DOI:10.12441/spyswjs.20250729002 [文章编号] 1673-1689(2026)05-0027-11

金坛盐穴中产四氢嘧啶菌株的筛选、鉴定及发酵条件优化

徐俊辉[1,2] 何晓璇[3] 陆佳敏[4] 王卫东[4] 王 浩[4] 王 斌[4] 王玉涵[3] 郭亚辉[3*]
钮永涛[1,2] 陈留平[4]

(1. 中盐金坛盐化有限责任公司,江苏 常州 213200; 2. 江苏省井矿盐综合利用工程技术研究中心,江苏 常州 213200; 3. 江南大学食品学院,江苏 无锡 214122; 4. 中盐盐穴综合利用股份有限公司,江苏 常州 213200)

摘要:【目的】以金坛盐穴中分离得到的菌株为研究对象,筛选高产四氢嘧啶菌株并优化其培养条件,以提高四氢嘧啶产量。**【方法】**采用高效液相色谱仪(HPLC)进行定量分析,液相色谱-质谱联用仪(LC-MS)进行定性分析,筛选产四氢嘧啶的菌株。通过单因素试验考察KCl、$MgSO_4$、*L*-谷氨酸钠(MSG)、酸水解酪蛋白(CA)、NaCl质量浓度及pH对四氢嘧啶产量的影响,并利用响应面优化法建立四氢嘧啶产量与关键影响因子(KCl、酸水解酪蛋白、NaCl质量浓度)的数学模型。**【结果】**成功筛选获得一株高产四氢嘧啶的菌株DJA10,经分类鉴定确定其为海杆菌属(*Marinobacter*)菌株。在最优培养条件($MgSO_4$ 12.0 g/L、*L*-谷氨酸钠6.8 g/L、NaCl 56.6 g/L、KCl 37.3 g/L、酸水解酪蛋白10.5 g/L、pH 8.5)下,菌株四氢嘧啶产量由(195.30±2.06) mg/L提升至(458.51±1.08) mg/L,增幅达134%。**【结论】**该研究成功筛选出高产四氢嘧啶的菌株DJA10,通过优化培养条件显著提高了四氢嘧啶产量,为四氢嘧啶的工业化生产提供了优质菌种资源。

关键词:四氢嘧啶;海杆菌属;分离鉴定;发酵

Screening, Identification, and Fermentation Conditions Optimization of an Ectoine-producing Strain from the Jintan Salt Cavern

XU Junhui[1,2] *HE Xiaoxuan*[3] *LU Jiamin*[4] *WANG Weidong*[4] *WANG Hao*[4] *WANG Bin*[4]
WANG Yuhan[3] *GUO Yahui*[3*] *NIU Yongtao*[1,2] *CHEN Liuping*[4]

(1. China Salt Jintan Salt Chemical Co., Ltd., Changzhou 213200, China; 2. Jiangsu Engineering Research Centre for Comprehensive Utilization of Well and Rock Salt, Changzhou 213200, China; 3. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 4. CNSIG Salt Cavern Comprehensive Utilization Co., Ltd., Changzhou 213200, China)

Abstract: [**Objective**] This study aimed to screen high-yield ectoine-producing strains from the strains isolated from the Jintan salt cavern and optimize their culture conditions to enhance ectoine production. [**Method**] High-performance liquid chromatography (HPLC) was employed for quantitative analysis and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) for qualitative analysis. The ectoine-producing strains were screened. The effects of pH and mass concentrations of KCl, $MgSO_4$, *L*-glutamate sodium (MSG), acid-hydrolyzed casein (CA), and NaCl on ectoine production were investigated *via* a single-factor approach. Response surface methodology was then adopted to establish a mathematical model between ectoine production and key influencing factors (mass concentrations of KCl, acid-hydrolyzed casein, and NaCl). [**Result**] A high-yield ectoine-producing strain,

基金项目:国家"十四五"重点研发计划项目(2023YFB4005500);中国盐业股份有限公司科技发展重点项目(ZK-2301)。
通信作者:郭亚辉(1988—),男,博士,副教授,博士研究生导师,主要从事食品安全快速检测研究。E-mail:guoyahui@jiangnan.edu.cn
收稿日期:2025-07-29 **修回日期:**2025-09-28

DJA10, was successfully screened and identified as *Marinobacter* through systematic characterization. Under the optimized culture conditions ($MgSO_4$ 12.0 g/L, *L*-glutamate sodium 6.8 g/L, NaCl 56.6 g/L, KCl 37.3 g/L, and acid-hydrolyzed casein 10.5 g/L, pH 8.5), the ectoine titer of the strain significantly increased by 134%, from (195.30±2.06) mg/L to (458.51±1.08) mg/L. [**Conclusion**] This study successfully screened a high-yield ectoine-producing strain, DJA10, and significantly enhanced its ectoine production through culture condition optimization, providing an excellent microbial resource for the industrial production of ectoine.

Keywords: ectoine; *Marinobacter*; isolation and identification; fermentation

为了适应高盐环境，盐矿中的微生物可以通过分泌相容性溶质维持自身正常的生理代谢。四氢嘧啶是嗜盐微生物合成的天然相容性溶质，在生物体内可作为酶、DNA等生物大分子及细胞的保护剂，保障其在极端环境下的结构完整性和生理功能[1-2]，在医药、化妆品、生物技术等领域具有广阔的应用前景。

四氢嘧啶可有效维持乳过氧化物酶在极端温度与酸碱条件下的稳定性和活性[3]，稳定蛋白质空间构象[4]，同时能够抵御紫外线和电离辐射对DNA的损伤[5-6]。在日化领域，四氢嘧啶具有优异的保湿活性与抗氧化活性[7]；在临床治疗中，四氢嘧啶凭借多重生物活性，在炎症性疾病、过敏性疾病及神经退行性疾病的治疗中均展现出良好的应用潜力[8]；在工业生产中，四氢嘧啶可作为食品酶保护剂，显著提升淀粉酶等工业酶的热稳定性，同时有效提高嗜热链球菌的冷冻存活率[9-10]。Yue等[11]研究表明，采用2 g/L的四氢嘧啶处理西兰花，可有效保留西兰花的营养成分，延长保鲜期。

目前，全球四氢嘧啶市场单价约1 000美元/kg，且随着其应用场景不断拓展，市场需求持续攀升，行业对四氢嘧啶工业化生产的产量与效率要求也逐步提高。四氢嘧啶的合成方式主要包括化学合成和生物合成[12]。由于四氢嘧啶独特的分子结构，其化学合成工艺成本较高，现阶段主要依靠菌株发酵、分离纯化获得。自1985年四氢嘧啶在嗜盐外硫红螺菌中被发现以来，科研人员已开发出细菌泌乳、分批发酵、分批补料发酵等多种生物制备工艺[13-14]。

Sauer等[15]以嗜盐菌*H. elongate* DSM142为研究菌株，采用细菌泌乳法在2.57 mol/L NaCl培养基中开展发酵试验，四氢嘧啶产量达7.4 mg/(mL·d)。近年来，基于Biobrick法的重组载体构建策略为四氢嘧啶高效生产提供了灵活、可控的技术路径。Zhang等[16]通过系统优化培养基组分与发酵工艺，将目标菌株的四氢嘧啶产量由3.2 g/L提升至5.8 g/L。Fang等[17]通过代谢工程改造大肠杆菌，以菊芋为原料生产四氢嘧啶，产量由31.2 g/L提升至52.4 g/L。Naeem等[18]对大肠杆菌BL21(DE3)进行基因重组改造，实现了低盐培养基条件下四氢嘧啶的体外合成，产量高达167.2 mg/(mL·d)。现阶段虽已围绕发酵工艺优化、菌株重组改造等方面开展研究，但针对高效菌种资源挖掘、分离纯化及检测技术的相关研究仍较为薄弱[19]。

卢静等[20]从连云港高盐土壤中筛选出一株嗜盐反硝化菌株*Halomonas alkaliphila* L8，该菌株在0.15 g/mL NaCl条件下可高效生产四氢嘧啶，产量达0.54 mg/mL，但存在培养时间较长的问题。金坛盐穴蕴含丰富的微生物资源，其高盐卤水中存在大量可培养嗜盐细菌与古菌，如海杆菌属(*Marinobacter*)、盐单胞菌属(*Halomonas*)和富盐菌属(*Haloferax*)等。宏基因组学分析结果证实，该区域微生物群落以广古菌门(Euryarchaeota)、变形菌门(Proteobacteria)等为优势菌群[21]。其中，海杆菌属和盐单胞菌属是工业生产中较为常见的高产四氢嘧啶菌属。

作者以金坛盐穴中分离得到的菌株为研究对象，采用HPLC开展产四氢嘧啶菌株的筛选与分析[22]，并对高产菌株进行形态学、生理生化及分子生物学鉴定。为进一步提高四氢嘧啶产量，通过单因素试验对其发酵条件进行初步优化，在此基础上采用响应面优化法进行多因素协同优化，确定该菌株合成四氢嘧啶的最优发酵条件，为四氢嘧啶的工业化生产提供了优质菌种资源。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

乙醇、甘油、氯化钠：均为分析纯，国药集团化

学试剂有限公司；四氢嘧啶：色谱级，上海源叶生物科技有限公司；乙腈：色谱级，上海泰坦科技股份有限公司。

种子培养基：胰蛋白胨10.0 g/L、酵母浸粉5.0 g/L、NaCl 50.0 g/L，pH 7.0。

发酵培养基：胰蛋白胨10.0 g/L、酵母浸粉5.0 g/L、NaCl 50.0 g/L、KCl 1.12 g/L、$MgSO_4$ 0.24 g/L、*L*-谷氨酸钠0.08 g/L、酸水解酪蛋白5 g/L，pH 8.0。

1.2 仪器与设备

高效液相色谱仪：1260型，美国安捷伦科技有限公司；全功能酶标仪：Synergy H1型，美国Bio Tek公司；紫外-可见分光光度计：TU-1901型，青岛精诚仪器仪表有限公司；扫描电子显微镜：Regulus1800型，日本日立公司；干燥仪：K850型，英国Quorum技术有限公司；离子溅射仪：MC1000型，日本日立公司。

1.3 方法

1.3.1 菌株的分离纯化

金坛盐穴卤水样品于2023年6月采集，无菌处理后于4 ℃保存。取500 mL样品经0.22 μm MCE滤膜过滤后，分别接种于R2A、CM和NHM液体培养基中，37 ℃富集培养3~7 d。随后按常规方法进行菌株分离与纯化，并将纯化菌株于液体培养基中培养24~48 h备用。

1.3.2 产四氢嘧啶菌株的筛选

将菌株分别接种至种子培养基中，培养活化24 h后，以1%的体积分数接种至发酵培养基，于150 r/min、37 ℃振荡培养24 h，然后进行四氢嘧啶的提取和测定。

1.3.3 四氢嘧啶的提取

取10 mL发酵液，于10 000 r/min离心5 min，去除上清液，向菌体中加入2 mL体积分数80%的乙醇（70 ℃预热），1 500 r/min振荡30 min。振荡结束后，10 000 r/min离心15 min，转移上清液至新的试管中，于60 ℃烘干。

1.3.4 四氢嘧啶的测定

取不同质量浓度的四氢嘧啶标准品进行HPLC分析，根据谱图的峰面积和质量浓度构建四氢嘧啶标准曲线。HPLC条件为：采用EClipse XDB-C18色谱柱（150 mm×4.6 mm×5 μm），检测波长210 nm，流动相为乙腈-水（体积比35∶65），柱温20 ℃，进样量25 μL，流量0.8 mL/min，运行时间10 min。用3 mL超纯水溶解烘干后的四氢嘧啶，适当稀释进行HPLC分析。

LC-MS检测条件：采用HSS T3色谱柱（100 mm×2.1 mm×1.8 μm），柱温40 ℃，进样量2 μL，流量0.30 mL/min，流动相A为乙腈，流动相B为体积分数0.1%的甲酸-水溶液。质谱条件为：涡轮喷雾（Turbo Spray）离子源，正离子模式，离子喷雾电压5 500.0 V，离子源温度500.0 ℃。

1.3.5 细胞干质量测定

取10 mL发酵液，于10 000 r/min离心5 min，用等渗盐溶液洗涤菌体2次，60 ℃烘干至恒质量。

1.3.6 产四氢嘧啶菌株的鉴定

1）表型鉴定：样品制备方法参照文献[23-24]并稍加修改，于固体平板培养基上使用扫描电子显微镜观察菌落形态。

2）生长特征：将菌株以1%的体积分数接种至含不同NaCl质量浓度（0~250 g/L）的培养基中，测定0~72 h的OD_{600}值，确定耐盐范围及最适NaCl质量浓度。在最适NaCl质量浓度下，分别于4、28、35、37、40 ℃培养，测定0~72 h的OD_{600}值，确定生长温度范围及最适生长温度。在最适NaCl质量浓度和温度下，于pH 6.5~9.0的培养基中培养，测定0~72 h的OD_{600}值，确定生长pH范围及最适pH。

3）分子生物学鉴定：使用Ezup柱状细菌基因组DNA纯化试剂盒提取菌株DNA，用超微分光光度计检测其浓度和纯度。细菌基因组采用通用引物27F/1492R扩增，古细菌基因组采用25F/1525R扩增，见表1。PCR反应体系为20 μL：引物各0.5 μL、2×*Taq*混合物10.0 μL、模板DNA 0.5 μL、ddH_2O 8.5 μL。反应条件为：94 ℃预变性5 min；94 ℃变性30 s，59 ℃退火30 s，72 ℃延伸2 min，共30个循环；最后72 ℃延伸10 min。采用10 g/L琼脂糖凝胶电泳（100 V，30 min）对PCR产物进行检测，拍照记录。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名称	引物序列（5′—3′）
27F	AGAGTTTGATCATGGCTCAG
1492R	TACGGTTACCTTGTTACGAC
25F	ATTCCGGTTGATCCTGCCGGA
1525R	AGGAGGTGATCCAGCCGCAG

利用 NCBI BLAST 对菌株 16S rDNA 基因序列进行比对。采用 ClustalW 和 MEGA 6 软件基于邻接法构建系统发育树，并通过 1 000 次 Bootstrap 重采样评估分支可靠性[25]。

1.3.7 四氢嘧啶产率计算

四氢嘧啶产率定义为单位细胞菌体质量浓度对应的四氢嘧啶合成量，用于表征菌株的合成效率。按式（1）计算四氢嘧啶产率。

$$Y=\frac{P}{X} \quad (1)$$

Y——四氢嘧啶产率，mg/g；

P——发酵液中四氢嘧啶产量，mg/L；

X——细胞菌体质量浓度，g/L。

1.3.8 产四氢嘧啶菌株的发酵条件优化

分别设置不同质量浓度梯度的 $MgSO_4$、KCl、*L*-谷氨酸钠、酸水解酪蛋白、NaCl 及 pH。在 37 ℃、150 r/min 条件下培养 48 h，测定四氢嘧啶产量并计算产率。

1.3.9 统计分析

所有试验均进行 3 次重复，结果以平均值±标准偏差表示。使用 SPSS 27 软件进行统计学分析，通过单因素方差分析及 Tukey 事后检验（P<0.05）判断组间差异显著性，采用 Origin 2022 软件制图。

2 结果与讨论

2.1 菌株的筛选结果

四氢嘧啶标准曲线为：y=68.13x+149.02（R^2=0.999 2）。作者对 18 株海杆菌属和盐单胞菌属菌株的发酵产物进行定量分析，均检测到与四氢嘧啶标准品一致的峰，表明均具有四氢嘧啶合成能力，但产量差异显著。其中菌株 DJA10 的四氢嘧啶产量最高，达（195.30±2.06）mg/L，四氢嘧啶产率为（64.46±0.68）mg/g，显著高于其他菌株（P<0.05），见图 1。

在四氢嘧啶标准品的质谱图中，观察到了一个质荷比（m/z）为 143.08 的峰；同时，在 DJA10 菌株提取液的质谱图中，同样检测到一个 m/z 为 143.09 的峰，见图 2。该数值与四氢嘧啶的相对分子质量（143.10）一致。结果表明，菌株 DJA10 能够通过合成相容性溶质四氢嘧啶来抵御高盐环境胁迫，从而维持自身的存活与生长。因此，后续将对 DJA10 菌株进行鉴定并优化其发酵条件，以提升四氢嘧啶产量。

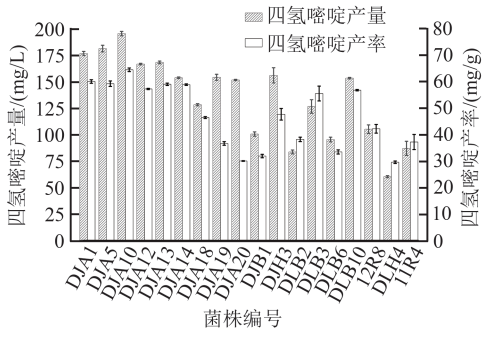


图 1 不同菌株的四氢嘧啶产量与产率

Fig. 1 Ectoine titers and yields of different strains

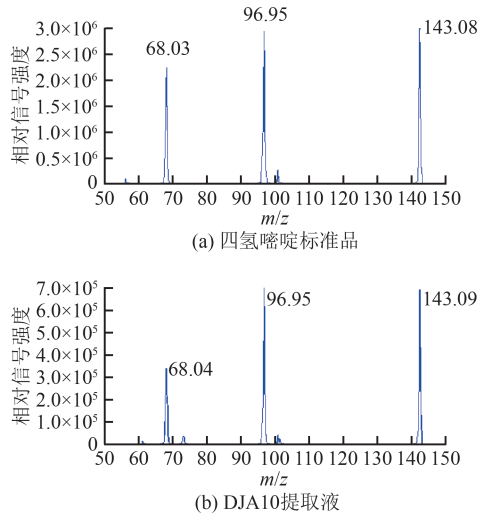


图 2 LC-MS 结果

Fig. 2 LC-MS results

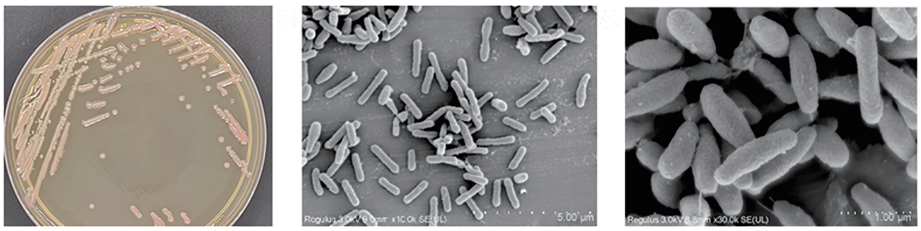
2.2 DJA10 菌株的鉴定结果

2.2.1 表型鉴定结果

DJA10 菌株在平板上可形成米黄色圆形菌落，菌落不透明，表面光滑、湿润且有光泽，易于挑起。扫描电镜下菌体呈长杆状，长度为 3~5 μm，见图 3。

2.2.2 生长特征结果

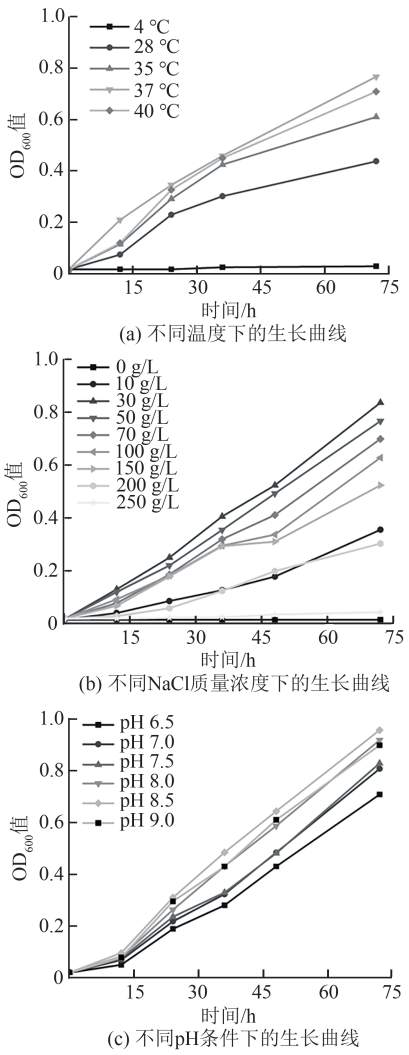
DJA10 菌株具有较强的环境适应能力，可在极端环境中维持正常的生长与增殖，见图 4。结果表明，DJA10 菌株在 28~40 ℃均可生长，最适温度为 37 ℃。DJA10 菌株表现出优异的耐盐性，可在 NaCl 质量浓度为 10~250 g/L 条件下生长，最适 NaCl 质量浓度为 30 g/L，此时菌株生长状态最佳，表明该菌株在中等盐度环境下的生长性能最优。此外，DJA10 菌株在 pH 6.5~9.0 条件下可以生长，最适 pH 为 8.5，表明该菌株在微碱性环境下的生长效率更高，反映出该菌株对原生盐碱环境的进化匹



(a) 菌落形态　(b) 扫描电镜下菌体形态(10 000×)　(c) 扫描电镜下菌体形态(30 000×)

图 3　DJA10 菌株的菌株形态

Fig. 3　Morphological characteristics of strain DJA10



(a) 不同温度下的生长曲线

(b) 不同NaCl质量浓度下的生长曲线

(c) 不同pH条件下的生长曲线

图 4　DJA10 菌株的生长特征

Fig. 4　Growth characteristics of strain DJA10

配，塑造了其适配盐碱环境的特异性调控网络与最适生长盐碱条件。

2.2.3　分子生物学鉴定结果

分子测序结果表明，菌株 DJA10 的 16S rDNA 序列全长为 1 422 bp。利用 MEGA7.0 软件绘制菌株的系统发育树，见图 5。结果表明，DJA10 菌株与已知的海杆菌属中 *Marinobacter adhaerens* HP15 有极高的同源性，达 99.72%，表明两者之间存在密切的亲缘关系。结合其菌落及菌体形态，判断 DJA10 为海杆菌属（*Marinobacter*）菌株。

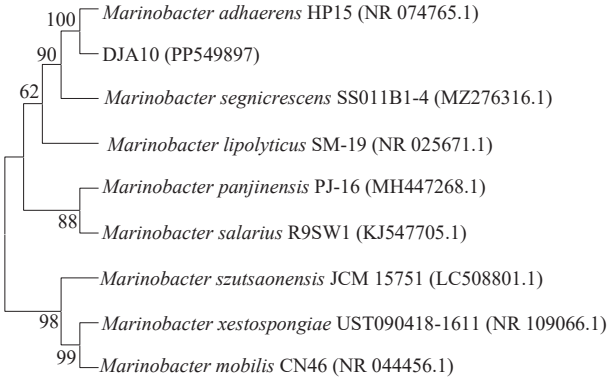


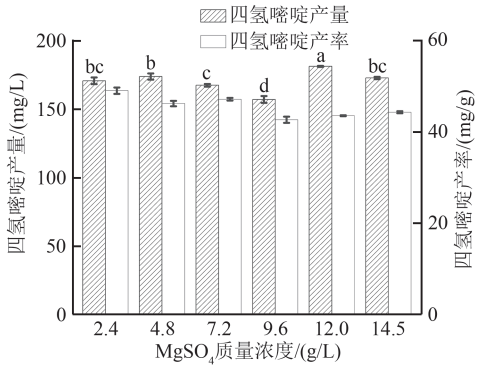
图 5　DJA10 菌株的系统发育树

Fig. 5　Phylogenetic tree of strain DJA10

2.3　DJA10 菌株产四氢嘧啶的单因素试验结果

2.3.1　$MgSO_4$ 质量浓度对四氢嘧啶产量和产率的影响

当 $MgSO_4$ 质量浓度由 2.4 g/L 升至 12.0 g/L 时，四氢嘧啶产量呈波动趋势，于 12.0 g/L 时达到峰值，见图 6。因此四氢吡啶合成的最适 $MgSO_4$ 质量浓度



不同字母表示组间差异显著（P<0.05）。

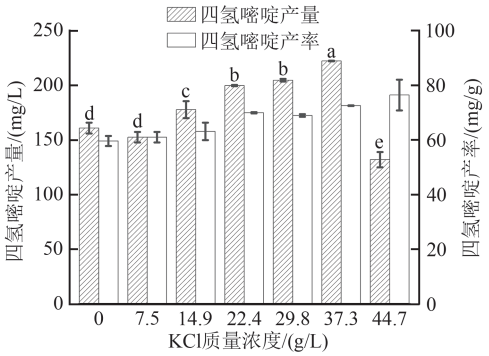
图 6　$MgSO_4$ 质量浓度对四氢嘧啶产量和产率的影响

Fig. 6　Effects of $MgSO_4$ mass concentration on ectoine titer and yield

为 12.0 g/L，这可能与四氢吡啶合成关键酶 EctB、EctC 的酶活性依赖 Mg^{2+} 有关。当 $MgSO_4$ 质量浓度超过 12.0 g/L 时，四氢吡啶产量下降，表明 $MgSO_4$ 质量浓度过高会对四氢嘧啶的合成产生抑制作用。在试验质量浓度范围内，四氢嘧啶产率稍有下降，为 42.65~49.01 mg/g，说明此时菌体生长速度大于四氢嘧啶合成速度。因此，Mg^{2+} 在提升四氢吡啶合成酶活性的同时，也会影响菌体的生长与代谢平衡。

2.3.2 KCl 质量浓度对四氢嘧啶产量和产率的影响

K^+ 是细胞内关键的阳离子，参与多种酶的激活与代谢调控。在最适 $MgSO_4$ 质量浓度下，不同 KCl 质量浓度对四氢嘧啶产量和产率具有显著影响，见图 7。当 KCl 质量浓度为 0~37.3 g/L 时，四氢嘧啶产量和产率均随 KCl 质量浓度增加呈上升趋势，并于 37.3 g/L 时达到最大值，表明该质量浓度既有利于细胞生长，又促进了细胞内四氢嘧啶的合成。当质量浓度超过 37.3 g/L 时，四氢嘧啶的产量随 KCl 质量浓度的升高而降低。对比发现，KCl 在最适质量浓度下对四氢嘧啶产量的提升效果优于 NaCl，表明 K^+ 可能对关键合成酶具有更强的激活作用，或更有利于菌体渗透调节。



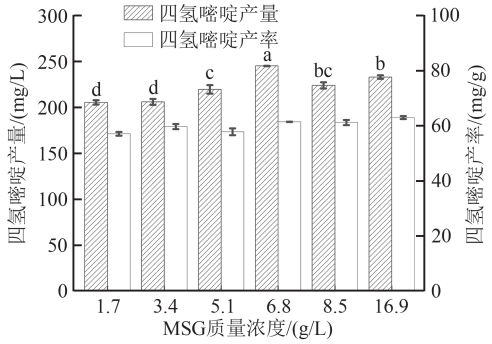
不同字母表示组间差异显著（P<0.05）。

图 7 KCl 质量浓度对四氢嘧啶产量和产率的影响

Fig. 7 Effects of KCl mass concentration on ectoine titer and yield

2.3.3 MSG 质量浓度对四氢嘧啶产量和产率的影响

在最适 $MgSO_4$ 和 KCl 质量浓度下，MSG 质量浓度对四氢嘧啶产量和产率的影响见图 8。当 MSG 质量浓度为 1.7~6.8 g/L 时，四氢嘧啶产量呈上升趋势。MSG 作为合成四氢嘧啶的前体物质，当其质量浓度为 6.8 g/L 时，前体供应充足，四氢嘧啶合成酶（EctA、EctB、EctC）的催化效率达到峰值，四氢嘧啶产量达到最大值。当 MSG 质量浓度>6.8 g/L 时，四氢嘧啶产量随之降低，这可能是由于高质量浓度的 MSG 会造成培养基的渗透压过高，抑制了菌体生长，从而抑制了菌体内四氢嘧啶的合成。四氢嘧啶产率整体变化较小，在 MSG 质量浓度为 6.8 g/L 时也呈现出较高水平。



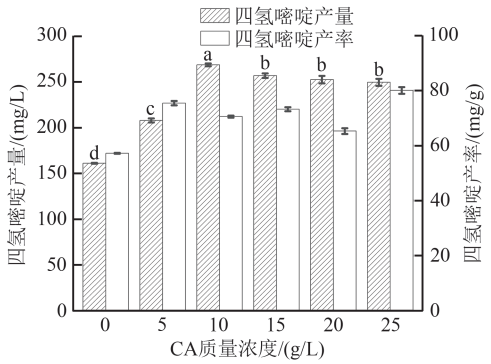
不同字母表示组间差异显著（P<0.05）。

图 8 MSG 质量浓度对四氢嘧啶产量和产率的影响

Fig. 8 Effects of MSG mass concentration on ectoine titer and yield

2.3.4 CA 质量浓度对四氢嘧啶产量和产率的影响

在最适 $MgSO_4$、KCl 和 MSG 质量浓度下，CA 质量浓度对四氢嘧啶产量和产率的影响见图 9。当 CA 质量浓度为 0~10 g/L 时，四氢嘧啶产量呈上升趋势，并于 10 g/L 时达到最大值。细胞菌体的增长幅度与产量增长幅度相对一致，产率维持在较高水平。当 CA 质量浓度>10 g/L 时，底物抑制或代谢分流导致四氢嘧啶产率缓慢下降，产量趋于稳定。



不同字母表示组间差异显著（P<0.05）。

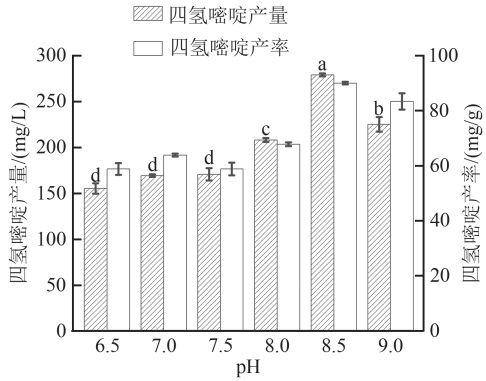
图 9 CA 质量浓度对四氢嘧啶产量和产率的影响

Fig. 9 Effects of CA mass concentration on ectoine titer and yield

2.3.5 pH 对四氢嘧啶产量和产率的影响

环境 pH 会直接影响微生物的生长和增殖，当环境 pH 与微生物的最适 pH 相差大于 1 时，微生物

的生长速率和代谢活性可降低50%以上[27]。在最适$MgSO_4$、KCl、MSG和CA质量浓度下，pH对四氢嘧啶产量和产率的影响见图10。当pH为6.5~8.5时，四氢嘧啶产量呈上升趋势，并于pH 8.5时达到最大值。当pH>8.5时，四氢嘧啶产量下降。四氢嘧啶产率变化趋势与四氢嘧啶产量相似，在pH 8.5时，四氢嘧啶产率最大，此时菌体合成效率最高。



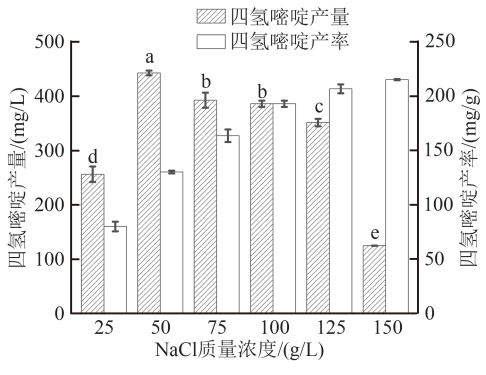
不同字母表示组间差异显著（P<0.05）。

图10　pH对四氢嘧啶产量和产率的影响

Fig. 10　Effects of pH on ectoine titer and yield

2.3.6　NaCl质量浓度对四氢嘧啶产量和产率的影响

在最适$MgSO_4$、KCl、MSG、CA质量浓度和pH条件下，NaCl质量浓度对四氢嘧啶产量和产率的影响见图11。当NaCl质量浓度为25~50 g/L时，四氢嘧啶产量随NaCl质量浓度的升高显著上升，并于50 g/L时达到最大值，表明这一质量浓度是促进菌株细胞生长和增加细胞内四氢嘧啶合成量的最适条件。当NaCl质量浓度为75~100 g/L时，



不同字母表示组间差异显著（P<0.05）。

图11　NaCl质量浓度对四氢嘧啶产量和产率的影响

Fig. 11　Effects of NaCl mass concentration on ectoine titer and yield

虽然四氢嘧啶产率稍有上升，但产量下降，不利于四氢嘧啶的工业化生产。

2.4　DJA10菌株产四氢嘧啶的响应面优化结果

Omara等[28]确定*Vibrio* sp. CS1产四氢嘧啶的最优条件为pH 7.47、NaCl质量浓度7.27 g/L下培养63.7 h，此时四氢嘧啶产量达465.7 mg/L。Orhan等[29]采用响应面法优化了盐、pH、碳源和氮源质量浓度等条件，显著提高了菌株*Nesterenkonia xinjiangensis*的四氢嘧啶产量。作者在单因素试验的基础上，以NaCl质量浓度（A）、KCl质量浓度（B）、CA质量浓度（C）为自变量，以四氢嘧啶产量（y）为响应值进行三因素三水平分析，见表2。响应面试验结果见表3。

表2　响应面试验因素设计与水平表

Table 2　Factors and levels of response surface design

水平	因素		
	NaCl质量浓度/（g/L）	KCl质量浓度/（g/L）	CA质量浓度/（g/L）
−1	25	29.8	5
0	50	37.3	10
1	75	44.7	15

采用Design Expert 13.0软件对表3所得数据进行回归分析，得到回归方程式为：y=452.60+45.18A+3.15B+12.21C+14.06AB−13.66AC−28.47BC−83.31A^2−84.81B^2−40.10C^2。方差分析及显著性检验结果见表4。结果表明，R^2=0.985 2、F=51.68，说明该模型拟合度较好。本模型P<0.000 1，表明模型中的自变量与响应值之间存在极显著相关性。失拟项检验结果显示，P=0.283 0（P>0.05），未达到显著性水平。表明所构建的二次回归模型具有较高的可靠性，能够较好地反映实际情况，模型与试验数据之间一致性较好。另外，二次项变量A^2、B^2、C^2的P<0.01，表明在模型中起着关键作用，影响了四氢嘧啶产量的非线性变化。

在变量交互作用分析中，KCl质量浓度与CA质量浓度（BC）对四氢嘧啶产量的影响显著（P<0.05），NaCl质量浓度与KCl质量浓度（AB）及NaCl质量浓度与CA质量浓度（AC）组合均无显著影响（P>0.05）。

通过等高线图和响应面图可判断不同因素对四氢嘧啶产量的影响[30]。等高线图可显示交互作用强弱：椭圆形表示显著，圆形表示交互作

表 3 响应面试验结果

Table 3 Response surface test results

编号	NaCl质量浓度/（g/L）	KCl质量浓度/（g/L）	CA质量浓度/（g/L）	四氢嘧啶产量/（mg/L）
1	50	29.8	15	373.47
2	25	37.3	15	296.39
3	75	44.7	10	341.64
4	75	37.3	15	368.04
5	75	37.3	5	389.32
6	50	44.7	5	338.84
7	25	29.8	10	255.45
8	50	44.7	15	324.70
9	50	29.8	5	273.74
10	25	37.3	5	263.01
11	50	37.3	10	460.05
12	50	37.3	10	439.94
13	50	37.3	10	445.49
14	50	37.3	10	447.25
15	50	37.3	10	470.28
16	25	44.7	10	231.76
17	75	29.8	10	309.07

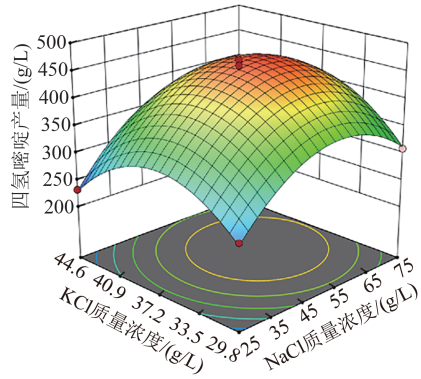
表 4 二次回归模型方差分析

Table 4 Analysis of variance for the quadratic regression model

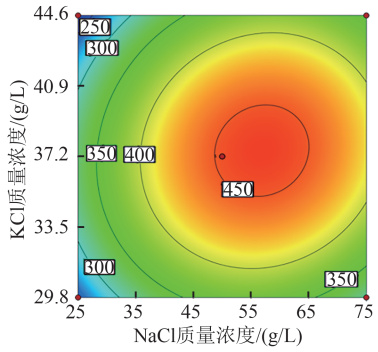
来源	平方和	自由度	均方	*F*值	*P*值	显著性
模型	95 552.86	9	10 616.98	51.68	<0.000 1	*
A	16 331.67	1	16 331.67	79.50	<0.000 1	*
B	79.44	1	79.44	0.39	0.553 7	
C	1 192.92	1	1 192.92	5.81	0.046 8	*
AB	791.3	1	791.30	3.85	0.090 5	
AC	746.93	1	746.93	3.64	0.098 2	
BC	3 241.59	1	3 241.59	15.78	0.005 4	*
A^2	29 223.22	1	29 223.22	142.25	<0.000 1	*
B^2	30 286.81	1	30 286.81	147.43	<0.000 1	*
C^2	6 771.33	1	6 771.33	32.96	0.000 7	*
残差	1 438.01	7	205.43			
失拟项	830.47	3	276.82	1.82	0.283 0	
净误差	607.54	4	151.88			
总离差	96 990.87	16				

注：“*”表示差异显著，$P<0.05$。

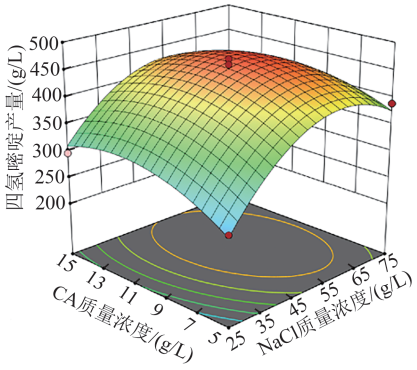
用较弱或无明显交互作用。由图 12 可以看出，NaCl质量浓度与KCl质量浓度、NaCl质量浓度与CA质量浓度交互作用等高线接近圆形，影响不显著；KCl质量浓度与CA质量浓度交互作用等高线呈椭圆形，影响显著。根据所得模型，确定四氢嘧啶最优发酵条件为：NaCl质量浓度 56.6 g/L、KCl质量浓度37.3 g/L、CA质量浓度10.5 g/L，此时四氢嘧啶产量为 459.23 mg/L。为了验证模型的准确性与可靠性，在预测的最佳条件下进行 5 次验证试验，结果显示，在最优条件下四氢嘧啶产量为（458.51±1.08）mg/L，与理论值较为接近，表明此模型具有良好的可行性。



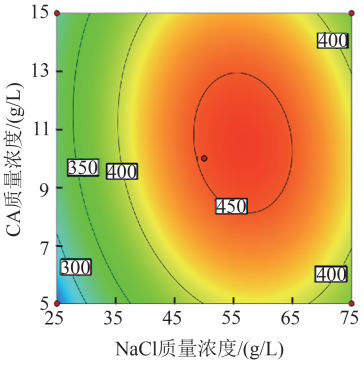
(a) NaCl质量浓度和KCl质量浓度交互作用响应面图



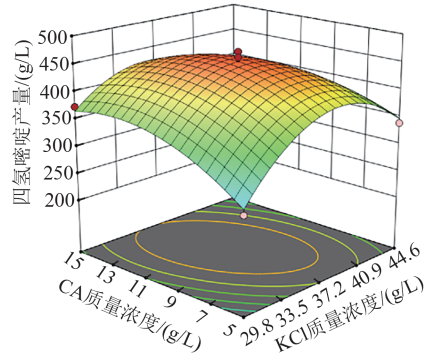
(b) NaCl质量浓度和KCl质量浓度交互作用等高线图



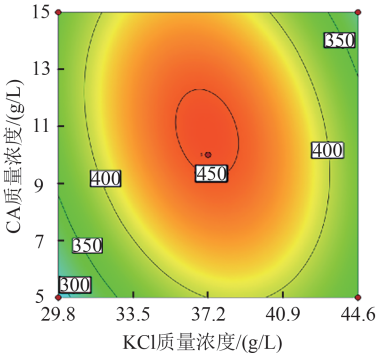
(c) NaCl质量浓度和CA质量浓度交互作用响应面图



(d) NaCl质量浓度和CA质量浓度交互作用等高线图



(e) KCl质量浓度和CA质量浓度交互作用响应面图



(f) KCl质量浓度和CA质量浓度交互作用等高线图

图 12　各变量间的响应面图及等高线图

Fig. 12　Response surface and contour plots of interactions between variables

3　结论

作者以金坛盐穴分离获得的盐单胞菌属（*Halomonas*）和海杆菌属（*Marinobacter*）为研究对象，通过HPLC和LC-MS进行定量和定性分析，筛选出一株高产四氢嘧啶的菌株DJA10，并对其进行了鉴定及发酵条件优化。结果表明，DJA10为海杆菌属菌株；当$MgSO_4$质量浓度为12.0 g/L、*L*-谷氨酸钠质量浓度为6.8 g/L、pH为8.5、NaCl质量浓度为56.6 g/L、KCl质量浓度为37.3 g/L、酸水解酪蛋白质量浓度为10.5 g/L时，菌株DJA10的四氢嘧啶产量显著提高，从（195.30±2.06）mg/L增至（458.51±1.08）mg/L，提高了134%。结果显示，菌株DJA10在中等盐度（56.6 g/L NaCl）下四氢嘧啶产量最高，过高盐度反而抑制其合成；且KCl（37.3 g/L）对四氢嘧啶产量的促进作用显著强于NaCl，表明DJA10可能具有嗜钾特性，为发酵条件优化提供了参考。作者通过单因素与响应面优化

显著提升了菌株DJA10的四氢嘧啶产量，为四氢嘧啶的工业化生产提供了优质菌种资源和工艺参数支持。与已报道的高产菌株相比，DJA10的产量虽仍有提升空间，但其作为天然菌株展现出的生产潜力，为进一步通过遗传改造或工艺放大研究奠定了基础。未来研究应聚焦于菌株DJA10合成四氢嘧啶的调控机制，探索低成本氮源（如工业副产物谷氨酸）替代*L*-谷氨酸钠的可行性，并评估规模化发酵的经济可行性，从而推动其工业应用。

参考文献

[1] 张鑫，舒志万，李永臻，等. 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 Z W，Li Y Z，et al. Advances in the microbial production of the compatible solute ectoine：a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology，2022，38(3)：868-881.(in Chinese)

[2] Hermann L，Mais C N，Czech L，et al. The ups and downs of ectoine：structural enzymology of a major microbial stress protectant and versatile nutrient[J]. Biological Chemistry，2020，401(12)：1443-1468.

[3] Boroujeni M B，Nayeri H. Stabilization of bovine lactoperoxidase in the presence of ectoine[J]. Food Chemistry，2018，265：208-215.

[4] Ma Z，Wu C T，Zhu L J，et al. Bioactivity profiling of the extremolyte ectoine as a promising protectant and its heterologous production[J]. 3 Biotech，2022，12(12)：331.

[5] Schröter M A，Meyer S，Hahn M B，et al. Ectoine protects DNA from damage by ionizing radiation[J]. Scientific Reports，2017，7：15272.

[6] Hahn M B，Meyer S，Schröter M A，et al. DNA protection by ectoine from ionizing radiation：molecular mechanisms[J]. Physical Chemistry Chemical Physics，2017，19(37)：25717-25722.

[7] Brands S，Schein P，Castro-Ochoa K F，et al. Hydroxyl radical scavenging of the compatible solute ectoine generates two *N*-acetimides[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics，2019，674：108097.

[8] Kanapathipillai M，Lentzen G，Sierks M，et al. Ectoine and hydroxyectoine inhibit aggregation and neurotoxicity of Alzheimer's β-amyloid[J]. FEBS Letters，2005，579(21)：4775-4780.

[9] Orhan F，Demirci A，Efe D，et al. Usage of ectoine as a cryoprotectant for cryopreservation of lactic acid bacteria[J]. Folia Microbiologica，2024，69(1)：133-144.

[10] 郑昕. 四氢嘧啶对澳麦Gairdner和国麦甘啤3号制麦过程的影响[J]. 食品科技，2011，36(8)：127-131.
Zheng X. Influence of ectoine in the process of malting barley with Gairdner and Ganpi No. 3[J]. Food Science and Technology，2011，36(8)：127-131.(in Chinese)

[11] Yue X Z，Tian T，Duan W H，et al. Ectoine maintains the flavor and nutritional quality of broccoli during postharvest storage[J]. Food Chemistry，2024，458：140204.

[12] Kunte H J，Lentzen G，Galnski E A. Industrial production of the cell protectant ectoine：protection mechanisms，processes，and products[J]. Current Biotechnology，2014，3(1)：10-25.

[13] 王冠凤，石艳丽，钱晓路，等. 四氢嘧啶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 G F，Shi Y L，Qian X L，et al. Screening of ectoine high-productive strain and optimization of fermentation condition[J]. Food and Drug，2019，21(1)：49-56.(in Chinese)

[14] 陈永涛. 利用葡萄糖合成四氢嘧啶菌株的构建[D]. 福州：福建师范大学，2021：6.

[15] Sauer T，Galinski E A. Bacterial milking：a novel bioprocess for production of compatible solutes[J]. Biotechnology and Bioengineering，1998，57(3)：306-313.

[16] Zhang H，Tong H R，Yin Q，et al. Efficient production of ectoine from Jerusalem artichoke using engineered *Escherichia coli*[J]. Bioresource Technology，2025，431：132589.

[17] Fang T Z，Hu M K，Li D D，et al. Efficient biosynthesis of ectoine in engineered *Vibrio natriegens*[J]. Journal of Biotechnology，2025，405：238-248.

[18] Naeem M，Yuan H L，Luo S Y，et al. Efficient biosynthesis of ectoine in recombinant *Escherichia coli* by biobrick method[J]. Fermentation，2024，10(9)：450.

[19] 李月. 四氢嘧啶的分析与制备纯化研究[D]. 大连：大连海洋大学，2024：5.

[20] 卢静，武丽娜，田凤蓉，等. 一株嗜盐反硝化菌*Halomonas alkaliphile* L8的脱氮及其产四氢嘧啶研究[J]. 山西大学学报(自然科学版)，2024，47(6)：1326-1336.
Lu J，Wu L N，Tian F R，et al. Study on the denitrification performance and tetrahydropyrimidine production of *Halomonas alkaliphile* L8[J]. Journal of Shanxi University (Natural Science Edition)，2024，47(6)：1326-1336.(in Chinese)

[21] He X X, Lu J M, Wang W D, et al. Isolation and metagenomic analysis of halophilic microorganisms from Jintan salt mine in China[J]. Geomicrobiology Journal, 2025,42(2):137-146.

[22] 刘紫寒,郭秋爽,周超,等. 高效液相色谱法检测发酵液中四氢嘧啶及羟基四氢嘧啶[J]. 日用化学工业(中英文), 2022,52(11):1236-1240.
Liu Z H, Guo Q S, Zhou C, et al. Determination of ectoine and hydroxyectoine in fermentation broth by high performance liquid chromatography[J]. China Surfactant Detergent & Cosmetics, 2022, 52(11): 1236-1240.(in Chinese)

[23] 刘恺,密玲煜,刘玲玲,等. 不同扫描电镜制样方法观察棉花叶片气孔[J]. 生命科学研究,2020,24(4):293-300.
Liu K, Mi L Y, Liu L L, et al. Different SEM sample preparation methods to observe the stomata of cotton leaves[J]. Life Science Research,2020,24(4):293-300.(in Chinese)

[24] 孙镇平,李佳,刘洪红,等. 不同处理技术对环境扫描电镜下细菌原始形态的影响[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版),2013,34(1):41-43.
Sun Z P, Li J, Liu H H, et al. The impact of different processing techniques on the original form of environmental scanning electron microscope bacteria[J]. Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition),2013,34(1):41-43.(in Chinese)

[25] Letunic I, Bork P. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(W1):W242-W245.

[26] 翁南海,王焕宇,张磊,等. 一株耐盐反硝化细菌的筛选、鉴定和特性及其产物四氢嘧啶的检测[J]. 微生物学通报,2023,50(6):2335-2348.
Weng N H, Wang H Y, Zhang L, et al. A salt-tolerant denitrifying bacterial strain: screening, identification, characterization, and detection of its product ectoine[J]. Microbiology China, 2023, 50(6): 2335-2348.(in Chinese)

[27] Ye R Z, Jin Q S, Bohannan B, et al. pH controls over anaerobic carbon mineralization, the efficiency of methane production, and methanogenic pathways in peatlands across an ombrotrophic-minerotrophic gradient[J]. Soil Biology and Biochemistry,2012,54: 36-47.

[28] Omara A M A, Sharaf A E M, El-Hela A A, et al. Optimizing ectoine biosynthesis using response surface methodology and osmoprotectant applications [J]. Biotechnology Letters,2020,42(6):1003-1017.

[29] Orhan F, Ceyran E, Akincioğlu A. Optimization of ectoine production from *Nesterenkonia xinjiangensis* and one-step ectoine purification[J]. Bioresource Technology, 2023,371:128646.

[30] 王诗瑞,缪增强,邢江娃,等. 基于响应面法优化四氢嘧啶羟化酶体外催化合成5-羟基四氢嘧啶条件[J]. 中国高原医学与生物学杂志,2023,44(4):263-269.
Wang S R, Miao Z Q, Xing J W, et al. Optimization of the conditions of 5-hydroxyectoine catalyzed by ectoine hydroxylase *in vitro* based on response surface method [J]. Chinese High Altitude Medicine and Biology,2023, 44(4):263-269.(in Chinese)