



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101932693 B

(45) 授权公告日 2013. 03. 27

(21) 申请号 200880119201. 6

C12M 1/18 (2006. 01)

(22) 申请日 2008. 10. 08

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

EP 1733793 A, 2006. 12. 20, 1.

102007048201. 0 2007. 10. 08 DE

审查员 翟羽

102008008256. 2 2008. 02. 08 DE

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 06. 04

(86) PCT申请的申请数据

PCT/DE2008/001623 2008. 10. 08

(87) PCT申请的公布数据

W02009/046697 DE 2009. 04. 16

(73) 专利权人 M2P- 实验室有限责任公司

地址 德国贝斯韦勒

(72) 发明人 F · 肯西 C · 米勒 J · 布克斯

M · 芬克

(74) 专利代理机构 中国专利代理 ( 香港 ) 有限公

司 72001

代理人 周铁 林森

(51) Int. Cl.

C12M 3/04 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 13 页

(54) 发明名称

微型反应器

(57) 摘要

本发明涉及一种具有至少一个空腔的微型反应器,所述空腔包括底部、侧壁和位于底部对面的开口,其具有平行于底部横切侧壁的截面,该截面具有不同于圆形、正方形或长方形的形状。

1. 用作生物化学、化学或酶促反应以及微生物发酵的反应容器的微型反应器,其具有至少一个空腔,所述空腔包括底部、侧壁和位于底部对面的开口,特征在于与底部平行横切侧壁的截面具有不同于圆形、正方形或长方形的形状。

2. 根据权利要求 1 的微型反应器,特征在于所述截面具有四个以上角。

3. 根据权利要求 1 的微型反应器,特征在于所述截面具有少于四个角。

4. 根据前面任一权利要求的微型反应器,特征在于所述空腔偏离多边形形状。

5. 根据前面任一权利要求的微型反应器,特征在于平行于底部横切侧壁的截面包括至少一个凹陷和 / 或凸出的弓形,其以一定半径突入截面或从中突出,此半径为截面对角线的 0.067-0.49 倍。

6. 根据前面任一权利要求的微型反应器,特征在于所述截面的基本形状为包括至少一个多个凹陷或凸出的弓形的任意多边形或圆。

7. 根据前面任一权利要求的微型反应器,特征在于所述截面包括构成超过  $90^\circ$  的弓形的弧。

8. 根据前面任一权利要求的微型反应器,特征在于所述截面包括 3 个以上、优选地 4 个以上弧,其中每个所述弧都构成超过  $90^\circ$  的弓形。

9. 根据前面任一权利要求的微型反应器,特征在于所述截面包括半径在 0.5mm 以上的角。

10. 根据前面任一权利要求的微型反应器,特征在于所述截面包括突入所述空腔的区域。

11. 根据前面任一权利要求的微型反应器,特征在于所述截面包括突出于所述空腔的区域。

12. 根据权利要求 10 或 11 的微型反应器,特征在于所述区域为矩形。

13. 根据权利要求 10-12 中任一项的微型反应器,特征在于所述区域为弓形。

14. 根据权利要求 10-13 中任一项的微型反应器,特征在于所述区域位于角中。

15. 根据权利要求 10-14 中任一项的微型反应器,特征在于提供有多个具有不同尺寸的这种区域。

16. 根据权利要求 10-15 中任一项的微型反应器,特征在于多个这种区域彼此相邻。

17. 根据前面任一权利要求的微型反应器,特征在于平行于底部横切侧壁的截面具有圆形、正方形或长方形的形状。

18. 根据前面任一权利要求的微型反应器,特征在于通过所述底部或通过盖向所述空腔中引入至少一个改变所述截面的部件。

19. 根据前面任一权利要求的微型反应器,特征在于所述底部由允许透过底部进行测量的光学透明材料构成。

20. 根据前面任一权利要求的微型反应器,特征在于其包括多个空腔。

21. 根据前面任一权利要求的微型反应器,特征在于其包括盖。

22. 根据权利要求 21 的微型反应器,特征在于所述盖包括透气区域。

23. 根据权利要求 21 或 22 的微型反应器,特征在于所述盖包括可再封闭的区域。

24. 根据权利要求 21-23 任一项的微型反应器,特征在于除了所述透气和 / 或可再封闭的区域之外,所述盖与所述腔壁和 / 或所述底部构成为一体。

25. 根据权利要求 21-24 任一项的微型反应器,特征在于所述盖包括由坚硬、柔性和 / 或透气的材料构成的夹层材料。

26. 根据权利要求 21-25 任一项的微型反应器,特征在于所述盖包括带密封的稳定框架。

27. 根据权利要求 21-26 任一项的微型反应器,特征在于所述盖可以通过预拉伸固定于腔壁。

28. 根据权利要求 21-27 任一项的微型反应器,特征在于所述盖根据鲁尔原理固定到腔壁上。

29. 根据权利要求 21-28 任一项的微型反应器,特征在于在所述盖上提供鲁尔锁定装置的公部件,而使腔壁构成母相对部件。

30. 根据权利要求 21-29 任一项的微型反应器,特征在于所述盖与所述腔壁通过可彼此移位的斜面相连。

31. 根据权利要求 21-30 任一项的微型反应器,特征在于为了将所述盖与所述腔壁分离,可以向间隙中插入楔以将盖与腔壁分开来。

32. 根据权利要求 21-31 任一项的微型反应器,特征在于为了分离所述盖,在所述盖中设置了可以插入抓爪的孔。

33. 根据权利要求 21-32 任一项的微型反应器,特征在于所述用于分离盖的抓爪包括用于施加机械或气动反压的装置。

34. 根据权利要求 21-33 任一项的微型反应器,特征在于为了分离所述盖,插脚从下面施加分离所述盖所需的机械压力。

35. 根据权利要求 21-34 任一项的微型反应器,特征在于所述盖被粘合到所述腔壁上。

36. 根据权利要求 21-35 任一项的微型反应器,特征在于所述盖被以锁扣方式固定到所述腔壁上。

37. 根据权利要求 21-36 任一项的微型反应器,特征在于所述盖被用于产生负压的装置通过微型反应器壁拉向微型反应器。

38. 根据前面任一权利要求的微型反应器,特征在于其构成具有多个同种空腔的微型反应器阵列的一部分。

39. 根据前面任一权利要求的微型反应器,特征在于其包括振动装置。

40. 根据前面任一权利要求的微型反应器,特征在于其使得能够不打断振动过程而进行反应参与物的供应和去除以及取样。

## 微型反应器

[0001] 本发明涉及具有至少一个空腔的微型反应器,其中所述空腔包括底部、侧壁和位于底部对面的开口。

[0002] 通过传统的微型反应器阵列(所谓的微量滴定板)可以产生例如6、24、48、96、384个或更多个单独的微型反应器。正如可以极大地改变微型反应器的数目一样,单个反应器的容积也可以不同。虽然已有人提到过规模小于10ml的微型反应器,但其容积还可进一步降低到小于1ml、小于500  $\mu$ l、小于100  $\mu$ l乃至小于10  $\mu$ l。

[0003] 微型反应器充当生物化学、化学或酶促反应以及微生物发酵的反应容器。反应器阵列使得可以用小工作容积、高数据获取和简化的自动化可能性以高度的平行性研究细胞培养物。这种阵列特别适于在改进的混合和传质条件下进行的筛选试验的自动化,且它们使得能够实现与外界分离或消毒的、无菌的或单菌的(monoseptisch)操作。

[0004] 生物系统的筛选在生物学、化学、化工、药学和医学的许多领域都是必需的(例如适合的生物品系、酶或适合的培养基和培养条件的选择)。在这里存在对高试样吞吐量(测试平行化)和对减少往往昂贵的起始材料的需要。

[0005] 目前使用的生物反应器如振动烧瓶、小发酵器和试管并不能满足此需要。已有的方法不能满足对自动化、成本最小化和要求的高吞吐量的需要。对于生物催化体系恰好存在对微升规模的许多平行试验的极高需要,因为这类过程通常比类似的化学过程进行的更慢和特别是在开发阶段也更昂贵。因此存在对开发能为生物培养和为生物催化反应以可能的最小空间提供适合的环境的微型生物反应器的需要。

[0006] 对于适合的操作条件,应当作为重要前提强调两个准则:在消毒和单菌条件下执行相应测试的可能性,以及保证对于生物培养或生物催化反应体系来说适合和足够的传质(液-液、液-气、固-液、固-气)。

[0007] 微型反应器阵列,例如微量滴定板,为实现高度的平行化提供了一个理想的平台。由于小的反应体积(例如每室 $> 10 \mu$ l到 $< 10$ ml)、高度的平行化(例如每板6-1536个室)和培养过程自动化的可能性(可由自动装置处理的形式),微型反应器阵列代表了总地来说最成本有效和有前途的生物反应器。

[0008] 此外,在这类反应器中使用非侵入式的光学测量方法来获取过程参数也已得到了很好的发展。另外,振动微量滴定板中有关传质的操作条件(最大氧传递能力,OTR<sub>max</sub>)也已得到很好的表征。

[0009] 已经能够证实,使用标准的96孔微量滴定板(圆横截面),用空气充气只能实现0.030mol/l/h的最大氧传递能力OTR<sub>max</sub>(Hermann R., Lehmann M., Büchs J.: Characterization of gas-liquid mass transfer phenomena in microtitre plates. Biotechnol Bioeng, 81(2), 178-186, 2003)。然而,对于好氧微生物培养的培养操作来说,为了不以氧有限的方式操作所述培养,这往往是不足的。

[0010] 许多微生物培养的要求往往在0.05mol/l/h的OTR值以上,在很多情况下在分批过程中它们甚至达到了0.1mol/l/h的OTR值,在补料分批过程中甚至高达0.3mol/l/h。已经能够在方形和圆形96深孔板中达到0.1-0.15的更高OTR<sub>max</sub>值。然而,只有以相应地

200  $\mu$ l 的较小填充体积才能达到这些值。由此液体几乎被完全从底部移走,已不可能再进行在底部的光学测量。此外,目前还不存在具有光学透明底部的深孔板,因此这使得透过底部进行光学测量也是不可能的。

[0011] 微量滴定板目前已被用于生物系统筛选。为此,需要在旋转振动器上填充、播种和在旋转振动器上培养单独的反应室。由于通常是轨道振动运动,因此提高了向反应液体中的氧输入并实现了反应混合物的充分混合。为了保持系统无菌,用透气膜(孔径 $< 0.2 \mu\text{m}$ )或气密膜或盖结构覆盖微量滴定板,或将其在无菌环境中开放培养。

[0012] 用于所述应用的微量滴定板目前以两种基本设计由众多制造商提供:具有圆形空腔的或具有长方形空腔的。第一批微量滴定板是由匈牙利人 G. Takatsky 博士在 1951 年制造的,具有圆形横截面。后来在上个世纪九十年代引入了具有正方形和长方形横截面的微量滴定板。虽然微量滴定板被用于化学、医学、生物工程和生物学的众多领域,但具体对于细胞培养来说几乎没有出现任何发展。

[0013] 1991 年的 US5225164 的专利说明书中记述了几个少数的例外,其中记载了在正方形空腔的至少一个垂直壁上提供突入到所述空腔中的阻流器(**Stromstörer**)的可能性。该方案原则上可以导致提高的传质,但所述阻流器(Strombrecher)在具有明显的轮廓时会严重限制液体在反应器中的环流、好的混合和好的传质。

[0014] 另一方面,阻流器可能有助于显著的滴形成/飞溅,而这会导致不均匀、增强的壁生长和对板的透气盖的润湿和堵塞(Büchs J., Introduction to advantages and problems of shaken cultures, Biochem. Eng. J. 7(2), 91-98, 2001)。另外,在市场上或在专业文献中也找不到对具有变化的空腔几何形状(除圆形和长方形横截面之外)的微量滴定板的实施和研究的其它教导。

[0015] 从实践中已知,在测量系统如 m2p-labs 公司出售的 Bio-Lector-Technologie 中使用具有圆形空腔的微量滴定板(WO2005/098397)会导致在振动过程中获取测定值时出现问题。为了保证向反应液体中的连续良好传质,持久的振动是必需的,但在高振动器转速下它会导致液层大幅度缩小直至被传感器占据的空腔底部完全变干(Freilaufen),并由此导致在测量值获取时出现问题(还参见:Kensy F., John G. T., Hofmann B., Büchs J., Characterisation of operation conditions and online monitoring of physiological culture parameters in shaken 24-well microtiter plates; Bioprocess and Biosystems Engineering 28(2), 75-81, 2005)。

[0016] 在市场上有各种用于覆盖这种微量滴定板的体系。首先,大多数微量滴定板制造商还提供被松散地放在微量滴定板上的塑料盖。

[0017] 其次,粘贴膜的概念在市场上也已经形成。从不同供应商处还能获得用于此用途的各种手动或自动化操作作用的额外装置(密封器)。

[0018] 作为第三种变体,还有垫子或柔性塑料(例如硅)销售,其细毛状突出物与每个单独的空腔接合并由此封闭后者。

[0019] 已知市售的只有两种借助于力将尺寸稳定的盖紧密压到微量滴定板上的体系。首先,是 EnzyScreen 公司出售的“Sandwich Cover Plate”体系。

[0020] 其次,从 US6896848 的专利说明书中已知有一种盖,其完全接合在微量滴定板周围并由此抓紧微量滴定板。两种系统都需要专门的装置来施加或放置盖。因此没有额外的

保持装置或施加装置则两种系统都不能自动化。

[0021] 现有技术已知的上述反应容器对于大部分应用（特别是与气相的化学反应或细胞培养）来说是不适合的。它们具有以下缺陷：

[0022] - 周围气相与空腔内的液相之间的气体交换不足。

[0023] - 空腔内的各种成分（液-液混合物或固-液悬浮液）的混合不充分或过慢。

[0024] - 在提高的振动频率下液体在腔壁上上升和在较低的振动频率下即已到达空腔上缘。由此，可用的填充体积有限，因为否则就会发生液体逸出空腔边缘或者堵塞所施加的覆盖膜。

[0025] - 在提高的转速下空腔底部变干，其使得不能使用固定或安装在空腔底部的传感器进行测量或从底部下面对液体进行光学测量。

[0026] - 使用例如正方形空腔截面或具有阻流器的空腔可能会导致流中断，其会导致形成液滴和/或气溶胶。这会导致在空腔腔壁上的固体和反应组分沉积和导致堵塞微型反应器阵列的覆盖物。液滴和/或气溶胶的形成还会对光学测量有不利影响。

[0027] - 在阻流器过度突出时形成泡沫。

[0028] 对于目前已知的各种微型反应器阵列覆盖体系，特别是以下缺点被认为是非常严重的：

[0029] - 不能牢固和紧密地封闭微量滴定板，特别是在振动过程中（只是松散地放置的塑料制成的标准盖）。

[0030] - 复杂的操作，在某些情形下为了将盖固定到微量滴定板上还必须使用附件。没有或只有复杂的自动化可能性且自动化的解决方案很昂贵（粘着膜和塑料垫）。

[0031] - 当使用已有的微量滴定板覆盖物（膜，盖体系）时，没有或只有不充分不均匀的气体供应和/或不期望的反应液体高蒸发。

[0032] - 不可能在没有污染危险的情况下进行取样或向微量滴定板中添加或从中除去液体/固体，因为不存在能够不需额外费用或不需额外装置就能再次封闭并同时保证气体传递的覆盖物。

[0033] 本发明的目的是克服上述传统微量滴定板的缺陷并由此从根本上将微量滴定板主要作为化学和生化反应装置的容器的已有概念扩展到创建一个完全足够和普遍适用的反应和培养体系，其中优选地满足以下几点。

[0034] 对于微型反应器阵列而言，包括：

[0035] - 与空腔内的液体的增强的气体交换

[0036] - 空腔内的液体或悬浮液的混合加强

[0037] - 防止反应溶液在要求的高振动转速下从反应容器中溢出，

[0038] - 防止空腔底部在振动过程中变干（例如：以保证可以在底部或透过底部进行光学或任何测量）并实现与可能设置在空腔底部的传感器的持续接触。

[0039] - 防止形成液滴和/或气溶胶，其可能会对测量产生不利影响，在腔壁上沉积反应成分和/或生物物质和/或可能由于堵塞而妨碍或阻断透过微型反应器阵列的透气盖的传质。

[0040] - 由于液体运动尽可能均匀，所以泡沫形成少。

[0041] 对于微型反应器阵列的盖而言，包括：

[0042] - 通过盖的施加可以牢固和紧密地将每个单独的空腔相对于相邻空腔和周围封闭,所述盖可被锁定在微型反应器阵列上和 / 或再次解除。

[0043] - 盖的操纵简单,可以将例如液体处理系统的传统的夹持臂加以自动化。

[0044] - 通过调整盖中的开口的尺寸和 / 或使用扩散控制材料覆盖这些开口,减少蒸发并同时通过这些开口提供充分的气体传递。

[0045] - 无菌取样和 / 或向微型反应器阵列的单独空腔中供给和从中除去液体或固体的可能性。

[0046] 对于微型反应器,问题的解决是通过与底部平行横切侧壁的截面具有不同于圆形、正方形或长方形的形状。在此,形状是指基本形状,此基本形状不会被较小的阻流器改变。

[0047] 上述问题的解决是通过改变空腔的几何形状使其不同于已有的圆柱形或长方形截面几何形状来进行的。

[0048] 问题的解决是通过改变现有技术已知的圆形或正方形空腔,使得由于在空腔中引入突起或凹陷而造成的流干扰(**Stromstörung**)的积极性能与圆空腔和从而尽可能不被干扰的流的积极性能以理想方式针对所述的应用情形彼此互补。

[0049] 由于新提出的空腔形状,旋转的液体运动在施加轨道振动时受到适度干扰。

[0050] 由于对均匀壁流的干扰或妨碍,形成了对充分混合以及从气相向液相的传质(反之亦然)有积极作用的湍流分布。突起和凹陷的形成应当协调,从而使得不会导致形成液滴和气溶胶,其可能会导致堵塞放上的盖(例如膜)或在反应器器壁上附着 / 沉积液体或固体(例如生物质)。协调流干扰作用的效果还使得液体持续地润湿底部,由此使得可以在空腔底部进行光学或其它测量。协调流干扰作用还可以提高可能的填充体积,直至在相应的振动频率下发生液体溢出。

[0051] 所述问题可以通过创建不同的空腔几何形状来解决:

[0052] 空腔底部区域(**Grundfläche**)的第一种变化方案,是从正方形底部区域的极端开始,通过增大角的数目,向另一个圆形底部区域极端靠近。由此提出所述截面应当包括四个以上角。

[0053] 对于  $112.16\text{mm}^2$  的给定区域,还可以通过在多边形的底边与两个相邻半径(Radien)之间构造三角形来计算多边形底边的与构造相关的长度。由此还提出所述截面少于四个角。

[0054] 在第二种变化方案中,还是从正方形开始,向圆形底部区域的转变是通过在正方形的角中构造半径不断增大的圆来实现的。角圆的半径大小,以及初始正方形的剩余直线与所述构造相关。

[0055] 有利的是,空腔偏离多边形的形状。

[0056] 其形状可以用平行于底部横切侧壁的截面来描述,该截面包括至少一个凹陷和 / 或凸出的弓形,该弓形以某一半径突入或突出于截面,此半径为截面对角线的 0.067-0.49 倍。

[0057] 一个例子规定所述截面的基本形状为包括多个凹陷或凸起的弓形的任意多边形或圆。

[0058] 所述截面可以包括形成超过  $90^\circ$  的弓形的弧,或所述截面可以包括 3 个以上、优

选 4 个以上的弧,所述弧在每种情形下都构成超过  $90^\circ$  的弓形。

[0059] 在第三种变化方案中,选择了五边形为初始形状,并通过把角修圆逐渐变为圆形。

[0060] 对于第二和第三种变化方案,已经证明有利的是所述截面包括半径超过 0.5mm 的角。

[0061] 第四种方案在于引入不同形状和大小的阻流器来改变原本为圆形的空腔基本形状。此处产生的底部区域在很多情况下并不容易计算。为了满足这里  $112.16\text{mm}^2$  的规定,在使用 Autodesk Inc. 公司的软件 AutoCADVer. 14.01 绘制之后测量面积,然后再相应缩放。

[0062] 由此产生截面包括突入空腔的区域的形状。另一种方案规定截面包括突出于空腔的区域。对于许多实施方案来说,有利的是此区域位于角中。

[0063] 此外,还提出提供多个具有不尺寸的这种区域或使多个这种区域彼此相邻。

[0064] 在最简单的情况下,在空腔的整个高度上都在其器壁上安装了长方形或半圆形的挡板。

[0065] 因此提出所述区域为矩形或弓形。

[0066] 此外,采用的空腔几何形状的给定截面可以在高度方向上变宽,以例如在注塑成型时确保更好地脱模,或者在高度方向上变窄,以例如能进一步增大在相应振动频率下不会发生液体溢出的填充体积。

[0067] 作为问题的另一种解决方案,可以使用上述空腔几何形状,其随后在高度方向上向上或向下转变成另一种空腔几何形状。所述转变可以在此处所述的一个空腔几何形状之间进行,也可以转变成圆形、正方形或长方形的空腔几何形状。还可以在圆形、正方形或长方形空腔几何形状之间进行转变。

[0068] 例如,由此提出与底部平行横切侧壁的另一截面具有圆形、正方形或长方形的形状。

[0069] 对于某些应用,也可能有利的是通过底部或通过盖向空腔中引入至少一个能改变所述截面的部件。

[0070] 为使能够实现透过底部的测量,还提出底部由光学透明材料构成。

[0071] 有利的是,微型反应器包括多个空腔,所述多个空腔特别优选地以阵列的形式排列。

[0072] 独立于上述实施方案和由此可获得的优点,有利和对于本发明重要的是微型反应器,特别上面所述的反应器,包括特别的盖。

[0073] 此盖优选地包括透气区域,以特别是在阵列的情形下使每个单独的空腔相对来自周围的固体和液体封闭。同时,有利的是在每个空腔之上提供开口,开口的形状和大小以及封闭开口的材料应使得反应液体的蒸发被大大减少且从周围气相向空腔内的液相或在相反方向上的传质不会受到不利影响。

[0074] 此外,还提出所述盖应当包括可再封闭的区域。特别优选的是,除了透气和 / 或可再封闭区域之外,盖与腔壁和 / 或底部是一体的。

[0075] 有利的是盖包括由坚硬、柔性和 / 或透气的材料制成的夹层材料。一个实施方案规定盖包括带密封的稳定框架。

[0076] 盖可以通过预拉伸固定到腔壁上,且其可以根据鲁尔原理固定到腔壁上。在这里,优选的是在盖上提供鲁尔锁定装置的公部件,且使腔壁构成母相对部件。

[0077] 一种变体规定盖与腔壁通过可彼此移位的斜面相连。这可以例如通过为使盖与腔壁分离而可向间隙中插入楔以将盖与腔壁分离开来实现。

[0078] 为了抬起盖,还提出为了分离盖而在盖中设置可以插入抓爪的孔。特别有利的是所述用于分离盖的抓爪包括用于施加机械或气动反压的装置。例如,为分离锚定的盖,可以在开口中提供孔,夹持臂的插脚或空心针可以通过所述孔向空腔施加机械或气动压力,以将盖与反应容器装置分离。

[0079] 为了固定盖,提出了将盖粘合到腔壁上。此外,还可以以锁扣方式将盖固定到腔壁上,或者盖可以包括用于在空腔内产生负压的装置。

[0080] 有利的是,盖使得能够实现不中断振动过程地进行反应参与物的供应和去除以及取样。

[0081] 一个实施例规定微型反应器构成具有多个相同类型空腔的微型反应器阵列的一部分且其优选地包括振动装置。

[0082] 附图显示了微型反应器、反应器阵列和用于反应器和反应器阵列的各种盖的实施方案变体以及测量结果。

[0083] 在附图中:

[0084] 图 1 显示了空腔的角的个数变化,

[0085] 图 2 显示了在正方形空腔中角的形成变化,

[0086] 图 3 显示了在五边形空腔中角的形成变化,

[0087] 图 4 显示了具有长方形和半圆形阻流器的空腔的示意图,

[0088] 图 5 图解显示了具有不对称的半圆形挡板的五边形底部区域的构造,

[0089] 图 6 图解显示了具有不对称的半圆形挡板的五边形和六边形底部区域,

[0090] 图 7 图解显示了具有圆角挡板和顶点挡板的四边形、五边形和六边形底部区域,

[0091] 图 8 显示了排列成阵列的各种微型反应器几何形状的照片,

[0092] 图 9 显示了用于微型反应器阵列的符合鲁尔原理的盖模型照片,

[0093] 图 10 显示了用于解释鲁尔原理的示意图,

[0094] 图 11 图解显示了用于借助负压将盖保持在微型反应器阵列上的方案,

[0095] 图 12 图解显示了用于将盖保持在微型反应器阵列上的钩,

[0096] 图 13 图解显示了从微型反应器阵列上分离盖的可能性,

[0097] 图 14 图解显示了放置到微型反应器阵列上的多功能盖,

[0098] 图 15 用图表显示了在不同的实施例几何形状中最大氧传递速率的测量结果,

[0099] 图 16 用图表显示了在其他实现的实施例几何形状中最大氧传递速率的测量结果,

[0100] 图 17 用图表显示了在具有挡板的实施例几何形状的情形下最大氧传递速率的测量结果,

[0101] 图 18 显示了在实现的实施例几何形状中最大填充体积的测量结果,和

[0102] 图 19 显示了在实现的实施例几何形状中在轨道振动的情形下空腔中的可测量填充高度的测量结果。

[0103] 图 1 显示了对于给定区域(在本实施例中为  $112.16\text{mm}^2$ )如何通过多边形的底边与两个相邻半径之间构造三角形来计算多边形底边的构造相关长度。

[0104] 图 2 所示的变化方案从正方形出发,其中向圆形底面积的转变是通过在正方形的角中构造半径不断增大的圆来进行的。角圆的半径大小和初始正方形的剩余直线是与构造相关的。它们的计算是通过构造和计算具有位于初始正方形角中的所述角圆的中心点的筝形多边形来进行的。

[0105] 图 3 显示了使用五边形的例子作为初始形状的相同步骤。

[0106] 图 4 显示了如何通过引入了不同形状和大小的阻流器来改变原本为圆形的空腔基本形状。此处产生的底部区域在很多区域不容易计算。为了满足  $112.16\text{mm}^2$  的规定,在使用 CAD 系统绘制之后测量面积,然后再缩放。作为举例,这里在空腔的整个高度上都在其器壁上安装了长方形和半圆形的挡板。然而这只是举例,挡板的形状及其在空腔高度上的延展范围在不同的实施例中都可以变化。

[0107] 图 5-7 显示了底部区域的几何形状,它们由对适合的变形的理论研究而来并以各种不同的几何形状呈现。对于所有这些基本形状,都引入了规定大小的圆,以  $1\text{mm}$  的步长改变圆的半径。基于对空腔内的流的影响的纯理论评定而对由此得到的几何形状进行选择。排除具有极强突出或极弱突出的阻流器的形状。

[0108] 图 6 和 7 显示由五边形或六边形底部区域转化来的阻流器的底部区域。它们的构造被举例显示在图 6 和图 7 中。这些底部区域的角已经被修圆,角圆的半径为  $1$  或  $2$  毫米。在每个角上设置了半径为  $1\text{mm}$  的半圆形挡板。由于缺乏对称,这种构造为空腔的振动规定了旋转方向。

[0109] 图 7 中给出了空腔的进一步的基本形状。从四边形、五边形、六边形或七边形的基本形状出发,角部同样修圆,在这种情况下这些角之间的区域不是平直的,而是具有向内延伸的尖点。这些尖点构成这些空腔内的挡板。

[0110] 图 8 中显示的阵列由不同的空腔构成,用于研究不同几何形状的性能表现 (Leistungsfunktion)。

[0111] 制造的微型反应器阵列盖,如图 9 所示的模型,将每个单独的空腔相对周围紧密地封闭并在每个空腔之上具有开口,所述开口的构造使得反应流体的蒸发被显著减少并且从周围气相向空腔内流体以及相反方向的传质不会受到不利影响。

[0112] 微型反应器阵列的个别或所有反应器相对于具有鲁尔芯的盖构造为鲁尔套。为了同时实现所有空腔相对于周围的密封,所有空腔都是鲁尔套的实施方案是有利的。

[0113] 图 10 所示的鲁尔原理已被证明对于此模型来说是非常有利的。其能够相对于周围牢固且紧密地封闭独立的反应空间。为此,用充当覆盖物的盖 2 封闭空腔 1。盖 2 具有圆锥形定位单元 (Passelemente) 3,其位于空腔壁附近并将盖 2 密封到空腔 1。在其上侧,盖 2 具有透气膜 4,其被粘合或焊接到盖上。此膜保证了必要的气体交换、减少的蒸发和单菌操作。所述部件 - 微型反应器阵列和具有遮蔽透气膜的配合盖 - 在供用户使用之前应当是预消毒的。

[0114] 图 10B 中显示了另一种实施方案。其中在空腔 5,6 上提供了柔性封闭层 7,在所述柔性封闭层 7 上有透气膜 8。

[0115] 微型反应器阵列在其主体内具有锥形空腔,其充当母鲁尔套 9。微型反应器阵列的盖 10 具有鲁尔芯 11,其作为公部件与套 9 配合并将盖保持在阵列上。

[0116] 柔性层 7 被施加在空腔之上。它通过适当的盖接触压力封闭所有的井,其中所述

盖由鲁尔连接保持。所述鲁尔套可被提供在例如单独并之间以及微型反应器阵列的框架上。图 10C 显示了一种可能的方案。其中用微型反应器阵列 13 上的固定点 12 显示了用于封闭空腔 14 的鲁尔套的可能位置。

[0117] 图 10D 显示了如何可将鲁尔原理应用于整个微型反应器阵列。在这里,阵列框架 15 的至少两个相对侧是倾斜的。它们由此充当盖 16 的鲁尔芯,盖 16 或者构成外周鲁尔套,或者只在相对侧被套在阵列框架 15 的侧面上。阵列盖 16 由此构造成鲁尔套并与阵列框架 15 产生摩擦连接。在盖 16 与微型反应器阵列框架之间同样提供了透气膜 17 和柔性覆盖层 18。

[0118] 为了保证在微型反应器阵列 21 的每一位置处盖 19 对柔性层 20 的均匀或足够的接触压力,盖 19 有利地向内凸出,如图 10E 中所示。这由此确保了均匀的应力分布。

[0119] 图 11 显示了一种实施方案变体,其中盖 22 被真空或负压吸在微型反应器阵列 23 上。为此,通过微型反应器阵列 23 主体内的孔 24 抽真空,从而产生负压,盖被吸盘或类似的中间部件 25 拉向微型反应器阵列 23。其上具有透气膜 27 的柔性层 26 由此被压在空腔上,以将其密封。只要抽真空或产生负压,所述按压和密封就是有效的。因此,这种连接很容易分开。抽吸钮 25 和孔 24 可以根据应用的情形随意分布在阵列上。

[0120] 图 12A 显示了如何通过有倒刺的钩 31 将盖 30 固定到板几何形状上。在该示例实施方案中,有倒刺的钩 31 钩在部件 (Steg) 32 上。只是在这里必须将具有有倒刺的钩 31 的盖 30 被从上面或从侧面推到微型反应器阵列 33 上。在封闭状态,使盖 30 保持与微型反应器阵列 33 如此之近,以致于盖 30 将柔性层 34 压在空腔 (未显示) 上并由此密封空腔。

[0121] 图 12B 显示了一种变体,其中有倒刺的钩 35 牢牢钩在微型反应器阵列 37 中的槽 36 内。

[0122] 为了随后再拆下盖 30,有利的是将盖 30 的有倒刺的钩 35 引导在导槽 38 中。在导槽 38 的末尾位置,有倒刺的钩 35 被柔性层 39 的弹簧张力保持住。为了啮合和脱离所述末尾位置,必须通过滴管自动装置的夹持臂或人工对盖 30 施加外力,其能轻易克服柔性层 38 的弹簧张力。

[0123] 图 12D 显示了通过借助于有倒刺的钩 43 上的弹簧 42 施加弹簧张力将盖 40 固定在微型反应器阵列 41 上的备选解决方案。只有通过滴管自动装置的夹持臂或人工施加外力 44 才能抵消弹簧 42 的张力,并将有倒刺的钩 43 向外打开。通过向下移动盖 40 和随后松开弹簧 42,可将盖 40 放上和将有倒刺的钩啮合到侧面部件 (Seitensteg) 45 上。

[0124] 在某些应用中,可能必需要将盖与微型反应器阵列再次分开。也应当通过除了具有抓爪的简单液体处理系统 (标准的滴管自动装置) 之外没有较大附件的简单装置来提供这种可能性。为此,图 13 中显示了一种可能的方案。一方面,可以如图 13A 所示通过鲁尔套内部的超压来分离鲁尔连接。所述超压可以通过穿过鲁尔芯中的孔的压缩空气管线来提供,所述压缩空气管线被安装在滴管自动装置的夹持壁上。为此,压缩空气管线 51 必须通向每个鲁尔芯 50。

[0125] 图 13B 显示了如何在板 52 上提供插脚 53,所述插脚从下面将鲁尔芯 54 挤松。所述板只不过是放在插脚 53 上,插脚 53 穿过微型反应器阵列基体 56 中的通孔 55 将盖 57 向上向鲁尔芯 54 挤压。

[0126] 如果在微型反应器阵列上使用多个鲁尔连接或其它摩擦连接来固定盖,则有利的

是不必有针对性地将力作用在每个单独的连接上。图 13C 给出的构造显示了一种解决方案。在这里,力 60 只被施加到盖 62 的外框架 61 上,其中斜靴 63 作为夹持壁的机械指水平地在盖 62 下通过。在微型反应器阵列 65 的斜壁 64 处,最后有向垂直方向的偏移力 60,由此靴 63 在盖 62 之下通过并将后者抬起。靴 63 的运动迫使微型反应器阵列 65 相对于盖 62 产生相对运动并由此将其分离。

[0127] 图 13D 显示了此原则的一个简单变体。在这里,靴 66 是向上倾斜的。盖 67 向上从斜面 68 之上通过,微型反应器阵列 69 保持在其固定位置中。

[0128] 图 13E 给出了又一种分离机构。此分离机构在夹持臂的机械指处没有专门的斜靴也行。通过在微型反应器阵列 72 和盖 73 上提供两个呈镜面的斜面 70 和 71,在盖(其在此侧面上为部分柔性)上施加水平力 74 时可以根据上述原则产生力 74 向垂直方向上的偏移。

[0129] 现在正变得越来越必要的是,不仅通过适当使用位于反应器之内或之上的传感器从微型反应器阵列的反应器装置获得在线信息,还用进一步的离线分析来确认反应状态随时间的变化或获得进一步的洞察。因此在反应进行期间从单独的反应器获取试样材料并在其之后以不受影响的方式继续所述反应是非常重要的。向反应混合物供给或从中除去液态或固态物质可能也是必需的。因此必需获得对反应容器的可逆访问。因此之故,在盖中除了用于透气层的开口之外,还应提供用于采样和/或提供、去除物质/反应参与物的开口。

[0130] 还为此使用了硅或另一种柔性聚合物的隔膜材料,由于其材料性质,所述隔膜材料能自动再次封闭。最后,所述隔膜应当能用插管 80、滴管或滴管针穿过,以向空腔内部滴入或移出试样材料 81。在抽出插管 80 和再封闭隔膜之后,反应应当能不受影响地继续进行。特别是对于细胞应用来说,为了不产生任何通常是单菌的培养操作的污染可能,无菌取样是极为重要的。

[0131] 有利的是,特别是在非常快速的反应和发酵的情形下,可以不中断振动地进行取样或介入工艺,以便不会限制传质。为此,设计以非常小的直径执行振动过程,以使即使是在振动过程当中也可以穿过隔膜渗入反应空间并取样或供应、除去基质。在这里,1-5mm 的振动直径是有利的。此外,还必须保证用于在振动期间取样的插管最多只在弹性范围内变形或柔性地安装。

[0132] 图 14 所示的方案包括插管 80,其穿过刚性盖背 83 内的开口 82,通过透气膜 84 和柔性覆盖层 85 进入空腔 86,以从空腔 86 中移除或向其中引入反应液体。为了内外部之间的传质,在柔性覆盖层 85 中提供了孔 87,所述孔与刚性盖背 83 中的开口 88 对齐。

[0133] 微型反应器阵列的变化的空腔几何形状的巨大优点已在对多个模型的广泛测试中得到证明。一方面,已经证明可以实现向反应液体中的氧传递速率的巨增,氧传递速率水平是现有技术的微量滴定板,特别是用于微生物发酵时,的一个限制因素。还证明了根据现有技术在已有的微量滴定板或深并板中使用的空腔几何形状(圆形或正方形)对于氧传递来说绝不是最佳的。图 15-17 显示了在不同几何形状和振动转速以及不同的工作体积下的最大传质速率(在此为氧传递速率:OTR)(在所有情况下振动直径都为 3mm 的轨道)。由这些测量数据还可以推断,US5225164 的专利说明书中记述的空腔形状也不可能是最佳的,因为由正方形的基本形状与角阻流器(eckigen **Stromstörern**)的组合不可能预期有最大输氧,相反会观察到明显的水滴形成。

[0134] 在第二系列测试中,研究了在轨道振动期间的溢出和液滴形成。对每种创造的实施方案进行研究,以确定在 1000 转 / 分的振动速度和 3mm 的振动直径下在 20mm 高的模型微量滴定板中的最大填充体积 (图 18)。

[0135] 可以表明,如果充当阻流器的突起或凹陷只是很小或具有适度的坡度,会产生有利的液体行为。

[0136] 除了本发明的这两个优点即提高的传质和同时低的液滴形成或反应液体溢出倾向之外,本发明的另一重要优点在于防止空腔底部变干。为了研究此性能,通过荧光素溶液的荧光强度反过来计算在振动器转动期间存在于井底的液体层厚。图 19 显示的结果表明,角和边缘越明显越能防止液体在空腔壁上展开,从而防止其离开底部。

[0137] 同时考虑上述三个试验系列 (输氧量、最大填充体积、底部变干) 可知,相对于现有技术本发明从根本上改进了微量滴定板的构思,特别是对于其作为细胞培养系统的应用来说。由于可以实现高得多的输氧,同时实现没有液滴或飞溅形成的充分均匀的流体力学,所以使得微生物和更高级细胞 (植物、动物和人体细胞) 的在宽范围内不受限制的发酵成为了可能。由于防止了空腔底部变干,即使在高振动速度下也有足够高的液柱留在空腔底部。由此在空腔底部液体更容易出于测量目的而被接近。安装在这里的传感器不会存在与反应混合物失去接触的危险。

[0138] 微量滴定板盖的新颖设计克服了在用微量滴定板进行培养时常会产生的一个严重缺陷。特别是在更高的培养温度下产生的从空腔中的液体损失被显著减少。同时,实现了环境与反应体积之间的充分气体交换。每个空腔通过隔膜保持可用于取样。由于用尺寸稳定部件和覆盖用柔性材料制造的盖的结构以及盖能够很容易地拆下,本发明提供了将此体系安装在自动化系统 (滴管自动装置; 夹持臂) 中而不需较大辅助设备或专门的施加装置的可能性。

|         |                                                                                   |                                                                                   |                                                                                   |                                                                                   |                                                                                    |                                                                                     |                                                                                     |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
|         |  |  |  |  |  |  |  |
| 角数目     | 4                                                                                 | 5                                                                                 | 6                                                                                 | 7                                                                                 | 8                                                                                  | 10                                                                                  | $\infty$                                                                            |
| 边长 [mm] | 10.59                                                                             | 8.07                                                                              | 6.57                                                                              | 5.56                                                                              | 4.82                                                                               | 3.82                                                                                | 0                                                                                   |

图 1

|                  |                                                                                   |                                                                                   |                                                                                   |                                                                                   |                                                                                    |                                                                                     |                                                                                     |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
|                  |  |  |  |  |  |  |  |
| 角圆半径 [mm]        | 0                                                                                 | 1                                                                                 | 2                                                                                 | 3                                                                                 | 4                                                                                  | 5                                                                                   | 5.975                                                                               |
| 边长<br>基础正方形 [mm] | 10.59                                                                             | 10.63                                                                             | 10.75                                                                             | 10.95                                                                             | 11.22                                                                              | 11.56                                                                               | 11.95                                                                               |
| 正方形剩余直线<br>[mm]  | 10.59                                                                             | 8.63                                                                              | 6.75                                                                              | 4.95                                                                              | 3.22                                                                               | 1.56                                                                                | 0                                                                                   |

图 2

|                  |                                                                                     |                                                                                     |                                                                                     |                                                                                     |                                                                                       |                                                                                       |                                                                                       |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
|                  |  |  |  |  |  |  |  |
| 角圆半径<br>[mm]     | 0                                                                                   | 1                                                                                   | 2                                                                                   | 3                                                                                   | 4                                                                                     | 5                                                                                     | 5.975                                                                                 |
| 边长<br>基础五边形 [mm] | 8.07                                                                                | 8.09                                                                                | 8.14                                                                                | 8.23                                                                                | 8.35                                                                                  | 8.5                                                                                   | 8.68                                                                                  |
| 五边形剩余直线<br>[mm]  | 8.07                                                                                | 6.64                                                                                | 5.24                                                                                | 3.87                                                                                | 2.54                                                                                  | 1.24                                                                                  | 0                                                                                     |

图 3

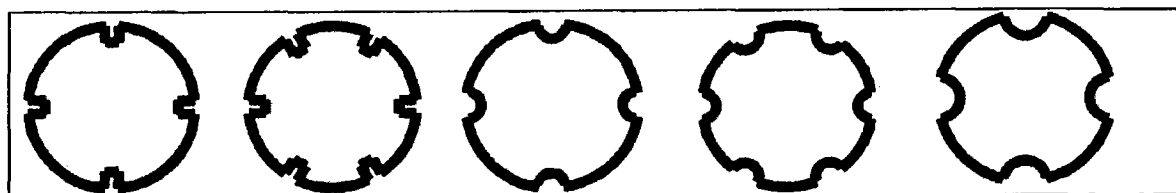


图 4

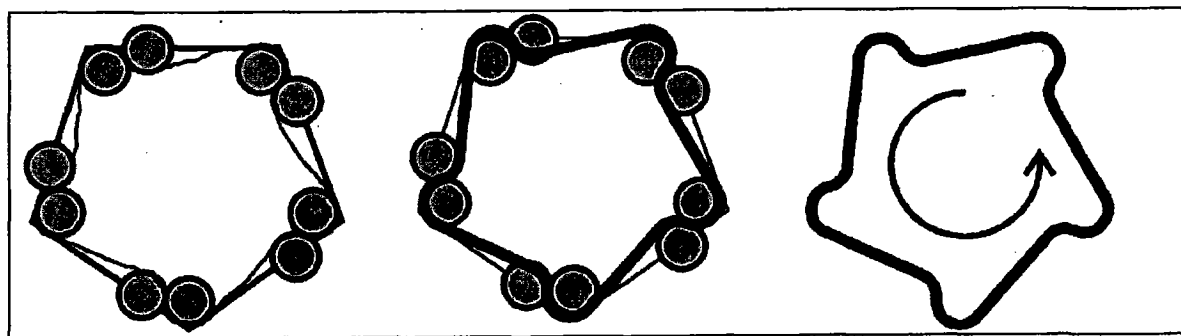


图 5

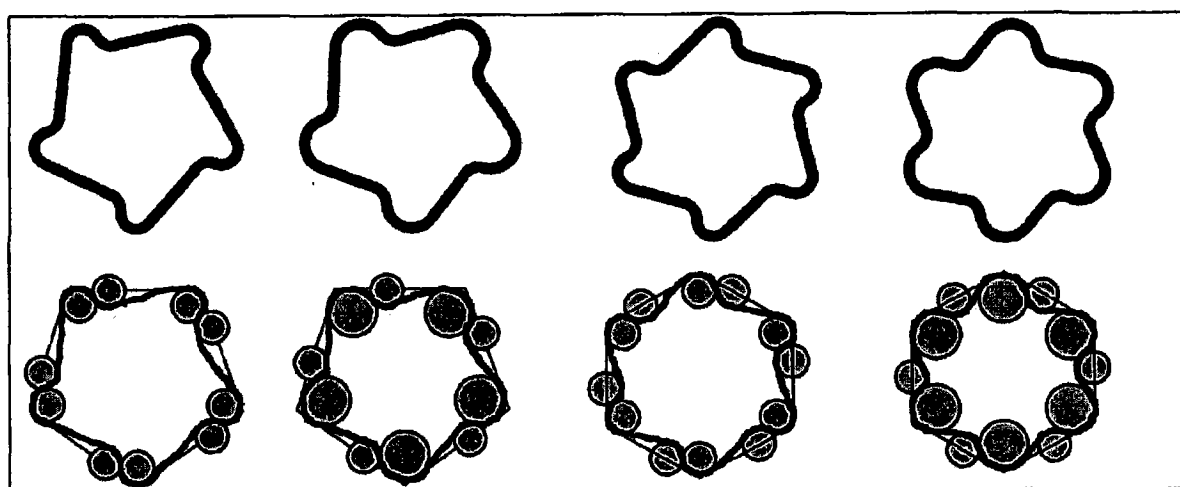


图 6

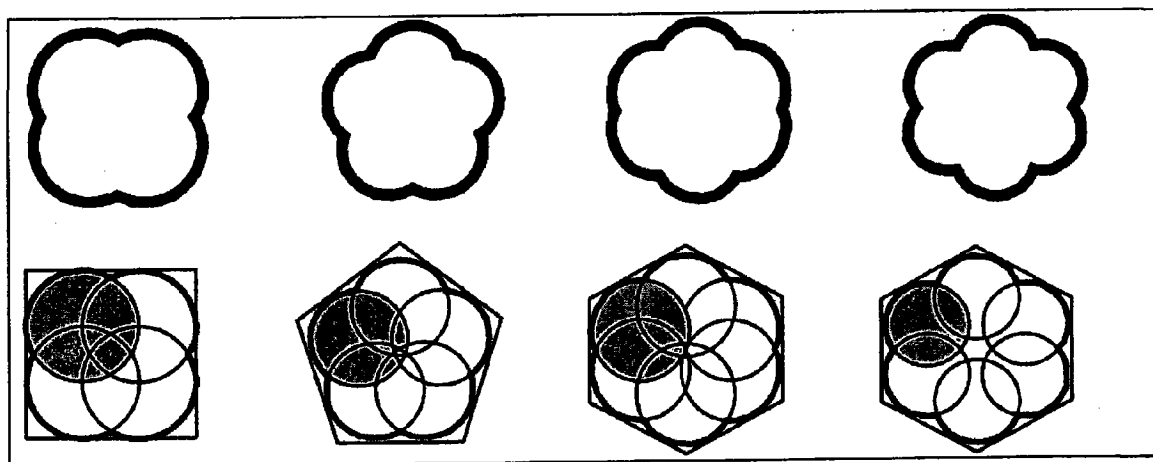


图 7

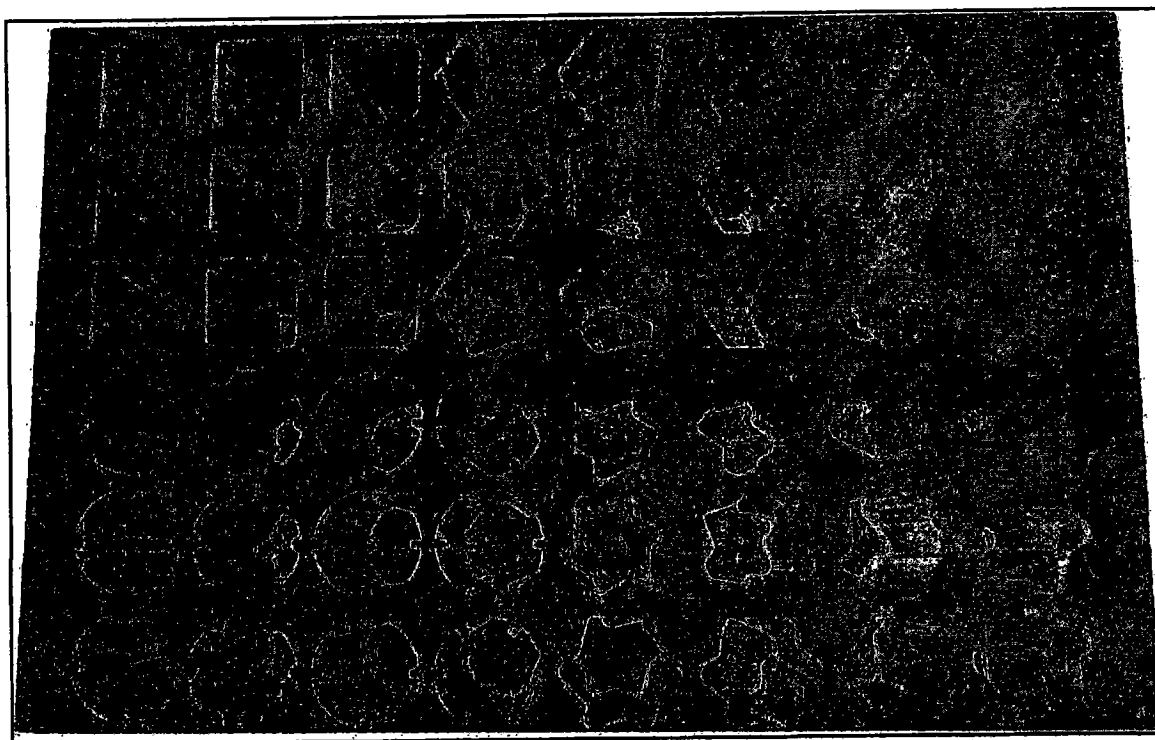


图 8

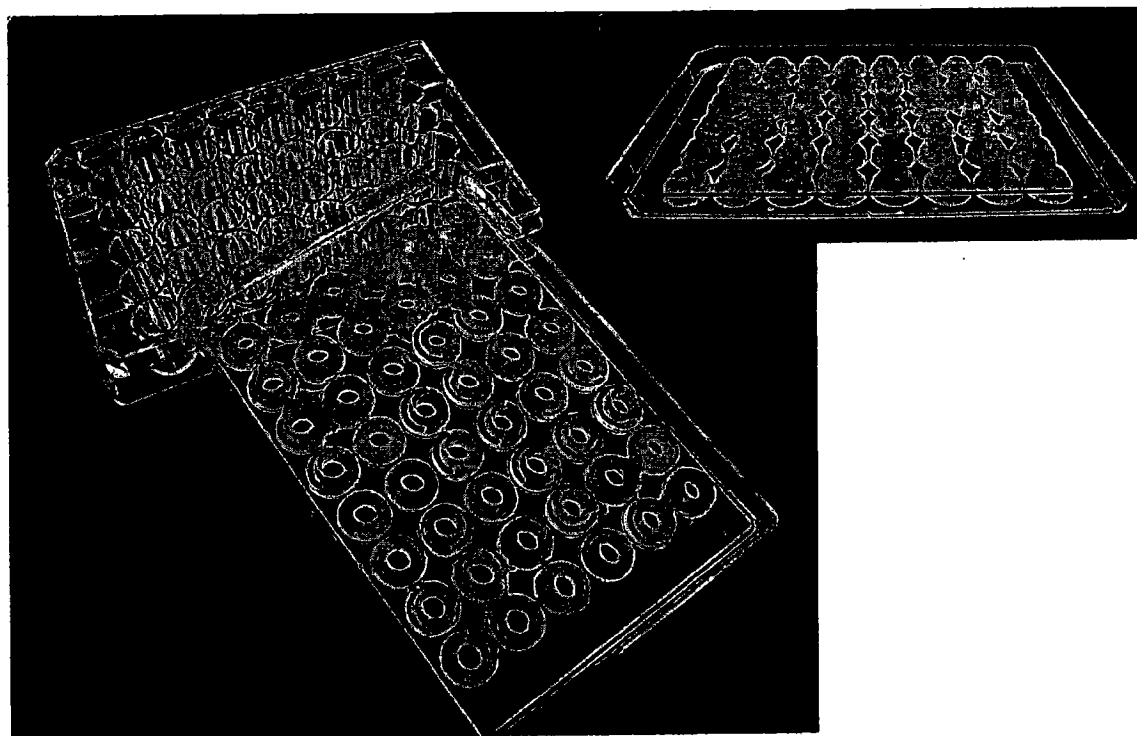


图 9

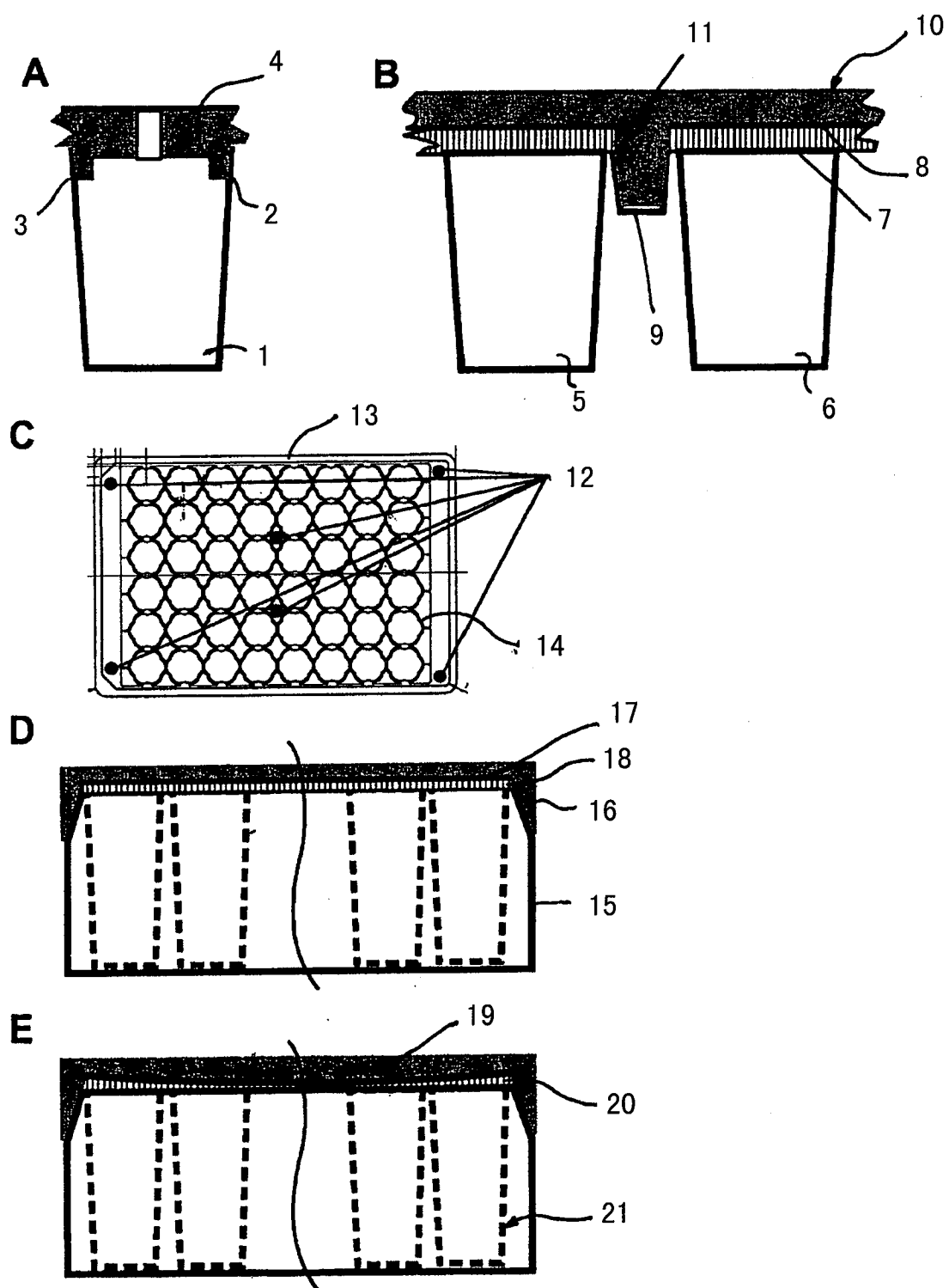


图 10

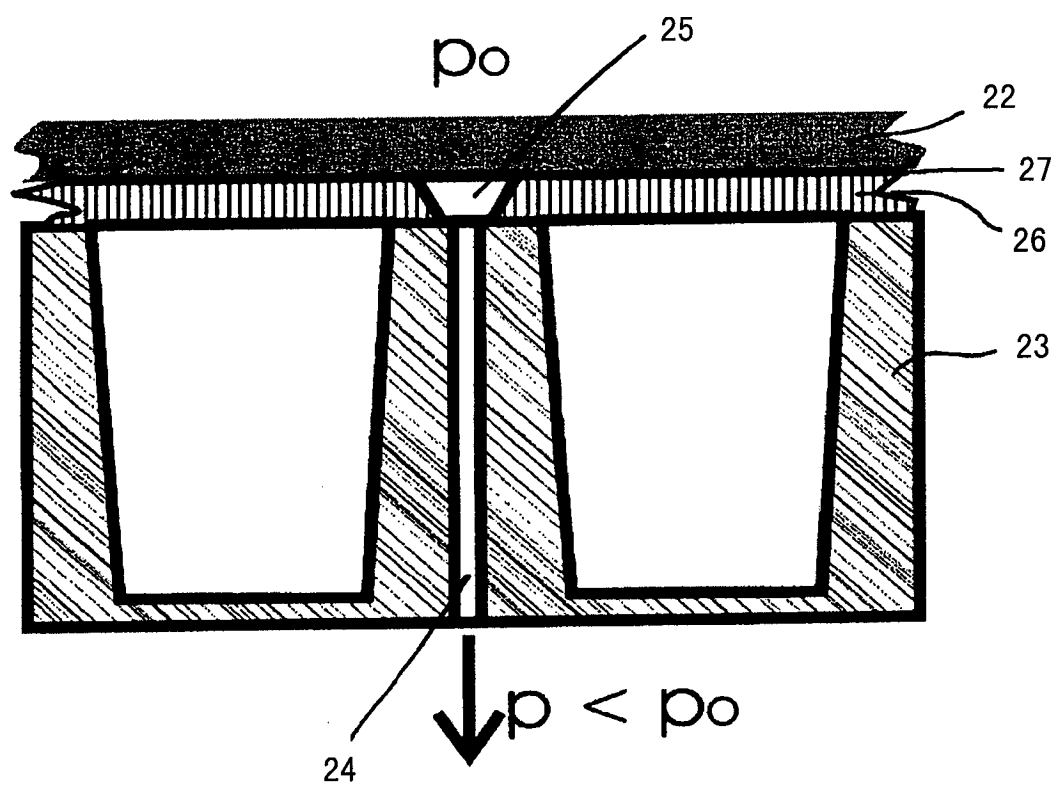


图 11

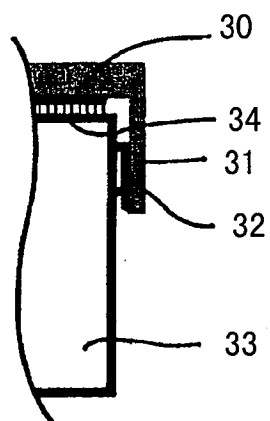
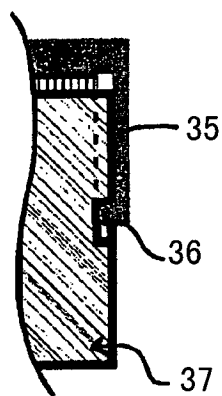
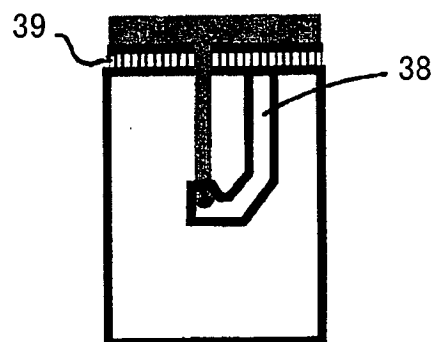
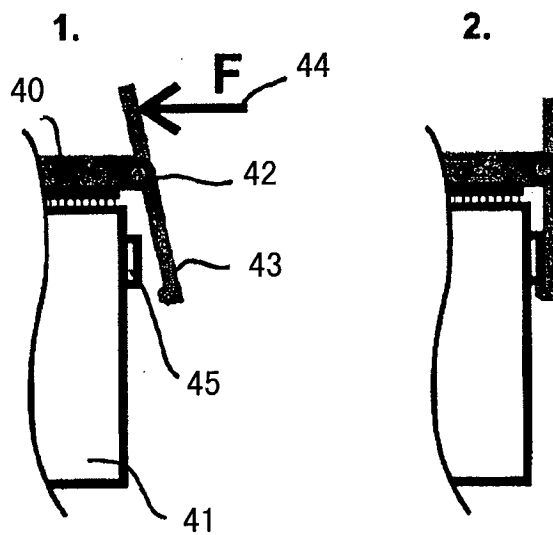
**A****B****C****D**

图 12

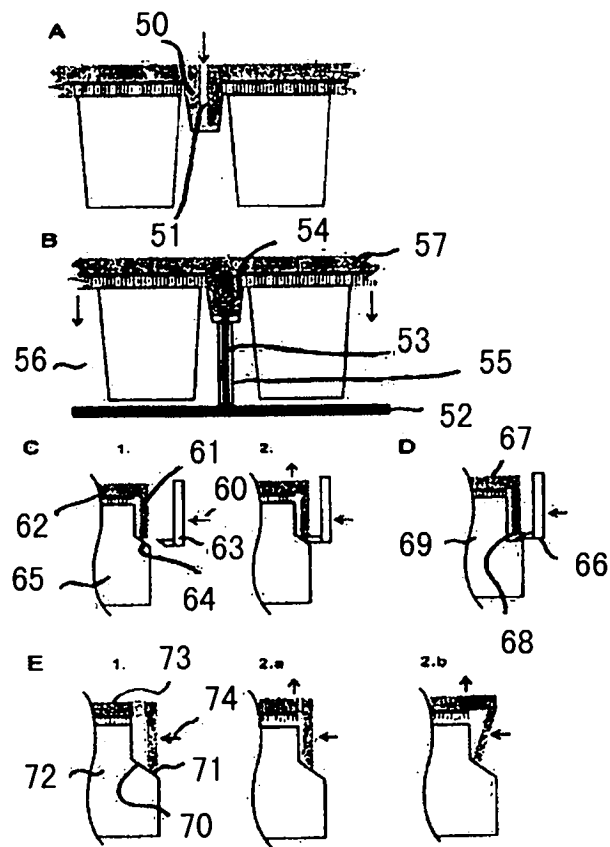


图 13

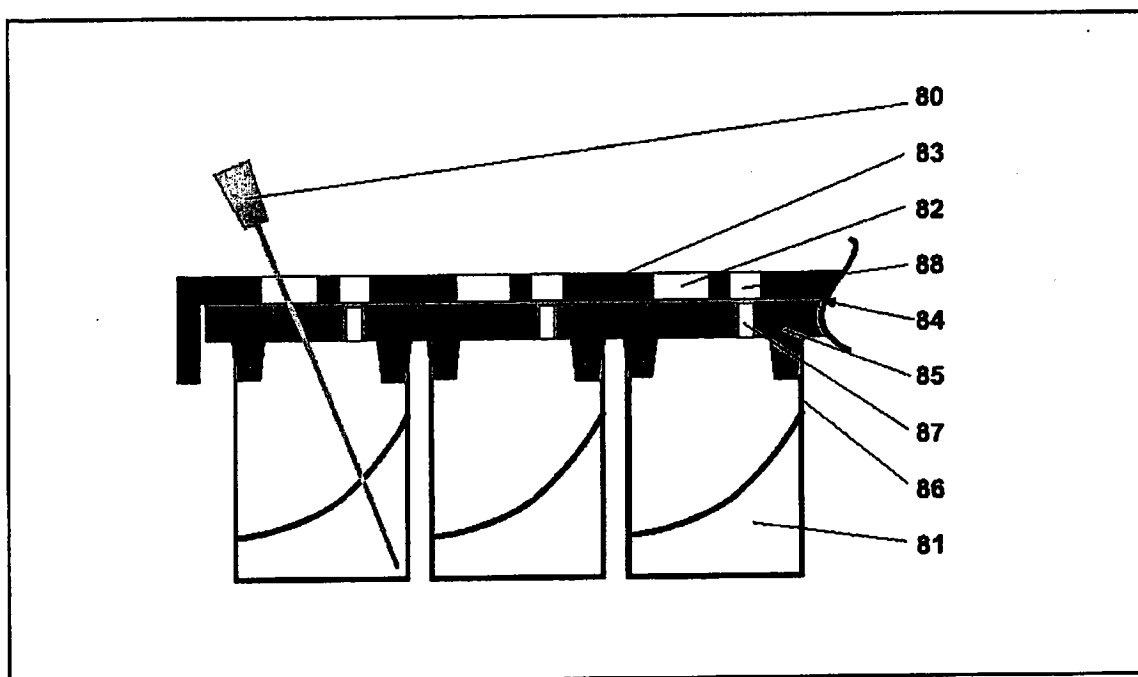


图 14

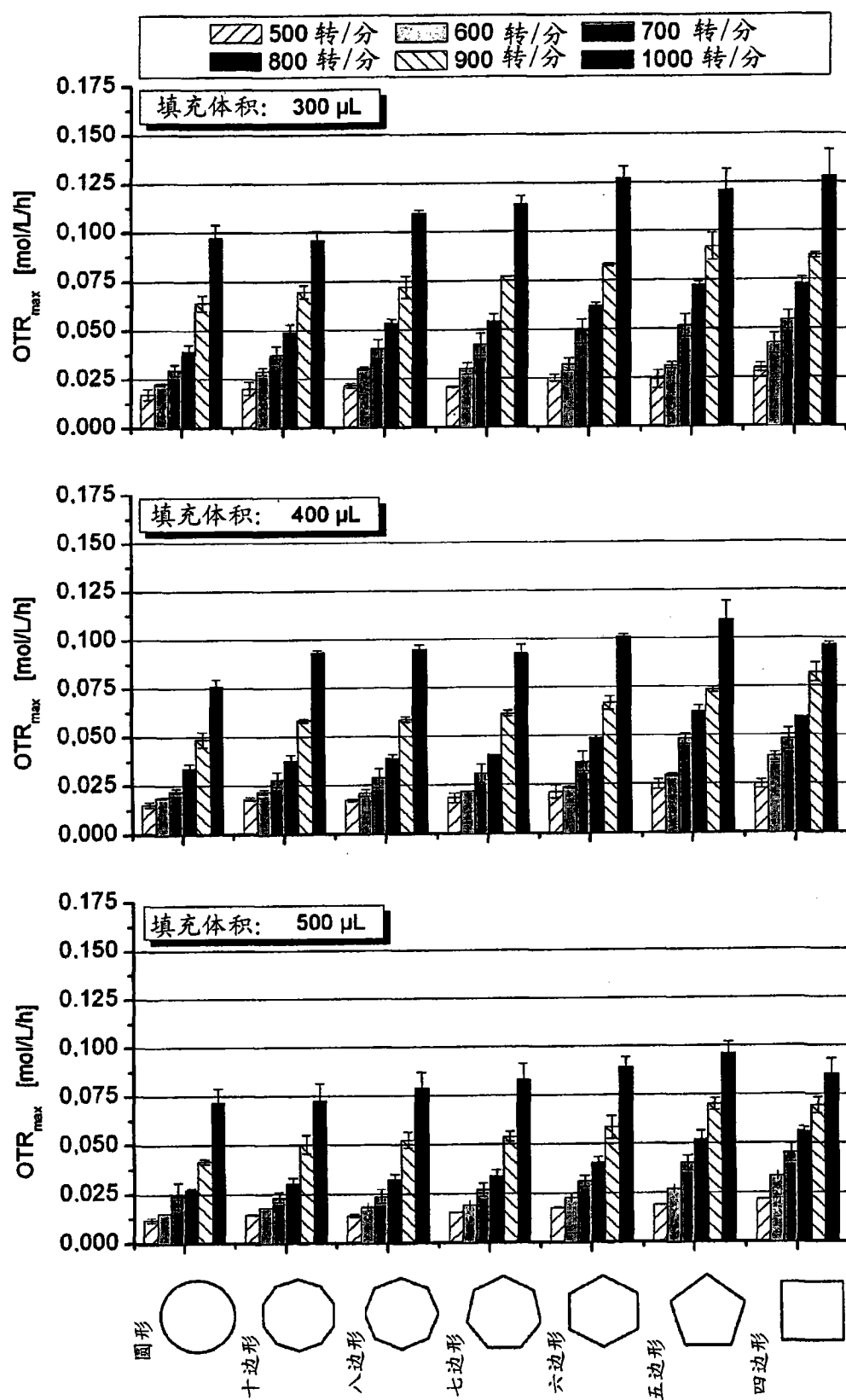


图 15

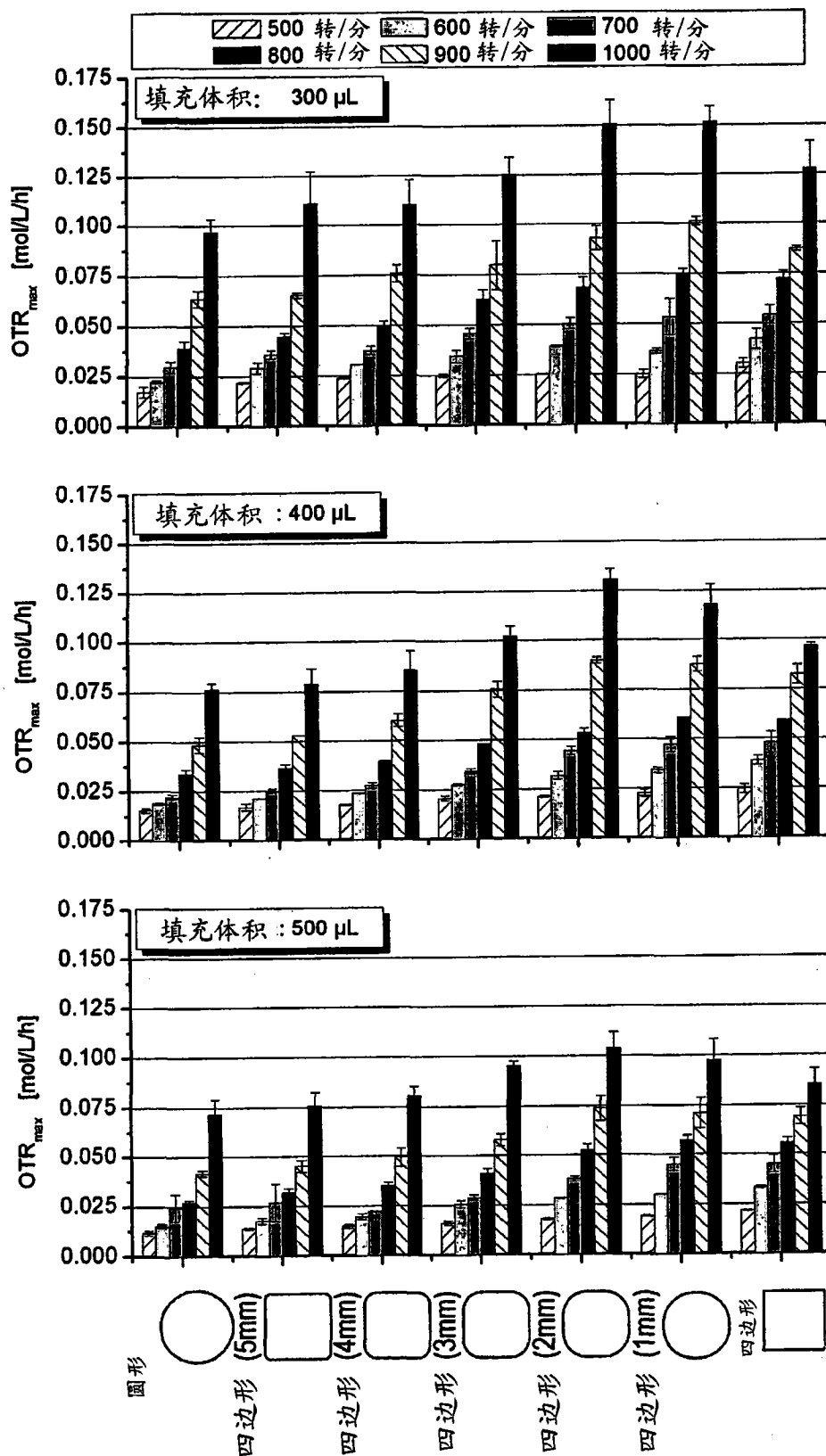


图 16

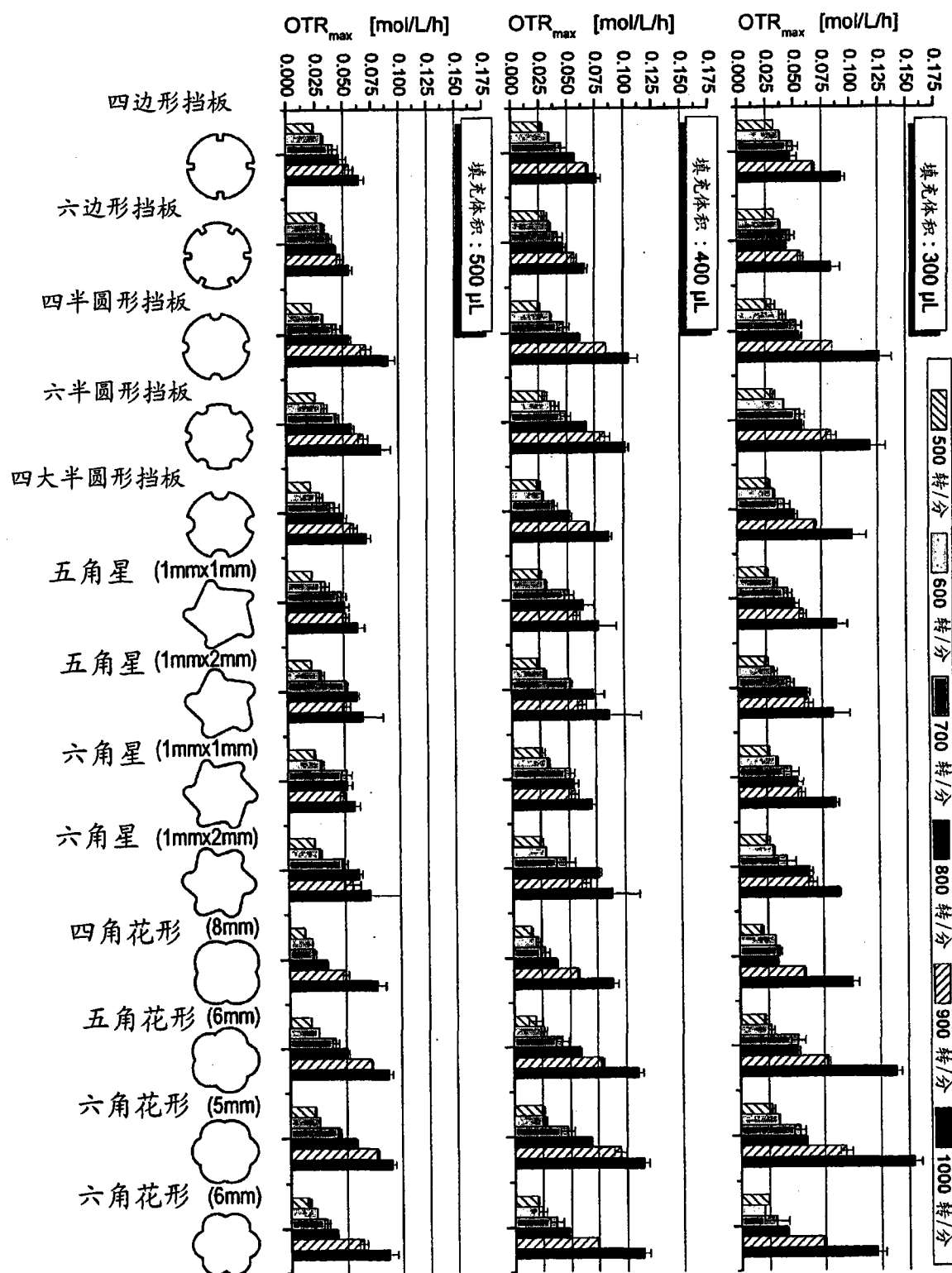


图 17

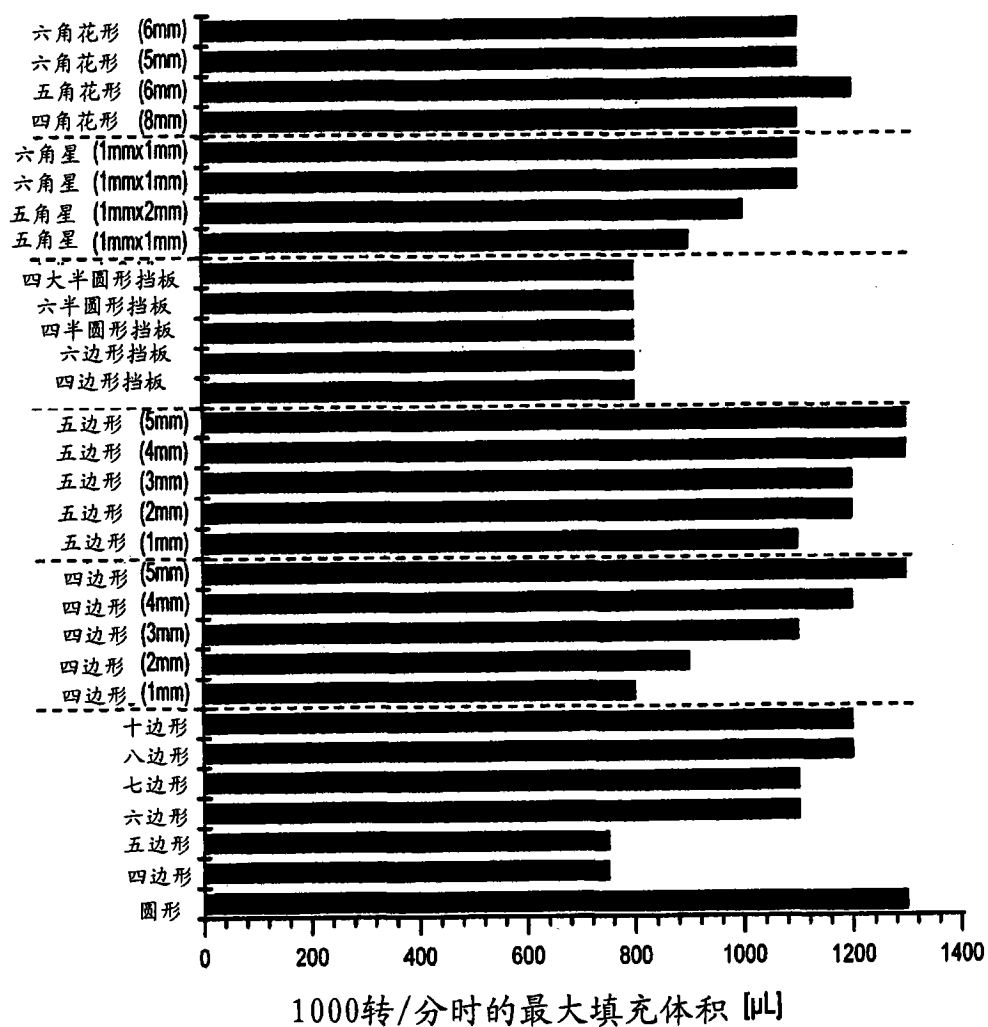


图 18

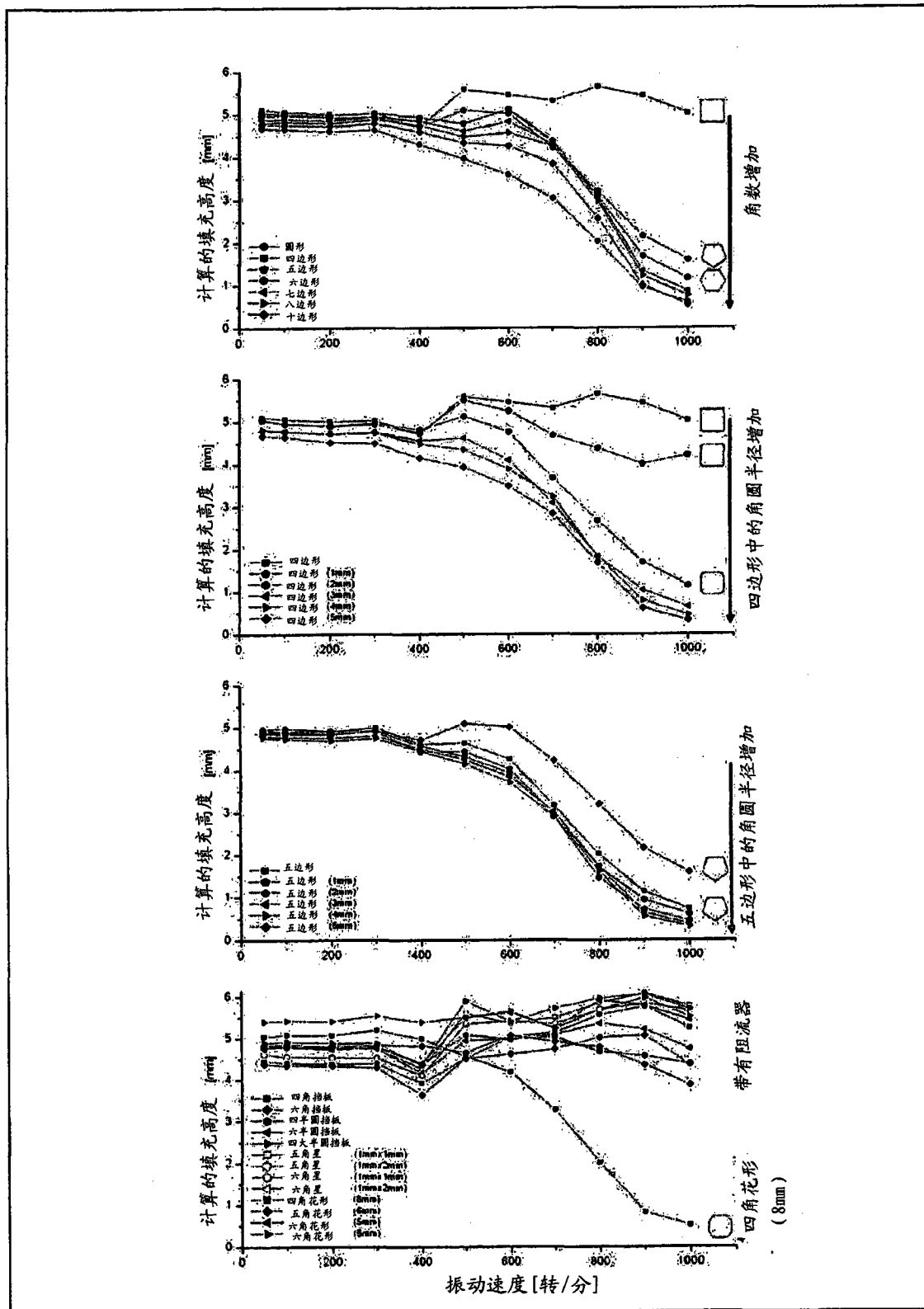


图 19