

使用安捷伦在线液相色谱系统监控生物发酵反应



作者

周影, 陈波
安捷伦科技(中国)有限公司

摘要

在生物发酵过程中实时监控反应液, 有助于研究者更好地判断反应进程。Agilent InfinityLab 在线液相色谱系统能够对各类均质反应进行全自动在线监控, 通过触发样品前处理设备, 在发酵反应过程中自动完成样品传输、样品前处理、样品采集、数据处理等工作。

本研究采用蠕动泵作为样品传输装置, 将样品从发酵罐传输至在线液相色谱系统。由安捷伦在线液相色谱监控软件在指定时间触发蠕动泵传输发酵液, 并通过传输管路中的滤器进行过滤, 处理后自动传输至在线液相色谱系统。然后利用预设方法进行数据采集和分析, 同时绘制目标产物含量变化趋势图。

前言

生物发酵反应中经常使用 HPLC 监测进程。通过对比不同时刻、不同工艺参数下的产物和代谢物含量，控制发酵进程并寻求更适合、更高效的发酵条件。传统的发酵反应监测工作流程一般使用人工取样、前处理和离线液相色谱检测。通常在发酵反应完成后，才对所收集的发酵液进行统一处理和检测，然后根据检测结果追溯工艺参数，需要多次方法重现以实现工艺优化。由于液相色谱检测是后置进行的，因此无法实时反馈实验数据以帮助研究者及时调整工艺参数，导致研发效率低且进度慢。因此，迫切需要对生物发酵过程进行在线液相色谱监测的技术。

针对生物发酵过程的特点，发酵液样品前处理通常包括稀释、过滤等操作，使得测物充分溶解于稀释液中，并经由过滤以去除其中的菌体等不溶物，再进行液相色谱检测。生物合成过程通常使用发酵罐作为容器，并配置多个取样出口。本研究将蠕动泵装置与发酵罐串联，作为生物发酵取样和处理的驱动装置。考虑到发酵液中包含较多的不溶物，因此在传输管路中增加过滤器，对发酵液进行过滤净化。结合安捷伦在线液相色谱系统，通过在线液相色谱监测软件触发蠕动泵的运行及在线液相色谱系统的样品前处理，实时采集发酵液并进行在线色谱分析，自动完成数据处理。与传统的后置检测相比，在线液相色谱系统能够实时展示发酵罐中目标产物含量变化的趋势。研究者可根据实时监测结果及时调整工艺参数，从而提高发酵产率及研发效率。

实验部分

试剂和样品

乙腈为 HPLC 级，购于 Merck；所用实验用水为自制的 HPLC 级纯化水；甲酸铵为 HPLC 级，购于 SIGMA-ALDRICH；甲酸为 HPLC 级，购于 DIKMA；乙醇为 HPLC 级，购于 CNW。

仪器和设备

仪器设备连接示意图如图 1 所示。

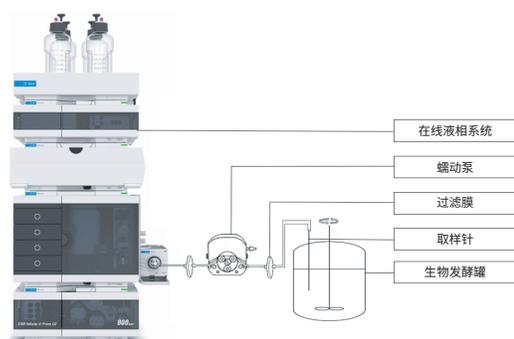


图 1. 仪器设备连接示意图

液相色谱系统部分

采用 Agilent InfinityLab 在线液相色谱系统，配备如下安捷伦模块：

Agilent 1260 Infinity II 全能泵（部件号 G7104C）；

Agilent 1260 infinity II 在线样品管理器组件（部件号 G3167AA）；

Agilent 1260 Infinity II 大容量柱温箱（部件号 G7116A），配备标准热交换器（部件号 G7116-60051）；

Agilent 1260 Infinity II 二极管阵列检测器（部件号 G7117C），配备最大光强卡套式流通池（10 mm，部件号 G4212-60008）。

软件采用 Agilent OpenLab CDS 2.7 版和安捷伦在线液相色谱监测软件 1.1 版。

蠕动泵联机部分

通用型样品传输泵：兰格蠕动泵 YZ1515X

线路连接：ERI 连线（部件号 5188-8029）

联机软件：安捷伦在线液相色谱监测软件 1.1 版

采用蠕动泵作为“通用样品传输泵”，通过安捷伦在线液相色谱监测软件进行控制（见图 2）。在软件给出触发指令后，蠕动泵开始运行，且运行持续时间与设定“Pump time”保持一致。蠕动泵运行时间的设定考虑到整个传输管路及过滤装置的死体积。单次泵液总体积应大于整个传输过程中的消耗量，以确保整个管路的反应液被完全置换，从而提高检测结果的准确性。

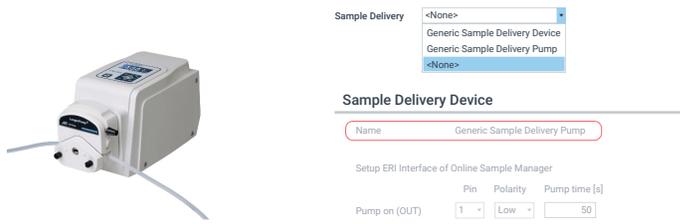


图 2. 左图：兰格蠕动泵，右图：安捷伦在线液相色谱监测软件 — 样品传输装置设定

发酵液过滤

过滤膜：赛多利斯正压型过滤器 18072-D 和 18076-N

基于发酵过程中发酵液的特点以及液相色谱对测试溶液颗粒度的要求，在样品传输过程中对发酵液进行过滤。本实验采用多级过滤对发酵液进行前处理，其中首先使用较大孔径 (0.8 μm) 的滤膜进行第一级过滤，然后使用较小孔径 (0.45 μm) 的滤膜进行第二级过滤。多级过滤可有效延长发酵过程中滤膜的使用寿命，同时避免取样过程中滤膜造成流路堵塞。

软件设定

第一步：采集方法及进样规则设定

在实验编辑过程中，首先需要确定分析方法，设定样品采集方法及数据处理方法。由于生物发酵过程中两次取样间隔时间较长，因此可以设定“Sleep method”，在进样间隙以较低的流速运行，减少溶剂消耗；再次取样之前，通过“Wake-up method”提升流速至采集方法初始比例，确保仪器在稳定状态下进行样品采集及分析（见图3）。

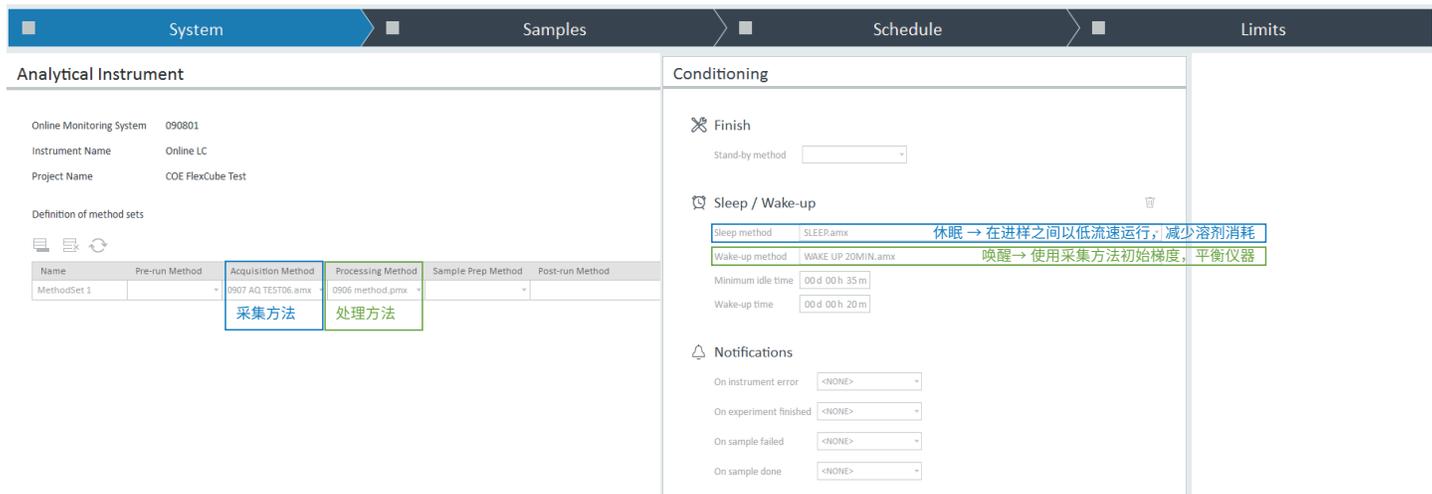


图3. 实验参数设定 — 采集方法及进样规则

第二步：取样方法设定

安捷伦在线液相色谱监测软件可根据不同阶段的实验需求选择合适的取样方式。一方面，可根据样品来源，选择从进样小瓶或反应器中采集样品（如图4A和4B所示）；另一方面，可根据反应进程中待测物的浓度高低，选择是否对待测溶液进行稀释（如图4C和4D所示）。考虑到在生物发酵反应过程中可能需要通过多种检测方式判断发酵反应进程，因此在实施液相色谱检测的同时，将收集的样品储存在进样小瓶中以备后期用于其他检测。

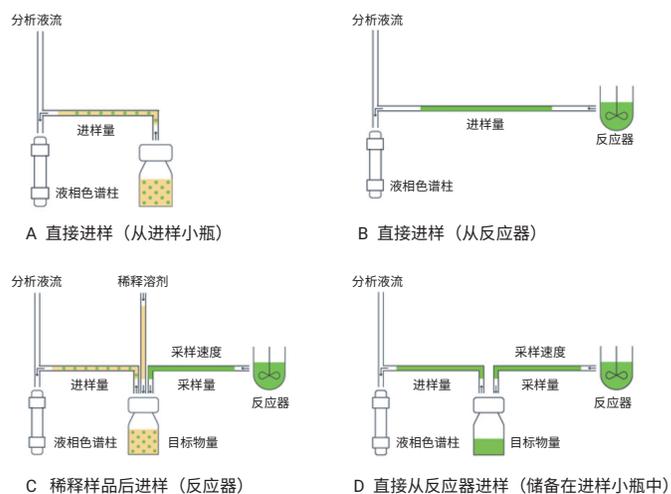


图4. 在线液相色谱系统不同取样及分析模式

第三步：设定取样时间

根据既往知识，在生物发酵反应过程中，在反应开始 30 分钟后每隔 4 小时取样一次。以发酵产物作为目标物，分析反应进程中目标产物含量随时间推移的变化。因此，需要在在线液相色谱监测软件中设定取样开始时间、取样次数、取样间隔以及实际收集样品的进样小瓶位置（见图 5）。软件将根据设定的取样规则自动生成进样计划，并检查设定取样逻辑能否满足实际监测目的。

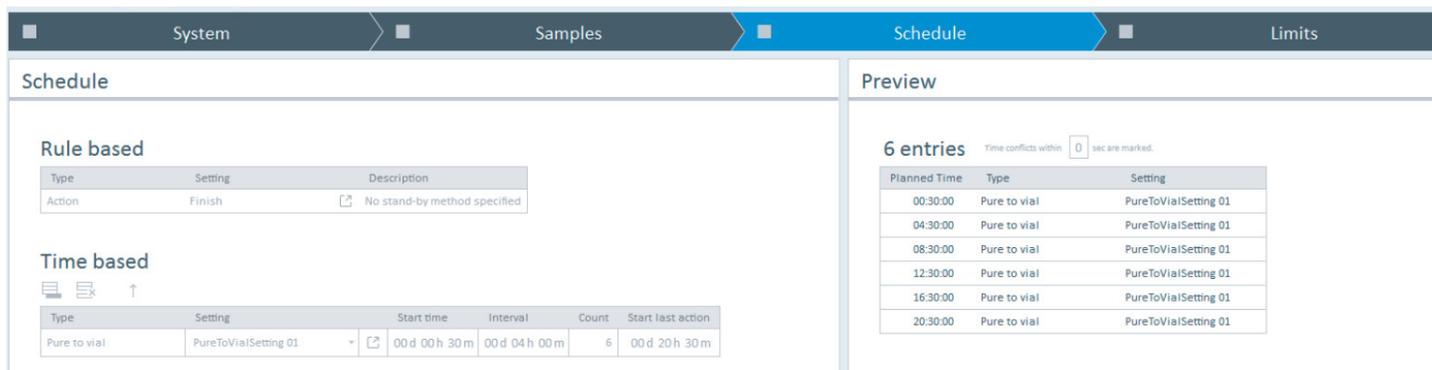


图 5. 设定取样时间表

色谱条件

色谱柱	Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.7 μm , 3.0 mm \times 150 mm (部件号 693975-302)		
柱温	40 $^{\circ}\text{C}$		
检测波长	270 nm		
进样量	2 μL		
流速	0.5 mL/min		
流动相 A	20 mmol/L 甲酸铵缓冲盐 (精密称取 1.26 g 甲酸铵, 溶于 1000 mL 纯化水中, 然后用甲酸将 pH 调节至 3.0)		
流动相 B	乙腈		
洗脱梯度	时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
	0.0	95	5
	6.0	70	30
	7.0	95	5
12.0	95	5	

结果与讨论

在线液相色谱与离线液相色谱监测结果对比

在传统离线液相色谱系统的样品前处理中，需要首先将发酵液与稀释剂充分混合并稀释至合适的浓度；然后离心取上清液，过滤后将其转移至进样小瓶中进行分析。整个样品前处理过程均由人工完成，稀释操作的准确性、转移过程以及所用实验器具的洁净度都会影响检测结果的准确度。

将安捷伦在线液相色谱系统与发酵罐串联，能够自动完成样品前处理操作，并根据目标产物在发酵液中的溶解性以及待测物的实际浓度确定合适的样品前处理流程。详见图 6。

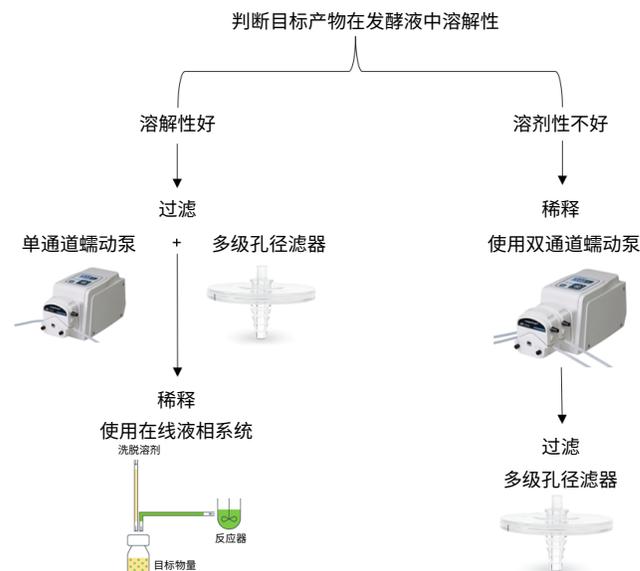


图 6. 在线液相色谱样品前处理流程

本实验使用安捷伦在线液相色谱系统触发蠕动泵，在传输管路中进行样品前处理。与传统离线系统中的手工样品前处理模式相比，在线液相色谱系统的自动模式能够在保证检测时效的同时，大大减少繁琐的人为操作可能造成的误差，从而提高检测效率。利用离线系统和在线系统所得到的图谱如图 7 所示。从图中可以看出，虽然样品前处理流程略有差异，但所得图谱中的杂质基本一致。其中保留时间 5.45 min 处的峰对应于目标产物，保留时间 5.70 min 处的峰对应于副产物。通过两种不同的样品前处理方法所得到的检测结果相当，表明在线样品前处理同样能够提供比较准确的结果。

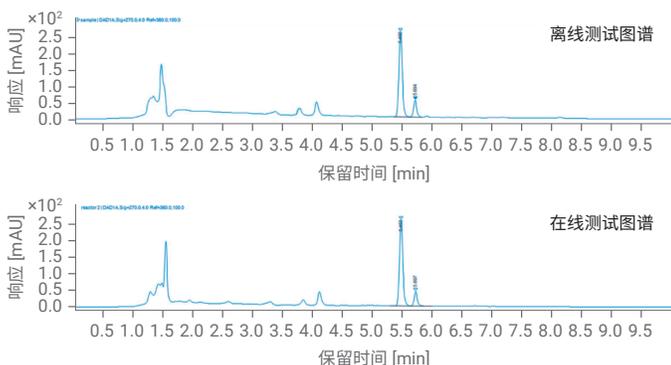


图 7. 离线液相色谱与在线液相色谱检测所得到的图谱对比

在线液相色谱系统实时数据反馈

在实验运行过程中，在线液相色谱监测软件能够实时显示实验进度。通过仪器状态可查看在线监测进程、当前实验进展、实际取样时间、进样时间及相关方法（见图 8）。使用预设的数据处理方法，结果界面可实时显示已完成的监测结果，自动更新反应液中目标物的含量随时间推移的变化（见图 9）。研发人员可根据目标物含量的变化趋势判断反应进程并调整工艺参数。从图 9 可以看出，在本实验中，在 0-8 小时，发酵液中的目标物含量随时间推移而缓慢增加；而在 8-20 小时，目标物含量快速提高，与预设反应状态相似。表明本实验所用的在线液相色谱系统能够很好地反映发酵罐中目标产物的含量变化进程。

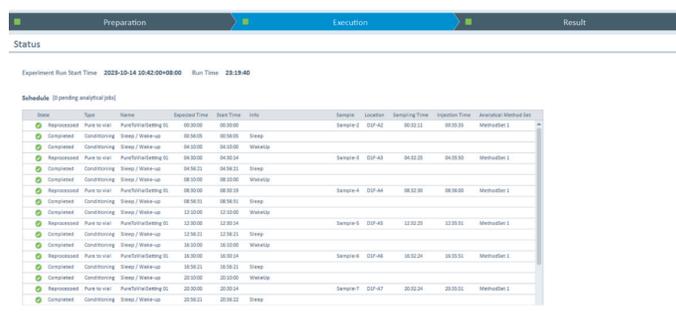


图 8. 在线液相色谱监测软件工作状态显示

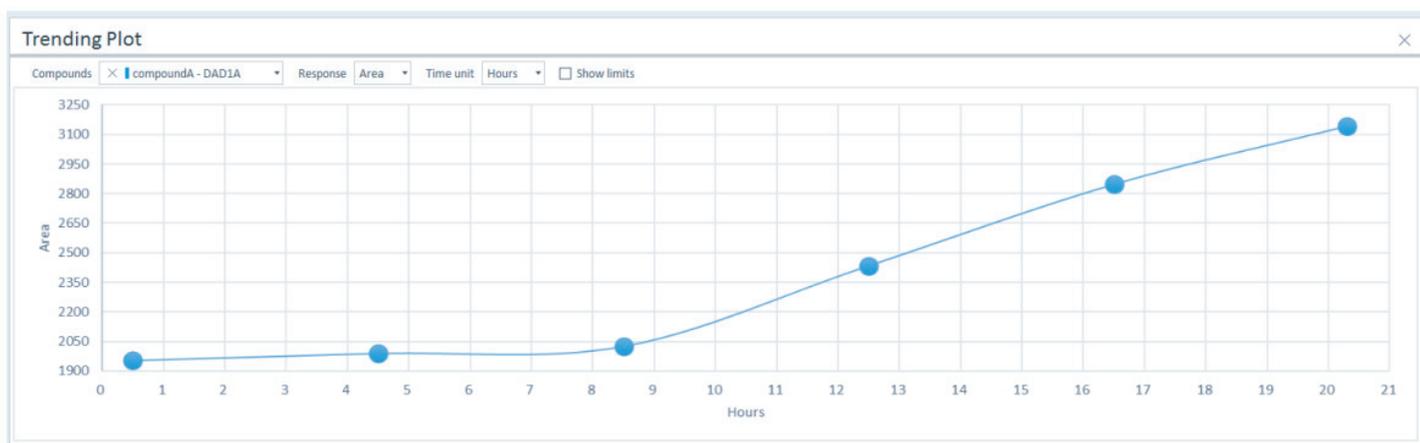


图 9. 目标产物含量变化趋势曲线

实验结果反馈

在实验运行前，研究者可根据不同反应时刻对待测物浓度的判断来设定可接受浓度的范围。在监测过程中，一旦待测物浓度超过可接受范围，在线液相色谱系统将通过邮件通知或发送触发信号至反应器以反馈异常结果（如图 10 所示）。

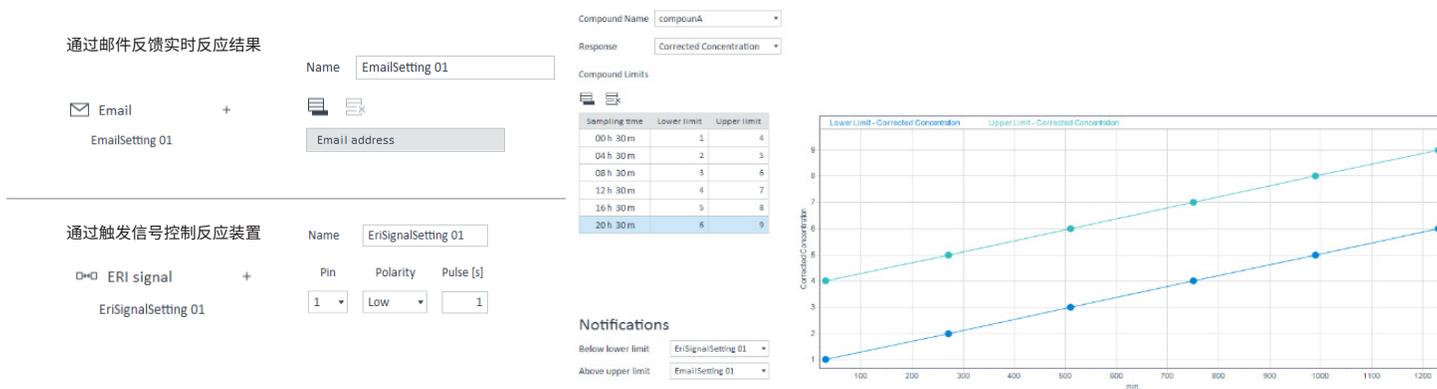


图 10. 在线液相监测软件设定待测物在不同时刻的合理浓度区间及异常结果反馈途径

结论

本实验使用蠕动泵作为样品传输装置，将安捷伦在线液相色谱系统与发酵罐串联，对发酵罐中的目标产物进行监测。与传统的离线液相色谱监测相比，在线液相色谱系统在样品前处理自动化以及监测结果时效性方面都具有明显优势。全自动化样品前处理及采集流程一方面大大提高了实验室工作效率，另一方面规避了复杂样品前处理过程中引入人为误差的可能。利用安捷伦在线液相色谱监测软件，在预设采样频率、采集方法及数据处理方法后，在线液相色谱系统将在预设时间点触发蠕动泵运行，根据预设程序完成取样、稀释等操作，并通过管路中安装的过滤器进行过滤，然后进样分析。完成样品检测后，在线液相色谱监测软件将自动处理检测数据，并绘制发酵罐中的目标物含量随时间推移的变化趋势。根据这些实时监测结果，研究者可随时随地掌控发酵进程，并及时对工艺参数进行调整。综上所述，安捷伦在线液相色谱系统使研发生产中的发酵反应监控的全自动化和无人化成为可能，有望大幅加快生物发酵工艺优化过程，从而显著提升研发效率。

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn



微信搜一搜

安捷伦视界

www.agilent.com

DE56191803

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和指标如有变更,恕不另行通知。

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2023
2023年11月23日, 中国出版
5994-6950ZHCN

