

生物发酵过程中在线液体分析的整体解决方案

发酵工艺的效率高度依赖于过程条件的准确性——只有在稳定受控的条件下，微生物的繁殖和收获才能达到最佳。因而必须安装一套成熟可靠的系统来采集生物反应器内的信息。

文 / 兰思杰

在生物发酵中，生物反应器的测量点繁杂，而且对卫生性和可追溯性有着极高的要求，如图1所示。在这些信息当中，最重要的参数就是pH、溶解氧和细胞浓度，这些数据必须被精确地控制和记录。

PROCESS-Tip

* 更多信息请登录：
pharm.vogel.com.cn
* 反馈编码：210230

pH综合表征了微生物代谢进程，是发酵过程中十分重要的控制参数。pH影响生物酶的活性和细胞膜的通透性，适当的pH会促进微生物的新陈代谢，反之则会抑制其活性，降低目标产物的得率，例如，胃蛋白酶的最适pH为1.5~2.2，胰蛋白酶的最适pH为8.0~9.0，唾液淀粉酶的最适pH为6.8。pH影响培养基成分的存在状态和中间代谢物的解离，直接关系到生物反应方向和反应副产物。例如，黑曲霉在pH为2~3时发酵产生柠檬酸，在pH近中性时，则产生草酸。微生物发酵的不同阶段有不同的pH值，因此精准的

本文作者系Endress+Hauser分析产品专家。

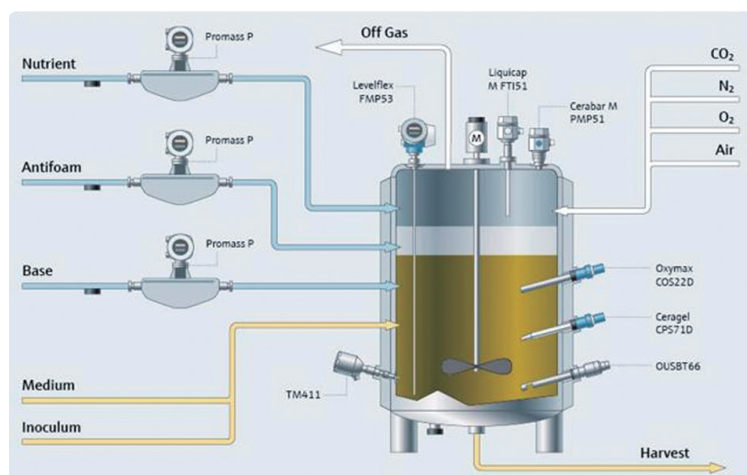


图1 典型生物发酵中生物反应器的在线仪表测量点

pH控制直接关系到生产效率，在发酵全周期中必须对pH实时监控。

发酵过程中的基质代谢、发酵产物的形成、菌体自溶都会引起介质的pH发生变化。在线pH测量不仅要求测量精准快速，同时要求传感器及其对应的安装支架完全满足卫生要求，不引入杂菌和干扰微生物反应的物质，如单体丙烯酰胺和银离子等。除此之外，也要求电极在耐受严苛的原位清洗（CIP）和原位消毒（SIP）后，依然能保持测量的稳定性，从而保障整个发酵周期中pH的可靠测量。

Memosens CPS171D：专为生命科学行业研发的pH电极

特制内加压参比凝胶与离子捕捉阱

CPS171D采用特制的参比凝胶，不含单体丙烯酰胺和动物来源成分，无细胞毒性，对生物活性没有干扰，适用于微生物反应过程的监控。参比凝胶出厂前实现7 bar abs内加压，以减缓介质成分浸入对参比系统的干扰。其内部具体结构如图2所示。

参比凝胶不含银离子，不会与培养基中的物质产生反应（例

如, Tris 与银离子反应后, 在电极内部形成黑色沉淀堵塞隔膜)。取而代之的是离子捕捉阱, 与传统电极内部直接投加离子捕捉剂不同的是, CPS171D 将离子捕捉剂以微管型式固定在 Ag/AgCl 引线的周围, 可以有效地吸附 SIP 过程中引线溶解的银离子, 同时与过程中的杂质离子反应, 从而保护引线与测量电势链的完整, 其内部构造如图 3 所示。

耐受频繁CIP/SIP的N Type耐高温型玻璃敏感膜

CPS171D 采用特制的 N Type 耐高温型玻璃敏感膜, 参比系统不易老化黄变和液化, 在频繁的 CIP/SIP 下拥有非常好的零点 / 斜率稳定性及使用寿命。从 50 次标准 SIP 后电极的零点和斜率变化中就能一

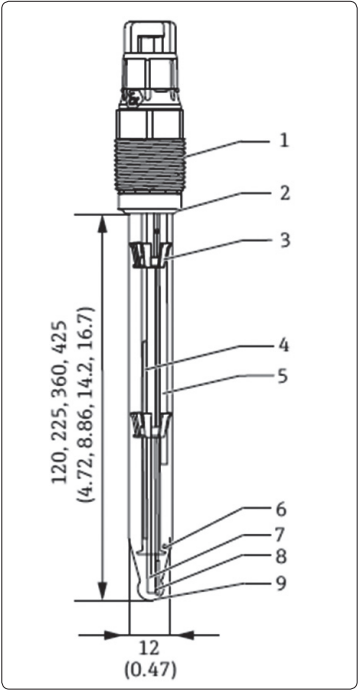


图 2 CPS171D 的内部结构示意图 (1.Memosens 感应式接头; 2.FKM O 型圈, 带止推环; 3. 固定部件; 4. 电极内加压气泡指示器; 5. Ag/AgCl 引线, 带离子捕捉阱; 6. 卫生型微孔陶瓷隔膜; 7. NTC 30K 温度传感; 8. Ag/AgCl 内部参比引线; 9. N Type 耐高温型玻璃敏感膜。)

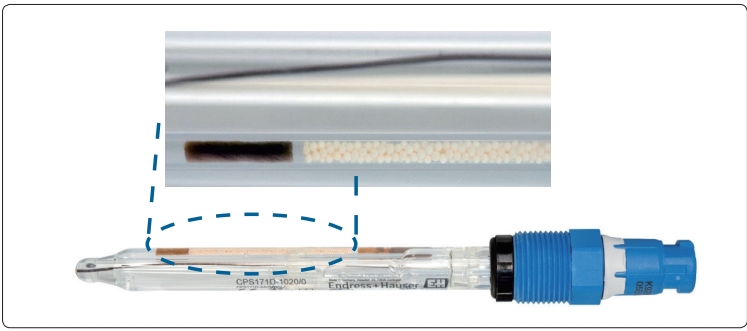


图 3 CPS171D 内部离子捕捉阱的局部构造图

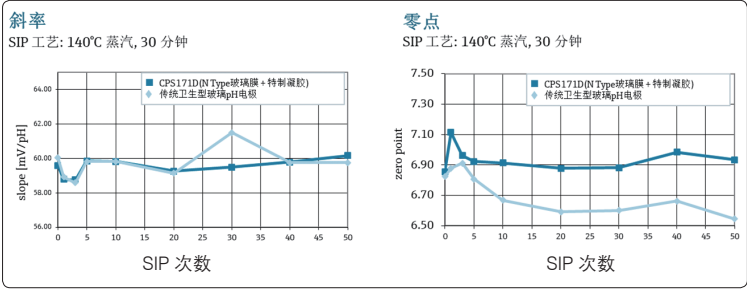


图 4 CPS171D 与传统卫生型玻璃 pH 电极在 SIP 后的鲁棒性变化

见端倪, 如图 4 所示, 不难发现, 随着玻璃敏感膜和凝胶的强化, 电极耐受 SIP 的次数显著提升。

溶解氧是好氧微生物生长及合成代谢产物所必需的, 但这并不意味着溶解氧的浓度越高越好, 溶解氧浓度过高有时反而会抑制目标产品的形成。研究发现, 发酵需氧量主要与产物的合成途径有关, 例如, 谷氨酸发酵过程中, 如果溶解氧浓度不足, 会抑制谷氨酸的积累, 并在厌氧合成路径下产生乳酸和琥珀酸。但是, 维生素 B12 的生产过程中却需要采用前期厌氧和后期好氧的方法。因此, 发酵过程溶中溶解氧的控制实质是, 控制发酵的前、中、后段每一个时期的溶解氧都能满足合成路径中优势菌种的氧气需求, 控制溶解氧在合适的时机补料、补糖, 从而实现产物的转变。

因此, 在线溶解氧测量不但对传感器的卫生型设计和测量原理提出要求, 更为显著的需求是

传感器在反应器中必须能够快速响应, 并且稳定地反应发酵液中的溶解氧浓度, 尽可能不受充气过程中气泡和搅拌带来的影响。

以典型的好氧发酵为例。发酵前期为微生物对数生长期, 菌体大量繁殖, 菌体浓度不断上升, 耗氧量不断增加, 溶解氧浓度明显下降。在对数生长期后, 菌体耗氧量有所减少, 溶解氧浓度维持平稳或小幅上升后, 开始形成产物。发酵中后期, 菌体呼吸强度趋于平稳, 如不补料、补糖或改变供氧量, 溶解氧浓度几乎没有变化。如果此时补充碳源或者糖分, 发酵液对溶解氧的消耗量会产生变化, 应随补料时的菌龄、补料的种类和补料量, 对溶解氧的浓度和维持时间进行控制, 以达到新的平衡, 不然会抑制目标产物的生成。发酵后期, 随着菌体衰老呼吸强度减弱和菌体的自溶, 溶解氧浓度逐渐小幅升高, 直至发酵结束。这一发酵过程中溶解氧的变化曲线如图 5 所示。

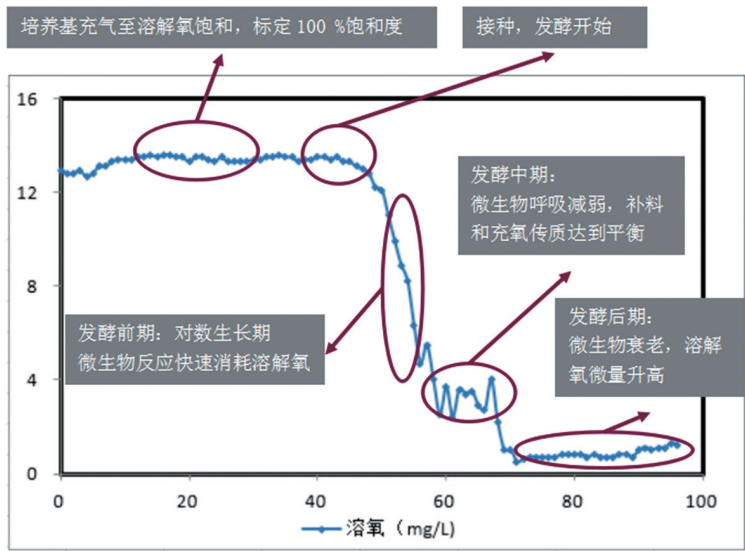


图 5 典型好氧生物发酵过程中溶解氧的变化曲线

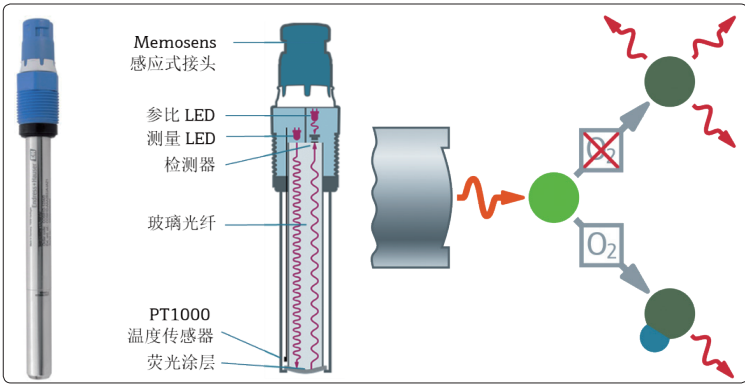


图 6 荧光淬灭法溶解氧传感器的测量原理

表 1 不同类型荧光帽的表面特性

	C-shape 荧光帽	U-shape 荧光帽	传统平头帽
适合工况	含气泡液体 (适合生物发酵工况)	气体, 研磨性介质	受气泡和研磨颗粒干扰
安装	0 到 360° (甚至倒装)	0 到 45°	
表面特性			

Memosens COS81D : 专门为发酵过程研发的荧光法溶解氧传感器

更快的响应速度 ($t_{90} < 10\text{ s}$ 、 $t_{98} < 20\text{ s}$) 和更高的稳定性

荧光淬灭法 (测量原理如图 6 所示) 相较传统的电化学法, 不需要长时间的极化, 没有需要频

繁维护更换的覆膜帽、阴极和电解液。传感器浸入在介质中时, 介质和荧光层之间能够迅速建立氧分压平衡。传感器光学部件向荧光层发出橙色光脉冲信号, 记号体激发深红色荧光。响应信号的衰减时间和强度与氧浓度和氧分压直接相关。内置参比 LED 光源, 对测量 LED 光源老化进行补

偿, 保证整个生产批次的测量值均可靠。

独特的 C-shape 防气泡聚集型荧光帽

COS81D 的荧光帽包含荧光层、光学隔离层和保护层以及载板, 氧敏感分子 (记号体) 集成在光学活性层 (荧光层) 中, 针对不同的应用工况有两种截然不同的种类, 分别是防气泡聚集的 C-shape 型荧光帽和防磨损的 U-shape 型荧光帽。如表 1 所示, C-shape 荧光帽通过将荧光层均匀地涂布在预拉伸凸起的载板上, 从而使气泡在接触膜片表面时顺膜片边缘光滑地脱离荧光帽, 减少气泡对测量值产生干扰与波动。U-shape 荧光帽将荧光层保护在电极的金属感体内部, 防止快速的流体冲击, 尤其是研磨性介质对膜片的冲刷, 从而延长电极寿命。

OUSBT66 : 细胞增长和生物质量传感器

细胞生长情况的实时监控是生物发酵过程控制的核心参数之一, 使用在线的光密度计替代采样细胞计数器是大势所趋。在发酵和结晶应用中的卫生型近红外光谱 (NIR) 吸收传感器 OUSBT66 监测细胞生长、生物质量、藻类系统和结晶过程, 可以实时提供可靠、精准的测量值, 优化监测过程和提高产品率。

OUSBT66 的内部构造如图 7 所示, 其测量原理基于经典的朗博比尔定律, 即吸光度和吸光物质浓度之间为线性关系。光源向介质方向发射光线, 光线穿过介质, 介质另一端的检测器测量穿透介质的光线。光电二极管检测光线强度, 并将其转换成光电流。随后, 变送器将光电流转换成吸光

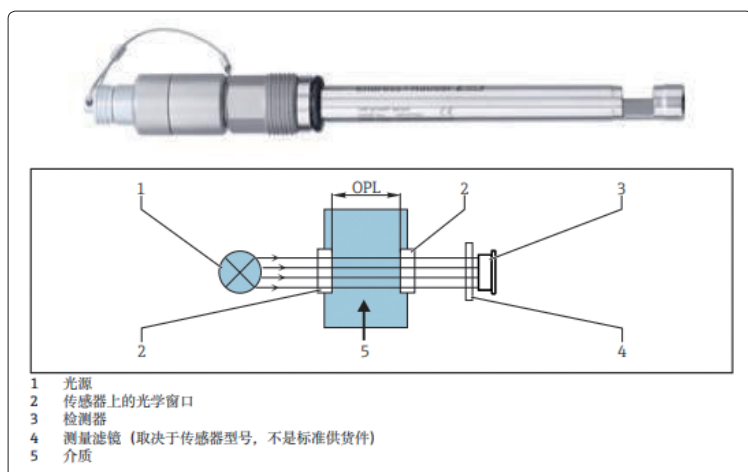


图 7 细胞增长和生物质量传感器的测量原理及构造示意图

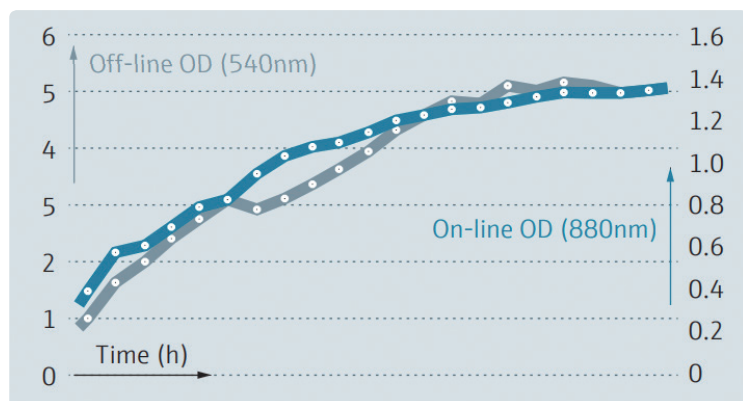


图 8 在线传感器和实验室光度计测量固氮螺旋菌和根瘤菌的光密度值

度 (AU) 或者光密度 (OD)。

$$A = -\log(T) = \varepsilon \cdot c \cdot OPL$$

$$T = I/I_0$$

式中：

A——吸光度；

T——传输率；

ε ——消光系数；

c——浓度；

OPL——光程；

I——检测器接收光强度；

I_0 ——光源发射光强度。

在某个 5000 L 的通过发酵方式进行固氮的生物反应器中，同时使用了在线近红外传感器和实验室可见光光度计测试了不同阶段固氮螺旋菌和根瘤菌的光密度值，如图 8 所示，实验结果表明在线传感器和实验室光度计之间的测量值误差非常微小。同时，在线传

感器可以实时不间断地测量罐体部的介质光密度值，无需取样，不会受到介质在采样、传递和等待过程中的变质和污染的风险。

结语

Endress+Hauser 可为业界提供完整的发酵过程在线测量整体解决方案，帮助简化项目、减少后期维护成本和停机时间。以便在设计阶段即推行早期标准化，降低资本性支出 (CapEx) 和运营成本 (OpEx)，提高生产效率和投资回报率 (ROI)。作为生物技术领域可靠的合作伙伴，无论是中试生产还是自动化生产过程，Endress+Hauser 都能为客户减少风险并优化绩效，稳步提升质量。

We Are **E-Pharma**,
我们是 **意发玛**,
Sanitary Heat Exchanger
卫生级换热器
Supplier.
提供商。

专业、专注、精益求精
Specialized, Focus, Try for the Best

www.epharmatech.net
E-mail: info@epharmatech.net
Tel: +86-21-32503721 32503722