

基于混合培养和条件优化促进嗜盐菌中四氢嘧啶的合成及转化

田雪¹, 董梦瑶¹, 秦蕊¹, 龙启福¹, 韩睿², 朱德锐¹, 李永臻^{1*}

1 青海大学 医学院, 基础医学部, 青海 西宁

2 青海大学 农林科学院, 蔬菜遗传与生理重点实验室, 青海 西宁

田雪, 董梦瑶, 秦蕊, 龙启福, 韩睿, 朱德锐, 李永臻. 基于混合培养和条件优化促进嗜盐菌中四氢嘧啶的合成及转化[J]. 微生物学报, 2025, 65(12): 5524-5539.

TIAN Xue, DONG Mengyao, QIN Rui, LONG Qifu, HAN Rui, ZHU Derui, LI Yongzhen. Mixed culture and condition optimization promote ectoine synthesis and transformation in halophilic bacteria[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(12): 5524-5539.

摘要:【目的】基于 MG 培养基, 考察 pH、金属离子及 NaCl 浓度等单因素变化对嗜盐枝芽孢杆菌(*Virgibacillus salexigens*) DSM 11483 生长及 5-羟基四氢嘧啶(5-hydroxyectoine, 5-HE)产量的影响, 优化得到最佳培养条件, 并探索坎帕尼亚盐单胞菌(*Halomonas campaniensis*) XH26 与 *V. salexigens* DSM 11483 混合培养条件及 5-HE 产量变化。【方法】利用分光光度计法(OD_{600})监测细菌的生长情况; 采用 HPLC 法检测四氢嘧啶(ectoine, Ect)及 5-HE 产量; 所有实验数据采用 *t* 检验方法进行统计学分析。【结果】当 *V. salexigens* DSM 11483 在最佳培养条件 pH 为 9.0、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 为 1.00 mmol/L、NaCl 浓度为 2.0 mol/L 进行培养时 Ect 和 5-HE 产量分别为 200.4 mg/L 和 80.0 mg/L; 以 40.0 mmol/L Ect “喂养” *V. salexigens* DSM 11483 并培养 72 h 后 5-HE 产量为 1 373.5 mg/L, 是对照组产量的 17.2 倍。将 *H. campaniensis* XH26 培养 24 h 后与培养 36 h 的 *V. salexigens* DSM 11483 混合, 继续培养 72 h 后的 Ect 和 5-HE 合成产量分别为 1 535.1 mg/L 和 168.7 mg/L, 分别是 *V. salexigens* DSM 11483 纯培养产量的 7.7 倍和 2.1 倍。【结论】本研究表明嗜盐菌混合培养可充分利用各自优势提高 Ect 的合成与转化效率, 具有进一步研究的价值。

关键词: 嗜盐菌; 混合培养; 培养条件优化; 四氢嘧啶“喂养”; 5-羟基四氢嘧啶

资助项目: 国家自然科学基金(32260019); 青海中央引导地方科技发展资金(2024ZY015)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32260019) and the Qinghai Central Government Guide Local Science and Technology Development Fund (2024ZY015).

*Corresponding author. E-mail: liyongzhen885@qhu.edu.cn

Received: 2025-05-31; Accepted: 2025-08-20; Published online: 2025-09-08

Mixed culture and condition optimization promote ectoine synthesis and transformation in halophilic bacteria

TIAN Xue¹, DONG Mengyao¹, QIN Rui¹, LONG Qifu¹, HAN Rui², ZHU Derui¹, LI Yongzhen^{1*}

1 Department of Basic Medical Sciences, Medical College, Qinghai University, Xining, Qinghai, China

2 Key Laboratory of Vegetable Genetics and Physiology, Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Qinghai University, Xining, Qinghai, China

Abstract: [Objective] To investigate the effects of changes in single factors such as pH, metal ions, and NaCl concentration in the MG medium on the growth of *Virgibacillus salexigens* DSM 11483 and the yield of 5-hydroxyectoine (5-HE), optimize the culture conditions, and explore the mixed culture conditions of *Halomonas campaniensis* XH26 with *V. salexigens* DSM 11483 and the change in the yield of 5-HE. [Methods] We used a spectrophotometer was used to monitor the biomass (OD_{600}) of bacteria. The HPLC method was used to measure the yields of ectoine and 5-HE. The one-sample *t*-test was conducted to analyze the difference significance of the experimental data. [Results] The optimal culture conditions for *V. salexigens* DSM 11483 were as follows: pH 9.0, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ concentration of 1.00 mmol/L, and NaCl concentration of 2.0 mol/L. In this medium, the yields of ectoine and 5-HE were 200.4 mg/L and 80.0 mg/L, respectively. After “feeding” *V. salexigens* DSM 11483 with 40.0 mmol/L ectoine and culturing for 72 h, the yield of 5-HE reached 1 373.5 mg/L, which was 17.2 times that in the control group. After 72 h of mixed culture of *H. campaniensis* XH26 cultured for 24 h with *V. salexigens* DSM 11483 cultured for 36 h, the yields of ectoine and 5-HE were 1 535.1 mg/L and 168.7 mg/L, respectively, which were 7.7 times and 2.1 times the yield of *V. salexigens* DSM 11483 in pure culture. [Conclusions] The mixed culture of halophilic bacteria can make full use of their respective advantages to improve the synthesis and transformation efficiency of ectoine, demonstrating further research value.

Keywords: halophilic bacteria; mixed culture; optimization of culture conditions; “feeding” of ectoine; 5-hydroxyectoine

嗜盐微生物为抵御高盐环境的渗透压胁迫, 会通过积累水溶性高的相容性溶质来平衡细胞内外的渗透压, 从而在高盐度、高温等极端环境中生存^[1-3]。相容性溶质在自然界中分布广泛, 主要包括糖类、多元醇以及氨基酸及其衍生物^[4]。其中, 四氢嘧啶(ectoine, Ect)及其羟基化衍生物 5-羟基四氢嘧啶(5-hydroxyectoine, 5-HE)因其具有维持蛋白质与 DNA 稳定性、保护细胞组织等生物学性能而备受关注^[5-8]。5-HE 相较于 Ect 额外多一个羟基基团, 使其在耐高盐、高温

等极端环境中展现出更为优异的性能, 在化妆品、医药等工业应用中具有广阔的前景与巨大的开发价值^[9]。

5-HE 以 L-天冬氨酸为起始, 依次经 L-天冬氨酸激酶(L-aspartate kinase, Ask)、L-天冬氨酸- β -半醛脱氢酶(L-aspartate- β -semialdehyde dehydrogenase, Asd)、L-2,4-二氨基丁酸转氨酶(L-2,4-diaminobutyrate transaminase, EctB)、L-2,4-二氨基丁酸乙酰基转移酶(L-2,4-diaminobutyrate acetyltransferase, EctA)和四氢嘧啶合成酶

(L-ectoine synthase, EctC)催化转化为 Ect, 最终由四氢嘧啶羟化酶(ectoine hydroxylase, EctD)催化 Ect 生成 5-HE。然而, 目前能用于高效合成 5-HE 的野生菌株较少, 且菌株中 EctD 酶的催化效率存在较大差异^[10]。因此, 如何寻找大量合成 5-HE 的菌株成为国内外研究热点。尽管国内外学者已尝试通过代谢工程改造菌株以提高 5-HE 产量, 如 Yang 等^[11]通过改造嗜盐菌 *Halomonas salifodinae* IM328 显著提升了 EctD 表达水平最终使 5-HE 产量达到 4.9 g/L; Ma 等^[12]通过代谢工程优化大幅提高了大肠杆菌的 5-HE 产量至 14.9 g/L; Jungmann 等^[13]通过改造谷氨酸棒状杆菌提高异源表达 EctD 酶活性进而高产 5-HE (产量为 74.0 g/L)。虽然通过改造大肠杆菌和谷氨酸棒状杆菌使 5-HE 产量得到一定提升, 但实际生产中仍面临诸多难题: (1) 嗜盐菌的工程菌构建及代谢调控难度大; (2) 传统工业生物技术存在易染菌、设备复杂、难以连续发酵等缺点; (3) 5-HE 合成路线存在成本高、产物分离纯化难度大, 产量低的问题。相比之下, 嗜盐菌、嗜热菌和嗜酸碱菌等极端微生物具有显著优势, 其具有能够适应开放环境、无需灭菌、可连续发酵等优点^[14], 而嗜盐菌因其独特的生理特性(如高耐盐性、耐极端环境等)在生物合成领域具有潜在优势。

混合培养策略在天然产物合成中的应用广泛^[15-16], 然而针对嗜盐菌混合培养提升相容性溶质产量的研究仍较为有限, 本研究选取的 2 种嗜盐菌——坎帕尼亚盐单胞菌(*Halomonas campaniensis*) XH26 和需盐枝芽孢杆菌(*Virgibacillus salexigens*) DSM 11483, 它们在合成 Ect 及 5-HE 上具有互补优势。其中, 菌株 *H. campaniensis* XH26 的 Ect 合成能力较强, 产量可达(456.82±15.72) mg/L^[17], 能够为混合培养体系提供充足的 Ect 前体; 菌株 *V. salexigens* DSM 11483 不仅具有较强的耐盐能力, 还可长时间连续培养, 其关键酶 EctD 可高效催化合成 5-HE, 已知通过优化培养条件其产量可达

121.9 mg/L^[3]。基于此, 本研究通过嗜盐菌混合培养及培养条件优化, 以期提高嗜盐菌混合体系中 5-HE 的产量, 为 5-HE 的高产提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 菌株来源和培养基

需盐枝芽孢杆菌(*Virgibacillus salexigens*) DSM 11483 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC 1.3498)。坎帕尼亚盐单胞菌(*Halomonas campaniensis*) XH26 由青海大学基础医学研究中心保存, 该菌株分离自小柴旦盐湖。

MG 优化培养基(g/L)^[3]: L-谷氨酸钠 120.0, 葡萄糖 15.0, 蛋白胨 10.0, KH₂PO₄ 3.0, K₂HPO₄ 9.0, MgSO₄·7H₂O 0.4, FeSO₄·7H₂O 0.2, NaCl 6.0, pH 调至 7.0。

OSM 优化培养基(g/L)^[18]: L-谷氨酸钠 6.6, 酶水解酪素 7.5, NaCl 58.5, MgSO₄·7H₂O 24.7, KCl 55.9, CaCl₂ 0.2, 酵母 2.0, pH 调至 7.0。

1.2 主要试剂和仪器

NaCl、MgSO₄·7H₂O、FeSO₄·7H₂O, 上海麦克林生化科技有限公司; 四氢嘧啶(ectoine, Ect)标准品、5-羟基四氢嘧啶(5-hydroxyectoine, 5-HE)标准品、甲醇(HPLC 级), 赛默飞世尔科技公司; 有机系微孔滤膜, 青海赛斯克生物科技有限公司。

恒温摇床、超净工作台, 知楚生物科技(上海)有限公司; 高效液相色谱仪, 安捷伦科技有限公司; 色谱柱, 资生堂(中国)投资有限公司; 台式离心机, 艾本德(上海)国际贸易有限公司; pH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司。

1.3 菌株活化

将 *V. salexigens* DSM 11483 和 *H. campaniensis* XH26 原始菌株分别以 1% 的比例接种于 10 mL 的 MG 优化培养基和 OSM 优化培养基中, 37 °C、160 r/min 振荡培养, 并每隔 12 h 测定 OD₆₀₀ 值直至其达到 0.6–1.0。然后分别取活化后

的菌液 1% 接种于 100 mL 培养基内进行扩大培养。

1.4 标准曲线的建立

取 Ect 28.4 mg 和 5-HE 31.6 mg 标准品分别加入 100 mL 纯水, 配制成 2.00 mmol/L 的标准品母液, 再将母液以梯度稀释成浓度分别为 1.75、1.50、1.25、1.00、0.75、0.50、0.25 mmol/L 的工作液。经有机系膜过滤后, 利用 HPLC 进行分析检测, 根据色谱峰面积和配制浓度制作标准曲线。HPLC 检测条件: 流动相为磷酸二氢钾(pH 3.0)/甲醇(96:4, 体积比), 检测波长 210 nm, 流速为 1.0 mL/min, 柱温恒定 30 °C, 上样量为 5 μ L。

1.5 培养条件优化

将活化好的菌液接种到不同培养基内, 每组设 3 个生物学重复, 37 °C、160 r/min 培养 72 h, 并测定 OD_{600} 。取 1 mL 发酵液, 12 000 r/min 离心 5 min 弃上清, 收集菌泥置于 100 °C 干浴器内, 加热 15 min 后加 1 mL 纯水振荡混匀, 12 000 r/min 离心 5 min 取上清液过滤后, 用 HPLC 检测样品中 5-HE 和 Ect 的含量。

1.5.1 筛选最适 pH 值

将菌株分别接种到不同 pH (4.0–11.0) 的培养基中, 按照 1.3 节的方法进行培养, 采用 1.4 节的方法检测 5-HE 及 Ect 的产量。

1.5.2 筛选最佳金属离子组合及浓度

依据最佳 pH 值, 在 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 的基础上添加锰离子和镁离子, 分组设置为 $FeSO_4 \cdot 7H_2O + MnCl_2$ 、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O + MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O + MnCl_2 + MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 组, 各金属离子初始浓度均设为 0.25 mmol/L。按照 1.3 节的方法进行培养, 采用 1.4 节的方法检测 5-HE 及 Ect 的产量。

1.5.3 筛选 NaCl 最佳浓度

依据最佳 pH 值与最适金属离子组合和最佳浓度, 设置 0.0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mol/L 不同 NaCl 浓度组。按照 1.3 节的方法进行培养, 采用 1.4 节的方法检测 5-HE 及 Ect 的产量。

1.6 Ect “喂养” *V. salexigens* DSM 11483 及代谢产物检测

在最优培养基条件下, 向培养基内添加不同浓度的 Ect, 通过底物“喂养”提高 *V. salexigens* DSM 11483 合成 5-HE 的产量。Ect 浓度依次为 0.0、10.0、20.0、30.0、40.0、50.0 mmol/L, 以 0 mmol/L Ect 为对照组, 10.0–50.0 mmol/L 为实验组。按照 1.3 节的方法进行培养, 采用 1.4 节的方法检测 5-HE 及 Ect 的产量。

1.7 嗜盐菌混合培养最适条件的探索

1.7.1 嗜盐菌混合培养最优混合时间筛选

将 *H. campaniensis* XH26 菌株培养至 24 h, *V. salexigens* DSM 11483 菌株分别培养 36、48、60、72 h 后, 各取 30 mL 菌液混合(总体积 60 mL), 继续培养 72 h, 然后提取样品进行 HPLC 检测。

1.7.2 嗜盐菌混合培养最优比例筛选

依据最佳混合培养时间, 设置不同体积的 *H. campaniensis* XH26 与 *V. salexigens* DSM 11483 进行混合共培养, 比例分别为 *H. campaniensis* XH26:*V. salexigens* DSM 11483 为 1:4、1:3、1:1、3:1、4:1, 混合后继续培养 72 h, 经 HPLC 检测 5-HE 和 Ect 的产量。之后根据两菌的 OD_{600} 进行不同生物量比例混合, 与上述体积比一致, 继续培养 72 h 后经 HPLC 检测产量。

1.8 统计学方法

本研究所有实验数据均基于 3 次平行实验, 利用 GraphPad Prism 10.0、Origin 2021 统计软件作图, 数据比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示有统计学差异。

2 结果与分析

2.1 标准曲线

根据 HPLC 中 Ect 和 5-HE 的色谱峰面积和浓度绘制标准曲线, 得到 Ect 的线性回归方程: $y = 0.0005x + 0.0133$ ($R^2 = 0.9998$); 5-HE 的线性回

归方程: $y=0.0006x-0.0181$ ($R^2=0.9999$), 并计算产量。

2.2 pH 值对菌株合成 5-HE 产量的影响

根据 OD_{600} 测量结果(图 1A)可知, *V. salexigens* DSM 11483 菌株在 pH 4.0–5.0、pH 10.0–11.0 的培养基中生长受到抑制, 在 pH 6.0–9.0 范围内生长良好。在 pH 为 7.0 时 Ect (图 1B) 产量为 202.0 mg/L, 5-HE (图 1C) 产量为 67.4 mg/L; pH 为 9.0 时 Ect 产量较高, 为 249.5 mg/L, 5-HE 产量为 57.1 mg/L, 且 pH 9.0 时具有显著差异。综合考虑, 将后续培养基的 pH 值确定为 9.0。

2.3 金属离子组合及浓度对 5-HE 产量的影响

金属离子会影响微生物的代谢产物, 在最适 pH 为 9.0、NaCl 为 2.5 mol/L 的条件下添加不同金属离子, 检测 *V. salexigens* DSM 11483 中 5-HE 和 Ect 的产量。不同金属离子的生长曲线显示(图 2A), 菌株在 36 h 后进入稳定期, 金属离子对菌株生长无明显抑制作用。菌株培养至 24 h 开始积累 Ect (图 2B), 72 h 时积累量均逐渐增加。当培养基中单独添加 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 时 Ect 产量为 184.8 mg/L, 5-HE 产量为 57.8 mg/L;

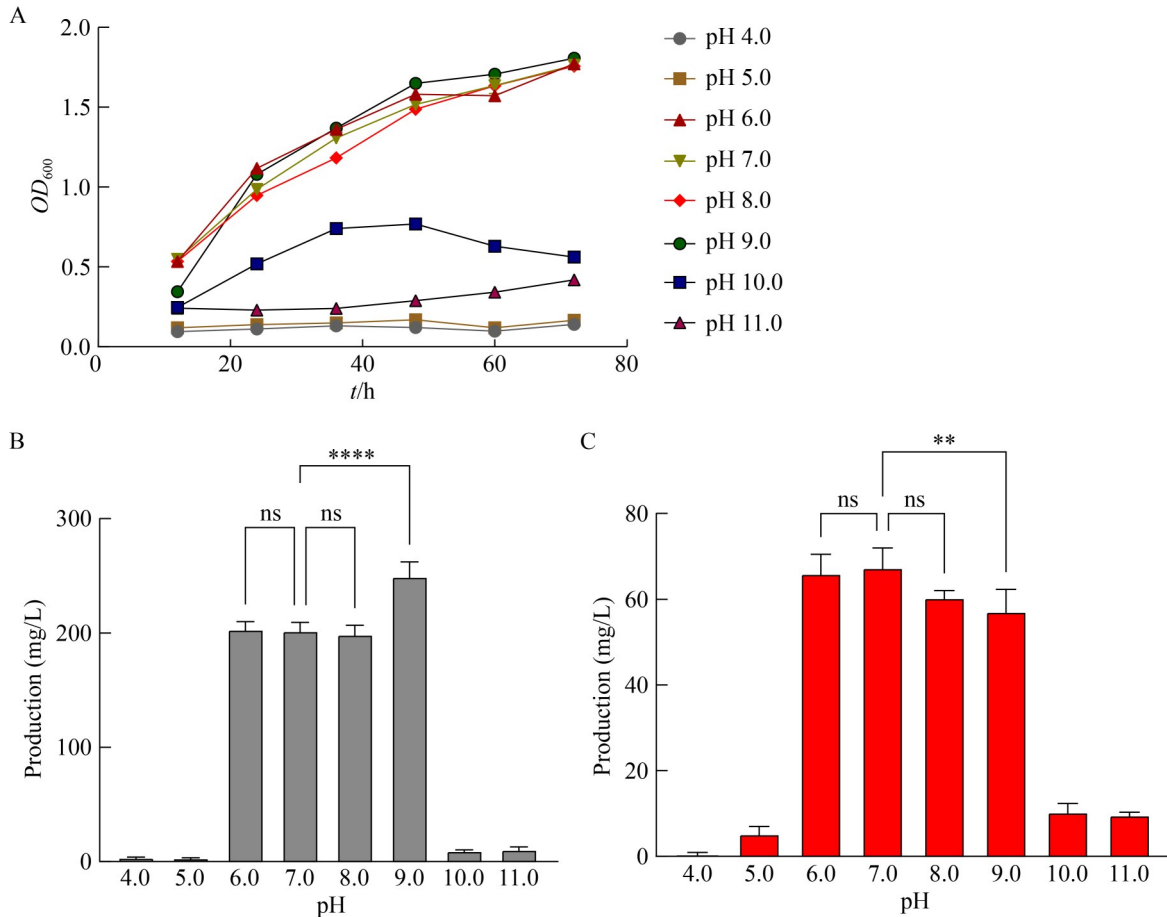


图1 不同pH条件下*Virgibacillus salexigens* DSM 11483菌株的生长量及ectoine和5-HE的产量检测。A: 不同pH作用下*Virgibacillus salexigens* DSM 11483菌株生长量; B: Ectoine产量; C: 5-HE产量。

Figure 1 Detection of the growth of *Virgibacillus salexigens* DSM 11483 strain and the yields of ectoine and 5-HE under different pH conditions. A: *Virgibacillus salexigens* DSM 11483 strain growth under different pH; B: Ectoine yield; C: 5-HE yield. **: $P<0.01$; ****: $P<0.0001$; ns: No significant difference.

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 组合后 5-HE 产量为 60.5 mg/L; 3 种盐混合培养后至 36 h 的 5-HE 产量为 41.0 mg/L, 至 72 h 后产量下降为 26.8 mg/L。结果表明, 铁离子和镁离子组合培养至 72 h 时 5-HE 产量相对较高, 其中铁离子贡献最大(图 2C)。因此, 选择铁离子和镁离子组合为后续提高 5-HE 产量筛选的基础条件。

基于最适 pH 及最适金属离子条件, 本研究在培养基中添加不同浓度的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 浓度范围设定为 0.25–1.00 mmol/L。结果表明, 添加 1.00 mmol/L 铁离子时菌株生长态势更佳(图 3A), 随培养时间变化 Ect 产量逐渐增加, 至 72 h 时为 210.4 mg/L (图 3B), 5-HE 产量为 74.6 mg/L (图 3C)。因此, 选定培养

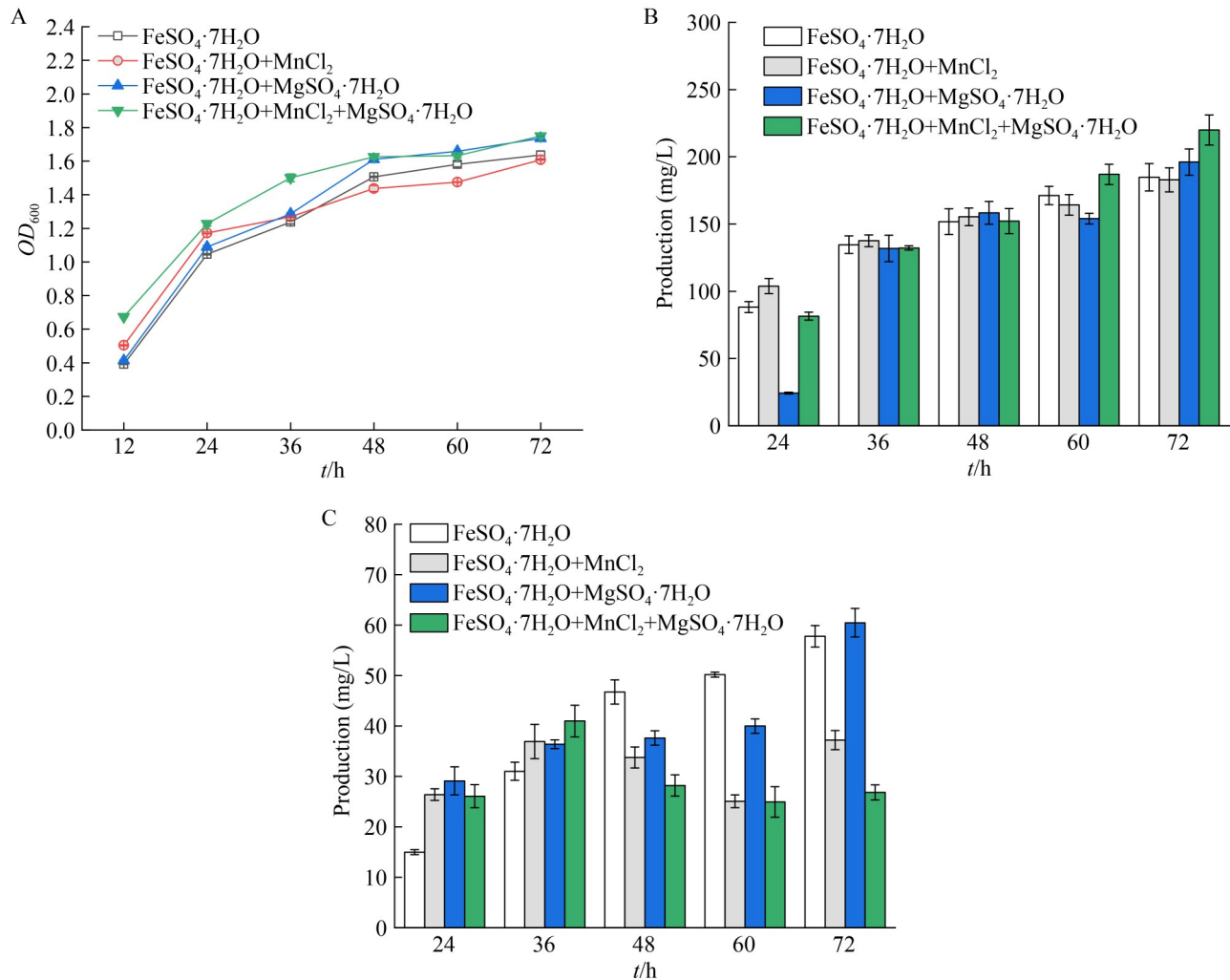


图2 不同金属离子对*Virgibacillus salexigens* DSM 11483菌株生长量及Ect和5-HE产量的影响。A: 添加不同金属离子组*Virgibacillus salexigens* DSM 11483菌株的生长量; B: Ect产量随时间变化情况; C: 5-HE产量随时间变化情况(金属离子初始浓度均设置为0.25 mmol/L)。

Figure 2 Effects of different metal ions on the growth of *Virgibacillus salexigens* DSM 11483 strain and the yields of ectoine and 5-HE. A: Growth curves of *Virgibacillus salexigens* DSM 11483 after addition of different metal ion groups; B: Ectoine yield with time; C: 5-HE yield with time (The initial concentration of metal ions was set to 0.25 mmol/L).

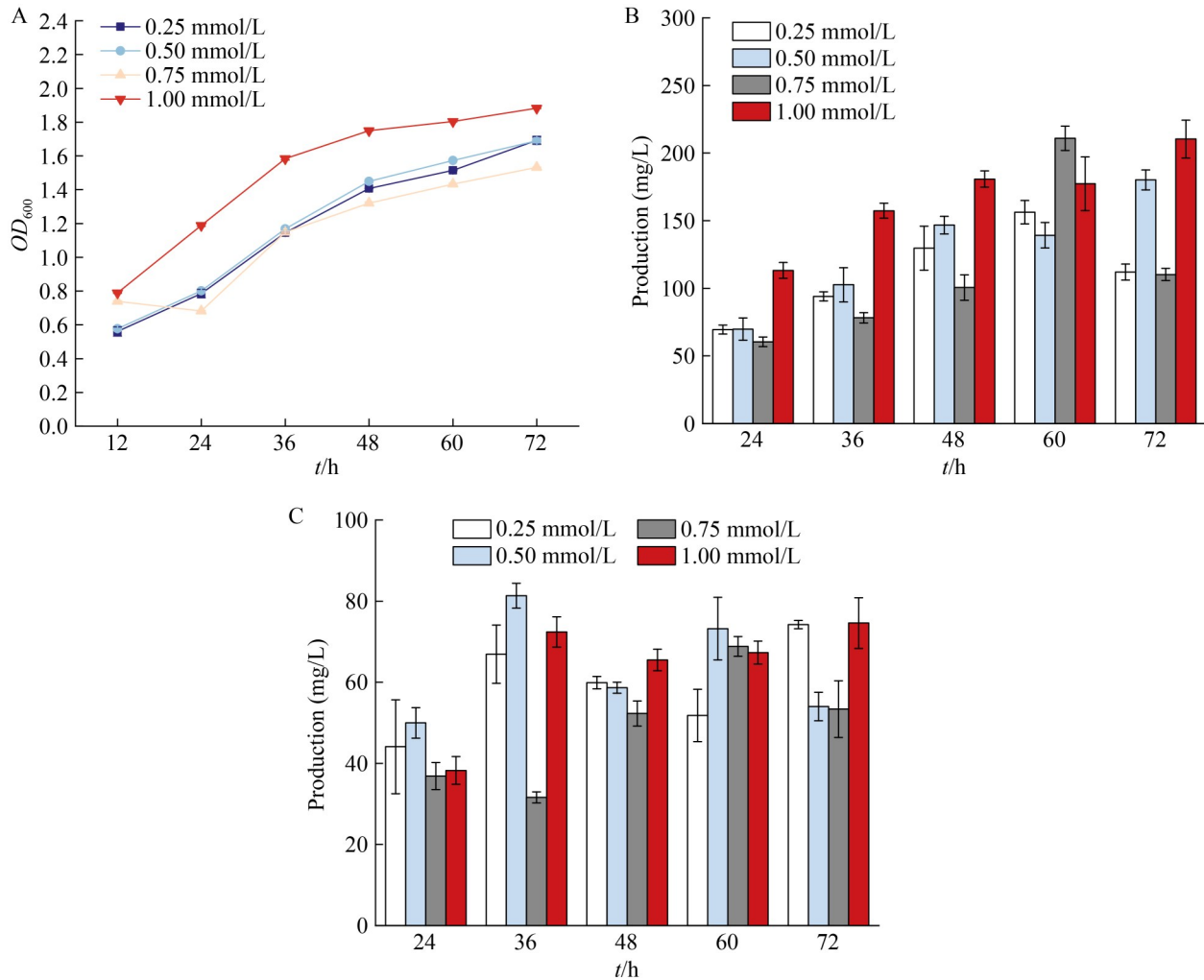


图3 不同浓度 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 对*Virgibacillus salexigens* DSM 11483菌株生长及Ect和5-HE产量的影响。A: 不同浓度 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 对*Virgibacillus salexigens* DSM 11483菌株生长量的影响; B: Ect产量随时间变化情况; C: 5-HE产量随时间变化情况。

Figure 3 Effects of different concentrations of $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ on the growth of *Virgibacillus salexigens* DSM 11483 strain and the yields of ectoine and 5-HE. A: Effects of different concentrations of $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ on the growth of *Virgibacillus salexigens* DSM 11483 strain; B: The change of ectoine yield over time; C: The change of 5-HE yield over time.

基中 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的最佳浓度为 1.00 mmol/L。

2.4 NaCl 浓度对 5-HE 产量的影响

NaCl 浓度对微生物的生长和代谢产物的生成具有显著影响, 较高浓度的 NaCl 可能会促进 Ect 及 5-HE 的生成, 但会对生物生长产生一定的抑制作用。在最适 pH 和金属离子条件下, 考

察培养基中 NaCl 浓度对菌株生长及 5-HE 产量的影响。在 2.0 mol/L 的 NaCl 浓度下菌株生长情况最佳(图 4A), 该浓度下 Ect 和 5-HE 的产量分别为 200.4 mg/L 和 80.0 mg/L (图 4B)。因此, 最终确定合成 Ect 与 5-HE 的最佳培养条件为 pH 9.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度为 0.25 mmol/L,

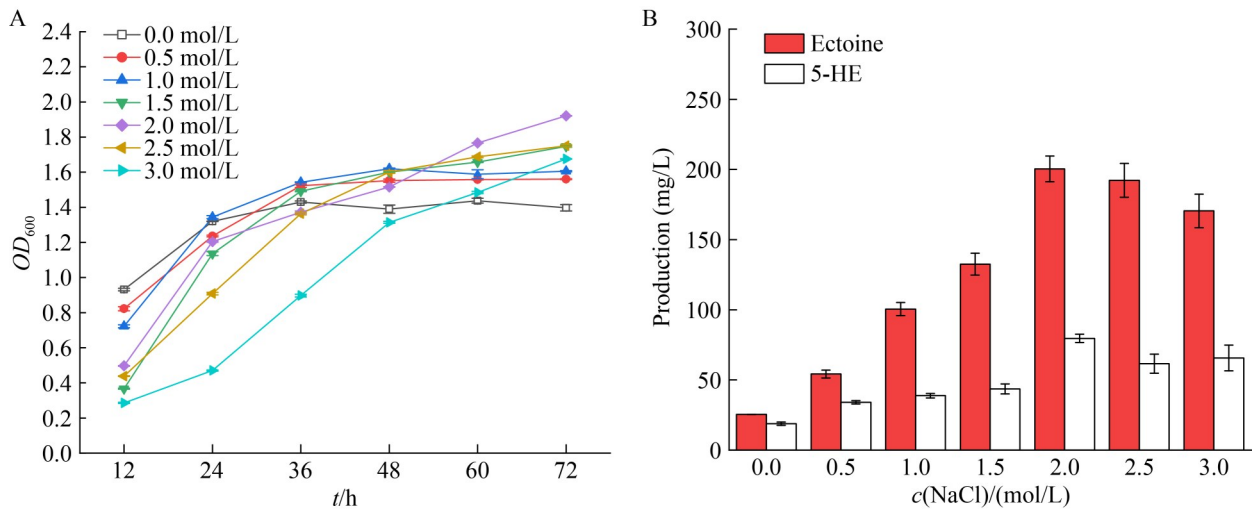


图4 NaCl浓度对*Virgibacillus salexigens* DSM 11483菌株生长及Ect和5-HE产量的影响。A: 不同NaCl浓度培养基内*Virgibacillus salexigens* DSM 11483菌株的生长量; B: Ect和5-HE的产量。

Figure 4 Effects of NaCl concentration on the growth of *Virgibacillus salexigens* DSM 11483 strain and the yields of ectoine and 5-HE. A: Growth amount of *Virgibacillus salexigens* DSM 11483 strain in culture media with different NaCl concentrations; B: Yields of ectoine and 5-HE.

FeSO₄·7H₂O 浓度为 1.00 mmol/L, NaCl 浓度为 2.0 mol/L。

2.5 Ect “喂养” *V. salexigens* DSM 11483 菌株的产量变化

前期体外酶学催化特性研究发现, *V. salexigens* DSM 11483 菌株的 EctD 活性较高^[10]。以不同浓度 Ect “喂养” *V. salexigens* DSM 11483 菌株并检测对 5-HE 产量的影响。该菌生长曲线结果显示在 30–36 h 生长迅速(图 5A), 表明以 Ect “喂养” 对菌株的生长无抑制作用, 且能促进该菌株生长。检测结果表明, 在底物浓度为 40.0 mmol/L 培养 72 h 时, 胞内 5-HE 产量最高为 1 373.5 mg/L (图 5C), 此时 Ect 产量为 541.8 mg/L (图 5B), 5-HE/Ect 产量比值约为 2.5。其中, 5-HE 产量是对照组的 17.2 倍, 说明添加 Ect 可显著提高 5-HE 产量。

2.6 嗜盐菌混合培养体系优化

2.6.1 嗜盐菌混合培养的最优混合时间

基于两菌株的最佳培养基分别对 *V. salexigens* DSM 11483 (盐度 2.0 mol/L) 与 *H. campani*

ensis XH26 (盐度 1.0 mol/L^[18]) 进行单独培养。通过 HPLC 检测及生长曲线分析发现(图 6A), *H. campani* XH26 菌株在 24 h 进入对数期, 菌株生长较为迅速, 且 Ect 产量明显增加, 但培养至 84 h 后产量逐渐下降。*V. salexigens* DSM 11483 菌株的细菌生物量随培养时间增加而持续增加, 当培养至 72 h 时 Ect 产量达到最高, 但 5-HE 产量在 72 h 前后无明显变化(图 6B)。综合考虑, 确定 *H. campani* XH26 与 *V. salexigens* DSM 11483 的最佳培养时间分别为 24 h 和 36 h。

在混合培养条件下, 两菌不同混合时间培养对产量有显著影响。因此, 确定将 *H. campani* XH26 培养至 24 h 后与培养不同时间的 *V. salexigens* DSM 11483 进行等比例混合培养 72 h 后检测产量。结果显示(图 7A、7B), 当 *V. salexigens* DSM 11483 培养 36 h 后, 与 *H. campani* XH26 混合并继续培养 72 h, Ect 及 5-HE 产量均为最高, Ect 产量为 1 535.1 mg/L, 5-HE 产量达到最高值 168.7 mg/L。如图 7C 所示, 细菌生物量持续增长, 相较于 *V. salexigens*

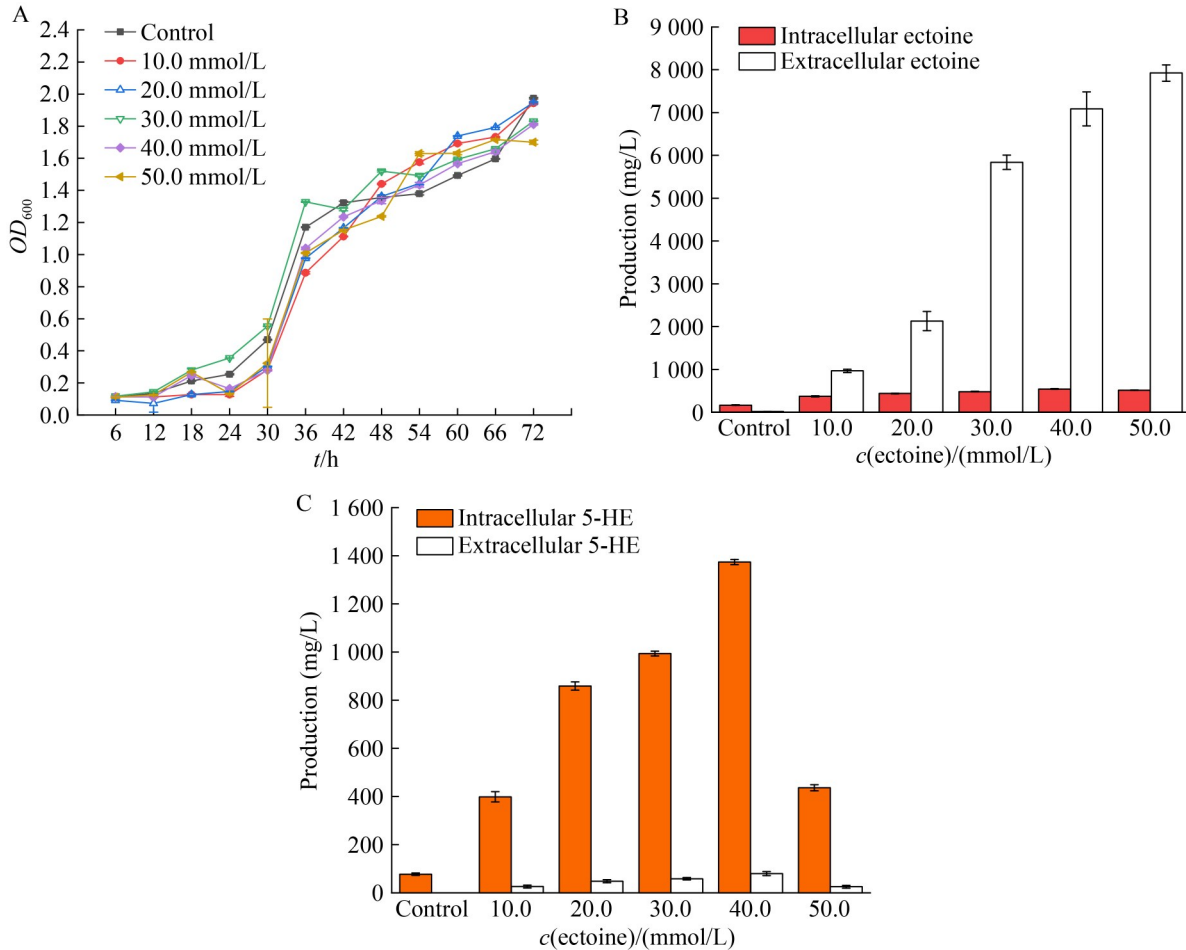


图5 底物浓度对*Virgibacillus salexigens* DSM 11483菌株生长及ectoine和5-HE产量的影响。A: 不同底物浓度下*Virgibacillus salexigens* DSM 11483菌株的生长量; B: 细菌胞内和胞外ectoine产量检测; C: 细菌胞内和胞外5-HE产量检测。

Figure 5 Effects of substrate concentration on the growth of *Virgibacillus salexigens* DSM 11483 strain and the yields of ectoine and 5-HE. A: Growth of *Virgibacillus salexigens* DSM 11483 strain under different substrate concentrations; B: Detection of ectoine production in intracellular and extracellular of bacteria; C: Detection of 5-HE production in intracellular and extracellular of bacteria.

DSM 11483 菌株单独培养, 嗜盐菌混合培养可显著提高 5-HE 和 Ect 产量。

2.6.2 嗜盐菌不同体积比混合培养后 Ect 和 5-HE 产量

为探索培养体系中两菌最佳混合体积比, 按照 1.7.2 节中的比例进行混合培养。不同比例混合培养结果显示(图 8A、8B), Ect 和 5-HE 产量随时间增加而增多, 且均高于单独培养。当

两菌混合体积比为 1:1, 并培养至 72 h 时, Ect 产量为 1 489.8 mg/L, 5-HE 产量为 164.3 mg/L, 均高于其他比例。细菌干重结果显示(图 8C), 混合培养细菌干重比单独培养高, 在 60 h 细菌干重呈下降趋势。

为进一步探索细菌生物量对产量的影响, 将处于对数生长期的 *H. campaniensis* XH26 ($OD_{600}=1.8$, 图 6A)与处于稳定期的 *V. salexigens*

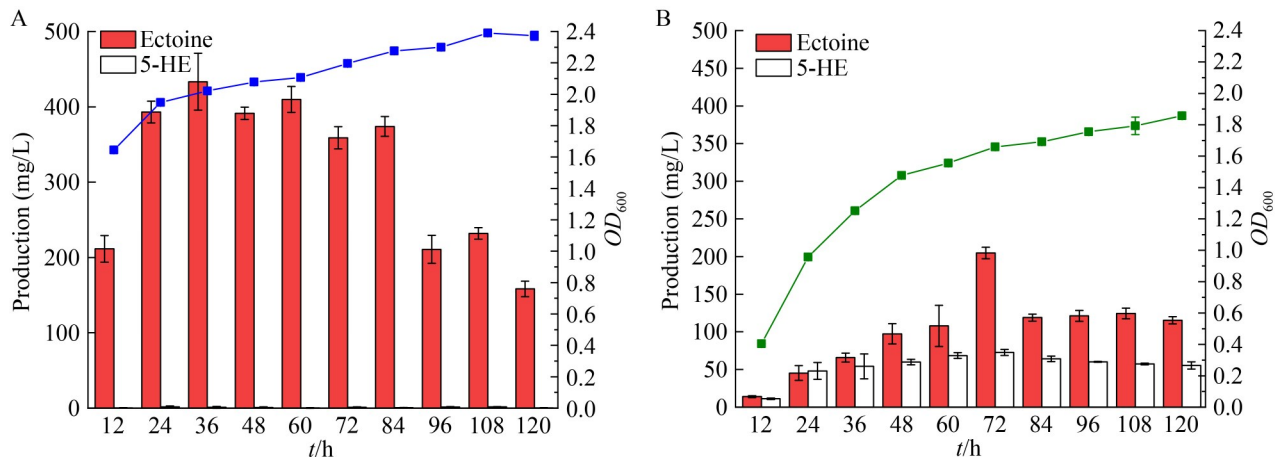


图6 *Halomonas campaniensis* XH26和*Virgibacillus salexigens* DSM 11483菌株生长情况及Ect和5-HE产量分析。A: *Halomonas campaniensis* XH26细菌生长量、Ect及5-HE产量；B: *Virgibacillus salexigens* DSM 11483细菌生长量、Ect及5-HE产量。

Figure 6 Growth conditions of *Halomonas campaniensis* XH26 and *Virgibacillus salexigens* DSM 11483 strains and analysis of ectoine and 5-HE yields. A: Growth amount of *Halomonas campaniensis* XH26 bacteria, ectoine and 5-HE production; B: Growth amount of *Virgibacillus salexigens* DSM 11483 bacteria, ectoine and 5-HE production.

DSM 11483 ($OD_{600}=1.8$)菌株按不同比例混合后继续培养,并检测 Ect 与 5-HE 产量。结果显示,当 *H. campaniensis* XH26:*V. salexigens* DSM 11483 体积比为 1:4 时, Ect 产量为 1 246.9 mg/L (图 9A), 5-HE 的产量为 157.2 mg/L (图 9B); 体积比例为 3:1 时, Ect 产量较高, 为 1 380.6 mg/L, 而 5-HE 产量为 56.8 mg/L。

综合来看,在探索不同混合时间、混合比例及生物量条件下发现,当 *H. campaniensis* XH26 培养至 24 h, *V. salexigens* DSM 11483 培养至 36 h 时,按体积比 1:1 混合继续培养 72 h, 5-HE 呈现最高产量,为 168.7 mg/L。

3 讨论

本研究探索了 *V. salexigens* DSM 11483 菌株生产 5-HE 和 Ect 的最优培养条件。结果表明,该菌株在 pH 6.0–9.0 环境中生长良好,过酸或过碱均会显著抑制微生物生长及代谢产量^[19-20]。铁、镁等离子是微生物生长所必需的微量元

素,根据 5-HE 合成催化机制,铁离子可提高 5-HE 产量^[21-22]。因此,本研究在 MG 培养基中含 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 的基础上,增加 $MnCl_2$ 和 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 后探索不同金属离子组合对 5-HE 和 Ect 产量的影响。菌株生长曲线及代谢产物分析结果显示,添加金属离子并未抑制菌株生长,3 种金属离子的协同作用可显著促进 Ect 合成,而铁、镁离子组合对 5-HE 积累表现出特异性刺激作用。该结果与 Bursy 等^[22]在体外实验中得出的 EctD 催化 Ect 发生羟基化反应依赖铁离子的结论高度一致。添加锰离子后 5-HE 产量下降,可能是锰离子对 Ect 合成途径关键酶活性具有正向调控作用^[23-24]。铁离子作为 EctD 酶的必需辅酶因子,可与镁离子协同促进 5-HE 生物合成^[25],验证了金属离子组合在 Ect 代谢调控中的关键作用。本菌株在盐环境中的生长曲线显示,在 0–3.0 mol/L 盐度范围内生长良好,当盐度为 2.0 mol/L 时生长量、5-HE 与 Ect 产量最高,这可能是高盐环境下菌株通过积累 Ect 及 5-HE 等

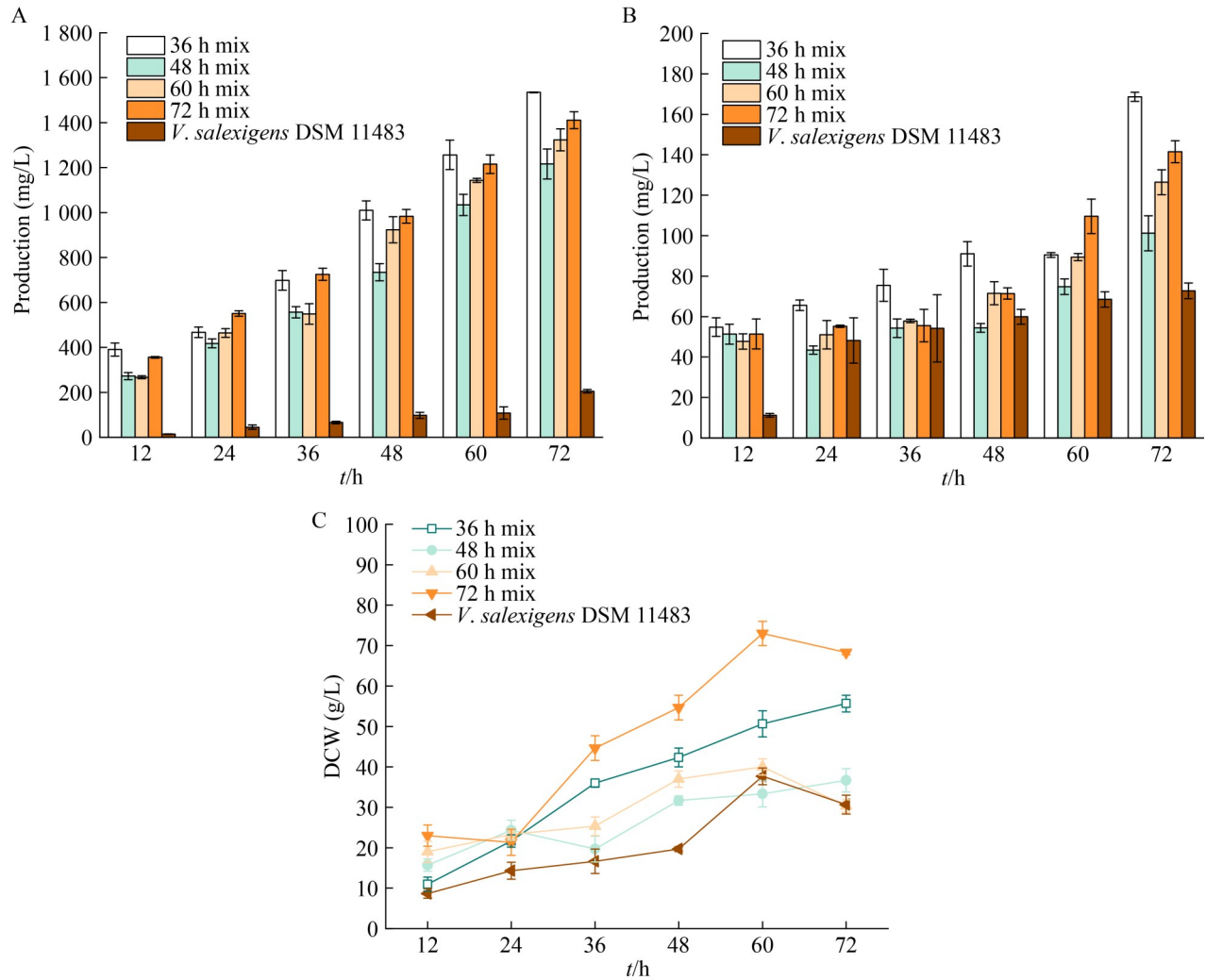


图7 不同时间混合培养Ect和5-HE产量及细菌干重分析。A: 不同时间混合培养的Ect产量; B: 不同时间混合培养的5-HE产量; C: 两菌株不同时间混合培养的细菌干重。

Figure 7 Analysis of ectoine and 5-HE yields and bacterial dry weight in mixed cultures at different times. A: Ectoine production in mixed cultures at different times; B: 5-HE production in mixed cultures at different times; C: Dry weight of bacteria in co-culture of two strains at different times.

相容性溶质来平衡细胞内外渗透压^[5,26]。

酶促反应动力学实验结果表明, 源于 *V. salexigens* DSM 11483 的 EctD 具有较高催化效率^[10]。因此, 本研究将 Ect 作为外源底物检测其被 *V. salexigens* DSM 11483 吸收并转化合成 5-HE 的能力。结果显示, 在底物浓度为 0–40.0 mmol/L 范围内细菌胞内的 Ect 和 5-HE 积累量逐渐增加; 当底物浓度为 40.0 mmol/L 时

5-HE 产量最高, 5-HE/Ect 产量比为 19%, 但底物浓度超过 40.0 mmol/L 时细菌胞内的二者产量均下降。Jungmann 等^[13]研究发现, 在 *C. glutamicum* 菌中当底物浓度提高至 5.0 mmol/L 时 5-HE 在培养基内积累。本研究中 *V. salexigens* DSM 11483 对外加 Ect 转化能力不足的原因可能是胞内高浓度 5-HE 抑制了 EctD 酶后续催化, 这与井东源等^[10]的实验结果相符。值得注意的是, 生长曲

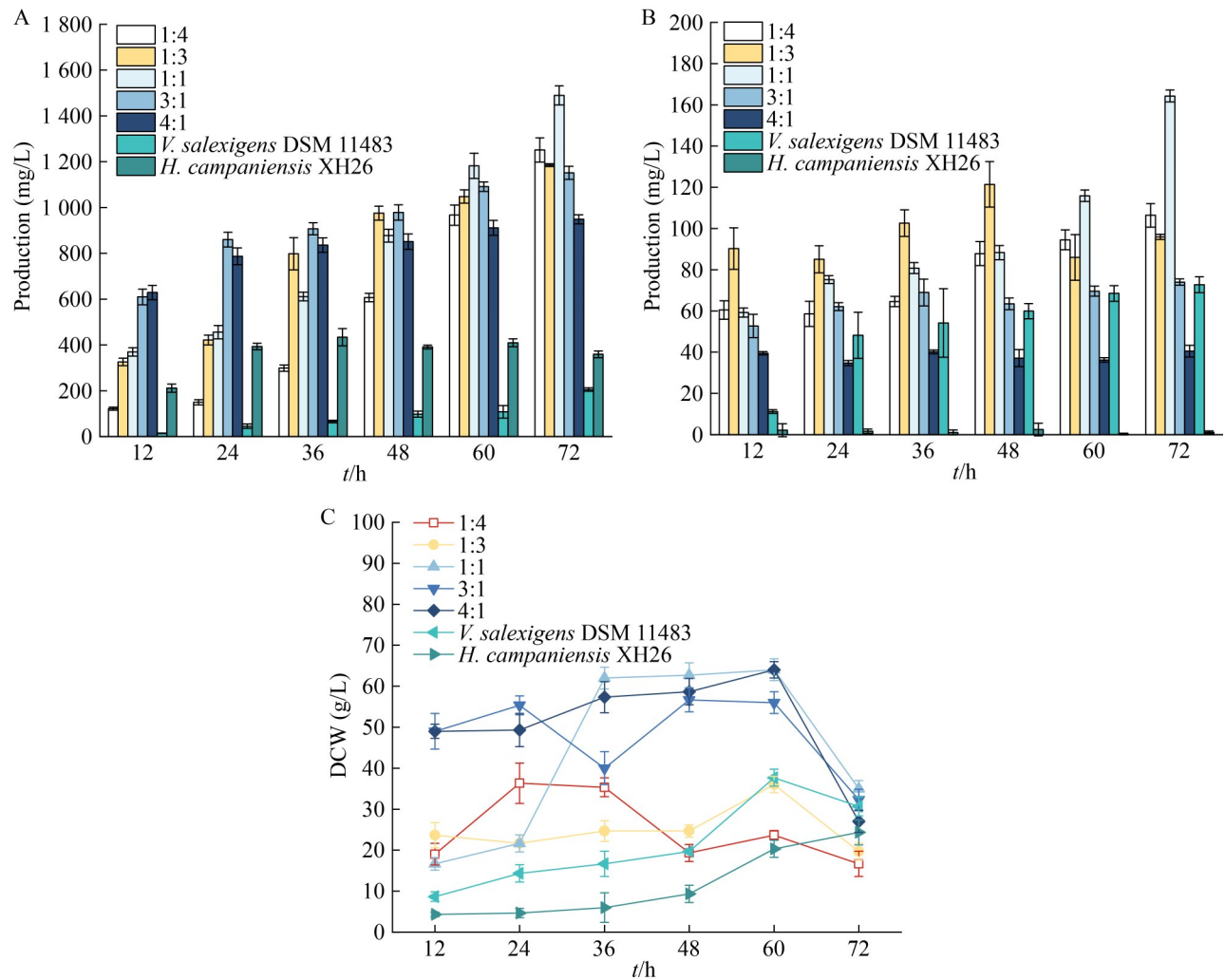


图8 不同体积混合后Ect、5-HE及细菌干重分析。A：不同体积混合Ect产量；B：不同体积混合后5-HE产量；C：不同体积混合后细菌干重。

Figure 8 Analysis of ectoine, 5-HE and bacterial dry weight after mixing different volumes. A: Ectoine production in mixtures of different volumes; B: 5-HE production after mixing different volumes; C: Dry weight of bacteria after mixing different volumes.

线显示此时菌体生物量仍保持持续增长，因此推测该嗜盐菌在特定盐浓度培养基中维持细菌生长至稳定期所需相容性溶质^[27-28]的产量是一定的，而此时外加 Ect 可能会破坏其渗透压稳态，进而抑制该菌自身 Ect 和 5-HE 合成，提示 Ect 和 5-HE 可能存在其他未知的代谢降解途径参与调控。

本研究还探索了菌株对胞内合成的 Ect 和

5-HE 的外泌特性，分别检测 0 h 和 72 h 时培养基中 Ect 和 5-HE 的产量。结果表明，在 72 h 时培养基中仅检测到少量 Ect，但未能检测出 5-HE，推测可能是大部分相容性溶质积累在胞内发挥维持渗透压作用，抑或该菌合成的 5-HE 产量较少不足以外泌至培养基内或 HPLC 检测能力不足导致，后续计划通过同位素示踪法并利用高分辨质谱进行检测^[29-30]并追踪外加 Ect 的

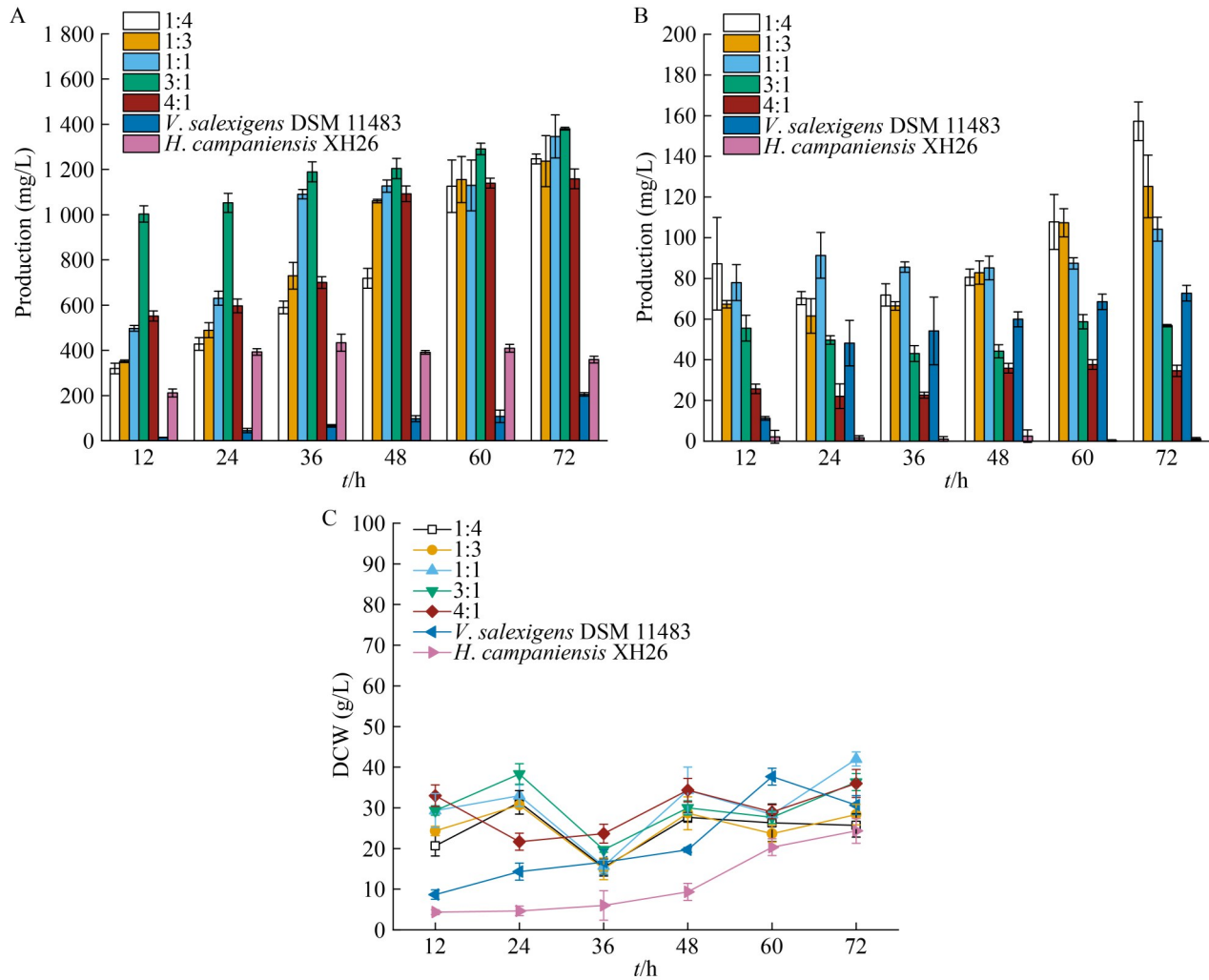


图9 相同 OD_{600} 条件下不同体积混合后Ect、5-HE及细菌干重分析。A: 不同体积混合培养Ect产量; B: 不同体积混合培养5-HE产量; C: 不同体积混合培养细菌干重。

Figure 9 Analysis of ectoine, 5-HE and bacterial dry weight after mixing different volumes under the same OD_{600} condition. A: Ectoine yield in mixed cultures of different volumes; B: Yield of 5-HE in mixed cultures of different volumes; C: Dry weight of bacteria cultured in mixed volumes of different sizes.

转化及降解途径。值得注意的是, 在Ect“喂养”体系中将细菌培养至72 h时检测胞内、外的Ect和5-HE产量发现可检测到少量5-HE外泌。当“喂养”Ect浓度小于20.0 mmol/L培养至72 h时, 胞外Ect的浓度相比初始浓度有所减少, 同时伴有5-HE产量的升高, 可能是外源添加的Ect被摄取并转化为5-HE, 此时Ect转化率为25%, 这与Jungmann等^[13]的推测一致。当底物

浓度超过20.0 mmol/L时, 胞外的Ect浓度则比初始浓度略有升高, 这些结果表明培养基中低浓度Ect时菌株以吸收转化Ect为主, 而高浓度时细菌可能激活其他未知代谢路径或自身开始合成Ect。在本研究体系中, *V. salexigens* DSM 11483菌株生长代谢过程中胞内5-HE持续累积到一定浓度, 进而触发外泌机制, 推测还可能在外膜囊泡分泌或主动转运等来实现胞

内外物质平衡。然而, 具体外泌机制和调节机制仍需进一步实验研究来阐明^[31-32]。

微生物在共培养环境下会相互促进或抑制生长, 不同微生物也会争夺环境中的营养成分^[16]。*H. campaniensis* XH26 与 *V. salexigens* DSM 11483 菌株分别具有高产 Ect 和 5-HE 的能力, 且二者均可在高盐条件下生长, 因此本研究中将 2 种嗜盐菌株 *H. campaniensis* XH26 和 *V. salexigens* DSM 11483 进行混合, 拟通过混合培养提高 5-HE 产量。实验数据表明, *H. campaniensis* XH26 培养 24 h、*V. salexigens* DSM 11483 培养 36 h 后再混合培养 72 h, 此时 5-HE 产量相对较高, 其 5-HE/Ect 产量比为 10%, 显著高于单独培养或其他时间点混合培养的产量比, 这可能是因为混合培养时通过交叉喂养促进了相容性溶质 Ect 的合成和转化。基于 Ect “喂养”实验有明显增加 5-HE 合成的效果, 推测两菌株以不同比例混合可能会有利于 5-HE 的合成, 但结果表明不同体积混合培养时, *H. campaniensis* XH26:*V. salexigens* DSM 11483 为 1:1 时 5-HE 产量较高, 5-HE/Ect 产量比为 11%, 在相同体积下混合体系中 *H. campaniensis* XH26 菌株生物量较多, 提供了更充足的 Ect 底物, 所以起到部分 Ect “喂养”效果, 从而使 5-HE 产量相对高于单独培养; 而将相同 OD_{600} 值两菌培养物以不同比例混合时, *H. campaniensis* XH26:*V. salexigens* DSM 11483 为 1:4 或 3:1 时 5-HE 和 Ect 产量均比 1:1 混合培养高, 此时 5-HE/Ect 产量比分别为 12% 和 4%, 这可能是因为 1:1 时菌株的生物量相近, 代谢产物合成过程中存在营养竞争, 导致 5-HE 产量相对较低, 但菌株间的相互作用和具体促进分子机制后续还需通过检测胞内代谢情况和转录组分析技术进行深入分析以进一步验证。混合培养体系中 Ect 及 5-HE 产量及比例不如 Ect “喂养”效果好, 可能是 *H. campaniensis* XH26 菌株自身分泌的 Ect 仅为 433.0 mg/L, 而 Ect “喂养”是该菌株分泌的 3.5–16.0 倍, 远低于外源添加 Ect 量, 使得

5-HE 产量未达期望值。后续实验可通过多种手段增加 *H. campaniensis* XH26 中 Ect 外泌至混合培养体系, 如基因重组增加 *H. campaniensis* XH26 的 *ectABC* 基因表达或体外增加 EctABC 酶的催化活性提高 Ect 供给, 或可直接加 *H. campaniensis* XH26 裂解液, 进而提升 5-HE 合成效率。

4 结论

本研究对嗜盐菌 *V. salexigens* DSM 11483 与 *H. campaniensis* XH26 混合培养及 *V. salexigens* DSM 11483 喂养 Ect 并提高 5-HE 产量的策略进行了初步探索与条件优化。结果表明, 在 pH 9.0、1.00 mmol/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 及 2.0 mol/L NaCl 条件下, *V. salexigens* DSM 11483 菌中 5-HE 产量达 80.0 mg/L, 是原始培养条件下 5-HE 合成产量的 1.2 倍。40.0 mmol/L Ect “喂养”*V. salexigens* DSM 11483 时 5-HE 产量最高达 1 373.5 mg/L, 是上述优化条件下 5-HE 产量的 17.2 倍。在两菌株混合培养实验中, 将菌株 *H. campaniensis* XH26 培养 24 h 后与 *V. salexigens* DSM 11483 (培养至 36 h)按 1:1 比例混合培养至 72 h, 5-HE 产量提高至 168.7 mg/L, 是单因素优化下 5-HE 产量的 2.1 倍。混合培养效果还远不如外源 Ect 喂养的效果, 未来需进一步优化菌株共培养条件或增强 *H. campaniensis* XH26 的 Ect 分泌效率以提高 5-HE 产量及比例, 为后续 5-HE 的高效生产提供理论基础。

作者贡献声明

田雪: 研究设计、数据处理、论文撰写及修改; 董梦瑶: *V. salexigens* DSM 11483 的基础条件优化; 秦蕊: *H. campaniensis* XH26 基础培养条件优化; 龙启福: 两菌混合培养研究方法指导; 韩睿: 研究方法指导; 朱德锐: 实验方案可行性评估与指导; 李永臻: 研究方法指导及论文讨论与修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] BECKER J, WITTMANN C. Microbial production of extremolytes: high-value active ingredients for nutrition, health care, and well-being[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2020, 65: 118-128.
- [2] PASTOR JM, SALVADOR M, ARGANDOÑA M, BERNAL V, REINA-BUENO M, CSONKA LN, IBORRA JL, VARGAS C, NIETO JJ, CÁNOVAS M. Ectoines in cell stress protection: uses and biotechnological production[J]. *Biotechnology Advances*, 2010, 28(6): 782-801.
- [3] 董梦瑶, 龙启福, 邢江娃, 高翔, 李永臻. 转录物组和代谢组学探究高盐胁迫对 *Virgibacillus salexigens* 羟基四氢嘧啶合成通路的影响[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2025, 41(4): 586-596.
DONG MY, LONG QF, XING JW, GAO X, LI YZ. Transcriptomic and metabolomic investigations on the effects of high salt stress on hydroxyectoine biosynthesis in *Virgibacillus salexigens*[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2025, 41(4): 586-596 (in Chinese).
- [4] ROBERTS MF. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms[J]. *Saline Systems*, 2005, 1: 5.
- [5] LIU MS, LIU H, SHI M, JIANG MY, LI LL, ZHENG YN. Microbial production of ectoine and hydroxyectoine as high-value chemicals[J]. *Microbial Cell Factories*, 2021, 20(1): 76.
- [6] KUHLMANN AU, HOFFMANN T, BURSLEY J, JEBBAR M, BREMER E. Ectoine and hydroxyectoine as protectants against osmotic and cold stress: uptake through the SigB-controlled betaine-choline- carnitine transporter-type carrier EctT from *Virgibacillus pantothenticus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(18): 4699-4708.
- [7] ARGANDOÑA M, NIETO JJ, IGLESIAS-GUERRA F, CALDERÓN MI, GARCÍA-ESTEPA R, VARGAS C. Interplay between iron homeostasis and the osmotic stress response in the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(11): 3575-3589.
- [8] PÉREZ-GARCÍA F, ZIERT C, RISSE JM, WENDISCH VF. Improved fermentative production of the compatible solute ectoine by *Corynebacterium glutamicum* from glucose and alternative carbon sources[J]. *Journal of Biotechnology*, 2017, 258: 59-68.
- [9] TANNE C, GOLOVINA EA, HOEKSTRA FA, MEFFERT A, GALINSKI EA. Glass-forming property of hydroxyectoine is the cause of its superior function as a desiccation protectant[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 150.
- [10] 井东源, 龙启福, 朱德锐, 莫天录, 李永臻. 四氢嘧啶羟化酶的酶学特性及催化能力研究[J]. *化学与生物工程*, 2025, 42(7): 28-36.
JING DY, LONG QF, ZHU DR, MO TL, LI YZ. Enzymatic characteristics and catalytic ability of ectoine hydroxylase[J]. *Chemistry & Bioengineering*, 2025, 42(7): 28-36 (in Chinese).
- [11] YANG NP, LIU MS, HAN J, JIANG MY, ZENG Y, LIU Y, XIANG H, ZHENG YN. Rational engineering of *Halomonas salifodinae* to enhance hydroxyectoine production under lower-salt conditions[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2024, 108(1): 353.
- [12] MA Q, XIA L, WU HY, ZHUO MY, YANG MY, ZHANG Y, TAN M, ZHAO KX, SUN QW, XU QY, CHEN N, XIE XX. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for efficient osmotic stress-free production of compatible solute hydroxyectoine[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2022, 119(1): 89-101.
- [13] JUNGMANN L, HOFFMANN SL, LANG C, de AGAZIO R, BECKER J, KOHLSTEDT M, WITTMANN C. High-efficiency production of 5-hydroxyectoine using metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2022, 21(1): 274.
- [14] 邵明威, 孙思勉, 杨时茂, 陈国强. 基于极端微生物的生物制造[J]. *合成生物学*, 2024, 5(6): 1419-1436.
SHAO MW, SUN SM, YANG SM, CHEN GQ. Bioproduction based on extremophiles[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2024, 5(6): 1419-1436 (in Chinese).
- [15] 徐德阳, 王莉莉, 杜春梅. 微生物共培养技术的研究进展[J]. *微生物学报*, 2015, 55(9): 1089-1096.
XU DY, WANG LL, DU CM. Progress in microbial co-culture-a review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2015, 55(9): 1089-1096 (in Chinese).
- [16] 李洪涛, 周皓, 丁中涛. 微生物共培养产生新颖活性次生代谢产物的研究进展[J]. *云南大学学报(自然科学版)*, 2023, 45(2): 493-512.
LI HT, ZHOU H, DING ZT. Advances in producing novel active secondary metabolites by co-culture of microorganisms[J]. *Journal of Yunnan University (Natural Sciences Edition)*, 2023, 45(2): 493-512 (in Chinese).
- [17] 田磊, 张芳, 沈国平, 高翔, 龙启福, 朱德锐. Ectoine高产菌株 *Halomonas* sp. XH26 的鉴定及紫外诱变选育[J]. *生物学杂志*, 2020, 37(4): 31-35.
TIAN L, ZHANG F, SHEN GP, GAO X, LONG QF, ZHU DR. Identification of high-yielding strain *Halomonas* sp. XH26 for producing ectoine and UV mutagenesis breeding[J]. *Journal of Biology*, 2020, 37(4): 31-35 (in Chinese).
- [18] 张欣, 刘静, 朱德锐. 天然产物 Ectoine 与 Hydroxyectoine 的生物工程及医学应用研究进展[J]. *天然产物研究与开发*, 2017, 29(5): 882-887.
ZHANG X, LIU J, ZHU DR. Review on bioengineering and biomedical applications of natural products ectoine and hydroxyectoine[J]. *Natural Product Research and Development*, 2017, 29(5): 882-887 (in Chinese).
- [19] DERVAUX J, MAGNIEZ JC, LIBCHABER A. On growth and form of *Bacillus subtilis* biofilms[J]. *Interface*

- Focus, 2014, 4(6): 20130051.
- [20] 代妮妮, 梁笑, 闫致会, 仰凡, 杨欣婷, 卢恒谦, 王永中. 潜在植物根际促生菌副地衣芽孢杆菌 HMPM220325 生物膜培养条件优化[J]. 微生物学报, 2024, 64(8): 2784-2798.
- DAI NN, LIANG X, YAN ZH, YANG F, YANG XT, LU HQ, WANG YZ. Optimization of culture conditions for biofilm formation of the potential plant growth-promoting rhizobacterial strain *Bacillus paralicheniformis* HMPM220325[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(8): 2784-2798 (in Chinese).
- [21] CHEN WC, HSU CC, WANG LF, LAN JC, CHANG YK, WEI YH. Exploring useful fermentation strategies for the production of hydroxyectoine with a halophilic strain, *Halomonas salina* BCRC 17875[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2019, 128(3): 332-336.
- [22] BURSLEY J, PIERIK AJ, PICA N, BREMER E. Osmotically induced synthesis of the compatible solute hydroxyectoine is mediated by an evolutionarily conserved ectoine hydroxylase[J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(43): 31147-31155.
- [23] CASTRO CB, FERREIRA MP, MARQUES NETTO CGC. Metalloenzyme mechanisms correlated to their turnover number and metal lability[J]. Current Research in Chemical Biology, 2021, 1: 100004.
- [24] AULAKH SK, VARMA SJ, RALSER M. Metal ion availability and homeostasis as drivers of metabolic evolution and enzyme function[J]. Current Opinion in Genetics & Development, 2022, 77: 101987.
- [25] REUTER K, PITTELKOW M, BURSLEY J, HEINE A, CRAAN T, BREMER E. Synthesis of 5-hydroxyectoine from ectoine: crystal structure of the non-heme iron(II) and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase EctD[J]. PLoS One, 2010, 5(5): e10647.
- [26] VARGAS C, ARGANDOÑA M, REINA-BUENO M, RODRÍGUEZ-MOYA J, FERNÁNDEZ-AUNIÓN C, NIETO JJ. Unravelling the adaptation responses to osmotic and temperature stress in *Chromohalobacter salexigens*, a bacterium with broad salinity tolerance[J]. Saline Systems, 2008, 4: 14.
- [27] WOOD JM, BREMER E, CSONKA LN, KRAEMER R, POOLMAN B, van der HEIDE T, SMITH LT. Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2001, 130(3): 437-460.
- [28] 赵百锁, 杨礼富, 王磊, 卢伟东, 杨苏声. 中度嗜盐菌相容性溶质机制的研究进展[J]. 微生物学报, 2007, 47(5): 937-941.
- ZHAO BS, YANG LF, WANG L, LU WD, YANG SS. Study progress on compatible solutes in moderately halophilic bacteria[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2007, 47(5): 937-941 (in Chinese).
- [29] 饶欣, 王菊先, 戴树桂. 同位素示踪法研究有机污染物在模拟水生生态系统中的行为[J]. 环境化学, 1994, 13(6): 519-524.
- RAO X, WANG JX, DAI SG. Study of behavior of organic pollutants in a simulated aquatic ecosystem by isotope tracer[J]. Environmental Chemistry, 1994, 13(6): 519-524 (in Chinese).
- [30] 许慧娟, 陈永涛, 黄建忠, 陶勇, 柯崇榕, 杨欣伟. 四氢嘧啶生物合成及其关键酶生化特性研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1620-1643.
- XU HX, CHEN YT, HUANG JZ, TAO Y, KE CR, YANG XW. Advances in ectoine biosynthesis and biochemical characteristics of key enzymes[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1620-1643 (in Chinese).
- [31] ZHANG TT, ZHANG X, LI YZ, YANG N, QIAO LJ, MIAO ZQ, XING JW, ZHU DR. Study of osmoadaptation mechanisms of halophilic *Halomonas alkaliphila* XH26 under salt stress by transcriptome and ectoine analysis[J]. Extremophiles, 2022, 26(1): 14.
- [32] ROEBLER M, MÜLLER V. Osmoadaptation in bacteria and archaea: common principles and differences[J]. Environmental Microbiology, 2001, 3(12): 743-754.