



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

⑬ PATENTSCHRIFT A5

⑭ Gesuchsnummer: 1310/86

⑮ Inhaber:
Proton AG, Zug

⑯ Anmeldungsdatum: 03.04.1986

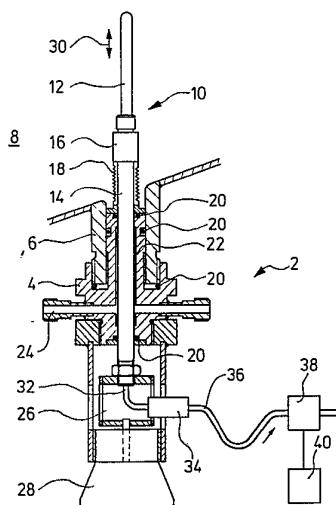
⑰ Erfinder:
Samhaber, Wolfgang, Dr., Allschwil
Renn, Werner, Allschwil

⑲ Patent erteilt: 31.03.1989

⑳ Vertreter:
Schmauder & Wann, Patentanwaltsbüro, Zürich

㉑ Probeentnahmeverrichtung.

㉒ Die Probeentnahmeverrichtung (2) weist ein Sondengehäuse (4) auf, das an einem Anschlussstutzen (6) eines Bioreaktors (8) befestigbar ist. Eine im Sondengehäuse 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 Membrane eine ständige Schwingbewegung verleiht, die vorzugsweise in Achsrichtung der Sonde (10) verläuft.



PATENTANSPRÜCHE

1. Probeentnahmeverrichtung, 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 Kopplungsgehäuse (26) trägt, an dem ein Vibrator (28) zur Vibration des Rohrstückes (14) und der Membrane (12) angeschlossen ist.
2. Probeentnahmeverrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Schwingungen des Vibrators (28) in Längsrichtung (30) der Sonde (10) erfolgen.
3. Probeentnahmeverrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Sondengehäuse (4) zur lösbaren Befestigung an einem Anschlussstutzen (6) des Bioreaktors (8) ausgebildet ist.
4. Probeentnahmeverrichtung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Sondengehäuse (4) einen für Messsonden genormten Anschlussstutzen aufweist.
5. Probeentnahmeverrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie an ein Mess- und/oder Regelgerät anschliessbar ist.
6. Probeentnahmeverrichtung 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 Probeentnahmeverrichtung der im Oberbegriff des Anspruchs 1 angegebenen Art.

Solche Probeentnahmeverrichtungen 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, CO₂ 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 Probeentnahmeverrichtung 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 Probeentnahmeverrichtung 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 Probeentnahmeverrichtung 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 Verschutungsgrad 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 gewichtmäßig kleinem Körpergewebe sieht es zum Ausschluss einer durch das Entnahmeverfahren sowie beim Probentransport zum Untersuchungsort bedingten Kontamination der Probe mit Mikroorganismen vor, das stempelförmige Gewebeentnahmehandinstrument 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 Anschlässen im Verschlussstopfen eines Probeaufnehmeröhrchens angeschlossen, während der andere Anschluss mit einer Saugeeinrichtung verbunden ist. Die derart angesaugte Materialprobe sammelt sich im Bodenbereich des Aufnehmeröhrchens 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 Probeentnahmeverrichtung 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 Probeaufnahmehröhrlchen abgeleitet wird, der an den Pistolenkörper angeschlossen ist.

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, eine Probeentnahmeverrichtung 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 Probeentnahmeverrichtung sind in den abhängigen Ansprüchen angegeben.

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

Die erfindungsgemässen Probeentnahmeverrichtung ist vor teilhafterweise mit Anschlässen nach bestehender Anschlussnorm für Bioreaktoren versehen, wie sie z.B. bei pH-, pO₂- 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 erfundungsgemässen Probeentnahmeverrichtung 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 µm vorteilhaft.

Die Probeentnahmeverrichtung 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-Steuengerät 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 Probeentnahmeverrichtung.

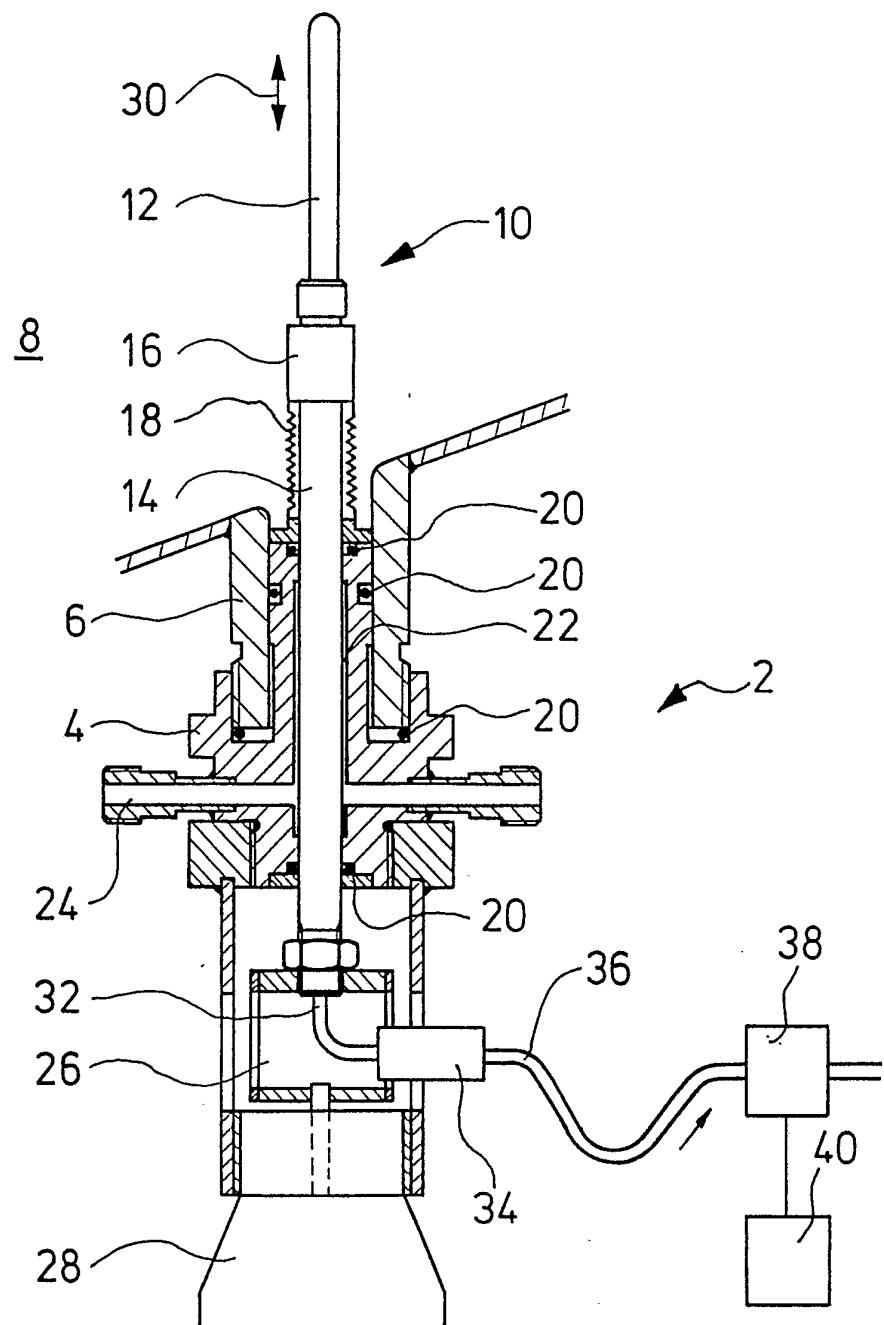
Die Probeentnahmeverrichtung 2 enthält ein Sondengehäuse 5, welches am Anschlussstutzen 6 eines Bioreaktors 8 lösbar befestigt, beispielsweise angeschraubt ist. Die Probeentnahmeverrichtung 2 enthält eine Sonde 10, die im Sondengehäuse 4 in axialer Richtung verschiebbar gelagert ist. Die Sonde 10 weist einen Kopf aus einer semipermeablen Membrane 12 auf, die an 10 einem Rohrstück 14 befestigt ist, welches im Sondengehäuse 4 beweglich gelagert ist. Die Membrane 12 ist an einem Halter 16 des Rohrstücks 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 15 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.

20 Das der Membrane 12 abgewandte Ende des Rohrstücks 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 25 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 30 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 Probeentnahmeverrichtung 2 bestehen aus solchen Materialien, 35 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 40 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 45 das Eindringen des Reaktorgutes in die Probeentnahmeverrichtung bzw. bewahren umgekehrt die innere Sterilität des Bioreaktors 8.



Figur