

デュアルインジェクションによる 発酵過程のモニタリング

第26回クロマトグラフィーシンポジウム

P-17

小寺澤 功明、寺田英敏、松本恵子
島津製作所 分析計測事業部

デュアルインジェクションによる発酵過程のモニタリング

1. 概要

微生物が各種の物質を分解または合成する機能である発酵は、食品だけでなく、近年は医療や工業分野でも広く利用されている。発酵過程の解明や条件の最適化のため、有機酸、糖、アミノ酸など複数の化合物群を測定して多角的な解析が行われている。しかし、HPLCの場合は、検出方法や分離モードが異なるため、個別に分析することが課題であった。

本発表では、発酵試料の典型例としてヨーグルトを用い、デュアルインジェクションシステムにより異なる分離モード（2系統）の分析を1システムで同時に行うことで、より効率的な発酵過程のモニタリングが可能であったので、ここで報告する。

デュアルインジェクションによる発酵過程のモニタリング

2. 実験方法

2-1. システム

高速液体クロマトグラフには、1システム内にUHPLC2流路を有するNexera デュアルインジェクションシステムを用いた。2流路のうち1つ目の流路では有機酸分析、2つ目の流路では糖分析を行った。オートサンプラによる注入方式はループ注入方式を用いている。

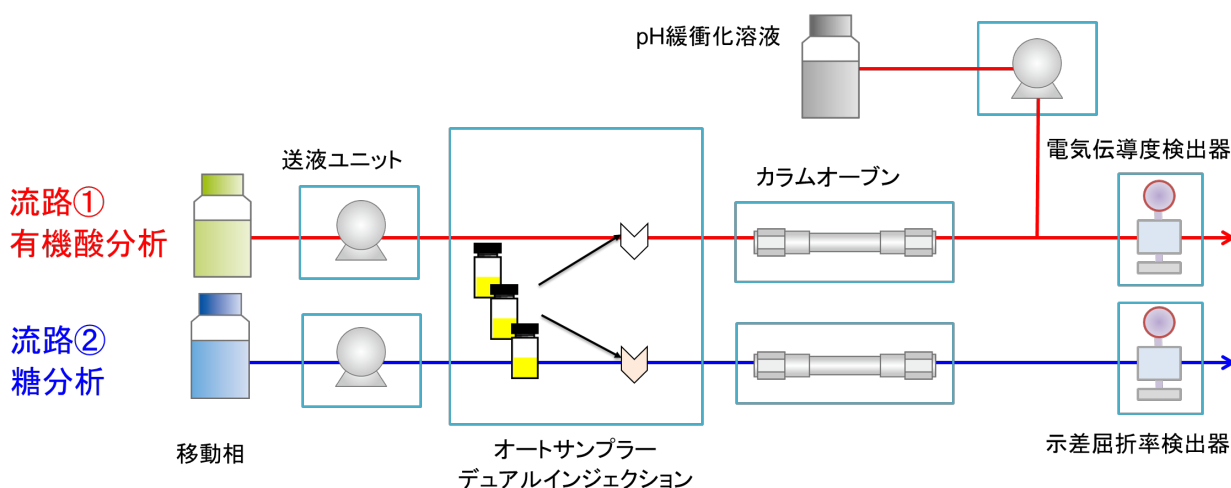


Fig.1. Nexera デュアルインジェクションシステムの流路スキーム

2-2. サンプル

市販のヨーグルト製造機を用いて、牛乳にヨーグルトを添加したものを40 °Cで発酵させた。発酵開始から一定時間経過後に一部採取した。採取したサンプルは以下の手順で前処理を行った。

1. ヨーグルト250 mgをエッペンドルフチューブに秤量し、1 mol/L 過塩素酸水溶液 1 mL, クロロホルム 250 μ Lを加えた。
2. 1分間振盪した後、10000 rpmで2分遠心分離した。
3. 上澄み液を回収し、0.2 μ m細孔のフィルターでろ過し、分析試料とした。

デュアルインジェクションによる発酵過程のモニタリング

2-3. 分析条件

●有機酸分析

有機酸分析では、ポストカラムpH緩衝化法を用いて電気伝導度検出器で検出した。イオン排除クロマトグラフィーで有機酸を分離した後、カラム溶出液にpH緩衝化試薬を連続的に添加し、pHを中性付近に保つことにより有機酸を解離状態にして電気伝導度検出した。このイオン排除モードでは充てん剤としてH⁺型陽イオン交換樹脂が用いられ、有機酸は固定相表面のH⁺型イオン交換基と移動相間における排除の大きさによって分離される。そのため、このモードでは有機酸の負電荷の大きさによって保持が変化し、大きな負電荷を持つ (pK_a の小さい) くえん酸や乳酸は、酢酸などと比べ、より早く溶出する。以下に詳細な分析条件を示す。

Table 1. 有機酸の分析条件

Column	Shim-pack™ SCR-102H (300 mm L. x 8.0 mm I.D., 7 μm)
Mobile phase	: 5.0 mmol/L p-トルエンスルホン酸水溶液
pH Buffer	: 5.0 mmol/L p-トルエンスルホン酸水溶液 20 mmol/L Bis (2-hydroxyethyl) aminotris (hydroxymethyl) methane, 0.1 mmol/L エチレンジアミン四酢酸混合水溶液
Temperature	: 40°C
Detector	: 電気伝導度検出器
Injection volume	: 10 μL

●糖分析

ゲルろ過モードに配位子交換モードが組み合わされたShim-pack SCR-102Cを用いて分離し、示差屈折率検出器RID-20Aを用いて検出・定量した。以下に詳細な分析条件を示す。

Table 2. 糖の分析条件

Column	Shim-pack™ SCR-102C Ca型スルホ基 (300 mm L. x 7.9 mm I.D., 10 μm)
Mobile phase	: 水
Temperature	: 80°C
Detector	: 示差屈折率検出器
Injection volume	: 10 μL

デュアルインジェクションによる発酵過程のモニタリング

3. 実験と結果

3-1. 実サンプルを用いた糖・有機酸の分離

デュアルインジェクションシステムで糖、有機酸分析を統合して行い、(1) 分離検討・検量線の作成, (2) キャリーオーバー評価, (3) 回収率評価 を行った。

(1) ターゲット成分の分離検討, 検量線の作成

標準物質を用いて、分離の確認、検量線の作成を行い、デュアルインジェクションシステムでも、幅広い濃度域で良好な直線性が得られることを確認した (Table 3)。

また、ヨーグルトサンプルの分析検討を行い、乳糖、クエン酸、乳酸をターゲット成分とした。また、本分析条件では、各成分を短時間 (14分) で分離できることが確認された (Fig. 2)。

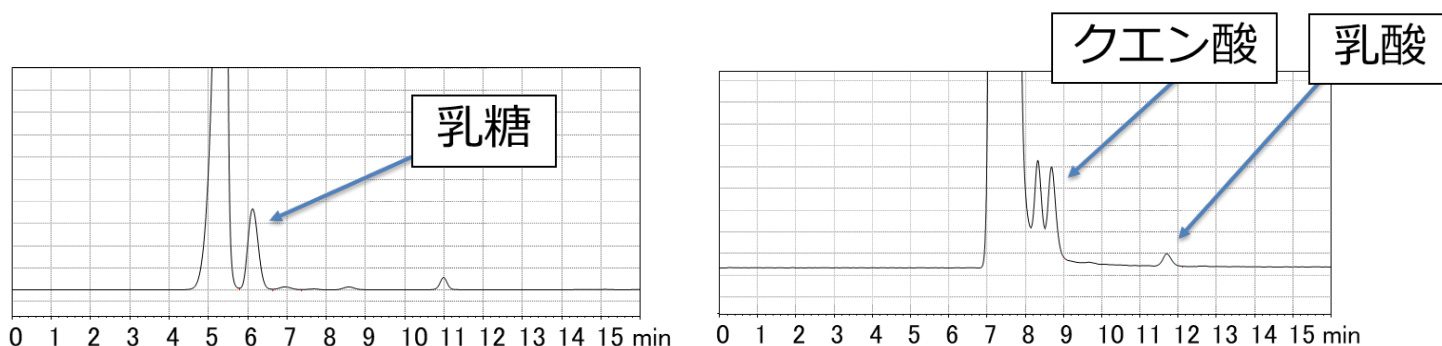


Fig.2. ヨーグルトサンプル (発酵温度40 °C, 発酵後6時間) のクロマトグラム (左: 糖分析, 右: 有機酸分析)

Table 3. ターゲット成分の直線性.

有機酸	Range (mg/L)	Coefficient (r ²)	糖	Range (mg/L)	Coefficient (r ²)
乳酸	20-1,000	0.9999	乳糖	100-20,000	0.9998
クエン酸	20-1,000	0.9999			

デュアルインジェクションによる発酵過程のモニタリング

3. 実験と結果

3-1. 実サンプルを用いた糖・有機酸の分離

デュアルインジェクションシステムで糖、有機酸分析を統合して行い、
(1) 分離検討・検量線の作成, (2) キャリーオーバー評価, (3) 回収率評価 を行った。

(2) ニードルリンスによるキャリーオーバー抑制

一般に、UHPLCのオートサンプラーの注入方式として、ループ注入方式は、ニードルそのものが注入後分析流路になる全量注入方式に比べてキャリーオーバーが生じやすいことが知られている。本分析ではループ注入方式を用いているため、サンプル注入前後に水を用いてニードルのリンスを行った。この方式でキャリーオーバーを評価した結果、糖分析では0.0041%、有機酸分析では未検出の結果が得られ、ニードルリンスによって充分キャリーオーバーが抑制されていることが示唆された。

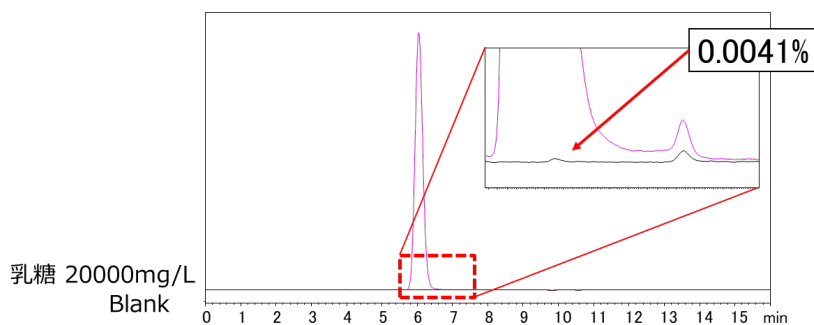


Fig.3. 糖 (20000 mg/L) およびブランクのクロマトグラム

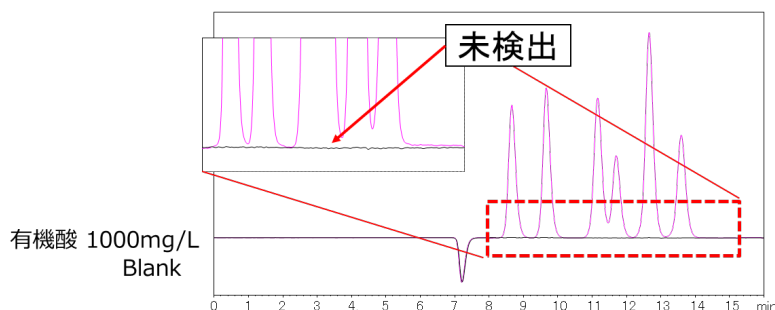


Fig.4. 有機酸 (1000 mg/L) およびブランクのクロマトグラム

デュアルインジェクションによる発酵過程のモニタリング

3. 実験と結果

3-1. 実サンプルを用いた糖・有機酸の分離

デュアルインジェクションシステムで糖、有機酸分析を統合して行い、
(1) 分離検討・検量線の作成, (2) キャリーオーバー評価, (3) 回収率評価 を行った。

(3) 添加回収試験による回収率評価

乳糖、有機酸（クエン酸、酢酸、ギ酸、乳酸、りんご酸、コハク酸）を既知量添加したヨーグルトサンプルを前処理した後、分析し回収率を評価した。

クエン酸、乳糖、乳酸はいずれも良好な結果が得られ、前処理によって損失していないことが分かった。
この結果から、本分析法はサンプル中の対象成分量の経時変化評価に適用可能であると考えられる。

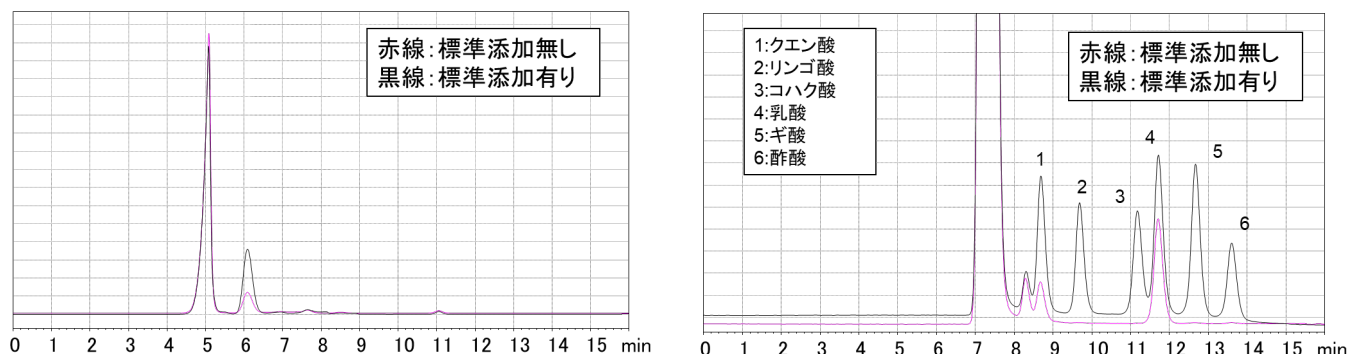


Fig.5. 標準添加有りのクロマトグラム（左：糖分析，右：有機酸分析）

Table 4. ターゲット成分（糖）の回収率.

糖	添加濃度 (mg/L)	実測 (mg/L)	回収率 (%)
乳糖	5000	5181.2	103.6

Table 5. ターゲット成分（有機酸）の回収率.

有機酸	添加濃度 (mg/L)	実測 (mg/L)	回収率 (%)
クエン酸	250	259.5	103.8
乳酸	250	232.8	93.1

デュアルインジェクションによる発酵過程のモニタリング

3. 実験と結果

3-2. 発酵による各成分の経時変化評価

ヨーグルトの発酵の各成分の経時変化(0.0, 2.5, 6.0, 7.5, 9.0時間) を評価した。

乳糖の含有量の減少に対応して乳酸が増加していることから、ヨーグルトに含まれる微生物の代謝によって乳糖が消費され乳酸が生成されていることが示唆された。

また、加温してから2.5時間で活発化し発酵が進行するが8時間で進行が沈静化する、という発酵状態の変化を確認することが出来た。前処理を含めて1分析20分程度で行え、また、ターゲット成分の標準誤差は1.0%以下 (n=3) であるため、より細かく発酵状態をモニターすることも可能である。

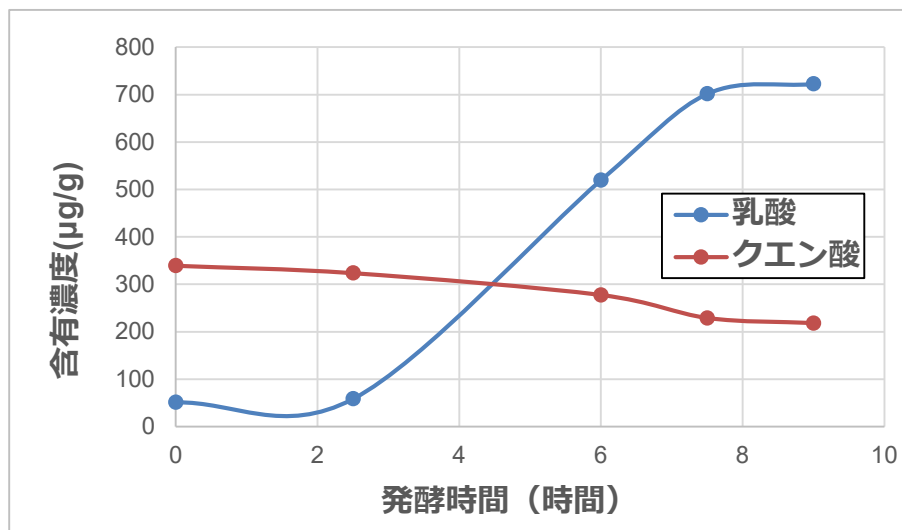
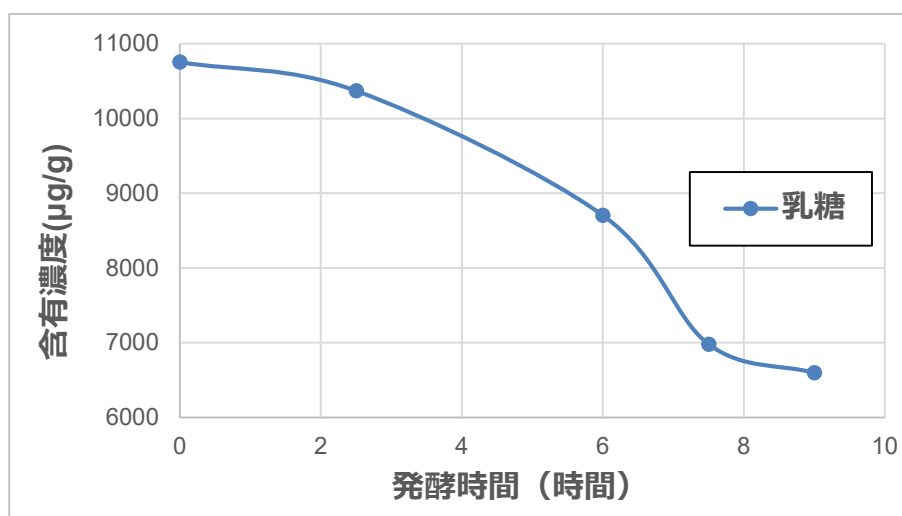


Fig. 4. 発酵時間に対する糖, 有機酸の経時変化 (上: 糖分析, 下: 有機酸分析) .

デュアルインジェクションによる発酵過程のモニタリング

4. 結論・まとめ

- 微生物の発酵生成物として代表的な有機酸・糖を同時分析するメソッドを確立した。
- デュアルインジェクションシステムを用いて糖・有機酸を分析し良好な直線性を得られたと共に、2系統の分析を一つに統合することで分析全体の高速化を達成した。
- ヨーグルトサンプル中の有機酸・糖の経時変化を評価することが出来たことから、微生物の発酵モニタリングに適用しうることを確認できた。

First Edition: July, 2021