



天津科技大学学报

Journal of Tianjin University of Science & Technology

ISSN 1672-6510, CN 12-1355/N

## 《天津科技大学学报》网络首发论文

题目： 基于在线近红外分析技术的 1, 5-戊二胺精准制备体系  
作者： 李丹宁, 马翠华, 陈浩, 周丽, 田康明  
DOI: 10.13364/j.issn.1672-6510.20250081  
收稿日期: 2025-04-25  
网络首发日期: 2026-02-09  
引用格式: 李丹宁, 马翠华, 陈浩, 周丽, 田康明. 基于在线近红外分析技术的 1, 5-戊二胺精准制备体系[J/OL]. 天津科技大学学报.  
<https://doi.org/10.13364/j.issn.1672-6510.20250081>



**网络首发:** 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

**出版确认:** 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。



DOI: 10.13364/j.issn.1672-6510.20250081

# 基于在线近红外分析技术的 1,5-戊二胺精准制备体系

李丹宁<sup>1</sup>, 马翠华<sup>2</sup>, 陈浩<sup>3</sup>, 周丽<sup>4</sup>, 田康明<sup>1</sup>

(1. 天津科技大学化工与材料学院, 天津 300457; 2. 博兴县综合检验检测中心, 博兴 256500; 3. 青岛高能合诚生物科技有限公司, 青岛 266114; 4. 江南大学生物工程学院, 无锡 214122)

**摘要:** 生物基聚酰胺前体戊二胺在农业、食品、医药和工业领域均有广泛应用。为了降低戊二胺的生产成本, 提高戊二胺的生产效率, 实现对戊二胺发酵过程中重要参数的在线监测, 建立精准制备戊二胺的生产体系, 基于非接触式近红外 (near infrared, NIR) 在线分析技术, 开发了精准的实时在线监测系统。以大肠杆菌生产 1,5-戊二胺为例, 建立了发酵过程中菌体浓度、甘油、赖氨酸、1,5-戊二胺浓度的近红外光谱预测模型, 最后结果显示菌体量、甘油、赖氨酸、戊二胺指标的  $R^2$  均在 0.960 以上, 相关性较好, 并进行了准确性验证, 结果表明模型预测趋势符合实测结果, 且优化之后的工艺, 赖氨酸的转化速率比优化之前高了 3.5 倍 (22.96/6.56)。通过发酵验证, 将近红外在线监测应用在戊二胺连续生产过程中, 建立了连续转化制备戊二胺的工艺, 有望显著增加连续转化的循环次数, 更好地降低生产戊二胺的成本, 提高生产效率。

**关键词:** 近红外在线分析技术; 发酵过程控制; 菌体沉降; 1,5-戊二胺生产; 连续转化

中图分类号: Q815

文献标志码: A

## Precise Preparation System of 1,5-Diaminopentane was Established Based on Near Infrared Online Analysis Technology

LI Danning<sup>1</sup>, MA Cuihua<sup>2</sup>, CHEN Hao<sup>3</sup>, ZHOU Li<sup>4</sup>, TIAN Kangming<sup>1</sup>

(1. College of Chemical Engineering and Materials, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China;

2. Boxing County Comprehensive Inspection and Testing Center, Boxing 256500, China;

3. Qingdao Hi-Energy and Co-Integrity Biotechnology, Qingdao 266114, China;

4. School of Biological Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** Biobased polyamide precursor 1,5-diaminopentane is widely used in agriculture, food, medicine and industry. In order to reduce the production cost of 1,5-diaminopentane, and improve the production efficiency of 1,5-diaminopentane, realize online monitoring of important parameters in the fermentation process of 1,5-diaminopentane, and establish a production system for accurate preparation of 1,5-diaminopentane, this study developed an accurate real-time online monitoring system based on non-contact near infrared (NIR) online analysis technology. Taking the production of 1,5-diaminopentane by *E. coli* as an example, a near-infrared spectroscopy prediction model for bacterial concentration, glycerol, lysine and 1,5-diaminopentane during fermentation was established. The final results showed that the  $R^2$  of the four indexes of bacterial weight, glycerol, lysine and 1,5-diaminopentane were all above 0.960, indicating a good correlation, and the accuracy was verified. The results showed that the predicted trend of the model was consistent with the measured results, and the conversion rate of lysine after optimization was 3.5 times higher than that before optimization (22.96/6.56). Through fermentation verification, near infrared online monitoring was applied in the continuous production process of 1,5-diaminopentane, and the process of continuous conversion to prepare 1,5-diaminopentane was established, which is

收稿日期: 2025-04-25; 修回日期: 2025-08-10

基金项目: 广西科技重大专项项目 (桂科 AA24206048); 天津市科技计划项目 (19YFZCSN00560)

作者简介: 李丹宁 (2000—), 女, 安徽池州人, 硕士研究生; 通信作者: 田康明, 副教授, jinanktm@163.com

expected to significantly increase the number of cycles of continuous conversion, better reduce the cost of production of 1,5-diaminopentane, and increase the production efficiency.

**Key words:** near infrared online analysis technology; fermentation process control; bacterial settlement; 1,5-diaminopentane production; continuous transformation

1,5-戊二胺 (1,5-diaminopentane), 又名尸胺 (cadaverine)。在农业<sup>[1]</sup>、食品<sup>[2]</sup>、医药<sup>[3]</sup>和工业领域均有广泛应用, 尤其在工业领域, 可以和多种二元羧酸聚合制备性能优良的生物基聚酰胺 PA5X, 如 PA54<sup>[4]</sup>、PA56<sup>[5]</sup>、PA510<sup>[6]</sup>。聚酰胺作为多用途材料广泛应用于全球各个领域<sup>[7]</sup>, 对戊二胺进行大规模工业化生产十分重要。现在常用生产戊二胺的生物合成法有微生物法和全细胞转化法<sup>[8]</sup>。微生物法合成是指宿主菌株利用葡萄糖、纤维二糖等碳源合成 1,5-戊二胺, 常涉及到工程改造微生物如谷氨酸棒状杆菌 (*C. glutamicum*) 和大肠杆菌 (*E. coli*)。除了葡萄糖、纤维二糖等碳源外, 该方法还可以利用甘油、甲醇、甲烷等碳源。以甘油为唯一碳源, 构建由谷氨酸棒状杆菌 cgl-FDK 和大肠杆菌 BL-ABST-Spy 组成的微生物联合体, 可重新合成尸胺, 最终尸胺产量达到 9.3 g/L<sup>[9]</sup>。全细胞催化是指以 L-赖氨酸为底物, 利用表达赖氨酸脱羧酶的工程细胞催化生成 1,5-戊二胺<sup>[10]</sup>。Kim 等<sup>[11]</sup>从 *E. coli* MG1655 中克隆得到赖氨酸脱羧酶基因 *CadA*, 并构建了 *CadA* 过表达菌株, 通过系统优化全细胞催化体系的工艺参数, 发现磷酸吡哆醛 (PLP) 作为辅酶对催化效率具有决定性影响。以戊二胺耐受性为筛选指标, 从 *E. coli* W3110 出发构建高耐受性宿主菌, 并通过强化 *CadA* 表达获得重组菌株 JW, 最终戊二胺产量、转化率和生产强度分别达到 221 g/L、86% 和 55.30 g/(L h)<sup>[12]</sup>。Gao 等<sup>[13]</sup>采用理性设计和工程改造获得一种 pH 稳定的 *EcCadAV12C/D41C* 突变体, 并将其应用于 M3 菌株中, 最终通过分批补料的全细胞催化方法, 成功生产高达 418 g/L 的戊二胺。全细胞催化法可将生长阶段和产品生产分离开来, 还可根据培养基和反应类型进行系统优化, 提高生物转化的效率<sup>[14-15]</sup>, 而且可保护酶不受恶劣环境的影响, 有助于酶的重复利用, 全细胞催化的制备条件简单, 避免了传统催化剂的局限性<sup>[16]</sup>。

微生物的发酵是一个动态变化且复杂的过程, 在实际的生物发酵过程中, 能在线检测和控制的参数有温度、pH、压力、溶解氧等。但是对于发酵过程很重要, 且需要及时反馈的参数 (如底物浓度和产物浓度) 大多数是取样后进行测定, 这种测定方

式存在明显的滞后性, 使对关键参数及时有效控制变得极为困难<sup>[17]</sup>。通过实时控制环境参数, 可以灵活调节细胞的代谢状态, 获得高滴度、高产率和高产量的产品<sup>[18-19]</sup>。因此, 生物发酵过程中的工艺参数检测是发酵优化的基础<sup>[20]</sup>。随着传感技术的发展, 许多物理、化学和生理参数的在线测量成为可能。近红外谱分析技术作为一种先进的分析方法, 其原理基于物质对近红外的吸收特性。近红外 (near infrared, NIR) 是介于可见光 (visible light) 和中红外光 (mid infrared) 之间的电磁波, 波长范围通常在 780~2526 nm 之间。当近红外照射到样品上时, 样品中的分子会吸收特定波长的近红外, 这是因为分子中的化学键, 如 C—H、O—H、N—H 等, 在近红外的作用下会发生振动和转动能级的跃迁。不同的化学键具有不同的振动频率, 因此会吸收不同波长的近红外, 从而产生具有特征性的近红外吸收光谱<sup>[21]</sup>。近红外在线分析技术是一种准确、在线、无创的技术, 不需要复杂的样品制备。因此, 它已广泛应用于食品、医药的定量和定性分析<sup>[22]</sup>。Chen<sup>[23]</sup>等基于偏最小二乘回归 (PLS) 和内部交叉验证方法, 采用近红外在线分析仪建立了乳酸、槐油脂和葡萄糖酸钠发酵过程的预测模型, 证实了近红外可以实现不同发酵体系下工艺多参数的实时在线检测。

全细胞催化法合成 1,5-戊二胺的整个过程分为全细胞的制备和赖氨酸的转化, 常采用发酵罐进行生产, 发酵罐是一种常用的反应器, 温度、pH、溶氧等可通过相应的电极进行控制, 像底物产物浓度等难以及时测量与反馈的关键指标则需要通过近红外在线分析技术实现, 进而实现发酵过程的智能化、高效化控制。大肠杆菌 GLK09 通过删除脂多糖相关基因和细胞外膜相关基因, 使菌株在转化完成之后, 菌体可以发生自沉降, 为后续连续转化和 1,5-戊二胺的提取纯化提供了便捷, 且多次连续转化过程之后, 戊二胺可积累至较高水平。本研究利用近红外谱技术, 对 1,5-戊二胺发酵过程中的菌体量、甘油、赖氨酸、戊二胺浓度建立全面、精准的在线分析模型, 并对模型进行优化和验证, 提高模型的预测准确性和稳定性, 实现对 1,5-戊二胺发酵过程的实时、精确监测与控制。

## 1 材料与方

### 1.1 菌株

大肠杆菌(*E. coli*)GLK09 为本实验室保藏菌株,可通过升温诱导表达赖氨酸脱羧酶,用于一步法制备1,5-戊二胺。

### 1.2 试剂与培养基

酵母提取物、蛋白胨购自 Oxoid 公司; 茛三酮,北京沃凯生物科技有限公司; 常规化学品均为分析纯, 国药集团化学试剂有限公司。

LB 培养基<sup>[24]</sup>: 0.5% 酵母提取物、1% 胰蛋白胨、1% NaCl, 固体培养基需加入 0.24% 琼脂粉, 121 °C 灭菌 20 min。

微量元素母液<sup>[25]</sup> (g/L): FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 2, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2.20, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 1, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.50, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.10, Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O 0.02, 115 °C 灭菌 20 min 备用。

R/2 培养基<sup>[25]</sup>: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g/L, 柠檬酸 0.85 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6.75 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 g/L, 接种前加入 0.07% MgSO<sub>4</sub> 溶液(母液 140 g/L)、甘油(50 mL 种子液添加量为 1%; 5 L 发酵罐和 30 L 发酵罐添加量为 3%)和 0.1% 微量元素母液; 115 °C 灭菌 20 min。

柠檬酸缓冲液: 氢氧化钠 16.80 g/L, 柠檬酸 42.40 g/L, 并用 5 mol/L 盐酸调 pH=1.30。

10% 茛三酮溶液: 茛三酮 10 g/L, 二水氯化铜 13.40 g/L, 柠檬酸缓冲液 125 mL/L, 乙二醇甲醚 375 mL/L, 室温下棕色瓶保存。

### 1.3 仪器

ZXSD-B1160 型生化培养箱, 上海智城分析仪器制造有限公司; CLD-20X 型恒温摇床, 江苏新春兰科学仪器有限公司; TG-16 型离心机, 湖南沪康离心机有限公司; WMC-9005A 型 5 L 生物反应器和 30 L 生物反应器, 上海万木春生物工程有限公司; T2 型紫外分光光度计, 上海精科实业有限公司; 1260 型高效液相色谱仪, 安捷伦科技有限公司; DA-5G/7G 标准型近红外在线分析仪, 瑞谱分析仪器(天津)有限公司。

### 1.4 实验方法

#### 1.4.1 种子培养

取保藏于-70 °C 的甘油管, 接种涂布于 LB 平板, 37 °C 培养 24 h。单菌落接种于 LB 液体培养基, 菌体在 37 °C 条件下好氧培养(200 r/min) 15~17 h, 采用 LB 培养基, 250 mL 三角瓶中装液量 50 mL。菌体量(用 600 nm 处吸光度 A<sub>600</sub> 表示)达到 3.0~3.5 时, 8000 r/min 离心 5 min, 收集菌体并用 R/2 培养基重悬菌体。

R/2 培养基在 250 mL 三角瓶中装液量为 50 mL, 菌体在 37 °C 条件下好氧培养(200 r/min) 15~17 h, 接种量控制初始 A<sub>600</sub> 为 0.05。

菌体量(A<sub>600</sub>)达到 4.5~5.5 时, 接种至 5 L 发酵罐。R/2 培养基在 5 L 反应器中的起始装液量为 3 L, 37 °C 条件下好氧培养 9~11 h, 接种量控制初始 A<sub>600</sub> 为 0.3。

#### 1.4.2 30 L 发酵罐工艺

5 L 发酵罐菌体量(A<sub>600</sub>)达到 18~20 时, 接种至 30 L 发酵罐。R/2 培养基在 30 L 反应器中的起始装液量为 20 L, 接种量控制初始 A<sub>600</sub> 为 0.5。37 °C 条件下好氧培养 9~11 h 之后, 待菌体量(A<sub>600</sub>)达到 13~15 时, 升温至 40 °C, 诱导产酶 4 h, 加入赖氨酸盐酸盐进入转化阶段。

#### 1.4.3 连续转化工艺

转化结束之后(当赖氨酸含量为 0.6 g/L 以下时转化完成), 菌体自沉降, 回收菌体进入下一批次转化阶段(工艺流程图如图 1 所示)。

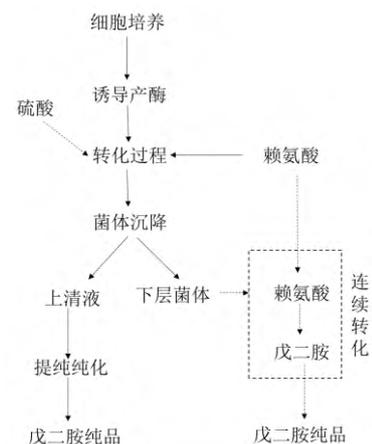


图 1 连续转化流程图

Fig. 1 Flowchart of continuous transformation

### 1.5 测定方法

#### 1.5.1 菌体量的测定

吸取菌液置于具塞试管中, 用去离子水稀释到合适倍数。以水为空白, 测定 A<sub>600</sub>。A<sub>600</sub>=1.0 相当于 0.38 g/L 细胞干质量。

#### 1.5.2 甘油的测定

用高效液相色谱法<sup>[26]</sup>测定发酵过程中甘油的含量。发酵液 12000 r/min 离心 5 min 后, 取上清经 5 mmol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 酸化处理后, 再次离心取上清, 1:1 加入 10% 三氯乙酸后, 在 4 °C 冰箱中沉淀 4 h, 离心后将上清液用 0.22 μm 有机微孔滤膜过滤, 用于高效液相色谱分析。

色谱条件: Aminex®HPX-87H 型色谱柱, 300 mm×7.8 mm (catalog#1250140, BIORAD), 柱温 65 °C, 流动相为 0.05 mmol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 流量 0.6

mL/min, 检测器为折射率检测器 RID, 进样量 10  $\mu$ L。

### 1.5.3 赖氨酸的测定

用茚三酮法测定发酵过程中赖氨酸的含量<sup>[27]</sup>。发酵液 12000 r/min 离心 5 min 后, 稀释适当倍数, 取 1 mL 上清液加到具塞刻度试管中 (空白对照试管中加 1 mL 水); 在试管中加入 1 mL 10% 茚三酮溶液, 混匀, 盖上塞子; 沸水浴 10 min 后放入凉水中, 冷却后加入 8 mL 超纯水补齐 10 mL 体系, 在紫外 475 nm 下检测吸光度。吸光度数值代入标准曲线计算得到赖氨酸含量。

### 1.5.4 戊二胺的测定

用高效液相色谱法测定发酵过程中戊二胺的含量<sup>[11]</sup>。发酵液 12000 r/min 离心 5 min, 取上清液进行柱前衍生化处理。衍生化体系为: 300  $\mu$ L 硼酸盐缓冲液 (pH 9.0, 50 mmol/L), 100  $\mu$ L 甲醇, 47  $\mu$ L 双蒸水, 3  $\mu$ L 乙氧基甲叉丙二酸二乙酯 (DEEMM), 50  $\mu$ L 样品, 70  $^{\circ}$ C 反应 2 h, 用 0.22  $\mu$ m 有机系膜过滤后用于高效液相色谱分析。

色谱条件: Diamonsil C18 (2) 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm $\times$ 5  $\mu$ m), 柱温 35  $^{\circ}$ C, 流动相为 75% 乙腈溶液, 流量 0.7 mL/min, 检测器为折射率检测器 UVD, 检测波长 254 nm, 进样量 10  $\mu$ L。

### 1.5.5 转化率和转化速率的测定

1,5-戊二胺的转化率以及赖氨酸的转化速率, 计算公式如式 (1) 和式 (2) 所示。

$$R_c = \frac{a}{b} \times 100\% \quad (1)$$

式中:  $R_c$  为转化率, %;  $a$  为 1,5-戊二胺生成量, g/L;  $b$  为赖氨酸减少量, g/L。

$$v = (d - c) / t \quad (2)$$

式中:  $v$  为转化速率, g/(L $\cdot$ h);  $d$  为转化结束时赖氨酸含量, g/L;  $c$  为转化初始时赖氨酸含量, g/L;  $t$  为转化时长, h。

### 1.5.6 沉降率的测定

菌株沉降率测定方法<sup>[28]</sup>: 转化完成 (赖氨酸含量为 0.60 g/L 以下) 之后, 取上述菌体在 50 mL 离心管内加入 40 mL 菌液, 在 4 $^{\circ}$ C 冰箱内静置, 观察菌体沉降情况, 通过量筒测定体积, 按照式 (3) 计算菌株的沉降率。

$$c_1 = \frac{V_1 - V_2}{V_1} \times 100\% \quad (3)$$

式中:  $c_1$  为沉降率, %;  $V_1$  为沉降前菌液体积, mL;

$V_2$  为沉降后下层菌液体积, mL。

## 1.6 近红外在线分析

### 1.6.1 仪器安装与检测原理

近红外生物过程在线分析仪的非接触式探测器安装在 30 L 生物反应器侧面 20~30 cm 处, 探测器与发酵罐视窗平行 (图 2)。采集近红外光谱, 选择非接触漫反射模式作为采样方法, 记录在线近红外数据。在进行光谱采集前, 将仪器开机预热 2 h 以上。光谱采集条件: 分辨率 3.125 nm, 扫描次数 300, 扫描范围 950~1650 nm, 温度 25  $^{\circ}$ C, 相对湿度 50%~60%。按照上述条件, 对不同时间段光谱进行采集。在发酵过程中, 仪器发出的近红外穿过发酵罐的玻璃视窗, 照射发酵液, 经过多次反射或折射, 设备重新吸收返回的光谱, 透射出来的近红外携带有机物组分和结构的信息。

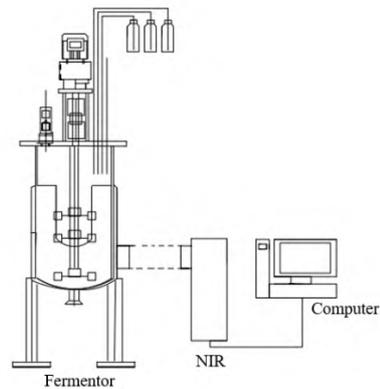


图 2 近红外在线检测示意图

## Fig. 2 Schematic diagram of near infrared online detection

### 1.6.2 近红外检测系统组成

该近红外检测系统主要由硬件设备、化学计量软件 (The Unscrambler X 软件对采集到的原始光谱进行求导、标准化和去趋势处理后, 通过解析物质成分含量与复合光谱信息中的吸收对应关系, 完成模型建立) 和数学模型三部分构成。其中, 系统的光谱区域选取为 950~1650 nm, 同时去除了水汽的干扰波长范围 (1350~1410 nm), 并且对异常样品进行了剔除处理。所有接收到的光谱信号结果存储并显示在与之连接的计算机上。

### 1.6.3 光谱数据处理与分析

在发酵过程中, 实时收集发酵液里各成分的近红外谱信号。使用多元变量分析软件对收集的近红外谱进行预处理, 最后采用偏最小二乘法 (PLS) 对近红外谱进行建模分析和浓度预测<sup>[29]</sup>。

### 1.6.4 近红外谱模拟

为消除环境条件变化对光谱测量的干扰,采用求导、标准正态变量(SNV)、去趋势算法等方法对光谱数据进行预处理,以提高检测精度和可靠性<sup>[23]</sup>。

将获取的光谱数据导入 The Unscrambler X 软件中,依次对数据进行求导、标准正态变量(SNV)、去趋势的处理(选择软件中对应选项),再选择 PLS 对处理后的近红外谱数据进行模型构建和浓度预测,模型预测的数据和实测数据对比的结果反应模型的预测精度。

数据预处理之后,为评价近红外谱对发酵工艺参数的预测功能,采用预测集的均方根误差(RMSEP,用符号  $E_{RMSEP}$  表示)和相关系数( $R^2$ )进行预测,计算公式如式(4)、式(5)所示。

$$E_{RMSEP} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2} \quad (4)$$

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_m)^2} \quad (5)$$

其中:  $y_i$  为样本  $i$  的参考值,  $\hat{y}_i$  为样本  $i$  的预测值,  $\hat{y}_m$  为待预测的样本均值。采用 RMSEP 评价预测值与参考值的偏差,  $R^2$  表示预测值与参考值的相关性。RMSEP 越小,  $R^2$  越接近 1, 说明近红外模型的精度越高<sup>[30]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的沉降特性

菌株沉降结果如图 3 所示,菌体在静置 5 h 后,菌体和上清液界线分明,菌体出现了明显的沉降。菌株沉降特性测定结果如图 4 所示,菌体在静置 2 h 后沉降率为 72%,静置 5 h 后沉降率为 81%,证实该菌株在转化完成之后菌体可以完成沉降。



图 3 菌株沉降结果

Fig. 3 Results of strain sedimentation

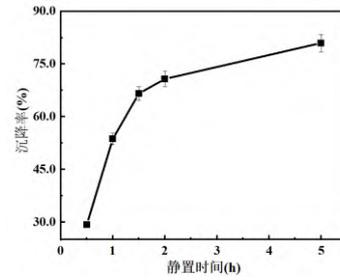


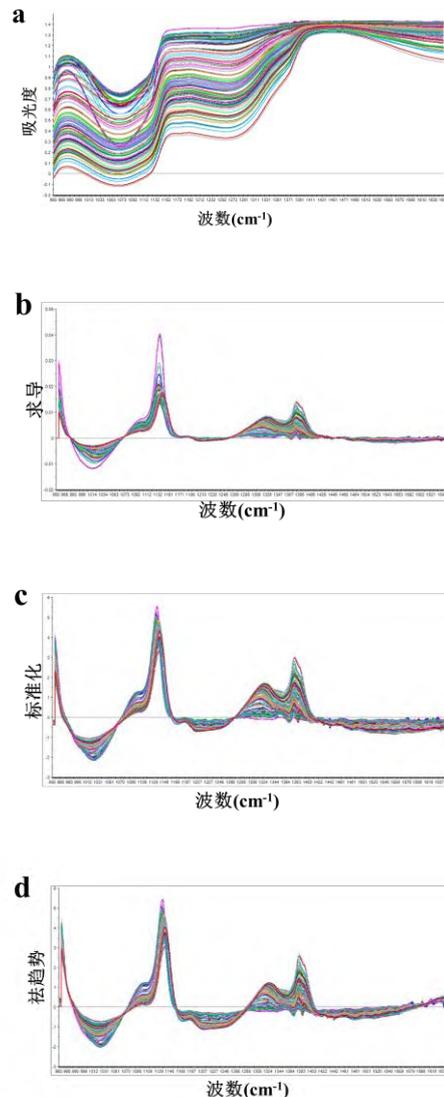
图 4 菌株沉降特性测定结果

Fig. 4 Measurement results of bacterial sedimentation characteristics

### 2.2 模型建立

#### 2.2.1 光谱预处理结果

为了增强光谱特征,需要对原始光谱进行预处理用于构建校准模型。图 5 为原始光谱和三条经过以上处理的光谱。求导、SNV、去趋势可以消除与浓度变化相关的基线漂移,如图 5 (b) — (d) 所示。



注: a 为原始光谱; b 为经过求导处理的光谱; c 为经过求导、标准

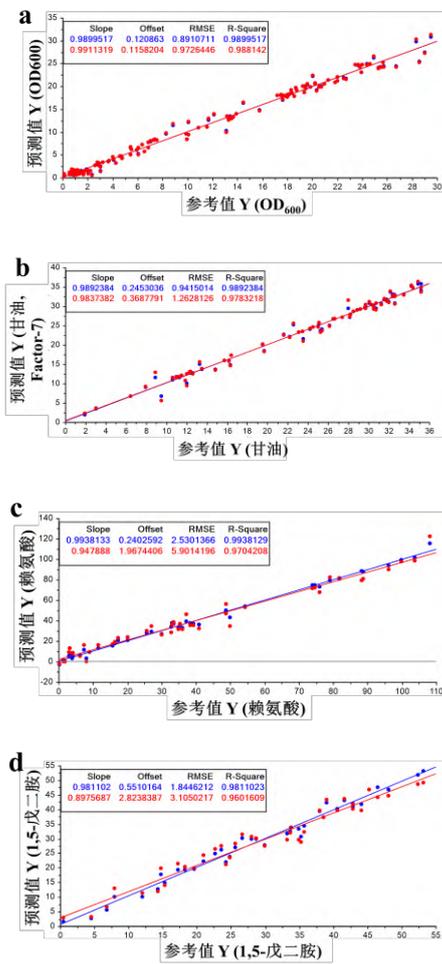
化处理后的光谱; d 为经过求导、标准化、去趋势处理后的光谱。

图 5 近红外谱处理

Fig. 5 Near infrared spectrum processing

2.2.2 模型建立结果

数据预处理之后,运用 PLS 法对近红外谱进行建模,结果如图 6 所示。基于图 6 中近红外模型分析,各关键指标模型拟合效果显著:菌体量模型  $R^2$  为 0.99,甘油模型  $R^2$  为 0.98,赖氨酸模型  $R^2$  为 0.97,1,5-戊二胺模型  $R^2$  为 0.96。模型  $R^2$  均在 0.96 以上,接近 1,且散点紧密围绕拟合线分布,表明近红外模型对发酵过程中的菌体量、甘油、赖氨酸及 1,5-戊二胺具有高拟合度与可靠预测能力,可有效用于相关指标的快速分析预测。



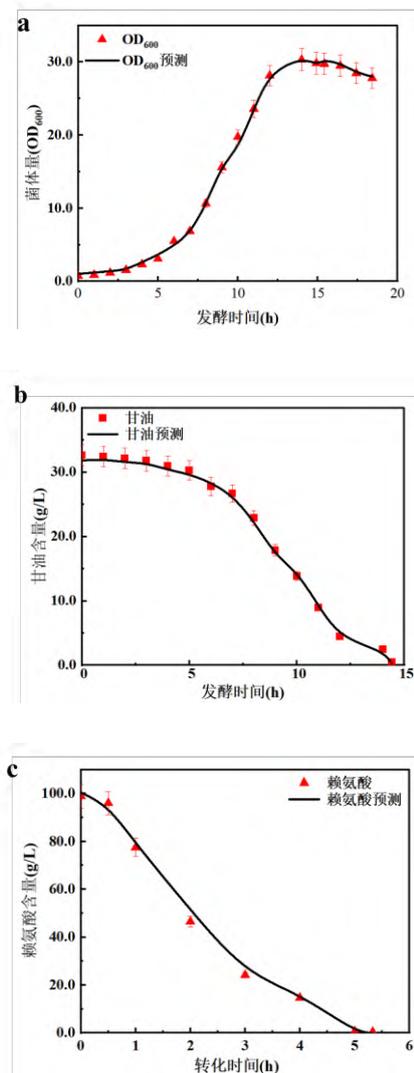
注: a 为菌体量 ( $OD_{600}$ ) 的模型; b 为甘油的模型; c 为赖氨酸的模型; d 为 1,5-戊二胺的模型。

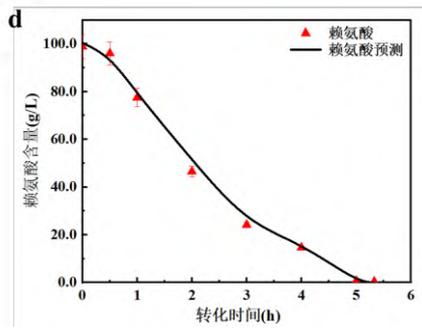
图 6 戊二胺制备过程中关键指标的近红外模型建立

Fig. 6 Establishment of near infrared model of key indexes of preparation of 1,5-diaminopentane

2.2.3 预测和实测对比结果

将预测模型导入软件,测定不同时间点的各成分的含量,预测结果与实测结果的对比情况如图 7 所示。由图 7 可知,甘油、 $OD_{600}$ 、赖氨酸和 1,5-戊二胺在不同时间节点的实测值与预测相符程度,这 4 个指标的预测值与实测值趋势吻合。由此可见,对应预测模型对发酵过程中关键指标具备有效预测能力,实测与预测的一致性验证了模型的可靠性,可用于戊二胺生产中相关指标的分析与预测。最终构建的近红外预测模型对发酵过程参数的检测具有较好的预测精度,在转化时间 5.33 h 内,98.85 g/L 的赖氨酸转化生成了 56.08 g/L 的 1,5-戊二胺,转化率为 56.73%,转化速率为 18.55 g/(L·h)。



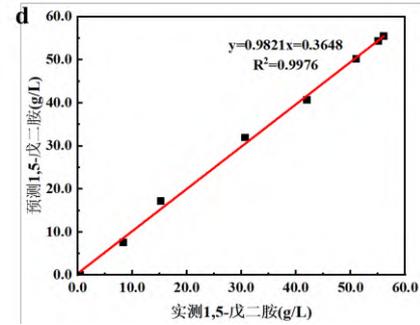
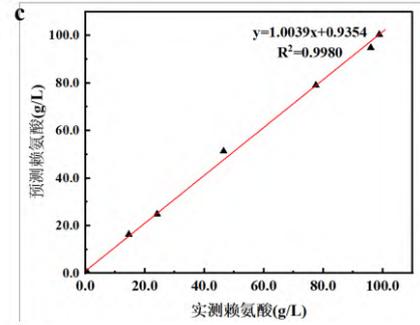
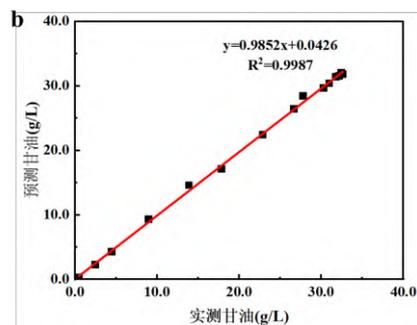
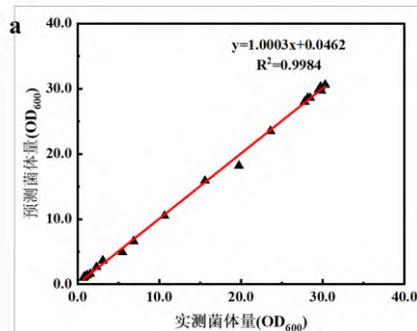


注: a 为菌体量 ( $OD_{600}$ ); b 为甘油; c 为赖氨酸; d 为 1,5-戊二胺。

图 7 预测结果和实测结果对比

Fig. 7 Comparison between predicted results and measured results.

在图 7 的基础上, 以实测菌体量 ( $OD_{600}$ )、甘油、赖氨酸、1,5-戊二胺含量为横坐标, 以预测菌体量 ( $OD_{600}$ )、甘油、赖氨酸、1,5-戊二胺含量为纵坐标, 绘制拟合程度曲线, 结果如图 8 所示。图 8 中的红色线为测定值与近红外预测模型预测值之间的最优拟合线, 由近红外模型预测出的数值, 越接近最优拟合线, 说明模型性能越好。图 8 呈现了菌体量 ( $OD_{600}$ )、甘油、赖氨酸、1,5-戊二胺在不同时间节点数据的拟合程度, 模型的拟合  $R^2$  均为 0.99, 接近 1, 且由近红外预测模型得到的预测值, 基本落在最优拟合线上, 模型性能良好。



注: a 为预测  $OD_{600}$  和实测  $OD_{600}$  拟合程度; b 为预测甘油和实测甘油拟合程度; c 为预测赖氨酸和实测赖氨酸拟合程度; d 为预测 1,5-戊二胺和实测 1,5-戊二胺拟合程度。

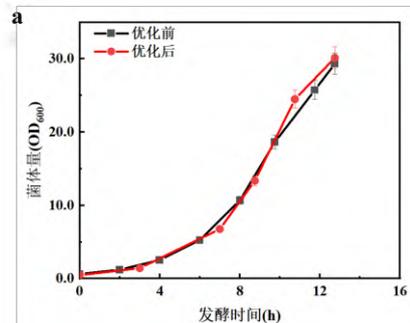
图 8 预测结果和实测结果拟合程度图

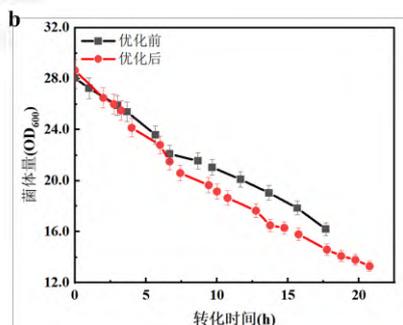
Fig. 8 Degree of fitting between the predicted results and the measured results

### 2.3 近红外模型在连续转化生产戊二胺中的应用

将以上建立的模型运用到连续转化生产戊二胺的工艺中, 工艺优化前后的结果如图 9、图 10 和表 1 所示, 图 9 为菌体生长阶段  $OD_{600}$  变化和转化阶段  $OD_{600}$  的变化情况, 图 10 分别为工艺优化前后, 赖氨酸和 1,5-戊二胺含量的变化情况, 表 1 为发酵过程中数据的对比。

由图 9 可知, 在菌体生长阶段, 菌株生长曲线几近重合; 转化阶段, 优化前后  $OD_{600}$  下降趋势一致,  $OD_{600}$  不同这是由于赖氨酸添加量差异导致的。



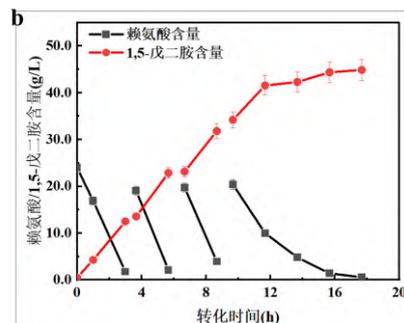
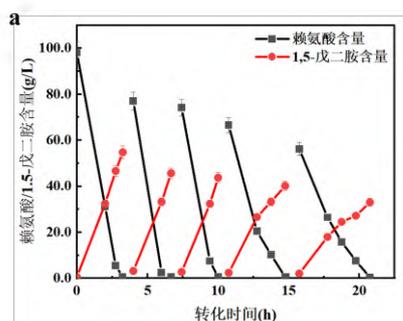


注: a 为菌体生长阶段  $OD_{600}$  变化; b 为转化阶段  $OD_{600}$  变化。

图 9 菌体生长阶段和转化阶段  $OD_{600}$  变化

Fig. 9 Changes of  $OD_{600}$  in the growth stage and transformation stage of bacteria.

由图 10 (a) 可知, 优化前 4 次转化过程中往发酵体系里均加入 60 g 的赖氨酸, 全程转化了 17.67 h, 4 次转化一共累计了 44.88 g/L 的戊二胺产物; 图 10 (b) 为结合了菌株沉降属性的连续转化工艺, 5 次均加入 240 g 的赖氨酸, 全程转化了 20.75 h, 平均每次累计了 43.50 g/L 的戊二胺产物。



注: a 为优化前转化工艺; b 为优化后的连续转化工艺。

图 10 连续转化工艺优化前后赖氨酸和 1,5-戊二胺含量变化对比

Fig. 10 Comparison of lysine and 1,5-diaminopentane contents before and after continuous transformation process optimization.

近红外模型应用之前, 开始诱导产酶的  $A_{600}$  为  $18.65 \pm 0.47$ , 已经过了诱导产酶的节点 (诱导产酶节点为  $A_{600}=15$ ), 应用之后, 诱导产酶时的  $A_{600}$  为  $14.36 \pm 0.36$ , 是通过近红外在线分析及及时的预测  $A_{600}$  的变化, 从而开启诱导产酶阶段。由表 1 可知, 应用模型之后, 近红外在线分析可以预测赖氨酸的含量, 5 次连续转化结束时赖氨酸残留量为 0.59、0.54、0.50、0.55、0.47 g/L, 当赖氨酸的含量达到了 0.6 g/L 以下, 单批次转化结束, 菌体沉降后回收菌体, 进入下一批转化; 工艺优化前, 4 次转化赖氨酸的平均转化速率为 6.56g/(L·h), 优化后, 5 次连续转化赖氨酸的平均转化速率为 22.96g/(L·h), 工艺优化之后, 赖氨酸的转化速率比优化之前高了 3.5 倍 (22.96/6.56)。

表 1 连续转化工艺优化前后发酵数据对比

Tab. 1 Comparison of fermentation data before and after continuous transformation process optimization

发酵数据	转化赖氨酸残留量/(g/L)		转化戊二胺生成量/(g/L)		转化率/%		转化速率/(g/(L·h))	
	优化前	优化后	优化前	优化后	优化前	优化后	优化前	优化后
第 1 次	1.76±0.09	0.59±0.03	12.51±0.63	54.81±1.37	54.05±1.35	55.69±1.39	7.40±0.37	29.97±0.75
第 2 次/(g/L)	2.13±0.11	0.54±0.03	22.88±1.14	45.68±1.14	54.94±1.37	55.55±1.39	8.46±0.42	28.64±0.72
第 3 次/(g/L)	3.94±0.20	0.50±0.03	31.80±1.59	43.76±1.10	54.53±1.36	55.64±1.39	7.91±0.40	28.55±0.71
第 4 次/(g/L)	0.58±0.03	0.55±0.03	44.88±1.12	40.18±1.00	53.81±1.35	55.69±1.39	2.48±0.22	16.50±0.41
第 5 次/(g/L)	—	0.47±0.02	—	33.05±0.83	—	55.47±1.39	—	11.15±0.56

### 3 结论

通过实验研究, 近红外模型的  $R^2$  均达到 0.960 以上, 具有良好的可预测性和可靠性, 将模型运用于戊二胺连续转化的工艺中, 成功搭建了精准制备

戊二胺的生产工艺。证实了近红外在线检测技术可以应用于戊二胺的生产过程中, 结合菌株的沉降属性, 并将近红外模型应用于连续转化过程中, 对于连续转化生产戊二胺有明显的指导意义。

本研究通过结合菌体沉降以及近红外在线分析技术建立了一套 1,5-戊二胺精准制备工艺, 该工艺通

过分离菌体与上清液实现连续转化生成1,5-戊二胺,但是对于整体的连续转化来说,沉降时间还是较长,且连续转化次数太少,在未来的生产实践中,通过深入剖析菌株的沉降特性以及优化赖氨酸脱羧酶的稳定性,并充分利用近红外在线检测技术,有望显著增加连续转化的循环次数。这一技术不仅能有效削减戊二胺的生产成本,还将大幅提升整体生产效率,为戊二胺的工业化生产开拓更广阔的发展空间。

#### 参考文献:

- [1] GIBBS N M, SU S H, LOPEZ-NIEVES S, et al. Cadaverine regulates biotin synthesis to modulate primary root growth in *Arabidopsis*[J]. The plant journal, 2021, 107(5): 1283-1298.
- [2] COSTA C A B, GRAZHDAN D, FIUTOWSKI J, et al. Meat and fish freshness evaluation by functionalized cantilever-based biosensors[J]. Microsystem technologies, 2020, 26(3): 867-871.
- [3] JANCEWICZ A L, GIBBS N M, MASSON P H. Cadaverine's functional role in plant development and environmental response[J]. Frontiers in plant science, 2016, 7: 870.
- [4] LEE P C, LEE S Y, HONG S H, et al. Isolation and characterization of a new succinic acid-producing bacterium, *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E, from bovine rumen[J]. Apply microbiology biotechnology, 2002, 58(5): 663-668.
- [5] DRATHS K M, FROST J W. Environmentally compatible synthesis of adipic acid from *D*-glucose[J]. Journal of the American chemical society, 1994, 116(1): 399-400.
- [6] OGUNNIYI D S. Castor oil: a vital industrial raw material[J]. Bioresource technology, 2006, 97(9): 1086-1091.
- [7] YANG P P, LI X J, LIU H D, et al. Thermodynamics, crystal structure, and characterization of bio-based nylon 54 monomer[J]. CrystEngComm, 2019, 21(46): 7069-7077.
- [8] 米佳黎. 生物转化及混菌发酵合成1,5-戊二胺[D]. 天津: 天津大学, 2021.
- [9] LIU S, MI J, SONG K, et al. Engineering synthetic microbial consortium for cadaverine biosynthesis from glycerol[J]. Biotechnology letters, 2022, 44(12): 1389-1400.
- [10] MI J L, LIU S M, QI H S, et al. Cellular engineering and biocatalysis strategies toward sustainable cadaverine production: state of the art and perspectives[J]. ACS Sustainable chemistry & engineering, 2021, 9(3): 1061-1072.
- [11] KIM H J, KIM Y H, SHIN J H, et al. Optimization of direct lysine decarboxylase biotransformation for cadaverine production with whole-cell biocatalysts at high lysine concentration[J]. Journal of microbiology and biotechnology, 2015, 25(7): 1108-1113.
- [12] TING W W, HUANG C Y, WU P Y, et al. Whole-cell biocatalyst for cadaverine production using stable, constitutive and high expression of lysine decarboxylase in recombinant *Escherichia coli* W3110[J]. Enzyme and microbial technology, 2021, 148: 109811.
- [13] GAO S Y, ZHANG A L, MA D, et al. Enhancing pH stability of lysine decarboxylase via rational engineering and its application in cadaverine industrial production[J]. Biochemical engineering journal, 2022, 186: 108548.
- [14] LIN B X, TAO Y. Whole-cell biocatalysts by design[J]. Microbial cell factories, 2017, 16(1): 106-110.
- [15] DOMACH M M. Perspectives and prospects for whole cell catalysis[J]. Catalysis letters, 2015, 145(1): 346-359.
- [16] MA W C, CAO W J, ZHANG H, et al. Enhanced cadaverine production from *L*-lysine using recombinant *Escherichia coli* co-overexpressing CadA and CadB[J]. Biotechnology letters, 2015, 37(4): 799-806.
- [17] RATHORE A S, MISHRA S, NIKITA S, et al. Bioprocess control: current progress and future perspectives[J]. Life, 2021, 11(6): 557-578.
- [18] 潘妍如. 基于代谢网络的发酵过程模型化研究[D]. 无锡: 江南大学, 2020.
- [19] 邓宇曦. 大肠杆菌发酵过程多目标优化控制[D]. 济南: 山东大学, 2021.
- [20] WANG X. Strategy for improving *L*-isoleucine production efficiency in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Apply microbiology biotechnology, 2019, 103(5): 2101-2111.
- [21] AREFI A, STURM B, BABOR M, et al. Digital model of biochemical reactions in lactic acid bacterial fermentation of simple glucose and biowaste substrates[J]. Heliyon, 2024, 10(19): e38791.
- [22] 杨雁. 近红外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.
- [23] CHEN Y, CHEN L L, GUO M J, et al. Application of near-infrared spectroscopy technology in the complex fermentation system to achieve high-efficiency

- production[J]. *Bioresources and bioprocessing*, 2021, 8(1): 96-109.
- [24] 田康明,石贵阳,路福平,等.代谢工程大肠杆菌利用甘油高效合成 L-乳酸[J]. *生物工程学报*,2013,29(9):1268-1277.
- [25] QIAN Z G, XIA X X, LEE S Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of cadaverine: a five carbon diamine[J]. *Biotechnology bioengineering*, 2011, 108(1):93-103.
- [26] 陈菁, 陈建华, 周怡雯, 等. 高效液相色谱法检测发酵液中二羟基丙酮和甘油的含量[J]. *中国生化药物杂志*, 2007, 32(3): 170-172.
- [27] 田康明, 尔昊, 路福平, 等. 磷酸盐精确控制策略提升大肠杆菌生长和产物合成效率[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(1): 184-189.
- [28] 李婧芳, 韩梦圆, 李铭心, 等. 脂多糖减量合成对细胞外膜功能的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2023, 49(24): 15-20.
- [29] 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.
- [30] DONG C, LI J, WANG J, et al. Rapid determination by near infrared spectroscopy of theaflavins-to-thearubigins ratio during Congou black tea fermentation process[J]. *Spectrochimica acta part A: molecular and biomolecular spectroscopy*, 2018, 205: 227-234.