



PROCESS ANALYTICAL TECHNOLOGY BY TIMEGATED® RAMAN

Seeing the Unseen in
Fermentation

発酵プロセスの“見えない”を“見える”へ

 **timegate**

Timegated® Ramanによる プロセス分析技術

発酵プロセスの“見えない”を“見える”へ

バイオテクノロジーは、世界中の経済を牽引する重要な原動力となっています。エタノールのような単純な物質から、抗生物質や最先端のmRNAやDNAベースの治療薬に至るまで、すべてがバイオテクノロジー製品の範疇に含まれます。食品科学や医療をはじめとする様々な産業で、多種多様な生物や環境が活用されています。

バイオペロセスのプロセスモニタリングにおいて、豊富な生理学的バイオマーカーの存在により、複数の成分を定量化することが重要となります。

治療目的に必要な一次、二次、三次、四次構造を最終製品が持つためには、設計された細胞培養媒体の最適条件を維持することが不可欠です。このため、バイオペロセスの各段階において、培養媒体をモニタリングすることが重要であり、それには物理的、化学的、分子レベルでの複雑性が伴います。

現在、液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS)は、細胞培養媒体の一貫した品質を分析するためによく用いられています。しかしながら、バイオペロセス中の細胞培養媒体を非破壊的にオンラインモニタリングする技術には未だ課題が残っています。蛍光、赤外線、およびラマン分光法といった分光技術は、化学計測学や統計データ解析と組み合わせることで研究が進められています。

ラマン分光法は、迅速かつ頑健なデータ取得が可能で、試料から定性的および定量的な情報を非破壊的に抽出できるため、他の技術と比較して水溶液に非常に適しています。しかし、試料にネイティブな蛍光性物質が含まれている場合、蛍光が課題となります。

この問題は、Timegate Instruments社が特許を持つ技術によって解決されました。この技術では、蛍光の発生に先立ってラマン分光データを記録することが可能です。ラマン光子と他の妨害となるフォトルミネッセンス(蛍光を含む)の間に時間差がある場合、time-gating技術によりラマン散乱光子を分離することができます(図1)。

他のフォトルミネッセンス効果が排除されることで、ラマン分光法はもはや暗室を必要とする技術ではなくなりました。この技術により分析対象試料におけるフォトルミネッセンスの影響を受けることなく、多くの情報を取得することが可能です。time-gatedラマン分光法の特異な能力を例証するために、本研究では、単純なバイオテクノロジープロセスの代表例として、酵母によるグルコースの発酵プロセスを、連続波ラマン分光法とtime-gatedラマン分光法を用いて同時に測定しました。

Timegated® ラマン

従来のラマン

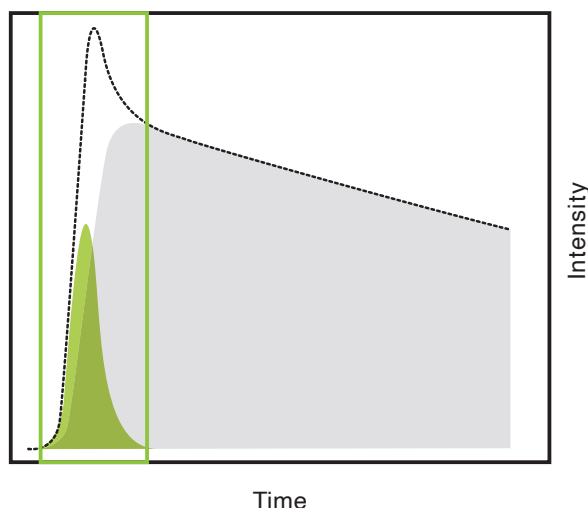


図1 従来のラマン分光法と
Timegatedラマン分光法の
プロセスの概略比較

■ 蛍光発光
■ ラマン
--- 総パルス

機器と方法

150gのD-(+)-グルコース（Alfa Aesar™）を1リットルの蒸留水に溶解し、この溶液に湿った酵母10gを加えました。調製した酵母培養液は、磁気攪拌機を用いて200rpmで連続的に攪拌しました。

培養液の測定に、Kaiser社のRXN2 785nmレーザー励起ラマン分光計とTimegate社のPicoRaman532nmパルスレーザーを使用しました。両分光計には作業距離0mmの浸漬プローブを接続し、プローブを培養液中に直接浸漬して測定を行いました。

発酵過程で嫌気条件を維持するため、培養液容器の口をパラフィルムで密封しました。さらに、培養液に別のチューブを挿入し、その反対側を水を入れたビーカーに浸漬させました。この構造により、発生したCO₂ガスが効率的に排出されると同時に、容器内の圧力が均等化され、嫌気的な発酵環境を維持することが可能です（図2および3参照）。

また、レーザー使用時の安全性を確保するため、実験中はフラスコ全体を覆う保護カバーを設置しました。

図2 プローブと分光計を用いた発酵セットアップ。

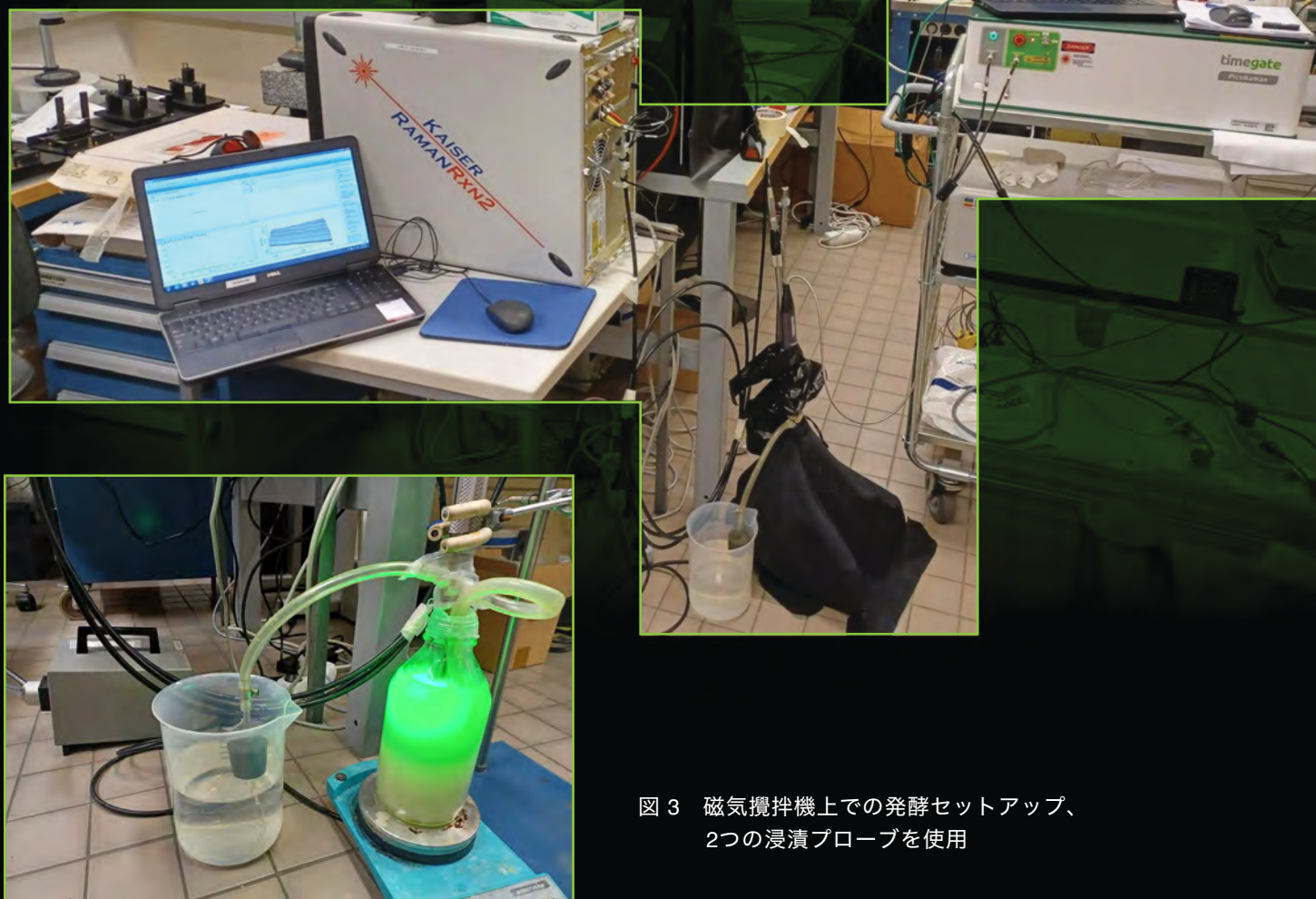


図3 磁気攪拌機上での発酵セットアップ、2つの浸漬プローブを使用

スペクトルデータの比較

発酵プロセスのラマン分光図は、24時間にわたり15分ごとに、両方の分光計を用いて同時に測定しました。図4aおよび4bには、両方の機器から得られた未処理スペクトルが示されています。

未処理スペクトルは、backcorアルゴリズムを用い

てベースライン補正され、Savitzky-Golayフィルター(窓長5、次数3)を用いて平滑化されました。

図5aおよび5bには、前処理後のスペクトルが示されており、Kaiser分光計の信号対ノイズ比(S/N)は約18、PicoRaman分光計のS/Nは約39でした。

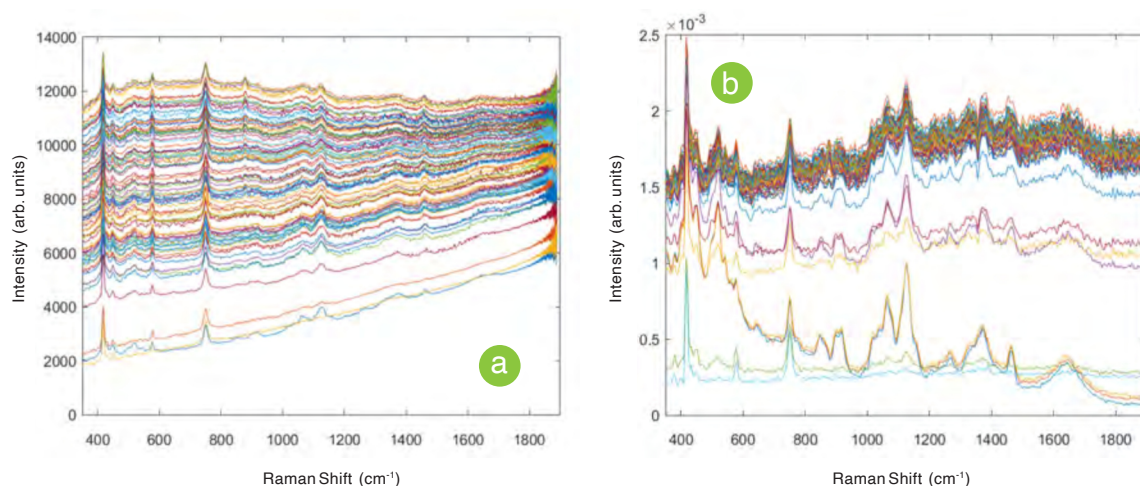


図4 (a) Kaiser Raman の未処理ラマンスペクトル
(b) PicoRaman system の未処理ラマンスペクトル

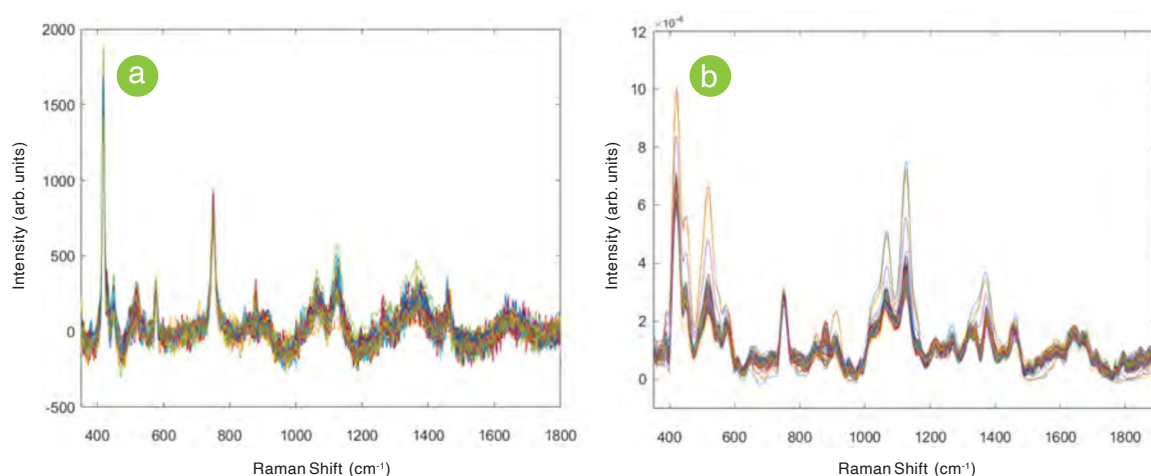


図5 (a) 前処理されたKaiser Raman のスペクトル
(b) 前処理されたPicoRaman のスペクトル

定量分析

図6aに示されているように、グルコースの最も強いバンド(1125 cm^{-1})のピーク高さを基に、定量分析用のキャリブレーションカーブを作成しました。

同様に、図6bではエタノールの最も強いバンド(880 cm^{-1})のピーク高さを使用してキャリブレーションカーブを構築しています。

これらの結果により、両方のラマン分光計を用いて主要なピークを明確に識別できることが確認されました。

ラマン分光スペクトルに蛍光が干渉する場合、乳酸のピーク(830 cm^{-1})やアミドIのピーク(1670 cm^{-1})といった微小なピークはKaiserシステムでは識別が困難です。

しかし、PicoRamanシステムのスペクトルではこれらのピークが明確に観察されます。この特性は、微量のタンパク質や重要なバイオマーカーのモニタリングにおいて非常に重要です。

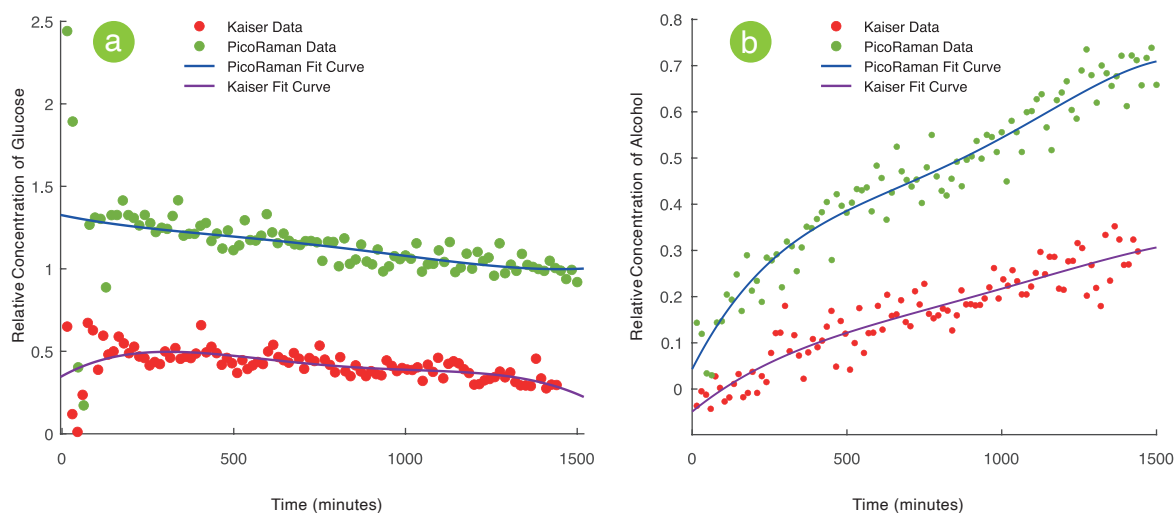


図6 a 発酵スペクトルからのグルコース濃度の予測
b 発酵スペクトルからの相対エタノール濃度の予測

結論

本アプリケーションノートでは、バイオプロセスをモニタリングするためのTime-gatedラマン分光法の有効性が、グルコースおよびエタノールの濃度に関する定性分析および定量分析において連続波ラマン

分光法と比較して明確に示されています。

このように、Time-gatedラマン分光法は発酵プロセスをモニタリングするための強力な手法であることが証明されています。

Be faster than your fluorescence

蛍光よりも速く



Find us on:



@TgiRaman



Timegate Instruments Ltd

Visiting address:

Timegate Instruments Ltd

Tutkijantie 7

FI-90590 OULU, FINLAND

info@timegate.com

www.timegate.com

日本販売店



HORIZO Inc.

ホライゾ株式会社

<https://www.horizo.co.jp>
contact@sub.horizo.co.jp
お気軽にお問い合わせください