2025, 65(10): 4621-4636
CSTR: 32112.14.j.AMS.20250237
DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.20250237

微生物学报
Acta Microbiologica Sinica
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

Research Article 研究报告

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

逯心玥[1]，李昊鑫[1]，张培霞[1]，师博涵[1]，李永臻[1]，王嵘[1]，朱德锐[1]，韩睿[2*]

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

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 Xinyue, LI Haoxin, ZHANG Peixia, SHI Bohan, LI Yongzhen, WANG Rong, ZHU Derui, HAN Rui. Targeted metabolomics reveals changes in metabolic pathways related to ectoine in *Halomonas* cultured with aspartate[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(10): 4621-4636.

摘　要：【目的】添加 9 种不同氨基酸培养坎帕尼亚盐单胞菌(*Halomonas campaniensis*) XH26，分析菌株的生长情况与胞内四氢嘧啶(ectoine)的积聚量差异，明确最适氨基酸前体对菌株 XH26 四氢嘧啶的合成代谢通路的影响。【方法】在最适盐浓度(1.5 mol/L)条件下，以 9 种氨基酸(L-谷氨酸钠、L-谷氨酰胺、L-天冬氨酸、L-天冬酰胺、L-组氨酸、L-色氨酸、L-甘氨酸、L-丝氨酸和 L-赖氨酸)作为培养基的单一碳/氮源，设置氨基酸浓度梯度范围为 20−50 mmol/L (间隔 5 mmol/L)，筛选四氢嘧啶积聚量最高的最适氨基酸及其作用浓度。设置 L-天冬氨酸低浓度组[low group (L), 20 mmol/L]、中浓度组[medium group (M), 35 mmol/L]和高浓度组[high group (H), 50 mmol/L]进行靶向代谢组学测序与分析。【结果】四氢嘧啶合成量随氨基酸浓度梯度先增加后降低，并在最适(30 mmol/L 或 35 mmol/L)浓度时达到最高。代谢组学分析显示，分别筛选出 28 个(L *vs*. M)、27 个(L *vs*. H)和 26 个(H *vs*. M)显著差异代谢物，如甘油酸、乳糖、腺苷 5′-单磷酸、α-酮戊二酸、葡萄糖-1-磷酸、延胡索酸、柠檬酸等。KEGG 代谢通路富集分析发现 L-丙氨酸、L-天冬氨酸和 L-谷氨酸代谢通路是最显著的富集通路。【结论】靶向代谢组学技术分析细菌胞内差异代谢物发现，菌株 XH26 通过天冬氨酸-丙氨酸轴和精氨酸-脯氨酸代谢轴实现氮稳态与能量供应的再平衡。

关键词：坎帕尼亚盐单胞菌；靶向代谢组学；四氢嘧啶；能量代谢

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: 2025-03-24; Accepted: 2025-04-29; Published online: 2025-05-27

Targeted metabolomics reveals changes in metabolic pathways related to ectoine in *Halomonas* cultured with aspartate

LU Xinyue[1], LI Haoxin[1], ZHANG Peixia[1], SHI Bohan[1], LI Yongzhen[1], WANG Rong[1], ZHU Derui[1], HAN Rui[2*]

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] We systematically analyzed the growth and compared the ectoine accumulation of *Halomonas campaniensis* XH26 cultured with nine different amino acids, aiming to clarify the optimal amino acid for ectoine accumulation of strain XH26. **[Methods]** Under the optimal salt concentration of 1.5 mol/L, nine amino acids (L-monosodium glutamate, L-glutamine, L-aspartic acid, L-asparagine, L-histidine, L-tryptophan, L-glycine, L-serine, and L-lysine) were selected as the single carbon/nitrogen source of the culture medium and added within the concentration range of 20−50 mmol/L (interval of 5 mmol/L), on the basis of which the optimal concentration and optimal amino acid for ectoine accumulation were screened. L-aspartic acid was selected to culture the cells at low (L, 20 mmol/L), medium (M, 35 mmol/L), and high (H, 50 mmol/L) concentrations for targeted metabolomics sequencing and analysis. **[Results]** The amount of ectoine synthesis first increased and then decreased as the amino acid concentration increased and reached the highest at optimum concentration (30/35 mmol/L). Metabolomics analysis screened out 28 (L *vs*. M), 27 (L *vs*. H), and 26 (H *vs*. M) significantly differential metabolites, such as glyceric acid, lactose, adenosine 5′-monophosphate, α-ketoglutaric acid, glucose-1-phosphate, fumaric acid, and citric acid. KEGG metabolic pathway enrichment analysis showed that L-alanine, L-aspartic acid, and L-glutamate metabolic pathways were the most significantly enriched pathways. **[Conclusion]** Targeted metabolomics of differential metabolites of bacteria discovers that the strain achieves a rebalance between nitrogen homeostasis and energy supply through the aspartate-alanine axis and the arginine-proline metabolic axis.

Keywords: *Halomonas campaniensis*; targeted metabolomics; ectoine; energy metabolism

目前，代谢组学(metabonomics/metabolomics)技术已广泛用于胞内各类化合物的关键代谢途径、代谢节点和代谢流调控分析，是合成生物学和系统代谢工程的研究热点[1]。根据研究目的不同，代谢组学分为非靶向代谢组学(untargeted metabolomics, uTM)和靶向代谢组学(targeted metabolomics, TM) 2 种。uTM 化合物覆盖率高(几乎所有)，但准确度低、针对性较弱；而 TM 具有较高的数据准确性和可靠性，尤其适用于针对特定的代谢通路和代谢物[2]。Ouyang 等[3]利用 uTM 技术分析眼虫藻(*Euglena gracilis*)和需钠弧菌(*Vibrio natriegens*)的共生分子机制，发现藻-菌共培养后细菌胞内代谢物显著增加，如甲基氨基甲酸、四氢嘧啶(ectoine)、胆碱、龙胆碱(gentianine)、4R-氨基戊酸、L-谷氨酸和 L-缬氨酸等，表明藻-菌共培养系统具有互惠共生作用。

Joghee 等[4]利用 TM 技术分析嗜盐细菌在盐胁迫条件下的显著差异代谢物(significantly differential metabolites, SDM)，结果显示在中等盐度条件(5% NaCl)下核苷酸及其衍生物[如腺嘌呤、腺苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)和还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NADH)]有所增加；而在高盐浓度(10% NaCl)时核苷酸、维生素、芳香族氨基酸(如 L-苯丙氨酸、L-酪氨酸和 L-色氨酸)和支链氨基酸(L-亮氨酸、L-异亮氨酸和 L-缬氨酸)的含量水平有所下降。

四氢嘧啶是一类积聚于好氧耐盐/嗜盐微生物胞内的具有亲水性和两性离子特征的相容溶质有机化合物[5]。其主要合成途径为：草酰乙酸→L-天冬氨酸→天冬氨酸-β-半缩醛→醛氨酸→草酰乙二氨基丁酸→N-γ-乙酰二氨基丁酸→四氢嘧啶[6]。研究表明四氢嘧啶的生物合成与天冬氨酸(aspartate, Asp)和天冬氨酸半醛(L-aspartate-4-semialdehyde, ASA)代谢直接相关，同时与氨基酸及其衍生物[如 L-谷氨酸(L-glutamate, Glu)、L-谷氨酰胺(L-glutamine, Gln)和 L-天冬酰胺(L-asparagine, Asn)]以及 TCA 循环中的柠檬酸(citric acid)、苹果酸(malic acid)和草酰乙酸(oxaloacetic acid, OAA)等代谢物间接相关[7-9]。然而，菌株 XH26 胞内差异代谢物是否与四氢嘧啶的代谢通路存在关联，四氢嘧啶特定代谢通路(如 L-天冬氨酸、L-丙氨酸、L-谷氨酸、L-脯氨酸等)的动态变化以及氨基酸浓度梯度如何动态调控代谢通量分配及合成效率的机制仍不明确，有待深入探究。由于目标代谢物种类明确，且需要对差异代谢物进行高灵敏度和高准确度的定量比较，靶向代谢组学技术相较于非靶向代谢组学更能满足本研究对数据可靠性与生物学解释力的要求。因此，本研究以坎帕尼亚盐单胞菌(*Halomonas campaniensis*) XH26 菌株为研究对象，通过靶向代谢组学技术并结合多元统计分析与 KEGG 通路富集分析研究不同 L-天冬氨酸浓度梯度条件下的代谢物差异，探究影响四氢嘧啶合成的关键差异代谢物及代谢应答机制，以期为构建高产四氢嘧啶的工程菌株奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株来源与培养条件

野生盐单胞菌株 *H. campaniensis* sp. XH26 (CCTCC M2019776M)分离自小柴旦盐湖。菌株 XH26 培养基(g/L)[10]：L-谷氨酸钠 5.61，酶水解酪素 7.50，NaCl 87.50 (最适盐浓度 1.5 mol/L)，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 24.65，柠檬酸钠 3.00，无水 $CaCl_2$ 0.20，KCl 55.88，酵母 2.00。菌株接种量为 1%，培养时间为 48 h，pH 8.0，温度 35 ℃。

1.2 主要试剂和仪器

分析纯 L-谷氨酸钠和酶水解酪素，天津市永大化学试剂有限公司；分析纯 NaCl 和 KCl，北京索莱宝科技有限公司；乙腈，赛默飞世尔科技公司；HPLC 级四氢嘧啶标准品，Fluka 公司；HPLC 级甲醇，ThermoFisher Scientific 公司。

微孔过滤器，天津亳津科技有限公司；冷冻研磨仪，上海万柏生物科技有限公司；色谱分析柱，Merck 公司；紫外分光光度计，上海舜宇恒平科学仪器有限公司；高效液相色谱仪，Agilent 公司；液相质谱联用仪，SCIEX 公司；液相色谱柱，Waters 公司。

1.3 菌株生长和四氢嘧啶检测

基于最适盐浓度(1.5 mol/L)条件下，分别以 L-谷氨酸钠、L-谷氨酰胺、L-天冬氨酸、L-天冬酰胺、L-组氨酸、L-色氨酸、L-甘氨酸、L-丝氨酸和 L-赖氨酸为培养基单一碳/氮源氨基酸，设置氨基酸浓度梯度范围为 20−50 mmol/L (间隔 5 mmol/L)。活化菌液(OD_{600} 约为 1.20)按 1% 的接种量分别转接至摇瓶内(n=3)，37 ℃、180 r/min 摇床培养 24 h，紫外分光光度计测定菌液光度密度值(OD_{600})，并提取菌株胞内四氢嘧啶进行 HPLC 定量分析。HPLC 检测条件：流动相乙腈/水=80/20 (体积比)，流速 1.0 mL/min，

柱温 30 ℃，检测波长 210 nm，进样量 5 μL。最后以培养时间(t)为横坐标，以 OD_{600} 值与四氢嘧啶产量为纵坐标，绘制菌株生长和四氢嘧啶产量的关系曲线。

1.4 制备代谢组学样本

L-天冬氨酸对菌株 XH26 胞内四氢嘧啶积聚量的促进效率最高，由此选择最低(20 mmol/L)、最适(35 mmol/L)以及最高(50 mmol/L)浓度梯度分别作为低浓度组[low group (L)]、中浓度组[medium group (M)]和高浓度组[high group (H)]进行靶向代谢组学分析。精确称取 10 mg 样本，加入一颗钢珠，加入 500 μL 90% 甲醇，冷冻研磨仪研磨 6 min (−10 ℃、50 Hz)，4 ℃、14 000×g 离心 20 min，取上清液 20 μL 至 1.5 mL 离心管氮气吹干，加入 50 μL 50% 乙腈水溶液，涡旋 1 min，然后瞬离 5 s，加入 30 μL 10 mg/mL 丹磺酰氯溶液(丹磺酰氯用 15 mL 离心管配制)和 40 μL 0.5 mol/L Na_2CO_3-NH_4HCO_3 缓冲液(用 15 mL 离心管配制)，封口并迅速涡旋 1 min，然后瞬时离心 5 s，恒温振荡器 60 ℃、110 r/min 反应 30 min。反应完成后常温静置 5 min，然后瞬离 5 s，加入 10 μL 0.25 mol/L NaOH 溶液，涡旋 1 min，然后瞬时离心 5 s，再次恒温振荡器 60 ℃、110 r/min 反应 10 min。反应完成后恢复至室温(静置 5 min)，加入 70 μL 10% 甲酸溶液，涡旋 1 min，4 ℃、14 000×g 离心 15 min，取上清液至进样小瓶，上机检测。

1.5 质谱检测与数据质控

采用 LC-ESI-MS/MS 对样品中的目标物进行定性定量检测。色谱条件：ExionLC AD system，柱温 40 ℃，进样量 2 μL。流动相 A (0.1% 甲酸水)，流动相 B (0.1% 甲酸甲醇)。质谱条件：SCIEX QTRAP 6500+，采用正模式检测，Curtain Gas (CUR) 为 35，Collision Gas (CAD) 为 Medium，IonSpray Voltage (IS) 为 +5 000，Temperature (TEM)为 350，Ion Source Gas1 (GS1)为 60，Ion Source Gas2 (GS2)为 60。上机完成之后，LC-MS 原始数据导入 Progenesis QI (Waters 公司)进行基线过滤、峰识别、积分、保留时间校正、峰对齐，最终得到一个保留时间、质荷比和峰强度的数据矩阵。采用 R 软件(v.1.6.2) ropls 包进行主成分分析(principal components analysis, PCA)和正交最小偏二乘判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)预处理后数据矩阵，并使用循环交互(n=7)评估模型的稳定性。利用 OPLS-DA 模型得到的变量权重值(variable importance in the projection, VIP)和 Student's t 检验 P 值，VIP>1，P<0.05 的代谢物为显著差异代谢物。利用 KEGG (http://www.kegg.jp)进行差异代谢物通路注释。Python 软件(v.3.11.3) scipy.stats 包进行通路富集分析，并通过 Fisher 精确检验获得与实验处理最相关的生物学途径。

1.6 数据处理

利用 Origin 软件(v.8.6)和 Adobe Illustrator (v.29.3.1)软件绘制实验图形，SPSS (v.27.0)软件中方差分析(analysis of variance, ANOVA)计算组间差异(显著性水平 α 设为 0.05)。原始代谢数据经过偏差过滤、填补缺失值和归一化等处理，再利用 MetaboAnalyst (v.6.0)对不同菌株样品之间的代谢物进行比较分析。

2 结果与分析

2.1 添加 9 种不同氨基酸培养菌株 XH26 与胞内四氢嘧啶的积聚量分析

在最适盐度(1.5 mol/L)培养基中添加不同浓度的氨基酸(L-谷氨酸钠、L-谷氨酰胺、L-天冬氨酸、L-天冬酰胺、L-赖氨酸、L-色氨酸、L-甘氨酸、L-丝氨酸和 L-组氨酸)，培养盐单胞菌菌株 XH26 (48 h)，并检测菌株胞内四氢嘧啶的积聚量和生长曲线(图 1)。结果显示，随着氨基酸浓度的增加，菌株 XH26 胞内四氢嘧啶的积聚量均呈先增加后减少的变化趋势。当 Gln、Asp、Gly 和 Ser 的浓度为 20−35 mmol/L 时菌株胞内的四

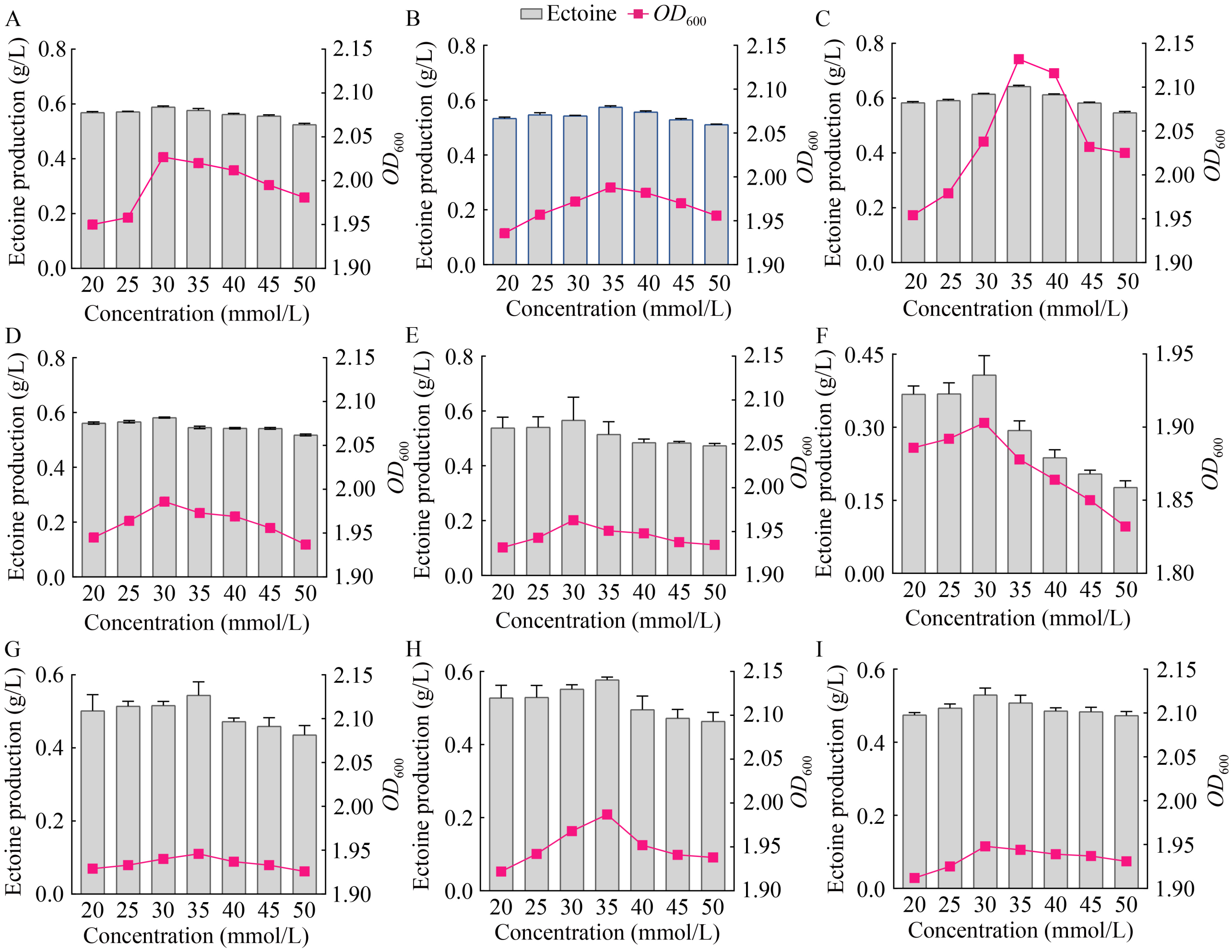

图1　添加9种不同氨基酸培养菌株XH26与胞内四氢嘧啶的积聚量分析

Figure 1　Analysis of intracellular ectoine accumulation in strain XH26 cultured with nine different amino acids. A: L-monosodium glutamate; B: L-glutamine; C: L-aspartic acid; D: L-asparagine; E: L-lysine; F: L-tryptophan; G: L-glycine; H: L-serine; I: L-histidine.

氢嘧啶积聚量呈上升趋势，且在35 mmol/L时达到最大值，分别为0.58、0.64、0.54和0.58 g/L；随着氨基酸浓度的进一步增加菌株胞内的四氢嘧啶积聚量呈现下降趋势。当MSG、Asn、Lys、Trp和His的浓度为20−30 mmol/L时菌株胞内的四氢嘧啶积聚量呈上升趋势，且在30 mmol/L时达到最大值，分别为0.59、0.58、0.57、0.41和0.53 g/L；随着氨基酸浓度的进一步增加，菌株胞内的四氢嘧啶积聚量呈现下降趋势。菌株的生长趋势与四氢嘧啶含量的变化趋势相似，当氨基酸浓度过高时菌株的OD_{600}值和四氢嘧啶积聚量均同步下降。

2.2　HPLC检测四氢嘧啶的积聚量与代谢组样本靶向定量检测

抽提菌株XH26胞内四氢嘧啶，并利用HPLC分析四氢嘧啶积聚量的变化(图2A)。结果显示，四氢嘧啶的浓度在中浓度组(M)中达到最高，为0.61 g/L；低浓度组(L)和高浓度组(H)的浓度分别为0.50 g/L和0.48 g/L。统计分析表明，L组与H组之间存在一定差异(P<0.05)，而

M 组与 H 组及 L 组与 M 组之间差异显著(P<0.01)。采用 LC-ESI-MS/MS 法对 46 种已知氨基酸及其衍生物(图 2B)以及中心碳循环代谢物(图 2C)进行了准确定量，结果以浓度(ng/mg)表示，为后续代谢模式识别和机制探究提供了基础数据支持。在不同天冬氨酸浓度处理下，菌株胞内氨基酸及其衍生物和中心碳循环代谢物的含量发生了显著变化。M 组中，L-天冬氨酸、L-天冬酰

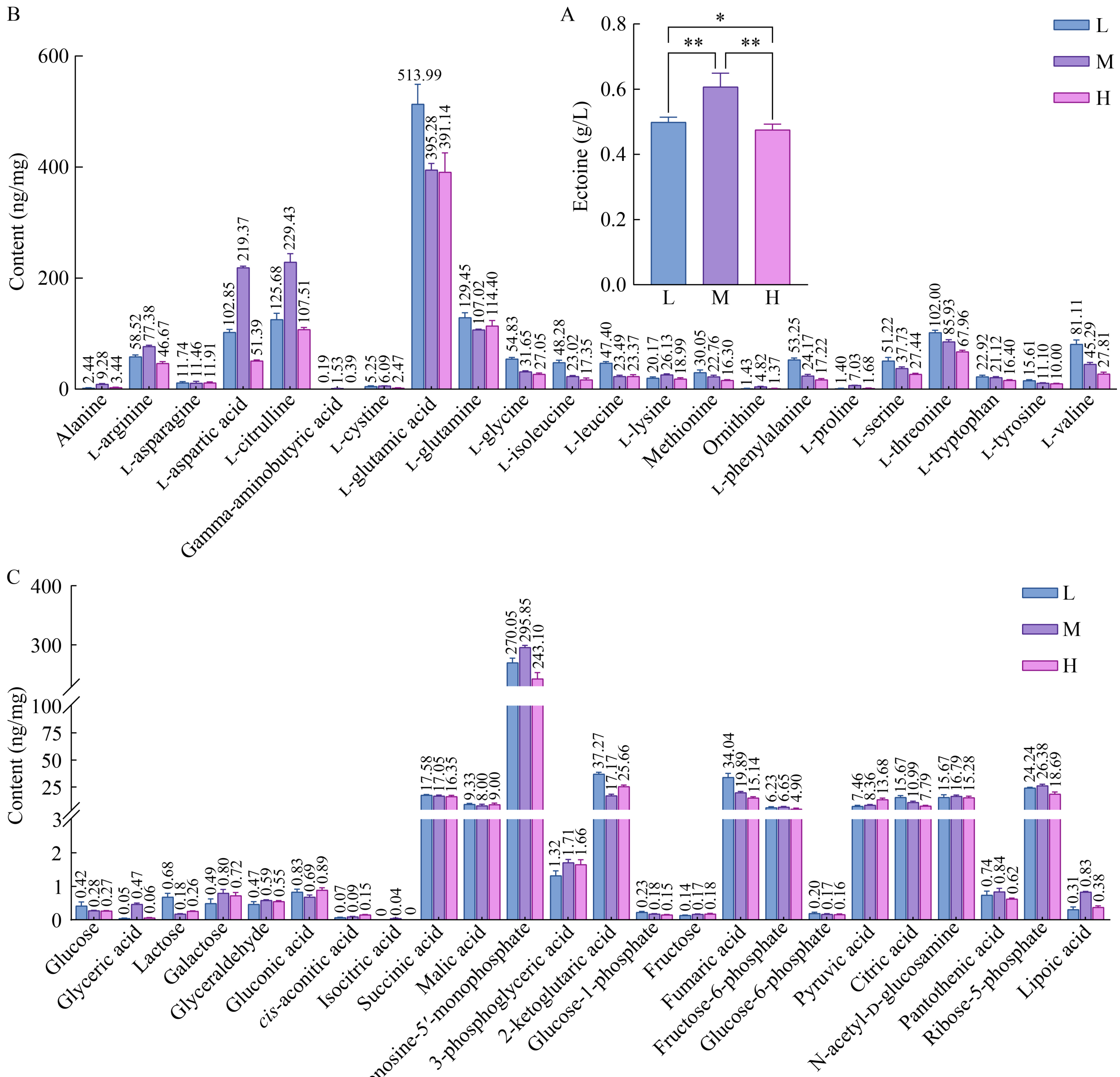

图2　不同天冬氨酸浓度下四氢嘧啶积聚量以及不同组间代谢物含量

Figure 2　Ectoine accumulation at different aspartate concentrations and metabolite contents among different groups. A: Intracellular ectoine accumulation of strain XH26 (*: P<0.05; **: P<0.01); B: Amino acids and their derivatives; C: Central carbon metabolism.

胺、L-赖氨酸、丙氨酸、3-磷酸甘油酸等含量升高，L-谷氨酸、L-谷氨酰胺、柠檬酸和α-酮戊二酸等含量降低；H 组中，L-谷氨酰胺、乳糖、葡萄糖酸和α-酮戊二酸等含量升高，其余大部分代谢物均呈降低趋势。

2.3 不同天冬氨酸浓度培养下代谢组样本多元统计分析

为系统揭示不同天冬氨酸浓度培养下代谢物的整体变化趋势与样本间差异性，基于多元统计分析对氨基酸及其衍生物和中心碳代谢两组代谢物进行模式识别(图 3)，进一步验证组间代谢差异的显著性与系统性特征。氨基酸及衍生物的 PCA 模型分析显示(图 3A)，第一主成分揭示了 37.4% 的代谢物信息，第二主成分揭示了 51.0% 的代谢物信息，对照组与实验组成分在空间分布上相对独立。PLS-DA 模型分析显示(图 3C)，主要得分 28.0%，正交得分 71.7%。中心碳代谢的 PCA 模型分析显示(图 3B)，第一主成分揭示了 40.6% 的代谢物信息，第二主成分揭示了 32.3% 的代谢物信息，对照组与实验组成分在空间分布上相对独立。PLS-DA 模型分析显示(图 3D)，主要得分 99.7%，正交得分 0.19%。对照组与实验组样本组内分布较为聚集，组间总体分布趋势相对独立，代谢物差异明显。R^2 和 Q^2 的值超过 0.4 通常被视为可接受的阈值，氨基酸及衍生物模型(图 3E)的 Q^2 值为 0.946，R^2Y 为 0.481，Q^2 的回归线截距为−0.495 9<0；中心碳循环模型(图 3F)的 Q^2 值为 0.479，R^2Y 为 0.488，Q^2 的回归线截距为−0.241 9<0，表明此模型无过度拟合现象，具有较好的可预测性和拟合度，可准确地描述数据。

2.4 筛选差异代谢物与聚类分析

为筛选出与四氢嘧啶积聚密切相关的关键代谢物，基于 OPLS-DA 模型筛选显著差异代谢物，并通过聚类分析比较不同组间代谢物上表达模式。结果显示，在 3 个比较组中分别筛选出 28 个(L *vs*. M)、27 个(L *vs*. H)和 26 个(H *vs*. M)显著差异代谢物(VIP>1, P<0.05，表 1)。甘油酸、乳糖、腺苷 5′-单磷酸、α-酮戊二酸、葡萄糖-1-磷酸、延胡索酸、柠檬酸、丙氨酸(alanine, Ala)、L-天冬酰胺(L-asparagine)、L-瓜氨酸(L-citrulline)、L-苯丙氨酸(L-phenylalanine)、L-苏氨酸(L-threonine)和 L-缬氨酸(L-valine)是共同差异代谢物。在中浓度组中甘油酸、腺苷 5′-单磷酸、L-天冬氨酸(L-aspartic acid)、L-天冬酰胺、丙氨酸和硫辛酸(lipoic acid)等上调。

利用 Origin 软件对不同天冬氨酸浓度组(L、M、H)的代谢物进行层次聚类分析(hierarchical cluster analysis，图 4)。结果显示，在 L 组中葡萄糖、葡萄糖-1-磷酸、L-酪氨酸、L-谷氨酸以及甲硫氨酸等显著上调；在 M 组中 L-天冬氨酸、L-天冬酰胺、L-赖氨酸、丙氨酸以及 L-脯氨酸等显著上调；在 H 组中，仅甘油酸和丙酮酸显著上调。整体来看代谢物表达在不同组间呈现明显差异，部分代谢物在中浓度组显著上调(红色区域)，而在高浓度组和低浓度组中表现为下调(蓝色区域)。此外，一些代谢物在低浓度组和高浓度组中具有相似的表达模式，而中浓度组的代谢特征较为独特，表现出与其他 2 组不同的聚类趋势。

2.5 KEGG 富集分析差异代谢物

为进一步解析差异代谢物在代谢网络中的生物学功能，利用 MetaboAnalyst 平台进行 KEGG 差异代谢物的富集分析，确定主要受影响的代谢途径，并绘制各比较组的气泡图(前 25 个，图 5)。结果显示，在 L *vs*. M 比较组中与菌株 XH26 胞内代谢相关的代谢物主要富集于精氨酸生物合成(arginine biosynthesis)、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成(valine, leucine and isoleucine biosynthesis)、乙醛酸和二羧酸代谢(glyoxylate and dicarboxylate metabolism)、TCA 循环(TCA cycle)及苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成(phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis)等通路。在 L *vs*. H 比较组中主要富

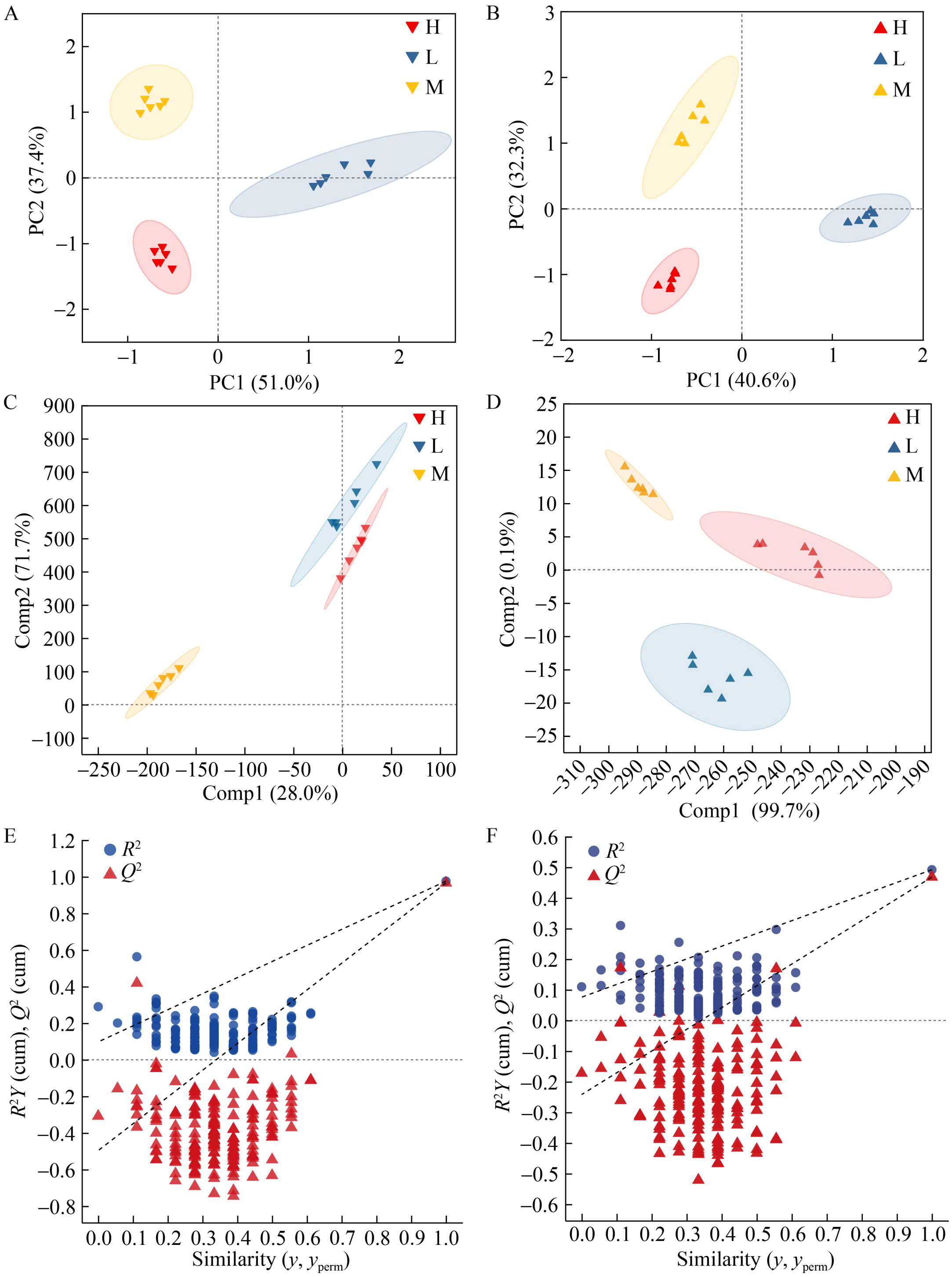

图3　代谢组学样本PCA得分图、PLS-DA得分图和置换检验结果

Figure 3　Metabolomics sample PCA score plot, PLS-DA score plot, and permutation test results. A: PCA of amino acids and their derivatives; B: PCA of central carbon metabolism; C: PLS-DA of amino acids and their derivatives; D: PLS-DA of central carbon metabolism; E: Permutation testing of amino acids and their derivatives; F: Permutation testing of central carbon metabolism.

表1　不同浓度处理下的差异代谢物

Table 1　Different metabolites under different concentration treatments

代谢物 Metabolite	VIP			*P* value
	L *vs*. M (A)	L *vs*. H (B)	H *vs*. M (C)	
甘油酸 Glyceric acid (GA)	1.275 57	1.044 03	1.249 10	0.05
乳糖 Lactose	1.233 39	1.251 95	1.239 97	0.05
半乳糖 Galactose	1.035 96	–	–	0.05
异柠檬酸 Isocitric acid	1.230 16	–	1.204 99	0.05
顺乌头酸 *cis*-aconitic acid	–	1.297 92	1.208 94	0.05
葡萄糖酸 Gluconic acid	–	–	1.098 68	0.05
腺苷 5′-单磷酸 Adenosine 5′-monophosphate (AMP)	1.181 32	1.133 22	1.217 46	0.05
3-磷酸甘油酸 3-phosphoglyceric acid (3-PGA)	1.122 55	1.044 00	–	0.05
α-酮戊二酸 2-ketoglutaric acid (α-KG)	1.274 38	1.298 10	1.217 49	0.05
葡萄糖-1-磷酸 Glucose-1-phosphate (G-1-P)	1.080 08	1.210 83	1.088 54	0.05
果糖 Fructose	1.165 38	1.220 86	–	0.05
延胡索酸 Fumaric acid (FA)	1.210 31	1.280 28	1.171 28	0.05
丙酮酸 Pyruvic acid (Pyru)	–	1.278 47	1.198 18	0.05
果糖-6-磷酸 Fructose-6-phosphate	–	–	1.060 63	0.05
柠檬酸 Citric acid (CA)	1.151 17	1.281 12	1.141 58	0.05
泛酸 Pantothenic acid	–	–	1.058 21	0.05
硫辛酸 Lipoic acid	1.262 62	–	1.248 14	0.05
γ-氨基丁酸 Gamma-aminobutyric acid	1.100 94	–	1.075 22	0.05
核糖-5-磷酸 Ribose-5-phosphate	–	1.206 29	1.180 75	0.05
丙氨酸 Alanine (Ala)	1.084 34	1.074 28	1.138 98	0.05
L-天冬酰胺 L-asparagine (Asn)	1.117 86	1.184 39	1.154 51	0.05
L-天冬氨酸 L-aspartic acid (Asp)	1.091 34	–	1.118 61	0.05
L-瓜氨酸 L-citrulline (Cit)	1.072 24	1.034 54	1.053 21	0.05
L-胱氨酸 L-cystine (Cys)	–	1.088 59	–	0.05
L-谷氨酸 L-clutamic acid (Glu)	1.041 11	1.059 08	–	0.05
L-甘氨酸 L-glycine (Gly)	1.104 49	1.181 08	–	0.05
L-异亮氨酸 L-isoleucine (Ile)	1.092 01	1.171 17	–	0.05
L-亮氨酸 L-leucine (Leu)	1.104 83	1.169 53	–	0.05
L-谷氨酰胺 L-glutamine (Gln)	1.013 02	–	–	0.05
鸟氨酸 Ornithine (Orn)	1.089 45	–	1.093 04	0.05
L-赖氨酸 L-lysine (Lys)	–	–	1.014 83	0.05
L-甲硫氨酸 L-methionine (Met)	–	1.088 55	–	0.05
L-苯丙氨酸 L-phenylalanine (Phe)	1.100 52	1.185 35	1.000 82	0.05
L-脯氨酸 L-proline (Pro)	1.116 14	–	1.104 15	0.05
L-丝氨酸 L-serine (Ser)	–	1.130 53	–	0.05
L-苏氨酸 L-threonine (Thr)	1.029 69	1.175 88	1.037 14	0.05
L-色氨酸 L-tryptophan (Trp)	–	1.081 23	–	0.05
L-酪氨酸 L-tyrosine (Tyr)	1.006 72	1.106 14	–	0.05
L-缬氨酸 L-valine (Val)	1.072 58	1.171 24	1.006 47	0.05

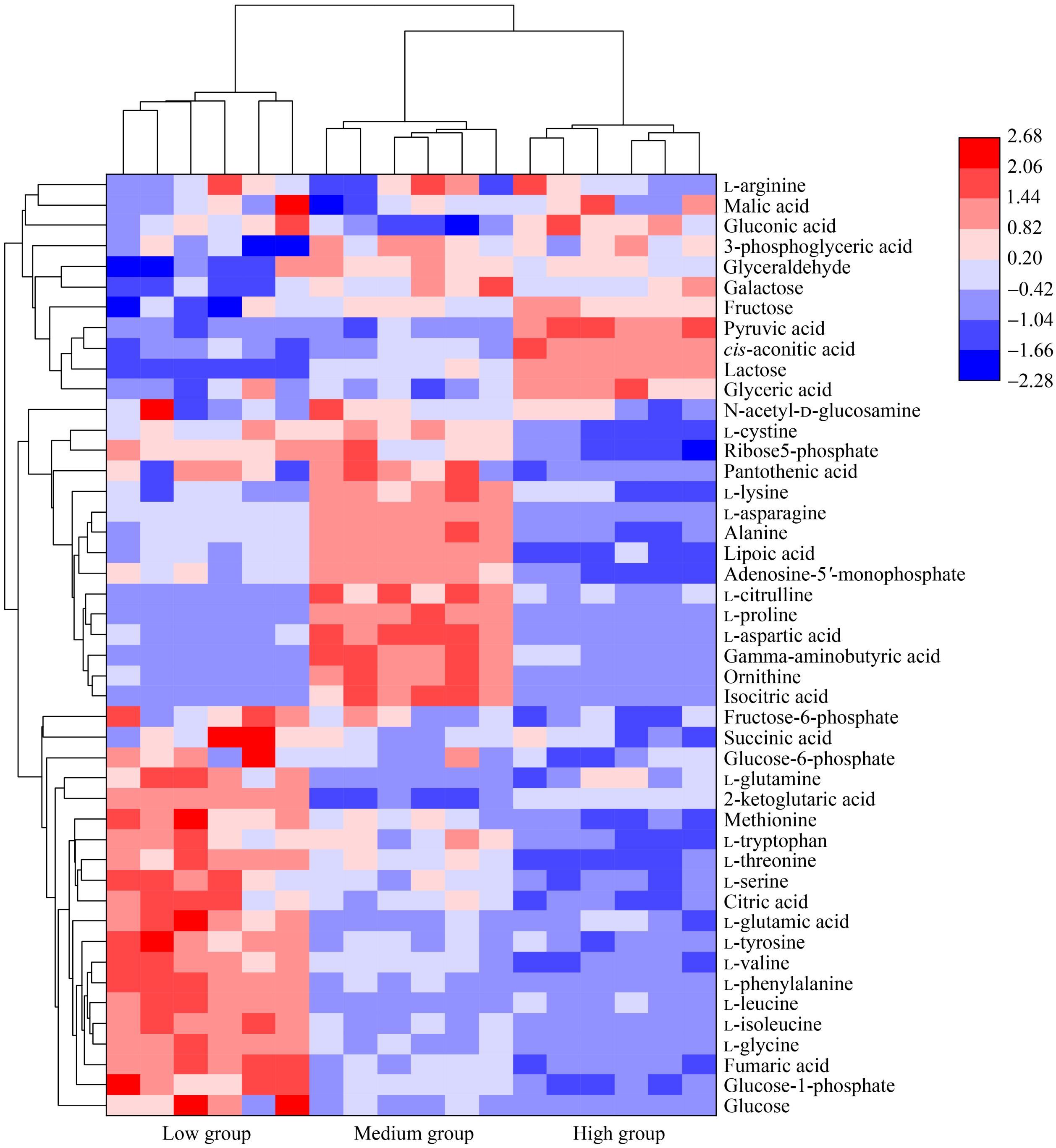

图4　比较组差异代谢物的聚类分析

Figure 4　Cluster analysis of differential metabolites of comparison groups.

集于乙醛酸和二羧酸代谢、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成、TCA 循环和精氨酸生物合成等通路。在 H *vs*. M 比较组中主要富集于 TCA 循环、精氨酸生物合成、乙醛酸和二羧酸代谢、磷酸戊糖途径(pentose phosphate pathway)、精氨酸和脯氨酸代谢(arginine and proline metabolism)和泛酸和辅酶 A 的生物合成(pantothenate and CoA biosynthesis)。在 3 个比较组中，丙氨酸、

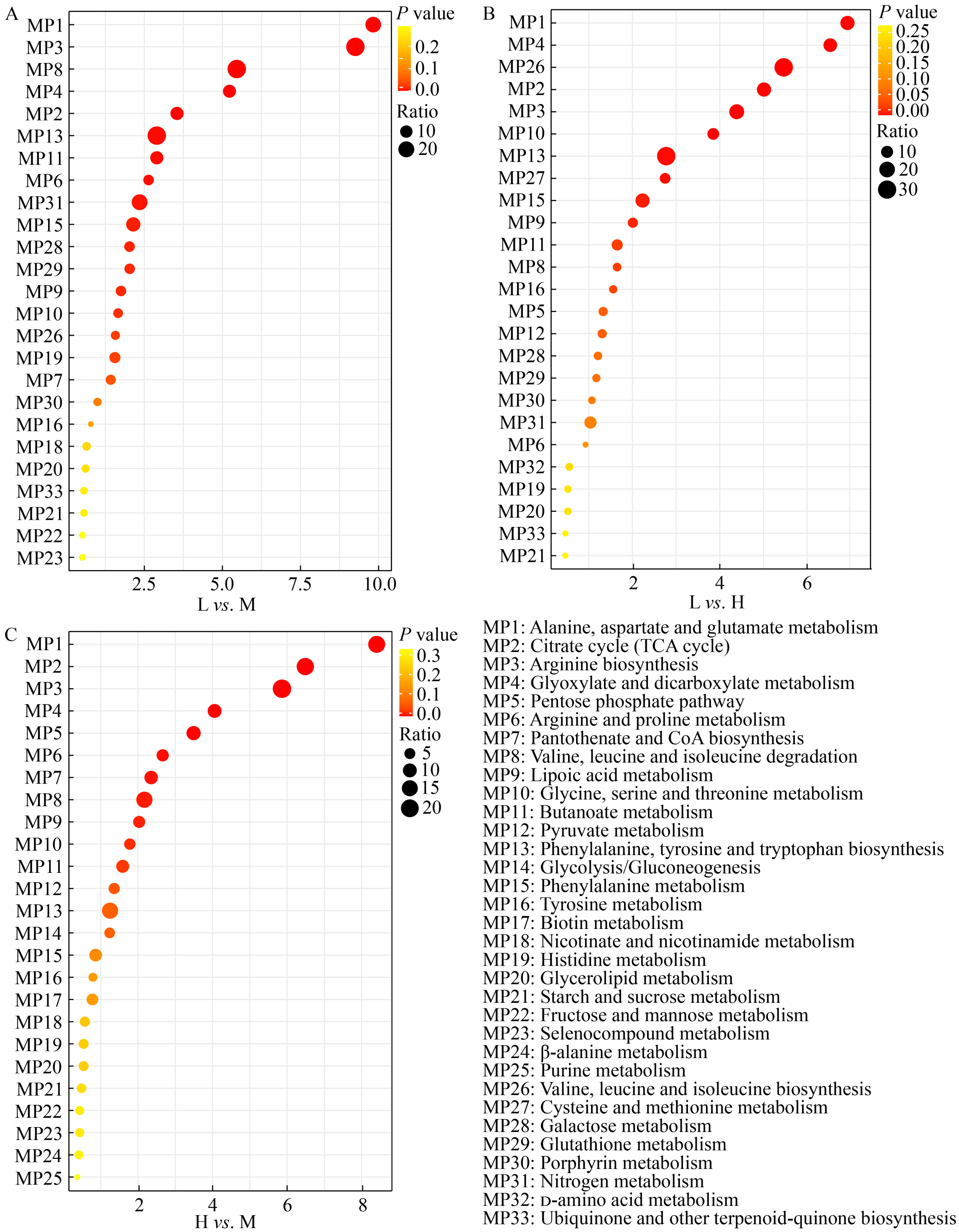

图5　不同比较组的KEGG富集分析

Figure 5　KEGG enrichment analysis of different comparison groups. A: Comparison groups of L *vs*. M; B: Groups of L *vs*. H; C: Groups of H *vs*. M.

天冬氨酸和谷氨酸代谢(alanine, aspartate and glutamate metabolism)通路均为最显著的富集通路。

3 讨论与结论

3.1 氨基酸浓度梯度对四氢嘧啶合成的双相调控机制

氨基酸按其侧链 R 基团的结构和理化性质不同分为 4 类：非极性疏水性氨基酸、极性中性氨基酸、酸性氨基酸和碱性氨基酸[11]。Zhao 等[12]在构建大肠杆菌基因工程菌时以天冬氨酸为碳源或氮源底物进行补料发酵，结果显示相比对照菌株四氢嘧啶的总积累量提高了 3.1%。本研究中添加的 9 种氨基酸包括酸性氨基酸(MSG 和 Asp)、极性中性氨基酸(Gln、Asn、Try 和 Ser)、碱性氨基酸(His 和 Lys)和非极性疏水性氨基酸(Gly)。菌株 XH26 经 9 种氨基酸培养后，以 Asp 培养后的四氢嘧啶积聚量最高(因其作为直接前体，路径最短且无代谢分流)，其次是 MSG (经 TCA 循环转化为 α-KG 后生成 L-天冬氨酸[13])、Asn [经天冬酰胺酶(asparaginase, ASNase)水解为 L-天冬氨酸和氨，但水解步骤引入轻微延迟[14]]、Ser 和 Gln (需多步碳/氮流重定向或竞争氮源)、Lys 和 Gly (因降解路径冗长或一碳代谢竞争导致前体供应不足)、His 和 Try [His 和 Try 则因碳骨架不适配或产生毒性中间体(如犬尿氨酸)严重抑制合成效率[15-16]]。当氨基酸浓度达到最适(30 mmol/L 或 35 mmol/L)浓度时四氢嘧啶积聚量达到峰值，当超过最适浓度时又呈现下降趋势，表明四氢嘧啶随氨基酸浓度变化呈现“先增后减”的双相趋势，这一现象与代谢流的动态重分配密切相关[17]。过量氨基酸可能通过以下机制抑制合成：其一是反馈抑制，高浓度 Gln 通过 mTOR 通路抑制 GS 活性，减少 Glu 生成，限制四氢嘧啶前体供应[18]；其二是代谢分流，Asp 通过天冬氨酸激酶(aspartokinase, AspK)促进 Lys 合成，竞争性消耗 OAA，削弱 TCA 循环对四氢嘧啶的碳骨架支持[19-20]；其三是氮毒性，氨积累抑制谷氨酸脱氢酶(glutamic dehydrogenase, GDH)，阻断 α-KG 的还原胺化[21-22]。尽管 Gln、Ser、MSG、Asn、Lys 等氨基酸在最适浓度下的四氢嘧啶积聚量与 Asp 数值接近，但其对合成代谢网络的影响程度并不相当。Asp 作为四氢嘧啶合成的直接前体，不仅在路径结构上具有最短合成距离，更在代谢流调控中处于核心节点，其引发的丙氨酸-天冬氨酸轴重构与能量代谢联动强于其他氨基酸。相比之下，Gln、Ser 等需经多步转化进入通路，调控作用分散，系统响应范围有限。因此即使部分氨基酸在产量上略趋接近，但在代谢路径主导性与系统调控强度上 Asp 的影响更具主导性与持续性。

3.2 添加天冬氨酸培养对 XH26 菌株糖代谢和 TCA 循环的影响

细菌常通过动态调控能量代谢和 TCA 循环响应外界渗透压、碳/氮源失衡等环境胁迫[23]。如 Pastor 等[24]研究伸长盐单胞菌(*Halomonas elongata*)的渗透应激机制时发现，其通过天冬氨酸代谢重编程增强四氢嘧啶合成，同时抑制 TCA 循环以优先分配碳流至相容性溶质。Rensing 等[25]研究铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)在铜胁迫下的代谢适应时发现，其通过抑制 TCA 循环(α-KG 和 CA 下调)并激活谷胱甘肽合成通路，以螯合金属离子并缓解氧化损伤。在本研究中，中浓度天冬氨酸(35 mmol/L)胁迫下 TCA 循环通路受到抑制(CA、α-KG 和 FA 下调)，菌株处于能量代谢失衡和氮代谢紊乱的状态[26]。α-KG 的短缺抑制 Glu 合成(α-KG+氨基酸→Glu)，导致 Glu 与 Gln 下调。为缓解氮源匮乏，OAA 经天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)转化为 Asp，进一步生成 L-天冬酰胺储存氨基(图 6)[27]。这一过程不仅补偿氮代谢需求，还为四氢嘧啶合成提供了前体。此外，糖酵解增强(3-PGA、Pyru 上调)产生的

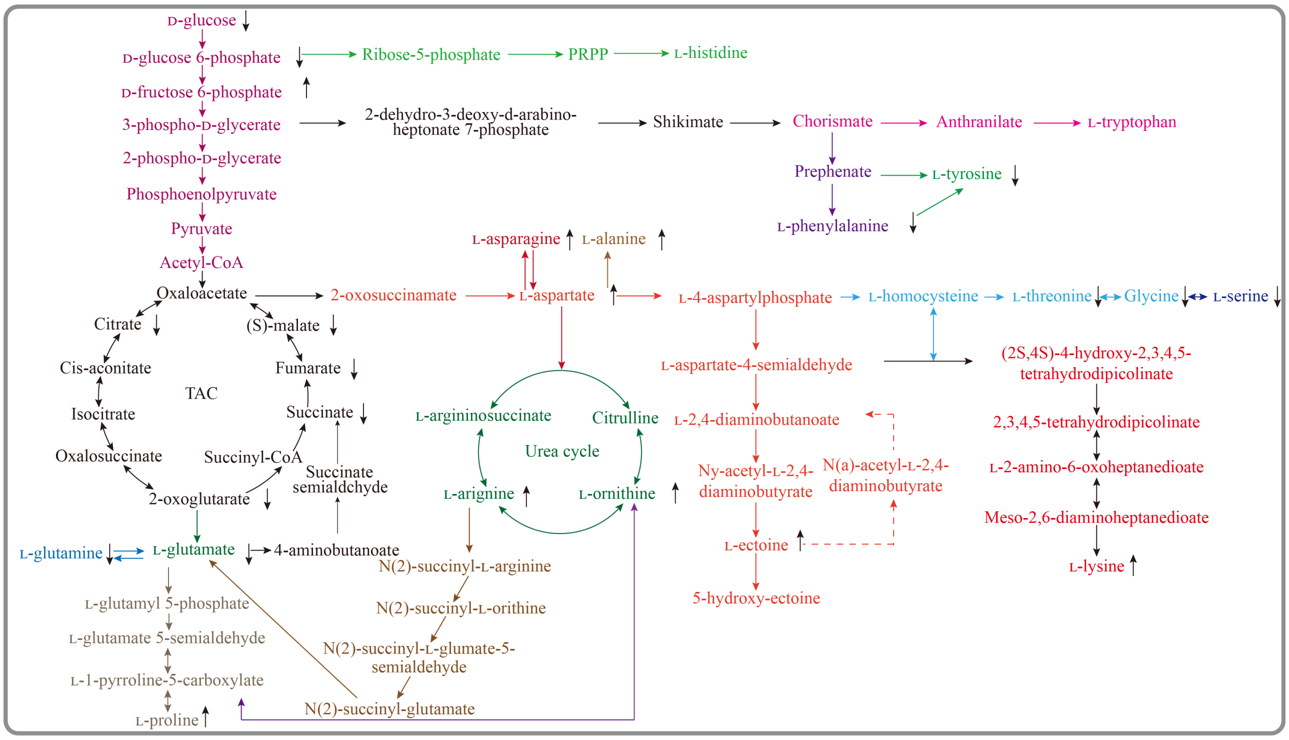

图6　四氢嘧啶合成通路

Figure 6　Ectoine synthesis pathway.

Pyru 通过天冬氨酸-丙氨酸循环，在丙氨酸转氨酶(alanine transaminase, ALT)作用下转化为 Ala，同时消耗 Glu 生成 α-KG (Pyru+Glu→Ala+α-KG)[28-29]。此循环虽然导致了 Glu 的消耗增多，但为菌株提供了可溶性氮载体以支持氮转运。由于 TCA 循环通路受到抑制，ATP 合成减少，而腺苷 5′-单磷酸(AMP 上调)积累激活 AMPK 通路，促进糖酵解(葡萄糖下调，Pyru 上调)与脂肪酸氧化，从而恢复能量稳态[30]。硫辛酸作为丙酮酸脱氢酶复合体(pyruvate dehydrogenase complex, PDH)的辅因子缓解了 TCA 循环通路阻滞，同时其抗氧化功能协同四氢嘧啶抵抗代谢压力诱导的活性氧(reactive oxygen species, ROS)损伤[31]。代谢网络通过以上策略实现动态平衡。M 组通过分流碳/氮流至天冬氨酸-丙氨酸轴，实现氮稳态与能量供应的再平衡，同时启动相容性溶质合成以增强胁迫耐受性，这一阶段代表菌株的代偿期(compensatory stage)[32]。

当 L-天冬氨酸浓度达到 50 mmol/L 时代谢代偿机制突破阈值进入失代偿期(decompensation)[32]。为缓解严重受阻的 TCA 循环(α-KG、CA、FA 持续下调)，Gln 经谷氨酰胺酶(glutaminase, GLS)水解为 Glu，再经谷氨酸脱氢酶(glutamic dehydrogenase, GLUD)生成 α-KG[27]。这一过程虽然短暂回补了 TCA 循环，但由于 Gln 的过度消耗导致氮代谢全面紊乱(Gly、Ser 和支链氨基酸等下调)。Gln 分解产生的氨需要通过尿素循环并消耗 Asp 与 L-精氨酸转化为尿素解毒，导致天冬氨酸相关代谢通路(Asp 下调、Asn 下调)彻底崩溃[33]。葡萄糖与葡萄糖-6-磷酸的持续减少提示碳流无法有效进入糖酵解或磷酸戊糖途径(pentose phosphate pathway, PPP)，NADPH/ATP 合成严重受限。支链氨基酸(L-异亮氨酸和 L-缬氨酸)与芳香族氨基酸(L-苯丙氨酸)含量降低，表明蛋白质合成与分解代谢失衡[34]，进入“代谢僵局”。H 组中氮代谢网络的不可逆损伤标志菌株

从代偿适应转向代谢崩溃[32]。除 Asp 外，Gln、Ser、Asn、MSG 与 Lys 等氨基酸虽然并非直接前体，但通过多种途径支持了天冬氨酸-丙氨酸代谢轴的动态平衡。其中，Gln 通过谷氨酸合成途径供给 Glu，Ser 通过一碳代谢调节氮流分配，Asn 水解产生 Asp，MSG 经 TCA 循环生成 α-酮戊二酸进一步促进 Glu 合成，Lys 则通过反馈调控 AspK 影响 Asp 碳流(图 6)。上述代谢物和通路协同作用强化了丙氨酸转氨循环(Pyru+Glu→Ala+α-KG)的活性，提升了天冬氨酸-丙氨酸轴的碳氮流动性，从而为四氢嘧啶合成提供了持续而稳定的碳源和氮源支持。

3.3 精氨酸-脯氨酸代谢轴对氮源分配的全局调控

氮代谢网络作为细胞应对环境胁迫的核心枢纽，其动态调控不仅依赖关键代谢通路的局部适应，还需通过全局协同机制实现资源分配与稳态维持[35]。例如，Jensen 等[36]研究谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)的氨胁迫响应机制发现，通过激活精氨酸生物合成通路(*argB*/*argC* 基因上调)增强尿素循环通量，将过量氨转化为精氨酸并进一步生成 L-脯氨酸，同时抑制谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)以减少氮同化负担。联合 KEGG 通路分析显示，L-精氨酸通过精氨酸脱亚氨酶(arginine deiminase, ADI)分解为 L-瓜氨酸和氨，瓜氨酸通过鸟氨酸转氨酶(ornithine transaminase, OTA)生成谷氨酸半醛，为四氢嘧啶提供直接前体；氨通过谷氨酰胺合成酶-谷氨酸合酶(GS-GOGAT)循环整合到谷氨酸代谢中，直接参与四氢嘧啶合成[37]。在本研究中 M 组由于 TCA 循环通路受到抑制导致 Glu 合成受限，氨积累激活尿素循环，继而 L-精氨酸(尿素循环的核心)通过精氨酸酶(arginase, Arg)催化生成鸟氨酸和尿素，直接参与氨解毒[37]。此外，Glu 在谷氨酸激酶(glutamate kinase, GK)和吡咯啉-5-羧酸合成酶(Δ1-pyrroline-5-carboxylate synthetase, P5CS)催化下生成脯氨酸，作为相容性溶质抵抗渗透压应激(与四氢嘧啶协同)；脯氨酸-吡咯啉-5-羧酸循环过度消耗 NADPH/NADH 平衡氧化还原状态，缓解 TCA 循环抑制导致的 $NADH/NAD^+$ 失衡[38]。在高浓度胁迫下尿素循环关键中间体(如 L-精氨酸、L-鸟氨酸)可能因合成酶活性抑制或前体耗竭(Asp 下调)而减少，导致氨无法有效排出，支链氨基酸(L-异亮氨酸和 L-缬氨酸)的下调表明氨毒性加剧。Glu 的严重缺乏切断了脯氨酸合成路径，导致 L-脯氨酸水平下降，削弱其渗透保护与抗氧化功能[39]；同时，氧化应激可能激活脯氨酸氧化酶(proline oxidase, POX)，将 L-脯氨酸降解为吡咯啉-5-羧酸并生成 ROS，进一步放大氧化损伤[40]。这种氮代谢网络的动态平衡确保了在盐胁迫下细胞既能维持基础氮代谢稳态，又能优先将资源分配给渗透保护剂的生物合成。Gln、Asn、Lys 和 Ser 等氨基酸同样在代谢网络中发挥了重要作用。如 Gln 可通过 GLS 水解生成 Glu，继而经 GK 和 P5CS 催化合成 L-脯氨酸，支持细胞在高渗胁迫下的渗透保护；Asn 则通过 Asp 供给进一步参与尿素循环，与 Arg 及 Orn 代谢关联促进氨的排泄与氮稳态维持；Lys 作为 Asp 代谢的分支产物可能通过竞争性抑制 AspK，影响 Arg 的生物合成通量，从而间接调节尿素循环及氨解毒速率；Ser 和 Gly 则通过调节一碳单位代谢为氮循环提供还原力支持。这些协同效应不仅有助于缓解氮毒性和氧化压力，还为四氢嘧啶合成提供了稳定的代谢环境。

作者贡献声明

逯心玥：数据收集及分析、验证、完成呈现、撰写文章；李昊鑫：天冬氨酸/天冬酰胺/谷氨酸钠/谷氨酰胺的数据验证；张培霞：数据监督管理、软件程序；师博涵：赖氨酸/色氨酸/甘氨酸/丝氨酸/组氨酸的数据验证；李永臻：提供仪器资源及监督管理；王嵘：提供文献资源；朱德锐：获取基金、项目管理、提供实验耗材

资源、审阅；韩睿：项目管理、提供设备资源、审阅。

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] FIEHN O. Metabolomics: the link between genotypes and phenotypes[M]//Functional Genomics. Dordrecht: Springer Netherlands, 2002, 155-171.

[2] WANG ZH, GAN S, SUN WJ, CHEN ZD. Widely targeted metabolomics analysis reveals the differences of nonvolatile compounds in oolong tea in different production areas[J]. Foods, 2022, 11(7): 1057.

[3] OUYANG Y, CHEN SY, ZHAO LQ, SONG YT, LEI AP, HE JY, WANG JX. Global metabolomics reveals that *Vibrio natriegens* enhances the growth and paramylon synthesis of *Euglena gracilis*[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2021, 9: 652021.

[4] JOGHEE NN, JAYARAMAN G. Metabolomic characterization of halophilic bacterial isolates reveals strains synthesizing rare diaminoacids under salt stress[J]. Biochimie, 2014, 102: 102-111.

[5] 朱德锐, 韩睿, 沈国平, 龙启福, 李丹丹, 刘建, 刘德立. 青海湖盐单胞菌ectoine合成基因簇ectABC的重组共表达[J]. 水生生物学报, 2015, 39(2): 358-367.
ZHU DR, HAN R, SHEN GP, LONG QF, LI DD, LIU J, LIU DL. Recombinant co-expression of the ectoine biosynthesis gene cluster ectABC in *Halomonas* from Qinghai lake[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2015, 39(2): 358-367 (in Chinese).

[6] 张鑫, 舒志万, 李永臻, 邢江娃, 王嵘, 沈国平, 朱德锐. 相容溶质四氢嘧啶的微生物合成研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(3): 868-881.
ZHANG X, SHU ZW, LI YZ, XING JW, WANG R, SHEN GP, ZHU DR. Advances in the microbial production of the compatible solute ectoine: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(3): 868-881 (in Chinese).

[7] 高红亮, 丛威, 欧阳藩. 体外培养的哺乳动物细胞的葡萄糖和谷氨酰胺代谢[J]. 生物技术通报, 2000, 16(2): 17-22.
GAO HL, CONG W, OUYANG F. Glucose and glutamine metabolism in cultured mammalian cells[J]. Biotechnology Information, 2000, 16(2): 17-22 (in Chinese).

[8] RESHETNIKOV AS, KHMELENINA VN, MUSTAKHIMOV II, TROTSENKO YA. Chapter two genes and enzymes of ectoine biosynthesis in halotolerant methanotrophs[J]. Methods in Enzymology, 2011, 495: 15-30.

[9] LO CC, BONNER CA, XIE G, D'SOUZA M, JENSEN RA. Cohesion group approach for evolutionary analysis of aspartokinase, an enzyme that feeds a branched network of many biochemical pathways[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2009, 73(4): 594-651.

[10] 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).

[11] 张海涛, 伍俊, 汪宗桂, 李彩虹, 丁航. 生物化学教材中氨基酸分类与理化性质的辨析[J]. 高教学刊, 2023, 9(16): 43-46.

[12] ZHAO Q, LI SN, LV PW, SUN SM, MA CQ, XU P, SU HJ, YANG CY. High ectoine production by an engineered *Halomonas hydrothermalis* Y2 in a reduced salinity medium[J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18(1): 184.

[13] DeBERARDINIS RJ, CHENG T. Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer[J]. Oncogene, 2009, 29(3): 313-324.

[14] ZHANG J, FAN J, VENNETI S, CROSS JR, TAKAGI T, BHINDER B, DJABALLAH H, KANAI M, CHENG EH, JUDKINS AR, PAWEL B, BAGGS J, CHERRY S, RABINOWITZ JD, THOMPSON CB. Asparagine plays a critical role in regulating cellular adaptation to glutamine depletion[J]. Molecular Cell, 2014, 56(2): 205-218.

[15] PLATTEN M, NOLLEN EAA, RÖHRIG UF, FALLARINO F, OPITZ CA. Tryptophan metabolism as a common therapeutic target in cancer, neurodegeneration and beyond[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2019, 18(5): 379-401.

[16] DUCKER GS, RABINOWITZ JD. One-carbon metabolism in health and disease[J]. Cell Metabolism, 2017, 25(1): 27-42.

[17] VARELA C, AGOSIN E, BAEZ M, KLAPA M, STEPHANOPOULOS G. Metabolic flux redistribution in *Corynebacterium glutamicum* in response to osmotic stress[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 60(5): 547-555.

[18] BROSNAN JT. Interorgan amino acid transport and its regulation[J]. The Journal of Nutrition, 2003, 133(6): 2068S-2072S.

[19] HUDSON AO, BLESS C, MACEDO P, CHATTERJEE SP, SINGH BK, GILVARG C, LEUSTEK T. Biosynthesis of lysine in plants: evidence for a variant of the known bacterial pathways[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2005, 1721(1/2/3): 27-36.

[20] AZEVEDO RA, LANCIEN M, LEA PJ. The aspartic acid metabolic pathway, an exciting and essential pathway in plants[J]. Amino Acids, 2006, 30(2): 143-162.

[21] REITZER L. Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*[J]. Annual Review of Microbiology, 2003, 57: 155-176.

[22] MERRICK MJ, EDWARDS RA. Nitrogen control in bacteria[J]. Microbiological Reviews, 1995, 59(4): 604-622.

[23] IMLAY JA. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium[J]. Nature Reviews

Microbiology, 2013, 11(7): 443-454.

[24] 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.

[25] RENSING C, GRASS G. *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2003, 27(2/3): 197-213.

[26] HAN M, ZHANG C, SUGLO P, SUN SY, WANG MY, SU T. L-aspartate: an essential metabolite for plant growth and stress acclimation[J]. Molecules, 2021, 26(7): 1887.

[27] BIRSOY K, WANG T, CHEN WW, FREINKMAN E, ABU-REMAILEH M, SABATINI DM. An essential role of the mitochondrial electron transport chain in cell proliferation is to enable aspartate synthesis[J]. Cell, 2015, 162(3): 540-551.

[28] HUA Q, YANG C, BABA T, MORI H, SHIMIZU K. Responses of the central metabolism in *Escherichia coli* to phosphoglucose isomerase and glucose-6-phosphate dehydrogenase knockouts[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(24): 7053-7067.

[29] IKEDA M, OHNISHI J, HAYASHI M, MITSUHASHI S. A genome-based approach to create a minimally mutated *Corynebacterium glutamicum* strain for efficient L-lysine production[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2006, 33(7): 610-615.

[30] HARDIE DG, ROSS FA, HAWLEY SA. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2012, 13(4): 251-262.

[31] REED LESTER J. A trail of research from lipoic acid to α-keto acid dehydrogenase complexes[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(42): 38329-38336.

[32] YIZHAK K, GAUDE E, le DÉVÉDEC S, WALDMAN YY, STEIN GY, van de WATER B, FREZZA C, RUPPIN E. Phenotype-based cell-specific metabolic modeling reveals metabolic liabilities of cancer[J]. eLife, 2014, 3: e03641.

[33] ALTMAN BJ, STINE ZE, DANG CV. From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy[J]. Nature Reviews Cancer, 2016, 16(10): 619-634.

[34] TESSARI P. Protein metabolism in liver cirrhosis: from albumin to muscle myofibrils[J]. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care, 2003, 6(1): 79-85.

[35] CZECH L, HERMANN L, STÖVEKEN N, RICHTER AA, HÖPPNER A, SMITS SHJ, HEIDER J, BREMER E. Role of the extremolytes ectoine and hydroxyectoine as stress protectants and nutrients: genetics, phylogenomics, biochemistry, and structural analysis[J]. Genes, 2018, 9(4): 177.

[36] JENSEN JVK, EBERHARDT D, WENDISCH VF. Modular pathway engineering of *Corynebacterium glutamicum* for production of the glutamate-derived compounds ornithine, proline, putrescine, citrulline, and arginine[J]. Journal of Biotechnology, 2015, 214: 85-94.

[37] CALDOVIC L, TUCHMAN M. N-acetylglutamate and its changing role through evolution[J]. Biochemical Journal, 2003, 372(Pt 2): 279-290.

[38] HARE PD, CRESS WA. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants[J]. Plant Growth Regulation, 1997, 21(2): 79-102.

[39] KRISHNAN N, DICKMAN MB, BECKER DF. Proline modulates the intracellular redox environment and protects mammalian cells against oxidative stress[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2008, 44(4): 671-681.

[40] PHANG JM, LIU W, HANCOCK C, CHRISTIAN KJ. The proline regulatory axis and cancer[J]. Frontiers in Oncology, 2012, 2: 60.