

Thermo Scientific™ Prima BT和Prima PRO过程质谱仪

气体分析质谱仪在发酵和细胞培养过程中的应用

发酵

发酵是微生物学家描述通过大量培养微生物的方法生产化合物所使用的术语。该产品可以是细胞本身（生物质产品），微生物自身的代谢产物或异质产品。使用氧气执行其代谢作用的微生物被称为好氧微生物。另一些微生物可以用硝酸盐或硫酸盐代替氧气，因此可以在缺氧的情况下生长。这些微生物被称为厌氧微生物。



关键词

- 生物技术
- 发酵
- 生物反应器
- 尾气分析
- 过程分析技术（PAT）
- 先进过程控制（APC）
- 耗氧速率（OUR）
- 二氧化碳释放率（CER）
- 呼吸熵（RQ）
- 活细胞计数（VCC）
- 哺乳动物细胞培养
- 快速多流取样器（RMS）
- 扇形磁场

简介

“生物技术”一词最早于1919年由匈牙利农业工程师Karl Ereky使用。发酵这一过程在生物技术中发挥着关键作用，并且广泛应用于不同行业以生产各类主要产品：

- 医药制药：抗生素，疫苗，预防药物，人体胰岛素等激素
- 生物能源：基于低价值非食品原料的生物酒精燃料
- 生物材料：高效节能，生物降解塑料
- 动物营养：饲料添加剂，氨基酸

发酵过程类型

有三种不同的发酵过程：

分批发酵

- 将微生物灌输到发酵罐中的无菌营养液中，并进行培养。在发酵过程中，加入氧气和酸或碱以控制pH（在好氧微生物的情况下）。细胞活动通常会导致培养基的成分、生物质浓度和代谢物浓度不断变化。

分批补料发酵

- 是封闭批量处理的增强，方法是在发酵过程中以增量方式添加物料。

持续发酵

- 建立设置开放系统，并将无菌营养液持续添加到生物反应器。同时，从系统提取含有微生物的已转换的等量营养液。

从历史上看，发酵罐和生物反应器是为了反复使用而设计的，在批次之间需要小心地对容器进行消毒，以避免可能的污染。最近，“一次性使用”容器变得普遍，无需昂贵且耗时的灭菌消毒过程。图1为Thermo Scientific™ HyPerforma™ 50升一次性生物反应器（S.U.B.），其用于哺乳动物细胞培养发酵。HyPerforma S.U.B.s的完整产品线包括50，100，250，500，1,000和2,000升尺寸，有助于保障一致的可扩展性，同时提供广泛的应用用途。此外，我们还提供30和300升尺寸的一次性发酵罐（S.U.F.），用于细菌或真菌发酵。

有三种宿主生物可用于发酵过程：

细菌：乳酸菌，大肠杆菌和芽孢杆菌

它们是能够快速生长，高细胞密度和廉价的底物。它们相对容易培养和扩大规模，但许多被认为是不安全的病原体。产品回收可能会更加困难。

微生物：如酿酒酵母（啤酒酵母）的酵母菌和霉菌

它们已被使用多年并且被认为是安全的宿主生物，因此产品批准变得更加容易。同时它们可以产生相对便宜，高产量的产品。

哺乳动物：中国仓鼠卵巢（CHO）细胞，杂交瘤细胞

它们以非常特定和活跃的形式生产高度专用产品 - 疫苗，单克隆抗体，干扰素和重组治疗性蛋白质。但其生产途径比细菌和微生物过程更复杂，并且细胞系稳健性相比较弱，对剪切和应力相比较敏感。

我们气体分析质谱仪已成功应用于细菌和微生物过程30多年。最近，人们对哺乳动物细胞培养的兴趣日益增加，因为它们为疫苗，单克隆抗体和基因治疗的突破性进步提供无限可能。尽管哺乳动物细胞发酵过程的高要求对尾气分析仪的技术提出了挑战，然而我们的质谱仪在提高对哺乳动物细胞培养物的理解和提高产量方面，已被证明具有不可估量的价值。

对于气体分析的需求

在任何发酵过程中，监测培养物的状态非常重要，因为它的健康决定了营养物质的转化率，不需要的副产物的形成，以及在最坏的情况下，中毒的发生。分析进入发酵罐和从发酵罐中取出的呼吸气体是表征发酵的理想方式。它是非侵入性的并且能够监测发酵的生理状态，包括生长动力学和底物消耗。它还有助于确定停止过程以获得最大产量的最佳点。



图1 Thermo Scientific™ HyPerforma™ 50升一次性生物反应器（S.U.B.）

为何需要使用质谱分析法进行气体分析？

许多发酵过程以发酵关键阶段的氧气和二氧化碳浓度的细微变化为特征，例如当微生物与营养物相处于平衡状态时出现的迟滞期。用于测量尾气的方法具有快速和精确的分析能力是至关重要的。质谱分析 (MS) 的速度令其特别适合用于发酵应用。但是，速度不得以精确度为代价；获得精确的数据以确保浓度的细微变化不会被遗漏同样很重要。

在进行过程控制的第一步时，假设尾气中的氧气和二氧化碳的测量是唯一所需的，且通过离散测量技术可以实现足够的精度的情况并不罕见。但这两个假设都是错误的。首先，由于生物外源性，喷射气体总是变化的 – 人类和动物持

续进行呼吸，消耗 O_2 并产生 CO_2 ，在白天还有植物光合作用消耗 CO_2 并产生 O_2 。其次，普遍使用的双塔干燥剂干燥系统将根据它们在再生循环链中的位置吸收或回收 CO_2 。

图2描述了上述影响，具体使用了Prima PRO工艺质谱仪在24小时内测量的 CO_2 和 O_2 喷射气体水平的日夜变化的实例。

只有准确比较喷射气体和尾气才能为可能的污染提供准确的预筛选。为了计算有关培养物呼吸和营养物可得性的实时信息，还需要进行准确的比较。

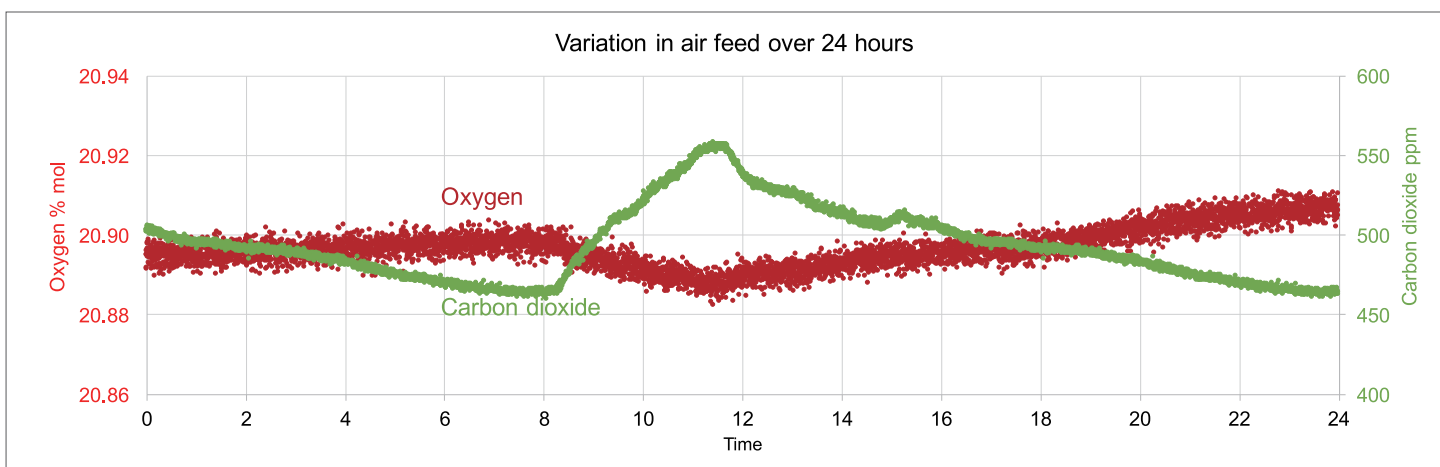


图2 使用Prima PRO质谱仪测量喷射气体中的 CO_2 和 O_2 水平24小时日夜变化的实例

扇形磁场MS的优点

监测发酵过程可使用两种类型的MS：扇形磁场，其带电粒子在可变磁场中被分离；以及四极，其带电粒子在可变射频场中被分离。ThermoFisher既生产四极杆质谱仪，也生产扇形磁场质谱仪 – 超过 30 年的行业经验确保我们基于扇形磁场的分析仪为发酵尾气分析提供最佳的性能^{2,3}。

扇形磁场分析仪的主要优点包括更高的精确度、准确性、较长的校准间隔时间，以及抗污染能力。通常，分析精确度比四极分析仪高出2到10倍，具体取决于被分析的气体 and 混合物的复杂性。图2显示扇形磁场质谱分析仪的原理图。

扇形磁场分析仪上任何特定质量位置的信号强度显示为平顶峰。这意味着质量标度中的任何小漂移都不会导致信号强度的变化。对于提供圆形峰的四极杆质谱仪，情况并非如此。我们的Prima系列质谱仪中使用的扇形磁场分析仪是层压的，因此它们的扫描速度相当于四极分析仪的速度，成就快速分析和高稳定性的独特组合。这可以快速并极其稳定地分析无限种类的用户自定义的气体。

扇形磁场质谱仪出色的长期稳定性正如表1所示。Prima BT台式气体分析质谱仪被配置为连续7天分析压缩空气气瓶中的 N_2 ， O_2 ，Ar和 CO_2 ，期间不中断且无需重新校准。测量这四个气体成分的分析周期时间为5秒。氮气和氧气的日常平均值变化为0.005%mol或更低，二氧化碳的日常平均值变化为1ppm或更少。

表1 使用Prima BT 扇形磁场MS连续7天分析压缩空气

	Nitrogen %mol		Oxygen %mol		Argon %mol		Carbon dioxide ppm	
	Mean	Std dev	Mean	Std dev	Mean	Std dev	Mean	Std dev
Day 1	78.0807	0.0028	20.9459	0.0026	0.9337	0.0003	396.84	1.31
Day 2	78.0767	0.0023	20.9494	0.0023	0.9342	0.0003	397.46	1.25
Day 3	78.0761	0.0024	20.9500	0.0023	0.9342	0.0003	397.34	1.28
Day 4	78.0798	0.0023	20.9469	0.0023	0.9337	0.0003	396.31	1.31
Day 5	78.0777	0.0030	20.9487	0.0028	0.9339	0.0003	396.76	1.34
Day 6	78.0741	0.0023	20.9518	0.0022	0.9344	0.0003	397.47	1.27
Day 7	78.0750	0.0023	20.9512	0.0022	0.9342	0.0003	397.23	1.30

图3是四种气体读数的图形显示，数据取自Thermo Scientific GasWorks®软件的数据审查Plus模块。这种长期稳定性仅适用于扇形磁场质谱仪 - 四极杆质谱仪则需要经常校准以校正其固有性质漂移。

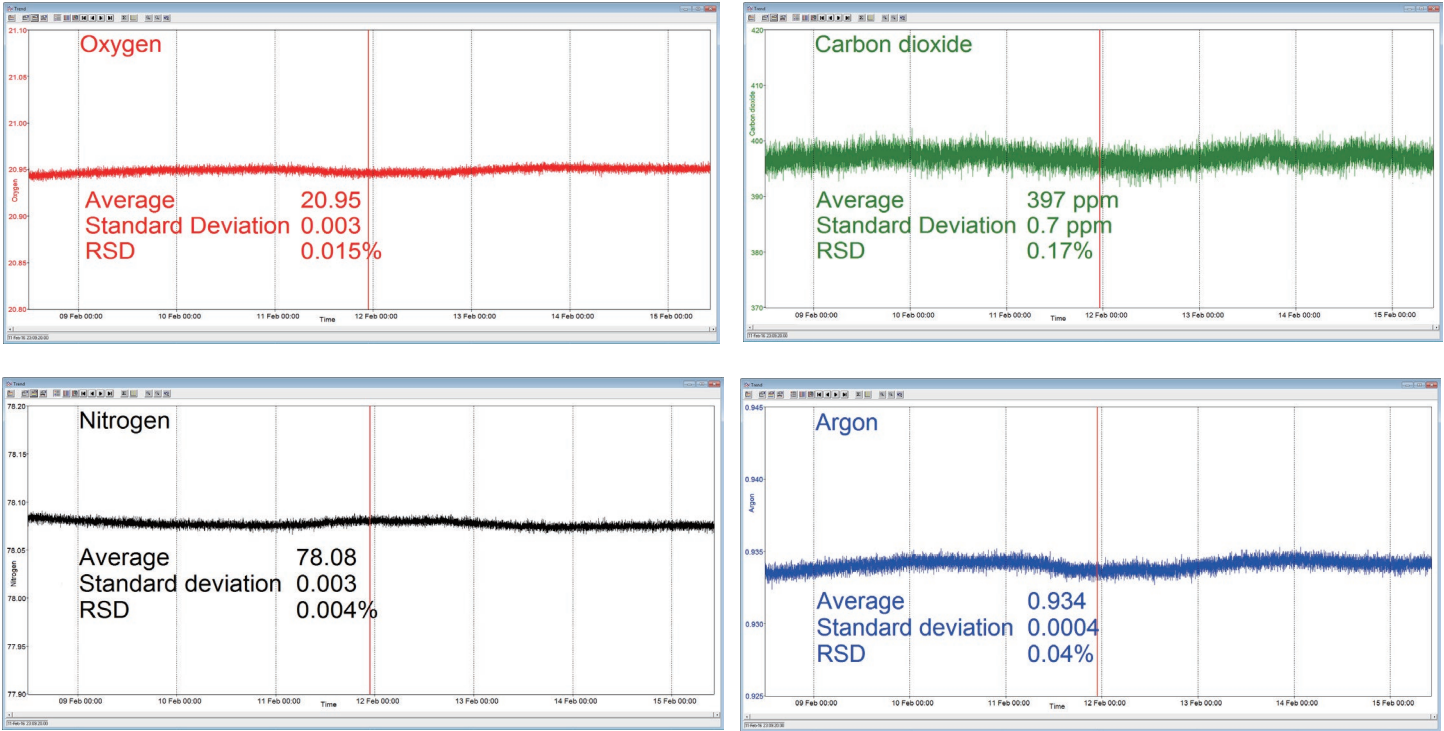


图3 Prima BT 扇形磁场MS的长期稳定性数据

快速多流取样

如果使用MS监测多个发酵罐，那么必须采用快速和可靠的方法以切换不同的气流。电磁阀组的死体积太大，而旋转阀的可靠性较差，因此我们开发独特的快速多气流取样器 (RMS)。它将取样速度和可靠性进行完美整合，并允许从最多 64个气流选择样本。

气流稳定时间取决于应用，并且可完全由用户进行配置。RMS包括每个选定气流的数字样本流量记录。如果样本流量下降，这可用于触发警报，例如，如果样本调节系统中的过滤器堵塞。RMS经过加热，即使是最具“粘性”的挥发物也能快速作出响应。

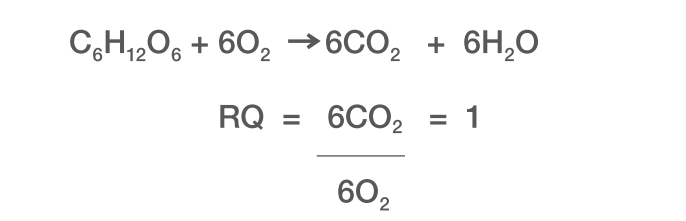
Table 2 Respiratory quotient for fermentation off-gas analysis

CER (CO ₂ Evolution Rate)	=	(%Volume of CO ₂ out × flow out)	-	(%Volume CO ₂ in × Flow in)
OUR (O ₂ Uptake Rate)	=	(%Volume of O ₂ in × flow in)	-	(%Volume O ₂ out × Flow out)
RQ (Respiratory Quotient)	=	CER/OUR		

呼吸熵

呼吸是生物体氧化食物以产生能量的过程，因此发酵过程中的重要控制参数是呼吸熵(RQ)。这是二氧化碳释放率(CER)与耗氧速率(OUR)的比率。完整的RQ计算参见表2。

高RQ意味着正在生产大量的CO₂，因此可知新陈代谢同时在以高效率运行。RQ在识别和控制被代谢的碳源方面也是极其有帮助的，例如：如果葡萄糖（或其他碳水化合物）是碳源，那么理论上RQ为1。



然而该等式仅涉及燃烧，不包括生物质的生产或产物形成。因此葡萄糖的RQ不太可能是1.00，实际上可能是1.04。

准确确定RQ取决于确定进出发酵罐的流量比率。通过扫描 MS可轻松确定此比率，除测量O₂和CO₂之外，它也可用于测量N₂和Ar。这两种气体中，至少有一种气体对过程是惰性的，因此它可用于有效校正湿度变化，湿度变化在当干燥原料气体被鼓入发酵罐液体时可能发生。如果未进行该项校正操作，由于被额外的水蒸气稀释，顶空气体数据可能出现错误4。表3展示了使用N₂作为流量校正以计算RQ的结果。作为发酵应用程序的一项标准功能，Thermo Scientific GasWorks® 软件可计算 RQ。

Table 3 Respiratory Quotient calculated by MS

=	{CO ₂ out	×	(N ₂ in / N ₂ out)}	×	CO ₂ in
	O ₂ in	-	{O ₂ out	-	(N ₂ in / N ₂ out)}

图4显示的是大肠杆菌分批补料发酵的数据。我们的MS测量出入样口的O₂，CO₂，N₂和Ar，并计算RQ。在温度T0下，引入试剂以诱导细胞从繁殖变为表达所需产物

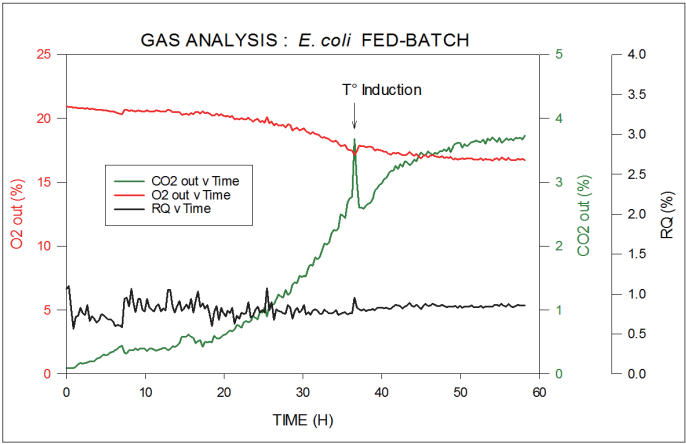


图4 MS生成的大肠杆菌分批补料发酵过程中尾气 and RQ 数据

挥发物分析

呼吸气体并非排出气体中唯一值得关注的气体。在顶部空间可发现各种挥发性有机物（以ppm水平表示），例如甲醇、乙醇、乙酸乙酯，甚至硫化氢，通过分析它们可获得有关发酵健康状态的关键信息。但是，为确保分析数据有意义，必须解决特定技术问题。

例如，测量痕量级别的甲醇和乙醇要求在质量31时测量CH₂OH+碎片。但是，我们需要考虑排出气体中的O₂是百分含量级别的，其在质量32存在一个大峰。如果我们要准确测量痕量级别的乙醇，我们需要针对32峰值的尾值进行校正。

与质量32时的峰值强度相比，质量31时O₂的尾值强度是0.02%。当O₂浓度约为20%，这意味着质量31时的信号相当于大约40ppm。在校准期间记录此干扰，以便正确校正后续分析。在四极杆质谱仪上，此干扰水平要高得多并且会发生变化，造成低水平乙醇测量的不确定因素过多。实际上，低水平乙醇信号会“淹没”在氧峰值的噪声中。使用扇形磁场质谱仪，测量具有极高的可重现性，并且能够以低至10 ppm的精确度测量甲醇和乙醇。

图5显示的是酿酒酵母分批补料发酵的数据。我们的MS测量进口中的O₂，CO₂，N₂和Ar，同时还测量出口顶部空间中ppm水平的乙醇，并计算RQ。乙醇作为初始碳源被消耗，然后转换为葡萄糖以表达所需产物。值得注意的是，在发酵刚开始时，由于O₂消耗量极低，导致信噪比也相应较低，因此精度较低。该周期被称为迟滞期，在此期间细胞计数极低。一旦生物体开始繁殖，精确度将迅速提高。

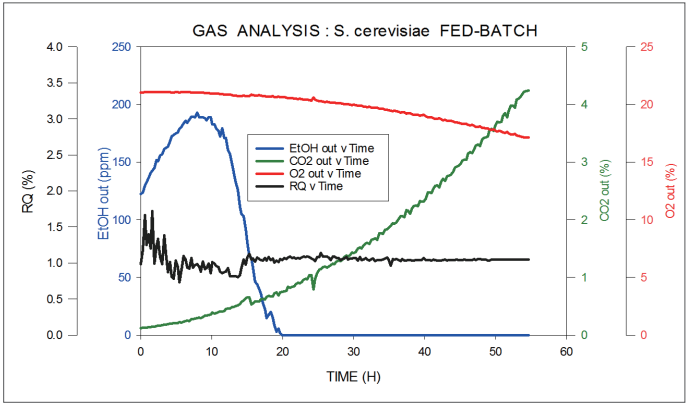


图5 MS生成的酿酒酵母分批补料发酵过程中尾气 and RQ 数据

我们的 Thermo Scientific Prima PRO 扇形磁场MS的标准性能规格如表 4 所示。精确度是在16小时内观察到的标准偏差。注意：在 16 小时内测量氧气时可实现极高的精确度- 0.05%（相对）。所有6种成分的分析时间（包括气流切换时间）为20 秒。如果在分析时忽略甲醇和乙醇，则分析时间可缩短至 10 秒。

Component	Concentration range %mol	Precision of analysis by Prima PRO (single standard deviation) ≤
Nitrogen	0 – 100	0.005 %mol
Oxygen	0 – 100	0.005 %mol
Argon	0 – 1	0.001 %mol
Carbon dioxide	0 – 10	0.1% relative or 0.0003 %mol*
Methanol	0 – 1	2% relative or 0.001 %mol*
Ethanol	0 – 1	2% relative or 0.001 %mol*

* Whichever is greater

哺乳动物细胞培养

在微生物和细菌发酵中，原料气体成分相对恒定 - 空气或富氧空气。在哺乳动物细胞发酵中，原料气体组成是几种化合物（如N₂，O₂和CO₂）频繁变化的混合物。原料气体浓度范围变化很大-例如CO₂变化范围可在几十ppm到百分之几十之间变化。因为整个进口气体组成是喷射气体和覆盖层气体，所以若使用覆盖层气体，将会引入更多的复杂性。使用碳酸氢钠作为pH缓冲剂也会对出口的CO₂水平有所贡献。

如果有意义的在线数据来补充充实离线数据（如活细胞计数和代谢物浓度数据），这些因素都会对尾气分析仪提出一系列具有挑战性的要求。图6说明了扇形磁场的速度和精确度如何提供这些有价值的信息。Prima BT监测两个其中经改良的中国仓鼠卵巢（CHO）细胞用于表达单克隆抗体的5升生物反应器。

质谱仪分析了两个生物反应器进口和出口气体中的O₂，CO₂，N₂和Ar。除了在线质谱仪测量外，还可以离线分析细胞计数（细胞总数和活细胞），乳酸水平和葡萄糖水平。对于每个生物反应器，只有一个进口-喷射气体（O₂，CO₂，N₂和Ar的组合）。O₂进料用于控制氧溶解量，CO₂用于控制pH。MS循环时间为每点15秒，包括稳定时间。浓度需在99个读数上取平均值以减少由喷射气体浓度扰动引起的噪声。由于在反应初始阶段几乎没有反应活动，因此图6仅显示从第100小时开始的数据。

虽然两个生物反应器都由同一个控制器控制，但Bio 1的进口CO₂曲线显示出其与众不同，这是由于Bio 1从进口注入大量CO₂来调节pH值。而Bio 2中更平缓稳定的C₂曲线导致更多的活细胞计数和更长的培养持续时间；在随后的反应中，控制策略的修改将导致培养持续时间的进一步增长和活细胞计数（VCC）水平的增加。

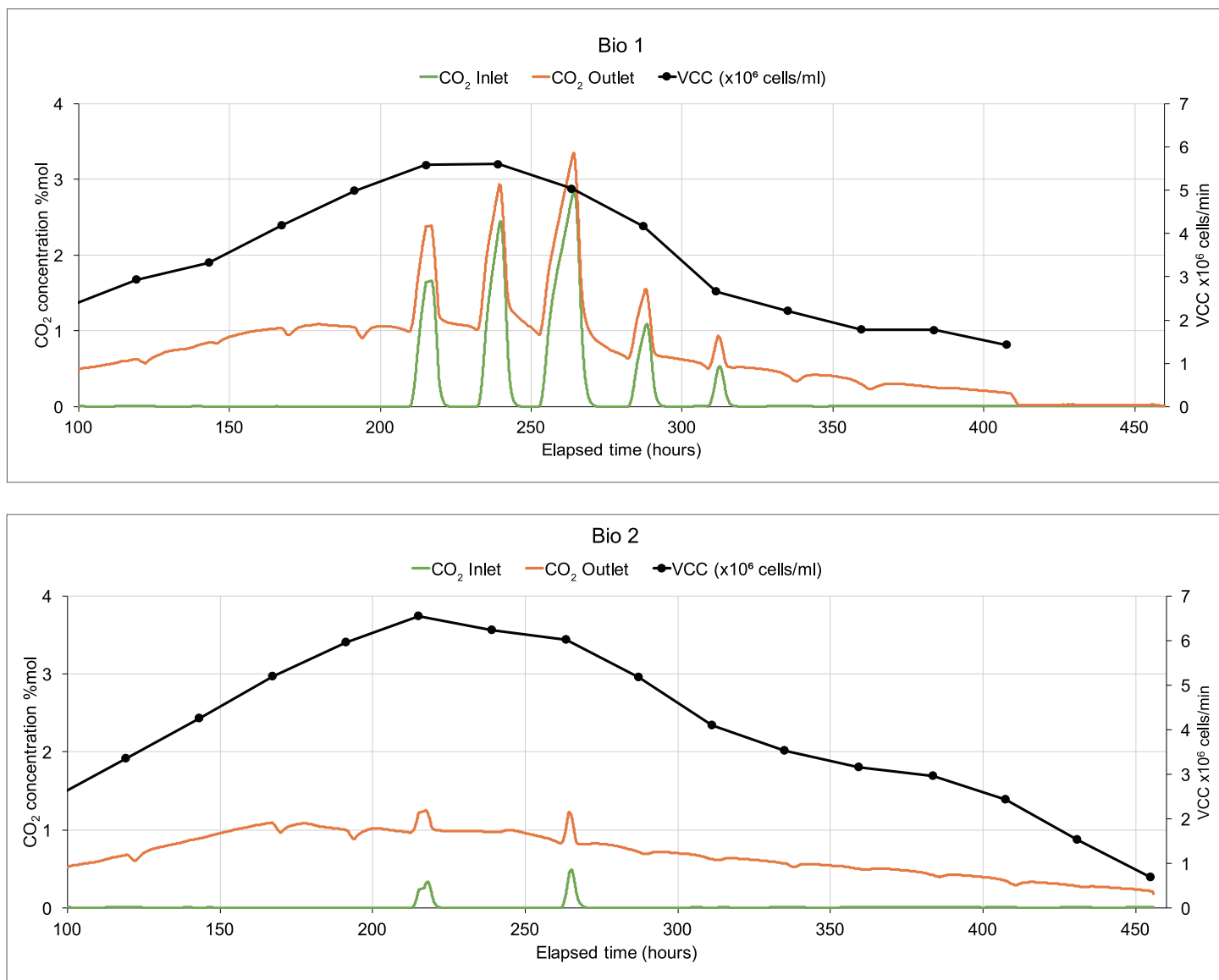


图6 从两个培养哺乳动物细胞的生物反应器中提取的在线进出口CO₂数据以及离线活细胞计数数据

从实验室扩大至批量生产

生产过程通常以实验室的细胞培养物生长开始。然后，在扩大过程中，细胞连续转移到越来越大的发酵罐，最终转移到可容纳最多20,000升生长培养基和细胞的生产容器中。它对于维持特定细胞保持健康和生长所需的精确环境至关重要—这要求获得放大过程的每个阶段（从实验室到试验工厂再到批量生产）的精确尾气分析数据。在某些情况下，配备合适的RMS多气流进口的单台质谱仪可监测所有发酵罐，而在其他情况下，必须在实验室和工厂使用单独的MS分析仪。两个分析仪平台的结果相互关联，确保通过不同的扩大阶段实现平稳过渡，这点至关重要。

图7显示适合发酵过程开发的质谱仪的范例Thermo Scientific Prima BT MS，图8显示适合生产过程监测的质谱仪的范例 Thermo Scientific Prima PRO MS。两套系统共享 Thermo Scientific扇形磁场分析仪，以执行高精度多成分气体分析，并且两套系统均提供高度可靠的快速多气流取样器。

我们的气体分析MS产品系列：Prima BT和Prima PRO，从实验室到试点工厂，再到批量生产，它们在发酵和细胞培养过程的每个阶段都能提供快速并精确的尾气分析。Prima PRO可以在保证不破坏无菌环境的情况下监测60多个生物反应器。Prima BT为小规模生物反应器提供了台式解决方案，配有15个样品口和6个校准口。两种型号提供的高精确度且完整的气体成分检测，能够非常简易方便地结合先进过程控制（APC）系统使用。过程控制的显著改进能够极其快速地予以实现 - 通常在仪器开机后的一两天内。

参考文献

- 1 M.G. Fári, U.P. Kralovánszky, The founding father of biotechnology: Károly (Karl) Ereky. Int. J. Hort. Sci., Vol 12, n.1, p.9-12, 2006.
- 2 David Pollard, Jens Christensen, Vent Gas Analysis, Encyclopaedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology 2010, John Wiley & Sons.
- 3 Joseph S. Alford, Bioprocess control: Advances and challenges, Computers & Chemical Engineering Volume 30, September 2006.
- 4 P.C. van der Aar, A.H. Stouthamer, H.W. van Verseveld, Possible misconceptions about O₂ consumption and CO₂ production measurements in stirred microbial cultures, Journal of Microbiological Methods Volume 9, Issue 4, June 1989.



图7 Prima BT 过程开发



图8 Prima PRO 过程MS

总结

扇形磁场质谱仪已证明在分析发酵排出气体时具有最高的精确度，多年来，它已在全球多家领先的生物科技和制药公司成功监测发酵罐排出气体。通过整合高速度和出色的稳定性，扇形磁场分析仪特别适合高要求应用。

USA

27 Forge Parkway
Franklin, MA 02038
Ph: (800) 437-7979
Fax: (713) 272-2273
orders.process.us@thermofisher.com

India

C/327, TTC Industrial Area
MIDC Pawane
New Mumbai 400 705, India
Ph: +91 22 4157 8800
india@thermofisher.com

China

+Units 702-715, 7th Floor
Tower West, Yonghe
Beijing, China 100007
Ph: +86 10 84193588
info.eid.china@thermofisher.com

Europe

Ion Path, Road Three,
Winsford, Cheshire CW73GA UK
Ph: +44 1606 548700
Fax: +44 1606 548711
sales.epm.uk@thermofisher.com

Find out more at thermofisher.com/primapro

ThermoFisher
SCIENTIFIC