

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2023 年 2 月 23 日 (23.02.2023)



(10) 国际公布号
WO 2023/019883 A1

- (51) 国际专利分类号:
G16B 40/00 (2019.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2022/073490
- (22) 国际申请日: 2022 年 1 月 24 日 (24.01.2022)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
202110950873.9 2021年8月18日 (18.08.2021) CN
- (71) 申请人: 江南大学(JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。
- (72) 发明人: 刘飞(LIU, Fei); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 李权(LI,

Quan); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 赵忠盖(ZHAO, Zhonggai); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 李恭新(LI, Gongxin); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 王志国(WANG, Zhiguo); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。

(74) 代理人: 苏州市中南伟业知识产权代理事务所(普通合伙)(CENTRAL SOUTH WELL INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE); 中国江苏省苏州市吴中区石湖西路 188 号吴中万达广场 A 座苏州大学国家科技园 2303, Jiangsu 215000 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,

(54) Title: METHOD FOR MONITORING BIOLOGICAL MANUFACTURING PROCESS BY USING CELL METABOLIC NETWORK

(54) 发明名称: 利用细胞代谢网络监测生物制造过程的方法

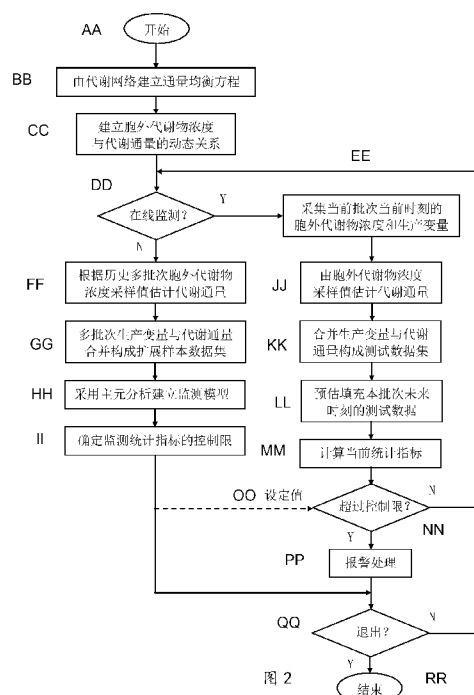


图 2

- AA Start
- BB Establish a flux balance equation by means of a metabolic network
- CC Establish a dynamic relationship between the concentration of an extracellular metabolite and a metabolic flux
- DD Is online monitoring performed?
- EE Collect concentrations of extracellular metabolites, and production variables of the current batch at the current moment
- FF Estimate the metabolic flux according to sampling values of concentrations of extracellular metabolites of a plurality of historical batches
- GG Combine production variables of a plurality of batches and the metabolic flux to form an expanded sample data set
- HH Establish a monitoring model by using principal component analysis
- II Determine a control limit of a monitoring statistical index
- JJ Estimate the metabolic flux according to sampling values of the concentrations of the extracellular metabolites
- KK Combine the production variables and the metabolic flux to form a test data set
- LL Estimate test data for filling future moments of the present batch
- MM Calculate the current statistical index
- NN Does the set value exceed the control limit?
- OO Set value
- PP Perform alarm processing
- QQ Exit?
- RR End

(57) Abstract: The present invention relates to a method for monitoring a biological manufacturing process by using a cell metabolic network. The method comprises the following steps: performing flux balance analysis on the basis of a metabolic network, so as to obtain a metabolic flux that reflects a cell growth and reproduction process; forming a training data set by using an intracellular metabolic flux and a production process variable, and establishing a biological fermentation process monitoring model and a statistics control limit; and on the basis of the monitoring model, performing online monitoring on an operation situation by using a production process variable that is collected in real time, and a calculated metabolic flux value. In the method for monitoring a biological manufacturing process

BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

- (84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

by using a cell metabolic network in the present invention, detectable or observable information during a biological manufacturing process is used, and undetectable intracellular metabolism information during a cell growth and reproduction process is fully mined, such that operation situation evaluation and fault monitoring of a production and manufacturing process can be performed in a more effective manner.

(57) 摘要: 本发明涉及一种利用细胞代谢网络监测生物制造过程的方法, 包括如下步骤: 基于代谢网络进行通量均衡分析, 得到反映细胞生长与繁殖过程的代谢通量; 将细胞内代谢通量与生产过程变量一起构成训练数据集, 建立生物发酵过程监测模型及统计量控制限; 基于监测模型, 利用实时采集的生产过程变量和代谢通量计算值进行运行状况在线监测。本发明的利用细胞代谢网络监测生物制造过程的方法, 该方法既利用微生物制造过程可检测或可观测信息, 又充分挖掘细胞生长繁殖过程中不可检测的胞内代谢信息, 能够更加有效的实施对生产制造过程运行状况评估及故障监测。

利用细胞代谢网络监测生物制造过程的方法

技术领域

5 本发明涉及工业生物过程控制技术领域，尤其是指一种利用细胞代谢网络监测生物制造过程的方法。

背景技术

10 随着全球经济发展和社会进步，为了满足人们日益增长的生活需求，以工业微生物技术为代表的小批量、高利润、多品种生产方式受到重视。生物制造过程一般在生物反应器中进行，其可以通过批次生产的方式在一定周期时间内获得经济效益高的产物，比如常用抗生素青霉素的生产，其外源分泌蛋白等一般由生物发酵反应而得。然而在发酵生产过程中经常会出现各类生产状况的失控或运行故障，如果不能及早监测、预警并及时调控，最终会影响生产质量和目标产物的产量。因此，生物制造过程运行状况评估与故障监测，具有重要的实际工程价值。

15 生物发酵过程中同时存在物化和生化反应，细胞内部机理复杂，而实际生产过程中一般只能检测到温度、pH、通风率、搅拌功率等基本生产工艺变量及一些可观测的细胞外物质浓度，对于细胞内的微观的代谢活动则无法观测，导致现有的发酵生产运行状况评估技术主要依据生产过程中各工艺变量和物质浓度进行综合分析，其监测的实效性和及时性有待提高。

20 发明内容

为此，本发明所要解决的技术问题在于克服现有技术中于细胞内微观的代谢活动无法观测，导致现有的发酵生产运行状况评估不足的问题，提供一种利用细胞代谢网络监测生物制造过程的方法，该方法既利用微生物制造过程可检测或可观测信息，又充分挖掘细胞生长繁殖过程中不可检测的胞内代

谢信息，能够更加有效的实施对生产制造过程运行状况评估及故障监测。

为解决上述技术问题，本发明提供了一种利用细胞代谢网络监测生物制造过程的方法，包括如下步骤：基于代谢网络进行通量均衡分析，得到反映细胞生长与繁殖过程的代谢通量；将细胞内代谢通量与生产过程变量一起构成训练数据集，建立生物发酵过程监测模型及统计量控制限；基于监测模型，
5 利用实时采集的生产过程变量和代谢通量计算值进行运行状况在线监测。

在本发明的一个实施例中，所述通量均衡分析过程包括：建立通量均衡方程；建立胞外代谢物浓度与代谢通量的动态关系；根据多批次胞外代谢物浓度采样值估计代谢通量。

10 在本发明的一个实施例中，所述代谢通量的随时间变化，采集相邻两个时间点之间的代谢通量变化规律对代谢通量进行瞬态特征描述，包括常数、线性函数、二次函数。

在本发明的一个实施例中，多批次胞外代谢物浓度采样值根据生产实际来选取，在计算时间间隔内采样一次或多次采样，再进行曲线拟合。

15 在本发明的一个实施例中，在估计代谢通量时，通过求导数、线性规划、二次规划的优化算法求得最优代谢通量。

在本发明的一个实施例中，建立生物发酵过程监测模型包括：将生产过程变量和细胞内代谢通量合并构成扩展样品数据集；对样品数据集进行标准化处理生成标准样品数据集；利用主元分析建立监测模型；确定监测统计指
20 标的控制限。

在本发明的一个实施例中，在扩展样品数据集时，所述细胞内代谢通量选取全部代谢通量或胞内外交换代谢通量或内部代谢通量。

在本发明的一个实施例中，所述主元分析包括一般主元分析、多阶段主元分析、核主元分析以及支持向量机方法。

25 在本发明的一个实施例中，所述运行状况在线监测包括：采集当前批次当前时刻的胞外代谢物浓度和生产过程变量；由胞外代谢物浓度估计获得的

代谢通量；将生产过程变量与代谢通量合并构成测试数据集；对测试数据集进行标准化处理生成测试标准数据集；预估填充未来时刻的测试数据；计算统计标准，并与统计量控制限比较。

在本发明的一个实施例中，预估填充未来时刻的测试数据的方法包括直接
5 用前若干批次对应时刻的均值数据、或考虑本批次当前及过去时刻实际数据与对应均值数据之差，预估填充未来数据。

本发明的上述技术方案相比现有技术具有以下优点：

本发明所述的利用细胞代谢网络监测生物制造过程的方法，在多批次生
产过程数据基础上，利用细胞代谢网络和胞外可观测代谢物浓度，通过估计
10 细胞代谢通量，将代谢通量与生产过程变量结合，构建扩展样本数据集，给出一种在线监测过程运行状况的方法，该方法既利用微生物制造过程可检测或可观测信息，又充分挖掘细胞生长繁殖过程中不可检测的胞内代谢信息，能够更加有效的实施对生产制造过程运行状况评估及故障监测，能够及时发现过程运行中的异常，以便做出相应的控制措施，对于减少安全隐患、提高
15 企业综合效益具有明显的作用。

附图说明

为了使本发明的内容更容易被清楚的理解，下面根据本发明的具体实施例并结合附图，对本发明作进一步详细的说明，其中

图 1 是本发明利用细胞代谢网络监测生物制造过程的方法步骤图；

20 图 2 是本发明利用细胞代谢网络监测生物制造过程的方法流程示意图；

图 3 青霉素发酵过程部分可观测代谢物浓度计算结果。

图 4 青霉素发酵过程部分代谢通量动态估计。

图 5 青霉素发酵过程运行状况监测效果。

具体实施方式

25 下面结合附图和具体实施例对本发明作进一步说明，以使本领域的技术

人员可以更好地理解本发明并能予以实施,但所举实施例不作为对本发明的限定。

参照图 1 所示,本发明的利用细胞代谢网络监测生物制造过程的方法,包括如下步骤:基于代谢网络进行通量均衡分析,得到反映细胞生长与繁殖过程的代谢通量;将细胞内代谢通量与生产过程变量一起构成训练数据集,建立生物发酵过程监测模型及统计量控制限;基于监测模型,利用实时采集的生产过程变量和代谢通量计算值进行运行状况在线监测;在多批次生产过程数据基础上,利用细胞代谢网络和胞外可观测代谢物浓度,通过估计细胞代谢通量,将代谢通量与生产过程变量结合,构建扩展样本数据集,给出一种在线监测过程运行状况的方法,该方法既利用微生物制造过程可检测或可观测信息,又充分挖掘细胞生长繁殖过程中不可检测的胞内代谢信息,能够更加有效的实施对生产制造过程运行状况评估及故障监测,能够及时发现过程运行中的异常,以便做出相应的控制措施,对于减少安全隐患、提高企业综合效益具有明显的作用。

参照图 2 所示,所述通量均衡分析过程包括:建立通量均衡方程;建立胞外代谢物浓度与代谢通量的动态关系;根据多批次胞外代谢物浓度采样值估计代谢通量;建立生物发酵过程监测模型包括:将生产过程变量和细胞内代谢通量合并构成扩展样品数据集;对样品数据集进行标准化处理生成标准样品数据集;利用主元分析建立监测模型;确定监测统计指标的控制限;所述运行状况在线监测包括:采集当前批次当前时刻的胞外代谢物浓度和生产过程变量;由胞外代谢物浓度估计获得的代谢通量;将生产过程变量与代谢通量合并构成测试数据集;对测试数据集进行标准化处理生成测试标准数据集;预估填充未来时刻的测试数据;计算统计标准,并与统计量控制限比较。

建立通量均衡方程:

微生物发酵过程中胞内代谢物的净积累或消耗速率远小于胞内外代谢物之间的交换反应速率,对于一个总化学反应个数为 F 并且包含了 m 个胞内代谢物和 R 个胞外可测代谢物的代谢网络,其通量均衡方程如下:

$$\dot{C}_{R,t} = S_R \cdot V_t, \quad S_m \cdot V_t = 0 \quad (1)$$

其中, $C_{R,t} \in R^R$ 表示 R 个可测的胞外代谢物在 t 时刻浓度向量, $S_R \in R^{R \times F}$ 表示胞外可测代谢物的化学计量矩阵, $V_t \in R^F$ 表示代谢网络内代谢通量向量, 包括胞内代谢通量及胞内外交换通量, $S_m \in R^{m \times F}$ 表示 m 个胞内代谢物的化学
5 计量矩阵。

微生物代谢网络中化学反应个数 F 多于细胞内代谢物数量 m , 其自由度 $d=F-\text{rank}(S_m)$, 采用一组独立通量 $u_t \in R^d$ 的线性组合表示代谢通量, 即 $V_t = K \cdot u_t$, 其中 $K \in R^{F \times d}$ 表示 S_m 零空间的一组标准正交基, u_t 称为自由通
10 量。

代谢通量的瞬态特征描述:

考虑代谢通量 V_t 随时间变化, 引入计算时间序列点 t_D , $D=1, \dots, Z$, 用以描述分析 V_t 的动态变化, 即将整个生产过程划分为 $Z-1$ 个时间间隔, 在每个时间间隔内, 即在相邻两个时间点 t_D 和 t_{D+1} 之间, 假设代谢通量按一定函数规律变化, 可以是常数、线性函数、二次型函数。选用线性函数后的代谢
15 通量 V_t 表示如下:

$$V_t = \sum_{D=1}^Z K \cdot u_D \cdot k(t, t_D) \quad (2)$$

其中, u_D 表示第 D 个计算时刻的自由通量, $k(t, t_D)$ 是各时间间隔内代谢通量线性变化的系数函数, 按表 1 选取。

时间间隔	系数函数 $k(t, t_D)$
$D=1 \text{ \& } t = t_D$	1
$D > 1 \text{ \& } t \leq t_{D-1}$	0
$D > 1 \text{ \& } t_{D-1} < t \leq t_D$	$\frac{t - t_{D-1}}{t_D - t_{D-1}}$
$D < Z \text{ \& } t_D < t \leq t_{D+1}$	$1 - \frac{t - t_D}{t_{D+1} - t_D}$
$D < Z \text{ \& } t_{D+1} < t$	0

表 1

基于代谢通量的胞外代谢物浓度计算：

将式(2)代入式(1)，得：

$$\dot{C}_{R,t} = \sum_{D=1}^Z S_R \cdot K \cdot u_D \cdot k(t, t_D) \quad (3)$$

5 对式(3)两边积分得：

$$C_{R,t} = C_{R,0} + \sum_{D=1}^Z S_R \cdot K \cdot u_D \cdot \gamma(t, t_D) \quad (4)$$

其中，函数 $\gamma(t, t_D) = \int_0^t k(t, t_D) dt$ ，而 $C_{R,0} = [C_{1,0}, C_{2,0}, \dots, C_{R,0}]^T$ 表示 R 个胞外可观测代谢物的初始浓度向量。

10 生产过程中实际采样观测时间点为 t_n^* , $n=1, \dots, N$ ，根据式(4)，第 r 个胞外代谢物， $r=1, \dots, R$ ，在实际采样时刻 t_n^* 的浓度计算值为：

$$C_{r,n} = C_{r,0} + \sum_{D=1}^Z S_R \cdot K \cdot u_D \cdot \gamma(t_n^*, t_D) \quad (5)$$

其中， $C_{r,0}$ 表示第 r 个胞外代谢物初始浓度值。

15 采样点可以根据生产实际来选取，简单操作是在代谢通量 V_t 的每个计算时间间隔内进行一次采样观测，即 $Z=N-1$ ，也可以在计算时间间隔内进行多次采样；一般情形下代谢通量 V_t 的第一个和最后一个计算时间点应分别对应于实际采样观测的初始和最终时刻。

各采样时刻的代谢通量估计：

在采样观测时间点 t_n^* ，各胞外代谢物的实际采样值为 $C_{r,n}^*$ ，则浓度计算值与采样值的偏差为：

$$20 \quad \Phi = \sum_{r=1}^R \sum_{n=1}^N [\sigma_{r,n}^{-2} \cdot (C_{r,n} - C_{r,n}^*)^2] \quad (6)$$

其中， $\sigma_{r,n}^2$ 为胞外代谢物 r 在采样时刻 n 的浓度误差项方差。

以 $U = [u_1^T, u_2^T, \dots, u_Z^T]^T$ 表示各个计算时刻的 d 维自由通量，通过优化算法寻找满足式(5)的 U，使得偏差 Φ 最小，即求解 $\min_U \Phi$ ，获得最优的自由通量 U，也即各 t_D 时刻的自由通量 u_D ，再利用式(2)估计代谢通量 V_t 。

简单的优化算法是直接由式(6)对 U 求导数, 即 $\frac{\partial \Phi}{\partial U}$, 得到优化变量 $U = H^{-1} \cdot J$, 其中矩阵 H 和矩阵 J 由下式给定:

$$H = \sum_{r=1}^R \sum_{n=1}^N \left[\left(\frac{\partial C_{r,n}}{\partial P} \right)^T \cdot W_r \cdot \left(\frac{\partial C_{r,n}}{\partial P} \right) \right]$$

$$J = \sum_{r=1}^R \sum_{n=1}^N \left[\left(\frac{\partial C_{r,n}}{\partial P} \right)^T \cdot W_r \cdot C'_{r,n} \right]$$

5 式中 W_r 是由 $\sigma_{r,n}^{-2}$ 构成的对角矩阵。

工程实际中可增加初始浓度 C_{R0} 、代谢通量计算时刻 t_D 为优化变量, 利用优化算法求解 $\min_{U, C_{R0}, t_D} \Phi$, 获得最优的自由通量 U 、初始浓度 C_0 以及时刻 t_D 。

建立运行状况监测模型及指标:

扩展样本数据集

10 生产中已有的 I 个正常批次数据, 其中第 i 批次生产变量 (包括温度、pH 通风率、搅拌功率、底物流加速率等) 数据矩阵为 $X_i \in R^{N \times O}$, $i = 1, \dots, I$, N 为采样观测点数, O 为生产变量数。根据估计所得的代谢通量 V_t , 选取其中全部或部分代谢通量, 若选取 L 个胞内外交换代谢通量在第 i 批次的数据构成集合 $Y_i \in R^{N \times L}$, 则该批次的生产变量数据与胞内外交换代谢通量合并构成

15 扩展样本数据集 $G_i = [X_i, Y_i]^T \in R^{N \times H}$, 其中 $H = O + L$ 。全部 I 个批次的发酵过程扩展样本数据集则为 $\bar{G} = [G_1, G_2, \dots, G_I] \in R^{I \times N \times H}$, 按批次方向展开得 $G \in R^{I \times N \times H}$ 。

数据集的标准化处理

将扩展样本数据集标准化变换为均值为 0、方差为 1 的标准训练数据集,

20 近似服从多维正态分布:

$$G_{train} = \frac{G - \text{mean}(G)}{\text{std}(G)} \quad (7)$$

其中, $\text{mean}(G)$ 为 G 中同一时刻各个批次同一变量的均值, 即多批次正常操作下的平均运行轨迹, $\text{std}(G)$ 是 G 中同一时刻各个批次同一变量的标准

差。

监测模型及控制限的求取

构造标准数据集 G_{train} 的协方差矩阵 $\Sigma = \frac{1}{I-1} G_{\text{train}}^T G_{\text{train}}$ ，利用主元分析建立监测模型，先求取其特征值及其特征向量，按累计方差贡献率从大到小，选取 A 个主元特征值所对应的特征向量 $q_1, \dots, q_A$ ，构成载荷矩阵 $Q = [q_1, \dots, q_A]$ ，进而计算 G_{train} 的各批次得分向量和残差向量，全部 I 批次得分向量和残差向量分别构成得分矩阵和残差矩阵，据此求取常用的 T^2 控制限和 SPE 控制限。

监测模型也可以采用多阶段多向主元分析、多向核主元分析和多类支持向量机等方法。

在线实时运行状况监测：

当前时刻数据处理

采集生产过程当前时刻 n 的生产变量数据 $X_{\text{test},n} \in R^{n \times O}$ ，通过估计获得的代谢通量 $Y_{\text{test},n} \in R^{n \times L}$ ，将生产变量和代谢通量合并得到测试数据集 $G_{\text{test},n} \in R^{n \times H}$ ；以训练数据集中相应时刻的平均值和标准差对 $G_{\text{test},n} \in R^{n \times H}$ 进行标准化处理。

未来时刻数据估计

当前时刻之后的 $n+1$ 至批次结束 N 时刻的数据，采用预估的方法进行填充，用标准化的 $G_{\text{test},n}$ 中第 n 时刻数据值进行填充，得到 $G_{\text{test},n}^* \in R^{n \times H}$ ，再按时间方向展开为 $G_{\text{test},n}^{**} \in R^{1 \times N \times H}$ 。也可以直接用前若干批次对应时刻的均值数据，或考虑当前及过去时刻实际数据与对应均值数据之差，预估填充未来数据。

计算当前时刻 T^2 统计量和 SPE 统计量

根据标准训练数据集 G_{train} 的载荷矩阵 Q 计算当前 n 时刻得分向量 $t_{\text{test},n}$ 和残差向量 $e_{\text{test},n}$ ：

$$\begin{aligned}
t_{test,n} &= G_{test,n}^{tr} \cdot Q \\
G_{new,n} &= t_{test,n} \cdot Q^T \\
e_{test,n} &= G_{test,n}^{tr} - G_{new,n}
\end{aligned} \tag{8}$$

按下式计算 n 时刻 T^2 统计量和 SPE 统计量:

$$\begin{aligned}
T^2 &= t_{test,n} \cdot \Psi^{-1} \cdot t_{test,n}^T \\
SPE_n &= e_{test,n} \cdot e_{test,n}^T
\end{aligned} \tag{9}$$

其中, $\Psi \in R^{4 \times 4}$ 是由 G_{train} 的第 i 批次得分向量中各个元素构成的对角矩阵。

过程运行状况监测

10 若 T^2 和 SPE_n 低于统计量控制限, 则过程运行正常; 否则预警过程有异常或故障。

为了验证本实施例的利用细胞代谢网络监测生物制造过程的方法的效果, 将方法应用于青霉素生产过程运行监测:

15 青霉素发酵代谢网络共包含 66 个代谢通量(其中胞内外交换通量 5 个)和 49 种胞内代谢物, 葡萄糖、青霉素、菌体生物质、氧气及二氧化碳等 5 种胞外代谢物可检测, 考虑反应温度、pH 值、通风率、搅拌功率、底物流加速率和冷却水流加速率等生产工艺变量和胞内外交换代谢通量共 11 个, 选取 30 批次、每批次 800 采样点, 形成扩展样本数据集。

20 按本发明方法完成代谢通量的胞外代谢物浓度计算和各采样时刻的代谢通量估计, 图 3 给出胞内外交换代谢通量的估计值, 由此扩展样本数据集不仅包含了生物发酵过程可检测的生产工艺变量信息, 也包含了细胞内部不可测的代谢信息, 更全面地反映生产过程特征。

针对青霉素发酵过程由通风、搅拌及底物流加引起的典型故障, 图 4 给出了本发明在线监测结果:

25 其中(a)表示的过程监测只采用了生产工艺变量, 而(b)则同时结合代谢

网络信息。从 T^2 监测图中可以发现，当故障发生时，本发明所提出的方法能够及时准确地监测故障，而基于生产变量监测有一定时间滞后。

本领域内的技术人员应明白，本申请的实施例可提供为方法、系统、或计算机程序产品。因此，本申请可采用完全硬件实施例、完全软件实施例、
5 或结合软件和硬件方面的实施例的形式。而且，本申请可采用在一个或多个其中包含有计算机可用程序代码的计算机可用存储介质（包括但不限于磁盘存储器、CD-ROM、光学存储器等）上实施的计算机程序产品的形式。

本申请是参照根据本申请实施例的方法、设备（系统）、和计算机程序产品的流程图和 / 或方框图来描述的。应理解可由计算机程序指令实现流程图和 / 或方框图中的每一流程和 / 或方框、以及流程图和 / 或方框图中的流
10 程和 / 或方框的结合。可提供这些计算机程序指令到通用计算机、专用计算机、嵌入式处理机或其他可编程数据处理设备的处理器以产生一个机器，使得通过计算机或其他可编程数据处理设备的处理器执行的指令产生用于实现在流程图一个流程或多个流程和 / 或方框图一个方框或多个方框中指定的功能的装置。
15

这些计算机程序指令也可存储在能引导计算机或其他可编程数据处理设备以特定方式工作的计算机可读存储器中，使得存储在该计算机可读存储器中的指令产生包括指令装置的制造品，该指令装置实现在流程图一个流程或多个流程和 / 或方框图一个方框或多个方框中指定的功能。

20 这些计算机程序指令也可装载到计算机或其他可编程数据处理设备上，使得在计算机或其他可编程设备上执行一系列操作步骤以产生计算机实现的处理，从而在计算机或其他可编程设备上执行的指令提供用于实现在流程图一个流程或多个流程和 / 或方框图一个方框或多个方框中指定的功能的步骤。

25 显然，上述实施例仅仅是为清楚地说明所作的举例，并非对实施方式的限定。对于所属领域的普通技术人员来说，在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。而

由此所引伸出的显而易见的变化或变动仍处于本发明创造的保护范围之内。

权 利 要 求 书

1. 一种利用细胞代谢网络监测生物制造过程的方法，其特征在于：包括如下步骤：基于代谢网络进行通量均衡分析，得到反映细胞生长与繁殖过程的代谢通量；将细胞内代谢通量与生产过程变量一起构成训练数据集，建立生物发酵过程监测模型及统计量控制限；基于监测模型，利用实时采集的生产过程变量和代谢通量计算值进行运行状况在线监测。

2. 根据权利要求1所述的利用细胞代谢网络监测生物制造过程的方法，其特征在于：所述通量均衡分析过程包括：建立通量均衡方程；建立胞外代谢物浓度与代谢通量的动态关系；根据多批次胞外代谢物浓度采样值估计代谢通量。

3. 根据权利要求2所述的利用细胞代谢网络监测生物制造过程的方法，其特征在于：所述代谢通量的随时间变化，采集相邻两个时间点之间的代谢通量变化规律对代谢通量进行瞬态特征描述，包括常数、线性函数、二次函数。

4. 根据权利要求2所述的利用细胞代谢网络监测生物制造过程的方法，其特征在于：多批次胞外代谢物浓度采样值根据生产实际来选取，在计算时间间隔内采样一次或多次采样，再进行曲线拟合。

5. 根据权利要求2所述的利用细胞代谢网络监测生物制造过程的方法，其特征在于：在估计代谢通量时，通过求导数、线性规划、二次规划的优化算法求得最优代谢通量。

6. 根据权利要求1所述的利用细胞代谢网络监测生物制造过程的方法，其特征在于：建立生物发酵过程监测模型包括：将生产过程变量和细胞内代谢通量合并构成扩展样品数据集；对样品数据集进行标准化处理生成标准样品数据集；利用主元分析建立监测模型；确定监测统计指标的控制限。

7. 根据权利要求6所述的利用细胞代谢网络监测生物制造过程的方法，

其特征在于：在扩展样品数据集时，所述细胞内代谢通量选取全部代谢通量或胞内外交换代谢通量或内部代谢通量。

8. 根据权利要求6所述的利用细胞代谢网络监测生物制造过程的方法，其特征在于：所述主元分析包括一般主元分析、多阶段主元分析、核主元分析以及支持向量机方法。

9. 根据权利要求1所述的利用细胞代谢网络监测生物制造过程的方法，其特征在于：所述运行状况在线监测包括：采集当前批次当前时刻的胞外代谢物浓度和生产过程变量；由胞外代谢物浓度估计获得的代谢通量；将生产过程变量与代谢通量合并构成测试数据集；对测试数据集进行标准化处理生成测试标准数据集；预估填充未来时刻的测试数据；计算统计标准，并与统计量控制限比较。

10. 根据权利要求9所述的利用细胞代谢网络监测生物制造过程的方法，其特征在于：预估填充未来时刻的测试数据的方法包括直接用前若干批次对应时刻的均值数据、或考虑本批次当前及过去时刻实际数据与对应均值数据之差，预估填充未来数据。

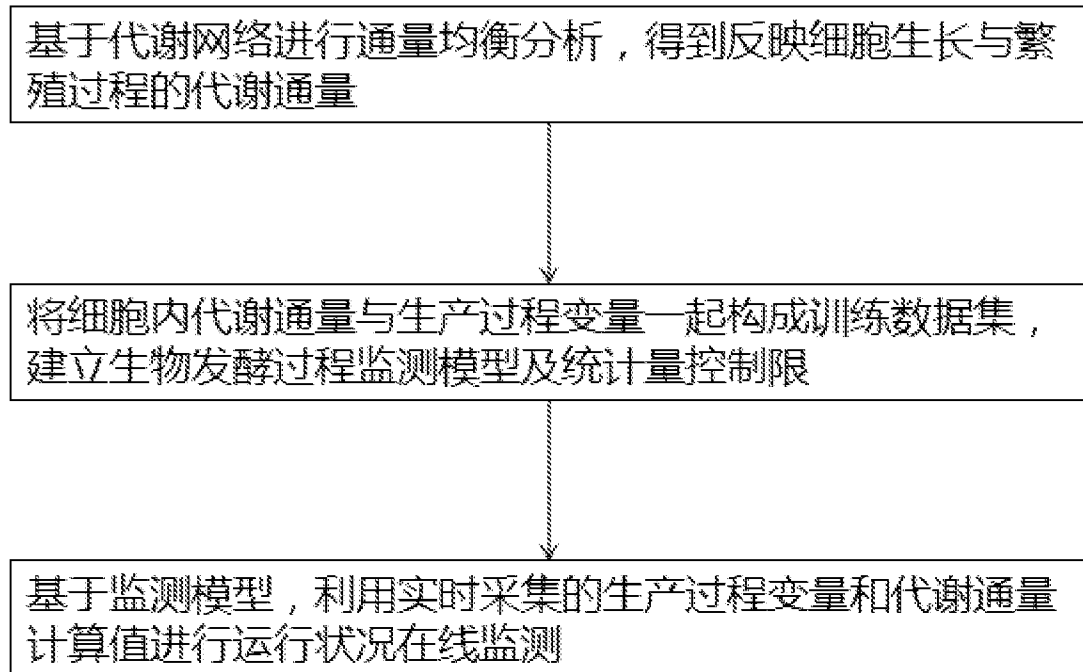


图 1

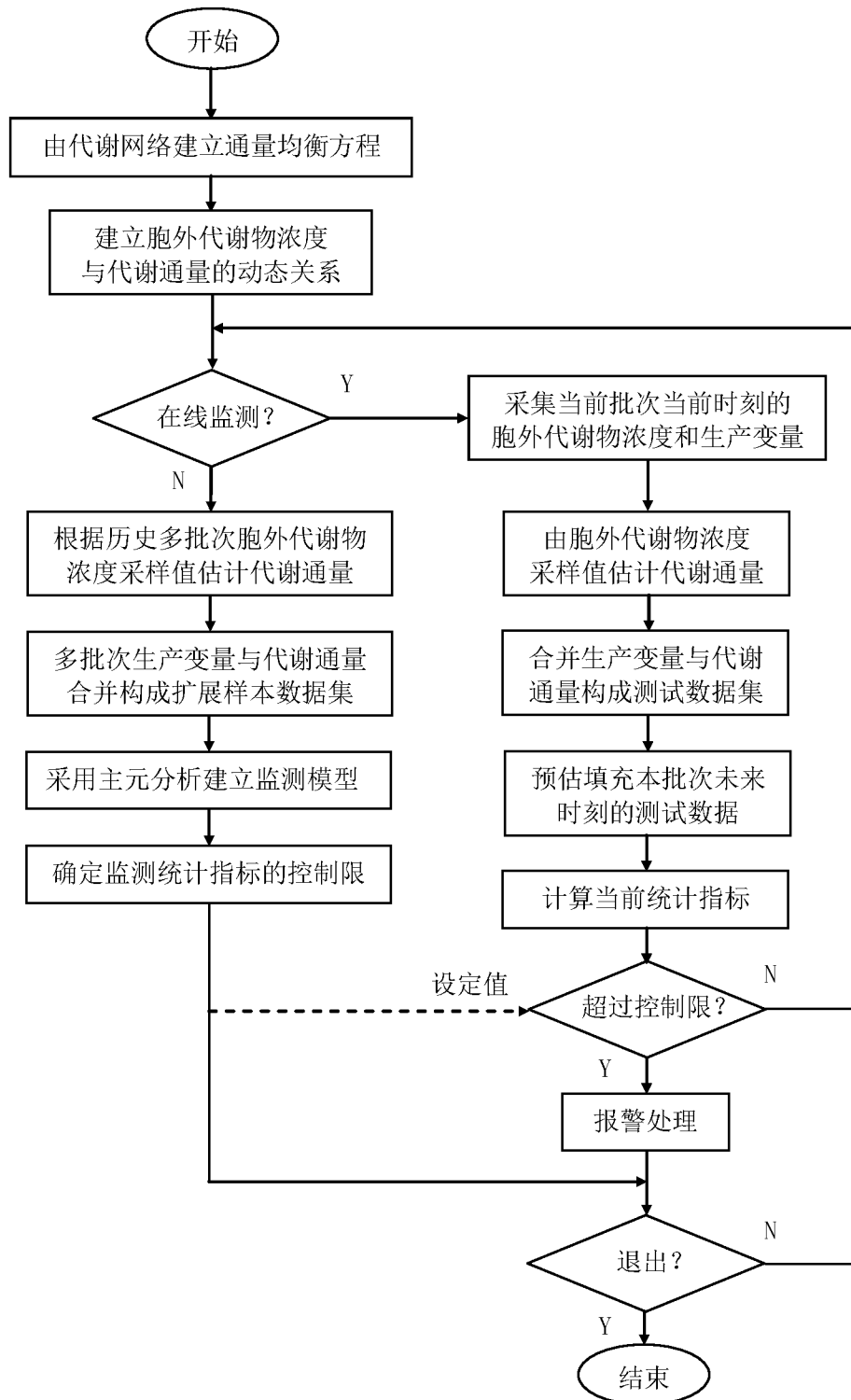


图 2

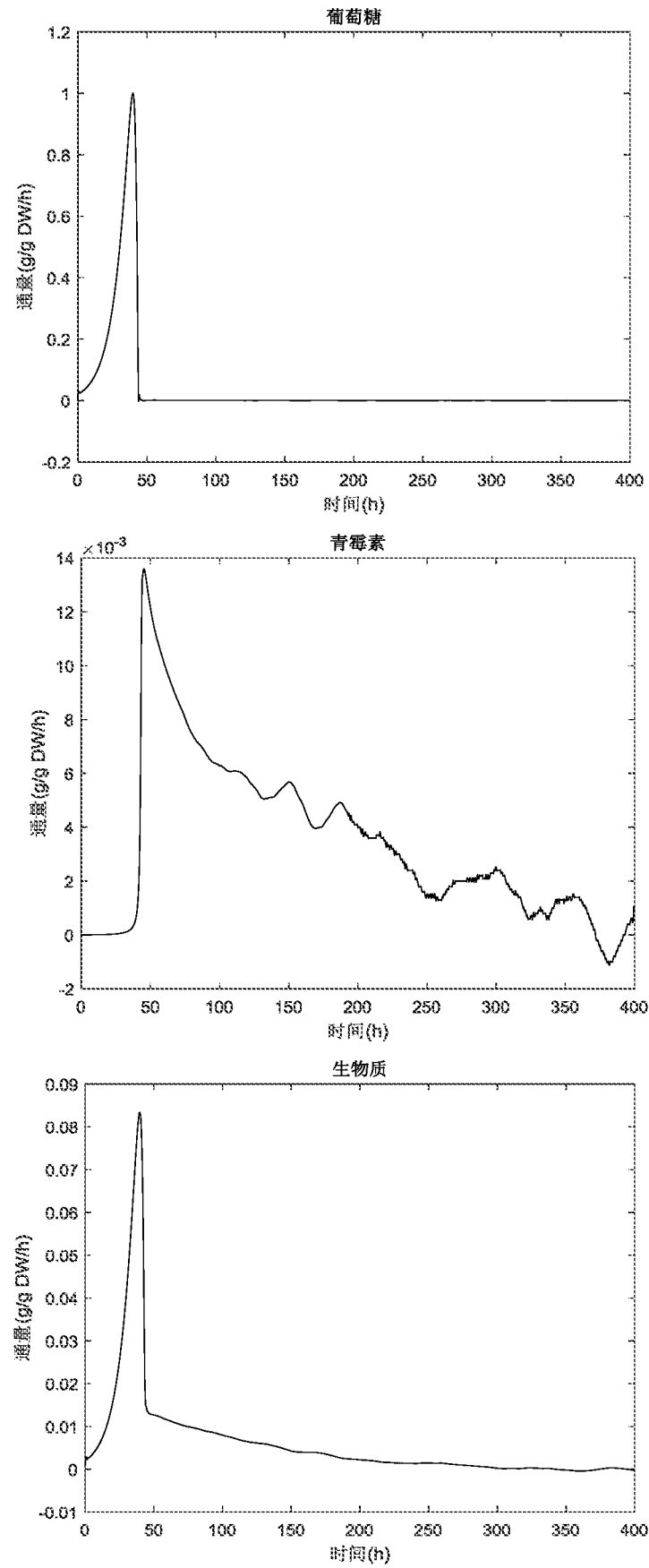


图 3

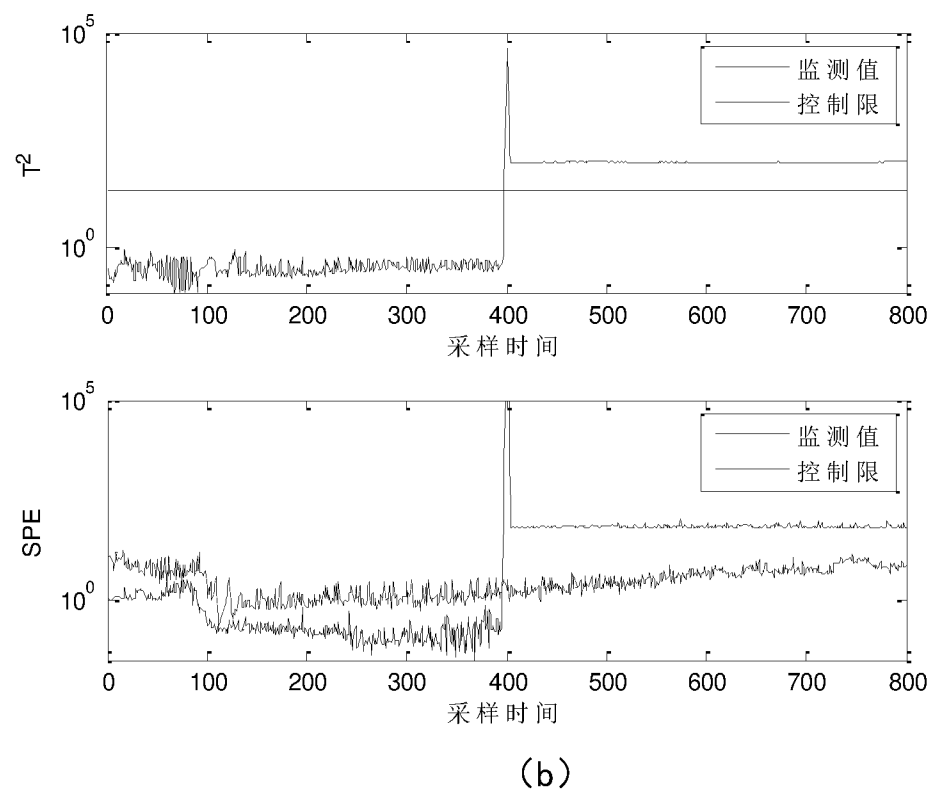
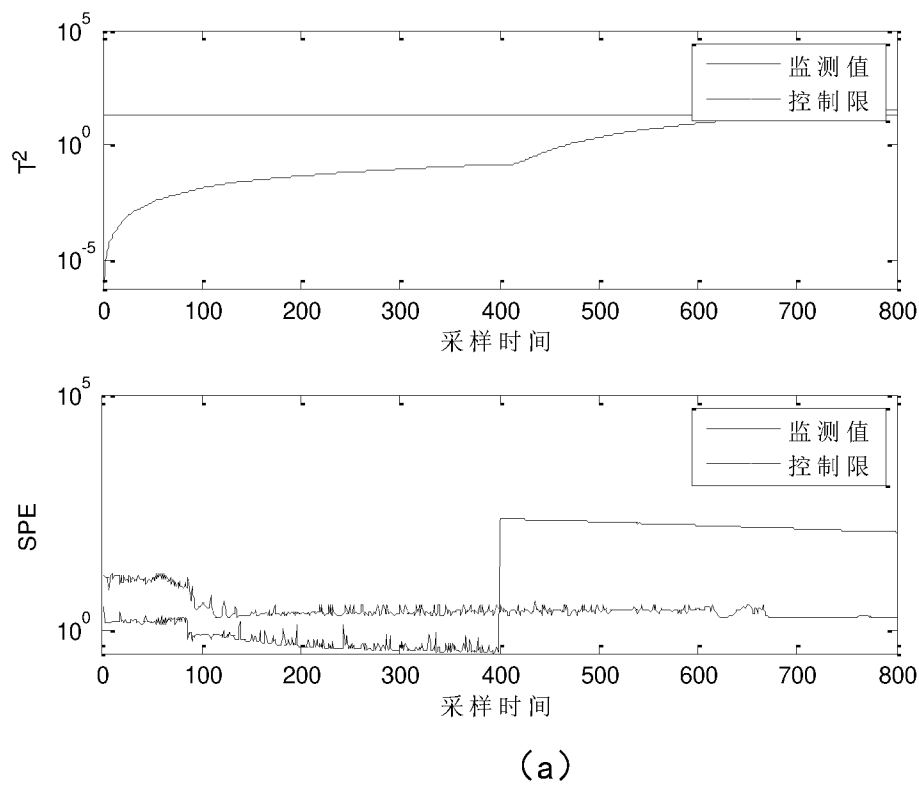


图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/073490

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G16B 40/00(2019.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G16B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT, CNKI, EPODOC, WPI: 细胞, 胞内, 胞外, 代谢网络, 通量, 分析, 变量, 发酵, 模型, 监测, 控制限, 阈值, 状态, 主元分析, cell, intracellular, extracellular, metabolic network, flux, analysis, variable, fermentation, model, monitor, control limit, threshold, state, principal component analysis

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 113838530 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 24 December 2021 (2021-12-24) claims 1-10	1-10
X	CN 112119306 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 22 December 2020 (2020-12-22) description, paragraphs 193-522, and figure 3A	1-10
A	CN 111341382 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 26 June 2020 (2020-06-26) entire document	1-10
A	CN 111210867 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 29 May 2020 (2020-05-29) entire document	1-10
A	US 2019221282 A1 (TATA CONSULTANCY SERVICES LTD.) 18 July 2019 (2019-07-18) entire document	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
 “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 “&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 April 2022

Date of mailing of the international search report

13 May 2022

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088, China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/073490

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	113838530	A	24 December 2021	None			
CN	112119306	A	22 December 2020	WO	2019129891	A1	04 July 2019
				EP	3732485	A1	04 November 2020
				US	2020377844	A1	03 December 2020
				JP	2021508872	W	11 March 2021
CN	111341382	A	26 June 2020	None			
CN	111210867	A	29 May 2020	None			
US	2019221282	A1	18 July 2019	EP	3514797	A1	24 July 2019
				IN	201821002156	A	26 June 2020

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/073490

A. 主题的分类 G16B 40/00 (2019.01) i 按照国际专利分类 (IPC) 或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类				
B. 检索领域 检索的最低限度文献 (标明分类系统和分类号) G16B 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库 (数据库的名称, 和使用的检索词 (如使用)) CNPAT, CNKI, EPDOC, WPI: 细胞, 胞内, 胞外, 代谢网络, 通量, 分析, 变量, 发酵, 模型, 监测, 控制限, 阈值, 状态, 主元分析, cell, intracellular, extracellular, metabolic network, flux, analysis, variable, fermentation, model, monitor, control limit, threshold, state, principal component analysis				
C. 相关文件				
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求		
PX	CN 113838530 A (江南大学) 2021年12月24日 (2021 - 12 - 24) 权利要求1-10	1-10		
X	CN 112119306 A (豪夫迈·罗氏有限公司) 2020年12月22日 (2020 - 12 - 22) 说明书第193-522段, 图3A	1-10		
A	CN 111341382 A (江南大学) 2020年6月26日 (2020 - 06 - 26) 全文	1-10		
A	CN 111210867 A (江南大学) 2020年5月29日 (2020 - 05 - 29) 全文	1-10		
A	US 2019221282 A1 (TATA CONSULTANCY SERVICES LIMITED) 2019年7月18日 (2019 - 07 - 18) 全文	1-10		
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。				
<table><tr><td>* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</td><td>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件</td></tr></table>			* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件	“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件	“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件			
国际检索实际完成的日期 2022年4月19日		国际检索报告邮寄日期 2022年5月13日		
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局 (ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		受权官员 姜玲玲 电话号码 86-(10)-53961421		

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/073490

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	113838530	A	2021年12月24日	无			
CN	112119306	A	2020年12月22日	WO	2019129891	A1	2019年7月4日
				EP	3732485	A1	2020年11月4日
				US	2020377844	A1	2020年12月3日
				JP	2021508872	W	2021年3月11日
CN	111341382	A	2020年6月26日	无			
CN	111210867	A	2020年5月29日	无			
US	2019221282	A1	2019年7月18日	EP	3514797	A1	2019年7月24日
				IN	201821002156	A	2020年6月26日