

# 代谢工程耦合响应面法优化盐单胞菌合成四氢嘧啶的关键技术

李昊鑫<sup>1</sup>, 何珊珊<sup>1</sup>, 张宗豪<sup>1</sup>, 李永臻<sup>1</sup>, 王嵘<sup>1</sup>, 韩睿<sup>2\*</sup>, 朱德锐<sup>1</sup>

1 青海大学 医学院, 基础医学研究中心, 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

李昊鑫, 何珊珊, 张宗豪, 李永臻, 王嵘, 韩睿, 朱德锐. 代谢工程耦合响应面法优化盐单胞菌合成四氢嘧啶的关键技术[J]. 微生物学报, 2026, 66(3): 1447-1466.

LI Haoxin, HE Shanshan, ZHANG Zonghao, LI Yongzhen, WANG Rong, HAN Rui, ZHU Derui. Metabolic engineering coupled with response surface methodology for optimization of ectoine synthesis in *Halomonas*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2026, 66(3): 1447-1466.

**摘要:**【目的】通过构建 5 种含  $P_{tac}$  启动子的重组质粒 pHX01-pHX05 (组合基因 *asd*、*lysC*、*ectA*、*ectB*、*ectC*), 导入坎帕尼亚盐单胞菌(*Halomonas campaniensis*) XH26, 构建高产工程菌株, 并结合响应面法(response surface methodology, RSM)优化培养条件提高四氢嘧啶(ectoine)的积累量。【方法】重组质粒经大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*) S17-1( $\lambda$ -pir)接合转移至菌株 XH26, 利用庆大霉素(50  $\mu$ g/mL)筛选阳性克隆子; 以 0.2 mmol/L IPTG 诱导表达重组菌株, 用 HPLC 检测四氢嘧啶的积累量; 采用单因素试验、Plackett-Burman 与 Box-Behnken 设计优化关键变量因素(NaCl、蛋白胨、L-谷氨酸钠、葡萄糖)。【结果】构建了 5 株重组菌株(XH26/pHX01-pHX05)。采用 MG 培养基培养重组菌株, 发现菌株 XH26/pHX04 (*asd-lysC-ectA-ectB*)的四氢嘧啶积累量最高, 达(1.32 $\pm$ 0.04) g/L; 菌株 XH26/pHX05 和菌株 XH26/pHX03 次之, 四氢嘧啶积累量分别为(1.19 $\pm$ 0.07) g/L 和(1.07 $\pm$ 0.08) g/L; 而 XH26/pHX02 积累量较低, 为(1.02 $\pm$ 0.14) g/L。利用响应面法优化培养基的关键成分, 确定最优条件为 NaCl 116.08 g/L、蛋白胨 16.30 g/L、L-谷氨酸钠 169.57 g/L、葡萄糖 15.53 g/L。在此条件下, 重组菌株 XH26/pHX04 的四氢嘧啶积累量提高至(1.81 $\pm$ 0.02) g/L, 较野生型菌株 XH26 显著提高了 301.56%。【结论】以坎帕尼亚盐单胞菌为“底盘细胞”, 利用强启动子组合过表达基因 *asd*、*lysC*、*ectA/B*, 辅以响应面法优化重组菌株的培养基条件, 可显著提高重组菌株的四氢嘧啶积累量, 为后续工业化生产提供了一定的技术参考依据。

**关键词:** 四氢嘧啶; 坎帕尼亚盐单胞菌; 代谢工程; 响应面法; 基因过表达; 合成生物学

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: hanrui11473@163.com

Received: 2025-09-17; Accepted: 2025-11-27; Published online: 2025-12-05

# Metabolic engineering coupled with response surface methodology for optimization of ectoine synthesis in *Halomonas*

LI Haoxin<sup>1</sup>, HE Shanshan<sup>1</sup>, ZHANG Zonghao<sup>1</sup>, LI Yongzhen<sup>1</sup>, WANG Rong<sup>1</sup>, HAN Rui<sup>2\*</sup>, ZHU Derui<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Basic Medical Sciences, School of Medicine, Qinghai University, Xining, Qinghai, China

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

**Abstract:** **[Objective]** To construct high-yield engineering strains of *Halomonas campaniensis* XH26 by introducing five recombinant plasmids (pHX01–pHX05), each carrying the  $P_{tac}$  promoter and combinations of the genes *asd*, *lysC*, *ectA*, *ectB*, and *ectC*. This metabolic engineering strategy was coupled with the response surface methodology (RSM) for optimization of the culture conditions, thereby enhancing ectoine accumulation. **[Methods]** The recombinant plasmids were conjugally transferred from *Escherichia coli* S17-1( $\lambda$ -pir) into *H. campaniensis* XH26, with positive transconjugants selected *via* gentamicin (50  $\mu$ g/mL). Recombinant strains were induced with 0.2 mmol/L IPTG, and ectoine accumulation was quantified by HPLC. Critical nutritional variables—NaCl, peptone, L-glutamate, and glucose—were optimized through one-factor-at-a-time experiments, Plackett-Burman design, and Box-Behnken design. **[Results]** Five recombinant strains (XH26/pHX01–XH26/pHX05) were successfully constructed. Culture in the MG medium revealed that strain XH26/pHX04 (overexpressing *asd-lysC-ectA-ectB*) achieved the highest ectoine titer of (1.32 $\pm$ 0.04) g/L. Strains XH26/pHX05 and XH26/pHX03 achieved the ectoine titer of (1.19 $\pm$ 0.07) g/L and (1.07 $\pm$ 0.08) g/L, respectively, while XH26/pHX02 yielded a lower titer of (1.02 $\pm$ 0.14) g/L. The medium composition optimized by RSM was composed of 116.08 g/L NaCl, 16.30 g/L peptone, 169.57 g/L L-glutamate, and 15.53 g/L glucose. Under these optimized conditions, the titer of ectoine produced by XH26/pHX04 increased to (1.81 $\pm$ 0.02) g/L, representing a significant increase of 301.56% compared with that of the wild-type strain XH26. **[Conclusion]** This study demonstrates that using *H. campaniensis* as a chassis and overexpressing a key gene combination (*asd*, *lysC*, *ectA*, *ectB*) under a strong promoter, synergized with culture medium optimization *via* RSM, can significantly boost the ectoine yield of recombinant strains. The findings provide a robust technical framework for the subsequent industrial production of ectoine.

**Keywords:** ectoine; *Halomonas campaniensis*; metabolic engineering; response surface methodology; gene overexpression; synthetic biology

相容溶质四氢嘧啶(ectoine)是嗜盐/耐盐微生物胞内合成的一类环状氨基酸衍生物。四氢嘧啶能够维持蛋白质水化层和生物膜的结构稳定性, 以此抵抗高盐、高温、干燥及辐射等条件

胁迫<sup>[1-2]</sup>, 广泛应用于生物医药健康、生物制剂及工业酶保护剂等领域<sup>[3]</sup>。四氢嘧啶的合成以天冬氨酸(aspartate, Asp)为前体物质: 首先由天冬氨酸激酶(aspartate kinase, LysC)催化 Asp 转化

为天冬氨酸- $\beta$ -半醛(L-aspartate- $\beta$ -semialdehyde, ASA), 随后该中间产物再经二氨基丁酸转氨酶(diaminobutyrate transaminase, EctB)、二氨基丁酸乙酰基转移酶(diaminobutyrate acetyltransferase, EctA)与四氢嘧啶合成酶(ectoine synthase, EctC)依次催化, 最终合成四氢嘧啶<sup>[4]</sup>。在工业化发酵生产中, 嗜盐微生物可能存在生长速率缓慢、碳代谢流分配失衡、次级代谢物积累偏低以及高盐条件诱导等生长条件限制, 严重制约了四氢嘧啶的工业化实际生产<sup>[5-6]</sup>。为解决上述的技术瓶颈, 研究人员通过构建重组表达质粒(如基因簇 *ectABC*、*ask-ectABC* 或 *ask-lysC-ectABC*), 转化至非嗜盐宿主大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)或谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*), 异源表达相关合成基因以实现高效生产四氢嘧啶。例如, Wang 等<sup>[7]</sup>通过提高宿主 *E. coli* 基因簇 *ectABC* 的拷贝数(5 倍), 并过表达天冬氨酸激酶(threonine-resistant aspartokinase, ThrA), 增加合成前体的代谢流, 实现四氢嘧啶的高积累量(5 L 发酵罐 35.33 g/L); Jiang 等<sup>[8]</sup>将来源于假单胞菌(*Pseudomonas*)的 *ectABC* 操纵子整合至 *C. glutamicum* 菌株, 采用“插件式阻遏蛋白库”动态调控策略, 提高四氢嘧啶积累量至 45.52 g/L。由此可见, 强化前体供应可能是提高四氢嘧啶积累量的系统代谢工程策略之一。

尽管异源表达系统在一定程度上可以提升四氢嘧啶的积累量, 但仍存在一些技术难题亟待解决, 如常温宿主嗜盐酶类的活性受损、辅因子 NADPH 竞争导致的代谢负担, 以及诱导剂依赖引起的生产成本增加等<sup>[9-11]</sup>。基于同源嗜盐宿主菌株构建“底盘细胞”工厂, 可能是一种更优的合成生物学研究策略。盐单胞菌(*Halomonas*)具有耐高盐、增殖传代快和易于工程改造等特点, 已被成功应用于聚羟基脂肪酸酯(polyhydroxyalkanoates, PHA)、四氢嘧啶等次级代谢的工业化生产。Zhang 等<sup>[12]</sup>采用 CRISPRi 技术筛选蓝色盐单胞菌(*Halomonas bluephagenesis*)增产的关键基因 *mvaS* (编码 3-羟

基-3-甲基戊二酰辅酶 A 合酶), 成功将甲羟戊酸的积累量提高至 121 g/L。Hu 等<sup>[13]</sup>将 *H. bluephagenesis* 基因簇 *ectABC* 的启动子替换为组成型强启动子 Porin P140, 同时过表达上游基因 *asd* 和 *lysC*, 提高四氢嘧啶积累量至 85–93 g/L。Zhu 等<sup>[14]</sup>发现, 大肠杆菌(*E. coli*) BL21 菌株异源表达盐单胞菌(*Halomonas* sp.) QHL1 的基因簇 *ectABC*, 仅能有限地提升重组菌株的耐盐度, 可能与非嗜盐宿主 *E. coli* 的遗传背景、代谢途径兼容性以及酶催化活性有关。至此, 为解决异源系统存在的代谢不兼容性等瓶颈, 本研究聚焦坎帕尼亚盐单胞菌(*Halomonas campaniensis*) XH26 这一嗜盐菌株, 构建多基因(*asd*、*lysC*、*ectA*、*ectB*、*ectC*)强启动子组合的重组质粒, 并耦合响应面法(response surface methodology, RSM)优化培养条件, 以期显著提升四氢嘧啶的积累量。基于同源表达宿主的适配调控, 过表达四氢嘧啶的相关合成基因, 系统强化代谢流。本研究不仅为 *H. campaniensis* XH26 的代谢工程改造提供了可复用的技术框架, 更可为其他嗜盐微生物的遗传表达操作、次级代谢物高效生产提供关键参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和培养基

野生型 *H. campaniensis* XH26, CCTCC M 2019776M, 分离自青海小柴旦盐湖; 质粒接合供体菌为大肠杆菌(*Escherichia coli*) S17-1( $\lambda$ -pir), 购自天津物源生物科技有限公司。

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0 (标准 LB)。限制性 LB 培养基添加 20.0 g/L NaCl (即 LB<sub>20</sub>)或 60.0 g/L NaCl (LB<sub>60</sub>), 用于嗜盐菌的培养与抗性筛选。嗜盐菌基础培养基<sup>[15]</sup> (Oesterhelt-Stoeckenius medium, OSM) (g/L): L-谷氨酸钠 5.61, 酶水解酪素 7.50, NaCl 87.50, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 24.65, Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>

3.00, CaCl<sub>2</sub> 0.20, KCl 55.88, 酵母提取物 2.00。发酵培养基<sup>[8]</sup>(MG) (g/L): L-谷氨酸钠 120.0, 葡萄糖 15.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 117.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 9.0, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.4, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2, 以 1.0 mol/L NaOH 溶液调节 pH 至 7.85。固体培养基添加 15.0 g/L 琼脂粉, 121 °C 灭菌 20 min。菌株接种量为 1%, 37 °C、120 r/min 培养 72 h。

## 1.2 主要试剂和仪器

四氢嘧啶标准对照品(HPLC 级, 纯度>95%), Fluka 分析公司; 甲醇(HPLC 级), ThermoFisher Scientific 公司; 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷, 北京酷来搏科技有限公司; 微孔过滤器(0.22 μm 水系膜), 天津毫津科技有限公司; 质粒小提试剂盒、蓝光切胶仪, 天根生化科技(北京)有限公司。

蓝光切胶仪, 天根生化科技(北京)有限公司; 冷冻研磨仪, 上海万柏生物科技有限公司; 电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; 高效液相色谱仪、色谱分析柱, Agilent 公司; 液相色谱柱, Shimadzu 公司; 紫外分光光度计, 上海舜宇恒平科学仪器有限公司。

## 1.3 抗生素抗性筛选

分别使用含有氯霉素(chloramphenicol, Chl)、氨苄青霉素(ampicillin, Amp)、庆大霉素(gentamicin, Gen)及四环素(tetracycline, Tet)的 OSM 培养基对菌株 XH26 进行抗生素抑菌率测试。菌株 XH26 于 37 °C、180 r/min 培养 6 h, 使用紫外分光光度计测定 OD<sub>600</sub> 约 0.6, 取 1 mL 菌液收集菌体, 8 000 r/min 离心 5 min。使用无菌 NaCl 溶液(60 g/L)洗涤菌体 2 次后, 调整菌悬液至 5×10<sup>5</sup> CFU/mL。在无菌 96 孔板中, 每孔依次加入 100 μL 上述菌悬液与 100 μL 含抗生素的 OSM 培养基(最终抗生素浓度梯度为 0.5–256.0 μg/mL)。实验同时设置阴性对照(菌液+无抗生素培养基)。将 96 孔板 37 °C 培养 12 h 后, 测定各孔 OD<sub>600</sub> 值。计算各抗生素的抑菌

率, 如公式(1)所示。

$$\text{抑菌率} = [1 - (OD_{\text{实验组}} - OD_{\text{空白}}) / (OD_{\text{阴性对照}} - OD_{\text{空白}})] \times 100\% \quad (1)$$

## 1.4 过表达质粒的设计与构建

通过化学合成法分步合成 5 个质粒(由苏州金唯智生物科技有限公司合成), 分别命名为 pHX01–pHX05 (图 1A)。在质粒 pBBR1MCS-5 (图 1B)中插入 P<sub>tac</sub> 启动子、核糖体结合位点序列(ribosome binding site, RBS)、超折叠绿色荧光蛋白报告基因(*sfGFP*)以及终止子, 构建重组质粒 pHX01 (即 pBBR-P<sub>tac</sub>-*sfGFP*)。依此方法依次构建后续 4 个重组质粒: 天冬氨酸半醛脱氢酶基因(*asd*)重组质粒 pHX02 (pBBR-P<sub>tac</sub>-*asd*); 基因 *asd* 与基因 *lysC* 重组质粒 pHX03 (pBBR-P<sub>tac</sub>-*asd-lysC*); 基因 *asd*、基因 *lysC*、L-2,4-二氨基丁酸乙酰转移酶基因(*ectA*)及 L-2,4-二氨基丁酸转氨酶基因(*ectB*)重组质粒 pHX04 (pBBR-P<sub>tac</sub>-*asd-lysC-ectA-ectB*); 基因 *asd*、基因 *lysC*、基因 *ectA*、基因 *ectB* 及四氢嘧啶合成酶基因(*ectC*)重组质粒 pHX05 (pBBR-P<sub>tac</sub>-*asd-lysC-ectA-ectB-ectC*)。

## 1.5 质粒接合转移与工程菌株验证

以携带重组质粒 pHX01–pHX05 的 *E. coli* S17-1 为供体菌, 菌株 XH26 为受体菌, 通过接合转移法构建重组菌株, 分别命名为: XH26/pHX01、XH26/pHX02、XH26/pHX03、XH26/pHX04 及 XH26/pHX05。具体步骤如下: 供体菌与受体菌分别在 LB 与 LB<sub>60</sub> 培养基中 37 °C、180 r/min 培养 12 h 后, 各取 1 mL 菌液以 8 000 r/min 离心 2 min 收集菌体。将等体积的菌泥混合至 100 μL LB<sub>20</sub> 培养基后, 涂布 LB<sub>20</sub> 平板, 37 °C 培养 8 h。刮取培养后菌苔重悬于 100 μL LB<sub>60</sub> 培养基中, 梯度稀释后涂布于含有 Gen 的 LB<sub>60</sub> 筛选平板, 37 °C 培养 24 h。提取阳性克隆菌株质粒, 并使用表 1 的引物进行 PCR 验证, 1% 琼脂糖凝胶电泳分析结果。本实验所有重组质粒与重组菌株见表 2。

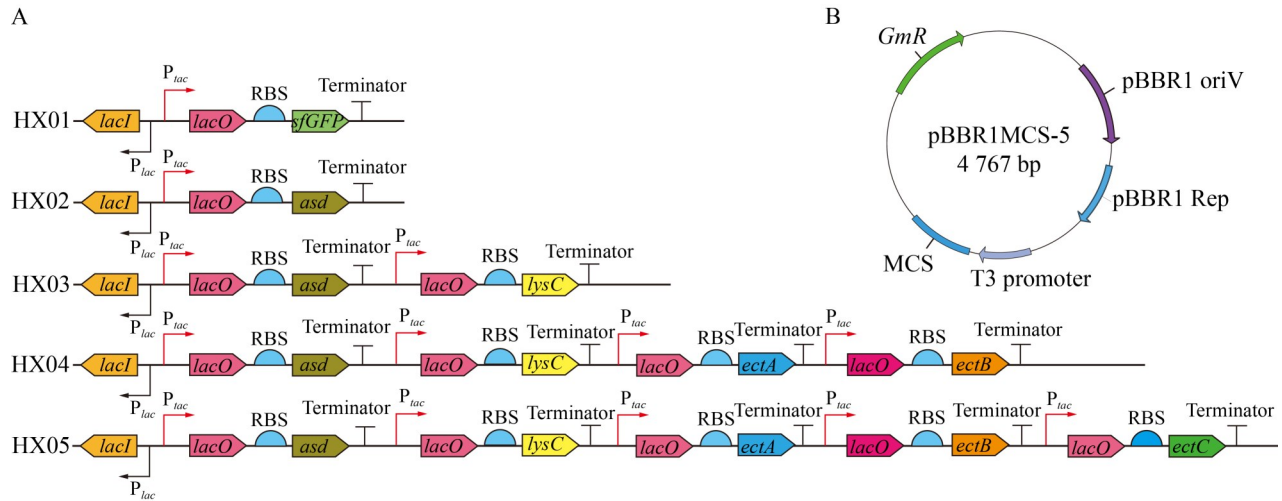


图1 重组质粒基因表达单元设计及载体骨架示意图

Figure 1 Schematic diagram of recombinant plasmid gene expression units and backbone vector. A: Schematic design of engineered plasmids (pHX01–pHX05) incorporating synthetic gene circuits; B: pBBR1MCS-5 backbone vector used for plasmid construction.

表1 本研究中使用的引物

Table 1 Primers used in this study

Gene names	Primer sequences (5'→3')	Product length (bp)
<i>sfGFP</i>	F: ATGCGCAAAGGCGAAGAACT R: TTTATACAGTTCATCCATGCCGTGGG	714
<i>asd</i>	F: ATGTTGAAAGTCGGTTTCGTGGG R: CTGCTCGCGTAAGATCTTTAG	1 110
<i>lysC</i>	F: ATGGCATTATACGTACAGAAGTTCGGC R: TTCAGATTTCGATATCAGACTTATCTAAACCGAAT	1 248
<i>ectA</i>	F: ATGAGCACGCCAATAACACCT R: CATACTGTCTGTTTGAATGGACCTATGC	576
<i>ectB</i>	F: ATGCAGACCCAGACGCTTGA R: CGCTTGGATAACAGCATTGACTGA	1 266
<i>ectC</i>	F: ATGATCGTTCGTAATCTTGAAGAAGCAC R: TCACTCACTAGCAGGTGCAGC	399

表2 本研究构建的重组质粒与对应重组菌株

Table 2 Recombinant plasmids and corresponding recombinant strains constructed in this study

Recombinant plasmid names	Vector backbone	Carried target genes	Corresponding recombinant strain
pHX01	pBBR1MCS-5	<i>sfGFP</i>	XH26/pHX01
pHX02	pBBR1MCS-5	<i>asd</i>	XH26/pHX02
pHX03	pBBR1MCS-5	<i>asd, lysC</i>	XH26/pHX03
pHX04	pBBR1MCS-5	<i>asd, lysC, ectA, ectB</i>	XH26/pHX04
pHX05	pBBR1MCS-5	<i>asd, lysC, ectA, ectB, ectC</i>	XH26/pHX05

## 1.6 摇瓶发酵与四氢嘧啶定量分析

系列重组菌株和野生型菌株 XH26 均以体积分数为 1% 分别接种至 OSM 或 MG 培养基。当培养液  $OD_{600}$  达到 0.6–0.8 时添加 0.1–1.0 mmol/L IPTG 进行诱导, 于 37 °C、180 r/min 条件下持续培养 72 h。经 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min 回收菌体, 采用机械研磨法破碎细胞, 提取胞内四氢嘧啶。在预冷的研钵中充分研磨菌体; 随后加入 5 mL 体积分数为 80% 的甲醇溶液, 冰浴超声萃取 30 min; 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min 后, 收集上清液, 经 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜过滤, 所得滤液采用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)进行定量分析<sup>[16]</sup>。色谱分析条件: 色谱柱为 C18 柱, 流动相为 20 mmol/L  $KH_2PO_4$  缓冲液与甲醇按照 96:4 体积比例配制, 流速 1.0 mL/min, 柱温 30 °C, 进样量 5  $\mu$ L。采用 12.5% SDS-PAGE 分析重组菌株的蛋白表达情况(20  $\mu$ L 蛋白样品)。

## 1.7 单因素试验与响应面优化

采用 MG 培养重组菌株 XH26/pHX04 (37 °C、180 r/min 培养 72 h), 并进行 8 因素单变量试验( $n=3$ )和四氢嘧啶积累量分析。设置单因素条件: NaCl (58.50–175.50 g/L,  $\Delta$ 29.25)、蛋白胨 (10.00–30.00 g/L,  $\Delta$ 5.00)、L-谷氨酸钠 (80.00–240.00 g/L,  $\Delta$ 40.00)、葡萄糖 (10.00–30.00 g/L,  $\Delta$ 5.00)、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  (0.2.00–1.00 g/L,  $\Delta$ 0.20)、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0.40–1.20 g/L,  $\Delta$ 0.20)、 $KH_2PO_4$  (3.00–15.00 g/L,  $\Delta$ 3.00)、 $K_2HPO_4$  (9.00–21.00 g/L,  $\Delta$ 3.00)。基于单因素试验结果, 采用 Design-Expert v13.0 软件优化条件组合, 采用 Plackett-Burman 设计分析关键因素(表 3), 变量为 NaCl ( $X_1$ )、蛋白胨( $X_2$ )、L-谷氨酸钠( $X_3$ )、葡萄糖( $X_4$ )、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  ( $X_5$ )、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  ( $X_6$ )、 $KH_2PO_4$  ( $X_7$ )、 $K_2HPO_4$  ( $X_8$ ), 响应值为四氢嘧啶的积累量。响应面优化实验采用 Box-Behnken 设计(4 因素 3 水平, 表 3), 并验证响应模型。按 1% 接种量, 将野生菌

表3 实验因素与水平设置

Table 3 Experimental factors and corresponding level settings

Test	Factor	Variant	Level		
			-1	0	1
Plackett-Burman	NaCl (g/L)	$X_1$	87.75		146.25
	Peptone (g/L)	$X_2$	10.00		20.00
	L-glutamate (g/L)	$X_3$	120.00		200.00
	Glucose (g/L)	$X_4$	10.00		20.00
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (g/L)	$X_5$	0.20		1.00
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (g/L)	$X_6$	0.40		1.20
	$KH_2PO_4$ (g/L)	$X_7$	3.00		15.00
	$K_2HPO_4$ (g/L)	$X_8$	9.00		21.00
Box-Behnken	NaCl (g/L)	A	87.75	117.00	146.25
	Peptone (g/L)	B	10.00	15.00	20.00
	L-glutamate (g/L)	C	120.00	160.00	200.00
	Glucose (g/L)	D	10.00	15.00	20.00

株 XH26 与重组菌株 XH26/pHX04 分别接种于 OSM 培养基与优化 MG 培养基, 37 °C、180 r/min 培养 72 h; 每间隔 8 h 测定菌液  $OD_{600}$  和四氢嘧啶积累量, 对比分析两者的生长曲线和产物积累变化。

## 1.8 数据处理

建立检测四氢嘧啶的标准曲线, 即  $y=13\ 250.8x+17.2$ ,  $R^2=0.995$ , 式中  $y$  为 HPLC 峰面积,  $x$  为四氢嘧啶的积累量(g/L)。使用 Prism 软件和 Adobe Illustrator 软件进行图形绘制。采用 SPSS 软件(v. 27.0)进行统计和方差分析(analysis of variance, ANOVA), 以评估组间差异, 显著性水平设定为  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 筛选盐单胞菌 XH26 的敏感性抗生素

采用 OSM 培养基(含有 0.5–256.0  $\mu$ g/mL 的 Chl、Amp、Gen 及 Tet)培养野生型菌株 XH26,

筛选最佳抑菌抗生素和最低抑菌浓度。结果显示, 不同浓度的 Chl、Amp、Gen 及 Tet 均能抑制菌株 XH26 生长, 但存在显著差异。64.0  $\mu\text{g/mL}$  Chl 的抑菌率为 60.13% (图 2A); 128.0  $\mu\text{g/mL}$  Amp 的抑菌率为 66.4% (图 2B); 4.0  $\mu\text{g/mL}$  Gen 的抑菌率为 68.62% (图 2C); 8.0  $\mu\text{g/mL}$  Tet 的抑菌率为 50.12% (图 2D)。由此表明, Gen 对菌株 XH26 生长具有良好的抑制能力, 最终确定重组菌株选择性培养基的工作浓度为 50.0  $\mu\text{g/mL}$  Gen。

## 2.2 质粒元件的组合与有效表达

采用接合转移法将质粒 pHX01 转化至表达宿主菌株 *E. coli* S17-1 和 XH26, 以验证  $P_{tac}$  启动子、RBS、报告基因 *sfGFP*、终止子以及 Gen 抗性基因的表达情况。选择 0.5 mmol/L IPTG 诱导表达阳性克隆子的报告基因 *sfGFP*, 并采用蓝

光切胶仪与荧光显微镜(激发波长 488 nm)检测报告基因 *sfGFP* 的表达效果(图 3)。蓝光激发照射显示, 未诱导的菌株 *E. coli* S17-1/pHX01 (图 3A 中 1)和菌株 XH26/pHX01 (图 3B 中 5、6)均无绿色荧光; 经 50  $\mu\text{g/mL}$  IPTG 诱导的菌株 *E. coli* S17-1/pHX01 (图 3A 中 2、4)和菌株 XH26/pHX01 (图 3B 中 7、8)均呈现出明显的绿色荧光。荧光显微镜观察显示, 经诱导的菌株 *E. coli* S17-1/pHX01 (图 3C)与菌株 XH26/pHX01 (图 3D)均检测到明显的绿色荧光信号。由此表明, 重组质粒 pHX01 的功能表达元件均能正常工作, 适用于盐单胞菌表达宿主的遗传操作。

## 2.3 筛选阳性重组菌株与 PCR 验证

筛选阳性重组菌株, 并进行菌落 PCR 验证。结果显示, 菌株 XH26/pHX02 扩增出基因 *asd*

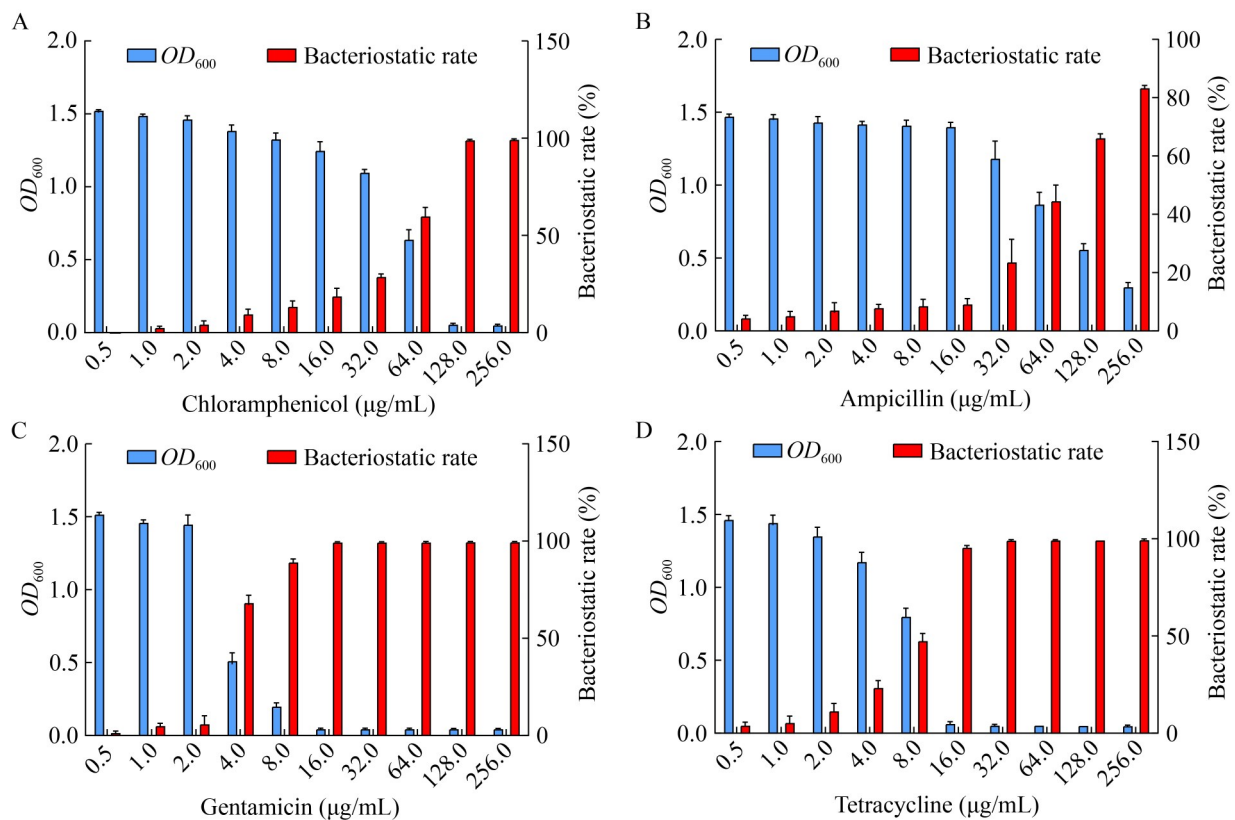


图2 XH26在不同浓度4种抗生素作用下的生长抑制分析

Figure 2 Dose-dependent growth inhibition of XH26 by four antibiotics. A: Chloramphenicol; B: Ampicillin; C: Gentamicin; D: Tetracycline.

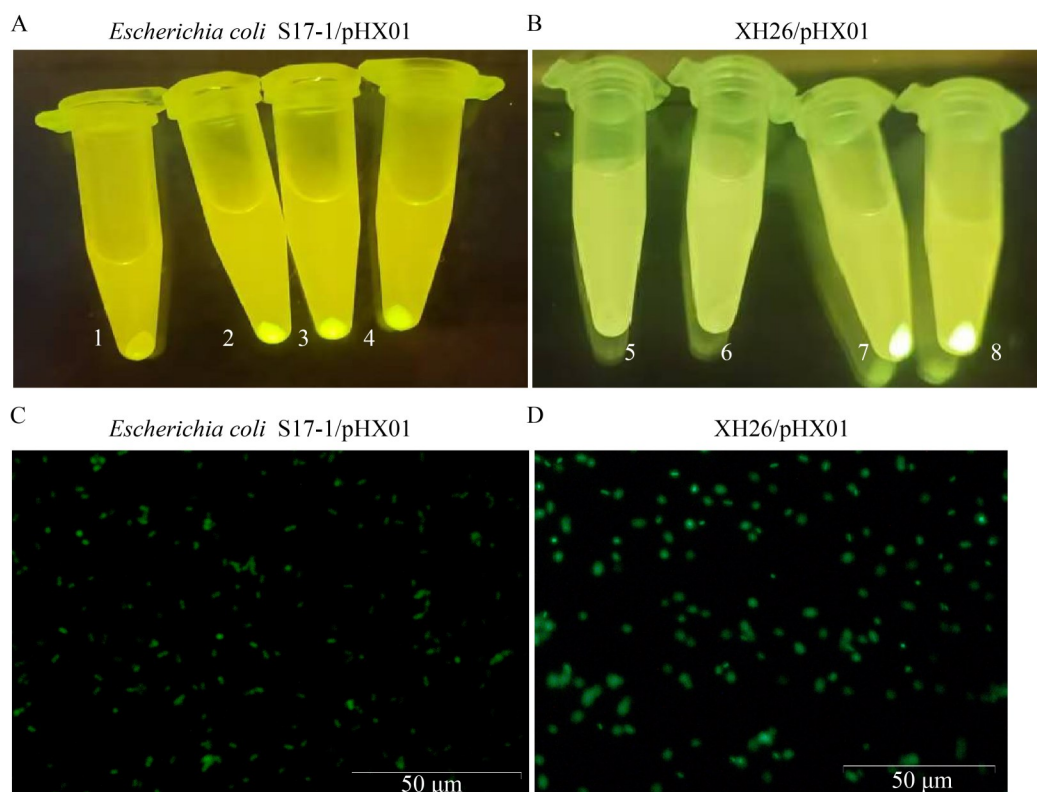


图3 宿主菌株*Escherichia coli* S17-1( $\lambda$ -pir)与XH26诱导表达报告基因重组质粒pHX01-*sfGFP*

Figure 3 Inducible expression of recombinant plasmid pHX01-*sfGFP* carrying the reporter gene in host strains *Escherichia coli* S17-1( $\lambda$ -pir) and XH26. A: Green fluorescence of *Escherichia coli* S17-1 harboring *sfGFP* observed under a blue-light transilluminator; B: Green fluorescence of XH26 under identical blue-light transillumination conditions; C: Cellular fluorescence of *Escherichia coli* S17-1 visualized by fluorescence microscopy with 488 nm excitation; D: Cellular fluorescence of XH26 visualized under equivalent microscopy settings.

(1 110 bp, 图 4B); 菌株 XH26/pHX03 同时扩增出基因 *asd* 与 *lysC* (1 248 bp, 图 4C); 菌株 XH26/pHX04 进一步扩增出基因 *ectA* (576 bp) 以及基因 *ectB* (1 266 bp, 图 4D); 菌株 XH26/pHX05 在菌株 XH26/pHX04 基础上, 额外扩增出基因 *ectC* (399 bp, 图 4E)。由此表明, 重组质粒 pHX02 – pHX05 均成功转入宿主菌株 XH26。

#### 2.4 重组菌株四氢嘧啶的积累量分析与目的蛋白表达验证

IPTG 诱导培养野生菌株 XH26 和系列重组菌株(XH26/pHX02–pHX05), 并分析胞内四氢嘧

啶的积累量。结果显示, 重组菌株 XH26/pHX04 的四氢嘧啶积累量最高, 为  $(0.66 \pm 0.04)$  g/L (图 5A)。随后优化 XH26/pHX04 的诱导条件, 发现在 0.2 mmol/L IPTG 条件下, 四氢嘧啶的积累量最高  $(0.80 \pm 0.01)$  g/L (图 5B)。更换 MG 培养基后, 菌株 XH26/pHX04 的四氢嘧啶积累量进一步提升至  $(1.32 \pm 0.04)$  g/L (图 5C)。SDS-PAGE 分析显示(图 5D), 各重组菌株均成功表达预期的目的蛋白, 即菌株 XH26/pHX02 表达 Asd (40.2 kDa), 菌株 XH26/pHX03 在此基础上新增表达 LysC (44.2 kDa), 菌株 XH26/pHX04 进一步新增表达 EctA (21.2 kDa) 与 EctB

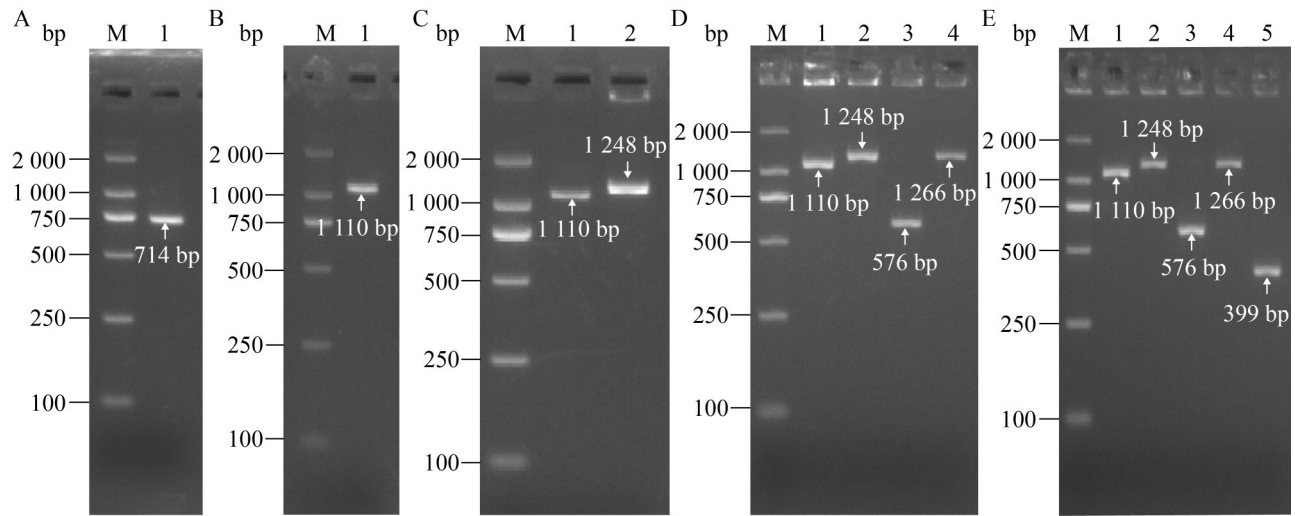


图4 琼脂糖凝胶电泳分析阳性重组菌株PCR产物

Figure 4 Agarose gel electrophoresis analysis of PCR products from positive recombinant strains. A: HX01 strain (*sfGFP*) [Lane 1: *sfGFP* (714 bp)]; B: HX02 strain (*asd*) [Lane 1: *asd* (1 110 bp)]; C: HX03 strain (*asd+lysC*) [Lane 1: *asd*; Lane 2: *lysC* (1 248 bp)]; D: HX04 strain (*asd+lysC+ectA+ectB*) [Lanes 1–4: *asd*, *lysC*, *ectA* (576 bp), and *ectB* (1 266 bp), respectively]; E: HX05 strain (*asd+lysC+ectA+ectB+ectC*) [Lanes 1–5: *asd*, *lysC*, *ectA*, *ectB*, and *ectC* (399 bp), respectively]. Lane M: DNA molecular weight marker (bands from top to bottom: 2 000, 1 000, 750, 500, 250, and 100 bp).

(46.5 kDa), 菌株 XH26/pHX05 则额外表达 EctC (14.8 kDa)。

## 2.5 重组菌株 XH26/pHX04 四氢嘧啶积聚的最佳单因素条件

优化重组菌株 XH26/pHX04 的发酵条件, 重点考察 NaCl、蛋白胨、L-谷氨酸钠、葡萄糖、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  及  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  共 8 种因素浓度对四氢嘧啶积累量的影响。结果表明, 各因素的最适浓度和相应的积累量分别为: NaCl 87.75 g/L (1.41 g/L)、蛋白胨 15.00 g/L (1.80 g/L)、L-谷氨酸钠 160.00 g/L (1.77 g/L)、葡萄糖 15.00 g/L (1.41 g/L)、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.60 g/L (1.33 g/L)、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.80 g/L (1.30 g/L)、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  9.00 g/L (1.32 g/L) 和  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  15.00 g/L (1.38 g/L) (图 6A–6H)。

## 2.6 影响重组菌株 XH26/pHX04 四氢嘧啶积聚的关键因素

甄选各因素的最适浓度, 采用 Plackett-

Burman 实验筛选关键变量。实验结果(表 4)与统计学分析结果显示(表 5), NaCl、蛋白胨、1 L L-谷氨酸钠和葡萄糖对菌株 XH26/pHX04 胞内四氢嘧啶积累具有极显著正向影响( $P < 0.01$ ), 而其余因素无显著作用( $P > 0.05$ )。所建模型显著有效( $F = 29.52$ ,  $P < 0.05$ ), 且拟合良好( $R^2 = 0.9875$ )。因此, 选定上述 4 种成分为关键因素进行后续响应面优化, 其余组分浓度保持不变。

## 2.7 多因素交互分析重组菌株 XH26/pHX04 的四氢嘧啶积累量

采用 Design-Expert v13.0 软件设计了 4 因素组合试验(表 6), 并以菌株 XH26/pHX04 的四氢嘧啶积累量( $Y$ )为响应变量, 构建了二次多项式回归模型:  $Y = 1.82 - 0.0490A + 0.0168B + 0.0238C + 0.0102D - 0.0017AB + 0.0662AC + 0.0570AD + 0.0225BC + 0.0422BD + 0.0112CD - 0.1857A^2 - 0.0637B^2 - 0.0672C^2 - 0.1022D^2$ 。方差分析结果显示(表 7), 该模型整体高度显著( $P < 0.05$ ), 且

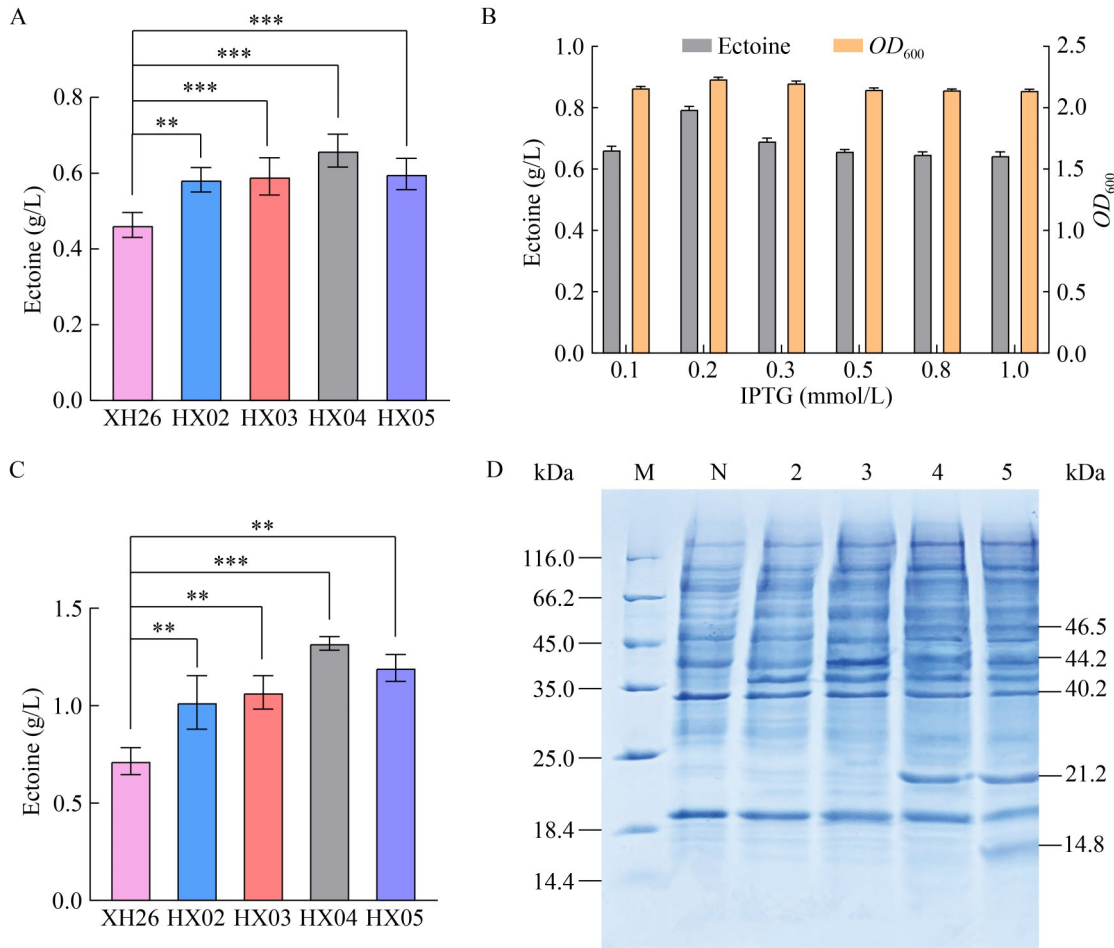


图5 重组菌株的四氢嘧啶积累量和目的蛋白表达分析

Figure 5 Ectoine accumulation and target protein expression analysis of recombinant strains. A: Comparison of ectoine yield between wild-type XH26 and recombinant strains cultured in basal (OSM) medium (\*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ); B: Effect of IPTG concentration optimization on ectoine production in *H. campaniensis* XH26/pHX04; C: Comparison of ectoine yield between wild-type XH26 and recombinant strains cultured in optimized (MG) medium (\*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ); D: SDS-PAGE analysis of target protein expression in recombinant strains induced with 0.2 mmol/L IPTG (Lane M: Protein molecular weight marker; Lane N: Uninduced control; Lanes 2–5: Protein extracts from XH26/pHX02, pHX03, pHX04, and pHX05, respectively).

拟合优度优异( $R^2=0.9976$ );此外,失拟项不显著( $P=0.2313 > 0.05$ ),表明残差主要源于随机误差,模型具备良好的预测可靠性。响应面分析结果表明(图7),NaCl分别与蛋白胨、L-谷氨酸钠和葡萄糖的交互作用显著,且均在NaCl 117.00 g/L附近达到峰值。蛋白胨与葡萄糖间也存在显著交互作用,最优浓度均为15.00 g/L。基于响应面模型预测的最佳发酵条件

(NaCl 116.08 g/L、蛋白胨 16.30 g/L、L-谷氨酸钠 169.57 g/L、葡萄糖 15.53 g/L),进行3批次独立摇瓶重复实验以验证模型的实际预测效能。结果显示,重组菌株 XH26/pHX04 的四氢嘧啶积累量达到( $1.81 \pm 0.02$ ) g/L,与模型预测值(1.83 g/L)高度一致,相对误差仅为 0.88% ( $< 5.00\%$ )。由此表明,所构建的响应面回归模型准确可靠。

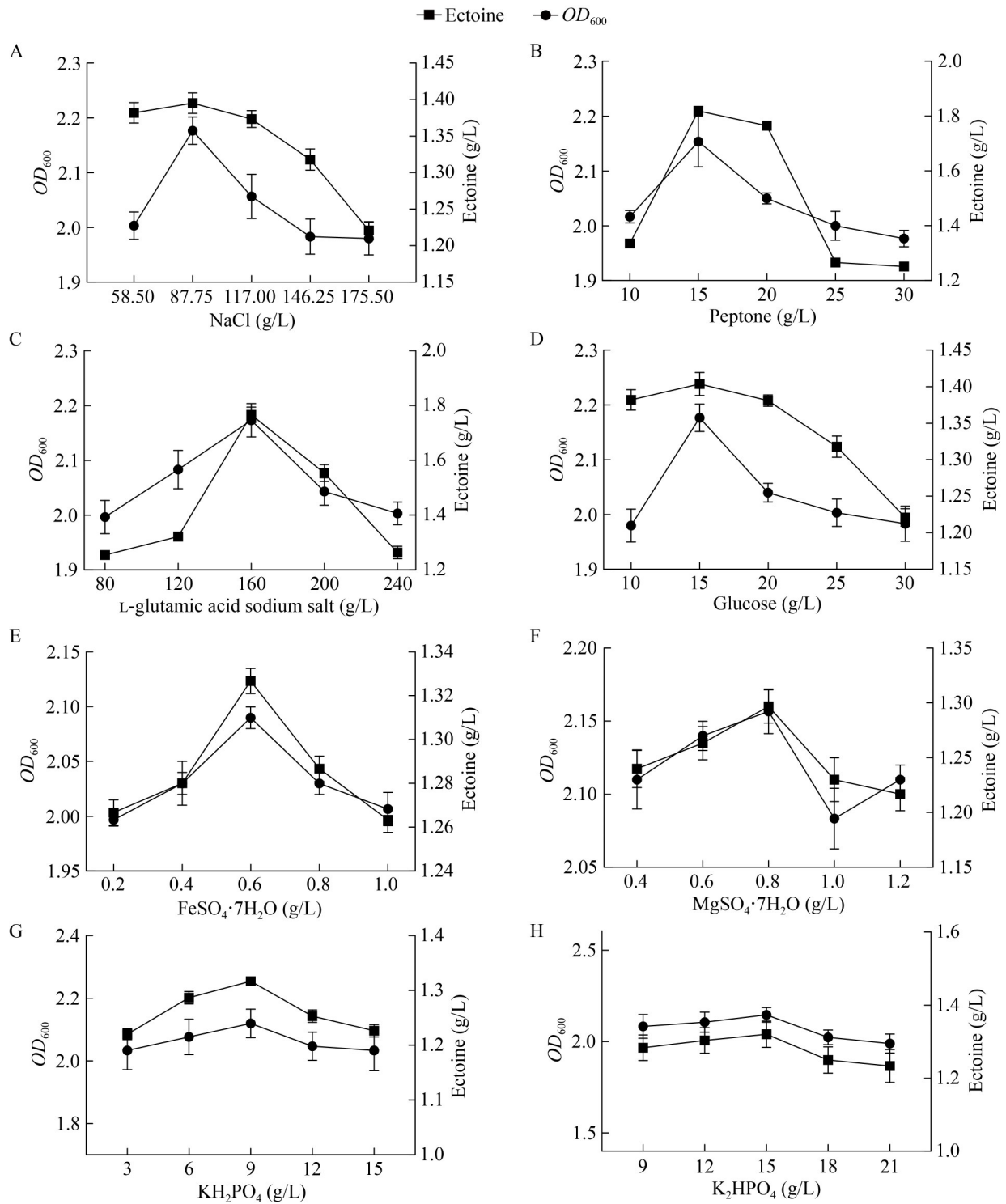


图6 不同单因素条件下XH26/pHX04菌株的生长量( $OD_{600}$ )和四氢嘧啶积累量

Figure 6 Growth ( $OD_{600}$ ) and intracellular ectoine accumulation of strain XH26/pHX04 under different single-factor conditions. A: NaCl; B: Peptone; C: L-glutamate; D: Glucose; E:  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ; F:  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; G:  $KH_2PO_4$ ; H:  $K_2HPO_4$ .

表4 Plackett-Burman实验结果

Table 4 Results of the Plackett-Burman experiment

Experiment No.	Variant								Ectoine (g/L)
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$X_5$	$X_6$	$X_7$	$X_8$	
1	-1	1	1	1	1	-1	1	1	1.77
2	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1.64
3	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1.80
4	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1.63
5	1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1.79
6	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1.38
7	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1.79
8	-1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1.67
9	-1	-1	-1	1	-1	1	1	1	1.40
10	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	1.47
11	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1.73
12	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	1.45

表5 Plackett-Burman实验结果

Table 5 Experimental results of Plackett-Burman design

Source	Sum of squares	<i>df</i>	Mean square	<i>F</i> -value	<i>P</i> -value	Significance
Model	0.276 3	8	0.034 5	29.52	0.009 0	*
$X_1$ : NaCl (g/L)	0.061 6	1	0.061 6	52.68	0.005 4	*
$X_2$ : Peptone (g/L)	0.073 0	1	0.073 0	62.41	0.004 2	*
$X_3$ : L-glutamate (g/L)	0.061 9	1	0.061 9	52.93	0.005 4	*
$X_4$ : Glucose (g/L)	0.069 6	1	0.069 6	59.51	0.004 5	*
$X_5$ : FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (g/L)	0.000 4	1	0.000 4	0.329	0.606 2	
$X_6$ : MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (g/L)	0.001 2	1	0.001 2	1.06	0.378 9	
$X_7$ : KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	0.007 1	1	0.007 1	6.07	0.090 5	
$X_8$ : K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/L)	0.001 4	1	0.001 4	1.20	0.352 7	
Pure error	0.003 5	3	0.001 2			
Cor total	0.279 8	11				

$R^2=0.987 5$ ;  $R_{adj}^2=0.954 0$ ; \*:  $P<0.05$ .

## 2.8 比较分析野生菌株和重组菌株 XH26/pHX04 的生长特性

菌株生长特性分析显示(图 8), 野生菌株 XH26 和重组菌株 XH26/pHX04 均在 8 h 左右进入对数生长期, 野生菌株 XH26 在 16 h 左右结束对数生长期, 生长速度逐渐变得缓慢, 48 h 完全进入平台期, 此时胞内四氢嘧啶的积累量

可达 0.454 g/L; 重组菌株 XH26/pHX04 同样在 16 h 左右结束对数生长期, 但平台期启动更晚, 48–72 h 为主要平台期, 随着培养时间的延长, 四氢嘧啶积累量仍然能持续累积, 72 h 达到平均值峰值 1.798 g/L。由此表明, 重组菌株 XH26/pHX04 进入平台期的时间更晚且持续时间更长, 且四氢嘧啶的持续合成能力显著优于原始菌株 XH26。

表6 Box-Behnken实验设计与响应值分析

Table 6 Box-Behnken experimental design and response value analysis

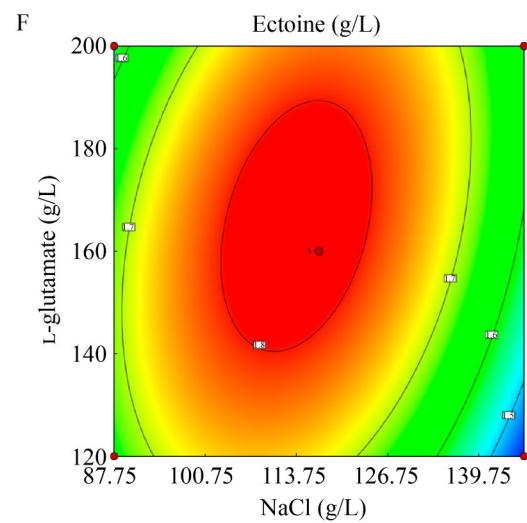
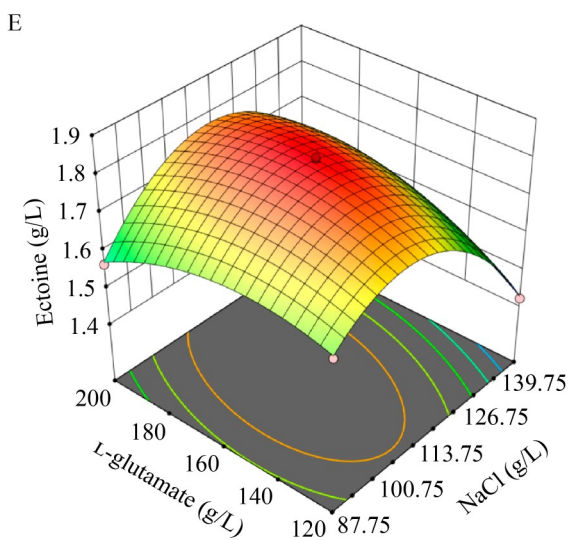
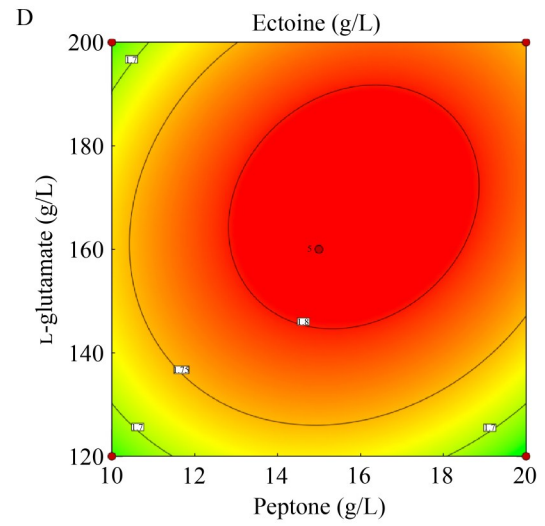
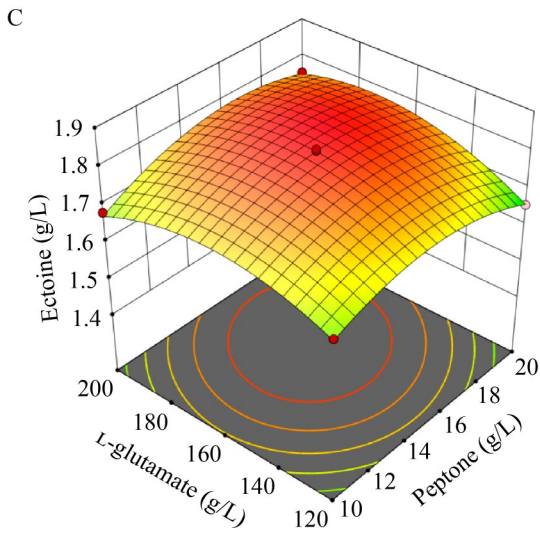
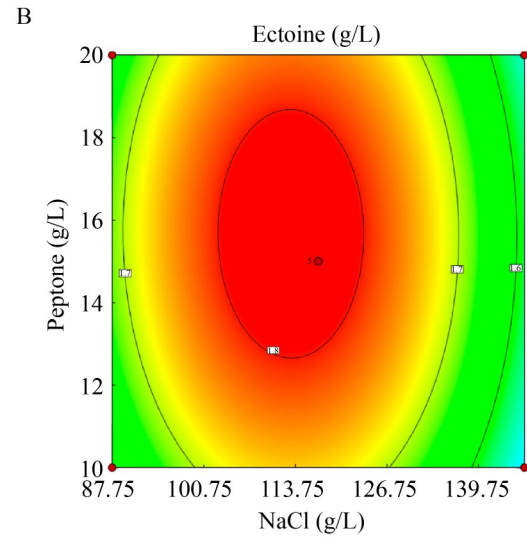
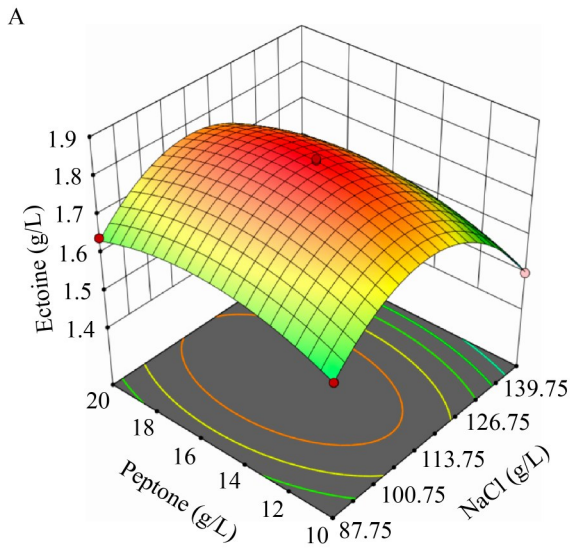
Experiment No.	NaCl (g/L)	Peptone (g/L)	L-glutamate (g/L)	Glucose (g/L)	Ectoine (g/L)	Experiment No.	NaCl (g/L)	Peptone (g/L)	L-glutamate (g/L)	Glucose (g/L)	Ectoine (g/L)
1	87.75	10.00	160.00	15.00	1.60	16	117.00	20.00	200.00	15.00	1.76
2	146.25	10.00	160.00	15.00	1.50	17	87.75	15.00	120.00	15.00	1.65
3	87.75	20.00	160.00	15.00	1.64	18	146.25	15.00	120.00	15.00	1.42
4	146.25	20.00	160.00	15.00	1.54	19	87.75	15.00	200.00	15.00	1.57
5	117.00	15.00	120.00	10.00	1.63	20	146.25	15.00	200.00	15.00	1.60
6	117.00	15.00	200.00	10.00	1.65	21	117.00	10.00	160.00	10.00	1.67
7	117.00	15.00	120.00	20.00	1.63	22	117.00	20.00	160.00	10.00	1.61
8	117.00	15.00	200.00	20.00	1.69	23	117.00	10.00	160.00	20.00	1.60
9	87.75	15.00	160.00	10.00	1.63	24	117.00	20.00	160.00	20.00	1.71
10	146.25	15.00	160.00	10.00	1.42	25	117.00	15.00	160.00	15.00	1.81
11	87.75	15.00	160.00	20.00	1.54	26	117.00	15.00	160.00	15.00	1.82
12	146.25	15.00	160.00	20.00	1.56	27	117.00	15.00	160.00	15.00	1.82
13	117.00	10.00	120.00	15.00	1.67	28	117.00	15.00	160.00	15.00	1.82
14	117.00	20.00	120.00	15.00	1.66	29	117.00	15.00	160.00	15.00	1.82
15	117.00	10.00	200.00	15.00	1.68						

表7 响应面模型方差分析

Table 7 Analysis of variance (ANOVA) for the response surface model

Source	Sum of squares	df	Mean square	F-value	P-value	Significant
Model	0.339 3	14	0.024 2	423.52	<0.000 1	*
A	0.028 8	1	0.028 8	503.50	<0.000 1	*
B	0.003 4	1	0.003 4	59.42	<0.000 1	*
C	0.006 8	1	0.006 8	119.12	<0.000 1	*
D	0.001 2	1	0.001 2	21.68	0.000 4	*
AB	0.000 0	1	0.000 0	0.21	0.650 7	
AC	0.017 6	1	0.017 6	306.80	<0.000 1	*
AD	0.013 0	1	0.013 0	227.11	<0.000 1	*
BC	0.002 0	1	0.002 0	35.39	<0.000 1	*
BD	0.007 1	1	0.007 1	124.78	<0.000 1	*
CD	0.000 5	1	0.000 5	8.85	0.010 0	*
A <sup>2</sup>	0.223 8	1	0.223 8	3 910.32	<0.000 1	*
B <sup>2</sup>	0.026 3	1	0.026 3	460.43	<0.000 1	*
C <sup>2</sup>	0.029 3	1	0.029 3	512.39	<0.000 1	*
D <sup>2</sup>	0.067 8	1	0.067 8	1 184.73	<0.000 1	*
Residual	0.000 8	14	0.000 1			
Lack of fit	0.000 7	10	0.000 1	2.21	0.231 3	Not significant
Pure error	0.000 1	4	0.000 0			
Cor total	0.340 1	28				

$R^2=0.997 6$ ;  $R_{adj}^2=0.995 3$ ; \*:  $P<0.05$ .



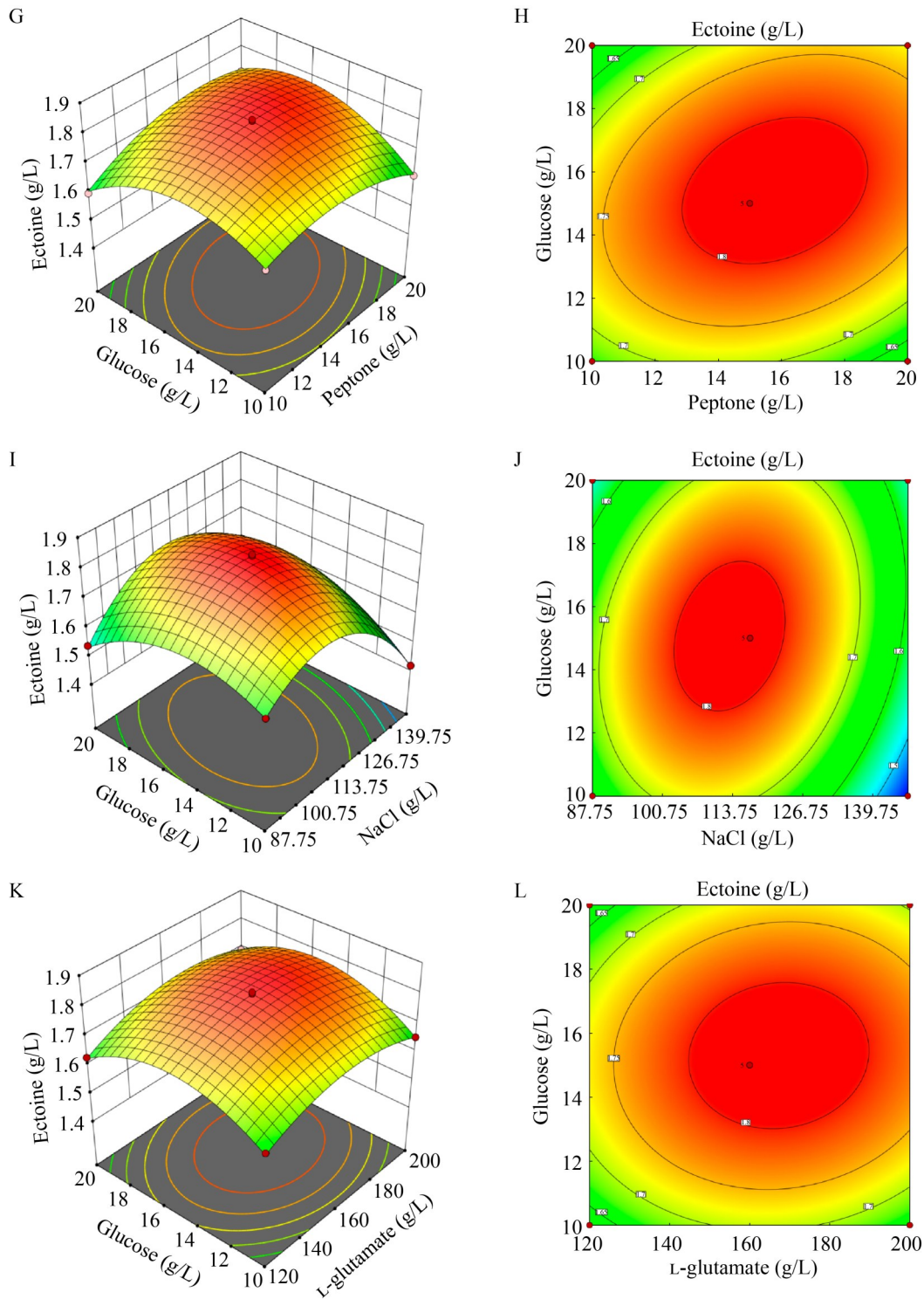


图7 各因素交互作用对胞内四氢嘧啶积累量影响的响应面图(A、C、E、G、I、K)和等高线图(B、D、F、H、J、L)  
 Figure 7 Response surface (A, C, E, G, I, K) and contour plots (B, D, F, H, J, L) illustrating the interaction effects of multiple factors on ectoine accumulation. A, B: Peptone vs. NaCl; C, D: L-glutamate vs. Peptone; E, F: L-glutamate vs. NaCl; G, H: Glucose vs. Peptone; I, J: Glucose vs. NaCl; K, L: Glucose vs. L-glutamate.

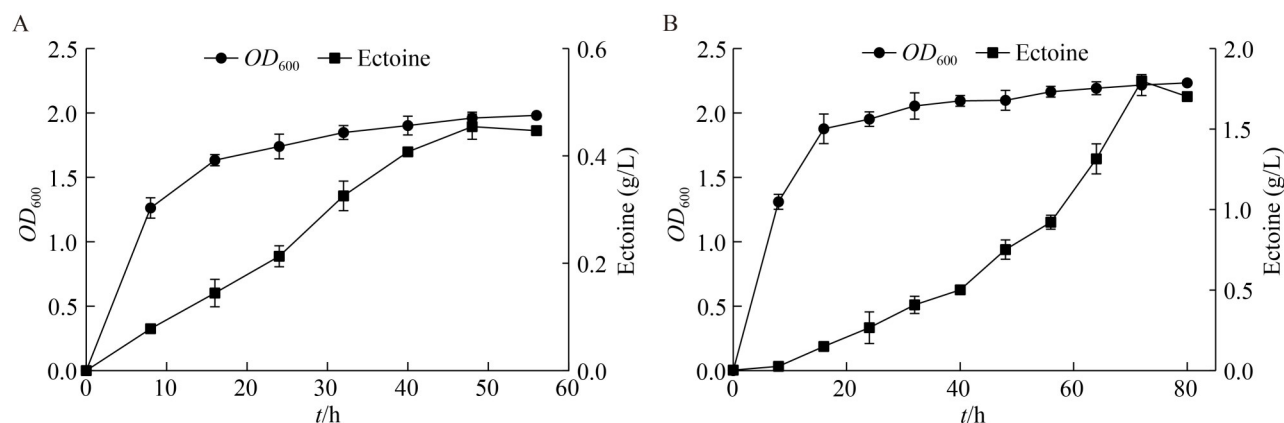


图8 比较分析野生菌株和重组菌株的生长特性

Figure 8 Comparative analysis of growth characteristics between wild-type strains and recombinant strains. A: Growth and ectoine yield of wild strain XH26; B: Growth and ectoine yield of mutant strain XH26/pHX04.

### 3 讨论

#### 3.1 盐单胞菌“底盘细胞”与四氢嘧啶合成相关基因的增强型表达

盐单胞菌凭借独特的耐盐碱生理特性已成为合成生物学中一类极具应用潜力的新型“底盘细胞”工厂<sup>[1]</sup>。首先，与传统表达宿主相比，该类菌株能够在高盐/碱性条件下实现开放式培养，这不仅显著降低了菌株的污染风险，也为特殊次级代谢物的盐碱条件发酵提供了可能的解决方案<sup>[17-18]</sup>。在实际应用方面，盐单胞菌已展现出独特的生产潜能，如 *H. bluephagenesis* 菌株已被成功用于开放式生产 PHA<sup>[19]</sup>；菌株 *Halomonas* sp. AAD6 和 KM-1 用于高效合成结冷胶、丙酮酸等<sup>[20-21]</sup>。其次，涉及适配盐单胞菌表达宿主的分子工具开发也取得了重要进展，包括 pSEVA 系列载体、孔蛋白启动子文库和类 T7 诱导系统在内的多种遗传操作元件<sup>[22-24]</sup>。尤其值得注意的是，CRISPR/Cas9 系统已成功应用于 *H. bluephagenesis* 的基因组编辑和染色体整合，大幅提升了可编程性遗传操作水平<sup>[25-26]</sup>。基于此，本研究以 *H. campaniense* XH26 为“底盘细胞”，通过接合转移强化四氢嘧啶合成基因簇的表达，在高盐培养基中实现了该化合物积

累量的显著提升，进一步证明了盐单胞菌作为耐盐细胞工厂在合成生物学中的工程价值。

#### 3.2 基因导入策略与多基因表达的负效应

在合成生物学领域，关联基因或基因簇的协同表达和定向强化关键中间体的代谢流可能是提升次级代谢物合成能力的有效策略之一<sup>[27]</sup>。Wang 等<sup>[28]</sup>利用 *E. coli* BL21(DE3) 菌株异源表达基因簇 *ectABC*，同时过表达相关前体合成基因 *lysC* 与 *asd*，通过连续补料发酵四氢嘧啶，其积累量高达 60.7 g/L。Eun 等<sup>[29]</sup>通过删除 *C. glutamicum* 的基因 *crtEb* 和 *crtYe/f*，成功构建  $\alpha$ -胡萝卜素合成途径，经 54 h 补料发酵后叶黄素的积累量为 1.78 g/L。Zhong 等<sup>[30]</sup>利用 *C. glutamicum* 共表达基因 *xylA*、*xylB* 与 *EcxylE*，采用 5 L 发酵罐以木糖生产 L-高丝氨酸，其积累量可达 93.1 g/L。然而，外源基因的导入并非简单叠加，过量表达易引发“代谢负荷” (metabolic burden)<sup>[31-32]</sup>。该效应主要表现为能量、辅因子、氨基酸及转录翻译资源的过度消耗。

本研究中，菌株 XH26/pHX05 在菌株 XH26/pHX04 (含 *asd*、*lysC*、*ectA*、*ectB*) 基础上额外导入基因 *ectC* 后，四氢嘧啶积累量从 (1.32±0.04) g/L 降至 (1.19±0.07) g/L，该现象可

从 3 方面机制解释。(1) 基因 *ectC* 过表达破坏了四氢嘧啶合成途径的酶平衡。Zhang 等<sup>[33]</sup>发现, 当基因 *ectA:ectB:ectC* 拷贝数比例为 1:2:1 时, 四氢嘧啶积累量达 12.9 g/L, 而仅将基因 *ectC* 拷贝数增至 3 倍, 产物积累量便骤降至 1.04 g/L。Gießelmann 等<sup>[34]</sup>在谷氨酸棒状杆菌异源合成四氢嘧啶的研究中发现, EctB 作为限速酶直接决定合成途径通量。过度表达下游 EctC 会导致上游中间产物供应不足, 最终降低产物积累量。(2) 基因 *ectC* 过表达会引起胞内资源竞争。González-Colell 等<sup>[35]</sup>通过构建多基因竞争模型发现, 过表达外源基因会竞争 RNA 聚合酶与核糖体等有限资源, 本体系中高表达基因 *ectC*, 势必削弱 *asd*、*lysC* 等前体基因的转录与翻译能力, 进而影响前体供应, 该过程也符合 Sabi 与 Tuller<sup>[36]</sup>所揭示的 tRNA 池竞争导致翻译失衡的机制。此外, 基因过表达 *ectC* 也可能干扰四氢嘧啶合成与降解的动态平衡。Schwibbert 等<sup>[37]</sup>在盐单胞菌中证实四氢嘧啶积累可诱导四氢嘧啶水解酶编码基因(*doeA*)表达, 本研究中菌株 XH26/pHX05 过表达基因 *ectC* 所引起的代谢扰动激活了四氢嘧啶降解途径, 从而降低其积累量。综上所述, 基因 *ectC* 的单独导入与过表达并未有效提升产物合成, 反而因破坏代谢平衡、引发资源竞争并激活降解途径, 最终导致胞内四氢嘧啶积累量降低。

### 3.3 碳氮源的协同调控对四氢嘧啶合成的驱动作用

碳、氮源可通过调整自身种类与配比, 调控胞内碳氮代谢流、前体供应及胁迫响应过程, 进而对四氢嘧啶的合成效率产生显著影响<sup>[38]</sup>。本研究采用响应面法优化得到最佳培养基配比 (NaCl 116.08 g/L, 蛋白胨 16.30 g/L, L-谷氨酸钠 169.57 g/L, 葡萄糖 15.53 g/L) 印证了上述理论, 揭示了碳氮源协同调控的具体模式: 高浓度 L-谷氨酸钠作为氨基供体促进 EctB 催化生成前体 L-2,4-二氨基丁酸<sup>[39]</sup>; 适量葡萄糖提供能量

(ATP)、还原力(NADPH)及草酰乙酸等碳骨架<sup>[40]</sup>。该响应面模型进一步揭示, 碳、氮源浓度过高或过低会引发代谢流分配失衡与代谢溢流效应, 最终降低四氢嘧啶积累量<sup>[41]</sup>; 同时, 16.30 g/L 蛋白胨可提供氨基酸、小肽及生长因子, 多途径促进菌体生长<sup>[42]</sup>。此外, 116.08 g/L NaCl 构建的高盐环境能激活基因簇 *ectABC*, 驱动碳氮代谢流向四氢嘧啶合成途径汇聚<sup>[43]</sup>。此次优化确定的多因素浓度组合, 实现了前体供应、能量代谢与胁迫响应的高效平衡: 其中碳氮比(C/N)的精确调控对四氢嘧啶合成通量起决定性作用<sup>[44]</sup>, 渗透压与营养素的协同调控策略, 为适配嗜盐菌株代谢特性、提升四氢嘧啶合成效率提供了可行方向<sup>[45]</sup>; 同时, 这种多因素协同优化方法与近期微生物细胞工厂代谢工程的系统优化理念高度契合<sup>[46-48]</sup>, 为同源底盘细胞的工业化应用奠定了坚实基础。

## 4 结论

本研究围绕 *H. campaniense* XH26 的同源代谢改造展开核心探索, 通过  $P_{tac}$  强启动子驱动关键基因(*asd*、*lysC*、*ectA*、*ectB*)过表达, 其中 *asd* 与 *lysC* 强化前体天冬氨酸- $\beta$ -半醛的供应, *ectA* 与 *ectB* 加速中间产物向四氢嘧啶的转化, 再耦合响应面法精准优化培养基组分, 最终使重组菌株的四氢嘧啶积累量从野生型的 0.454 g/L 提升至(1.81 $\pm$ 0.02) g/L, 增幅达 301.56%。这一成果不仅验证了“前体强化+关键步骤调控”策略在该同源底盘中的有效性, 更首次建立了针对 XH26 的“基因克隆-接合转移-培养优化”完整技术体系, 填补了该菌株代谢工程改造的研究空白, 为后续嗜盐微生物次级代谢物的同源合成提供了可复用的技术范式。

需客观说明的是, 当前(1.81 $\pm$ 0.02) g/L 的产量为摇瓶基础研究水平, 与文献中“基因组编辑菌株+发酵罐补料”的工业化高产数据存在差距, 此差异源于研究阶段的定位不同, 而非改造策略的局限。同时, 当前使用的诱导性  $P_{tac}$  启动子

虽证实了菌株 XH26 的代谢强化潜力, 但也暴露了关键基因表达比例难以动态调控的问题, 为后续提升菌株生产能力指明了方向。基于本研究建立的基础框架, 后续将从两方面推进菌株生产能力的突破: 一是结合代谢组学数据筛选菌株 XH26 基因组内不同强度的内源性启动子, 精准调控基因 *ectA*、*ectB*、*ectC* 的表达比例, 消除因酶活失衡导致的代谢瓶颈; 二是开发 CRISPR/Cas9 介导的基因组整合技术, 将优化后的表达模块定点插入染色体, 构建无质粒、无抗性标记的稳定工程菌株, 为推动研究向产业化转化奠定关键基础。

### 作者贡献声明

李昊鑫: 数据收集及分析、验证、完成呈现和撰写文章等; 何珊珊: 数据收集及验证; 张宗豪: 实验指导; 李永臻: 项目管理; 王嵘: 提供资源; 韩睿: 监督管理; 朱德锐: 提出概念、执行调研、获取基金提供资源和审阅贡献。

### 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] YE JW, CHEN GQ. *Halomonas* as a chassis[J]. *Essays in Biochemistry*, 2021, 65(2): 393-403.
- [2] ZHANG W, LIU K, KONG F, YE T, WANG TW. Multiple functions of compatible solute ectoine and strategies for constructing overproducers for biobased production[J]. *Molecular Biotechnology*, 2024, 66(8): 1772-1785.
- [3] LIU XR, GORISH BMT, QARIA MA, HUSSAIN A, ABDELMULA WIY, ZHU DC. Unlocking ectoine's postbiotic therapeutic promise: mechanisms, applications, and future directions[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2025: 1-26.
- [4] 张培霞, 陶宇杰, 乔丽娟, 王嵘, 韩睿, 朱德锐, 沈国平. 转录组学分析 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 纳米颗粒胁迫下盐单胞菌 XH26 与四氢嘧啶代谢相关的差异表达基因[J]. *微生物学报*, 2025, 65(1): 239-255.
- [5] ZHANG PX, TAO YJ, QIAO LJ, WANG R, HAN R, ZHU DR, SHEN GP. Transcriptomics reveals differentially expressed genes related to ectoine metabolism in *Halomonas campaniensis* XH26 under Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticle stress[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(1): 239-255 (in Chinese).
- [5] MA YY, YE JW, LIN YN, YI XQ, WANG X, WANG H, HUANG RY, WU FQ, WU Q, LIU X, CHEN GQ. Flux optimization using multiple promoters in *Halomonas bluephagenesis* as a model chassis of the next generation industrial biotechnology[J]. *Metabolic Engineering*, 2024, 81: 249-261.
- [6] HOBMEIER K, CANTONE M, NGUYEN QA, PFLÜGER-GRAU K, KREMLING A, KUNTE HJ, PFEIFFER F, MARIN-SANGUINO A. Adaptation to varying salinity in *Halomonas elongata*: much more than ectoine accumulation[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 846677.
- [7] WANG K, SONG XT, CUI BY, WANG Y, LUO W. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for efficient production of ectoine[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2025, 73(1): 646-654.
- [8] JIANG A, SONG YH, YOU J, ZHANG X, XU MJ, RAO ZM. High-yield ectoine production in engineered *Corynebacterium glutamicum* by fine metabolic regulation via plug-in repressor library[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 362: 127802.
- [9] WANG JJ, ZHANG R, ZHU GL, WANG LL, BAI H, QIAN Y, ZHOU XZ, YIN Q, ZHANG Y. Expression of a deep-sea bacterial laccase from *Halomonas alkaliantartica* and its application in dyes decolorization[J]. *Annals of Microbiology*, 2023, 73(1): 19.
- [10] LEI Z, CHEN XS, YUAN LX, WU JY, YAO JM. Metabolic control for high-efficiency ectoine synthesis in engineered *Escherichia coli*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2025, 14(8): 3177-3185.
- [11] SZÉLIOVÁ D, KRAHULEC J, ŠAFRÁNEK M, LIŠKOVÁ V, TURŇA J. Modulation of heterologous expression from PBAD promoter in *Escherichia coli* production strains[J]. *Journal of Biotechnology*, 2016, 236: 1-9.
- [12] ZHANG J, YUAN Y, WANG ZW, CHEN T. Metabolic engineering of *Halomonas bluephagenesis* for high-level mevalonate production from glucose and acetate mixture[J]. *Metabolic Engineering*, 2023, 79: 203-213.
- [13] HU QT, SUN SM, ZHANG ZN, LIU W, YI XQ, HE HT, SCRUTTON NS, CHEN GQ. Ectoine hyperproduction by engineered *Halomonas bluephagenesis*[J]. *Metabolic Engineering*, 2024, 82: 238-249.
- [14] ZHU DR, LIU J, HAN R, SHEN GP, LONG QF, WEI XX, LIU DL. Identification and characterization of ectoine biosynthesis genes and heterologous expression of the ectABC gene cluster from *Halomonas* sp. QHL1 a moderately halophilic bacterium isolated from Qinghai Lake[J]. *Journal of Microbiology*, 2014, 52(2): 139-147.
- [15] ZHANG TT, CUI TQ, CAO YN, LI YZ, LI FH, ZHU DR, XING JW. Whole genome sequencing of the halophilic *Halomonas qaidamensis* XH36, a novel species strain with high ectoine production[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2022, 115(4): 545-559.
- [16] 逯心玥, 李昊鑫, 张培霞, 师博涵, 李永臻, 王嵘, 朱德锐, 韩睿. 靶向代谢组学分析添加天冬氨酸培养盐单胞菌

- 时四氢嘧啶的代谢通路变化[J]. 微生物学报, 2025, 65(10): 4621-4636.
- LU XY, LI HX, ZHANG PX, SHI BH, LI YZ, WANG R, ZHU DR, HAN R. Targeted metabolomics reveals changes in metabolic pathways related to ectoine in *Halomonas* cultured with aspartate[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(10): 4621-4636 (in Chinese).
- [17] KIVISTÖ A, SANTALA V, KARP M. Non-sterile process for biohydrogen and 1,3-propanediol production from raw glycerol[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2013, 38(27): 11749-11755.
- [18] OREN A. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms[J]. Environmental Technology, 2010, 31(8/9): 825-834.
- [19] YUE HT, LING C, YANG T, CHEN XB, CHEN YL, DENG HT, WU Q, CHEN JC, CHEN GQ. A seawater-based open and continuous process for polyhydroxyalkanoates production by recombinant *Halomonas campaniensis* LS21 grown in mixed substrates[J]. Biotechnology for Biofuels, 2014, 7(1): 108.
- [20] KAZAK SARILMISER H, ATES O, OZDEMIR G, ARGA KY, TOKSOY ONER E. Effective stimulating factors for microbial levan production by *Halomonas smyrnensis* AAD6T[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2015, 119(4): 455-463.
- [21] JIN YX, SHI LH, KAWATA Y. Metabolomics-based component profiling of *Halomonas* sp. KM-1 during different growth phases in poly(3-hydroxybutyrate) production[J]. Bioresource Technology, 2013, 140: 73-79.
- [22] ZHAO H, ZHANG HM, CHEN XB, LI T, WU Q, OUYANG Q, CHEN GQ. Novel T7-like expression systems used for *Halomonas*[J]. Metabolic Engineering, 2017, 39: 128-140.
- [23] SHEN R, YIN J, YE JW, XIANG RJ, NING ZY, HUANG WZ, CHEN GQ. Promoter engineering for enhanced P(3HB-co-4HB) production by *Halomonas bluephagenesis*[J]. ACS Synthetic Biology, 2018, 7(8): 1897-1906.
- [24] MARTÍNEZ-GARCÍA E, GOÑI-MORENO A, BARTLEY B, McLAUGHLIN J, SÁNCHEZ-SAMPEDRO L, PASCUAL del POZO H, PRIETO HERNÁNDEZ C, MARLETTA AS, de LUCREZIA D, SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ G, FRAILE S, de LORENZO V. SEVA 3.0: an update of the standard European vector architecture for enabling portability of genetic constructs among diverse bacterial hosts[J]. Nucleic Acids Research, 2020, 48(D1): D1164-D1170.
- [25] YE JW, HU DK, YIN J, HUANG WZ, XIANG RJ, ZHANG LZ, WANG X, HAN JN, CHEN GQ. Stimulus response-based fine-tuning of polyhydroxyalkanoate pathway in *Halomonas*[J]. Metabolic Engineering, 2020, 57: 85-95.
- [26] JIANG XR, YAO ZH, CHEN GQ. Controlling cell volume for efficient PHB production by *Halomonas*[J]. Metabolic Engineering, 2017, 44: 30-37.
- [27] PARK YK, SELLÉS VIDAL L, BELL D, ZABRET J, SOLDAT M, KAVŠČEK M, LEDESMA-AMARO R. Efficient synthesis of limonene production in *Yarrowia lipolytica* by combinatorial engineering strategies[J]. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 2024, 17(1): 94.
- [28] WANG DA, CHEN JM, WANG Y, DU GC, KANG Z. Engineering *Escherichia coli* for high-yield production of ectoine[J]. Green Chemical Engineering, 2023, 4(2): 217-223.
- [29] EUN H, PRABOWO CPS, LEE SY. Gram-per-litre-scale production of lutein by engineered *Corynebacterium*[J]. Nature Synthesis, 2025, 4(10): 1200-1211.
- [30] ZHONG ZY, MA ZP, CAO YZ, ZHANG HY, QI YT, WEI L, JIANG JQ, XU N, LIU J. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for efficient L-homoserine production from lignocellulose-derived sugars[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2025, 13(9): 3441-3451.
- [31] WU G, YAN Q, JONES JA, TANG YJ, FONG SS, KOFFAS MAG. Metabolic burden: cornerstones in synthetic biology and metabolic engineering applications[J]. Trends in Biotechnology, 2016, 34(8): 652-664.
- [32] KASTBERG LB, ARD R, JENSEN MK, WORKMAN CT. Burden imposed by heterologous protein production in two major industrial yeast cell factories: identifying sources and mitigation strategies[J]. Frontiers in Fungal Biology, 2022, 3: 827704.
- [33] ZHANG H, LIANG Z, ZHAO M, MA YQ, LUO ZS, LI S, XU H. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for ectoine production with a fermentation strategy of supplementing the amino donor[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022, 10: 824859.
- [34] GIEßELMANN G, DIETRICH D, JUNGMANN L, KOHLSTEDT M, JEON EJ, YIM SS, SOMMER F, ZIMMER D, MÜHLHAUS T, SCHRODA M, JEONG KJ, BECKER J, WITTMANN C. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for high-level ectoine production: design, combinatorial assembly, and implementation of a transcriptionally balanced heterologous ectoine pathway[J]. Biotechnology Journal, 2019, 14(9): 1800417.
- [35] GONZÁLEZ-COLELL M, MACÍA J. General analyses of gene expression dependencies on genetic burden[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 1017.
- [36] SABI R, TULLER T. Modelling and measuring intracellular competition for finite resources during gene expression[J]. Journal of the Royal Society, Interface, 2019, 16(154): 20180887.
- [37] SCHWIBBERT K, MARIN-SANGUINO A, BAGYAN I, HEIDRICH G, LENTZEN G, SEITZ H, RAMPP M, SCHUSTER SC, KLENK HP, PFEIFFER F, OESTERHELT D, KUNTE HJ. A blueprint of ectoine metabolism from the genome of the industrial producer *Halomonas elongata* DSM 2581T[J]. Environmental Microbiology, 2011, 13(8): 1973-1994.
- [38] CHEN YP, LIU YJ, MENG Y, JIANG YT, XIONG WN, WANG SF, YANG C, LIU RH. Elucidating the salt-tolerant mechanism of *Halomonas cupida* J9 and unsterile ectoine production from lignocellulosic

- biomass[J]. *Microbial Cell Factories*, 2024, 23(1): 237.
- [39] 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.
- [40] KHALEQUE HN, NAZEM-BOKAEE H, GUMULYA Y, CARLSON RP, KAKSONEN AH. Simulating compatible solute biosynthesis using a metabolic flux model of the biomining acidophile, *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270[J]. *Research in Microbiology*, 2024, 175(1/2): 104115.
- [41] NAKAYAMA H, KAWAMOTO R, MIYOSHI K. Ectoine production from putrefactive non-volatile amines in the moderate halophile *Halomonas elongata*[J]. *Earth and Environmental Science*, 2020, 439(1): 012001.
- [42] CANTERA S, TAMARIT D, STRONG PJ, SÁNCHEZ-ANDREA I, ETTEMA TJG, SOUSA DZ. Prospective CO<sub>2</sub> and CO bioconversion into ectoines using novel microbial platforms[J]. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 2022, 21(3): 571-581.
- [43] SALAR-GARCÍA MJ, BERNAL V, PASTOR JM, SALVADOR M, ARGANDOÑA M, NIETO JJ, VARGAS C, CÁNOVAS M. Understanding the interplay of carbon and nitrogen supply for ectoines production and metabolic overflow in high density cultures of *Chromohalobacter salexigens*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1): 23.
- [44] ZOU ZY, KAOTHIEN-NAKAYAMA P, NAKAYAMA H. Enhanced accumulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid by deletion of aminotransferase genes involved in  $\gamma$ -aminobutyric acid catabolism in engineered *Halomonas elongata*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2024, 90(9): e0073424.
- [45] LIM SE, CHO S, CHOI Y, NA JG, LEE J. High production of ectoine from methane in genetically engineered *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z by preventing ectoine degradation[J]. *Microbial Cell Factories*, 2024, 23(1): 127.
- [46] HUANG ML, ZHANG HN, REN M, JI BX, SUN KY. The synthesis of ectoine enhance the assimilation of ammonia nitrogen in hypersaline wastewater by the salt-tolerant assimilation bacteria sludge[J]. *Science of The Total Environment*, 2024, 913: 169694.
- [47] ASIRI F, CHEN CH, HWANGBO M, SHAO YR, CHU KH. From organic wastes to bioplastics: feasibility of nonsterile poly(3-hydroxybutyrate) production by *Zobellella denitrificans* ZD1[J]. *ACS Omega*, 2020, 5(38): 24158-24168.
- [48] WANG T, LI J, ZHANG LH, YU Y, ZHU YM. Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at high concentrations of NaCl and ammonia nitrogen by *Halomonas* bacteria[J]. *Water Science and Technology*, 2017, 76(2): 386-395.