

Disposable Lab-on-Chip Systems for Biotechnological Screening

Von der Fakultät für Maschinenbau
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung der Würde
einer Doktor-Ingenieurin (Dr.-Ing.)
genehmigte

Dissertation

von
Dipl.-Ing. Stefanie Demming
aus Bocholt

eingereicht am: 26. November 2010

mündliche Prüfung am: 21. Dezember 2010

Referenten: Prof. Dr. rer. nat. S. Büttgenbach

Juniorprof. Dr. E. Franco-Lara

Vorsitzender: Prof. Dr.-Ing. J. Schwedes

2010

Berichte aus der Mikro- und Feinwerktechnik

herausgegeben von Prof. Dr. rer. nat. S. Büttgenbach

Band 30

Stefanie Demming

**Disposable Lab-on-Chip Systems
for Biotechnological Screening**

Shaker Verlag
Aachen 2011

Bibliographic information published by the Deutsche Nationalbibliothek

The Deutsche Nationalbibliothek lists this publication in the Deutsche Nationalbibliografie; detailed bibliographic data are available in the Internet at <http://dnb.d-nb.de>.

Zugl.: Braunschweig, Techn. Univ., Diss., 2010

Copyright Shaker Verlag 2011

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without the prior permission of the publishers.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8322-9941-5

ISSN 1433-1438

Shaker Verlag GmbH • P.O. BOX 101818 • D-52018 Aachen

Phone: 0049/2407/9596-0 • Telefax: 0049/2407/9596-9

Internet: www.shaker.de • e-mail: info@shaker.de

Vorwort und Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Mikrotechnik der Technischen Universität Braunschweig. Sie wurde im Rahmen der Forschergruppe mikroPART (FOR 856) „Mikrosysteme für partikuläre Life-Science-Produkte“ von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert.

Mein besonderer Dank gilt vor allem meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. S. Böttgenbach. Er ermöglichte mir ein selbstständiges und eigenverantwortliches Arbeiten unter hervorragenden technischen Bedingungen. Durch einen regen Austausch von nicht nur fachlichen, sondern auch kulturellen, interkulturellen und hochschulpolitischen Aspekten, habe ich viel erfahren und gelernt. Als Doktorvater hat er mir stets großes Vertrauen entgegengebracht.

Ferner danke ich dem Vorsitzenden der Prüfungskommission, Prof. Dr.-Ing. J. Schwedes, der sich als Emeritus die Zeit nahm, meine Prüfung zu leiten. Er hat durch die Gründung des Studiengangs Bioingenieurwesen im Jahr 2000 an der TU Braunschweig und als ehemaliger Auslandsbeauftragter der Fakultät für Maschinenbau wesentlich die zehn Jahre meiner Studiums- und Promotionszeit mitbestimmt.

Ebenso danke ich dem Koreferenten Juniorprof. Dr. E. Franco-Lara für das entgegengebrachte Interesse an meiner Arbeit und für die kreative und unkomplizierte Zusammenarbeit in der Forschergruppe.

Weiterhin danke ich meinen IMT-Kollegen für die hervorragende Unterstützung in fachlichen Fragen und für das stets sehr gute Arbeitsklima. Besonders angenehm empfand ich das freundliche Büroklima mit meinen (Ex)-Kollegen Dr.-Ing. Marco Feldmann, Dr.-Ing. Andreas Waldschik, Dipl.-Ing. Christoph Boese und Dipl.-Ing. Nelson Ferreira.

Besonderer Dank gilt meinen Kollegen und Freunden Dipl.-Ing. Claudia Lesche und Dr.-Ing. Björn Hoxhold. Claudia danke ich für die immer kreative, effektive und angenehme Zusammenarbeit innerhalb der Forschergruppe. Björn danke ich für die unzähligen und bereichernden Gespräche fachlicher und persönlicher Art.

Frau Rosmarie Kauf danke ich für ihre Geduld und Hilfestellung bei organisatorischen und bürokratischen Fragen sowie für die Organisation und Koordination von Finanzmitteln, insbesondere innerhalb der Auslandsprogramme. Stefan Schieseck danke ich für die sofortige Hilfe bei Rechner- und Netzwerkproblemen. Dem technischen Personal und den Auszubildenden möchte ich für die vielen kleinen Handgriffe und Unterstützungen danken, die mir die Reinraum- und Laborarbeit oft erleichterten und beschleunigten.

Danken möchte ich auch meinen vielen fleißigen Studierenden, die durch ihre Kreativität und Eigeninitiative wichtige Aspekte dieser Arbeit in Form von Studien- und Diplomarbeiten bzw. Tätigkeiten als Hilfswissenschaftler unterstützten.

Auch danke ich den ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern der FOR 856, die mit ihrer freundlichen Unterstützung ebenfalls einen Teil zum Gelingen der Arbeit beitrugen.

Großer Dank gilt meinen zahlreichen ausländischen Projektpartnern, die es mir ermöglichten, meine Forschung auch auf interkultureller Ebene durchzuführen. Insbesondere möchte ich Dr. Andreu Llobera für seine kreativen Ideen und immer unterstützende und effektive Zusammenarbeit danken. Prof. Dr. E. Verpoorte und Dr. María José López danke ich für die Ermöglichung meines Forschungsaufenthaltes in ihrer Arbeitsgruppe an der Rijksuniversiteit Groningen.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, meinen drei Schwestern und meiner Tante, die durch ihre liebevolle und unermüdliche Unterstützung die Basis für diese Arbeit geschaffen haben. Ich danke Euch dafür, dass Ihr immer für mich da seid und mich stets auf all meinen Wegen unterstützt und begleitet.

Kurzfassung

Im Rahmen der Dissertation wurden verschiedene Einweg-Lab-on-Chip Systeme entwickelt, die beispielsweise bei biotechnologischen Parameterstudien von Mikroorganismen zur Bioprozesssteigerung oder von humanen Zelllinien zum Wirkstoffscreening Anwendung finden. Die Mikrofluidik ist ein vielversprechendes Forschungsgebiet für die Herstellung von kostengünstigen Mikrochips, womit der steigende Bedarf für Screening-Daten aufgrund von Vorteilen wie Zeit- und Kostenreduzierung erfüllt werden kann. Eine ideale mikrofluidische Plattform zum biotechnologischen Screenen sollte aus folgenden Gruppen bestehen: (i) dem Mikrobioreaktor zur Kultivierung, (ii) mikrofluidische Komponenten zum Transportieren, Filtrieren und Mischen von Suspensionen, und (iii) einem enzymatischen Biosensor für die on-Chip Analyse von Substratkonzentrationen. Innerhalb der Arbeit wurden diverse horizontal und vertikal positionierte Mikrobioreaktoren entwickelt, hergestellt und erfolgreich zum Screenen von unterschiedlichen biologischen Expressionssystemen (wie *S. cerevisiae*, *A. ochraceus* und humane Endothelzellen) angewendet. Die Integration von geometrischen, optischen und elektrischen Funktionselementen erlaubte eine *online* Überwachung von verschiedenen physikalischen, chemischen und biologischen Prozessparametern während der Kultivierung. Im Bereich der Gruppe (ii) wurden passive und aktive Mikroventile, PZT- und pneumatisch aktivierte Mikropumpen, Filtrations- und Mischkomponenten hergestellt und charakterisiert. Gruppe (iii) umfasste die Entwicklung eines enzymatischen Biosensors mit hybridem (elektrochemisch-optisch) Messumformer. Der einheitliche Chipaufbau aller Lab-on-Chip Systeme – bestehend aus einer Kombination von strukturiertem Polydimethylsiloxan und Glas – erlaubt das monolithische und modulare Zusammenschalten der Einzelsysteme zu der gewünschten Plattform. Da für erste Prototypen eine modulare Verschaltung zu bevorzugt ist, wurde ein Baukastensystem entwickelt, welches eine standardisierte und benutzerfreundliche Plattform für flexible Versuchsaufbauten bietet.

Abstract

The main goal of this work was to develop different disposable Lab-on-Chip (LoC) systems for the application of biotechnological screening e.g. for bioprocess development through microorganisms or drug testing with human cell lines. Nowadays, microfluidics represents a highly promising field for the fabrication of microtools, as the increasing demand for screening data are difficult to meet with current platforms. This is mainly due to time and cost aspects as well as a limited amount of newly developed drugs. The ideal microfluidic platform for biotechnological screening should include three different groups of elements: (i) microbioreactors (MBR) in which cultivation takes place; (ii) auxiliary microfluidic systems (for transportation, filtration or mixing), and (iii) enzymatic biosensors for on-chip analysis of substrate concentrations which are difficult to measure offline due to small available sample volumes. Within the scope of this work, various horizontally and vertically positioned MBR designs (resembling plug flow reactors, micro stir tanks or bubble columns) were developed, fabricated and successfully applied to the screening of different biological expression systems, such as yeast cells (*S. cerevisiae*), fungal spores (*A. ochraceus*) and primary human endothelial cells. Different integrated functional structures based on geometrical, optical or electrical elements allowed for online monitoring of various physical, chemical and biological process parameters during cultivation. In terms of the second group, passive and active microvalves, PZT- and pneumatically actuated micropumps, passive filtration and mixing elements were produced. The third group comprised different types of enzymatic biosensors based on a hybrid detection principle (electrochemical-optical) and on different types of enzymatic responses. In general, the unique LoC setup (patterned element made of poly(dimethylsiloxane) and bonded to a glass substrate) allows an easy integration of systems into one monolithic LoC platform which are usually better suited for technically mature systems. Modular systems are advantageous for prototyping of new microfluidic applications. Therefore, an LoC construction kit was developed that offers a user friendly, standardized modular platform.

Contents

1	Introduction.....	1
2	Theoretical Background	5
2.1	Motivation of Lab-on-Chip Technology.....	5
2.1.1	Physical Characteristics of Fluids on the Microscale	6
2.2	Biotechnological Screening	8
2.2.1	Biological Cultivation and Biotechnological Processes	9
2.2.2	Controlled and Measured Parameters during Cultivation.....	11
3	Disposable LoC Platform: Concept.....	13
4	Materials and Fabrication Technologies.....	15
4.1	Epon SU-8 Photoresist.....	15
4.1.1	Characteristics.....	15
4.1.2	Fabrication Technologies and Processing.....	16
4.2	Glass with Functional Structures	18
4.2.1	Characteristics.....	18
4.2.2	Fabrication Technologies and Processing.....	18
4.3	Poly(dimethylsiloxane) (PDMS)	20
4.3.1	Characteristics.....	20
4.3.2	Fabrication and Processing	21
4.4	Sol-Gel Glass	28
4.4.1	Characteristics.....	29
4.4.2	Processing.....	29
4.5	Indium Tin Oxide (ITO)	30
4.5.1	Characteristics.....	30
4.5.2	Process Optimization and Characterization	30
4.6	Fluidic and Electronic Interfaces	33
4.7	Biological Expression Systems.....	35
4.7.1	Aspergillus ochraceus	35
4.7.2	Saccharomyces cerevisiae.....	36
4.7.3	Primary Human Endothelial Cells	36
5	Microbioreactor Designs.....	39
5.1	State of the Art in MBRs	39
5.1.1	Enhanced Microtiter Plates.....	40
5.1.2	Miniaturization of Stir Tank Reactors and Bubble Columns.....	40
5.1.3	Microbioreactors Based on Microtechnologies	41

5.1.4	Commercially Available Platforms for Biological Screening.....	43
5.2	Horizontally Positioned Microbioreactors (hMBR).....	44
5.2.1	MBR with Integrated Readout Grid (hMBR-G).....	44
5.2.2	MBR with Integrated Passive Elements (hMBR-PE).....	49
5.2.3	MBR with Multiple Internal Reflection (hMBR-MIR).....	54
5.2.4	MBR with Integrated Segmented Waveguides (hMBR-SWG).....	63
5.2.5	Active Micro Stir Tank MBR (hMBR-ST).....	69
5.2.6	Conclusions and Perspectives of hMBRs.....	74
5.3	Vertically Positioned MBRs.....	74
5.3.1	Fluidized Bed MBR (vMBR-FB).....	75
5.3.2	Bubble Column (vMBR-BC).....	79
5.4	Extended Integration of Functional Elements.....	89
5.4.1	Integration of Flexible Emitters.....	89
5.4.2	Integration of Optical Filters.....	92
5.4.3	Optical Sol-gel-Structures.....	99
5.4.4	Antiseptic Biodevices via Locally Structured PDMS-Composites.....	102
5.4.5	Integrated ITO-Heater for Temperature Stabilization.....	106
6	Auxiliary Microfluidic Systems.....	111
6.1	Microvalves.....	111
6.1.1	Passive Check Valves.....	111
6.1.2	Active Pneumatic Valves.....	114
6.1.3	Three-Way Valve.....	118
6.2	Micropumps.....	119
6.2.1	PZT-PDMS-Micropump.....	119
6.2.2	Pneumatic PDMS Micropump.....	124
6.3	Passive Microseparators Based on Filtration.....	127
6.4	Passive Micromixers.....	129
7	On-Chip Analytics of Substrates/Metabolites.....	133
7.1	Theory: Enzymatic Immobilization and Reactions.....	134
7.2	Biosensor with Hybrid Transducer: Feasibility Study.....	136
7.3	Optimization of Enzymatic Response.....	142
7.4	Combined Optical Transducer and Microbead Recognition Element for the Detection of Glucose.....	145
7.5	Perspective: Hybrid Sol-gel-SWG Biosensor.....	147
8	LoC Construction Kit: Modular to Monolithic.....	149
8.1	Modular LoC Platform.....	150
8.2	Monolithic LoC Platform.....	155
9	Conclusion and Outlook.....	157
10	References.....	161
10.1	List of Own Publications.....	161
10.2	List of References.....	167
Appendix		
A	Process Plans.....	181

List of Symbols and Acronyms

List of Symbols

Symbol	Denotation	SI-Unit
A	Cross section	[m ²]
a	Lateral side	[m]
b	Intercept with y-axis	
c	Concentration	[kg/m ³]
c _d	Drag coefficient	[-]
D	Diffusion coefficient	[m ² /s]
D	Dilution rate	[1/h]
D	Diodicity	[-]
d	Layer thickness	[m]
d _b	Bubble diameter	[m]
d _d	Distance of a particle (related to diffusion)	[m]
d _h	Hydraulic diameter	[m]
d _{mem}	Thickness of PDMS membrane	[m]
d _n	Diameter of nozzle	[m]
d _p	Diameter of particle	[m]
F _B	Buoyancy force	[kg·m/s ²]
F _D	Drag force	[kg·m/s ²]
F _G	Gravity force	[kg·m/s ²]
I	Intensity	[A]
k _L a	Volumetric oxygen transfer coefficient in the liquid phase	[1/s]
l	Length	[m]
m	Slope	
n	Refractive indice	[-]
P	Electrical Power	[W]
p	Pressure	[Pa]
Q _r	Flow rate in reverse direction	[m ³ /s]
Q _f	Flow rate in forward direction	[m ³ /s]
q	Height of cell	[m]
R	Resistance	[Ω]

Re	Reynolds number	[-]
T _P	Transmittance at passband	[dB]
T _S	Transmittance at stopband	[dB]
t	Time	[s]
U	Perimeter	[m]
U	Voltage	[V]
v	Fluid flow velocity	[m/s]
v _{mf}	Minimal fluidization velocity	[m/s]
v _s	Terminal velocity	[m/s]
μ	Growth rate	[1/h]
ρ _d	Density of particle	[kg/m ³]
ρ _l	Density of liquid	[kg/m ³]
ν	Kinematic fluid viscosity	[m ² /s]
σ	Error	
τ	Hydraulic retention time	[s]

Acronyms

Symbol	Denotation
μTAS	Micro total analysis systems
μTM	Microtransfer molding
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) acid
ADH	Alcohol dehydrogenase
AOX	Alcohol oxidase
ASD	Average standard deviation
AV	Active valve
CA	Contact angle
CCD	Charge-coupled device
CDW	Cell dry weight
CNM	Centre Nacional de Microelectronica
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DI	De-ionized
DO	Dissolved oxygen
DSMZ	German Collection of Microorganisms and Cell Cultures
EBR	Enzymatic bead reactor
EC	Endothelial cell
HPLC	High performance liquid chromatography
HRP	Horseradish peroxidase
HTP	High-throughput
ISO	International organization for standardization
ITO	Indium tin oxide
LED	Light emitting diode

LoC	Lab-on-Chip
LOD	Limit of detection
GBL	γ -butyrolactone
GOX	Glucose oxidase
MBR	Microbioreactor
hMBR	Horizontal microbioreactor
hMBR-G	Horizontal microbioreactor with readout grid
hMBR-MIR	Horizontal microbioreactor with multiple internal reflection
hMBR-PE	Horizontal microbioreactor with passive elements
hMBR-ST	Horizontal microbioreactor with microstirrer
hMBR-SWG	Horizontal microbioreactor with segmented waveguides
vMBR	Vertical microbioreactor
vMBR-BC	Vertical microbioreactor: bubble column
vMBR-FB	Vertical microbioreactor: fluidized bed reactor
MIMIC	Micromolding in capillaries
MIR	Multiple internal reflection
MTMOS	Methyltrimethoxysilane
OD	Optical density
PBS	Phosphate buffer solution
PDMS	Poly(dimethylsiloxane)
PE	Passive element
PEB	Post exposure bake
PECVD	Plasma enhanced chemical vapour deposition
PEG	Poly(ethylene glycol)
PGMEA	Propylenglycol methyl ether acetate
PhTMOS	Phenylmethoxysilane
PMMA	Polymethylmethacrylate
PV	Passive valve
PVA	Polyvinyl alcohol
PZT	Piezo-electric transducer
QD	Quantum dot
RI	Refractive index
RP	Replica molding
SEM	Scanning electron microscope
SLED	Superluminescent light emitting diode
SNR	Signal-to-noise ratio
SVR	Surface-to-volume-ratio
SWG	Segmented waveguide
TEOS	Tetraethoxysilane
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
TMOS	Tetramethoxysilane
UV	Ultra violet

