

Application News

No. C131

LC/MS
Liquid Chromatography Mass Spectrometry

代谢组学研究在微生物育种中的应用

Application of Metabolomics to Microbial Breeding

使用微生物生产有用物质广泛应用于食品、生物、能源等各个领域。例如在食品行业，以酒类、发酵食品为代表，微生物的发酵工艺应用于食品加工；在生物领域，用于大量提供氨基酸及抗生素。在能源领域，生物燃料方面的实际应用有着迫切的需要，而降低成本则是今后的课题。虽然当前微生物已被广泛应用于多种有用物质的生产，但为了进一步提高生产效率，转基因及育种等研究也日益活跃。代谢组学不仅可对微生物育种的代谢变动进行分析，还可得到目标物质及其前驱体和中间体代谢变动信息，从而更加深入理解物质生产相关的代谢途径，实现高效率的物质生产。本文向您介绍以生成半胱氨酸的大肠杆菌为样品，在合成半胱氨酸时使用的硫源中添加硫代硫酸或硫酸，使用 LC/MS 分析相关含硫代谢物随着培养时间的延长所发生变化的分析示例。

■ 大肠杆菌提取物的 LC/MS 分析

LC/MS Analysis of *Escherichia coli* Extract

使用作为硫源添加了硫代硫酸或硫酸的最小培养基培养大肠杆菌。为了观察随着培养时间的延长代谢物发生的变化，我们分别在 3、4、5、6、7、8、9 小时后从培养悬浊液中回收了一部分菌体。回收的大肠杆菌在测定 OD 值之后，通过过滤器过滤，将培养基成分与菌体迅速分离。然后将分离的菌体在甲醇中进行破碎，制备大肠杆菌萃取液。使用浓缩离心机将甲醇分离后，用超纯水对溶解液进行适当稀释，然后进行 LC/MS 分析。在分析代谢物时，使用 LCMS 初生代谢物方法包的离子对色谱法 (LCMS-8040) 及非离子对色谱法 (LCMS-8050) 的分析条件进行同时分析。表 1 为各方法的分析条件；图 1 为对添加了硫代硫酸的培养基所培养的大肠杆菌的萃取液进行分析时，各分析方法所对应的 MRM 色谱图（均为 6 小时后的时间点）。由图可知，离子对色谱法主要检测到氨基酸、辅酶、核酸相关化合物的峰，而非离子对色谱法则检测到源自氨基酸、有机酸、核酸相关化合物的峰。

表 1 离子对色谱法和非离子对色谱法的分析条件
Analytical Conditions for Ion Pairing Method and Non-Ion Pairing Method

离子对色谱法 (LC 分析条件)		非离子对色谱法 (LC 分析条件)	
色谱柱	: 反相色谱柱	色谱柱	: 反相色谱柱
流动相 A	: 15 mmol/L 醋酸, 10 mmol/L 三丁胺-水	流动相 A	: 0.1% 甲酸-水
流动相 B	: 甲醇	流动相 B	: 0.1% 甲酸-乙腈
流速	: 0.3 mL/min	流速	: 0.25 mL/min
模式	: 梯度洗脱	时间程序 (B Conc.)	: 梯度洗脱

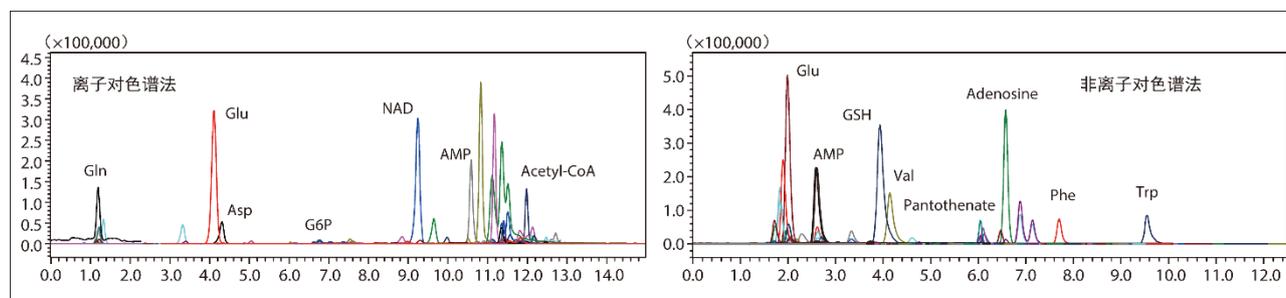


图 1 添加了硫代硫酸培养基的大肠杆菌提取物的 MRM 色谱图
MRM Chromatograms of *Escherichia coli* Extract After Culture in Thiosulfate-Containing Medium

■ 随含硫代谢物的培养时间延长而发生的代谢变动

Change in Sulfur-Containing Metabolites over Time

根据分析结果，将半胱氨酸等含硫相关代谢物的面积比与硫酸及硫酸培养基中培养时间分别进行比较，结果如图 2 所示（纵轴：面积比、横轴：时间）。由图可知，因硫源的差异导致培养过程中代谢物发生变化。特别在葡萄糖将要枯竭的 6 小时左右，添加了硫化硫酸的培养基中 Cysteine 急剧减少（7 小时之后），而位于代谢途径上游的 Serine 存在增加（6 小时处）。

除此之外，还确认到在添加了硫化硫酸的培养基中核苷有所上升（Adenosine、Inosine）。因此，通过代谢组学方法可知，在培养基中添加硫源会影响 Cysteine 等含硫代谢物的生产率。

本文围绕产半胱氨酸相关的含硫代谢物，对大肠杆菌随培养时间的变化而发生的代谢变化进行观察。将初生代谢物方法包和三重四极杆质量分析仪进行组合，可对在生命中起着重要作用的氨基酸、有机酸、核酸相关化合物的代谢变化进行测定。

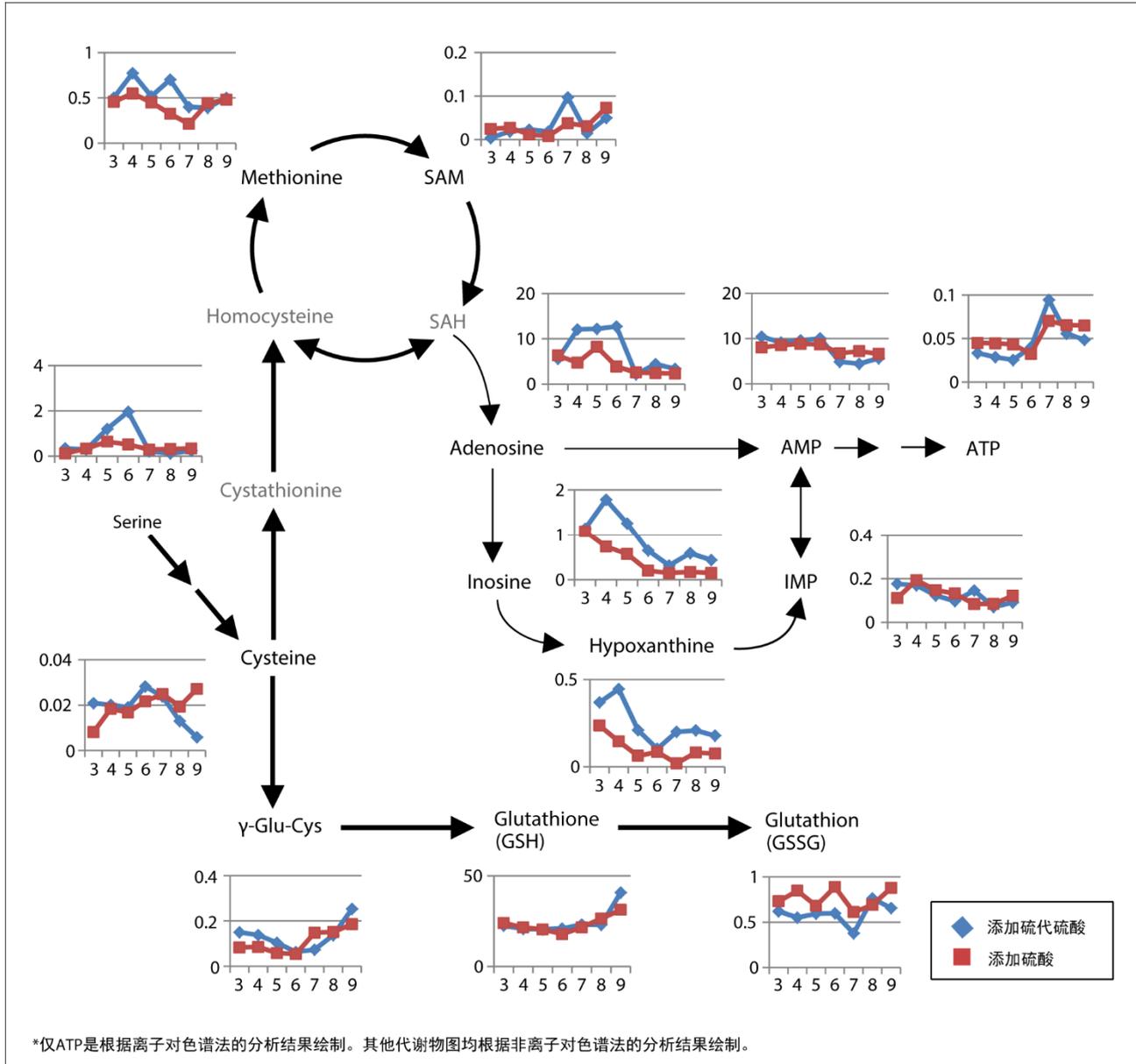


图 2 添加了硫化硫酸及硫酸的大肠杆菌培养基中含硫代谢物的变化
Changes in Sulfur-Containing Metabolites in *Escherichia coli* Cultured in a Thiosulfate- or Sulfate-Containing Medium

* 大肠杆菌样品由奈良先端科学技术大学院大学生物科学研究科 生物科学专业 统合系统生物学领域的大津产生副教授、河野祐介研究员提供。
* 本研究由农林水产省的“农林水产业/食品产业科学技术研究推进事业”协助进行。



岛津企业管理（中国）有限公司
岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话： 800-810-0439
400-650-0439

免责声明：

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售；
* 本资料中的所有信息仅供参考，不予任何保证。
如有变动，恕不另行通知。

第一版发行日：2016年7月