

文章编号: 1006-3080(2025)06-0774-09

DOI: 10.14135/j.cnki.1006-3080.20250310001

甜菜碱增强延长盐单胞菌高盐适应性的代谢机理解析

刘昊, 张悦, 居润霖, 银肖剑, 余君雄, 王泽建

(华东理工大学生物工程学院, 上海 200237)

摘要:本研究针对延长盐单胞菌(*Halomonas elongata*)在高盐胁迫下生长受抑制的瓶颈问题,系统筛选了可缓解盐抑制效应的保护因子,结果表明甜菜碱的添加能够使菌体生物量提高18%,显著优于其他渗透调节剂。代谢动力学建模分析表明甜菜碱添加后菌体的最大比生长速率(μ_{\max})显著增加42%、呼吸强度提高118%。碳分布统计结果表明甜菜碱添加后依克多因合成在延滞期明显减弱,碳代谢向细胞菌体生长迁移。胞内关键代谢物分析表明,甜菜碱的添加显著降低丙氨酸、缬氨酸和亮氨酸水平,揭示其可能通过增强三羧酸(TCA)循环代谢通量以提升盐适应能力。该研究为构建高盐环境下嗜盐菌高效表达体系提供了理论依据与工艺优化策略。

关键词:延长盐单胞菌;高盐胁迫;甜菜碱;代谢动力学建模;代谢物分析

中图分类号:Q815

文献标志码:A

嗜盐微生物在高盐环境中的生存依赖于其特有的细胞结构特征及协同进化的代谢适应机制。从代谢调控的角度来看,这些微生物主要采用两种经典的抗逆策略以维持渗透稳态并确保细胞功能的正常运行。第1种策略是胞内盐平衡(Salt-in-cytoplasm)机制,主要见于极端嗜盐古菌中,其通过选择性积累 K^+/Cl^- 等无机离子来维持胞内外渗透压的动态平衡^[1-2]。第2种策略是相容溶质(Compatible solute)机制,广泛存在于中度嗜盐细菌中,该机制依赖于合成或主动摄取电中性有机小分子(如依克多因、甜菜碱)来抵消外界渗透压,同时避免对胞内酶活性的干扰^[3]。在实际生存过程中,这两种适应策略并非完全独立,而是相互协同,以应对不同时间尺度的渗透压变化。例如,在盐应激初期,微生物主要依赖离子稳态机制快速响应环境变化,而在长期适应过程中,则逐步转向相容溶质的积累,以降低高盐对胞内代谢网络的潜在影响,从而确保细胞稳态的维持。

盐单胞菌属(*Halomonas*)多数菌株可在pH>10的碱性环境及50℃高温条件下稳定生长,这种极端环境适应性显著降低了培养过程中的杂菌污染风

险。相较于传统工业底盘微生物(如大肠杆菌、酵母菌及谷氨酸棒杆菌),该属菌株在开放式培养体系中展现出更强的环境竞争优势。延长盐单胞菌(*Halomonas elongata*)可以耐受高于10%(100 g/L) NaCl的盐浓度^[4],已有报道其在8%(80 g/L,下同) NaCl条件为其最适盐浓度,在低盐(<6%(60 g/L,下同) NaCl)和中高盐(>13%(130 g/L,下同) NaCl)的环境下,其生理代谢受到严重抑制^[5]。*H. elongata*主要采取相容溶质策略保护细胞,依克多因作为其重要的渗透保护物质,是一种天冬氨酸族衍生物,它利用天冬氨酸半醛作为前体,依赖于在进化中高度保守的连锁基因簇 $ectABC$,在多酶级联反应的催化下将天冬氨酸转化为依克多因^[6]。目前,依克多因因其强水合作用^[7],主要应用于蛋白质保护剂^[8]、阿尔兹海默症治疗^[9]、DNA保护剂^[10]、抗病毒药物^[11]等,具有良好的应用前景和科学价值。

*H. elongata*的发酵代谢过程具有显著盐度依赖性,其生理代谢活动显著受盐度差异的影响^[12]。Sauer等^[13]首创的"Bacterial milking"工艺通过调控渗透压环境,实现了相容溶质的工业化生产流程。近年来,

收稿日期: 2025-03-10

基金项目: 国家重大专项项目(2020YFA096800)

作者简介: 刘昊(1999—),男,上海人,硕士生,主要研究方向为发酵工程。E-mail: 2723762899@qq.com

通信联系人: 王泽建, E-mail: wzjvictory@163.com

引用本文: 刘昊,张悦,居润霖,等.甜菜碱增强延长盐单胞菌高盐适应性的代谢机理解析[J].华东理工大学学报(自然科学版),2025,51(6): 774-782.

Citation: LIU Hao, ZHANG Yue, JU Runlin, et al. Analysis of the Metabolic Mechanism for the Enhancement of High Salt Acclimatization of *Halomonas elongata* Mediated by Betaine[J]. Journal of East China University of Science and Technology, 2025, 51(6): 774-782.

研究多聚焦于中低盐度条件下菌株代谢改造与工艺优化: Tanimura 等^[4]与 Nakayama 等^[14]开发了基于木质纤维素、腐胺等非常规碳源的依克多因合成体系,有效拓展了底物利用范围; Khanh 等^[15-16]通过强化脯氨酸和谷氨酸生物合成途径,显著提升 *H. elongata* OUT 30018 在 8% 盐度条件下的产物合成效率; Grammann 团队^[17]则通过敲除 TeaABC 转运蛋白编码基因,建立依克多因的高效外排生产系统。然而,现有研究缺乏对高盐环境下的代谢调控机制探索,在应对实际工业生产中高盐胁迫导致的细胞活性抑制、产物合成效率低下等关键问题方面仍存在显著不足。

甜菜碱(甘氨酸甜菜碱)是一种四价铵化合物,其生物合成主要通过胆碱氧化途径完成:胆碱经胆碱脱氢酶(BetA)和甜菜碱醛脱氢酶(BetB)两步催化生成,部分微生物也可通过甘氨酸甲基化直接合成^[18-19]。作为多功能相容性溶质,甜菜碱具有以下特性:通过胞内积累发挥渗透调节作用,稳定细胞水势以抵御高盐、干旱等胁迫^[20];其分子表面氢键网络可保护蛋白质空间构象,防止高温、冷冻或离子强度变化导致的酶失活^[21];作为甲基供体参与甲硫氨酸循环,调节 DNA 甲基化及磷脂代谢^[22];激活超氧化物歧化酶(SOD)等抗氧化酶系统抑制活性氧积累,增强细胞氧化应激耐受性^[23];稳定呼吸链相关酶(如替代氧化酶 AOX)的活性,增强细胞在高盐环境下的能量代谢效率^[24]。这些特性使其在微生物抗逆机制和工业发酵优化中具有重要应用价值。

目前, *H. elongata* 的工业应用面临盐浓度调控的两难挑战:在中低盐(<8% NaCl)环境中,菌体呈现较快的生长速率和代谢活性;而在高盐(>10% NaCl)条件下,能够胁迫 *H. elongata* 快速合成依克多因,但因渗透压胁迫导致菌体生长迟滞及产物合成效率下降^[5]。本研究在维持高盐高产优势的前提下,通过外源添加渗透保护剂的方式,筛选得到的甜菜碱能够有效缓解高盐下 *H. elongata* 受到的生长抑制;通过宏观参数、代谢动力学和胞内代谢物的联合分析,阐释甜菜碱对 *H. elongata* 代谢影响的作用机制,并为嗜盐菌在工业发酵过程中应对高盐环境提供有效的调控手段。

1 实验部分

1.1 原料和试剂

1.1.1 底盘菌株 本研究采用的菌株是延长盐单胞菌 *H. elongata* DSM 2581^T,由中科院微生物所提供。

1.1.2 试剂 葡萄糖:中国惠兴生化试剂有限公司;蛋白胨:德国 MERCK 公司;氯化钠(NaCl):上海菲达亚工贸有限公司和桥分公司;依克多因:赛默飞世尔科技公司;琼脂粉(Agar):中国惠兴生化试剂有限公司;所使用的渗透调节物质都购买于上海凌峰化学试剂有限公司。所有试剂均为分析纯。

1.1.3 培养基组成

(1)平板活化培养基(g/L):蛋白胨 10.0,酵母粉 5.0,氯化钠 80.0,琼脂 16.0。

(2)种子培养基(g/L):蛋白胨 10.0,酵母粉 5.0,氯化钠 80.0, pH 7.0 ± 0.1。

(3)发酵培养基(g/L):蛋白胨 20.0,酵母粉 10.0,葡萄糖 20.0,氯化钠(依实验条件设定),pH 为 7.0 ± 0.1。

1.2 实验方法

1.2.1 培养方法

(1)种子培养:将 2 mL 保种管菌液接入装有 20 mL 种子培养基的 100 mL 摇瓶中,于 37 °C 培养 20 h。

(2)摇瓶培养:将种子液按 10% 接种量接入装有 100 mL 培养基的 500 mL 摇瓶中,于 37 °C、220 r/min 培养 20 h。

(3)反应器培养:采用 5 L 体系发酵罐(上海国强生化工程装备有限公司),工作体积为 3 L,接种量 10%,控制温度 37 °C,罐压 0.05 MPa,氨水控制 pH 在 7.0 ± 0.1,初始通气量 1 vvm,初始转速 600 r/min,通过搅拌控制耦合溶氧(DO)水平为 20%~30%,过程中进行发酵液采集并进行 OD₆₀₀、残糖和依克多因等参数的离线检测。

1.2.2 菌体光密度(OD₆₀₀)与残糖测定 发酵液用等渗磷酸盐缓冲液(NaCl 浓度与实验添加浓度一致)进行稀释,控制 OD₆₀₀ 在 0.2~0.8 之间,用 Varioskan LUX 型酶标仪(Thermo 公司)进行测定。取发酵液样品 1 mL 于 12000 r/min 条件下离心 2 min,取上清,使用一次性注射针筒进行无菌过滤,得到无菌清液,然后使用超纯水稀释无菌清液,最后利用 SBA-40C 型生物传感器分析 510 nm 处吸光度,测定葡萄糖浓度。

1.2.3 依克多因含量测定 取 1 mL 发酵液放入加有研磨珠的 EP 管中,在冷冻研磨机中于 65 Hz 条件下研磨 30 min。取出后在 4 °C、12000 r/min 条件下离心 10 min。取上清经稀释过膜后通过高效液相色谱(HPLC)分析,以水:乙腈(体积比 98:2)溶液为流动相,色谱柱为 WondaSil C18(5 μm×4.6 mm×250 mm),流速为 0.5 L/min,柱温 30 °C,检测器为 SPD-20AV,检测波长 210 nm。

1.2.4 动力学模型分析

(1) 菌体生长动力学模型

$$\text{Logistic 方程: } \frac{dX}{dt} = \mu_m X \left(1 - \frac{X}{X_m}\right)$$

$$\text{积分得到: } X = \frac{X_0 \times e^{\mu_m t}}{1 - \left(\frac{X_0}{X_m}\right) \times (1 - e^{\mu_m t})} \quad (1)$$

其中, X_0 为接种后的初始生物量, X_m 为最大生物量, μ_m 为最大比生长速率, t 为发酵时间。

(2) 产物合成动力学模型

$$\text{Luedeking-Piret 方程: } \frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X$$

积分得到:

$$P = P_0 + \alpha(X - X_0) + \beta \frac{X_m}{\mu_m} \times \ln \left[1 - \left(\frac{X_0}{X_m}\right) \times (1 - e^{\mu_m t}) \right] \quad (2)$$

其中, P_0 为初始产物合成量, α 为生长偶联型系数, β 为非生长偶联型系数。

1.2.5 碳利用率分析 菌体的葡萄糖消耗主要用于菌体生长、呼吸作用和产物合成 3 个部分。

(1) 呼吸作用: $m_{\text{CO}_2} = N_{\text{CO}_2} \times M_{\text{CO}_2}$, 其中 N_{CO_2} 为二氧化碳累积量(mmol/L), 由发酵过程二氧化碳释放速率(CER)曲线积分所得; M_{CO_2} 为二氧化碳分子含碳系数, 此处为 1(即 1 分子 CO_2 含 1 个碳原子)。

(2) 产物合成: $m_{\text{ect}} = M_{\text{ect}} \times c_{\text{ect}}$, 其中 M_{ect} 为依克多因($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$)分子含碳系数, 此处为 6(即 1 分子依克多因含 6 个碳原子); c_{ect} 为依克多因浓度(mmol/L)。

(3) 菌体生长: $m_c = m_x C - m_{\text{ect}}$, 其中 m_x 为细胞干重(g/L), C 为细胞含碳系数(由菌体原子组成测得为 0.38)。

此处葡萄糖消耗量指用于细胞骨架、胞内其他代谢物合成的消耗(不包括依克多因的合成)。

1.2.6 胞内氨基酸含量测定 快速取发酵液样品 2 mL 于 φ 为 40% 冷甲醇中淬灭处理, 同时加入 100 μL 含 $\text{U-}^{13}\text{C}$ 标记的代谢物溶液, 将混合溶液倒入预热的 φ 为 95% 乙醇中煮沸 5 min, 随后 8000 r/min 离心 5 min 取上清, 置于 -80°C 冰箱冷冻保藏。氨基酸衍生化处理方法: 取 100.00 μL 样品于 -60°C 下冷冻干燥, 加入 100.00 μL 吡啶于 60°C 下溶解样品 1 h, 随后加入 100.00 μL 衍生剂 MSTBFA 于 60°C 进行 1 h 衍生化处理, 待气相色谱-质谱联用(GC-MS)分析。GC-MS 分析方法参考文献 [25], 采用带有毛细管色谱柱 HP5-MS 的 GC-MS 分析, 进样体积为 1.00 μL , 高纯氦气流速 1.00 mL/min, 分流比 1 : 10。质谱条件: 离子源温度 230°C , 四级杆温度控制 150°C , 起始 100°C , 以 $10^\circ\text{C}/\text{min}$ 的升温速率升至 280°C , 保持 5 min。

2 结果与讨论

2.1 渗透保护剂的筛选

为了缓解高盐(13% NaCl)环境对 *H. elongata* 的抑制作用, 选取多种常见的渗透保护物质进行筛选实验。这些物质包括氨基酸、产物合成前体、有机酸和维生素等, 具体为甜菜碱、山梨醇、依克多因、甘露醇、海藻酸盐、谷氨酰胺、天冬氨酸、天冬酰胺、半胱氨酸、脯氨酸、谷氨酸、柠檬酸、苹果酸、酮戊二酸、硫酸素、核黄素、泛酸、生物素、叶酸和钴胺素等 20 种物质。浓度的选取参考文献 [26-27], 其中渗透压保护剂质量浓度范围 1~8 g/L, 本实验目的仅为缓解发酵前期的高盐抑制效应, 因此选用 0.5 g/L 的添加剂质量浓度进行筛选。在实验中, 将各物质分别添加至发酵体系中, 并设置未添加任何物质的对照组。所有实验条件均保持一致, 每组实验设置 3 组平行, 发酵持续 20 h 后, 测定发酵液的 OD_{600} 值, 以评价各添加剂对 *H. elongata* 生长的影响效果。

由图 1 可得, 相比于对照组, 有 9 种添加剂对菌体生长具有促进作用, 分别为甜菜碱、依克多因、谷氨酰胺、天冬氨酸、天冬酰胺、半胱氨酸、谷氨酸、柠檬酸和苹果酸。值得注意的是, 在所有添加剂中, 甜菜碱和柠檬酸对菌体生长的促进效果具有显著性差异($p < 0.01$, 显著性分析采用 T 值检验, 通过 SPSS 数据分析软件进行计算)。甜菜碱和柠檬酸添加组发酵液 OD_{600} 值分别达到了 41.4 和 40.5, 相比对照组分别提高了 18% 和 16%(表 1), 表明甜菜碱和柠檬酸的添加能够显著改善 13% NaCl 盐胁迫条件下延长盐单胞菌的菌体生长, 基于此前对柠檬酸添加调控效应的研究 [28], 本工作将重点探讨甜菜碱外源添加的作用机制。

2.2 甜菜碱对 *H. elongata* 生理代谢的影响

为了验证甜菜碱对 *H. elongata* 生理代谢的影响, 在 5 L 发酵罐规模中设置甜菜碱梯度质量浓度(0、0.5、1.0 g/L)实验组, 系统监测菌体生长(OD_{600})、产物合成(依克多因)、呼吸代谢(摄氧速率 OUR、CER)及底物消耗的动态关联, 结果如表 2 所示。

数据分析表明, 添加甜菜碱能显著强化菌体的代谢活性: 0.5 g/L 与 1.0 g/L 组 OD_{600} 分别达到 38.52 和 40.64, 相较于对照组分别提高 24.6% 和 31.4%; 依克多因最终产量(P)达到 3.95 g/L 和 4.11 g/L, 生产强度分别为对照组的 1.28 倍和 1.33 倍, 依克多因产率分别为 0.28 g/(L·h) 和 0.34 g/(L·h), 分别为对照组 1.64 倍和 2 倍; 底物利用效率分别提高 22.2% 和 33.3%。呼吸代谢参数变化尤为显著, 6 h 时 OUR 分

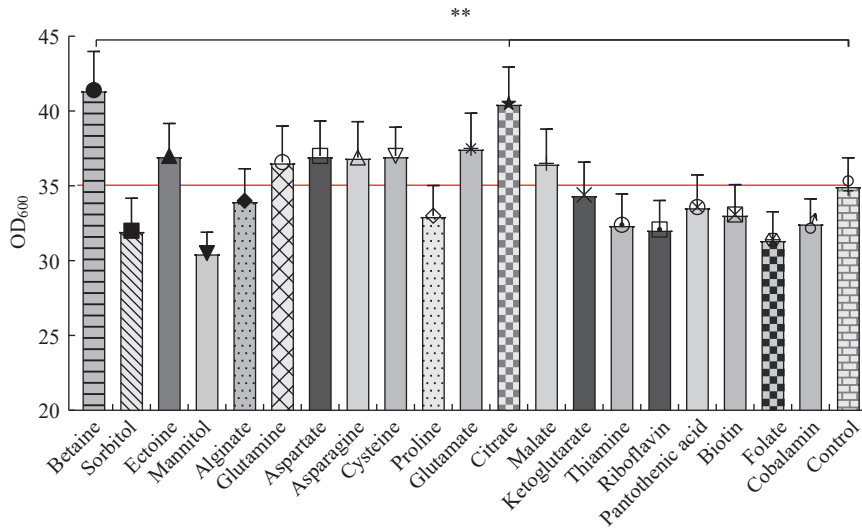


图 1 不同渗透保护剂对延长盐单胞菌生长的影响

Fig. 1 Effects of different osmotic protectants on the growth of *H. elongata*

表 1 不同添加剂条件下 *H. elongata* 发酵液 OD₆₀₀

Table 1 OD₆₀₀ of *H. elongata* with different additive conditions

Component	OD ₆₀₀	<i>p</i>	Component	OD ₆₀₀	<i>p</i>
Betaine	41.4 ± 1.09	0.001	Citrate	40.5 ± 1.03	0.002
Sorbitol	32.0 ± 0.58	0.035	Malate	36.5 ± 0.56	0.218
Ectoine	37.0 ± 0.82	0.074	Ketoglutarate	34.4 ± 0.87	0.616
Mannitol	30.5 ± 0.53	0.002	Thiamine	32.4 ± 0.59	0.051
Alginate	34.0 ± 0.67	0.472	Riboflavin	32.1 ± 0.51	0.044
Glutamine	36.6 ± 0.85	0.190	Pantothenic acid	33.6 ± 0.71	0.337
Aspartate	37.0 ± 0.88	0.098	Biotin	33.1 ± 0.67	0.234
Asparagine	36.9 ± 0.81	0.185	Folate	31.4 ± 0.65	0.018
Cysteine	37.0 ± 0.79	0.054	Cobalamin	32.5 ± 0.78	0.072
Proline	33.0 ± 0.54	0.163	Control	35.0 ± 0.89	
Glutamate	37.5 ± 0.66	0.089			

别达到对照组的 163.63% 和 218.5%, 提示 *H. elongata* 的呼吸代谢系统性增强。

有趣的是, 基于单位菌体代谢分析表明, 甜菜碱对 *H. elongata* 的代谢影响呈现阶段性特征(图 2)。在发酵初始阶段, 甜菜碱添加组的单位菌体依克多

因合成速率(p_{ect})显著降低, 由对照组的 0.30 g/g 降低至 0.20 g/g 和 0.15 g/g, 而呼吸代谢活性(q_{O_2})同步增强, 分别达到 2.95 mmol/(g·h) 和 3.33 mmol/(g·h), 较对照组提升 36.57% 和 54.17%, 表明甜菜碱的添加使得 *H. elongata* 减缓依克多因的合成, 更多代谢通量流入呼吸代谢。随着发酵进入指数生长期, 这一代谢变化逐渐衰减, 实验组与对照组的 p_{ect} 及 OUR 水平趋于一致。这一动态变化表明, 甜菜碱对中心碳代谢网络的影响主要集中于菌体适应高渗环境的过渡阶段(延滞期至指数初期), 通过暂时抑制相容性溶质自主合成、促进外源甜菜碱吸收利用的策略, 实现渗透胁迫响应及生物量的快速增长。

基于甜菜碱对依克多因合成产生的抑制效应, 本研究进一步考察了甜菜碱添加质量浓度 2.0 g/L 对 *H. elongata* 生长代谢的影响, 如图 3 所示。实验结果表明, 在 13% 盐胁迫条件下, 1.0 g/L 与 2.0 g/L 甜菜碱添加组在依克多因合成方面未呈现显著差异。据此推测, 1.0 g/L 甜菜碱已能有效满足菌株渗透压调节需求, 继续提高甜菜碱的质量浓度对 *H. elongata* 的生长代谢无明显促进作用。基于上述实验结果, 后续研究将甜菜碱添加质量浓度固定为 1.0 g/L, 并构建代谢动力学模型解析甜菜碱影响的具

表 2 不同浓度甜菜碱条件下对延长盐单胞菌代谢参数的影响

Table 2 Effects of different betaine mass concentrations on the metabolic parameters of *H. elongata*

$\rho(\text{Betaine})/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	OD ₆₀₀	$P/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	$p_{ect}/(\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	Substrate exhaustion time/h	OUR/(mmol·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	$q_{O_2}/(\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1})$	Productivity/(g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)
0	30.92	3.08	0.30	18	23.36	2.16	0.17
0.5	38.52	3.95	0.20	14	37.99	2.95	0.28
1.0	40.64	4.11	0.15	12	51.03	3.33	0.34

P —Ectoine mass concentration; p_{ect} —Ectoine concentration with unit biomass; q_{O_2} —Oxygen uptake rate with unit biomass

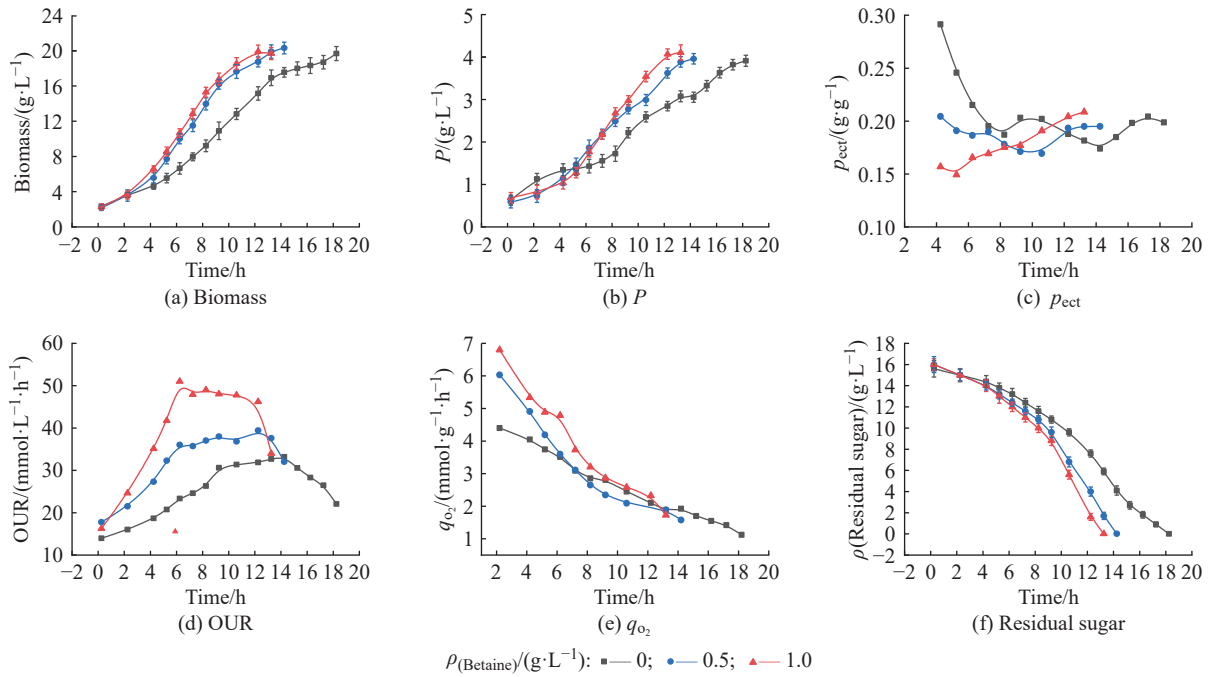


图 2 不同质量浓度甜菜碱条件下对延长盐单胞菌生理代谢的影响

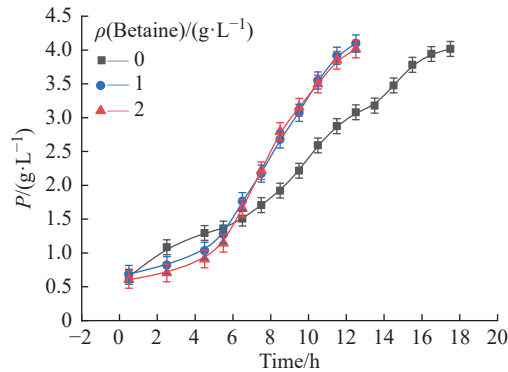
Fig. 2 Effects of different betaine mass concentrations on the physiological metabolism of *H. elongata*

图 3 1.0 g/L 和 2.0 g/L 甜菜碱条件下对延长盐单胞菌产物依克多因合成的影响

Fig. 3 Effects of 1.0 g/L and 2.0 g/L betaine on the ectoine biosynthesis of *H. elongata*

体作用机制。

2.3 动力学模型阐释甜菜碱的代谢规律

2.3.1 菌体生长动力学模型 按式(1)对添加 0、0.5 g/L 和 1.0 g/L 甜菜碱的生物量参数进行菌体生长动力学拟合,得到方程分别如式(3)~式(5)所示:

$$X = \frac{1.952 \times e^{0.253t}}{1 - 0.090 \times (1 - e^{0.253t})} \quad (3)$$

$$X = \frac{1.897 \times e^{0.346t}}{1 - 0.086 \times (1 - e^{0.346t})} \quad (4)$$

$$X = \frac{2.018 \times e^{0.360t}}{1 - 0.090 \times (1 - e^{0.360t})} \quad (5)$$

如表 3 所示,菌体生长动力学模型(式(1))的拟合优度 ($R^2 > 0.995$) 及最大比生长速率 (μ_{max}) 预测误差

表 3 不同质量浓度甜菜碱条件下菌体生长动力学参数
Table 3 Growth kinetic parameters of *H. elongata* with different betaine mass concentrations

$\rho(\text{Betaine})/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	$X_0/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	$X_m/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	$\mu_{\text{max}}/\text{h}^{-1}$	R^2
0	1.952	21.773	0.253 ± 0.002	0.996
0.5	1.897	22.058	0.346 ± 0.004	0.995
1.0	2.018	22.345	0.360 ± 0.004	0.995

($\pm 1\%$)表明,该模型能够精确表征 *H. elongata* 的生长特性。添加 0.5 g/L 和 1.0 g/L 甜菜碱的实验组,最大比生长速率分别为 0.346 h^{-1} 和 0.360 h^{-1} ,相较于未添加甜菜碱的对照组,分别提高了 0.36 倍和 0.42 倍,说明甜菜碱的添加显著促进了延长盐单胞菌在高盐胁迫环境下的菌体生长。

2.3.2 产物合成动力学模型 根据式(2),对添加 0、0.5 g/L 和 1.0 g/L 甜菜碱的依克多因代谢参数进行产物合成动力学模拟方程分别如式(6)~式(8)所示:

$$P = P_0 + 0.1447(X - X_0) + 0.3012 \ln[1 - 0.090 \times (1 - e^{0.253t})] \quad (6)$$

$$P = P_0 + 0.1233(X - X_0) + 0.4463 \ln[1 - 0.086 \times (1 - e^{0.346t})] \quad (7)$$

$$P = P_0 + 0.0767(X - X_0) + 0.8938 \ln[1 - 0.090 \times (1 - e^{0.360t})] \quad (8)$$

基于产物合成动力学模型的参数解析结果(表 4)表明, *H. elongata* 的依克多因生物合成呈现典型生长

表 4 不同质量浓度甜菜碱条件下产物合成动力学模拟参数
Table 4 Product synthesis kinetic simulation parameters of *H. elongata* with different betaine mass concentrations

$\rho(\text{Betaine})/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	$P_0/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	α	β	R^2
0	0.6311	0.1447±0.0158	0.0035±0.0018	0.9822
0.5	0.5865	0.1233±0.0093	0.0070±0.0013	0.9947
1.0	0.6896	0.0767±0.0185	0.0144±0.0028	0.9847

偶联型特征。在未添加甜菜碱的对照组中, $\alpha(0.1447)$ 显著高于 $\beta(0.0035)$, 证实依克多因合成与菌体生长存在强偶联关系。值得注意的是, 随着甜菜碱质量浓度增加, 代谢关联模式发生动态转变: α 值分别下降至 0.1233 和 0.0767, 而 β 值则上升至 0.0070 和 0.0144, 这表明甜菜碱的添加使依克多因合成逐渐脱离严格的生长偶联模式, 转向部分生长关联型代谢特征。

由于 *H. elongata* 从低渗种子培养基 (8% NaCl) 转接至高渗发酵环境 (13% NaCl) 时, 胞内渗透压应激响应系统迅速激活, 启动依克多因的爆发式合成以应对离子强度剧变^[5]。然而外源甜菜碱的介入打破了这一生理适应机制: 在发酵初期, 甜菜碱作为高效相容性溶质被优先吸收, 通过直接渗透保护作用降低细胞合成依克多因的代谢负荷, 从而将更多碳

源分配至生物量积累。随着胞内甜菜碱库容趋于饱和, 菌体重新启动依克多因合成途径以维持渗透稳态。基因组注释结果显示 *H. elongata* 中存在编码甜菜碱/脯氨酸转运蛋白的基因 (HELO_RS12995, HELO_RS13000), 表明其能够直接利用环境中的甜菜碱作为胞内的渗透平衡物质, 以应对高渗胁迫环境。

为了进一步验证甜菜碱对于 *H. elongata* 生长和产物合成的阶段性影响, 统计了不同质量浓度 (0, 0.5 g/L 和 1.0 g/L) 甜菜碱条件下 *H. elongata* 在不同发酵时期的碳源利用情况, 结果如图 4 和表 5 所示。在延滞期, 对照组的产物合成占碳源利用率的 30%, 而添加 1.0 g/L 甜菜碱条件下的产物碳源利用率仅为 15%, 此时甜菜碱中更多的碳源流向菌体生长, 碳源利用率达到 59%, 而对对照组的利用率仅为 47%。表明甜菜碱的添加使得 *H. elongata* 在延滞期直接吸收培养基中的甜菜碱作为渗透保护物质, 减缓依克多因的合成, 使得更多的碳源流向细胞生长。而随着发酵过程的进行, 甜菜碱造成的碳源流向差异逐渐减弱, 并在指数中后期和对照组趋于一致, 说明此时依克多因的合成不受甜菜碱添加的影响, 已恢复正常合成状态。

2.4 胞内代谢物解析甜菜碱的作用机理

为了进一步解析甜菜碱影响 *H. elongata* 生理代

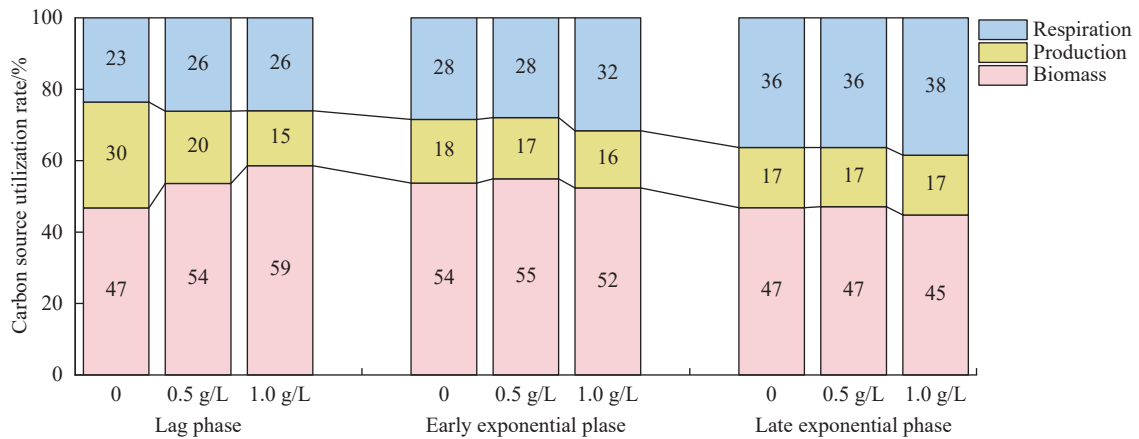


图 4 不同质量浓度甜菜碱条件下延长盐单胞菌在不同发酵时期的碳源利用情况

Fig. 4 Carbon source utilization of *H. elongata* at different fermentation stages with different betaine mass concentrations

表 5 不同甜菜碱浓度条件下延长盐单胞菌在不同生长时期的碳源利用率统计

Table 5 Statistical analysis of carbon source utilization rate at different growth stages under various betaine concentrations

Growth phase	Carbon utilization at growth and maintenance/(mmol·L ⁻¹)			Carbon utilization at product synthesis/(mmol·L ⁻¹)			Carbon utilization at cytosolic respiration/(mmol·L ⁻¹)		
	0	0.5 g/L	1.0 g/L	0	0.5 g/L	1.0 g/L	0	0.5 g/L	1.0 g/L
Lag	24.36	34.97	45.02	15.50	13.11	11.82	12.26	17.07	20.11
Early exponential	59.71	91.97	101.18	19.85	28.64	30.85	31.61	46.75	61.04
Late exponential	124.91	129.78	125.13	45.04	45.59	46.85	96.72	99.98	107.41

谢的作用机制,在不添加甜菜碱和添加 1.0 g/L 甜菜碱条件下,设置了延滞期(1)、指数生长前期(2)和指数生长后期(3),考察甜菜碱对 *H. elongata* 不同生理状态下的代谢影响,结果如图 5 所示。由图可得,如

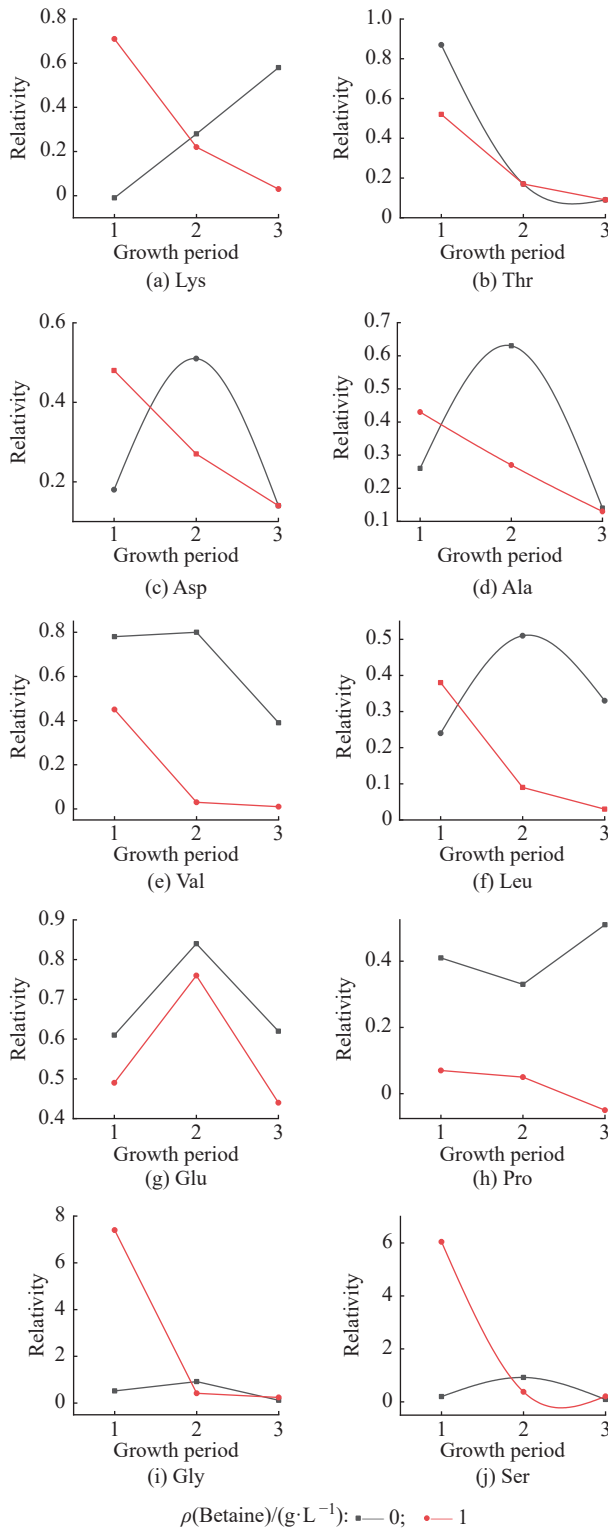


图 5 外源添加甜菜碱条件下延长盐单胞菌胞内代谢物池的变化

Fig. 5 Changes of intracellular metabolite pools under exogenous betaine addition

图 5 所示,赖氨酸(Lys)、苏氨酸(Thr)与依克多因作为天冬氨酸族(Asp)衍生物的胞内代谢池水平均呈现同步降低趋势。在甜菜碱添加条件下,天冬氨酸节点的碳骨架被显著导向依克多因的生物合成,导致其自身代谢池快速消耗。这一现象表明,随着发酵进程的推进,依克多因合成途径的代谢通量占据主导地位,从而削弱了 Lys 与 Thr 的合成能力。代谢通量的竞争性分配可能归因于 Asp 代谢网络节点的优先级调控,使得碳源流向更倾向于相容性溶质依克多因的生成,而非传统氨基酸的生物合成,进一步佐证了依克多因途径在该代谢分支中的竞争优势。

进一步通过代谢物池分析揭示了甜菜碱对 *H. elongata* 中心碳代谢网络的影响机制。丙氨酸(Ala)、缬氨酸(Val)和亮氨酸(Leu)作为丙酮酸衍生型氨基酸,其代谢池在甜菜碱添加组显著降低($p < 0.05$),这说明丙酮酸节点代谢通量由氨基酸合成路径向 TCA 循环发生迁移。该代谢通量变化在丝氨酸(Ser)、甘氨酸(Gly)代谢池中得到进一步验证:延滞期实验组中 Ser/Gly 代谢池是对照组的 21.9 倍($p < 0.01$),这与嗜盐微生物经甜菜碱裂解酶系统产生的回补机制相吻合^[29]。具体而言,甜菜碱通过 β -裂解途径生成甘氨酸,并经丝氨酸羟甲基转移酶(SHMT)催化生成丝氨酸,后者通过丝氨酸脱水酶回补 EMP 途径^[30]。

值得注意的是,随着指数生长期到来,实验组 Ser/Gly 代谢池逐渐与对照组趋同,表明外源甜菜碱对中心碳代谢的影响呈现阶段性特征。从生物能学角度分析,高渗环境(1.5 mol/L NaCl)显著抑制 *H. elongata* 的钠离子梯度依赖型 ATP 合成效率^[31],通过增强 TCA 循环通量提高 NADH/FADH₂ 再生速率,能够有效维持质子驱动力和氧化磷酸化效率^[32]。这一能量代谢理论证明甜菜碱在 *H. elongata* 盐适应机制中发挥重要作用。

3 结 论

本研究针对 *H. elongata* 在高盐胁迫下生长受抑制的瓶颈问题,系统筛选了可缓解盐抑制效应的保护因子,结果表明甜菜碱为最优渗透调节剂。进一步进行宏观参数和代谢动力学建模分析,结果表明甜菜碱添加后能够显著提高 *H. elongata* 最大比生长速率和呼吸强度。碳分布统计结果表明甜菜碱添加后依克多因合成在延滞期明显减弱,碳代谢向细胞菌体生长迁移。胞内关键代谢物分析表明,甜菜碱的添加显著降低丙氨酸、缬氨酸和亮氨酸水平,揭示

其可能通过增强 TCA 循环代谢通量以提升盐适应能力。本研究证实甜菜碱的添加在发挥其渗透保护剂功能的同时,能够改善高盐胁迫条件下细胞的呼吸作用和能量代谢,实现了渗透胁迫响应与生物量合成的代谢平衡,为构建高盐环境下嗜盐菌高效表达体系提供了理论依据与工艺优化策略。

参考文献:

- [1] GUNDE-CIMERMAN N, PLEMENITAS A, OREN A. Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations[J]. *Fems Microbiology Reviews*, 2018, 42(3): 353-375.
- [2] OREN A. Life at high salt concentrations, intracellular KCl concentrations, and acidic proteomes[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2013, 4: 315-328.
- [3] 庄滢潭, 刘芮存, 陈雨露, 等. 极端微生物及其应用研究进展 [J]. *中国科学: 生命科学*, 2022, 52(2): 204-222.
- [4] TANIMURA K, NAKAYAMA H, TANAKA T, *et al.* Ectoine production from lignocellulosic biomass-derived sugars by engineered *Halomonas elongata*[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 142: 523-529.
- [5] YU J, WANG Z, WANG J, *et al.* Physiological metabolic topology analysis of *Halomonas elongata* DSM 2581^T in response to sodium chloride stress[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2022, 119(12): 3509-3525.
- [6] GARCIA-ESTEPA R, ARGANDONA M, REINA-BUENO M, *et al.* The *ectD* gene, which is involved in the synthesis of the compatible solute hydroxyectoine, is essential for thermoprotection of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(11): 3774-3784.
- [7] EIBERWEISER A, NAZET A, KRUCHININ S E, *et al.* Hydration and ion binding of the osmolyte ectoine[J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2015, 119(49): 15203-15211.
- [8] ROYCHOUDHURY A, HAEUSSINGER D, OESTERHELT F. Effect of the compatible solute ectoine on the stability of the membrane proteins[J]. *Protein and Peptide Letters*, 2012, 19(8): 791-794.
- [9] KANAPATHIPILLAI M, LENTZEN G, SIERKS M, *et al.* Ectoine and hydroxyectoine inhibit aggregation and neurotoxicity of Alzheimer's β -amyloid[J]. *Febs Letters*, 2005, 579(21): 4775-4780.
- [10] PASTOR J M, SALVADOR M, ARGANDONA M, *et al.* Ectoines in cell stress protection: Uses and biotechnological production[J]. *Biotechnology Advances*, 2010, 28(6): 782-801.
- [11] LAPIDOT A, BEN-ASHER E, EISENSTEIN M. Tetrahydropyrimidine derivatives inhibit binding of a tat-like, arginine-containing peptide, to HIV TAR RNA *in vitro*[J]. *FEBS Letters*, 1995, 367(1): 33-38.
- [12] ZHAO Q, LI S, LV P, *et al.* High ectoine production by an engineered *Halomonas hydrothermalis* Y2 in a reduced salinity medium[J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 1-12.
- [13] SAUER T, GALINSKI E A. Bacterial milking: A novel bioprocess for production of compatible solutes[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1998, 57(3): 306-313.
- [14] NAKAYAMA H, KAWAMOTO R, MIYOSHI K, *et al.* Ectoine production from putrefactive non-volatile amines in the moderate halophile *Halomonas elongata* [J]. *Iop Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2020, 439(1): 1-15.
- [15] KHANH H C, KAOTHIEN-NAKAYAMA P, ZOU Z, *et al.* Metabolic pathway engineering of high-salinity-induced overproduction of *L*-proline improves high-salinity stress tolerance of an ectoine-deficient *Halomonas elongata*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2024, 90(9): e0119524.
- [16] KHANH H C, KAOTHIEN-NAKAYAMA P, ZOU Z, *et al.* Expression of an engineered salt-inducible proline biosynthetic operon in a glutamic acid over-producing mutant, *Halomonas elongata* GOP, confers increased proline yield due to enhanced growth under high-salinity conditions[J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2024, 88(10): 1233-1241.
- [17] GRAMMANN K, VOLKE A, KUNTE H J. New type of osmoregulated solute transporter identified in halophilic members of the *Bacteria* domain: TRAP transporter TeaABC mediates uptake of ectoine and hydroxyectoine in *Halomonas elongata* DSM 2581^T[J]. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(11): 3078-3085.
- [18] SAKAMOTO A, MURATA N. Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in plants: Current status and implications for enhancement of stress tolerance[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2000, 51(342): 81-88.
- [19] Chen T H H, MURATA N. Glycinebetaine protects plants against abiotic stress: Mechanisms and biotechnological applications[J]. *Plant Cell and Environment*, 2011, 34(1): 1-20.
- [20] YANCEY P H. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2005, 208(15): 2819-2830.
- [21] DIAMANT S, ELIAHU N, ROSENTHAL D, *et al.* Chemical chaperones regulate molecular chaperones *in vitro* and in cells under combined salt and heat stresses[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(43): 39586-39591.
- [22] LI K T, LIU D H, LI Y L, *et al.* Improved large-scale production of vitamin B12 by *Pseudomonas denitrificans* with betaine feeding[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(17): 8516-8520.
- [23] ZHANG M, ZHANG H, LI H, *et al.* Antioxidant mechanism of betaine without free radical scavenging ability[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(42): 7921-7930.
- [24] MCNEIL S D, NUCCIO M L, HANSON A D. Betaines

- and related osmoprotectants: Targets for metabolic engineering of stress resistance[J]. *Plant Physiology*, 1999, 120(4): 945-949.
- [25] LIU P, WANG S, LI C, *et al.* Dynamic response of *Aspergillus niger* to periodical glucose pulse stimuli in chemostat cultures[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2021, 118(6): 2265-2282.
- [26] 王俊, 杨丹燕. 表面活性剂、渗透压保护剂与氧载体对阿卡波糖生物合成的影响 [J]. *化工管理*, 2019(26): 179-180.
- [27] 陈东, 郭佳, 马思丽. 渗透压对林可霉素发酵效价影响的研究 [J]. *当代化工研究*, 2024(4): 32-34.
- [28] 张悦, 刘昊, 刘玮, 等. 延长盐单胞菌生产依克多因高密度发酵工艺优化 [J]. *华东理工大学学报(自然科学版)*, 2025, 51(1): 50-59.
- [29] LIU M, LIU H, MEI F, *et al.* Identification of the biosynthetic pathway of glycine betaine that is responsible for salinity tolerance in halophilic *thioalkalivibrio versutus* D301[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 875-891.
- [30] ZOU H, CHEN N, SHI M, *et al.* The metabolism and biotechnological application of betaine in microorganism [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(9): 3865-3876.
- [31] OREN A. Molecular ecology of extremely halophilic archaea and bacteria[J]. *Fems Microbiology Ecology*, 2002, 39(1): 1-7.
- [32] KAILA V R I, WIKSTROM M. Architecture of bacterial respiratory chains[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2021, 19(5): 319-330.

Analysis of the Metabolic Mechanism for the Enhancement of High Salt Acclimatization of *Halomonas elongata* Mediated by Betaine

LIU Hao, ZHANG Yue, JU Runlin, YIN Xiaojian, YU Junxiong, WANG Zejian

(School of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: In this study, to address the bottleneck problem of growth inhibition under high salt stress in *Halomonas elongata*, we conducted a systematic selection of protective factors that could relieve the effect of salt stress inhibition. The results showed that the addition of betaine was able to increase the biomass by 18%, which was significantly better than that achieved with other osmotic regulators. Furthermore, metabolic kinetic modeling analysis showed that the maximum specific growth rate (μ_{\max}) of the bacterium significantly increased by 42% after the betaine addition, and the respiratory intensity increased by 118%. Carbon distribution statistics showed that ectoine synthesis was significantly weakened during the delayed phase after betaine addition, and carbon metabolism was shifted toward growth of the cells. Finally, the analysis of intracellular key metabolites showed that the addition of betaine significantly reduced the levels of alanine, valine and leucine, revealing that it may enhance the salt adaptation capacity of *Halomonas elongata* by strengthening the metabolic flux of the tricarboxylic acid (TCA) cycle. This study provides a theoretical basis and process optimization strategy for the construction of an efficient expression system for halophilic bacteria in high salt environment.

Key words: *Halomonas elongata*; salt stress; betaine; metabolic kinetics modeling; metabolite analysis

(责任编辑: 王晓丽)