



一株耐盐碱乳酪短杆菌 G20 响应盐碱胁迫的差异代谢物分析

伍杰毅², 岳海涛^{1,2*}, 赵鲁玉², 邢祥祥², 胡红英², 孙淑文², 马晓云²

1 新疆大学未来技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830017

2 新疆大学生命科学与技术学院 合成生物学实验室, 新疆 乌鲁木齐 830017

伍杰毅, 岳海涛, 赵鲁玉, 邢祥祥, 胡红英, 孙淑文, 马晓云. 一株耐盐碱乳酪短杆菌 G20 响应盐碱胁迫的差异代谢物分析[J]. 微生物学报, 2023, 63(2): 582-600.

WU Jieyi, YUE Haitao, ZHAO Luyu, XING Xiangxiang, HU Hongying, SUN Shuwen, MA Xiaoyun. Analysis of differential metabolites of *Brevibacterium casei* G20 in response to saline-alkali stress[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(2): 582-600.

摘要: 【目的】探究耐盐碱乳酪短杆菌 G20 响应盐碱胁迫的代谢物组成以及代谢物合成潜力, 为潜在功能分子和盐碱诱导的快速稳定响应逻辑门基因线路的挖掘提供参考。【方法】利用液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)检测乳酪短杆菌 G20 盐碱环境与正常环境下 4 个生长时期的代谢产物。着重对富含高差异变化倍数代谢物的适应期与指数期进行分析。【结果】乳酪短杆菌 G20 可以在 pH 10.0、9% NaCl 环境中正常生长, 同时环境 pH 值会随菌株生长逐步下降。综合正负离子 2 种模式, 乳酪短杆菌 G20 在盐碱环境下各生长时期差异代谢物数量分别为正常环境的 0.69、0.75 和 0.81 倍。盐碱胁迫诱导下适应期与指数期差异代谢物主要为苯环型化合物、有机酸及其衍生物与有机杂环类化合物。其中上调的有机酸化合物吡啶-3-乙酸、犬尿酸和葡萄糖酸指数期质谱信号强度低于适应期。菌株中可能存在的渗透保护剂有 L-瓜氨酸、L-脯氨酸、N-乙酰鸟氨酸和左旋肉碱等。适应期变化倍数较大或质谱信号强度较高的差异化合物有毛果芸香碱、植物鞘氨醇和柠檬酸等, 指数期有组胺、L-脯氨酸和硫胺素等。菌株差异代谢通路集中在氨基酸代谢与碳水化合物代谢。菌株代谢物中存在甜菜碱和葫芦巴碱的结构类似物。此外受盐碱胁迫诱导变化幅度较大的代谢物如组胺、L-脯氨酸和胆碱等化合物, 能够通过代谢组学与基因组学数据耦合, 推测其

资助项目: 国家自然科学基金(U2003305, 31860018); 新疆维吾尔自治区天山创新团队(2020D14022); 新疆维吾尔自治区优秀青年科技人才培养计划(天山杰青)(2020Q02); 国家重点研发计划项目课题(2019YFC1606102)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (U2003305, 31860018), the Tianshan Innovation Team Project of Xinjiang Uyghur Autonomous Region (2020D14022), the Outstanding Young Scientific and Technological Talents Training Program of Xinjiang Uyghur Autonomous Region (2020Q02), and the National Key Research and Development Program Project (2019YFC1606102).

*Corresponding author. E-mail: yuehaitao@tsinghua.org.cn

Received: 2022-05-14; Accepted: 2022-07-06; Published online: 2023-01-07

合成与代谢通路。【结论】菌株会外分泌吲哚-3-乙酸、犬尿酸和葡萄糖酸等有机酸化合物降低环境 pH 值, 积累 L-瓜氨酸和 L-脯氨酸等渗透保护剂维持渗透压平衡。菌株可能具备合成甜菜碱、葫芦巴碱和毛果芸香碱结构类似物的能力, 为以原核细菌为底盘构建新的合成路径提供了可能。菌株中组胺、L-脯氨酸和胆碱等化合物合成与代谢通路中酶的编码基因及上下游元件序列, 可以为受盐碱理化因子诱导的逻辑门基因菌为底盘构建新的合成路径提供了可能。菌株中组胺、L-脯氨酸和胆碱等化合物合成与代谢通路上酶的编码基因及上下游元件序列, 可以为受盐碱理化因子诱导的逻辑门基因线路的梳理提供参考。

关键词: 耐盐碱细菌; 昆虫肠道内生菌; 代谢组学

Analysis of differential metabolites of *Brevibacterium casei* G20 in response to saline-alkali stress

WU Jieyi², YUE Haitao^{1,2*}, ZHAO Luyu², XING Xiangxiang², HU Hongying², SUN Shuwen², MA Xiaoyun²

1 School of Future Technology, Xinjiang University, Urumqi 830017, Xinjiang, China

2 Synthetic Biology Laboratory, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830017, Xinjiang, China

Abstract: [Objective] To explore the metabolite composition and metabolite synthesis potential of *Brevibacterium casei* G20 in response to saline-alkali stress, and to provide a reference for the mining of potential functional molecules and the rapidly and stably responsive genetic logic gate line induced by saline-alkali. [Methods] We used LC-MS to detect the metabolites of G20 at four growth phases in saline-alkali and normal environments, and focused on the analysis of the lag and logarithmic phases rich in metabolites with high differential fold changes. [Results] *B. casei* G20 grew well in the environment with pH 10.0 and 9% NaCl, and the pH of the environment gradually decreased with the growth. According to the detection result in positive ion mode and negative ion mode, the numbers of differential metabolites of *B. casei* G20 during growth in the saline-alkali environment were 0.69, 0.75, and 0.81 times that in the normal environment, respectively. The metabolites that differed between the lag and logarithmic phases under saline-alkali stress were mainly benzenoids, organic acids and their derivatives, and organic heterocyclic compounds. Among them, the MS signal intensity of the organic acids such as indole-3-acetic acid, kynurenic acid, and gluconic acid that were up-regulated in the logarithmic phase was lower than that in the lag phase. The possible osmoprotectants in the strain were L-citrulline, L-proline, N-acetylornithine, L-carnitine, etc. The differential compounds with larger fold changes or higher MS signal intensity in the lag phase were pilocarpine, phytosphingosine, and citrate, and in the logarithmic phase were histamine, L-proline, and thiamine. The differential metabolic pathways of the strain were mainly the amino acid metabolism and carbohydrate metabolism. There were also structural analogs of betaine and trigonelline in the metabolites of the strain. In addition,

for metabolites with large changes induced by saline-alkali stress, such as histamine, L-proline, and choline, we could infer their synthetic and metabolic pathways through the coupling of metabolomic and genomic data. **[Conclusion]** The strain secreted organic acids such as indole-3-acetic acid, kynurenic acid, and Gluconic acid to reduce the pH value of the environment, and accumulated osmoprotectants such as L-citrulline and L-proline to maintain osmotic balance. In addition, the strain may also have the ability to synthesize structural analogs of betaine, trigonelline, and pilocarpine, allowing the construction of a new synthetic pathway based on prokaryotic bacteria. Moreover, the enzyme-coding genes and upstream and downstream element sequences in the synthetic and metabolic pathways of compounds such as histamine, L-proline, and choline in the strain can serve as a reference for sorting out the logic gate gene circuits induced by saline-alkali stress.

Keywords: saline-alkali-tolerant bacteria; intestinal endophytic bacteria; metabolomics

盐碱逆境是极端环境的重要组成部分之一，由盐碱胁迫造成的生物抗逆机制兼具理论研究和应用价值。除了抗盐碱植物资源外^[1]，在进化分支上处于较早期地位的耐盐碱微生物资源也尤为宝贵。通过对这类微生物盐碱耐受相关基因、酶和产物的不断挖掘，已经形成了一系列应用成果，如通过异源表达嗜盐酶和嗜碱酶基因从而提高酶产量，Zhou 等通过芽孢杆菌表达热碱性 β -甘露聚糖酶(BcManA)基因，获得了 6 041 U/mL 胞外 BcManA 产率^[2]；再如通过耐盐碱基因的异源表达提高抗逆能力，Zhai 等通过在大肠杆菌和拟南芥中过表达 *Alkalomonas amylolytica* 的肽聚糖关联脂蛋白基因，提高了二者的耐盐性^[3]。近些年随着对嗜盐嗜碱微生物代谢通路及产物(相容性溶质、聚羟基脂肪酸酯 PHA 和酶)的深入研究^[4-6]，结合其对盐碱环境的耐受能力和高鲁棒性，开发基于海水或盐碱基质的开放连续发酵工艺，使得降低淡水消耗及工艺成本的下一代工业生物技术初具雏形^[7]。在此背景下，耐盐碱微生物作为细胞工厂生产功能分子和大宗化学品的潜力日益受到重视^[8]。利用耐盐碱细菌作为细胞工厂，已实现了四氢嘧啶、甜菜碱、聚(3-羟基丁酸)、羟基丁酸戊酸共聚酯、聚(3-羟基丁酸酯-co-4-羟基丁

酸酯)和淀粉酶等高附加值产物的生产^[9-14]。

为深入探讨耐盐碱微生物作为细胞工厂的潜力，对其代谢产物进行系统性分析和挖掘显得尤为必要。以合成生物学研究思路，挖掘可由简单外界理化因子所诱导的快速稳定响应的逻辑门基因线路，是兼具学术价值和应用潜力的研究方向。耐盐碱微生物能够很好地适应正常盐分浓度及高盐碱培养环境，其代谢通路可以在数小时内对外界盐碱胁迫形成有效的响应。通过对不同盐碱梯度下耐受菌株的代谢产物进行分析，可为挖掘逻辑门基因线路提供参考。此外，在耐盐碱细菌的代谢产物中所含有的潜在的功能分子或生物活性分子也是值得研究的对象，开发出的四氢嘧啶和羟基四氢嘧啶等细胞保护剂可以在细胞表面形成一层保护性的水层，抵御外部压力的屏障^[15]；还有开发为药物的葡萄糖基甘油^[16]和哌啶酸^[17]等。

本文选取的乳酪短杆菌(*Brevibacterium casei*) G20 是一株具有盐碱环境耐受特性的蛻螂肠道内生菌。此前有学者从植物根际、干酪表面、海洋生物和工业废水中筛选出的乳酪短杆菌也对盐碱环境具备一定的耐受能力，它们大多可以在 pH 3.0–9.0，1%–12% NaCl 环境中生长^[18-21]。例如 Kiran 等从海洋海绵中筛选的乳酪短杆菌

MSI04 可以在 pH 5.0–9.0 范围内生长, 最大耐盐度达到 12% NaCl^[20]。Carolyn 等从纺织废水中筛选的乳酪短杆菌 4AB 生长的 pH 范围为 3.0–9.0^[21]。此外 Ateyyat 等^[22]还从甘薯粉虱中分离出了乳酪短杆菌。而从蜚螂消化道中筛选出具耐盐碱特性的乳酪短杆菌的报道鲜见。

本研究通过设置不同培养条件(盐碱环境和正常环境)和不同生长时期(适应期和指数期), 对耐盐碱乳酪短杆菌 G20 受盐碱诱导产生的差异代谢物进行全局分析, 掌握盐碱环境诱导下菌株代谢产物组成和浓度在不同生长时期产生的变化, 挖掘乳酪短杆菌 G20 潜在的代谢合成能力, 以期为抗盐碱功能分子的挖掘和受盐碱理化因子诱导的逻辑门基因线路梳理等提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株

乳酪短杆菌 G20 由本课题组自蜚螂消化道分离并保藏, 已通过 DNBSEQ 平台进行二代测序获得菌株全基因组序列, 并上传至 NCBI (登录号: PRJNA754761)。

1.1.2 培养基

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母浸粉 5.0, 氯化钠 10.0, pH 7.0; 盐碱 LB 液体培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母浸粉 5.0, 氯化钠 60.0, 通过加入 1 mol/L NaOH 溶液将 pH 调节至 10.0; 不同盐碱梯度 LB 培养基: 基础碳氮源与普通 LB 培养基一致, 通过加入不同浓度氯化钠(10、30、60、90 g/L)以及加入 1 mol/L NaOH 溶液将 pH 调节至 pH 7.0、8.0、9.0、10.0。

1.1.3 主要仪器和试剂

超高效液相型号为 Waters 2D UPLC, 色谱柱型号为 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (1.7 μm, 2.1 mm×100 mm), Waters 公司; 高分辨质谱型

号为 Q Exactive HF, Thermo Fisher Scientific 公司; 低温高速离心机型号为 Centrifuge 5430, Eppendorf 公司; 涡旋仪型号为 QL-901, 中国其林贝尔仪器制造有限公司; 纯水仪型号为 Mili-Q Integral, Milipore 公司; 冷冻真空浓缩仪型号为 Maxi Vacbeta, GENE 公司; 组织研磨仪型号为 JXFSTPRP, 中国上海净信; 酶标仪型号为 Multiskan SkyHigh, Thermor 公司。

L-leucine-d3、L-PHENYLALANINE (13C9, 99%)、L-tryptophan-d5、Progesterone-2,3,4-13C3 为内标试剂。甲醇(A454-4)和乙腈(A996-4)均为 LC-MS 级别, 购自 Thermo Fisher Scientific 公司; 甲酸铵(17843-250G)购自 Honeywel Fluka 公司; 甲酸(50144-50 mL)购自 DIMKA 公司。蛋白胨和酵母粉均购自北京奥博星公司; 氯化钠、氢氧化钠、乙醇和次氯酸钠均购自天津盛奥化学公司。

1.2 乳酪短杆菌 G20 的分离

参照 Skowronek 等^[23]的方法将蜚螂样本表面用无菌水冲洗干净, 使用 75%的乙醇溶液浸泡 30 s 后取出虫体, 使用 1%次氯酸钠浸泡 5 min, 无菌水漂洗 10 次。接着将已消毒的虫体使用灭菌过后的解剖剪刀从肛门处一侧剪开腹部, 用灭菌过的解剖针剖开腹部, 取出虫体中后肠, 置于灭菌过的研钵中研磨。然后使用无菌研磨棒研磨 1 min, 加入 5 mL 无菌水制成菌悬液, 使用移液枪将菌悬液转移至 50 mL 无菌螺纹离心管中, 加入 20 mL 无菌水, 37 °C、150 r/min 振荡 30 min 后, 取 100 μL 涂布于 LB 固体培养基, 37 °C 培养 24 h。之后挑取不同形态、颜色及大小的菌落, 划线纯化。最后用无菌接种环挑取单菌落, 接种于 LB 液体培养基, 150 r/min 培养 48 h, 取 500 μL 菌液与 40%甘油溶液混合置于冻存管中, -80 °C 保藏。

1.3 菌株盐碱耐受能力测定及菌株形态的扫描电镜观察

将乳酪短杆菌 G20 以 3% (体积分数)的接种量接种于 LB 液体培养基中,37 °C、150 r/min 培养 16 h 至指数生长期作为种子液。以 3% (体积分数)的接种量将种子液接种于 LB 液体培养基(NaCl 10 g/L, pH 7.0)和盐碱 LB 液体培养基中(NaCl 60 g/L, pH 10.0), 37 °C、150 r/min 培养 72 h, 期间每隔 4 h 测量培养液 OD_{600} 与 pH 值, 绘制生长曲线与 pH (体积比)值变化曲线。将乳酪短杆菌 G20 种子液以 3%的接种量接种于不同盐碱梯度 LB 液体培养基中, 37 °C、150 r/min 培养 72 h 后测量培养液 OD_{600} 。

吸取乳酪短杆菌 G20 培养液, 离心清洗菌体并涂抹于载玻片上, 自然晾干水分, 背面朝上用液体导电胶固定在扫描电镜铜板上喷金, 之后放于电镜载物台采集图像。

1.4 菌株样本制备

将乳酪短杆菌 G20 以 3% (体积分数)的接种量接种于 LB 液体培养基中,37 °C、150 r/min 培养 16 h 至指数生长期作为种子液。以 3% (体积分数)接种量将种子液分别接种于 LB 液体培养基和盐碱 LB 液体培养基中,37 °C、150 r/min 培养。LB 液体培养基中在培养 1 h (适应期)、16 h (指数期)、36 h (平台期)和 7 d (衰亡期)取适量菌液作为正常环境样本。盐碱 LB 液体培养基中在培养 2 h (适应期)、20 h (指数期)、56 h (平台期)和 7 d (衰亡期)取适量菌液作为盐碱环境样本。然后分别将以上菌液转移至 50 mL 无菌离心管, 4 °C、6 000 r/min 离心 10 min, 去上清。接着用无菌 PBS 与无菌盐水(60 g/L NaCl)冲洗, 4 °C、6 000 r/min 离心 10 min, 去上清。液氮速冻 30 min, -80 °C 放置。

1.5 菌株代谢物提取及 QC 样本制备

菌株代谢物提取、LC-MS 检测和化合物鉴

定均委托深圳华大基因科技有限公司进行操作。将菌体在 4 °C 条件下缓慢解冻后, 称取 25 mg 置于 1.5 mL Eppendorf 管中, 加入 800 μ L 提取液(甲醇:乙腈:水 = 2:2:1, 体积比, -20 °C 预冷)和 10 μ L 内标, 加入 2 颗小钢珠, 放入组织研磨仪中进行研磨(50 Hz, 5 min), 4 °C 水浴超声 10 min 后, -20 °C 冰箱静置 1 h。4 °C、25 000 r/min 离心 15 min 后取 600 μ L 上清, 置于冷冻真空浓缩仪抽干后, 加入 200 μ L 复溶液(甲醇:H₂O=1:9, 体积比)进行复溶, 涡旋振荡 1 min, 4 °C 水浴超声 10 min 后以同样的温度 25 000 r/min 离心 15 min, 取上清置于进样瓶中。每个实验样本取等量混合成质量控制(quality control, QC)样本, 用于质量控制。预实验选取 10 个 QC 样本, 正式实验开始后每 10 个样本穿插一个 QC 样本, 最后检测 3 个 QC 样本结束试验, 用于评估 LC-MS 分析过程的重复性和稳定性。

1.6 LC-MS 检测

1.6.1 液相色谱参数描述

正离子模式流动相为含 0.1%甲酸的水溶液(A 液)和含 0.1%甲酸的 100%甲醇(B 液), 负离子模式流动相为含 10 mmol/L 甲酸氨的水溶液(A 液)和含 10 mmol/L 甲酸氨的 95%甲醇(B 液)。采用以下梯度进行洗脱: 0–1 min, 2% B 液; 1–9 min, 2%–98% B 液; 9–12 min, 98% B 液; 12–12.1 min, 98% B 液–2% B 液; 12.1–15 min, 2% B 液。流速为 0.35 mL/min, 柱温 45 °C, 进样量为 5 μ L。

1.6.2 质谱参数描述

利用 Q Exactive HF 质谱仪(Thermo Fisher Scientific)进行一级和二级质谱数据采集。质谱扫描质核比范围为 70–1 050, 一级分辨率为 120 000, AGC 为 3.00E+06, 最大注入时间(injection time, IT)为 100 ms。按照母离子强度, 选择 Top3 进

行碎裂, 采集二级信息, 二级分辨率为 30 000, AGC 为 $1.00E+05$, 最大注入时间为 50 ms, 碎裂能量(stepped nce)设置为 20、40、60 eV。离子源(ESI)参数设置: 鞘气流速(sheath gas flow rate)为 40, 辅助气流速(aux gas flow rate)为 10, 喷雾电压(spray voltage([KV])正离子模式为 3.80, 负离子模式为 3.20, 离子传输管温度(capillary temp)为 320 °C, 辅助气加热温度(aux gas heater temp)为 350 °C。

1.7 数据处理和分析

使用 Compound Discoverer 3.0 (Thermo Fisher Scientific)软件进行 LC-MS 数据处理, 主要为峰提取、峰对齐和化合物鉴定。化合物鉴定数据库有 BGI Library (<https://mscloud.bgi.com>)、mzCloud (<https://www.mzcloud.org>)和 chemSpider (<http://www.chemspider.com>)。使用代谢组学 R 软件包以及代谢组信息分析流程进行数据预处理、统计分析及代谢物分类注释和功能注释。采用主成分分析(principle component analysis, PCA)方法对多变量的原始数据进行降维, 以此分析该数据集中所观测变量的分组、趋势(样本组内和组间相似性和差异性)及离群值(是否存在异常样本)。使用单变量分析获得的差异变化

倍数(fold-change)和 t 检验(Student's t test)的结果来筛选差异代谢物。

2 结果与分析

2.1 乳酪短杆菌 G20 对盐碱环境的耐受能力

利用 LB 培养基对荒漠蜚螂肠道可培内生细菌进行分离, 通过盐碱 LB 培养基对内生细菌进行耐盐碱菌株筛选, 其中乳酪短杆菌 G20 表现最佳。由图 1A 可知, 正常环境(pH 7.0、NaCl 10 g/L)与盐碱环境(pH 10.0、NaCl 60 g/L)中菌株适应期阶段分别约处于 0–1 h 和 0–4 h, 指数期阶段分别约处于 4–36 h 和 8–48 h, 平台期阶段分别约处于 36–72 h 和 48–72 h。此外 2 种环境下菌株在培养 7 d 时皆处于衰亡期阶段。盐碱环境中菌株适应期明显延长, 且生长至平台期的时间点会延后。随着培养时间的增加, 盐碱环境中的 pH 值也会逐步下降, 从最初的 pH 值为 10.0 下降至 8.1。由图 1B 可知, 菌株对盐碱环境耐受范围较广, 在 pH 9.0–10.0、9% NaCl 环境中依然可以正常增殖, 但 OD_{600} 有一定降低分别为 1.359 与 1.21。菌株在 pH 7.0、1% NaCl 与 pH 8.0、9% NaCl 环境中 OD_{600}

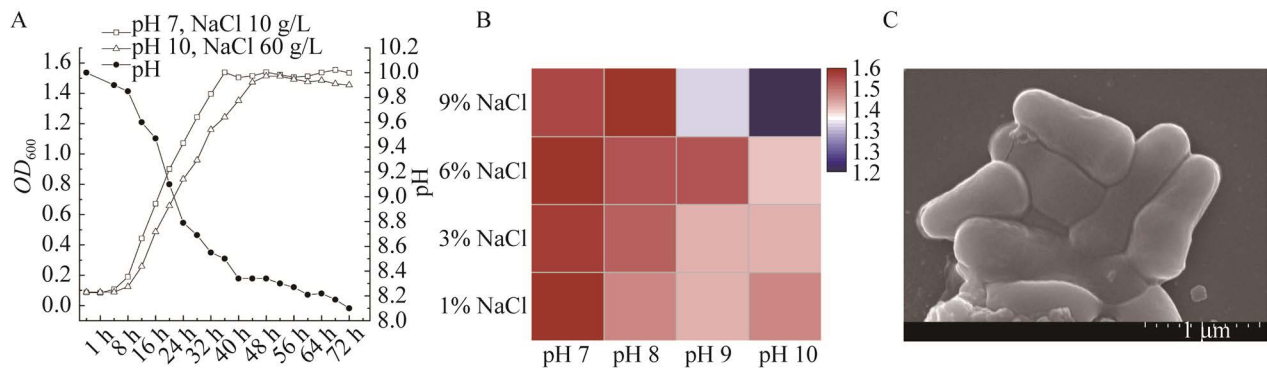


图 1 乳酪短杆菌 G20 耐盐碱能力测定及扫描电镜图片

Figure 1 Determination of salt and alkali resistance of *Brevibacterium casei* G20 and SEM picture. A: Growth curve of *B. casei* G20 under two saline alkali gradients pH 7.0, 10 g/L NaCl and pH 10.0, 60 g/L NaCl. B: Heatmap of *B. casei* G20 cultured under different saline alkali gradients for 72 hours. C: SEM image of *B. casei* G20.

较高分别为 1.558 与 1.563。除上述环境, 其余环境中菌株 OD_{600} 维持在 1.45–1.55, 与最高的 1.563 相差不大。乳酪短杆菌 G20 的扫描电镜观察结果表明, 乳酪短杆菌 G20 菌株菌体形态呈短杆状, 大小在 1 μm 左右(图 1C)。

2.2 乳酪短杆菌 G20 代谢物的 LC-MS 检测分析

正式检测实验中所有菌体细胞内代谢产物提取后进行上机检测。将所有 QC 样品中相对峰面积变异系数大于 30% 的化合物删除后。根据一级分子量、二级碎片图谱、保留时间和有无参考标准品等信息对化合物进行鉴定。最终正负离子模式下分离出 9 003 和 2 304 个化合物, 可注释到的具体化合物分别有 2 108 和 787 个, 其中处于置信区间的有 221 和 124 个。这些化合物主要为有机杂环类化合物、有机氧化物、核苷、核苷酸和类似物、苯环型化合物、生物碱及其衍生物、有机酸及其衍生物。后续对具体代谢物的分析主要针对处于置信区间的

化合物。

从主成分分析图(图 2)中可以看出, 不同处理组培养物在不同生长阶段的代谢物类群呈现出分散分布, 但同一组别的代谢物平行样品间聚合度较集中, 说明所得到的代谢组数据离散度低、分布稳定, 不同实验组间也具有较明显的分布规律。

2.3 差异代谢物筛选

对各组实验样本检测出的代谢物, 采用多元统计分析(PCA)、单变量分析(差异变化倍数(fold change, FC)和 t 检验(Student's t test)相结合的方式筛选组间差异代谢物。以正常 LB 培养基中培养物的代谢产物浓度为基准, 如某一代谢产物变化倍数 $\text{fold change} \geq 1.2$ 为显著上调, $\text{fold change} \leq 0.83$ 为显著下调($Q < 0.05$)。图 3 为乳酪短杆菌 G20 在正常环境与盐碱环境下各生长时期差异代谢物火山图, 表 1 为对应的数量。正离子模式下鉴定到的差异代谢物数量要多于负离子模式。综合正负离子模式, 菌株

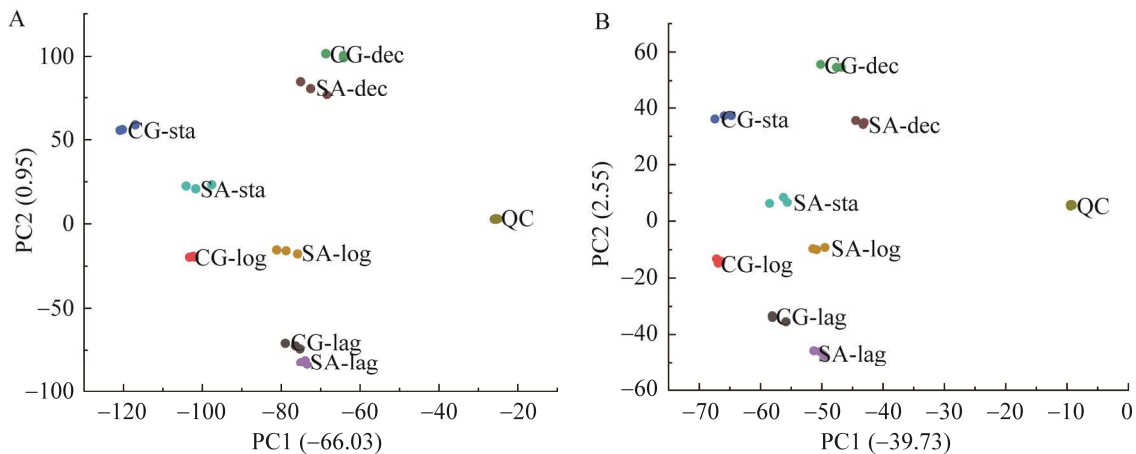


图 2 实验样本的主成分分析图

Figure 2 The principal component analysis (PCA) diagram of the experimental sample. A: Positive ion mode. B: Negative ion mode. CG-lag: Lag phase under normal environment; SA-lag: Lag phase in saline-alkali environment; CG-log: Logarithmic phase under normal environment; SA-log: Logarithmic phase in saline-alkali environment; CG-sta: Stationary phase under normal environment; SA-sta: Stationary phase in saline-alkali environment; CG-dec: Decline phase under normal environment; SA-dec: Decline phase in saline-alkali environment.

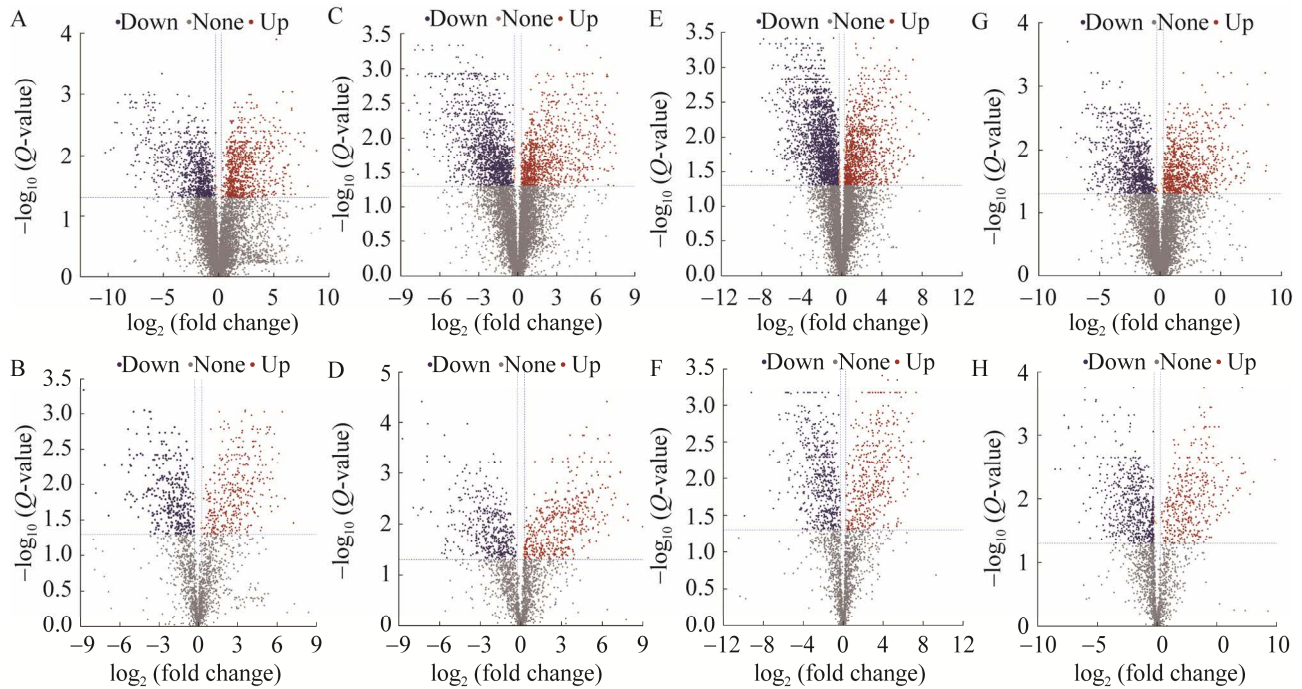


图 3 乳酪短杆菌 G20 正常环境与盐碱环境下各生长时期差异代谢物火山图

Figure 3 Volcanic map differential metabolites of *Brevibacterium casei* G20 in normal and saline-alkali environment in different growth phases. A, B: Lag phase pos/neg. C, D: Logarithmic phase pos/neg. E, F: Stationary phase pos/neg. G, H: Decline phase pos/neg.

表 1 乳酪短杆菌 G20 正常环境与盐碱环境下各生长时期差异代谢物数量

Table 1 Quantities of differential metabolites of *Brevibacterium casei* G20 in normal and saline-alkali environment in different growth phases

Sample group	Mode	Number of differential metabolites	Up	Down
SA-lag: CG-lag	pos	1 885	891	994
	neg	771	398	373
SA-log: CG-log	pos	2 736	1 119	1 617
	neg	983	499	484
SA-sta: CG-sta	pos	3 343	1 234	2 109
	neg	999	429	570
SA-dec: CG-dec	pos	2 039	980	1 059
	neg	1 067	403	664
SA-lag: SA-log	pos	402	205	197
	neg	229	82	147
CG-lag: CG-log	pos	581	294	287
	neg	329	136	193
SA-log: SA-sta	pos	763	447	316
	neg	284	152	132
CG-log: CG-sta	pos	1 007	620	387
	neg	395	210	185
SA-sta: SA-dec	pos	1 063	345	718
	neg	395	167	228
CG-sta: CG-dec	pos	1 338	451	887
	neg	459	169	290

pos: Positive ion mode; neg: Negative ion mode.

受盐碱胁迫时, 平台期差异代谢物数量最多, 此外各时期下调代谢物数量多于上调代谢物, 分别是上调代谢物数量的 1.06、1.30、1.61 和 1.25 倍。同时菌株在盐碱环境下适应期至指数期、指数期至平台期、平台期至衰亡期间的差异代谢物数量低于正常环境, 分别是正常环境下的 0.69、0.75 和 0.81 倍。这说明了盐碱环境会降低乳酪短杆菌 G20 在不同生长时期间的代谢物变化。

2.4 差异代谢物分析

由表 1 可知, 平台期差异代谢物数量最多, 但菌株在平台期与衰亡期的代谢物差异变化倍数较低, 处于鉴定置信区间的化合物较少, 同时可鉴定到的差异代谢物种类与指数期趋同, 故下文只集中讨论适应期与指数期的差异代谢物谱系。菌株在适应期与指数期的差异代谢物主要构成为有机杂环类化合物、苯环型化合物、有机酸及其衍生物。

从图 4 中可以看出, 所有检测的实验样本在组内和组间都具有一定的离散程度, 相互比较的 2 组具有明显的代谢物分组差异。图 4A 为乳酪短杆菌 G20 盐碱胁迫诱导下适应期的差异代谢物热图。上调代谢物中差异变化倍数最大的化合物为毛果芸香碱(pilocarpine, FC=44.08)。上调代谢物在盐碱环境中质谱信号强度(代谢物质谱信号强度与其含量成正比)最高的化合物为植物鞘氨醇(2-amino-1,3,4-octadecanetriol, FC=5.24)。下调代谢物中差异变化倍数最大的化合物为黄腐酚(xanthohumol, FC=0.013)。

图 4B 为乳酪短杆菌 G20 盐碱胁迫诱导下指数期的差异代谢物热图。其中上调代谢物中差异变化倍数最大的化合物为组胺(histamine, FC=21.01)。上调代谢物在盐碱环境中质谱信号强度最高的化合物为 L-脯氨酸(L-proline, FC=4.18)。指数期下调代谢物里差异变化倍数

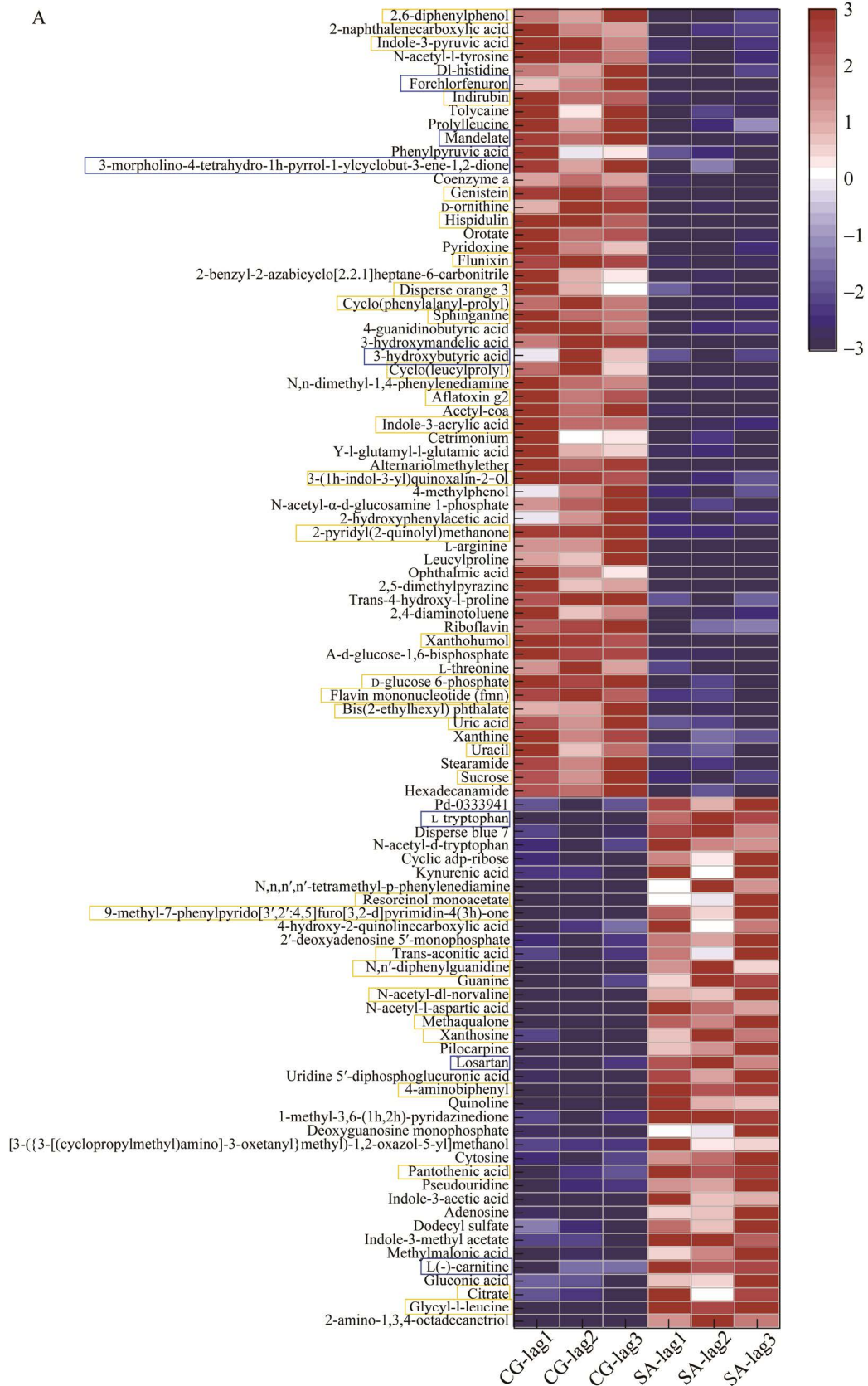
最大的化合物为胆碱(choline, FC=0.003)。

此外, 乳酪短杆菌 G20 代谢物中有 3 种化合物一直具备较高的质谱信号强度(表 2), 分别被注释为甜菜碱(betaine)、葫芦巴碱(trigonelline)和毛果芸香碱(pilocarpine)。将上述化合物的质谱信号强度与生物必需的有机化合物腺嘌呤(非差异代谢物, $Q < 0.05$)正常环境下各时期平均质谱信号强度进行比较, 以直观体现上述化合物质谱信号强度的高低。注释为甜菜碱的化合物, 其质谱信号强度是菌株能够鉴定到的代谢物中最高的, 在正常环境下其质谱信号强度分别是腺嘌呤的 1 244.35、1 077.92、436.19 和 1 033.51 倍, 盐碱环境中略低于正常环境分别为 1 214.9、808.61、390.78 和 725.3 倍。甜菜碱是广泛存在于耐盐碱微生物中的一种相容性溶质^[24], 而葫芦巴碱与毛果芸香碱却是分离自葫芦巴与毛果芸香叶中的生物碱^[25-26], 故菌株代谢物中注释为这 2 种生物碱的化合物, 其结构可能与葫芦巴碱和毛果芸香碱的结构类似, 可能是这 2 种生物碱的同分异构体。后续将采用制备色谱, 对上述代谢物进行纯化、利用质谱进行鉴定。

2.5 差异代谢物 Pathway 富集

图 5 为乳酪短杆菌 G20 显著差异代谢通路富集分析气泡图($P < 0.05$), X 轴富集因子(rich factor)为注释到该 Pathway 的差异代谢物数目除以注释到该 Pathway 的所有鉴定到代谢物, 该值越大, 说明注释到该 Pathway 差异代谢物比例越高。圆点大小代表注释到该 Pathway 的差异代谢物的数目。

综合正负离子 2 种模式下代谢产物差异情况, 发现菌株在适应期代谢通路和次级代谢生物合成注释到的差异代谢物最多, 其次是抗生素的生物合成、不同环境中的微生物代谢和氨基酸生物合成。代谢通路、次级代谢生物合成



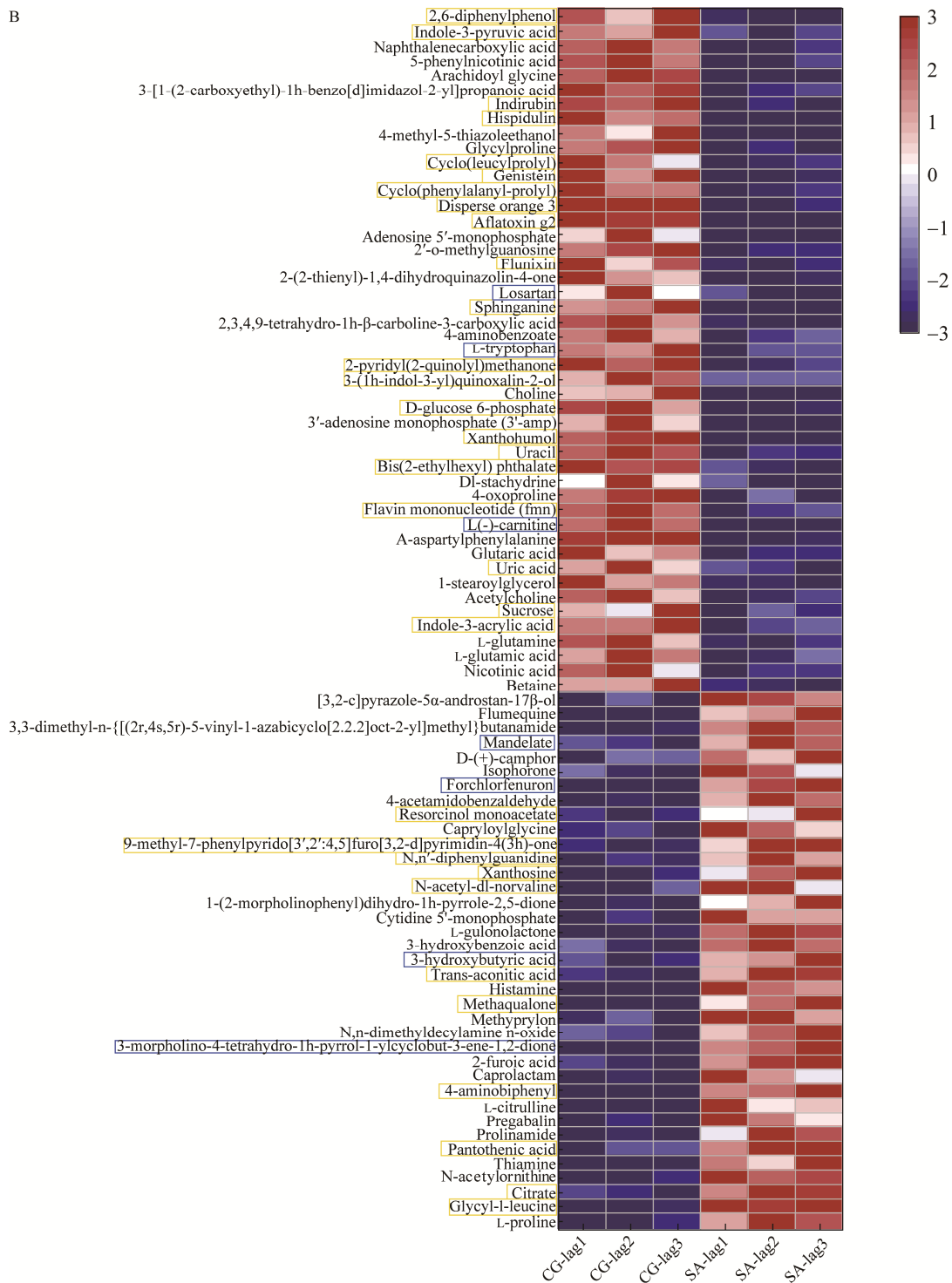


图 4 乳酪短杆菌 G20 在盐碱胁迫诱导下不同生长时期的差异代谢物

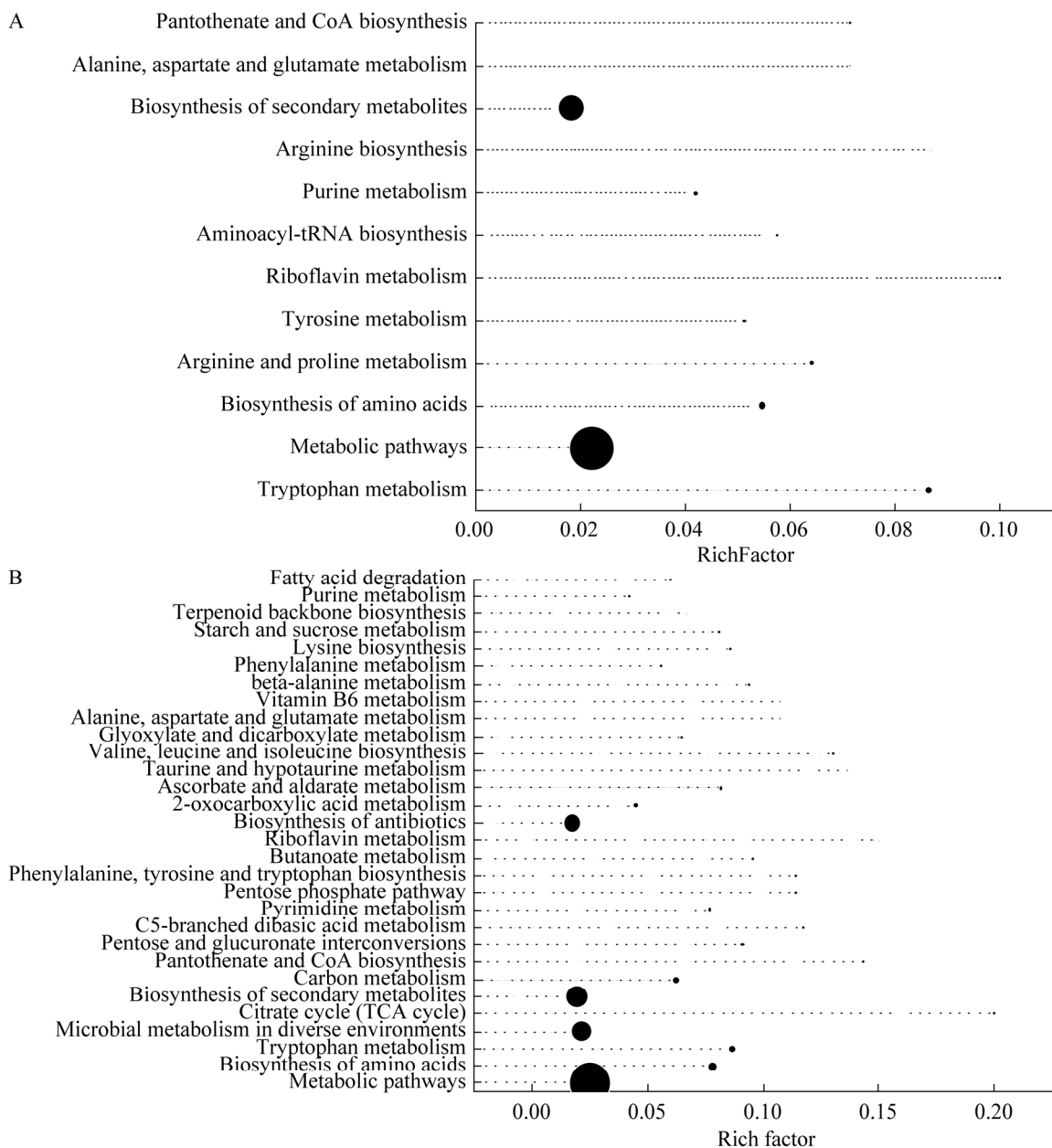
Figure 4 Differential metabolites of *Brevibacterium casei* G20 in different growth stages induced by saline-alkali stress. A: Lag phase. B: Logarithmic phase. Metabolites in the yellow box are the common differential metabolites in the two growth phases, and metabolites in the blue box are the opposite differential metabolites in the two growth phases.

表 2 乳酪短杆菌 G20 具生物活性的代谢物列表

Table 2 Up-regulated metabolites with biological activity in *Brevibacterium casei* G20

Annotation compound	Formula	Molecular weight	RT (min)	Score	MS signal intensity ratio	
					Normal	Saline-alkali
Betaine	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117.079 0	0.713	88.2	1 244.35 ^[a]	1 077.92 ^[b]
					436.19 ^[c]	1 033.51 ^[d]
Trigonellin	C ₇ H ₇ NO ₂	137.047 8	0.715	75.9	0.53 ^[a]	0.84 ^[b]
					0.46 ^[c]	0.10 ^[d]
c Pilocarpine	C ₁₁ H ₁₆ N ₂ O ₂	208.121 4	2.978	79.4	0.01 ^[a]	0.13 ^[b]
					0.42 ^[c]	0.02 ^[d]
					1 214.90 ^[a]	808.61 ^[b]
					390.78 ^[c]	725.39 ^[d]

^[a]: Lag phase; ^[b]: Logarithmic phase; ^[c]: Stationary phase; ^[d]: Decline phase. MS signal intensity ratio: Annotation compound of MS signal intensity/Adenine of MS signal intensity, RT (min): Retention time; Score: The matching score of the Secondary spectrum matching of the compound is in mzCloud Library.



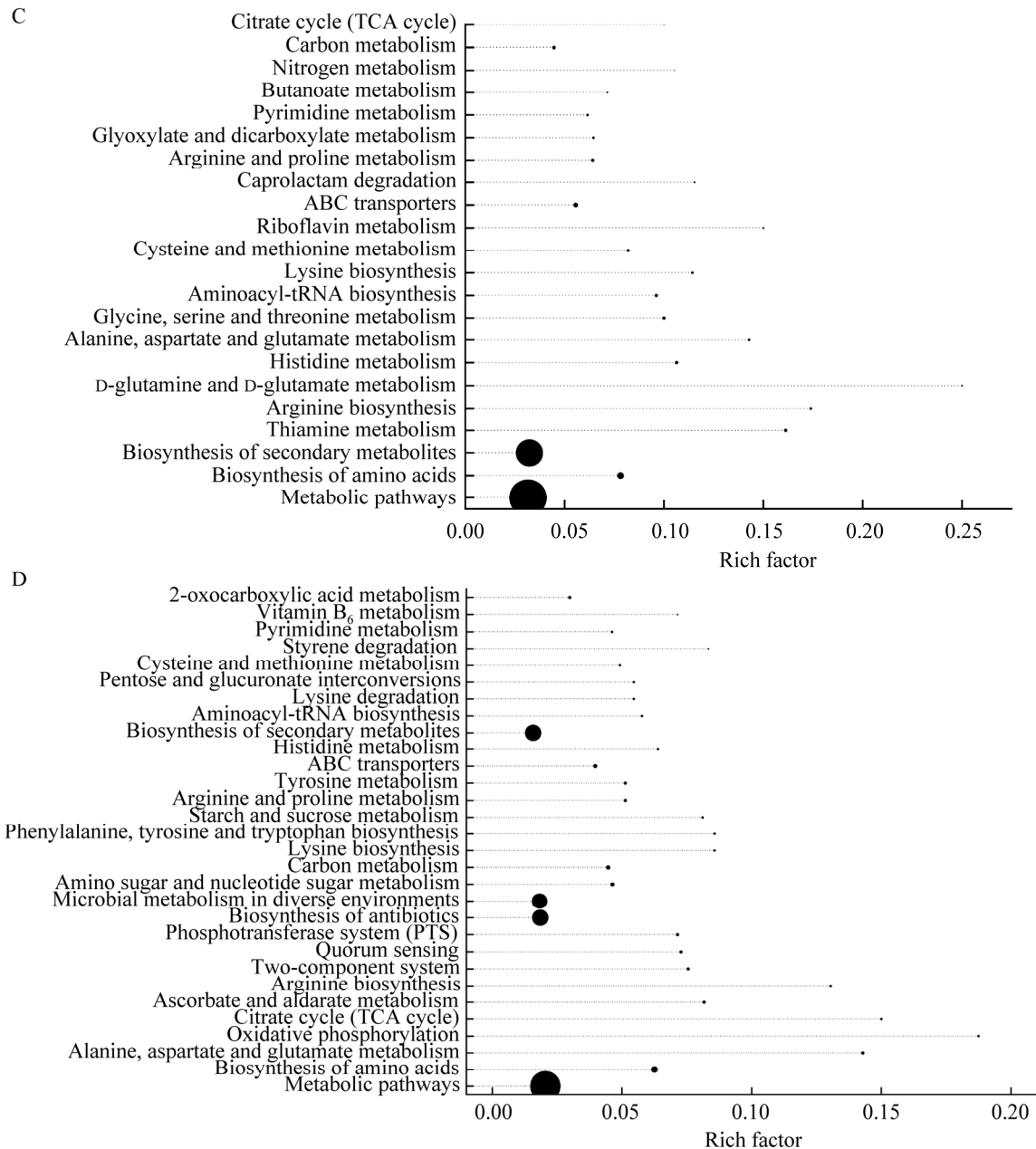


图 5 乳酪短杆菌 G20 盐碱胁迫诱导下代谢通路富集分析气泡图($P<0.05$)

Figure 5 Bubble plot of metabolic pathways enriched in *Brevibacterium casei* G20 induced by saline alkali stress ($P<0.05$). A: Lag phase in positive ion mode. B: Lag phase in negative ion mode. C: Logarithmic phase in positive ion mode. D: Logarithmic phase in negative ion mode.

通路、抗生素的生物合成通路以及不同环境中的微生物代谢通路，这 4 条代谢通路涵盖众多代谢途径，能够注释到的代谢物极多，因此这 4 条代谢通路拥有较多的差异代谢物数量，但富集因子很低。适应期富集因子较高的通路有

色氨酸代谢、精氨酸生物合成、核黄素代谢和柠檬酸循环。菌株在指数期时差异代谢物较多的代谢通路与适应期一致，而富集因子较高的通路则是 D-谷氨酰胺、D-谷氨酸代谢和氧化磷酸化。综合来看菌株 2 个生长时期的差异代谢通

路,可以发现氨基酸代谢与碳水化合物代谢拥有极高的占比,其次为辅助因子和维生素的代谢。

通过对不同盐碱浓度下菌株适应期和指数期差异代谢通路分析,发现氨基酸的生物合成通路是2个时期共有的差异代谢通路,同时该通路在差异代谢物数量、富集因子以及差异显著性3方面都有突出表现,可以推测氨基酸

的生物合成通路是乳酪短杆菌 G20 应对盐碱环境时极为重要的代谢通路。进一步分析该通路上代谢物的变化,可以了解菌株在盐碱环境中代谢流向的改变。参照原核生物氨基酸的生物合成通路(KEGG map01230)复合菌株适应期与指数期不同氨基酸质谱信号强度变化数据生成图6。图6中可以看出菌株在面对盐碱环境的初

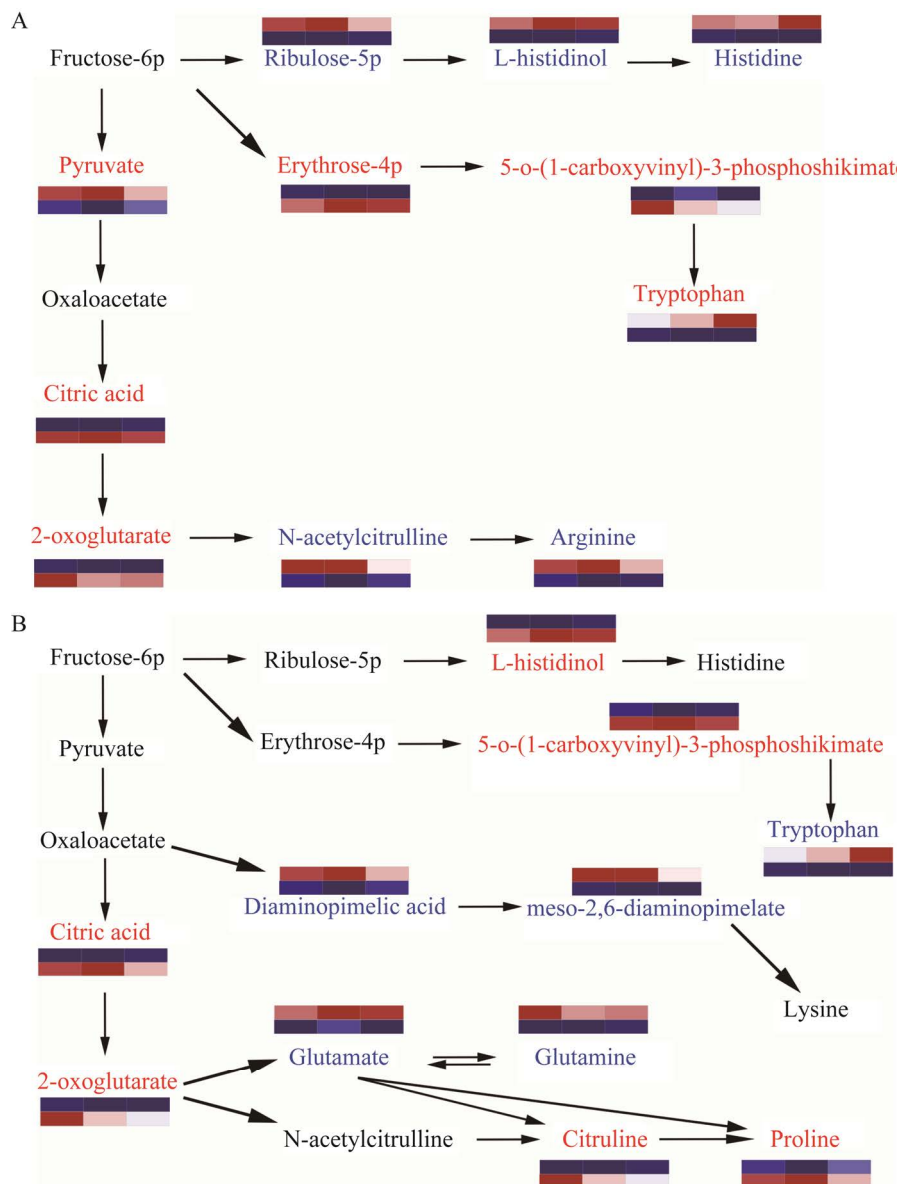


图6 乳酪短杆菌 G20 盐碱胁迫诱导下氨基酸的生物合成通路

Figure 6 Biosynthesis of amino acid in *Brevibacterium casei* G20 induced by saline-alkali stress. A: Lag phase. B: Logarithmic phase. Up-regulated metabolites are represented in red font and down-regulated metabolites in blue font. This picture was modified based on KEGG map01230, <https://www.kegg.jp/pathway/map01230>.

期, 氨基酸生物合成通路中组氨酸合成、色氨酸合成和精氨酸合成途径上存在差异代谢物。其中 L-色氨酸(L-tryptophan, FC=1.87)含量上升, L-精氨酸(L-arginine, FC=0.037)和 DL-组氨酸(DL-histidine, FC=0.112)含量下降。而在指数期时菌株的氨基酸生物合成通路中组氨酸合成、色氨酸合成、赖氨酸合成、瓜氨酸合成以及脯氨酸合成途径中存在差异代谢物, 其中 L-色氨酸(L-tryptophan, FC=0.387)含量下降, L-瓜氨酸(L-citrulline, FC=12.77)和 L-脯氨酸(L-proline, FC=4.18)的含量上升, 组氨酸和赖氨酸含量无明显差异。由于菌体代谢是一种动态变化的过程, 代谢组学受限于技术只能探究某一时刻菌体内的代谢物变化, 故不能将所有代谢物简单地用上调与下调区分作用。但我们可知的是, 上述氨基酸的合成途径与菌株盐碱环境应对策略有着极大关联。

3 讨论与结论

近年来, 随着对嗜盐嗜碱微生物研究的深入, 通过嗜盐嗜碱微生物构建细胞工厂进行无灭菌和开放发酵的体系不断完善, 并逐步推广应用。对高盐和高碱环境都具备一定耐受能力的耐盐碱菌株, 也可很好满足上述技术要求, 其工业应用价值日益凸显^[13]。通过研究该类菌株的耐盐碱机制, 系统分析耐盐碱菌株在盐碱环境与正常环境下的代谢物差异, 既可以了解菌株耐盐碱机制在代谢层面的表现, 也可以进一步挖掘该类菌株在代谢物合成方面的潜力。

乳酪短杆菌 G20 筛选自蜚螂肠道样本, 是该昆虫肠道可培内生细菌中盐碱耐受能力最强的菌株, 此前研究筛选出的乳酪短杆菌大多可以耐受 pH 9.0 的碱性环境, 而乳酪短杆菌 G20 可以在 pH 10.0、9% NaCl 环境正常生长, 其耐碱特性高于此前研究筛选出的乳酪短杆菌, 且

该菌株在 pH 10.0、9% NaCl 环境中生长密度与最适生长环境相差较小。同时该菌株可以在以微晶纤维素为唯一碳源的固体平板上生长, 48 h 菌落大小达到 0.5 mm 左右, 这与以往报道的乳酪短杆菌特性并不相同。

在代谢物分析中, 乳酪短杆菌 G20 在不同生长时期和不同环境的差异代谢物主要包含苯环类化合物、有机酸及其衍生物与有机杂环类化合物。在利用盐碱 LB 培养基培养菌株时, 随着培养时间的增加, 培养基 pH 值不断下降, 这可能是导致菌株平台期与衰亡期的差异代谢物差异变化倍数低、差异代谢物种类与指数期趋同的原因。菌株在盐碱环境中为维持胞内 pH 值的稳定会在胞内积累酸性代谢物^[27], 而培养环境 pH 值的下降则可能是由于这些酸性代谢物部分外泌。本研究中菌株代谢物中上调的有机化合物吲哚-3-乙酸(indole-3-acetic acid)、犬尿酸(kynurenic acid)和葡萄糖酸(gluconic acid)在盐碱环境中指数期的质谱信号强度低于适应期, 推测是这些化合物外泌到胞外, 从而降低了环境 pH 值。菌株上调代谢物中可作为渗透压保护剂的有 L-瓜氨酸(L-citrulline)、L-脯氨酸(L-proline)和 N-乙酰鸟氨酸(N-acetylmethionine)等氨基酸与其衍生物^[28-30], 此外左旋肉碱[L(-)-carnitine]也可作为一种渗透保护剂^[31]。柠檬酸(citrate)在适应期与指数期的持续上调可以为菌株的各项活动提供能量^[32]。

在各时期差异变化较大或质谱信号强度较高的化合物中, 植物鞘氨醇^[33-34]的大量合成有利于细胞锁住胞内水分, 维持自身的渗透平衡。同时通过植物鞘氨醇形成鞘糖脂, 可以修复因渗透压突然改变造成的细胞膜损伤^[35-36]。而组胺的大量生成, 可能是因为耐盐微生物在高盐环境中会将游离的氨基酸脱羧形成组胺^[37]。硫胺素(thiamine)在指数期的大量上调说明菌株开

始不断利用培养基底物, 通过磷酸戊糖途径大量产能^[38], 供给自身能量消耗。此外有报道称硫胺素会提高鲁氏接合酵母的高盐适应性^[39], 以及可以通过提高线粒体氧化状态促进植物快速响应外界胁迫^[40]。指数期下调代谢物中差异变化倍数最大的化合物为胆碱。胆碱是甜菜碱的合成前体, 而菌株代谢物中也检测出了大量的甜菜碱。在差异代谢物通路富集分析中发现, 乳酪短杆菌 G20 适应期与指数期的显著差异代谢通路主要涉及氨基酸的代谢以及碳水化合物代谢, 其中氨基酸合成通路中组氨酸合成、色氨酸合成、精氨酸合成、赖氨酸合成、瓜氨酸合成, 以及脯氨酸合成途径上都有代谢物变化。

综合分析乳酪短杆菌 G20 应对盐碱环境的策略, 菌株在盐碱环境中会有大量氨基酸及其衍生物和能量代谢相关化合物的变化, 同时差异代谢通路中氨基酸代谢与碳水化合物代谢具有极大的占比, 这与以往报道的嗜盐嗜碱微生物盐碱耐受机制相类似^[41]。但不同的是, 菌株在不同生长时期都具备一些差异变化倍数极大且未有文献报道与盐碱耐受机制相关的上调代谢物, 如四甲基对苯二胺(n,n,n',n'-tetramethyl-p-phenylenediamine)、脱氧鸟苷酸(deoxyguanosine monophosphate)、氟甲喹(flumequine)、氯吡苯脲(forchlorfenuron)和 L-古洛糖酸内酯(L-gulonolactone)等。这些化合物变化可能是乳酪短杆菌 G20 对盐碱环境应对策略的独特之处。但其中氟甲喹和氯吡苯脲作为人工合成的药物^[42-43]在乳酪短杆菌 G20 中被生物合成的可能性很低, 而本文是通过全局非靶向代谢分析代谢物的组成, 会根据代谢物结构注释相似化合物, 故部分化合物可能与注释化合物有一定差异, 可能是注释物质的同分异构体。

通过对乳酪短杆菌 G20 所有代谢物进行挖掘, 一些化合物分别被注释为甜菜碱(减轻氧化

应激、内质网应激、炎症和癌症发展^[44-45])、葫芦巴碱(降血糖、抗氧化、促进神经再生^[24,46])和毛果芸香碱(治疗原发性青光眼, 包括开角型与闭角型青光眼^[26])。甜菜碱是耐盐碱微生物中一种常见且应用极为广泛的相容性溶质, 在乳酪短杆菌 G20 正常环境与盐碱环境中它都具备极高的质谱信号强度。而在基因组注释中乳酪短杆菌 G20 具备从胆碱形成甜菜碱的一系列催化酶, 如胆碱氧化酶(EC 1.1.3.17, 1 596 bp)、胆碱脱氢酶(EC 1.1.99.1, 1 875 bp)和甜菜碱醛脱氢酶(EC 1.2.1.8, 1 497 bp)。葫芦巴碱又名烟酸甜菜碱, 有研究表明它可以作为渗透剂对于干旱和盐分胁迫产生反应^[47], 但根据 Ashihara 等^[48]的说法, 其效果小于其他相容性溶质, 如甘氨酸甜菜碱。葫芦巴碱与毛果芸香碱类似, 也是植物中的一种生物碱, 故注释为葫芦巴碱的化合物可能为葫芦巴碱的结构类似物。上调代谢物中还有一些化合物质谱信号强度和变化倍数都较高, 但未能注释到具体化合物, 如长碳链的 $C_{20}H_{43}NO_4$ 、 $C_{16}H_{35}NO_2$, 短碳链的 $C_4H_2N_6O_5$ 、 C_4H_5NO 。

极端微生物是近些年新型可药用分子的重要挖掘来源^[49], 而乳酪短杆菌 G20 上调代谢物中这些与已知生物碱结构相似的物质, 需要在后续的研究中通过色谱分离和质谱鉴定探究功效。拥有极高的质谱信号强度和差异变化倍数的未知物质, 也值得进一步关注。此外有化合物与葫芦巴碱和毛果芸香碱这类分离自植物而生物合成途径尚不明确的活性物质结构相似, 它们在乳酪短杆菌 G20 中大量地积累, 这为能在原核细胞工厂中构建一条更加高效简便的合成路径提供了可能性。而甜菜碱的大量合成, 则使得菌株具备了被底盘化改造成抗逆细胞工厂, 进行甜菜碱生物生产的潜力。同时有研究表明参与甜菜碱合成和转运的基因克

隆后在大肠杆菌中异源表达,可以提高大肠杆菌的抗逆性^[50]。

通过基因组学与代谢组学数据的耦合,能够推测部分高差异变化倍数代谢物在乳酪短杆菌 G20 中的合成通路,如上调代谢物组胺可能会以 L-组胺醇为起点在组胺醇脱氢酶(EC 1.1.1.23, 1 305 bp)连续作用下先后形成 L-组胺醛、L-组氨酸, L-组氨酸在 L-组氨酸羧基裂解酶(EC 4.1.1.22)作用下形成组胺。通路上涉及到的化合物都存在于菌株代谢物中,而催化酶 L-组氨酸羧基裂解酶未能在菌株基因组上注释到,但乳酪短杆菌 G20 基因上存在该酶同工酶芳香 L-氨基酸脱羧酶(EC 4.1.1.28, 1 373 bp)的编码序列。此外还有上调代谢物 L-脯氨酸可能会以 L-谷氨酸为起点在 L-吡咯啉脱氢酶(EC 1.2.1.88, 3 532 bp)和吡咯啉-5-羧酸还原酶(EC 1.5.1.2, 795 bp)先后作用下合成,以及上文所述从胆碱至甜菜碱的合成通路。这类对盐碱环境高度应答的代谢物,其合成路线上相关酶的编码基因及上下游元件序列可为受盐碱理化因子诱导的逻辑门基因线路梳理提供参考。

参考文献

- [1] 杨多, 岳海涛, 伍杰毅, 赵鲁玉, 邢祥祥, 郭飞, 杨洁. 胡杨叶片及韧皮部内生细菌多样性及生物学功能分析[J]. *微生物学报*, 2022, 62(1): 213-226. YANG D, YUE HT, WU JY, ZHAO LY, XING XX, GUO F, YANG J. Diversity and biological function of endophytic bacteria in *Populus euphratica* leaves and phloem[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(1): 213-226 (in Chinese).
- [2] ZHOU C, XUE YF, MA YH. Characterization and high-efficiency secreted expression in *Bacillus subtilis* of a thermo-alkaline β -mannanase from an alkaliphilic *Bacillus clausii* strain S10[J]. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17(1): 124.
- [3] ZHAI L, XUE YF, SONG YH, XIAN MJ, YIN L, ZHONG NQ, XIA GX, MA YH. Overexpression of AaPal, a peptidoglycan-associated lipoprotein from *Alkalomonas amylolytica*, improves salt and alkaline tolerance of *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana*[J]. *Biotechnology Letters*, 2014, 36(3): 601-607.
- [4] LEÓN MJ, HOFFMANN T, SÁNCHEZ-PORRO C, HEIDER J, VENTOSA A, BREMER E. Compatible solute synthesis and import by the moderate halophile *Spiribacter salinus*: physiology and genomics[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 108.
- [5] SHARMA V, SEHGAL R, GUPTA R. Polyhydroxyalkanoate (PHA): properties and modifications[J]. *Polymer*, 2021, 212: 123161.
- [6] GUTIÉRREZ-ARNILLAS E, DEIVE FJ, RODRÍGUEZ A, SANROMÁN MÁ. Unravelling the suitability of biological induction for halophilic lipase production by *Halomonas* sp. LM1C cultures[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 239: 368-377.
- [7] 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): 1-12.
- [8] ZHANG X, LIN YN, CHEN GQ. Halophiles as chassis for bioproduction[J]. *Advanced Biosystems*, 2018, 2(11): 1800088.
- [9] KUNTE H, LENTZEN G, GALINSKI E. Industrial production of the cell protectant ectoine: protection mechanisms, processes, and products[J]. *Current Biotechnology*, 2014, 3(1): 10-25.
- [10] NYSSOLA A, KEROVUO J, KAUKINEN P, von WEYMARN N, REINIKAINEN T. Extreme halophiles synthesize betaine from glycine by methylation[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(29): 22196-22201.
- [11] PARK YL, BHATIA SK, GURAV R, CHOI TR, KIM HJ, SONG HS, PARK JY, HAN YH, LEE SM, PARK SL, LEE HS, KIM YG, YANG YH. Fructose based hyper production of poly-3-hydroxybutyrate from *Halomonas* sp. YLGW01 and impact of carbon sources on bacteria morphologies[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 154: 929-936.
- [12] MAHANSARIA R, DHARA A, SAHA A, HALDAR S, MUKHERJEE J. Production enhancement and characterization of the polyhydroxyalkanoate produced by *Natrinema ajinwuensis* (as synonym) \equiv *Natrinema altunense* strain RM-G10[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 107: 1480-1490.
- [13] YE JW, HU DK, CHE XM, JIANG XR, LI T, CHEN JC, ZHANG HM, CHEN GQ. Engineering of

- Halomonas bluephagenesis* for low cost production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) from glucose[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 47: 143-152.
- [14] BAJPAI B, CHAUDHARY M, SAXENA J. Production and characterization of α -amylase from an extremely halophilic archaeon, *Haloferax* sp. HA10[J]. *Food Technology and Biotechnology*, 2015, 53(1): 11-17.
- [15] 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.
- [16] TANI Y, MIYAKE R, YUKAMI R, DEKISHIMA Y, CHINA H, SAITO S, KAWABATA H, MIHARA H. Functional expression of l-lysine α -oxidase from *Scomber japonicus* in *Escherichia coli* for one-pot synthesis of l-pipecolic acid from dl-lysine[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(12): 5045-5054.
- [17] SCHAGEN S, OVERHAGEN S, BILSTEIN A. New data confirm skin revitalizing and stress protection by Glycoin natural[J]. *Europe Cosmetics*, 2017: 14-17.
- [18] JHA B, GONTIA I, HARTMANN A. The roots of the halophyte *Salicornia brachiata* are a source of new halotolerant diazotrophic bacteria with plant growth-promoting potential[J]. *Plant and Soil*, 2012, 356(1): 265-277.
- [19] DOLCI P, BARMAZ A, ZENATO S, PRAMOTTON R, ALESSANDRIA V, COCOLIN L, RANTSIOU K, AMBROSOLI R. Maturing dynamics of surface microflora in Fontina PDO cheese studied by culture-dependent and-independent methods[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 106(1): 278-287.
- [20] KIRAN GS, LIPTON AN, PRIYADHARSHINI S, ANITHA K, SUÁREZ LEC, ARASU MV, CHOI KC, SELVIN J, AL-DHABI NA. Antiadhesive activity of poly-hydroxy butyrate biopolymer from a marine *Brevibacterium casei* MSI04 against shrimp pathogenic vibrios[J]. *Microbial Cell Factories*, 2014, 13: 114.
- [21] FEMINA CAROLIN C, KUMAR PS, JOSHIBA GJ, MADHESH P, RAMAMURTHY R. Sustainable strategy for the enhancement of hazardous aromatic amine degradation using lipopeptide biosurfactant isolated from *Brevibacterium casei*[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 408: 124943.
- [22] ATEYYAT MA, SHATNAWI M, AL-MAZRA'AWI M. Isolation and identification of culturable forms of bacteria from the sweet potato whitefly *Bemisia tabaci* Genn. (Homoptera: Aleyrodidae) in Jordan[J]. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 2010: 34(3): 225-234.
- [23] SKOWRONEK M, SAJNAGA E, PLESZCZYŃSKA M, KAZIMIERCZAK W, LIS M, WIATER A. Bacteria from the midgut of common cockchafer (*Melolontha melolontha* L.) larvae exhibiting antagonistic activity against bacterial symbionts of entomopathogenic nematodes: isolation and molecular identification[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(2): 580.
- [24] ARUMUGAM MK, PAAL MC, DONOHUE TM Jr, GANESAN M, OSNA NA, KHARBANDA KK. Beneficial effects of betaine: a comprehensive review[J]. *Biology*, 2021, 10(6): 456.
- [25] BEYGI Z, NEZAMZADEH Z, RABIEI M, MIRAKHORLI N. Enhanced accumulation of trigonelline by elicitation and osmotic stresses in fenugreek callus culture[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2021, 147(1): 169-174.
- [26] SCHMIDT T, HEISE N, MERZWEILER K, DEIGNER HP, AL-HARRASI A, CSUK R. Concise synthesis of both enantiomers of pilocarpine[J]. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2021, 26(12): 3676.
- [27] SARETHY IP, SAXENA Y, KAPOOR A, SHARMA M, SHARMA SK, GUPTA V, GUPTA S. Alkaliphilic bacteria: applications in industrial biotechnology[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2011, 38(7): 769-790.
- [28] CHUN BH, HAN DM, KIM KH, JEONG SE, PARK D, JEON CO. Genomic and metabolic features of *Tetragenococcus halophilus* as revealed by pan-genome and transcriptome analyses[J]. *Food Microbiology*, 2019, 83: 36-47.
- [29] KIM KH, JIA BL, JEON CO. Identification of trans-4-hydroxy-L-proline as a compatible solute and its biosynthesis and molecular characterization in *Halobacillus halophilus*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2054.
- [30] del MORAL A, SEVERIN J, RAMOS-CORMENZANA A, TRÜPER HG, GALINSKI EA. Compatible solutes in new moderately halophilic isolates[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1994, 122(1/2): 165-172.
- [31] SANTOS G, HORMIGA JA, ARENSE P, CÁNOVAS M, TORRES NV. Modelling and analysis of central metabolism operating regulatory interactions in salt stress conditions in a L-carnitine overproducing *E. coli*

- strain[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e34533.
- [32] AIKAWA S, NISHIDA A, HASUNUMA T, CHANG JS, KONDO A. Short-term temporal metabolic behavior in halophilic *Cyanobacterium Synechococcus* sp. strain PCC 7002 after salt shock[J]. *Metabolites*, 2019, 9(12): 297.
- [33] BREIDEN B, SANDHOFF K. The role of sphingolipid metabolism in cutaneous permeability barrier formation[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2014, 1841(3): 441-452.
- [34] RABIONET M, GORGAS K, SANDHOFF R. Ceramide synthesis in the epidermis[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2014, 1841(3): 422-434.
- [35] van SMEDEN J, JANSSENS M, GOORIS GS, BOUWSTRA JA. The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2014, 1841(3): 295-313.
- [36] PROKSCH E, BRANDNER JM, JENSEN JM. The skin: an indispensable barrier[J]. *Experimental Dermatology*, 2008, 17(12): 1063-1072.
- [37] LORENTZEN G, WESMAJERVI BREILAND MS, ØSTLI J, WANG-ANDERSEN J, OLSEN RL. Growth of halophilic microorganisms and histamine content in dried salt-cured cod (*Gadus morhua* L.) stored at elevated temperature[J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2015, 60(1): 598-602.
- [38] PHAM N, PHAM K, LEE C, JANG S. Novel insight into the role of thiamine for the growth of a lichen-associated Arctic bacterium, *Sphingomonas* sp. in the light[J]. *Korean Journal of Microbiology*, 2019, 55(1): 17-24.
- [39] 姚婉婷, 李可, 宋娜, 王慧, 卢慧芳, 陈雄, 李沛, 姚娟, 代俊. 硫胺素对鲁氏接合酵母高盐适应性的影响[J]. *中国酿造*, 2020, 39(11): 78-84.
- YAO WT, LI K, SONG N, WANG H, LU HF, CHEN X, LI P, YAO J, DAI J. Effect of thiamine on high-salt adaptability of *Zygosaccharomyces rouxii*[J]. *China Brewing*, 2020, 39(11): 78-84 (in Chinese).
- [40] 周俊, 孙爱珍, 曾礼漳, 李哲. 硫胺素通过提高线粒体氧化状态促进植物快速响应外界胁迫的研究[J]. *激光生物学报*, 2012, 21(4): 340-345.
- ZHOU J, SUN AZ, ZENG LZ, LI Z. Thiamin promotes plant rapid response to external stress through improving mitochondrial oxidation status[J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2012, 21(4): 340-345 (in Chinese).
- [41] 王伟伟, 唐鸿志, 许平. 嗜盐菌耐盐机制相关基因的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2015, 42(3): 550-558.
- WANG WW, TANG HZ, XU P. Salt-tolerance related genes in halophilic bacteria and Archaea[J]. *Microbiology China*, 2015, 42(3): 550-558 (in Chinese).
- [42] IFTIKHAR S, GILANI S, TAJ B, RAHEEL A, UD-DIN-IMTIAZ U, TERMIZI S, AL-SHAKBAN M, ALI H. Design, synthesis and biological evaluation of organotin(IV) complexes of flumequine and cetirizine[J]. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 2018, 83(4): 425-437.
- [43] SHAN TT, ZHANG X, GUO CF, GUO SH, ZHAO XB, YUAN YH, YUE TL. Identity, synthesis, and cytotoxicity of forchlorfenuron metabolites in kiwifruit[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(33): 9529-9535.
- [44] WANG C, MA C, GONG LH, DAI S, LI YX. Preventive and therapeutic role of betaine in liver disease: a review on molecular mechanisms[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2021, 912: 174604.
- [45] UELAND PM. Choline and betaine in health and disease[J]. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2011, 34(1): 3-15.
- [46] LI YY, LI Q, WANG CY, LOU Z, LI QC. Trigonelline reduced diabetic nephropathy and insulin resistance in type 2 diabetic rats through peroxisome proliferator-activated receptor- γ [J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2019, 18(2): 1331-1337.
- [47] SCHWARTZ LM, WOODA AJ, GIBSON DJ. Trigonelline accumulation in leaves of *Panicum virgatum* seedlings[J]. *Natural Product Communications*, 2014, 9(8): 1163-1166.
- [48] ASHIHARA H, LUDWIG IA, KATAHIRA R, YOKOTA T, FUJIMURA T, CROZIER A. Trigonelline and related nicotinic acid metabolites: occurrence, biosynthesis, taxonomic considerations, and their roles in *planta* and in human health[J]. *Phytochemistry Reviews*, 2015, 14(5): 765-798.
- [49] SAYED AM, HASSAN MHA, ALHADRAMI HA, HASSAN HM, GOODFELLOW M, RATEB ME. Extreme environments: microbiology leading to specialized metabolites[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2020, 128(3): 630-657.
- [50] GU ZJ, WANG L, RUDULIER D, ZHANG B, YANG SS. Erratum to: characterization of the *Glycine* betaine biosynthetic genes in the moderately halophilic bacterium *Halobacillus dabanensis* D-8T[J]. *Current Microbiology*, 2009, 59(6): 665.