



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT  
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑪ CH 669 669 A5

⑤① Int. Cl. 4: G 01 N 1/10  
C 12 M 1/26

**Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein**  
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

## ⑫ PATENTSCHRIFT A5

⑮① Gesuchsnummer: 1310/86

⑮② Anmeldungsdatum: 03.04.1986

⑮③ Priorität(en): 04.05.1985 DE 3516080

⑮④ Patent erteilt: 31.03.1989

⑮⑤ Patentschrift  
veröffentlicht: 31.03.1989

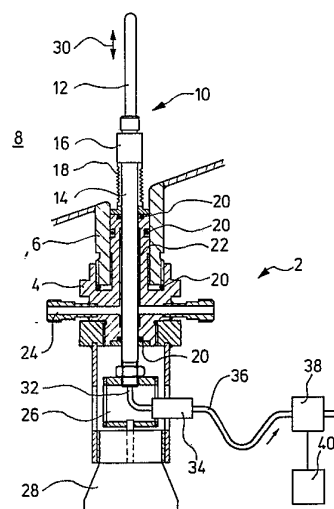
⑮⑦ Inhaber:  
Proton AG, Zug

⑮⑦ Erfinder:  
Samhaber, Wolfgang, Dr., Allschwil  
Renn, Werner, Allschwil

⑮④ Vertreter:  
Schmauder & Wann, Patentanwaltsbüro, Zürich

### ⑮④ Probeentnahmevorrichtung.

⑮⑦ Die Probeentnahmevorrichtung (2) weist ein Sonden-  
gehäuse (4) auf, das an einem Anschlussstutzen (6)  
eines Bioreaktors (8) befestigbar ist. Eine im Sonden-  
gehäuse angeordnete Sonde (10) enthält einen Kopf aus einer  
semipermeablen Membrane (12), welche Kulturfiltrat  
durchlässt, jedoch den Durchtritt von Zellen verhindert.  
Zur Vermeidung einer Verstopfung der Membrane (12) ist  
diese mit einem Vibrator (28) verbunden, der der Mem-  
brane eine ständige Schwingbewegung verleiht, die vor-  
zugsweise in Achsrichtung der Sonde (10) verläuft.



## PATENTANSPRÜCHE

1. Probeentnahmevorrichtung, mit einer mit einem Bioreaktor verbindbaren semipermeablen Membrane, welche mit einer Leitung für die Probeentnahme verbunden ist, gekennzeichnet, durch ein in einem Sondengehäuse (4) verschiebbar gelagertes und mittels Dichtungen (20) abgedichtetes Rohrstück (14), das an einem Ende die Membrane (12) und am anderen Ende einen Anschluss für die Leitung (32) sowie ein Kopplungsgewinde (26) trägt, an dem ein Vibrator (28) zur Vibration des Rohrstückes (14) und der Membrane (12) angeschlossen ist.

2. Probeentnahmevorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Schwingungen des Vibrators (28) in Längsrichtung (30) der Sonde (10) erfolgen.

3. Probeentnahmevorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Sondengehäuse (4) zur lösbaren Befestigung an einem Anschlussstutzen (6) des Bioreaktors (8) ausgebildet ist.

4. Probeentnahmevorrichtung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Sondengehäuse (4) einen für Messsonden genormten Anschlussstutzen aufweist.

5. Probeentnahmevorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie an ein Mess- und/oder Regelgerät anschliessbar ist.

6. Probeentnahmevorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Membrane (12) mittels eines Halters (16) am Rohrstück (14) befestigt ist, wobei der Halter (16) zur Abdichtung über einen Balg (18) mit dem Sondengehäuse (4) verbunden ist.

## BESCHREIBUNG

Die Erfindung betrifft eine Probeentnahmevorrichtung der im Oberbegriff des Anspruchs 1 angegebenen Art.

Solche Probeentnahmevorrichtungen sind vor allem für die Bestimmung von gelösten Substanzen wie Nährstoffen, Metaboliten, Produkten und deren Konzentration vorgesehen. Die Messung dieser Parameter — neben den bereits klassischen Parametern wie Temperatur, pH, Sauerstoff, CO<sub>2</sub> usw. — ermöglicht eine verbesserte Führung von biologischen Prozessen. Unterstützt wird diese Prozessführung heutzutage durch den Einsatz von Mikroprozessoren. Deren Einsatz ist jedoch nur möglich, wenn alle Messungen «on line» erfolgen können, um die für die Prozessführung notwendigen Messdaten kontinuierlich und schnell erhalten zu können.

Für den Einsatz von Mikroprozessoren geeignete Messmethoden sind für bestimmte Parameter bereits entwickelt worden, wie z.B. Enzymelektroden oder Messsonden mit Siliconmembranen, die jedoch sehr produktspezifisch und teilweise aus Gründen der Sterilisierbarkeit nicht direkt im Bioreaktor einsetzbar sind.

Um dieses Problem zu meistern, wurde neuerdings der Vorschlag einer Probeentnahmevorrichtung der eingangs genannten Art gemacht, bei der die kontinuierliche Probeentnahme mittels eines Mikrofiltrationssystems erfolgt, das mit Reaktorgut durchströmt und an ein Messsystem angeschlossen ist. Beschrieben ist dieser Vorschlag beispielsweise in

a) A. Dincer et al. (1984), *Developments in Industrial Microbiology* 25; Seite 603 ff, und

b) Kempe und Schallenberger (1983), *Process Biochemistry*, December; Seite 7 ff.

Ein entscheidender Nachteil der vorgeschlagenen Probeentnahmevorrichtung ist, dass die Probeentnahme in einem externen Loop erfolgt. Dies bedingt die Konstruktion von eigens zu diesem Zweck konzipierten Entnahmesystemen mit Pumpe, Zu- und Rückleitungen und Trenneinrichtungen. Dazu kommt, dass die unbedingt erforderliche Sterilisation dieser Systeme Proble-

me mit sich bringt. Ausserdem ist die entnommene Probemenge relativ gross.

In der US-PS 3 830 106 ist eine Probeentnahmevorrichtung beschrieben, wobei die Probeentnahme mittels einer Trägerlösung erfolgt, die durch schraubenförmig verlaufende Kanäle in einer zylindrischen Sonde geführt wird. Diese Kanäle sind nach aussen durch die Membrane abgeschlossen. Die Fermentationslösung dringt dabei durch die Membrane in die Kanäle ein und wird von der Trägerflüssigkeit mitgenommen. Damit ist zwar eine laufende Probeentnahme möglich, die allerdings mit Nachteilen verbunden ist. Die Fermentationslösung wird durch die Trägerlösung verdünnt, so dass stets der Verdünnungsfaktor ermittelt werden muss. Dabei ist es weiter nachteilig, dass sich dieser Verdünnungsfaktor laufend ändert, und zwar u.a. in Abhängigkeit vom Verschmutzungsgrad der Membrane der Sonde, so dass realistische Werte über einen längeren Zeitraum nicht erhältlich sind.

Aus der EP 7133-A ist es bekannt, Mikrofilmmembranen in Bioreaktoren in situ, jedoch lediglich zur kontinuierlichen Abführung der gewünschten Endprodukte einzusetzen.

Eine aus der DE-PS 26 22 850 bekannte Vorrichtung zur Probeentnahme von gewichtsmässig kleinem Körpergewebe sieht es zum Ausschluss einer durch das Entnahmeverfahren sowie beim Probenransport zum Untersuchungsort bedingten Kontamination der Probe mit Mikroorganismen vor, das stempelförmige Gewebeentnahmeinstrument dicht verschliessbar in einem Transportröhrchen anzuordnen.

Aus der DE-OS 27 23 240 ist eine Vorrichtung zur Entnahme von Untersuchungsmaterialproben aus Zellkulturen bekannt, die eine schlauchförmige Anschlusssonde umfasst, über die eine Materialprobe ansaugbar ist. Zu diesem Zweck ist die Schlauchsonde an einen von zwei Anschlüssen im Verschliessstopfen eines Probeaufnahme Röhrchens angeschlossen, während der andere Anschluss mit einer Saug Einrichtung verbunden ist. Die derart angesaugte Materialprobe sammelt sich im Bodenbereich des Aufnahme Röhrchens an, ohne dass das mit der Probeentnahme befasste Personal in Kontakt mit der Probe gelangt, was vor allem bei infektiösen Proben wichtig ist. Eine weitere aus der DE-OS 28 53 956 bekannte Probeentnahmevorrichtung dient zur Probeentnahme von Partikeln auf (Haut-) Oberflächen und ist für den ambulanten Einsatz vor Ort in Form einer Pistole ausgelegt, über deren Mündung zerstäubte Spülflüssigkeit auf die zu untersuchende Hautfläche aufgesprüht und die abgespülte, mit Partikeln angereicherte Spülflüssigkeit in einen Probeaufnahmebehälter abgeleitet wird, der an den Pistolenkörper angeschlossen ist.

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, eine Probeentnahmevorrichtung der eingangs genannten Art zu schaffen, die eine sterile in situ Messung von gelösten Substanzen im Bioreaktor gewährleistet.

Gelöst wird diese Aufgabe durch die kennzeichnenden Merkmale des Anspruchs 1. Vorteilhafte Ausgestaltungen der erfindungsgemässen Probeentnahmevorrichtung sind in den abhängigen Ansprüchen angegeben.

Mit der erfindungsgemässen über ein abgedichtetes Rohrstück, an das die Probeentnahmeleitung angeschlossen ist, vibrationsangetriebenen Membrane wird eine in situ Messung von gelösten Substanzen im Bioreaktor ermöglicht.

Die erfindungsgemässe Probeentnahmevorrichtung ist vorteilhafterweise mit Anschlüssen nach bestehender Anschlussnorm für Bioreaktoren versehen, wie sie z.B. bei pH-, pO<sub>2</sub>- etc. Sonden gelten. Die grundsätzlich bestehende Gefahr, dass sich wegen der relativ kleinen Querschnittsfläche der Sonden, je nach Beschaffenheit des Bioreaktors, Substanzen an der Membrane ansetzen, wodurch deren Funktionsfähigkeit vermindert ist, wird durch die erfindungsgemäss vorgesehene Membranbewegung vermieden, die entweder intermittierend oder kontinuierlich erfolgen kann.

Die Membranbewegung durch den Vibrationsantrieb kann entweder als Drehbewegung um die Membranachse oder als Hin- und Herbewegung erfolgen, also als vibrierende Bewegung in Umfangsrichtung oder in axialer Richtung des Rohrstücks. Eine axiale Bewegung wird bevorzugt, da eine zweckmässige «crossflow»-Strömung an der Membrane durch Hin- und Herbewegen der Membrane mit kleiner Amplitude bei sehr hoher Frequenz mit geringem Aufwand realisiert werden kann. Hierdurch wird der Einfluss des Reaktorgutes auf die Probeentnahme bei optimaler Effizienz gering gehalten.

Die mit der erfindungsgemässen Probeentnahmevorrichtung erzielten Vorteile sind demnach:

- a) Einsatz in bestehenden Bioreaktoren an Normstutzen;
- b) grosse Effizienz bei geringfügigem Einfluss des Bioreaktorgutes;
- c) kontinuierliche und sehr schnelle Erfassbarkeit von momentanen Substanzwerten im Bioreaktor;
- d) Entnahme der jeweils erforderlichen Probemengen, die durch das geringe Totvolumen der Sonden sehr genaue Messwerte erlauben und
- e) in situ Sterilisation.

Für die Membrane können Materialien ausgewählt werden, die nur für die zu messenden gewünschten Substrate durchlässig sind. Es können konventionelle Membranen wie z.B. symmetrische oder asymmetrische, polare oder unpolare, hydrophile oder hydrophobe Membranen verwendet werden, die je nach Beschaffenheit der zu messenden gelösten Substanzen ausgewählt werden können, wobei diese vor allem für die gezüchteten Mikroorganismen, Zellen usw. undurchlässig sein müssen. Für Proteine wäre z.B. eine Porengrösse von ca. 0,01 bis 0,1  $\mu$ m vorteilhaft.

Die Probeentnahmevorrichtung kann sowohl zur Entnahme von Einzelproben dienen wie zur fortlaufenden Entnahme. Insbesondere in letzterem Falle werden die entnommenen Proben vorzugsweise zu einem geeigneten on line Messsystem geführt, das nach bekannten Prinzipien gewählt wird. Einzelkomponenten sind z.B. solche, wie in der Literaturstelle a) beschrieben und können z.B. an einem Mikroprozessor-Steuergerät angeschlossen werden.

Die Bewegung der Membrane kann durch eine geeignete Vorrichtung für drehende oder hin- und hergehende Bewegung bewirkt werden. So kann z.B. im letzteren Fall mit einer Bewegung von z.B. lediglich 0,1 mm Amplitude eine «cross-flow» Strömung an der Membrane von ca. 4 m/s durch Einsatz eines Ultraschallvibrators bei einer Frequenz von ca. 20 kHz erreicht werden.

Ein typisches Ausführungsbeispiel der Erfindung wird an-

hand der Zeichnung nachfolgend näher beschrieben. Dabei zeigt die Figur einen Schnitt durch eine an einem Bioreaktor montierte Probeentnahmevorrichtung.

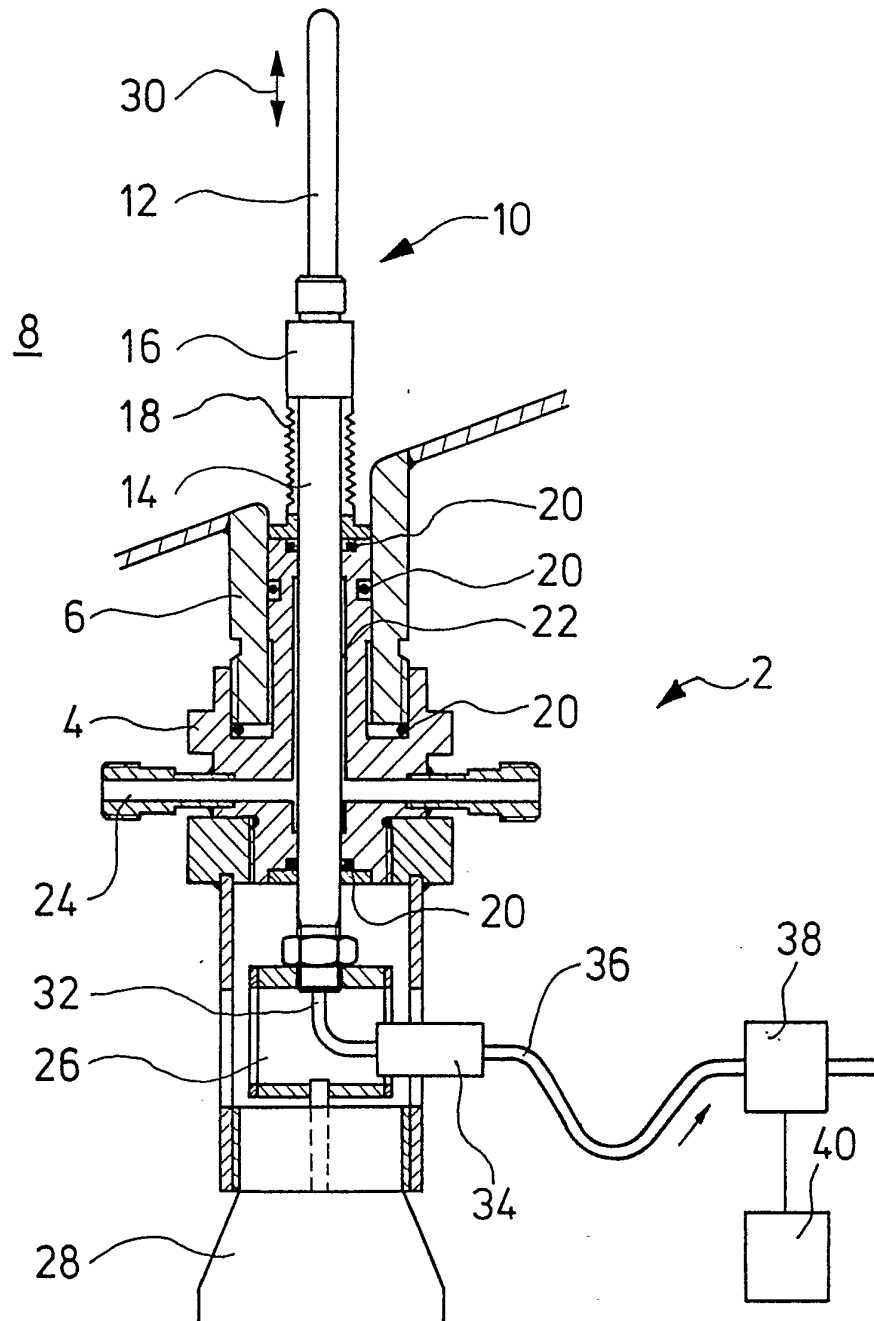
Die Probeentnahmevorrichtung 2 enthält ein Sondengehäuse 4, welches am Anschlussstutzen 6 eines Bioreaktors 8 lösbar befestigt, beispielsweise angeschraubt ist. Die Probeentnahmevorrichtung 2 enthält eine Sonde 10, die im Sondengehäuse 4 in axialer Richtung verschiebbar gelagert ist. Die Sonde 10 weist einen Kopf aus einer semipermeablen Membrane 12 auf, die an einem Rohrstück 14 befestigt ist, welches im Sondengehäuse 4 beweglich gelagert ist. Die Membrane 12 ist an einem Halter 16 des Rohrstückes 14 befestigt, wobei der Halter 16 zur Abdichtung über einen Balg 18 mit dem Sondengehäuse 4 verbunden ist. Das im Sondengehäuse 4 geführte Rohrstück 14 ist über Dichtungsringe 20 weiter abgedichtet. Im Sondengehäuse 4 ist eine das Rohrstück 14 umgebende Ringkammer 22 vorhanden, die mit Leitungsanschlüssen 24 in Verbindung steht, um eine Sterilitätsbarriere beispielsweise mittels Durchströmung von Dampf, zu bilden.

Das der Membrane 12 abgewandte Ende des Rohrstückes 14 der Sonde 10 trägt ein weiteres Gehäuse 26, mit dem das Rohrstück 14 mit einem Vibrator 28 verbunden ist, welcher der Sonde eine axiale Schwingbewegung 30 verleiht.

An dem Rohrstück 14 ist innerhalb des Gehäuses 26 eine Leitung 32 angeschlossen, die über ein Kupplungsstück 34 mit einer flexiblen Leitung 36 verbunden ist, die zu einem Messsystem 38 führt. An das Messsystem 38 ist ein Mikroprozessor 40 angeschlossen, der die gemessenen Daten des Messsystems 38 verarbeitet und damit den Prozess des Bioreaktors 8 in nicht näher dargestellter Weise steuert. Anstelle der Leitung 36 kann an dem Kupplungsstück 34 ein Hahn zur Entnahme von Einzelproben angeschlossen sein.

Die dem Inneren des Bioreaktors 8 ausgesetzten Teile der Probeentnahmevorrichtung 2 bestehen aus solchen Materialien, die den in einem Bioreaktor üblichen Sterilisationsmassnahmen standhalten.

Während des Betriebes wird das Gehäuse 26 durch den Vibrator 28 in Schwingung gehalten, wodurch sich diese Schwingungen über das Rohrstück 14 in die Membrane 12 der Sonde 10 fortsetzen. Dadurch wird ein Ansetzen, beispielsweise von Zellen, an der Membrane weitgehend verhindert. Das Kulturfiltrat dringt durch die Membrane 12 und wird über das Rohrstück 14, die Leitung 32 und die Leitung 36 in das Messsystem 38 geführt und dort ausgewertet. Dichtungsringe 20 verhindern das Eindringen des Reaktorgutes in die Probeentnahmevorrichtung bzw. bewahren umgekehrt die innere Sterilität des Bioreaktors 8.



Figur