

综述



臧恒昌, 博士, 教授, 博士生导师, 山东大学药学院药物智能制造技术研究团队PI, “药物制剂技术与评价”国家药品监督管理局重点实验室主任。主要从事药物智能制造与监管科学研究, 主持国家重点研发计划、国家重大新药创制专项课题、国家“863”计划子课题、山东省科技示范工程等40余项省部级课题, 获山东省科技进步一等奖、陆婉珍近红外光谱科技奖、中国药学会科学技术奖二等奖等多项奖励, 发表领域内高水平论文100余篇, 授权发明专利40余项。



李连, 博士, 副教授, 山东大学药学院药物智能制造技术研究团队成员, 主要从事药物智能制造关键质量属性的数据传感研究, 主持国家自然科学基金青年基金、国家重点研发计划子课题、博士后面上基金、山东省博士后创新基金等课题。先后获得山东省科技进步一等奖、陆婉珍近红外光谱青年奖、中国仪器仪表学会科技进步三等奖等多项奖励, 发表领域内高水平论文13篇。

近红外光谱分析技术在发酵工程中的应用

李浩源, 马晓博, 李连*, 臧恒昌*

(山东大学药学院, 济南 250012)

摘要: 生物发酵智能化程度低与生物发酵体系愈发复杂之间的矛盾成为制约我国发酵工程新质生产力的瓶颈。随着过程分析技术的发展, 基于关键质量属性实时监测和关键操作参数在线控制的交互式操作模式成为实现生物发酵过程智能化的核心。为此, 本文综述了近红外光谱分析技术这一常用的过程分析手段的基本原理及其在生物发酵过程中的应用进展, 期望对其未来新质生产力的发展方向有所引导。

关键词: 近红外光谱分析技术; 发酵; 过程分析技术

The application of near infrared spectroscopy in fermentation engineering

LI Haoyuan, MA Xiaobo, LI Lian*, ZANG Hengchang*

(School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Ji'nan 250012, China)

收稿日期: 2024-06-19

基金项目: 山东省重点研发计划(科技示范工程)项目(2022SFGC0104)

第一作者: E-mail: lhy10051024@163.com

*通信作者: 李连, E-mail: lilian@sdu.edu.cn; 臧恒昌, E-mail: zanghcw@126.com

Abstract: The contradiction between low intelligent degree of biological fermentation and increasing bioprocess complexity is the limitation that restricts the development of new quality productivity forces in China. With the application and development of process analysis technology, the interactive communications mode based on real time monitoring of critical quality attributes and the on-line control of critical process parameters has become the core of realizing the intelligent biological fermentation process. In this paper, the basic principle of near infrared spectroscopy which is a common process analysis method and its application in the biological fermentation were reviewed, hoping to guide its future development.

Key Words: NIRS; fermentation; PAT

创新驱动始终是生物发酵新质生产力发展的动力所在。随着科学技术的进步,尤其是针对生产过程中关键质量属性的传感器的研究与应用,生物发酵产业正在经历由传统的参数操作生产模式向以质量属性为核心的柔性化、智能化生产模式的转变。生物发酵产业因其本身生产过程的复杂化、涉及知识领域的多样化等特点,对生产过程数据尤其是关键质量属性的在线数据需求更为强烈。通过在线分析数据可以更高效地从基础科学的层面理解生物发酵过程中的变化,从而推动生物发酵工程的继续进步。因此,通过过程分析技术(process analytical technology, PAT)即时获取生产过程中关键质量属性和关键工艺参数来设计、分析和控制生物发酵过程^[1],有效地确保终产品的质量成为实现生物发酵过程智能化的核心。

在现代过程分析中, PAT的发展经历了离线分析、现场分析、在线分析、原位分析和不接触样品分析等阶段^[2]。在PAT的各个阶段,分子光谱技术如近红外光谱(near-infrared spectroscopy, NIRS)、中红外光谱(infrared spectroscopy, IR)和拉曼光谱(Raman spectroscopy)等应用最为广泛^[3,4]。其中, NIRS利用物质含氢基团的分子振动和转动引起的光谱吸收特性来分析样品的成分和特性,在发酵行业的实时监测和控制方面具有潜在优势。本文将对NIRS在发酵过程中的菌种选育、过程分析、在线控制等方面进行综述,并展望其发展趋势和应用前景。

1 NIRS基本原理与分析方法

近红外光是波长在780~2526 nm范围内的电磁波^[5]。近红外光谱是由于化合物共价化学键非谐能

级振动产生的,主要反映的是物质C-H、N-H、O-H等含氢基团振动的倍频和合频吸收,因此其峰强度远低于红外产生的吸收强度。基于以上特点, NIRS非常适于含氢有机物质的无损、快速和原位分析。其应用领域也在各个方向得到了快速发展,由最早应用的农业领域扩展到食品加工、药品制造、医学诊断、石油化工、生物工程和发酵工艺等领域。

然而,由于NIRS反映的是物质含氢基团的吸收,其原始光谱的可解释性不强,需要利用化学计量学方法将隐藏在重叠吸收峰下的有效信息挖掘出来,并利用相关建模方法建立回归模型,从而实现目标属性的预测。目前模型的建立方法包括偏最小二乘回归(partial least squared regression, PLSR)方法^[6]、人工神经网络(artificial neural networks, ANN)方法^[7]、卷积神经网络(convolutional neural network, CNN)方法^[8]等,且随着人工智能的发展,非线性的方法得到越来越多的使用。无论采取何种建模方法,均需要将获得的近红外光谱分为校正和预测两个部分^[9]。校正指建立近红外光谱与被测性质数据之间的定性或定量关系。预测是指根据已建立的模型和待测样品的近红外光谱数据计算其被测性质。构建完整的NIRS分析方法具体包括样品信息的收集、有效信息的提取、分析模型的建立、分析模型的评价、分析模型的应用以及分析模型的更新与维护^[10]。

2 NIRS在生物发酵领域的应用

传统发酵工艺过程的开发通常基于经验和试错的方法,其关键操作参数(溶氧、转速、pH等)的确定主要通过取得的离线样品分析(产物浓度、微生

物生长状况、原料消耗等)来确定,后续的生产过程采用固化的关键操作参数完成发酵。整个过程存在产品关键质量属性不可视的瓶颈。NIRS可以直接在线即时分析,实时监测发酵过程中的多个关键参数,如底物消耗率、代谢产物浓度、微生物生长情况等,从而利用智能控制算法及时地调整发酵条件,实现对发酵过程的精确控制和优化。

2.1 菌种选育与筛选研究

菌种选育与筛选是生物发酵的重要环节之一,寻找具有高产量、高效率、高稳定性的菌株对于提高产品质量和产量具有重要意义。传统的菌种选育与筛选方法通常需要耗费大量时间和资源,且效率较低。NIRS可以通过分析菌种代谢产物,提供其含量和组成信息;通过对不同菌种的代谢产物进行光谱分析,可以快速筛选出产量高、代谢途径优化的菌株。Cozzolino等^[11]利用NIRS结合化学计量学对产葡萄酒酵母菌尤其是代谢途径中具有缺失突变的酵母菌株进行了分离鉴定,基于菌株谱图之间差异,对其进行代谢组学分类,区分结果与传统代谢组学中MS或ESI-MS研究结果一致。Sun等^[12]利用NIRS成功地实现了基于大气压常温等离子诱变的高产结冷胶菌株的在线筛选。

此外,NIRS结合化学计量学分析方法可以实现对不同菌株的快速鉴定和分类。林云等^[13]提出一种霉菌酵母测试片结合NIRS技术快速鉴别霉变烟叶中最优势霉菌种类的方法。应用NIRS技术对培养后的含菌测试片进行光谱采集,获得具有不同种类最优势霉菌特征信息的近红外光谱数据,运用随机森林算法构建不同最优势霉菌种类的鉴别模型。测试集预测正确率达99.30%,能够用于识别常见的烟草最优势霉菌种类。Truong等^[14]利用NIRS建立了一种评价大肠杆菌对于不同浓度四环素产生抗性的方法,该方法相较于常规菌种评价方法具有省时、省力的优点。Alharbi等^[15]利用NIRS建立了一种用于准确区分肺炎克雷伯菌和大肠杆菌的方法,并对其耐药性进行评价,对于准确鉴定细菌种类与相关的抗菌素耐药性具有重要意义。Zavala-Ortiz等^[16]通过利用NIRS方法成功对3L的生物反应器中的长春花悬浮培养细胞中的薄壁组织、厚壁组织和厚壁组织细胞的分布进行原

位表征,为细胞分化的原位表征奠定了基础。

2.2 发酵过程的多参数在线质量监测

NIRS可以用于实时监测发酵过程中单个或多个关键质量属性,如生物质浓度、产物浓度、底物消耗等。通过这些数据,可以实现对发酵过程中关键操作参数的调控,从而保证产物的纯度、含量和结构等关键质量属性,确保终产品符合规定的质量标准。

在单个关键质量属性的在线监测方面,针对固态发酵过程,Zhao等^[17]建立了一个准确定量测定固态乙醇发酵过程中还原糖水平的预测模型,并通过对发酵液中还原糖在早期、中后期含量的动态分析,结合发酵数据集呈现的不均匀性,为发酵过程的补糖提供了依据。Zhao等^[7]对比了线性和非线性的建模方法在红茶菌发酵过程中总糖含量的在线监测结果,表明利用PLS和BPANN融合建模的方法可以有效地实现发酵过程中总糖含量变化的实时监测。针对液态发酵过程,Yang等^[18]利用微型光谱仪建立了一种快速预测乳酸菌发酵过程中胞外多糖含量的方法。Kambayash等^[19]构建了一种超声辅助的近红外光谱分析单元,可以实现中国仓鼠卵巢CHO细胞发酵过程中葡萄糖含量的快速预测,为实现细胞培养过程的在线分析提供了一种简单、方便的工具。Kozma等^[20]进一步利用NIRS研究了CHO细胞在1 L、20 L、100 L、1 000 L以及5000 L发酵体系下培养基葡萄糖含量的变化规律,以期为发酵过程尤其是流加式操作过程确定葡萄糖的浓度提供快速监测手段。

NIRS更大的优势是可以实现不同类型的多关键质量属性的同时在线监测,包括底物浓度、产物浓度以及营养成分等不同类型物质的在线分析。吴平^[21]利用台式近红外光谱仪采集过程样品的的光谱构建出近红外光谱信息与豆粕高温固态发酵过程中多肽、粗蛋白和胰蛋白酶抑制剂含量变化的Si-PLS模型,为实现发酵过程的实时在线分析与精准控制提供了理论支持。张英昊^[22]针对出芽短梗霉发酵产聚苹果酸过程,同样利用台式近红外光谱仪采集过程样品的的光谱建立了能够快速、无损地对发酵液中的主产物、粗多糖副产物进行定量测量的NIR分析方法,为实现多参数实时监测奠定了基础。

作为实现在线监测的有力测量工具, 光纤探头经常用于发酵过程的在线分析。Sedjoah等^[23]利用低成本的近红外光谱仪结合透射光纤建立了桑葚醋发酵过程中总酸和总多酚含量的快速监测方法, 可以实现桑葚醋发酵过程的关键质量属性监测。Jin等^[24]利用透反射光纤模式对黑曲霉发酵生产柠檬酸过程中的总糖、柠檬酸和细胞干重三个关键参数进行了实时的监测。Kasemsumran等^[25]利用透射光纤的方式对酿酒酵母在菠萝果酒发酵中的乙醇、总可溶性固形物、总酸度和总挥发性酸含量进行了测定。杨雁^[26]利用漫反射光纤的模式结合近红外光谱仪实现了普鲁兰糖发酵过程中蔗糖消耗、普鲁兰糖含量与重均相对分子质量的在线预测, 对于实现精准重均相对分子质量发酵工艺的开发奠定了基础。Banerjee等^[27]通过构建CNN模型实现了大肠杆菌发酵过程中20种氨基酸、葡萄糖、乳糖以及醋酸的在线监测。Zavala-Ortiz等^[28]利用可高压灭菌的透反射探头采集CHO细胞发酵过程中的近红外光谱, 进而通过建立支持向量局部加权回归的模型实现了单克隆抗体糖基化类型的实时监测。以光纤为感知手段可以原位在线获取发酵过程的多个关键质量属性, 但是由于需要灭菌等操作, 对于光纤探头的制造提出了严格的要求。

另外一种实现在线分析的方式为非接触式分析, 可以有效地避免灭菌等要求较为苛刻的条件。Yang等^[29]利用非接触式的近红外光谱仪透过玻璃发酵罐直接获得在线近红外光谱, 实现了发酵过程左旋乳酸、葡萄糖酸钠、槐糖脂等多个参数的在线监测, 对于实现复杂发酵体系的调控具有重要意义。Zimmerleiter等^[30]利用微型近红外光谱仪构建了一种不需要探头的无接触在线监测体系, 实现了青霉菌分批补料发酵过程中生物量、盘尼西林以及苯氧乙酸含量的在线监测。通过利用NIRS可以获得大量的生物发酵过程中的直接质量参数, 这些大量的数据成为建立生物发酵智能化调控系统的数据基石。

2.3 基于过程分析技术的发酵过程优化及控制

发酵过程的多参数在线监测是实现发酵过程在线优化与控制的前提。通过利用NIRS提供的丰富信息, 精准地调控关键操作参数(pH值、温度、气

体供给等), 构建监测微生物实时生长状态和代谢活性的数据库, 可以实现微生物的生长速率和产物生成效率的最优化, 完成智能化调控。首先, 通过利用NIR模型预测关键质量属性浓度, 可以及时调整发酵工艺。魏洪波等^[31]通过NIRS构建了L-缬氨酸发酵过程中的L-缬氨酸、葡萄糖、乳酸等主要代谢原料及代谢产物浓度预测模型, 快速得到并分析出L-缬氨酸发酵过程中通过EMP途径、HMP途径和TCA等重要节点或产物的代谢流量, 解析发酵过程的基本原理和影响因素, 从而及时调整发酵条件, 实现发酵过程关键质量属性的预测和调控。

其次, 可以通过获得的在线数据集进行多元分析, 及时监测与控制发酵过程。Cimander等^[32]构建了集近红外光谱仪、电子鼻、质谱仪和标准生物传感器于一体的针对大数据流的多变量统计过程控制(multivariate statistical process control, MSPC)系统。所得模型在大肠杆菌补料分批生产色氨酸的过程中得到了验证, 也为众多的在线分析和控制工作提供了一个通用的模型框架, 可以有效地降低批次与批次之间的差异, 提升产品的质量。周新奇等^[33]成功开发了近红外光谱在线监测系统, 可以实时监测窖酒醅配粮前的水分、淀粉及酸度的参数并将检测结果转化为4~20 mA的电控信号输入中控系统, 实现酒醅智能化精准配粮。Gorla等^[34]利用小型化的近红外设备采集开菲尔发酵过程中的近红外光谱, 通过移动块标准偏差(moving block standard deviation, MB-STD)、移动窗口主成分分析(moving window principal component analysis, MWPCA)等方法来研究发酵过程趋势和轨迹, 并确定发酵的状态和终点。NIRS获得的动态参数结合自动控制系统构建的基于质量数据的生物发酵智能化调控系统将有效地提升我们对生物工艺的理解, 并最终实现“黑灯”生产模式。

3 总结

近年来, NIRS在生物发酵过程中的应用研究取得了一定的进展, 为推动新质生产力的发展提供了新的途径和方法。随着我国相关鼓励政策的出台, 尤其是对连续化制造先进技术的产业化应

用的推动, 能够有效地将生物发酵过程中原料的质量数据、生产过程底物、产物等关键质量数据和关键过程操作参数融合起来, 建立基于过程的质量数据系统, 从而实现生物发酵过程产品的精准、高效和可控生产, 最终为实现工业生物发酵的新质生产力注入智能化和可持续发展的动能。

参考文献

- [1] Read EK, Park JT, Shah RB, et al. Process analytical technology (PAT) for biopharmaceutical products: Part I. concepts and applications. *Biotech Bioeng*, 2010, 105(2): 276-284
- [2] Callis JB, Illman DL, Kowalski BR. Process analytical chemistry. *Anal Chem*, 1987, 59(9): 624A-637A
- [3] Esmonde-White KA, Cuellar M, Uerpmann C, et al. Raman spectroscopy as a process analytical technology for pharmaceutical manufacturing and bioprocessing. *Anal Bioanal Chem*, 2017, 409(3): 637-649
- [4] Grassi S, Alamprese C. Advances in NIR spectroscopy applied to process analytical technology in food industries. *Curr Opin Food Sci*, 2018, 22: 17-21
- [5] Clementschitsch F, Bayer K. Improvement of bioprocess monitoring: development of novel concepts. *Microb Cell Fact*, 2006, 5(1): 19
- [6] Krämer D, King R. A hybrid approach for bioprocess state estimation using NIR spectroscopy and a sigma-point Kalman filter. *J Process Control*, 2019, 82: 91-104
- [7] Zhao S, Adade SYSS, Wang Z, et al. On-line monitoring of total sugar during kombucha fermentation process by near-infrared spectroscopy: comparison of linear and non-linear multiple calibration methods. *Food Chem*, 2023, 423: 136208
- [8] Zheng P, Solomon Adade SYS, Rong Y, et al. Online system for monitoring the degree of fermentation of oolong tea using integrated visible-near-infrared spectroscopy and image-processing technologies. *Foods*, 2024, 13(11): 1708
- [9] 田静. 基于光谱标准化的小麦粉品质NIR模型跨仪器共享的研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2022
- [10] 陆婉珍, 褚小立. 近红外光谱(NIR)和过程分析技术(PAT). *现代科学仪器*, 2007(4): 13-17
- [11] Cozzolino D, Flood L, Bellon J, et al. Combining near infrared spectroscopy and multivariate analysis as a tool to differentiate different strains of *Saccharomyces cerevisiae*: a metabolomic study. *Yeast*, 2006, 23(14-15): 1089-1096
- [12] Sun L, Wang Y, Yue M, et al. Rapid screening of high yield gellan gum mutants of *spingomonas paucimobilis* ATCC 31461 by combining atmospheric and room temperature plasma mutation with near-infrared spectroscopy monitoring. *Foods*, 2022, 11(24): 4078
- [13] 林云, 欧阳璐斯, 赖燕华, 等. 基于霉菌酵母测试片和 NIR技术快速鉴别霉变烟草最优势霉菌种类. *食品工业科技*, 2021, 42(23): 280-286
- [14] Truong VK, Chapman J, Cozzolino D. Monitoring the bacterial response to antibiotic and time growth using near-infrared spectroscopy combined with machine learning. *Food Anal Methods*, 2021, 14(7): 1394-1401
- [15] Alharbi B, Sikulu-Lord M, Lord A, et al. Near-infrared spectroscopy evaluations for the differentiation of carbapenem-resistant from susceptible enterobacteriaceae strains. *Diagnostics*, 2020, 10(10): 736
- [16] Zavala-Ortiz DA, Ebel B, Guedon E, et al. *In situ* cell differentiation monitoring of *Catharanthus roseus* suspension culture processes by NIR spectroscopy. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2020, 43(4): 747-752
- [17] Zhao M, Sun A, He S, et al. Quantitative analysis of reducing sugars in solid-state fermentation based on NIR combined with GA-AdaBoost. *Int J Food Sci Tech*, 2024, 59(4): 2262-2274
- [18] Yang S, Tao Y, Maimaiti X, et al. Investigation on the exopolysaccharide production from blueberry juice fermented with lactic acid bacteria: optimization, fermentation characteristics and Vis-NIR spectral model. *Food Chem*, 2024, 452: 139589
- [19] Kambayashi T, Noguchi T, Nojima A, et al. Glucose monitoring in cell culture with online ultrasound-assisted near-infrared spectroscopy. *Anal Chem*, 2020, 92(4): 2946-2952
- [20] Kozma B, Salgó A, Gergely S. On-line glucose monitoring by near infrared spectroscopy during the scale up steps of mammalian cell cultivation process development. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2019, 42(6): 921-932
- [21] 吴平. 豆粕高温固态发酵及其低强度交变磁场强化研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2020
- [22] 张英昊. 出芽短梗霉发酵产聚苹果酸过程的近红外建模[D]. 天津: 天津科技大学, 2019
- [23] Sedjoah RCAA, Ma Y, Xiong M, et al. Fast monitoring total acids and total polyphenol contents in fermentation broth of mulberry vinegar using MEMS and optical fiber near-infrared spectrometers. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectr*, 2021, 260: 119938
- [24] Jin S, Sun F, Hu Z, et al. Online quantitative substrate, product, and cell concentration in citric acid fermentation using near-infrared spectroscopy combined with chemometrics. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectr*, 2023, 285: 121842

- [25] Kasemsumran S, Boondaeng A, Ngowsuwan K, et al. Simultaneous monitoring of the evolution of chemical parameters in the fermentation process of pineapple fruit wine using the liquid probe for near-infrared coupled with chemometrics. *Foods*, 2022, 11(3): 377
- [26] 杨雁. 近红外光谱分析技术在普鲁兰糖发酵过程质量分析中的应用研究[D]. 济南: 山东大学, 2023
- [27] Banerjee S, Mandal S, Jesubalan NG, et al. NIR spectroscopy—CNN-enabled chemometrics for multianalyte monitoring in microbial fermentation. *Biotech Bioeng*, 2024, 121(6): 1803-1819
- [28] Zavala-Ortiz DA, Ebel B, Li MY, et al. Support vector and locally weighted regressions to monitor monoclonal antibody glycosylation during CHO cell culture processes, an enhanced alternative to partial least squares regression. *Biochem Eng J*, 2020, 154: 107457
- [29] Yang C, Lingli C, Meijin G, et al. Application of near-infrared spectroscopy technology in the complex fermentation system to achieve high-efficiency production. *Bioresour Bioprocess*, 2021, 8(1): 96
- [30] Zimmerleiter R, Kager J, Nikzad-Langerodi R, et al. Probeless non-invasive near-infrared spectroscopic bioprocess monitoring using microspectrometer technology. *Anal Bioanal Chem*, 2019, 412(9): 2103-2109
- [31] 魏洪波, 石拓, 崔毅, 等. 基于近红外光谱结合代谢流分析的L-缬氨酸发酵过程监控. *中国食品学报*, 2019, 19(11): 79-87
- [32] Cimander C, Mandenius CF. Online monitoring of a bioprocess based on a multi-analyser system and multivariate statistical process modelling. *J Chem Tech Biotech*, 2002, 77(10): 1157-1168
- [33] 周新奇, 郑启伟, 刘妍, 等. 基于近红外光谱技术的白酒酒醅在线监测研究. *分析测试学报*, 2020, 39(11): 1358-1364
- [34] Gorla G, Ferrer A, Giussani B. Process understanding and monitoring: a glimpse into data strategies for miniaturized NIR spectrometers. *Anal Chim Acta*, 2023, 1281: 341902