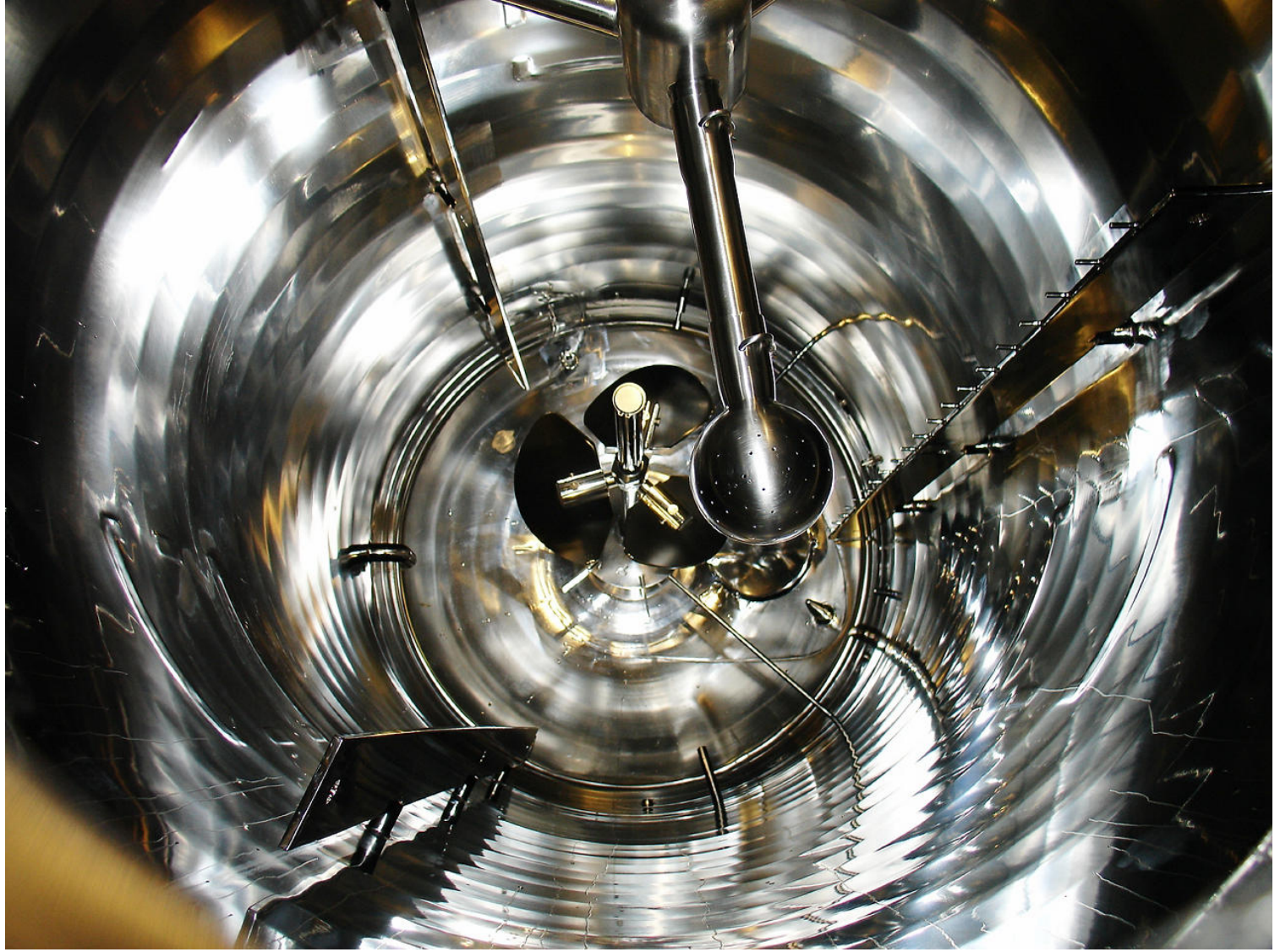




Application Note AN-NIR-099

Controllo di qualità dei brodi di fermentazione

Determinazione di più parametri entro un minuto

I processi di fermentazione cellulare rappresentano un metodo di produzione affidabile per piccole molecole e principi attivi farmaceutici (API) a base di proteine, consentendo alle aziende farmaceutiche di ottimizzare il processo di produzione e ridurre il time-to-market. Per garantire una produzione ottimale, è necessario monitorare molti parametri diversi del processo di fermentazione. Tali parametri di qualità includono (ma non sono limitati a) pH, contenuto batterico, efficacia, glucosio e concentrazione di

zuccheri riduttori. Le analisi di laboratorio tradizionali richiedono una notevole quantità di tempo e diverse tecniche analitiche per monitorare i vari parametri di qualità nel processo di fermentazione.

Rispetto ai metodi tradizionali, la spettroscopia nel vicino infrarosso (NIRS) rappresenta un'alternativa più veloce ed economica per la determinazione di parametri fondamentali nei brodi di fermentazione, a qualsiasi stadio del processo di fermentazione.

STRUMENTI DI ANALISI

I campioni di brodo di fermentazione prelevati a diversi tempi di fermentazione sono stati misurati in modalità di riflessione con lo strumento Metrohm DS2500 Solid Analyzer. Poiché i campioni erano di colore scuro (giallo-marrone), sono stati misurati senza la necessità di utilizzare il riflettore d'oro e non hanno richiesto la preparazione del campione. Il pacchetto software Metrohm Vision Air Complete è stato utilizzato per l'acquisizione di tutti i dati e lo sviluppo di modelli predittivi.

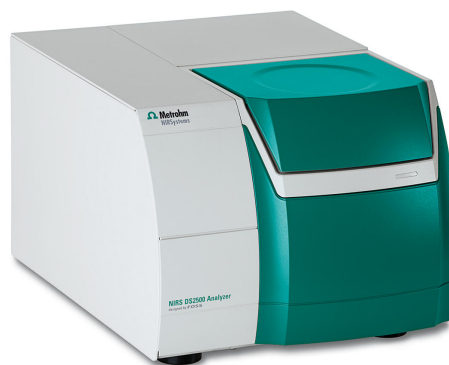


Figure 1. DS2500 Solid Analyzer.

Tabella 1. Panoramica delle apparecchiature hardware e software

Attrezzatura	Numero metrohm
DS2500 Solid Analyzer	2.922.0010
Vaso di trasflessione NIRS	6.7401.000
Portabicchieri mini NIRS per DS2500	6.7430.040
Vision Air 2.0 completo	6.6072.208

RISULTATO

Gli spettri Vis-NIR ottenuti (**figura 2**) sono stati utilizzati per creare modelli predittivi per la quantificazione della concentrazione di batteri, glucosio e zuccheri riducenti, nonché del pH e della potenza. La qualità dei modelli di previsione è stata valutata utilizzando il diagramma di correlazione, che

mostra un'elevata correlazione tra la previsione Vis-NIR ei valori di riferimento. I rispettivi valori di riferimento (FOM) mostrano la precisione attesa di una previsione durante l'analisi di routine. La potenza (**Figure 7 e 8**) è stato misurata con due diversi metodi di laboratorio come descritto in **Tabella 8**.

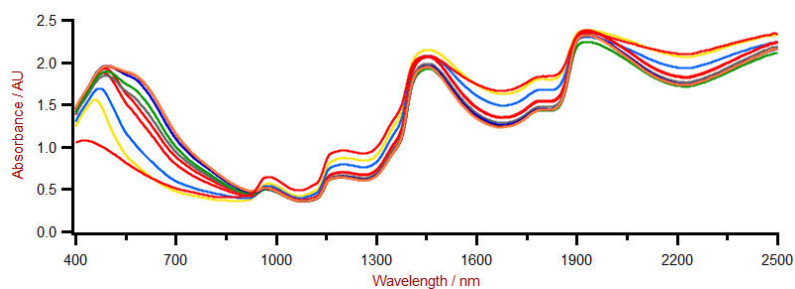


Figure 2. Spettri Vis-NIR di campioni di brodo di fermentazione prelevati a diversi tempi di fermentazione e analizzati su DS2500 Solid Analyzer.

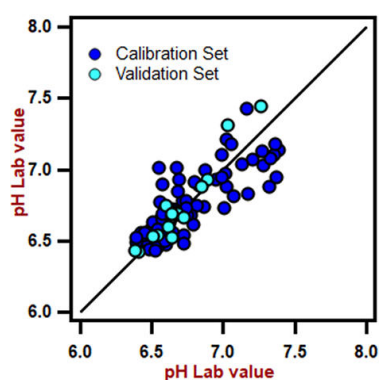


Figure 3. Diagramma di correlazione per la previsione del pH nel brodo di fermentazione utilizzando DS2500 Solid Analyzer. Il valore di laboratorio è stato valutato utilizzando un pHmetro.

Tabella 2. Valori di riferimento per la previsione del pH in brodo di fermentazione utilizzando DS2500 Solid Analyzer.

Riferimento	Valore
R^2	0,6461
Errore standard di calibrazione	0,1645
Errore standard di convalida incrociata	0,1686
Errore standard di convalida	0,0997

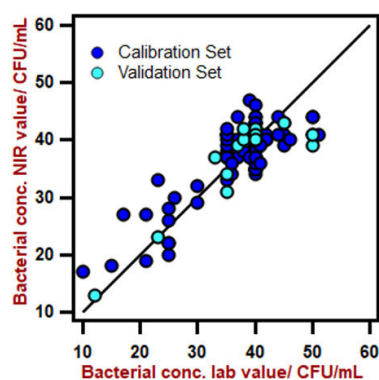


Figure 4. Diagramma di correlazione per la previsione della concentrazione batterica nel brodo di fermentazione utilizzando un DS2500 Solid Analyzer. Il valore di laboratorio è stato valutato utilizzando la spettrofotometria UV-Vis.

Tabella 3. Valori di riferimento per la previsione della concentrazione batterica in brodo di fermentazione utilizzando DS2500 Solid Analyzer.

Riferimento	Valore
R^2	0,7086
Errore standard di calibrazione	4,6884 UFC/mL
Errore standard di convalida incrociata	4,7429 UFC/mL
Errore standard di convalida	5,0916 UFC/mL

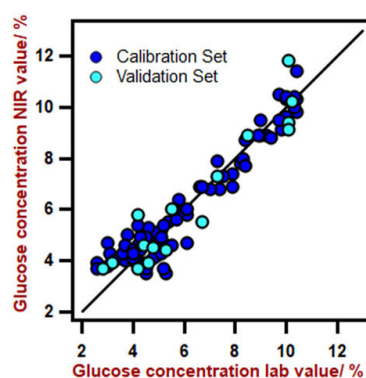


Figure 5. Diagramma di correlazione per la previsione della concentrazione di glucosio nel brodo di fermentazione utilizzando DS2500 Solid Analyzer. Il valore di laboratorio è stato valutato utilizzando HPLC.

Tabella 4. Valori di riferimento per la previsione del glucosio contenuto nel brodo di fermentatoina utilizzando DS2500 Solid Analyzer.

Riferimento	Valore
R^2	0,9165
Errore standard di calibrazione	0,6938%
Errore standard di convalida incrociata	0,7896%
Errore standard di convalida	0,8628%

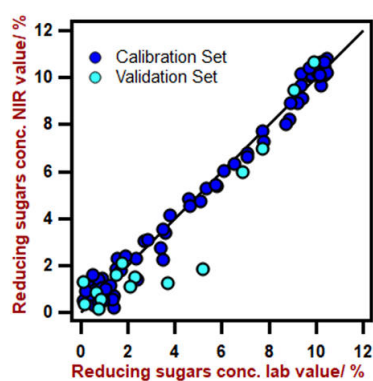


Figure 6. Diagramma di correlazione per la previsione degli zuccheri riduttori nel brodo di fermentazione utilizzando DS2500 Solid Analyzer. Il valore di laboratorio è stato valutato utilizzando HPLC.

Tabella 5. Valori di riferimento per la previsione degli zuccheri contenuto nel brodo di fermentazione utilizzando DS2500 Solid Analyzer.

Riferimento	Valore
R^2	0,9863
Errore standard di calibrazione	0,4767%
Errore standard di convalida incrociata	0,6821%
Errore standard di convalida	1,2429%

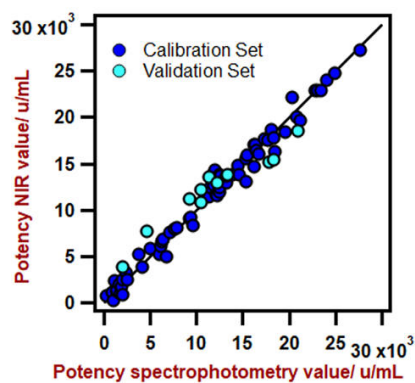


Figure 7. Diagramma di correlazione per la previsione della potenza nel brodo di fermentazione utilizzando DS2500 Solid Analyzer. Il valore di laboratorio è stato valutato utilizzando la spettrofotometria UV-Vis.

Tabella 6. Valori di riferimento per la previsione della potenza in brodo di fermentazione utilizzando DS2500 Solid Analyzer.

Riferimento	Valore
R^2	0,9083
Errore standard di calibrazione	2295 u/ml
Errore standard di convalida incrociata	2968 u/ml
Errore standard di convalida	2089 u/ml

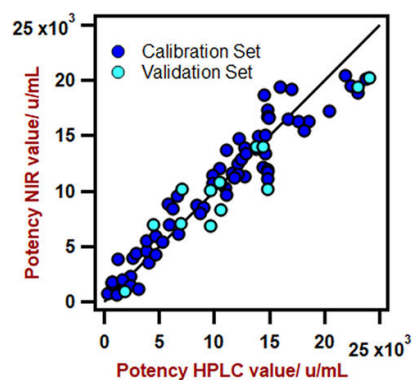


Figure 8. Diagramma di correlazione per la previsione della potenza nel brodo di fermentazione utilizzando DS2500 Solid Analyzer. Il valore di laboratorio è stato valutato utilizzando HPLC + PCR.

Tabella 7. Valori di riferimento per la previsione della potenza in brodo di fermentazione utilizzando DS2500 Solid Analyzer.

Riferimento	Valore
R^2	0,9156
Errore standard di calibrazione	1913 u/ml
Errore standard di convalida incrociata	2172 u/ml
Errore standard di convalida	1168 u/ml

CONCLUSIONE

Questa Application Note dimostra la fattibilità per determinare i parametri chiave del controllo di qualità del processo di fermentazione con la spettroscopia NIR. I principali vantaggi della spettroscopia Vis-NIR rispetto ai metodi chimici a umido sono che i costi di

esercizio sono notevolmente inferiori e il tempo per ottenere il risultato è notevolmente ridotto. Inoltre, non sono necessarie sostanze chimiche e la tecnica non è distruttiva per i campioni.

Tabella 8. Panoramica del tempo per il risultato per i diversi parametri di qualità

Parametro	Metodo	Tempo per il risultato
pH	misuratore di acidità	3–5 minuti
Concentrazione batterica	UV-Vis	8 ore (preparazione del campione) + 1 minuto (UV-Vis)
Concentrazione di glucosio e zuccheri riduttori	HPLC	30–45 minuti
Potenza	UV-Vis	7 minuti (preparazione del campione) + 1 minuto (UV-Vis)
Potenza	HPLC + PCR	1 ora (preparazione del campione) + 20 minuti (HPLC + PCR)

Internal reference: AW NIR CN-0017-112021

CONTACT

Metrohm Italiana Srl
Via G. Di Vittorio, 5
21040 Origgio (VA)

info@metrohm.it



DS2500 Solid Analyzer

Robusta spettroscopia nel vicino infrarosso per il controllo di qualità in laboratorio e nell'ambiente di produzione.

DS2500 Analyzer è la soluzione comprovata e flessibile per l'analisi di routine di sostanze solide, creme ed eventualmente anche liquidi lungo tutta la catena produttiva. Il design robusto rende lo strumento DS2500 Analyzer insensibile a polveri, umidità, vibrazioni e oscillazioni di temperatura e quindi ideale per l'utilizzo in ambienti di produzione difficili.

DS2500 copre l'intero campo spettrale da 400 a 2.500 nm e fornisce risultati precisi e riproducibili in meno di un minuto. DS2500 Analyzer soddisfa i requisiti dell'industria farmaceutica e supporta gli utenti, grazie alla facilità di utilizzo, nelle loro attività di routine quotidiane.

Grazie agli accessori perfetti per l'apparecchio, è possibile ottenere risultati ottimali anche con i tipi di campioni più impegnativi, quali per esempio sostanze solide a grana grossa come i granulati oppure i campioni semisolidi-liquidi come creme. Nella misurazione delle sostanze solide è possibile migliorare la produttività grazie all'impiego di MultiSample Cup, che consentono misure automatiche in serie fino a 9 campioni.



Recipiente per transflessione NIRS, otticamente piano
Recipiente per transflessione otticamente piano per la misurazione spettrale di liquidi. Combinabile con i seguenti dispositivi:

- NIRS DS2500 Analyzer (**numero ordine d'acquisto: 2.922.0010**)
- NIRS XDS MasterLab Analyzer (**numero ordine d'acquisto: 2.921.1310**)
- NIRS XDS MultiVial Analyzer (**numero ordine d'acquisto: 2.921.1120**)
- NIRS XDS RapidContent Analyzer (**numero ordine d'acquisto: 2.921.1110**)
- NIRS XDS RapidContent Analyzer – Solids (**numero ordine d'acquisto: 2.921.1210**)



Supporto DS2500

Supporto per l'utilizzo con:

- Vial piccoli (**6.7402.030**)
- DS2500 Iris (**6.7425.100**)



Vision Air 2.0 Complete

Vision Air - Software universale per la spettroscopia.

Vision Air Complete è una soluzione software moderna e facile da utilizzare per l'impiego in ambiente regolamentato.

Panoramica dei vantaggi di Vision Air:

- le applicazioni software individuali con interfacce utente personalizzate garantiscono un funzionamento intuitivo e semplice
- semplice creazione e manutenzione dei protocolli
- banca dati SQL per una gestione dei dati sicura e semplice

La versione Vision Air Complete (66072208) include tutte le applicazioni per la garanzia della qualità tramite spettroscopia Vis-NIR:

- applicazione per la gestione degli strumenti e dei dati
- applicazione per lo sviluppo di metodi
- applicazione per l'analisi di routine

Altre soluzioni Vision Air Complete:

- 66072207 (Vision Air Network Complete)
- 66072209 (Vision Air Pharma Complete)
- 66072210 (Vision Air Pharma Network Complete)