

## 特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2023-026

## 高通量平行发酵技术的发展与应用

白仲虎<sup>1</sup>, 任和<sup>1</sup>, 聂简琪<sup>1</sup>, 孙杨<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 江南大学粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心, 江苏 无锡 214122; <sup>2</sup> 河南大学生命科学学院, 河南 开封 475004)

**摘要:** 21世纪初, 为解决生物医药过程工程研究所面临的微生物和哺乳动物细胞培养的实验通量、研发效率与成本方面的问题, 更重要的是质量源于设计 (QbD) 导向的生物过程工程实验设计 (DoE) 的迫切需要, 基于微、小型生物反应器的平行发酵 (细胞培养) 技术与产品得到了广泛应用。近年来微生物代谢工程与合成生物学的飞速发展, 对高性能菌种库的高通量筛选与菌种表型过程表现的早期评价提出了更高实验通量的需求, 这进一步拓展了不同培养体积的平行发酵培养装置在工业生物技术领域的应用。时至今日, 可模拟工业培养条件并实施过程参数准确控制的微小型反应器的多联罐平行发酵装置、系统操作软件和数据处理的集成系统已成为生物过程工程研发的强大工具, 它在生物医药创新、代谢工程和合成生物学等基础研究成果向工业化技术转化中起到重要的支撑作用。特别是在合成生物学领域中, 基于“工业相似性”原则的平行发酵技术, 可以解决培养板或摇瓶高通量菌种筛选无法表征克隆表型、在规模化培养中的表现受培养过程参数显著影响的痛点问题, 实现过程工程导向的高通量、高效率的菌种筛选与评价。本文对高通量平行发酵与细胞培养技术的发展近况与其在合成生物学研究中的应用场景做了介绍, 其中主要总结了平行发酵培养技术在高通量菌种筛选评价“三段论”中的价值、平行发酵培养如何支持菌种筛选的工业相似性原则的实施、平行发酵培养结合 DoE 实验策略实施高效的生物过程工程开发、使用平行发酵培养建立过程多变量批次模型的方法, 以及平行发酵培养与建立生物培养过程缩小模型的关系等。

**关键词:** 发酵; 细胞培养; 平行培养; 高通量; 合成生物学; 实验设计 (DoE)

**中图分类号:** Q815 **文献标志码:** A

## The recent progresses and applications of in-parallel fermentation technology

BAI Zhonghu<sup>1</sup>, REN He<sup>1</sup>, NIE Jianqi<sup>1</sup>, SUN Yang<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>National Engineering Research Center of Cereal Fermentation and Food Biomanufacturing, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China; <sup>2</sup>School of Life Science, Henan University, Kaifeng 475004, Henan, China)

**Abstract:** At the beginning of this century, high-throughput in-parallel fermentation (cell culture) technology and its related apparatus based on microbioreactor and miniature bioreactor were developed and widely applied. This was to solve the challenges encountered by biopharmaceutical process researches in terms of cultivation throughput, R&D

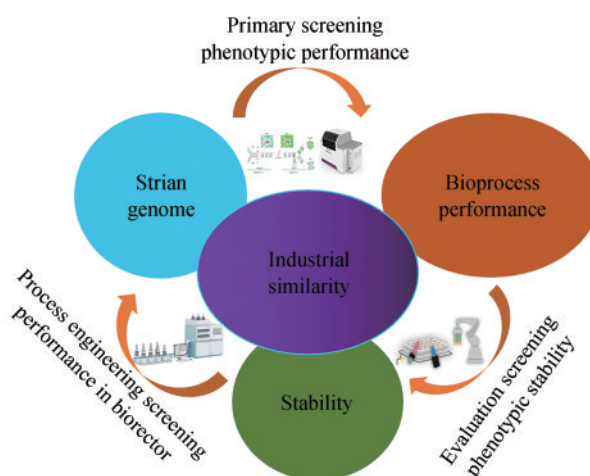
收稿日期: 2023-03-30 修回日期: 2023-06-25

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (2015A020802)

引用本文: 白仲虎, 任和, 聂简琪, 孙杨. 高通量平行发酵技术的发展与应用[J]. 合成生物学, 2023, 4(5): 904-915

Citation: BAI Zhonghu, REN He, NIE Jianqi, SUN Yang. The recent progresses and applications of in-parallel fermentation technology[J]. Synthetic Biology Journal, 2023, 4(5): 904-915

efficiency, and the continuous rising on the cost for microbial fermentation and mammalian cell cultures of multiple clones, and more importantly, the urgent needs for conducting design of experiment (DoE) driven by the principle of quality by design (QbD). In the recent years, the rapid advance of microbial metabolic engineering and synthetic biology has put forward a rather strong demands for the high-throughput screening on high-performance strain libraries and the early evaluation of strain phenotypic potential performance under industrial cultivation conditions. This has further expanded the application range of in-parallel fermentation technology with various culture volumes in the field of modern industrial biotechnology. Up to now, integrated systems containing in-parallel fermentation setups with multiple microbioreactors, online probes, operating software, and data processing units, which can simulate industrial cultivation conditions and implement accurate control of process parameters, have become a powerful tool for accelerating bioprocesses engineering R&D. They play a central role in transforming basic research achievements, such as drug discovery, metabolic engineering, and synthetic biology, into industrial technologies. Especially in the field of synthetic biology, based on the principle of “industrial similarity”, in-parallel fermentation technology addresses key limitations of the conventional microplate and shake flask based high throughput screening, which cannot characterize the significant impact of culture conditions on the phenotypic performance of the selected clones at a large scale. This enables a process-oriented, high throughput, and efficient screening and evaluation if microbial strain libraries. This review provides an overview on the recent development in high throughput in-parallel fermentation & cell culture technology and its application scenarios of synthetic biology researches. In particular, it emphasizes the value of in-parallel fermentation technology in high-throughput strain screening complying with the three-stage strategy, and how in-parallel fermentation technology makes the implementation of the industrial similarity principle of strain screening possible, and how the technology combines DoE experimental tactic to significantly improve the efficiency of bioprocess development. It is also discussed the general procedure to build up a multivariate batch model of bioprocess based on in-parallel fermentation technology. In the end the approach of using in-parallel culture to establish a process scale down model is also explored.



**Keywords:** fermentation; cell culture; in-parallel cultivation; high throughput; synthetic biology, design of experiment (DoE)

工业生物技术、合成生物学和生物医药创新研究成果实现工业转化的过程工程开发起始于高

性能工业菌种或细胞株的建立，其过程一般分为三阶段：①海量候选菌种库的高通量培养筛选；

②大量候选菌种的性能评价筛选与高性能生产菌种的确定；③高性能工业菌种的规模化生产工艺的建立。三个阶段所解决问题的侧重点不尽相同，但采用高通量培养技术是提高每个阶段研发效率的共同点。

高通量微生物菌种筛选的目的是发现可以在工业化生产中实现稳定高产且能耗低的新菌株。但是传统意义上的高通量克隆筛选一般使用多孔板和摇瓶培养，其培养过程与工业规模反应器培养过程很不相同，而菌株的表型在不同培养过程中的性能表现也不同，即工业潜能与培养条件往往密切相关。传统的高通量培养技术为提高通量多采用微小体积培养，包括多孔板或药瓶培养，受条件限制，这些培养大多要牺牲对培养过程参数的全面控制（例如pH的稳定控制、DO供应稳定等），但实际工业培养条件与此不同，导致筛选出的菌种在规模化培养时未必能给出筛选培养阶段的优异表现。因此，需要高通量筛选培养时开展培养过程工程驱动的筛选，即尽量模拟规模化培养的条件（称之为“工业相似”的培养）开展对候选菌种库的高效率性能评价。所以，实现微小体积培养条件下对过程参数的有效控制是推动平行发酵培养技术（in-parallel fermentation）在代谢工程和合成生物学领域广泛应用的关键点之一。

## 1 平行发酵培养技术与平行反应器

平行发酵培养技术的定义为：在具有在线多参数与离线多参数采集的多个微型（1~50 mL培养体积）或小型（100~1000 mL培养体积）生物反应器上，平行地开展多个菌株的发酵培养技术；或针对一个克隆（菌株）开展多个发酵条件下平行培养的发酵培养技术。很明显，平行发酵培养技术的应用目的包括两个方面：一是对多个候选克隆开展同一发酵条件下的平行培养，对比候选克隆在所谓“工业相似”条件下的性能，对候选菌种库依据工业性能排序<sup>[1]</sup>；另一个是通过实验设计（design of experiment, DoE），平行开展DoE方案所设计不同培养条件下克隆或菌株在具备工业环境的反应器内的发酵性能研究，从而发现影响菌种克隆工业性能的关键过程参数和参

数之间的交互作用，并确定菌种的培养工艺条件<sup>[2-3]</sup>。需要强调的是平行发酵技术在实现真正的“平行培养”时，需要满足3个基本要素：出发细胞株和种子培养液的一致性、平行培养的多个反应器性能的一致性、培养过程参数检测和分析的一致性。

进入21世纪，在生物医药创新研究领域，显著缩短“从DNA到上市的蛋白质药物”的生物新药创制时间历程已成为医药行业在商业上的共识。同时根据ICH Q8<sup>[4]</sup>的建议：生物医药的过程研发要基于牢固的科学知识，即建立对产品和过程的科学理解——QbD导向的生物医药过程开发新理念，所以在候选分子的评价、生产用细胞株高效筛选和建立培养关键过程参数的设计空间（design space）工作中，采用平行发酵培养技术开展DoE实验，提高过程研究的效率和成功率已成为了生物制药领域的通行方法，同时也推动了平行发酵与平行细胞培养技术在多个方面的进步。近10年来，微生物代谢工程所设计和合成生物学研究所构建的细胞克隆，都需要开展“设计-构建-测试-学习”（DBTL）数据科学驱动的研究循环<sup>[5-8]</sup>，所以已经发展成熟的平行发酵培养系统，就自然介入高效筛选与评价海量基因型菌株库和开发适配工业表型菌株的规模化生产工艺。同时也针对以微生物菌种为主的合成生物学过程工程研究的需要，对平行发酵培养技术进行了相应技术改进<sup>[9-10]</sup>。总而言之，在菌种筛选评价和早期工艺的开发中，平行发酵培养技术可以有力支持回答下列科学技术问题：

（1）如何高效、快速、高通量地评价大量候选细胞克隆的生物学功能和目标产品的合成效能？

（2）如何高通量地验证承载人工设计代谢路线的大量细胞克隆在工业化环境反应器内的表现？

（3）如何高通量地揭示细胞工厂的运行机理和构造原理，实现优化设计，提高元件、底盘细胞的合成能力和过程调控能力？

（4）如何在高性能新菌种克隆确定后，高效率地建立最优化的生产过程工艺？

平行发酵（细胞培养）系统或装置是由一组多个并行的微小型生物反应器、过程参数控制单元、在线传感器组、过程数据处理与分析软硬件系统、DoE工具、样品自动采集等多个单元功能

有机组成的实验台规模的多联罐体集成培养系统。这个系统的核心原则就是要在高通量平行培养的状态下，最大化模拟工业规模培养条件，即实现高通量培养的“工业相似性”。根据反应器的培养体积，平行发酵技术系统可以分两类。

第一类为微型反应器 (miniature bioreactor) 的平行发酵系统，单个反应器体积一般小于 100 mL，甚至到微升规模。这种平行发酵系统由于培养体积小，平行操作的反应器数量高 ( $\geq 24$  个/单元设备)。虽然微型生物反应器平行培养通量高，但也由于体积小，在线或离线过程数据采集能力有限，实施过程精准控制也更为困难，可获取的过程数据少。然而，培养成本低是微型平行培养系统的优势。目前这类平行培养反应器的典型代表是 BioLector™ (德国 M2P)<sup>[11]</sup> 和 amber 15™ (德国 Sartorius)<sup>[12]</sup>。

另一类是基于小型生物反应器 (MicroBioreactor, MBR) 的平行多联罐发酵系统，反应器体积一般在 100~1000 mL 之间，反应器平行操作数量一般  $\geq 8$  个/单元<sup>[13]</sup>。增大小型生物反应器的培养体积，虽然培养通量有所降低，但是可承载的在线传感器数量增加，反应器结构和过程参数的控制也近乎完全模拟规模化培养，所以在线、离线过程数据的采集能力也得到提高，过程数据较丰富，可以支撑建立过程数据库和培养过程批次数据模型。目前这一类平行发酵反应器的典型代表是 Dasgip™ (德国 Eppendorf)、MinBio™ (荷兰 Applikon) 和 amber 250™ (德国 Sartorius)。

近几年国内也有多个发酵罐制造厂家在研发推广多个型别的平行发酵系统 (培养体积一般在 100 mL 以上)，尤其是在微生物平行培养系统中取得了显著的成绩。但是，目前国产平行生物反应器在反应器微型化 (毫升级培养体积)、哺乳动物细胞培养用的平行反应器以及一次性平行生物反应器方面还存在许多的不足。

如果按照平行培养的细胞种类来分，平行培养系统可以简单分为微生物培养用的微小型平行发酵罐和哺乳动物细胞培养用的平行细胞培养生物反应器两大类。微生物生长快，单位时间内代谢强度大，导致单位时间内产热多、耗氧多、底物消耗快，所以传质与混合的操作压力大，过程参数的控制要求高；而哺乳动物细胞生长缓慢、

易染菌、需要 CO<sub>2</sub>、接种量大，有可能需要采用灌流培养策略等。所以，在微小型反应器罐体设计和控制方面多有不同，典型的差别是哺乳动物细胞，特别是干细胞和类器官等原代细胞培养多用一次性的反应器罐体，培养过程一般不需要加碱调控 pH 值，培养中搅拌速率低<sup>[14]</sup>。但无论是微生物细胞还是哺乳动物细胞培养，目前平行发酵培养技术都更多关注于多罐体的平行多元过程数据的在线采集能力、大数据处理能力甚至云端的大数据存储与共享能力等方面，其驱动力来自智能绿色生物制造技术发展的需要<sup>[15-17]</sup>。

## 2 平行发酵培养技术的菌种筛选评价“三段论”

起始于多基因型候选菌种库的建立，中间经过表型菌种的重重筛选，结束于最优的高性能菌种的确定并建立适配的规模化生产工艺，这个完整的高性能菌种筛选过程可以分为三个阶段 (可以称之为菌种筛选的“三段论”)，具体步骤为：第一阶段，海量高通量菌种评价与筛选，主要聚焦在最关注的菌种特征，比如产量和产率等——特征筛选；第二阶段，多候选菌种的性能评价筛选，使用平行发酵技术培养候选菌种，在“工业相似”条件下评价菌种的性能——评价筛选；第三阶段，高性能工业菌种的确定与适配优化工艺的的建立——过程筛选。特征不同的平行发酵培养技术分别用于菌种筛选的三段论。

第一阶段是面对数以万计 (菌种数  $N=1000\sim 10\,000$ ) 的多基因型菌种克隆，完成表型对比与性能定量评价，通过特征筛选，将候选菌种数量降低到可以开展模拟工业培养条件下的可控制培养的水平，即千百级菌种数量 ( $N=100\sim 1000$ )。这个阶段的工作对应于 DBTL 循环中的“设计” (D) 和“构建” (B)。为实现高通量培养筛选，可以设计皮升、纳升、微升等不同体积大小的液滴作为微型反应器，将单细胞包裹其中实现超高通量的并行培养和测试，其培养效率高并可自动化操作<sup>[18-20]</sup>。但该过程还要面对诸多关键科学技术难题，包括：如何针对不同类型微生物，构建稳定

的培养空间、底物、溶氧等液滴环境；微液滴体系采用油包水结构实现微生物高通量平行培养，单克隆菌株、底物、代谢物均包裹于液滴之中，如何利用非侵入式光学检测方法实现对菌株生长和生产特征参数的检测；如何实现细胞生长、底物耐受、代谢物合成等工业表型的高效、稳定传感检测等<sup>[21-23]</sup>。

第二阶段是评价筛选，要解决候选菌种在可控制的培养条件下，即模拟工业规模培养条件下，对有潜力表型菌种的表现评价。这一阶段所处理的菌种数量分布范围从100到1000个初步选定的高性能工业菌种，对应于DBTL循环中的“测试”(T)和“学习”(L)环节。基于微型生物反应器(毫升级)的平行发酵培养装置主要用于这个阶段的研发实验需求。通过使用微型的平行发酵生物反应器，针对候选高性能菌种库，在相对模拟工业化培养的条件下，开展以克隆的稳定性和产品的产量、产率、质量、能耗和成本等为筛选目标的过程工程驱动的高通量评价，筛选出工业性能最好的一组生产菌种( $N=10$ )<sup>[24-25]</sup>。同时通过对多

元过程参数的在线采集，建立与表型克隆相关联的早期过程数据库。

第三阶段是在完全模拟规模化培养的条件下，使用小型平行生物反应器的平行培养装置(培养体积100~1000 mL)，通过DoE开展以过程表现和目标产品产量为筛选目标的过程驱动的高通量评价，在第二阶段所筛选出的最好的一组表型克隆( $N=10$ )中，确定工业性能最好的生产菌种( $N=1$ )<sup>[26-27]</sup>。同时通过对DoE实验批次的多元过程参数的在线采集，建立平行培养的过程大数据库，并建立平行培养的过程批次过程数据模型，包括过程缩小模型、关键过程参数的设计空间、批次多元过程模型。这个阶段的工作主要对应于DBTL循环中的“学习”(L)环节，也是DBTL循环的最终出口，实现了快速“从单克隆到规模化过程工艺”的生物过程工程开发的目标。

基于平行培养技术的高通量菌种筛选的三段论策略所包括的平行培养技术特征、培养目的、培养通量和在DBTL循环中的节点，概括如图1所示。

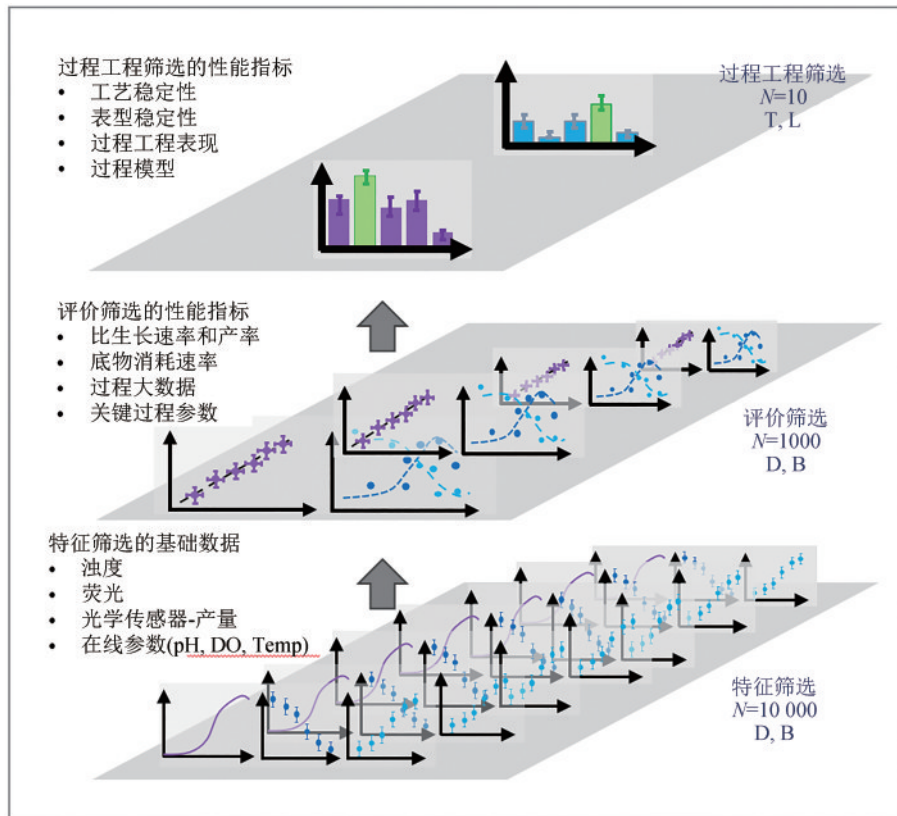


图1 平行培养技术的高通量高效率菌种筛选的三段论策略<sup>[13]</sup>

Fig. 1 Three-stage strategy for high-throughput and high-efficiency strain screening by in-parallel cultivation technology<sup>[13]</sup>

### 3 平行发酵培养的工业相似性原则的实施

平行发酵技术实现高通量菌种筛选的挑战之一是如何确保高通量培养的菌种基于克隆表型特征（如目标产品生产能力、目标产品得率和收率等）的排序（ranking）与其未来在规模化培养条件下的排序一致。挑战之二是如何在较短的时间内，高效率地挖掘出最优的候选菌株，并同步建立可以指导工业规模生产的过程工艺<sup>[28-29]</sup>。导致这两个挑战的主因均是来自高通量平行培养是否能够实现“工业相似”下的培养过程。工业菌种潜能的实现与反应器过程参数的控制密切相关，如果可以模拟工业培养条件，则在菌种克隆的高通量培养时，就能精准挖掘出可工业规模培养的菌种，获得关键过程参数对目标参数的影响规律。因此微小型生物反应器的高通量平行发酵能否实现“工业相似”的培养条件显得尤其关键。

工业相似性的高通量筛选策略是可以贯穿到从菌种筛选到过程工艺开发的整个流程，但是考虑到现有技术可行性的问题，工业相似性的“相似度”会随着平行培养通量的提高而显著降低<sup>[1, 13]</sup>。在基于微流控液滴高通量培养的特征筛选阶段，以目前的技术水平，也只能做到少量几个过程参数的控制，比如温度、pH等。在基于微型生物反应器的“评价筛选”阶段，在微小体积（ $\leq 50$  mL）的培养过程中，目前只能较低水平地模拟规模化培养条件，对数以百计的菌种克隆开展平行评价。随着小型生物反应器技术的进步，目前小型反应器的平行发酵装置在升（L）级别的培养体积下，可以认为已完全解决“工业相似”的平行培养。但是，培养通量与工业相似度的反比问题，可以通过筛选过程的技术策略优化来解决，至少是部分解决<sup>[30-31]</sup>。这个技术策略具体如下：

“特征筛选”聚焦克隆的基因型和表型，在微流控液滴高通量培养和高通量在线检测的技术手段基础上，将菌种克隆数从海量 $N=1000\sim 100\ 000$ 级降低到 $N=100\sim 1000$ 级。在这个阶段平行发酵的逻辑是发现一组有成为优秀工业菌种潜质的“较”优秀候选克隆。这里有可能会错过在规模化反应器内表现绝对第一的克隆，但是获得了极高的筛

选效率。

“评价筛选”聚焦克隆表型和表型的稳定性，使用毫升级微孔培养板或微型生物反应器的高通量平行发酵，并实现在线监测和（或）控制微型生物反应器内培养介质的pH、DO和底物浓度，开展以目标产品产量和生物量为目标的高通量菌种性能评价筛选，获得基本过程数据。从 $N=100\sim 1000$ 的候选菌种克隆中，降维筛选出一组 $N=10\sim 100$ 级的候选高性能菌种。在这个阶段平行发酵的逻辑是在一组“较”优秀的候选菌种中，实施（部分）“工业相似”条件下的高通量平行发酵，进一步筛选出有可能在规模化反应器内表现较好的潜在克隆，并获得了极高的筛选效率。

由于微生物菌种筛选有“生产潜力”与“生长能力”两个目的指标，其中工业菌种生产潜能要通过内因（基因型）和外因（培养过程条件）的协同作用，通过优秀的可生长性来实现，因此前述“特征筛选”和“评价筛选”仍无法正确回答这个问题。“过程工程筛选”聚焦在克隆表型在反应器内表现特征：使用小型平行发酵生物反应器，针对候选高性能菌种（ $N=10\sim 100$ ），在完全模拟规模化培养的条件下，通过DoE开展以过程表现为筛选目标的过程驱动的高通量评价，达到在较短的时间内，筛选出工业性能最好的生产菌种（ $N=1$ ），作为工业菌种。

### 4 平行发酵培养与使用DoE的高效过程工程开发

实验设计（DoE）是研究过程输入参数与过程输出目标参数之间关系的一种科学实验手段，通过建立两者之间的定量数学关系来实现对过程的深刻理解。DoE可以显著提高发酵过程工艺的开发。传统的发酵过程开发包括初期菌种筛选和培养条件的选择、摇瓶培养中进行二次筛选或培养条件优化，最终将最佳条件放大到中试与生产规模（图2）<sup>[13]</sup>。为实现对培养过程的充分理解，需要多个过程因素的测试分析。传统的单因素实验（one-factor-at-a-time, OFAT）虽简单易行，但会增加实验次数，耗时长且无法评估因素之间的交叉作用。

今日的生物过程工程开发理念，需要在菌种筛选阶段就对菌种与发酵过程参数之间的关联（即菌种、过程与产品）进行科学深入的理解。在评价筛选与过程筛选阶段使用 DoE 策略，确定关键过程参数。DoE 的核心是可以系统地研究关键过程参数（CPPs）与关键质量属性（CQAs）之间的关系。与 OFAT 方法相比，DoE 可以提供更准确的结论。此外，DoE 的实施减少了培养实验的罐批数量，并可以通过建立多参数的线性模型，提供更多的统计分析信息，分析出多个关键参数之间的相互作用，建立对多个目标参数（产率与质量）工艺条件优化的统计模型，指导建立过程设计空间<sup>[32-34]</sup>。

可实施工业相似培养的平行发酵装置是开展 DoE 实验的必需品，比如一个 3 参数包括中间值的全因子 DoE 至少需要 24 个平行培养。目前成熟的平行发酵系统都内置有 DoE 实验设计功能。例如德国 Sartorius 公司的 ambr250™ 系统已将 MODDE 软件内置到其控制软件中<sup>[35-36]</sup>，通过平行系统的操作界面可快速开展 DoE 实验条件的设置，并自动将设置的工艺参数下发到平行培养的控制系统，驱动操作软件实施对过程参数的设定与执行。在培养结束后，可通过软件对培养过程数据和目标参数结果进行多元变量统计分析。如果已商业化的平行发酵系统还没有内嵌 DoE 功能模块，需借

助第三方 DoE 软件进行实验方案的设计，并将所需实验条件手动设置到平行培养操作控制系统。在实验过程中对数据进行收集，通过 Excel 导入 DoE 软件进行结果分析。

## 5 平行发酵培养与多变元批次模型

多变元数据分析（multivariate data analysis, MVDA）在 QbD 驱动的生物医药过程工程研发策略，在合成生物学研究中过程工程导向的菌种筛选评价上发挥着越来越关键的作用。因为 MVDA 能够将过程分析技术（process analytical technology, PAT）生成的大量随发酵培养时间各个时间节点的在线和离线参数检测结果，转换处理成分类的关键过程信息<sup>[37-39]</sup>。由于早期采用了工业相似的平行发酵培养技术，在过程开发的初始阶段可能采集到 1~1000 mL 培养水平上的多元过程参数变化数据。但是在菌种克隆评价阶段，表型菌种克隆众多，过程数据是海量的，而这些数据所描述的培养过程特征，往往又是所筛选的高性能表型菌种在未来工业规模培养中实现能力的一个外部条件，致使现实情况是高通量平行发酵的培养条件与中试和生产规模培养条件总会存在差异。如何判断这些条件和参数的差异是否会影响到所筛选到的高性能表型菌种的表现，成为在高通量平行发酵培养阶段需要

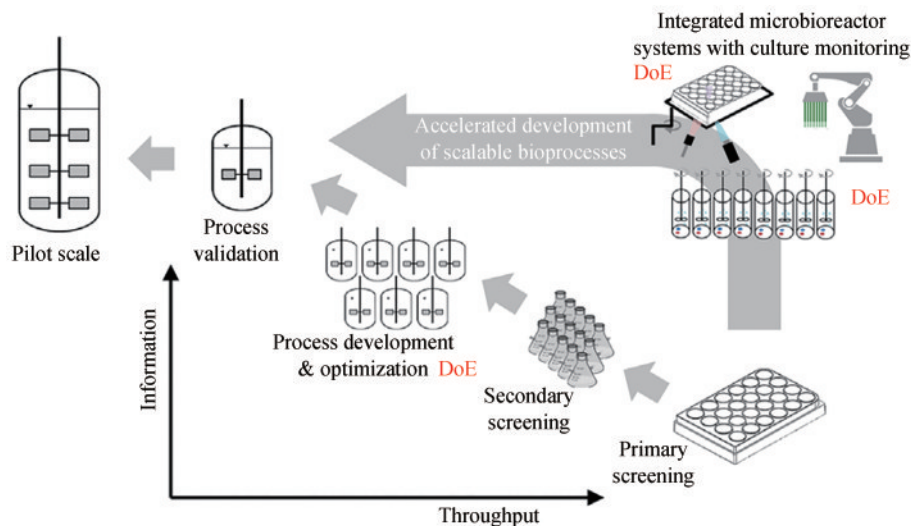


图2 传统的生物过程工程研发途径与使用平行发酵技术实施 DoE 的过程工程研发路径<sup>[13]</sup>

Fig. 2 Comparison between traditional roadmap of bioprocess R&D and the new approach using DoE implemented by in parallel fermentation system<sup>[13]</sup>

给出答案的关键问题。而多变元数据分析 (MVDA) 与多变元过程批次模型 (PLS-MVD batch model) 是解决这个问题的一个有效方法。

在高通量平行发酵培养实验中, 一般会有大量的 DoE 培养批次, 多个过程参数会在一定范围内人为设计变化, 所以在基于平行发酵的 DoE 实验批次上, 采集尽量完善的多元过程参数数据并实施 MVDA 分析, 建立 PLS-MVD 批次模型, 就可以在建立过程设计空间的同时, 揭示多元过程输入参数和输出变量 (产率与质量) 之间可能的相互作用信息。对比“好”培养批次 (输出参数符合要求) 和“坏”培养批次 (输出参数不符合要求) 的 PLS-MVD 模型, 就可以发现过程参数在培养过程中某个节点的变化或者持续的变化, 对培养目标参数的影响。换言之, 基于平行发酵培养的数据所建立的 PLS-MVD 批次模型, 能够识别过程参数变化的极限范围和未来发生细胞培养过程事故的原因, 这是进一步开发准确控制的规模化培养过程的关键过程信息。这里所描述的用于多变元分析和批次模型建立的过程数据采集, 过程和内容如图 3 所示。目前有多个商业化的软件, 例如 SIMICA+, 可以用于多变元的数据分析和模型建立。

使用平行发酵技术, 建立 PLS-MVD 过程批次模型的操作流程一般是:

(1) 批次输入变量的收集 (inputs) 尽可能地采用 PAT 技术, 收集完善的每一批次的在线过程参数随时间的变化数据; 收集起始批次数据, 包括培养基、接种量、种子的质量指标等。

(2) 批次输出变量 (outputs) 的采集 建立完善的培养终点数据, 包括产物浓度和质量指标参

数、生物量、活细胞比例等。

(3) 数据预处理和变量选择 所有输入与输出数据在 excel 表格中进行处理, 要完成规范化 (normalization), 根据情况可以选择要输入 SIMICA+ 软件的数据, 然后将数据导入软件。

(4) 多变元分析和多变元批次过程模型的建立 在 SIMICA+ 软件中完成多变元分析和批次 MVD 模型的建立。多变元分析可以发现不同过程参数对与过程输出参数的响应关系分类和程度排序。PLS-MVA 模型可以用于建立 Scale down 模型, 指导建立过程设计空间。批次 PLS-MVA 模型最主要的用途是可以实施对过程质量的实时监控, 依据批次输出参数, 分类“好”批次与“坏”批次, 发现“好、坏”批次的 MVA 特征, 并确定导致培养结果不同的根本原因。图 4 描述了这种“好”批次和“坏”批次的对比分析方式。

## 6 平行发酵培养与过程缩小模型的建立

基于微小型生物反应器的平行发酵装备和过程缩小模型 (scale down model) 是偶联在一起的两项技术<sup>[40-43]</sup>, 前者是指仪器装备, 后者是技术方法, 都是执行工业相似条件下高通量过程工程开发策略的关键要素。菌种筛选与过程工程研究通过平行发酵培养技术在实验室规模高效进行, 但是如何确保微小生物反应器规模培养的过程工艺可以直接快速地放大到规模化培养, 是通过建立过程缩小模型来实现的。因此在工业相似的高通量培养理念下, 建立一个具有代表性的缩小

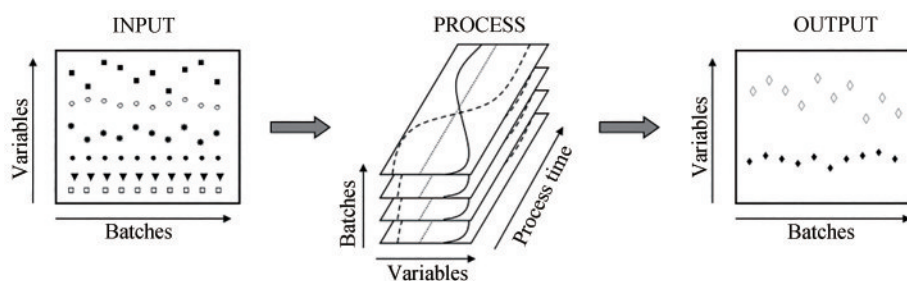


图 3 培养过程数据采集的示意图<sup>[37]</sup>

[过程参数的输入是在预定受控的设定点范围内运行, 这些参数的变化可能导致培养目标参数输出 (产量或质量) 的显著变化]

Fig. 3 Schematic diagram of data collection from bioprocesses<sup>[37]</sup>

[Inputs to the process parameters are operating within predetermined controlled set points. Changes in these parameters may result in significant changes in the output (yield or quality) of the culture target parameters.]

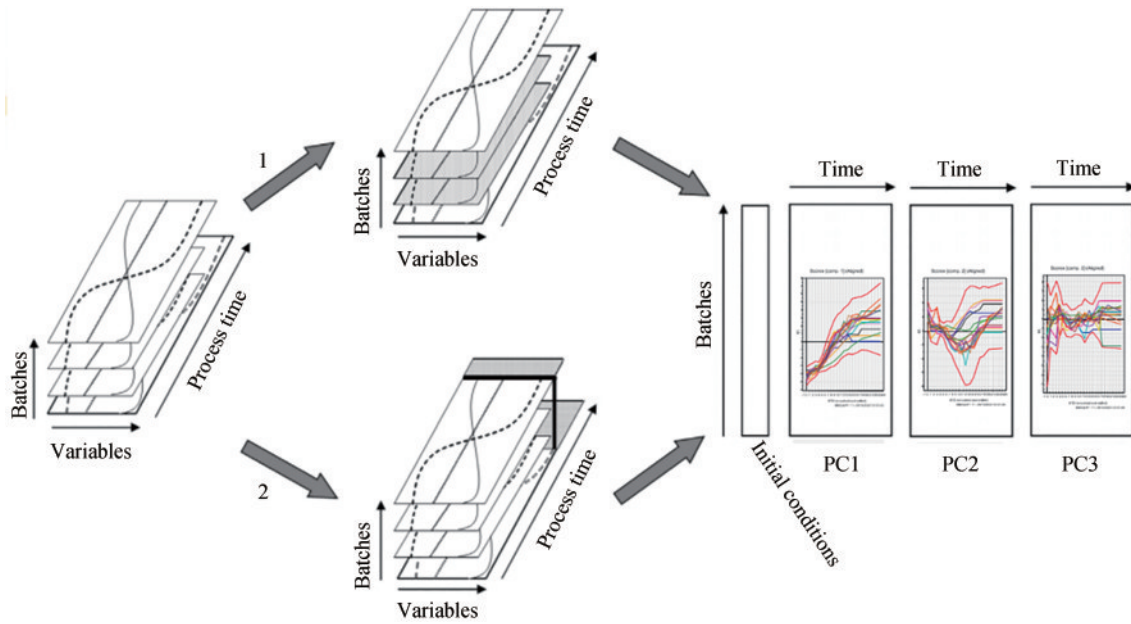


图4 “好”的培养批次与“坏”批次培养的过程批次数据的展开, 并进行模型对比示意图<sup>[37]</sup>

(在选项1中, 只保留符合目标参数要求的所谓“好”的批次。在选项2中, 所有批次均表现出不符合目标参数要求的所谓“坏”批次。可以基于好的批次建立PLS-MVA批次模型, 通过将坏批次的过程参数带入该批次模型, 就可识别出坏批次发生问题的原因)

Fig. 4 Schematic diagram of unfolding and comparing the batch models of the processes of “good” and “bad” batches<sup>[37]</sup>

(In option 1, only the so-called “good” batches that meet the requirements of the target parameters are retained. In option 2, all batches exhibit the so-called “bad” batches that do not meet the target parameters. The PLS-MVA batch model can be built based on the good batches, and by bringing the process parameters of the bad batches into the batch model, the causes of the problems of the bad batches can be identified.)

(scale down) 模型对高通量培养实现规模化过程成功表征至关重要。

生物过程工程的过程缩小模型对过程的表征包括三个方面: ①高通量微型平行生物反应器所建立的培养过程工艺与规模化培养下的工艺, 在决定性影响过程目标参数的关键过程参数上能够保持统计学意义上的相似性<sup>[44-45]</sup>; ②如果在高通量培养下建立了过程多元过程批次模型(PLS-MVA), 那么它与规模化培养条件下的多元批次过程模型, 在主元分析(principle component analysis, PCA)上要表现出一致性; ③高通量平行培养与规模化培养的关键过程参数设计空间要一致。

缩小模型的建立, 首先要基于对同一种细胞的培养, 通过高通量培养的DoE实验, 采集过程参数, 建立过程DoE优化模型, 进一步建立过程设计空间, 并建立多元过程模型<sup>[46-48]</sup>。然后要在规模化培养上完成同样的多元过程批次模型的建立工作, 再对微型培养和规模培养的过程模型与设计空间进行数据的对比。如果对比结果一致, 就针对该细胞种类, 在所使用的微型平行发酵装

置上, 建立一个成功的过程缩小模型。如果改变细胞种类, 过程缩小模型需要开展上述同样的研究, 然后建立新的缩小模型。所以过程缩小模型包括三个基本要素: 细胞种类、平行发酵培养过程与规模化培养过程。

规模化培养装置与工艺要根据平行发酵结果进行选择与设计, 这种情况下的过程缩小模型的建立, 技术策略与传统的过程放大类似。首先是线性放大与规模相关的操作参数, 同时将与规模无关的参数保持在与高通量平行发酵工艺相同的控制设定点。对于微生物发酵或细胞培养过程, 与规模无关的参数包括工艺温度、pH值、DO、接种量(体积分数)以及流加培养基的时间与营养物流加策略等。如果不同培养规模的氧气传输速率相等, 则溶解氧控制设定值和罐压也应保持恒定<sup>[49-51]</sup>。然后开展过程表征的研究: 对比过程多元过程批次模型, 规模化培养与平行发酵的模型要匹配; 对比“设计空间”, 在该空间内, 过程可以在产品目标和过程一致性方面以可接受的方式运行。完成了这些工作, 就在规模化培养和微小

型平行培养之间建立起一个过程缩小模型。

使用平行发酵技术建立生物过程缩小 (scale down) 模型在生物医药的过程开发中已积累了许多成功的案例。例如在一个CHO细胞培养过程特征的研究中<sup>[52]</sup>, 使用5 L生物反应器对数个工艺参数展开多工艺条件的培养, 通常需要几个月的时间来完成, 但是在使用微型生物反应器 (ambr15™) 后, 在一个月内就可结束过程特征的特征, 并且能同步建立针对关键过程参数的过程控制策略。该研究策略就是使用 ambr15 平行培养系统, 先应用过程多变元分析技术建立细胞培养过程的缩小模型, 模型要证明 ambr15 的 15 mL 规模培养与 5 L 实验室培养和 1500 L 生产规模有高度的相似性。具体地, 通过应用 ambr15, 在 15 mL 规模上开展过程特性的 DoE 研究, 建立多变元过程批次模型, 确定关键过程参数和设计空间。再通过与 5 L 规模实验室培养的 DoE 数据和多变元过程模型进行比较, 发现两个培养规模系统之间的过程参数对过程的产量和质量的影响相似, 说明 ambr15 高通量系统能够取代 5 L 规模反应器系统进行常规的实验室过程特性表征。

## 7 结语与展望

在工业生物技术领域, 生物信息、基因编辑、全基因组测序以及合成生物学等技术的稳步进展, 使计算机辅助设计、全基因组人工合成变为可能。工业生物技术产业进入工程化与设计化的全新模式, 人们可以设计细胞工厂, 可以在前所未有的短时间内构建表达多层次异源生物合成途径的大型菌株库。所以工业生物技术的“设计-构建-测试-学习”(DBTL) 周期中 D 和 B 的阶段显著加速, 使得 T 和 L 阶段在合成细胞工厂开发中的速度越来越成为限制性因素。要提高 T 与 L 环节的效率 and 成功率, 过程工艺开发的初始阶段就必须开展充分的菌种筛选, 并实施关键过程工艺参数的早期挖掘。微型生物反应器的平行发酵培养系统正越来越多地应用于各类菌种库的早期筛选与评价, 这种技术可以实现过程工程导向的高通量菌种筛选评价。通过将平行发酵培养技术与 DoE 方法相结合, 可以进一步最大化地研究多菌种的过程表

象, 进一步提高 T 与 L 的效率。平行发酵培养技术支撑的 DoE 有助于系统地评估交互作用中的因素, 并有助于更深入地探索关键过程参数设计空间。

实验室规模的反应器培养是合成生物学研究中菌株评价的最后一步, 提供了工业相似条件下菌种性能的真实数据。如今一个代谢工程研究机构每年通常筛选数百万株或更多的菌株, 如果使用传统的台式发酵罐培养筛选, 即便投入庞大数量的发酵罐和大量的实验经费也难以完成。现在, 在实验室规模的反应器和微孔培养板的高通量培养之间, 已建立了全自动的微、小型化的平行培养技术和装置, 成为显著提高合成生物学和代谢工程中对候选菌种开展过程工程导向的评价筛选效率的强大工具。虽然这些系统可以提供比传统实验室规模培养更高的培养实验通量, 但它们尚不能完全满足遗传多样性筛选评价所需的候选菌种数量级的快速增长。

因此, 目前平行发酵培养技术尚需解决的问题包括: ①解决平行培养通量越高, 工业相似度越低的矛盾; ②平行发酵培养所产生的过程大数据处理能力与所建立的过程模型如何满足智能生物制造的需要; ③建立基于微型生物反应器的平行连续化灌流细胞培养过程, 提高连续化生物制造过程的开发效率并降低成本; ④进一步提高平行发酵培养的集成度和平行培养通量, 并降低采用一次性反应器的平行培养的运行成本, 等等。上述问题的解决, 将进一步拓展平行发酵技术在生物过程工程中的应用, 缩短“从 DNA 到成熟制造工艺”的过程研发时间。

## 参 考 文 献

- [1] RIENZO M, JACKSON S J, CHAO L K, et al. High-throughput screening for high-efficiency small-molecule biosynthesis[J]. *Metabolic Engineering*, 2021, 63: 102-125.
- [2] AKKERMANS S, NIMMEGEERS P, VAN IMPE J F. Comparing design of experiments and optimal experimental design techniques for modelling the microbial growth rate under static environmental conditions[J]. *Food Microbiology*, 2018, 76: 504-512.
- [3] WALSH I, MYINT M, NGUYEN-KHUONG T, et al. Harnessing the potential of machine learning for advancing "Quality by Design" in biomanufacturing[J]. *mAbs*, 2022, 14 (1): 2013593.

- [4] ICH Q8(R2). Pharmaceutical Development[EB/OL]. 2009 [2023-03-01]. [https://max. book118. com/html/2019/0805/5044012342002112.shtm](https://max.book118.com/html/2019/0805/5044012342002112.shtm).
- [5] LIAO X P, MA H W, TANG Y J. Artificial intelligence: a solution to involution of design-build-test-learn cycle[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2022, 75: 102712.
- [6] ORSI E, BEEKWILDER J, EGGINK G, et al. The transition of *Rhodobacter sphaeroides* into a microbial cell factory[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2021, 118(2): 531-541.
- [7] FLETCHER E, CHEN Y, CASPETA L, et al. Editorial: genomic strategies for efficient microbial cell factories[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022, 10: 962828.
- [8] GURDO N, VOLKE D C, MCCLOSKEY D, et al. Automating the design-build-test-learn cycle towards next-generation bacterial cell factories[J]. *New Biotechnology*, 2023, 74: 1-15.
- [9] NAKAZAWA S, IMAICHI O, KOGURE T, et al. History-driven genetic modification design technique using a domain-specific lexical model for the acceleration of DBTL cycles for microbial cell factories[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(9): 2308-2317.
- [10] ISETT K, GEORGE H, HERBER W, et al. Twenty-four-well plate miniature bioreactor high-throughput system: assessment for microbial cultivations[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 98(5): 1017-1028.
- [11] MÜHLMANN M, KUNZE M, RIBEIRO J, et al. Cellulolytic RoboLector-towards an automated high-throughput screening platform for recombinant cellulase expression[J]. *Journal of Biological Engineering*, 2017, 11(1): 1.
- [12] VELEZ-SUBERBIE M L, BETTS J P J, WALKER K L, et al. High throughput automated microbial bioreactor system used for clone selection and rapid scale-down process optimization [J]. *Biotechnology Progress*, 2018, 34(1): 58-68.
- [13] HEMMERICH J, NOACK S, WIECHERT W, et al. Microbioreactor systems for accelerated bioprocess development [J]. *Biotechnology Journal*, 2018, 13(4): 1700141.
- [14] ABATE A R, HUNG T, MARY P, et al. High-throughput injection with microfluidics using picoinjectors[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(45): 19163-19166.
- [15] BROMIG L, VON DEN EICHEN N, WEUSTER-BOTZ D. Control of parallelized bioreactors I : dynamic scheduling software for efficient bioprocess management in high-throughput systems[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2022, 45(12): 1927-1937.
- [16] LONG Q, LIU X X, YANG Y K, et al. The development and application of high throughput cultivation technology in bioprocess development[J]. *Journal of Biotechnology*, 2014, 192 Pt B: 323-338.
- [17] SANDNER V, PYBUS L P, MCCREATH G, et al. Scale-down model development in ambr systems: an industrial perspective [J]. *Biotechnology Journal*, 2019, 14(4): 1700766.
- [18] CRUZ BOURNAZOU M N, BARZ T, NICKEL D B, et al. Online optimal experimental re-design in robotic parallel fed-batch cultivation facilities[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2017, 114(3): 610-619.
- [19] JANSEN R, TENHAEF N, MOCH M, et al. FeedER: a feedback-regulated enzyme-based slow-release system for fed-batch cultivation in microtiter plates[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2019, 42(11): 1843-1852.
- [20] HEMMERICH J, WIECHERT W, OLDIGES M. Automated growth rate determination in high-throughput microbioreactor systems[J]. *BMC Research Notes*, 2017, 10(1): 617.
- [21] MORSCHETT H, JANSEN R, NEUENDORF C, et al. Parallelized microscale fed-batch cultivation in online-monitored microtiter plates: implications of media composition and feed strategies for process design and performance[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2020, 47(1): 35-47.
- [22] HEMMERICH J, TENHAEF N, STEFFENS C, et al. Less sacrifice, more insight: repeated low-volume sampling of microbioreactor cultivations enables accelerated deep phenotyping of microbial strain libraries[J]. *Biotechnology Journal*, 2019, 14(9): 1800428.
- [23] UNTHAN S, RADEK A, WIECHERT W, et al. Bioprocess automation on a Mini Pilot Plant enables fast quantitative microbial phenotyping[J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14: 32.
- [24] LAWSON C E, HARCOTBE W R, HATZENPICHLER R, et al. Common principles and best practices for engineering microbiomes[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17(12): 725-741.
- [25] ZHU X F, DU C C, MOHSIN A, et al. An efficient high-throughput screening of high gentamicin-producing mutants based on titer determination using an integrated computer-aided vision technology and machine learning[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(33): 11659-11669.
- [26] KAMMINGA T, SLAGMAN S J, MARTINS DOS SANTOS V A P, et al. Risk-based bioengineering strategies for reliable bacterial vaccine production[J]. *Trends in Biotechnology*, 2019, 37(8): 805-816.
- [27] LIU Y, NIELSEN J. Recent trends in metabolic engineering of microbial chemical factories[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2019, 60: 188-197.
- [28] SARNAIK A, LIU A, NIELSEN D, et al. High-throughput screening for efficient microbial biotechnology[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2020, 64: 141-150.
- [29] ZENG W Z, GUO L K, XU S, et al. High-throughput screening technology in industrial biotechnology[J]. *Trends in Biotechnology*, 2020, 38(8): 888-906.

- [30] RAJ K, VENAYAK N, DIEP P, et al. Automation assisted anaerobic phenotyping for metabolic engineering[J]. *Microbial Cell Factories*, 2021, 20(1): 184.
- [31] RIENZO M, LIN K C, MOBILIA K C, et al. High-throughput optofluidic screening for improved microbial cell factories *via* real-time micron-scale productivity monitoring[J]. *Lab on a Chip*, 2021, 21(15): 2901-2912.
- [32] POLITIS S N, COLOMBO P, COLOMBO G, et al. Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development[J]. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2017, 43(6): 889-901.
- [33] SWAIN S, PARHI R, JENA B R, et al. Quality by design: concept to applications[J]. *Current Drug Discovery Technologies*, 2019, 16(3): 240-250.
- [34] NOLD V, JUNGHANS L, BISGEN L, et al. Applying intensified design of experiments to mammalian cell culture processes[J]. *Engineering in Life Sciences*, 2022, 22(12): 784-795.
- [35] TAI M, LY A, LEUNG I, et al. Efficient high-throughput biological process characterization: definitive screening design with the ambr250 bioreactor system[J]. *Biotechnology Progress*, 2015, 31(5): 1388-1395.
- [36] PEREIRA R F S, DE CARVALHO C C C R. Optimization of multiparameters for increased yields of cytochrome B5 in bioreactors[J]. *Molecules*, 2021, 26(14): 4148.
- [37] MERCIER S M, DIEPENBROEK B, DALM M C F, et al. Multivariate data analysis as a PAT tool for early bioprocess development data[J]. *Journal of Biotechnology*, 2013, 167(3): 262-270.
- [38] MERCIER S M, DIEPENBROEK B, WIJFFELS R H, et al. Multivariate PAT solutions for biopharmaceutical cultivation: current progress and limitations[J]. *Trends in Biotechnology*, 2014, 32(6): 329-336.
- [39] RATHORE A S, MITTAL S, PATHAK M, et al. Guidance for performing multivariate data analysis of bioprocessing data: pitfalls and recommendations[J]. *Biotechnology Progress*, 2014, 30(4): 967-973.
- [40] XU P, CLARK C, RYDER T, et al. Characterization of TAP Ambr 250 disposable bioreactors, as a reliable scale-down model for biologics process development[J]. *Biotechnology Progress*, 2017, 33(2): 478-489.
- [41] NIKITA S, MISHRA S, GUPTA K, et al. Advances in bioreactor control for production of biotherapeutic products[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2023, 120(5): 1189-1214.
- [42] SÃO PEDRO M N, SILVA T C, PATIL R, et al. White paper on high-throughput process development for integrated continuous biomanufacturing[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2021, 118(9): 3275-3286.
- [43] KHANAL O, LENHOFF A M. Developments and opportunities in continuous biopharmaceutical manufacturing[J]. *mAbs*, 2021, 13(1): 1903664.
- [44] ANANE E, GARCÍA Á C, HABY B, et al. A model-based framework for parallel scale-down fed-batch cultivations in mini-bioreactors for accelerated phenotyping[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2019, 116(11): 2906-2918.
- [45] TAPIA F, VÁZQUEZ-RAMÍREZ D, GENZEL Y, et al. Bioreactors for high cell density and continuous multi-stage cultivations: options for process intensification in cell culture-based viral vaccine production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(5): 2121-2132.
- [46] JANOSCHEK S, SCHULZE M, ZIJLSTRA G, et al. A protocol to transfer a fed-batch platform process into semi-perfusion mode: the benefit of automated small-scale bioreactors compared to shake flasks as scale-down model[J]. *Biotechnology Progress*, 2019, 35(2): e2757.
- [47] LIN H, LEIGHTY R W, GODFREY S, et al. Principles and approach to developing mammalian cell culture media for high cell density perfusion process leveraging established fed-batch media[J]. *Biotechnology Progress*, 2017, 33(4): 891-901.
- [48] XU J L, OU J F, MCHUGH K P, et al. Upstream cell culture process characterization and in-process control strategy development at pandemic speed[J]. *mAbs*, 2022, 14(1): 2060724.
- [49] WOLF M K F, LORENZ V, KARST D J, et al. Development of a shake tube-based scale-down model for perfusion cultures[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2018, 115(11): 2703-2713.
- [50] MACDONALD M A, NÖBEL M, ROCHE RECINOS D, et al. Perfusion culture of Chinese Hamster Ovary cells for bioprocessing applications[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2022, 42(7): 1099-1115.
- [51] KUIPER M, SPENCER C, FÄLDT E, et al. Repurposing fed-batch media and feeds for highly productive CHO perfusion processes[J]. *Biotechnology Progress*, 2019, 35(4): e2821.
- [52] JANAKIRAMAN V, KWIATKOWSKI C, KSHIRSAGAR R, et al. Application of high-throughput mini-bioreactor system for systematic scale-down modeling, process characterization, and control strategy development[J]. *Biotechnology Progress*, 2015, 31(6): 1623-1632.



第一作者及通讯作者：白仲虎 (1965—)，男，教授，博士生导师。研究方向为发酵工程、生物反应器、生物医药过程工程。

E-mail: baizhonghu@jiangnan.edu.cn