

# 第三代细胞培养分析方法包监控微生物发酵过程

## LCMSMS-955

**摘要：** 本文使用三重四极杆液质联用仪结合第三代细胞培养分析方法包建立了半定量分析抗生素发酵液成分的方法，采集不同时间发酵液中 144 种化合物，采用多组学整合分析工具 Multi-omics 绘制不同类别化合物相对含量变化趋势，用于判断发酵液成分含量的变化对抗生素产量的影响。该方法可在 17 min 内完成 144 种化合物的分析，分析速度快、灵敏度高、抗干扰能力强，适合发酵液中糖类、氨基酸类、核苷类和维生素类等化合物的快速检测。

**关键词：** 三重四极杆质谱仪 发酵液 细胞培养分析方法包

### 技术特点：

- ❖ 基于三重四极杆液质联用仪，第三代细胞培养分析方法包最快可在 17 min 内完成 144 种化合物的分析，无需方法优化。
- ❖ 配备多组学整合分析工具 Multi-omics，可根据代谢通路快速绘制不同类别化合物及其代谢物含量变化趋势图。

发酵工程作为现代生物技术的一个重要组成部分，具有广阔的应用前景。例如，用基因工程的方法有目的地改造原有的菌种并且提高其产量；利用微生物发酵生产药品，如人的胰岛素、干扰素和生长激素等。但是由于微生物发酵过程，机理十分复杂，影响因素错综复杂，为了对发酵过程进行优化控制，保持微生物生长按照一定的生长轨迹生长，需要确保微生物生长的环境条件为最优。

传统的方式是通过控制微生物生长环境参数如温度、pH 值、溶氧度等来实现的。但是由于缺乏量化的依据，传统的方式难以准确的对发酵过程中各成份的变化进行监控，所以在从实验室到中试，从

中试到大规模生产过程中会出现许多问题，因此开发一种能准确的对发酵过程中各组分进行量化监控的方法是十分必要的。

岛津开发了“细胞培养分析方法包”，目前该方法包已升级至第三代，包括培养基上清液组分和细胞内代谢物，共 144 种化合物。分析采用三重四极杆液质联用仪，仅需 17 分钟，即可同时监测分析 144 种培养上清液营养成份和代谢物的相对含量变化，结合多组学整合分析工具 Multi-omics 提供的代谢分类趋势图，为发酵过程中各组分的量化监控提供了有效的手段。

## ■ 实验部分

### 1.1 仪器

本实验采用岛津 Nexera LC-40D XR 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为：

系统控制器：	SCL-40	自动进样器：	SIL-40C XR
输液泵：	LC-40D XR	质谱仪：	LCMS-8050
柱温箱：	CTO-40S	色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.114
在线脱气机：	DGU-40S		

### 1.2 分析条件

#### 液相条件

- 色谱柱：见细胞培养基上清液分析方法包（P/N: 225-46320-93）
- 流动相：见细胞培养基上清液分析方法包

柱温 :	40°C	流速 :	0.3 mL/min
洗脱方式 :	见细胞培养基上清液分析方法包	进样体积 :	1 µL
质谱条件			
离子源 :	ESI, 正负模式	DL管温度 :	250°C
接口电压 :	+4.0 kV; -3.0 kV	加热模块温度 :	400°C
雾化气 :	氮气 3.0 L/min	接口温度 :	300°C
干燥气 :	氮气 10 L/min	扫描模式 :	多反应监测 (MRM)
加热气 :	空气 10 L/min		

表 1 细胞培养方法包中 146 种化合物列表 (含 2 种内标)

编号	化合物名	类别	编号	化合物名	类别
1	5-Oxoproline	氨基酸	74	Adenosine	核苷酸
2	Alanine	氨基酸	75	Adenosine monophosphate	核苷酸
3	Asparagine	氨基酸	76	Deoxyadenosine	核苷酸
4	Aspartic acid	氨基酸	77	Deoxyguanosine	核苷酸
5	Glutamic acid	氨基酸	78	Deoxyguanosine monophosphate	核苷酸
6	Glutamine	氨基酸	79	Guanine	核苷酸
7	N-Acetylaspartic acid	氨基酸	80	Guanosine	核苷酸
8	4-Aminobutyric acid	氨基酸	81	Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate	核苷酸
9	4-Hydroxyproline	氨基酸	82	Guanosine monophosphate	核苷酸
10	Arginine	氨基酸	83	Hypoxanthine	核苷酸
11	Argininosuccinic acid	氨基酸	84	Inosine	核苷酸
12	Citrulline	氨基酸	85	Inosine monophosphate	核苷酸
13	Creatine	氨基酸	86	Uric acid	核苷酸
14	Ornithine	氨基酸	87	Xanthine	核苷酸
15	Proline	氨基酸	88	Xanthosine	核苷酸
16	Putrescine	氨基酸	89	Xanthosine monophosphate	核苷酸
17	2-Aminobutyric acid	氨基酸	90	3-Aminoisobutyric acid	核苷酸
18	5-Glutamylcysteine	氨基酸	91	3-Aminopropanoic acid	核苷酸
19	5'-Methylthioadenosine	氨基酸	92	Cytidine	核苷酸
20	Cystathionine	氨基酸	93	Cytidine 3',5'-cyclic monophosphate	核苷酸
21	Cysteine	氨基酸	94	Cytidine monophosphate	核苷酸
22	Cystine	氨基酸	95	Cytosine	核苷酸
23	Glutathione	氨基酸	96	Deoxycytidine	核苷酸
24	Homocysteine	氨基酸	97	Deoxycytidine monophosphate	核苷酸

25	Homocystine	氨基酸	98	Orotic acid	核苷酸
26	Methionine	氨基酸	99	Thymidine	核苷酸
27	Methionine sulfoxide	氨基酸	100	Thymidine monophosphate	核苷酸
28	N-Acetylcysteine	氨基酸	101	Thymine	核苷酸
29	Ophthalmic acid	氨基酸	102	Uracil	核苷酸
30	Oxidized glutathione	氨基酸	103	Uridine	核苷酸
31	S-Adenosylhomocysteine	氨基酸	104	Uridine monophosphate	核苷酸
32	2-Aminoethanol	氨基酸	105	Gluconic acid	糖类
33	Glycine	氨基酸	106	Hexose (Glucose)	糖类
34	O-Phosphoethanolamine	氨基酸	107	Sucrose	糖类
35	Serine	氨基酸	108	Threonic acid	糖类
36	Threonine	氨基酸	109	Riboflavin	维生素
37	2-Amino adipic acid	氨基酸	110	Pantothenic acid	维生素
38	Acetylcarnitine	氨基酸	111	4-Pyridoxic acid	维生素
39	Carnitine	氨基酸	112	Pyridoxal	维生素
40	Hydroxylysine	氨基酸	113	Pyridoxalphosphate	维生素
41	Lysine	氨基酸	114	Pyridoxine	维生素
42	Pipecolic acid	氨基酸	115	Biotin	维生素
43	Saccharopine	氨基酸	116	4-Aminobenzoic acid	维生素
44	3-Hydroxyanthranilic acid	氨基酸	117	Folic acid	维生素
45	5-Hydroxytryptophan	氨基酸	118	Cyanocobalamin	维生素
46	Anthranilic acid	氨基酸	119	Ascorbic acid	维生素
47	Formylkynurenine	氨基酸	120	Acetylcholine	维生素
48	Hydroxykynurenine	氨基酸	121	Choline	维生素
49	Indole-3-acetic acid	氨基酸	122	Citicoline	维生素
50	Kynurenic acid	氨基酸	123	NAD	维生素
51	Kynurenine	氨基酸	124	Niacinamide	维生素
52	Serotonin	氨基酸	125	Nicotinic acid	维生素
53	Tryptophan	氨基酸	126	Lipoic acid	维生素
54	1-Methylhistidine	氨基酸	127	2-ketoglutaric acid	其它
55	3-Methylhistidine	氨基酸	128	Acotinic acid	其它
56	Histidine	氨基酸	129	Citric acid	其它
57	Urocanic acid	氨基酸	130	Fumaric acid	其它
58	4-Hydroxyphenyllactic acid	氨基酸	131	Isocitric acid	其它
59	Dopa	氨基酸	132	Lactic acid	其它
60	Norepinephrine	氨基酸	133	Malic acid	其它
61	Phenylalanine	氨基酸	134	Pyruvic acid	其它

62	Phenyllactic acid	氨基酸	135	Succinic acid	其它
63	Tyrosine	氨基酸	136	Glyceric acid	其它
64	3-Hydroxyisobutyric acid	氨基酸	137	Glycolic acid	其它
65	3-Methyl-2-oxovaleric acid	氨基酸	138	Glyoxylic acid	其它
66	Isoleucine	氨基酸	139	Mevalonic acid	其它
67	Leucine	氨基酸	140	MVA-P	其它
68	Valine	氨基酸	141	Penicillin G	其它
69	Alanyl-glutamine	氨基酸	142	Resveratrol	其它
70	Asymmetric dimethylarginine	氨基酸	143	Shikimic acid 3-phosphate	其它
71	Glycyl-glutamine	氨基酸	144	Taurine	其它
72	Symmetric dimethylarginine	氨基酸	145	2-Isopropylmalic acid	内标
73	Adenine	核苷酸	146	10-Camphorsulfonic acid	内标

### 1.3 样品前处理方法

本实验样品为某菌种发酵液，用于合成红霉素，分别在发酵期间的 0、23、47、71、95、119、140、167 和 191 小时取样，前处理方法见细胞培养分析方法包 Ver.3。

## ■ 结果与讨论

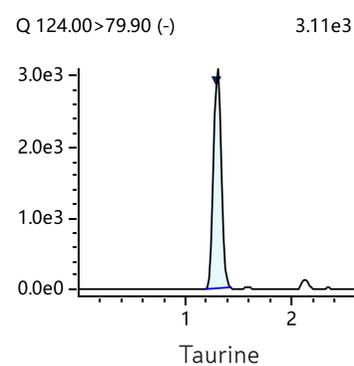
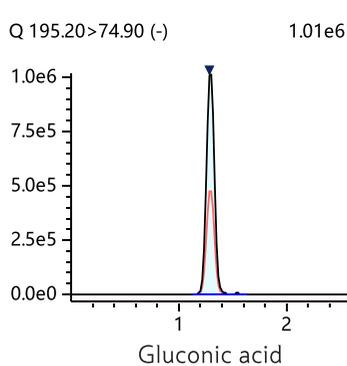
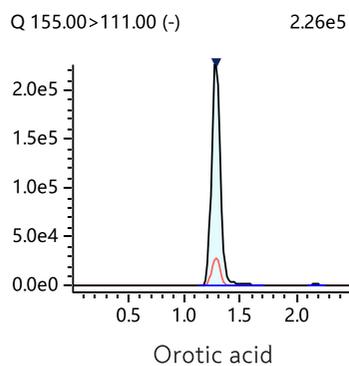
### 2.1 部分检出组分 MRM 色谱图及半定量结果

使用该方法包对不同时间的某菌种发酵液上清液进行了分析，检出 113 种组分。部分检出化合物与内标峰面积的比值（半定量结果）见表 2，部分检出的化合物的色谱图如图 1 所示。

表 2 发酵液样品中部分检出化合物列表

No.	化合物名	不同时间点目标物峰面积比值								
		0 h	23 h	47 h	71 h	95 h	119 h	140 h	167 h	191 h
1	Gluconic acid	5.599	6.546	4.129	5.348	10.25	7.574	8.937	7.845	8.675
2	Hexose (Glucose)	6.897	5.698	3.358	2.842	5.542	1.924	1.476	1.658	1.343
3	Sucrose	5.552	2.907	2.671	2.281	0.784	1.276	0.984	0.604	0.358
4	Aspartic acid	12.03	19.88	15.820	17.17	27.83	24.15	8.405	17.92	16.57
5	Malic acid	0.804	0.379	0.459	0.390	0.439	0.851	0.363	0.646	0.740
6	Serine	20.37	31.71	29.688	33.52	37.16	35.85	18.73	38.15	37.34
7	Hydroxyproline	0.903	2.035	3.105	4.124	4.516	5.203	7.516	5.169	5.508
8	Asparagine	8.835	5.364	4.728	4.936	5.531	4.877	2.559	5.161	5.162
9	Threonine	9.119	16.26	15.965	19.11	21.64	21.10	11.74	21.34	17.77
10	Glycine	1.847	3.900	3.919	4.147	5.213	4.728	2.336	4.441	4.145
11	Glutamic acid	10.71	46.39	40.211	53.20	57.19	62.11	53.57	71.64	77.91
12	Alanine	48.62	73.84	75.209	77.83	85.30	77.99	41.15	80.18	78.38
13	Citrulline	2.266	53.98	24.385	5.912	10.35	3.333	1.798	3.412	3.142
14	2-Aminoadipic acid	0.046	3.352	6.876	9.068	11.41	12.24	11.09	10.69	11.28

15	Proline	1.227	1.293	1.036	1.167	1.294	1.230	0.529	1.293	1.288
16	Uridine	1.902	7.658	10.007	12.12	12.46	13.38	4.737	13.95	14.09
17	Valine	5.183	7.712	8.614	9.648	11.38	11.15	4.795	10.89	10.36
18	Uracil	0.939	3.555	3.813	4.211	4.051	4.137	1.438	4.086	4.101
19	Ornithine	4.928	3.695	0.358	0.821	0.966	0.295	0.203	0.418	0.357
20	Lysine	16.43	96.47	100.47	43.68	38.55	37.94	18.06	28.37	25.80
21	Histidine	3.965	4.037	4.201	4.696	5.192	5.429	2.743	5.647	5.788
22	Methionine	12.602	14.381	14.748	17.520	21.88	20.17	9.218	20.82	24.31
23	Aminobutyric acid	44.469	32.084	40.704	51.441	36.155	39.038	2.699	25.993	19.640
24	Arginine	50.919	68.798	61.522	65.384	69.282	67.941	33.047	74.078	75.663
25	Tyrosine	27.137	31.074	31.077	36.031	42.461	38.486	18.894	43.549	42.804
26	Nicotinic acid	0.658	4.191	6.945	8.676	9.998	11.562	15.779	13.182	13.221
27	Inosine	0.050	2.619	1.746	2.850	3.514	3.485	2.204	3.488	3.843
28	Isoleucine	5.794	12.212	11.925	12.835	16.367	14.094	3.817	12.840	12.687
29	Pipecolic acid	7.265	46.393	47.845	20.844	17.538	16.747	8.501	13.430	12.840
30	Cytidine	5.629	6.553	4.557	4.464	2.544	3.125	0.089	2.427	1.961
31	Xanthine	0.110	2.459	2.316	1.642	0.953	0.746	0.149	0.450	0.365
32	Leucine	23.305	24.957	25.291	30.136	35.159	33.454	12.783	33.103	33.785
33	Hypoxanthine	0.187	5.168	6.306	6.844	7.161	6.683	3.904	6.402	6.001
34	Pantothenic acid	0.128	0.834	1.457	1.541	1.753	1.908	2.476	2.776	3.378
35	Xanthosine	0.299	1.664	1.209	1.804	2.200	2.109	1.134	2.053	2.158
36	Guanosine	6.208	30.348	21.720	30.863	37.267	37.837	19.675	36.149	37.932
37	Deoxycytidine	1.612	5.600	1.362	0.338	0.295	0.460	0.238	0.395	0.454
38	Phenylalanine	48.064	51.561	50.008	57.288	71.778	64.994	28.185	74.750	74.779
39	Thymidine	0.141	1.752	1.896	1.835	1.455	1.516	0.536	1.655	1.413
40	Deoxyguanosine	0.047	18.177	16.006	15.601	29.707	28.583	23.406	32.863	33.685
41	Choline	50.062	0.416	0.503	4.297	1.767	1.715	2.922	5.020	8.151
42	Riboflavin	0.031	0.485	0.779	0.929	1.040	1.059	0.478	0.871	0.970
43	Tryptophan	6.921	23.794	24.481	30.384	40.972	39.809	19.834	49.318	51.324



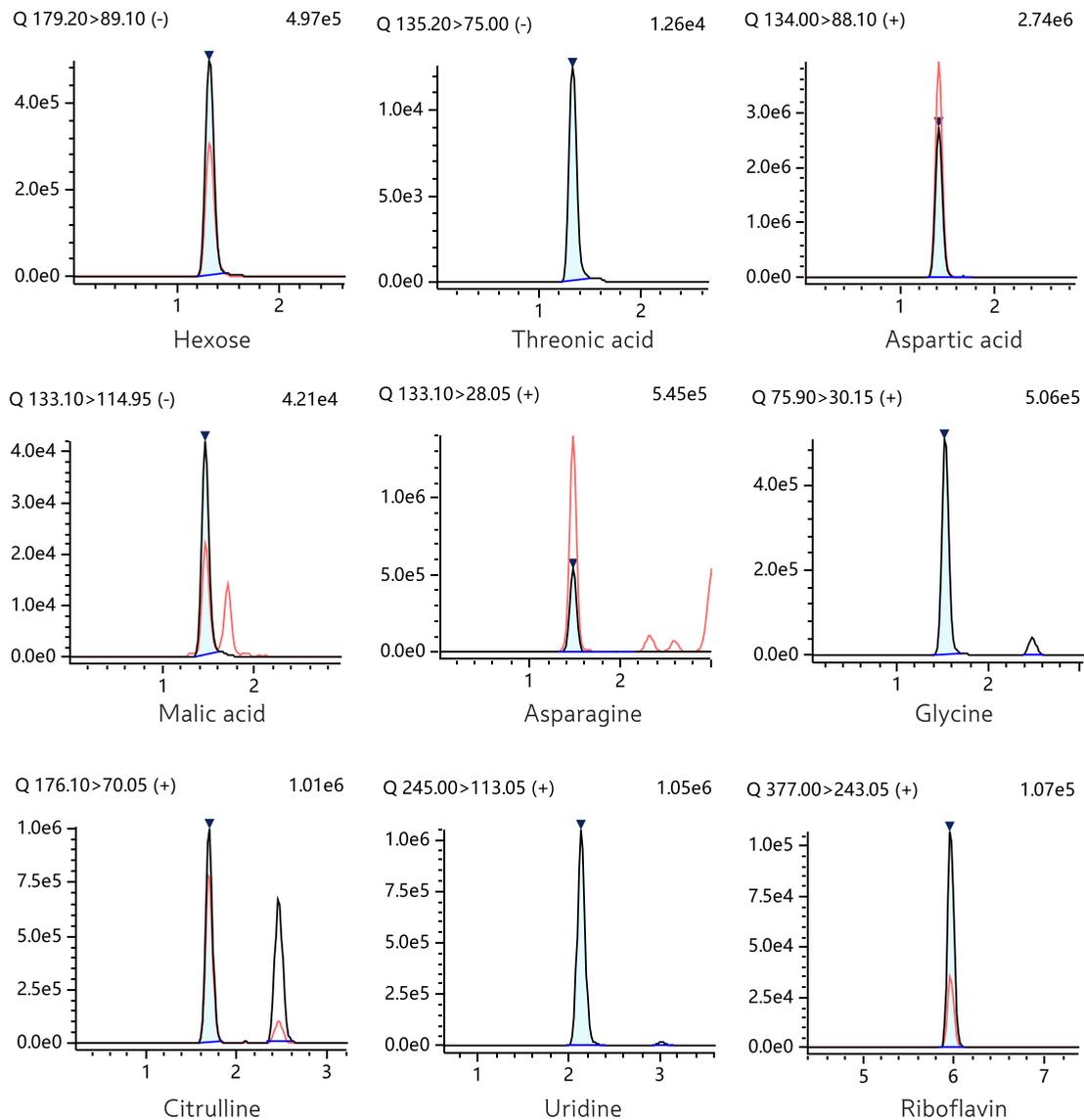


图 1 部分检出化合物色谱图

## 2.2 部分糖、氨基酸、核苷和维生素类化合物的含量变化趋势

采用多组学整合分析工具 Multi-omics 分析发酵液中目标组分含量的变化趋势。按照化合物所属类别分类，以发酵时间为横坐标，目标化合物与内标化合物的峰面积比为纵坐标进行绘图，部分糖类、氨基酸、核苷和维生素的变化趋势如下。

### 糖类化合物：

糖类化合物作为发酵的碳源之一，在发酵过程中可能会转化为糖酸。图 2 为葡萄糖酸（Gluconic acid）、葡萄糖（Hexose）、蔗糖（Sucrose）、苏糖酸（Threonic acid）四种物质含量随时间的变化趋势。从图可以看出，两种糖的含量整体呈现下降趋势，但在 95h 时葡萄糖含量增加，推测此时可能进行了补料。糖酸中葡萄糖酸的含量比较稳定，而苏糖酸含量在 23h 后下降明显，推测糖更多的转化形成了葡萄糖酸。

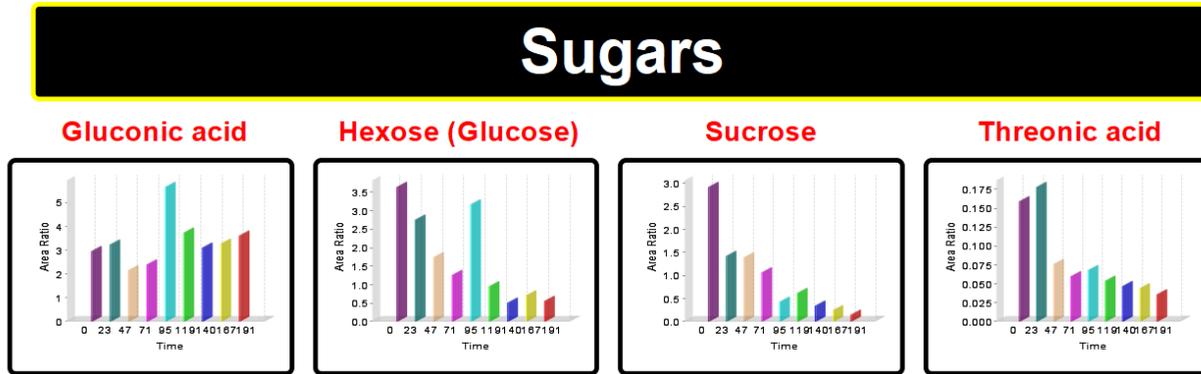


图 2 发酵液中糖类相对含量变化趋势

氨基酸类化合物：

氨基酸是菌种发酵中的氮源，图 3 为赖氨酸代谢通路中相关化合物随时间的变化趋势图。其中 2-氨基己二酸（2-Amino adipic acid）、乙酰左旋肉碱（Acetylcarnitine）、酵母氨酸（Saccharopine）含量基本维持稳定，而赖氨酸（Lysine）、羟基赖氨酸（Hydroxylysine）、哌啶酸（Pipelic acid）则在增加后迅速消耗。

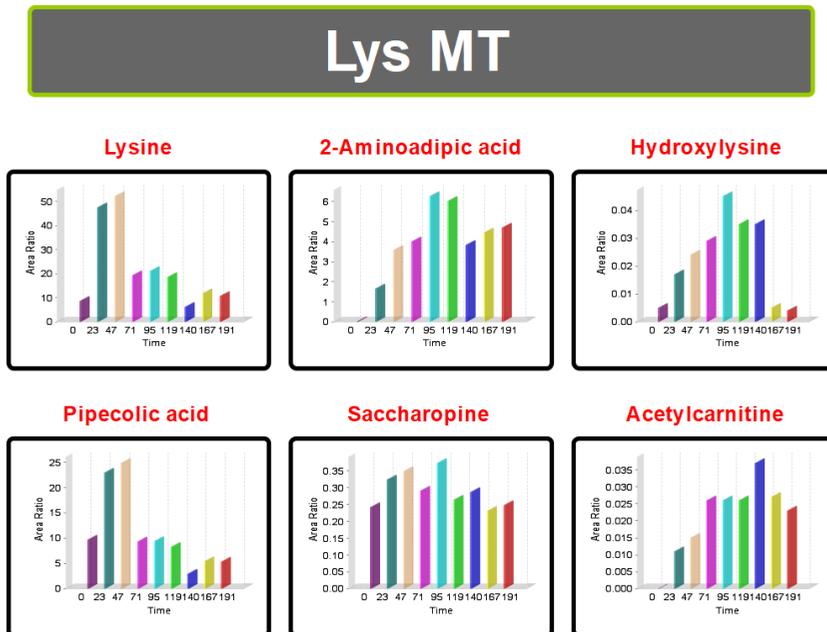


图 3 发酵液中赖氨酸代谢通路中相关化合物相对含量变化趋势

核苷类化合物：

核苷类物质在发酵过程中作为生物活性物质，图 4 为嘧啶的代谢通路中相关化合物含量变化趋势图。其中胸腺嘧啶（Thymidine）、尿嘧啶（Uracil）、尿苷（Uridine）在 23 h 内含量迅速上升，之后维持稳定（140 h 出现异常下降的情况）。3-氨基异丁酸（3-Aminoisobutyric acid）、5-尿苷一磷酸（Uridine monophosphate）含量则在上升后出现下降的趋势。

## Pyrimidine MT

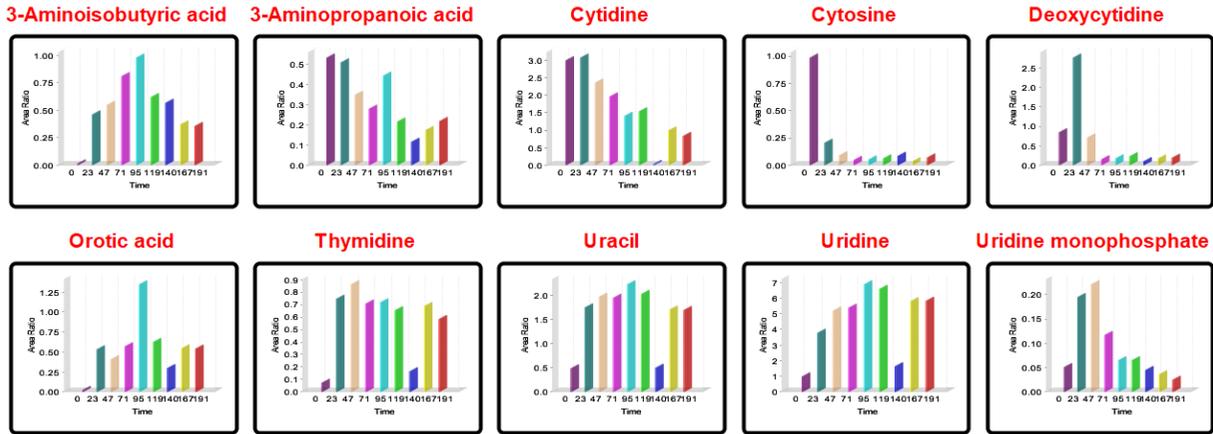


图 4 发酵液中嘧啶代谢通路中相关化合物相对含量变化趋势

维生素类化合物：

维生素是发酵过程中的微量营养物质，图 5 为维生素 B 和 C 含量随时间的变化趋势。从图可以看出，发酵开始后维生素 B2、B5、B6、C 含量先迅速增加，然后基本维持稳定（140 h 时含量略有下降）。

## Vitamins

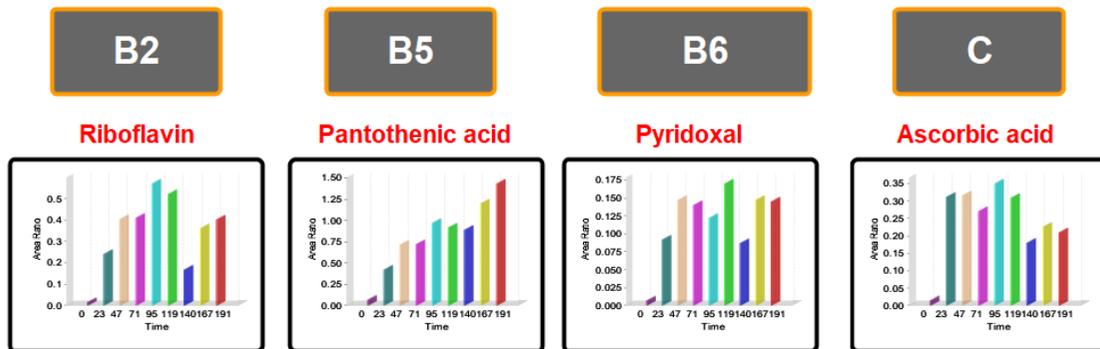


图 5 发酵液中部分维生素相对含量变化趋势

### ■ 结论

本文利用细胞培养分析方法包及三重四极杆液质联用仪 LCMS-8050 快速分析了发酵液中目标组分相对含量，并采用多组学整合分析工具 Multi-omics 绘制部分化合物在不同发酵时间点含量变化趋势，可用于监测发酵液成分的变化，为发酵效率的提高提供技术支持。

岛津应用云

