

# 红外光谱技术在生物过程监测中的应用

邱 江 叶 勤 张嗣良

(华东理工大学生物反应器国家重点实验室 上海 200237)

**摘 要** 在线监测化学组分的浓度对许多生物过程都是十分必要的。然而,探头需耐高温灭菌的要求和生物体系自身的复杂性给许多分析技术的在线监测带来了困难。近几年,随仪器和数据处理技术的迅速发展,应用红外光谱技术对生物过程的原位或在线监测日益广泛。本文对红外过程分析技术进行了较全面的综述,介绍了红外分析的原理、进展及在生物过程监测中的应用。

**关键词** 傅里叶变换红外光谱,衰减全反射,过程分析,生物过程,发酵过程

**学科分类号** Q503

生物技术作为新兴的高技术产业,日益显示出巨大潜在的经济效益。生物技术产品的生产多通过发酵或细胞培养过程来获得,发酵或细胞培养过程及产品分离纯化等过程中关键化学成分的检测,对了解生物的生长规律和优化生产过程极为重要。

## 1 生物过程监测的现状

生物过程培养液的特点是组成复杂,且通常气、固、液三态并存,其组份和含量具有时变性。由于培养过程的无菌和密封性要求,插入培养液的探头需耐高温灭菌,这给许多技术的原位监测带来了困难。目前,培养过程中的物理参数,如流量、压力、温度、流速、搅拌速率等可以在线监测和控制,而化学参数的原位在线检测仪,pH和溶解氧比较普遍<sup>[1]</sup>。尽管多种分析技术应用于生物培养过程的研究,而化学成分参数的在线检测仍存在缺陷。质谱技术主要对培养液中易挥发成分或尾气成分进行检测,间接得到培养液中化学组成变化的信息,但仪器设备昂贵<sup>[2,3]</sup>。高压液相色谱(HPLC)和气相色谱将分离与连续检测相结合,实现了对复杂体系中组份、价态和性质相近的元素或化合物分析,比较广泛用于培养液中的许多成分测定,但需要复杂的预处理且测样时间长<sup>[4]</sup>。生物传感器的电极探头不能耐高温灭菌,采用与流动注射分析技术结合,将培养液引流出反应器检测一种或数种成份,存在一定时间滞后,过滤膜易被菌体堵塞等缺点<sup>[5-9]</sup>。此外,也有红外(包括近红外<sup>[10]</sup>和中红外<sup>[11]</sup>)、压电<sup>[12]</sup>、荧光<sup>[13]</sup>、核磁共振<sup>[14]</sup>等用于研究生物过程,各种技术都具有自身的特点,在不同程度上反映了生物过程的变化信息。在实际过程分析中,仍多使用操作繁琐、费时费力的离线化学分析或色谱分析方法。

## 2 液相红外分析技术

红外区介于可见光区和微波区之间,又分成近红外、中红外和远红外三个区域。中红外( $400 \sim 4000\text{cm}^{-1}$ )反映了物质分子振动和转动的光谱信息,绝大多数有机化合物和无机离子的基频吸收带出现在该区域。由于基频振动是红外光谱中吸收最强的振动,所以最适用于红外光谱的定性和定量分析。与其它分析技术如荧光、紫外和可见光、色谱或电分析化学方法相比,红外光谱含有独特的化学结构和组成信息,能区别结构极为接近的物质。这也是红外光谱长期以来主要用于物质分子结构解析的原因。

中红外光谱在定量分析和过程监测中应用受到限制的原因是(1)传统的红外光谱,如固体压片或

液膜法采集制样麻烦,光程难于控制一致。(2)大多数物质都会有独特的红外吸收,多组分共存时谱峰重叠现象普遍。(3)原位过程监测中红外光的传递和高性能红外探头的研制一直是难于解决的问题。借助光路系统或光导纤维传递红外光和高性能红外探头的设计成功只是近几年红外技术取得的巨大突破,解决了反应过程原位监测的困难。

### 2.1 衰减全反射原理

由于水分子或有机溶剂都有强烈的红外吸收,为克服溶剂的吸收影响,液体样品的红外测定常用液膜或短光程的液体透射池,但存在光程难以控制和清洗困难等缺点。早在1961年,J. Fahren Fahrenfort<sup>[15]</sup>为解决透射光谱法不能用于某些红外强吸收物质测定,提出了衰减全反射法。(Attenuated total reflection, ATR),ATR样品池或探头用锗、硅或硒化锌等折射率高的红外透过晶体构成,红外光由光密介质(ATR晶体)透入光疏介质(样品)。调整入射光的角度,当入射角大于临界角时,在两介质界面会发生全反射现象。然而入射光仍会透入样品一定深度,在样品有吸收的频率内红外光会被样品吸收而强度衰减,而样品无吸收的频率范围内红外光被全部反射回ATR晶体。入射光能被部分衰减的程度与样品的吸收特性、穿透深度以及多次内反射中入射光与样品接触的次数有关<sup>[16]</sup>。

ATR的光谱强度取决于穿透深度 $dp$ ,反射次数和样品与ATR晶体的紧密贴合情况以及样品本身吸收的大小。根据麦克斯韦理论,全反射光束穿透样品的厚度遵循下列公式:

$$dp = \frac{\lambda_1}{2\pi \left[ \sin^2 \alpha - \left( \frac{n_2}{n_1} \right)^2 \right]^{1/2}}$$

式中 $\lambda_1$ 是红外光在ATR晶体(光密介质)中的波长,它与入射光波长 $\lambda$ 的关系是 $\lambda_1 = \lambda/n_1$ ;  $n_1$ 是ATR晶体材料的折射率; $\alpha$ 为入射角; $n_2$ 是样品的折射率; $dp$ 是光透入样品的垂直深度,称穿透深度。从上式可知,与光谱吸收强度直接有关的光线透射到样品内的透射深度 $dp$ ,与以下3个因素有关(1)光束在反射晶体内的波长 $\lambda_1$ ;(2)晶体材料和待测样品的折射率 $n_1$ 和 $n_2$ ;(3)入射角 $\alpha$ 。

当样品与ATR晶体紧密贴合时,衰减全反射光谱对一定频率的波长具有恒定的穿透深度即光程。换句话说,光谱的吸收强度仅与 $\lambda_1$ 、 $\alpha$ 、 $n_1$ 和 $n_2$ 几个因素有关,而与样品用量无关。利用衰减全反射原理制做的红外液体池或红外探头,可适用于包括水溶液或其它强红外吸收溶剂、固体粉末或红外强吸收的样品,红外光进入样品的光程恒定,样品只要与全反射晶体材料紧密贴合即可,采集样品的红外光谱十分简便。

随穿入样品的深度增加,入射光的能量呈指数衰减。穿透深度 $dp$ 与 $\lambda_1$ 同数量级,这说明衰减全反射光谱仅提供距界面微米数量级或更薄膜层的光谱信息。用于液相反应过程的研究时,体系中存在的气泡、固体颗粒或悬浮物并不干扰测定,红外光谱反映的是液相化学组成的吸收光谱。

### 2.2 ATR技术的发展

1982年,Wilks<sup>[17]</sup>提出新的圆柱内反射(Cylindrical internal reflection, CIR)ATR取样系统,随即商品化的ATR附件用于过程监测。1986年,研制出水平ATR附件<sup>[18]</sup>(Horizontal ATR, HATR),随后相继开发不同形状和材料的ATR附件。用ATR技术在线监测反应过程的动态变化,开始是通过取样系统(如蠕动泵)将反应器中反应液循环引入流动ATR样品池,或将ATR附件直接安装在反应器的底部或壁上<sup>[19]</sup>,原位跟踪反应过程的变化。1993年,两次反射可插入式ATR探头问世,探头可耐高温灭菌,直接插入反应器中,探头与红外仪通过光路系统联接,ATR晶体材料可以是ZnS、ZnSe等。此类探头可实现原位监测,但仍不能用于苛刻环境如强酸或强碱介质。1994年多次反射复合金刚石、锗可插入探头研制成功<sup>[20]</sup>,能耐高温、高压、强酸或强碱环境,适用面更广,极大地拓宽了监测反应体系的范围。红外光可用光纤或光路系统传输,实现原位监测,但各有特点。光纤是用能透过 $4000 \sim 900\text{cm}^{-1}$ 的中红外光的硫属化合物玻璃制造而成的,传输距离较近,通常不超过3m;光纤材料柔软性差,弯曲不能大于 $45^\circ$ ,否则光纤会被折断,但光纤使用比较轻便。光路系统是由多节特殊材料外壳内置反射镜或聚焦镜的光

的导管构成, 坚固可靠, 不易损坏。借助调节多次反射光路系统多节光的导管连接处, 探头可从任意高度和方向插入反应器监测反应过程, 已成功应用于工业生产连续控制和反应过程的优化。

### 3 红外光谱定量分析方法的原理

红外光谱定量分析的根本依据是朗伯-比尔定律。然而实际体系中各组分吸收峰严重重叠等因素使产生的吸光度非线性叠加以及各组分的化学反应存在未知成分, 使简单的线性回归和建立联立方程的方法不适用定量分析。化学计量学中对混合物多成分同时定量分析的迅速发展, 重叠峰分解、含有未知成分体系定量分析、多元非线性修正、多次叠加平均, 以及运用多元校正方法如多元(非)线性回归、主成分分析、因子分析、偏最小二乘法、人工神经网络等对不同样品和测量误差的计算及修正等的发展, 在分析速度和准确度方面均得到极大的提高, 为利用红外光谱信息定性和定量描述生物过程的变化规律提供了条件和可能性。

### 4 红外光谱技术在生物过程中的研究进展

近红外光谱(NIR)适用的光源、检测器等比中红外区的相应器件更早商品化, 其在农业、食品和生物分析领域得到了广泛的应用。在生物过程中的应用研究也有报道<sup>[21~25]</sup>。然而, 与近红外光谱相比, 中红外光谱含有的化学信息更加丰富, 其光谱吸收强度相对较强。Wong *et al.*<sup>[26]</sup>曾用内反射液体池与 FTIR 联用研究了青霉素 VK 的红外光谱图, 直接寻找出其特征峰  $1767\text{cm}^{-1}$  的吸光度与浓度符合朗伯比尔定律, 抗生素水溶液和发酵液中的检测限小于 0.1%。Kuehl *et al.*<sup>[27]</sup>用 ATR 液体池研究了甲醇、乙醇和丙酮混合体系, 用 K-矩阵法建立了同时测定该 3 种成分的方法, 测定结果相对误差小于 2%。White *et al.*<sup>[28]</sup>用圆柱形内反射液体池与反应器连接, 研究了 *E. coli* 发酵过程。红外光谱的变化反映了 *E. coli* 对丙酮酸的利用和引起磷酸盐缓冲溶液组成的变化。用已知浓度的丙酮酸溶液分别建立了特征峰  $1356$  和  $1176\text{cm}^{-1}$  的吸光度和浓度的关系, 进而确定了丙酮酸在发酵过程中的含量变化, 发现发酵 9h, 丙酮酸浓度从开始的  $0.023\text{mol/L}$  下降了  $0.016\text{mol/L}$ 。

Fairbrother *et al.*<sup>[29]</sup>用液体内反射池与发酵罐通过蠕动泵相联, 在线监测了干酪乳清发酵过程。用 13 种含有酒精和乳糖的标准溶液通过偏最小二乘法建立校正方法。在线每间隔 0.5h 采集 24h 发酵过程的红外光谱, 预测了发酵过程中酒精的生成和乳糖消耗的变化规律, 显示出红外技术是十分有效在线监测发酵过程的方法, 可以方便地从实验室的发酵罐到工业生产实际过程中应用。

Fairbrother *et al.*<sup>[30]</sup>还用上述方法在线监测了乳清发酵过程。对合成混合液乳糖和乳酸的测定误差分别为 1.1% 和 0.9%, 测定时间大约 3min, 对发酵液样品的测定结果与离线酶试剂盒方法一致, 相关系数为 0.997。

Picque *et al.*<sup>[31]</sup>用傅里叶变换红外光谱近红外(NIR)和中红外(MIR)技术监测了酒精和乳酸发酵过程, 离线取样, 采集用 ATR 液体反射池和透射池, 将已知发酵液组分的浓度和吸光度矩阵用偏最小二乘法建立定量分析校正方法。用 NIR 对酒精和乳酸发酵过程的研究发现, 在发酵过程中没有明显的吸收峰或区间的变化, 近红外光谱变化不大, 不易用于定量分析。透射池和 ATR 液体反射池红外吸收特征谱图完全相同, 仅是 ATR 反射池红外吸收强度减弱一半, 这是由于光程长短的缘故。通过红外分析方法快速测定了乳酸发酵过程中乳糖、半乳糖和乳酸, 酒精发酵过程中糖(葡萄糖和果糖)、甘油和醇。红外测定结果与液相色谱之间的相关系数优于 0.99。最大标准误差对乳糖、半乳糖和乳酸分别为  $0.46$ 、 $0.57$  和  $9.5\text{g/L}$ , 对于糖、甘油和醇分别为  $2.5$ 、 $0.09$  和  $0.98\text{g/L}$ 。Veronique B<sup>[32]</sup>用 FTIR/ATR 研究了酿酒发酵过程, 采用多元线性回归、主成分回归和偏最小二乘(PLS)法分析了葡萄糖和果糖的含量变化, 用发酵液样品作为校正集。3 种多元校正方法相比较, PLS 结果最好, 葡萄糖的最小预测误差为  $1.1\text{g/L}$ 。迄今为止, Lehigh University 的研究小组对红外技术在生物过程中的应用做了全面的研究工作。早在 1985 年, Alberti 和 Phillips<sup>[33]</sup>用离线 ATR/FTIR 监测了 *Saccharomyces cerevisiae* 补料发酵过程, 详细讨论了红外技术在线过程控制的可能性, 他们用多元校正方法 K-矩阵、P-矩阵和最小二乘法

测定了培养液中葡萄糖、酒精和甘油含量,发现水、菌体和一些主要微量介质的存在不影响测定结果,能准确监测到基质和产物在 0.8 至 60g/L 范围间的含量变化。Kun Yu *et al.*<sup>[34]</sup>用在线 ATR 探头跟踪了蔗糖水解、动物细胞培养、青霉素和大肠杆菌发酵过程,显示出 ATR/FTIR 用于在线控制过程的优势。从蔗糖水解过程的红外谱图的变化,可以清楚地看到蔗糖吸收峰的吸光度下降,葡萄糖和果糖吸收峰的吸光度增加,亦能判断完全水解所需要的时间。在动物细胞培养过程中监测了葡萄糖、DMEM 的消耗,铵根离子和乳酸的积累。在青霉素发酵过程中监测了基质葡萄糖、前体苯乙酸和产物青霉素的变化。对大肠杆菌发酵过程,在线监测了甘油浓度,并实现了控制补加甘油,明显地延长了菌体的生产期,菌体量增加了 66%。最近 Fayolle *et al.*<sup>[35]</sup>用中红外光谱技术研究了酒精发酵过程,样品采集使用 ATR 液体池,用偏最小二乘法测定了酒精发酵过程中的主要成分,基质葡萄糖和果糖、产物甘油和酒精的浓度。他们考察了温度变化对测定结果的影响,同时用人工神经网络法建立的非线性校正模型,取得了比用 PLS 更好的计算结果。作者也率先在国内开展了红外光谱技术应用于生物过程监测的研究。对红霉素发酵过程<sup>[36]</sup>,用含有发酵液主要成份的葡萄糖溶液为校正集,建立偏最小二乘法定量葡萄糖的分析方法,对分批和连续培养过程中葡萄糖的测定和传统化学分析的结果比较,相关系数优于 0.97。对维生素 C 生产中山梨醇发酵生成山梨糖的过程,发现通过跟踪山梨糖的  $1081\text{cm}^{-1}$  的吸收峰和山梨糖  $1052\text{cm}^{-1}$  的特征吸收峰可定性描述反应的进程。分别用线性回归法<sup>[37]</sup>、偏最小二乘法<sup>[38]</sup>建立了山梨醇和山梨糖的定量分析方法。

## 5 展望

红外光谱过程分析技术的特点有:①探头能耐高温灭菌,原位或在线获取反应体系的红外吸收光谱。跟踪生物过程或快速反应,得到常规技术难以获取的反应变化信息,其魅力更在于用真实地观察反应的进程,揭示从未见到的现象;②同时实现多组分检测,获取参数时间短;③适用面广,可用于各种化学反应、微生物、动植物细胞的培养过程及下游过程;④光谱分析是无破坏性样品测定,不影响正常的培养过程,并可通过计算机实现数据采集、定量和及时的过程控制。采用红外原位或在线分析技术跟踪反应过程,可进行反应机理和动力学的研究、反应条件的优化,无疑对实际生产过程具有重要的指导意义。

致 谢 本工作得到美国 Lehigh University 余昆博士的热情帮助。

## 参 考 文 献

- 1 俞俊棠,唐孝宣主编.生物工艺学,上海:华东化工学院出版社,1992,下册:165~205
- 2 Hansen K F, Lauritsen F R, Degn H. *Biotech and Bioeng*, 1994, **44**(3):347~353
- 3 Srinivasan N, Kasthurikrishnan N, Cooks R G *et al.* *Anal Chim Acta*, 1995, **316**:269~276
- 4 Pope J A, Nelson R A, Schaffner C P *et al.* *Journal of Industrial Microbiology*, 1990, **1**:61~69
- 5 Huang Y L, Foellmer T J, Ang K C *et al.* *Anal Chim Acta*, 1995, **317**:223~232
- 6 Min R W, Nielsen J, Villadsen J. *Anal Chim Acta*, 1996, **320**:199~205
- 7 Forman L W, Thomas B D, Jacobson F S. *Anal Chim Acta*, 1991, **249**:101~111
- 8 White S F, Turner A P F, Biltewski U *et al.* *Biosensors & Bioelectronics*, 1995, **10**:543~551
- 9 White S F, Tothill I E, Newman J D *et al.* *Anal Chim Acta*, 1996, **321**(2-3):165~172
- 10 Buchanan B R, Honigs D E, Cynthia J L *et al.* *Applied Spectroscopy*, 1988, **42**(6):1106~1111
- 11 Timothy B H, Melody L M, Joseph T K *et al.* *Anal Biochem.*, 1988, **174**:415~422
- 12 姚守拙,何风娇,聂利华. *湖南大学学报*, 1995, **22**(1):48~54
- 13 Lasko D R, Wang D I C. *Biotech and Bioeng*, 1996, **52**:364~372
- 14 Sarazin C, Ergon F, Seguin J P *et al.* *Biotech and Bioeng*, 1996, **51**:636~644
- 15 Fahrefort J. *Spectrochimica Acta*, 1961, **17**:69. ©1999 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- 16 倪 行,朱伯荣,柳 晓.化学通报,1989,2:17~22
- 17 Rein A,Wilks P J. Amer Lab,1982,14(10):152~155
- 18 Hewitt F C,Morris K S,Rein A J. Amer Lab,1985,17(12):32
- 19 Rein A J. Amer Lab,1989,21(3):126
- 20 Milosevic M,Sting D,Rein A. Spectroscopy,1995,10(4):44~49
- 21 Nishinari K,Cho R K,Iwamoto M. Starch,1989,41:110~112
- 22 Cavinato A G,Mayes D M,Ge Z *et al.* Anal Chem,1990,62:1977~1982
- 23 Vaccari G,Dosi E,Campi A L *et al.* Biotech and Bioeng,1994,43:913~917
- 24 Chung H,Arnold M A. Applied Spectroscopy,1995,49(8):1097~1102
- 25 Jeffrey W H,Brain M,Malcolm J R *et al.* Applied Spectroscopy,1996,50(1):102~108
- 26 Wong J S,Rein A J,Wilks D *et al.* Applied Spectroscopy,1984,38(1):32~35
- 27 Kuehl D,Crocombe R. Applied Spectroscopy,1984,38(6):907~909
- 28 White R L,Robert D E,Attridge M C. Anal Chem,1985,57:2487~2491
- 29 Fairbrother P,George W O,Williams J M. Anal Proc,1989,26:264~267
- 30 Fairbrother P,George W O,Williams J M. Appl Microbiol Biotechnol,1991,35:301~305
- 31 Picque D,Lefier D,Grappin R *et al.* Anal Chim Acta,1993,279:67~72
- 32 Veronique B. Sensors and Actuators,1993,12(B):57~64
- 33 Alberti J C,Phillips J A,Fink D J *et al.* Biotech and Bioeng Symp,1985,15:689~722
- 34 Yu K,Phillips J A. IFAC Symposia Series,1992,10:7~13
- 35 Fayolle P,Picque D,Perret E *et al.* Applied Spectroscopy,1996,50(10):1325~1330
- 36 邱 江,孙际滨,叶 勤等.第七届全国生物化工会议论文集,1996:657~657
- 37 邱 江,黄明志,韩崇家等.华东理工大学学报,1997,23(2):200~203
- 38 Qiu J,Huang M Z,Hang H F *et al.* Fourth Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference,Beijing:1997,1188~1192

## Application of Infrared Spectroscopy to Monitoring the Bioprocesses

Qiu Jiang Ye Qin Zhang Siliang

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science & Technology, Shanghai 200237)

**Abstract** On-line measuring concentrations of chemical components is of fundamental importance in many bioprocesses. However, the on-line measurement is very difficult to make for many analytical techniques because of the requiring sterilization of probes and the complexity of the bioprocesses. Rapid advances in instrumentation and data processing techniques in recent years have allowed infrared spectroscopy to be increasingly applied to *in situ* or on-line monitoring bioprocesses. The basic principle and recent developments of infrared process analysis are introduced. In addition, the application of infrared spectroscopy in monitoring bioprocesses are reviewed.

**Key words** Fourier transform infrared (FTIR), attenuated total reflection (ATR), process analysis, bioprocesses, fermentation