

文章编号:1009-038X(2003)01-0033-04

生物反应过程在线检测系统的研制

杨海麟, 吕霞付, 王龙刚, 杨胜利, 王武

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘要: 计算机控制的微型生物传感器分析系统可以实现生物反应过程中多参数的在线检测. 系统包含在线微量取样、级联稀释、微型生物传感器、生化工程数据处理和分析软件与计算机. 系统实现的指标为取样 $10 \sim 1\,000\ \mu\text{L}/\text{min}$, 稀释倍数 $1\,010.54$, 相对误差小于 2.5% . 在线测量酵母发酵的葡萄糖质量浓度, 最大误差率为 3.88% .

关键词: 微型生物传感器; 在线测量; 级联稀释

中图分类号: Q 811.4

文献标识码: A

The Design and Study on Bioprocess On-Line Micro-Biosensors Analyzer System

YANG Hai-lin, LU Xia-fu, WANG Long-gang, YANG Sheng-li, WANG Wu

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The micro-biosensor analysis system can be applied to on-line multi-parameters identification in bioprocesses. The on-line analysis system consisted of a micro-flow sampler, a cascade dilution unit, a micro-biosensor, a software for bioprocess data processing, and a computer. The flow rate of the sampler ranges from $10 \sim 1\,000\ \mu\text{L}/\text{min}$, the relative error was less than 2.5% , and the dilution times were up to $1\,010.54$. The glucose concentration was determined by the on-line micro-biosensor during the yeast fermentation, with the maximum relative error of 3.88% .

Key words: micro-biosensors; on-line analysis; cascade dilution

至今为止,生物反应过程控制依赖于 pH 值、温度(T)、紫外线(OD)等传感器测得的少数物理参数,由控制专家经过数学建模对生物反应过程进行过程曲线拟合,对生物反应体系而言,就是在线分析检测.在线调控主要受制于生化反应系统的复杂性,易造成生化反应中生物信息无法及时得到.复杂性体现在:(1)菌体生长和代谢的机制模糊以及发酵系统所包含的参数多,且为时间函数(往往包含气、液、固三相体系);(2)发酵系统经常要求保持

无菌,高温灭菌会严重破坏生物传感器生物活性物质如酶的活性;发酵时 pH、温度等条件与生物传感器上酶测定条件不符造成的测量偏差;发酵液的底物浓度往往超出传感器线性范围;(3)膜长期与底物接触活性下降,使电极寿命缩短等^[1~3].因此,在生化反应体系中实现在线检测生物、化学量的分析系统尚未见报道.

生物传感器具有专一性好、酶可以重复多次使用、分析速度快、准确度高、操作系统比较简单等特

收稿日期:2002-06-12; 修回日期:2002-09-13.

基金项目:无锡市工业攻关项目(W00048).

作者简介:杨海麟(1971-),男,江苏无锡人,工学博士,讲师.

点,为计算机直接控制生物反应系统准备了可行的传感器条件.生物、化学量无法实现在线测量,究其原因这是由于生物传感器与复杂的生物反应过程的检测接口技术尚未过关,这成为生物传感器实现在线检测的‘瓶颈’技术^[4].

本研究的目的是发酵在线分析和控制系统的关键技术,包含微量取样器、级联稀释器、微型生物传感器组和生化工程数据处理及分析软件,为进一步实现生物过程优化和自动控制打下基础.

1 系统的设计

在线检测系统(见图 1)设计包括:取样器、稀释器、生物传感器组、微机、生化工程数据处理和分析软件.

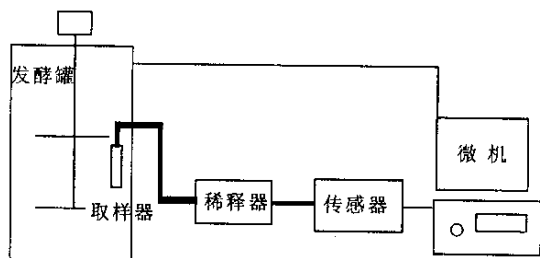


图 1 生物反应过程在线检测系统组成示意图

Fig.1 The on-line analysis system for bioprocess

理想的生物过程在线检测系统应该满足以下条件:

1)用自动取样方式取代手动取样方式,才能适应自动化的要求.

2)具有自动稀释系统.生物传感器的线性范围多在 $1 \sim 10 \text{ mmol/L}$,发酵液中主要成分,如葡萄糖为 $10 \sim 100 \text{ mmol/L}$,需要对样品稀释 $10 \sim 100$ 倍.根据测定指标的要求,系统中包含自动稀释器.

3)生物传感器由于不耐热,需在罐外测量.生物传感器目前朝着集成化、微型化和智能化的方向发展,生物传感器中生物活性物质参与反应的特殊性增加了传感器集成化的难度.

4)计算机的发展使在线检测的数据显示、贮存和处理比单片机优越.计算机的功能最主要是数据的处理,包含生化工程信息的数据处理软件的编制显得相当重要;

5)样品传输、稀释过程必然造成结果的滞后表达,系统要求滞后的时间尽可能短,组成和物理状态不能有明显的变化.

6)在线检测系统整机的可靠性是评价系统优劣最重要的指标,其次应价格便宜,操作简便,便于维护. 万方数据

2 在线分析系统的工作性能

2.1 在线取样、稀释系统的研制

目前生物反应过程研发的取样系统多为分批取样过程,其流程如下:

吸去取样小室死样(阀或泵)→关闭阀或泵→开启取样阀门,让样品液充满小室→计量泵抽取样品,转移到稀释器内→待下一次操作,循环如上.

分批取样的优缺点:(1)所有操作依赖阀和泵,对自动化要求高;(2)间歇操作,容易染菌;(3)稀释操作多采用自动机械臂,稀释步骤繁琐、困难;(4)死体积取样容易造成样品的代表性差.

连续取样稀释的流程是让样品依次流经取样管路和稀释管路,样品处于连续流动,其流量容易控制.连续取样、稀释系统制造简单、廉价,样品代表性好,适合于在线分析检测用.考虑到稀释系统设计的难度,在线检测系统采用连续自动取样、稀释.间歇测量方法流程见图 2.

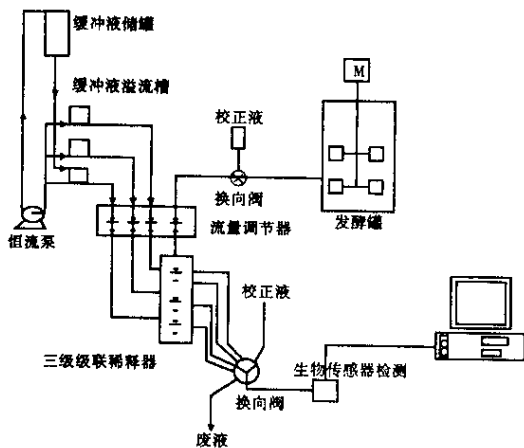


图 2 微型取样、级联稀释与传感器的接口流程

Fig.2 The flow of connection between micro-biosensor and cascade dilution

微量取样器在发酵期间连续不断的取样,其流量可以通过管路上阀门调节,流量范围在 $10 \sim 1\,000 \mu\text{L/min}$.经三级稀释器稀释,样品可以被缓冲液稀释至特定倍数,稀释过程连续操作.不同稀释比的稀释液通过换向阀流入传感器进行检测.在稀释器和传感器前面均装有清洗液和校正液对其进行清洗和校正.

2.1.1 在线取样器 在线取样的要求:连续取样,滞后时间短,不堵塞,易清洗.为此,在线取样系统设计采用如下措施:(1)采用错流过滤技术,利用膜件实现发酵液与固体的分离.膜件外侧采用螺纹导流,实现液体的先进先出.(2)在线取样器采用 0.2

μm 陶瓷膜,保证了采样的无菌性.(3) 取样器管路体积 $V \leq 0.690\text{ mL}$,在取样量 $10 \sim 1\,000\text{ }\mu\text{L}/\text{min}$ 下,取样器滞后时间 $t < 1.38\text{ min}$;

2.1.2 在线级联稀释器 目前已有的稀释系统,如机械臂、流动注射分析在线稀释技术^[5,6],为高浓度样品的在线测定提供了有效的方法,但需要时间控制器、计算机控制阀和精度较高的蠕动泵.因此,机械加工要求高,价格昂贵,稀释比的控制不灵活,严重影响了生物传感器在生物反应过程的在线检测应用.合理的稀释方案应该是级联稀释,价格便宜,便于清洗和更换,操作灵活方便.为此,设计了依赖流体自身重力运行的适合生物反应过程在线分析的三级级联稀释器(见图 3,4)^[7].

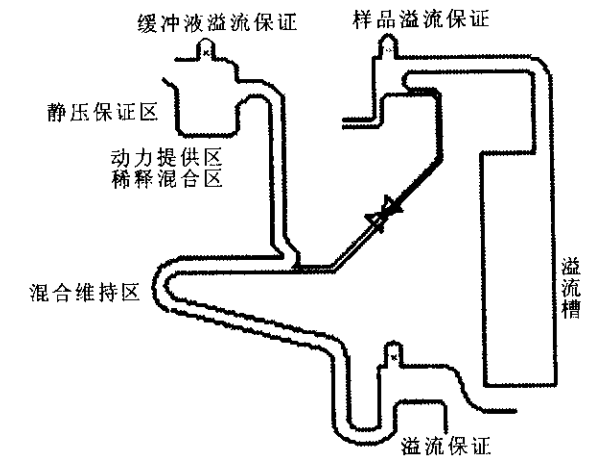


图 3 连续流动单级稀释结构示意图

Fig.3 The structure figure of the cascade dilution

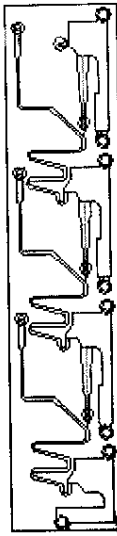


图 4 连续流动多级稀释器

Fig.4 The three levels cascade dilution unit

重力自流的级联稀释器采用溢流设计控制稀释样品和缓冲液流量的稳定性.以 CuSO_4 为校准液,对每级进行单独测试稀释. CuSO_4 校准液质量浓度为 40.02 g/L ,样品用葡萄糖,其原始质量浓度为 278.54 g/L ,进行三级稀释.在不同的稀释比条件下,检测葡萄糖三级稀释比与误差率的关系(见表 1).由表 1 可知,控制单级稀释比约在 $4 \sim 10$ 之间时,单级稀释误差小于 1% ,三级稀释的稀释比为 $1\,010.54$ 时,稀释误差小于 2.5% ,基本符合设计的要求.该级联稀释无需时间控制器、计算机控制阀和精度较高的蠕动泵,操作方便、灵活,适合工业应用.

表 1 三级级联稀释精度的测试

Tab.1 The accuracy test of three level cascade dilution

测 度 项 目	一级稀释		二级稀释		三级稀释		总稀释比		误差率/ %
	CuSO_4	葡萄糖	CuSO_4	葡萄糖	CuSO_4	葡萄糖	CuSO_4	葡萄糖	
平均质量浓度/(g/L)	7.51	52.23	8.32	10.89	8.97	2.45			
稀释倍数	5.33	5.33	4.81	4.80	4.46	4.44	114.37	113.69	0.6
平均质量浓度/(g/L)	6.82	47.42	5.52	6.65	5.68	0.94			
稀释倍数	5.87	5.87	7.25	7.13	7.05	7.07	299.88	296.32	1.2
平均质量浓度/(g/L)	4.07	28.83	4.60	3.30	5.44	0.45			
稀释倍数	9.84	9.66	8.70	8.74	7.36	7.33	630.12	618.98	1.8
平均质量浓度/(g/L)	4.07	28.83	4.6	3.30	5.44	0.45			
稀释倍数	9.84	9.66	10.20	10.11	10.32	10.35	1035.80	1010.54	2.5

2.2 微型生物传感器的在线测量

2.2.1 电极的制备 在 SiO_2 片上用真空蒸镀机依次蒸镀上 50 nm 的钛中间层和 200 nm 的铂层,再

应用剥离技术将硅片刻蚀成如图 4 的基体电极^[8].将葡萄糖氧化酶溶解在 $50\text{ }\mu\text{L}$ 含质量浓度 2 g/dL 明胶的缓冲液中($\text{pH } 7$).再取 $1\text{ }\mu\text{L}$ 质量浓度

10 g/dL 明胶溶液滴于工作电极表面,置于冰箱中. 晾干后,用体积分数为 2.5% 的戊二醛溶液浸 1 min 处理. 置于冰箱备用.

2.2.2 微型电极性能测定 传感器测试系统:电解质溶液为 0.1 mol/L KCl 的 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(pH 7),循环伏安法采用三电极体系. 传感器性能测定采用恒电位法,用饱和甘汞电极作参比电极兼作对电极的两电极体系. 实验在搅拌、恒温(20 ℃)状态下进行,当基底电流稳定后,再加入谷氨酸标准溶液,测量其稳定时响应电流,以总电流与基底电流差作为传感器的响应电流.

2.2.3 微型电极的在线测量 目前主要考虑系统的可靠性,采用发酵常用的葡萄糖微电极,连接微量取样系统和稀释系统,以酵母发酵为研究对象,初始糖的质量浓度为 18.6 g/mL,结果见图 5.

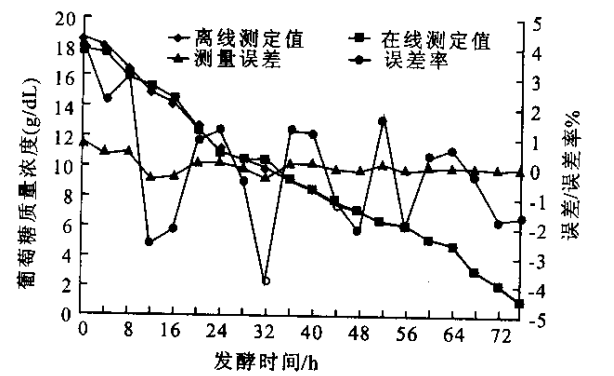


图 5 酵母发酵葡萄糖质量浓度的在线测定
Fig.5 The on-line analysis of Glucose concentration for yeast fermentation

由于糖质量浓度高时需要稀释较高的倍数,稀释的误差造成测量误差,最大为 3.88%;随着质量浓度的降低,误差也逐渐变小,有利于精确测量. 在线检测系统基本能满足测量的需要.

2.3 生化工程数据分析和处理软件

利用 VISUAL BASIC 6.0 语言开发生化工程实验数据处理软件. 根据细胞动力学实验的培养方式,软件分为两大主要模块:分批培养数据处理模块与连续培养数据处理模块. 用户输入实验数据后,由程序对数据进行适当的处理,然后根据需要作图. 一般有质量浓度—时间曲线、速率—时间曲线、比速率—时间曲线和模型方程的线性化曲线. 图 6a 显示的是该软件数据输入界面,图 6b、图 6c 分别显示的是细胞生长期和产物形成期时比速率—时间曲线. 从曲线判断细胞生长动力学模型、基质消耗动力学模型或代谢产物生成模型,或者由线性方程求参数.

软件采用 Access 动态数据库和 OLE 自动化的

编程技术. 软件界面友好,操作较方便.

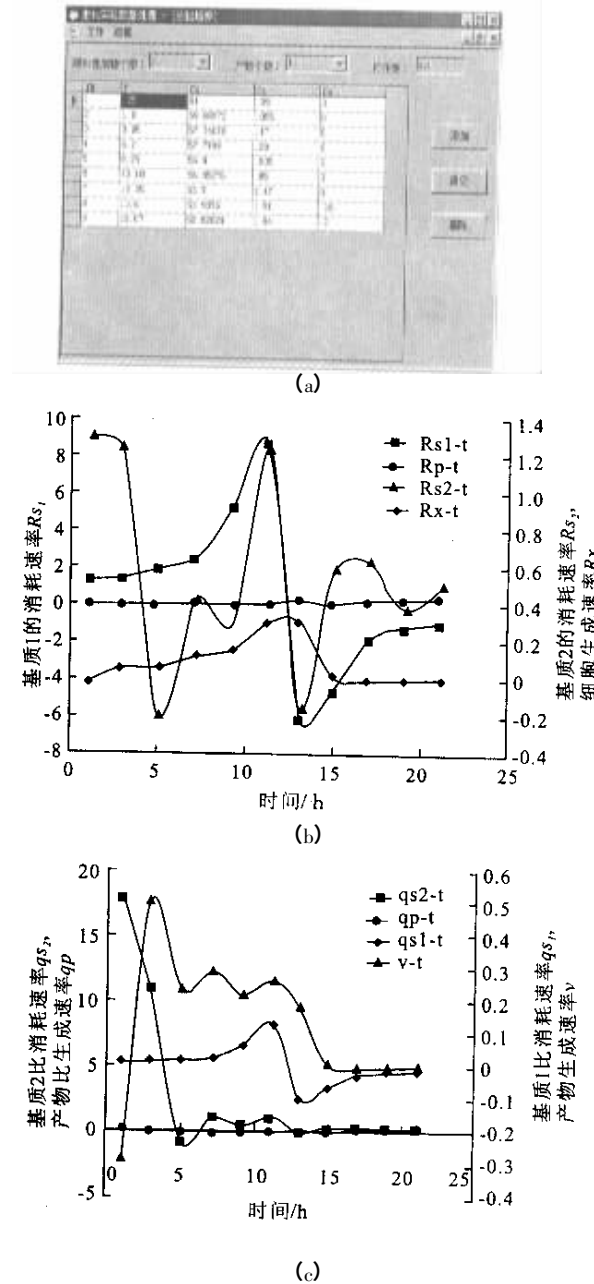


图 6 生化工程数据分析和处理软件
Fig. 6 Data analysis and management software for bioprocesses

3 讨论

生物传感器应用到生产实践中,需要解决的技术难题主要集中在样品的前期处理、生物传感器的研究和数据处理软件的开发 3 个部分. 样品的前期处理目前采用微流控芯片技术是研究的主要方向;生物传感器的研究趋势在微型化、集成化;数据处理软件的编写不仅需要软件人员的参与,更需要专业人员的分析方法.

(下转第 42 页)

参考文献：

[1] Barber M. The Penicillin Business[M]. Michael Barber and Associates,1996.

[2] Court J R,Pirt S J. The application of fed-batch culture to the penicillin fermentation[A]. 5th Int. Ferment. Symp[C]. Berlin :1976.

[3] Pirt S J. Principles of Microbe and Cell Cultivation[M]. Oxford :Blackwell Scientific, 1975.

[4] 徐亲民,温同礼,米贯东,等.青霉素发酵过程经济学模型的建立与发酵周期的优化[A].全国生物化工反应工艺及工程学术讨论会[C]. 1991.

[5] 米贯东,赵勇军,赵国斌,等.链霉素发酵周期与经济效益的关系[J].中国医药工业杂志,1992, 23 :347 – 349.

[6] 徐亲民.补料分批发酵产物生成动力学的数学模拟[A].中国生物工程学会成立大会暨第一届学术研讨会[C].北京 : 1993.

[7] 徐亲民.发酵过程不可测变量的计算及优化控制[A].国家医药管理局医药生产过程自动控制技术推广交流会[C].宜昌 :1994.

[8] 徐亲民,谷 达,马民强,等.由排气二氧化碳分析估计青霉素发酵过程的生物质浓度[J].无锡轻工大学学报,1996,15/A : 80 – 86.

[9] 徐亲民.补料分批发酵过程的模拟与优化[J].无锡轻工大学学报,1996,15/A,87 – 92.

[10] 徐亲民,陆旋,谷达.青霉素反复补料分批发酵过程的模型化与智能优化控制[A].朱学锋.过程控制科学技术与应用(第十三届中国过程控制年会论文集)[C].广州 华南理工大学出版社,2002. 128 – 132.

[11] Contois D E. Kinetics of bacterial growth :relationship between population density and specific growth rate of continuous cultures[J]. J Gen Microbiol, 1959, 21 :40 – 50.

(责任编辑 朱 明)

(上接第 36 页)

本研究对连续取样、稀释系统进行了新的探索,基本满足生物传感器在线检测的要求.目前主要的问题是系统的设计和二次仪表的开发还需进

一步实现.随着罐外 pH 传感器、超声波测定菌浓度传感器的研制,配套以上生物反应过程在线检测系统,相信生物技术的在线检测指日可待.

参考文献：

[1] Yailin Yang, Wu Wang. Biosensor and its application in bioprocess[A]. The 7th Tri-university International Joint Seminar & Symposium[C]. Japan :mie-academic press, 2000. 140 – 145.

[2] 冯德荣,朱思荣,周万里,等.SBA-60 型四电极生物传感器分析系统的研制[J].山东科学,1998,(2) :32 – 36.

[3] Bernhard Sonnleitner. New concepts forquantitative bioprocess research and development[J]. Adv Biochem Engg/Biotechnol, 1996, 54 :155 – 188.

[4] 伦世仪. 生化工程[M]. 北京 中国轻工业出版社,1991.

[5] 马惠昌. 关于流动分析的一些名词解释[J]. 分析仪器. 2001,(2) :39 – 44.

[6] 柳萍,苏德林,周定. 流动注射分析在线稀释技术的进展[J]. 现代仪器,1997,33(2) :37 – 90.

[7] 杨海麟,冯 蕾,王龙刚,等.一种新型在线级联稀释系统的研究[J]. 现代科学仪器,2002,(5) :19 – 22.

[8] 王荣,黄春琴,吴跃东,等.谷氨酸氧化酶传感器芯片的研制[J]. 化学传感器,1999,3(9) :31 – 34.

(责任编辑 杨 萌)