



紫外突变型盐单胞菌株的基因突变位点与四氢嘧啶高产的分子变异机制

薛彬娟¹, 韩睿², 乔丽娟¹, 李永臻¹, 邢江娃¹, 王嵘¹, 沈国平^{1*}, 朱德锐¹

1 青海大学 医学院, 基础医学研究中心, 青海 西宁 810016

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 810016

薛彬娟, 韩睿, 乔丽娟, 李永臻, 邢江娃, 王嵘, 沈国平, 朱德锐. 紫外突变型盐单胞菌株的基因突变位点与四氢嘧啶高产的分子变异机制[J]. 微生物学报, 2024, 64(12): 4902-4917.

XUE Binjuan, HAN Rui, QIAO Lijuan, LI Yongzhen, XING Jiangwa, WANG Rong, SHEN Guoping, ZHU Derui. Mutation sites and high ectoine production mechanism of a *Halomonas* mutant induced by ultraviolet radiation[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(12): 4902-4917.

摘要: 利用紫外诱变获得的一株高产四氢嘧啶(ectoine)的突变型坎帕尼亚盐单胞菌(*Halomonas campaniensis*) G₉-72, 其突变位点、分子变异和高产四氢嘧啶的机制未知。【目的】探讨野生型菌株 XH26 与突变菌株 G₉-72 的突变位点与分子遗传变异机制, 明确四氢嘧啶积聚量暴发的可能原因。【方法】采用 PacBio Sequel II 平台进行全基因组测序, 分析突变菌株的突变基因位点, 结合氨基酸代谢通路分析突变基因与四氢嘧啶合成代谢的关联性, 并进行 RT-PCR 验证。【结果】全基因组测序结果显示野生菌株 XH26 的基因组 4.11 Mb, 编码基因 3 927 个。突变菌株 G₉-72 的基因组存在 35 个突变位点, 包括 18 个单核苷酸多态性突变、14 个插入突变和 3 个缺失突变。代谢通路的关联分析显示: 突变基因 *argF*、*coaBC* 和 *livH* 分别编码鸟氨酸氨甲酰基转移酶(NCBI 数据库蛋白 ArgF 相似度 100.00%)、磷酸泛酰半胱氨酸脱羧酶(蛋白 CoaBC 相似度 99.28%)和支链氨基酸 ABC 转运体渗透酶(与蛋白 LivH 相似度 96.27%), 分别参与延胡索酸、柠檬酸的合成以及增加支链氨基酸的吸收转运。上游代谢物的流量增加可能是突变菌株四氢嘧啶积聚量暴发的关键原因。RT-PCR 验证四氢嘧啶代谢通路相关的 20 个基因, 转录表达水平与预期分析相一致。【结论】突变基因 *argF*、*coaBC* 和 *livH* 的过表达增强四氢嘧啶合成的代谢流, 与突变菌株四氢嘧啶积聚量的暴发有关, 此为后续突变菌株酶分子的反应机制研究和发酵生产提供参考依据。

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项目(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 Project (2024ZY015).

*Corresponding author. E-mail: sgpkkll@126.com

Received: 2024-07-24; Accepted: 2024-09-19; Published online: 2024-09-23

关键词: 盐单胞菌; 紫外诱变; 突变基因; 比较基因组学; 四氢嘧啶

Mutation sites and high ectoine production mechanism of a *Halomonas* mutant induced by ultraviolet radiation

XUE Binjuan¹, HAN Rui², QIAO Lijuan¹, LI Yongzhen¹, XING Jiangwa¹, WANG Rong¹, SHEN Guoping^{1*}, ZHU Derui¹

¹ Department of Basic Medical Sciences, Medical College, Qinghai University, Xining 810016, Qinghai, China

² Key Laboratory of Vegetable Genetics and Physiology, Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Qinghai University, Xining 810016, Qinghai, China

Abstract: A mutant (G₉-72) of *Halomonas campaniensis* exhibiting high ectoine production was obtained by ultraviolet (UV) mutagenesis. The mutation sites, molecular variations, and high ectoine production mechanism of this mutant remain unknown. **[Objective]** To investigate the mutation sites and genetic variations of G₉-72 compared with the wild type strain XH26 and identify the potential causes of ectoine accumulation outbreak. **[Methods]** PacBio Sequel II was used for whole-genome sequencing, and the mutation sites in the genome of the mutant were identified based on the sequencing results. The amino acid metabolic pathways were analyzed to reveal the association between mutated genes and ectoine synthesis, and the results were verified by RT-PCR. **[Results]** The genome of strain XH26 was 4.11 Mb, encoding 3 927 genes. Compared with strain XH26, G₉-72 showed 35 mutation sites, including 18 single nucleotide polymorphism mutations, 14 insertion mutations, and 3 deletion mutations. The mutated genes *argF*, *coaBC*, and *livH*, which encoded ornithine transcarbamylase (100.00% similarity with ArgF proteins in NCBI database), phosphopantothencysteine decarboxylase (99.28% similarity with CoaBC proteins in NCBI database), and branched-chain amino acid ABC transporter permease (96.27% similarity with LivH proteins in NCBI database), were implicated in the synthesis of fumaric acid, citric acid and the absorption and transport of branched-chain amino acids, respectively. The increased flow of upstream metabolites may be the key reason for the sharply increased accumulation of ectoine in the mutant. RT-PCR verified 20 genes related to the ectoine metabolic pathway, and the transcriptional expression levels were consistent with the expected analysis. **[Conclusion]** The overexpression of genes *argF*, *coaBC*, and *livH* enhanced the anabolic flow of ectoine, which contributed to a significant increase in ectoine accumulation in the mutant. This finding provides a reference point for subsequent studies on the reaction mechanisms of enzymes in the mutant and the fermentation production.

Keywords: *Halomonas*; ultraviolet mutagenesis; mutation gene; comparative genomics; ectoine

四氢嘧啶(ectoine)是中度嗜盐菌或耐盐菌胞内积聚的相容溶质,作为细胞的保护剂和稳定剂,已被广泛应用于化妆品、生物制剂、药物佐剂等研究领域^[1-2]。四氢嘧啶的合成途径以天冬氨酸半醛(L-aspartate-4-semialdehyde, ASA)为前体底物,经二氨基丁酸转氨酶(diaminobutyrate transaminase, EctB)、二氨基丁酸乙酰基转氨酶(diaminobutyrate acetyl transferase, EctA)和四氢嘧啶合成酶(ectoine synthase, EctC) 3步催化合成^[3]。然而,四氢嘧啶的化学合成工艺较为复杂,副产物多,且能耗大,易造成环境污染。国内外学者采用多种四氢嘧啶过量化生产的策略,以提高菌株胞内的四氢嘧啶积累,如物理/化学诱变、发酵工程法、基因工程或系统代谢工程(碳/氮代谢流)等^[4-5]。王冠凤等^[6]利用海神盐单胞菌(*Halomonas neptunia*)进行紫外线(ultraviolet, UV)和亚硝基胍的复合诱变,筛选获得突变株 UN2,四氢嘧啶的摇瓶发酵产量达 1.80 g/L (提高 53.80%)。Schiraldi 等^[7]利用嗜盐海球菌(*Marinococcus halophilus*)进行批式和补料分批发酵,四氢嘧啶产量分别为 1.60 g/L 和 3.60 g/L。Chen 等^[8]将延长盐单胞菌(*H. elongata*)的四氢嘧啶合成基因簇 *ectABC* 成功导入大肠杆菌(*Escherichia coli*) MG1655,构建四氢嘧啶异源合成工程菌,并敲除 *lysA* 基因以削弱赖氨酸(lysine, Lys)的合成代谢分流,最终四氢嘧啶的产量达 12.70 g/L (提高 16.85 倍)。Ma 等^[9]对蓝晶盐单胞菌(*H. bluephagenesis*) TD01 中 3 个基因簇 *ectABC*、*lysC* 和 *asd* 过表达,并通过 CRISPR/Cas9 基因编辑工具敲除基因 *doeA* 和 *ectD*,防止四氢嘧啶降解,获得重组菌株 TD-ADEL-58,分批补料生产四氢嘧啶,28 h 产量达 28 g/L。

课题组前期以四氢嘧啶产量 491.19 mg/L 的野生坎帕尼亚盐单胞菌(*Halomonas campaniensis*)

XH26 为研究材料,经多轮紫外循环诱变和筛选,获得遗传稳定的突变菌株 G₈-52 和 G₉-72^[10]。比较基因组学分析野生菌株 XH26 和突变菌株 G₈-52 (四氢嘧啶产量 1.51 g/L),结果显示菌株 G₈-52 存在 24 个基因突变,其中基因 *orf00723* 和 *orf02403* (*lipA*)分别突变编码 γ -氨基丁酸转移酶(DavT)和 NAD-琥珀酸半醛脱羧酶(GabD),推测四氢嘧啶的产量增加可能与琥珀酸(succinic acid)的合成代谢流有关^[11]。然而,突变菌株 G₉-72 的四氢嘧啶产量更高,达到(1.93±0.01) g/L,何种突变基因参与四氢嘧啶合成代谢的网络通路调控,致使四氢嘧啶积聚量暴发,有待深入探讨。因此,本研究采用 PacBio Sequel II 平台进行野生菌株 XH26 和突变菌株 G₉-72 的全基因组测序,利用比较基因组学分析关键的突变基因和可能涉及的代谢通路,以此探究四氢嘧啶积聚量的暴发原因,为后续突变菌株的发酵生产和实际应用提供一定的理论参考。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株和培养基

野生菌株 *H. campaniensis* sp. XH26 (CCTCCM 2019776M)和紫外突变菌株 G₉-72,均保存于青海大学医学院基础医学研究中心。菌株培养基(g/L, pH 8.0)^[10]: NaCl 58.50, KCl 55.88, MgSO₄·7H₂O 24.65, L-谷氨酸钠(monosodium glutamate monohydrate, MSG) 6.50, 柠檬酸钠 3.00, 酶水解酪素 7.50, 无水 CaCl₂ 0.20, 酵母抽提物 2.00, 121 °C 灭菌 15 min。

1.2 主要试剂和仪器

分析纯 NaCl、MSG、无水 CaCl₂、MgSO₄·7H₂O、KCl、琼脂、柠檬酸钠和酶水解酪素等,北京索莱宝科技有限公司;戊二醛固定液,南京森贝伽生物科技有限公司;乙腈、色谱柱和 DNA-freeTM DNA 去除试剂盒,赛默飞世尔

科技公司; 微孔过滤器, 天津市津腾实验设备有限公司; SPARKEasy 细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒, 山东思科捷生物技术有限公司; TransZol Up 强化 RNA 提取试剂盒, 北京全式金生物技术股份有限公司; PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 和 TB Green Premix Ex Taq™ II, TaKaRa 公司。

恒温培养摇床, 上海一恒科学仪器有限公司; 高效液相色谱仪, Agilent 公司; 可见分光光度计, 上海舜宇恒平科学仪器有限公司; TGrinder 第三代高速组织研磨器, 天根生化科技(北京)有限公司; 扫描电子显微镜, FEI 公司; 高通量测序平台, PacBio 公司; PCR 仪, Bio-Rad 公司; 实时荧光定量 PCR 仪, Roche 公司。

1.3 菌株形态学分析

活化菌液按 1% 比例接种于 100 mL 的液体培养基, 37 °C、180 r/min 培养 12 h 至对数生长期(OD_{600} 约为 1.20), 再利用平板划线观察菌落形态(37 °C 培养 36 h)。液体培养的菌悬液转移至 1.5 mL 尖底离心管中, 8 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 用吸管沿管壁缓慢加入 3% 戊二醛固定液, 吹打混匀、悬浮固定细菌, 制备扫描电镜样品, 观察菌体形态。

1.4 菌株生长和四氢嘧啶检测

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 °C、180 r/min 培养 60 h, 其间每 4 h 测定菌液光度密度值(OD_{600}), 并提取 ectoine 进行 HPLC 定量分析^[12]。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 °C, 检测波长 210 nm, 进样量 5 μ L。最后以培养时间(t)为横坐标, 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。

1.5 全基因组测序及基础分析

采用细菌基因组 DNA 试剂盒进行 DNA 抽

提, 利用琼脂糖凝胶电泳法和微量分光光度计检测基因组 DNA 的完整度、纯度(满足 $OD_{260}/OD_{280}=1.8-2.0$, $OD_{260}/OD_{230}=2.0-2.2$)和浓度(>50 ng/ μ L)。检测合格的 DNA 样本进行文库构建, 利用 PacBio Sequel II 平台进行测序分析, 由武汉菲沙基因信息公司完成。利用 Gapclose 软件(v1.12)进行原始数据预处理和冗余序列去除, 过滤序列采用 HGAP 软件(v4.0)组装。分别利用 Glimmer 软件(v3.02)、tRNAscan-SE 软件(v2.0)和 RNAmmer 软件(v1.2)进行编码 mRNA、tRNA 和 rRNA 基因预测。通过基因本体论(gene ontology, GO)数据库(<http://geneontology.org/>)和京都基因和基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)数据库(<http://www.genome.jp/kegg/>)分别进行基因序列比对和功能注释。

1.6 突变位点与代谢通路关联分析

利用 Mummer 软件(v4.0)进行比较基因组分析, 参考基因组为野生菌株 XH26, 查询基因组为突变菌株 G₉-72, 采用 Delta-filter 工具进行比对过滤, 以获得有效突变信息。利用 Show-snps 程序进行全基因组单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)和插入/缺失(insertion-deletion, InDel)检测, 并使用 ANNOVAR 软件(v20191024)进行 SNP 和 InDel 注释; 然后利用 NCBI-BLAST 在线程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)比对分析基因的突变位点, 并结合 KEGG 分析突变基因与四氢嘧啶代谢通路的关联性。

1.7 关键基因 RT-PCR 检测

采用 RNA 提取试剂盒提取菌株总 RNA ($n=3$), 利用 DNA 去除试剂盒去除样本残留的 DNA, 并通过 PCR 仪和 NanoDrop 2000 检测 DNA 去除、RNA 纯度($OD_{260}/OD_{280}=1.7-2.0$)和浓度(浓度 500–700 ng/ μ L)。符合要求的 RNA 使用反转录试剂逆转录得到 cDNA (–80 °C 保存)。

按 RT-PCR 试剂盒进行定量检测,反应体系 20 μL : TB 溶液 10 μL ,正、反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.8 μL , 无菌无酶水 4.4 μL , cDNA 4 μL 。RT-PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 45 个循环。以 *GAPDH* 作为内参基因, 利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法比较同一基因在两菌株中的相对表达水平。本研究中所有的引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表 1)。

2 结果与分析

2.1 野生菌株和突变菌株的形态学与生长特性比较分析

野生菌株 XH26 菌落(图 1A)与突变菌株 G₉-72 菌落(图 1D)形态基本一致, 菌落圆形、乳白色、不透明、轻微隆起, 且边缘规则, 但突变

菌落的直径略有变小。电镜形态显示, 两株菌体均呈短杆状, 略微弯曲, 两端圆润, 无鞭毛。野生菌株 XH26 的大小为 (1.66–5.47) $\mu\text{m} \times$ (0.60–0.77) μm (图 1B); 而突变菌株 G₉-72 较短宽, 大小为(1.57–2.79) $\mu\text{m} \times$ (0.76–0.99) μm (图 1E)。菌株生长特性分析显示, 野生菌株 XH26 (图 1C)和突变菌株 G₉-72 (图 1F)均在 4 h 时进入对数生长期。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, 32 h 时胞内四氢嘧啶积聚量可达峰值 0.64 g/L; 突变菌株 G₉-72 在 20 h 左右结束对数生长期, 但随着培养时间的延长, 四氢嘧啶产量仍然能持续累积, 52 h 达到峰值 1.93 g/L。由此表明, 突变菌株 G₉-72 进入对数生长期的时间更长, 且四氢嘧啶的持续合成能力较好。

表 1 本研究使用的 RT-PCR 引物

Table 1 Fluorescent quantitative RT-PCR primers used in this study

Genes name	Primer sequences (5'→3')
Amino-acid-N-acetyltransferase (<i>argA</i>)	F: CACGGTGTAGAGCTTAGCGT; R: CAGCATGTTGTGCGACTTCC
N-acetylglutamate kinase (<i>argB</i>)	F: GTGCGGTCACTCAGGACTT; R: CTTTGTGAACGGCATGCGAG
N-acetyl- γ -glutamyl-phosphate reductase (<i>argC</i>)	F: CTTTGACGCTGCGAGTTTCC; R: CCAGCGAATCGATGAAAGCC
Aspartate aminotransferase (<i>argD</i>)	F: GAAAGTGCGCCATGGAAAG; R: CACTGAGCGTACTTTTGCCG
N-acetylmethionine deacetylase (<i>argE</i>)	F: CGTTGAAATCACACCAGC; R: TGAGGTGTTTCTAGCGCCTG
Ornithine transcarbamylase (<i>argF</i>)	F: CGTTAATCACAGGCACGCTG; R: AGAGCCGATTGAAGACACCG
Argininosuccinate synthase (<i>argG</i>)	F: CGCTTAGCAATCAACGGACG; R: AGGTTGTGCTGGCGTATTCA
Argininosuccinate lyase (<i>argH</i>)	F: CACGCTCTTCATCGGTCACT; R: AGCCAAGTACGAACCAGTC
Phosphopantothoenoylcysteine decarboxylase (<i>coaBC</i>)	F: GGCGTTGGTTAGTAGGCAGT; R: AAGCGGCCAGTTAATCTCC
Pantetheine-phosphate adenylyltransferase (<i>coaD</i>)	F: CCTATCACCAACGGCCACTT; R: TCAAGACTAGGCTGCTTGCC
Dephospho-CoA kinase (<i>coaE</i>)	F: CCGAACACTTTGGCACAGAC; R: GTGCGTGATAATTGCAGCGA
Citrate synthase (<i>gltA</i>)	F: TGAGCCTGCTAAGCGTACTG; R: GTTCAGCAATCCGTGCGAAG
Malate dehydrogenase (<i>mdh</i>)	F: GTGCTTGCCGGTTTTCTGAG; R: GCGTGTACTCGTTGTCGGTA
Branched-chain amino acid transporter (<i>livH</i>)	F: ATGCCTCCTTACCGAACAGC; R: GGTGCGATTCTTACTGGCCT
Aspartate kinase (<i>lysC</i>)	F: GAGGACGCTATGGAAGAAC; R: GCGATAGGACCAAGAATACG
Aspartate-semialdehyde dehydrogenase (<i>asd</i>)	F: GAACGACAAAGACGCTACAG; R: CAACACTGAAGGCTGACAAG
Diaminobutyrate acetyl transferase (<i>ectA</i>)	F: AGTCGCTGATGCTGTGGTTGG; R: ACATCAAGCGGCGGACAAG
Diaminobutyrate transaminase (<i>ectB</i>)	F: TGGTATTGATGTTGTCTCTGG; R: TCACTACTTCGCCGCTTGG
Ectoine synthase (<i>ectC</i>)	F: TGAAGGCGAAGGCGAAGTAG; R: GATGTTTCGTCGTGCTGATCC
Ectoine hydroxylase (<i>ectD</i>)	F: CCAGAAAGCCACGATATTC; R: TGATGCACGTAAGGATTAGCG
Housekeeping gene (<i>GAPDH</i>)	F: TCCTTCCCTAAACTCGCACCT; R: ACGATAGTAGCGTCAGCAT

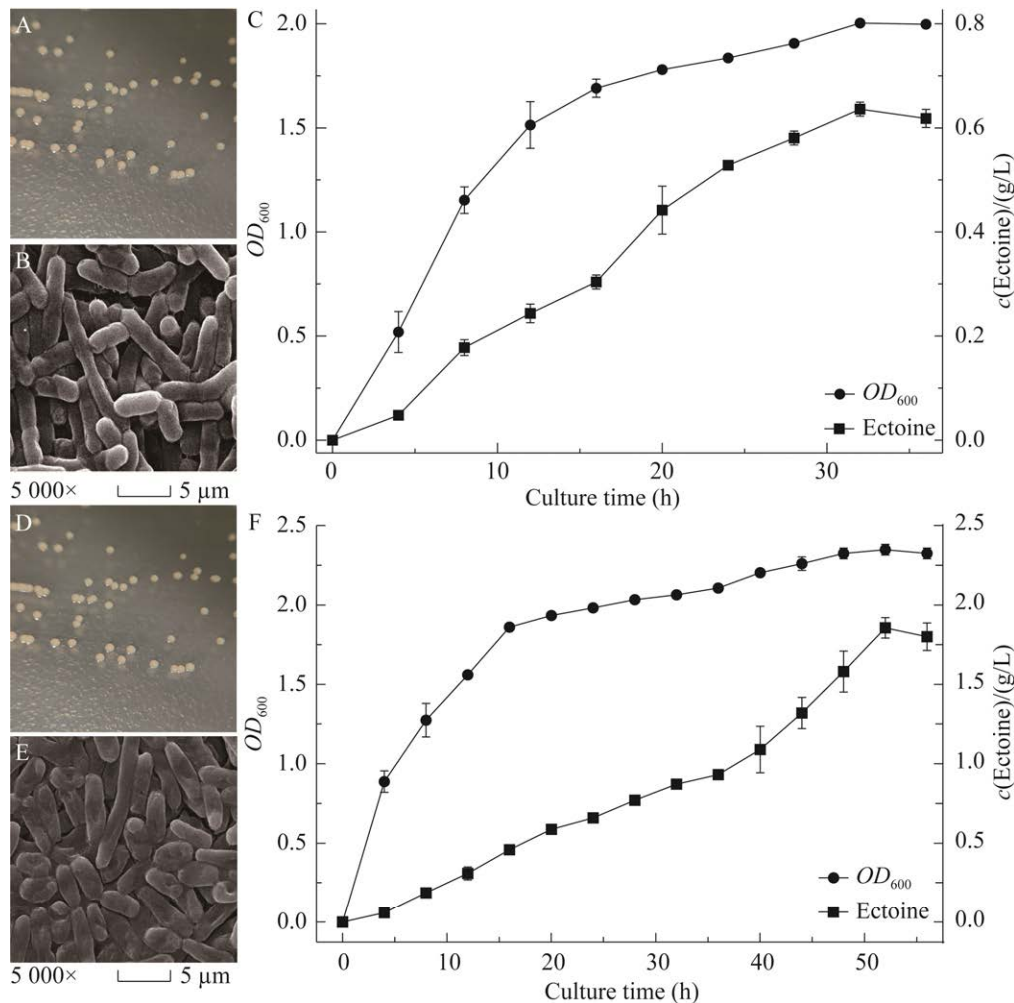


图1 野生 XH26 与突变型 G₉-72 菌株的形态学和生长特性比较分析

Figure 1 Comparison of morphology and growth characteristics between wild strain XH26 and mutant strain G₉-72. A: Wild strain XH26 colony morphology. B: Microscopic morphology of wild strain XH26 bacteriophage. C: Growth and ectoine yield of wild strain XH26. D: Mutant strain G₉-72 colony morphology. E: Microscopic morphology of mutant strain G₉-72 bacteriophage. F: Growth and ectoine yield of mutant strain G₉-72.

2.2 全基因组测序基础分析

利用 PacBio 平台进行野生菌株 XH26 和突变菌株 G₉-72 的全基因组测序, 并对测序结果进行基础分析(表 2)。结果显示, 野生菌株 XH26 和突变菌株 G₉-72 的全基因组大小分别为 4.11 Mb (G+C 含量 52.62%) 和 4.06 Mb (G+C 含量 52.55%)。菌株 XH26 和突变菌株 G₉-72 基因组预测到的编码基因分别为 3 927 个和 3 882 个, 其中蛋白质编码基因各有 3 830 个和 3 785 个;

两株菌的 tRNA 编码基因(63 个)和 rRNA 编码基因(18 个)的数量相等。

2.3 GO/KEGG 注释与聚类分析

基于 GO 功能数据库比对分析野生菌株 XH26 和突变菌株 G₉-72 基因的编码产物, 可能涉及参与的生物过程、分子功能以及细胞组成(图 2A)。结果显示, 野生菌株 XH26 和突变菌株 G₉-72 的基因组分别注释到 2 618 个和 2 592 个预测基因。其中, 生物学过程亚类中的预测基因主

表 2 野生菌株 XH26 与突变菌株 G₉-72 基因组比较分析

Table 2 Comparison genomes of wild strain XH26 and mutant strain G₉-72

Analysis content	Wild strain	Mutant strain
	XH26	G ₉ -72
Molecule shape	Circular	Circular/Oval
Coverage (%)	100	100
Genome size (bp)	4 112 053	4 058 888
G+C content (%)	52.62	52.55
Coding sequences (CDS)	104 708	126 226
Total RNA genes	97	97
tRNAs	63	63
5S rRNAs	6	6
16S rRNAs	6	6
23S rRNAs	6	6
Other RNA genes	16	16
Predicted coding genes	3 927	3 882
Total length of predicted coding genes (bp)	3 687 732	3 636 840

要富集于代谢过程(分别为 1 466 个和 1 447 个)和细胞代谢过程(分别为 1 297 个和 1 279 个);细胞组分亚类中的预测基因主要集中于细胞(分别为 733 个和 727 个)和细胞组分(分别为 762 个和 754 个);分子功能亚类中的预测基因主要富集在催化功能(分别为 1 495 个和 1 481 个)及锚定/结合作用(分别为 1 108 个和 1 098 个)。

利用 KEGG 数据库分析野生菌株 XH26 和突变菌株 G₉-72 的基因表达产物,并进行可能参与的代谢通路统计分析(图 2B)。结果显示,野生菌株 XH26 和突变菌株 G₉-72 的 KEGG 代谢通路分别注释到 2 305 个和 2 272 个蛋白质。大多数注释的通路蛋白聚类于氨基酸代谢(分别为 277 个和 276 个)、碳水化合物代谢(221 个和 220 个)、辅助因子和维生素代谢(分别为 182 个和 181 个)、跨膜转运(分别为 178 个和 177 个)以及能量代谢(分别为 140 个和 139 个)等。在次级代谢物的生物合成途径中,野生菌株 XH26 和突变菌株 G₉-72 分别有 44 个和 43 个注释基因(或蛋白质)。

2.4 比较基因组学分析突变位点

基于基因组两两比对的突变信息集,采用 Show-snps 程序和 ANNOVAR 软件分别进行 SNP 和 InDel 检测和功能注释(表 3)。结果显示,与野生菌株 XH26 相比,突变菌株 G₉-72 存在小片段序列突变的数目为 17 个(包括 14 个插入和 3 个缺失突变),单核苷酸多态性(SNP)数目为 18 个(包括 11 个同义突变和 7 个非同义突变),共计 35 个突变位点。其中 24 个突变发生在结构基因内部,10 个突变位于结构基因上游区域,以及 1 个突变位于结构基因下游区域。

2.5 突变基因功能解析

深入分析 24 个结构基因及翻译蛋白质的突变位点,进行突变前后的功能比较(表 4)。结果显示,突变蛋白主要包括 RNA 结合蛋白(由基因 *cvfB* 编码)、DUF6164 家族蛋白(基因 *orf00223* 编码)、3 个假定蛋白(基因 *orf00228*、*cphA* 与 *orf02867* 编码)、TRAP 转运体底物结合蛋白(基因 *yiaO* 编码)、TRAP 转运体大渗透酶(基因 *siaM* 编码)、鸟氨酸氨甲酰基转移酶(基因 *argF* 编码)、支链氨基酸 ABC 转运体渗透酶(基因 *livH* 编码)、TonB 家族转录调节因子(基因 *tonB* 编码)、类 Ig 结构域蛋白(基因 *orf02504* 编码)、限制性内切酶(基因 *orf02758* 编码)、锰转运体(基因 *mntA* 编码)、乙醛脱氢酶(基因 *xylQ* 编码)、磷酸泛酰半胱氨酸脱羧酶(基因 *coaBC* 编码)、ABC 转运蛋白(基因 *orf00609* 编码)以及醇脱氢酶的催化结构域蛋白(基因 *rspB* 编码)。

突变菌株 G₉-72 中存在 3 个关键的突变蛋白(ArgF、CoaBC 和 LivH),可能增加三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)中延胡索酸(fumaric acid)、柠檬酸(citric acid)、乙酰辅酶 A(acetyl CoA)和琥珀酰辅酶 A(succinyl CoA)的碳/氮代谢流,从而提高四氢嘧啶的合成量。首先,突变菌株 G₉-72 的基因 *orf01257* (*gacA*)

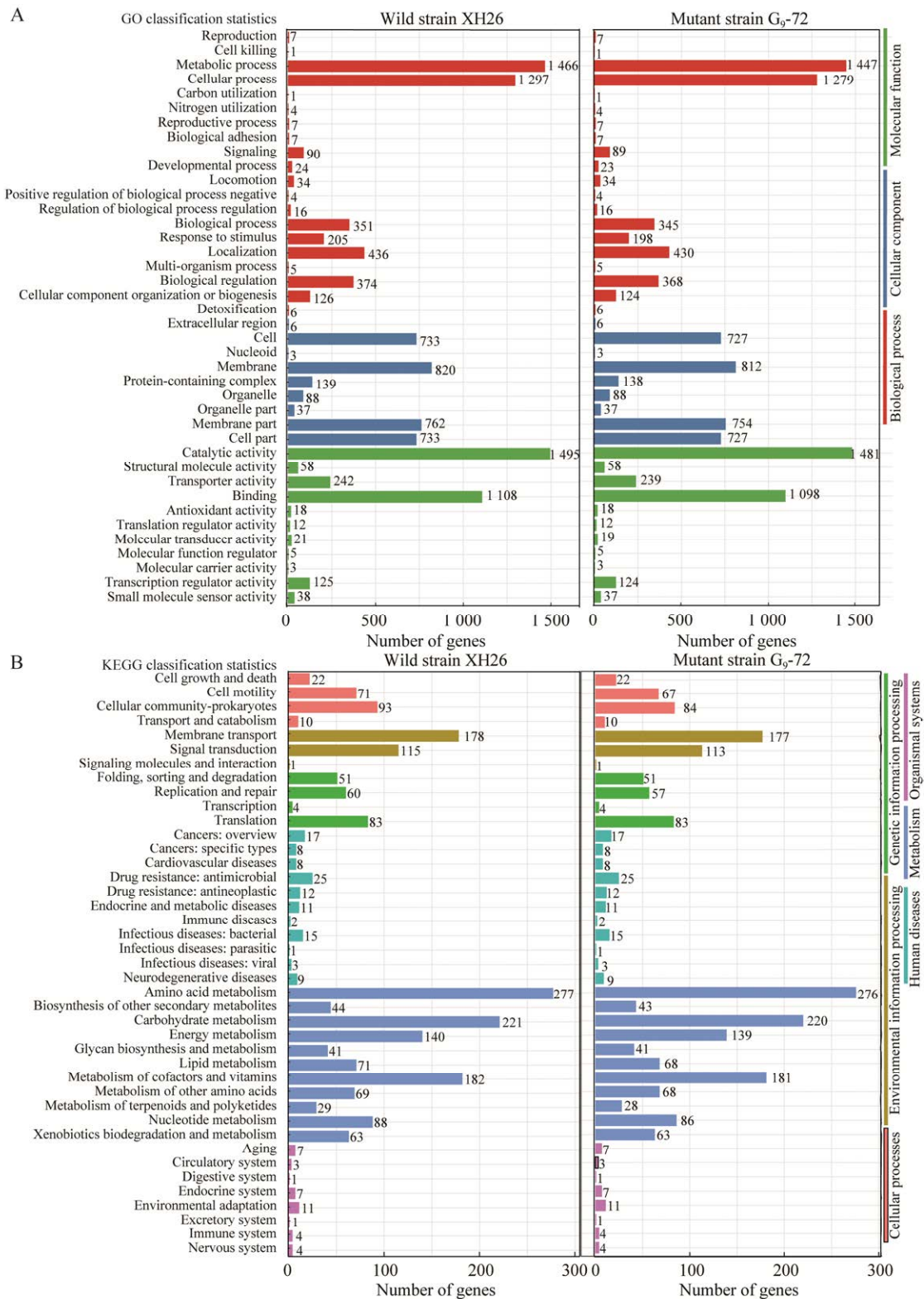
图 2 野生菌株 XH26 与突变菌株 G₉-72 的 GO/KEGG 注释分类

Figure 2 GO/KEGG annotated classification of wild strain XH26 and mutant strain G₉-72. A: GO annotated classification of strains XH26 and G₉-72. B: KEGG annotated classification of strains XH26 and G₉-72.

表 3 野生菌株 XH26 与突变菌株 G₉₋₇₂ 基因组的突变类型分析Table 3 Comparative genomic analysis of wild strain XH26 and mutant strain G₉₋₇₂

Number	ORF number	Protein name	Locus	Block	Reference	Change	Type
1	<i>orf00034</i>	RNA-binding protein S1	37 964	Exonic	–	G	Insertion
2	<i>orf00080</i>	Hypothetical protein HALTITAN3299	86 078	Upstream	–	T	Insertion
3	<i>orf00256</i>	Lactoylglutathione lyase	257 737	Upstream	–	C	Insertion
4	<i>orf00263</i>	Hypothetical protein	261 715	Upstream	–	T	Insertion
5	<i>orf00263</i>	Hypothetical protein	261 744	Upstream	–	AG	Insertion
6	<i>orf00469</i>	Acetaldehyde dehydrogenase	471 178	Exonic	T	C	Synonymous SNV
7	<i>orf00501</i>	TRAP transporter substrate-binding protein	504 022	Upstream	–	G	Insertion
8	<i>orf00566</i>	Phosphopantothienoylcysteine decarboxylase	568 137	Exonic	C	A	Nonsynonymous SNV
9	<i>orf00643</i>	ABC transporter ATP-binding protein	647 351	Upstream	A	T	Synonymous SNV
10	<i>orf00726</i>	TRAP transporter large permease	732 078	Exonic	–	GT	Insertion
11	<i>orf01257</i>	UvrY/SirA/GacA family response regulator transcription factor	1 312 231	Upstream	–	A	Insertion
12	<i>orf02141</i>	Branched-chain amino acid ABC transporter permease	2 212 367	Exonic	–	C	Insertion
13	<i>orf02185</i>	Hypothetical protein	2 262 995	Upstream	–	G	Insertion
14	<i>orf02433</i>	Hypothetical protein	2 529 845	Exonic	–	T	Insertion
15	<i>orf02522</i>	Membrane proteins	2 628 488	Exonic	–	C	Insertion
16	<i>orf02541</i>	Ig-like domain-containing protein	2 650 751	Exonic	G	A	Synonymous SNV
17	<i>orf02541</i>	Ig-like domain-containing protein	2 651 078	Exonic	A	G	Synonymous SNV
18	<i>orf02541</i>	Ig-like domain-containing protein	2 651 117	Exonic	G	A	Synonymous SNV
19	<i>orf02541</i>	Ig-like domain-containing protein	2 651 159	Exonic	C	G	Synonymous SNV
20	<i>orf02541</i>	Ig-like domain-containing protein	2 651 160	Exonic	G	C	Nonsynonymous SNV
21	<i>orf02541</i>	Ig-like domain-containing protein	2 651 163	Exonic	T	–	Deletion
22	<i>orf02541</i>	Ig-like domain-containing protein	2 651 165	Exonic	G	T	Nonsynonymous SNV
23	<i>orf02541</i>	Ig-like domain-containing protein	2 651 166	Exonic	C	G	Nonsynonymous SNV
24	<i>orf02541</i>	Ig-like domain-containing protein	2 651 168	Exonic	–	A	Insertion
25	<i>orf02541</i>	Ig-like domain-containing protein	2 651 174	Exonic	A	G	Synonymous SNV
26	<i>orf02541</i>	Ig-like domain-containing protein	2 651 177	Exonic	C	G	Nonsynonymous SNV
27	<i>orf02541</i>	Ig-like domain-containing protein	2 651 180	Exonic	C	T	Synonymous SNV
28	<i>orf02541</i>	Ig-like domain-containing protein	2 651 181	Exonic	G	A	Nonsynonymous SNV
29	<i>orf02541</i>	Ig-like domain-containing protein	2 652 098	Exonic	G	A	Synonymous SNV
30	<i>orf02541</i>	Ig-like domain-containing protein	2 653 040	Exonic	A	G	Synonymous SNV
31	<i>orf02542</i>	Hypothetical protein	2 653 448	Exonic	G	–	Deletion
32	<i>orf02804</i>	Hypothetical protein	2 932 441	Downstream	C	–	Deletion
33	<i>orf02913</i>	Hypothetical protein	3 032 494	Exonic	T	C	Synonymous SNV
34	<i>orf03675</i>	Urease accessory protein ureD	3 867 248	Upstream	–	G	Insertion
35	<i>orf03864</i>	Alcohol dehydrogenase catalytic domain-containing protein	4 050 113	Upstream	T	G	Nonsynonymous SNV

– means there are no base pairs at this location.

表 4 野生菌株 XH26 与突变菌株 G₉₋₇₂ 基因突变位点分析Table 4 Mutation sites analysis of wild strain XH26 and mutant strain G₉₋₇₂

Reference gene of XH26	Reference proteins of wild strain XH26 (NCBI identity, %)	NCBI accession number	Alter gene of G ₉₋₇₂	Alter proteins of mutant strain G ₉₋₇₂ (NCBI identity, %)	NCBI accession number
<i>orf00034</i>	RNA-binding protein S1 (100.00)	WP030071723.1	<i>cvfB</i>	RNA-binding protein S1 (100.00)	WP038480019.1
<i>orf00080</i>	Hypothetical protein HALTITAN3299 (98.16)	ELY20074.1	<i>orf00078</i>	Hypothetical protein HALTITAN_3299 (98.16)	ELY20074.1
<i>orf00257 (glo1)</i>	Lactoylglutathione lyase (100.00)	WP253486412.1	<i>orf00223</i>	DUF6164 family protein (100.00)	WP038480437.1
<i>orf00263</i>	Hypothetical protein (100.00)	WP038480446.1	<i>orf00228</i>	Hypothetical protein (100.00)	WP038480446.1
<i>orf00501 (viaO)</i>	TRAP transporter substrate-binding protein (100.00)	WP253486511.1	<i>viaO</i>	TRAP transporter substrate-binding protein (100.00)	WP253486511.1
<i>orf00726 (siaT)</i>	TRAP transporter large permease (99.28)	WP038481516.1	<i>siaM</i>	TRAP transporter large permease (93.63)	WP088700581.1
<i>orf01257 (gacA)</i>	UvrY/SirA/GacA family response regulator transcription factor (100.00)	WP038482893.1	<i>argF</i>	Ornithine carbamoyltransferase (100.00)	WP198350143.1
<i>orf02141</i>	Branched-chain amino acid ABC transporter permease (100.00)	WP038485114.1	<i>livH</i>	Branched-chain amino acid ABC transporter permease (96.27)	WP088701692.1
<i>orf02185</i>	Hypothetical protein (100.00)	WP038485216.1	<i>tonB</i>	Energy transducer TonB (99.03)	WP271909853.1
<i>orf02433</i>	Hypothetical protein (100.00)	WP253485643.1	<i>cphA</i>	Hypothetical protein (100.00)	WP253485645.1
<i>orf02541</i>	Ig-like domain-containing protein (100.00)	WP253485764.1	<i>orf02504</i>	Ig-like domain-containing protein (99.70)	WP253485764.1
<i>orf02542</i>	Hypothetical protein (100.00)	WP253485765.1	<i>orf02504</i>	Ig-like domain-containing protein (99.70)	WP253485764.1
<i>orf02804</i>	Hypothetical protein (100.00)	WP167541166.1	<i>orf02758</i>	Restriction endonuclease, type I, EcoR I, R subunit/Type III (74.42)	AIA76090.1
<i>orf03675 (ureD)</i>	Urease accessory protein ureD (100.00)	WP253486280.1	<i>mntA</i>	Manganese transporter (96.25)	AIA74233.1
<i>orf00469 (xylQ)</i>	Acetaldehyde dehydrogenase (100.00)	WP038480889.1	<i>xylQ</i>	Acetaldehyde dehydrogenase (100.00)	AIA74850.1
<i>orf00566</i>	Phosphopantothienoylcysteine decarboxylase (100.00)	WP253486540.1	<i>coaBC</i>	Phosphopantothienoylcysteine decarboxylase (99.28)	AIA74921.1
<i>orf00643 (dppD)</i>	ABC transporter ATP-binding protein (100.00)	WP231658237.1	<i>orf00609</i>	ABC transporter ATP-binding protein (-)	-
<i>orf02913</i>	Hypothetical protein (100.00)	WP038477584.1	<i>orf02867</i>	Hypothetical protein (71.36)	WP088698847.1
<i>orf03864 (rspB)</i>	Alcohol dehydrogenase catalytic domain-containing protein (100.00)	WP253488167.1	<i>rspB</i>	Alcohol dehydrogenase catalytic domain-containing protein (98.70)	WP301271689.1

- means that no consistent protein sequence was found in the NCBI database.

发生插入突变, 框移突变导致翻译表达为鸟氨酸氨甲酰基转移酶(ornithine transcarbamylase), 与 NCBI 数据库中的蛋白 ArgF 同源(相似度 100.00%)。KEGG 代谢通路分析显示, 胞内的 N-乙酰鸟氨酸(N-acetyl-ornithine)依次在酶 ArgF、ArgE、ArgG 和 ArgH 作用下可生成延胡索酸。其次, 突变菌株 G₉₋₇₂ 的基因 *orf00566* 发生点突变, 翻译表达磷酸泛酰半胱氨酸脱羧酶

(phosphopantothienoyl cysteine decarboxylase), 与 NCBI 数据库中的蛋白 CoaBC 同源(相似度 99.28%)。以半胱氨酸(cysteine, Cys)为底物, 经系列酶 CoaBC、CoaD、CoaE 和 CoaA 催化生成乙酰 CoA, 再经柠檬酸合酶(基因 *gltA*)缩合生成柠檬酸。再次, 突变菌株 G₉₋₇₂ 的基因 *orf02141* 发生插入突变, 框移突变导致翻译表达为支链氨基酸 ABC 转运体渗透酶(branched-chain amino

acid ABC transporter permease), 与 NCBI 数据库中的蛋白 LivH 同源(相似度 96.27%)。蛋白 LivH 参与支链氨基酸的跨膜转运, 将胞外的亮氨酸(leucine, Leu)、异亮氨酸(isoleucine, Ile)和组氨酸(histidine, His)转运至胞内。

2.6 突变基因差异表达验证

以筛选到的 3 个突变基因(*argF*、*coaBC* 和 *livH*)为参考, 关联分析上下游的代谢通路和甄选可能参与的关键基因, 进行 RT-PCR 转录差异分析(图 3)。结果显示, 与野生菌株 XH26 相比,

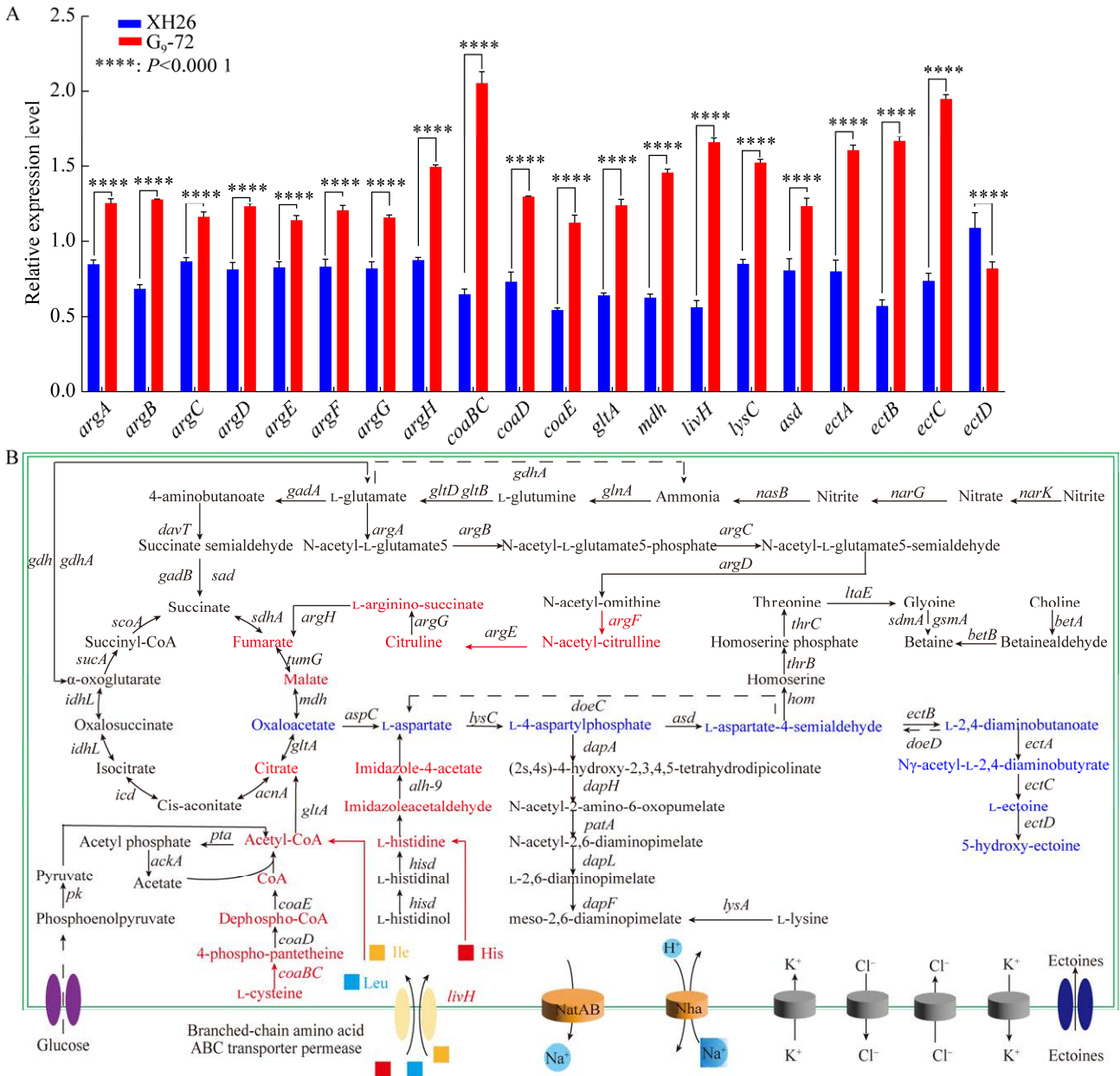


图 3 关键差异基因的 RT-PCR 验证(A)与四氢嘧啶生物合成的代谢途径(B)

Figure 3 RT-PCR validation of key differential genes (A) and metabolic pathways of ectoine biosynthesis (B). The red font and lines means mechanism by which mutant genes facilitate the synthesis of ectoine. Similarly, the main pathways of ectoine synthesis are represent by the blue font and lines. The solid and dashed lines means the synthesis and degradation processes, respectively.

突变菌株 G₉-72 中除基因 *ectD* 外, 其他基因均转录表达上调($P < 0.0001$)。首先, 基因 *argA*、*argB*、*argC*、*argD*、*argE*、*argF*、*argG*、*argH* 表达上调可增强谷氨酸(glutamate, Glu)合成延胡索酸途径, 从而提高草酰乙酸(oxaloacetic acid, OAA)和天冬氨酸(aspartate, Asp)的代谢流。其次, 基因 *coaBC*、*coaD*、*coaE*、*gltA* 转录表达上调, 也可增加 TCA 中 OAA 代谢流量促进 Asp 的转化代谢。再次, 基因 *livH* 转录的表达量升高, 说明进入胞内的 His、Leu 和 Ile 量增加, 后续 Leu 与 Ile 的分解代谢生成乙酰 CoA, His 则可合成 Asp, 以此增强四氢嘧啶合成代谢流, 致使胞内四氢嘧啶的合成量升高。最后, 合成四氢嘧啶的主要基因 *lysC*、*asd*、*ectA*、*ectB*、*ectC* 表达量均上调, 提升了四氢嘧啶的直接合成量; 同时, 编码四氢嘧啶羟化酶(ectoine hydroxylase)的基因 *ectD* 转录表达下调, 减少了四氢嘧啶向羟基四氢嘧啶(5-hydroxyectoine)的代谢转化。

3 讨论

3.1 紫外突变位点与四氢嘧啶暴发的关联性分析

目前, 微生物诱变育种主要包括紫外诱变、化学诱变和常压室温等离子体诱变等方法。紫外诱变技术因操作简便、成本低、遗传稳定性良好, 适用于实验室突变菌株的大规模筛选^[12-15]。紫外诱变常选取的最佳光源为短波紫外线(波长 200–280 nm), 经短波紫外线辐射后易形成嘧啶二聚体, 阻碍碱基间的正常配对, 造成基因复制的错配, 从而导致突变菌株发生形态、生长特性的变化^[16-19]。本研究采用短波紫外线(25 W, 30 cm, 诱变 50 s)诱变盐单胞菌 XH26, 获得一株高产四氢嘧啶的突变菌株 G₉-72 (四氢嘧啶产量 1.93 g/L, 提高 2.97 倍)。与野生菌株相比, 突变菌株的菌落形态基本一致, 但菌落直径更

小, 生长略微缓慢, 菌体形态略微短宽。盐单胞菌胞内的四氢嘧啶积累是以 ASA 为底物, 依次在酶 EctB、EctA 和 EctC 的作用下逐步合成(图 3B)^[3]。我们的前期研究发现, 盐单胞菌 XH26 的四氢嘧啶生物合成与 Asp 和 ASA 代谢直接相关, 与 Glu、谷氨酰胺(glutamine, Gln)、半胱氨酸以及 TCA 中的琥珀酸、苹果酸(malic acid)、OAA 等间接相关^[20-22]。此外, 四氢嘧啶的合成代谢通路中还存在代谢分流支路, 如 ASA 经高丝氨酸脱氢酶(基因 *hom* 编码)作用可分流合成甜菜碱(betaine); 又如代谢中间物天冬氨酰磷酸(L-4-aspartylphosphate)由 4-羟基-四氢二吡啶甲酸合成酶(基因 *dapA* 编码)的催化作用, 可生成赖氨酸^[23-25]。

课题组前期对获得的另一遗传稳定的突变菌株 G₈-52 进行比较基因组学分析^[11], 发现紫外突变菌株 G₈-52 存在 2 个关键突变酶: γ -氨基丁酸转移酶(基因 *davT*)和 NAD-琥珀酸半缩醛脱羧酶(基因 *gabD*), 催化反应增强了 Glu 向琥珀酸半缩醛(succinic semialdehyde)和延胡索酸的转化代谢, 从而提高 OAA、Asp 和四氢嘧啶的代谢流。本研究中, 与野生菌株 XH26 相比, 突变菌株 G₉-72 筛选出的 2 个突变基因 *argF* 和 *coaBC*, 分别表达鸟氨酸氨甲酰基转移酶和磷酸泛酰半胱氨酸脱羧酶(图 3B); 二者与四氢嘧啶的合成代谢通路密切关联, 分别促进延胡索酸和柠檬酸的合成。通过增加 TCA 的代谢流量促进 Asp 的转化代谢, 可能是导致四氢嘧啶产量暴发的主要原因。至此, 无论是突变菌株 G₉-72 还是菌株 G₈-52, 四氢嘧啶合成量的暴发机制均是通过 Glu→TCA→OAA→Asp→四氢嘧啶代谢通路介导实现, 增强其中某一物质的代谢流, 最终促进 Asp 转化合成四氢嘧啶。

此外, 本研究中突变菌株 G₉-72 的部分 ABC 转运蛋白和 TRAP 转运体的编码基因发生突变(表 4), 如 TRAP 转运体底物结合蛋白(基因 *yiaO*

编码)、TRAP 转运体大渗透酶(基因 *siaM* 编码)、支链氨基酸 ABC 转运体渗透酶(基因 *livH* 编码)和 ABC 转运蛋白(基因 *orf00609* 编码)。ABC 转运蛋白主要参与糖类、氨基酸、蛋白质及代谢产物等物质的跨膜运输和四氢嘧啶的吸收和排泄,而 TRAP 转运体(tripartite ATP-independent periplasmic transporter)与 ABC 转运系统(ATP-binding cassette transporters)具有相似的胞外溶质结合受体,与 ABC 转运蛋白功能相似^[26-27]。其中,支链氨基酸 ABC 转运体渗透酶可将 His、Leu 和 Ile 从胞外转运至胞内,可能增加 Asp 合成四氢嘧啶的代谢流量。由此我们推测,基因 *livH* 的突变可能是导致四氢嘧啶积聚量暴发的次要原因。

3.2 突变基因遗传改造和代谢工程的应用前景

代谢工程是借助基因工程技术有目的的实施细胞代谢途径的修饰与改造,以增加目标产物的合成^[28]。截至目前,利用系统代谢工程或合成生物学的技术策略来促进四氢嘧啶的生物合成,已成为当前的研究热点。首先,基于四氢嘧啶代谢通路,采用过表达四氢嘧啶合成途径的相关代谢酶基因,以增强中间代谢物或合成前体的供应流。如过表达天冬氨酸转氨酶基因(*aspC*)、天冬氨酸激酶基因(*lysC*)^[29]和天冬氨酸半醛脱氢酶基因(*asd*)^[30]以增强 Asp 的代谢流;过表达丙酮酸激酶基因(*pk*)^[31]以增强 OAA 的代谢流;过表达谷氨酸脱氢酶基因(*gdh*)以增强二氨基丁酸(L-diaminobutyric acid)的代谢流^[32]。其次,利用 CRISPR/Cas9 基因编辑工具敲除四氢嘧啶合成代谢分流或降解的相关基因,构建代谢分流缺陷型菌株。如设计敲除甜菜碱合成基因 *hom*^[33]、赖氨酸合成基因 *dapA*、羟基四氢嘧啶合成基因 *ectD* 和四氢嘧啶水解的相关酶基因 *doeA/B/C*^[9],以减少四氢嘧啶合成代谢流的分流损失。再次,挖掘新型的代谢调控基

因或上游关键代谢的酶基因,采用分子克隆技术进行系统代谢工程整合或改造,实现四氢嘧啶合成代谢通路的优化改造和系统整合,提高代谢中间物(或前体)的流量和四氢嘧啶的合成量。如整合表达突变菌株 G₈-52 的关键突变基因 *davT* 和 *gabD*,以及本研究菌株 G₉-72 的潜在突变基因 *argF*、*coaBC* 和 *livH*,以增加四氢嘧啶合成上游底物的代谢流;又如构建重组整合质粒(*argA/B/C/D/E/F/G/H+mdh*)或(*coaBC/D/E+gltA*),并利用 T₇ 强启动子诱导基因表达,以增强上游的 OAA 代谢流;同时,过表达基因 *aspC*、*lysC*、*asd* 和 *ectABC* 基因簇,进一步提高四氢嘧啶的合成量。最后,利用合成生物学和 AI (artificial intelligence)智能设计,以简化的“细胞工厂”为载体,运用网络代谢重构技术,精准调控天然次级代谢物的碳/氮源代谢流,可能实现 ectoine 的单通路发酵生产^[34]。

4 结论

盐单胞菌株 XH26 突变前后的菌落形态基本一致,但突变菌株的菌体略微短宽,且四氢嘧啶的积聚量提升 2.97 倍(为 1.93 g/L)。基于比较基因组学分析发现,突变菌株 G₉-72 存在 35 个基因突变位点,包括 18 个单核苷酸多态性位点,17 个碱基插入/缺失突变。关键突变基因 *argF* 和 *coaBC* 分别编码鸟氨酸氨甲酰基转移酶和磷酸泛酰半胱氨酸脱羧酶,可能增加 TCA 中延胡索酸和柠檬酸的代谢流,以此增加四氢嘧啶合成的代谢流,这可能是菌株 G₉-72 四氢嘧啶积聚量暴发的关键原因。关键突变基因 *livH* 编码支链氨基酸 ABC 转运体渗透酶,促进胞外 His、支链氨基酸 Leu 和 Ile 转运至胞内,增加 Asp 合成四氢嘧啶的代谢流,可能是导致四氢嘧啶积聚量暴发的次要原因。后续我们将采用分子对接和分子动力学模拟,并结合体外酶促

反应实验, 从酶分子结构、功能和催化效能的角度进一步解析突变菌株高效积聚四氢嘧啶的作用机制。

参考文献

- [1] BECKER J, WITTMANN C. Microbial production of extremolytes: high-value active ingredients for nutrition, health care, and well-being[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2020, 65: 118-128.
- [2] 张欣, 刘静, 朱德锐. 天然产物 Ectoine 与 Hydroxyectoine 的生物工程及医学应用研究进展[J]. *天然产物研究与开发*, 2017, 29(5): 882-887.
ZHANG X, LIU J, ZHU DR. Review on bioengineering and biomedical applications of natural products ectoine and hydroxyectoine[J]. *Natural Product Research and Development*, 2017, 29(5): 882-887 (in Chinese).
- [3] 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 2581 T[J]. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(8): 1973-1994.
- [4] 张鑫, 舒志万, 李永臻, 邢江娃, 王嵘, 沈国平, 朱德锐. 相容溶质 ectoine 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).
- [5] SAUER T, GALINSKI EA. Bacterial milking: a novel bioprocess for production of compatible solutes[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1998, 57(3): 306-313.
- [6] 王冠凤, 石艳丽, 钱晓路, 董艳美, 陈晨, 栾贻宏, 郭学平. ectoine 高产菌株的筛选及发酵条件的优化[J]. *食品与药品*, 2019, 21(1): 49-56.
WANG GF, SHI YL, QIAN XL, DONG YM, CHEN C, LUAN YH, GUO XP. Screening of ectoine high-productive strain and optimization of fermentation condition[J]. *Food and Drug*, 2019, 21(1): 49-56 (in Chinese).
- [7] SCHIRALDI C, MARESCA C, CATAPANO A, GALINSKI EA, de ROSA M. High-yield cultivation of *Marinococcus* M52 for production and recovery of hydroxyectoine[J]. *Research in Microbiology*, 2006, 157(7): 693-699.
- [8] CHEN J, LIU PF, CHU XH, CHEN JW, ZHANG HW, ROWLEY DC, WANG H. Metabolic pathway construction and optimization of *Escherichia coli* for high-level ectoine production[J]. *Current Microbiology*, 2020, 77(8): 1412-1418.
- [9] MA H, ZHAO YQ, HUANG WZ, ZHANG LZ, WU FQ, YE JW, CHEN GQ. Rational flux-tuning of *Halomonas bluephagenesis* for co-production of bioplastic PHB and ectoine[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 3313.
- [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] WANG ZB, LI YZ, GAO X, XING JW, WANG R, ZHU DR, SHEN GP. Comparative genomic analysis of *Halomonas campaniensis* wild-type and ultraviolet radiation-mutated strains reveal genomic differences associated with increased ectoine production[J]. *International Microbiology*, 2023, 26(4): 1009-1020.
- [12] BOSE JL. Chemical and UV mutagenesis[M]//BOSE JL. *Methods in Molecular Biology*. New York: Springer New York, 2014: 111-115.
- [13] ZHANG X, ZHANG XF, LI HP, WANG LY, ZHANG C, XING XH, BAO CY. Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) as a new powerful mutagenesis tool[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(12): 5387-5396.
- [14] 孟甜, 李玉锋. 现代工业微生物育种技术研究进展[J]. *生命科学仪器*, 2009, 7(12): 3-6.
MENG T, LI YF. The investigative development of breeding technology in industrial microorganisms[J].

- Life Science Instruments, 2009, 7(12): 3-6 (in Chinese).
- [15] 李艳青, 戴剑灏, 蒋忠科, 罗辉, 孙承航. 常压室温等离子体-紫外复合诱变选育新硫肽类抗生素 166A 高产菌株[J]. 中国抗生素杂志, 2022, 47(5): 514-520. LI YQ, DAI JL, JIANG ZK, LUO H, SUN CH. Breeding of new thiopeptide antibiotic 166A high-yield producing strain by MPMS composite mutagenesis with plasma and UV[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2022, 47(5): 514-520 (in Chinese).
- [16] 曹恩华. UVA 的辐射效应及其分子机理[J]. 激光生物学, 1994(4): 529-534. CAO EH. Radiation effects of ultraviolet and its molecular mechanism[J]. Acta Laser Biology Sinica, 1994, (4): 529-534 (in Chinese).
- [17] 王付转, 梁秋霞, 李宗伟, 王雁萍, 吴健. 诱变和筛选方法在微生物育种中的应用[J]. 洛阳师范学院学报, 2002, 21(2): 95-99. WANG FZ, LIANG QX, LI ZW, WANG YP, WU J. Applications of mutation and screening in microbiology breeding[J]. Journal of Luoyang Normal University, 2002, 21(2): 95-99 (in Chinese).
- [18] RODRÍGUEZ-CALZADA T, QIAN MJ, STRID Å, NEUGART S, SCHREINER M, TORRES-PACHECO I, GUEVARA-GONZÁLEZ RG. Effect of UV-B radiation on morphology, phenolic compound production, gene expression, and subsequent drought stress responses in chili pepper (*Capsicum annum* L.)[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2019, 134: 94-102.
- [19] QIAN MJ, ROSENQVIST E, PRINSEN E, PESCHECK F, FLYGARE AM, KALBINA I, JANSEN MAK, STRID Å. Downsizing in plants-UV light induces pronounced morphological changes in the absence of stress[J]. Plant Physiology, 2021, 187(1): 378-395.
- [20] 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.
- [21] RESHETNIKOV AS, KHMELENINA VN, MUSTAKHIMOV II, TROTSSENKO YA. Genes and enzymes of ectoine biosynthesis in *Halotolerant Methanotrophs*[J]. Methods in Enzymology, 2011, 495: 15-30.
- [22] 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(2): 17-22. GAO HL, CONG W, OUYANG F. Glucose and glutamine metabolism in cultured mammalian cells[J]. Biotechnology Bulletin, 2000(2): 17-22 (in Chinese).
- [23] SHU ZW, ZHANG X, WANG R, XING JW, LI YZ, ZHU DR, SHEN GP. Metabolic engineering of *Halomonas campaniensis* strain XH26 to remove competing pathways to enhance ectoine production[J]. Scientific Reports, 2023, 13(1): 9732.
- [24] PETERKOFKY B, GILVARG C. N-succinyl-L-diaminopimelic-glutamic transaminase[J]. Journal of Biological Chemistry, 1961, 236(5): 1432-1438.
- [25] SIMMS SA, VOIGE WH, GILVARG C. Purification and characterization of succinyl-CoA: tetrahydrodipicolinate N-succinyltransferase from *Escherichia coli*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1984, 259(5): 2734-2741.
- [26] 王永宝, 陈爱民, 孙杰, 王彦章. TRAP 转运体: 一种新的依赖于胞外溶质结合受体的转运系统[J]. 生命的化学, 2009, 29(6): 789-793. WANG YB, CHEN AM, SUN J, WANG YZ. TRAP transporter-a novel extracytoplasmic solute receptor-dependent transporter[J]. Chemistry of Life, 2009, 29(6): 789-793 (in Chinese).
- [27] 陈福暖, 黄瑜, 蔡佳, 王忠良, 简纪常, 王蓓. ABC 转运蛋白结构及其在细菌致病性中的研究进展[J]. 生物技术通报, 2022, 38(6): 43-52. CHEN FN, HUANG Y, CAI J, WANG ZL, JIAN JC, WANG B. Structure of ABC transporter and research progress of it in bacterial pathogenicity[J]. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(6): 43-52 (in Chinese).
- [28] 赵学明, 王靖宇, 陈涛, 陈洵, 班睿, 马红武. 后基因组时代的代谢工程: 机遇与挑战[J]. 生物加工过程, 2004, 2(2): 1-7. ZHAO XM, WANG JY, CHEN T, CHEN X, BAN R,

- MA HW. Metabolic engineering in the post genomic era: opportunities and challenges[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2004, 2(2): 1-7 (in Chinese).
- [29] ZHANG SY, FANG Y, ZHU LF, LI HD, WANG Z, LI Y, WANG XY. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for efficient ectoine production[J]. Systems Microbiology and Biomanufacturing, 2021, 1(4): 444-458.
- [30] XU SQ, ZHANG B, CHEN WH, YE K, SHEN J, LIU PF, WU JQ, WANG H, CHU XH. Highly efficient production of ectoine via an optimized combination of precursor metabolic modules in *Escherichia coli* BL21[J]. Bioresource Technology, 2023, 390: 129803.
- [31] 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.
- [32] 张鑫. 转录组学分析盐单胞菌 Ectoine 合成通路的关联基因与 CRISPR/Cas9 系统敲除合成分流基因 *hom*[D]. 西宁: 青海大学硕士学位论文, 2022.
- ZHANG X. Transcriptome analysis of related genes of Ectoine synthesis pathway in *Halomonas salina* and knock-out of synthetic shunt gene *hom* by CRISPR/Cas9 system[D]. Xining: Master's Thesis of Qinghai University, 2022 (in Chinese).
- [33] HE YZ, GONG J, YU HY, TAO Y, ZHANG S, DONG ZY. High production of ectoine from aspartate and glycerol by use of whole-cell biocatalysis in recombinant *Escherichia coli*[J]. Microbial Cell Factories, 2015, 14: 55.
- [34] 王晟, 王泽琛, 陈威华, 陈珂, 彭向达, 欧发芬, 郑良振, 孙璠原, 沈涛, 赵国屏. 基于人工智能和计算生物学的合成生物学元件设计[J]. 合成生物学, 2023, 4(3): 422-443.
- WANG S, WANG ZC, CHEN WH, CHEN K, PENG XD, OU FF, ZHENG LZ, SUN JY, SHEN T, ZHAO GP. Design of synthetic biology components based on artificial intelligence and computational biology[J]. Synthetic Biology Journal, 2023, 4(3): 422-443 (in Chinese).