu präparieren, um das Fluid bei entsprechender Verweilzeit auf das gewünschte Temperaturniveau anheben.

Für fluidische Systeme ist im Bereich signifikanter Querschnittsänderungen in den fluidführenden Strukturen mit Totbereichen zu rechnen. Der Fluidstrom muss daher bei einer Querschnittsvergrößerung in geeigneter Weise verteilt bzw. im umgekehrten Falle aufgesammelt werden. In Mikrostrukturen wurde dies z.B. durch fluidische Bifurkationen gelöst (Amador 2003,

Gobby 2001). (s. Abb. 9) Kritische Parameter hierbei sind die Anzahl der Bifurkationsstufen, die Länge  $l$  sowie der Durchmesser  $d$  der Fluidkanäle. Zur Optimierung der Struktur können die Absolutwerte sowie das Verhältnis von  $l / d$  variieren. Die Anzahl der Ausgänge und damit der Stufenzahl richtet sich nach der zu durchströmenden Fläche. Eine Verrundung der Bifurkation begünstigt das Strömungsverhalten in der Struktur. Somit kommt der Radius  $r$  bzw. das Verhältnis  $l / r$  als weiterer Parameter ins Spiel.

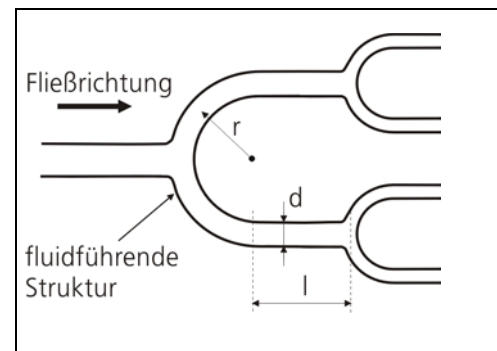


Abb. 9: verrundete 2-stufige Bifurkation; hier: Verteiler

Im Falle des Fluss-Mikroreaktors wurde eine 3-stufige Bifurkation als fluidische Verteiler- bzw. Sammlerstruktur gewählt und spiegelbildlich an die Reaktionskammer angeschlossen. Im ursprünglichen Layoutentwurf „JBCC 1.1“ betragen die Verhältnisse innerhalb der Bifurkation  $l / r = 3/2$  und  $l / d = 50$ . Aus Gründen des Druckverlustes und der Strömungsgeschwindigkeit wurde der Durchmesser  $d$  des Zulauf- bzw. Ablaufkanals doppelt so groß bestimmt wie derjenige der Kanäle in der Bifurkationsstruktur.

In die Konzeption und fluidische Auslegung des Chipreaktors und der Peripherie flossen u.a. Erkenntnisse der Arbeitsgruppen um VEKILOV und ROSENBERGER ein. Diese zeigten, dass ein erzwungener kontinuierlicher Konvektionsstrom die kinetischen Fluktuationen und damit die Defektdichte der Kristalle reduzieren kann. Darüber hinaus wurde darauf hingewiesen, dass die Wachstumsrate sowie die Kristallqualität ein Maximum durchschreiten, welches für HEWL bei einer Bulk-Flussgeschwindigkeit  $u \approx 250 \mu\text{m/s}$  liegt. Bei höheren Flussgeschwindigkeiten nahm die Wachstumsrate weiter ab und kam in bestimmten Fällen komplett zum Erliegen („cessation of growth“). Es wurde nun vermutet, dass durch die erhöhte Konvektion die Versorgung des Kristalls mit Verunreinigungen den Effekt erhöhter Proteinkonzentration an der Kristalloberfläche überkompensierte. Somit wurde die Oberfläche derart verschmutzt, dass nur noch wenige Proteine eingebaut werden konnten. (Vekilov 2000, Vekilov 1998b, c, Blagova 1999) Die Flussgeschwindigkeit  $u = 250 \mu\text{m/s}$  bildete besonders im Zuge der Charakterisierung des Mikroreaktorsystems einen wesentlichen Orientierungspunkt.

## 2.2 Präparationstechnologien

Die Präparation der Mikroreaktoren beinhaltet die mikrosystemtechnische Bearbeitung von Substratscheiben aus Silizium, sog. Wafer, ferner die Mikromaterialbearbeitung der Chipreaktoren und schließlich den Aufbau zu den Mikroreaktionssystemen.

### 2.2.1 Mikrosystemtechnik

Ausgangsmaterial zur Präparation der Chipreaktoren sind Wafer aus einkristallinem Silizium hoher Reinheit. (s. Tabelle 2) Die Wafer wurden aus fertigungstechnischen Gründen sowie zur elektrischen Isolation der Dünnschicht-Transducer-Schichten gegenüber dem Siliziumsubstrat mit einem Siliziumnitrid-Dünnschichtsystem beaufschlagt. Bei der Beschichtung können z.B. durch Verunreinigungen im Reaktorsystem sog. Pin-Holes entstehen. Eine vollständige Isolation ist damit oft nicht mehr gewährleistet. Denn Transducer, die auf derartigen defektbehafteten Schichten präpariert werden, befinden sich an den Pin-Holes im direkten Kontakt mit dem Silizium-Substrat und bewirken einen Kurzschluss. Dies macht beispielsweise eine exakte Temperaturregelung über Widerstandssensoren unmöglich. Bei der vergleichsweise groben Präparation der fluidischen Strukturen mit lateralen Dimensionen  $> 100 \mu\text{m}$  können Pin-Holes weitgehend vernachlässigt werden.

**Tabelle 2:** Physikalisch-chemische Eigenschaften von Silizium (Si) und LPCVD-Silizium-Nitrid (LP-Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>) bei Raumtemperatur – verwendete Wafer (Menz 1997, Gerlach 1997, Ullmann 2000, Gmelin 1965)

| Substratmaterialien  |                      |                     | Si                  | LP-Si <sub>3</sub> N <sub>4</sub> * |
|--|----------------------|---------------------|---------------------|-------------------------------------|
| Ätzrate r (40% NaOH, $\vartheta = 80^\circ\text{C}$ )<br>bei p-Typ Dotierung, $c(\text{Bor}) < 10^{16} \text{ 1/cm}^3$ | <100>                | nm/min              | 1200                | n.s.**                              |
|  | <110>                | nm/min              | 120                 |                                     |
|  | <111>                | nm/min              | 0,6                 |                                     |
| Temperaturleitfähigkeit $\kappa$   |                      | m <sup>2</sup> /s   | $9,6 \cdot 10^{-5}$ | $1,2 \cdot 10^{-6}$                 |
| thermischer Ausdehnungskoeffizient $\alpha$  |                      | 1/K                 | $2,5 \cdot 10^{-6}$ | $3,0 \cdot 10^{-6}$                 |
| spezifischer elektrischer Widerstand $\rho_{el}$   |                      | $\Omega \text{ cm}$ | $> 1$               | $> 10^{13}$                         |
| <b>Silizium-Wafer mit Silizium-Nitrid-2-Schichtsystem</b>  |                      |                     |                     |                                     |
| Si <sub>3</sub> N <sub>4</sub> -2-Schichtsystem  | LP (Reaktorseite)    | nm                  | 150                 |                                     |
|  | LP-PE (Schichtseite) | nm                  | 150-1100            |                                     |
| Rauigkeit (beidseitig poliert)   |                      | nm                  | $< 10$              |                                     |
| Waferdicke   | Batch-Mikroreaktor   | $\mu\text{m}$       | 490                 |                                     |
|  | Fluss-Mikroreaktor   | $\mu\text{m}$       | 390                 |                                     |
| Durchmesser (4" Wafer)   |                      | mm                  | 100                 |                                     |

\* Physikalisch-chemische Eigenschaften von PE-Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> in der gleichen Größenordnung wie LP-Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>

\*\* n.s.: nicht signifikant

Zur vollständigen elektrischen Isolierung einer Metallschicht gegenüber dem Siliziumsubstrat bietet sich die Kombination einer 100-nm-LPCVD-Nitrid-Schicht (Low Pressure Chemical Vapor Deposition) mit einer darüber liegenden PECVD-Nitrid-Schicht (Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition) 10-facher Dicke an (elektrische Leitfähigkeit  $\chi < 10^{-9} \text{ 1}/(\Omega \text{ cm})$ ). Die dünne LPCVD-Siliziumnitrid-Schicht (LP-Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>) besitzt eine höhere Oberflächengüte als die PECVD-Siliziumnitrid-Schicht (PE-Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>). Bei letzterem wird durch die Plasmaunterstützung eine deutlich höhere Abscheidungsrate erzielt. Damit sind auch PE-Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>-Schichten im Bereich von Mikrometern ökonomisch noch sinnvoll. Das Schichtsystem für die Mikroreaktoren bestand auf der fluidischen Seite aus LP-Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, auf der Transducerseite aus einem 2-Schicht-System aus LP-/PE-Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>.

Die Silizium-Wafer wurden so gesägt, dass deren Oberfläche von der  $\langle 100 \rangle$ -Hauptnormalenrichtung des Siliziumkristalls gebildet wird. Die Ursache für die Richtungsabhängigkeit der Ätzraten liegt in der Anisotropie des (Silizium-) Kristalls begründet. Dieser Effekt wird beispielsweise zur Präparation unterschiedlicher Mikrostrukturen ausgenutzt. (s. Kap. 2.2.1 C, S. 38ff) Die beidseitig polierten Si- $\langle 100 \rangle$ -Wafer wurden bei der Fa. Siltronic SARL, F bezogen. Es kamen aus ökonomischen Gründen Wafer mit einer p-Typ-Dotierung zum Einsatz. Aufgrund der geringen Konzentration an Fremdatomen (Bor) konnte der Einfluss der Dotierung auf die thermischen und chemischen Eigenschaften des Substrates vernachlässigt werden. Die Si-Wafer wurden bei der Fa. X-Fab GmbH, D mit einem 2-Schicht-Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>-System beschichtet.

### Schematischer Prozessablauf

In Abbildung 10 ist der prinzipielle Prozessablauf zur mikrosystemtechnischen Fertigung der Chipreaktoren für den Batch-Mikroreaktor schematisch dargestellt. Er umfasst im Wesentlichen folgende Schritte:

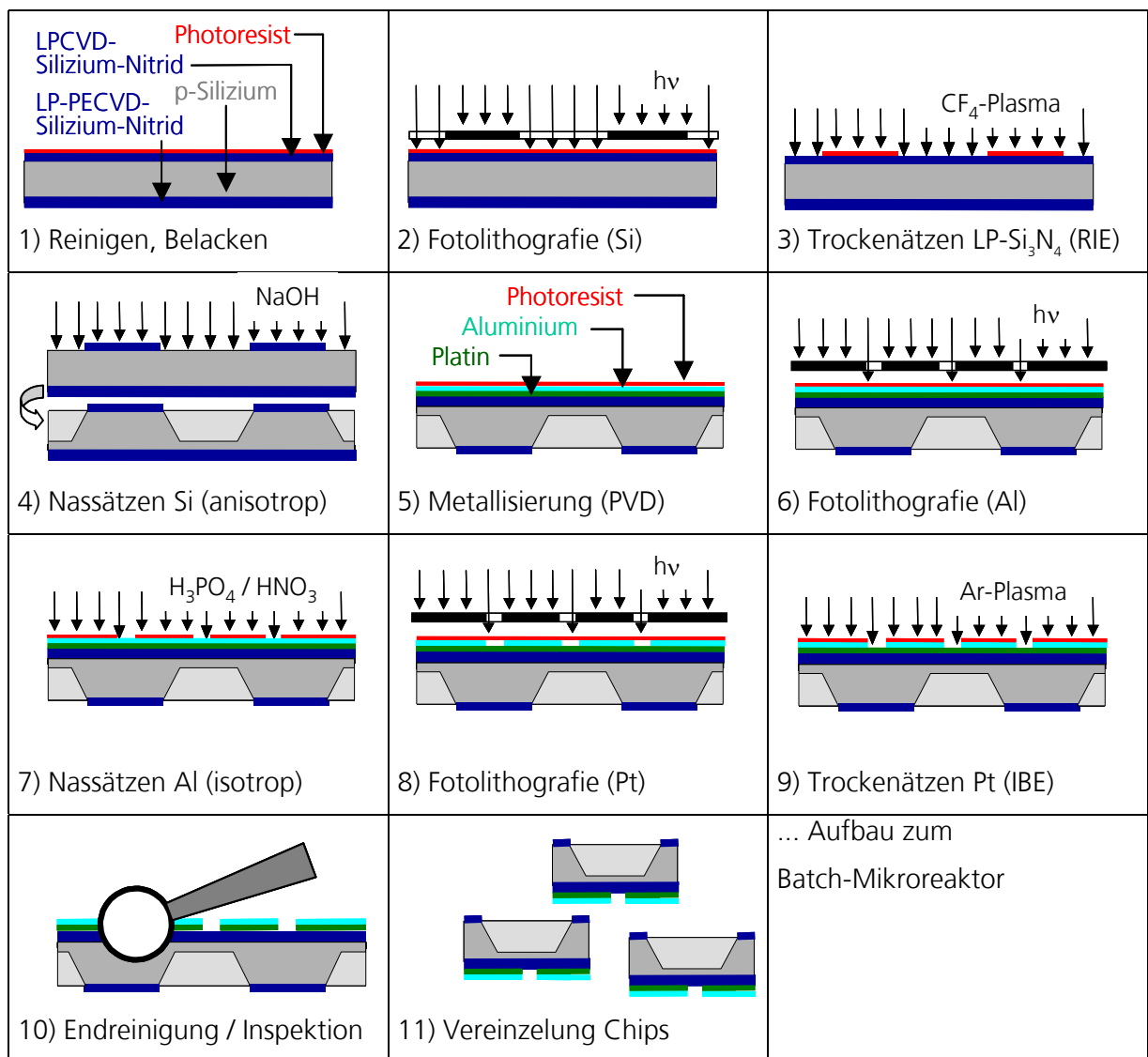


Abb. 10: Schematischer Prozessablauf Präparation der Chipreaktoren (hier: Batch-Mikroreaktor – Fluss-Mikroreaktor prinzipiell analog)

- 1) Oberflächenreinigung des Wafers und Beschichtung der zu ätzenden fluidischen Seite (LPCVD-Nitrid) mit Fotoresist durch Aufschleudern
- 2) Fotolithografische Übertragung der Strukturen in den Fotoresist mittels Cr-beschichteter Maske
- 3) Strukturierung des LP-Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> im RIE-Trockenätzprozess (Reactive Ion Etching) mittels Ar-Plasma mit CF<sub>4</sub> als chemische Komponente
- 4) Anisotropes nasschemisches Si-Tiefenätzen mit NaOH oder alternativ TMAH (Tetramethyl-Ammoniumhydroxid)
- 5) Metallisierung des 2-Schicht-Systems (LPCVD- / PECVD-Siliziumnitrid) mit Pt (120 nm) und Al im PVD-Prozess (Physical Vapor Deposition) durch Sputtern anschließendes Belacken
- 6) Fotolithografische Übertragung der Al-Strukturen in den Fotoresist mittels NiCr-beschichteter Maske
- 7) Isotropes nasschemisches Ätzen der Al-Strukturen mit im H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/HNO<sub>3</sub>-Ätzbad
- 8) Fotolithografische Übertragung der Pt-Strukturen in den Fotoresist mittels NiCr-beschichteter Maske
- 9) Strukturierung der Pt-Strukturen im IBE-Trockenätzprozess (Ion Beam Etching) im Ar-Plasma
- 10) Reinigung und abschließende Inspektion des Wafers
- 11) Vereinzelung des Wafers zu Chipreaktoren

Die aufwändigere Prozessablauf für die Fluss-Chipreaktoren entspricht prinzipiell dem der Batch-Chipreaktoren (s. Abb. 10, S. 34). Es kommen jedoch weitere Fotolithografie- und Ätzschritte hinzu zur Präparation der Mikrofluidkanäle sowie der Dünnschichttransducer für die Temperierung der Mikrokanäle. Die Ablaufprotokolle für die Batch- und Fluss-Mikroreaktorchips sind dem Anhang C2a) und b) zu entnehmen.

### **A) Lithografische Verfahren**

Lithografische, insbesondere fotolithografische Verfahren bieten die Möglichkeit, Strukturen bis in den sub-Mikrometerbereich zu präparieren und erlauben durch die Parallelisierbarkeit eine kostengünstige Serienfertigung. Hierbei werden mittels Strahlung die Strukturen auf dünne Fotolackschichten, sog. Resists, abgebildet. Diese organischen Polymere ändern bei Bestrahlung ihre Löslichkeit und können im anschließenden Entwicklungsprozess mit Lösungsmitteln selektiv entfernt werden. Je nachdem ob der belichtete oder unbelichtete Teil gelöst wird, ist zwischen Positiv- und Negativresists zu unterscheiden. Nach dem Entwickeln werden die Resists unter UV-Strahlung ausgehärtet (hard bake). Die auf der Oberfläche verbleibende Resistschicht widersteht nachgeschalteten Ätzprozessen, wobei je nach Prozessablauf der geeignete Resist zu wählen ist.

Bei der Präparation der Mikroreaktoren wurden Fotoresists verwendet, welche bei 3000 ... 5000 U/min in Schichten von etwa 1...2 µm im Spin-on-Verfahren aufgeschleudert werden. Es kamen die Positivresists AZ 1514 H und AZ 5214 E zum Einsatz, welche im Maskaligner AL 6-2 (Electronic

Visions Inc., USA) bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 365$  nm belichtet wurden. Die bei der Präparation der Mikroreaktoren verwendeten Masken bestanden aus einem quadratischen Glassubstrat ( $d \approx 2,4$  mm,  $l = 6''$ ) (Schott Jena<sup>er</sup> Glas GmbH, D) und einer Cr-Schicht ( $d \approx 100$  nm), welche auf einem Pattern-Generator und einer Elektronenstrahlanlage ZBA 23 (Jenoptik, D) im seriellen Modus belichtet wurden. Durch elektronenoptische Manipulation des Strahls wird ein sog. Formstrahl erzeugt, wodurch Strukturbreiten von weniger als  $0,5 \mu\text{m}$  zu realisieren sind. Zur Schonung der Maske sowie um Fehler durch direkten Kontakt mit dem Wafer zu vermeiden, erfolgte die Belichtung der Fotesists im Proximity-Verfahren. Durch FRESNELSche Beugung am Spalt wird die minimal erreichbare Strukturbreite reduziert, dem sog. Proximity-Effekt.

Die bei der Fotolithografie minimale Strukturbreite  $b_{\min}$  ergibt sich durch

$$b_{\min} = \sqrt{\lambda \cdot \left( s + \frac{d}{2} \right)}.$$

Bei einem Spalt (Proximityabstand)  $s$  von etwa  $10 \mu\text{m}$  und  $\lambda = 365$  nm erhöht sich  $b_{\min}$  in einer Resist von  $1 \mu\text{m}$  Dicke von ca.  $0,4 \mu\text{m}$  zu  $1,9 \mu\text{m}$ . Dies ist jedoch für die hier verwendeten Strukturgrößen noch unkritisch. (*Lerm 2001, Büttgenbach 1994, Menz 1997, Gerlach 1997*)

## **B) Dünnschichttechnologie und Dimensionierung der Transducer**

Mithilfe von Planarbeschichtungs- und Strukturierungstechniken wurden zur Realisierung der Temperaturregelung Pt-Al-Dünnschichttransducer auf der Chipoberfläche präpariert. (s. Kap. 1.1.2, S. 17f) Zur Realisierung von Temperatursensoren und Widerstandsheizern bietet sich aufgrund der thermischen und elektrischen Eigenschaften eine Kombination aus Pt- und Al-Dünnschichttransducern an. (s. Kap. 2.3.1, S. 43f) Pt bildet dabei die eigentliche Funktionsschicht. Al dient als Material für die Leiterbahnen zum widerstandsarmen Elektronentransport zu den Pt-Strukturen. Die Materialien Pt bzw. Al werden als Dünnschichten in einem PVD-Prozess (Physical Vapor Deposition) auf die LP-PECVD-Silizium-Nitridoberflächen gesputtert. Eine Zwischenschicht aus NiCr ( $3 \dots 5$  nm) wurde jeweils als Haftvermittler und Ätzstopp verwendet. Die Pt-Schicht wurde in der HF-Sputteranlage „Sputter Sphere“ (MRC Inc., USA) mit einer Dicke von  $120$  nm gesputtert, die  $1000$  nm dicke Al-Schicht in einer DC-Magnetron-Anlage „PE 4480“ (Perkin Elmer, USA). (s. Anhang C2a) und b) , Tabellen C1 und C2) Bei der Sputterbeschichtung werden Ionen eines Entladungsgases durch Plasmaentladung zur Kathode als Target hin beschleunigt. Durch Impulsübertragung werden Targetatome an der Oberfläche freigesetzt und bewegen sich mit hoher kinetischer Energie in Richtung Anode, dem zu beschichtenden Substrat. Auf dessen Oberfläche kondensieren die Spezies aus der Gasphase als homogene und feinkörnige polykristalline Schicht mit Korngrößen im Bereich weniger Nanometer, aber auch teilkristalline oder amorphe Schichten. Nach dem Sputtern befinden sich die Dünnschichten im thermischen Nicht-Gleichgewicht. Das thermische Gleichgewicht wird dadurch angestrebt, dass das System rekristallisiert. Körner lagern sich zusammen und bilden größere kristalline Domänen aus, wobei Phasengrenzen teilweise verschwinden (s. Abb. 18, S. 45). (*Büttgenbach 1994, Menz 1997, Köhler 1999, Kessler 2002*)



Die Dünnschichttransducer besitzen einen rechteckförmigen Leiterbahnquerschnitt und werden mäandrierend auf dem Substrat angeordnet. Damit lassen sich bezogen zur Fläche relativ große Sensorwiderstände und Heizflächen realisieren. Der Abstand zwischen den Pt-Strukturen beträgt für die Mikroreaktoren 100  $\mu\text{m}$ , was sich problemlos mit den vorhandenen Strukturierungsmethoden präparieren ließ.

Die elektrischen Randbedingungen bzgl. des Sollwiderstands, der Sollspannung und –leistung sind durch die Dimensionierung des Reglers vorgegeben. Die maximale Stromdichte  $J_{\text{max}}$  der Pt-Schichten wurde experimentell in Dauerversuchen ermittelt. Nach 72 h konnte bei  $J = 4 \cdot 10^8 \text{ A/m}^2$  keine Veränderung der elektrischen Parameter der 0,12  $\mu\text{m}$  dicken und 900  $\mu\text{m}$  breiten Schicht festgestellt werden. Für die Konstruktion wurde somit die maximale Stromdichte festgelegt zu  $J_{\text{max}} = 2 \cdot 10^8 \text{ A/m}^2$ . Die Mikroreaktoren arbeiten i.d.R. im Impulsbetrieb und erreichen  $J_{\text{max}}$  demnach nur kurzzeitig.

Die Dimensionierung der Dünnschichttransducer erfolgte zweckmäßiger Weise mithilfe des sog. Quadratwiderstandes  $R_{\square}$ . (Tuchscherer 1996, Mokansky 1997, Kielpinski 2002) Dieser Parameter eignet sich zur praktischen Ermittlung der Länge  $l$  von Widerstandsschichten. Bei gegebener Breite  $b$  und Höhe  $z$  ergibt sich unter der Annahme quadratischer Widerstandseinheiten aus dem OHMSchen Gesetz folgende Beziehung:

$$R = \frac{\rho \cdot l}{A} \quad \Rightarrow \quad R_{\square} = \frac{\rho}{z}, \quad \text{mit } l = b \text{ und } A = b z ;$$

Der Gesamtwiderstand bzw. die Länge des Transducers ergeben sich damit zu

$$R = n_{\square} R_{\square} \quad \text{bzw.} \quad l = n_{\square} b. \quad (\text{G3})$$

Die Anzahl  $n_{\square}$  der quadratischen Widerstandselemente und damit die Länge der Sensoren/ Heizer geht als konstruktiver Parameter in das Design der Dünnschichttransducer ein. Für Pt-Dünnschichttransducer bewegt sich der Gesamtwiderstand typischer Weise im Bereich  $R = 50 \dots 500 \Omega$  bei charakteristischen Längen  $l = 2,5 \dots 25 \text{ mm}$ .

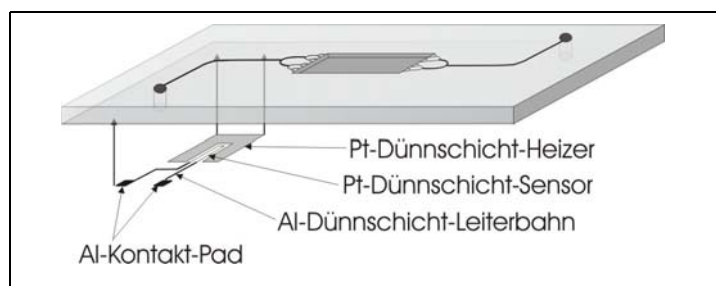
Tabelle 3 illustriert beispielhaft für je einen Pt- Sensor und –Heizer den Gang der geometrischen Dimensionierung. Es ist anzumerken, dass der experimentell ermittelte Quadratwiderstand ( $R_{\square} \approx 2,2 \Omega$ ) etwa doppelt so groß ist wie der berechnete Wert unter Berücksichtigung des spezifischen Widerstandes für Pt-Bulk-Material. Diese Überhöhung des Widerstandes liegt im Präparationsprozess begründet. Im Gegensatz zum Bulk-Material entstehen beim Sputtern feinkörnige Schichten, deren Korngrenzen den Elektronenfluss behindern. (s. S. 36) Solange sich die Dünnschichten nicht vollständig im thermischen Gleichgewicht befinden, ist der Gesamtwiderstand überhöht. (Kessler 2002) Die Leiterbahnen auf dem Chipreaktor wurden sowohl aus elektrischen als auch aus ökonomischen Gründen als Al-Dünnschichten ausgeführt. Der spezifische Widerstand von Bulk-Aluminium ist gegenüber Pt um etwa den Faktor 4 niedriger.

**Tabelle 3:** Beispiel zur Dimensionierung von Pt-Sensor- (A) und Pt-Heizerstrukturen (B) (Kuchling 1991, Kielpinski 2002)

| <b>A) Sensoren</b>                              |                    |                      |
|---|--------------------|----------------------|
| Sollwiderstand $R_{\text{soll}}$                | $\Omega$           | 250                  |
| Schichtdicke $z$                                | $\mu\text{m}$      | 0,12                 |
| spez. Widerstand Pt (Bulk-Material) $\rho$      | $\Omega \text{ m}$ | $1,07 \cdot 10^{-7}$ |
| Quadratwiderstand $R_{\square}$ (Bulk-Material) | $\Omega$           | 1,07                 |
| Breite der Leiterbahnen $b$                     | $\mu\text{m}$      | 100                  |
| Quadratwiderstand $R_{\square}$ (Dünnschichten) | $\Omega$           | 2,18                 |
| Anzahl der Widerstandselemente $n_{\square}$    | –                  | 115                  |
| <b>Länge der Sensoren <math>l</math></b>        | mm                 | <b>11,5</b>          |

| <b>B) Heizer (Fluidkanal)</b>                          |                          |             |
|--|--------------------------|-------------|
| Sollspannung $U_{\text{soll}}$                         | V                        | 15          |
| Sollleistung $P_{\text{soll}}$                         | W                        | 2           |
| Schichtdicke $z$                                       | $\mu\text{m}$            | 0,12        |
| Breite der Leiterbahnen $b$                            | $\mu\text{m}$            | 900         |
| Quadratwiderstand $R_{\square}$ (Dünnschichten)        | $\Omega$                 | 2,175       |
| Stromdichte $J$ ( $I_{\text{max}} = 2 \cdot 10^{-3}$ ) | $\text{A}/\mu\text{m}^2$ | $10^{-3}$   |
| Widerstand $R$   | $\Omega$                 | 139         |
| Anzahl der Widerstandselemente $n_{\square}$           | –                        | 64          |
| <b>Länge der Heizer <math>l</math></b>                 | mm                       | <b>58,0</b> |

Der Quadratwiderstand einer 1  $\mu\text{m}$  dicken Al-Schicht beträgt  $R_{\square} \approx 0,027 \Omega$  und ist damit mindestens 40 Mal kleiner als der Wert für die etwa 120 nm dicke Pt-Schichten. Damit kann eine scharfe elektrische Trennung zwischen Leiterbahn und Funktionselement erfolgen. Einschließlich der Verluste durch die Kontaktierung der Zuleitungen an den Chip wird der Strom auf dem Chipreaktor zu den Pt-Transducern mit einer Verlustleistung von kleiner 5% transportiert. Dort erfolgt ein thermisch bedingter entsprechender Spannungsabfall (Sensoren) bzw. wird umgekehrt elektrische Leistung in Form von JOULEscher Wärme eingekoppelt (Heizer). Der Messstrom  $I_{\text{mess}}$  beim Betrieb der Pt-Sensoren betrug  $I_{\text{mess}} = 400 \mu\text{A}$ . Zur leichteren Kontaktierung der Dünnschichttransducer mit den Kontaktdrähten wurden die Leiterbahnen an einer Chipkante zusammengeführt und mit einem sog. Kontakt-Pad versehen. (s. Abb. 11)



**Abb. 11:** Anordnung eines Pt-Dünnschicht-Widerstandsheizers und -sensoren unter dem Fluidkanal des Fluss-Mikroreaktors (Explosionsdarstellung)

### C) Trocken- und Nassätztechniken

Trocken- und Nassätztechniken dienen der subtraktiven Mikrostrukturierung von Materialien. Ein herausragendes Merkmal physikalischer **Trockenätzverfahren** ist ihre im Vergleich zu chemischen Nassätztechniken geringe Selektivität. Durch Einführung einer chemischen Ätzkomponente kann die

Selektivität erhöht werden. Es entstehen jedoch häufiger weniger steile Flanken, bedingt durch den partiell isotropen Charakter des chemischen Trockenätzprozesses.

Die LP-Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>- und PE-Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>-Schichten wurden in einem Planarplattenreaktor „RIE 488“ (ZWG/Sentech, D) während eines Ar-plasmaunterstützten RIE-Prozesses (reaktives Ionenätzen) mit CF<sub>4</sub> als Reaktivgas strukturiert. Zur Präparation der Pt-Schichten wurde in einem IBE-Prozess (Ionenstrahlätzen) in der kombinierten RIBE-IBE-Anlage „Microfab 300“ (Oxford Plasma, GB) ein Ar-Plasma verwendet. Zur Erhöhung der Homogenität der Ätzung wurde das Substrat auf einem Drehteller fixiert und zur Vermeidung thermischer Spannungen gekühlt.

Mithilfe **nasschemischer Ätztechniken** können die Maskierungsstrukturen isotrop oder anisotrop in das darunter liegende Substrat übertragen werden. Dies hängt von den Eigenschaften des Substratmaterials und dem Ätzmittel ab. In der Mikrosystemtechnik kommt dem anisotropen Tiefenätzen von Silizium eine zentrale Bedeutung zu. Dieser Anisotropie-Effekt beruht auf der Eigenschaft basischer Ätzmittel (Alkalilaugen), die niedrigindizierten Hauptebenen des Si-Kristalls unterschiedlich schnell abzutragen (s. Tabelle 2, S. 33). Die in heißer NaOH etwa 100-mal langsamer zu ätzende <111>-Ebene fungiert quasi als natürlicher Ätzstopp. Je nach der Schnittrichtung des Wafers in Bezug zu den Hauptkristallrichtungen entstehen so unterschiedliche Querschnittsformen. Die laterale Öffnung der Ätzmaske sowie die Ätzzeit definiert die geometrische Gestalt der tiefengeätzten Struktur: für <100>-Wafer ergeben sich bei engen Maskenöffnungen und beim Ätzen bis zum geometrischen Ätzstopp V-förmige Gräben, ansonsten entstehen trapezförmige Gruben. (s. Abb 12) Ätzen von <110>-Wafers ermöglicht die Präparation senkrechter Gräben mit hohem Aspektverhältnis.

Beim weitaus seltener angewendeten isotropen nasschemischen Ätzen von Silizium findet der Ätzangriff ohne Vorzugsrichtung statt. Zum einen führt die räumliche Isotropie des Ätzvorgangs zu einer starken Unterätzung der Ätzmaske. Zum anderen kommt es zur Verrundung beispielsweise zuvor anisotrop geätzter Strukturen. (s. Abb 13) Aus strömungsmechanischen Gründen ist

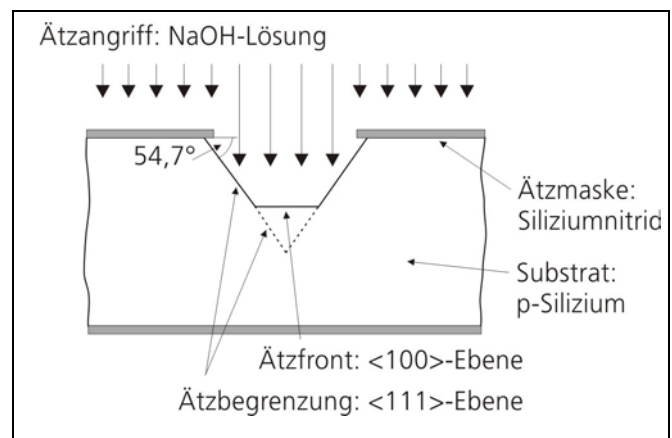


Abb. 12: Anisotropes Nassätzen von <100>-Si-Wafern zur Präparation trapezförmiger Gruben oder V-förmiger Gräben durch Ätzen bis zum geometrischen Ätzstopp (<111>-Ebene)

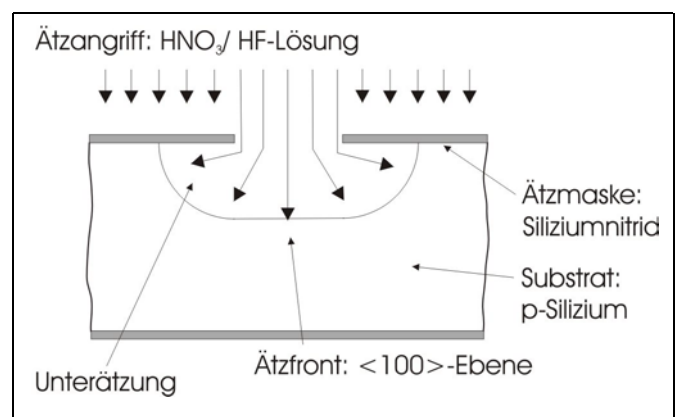


Abb. 13: Isotropes Nassätzen von <100>-Si-Wafern zur Präparation runder Strukturen

dies besonders vorteilhaft, wenn fluidische Elemente in Siliziumsubstrate zu präparieren sind. (Büttgenbach 1994, Menz 1997, Köhler 1999)

Zum anisotropen nasschemischen Tiefenätzen der Reaktionskammern und Thermo-Gaps im Si-Substrat bei Batch- und Fluss-Mikroreaktoren wurde über mehrere Stunden mittels 40%-iger NaOH bei  $\vartheta = 80^\circ\text{C}$  mit einer Ätzrate von  $r_{\text{etch}}(\text{NaOH}) \approx 72 \mu\text{m/h}$  geätzt. Zur Erzeugung von Ätzoberflächen mit geringer Welligkeit und gleichmäßigerer Struktur bietet sich der Einsatz von TMAH (Tetramethyl-Ammoniumhydroxid) an. Allerdings muss hierbei ein um den Faktor 3 langsamere Ätzrate in Kauf genommen werden. Zudem kann die etwa 10-fach kleinere Anisotropie u.U. zu stärkerer Unterätzung führen. Isotropes Nassätzen diente bei der Präparation der Fluss-Mikroreaktoren dazu, die fluidischen Strukturen in das Substrat zu präparieren. Der Ätzangriff eines Gemisches aus  $\text{HNO}_3$  und HF gelöst in  $\text{CH}_3\text{COOH}$  und  $\text{HClO}_4$  bewirkte ein Verrunden der bereits tiefengeätzten Ecken und Kanten der Strukturen. Die Präparation runder Mikrofluidkanäle wird durch den Einsatz des isotropen Ätzmittels erst möglich. Die nur mäßige Ätzrate  $r_{\text{etch}} \approx 30 \mu\text{m/h}$  sowie die Aggressivität des Ätzbades (Flusssäure-haltig, Umsetzung zu nitrosen Gasen) sind bei diesem Verfahren als nachteilig zu bemerken.

Das nasschemische Ätzen der NiCr-Haftvermittlerschichten und der Al-Metallisierungen zählt aufgrund der geringen Schichtdicken zu den Planarätzverfahren. NiCr-Schichten werden in einem Ätzbad aus  $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$  in  $\text{HClO}_4$  bei Raumtemperatur präpariert mit einer Rate von  $r_{\text{etch}} \approx 10 \mu\text{m/h}$ . Im Falle der Al-Metallisierungen kommt ein Gemisch aus  $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{HNO}_3$  mit  $r_{\text{etch}} \approx 30 \mu\text{m/h}$  zum Einsatz. Anschließend werden die Al-Strukturen in einem sog. Flankenbad aus HF-Lösung für wenige Minuten zum Glätten der Kanten nachbehandelt. (Lerm 2001, Köhler 1999)

## 2.2.2 Mikromaterialbearbeitung

Zur Vereinzelung der auf dem Wafer angeordneten Chipreaktoren kam ein CNC-Präzisionstrennschleifer „Seier 301“ (Seier, D) zum Einsatz. Die diamantbeschichtete Trennscheibe dieser „Wafersäge“ ermöglicht minimale Schnittbreiten von  $40 \mu\text{m}$  mit Rauigkeiten  $< 10 \mu\text{m}$ . Die Wafer wurden auf selbstklebenden Folien mit einer Dicke von  $70 \mu\text{m}$  aufgebracht. Eine Vakuumsaugung sorgte für eine Fixierung auf dem Fahrteller während des Sägevorgangs.

Zur Verbindung der Mikrofluidelemente des Chipreaktors mit den Kapillarschläuchen und damit der fluidischen Peripherie wurde mit totvolumenarmen Fluidanschlüssen realisiert. (s. Abb. 14) Diese Mikrobauerteile wurden im

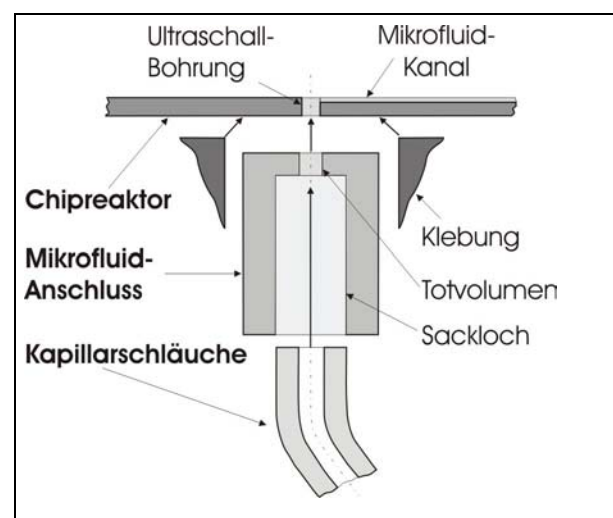


Abb. 14: Fluidische Anschluss technik (Explosionszeichnung)

hauseigenen Musterbau aus PEEK-Rundmaterial gefertigt. Hierzu wurde der Außendurchmesser auf 3 mm abgedreht und die Teile auf 4 mm abgelängt. Ein achsensymmetrisches Sackloch bildet die Andockstelle für die PTFE-Kapillarschläuche ( $\varnothing_a = 1/16'' \approx 1,6 \text{ mm}$ ;  $\varnothing_i = 0,25 \text{ mm}$ ). Das Totvolumen des Mikrofluid-Anschlusses beträgt etwa  $V_{\text{tot}} \approx 0,1 \mu\text{l}$  und kann gegenüber dem Totvolumen der Kapillarschläuche ( $V_{\text{tot}} \approx 50 \mu\text{l} @ l = 1 \text{ m}$ ) vernachlässigt werden.

Mit dem Ultraschall-Schwingläppen (auch Ultraschall-Bohren) zur Bearbeitung spröder Werkstoffe ist es möglich, Löcher mit Bohrweiten von  $\varnothing = 0,3 \dots 2 \text{ mm}$  zu bohren. Die in Schwingung versetzten 20- $\mu\text{m}$ -Körner der Lappsuspension (Siliziumcarbid und Wasser) schlagen Partikeln aus der Substratoberfläche heraus. Dabei wird jedoch auch das Bohrwerkzeug (Hartmetallbohrerschaft) abgetragen, so dass die Standzeiten der Maschine vergleichsweise gering sind. (Matuschek 1962) Die Durchgangslöcher ( $\varnothing = 400 \mu\text{m}$ ) zur fluidischen Anbindung der

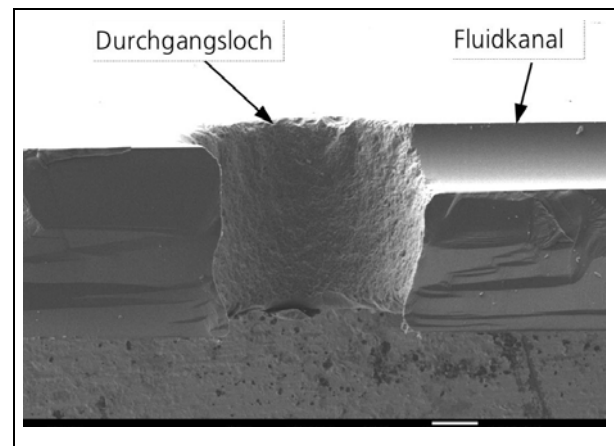


Abb. 15: Ausschnitt Fluss-Mikroreaktor (Chipreaktor): Ultraschallbohrung Durchgangsloch ( $\varnothing = 400 \mu\text{m}$ ) (REM-Aufnahme)

Mikrofluid-Kanäle auf der Chipvorderseite an die Fluidanschlüsse auf der Rückseite erfolgte mithilfe des Ultraschall-Cutters 601 (Gatan, GB). (s. Abb. 15) Zur Fixierung und zum Schutz der Dünnschichtstrukturen vor Abrieb während des Lappvorgangs wurde das zu bearbeitende Substrat auf eine selbstklebende Kunststoffolie aufgebracht. Nach der Bearbeitung konnten die suspendierten Partikeln mit reichlich  $\text{H}_2\text{O}$ , bidest. und einer kurzen ( $t \approx 15 \text{ s}$ ) Behandlung im Ultraschallbad entfernt werden, ohne die Dünnschichttransducer zu zerstören.

### 2.2.3 Aufbau- und Verbindungstechnik

#### A) Elektrische Kontaktierung

Zur elektrischen Kontaktierung von Chipbauteilen werden zur Serienfertigung in der Elektronikindustrie Technologien wie z.B. die Flip-Chip-Technik, Ultraschall-Wedge-Bonding, Tape-Automated-Bonding oder Drahtboden verwendet. (Büttgenbach 1994, Gerlach 1997) Aufgrund des hohen apparativen Aufwandes und der überschaubaren Stückzahlen sowie der mechanischen Empfindlichkeit wurde ein alternatives Verfahren entwickelt. Die Elektroden der Kristallisationsreaktoren ( $\varnothing = 0,3 \text{ mm}$ ) wurden mithilfe von Silberleitlack SCP 003 (RS Components AG, D) auf den Al-Kontakt-Pads ( $1,5 \times 2 \text{ mm}$ ) des Chipreaktors kontaktiert. Im Falle des Batch-Mikroreaktors waren je 7 Drähte zu kontaktieren, für den Fluss-Mikroreaktor 13. Nach 30-minütiger Trocknung des Silberleitlacks bei Raumtemperatur wurde die Verbindung mit 2-Komponenten-Epoxidklebstoff „plus schnellfest“ (Uhu GmbH, D) von der Umgebung gekapselt und erlaubte

mäßige, jedoch ausreichende mechanische Belastungen ( $\sigma > 1650 \text{ N/cm}^2$ ). Zur Erhöhung der Festigkeit erfolgte die Aushärtung der Klebung bei etwa  $70^\circ\text{C}$ .

Die manuell aufwändige Prozedur konnte durch den Einsatz einer Vorrichtung aus hitzebeständigen Kunststoffen (PTFE und POM) und Aluminium erleichtert werden (s. Abb. 16). (Seiler 2003) Damit war es möglich, die Elektroden mit einer Pinzette unter einem Stereomikroskop exakt zu positionieren und während des

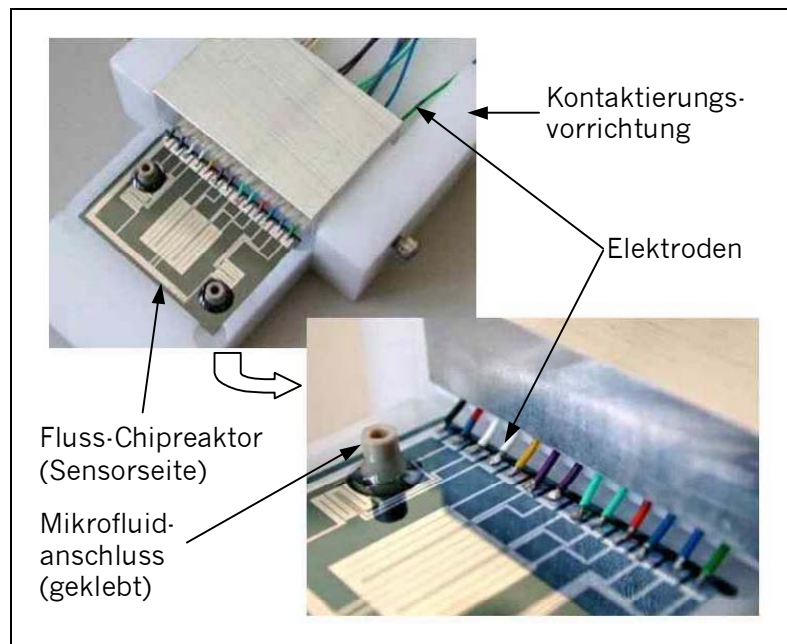


Abb. 16: Kontaktierung der Elektroden des Fluss-Mikroreaktors

gesamten Kontaktierungsprozesses zu fixieren. Die Drähte wurden schließlich in mehrpoligen Steckern verlötet und so die Schnittstelle zum Regler geschaffen.

## B) thermische und mechanische Kopplung

Die thermische und mechanische Kopplung der Einzelkomponenten erfolgte durch die trägerlose Wärmeleitfilme „FSF 52P“ und „FSF 98P“ (Fischer Elektronik AG/ 3M, D). Diese Materialien besitzen eine gute thermische Leitfähigkeit ( $\lambda = 3 \text{ W/(m K)}$ ) und schmelzen bei Erreichen ihrer Nenntemperatur  $52^\circ\text{C}$  bzw.  $98^\circ\text{C}$ . Damit wird eine einfache und schnelle (De-) Montage der Mikroreaktorkomponenten ermöglicht. Die Montage erfolgte auf einer „Hotplate PLS 509S“ (Convac GmbH, D). Zur Verbindung des Chipreaktors und des Durchfluss-Wärmetauschers mit dem PELTIER-Element (s. Abb. 8a, 2, S. 31) kam der Wärmeleitfilm „FSF 98P“ zum Einsatz. Zur Fixierung auf dem Objektträger konnte der kostengünstigere Film „FSF 52P“ verwendet werden. Aufgrund der geringeren thermischen Belastung des Wärmeleitfilms an dieser Stelle im Betrieb ist ein selbsttätiges Lösen der Verbindung nicht zu befürchten. Durch den Einsatz von Objektträgern ist die mechanische Kompatibilität zum Standardaufbau von Mikroskoptischen gewährleistet.

## C) Fluidische Komponenten

Für den Fluss-Mikroreaktor kommen zu den thermischen Funktionselementen noch fluidische Komponenten hinzu, welche einen kontinuierlichen Betrieb ermöglichen. (s. Abb. 8b, 2, S. 31) Die Mikrofluidanschlüsse des Fluss-Mikroreaktors als Schnittstelle zwischen Chipreaktor und fluidischer Peripherie (s. Abb. 14, S. 40) konnten mithilfe der Kontaktierungsvorrichtung justiert und geklebt werden. Die übrigen Fluidikelemente wie die Kapillarschläuche, Pumpen und Ventile wurden über totvolumenarme Flanschverbindungen gekoppelt. Das Fluid wurde in Kapillarschläuchen aus

biologisch inerten Hochleistungskunststoffen (PEEK und PTFE) geführt mit Außen- bzw. Innendurchmesser  $d_a = 1/16''$  bzw.  $d_i = 0,25$  mm. Als miniaturisierte Flanschverbindungen kamen lösbare HPLC-Schlauchverbinder „Low pressure PEEK unions 1/16'' P 702“ bzw. am Chipreaktor „PEEK quick connect LUER adapters P 655, P 658“ (Upchurch Scientific Inc, USA) zum Einsatz. Als Pumpe diente eine Spritzenpumpe „SP210 iwz“ (WPI, D), welche einen besonders druckstoßarmen Fluidtransport ermöglicht. Die Herstellerangaben bezüglich der Genauigkeit bzw. Reproduzierbarkeit der Fördermenge ( $< 1\%$  bzw.  $\pm 0,1\%$ ) wurde mittels Wägungen einer wässrigen Lösung im Rahmen der Messgenauigkeit bestätigt. Zur Aufnahme der Lösungen und als Reservoir wurden Mikroliterspritzen (100  $\mu$ l und 250  $\mu$ l) „Microsyringe, 1/4'' 10-28“ (Innovative Laborsysteme GmbH, D) verwendet. Ein motorbetriebenes 10/2-Wegeventil „iV750-102“ (ECR GmbH, D) diente als fluidischer Gleichrichter. Damit wurde erreicht, dass die Reaktionskammer in derselben Richtung durchströmt wird, während die Pumprichtung umgekehrt wird. Die Abstimmung des Schaltvorgangs des Ventils mit der Umkehr der Pumprichtung erfolgte über TTL-Impulse. Zur Vermeidung der zu erwartenden Drucküberhöhungen oder Gasblasen im System (Koch 2000, Gad-el-Hak 2002) wurde die fluidische Anordnung durch Komponenten wie beispielsweise durch eine Blasenfalle erweitert und optimiert. Die detaillierte Beschreibung der bei der Konstruktion umgesetzten und beim Einsatz des Fluss-Mikroreaktors realisierten Maßnahmen ist in Kapitel 3.3.2 (S. X100ff) einzusehen.

## 2.3 Temperierung

Die Temperierung der Reaktionskammern der Mikroreaktoren wird realisiert mit einer Kombination aus Dünnschicht-Transducern (Sensoren) und einem wassergekühlten PELTIER-Element. Zur Regelung dient ein rechnergesteuerter und softwaregestützter PID-Regelkreis.

Durch die Sensitivität der Proteinkristallisation gegenüber der Temperatur ist es im Falle des Fluss-Mikroreaktors notwendig, alle fluidischen Elemente thermisch zu kontrollieren. Die Temperatur in der Reaktionskammer des Chipreaktors, in der die Kristallisation kontrolliert stattfindet, muss dabei getrennt regelbar sein. Auf dem Chip des Fluss-Mikroreaktors werden daher eine fluidische Vor- und Nachlaufstrecke integriert und mittels Pt-Dünnschichtwiderstandsheizer temperiert. Die Beheizung der an den Chipreaktor angeschlossenen Kapillarschläuche als Zuleitungen zum Chipreaktor erfolgt über eine Widerstandsdrahtwicklung. Alle anderen Komponenten (Pumpen, Ventile etc.) befinden sich in einem Kompaktofen. Damit ist es möglich, je nach Habitus der Proteine (Lösungsenthalpie  $\Delta h_{\text{sol}} < > 0$ ; s. Kap. 1.1.1, S. 8) die Reaktionskammer entweder auf einem höheren oder niedrigeren Temperaturniveau als im übrigen System zu betreiben.

### 2.3.1 Interne Komponenten: Dünnschichttransducer

Wie in Kapitel 2.2.1 (S. 36ff) erwähnt, dienen die Dünnschichttransducer als funktionelle Elemente zur Umsetzung von Temperaturunterschieden in Widerstandsdifferenzen und umgekehrt. Dabei wird die Temperaturabhängigkeit der elektrischen Leitfähigkeit von Metallen ausgenutzt. Der funktionale Zusammenhang zwischen Widerstand und Temperatur wird in sog. R-T-Diagrammen dargestellt. Für

Pt-Widerstandsthermometer ergibt sich im Temperaturbereich  $\vartheta \approx 0 \dots 100 \text{ }^\circ\text{C}$  in guter Näherung ein linearer Zusammenhang der folgenden Form:

$$R_b = R_a \cdot [1 + TK_a^b \cdot (T_b - T_a)], \quad \text{mit } R_a = R(T_a) \text{ bzw. } R_b = R(T_b); [T_i] = \text{ }^\circ\text{C} \quad (\text{G4})$$

Der Koeffizient  $R_a$  (G4) entspricht dabei dem Widerstand bei  $0^\circ\text{C}$  und wird als Nennwert des Sensors bezeichnet. Die Steigung der Geraden enthält eine Materialkonstante, den sog. Temperaturkoeffizienten  $TK_a^b$  (G4) bei der unteren bzw. oberen Temperatur  $T_a$  bzw.  $T_b$ . Die genormte Kenngröße  $\alpha = TK_0^{100}$  (DIN EN 50751) gibt somit die mittlere Empfindlichkeit im Temperaturbereich  $0^\circ\text{C} < \vartheta < 100^\circ\text{C}$  bezogen auf den Nennwert an.

Der tabellierte Wert von  $\alpha$  für Pt-Dünnschicht-Messwiderstände beträgt  $\alpha = 3,85 \cdot 10^{-3} \text{ 1/K}$ . Herstellungstechnologie und Materialzusammensetzung haben allerdings signifikanten Einfluss auf den Absolutwert des Temperaturkoeffizienten. (Tegeler 2004, Nau 2004)

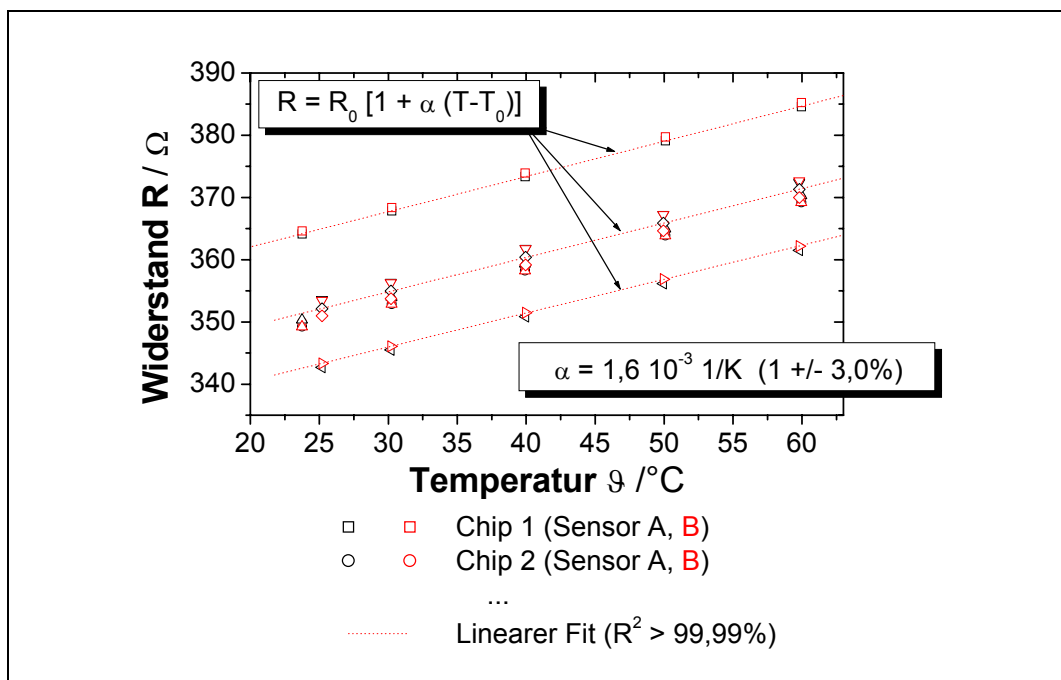


Abb. 17: R-T-Kennlinien von Pt-Dünnschicht-Widerstandsthermometer (Sensoren)

Die bei der Präparation der Chipreaktoren hergestellten Pt-Dünnschichtwiderstände (s. Kap. 2.2.1, S. 36ff) wurden kalibriert, um sie zur Temperaturmessung einsetzen zu können. (Tegeler 2004) Hierzu wurden die Chipreaktoren in einem temperierbarer Klimaschrank VMT 04/35 (Heraeus-Vötsch, D) auf 5 verschiedene Temperaturen ( $25^\circ\text{C} < \vartheta < 60^\circ\text{C}$ ) gebracht. Die Innentemperatur des Ofens wurde kontrolliert mittels einem Quecksilber- und einem Digital-Thermometer 2084T (Digitron, D). Die zugehörigen Widerstandswerte wurden mit einem Digital-Multimeter K 2000 (Keithley, USA) gemessen. Hierbei kam 4-Leiter-Messtechnik zum Einsatz, um den Messfehler durch die Zuleitungen zu kompensieren. (van der Pauw 1958) Die Parameter der R-T-Kennlinien wurden gemäß Abbildung 17 bestimmt. Technologisch bedingt schwanken die Widerstandswerte der Pt-Sensoren um etwa 5%. Dies wird durch die Eingabe der Chipparameter beim Betrieb der Mikroreaktoren kompensiert



und ist somit für die Regelung unerheblich. Für den Temperaturkoeffizienten  $\alpha$  ergibt sich bei einer Grundgesamtheit von etwa 150 präparierten Pt-Sensoren ein Mittelwert  $\alpha = 1,63 \cdot 10^{-3} \text{ 1/K}$  ( $1 \pm 3,0\%$ ). Die Sensoren besitzen demnach gegenüber dem Literaturwert eine etwa 2,5-fach geringere Sensitivität. Die Abweichung wurde sowohl auf die Prozessparameter bei der Beschichtung als auch die Eigenschaften des eingesetzten Materials zurückgeführt.

In den systematischen Fehler bei der Bestimmung von  $\alpha$  fließen sowohl Messungenauigkeiten (Temperatur- und Widerstandsmessung) als auch Vereinfachungen in der Messanordnung (unzureichende Kontaktierung der Pt-Sensoren) ein. Der systematische Fehler bei der Bestimmung der R-T-Kennlinien wurde zu etwa 2% abgeschätzt. Der statistische Fehler wird dominiert durch die Ungenauigkeit bei der Messung der Temperatur im Kalibrierofen (ca. 1%). Die Bestimmung des Nennwerts der Sensoren ergab, dass es sich im Falle der Batch-Mikroreaktoren um Pt 350-Elemente, bei den Fluss-Mikroreaktoren um Pt 450- (Reaktionskammer) bzw. Pt 250-Elemente (Fluidkanal) handelt.

Die R-T-Kennlinien von Pt-Widerständen driften im Laufe der Einsatzzeit zu niedrigeren Widerstandswerten. Dies wurde häufig darauf zurückgeführt, dass sich die Kristallstruktur infolge thermischer oder mechanischer Belastung ändert. Wie in Kapitel 2.2.1 (S. 36ff) angedeutet, strebt das System durch Energieeintrag in Rekristallisationsprozessen in Richtung des Gleichgewichtszustandes. Die damit verbundene Änderung der Kristallstruktur drückt sich in einer signifikanten Drift der Widerstandswerte aus. Dieser Ausheilungsprozess kann durch den Eintrag thermischer Energie beschleunigt werden. (Nau 2004, Kessler 2002) Eine exakte Temperierung der Chipreaktoren ist nur dann möglich, wenn die Dünnschichttransducer ausreichend stabilisiert worden sind. Hierzu werden die Chipreaktoren bei Temperaturen, die deutlich über der Betriebstemperatur liegen, künstlich ausgeheilt. Die Temperung erfolgte in einem Temperierofen T6030 (Kendro Heraeus GmbH, D) über 24 h bei  $\vartheta = 200^\circ\text{C}$ . Dieser Rekristallisationsvorgang drückt sich aus in einer Vergrößerung der Pt-Struktur, welcher mittels Widerstandsmessungen quantifiziert werden kann. (s. Abb. 18)

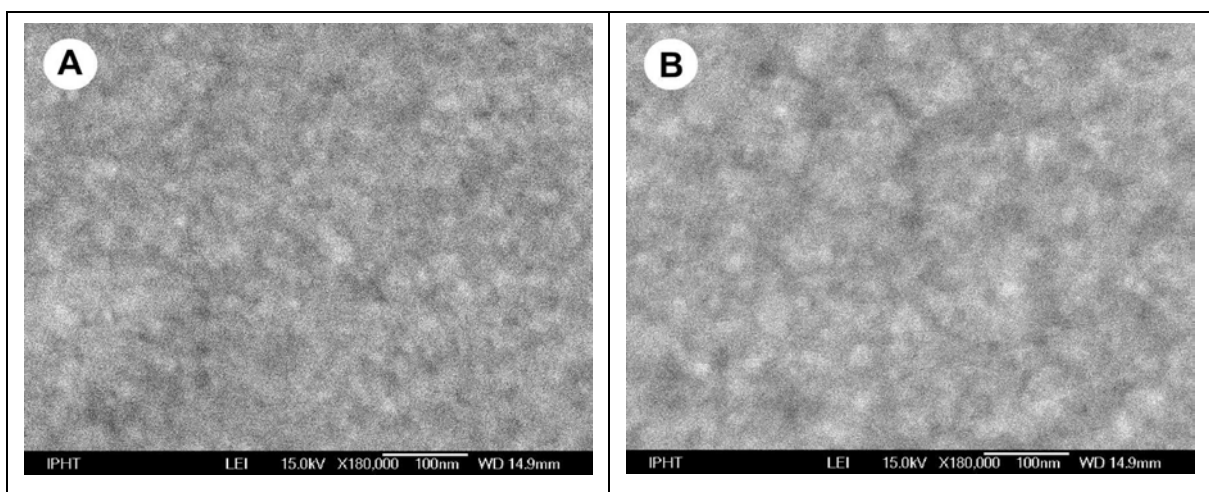


Abb. 18: REM-Aufnahmen: Pt-PVD-Beschichtung (120 nm) vor (A) und nach (B) dem Tempern über 24 h bei  $200^\circ\text{C}$

Messungen direkt vor und nach dem Tempersschritt haben relative Widerstandsänderungen  $\Delta R/R = 2...3\%$  ergeben. Dies entspricht einer Änderung der Temperaturanzeige um  $\Delta T = 2...3$  K. Erneute Messungen nach 50 bzw. 100 Tagen zeigten, dass die Dünnschichten trotz thermischer Belastung bei maximaler Betriebstemperatur nur noch geringe Widerstandsänderungen erfahren. Die relative Widerstandsänderung direkt beträgt nach dem Tempern gegenüber 100 Tagen  $\Delta R/R < \pm 0,025\%$ , was einer Temperaturdifferenz  $\Delta T < 0,025$  K entspricht.

Aufgrund der guten Temperaturleitfähigkeit der Substratmaterialien ( $\text{Si}$ ,  $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) sind sowohl die Temperaturdifferenz zwischen Unter- und Oberseite des Chips als auch die resultierende Zeitverzögerung durch die thermische Relaxation vernachlässigbar. (s. Tabelle 2, S. 33) Es ist daher möglich, die Dünnschichttransducer auf der Unterseite der Chipreaktoren zu platzieren. Dies hat zum einen eine drastische Vereinfachung der Präparationstechnologie zur Folge. Zum anderen wird das Risiko einer störenden Wechselwirkung der Transducer mit der Reaktionslösung eliminiert.

Obwohl die Temperatur im Innern der Reaktionskammer interessiert, wird doch die Regelung mit den Pt-Sensoren an der Chipunterseite bewerkstelligt. Der dabei gemachte Fehler  $\Delta T < 10^{-2}$  K kann vernachlässigt werden.

### 2.3.2 Externe Komponenten: PELTIER-Element, Kapillarheizung und Kompaktofen

Die Kühlung der Reaktionskammer, wie in späteren Systemversionen auch deren Beheizung, wurde mithilfe von externen Komponenten, sog. PELTIER-Elementen, realisiert. In einer Materialkombination bestehend aus zwei Metallen oder Halbleitern wird eine angelegte Spannung über den inversen thermoelektrischen Effekt (PELTIER-Effekt) in eine Temperaturdifferenz umgesetzt. Hierbei entsteht eine warme und eine kalte Seite. Durch Umpolung ist es möglich, PELTIER-Elemente sowohl im Kühl- als auch im Heizmodus zu betreiben. Besonders bei kompakten Geräten kommen derartige Module zum Einsatz. Zur Realisierung großer Heizleistungen bzw. hoher Temperaturen muss die entstehende Wärme auf der Rückseite vibrationsfrei mit einer Kühlvorrichtung abgeführt werden. Im Falle des Batch-Mikroreaktors wurden einstufige PELTIER-Elemente „CP 1.0-31-08L“ (Melcor Inc., USA) verwendet. In ihren geometrischen Abmaßen  $15 \times 15 \times 4$  mm<sup>3</sup> erzeugen sie bei einer maximalen elektrischen Leistung  $P_{\text{el}} = 5,3$  W eine maximale Temperaturdifferenz  $\Delta T_{\text{max}} = 80$  K. Die Temperierung der Reaktionskammer des Fluss-Chipreaktors wurde mit 2 unterschiedlichen PELTIER-Element-Typen getestet: neben den genannten Elementen „CP 1.0-31-08L“ wurden Module des Typs „PE-031-05-15“ (SuperCool AB, Schweden) geometrischer Abmaße getestet:  $15 \times 15 \times 4$  mm<sup>3</sup> ( $P_{\text{el}} = 5,3$  W,  $\Delta T_{\text{max}} = 80$  K) und  $8 \times 8 \times 3$  mm<sup>3</sup> ( $P_{\text{el}} = 6,4$  W,  $\Delta T_{\text{max}} = 73$  K). Zur Kühlung der Elemente bieten sich Kühlkörper auf der Basis freier natürlicher Konvektion oder mit verbesserter erzwungener Konvektion durch Einsatz eines Luftstroms. Ferner existieren Lösungen für Kühlkörper, welche als Durchfluss-Wärmetauscher realisiert sind. In vergleichenden Experimenten wurde festgestellt, dass für den Einbau in Mikroreaktoren für die Proteinkristallisation kompakte Durchfluss-Wärmetauscher am besten geeignet sind. Ventilator-gestützte Kühlmodule und Gasexpansionskühlungen von

Mikroprozessor-Rippenkühlkörpern hatten im Vergleich zum wassergekühlten Wärmetauscher sowohl konstruktive als auch wärmetechnische Nachteile. Folglich wurden die Wärmetauscher aus gut wärmeleitendem und leicht zu verarbeitendem Material (Messing,  $\lambda = 111 \text{ W/(m K)}$ ) gefertigt. (s. Abb. 19) Als Fluidkanal diente eine U-förmige Bohrung ( $d = 4 \text{ mm}$ ). Der Wärmetauscher wurde mit einer Peristaltikpumpe „Minipuls 3“ (Gilson Inc., USA), Tygon®-Tubing (ID = 3,17 mm) (VWR Inc., D) und entsprechenden Fluidanschlüsse „Miniadapter 10-32 UNF, PP-10U S32“ (Infiltec GmbH, D) mit Kühlflüssigkeit versorgt. Diese stehen über ein Reservoir ( $V \approx 100 \text{ ml}$ ) im thermischen Gleichgewicht mit der Umgebung. Die vom Hersteller angegebene Linearität der Peristaltikpumpe wurde über Wägung der geförderten Menge pro Zeiteinheit im Rahmen der Messgenauigkeit verifiziert.

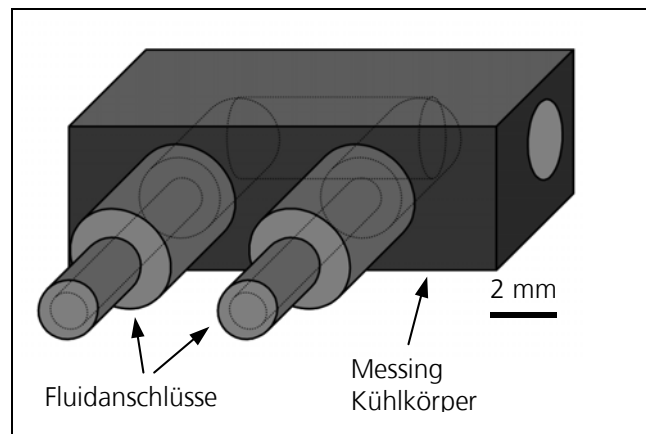


Abb. 19: Durchfluss-Wärmetauscher zur Kühlung des PELTIER-Elements (Skizze)

Die Auslegung des Durchfluss-Wärmetauschers zur vibrationsfreien Kühlung des PELTIER-Elements mittels zirkulierender Kühlflüssigkeit erfolgte experimentell in mehreren Iterationsschritten. Eine analytische Herangehensweise wäre aufwändig und in dem Falle nicht zweckmäßig gewesen. Der Wärmetauscher wurde so dimensioniert, dass die zu übertragende Wärmeleistung erreicht wird und gleichzeitig geometrische Randbedingungen (Bauhöhe/ Abmaße der fluidischen Anschlüsse) und Kristallisationsvoraussetzungen (minimale Pulsation des Fluids) eingehalten werden. Denn Proteinkristalle reagieren empfindlich auf Druckstöße, die zu Versetzungen im Kristallgitter führen können. Die maximale Flussgeschwindigkeit im Kühlkörper wurde mithilfe von CLSM-Aufnahmen bestimmt. Ab einer Geschwindigkeit  $u = 10^{-3} \text{ m/s}$  waren die Pulsationen als Streifen in den Bildern zu erkennen. Damit konnte das Design des Wärmetauschers hinsichtlich seiner Kühlleistung optimiert werden, was vornehmlich die innere und äußere wärmeübertragende Fläche bei einer Bauhöhe von maximal 10 mm betraf.

Die Temperierung der fluidischen Peripherie des Fluss-Mikroreaktors, welche sich aus Spritzenpumpe, Blasenfalle, Mehrwege-Ventil und Kapillarschläuchen zusammensetzte, bestand aus 2 Teilabschnitten:

1. Temperierung von Spritzenpumpe, Blasenfalle und Mehrwege-Ventil im Kompaktofen
2. Beheizung der Kapillarschläuche mittels Widerstandsdrahtwicklung

Als Kompaktofen wurde aufgrund seiner geringen Abmessungen ein „Kleinbrutschrank B15“ (Kendro Lab Products GmbH, D) eingesetzt. Dieser erlaubt die manuelle Einstellung einer konstanten Temperatur bis  $\vartheta_{\text{max}} = 50^\circ\text{C}$  mit einer Genauigkeit von  $\Delta T < \pm 1 \text{ K}$ . Laut Herstellerangaben bestehen für die fluidischen Komponenten (Spritzenpumpe, Blasenfalle, Mehrwege-Ventil und

Kapillarschläuche) in diesem Temperaturbereich alle Garantieansprüche, womit die grundsätzliche Voraussetzung für den Einsatz eines Kompaktofens erfüllt ist.

Da kommerziell keine Heizschläuche erhältlich waren, welche die geforderten Spezifikationen (geringe Masse:  $m < 200$  g/m, kleiner Durchmesser:  $d_a < 10$  mm) erfüllten, wurde eine Eigenentwicklung durchgeführt. (Wenzel 2003) Die aktiven Elemente Kapillarheizung (s. Abb. 20) bildeten eine Widerstandsdrhtwicklung aus Konstantan (Cu: 55%, Ni: 44%, Mn: 1%) und einem Pt100-Thermoelement (Delta Regelungstechnik GmbH, D) (Nau 2003) mit

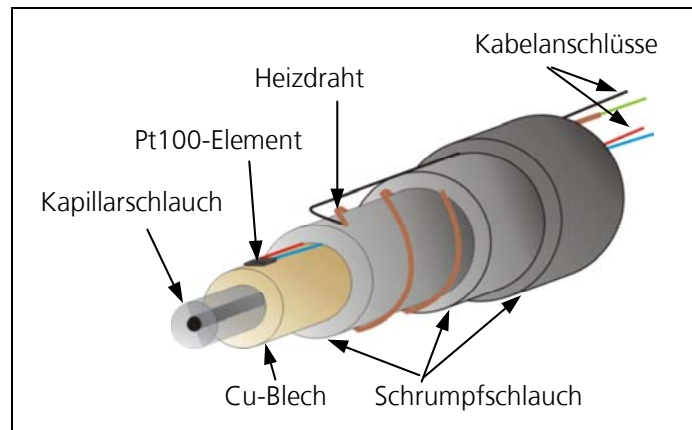


Abb. 20: Aufbau der Kapillarheizung (Skizze)

einer thermischen Relaxationszeit (Ansprechzeit)  $\tau = t_{0,63} = 1,2$  s in Luft. Die Regelung erfolgte mithilfe einer steuerbaren Spannungsquelle „PS-3403D“ (RS Components GmbH, D). Durch Variation der angelegten Spannung im Widerstandsdraht ( $\rho = 5 \cdot 10^5 \Omega \text{ m}$ ) wurde die Temperatur des Fluids im Kapillarschlauch verändert.

Der Heizdraht ( $d = 0,55$  mm) wurde spiralförmig auf den PTFE-Kapillarschlauch ( $d_a = 1/16''$ ) aufgewickelt. Seine mechanische Festigkeit ( $\sigma = 420 \text{ N/mm}^2$ ) erlaubte eine maschinelle Wicklung durch Einspannen in das Backenfutter einer Drehmaschine. Der endliche Abstand zwischen den Windungen des Drahtes (ca. 5 mm) erzeugte eine inhomogene Temperaturverteilung auf der Mantelfläche des Kapillarschlauches. Deshalb wurde der Konstantandraht auf ein Kupferblech ( $\lambda = 384 \text{ W/(m K)}$ ,  $d = 0,3$  mm) montiert. Zur elektrischen Isolation wurde ein Schrumpfschlauch aus Polyurethan (spez. Widerstand  $\rho \approx 10^{17} \Omega \text{ m}$ ,  $\lambda = 0,4 \text{ W/(m K)}$ ) zwischen Kupferblech und Konstantandraht aufgebracht. Zur Fixierung des Pt100-Elementes, der Anschlusskabel sowie als thermische Isolation zur Umgebung wurde die Kapillarheizung nach außen von einem weiteren Schrumpfschlauch eingefasst. Die Anordnung wurde mit Korrelationskurven für verschiedene Flussraten entsprechend kalibriert.

### 2.3.3 Temperaturregelung

Die Temperaturregelung des Mikroreaktors wird über einen rechnergesteuerten PID-Regelkreis realisiert. (Tietze 1993, Posten 1996, Mesch 1995) Die vereinfachten Blockschaltbilder sind in Abbildung 21 gezeigt. Der Sollwert wird über eine grafische Benutzeroberfläche (GUI) eingegeben und in einem DA-Wandler in analoge Signale gewandelt. Der Istwert wird über die Sensoren auf dem Chipreaktor abgegriffen, gewandelt und im Rechner digital verarbeitet. Die analoge Regelabweichung zwischen Ist- und Sollwert wird in einem PID-Regler minimiert und als Stellgröße

an die Temperierung geleitet. Damit werden Störgrößen ausgeglichen, die z.B. aus der Umgebung auf den Chipreaktor als Regelstrecke einwirken.

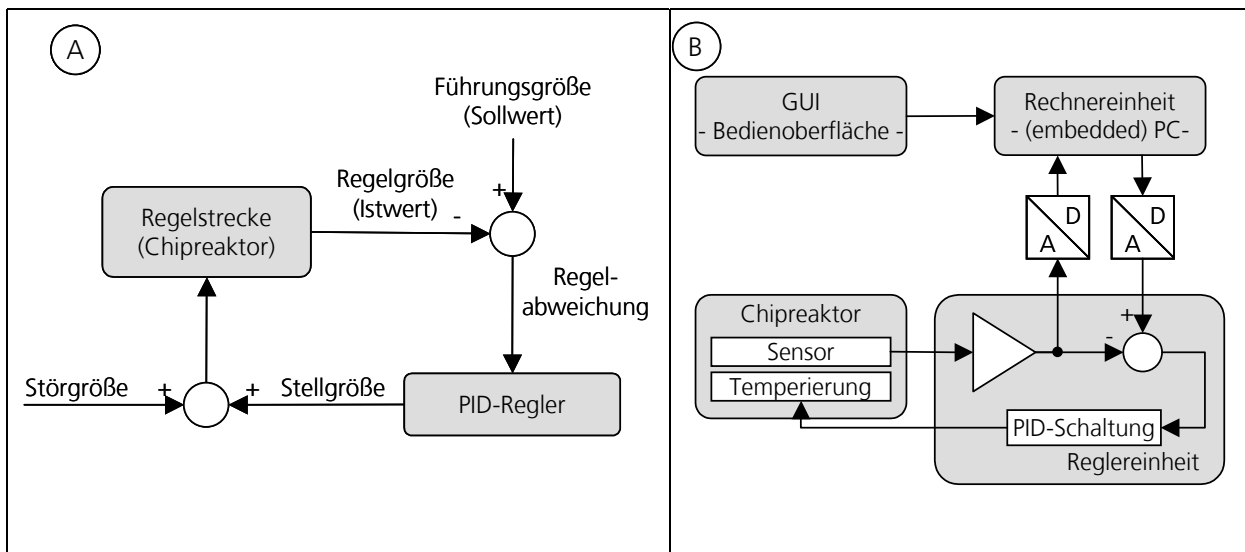


Abb. 21: Blockschaltbilder der Temperaturregelung: **A)** Regelkreis; **B)** schematische Gesamtansicht

Die Zeitkonstante  $\tau_{el}$  der elektronische Schaltung liegt in der Größenordnung von  $10^{-3}$  s. Die Reglerparameter wurden so eingestellt, dass die Solltemperatur möglichst schnell erreicht wird. Dies bedeutete gleichzeitig einen Kompromiss zwischen hoher Dynamik (Temperiertrate), geringem Überschwingen und kurzer Einschwingzeit. Um einen stabilen Betrieb auch bei Temperaturen  $\vartheta < 10^\circ\text{C}$  zu gewährleisten, war es notwendig, im Kühlmodus auf eine gewisse Dynamik zu verzichten. Aufgrund der beschränkten Wärmeabfuhr durch den Durchfluss-Wärmetauscher wurde die Leistung des PELTIER-Elementes im Kühlmodus entsprechend reduziert.

Die Rechnersteuerung der Regelung wurde am IPHT in zwei Varianten realisiert:

- 1) PC mit AD/DA-Wandlerkarte
- 2) Embedded PC

Besonders in der frühen Entwicklungsphase erwies sich Variante 1) als Testplattform zur Programmoptimierung als vorteilhaft. Für die Realisierung der Variante 2), einem Stand-alone Gerät, wurde aus ökonomischen Gründen auf den bei Seriengeräten sonst üblichen Einsatz eines Micro-Controllers verzichtet. Ein Embedded PC bietet besonders bei kleinen Stückzahlen deutliche Preisvorteile, da kostengünstige Entwicklungsumgebungen zur Verfügung stehen. Zugunsten der Kompaktheit wurde bei derartigen Modulen auf einen Festplattenspeicher und Ein-/ Ausgabemedien wie Keyboard oder Monitor verzichtet. Sie sind aufgrund ihrer Rechenleistung als vollwertige PC-Systeme anzusehen. Ein interner Speicher sowie entsprechende Schnittstellen (z.B. USB) ermöglichen den Transfer von Temperatursteuerprotokollen oder während des Experiments aufgezeichneter Temperaturdaten. Zur Realisierung der Regelung wurde ein Embedded-PC „DIMM-PC / 386-B“ (Kontron AG, D) mit einer internen Speicherkapazität von 128 MB verwendet.

Die zur Temperatursteuerung entwickelte Software wurde auf Basis einer Delphi™-Programmierung (Delphi™, Version 5, Borland, USA) erstellt. Die MS-Windows™-basierte Benutzeroberfläche (GUI) erlaubt eine intuitive Erstellung komplexer Temperaturprotokolle, unter Verwendung einfacher Bausteine wie konstanter Abschnitte, Rampen, Stufen oder Zyklen. Die Temperaturdaten werden dynamisch mitgeschrieben und während des laufenden Experiments grafisch dargestellt. (z.B. Abb. 55, S. 90)

## 2.4 Oberflächentechnologie

Im Zuge der Miniaturisierung gewinnt die Oberfläche relativ zum Gesamtvolumen stark an Einfluss. (s. Kap. 1.1.2, S. 13ff) Bei der Entwicklung der Mikroreaktoren für die Proteinkristallisation waren oberflächentechnologische Prozesse sowohl bei der chemischen Vorbereitung der Oberfläche für den Befüllvorgang des Fluss-Mikroreaktors als auch bei der Präparation der Chipdeckelung involviert.

### 2.4.1 Chemische Modifikation zur Einstellung des Benetzungsverhaltens

Um Mikrostrukturen blasensfrei befüllen zu können, ist es notwendig, die Eigenschaften der zu benetzenden Oberflächen gezielt in ihrem Verhalten (Hydrophilie bzw. Hydrophobie) gegenüber dem Fluid zu modifizieren (s. Abb. 21). Tendenziell gilt hierbei folgende Faustregel:

- enge runde Strukturen → hydrophil
- weite Strukturen mit Ecken → hydrophob

Dies lässt sich gut auf den Oberflächen von Glas- und Siliziumsubstraten realisieren. Eine leicht zugängliche Größe zur Beurteilung des Benetzungsverhaltens ist der sog. Randwinkel  $\Theta$  an der Grenzfläche fest-flüssig-gasförmig. Hydrophile Oberflächen besitzen gegenüber hydrophilen (wässrigen) Fluiden einen Randwinkel  $0^\circ < \Theta < 90^\circ$ , hydrophobe Oberflächen  $90^\circ < \Theta < 180^\circ$ .

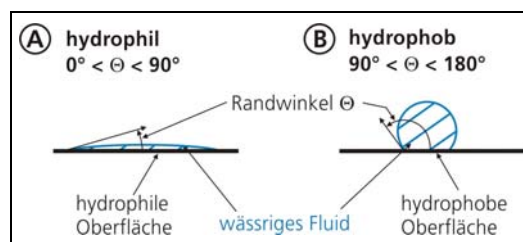


Abb. 22: Schematische Darstellung Benetzungsverhalten wässriger Lösungen gegenüber **A)** hydrophilen und **B)** hydrophoben Oberflächen

Zur Erniedrigung der Benetzbarkeit der Reaktionskammer gegenüber wässrigen Lösungen wurde die Oberfläche mit den Alkyl-Silanen, z.B. HMDS (Hexadimethyl-Disilazan) oder ODTS (Octadecyl-trichorsilan) behandelt. (vgl. Anhang H, Tabellen H1, H2) Dabei gehen die hydrophilen Molekülanteile kovalente Bindungen mit oberflächlichen OH-Gruppen ein. Die u.U. langkettigen Alkylreste orientieren sich entsprechend weg von der Grenzfläche hin zum Lösungsmittel. Diese Reaktionen stehen in Konkurrenz zur Dimerisierung, Kettenwachstum oder der Bildung von Netzwerkclustern. Durch geeignete Parametrisierung der Reaktionsbedingungen (Temperatur, Konzentration, pH) und der verwendeten Chemikalien entstehen dabei auf der zu behandelnden Oberfläche hydrophobe Domänen oder geschlossene Schichten. Diese Nanofilme können sich sowohl in Form von Poly- oder Monolagen ausbilden. (Reichert 2003, Kumar 1995, Brinkler 1990, Arkles 1977)

Zur Erhöhung der Benetzbarkeit wässriger Lösungen können Oberflächen hydrophilisiert werden. Eine Möglichkeit besteht darin, ursprünglich hydrophile Substrate in ihren nativen Zustand zurückzuführen. Hierzu werden die bedeckten hydrophilen Oberflächengruppen (OH-Gruppen) wieder freigelegt. Außerdem lassen sich Substrate mit hydrophilen Schichten überziehen. Zur Aktivierung hydrophiler Oberflächen kommen saure Oxidationsmittel wie sprudelnde Peroxomonoschwefelsäure („Piranha“-Lösung) oder Trockenätzverfahren wie  $O_2$ -Plasmen (RIE-Verfahren) zur Anwendung. Zur Beschichtung eignet sich beispielsweise die Flammpyrosilierung. Bei diesem Verfahren wird ein Gasgemisch aus leicht oxidierbaren Silanen und Butan verbrannt. Die Silane werden dabei zu  $SiO_2$  total oxidiert und scheiden sich als Cluster oder Partikeln auf der abgeflamten Oberfläche ab. (s. Anhang H, Tabellen H1, H2)

Aktiviertes Silizium- oder Glassubstrate bilden oft den Ausgangspunkt für nachgeschaltete oberflächenchemische Prozesse. Diese Technologien bilden in Kombination mit Mikrostrukturierungsmethoden, wie z.B. Lithographie oder Micro-Contact-Printing ( $\mu$ -CP), die Grundlage zur Erzeugung hochintegrierter Biochips. (Kumar 1995, Reichert 2003, Xia 1998, SurA 2002)

#### **2.4.2 Aufbau und Präparation der Deckelung**

Die Spezifikationen der Chipdeckelung (s. Kap. 2.1, S. 27) erforderten den Einsatz von Mikroskopie-Deckgläsern. Um die gewünschte Dichtwirkung zu erzielen, waren die Deckgläser mit einem geeigneten Dichtmittel zu versehen. Für die Deckelung der Chipreaktoren wurden mit 150  $\mu$ m dicken Deckgläsern „Superior“ aus reinweißem Glas der hydrolytischen Klasse 1 (Marienfeld GmbH, D) gewählt. Zur leichteren Handhabung waren die Deckgläser in ihren lateralen Abmessungen so beschaffen, dass sie je etwa 2 mm über den Chipreaktor hinaus ragten. Ausgangsmaterial ist Borofloat®-Dünnglas „D263T“ (Schott Jena<sup>er</sup> Glas GmbH, D). Die optischen Eigenschaften (z.B. Brechungsindex) entsprechen denen der optischen Bauteile des CLSM und ermöglichen eine verlustarme Beobachtung (s. Anhang E). Durch ihre geringe Dicke werden die Deckgläser in Grenzen biegsam, was sich positiv auf die zu realisierende Deckelungsprozedur auswirkt. Das Glassubstrat besitzt durch seine relativ kleine Wärmeleitfähigkeit eine gewisse wärmedämmende Wirkung, was sich positiv auf die Homogenität der Temperaturverteilung in der Reaktionskammer auswirken sollte. (s. Tabelle 1, S. 29)

Die Dichtmembran hatte die Aufgabe, den Deckel mechanisch auf dem Chipreaktor zu halten und die Verdunstung der Reaktionslösung in der Reaktionskammer auch bei thermischer Belastung zu unterbinden. Dabei darf es zu keiner störenden Wechselwirkung mit der Lösung kommen.

#### **A) Deckelung des Batch-Mikroreaktors:**

Im Falle des Batch-Mikroreaktors war es ausreichend einen anorganischen Ölfilm als Dichtmittel zwischen Deckglas und Chipoberfläche zu verwenden. Parafin-Öl wurde in der Proteinkristallisation erfolgreich zur Unterdrückung der Verdunstung eingeführt (Chayen 1992, Galkin 1999). Zur Reinigung der Deckgläser kamen  $H_2O$ , bidest. (Millipore, D), HistoClear® (Sigma-Aldrich, D) als Xylol-

Ersatz sowie staubfreie Tücher zur Anwendung. Das Öl wurde mittels einer Mikroliterspritze auf die Oberfläche des Chipreaktors außerhalb der Thermo-Gaps appliziert. (s. Abb. 23). Mäßiges Anpressen des gereinigten Deckglases der Größe 20 x 20 mm<sup>2</sup> bewirkt, dass sich zur Chipoberfläche ein dünner Ölfilm ausbildet. Die Kapillarkräfte bewirken eine erhöhte mechanische Stabilität der Deckelung.

Um das Deckglas in lateraler Richtung zu fixieren, kann zusätzlich ein Silikonkleber „Fixogum“ (Marabu GmbH, D) am Übergang des Deckglasrandes zum Chip aufgebracht werden.

Nach 5-minütiger Trocknungszeit hat sich ein etwa 100 µm dicker gummiartiger Film gebildet. Der mit Öl gefüllte Spalt zwischen Deckglas und Chip unterstützt die verdunstungshemmende Wirkung des Ölfilms. Zusätzlich wirkt das Parafinöl durch eine Hydrophobizität als Barriere für die wässrigen Reaktionslösungen und erleichtert das blasenfreie Befüllen des Batch-Mikroreaktors.

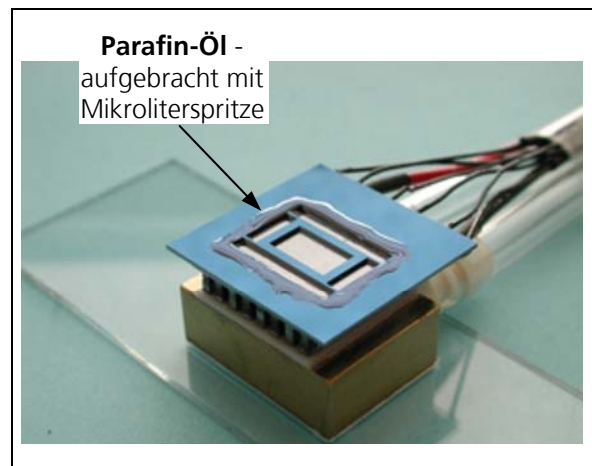


Abb. 23: Öl auf Oberfläche des Chipreaktors zur Deckelung Batch-Mikroreaktor

## B) Deckelung des Fluss-Mikroreaktors

Im Gegensatz zum Batch-Mikroreaktor muss die Deckelung des Fluss-Mikroreaktors die Fluidkanäle gegeneinander abdichten sowie konvektionsbedingten Drücken in der Größenordnung von einigen hundert Millibar standhalten. Als Substratmaterial kamen Deckgläser mit lateralen Abmessungen 24 x 40 mm<sup>2</sup> zum Einsatz. Experimente zeigten, dass das Parafinöl die Fluidkanäle blockiert und so das Befüllen des Mikroreaktors verhinderte. Es musste also eine alternative Lösung für den Fluss-Mikroreaktor entwickelt werden.

Das Elastomer Poly-Dimethylsiloxan (PDMS) hat durch seine mechanischen Eigenschaften, seine (Mikro-)Strukturierbarkeit und Biokompatibilität verstärkt Eingang in die biotechnisch orientierte Mikroreaktionstechnik gefunden. Im Kontakt mit glatten Oberflächen wie Glas oder anderen polierten Flächen wird die Polymerschicht durch Kapillar- und Oberflächenadhäsionskräfte (hauptsächlich VAN-DER-WAALS-Kräfte) angesaugt und festgehalten. (Quake 2000, Xia 1998, Lötters 1997)

Als Dichtmittel bietet sich im Falle des Fluss-Mikroreaktors eine PDMS-Schicht an. Dabei sollte die Membran im Bereich der Reaktionskammer ein Fenster besitzen, im Übrigen jedoch kovalent an die Glasoberfläche gebunden sein. (s. Abb. 24) Für die Strukturierung der PDMS-Membran wurde eine Technologieentwicklung durchgeführt. Im

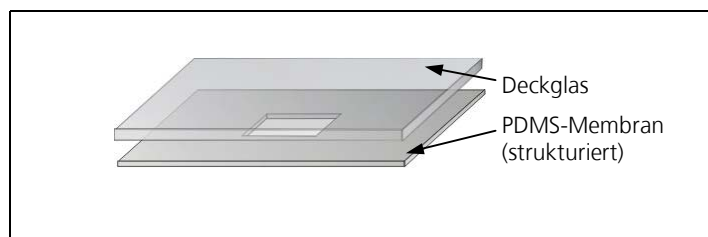


Abb. 24: Deckelung des Fluss-Mikroreaktors mit PDMS-Membran (Explosionsdarstellung)



Wesentlichen wurden folgende Strukturierungsmethoden erprobt, welche im Anschluss erläutert werden:

- rein mechanische Präparation mittels Skalpell
- rein photochemische Strukturierung photoempfindlicher PDMS-Derivate (*Stadtmüller 2001, Gonzales 1998, Lötters 1997*)
- Kombination chemische Strukturierung durch „inverses micro-contact printing“ (i- $\mu$ -CP, s.u.) und mechanische Präparation mittels Skalpell

Die erstgenannte Methode führte nicht zum Ziel. Es ließen sich zwar saubere Kanten in die ausgehärtete PDMS-Membran präparieren. Allerdings gelang es nicht, das Fenster in der Membran in ökonomisch sinnvoller Zeit vollständig von PDMS freizulegen. Die grundsätzlich elegante Methode einer photochemischen Strukturierung schlug ebenfalls fehl. Obwohl die prinzipielle Vorgehensweise in der Literatur beschrieben ist, sind die mechanischen und photochemischen Eigenschaften aufeinander abzustimmen. Es konnte durch Variation der Zusammensetzung (Aktivatoranteil) und Belichtungszeit keine Kombination gefunden werden, welche eine ausreichend elastische Membran erzeugte, um als Dichtung zu dienen.

Schließlich wurde die letztgenannte Methode verfolgt und letztlich ausgewählt, um eine 100  $\mu\text{m}$  dicke strukturierte PDMS-Membran aus „Sylgard 184“ (Dow Corning Inc., USA) auf die Oberfläche des Deckglases zu präparieren. (s. Abb. 25) Eine vorgeschaltete Hydrophobisierung der Gläser mit dem Silan ODTs (1) verhinderte, dass die PDMS-Monomere oder -Cluster kovalente Bindungen mit der Oberfläche eingingen. Das Verfahren des micro-contact printings dient i.A. zur örtlich selektiven Beschichtung ebener Flächen mithilfe mikromechanisch bearbeiteter Stempel. (*Kumar 1998, Jeon 1997*) Für den umgekehrten Fall, also das örtlich selektive Verhindern einer Beschichtung mit einer präparierten Maske, wurde der Arbeitstitel „inverses micro-contact printing“ (i- $\mu$ -CP) geprägt.

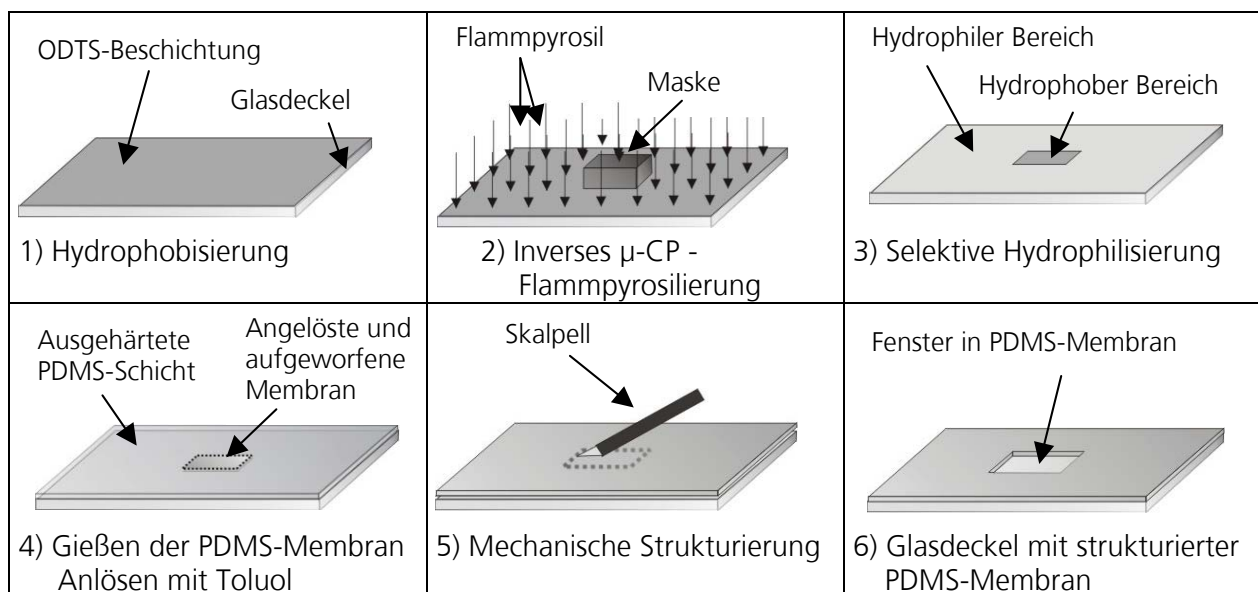


Abb. 25: Schematischer Prozessablauf zur Präparation strukturierter PDMS-Glasdeckel (Fluss-Mikroreaktor)

Durch Abschattung mit einem entsprechend dimensionierten Silizium-Quader als Maske ( $4 \times 7 \text{ mm}^2$ ) konnte die Flammpyrosilierung strukturgetreu erfolgen. Zur Flammpyrosilierung kam „Flammpyrosil FB07“ (SurA Instruments GmbH, D) zum Einsatz. Die Anwendung des i- $\mu$ -CP hatte zur Folge, dass die PDMS-Lösung nur im Bereich der abgeflamten hydrophilen Oberfläche eine chemische Bindung eingehen konnte. (2, 3) Der Übergang der hydrophilen und hydrophoben Fläche wurde mithilfe von AFM-Messungen (s. Kap. 2.5.3, A, S. 79) auf einer Fläche  $A = 75 \times 75 \text{ }\mu\text{m}^2$  im tapping mode mit einer Scanrate  $f = 0,803 \text{ Hz}$  charakterisiert. Hierzu wurden 3 behandelte Deckgläser vermessen und in den verschiedenen Bereichen 3-fach Messungen durchgeführt. Eine Nachbehandlung der Membran mit Toluol bewirkte, dass die PDMS-Schicht selektiv im Bereich der Hydrophobisierung angelöst wurde und sich entlang einer Strukturkante aufwarf. (4) Mit einem Skalpell schließlich konnte damit ein scharfkantiges Fenster präpariert werden. (5, 6) Das Präparationsprotokoll des Herstellungs- und Strukturierungsprozesses befindet sich im Anhang C3.

Zur Wiederverwendung benutzter oder gealterter PDMS-Glasdeckel muss die Oberfläche wieder aktiviert werden. Es existieren zahlreiche Methoden, um die Adhäsionskraft der PDMS-Oberfläche zu regenerieren, wie z.B. Anätzen der Schicht im  $\text{O}_2$ -Plasma (RIE) oder in Lösung sowie oxidative Verfahren. (Reichert 2003, Jo 2000) Eine 10-minütige Säurebehandlung ( $\text{HCl}:\text{H}_2\text{O} = 1:5$ ) nach Jo et al. erschien zweckmäßig. (Jo 2000) Denn dieses Verfahren ist weder apparativ noch zeitlich aufwändig. Durch Abspülen der zu regenerierenden PDMS-Schichten mit  $\text{H}_2\text{O}$ , bidest. konnte der Deckel lediglich geringen Drücken  $p = 50 \dots 75 \text{ mbar}$  standhalten. Mit Isopropanol war es möglich, Fettschichten und Fusseln zu entfernen. Dies äußerte sich in einer Steigerung des Drucks auf  $p \approx 100 \text{ mbar}$ . Nach der Säurebehandlung wurde der Deckel erst bei  $p = 150 \dots 175 \text{ mbar}$  abgehoben. (Zur Messung des Drucks siehe Kapitel 2.5.2 C), S. 73.) Zur vollständigen Regeneration der PDMS-Membran kam eine Kombination aus Isopropanol-Spülung und anschließender Säurebehandlung zur Anwendung.

## 2.5 Charakterisierungsmethoden

Zur Ermittlung des mikroverfahrenstechnischen Systemverhaltens wurden die Mikroreaktoren hinsichtlich ihrer thermischen und fluidischen Eigenschaften charakterisiert. Zur Prozesskontrolle bei der Präparation der Mikroreaktoren wurden die Oberflächen inspiziert. Applikationsexperimente wurden anhand der Kristallisation von Modellproteinen durchgeführt.

### 2.5.1 Thermisches Verhalten

Die Mikroreaktoren wurden bezüglich der Homogenität der Temperaturverteilung und des dynamischen Verhaltens überprüft. Hierzu wurde das statische Temperaturfeld auf dem Chipreaktor, insbesondere in der Reaktionskammer untersucht. Hieraus konnten laterale und vertikale Temperaturdifferenzen bestimmt werden. Die Einschwingzeit, die thermische Relaxation und Heiz-/Kühlrate wurden als dynamische Systemparameter verwendet. Werkzeuge zur Charakterisierung

waren analytische 1D-Modelle (A), welche mit 3D-FEM-Simulationen (B) und Experimenten (C) verglichen wurden.

### A) Analytische 1D-Modelle

Ziel der Überlegungen war die Überprüfung, inwieweit sich analytische 1D-Modelle zur Abschätzung der statischen Temperaturverteilung in der Reaktionskammer der Chipreaktoren sowie dynamischer Zeitkonstanten eignen. Diese Beziehungen sollten als Referenzgleichungen herangezogen werden, um die Ergebnisse aus den 3D-FEM-Simulationen und den Messungen auf Plausibilität zu überprüfen.

Zur Bestimmung der Temperaturverteilung im Chipreaktor wurde zunächst analysiert, ob sich das Problem auf eine eindimensionale vertikale Betrachtung reduzieren lässt. Nach SOMMERFELD ist dies dann möglich, wenn der konvektive Anteil der Wärmebilanzgleichung zu vernachlässigen ist. (*Sommerfeld 1954, Klupsch 2003*) Im Anhang D2a) sind die nachfolgend zusammengefassten Betrachtungen im Detail ausgeführt.

Im Batch-Mikroreaktor konnte Konvektion lediglich durch thermisch verursachte Dichtegradienten und damit verbundenen Auftriebskräften entstehen. Diese **freie Konvektion** wird charakterisiert durch die sog. RAYLEIGHzahl  $Ra$  (s. G5), also dem Produkt aus der GRASHOFzahl  $Gr$  und der materialspezifischen PRANDTLzahl  $Pr$ :

$$Ra = Gr \cdot Pr = \frac{L^3 \cdot g \cdot \beta \cdot \Delta T}{\nu^2} \cdot \frac{\nu}{\kappa} \quad (G5)$$

Die  $Ra$ -Zahl ist also eine Funktion von materialspezifischen Größen wie der dynamischen Viskosität  $\nu$ , der Temperaturleitfähigkeit  $\kappa$  und dem thermischen Ausdehnungskoeffizienten  $\beta$ . Zudem ist  $Ra$  proportional zur 3. Potenz der charakteristischen Länge  $L$  sowie den Randbedingungen des Temperaturfeldes  $\Delta T$ . In geschlossenen Gas- oder Flüssigkeitsschichten setzt die laminare freie Konvektion ein, sobald  $Ra \geq Ra_{krit} = 1708$ . Für  $Ra > 2,2 \cdot 10^4$  kommt es zur turbulenten Konvektion. (*Rheinländer 1988*) Eine Abschätzung unter den gegebenen Stoff- und Geometrieverhältnissen ergibt  $Ra_{krit} \approx 4 \ll 1708$ . Dies erlaubt, die (freie) Konvektion im Batch-Mikroreaktor zu vernachlässigen und das Wärmübertragungsproblem eindimensional zu betrachten.

Im Fluss-Mikroreaktor ruft der Volumenstrom eine **erzwungene Konvektion** hervor. Die Reaktionskammern der beiden Mikroreaktor-Typen sind geometrisch ähnlich und unterscheiden sich in ihren vertikalen Abmessungen um weniger als 2,5%. Folglich wird die Konvektion im Fluss-Mikroreaktor allein durch die Komponente der erzwungenen Konvektion bestimmt. Bei der Berechnung des vertikalen Temperaturprofils ist die Konvektion dann vernachlässigbar, wenn die thermische Relaxation  $\tau_{therm}$  der Lösung in der Reaktionskammer klein ist gegenüber der konvektionsbedingten Verweilzeit  $\tau_{verweil}$  eines mit der Geschwindigkeit  $w_x$  strömenden fiktiven Teilchens in einem Streckenelement  $x$  (s. G6). Es muss also gelten:

$$\tau_{therm} = \frac{z^2}{\kappa} \ll \tau_{Verweil} = \frac{x}{w_x} \quad (G6)$$

Zur Ableitung der thermische Relaxation  $\tau_{therm}$  siehe Anhang D2a) bzw. Gleichung G1 (S. 28). In einem applikativ relevanten Beispiel für den Fluss-Mikroreaktor ergibt sich bei einer Strömungsgeschwindigkeit von  $w_x = 250 \mu\text{m/s}$  das Verhältnis  $\tau_{therm} / \tau_{Verweil} \approx 0,04 \ll 1$ . (s. Anhang D2a))

Somit kann für Batch- und Fluss-Mikroreaktor der konvektive Anteil vernachlässigt werden. Dies führt zu einer deutlichen Vereinfachung der Bilanzgleichungen.

Wie der Herleitung im Anhang D2a), b) und den Ausführungen zur Temperaturleitfähigkeit in Kapitel 2.1 (S. 28ff) zu entnehmen ist, lässt sich unter den oben genannten Voraussetzungen das Temperaturprofil in z-Richtung durch eine eindimensionale stationäre Wärmebilanz abschätzen. Es ergibt sich für den volumenbezogenen Volumenstrom das FOURIERSche Grundgesetz der Wärmeleitung (G7).

$$Q_V = -\lambda \cdot A \cdot \frac{\partial T}{\partial z} \quad (G7)$$

Unter Ansatz eines linearen Temperaturgradienten folgt Gleichung G8, welche das vertikale Temperaturprofil in eindimensionaler z-Richtung unter den vereinfachenden Annahmen analytisch beschreibt.

$$T_3 = T_1 - \left[ \frac{k_{12}}{k_{13}} \cdot (T_1 - T_2) \right] \quad (G8)$$

Die Konstanten  $k_{ij}$  repräsentieren den Wärmeübergangskoeffizienten von Komponente i nach j. In Abbildung 26 ist schematisch der Zusammenhang zwischen Geometrie und möglichem Kurvenverlauf gemäß Gleichung G8 dargestellt.

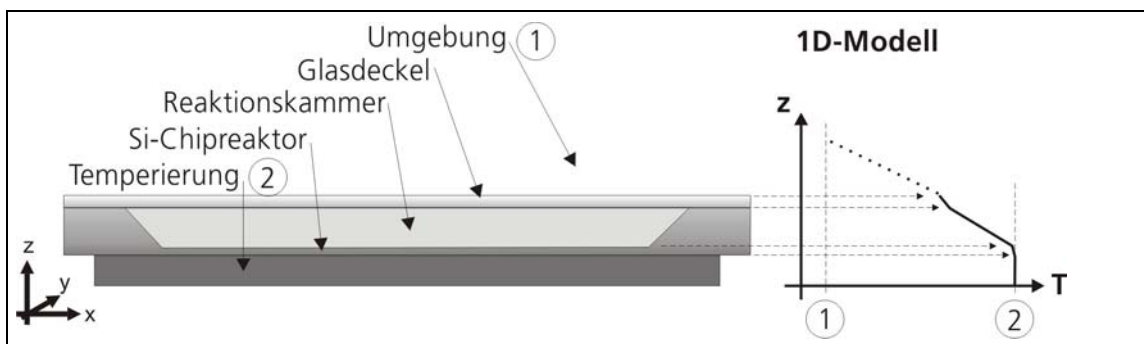


Abb. 26: Schematische Darstellung des analytischen 1D-Modells zur Ermittlung des vertikalen Temperaturprofils in den Chipreaktoren → Heizmodus

Die an der Wärmeübertragung beteiligten Einzelkomponenten wurden bezüglich ihrer thermischen Parameter abgeschätzt. Eine Sensitivitätsanalyse ergab, dass der Wärmeübergang Glas  $\rightarrow$  Umgebung für realistische Werte ( $5 < \alpha_{G \rightarrow L} / W/(m^2K) < 25$ ) (Schlünder 1995, Simon 1977) zum thermischen Gesamtwiderstand  $R_{th}$  mit mehr als 97,5% beiträgt.  $R_{th}$  des Chipreaktors wird damit dominiert vom konvektiven Wärmeübergang vom Glasdeckel zur Umgebung  $\alpha_{G \rightarrow L}$ , während die Anteile der Wärmeleitung in den verschiedenen Materialschichten demnach weitgehend vernachlässigt werden können. Über der Lösung in der Reaktionskammer bzw. den Glasdeckel fallen maximal 2% bzw. 0,4% der Wärme ab. Dies sollte der Homogenität der Temperaturverteilung in der Reaktionskammer zuträglich sein.

Die Abschätzung dynamischer Parameter erfolgte anhand verschiedener Zeitkonstanten. Für die Anwendung in der Proteinkristallisation sind folgende Größen interessant:

- Einschwingzeit des Reglers  $t_{\text{Regler}} \equiv t_{95}$  (stationärer Zustand zu 95% erreicht)
- Thermische Relaxationszeit des Fluids  $\tau_{\text{therm}}$
- Heiz-/ Kühllraten  $dT/dt$

Unter Anwendung der elektrothermischen Analogie (Bernhard 2004) sollte sich das Chipreaktorsystem mit einem RC-Modell 2. oder höherer Ordnung approximieren lassen. Sowohl die Temperatursensoren, als auch der Chip und das zu temperierende Fluid bilden RC-Glieder, welche zu einer zeitlichen Verzögerung der Sprungantwort beitragen. Demnach sollte sich ein sigmoidaler Kurvenverlauf des Antwortsignals ergeben. Die Größen  $t_{\text{Regler}}$  und  $dT/dt$  sind hauptsächlich abhängig von den Charakteristika des PID-Reglers. Entsprechend sind sie einer analytischen Abschätzung nur über relativ aufwändige transiente Modellbetrachtungen zugänglich. In der Praxis ist die Bestimmung des Zeitverhaltens mit experimentellen Methoden zweckmäßig. (Bernhard 2004) Die thermische Relaxation  $\tau_{\text{therm}}$  des Fluids lässt sich wie in Gleichung G6 (S. 56) beschreiben. Die Abschätzungen im Anhang D2a) ergaben einen Wert  $\tau_{\text{therm}} \approx 1,4$  s. Das bedeutet, dass sich im Fluid das stationäre thermische Gleichgewicht auf eine Störung hin mit einer zeitlichen Verzögerung von  $\Delta t = 1,4$  s zu mindestens 95% wieder eingestellt hat.

Im Gegensatz zur vertikalen Temperaturverteilung liefe eine analytische Abschätzung der statischen lateralen Temperaturverteilung auf eine zweidimensionale Betrachtung hinaus. Für dieses deutlich komplexere Problem wäre eine geschlossene analytische Lösung nur noch mit erheblichem Rechenaufwand anzugeben. Hauptziel der modellhaften Betrachtungen ist die Plausibilitätsprüfung der Ergebnisse aus Simulation und Experiment. Der Bezug zu diesen Ergebnissen wird durch das relativ einfache analytische 1D-Modell (Gleichung G8, S. 56) für den Fall der vertikalen Temperaturverteilung hergestellt. Damit ist eine Validierung der Simulationsrechnungen und der Vergleich mit experimentellen Ergebnissen möglich. Damit konnte auf die analytische Lösung für die laterale statische Temperaturverteilung verzichtet werden.

## B) Numerische 3D-FEM-Simulationen

Dreidimensionale numerische Untersuchungen dienen u.a. dazu, Information über analytisch und experimentell schwer zugänglich Stellen innerhalb des Systems zu gewinnen. Zur Erfassung von Randeffekten und zur Analyse des Innern der Reaktionskammer der Mikroreaktoren bieten sich 3D-FEM-Simulationen (Finite Element Method) an. Diese Methode arbeitet auf der Basis diskretisierter (finiter) Elemente, welche je nach den zugrunde liegenden Modellen über Zustandsgleichungen beschrieben werden. Benachbarte Elemente sind über Knotenpunkte miteinander verknüpft, an denen die Kontinuitätsbedingungen gelten müssen. Je nach Art der Elemente und Anzahl der Freiheitsgrade ergeben sich somit i.d.R. aufwändige Rechnungen. Dies macht Investitionen in entsprechende Rechentechnik und Simulationssoftware notwendig. Die geometrischen Parameter werden i.A. aus CAD-Dateien in Simulationsblöcke bzw. Materialblöcke umgewandelt und anschließend durch ein Gitternetz ersetzt. Je feiner das Gitter, desto genauere Rechnungen sind möglich. Allerdings ist zwischen Genauigkeit und Rechenaufwand abzuwägen. Bei ausreichend realistischer Definition der Randbedingungen und einem entsprechend guten Modell ist es möglich, a priori Aussagen über das prinzipielle Verhalten komplexer Systeme zu treffen. Durch die Integration experimenteller Daten lässt sich die Qualität dieser Aussagen erheblich steigern. Damit können Systeme beschrieben werden, die in geschlossener Form in ihrer Gesamtheit analytisch nicht mehr erfasst werden können. Zeit- und kostenintensive Experimente lassen sich durch FEM-Simulationen auf ein notwendiges Minimum reduzieren.

### Batch-Mikroreaktor

Die 3D-Temperaturfelder des Chipreaktors, insbesondere in der Reaktionskammer, des Batch-Mikroreaktors wurden mithilfe statischer FEM-Simulationen mit dem Software Paket Ansys™ 6.0 (Ansys Inc., USA) berechnet. Die Rechnungen beinhalteten 2800 Hexaeder-Elemente der Art „SOLID 70: 3D-thermal solid“ mit 8 Knoten und je einem Freiheitsgrad (Temperatur) pro Knoten. (s. Abb. 27) Somit sind bei der Berechnung der Temperaturverteilung des Chipreaktormodells 25.000 Freiheitsgrade zu berücksichtigen. Die Berechnungen

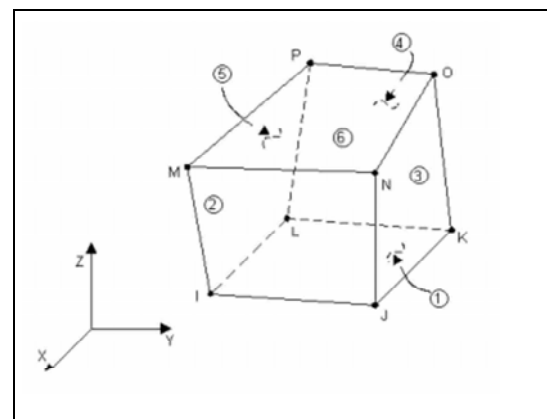


Abb. 27: Schematische Darstellung eines FEM-Elements SOLID 70 (Ansys 1996)

wurden durchgeführt unter Vorgabe einer konstanten Leistung bzw. Temperatur an der Chipunterseite. Die einzelnen Materialien incl. der Luftumgebung wurden als starre Körper angenommen, in denen Wärme nur durch Leitung transportiert wird. In früheren Studien zu thermischen Mikrosystemen hat sich die Gültigkeit dieser Vereinfachung als realistisch bestätigt (Müller 1998, Dillner 1995).

Die FEM-Simulationen mit dem Software-Paket „Ansys™ 6.0“ wurden am IPHT durchgeführt ausgehend von früheren Berechnungen zum PCR-Chip (s. Kap. 2.1, S. 28). Das zugrunde liegende

Modell wurde im Wesentlichen übernommen. Lediglich die thermischen Randbedingungen wurden angepasst. Mit dem reduzierten Anspruch an die FEM-Simulationen, eine erste Annäherung an die thermischen Verhältnisse im Batch-Mikroreaktor zu schaffen, blieb die wärmeübertragende Fläche in ihren lateralen Abmessungen auf die Reaktionskammer beschränkt. Abbildung 28 zeigt das vernetzte 3D-Modell des Chipreaktors zur Berechnung der Temperaturverteilung. Die verschiedenen Materialblöcke des Modells sind farblich abgesetzt. Zur besseren Anschaulichkeit ist das Modell im Schnitt dargestellt mit der Mittelachse des Chips als Schnittfläche. Das Fluid in Reaktionskammer (rot) bzw. die Thermo-Gaps sind gut zu erkennen.

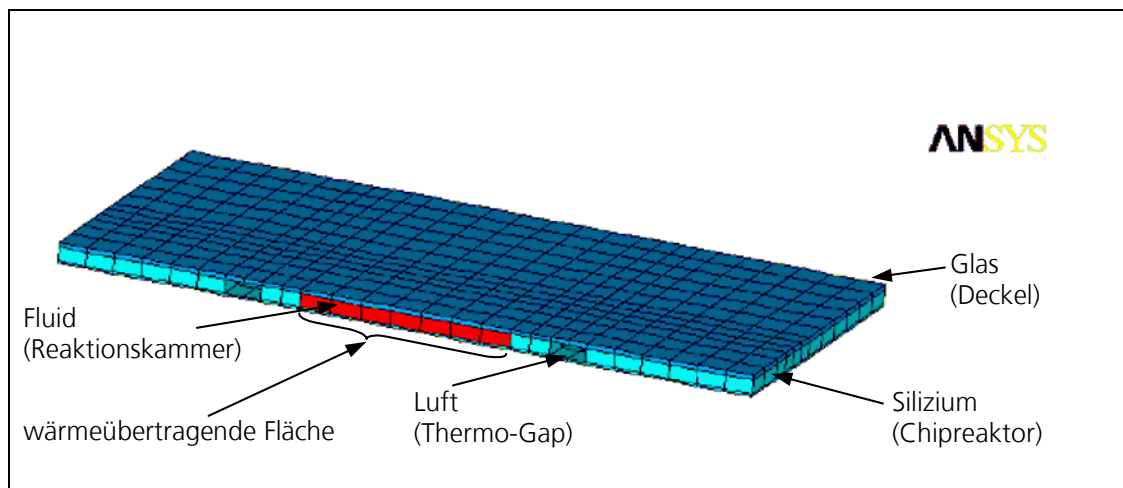


Abb. 28: Schnitt durch das vernetzte 3D-Modell (1/2 des Chipreaktors) zur Berechnung der Temperaturfelder im Batch-Mikroreaktor mittels FEM (Ansys™ 6.0)

Im Kühlmodus wurde an der Chipunterseite eine Leistung von  $P = -0,35 \text{ W}$  angenommen, für den Heizmodus betrug  $P = 0,46 \text{ W}$ . Dies entsprach bei Umgebungstemperatur  $T_U = 296 \text{ K}$  der Solltemperatur  $T_{\text{soil}}$  (Kühlen) =  $292 \text{ K}$  bzw.  $T_{\text{soil}}$  (Heizen) =  $304 \text{ K}$ .

### Fluss-Mikroreaktor

Für die Simulationen für den Fluss-Mikroreaktor wurden statische 3D-CFD-Rechnungen (computational fluid dynamics) durchgeführt. Diese spezielle FE-Methode bietet sich insbesondere an bei der Berechnung von Strömungsfeldern bzw. Geschwindigkeitsprofilen. Die Rechnungen basieren auf der Lösung der NAVIER-STOKES-Gleichungen als Impulsbilanz. Durch Verknüpfung mit der Wärmebilanz über den Geschwindigkeitsvektor wird es möglich, gekoppelte thermische und fluidische 3D-Simulationen durchzuführen.

Die Evaluierung des Temperaturprofils sowie die Bestimmung des Strömungsprofils im Chipreaktor des Fluss-Mikroreaktors wurde mit entsprechenden Vorgaben als Unterprojekt an das Institut für Bioprozess- und Analysenmesstechnik e.V. (IBA), Heiligenstadt vergeben. Die Rechnungen wurden mithilfe des Software-Pakets „Mark™ - Mentat™“ (MSC.software GmbH, D) durchgeführt. Die CFD-Simulationen dienen der fluidischen und thermischen Optimierung des Designs des Chipreaktors. Die fluidisch-thermische Simulation des Fluss-Mikroreaktors beinhaltet folgende Aspekte:

- Variation der Heiz- und Kühltemperaturen im Bereich der Reaktionskammer und der Mikrofluidkanäle
- Optimierung der geometrischen Lage und Größe der Dünnschicht-Kanalheizier und des PELTIER-Elements zur Temperierung der Reaktionskammer

In Testrechnungen wurden die Randbedingungen (Oberfläche des Chipreaktors) variiert, um einen Kompromiss zwischen Rechenaufwand und möglichst exakter Beschreibung des Systems zu finden. Ausgehend von einem einfachen Modell wurden schrittweise immer komplexere Bedingungen gewählt: konstante (Umgebungs-) Temperatur auf der Oberfläche → Implementierung realer Messergebnisse und linear interpolierter Zwischenwerte → Wärmeübergangskoeffizient Chipoberfläche zu Umgebung → Luftschicht um Chipreaktor. Erst durch die Simulation einer 2 mm dicken Luftschicht konnten anschaulich plausible Ergebnisse errechnet werden. Allerdings wurde die Modellgröße und damit die Rechenzeit um etwa 25% erhöht. Die endgültigen Modelle der gekoppelten Rechnungen enthielten über 120.000 Hexaeder-Elemente, davon etwa 20% vom „Typ 7“ und 80% vom „Typ 43“, analog zu den FEM-Elementen in Abbildung 27 (S. 58). Damit sind für diese Modelle mit ca.  $1,2 \cdot 10^6$  Freiheitsgraden gegenüber dem Batch-Mikroreaktor etwa 50 mal so viele Rechenoperationen durchzuführen. Das vernetzte 3D-CFD-Modell zur Berechnung Temperaturfelder ist in Abbildung 29 zu sehen. Wie in Abbildung 28 entsprechen die unterschiedlichen Farben den verschiedenen Simulationsblöcken.

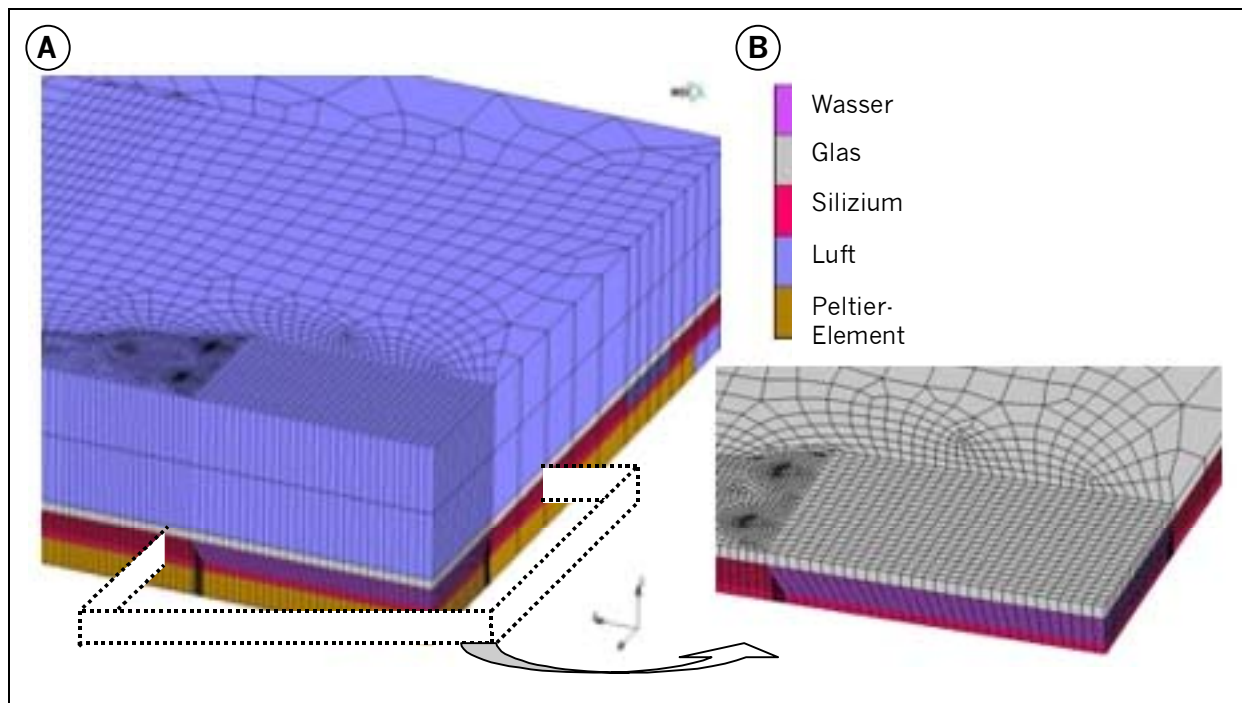


Abb. 29: Schnitt durch das vernetzte 3D-Modell (1/4 des Chipreaktors) zur Berechnung der Temperaturfelder mittels CFD (Mark<sup>TM</sup>, Mentat<sup>TM</sup>):

**A)** Gesamtmodell mit Luftumgebung – **B)** Detail: Chipreaktor ohne Luftumgebung



Das Modell wurde zur Optimierung der Rechengenauigkeit in den relevanten Bereichen (Reaktionskammer und Mikrofluidkanäle) enger vernetzt, was in Abbildung 29 B deutlich zu erkennen ist. Um in der Reaktionskammer und den Mikrofluidkanälen ein rechentechnisch optimales Gitter zu erhalten, sind die Elemente außerhalb dieser Strukturen durch die automatische Gittergenerierung z.T. beträchtlich deformiert, was die Berechnungen jedoch nicht signifikant beeinträchtigte. Im Gegensatz zu den Simulationen des Batch-Mikroreaktors wurden als variable Eingangsdaten an den Heiz-/ Kühlflächen Temperaturen statt Leistungen vorgegeben. Damit war ein unmittelbarer Vergleich mit den Experimenten möglich.

### C) Experimente

Die lokalen kontaktthermometrischen Messungen wurden mithilfe von Dünnschichtsensoren, die thermografischen Analysen der lateralen Temperaturverteilung mittels einer Wärmebild-Kamera durchgeführt.

#### Dünnschichtsensoren

Zur Detektion lokaler Temperaturen wurden Pt-Dünnschichttransducer auf die Unterseite des Chipreaktors und des Glasdeckels präpariert. Die Sensoren am Glasdeckel befinden sich im direkten Kontakt mit der Lösung und messen somit die Temperatur der Reaktionskammer in der Höhe  $Z$  (Oberkante Fluid). Die Temperatur am Boden der Reaktionskammer wird quasi mit den Sensoren an der Chipunterseite detektiert. Gemäß der Abschätzung in Kapitel 2.1 (S. 28ff) ist der systematische Fehler im stationären Zustand  $\Delta T < 10^{-2}$  K und kann im Rahmen der Messgenauigkeit von  $\Delta T < 10^{-1}$  K vernachlässigt werden. Sorgfältig kalibrierte Dünnschichtsensoren konnten damit als Referenzmessmittel für thermische Experimente herangezogen werden. Die Definition der statischen Temperaturdifferenzen in vertikaler und lateraler Richtung  $\Delta T_{\text{vert}}$  und  $\Delta T_{\text{lat}}$  ist der Darstellung in Abbildung 30 zu entnehmen.

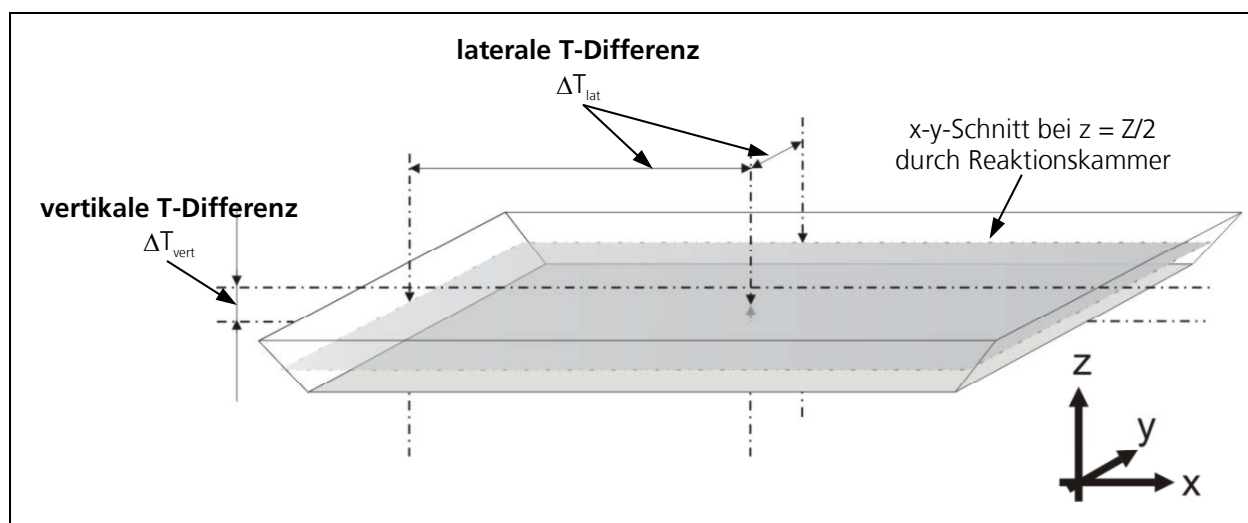


Abb. 30: Bestimmung der lateralen und vertikalen Temperaturdifferenzen  $\Delta T_{\text{lat}}$  und  $\Delta T_{\text{vert}}$  in der Reaktionskammer lateral  $\Delta T_{\text{lat}}$  und vertikal  $\Delta T_{\text{vert}}$

Die Messungen anhand der Pt-Widerstandsthermometer erlaubten die Bestimmung von  $\Delta T_{\text{vert}}$  bei verschiedenen Temperaturen. Zur Evaluierung wurde die Abhängigkeit vom Abstand der Solltemperatur  $T_{\text{soll}}$  von der Umgebungstemperatur  $T_U$  bestimmt. Die Analyse  $\Delta T_{\text{lat}}$  erfolgte über thermografische Experimente (s. S. 63ff).

Für die dynamischen Messungen des zeitlichen Verlaufs des Antwortsignals auf eine sprungartige thermische Störung dienten wiederum die Pt-Dünnschichtsensoren am Chip und am Deckel. In Abbildung 31 ist anhand eines Messbeispiels dargestellt, wie die dynamischen Parameter Einschwingzeit des Reglers  $t_{\text{Regler}}$  bzw.  $t_{95}$ , thermische Relaxationszeit des Fluids  $\tau_{\text{therm}}$  sowie Heiz-/Kühlraten  $dT/dt$  ermittelt wurden. Wie in der Grafik illustriert, ist die Temperierrate äquivalent zur Steigung der Kurve zu Beginn der Sprungantwort (Schnittpunkt 1). Thermische Relaxationszeit wird aus der Differenz der Zeiten bis zum Erreichen (95%) des stationären Wertes gebildet, welche an den Sensor unterhalb Bodens des Chipreaktors bzw. an der Unterseite des Glasdeckels gemessen werden. Dieser entspricht also der Zeit, welche zum thermischen Äquilibrieren des Fluid nötig ist. Die Einschwingzeit des Reglers  $t_{\text{Regler}}$  bzw.  $t_{95}$  beginnt, wenn der Sensor unterhalb der Reaktionskammer die Solltemperatur erreicht hat (Schnittpunkt 2). Die Einschwingzeit endet, sobald der Sensor die Temperatur des stationären Wertes zu 95% angenommen hat. Der Graph des Pt-Sensors unterhalb des Glasdeckels (gekreuzte Symbole) gab in Testmessungen qualitativ den Verlauf eines RC-Gliedes höherer Ordnung wieder.

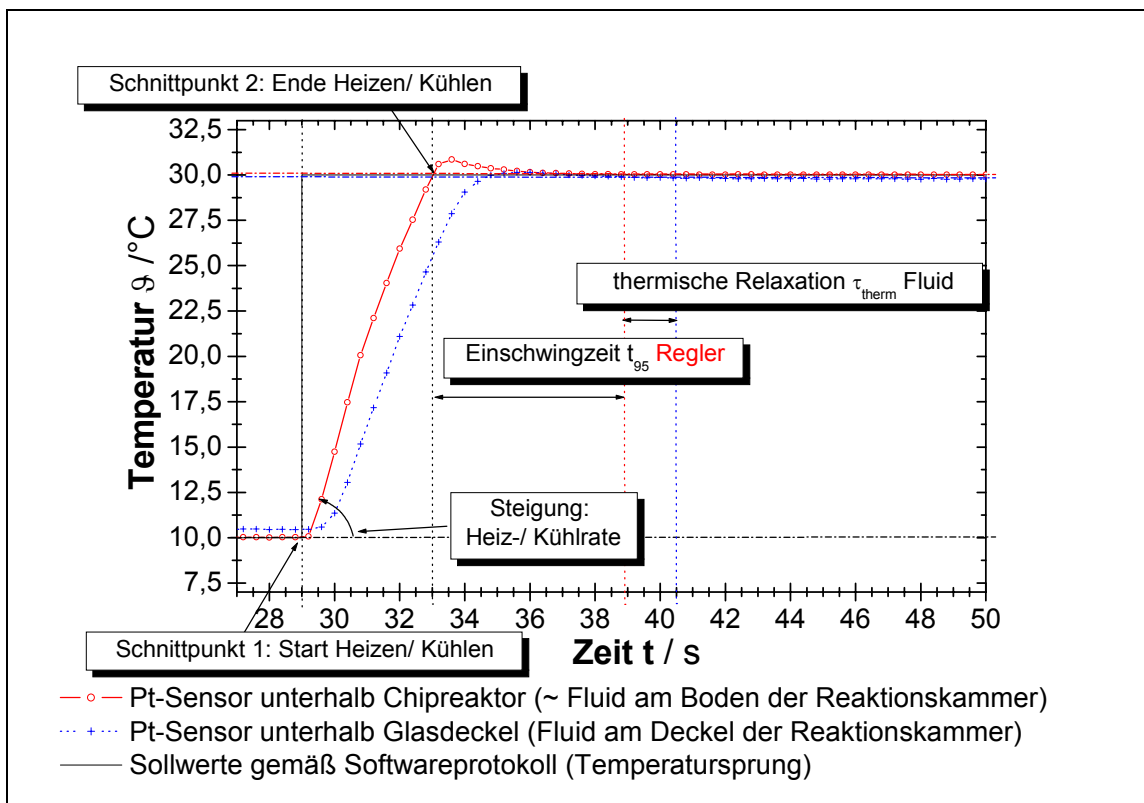


Abb. 31: Beispielhafte Darstellung der Bestimmung der dynamischen Parameter

Die Aufzeichnung der Temperatur erfolgte PC-gestützt über eine Messkarte „GPIB-PCII 488.2“ (National Instruments Inc, USA), welche mithilfe eines „LabVIEW™“-Programms, Version 5.1.1 (National Instruments Inc, USA) angesteuert wurde. Im Rahmen der Messungen wurden sowohl die Höhe der Temperatursprünge  $|\Delta T| = 1 \dots 40 \text{ K}$  als auch das Ausgangsniveau im Temperaturintervall  $\vartheta = 5^\circ\text{C} \dots 50^\circ\text{C}$  variiert.

### Wärmebild-Kamera

Zur Evaluierung der lateralen Temperaturverteilung auf der Oberfläche des Chipreaktors sowie des Fluids kam das Infrarot-Thermografiesystem „ThermaCAM® PM 280“ (FLIR Systems GmbH, D) zum Einsatz. Der effektive Spektralbereich dieses Bandstrahlungsthermometers beträgt  $\lambda = 3,1 \dots 5,2 \mu\text{m}$  mit einer thermischen Pixel-Auflösung des gekühlten 256x256-Detektorarrays (Pt-Si-Sensoren) von  $\pm 2\%$ . Prinzipiell sind damit Temperaturmessungen im Bereich  $\vartheta \approx -100 \dots 3000^\circ\text{C}$  möglich. Im relevanten Intervall von  $0^\circ\text{C} < \vartheta < 60^\circ\text{C}$  können unter idealen Bedingungen (z.B. optisch nicht-transparentes und nicht reflektierendes Messobjekt) Temperaturdifferenzen  $\Delta T < 0,5 \text{ K}$  aufgelöst werden. (Florin 2004, Dittmar 2004, Inframetrics 2000) Dies wurde mithilfe eines Schwarzen Strahlers verifiziert. (s. Anhang E)

Für eine fehlerarme berührungslose Temperaturmessung sind ausreichende Kenntnisse über Emission, Absorption, Transmission und Reflexion des zu analysierenden Systems notwendig. Nach dem KIRCHHOFFSchen Strahlungsgesetz ist der Emissionsgrad  $E(\lambda, T)$  gleich dem Absorptionsgrad  $A(\lambda, T)$ . Damit ist die Emission eines Körpers direkt mit dessen Transmissionsgrad  $T$  und Reflexion  $\mathfrak{R}$  gekoppelt:

$$E = A = 1 - (T + \mathfrak{R})$$

Der Emissionskoeffizient  $\varepsilon$  wird im allgemeinen von folgenden Faktoren beeinflusst:

- Oberflächenbeschaffenheit, Zusammensetzung und Struktur des Materials (Reflexion, Transmission)
- Richtung und Wellenlänge  $\lambda$  der emittierten Strahlung
- Temperaturbereich

Daher können tabellierte Werte für  $\varepsilon$  nur der Orientierung dienen, müssen im Einzelfall jedoch für das betreffende System experimentell bestimmt werden. Es existieren mehrere Methoden zur Bestimmung des Emissionskoeffizienten. Ein gebräuchliches Verfahren ist die sogenannte Substitutionsmethode. (Güttich 2002, Kessler 2003, Dittmar 2004)

Die Evaluierung des Thermografiesystems „ThermaCAM® PM 280“ hat ergeben, dass der Einsatz des Infrarot-Thermografiesystem „ThermaCAM® PM 280“ (FLIR Systems GmbH, D) nur nach Kalibrierung des Systems sinnvoll ist. Es muss also das Strahlungsverhalten des Messobjektes auf die Absorptionscharakteristik des Empfängers (Sensorarray) abgestimmt werden. Dies beinhaltet zum einen die Bestimmung der Emissionskoeffizienten des Messobjektes. Zum anderen ist die Wärmebild-

Kamera auf ein Objekt abzugleichen, welches sich im thermischen Gleichgewicht mit der Umgebung befindet. (s. Anhang E)

Temperaturmessungen auf den Chipreaktoren zeigten, dass die Messwerte mit dem Thermografiesystem im Temperaturintervall  $|T| < T_U \pm 10$  K absolut bis zu 3 K von den Referenztemperaturen abweichen können. Als Referenzwerte wurden hierbei die Messwerte kalibrierter Pt-Sensoren zugrunde gelegt. Trotz Kalibrierung des thermografischen Systems erschienen in diesem Intervall demnach nur qualitative Aussagen über laterale Temperaturverteilungen sinnvoll.

Weiterhin wurde ermittelt, dass sich im Falle der Batch- bzw. Fluss-Mikroreaktoren Mischbilder ergaben, welche sowohl thermische Information der Oberfläche des Deckels als auch des Fluids enthielten (Wärmeleitung und -strahlung). (s. Anhang E) In Gebieten mit derselben Materialkombination, wie z.B. die Kombination Fluid-Glas im Bereich der fluidischen Strukturen (Reaktionskammer oder Mikrofluidkanäle), sind dennoch relative Aussagen möglich. Die Abweichungen bei Temperaturmessungen in der Reaktionskammer betragen lediglich  $\Delta T \approx \pm 0,5$  K gegenüber Pt-Sensormessungen.

Abbildung 32 illustriert am Beispiel des Fluss-Mikroreaktors, dass Messungen mit der Wärmebildkamera die Fluidstrukturen auf dem Chipreaktor qualitativ gut wiedergeben. Die Auflösung der Kamera reicht aus, um die 100  $\mu\text{m}$  breiten Mikrofluidkanäle in der fluidischen Bifurkation zu analysieren. Eine Aufzeichnung der Temperaturwerte entlang lateral definierter Pfade ermöglicht die semi-quantitative Beurteilung der Temperaturverteilung im Fluid über den gesamten Chipreaktor.

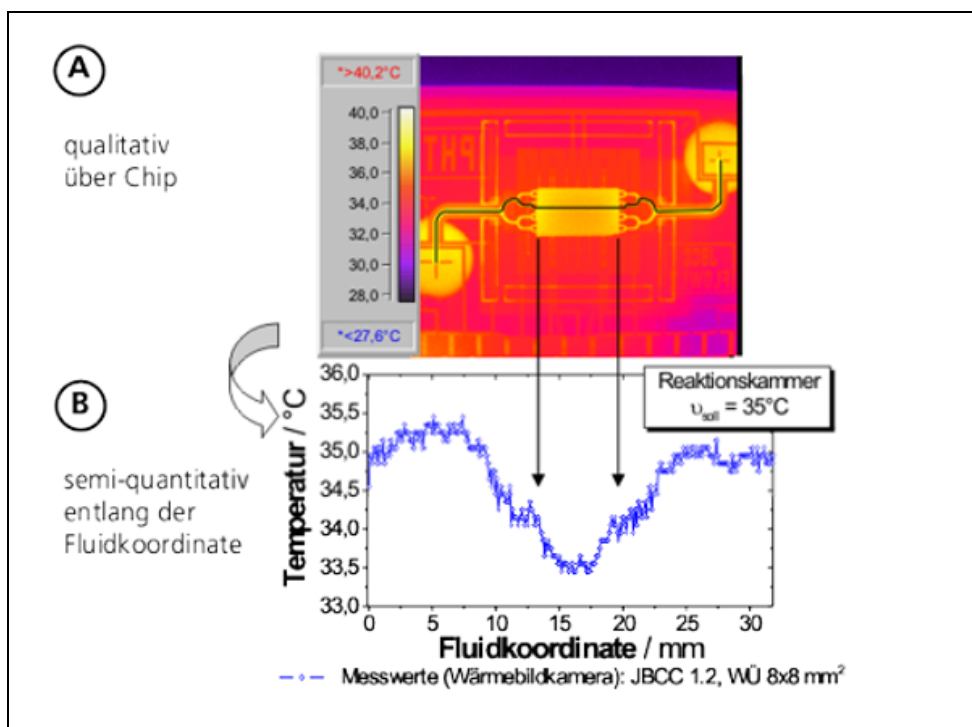


Abb. 32: Qualitative (A) bzw. semi-quantitative (B) Analyse der Temperaturfelder im Fluid auf dem Chipreaktor (Fluss-Mikroreaktor) mittels Wärmebildern und Liniengraphen

Das Wärmebild zeigt, dass außer den Fluidstrukturen auch die auf der Chipunterseite angebrachten Transducerstrukturen, aufgrund der Transparenz des Siliziums in diesem Wellenlängenbereich, schemenhaft zu erkennen sind. Da sich die verschiedenen Materialien in ihren Emissionskoeffizienten  $\varepsilon$  unterscheiden, besitzen diese entsprechend unterschiedliche Farben. Die Wärmebild-Kamera erlaubt lediglich die Einstellung eines globalen Emissionskoeffizienten, welcher auf einen bestimmten Bereich abgestimmt ist, beispielsweise auf die Fluidstrukturen. Folglich sind nur die Farbkodierungen direkt miteinander zu vergleichen, welche identische Emissionskoeffizienten besitzen.

Für die experimentelle Bestimmung der lateralen Temperaturverteilungen in den Chipreaktoren lässt sich somit folgendes Fazit ziehen:

Der Einsatz kalibrierter Dünnschichtsensoren ermöglicht die quantitative Messung lokal definierter Temperaturen. Mit der Wärmebild-Kamera kann die relative Temperaturverteilung im Fluid semi-quantitativ analysiert werden.

Die statischen Messungen der lateralen Temperaturverteilung  $\Delta T_{\text{lat}}$  auf dem Chipreaktor bzw. in der Reaktionskammer umfassten folgende Teilaspekte:

- qualitative Untersuchungen der Abhängigkeit vom Abstand der Solltemperatur  $T_{\text{soll}}$  von der Umgebungstemperatur  $T_U$  für Batch- und Flussreaktor
- qualitative Analyse der Veränderung der Temperaturverteilung durch konstruktive Modifikationen des Fluss-Mikroreaktors

Die Ergebnisse dieser thermischen Experimente wurden mit den FEM-Simulationen verglichen. Analytische 1D-Modellen dienten dabei der Plausibilitätsprüfung.

### **Thermischer Einfluss der Proteinkristallisation**

Der Einfluss der Wärmetönung bei der Proteinkristallisation auf die Temperierung wurde anhand einer Energiebilanz abgeschätzt. (Anhang D2c)) Bei vollständiger Kristallisation des gesamten Modellproteins HEWL ( $c_{\text{HEWL}} = 25 \text{ kg/m}^3$ ) ergibt sich eine zu vernachlässigende Temperaturerniedrigung  $\Delta T \approx -0,025 \text{ K}$ . Zudem ist die Kristallisation ein relativ langsamer Prozess mit Geschwindigkeitskonstanten in der Größenordnung von  $10^{-8} \text{ } \mu\text{l/s}$ . Da die Temperaturregelung mit Zeitkonstanten  $\tau_{\text{Regler}}$  im Bereich Millisekunden arbeitet und die Lösung mit Relaxationszeiten  $\tau_{\text{therm}}$  im Sekundenbereich reagiert (s. Anhang D2a)), werden die thermischen Störungen durch die Kristallisationswärme problemlos weggeregelt. Dies wurde in Testexperimenten bestätigt. Diese Erkenntnis erlaubte, für die thermische Charakterisierung der Mikroreaktoren Wasser, bidest. anstatt Proteinlösung einzusetzen.

### **2.5.2 Fluidisches Verhalten**

Neben den thermischen Messungen bildete die Analyse des fluidischen Verhaltens einen weiteren Hauptpunkt bei der Charakterisierung des Fluss-Mikroreaktors. Die Abschätzung des Druckverlustes im Reaktionssystem flossen in konstruktive Überlegungen zur Deckelung und fluidischen Peripherie

ein. Mithilfe von Strömungsprofilen in der Reaktionskammer konnte die Geschwindigkeitsverteilung auf Homogenität geprüft werden. Die Analyse des Verweilzeitverhaltens sollte zur Beantwortung der Frage nach der Übertragbarkeit makroskopischer Modelle auf Mikroreaktoren beitragen und die Untersuchungen zum Fluss-Mikroreaktor komplettieren. In Analogie zur thermischen Charakterisierung wurden analytische Modelle (A) mit 3D-Simulationen (B) und Experimenten (C) verglichen.

### A) Analytische Modelle

Der Entwurf analytischer Modelle diente zur Überprüfung der 3D-FEM-Simulationen und der Messungen auf deren Plausibilität. Das Ziel war es hierbei, durch die Anwendung geeigneter Modelle auf das prinzipielle fluidische Verhalten des Fluss-Mikroreaktors schließen zu können. Hierbei sind besonders die Überlegungen zum Druckverlust und zu den Strömungsfeldern eng miteinander verknüpft.

#### Druckverlust

Zur Auswahl geeigneter analytischer strömungstechnischer Modelle war zunächst zu bestimmen, ob im System turbulente Strömungsverhältnisse zu erwarten sind. Das Wachstum von Proteinkristallen erfordert Strömungsgeschwindigkeiten in der Reaktionskammer im Bereich von  $u < 250 \mu\text{m/s}$ . Damit ergeben sich in der Kammer ( $7 \times 4 \times 0,44 \text{ mm}^3$ ) mit einer charakteristischen Länge  $L$  bzw. einem hydraulischen Durchmesser  $d_h \approx 0,8 \text{ mm}$  für wässrige Lösungen ( $u \approx 10^{-6} \text{ m/s}$ ) nach Gleichung G9 REYNOLDSzahlen  $Re \approx 0,2$ .

$$Re = \frac{d_h \cdot u}{\nu} \quad (\text{G9})$$

Auf dem Chipreaktor erreicht die Strömung in den Abschnitten mit dem engsten Querschnitten (fluidische Verteilerstruktur,  $d_h \approx 0,135 \text{ mm}$ ) REYNOLDSzahlen  $Re \approx 4$ . Auf dem Chipreaktor kann also von laminaren Strömungsverhältnissen ausgegangen werden, da  $Re \ll Re_{\text{krit}} = 2300$ . Außerhalb des Chipreaktors bildeten die Kapillarschläuche ( $d_h = 0,25 \text{ mm}$ ) die strömungstechnisch sensitivsten Komponenten. Auch hier bewegt sich die Strömung mit  $Re \approx 2,5$  jedoch weit im laminaren Regime. Zur Abschätzung des Druckabfalls  $\Delta p$  in den Einzelkomponenten und im Gesamtsystem des Fluss-Mikroreaktors wurden folgende vereinfachende Annahmen getroffen:

- Strömung ausschließlich aufgrund einer Druckdifferenz in Hauptströmungsrichtung
- kein Druckgradient orthogonal zur Hauptströmungsrichtung
- ausgebildete laminare und reibungsbehaftete (Schichten-)Strömung
- koaxialer Zylinder mit Kreisquerschnitt

Damit konnte das Modell nach HAGEN-POISEUILLE herangezogen werden (G10). (Zierep 1990)

$$\Delta p = 8 \frac{\mu \cdot L \cdot Q}{\pi \cdot r^4} \quad (\text{G10})$$

Der **Druckabfall** eines Fluids mit der dynamischen Viskosität  $\mu$  über einem glatten Rohr der Länge  $L$  ist im laminaren Regime proportional zur Flussrate  $Q$  und reziprok proportional zur 4. Potenz des (Rohr-)Radius  $r$ . Zur Berechnung des Druckabfalls  $\Delta p$  im Fluss-Mikroreaktor wurden alle fluidischen Komponenten in ihrer Länge und ihrem (hydraulischen) Durchmesser erfasst. Somit konnte der Druckverlust beliebiger Einzelkomponenten bestimmt werden, wie z.B.  $\Delta p$  des Chipreaktors. Durch Kumulation aller Komponenten wurde der Gesamtwert ermittelt.

Neben Wandreibungskräften und der Kraft des evtl. vorhandenen Gegendrucks sind beim Befüllen mikrofluidischer Systeme Kapillar- und Oberflächenkräfte zu überwinden. Aus einer Kräftebilanz lässt sich die Abhängigkeit des **Innendrucks**  $p$  in Gasblasen bzw. Flüssigkeitstropfen ableiten. Es ergibt sich nach LAPLACE eine einfache Beziehung zwischen der Oberflächenspannung  $\sigma$  und dem Blasen- bzw. Tropfenradius  $r$  (G11). (Zieryp 1990)

$$p = \frac{2 \cdot \sigma}{r} \quad (\text{G11})$$

Je nach hydrophilem oder hydrophobem Benetzungsverhalten der Oberfläche gegenüber dem Fluid bildet das Fluid im Kanal eine konkave oder konvexe Oberfläche. (s. Abb. 33) Entsprechend ist der Krümmungsradius der Fluidoberfläche in Kontakt mit der Luft  $r < 0$  oder  $r > 0$ . Bei gegebener Oberflächenspannung  $\sigma$  des Fluids ( $\sigma_{\text{Wasser}} = 72 \cdot 10^{-3} \text{ N/m}$ ) (Atkins 1994) errechnet sich somit ein negativer bzw. positiver Blasendruck. Dieser steigt gemäß (G11) mit betragsmäßig abnehmenden Krümmungsradius.

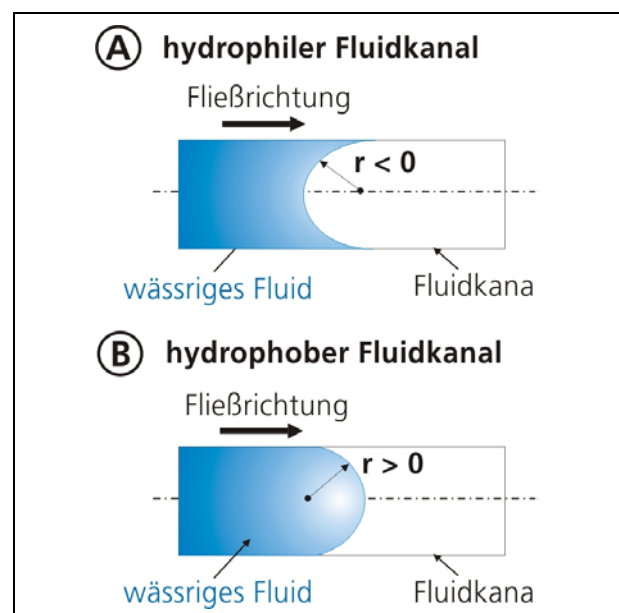


Abb. 33: Oberflächengestalt bei hydrophilem (A) und hydrophobem (B) Fluidkanal

### Strömungsprofil

Die vorangegangenen Betrachtungen zum Druckverlust haben gezeigt, dass in der Reaktionskammer des Fluss-Mikroreaktors aufgrund der niedrigen Re-Zahlen laminare Strömungsverhältnisse zu erwarten sind. Die geometrischen Abmessungen in den Mikrostrukturen des Chipreaktors liegen um einige Zehnerpotenzen oberhalb des Bereiches, in dem die klassischen hydrodynamischen Gesetzmäßigkeiten ihre Gültigkeit verlieren (s. Kap. 1.1.2, S. 13ff). Entsprechend sind zur analytischen Betrachtung des Problems keine zusätzlichen Terme zu berücksichtigen. Nach GAD-EL-HAK (Gad-el-Hak 2002) ist das laminare Strömungsprofil insbesondere für Mikrosysteme aus den

üblichen Materialien (Silizium, Edelstahl, Glas, Polymere) unabhängig von der Rauigkeit des umgebenden Materials.

Ausgangspunkt zur Berechnung von Geschwindigkeitsverteilungen bilden i.A. die NAVIER-STOKES-Gleichungen. Gleichung (G12) repräsentiert die allgemeine Impulsbilanz für kompressible Medien in vektorieller Form.

$$\frac{\partial \vec{w}}{\partial t} = -\text{grad}\left(\frac{1}{\rho} \cdot p\right) + \text{div}\left(\frac{\mu}{\rho} \cdot \text{grad}\vec{w}\right) + \vec{f} \quad (\text{G12})$$

Der Geschwindigkeitsvektor  $\vec{w}$  ist demnach abhängig von einem äußeren Kraftvektor  $\vec{f}$ , der Dichte  $\rho$  und der dynamischen Viskosität  $\mu$  des Fluids sowie dem Druck  $p$ .

Je nach Wahl der Randbedingungen lassen sich verschiedene analytische Modelle ableiten, um die Geschwindigkeitsverhältnisse zu beschreiben. Unter der Annahme einer stationären und ausgebildeten Schichtenströmung (laminare Strömung) in x-Richtung ergibt sich für ein inkompressibles Fluid im seitlich begrenzten ebenen Spalt der Höhe  $Z$  und Breite  $Y$  ( $-Z/2 \leq z \leq Z/2$ ;  $-\infty < y < \infty$ ) im stationären Zustand die sog. HAGEN-POISEUILLE-Strömung (G13).

$$u(z) = u_{\max} \cdot \left(1 - \frac{z^2}{(Z/2)^2}\right), \quad \text{mit } u_{\max} = -\frac{1}{\mu} \cdot \frac{dp}{dx} \cdot \frac{(Z/2)^2}{2}; \quad (\text{G13})$$

Die Ableitung dieser Beziehung ist im Anhang D1a) einzusehen. Sie beschreibt die Geschwindigkeitsverteilung in **z-Richtung** als Parabel mit Maximum  $u_{\max}$  in der Spaltmitte (Abb. 34). Die Strömung besitzt per definitionem keine Druckgradienten orthogonal zur Hauptströmungsrichtung. Somit existieren lediglich Geschwindigkeitskomponenten in x-Richtung.

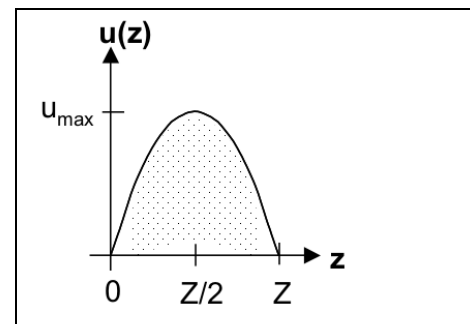


Abb. 34: HAGEN-POISEUILLE-Strömung in z-Richtung

Die Reaktionskammer der Fluss-Mikroreaktors besitzt aufgrund des Präparationsverfahrens eine trapezoide Strömungsquerschnittsfläche. Diese wird durch ein Rechteck mit einem Fehler  $< 5\%$  angenähert. Phänomenologisch betrachtet nimmt die Geschwindigkeit  $u$  vom Rand zur Mitte hin zu. An einer beliebigen Stelle innerhalb der  $y$ - $z$ -Ebene bestimmt der kleinste Abstand zum Rand die maximale Geschwindigkeit  $u_{\max}$ . Da das Verhältnis Höhe zu Breite gegeben ist mit  $Z/Y \approx 1/9 < 1$ , muss außerhalb des Randbereichs über einen großen Bereich gelten:

$$u_{\max}(y, z) = u_{\max}(z) \quad \text{mit } Z/2 < y < Y - Z/2 \quad (\text{G14})$$

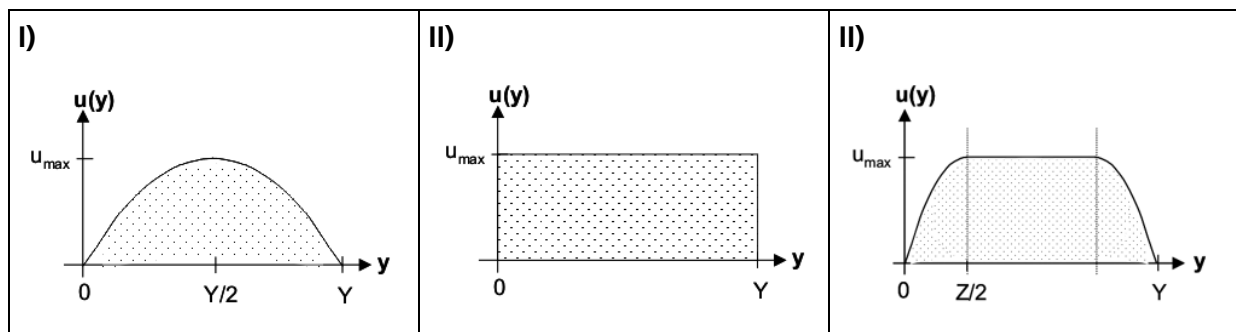
Zur Lösung der laminare Geschwindigkeitsverteilung in **y-Richtung** ist also die geschwindigkeitsbestimmende Abstandsfunktion  $f(y, z)$  zu implementieren. Der exakte funktionale Zusammenhang ist dann allerdings nicht mehr in geschlossener Form ohne den Einsatz komplexer



Rechenprogramme, wie z.B. „Mathematica®“ (Wolfram Research Inc., USA) anzugeben. Zur Näherung der realen Verhältnisse sind mehrere analytische Modelle denkbar (s. Anhang D1b)):

- I. HAGEN-POISEUILLE-Profil analog zur z-Richtung (unterer Grenzfall)
- II. konstantes Profil analog zu einem seitlich *nicht*-begrenzten Spalt (oberer Grenzfall)
- III. HAGEN-POISEUILLE im seitlich begrenzten Spalt, modifiziert mit abschnittsweise definierter Funktion (Kombination)

Abbildung 35 illustriert grafisch die Modelle. Die funktionalen Zusammenhänge sind Anhang D1b) zu entnehmen. Modell III kombiniert also die Modelle I und II unter Berücksichtigung der Randbedingung aus Gleichung G14.



**Abb. 35:** Analytische Modelle zur Beschreibung des Geschwindigkeitsprofils in der Reaktionskammer des Fluss-Mikroreaktors in y-Richtung:  
**I)** HAGEN-POISEUILLE-Profil – **II)** konstantes Profil – **III)** HAGEN-POISEUILLE, modifiziert

Die Modelle I ... III sollen zur prinzipiellen Einordnung des Verhaltens des Chipreaktors dienen. Die gemeinsame Basis zur Validierung der Experimente, Simulationen und Modelle bildet der Volumenstrom  $Q$ . Dieser Parameter ging sowohl in die 3D-FEM-Simulationen als auch in die Geschwindigkeitsfeld-Experimente als Eingangsgröße ein. Die Rückrechnung auf  $Q$  erfolgte über die mathematische Kopplung der Geschwindigkeitsprofile in y- und z-Richtung (s. Anhang D1b)). Die Abweichung vom erwarteten Volumenstrom  $Q_{\text{erw}}$  stellte den Hauptparameter zur quantitativen Analyse dar. Die maximale Geschwindigkeit  $u_{\text{max}}$  im Zentrum der Reaktionskammer ( $x, y, z$ ) bildete ein weiteres Kriterium bei der quantitativen Analyse. Zur qualitativen Beurteilung der Plausibilität wurden Liniengraphen und 2D-Farbplots in verschiedenen Schnittebenen herangezogen.

### Verweilzeitverhalten

Verweilzeitverteilungen können experimentell relativ einfach ermittelt werden, beispielsweise mithilfe von Tracerpartikeln (s. Kap. 2.5.2 C), S. 78). Trotz dieser „black box“-Betrachtung lässt die Signalform gewisse Rückschlüsse auf die Vorgänge im Innern des Reaktors zu. Detailliertere Untersuchungen erfordern allerdings die Implementierung theoretischer Ansätze. Ein analytischer Zugang zur Bestimmung realer Verweilzeitverteilungen ist aus heutiger Sicht jedoch nur in Ausnahmefällen möglich. Denn neben Eigenschaften des Fluids nehmen auch Geometrieparameter und konstruktive Gegebenheiten signifikanten Einfluss auf die Strömungsprofile. Deshalb wird zur Abschätzung des Verhaltens makroskopischer Reaktoren auf Modelle wie z.B. das Dispersionsmodell

zurückgegriffen. (Platzer 1999, Fitzer 1995, Gorges 2001) Dieses Modell überlagert die ideale Pfropfenströmung in einem realen Strömungsrohr mit einer diffusionsartigen axialen Vermischung  $D_{ax}$ . Das Dispersionsmodell ist demnach ein makroskopisches Analogon zum FICKSchen Diffusionsgesetz, in dem der Diffusionskoeffizient  $D$  ersetzt wurde durch  $D_{ax}$ . Diese axiale Vermischung kann durch folgende Effekte beeinflusst werden:

- Strömungsverhältnisse:
  - konvektive Vermischung in Strömungsrichtung durch Wirbelbildung und Turbulenz
  - ungleichförmige Verteilung der Strömungsgeschwindigkeiten über dem Rohrquerschnitt
- Stoffeigenschaften: molekulare Diffusion, Partikeln ...
- Konstruktion: Geometrie des Reaktorsystems, evtl. Einbauten ...

Im Falle realer Reaktoren ist für  $D_{ax}$  keine geschlossene Lösung anzugeben. Aus Verweilzeitmessungen, welche ein Eingangssignal  $x(t)$  und ein Ausgangssignal  $y(t)$  vorgeben, lassen sich u.U. dennoch die mittlere Verweilzeit  $\tau_{verweil}$  sowie eine dimensionslose Kennzahl, sog. BODENSTEINZahl  $Bo$  (G15) bestimmen. Eine Voraussetzung ist jedoch, dass das zugrundeliegende Dispersionsmodell die Antwortkurve  $y(t)$  genügend gut annähert.  $Bo$  setzt den konvektiven Stofftransport ins Verhältnis zur axialen Vermischung:

$$Bo = \frac{u \cdot L}{D_{ax}} \quad (G15)$$

Aus einer Verweilzeitverteilung  $E(t)$  wird dabei über ein Fitverfahren (Summe der kleinsten Fehlerquadrate) aus dem Eingangssignal  $x(t)$  das Ausgangssignal  $y^*(t)$  angenähert. (Fitzer 1995, Froment 1990, Gorges 2001) Für eine Stoßmarkierung ergibt sich die dimensionslose Verweilzeitverteilung  $E(t/\tau)$  zu Gleichung G16:

$$E(t/\tau_{verweil}) = \frac{1}{2} \cdot \left( \frac{Bo}{\pi \cdot (t/\tau_{verweil})} \right)^{\frac{1}{2}} \cdot \exp\left( \frac{Bo \cdot [1 - (t/\tau_{verweil})]^2}{4 \cdot (t/\tau_{verweil})} \right) \quad (G16)$$

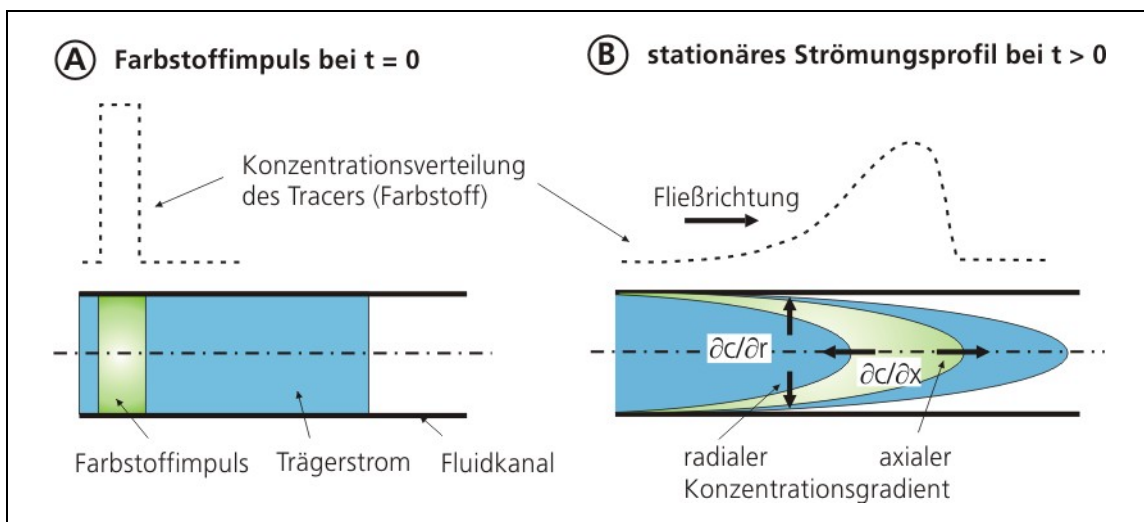
Diese Gleichung gilt unter der Annahme, dass für große BODENSTEINZahlen die konvektionsbedingte Ausbreitung sehr viel größer ist als die dispersionsbedingte. Für den einen theoretischen Grenzfall  $Bo \rightarrow 0$  liegt ein idealer Rührkessel vor, da  $D_{ax} \rightarrow \infty$ . Eine unendliche Rührkesselkaskade, also ein Strömungsrohr, liefert hingegen Werte für  $Bo \rightarrow \infty$ . Ein reales Strömungsrohr wird repräsentiert durch eine Kaskade mit endlich vielen Elementen, was BODENSTEINZahlen mit Werten zwischen  $0 < Bo < \infty$  ergeben sollte.

Die Verweilzeitverteilungsfunktion  $E(t/\tau)$  kann durch den Schwerpunkt und die Breite der Funktion charakterisiert werden. Diese beiden Parameter werden demnach repräsentiert durch das statistische Mittel  $\tau_{verweil}$  und die Varianz  $\sigma^2$  der Verweilzeitfunktion. Bei hinreichend großen BODENSTEINZahlen ( $Bo > 10$ ) gilt für die Varianz der Verteilungsfunktion folgender einfache Zusammenhang mit  $Bo$ :

$$\sigma^2 = \frac{2}{Bo} \cdot \left[ 1 - \frac{1}{Bo} (1 - e^{-Bo}) \right] \approx \frac{2}{Bo} \quad , \text{ für } Bo > 10 \quad (G17)$$

Je größer die BODENSTEINZahl, desto kleiner wird  $\sigma^2$ . Dies ist unmittelbar einsichtig, wenn die Zunahme von  $Bo$  beispielsweise durch eine abnehmende axiale Vermischung  $D_{ax}$  verursacht wird. Die Tracerpartikeln der Stoßmarkierung strömen also gewissermaßen im engen Verband durch den Reaktor.

Laminare Strömungsprofile sind u.a. gekennzeichnet durch eine Schichtenströmung. Konzentrationsunterschiede in axialer (Fließ-)Richtung führen daher nach einer Einlaufstrecke zu Konzentrationsgradienten in radialer Richtung, wie Abbildung 36 anhand eines Farbstoffimpulses in einem Rohrreaktor illustriert. Zur axialen Dispersion verursacht der Gradient  $\partial c/\partial r$  einen zusätzlichen Diffusionsstrom in radialer Richtung.



**Abb. 36:** Schema der Konzentrationsverteilung aufgrund der radialen und axialen Konzentrationsgradienten bei laminarem Strömungsprofil in einem engen Rohrreaktor als Folge eines Farbstoffimpulses:

- A)**  $t = 0$ : Zugabe des Farbstoffimpulses ohne Strömung–
- B)**  $t > 0$ : stationäres ungestörtes laminares Strömungsprofil

In Reaktoren mit engem Querschnitt ( $d < 500 \mu\text{m}$ ) und laminarem Geschwindigkeitsprofil mit kleinen Flussraten ( $Q < 50 \mu\text{l/min}$ ) gewinnt die radiale Dispersion durch die Diffusion quer zur Strömung an Signifikanz gegenüber der axialen Dispersion.

$$\tau_{Diff} = \frac{r^2}{D} \quad (G18)$$

Nach G18 lässt sich die Diffusionszeit  $\tau_{Diff}$  für wässrige Lösungen mit einem Diffusionskoeffizienten  $D \approx 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$  und einer radialen Längendimension  $r \approx 100 \mu\text{m}$  abschätzen zu  $\tau_{Diff} \approx 10 \text{ s}$ . Die Diffusionszeit liegt damit in derselben Größenordnung wie die mittlere Verweilzeit  $\tau_{Verweil}$  (G19) für Flussraten  $Q \approx 10 \mu\text{l/min}$ .

$$\tau_{\text{Verweil}} = \frac{V}{Q} \quad (\text{G19})$$

In der Reaktionskammer des Fluss-Mikroreaktors ergibt sich näherungsweise  $\tau_{\text{Verweil}} \approx 10$  s, für die Mikrokanäle bzw. Kapillarschläuche ( $d \approx 200 \mu\text{m}$ ,  $l = 10$  cm) erreicht  $\tau_{\text{Verweil}} \approx 30$  s. Falls Totvolumina (z.B. fluidische Kupplungen oder ausgeprägte Ecken) im System vorhanden sind, wirken diese als parallel geschaltete Verzögerungsglieder, da zum Durchlaufen dieser Störbereiche mehr Zeit erforderlich ist. Damit kommt es in der Verweilzeitverteilungsfunktion zu Nebenmaxima, welche nach dem Hauptmaximum der Funktion beispielsweise als „Schultern“ oder „Wellen“ zu Tage treten.

Es ist zu erwarten, dass der Einfluss der radialen Dispersion und damit die Bedeutung dieser Effekte in Mikrostrukturen bei abnehmender Fließgeschwindigkeit bzw. steigender Viskosität zunimmt.

### B) Numerische 3D-FEM-Simulationen der Strömungsfelder

Zur numerischen Berechnung der Strömungsfelder in den fluidischen Strukturen des Chipreaktors wurden CFD-Simulationen ebenfalls am IBA, Heiligenstadt angefertigt. (s. Kap. 2.5.1 B, S. 59f). In den rein fluidischen Simulationen wurde die Struktur der Mikrofluidkanäle hinsichtlich eines möglichst homogenen Strömungsprofils in der Reaktionskammer variiert. Die erste strömungstechnische Optimierung des ursprünglichen intuitiven Chipdesigns (JBCC 1.1) erfolgte auf der Grundlage dieser Variantenstudie. Das optimierte CFD-Modell enthielt über 40.000 Hexaeder-Elemente vom „Typ 7“, welche analog zu den FEM-Elementen in Abbildung 27 (S. 58) aufgebaut sind. Abbildung 37 zeigt ein vernetztes 3D-CFD-Modell des Chipreaktors zur Berechnung der Geschwindigkeitsverteilung bzw. der Strömungsfelder.

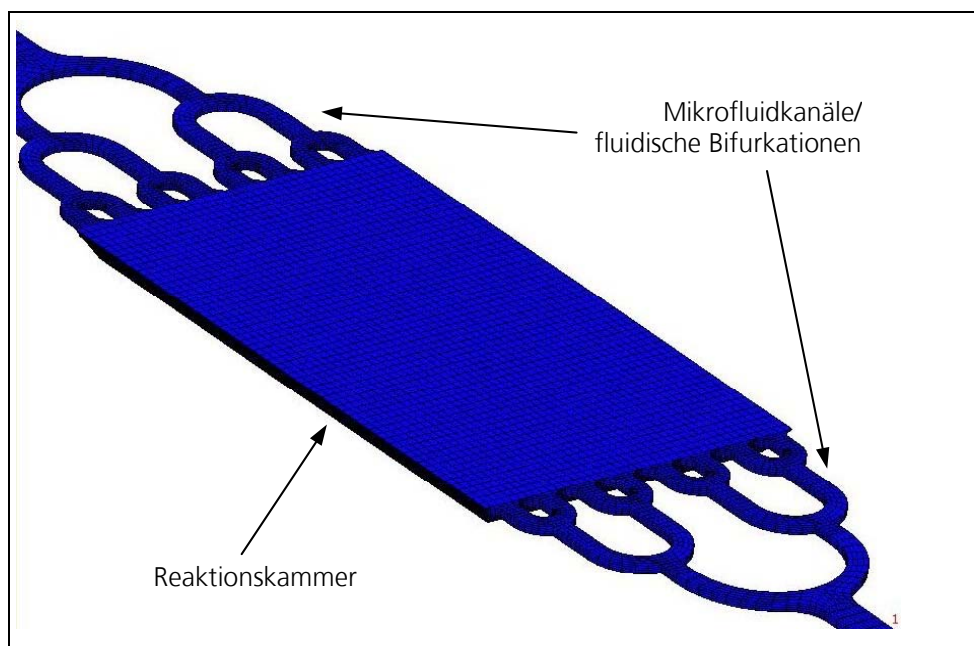


Abb. 37: Darstellung des vernetzten 3D-Modells (Reaktionskammer und Mikrofluidkanäle/ fluidische Bifurkationen) zur Berechnung der Strömungsfelder mittels CFD -Simulation

Das Modell umfasste die Reaktionskammer und Mikrofluidkanäle, wobei sich insgesamt ca. 200.000 Freiheitsgrade ergaben. Im Vergleich zum gekoppelten thermisch-fluidischen Modell (vgl. Abb. 29, S. 60) schrumpfte das rein fluidische Modell auf 1/6 der Größe und erlaubte ausführliche Variantenstudien zur Designoptimierung.

Die Untersuchungen fokussierten auf 3 verschiedene Flussraten  $Q = 6,0 \mu\text{l}/\text{min}$ ,  $27,6 \mu\text{l}/\text{min}$  und  $60 \mu\text{l}/\text{min}$ . Die Auswertung beinhaltete die qualitative Beurteilung der Strömungsfelder in verschiedenen Schnittebenen mittels farbkodierter 2D-Farbplots. Zur quantitativen Analyse wurden die Geschwindigkeiten entlang 1D-Stromfäden in Liniendiagramme umgesetzt.

Ein Teilaspekt der Strömungssimulation thematisierte den Effekt gegenständlicher Störungen auf die Homogenität des Strömungsfeldes. Ziel der Untersuchungen war es zu sehen, inwieweit die Anwesenheit wachsender Proteinkristalle die Strömung beeinflussen. Hierzu wurden fiktive Kristalle in Form quaderförmiger Elemente unterhalb des Glasdeckels platziert und in ihrer Größe (Kantenlänge  $l = 20 \mu\text{m} \dots 100 \mu\text{m}$ ) variiert. Die Simulationen wurden wiederum bei den Flussraten  $Q = 6,0 \mu\text{l}/\text{min}$ ,  $27,6 \mu\text{l}/\text{min}$  und  $60 \mu\text{l}/\text{min}$  durchgeführt. Der Einfluss des Kristallwachstums auf das Strömungsfeld wurde mithilfe farbkodierter 2D-Farbplots qualitativ beurteilt.

## C) Experimente

### Druckverlust

Die Analyse des Druckverlustes im Fluss-Mikroreaktor beinhalteten 2 unterschiedliche Messungen:

1. Druckverlust über komplettem Fluss-Mikroreaktor als Funktion der Flussrate
2. Druckabfall über Chipreaktor beim Befüllen

Zur experimentellen Bestimmung kam nebenstehender Aufbau (Abb. 38) zum Einsatz. Er bestand prinzipiell aus dem zu messenden Objekt (Chipreaktor bzw. Fluss-Mikroreaktor), aus einer Fluidfördereinrichtung sowie einer Druckmessvorrichtung. Der Vorschub wurde in beiden Fällen von einer Spritzenpumpe „SP210 iwz“ (WPI, D) geleistet. Das Fluid wurde gegen den Atmosphärendruck  $p_0$  gefördert. Zur Druckanzeige wurde bei Messung 1 ein Handmanometer „P/N 63-2204“ (Praxair Inc., USA) für den Druckbereich  $p = -1,0 \dots +2,0$

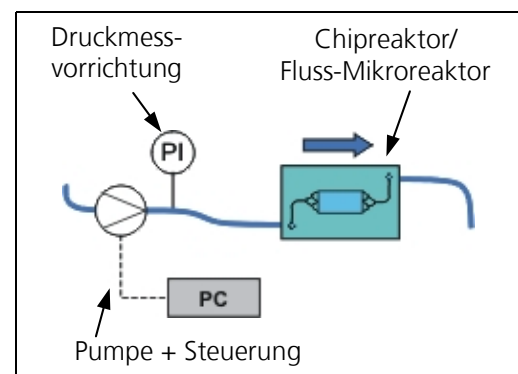


Abb. 38: Prinzipieller Aufbau zur Messung des Druckverlustes

bar ( $1 \pm 0,03$ ) benutzt. Bei Messung 2 war es notwendig, einen Druckabfall im unteren Millibar-Bereich aufzulösen. Zu diesem Zweck wurde eine Vorrichtung gebaut, in der ein in einer Kapillare eingeschlossenes Gasvolumen (Luft) als Arbeitsmittel diente. Die Luft stand über ein T-Stück ohne signifikante Querschnittsänderungen in direkter Korrespondenz mit dem Fluid des Chipreaktors. Der Füllstand des Fluids in der Messkapillare bei Umgebungsdruck  $p_0$  wurde als Referenzpunkt festgelegt.

Beim Pumpen stieg der Füllstand in der Kapillare, das Luftvolumen verkleinerte sich also von  $V_0$  auf  $V_1$ , während der Druck auf  $p_1$  anstieg. Über die Beziehung von BOYLE-MARIOTTE (Gleichung G20) (Luft als ideales Gas bei  $T = \text{const.}$ ) kann der Druckabfall im Chipreaktor über die Kompression des Luftvolumens bestimmt werden zu:

$$p_1 = p_0 \cdot \frac{V_0}{V_1} \quad (\text{G20})$$

Messung 1 wurde bei 4 Volumenströmen  $Q = 15 \dots 60 \mu\text{l}/\text{min}$  durchgeführt. Messung 2 erfolgte bei einer Förderrate von  $Q = 15 \mu\text{l}/\text{min}$ .

### 3D-Strömungsprofil

Die experimentelle Bestimmung des 3D-Strömungsfeldes bzw. der Geschwindigkeitsverteilung in der Reaktionskammer des Chipreaktors erfolgte mithilfe micro-particle-trace-velocimetry-Messungen ( $\mu$ -PTV). Dieses Verfahren benutzt Tracer-Partikeln, welche annähernd verzögerungsfrei der Strömung folgen und so einer optischen Analyse zugänglich macht. Im folgenden wird jedoch der in der Literatur üblicher Weise verwendete Überbegriff micro-particle-image-velocimetry ( $\mu$ -PIV) verwendet.

Als Tracerpartikeln kamen polychromatische fluoreszente Polystyrol-Beads „fluoresbrite“ (Polysciences Europe GmbH, D) zum Einsatz mit einem Durchmesser  $\varnothing = 1,0 \mu\text{m}$  ( $925 \text{ nm} \pm 25 \text{ nm}$ ) mit 2,6% Feststoffanteil ( $\rho = 1,055 \cdot 10^{-3} \text{ kg}/\text{m}^3$ ). Derartige Partikeln folgen Strömungen wässriger Medien selbst in den unteren turbulenten Bereich zuverlässig. (*Adrian 1991, Raffel 1998*) Besonders bei kleinen Strömungsgeschwindigkeiten  $u < 10 \mu\text{m}/\text{s}$  gewinnt die BROWNSche Molekularbewegung an Bedeutung. Der Fehler  $\varepsilon$ , welcher aufgrund der Diffusion des Moleküls gegenüber seiner konvektiven Bewegung im Zeitintervall  $\Delta t$  auftritt, ist gegeben durch die Gleichung G21. (*Santiago 1998, Meinhart 1999*)

$$\varepsilon = \frac{1}{u} \cdot \sqrt{\frac{2 \cdot D}{\Delta t}}, \quad \text{mit } D = \frac{k \cdot T}{3\pi \cdot \mu \cdot d_p}; \quad (\text{G21})$$

Der Diffusionskoeffizient  $D$  ist nach STOKES-EINSTEIN umgekehrt proportional zu Partikeldurchmesser  $d_p$  und der dynamischen Viskosität  $\mu$ , bei gegebener absoluter Temperatur  $T$  und der BOLTZMANN-Konstante  $k$ . Das Zeitintervall  $\Delta t$  entspricht hierbei der Illuminationszeit  $t_{\text{illum}}$  für die gegebene experimentelle Anordnung. Im vorliegenden Fall ergab sich für eine applikativ relevante Geschwindigkeit  $u = 250 \mu\text{m}/\text{s}$  und  $\Delta t = 0,2 \text{ s}$  ein Fehler  $\varepsilon < 1\%$ . Somit konnte die BROWNSche Molekularbewegung vernachlässigt werden.

Die Einstellung der optimalen Versuchsbedingungen erforderte intensive Vorexperimente. Hierbei bedingten sich die Parameter Flussrate, Illuminationszeit, Spurlänge, Illuminationsvolumen, Partikelkonzentration und Signalintensität wechselseitig. Um ein Agglomerieren der Tracerpartikeln

zu verhindern wurden  $V = 0,5 \mu\text{l}$  Beads in  $V = 3,5 \text{ ml}$  einer  $0,002\%$  Natrium-dodecylsulfat-Lösung (SDS) suspendiert.

Der Fluss-Mikroreaktor wurde auf einem Fluoreszenz-Mikroskop „AxioTech“ (Carl Zeiss Jena GmbH, D) mit manuellem x-y-z-Trieb montiert. (s. Abb. 39) Als UV-Quelle diente eine  $200 \text{ W}$  Hg-Dampflampe „SUV DC“ (Lumatec GmbH, D). Die Fluoreszenzaufnahmen wurden in der CCD-

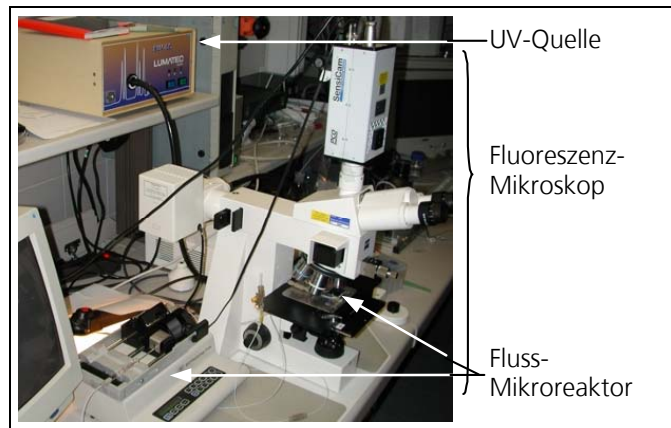


Abb. 39: Experimenteller Aufbau  $\mu$ -PIV-Messungen

Kamera „SensiCam“ (PCO GmbH, D) auf ein  $640 \times 480$  Pixelarray abgebildet. Bestrahlung durch ein Cy3-Filter (Carl Zeiss Jena GmbH, D) bei  $\lambda_{\text{exc}} = 530 \dots 560 \text{ nm}$  mit einer Cut-Off-Wellenlänge  $\lambda = 470 \text{ nm}$  ergab ein ausreichend starkes Signal mit  $\lambda_{\text{em}} = 575 \dots 650 \text{ nm}$  (leuchtendes orange).

Für den zu analysierenden Geschwindigkeitsbereich wurde eine optimale Spurlänge  $l \approx 50 \mu\text{m}$  bei einer Illuminationszeit  $t_{\text{illum}} = 200 \text{ ms}$  erreicht. Das Mess- oder Illuminationsvolumen betrug mit 5-, 10- und 20-fach vergrößernden Objektiven (Carl Zeiss Jena GmbH, D) folglich  $V_{\text{illum}} = 500 \times 375 \times 15 \mu\text{m}^3$ . Das gesamte zu analysierende Volumen  $V = 7000 \times 4000 \times 440 \mu\text{m}^3$  (Interrogationsraum) wurde entsprechend in x-, y- und z-Richtung mit  $7 \times 5 \times 7$  Messvolumina charakterisiert. (Abb. 40) Damit wurde eine dreidimensionale Abdeckung von etwa  $5\%$  erreicht. Dies stellt einen guten Kompromiss zwischen Messaufwand und -genauigkeit dar. Je Messfeld wurden 10 Bilder mit einer Pause von  $t = 0,1 \text{ s}$  gespeichert und automatisch in Listen übertragen.

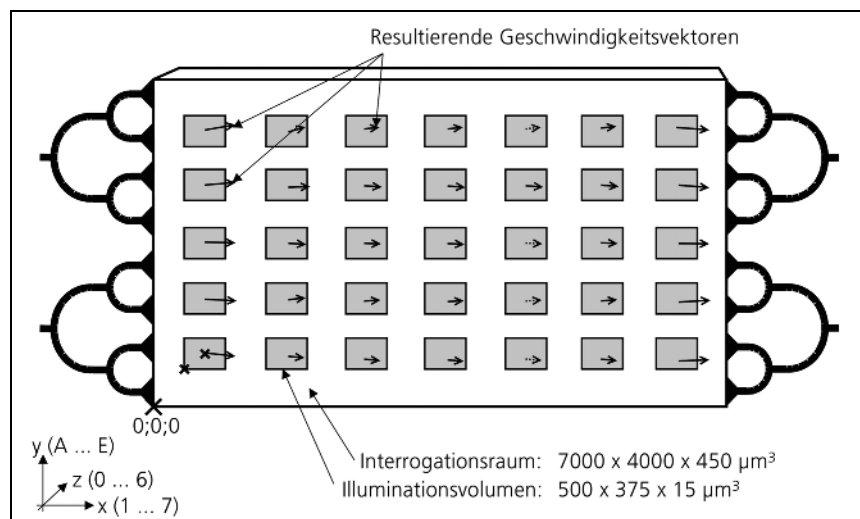


Abb. 40:  $\mu$ -PIV-Messungen: Platzierung der Messsegmente (Illuminationsvolumina) in der Reaktionskammer

Ausgangspunkt zur qualitativen und quantitativen Analyse der Strömungsverhältnisse auf dem Chipreaktor waren die  $\mu$ -PIV-Aufnahmen. (s. Abb. 41) An den Oberflächen adhärierende Schmutz- oder Tracerpartikeln sind als helle Flecke zu erkennen (Abb. 42) Durch die endliche Illuminationszeit werden die fokussierten kugelförmigen Tracerpartikeln zu hellen Spuren mit dem Durchmesser eines

Partikels  $d_p$  (s. Abb. 41 B). Partikeln, welche außerhalb der Fokusebene liegen, erscheinen im Fluoreszenzmodus als diffuse Objekte und wurden durch einen Auswertungsalgorithmus (s. Abb. 43, S. 77) eliminiert.

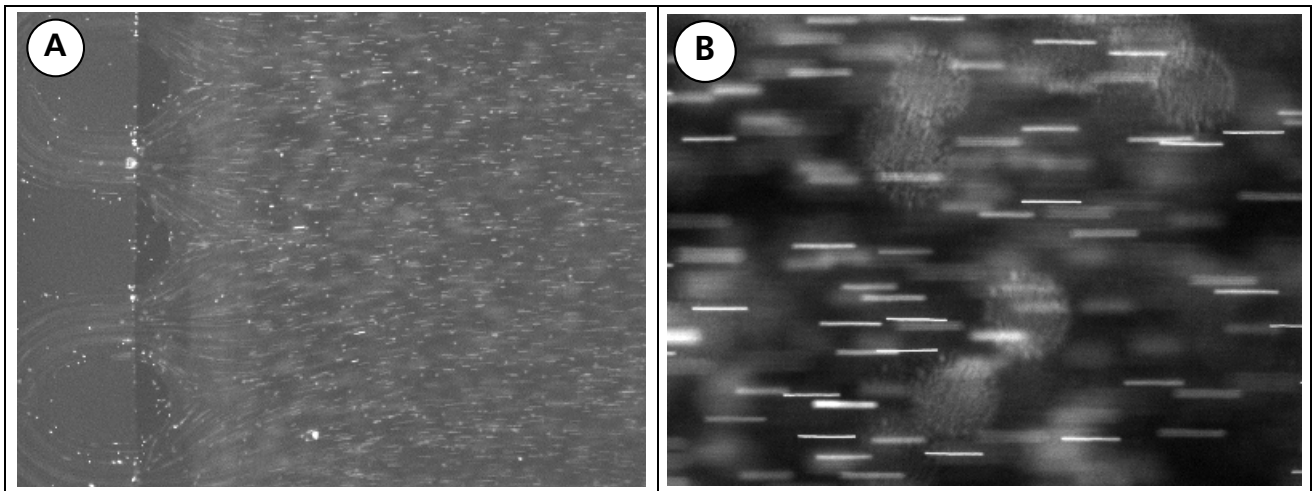


Abb. 41: Typische CCD-Aufnahmen als Ausgangsbilder zur *qualitativen* (A) und *quantitativen* (B)  $\mu$ -PIV-Analyse der Strömung in der Reaktionskammer  
**A)** am Übergang fluidische Verteilerstruktur  $\rightarrow$  Reaktionskammer (5-fache Vergrößerung)  
**B)** im Innern der Reaktionskammer (20-fache Vergrößerung)

Zur quantitativen Auswertung waren ausreichend hohe Signalintensitäten erforderlich. Die Aufnahmen wurden folglich mit 20-fach vergrößernden Objektiven getätigt. Wie Abbildung 42 offenbart, ist im Mikrokanal eine quantitative Erfassung der gekrümmten und relativ unscharfen Tracerspuren nicht möglich, eine qualitative Beurteilung des Stromlinienverlaufs hingegen durchaus. Eine Quantifizierung der Geschwindigkeitsvektoren blieb demnach auf die Reaktionskammer beschränkt.

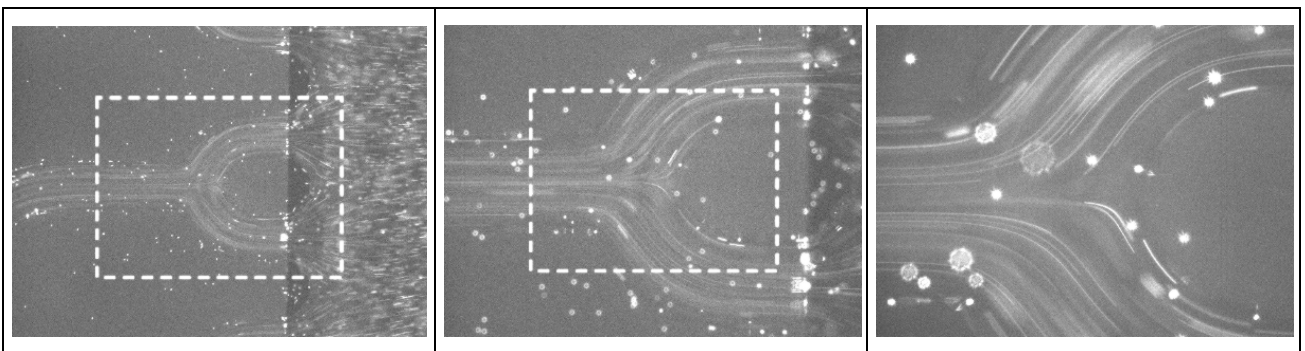


Abb. 42: Übergang von der fluidischen Verteilerstruktur in die Reaktionskammer bei verschiedenen Vergrößerungen (CCD-Aufnahmen mit Fluoreszenz-Mikroskop):  
**A)** 5-fach  $\rightarrow$  **B)** 10-fach  $\rightarrow$  **C)** 20-fach

Die Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen erfolgte mithilfe eines semi-automatisierten Algorithmus. (s. Abb. 43) Dieses Verfahren beinhaltet folgende Hauptpunkte:



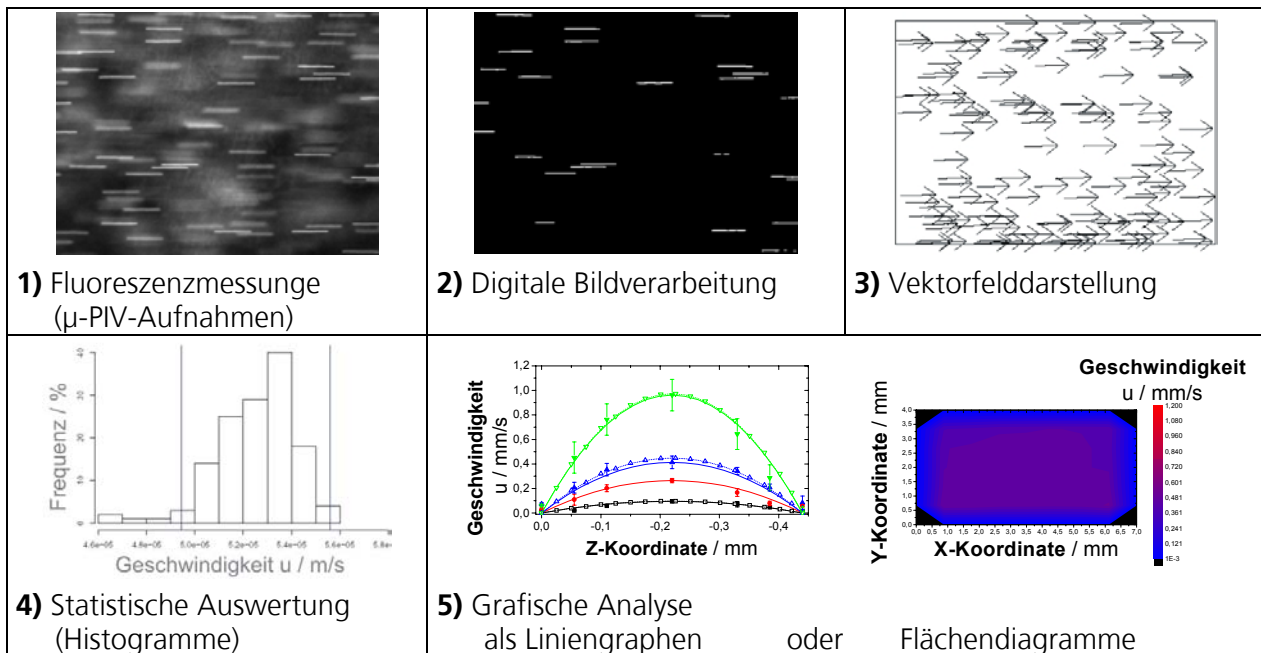


Abb. 43: Auswertungsalgorithmus (Schema) der  $\mu$ -PIV-Messungen zur Analyse der Geschwindigkeitsfelder

- digitale Bildverarbeitung zur Eliminierung des Hintergrunds und Separierung der Tracerspuren außerhalb der Fokusebene: Medianfilter I 1x10; Hintergrundsubtraktion; Medianfilter II 1x5; Binarisierung
- statistische Auswertung zur Eliminierung stehender oder aus der Fokusebene wandernder Partikel: Darstellung der digital verarbeiteten Bilder als Vektorplots (eindeutig definiert durch Ursprung, Länge und Richtung); manuelle Einschränkung der zu analysierenden Objekte mittels Häufigkeitsverteilung über der Objektlänge (Histogramm) für den annähernd GAUß-normalverteilten Bereich
- grafische und numerische Analyse der Daten: Mittelwertbildung und Interpolation der fehlenden Messpunkte zwischen den diskreten Illuminationsvolumina; Darstellung der Geschwindigkeitsverteilung als farbkodierte 2D-Schnittbilder (Abb. 44) oder Liniengraphen; Analyse der Daten mithilfe „Mathcad 2000 Pro“ (MathSoft Inc., USA), „Origin 6.1“ (OriginLab Corp., USA) sowie „Excel 2000“ (Microsoft Inc., USA)

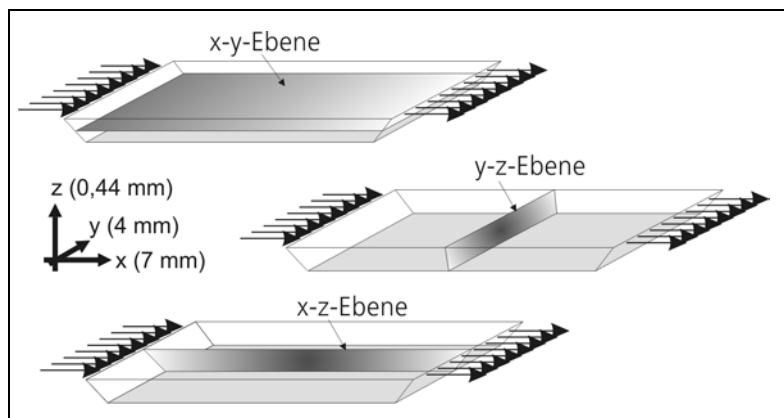


Abb. 44: Lage der Schnittebenen zur Analyse der Geschwindigkeitsprofile in der Reaktionskammer

Die  $\mu$ -PIV-Experimente wurden für die Flussraten  $Q = 6 \mu\text{l}/\text{min}$ ,  $16,8 \mu\text{l}/\text{min}$ ,  $27,6 \mu\text{l}/\text{min}$  und  $60 \mu\text{l}/\text{min}$  durchgeführt. Damit sind mittlere Geschwindigkeiten in der Reaktionskammer des Fluss-Mikroreaktors  $u = 80 \mu\text{m}/\text{s}$ ,  $230 \mu\text{m}/\text{s}$ ,  $380 \mu\text{m}/\text{s}$  und  $830 \mu\text{m}/\text{s}$  zu erwarten. Hieraus wurden die 3D-Geschwindigkeitsverteilungen bestimmt und mit Simulation und Modell verglichen.

### Verweilzeitverhalten

Die experimentelle Ermittlung des Verweilzeitverhalten des Fluss-Mikroreaktors beschränkte sich auf den Chipreaktor sowie die zur Messung erforderlichen fluidischen Peripherie. Sowohl die Durchführung als auch die Auswertung der Experimente erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Physik, Fachgebiet Mikroreaktionstechnik an der TU Ilmenau. Abbildung 45 skizziert den an der TU Ilmenau realisierten Messaufbau zur optischen Erfassung von Tracerpartikeln vor (Eingangssignal  $x(t)$ ) bzw. nach (Ausgangssignal  $y(t)$ ) dem Chipreaktor.

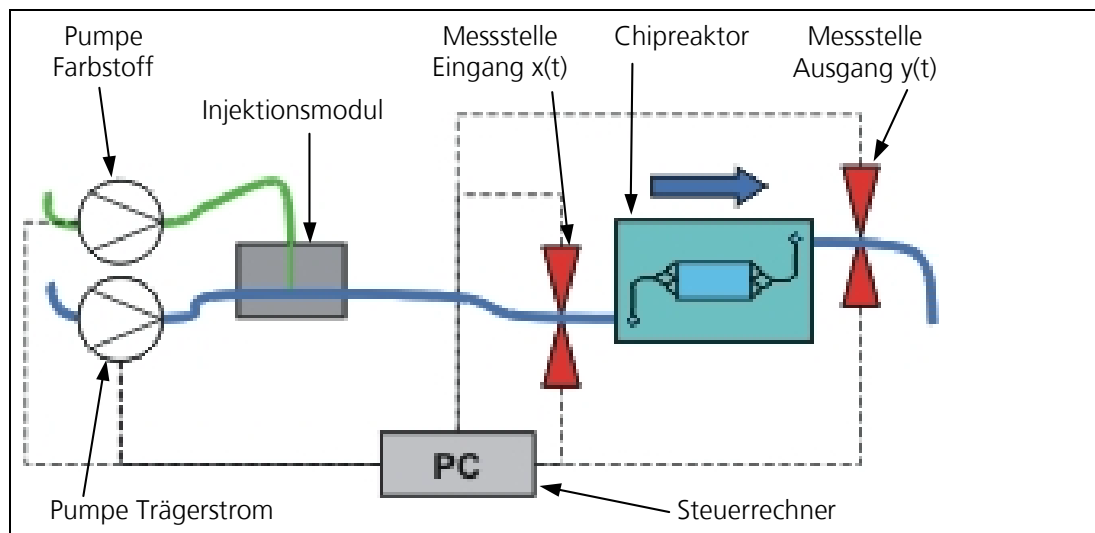


Abb. 45: Schematischer Aufbau zur Messung des Verweilzeitverhaltens des Fluss-Mikroreaktors

Hierzu wurden die Transmissionskurven als Impulsantwort  $x(t)$  und  $y(t)$  auf einen Farbstoffimpuls (Malachitgrünlösung,  $c = 0,06 \text{ mol/l}$ ) in zeitabhängigen Extinktionsmessungen aufgezeichnet. Die Impulszeit betrug  $\Delta t = 2 \text{ s}$ , die Messzeit jeweils  $t = 250 \text{ s}$ . Die Messungen wurden als Dreifachmessungen bei 4 verschiedenen Volumenströmen  $Q = 15 \dots 60 \mu\text{l}/\text{min}$  mit wässrigen Farbstofflösungen durchgeführt. Für  $Q = 30 \mu\text{l}/\text{min}$  wurde das Lösungsmittel Wasser ( $\mu_{20} = 1,01 \cdot 10^{-3} \text{ Pa s}$ ) (Atkins 1994) durch eine Glycerin, 20% ( $\mu_{20} = 1,76 \cdot 10^{-3} \text{ Pa s}$ ) (Ekani-Nkodo 2003) ersetzt, um erste Hinweise auf die Viskositätsabhängigkeit des Verweilzeitverhaltens zu erhalten.

An den beiden Messstellen wurde die transmittierte Strahlung als Funktion der Zeit detektiert, gemäß dem LAMBERT-BEERSchen Gesetz in Extinktionseinheiten  $E$  umgerechnet und auf den Minimalwert  $E^* = E/E_{\min}$  normiert. Nach einer weiteren Normierung des Flächenintegrals über der Zeit konnte schließlich das Dispersionsmodell (s. Kap. 2.5.2 A), S. 69ff) auf die Kurven angewendet werden. (Gorges 2001, Günther 2003) Bei ausreichender Übereinstimmung des realen Verhaltens

mit dem Dispersionsmodell (Summe der mittleren Fehlerquadrate  $< 10^{-3}$ ) lässt sich das Antwortsignal  $y(t)$  aus dem Eingangssignal  $x(t)$  berechnen. Daraus sind dann sowohl die mittlere Verweilzeit  $\tau_{\text{Verweil}}$  sowie über die BODENSTEINZahl  $B_0$  die axiale Vermischung  $D_{\text{ax}}$  zu ermitteln. Die Größen  $\tau_{\text{Verweil}}$  und  $D_{\text{ax}}$  erlauben schließlich in Grenzen Rückschlüsse auf das Verweilzeitverhalten des realen Chipreaktors.

### 2.5.3 Oberflächentechnologie

#### A) Verfahren und Geräte zur Oberflächeninspektion

Für die physiko-chemische und mechanische Charakterisierung von Oberflächen standen die in Tabelle 4 gelisteten Verfahren und Geräte zur Verfügung. Sie wurden entsprechend den angegebenen Anwendungen eingesetzt.

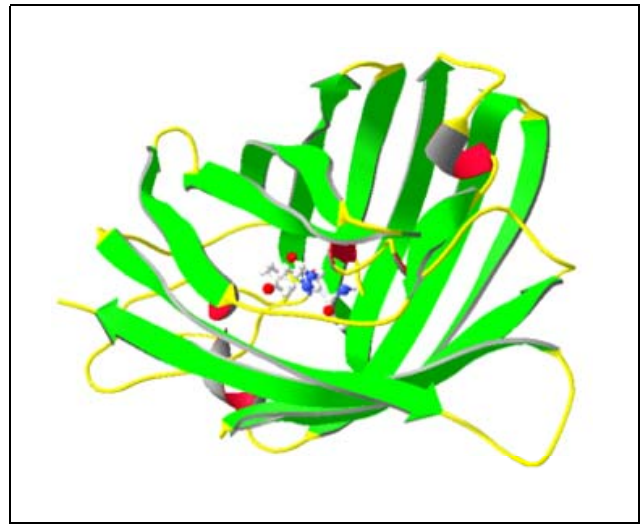
Tabelle 4: Verfahren und Geräte zur Charakterisierung von Oberflächen

| Verfahren/ Prinzip                          | Gerät  | Anwendung  |
|---|--|--|
| Fluoreszenz-Mikroskopie                     | „TCS“ (Leica GmbH, D);<br>„Axioplan“ (Carl Zeiss Jena GmbH, D)   | Evaluierung Reinigungsprotokolle;<br>$\mu$ -PIV Messungen  |
| konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) | „TCS“ (Leica GmbH, D)  | <i>in situ</i> Analyse Proteinkristallisation;<br>Vibrationsanalyse Peristaltikpumpe   |
| Licht-Mikroskopie                           | „Stemi 2000-C“, „Axiotech“ (Carl Zeiss Jena GmbH, D)   | Montage / Inspektion der Mikroreaktoren;<br><i>in situ</i> Analyse Proteinkristallisation  |
| Randwinkelmessungen                         | „OCA 20“ (Dataphysics, D)  | Prozesskontrolle Präparation der Chipdeckelung;<br>Prozesskontrolle Oberflächenbehandlung Fluss-Mikroreaktor (blasenfreies Befüllen) |
| Raster Elektronen Mikroskopie (REM)         | „Jeol JSM 6700 F“ (Jeol Ltd., Belgien)   | mikromechanisch bearbeitete und/ oder mikrostrukturierte Elemente  |
| Raster Kraft Mikroskopie (AFM)              | „NanoScope III“ mit „Dimension 3100“ Messkopf und $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Spitzen (Digital Instruments Inc., USA) | Nanoschichten Präparation der Chipdeckelung  |
| Spektrofluorimetrie                         | „FP-6200“ (Jasco GmbH, D)  | Konzentrationsreihen Evaluierung Reinigungsprotokolle  |
| Tastschnittmessungen                        | „P2 Long Scan Profiler“ (Tencor Instruments Inc., USA)   | Prozesskontrolle und Bestimmung der Rauigkeit von Oberflächen  |

#### B) Regeneration der Oberflächen des Batch-Mikroreaktors

Zur vollständigen Regeneration der Oberfläche der Reaktionskammer des Batch-Mikroreaktors wurde eine geeignete Reinigungsprozedur entwickelt. Hierbei kam das Modellprotein Green Fluorescent Protein (GFP) bzw. dessen kommerziell erhältliche rekombinante Variante r-GFP aus *E.coli* zum Einsatz. (s. Abb. 46) Die fluorophore Gruppe befindet sich im Innern des Moleküls. Sein hydrophiler Charakter bewirkte eine starke Kontamination der hydrophilen Si-Oberfläche. Die Verschmutzung wurde noch dadurch verstärkt, dass die Reaktionskammer zuvor mit „Piranha-Lösung“ ( $\text{H}_2\text{SO}_4 - \text{H}_2\text{O}_2$ ) aktiviert wurde und die wässrige Protein-Lösung eintrocknete.

Die Optimierung der Reinigungsprotokolle wurden mithilfe eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops (CLSM) „TCS“ (Leica GmbH, D) im Fluoreszenzmodus durchgeführt ( $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} > 515 \text{ nm}$ ). Aus praktischen Gründen wurde ein Standard- Filtersatz für den Farbstoff Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) verwendet. Aufgrund der nicht-identischen Absorptions- und Emissionscharakteristika von FITC und der fluorophoren Gruppe von r-GFP ( $\lambda_{\text{ext}} = 395 \text{ nm}$  bzw.  $\lambda_{\text{em}} = 509 \text{ nm}$ ) musste dabei ein Verlust an Signalintensität von etwa 75% in Kauf genommen werden. Zur Analyse der Oberflächenkontamination wurde die optimale



**Abb. 46:** Tertiärstruktur des Modellproteins recombinant Green Fluorescent Protein (r-GFP)

r-GFP-Konzentration über eine Konzentrationsreihe zu  $c_{\text{GFP}} = 500 \mu\text{g/ml}$  bestimmt. Als Referenzmessungen dienten Fluoreszenz-Aufnahmen der leeren Reaktionskammer bzw. Abschnitte mit unkontaminierter Oberfläche. Die Evaluierung der Protokolle erfolgte mithilfe weiterer Aufnahmen an denselben Positionen nach Kontamination mit r-GFP ( $V = 2 \mu\text{l}$ ) sowie im Anschluss an die Reinigung. Die r-GFP-Lösung beinhaltete  $c_{\text{GFP}} = 500 \mu\text{g/ml}$  gelöst in Tris HCL,  $c = 1 \text{ mol/l}$  und EDTA,  $c = 0,5 \text{ mol/l}$  bei  $\text{pH} = 8$ . Im Kontakt mit der aktivierten Oberfläche der Reaktionskammer spreitete die Lösung und bildete nach vollständigem Eintrocknen (ca. 60 min) in den Rändern eine stark fluoreszierende Kruste. Die Parameter des CLSM wurden zur Vergleichbarkeit der Messungen entsprechend eingestellt: ArKr-Laserspannung  $U = 765 \text{ V}$ , Pinhole-Öffnung 100, Objektiv „Planapo“ 20-fach mit  $\text{NA} = 0,7$  sowie Zoomfaktor 2,25.

Die starke Abhängigkeit der Kristallisation von der Anwesenheit an Fremdsubstanzen wurde als sensibles Kriterium zur qualitativen Beurteilung der Güte des Reinigungsprotokolls herangezogen. Zur Analyse der Praxistauglichkeit des Dekontaminationsverfahrens wurden mit dem Modellprotein Hen Egg-White Lysozym (HEWL) Kristallisationsexperimente durchgeführt. (s. Kap. 2.5.4, S. 80ff) Nach der Verunreinigung mit r-GFP wurde die Kristallogenese des Proteins vor und nach dem Reinigen begutachtet.

#### **2.5.4 Temperaturkontrollierte Proteinkristallisation in Mikroreaktoren**

Die Kristallisation von Modellproteinen stellt die letztlich entscheidende Charakterisierungsmethode des Mikroreaktor-Konzeptes dar. Die applikativen Arbeiten beschränkten sich auf die Validierung der temperaturkontrollierten Proteinkristallisation im Batch-Mikroreaktor. Voruntersuchungen ergaben, dass die Mikroreaktoren schwerpunktmäßig in folgenden Applikationsfeldern eingesetzt werden könnten:

- 1) Temperatur-Screening als ergänzende Methode bei der Parameter-Optimierung
- 2) Physiko-chemische Untersuchungen zur temperaturabhängigen Kristallgenese

### A) Temperaturprotokolle

Neben einer langzeitstabilen konstanten Temperatur können auch zyklische Temperaturprotokolle die Kristallqualität in anorganischen und biochemischen Systemen positiv beeinflussen. (Scholz 1967, Heinrichs 1992) (s. Kap. 1.1.1, S. 9) Dieses sog. „Enforced OSTWALD Ripening“ (EOR) wurde durch HEINRICHS *et al.* in die Proteinkristallisation eingeführt und bestätigte für HEWL die Erkenntnisse aus der anorganischen Kristallisation. Statt vieler kleiner Kristalle wuchsen lediglich einige wenige große. Trotz ihrer relativ großen Dimension von ca. 2,5 mm konnte keine Abnahme der Wachstumsrate beobachtet werden. Aufgrund der Flexibilität und der Spezifikationen der Mikroreaktoren lassen sich Temperaturprotokolle, wie sie das „Enforced OSTWALD Ripening“ vorschreibt, in einfacher Weise realisieren. (s. Abb. 55, S. 90) Es lag somit nahe, das Potenzial dieser Methode für die Proteinkristallisation in den Batch-Mikroreaktor zu überführen und so die Anwendbarkeit zu demonstrieren.

Zur Erstellung der Temperaturprotokolle wurde die Temperatur schrittweise ( $\Delta T = 1 \text{ K}$  nach  $t = 20 \text{ min}$ ) verringert, da ausschließlich Proteine mit nicht-retrogradem Kristallisationsverhalten untersucht wurden. Mithilfe eines Licht-Mikroskops „Axioskop II“ mit 20-fach vergrößerndem Objektiv wurde beobachtet (s. Kap. 2.5.3, S. 79), bei welcher Temperatur innerhalb der 20-minütigen Haltezeit Kristallite auftraten. Diese Temperatur wurde als die untere Zyklustemperatur oder Wachstumstemperatur  $\vartheta_{\text{Wachstum}}$  definiert. Die obere Zyklustemperatur entsprach dem Temperaturniveau, bei welchem sich die Kristallite aufzulösen begannen, also der Auflösungstemperatur  $\vartheta_{\text{Auflösung}}$ . Ein geeignetes Zeitregime wurde bestimmt, in dem die Proteinkristalle etwa 8 h lang bei einer Zykluszeit im Bereich von 10 ... 30 Minuten beobachtet wurden. Es ergaben sich zur ersten Näherung ausreichende Haltezeiten  $t_{\text{Halt}} \approx 5 \dots 10 \text{ min}$ . Die exakte Bestimmung der EOR-Parameter bedarf jedoch weiterer Studien. Im Falle konstanter Temperaturprotokolle wurde die Temperatur definiert als der Mittelwert aus  $\vartheta_{\text{Wachstum}}$  und  $\vartheta_{\text{Auflösung}}$ .

### B) Modellproteine

Für die Applikationsversuche in Mikroreaktoren bieten sich Modellproteine an. Diese kristallisieren unter entsprechenden Bedingungen reproduzierbar und innerhalb eines ökonomisch vertretbaren Zeitraums. Hen Egg-White Lysozyme (HEWL) (Abb. 47) kam in der Literatur häufig zu Evaluierung neuer Methoden zum Einsatz. (Chayen 2001, Strydnaka 1996, Steinrauf 1959) Die weite Verbreitung ermöglicht außerdem, die erzielten Ergebnisse in Grenzen miteinander zu vergleichen. HEWL

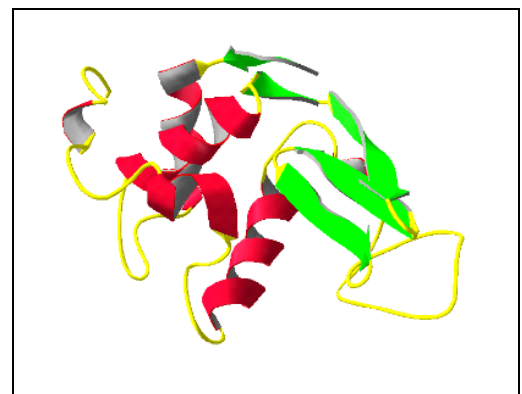


Abb. 47: Tertiärstruktur Modellprotein „Hen Egg-White Lysozyme“

bietet sich insbesondere zur Studie des Einflusses der Temperatur im Kristallisationsprozess an. Die Morphologie der Kristalle dieses Proteins hängt sowohl von der Zusammensetzung der Lösung als auch von der Temperatur ab. (Kurinov 1995, Jolles 1972, Schall 1996)

Humanes Insulin (Abb. 48) bzw. dessen Derivate dienen als Beispiel für ein therapeutisch interessantes Protein. (Owens 2001, Blundell 1971)

Obwohl es sich hierbei um kein neuartiges Protein handelt, so gestaltet sich dieser Wirkstoff aufgrund seines enormen Marktpotenzials noch heute als wirtschaftlich äußerst interessantes Forschungsobjekt. Am IMB, Jena wurde in der Abteilung Strukturbiologie seit Jahren an der Erforschung speziell derivatisierter Insuline gearbeitet.

(Mühlig 2001, 2003) Diese haben gegenüber konventionellen Insulinkristallen den Vorteil, dass sie durch ihre langsamere Auflösungskinetik dem Körper

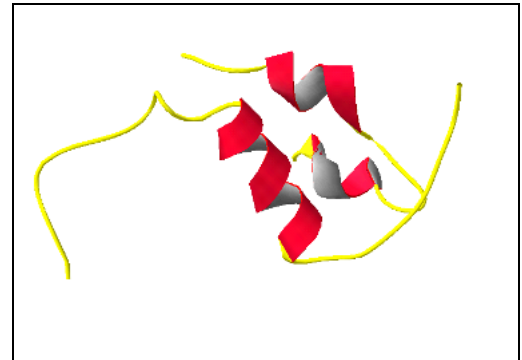


Abb. 48: Tertiärstruktur Modellprotein „human Insulin“

länger als Depot zur Verfügung stehen und damit eine deutlich verbesserte Pharmakokinetik besitzen. Es kamen das Derivat „human Insulin Glargine®“ und „DesThrB30 human Insulin“ zum Einsatz. Die Modellproteine selbst sowie ihre grundsätzlichen Kristallisationsbedingungen waren somit leicht verfügbar.

### C) Screening-Experimente

Der Screening-Prozess nach optimalen Kristallisationsbedingungen kann durch den Einsatz des Batch-Mikroreaktors um den Parameter Temperatur erweitert werden. Falls die Zusammensetzung der Lösung mit Standardmethoden, wie z.B. der Dampf-Diffusion „Hängender Tropfen“ (s. Kap. 1.1.1, S. 5), grundsätzlich eruiert wurde, ermöglicht der Batch-Mikroreaktor eine temperaturbasierte Optimierung der Kristalle. Durch die exakte Temperierbarkeit sollte es gelingen, die Wachstumsgeschwindigkeit beliebig zu variieren und u.U. umzukehren. Dies käme einem „Züchten“ von Proteinkristallen nahe.

Gegenstand der Untersuchungen war zunächst die direkte Übertragbarkeit von Kristallisationsbedingungen auf den Batch-Mikroreaktor. Als Referenzmethode wurde die Dampfdiffusionsmethode „Hängender Tropfen“ gewählt. Hierbei wurde HEWL in 3 verschiedenen Kristallmorphologien untersucht:

- tetragonale NaCl-Form ( $P4_32_12$ ) nach WEISS *et al.* (Weiss 2000)
- monokline  $\text{NaNO}_3$ -Form ( $P2_1$ ) nach VANEY *et al.* (Vaney 2001)
- orthorhombische NaCl-Form ( $P2_12_12_1$ ) nach SUKUMAR *et al.* (Sukumar 1999)

Die Zusammensetzung und Temperatur wurde der Literatur entnommen. Die Probenvorbereitung und die Kristallisationsvorschriften sind im Anhang G gelistet. Die Experimente im „Hängenden Tropfen“ wurden in Mikroplatten (Linbro Inc., USA) durchgeführt. Dabei wurden 24 Kombinationen bezüglich der Salzkonzentrationen (Präzipitanten, Hilfsstoffe) und des pH-Wertes angesetzt. Das Mischungsverhältnis zwischen Protein- und Präzipitantenlösung im Tropfen war 1:1. Die Platten

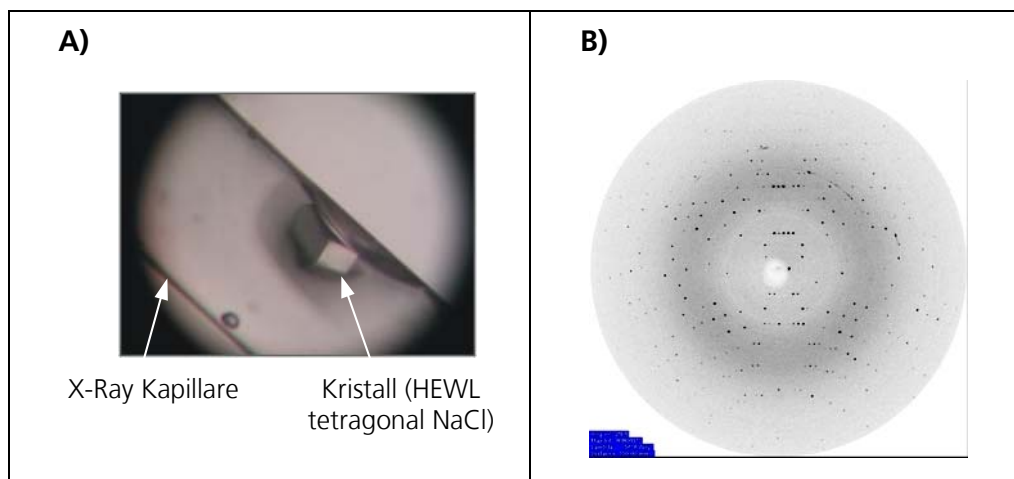
wurden bei  $\vartheta = 20^\circ\text{C} = \text{const}$  (klimatisierter Raum mit Temperiergenauigkeit  $\Delta T < \pm 1 \text{ K}$ ) aufbewahrt. Zur Vergleichbarkeit wurden die Lösungen für die Experimente im Batch-Mikroreaktor in demselben Verhältnis gemischt und in die Reaktionskammer pipettiert. Es kamen sowohl konstante als auch zyklische Temperaturprotokolle im Sinne des EOR zum Einsatz.

Zur qualitativen Beurteilung der Kristalle wurden folgende Kriterien analysiert:

- Anzahl der Kristalle
- Homogenität der Kristallgröße und –morphologie
- Beschaffenheit der Kristalloberfläche

Zur *in situ*-Analyse kamen sowohl ein Licht-Mikroskop mit 20-fach vergrößerndem Objektiv als auch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie z.T. mit 100-fach Objektiven zum Einsatz. (s. Kap. 2.5.3, S. 79) Zur Dokumentation der Kristalle diente eine CCD-Kamera „CoolPix 990“ (Nikon Inc., Japan).

Bei der quantitativen Untersuchung der Kristallqualität wurden erste **röntgenografische Messungen** durchgeführt. Bei diesem Verfahren werden die Kristalle in Glaskapillaren montiert und bestrahlt. (s. Abb. 49) Entsprechend mussten die Kristalle aus der Reaktionskammer und dem Hängenden Tropfen entnommen bzw. geerntet werden. Mithilfe einer dünnen Schleife Pt-Draht wurden Kristalle geeigneter Größe ( $\sim 200 \mu\text{m}$ ) aufgenommen und in die Kapillare transferiert. Die äußerst fragile und gallertartige Beschaffenheit der Analysate stellte erhöhte Anforderungen an deren manuelle Handhabung.



**Abb. 49:** Illustration zur Ermittlung von Beugungsdiagrammen **(B)** durch Röntgenstrukturanalyse von Proteinkristallen **(A)**:  
Bsp.: HEWL tetragonale NaCl-Form kristallisiert nach EOR

Zur Röntgenstrukturanalyse wurde die Kapillare auf dem Goniometer einer „mar-research desktop beamline“ (X-Ray Research GmbH, D) montiert. Die Bildplatte war in 150 mm Entfernung angeordnet. Die Parameter des Generators „Nonuis FR591“ (X-Ray Research GmbH, D) wurden folgendermaßen eingestellt: Leistung  $P = 3,8 \text{ kW}$  bei 40 kV und 95 mA, Wellenlänge  $\lambda = 0,154175 \text{ nm}$ , Blendenweite  $0,2 \times 0,2 \text{ mm}$ . Die Auswertung erfolgte mithilfe des Software-Pakets „HKL“ (X-

Ray Research GmbH, D). Hierbei wird eine Übereinstimmung zwischen den Messdaten und den 14 Bravais-Gitterstrukturen analysiert. Üblicherweise wird dann der Auswertung das Gittermodell zugrunde gelegt, welches den komplexesten Aufbau besitzt.

Da es nicht um die Strukturaufklärung als solche, sondern um die Beurteilung der Kristallqualität ging, wurden folgende Parameter betrachtet:

- R-Merge-Faktor: Regressionskoeffizient zur Charakterisierung der Übereinstimmung des ausgewählten Gittermodells mit den Messdaten der zu vergleichenden Kristalle
- Mosaizität: Qualität des Gitteraufbaus
- Auflösung: minimale zu detektierende Strukturabstände
- Signal-Rausch-Verhältnis: relative Intensität des Messsignals zum Hintergrundsignal

Da sich die Parameter gegenseitig beeinflussen, müssen diese bei der Charakterisierung der Kristallqualität im Zusammenhang analysiert werden.

#### D) Physiko-chemische Untersuchungen

Voraussetzung für den Einsatz des Batch-Mikroreaktors für physiko-chemische Studien war die Möglichkeit, unterschiedliche Wachstumscharakteristika *in situ* mittels hochauflösender Mikroskopie sichtbar zu machen. Im Rahmen der Applikationsexperimente wurden 2 Insulinderivate hinsichtlich ihres Wachstumsmechanismus untersucht. Die Zusammensetzung der Lösungen ist im Anhang G einzusehen. Zur Charakterisierung des Wachstumsmechanismus wurde konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie z.T. mit 100-fach Objektiven eingesetzt.

Das Modellprotein DesThrB30 human Insulin wurde außerdem hinsichtlich seiner Auflösungscharakteristik analysiert. Hierzu wurden verschiedene Temperaturprotokolle getestet und die potenzielle Verkleinerung der Kristalle verfolgt. Ziel dieser Untersuchungen war es, Rückschlüsse aus dem Auflösungsverhalten auf den Zustand der Kristalloberfläche zu schließen.

Ein weiterer Schwerpunkt physiko-chemischer Studien betraf die Ermittlung von Phasendiagrammen. (vgl. Kap. 1.1.1, S. 8f & Abb. 4, S. 8) Als Modellprotein diente hierbei HEWL in der tetragonalen NaCl-Form. Hierzu wurde die Längenänderung der größten Dimension  $L$  als Funktion der Zeit  $t$  aufgenommen. (s. Abb. 50) Hieraus wurde für verschiedene Temperaturen Wachstumsraten  $GR$  berechnet. Solange die Übersättigung klein ist, kann das Kristallwachstum als transportlimitiert angenähert werden. Im dynamischen Gleichgewicht findet kein Kristallwachstum mehr statt. Entsprechend wird hier die Wachstumsrate  $GR = 0$ . Für hinreichend kleine Differenzen der Temperatur zur Gleichgewichtstemperatur  $T^*$  kann eine lineare Abhängigkeit der Wachstumsrate  $GR$  von der

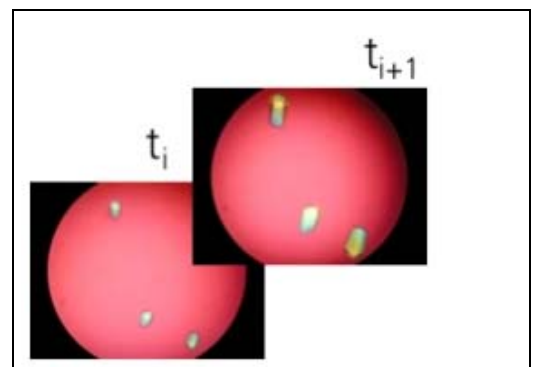


Abb. 50: *In situ*-Analyse der Kristallgröße bei Zeiten  $t_i$  zur Ermittlung der Wachstumsrate



Temperatur  $T$  angenommen werden, gemäß Gleichung G22.

$$GR \approx -C \cdot T, \quad \text{mit } C = \text{const}; \quad (\text{G22})$$

Die Extrapolation der aus allen Messdaten resultierenden Geraden auf  $GR = 0$  ergibt eine Temperatur  $T^*$ . Diese definiert dann einem Punkt auf der Liquidus- bzw. Soliduslinie im Phasendiagramm für die gegebenen Parametersatz.

Die *in situ*-Analyse der Wachstumsversuche wurde mithilfe eines Licht-Mikroskops mit 20-fach vergrößerndem Objektiv und einer CCD-Kamera „CoolPix 990“ (Nikon Inc., Japan) durchgeführt. Die Bildverarbeitung zur Vermessung der Kristalle erfolgte mit dem Softwarepaket „ImageJ“ (National Institute of Mental Health, USA). Die Wachstumsraten wurden bei je 4 verschiedenen konstanten Temperaturen im Intervall  $16^\circ\text{C} < \vartheta < 26^\circ\text{C}$  innerhalb von 60 min aufgenommen. Zu Beginn sowie zwischen den Wachstumsphasen kamen jeweils zyklische Temperaturprotokolle zum Einsatz:  $\vartheta_{\text{Wachstum}} = 19^\circ\text{C}$ ,  $\vartheta_{\text{Auflösung}} = 22^\circ\text{C}$ ,  $t_{\text{Halt}} = 5$  min. Die Aufzeichnung begann, sobald die Kristallite eine Größe  $L \approx 10 \dots 20 \mu\text{m}$  erreicht hatten. Die Messdaten wurden in 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 verschiedenen Kristallen generiert.

### 3 Entwicklung und Charakterisierung der Mikroreaktoren

Die Entwicklung der Mikroreaktoren zur *in situ*-Analyse der Kristallisation kleiner Mengen biologischer Makromoleküle wurde stufenweise realisiert. Hierbei konnte jeweils auf Vorhandenem aufgebaut werden. Im Falle des Batch-Mikroreaktors wurde ein Silizium-Chipreaktor zur DNA-Vervielfältigung gemäß den Spezifika der Proteinkristallisation modifiziert. Der Fluss-Mikroreaktor stellt die Erweiterung des Konzepts des Batch-Mikroreaktors für den kontinuierlichen Betrieb dar. Beide Systeme wurden hinsichtlich ihrer physikalischen und verfahrenstechnischen Eigenschaften charakterisiert. Hierbei stand die Temperatur als Hauptmerkmal beider Mikroreaktorsysteme im Mittelpunkt der Untersuchungen. Einen weiteren Schwerpunkt bei der Analyse des Fluss-Mikroreaktors bildete die Studie des fluidischen Verhaltens. Applikationsexperimente zur Kristallisation von Modellproteinen im Batch-Mikroreaktor dienten dem Funktionsnachweis sowie der Eruierung von Einsatzmöglichkeiten.

#### 3.1 Entwicklung des Batch-Mikroreaktors

Der folgende Abschnitt fokussiert auf die Entwicklung des Batch-Mikroreaktors. Dies beinhaltet die Mikrostrukturierung des Chipreaktors auf der Grundlage eines am IPHT entwickelten PCR-Chips sowie die Realisierung des Gesamtsystems. Dieses dient hauptsächlich der exakten und langzeitstabilen Temperierung von Proteinlösungen.

##### 3.1.1 Mikrostrukturierung – Weiterentwicklung des PCR-Chips

Das Konzept des PCR-Chipreaktors (*Poser 1997, Schneegaß 2001*) wurde hinsichtlich der Präparationstechnologie und der Temperierung auf der Grundlage von Pt-Dünnschichttransducern prinzipiell beibehalten. (Abb. 51)

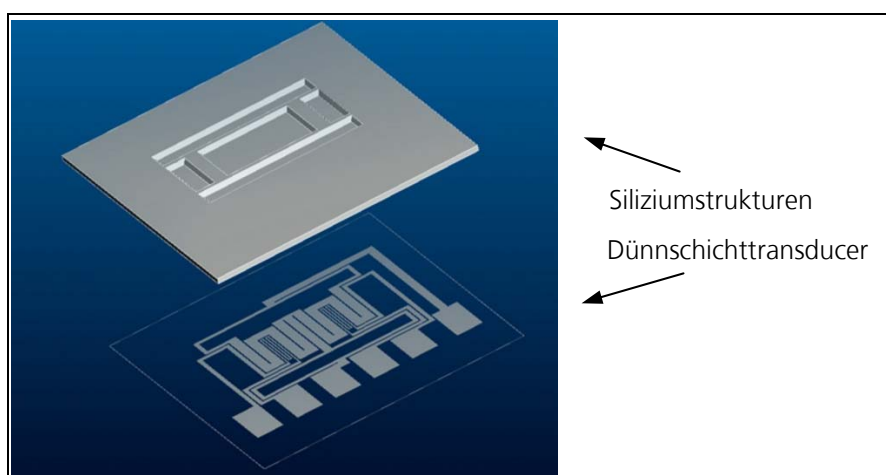


Abb. 51: Design Chipreaktor des Batch-Mikroreaktors

Die Präparation des Chipreaktors entspricht dem in Kapitel 2.2.1 (S. 34ff) skizzierten Prozessablauf. Im Anhang C2a) ist das gegenüber dem PCR-Chipreaktor vereinfachte Präparationsprotokoll für den Batch-Mikroreaktors einzusehen. Abbildung 52 illustriert den fertig präparierten Chipreaktor des

Batch-Mikroreaktors. Der Präparationsprozess konnte erheblich vereinfacht werden, indem die Thermo-Gaps dieselbe Tiefe erhielten wie die Reaktionskammer, also nicht durchgeätzte wurden. In Teilbild B) sind die Heizer und Sensoren zu erkennen.

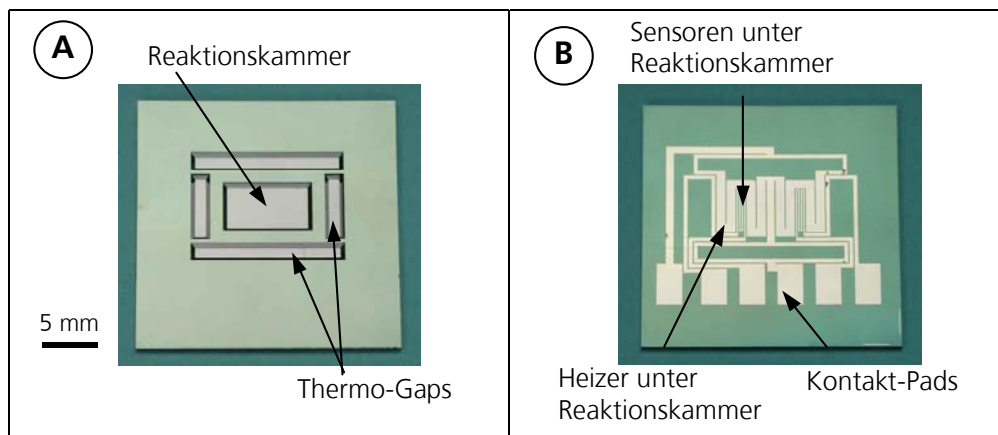


Abb. 52: Realisierung Chipreaktor des Batch-Mikroreaktors:  
**A)** Fluidseite; **B)** Sensorseite

Zur möglichst gleichmäßigen Temperierung im Bereich der Reaktionskammer zu erzielen, wurden die beiden Heizer bereits auf dem Chip parallel geschaltet. Die Abmaße der Chips ermöglichten die gleichzeitige Präparation von 12 Chipreaktoren pro Wafer.

### 3.1.2 Realisierung der Batch-Mikroreaktoren

#### A) Temperierung

Als Erweiterung gegenüber dem PCR-Chipreaktor wurde die Temperierung des Batch-Mikroreaktors durch ein aktives Kühlsystem als externe Komponente komplettiert. Die Realisierung der Temperaturregelung erfolgte in 3 Schritten:

1. Testaufbau unter Verwendung vorhandener Reglerkomponenten
2. vereinfachter Regleraufbau und stabile Temperierung auch um die Raumtemperatur
3. stand alone-Gerät als Vorstufe eines vermarktungsfähigen Produktes (s. Abb. 52)

Hieraus ergaben sich entsprechend 3 Reglerversionen, die sich hinsichtlich ihres Aufbaus und der Rechneransteuerung unterschieden:

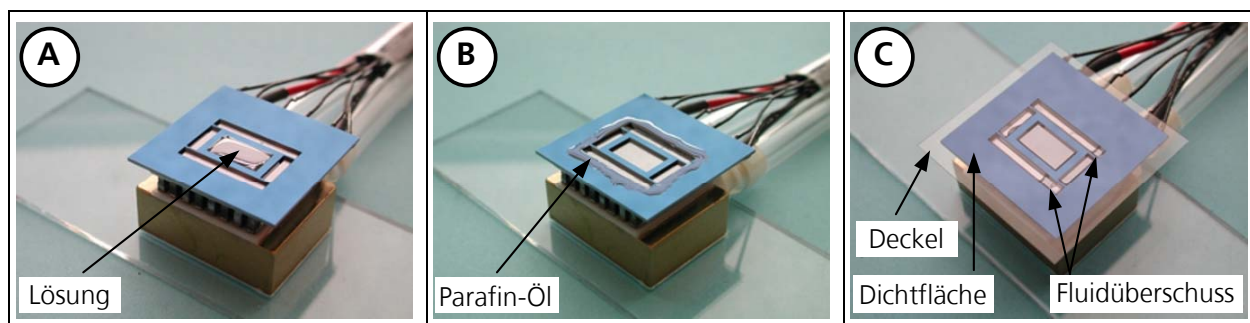
1. 2-Kreis-Regelung (Dünnschichtheizer + PELTIER-Element) mit PC-Steuerung
2. 1-Kreis-Regelung (PELTIER-Element) mit PC-Steuerung
3. 1-Kreis-Regelung (PELTIER-Element) mit Embedded PC-Steuerung

Die Version 1 musste verworfen werden, da mit diesem Hybrid Aufbau keine stabile Temperierung im Bereich der Raumtemperatur  $T_U \pm 0,5 \text{ K}$  erzielt wurde. In diesem Intervall beeinflussten sich die beiden Regelkreise zum Heizen (Dünnschichtheizer) bzw. Kühlen (PELTIER-Element) gegenseitig. Als möglicher Lösungsweg wurde das PELTIER-Element durch entsprechende Polung sowohl zum Kühlen als auch zum Heizen eingesetzt. Da die Zeitkonstante der Schaltung erheblich kleiner war als die thermische Relaxation des Chipreaktors, konnten in dieser Reglerversion 2 alle Temperaturen im geforderten Intervall stabil angefahren bzw. gehalten werden. Testexperimente zeigten, dass

gegenüber dem Hybridaufbau keine signifikanten Einbußen in der Dynamik und in der Genauigkeit bzw. Langzeitstabilität festzustellen waren. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde beim Batch-Mikroreaktor auf den Einsatz der Dünnschichtheizer verzichtet. Ein positiver Nebeneffekt bestand in der verbesserten Homogenität des lateralen Temperaturprofils in der Reaktionskammer. Dies wurde verursacht durch die größere wärmeübertragende Fläche des PELTIER-Elementes gegenüber den Dünnschichtheizern. (vgl. Kap. 3.4.4 C), S 122f) Durch den Ersatz der PC-Steuerung durch einen Embedded PC gelang es, die Temperierung als Stand-Alone-Gerät zu gestalten. Diese Version 3 hatte gegenüber den ersten beiden Versionen deutliche Kostenvorteile, da auf die permanente Bereitstellung eines Steuer-PCs verzichtet werden konnte. Die Temperaturprotokolle waren über Funktionstasten am Gerät einzugeben. Über eine RS232-Schnittstelle war es allerdings optional möglich, den vollen Funktionsumfang durch den temporären Anschluss z.B. eines Laptop-PCs zu nutzen.

## B) Deckelung

Die Deckelung des Batch-Mikroreaktors dient zum einen dem luftdichten und reversiblen Abschließen der Reaktionskammer für den Zeitraum des Kristallisationsexperimentes. Außerdem soll sie eine optischen *in situ*-Analyse der Vorgänge im Innern der Reaktionskammer ermöglichen. Schließlich war gefordert, dass der Deckelungsprozess für den Laboranwender in kurzer Zeit erlernbar ist. Der 3-stufige Ablauf ist in Abbildung 53 dokumentiert.



**Abb. 53:** Deckelung des Batch-Mikroreaktors: **A)** Reaktionskammer mit Lösung gefüllt; **B)** mit Parafin-Öl versehen; **C)** mit Glasdeckel und Ölfilm abgedichteter Mikroreaktor

Die Lösung wurde im Überschuss von etwa 10% des Kammervolumens zugegeben. Damit konnte der Einschluss von Luft beim Aufsetzen des Deckels vermieden werden. Die Thermo-Gaps dienen in dem Falle als Überlaufrinnen für den Fluidüberschuss. Das Parafin-Öl verhinderte zusätzlich, dass die Lösung über die Thermo-Gaps hinaus auf die Dichtfläche floss. Auch bei erhöhten Temperaturen  $\vartheta = 50^{\circ}\text{C}$  nach 20 Tagen waren noch keine Verdunstungserscheinungen in der Reaktionskammer festzustellen. Die Deckelung erfüllte demnach alle Anforderungen.

Das Deckglas hat durch seine geringe Dicke  $d = 150 \mu\text{m}$  eine schwach ausgeprägte isolierende Wirkung. In der Reaktionskammer sind entsprechend große vertikale Temperaturgradienten zu

erwarten. Der Einsatz dieses Materials war jedoch zwingend erforderlich, da es in seinen optischen Eigenschaften (Brechungsindex) auf hochauflösende Mikroskope, wie z.B. CLSM, abgestimmt ist. Zudem besitzen stark vergrößernde CLSM-Objektive (100-fach) eine maximale Fokustiefe in der Größenordnung von 0,5 mm. Eine dünne Deckelung lässt entsprechend mehr Raum zur Analyse der Objekte.

### C) Aufbau Gesamtsystem

Der Batch-Mikroreaktor setzte sich zusammen aus dem eigentlichen Mikroreaktor und dem Reglermodul zur Temperatursteuerung. Dies ist auf den Fotografien der Abbildung 54 dokumentiert. Der Aufbau des Gesamtsystems entspricht den schematischen Darstellungen in Abbildung 8a (S. 31).

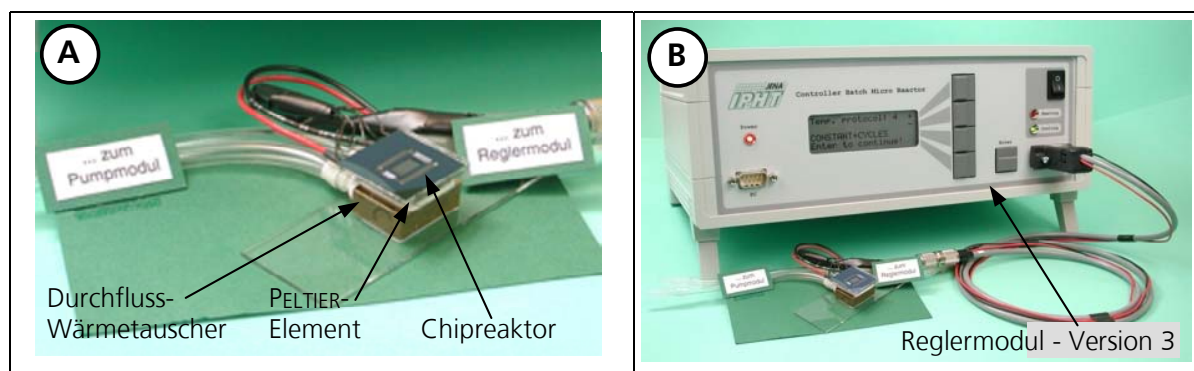


Abb. 54: Realisierung Batch-Mikroreaktor: **A)** Detailansicht Mikroreaktor; **B)** Gesamtansicht

Derartige Batch-Mikroreaktoren waren Gegenstand der Charakterisierungsexperimente (Kap. 3.2, S. 89ff). Sie dienten ferner als Versuchsplattform zur Evaluierung der Möglichkeiten bei der thermisch kontrollierten Proteinkristallisation (Kap. 3.5, S. 129ff).

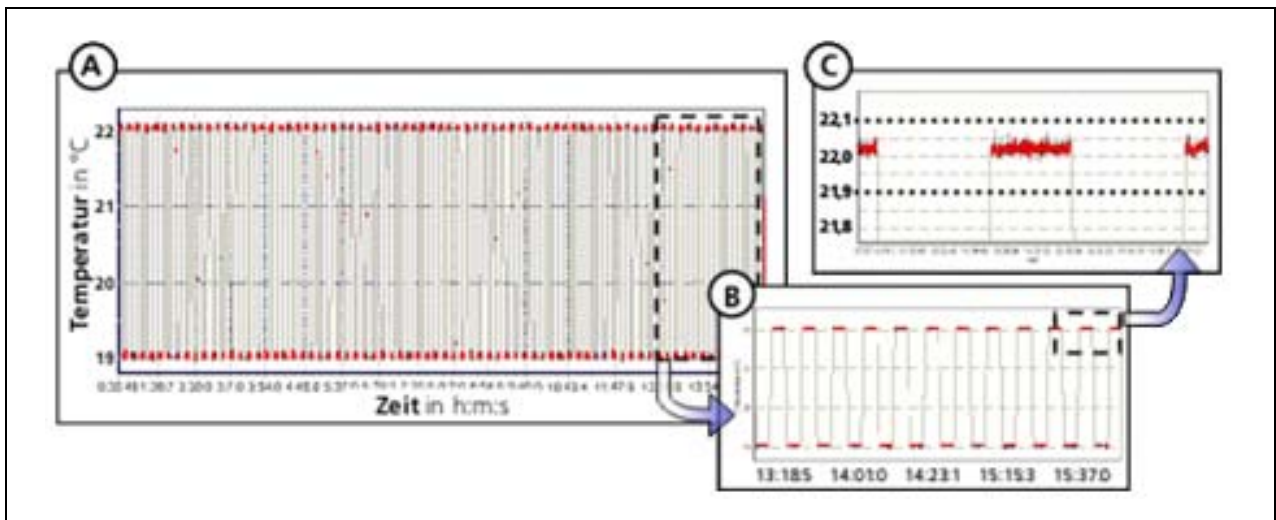
## 3.2 Charakterisierung des Batch-Mikroreaktors

### 3.2.1 Thermisches Verhalten

Die thermische Charakterisierung des Batch-Mikroreaktors beinhaltete die Charakterisierung der Langzeitstabilität und Genauigkeit der Temperaturregelung, die Beurteilung der Temperaturfelder in Form vertikaler und lateraler Temperaturdifferenzen im Chipreaktor sowie die Analyse dynamischer Parameter. Bei der Analyse wurden Messungen mithilfe eines Thermografiesystems (Wärmebild-Kamera) und Dünnschichtsensoren verglichen mit 3D-FEM-Rechnungen und analytischen 1D-Modellen.

#### A) Langzeitstabilität und Genauigkeit

Die Temperaturregelung des Batch-Mikroreaktors wurde mittels konstanter und zyklischer Temperierprotokolle getestet. Die Abweichung der Ist-Temperatur von der Solltemperatur (Präzision) im Falle von Messungen der konstanten Temperatur über mehrere Tage ( $t > 100$  h) betrug  $\Delta T < \pm 0,05$  K. Abweichungen vom Sollwert aufgrund von Kalibrierungsfehlern lagen im Bereich  $\Delta T < \pm 0,03$  K. Im Falle zyklischer Protokolle ergaben sich identische Werte bzgl. der Präzision. (s. Abb. 55)



**Abb. 55:** Genauigkeit und Langzeitstabilität der Temperierung des Batch-Mikroreaktors, hier: 1-Kreis-(Peltier-Element) embedded PC-Regelung  $\vartheta = 19^{\circ}\text{C} - 22^{\circ}\text{C}$   
**A)** Gesamtansicht – **B)** Detail I: Zyklen – **C)** Detail II: Toleranzintervall (gestrichelte Linien)

Die Reproduzierbarkeit der Temperierung wurde definiert als die Wiederholpräzision bei Rückkehr zum gleichen Temperaturniveau infolge von Rampen oder Sprüngen. Es zeigte sich, dass die Temperatur über die gesamte Messzeit hinweg ( $t > 24\text{ h}$ ) innerhalb des Toleranzintervalls  $\Delta T < \pm 0,1\text{ K}$  blieb. Es konnte keine signifikante Drift festgestellt werden. Voraussetzung hierfür war jedoch der Einsatz getemperter und sorgfältig kalibrierter Dünnschichttransducer (s. Kap. 2.3.1, S. 43ff). Die Anforderungen an die Funktionalität der Temperaturregelung waren damit erfüllt.

### **B) Thermografie und 3D-FEM-Simulation**

Zur gegenseitigen Validierung der 3D-FEM-Simulationen und der thermographischen Aufnahmen wurde die Reaktionskammer im Heiz- ( $\vartheta = 18^{\circ}\text{C}$ ) und Kühlmodus ( $\vartheta = 30^{\circ}\text{C}$ ) temperiert. Die Farbkodierung in Abbildung 56 (S. 91) illustriert die qualitative Übereinstimmung der lateralen Temperaturverteilung von Experiment und Simulation in der Reaktionskammer des Chipreaktors. Die Umrisse der Chipstrukturen sowie die mit Fluid gefüllten Bereiche des Chipreaktors sind im Wärmebild gut zu erkennen. Allerdings scheinen die Transducerstrukturen durch das Siliziumsubstrat durch. (vgl. Kap. 2.5.1 C, S. 65f) sowie Anhang E) Dies führte bei der visuellen Beurteilung der Temperaturfelder anfangs zu Missinterpretationen.

Die Grafik zeigt ferner, dass die Absolutwerte der Temperaturverteilung der beiden Methoden trotz korrekt eingestellter  $\varepsilon$ -Werte um  $\Delta T \approx 3\text{ K}$  voneinander abweichen. Zur Erklärung dieses Effektes wurden Vergleichsexperimente durchgeführt. Referenzmessungen mithilfe eines Schwarzen Strahler, einer Heizplatte sowie verschiedener Temperaturmessgeräte (Handpyrometer, Digitalthermometer, Pt100-Elemente) zeigten, dass die Diskrepanz auf die Wärmebild-Kamera zurückzuführen ist. Zur Messung auf Oberflächen, welche im betreffenden Wellenlängenbereich ausreichend transparent sind und stark reflektieren, wie z.B. Glasoberflächen, sind spezielle Filteraufsätze nötig. Diese eliminieren den Einfluss des Glases und ermöglichen damit Messungen auch im Temperaturintervall

$T < T_u \pm 15 \text{ K}$ . Es wurde somit gefolgert, dass die IR-Messungen mit dem vorliegenden Thermografiesystem keine quantitativen Messungen erlauben. Der Einsatz der Wärmebild-Kamera erfordert also neben der Ermittlung des Emissionskoeffizienten  $\varepsilon$  die Eichung der Temperaturskala mit berührungslosem Thermometer (z.B. Handpyrometer) oder die Korrelation mit Sensormessungen. Die Graphik B) in Abbildung 56 illustriert die qualitative Analyse der Temperaturfelder mittels 3D-FEM-Rechnungen (vgl. Abb. 28, S. 59).

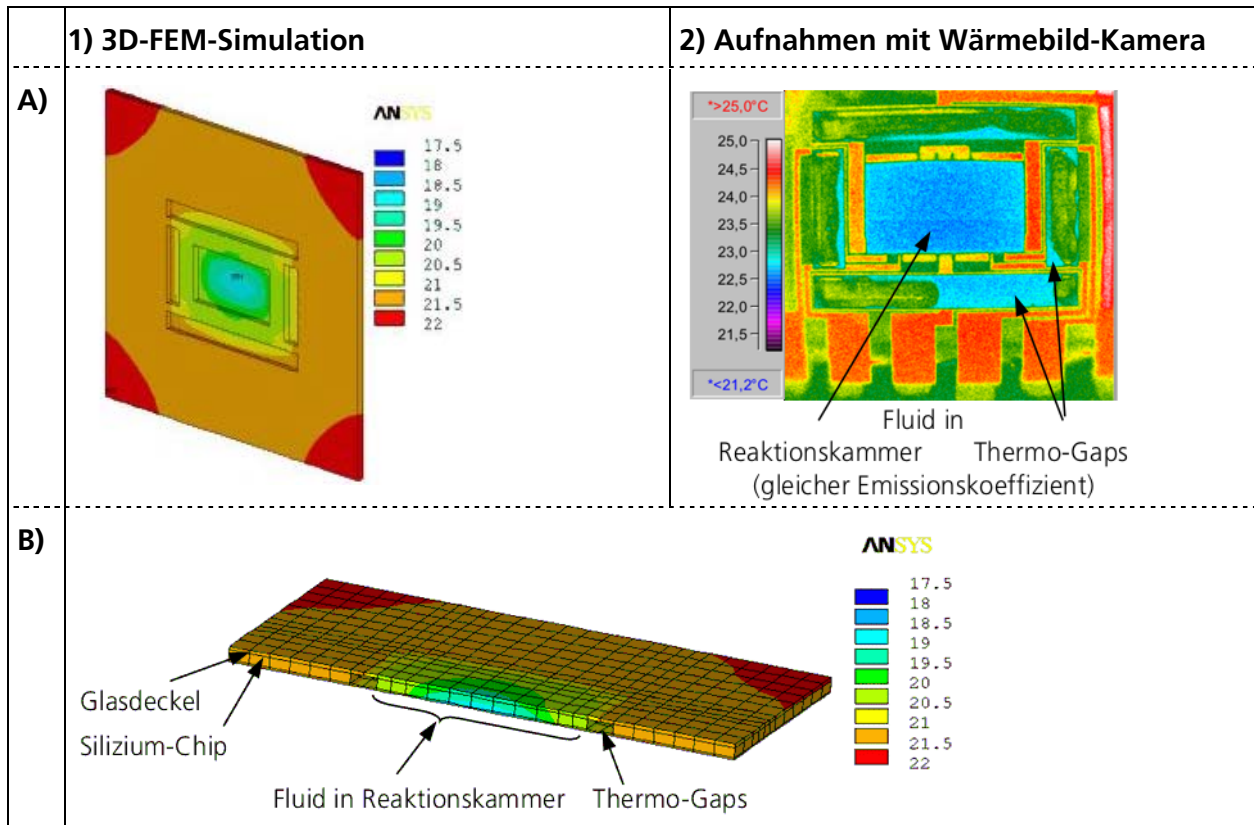


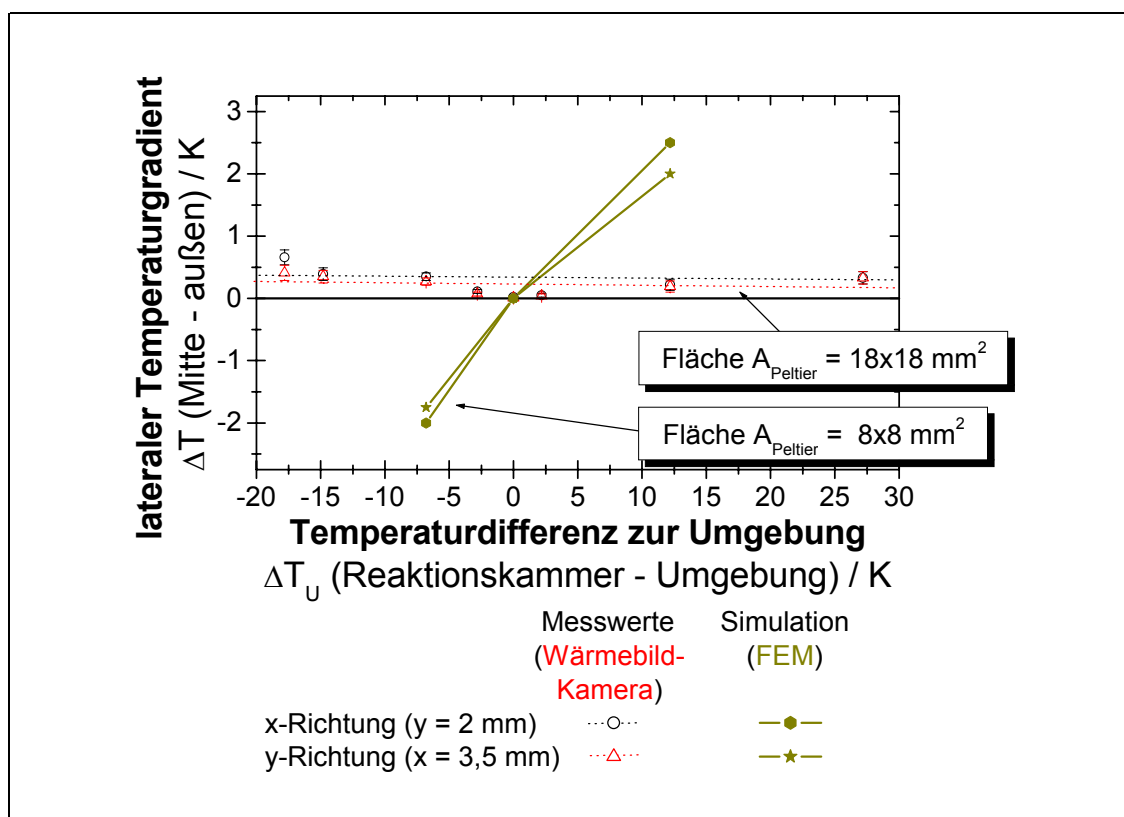
Abb. 56: **A)** Qualitative Übereinstimmung der 3D-FEM-Simulationen (**1**) mit den Messungen mithilfe der Wärmebild-Kamera (**2**): Einfluss der Geometrie des PELTIER-Elementes  
**B)** Schnitt durch FEM-Modell in Mitte der Reaktionskammer ( $y = 2 \text{ mm}$ )  
 Batch-Mikroreaktor temperiert mit Solltemperatur  $\vartheta_{\text{soll}} = 18^\circ\text{C}$

Beliebige Schnitte in den Grafiken ermöglichen den Zugang zu den Ergebnissen im Inneren des Modells. Die prinzipielle Übereinstimmung der Simulationen mit den Messungen erlauben grundsätzliche Vorhersagen über das thermische Verhalten des Batch-Mikroreaktors mithilfe 3D-FEM-Rechnungen. Die Qualität der Aussagen würde durch eine Adaption der Geometrie des Simulationsmodells an die realen Verhältnisse hinsichtlich der relativen Temperaturdifferenzen entsprechend erhöht werden.

### C) Laterale Temperaturprofile

Die Analyse der lateralen Temperaturdifferenzen in der Reaktionskammer des Chipreaktors wurde experimentell mithilfe des Thermografiesystems durchgeführt. (s. Abb. 57) Hinsichtlich der Quantifizierung bestand die Schwierigkeit, den Messpunkt am Rand der Reaktionskammer exakt zu

definieren. Die Lage dieses Punktes sowie die Auflösung der Kamera waren sensitive Parameter hinsichtlich des Messergebnisses. Es konnten dennoch tendenzielle Aussagen über das thermische Verhalten getroffen werden. Durch den Einfluss der Umgebung auf die Temperatur im Innern der Reaktionskammer wurde erwartet, dass die Messwerte Ursprungsgraphen mit positiver Steigung bilden. Allerdings verlaufen die Graphen für alle Temperaturdifferenzen  $\Delta T_U$  oberhalb der Nulllinie. (vgl. Abb. 57) Die Diskrepanz der experimentellen Resultate gegenüber dem physikalisch plausiblen Ergebnis wurde zurückgeführt auf die unzureichende Genauigkeit der thermografischen Messungen im analysierten Temperaturintervall in Verbindung mit dem Messobjekt sowie auf die Messmethodik. Trotz der nur relativ groben Quantifizierungsmöglichkeiten wurden die maximalen lateralen Temperaturdifferenzen größenordnungsmäßig abgeschätzt. Für das Temperaturintervall  $\Delta T_U < \pm 15$  K ergab sich  $\Delta T_{\text{lat}} < 1$  K.



**Abb. 57:** Laterale Temperaturdifferenz  $\Delta T_{\text{lat}}$  des Batch-Mikroreaktors in der Reaktionskammer (Mitte – Rand) in x- und y-Richtung als Funktion der Temperaturdifferenz zur Umgebung  $\Delta T_U$  und des PELTIER-Elements: Vergleich Messwerte Wärmebild-Kamera mit den CFD-Simulationen

Die FEM-Simulationen liefern deutlich höhere laterale Temperaturdifferenzen als die thermografischen Messungen, wie in Abbildung 57 zu sehen ist. Die Rechnungen basierten auf früheren Simulationen zum PCR-Chip. Sie dienten lediglich einer ersten Abschätzung zur Überprüfung der Plausibilität der Messungen. Um den Aufwand im Vorfeld der Simulation gering zu halten, wurde das Modell nur hinsichtlich leicht modifizierbarer Parameter angepasst. Folglich blieb die wärmeübertragende Heiz- bzw. Kühlfläche auf die lateralen Abmaße der Reaktionskammer



beschränkt. Die tatsächliche Größe des PELTIER-Elements ist jedoch um etwa 40% größer. (s. Kap. 2.5.1 B, S. 58f) Damit ist anschaulich klar, dass die thermischen Gradienten in der Reaktionskammer größer sein müssen als die experimentell ermittelten Werte. Dieser Befund lässt vermuten, dass die Geometrie der wärmeübertragenden Fläche als wesentlicher Parameter in laterale Temperaturgradienten eingeht. Die Übertragung des FEM-Modells des PCR-Chips auf den Batch-Mikroreaktor ist demnach aufgrund der fehlenden geometrischen Modifikationen nur sehr eingeschränkt möglich.

#### D) Vertikale Temperaturprofile

Zur Ermittlung der vertikalen Temperaturdifferenzen im Fluid vom Boden zum Deckel der Reaktionskammer kamen sowohl Messungen mithilfe des Thermografiesystems als auch Sensormessungen zum Einsatz. Die Kurven verlaufen in allen Fällen gemäß den Erwartungen als Ursprungsgerade mit positiver Steigung. (Abb. 58)

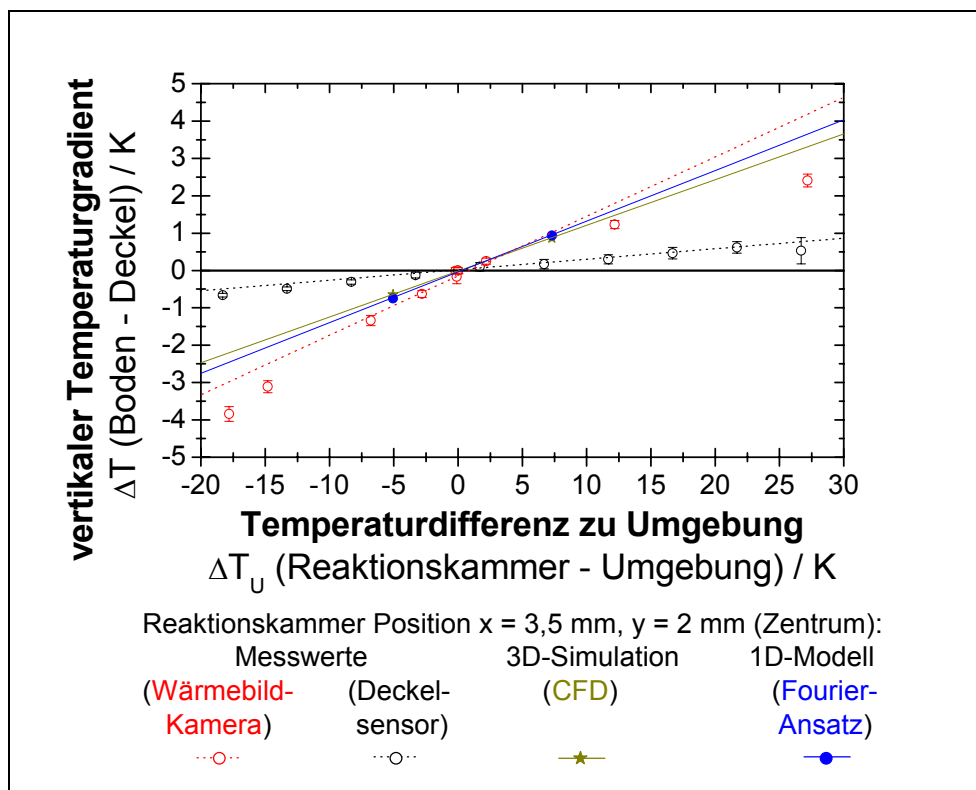


Abb. 58: Vertikale Temperaturdifferenz  $\Delta T_{\text{vert}}$  in der Reaktionskammer des Batch-Mikroreaktors (Boden – Deckel) als Funktion der Temperaturdifferenz zur Umgebung  $\Delta T_U$  – Vergleich Messwerte Wärmebild-Kamera mit den FEM-Simulationen

Die Sensoren detektierten Werte für  $\Delta T_{\text{vert}} < 0,5 \text{ K}$  im Temperaturintervall  $\Delta T_U < \pm 15 \text{ K}$ . Die Wärmebild-Aufnahmen überschätzen den vertikalen Gradienten im Fluid um etwa einen Faktor 7. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass das detektierte Mischbild durch Anteile des Glasdeckels von der Umgebung beeinflusst ist. (vgl. Kap. 2.5.1 C, S. 63f) Im Gegensatz zur Ermittlung der lateralen Temperaturdifferenzen geht dieser Fehler absolut in das Ergebnis ein, da die Temperatur am Boden

der Reaktionskammer vom Chipsensor geliefert wurde. Da die Messwerte auf unterschiedlichen Messprinzipien beruhen, werden die systematischen Abweichungen der thermografischen Messungen durch die Differenzbildung nicht egalisiert.

Die über die 3D-FEM-Simulationen berechneten vertikale Temperaturdifferenzen besaßen etwa 5-fach höhere Werte als die mit den Sensoren gemessenen. Der Vergleich mit dem analytischen 1D-Modell nach FOURIER (s. Gleichung G8, S. 56) diente hierbei zur Validierung der Simulation. Eine Variantenstudie verschiedener Parameter ergab, dass der Wärmeübergangskoeffizient  $\alpha_{\text{Glas} \rightarrow \text{Luft}}$  die weitaus sensitivste Größe war. Der relative Anteil des Wärmeübergangswiderstandes  $1/\alpha_i$  am Gesamtwiderstand lag für Werte  $\alpha_{\text{Glas} \rightarrow \text{Luft}} < 150 \text{ W}/(\text{m}^2 \text{ K})$  über 90%. Wie zu erwarten war, fand sich die beste Übereinstimmung zwischen Modell und Simulation für  $\alpha_{\text{Glas} \rightarrow \text{Luft}} = 100 \text{ W}/(\text{m}^2 \text{ K})$ , da die Simulationsrechnungen mit diesem Wert durchgeführt worden sind. Dieser Richtwert wurde auf Grundlage der Erkenntnisse früherer FEM-Berechnungen in thermischen Mikrosystemen (IR-Strahlungssensoren) abgeschätzt. (Müller 1998, Dillner 1995) Allerdings unterscheidet er sich von tabellierten Werte für polierte Flächen bzw. Glasscheiben im Makromaßstab, welche für geschlossene Räume im Bereich von  $5 < \alpha / \text{W}/(\text{m}^2 \text{ K}) < 15$  liegen. (Schlünder 1988, 1995, Kuchling 1991b) Ein hoher Wärmeübergangskoeffizient von Glas zur Umgebung führt zu großen vertikalen Temperaturdifferenzen im Fluid. Dies korrespondiert qualitativ mit den Resultaten aus den Simulationen. Es lässt sich vermuten, dass für das vorliegende Mikrosystem für  $\alpha_{\text{Glas} \rightarrow \text{Luft}}$  niedrigere Werte anzusetzen wären. Im Rahmen der Studie des Batch-Mikroreaktors wurden jedoch keine weiteren Optimierungen des FEM-Modells durchgeführt.

#### D) Dynamische Parameter

Zur Charakterisierung des dynamischen Verhaltens der Mikroreaktoren wurden zum einen die Temperierrate des PELTIER-Elementes  $dT/dt$ , ferner die Einschwingzeit des Reglers  $t_{95}$  sowie die thermische Relaxationszeit des Fluids (Deckel  $\rightarrow$  Boden)  $\tau_{\text{therm}}$  analysiert. Die Parameter wurden anhand der Aufzeichnungen des Sprungsignals nach thermischen Störungen ermittelt. Die Antwortkurven auf sprunghafte thermische Störungen besaßen erwartungsgemäß sämtlich sigmoidale Gestalt. Das dynamische Verhalten entspricht demnach qualitativ dem Modell eines RC-Glieds 2. oder höherer Ordnung. Es zeigte sich ferner, dass die Temperierraten weitgehend unabhängig vom Temperaturniveau und von der Höhe des Temperatursprungs waren. Die Heizrate betrug  $(dT/dt)_{\text{Heizen}} \approx 5 \text{ K/s}$ , die Kühlrate  $(dT/dt)_{\text{Kühlen}} \approx -3 \text{ K/s}$ . (s. Tabelle 5, S. 95)

Das Verhältnis der beiden Temperierraten spiegelt die Reglereinstellungen wider. Zugunsten einer stabilen Regelung wurde die Kühlleistung reduziert und damit eine geringere Dynamik in Kauf genommen. Die Einschwingzeit des Reglers bis zum Erreichen (95%) des stationären Endtemperatur wurde für beide Temperiermodi zu  $t_{95} \approx 4,5 \text{ s}$  bestimmt. Äquivalent wurde die Einschwingzeit für das Fluid mithilfe Sensoren am Deckel gemessen. Hieraus wurde die thermische Relaxation zur thermischen Äquilibration des Fluids in der Reaktionskammer  $\tau_{\text{therm}} \approx 1,6 \text{ s}$  ermittelt. Auch dieser Parameter zeigte keine Abhängigkeit von Temperierniveau und Temperiermodus. Dies entspricht den

Erwartungen, da  $\tau_{\text{therm}}$  nur durch Geometrie- und Materialparameter bestimmt wird. Dieser experimentell bestimmte Wert stimmt sehr gut mit dem analytisch berechneten Wert  $\tau_{\text{therm}}$  (Modell) = 1,4 s überein. (vgl. Gleichung G6, S 56 und Anhang D2a) Dies ergibt eine relative Abweichung  $\Delta\tau_{\text{therm}} / \tau_{\text{therm}} \approx 15\%$  ( $1 \pm 40\%$ ).

**Tabelle 5:** Ergebnistabelle der dynamischen Parameter des Batch-Mikroreaktors Heizen und Kühlen: Temperierrate des PELTIER-Elements dT/dt; Einschwingzeit des Reglers  $t_{95}$  und thermische Relaxationszeit des Fluids (Deckel → Boden)  $\tau_{\text{therm}}$

|  |     | Heizen     |            | Kühlen     |           |
|--|-----|------------|------------|------------|-----------|
|  |     | Mittelwert | Std.-Abw.* | Mittelwert | Std.-Abw. |
| <b>Temperierrate dT/dt</b><br>(PELTIER-Element)  | K/s | 5,18       | 1,36       | -3,29      | 0,70      |
| <b>Einschwingzeit <math>t_{95}</math></b><br>(Regler)  | s   | 4,56       | 0,57       | 4,47       | 0,71      |
| <b>thermische Relaxationszeit <math>\tau_{\text{therm}}</math></b><br>(Fluid in Reaktionskammer) | s   | 1,75       | 0,62       | 1,58       | 0,48      |

\*Std.-Abw.: Standard-Abweichung

Die Gesamteinschwingzeit des Batch-Mikroreaktors beträgt demnach  $t_{95, \text{gesamt}}$  (Heizen)  $\approx t_{95, \text{gesamt}}$  (Kühlen) < 6 s. Der Einfluss des Si-Chips auf die dynamischen Parameter ist vernachlässigbar, da das Verhältnis der Temperaturleitfähigkeiten  $\kappa$  von Silizium und Wasser  $\kappa_{\text{Silizium}} / \kappa_{\text{Wasser}} \approx 700$  (s. Kap. 2.1, S. 29) beträgt. Aus den Messungen ist zu entnehmen, dass  $t_{95} \approx 3 \tau_{\text{therm}}$ . Das bedeutet, dass die thermische Einschwingzeit des Gesamtsystems von der Einschwingzeit des Reglers dominiert wird. Dies wiederum ist durch die Leistung und die Einstellung der PID-Parameter des Reglers bestimmt und ist in Grenzen zu modifizieren. Bezüglich des thermischen Verhaltens des Batch-Mikroreaktors lässt sich zusammenfassen, dass die dynamischen Parameter wie auch die Anforderungen an Homogenität und Langzeitstabilität der Temperaturfelder innerhalb der spezifizierten Intervalle liegen. (vgl. Kap. 1.2, S. 27)

### 3.2.2 Reinigungsprozedur

Das optimierte Reinigungsprotokoll zur vollständigen Regeneration der Oberfläche des Chipreaktors bestand aus folgenden Teilschritten:

1. 20  $\mu\text{l}$  Na-Acetat, 0,05 mol/l
2. 20  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O, bidest.
3. 20  $\mu\text{l}$  10% Natrium-dodecyl-sulfat-Lösung (SDS)
4. 20  $\mu\text{l}$  5% SDS
5. 20  $\mu\text{l}$  1% SDS
6. 5x 20  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O, bidest.
7. 2 x 15  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O, AFM-Qualität

Hierbei diene Schritt 1 der Zerstörung der Tertiärstruktur der Proteine und deren Spaltung in Peptidfragmente. Durch die anschließenden Spülschritte unter Verwendung der oberflächenaktiven

Substanz SDS werden die Verunreinigungen allmählich gewaschen. Dieser Vorgang kann durch mehrmaliges Aufsaugen und Dispensieren mit einer Handpipette intensiviert werden.

Die Güte des Protokolls wurde mithilfe von CLSM-Fluoreszenzuntersuchungen an einer starken Verunreinigung in Form von verkrustetem r-GFP als Modellprotein demonstriert. (Abb. 59)

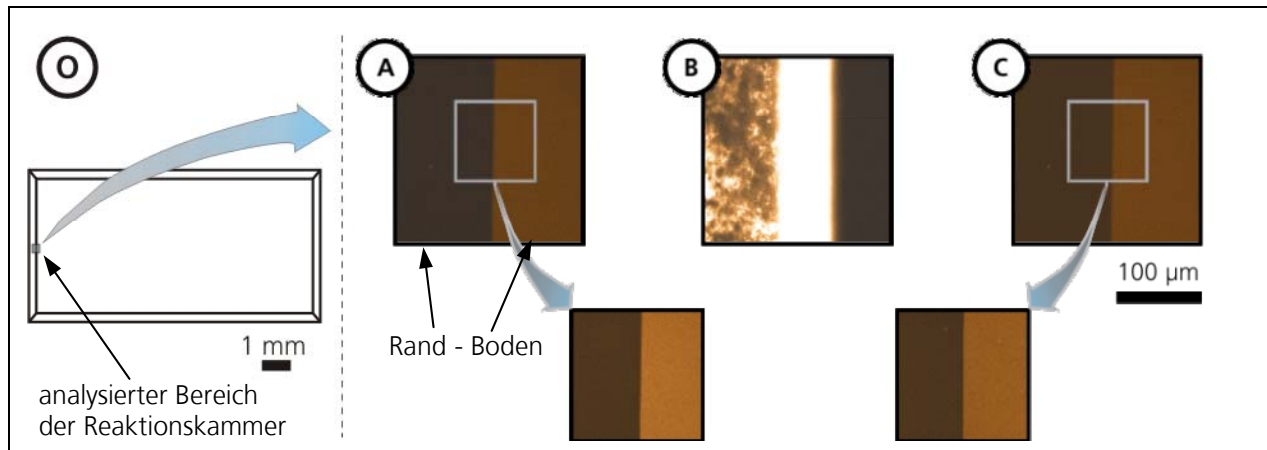


Abb. 59: Reinigung des mit r-GFP kontaminierten Batch-Mikroreaktors:

- O)** Messbereich in Reaktionskammer; **A)** vor Kontamination; **B)** Kontamination mit r-GFP;
  - C)** nach Regeneration mit optimiertem Reinigungsprotokoll
- Detailvergrößerungen: Laserspannung  $U = 1 \text{ kV}$

Die Fluoreszenzaufnahme der kontaminierten Oberfläche (Abb. 59B) zeigt deutlich die starke Verschmutzung im Bereich des Kammerrandes. Trotz der Wechselwirkung des hydrophilen Proteins mit der aktivierten Si-Oberfläche und der starken Verkrustung insbesondere im Randbereich der Reaktionskammer konnte die Oberfläche regeneriert werden. Das schwache Signal in Abb. 59A) und C) vor der Kontamination bzw. nach dem Reinigen rührt von der Restfluoreszenz des Immersionsöls her. Auch durch Verstärkung der Laserspannung auf  $U_{\text{max}} = 1 \text{ kV}$  (Detailvergrößerungen) konnte keine Fluoreszenz der r-GFP-Moleküle detektiert werden. Eine visuelle Beurteilung ergab, dass der spiegelnde Zustand einer unkontaminierten Si-Oberfläche vollständig wiederhergestellt wurde.

Kristallisationsexperimente zeigten, dass es in der kontaminierten Reaktionskammer erwartungsgemäß zu keiner Kristallisation kam. (s. Kap. 3.5, S. 129ff) Die Anwendung des Reinigungsprotokolls bewirkt, dass es zu keinerlei Beeinträchtigung der Kristallogeneese des HEWL kam. Das Protokoll wurde damit als praxistauglich eingestuft.

### 3.3 Entwicklung des Fluss-Mikroreaktors

Die thermische und fluidische Kontrolle bilden die Hauptmerkmale des Fluss-Mikroreaktors. Hierzu wurde das Konzept des Batch-Mikroreaktors erweitert. Dies bedingte Modifikationen bei der Präparation des Chipreaktors sowie beim Aufbau des Gesamtsystems durch die Integration einer aufwändigen fluidischen und thermischen Peripherie.

### 3.3.1 Mikrostrukturierung – Weiterentwicklung des Batch-Mikroreaktors

#### A) Design der Mikrofluidstrukturen

Zur Realisierung eines kontinuierlichen Fließbetriebes galt es, auf dem Chipreaktor Mikrofluidstrukturen als Zu- bzw. Ablauf der Reaktionskammer zu integrieren. Es wurden sowohl Mikrofluidkanäle zum Transport der Lösung zur Reaktionskammer entwickelt, als auch fluidische Bifurkationen. Dies diente dazu, ein homogenes Ein- und Ausströmverhalten in der Reaktionskammer zu erzielen. (s. Abb. 9, S. 32) Zur Realisierung der tiefengeätzten fluidischen Strukturen war zunächst eine geeignete Präparationstechnologie aufzubauen. Eine Kombination aus anisotroper und isotroper Si-Tiefenätztechnik bildete schließlich das 2-stufige Verfahren, um verrundete Strukturen gemäß den Anforderungen zu herzustellen. In der ersten Stufe wurde in Analogie zum Batch-Mikroreaktor die Reaktionskammer mittels TMAH anisotrop bis zu einer Tiefe  $t = 240 \mu\text{m}$  geätzt. Die Präparation der Mikrofluidkanäle sowie die Verrundung und Vertiefung der Reaktionskammer erfolgte in der zweiten isotropen Ätzstufe ( $t = 100 \mu\text{m}$ ). Hierbei bewährte sich eine photolithografisch strukturierte NiCr-Schicht als Ätzmaske. Die REM-Aufnahmen der runden Fluidstrukturen im Übergangsbereich Mikrofluidkanäle - Reaktionskammer illustrieren qualitativ die Funktionalität und Güte des Ätzverfahrens. (Abb. 60) Somit stand ein technologischer Baukasten zur Verfügung, um die fluidischen und thermischen Anforderungen in ein geeignetes Chipdesign umsetzen zu können.

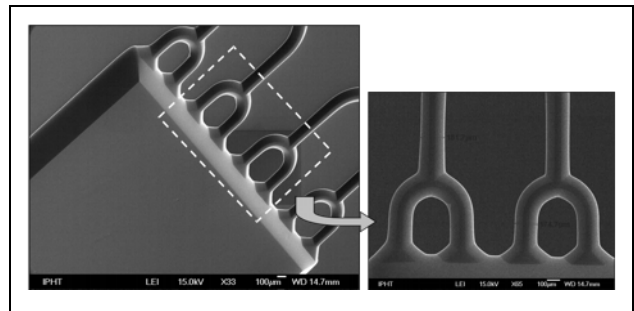
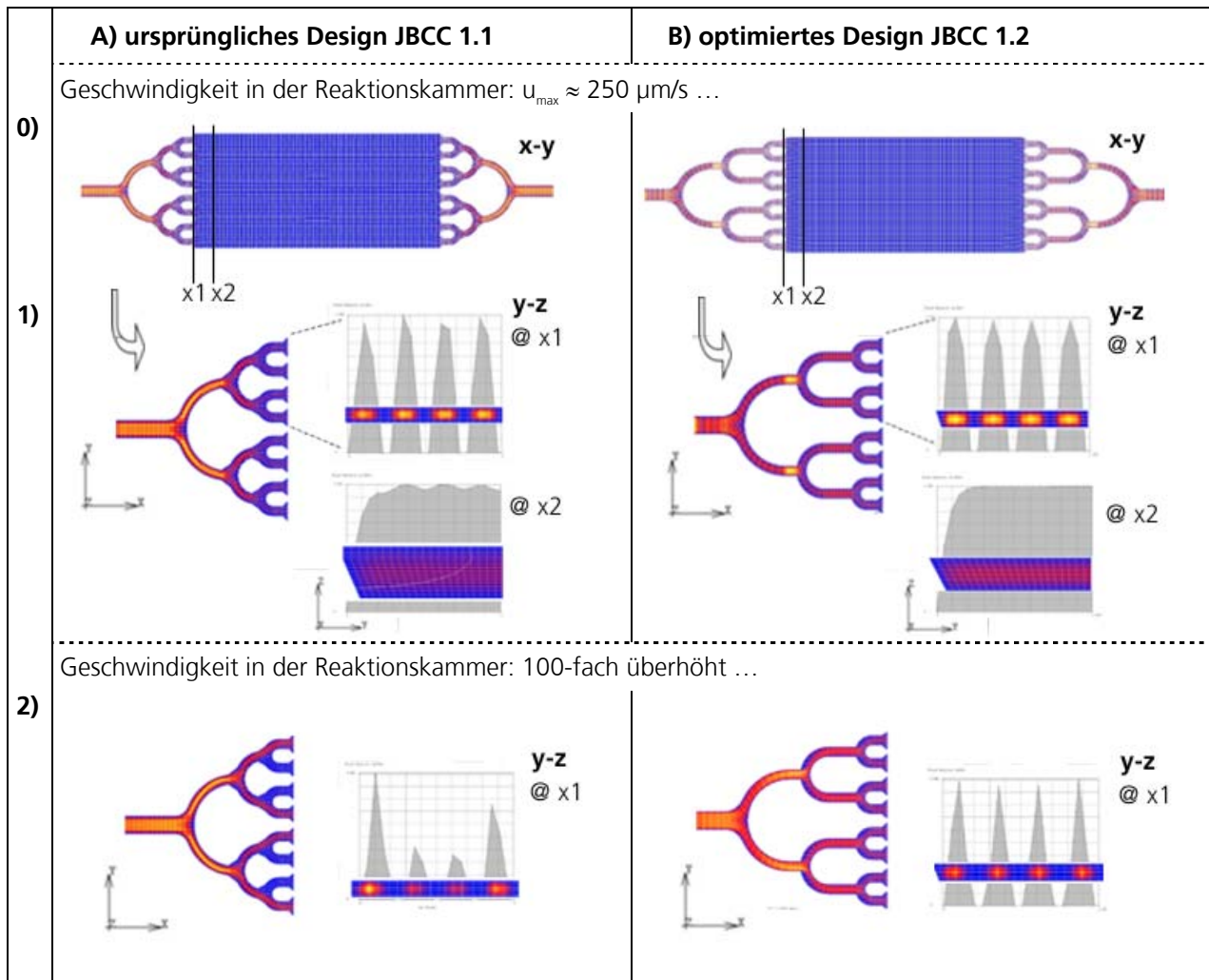


Abb. 60: Güte der Ätztechnologie Präparation des Chipreaktors im Bereich der Bifurkationen (Fluss-Mikroreaktor)

Aus Gründen der Ressourcenschonung wurde die Optimierung der Geometrie der fluidischen Bifurkation des Chipreaktors mithilfe CFD-Simulationen durchgeführt. Bei der applikativ interessanten maximalen Geschwindigkeit  $u_{\text{max}} \approx 250 \mu\text{l/min}$  in der Reaktionskammer zeigte das ursprüngliche Design „JBCC 1.1“ ein unregelmäßiges Strömungsfeld.

Die y-z-Schnitte machen deutlich, dass selbst etwa 1 mm nach Eintritt in die Kammer (Position x2) eine relativ starke Welligkeit im Geschwindigkeitsprofil vorherrschte. (s. Abb. 61 A1, S. 98) Um die Ursache für diese Strömungsverhältnisse zu ergründen, wurde eine weitere Simulation bei 100-facher Flussrate angefertigt. Die Grafik in Abbildung 61 A2 illustriert die stark unsymmetrische Strömung, verursacht durch die Bifurkationsstufe 2 und 3. Dies ist sowohl in der Draufsicht (x-y) als auch im y-z-Schnitt an der unregelmäßigen Farbverteilung in den einzelnen Fluidkanälen gut zu erkennen. Die Krümmung in der Bifurkation hat zur Folge, dass der Hauptimpuls der Strömung nicht senkrecht auf die Gabelung der nächsten Stufe zeigt. Entsprechend strömt der Großteil des Fluids im äußeren Teil der Verteilerstruktur. Dies resultiert schließlich in einem asymmetrischen Strömungsfeld in der Reaktionskammer.



**Abb. 61:** CFD-Simulation des Strömungsprofil in der Reaktionskammer des Fluss-Mikroreaktors bei verschiedenen fluidischen Verteilerstruktur (Bifurkation)

**A)** ursprüngliches Design „JBCC 1.1“ – **B)** optimiertes Design „JBCC 1.2“

**0)** Gesamtansicht  $u_{\max} \approx 250 \mu\text{m/s}$  – **1)** Detail  $u_{\max} \approx 250 \mu\text{m/s}$ : y-z-Schnitt bei x1 und x2

**2)** Detail  $u_{\max} \approx 25 \text{ mm/s}$ : y-z-Schnitt bei x1

Farbkodierung „gelb → rot → blau“ – Geschwindigkeit „schnell → mittel → langsam“

Konsequenterweise wurde die Bifurkation in einer Designvariante „JBCC 1.2“ gestreckt: das Verhältnis von Länge des geraden Anteils zu Radius der Krümmung wurde entsprechend vergrößert von  $l/r$  („JBCC 1.1“) =  $3/2$  auf  $l/r$  („JBCC 1.2“) =  $3$ . Der Einbau dieser Beruhigungsstrecken führte selbst bei der stark überhöhter Flussrate zu einer relativ symmetrischen Strömung durch die Struktur, wie die Grafiken in Abbildung 61 B2 wiedergeben. Eine Verkleinerung auf  $u_{\max} \approx 250 \mu\text{l/min}$  schließlich zeigte keinerlei Unregelmäßigkeiten in der Geschwindigkeitsverteilung. (s. Abb. 61 B1) Bereits nach  $0,5 \text{ mm}$  (Position x2) wies die Strömung keine Asymmetrie oder Welligkeit mehr auf. Die Schwankungen des Geschwindigkeitsprofils im Anschluss an den Einlaufbereich der Reaktionskammer (Position x2) sind von  $\Delta u/u < 1,5\%$  auf  $\Delta u/u < 0,5\%$  gesunken (vgl. graue Graphen in Abbildung 61 A1 und B1).

Aus diesen Erkenntnissen heraus wurde das fluidische Design des Chipreaktors für den Fluss-Mikroreaktor auf die Variante „JBCC 1.2“ festgelegt. (Abb. 62)

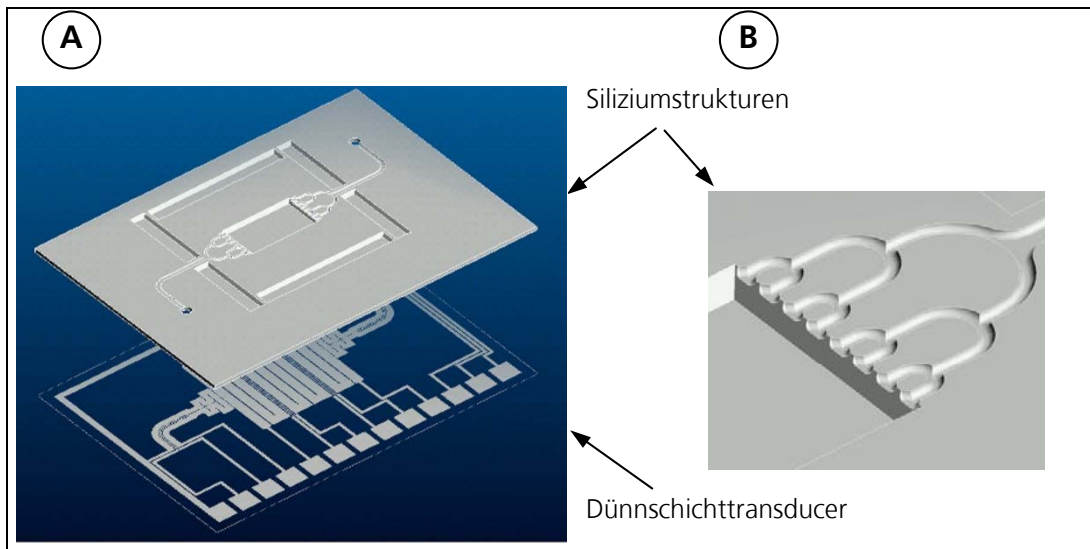


Abb. 62: Design Chipreaktor des Fluss-Mikroreaktors: optimiertes Design der Bifurkations- und Transducerstrukturen, JBCC 1.2

**A)** Explosionsdarstellung Siliziumstruktur und Dünnschichttransducer

**B)** Detail fluidische Bifurkation

Die Überlegungen, welche zum Design der Dünnschichtstrukturen führten, werden in den Kapiteln 3.3.2 (S. 100ff) und 3.4.4 C (s. 122ff) besprochen. Das Protokoll zur Präparation der Chipreaktoren ist im Anhang C2b) hinterlegt. Die Fotografien in Abbildung 63 zeigen die tiefengeätzte Seite der Fluidstrukturen (A) sowie die Seite der optimierten Dünnschichttransducer (B).

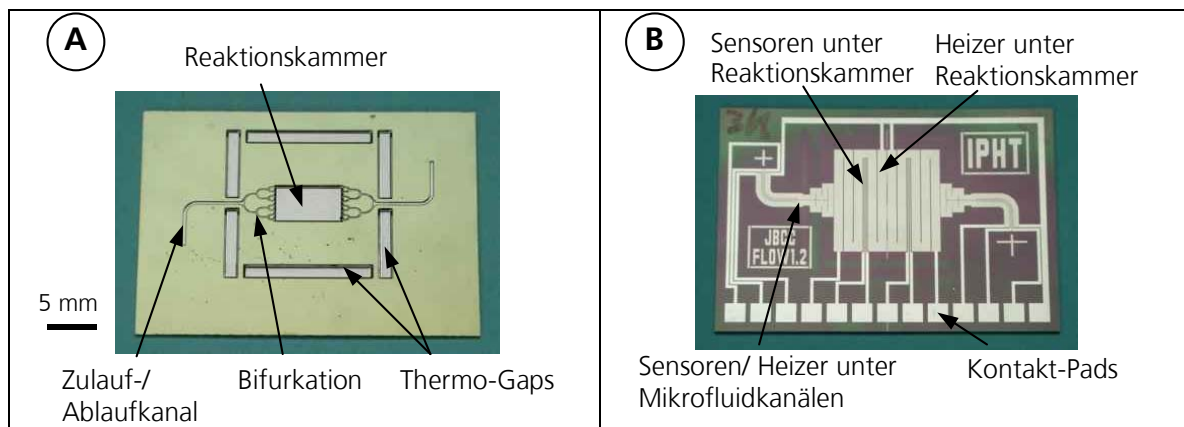


Abb. 63: Realisierung Chipreaktor des Fluss-Mikroreaktors: **A)** Fluidseite; **B)** Transducerseite (optimiertes Design „JBCC 1.2“)

### **B) Design der aktiven thermischen Komponenten**

Die Pt- und Al-Dünnschichttransducer wurden analog zu den Strukturen des Batch-Mikroreaktors präpariert. Obwohl die Kühlung und Heizung der Reaktionskammer mithilfe eines Peltier-Element bewerkstelligt wurde, wurden Pt-Dünnschichtheizer zu Testzwecken integriert. (s. Abb. 63) Zur thermischen Kontrolle des Fluids beim Eintritt in den Chipreaktor bzw. bei Verlassen der Reaktionskammer musste das Layout durch Kanalheizer und –sensoren ergänzt werden. (vgl. Kap. 2.1, S. 31 und Kap. 3.4.4 D, S. 125ff) Diese wurden in Form von Pt-Dünnschichttransducern

realisiert. Geometrie und Lage dieser Elemente beeinflussten dabei das Temperaturfeld. In erster Näherung wurden quadratische Strukturen ( $4 \times 4 \text{ mm}^2$ ) unter der Biegung des Fluidkanals platziert. Zur Studie des Effektes wurden die Strukturen in einer zweiten Layoutversion („JBCC 1.2“) dem Verlauf der Mikrofluidkanäle und der Bifurkationen geometrisch nachempfunden. Es ist zu anzumerken, dass aus Gründen der Montierbarkeit auf einen Abstand der Transducer zur Durchgangsbohrung von etwa 1 mm zu achten war. Eine detaillierte Untersuchung des thermischen Effektes des Heizerdesigns ist in Kapitel 3.4.4 (S. 122ff) zu finden.

### 3.3.2 Realisierung der Fluss -Mikroreaktoren

#### A) Temperierung

Der Fluss-Mikroreaktor ist durch die Integration von 3 Temperierkomponenten im Temperaturbereich  $5^\circ\text{C} < \vartheta < 50^\circ\text{C}$  thermisch lückenlos kontrollierbar: Chipreaktor (1), Kompaktofen (2) und Kapillarheizung (3) (s. Abb. 64) Neben der Temperierung der Reaktionskammer wurden zusätzlich die Mikrofluidkanäle auf dem Chipreaktor separat beheizt. Damit waren die thermischen Voraussetzungen für eine lokal begrenzte Kristallisation in der Reaktionskammer des Chipreaktors geschaffen. Während der Chipreaktor präzise ( $\Delta T < \pm 0,1 \text{ K}$ ) geregelt wurde, reichte zur Temperierung der fluidischen Peripherie eine weniger exakte Regelung aus.

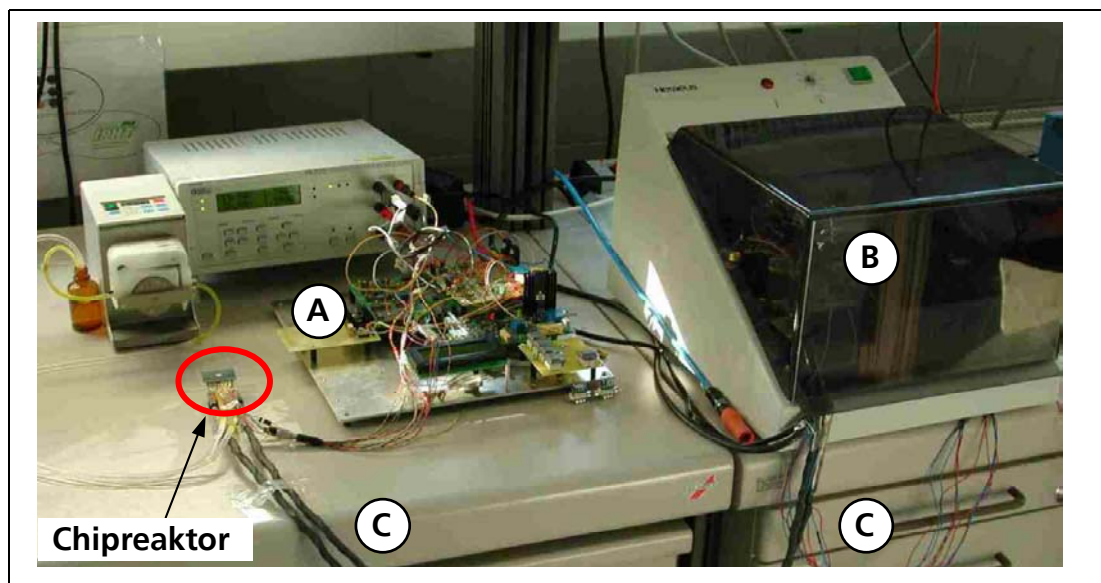


Abb. 64: Komponenten der Temperierung des Fluss-Mikroreaktors als Gesamtsystem:  
**A)** Temperaturregelung Chipreaktor - **B)** Kompaktofen – **C)** Kapillarheizung

Der Temperierung des Chipreaktors (A) wurde analog zum Batch-Mikroreaktor rechnergestützt geregelt und erlaubt so komplexe Temperaturprotokolle. Die Temperierung der Reaktionskammer wurde mithilfe eines Peltier-Elements realisiert. Hierbei wurde die Größe des wärmeübertragenden Fläche variiert. Um die Temperatur in den Mikrofluidstrukturen unabhängig von der Reaktionskammer einzustellen, wurden Pt-Dünnschichtheizer und -sensoren integriert. Die



Auswirkungen verschiedener Designvarianten auf das Temperaturprofil wird in Kapitel 3.4.4 (S. 122ff) geschildert.

Der Kompaktofen (B) sowie die Kapillarheizung (C) ermöglichen die Einstellung konstanter Temperaturen mit einer Genauigkeit von  $\Delta T < \pm 1\text{K}$ . Die Kapillarheizung dient dabei der thermischen Überbrückung der Temperierung des Chipreaktors und dem Kompaktofen, in welchem die fluidischen Komponenten angeordnet sind. Der Aufbau der Kapillarheizung erlaubt Biegeradien von etwa 30 cm und ist damit ausreichend mechanisch flexibel, um den Fluss-Mikroreaktor an örtliche Gegebenheiten anzupassen. Es lassen sich beispielsweise für Flussraten  $Q_{\min} = 30 \mu\text{l}/\text{min}$  Fluidtemperaturen von  $\vartheta = 50^\circ\text{C}$  realisieren bei maximalen Leistungen von  $P_{\text{el}} = 28 \text{ W}$  ( $U_{\max} = 20 \text{ V}$ ;  $I_{\max} = 1,4 \text{ A}$ ). Mit einer Masse von  $m \approx 100 \text{ g/m}$  und Außendurchmesser  $d_a \approx 6,5 \text{ mm}$  sind die Forderungen (vgl. Kap. 2.3.2, S. 48) gut erfüllt. (Wenzel 2003)

## B) Deckelung

Die mechanisch-chemische Herstellung der strukturierten PDMS-Glasdeckel erfolgte entsprechend dem Schema in Abbildung 25 (S. 53). Sowohl bei der Entwicklung des Präparationsprotokolls als auch bei der Prozesskontrolle war die Inspektion der Oberfläche ein wesentlicher Bestandteil. (s. Anhang C3) Der Fortschritt der Oberflächenmodifikation ließ ich durch jeweilige Messung des Randwinkels  $\Theta$  verfolgen. (s. Anhang C3, Abb. C4) Die Abweichungen der Messwerte von Literaturwerten lagen dabei im Bereich von  $\Delta\Theta < \pm 10^\circ$ . (Reichert 2003)

Vor und nach dem Prozessschritt des Inversen  $\mu$ -Contact Printings bzw. der Flammpyrosilierung wurden die Oberflächen zusätzlich mithilfe eines AFM analysiert. Der Fokus lag hierbei auf dem Übergangsbereich der selektiv hydrophobisierten zur hydrophilen Fläche. (s. Anhang C3, Abb. C5) Die AFM-Aufnahmen konnten die Rauigkeitsunterschiede vor und nach der Flammpyrosilierung gut sichtbar machen. Nach der Hydrophobisierung mit ODTS und vor der Flammpyrosilierung betrug die mittlere Rauigkeit  $R_a$  (hydrophob)  $\approx 6,6 \text{ nm}$ . Nach dem Abflammen stieg der Wert auf  $R_a$  (hydrophil)  $\approx 61,4 \text{ nm}$  an. Die Abscheidung der  $\text{SiO}_2$ -Partikeln bewirkte also eine gleichmäßige, aber relativ raue Texturierung der Oberfläche. Innerhalb des mittels  $i$ - $\mu$ -CP abgeschatteten Bereiches, welcher das hydrophobe Fenster bildete, blieb die Rauigkeit mit  $R_a \approx 7,6 \text{ nm}$  annähernd konstant. Die Fläche war weniger homogen als vor der  $i$ - $\mu$ -CP-Behandlung. Die stellenweise signifikanten Erhöhungen von bis zu 500 nm konnten auf Verunreinigungen durch den  $i$ - $\mu$ -CP-Stempel (Si-Stück) zurückgeführt werden. Eine sorgfältige Reinigung des Stempels reduzierte die Rauigkeit auf  $R_a \approx 6,8 \text{ nm} \approx R_a$  (hydrophob). Die Analyse des Randbereiches der abgeschatteten Fläche zeigte, dass ein gradueller Übergangsbereich von etwa 100  $\mu\text{m}$  existiert. Die  $\text{SiO}_2$ -Deposite bauen allmählich eine hydrophile Schicht auf und sorgen für eine Zunahme der Rauigkeit bis zum oben genannten Wert  $R_a$  (hydrophil).

Beim Aufsetzen eines fertig strukturierten PDMS-Glasdeckels auf einem gereinigten Chipreaktor schmiegte sich die Polymermembran selbsttätig an die Oberfläche an. Das Vorrücken der Kontaktfront ließ sich optisch gut verfolgen. (vgl. Anhang C3, Abb. C6) Im Randbereich kam es teilweise zu unvollständiger Adhäsion der PDMS-Membran auf der Oberfläche (vgl. Abb. 65). Die PDMS-Schicht wies hier durch die mechanische Bearbeitung u.U. Aufwerfungen in der Größenordnung von einigen 10  $\mu\text{m}$  auf. Für die Funktionalität der Deckelung war dies jedoch als unkritisch einzustufen.

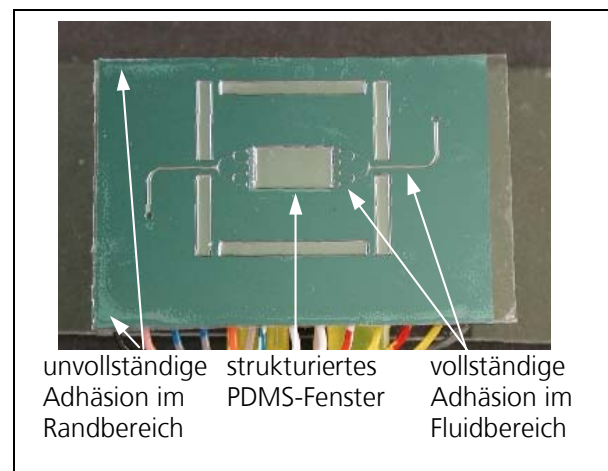


Abb. 65: Strukturierter PDMS-Glasdeckel auf Fluss-Mikroreaktor

Die vorgeschlagene Deckelung mithilfe strukturierter PDMS-Glasdeckel erfüllt die Anforderungen an effektiven Verdunstungsschutz sowie Wiederverwendbarkeit. Durch das strukturierte Fenster in der PDMS-Membran ist eine optisch ungestörte *in situ*-Analyse der Kristallisationsvorgänge in der Reaktionskammer z.B. mittels CLSM möglich. Durch intensiven Kontakt mit Lösungsmitteln ist u.U. ein Diffundieren nicht vollständig ausgehärteten Silikons in die Lösung denkbar. Ferner ist aufgrund der kleinen Kontaktfläche  $A \approx 2,6 \text{ mm}^2$  der Diffusionsstrom als vernachlässigbar klein einzuschätzen. Proteine reagieren aber in ihrem Kristallisationsverhalten äußerst empfindlich auf die Anwesenheit von Fremdstoffen. PDMS wird zwar aufgrund seiner biokompatiblen Eigenschaften häufig für biologische Applikationen eingesetzt. Der grundsätzliche Nachweis auf Kompatibilität der Deckelung ist in breit angelegten Praxistests zur Proteinkristallisation noch zu erbringen.

### C) Fluidischer Aufbau

Im praktischen Einsatz des Mikrofluidreaktors war zu erwarten, dass Schwierigkeiten durch Drucküberhöhungen oder Gasblasen entstehen würden. (Koch 2000, Gad-el-Hak 2002) Durch eine ungünstige Druckverteilung baute sich im System ein Druck von einigen hundert Millibar auf. In der Reaktionskammer wurde der Druck schließlich so groß, dass die Deckelung dem Druck nicht mehr standhielt und abgesprengt wurde. Ferner sammelten sich im Fluss-Mikroreaktor besonders an Querschnittsänderungen und Materialübergängen Gasblasen, welche z.T. in die Reaktionskammer eingetragen wurden. Dies wurde bereits bei der Konzeption des Fluss-Mikroreaktors in einer Optimierungsphase entsprechend berücksichtigt.

Zur Minimierung von **Drucküberhöhungen** im Pumpbetrieb wurde das System mit einer zweiten Spritze ausgestattet. Diese wurde durch einen lösbaren Klemmmechanismus mechanisch an den Pumpentrieb gekoppelt. Damit bewegt sich die zweite Spritze synchron und gegenläufig zu der ersten. Folglich arbeiten die Spritzen abwechselnd im Zug- und Druckmodus und kompensieren so weitgehend die Drucküberhöhungen gegenseitig. Weiterhin konnte mit dieser Anordnung verhindert

werden, dass sich ein Unterdruck aufbaute. Damit wurde ein Ansaugen von Umgebungsluft verhindert und so eine Hauptquelle zur Blasenbildung eliminiert. Schließlich wurde durch die zweite Spritze unterbunden, dass sich das Fluid beim Richtungswechsel der Pumpe entspannte ( $V \approx 5 \mu\text{l}$ ) und damit eine unerwünschte Rückströmung entstand. In der optimierten Anordnung verlangsamte sich der Fluidstrom in der Reaktionskammer beim Umschalten, stoppte jedoch aufgrund der Elastizität der fluidischen Komponenten nicht vollständig. Dies führte zu einem für das Kristallwachstum in der Reaktionskammer günstigen weichen Anfahr- und Abbremsverhalten des Fluids.

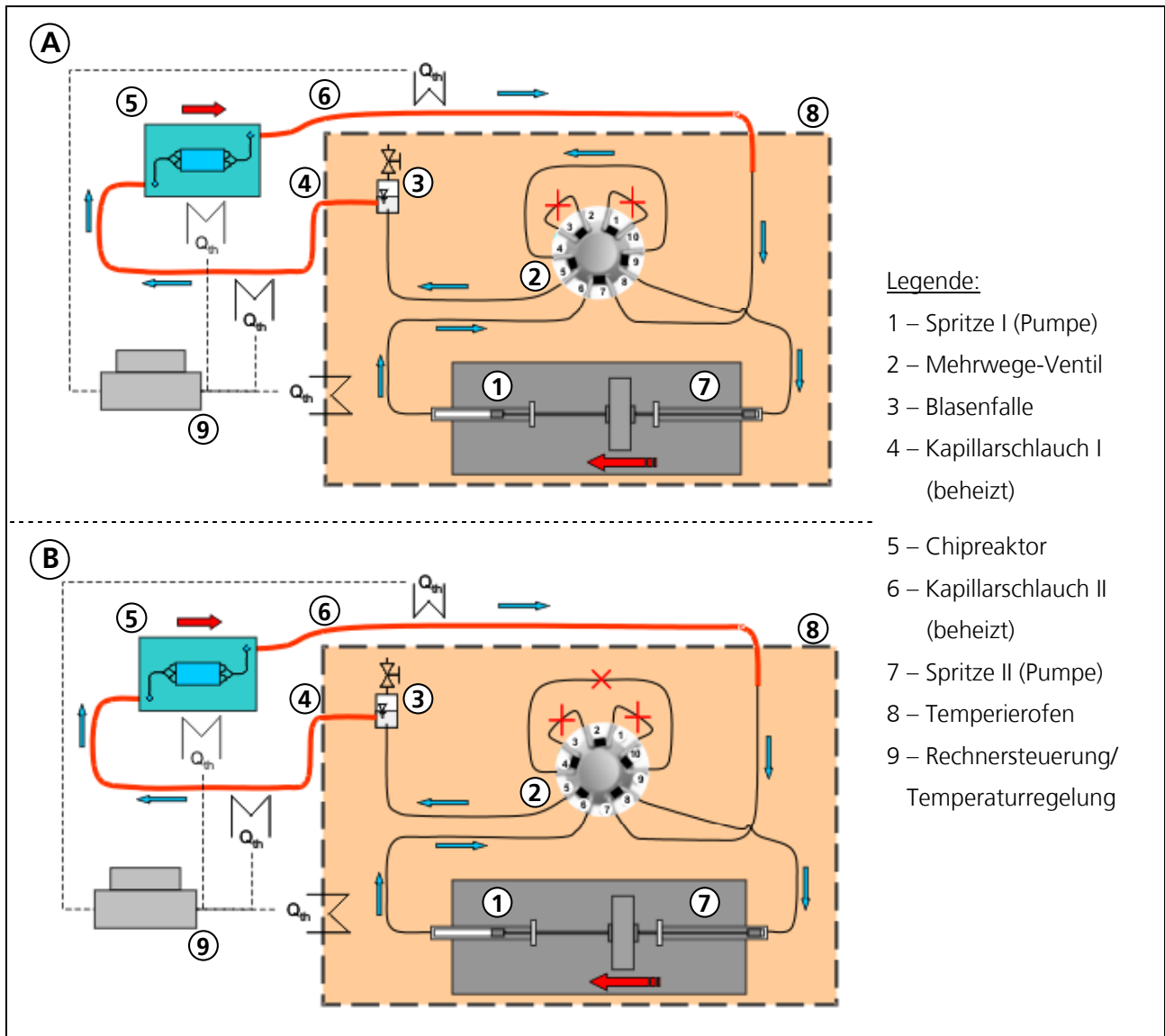


Abb. 66: Verschaltung des Mehrwege-Ventils zur Erzeugung eines Vorwärtslaufs durch die Reaktionskammer bei Pumprichtung „vorwärts“ (A) und „rückwärts“ (B)

Die Kapillarschläuche zur Verbindung der fluidischen Peripherie (Pumpen, Ventile etc.) mit dem Chipreaktor bildeten die sensitivsten Komponenten bezüglich des Druckabfalls im System. Durch ihren relativ kleinen Durchmesser ( $d_i = 0,25 \text{ mm}$ ) und v.a. durch ihre Länge von je etwa 1 m steuerten sie mit  $\Delta p \approx 50 \text{ mbar}$  den weitaus größten Anteil (je 35%) zum Gesamtdruckverlust bei.

Daneben erzeugte die aufwändige Verschaltung des 10/2-Wegeventils mit weiteren Kapillarschläuchen einen fluidischen Widerstand. Die Ventildurchgänge und die Kapillarschläuche trugen zum Gesamtdruckverlust mit weiteren 25% bei. Zur Minimierung des Druckabfalls im System ist demzufolge die Minimierung des Druckverlustes durch die Kapillaren besonders effektiv. Hierzu kommen prinzipiell eine Reduktion der Kapillarlänge und die Erweiterung des Durchmessers in Betracht. Da das Volumen im Fluss-Mikroreaktor mit  $V_{\max} = 250 \mu\text{l}$  nach oben begrenzt war, konnte nur die Länge der Kapillarschläuche verkürzt werden. Allerdings konnte der Abstand des Chipreaktors mit der Peripherie und entsprechend die Länge der Kapillarschläuche  $l \approx 1 \text{ m}$  aus Gründen der Handhabbarkeit nicht weiter vermindert werden. Der Fluidwiderstand wurde schließlich durch eine optimierte Anordnung der fluidischen Komponenten verringert. (s. Abb. 66). Die Verschaltung des Mehrwege-Ventils wurde zu einem quasi 4/2-Wegeventil vereinfacht und dahingehend optimiert, dass sich der größere fluidische Widerstand immer vor der Reaktorkammer aufbaute. Dadurch konnte ein Absprennen des Deckels sowohl im Betrieb als auch beim Befüllen verhindert werden.

Um den Fluss-Mikroreaktor möglichst **blasenfrei** zu befüllen, wurde die Apparatur vor dem Befüllen vorbehandelt. (Richter 1996, Koch 2000) Folgende Schritte wurden hierzu angewandt:

- kurzzeitiges Spülen der fluidischen Einzelkomponenten mit Methanol;

Das Lösungsmittel benetzt die fluidischen Komponenten, löst dabei evtl. an den Wandungen haftende Verunreinigungen und schleust sie aus dem System.

Zur Vermeidung von Lufteinschlüssen sowohl in den Mikrofluidkanälen als auch in der Reaktionskammer beim Befüllen des Chipreaktors mussten die physiko-chemischen Eigenschaften dieser Oberflächen separat eingestellt werden (s. Kap. 2.4.1, S. 50f) Abbildung 67 illustriert schematisch den Effekt der chemischen Oberflächenmodifikation.

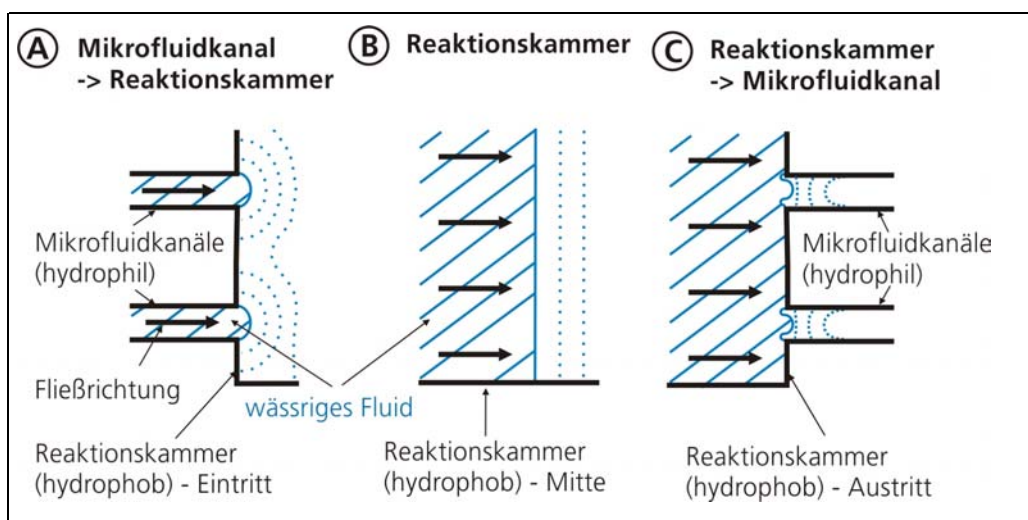


Abb. 67: Schematische Darstellung Effekt der Oberflächenmodifikation – gleichmäßiges blasenfreies Befüllen beim Übertritt ...

**A)** ... Fluidkanal → Reaktionskammer

**B)** in der Reaktionskammer

**C)** ... Reaktionskammer → Fluidkanal

- Hydrophobisieren der Reaktionskammer durch schnell verdampfende HMDS-Lösung: Randwinkel  $\Theta \approx 90^\circ$

Die Hydrophobisierung der Kammerwandung wirkt wie eine Barriere, welche das Fluid beim Übertritt aus den Mikrofluidkanälen in die Reaktionskammer bzw. in die Kanäle am Ende der Kammer aufstaut. Dies führt dazu, dass alle Kanäle am Fluidtransport beteiligt sind und kein fluidischer Kurzschluss im Verteilersystem entsteht. In der Reaktionskammer schreitet die Fluidfront orthogonal zu den Wandungen fort. Dies ist in Abb. 68 dokumentiert. Die leichte Wölbung der Fluidfront entstand durch die nicht unendlich kleine Pumpgeschwindigkeit. Durch die Silanisierung der Reaktionskammer konnten Lufteinschlüsse selbst in den Ecken vermieden werden.

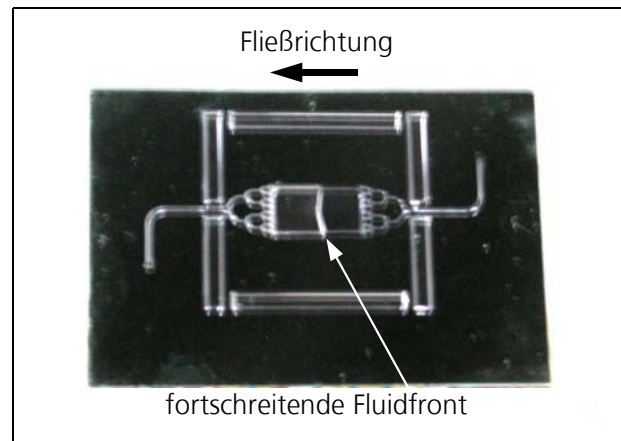


Abb. 68: Foto Fluidfront in der Reaktionskammer

- Hydrophilisieren der Mikrofluidkanäle mit Piranha-Lösung, um ein selbsttätiges und gleichmäßiges Befüllen mit wässrigen Lösungen zu erzielen: Randwinkel  $\Theta < 7^\circ$  (spreitet auf Oberfläche)
- Spülen der gesamten Apparatur mit  $\text{CO}_2$  technischer Reinheit (Messer-Griesheim GmbH, D) etwa 10 Minuten bei leichtem Überdruck ( $p \approx 5$  mbar) nach Entleeren und Zusammenbau (Deckelung etc.)

Nach dem HENRYschen Gesetz für verdünnte Lösungen ergibt sich für  $\text{CO}_2$  gegenüber Luft ( $\approx \text{N}_2$ ) eine etwa 50-fach größere Löslichkeit in Wasser. (Atkins 1994) Damit wird die Blasenbildung beim anschließenden Befüllen mit wässrigen Lösungen deutlich reduziert. Zur Verstärkung des Effektes kommt vor der Proteinlösung entgastetes Wasser zum Einsatz.

- Spülen mit entgastem  $\text{H}_2\text{O}$ , bidest. (30 Minuten im Exsikkator)

Es war zu beobachten, dass sich besonders an Querschnittsänderungen vereinzelt Gasblasen bildeten. Diese wurden jedoch im vorbeiströmenden entgasteten Wasser vollständig aufgelöst.

- Verdrängung des mit  $\text{CO}_2$  angereicherten Wassers zum Befüllen des Fluss-Mikroreaktors mit der eigentlichen Lösung

Im Betrieb kam es dennoch aufgrund von Undichtigkeiten oder chemischer Gasentwicklung zu einer Ansammlung von Luft bzw. Gasen kommen und sich im ungünstigen Falle in der Reaktionskammer akkumulierten. Damit wäre die Proteinkristallisation beeinträchtigt oder gar vollständig unterbunden. Ferner war es beim Befüllen notwendig, die verdrängte Luft kontrolliert aus dem System auszuschleusen. Aus diesen Gründen wurde eine sog. Blasenfalle konstruiert. Diese besteht aus einem Absperrhahn (PEEK), einem T-Stück (PTFE), einem Schlauchstück als Reservoir (Tygon<sup>®</sup>) mit einem Innendurchmesser ID = 3,17 mm. Zum fluidischen Anschluss der Komponente in Richtung des

Ventils bzw. des Chipreaktors wurden Kapillarschläuche (PTFE) (ID = 0,25 mm) mit 2-Komponenten Epoxidklebstoff fixiert.

Die Kernidee der Anordnung bestand darin, dass das Fluid unterhalb des Reservoirs ausgeschleust wird. (s. Abb. 69) Das Gas folgt dem Fluidstrom jedoch nicht in Richtung der Ausgangskapillaren, sondern sammelt sich im Reservoir über dem Ende der Eingangskapillare als Gasblase. Diese löst sich bei genügender Größe und steigt auftriebsbedingt im Reservoir nach oben. Das Fluid erfährt beim Übergang vom Reservoir zum Kapillarschlauch zum Chipreaktor eine Querschnittsverengung um den Faktor 12,5. Für Gasblasen, deren Durchmesser denjenigen des Kapillarschlauchs überschreiten, ist es energetisch günstiger, dem Fluidstrom nicht zu folgen. Denn eine entsprechende Verkleinerung des Radius  $r$  bedingt eine Zunahme der Oberflächenenergie mit  $r^2$ . Es war jedoch darauf zu achten, dass der Füllstand im Reservoir nicht unter die Höhe der Eingangskapillare fällt. Über eine geringfügige Verkleinerung des Pumpweges konnte der Fluidpegel korrigiert werden und das angesammelte Gas über den Absperrhahn ausgetrieben werden. Dies war jedoch meist nur innerhalb einer Einlaufphase von etwa 20 Pumpzyklen notwendig.

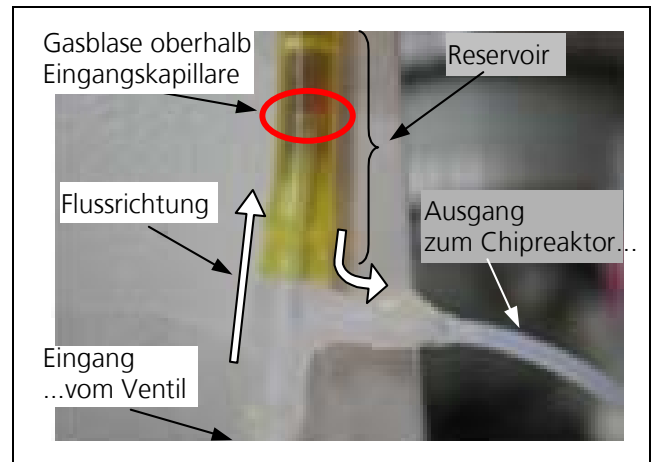


Abb. 69: Foto der Blasenfalle – Detail einer sich bildenden Gasblase

#### D) Aufbau Gesamtsystem

Die Integration der fluidischen und thermischen Komponenten zum Gesamtsystem erfolgte prinzipiell analog den Skizzen in Abbildung 8b) (S. 31). Die Übersichtsaufnahme in Abbildung 64 (S. 100) sowie die Detailfotos in Abbildung 70 dokumentieren die Realisierung des Fluss-Mikroreaktors.

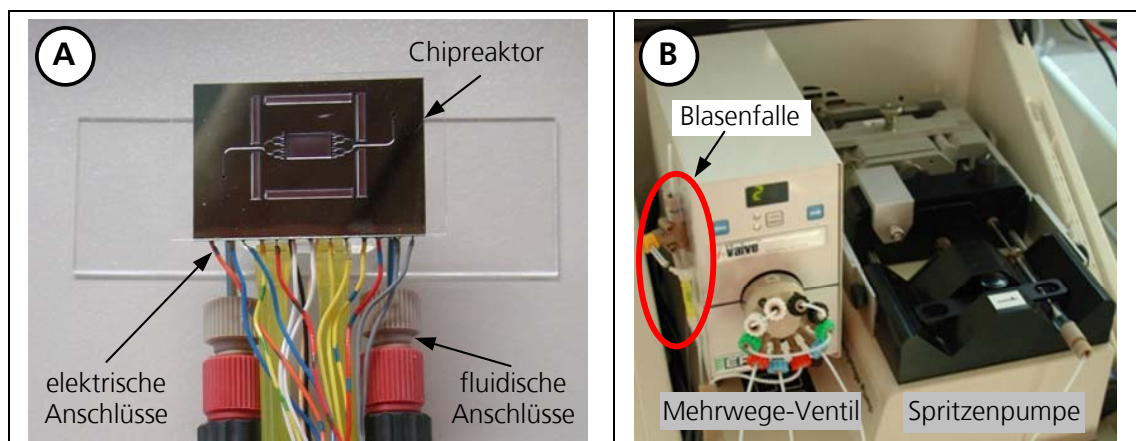


Abb. 70: Realisierung Fluss-Mikroreaktor: **A)** Detailansicht Mikroreaktor; **B)** fluidische Komponenten im geöffneten Temperierofen – (Gesamtansicht s. Abb. 64)

### 3.4 Charakterisierung des Fluss-Mikroreaktors

Der Schwerpunkt der verfahrenstechnischen Evaluierung des Fluss-Mikroreaktors lag auf der thermischen und fluidischen Charakterisierung. Aus allgemeiner Betrachtung wurde die grundsätzliche Eignung des Systems zur Anwendung in der Proteinkristallisation abgeleitet.

#### 3.4.1 Druckverlustbestimmung – Befüllvorgang und Betrieb

Die relative experimentelle Bestimmung des Druckverlustes  $\Delta p$  im Fluss-Mikroreaktor ergab eine lineare Abhängigkeit von der Flussrate  $Q$ . Der Graph in Abbildung 71 illustriert neben den Messwerten die sehr gute Übereinstimmung mit der analytischen Lösung, welche gemäß HAGEN-POISEUILLE berechnet wurde.

Die Abweichung der beiden Geraden beträgt  $p < \pm 5\%$ , nimmt jedoch durch Ableseungenauigkeiten für kleine Flussraten  $Q < 15 \mu\text{l}/\text{min}$  zu. Die direkte Proportionalität des Druckabfalls  $\Delta p$  zum Volumenstrom  $Q$  sowie die umgekehrte Proportionalität zur 4. Potenz des Radius  $r^4$  wurde bestätigt. Die gute Korrelation mit dem Gesetz nach HAGEN-POISEUILLE legt den Schluss nahe, dass die Strömung im Fluss-Mikroreaktor laminar ist, was auch bereits qualitativ durch die niedrigen REYNOLDS-Zahlen  $Re < 1$  zu erwarten war. Der Druckabfall im Gesamtsystem belief sich auf  $\Delta p \approx 150 \text{ mbar}$  bei  $Q = 30 \mu\text{l}/\text{min}$ . Den größten Betrag steuerten die Kapillarschläuche bzw. -heizung mit einem spezifischen Druckverlust  $\Delta p' \approx 50 \text{ mbar}/\text{m}$  bei. Trotz des kleinen Durchmessers ( $d \approx 100 \mu\text{m}$ ) der Mikrokanäle der fluidischen Verteilerstruktur des Chipreaktors spielten sie aufgrund ihrer geringen Länge  $l \approx 1 \text{ mm}$  nur eine untergeordnete Rolle. Nach HAGEN-POISEUILLE wurde der Druckabfall über dem Chipreaktor berechnet zu  $\Delta p \approx 3,15 \text{ mbar}$  bei einer Flussrate  $Q = 15 \mu\text{l}/\text{min}$ .

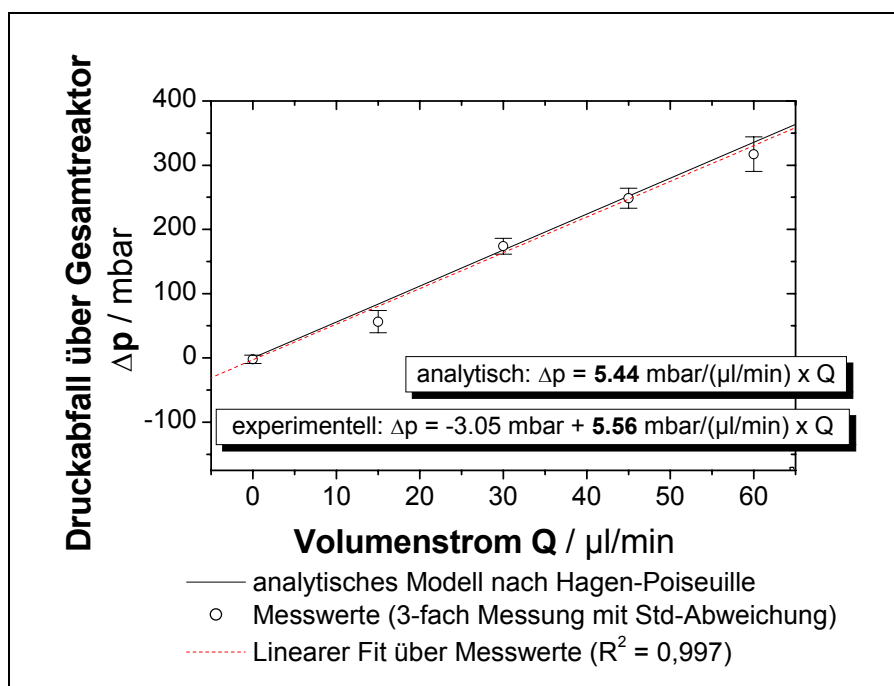


Abb. 71: Druckverlust über Gesamtsystem Fluss-Mikroreaktor: Messung mit Wasser bei 5 Flussraten – Analytische Lösung nach HAGEN-POISEUILLE

Der Verlauf der Druckmessung beim Befüllen des Chipreaktors gegen die Atmosphäre ist in Abb. 72 dargestellt. Das Ergebnis dieses 2. Experimentes zum Druckverlust stimmt qualitativ gut mit dem erwarteten Druckprofil überein:

- Zunahme des Drucks beim Übertritt aus den hydrophilen Mikrokanälen ( $\Theta < 7^\circ$ ) in die hydrophobe Reaktionskammer ( $\Theta \approx 90^\circ$ ) (s. Kap. 3.3.2, S. 104f)
- Rückgang des Drucks beim Durchlaufen der Reaktionskammer
- Druckanstieg beim Übertritt aus Reaktionskammer in hydrophile Mikrokanäle
- bleibende Druckdifferenz zwischen Chipeingang und -ausgang

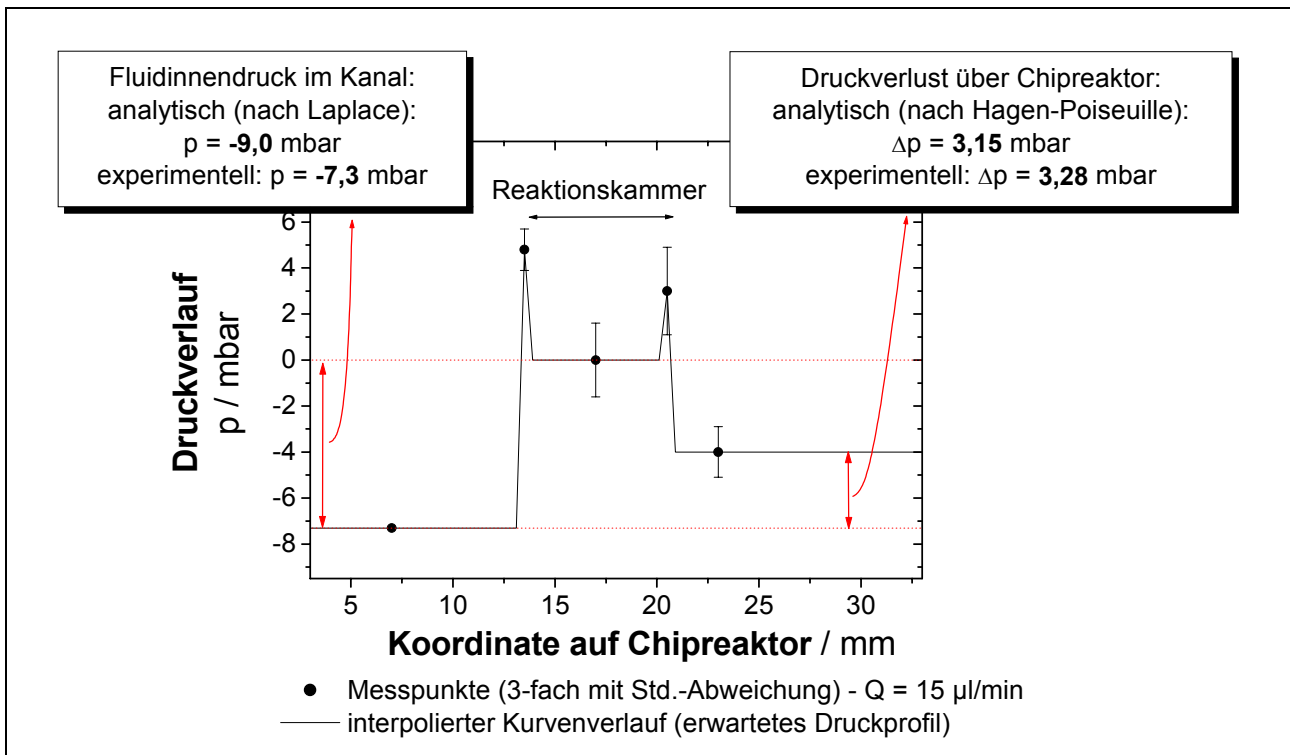


Abb. 72: Druckverlust über Chipreaktor: Messung beim Befüllen des Fluss-Mikroreaktors mit Wasser – analytische Lösung nach LAPLACE

Nach LAPLACE (Gleichung G11, S. 67) nimmt der Innendruck  $p$  im Fluid negative Werte an, solange dieses sich in den hydrophilen Mikrokanälen befindet. Mit Erreichen des Kanalendes steigt der Druck durch betragsmäßiges Anwachsen des Krümmungsradius  $r$  bis  $p = 0$  an. Da sich das Fluid nun am Übergang zum hydrophoben Bereich befindet, steigt der Innendruck weiter an. Die Oberfläche beult sich mit positivem abnehmendem Krümmungsradius. Der Randwinkel  $\Theta \approx 90^\circ$  begrenzt den Radius auf die Abmessungen des Mikrofluidkanals ( $d_{\text{hydr}} = 2r = 140 \mu\text{m}$ ). Bei weiterer Fluidförderung muss das Fluid in Strömungsrichtung in die Reaktionskammer ausweichen. Durch die Geometrieänderung bei Kammereintritt fällt der Druck  $p$  ab, da der Krümmungsradius zunimmt. Der Randwinkel  $\Theta \approx 90^\circ$  hat nun zur Folge, dass der Krümmungsradius der Fluidfront  $r \rightarrow \infty$  geht, der Druck also entsprechend 0 wird. Beim Übertritt in die Mikrokanäle kehrt sich der Vorgang bei Kammereintritt um. Entsprechend steigt der Druck zunächst an und sinkt dann in den Kanälen auf einen stationären



Wert  $p < 0$ . Die bleibende Druckdifferenz  $\Delta p$  in den Mikrokanälen entspricht dem Druckabfall über dem Chipreaktor. Im Experiment ergab sich ein Druckabfall  $\Delta p \approx 3,3$  mbar (Abb. 72), was gut mit dem Wert nach HAGEN-POISEUILLE ( $\Delta p \approx 3,15$  mbar) übereinstimmt (s.o.). Die relative Abweichung beträgt hierbei ca. 5%.

Bei Annahme eines Randwinkels  $\Theta \approx 5^\circ$  im hydrophilen Kanal ergibt sich ein Krümmungsradius  $r \approx -80$   $\mu\text{m}$ . Mit der Oberflächenspannung von Wasser  $\sigma = 72 \cdot 10^{-3}$  N/m wird beispielsweise ein Fluidinnendruck  $p \approx -9$  mbar abgeschätzt. Abbildung 72 illustriert die im Rahmen der Messgenauigkeit gute Übereinstimmung der analytischen Abschätzung mit den Messwerten  $p \approx -7,3$  mbar. Allerdings weisen die Experimente generell betragsmäßig kleinere Werte auf als analytisch abgeschätzt. Dies wurde auf die Druckmessmethode zurückgeführt. Diese volumenverbrauchende Methode besitzt ein sehr großes Totvolumen  $V_{\text{tot}} \approx 10 V_{\text{mess}}$  und wird zusätzlich durch die Elastizität der PTFE-Kapillaren gestört. Der Einsatz eines verfeinerten Messverfahrens könnte dazu beitragen, Druckdifferenzen im Bereich einzelner Fluidstrukturen auf dem Chipreaktor aufzulösen. Damit wäre es zukünftig denkbar, die Geometrie der Fluidstrukturen zu analysieren und zu optimieren, ohne aufwändige Messung von Geschwindigkeitsfeldern durchzuführen.

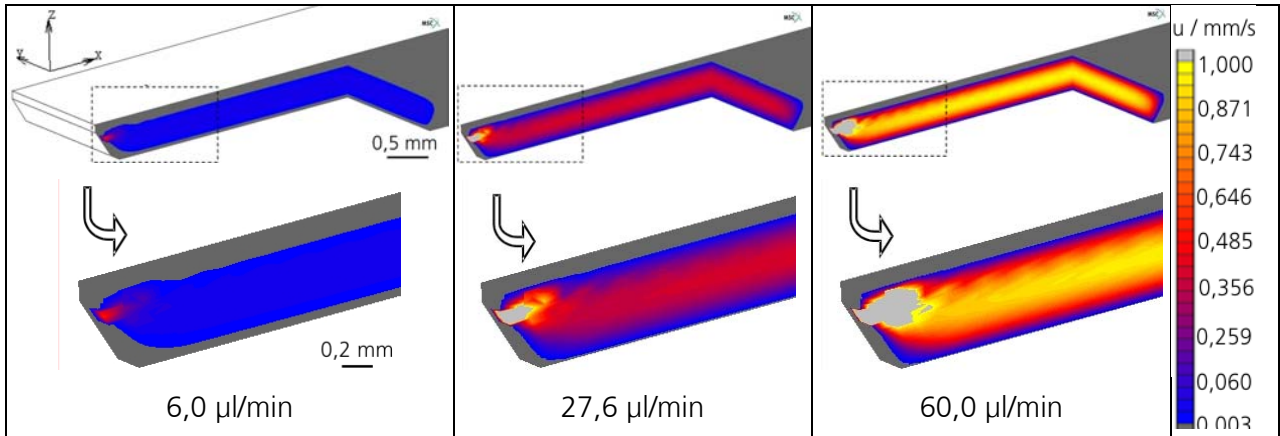
### 3.4.2 Strömungsprofil

Das Strömungsprofil in der Reaktionskammer der Fluss-Mikroreaktors wurde experimentell mit  $\mu$ -PIV-Messungen bestimmt. Zur detaillierten Analyse experimentell schwer zugänglicher Bereich wie z.B. dem Ein- und Ausströmbereich der Kammer sowie als Werkzeug zur Parametervariation wurden 3D-FEM-Simulationen in Form von CFD-Rechnungen durchgeführt. Die Ergebnisse aus den Simulationen wurden gegenüber den Experimenten und analytischen Modellen verglichen und auf Plausibilität geprüft.

#### A) $\mu$ -PIV-Experiment und CFD-Simulation

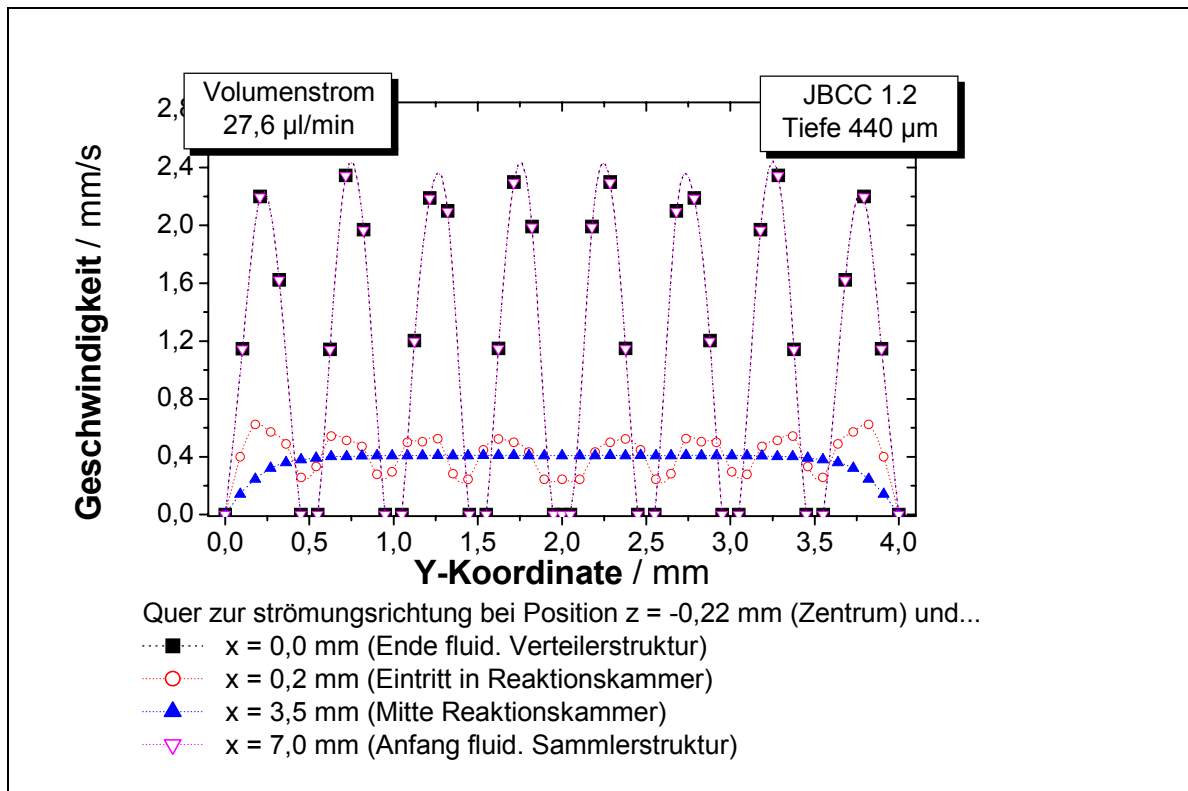
Die qualitative  $\mu$ -PIV-Analyse des Strömungsfeldes zeigte, dass selbst bei großen Querschnittsänderungen, beispielsweise beim Übergang aus den Mikrofluidkanälen in die Reaktionskammer, keine signifikanten Verwirbelungen oder Rückströmungen auftreten. (vgl. Abb. 41A, S. 76) Auch in den Mikrokanälen, bei etwa 40-facher Geschwindigkeit im Vergleich zur Reaktionskammer, machten die Tracerpartikeln die Stromlinien einer Potenzialströmung sichtbar. (vgl. Abb. 42, S. 76) Die gekrümmte Kanalgeometrie stellt demnach fluiddynamisch günstige Rahmenbedingungen zur Ausbildung einer verwirbelungs- und totvolumenfreien Strömung bereit.

Die 3D-FEM-Strömungssimulationen zeigten die erwartete Zunahme der Strömungsgeschwindigkeit in den Fluidstrukturen bei steigender Flussrate. Beim Übertritt aus den Mikrofluidkanälen in die Reaktionskammer erfährt die Strömung durch die drastischen Querschnittsänderung Druckgradienten orthogonal zur Hauptströmungsrichtung (x-Richtung). Dies resultiert in Instationaritäten, welche jedoch relativ rasch abklingen. Abbildung 73 illustriert dies qualitativ anhand 3 verschiedener Flussrate.



**Abb. 73:** CFD-Simulation – 3D-Schnittgrafiken (1/4-Ausschnitt der Reaktionskammer) bei 3 verschiedenen Volumenströmen zur qualitativen Analyse der Geschwindigkeitsverteilung in der Reaktionskammer: Detailanalyse des Einstrombereichs x-z-Schnitt in Kanalmitte schnelle Beruhigung der Instationaritäten der Strömung nach Eintritt in Reaktionskammer

Die Liniengraphen in Abbildung 74 erlauben eine quantitative Auswertung des Strömungsprofils  $u(y)$  bei verschiedenen x-Positionen im vertikalen Zentrum bei  $z = -0,22$  mm.



**Abb. 74:** CFD-Simulation – Geschwindigkeitsprofil quer zur Strömungsrichtung (y-z-Schnitt) bei  $z = -0,22$  mm und verschiedenen x-Positionen und  $Q = 27,6 \mu\text{l/min}$ :  $u(y)$

Zur Verifizierung der quantitativen Übereinstimmung von Simulation und Experiment wurde die maximale Geschwindigkeit  $u_{\text{max}}$  im Zentrum der Reaktionskammer ( $x = 3,5$  mm;  $y = 2$  mm;  $z = -0,22$  mm) bestimmt. Erwartungsgemäß sind beide Methoden eine lineare Funktion im Volumenstrom  $Q$ . Die relative Abweichung der Simulation gegenüber dem Experiment beträgt  $\Delta u/u < 10\%$ . (Abb. 75)

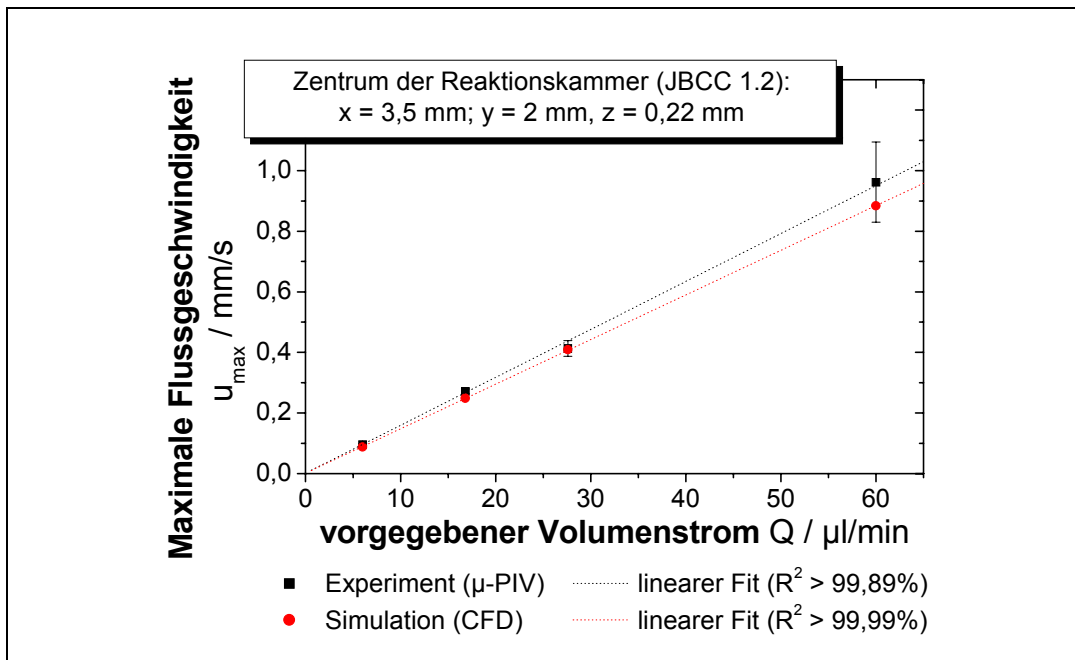


Abb. 75: Vergleich µ-PIV-Experiment – CFD-Simulation:  
Maximale Flussgeschwindigkeit im Zentrum der Reaktionskammer als  
Funktion des vorgegebenen Volumenstroms (Sollwert)

Dieser Fehler bewegt sich im Bereich der experimentellen Unsicherheiten. Der statistische Auswertungsalgorithmus beinhaltet als größte Unsicherheitsfaktoren die Eliminierung von Messobjekten (Häufigkeitsverteilung) und die Interpolation der fehlenden Messpunkte zwischen den diskreten Illuminationsvolumina. (s. Abb. 43, S. 77) In Testläufen wurde der hierbei auftretende systematische Fehler zu etwa 5% abgeschätzt. In der realen Strömung können Störungen und damit Schwankungen im Geschwindigkeitsprofil auftreten. Zu diesen Störgrößen zählen u.a. Druckschwankungen aufgrund des nicht-idealen Pumpvorgangs, partikuläre Störungen durch Agglomeratbildung des Tracermaterials oder an den Wänden adhärierende Partikeln. Eine Abschätzung ergab eine statistische Abweichungen von der Idealität von etwa  $< \pm 5\%$  für kleine Flussraten  $Q < 30 \mu\text{l/min}$ . Für  $Q > 30 \mu\text{l/min}$  nimmt der Fehler bis ca.  $\pm 15\%$  zu, da der Einfluss der Störungen weiter in das Strömungsfeld hinein reicht.

Der qualitative und quantitative Vergleich der Simulationen mit den experimentellen Ergebnissen zeigt, dass die realen Verhältnisse durch die Berechnungen gut wiedergegeben werden. Die 3D-FEM-Rechnungen ermöglichen die detaillierte Analyse des Strömungsfeldes in den experimentell schwer zugänglichen Bereichen wie z.B. der Ein- und Ausströmzone der Reaktionskammer.

## B) Bestimmung des optimalen Modells

Zur Validierung der verschiedenen analytischen Modelle gegenüber den Simulationsrechnungen und den experimentellen Messdaten wurde die Strömungsgeschwindigkeit  $u$  als Vergleichsparameter herangezogen. Zunächst wurde das analytische Modell zur Berechnung der Geschwindigkeitsverteilung in **z-Richtung** untersucht. Das Strömungsprofil  $u(z)$  quer zur

Hauptströmungsrichtung im Zentrum der Reaktionskammer ( $x = 3,5 \text{ mm}$ ,  $y = 2 \text{ mm}$ ) wurde für verschiedene Flussraten  $Q$  verglichen. Die Liniengraphen  $u(z)$  in Abbildung 76 illustrieren, dass das Modell einer HAGEN-POISEUILLE-Strömung sowohl die Realität als auch die Simulation qualitativ sehr gut beschreiben. Zur modellhaften Berechnung wurde jeweils  $u_{\max}$  als Startwert vorgegeben und das Geschwindigkeitsprofil gemäß Gleichung G13 (S. 68) berechnet.

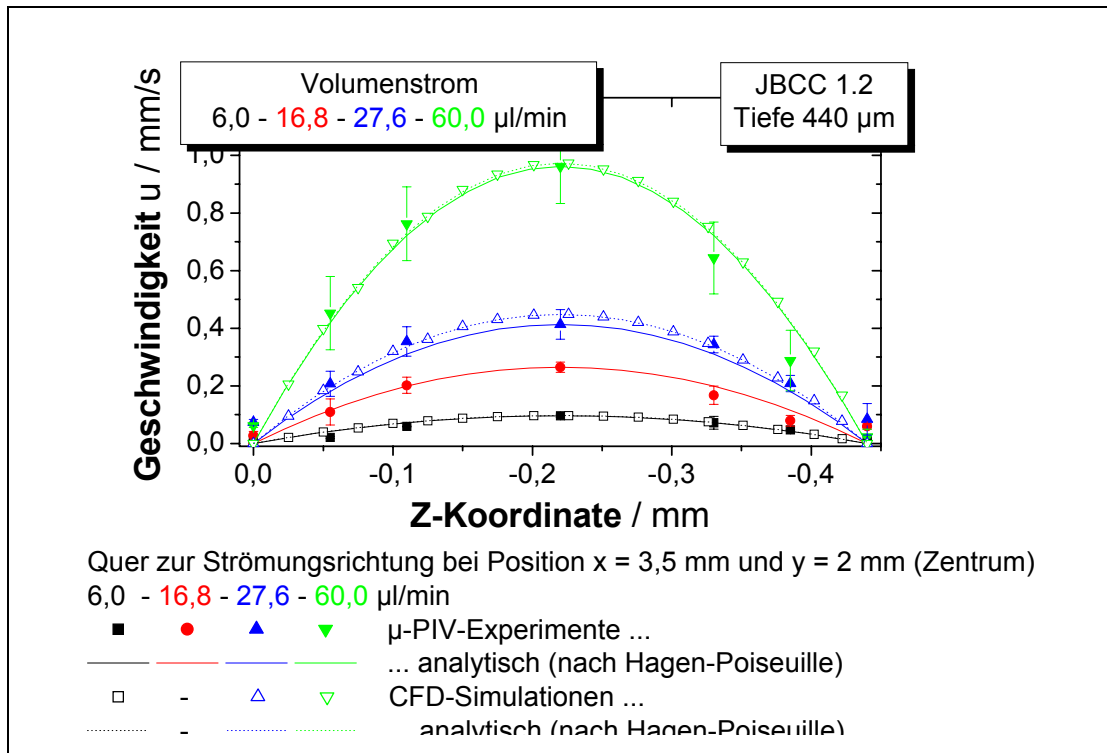


Abb. 76: Vergleich Strömungsprofil quer zur Hauptströmungsrichtung (y-z-Schnitt) im Zentrum der Reaktionskammer ( $x = 3,5 \text{ mm}$ ,  $y = 2 \text{ mm}$ ) verschiedene Flussraten:  $u(z)$   
 $\mu$ -PIV-Experiment und analytisches Modell nach HAGEN-POISEUILLE, modifiziert  
 CFD-Simulation und analytisches Modell nach HAGEN-POISEUILLE, modifiziert

Als Parameter für die Abweichungen des Modells von den Mess- bzw. Simulationskurven wurden die Geschwindigkeitsverteilung  $u(z)$  über die Höhe  $Z$  der Reaktionskammer integriert. Es ergaben sich ein relativer Fehler zum Experiment  $\Delta u/u < \pm 10\%$ , zur Simulation hingegen  $\Delta u/u < \pm 0,5\%$ . Die CFD-Simulationen berechnen also in sehr guter Näherung Strömungsfelder mit einem „HAGEN-POISEUILLE-Profil“. Die Abweichung des Modells von den Messergebnissen liegt somit in derselben Größenordnung wie die Abweichung von Experiment und Simulation. Dies bestätigt die oben angeführte Abschätzung (s. Kap. 3.4.2 A, S. 111), dass der gesamte experimentelle Fehler der  $\mu$ -PIV-Analyse im Bereich von  $\pm 10\%$  liegt.

Für die Näherung der Geschwindigkeitsverteilung in  $y$ -Richtung wurden 3 analytische Modelle verglichen und gegenüber der  $\mu$ -PIV-Messung validiert (vgl. Kap. 2.5.2 A, S. 67ff):

- I. HAGEN-POISEUILLE-Profil
- II. konstantes Profil
- III. HAGEN-POISEUILLE, modifiziert mit konstantem Bereich als abschnittsweise definierte Funktion

Bei verschiedenen Flussraten wurde in der Mitte der Reaktionskammer ( $x = 3,5 \text{ mm}$ ;  $z = -0,22 \text{ mm}$ ) das Geschwindigkeitsprofil  $u(y)$  bestimmt. Die Liniengraphen in Abbildung 77 zeigen exemplarisch für  $Q = 27,6 \mu\text{l}/\text{min}$  die Abweichung der einzelnen Modelle gegenüber der  $\mu\text{-PIV}$ -Messkurve.

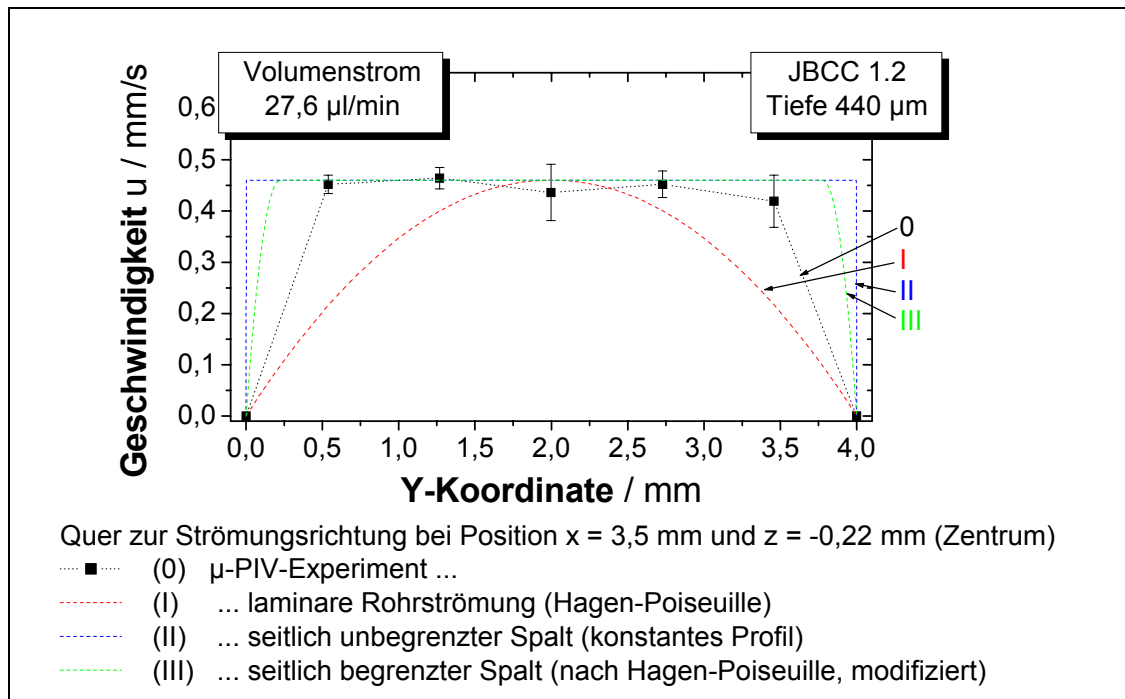


Abb. 77: Vergleich 3 analytischer Modelle  $u(y)$  mit experimentell ( $\mu\text{-PIV}$ ) bestimmten Strömungsprofilen quer zur Hauptströmungsrichtung ( $y$ - $z$ -Schnitt) im Zentrum der Reaktionskammer ( $x = 3,5 \text{ mm}$ ,  $z = -0,22 \text{ mm}$ ) für  $Q = 27,6 \mu\text{l}/\text{min}$

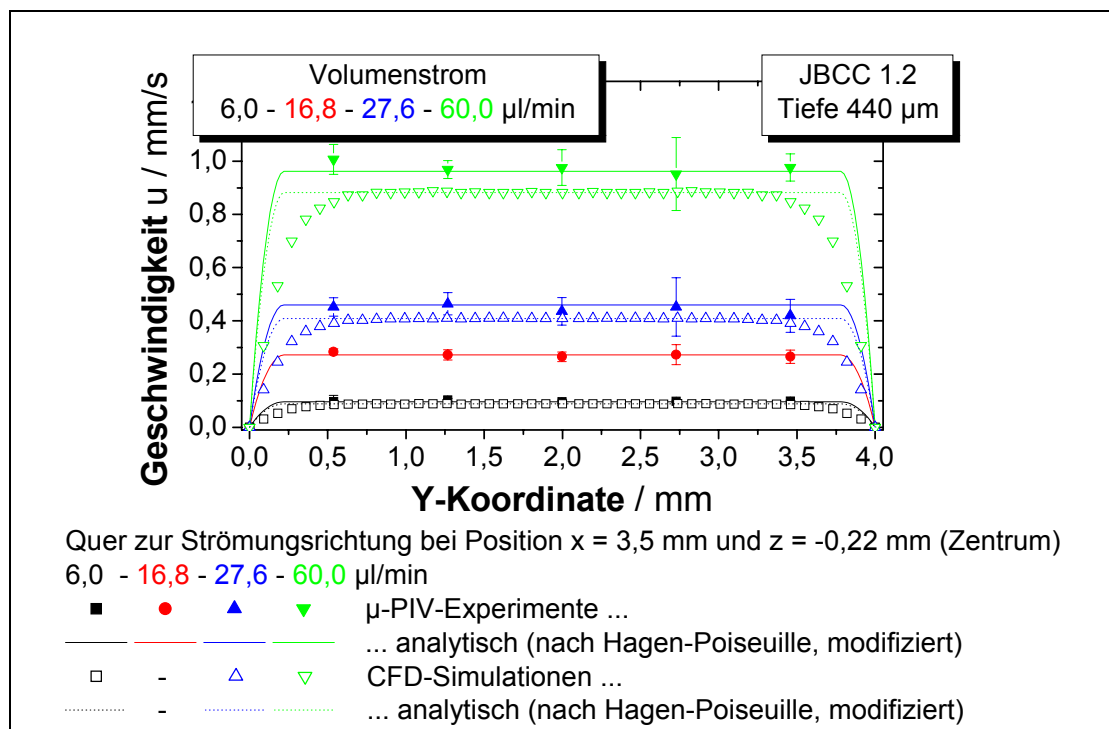


Abb. 78: Vergleich Strömungsprofil quer zur Hauptströmungsrichtung ( $y$ - $z$ -Schnitt) im Zentrum der Reaktionskammer ( $x = 3,5 \text{ mm}$ ,  $z = -0,22 \text{ mm}$ ) verschiedene Flussraten:  $u(y)$   
 $\mu\text{-PIV}$ -Experiment und analytisches Modell nach HAGEN-POISEUILLE, modifiziert  
 CFD-Simulation und analytisches Modell nach HAGEN-POISEUILLE, modifiziert

Qualitativ lässt sich erkennen, dass die Modelle den experimentellen Verlauf grob annähern, jedoch relativ stark von der Messkurve abweichen. Der untere Grenzfall Modell I weicht im Rahmen der Messgenauigkeit erwartungsgemäß negativ von den Messwerten ab. Modell II als dem oberen Grenzfall sowie Modell III als „Kombinationsmodell“ liefern besonders zum Rand hin zu große Werte. Hierzu ist anzumerken, dass die Dichte der Messpunkte im Randbereich ( $y < 0,5 \text{ mm}$ ;  $y > 3,5 \text{ mm}$ ) für eine gesicherte Aussage zu gering war. Für detailliertere Untersuchungen sollte der Mittenabstand der Illuminationsvolumina in Wandnähe auf  $d_{\text{max}} = 250 \text{ }\mu\text{m}$  reduziert werden. Die Graphen deuten jedoch an, dass das Modell III der Realität am nächsten kommt. Entsprechend wurde dieses Modell analog zur z-Richtung den Experimenten und Simulationen für mehrere Flussraten gegenübergestellt. (s. Abb. 78)

Die Graphen des Modells III geben den Verlauf der experimentellen und simulierten Kurven qualitativ gut wieder. Allerdings strömt das Fluid Experiment und Simulation zufolge im Randbereich weniger schnell. Die Reichweite des Wandeinflusses, also der Bereich mit HAGEN-POISEUILLESchem Strömungsverlauf, wurde im Modell offenbar unterschätzt.

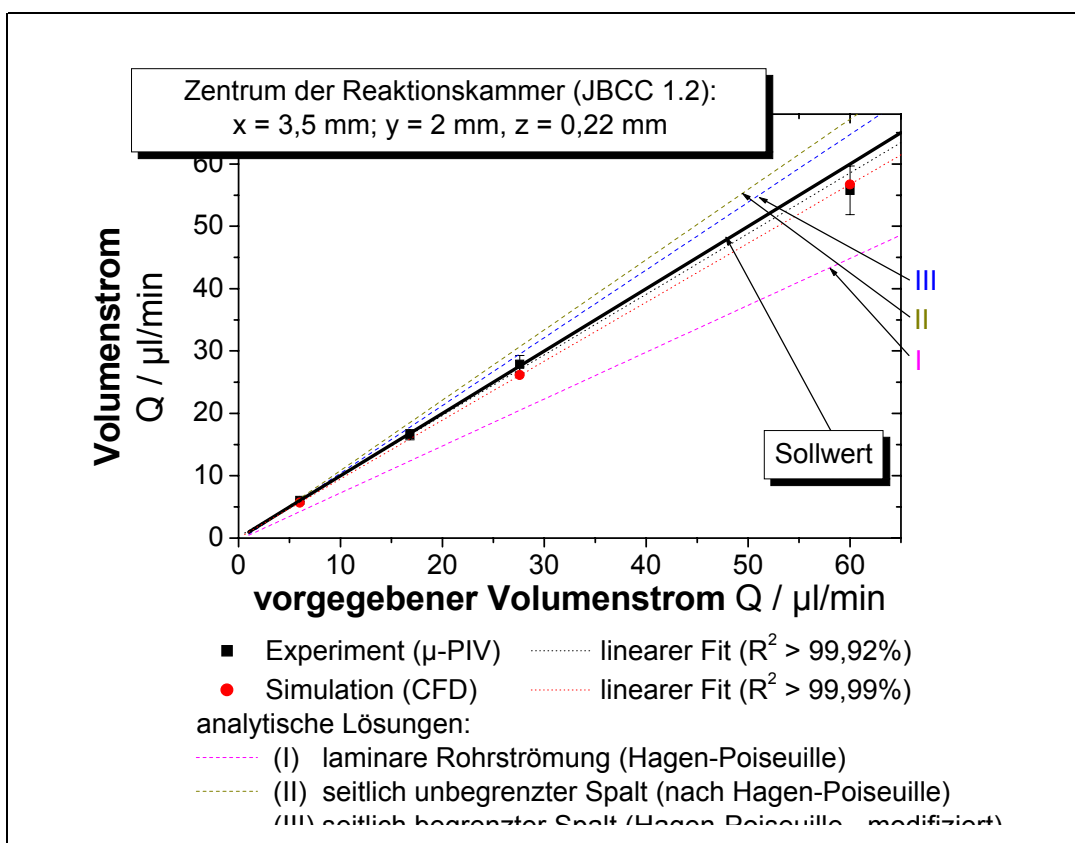


Abb. 79: Vergleich des errechneten Volumenstroms im Fluss-Mikroreaktor als Funktion des vorgegebenen Volumenstroms (Sollwert):  $\mu$ -PIV-Experiment – CFD-Simulation – analytische Lösungen

Zum quantitativen Vergleich von Modell, Simulation und Experiment sowie zu deren Validierung wurde der Volumenstrom  $Q$  herangezogen, wie in Kap. 2.5.2 A) (S. 68ff) und ist im Anhang D1b) beschrieben. Das Diagramm in Abbildung 79 fasst die jeweilige Abweichung vom erwarteten bzw. vorgegebenen Volumenstrom  $Q$  grafisch zusammen. Tabelle 6 quantifiziert die Ergebnisse in Form

relativer Abweichungen. Die Geschwindigkeit  $u_{\max}$  ging dabei als Ausgangsgröße in die analytische Berechnungen ein. Da Simulation und Experiment für  $u_{\max}$  geringfügig voneinander abweichende Werte ergaben (s. Abb. 75), existieren für die jeweiligen Modelle zwei Lösungen je nachdem, welcher Parametersatz zugrunde gelegt wurde.

**Tabelle 6:** Geschwindigkeitsprofil in y-Richtung: relative Abweichung vom Sollwert beim Vergleich des errechneten Volumenstroms im Fluss-Mikroreaktor als Funktion des vorgegebenen Volumenstroms (Sollwert):  
 $\mu$ -PIV-Experiment – CFD-Simulation – analytische Lösungen

| relative Abweichung vom Sollwert /%  |            | Volumenstrom (Sollwert) Q / $\mu\text{l}/\text{min}$ |       |       |       |
|--|------------|--|-------|-------|-------|
|  |            | 6,0  | 16,8  | 27,6  | 60,0  |
| Experiment ( $\mu$ -PIV)   | Mittelwert | 0,8  | -1,2  | 1,0   | -7,1  |
|  | Std-Abw    | 0,0  | -0,1  | 0,1   | -0,5  |
| Simulation (CFD)   |            | -5,9   | n.d.  | -5,2  | -5,5  |
| Modell I: HAGEN-POISEUILLE-Profil<br>(analog zur z-Richtung)                         | $\mu$ -PIV | -24,9  | -24,1 | -29,7 | -24,7 |
|  | CFD        | -31,2  | n.d.  | -30,4 | -30,9 |
| Modell II: konstantes Profil<br>(analog zum seitlich <i>nicht</i> -begrenzter Spalt) | $\mu$ -PIV | 12,6   | 13,9  | 5,4   | 12,9  |
|  | CFD        | 3,3  | n.d.  | 4,3   | 3,7   |
| Modell III: HAGEN-POISEUILLE, modifiziert<br>(seitlich begrenzter Spalt)             | $\mu$ -PIV | 8,5  | 9,7   | 1,5   | 8,7   |
|  | CFD        | -0,5   | n.d.  | 0,7   | -0,3  |

n.d.: nicht durchgeführt

Die Graphen von Experiment und Simulation besitzen, wie zu erwarten war, einen linearen Verlauf in Q mit einem hohen Korrelationskoeffizienten  $R^2 > 99,9\%$ . Die Abweichungen vom erwarteten Volumenstrom  $Q_{\text{erw}}$  bewegen sich für die Messungen mit  $\Delta Q/Q_{\text{erw}} < 8\%$  im Bereich des experimentellen Fehlers. Die Übereinstimmung des simulierten Volumenstroms mit dem Erwartungswert  $Q_{\text{erw}}$  liegen bei 95%.

Der Vergleich der analytischen Modelle bestätigte die oben aufgestellte Vermutung: Modell I unterschätzt den Volumenstrom Q, während die Werte nach den Modellen II und III über  $Q_{\text{erw}}$  liegen. Hierbei betragen die Abweichungen der Grenzfallmodelle I und II  $\Delta Q/Q_{\text{erw}} \approx -30\%$  und  $\Delta Q/Q_{\text{erw}} < 15\%$ . Modell III nähert  $Q_{\text{erw}}$  besser als 90% an. Diese Abweichung wird hauptsächlich durch das Geschwindigkeitsprofil  $u(y)$  verursacht. Die Strömung in der Reaktionskammer ist durch das einfache Modell III offenbar nicht vollständig zu beschreiben. Die Vermutung lag nahe, dass das Strömungsfeld durch den Ein- und Ausströmbereich in der *gesamten* Reaktionskammer Geschwindigkeitskomponenten orthogonal zur Hauptströmachse enthielte. Entsprechend wurden in den  $\mu$ -PIV-Messungen und CFD-Rechnungen die Anteile der Geschwindigkeitsvektoren in y- und z-Richtung  $u_y$  und  $u_z$  überprüft. Im Innern der Reaktionskammer ab einem lateralen Randabstand  $d_x \approx 1$  mm machten die Queranteile in beiden Fällen etwa 2 ... 5% des Längsbetrags aus und lagen im Bereich der experimentellen statistischen Winkelfehler. Die Untersuchung der Druckgradienten  $\delta p/\delta y$  bzw.  $\delta p/\delta z$  mithilfe der Simulationen lieferte äquivalente Resultate. Der Einfluss der Querströmung

wurde zwar bestätigt, erklärt die Diskrepanz des Modells III jedoch noch nicht ausreichend. Offensichtlich existiert eine Grenzschicht, in der die Strömung ein parabolisches Profil annimmt. Die Dicke der Grenzschicht ist jedoch abhängig von der Geometrie des Strömungsquerschnittes  $Y/Z$ . Die Zunahme bzw. Abnahme der Geschwindigkeit innerhalb der Schicht verläuft asymmetrisch: die Entfernung zur Wand bis zum Erreichen von  $u_{\max}$  beträgt in  $z$ -Richtung  $l = Z/2 = 0,22$  mm, in  $y$ -Richtung jedoch  $l \approx 0,6$  mm  $\neq Z/2$ . Dies wurde sowohl experimentell als auch durch die Simulationen bestätigt. (vgl. Abb. 76, S. 112 und Abb. 78, S. 113) Dies deutet, dass eine isolierte Betrachtung der Geschwindigkeitsfunktionen  $u(y)$  und  $u(z)$  nicht zulässig ist. Anschaulich gesprochen sind die beiden Funktionen über eine geschwindigkeitsbestimmende Abstandsfunktion  $f(y,z)$  miteinander gekoppelt (s. Kap. 2.5.2. A, S. 67ff). Die geschlossene Lösung des Problems wäre nur noch unter Berücksichtigung der PRANDTLschen Grenzschichttheorie und dem Einsatz komplexer Rechenprogramme zu lösen. (Sommerfeld 1970, Zierep 1993)

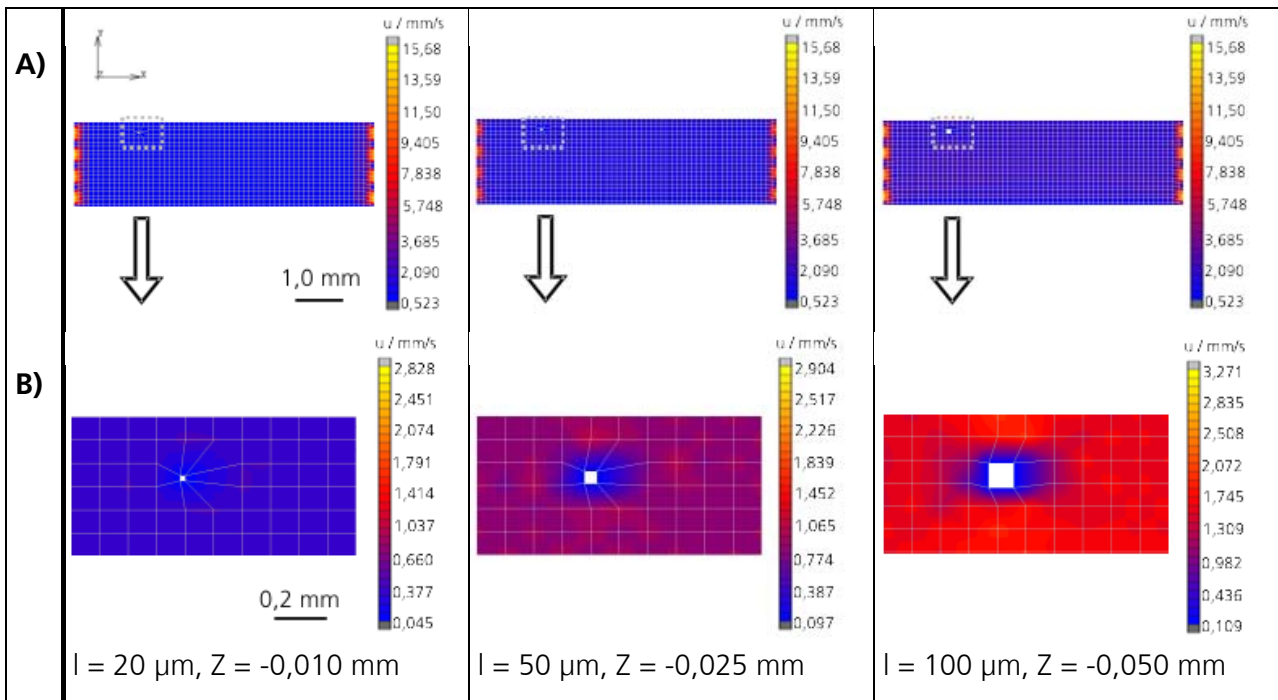
Unter Berücksichtigung der Vereinfachungen und experimentellen Fehler lässt sich folgern: die analytischen Modelle in  $z$ -Richtung (HAGEN-POISEUILLE) sowie in  $y$ -Richtung (Modell III) stimmen prinzipiell mit der realen und gerechneten Strömung überein. Dies erhärtet die bisherigen Befunde, dass im Fluss-Mikroreaktor eine laminare Strömung ohne Verwirbelungen vorherrscht. Die Validierung von Experiment, Simulation und Modell gegenüber den erwarteten Flussraten war demnach erfolgreich. Das Geschwindigkeitsprofil ist jedoch nicht durch den einfachen Grenzfall einer ideal laminaren Rohrströmung analytisch zu beschreiben, sondern bedarf eines komplexeren Modells.

### C) Einfluss des Kristallwachstums

Aus den bisherigen Ausführungen ging hervor, dass die fluidischen 3D-Simulationen die realen Strömungsverhältnisse in der Reaktionskammer gut wiedergeben. Somit konnten die Ergebnisse aus der Untersuchung des Einflusses wachsender Kristalle zur qualitativen Beurteilung herangezogen werden. Am Deckel adhärierende Kristalle mit Kantenlängen  $l \leq 100$   $\mu\text{m}$  stören das Strömungsprofil nicht signifikant. Die Stromlinien der Umströmung des Hindernisses entsprechen dabei einer halbseitigen Zylinderumströmung ohne Zirkulation. (Zierep 1993)

X-y-Schnitte durch die Reaktionskammer bei  $z = Z - l/2$  (Kristallmitte) zeigen, dass der Einfluss der Störung auf das Strömungsfeld in endlicher Entfernung  $d \approx \pm 2 l$  zu vernachlässigen ist. Die Grafik in Abbildung 80 illustriert das „worst case scenario“ bei der Flussrate  $Q = 60$   $\mu\text{l}/\text{min}$ . Das Kristallwachstum stört die Geschwindigkeitsverteilung nur in deren unmittelbaren Umgebung. Ihr Einfluss auf das Gesamtströmungsfeld kann somit bei den für die Applikation relevanten Flussraten  $Q < 60$   $\mu\text{l}/\text{min}$  vernachlässigt werden.





**Abb. 80:** CFD-Simulation – qualitative Analyse Einfluss des Kristallwachstums von  $l = 20 \dots 100 \mu\text{m}$  auf das Strömungsfeld bei  $Q = 60 \mu\text{l}/\text{min}$ :  
 2D-Schnitte der x-y-Ebene durch Reaktionskammer auf Höhe der Kristallmitte  
**A)** Übersicht der halben Reaktionskammer – **B)** Detail um Kristall (Achtung: unterschiedliche Farbskalen!)

Auf Grundlage der Strömungsfeldanalyse erfüllt der Fluss-Mikroreaktor in der Variante „JBCC 1.2“ die fluidische Forderung eines laminaren und homogenen Strömungsfeld in der Reaktionskammer.

### 3.4.3 Verweilzeituntersuchungen

Die Messung des Verweilzeitverhaltens diente der Fragestellung, inwieweit klassische verfahrenstechnische Modelle auf den Bereich der Mikroreaktoren übertragen werden können. Hiermit sollten dann die mittlere Verweilzeit  $\tau_{\text{verweil}}$  bestimmt und der Reaktortyp eingegrenzt werden. Die Messung der Impulsantwort auf einen Farbstoffimpuls über der Zeit ergab für das Trägermedium Wasser den in Abbildung 81 dargestellten Verlauf. Erwartungsgemäß steigt das Extinktionssignal nach einer Lag-Phase rasch an, sobald die ersten Farbstoffmoleküle den Detektor erreichen. Nach Durchlaufen eines Maximalwertes klingt das Signal ab und bildet so je nach den Messparametern eine mehr oder weniger breite Verteilungsfunktion. Die Ausgangskurve  $y(t)$  ähnelt in ihrer Form der Eingangskurve  $x(t)$ . Es ist keine auffällige Verbreiterung der Verweilzeit-Summenfunktion am Reaktorausgang zu erkennen. Dies deutet darauf hin, dass keine signifikante Dispersion im Chipreaktor selbst vorliegt. Damit sind im Chipreaktor keine Kurzschlussströmungen zu erwarten, was sich mit den Befunden aus den Druckverlust- und Geschwindigkeitsfeld-Analysen deckt. Separate Messungen der fluidischen Peripherie ohne den Chipreaktor bestätigten, dass die Störungen der Strömung v.a. fluidische Kupplungen die Gestalt der Verweilzeit-Summenfunktion dominieren.

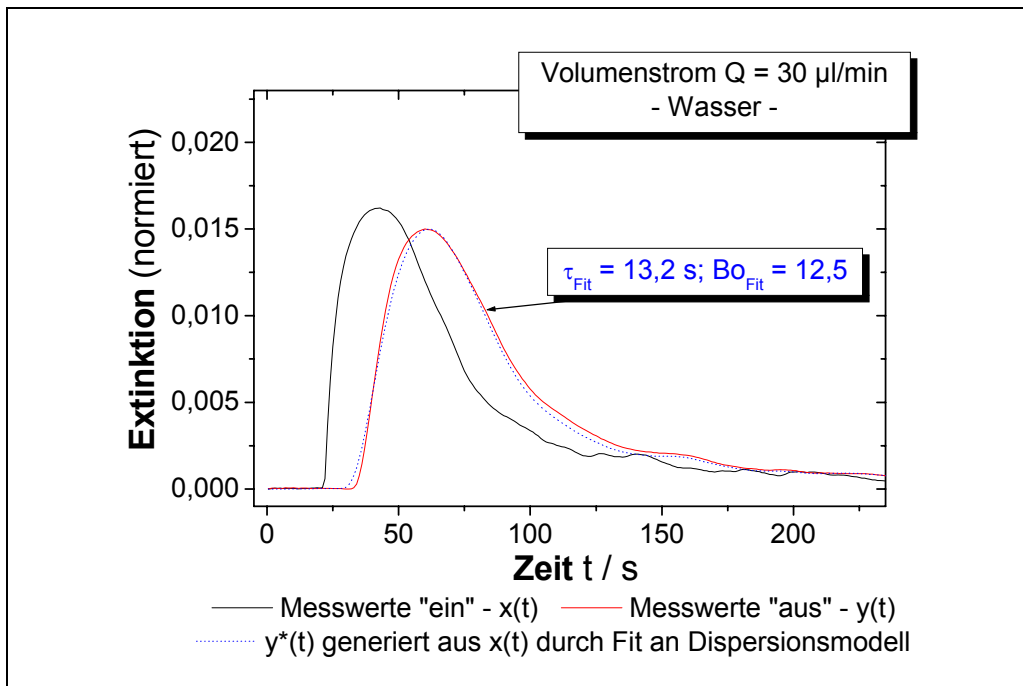


Abb. 81: Qualitative Untersuchung des Verweilzeitverhaltens: Ausgangssignal  $y(t)$  gegenüber Eingangssignal  $x(t)$  unter Anwendung des Dispersionsmodells – Lösungsmittel Wasser

Experimente mit Glycerin, 20% als Trägermedium dienen der Untersuchung der Abhängigkeit des Verweilzeitverhaltens von der Viskosität. Messungen bei  $Q = 30 \mu\text{l}/\text{min}$  zeigten eine unterschiedliche Gestalt der Eingangs- und Ausgangskurve (s. Abb. 82).

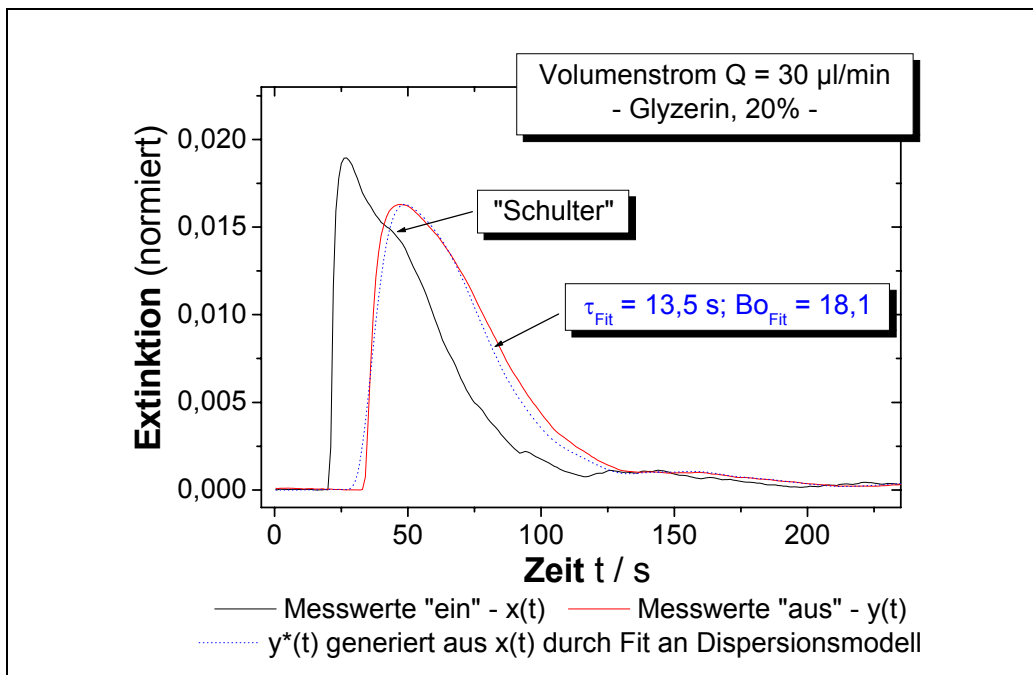


Abb. 82: Qualitative Untersuchung des Verweilzeitverhaltens: Ausgangssignal  $y(t)$  gegenüber Eingangssignal  $x(t)$  unter Anwendung des Dispersionsmodells – Lösungsmittel Glycerin, 20%  
Schulter bei  $x(t)$  verschwindet bei  $y(t)$

Die bei  $x(t)$  deutlich ausgeprägte Schulter ist bei  $y(t)$  kaum erkennbar. Das Strömungsverhalten in der Reaktionskammer gleicht also eine Verbreiterung der Verweilzeit-Summenfunktion aus. Dies wurde anschaulich auf die Bereiche unterschiedlicher Strömungsgeschwindigkeit auf dem Chipreaktor zurückgeführt. Tracermoleküle, welche zeitlich verschoben im Chipreaktor ankommen, werden in der Reaktionskammer auf 1/20 ihrer Geschwindigkeit abgebremst. Damit kann es zum Ausgleich kleiner Laufzeitunterschiede kommen. Der Tracer verlässt den Chipreaktor infolge dieses „Beckeneffektes“ als homogenisierter Molekülverband. Die etwa 1,75-fach höhere dynamische Viskosität  $\mu$  der 20%-igen Glycerin-Lösung gegenüber Wasser bewirkt eine entsprechend eingeschränkte Molekülbewegung, da nach STOKES-EINSTEIN  $D \sim 1/\mu$ . Dadurch gewinnen diffusionskontrollierte Störbereiche, wie z.B. fluidische Kupplungsstücke, relativ an Bedeutung. Diese tragen signifikant zu einer Veränderung der Verweilzeitverteilung durch Nebenpeaks (Schultern) bei. (vgl. Kap. 2.5.2 A, S. 70ff) Im direkten Vergleich der Kurven  $x(t)$  in den Abbildungen 81 und 82 (S. 118) ist dies deutlich zu erkennen.

Die gleiche Tendenz zeigen die Untersuchungen zur Abhängigkeit vom Volumenstrom  $Q$ . Mit abnehmender Flussrate steigt die Welligkeit der Kurven  $y(t)$  und insbesondere  $x(t)$ . (s. Abb. F1, Anhang F) Erwartungsgemäß verschiebt sich das Hauptmaximum bei steigendem  $Q$  zu kürzeren Antwortzeiten hin. Dies entspricht kleineren mittleren Verweilzeiten  $\tau_{\text{Verweil}}$ .

Mithilfe des Dispersionsmodells wurde die Ausgangskurve  $y^*(t)$  aus  $x(t)$  berechnet. In Abbildung 81 und 82 (S. 118) sind beispielhaft für die Trägermedien Wasser und Glycerin, 20% die ermittelte Kurven  $y^*(t)$  bei  $Q = 30 \mu\text{l}/\text{min}$  dargestellt. Die berechneten Kurven  $y^*(t)$  stimmten gut mit den experimentell ermittelten Kurven  $y(t)$  überein. Das Dispersionsmodell ist also grundsätzlich auf den vorliegenden Chipreakortyp anwendbar. Die hieraus ermittelten Werte für  $\tau_{\text{Verweil}}$  und  $B_o$  sind in der nachfolgenden Tabelle (Tabelle 7) zusammengefasst.

**Tabelle 7:** Zusammenfassung der theoretisch erwarteten Werte für  $\tau_{\text{Verweil}}$  und der mithilfe des Dispersionsmodells ermittelten Werte für  $\tau_{\text{Verweil}}^*$ ,  $B_o$  und  $\sigma^2$  als Funktion des Volumenstroms  $Q$  für Wasser und Glycerin, 20%

| Volumenstrom<br>$Q / \mu\text{l}/\text{min}$ | Transport-<br>Medium | erwarteter<br>Druckverlust<br>$\Delta p / \text{Pa}$ | erwartete<br>Verweilzeit<br>$\tau_{\text{Verweil}} / \text{s}$ | mittlere<br>Verweilzeit<br>$\tau_{\text{Verweil}}^* / \text{s}$ | BODENSTEIN<br>zahl $B_o$ | Varianz der<br>Verteilung<br>$\sigma^2 / \text{s}^2$ |
|--|----------------------|--|--|---|--------------------------|--|
| 6  | Wasser               | 0,003  | 163,1  | $93,4 \pm 0,5$  | $46,6 \pm 0,5$           | 0,04   |
| 15   | Wasser               | 0,008  | 65,2   | $32,3 \pm 0,2$  | $23,1 \pm 0,4$           | 0,09   |
| 30   | Wasser               | 0,016  | 32,6   | $13,3 \pm 0,3$  | $12,5 \pm 0,1$           | 0,16   |
| 30   | Glycerin, 20%        | 0,029  | 32,6   | $13,5 \pm 0,1$  | $18,1 \pm 0,4$           | 0,11   |
| 60   | Wasser               | 0,033  | 16,3   | $5,6 \pm 0,1$   | $10,1 \pm 0,1$           | 0,20   |

Zum Vergleich sind die theoretisch erwarteten mittleren Verweilzeiten  $\tau_{\text{Verweil}}$  aufgeführt. Diese wurden unter Berücksichtigung des laminaren Strömungsprofils sowie der Geometrie der Einzelkomponenten berechnet. Mit zunehmendem Volumenstrom  $Q$  nehmen die theoretisch

erwarteten Verweilzeiten  $\tau_{\text{Verweil}}$  sowie die mithilfe des Dispersionsmodells berechneten Werte  $\tau_{\text{Verweil}}^*$  ab, da diese vornehmlich durch den Konvektionsstrom bestimmt werden. Die berechneten Werte folgen tendenziell den erwarteten Verweilzeiten, liegen jedoch betragsmäßig darunter. Die BODENSTEINZahl  $Bo$  sollte proportional zur Geschwindigkeit und damit zum Volumenstrom zunehmen. Für den Fall einer laminaren Strömung ist jedoch einsichtig, dass auch die axiale Dispersion  $D_{\text{ax}}$  mit  $Q$  zunimmt. Bildlich gesprochen zieht sich das Profil mit steigender Flussrate auseinander. Dies führt zu einer mit ansteigendem Volumenstrom zunehmender Varianz  $\sigma^2$  der Verweilzeitverteilungsfunktion und entsprechend der reziproken Abhängigkeit zu sinkenden BODENSTEINZahlen. Für kleine Werte für  $Q$  gewinnt die radiale Dispersion gegenüber der axialen Dispersion an Bedeutung, da  $\tau_{\text{Verweil}} \approx \tau_{\text{Diff}}$ . Da die radiale Dispersion jedoch im Dispersionsmodell nicht berücksichtigt wird, steigt die BODENSTEINZahl und damit die Varianz der Verweilzeitverteilung für abnehmende Volumenströme folgerichtig an. Diese Erkenntnisse stimmen mit dem in Mikrosystemen erwarteten Verhalten überein. (s. Kap. 2.5.2 A, S. 72)

Die Viskositätsstudien zeigen den erwarteten Trend: während die mittlere Verweilzeit als unabhängig von der Viskosität anzusehen ist, wurde eine Abhängigkeit des Druckverlustes und der BODENSTEINZahl bzw. Varianz der Verteilungsfunktion gefunden. Der Druckverlust  $\Delta p$  nimmt nach HAGEN-POISEUILLE linear mit der Viskosität  $\mu$  und dem Volumenstrom  $Q$  zu. Bei gleicher Strömungsgeschwindigkeit ist die Molekülbeweglichkeit von Glycerin gegenüber Wasser eingeschränkt. Das Profil ist entsprechend weniger stark gespreizt, was sich in einer kleineren Varianz manifestierte. Die Experimente bestätigen, dass  $Bo$  für das viskosere Trägermedium Glycerin im Vergleich zu Wasser ebenfalls ansteigt. Die Verhältnisse der axialen Vermischung werden wiedergegeben durch  $D_{\text{ax}}(\text{Glycerin}) / D_{\text{ax}}(\text{Wasser}) < 1$  und korrespondieren mit den Eigenschaften (Viskosität bzw. Diffusionskoeffizient) der beiden Stoffe.

Das Dispersionsmodell lieferte für den vorliegenden Fluss-Mikroreaktor qualitativ richtige Ergebnisse. Es erlaubte jedoch keine detaillierte quantitative Aussagen über das Dispersionsverhalten und damit über den Reaktortypus. Eine Interpretation der Ergebnisse war nur eingeschränkt möglich, da die Voraussetzungen bezüglich der Strömungsverhältnisse, der Reaktorgeometrie sowie der Messanordnung nur teilweise zutreffen:

- 1) keine turbulente Pfropfenströmung, sondern laminarer Fluss;  
Hinweise aus Druckverlustbetrachtungen, Geschwindigkeitsverteilung aus  $\mu$ -PIV-Messungen und CFD-Simulationen und  $Re \ll 10$
- 2) Anpassung des Modells ohne Berücksichtigung der Reaktorgeometrie und des realen Strömungsfeldes (Spaltströmung mit HAGEN-POISEUILLE-Profil in der z-Dimension und annähernd konstantem Geschwindigkeitsprofil in der y-Dimension)
- 3) Volumen des Tracerpulses in der Größenordnung des Volumenstroms; Detektoren sind nicht klein gegenüber dem Probenvolumen

Die Anwendung des makroskopischen Dispersionsmodells auf Mikroreaktoren erscheint somit nur in einfachen Sonderfällen sinnvoll und bedarf einer aufwändigen Anpassung an die realen hydrodynamischen und geometrischen Verhältnisse des zu analysierenden Reaktors.

#### **3.4.4 Thermisches Verhalten**

Analog zur Charakterisierung des Batch-Mikroreaktors umfasst die thermische Analyse des Fluss-Mikroreaktors dynamische Parameter sowie Größen zur Homogenität und Langzeitstabilität der Temperaturfelder auf dem Chipreaktor.

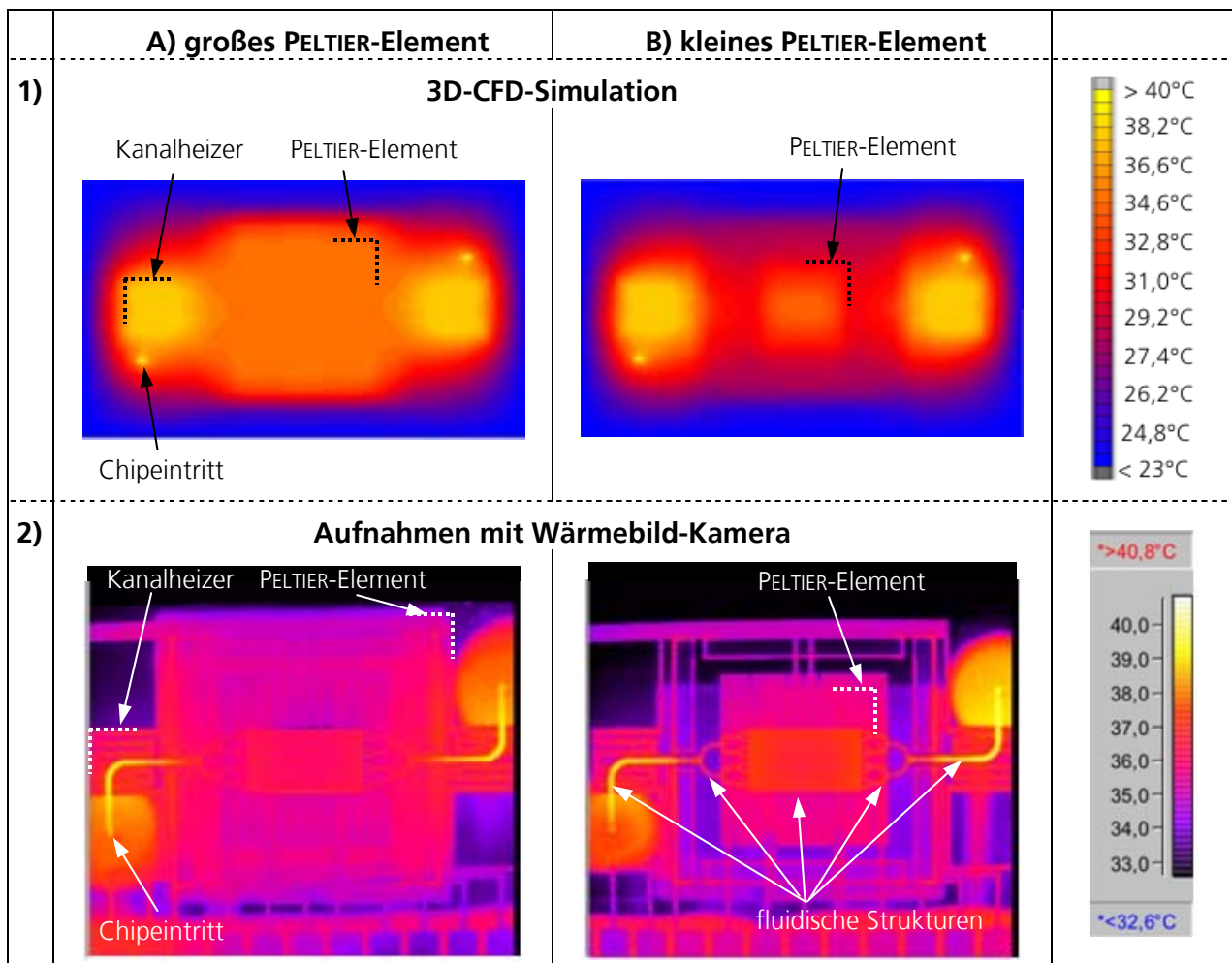
##### **A) Langzeitstabilität und Genauigkeit**

Messungen der Langzeitstabilität und Genauigkeit der Temperaturregelung des Fluss-Mikroreaktors ergaben prinzipielle Übereinstimmung mit dem Verhalten des Batch-Mikroreaktors (s. Abb. 55, S. 90). Die Genauigkeit wurde hinsichtlich Präzision und Reproduzierbarkeit durch Anwendung zyklischer Protokolle getestet. Die Abweichung der Temperatur vom Sollwert betrug  $\Delta T < \pm 0,9$  K für ein Zeitintervall von ca. 60 h. Bei ausgeschalteten Kanalheizern sank die Ungenauigkeit auf  $\Delta T < \pm 0,7$  K. Die Werte liegen demnach für einen ausreichend langen Zeitraum innerhalb der geforderten Genauigkeitsgrenzen.

##### **B) Thermografie und CFD-Simulation**

Die gekoppelt thermisch-fluidischen CFD-Rechnungen stimmen qualitativ gut mit den Aufnahmen einer kalibrierten Wärmebild-Kamera überein. Ein Vergleich der beiden Messmethoden ist in Abbildung 83 (S. 122) illustriert für Solltemperaturen  $\vartheta_{\text{soll}}$  (Reaktionskammer) = 35°C und  $\vartheta_{\text{soll}}$  (Kanalheizer) = 38°C. Außerdem sind zwei Designvarianten gegenübergestellt, um qualitativ den Einfluss der Größe des PELTIER-Elementes zu demonstrieren. Die Schnittebene der Simulationen befindet sich hierbei an der Unterkante des Glasdeckels. Die laterale Ausdehnung und der thermische Einfluss der wärmeübertragenden Flächen (PELTIER-Element und Kanalheizer) ist deutlich erkennbar. Die Wärmebild-Aufnahmen ergaben tendenziell dasselbe Ergebnis.

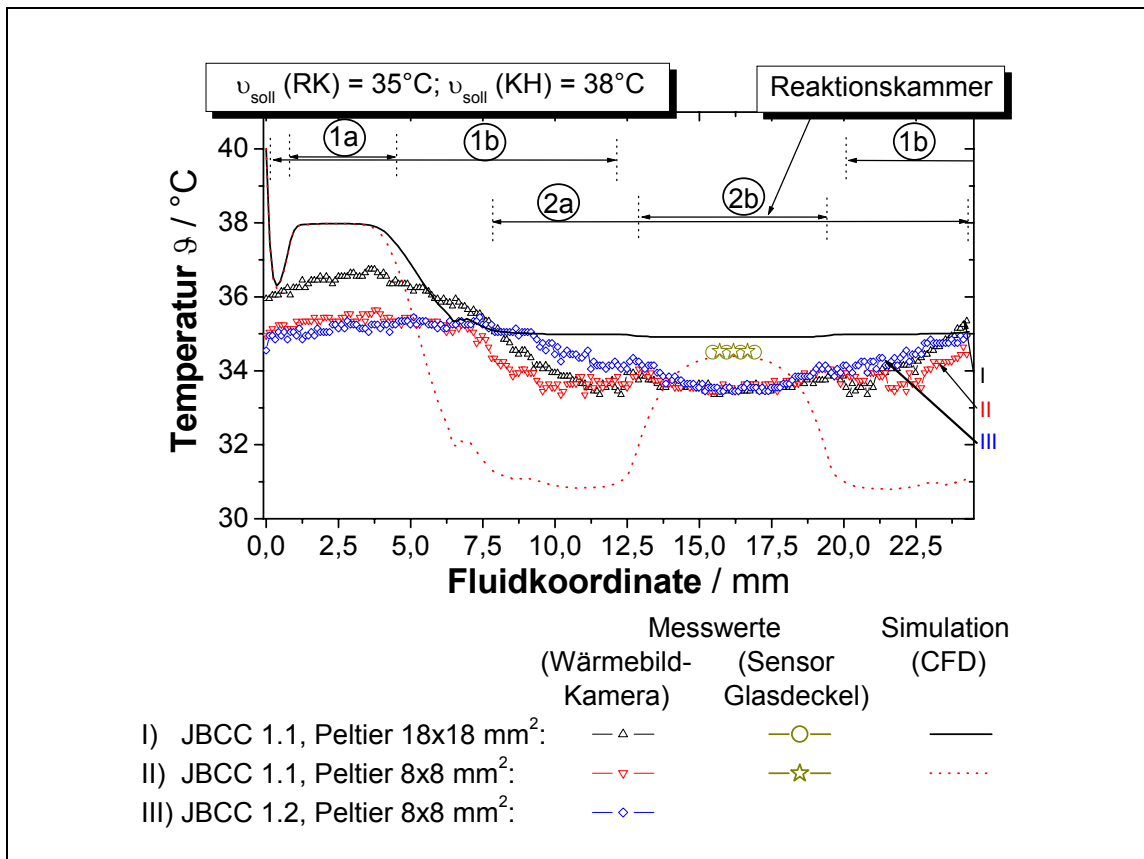
Störend bei der thermografischen Beurteilung des Chipreaktors fallen die Metallisierungen auf der Chiprückseite auf. (vgl. Abb. 83 2) Aufgrund der Transparenz des Siliziumsubstrates in diesem Wellenlängenbereich kommt es zur Absorption von Strahlung geometrisch darunter liegender Materialien. Entsprechend sind sowohl die Dünnschichtmetallisierungen (Sensor- und Heizerstrukturen) als auch das PELTIER-Element zu erkennen. Die thermische Analyse der fluidischen Strukturen wurde davon jedoch nicht beeinflusst, da im interessierenden Bereich, dem Fluid, die Strahlung vollständig absorbiert wird.



**Abb. 83:** Qualitativer Vergleich der CFD-Simulationen (**1**) mit den Messungen mithilfe der Wärmebild-Kamera (**2**): Einfluss der Geometrie des PELTIER-Elementes:  
**A)** großes PELTIER-Element (18 x 18 mm) – **B)** kleines PELTIER-Element (8 x 8 mm)  
 Fluss-Mikroreaktor mit  $\vartheta_{\text{soil}}$  (Reaktionskammer) = 35°C –  $\vartheta_{\text{soil}}$  (Kanalheizer) = 38°C

### C) Laterale Temperaturprofile

Zur vorläufigen Validierung der CFD-Simulationen wurden die Messungen mit Sensoren unterhalb des Glasdeckels, welche dadurch im Kontakt mit dem Fluid in der Reaktionskammer stehen, als Referenzwerte herangezogen. Hierzu wurden die berechneten Temperaturen mit den Messwerten an derselben Position miteinander verglichen. Abbildung 84 zeigt, dass Rechnung und Sensormessung quantitativ gut miteinander übereinstimmen. Die Abweichungen liegen im Beispiel ( $\vartheta_{\text{soil}}$  (Reaktionskammer) = 35°C und  $\vartheta_{\text{soil}}$  (Kanalheizer) = 38°C) unter  $\Delta T < 0,2$  K. Die Grafik zeigt weiterhin die Abhängigkeit des Temperaturverlaufes über der Fluidkoordinate bei verschiedenen Designvarianten. (vgl. 3.3.1, S. 98f) Hierbei wurde qualitativ der Einfluss der Geometrie des PELTIER-Elementes sowie Design und Position der Kanalheizer in drei Varianten (I ... III) untersucht. Die Wärmebild-Aufnahmen schufen den experimentellen Zugang zur lateralen Temperaturverteilung. Die Kurven in Abbildung 84 bestätigen die bereits im Zuge der thermischen Untersuchungen zum Batch-Mikroreaktor (s. Kap. 3.2.1 C, S. 93) geäußerten Vermutungen:



**Abb. 84:** Laterales Temperaturprofil auf Chipreaktor entlang der Fluidkoordinate – Einfluss der Geometrie der wärmeübertragenden Flächen  
 Vergleich Messwerte Wärmebild-Kamera, Messwerte Sensoren und CFD-Simulationen unterhalb des Glasdeckels in drei Varianten I ... III  
 Beispiel:  $\vartheta_{\text{soll}}$  (Reaktionskammer, RK) = 35°C und  $\vartheta_{\text{soll}}$  (Kanalheizer, KH) = 38°C  
**1a)** KH-Design JBCC 1.1 – **1b)** KH-Design JBCC 1.2 –  
**2a)**  $A_{\text{PELTIER}} = 18 \times 18 \text{ mm}^2$  – **2b)**  $A_{\text{PELTIER}} = 8 \times 8 \text{ mm}^2 \equiv$  etwa Abmessung von RK

- Je kleiner die wärmeübertragende Fläche, desto größer ist die lateralen Temperaturdifferenzen in der Reaktionskammer, und umgekehrt (vgl. Varianten I und III).
- Je größer der Abstand zwischen der Position des Kanalheizers und dem PELTIER-Element, desto inhomogener ist das Temperaturprofil.
- Die Geometrie der Kanalheizer hat keinen signifikanten Effekt auf die Homogenität in der Reaktionskammer bei gleicher Geometrie des PELTIER-Elementes (vgl. Varianten II und III).

Die Kombination Kanalheizerdesign nach Design JBCC 1.1 ( $\equiv$  1a) und kleine wärmeübertragende Fläche ( $\equiv$  2b) ist dabei am ungünstigsten. Dies entspricht Designvariante II. Die Umgebung kühlt das Fluid im Bereich zwischen Reaktionskammer und Kanalheizer sogar auf eine Temperatur unterhalb  $\vartheta_{\text{soll}}$  (Reaktionskammer). Damit herrschen vom thermischen Standpunkt aus gesehen ungünstige Kristallisationsverhältnisse. Der kälteste Bereich ist nicht mehr in der Reaktionskammer, sondern in die Mikrofluidkanäle verlagert. Es besteht die Gefahr, dass an der Kanalwandung aufgrund der niedrigen Strömungsgeschwindigkeit Kristallisationskeime nicht-retrograder Proteine entstehen. Im

Extremfall könnten diese zum Blockieren der Kanäle und damit zum Ausfall des Mikroreaktors führen.

Die Analyse der lateralen Temperaturverteilung entlang der Fluidkoordinate auf dem Chipreaktor hat gezeigt, dass zwischen den Simulationen und den thermografischen Messungen grundsätzliche Übereinstimmung besteht. Aufgrund der messtechnischen Randbedingungen der Wärmebild-Aufnahmen (Mischbild-Effekt, s. Kap. 2.5.1 C, S. 64) sind die Profile im Vergleich zu den Simulationen weniger scharf definiert. Dennoch liefert die Wärmebild-Kamera qualitativ richtige Ergebnisse und gibt die realen Verhältnisse grundsätzlich wieder.

Die Quantifizierung der lateralen Temperaturdifferenzen  $\Delta T_{\text{lat}}$  in der Reaktionskammer stellte sich in Analogie zum Batch-Mikroreaktor auch für den Fluss-Mikroreaktor als schwierig dar. (vgl. Kap. 3.2.1 C, S. 91f) Eine Abschätzung auf Basis der Messwerte der Wärmebild-Kamera und der Simulationen lieferte physikalisch plausible Ergebnisse. (s. Abb. 85)

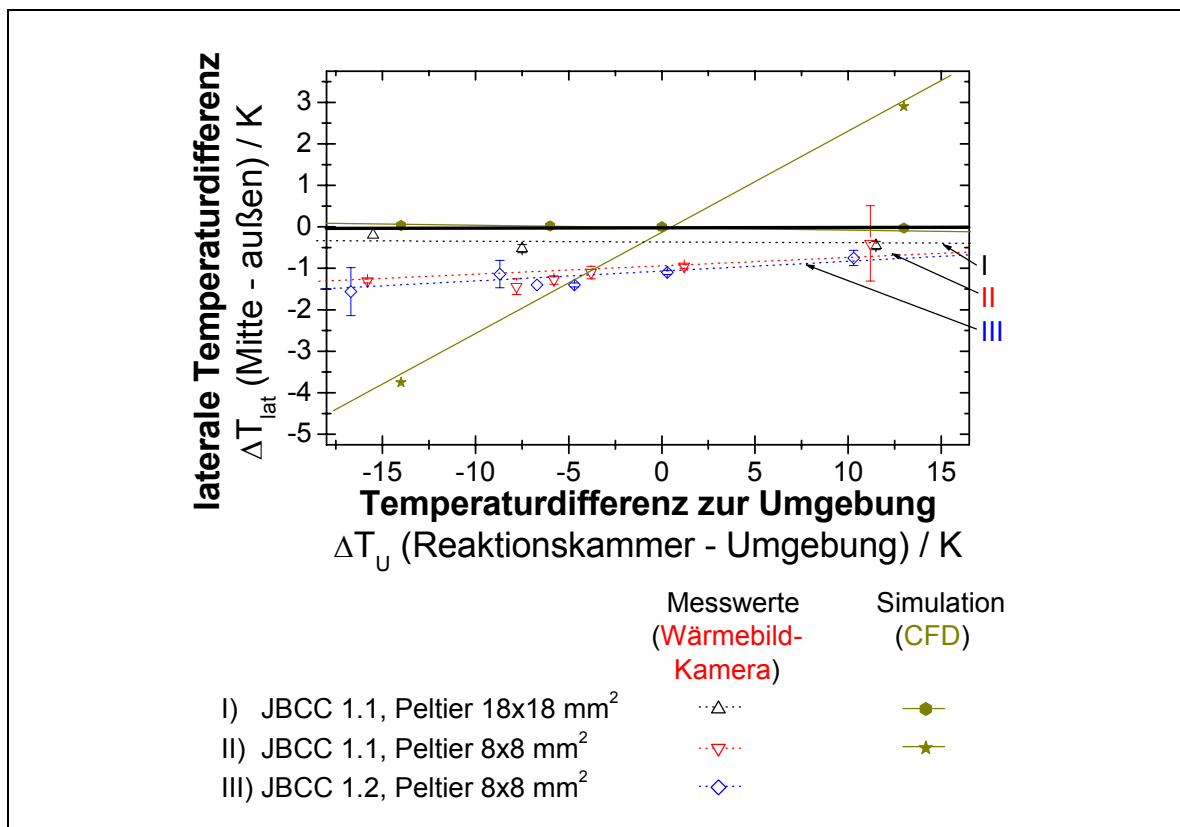


Abb. 85: Laterale Temperaturdifferenz  $\Delta T_{\text{lat}}$  des Fluss-Mikroreaktors in der Reaktionskammer (Mitte – Ein-/ Ausgang) als Funktion der Temperaturdifferenz zur Umgebung  $\Delta T_U$  – Einfluss der Geometrie des PELTIER-Elementes: Vergleich Messwerte Wärmebild-Kamera mit den CFD-Simulationen

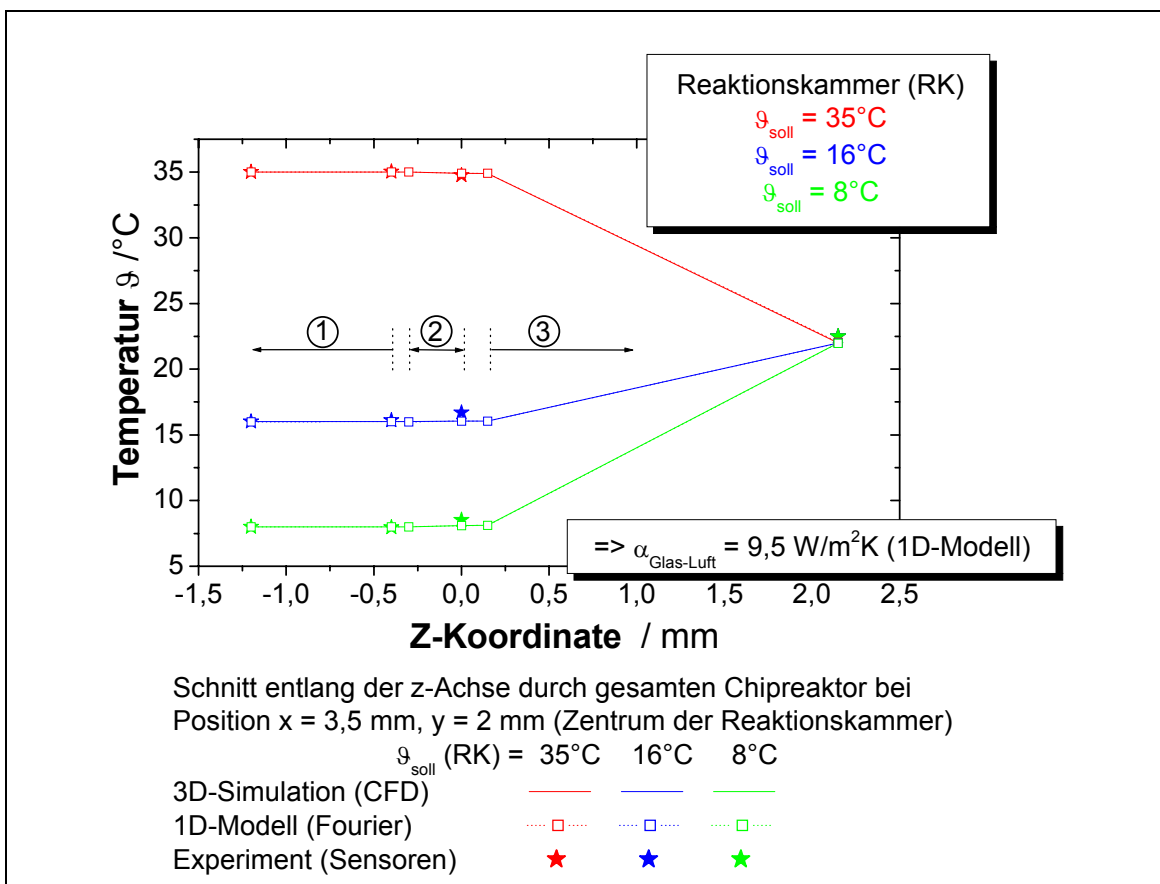
Die Messkurven liegen unterhalb der Nulllinie, da die Temperatur in den Mikrokanälen mithilfe der Kanalheizer auf einem höheren Niveau gehalten werden. Der „cold spot“ befand sich also tatsächlich im Zentrum der Reaktionskammer. Beim Einsatz eines PELTIER-Elementes mit der Fläche  $A = 8 \times 8 \text{ mm}^2$  überschritten die lateralen Temperaturdifferenzen jedoch das geforderte Intervall



$\Delta T_{\text{lat}} < 1 \text{ K}$ . Die Graphen der Simulationsergebnisse bestätigen ebenfalls die qualitativen Erkenntnisse hinsichtlich des Designs der wärmeübertragenden Flächen: das Design des PELTIER-Elements (vgl. Variante I und II) beeinflusst den lateralen Temperaturgradient in der Reaktionskammer signifikant.

#### D) Vertikale Temperaturprofile

Die Validierung der 3D-CFD-Rechnungen erfolgte anhand des analytischen 1D-Modells nach FOURIER. (s. Gleichung G8, S. 56) Dieses wurde zudem mit den Messungen der Pt-Sensoren an der Unterseite von Chipreaktor und Glasdeckel verglichen. Zur Quantifizierung wurden die vertikalen Temperaturverteilung  $\Delta T_{\text{vert}}$  entlang der z-Koordinate im lateralen Zentrum der Reaktionskammer ( $x = 3,5 \text{ mm}$ ,  $y = 2 \text{ mm}$ ) aufgetragen. (s. Abb. 86)



**Abb. 86:** Vertikales Temperaturprofil über Chipreaktor incl. Luft/ Umgebung als Funktion der z-Koordinate des Fluss-Mikroreaktors:  
 Vergleich der 3D-CFD-Simulationen und analytisches 1D-Modell nach FOURIER mit Messwerten der Sensoren (Unterseite Chipreaktor & Glasdeckel)  
**1) PELTIER-Element – 2) Fluid in Reaktionskammer – 3) Luft/ Umgebung**

Die vergleichende Analyse innerhalb des Chipreaktors sowie in dessen unmittelbaren Umgebung ergab folgende Resultate:

- 3D-Simulation, 1D-Modell und Sensormessungen stimmen sehr gut miteinander überein. Die relativen Abweichungen  $\Delta\vartheta/\vartheta$  sind kleiner 2%.

Das stark vereinfachende 1D-Modell nach FOURIER approximiert die aufwändigen 3D-Berechnungen sehr gut. Es liefert jedoch keine Information beispielsweise zur lateralen Temperaturverteilung sowie zum Einfluss von Strömungen im Chipreaktor.

- Eine Abschätzung des Wärmeübergangskoeffizienten  $\alpha_{\text{Glas} \rightarrow \text{Luft}}$  durch Parametervergleich zwischen Simulation und Modell ergab beste Übereinstimmung für  $\alpha_{\text{Glas} \rightarrow \text{Luft}} \approx 9,5 \text{ W}/(\text{m}^2 \text{ K})$ .

Der Wert liegt sehr gut im Bereich der Literaturwerte von  $5 < \alpha / \text{W}/(\text{m}^2 \text{ K}) < 15$  (vgl. Kap. 3.2.1 C, S. 94). Der relative Anteil am Gesamtwärmeübergang errechnete sich zu  $R_{\text{th}}(\alpha_{\text{Glas} \rightarrow \text{Luft}}) > 99\%$ . Dies bedeutet gleichzeitig, dass der Wärmewiderstand des Glasdeckels mit  $R_{\text{th}}(\text{Glasdeckel}) < 0,5\%$  wenig wärmeisolierende Wirkung besitzt. Dies deckt sich mit den Erkenntnissen aus Kapitel 3.1.2 C (S. 94). Folglich sind in der Reaktionskammer verhältnismäßig kleine vertikale Temperaturdifferenzen  $\Delta T_{\text{vert}}$  zu erwarten.

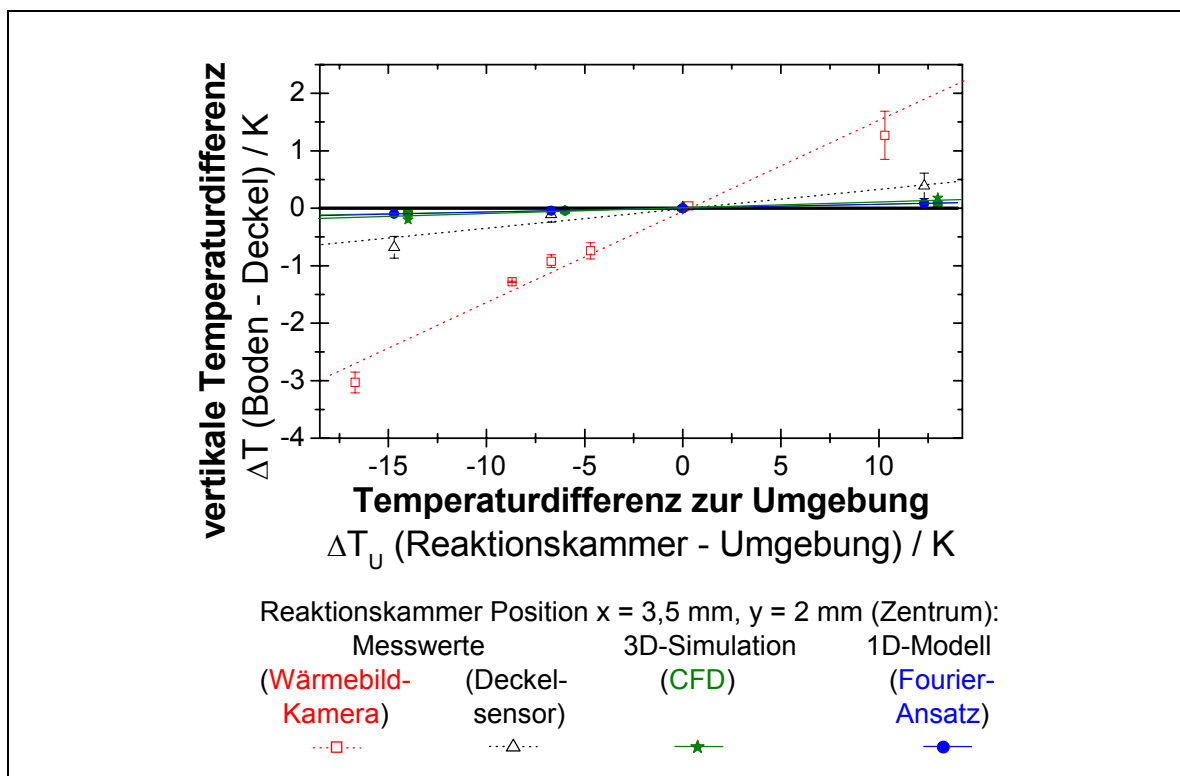


Abb. 87: Vertikale Temperaturdifferenz  $\Delta T_{\text{vert}}$  in der Reaktionskammer des Fluss-Mikroreaktors (Boden – Deckel) als Funktion der Temperaturdifferenz zur Umgebung  $\Delta T_{\text{U}}$  – Einfluss der Geometrie des PELTIER-Elementes für Flussrate  $Q = 30 \mu\text{l}/\text{min}$ : Vergleich Messwerte Wärmebild-Kamera mit den CFD-Simulationen

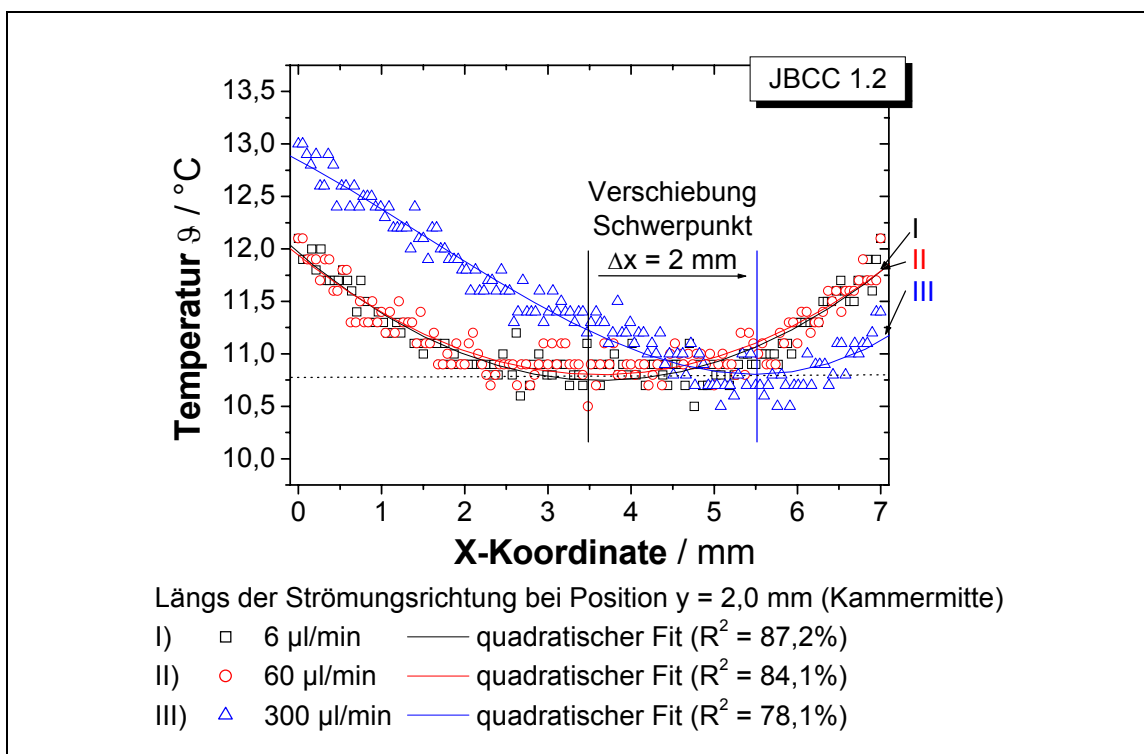
Der Verlauf der Kurven  $\Delta T_{\text{vert}}$  über der Temperaturdifferenz zur Umgebung  $\Delta T_{\text{U}}$  korrespondieren gut mit Resultaten des Batch-Mikroreaktors. (Abb. 87) Die Graphen bilden erwartungsgemäß Ursprungsgeraden mit positiver Steigung. Die Sensoren detektierten im lateralen Zentrum der Reaktionskammer maximale vertikale Temperaturdifferenzen  $\Delta T_{\text{vert}} < \pm 0,5 \text{ K}$  für  $\Delta T_{\text{U}} < \pm 15 \text{ K}$ . Die thermografischen Messungen lieferten etwa 6-fach höhere vertikale Gradienten im Fluid. Diese Diskrepanz wurde wie auch bei der Analyse des Batch-Mikroreaktors darauf zurück geführt, dass bei

der Bestimmung von  $\Delta T_{\text{vert}}$  2 unterschiedliche Messmethoden kombiniert wurden. (s. Kap. 3.2.1 C, S. 93f) Der Vergleich der Simulationen mit den Sensormessungen zeigte, dass die Rechnungen die Gradienten in der Reaktionskammer um etwa einen Faktor 2 unterschätzen. Dies legte die Vermutung nahe, dass der effektive Wärmeübergangskoeffizient  $\alpha_{\text{Glas} \rightarrow \text{Luft}}$  geringfügig höher liegt als derjenige, welcher über das 1D-Modell aus dem CFD-Modell zu  $\alpha_{\text{Glas} \rightarrow \text{Luft}} \approx 9,5 \text{ W}/(\text{m}^2 \text{ K})$  bestimmt wurde. Tendenziell stimmt dieser Befund mit den Ergebnissen thermischer Mikrosysteme (Müller 1998, Dillner 1995) überein. Durch Verkleinerung der Längedimensionen nähert sich das System allmählich dem Extremfall einer Kugel. Dadurch steigt der Einfluss der ebenfalls wärmeübertragenden Randbereiche relativ an und vergrößert so die pro Zeiteinheit übertragbare Wärmemenge.

Dieser Effekt könnte demnach in einem entsprechend größeren effektiven Wärmeübergangskoeffizient zusammengefasst werden. Eine weitere Verfeinerung des Simulationsmodells könnte einen wertvollen Beitrag zur Aufklärung des thermischen Verhaltens leisten.

### E) Einfluss der Strömungsgeschwindigkeit

Wie Abbildung 88 illustriert, ist bei experimentell relevanten Volumenströmen  $Q < 30 \mu\text{l}/\text{min}$  keine Abhängigkeit des Temperaturprofils von der Strömungsgeschwindigkeit im Rahmen der Messgenauigkeit festzustellen.



**Abb. 88:** Messpunkte der Verschiebung des Schwerpunktes der Temperaturverteilung in der Reaktionskammer aufgrund erhöhter bzw. Überhöhung des Volumenstroms  $Q$  in Richtung der Hauptströmung (x-Koordinate): Kammermitte bei  $x = 3,5 \text{ mm}$

Erst bei erhöhten Flussraten  $Q > 100 \mu\text{l}/\text{min}$  ist eine signifikante Verschiebung des Schwerpunkts in Richtung der Hauptströmungsrichtung nachzuweisen. Für  $Q = 300 \mu\text{l}/\text{min}$  beträgt die Verschiebung  $\Delta x \approx 2 \text{ mm}$ . Ferner liegt die Temperatur bei Kammereintritt  $T(x=0)$  höher, da die im Mikrokanal vorgeheizte Lösung entsprechend nicht schnell genug auf die Solltemperatur  $T_{\text{RK,soll}} < T_{\text{Kanal}}$  in der Reaktionskammer gebracht werden kann. Es gelang also, die Aussagekraft der analytischen Abschätzung  $\tau_{\text{therm}} / \tau_{\text{Verweil}}$  hinsichtlich des Strömungseinflusses mithilfe der experimentellen Ergebnisse zu verifizieren. (s. Gleichung G6, S. 56 und Anhang D2a) Für  $Q < 30 \mu\text{l}/\text{min}$  war  $\tau_{\text{therm}} / \tau_{\text{Verweil}} \approx 0,04 \ll 1$ . Die 10-fache mittlere Strömungsgeschwindigkeit führt zu dem Verhältnis  $\tau_{\text{therm}} / \tau_{\text{Verweil}} \approx 0,4$ .  $\tau_{\text{therm}}$  kann nicht mehr als klein gegenüber  $\tau_{\text{Verweil}}$  gelten. Die Voraussetzung strömungsunabhängiger Bedingungen ist hier also nicht mehr erfüllt. Die entsprechenden Temperaturänderungen lagen dabei unterhalb  $\Delta T < 1 \text{ K}$ . Die CFD-Simulationen bestätigen diese Befunde.

## F) Dynamische Parameter

Das dynamische Verhalten des Fluss-Mikroreaktors wurde in Analogie zum Batch-System über die Einschwingzeit des Reglers  $t_{\text{Regler}}$  bzw.  $t_{95}$ , die thermische Relaxationszeit des Fluids  $\tau_{\text{therm}}$  sowie die Heiz-/ Kühllraten  $dT/dt$  ermittelt. (Abb. 31, S. 62) Die Ergebnisse für eine Flussrate  $Q = 30 \mu\text{l}/\text{min}$  sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

**Tabelle 8:** Ergebnistabelle der dynamischen Parameter des Fluss-Mikroreaktors Heizen und Kühlen: Temperiertrate des PELTIER-Elements  $dT/dt$ ; Einschwingzeit des Reglers  $t_{95}$  und thermische Relaxationszeit des Fluids (Deckel  $\rightarrow$  Boden)  $\tau_{\text{therm}}$  – Messungen bei  $Q = 30 \mu\text{l}/\text{min}$

|  |     | Heizen     |           | Kühlen     |           |
|--|-----|------------|-----------|------------|-----------|
|  |     | Mittelwert | Std.-Abw. | Mittelwert | Std.-Abw. |
| <b>Temperiertrate <math>dT/dt</math></b><br>(PELTIER-Element)                                    | K/s | 15,19      | 0,54      | -6,32      | 0,31      |
| <b>Einschwingzeit <math>t_{95}</math></b><br>(Regler)  | s   | 6,35       | 0,56      | 10,76      | 2,24      |
| <b>thermische Relaxationszeit <math>\tau_{\text{therm}}</math></b><br>(Fluid in Reaktionskammer) | s   | 1,49       | 0,11      | 1,57       | 0,09      |

Std.-Abw.: Standard-Abweichung

Im Heizmodus wurde die Temperiertrate bestimmt zu  $(dT/dt)_{\text{Heizen}} \approx 15 \text{ K/s}$ , im Kühlmodus  $(dT/dt)_{\text{Kühlen}} \approx -6 \text{ K/s}$ , jeweils unabhängig vom Temperaturniveau und von der Höhe des Temperatursprungs. Die Einschwingzeit des Reglers betrug  $t_{95}$  (Heizen)  $\approx 6 \text{ s}$ ,  $t_{95}$  (Kühlen)  $\approx 11 \text{ s}$ . Das Verhältnis der beiden Werte entspricht tendenziell den Einstellungen der Reglerparameter, da die Kühlleistung im Vergleich zum Heizmodus aus Stabilitätsgründen deutlich reduziert wurde. Die experimentell bestimmte thermische Relaxation des Fluids in der Reaktionskammer  $\tau_{\text{therm}} \approx 1,5 \text{ s}$  korreliert bei einer relativen Abweichung  $\Delta\tau_{\text{therm}} / \tau_{\text{therm}} \approx 10\% (1 \pm 30\%)$  sehr gut mit dem analytisch ermittelten Wert ( $\tau_{\text{therm}}$  (Modell) = 1,4 s).

Das Gesamtsystem ist also nach  $t_{95, \text{gesamt}}$  (Heizen)  $\approx \frac{1}{2} t_{95, \text{gesamt}}$  (Kühlen)  $< 10$  s auf einer geänderten Solltemperatur eingeschwungen. Weitere Experimente bestätigten die weitgehende Unabhängigkeit des thermischen Verhaltens von der Flussgeschwindigkeit. Die Bestimmung der dynamische Parameter ergab im Rahmen der Messgenauigkeit identische Werte für  $Q < 60$   $\mu\text{l}/\text{min}$ .

Grundsätzlich verhält sich der Fluss-Mikroreaktor in seinem dynamischen Verhalten analog zum Batch-Mikroreaktor. Eingeschaltete Kanalheizer erhöhten die Einschwingzeit des Systems um etwa 20%, da Regelungen über den Si-Chip miteinander gekoppelt sind und die Temperaturen gegeneinander ausgeregelt werden müssen. Die Reglerparameter des Fluss-Mikroreaktors wurden entsprechend so gewählt, dass instabile Zustände vermieden werden konnten. Trotz der leicht erhöhten Temperieraten zeichnet sich der Fluss-Mikroreaktor im Vergleich zum Batch-Mikroreaktor durch die längeren Einschwingzeiten in einer reduzierten Gesamtdynamik aus.

### **3.5 Applikation – Temperaturkontrollierte Kristallisation in Mikroreaktoren**

Ziel der Applikationsexperimente war die Evaluierung des Konzeptes der temperaturkontrollierten Proteinkristallisation in mikrotechnisch gefertigten Reaktionssystemen. Demzufolge sind die Untersuchungen zum Kristallwachstum nur im Kontext mit der Charakterisierung der Mikroreaktoren zu sehen. Eine detaillierte Studie zu Kristallisationseffekten ist nicht Inhalt dieser Arbeit. Zur Klärung derartiger Zusammenhänge sind deshalb an einigen Stellen weiterführende Untersuchungen notwendig.

Die im Rahmen dieser Evaluierung dokumentierten Temperaturen beziehen sich jeweils auf die Solltemperatur der Reaktionskammer. Bei der Interpretation der Temperatureffekte ist zu beachten, dass sich innerhalb der Reaktionskammer laterale und vertikale Temperaturgradienten ausbildeten. Je nach Position des Kristalls in der Kammer ergaben sich aufgrund des Einflusses der Umgebung im Batch-Mikroreaktor Temperaturunterschiede zur Solltemperatur bis zu  $\Delta T = 1$  K. (s. Kap. 3.2.1, S. 89ff) Eine detaillierte Analyse der Effekte kleiner Temperaturunterschiede  $\Delta T < 1$  K könnte jedoch Gegenstand weiterführender Studien sein.

Schwerpunkt der Applikationsexperimente waren das Temperatur-Screening als ergänzende Methode bei der Parameter-Optimierung sowie die physiko-chemischen Untersuchungen zur temperaturkontrollierten Kristallogeneese.

#### **3.5.1 Anwendung im Screening-Prozess**

##### **A) Übertragbarkeit der Kristallisationsbedingungen**

Die Anwendung des Batch-Mikroreaktors als Sekundärverfahren in Ergänzung zu Standardkristallisationsmethoden setzt voraus, dass die zuvor eruierten Kristallisationsbedingungen direkt zu übernehmen sind. Für das Modellprotein Hen Egg-White Lysozym (HEWL) wurden die experimentellen Parameter für die Dampfdiffusion „Hängender Tropfen“ für verschiedene Kristallmorphologien der Literatur entnommen. (*Weiss 2000, Vaney 2001, Sukumar 1999*) Die

Ergebnisse der Kristallisationsexperimente sind in tabellierter Form dargestellt. (s. Tabelle 9) Der Einsatz von 24-well Mikroplatten erlaubte eine entsprechende Variation der Konzentrationsbedingungen. Die Bedingungen (pH, Konzentration der Präzipitanten), bei denen Kristalle im „Hängenden Tropfen“ gefunden wurden, sind Tabelle G1 zu entnehmen. (s. Anhang G)

**Tabelle 9:** Zusammenfassung der Wachstumsexperimente von HEWL für drei Kristalltypen:  
**A)** tetragonal NaCl – **B)** monoklin NaNO<sub>3</sub> – **C)** orthorhombisch NaCl  
 Methoden: Dampfdiffusion „Hängender Tropfen“ und Batch-Mikroreaktor

| Kristall-Morphologie                | Kristallisations-method                         | Ergebnis  |
|-------------------------------------|---|---|
| <b>A) tetragonal NaCl</b>           | „Hängender Tropfen“ nach WEISS (Weiss 2000)     | 150 µm nach 20 h bei $\vartheta = 20^{\circ}\text{C}$ (Klimaanlage)<br>Bedingungen: 6; 7% (w/v) NaCl, pH 4.3; 4.5   |
|                                     | Batch-Mikroreaktor                              | 250 µm nach 18h bei $\vartheta_{\text{Wachstum}} = 19^{\circ}\text{C} = \text{const.}$<br>150 µm nach 48 h (bzw. 10 µm nach 3 h) mit EOR*: $\vartheta_{\text{Wachstum}} = 19^{\circ}\text{C}$ , $\vartheta_{\text{Auflösung}} = 22^{\circ}\text{C}$ , $t_{\text{Halt}} = 5 \text{ min}$<br>qualitative Verbesserung in Größe und Qualität durch EOR<br>Bedingungen: 4,5% (w/v) NaCl, pH 4.5 |
| <b>B) monoklin NaNO<sub>3</sub></b> | „Hängender Tropfen“ nach VANEY (Vaney 2001)     | 100 µm nach 24 h bei $\vartheta = 20^{\circ}\text{C}$ (Klimaanlage)<br>Bedingungen: 5; 6; 7% (w/v) NaNO <sub>3</sub> , pH 4.8   |
|                                     | Batch-Mikroreaktor                              | 300 µm nach 18 h<br>mit EOR: $\vartheta_{\text{Wachstum}} = 16^{\circ}\text{C}$ , $\vartheta_{\text{Auflösung}} = 18^{\circ}\text{C}$ , $t_{\text{Halt}} = 5 \text{ min}$<br>Bedingungen: 2,5 % (w/v) NaNO <sub>3</sub> , pH 5  |
| <b>C) orthorhombisch NaCl</b>       | „Hängender Tropfen“ nach SUKUMAR (Sukumar 1999) | keine Kristalle erhalten nach 24 h  |
|                                     | Batch-Mikroreaktor                              | 300 ... 500 µm nach 18 h (2 Kristallformen)<br>bei $\vartheta_{\text{Wachstum}} = 24^{\circ}\text{C} = \text{const.}$<br>Verhältnis variierte mit Änderung von $\vartheta_{\text{Wachstum}}$<br>Bedingungen: 8% (w/v) NaCl, pH 9.3  |

\* EOR: Enhanced OSTWALD Ripening

Zur Kristallisation im Batch-Mikroreaktor wurden die Lösungsparameter gewählt, bei denen im „Hängenden Tropfen“ die aussichtsreichsten Kristalle gewachsen sind. Unter diesen Lösungsbedingungen kam es im Mikroreaktor in allen Fällen auf Anhieb zur Kristallisation. Die Kristallisationsergebnisse der Standardmethode wurde ohne weitere Anpassungen reproduziert. Um jedoch die Wachstumsbedingungen und die Kristallgröße zu optimieren, wurde die Temperatur leicht variiert und entsprechend angepasst. Abbildung 89 illustriert die im Batch-Mikroreaktor HEWL-Kristalle in der jeweiligen Modifikation.

Während in den Experimenten zur Morphologie A) und B) im Batch-Mikroreaktor ausschließlich eine Kristallform vorlag, entstanden im Fall C) zwei Kristalltypen. Im Rahmen vergleichender visueller Analysen wurden die Formen A) und B) als tetragonal und monoklin identifiziert. Eine der beiden Kristallformen unter C) entsprach dem Habitus tetragonaler Kristalle. Die Inspektion der anderen Form deutete darauf hin, dass es sich um orthorhombische Kristalle handelte.

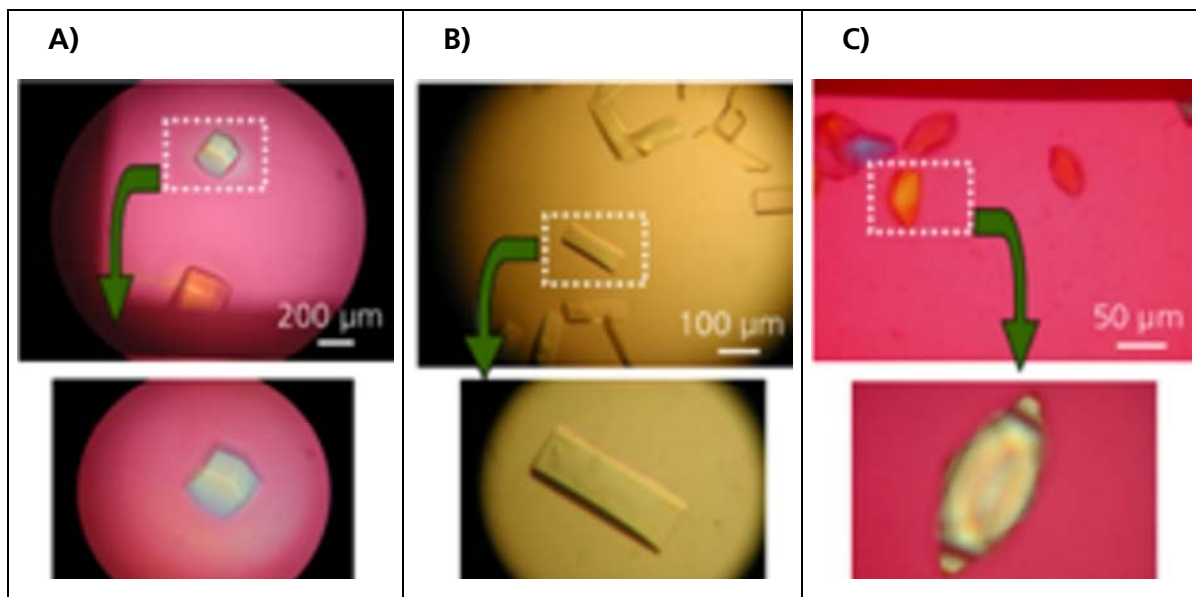


Abb. 89: Kristallisation von HEWL im Batch-Mikroreaktor unter Variation der Bedingungen:  
**A)** tetragonal NaCl – **B)** monoklin NaNO<sub>3</sub> – **C)** orthorhombisch NaCl

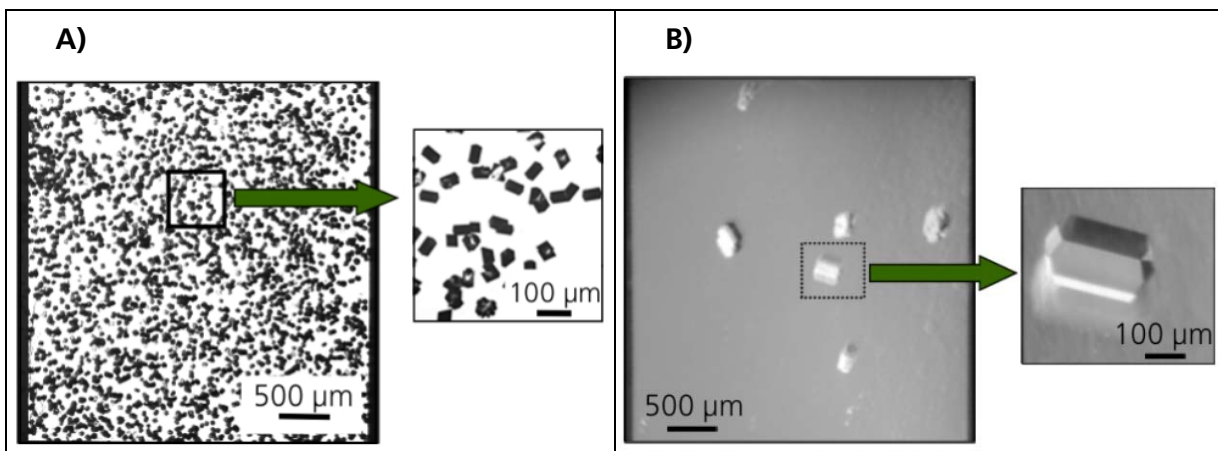
Die Bestimmung der Raumgruppen zur quantitativen Analyse der Kristallstrukturen wurde im Rahmen dieser vorläufigen Studien jedoch nicht durchgeführt. Das Verhältnis orthorhombischer zu tetragonalen Kristallen könnte durch Variation der Temperatur verändert werden. Für höhere Temperaturen nahm der Anteil der tetragonalen Kristalle ab. Am Beispiel des Modellproteins HEWL konnte demnach gezeigt werden, dass im Batch-Mikroreaktor Kristalle in denselben Lösungen wuchsen wie in der Dampfdiffusionsmethode des „Hängenden Tropfens“. Ein qualitativer visueller Vergleich mit der Literatur ergab, dass die erwarteten Morphologien reproduziert werden konnten.

Untersuchungen zum Einfluss konstanter und zyklischer Temperaturprotokolle mithilfe des Batch-Mikroreaktors ergaben folgende qualitative Ergebnisse:

- statische Protokolle: relativ viele Kristalle mit enger Größenverteilung, überwiegend nur eine Morphologie, aber z.T. miteinander verwachsen; saubere Kristalloberfläche
- zyklische Protokolle („Enforced-OSTWALD-Ripening“): nur wenige große Kristalle; nur eine Morphologie (je nach Lösung); klare Kristalle

In „Hängenden Tropfen“ sind meist nur ein oder zwei Kristalle zu finden, die sich aufgrund der beträchtlichen Konzentrationsgradienten oft in ihrer Morphologie und Größe unterscheiden. Im Batch-Mikroreaktor hingegen herrschen in der gesamten Reaktionskammer gleichmäßige Konzentrations- und Temperaturverhältnisse. Dies schlägt sich in einem homogenen Kristallisationsprozess nieder und findet Entsprechung in den illustrierenden CLSM- bzw. CCD-Kamera-Aufnahmen von HEWL in Abb. 90 (S. 132). Aus den Studien zur Kristallisation bei konstanter Temperatur (hier:  $\vartheta = 18^{\circ}\text{C}$ ) geht hervor, dass sich dieses Verfahren z.B. zur Massekristallisation kleiner Kristallite anbietet. Bei der Herstellung subkutan applizierter Depotwirkstoffe (z.B. Insulin) ist dies neben der Aktivität der Proteine einer der wesentlichen Parameter. Erhöhung der Temperatur

auf beispielweise  $\vartheta = 19^\circ\text{C}$  reduzierte die Anzahl der Kristalle beträchtlich und führte zu störungsärmeren Kristalloberflächen. Die Variation der Temperatur kann so als sensitiver Parameter zur Optimierung des Kristallwachstums eingesetzt werden.



**Abb. 90:** Kristallisation von HEWL im Batch-Mikroreaktor bei statischer **(A)** sowie zyklisch variiertem Temperatur **(B)**:

**A)**  $\vartheta = 18^\circ\text{C} = \text{const.}$  (CLSM-Aufnahmen nach Wachstumszeit  $t_{\text{Wachstum}} = 8 \text{ h}$ )

**B)**  $\vartheta_{\text{Wachstum}} = 19^\circ\text{C}$ ,  $\vartheta_{\text{Auflösung}} = 22^\circ\text{C}$ ,  $t_{\text{Halt}} = 5 \text{ min}$  (CCD-Kamera-Bilder  $t_{\text{Wachstum}} = 18 \text{ h}$ )

Zur detaillierten Untersuchung der Struktur der Proteine via Röntgenanalyse oder hochauflösender Mikroskopie bedarf es großer störungsfreier Kristalle. Die Kristallisationsstudien mit zyklischen Protokollen nach dem Prinzip des „Enforced-OSTWALD-Ripening“ (EOR) haben die Befunde von HEINRICHS *et al.* bestätigt. (Heinrichs 1992). (vgl. Kap. 2.5.4 A, S. 81) Es gelang hierbei auf Anhieb, klare Kristalle in der Größenordnung von  $L \approx 200 \mu\text{m}$  zu erhalten. Ferner lagen die Kristalle in nur einer Morphologie und enger Größenverteilung vor. Die scheinbar variierte Größe der tetragonalen HEWL-Kristalle in Abb. 90 B) rührt von deren unterschiedlichen räumlichen Lage und Orientierung her.

Aus diesen ersten Untersuchungen lässt sich folgern, dass eine exakt regelbare Temperaturführung eine notwendige Voraussetzung für ein optimiertes Kristallwachstum darstellt. Der Batch-Mikroreaktors bietet demnach eine geeignete Experimentierplattform zu deren Realisierung. Eine weitere ausgefeilte thermische Methode zur Proteinkristallisation schlugen SCHALL *et al.* (Schall 1996) vor. Hierbei wird die Übersättigung der Proteinlösung durch *in situ*-Anpassung der Temperatur konstant gehalten. Daraus resultiert, dass das chemische Potenzial und folglich auch die Wachstumsrate nicht variieren. Durch eine entsprechende Gestaltung des Temperaturprotokolls sind derartige Experimente im Batch-Mikroreaktor zu realisieren.

### **B) Qualitätsuntersuchungen mittels Röntgenstrukturanalyse**

Zur Untersuchung der Qualität der Proteinkristalle aus dem Batch-Mikroreaktor wurde als Referenz die Standardmethode der Dampfdiffusion „Hängender Tropfen“ herangezogen. Hierzu wurden



geeignete Kristalle aus den 24-well Mikroplatten und der Reaktionskammer des Batch-Mikroreaktors gesucht und röntgenografisch vermessen. Die Ernte der Kristalle aus dem „Hängenden Tropfen“ und dem Batch-Mikroreaktor wurde als das Nadelöhr im Gesamtprozess identifiziert. Um ein Austrocknen der Kristalle zu verhindern, war es notwendig, diese nach dem Abnehmen der Deckel direkt mit einer geeigneten Flüssigkeit (z.B. Puffer oder Öl) als Verdunstungsschutz zu überschichten. Teilweise zerbarsten optisch sauber gewachsene und große Kristalle auch beim manuellen Transfer in die Kapillaren mithilfe von Pt-Schleifen. Begrenzte Messzeiten an der Röntgenanlage hatten zur Folge, dass keine idealen Messbedingungen hinsichtlich einer einheitlichen Kristallgröße gegeben waren. Die Ergebnisse der röntgenografischen Untersuchungen zu tetragonalem HEWL in NaCl-Form (s. Tabelle 10) vermittelten dennoch einen ersten quantitative Eindruck bezüglich der Kristallqualität. Die Daten enthalten die aus zwei Experimenten gemittelten Messwerte. Die Kristallgröße unterschied sich in ihrem Volumen um mehr als 50%. Für die im Batch-Mikroreaktor mithilfe eines EOR-Protokolls (s. Tabelle 9, S. 130) gezogenen kleineren Kristalle waren prinzipiell bessere Werte für Mosaizität und den R-Merge-Faktor zu erwarten. Die Gitterqualität, repräsentiert durch den Parameter der Mosaizität bewegte sich in etwa bei einem Wert von etwa 0,3. Dies spricht für eine relativ fehlerfreie Gitteranordnung im Proteinkristall. Allerdings beeinflusst der Brechstrahl bei Mosaizitäten deutlich unter 0,3 das Ergebnis bereits. Deshalb ist der R-Merge-Faktor, also der Regressionskoeffizient zur Charakterisierung der Übereinstimmung von Messdaten und Gittermodell, in die Interpretation mit einzubeziehen.

**Tabelle 10:** Zusammenfassung der Qualitätsuntersuchungen mittels Röntgenstrukturanalyse von tetragonalem HEWL NaCl-Form: Mittelwerte aus 2-fach Messungen  
Methoden: Dampfdiffusion „Hängender Tropfen“ und Batch-Mikroreaktor

| Kristall-Morphologie | Kristallisations-method | Kristallgröße / $\mu\text{m}$ | Auflösung / 0.1 nm | Signal-Rausch-V.* | Mosaizität | R-Merge / % |
|----------------------|-------------------------|-------------------------------|--------------------|-------------------|------------|-------------|
| tetragonal NaCl      | „Hängender Tropfen“     | 200 x 300                     | 2.05               | 3.95              | 0.291      | 11.7        |
|                      | Batch-Mikroreaktor      | 150 x 200                     | 2.8                | 8.53              | 0.252      | 10.9        |

\* Signal-Rausch-Verhältnis

Die Messwerte liegen für beide Methoden deutlich über den Richtwerten für Kristalle sehr guter Qualität (5% ... 8%). Das gute Signal-Rausch-Verhältnis der Messung der Kristalle aus dem Batch-Mikroreaktor deutet darauf hin, dass wenig störende Fremdlösung (Puffer) in der Glaskapillaren vorhanden war.

Aus den vorangegangenen Analysen lässt sich schlussfolgern, dass die Qualitätsanforderungen an die Proteinkristalle aus dem Batch-Mikroreaktor ohne weitere Optimierung der Methodik erfüllt sind. Trotz der suboptimalen Messbedingungen lag die Qualität der Kristalle aus dem Batch-Mikroreaktor in derselben Größenordnung wie die der am weitesten verbreiteten Kristallisationsmethode, der Dampfdiffusion „Hängender Tropfen“. Die signifikante Abweichung der Kristallgrößen erlaubte

jedoch keinen direkten Vergleich der Absolutwerte. Dies macht weitere Experimente notwendig, wobei auf vergleichbare Größenverhältnisse der Kristalle zu achten sein wird.

Je nach statischem oder zyklisch alternierendem Temperaturprotokoll im Batch-Mikroreaktor gelang es, den Kristallisationsprozess zu variieren. Die Zusammensetzung der Lösung konnte dabei als konstant angenommen werden, wie die Abschätzung in Kapitel 2.1 (s. S 29) zeigte. Dies stellt den wesentlichen Unterschied der Kristallisation in derartigen Batch-Verfahren gegenüber beispielsweise der Dampfdiffusionsmethoden oder der Gegendiffusion in Kapillaren dar. Hier stellt sich ein dynamisches Konzentrationsgleichgewicht unter selbstständiger Anpassung der Zusammensetzung der Lösungen ein und führt zu einer Änderung der Konzentrationsverhältnisse im Verlauf des Experiments. (McPherson 1999, Bergfors 1999) Die Befunde aus der Kristallisation im Batch-Mikroreaktor sind demnach nicht unmittelbar mit den Ergebnissen aus der Methode des „Hängenden Tropfens“ zu vergleichen. Zur weiterführenden Charakterisierung des Batch-Mikroreaktors bietet sich an, eine vom Prinzip her ähnliche Kristallisationsmethode, wie z.B. „microbatch under oil“ (Chayen 1992, 1998) heranzuziehen. Im Rahmen dieser ersten Untersuchungen war jedoch, die neuartigen Mikroreaktoren mit der am weitest verbreiteten Standardmethode zu vergleichen, um aus einem möglichst breiten und leicht zugänglichen Informationspool schöpfen zu können.

### 3.5.2 Anwendung in der physiko-chemischen Untersuchung

#### A) Wachstumscharakteristik Insulin

Im Batch-Mikroreaktor konnten mithilfe hochauflösender konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) auf der Oberfläche der Proteinkristalle Wachstumsstrukturen sichtbar gemacht werden. Die *in situ*-Analyse der Wachstumscharakteristik von DesThrB30 human Insulin und human Insulin Glargine® legte grundsätzliche Wachstumscharakteristika offen (s. Abb. 91)

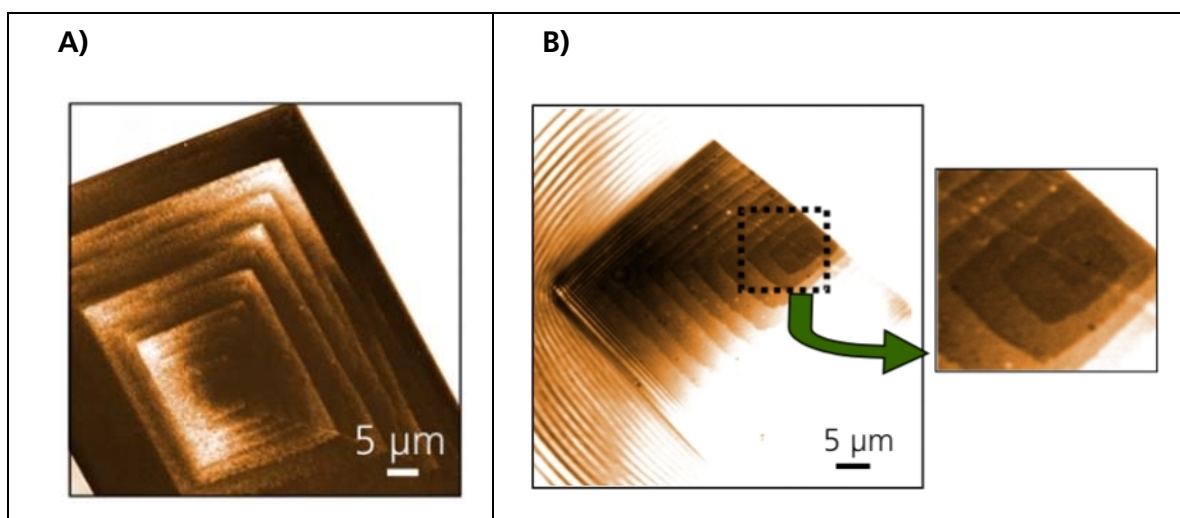


Abb. 91: *In situ*-Analyse der Wachstumscharakteristik von DesThrB30 human Insulin (A) und human Insulin Glargine® (B) mittels CLSM im Batch-Mikroreaktor  
**A)** 2D-Nukleation – **B)** Spiralwachstum

Es konnten sowohl Bereiche mit Wachstum nach dem Mechanismus der 2D-Nukleation als auch mit Spiralwachstum ermittelt werden. Diese gehören zu den grundlegenden Wachstumsmechanismen anorganischer und makromolekularer Kristalle. (Vekilov 2000, Malkin 1999, McPherson 1995) Prinzipielle Aussagen über die generellen Mechanismen der untersuchten Proteine sind zu diesem Zeitpunkt noch nicht möglich. Studien zur Auflösung des Proteins DesThrB30 human Insulin zeigten eine Abhängigkeit von der Größe der Kristallite. Abbildung 92 illustriert die Auflösung durch ein geeignetes Temperaturprotokoll:  $\vartheta_{\text{Wachstum}} = 25^\circ\text{C}$ ,  $t_{\text{Halt}} = 10 \text{ min}$   $\vartheta_{\text{Auflösung}} = 30^\circ\text{C}$ ,  $t_{\text{Halt}} = 5 \text{ min}$ . Solange die charakteristische Länge der Kristalle nicht größer als  $L \approx 20 \mu\text{m}$  war, konnten diese vollständig aufgelöst werden. Für größere Kristalle gelang es selbst bei überhöhten Temperaturen  $\vartheta > 40^\circ\text{C}$  nicht mehr, diese aufzulösen.

Dieser experimentelle Befund wurde auf kinetische Effekte aufgrund der Kontamination der Kristalloberfläche zurückgeführt. Die Insulinkristalle besaßen im Vergleich zu HEWL deutlich langsamere Wachstums- und Auflösungsrate. Entsprechend lag die Vermutung nahe, dass der Effekt der „cessation of growth“ bereits eingesetzt hatte. (s. Kap. 1.1.1 C, S. 9f) (Vekilov 1998a, Grant 1995) Detailaufnahmen der Kristalloberfläche mithilfe von CLSM traten hierzu nicht in Widerspruch, lieferten allerdings noch keinen eindeutigen Beweis. Zur Erhärtung und Quantifizierung dieser Hypothese sind entsprechend detaillierte Versuchsreihen notwendig.

Die Ergebnisse zeigten jedoch, dass die Kombination CLSM und Batch-Mikroreaktor ein geeignete *in situ*-Methode zur Untersuchung der Kristallogene von Proteinen ist.

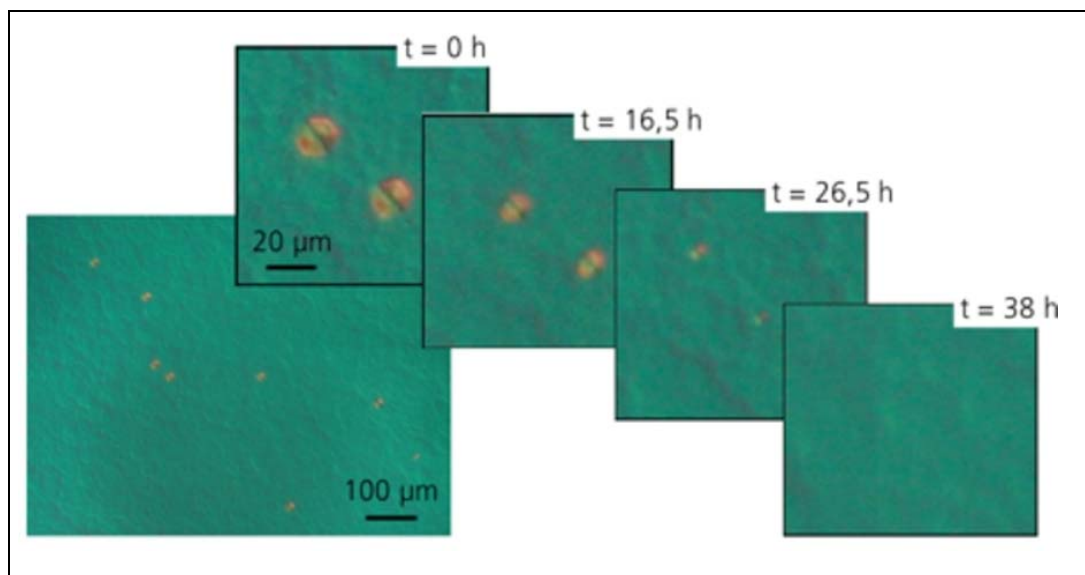


Abb. 92: Dokumentation der Auflösung von DesThrB30 human Insulin mittels CCD-Kamera im Batch-Mikroreaktor

### B) Wachstumskinetik HEWL zur Erstellung von Phasendiagrammen

Zur Ermittlung von Punkten im Phasendiagramm des HEWL wurden die Wachstumsraten als Funktion der Temperatur bestimmt. Wie die Graphen in Abbildung 93 zeigen, wuchsen die Kristalle

auf dem jeweiligen Temperaturniveau in guter Näherung linear mit der Zeit. Die Einzelgeraden besaßen erwartungsgemäß unterschiedliche Steigungen. Daraus ergaben sich mit steigender Temperatur eine abnehmende Wachstumsraten GR der HEWL-Kristalle.

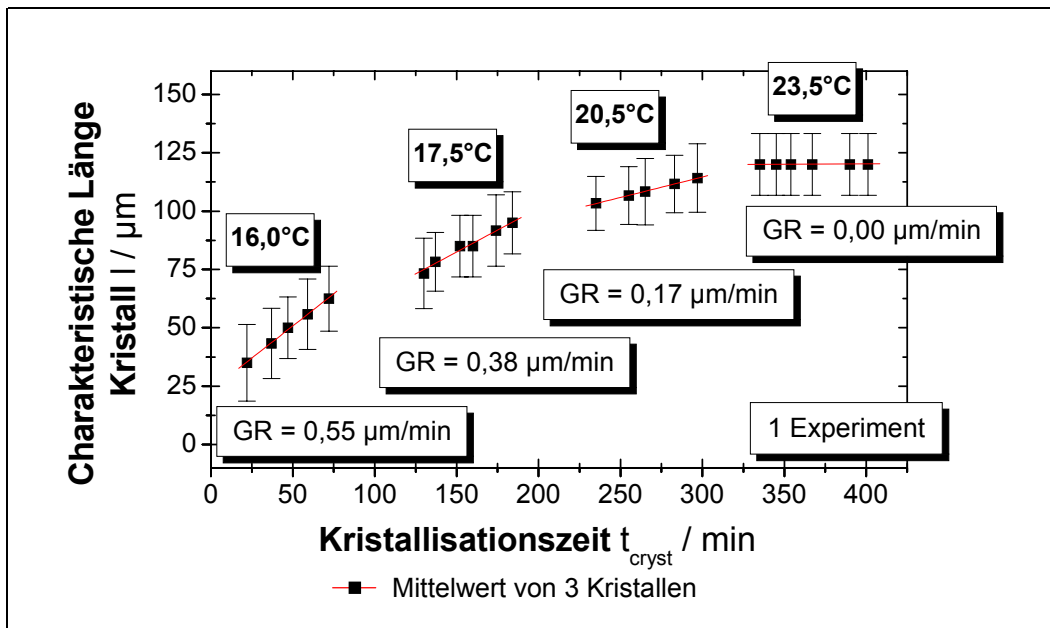


Abb. 93: Längenwachstum von HEWL im Batch-Mikroreaktor bei zyklischem Temperaturprotokoll

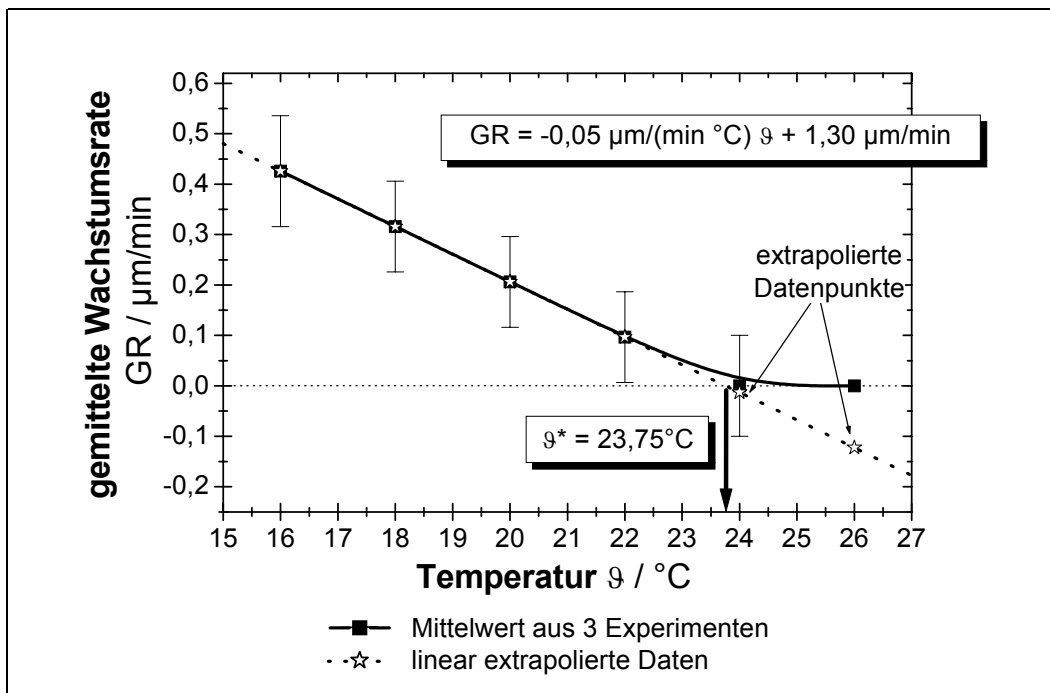


Abb. 94: Wachstumsrate von HEWL ermittelt aus 3 Kristallisationsexperimenten im Batch-Mikroreaktor

Die Auftragung von GR aus 3 unterschiedlichen Einzelerperimenten über der Temperatur ergab erwartungsgemäß eine über einen weiten Temperaturbereich lineare Kurve mit negativem Anstieg. (s. Abb. 94) Dies entspricht dem nach Gleichung G22 (S. 85) zu erwartenden Ergebnis. Der

Schnittpunkt der linear extrapolierten Messwerte auf  $GR = 0$  führt zu einer Gleichgewichtstemperatur  $\vartheta^* \approx 23,76^\circ\text{C}$  bei den gegebenen Konzentrationen des Proteins oder der Präzipitanten. Diese Temperatur korreliert gut mit dem Wert nach HAAS und DRENTH  $\vartheta^* \approx 22,5^\circ\text{C}$ . (Drenth 1998)

Allerdings gelang es für HEWL nicht, größere Kristalle mit  $L > 100 \mu\text{m}$  aufzulösen. Dieses Verhalten wurde analog zu den Auflösungsstudien des Insulins (s. Kap. 3.5.2 A, S. 135) auf den Effekt der „cessation of growth“ zurückgeführt. Es ist bekannt, dass HEWL-Kristalle bereits ab einer Größe  $L \approx 40 \mu\text{m}$  nicht mehr aufzulösen sind, sofern sie bei konstanter Temperatur gewachsen sind. (Klupsch 2002, Mühlig 2002) Die experimentellen Ergebnisse (vgl. Abb. 93 und 94, S. 136) zeigten jedoch, dass der Graph in Abbildung 94 auch für größere Kristalle  $40 \mu\text{m} < L < 100 \mu\text{m}$  linear verlaufen. Dies deutete darauf hin, dass der Einsatz von EOR-Protokollen zwischen den Messintervallen einen signifikanten Einfluss auf die Wachstumscharakteristik hatte. Offensichtlich trugen die zyklischen Protokolle dazu bei, die Limitierung der Wachstumsrate durch Kontamination der Kristalloberfläche zu verzögern bzw. hin zu größeren Kristallen zu verlagern. Ab einer gewissen Kristallgröße reichte jedoch das Anätzen der Oberfläche mittels EOR offenbar nicht mehr aus, die in den Messphasen verunreinigte Oberfläche zu regenerieren. Entsprechend wurden die Datenpunkte für  $\vartheta > 24^\circ\text{C}$  linear extrapoliert. Kritisch ist schließlich anzumerken, dass eine reproduzierbare Bestimmung von Phasendiagrammpunkten erst dann möglich ist, wenn auch die Auflösungsdaten zur Ermittlung der Temperatur  $\vartheta^*$  miteinbezogen werden können. Erste Testexperimente zeigten, dass Wachstum und Auflösung für Kristalle der Größe  $L < 50 \mu\text{m}$  vollständig reversibel sind. Die Anwendung dieser Erkenntnisse zur Erstellung von Phasendiagrammen werden Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein.

Die Ergebnisse der physiko-chemischen Untersuchungen lassen den Schluss zu, dass die temperaturgesteuerte Kristallisation im Batch-Mikroreaktor Möglichkeiten bietet, Punkte im Phasendiagramm von Proteinlösungen in relativ kurzer Zeit reproduzierbar zu erstellen.

## 4 Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

Mikroreaktoren zur Erschließung von physikalisch-chemischen Parametern in der Kristallisation kleiner Proteinmengen wurden gemäß dem Anforderungsprofil (vgl. Kap. 1.2, S. 25f) entwickelt, charakterisiert und in ersten Applikationsexperimenten erfolgreich getestet. Es konnte gezeigt werden, dass Mikroreaktoren für den Einsatz in der Biokristallisation geeignet sind.

Als Ergebnis stehen ein Batch-System (*Batch-Mikroreaktor*) als Prototyp sowie ein kontinuierlich betriebenes Mikrofluidsystem (*Fluss-Mikroreaktor*) als Versuchsmuster zur Verfügung. In die Auslegung und technische Realisierung der Chipreaktoren auf der Basis von Silizium-Mikromechanik und Dünnschichttechnologie gingen grundlegende Modellbetrachtungen ein. Beim Aufbau der Mikroreaktoren als Gesamtsysteme lag der Fokus auf der Kompaktheit, Wiederverwendbarkeit und Homogenität der Temperatur- und Geschwindigkeitsfelder. Die Charakterisierung der Mikroreaktoren erfolgte mithilfe von Experimenten und 3D-FEM-Simulationen. Diese wurden gegenüber analytischen Berechnungsmodellen abgeschätzt und validiert. Sie können zur Abschätzung des systemischen Verhaltens sowie als Basis für Systemadaptionen und zukünftige Mikroreaktorentwicklungen herangezogen werden. Einen Schwerpunkt hierbei bildete die Analyse des thermischen und fluidischen Verhaltens mit folgenden wesentlichen Ergebnissen:

- Anforderungen an Temperierung hinsichtlich Langzeitstabilität und Dynamik erfüllt
- Temperaturverteilung in der Reaktionskammer geprägt von thermischer Umgebung des Chipreaktors
- laminare Flussbedingungen im gesamten mikrofluidischen System
- homogenes Strömungsverhalten im Chipreaktor, keine Hinweise auf Totvolumina oder Rückströmungen
- fluidische Peripherie dominiert Druckverlust und Verweilzeitverhalten des Mikroreaktors

Der Funktionsnachweis erfolgte durch die Kristallisationsexperimente von Modellproteinen zunächst im Batch-Mikroreaktor. Als Applikationsfelder wurden identifiziert und erfolgreich getestet:

- temperaturkontrolliertes Screening nach optimalen Kristallisationsparametern
- physiko-chemische Untersuchungen zur Kristallogeneese für die reproduzierbare und schnelle Erstellung von Phasendiagrammen

Die Proteinkristallisation im Batch-Mikroreaktor gelang mit Protokollen aus der Dampfdiffusion „Hängender Tropfen“ ohne weitere Optimierung der Bedingungen und lieferte Kristalle vergleichbarer Qualität. Die Integration konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie erlaubt eine *in situ*-Analyse von Kristallisationsprozessen. Die Mikroreaktoren eignen sich durch homogene und gut zu charakterisierende fluidische und thermische Betriebsparameter hervorragend als Sekundärverfahren im Screening nach optimalen Kristallisationsparametern sowie für physiko-chemische Untersuchungen der Kristallogeneese zur Erstellung von Phasendiagrammen. Perspektivisch bedeutet die Integration weiterer fluidischer und analytischer Komponenten eine beträchtliche Erweiterung des Parameterraums und eröffnet neue Möglichkeiten zur *in situ*-Analyse physiko-chemischer Prozesse.

Die Komplexität der Aufgabenstellung legte eine detaillierte Aufschlüsselung der Hauptaussagen nahe, gruppiert nach den beiden Mikroreaktorsystemen sowie den Applikationsexperimenten.

## 4.1 Batch-Mikroreaktor

Ein Batch-Mikroreaktor wurde auf Grundlage eines PCR-Chipreaktor (*Poser 1997*) modifiziert und als voll funktionsfähiger Prototyp realisiert. Dieses System diente der temperaturgesteuerten Kristallisation biologischer Makromoleküle. Der Batch-Mikroreaktor wurde bereits erfolgreich in die strukturelle biologische Anwendung überführt.

### Mikrostrukturierung und Aufbau

Die Mikrostrukturierung der Chipreaktoren erfolgte mithilfe von Silizium-Mikromechanik und Dünnschichttechnologie. Hierzu kamen Standardmethoden zum Einsatz wie Fotolithografie, Trocken- und Nassätztechniken (anisotropes Si-Tiefenätzen) sowie Planarbeschichtungsverfahren (PVD, CVD) zum Einsatz. Die Temperierung wurde realisiert durch Pt-Dünnschichttransducer und einem PELTIER-Element. Im Bereich der Umgebungstemperatur übernahm das PELTIER-Element die Funktion eines Kühl- und Heizmoduls anstelle von Pt-Dünnschichtheizern. Damit konnte die Regelung vereinfacht und stabilisiert werden ohne signifikante Einbußen im dynamischen Verhalten in Kauf zu nehmen. Mithilfe eines embedded PCs wurde eine Stand-alone-Variante des Mikroreaktormoduls realisiert. Die Deckelung mit einem Mikroskopie-Deckglas und einer Parafin-Öl-Dichtung erfüllte die Anforderungen an Verdunstungsschutz und optischer Transparenz zur *in situ* Beobachtung der Kristallisation. Zudem war die Deckelung vollständig lösbar und gestattete so die Ernte von Kristallen. Die Wiederverwendbarkeit der Reaktionskammer wurde mithilfe des Modellproteins r-GFP und konfokaler Fluoreszenz-Mikroskopie analysiert. Durch ein geeignetes Reinigungsprotokoll war es möglich, die Oberfläche der Reaktionskammer nach Kontamination im Rahmen der Messmethodik vollständig zu regenerieren.

### Thermik

Der kompakte Hybridbau aus Pt-Dünnschichtsensoren und thermoelektrischem Element ermöglichte eine exakte und langzeitstabile Temperaturregelung mit  $\Delta T < \pm 0,07$  K auch bei periodischen Temperaturprotokollen über mehrere Tage im Temperaturbereich  $5^{\circ}\text{C} < \vartheta < 50^{\circ}\text{C}$ . Der Einfluss der Kristallisation auf das thermische Verhalten kann vernachlässigt werden. Die experimentell und simulationstechnisch bestimmten Temperaturverteilungen wurden mithilfe eines linearen Wärmeleitungsmodells nach FOURIER validiert. In der Reaktionskammer wurden die lateralen Temperaturdifferenzen im Temperaturintervall  $\Delta T_{\text{U}} = T - T_{\text{U}} < \pm 15$  K bestimmt zu  $\Delta T_{\text{lat}} < \pm 1$  K, die vertikalen Temperaturdifferenzen zu  $\Delta T_{\text{vert}} < \pm 0,5$  K. Die lateralen Gradienten werden dominiert vom Design der Temperierung. Die geringe thermische Isolation des relativ dünnen Glasdeckels gegenüber der Umgebung bestimmt den vertikalen Temperaturabfall in der Reaktionslösung.

3D-FEM-Simulationen auf der Basis früherer Rechnungen mikrotechnischer Komponenten ergaben hierzu äquivalente Aussagen. (Müller 1998, Dillner 1995) Als Referenzmessverfahren eigneten sich sorgfältig kalibrierte Pt-Dünnschichtsensoren. Damit waren aber lediglich lokal begrenzte Temperaturen möglich. Die Messungen mit der Wärmebild-Kamera gestalteten sich als äußerst aufwändig in der Auswertung und sind nur sinnvoll zur qualitativen Beurteilung lateraler Temperaturfelder.

Die dynamischen Parameter des Batch-Mikroreaktors liegen ebenfalls innerhalb der geforderten Grenzen. Unabhängig vom Temperaturniveau und Temperiermodus lag die Einschwingzeit des Reglers bei  $t_{95} \approx 4,5$  s, die thermische Relaxationszeit des Fluids bei  $\tau_{\text{therm}} \approx 1,6$  s. Die Abschätzung über ein vereinfachendes Modell nach SOMMERFELD approximiert die Messwerte sehr gut. Die Heiz- und Kühlraten waren hauptsächlich durch die Reglerparameter definiert und wurden ermittelt zu  $(dT/dt)_{\text{Heizen}} \approx 5$  K/s bzw.  $(dT/dt)_{\text{Kühlen}} \approx -3$  K/s. Entsprechend ist der Batch-Mikroreaktor je nach Temperiermodus nach  $t_{95, \text{gesamt}}(\text{Heizen}) \approx \frac{1}{2} t_{95, \text{gesamt}}(\text{Kühlen}) < 7$  s auf einem geänderten Temperaturniveau stationär eingeschwungen.

## 4.2 Fluss-Mikroreaktor

Die Weiterentwicklung des Mikroreaktorkonzeptes zu einem kontinuierlich betriebenen System mündete im Fluss-Mikroreaktor. Dieses Versuchsmuster bildet die technische Plattform für eine temperatur- und konvektionskontrollierte Kristallisation kleiner Mengen biologischer Makromoleküle. Durch Integration weiterer fluidischer Komponenten wie z.B. ein HPLC-Gradientensystem sollte es möglich sein, die Zusammensetzung der Lösungen *in situ* zu variieren und somit den Parameterraum bei der Biokristallisation beträchtlich zu erweitern.

### Mikrostrukturierung und Aufbau

Die Präparationstechnologie des Chipreaktors entsprach prinzipiell dem Protokoll des Batch-Mikroreaktors. Zur Präparation der mikrofluidischen Strukturen wurde die Technologie durch isotrope Si-Tiefenätzschritte erweitert. Das Design der fluidischen Bifurkationen wurde auf Grundlage der Erkenntnisse aus den CFD-Simulationen optimiert. Die Verlängerung der Struktur bewirkte eine signifikante Beruhigung und Homogenisierung der Strömung. Zur Deckelung des Chipreaktors kam wiederum ein Mikroskopie-Deckglas zum Einsatz. Die Dichtung wurde jedoch in Form einer strukturierten PDMS-Membran realisiert. Hierzu wurde ein mechanisch-chemisches Präparationsprotokoll entwickelt, welches eine oberflächenchemische Vorbehandlung des Glasdeckels beinhaltete. Eine Behandlung der PDMS-Membran mit einer wässrigen HCl-Lösung erlaubte eine ausreichende Regeneration der Hafteigenschaften. Die Deckelung erfüllte alle Anforderungen und hielt dem Druck im System in ausreichendem Maße stand. Um ein blasenfreies Befüllen des Fluss-Mikroreaktors zu ermöglichen, wurden die Oberflächen der fluidischen Strukturen auf dem Chipreaktor ebenfalls chemisch modifiziert. Eine Hydrophilisierung der Mikrofluidkanäle und eine Hydrophobisierung der Reaktionskammer erwies sich hierbei als geeignet.



Die vollständige thermische Kontrolle der Lösungen im Fluss-Mikroreaktor erforderte einen mehrstufigen Aufbau mit drei Temperierkomponenten: Chipreaktor, Kapillarschlauchheizung und Temperierofen. Aus den Temperaturfeldanalysen wurde ein optimiertes Design „JBCC 1.2“ für die aktiven thermischen Komponenten abgeleitet:

- PELTIER-Element auf Abmessung der Reaktionskammer begrenzt
- Kanalheizer dem Verlauf der Mikrofluidkanäle nachempfunden und so dicht als möglich an den Eingang des Chips bzw. der Reaktionskammer platziert

Damit waren die Bereiche getrennt temperierbar und erlaubten auf die jeweilige Applikation abgestimmte Temperaturprotokolle.

### Fluidik

Die Messungen des **Druckverlustes** im Fluss-Mikroreaktor sowie der Vergleich mit einem analytischen Modell nach HAGEN-POISEUILLE ( $\Delta p \sim Q$ ) ließ laminare Strömungsverhältnisse erwarten. Dieser Befund korrespondiert mit den Ergebnis kleiner REYNOLDSzahlen  $Re < 1$  für experimentell relevante Flussraten  $Q < 30 \mu\text{l}/\text{min}$ . Der Druckverlust belief sich hierbei auf etwa  $\Delta p_{\text{max}} \approx 100 \text{ mbar}$  und war dominiert von den Kapillarschläuchen der fluidischen Peripherie. Der Druckabfall über dem Chipreaktor betrug lediglich  $\Delta p \approx 3,5 \text{ mbar}$ . Die Befüllcharakteristik in Form von Druckprofilen wurde qualitativ wiedergegeben und korrelierte gut mit einem analytischen Blasendruck-Modell nach LAPLACE.

Die **Strömungsfeldanalysen** in der Reaktionskammer bestätigten die Vermutung, dass sich laminare Geschwindigkeitsprofile ohne Totbereiche und Rückströmungen ausbildeten. Nach einem kurzen Einströmbereich von etwa  $500 \mu\text{m}$  nach Kammereintritt wurde das stationäre Strömungsprofil zu 90% erreicht. Die 3D-CFD-Simulation korrelierte qualitativ und quantitativ mit  $\mu$ -PIV-Experimenten. Das Profil quer zur Strömungsrichtung ergab in vertikaler Richtung  $u(z)$  ein parabolisches Profil gemäß HAGEN-POISEUILLE. Horizontal war das Profil  $u(y)$  nicht vollständig durch ein geschlossenes analytisches Modell nach HAGEN-POISEUILLE anzugeben. Eine Analyse des Druckabfalls und der Geschwindigkeitskomponenten quer zur Hauptströmungsrichtung bestätigten, dass die Strömung in der Reaktionskammer nur durch Implementierung der PRANDTLschen Grenzschichttheorie vollständig zu lösen wäre. Durch eine simple Modifikation des HAGEN-POISEUILLESchen Modells für eine seitlich begrenzte Spaltströmung gelang es jedoch, die realen Verhältnisse gut anzunähern. Modell, Simulation und Experiment konnten über eine Rückrechnung der Ergebnisse auf die Eingangsparameter validiert werden. Die maximalen Abweichungen betragen etwa 10%. 3D-CFD-Simulationen zeigten, dass das Kristallwachstum am Deckel der Reaktionskammer das Strömungsfeld nur sehr lokal störte und insgesamt vernachlässigt werden konnte.

Die Untersuchungen zum **Verweilzeitverhalten** zeigten, dass in der Reaktionskammer weder Bereiche signifikanter Rückvermischung noch Kurzschlussströmungen existierten. Diese Befunde unterstützen die bisherigen Erkenntnisse. Das Verweilzeitverhalten wurde analog zum Druckverlust

dominiert durch die fluidische Peripherie. Viskositätsuntersuchungen zeigten, dass die Reaktionskammer ausgleichend auf Verweilzeitunterschiede wirkte und für ein homogenisiertes Verweilzeitprofil sorgte. Das generische (Dispersions-) Modell ließ sich grundsätzlich auf die experimentellen Ergebnisse anwenden. Die Berechnung des Ausgangssignals aus dem Eingangssignal mithilfe des Modells ergab einen qualitativ vergleichbaren Kurvenverlauf. Allerdings ist Vorsicht geboten bei der Interpretation betreffend der axialen Dispersion (BODENSTEINZahl) und der Verweilzeitverteilung:

- 1) Die hydrodynamischen Voraussetzungen (turbulente Pfropfenströmung) waren nicht erfüllt, da im Chipreaktor laminare Strömungsverhältnisse herrschten.
- 2) Bei der Anpassung des Modells wurde weder die Reaktorgeometrie noch die Abweichung von der ideal laminaren Rohrströmung nach HAGEN-POISEUILLE berücksichtigt.
- 3) Die messtechnischen Voraussetzungen (Volumen Tracerpuls  $\ll$  Volumenstrom, Detektor sei klein gegenüber dem Messvolumen) waren nur bedingt erfüllt.

Es zeigte sich, dass die Eliminierung von fluidischen Störbereichen umso wichtiger wurde, je kleiner die Flussrate und Abmessungen der Mikroreaktoren wurde und je größer die Viskosität des Trägerstroms war.

Die Hauptaussagen bezüglich des fluidischen Verhaltens des Fluss-Mikroreaktors lassen sich in folgenden Punkten zusammenfassen:

- laminarer Fluss ohne Totbereiche (Re-Zahl, Druckverlust, Strömungsfeld & Verweilzeit)
- homogenes Strömungsprofil ohne Kurzschlussströmung (Strömungsfeld & Verweilzeit)
- homogenes Ein- und Ausströmverhalten: schneller Ausgleich der Geschwindigkeitsverteilung nach dem Einströmen (Strömungsfeld)
- fluidische Bifurkationsstrukturen notwendig und erzielen homogenisierenden Effekt in der Strömung
- Untersuchungen ähnlicher Mikroreaktoren mit Modellen & Simulationen möglich

Vom fluidischen Standpunkt betrachtet erfüllte der Designvorschlag „JBCC 1.2“ die Anforderungen an den Fluss-Mikroreaktor.

### **Thermik**

Die thermischen Anforderungen an den Fluss-Mikroreaktor bezüglich Homogenität in der Reaktionskammer sowie Langzeitstabilität und Dynamik wurden analog zum Batch-Mikroreaktor erfüllt. Der Einfluss der Strömungsgeschwindigkeit bei experimentell signifikanten Flussraten  $Q < 30 \mu\text{l}/\text{min}$  konnte vernachlässigt werden. Genauigkeit und Langzeitstabilität lagen auch bei periodischen Temperaturprotokollen über mehrere Tage innerhalb des Toleranzintervalls  $\Delta T < \pm 0,1 \text{ K}$ . Die separate Temperierbarkeit der aktiven thermischen Komponenten des Chipreaktors (PELTIER-Element und Kanalheizer) ermöglichten Temperaturdifferenzen zwischen Reaktionskammer und Mikrofluidkanälen. Simulationen und Wärmebilder gaben den Einfluss des Designs qualitativ wieder. Das optimierte

Reaktordesign „JBCC 1.2“ resultierte in relativ großen lateralen Temperaturgradienten in der Reaktionskammer von  $\Delta T_{\text{lat}} < \pm 1,5$  K. Dies war begründet in der relativ kleinen wärmeübertragenden Fläche unter der Reaktionskammer. Die vertikale Temperaturdifferenz  $\Delta T_{\text{vert}} < \pm 0,5$  K lag im Bereich der Werte für den Batch-Mikroreaktor. Die 3D-CFD-Simulation konnte mithilfe eines 1D-Modells nach FOURIER erfolgreich validiert werden. Ein Parametervergleich ergab einen Wärmeübergangskoeffizient  $\alpha_{\text{Glas} \rightarrow \text{Luft}} \approx 9,5$  (W/(m<sup>2</sup> K)), welcher sehr gut mit tabellierten Werte für Makrosysteme korreliert. Messungen mit Dünnschichtensensoren deuteten jedoch an, dass der effektive Wärmeübergangskoeffizient aufgrund der kleinen Abmessungen des Mikrosystems leicht erhöht ist. Dies stimmt qualitativ mit den Befunden aus früheren Arbeiten überein. (Müller 1998, Dillner 1995)

Zugunsten eines stabilen Betriebes wurden die Reglerparameter so eingestellt, dass die Temperierung des Fluss-Mikroreaktors weniger dynamisch als die des Batch-Mikroreaktors ist. Entsprechend waren im Fluss-Mikroreaktor insgesamt weniger schnelle Temperaturprotokolle zu realisieren als im Batch-Mikroreaktor. Sie lagen aber für Flussraten  $Q < 60$   $\mu\text{l}/\text{min}$  noch im Bereich der geforderten Spezifikationen für Anwendungen in der Proteinkristallisation. Heiz- bzw. Kühlraten betragen  $(dT/dt)_{\text{Heizen}} \approx 15$  K/s bzw.  $(dT/dt)_{\text{Kühlen}} \approx -6$  K/s. Die Einschwingzeit des Gesamtsystems wurde ermittelt zu  $t_{95, \text{gesamt}}(\text{Heizen}) \approx \frac{1}{2} t_{95, \text{gesamt}}(\text{Kühlen}) < 10$  s. Hierbei stimmte die Abweichung der gemessenen thermischen Relaxationszeit des Fluids mit der analytischen Abschätzung auf 10% überein.

Zusammenfassend lässt sich für die thermischen Betrachtungen festhalten, dass sich Simulation, Experiment und analytische Modellbetrachtungen gegenseitig ergänzen. Modelle und Simulationen sind stets mit (Kontroll-) Experimenten abzugleichen. Die thermischen Anforderungen wurden erfüllt, ließen jedoch Ansatzpunkte für weitere konstruktive Optimierungsmaßnahmen erkennen.

### 4.3 Kristallisation von Modellproteinen

Der Funktionsnachweis der Kristallisation von Modellproteinen (Hen Egg-White Lysozym und humanes Insulin) in mikrostrukturierten Systemen wurde anhand des Batch-Mikroreaktors erfolgreich erbracht. Hierbei wurden zwei Hauptapplikationsfelder identifiziert:

- 1) Screening nach der optimalen Kristallisationstemperatur
- 2) physiko-chemische Untersuchungen der Kristallogeneese zur Erstellung von Phasendiagrammen

Im Batch-Mikroreaktor wuchsen auf Anhieb Proteinkristalle in ihren aus der Literatur zu erwartenden Morphologien und Größenverhältnissen. Die unmittelbare Anwendbarkeit des Batch-Mikroreaktors als Sekundärverfahren wurde dadurch gezeigt, dass die Kristallisationsbedingungen direkt aus Standardmethoden auf den Mikroreaktor zu übertragen waren. Dies gelang für die am weitesten verbreitete Methode der Dampfdiffusion „Hängender Tropfen“ ohne weitere Anpassungen. Ferner wurde beispielhaft für HEWL (tetragonal NaCl) der theoretisch erwartete Effekt der Temperatur auf die Kristallogeneese bestätigt: durch den Einsatz zyklischer Temperaturprotokollen nach der Methode

des „Enforced-OSTWALD-Ripening“ wuchsen im Vergleich zu Protokollen mit konstanter Temperatur nur wenige größere Kristalle mit enger Größenverteilung und nur einer Morphologie. Die Kristalle wurden visuell mithilfe von Lichtmikroskopie und konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht. Eine exakt regelbare Temperaturführung ist folglich eine notwendige Voraussetzung für ein optimiertes und reproduzierbares Kristallwachstum. Diese Anforderung nach definierten thermischen Bedingungen sind im Batch-Mikroreaktor auf Grundlage der Charakterisierung sehr gut erfüllt. Eine quantitative Analyse der Kristallqualität erfolgte mithilfe röntgenografischer Methoden. Die Qualität der Kristalle aus dem Batch-Mikroreaktor lagen trotz suboptimaler Messbedingungen ohne weitere Optimierung in derselben Größenordnung wie die aus der am weitesten verbreitete Standardmethode Dampfdiffusion „Hängender Tropfen“. Die Proteinkristalle aus dem Batch-Mikroreaktor erfüllen demnach die Qualitätsanforderungen zur Röntgenstrukturanalyse bereits in diesem frühen Entwicklungsstadium in ausreichendem Maße.

Im Bereich physiko-chemischer Untersuchungen gelang es unter Anwendung konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie, grundlegende Wachstumsmechanismen *in situ* zu analysieren. Durch die Aufzeichnung des Längenwachstums bei verschiedenen Temperaturen war es möglich, die Wachstumsraten zu bestimmen. Hieraus konnten dann Punkte auf der Liquiduslinie im Phasendiagramm des betreffenden Proteins abgeleitet werden. Der Batch-Mikroreaktor bietet sich demnach als neuartiges Werkzeug an, um Phasendiagramme schnell und reproduzierbar zu erstellen. Für exakte Untersuchungen sind die Abweichungen vom thermischen Sollwert in der Reaktionskammer zu berücksichtigen. Die Kenntnis der Lage des zu untersuchenden Kristalls ermöglicht jedoch unter Einbeziehung des Temperaturprofils eine Abschätzung der realen Werte.

Diese ersten applikativen Untersuchungen im Batch-Mikroreaktor zeigten, dass die Proteinkristallisation in Mikroreaktoren unmittelbar möglich ist und neben den am häufigsten eingesetzten Standardmethoden wie z.B. Dampfdiffusion „Hängender Tropfen“ bestehen kann. Diese neuartigen Technologieplattformen eröffnen durch ihre homogenen und exakt definierten thermischen und fluidischen Bedingungen Zugang zu hochauflösenden Analysemöglichkeiten. Sie eignen sich damit hervorragend für den Einsatz in der Biokristallisation und können neue Ansatzpunkte zur Effizienzsteigerung der Kristallisationsprozesse liefern.

#### **4.4 Ausblick**

Die fortschreitenden Bestrebungen zu immer höherer funktioneller Integration und weiterer Miniaturisierung im Bereich der Biowissenschaften fordert innovative Lösungsansätze. Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Mikroreaktoren bieten eine neuartige Technologieplattform zum unmittelbaren Einsatz in der Proteinkristallisation. Trotz der erzielten Erfolge ist weiterer Forschungs- und Entwicklungsbedarf festzustellen hinsichtlich der technologischen Weiterentwicklung der Mikroreaktoren sowie ausführlicher Applikationsstudien.

Zur Optimierung des Batch-Mikroreaktors ist der laterale und vertikale Temperaturgradient auf maximal  $\Delta T < 1$  K einzugrenzen. Als Werkzeug zur Designverbesserung bieten sich verfeinerte Simulationsrechnungen an. Dazu sind jedoch Untersuchungen zur Bestimmung des effektiven Wärmeübergangskoeffizienten und ein Abgleich mit analytischen Wärmeleitungsmodellen notwendig.

Im Falle des Fluss-Mikroreaktors wurde das geforderte Genauigkeitsintervall trotz des erheblich komplexeren Aufbaus im Vergleich zum Batch-Mikroreaktor eingehalten. Besonders das Zusammenspiel der Temperierung mittels PELTIER-Element und Kanalheizer führte das System allerdings bis an die Spezifikationsgrenzen und lässt Raum für Verbesserungen. Eine thermische Entkopplung der beiden Komponenten durch eine stringente konstruktive Feinabstimmung könnte hierfür ein Ansatzpunkt darstellen. Damit ist es durchaus vorstellbar, insbesondere die lateralen Temperaturgradienten in der Reaktionskammer weiter zu minimieren. Detaillierte Untersuchungen des Geschwindigkeitsprofils insbesondere im Randbereich werden ermöglicht durch die Erhöhung der Dichte der  $\mu$ -PIV-Messpunkte. Zur weiteren Optimierung der experimentellen Bedingungen sind Störungen durch Schmutzpartikeln oder Agglomerate der Tracer zu eliminieren. Dies kann bereits durch vorgeschaltete Filter und sorgfältige Reinigung der Fluidstrukturen vor der  $\mu$ -PIV-Messung erreicht werden. Zur Analyse des Verweilzeitverhaltens von Mikroreaktoren ist anstatt des klassischen makroskopischen Dispersionsmodells ein abschnittsweise definiertes Ersatzschaltbild in Analogie zur Elektrotechnik vorzustellen. Dieses „inkrementale Modell“ enthält ein rein konvektives Element (Strömungsbereich) und je ein vor- bzw. nachgeschaltetes diffusives Element (keine Strömung). Die Einzelmodule sind durch ihre Abstrahierung mathematisch erfassbar. Durch Kombination der Elemente sollte es im Rahmen von Grenzfallbetrachtungen prinzipiell möglich sein, ohne aufwändige Strömungssimulationen die möglichen Typen realer Mikroreaktoren einzuordnen.

Die Applikationsversuche im Batch-Mikroreaktor erfordern eine statistische Absicherung der Ergebnisse durch Wiederholungsexperimente. Hierbei ist schwerpunktmäßig der Einfluss konstanter und zyklischer Temperaturprotokolle auf die Kristallqualität mithilfe röntgenografischer Messungen zu untersuchen. Zum Vergleich mit Standardverfahren sind jedoch prinzipiell ähnliche Kristallisationsmethoden, wie z.B. „microbatch under oil“ anzuwenden. (Chayen 1992, 1998) Das Potenzial des Batch-Mikroreaktors hinsichtlich dynamischer Protokolle eröffnet die Möglichkeit, den Einfluss schneller Temperaturwechsel zu studieren. Einen weiteren Schwerpunkt bildet die Erstellung vollständiger Phasendiagramme. Hierbei ist es notwendig, Kristallite zu analysieren, welche ein reversibles Wachstumsverhalten aufweisen. Das Wachstum von Kristallen bei konstanter Übersättigung wurde von SCHALL *et al.* beschrieben. (Schall 1996) Unter Zuhilfenahme der hierin aufgestellten Regeln eignet sich der Batch-Mikroreaktor zur Realisierung entsprechender Versuchspläne. Die Strukturaufklärung neuartiger und therapeutisch relevanter Proteine ist letztlich das Ziel der Bemühungen. Entsprechend sind Kristallisationsexperimente mit geeigneten Kandidaten durchzuführen.

Zur Effizienzsteigerung des Batch-Mikroreaktors sind verschiedene technologische Weiterentwicklungen denkbar. Durch Parallelisierung der Reaktionskammer und der entsprechenden Temperierkomponenten ist ein Kristallisationsarray zu realisieren. Kernidee eines derartigen „Multi-Batch-Mikroreaktors“ ist dabei die gleichzeitige Beobachtung von Kristallen unter verschiedenen jedoch exakt definierten Bedingungen. Mit der Integration optischer *in situ*-Beobachtungsmethoden, wie z.B. der Statischen oder Dynamischen Lichtstreuung (SLS/ DLS), kann ein weiterer Aspekt der Kristallognese abgedeckt werden. Diese Methoden eignen sich zur Beobachtung der Nukleationsphase der Kristallognese. SLS und DLS ermöglichen die Untersuchung der Keimbildungsprozesse und des Wachstums von Molekülagglomeraten und Kristalliten im Größenbereich  $L \approx 1 \dots 100$  nm. In Kombination konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) mit einer lateralen Auflösung  $L > 100$  nm könnte so der Entstehungsprozess von Kristallen lückenlos verfolgt werden.

Der Fluss-Mikroreaktor ist analog zum Batch-System mithilfe der Kristallisation von Modellproteinen einem Funktionstest zu unterziehen. Neben dem Einfluss der Temperatur ist hierbei auch der Effekt der Konvektion auf die Kristallognese zu studieren. Die Integration eines weiteren Pumpkreises erweitert den zu analysierenden Parameterraum beträchtlich. Damit lässt sich die Zusammensetzung der Lösung *in situ* variieren. Hierzu bietet sich an, ein Gradientensystem analog zu HPLC-Anlagen anzukoppeln und mit einer integrierenden Software zu versehen.

Die vollständige Kontrolle der thermischen und fluidischen Parameter in Kombination mit einem Probenvolumen im Mikrolitermaßstab machen die Mikroreaktoren prinzipiell interessant für andere Applikationsfelder. Die chemische und pharmazeutische Forschung sind ebenso zu nennen wie beispielsweise die Kultivierung submerser Mikroorganismen. Inwieweit die Mikroreaktoren hierfür zu adaptieren und in die Praxis zu überführen sind, bleibt in weiterführenden Untersuchungen zu klären.

## 5 Literaturverzeichnis

- Adrian, R. J. (1991): Particle-imaging techniques for experimental fluid mechanics. *Annual Reviews in Fluid Mechanics* **23**: pp. 261-304.
- Amador, C., Gavriilidis, A. & Angeli, P. (2003): Flow distribution in different microreactor scale-out geometries and the effect of manufacturing tolerances and channel blocking. Proc. of Process Miniaturization: IMRET 7, Lausanne, Matlosz, pp. 321-323.
- Ansys Inc. (1996): ANSYS Workbook - Manual for Release 5.3. Houston, ANSYS IP.
- Aquilano, D., Veesler, S., Astier, J. P. & Pastero, L. (2003): Polymorphic - polytypic transition induced in crystals by interaction of spirals and 2D growth mechanisms. Proc. of 2nd French German Crystal Growth Meeting, Nancy/ F, pp. 135.
- Arpe, H.-J. (1986): Silicon Nitride in Pelc, H.: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* **5**, A17.
- Astier, J. P., Bokern, D., Lapena, L. & Veesler, S. (2001):  $\alpha$ -amylase crystal growth investigated by in situ atomic force microscopy. *Journal of Crystal Growth* **226**, 294-302.
- Ataka, M. & Tanaka, S. (1986): The growth of large single crystals of lysozyme. *Biopolymers* **25**: pp. 337-350.
- Atkins, P. W. (1994): Physical Chemistry. 5, Oxford, Oxford University Press, Oxford.
- Baal, T. (2004): Biomicrotechnology. *MST News*: pp. 5-8.
- Baier, V., Bodner, U., Dillner, U. & Köhler, J. M. (1995): Miniaturisierter Fluss-Thermocycler. EP 1 022059 A2: 12.09.95.
- Becker, H. & Gärtner, C. (2000): Polymer microfabrication methods for microfluidic analytical applications. *Electrophoresis* **21**: pp. 15-26.
- Becker, H. & Locascio, L. E. (2002): Polymer microfluidic devices. *Talanta* **56**: pp. 267-287.
- Becker, H., Ehrfeld, W. & Pommersheim, R. (1999): Multichannel arrays on polymer substrates - towards a disposable proteomics chip. *SPIE* **3680**: pp. 728-731.
- Benson, R. S. & Ponton, J. W. (1993): Process miniaturization - A route to total environmental acceptability? *Transactions in Chemical Engineering* **71 (Part A)**: pp. 160-168.
- Benson, R. S. (1989): Process Systems Engineering: Past, Present and a personal view of the Future. *Computers chem. Engng.* **13**: pp. 1193-1198.
- Benz, K. W. & Dold, P. (2002): Crystal growth under microgravity: present results and future prospects towards the International Space Station. *Journal of Crystal Growth* **237-239**, 1638-1645.
- Berg, M., Mühligh, P., Kielpinski, M., Urban, M., Mayer, G. & Hilgenfeld, R. (2003): Temperature-controlled Crystallization of Proteins in Micro-Batchreactors. in: *2nd French German Crystal Growth Meeting*. Nancy.
- Berg, M., Urban, M., Dillner, U., Mühligh, P. & Mayer, G. (2002): Development and characterization of temperature-controlled microreactors for protein crystallization. *Acta Crystallographica Section D* **58**, (10), 1643-1648.
- Bergfors, T. M. (1999). Protein Crystallization. La Jolla: IUL Press.
- Bernhard, F. (2004): Dynamisches Verhalten von Berührungsthermometern in Fluiden. Bernhard, F.: Technische Temperaturmessung. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg: pp. 271-424.
- Blagova, E. V. (1999): Crystallization and Preparation of Protein Crystals for X-ray Diffraction Analysis. *Crystallography Reports* **44**, 513-531.
- Blundell, T., Cutfield, J. F., Dodson, G. G., Dodson, E., Hodgkin, D. C. & Mercola, D. (1971): The Structure and Biology of Insulin. *Biochemical Journal* **125**, (3), 50P-51P.
- BMBF (2000): Förderkonzept: Mikrosystemtechnik 2000+. Bonn, Bundesministerium für Bildung und Forschung.
- BMBF (2003): Forschungsförderung. Bundesministerium für Bildung und Forschung, <http://www.bmbf.de/5458.html>.
- Boistelle, R. & Astier, J. P. (1988): Crystallization Mechanisms in solution - Review. *Journal of Crystal Growth* **90**, 14-30.
- Brander, J., Fichtner, M. & Schubert, K. (1999): Electrically heated microstructure heat exchanges and reactors. Proc. of Process Miniaturization: IMRET 3, Frankfurt/ M., pp. 607-616.

- Bray, T. L., Kim, L. J., Harrington, M. & DeLucas, L. J. (2002): Dynamically controlled crystal growth system. US 6,406,903 B2: 18.06.02.
- Brinkler, C. J. & Scherer, G. W. (1990): Sol-Gel Science - The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing. Oxford, Academic Press.
- Brüggemeier, U., Gress, T., Hoheisel, J., Joos, T., Lenke, R., Lichter, P. & Rosenthal, A. (2003): Chipbasierte Mikrosysteme für Chemo- und Biotechnologie. Proc. of Dechema Statusseminar: Chiptechnologien, Frankfurt/Main.
- Brzozowski, A. M. (2002): Is there any alternative to high-throughput screening? Proc. of ICCBM9, Jena.
- Budayova-Spano, M., Bonneté, F., Astier, J.-P. & Veessler, S. (2002): Investigation of aprotinin (BPTI) solutions during nucleation. *Journal of Crystal Growth* **235**: pp. 547-554.
- Büttgenbach, S. (1994): Mikromechanik - Einführung in Technologie und Anwendung. 2, Braunschweig, Teubner, Stuttgart.
- Cachau, R. E., J.R., C.-F. & Sanjoh, A. (2000): Automated crystallization of polar biomolecules in the metastable regime using microfluidic silicon devices and a variable temperature incubator. Proc. of 19th European Crystallographic Meeting (ECM19), Nancy.
- Cahill, D. J. (2001): Protein and Antibody arrays and their medical applications. *Journal of Immunological Methods* **250**: pp. 81-91.
- Chayen, N. E. & Hilgenfeld, R. (2002): Crystallization comes of age. *Trend in Biotechnology* **20**: pp. 320-321.
- Chayen, N. E. & Saridakis, E. (2001): Is lysozyme really the ideal model protein? *Journal of Crystal Growth* **232**, (1-4), 262-264.
- Chayen, N. E. (1998): Comparative studies of protein crystallization by vapour-diffusion and microbatch techniques. *Acta Crystallographica Section D* **D54**: pp. 8-15.
- Chayen, N. E., Stewart, P. D. S. & Blow, D. M. (1992): Microbatch crystallization under oil - a new technique allowing many small-volume crystallization trials. *Journal of Crystal Growth* **122**: pp. 176-180.
- Chernov, A. A., Rashkovitch, L. N., Smol'skii, I. L., Kuznetsov, Y. G., Mkrtychyan, A. A. & Malkin, A. J. (1988): Growth of KDP crystals from solution, in *Growth of Crystals*, E.I. Givargizov & S.A. Grinberg, Editors. 1988, Consultants Bureau: London. p. 43-91.
- Chiharu, N., Nobushisa, W., takashi, A., Isao, T., Toshinori, S., Yuichirou, N. & Hiroshi, T. (2003): Array for crystallizing protein, device for crystallizing protein and method of screening protein crystallization using the same. WO03053998: 03-07-2003.
- Christopher, G. K., Phipps, A. G. & Gray, R. J. (1998): Temperature-dependent solubility of selected proteins. *Journal of Crystal Growth* **191**, 820-823.
- Claus, P., Hönicke, D. & Zech, T. (2001): Miniaturization of screening devices for the combinatorial development of heterogeneous catalysts. *Catalysis Today* **67**: pp. 319.
- Csaki, A. (2003): DNA-basierte molekulare Nanokonstruktion. Dissertation an Universität Jena.
- Delboni, L. F., Lulek, J., Burger, R., DaSilva, A. C. R. & Moreno, A. (2002): Applications of thermal-gradients method for the crystallization of  $\alpha$ -amylase crystallization conditions based on dynamic and static light scattering data. *Journal of Molecular Structure* **604**, 253-260.
- DeLucas, L. J., Long, M. M., Moore, K. M., Rosenblum, W. M., Bray, T. L., Smith, C., Carson, M., ... & Bugg, C. E. (1994): Recent results and new hardware developments for protein crystal growth in microgravity. *Journal of Crystal Growth* **135**, 183-195.
- DeMattei, R. C. & Feigelson, R. S. (1993): Thermal methods for crystallizing biological macromolecules. *Journal of Crystal Growth* **128**, 1225-1231.
- Dietrich, T. R. (2002): Photostrukturierung von Glas. in: Handbuch Mikrotechnik. Carl Hanser Verlag. München - Wien.
- Dillner, U. (1995): Simulationswerkzeuge zur thermischen Modellierung thermoelektrischer Mikrosensoren. Abschlussbericht 2.2, VDI-VDE-Technologiezentrum Informationstechnik, Teltow.
- Dittmar, G. & Neuer, G. (2004): Strahlungstemperaturmessung. in Bernhard, F.: Technische Temperaturmessung. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg: pp. 979-1147.
- Drenth, J. & Haas, C. (1998): Nucleation in Protein Crystallization. *Acta Crystallographica Section D* **D54**: pp. 867-872.



- Drews, J. (1998): Die verspielte Zukunft - Wohin geht die Arzneimittelforschung. Basel, Boston, Berlin, Birkhäuser Verlag.
- Duffy, D. C., McDonald, J. C., Schueller, O. J. A. & Whitesides, G. M. (1998): Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane). *Analytical Chemistry* **70**: pp. 4974-4984.
- Durbin, S. D. & Carlson, W. E. (1992): Lysozyme crystal growth by atomic force microscopy. *Journal of Crystal Growth* **122**, 71-79.
- Ehrfeld, W., Ehrfeld, U., Bieber, T., Herbstritt, F., Koch, O., Kroschel, M., Merkel, T., Raffa, C., Salmon, A., Schael, F. & Schwank, T. (2003): Modular microreaction technology for process development and production. Proc. of 5th International Conference on Process Intensification for the Chemical Industry, Maastricht, NL, BHR Group, pp. 125-136.
- Ehrfeld, W., Hessel, V. & Löwe, H. (2000): Microreactors - New Technology for Modern Chemistry. 1, Mainz, Wiley-VCH, Weinheim.
- Ehrfeld, W., Hessel, W., Möbius, H., Richter, T. & Russow, K. (1995): Potentials and Realization of Microreactors. Proc. of Microsystem Technology for Chemical and biological Microreactors, Mainz, Wiley-VCH, pp. 1-28.
- Eichler, J. (2003): Kombinatorische Chemie. Methoden und Anwendungen. Wiesbaden, Teubner.
- Ekani-Nkodo, A. & Kuchnir Fygenon, D. (2003): Size exclusion and diffusion of fluoresceinated probes within collagen fibrils. *Physical Review E* **67**.
- Elwell, D. & Scheel, H. J. (1975): Conditions for stable crystal growth. in: Crystal growth from high-temperature solutions. Academic Press. London: pp. 237-277.
- Elwell, D. & Scheel, H. J. (1975): Crystal growth from high-temperature solutions. London, Academic Press.
- Elwell, D. & Scheel, H. J. (1975): Experimental techniques. in: Crystal growth from high-temperature solutions. Academic Press. London: pp. 278-432.
- Erickson, D., Sinton, D. & D, L. (2003): Joule heating and heat transfer in poly(dimethylsiloxane) microfluidic systems. *Lab on a Chip* **3**: pp. 141-149.
- EU-CORDIS (2003): 6th framework programme 2003 - Activities - Functional Genomics. European Commission, <http://www.cordis.lu/fp6/activities.htm>
- EU-CORDIS (2003): 6th framework programme 2003 - Life sciences, genomics and biotechnology for health. European Commission, <http://www.cordis.lu/fp6/lifescihealth.htm>
- Fatz, D. F. (2000): Is there a market for microengineered devices in medicine. *MST News*: pp. 46-47.
- Fitzer, E., Fritz, W. & Emig, G. (1995): Verweilzeitverhalten und Vermischung in kontinuierlich betriebenen Reaktoren. in Technische Chemie. Springer, Berlin. Karlsruhe/ Erlangen: pp. 289-316.
- Flören, T. (2003): NEXUS Task Force market Analysis: Microsystems World Market Analysis 2000-2005. Marktstudie - Executive Summary, NEXUS & Wicht Technologie Consulting, München.
- Florin, C. (2004): Thermographie. in Bernhard, F.: Technische Temperaturmessung. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg: pp. 1151-1198.
- Fouillet, Y., Vauchier, C., Clerc, J.-F., Raymond, C. & Sarrut, N. (2002): Method for carrying out a biochemical protocol in continuous flow in a microreactor. WO02/060584 A2: 29.01.01.
- Froment, G. F. & Bischoff, K. B. (1990): Chemical reactor analysis and design. 2, New York, Wiley Series in Chemical Engineering.
- Frommherz, P., Offenhäusser, A., Vetter, T. & Weis, J. (1991): A neuron-silicon junction - a Retzius cells of the Leech on an insulating-gate field-effect transistor. *Science* **252**: pp. 1290-1293.
- Fujii, T., Hosokawa, K., Nojima, T., Endo, I. & Shiyouji, S. (1997): Microreactor for biochemical reaction. JP 10337173 A: 05.06.97.
- Gad-el-Hak, M., Sharp, K. V., Adrian, R. J., Santiago, J. G. & Molho, J. I. (2002): Scaling in micromechanical devices and Liquid flows in microchannels. in Gad-el-Hak, M.: The MEMS Handbook. CRC Press. Boca Raton, London: pp. 1-1-5, 2\_1-9, 6\_1-38.
- Galkin, O. & Vekilov, P. G. (1999): Direct determination of the nucleation rates of protein crystals. *Journal of Physical Chemistry B* **103**: pp. 10965-10971.

- Garcia-Ruiz, J. M., Gonzalez-Ramirez, L. A., Gavira, J. A. & Otalora, F. (2002): Granada Crystallisation Box: a new device for protein crystallisation by counter-diffusion techniques. *Acta Crystallographica Section D* **58**, (1), 1638-1642.
- Garman, A. (2001): Microtechnologies and Drug Discovery: Matching Needs and Opportunities. Proc. of EuroBiochips 2001, München, ibc.
- Gastrock, G. (2003): Untersuchungen zur Zellrückhaltung mittels hochfrequenter elektrischer Felder für die Entnahme von Proben aus Bioreaktoren. Dissertation an der Humboldt-Universität Berlin.
- George, A., Chiang, Y., Guo, B., Arabshahi, A., Cai, Z. & Wilson, W. W. (1997): Second virial coefficient as predictor in protein crystal growth. *Methods in Enzymology* **276**, (1), 100-110.
- Gerlach, G. & Dötzel, W. (1997): Grundlagen der Mikrosystemtechnik. München, Wien, Hanser-Verlag.
- Gilliland, G. L., Tung, M., Blakeslee, D. M. & Ladner, J. (1994): The Biological Macromolecule Crystallization Database, Version 3.0: New Features, Data, and the NASA Archive for Protein Crystal Growth Data. *Acta Crystallographica Section D* **D50**, 408-413.
- Gilliland, G. L., Tung, M., Blakeslee, D. M. & Ladner, J. (2003): The Biological Macromolecule Crystallization Database. <http://www.bmcd.nist.gov:8080/bmcd/bmcd.html>.
- Gmelin, L. (1965): Silizium und Stickstoff in *Gmelins Handbuch der anorganischen Chemie* **8** L. Gmelin. 602-607.
- Gnielinski, V., Mersmann, A. & Thurner, F. (1993): Verdampfung, Kristallisation, Trocknung. Karlsruhe, München, Vieweg.
- Gobby, D., Angeli, P. & Gavriilidis, A. (2001): Mixing characteristics of T-type microfluidic mixers. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **11**: pp. 126-132.
- Gonzales, C., Collins, S. D. & Smith, R. L. (1998): Fluidic interconnects for modular assembly of chemical microsystems. *Sensors and Actuators B - Chemical* **49**: pp. 40-45.
- Gorges, R. (2001): Entwicklung eines photokatalytisch arbeitenden Mikroreaktors. Diplomarbeit an Friedrich-Schiller-Universität, Jena.
- Grabley, S. & Thiericke, R. (1999): Drug Discovery from Nature. Berlin, Springer.
- Grant, M. L. & Saville, D. A. (1995): Long-term studies on tetragonal lysozyme crystals grown in quiescent and forced convection environments. *Journal of Crystal Growth* **153**, 42-54.
- Gravesen, P., Branebjerg, J. & Jensen, O. S. (1993): Microfluidics - a Review. *J. Micromech. Microeng.* **3**: pp. 168-182.
- Gripon, C., Legrand, L., Rosenman, I., Boué, F. & Regnaut, C. (1998): Relation between the solubility and the effective solute-solute interaction for C60 solutions and lysozyme solutions : a comparison using the sticky hard sphere potential. *Journal of Crystal Growth* **183**: pp. 258-268.
- Guijt, R. M., Dodge, A., van Dedem, G. W. K., De Rooij, N. F. & Verpoorte, E. (2003): Chemical and physical processes for integrated temperature control in microfluidic devices. *Lab on a Chip* **3**: pp. 1-4.
- Günther, M., Köhler, J. M., Henkel, T. & Kielpinski, M. (2003): Characterization of residence time and residence time distribution in chip reactors with modular arrangements by integrated optical detection. Proc. of Process Miniaturization: IMRET 7, Lausanne, Matlosz, pp. 315-317.
- Güttich, R. (2002): Thermoelectric Radiation Sensors. Application Note, IPHT, Jena.
- Gwynne, P. & Heebner, G. (2002): Laboratory Technology Trends: Drug Discovery 5 - fast track to new drugs. *Science* **298**: pp. 1067-1081.
- Gwynne, P. & Heebner, G. (2002): Laboratory Technology Trends: Lab Automation and Robotics. *Science* **295**: pp. 525-533.
- Gwynne, P. & Heebner, G. (2003): Drug Discovery and Biotechnology Trends: Functional Genomics: bridging the knowledge gap. *Science* **300**: pp. 507-515.
- Gwynne, P. & Heebner, G. (2003): Drug Discovery and Biotechnology Trends: Lab Automation: bursting through the bottlenecks. *Science* **299**: pp. 583-591.
- Haas, C. & Drenth, J. (1998): The protein-water phase diagram and the growth of protein crystals from aqueous solution. *Journal of Physical Chemistry B* **102**: pp. 4226-4232.
- Haas, C. & Drenth, J. (1999): Understanding protein crystallization on the basis of the phase diagram. *Journal of Crystal Growth* **196**, 388-394.

- Hansen, C., Skordalakes, E., Berger, J. M. & Quake, S. R. (2002): A robust and scalable microfluidic metering method that allows protein crystal growth by free interface diffusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**: pp. 16531-16536.
- Heinrichs, W., Heinrichs, M. & Schönert, H. (1992): Growth of protein single crystals in a periodically changing solubility gradient: description of the method and first results. *Journal of Crystal Growth* **122**, 186-193.
- Heller, M. J. (2002): DNA microarray technology: Devices, Systems, and Applications. *Annual Review of Biomedical Engineering* **4**: pp. 129-153.
- Henze, G., Köhler, J. M. & Lay, J. P. (1999): Umweltdiagnostik mit Mikrosystemen - Übersicht Biochips. Weinheim, Wiley-VCH.
- Hessel, V. & Löwe, H. (2002): Mikroverfahrenstechnik: Komponenten - Anlagenkonzeption - Anwenderakzeptanz - Teil 1. *Chemie Ingenieur Technik* **74**: pp. 17-30.
- Hessel, V. & Löwe, H. (2002): Mikroverfahrenstechnik: Komponenten - Anlagenkonzeption - Anwenderakzeptanz - Teil 2. *Chemie Ingenieur Technik* **74**: pp. 185-207.
- Hessel, V. & Löwe, H. (2002): Mikroverfahrenstechnik: Komponenten - Anlagenkonzeption - Anwenderakzeptanz - Teil 3. *Chemie Ingenieur Technik* **74**: pp. 381-400.
- Hilgenfeld, R., Klupsch, T., Mühlig, P. & Mesters, J. R. (2001): Kristallwachstum Biologischer Makromoleküle. *Zeitschrift der Deutschen Gesellschaft für Kristallwachstum und Kristallzüchtung*: pp. 16 - 20.
- Inframetrics GmbH (2000): Inframetrics - Produktbeschreibung ThermoCam 280. Produktinformation.
- Iyer, G. H., Dasgupta, S. & Bell, J. A. (2000): Ionic strength and intermolecular contacts in protein crystals. *Journal of Crystal Growth* **217**, 429-440.
- Jakeway, S. C., de Mello, A. J. & Russell, E. (2000): Miniaturized total analysis systems for biological analysis. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **366**: pp. 525-539.
- Jandeleit, B., Schaefer, D. J., Powers, T. S. & Weinberg, W. H. (1999): Kombinatorische Materialforschung. *Angewandte Chemie* **111**: pp. 2649-2689.
- Jena BioCrystallogensis Center – JBCC (2001): gefördert durch das Thüringer Ministerium für Wissenschaft, Forschung und Kunst, FKZ: B 378-00024.
- Jensen, K. F. (2001): Microreactor Engineering - Is Small Better? - Übersicht - Review. *Chemical Engineering Science* **56**: pp. 293-303.
- Jeon, N. L., Finnie, K., Branshaw, K. & Nuzzo, R. G. (1997): Structure and Stability of patterned self-assembled films of octadecyltrichlorosilane formed by contact printing. *Langmuir* **13**: pp. 3382-3391.
- Jo, B.-H., van Lerberghe, L. M., Mortsegood, K. M. & Beebe, D. J. (2000): Three-dimensional micro-channel fabrication in Polydimethylsiloxane (PDMS) elastomer. *Journal of Micromechanical Systems* **9**: pp. 76-81.
- Jollès, P. & Berthou, J. (1972): High temperature crystallization of lysozyme: an example of phase transition. *FEBS letters* **23**, (1), 21-23.
- Jolly, C., Reetz, G., Béal, F., Baumgartner, W.-D., Salt, A. & Miller, J. (2003): Cochlear implant combined with short-term drug delivery. Proc. of Conference on Implantable Auditory Prostheses, Pacific Grove.
- Jones, A. G. & Mullin, J. W. (1974): Programmed cooling crystallization of potassium sulphate solutions. *Chemical Engineering Science* **29**, 105-117.
- Juárez-Martínez, G., Steinmann, P., Roszak, A. W., Isaacs, N. W. & Cooper, J. M. (2002): High-Throughput Screens for the Postgenomics: Studies of Protein Crystallization Using Microsystems Technology. *Analytical Chemistry* **74**, 3505-3510.
- Jury, A. Z. & Angelino, M. D. (2001): Microreactor. WO 01/68257 A1: 20.09.01.
- Karniadakis, G. E. & Beskok, A. (2002): Micro Flows: fundamentals and simulation. Springer-Verlag. New York/Berlin/ Heidelberg: pp. 21-37.
- Karniadakis, G. E. & Beskok, A. (2002): Micro Flows: fundamentals and simulation, Springer-Verlag, New York/Berlin/ Heidelberg.
- Kessler, E. & Baier, V. (2003): Emissionsverhalten von Wasser, Silizium und Glas. Seminar IPHT, Jena.
- Kessler, E. & Porwol, H. (2002): Mikroskopische Struktur von Pt- und Al-Dünnschichten. Seminar IPHT, Jena.
- Kessler, E. (2003) Emissionsverhalten von Wasser, Silizium und Glas. Seminar IPHT.
- Kielpinski, M. (2002): Quadratwiderstand von Pt-Dünnschichten. Seminar IPHT, Jena.

- Kitano, H. (2002): Systems Biology: A brief overview. *Science* **295**: pp. 1662-1664.
- Klocek, P. (1991): Handbook of infrared optical materials. New York, Marcel Dekker Inc.
- Klupsch, T. (2001): Abschätzungen zu physiko-chemischen Parametern in der Proteinkristallisation. Meeting, Jena.
- Klupsch, T. (2002): Physiko-chemische Aspekte des Kristallisation biologischer Makromoleküle. Vorlesung an der Universität Jena.
- Klupsch, T. (2003): Spezielle Lösungen von Energiebilanzgleichungen. Meeting, Jena.
- Klupsch, T., Mühlig, P. & Hilgenfeld, R. (2001): The JBCC Project. by IMB Jena, www.imb-jena.de.
- Knitter, R., Göhring, D., Risthaus, P. & Haußelt, J. (2001): Microfabrication of ceramic microreactors. *Microsystem Technologies* **7**: pp. 85-90.
- Koch, M., Evans, A. G. R. & Brunnschweiler, A. (2000): Microfluidic Technology and Applications. Baldock, Research Studies Press.
- Kodadek, T. (2001): Protein microarrays: prospects and problems. *Chemistry and Biology* **8**: pp. 105-115.
- Köhler, J. M. & Zieren, M. (1998): Chip reactor for micro fluid calorimetry. *Electrochimica Acta* **310**: pp. 25-35.
- Köhler, J. M. (1999): Etching in Microsystem Technology. Weinheim, Wiley-VCH.
- Köhler, J. M. (2002): Chemische und biologische Mikrolabortechnik. Proc. of Workshop, Ilmenau.
- Köhler, J. M., Mejevaia, T. & Saluz, H. P. (1999): Microsystem technology: a powerful tool for biomolecular studies. Basel, Birkhäuser Verlag.
- Kopp, M. U., Mello, A. J. d. & Manz, A. (1998): Chemical Amplification: continuous-flow PCR on a chip. *Science* **280**: pp. 1046-1048.
- Kuchling, H. (1991): Taschenbuch der Physik. Mittweida, Fachbuchverlag, Leipzig/ Köln.
- Kuchling, H. (1991): Wärmeübergangskoeffizienten - Tabelle 32. in Kuchling, H.: Taschenbuch der Physik. Fachbuchverlag, Leipzig/ Köln. Mittweida.
- Kumar, A., Abbott, N. L., Kim, Enoch, Biebuyck, H. A. & Whitesides, G. M. (1995): Patterned self-assembled monolayers and meso-scale phenomena. *Accounts of Chemical Research* **28**: pp. 219-226.
- Kundrot, C. E. & Richards, F. M. (1988): Effect of hydrostatic pressure on the solvent in crystals of hen egg-white lysozyme. *Journal of Molecular Biology* **200**: pp. 401-410.
- Kurinov, I. V. & Harrison, R. W. (1995): The influence of temperature on lysozyme crystals: structure, dynamics of protein and water. *Acta Crystallographica Section D* **D51**, 98-109.
- Lagally, E. T., Simpson, P. C. & Mathies, R. A. (2000): Monolithic integrated microfluidic DNA amplification and capillary electrophoresis analysis system. *Sensors and Actuators B - Chemical* **63**: pp. 138-146.
- Lerm, A. (2001): Elektronenstrahl-Lithographie - Seminar. IPHT-B3-Seminar, IPHT, Jena.
- Li, P. C. H. & Harrison, D. J. (1997): Transport, Manipulation, and Reaction of Biological Cells On-Chip Using Electrokinetic Effects 1997, 69, 1564-1568. *Analytical Chemistry* **69**: pp. 1564-1568.
- Lide, D. R., ed. (1998): Handbook of Chemistry & Physics. 78, London, CRC Press.
- Löbbecke, S. & Eyerer, P. (2003): Modular Microreaction Technology - Fraunhofer Alliance Modular Microreaction Systems. Pfinztal, FhG ICT: pp. 10.
- Long, M. M., Bishop, J. B., Nagabhushan, T. L., Reichert, P., Smith, G. D. & DeLucas, L. J. (1996): Protein crystal growth in microgravity review of large scale temperature induction method: bovine insulin, human insulin and human alpha interferon. *Journal of Crystal Growth* **168**, 233-243.
- Lorber, B. & Giegé, R. (1992): A versatile reactor for temperature controlled crystallization of biological macromolecules. *Journal of Crystal Growth* **122**, 168-175.
- Lorkowski, S., Lorkowski, G. & Cullen, P. (2000): Biochips - Das Labor in der Streichholzschachtel - Übersicht. *Chemie in unserer Zeit* **34**: pp. 356-372.
- Lötters, J. C., Olthuis, W., Veltink, P. H. & Bergveld, P. (1997): Polydimethylsiloxane, a photocurable rubberelastic polymer used as spring material in micromechanical sensors. *Microsystem Technologies*: pp. 64-67.
- Lottspeich, F. (1999): Proteomanalyse - ein Weg zur Funktionsanalyse von Proteinen - Übersicht. *Anal. Chem.* **111**: pp. 2631-2647.

- Luft, J. R. & DeTitta, G. T. (1997): Kinetic Aspects in macromolecular crystallization. *Methods in Enzymology* **276**, (1), 110-131.
- Madou, M. J. (1997): Fundamentals of Microfabrication. Boca Raton, CRC Press.
- Mala, G. M. (1999): Heat transfer and fluid flow in microchannels. Ann Harbor, UMI Dissertation Services.
- Malkin, A. J., Kuznetsov, Y. G. & McPherson, A. (1999): In situ atomic force microscopy studies of surface morphology, growth kinetics, defect structure and dissolution in macromolecular crystallization. *Journal of Crystal Growth* **196**: pp. 471-488.
- Manz, A. (1996): The secret behind electrophoresis microstructure design. 2nd International conference on Miniaturized total Analysis Systems, Proc. of  $\mu$ TAS95, Basel, pp. 28-30.
- Manz, A., Graber, N. & Widmer, H. M. (1990): Miniaturized total chemical-analysis systems: a novel concept for chemical sensing. *Sensors and Actuators B - Chemical*: pp. 244-248.
- Mao, H., Yang, T. & Cremer, P. S. (2002): A microfluidic device with a linear temperature gradient for parallel and combinatorial measurements. *Journal of American Chemical Society* **124**: pp. 4432-4435.
- Markowz, G. (2003): Neuer Schub für die Mikroreaktionstechnik. *elements Degussa ScienceNewsletter*: pp. 4-8.
- Martin, H. (1988): Dimensionslose Kenngrößen. in Schlünder, E.-U.: VDI-Wärmeatlas - Berechnungsblätter für den Wärmeübertrager. Düsseldorf, VDI-Verlag, pp. Bc1-Bc3.
- Matlosz, M. (2003): Microreaction technology and the quest for innovative sustainable development. Proc. of Process Miniaturization: IMRET 7, Lausanne.
- Matuschek, L. (1962): Einführung in die Ultraschalltechnik. Berlin, Verlag Technik.
- Maurer, J. & Lehrach, H. (2000): Klotzen statt Kleckern - Effektive Genomforschung braucht effiziente Förderung. *Spektrum der Wissenschaft*: pp. 98-99.
- May, M. & Heebner, G. (2002): Laboratory Technology Trends: Drug Discovery I. *Science* **295**: pp. 1345-1367.
- May, M. & Heebner, G. (2002): Laboratory Technology Trends: Functional Genomics. *Science* **298**: pp. 231-247.
- Mayer, G., Wohlfahrt, K., Schober, A. & Köhler, J. M. (1999): Nanotiterplates for screening and synthesis. in Köhler, J. M., Mejevaia, T. and Saluz, H. P.: BioMethods - Microsystem technology: a powerful tool for biomolecular studies. Birkhäuser Verlag. Basel: pp. 75-128.
- McElroy, H. E., Sisson, G. W., Schoettlin, W. E., Aust, R. M. & Villafranca, J. E. (1992): Studies on engineering crystallizability by mutatuin of surface residues of human thymidylate synthase. *Journal of Crystal Growth* **122**, 265-272.
- McPherson, A. (1999): Crystallization of biological Macromolecules. Cold Spring, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- McPherson, A. (2001): A comparison of salts for the crystallization of macromolecules. *Protein Science* **10**, 418-422.
- McPherson, A., Malkin, A. J. & Kuznetsov, Y. G. (1995): The Science of macromolecular crystallization. *Structure* **3**, 759-768.
- McPherson, A., Malkin, A. J. & Kuznetsov, Y. G. (2000): Atomic force microscopy in the study of macromolecular crystal growth. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **29**, 361-410.
- Meinhart, C. D., Wereley, S. T. & Santiago, J. G. (1999): PIV measurements of a microchannel flow. *Experiments in Fluids* **27**: pp. 414-419.
- Menz, W. & Mohr, J. (1997): Mikrosystemtechnik für Ingenieure. 2, Weinheim, VCH - Wiley.
- Mesch, F. & Trächtler (1995): Mess- und Regelungstechnik. Vorlesung: Karlsruhe (TH).
- Minster, O. (2003): The influence of the conditions on the growth of crystals: what we can learn from experimenting in space. in: *2nd French German Crystal Growth Meeting*. Nancy/ F, 135.
- Mokansky, A. (1997): Entwicklung und Herstellung eines miniaturisierten Durchflussreaktors für die Durchführung thermisch aktivierbarer biochemischer Reaktionen. Diplomarbeit an FSU.
- Moran, S. & Stewart, L. (2001): High-Throughput Crystallisation. *Drug Discovery World*: pp. 41-46.
- Mühlig, P., Klupsch, T. & Drenth, J. (2002): Kristallisation von HEWL: Experimentelle Bedingungen und Parameter. Bericht/ Meeting, Jena.

- Mühlig, P., Klupsch, T., Kaulmann, U. & Hilgenfeld, R. (2003): Noninvasive in situ observation of the crystallization kinetics of biological Macromolecules by confocal laser scanning microscopy. *Journal of Structural Biology* **142**: pp. 47-55.
- Mühlig, P., Klupsch, T., Schell, U. & Hilgenfeld, R. (2001): Observation of the early stage of insulin crystallization by confocal laser scanning microscopy. *Journal of Crystal Growth* **232**: pp. 93 - 101.
- Müller, A., Cominos, V., Drese, K., Hessel, V., Horn, B., Löwe, B., Ziogas, A., Jähnisch, K., Grosser, V., Hillmann, V., Jam, K. A., Rinke, G. and Bazzanella, A. (2003): Fluidic bus system for chemical micro process engineering. Proc. of AICHEM 2003, Frankfurt/M., DECHEMA.
- Müller, J., Dillner, U. & Güttich, R. (1998): Thermoelectric and bolometric infrared microsensors. in Baltes, H., Göpel, W. and Hesse, J.: Sensors Update Vol 3. Wiley-CH. Weinheim: pp. 3-28.
- Nanev, C. & Tsekova, D. (2000): Heterogeneous nucleation of hen egg-white lysozyme - molecular approach. *Crystal Research and Technology* **35**, (2), 189-195.
- Nature, N. (2000): News: Expensive space crystal programme has produced little of scientific value... *Nature* **404**: pp. 114.
- Nau, M. (2004): Metall-Widerstandsthermometer. in Bernhard, F.: Technische Temperaturmessung. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg: pp. 596-640.
- Northrup, M. A., Baba, Y., Beebe, D. J., van den Berg, A., Harrison, D. J., Jensen, K. F., Kitamori, T., Laurell, T., Ramsey, J. M., Shoji, S., Verpoorte, E. & Viovy, J.-L. (2003): 7th International Conference on Micro Total Analysis Systems. Proc. of  $\mu$ TAS2003, Squaw Valley, Transducers Research Foundation, pp. 300.
- Northrup, M. A., Ching, M. T., White, R. M. & Watson, R. T. (1993): DNA amplification with a microfabricated reaction chamber. Proc. of 7th International Conference on Solid-State Sensors and Actuators, Yokohama, pp. 924-926.
- Offenhäusser, A. & Knoll, W. (2000): Living cells as functional elements of a hybrid electronic/ bio-microsystem. *MST News*: pp. 26-28.
- Owens, D. R., Zinman, B. & Boll, G. B. (2001): Insulins today and beyond. *The Lancet* **358**, 739-746.
- Packer, A., Bonetta, L., Stebbins, M. & Gresham, D. (1999): The chipping forecast. *Nature Genetics Supplement* **21**: pp. 1-60.
- Pagel, L. (2001): Mikromechanische Systeme und Thermische Mikrosysteme. Weil der Stadt, Schlembach Fachverlag.
- Pattekar, A. V. & Kothare, M. V. (2003): Miniature Fuel Processors and Fuel Cells for Portable Power: Industry Trends and Potential Applications. Proc. of AIChE Annual Meeting 2003, San Francisco, AIChE, pp. Session 168.
- Pieper, G., Schmelz, M., Wurziger, H. & Schwesinger, N. (2001): Mikrokomponente. DE 101,46,545 A1: 21.09.01.
- Pinget, M., Jeandidier, N., Ortega, F., Wix, D. & Martegaux, J. (1995): Multicentre trial of a programmable implantable insulin pump in type 1 diabetes. *The International Journal of Artificial Organs* **18**: pp. 322-325.
- Platzer, B., Steffani, K. & Große, S. (1999): Möglichkeiten zur Vorausberechnung von Verweilzeitverteilungen. *Chemie Ingenieur Technik* **71**: pp. 795-807.
- Pletser, V., Minster, O., Bosch, R., Potthast, L. & Stapelmann, J. (2001): The protein diagnostics facility: status of the ESA programme on the fundamentals of protein crystal growth. *Journal of Crystal Growth* **232**, 439-449.
- Poser, S., Schulz, T., Dillner, U., Baier, V., Köhler, J. M., Mayer, G., Siebert, A. & Schimkat, D. (1997): Temperature controlled chip reactor for rapid PCR. Proc. of *Process Miniaturization: IMRET 1*, Frankfurt/M., Springer, pp. 294-301.
- Pusey, M., Witherow, W. & Naumann, R. (1988): Preliminary investigations into solutal flow about growing tetragonal lysozyme crystals. *Journal of Crystal Growth* **90**, 105-111.
- Quake, S. R. & Scherer, A. (2000): From Micro- to Nanofabrication with Soft Materials - Übersicht. *Science* **290**: pp. 1536-1540.
- Raffel, M., Willert, C. E. & Kompenhans, J. (1998): Particle image velocimetry : a practical guide. Berlin, Springer.

- Reichert, J. (2003): Herstellung Charakterisierung lateral mikrostrukturierter monofilme auf Silizium- und Glas-Chipoberflächen für die Anwendung in Bio-Chips. Universität Jena, Jena.
- Renken, A. (2003): Micro-structured reactors: novel approaches for chemical reaction engineering. Proc. of AIChE 2003, Frankfurt/M., DECHEMA.
- Renken, A., Baselt, J. P. & Matlosz, M. (2003): 7th International Conference on Microreaction Technology. Proc. of IMRET 7, Lausanne.
- Rheinländer, J., Kast, W. & Klan, H. (1988): Wärmeübergang bei freier einphasiger Strömung. in Schlünder, E.-U.: VDI-Wärmeatlas - Berechnungsblätter für den Wärmeübertrager. Düsseldorf, VDI-Verlag, pp. Fa-Fc.
- Ries-Kautt, M. M. & Ducruix, A. (1997): Inferences drawn physico-chemical studies of crystallogenes and precrystalline state. *Methods in Enzymology* **276**, (1), 23-59.
- Ritzhaupt-Kleissl, H.-J., Bauer, W., Knitter, R. & Haußelt, J. (1996): Keramik erobert die Mikrostrukturen. *Schweizerische Technische Rundschau* **9**: pp. 38-41.
- Rosenberger, F. (1996): Protein Crystallization. *Journal of Crystal Growth* **166**: pp. 40-54.
- Rosenberger, F., Vekilov, P. G., Muschol, M. & Thomas, B. R. (1996): Nucleation and Crystallization of globular Proteins - What we know and what is missing - Review. *Journal of Crystal Growth* **168**: pp. 1-27.
- Roth, C. M., Neal, B. L. & Lenhoff, A. M. (1996): Van der Waals interactions involving proteins. *Biophysical Journal* **70**: pp. 977-987.
- Rupp, B., Segelke, B. W., Krupka, H. I., Lekin, T., Schafer, J., Beerink, P., Lao, V., Zemica, A. & Toppani, D. (2002): The TB structural genomics consortium crystallization facility: towards automation from protein to electron density. Proc. of ICCBM9, Jena.
- Ruppert, S., Sandler, S. I. & Lenhoff, A. M. (2001): Correlation between the osmotic second virial coefficient and the solubility of proteins. *Biotechnol. Prog.* **17**: pp. 182-187.
- Sanjoh, A. & Tsukihara, T. (1999): Spatiotemporal protein crystal growth studies using microfluidic silicon devices. *J. Cryst. Growth* **196**: pp. 691-702.
- Sanjoh, A. (2001): Apparatus for growing crystals. US 6,258,331 B1: 07.10.01.
- Sanjoh, A., Tsukihara, T. & Sridhar, G. (2001): Surface-potential controlled Si-microarray devices for heterogeneous protein crystallization screening. *Journal of Crystal Growth* **232**, 618-628.
- Santiago, J. G., Wereley, S. T., Meinhart, C. D., Beebe, D. J. & Adrian, R. J. (1998): A particle image velocimetry system for microfluidics. *Experiments in Fluids* **25**: pp. 316-319.
- Schall, C. A., Riley, J. S., Li, E., Arnold, E. & Wiencek, J. M. (1996): Application of temperature control strategies to the growth of hen egg-white lysozyme crystals. *Journal of Crystal Growth* **165**: pp. 299-307.
- Schena, M., Ed. (1999): DNA Microarrays: a practical approach. Oxford, Oxford University Press.
- Schlünder, E.-U. & Martin, H. (1995): Einführung in die Wärmeübertragung. Karlsruhe, Vieweg.
- Schlünder, E.-U. (Hrsg.) (1988): VDI-Wärmeatlas - Berechnungsblätter für den Wärmeübertrager. Düsseldorf, VDI-Verlag.
- Schneegaß, I. & Köhler, J. M. (2001): Flow-through polymerase chain reactors in chip thermocyclers. *Reviews in Molecular Biotechnology* **82**: pp. 101-121.
- Schneider, K. (2003): Optische und thermische Eigenschaften von Borosilikatglas D 263 T. Meeting, Dateien, Schott Glaswerke GmbH, Werke Jena und Grünenplan, Jena & Mainz.
- Scholz, H. (1967): Crystal growth by temperature-alternating methods. *Philips Technical Reviews* **28**, 316-319.
- Schramm, H. & Berg, M. (2003): Aufbau- und Verbindungstechnik am Fluss-Mikroreaktor und Aufbau eines Messplatzes zur Strömungsmessung. Praktikumsarbeit, IPHT, Jena.
- Schubert, K., Brandner, J., Fichtner, M., Linder, G., Schygulla, U. & Wenka, A. (2001): Microstructure devices for applications in thermal and chemical process engineering. *Thermophysical Engineering* **5**: pp. 17-39.
- Schüle, A. (2002): Modulares mobiles Diagnostikgerät auf der Basis miniaturisierter Funktionsbausteine - Physio-Check. Proc. of Statusseminar Modulare Mikroverfahrenstechnik, Frankfurt/Main, pp. 16.
- Seiler, C. & Berg, M. (2003): Technologische Realisierung von Komponenten zur Charakterisierung des Fluss-Mikroreaktors. Praktikumsarbeit, IPHT, Jena.
- Simon, G. & Mende, D. (1977): Physik - Gleichungen und Tabellen. München, Wilhelm Heine Verlag.

- Sommerfeld, A. (1954): Randwertaufgaben in der Wärmeleitung. in: Partielle Differentialgleichungen in der Physik. Akademische Verlagsgesellschaft. Leipzig: pp. 63-85.
- Sommerfeld, A. (1970): Die Prandtlsche Grenzschicht. in Sommerfeld, A.: Mechanik der deformierbaren Medien. Akademische Verlagsgesellschaft. Leipzig: pp. 217-229.
- Arkles, B. (1977): Tailoring surfaces with silanes. *Chemtech* **7**, 766-778.
- Srinivasan, R., Hsing, I. M., Berger, P. E., Jensen, K. F., Firebaugh, S. L., Schmidt, M. A., Harold, M. P., Lerou, J. J. & Ryley, J. F. (1997): Micromachined reactors for catalytic partial oxidation reactions. *American Institute of Chemical Engineering Journal* **43**, 3059-3069.
- Stadtmüller, S. P. & Oestreich, S. (2001): Goldschmidt - Radiaton Curable Silicone Acrylates - Synthesis and Application. Produktinformation, Goldschmidt AG, Essen.
- Stankiewicz, A. & Moulijn, A. (2000): Process intensification: transforming chemical engineering. *Chemical Engineering Progress* **96**: pp. 22-34.
- Steinrauf, L. K. (1959): Preliminary X-ray data for some new crystalline forms of beta-lactoglobulin and hen egg-white lysozyme. *Acta Crystallographica Section D* **12**, 77-79.
- Strydom, N. C. J. & James, M. N. G. (1996): Lysozyme: a model enzyme in protein crystallography, in *Lysozymes: Model Enzymes in Biochemistry and Biology*, P. Jollès, Editor. 1996, Birkhäuser: Basel. p. 185-222.
- SurA Instruments (2002): SurA-Instruments - Pyrosil. Produktinformation.
- Suzuki, Y., Sasaki, G., Miyashita, S., Sawade, T., Tamura, K. & Komatsu, H. (2002): Protein crystallization under high pressure. *Biochimica et Biophysica Acta* **1595**: pp. 345-356.
- Tegeler, E. (2004): Kalibrierung von Berührungsthermometern. in Bernhard, F.: Technische Temperaturmessung. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg: pp. 423-540.
- Terry, S. C., Jerman, J. H. & Angell, J. B. (1979): A Gas Chromatographic Air Analyzer Fabricated on a Silicon Wafer. *IEEE Trans. Electron Devices*: pp. 1880-1886.
- Teunissen, R. & Oberscheidt, H. (2003): Mikrostrukturtechnik - Ein Milliardenmarkt entsteht weltweit. by technotrans AG, <http://www.technotrans.de/products/index.html>.
- Tietze, U. & Schenk, C. (1993): Elektronische Regler. in *Halbleiter-Schaltungstechnik* **1**, 940 - 951.
- Tsekova, D., Dimitrova, S. & Nanev, C. (1999): Heterogeneous nucleation (and adhesion) of lysozyme crystals. *Journal of Crystal Growth* **196**, 226-233.
- Tuchscherer, J. (1997): Entwicklung und Aufbau eines kompakten Labormessplatzes für biologische Reaktionen im Mikromaßstab. Diplomarbeit an FSU, Jena.
- van den Berg, A., Olthuis, W. & Bergveld, P. (2000): Micro total analysis systems. Dordrecht, Kluwer Academic.
- van der Pauw, L. J. (1958): A Method of Measuring Specific Resistivity and Hall Effect of Discs of Arbitrary Shape. *Phil. Res. Rep.* **13**: pp. 1-9.
- van Herwaarden, A. W., Sarro, P. M., Gardner, J. W. & Bataillard, P. (1994): Gas micro-calorimeter for (bio)chemical measurements. *Sensors and Actuators A - Physical* **43**: pp. 24-30.
- Vekilov, P. G. & Alexander, J. I. D. (2000): Dynamics of layer growth in protein crystallization. *Chemical Reviews* **100**: pp. 2061-2089.
- Vekilov, P. G. & Rosenberger, F. (1998): Increased stability in crystal growth kinetics in response to bulk transport enhancement. *Physical Review Letters* **80**: pp. 2654-2656.
- Vekilov, P. G. & Rosenberger, F. (1998): Protein crystal growth under forced solution flow: experimental setup and general response of lysozyme. *Journal of Crystal Growth* **186**: pp. 251-261.
- Vekilov, P. G., Monaco, L. A. & Rosenberger, F. (1995): High resolution interferometric technique for in-situ studies of crystal growth morphologies and kinetics. *Journal of Crystal Growth* **148**, 289-296.
- Vekilov, P. G., Thomas, B. R. & Rosenberger, F. (1998): Effects of convective solute and impurity transport in protein crystal growth. *Journal of Physical Chemistry B* **102**: pp. 5208-5216.
- Wagner, J., Kirner, T., Mayer, G., Albert, J. & Köhler, J. M. (in press): Generation of metal nanoparticles in a microchannel reactor. *Chemical Engineering Journal*.
- Wegeng, R. S., Call, C. J. & Drost, M. K. (1996): Chemical Systems Miniaturization. Proc. of 1996 Spring National Meeting AIChE, New Orleans, AIChE, pp. 1-13.



- Weigl, B. H. & Sygusch, J. (2001): Protein Crystallization in microfluidic structures. WO 01/75415 A2: 11.10.01.
- Wenzel, D. & Berg, M. (2003): Entwicklung einer Kapillarheizung für einen Mikroreaktor zur Proteinkristallisation. Praktikumsarbeit, IPHT, Jena.
- Werner, M., Heyn, S.-P. & Köhler, T. (2000): Microsystems in Health Care Markets: recent Achievements and future trends. *MST News*: pp. 4-7.
- Wienczek, J. M. (1999): New strategies for protein crystal growth. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **01**: pp. 505-534.
- Wilding, P., Shoffner, M. A. & Kricka, L. J. (1994): PCR in a silicon microstructure. *Clinical Chemistry* **40**: pp. 1815-1818.
- Wochner, M. & Dingeldein, S. (2002): Mikroreaktoren - kleine Ergänzung für große Kessel. *clartext Clariant Newsletter*: pp. 8-12.
- Wojas, P. (2001): Micropumps - summarizing the first two decades. *Proc. SPIE* **4560**: pp. 39-52.
- Xia, Y. & Whitesides, G. M. (1998): Soft Lithography. *Angew. Chem. Int. Ed. engl.* **37**: pp. 550-575.
- Zeisel, H. & Baselt, J. P. (2002): Modulare Mikroverfahrenstechnik. Statusseminar, Frankfurt/ Main.
- Zengerle, R. (2002): Systemtechnik & Märkte de Mikrosystemtechnik. Vorlesung an der Universität Freiburg/B.
- Zierep, J. (1993): Grundzüge der Strömungslehre. 5, Karlsruhe, Springer, Berlin.
- Zimmer, K. (2003): Arbeitsgemeinschaft Match-X im VDMA. Frankfurt/ M., VDMA: pp. 10.
- Zlokarnik, M. (2000): Scale-up: Modellübertragung in der Verfahrenstechnik. Weinheim, Wiley-VCH.
- Zlokarnik, M. (2003): Scale-up und Miniplants. *Chemie Ingenieur Technik* **75**: pp. 370-375.

## 6 Verzeichnisse

### 6.1 Abbildungen

|                 |  |    |
|-----------------|--|----|
| <u>Abb. 1:</u>  | Die Mikroreaktionstechnik in Chemie und Biowissenschaft – Querschnittsdisziplin im Kontext der aktuellen Forschungsschwerpunkte des BMBF bzw. EU zur Entwicklung innovativer Produkte und Verfahren im Sinne einer Nachhaltigen Entwicklung .....  | 1  |
| <u>Abb. 2:</u>  | Das Jena BioCrystallogeneses Center (JBCC) auf dem Beutenberg Campus Jena .....  | 6  |
| <u>Abb. 3:</u>  | Skizze des Prozessablaufs im JBCC zur Erlangung der 3D-Proteinstruktur: A) Proteinkristall → B) <i>in situ</i> CLSM-Analyse → C) Phasendiagrammpunkte → iteratives Feed-back der Information zur Optimierung des Kristalls ... → D) Röntgenstrukturanalyse → E) 3D-Struktur des Proteins ..... | 7  |
| <u>Abb. 4:</u>  | Schematische Darstellung von Reaktionspfaden in einem Phasendiagramm bei der Proteinkristallisation (lückenlose Mischkristallbildung): 1) Variation der Zusammensetzung – 2) Variation der Temperatur .....  | 8  |
| <u>Abb. 5:</u>  | Größenverhältnisse kleiner Dimensionen nach GAD-EL-HAK .....   | 11 |
| <u>Abb. 6:</u>  | Begriffsbildung mikrostrukturierter Reaktoren und Systeme: Orientierung am Applikationsfeld .....  | 12 |
| <u>Abb. 7:</u>  | PCR-Chip nach POSER <i>et al.</i> .....  | 27 |
| <u>Abb. 8a:</u> | Schematische Darstellung des Batch-Mikroreaktors: 1) Prinzipskizze; 2) Explosionsdarstellung .....   | 31 |
| <u>Abb. 8b:</u> | Schematische Darstellung des Fluss-Mikroreaktors – analog zu 8a mit Erweiterung: 1) Prinzipskizze; 2) Explosionsdarstellung .....  | 31 |
| <u>Abb. 9:</u>  | verrundete 2-stufige Bifurkation; hier: Verteiler .....  | 32 |
| <u>Abb. 10:</u> | Schematischer Prozessablauf Präparation der Chipreaktoren (hier: Batch-Mikroreaktor – Fluss-Mikroreaktor prinzipiell analog) .....   | 34 |
| <u>Abb. 11:</u> | Anordnung eines Pt-Dünnschicht-Widerstandsheizers und -sensoren unter dem Fluidkanal des Fluss-Mikroreaktors (Explosionsdarstellung) .....   | 38 |
| <u>Abb. 12:</u> | Anisotropes Nassätzen von <100>-Si-Wafern zur Präparation trapezförmiger Gruben oder V-förmiger Gräben durch Ätzen bis zum geometrischen Ätzstopp (<111>-Ebene) .....  | 39 |
| <u>Abb. 13:</u> | Isotropes Nassätzen von <100>-Si-Wafern zur Präparation runder Strukturen .....  | 39 |
| <u>Abb. 14:</u> | Fluidische Anschlusstechnik (Explosionszeichnung) .....  | 40 |
| <u>Abb. 15:</u> | Ausschnitt Fluss-Mikroreaktor (Chipreaktor): Ultraschallbohrung Durchgangsloch ( $\varnothing = 400 \mu\text{m}$ ) (REM-Aufnahme) .....  | 41 |
| <u>Abb. 16:</u> | Kontaktierung der Elektroden des Fluss-Mikroreaktors .....   | 42 |
| <u>Abb. 17:</u> | R-T-Kennlinien von Pt-Dünnschicht-Widerstandsthermometer (Sensoren) .....  | 44 |
| <u>Abb. 18:</u> | REM-Aufnahmen: Pt-PVD-Beschichtung (120 nm) vor (A) und nach (B) dem Tempern über 24 h bei 200°C .....   | 45 |
| <u>Abb. 19:</u> | Durchfluss-Wärmetauscher zur Kühlung des PELTIER-Elements (Skizze) .....   | 47 |
| <u>Abb. 20:</u> | Aufbau der Kapillarheizung (Skizze) .....  | 48 |
| <u>Abb. 21:</u> | Blockschaltbilder der Temperaturregelung: A) Regelkreis; B) schematische Gesamtansicht .....   | 49 |
| <u>Abb. 22:</u> | Schematische Darstellung Benetzungsverhalten wässriger Lösungen gegenüber A) hydrophilen und B) hydrophoben Oberflächen .....  | 50 |
| <u>Abb. 23:</u> | Öl auf Oberfläche des Chipreaktors zur Deckelung Batch-Mikroreaktor .....  | 52 |
| <u>Abb. 24:</u> | Deckelung des Fluss-Mikroreaktors mit PDMS-Membran (Explosionsdarstellung) .....   | 52 |
| <u>Abb. 25:</u> | Schematischer Prozessablauf zur Präparation strukturierter PDMS-Glasdeckel (Fluss-Mikroreaktor) .....  | 53 |
| <u>Abb. 26:</u> | Schematische Darstellung des analytischen 1D-Modells zur Ermittlung des vertikalen Temperaturprofils in den Chipreaktoren → Heizmodus .....  | 56 |
| <u>Abb. 27:</u> | Schematische Darstellung eines FEM-Elements SOLID 70 .....   | 58 |
| <u>Abb. 28:</u> | Schnitt durch das vernetzte 3D-Modell (1/2 des Chipreaktors) zur Berechnung der Temperaturfelder im Batch-Mikroreaktor mittels FEM (Ansys™ 6.0) .....  | 59 |
| <u>Abb. 29:</u> | Schnitt durch das vernetzte 3D-Modell (1/4 des Chipreaktors) zur Berechnung der Temperaturfelder mittels CFD (Mark™, Mentat™): A) Gesamtmodell mit Luftumgebung – B) Detail: Chipreaktor ohne Luftumgebung .....   | 60 |

|                 |  |    |
|-----------------|--|----|
| <u>Abb. 30:</u> | Bestimmung der lateralen und vertikalen Temperaturdifferenzen $\Delta T_{\text{lat}}$ und $\Delta T_{\text{vert}}$ in der Reaktionskammer lateral $\Delta T_{\text{lat}}$ und vertikal $\Delta T_{\text{vert}}$ .....  | 61 |
| <u>Abb. 31:</u> | Beispielhafte Darstellung der Bestimmung der dynamischen Parameter .....   | 62 |
| <u>Abb. 32:</u> | Qualitative (A) bzw. semi-quantitative (B) Analyse der Temperaturfelder im Fluid auf dem Chipreaktor (Fluss-Mikroreaktor) mittels Wärmebildern und Liniengraphen .....   | 64 |
| <u>Abb. 33:</u> | Oberflächengestalt bei hydrophilem (A) und hydrophobem (B) Fluidkanal .....  | 67 |
| <u>Abb. 34:</u> | HAGEN-POISEUILLE-Strömung in z-Richtung .....  | 68 |
| <u>Abb. 35:</u> | Analytische Modelle zur Beschreibung des Geschwindigkeitsprofils in der Reaktionskammer des Fluss-Mikroreaktors in y-Richtung: A) HAGEN-POISEUILLE-Profil – B) konstantes Profil – C) HAGEN-POISEUILLE, modifiziert .....  | 69 |
| <u>Abb. 36:</u> | Schema der Konzentrationsverteilung aufgrund der radialen und axialen Konzentrationsgradienten bei laminarem Strömungsprofil in einem engen Rohrreaktor als Folge eines Farbstoffimpulses: A) $t = 0$ : Zugabe des Farbstoffimpulses ohne Strömung– B) $t > 0$ : stationäres ungestörtes laminares Strömungsprofil .....                         | 71 |
| <u>Abb. 37:</u> | Darstellung des vernetzten 3D-Modells (Reaktionskammer und Mikrofluidkanäle/ fluidische Bifurkationen) zur Berechnung der Strömungsfelder mittels CFD –Simulation .....  | 72 |
| <u>Abb. 38:</u> | Prinzipieller Aufbau zur Messung des Druckverlustes .....  | 73 |
| <u>Abb. 39:</u> | Experimenteller Aufbau $\mu$ -PIV-Messungen .....  | 75 |
| <u>Abb. 40:</u> | $\mu$ -PIV-Messungen: Platzierung der Messsegmente (Illuminationsvolumina) in der Reaktionskammer .....  | 75 |
| <u>Abb. 41:</u> | Typische CCD-Aufnahmen als Ausgangsbilder zur <i>qualitativen</i> (A) und <i>quantitativen</i> (B) $\mu$ -PIV-Analyse der Strömung in der Reaktionskammer A) am Übergang fluidische Verteilerstruktur $\rightarrow$ Reaktionskammer (5-fache Vergrößerung) B) im Innern der Reaktionskammer (20-fache Vergrößerung) .....                        | 76 |
| <u>Abb. 42:</u> | Übergang von der fluidischen Verteilerstruktur in die Reaktionskammer bei verschiedenen Vergrößerungen (CCD-Aufnahmen mit Fluoreszenz-Mikroskop): A) 5-fach $\rightarrow$ B) 10-fach $\rightarrow$ C) 20-fach .....  | 76 |
| <u>Abb. 43:</u> | Auswertungsalgorithmus (Schema) der $\mu$ -PIV-Messungen zur Analyse der Geschwindigkeitsfelder .....  | 77 |
| <u>Abb. 44:</u> | Lage der Schnittebenen zur Analyse der Geschwindigkeitsprofile in der Reaktionskammer .....  | 77 |
| <u>Abb. 45:</u> | Schematischer Aufbau zur Messung des Verweilzeitverhaltens des Fluss-Mikroreaktors ..  | 78 |
| <u>Abb. 46:</u> | Tertiärstruktur des Modellproteins recombinant Green Fluorescent Protein (r-GFP) .....   | 80 |
| <u>Abb. 47:</u> | Tertiärstruktur Modellprotein „Hen Egg-White Lysozyme“ .....   | 81 |
| <u>Abb. 48:</u> | Tertiärstruktur Modellprotein „human Insulin“ .....  | 82 |
| <u>Abb. 49:</u> | Illustration zur Ermittlung von Beugungsdiagrammen (B) durch Röntgenstrukturanalyse von Proteinkristallen (A): Bsp.: HEWL tetragonale NaCl-Form kristallisiert nach EOR .....  | 83 |
| <u>Abb. 50:</u> | <i>In situ</i> -Analyse der Kristallgröße bei Zeiten $t_i$ zur Ermittlung der Wachstumsrate .....  | 84 |
| <u>Abb. 51:</u> | Design Chipreaktor des Batch-Mikroreaktors .....   | 86 |
| <u>Abb. 52:</u> | Realisierung Chipreaktor des Batch-Mikroreaktors: A) Fluidseite; B) Sensorseite .....  | 87 |
| <u>Abb. 53:</u> | Deckelung des Batch-Mikroreaktors: A) Reaktionskammer mit Lösung gefüllt; B) mit Parafin-Öl versehen; C) mit Glasdeckel und Ölfilm abgedichteter Mikroreaktor .....  | 88 |
| <u>Abb. 54:</u> | Realisierung Batch-Mikroreaktor: A) Detailansicht Mikroreaktor; B) Gesamtansicht .....   | 89 |
| <u>Abb. 55:</u> | Genauigkeit und Langzeitstabilität der Temperierung des Batch-Mikroreaktors, hier: 1-Kreis-(PELTIER-Element) embedded PC-Regelung $\vartheta = 19^\circ\text{C} - 22^\circ\text{C}$ (A) Gesamtansicht – B) Detail I: Zyklen – C) Detail II: Toleranzintervall (gestrichelte Linien) .....  | 90 |
| <u>Abb. 56:</u> | A) Qualitative Übereinstimmung der 3D-FEM-Simulationen (1) mit den Messungen mithilfe der Wärmebild-Kamera (2): Einfluss der Geometrie des PELTIER-Elementes B) Schnitt durch FEM-Modell in Mitte der Reaktionskammer ( $y = 2 \text{ mm}$ ) Batch-Mikroreaktor temperiert mit Solltemperatur $\vartheta_{\text{soil}} = 18^\circ\text{C}$ ..... | 91 |
| <u>Abb. 57:</u> | Laterale Temperaturdifferenz $\Delta T_{\text{lat}}$ des Batch-Mikroreaktors in der Reaktionskammer (Mitte – Rand) in x- und y-Richtung als Funktion der Temperaturdifferenz zur Umgebung $\Delta T_U$ und des PELTIER-Elements: Vergleich Messwerte Wärmebild-Kamera mit den CFD-Simulationen .....   | 92 |
| <u>Abb. 58:</u> | Vertikale Temperaturdifferenz $\Delta T_{\text{vert}}$ in der Reaktionskammer des Batch-Mikroreaktors (Boden – Deckel) als Funktion der Temperaturdifferenz zur Umgebung $\Delta T_U$ – Vergleich Messwerte Wärmebild-Kamera mit den FEM-Simulationen .....  | 93 |

|                 |  |     |
|-----------------|--|-----|
| <u>Abb. 59:</u> | Reinigung des mit r-GFP kontaminierten Batch-Mikroreaktors: O) Messbereich in Reaktionskammer; A) vor Kontamination; B) Kontamination mit r-GFP; C) nach Regeneration mit optimiertem Reinigungsprotokoll Detailvergrößerungen: Laserspannung $U = 1 \text{ kV}$ .....   | 96  |
| <u>Abb. 60:</u> | Güte der Ätztechnologie Präparation des Chipreaktors im Bereich der Bifurkationen (Fluss-Mikroreaktor) .....   | 97  |
| <u>Abb. 61:</u> | CFD-Simulation des Strömungsprofil in der Reaktionskammer des Fluss-Mikroreaktors bei verschiedenen fluidischen Verteilerstruktur (Bifurkation) A) ursprüngliches Design „JBCC 1.1“ – B) optimiertes Design „JBCC 1.2“ 0) Gesamtansicht $u_{\text{max}} \approx 250 \text{ } \mu\text{m/s}$ – 1) Detail $u_{\text{max}} \approx 250 \text{ } \mu\text{m/s}$ : y-z-Schnitt bei x1 und x2 2) Detail $u_{\text{max}} \approx 25 \text{ mm/s}$ : y-z-Schnitt bei x1 Farbkodierung „gelb → rot → blau“ – Geschwindigkeit „schnell → mittel → langsam“ ..... | 98  |
| <u>Abb. 62:</u> | Design Chipreaktor des Fluss-Mikroreaktors: optimiertes Design der Bifurkations- und Transducerstrukturen, JBCC 1.2 A) Explosionsdarstellung Siliziumstruktur und Dünnschichttransducer B) Detail fluidische Bifurkation .....   | 99  |
| <u>Abb. 63:</u> | Realisierung Chipreaktor des Fluss-Mikroreaktors: A) Fluidseite; B) Transducerseite (optimiertes Design „JBCC 1.2“) .....  | 99  |
| <u>Abb. 64:</u> | Komponenten der Temperierung des Fluss-Mikroreaktors als Gesamtsystem: A) Temperaturregelung Chipreaktor – B) Kompaktofen – C) Kapillarheizung .....   | 100 |
| <u>Abb. 65:</u> | Strukturierter PDMS-Glasdeckel auf Fluss-Mikroreaktor .....  | 102 |
| <u>Abb. 66:</u> | Verschaltung des Mehrwege-Ventils zur Erzeugung eines Vorwärtslaufs durch die Reaktionskammer bei Pumprichtung „vorwärts“ (A) und „rückwärts“ (B) .....  | 103 |
| <u>Abb. 67:</u> | Schematische Darstellung Effekt der Oberflächenmodifikation – gleichmäßiges blasenfreies Befüllen beim Übertritt ... A) ... Fluidkanal → Reaktionskammer – B) in der Reaktionskammer C) ... Reaktionskammer → Fluidkanal .....   | 104 |
| <u>Abb. 68:</u> | Foto Fluidfront in der Reaktionskammer .....   | 105 |
| <u>Abb. 69:</u> | Foto der Blasenfalle – Detail einer sich bildenden Gasblase .....  | 106 |
| <u>Abb. 70:</u> | Realisierung Fluss-Mikroreaktor: A) Detailansicht Mikroreaktor; B) fluidische Komponenten im geöffneten Temperierofen – (Gesamtansicht s. Abb. 64) .....   | 106 |
| <u>Abb. 71:</u> | Druckverlust über Gesamtsystem Fluss-Mikroreaktor: Messung mit Wasser bei 5 Flussraten – Analytische Lösung nach HAGEN-POISEUILLE .....  | 107 |
| <u>Abb. 72:</u> | Druckverlust über Chipreaktor: Messung beim Befüllen des Fluss-Mikroreaktors mit Wasser – analytische Lösung nach LAPLACE .....  | 108 |
| <u>Abb. 73:</u> | CFD-Simulation – 3D-Schnittgrafiken (1/4-Ausschnitt der Reaktionskammer) bei 3 verschiedenen Volumenströmen zur qualitativen Analyse der Geschwindigkeitsverteilung in der Reaktionskammer: Detailanalyse des Einströmbereichs x-z-Schnitt in Kanalmitte schnelle Beruhigung der Instationaritäten der Strömung nach Eintritt in Reaktionskammer .....   | 110 |
| <u>Abb. 74:</u> | CFD-Simulation – Geschwindigkeitsprofil quer zur Strömungsrichtung (y-z-Schnitt) bei $z = -0,22 \text{ mm}$ und verschiedenen x-Positionen und $Q = 27,6 \text{ } \mu\text{m/min}$ : $u(y)$ .....  | 110 |
| <u>Abb. 75:</u> | Vergleich $\mu$ -PIV-Experiment – CFD-Simulation: Maximale Flussgeschwindigkeit im Zentrum der Reaktionskammer als Funktion des vorgegebenen Volumenstroms (Sollwert) .....  | 111 |
| <u>Abb. 76:</u> | Vergleich Strömungsprofil quer zur Hauptströmungsrichtung (y-z-Schnitt) im Zentrum der Reaktionskammer ( $x = 3,5 \text{ mm}$ , $y = 2 \text{ mm}$ ) verschiedene Flussraten: $u(z)$ $\mu$ -PIV-Experiment und analytisches Modell nach HAGEN-POISEUILLE, modifiziert CFD-Simulation und analytisches Modell nach HAGEN-POISEUILLE, modifiziert .....  | 112 |
| <u>Abb. 77:</u> | Vergleich 3 analytischer Modelle $u(y)$ mit experimentell ( $\mu$ -PIV) bestimmten Strömungsprofilen quer zur Hauptströmungsrichtung (y-z-Schnitt) im Zentrum der Reaktionskammer ( $x = 3,5 \text{ mm}$ , $z = -0,22 \text{ mm}$ ) für $Q = 27,6 \text{ } \mu\text{l/min}$ .....  | 113 |
| <u>Abb. 78:</u> | Vergleich Strömungsprofil quer zur Hauptströmungsrichtung (y-z-Schnitt) im Zentrum der Reaktionskammer ( $x = 3,5 \text{ mm}$ , $z = -0,22 \text{ mm}$ ) verschiedene Flussraten: $u(y)$ $\mu$ -PIV-Experiment und analytisches Modell nach HAGEN-POISEUILLE, modifiziert CFD-Simulation und analytisches Modell nach HAGEN-POISEUILLE, modifiziert .....  | 113 |
| <u>Abb. 79:</u> | Vergleich des errechneten Volumenstroms im Fluss-Mikroreaktor als Funktion des vorgegebenen Volumenstroms (Sollwert): $\mu$ -PIV-Experiment – CFD-Simulation – analytische Lösungen .....  | 114 |

|                 |  |     |
|-----------------|--|-----|
| <u>Abb. 80:</u> | CFD-Simulation – qualitative Analyse Einfluss des Kristallwachstums von $l = 20 \dots 100 \mu\text{m}$ auf das Strömungsfeld bei $Q = 60 \mu\text{l}/\text{min}$ : 2D-Schnitte der x-y-Ebene durch Reaktionskammer auf Höhe der Kristallmitte A) Übersicht der halben Reaktionskammer – B) Detail um Kristall (Achtung: unterschiedliche Farbskalen!) .....  | 117 |
| <u>Abb. 81:</u> | Qualitative Untersuchung des Verweilzeitverhaltens: Ausgangssignal $y(t)$ gegenüber Eingangssignal $x(t)$ unter Anwendung des Dispersionsmodells – Lösungsmittel Wasser..  | 118 |
| <u>Abb. 82:</u> | Qualitative Untersuchung des Verweilzeitverhaltens: Ausgangssignal $y(t)$ gegenüber Eingangssignal $x(t)$ unter Anwendung des Dispersionsmodells – Lösungsmittel Glycerin, 20% Schulter bei $x(t)$ verschwindet bei $y(t)$ .....   | 118 |
| <u>Abb. 83:</u> | Qualitativer Vergleich der CFD-Simulationen (1) mit den Messungen mithilfe der Wärmebild-Kamera (2): Einfluss der Geometrie des PELTIER-Elementes:<br>A) großes PELTIER-Element (18 x 18 mm) – B) kleines PELTIER-Element (8 x 8 mm) Fluss-Mikroreaktor mit $\vartheta_{\text{soil}}$ (Reaktionskammer) = 35°C – $\vartheta_{\text{soil}}$ (Kanalheizer) = 38°C .....  | 122 |
| <u>Abb. 84:</u> | Laterales Temperaturprofil auf Chipreaktor entlang der Fluidkoordinate – Einfluss der Geometrie der wärmeübertragenden Flächen Vergleich Messwerte Wärmebild-Kamera, Messwerte Sensoren und CFD-Simulationen unterhalb des Glasdeckels in 3 Varianten I ...<br>III Beispiel: $\vartheta_{\text{soil}}$ (Reaktionskammer, RK) = 35°C und $\vartheta_{\text{soil}}$ (Kanalheizer, KH) = 38°C<br>1a) KH-Design JBCC 1.1 –1b) KH-Design JBCC 1.2 –<br>2a) $A_{\text{PELTIER}} = 18 \times 18 \text{ mm}^2$ – 2b) $A_{\text{PELTIER}} = 8 \times 8 \text{ mm}^2 \equiv$ etwa Abmessung von RK ..... | 123 |
| <u>Abb. 85:</u> | Laterale Temperaturdifferenz $\Delta T_{\text{lat}}$ des Fluss-Mikroreaktors in der Reaktionskammer (Mitte – Ein-/ Ausgang) als Funktion der Temperaturdifferenz zur Umgebung $\Delta T_{\text{U}}$ – Einfluss der Geometrie des PELTIER-Elementes: Vergleich Messwerte Wärmebild-Kamera mit den CFD-Simulationen .....  | 124 |
| <u>Abb. 86:</u> | Vertikales Temperaturprofil über Chipreaktor incl. Luft/ Umgebung als Funktion der z-Koordinate des Fluss-Mikroreaktors: Vergleich der 3D-CFD-Simulationen und analytisches 1D-Modell nach FOURIER mit Messwerten der Sensoren (Unterseite Chipreaktor & Glasdeckel) 1) PELTIER-Element – 2) Fluid in Reaktionskammer – 3) Luft/ Umgebung .....  | 125 |
| <u>Abb. 87:</u> | Vertikale Temperaturdifferenz $\Delta T_{\text{vert}}$ in der Reaktionskammer des Fluss-Mikroreaktors (Boden – Deckel) als Funktion der Temperaturdifferenz zur Umgebung $\Delta T_{\text{U}}$ – Einfluss der Geometrie des PELTIER-Elementes für Flussrate $Q = 30 \mu\text{l}/\text{min}$ : Vergleich Messwerte Wärmebild-Kamera mit den CFD-Simulationen .....  | 126 |
| <u>Abb. 88:</u> | Messpunkte der Verschiebung des Schwerpunktes der Temperaturverteilung in der Reaktionskammer aufgrund erhöhter bzw. Überhöhung des Volumenstroms $Q$ in Richtung der Hauptströmung (x-Koordinate): Kammermitte bei $x = 3,5 \text{ mm}$ .....   | 127 |
| <u>Abb. 89:</u> | Kristallisation von HEWL im Batch-Mikroreaktor unter Variation der Bedingungen: A) tetragonal NaCl – B) monoklin $\text{NaNO}_3$ – C) orthorhombisch NaCl .....  | 131 |
| <u>Abb. 90:</u> | Kristallisation von HEWL im Batch-Mikroreaktor bei statischer (A) sowie zyklisch variiertes Temperatur (B): A) $\vartheta = 18^\circ\text{C} = \text{const.}$ (CLSM-Aufnahmen Wachstumszeit $t_{\text{Wachstum}} = 18 \text{ h}$ ) B) $\vartheta_{\text{Wachstum}} = 19^\circ\text{C}$ , $\vartheta_{\text{Auflösung}} = 22^\circ\text{C}$ , $t_{\text{Halt}} = 5 \text{ min}$ (CCD-Kamera-Bilder $t_{\text{Wachstum}} = 18 \text{ h}$ ) .....   | 132 |
| <u>Abb. 91:</u> | <i>In situ</i> -Analyse der Wachstumscharakteristik von DesThrB30 human Insulin (A) und human Insulin Glargine® (B) mittels CLSM im Batch-Mikroreaktor A) 2D-Nukleation – B) Spiralwachstum .....  | 134 |
| <u>Abb. 92:</u> | Dokumentation der Auflösung von DesThrB30 human Insulin mittels CCD-Kamera im Batch-Mikroreaktor .....   | 135 |
| <u>Abb. 93:</u> | Längenwachstum von HEWL im Batch-Mikroreaktor bei zyklischem Temperaturprotokoll .....   | 136 |
| <u>Abb. 94:</u> | Wachstumsrate von HEWL ermittelt aus 3 Kristallisationsexperimenten im Batch-Mikroreaktor .....  | 136 |
| <u>Abb. C1:</u> | Batch-Mikroreaktor: Layout .....   | C1  |
| <u>Abb. C2:</u> | Fluss-Mikroreaktor - Fluidstrukturen: Layout .....   | C2  |
| <u>Abb. C3:</u> | Fluss-Mikroreaktor – Sensor- und Heizstrukturen: Layout .....  | C3  |
| <u>Abb. C4:</u> | Prozesskontrolle bei der Präparation der strukturierten PDMS-Glasdeckel mittels Randwinkelmessungen .....  | C10 |
| <u>Abb. C5:</u> | Prozesskontrolle bei der Präparation der strukturierten PDMS-Glasdeckel mittels AFM..  | C11 |
| <u>Abb. C6:</u> | Deckelung des Chipreaktors mit strukturiertem PDMS-Glasdeckel .....  | C11 |

|                 |  |    |
|-----------------|--|----|
| <u>Abb. E1:</u> | Transmissionskurven von Borofloat®-Dünnglas (Schott Jena <sup>er</sup> Glas GmbH, D) bei verschiedenen Dicken .....  | E1 |
| <u>Abb. E2:</u> | Softwaretechnische Eliminierung von Wärmereflexen mit Glättungsfunktion auf einem zu analysierenden Objekt Chipreaktor (Batch-Mikroreaktor): A) vor Kalibrierung; B) nach Kalibrierung ..... | E3 |
| <u>Abb. E3:</u> | Temperaturverteilung in der Reaktionskammer vor und nach Kalibrieren einer IR-Kamera: A) Messpfad innerhalb der Reaktionskammer auf dem Chipreaktor<br>B) Temperaturverlauf .....            | E4 |
| <u>Abb. F1:</u> | Qualitative Untersuchung: Vergleich der Verweilzeit-Summenfunktionen als Funktion der Flussrate $Q = 6 \dots 60 \mu\text{l}/\text{min}$ .....  | F1 |
| <u>Abb. F2:</u> | Quantitative Untersuchung: aus analytischem Modell erwartete und über Dispersionsmodell berechnete mittlere Verweilzeit als Funktion des Volumenstroms .....                                 | F1 |

## 6.2 Tabellen

|                    |  |     |
|--------------------|--|-----|
| <u>Tabelle 1:</u>  | Temperaturleitfähigkeit $\kappa$ von Wasser, (Borosilikat-) Glas, Silizium und LPCVD-Silizium-Nitrid ( $\text{LP-Si}_3\text{N}_4$ ) bei Raumtemperatur .....   | 29  |
| <u>Tabelle 2:</u>  | Physikalisch-chemische Eigenschaften von Silizium (Si) und LPCVD-Silizium-Nitrid ( $\text{LP-Si}_3\text{N}_4$ ) bei Raumtemperatur – verwendete Wafer .....  | 33  |
| <u>Tabelle 3:</u>  | Beispiel zur Dimensionierung von Pt-Sensor- (A) und Pt-Heizerstrukturen (B) .....  | 38  |
| <u>Tabelle 4:</u>  | Verfahren und Geräte zur Charakterisierung von Oberflächen .....   | 79  |
| <u>Tabelle 5:</u>  | Ergebnistabelle der dynamischen Parameter des Batch-Mikroreaktors Heizen und Kühlen: Temperierrate des Peltier-Elements $dT/dt$ ; Einschwingzeit des Reglers $t_{95}$ und thermische Relaxationszeit des Fluids (Deckel $\rightarrow$ Boden) $\tau_{\text{therm}}$ .....   | 95  |
| <u>Tabelle 6:</u>  | Geschwindigkeitsprofil in y-Richtung: relative Abweichung vom Sollwert beim Vergleich des errechneten Volumenstroms im Fluss-Mikroreaktor als Funktion des vorgegebenen Volumenstroms (Sollwert): $\mu$ -PIV-Experiment – CFD-Simulation – analytische Lösungen .....  | 115 |
| <u>Tabelle 7:</u>  | Zusammenfassung der theoretisch erwarteten Werte für $\tau_{\text{Verweil}}$ und der mithilfe des Dispersionsmodells ermittelten Werte für $\tau^*_{\text{Verweil}}$ , $Bo$ und $\sigma^2$ als Funktion des Volumenstroms $Q$ für Wasser und Glycerin, 20% .....   | 119 |
| <u>Tabelle 8:</u>  | Ergebnistabelle der dynamischen Parameter des Fluss-Mikroreaktors Heizen und Kühlen: Temperierrate des Peltier-Elements $dT/dt$ ; Einschwingzeit des Reglers $t_{95}$ und thermische Relaxationszeit des Fluids (Deckel $\rightarrow$ Boden) $\tau_{\text{therm}}$ – Messungen bei $Q = 30 \mu\text{l}/\text{min}$ ..... | 128 |
| <u>Tabelle 9:</u>  | Zusammenfassung der Wachstumsexperimente von HEWL für 3 Kristalltypen: A) tetragonal NaCl – B) monoklin $\text{NaNO}_3$ – C) orthorhombisch NaCl<br>Methoden: Dampfdiffusion „Hängender Tropfen“ und Batch-Mikroreaktor .....  | 130 |
| <u>Tabelle 10:</u> | Zusammenfassung der Qualitätsuntersuchungen mittels Röntgenstrukturanalyse von tetragonalem HEWL NaCl-Form: Mittelwerte aus 2-fach Messungen<br>Methoden: Dampfdiffusion „Hängender Tropfen“ und Batch-Mikroreaktor .....  | 133 |
| <u>Tabelle A1:</u> | Auswahl relevanter Literaturstellen (L) und Patente (P) im direkten im Zusammenhang mit Mikroreaktoren zur thermisch oder fluidisch kontrollierten Biokristallisation .....  | A1  |
| <u>Tabelle B1:</u> | Vergleich Mikro- und Makroreaktoren – geometrische Parameter .....   | B1  |
| <u>Tabelle B2:</u> | Vergleich Mikro- und Makroreaktoren – Reaktionstechnik .....   | B1  |
| <u>Tabelle B3:</u> | Vergleich Mikro- und Makroreaktoren – Betrieb .....  | B2  |
| <u>Tabelle B4:</u> | Vergleich Mikro- und Makroreaktoren – Kennzahlen .....   | B2  |
| <u>Tabelle C1:</u> | Batch-Mikroreaktor (JBCC) - anisotropes Si-Tiefenätzen Reaktionskammern<br>(Prozessablauf 02-07 .....  | C4  |
| <u>Tabelle C2:</u> | Fluss-Mikroreaktor (JBCC) – anisotropes & isotropes Si-Tiefenätzen Reaktionskammern und Mikrofluidstrukturen (Prozessablauf 03-12) .....   | C6  |
| <u>Tabelle G1:</u> | Zusammensetzung der Lösungen HEWL für Protein und Präzipitant<br>A) Hängender Tropfen Dampfdiffusion – B) Batch-Mikroreaktor .....   | G2  |
| <u>Tabelle G2:</u> | Zusammensetzung der Lösungen für Protein und Präzipitant<br>A) human Insulin Glargine® (Hoe930) – B) DesThrB30 human Insulin .....   | G2  |
| <u>Tabelle H1:</u> | Allgemeine Chemikalien .....   | H1  |
| <u>Tabelle H2:</u> | Chemikalien zur Modifikation der Siliziumoberflächen – Auswahl .....   | H1  |

## 7 Anhang

|    |   |     |
|----|---|-----|
| A) | Literaturauszug zu Mikroreaktoren in der Proteinkristallisation .....   | A1  |
| B) | Verfahrenstechnischer Vergleich mikro- und makroskopischer Reaktorsysteme .....   | B1  |
| C) | Präparation der Chipreaktoren .....   | C1  |
|    | C1) Layouts .....   | C1  |
|    | C2) Präparationsprotokolle .....  | C4  |
|    | a) Batch-Mikroreaktor .....   | C4  |
|    | b) Fluss-Mikroreaktor .....   | C6  |
|    | C3) Präparation PDMS-Glasdeckel (Fluss-Mikroreaktor) .....  | C10 |
| D) | Ableitung der analytischen Modelle .....  | D1  |
|    | D1) Fluidik .....   | D1  |
|    | a) HAGEN-POISEUILLE aus NAVIER-STOKES-Gleichungen (Strömungsprofil in z-Richtung)..                                       | D1  |
|    | b) Geschwindigkeitsprofil - Abschätzung Abweichung Modell, Simulation und<br>Experiment vom erwarteten Volumenstrom ..... | D2  |
|    | D2) Thermik .....   | D4  |
|    | a) Konvektive Verhältnisse und thermische Relaxationszeit - Abschätzung aus<br>Instationärer Wärmebilanz .....            | D4  |
|    | b) Vertikales 1D-Temperaturprofils - Abschätzung aus Stationärer Wärmebilanz.....   | D7  |
|    | c) Wärmeentwicklung bei der Kristallisation - Abschätzung aus Energiebilanz .....   | D9  |
| E) | Thermografie - Strahlungsmessungen mit Wärmebild-Kamera .....   | E1  |
| F) | Verweilzeitverteilung als Funktion der Flussrate .....  | F1  |
| G) | Kristallisationsvorschriften zur Validierung des Batch-Mikroreaktors .....  | G1  |
| H) | verwendete Chemikalien .....  | H1  |

## Anhang A Literatúrauszug zu Mikroreaktoren in der Proteinkristallisation

In der wissenschaftlichen und Patent-Literatur vorgeschlagene sowie kommerziell erhältliche Systeme im Zusammenhang mit Mikroreaktoren zur thermisch oder fluidisch kontrollierten Biokristallisation erfüllen deren Anforderungen nur unvollständig. Die nachfolgende Tabelle A1 gibt Auskunft, inwieweit die geforderten Merkmale adressiert werden.

Aufgrund dieser Studien zeigte sich, dass eine gezielte Neuentwicklung von Mikroreaktoren für die thermisch und fluidisch kontrollierte Kristallisation biologischer Makromoleküle notwendig ist.

**Tabelle A1:** Auswahl relevanter Literaturstellen (L) und Patente (P) im direkten im Zusammenhang mit Mikroreaktoren zur thermisch oder fluidisch kontrollierten Biokristallisation

| explizit zur Biokristallisation | thermisch kontrolliert | fluidisch kontrolliert | Kompaktheit/ Mikroliterbereich | Referenz                        |
|---------------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
|                                 | X                      | X                      | X                              | <i>Baier 1995 (P)</i>           |
| X                               | (X)                    |                        | (X)                            | <i>Bray 2002 (P)</i>            |
| X                               |                        |                        | X                              | <i>Chiharu 2003 (P)</i>         |
| X                               | X                      | X                      |                                | <i>DeLucas 1994 (L)</i>         |
|                                 | X                      | X                      | X                              | <i>Fouillet 2001 (P)</i>        |
|                                 | X                      | X                      | X                              | <i>Fujii 1997 (P)</i>           |
| X                               | X                      |                        | (X)                            | <i>Garcia-Ruiz 2002</i>         |
| X                               |                        | X                      | X                              | <i>Hansen 2002 (L)</i>          |
| X                               | X                      |                        |                                | <i>Heinrichs 1992 (L)</i>       |
|                                 |                        | X                      | X                              | <i>Jury 2001 (P)</i>            |
| X                               | (X)                    |                        | X                              | <i>Juárez-Martinez 2002 (L)</i> |
| X                               | X                      |                        |                                | <i>Lorber 1992 (L)</i>          |
| X                               | (X)                    | X                      | X                              | <i>Mao 2002 (L)</i>             |
|                                 | X                      |                        | X                              | <i>Pieper 2001 (P)</i>          |
| X                               | (X)                    | X                      | X                              | <i>Sanjoh 1999 (P)</i>          |
|                                 | X                      |                        |                                | <i>Scholz 1967 (L)</i>          |
| X                               |                        | X                      |                                | <i>Vekilov 1998 (L)</i>         |
| X                               | X                      | (X)                    | X                              | <i>Weigl 2001 (P)</i>           |

\* X: voll zutreffend; (X): partiell zutreffend



## Anhang B Verfahrenstechnischer Vergleich mikro- und makroskopischer Reaktorsysteme

Tabelle B1: Vergleich Mikro- und Makroreaktoren – geometrische Parameter

| Parameter              | Makroreaktor  | Mikroreaktor   | Funktionaler Zusammenhang                   |
|------------------------|---|--|---|
| <b>Allgemein</b>       |   |  |   |
| Größendimension d<br>L | $\approx 5 \times 10^{-1} \dots 10 \text{ m}$<br>$\approx 1 \dots 10^3 \text{ m}$ | $\approx 10^{-9} \dots 5 \times 10^{-3} \text{ m}$<br>$\approx 10^{-3} \dots 10 \text{ m}$ | f (Zielstellung –<br>technisch, ökonomisch) |
| Reaktionsvolumina      | $\approx 10^{-1} \dots 100 \text{ m}^3$<br>(100 ... 100.000 l)                    | $\approx 5 \times 10^{-10} \dots 10^{-6} \text{ m}^3$<br>(0,5... 1000 $\mu\text{l}$ )      | f (V)<br>$\sim d^3$                         |
| „S-zu-V“               | $\approx 0,5 \dots 20 \text{ m}^{-1}$<br>$\rightarrow 2 \text{ m}^{-1}$           | $\approx 10^2 \dots 10^9 \text{ m}^{-1}$<br>$\rightarrow 10^5 \text{ m}^{-1}$              | f (S/V, Geometrie)<br>$\sim d^{-1}$         |

Tabelle B2: Vergleich Mikro- und Makroreaktoren – Reaktionstechnik

| Parameter  | Makroreaktor  | Mikroreaktor  | Funktionaler Zusammenhang  |
|--|---|---|--|
| <b>Reaktionstechnik</b>  |   |   |  |
| Reaktions-<br>geschwindigkeit r                                      | $r_{\text{Makro}}$  | $r_{\text{Mikro}} > r_{\text{Makro}}$<br>$\rightarrow$ s. „Dynamik ...“   | f (r) = f ( $k_R$ , c) = f (T, c)<br>$\sim e^{-\text{const./T}}$ , f (c)   |
| Ausbeute A =<br>Umsatz x Selektivität                                | $A_{\text{makro}}$  | $A_{\text{Mikro}} > A_{\text{makro}}$<br>$\rightarrow$ s. „VZV“   | f (T, c, VZV)  |
| Verweilzeitverteilung<br>(VZV)                                       | ...<br>$\Rightarrow$ teilweise große<br>Dispersion  | ... (S-zu-V, relativ<br>erhöhter Durchsatz)<br>$\Rightarrow$ kleinere Dispersion                                | f (S-zu-V, $D_{ax}$ ,<br>Reaktionsführung,<br>Strömungsverhalten)  |
| Raum-Zeit-Ausbeute<br>( $RZA_m = m / (t V)$ )                        | $\approx 10 \text{ kg/s @ } 1 \text{ m}^3$<br>$\Rightarrow RZA_m: 10 \text{ kg/(s m}^3)$          | $\approx 1 \text{ kg/h @ } 10^{-4} \text{ m}^3$<br>$\Rightarrow RZA_m: 10^4 \text{ kg/(s m}^3)$                 | f (r, VZV)   |
| Wärmeübertragung<br>(Wärmeübergang)                                  | $\approx 1 \text{ kW/ m}^2 \text{ K @ } 10^3$<br>kg/s (Rohrbündel-WÜ)                             | $\approx 10 \text{ kW/ m}^2 \text{ K @ } 1 \text{ kg/s}$<br>(Mikrokreuzstrom-WÜ)<br>$\Rightarrow$ Faktor $10^4$ | f ( $k_W$ , $\Delta T$ ) $\sim$ f (S-zu-V)<br>$\sim d^{-1}$  |
| Mischregime<br>(Stoffübergang)                                       | turbulent - konvektiv<br>(statisch, dynamisch)  | laminar – diffusiv  | f (Pé, Bo, ...)<br>$\sim w$ , d (L), $D^{-1}$ , f(r)   |
| Strömungs-<br>verhältnisse<br><br>(w: Strömungs-<br>geschwindigkeit) | - turbulent oder laminar<br>- w (Wand) = 0  | - laminar<br>- w (Wand) > 0 $\Rightarrow$<br>erhöhter Durchsatz<br>- Viskosität $\neq$ const.<br>- Gasblasen    | - f (Re, Reaktorlänge L)<br>- f (diff. Unterschicht $\varepsilon$ ),<br>mit $\varepsilon \approx 10^{-5} \text{ m} \approx d$<br>- f (Oberflächenspg. $\sigma$ )<br>- f (w, $\sigma$ ) |
| Druckverhältnisse  | hydrostatisch und<br>hydrodynamisch   | nur hydrodynamisch<br>(„Bernoulli-Druck“)   | f (V, ...)   |
| Reaktionsführung   | dis- (batch), halb- (fed<br>batch), kontinuierlich<br>sowie Kombinationen<br>(Kaskade, Kreislauf) | i.d.R. kontinuierlich<br>(Flussreaktoren)<br>z.T. batch (Mikro-,<br>Nanotiterplatten)                           | f (Zielstellung)   |

Tabelle B3: Vergleich Mikro- und Makroreaktoren – im Betrieb

| Parameter   | Makroreaktor  | Mikroreaktor   | Funktionaler Zusammenhang   |
|---|---|--|---|
| <b>Betrieb</b>  |   |  |   |
| Dynamik des Betriebspunktes                                 | relativ träge Systeme, aufwendige Regelung  | schnelle Antwort, kaum Überschwingen   | $f(r) = f(T, c)$ und $f(k_W, \Delta T) \approx f(S\text{-zu-V})$<br>$\Rightarrow \sim d^{-1}, f(c)$ |
| spezifische Kapazität (Reaktionsvolumen-zu-Materialeinsatz) | Materialstärke:<br>$\approx 10^{-2} \dots 0,5 \text{ m}$<br>$\rightarrow 0,1 \dots 200$       | Reaktorvolumen:<br>$\approx 10^{-5} \dots 10^{-3} \text{ m}^3$<br>$\rightarrow 10^{-6} \dots 10$ | $f(S\text{-zu-V}, \text{Material}, \text{Integrationsgrad}, \text{Geometrie})$                      |
| Volumenstrom (kontinuierlich)                               | $\approx 10^{-2} \dots 10^5 \text{ m}^3/\text{s}$<br>(1 l/h ... $10^8 \text{ m}^3/\text{a}$ ) | $\approx 10^{-9} \dots 10^{-6} \text{ m}^3/\text{s}$<br>(1 $\mu\text{l/s}$ ... 1 l/s)            | $f(\text{RZA})$   |
| Energieeintrag, -abfuhr i.d.R. mittels                      | Reaktanden, Wärmetauscher, Brenner  | Reaktanden, elektr. Widerstandsheizung, Mikrowärmetauscher                                       | $f(S\text{-zu-V}, \text{Enthalpie}, \text{Art des Energieeintrags})$<br>$\sim d^{-1}, f(\dots)$     |
| typ. externe Heizleistung                                   | $\approx 10^6 \dots 10^9 \text{ W}$<br>(Brenner)  | $\approx 1 \dots 10 \text{ W}$<br>(Widerstandsheizler)   | s.o.  |
| Reaktormaterialien  | (Edel-) Stahl, Glas, Guss   | Si, Glas, Polymere   | Festigkeit $\leftrightarrow$ Mikrostrukturierbarkeit  |
| Materialeinsatz   | meist Einzel-/Handanfertigung   | Serienfertigung möglich und angestrebt   | $f(S)$<br>$\sim d^2$  |

Tabelle B4: Vergleich Mikro- und Makroreaktoren – Kennzahlen

| Parameter                                    | Makroreaktor  | Mikroreaktor   | Funktionaler Zusammenhang  |
|--|---|--|--|
| <b>Allgemein</b>                             |   |  |  |
| Kennzahlen<br>Reynolds<br>Péclet<br>Rayleigh | Konvektiver Impulsstrom <i>zu</i> Diffusiver I.<br>Konvektiver Wärme-/ Stoffstrom <i>zu</i> Diffusiver W.<br>Thermische Ausdehnung <i>zu</i> Viskosität<br>(Aufreten freier Konvektion) |  | $Re = u d / \nu$<br>$Pé = u d / D_{ax, rad}$<br>$Ra = L^3 g \beta \Delta T / \nu \kappa$ |
| Re   | $d = 100 \mu\text{m}$<br>$d = 1000 \mu\text{m}$<br>$d = 1 \text{ m}$  | —<br>—<br>$\approx 10^4$   | $\approx 1$<br>$\approx 10$<br>—   |
| Pé   | $d = 100 \mu\text{m}$<br>$d = 1 \text{ m}$  | —<br>$\approx 10^4$  | $\approx 10^{-2}$<br>—   |
| Ra   | $L = 100 \mu\text{m}$<br>$L = 1000 \mu\text{m}$<br><br>$L = 0,1 \text{ m}$  | —<br>—<br>$\approx 10^5$ (Stahl)   | $\approx 10^{-2}$ (Silizium)<br>$\approx 10$ (Silizium)<br>—                             |
| S-zu-V                                       | Kugel<br>Rechteck<br>Quader<br>Zylinder (Rohr)  |  | $6/d$<br>$4(ab+bL+aL)/abL$<br>$12/d$<br>$2(d+2L)/dL$                                     |
| Rauhigkeit versch. Materialien               | $k_S$ (Stahl) $\approx 5 \dots 5 \times 10^3 \mu\text{m}$<br>$k_S$ (Si, pol.) $\approx 10^{-2} \mu\text{m}$   | $k_S$ (Glas) $\approx 0,1 \dots 5 \mu\text{m}$<br>$k_S$ (Polymer) $\approx 1 \dots 10^3 \mu\text{m}$ |  |

# Anhang C1 Layouts

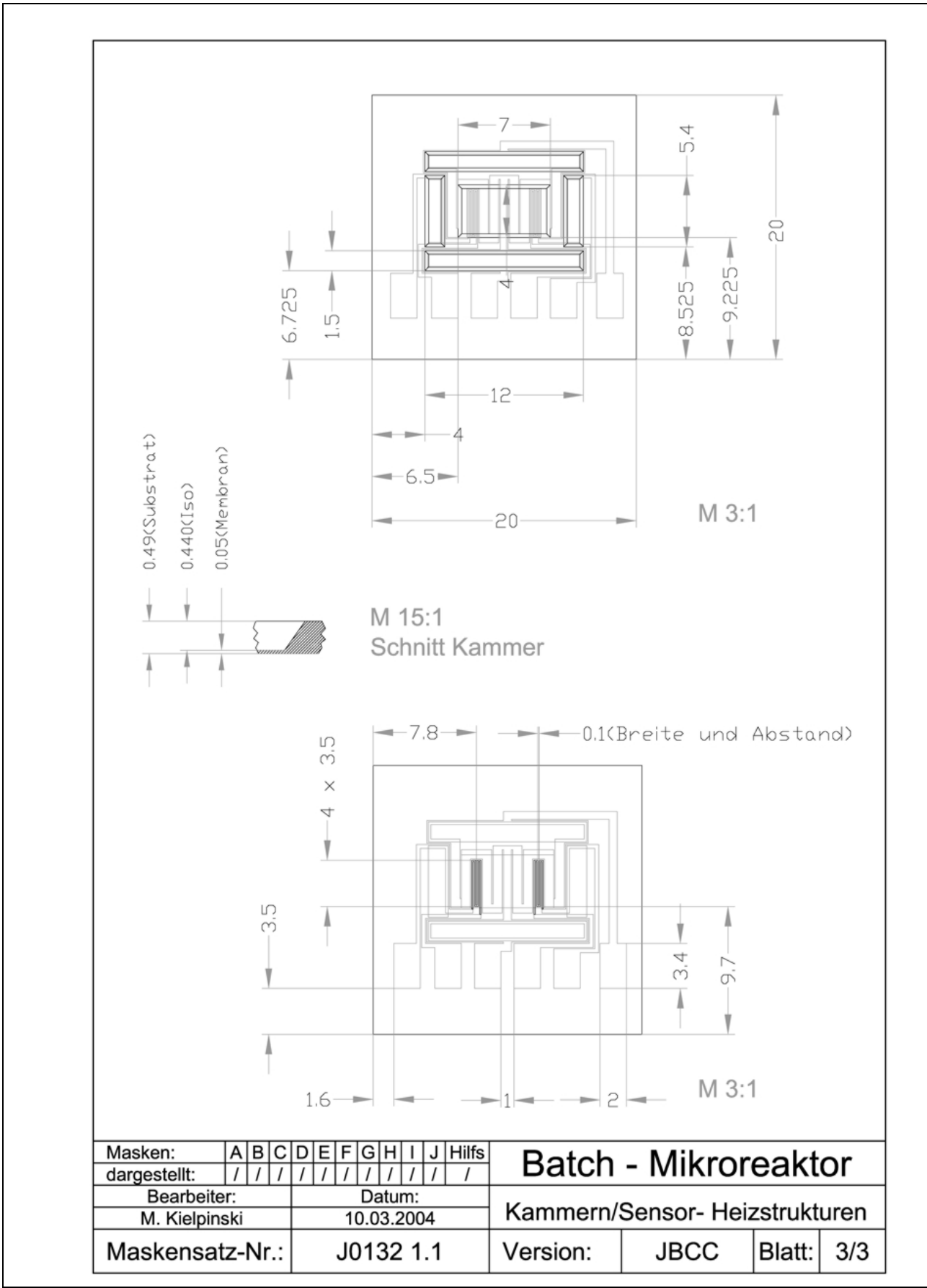


Abb. C1: Batch-Mikroreaktor: Layout

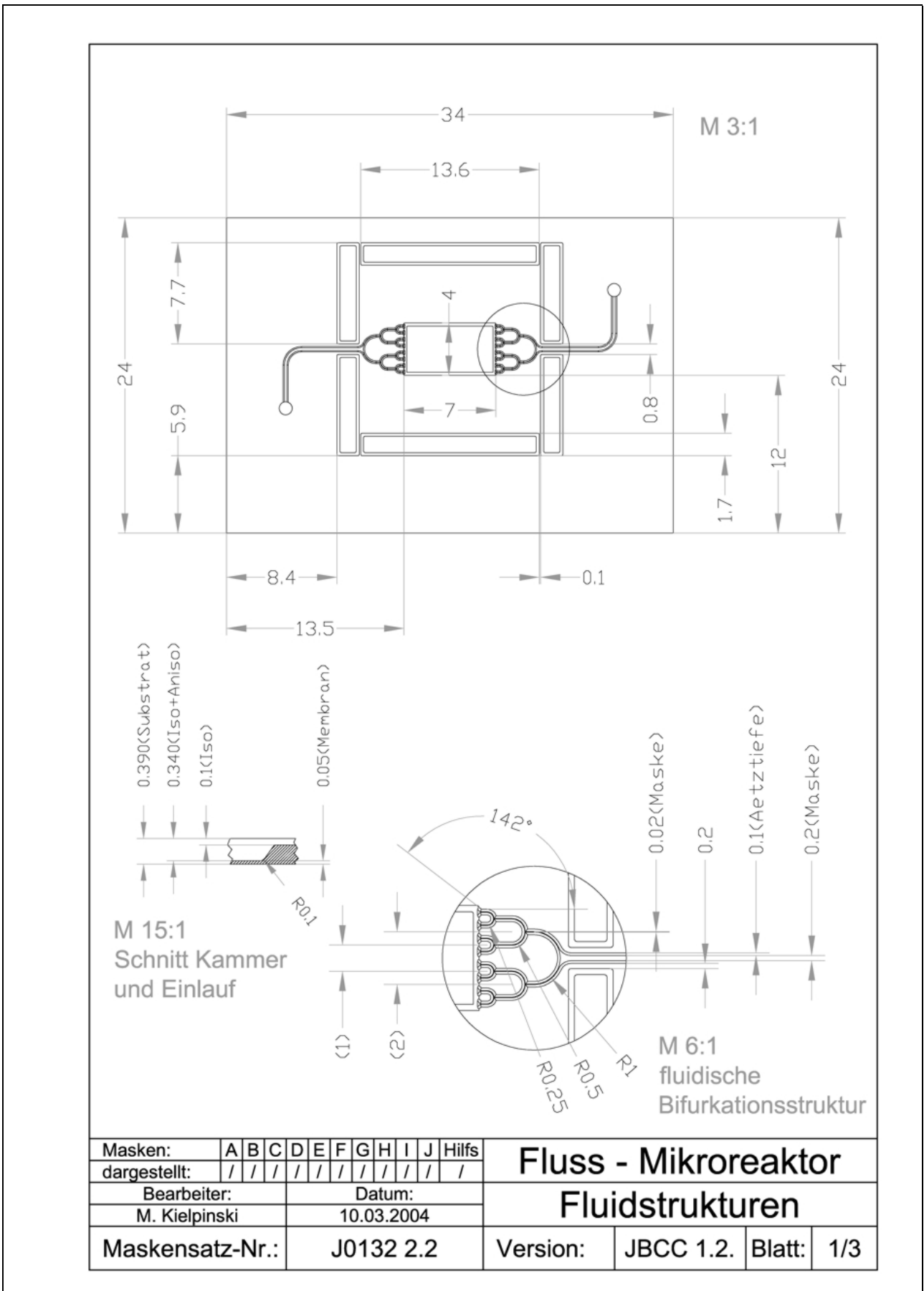


Abb. C2: Fluss-Mikroreaktor - Fluidstrukturen: Layout

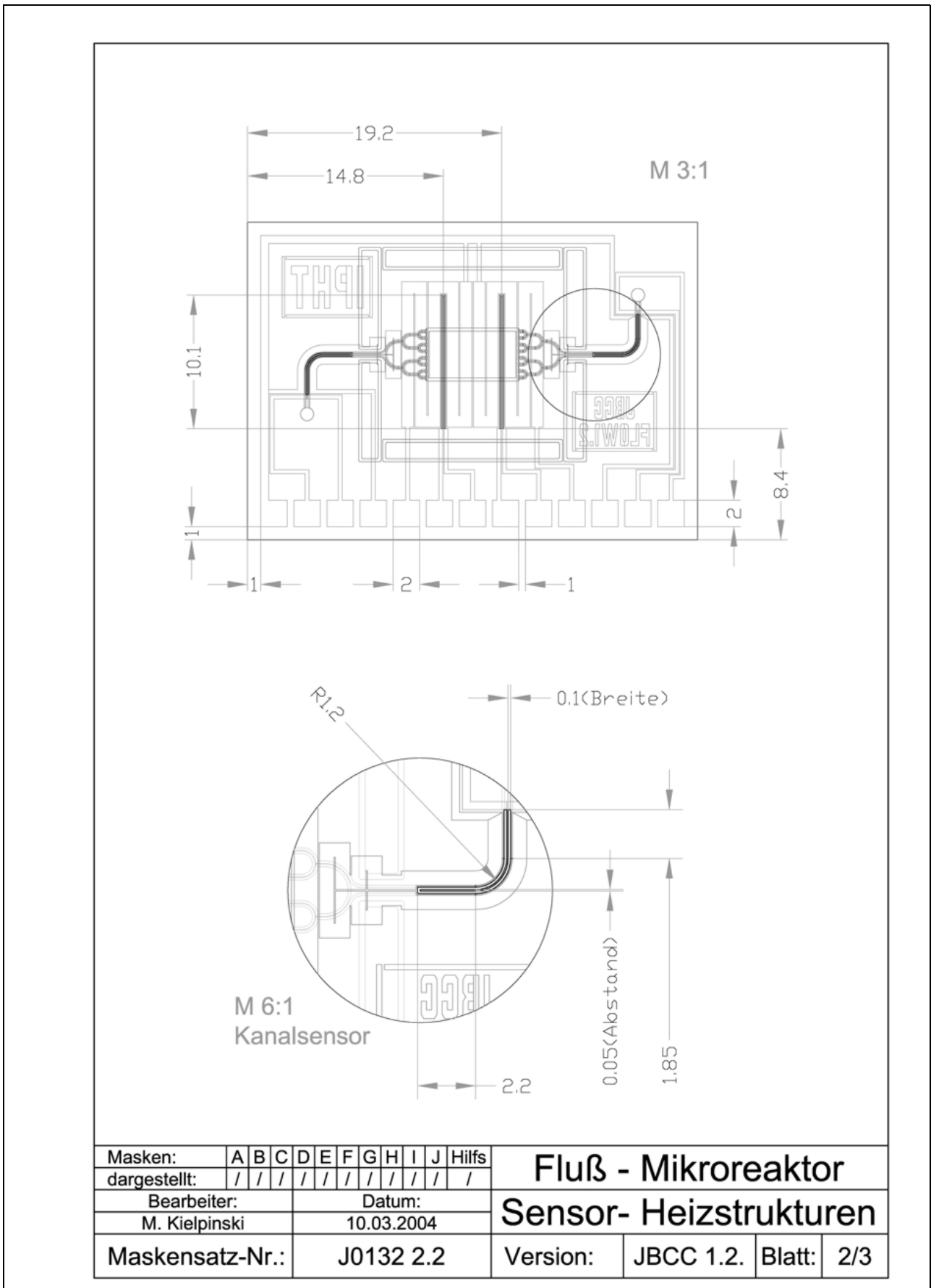


Abb. C3: Fluss-Mikroreaktor – Sensor- und Heizstrukturen: Layout

## Anhang C2a Präparationsprotokolle – Batch-Mikroreaktor

**Tabelle C1:** Batch-Mikroreaktor (JBCC) - **anisotropes Si-Tiefenätzen Reaktionskammern**  
(Prozessablauf 02-07)

Charge: Anzahl: 3, Art: Siliziumwafer mit LP-Nitrid (150 nm) und LP-PE-Nitrid (140/ 900 nm) „Thesys 7“; beidseitig (X-Fab), Größe: 4“, (<100>), Dicke: 490  $\mu\text{m}$ , Oberfläche: beidseitig poliert

| Prozess                      | Material  | Parameter  | Bemerkung/<br>Beurteilung  |
|------------------------------|---|--|--|
| <b>Vorbereitung</b>          | <b>Wafer</b>  |  |  |
| Temperung                    | Ofen  | $\vartheta = 200^\circ\text{C}$  |  |
| <b>Fotolithographie</b>      | <b>Wafer</b>  | <b>beidseitig belacken;<br/>nur LP-Nitrid Seite<br/>entwickeln</b>                       |  |
| Belacken                     | AZ 1514 H   | 5000 U/min, 30 s (zu<br>belichtende Seite)<br>3000 U/min, 30 s<br>(Rückseite zum Schutz) |  |
| Temperung                    | Ofen  | $80^\circ\text{C}$ , 20 min  |  |
| Belichten                    | Maske ‚J0132 1.1 – A-SI-<br>VORN‘ (JBCC 2.0)<br>Aligner AL-6.2                  | $t \approx 8$ s<br>nur LP-Nitrid-Seite!  |  |
| Entwickeln                   | AZ Developer  | Verdünnung 2 : 1 (Entwickler :<br>$\text{H}_2\text{O}$ ), ca. 45 s                       |  |
| Charakterisierung            |   | Struktur der Lackmaske auf<br>Risse prüfen   |  |
| <b>Trockenätzen</b>          |   |  |  |
| RIE im $\text{CF}_4$ -Plasma | LP-PE- $\text{Si}_3\text{N}_4$ mit Lackmaske<br>Planarreaktor (ZWG/<br>Sentech) | $\vartheta < 80^\circ\text{C}$ ( $\text{N}_2$ -Kühlung)<br>einige Minuten                |  |
| Lackablösung                 | Aceton<br>$\text{O}_2$ -Plasma  | über Nacht einweichen<br>einige Minuten für Lackreste                                    |  |
| <b>Si-Tiefenätzen</b>        | geöffnete Frontseite  |  |  |
| Nassätzen                    | Si (530 – 540 $\mu\text{m}$ )   | NaOH 40%; $\vartheta = 80^\circ\text{C}$<br>50 $\mu\text{m}$ -Brücke stehen lassen       | Bitte möglichst genau<br>50 $\mu\text{m}$ , im Zweifel eher<br>etwas mehr! |
| Charakterisierung            |   | Tiefe der Gräben $\rightarrow$ 440 $\mu\text{m}$<br>Inspektion auf Defekte               | Kammern/ Brücken auf<br>Risse/ Brüche prüfen                               |
| <b>Finish</b>                | <b>fertig strukturierter<br/>Wafer</b>  |  |  |
| Charakterisierung            |   | auf Sicht Grabenstruktur,  |  |
| Rückgabe/ Fazit              |   |  |  |

Bemerkung: Si-Bodendicke: 60  $\mu\text{m}$

**Prozessablauf 02-08 – Batch-Mikroreaktor (JBCC) - Dünnschichtelemente  
(Fortsetzung 07-02)**

| Prozess                                | Material   | Parameter  | Bemerkung/<br>Beurteilung                       |
|--|--|--|---|
| <b>Vorbereitung</b>                    | <b>Si-tiefengeätzter Wafer</b>                                       |  |   |
| Temperung                              | Ofen   | $\vartheta = 200^{\circ}\text{C}$  |   |
| <b>Metallisierung</b>                  | <b>LP-PE-Nitrid Seite</b>  |  |   |
| PVD-Prozess - Pt                       | NiCr-Target<br>Pt-Target<br>MRC HF-Anlage                            | Dicke (NiCr) $d = 3 \dots 5 \text{ nm}$<br>Dicke (Pt) $d = 100 \text{ nm}$               | NiCr als Haftvermittler für Pt                  |
| PVD-Prozess - Al                       | NiCr-Target<br>Al-Target<br>Perkin Elmer DC-Anlage                   | Dicke (NiCr) $d = 2 \dots 3 \text{ nm}$<br>Dicke (Al) $d = 1 \mu\text{m}$                | dto.  |
| <b>Strukturierung Al</b>               |  |  |   |
| Belacken                               | AZ 1514 H  | 5000 U/min, 30 s   |   |
| Temperung                              | Ofen   | $80^{\circ}\text{C}$ , 20 min  |   |
| Belichten                              | Maske ‚J0132 1.1 – C-AL-HINTEN‘ (JBCC 2.0)<br>"Neuer" Aligner EV 620 | $t \approx 5 \text{ s}$  |   |
| Entwickeln                             | AZ Developer   | Verdünnung 2 : 1 (Entwickler : $\text{H}_2\text{O}$ ), ca. 45 s                          |   |
| Temperung                              | Ofen<br>UV-Lampe   | $120^{\circ}\text{C}$ , 30 min,<br>dann 5 min UV,<br>dann $135^{\circ}\text{C}$ , 30 min | UV zur besseren Ablösung des Lacks vom Al       |
| <b>Ätzen</b>                           |  |  |   |
| Nassätzen Al                           | $85\% \text{ H}_3\text{PO}_4 + 65\% \text{ HNO}_3$                   | ca. 2 min (nach Sicht)   |   |
| Al-Flankenbad                          | HF   | $t \approx 10 \text{ s}$   |   |
| Lackablösung                           | alkalischer Lackablöser  | $t \approx 30 \dots 45 \text{ s}$  |   |
| <b>Strukturierung Pt</b>               |  |  |   |
| Temperung                              | Ofen   | $\vartheta = 120^{\circ}\text{C}$ , 15 min   |   |
| Belacken                               | AZ 5214 E  | 5000 U/min, 30 s, 18%-ig   |   |
| Temperung                              | Ofen   | $80^{\circ}\text{C}$ , 20 min  |   |
| Belichten                              | Maske ‚J0132 1.1 – B-PT-HINTEN‘, AL-6.2                              | $t \approx 7 \text{ s}$  |   |
| Entwickeln                             | AZ Developer   | Verdünnung 2 : 1 (Entwickler : $\text{H}_2\text{O}$ ), ca. 45 s                          |   |
| UV-Härtung                             | UV-Belichter „Sol 2“   | 15 min   |   |
| $\text{O}_2$ -Plasma                   |  | $t \approx 30 \text{ s}$ , $P = 35 \text{ W}$  |   |
| IBE im Ar-Plasma/<br>Charakterisierung | Pt mit Lackmaske<br>Metallsonden<br>Strom-Messgerät                  | leicht überätzen - bis kein Stromfluss mehr messbar                                      | unendl Widerstand zwischen Heizern und Sensoren |
| Charakterisierung                      | Mikroskop  | Strukturen glatt - Flecke?   | wenn ja evtl. NiCr-Ätzbad                       |
| Rückgabe/ Fazit                        |  |  |   |
| <b>Finish</b>                          | <b>fertig strukturierter Wafer</b>                                   |  |   |
| Lackablösung/<br>Schichten säubern     | Aceton<br>$\text{O}_2$ -Plasma                                       | evtl. über Nacht einweichen<br>ggfs. einige Minuten für Lackreste                        |   |
| Rückgabe/ Fazit                        |  |  |   |
| Charakterisierung                      | Digital Multimeter K 2000<br>Multimeter (Keithley)                   | Dünnschichtelemente elektr. Widerstand der Dünnschichten untereinander                   |   |
| Schichten tempern                      | Trockenschrank "T-5042" (Heraus)                                     | $\vartheta = 200^{\circ}\text{C}$<br>$t = 24 \text{ h}$                                  | Ausheilen der Dünnschichten                     |
| Vereinzelung                           | Wafersäge „Seier 301“  | $20 \times 20 \text{ mm}$  |   |

Bemerkung: -

## Anhang C2b Präparationsprotokolle – Fluss-Mikroreaktor

**Tabelle C2:** Fluss-Mikroreaktor (JBCC) – anisotropes & isotropes Si-Tiefenätzen Reaktionskammern und Mikrofluidstrukturen (Prozessablauf 03-12)

Charge: Anzahl: 3, Siliziumwafer mit LP-Nitrid (150 nm) und LP-PE-Nitrid (150/ 1100 nm) „**XFab\_16**“ (Lot A44038, Typ TSS); Größe: 4“, (<100>), Dicke: 390 µm, Oberfläche: beidseitig poliert

| Prozess                           | Material   | Parameter  | Bemerkung/<br>Beurteilung   |
|-----------------------------------|--|--|---|
| <b>Vorbereitung</b>               | <b>Wafer</b>   |  |   |
| Nitridschicht inspizieren         | Mikroskop  | Dunkel- und Hellfeld   |   |
| Reinigung                         |  | staubfrei  | Zahlen auf Membranseite zur Identifikation                                |
| <b>Metallisierung NiCr</b>        | <b>beide Seiten</b>  |  |   |
| PECVD-Prozess - NiCr              | NiCr   | Dicke (NiCr) d = 150 nm  | Maske für Kammerseite, Schutz für Dünnschichtseite                        |
|                                   |  |  |   |
| <b>Öffnen der Kammern</b>         | <b>NiCr und LP-Nitrid</b>  | <b>LP-Nitrid Seite</b>   |   |
| <b>Fotolithographie</b>           | <b>für NiCr und LP-Nitrid - Kammern</b>  |  |   |
| Reinigung                         |  | staubfrei  |   |
| Belacken                          | AZ 1514 H  | VS: 5000 U/min, 30 s<br>beidseitig<br>RS: 3000 U/min   | beidseitig (Schutz für RIE)<br>AZ 5214 E (für Trocken- + Nassätzprozesse) |
| Temperung                         | Ofen   | 80°C, 20 min   |   |
| Belichten                         | Maske „JBCC-Flusschip“<br>J0132 2.1 – A JBCC 3.0<br>Aligner AL-6.2                 | t ≈ 10 s<br>nur LP-Nitrid Seite  |   |
| Entwickeln                        | AZ Developer MIF 726   | Verdünnung 2 : 1<br>(Entwickler : H <sub>2</sub> O), ca. 45 s  |   |
| Aushärten                         | Ofen   | 120°C, 30 min  |   |
| Charakterisierung                 |  | Risse in Lackmaske?  |   |
| <b>Nassätzen</b>                  | <b>NiCr</b>  |  |   |
| Nassätzen                         | NiCr (150 nm)  | NiCr-Ätzbad ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Ce(NO <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> ):<br>165 g à 0,3 mol/l, HClO <sub>4</sub> : 43<br>g à 0,5 mol/l, auf 1 l H <sub>2</sub> O)<br>ϑ = 21°C,<br>t = 1 min |   |
| Charakterisierung                 |  | NiCr komplett weg?   |   |
| <b>Trockenätzen</b>               | <b>LP-Nitrid</b>   |  |   |
| RIE im CF <sub>4</sub> -Plasma    | LP-Si <sub>3</sub> N <sub>4</sub> mit Lackmaske<br>Planarreaktor (ZWG/<br>Sentech) | ϑ < 80°C (N <sub>2</sub> -Kühlung)<br>einige Minuten   |   |
| Lackablösung                      | PRS 3000   | einweichen   |   |
| <b>Öffnen der Fluidstrukturen</b> | <b>NiCr</b>  |  |   |



|   |   |  |  |
|---|---|--|--|
| <b>Fotolithographie</b>                                 | <b>nur NiCr – Kammer + Mikrofluidstrukturen</b>                                       | <b>LP-Nitrid Seite</b>   |  |
| Belacken  | AZ 1514 H   | VS: 5000 U/min, 30 s<br>beidseitig<br>RS: 3000 U/min   |  |
| Temperung   | Ofen  | 80°C, 20 min   |  |
| Belichten   | Maske „JBCC-Flusschip“<br>J0132 2.1 - B JBCC 3.0                                      | t ≈ 10 s<br>nur LP-Nitrid Seite  |  |
| Entwickeln  | AZ Developer  | Verdünnung 2 : 1<br>(Entwickler : H <sub>2</sub> O), ca. 45 s  |  |
| Aushärten   | Ofen  | 120°C, 30 min  |  |
| Charakterisierung                                       |   | Risse in Lackmaske?  |  |
| <b>Nassätzen</b>  | <b>der NiCr-Beschichtung</b>  |  |  |
| Nassätzen   | NiCr (150 nm)   | NiCr-Ätzbad, $\vartheta = 21^\circ\text{C}$ , 1 min  |  |
| Charakterisierung                                       |   | NiCr komplett weg?   |  |
| Lackablösung  | PRS 3000  | einweichen   |  |
| <b>Anisotropes Ätzen Kammern</b>                        |   |  |  |
| <b>Si-Tiefenätzen</b>                                   | <b>anisotrop (200 <math>\mu\text{m}</math>)</b>                                       |  |  |
| Nassätzen   | geöffneter Si-Wafer   | TMAH, $\vartheta = 80^\circ\text{C}$ (25 $\mu\text{m}/\text{h}$ )<br>200 $\mu\text{m}$ tief t ≈ 9,25 h                     |  |
| Charakterisierung                                       |   | Homogenität der Tiefe (Tastschnitt)<br>Rauigkeit Boden (optisch)   | Kammertiefe 240 $\mu\text{m}$  |
| Belacken  | AZ 1514 H   | VS: 5000 U/min, 30 s<br>beidseitig<br>RS: 3000 U/min   | Schutz der Rückseite   |
| Aushärten   | Ofen  | 120°C, 30 min  |  |
| <b>Isotropes Ätzen Mikrofluidstrukturen und Kammern</b> |   |  |  |
| <b>Trockenätzen</b>                                     | <b>LP-Nitrid</b>  |  |  |
| RIE im CF <sub>4</sub> -Plasma                          | LP-Si <sub>3</sub> N <sub>4</sub> mit „NiCr-Maske“<br>Planarreaktor (ZWG/<br>Sentech) | $\vartheta < 80^\circ\text{C}$ (N <sub>2</sub> -Kühlung)<br>einige Minuten   | ausreichend große<br>Selektivität NiCr<br>gegenüber LP-Nitrid<br>(min 10-fach)                           |
| <b>Si-Tiefenätzen</b>                                   | <b>isotrop (100 <math>\mu\text{m}</math>) gegen NiCr</b>                              |  |  |
| Lackablösung  | PRS 3000  | einweichen   |  |
| Nassätzen   | geöffneter Si –Wafer<br>Teflonbecher mit Ventil<br>(nur unter Abzug öffnen!)          | HNO <sub>3</sub> , HF (CH <sub>3</sub> COOH, HClO <sub>4</sub> )<br><b>100 <math>\mu\text{m}</math></b> tief (1,5 ... 2 h) | Vor Öffnen des<br>Bechers, Druckluft<br>vorsichtig einblasen ⇒<br>Gase über Ventil<br>abrauchen lassen – |
| Charakterisierung                                       |   | Homogenität der Tiefe<br>Kanten sauber?<br>Nitrid auf der Rückseite<br>angegriffen?  | Verteilerstruktur 99 ...<br>105 $\mu\text{m}$<br>großer Fluidkanal 130<br>$\mu\text{m}$                  |
| <b>Nassätzen</b>  | <b>NiCr ablösen</b>   |  |  |
| Nassätzen   | NiCr (150 nm)   | NiCr- Ätzbad; $\vartheta = 21^\circ\text{C}$ , 45 s  |  |
| Charakterisierung                                       |   | NiCr komplett weg?   |  |
| <b>Finish</b>   | <b>fertig strukturierter Wafer</b>  |  |  |
| Charakterisierung                                       | Lichtmikroskop,<br>REM  | Ätzstrukturen →<br>glatte Flächen, wenig<br>Kanten, Strukturtrue   |  |

Bemerkung: Si-Bodendicke: 50  $\mu\text{m}$

**Prozessablauf 03-13 – Fluss-Mikroreaktor (JBCC) – Dünnschichtelemente  
(Fortsetzung 03-12)**

| Prozess                                | Material  | Parameter  | Bemerkung/<br>Beurteilung                              |
|--|---|--|--|
| <b>Vorbereitung</b>                    | <b>Si-tiefengeätzter Wafer</b>  |  |  |
| Temperung                              | Ofen  |  |  |
| <b>Belacken Isolation</b>              |   |  |  |
| Belacken                               | Polyimid  | 12,5%, Dicke ca. 1 µm<br>⇒ 1000 U/min, 60 s                                  | Polymer als elektr.<br>Isolation Metall gegen Si       |
| Temperung                              | Ofen  | 250°C, Programm über Nacht   |  |
| <b>Metallisierung</b>                  | <b>LP-PE-Nitrid Seite</b>   |  |  |
| PVD-Prozess - Pt                       | NiCr-Target<br>Pt-Target<br>MRC HF-Anlage   | Dicke (NiCr) d = 3 ... 5 nm<br>Dicke (Pt) d = 120 nm                         | NiCr als Haftvermittler<br>für Pt                      |
| PVD-Prozess - Al                       | NiCr-Target<br>Al-Target<br>Perkin Elmer DC-Anlage  | Dicke (NiCr) d = 2 ... 3 nm<br>Dicke d = 1 µm                                |  |
| <b>Strukturierung Al</b>               |   |  |  |
| Belacken                               | AZ 1514 H   | 5000 U/min, 30 s   |  |
| Temperung                              | Ofen  | 80°C, 20 min   |  |
| Belichten                              | Maske ‚JBCC- Flusschip‘<br>"J0132-2.2-C AL" JBCC<br>3.1<br>"Neuer" Aligner EV 620               | t ≈ 5 s  | ACHTUNG: bei<br>Justierung auf<br>Nitridstufen achten  |
| Entwickeln                             | AZ Developer  | Verdünnung 2 : 1 (Entwickler :<br>H <sub>2</sub> O), ca. 45 s                |  |
| Temperung                              | Ofen<br>UV-Lampe  | 120°C, 30 min,<br>dann 5 min UV,<br>dann 135°C, 30 min                       | UV zur besseren<br>Ablösung des Lacks vom<br>Al        |
| <b>Ätzen</b>                           |   |  |  |
| Nassätzen Al                           | 85% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + 65% HNO <sub>3</sub>                                       | 2 min (nach Sicht)   |  |
| Al-Flankenbad                          | HF  | t = 10 s   |  |
| Lackablösung                           | PRS 3000  | t ≈ 30 ... 45 s  |  |
| <b>Strukturierung Pt</b>               |   |  |  |
| Temperung                              | Ofen  | ϑ = 120°C, 15 min  |  |
| Belacken                               | AZ 5214 E   | 5000 U/min, 30 s, 18%-ig   |  |
| Temperung                              | Ofen  | 80°C, 20 min   |  |
| Belichten                              | Maske ‚JBCC- Flusschip‘<br>"J0132-2.2-D PT" JBCC<br>3.1<br>AL-6.2                               | t ≈ 7 s  |  |
| Entwickeln                             | MIF 726   | ca. 30 s   |  |
| UV-Härtung                             | UV-Belichter „Sol 2“  | 15 min   |  |
| <b>Ätzen</b>                           |   |  |  |
| O <sub>2</sub> -Plasma                 |   | t ≈ 30 s, 35 W   |  |
| IBE im Ar-Plasma/<br>Charakterisierung | RIBE-IBE Microfab 300<br>(Oxford Plasma)<br>Pt mit Lackmaske<br>Metallsonden<br>Strom-Messgerät | 5 min. → leicht überätzen - bis<br>kein Stromfluss mehr messbar              |  |
| Charakterisierung                      | Mikroskop   | Strukturen glatt – Flecke?   | Saubere fleckenlose<br>Strukturen?                     |
| Charakterisierung                      | Digital Multimeter K 2000<br>Multimeter (Keithley)  | Dünnschichtelemente<br>elektr. Widerstand der<br>Dünnschichten untereinander | unendl Widerstand<br>zwischen Heizern und<br>Sensoren? |
| <b>Finish</b>                          | <b>fertig strukturierter<br/>Wafer</b>  |  |  |
| Lackablösung/<br>Schichten säubern     | O <sub>2</sub> -Plasma  |  |  |
| Rückgabe/ Fazit                        |   |  |  |

|                   |  |  |                                |
|-------------------|--|--|--------------------------------|
| Schichten tempern | Trockenschrank "T-5042"<br>(Heraus)                | $\vartheta = 200^{\circ}\text{C}$<br>$t = 24 \text{ h}$                      | Ausheilen der<br>Dünnschichten |
| Charakterisierung | Digital Multimeter K 2000<br>Multimeter (Keithley) | Dünnschichtelemente<br>elektr. Widerstand der<br>Dünnschichten untereinander |                                |
| Vereinzelung      | Wafersäge „Seier 301“                              | 24 x 34 mm   |                                |

Bemerkung: -

## Anhang C3 Präparation PDMS-Glasdeckel (Fluss-Mikroreaktor)

### A) Randwinkelmessungen

Die Dokumentation der Präparation der chemisch-mechanisch strukturierten PDMS-Glasdeckel erfolgte mithilfe einer CCD-Kamera sowie mit einem Randwinkelgerät zur Verfolgung des Randwinkels:

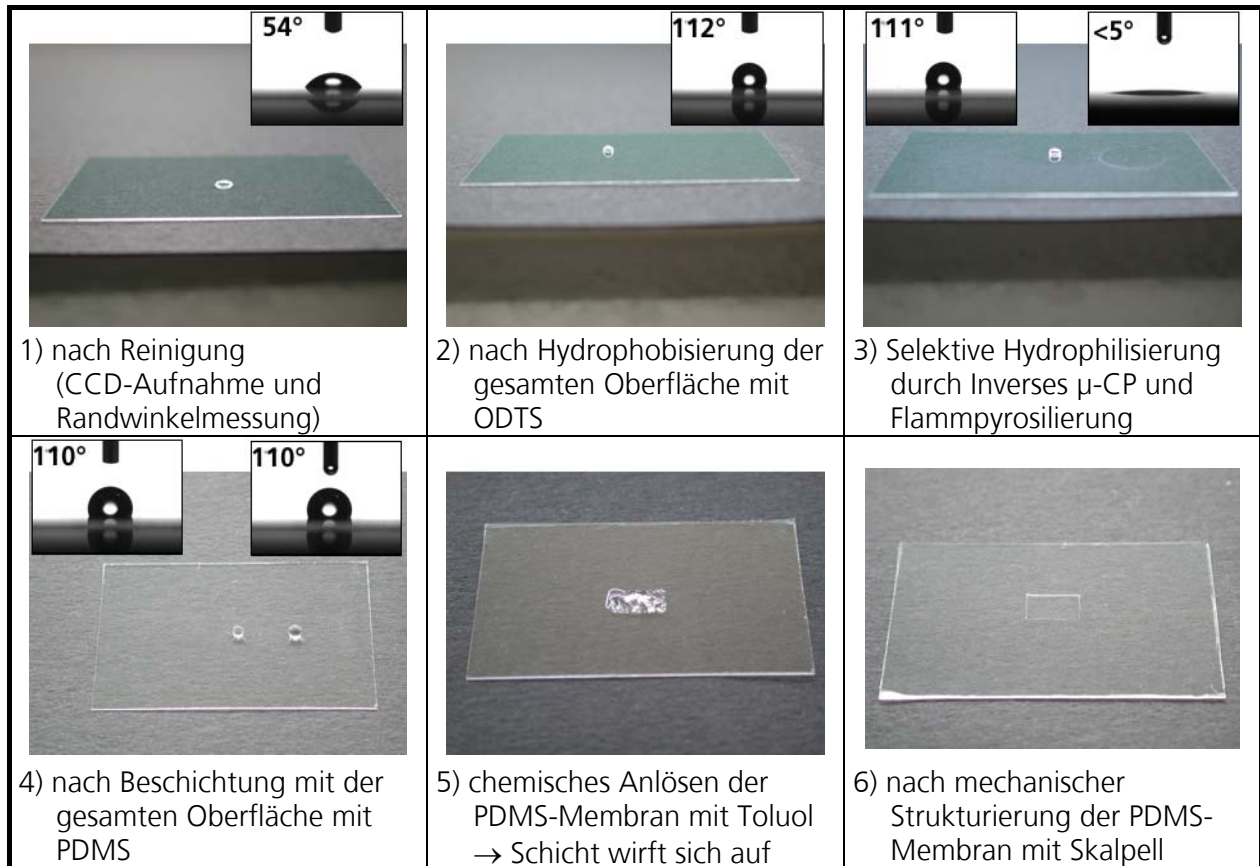


Abb. C4: Prozesskontrolle bei der Präparation der strukturierten PDMS-Glasdeckel mittels Randwinkelmessungen

### Randwinkel:

- nach Reinigung: 53,7°
- nach Hydrophobisierung mit ODS: 112,4°
- nach selektiver Hydrophilisierung durch Inverses  $\mu$ -CP und Flammpyrosilierung
  - hydrophob: 110,6°
  - hydrophil: spreitet (< 5°)
- nach Beschichtung mit der gesamten Oberfläche mit PDMS: 109,7°

**B) AFM-Messungen**

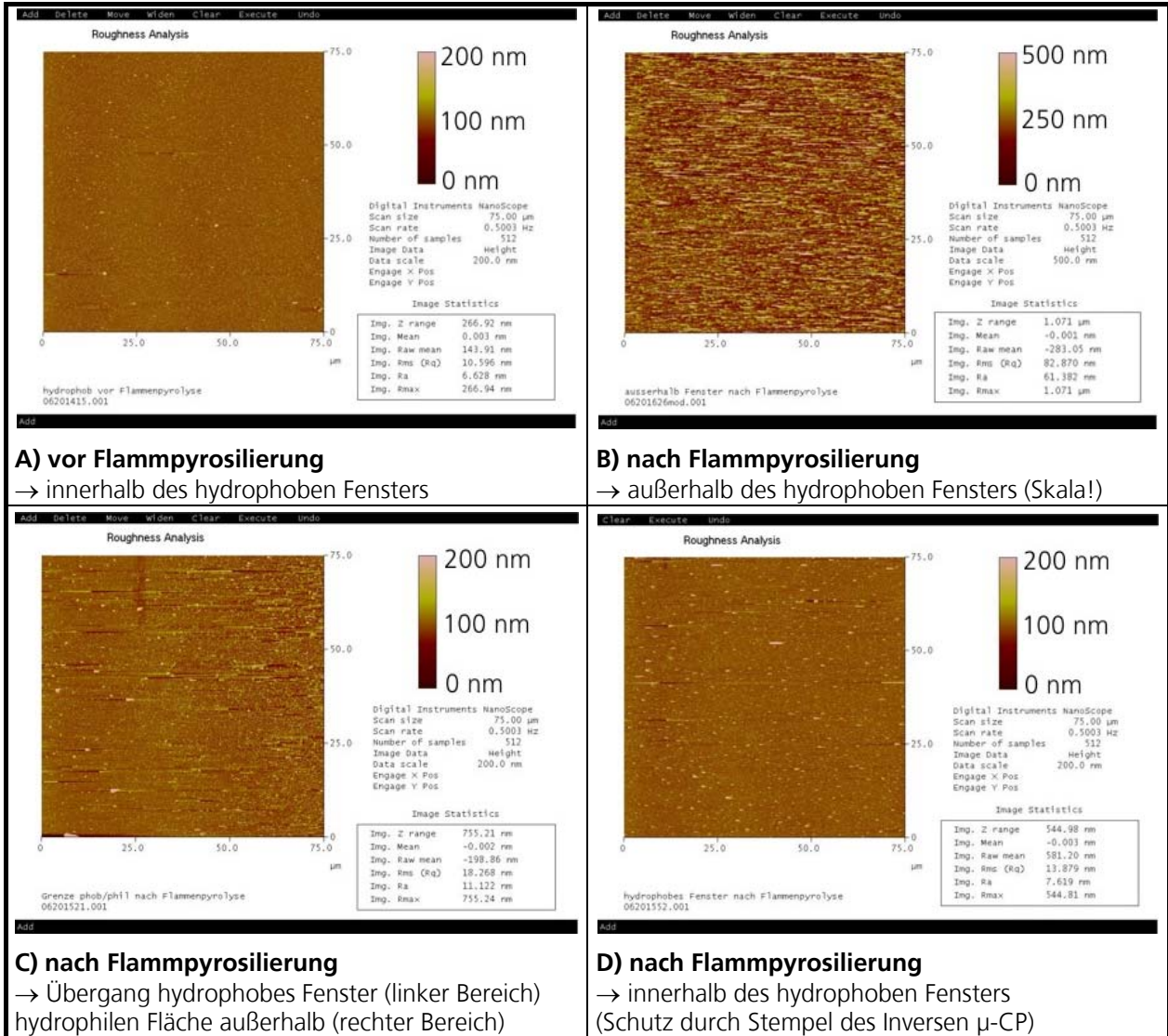


Abb. C5: Prozesskontrolle bei der Präparation der strukturierten PDMS-Glasdeckel mittels AFM

**C) Deckelung des Chipreaktors – Fortschreiten der selbstständigen Adhäsion**

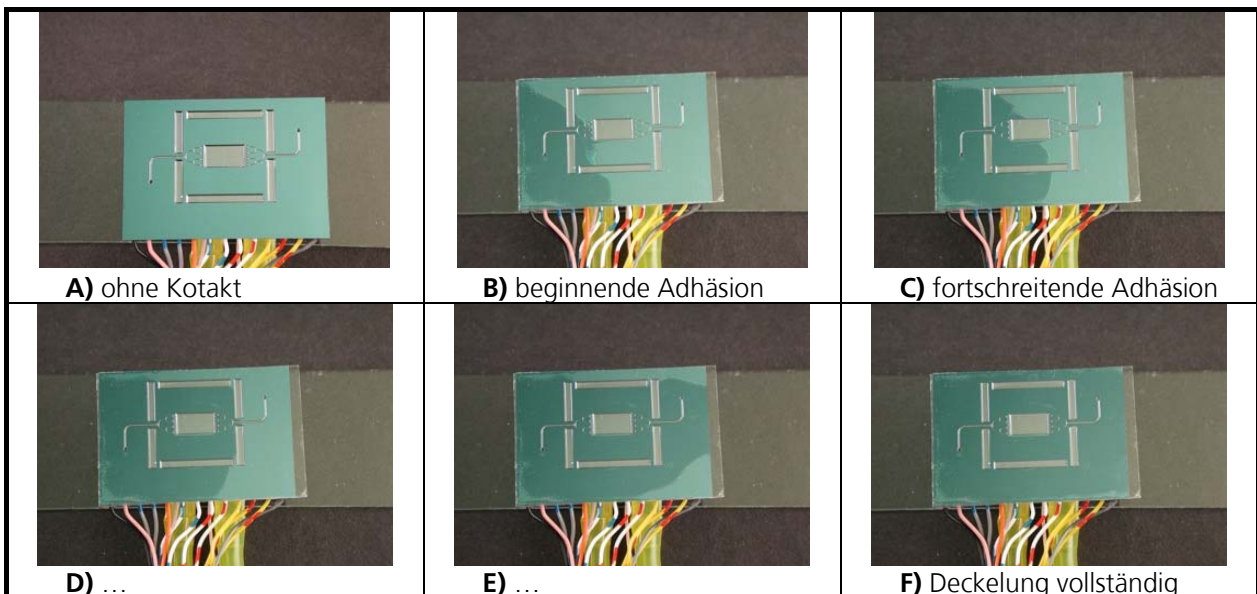


Abb. C6: Deckelung des Chipreaktors mit strukturiertem PDMS-Glasdeckel

## Anhang D1a Ableitung der analytischen Modelle – Fluidik

HAGEN-POISEUILLE aus NAVIER-STOKES-Gleichungen (Strömungsprofil in z-Richtung)

### A) Navier-Stokes-Gleichungen für inkompressible Medien:

$$\frac{\partial \vec{w}}{\partial t} = -\frac{1}{\rho} \cdot \text{grad}(p) + \frac{\mu}{\rho} \cdot \text{div}(\text{grad} \vec{w}) + \vec{f} \quad (\rightarrow 1 \text{ Gleichung je Raumrichtung}) \quad (1)$$

### B) Stationäre ausgebildete laminare Strömung im seitlich nicht-begrenzten ebenen Spalt:

Annahmen: 1) laminar:  $\vec{w} = (w_x, w_y, w_z) = (u, v, w)$

2) ausgebildete Strömung:  $-\infty < x < \infty$

$$\Rightarrow \frac{\partial \vec{w}_x}{\partial x} = 0$$

3) seitlich nicht-begrenzter Spalt:  $-\infty < y < \infty$

$$\Rightarrow \frac{\partial \vec{w}_y}{\partial y} = 0$$

4) ebener Spalt:  $-Z/2 \leq z \leq Z/2$

$$\Rightarrow \frac{\partial \vec{w}}{\partial y} = \frac{\partial \vec{w}}{\partial z} = 0 \quad \Leftrightarrow \quad v = w = 0;$$

$$\Rightarrow \vec{w} = u \quad \Rightarrow \quad u = u(z)$$

5) stationär:  $\frac{\partial \vec{w}}{\partial t} = 0$

6) inkompressibles Fluid:  $\rho = \text{const.}$  (siehe A))

$$\text{x-Richtung:} \quad \frac{\partial p}{\partial x} = \mu \cdot \frac{\partial^2 u}{\partial z^2} \quad (2)$$

$$\text{y, z-Richtung:} \quad -\frac{1}{\rho} \frac{\partial p}{\partial y} = -\frac{1}{\rho} \frac{\partial p}{\partial z} = 0 \quad \Rightarrow \quad p = p(x); \quad (3)$$

$$(3) \text{ in } (2): \quad \Leftrightarrow \quad \frac{1}{\mu} \frac{dp}{dx} = \frac{d^2 u(z)}{dz^2}$$

$$\Rightarrow \quad u(z) = -\frac{1}{\mu} \cdot \frac{dp}{dx} \cdot \frac{(Z/2)^2}{2} \cdot \left(1 - \frac{z^2}{(Z/2)^2}\right) \quad (\text{HAGEN-POISEUILLE})$$

$$\Leftrightarrow \quad u(z) = u_{\max} \cdot \left(1 - \frac{z^2}{(Z/2)^2}\right), \quad \text{mit } u_{\max} = -\frac{1}{\mu} \cdot \frac{dp}{dx} \cdot \frac{(Z/2)^2}{2}; \quad (4)$$

## Anhang D1b Ableitung der analytischen Modelle – Fluidik

Geschwindigkeitsprofil - Abschätzung Abweichung Modell,  
Simulation und Experiment vom erwarteten Volumenstrom

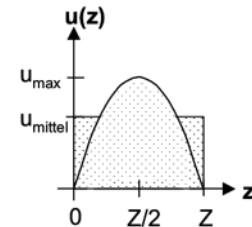
### A) Theoretische Modelle

#### z-Richtung:

#### laminare Rohrströmung (HAGEN-POISEUILLE-Gleichung)

Annahme: laminares Regime, also  $Re < 2300$

$$u(z) = u_{\max} \cdot \left[ 1 - \left( \frac{z}{Z/2} \right)^2 \right], \quad \forall z;$$



#### y-Richtung:

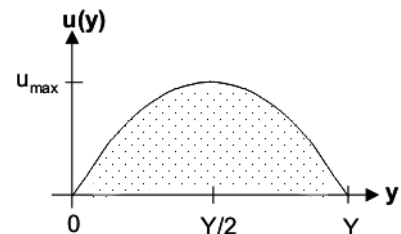
#### Modell I) laminare Strömung durch nicht-runden Körper

##### (HAGEN-POISEUILLE)

Annahme: - y-Profil nach HAGEN-POISEUILLE

-  $u_{\max, y} \equiv u_{\max, z}$  im Zentrum der Reaktionskammer

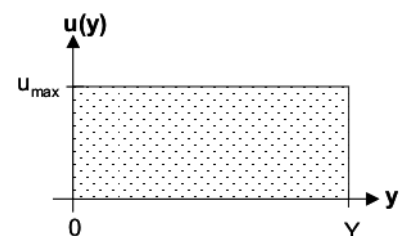
$$u(y) = u_{\max} \cdot \left[ 1 - \left( \frac{y}{Y/2} \right)^2 \right], \quad \forall y;$$



#### Modell II) unendlicher ebener Spalt $Y \gg Z$

Annahme: y-Profil sei unabhängig vom z-Profil

$$u(y) = u_{\max}, \quad \forall y;$$



#### Modell III) seitlich begrenzter ebener Spalt

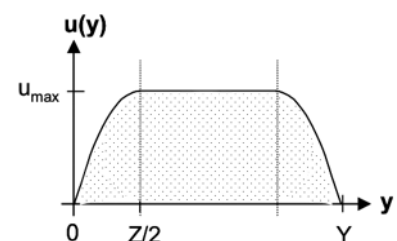
##### (HAGEN-POISEUILLE, modifiziert mit abschnittsweise definierter Funktion)

Annahme: y-Profil sei abhängig vom z-Profil

$$u(y) = u_{\max} \cdot \left[ 1 - \left( \frac{y}{Z/2} \right)^2 \right], \quad \forall 0 < y \leq Z/2;$$

$$u(y) = u_{\max}, \quad \forall Z/2 < y \leq (Y - Z/2);$$

$$u(y) = u_{\max} \cdot \left[ 1 - \left( \frac{y - (Y - Z/2)}{Z/2} \right)^2 \right], \quad \forall (Y - Z/2) < y \leq Y;$$



Für wässrige Lösungen gilt für experimentell relevante integrale Flussgeschwindigkeiten  $u < 250$   $\mu\text{m/s}$  in der Reaktionskammer:  $Re < 1 \Rightarrow$  **laminares Regime**

**B) Bestimmung des integrales Volumenstroms (volumetrische Flussrate) Q**

→ numerische Faltung der Geschwindigkeitsprofile in z- und y-Richtung  $I(z) \circ I(y)$

$$\mathbf{z\text{-Richtung:}} \quad I(z) = 2 \cdot \int_z^{Z/2} u(z) \cdot dz ;$$

$$\text{Es gilt:} \quad I(z) \equiv I(\bar{u}) = \bar{u} \cdot Z$$

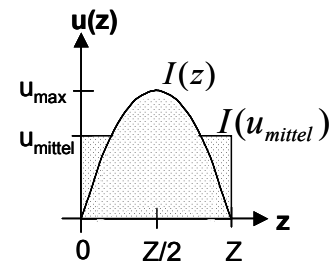
$$\Rightarrow \bar{u} = U_{\text{mittel}} = C_z \cdot u_{\text{max}}, \text{ mit } C_z = \frac{2}{Z} \cdot \int_z^{Z/2} \left[ 1 - \left( \frac{z}{Z/2} \right)^2 \right] \cdot dz ;$$

für die HAGEN-POISEUILLE-Strömung gilt:  $C_z = 2/3$

$$\mathbf{y\text{-Richtung:}} \quad I(y) = \int_y^y u(y) \cdot dy ;$$

⇒ **Volumetrische Flussrate:**

$$Q = C_z \cdot Z \cdot I(y) \quad , \text{ mit } [Q] = \text{m}^3/\text{s};$$



Hieraus lassen sich die nach den Modellen theoretisch erwarteten, den experimentellen und den simulierten Abweichungen vom erwarteten Volumenstrom berechnen.



## Anhang D2a Ableitung der analytischen Modelle – Thermik

### Konvektive Verhältnisse und thermische Relaxationszeit - Abschätzung aus Instationärer Wärmebilanz

#### A) Allgemeine Energiebilanz:

Allgemeine Wärmebilanz mit Kontrollraum um Reaktionskammer:

$$\underbrace{\frac{\partial}{\partial t} Q_V}_1 = - \underbrace{\text{div}(Q_V \cdot \vec{w}_t)}_2 - \underbrace{\text{div}(\vec{Q})}_3 + \underbrace{(\dot{Q})_U}_4$$

Hierin sind folgende Terme enthalten:

- 1) volumenbezogene zeitliche Änderung der Wärmeenergie (Speicherung)

Für den stationären Fall gilt:  $\frac{\partial}{\partial t} Q_V = 0$

- 2) zeitlicher Zu-/ Abfluss durch Strömung (konvektiver Stofftransport):  $Q_V = \rho \cdot c_p \cdot T$

- 3) zeitlicher Zu-/ Abfluss durch Leitung (konduktiver Stofftransport):  $\vec{Q} = -\lambda \cdot \text{grad}T$

Diese Wärmestromdichte entspricht dem 1. FOURIERSchen Gesetz.

- 4) Umwandlung bei konstanter innerer Energie U (Quell-/Senkenterm):  $(\dot{Q})_U = \sum_i r_i \cdot (\Delta H_{Ri})$

$$\Rightarrow \frac{\partial(\rho \cdot c_p \cdot T)}{\partial t} = -\text{div}(\rho \cdot c_p \cdot T \cdot \vec{w}) + \text{div}(\lambda \cdot \text{grad}T) + \sum_i r_i (-\Delta \tilde{H}_{Ri}) \quad (1)$$

#### B) Instationärer Fall mit vernachlässigbarer Konvektion und konstanter innerer Energie:

Annahmen: 1) freie und erzwungene Konvektion vernachlässigbar

2) eindimensionaler Fall, Wärmeleitung nur in z-Richtung

3) konstante innere Energie (keine chemische Reaktion), also  $\sum_i r_i (-\Delta \tilde{H}_{Ri}) = 0$

$$\Rightarrow \frac{\partial(\rho \cdot c_p \cdot T)}{\partial t} = -\lambda \cdot \frac{\partial^2 T}{\partial z^2}$$

$$\Leftrightarrow \frac{\partial T}{\partial t} - \kappa \cdot \frac{\partial^2 T}{\partial z^2} = 0 \quad \text{mit } \kappa = \frac{\lambda}{\rho \cdot c_p} \text{ (Temperaturleitfähigkeit), } [\kappa] = \text{m}^2/\text{s} \quad (2)$$

**C) Thermische Relaxationszeit – Zeit zum Erreichen des thermischen Gleichgewichts:**

Nach Sommerfeld lässt sich eine charakteristische Relaxationszeit angeben, welche mit (2) einer thermische Relaxationszeit  $\tau_{\text{therm}}$  entspricht: (Sommerfeld 1954, Klupsch 2003)

$$\tau_{\text{therm}} = \frac{Z_0^2}{\kappa} \quad \text{mit } [\tau_{\text{therm}}] = \text{s} \quad (3)$$

Zahlenbeispiel: Batch-Mikroreaktor

| Stoff- und Geometriedaten                   |                       | Wasser<br>(Reaktionskammer) | p-Silizium<br>(Kammerboden) |
|---|-----------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Charakteristische Länge (Höhe) $Z_0$        | m                     | $0,4 \cdot 10^{-3}$         | $0,1 \cdot 10^{-3}$         |
| Temperaturleitfähigkeit $\kappa$            | $\text{m}^2/\text{s}$ | $1,4 \cdot 10^{-7}$         | $9,6 \cdot 10^{-5}$         |
| thermische Relaxation $\tau_{\text{Relax}}$ | s                     | 1,1                         | $1,0 \cdot 10^{-4}$         |

**D1) Verifikation der Annahmen B.1) und 2) (Konvektion und Eindimensionalität)****a) Batch-Mikroreaktor**

Bedingung: (Freie) Konvektion vernachlässigbar

Laminare freien Konvektion aufgrund thermischer Dichtegradienten in geschlossenen Flüssigkeitsschichten setzt ein, falls 1. kritische RAYLEIGH-Zahl  $1708 < Ra_{\text{krit}} < 2,2 \cdot 10^4$  mit:

$$Ra = Gr \cdot Pr = \frac{L^3 \cdot g \cdot \beta \cdot \Delta T}{\nu^2} \cdot \frac{\nu}{\kappa}, \quad \text{mit GRASHOF-Zahl (Gr) und PRANDTL-Zahl (Pr)}$$

Zur Vernachlässigung der freien Konvektion muss also gelten:  $Ra_{\text{krit}} < 1708$

Zahlenbeispiel: Batch-Mikroreaktor (Lide 1998)

| Stoff- und Geometriedaten                          |                       | Wasser              |
|--|-----------------------|---------------------|
| Charakteristische Länge (Spalthöhe) L              | m                     | $0,4 \cdot 10^{-3}$ |
| Erdbeschleunigung g                                | $\text{m}/\text{s}^2$ | 9,81                |
| Thermischer Ausdehnungskoeffizient $\beta$ (298 K) | 1/K                   | $2,5 \cdot 10^{-4}$ |
| Temperaturdifferenz $\Delta T$ (maximal)           | K                     | 2                   |
| Kinematische Viskosität $\nu$                      | $\text{m}^2/\text{s}$ | $5,7 \cdot 10^{-7}$ |
| Temperaturleitfähigkeit $\kappa$                   | $\text{m}^2/\text{s}$ | $1,4 \cdot 10^{-7}$ |

Die Spalthöhe L ist im vorliegenden Fall identisch mit der Höhe  $Z_0$  der Reaktionskammer.

Daraus ergibt sich:  $Gr = 1,0$        $Pr = 4,1$

$\Rightarrow Ra_{\text{krit}} \approx 4 \ll 1708$

Damit ist die getroffene Annahme gerechtfertigt.

**b) Fluss-Mikroreaktor (Lide 1998)**

Bedingung: thermische Relaxation  $\tau_{\text{therm}}$  (des Fluids innerhalb der Reaktionskammer) ist klein gegenüber der konvektionsbedingten Verweilzeit  $\tau_{\text{Verweil}}$  eines fiktiven Teilchens in einem Streckenelement  $\Delta x$ , also muss gelten:  $\tau_{\text{therm}} / \tau_{\text{Verweil}} \ll 1$       mit  $\tau_{\text{Verweil}} = x/w_x$

Konvektion besitzt nur die erzwungene Komponente (s. D1.a)

Zahlenbeispiel: Fluss-Mikroreaktor

| Stoffdaten                             |                   | Wasser                  |
|--|-------------------|-------------------------|
| Wärmeleitfähigkeit $\lambda$           | W/(m K)           | 0,6                     |
| Dichte $\rho$                          | kg/m <sup>3</sup> | 1,0 · 10 <sup>3</sup>   |
| spez. Wärmekapazität $c_p$             | J/(kg K)          | 4,2 · 10 <sup>3</sup>   |
| Geometriedaten                         |                   | Reaktionskammer         |
| Höhe $z_0$                             | m                 | 0,44 · 10 <sup>-3</sup> |
| Länge $x$                              | m                 | 8,0 · 10 <sup>-3</sup>  |
| Geschwindigkeit der Bulkströmung $w_x$ | m/s               | 0,25 · 10 <sup>-3</sup> |

Daraus ergibt sich eine thermische Relaxationszeit  $\tau_{\text{therm}} = 1,4$  s und eine Verweilzeit  $\tau_{\text{Verweil}} = 32,0$  s.

$$\Rightarrow \tau_{\text{therm}} / \tau_{\text{Verweil}} \approx 0,04 \ll 1$$

## D2) Verifikation der Annahmen B.3) (konstante innere Energie)

Da außer der Kristallisation keine anderen für die Energiebilanz relevanten chemischen Reaktionen stattfinden, wurde  $(\dot{Q})_U = \dot{Q}_{V,\text{cryst}}$  gesetzt. Die bei der Kristallisation biologischer Makromoleküle freigesetzte volumenbezogene Wärme  $\dot{Q}_{V,\text{cryst}}$  bewirkt eine thermodynamisch maximal mögliche Temperaturerhöhung, welche für das Modellprotein Hen Egg-White Lysozyme (HEWL) mit einer mittleren Sättigungskonzentration von  $c_{\text{HEWL}} = 25$  kg/m<sup>3</sup> abgeschätzt wurde zu  $\Delta T \approx -0,025$  K. (Anhang D2c) Da die Biokristallisation eine relativ langsame Kinetik aufweist (volumenbezogene Wachstumsrate  $k_{\text{cryst}} \approx 10^{-6}$  µl/h) und somit nur sehr wenig Wärme pro Zeiteinheit freigesetzt wird, wurde der Quell-/Senkenterm  $(\dot{Q})_U$  in der weiteren Betrachtung vernachlässigt.

Aus den Betrachtungen unter D) folgt, dass sämtliche Annahmen unter B) gerechtfertigt sind.

## Anhang D2b Ableitung der analytischen Modelle – Thermik

### Vertikales 1D-Temperaturprofils - Abschätzung aus Stationärer Wärmebilanz

#### A) Allgemeine Energiebilanz:

$$\frac{\partial Q_V}{\partial t} = -\text{div}(Q_V \cdot \vec{w}) - \text{div}(\lambda \cdot \text{grad}T) + \sum_i r_i(-\Delta \tilde{H}_{R_i}) \quad \text{mit } Q_V = \rho \cdot c_p \cdot T$$

$$\Leftrightarrow \frac{\partial(\rho \cdot c_p \cdot T)}{\partial t} = -\text{div}(\rho \cdot c_p \cdot T \cdot \vec{w}) + \text{div}(\lambda \cdot \text{grad}T) + \sum_i r_i(-\Delta \tilde{H}_{R_i}) \quad (1)$$

#### B) Stationäre eindimensionale Energiebilanz für die volumenbezogene Wärmemenge $Q_V$ im integralen Ansatz:

- Annahmen:
- 1) Konvektion in der Reaktionskammer zu vernachlässigen, da  $\tau_{\text{therm}} / \tau_{\text{Verweil}} \ll 1$
  - 2) Strahlung zu vernachlässigen, da Betrachtungen bei Raumtemperatur
  - 3) stationärer Fall, da keine zeitliche Änderung
  - 4) konstante innere Energie, da keine stoffliche Umsetzung
  - 5) eindimensionaler Fall, da  $\kappa_{\text{Wasser}} / \kappa_{\text{Si}} \ll 1$  und  $\tau_{\text{therm}} / \tau_{\text{Verweil}} \ll 1$  (Wasser)
  - 6) linearer Temperaturgradient wegen der kleinen Längendimensionen  $z < 10^{-3}$  m

$$\dot{Q}_V = -\lambda \cdot A \cdot \frac{\partial T}{\partial z} \quad (\text{FOURIERSches Grundgesetz der Wärmeleitung}) \quad (2)$$

$$\Rightarrow T_3 = T_1 - \left[ \frac{k_{12}}{k_{13}} \cdot (T_1 - T_2) \right], \quad \text{mit } k_{ij} = \left( \sum_i^j \frac{1}{k_i} \right)^{-1} = \left( \sum_i^j \frac{1}{\alpha_i} + \sum_i^j \frac{z_i}{\lambda_i} \right)^{-1} \quad (3)$$

#### C) Verifikation der Annahmen B

Die getroffenen Annahmen sind gemäß der Abschätzung der konvektiven Verhältnisse und der thermischen Relaxation gerechtfertigt (s. Anhang D2a)

#### D) Abschätzung der Sensitivität der thermischen Widerstände der Komponenten

- Annahmen:
- 1) siehe B)
  - 2) Konvektion zur Umgebung

$$\dot{Q}_L = \frac{\lambda}{z} \cdot A \cdot (T_{\text{unten}} - T_{\text{oben}}) \quad (\text{Wärmeleitung im Glasdeckel}) \quad (4)$$

$$\dot{Q}_K = \alpha_{G \rightarrow L} \cdot A \cdot (T_{\text{oben}} - T_{\text{Umgebung}}) \quad (\text{Konvektion von Oberfläche Glas} \rightarrow \text{Luft}) \quad (5)$$

aus (4) und (5) mit  $\dot{Q}_L = \dot{Q}_K$ :

$$\Rightarrow T_{\text{oben}} = \frac{Bi}{1 + Bi} \cdot T_{\text{Umgebung}} + \frac{1}{1 + Bi} \cdot T_{\text{unten}}, \quad \text{mit } Bi = \frac{\alpha_{G \rightarrow L} \cdot z}{\lambda} \quad (\text{BIOT-Zahl})$$

Zahlenbeispiel: Glasdeckel der Mikroreaktoren (Lide 1998, Schlünder 1995)

| Stoff- und Geometriedaten                            |                      | Glas                 |
|--|----------------------|----------------------|
| Charakteristische Länge $z$                          | m                    | $0,15 \cdot 10^{-3}$ |
| Wärmeübergangskoeffizient $\alpha_{G \rightarrow L}$ | W/(m <sup>2</sup> K) | 10                   |
| Wärmeleitfähigkeit (Glas) $\lambda$                  | W/(m K)              | 1                    |
| BIOT -Zahl Bi  | -                    | $1,5 \cdot 10^{-3}$  |

und

| Thermische Randbedingungen |                       |   |     |
|----------------------------|-----------------------|---|-----|
| Temperatur T               | $T_{\text{unten}}$    | K | 308 |
|                            | $T_{\text{Umgebung}}$ | K | 295 |

Daraus ergibt sich eine Temperatur der Glasdeckel-Oberfläche  $T_{\text{oben}} = 305 \text{ K}$

$$\Rightarrow \tau_{\text{therm}} / \tau_{\text{Verweil}} \approx 0,04 \ll 1$$

| Stoff- und Geometriedaten | Wärmeleitfähigkeit $\lambda$<br>W/(m K) | Charakteristische Länge $z$<br>m | Wärmeübergangskoeffizient $\alpha$<br>W/(m <sup>2</sup> K) | Thermischer Widerstand $R_{\text{th}}$<br>1/(W/(m <sup>2</sup> K)) |
|---------------------------|---|----------------------------------|--|--|
| Wärmeleitfilm             | 3                                       | $0,13 \cdot 10^{-3}$             | $2,3 \cdot 10^4$   | $4,3 \cdot 10^{-5}$  |
| Si-Boden                  | 150                                     | $0,06 \cdot 10^{-3}$             | $2,5 \cdot 10^5$   | $4,0 \cdot 10^{-6}$  |
| Lösung in Reaktionskammer | 1                                       | $0,44 \cdot 10^{-3}$             | $1,4 \cdot 10^3$   | $7,1 \cdot 10^{-4}$  |
| Deckglas                  | 0,6                                     | $0,15 \cdot 10^{-3}$             | $6,7 \cdot 10^3$   | $1,5 \cdot 10^{-4}$  |
| Glas zur Umgebung         | -                                       | -                                | 10   | 0,1  |

Relativer Anteil für verschiedene Wärmeübergangskoeffizienten  $\alpha_{\text{Glas} \rightarrow \text{Umgebung}}$ :

| Stoff- und Geometriedaten | $\alpha = 25 \text{ W/(m}^2 \text{ K)}$ | $\alpha = 10 \text{ W/(m}^2 \text{ K)}$ | $\alpha = 5 \text{ W/(m}^2 \text{ K)}$ | $\alpha = 1 \text{ W/(m}^2 \text{ K)}$ |
|---------------------------|---|---|--|--|
|                           | %                                       | %                                       | %                                      | %                                      |
| Wärmeleitfilm             | 0,1                                     | $4 \cdot 10^{-2}$                       | $2 \cdot 10^{-2}$                      | $4 \cdot 10^{-3}$                      |
| Si-Boden                  | $1 \cdot 10^{-2}$                       | $4 \cdot 10^{-3}$                       | $2 \cdot 10^{-3}$                      | $4 \cdot 10^{-4}$                      |
| Lösung in Reaktionskammer | 1,7                                     | 0,7                                     | 0,35                                   | $7 \cdot 10^{-2}$                      |
| Deckglas                  | 0,4                                     | 0,2                                     | 0,07                                   | $1 \cdot 10^{-2}$                      |
| Glas zur Umgebung         | 97,8                                    | 99,1                                    | 99,6                                   | 99,9                                   |

## Anhang D2c Ableitung der analytischen Modelle – Thermik

### Wärmeentwicklung bei der Kristallisation - Abschätzung aus Energiebilanz

#### A) Energiebilanz:

$$\frac{\partial Q_V}{\partial t} = -\text{div}(Q_V \cdot \vec{w}) + \text{div}(\lambda \cdot \text{grad}T) + \sum_i r_i(-\Delta\tilde{H}_{R_i}) \quad \text{mit } Q_V = \rho \cdot c_p \cdot T$$

$$\Leftrightarrow \frac{\partial(\rho \cdot c_p \cdot T)}{\partial t} = -\text{div}(\rho \cdot c_p \cdot T \cdot \vec{w}) + \text{div}(\lambda \cdot \text{grad}T) + \sum_i r_i(-\Delta\tilde{H}_{R_i}) \quad (1)$$

#### B) Stationäre Energiebilanz für die volumenbezogene Wärmemenge $Q_V$ im integralen

##### Ansatz:

- Annahmen: 1) Konvektion vernachlässigbar  
2) stationärer Fall

$$\Rightarrow \dot{Q}_V = \rho \cdot c_p \cdot \Delta T + c_i \cdot \frac{\Delta\tilde{H}_{cryst}^\circ}{\tilde{M}} = 0 \quad (2)$$

Durch algebraische Umstellung der Energiebilanz folgt die Temperaturdifferenz zu:

$$\Rightarrow \Delta T = -\frac{\Delta\tilde{H}_{cryst}^\circ}{\rho \cdot c_p \cdot \tilde{M}} \cdot c_{HEWL} \quad (3)$$

Für das Modellprotein HEWL gelten folgende Stoffdaten: (Klupsch 2003)

|   |                   | HEWL        |
|---|-------------------|-------------|
| molare Masse $\tilde{M}$  | kg/mol            | 14,3        |
| molare Standard-Bildungsenthalpie $\Delta\tilde{H}_{cryst}^\circ$ | J/mol             | 60,0 $10^3$ |
| Dichte $\rho$   | kg/m <sup>3</sup> | 1,0 $10^3$  |
| spezifische Wärmekapazität $c_p \approx c_{p,Wasser}$             | J/(kg K)          | 4,2 $10^3$  |
| mittlere Sättigungskonzentration $c_{HEWL}$                       | kg/m <sup>3</sup> | 25,0        |

Es ergibt sich schließlich eine Temperaturdifferenz von  $\Delta T \approx -0,025$  K.

Diese Temperaturniedrigung ergibt sich bei vollständiger Kristallisation des gesamten Proteins. Die Kristallisation ein relativ langsamer Prozess ist mit Geschwindigkeitskonstanten in der Größenordnung von  $10^{-8}$   $\mu$ /s. Die Temperaturregelung arbeitet mit Zeitkonstanten  $\tau_{Regler}$  im Bereich Millisekunden, die Lösung reagiert mit Relaxationszeiten  $\tau_{therm}$  im Sekundenbereich. (s. Anhang D2a) Damit werden die thermischen Störungen durch die Kristallisationswärme weggeregelt.

Der Einfluss der Kristallisation auf die Temperatur kann somit vernachlässigt werden.

## Anhang E Thermografie - Strahlungsmessungen mit Wärmebildkamera

### A) Transmissionskurven Mikroskopie-Deckgläser

Als Deckel für die Mikroreaktoren kamen Deckgläsern aus reinweißem Glas der hydrolytischen Klasse 1 (Marienfeld GmbH, D) zum Einsatz. Diese sind hergestellt aus 150  $\mu\text{m}$ -Borofloat<sup>®</sup>-Dünnglas D263T (Fa. Schott GmbH, Jena) mit einem Brechungsindex  $n^{20} = 1,515$ . Abbildung E1 zeigt die Transmissionskurven handelsüblicher Dünngläser.

Die Transmissionskurven zeigen, dass die Intensität der transmittierten Strahlung bei geringerer werdender Dicke des Glases deutlich zunimmt, die Position der Wellenlängenmaxima jedoch beibehält. Das Verhalten entspricht dem LAMBERT-BEERSchen Gesetz. Das 150  $\mu\text{m}$ -Dünnglas weist im effektiven Messbereich der Wärmebild-Kamera „ThermaCAM<sup>®</sup> PM 280“ (FLIR Systems GmbH, D) eine Transmissionscharakteristik auf, welche genügend IR-Strahlung transmittieren sollte, um darunter liegende Schichten (z.B. fluidische Elemente) zu analysieren.

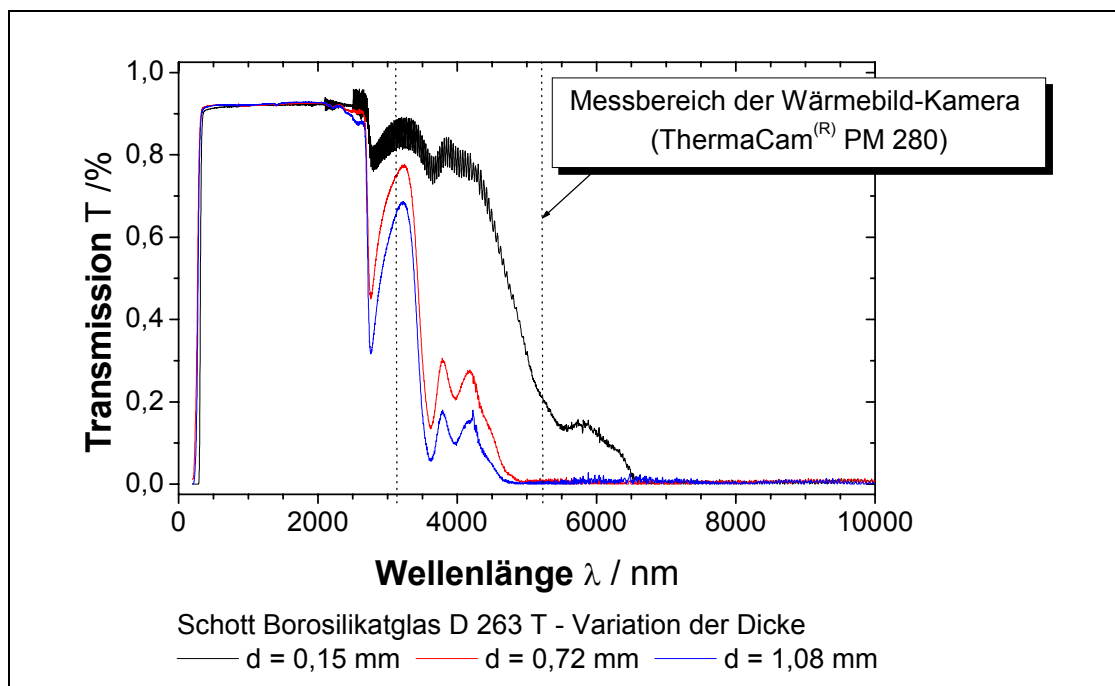


Abb. E1: Transmissionskurven von Borofloat<sup>®</sup>-Dünnglas (Schott Jena<sup>®</sup> Glas GmbH, D) bei verschiedenen Dicken (Schneider 2003)

### B) Wärmebildkamera

Die laterale Temperaturverteilung auf der Oberfläche des Chipreaktors sowie des Fluids wurde mit dem Infrarot-Thermografiesystem „ThermaCAM<sup>®</sup> PM 280“ (FLIR Systems GmbH, D) evaluiert. Wie in Kap. 2.5.1 C) (S. 63ff) beschrieben sind zur Messung mit derartigen Temperaturmesssystemen die Kenntnis des Transmissions- und Emissionsverhaltens des zu thermografierenden Objektes sowie die Messcharakteristik des Kamerasystems nötig.

### **B1) Einfluss der Transmission**

Die Transmission des zur Deckelung der Mikroreaktoren verwendeten Dünnglases ( $d \approx 150 \mu\text{m}$ ) im interessierenden IR-Bereich  $1 < \lambda / \mu\text{m} < 10$  zeigt die aufgeführte Transmissionscharakteristik. (s Abb. E1) Ein zur Charakterisierung herangezogener IR-Detektor misst folglich nicht nur die Strahlung an der Oberfläche des Glases, sondern auch aus tieferen Schichten sowie von der Oberfläche des Fluids. Somit beinhalten die Aufnahmen der Wärmebild-Kamera Informationen, die über Wärmeleitung vom Fluid zur Glasoberfläche transportiert und dort abgestrahlt werden, aber auch direkt durch das Glas transmittiert werden. Eine exakte Quantifizierung der Messwerte der Wärmebild-Kamera ist daher nicht möglich. Allerdings werden die fluidischen Strukturen relativ scharf auf den Detektor abgebildet, mit einer durch den IR-Detektor limitierten Auflösung von etwa  $\Delta x \approx 100 \mu\text{m}$ .

Die Integration eines speziellen optischen Filterelements (LTG-Filter, FLIR Systems GmbH, D), welches speziell für Temperaturmessungen hinter Glassubstraten abgestimmt ist, würde weitere Möglichkeiten eröffnen. Mit diesem Filter wäre laut Hersteller möglich, nach einmaliger Kalibrierung selbst in unmittelbarer Nachbarschaft zur Umgebungstemperatur quantitativ zu messen.

Die Transmission im Wellenlängenbereich  $\lambda > 1 \mu\text{m}$  kann bereits bei Schichtdicken  $d > 10 \mu\text{m}$  und Temperaturen um 300 K vernachlässigt werden. Somit entstammt quasi sämtliche Strahlung der Oberfläche des Fluids. (Kessler 2003) Der Emissionskoeffizient von Glas beträgt hingegen nur  $\varepsilon \approx 0,85$ . Ferner ist aufgrund des LAMBERT-BEERSchen Gesetzes die Transmission mit abnehmender Schichtdicke zu größeren Wellenlängen verschoben. Bei Temperaturen im Bereich von  $T = 273 \dots 323 \text{ K}$  beträgt die Kernwellenlänge der Strahlungsemission gemäß dem WIENSchen Verschiebungssatz etwa  $\lambda_{\text{max}} \approx 10 \mu\text{m}$ . Die PLANCKSche Strahlcharakteristik weist bei diesen Temperaturen einen relativ flachen Verlauf auf, wodurch Wellenlängen zwischen  $3 < \lambda / \mu\text{m} < 15$  zum abgestrahlten Spektrum beitragen. (Simon 1969)

### **B2) Ermittlung der Emissionskoeffizienten**

Mittels eines schwarzen Strahlers mit dem Emissionskoeffizient  $\varepsilon = 1,00$  lässt sich nun der  $\varepsilon$ -Wert des Kalibrierobjektes bestimmen und im Anschluss die Oberfläche des Analyten. Die verwendete Methode ist in der Infrarottechnik unter der Bezeichnung „substitution method“ eingeführt. (Florin 2004, Güttich 2002, Buchgeister 2003) Hierbei wird die Emission des zu messenden Objektes mit derjenigen eines Materials mit bekanntem  $\varepsilon$  verglichen. Das Bandstrahlungsthermometer misst mit voreingestelltem  $\varepsilon$ -Wert die Temperatur des Referenzobjektes (z.B. schwarzes Isolierband,  $\varepsilon = 0,95$ ), welches auf das eigentliche Messobjekt geklebt ist. Dadurch sind die beiden Objekte im thermischen Gleichgewicht und strahlen in etwa in dieselbe Richtung und Entfernung. Zur Strahlungsanalyse des Messobjektes muss nun der  $\varepsilon$ -Wert an der Wärmebild-Kamera solange angepasst werden, bis die zuvor gemessene Temperatur des Referenzobjektes angezeigt wird. Das nun eingestellte  $\varepsilon$  entspricht dem experimentell bestimmten Emissionskoeffizienten des Messobjektes.

Es ergab sich ein Emissionskoeffizient für das schwarze Isolierband  $\varepsilon = 0,95$ , was mit Werten aus der Literatur übereinstimmt. (Simon 1969) Durch Aufkleben des Bandes auf die Oberfläche des Objektes im Bereich der fluidischen Strukturen ermöglichte die Bestimmung des Emissionskoeffizienten zu  $\varepsilon \approx$

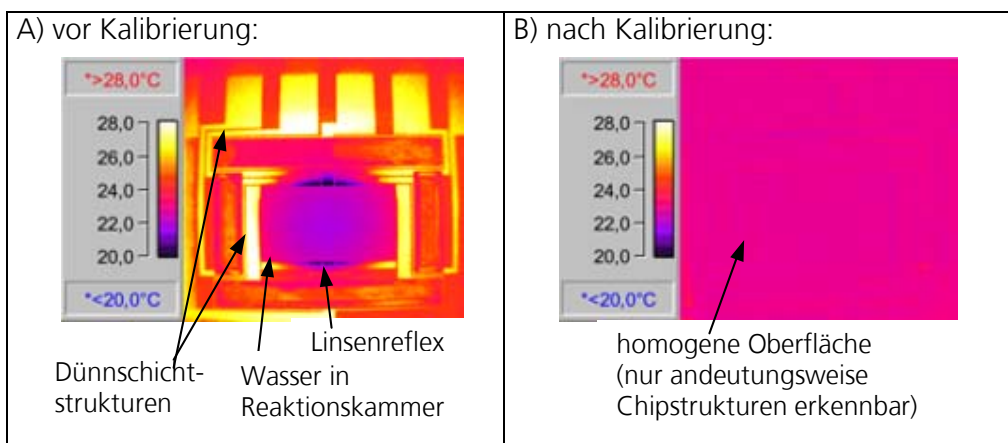


0,88. Hierbei handelt es sich um die Materialkombination Borofloat®-Glas– Wasser. Der Emissionskoeffizient von Wasser alleine ist mit  $\varepsilon > 0,96$  tabelliert. (Simon 1969)

### B3) Kalibrierung des Kamera

Die Abweichung der strahlungstechnisch **gemessenen Temperatur** des Infrarot-Thermografiesystems „ThermaCAM® PM 280“ (FLIR Systems GmbH, D) wurde gegenüber einem Schwarzen Strahler “BCABB4000V2” (Raytek Inc, USA) und einem Handpyrometer „Raynger MX4“ (Raytek Inc., USA) bestimmt. Im Temperaturbereich  $25^{\circ}\text{C} < \vartheta < 60^{\circ}\text{C}$  stimmt die am Thermografiesystem angezeigte Temperatur mit der „wahren“ Temperatur des Schwarzen Strahlers mit  $\Delta T < 0,1 \text{ K}$  überein.

Die Kühlung des Detektorarrays der Wärmebild-Kamera bewirkt eine Erwärmung des Geräts und damit u.U. eine Verfälschung Temperaturmessungen im Bereich um Raumtemperatur. Dies macht sich durch einen **kreisförmigen Reflex** auf den IR-Bildern bemerkbar, der die Messung beeinträchtigt. Dieser Reflex ist abhängig vom Aufnahmewinkel zur Normalen sowie dem Abstand des Objektes vom Gerät: je größer Abstand und Winkel, desto geringer der Einfluss. Dadurch verringert sich allerdings die Genauigkeit und Auflösung der Messung. Für die vorliegenden Messungen wurde ein Abstand Linse – Oberfläche von  $d = 0,45 \text{ cm}$  gewählt, und die Wärmebild-Kamera wurde nicht gekippt. Dies ergab einen kreisförmigen Reflex mit einem Durchmesser von etwa  $d \approx 8 \text{ mm}$ . Bei der Raumtemperatur  $\vartheta_{\text{RT}} = 23,3^{\circ}\text{C}$  wurde die Oberflächentemperatur der Linse der „ThermaCAM® PM 280“ mit dem Handpyrometer zu  $\vartheta_{\text{Linse}} = 30,1^{\circ}\text{C}$  bestimmt,. Bei einem Abstand der Linse zum Objekt kleiner als 10 cm und üblichen Laborbedingungen kann der Einfluss der Temperaturstrahlung der Wärmebild-Kamera auf das zu messende Objekt nicht mehr vernachlässigt werden. Der Effekt wird umso größer, je weiter die Temperatur des Messobjektes unterhalb der  $\vartheta_{\text{Linse}}$  liegt. Die Wärmereflexe auf dem Messobjekt durch die Abstrahlung der Kameralinse können durch eine softwaretechnische Kalibrierung (**Glättungsfunktion**) der „ThermaCAM® PM 280“ eliminiert werden. Das Sensorarray der Wärmebild-Kamera wird damit auf das Emissionsverhalten der zu messenden Oberfläche abgeglichen.



**Abb. E2:** Softwaretechnische Eliminierung von Wärmereflexen mit Glättungsfunktion auf einem zu analysierenden Objekt Chipreaktor (Batch-Mikroreaktor): **A)** vor Kalibrierung; **B)** nach Kalibrierung

Ein homogen temperiertes Objekt mit matter Oberfläche (Schwarzer Strahler oder unpolierte Holzplatte) können als Referenzobjekt für die Kalibrierung der Kamera auf der Oberfläche des Messobjektes dienen. Abbildung E2 zeigt in Teilbild A) IR-Aufnahmen von einem Chipreaktor (Batch-Mikroreaktor) im thermischen Gleichgewicht mit der Umgebung. Es sind deutlich sowohl der Linsenreflex (Mitte) als auch Strukturen des Chipreaktors zu sehen, obwohl sich das Objekt vollständig im thermischen Gleichgewicht mit der Umgebung befindet. Da Silizium in dem effektiven Spektralbereich des Bandstrahlungsthermometers ( $\lambda = 3,1 \dots 5,2 \mu\text{m}$ ) transparent ist, sind die Dünnschichtstrukturen der Chipunterseite zu sehen. (Klocek 1991) Nach Anwendung der Glättungsfunktion sind die Chipstrukturen nicht mehr bzw. nur noch andeutungsweise zu erkennen. Dies wird durch eine unzureichende Fixierung der relativen Position von Objekt und Wärmebildkamera verursacht, kann für qualitative Messungen jedoch vernachlässigt werden. Die Glättungsfunktion eliminiert also sowohl Unterschiede im Emissionsverhalten der verschiedenen Chipmaterialien als auch den Reflex.

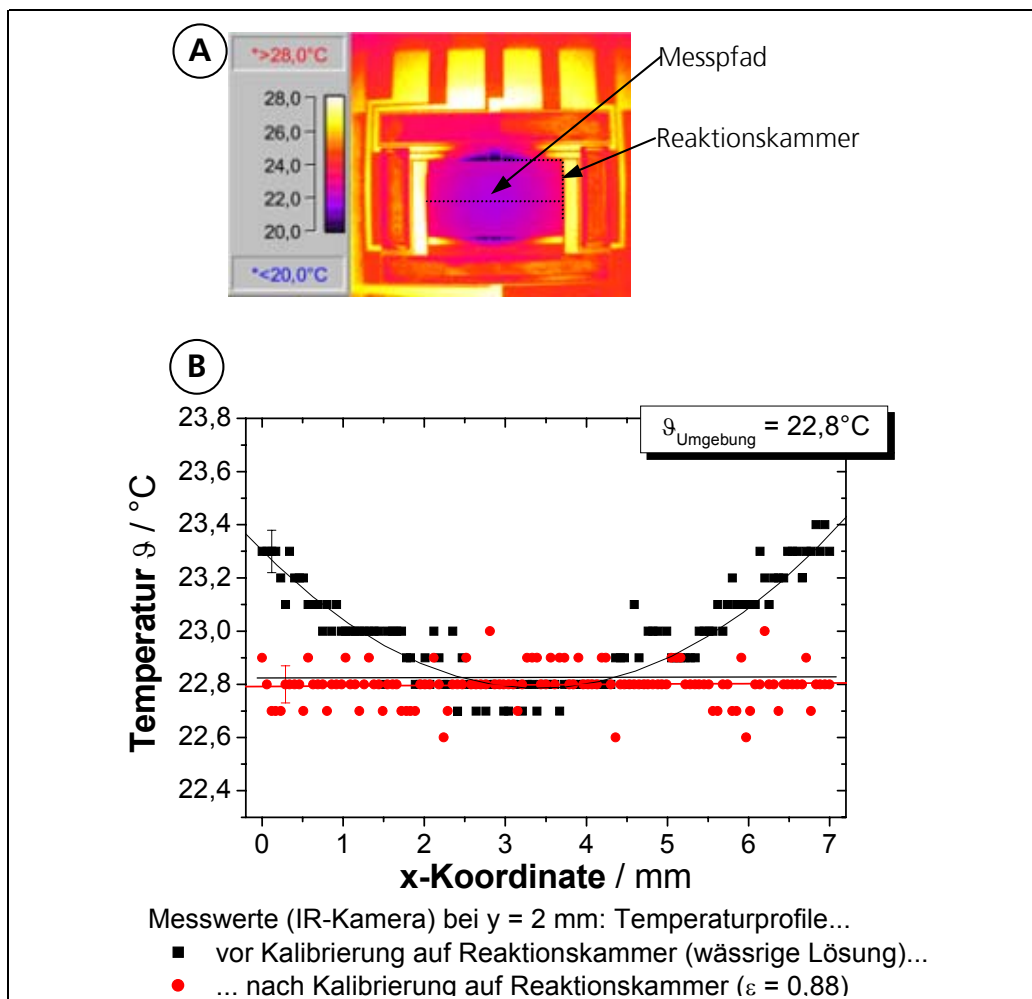


Abb. E3: Temperaturverteilung in der Reaktionskammer vor und nach Kalibrieren einer IR-Kamera:  
**A)** Messpfad innerhalb der Reaktionskammer auf dem Chipreaktor  
**B)** Temperaturverlauf

Abbildung E3 verdeutlicht den scheinbaren Temperaturverlauf in der Reaktionskammer vor dem Kalibrieren, hervorgerufen durch Linsenreflex. Nach dem Kalibrieren ist der Verlauf annähernd linear. Er repräsentiert damit den „wahren“ Temperaturverlauf auf dem Chipreaktor, welcher sich im thermischen Gleichgewicht mit der Umgebung befindet.

### **Fazit**

Der Einsatz Infrarot-Thermografiesystem „ThermaCAM® PM 280“ (FLIR Systems GmbH, D) ist nur nach Kalibrierung des Systems sinnvoll. Hierzu sind sowohl der Emissionskoeffizient des Messobjektes zu bestimmen als auch das Sensorarray der Wärmebild-Kamera auf das Objekt abzugleichen, welches sich im thermischen Gleichgewicht mit der Umgebung befindet. Aufgrund des Einflusses der Linsentemperatur  $\vartheta_{\text{Linse}}$  auf das Messobjekt ist unterhalb der Raumtemperatur als Richtwert eine quantitative Analyse der lateralen Temperaturverteilung beispielsweise auf Chipreaktoren mit der „ThermaCAM® PM 280“ nicht möglich.

# Anhang F Verweilzeitverteilung als Funktion der Flussrate

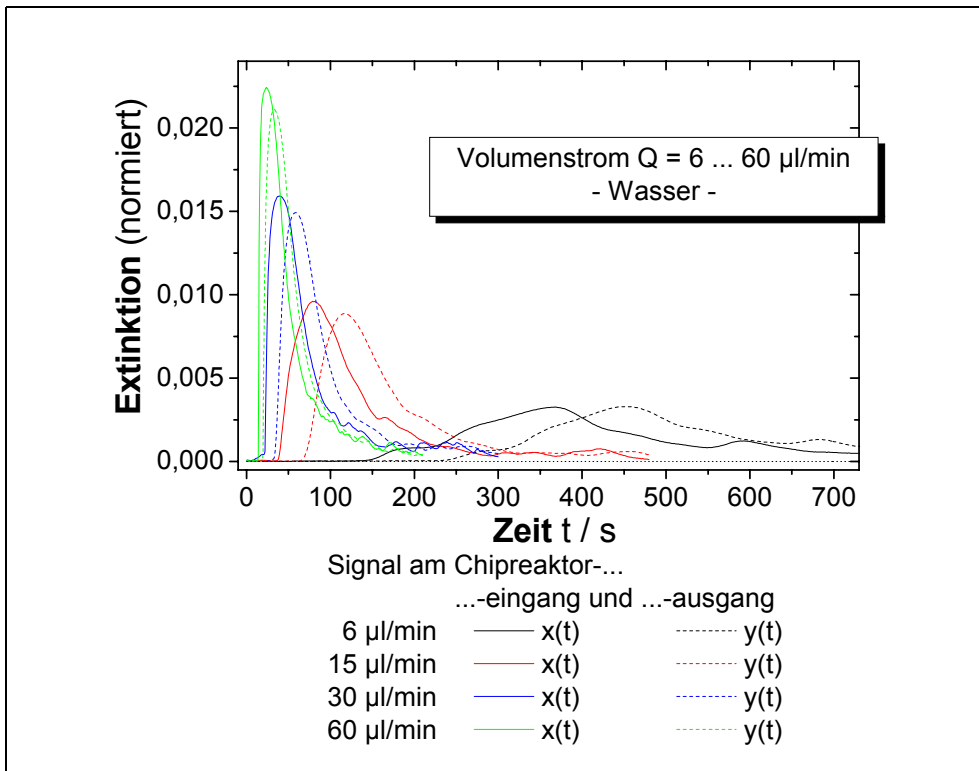


Abb. F1: Qualitative Untersuchung: Vergleich der Verweilzeit-Summenfunktionen als Funktion der Flussrate  $Q = 6 \dots 60 \mu\text{l}/\text{min}$

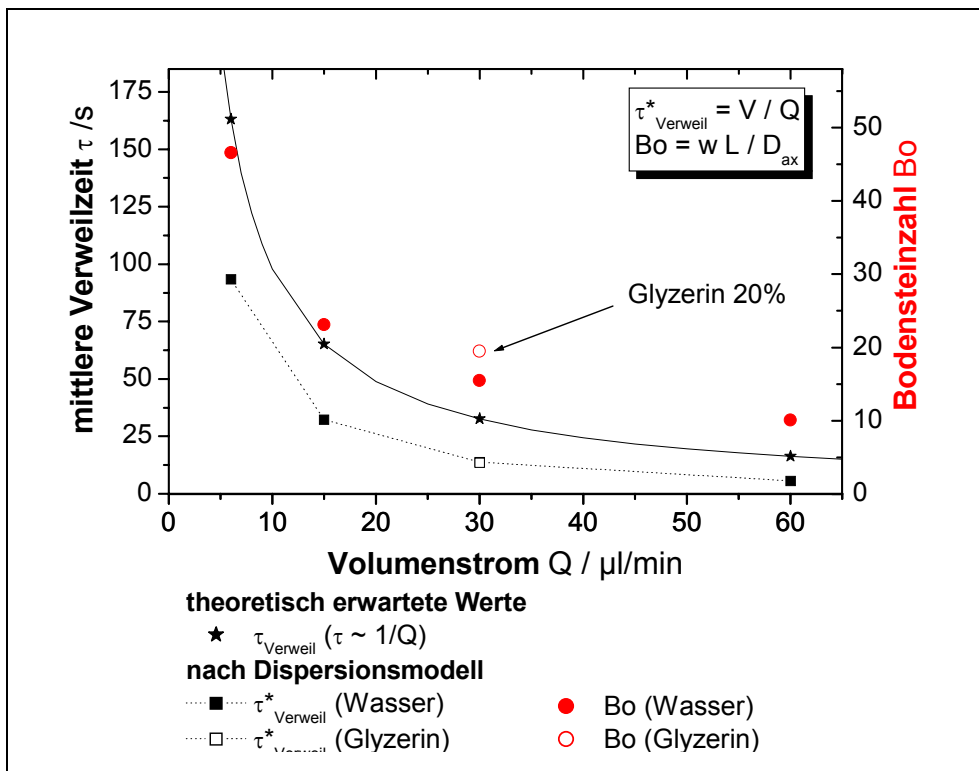


Abb. F2: Quantitative Untersuchung: aus analytischem Modell erwartete und über Dispersionsmodell berechnete mittlere Verweilzeit als Funktion des Volumenstroms

## Anhang G Kristallisationsvorschriften zur Validierung des Batch-Mikroreaktors

### A) Hen egg-White Lysozyme (HEWL)

#### Probenvorbereitung:

Auflösung von Hen egg-White Lysozyme (HEWL) (124 000 units/mg, Fluka, CH, No 62970, lyophilisiert) im geeigneten Puffersystem

#### 1. tetragonal NaCl:

- Auflösung in 5 mM NaAcetat, pH 4,5 (Essigsäure) mit Konzentration 40 mg/ml
- Gelfiltration zur Entfernung von 30% des Salzes im Lyophilisat: PD-10-Säule (Sephadex G-25 M, Pharmacia Biotech, D) – Äquilibrierung in 25 ml Pufferlösung – 2,5 ml Proteinlösung mit 3,5 ml Proteinpuffer eluiert
- Konzentrationsbestimmung nach BRADFORD
- Fällung des Proteins mit 10% NaCl-Lösung ( $t \approx 1\text{ h}$  bei  $\vartheta = 4^\circ\text{C}$ ) – Zentrifugation zum Pellet
- Resuspendieren des Pellets zu Konzentration  $c_0 = 45\text{ mg/ml}$  (Batch-Mikroreaktor) bzw.  $c_0 = 30\text{ mg/ml}$  (Hängender Tropfen)

#### 2. monoklin $\text{NaNO}_3$ : (analog zu 1)

- Auflösung in 5 mM NaAcetat, pH 5 (Essigsäure) mit Konzentration 40 mg/ml
- Gelfiltration zur Entfernung von 30% des Salzes im Lyophilisat: PD-10-Säule (Sephadex G-25 M, Pharmacia Biotech, D) – Äquilibrierung in 25 ml Pufferlösung – 2,5 ml Proteinlösung mit 3,5 ml Proteinpuffer eluiert
- Konzentrationsbestimmung nach BRADFORD
- Fällung des Proteins mit 8%  $\text{NaNO}_3$ -Lösung ( $t \approx 1\text{ h}$  bei  $\vartheta = 4^\circ\text{C}$ ) – Zentrifugation zum Pellet
- Resuspendieren des Pellets zu Konzentration  $c_0 = 20\text{ mg/ml}$  (Batch-Mikroreaktor) bzw.  $c_0 = 10\text{ mg/ml}$  (Hängender Tropfen)

#### 3. orthorhombisch NaCl: (analog zu 1)

- Auflösung in 5 mM CAPS (3-cyclo-Hexamino-1-Propan-Sulfonsäure), pH 9,3 (NaOH) mit Konzentration 40 mg/ml
- Gelfiltration zur Entfernung von 30% des Salzes im Lyophilisat: PD-10-Säule (Sephadex G-25 M, Pharmacia Biotech, D) – Äquilibrierung in 25 ml Pufferlösung – 2,5 ml Proteinlösung mit 3,5 ml Proteinpuffer eluiert
- Konzentrationsbestimmung nach BRADFORD
- Fällung des Proteins mit 25% NaCl-Lösung ( $t \approx 1\text{ h}$  bei  $\vartheta = 4^\circ\text{C}$ ) – Zentrifugation zum Pellet
- erneute Fällung des Proteins mit 4% NaCl-Lösung zur Eliminierung weiteren Salzes - ...
- Resuspendieren des Pellets zu Konzentration  $c_0 = 20\text{ mg/ml}$  (Batch-Mikroreaktor) bzw.  $c_0 = 10\text{ mg/ml}$  (Hängender Tropfen)

Die Lösungen wurden im Verhältnis 1:1 angesetzt gemäß der folgenden Tabelle G1

Tabelle G1: Zusammensetzung der Lösungen HEWL für Protein und Präzipitant

**A)** Hängender Tropfen Dampfdiffusion – **B)** Batch-Mikroreaktor

| Kristall-Morphologie                       | Kristallisations-method                               | Lösung Protein   | Lösung Präzipitant  |
|--|---|--|---|
| <b>tetragonal</b><br><b>NaCl</b>           | „Hängender Tropfen“<br>nach WEISS<br>(Weiss 2000)     | 30 mg/ml HEWL in<br>5 mM NaAcetat<br>pH 4.5 (Essigsäure)       | 50 mM NaAcetat<br>2; 3; 4; 5; 6; 7% (w/v) NaCl<br>pH 4.3; 4.5; 4.7; 4.9 (Essigsäure)              |
|  | Batch-Mikroreaktor                                    | 45 mg/ml HEWL in<br>5 mM NaAcetat<br>pH 4.5 (Essigsäure)       | 50 mM NaAcetat<br>9% (w/v) NaCl<br>pH 4.5 (Essigsäure)  |
| <b>monoklin</b><br><b>NaNO<sub>3</sub></b> | „Hängender Tropfen“<br>nach VANEY<br>(Vaney 2001)     | 10 mg/ml HEWL in<br>5 mM NaAcetat<br>pH 5 (Essigsäure)         | 50 mM NaAcetat<br>2; 3; 4; 5; 6; 7% (w/v) NaNO <sub>3</sub><br>pH 4.6; 4.8; 5.0; 5.2 (Essigsäure) |
|  | Batch-Mikroreaktor                                    | 20 mg/ml HEWL in<br>5 mM NaAcetat<br>pH 5 (Essigsäure)         | 50 mM NaAcetat<br>5% (w/v) NaNO <sub>3</sub><br>pH 5 (Essigsäure)                                 |
| <b>orthorhombisch</b><br><b>NaCl</b>       | „Hängender Tropfen“<br>nach SUKUMAR<br>(Sukumar 1999) | 20 mg/ml HEWL in<br>in 5 mM CAPS <sup>a</sup><br>pH 9.3 (NaOH) | 50 mM CAPS<br>4; 6; 8; 10; 12; 14% (w/v) NaCl<br>pH 9.1; 9.3; 9.5; 9.7 (NaOH)                     |
|  | Batch-Mikroreaktor                                    | 40 mg/ml HEWL in<br>5 mM CAPS<br>pH 9.3 (NaOH)                 | 50 mM CAPS<br>8% (w/v) NaCl<br>pH 9.3 (NaOH)  |

**B) Human Insulin**

Die human Insulin-Derivate wurden bezogen von der Fa. Aventis Pharma Deutschland AG, D über die Arbeitsgruppe Strukturbiologie des Instituts für Molekulare Biotechnologie e.V., Jena (IMB). Die Probenvorbereitung erfolgte analog zu HEWL mithilfe der Angaben in Tabelle G2.

Tabelle G2: Zusammensetzung der Lösungen für Protein und Präzipitant

**A)** human Insulin Glargine® (Hoe930) – **B)** DesThrB30 human Insulin

| Insulin-Derivat                     | Zusammensetzung   |
|-------------------------------------|---|
| human Insulin<br>Glargine® (Hoe930) | Endkonzentration: 5 mg/ml bei pH 6,5<br>Filterporenweite 0,22 µm<br>Pufferlösung: 50 mM Tris-HCl, Na-Citrat, 0,1% Phenol              |
| DesThrB30 human<br>Insulin          | Endkonzentration: 3,8 mg/ml bei pH 8,4<br>Filterporenweite 0,22 µm<br>Pufferlösung: 50 mM Tris-HCl, 0,3 M Ammoniumsulfat, 0,1% Phenol |

## Anhang H verwendete Chemikalien

Tabelle H1: Allgemeine Chemikalien

| Chemikalien  | Summenformel                           | Vertrieb                 |
|--|--|--------------------------|
| 3-cyclo-Hexamino-1-Propan-Sulfonsäure (CAPS)                   | $C_6H_{15}NH(CH_2)_2SO_3H$             | Fluka, CH                |
| Acetatpuffer (Essigsäure Natrium-) pH 4,6                      | NaCOOH                                 | Fluka, CH                |
| Diammonium-Cer-Nitrat  | $(NH_4)_2Ce(NO_3)_6$                   | Sigma-Aldrich, D         |
| Essigsäure   | $CH_3COOH$                             | Sigma-Aldrich, D         |
| Ethanol  | $C_2H_5OH$                             | Roth, D                  |
| Ethylen-Diamin-tetraacetat (EDTA)                              | $(HO_2CCH_2)_2NCH_2CH_2N(CH_2CO_2H)_2$ | Sigma-Aldrich, D         |
| Flammpyrosil, FB07   | k.A. $(SiO_2)_n$                       | SurA Instruments, D      |
| Flusssäure   | HF                                     | Sigma-Aldrich, D         |
| Hexamethyl-Disilazan (HMDS), purum                             | $C_6H_{19}NSi$                         | Sigma-Aldrich, D         |
| Hexan (n-Hexan)  | $C_7H_{16}$                            | Roth, D                  |
| Histoclear   | k.A.                                   | Shandon, Life Science, D |
| Methanol   | $CH_3OH$                               | Roth, D                  |
| Natriumchlorid   | NaCl                                   | Roth, D                  |
| Natrium-dodecyl-sulfat (SDS)                                   | $NaCH_3(CH_2)_{11}SO_4$                | Sigma-Aldrich, D         |
| Natriumhydroxid, Natronlauge                                   | NaOH                                   | Roth, D                  |
| Natriumnitrat  | $NaNO_3$                               | Roth, D                  |
| n-Octadecyl-trichlorosilan (ODTS)                              | $C_{18}H_{37}Cl_3Si$                   | ABCR, D                  |
| Paraffinöl (for IR-spectroscopy)                               | -                                      | Sigma-Aldrich, D         |
| Perchlorsäure  | $HClO_4$                               | Sigma-Aldrich, D         |
| Peroxomonoschwefelsäure  | $HO_3S-OOH$                            | Sigma-Aldrich, D         |
| Phosphorsäure  | $H_3PO_4$                              | Sigma-Aldrich, D         |
| Polydimethylsiloxan (PDMS), Sylgard 184                        | $(SiO(CH_3)_2)_n$                      | Dow Corning, D           |
| Salpetersäure  | $HNO_3$                                | Roth, D                  |
| Salzsäure  | HCl                                    | Roth, D                  |
| Schwefelsäure  | $H_2SO_4$                              | Roth, D                  |
| Tetramethyl-Ammoniumhydroxid (TMAH)                            | $C_4H_{13}ON$                          | VWR Int., D              |
| Toluol   | $C_7H_{18}O$                           | Roth, D                  |
| TRIS-HCl   | $C_4H_{11}NO_3$                        | Roth, D                  |
| Wasser, AFM-grade  | $H_2O$                                 | Sigma-Aldrich, D         |
| Wasserstoffperoxid   | $H_2O_2$                               | Roth, D                  |
| Xylol  | $C_6H_5(CH_3)_2$                       | Roth, D                  |
| Hen Egg-White Lysozyme (HEWL)                                  |  | Fluka, CH                |
| Human Insulin DesThrB30  |  | Aventis Pharma, D        |
| Human Insulin Glargine®  |  | Aventis Pharma, D        |
| recombinant Green Fluorescent Protein (rGFP) aus <i>E.coli</i> |  | Roche Pharma, D          |

Tabelle H2: Chemikalien zur Modifikation der Siliziumoberflächen - Auswahl

| Chemikalien  | Summenformel         | Vertrieb            | Randwinkel $\Theta$<br>( $H_2O$ , bidest.) |
|--|----------------------|---------------------|--|
| Hexamethyldisilazan (HMDS)   | $C_6H_{19}NSi$       | Sigma-Aldrich, D    | > 110°                                     |
| n-Octadecyl-trichlorosilan (ODTS)  | $C_{18}H_{37}Cl_3Si$ | ABCR, D             | > 90°                                      |
| Peroxomonoschwefelsäure, frisch<br>("Piranha"); ( $H_2SO_4:H_2O_2 = 4:1$ ) | $HO_3S-OOH$          | Sigma-Aldrich, D    | < 7° (spreitet)                            |
| Silan-Gas-Gemisch (Flammpyrosil<br>FB07)                                   | $(SiO_2)_n$          | SurA Instruments, D | < 7° (spreitet)                            |

# Lebenslauf

## Angaben zur Person

Name Michael Johannes Berg  
Geburtsdatum/ -ort 23.06.1973 in Pirmasens, Rheinland-Pfalz  
Familienstand verheiratet mit Anette Berg, Sonderpädagogin

## Ausbildung

Sep. 1999 – Juli 2000 Projekt-Kompetenz-Studium an der Steinbeis-Hochschule Berlin sowie Indiana University, Bloomington/ USA & University of Kita-Kyushu/ Japan als Stipendiat der Steinbeis-Stiftung, Stuttgart  
Masterarbeit: CyBio AG, Jena "Strategische Produktplanung - Proteomics"  
→ Master of Business and Engineering (MBE®)

Okt. 1992 – Dez. 1998 Studium Chemieingenieurwesen an der Universität Karlsruhe (TH)  
Hauptfächer: Chemische Verfahrenstechnik, Umweltmesstechnik  
Diplomarbeit: Hans-Knöll-Institut e.V., Jena & OPAL Jena GmbH, Jena  
„Methodenentwicklung zur Wirkstoffsuche im Hochdurchsatz-Screening“  
→ Diplom-Ingenieur (Dipl.-Ing.)

Juli 1997 – Sep. 1997 Seminararbeit an der McMaster University, Hamilton/ Kanada  
"Löslichkeitseigenschaften von hydrophob modifizierten Celluloseethern und ihre Wechselwirkung mit Tensiden"

Juli 1995 – Sep. 1995 Auslandspraktikum der der SRK PTY Ltd., Consulting Engineers & Scientists, Johannesburg/ Südafrika als „student engineer“

Aug. 1983 – Juni 1992 Immanuel Kant-Gymnasium, Pirmasens  
Abiturfächer: Mathematik, Chemie, Französisch, Gemeinschaftskunde  
→ Allgemeine Hochschulreife

## Beruflicher Werdegang

seit April 2004 Fertigungsingenieur bei der PV Crystalox Solar AG, Erfurt an der Schnittstelle Produktion und F&E

Nov. 2000 – März 2004 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Physikalische Hochtechnologie e.V., Jena, Bereich Mikrosysteme  
Dissertation: in Kooperation mit Universität Karlsruhe (TH) (Prof. Posten) und Technische Universität Ilmenau (Prof. Köhler)  
„Mikroreaktorentwicklung und -charakterisierung zur Erschließung physikalisch-chemischer Parameter in der Proteinkristallisation“  
→ cand. Doktor-Ingenieur (Dr.-Ing.)

Juli 2000 – Okt. 2000 Projektmanager bei der CyBio AG, Jena  
Konzepterstellung für neue Technologieplattformen und Koordination von Planungsabläufen bei F&E-Projekten / Assistenz Abteilungsleiter

Feb. 1999 – Juni 2000 Trainee der Jenoptik AG mit integriertem Master-Studium und Berater bei der CyBio AG, Jena an der Schnittstelle Markt und F&E