

バッチ発酵プロセスの分析

特長

- リアルタイムの発酵プロセス理解
- 1つのプローブを使用して複数の成分を定量化
- 1000 nm励起による干渉蛍光信号の効果的な低減
- ラマンは実証済みのプロセス分析技術(PAT)
- リアルタイムでのプロセスおよび製品品質の保証

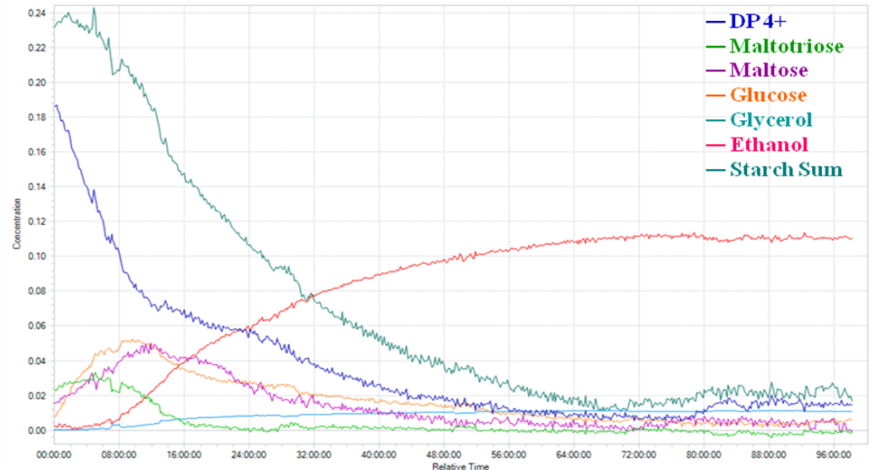


図1: ラマン分析では、1つのプローブを用いて複数の成分を定量化できます。

概要

アナライザ技術は、工業用プロセスを理解するために使用されます。この知識は、効果的な管理限界、重要な品質特性、合理的な仕様を開発するために利用できます。米国食品医薬品局 (FDA) は、バイオプロセス企業がクオリティ・バイ・デザイン (QbD) 製造方法のメリットを享受できるように、2004年当初のPATイニシアチブを拡大しました。

QbDの目的に沿った新しい発酵分析の開発と応用が検討されています。最新の研究では、グルコアミラーゼ酵素と酵母を用いて非常に高比重のコーンマッシュの糖化と発酵を同時に行う燃料エタノール生産について理解を深めることに焦点が当てられています。発酵プロセスの各段階を理解し、監視して制御することは、プロセスを健全に進行させるために不可欠です。ラマン分光法は、バイオリアクタの内容物に関する組成情報と定量化を提供できます。

ラマンの利点

ラマン分光法は、ラマン分光計によりプロセス環境におけるリアルタイムでの迅速な*in situ*監視と制御が可能になるため、特にQbDアプリケーションに有用です。ラマン分光法は振動分光法の一つで、FTIR (フーリエ変換赤外分光法) と同様の情報を生成します。ラマンの主な利点は、水溶液または水系スラリーで測定できることです。さらに、ラマンは、アナライザのリモート設置や非接触式サンプリングオプティックの使用など、使いやすさと柔軟なサンプリングというメリットを提供します。

これまで、発酵プロセスの監視に分散型ラマンを使用する場合に制約となるのは蛍光干渉でした。より長い入射波長を使用することによって、蛍光を減少または除去することができます。本研究では、1000 nm付近で励起する新しい分散型ラマン機器を使用して、コーンマッシュからエタノールへの発酵を監視しました。取得されたラマンスペクトルに蛍光は観察されませんでした。

① このアプリケーションノートに記載されているラマン分光計とプローブはすべて、Kaiserラマンテクノロジーを搭載したEndress+Hauser製品です。

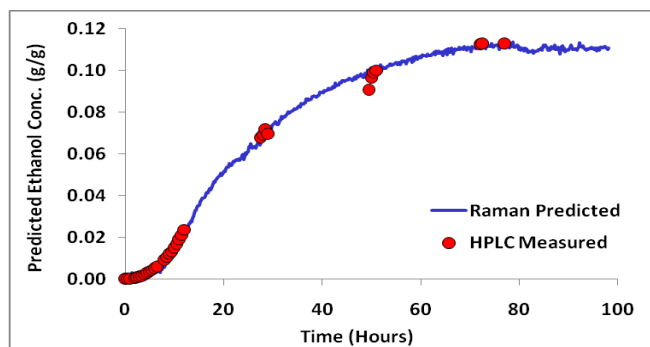


図2: ラマンは、HPLCと同様にプロセス成分の定量化を実現し、リアルタイムでのプロセス内測定を可能にします。

実験

バイオリアクタ (2L) を使用して、コーンマッシュの糖化と発酵を同時に実施しました。すべての条件と方法は、工業発酵プロセスをシミュレートしたものが採用されました。

発酵は72時間にわたって継続的に監視されました。InGaAs アレイ検出器とファイバー結合型 *in situ* プローブを備えたラマン分光計を使用しました。100時間の発酵バイオプロセス中、ラマンスペクトルは10分ごとに収集されました。採取サンプルも収集され、高速液体クロマトグラフ (HPLC) で分析されました。

ラマンスペクトル特性とHPLC測定を相関させるために、多変量モデルが構築されました。DP4+ (高糖)、マルトトリオース、マルトース、グルコース、グリセロール、エタノール、スターチの合計を含む対象成分のHPLC測定濃度は、部分最小二乗法 (PLS) 多変量キャリブレーションモデルを使用してラマンスペクトルと関連付けられました。すべてのデータは、5因子モデルを使用してGRAMS/AI™ PLSplus/IQ™ で解析されました。

溶液は、オンラインのラマンデータに応じて、必要に応じて追加されました。

結果

複数の重要なプロセス成分のラマン予測プロセストレンドが図1に示されています。図2は、オフラインHPLCの結果に対するラマン予測の結果がプロットされています。これらの結果から、*in situ* ラマン分析では、HPLC分析の欠点がなく、HPLCと同等の結果が得られることがわかりました。ラマン法を用いて分析された各成分は、優れた相関係数とクロスバリデーションによる標準予測誤差をもたらしました。これらの結果は、発酵プロセスを監視するために必要な診断情報がラマンスペクトルに含まれていることを示しています。

結論

結果は、発酵プロセスのリアルタイムでの *in situ* 監視におけるラマンの有用性を実証するものとなりました。ラマンは、水溶液系における容易で正確な分析を可能にし、1000 nm 励起を使用することで、成分の効果的な定量化を実現しました。ラマン分析がバイオテクノロジーのQbD環境で効果的に使用できることが、このアプリケーションにより実証されました。

In situ でプロセスを測定できるラマンは、リアルタイムの測定を可能にします。事業者はこれらの結果を利用して、プロセス性能の改善、製品品質の向上、運転コストの削減という観点からプロセスを最適化し、プロセス制御戦略を適時に変更することができます。従来のHPLC法と比べた場合、サンプルの抽出なしでラマンの結果は得られ、プロセス汚染の可能性がなく、標準液や希釈液も必要ありません。発酵産業ではラマン技術を使用することで、発酵の進行状況を容易に判断し、発酵プロセスを制御するためのデータを取得できます。