



# 拉曼光谱分析技术在资源微生物发酵性能评价中的应用

鲍伟威<sup>1#</sup>, 纪凯迪<sup>2#</sup>, 胡蜜蜜<sup>1#</sup>, 娄吉芸<sup>1</sup>, 彭祺群<sup>1</sup>, 李震<sup>3</sup>, 王霞<sup>1\*</sup>, 阮银兰<sup>4\*</sup>, 杨世辉<sup>1</sup>

1 湖北大学生命科学学院, 省部共建生物催化与酶工程国家重点实验室, 湖北 武汉 430062

2 桂林电子科技大学电子工程和自动化学院, 广西 桂林 541004

3 亚波光子(深圳)科技有限公司, 广东 深圳 518107

4 桂林电子科技大学光电工程学院, 广西 桂林 541004

鲍伟威, 纪凯迪, 胡蜜蜜, 娄吉芸, 彭祺群, 李震, 王霞, 阮银兰, 杨世辉. 拉曼光谱分析技术在资源微生物发酵性能评价中的应用. 微生物学报, 2022, 62(11): 4262–4272.

Bao Weiwei, Ji Kaidi, Hu Mimi, Lou Jiyun, Peng Qiqun, Li Zhen, Wang Xia, Ruan Yinlan, Yang Shihui. Applications of Raman spectroscopy in fermentation evaluation of resource microorganisms. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(11): 4262–4272.

**摘要:** 微生物发酵过程是细胞新陈代谢进行物质转化的过程, 为了提高目标产物的转化率, 需要对微生物发酵动态特性进行实时分析, 以便实时优化发酵过程。拉曼光谱(Raman spectroscopy)量化测试作为一种有应用前景的在线过程分析技术, 可以在避免微生物污染的条件下, 实现精准监测, 进而用于优化控制微生物发酵过程。【目的】以运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)为例, 建立微生物发酵过程中葡萄糖、木糖、乙醇和乳酸浓度拉曼光谱预测模型, 并进行准确性验证。【方法】采用浸入式在线拉曼探头, 收集运动发酵单胞菌发酵过程中多个组分的拉曼光谱, 采用偏最小二乘法对光谱信号进行预处理和多元数据分析, 结合离线色谱分析数据, 对拉曼光谱进行建模分析和浓度预测。【结果】针对运动发酵单胞菌, 首先实现拉曼分析仪对单一产品乙醇发酵过程的精准检测, 其次基于多元变量分析, 建立葡萄糖、乙醇和乳酸浓度变化的预测模型, 实现对发酵过程中各成分浓度变化的准确有效分析。【结论】成功建立了一种评价资源微生物尤其是工业菌株发

**基金项目:** 国家重点研发计划(2021YFC2101101); 国家自然科学基金(21978071, U1932141); 浙江省引进培育领军型创新创业团队项目(2018R01014)

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2101101), by the National Natural Science Foundation of China (21978071, U1932141) and by the Leading Innovative and Entrepreneur Team Introduction Program of Zhejiang (2018R01014)

\*Corresponding authors. E-mail: WANG Xia: xxwang@hubu.edu.cn; RUAN Yinlan: yinlan.ruan@guet.edu.cn

<sup>#</sup>Those authors contributed equally to this work.

Received: 10 October 2022; Revised: 26 October 2022; Published online: 2 November 2022

酵液多种组分的拉曼光谱分析方法。该方法为运动发酵单胞菌等工业菌株利用多组分底物工业化生产不同产物的实时检测, 以及其他微生物尤其工业菌株的选育和过程优化提供了新方法。

**关键词:** 运动发酵单胞菌; 在线拉曼光谱分析技术; 发酵过程控制

## Applications of Raman spectroscopy in fermentation evaluation of resource microorganisms

BAO Weiwei<sup>1#</sup>, JI Kaidi<sup>2#</sup>, HU Mimi<sup>1#</sup>, LOU Jiyun<sup>1</sup>, PENG Qiqun<sup>1</sup>, LI Zhen<sup>3</sup>, WANG Xia<sup>1\*</sup>, RUAN Yinlan<sup>4\*</sup>, YANG Shihui<sup>1</sup>

1 State Key Laboratory of Biocatalysis and Enzyme Engineering, School of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, Hubei, China

2 School of Electronic Engineering and Automation, Guilin University of Electronic Technology, Guilin 541004, Guangxi, China

3 Subphotonics (Shenzhen) Biotech Co., Ltd., Shenzhen 518107, Guangdong, China

4 School of Optoelectronic Engineering, Guilin University of Electronic Technology, Guilin 541004, Guangxi, China

**Abstract:** Microbial fermentation is a process of substrate transformation by cell metabolism. In order to improve the yield of target products, we need to analyze the dynamic characteristics of microbial fermentation in a real-time manner so as to optimize the fermentation process. As a promising inline process analysis technology, Raman spectroscopy can achieve accurate monitoring under the *in-situ* conditions without causing microbial pollution and help optimize the microbial fermentation process. **[Objective]** To develop the prediction models with the inline Raman measurement technology and evaluate model performance so as to accurately monitor the concentration changes of glucose, xylose, ethanol, and lactic acid in the whole fermentation process of *Zymomonas mobilis*. **[Methods]** Raman spectra for multiple components in the fermentation process of *Z. mobilis* were collected *in situ* by the immersion probe, and then the partial least square method was adopted to conduct spectral processing and multivariate data analysis. The multivariate models were developed via the combination of Raman spectra with the HPLC data and then used to predict the concentrations of multiple components in the fermentation broth. **[Results]** The established models accurately measured the single products in the fermentation broth of *Z. mobilis*. Then, the prediction models for the concentrations of glucose, ethanol, and lactic acid were developed through multivariate analysis and validated, which can be used for real-time accurate determination of multiple components in the fermentation process. **[Conclusion]** We successfully established a Raman spectral analysis method for monitoring multiple chemicals in the fermentation broth. This is a promising technology for real-time monitoring of multiple substrates and products in industrial fermentation and can be used for strain development and process optimization of microorganisms.

**Keywords:** *Zymomonas mobilis*; inline Raman spectroscopy; fermentation process control

微生物发酵过程是一个极其复杂的生物化学反应过程, 具有高度的非线性、动态变化性

和相关性。在微生物发酵过程中, 尽可能获得较多的过程状态变量, 掌握更多的反应过程信

息,是实现发酵过程控制和进一步提高发酵生产效率的必要前提<sup>[1]</sup>。然而在实际的生物发酵过程中,由于工艺和技术的限制,能在线测量的参数仅局限于某些简单、常见的物理化学参数,如温度、pH、压力、溶解氧等。而对于一些比较复杂但又很重要的生物参数,如细胞密度、底物浓度、代谢产物浓度等则不能或很难实现在线检测,目前仍主要采用传统的人工取样处理后测试的方法。这种离线的人工采样测试方法操作复杂,误差较大,具有严重的滞后性,不适宜进行现场快速监测和连续在线分析,难以满足现代发酵过程自动化和连续控制的需求<sup>[2]</sup>。因此,有必要寻找一种先进、有效的在线监测方法替代当前使用的离线人工检测方法,实现对发酵过程重要参数的在线监测。通过对在线检测数据的分析,结合实际的生产工艺状况,对发酵生产过程进行反馈调节,能够将微生物发酵过程较好地控制在一种优化的操作环境或条件下,被认为是促进发酵生产力提升、提高底物转化率和目标产物含量、降低原料消耗的有效措施或捷径之一,对提升发酵工艺整体经济效益具有极其重要的意义。

近年来,随着生物技术和检测技术的发展,已经开发了多种用于间接检测生物反应系统过程变量和数据分析的技术<sup>[2-3]</sup>,如包含线性和非线性回归的统计分析方法、人工智能技术<sup>[4]</sup>以及诸如紫外可见、中红外<sup>[5]</sup>和近红外光谱<sup>[6]</sup>、荧光<sup>[7]</sup>和拉曼光谱<sup>[8]</sup>等光谱检测方法。在这些检测技术中,紫外可见比色法需要额外添加反应试剂,中红外光谱法容易受水吸收峰干扰,近红外光谱法吸收峰重叠严重。拉曼光谱法分析速度快、无需化学试剂、特征峰明显、采样方式灵活、不受水等溶剂的干扰,因而被认为是一种具有实际应用前景的技术,是分析分子结构和含量的有用工具,现已越来越多地应用于微

生物的细胞结构、化学组成以及代谢过程的研究<sup>[9]</sup>。中国科学院青岛生物能源与过程研究所单细胞中心借助拉曼光谱发明了基于“拉曼组”的单细胞快检检测技术,能够在单个细胞精度同时测量多种不同代谢物的组成和动态变化,为细胞工厂的性能测试平台增添了崭新的手段<sup>[10]</sup>。

拉曼光谱(Raman spectroscopy)是一种产生于分子或者晶格振动能级的光子的非弹性散射光谱,拉曼光谱特征峰具有指纹谱特性,其位置、强度和线宽可提供分子振动、转动方面的信息,据此可以反映分子中不同的化学键和官能团。与其他检测技术相比,拉曼光谱检测具有无需样品预处理、受水的干扰弱、可同时测定多种组分等优点,任何气态、液态、固态样品均可直接通过探头进行测量并提供快速、简单、可重复且无损伤的定性定量分析<sup>[11]</sup>。然而,拉曼检测会受到固体粒子、气泡或浑浊系统中细胞的光散射的干扰<sup>[12]</sup>,因而在发酵在线分析应用方面存在技术瓶颈。通过旁路过滤去除颗粒物,可以使拉曼光谱分析技术能够在线监测发酵过程中的葡萄糖、乙醇以及其他物质的浓度<sup>[13]</sup>。

运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)是一种革兰氏阴性的兼性厌氧菌,是目前已知唯一可在厌氧条件下通过 Entner-Doudoroff (ED)途径代谢葡萄糖、果糖或蔗糖生产乙醇的微生物。运动发酵单胞菌的生长周期较短,在 ED 途径下生物量积累少,大部分碳源(>95%)被快速转化为产物乙醇<sup>[14]</sup>。近年来,除乙醇外,运动发酵单胞菌已通过代谢工程改造实现了 2,3-丁二醇、异丁醇、乳酸、聚羟基丁酸酯 PHB 等多种生物基化学品的合成生产<sup>[14-15]</sup>。其中乳酸是新型可降解材料聚乳酸的合成单体,由于聚乳酸可降解的特殊性,使得近年来乳酸生产备受关注,因此,本研究也针对运动发酵单胞菌的乳酸发酵过程开展了相关研究分析。高效液相色

谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)常用于测定运动发酵单胞菌发酵过程中的糖类、醇酸等物质的含量<sup>[16]</sup>, 此方法具有稳定性好、误差相对较小等优点, 但也存在滞后性, 不具备进行现场快速监测的能力, 无法满足发酵过程自动化和连续控制的需求。

本研究采用拉曼生物过程在线分析仪对运动发酵单胞菌不同发酵过程进行实验分析, 直接将拉曼探头插入发酵罐收集发酵过程中发酵液的拉曼信号, 采用数据预处理方法消除气泡和菌株的散射影响, 使用多元变量分析方法对发酵过程中葡萄糖、木糖、乙醇和乳酸浓度建立预测模型, 并进行准确性验证, 成功建立了一种多组分发酵产物拉曼光谱在线检测分析方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株及培养基

本研究中用到的运动发酵单胞菌均为本实验室保藏菌株(表 1), 其中 ZM4 衍生菌株 ZML-pdc-ldh 为乳酸生产菌株, 由本实验室前期通过引入外源乳酸脱氢酶并结合代谢工程改造所获得(数据未发表); 菌株 8b 及其衍生菌株 S8、S38 为经工程改造可代谢利用木糖的菌株<sup>[16]</sup>。

ZML-pdc-ldh 发酵培养基为葡萄糖富集培养基 RMG5: 葡萄糖 50 g/L, 酵母提取物 10 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 g/L。8b、S8 及 S38 发酵培养基为木糖富集培养基 RMX5: 木糖 50 g/L, 酵母提取物 10 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2 g/L。

### 1.2 培养方法

取 $-80\text{ }^\circ\text{C}$  冰箱保藏的甘油冻存菌株 100  $\mu\text{L}$  接种于装有 1 mL 富集培养基的冻存管中, 于  $30\text{ }^\circ\text{C}$  培养箱静置培养。待菌株生长至对数期 ( $OD_{600}\approx 1.5-2.0$ )后转接于装有 200 mL 富集培养基的锥形瓶于  $30\text{ }^\circ\text{C}$  培养箱静置培养, 直到菌株生长至对数期。将种子培养液转接入含有 0.6 L RMG5 培养基的 1-L T&J-MiniBox III 平行生物反应器(上海迪必尔生物工程有限公司)中(图 1), 控制菌液初始  $OD_{600}$  值为 0.1。利用 MiniControl 软件对生物反应器的温度、搅拌器转速、pH 和补料系统进行控制, 保持发酵过程中温度和搅拌转速分别为  $30\text{ }^\circ\text{C}$  和 100 r/min, 通过流加 4 mol/L KOH 溶液将 pH 值保持为  $5.8\pm 0.1$ 。

### 1.3 拉曼在线分析

拉曼生物过程在线分析仪[亚波光子(深圳)科技有限公司]的浸入式拉曼探头安装于生物反应器顶部的备用窗口(图 1)。该系统采用 830 nm 激发光波长, 拉曼探头直接插入发酵罐反应液, 在发酵过程中实时收集发酵液里各成分的拉曼光谱信号, 使用多元变量分析软件 SubAnalysis [亚波光子(深圳)科技有限公司]对收集的拉曼光谱进行批量化和实时自动化数据预处理。当进行拉曼连续测量时, 光谱中会出现一些与样品无关的尖锐峰, 这些峰由来自外太空的宇宙射线碰撞探测器产生。首先会利用它的峰宽比常规的拉曼峰窄的特征对其进行消除, 保证拉曼光谱中仅包含反应发酵液中各

表 1 本研究中所用菌株

Table 1 Strains used in this study

Strains	Related characteristics	References
<i>Z. mobilis</i> ZML-pdc-ldh	Lactate-producing strain	Lab stock
<i>Z. mobilis</i> 8b	Xylose-utilizing strains, ZM4 ( <i>ZMO1237::Pgap-xyIA-xyIB</i> , pZM41- <i>Peno-talB-ktA</i> ), NTG mutation	[17]
<i>Z. mobilis</i> S8	Xylose-utilizing strains, 8b (pEZ- <i>RsXI-xyIB</i> ) adapted for 8 generations under 50 g/L xylose	[16]
<i>Z. mobilis</i> S38	Xylose-utilizing strains, 8b (pEZ- <i>RsXI-xyIB</i> ) adapted for 38 generations under 50 g/L xylose	[16]

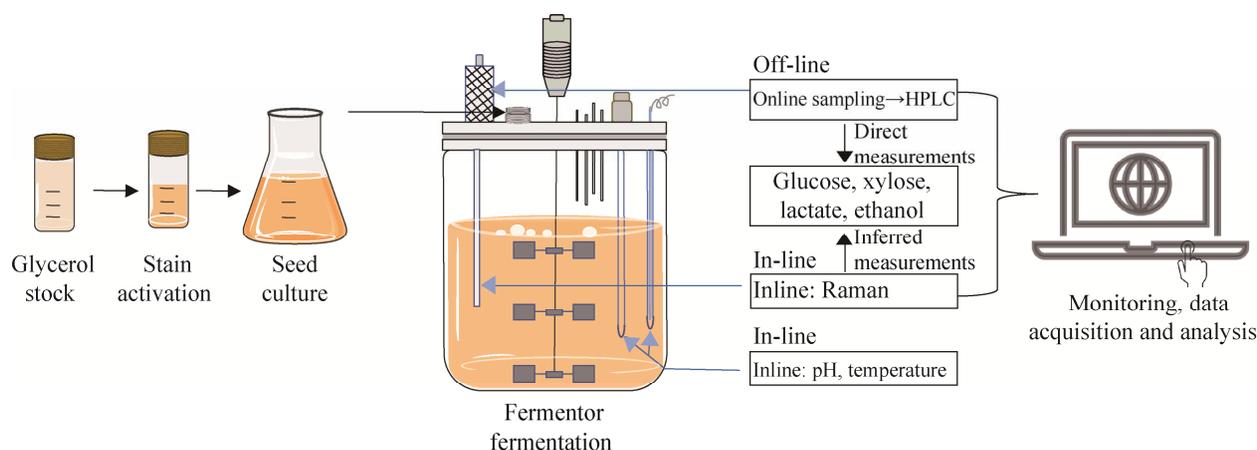


图 1 菌株发酵与拉曼在线检测示意图

Figure 1 Diagram for strain fermentation and inline measurement by Raman spectroscopy.

成分的拉曼特征峰。其次，根据具体光谱截取包含发酵液中各组分的指纹谱(wavenumber=255–1 730 nm)，进行 airPLS 拟合荧光基线，消除蛋白或色素的背景荧光干扰<sup>[18]</sup>。同时采用基于拉伊达法则的离群值检测算法自动消除由于气泡等因素引起的荧光过高明显异于正常采样的拉曼光谱，确保拉曼光谱仅反应发酵液成分的变化。最后采用 SubAnalysis 偏最小二乘法(partial least squares, PLS)对拉曼光谱进行建模分析和浓度预测。

#### 1.4 HPLC 检测

在拉曼分析仪进行实时收集发酵液拉曼光谱的同时，对发酵液进行离线高效液相色谱 HPLC 检测分析，为实时拉曼分析的验证提供建模和对比数据。在发酵过程中，选取不同时间点手动收集发酵液样品，高速离心机(Eppendorf) 12 000 r/min 离心 2 min 后收集发酵液上清，上清液经 0.45 μm 过滤器过滤后进行 HPLC 分析。采用 RID-20A 型示差折光检测器 HPLC (LC-20 AD, Shimadzu)，配备 Aminex HPX-87H 型色谱柱(300 mm×7.8 mm, Bio-Rad)对发酵液中的葡萄糖、木糖、乙醇和乳酸浓度进行检测。检测条件为：流动相为 0.005 mol/L

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>，流速为 0.5 mL/min，检测器温度为 40 °C，柱温度为 60 °C，进样量为 20 μL。

## 2 结果与分析

### 2.1 单一产物乙醇发酵过程成分浓度检测

首先利用拉曼分析仪对 3 个不同菌株 8b、S8 及 S38 利用木糖生产单一产品乙醇的过程样品进行测试，实验结果表明，拉曼光谱测试的木糖和乙醇的浓度与 HPLC 结果高度一致(图 2)。采用预测拟合系数(*R squared*)对模型的预测性能进行量化分析，结果表明，3 种菌株木糖拟合系数分别为 1.000 0、0.999 4 和 1.000 0 (图 2B、E 和 H)，乙醇拟合系数分别为 0.998 9、0.998 7 和 1.000 0 (图 2C、F 和 I)。通过上述回归分析，得到的拟合系数都接近或等于 1。该结果与目前广泛使用的 785 nm 激发光波长的在线拉曼分析结果相比，线性拟合系数更高，拟合效果更好<sup>[19-20]</sup>。国外有学者采用浸入式拉曼探头，在 993 nm 激发光波长下对酿酒酵母利用玉米醪同步糖化发酵产生乙醇的过程进行了过程分析，得到了 2%的预测准确度<sup>[21]</sup>。综合分析，本研究中使用的拉曼光谱分析技术能够精准监测利用木糖生产单一产品乙醇的浓度变化。

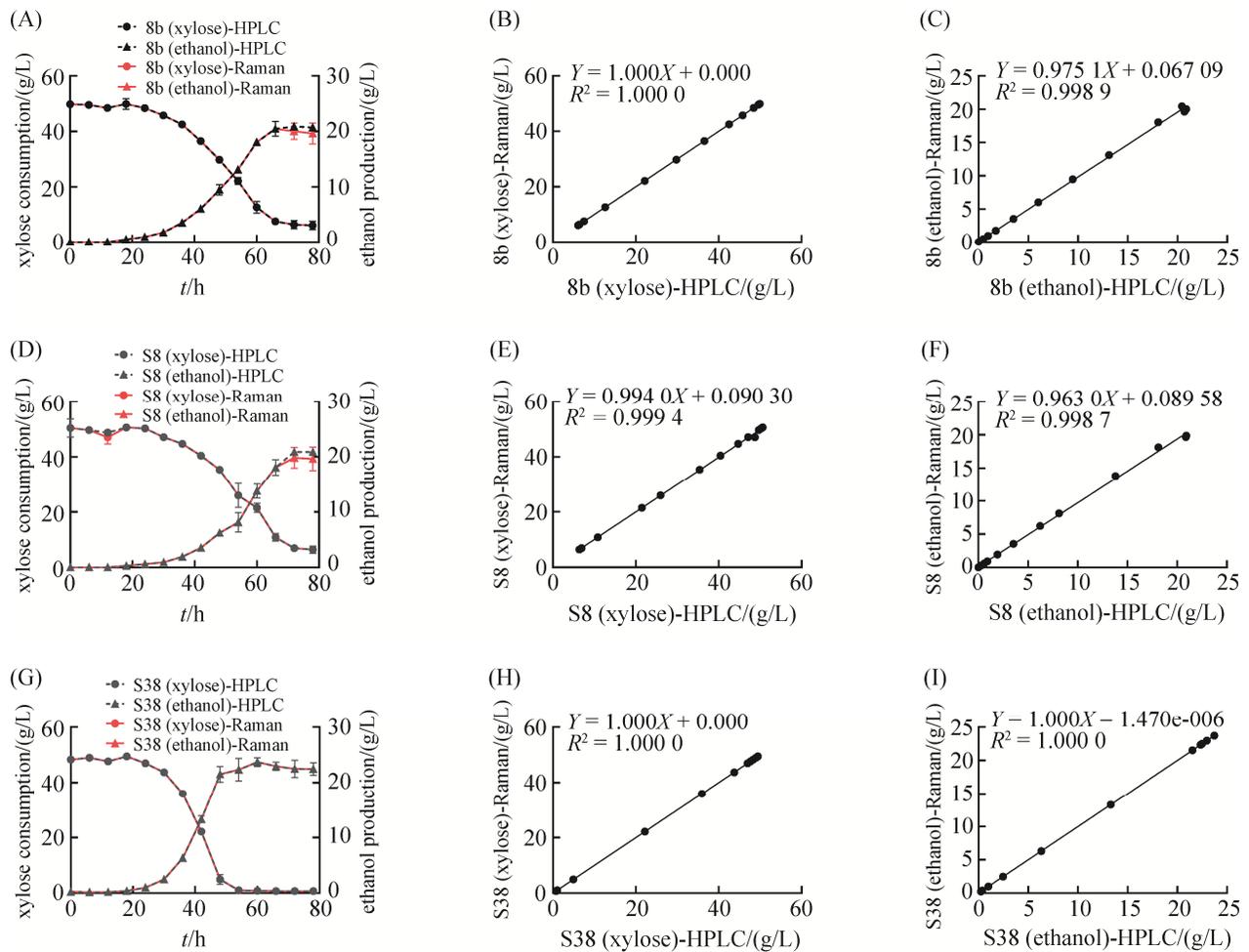


图 2 木糖利用菌株 8b、S8、S38 木糖、乙醇浓度的拉曼光谱预测和 HPLC 检测比较

Figure 2 Concentration of xylose and ethanol in the fermentation by the xylose utilizing strains 8b, S8 and S38 detected with Raman spectroscopy compared with HPLC. A, D, G: Raman spectroscopy and HPLC detection in strain 8b, S8 and S38; B, E, H: correlation between Raman and HPLC detection of xylose in strain 8b, S8 and S38; C, F, I: correlation between Raman and HPLC detection of ethanol in strain 8b, S8 and S38.

## 2.2 乙醇与乳酸多产品在线分析

### 2.2.1 数据预处理

运动发酵单胞菌重组菌株 ZML-pdc-ldh 在生产乳酸的同时也产生乙醇，拉曼分析仪实时收集发酵液的拉曼信号，部分信号如图 3A 所示。这些拉曼信号包含噪音，同时存在窄而尖锐的宇宙射线峰。另外由于发酵液成分复杂，一些蛋白或色素会导致拉曼信号中含有较强的背景荧光，同时拉曼连续测试存在环境干扰

和仪器自身背景信号的扰动等不利因素。因而消除背景荧光凸显拉曼特征峰是数据分析必要的前期工作。多项式拟合背景荧光或基线在一定程度上有效，但需要用户手工操作并且容易导致光谱基线变形，尤其对低信噪比的信号效果差<sup>[9,22]</sup>。

采用 SubAnalysis 软件消除宇宙射线和基线，并归一化的部分拉曼光谱数据如图 3B 所示。可以清晰观察到葡萄糖、乙醇和乳酸的特

征峰, 分别在  $1118\text{ cm}^{-1}$ 、 $881\text{ cm}^{-1}$  及  $827\text{ cm}^{-1}$  处, 并且葡萄糖的特征峰强度随发酵时间的增加而降低, 同时乳酸和乙醇的特征峰强度随时间的增加而增加。以上分析结果显示, 在线拉曼光谱分析技术能够准确地对发酵液中的葡萄糖、乙醇和乳酸进行识别与区分。

### 2.2.2 建立发酵液中单一组分葡萄糖预测模型

当发酵液中的成分种类较少时, 各成分的拉曼特征峰相对独立, 其强度的变化可直接反映其代表的成分浓度的变化。为了建立预测模型, 将 2 批乳酸发酵过程中发酵液单一组分葡萄糖的手动取样测试色谱值与拉曼强度趋势峰

( $1118\text{ cm}^{-1}$  特征峰) 进行比较(图 4)。从图 4A 和 4B 可以观察到, 2 批发酵过程中色谱分析的葡萄糖浓度与拉曼强度趋势峰基本重合, 二者均随发酵时间逐渐下降, 发酵 4 h 后下降速度加快。对色谱分析的葡萄糖浓度值进行计算可得, 2 批发酵过程中葡萄糖的消耗速率分别为  $5.219\text{ g}/(\text{L}\cdot\text{h})$  和  $5.550\text{ g}/(\text{L}\cdot\text{h})$ 。图 4C 将 2 批发酵过程的葡萄糖拉曼特征峰趋势曲线进行重合比较, 可以直观地看出第二批发酵的葡萄糖消耗速率略快于第一批发酵, 与 HPLC 色谱分析结果保持一致。在线拉曼光谱分析技术能够精准地对发酵过程中的葡萄糖浓度进行变化趋势预测。

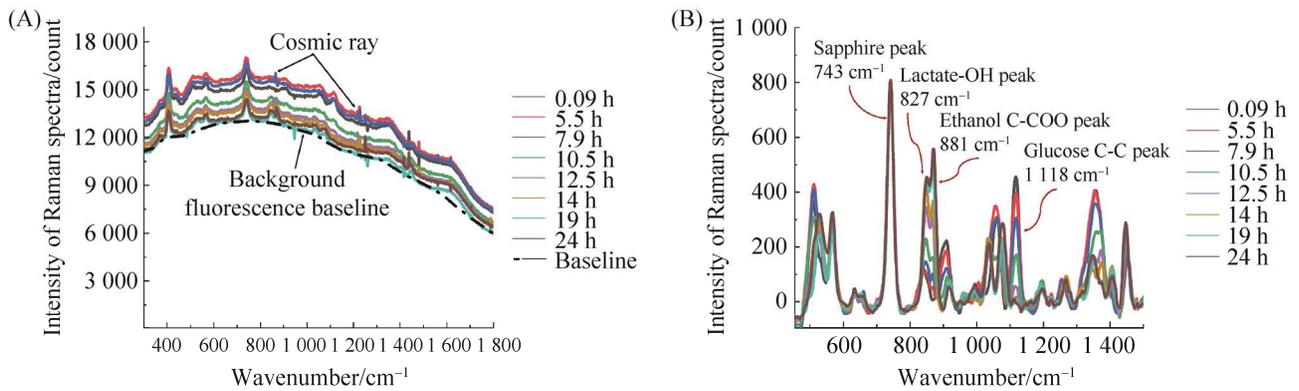


图 3 运动发酵单胞菌 *ZML-pdc-ldh* 乳酸发酵过程中不同时间的拉曼光谱信号

Figure 3 Time series of Raman spectra in lactate fermentation by *Zymomonas mobilis* ZML-pdc-ldh. A: raw Raman spectra; B: corrected Raman spectra.

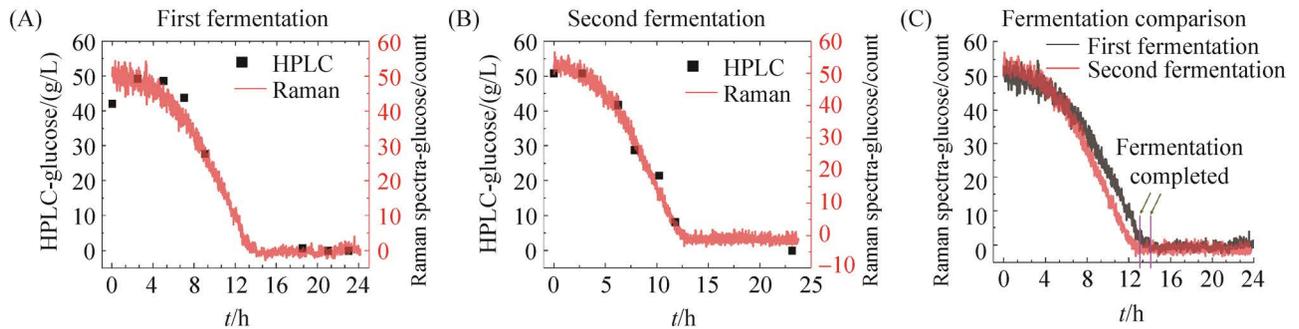


图 4 乳酸发酵过程中葡萄糖拉曼光谱强度与 HPLC 分析比较

Figure 4 Comparison of Raman spectra and HPLC analysis for glucose detection in lactate fermentation. A: first fermentation data; B: second fermentation data; C: Raman data comparison between two fermentations.

### 2.2.3 建立发酵液中多个组分预测模型

不同拉曼特征峰强度趋势曲线可以反映各成分的变化趋势,但拉曼特征峰对应的各成分实际浓度值需要利用取样离线色谱分析值建模预测。针对运动发酵单胞菌乳酸生产重组菌株 ZML-pdc-ldh 利用葡萄糖发酵生产乳酸和乙醇过程中多成分的预测,本研究基于第一批乳酸发酵结果,依据离线色谱分析值,对所有拉曼光谱进行 PLS 回归分析,建立各成分的预测模型。利用此模型对第二批发酵的拉曼光谱进行多成分浓度预测,结果如图 5A 所示,离散点为第二批发酵离线色谱分析的各成分浓度值,实线为通过第一批发酵建立的模型预测的第二批拉曼光谱对应的各成分浓度值。可以看出,乙醇的拉曼预测值与色谱值基本重合,但葡萄糖和乳酸预测误差较大(图 5A)。我们对第一批发酵离线取样的色谱数据进行修改补充,修正后的拉曼预测模型准确率得到提高,能够同时对葡萄糖、乙醇和乳酸浓度进行精准预测(图 5B)。

### 2.2.4 葡萄糖、乙醇和乳酸浓度的监测

由拉曼光谱计算的葡萄糖、乙醇和乳酸浓度与 HPLC 参考值重叠(图 6A)。采用预测

拟合系数( $R^2$ )对模型的预测性能进行了量化,结果表明,在多产物条件下,葡萄糖拟合系数为 0.999 9 (图 6B),乙醇拟合系数为 0.999 8 (图 6C),乳酸拟合系数为 1.000 0 (图 6D)。在多组分条件下,回归分析得到的拟合系数均接近或等于 1,拟合结果精确。该结果与目前广泛使用的 785 nm 激发光波长的拉曼分析结果相比,葡萄糖、乙醇及乳酸的线性拟合系数均更高,拟合效果更好<sup>[12,23]</sup>。在利用葡萄糖生成乙醇和乳酸的发酵过程中,拉曼光谱对于葡萄糖、乙醇和乳酸的浓度的监测精准高效,表明基于多元变量分析的拉曼光谱分析技术有望在发酵工业中得到进一步的应用和推广。

## 3 讨论与结论

本研究利用拉曼光谱分析技术实现了在线监测多种发酵产物的浓度变化,开发了一套批量化和实时自动化数据预处理程序,结合离线取样的 HPLC 色谱数据,建立了针对运动发酵单胞菌发酵液中葡萄糖、木糖、乙醇和乳酸浓度变化的预测模型,实现了对发酵过程中各成分浓度变化的准确有效分析。发酵过程拉曼

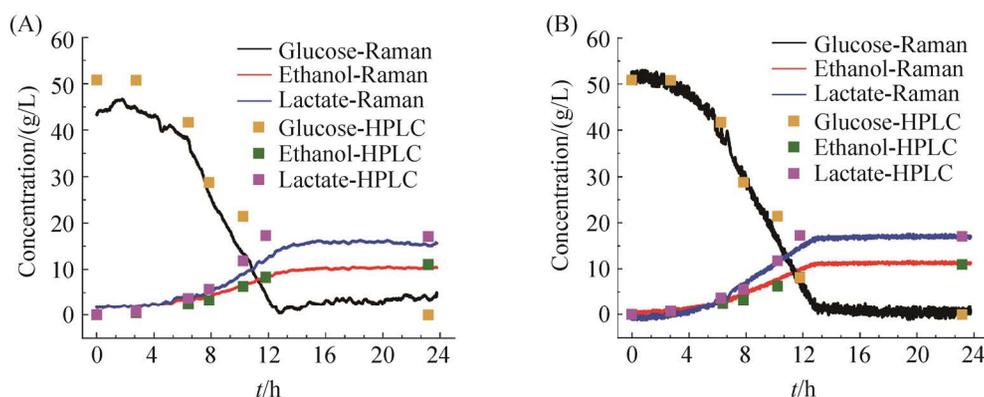


图 5 葡萄糖、乙醇和乳酸模型预测与 HPLC 检测值比较

Figure 5 Model evaluation compared with HPLC detection for glucose, ethanol and lactate. A: model before correction; B: model after correction.

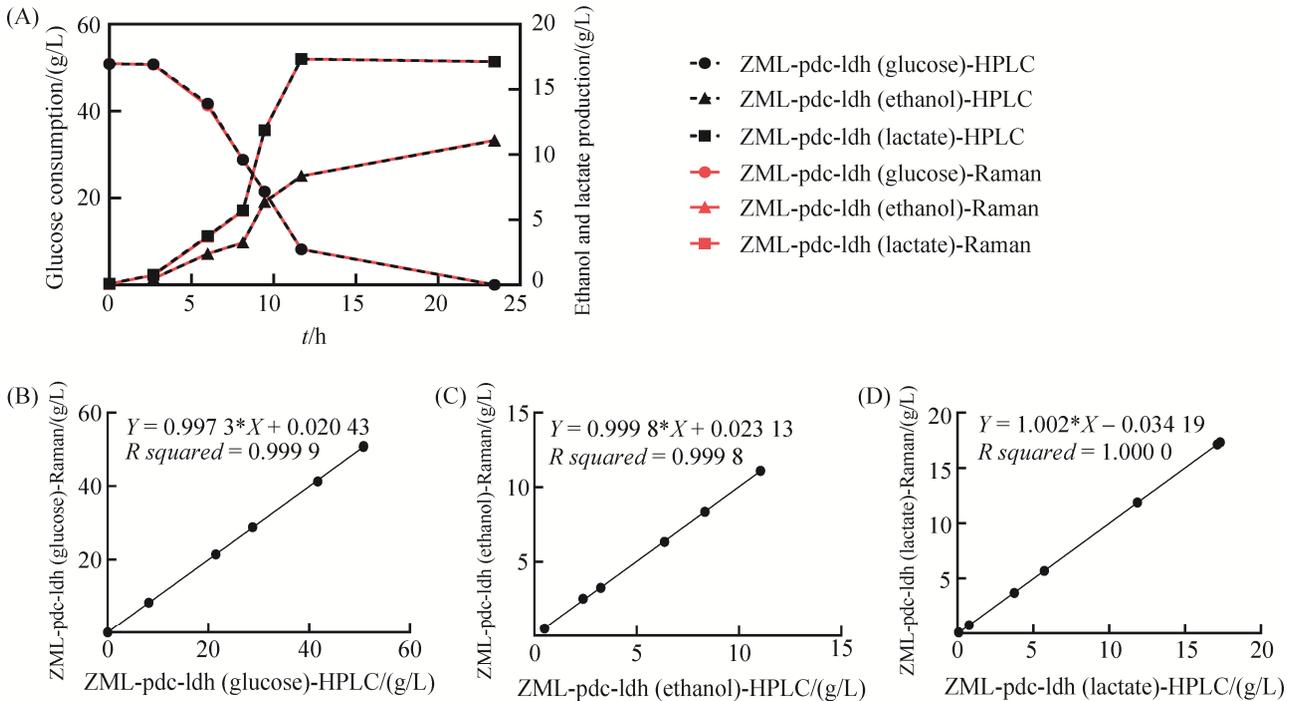


图 6 乳酸生产菌株 ZML-pdc-ldh 葡萄糖、乙醇和乳酸浓度的拉曼光谱预测和 HPLC 检测比较

Figure 6 Concentration of glucose, ethanol and lactate in the fermentation by the lactate production strain ZML-pdc-ldh detected with Raman spectroscopy compared with HPLC. A: Raman spectroscopy and HPLC detection; B–D: correlation between Raman and HPLC detection of glucose, ethanol and lactate.

分析国内外已经有比较广泛的报道，大部分采用的技术主要是基于显微拉曼，该技术由于需要对样品进行聚焦测试，收集的拉曼光谱数据稳定性较差，无法实现在线分析。本研究首次在国内使用可以进一步消除背景荧光干扰的 830 nm 商业化拉曼分析仪对运动发酵单胞杆菌的发酵过程进行建模和实时分析预测，且结果准确可信。本研究建立的技术体系可以有效地规避常规人工取样离线操作的繁琐和风险，并且具备同时实时分析多组分的能力。该技术体系可模块化应用到其他生物过程的监测和精准自动补料调控中，实现对发酵过程的及时反馈调节控制，提高发酵过程控制效率，显著加快工艺开发进度，节省成本，稳定产品质量，并有望推广至大规模生物合成反应和纯化分析等过程的应用；也可用于其他微生物菌株

的鉴定和发酵特性的评价与优化。

拉曼光谱分析技术在发酵领域的大规模应用，最主要的限制是发酵工艺的原材料采用低成本的农副产品较多，会导致发酵液整体颜色偏深，如糖蜜的使用会导致发酵液颜色偏深褐色，只有使用 1 064 nm 的拉曼系统才可以测试到发酵液成分的拉曼光谱信号，但由于激光波长越长拉曼信号越弱，导致仪器的检测极限偏高，难以满足工业应用需求。为解决此技术瓶颈，目前正在发展的时间门控技术有望大幅度解决背景荧光的干扰，同时可以使用短波长激光器如 532 nm 激发拉曼光谱信号<sup>[24]</sup>，进而在同样的功率条件下待测物的拉曼信号有近 16 倍的提升，这为发酵工业全方位采用无损的拉曼光谱在线分析技术提供了先进的技术解决方案。

## 参考文献

- [1] Beutel S, Henkel S. *In situ* sensor techniques in modern bioprocess monitoring. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 91(6): 1493–1505.
- [2] Rathore AS, Mishra S, Nikita S, Priyanka P. Bioprocess control: current progress and future perspectives. *Life*, 2021, 11(6): 557.
- [3] Claßen J, Aupert F, Reardon KF, Solle D, Scheper T. Spectroscopic sensors for in-line bioprocess monitoring in research and pharmaceutical industrial application. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2017, 409(3): 651–666.
- [4] Karim MN, Rivera SL. Artificial neural networks in bioprocess state estimation. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 1992, 46: 1–33.
- [5] Veale EL, Irudayaraj J, Demirci A. An on-line approach to monitor ethanol fermentation using FTIR spectroscopy. *Biotechnology Progress*, 2007, 23(2): 494–500.
- [6] Cozzolino D, Parker M, Damberg RG, Herderich M, Gishen M. Chemometrics and visible-near infrared spectroscopic monitoring of red wine fermentation in a pilot scale. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, 95(6): 1101–1107.
- [7] Skibsted E, Lindemann C, Roca C, Olsson L. On-line bioprocess monitoring with a multi-wavelength fluorescence sensor using multivariate calibration. *Journal of Biotechnology*, 2001, 88(1): 47–57.
- [8] Esmonde-White KA, Cuellar M, Uerpmann C, Lenain B, Lewis IR. Raman spectroscopy as a process analytical technology for pharmaceutical manufacturing and bioprocessing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2017, 409(3): 637–649.
- [9] Hirsch E, Pataki H, Domján J, Farkas A, Vass P, Fehér C, Barta Z, Nagy ZK, Marosi GJ, Csontos I. Inline noninvasive Raman monitoring and feedback control of glucose concentration during ethanol fermentation. *Biotechnology Progress*, 2019, 35(5): e2848.
- [10] Heidari Baladehi M, Hekmatara M, HeYH, Bhaskar Y, Wang ZB, Liu L, Ji YT, Xu J. Culture-free identification and metabolic profiling of microalgal single cells via ensemble learning of ramanomes. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(25): 8872–8880.
- [11] Shaw AD, Kaderbhai N, Jones A, Woodward AM, Goodacre R, Rowland JJ, Kell D. Noninvasive, on-line monitoring of the biotransformation by yeast of glucose to ethanol using dispersive Raman spectroscopy and chemometrics. *Applied Spectroscopy*, 1999, 53(11): 1419–1428.
- [12] Baradez MO, Biziato D, Hassan E, Marshall D. Application of Raman spectroscopy and univariate modelling as a process analytical technology for cell therapy bioprocessing. *Frontiers in Medicine*, 2018, 5: 47.
- [13] Wang QY, Li ZG, Ma ZH, Liang LQ. Real time monitoring of multiple components in wine fermentation using an on-line auto-calibration Raman spectroscopy. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014, 202: 426–432.
- [14] 杨永富, 耿碧男, 宋皓月, 何桥宁, 何明雄, 鲍杰, 白凤武, 杨世辉. 运动发酵单胞菌底盘细胞研究现状及展望. *合成生物学*, 2021, 2(1): 59–90.  
Yang YF, Geng BN, Song HY, He QN, He MX, Bao J, Bai FW, Yang SH. Progress and perspectives on developing *Zymomonas mobilis* as a chassis cell. *Synthetic Biology Journal*, 2021, 2(1): 59–90. (in Chinese)
- [15] Zhang K, Lu XX, Li Y, Jiang XB, Liu L, Wang HL. New technologies provide more metabolic engineering strategies for bioethanol production in *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(5): 2087–2099.
- [16] Lou JY, Wang JW, Yang YF, Yang Q, Li RX, Hu MM, He QN, Du J, Wang X, Li M, Yang SH. Development and characterization of efficient xylose utilization strains of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology for Biofuels*, 2021, 14(1): 231.
- [17] Zhang M, Eddy C, Deanda K, Finkelstein M, Picataggio S. Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*. *Science*, 1995, 267: 240–243.
- [18] Schalk R, Braun F, Frank R, Rädle M, Gretz N, Methner FJ, Beuermann T. Non-contact Raman spectroscopy for in-line monitoring of glucose and ethanol during yeast fermentations. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2017, 40(10): 1519–1527.
- [19] Iversen JA, Berg RW, Ahring BK. Quantitative monitoring of yeast fermentation using Raman spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2014, 406(20): 4911–4919.

- [20] Ewanick SM, Thompson WJ, Marquardt BJ, Bura R. Real-time understanding of lignocellulosic bioethanol fermentation by Raman spectroscopy. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6(1): 28.
- [21] Gray SR, Peretti SW, Lamb HH. Real-time monitoring of high-gravity corn mash fermentation using *in situ* Raman spectroscopy. *Biotechnology and Bioengineering*, 2013, 110(6): 1654–1662.
- [22] Graf A, Woodhams A, Nelson M, Richardson DD, Short SM, Brower M, Hoehse M. Automated data generation for Raman spectroscopy calibrations in multi-parallel mini bioreactors. *Sensors: Basel, Switzerland*, 2022, 22(9): 3397.
- [23] Lee HLT, Boccazzi P, Gorret N, Ram RJ, Sinskey AJ. *In situ* bioprocess monitoring of *Escherichia coli* bioreactions using Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 2004, 35(1/2): 131–137.
- [24] Kekkonen J, Talala T, Nissinen J, Nissinen I. On the spectral quality of time-resolved CMOS SPAD-based Raman spectroscopy with high fluorescence backgrounds. *IEEE Sensors Journal*, 2020, 20(9): 4635–4645.



阮银兰，2006年博士毕业于澳大利亚国立大学物理科学与工程专业，现任桂林电子科技大学光电工程学院研究员，博士生导师。2005–2020年在澳大利亚阿德莱德大学光子和先进传感研究所工作15年，主要从事微结构光纤和光谱生化检测研究，2020年9月加入桂林电子科技大学，聚焦拉曼光谱分析技术的开发及产业化应用，目前重点研究通过空芯光纤和超快时间门控技术解决拉曼检测信号弱荧光干扰大的瓶颈问题。现主持国家“绿色生物制造”重点研发专项“生物反应器与智能生物制造”子课题“智能感知在线仪器开发与应用(2021–2024)”，及国家自然科学基金面上项目“空芯光纤背景荧光种子法受激拉曼散射研究(2023–2026)”，参与国家自然科学基金面上项目“运用形态种分离与拉曼光谱技术研究淀山湖微囊藻时空格局(2021–2024)”，主持或参与澳大利亚政府和横向基金共13项，获得2008年澳大利亚博士后人才计划支持(相当于优秀青年基金)。发表学术期刊和会议论文110余篇，专利10项，文章累计引用2234次，H指数因子24(谷歌学术)。