

# 4

## Meßergebnisse

### 4.1 Monomer-Monomer-Wechselwirkungen

In diesem Abschnitt werden die Resultate, die mit der Klein-Goniometer-Apparatur gemessen wurden, vorgestellt. Insbesondere beziehen sich diese Messungen auf das Anfangsstadium einer aggregierenden Proteinlösung unter dem Einfluß verschiedener zugesetzter Elektrolyte [109]-[111].

#### 4.1.1 Diffusionskoeffizient $D$

Das zu untersuchende System besteht aus dem Protein Lysozym, gelöst in 0,1M Na-Acetat Puffer bei pH 4,26. Unter diesen Bedingungen hat das Lysozym einen Überschuß an positiven Ladungen an der Oberfläche, wobei die Nettoladung bei  $Z_p = 7$  Elementarladungen liegt, entsprechend 16 positiven und 9 negativen Elementarladungen. In dem gewählten Puffer stabilisieren die Acetat-Anionen das Lysozym, wodurch es bis zu hohen Konzentrationen löslich wird. Bei dem Kristallisationsoptimum von pH 4,26 wurde in unserer Gruppe die mittlere Oberflächenladung mit  $Z_p = 6,4$  bestimmt [112].

Bei zusätzlicher Anwesenheit von Salzen unterschiedlicher Art und Konzentration in der Proteinlösung ändert sich das elektrostatische Potential um die Proteinmonomere und damit deren Wechselwirkung untereinander und mit den Lösungsmittelmolekülen. Durch die unterschiedlichen Umgebungsbedingungen wird auch das Diffusionsverhalten beeinflusst, das sich auch im Aggregationsverhalten der Lysozym-Monomere niederschlägt.

Mit dieser Apparatur wurde der Aggregationsprozess hinsichtlich der Monomer-Monomer-Wechselwirkungen untersucht. Dazu wurde das Lysozym mit fünf verschiedenen Salzen im selben Puffer gelöst, damit die unterschiedlichen Wechselwirkungen im Anfangsstadium auf das Aggregationsverhalten des Proteins untersucht werden können. Hierzu wurde das Lysozym mit einer Konzentrationsreihe von  $5\text{mg/ml}$  bis  $30\text{mg/ml}$  mit jeweils konstanter Elektrolytkonzentration gemessen.

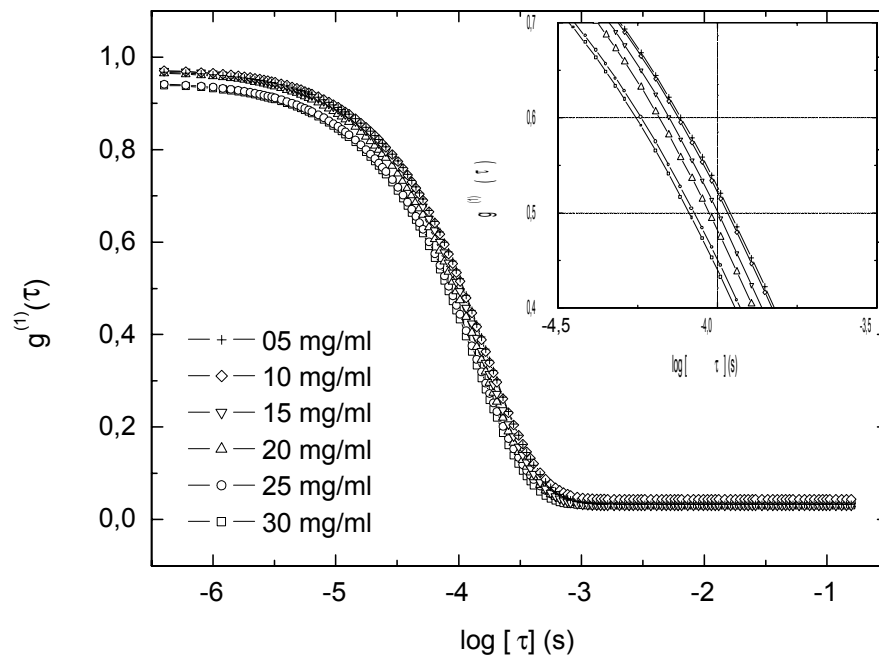


Abb.4.1: Korrelationsfunktionen des Lysozyms bei verschiedenen Konzentrationen ohne Elektrolytzusatz

Aufgrund der positiven Nettoladung des Lysozyms wurden die Salze mit einem unveränderten Kation, in diesem Fall Natrium, entsprechend ihrer Anionen ausgewählt. Diese sind:  $\text{NaSCN}$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  und  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ . Bei Zugabe eines Salzes wird die Proteinsuspension entsprechend der Eigenschaften der Anionen, d.h. Größe und Hydratisierbarkeit, instabil. Dieser Zustand wird zusätzlich durch die Menge des beteiligten Salzes beeinflusst.

Insgesamt werden jeweils dreimal jede der fünf Matrizen gemessen, wobei eine Matrix die Konzentrationen des Lysozyms und die eines Elektrolyts durchläuft. Gemessen wird direkt nach Mischung beider Komponenten, welche im selben Puffer in Stammlösungen vorbereitet wurden. Die Mischung dieser Komponenten wurde zusätzlich zentrifugiert und filtriert, um den Einfluß von bereits gebildeten Aggregaten zu vermeiden. Ausgewertet wurde nur der Diffusionskoeffizient der kleinsten Komponente in der Korrelationsfunktion. Gemittelt wurde jeweils über 10 Messungen à 30s Dauer.

Zur Darstellung der hohen Auflösungsfähigkeit dieser Meßapparatur wurde eine Meßreihe des gelösten Lysozyms ohne zusätzlichen Elektrolyt im Puffer über die Standardkonzentrationen gemessen.

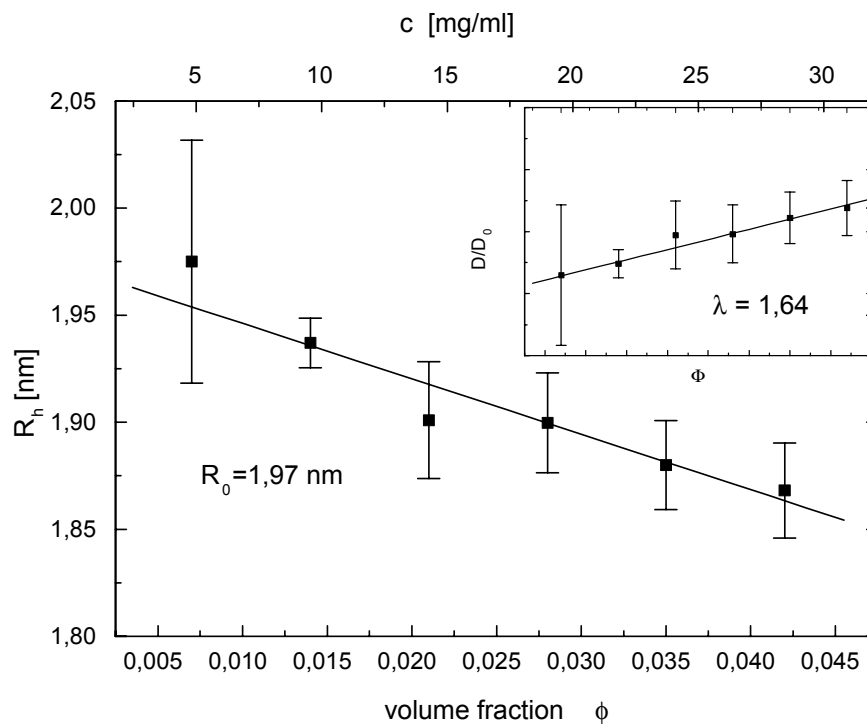


Abb.4.2: Hydrodynamische Radien des Lysozyms ohne Elektrolyt-Zusatz versus Konzentration  $c$  bzw. Volumenfraktion  $\phi$

In Abb.(4.1) sind die aus 10 Messungen gemittelten Korrelationsfunktionen dargestellt. Mit erhöhter Lysozymkonzentration verschiebt sich die Korrelationsfunktion in sehr kleinen

Abständen weiter nach links, was mit einem Verkleinern der Monomere einhergeht. Die relative Veränderung des Diffusionskoeffizienten beträgt dabei  $\Delta D/D_0 \approx 1\%$ .

Aufgrund des "excluded-volume"-Effektes vergrößert sich der Diffusionskoeffizient, d.h. die Relaxationszeiten werden kleiner. Die Teilchen haben nicht mehr genügend Raum, da sich die Konzentration erhöht hat, und lokale Bewegungen werden schneller gedämpft. Die entsprechenden hydrodynamischen Radien sind in der Abb.(4.2) gezeigt, in der die Fehlerbalken die Standardabweichung angeben. Integriert ist der normierte Verlauf des Diffusionskoeffizienten, welcher in erster Näherung einen Wechselwirkungsparameter  $\lambda = 1,64$  liefert. Diese Veränderung in Relation zu dem wechselwirkungsfreien Harte-Kugel-Potential kommt aus zusätzlichen hydrodynamischen Effekten, d.h. die gemessenen Radien verkleinern sich. Der extrapolierte hydrodynamische Radius für unendliche Verdünnung ergibt sich zu  $R_0 = 1,97nm$ .

#### 4.1.2 Wechselwirkungsparameter $\lambda$

Werden die Experimente unter verschiedenen Elektrolytkonzentrationen durchgeführt und der Diffusionskoeffizient der Monomere in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration bestimmt, so tritt eine Abhängigkeit des Wechselwirkungsparameters  $\lambda$  von der Salzkonzentration auf [113],[114].

Der Elektrolyt  $NaSCN$  wurde von 0,01M bis 0,175M in 0,025M Schritten gemessen,  $NaNO_3$  von 0,05M bis 0,45M in 0,05M Schritten,  $NaCl$  von 0,1M bis 1,1M in 0,1M Schritten und  $Na_2SO_4$  sowie  $Na_3C_6H_5O_7$  jeweils von 0,1M bis 0,7M in 0,1M Schritten.

Die oberen Grenzen der Salzkonzentrationen wurden durch die erheblich einsetzende Aggregatbildung festgelegt. Der Phasentübergang war hier bereits soweit fortgeschritten, sodaß das Auftreten von Mehrfachstreuung die Messungen unmöglich machte.

In erster Näherung wurde das Verhalten des Diffusionskoeffizienten über die Lysozymfraktion bei jeweils konstanter Salzmolarität aufgenommen.

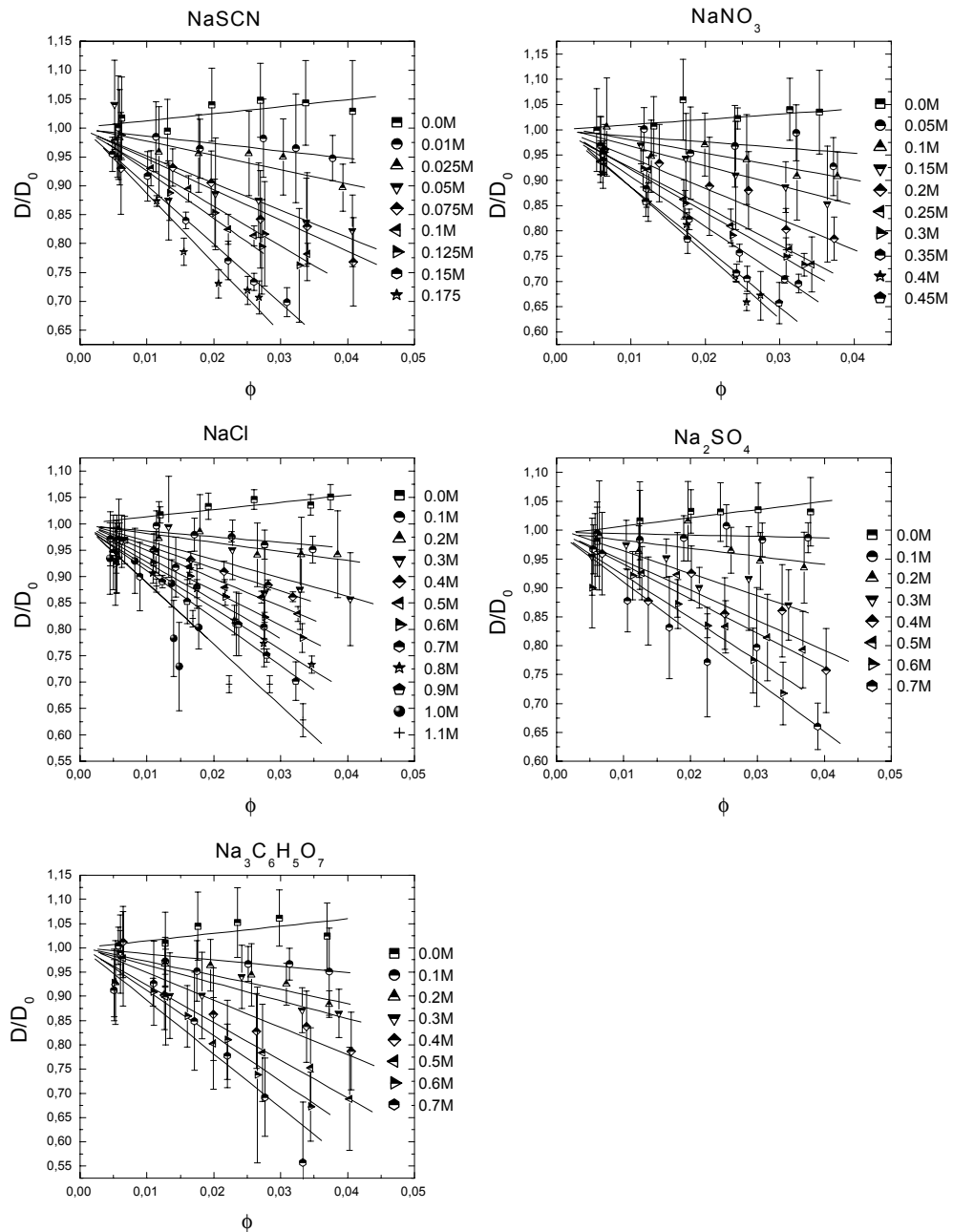
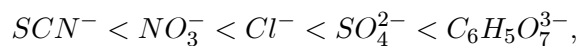


Abb.4.3: Darstellung des normierten Diffusionskoeffizienten über die Lysozymfraktion. Jede Messmatrix steht für einen bestimmten Elektrolyten bei verschiedenen Konzentrationen des Lysozyms und des Salzes.

In Abb.(4.3) sind die Meßreihen für jeweils ein festes Elektrolyt wiedergegeben, der Diffusionskoeffizient ist auf den extrapolierten wechselwirkungsfreien Koeffizienten  $D_0 = (10,8 \pm 0,15) \cdot 10^{-7} \text{cm}^2/\text{s}$  normiert. Die Viskositäten sind für den jeweiligen Salztyp und die jeweilige -konzentration korrigiert [115].

Der aus diesen Daten gemittelte Wechselwirkungsparameter  $\lambda$  ist in Abb.(4.4) dargestellt. Darin wird die Hofmeister-Serie der Anionen, die die Reihenfolge der Effektivität der verwendeten Salze aufzeigt, zunächst nur teilweise bestätigt. Die Hofmeister-Serie lautet für die Anionen der gelösten Salze [116]



wobei das Kation Natrium ist.

Die folgenden Effekte sind auf der folgenden Seite oben erkennbar:

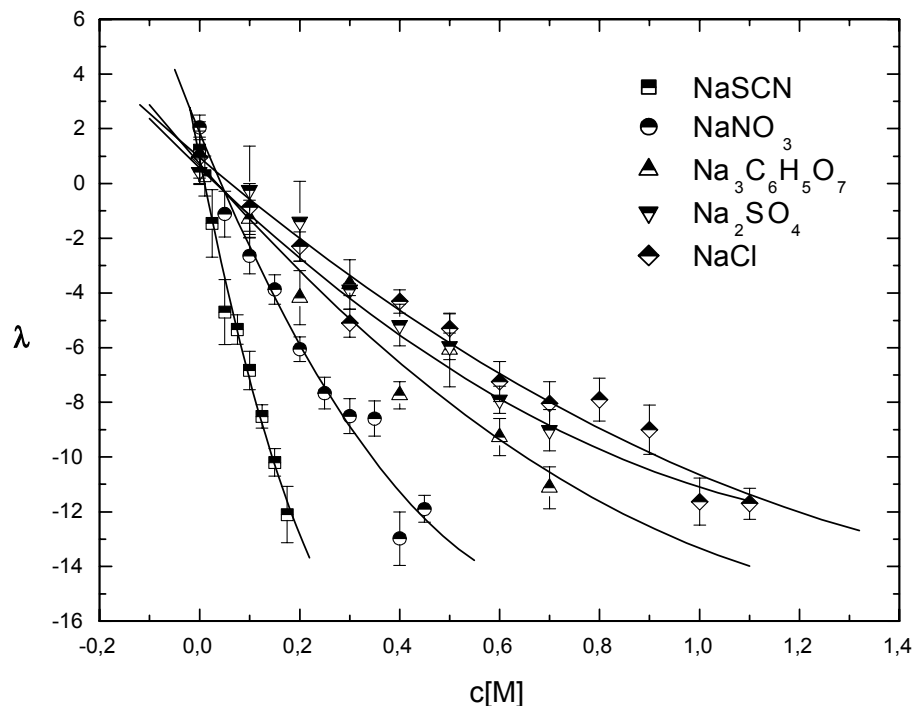


Abb.4.4: Wechselwirkungsparameter  $\lambda$  über die Salzkonzentration  $c$

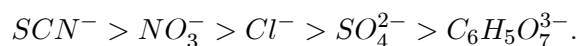
(i) Die Tendenz zur Aggregation nimmt mit dem Elektrolyt entsprechend der Hofmeister-Serie, aber in reziproker Weise und nur teilweise zu. Die stärkste Aggregation erfolgt mit  $NaSCN$  schon bei niedriger Salzkonzentration aufgrund des bereits niedrigen Sternpotentials. Der Wert des Sternpotentials stellt quantitativ die Größe der elektrostatischen Abstoßung dar, wobei eine geringe Abstoßung der Teilchen untereinander bei einem niedrigen Sternpotential vorliegt. Die Nettoladung des Proteins ist durch die adsorbierten Ionen weitestgehend kompensiert.

(ii) Zusätzlich schrumpft durch die schrittweise Erhöhung der Salzmolarität die Ausdehnung der diffusen Schicht, die durch die Debye-Hückel-Länge  $\kappa^{-1}$  beschrieben wird. Der Wert für  $\lambda$  sinkt in allen Fällen mit steigender Elektrolytkonzentration, jedoch mit unterschiedlicher Intensität.

Beides führt zu einer Schwächung des abstoßenden gegenüber dem anziehenden Potential. Damit wird eine Aggregation bei einem Potential ermöglicht, das keine oder eine nur sehr geringe Energiebarriere für ein sich annäherndes Monomer darstellt.

In Abb.(4.5) ist der Wechselwirkungsparameter  $\lambda$  nochmals dargestellt, und zwar ist nun zusätzlich zur Konzentration auch die Wertigkeit des Elektrolyts, d.h. die Ionenstärke, in dem dimensionslosen Produkt  $\kappa R$  berücksichtigt.

Die Effektivität der Anionen auf die Aggregation steigt von links nach rechts. Es ergibt sich für das aggregierende Lysozym-Monomer die umgekehrte Reihenfolge der Anionen in der Hofmeister-Serie:



Der Einfluß des Anions auf die Aggregation spiegelt sich wider in der Doppelschichttheorie, bestehend aus der Stern- sowie der diffusen Schicht. Erstere wird durch die adsorbierten Gegenionen bestimmt, die dadurch das Sternpotential festlegen. Die zweite wird durch die inverse Debye-Hückel-Länge ausgedrückt, die von der Ionenstärke des Elektrolyts abhängt.

Der Schnittpunkt aller fünf Geraden in der Abb.(4.5) gibt annähernd den wechselfreien Bereich an. Dieser Wert liegt bei  $\lambda = 1,76$  und wird im wesentlichen durch hydrodynamische Effekte beeinflußt.

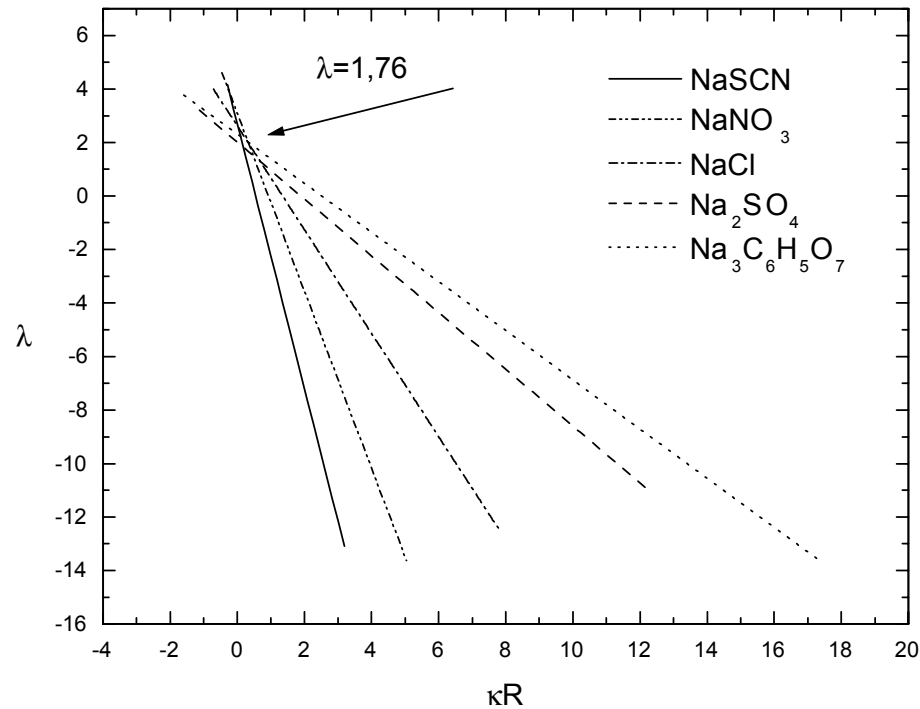


Abb.4.5: Wechselwirkungsparameter  $\lambda$  dargestellt über das dimensionslose Produkt  $\kappa R$  zur Berücksichtigung der Ionenwertigkeit.

#### 4.1.3 Hamaker-Konstante $A_H$ und Oberflächenpotential $\Psi_0$

Meßbar wird die Umgebung um das Protein durch das Zetapotential. Dieses liefert aber nur die Ladungszahl, d.h. das Oberflächenpotential bei unendlicher Verdünnung mit einem sehr niedrigen Salzgehalt ( $< 10^{-6}M$ ). Bei Anwendung der Gleichung (2.45) für  $\kappa = 0$  ergibt sich für  $Z_P = 7$  ein Oberflächenpotential von  $\Psi_0 = 63mV$ .

Das effektive Potential, d.h. das Sternpotential, ist eine Eigenschaft des Teilchens in der gelösten Umgebung. In dem verwendeten 0,1M Na-Acetat-Puffer mit pH 4,26 ergibt sich in erster Näherung ein theoretisches Sternpotential von  $\Psi_S = 21mV$ . Dieser Wert kann durch die Zugabe von verschiedenen Elektrolyten verändert werden.

Auch die resultierende Van der Waals Anziehung, quantitativ in der Hamaker-Konstanten erfaßt, wird durch den Puffer festgelegt. Somit ist die Hamaker-Konstante in erster



Näherung konstant und nur durch die stabilisierte Lösung bestimmt.

Nur im Puffer sind die elektrostatischen Abstoßungskräfte noch groß genug, damit das System in einem stabilen Zustand verbleibt. Es ist jedoch nicht unendlich stabil, daher wird die thermische Energie zur Überwindung der Energiebarriere durch Wärmeabfuhr, z.B. durch Aufbewahrung in einem Kühlschrank, erniedrigt. Nach einigen Tagen bei Raumtemperatur aggregiert dieses System ebenfalls.

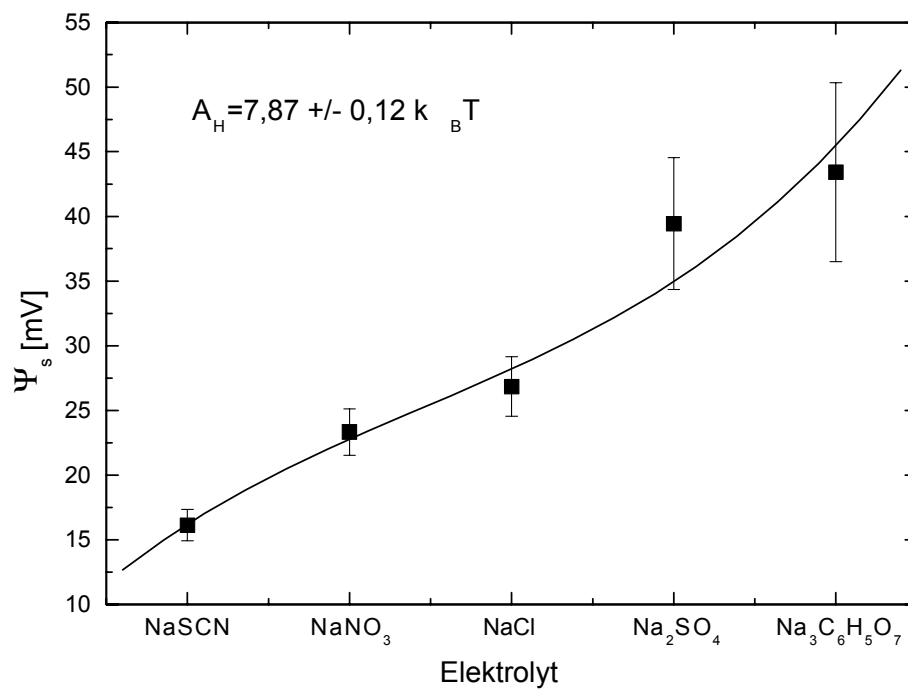


Abb.4.6: Berechnetes Sternpotential des Lysozyms unter dem Einfluß der verschiedenen Salze.

Dieser gesamte Sachverhalt läßt sich quantitativ mit Hilfe der DLVO-Theorie berechnen. Aus den angenommenen Potentialen für die Abstoßung und für die Anziehung zwischen den Teilchen läßt sich mit dem ermittelten Wechselwirkungsparameter  $\lambda$  aus einer gesamten Meßmatrix für einen bestimmten Elektrolyten ein Datensatz für die Hamaker-Konstante  $A_H$  und das Sternpotential  $\Psi_s$  der folgenden Form

$$A_H = f(\Psi_s, \lambda_i)$$

aufstellen (2.42). Die Anzahl der verschiedenen Salzkonzentrationen ist mit  $i$  repräsentiert. Dabei legt nun der Schnittpunkt aller funktionalen Abbildungen

$$A_H = f(\Psi_s), \lambda_i = \text{konst.}$$

die beiden Parameter  $A_H$  und  $\Psi_s$  fest. Hierbei ist zu sagen, daß in den verwendeten Gleichungen (2.44) bis (2.49) anstatt des Oberflächen- das Sternpotential eingesetzt wird, da hier von vornherein elektrolythaltige ( $> 0,1M$  Na-Acetat-Puffer) Lösungen vorliegen.

In der Abb.(4.6) sind die Ergebnisse für die obige Auswertung wiedergegeben. Es ergibt sich eine konstante Hamaker-Konstante von  $A_H = 7,87 \pm 0,12 k_B T$  und ein nichtlinearer Verlauf des Sternpotentials über die verwendeten Ausfällungssalze, wobei hier das Sternpotential  $\Psi_S$  im Bereich von  $16mV$  bis  $43mV$  liegt ( $NaCl : \Psi_S = 25,7mV$ ). In erster Linie wurden die obigen Berechnungen mit der Felderhof-Approximation (2.37) und mit der Gleichung (2.48) für das elektrostatische Potential durchgeführt. Ein Vergleich mit den zusätzlichen Formeln ergab Unterschiede von wenigen Prozentpunkten ( $\approx 3\%$ ).

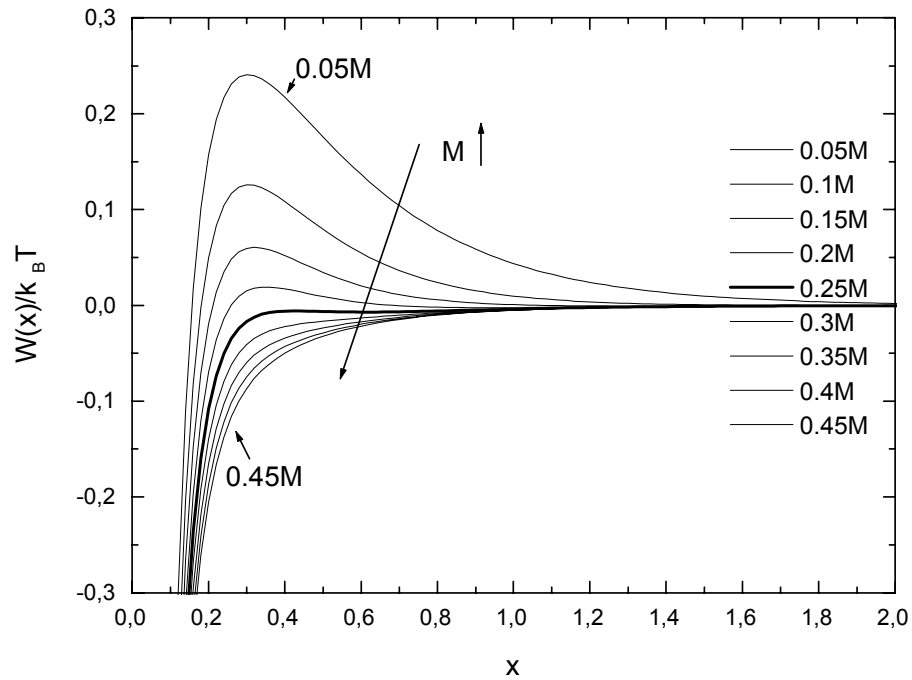


Abb.4.7: Es wird das berechnete Potential  $W(x)/k_B T$  mit  $NaNO_3$  über den dimensionslosen Teilchenabstand  $x = (r - 2R)/2R$  dargestellt.

Hinsichtlich der Ladungszahl  $Z_p$ , die in erster Näherung aus Gleichung (2.45) ermittelt werden kann, läßt sich ein Bereich zwischen 5,4 und 14,3 Elementarladungen berechnen ( $NaCl : Z_p = 8,6$ ).

Bei Elektrolytzusatz wird nach der reziproken Hofmeister-Serie die Neigung des Lysozyms zur Aggregation zum NaSCN hin erhöht. Dies geschieht, indem die Sternschicht durch adsorbierte Gegenionen aufgebaut und dadurch das Sternpotential z.B. beim NaSCN extrem erniedrigt wird. Daher reicht bereits in diesem Fall eine niedrigere Molarität an Salz aus, um das System instabil zu machen.

Entsprechend der diffusen Schicht steigt auch die Aggregationstendenz und -geschwindigkeit mit zunehmender Salzkonzentration an, da eine Komprimierung dieser Schicht erfolgt. Die elektrostatische Abstoßung verringert sich, und die Teilchen haben einen kleineren mittleren Abstand zueinander.

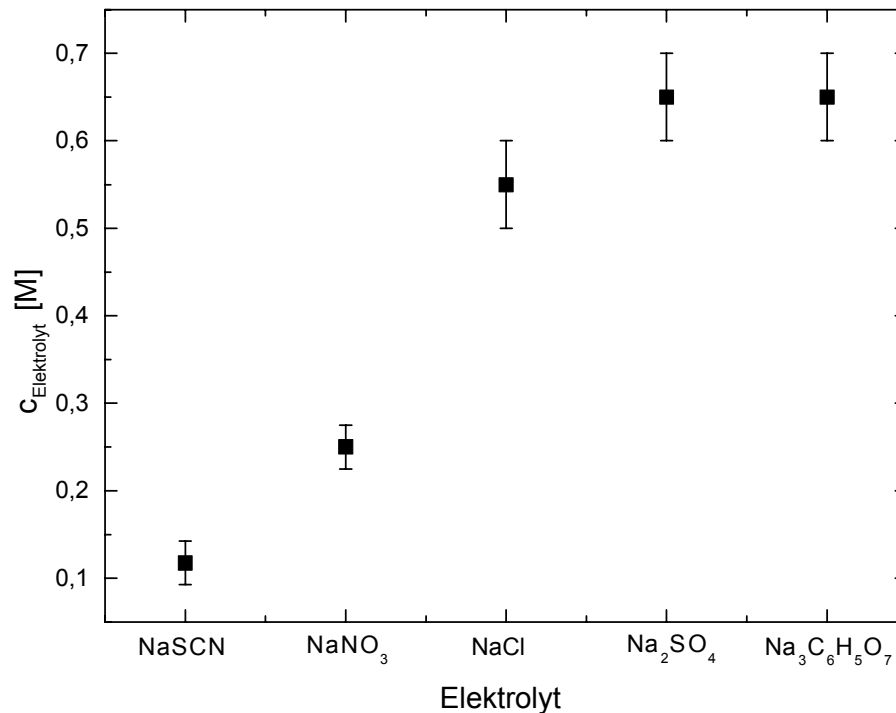


Abb.4.8: Angegeben sind die Konzentrationsbereiche für den Beginn der Aggregation

Eine Darstellung des aus abstoßenden ( $\Psi_s$ ) und anziehenden ( $A_H$ ) Beiträgen gemessenen Gesamtpotentials ist z.B. für verschiedene Konzentrationen des  $\text{NaNO}_3$  in der Abb.(4.7) wiedergegeben. Diese Darstellung verdeutlicht das Verringern der Energiebarriere durch Erhöhung der Salzkonzentration und die niedrige Energiebarriere beim Einsetzen der Aggregation für eine mittlere Molarität von 0,25M.

Zur Ergänzung wird in der Abb.(4.8) für jeden Elektrolyten der Bereich der Salzkonzentration angegeben, bei dem sich das System in einen instationären Zustand bewegt, d.h. die Aggregation der Teilchen aufgrund der geringen Energiebarriere eintritt. Dieser Bereich wird in erster Näherung durch die Potentialkurve festgelegt, die als erste streng-monoton fallend ist (Abb.(4.7)). Bei Berücksichtigung der thermischen Energie der Teilchen wird eine wesentliche Annäherung der Partikel auch schon bei einer noch vorhandenen Energiebarriere ermöglicht.

Vergleiche der Versuchsdaten für jedes System ergeben für die einwertigen Anionen eine sehr gute Übereinstimmung, wohingegen die theoretischen Ergebnisse für die höherwertigen Elektrolyte um 0,2M niedriger liegen.

Im nächsten Kapitel werden einige Kinetiken diesbezüglich vorgestellt.

## 4.2 Aggregationsprozesse

In diesem Abschnitt werden die Resultate, die mit der Hängender-Tropfen-Apparatur gemessen wurden, vorgestellt. Insbesondere beschreiben diese Messungen Proteinaggregationsprozesse [117]-[119], die unter günstigen wie ungünstigen Kristallisationsbedingungen in einem  $10\mu\text{l}$  Tropfen ablaufen [120]-[131].

### 4.2.1 Testmessungen $R_h$

Zur Verifizierung des Aufbaus wurden Latexdispersionen mit verschiedenen Größen im  $nm$ -Bereich ebenfalls im  $10\mu\text{l}$  Tropfen gemessen. Als Standardproteine dienen das Lysozym und das Concanavalin A. Die verwendeten Puffer waren Na-Acetat mit einem pH-Wert von 4,26 und Phosphat mit pH 7,0. Für die Beobachtung der unterschiedlichen Aggregationsverläufe dienen die Elektrolyte Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ ) und Ammoniumsulfat ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ).

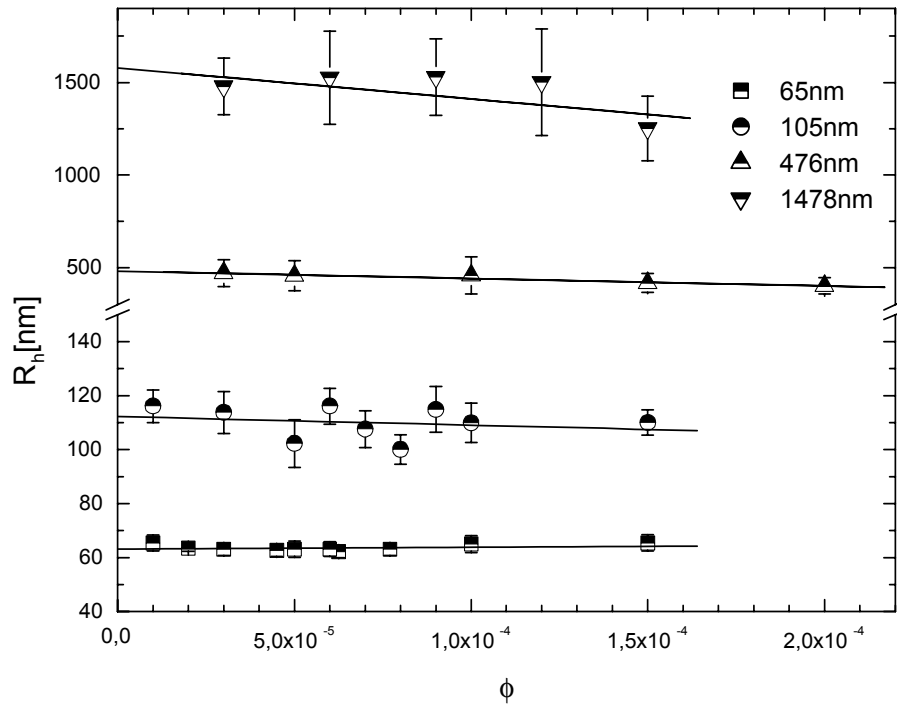


Abb.4.9: Vier Standard Latexmessungen der fraktionsabhängigen hydrodynamischen Radien  $R_h(\phi)$

### Latexpartikel

Die Latexpartikel mit den nominellen Radien von  $65\text{nm}$ ,  $105\text{nm}$ ,  $476\text{nm}$  und  $1478\text{nm}$  wurden untersucht. Es wurden Suspensionen mit verschiedenen Konzentrationen aus jeweils einer Stammlösung mit dreifach destilliertem Wasser hergestellt. Die gemessenen hydrodynamischen Radien  $R_h$  sind in Abb.(4.9) abgebildet. Diese wurden aus 10 gemessenen Korrelationsfunktionen gemittelt, wobei jede Korrelationsfunktion über eine Meßdauer von 30s akkumuliert wurde. Die mittleren hydrodynamischen Radien  $R_0$ , extrapoliert auf unendliche Verdünnung, entsprechen mit kleinen Abweichungen den Angaben des Herstellers.

Temperaturgradienten in den Mikro-Tropfen scheinen die Messungen nicht zu beeinflussen. Um die Langzeitstabilität von stationären Lösungen zu testen, wurden Experimente mit

den Latexsuspensionen mit Betreiben der Klimaanlage getestet. Die Resultate in Abb.(4.10) zeigen eine Unempfindlichkeit des gemessenen Radius, der Polydispersität und der Streulichtintensität über einen längeren Zeitraum.

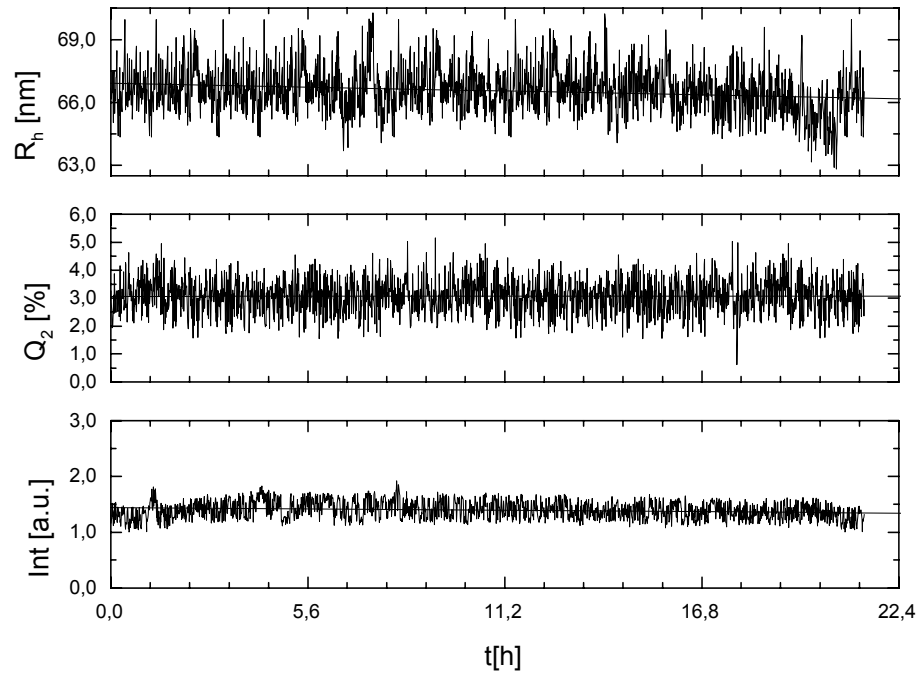


Abb.4.10: Stabilitätsmessungen am Latex  $65nm$  in  $H_2O$  über  $20h$

Unabhängig hiervon werden Temperaturfluktuationen die instationären Aggregationsmessungen beeinflussen, womit für die Zukunft eine Thermostatisierung der Linbro-Platten notwendig wird.

### Lysozym

Typische Autokorrelationsfunktionen, die in  $10\mu l$  Suspensionen gemessen wurden, sind in Abb.(4.11) dargestellt. Das Protein Lysozym wurde in dem Standard-System  $0,1M$  Na-Acetat-Puffer mit einem pH-Wert  $4,26$  gelöst.

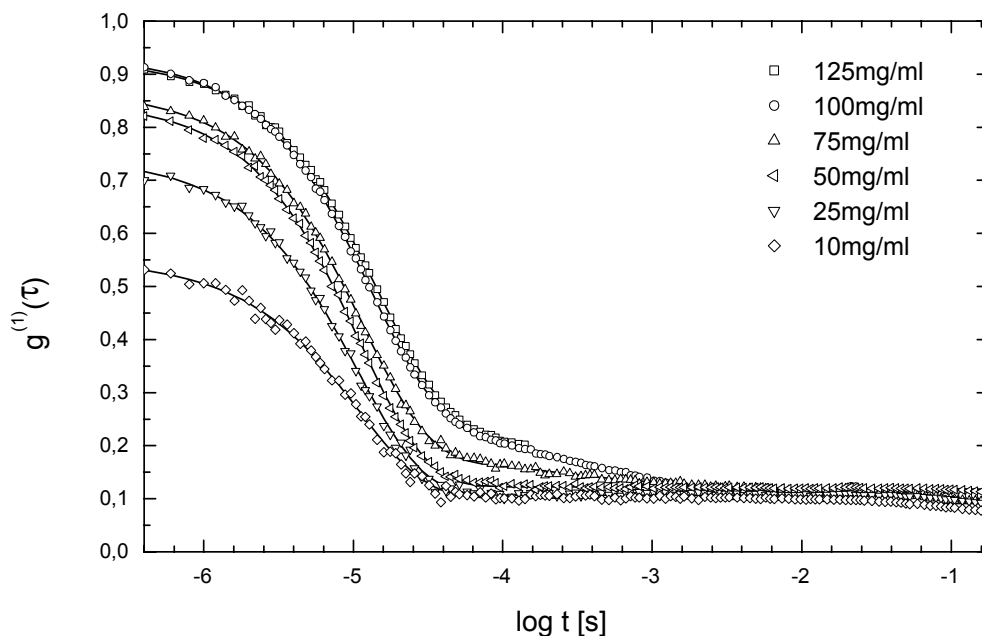


Abb.4.11: Autokorrelationsfunktionen des Lysozyms bei verschiedenen Konzentrationen gelöst im 0,1M Na-Acetat-Puffer, pH 4,26

Die Korrelationsfunktionen wurden unter stationären Bedingungen, d.h. ohne Zugabe eines Elektrolyten, bei verschiedenen Konzentrationen aufgenommen.

In der weiteren Abb.(4.12) sind die entsprechenden hydrodynamischen Radien aus CONTIN als ein Mittelwert von 20 Messungen à 30s Dauer errechnet. Die rohen Autokorrelationsfunktionen sind von ausreichender Qualität, so daß die Laplace-Inversion auch bei mit kurzen Meßzeiten aufgenommenen Daten korrekte Ergebnisse liefert.

Die hydrodynamischen Radien zeigen eine geringe Konzentrationsabhängigkeit mit sinkendem Radius aufgrund des "excluded-volume" Effektes und einem extrapolierten mittleren Radius von  $R_H = 1,98nm$ .

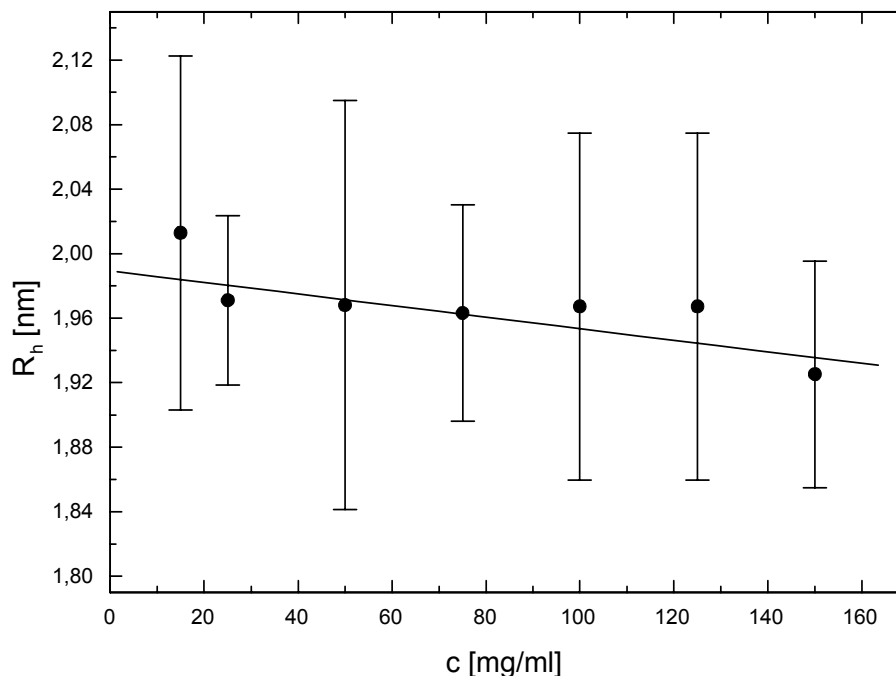


Abb.4.12: Hydrodynamische Radien  $R_h(c)$  des Lysozyms in Abhängigkeit der Konzentration

#### 4.2.2 Aggregationsverläufe *RLCA* – *DLCA*

Die Aggregationsphase kann durch die Anzahl der Komponenten, die an dem Prozeß beteiligt sind, beschrieben werden. Sieht man die Cluster als Indikatoren des Keimbildungsprozesses an, so stellt die Anzahl der in den Clustern gebundenen Monomeren, die durch die Größe der Cluster und ihre Anzahl definiert ist, ein Kriterium dar, das benutzt werden kann, um Aggregation und Kristallisation bzw. amorphen Ausfall zu korrelieren.

Die Anzahl der Populationen kann experimentell aus der spezifischen Streuintensität, die für jede Spezies als Faktor der Korrelationsfunktion gemessen wird, berechnet werden. Die Streuintensität ist nach Gleichung (2.86) proportional zum Quadrat der Masse eines Streuteilchens.

Für die Anzahl der einzelnen Populationen gelten die Zusammenhänge aus den Gleichungen (2.88) und (2.89). Entsprechend der Größe der Teilchen wird eine Gewichtung mit



dem Form- bzw. mit dem Strukturfaktor vorgenommen.

In den folgenden Abbildungen ist neben den Monomeren (M) und den großen Clustern (C) noch eine "dritte Komponente" vorhanden, die allerdings stark in der Größe schwankt und deren hydrodynamischer Radius nur ungenau bestimmt werden kann. Die Streuintensität der "dritten Komponente" ist um einige Größenordnungen geringer im Verhältnis zu der der anderen beiden Populationen.

Dieser Sachverhalt wurde bereits von Mitarbeitern in unserer Gruppe in herkömmlichen DLS Messungen gezeigt [132],[133]. Da in diesem Aufbau die Laserleistung um 200mal geringer ist als in herkömmlichen DLS Messungen, war die "dritte Komponente" aufgrund großer Schwankungsbreiten nicht auswertbar. Jedoch ist die "dritte Komponente" an dem allgemeinen Aggregationsprozess beteiligt. Darüber hinaus waren die Korrelationsfunktionen aufgrund der geringen Anfangsintensitäten erst nach 15 Minuten Meßdauer auswertbar.

Unter Verwendung der berechneten Radien und den relativen Intensitäten aus der Gewichtung der Korrelationsfunktionen wird die Tendenz der relativen Teilchenzahlen im Verlauf eines Aggregationsexperiments errechnet. Diese Verläufe geben einen Einblick in die verschiedenen Wechselwirkungen innerhalb des irreversiblen Prozesses und zeigen die Massenerhaltung für das Gesamtsystem hinsichtlich der teilweisen Beteiligung der "dritten Komponente" am Aggregationsprozess auf.

### **Lysozym**

Die folgenden Messungen beziehen sich auf positive Aggregationen, d.h. am Ende führte diese Kinetik zu einer Kristallbildung. In der nächsten Abb.(4.13) sind drei Aggregationsexperimente mit Lysozym dargestellt. Bei diesen wurde NaCl als Elektrolyt verwendet und konstant auf  $0,6M$  gehalten. Die Lysozymkonzentration betrug jeweils 20, 50 und  $100mg/ml$ .

In allen Fällen sind mindestens zwei Populationen festzustellen. Die erste korrespondiert mit Lysozym-Oligomeren und die zweite mit größeren fraktalen Clustern. Diese verschiedenen Teilchen lassen sich mittels der Laplace-Inversion über die Korrelationsfunktion entkoppeln.

Die Oligomere in den ersten beiden Fällen, Größenordnung  $3nm$ , weisen keine besondere Kinetik auf. Dagegen findet eine Größenveränderung deutlich im dritten Fall statt, die

sich bis in den Bereich von  $9\text{nm}$  bewegt. Bei den fractalen Clustern findet ein intensives Wachstum statt, das erst nach einigen Stunden in einen konstanten Wert konvergiert.

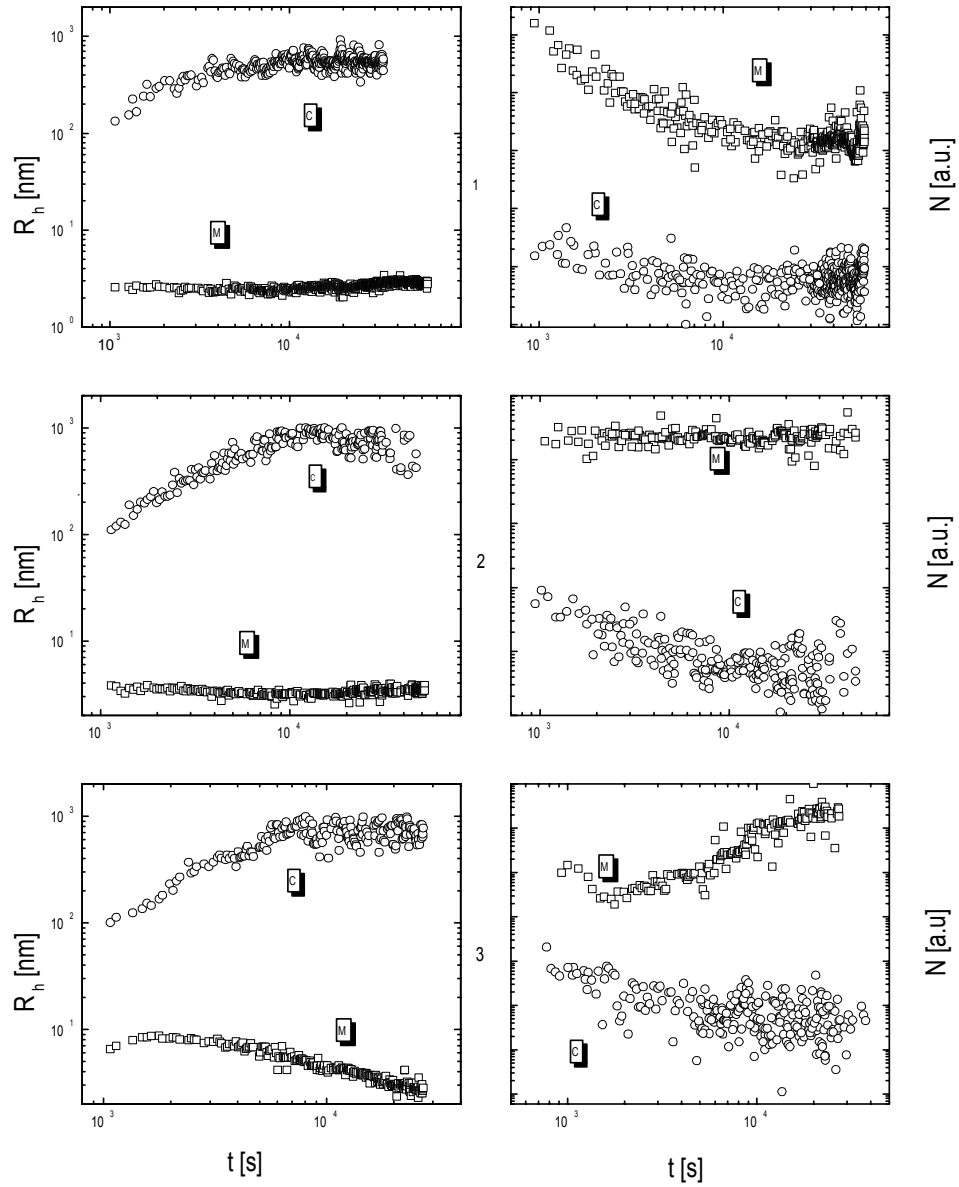


Abb.4.13: Lysozym unter positiven Aggregationsbedingungen. Links sind die Radien und rechts die relativen Teilchenzahlen.

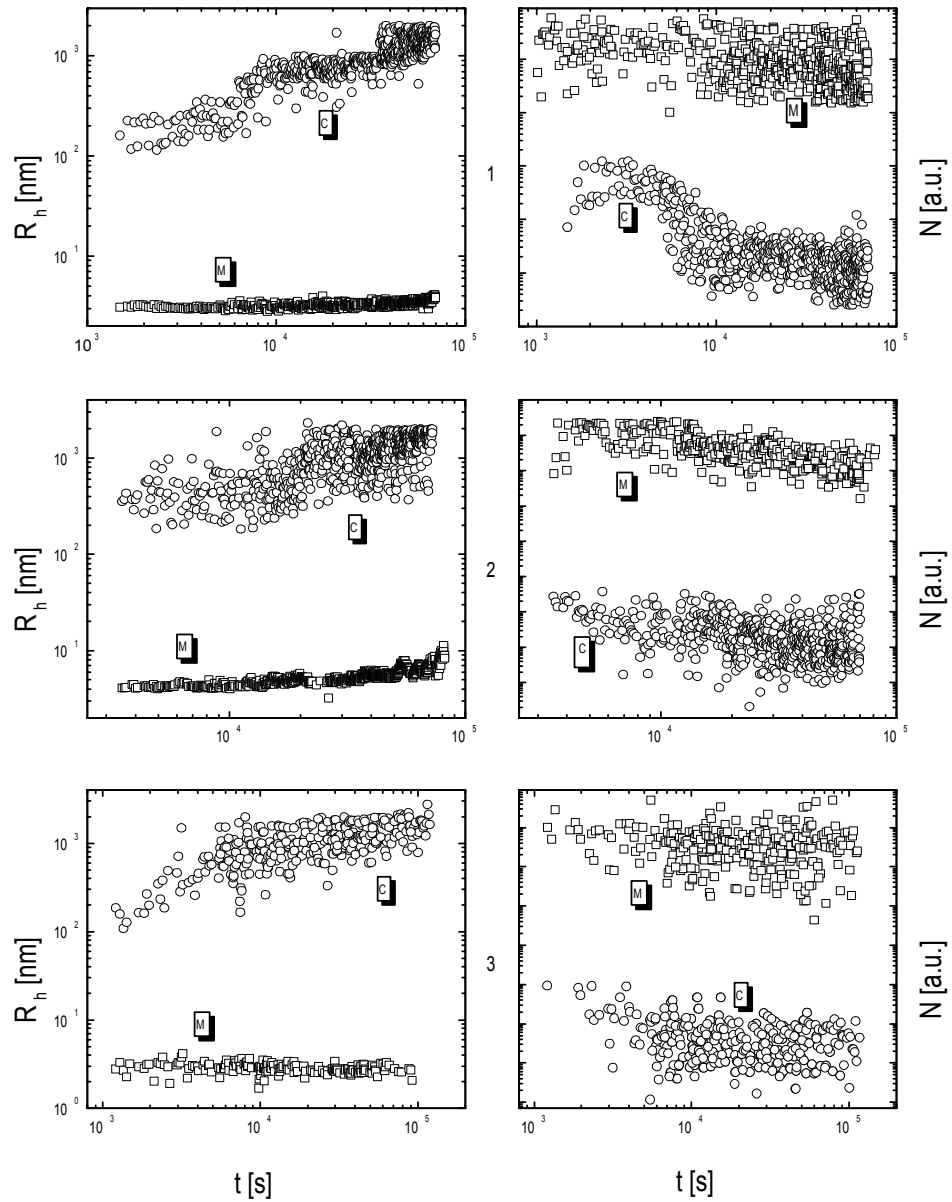


Abb.4.14: Negative Aggregationsexperimente des Lsyzoms

Leider läßt sich mit der DLS ein Größenwachstum auf über  $1\mu\text{m}$  nicht mehr zuverlässig messen. Lineare Anpassungen an die Anfangskinetiken der ersten beiden Messungen liefern Steigungen (s.u.), die eine DLCA ähnliche Bildung von fractalen Clustern bestätigt.

Kristalle bildeten sich im ersten Fall nach zwei Tagen, im zweiten Fall schon nach einem Tag und im letzten Fall erst nach vier Tagen. Bei näherer Betrachtung der Radienverläufe mit der Angabe der Teilchenzahlen stellt sich heraus, daß das Clusterwachstum im zweiten Fall am stärksten ist. Dagegen liegt im dritten Fall zunächst eine große Zahl von Oligomeren vor, die aber parallel zur Clusterbildung zügig abnimmt unter Bildung von Monomeren.

Im Kontrast zu den obigen positiven Kristallisationsversuchen werden nun drei negative in der Abb.(4.14) beschrieben. Hierfür wurden dieselben Lysozymkonzentrationen verwendet, aber mit einem anderen Elektrolyt, und zwar  $1.2M (NH_4)_2SO_4$ . Unter diesen Bedingungen wurde bisher kein positives Experiment festgestellt.

Diese zweite Versuchsreihe zeigt ein ähnliches Verhalten der Oligomere, jedoch steigen die hydrodynamischen Radien der Cluster-Population sehr viel stärker und irregulärer an, die  $1\mu m$  Grenze wird regelrecht überlaufen. Weiterhin liegt eine große Schwankungsbreite der Radien und auch der Teilchenzahlen vor. In diesen Tropfen wurde nach einiger Zeit nur amorphes Präzipitat sichtbar.

### Concanavalin A

In einer weiteren Meßreihe wurde Concanavalin A in (i)  $0.05 M$  Phosphat-Puffer mit  $pH 7.0$  und (ii) in  $0.1 M$  Na-Acetat-Puffer mit  $pH 4.26$  untersucht. Das Fällungsmittel war in beiden Fällen NaCl. Typische Autokorrelationsfunktionen aufgenommen während eines Aggregationsexperiments mit der Tropfen-Apparatur sind in Abb.(4.15) gezeigt. In diesen wurde  $40mg/ml$  Concanavalin A mit  $0.12M NaCl$  gemischt, wobei die Stocklösungen im Phosphat-Puffer gelöst waren. Die Korrelationsfunktionen zeigen deutlich ein bimodales Verhalten aufgrund anwachsender Cluster in Koexistenz mit Monomeren bzw. Oligomeren.

Zunächst wurden positive Kristallversuche mit  $20, 30, 40mg/ml$  Concanavalin A gemischt mit  $0.12M NaCl$  durchgeführt, gelöst im Phosphat-Puffer. Diese sind in der folgenden Abb.(4.16) zu sehen. In allen drei Fällen können wieder zwei Populationen beobachtet werden. Diese sind sehr gut zu unterscheiden in Oligomere ( $R_h \approx 4, 5nm$ ) und größere Cluster.

In den ersten beiden Versuchen zeigt die Größe der Cluster, die sich im Bereich von  $100nm$  zu  $200nm$  bewegen, kein wesentliches Wachstum im Laufe der Zeit. Kristalle wuchsen aus

beiden Lösungen, nach zwei bzw. drei Tagen. Ein Vergleich mit dem Aggregationsprozess im dritten Fall, welcher schneller abläuft, liefert die Erklärung.

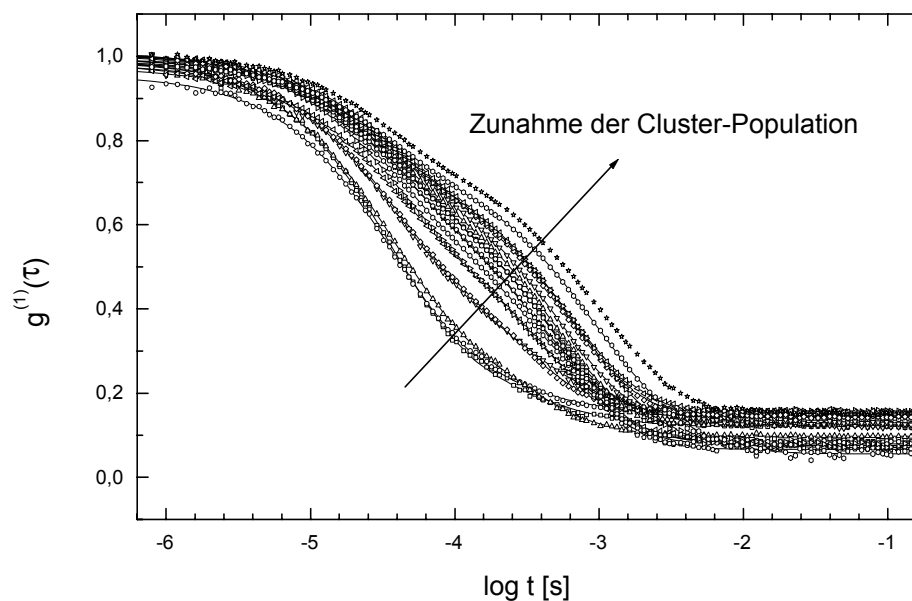


Abb.4.15: Messungen der Autokorrelationsfunktion des ConA bei 40mg/ml in 50mM P plus 0,12M NaCl während der Aggregation

Der mittlere hydrodynamische Radius beschreibt ein RLCA-Verhalten bezüglich der Cluster-Cluster-Aggregation, die durch ein exponentielles Wachsen charakterisiert ist. Bei der RLCA-Kinetik liegt eine höhere Energiebarriere vor als bei DLCA, sodaß das schnelle Anwachsen von Clustern verringert wird. Diese Barriere ist im dritten Fall reduziert, womit die mittlere Teilchenzahl zügig sank und sich schon nach einem Tag Kristalle bildeten. Die Barriere war jedoch noch hoch genug, damit es nicht zu einem rapiden Ausfall von Präzipitat kam.

Identische Messungen mit Concanavalin A wurden nun im Na-Acetat-Puffer durchgeführt. Diese sind in Abb.(4.17) aufgezeigt. In allen drei Fällen läßt sich eine langsamere Aggregation von Clustern bei der Anwesenheit von Oligomeren ( $R_h \approx 3nm$ ) feststellen. Bei allen überschreiten die Clusterradien die 200nm Grenze in der Beobachtungszeit nicht wesentlich. Diese Lösungen waren in sich so weit stabil, daß sich weder Kristalle bildeten noch amorphes Präzipitat.

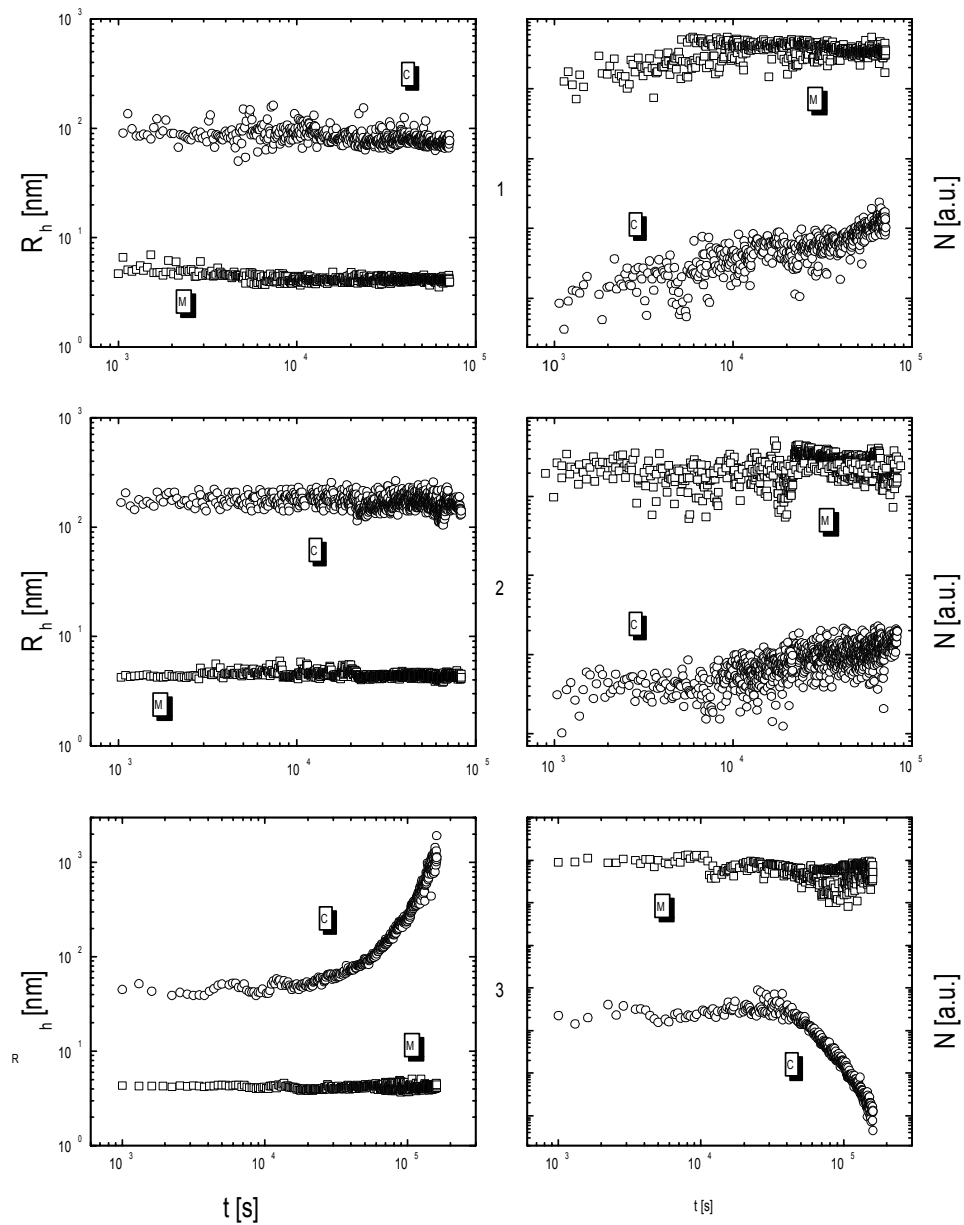


Abb.4.16: Positive ConA Aggregationsmessungen

Ein Vergleich der Messungen unter günstigen sowie unter ungünstigen Kristallisationsbedingungen zeigt, daß die Wachstumskinetiken mit den Endzuständen, d.h. der sich nun im Gleichgewicht befindenden Suspensionen, eindeutig in Korrelation gebracht werden

können.

Bei der Bildung von amorphem Präzipitat erreichen die Cluster stets die Auflösungsgrenze der Apparatur von  $1\mu\text{m}$ . In Relation zu den DLCA-Messungen weist der Wachstumsverlauf Unregelmäßigkeiten und eine größere Schwankungsbreite auf. Selbst bei den stabilen Lösungen überschreiten die Cluster einen bestimmten Radius nicht. Jedoch sind hierfür mindestens eintägige Messungen durchzuführen.

Bei Lysozym ist aus der Analyse der relativen Teilchenzahlen festzustellen, daß bei den DLCA-Messungen alle drei Wechselwirkungen vorkommen, d.h. die Monomer-Monomer-, die Monomer-Cluster- und die Cluster-Cluster-Wechselwirkungen. Die "dritte Komponente" existiert unabhängig von diesem Aggregationsprozess.

In diesem Regime bilden sich die Cluster relativ zügig, sodaß erst im späteren Verlauf eine Umstrukturierung der Fraktale stattfinden muß, da sich nach einigen Tagen Kristalle gebildet haben. Bei dem amorphen Präzipitat liegt im wesentlichen eine Cluster-Cluster-Anziehung vor, da die Radien und die Intensitäten der Monomere (Oligomere) unverändert bleiben. Dagegen liegen bei den Concanavalin A Messungen zunächst keine Monomer-Monomer-Wechselwirkungen vor; es findet ein reger Austausch zwischen den Clustern untereinander und auch mit der "dritten Komponente" statt. Dieser Sachverhalt ist unter anderem daran zu erkennen, daß die Clusterzahl bei gleichzeitigem Stagnieren der Clustergröße steigt. Dies zeigen z.B. die relativen Teilchenzahlangaben der beiden Hauptpopulationen, da bei konstanter Monomer-Teilchenzahl das gleichzeitige Ansteigen der Clustergröße und der Clusterzahl nicht erklärbar wäre. Bei den stabilen Lösungen, Abb.(4.17), verringern sich die Radienwerte um fast eine Größenordnung nach unten.

Im Vergleich mit den relativen Teilchenzahlen der beiden wesentlichen Spezies (Mono-/Oligomere und Cluster) können die Partikel der "dritten Komponente" einen konstanten oder dynamischen Zustand einnehmen. Entweder stellen sie unabhängig vom Keimbildungsprozess eine konstante, in sich stabile und sehr langsam wachsende Population dar oder sie werden stets von den Oligomeren gebildet und sind anschließend bei der Fraktalbildung beteiligt.

Dieses Verhalten bestätigt das empfindliche Gleichgewicht zwischen den Monomer-Monomer-, den Monomer-Cluster- und den Cluster-Cluster-Wechselwirkungen im Laufe der Zeit.

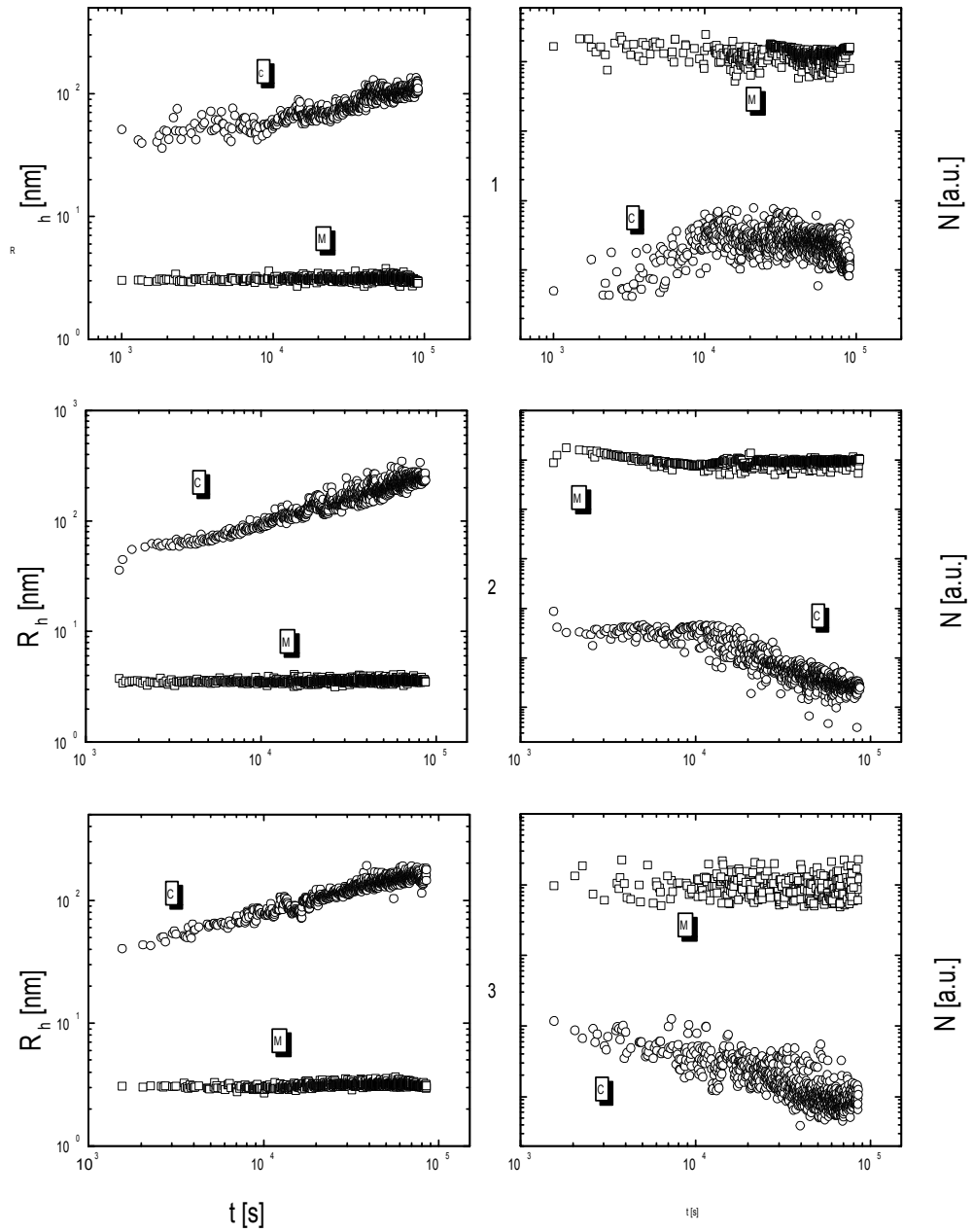


Abb.4.17: Messungen mit ConA unter negativen Aggregationsbedingungen



### 4.2.3 Fraktale Dimensionen $d_f$

Die Vorhersagbarkeit des Wachsens von Kristallen bei Verwendung der Tropfen-Apparatur ist möglich, erfordert jedoch Beobachtungszeiträume lange genug, um überhaupt Keimbildung zu erkennen. Für die positiven Lysozymmessungen lassen sich aus linearen Anpassungen der Radienverläufe die fractalen Dimensionen  $d_f = 1.56$  beziehungsweise  $d_f = 1.81$  errechnen. Bei den Beispielen unter ungünstigen Kristallisationsbedingungen erlauben die Kinetiken keine Identifikation mit den Aggregations-Regimen, gleiches gilt für die negativen Messungen des Concanavalin A.

Hinsichtlich der unter günstigen Kristallisationsbedingungen durchgeführten Concanavalin A Messungen führt die beobachtete Kinetik zu kompakteren fractalen Clustern mit einer fractalen Dimension von  $d_f = 2.1$  anstatt  $d_f = 1.81$  wie bei dem DLCA-Verhalten. Zurzeit liefert diese Anordnung nicht dieselbe Reproduzierbarkeit der fractalen Dimensionen  $d_f$  wie in herkömmlichen DLS Messungen. Die Ursache liegt wohl in der diffizileren Meßgeometrie, die zu anderen Wechselwirkungen der Teilchen untereinander und mit der Umgebung führt.

Wie oben schon erwähnt, werden die Messungen an hängenden Tropfen gemacht und beinhalten einen Verdampfungsprozess. Dieser beeinflußt natürlich das Aggregationsverhalten, sodaß andere Bedingungen als in herkömmlichen DLS Messungen vorliegen. Des weiteren wird in dieser Apparatur die Rückwärtsstreuung verwendet. Diese erhöht die Kopplung der Translations- und Rotationsgrade in der Messung während des Anwachsens der Cluster. Daher ist die Approximation der gewonnenen Daten nicht unbedingt vergleichbar mit den Ergebnissen von herkömmlichen DLS-Messungen, die im wesentlichen bei Vorwärtsstreuung gemacht werden.

## 4.3 Stabilitätsübergänge

In diesem Abschnitt werden die Resultate, die mit der Laser-Doppler-Elektrophorese-Apparatur gemessen wurden, vorgestellt. Insbesondere beziehen sich diese Messungen auf das Standardsystem Lysozym plus NaCl im 0,1M Na-Acetat Puffer (pH 4,26) durch systematische Variation der Salz- sowie der Lysozymkonzentration.

In den vorherigen Abschnitten wurden Untersuchungen zur Startphase der Aggregation und zu Aggregationskinetiken präsentiert. Nun wird durch Messung der elektrophore-

tischen Beweglichkeit das Zetapotential zur Beschreibung des gesamten Phasenüberganges genutzt [134]-[136].

### 4.3.1 Dopplerverschiebung $f_d$

Zunächst werden einleitende Messungen dargestellt, die die Verbindung zur dynamischen Lichtstreuung machen und die die Kalibrierung der Meßanlage gewährleisten.

Hierfür wurde der Aufbau mit dem Standardmaterial der Firma Malvern durchgemessen. Diese Suspension wurde mit einem Zetapotential von  $\zeta = -50 \pm 5mV$  angegeben und ließ sich nach Kalibrierung der Anlage auch bis zwei Monate nach Haltbarkeit messen.

Zur Verdeutlichung des Wiener-Khintchine-Theorems, d.h. Verknüpfung der Korrelationsfunktion im Zeitbereich mit dessen Spektrum im Frequenzbereich, sollen die folgenden beiden Abbildungen (4.18) und (4.19) dienen.

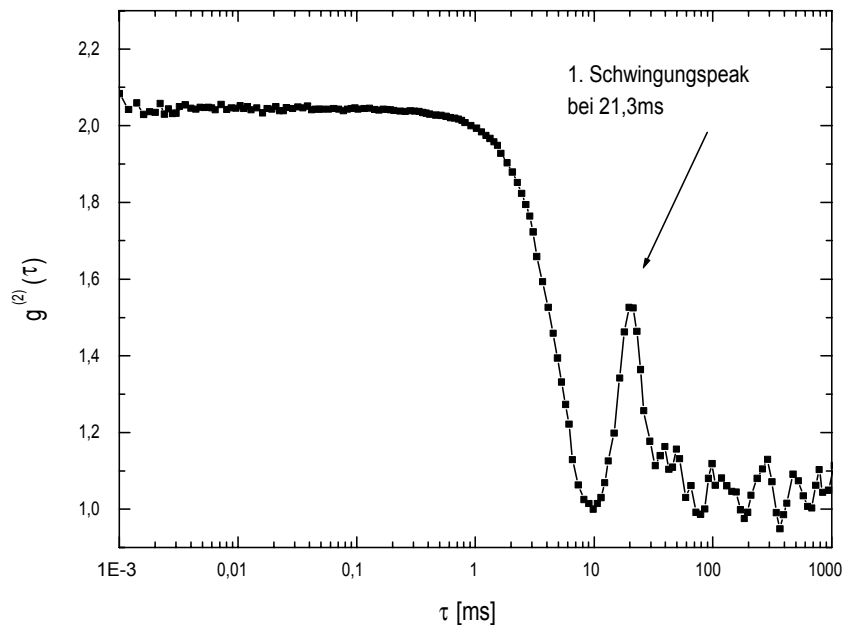


Abb.4.18: Korrelationsfunktion  $g^{(2)}(\tau)$  mit angelegter Spannung  $U$

Die Driftbewegung der Teilchen aufgrund des angelegten elektrischen Feldes,  $E = 29,3V/cm$ , zeigt sich in der Korrelationsfunktion wie im Spektrum, da beide über die oben genannte Fourier-Transformation im Zusammenhang stehen. In der Korrelationsfunktion ist der Schwingungsprozess durch das Auftauchen eines Peaks zu sehen, wobei im Spektrum diese Überlagerung zum vorhandenen Diffusionsprozess als Verschiebung zur Nulllinie, d.h. bei  $f = 0Hz$ , erkennbar ist.

In dem gemessenen Spektrum kommen auch zwei Nebenordnungen bei ungefähr 40 und 60Hz vor. Diese rühren her von dem angelegten elektrischen Feld, welches in diesem Fall mit 10Hz geregelt wurde. Diese Messungen wurden mit dem Malvern Standardmaterial durchgeführt.

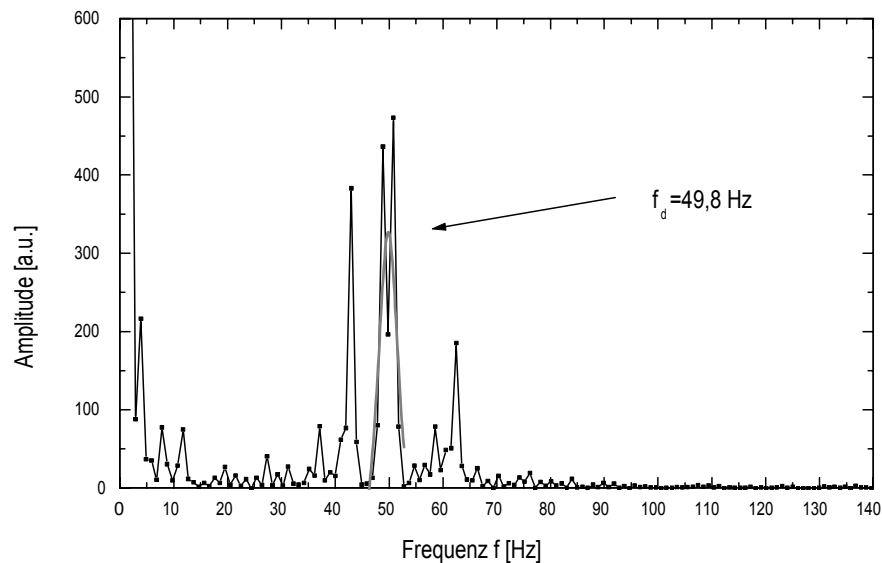


Abb.4.19: Frequenzspektrum des Lichtstreuensignals

Für die Meßreihen wurden die entsprechenden Meßparameter und Materialkonstanten bestimmt:

Die elektrophoretische Beweglichkeit  $\mu_{el}$  bzw. mit dem Zahlenwert  $u_E$  mit

$$\mu_{el} = u_E \cdot 10^{-6} \frac{m/s}{V/cm},$$

die Dielektrizitätskonstante  $\varepsilon = 8,8542 \cdot 10^{-12} \text{ As/Vm}$  und der Brechungsindex  $n = 1,334$  der Lösung.

Zur Berechnung des Zetapotentials mit dem Wert  $\{\mu_{el}\} = u_E$  dient folgende Tabelle:

$T/^\circ C$	$\eta/mPas$	$\varepsilon_r/1$	$\frac{\eta/\varepsilon}{mV}$
20	1	80,36	14,054
22,5	0,947	79,45	13,462
25	0,894	78,54	12,856

wobei sich alle Rechnungen auf  $20^\circ C$  beziehen.

Die Größe der Frequenzverschiebung ist abhängig von der Partikelgeschwindigkeit, so daß aus der gemessenen Frequenzverschiebung  $f_d$  die Partikelgeschwindigkeit  $v$  berechnet werden kann:

$$v = \frac{\lambda}{2n \sin(\frac{\Theta_{El}}{2})} \cdot f_d$$

mit  $f_d$  Dopplerfrequenz,  $\frac{\Theta_{El}}{2}$  Winkel, unter dem das Streulicht detektiert wird,  $\lambda$  Wellenlänge des Lichtes und  $v$  Partikelgeschwindigkeit. Für das Standardmaterial ergibt sich somit eine mittlere Partikelgeschwindigkeit von  $v = 1,08 \cdot 10^{-4} m/s$ .

Mit der Angabe des elektrischen Feldes  $E$ , d.h. der angelegten Spannung  $U$ , können damit die elektrophoretische Beweglichkeit  $\mu_{el}$  nach Gleichung (2.131) berechnet sowie das Zetapotential  $\zeta$  (2.136) und die Nettoladung  $Q$  (2.140) abgeleitet werden.

### Standardmaterial

Es folgt die Vermessung des Streuzentrums relativ zur Elektrodenmitte und der Proportionalität von der Teilchengeschwindigkeit mit der Stärke des elektrischen Feldes.

In der Abb.(4.20) ist die gemessene Frequenzverschiebung  $f_d$  über den Abstand  $\Delta l$  relativ zur Elektrodenmitte in Strahlrichtung bzw. quer zum elektrischen Feld dargestellt. Hierdurch wird der elektroosmotische Effekt untersucht, d.h. das Streuzentrum wurde innerhalb der Elektroden in der Küvette variiert und eine Messung der Doppler-Verschiebung in Abhängigkeit des Streuortes durchgeführt.

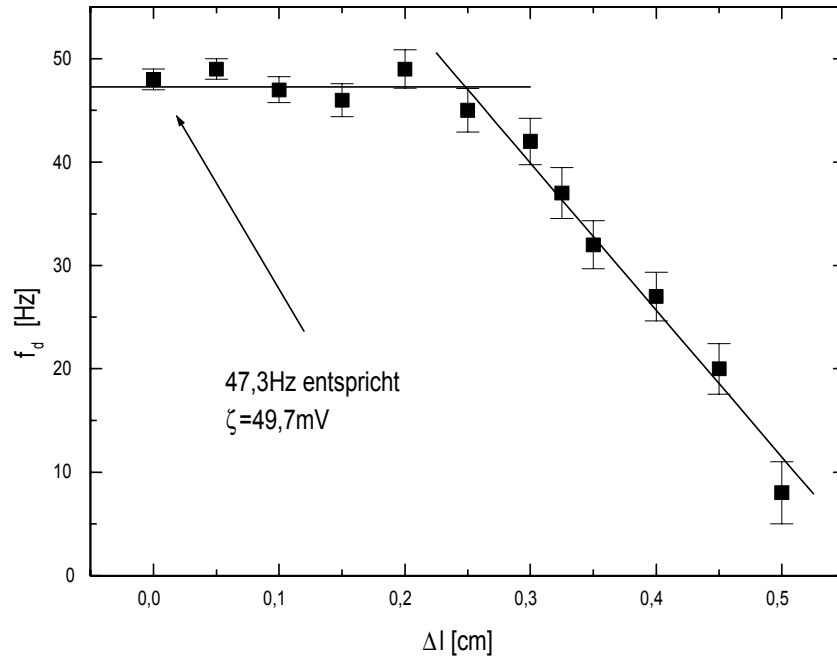


Abb.4.20: Vermessung des Streuzentrums relativ zur Elektrodenmitte

Es stellte sich heraus, daß der elektroosmotische Effekt innerhalb der Elektroden nicht auftrat. Die Begründung liegt darin, daß sich die Elektroden innerhalb der Küvette befanden, einen Abstand von  $2,5\text{mm}$  vom Küvettenrand hatten und sich die Wände nicht gegenpolig aufladen konnten.

Um auch die lineare Abhängigkeit der Partikelgeschwindigkeit vom angelegten elektrischen Feld zu überprüfen, wurde die Konstanz der elektrophoretischen Beweglichkeit  $\mu_{el}$  nachgeprüft. Diese Meßreihe ergab einen Wert von  $\mu_{el} = 3,68 \cdot 10^{-6} (\text{m/s}) / (\text{V/cm})$ , was sich in der Abb.(4.21) an der Steigung der linearen Anpassung widerspiegelt.

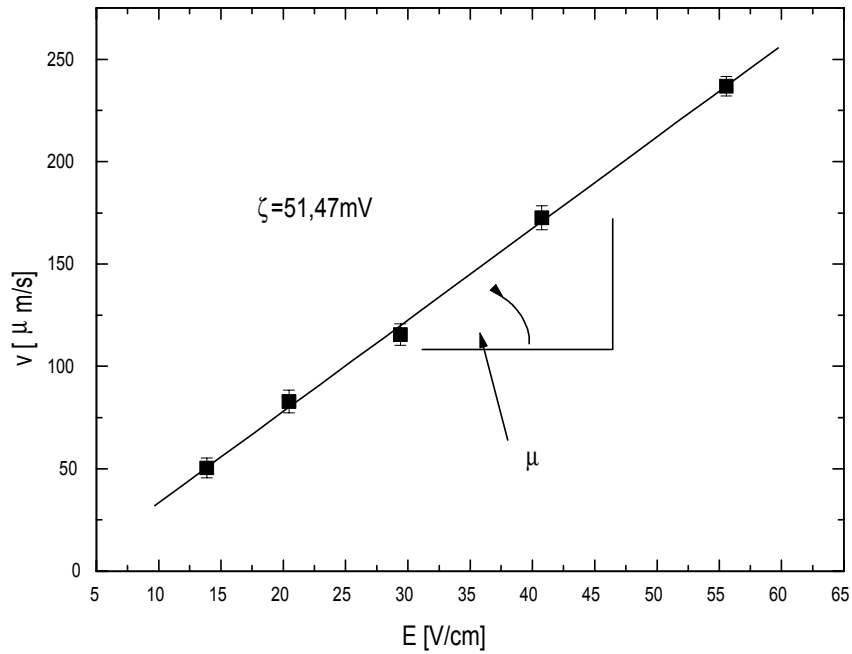


Abb.4.21: Vermessung der Proportionalität zwischen Teichengeschwindigkeit  $v$  und Stärke des angelegten elektrischen Feldes  $E$

### Latexpartikel

Weiterhin wurden elektrophoretische Messungen an gelösten Latexpartikeln in herkömmlichem tridestilliertem Wasser bei verschiedenen Konzentrationen gemessen. Es wurden Latexpartikel mit den hydrodynamischen Radien von 65, 105, 273, 5 und 449, 5nm verwendet. Die angelegte Spannung betrug  $U = 11\text{V}$  und die Rechteckfrequenz lag bei  $10\text{Hz}$ . Aufgrund des hohen Signal-Rausch-Verhältnisses genügten kurze Meßzeiten von 0, 5s.

Da alle Latexpartikel aus demselben Material Silikon mit denselben Ionengruppen auf der Oberfläche bestehen, ist ihr Zetapotential annähernd gleich. Diese Lösungen sind sehr stabil, was sich auch quantitativ im hohen Zetapotentialwert niederschlägt. Die berechneten Zahlenwerte für die Ladungszahl  $Z_P$  sind in der Abb.(4.22) mit angegeben.

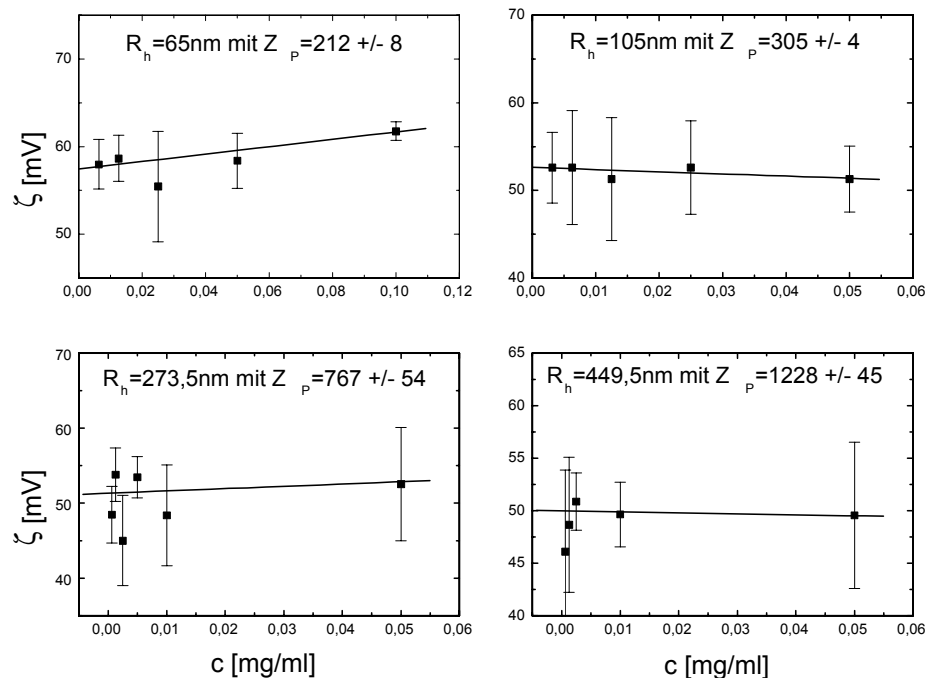


Abb.4.22: Zetapotentiale von Latexsuspensionen verschiedener Teilchengröße

### Lysozym

Die Messungen des Standardsystems Lysozym, ohne und mit dem Salz NaCl jeweils im 0,1M Na-Azetat-Puffer (pH 4,26) gelöst, werden vorgestellt.

Das Hauptinteresse ist das Aggregationsverhalten des Lysozyms in Abhängigkeit vom Oberflächenpotential  $\Psi_0$ , d.h. der Nettoladung  $Q$  des Lysozym-Monomers, in Relation zur Ionenstärke  $I$  des Lösungsmittels. Dazu wurde das Lysozym in einer Matrix mit den Konzentrationen 20, 30, 40 und 50 mg/ml mit den NaCl-Konzentrationen zwischen 0,3 und 1,1M in 0,1M Schritten untersucht.

Unmittelbar nach Präparation der instabilen übersättigten Lösung und nach drei Tagen, wo sich bereits ein stabiler bzw. stabilerer Zustand eingestellt hat, sind Daten aufgenommen worden. Weiterhin wurden die elektrophoretischen Beweglichkeiten für einige Aggregationskinetiken festgehalten.

### 4.3.2 Elektrophoretische Beweglichkeit $\mu_{el}$

Zunächst wurde die elektrophoretische Beweglichkeit von Lysozym bei verschiedenen Konzentrationen im 0,1M Na-Azetat-Puffer mit pH 4,26 ohne Fällungsmittel gemessen. Diese Messungen wurden mit einer 97,27V Rechteckspannung, die eine Frequenz von 1Hz hatte, durchgeführt.

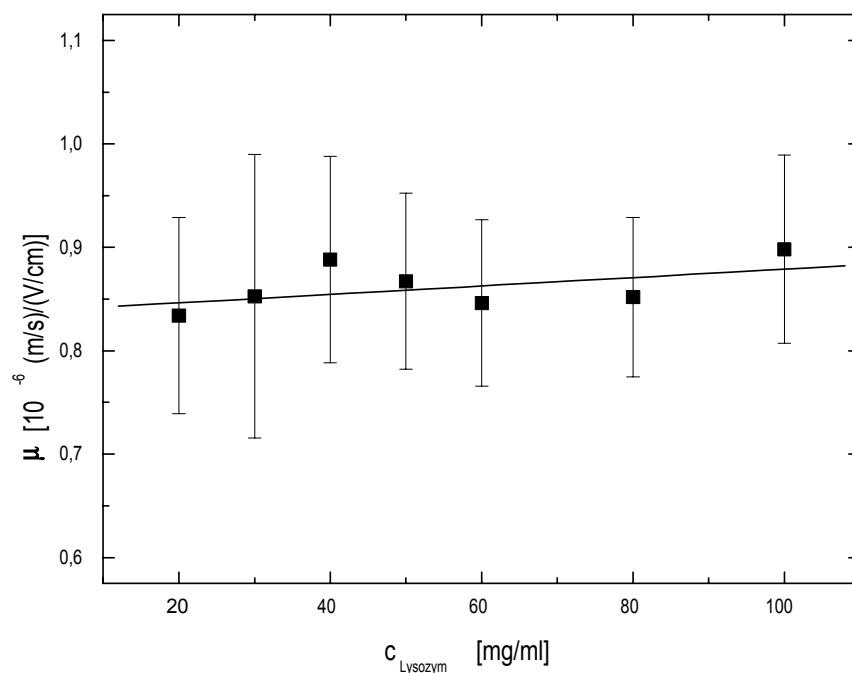


Abb.4.23: Messung der elektrophoretischen Beweglichkeit  $\mu$  von Lysozym gelöst in 0,1M Na-Acetate-Puffer, 4,26 pH, bei verschiedenen Konzentrationen  $c$

In der Abb.(4.23) ist die elektrophoretische Beweglichkeit für mehrere Lysozymkonzentrationen angegeben. Die Mittelwerte und die Standardabweichungen wurden aus 9 Meßwerten à 0,5s Meßzeit gebildet, wobei sich jeweils 3 Messungen auf eine neu präparierte Probe beziehen.

Die Anwendung der Smoluchowski- bzw. Hückel-Gleichungen (2.138, 2.137) ergaben Werte für die Zetapotential um die 12,1mV bzw. 18mV. Die genauere Berechnung des Zetapotentials nach Henry mit der Funktion  $H(\kappa R)$  mit  $\kappa = 1,46 \cdot 10^{-9} 1/m$  für 0,1M liefert einen



Gesamtmittelwert von  $\zeta = 17,0 \pm 0,45 mV$ . Dieser Wert verdeutlicht auch die relative Stabilität des Lysozyms in dem 0,1M Na-Acetat-Puffer. Die Berechnung der Ladung  $Q$  führt zu einem mittleren Wert der Ladungszahl von  $Z_p = 5,7$ .

Die gesamte Kinetik, wie in den DLS-Versuchen durchgeführt, ist auch hier von großem Interesse. Da zur Messung der elektrophoretischen Beweglichkeit ein invasives Meßverfahren vorliegt und der momentane Zustand des Systems erheblich gestört wird, können diese Messungen nicht als quasistationär angenommen werden.

Wegen des sehr hohen Materialaufwandes wurde der zeitliche Verlauf der elektrophoretischen Beweglichkeit  $\mu_{el}$  während der Aggregation innerhalb der ersten Stunde für die obigen Lysozymkonzentrationen bei 0,7M NaCl in 0,1M Na-Azetat-Puffer bei pH 4,26, einer Spannung von  $U = 97,27V$  und einer Feldfrequenz von  $f = 5Hz$  gemessen.

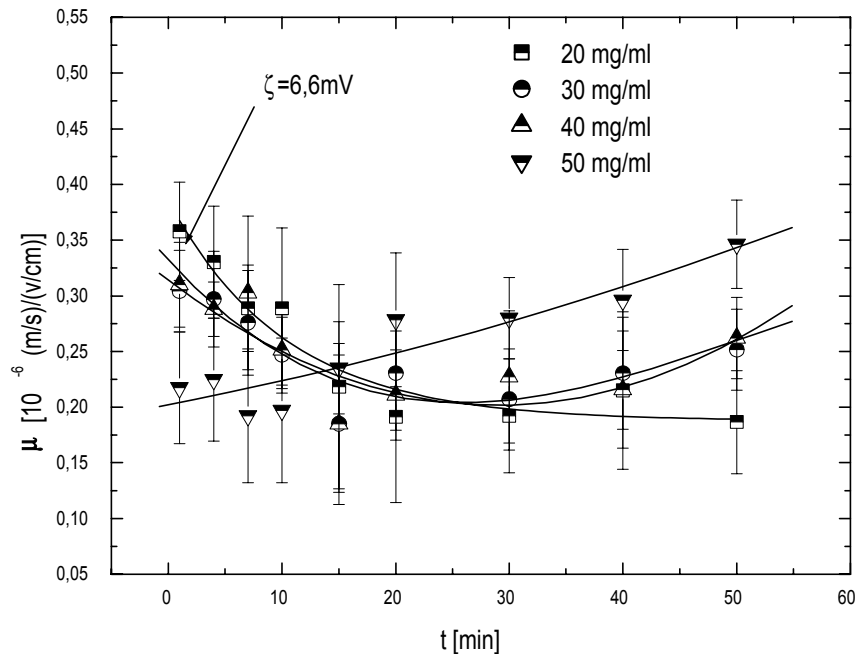


Abb.4.24: Kinetiken des aggregierenden Lysozyms bei verschiedenen Konzentrationen mit 0,7 NaCl durch Messung der gewichteten elektrophoretischen Beweglichkeit  $\mu_{el}$ .

In Abb.(4.24) ist die elektrophoretische Beweglichkeit gemittelt aus fünf Messreihen à 2,5s

zum gleichen Zeitpunkt über eine Stunde verfolgt worden. Hierzu wurde jeweils eine neue Probe angesetzt, die nach Ablauf der entsprechenden Zeit gemessen wurde. Insgesamt wurden vier Kinetiken innerhalb der ersten Stunde aufgenommen.

Der Ausgangswert  $\mu_{el}$  für die Aggregation ergibt ein Zetapotential von  $\zeta = 6,6mV$ . Dieser Wert des Zetapotentials ist bereits durch den hinzugefügten Elektrolyten der Konzentration 0,7M so erniedrigt, daß sich die Teilchen ohne signifikante Abstoßung nähern können. Bei Erhöhung der Lysozymkonzentration ändert sich der zeitliche Ablauf zu Beginn der Aggregation.

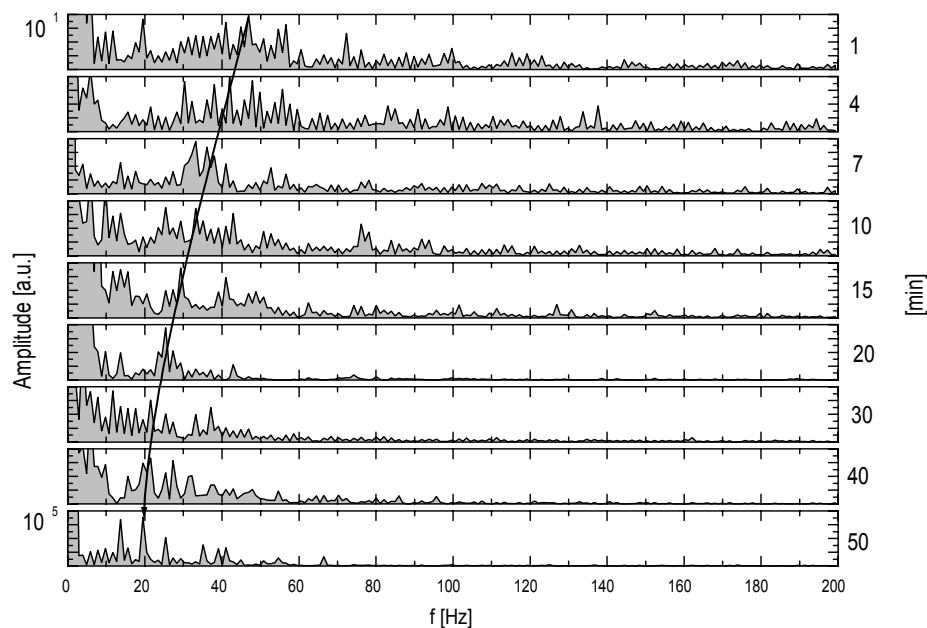


Abb.4.25: Darstellung einiger direkt aufgenommener Spektren der Aggregation von 20 mg/ml Lysozym mit 0,7M NaCl im Standard Puffer im Laufe einer Stunde.

Aufgrund der gravierenden Polymodalität und -dispersität war eine gewichtete Auswertung notwendig, d.h. nur die Stelle des Flächenmittelpunktes (gewichteter Mittelwert) der Spektren wurde zur Auswertung herangezogen. Zur Verdeutlichung dieses hochkomplizierten und invasiv-gemessenen Systems sind die Spektren für die Lysozymkonzentration von 20mg/ml in der Abb.(4.25) dargestellt.

Zwischen der ersten und der letzten Messung liegt ein Anstieg der Amplitude um vier Größenordnungen und eine Verkleinerung der Spektrumsbreite vor, was durch die größere Streufähigkeit der wachsenden Aggregate bedingt ist.

### 4.3.3 Zetapotential $\zeta$ und Ladungszahl $Z_p$

Die Messungen des Zetapotentials  $\zeta$  bzw. der elektrophoretischen Beweglichkeit  $\mu_{el}$  in Abhängigkeit der Ionenstärke des NaCl unmittelbar nach Präparation der Lysozymlösungen wurden bei einer Rechteckspannung von  $U = 62,91V$  und einer Frequenz von  $5Hz$  durchgeführt.

Das Lysozym wurde mit den Konzentrationen 20, 30, 40 und 50 mg/ml jeweils mit einer Salzkonzentration von 0,3 – 1,1 M gemessen. Hierbei wurden die Meßwerte aus fünf Messreihen à 2,5 s gemittelt und die entsprechenden Standardabweichungen angegeben.

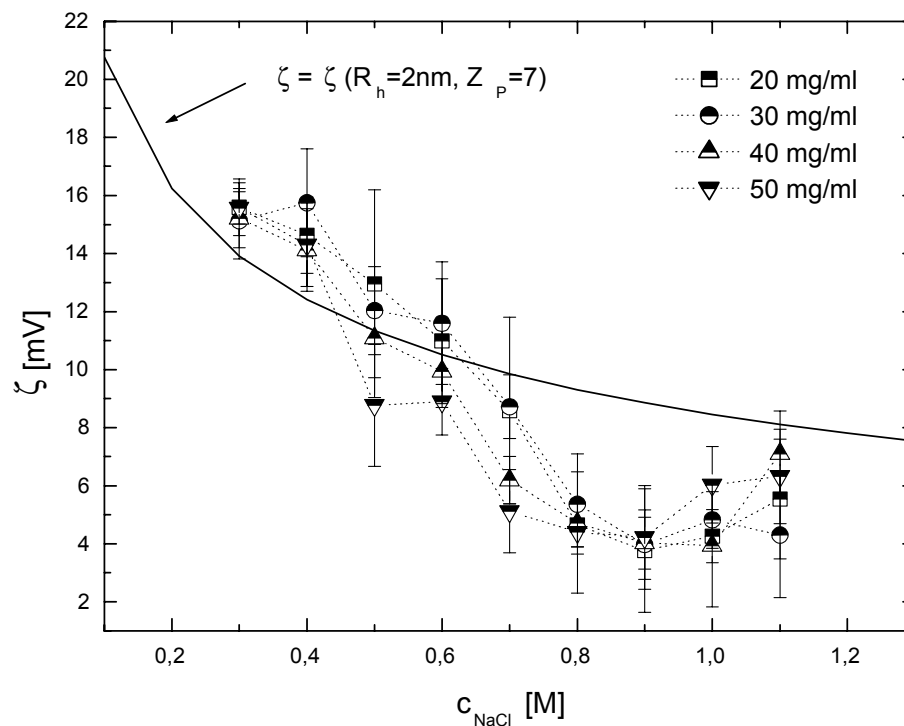


Abb.4.26: Zetapotential-Messungen des Lysozym-Systems zu Beginn der Aggregation

In Abb.(4.26) ist deutlich zu sehen, daß das Zetapotential bei Erhöhung der Ionenstärke abnimmt und bei  $0,9M$  NaCl ein Minimum aufweist. Dies ist durch die erhebliche Zunahme an Aggregaten in der Suspension verursacht, die das Signal der Monomere unterdrücken. Das Steigen des Zetapotentials hängt von den Aggregaten ab, die einen stabileren Zustand anstreben. Berechnet wurde das Zetapotential mit der exakteren Henry-Funktion (2.139).

Zusätzlich ist in dieser Abbildung der Verlauf des Debye-Hückel-Potentials (2.45) mit einer Ladungszahl von  $Z_P = 7$  dargestellt. Diese Kurve beschreibt die relativ großen Abweichungen zum realen experimentellen Verlauf.

Die Matrix der Messungen an den Proben der fortgeschrittenen Aggregation (nach 3 Tagen) sind aus fünf Meßreihen à  $2,5s$  ermittelt worden. Diese wurden bei einer Spannung von  $U = 32,64V$  und einer Frequenz von  $1Hz$  aufgenommen. Aufgrund der Größe der Aggregate reicht zur Ermittlung des Zetapotential-Wertes die Smoluchowski-Gleichung aus. Die Ergebnisse zeigen einen deutlichen Anstieg des Zetapotentials auf Werte zwischen  $15mV$  und  $24mV$ , wiedergegeben in der Abb.(4.27).

Insgesamt ist festzustellen, daß das Zetapotential des Lysozyls-Monomers in Abhängigkeit der Ionenstärke abnimmt. Weiterhin sinkt das Zetapotential im Anfangsstadium der Aggregation der übersättigten Suspensionen, sodaß eine Clusterbildung eingeleitet werden kann. Im weiteren Stadium beginnt das Zetapotential, nur noch anhand der wachsenden Aggregate meßbar, zu steigen. Das Zetapotential erreicht nach einigen Tagen einen Wert, welcher konform mit dem stabilen Zustand ist.

Selbst die eingeteilten Bereiche aus normalen DLS Messungen korrelieren mit den elektrophoretischen Messungen. D.h. eine niedrige Ionenstärke bis  $0,5M$  NaCl reicht diese nicht zum Ausfall von Lysozym aus, die übersättigten Lösungen sind relativ stabil, die Energiebarriere noch hoch genug. Es bilden sich zwar kleinere Aggregate, aber das System läßt keinen überlebendfähigen Keim zu.

Bei Erhöhung der Ionenstärke auf Werte zwischen  $0,6$  und  $0,8M$  liegt der XOVER-Bereich, wo das Zetapotential soweit gesunken ist, daß die Monomere nach einigen Zusammenstößen größere Aggregate bilden und einige auch zu Keimen heranwachsen können. Die Energiebarriere ermöglicht eine kontrolliertere Kristallbildung, was auch nach einigen Tagen mit dem bloßen Auge zu sehen ist.

Im DLCA-Bereich ist das Zetapotential der Monomere so weit gesunken bzw. vom Gesamtsystem annähernd Null, daß sich die Teilchen ohne Abstoßung in ein Energieminimum

begeben können. Bei Ionenstärken ab und oberhalb  $0,9M$  liegt keine Energiebarriere mehr vor. Das System tendiert einem stabileren Zustand entgegen, aber so schnell, daß sich im wesentlichen amorphes Präzipitat ausbildet.

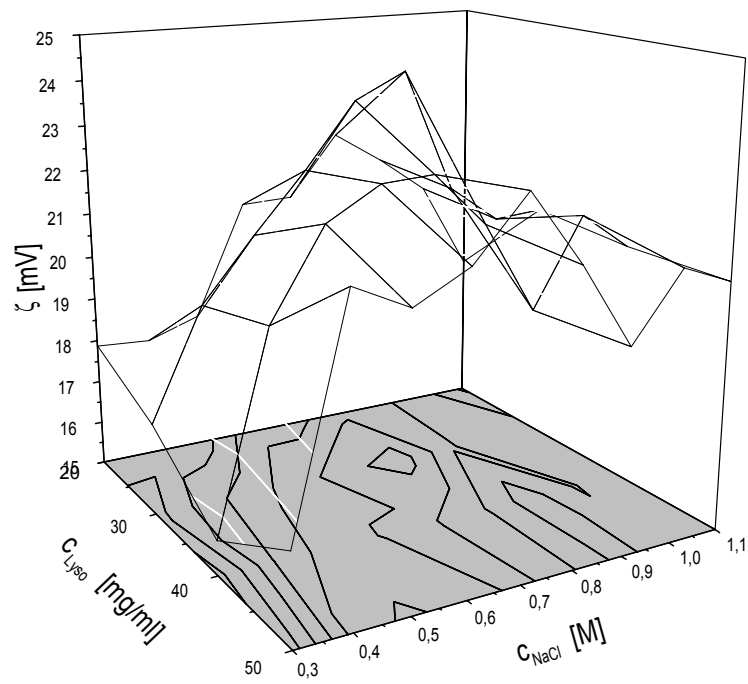


Abb.4.27: Zetapotential-Messungen des Lysozym-NaCl-Systems zum Ende des Phasenübergangs