全自动ÄKTAcrossflow膜分离系统快速优化中空纤维切向流微滤工艺

摘要

切向流过滤技术最近的发展已经使分离性能的一致性和质量有所提高。平行于膜表面的切向流清除了沉积在滤膜表面物料的累积，避免过滤膜的快速堵塞。切向流过滤概念上很简单，但正确高效的进行切向流过滤操作需要详细的背景知识和良好的膜过滤技术。切向流过滤技术包括广泛的膜技术，但在此应用指南中我们重点关注切向流微滤的应用(孔径在0.1 μm到1 μm)。微滤非常适合从生长培养基(发酵液)中分离细胞，以及用于过滤除菌和多种生物制药工艺中污染物和固体颗粒的去除。

当使用中空纤维滤柱时，切向流流速一般用剪切速率(Shear)来表述，剪切速率是每根纤维管理的流速和纤维管内径的函数。由于中空纤维是相对开放的流道，依靠高的切向流流速形成足够的湍流以防止细胞沉积在膜表面。切向流流速或剪切速率、透过端流速的控制等对于处理高密度细胞悬液而不引起膜的污染和堵塞是关键的参数。

在此应用中，我们总结列出了下面两个纯化工艺实例的优化步骤：1)毕赤酵母细胞培养液中的β-葡糖苷酶，这是一个全细胞的相对简单的应用，2)来自大肠杆菌细胞匀浆的绿色荧光蛋白-His，这是一个更具有挑战性的工艺过程，涉及到高浓度的蛋白质、不同大小的DNA等复杂的料液。

在每一种情况下，使用ÄKTAcrossflow™系统内的方法建立向导来简化过程的优化步骤，包括膜孔径筛选、关键参数值的优化和回留端冲洗的优化以增加目标蛋白回收率。结果显示，使用全自动的ÄKTAcrossflow膜分离系可以简单、快速的获得最优化的切向流微滤工艺参数。

图1. ÄKTAcrossflow系统配合Start AXM中空纤维滤膜

介绍

ÄKTAcrossflow全自动膜分离系统

作为世界首款用于切向流过滤的全自动膜分离系统，ÄKTAcrossflow非常适合小规模膜分离工艺研发、过滤膜筛选和工艺优化。ÄKTAcrossflow配合集成的UNICORN控制软件，可以全方位的在所需的压力和流速条件下对大规模的生产工艺进行一致的模拟，并且对回流体积、浓缩倍数、滤洗倍数和累计的透过体积等各种重要膜过滤参数进行实时监控。

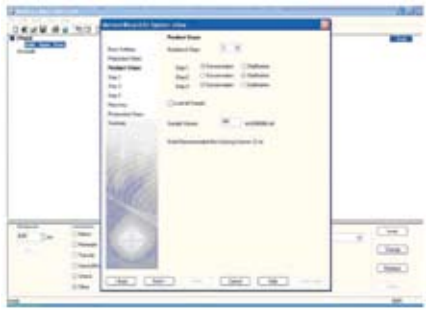

图2.在ÄKTAcrossflow方法建立向导中方便的进行操作步骤的选择。

方法建立向导可以简单的进行方法编程，用于常用过滤操作中的所有步骤 (图2)。例如，可以在每次运行前自动检测过滤膜质量和状态，自动完成新过滤膜的冲洗、用过滤膜的在位清洗，以及水通量测试等操作。方法建立向导也可以提供系统在位清洁方法。Evaluation自动数据处理模块，无需手动转移数据到电子表格而节约时间，并用5种不同的数据处理操作灵活地进行数据处理，直接得到最优化的结果。

ÄKTAcrossflow系统应用广泛，涵盖了使用中空纤维滤柱或平板膜包的微滤和超滤等诸多应用。UNICORN软件平台可以使用全方位的TMP探索进行充分有效的膜工艺开发，并能够控制层析系统和膜分离系统。

使用微滤从毕赤酵母细胞发酵液中纯化β-葡糖苷酶

目的

此应用的目的是使用中空纤维滤膜澄清酵母细胞发酵液并在透过液中回收β-葡糖苷酶。毕赤酵母胞外表达β-葡糖苷酶，因此目标蛋白质存在于酵母细胞培养上清中。β-葡糖苷酶是一种含有5个亚基的表观分子量大约为400 kD的复合物。毕赤酵母细胞可以生长到非常高的细胞密度-在此应用中细胞干重为～17%(相当于45%的细胞湿重)。这种高固体含量如果采用过高的切向流流速，容易产生一些问题。为了找到最优的参数，ÄKTAcrossflow系统上使用50 cm^2 Start AXM中空纤维膜进行切向流过滤实验。

过程优化

过程优化策略包括：
1. 选择最佳的膜孔径
2. 剪切速率-透过通量参数的优化
3. 建立最佳的蛋白质回收所需的回流滤洗次数

在微滤应用中，没有相当于TPM探索优化实验，因此不得不在不同的实验条件下完成全过程运行，并通过分析蛋白质回收率进行评估。然而，运用ÄKTAcrossflow的方法建立向导可以在几分钟内快速生成方法。

步骤1：膜孔径筛选

最佳的过滤膜孔径应该能够有效回流固体颗粒、产生最高的目标蛋白回收率，同时具有最短的处理时间。我们筛选了4种膜孔径：750 kDa、0.1 μm、 0.2 μm和0.45 μm。对不同的膜孔径测试了不同的剪切速率以发现能够提供最高蛋白回收率的组合。750 kDa膜在最初的实验中

蛋白回收率很低，因此没有用于进一步的测试。

孔径用两种不同的方法测试：
- 不浓缩直接进行4次洗滤
- 1.4倍浓缩后进行4次洗滤

洗滤步骤对提高蛋白质回收率是必要的，特别是澄清高固体含量的样品时，滤洗前进行浓缩的可能性很低的情况。

实验结果总结在表1中。使用0.45 μm过滤膜可以获得几乎100%的蛋白质回收率，因此选择这种膜用于进一步的过程优化。

表1.膜孔径选择实验结果

膜孔径 (μm)	剪切速率 (s-1)	回收率(%)	
		不浓缩	1.4×浓缩
0.1	5500	58	60
0.1	8000	56	-
0.2	4000	54	71
0.2	4500	67	72
0.45	4000	62	~100
0.45	6000	70	-

步骤2：剪切速率-透过通量的优化

使用0.45 μm膜孔径，分别在不浓缩和1.4×浓缩的条件下测定剪切速率对可达到的最大透过通量的影响。结果如表2所示。更高的剪切速率导致透过通量的增加，从而缩短了处理时间。然而，在6000(l/s)剪切速率下，由于膜入口压力超过允许限度，因此无法进行1.4×浓缩，

在此剪切速率下不浓缩，能够达到55 LMH的透过通量。透过通量的增加提供更短的处理时间，但必须综合考虑高剪切速率对某些高分子量(400 kDa)蛋白质的损伤以及有限的浓缩倍数。如果能够在更高的剪切速率下操作，先浓缩后洗滤的操作策略将会减少滤洗时间和缓冲液消耗。结果表明，最佳参数是在4000(l/s)剪切速率下进行1.4×浓缩，透过通量为35 LMH。

表2.剪切速率-透过通量优化结果

剪切速率(s-1)	透过通量(LMH)	
	不浓缩	1.4×浓缩
4000	44	35
6000	55	-

步骤3：优化滤洗步骤增加蛋白质回收率

过程优化的最后一步是评估滤洗对目标蛋白回收率的影响。应用前面建立的最佳工艺参数，对于浓缩和未浓缩的样品在4次滤洗的每次滤洗完成后测定蛋白质的回收率。如图3所示，第四次滤洗对目标蛋白的总回收率几乎没有影响，因此三次滤洗就已经足够保证蛋白质的回收率。

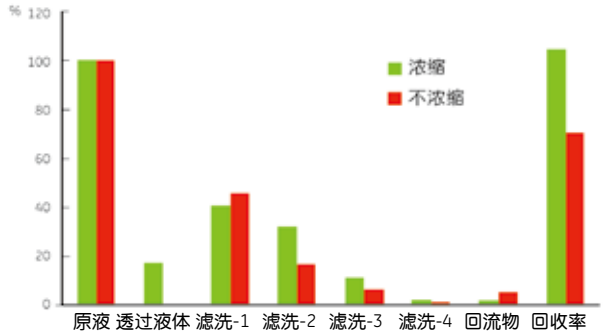

图3.评估滤洗步骤的次数对蛋白质回收率的影响。

结论

实验表明，当使用中空纤维微滤膜从高细胞密度毕赤酵母培养液中回收β-葡糖苷酶时应使用以下过程参数：

- 0.45 μm孔径中空纤维滤膜
- 循环物料剪切速率4000 s-1
- 透过通量为35 LMH实施工艺
- 滤洗前先浓缩1.4倍 (到21%干细胞重量)
- 用3倍回流体积的缓冲液滤洗细胞回流液

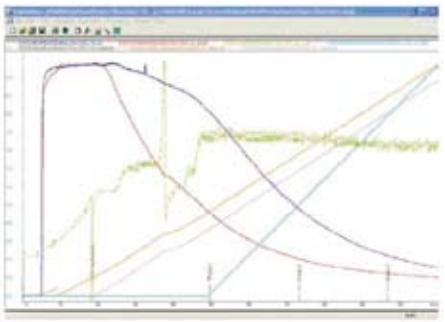

图4.用0.45 μm Start AXM中空纤维滤膜澄清毕赤酵母培养液。

图4显示使用上述参数的一轮完整运行的结果。注意到显示装置使得它能够同时监测许多参数，例如紫外曲线指示目标分子转移到透过液的速率。

应用微滤从大肠杆菌破碎匀浆中纯化绿色荧光蛋白-His

目的

此应用重点关注大肠杆菌BL21(DE3)破碎匀浆液的澄清(细胞和细胞碎片的去除)，以及透过液中目标蛋白(GFP-His)的回收率。GFP-His是一种在细胞内过度表达的胞内蛋白，以单体的形式存在，表观分子量大约为30 kD。

GFP-His在pH值低于8.2时吸附到细胞碎片上，因此将匀浆的pH值调节为8.3。中空纤维滤柱由于开放的流道设计，经常被选择用于大肠杆菌裂解匀浆的澄清。澄清过程的优化包括选择过滤膜孔径和操作条件，在特定的工艺时间内有效截留菌体碎片，同时保证目标蛋白的回收率。本实验使用全自动ÄKTAcrossflow系统，配合50 cm^2 Start AXM中空纤维滤柱进行切向流过滤澄清实验。

过程优化

过程优化策略包括：
- 滤膜孔径的筛选
- 剪切速率—透过通量的优化
- 提高蛋白质收率所需的滤洗次数

步骤1：膜孔径筛选

目的是确定提供最佳目标蛋白回收率的最小的膜孔径。较小的膜孔径减少了固体碎片嵌入膜孔内的可能性。我们在菌体浓度为50 g/L下筛选了3种不同的膜孔径：750 kD、0.1 μm和0.2 μm。样品不经浓缩，直接用缓冲液滤洗3次。

膜孔径研究的实验条件如下：

中空纤维滤膜	Start AXM 50 cm^2
样品体积	40 ml
抗剪试验范围	8500 s^{-1}
浓缩	无
滤洗	3×
TMP(对于UF过滤膜)	0.5 barg
通量(对于MF过滤膜)	20–45 LMH
透过液	收集并检测

表3概述了膜孔径筛选的实验结果。对于孔径分别为0.1 μm和0.2 μm的膜，蛋白质回收率分别为75%和83%，这两种膜被选择用于进一步的研究。

表3. GFP-His的膜孔径筛选

中空纤维膜孔径	滤洗体积	蛋白质回收率
750kDa	3 ×	61%
0.1 μm	3 ×	75%
0.2 μm	3 ×	83%

步骤2：剪切速率-透过通量的优化

此步骤的目的是对于给定的剪切速率确定最大的透过通量(通过TMP稳定性来评价)。测定需要两步：1)确定一系列可接受的剪切速率-透过通量，2)使用全方位的优化实验对剪切速率-透过通量值进行微调。

可接受的剪切速率-透过通量值的确定

对于初步实验，使用的菌体浓度为25 g/l，选择恒定的剪切速率，然后以逐步增加透过通量，同时监测TMP的变化。

对于剪切速率-透过通量优化的初步条件如下：

中空纤维滤膜	Start AXM 50 cm^2 1-mm纤维管内径
样品体积	200-250ml
剪切速率	8000-16000 s-1
通量测试范围	10-50LMH
透过方式	透过料液全循环

TMP的快速增加表明由于凝胶层的形成减少了膜的可通透性。对于0.1 μm和0.2 μm的膜孔径，分别重复8000和16000 S^{-1}的剪切速率。图5显示使用8000 S^{-1}和0.1 μm孔径膜的实验结果。在此测试中，产生稳定TMP的最大透过通量值为40 LMH。

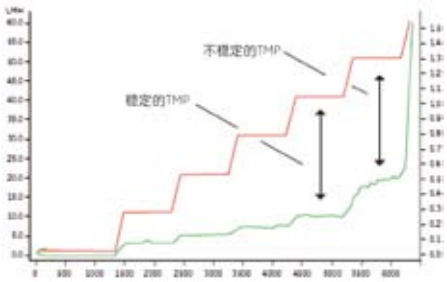

图5. 透过通量探索实验的ÄKTAcrossflow结果以确定对于给定剪切速率可达到的最大透过通量。

微调剪切速率—透过通量

微调剪切速率-透过通量优化的实验条件为：

中空纤维滤柱	Start AXM 50 cm^2 1-mm纤维管内径
样品体积	250ml
样品浓度	5 ×
滤洗	4 ×
剪切速率	10000-16000 s^{-1}
通量测试范围	20-45 LMH

用0.1 μm孔径膜和16000 S^{-1}剪切速率可以获得高通量(45 LMH)(表4)，具有相对高的回收率(83%)。使用0.2 μm孔径膜在这个高剪切速率下达到更高的产物回收率(93%)，但是通量低得多(20 LMH)。因此，高蛋白回收率被较低的通量抵消，并导致更长的工艺时间。这可以通过大型的膜面积补偿，但是将导致更大泵的投资和更高的膜成本。在以最大蛋白回收率为目标的条件下(如不考虑工艺时间)，0.2 μm孔径膜更为合适。然而，在目前模型系统中，考虑到较短的处理时间和可接受的蛋白回收率，在16000 S^{-1}剪切速率下的0.1 μm膜孔径是最理想的。

表4.透过通量优化实验结果

膜孔径(μm)	剪切速率(s^{-1})	通量(LMH)	蛋白透过(%总含量)
0.1	10000	35	69
0.1	14000	40	85
0.1	16000	45	83
0.2	16000	20	93

步骤3优化滤洗步骤增加蛋白质回收率

本研究的最后一步是确定提高目标蛋白回收率的最佳滤洗条件。GFP-His的滤洗体积-回收率研究的实验条件如下：

中空纤维滤柱	Start AXM 50 cm^2
样品体积	250ml
剪切速率	前面实验最优值
透过通量	前面实验最优值
浓缩	5 ×
滤洗	4 ×
透过	收集和分析 (可能的话进行分步收集)

滤洗缓冲液对蛋白回收率的影响如表5所示。在浓缩步骤期间，50%-60%的总GFP-His含量进入透过液。增加滤洗次数有助于得到更高的回收率，但是经过3次滤洗后回收的量微乎其微。因此，增加的蛋白回收量应该综合考虑额外的滤洗步骤所需要的时间。

表5.回流滤洗对蛋白回收率的影响

膜孔径	透过	滤洗1	滤洗2	滤洗3	滤洗4
0.1 μm	53%	14%	8%	5%	3%
0.2 μm	60%	16%	9%	5%	3%

结论

在本研究中所用的大肠杆菌裂解液的澄清需要具有相对大孔径的膜。为了获得快速、有效和稳定耐用的工艺用于含有GFP-His蛋白的菌体裂解液澄清，最佳条件是采用孔径为0.1 μm中空纤维滤柱、剪切速率16000 s^{-1}，透过通量45 LMH。在需要非常高的回收率的情况时，孔径为0.2 μm的膜也许是最适合的选择。当进一步优化样品上样量是必要步骤时，见下列步骤。

确定特定操作时间内的最大的料液处理体积

成功的运行微滤过程的一个关键参数是找到一个正确的进料体积与膜面积比率，这个因素能够改善过程的经济性。最大进料体积的计算是以所选择的最大透过通量、所需要的过程时间和滤膜表面积为基础。计算公式如下：

最大进料体积 = Qmax × t × m2 × (Vf/Vp)

其中：
Qmax=最大通量(LMH)
t=用于放大的目标过程时间(h)，用户定义
m2=用于优化的滤膜面积
Vf=进料体积(L)
Vp=全过程累积的透过液体积(L)

结论：

- 为了评估产物回收率和TMP稳定性，应该在计算的膜载量下进行过程验证。
- 减少进料体积(相比优化实验中所使用的进料体积)将缩短处理时间，同时对产物回收率几乎没有影响。
- 增加进料体积前，需要先仔细考虑可能对产物回收率和TMP稳定性造成的影响。