

## 四氢嘧啶吸收缺陷突变株高效制备四氢嘧啶

徐蕊, 张苓花\*

大连海事大学环境科学与工程学院, 大连 116026

**摘要:** 【目的】为进一步提高四氢嘧啶(1,4,5,6-四氢-2-甲基-4-嘧啶羧酸; 1,4,5,6-tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid; ectoine) 合成效率, 【方法】利用步移 PCR 方法克隆了 *Halomonas salina* DSM 5928<sup>T</sup> 四氢嘧啶特异性转运蛋白(ectoine-specific transporter; TeaABC) 编码基因 *teaABC*, Red 重组技术构建了四氢嘧啶吸收缺陷突变株 *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> (*teaABC*<sup>-</sup>)。【结果】*H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> (*teaABC*<sup>-</sup>) 10 L 发酵罐的四氢嘧啶发酵, 四氢嘧啶总浓度 9.10 (±0.08) g/L, 合成效率为 9.93 (±0.09) g/L·d。【结论】四氢嘧啶吸收缺陷突变株 *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> (*teaABC*<sup>-</sup>) 解除了四氢嘧啶吸收对其合成的负反馈调节, 从而显著提高了四氢嘧啶合成效率。

**关键词:** *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup>, 四氢嘧啶, *teaABC*, Red 重组, 吸收缺陷突变株

**中图分类号:** Q933      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2012) 05-0661-07

四氢嘧啶(1,4,5,6-四氢-2-甲基-4-嘧啶羧酸; 1,4,5,6-tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid; ectoine) 是某些微生物应答环境渗透压胁迫所合成的一种渗透压补偿溶质<sup>[1-2]</sup>。四氢嘧啶对逆环境下的核酸、蛋白质及细胞具有稳定性作用, 可作为化妆品保湿剂和酶蛋白稳定剂等<sup>[3-4]</sup>。近年来四氢嘧啶在医药领域的应用研究也日益受到关注<sup>[5]</sup>。四氢嘧啶具有广阔的应用前景和开发价值, 提高四氢嘧啶制备效率的研究具有重要意义。

用于对抗环境渗透压胁迫的胞内四氢嘧啶浓度与胞外盐(如 NaCl) 浓度呈正比<sup>[6]</sup>, 所以高效生产四氢嘧啶的工艺研究, 首先是解决高盐浓度下细胞的高密度培养。Onraedt A. E. 等利用表皮短杆菌(*Brevibacterium epidermis*) DSM 20659 菌株, 通过分批流加进行高密度发酵, 四氢嘧啶合成产率约为

2 g/L·d<sup>[7]</sup>。而首先用于四氢嘧啶批量生产的是“细菌挤奶”工艺。伸长盐单胞菌(*Halomonas elongata*) DSM 142<sup>T</sup> 在较高盐浓度(1.5 mol/L) 诱导下细胞合成四氢嘧啶, 经过分批流加的高密度发酵后收集细胞, 通过低渗胁迫使细胞迅速释放胞内四氢嘧啶(约释放总合成量的 64%), 随后, 细胞再在含有较高盐浓度的培养基中生长, 重新诱导合成胞内四氢嘧啶, 再行低渗透压释放。重复 9 次这种渗透压胁迫循环过程, 四氢嘧啶合成产率约为 3.3 g/L·d<sup>[8]</sup>。

中度嗜盐菌合成四氢嘧啶的渗透调节机理研究无疑对于提高四氢嘧啶制备效率具有重要的指导意义。四氢嘧啶生物合成途径是天冬氨酸家族氨基酸合成途径的分支<sup>[9]</sup>, Schwibbert K. 等通过基因组比较技术研究建立了四氢嘧啶合成和分解代谢网络<sup>[10]</sup>。Grammann K. 等进行了四氢嘧啶合成调节

基金项目: 国家自然科学基金(20776021)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-411-84723926; E-mail: dlzlh2008@163.com

作者简介: 徐蕊(1987-), 女, 辽宁朝阳人, 硕士研究生, 从事极端微生物及其环境生态效应研究。E-mail: liluodlmu@126.com

收稿日期: 2011-11-04; 修回日期: 2012-01-20

研究,在 *H. elongata* DSM 2581<sup>T</sup> 中首次发现了一种新型的四氢嘧啶特异性转运蛋白(ectoine-specific transporter; TeaABC),能够吸收细胞输出至细胞周质或培养基中的四氢嘧啶(包括向培养基中添加的四氢嘧啶)<sup>[11]</sup>。据此,Kunte H. J. 提出了一种解释 *H. elongata* DSM 2581<sup>T</sup> 四氢嘧啶合成调节的模型,在盐胁迫下细胞从头合成四氢嘧啶,胞内四氢嘧啶浓度增加导致细胞膨胀压力增加,当膨胀压力达到某一确定的阈值时,触发输出通道输出四氢嘧啶至细胞周质中。随后 TeaABC 把输出的四氢嘧啶再吸收至细胞质中。四氢嘧啶的吸收会导致四氢嘧啶合成的抑制作用(负反馈调节)。*H. elongata* DSM 2581<sup>T</sup> 四氢嘧啶的输出和吸收是平衡的(输出 = 吸收),培养基中不积累四氢嘧啶。敲除 TeaABC 编码基因 *teaABC* 的 *H. elongata* DSM 2581<sup>T</sup> 突变株,由于只有四氢嘧啶的输出而没有吸收,从而阻断了四氢嘧啶输出/回收循环,解除了四氢嘧啶吸收对其合成的负反馈调节,使四氢嘧啶的合成量增加,超过了胞内用于平衡渗透胁迫的四氢嘧啶浓度(超量合成四氢嘧啶),即 *H. elongata* DSM 2581<sup>T</sup> 四氢嘧啶吸收缺陷突变株超量合成四氢嘧啶<sup>[12]</sup>。这一研究成果对于大规模工业化生产四氢嘧啶具有重要意义<sup>[13]</sup>。

张苓花等人报道了一类野生型四氢嘧啶分泌型菌株 *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup>,在渗透压恒定条件下能够向细胞外分泌四氢嘧啶,并在培养基中累积四氢嘧啶<sup>[14-15]</sup>。显然 *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> 是天然的四氢嘧啶超量合成菌株。截止目前报道的四氢嘧啶合成菌株包括四氢嘧啶非分泌型(如 *H. elongata* DSM 2581<sup>T</sup>)和四氢嘧啶分泌型(如 *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup>)。四氢嘧啶非分泌型菌株合成的四氢嘧啶只积累于细胞内,胞内四氢嘧啶浓度等于四氢嘧啶的总浓度。而四氢嘧啶分泌型菌株四氢嘧啶的总浓度由两部分组成:用于平衡培养基渗透压的胞内四氢嘧啶和分泌积累于培养基中的四氢嘧啶。四氢嘧啶分泌和非分泌型菌株的共同点是:胞内四氢嘧啶浓度与胞外盐(如 NaCl)浓度呈正比。然而分泌型菌株 *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> 是否像非分泌型菌株 *H. elongata* DSM 2581<sup>T</sup> 那样也存在四氢嘧啶特异性转运蛋白 TeaABC,是否也通过四氢嘧啶输出/回收的循环调节胞内四氢嘧啶浓度阈值呢?本文前期利用野生型菌株 *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> 在 NaCl 胁迫下进行的四氢嘧啶吸收实验表明,该菌株具有较强的四

氢嘧啶吸收功能,因而推测四氢嘧啶的吸收也会造成对细胞合成四氢嘧啶的负反馈调节。如果构建 *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> 四氢嘧啶吸收缺陷突变株,则在野生型四氢嘧啶自然超量合成的基础上解除吸收四氢嘧啶对其合成的负反馈调节,藉此可进一步提高四氢嘧啶的合成量和合成效率。

本文利用步移 PCR 方法克隆 *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> *teaABC* 基因,利用 Red 重组技术敲除该基因,构建 *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> 四氢嘧啶吸收缺陷突变株,四氢嘧啶吸收实验考查该突变株的四氢嘧啶吸收效率。10 L 发酵罐进行四氢嘧啶发酵,考查该突变株的四氢嘧啶合成量和合成效率。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:** *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> 购自德国 DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) 公司。埃希氏大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 购自宝生物工程(大连)有限公司。*E. coli* W3110、质粒 pET28a-LIC 和质粒 pKD46 由上海意泓生物科技有限公司提供。pKD46 为同源重组的协助质粒,主要含有温度敏感型复制子 (*oriR101*),在高温条件下无法复制,重组后可通过高温培养将 pKD46 从宿主中消除。pKD46 质粒的 3 个  $\lambda$  噬菌体重组酶基因 *exo*、*bet* 和 *gam*,分别编码蛋白质 Exo、Bet 和 Gam。Exo 和 Bet 引导线性片段与同源区发生重组置换,其同源重组效率显著高于传统方法,Gam 抑制大肠杆菌的 RecBCD 核酸外切酶 V 活性,使外源线性 DNA 不被立即降解。pKD46 质粒的阿拉伯糖启动子基因 (*P<sub>araB</sub>*),可在一定浓度的阿拉伯糖诱导下表达 *exo*、*bet* 和 *gam* 基因<sup>[16-17]</sup>。

**1.1.2 培养基:** HLB 培养基(% ,w/v): 蛋白胨 1 g, 酵母粉 0.5 g, NaCl 6 g, 琼脂 1.5 g, pH 7.2。SOC 培养基(% ,w/v): 葡萄糖 0.4 g, 蛋白胨 2 g, 酵母粉 0.5 g, NaCl 6 g, KCl 0.02 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.25 g, MgCl<sub>2</sub> 0.1 g, pH 7.2<sup>[18]</sup>。MG-B 培养基(% ,w/v): L-谷氨酸单钠 3.7 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.2 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.04 g, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.001 g, NaCl 6 g, pH 7.2。

**1.1.3 引物:** 表 1 为本研究使用的引物。引物均由宝生物工程(大连)有限公司合成。

表1 实验所用 PCR 引物

Table 1 PCR primers used in this experiment

Name of primers	Sequence (5' → 3')	Introductions
TF1 TR1	CTGCTSAASAASATGTWCCCSGAAG ACCACGATGGGATCGATCGACRAACA	TF1/TR1: Chromosome walking PCR primer for partial conserved sequence of <i>H. salina</i> DSM 5928 <sup>T</sup> <i>teaABC</i> (2515 bp)
TF2 TR2	TCTTGGCATCGTTGGCAATC TGATTGAACATCATGAGCTC	TF2/TR2: Chromosome walking PCR primer for the entire sequence of <i>H. salina</i> DSM 5928 <sup>T</sup> <i>teaABC</i> (3291 bp)
AF AR	TACCGCGAGACCCACGCTCA GACGCCGGCAAGAGCAACT	AF/AR: Primer of PCR amplification for <i>amp<sup>r</sup></i> gene (481 bp)
KF KR	TGGCCTGTGAACAAGTCTG GAGAAAACCTACCGAGGCAG	KF/KR: Primer of PCR amplification for <i>kan<sup>r</sup></i> gene (205 bp)
RF RR	CATCATCGACGGCCAGGAGAAC GATGGAGGTGCCGGAGATCAC	RF/RR: Primer of PCR amplification for Red recombination DNA fragment (1802 bp)

**1.1.4 试剂盒:** TaKaRa DNAiso Reagent Code: D305A、TaKaRa LA Taq<sup>TM</sup> DNA Polymerase Code: DRR002A、TaKaRa Genome Walking Kit Code: D316、TaKaRa Taq Code: DR001A, 均购自宝生物工程(大连)有限公司。

**1.1.5 试剂和仪器:** 四氢嘧啶标准品购自德国 Biomol GmbH 公司。L-阿拉伯糖购自上海化学试剂采购供应站。泡敌购自大连旅顺化工厂。TP600 型 PCR 仪(宝生物工程(大连)有限公司), UV-9600 型紫外/可见分光光度计(北京瑞利分析仪器有限公司), P230 高效液相色谱仪(大连依利特分析仪器有限公司), Legend RT+ 型高速离心机(德国 Thermo Fisher 公司), BIOTECH-10BGZ 型全自动发酵罐(上海保兴生物设备有限公司)。

## 1.2 *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> *teaABC* 基因克隆

以 *H. elongata* DSM 2581<sup>T</sup> 的 *teaABC* (GenBank AY061646) 基因为参照设计简并引物 TF1/TR1, TaKaRa DNAiso Reagent Code: D305A 提取 *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> 基因组 DNA, 使用 TaKaRa LA Taq<sup>TM</sup> DNA Polymerase Code: DRR002A 和 TaKaRa Genome Walking Kit Code: D316、利用染色体步移 PCR 方法获得 *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> *teaABC* 完整序列。PCR 及琼脂糖凝胶电泳按文献[18]方法进行, 核苷酸序列测定委托宝生物工程(大连)有限公司进行。

## 1.3 Red 重组敲除 *teaABC* 方法

按文献[18]方法从 *E. coli* W3110 中提取质粒 pKD46, 而后电击法转化至 *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup>。重组酶基因 *exo*、*bet* 和 *gam* 的表达按文献[19]方法进行。构建的 Red 重组 DNA 片段构成见图 1, 该片段按文献[18]电击法转化 *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup>。

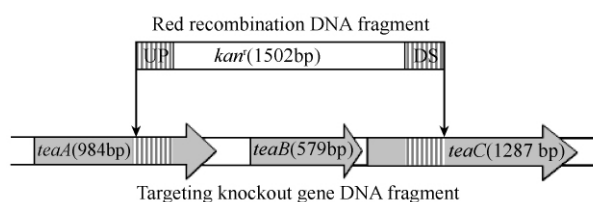


图1 Red 重组 DNA 片段构成

Fig. 1 Construction of Red recombination DNA fragment. UP and DS are homologous with targeting knockout gene; *kan<sup>r</sup>* comes from plasmid pET28a-LIC; *teaA*, *teaB* and *teaC* are targeting knockout gene DNA fragment.

## 1.4 四氢嘧啶浓度测定

按文献[14]利用高效液相色谱(HPLC)法测定四氢嘧啶浓度。

## 1.5 四氢嘧啶吸收速率测定

四氢嘧啶吸收速率定义为单位质量干细胞(CDW, g)、单位时间(T, min)内吸收的四氢嘧啶量(mg)。干细胞量测定按文献[14]方法进行。待测定菌株用 MG-B 培养基 30 °C、120 r/min、培养 18 h。取培养液 10 mL, 离心, 弃上清, 收集菌体。细胞低渗释放胞内四氢嘧啶: 加入去离子水 10 mL, 悬浮, 30 °C 静置 15 min, 然后测定胞内残留四氢嘧啶浓度(A)。盐胁迫细胞吸收四氢嘧啶: 用 10 mL 含 10 mmol/L 四氢嘧啶和 1.5 mol/L NaCl 的水溶液重新悬浮菌体, 30 °C 静置 15 min, 离心收集菌体, 测定胞内四氢嘧啶浓度(B)。四氢嘧啶吸收速率为 (B - A) / CDW · T (mg/g · min)。

## 1.6 四氢嘧啶发酵

四氢嘧啶发酵在 10 L 全自动发酵罐中进行。MG-B 培养基 6 L, 接种量 5%, 恒定 pH 7.2, 恒温 30 °C, 最大通风量 10 L/min。0.015% 泡敌消泡。

## 2 结果

### 2.1 *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> *teaABC* 基因克隆

步移 PCR 获得了包含 *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> *teaABC* 完整序列的 DNA 片段 (3291bp), 基因序列见 GenBank (HM126478.1)。SMS DNA 序列分析 (<http://www.bio-soft.net/sms/index.html>) 表明, 上述 DNA 片段包含 3 个开放的阅读框架 (984 bp、579 bp、1287 bp)。NNPP 启动子序列的预测分析 ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)) 表明, 其上游的核苷酸有启动子特征序列 (-35, -10) 3 个阅读框架构成 1 个基因簇, 共用 1 个启动子 (图 2)。



图 2 *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> *teaABC* 基因结构

Fig. 2 The organization of *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> *teaABC* gene.

表 2 *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> 与 *H. elongata* DSM 2581<sup>T</sup> TeaABC 结构相似性比较

Table 2 Comparison of TeaABC structure similarity between *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> and *H. elongata* DSM 2581<sup>T</sup>

Protein characteristics	TeaA		TeaB		TeaC	
	<i>H. salina</i> DSM 5928 <sup>T</sup>	<i>H. elongata</i> DSM 2581 <sup>T</sup>	<i>H. salina</i> DSM 5928 <sup>T</sup>	<i>H. elongata</i> DSM 2581 <sup>T</sup>	<i>H. salina</i> DSM 5928 <sup>T</sup>	<i>H. elongata</i> DSM 2581 <sup>T</sup>
The similarity of nucleotide (%)	86		88		88	
The similarity of amino acids (%)	85		86		92	
Size (kDa)	36.6	38.3	21.5	22.2	45	45
The proportion of acidic amino acids (%)	19.7	17.9	8.9	9	4.4	4.2
The proportion of hydrophobic amino acids (%)	49.2	48.1	62.2	60.7	73.6	73.4

### 2.2 Red 重组构建四氢嘧啶吸收缺陷突变株

为了提高重组效率, 首先将同源重组协助质粒 pKD46 转化至 *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> 细胞中, 在阿拉伯糖诱导下表达 Exo、Bet 和 Gam, 用以协助外源线性 DNA 片段 (Red 重组 DNA 片段) 与宿主基因组 DNA 的同源重组置换。在含 50 μg/mL 氨苄青霉素的 HLB 平板上挑选转化子并进行氨苄青霉素抗性基因 (*amp<sup>r</sup>*) PCR 验证。PCR 产物核苷酸序列测定结果表明该片段为 *amp<sup>r</sup>* 部分片段 (481 bp)。获得了质粒 pKD46 转化 *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> 的重组子。该重组子 37 °C、120 r/min、2 h 培养, 消除其中的质粒 pKD46。

构建的 Red 重组 DNA 片段转化上述重组子细胞, 在含 200 μg/mL 卡那霉素的 HLB 平板上挑选 3 个在生长和耐盐性上与野生型菌株没有明显差异的单菌落, 分别使用引物 KF/KR 和 RF/RR 进行 PCR, PCR 产物核苷酸序列测定结果显示, 它们分别为卡

核苷酸序列和氨基酸序列相似性分析 (NCBI 数据库) 表明 3 个开放阅读框架的核苷酸序列与 *H. elongata* DSM 2581<sup>T</sup> *teaA*、*teaB* 和 *teaC* (GenBank AY061646.1) 呈最大的相似性, 分别为 86%、88% 和 88%。Bioedit 分析表明, 由这 3 个阅读框架推断的 3 个蛋白质的氨基酸构成 (GenBank HM126478.1) 与 *H. elongata* DSM 2581<sup>T</sup> 的 TeaABC 的氨基酸组成特征基本相似, 结果见表 2。*H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> 和 *H. elongata* DSM 2581<sup>T</sup> 的 TeaA 的酸性氨基酸含量均相当高, 分别为 19.7% 和 17.9%, 这是接触盐环境的嗜盐细菌蛋白的典型特征<sup>[12]</sup>。*H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> 的 2 个跨膜蛋白 TeaB 和 TeaC 的疏水性比较强, 分别含有 62.2% 和 73.6% 的非极性残基。

那霉素抗性基因 (*kan<sup>r</sup>*) 部分片段和 Red 重组 DNA 片段。表明 Red 重组 DNA 片段成功地与宿主 DNA 重组置换了, 获得了 Red 重组子。

野生型菌株 *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> 及其 Red 重组子的四氢嘧啶吸收速率见图 3。*H. salina* DSM

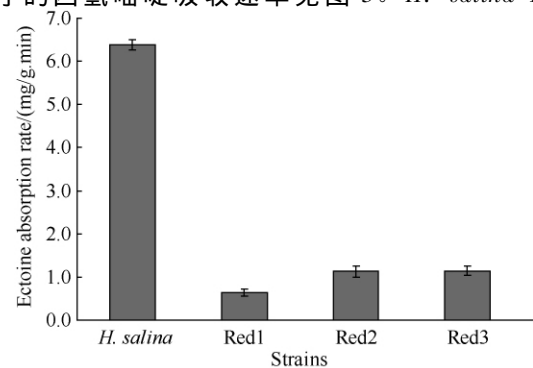


图 3 *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> (*teaABC<sup>-</sup>*) 四氢嘧啶吸收速率

Fig. 3 Ectoine absorption rate of *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> (*teaABC<sup>-</sup>*).

5928<sup>T</sup> 的四氢嘧啶吸收速率为 6.38 (±0.12) mg/g·min, Red 重组子的吸收速率显著低于野生型菌株, 分别为 0.64 (±0.08) mg/g·min、1.13 (±0.13) mg/g·min 和 1.14 (±0.11) mg/g·min。Red1-Red3 由于 *teaABC* 的缺失而成为四氢嘧啶吸收缺陷突变株。Red1 命名为 *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> (*teaABC*<sup>-</sup>), 用该菌株进行以下研究。

### 2.3 *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> (*teaABC*<sup>-</sup>) 四氢嘧啶发酵

*H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> (*teaABC*<sup>-</sup>) 在 10 L 发酵罐中的四氢嘧啶发酵结果如图 4 所示。4 h 延迟期后进入对数生长期, 18 h 达到平衡期。细胞最大生长量为 21.83 (±0.78) g/L (18 h)。至平衡期末期 (22 h) 四氢嘧啶总浓度和胞外四氢嘧啶浓度均随时间进程而增加, 最高值分别为 9.10 (±0.08) g/L 和 6.59 (±0.07) g/L, 四氢嘧啶的合成效率为 9.93

(±0.09) g/L·d。

野生型菌株按上述同样条件进行四氢嘧啶发酵, 并与 *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> (*teaABC*<sup>-</sup>) 进行比较 (表 3)。二者胞内四氢嘧啶浓度基本相同 (2.51 (±0.16) g/L、2.41 (±0.08) g/L), 表明无论分泌还是非分泌型菌株, 其胞内四氢嘧啶浓度均主要由培养基盐浓度控制<sup>[14]</sup>。比较二者胞外最高四氢嘧啶浓度, *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> (*teaABC*<sup>-</sup>) 为 6.59 (±0.07) g/L, *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> 为 4.22 (±0.17) g/L。二者均为四氢嘧啶分泌型菌株, 前者因为四氢嘧啶吸收缺陷, 而导致胞外浓度显著提高, 是野生型菌株的 1.56 (±0.05) 倍。同时由于胞外四氢嘧啶浓度的提高, 从而提高了四氢嘧啶总浓度及合成效率, 与野生型菌株 *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> 相比分别提高了 37.23 (±0.03) % 和 31.03 (±0.03) %。

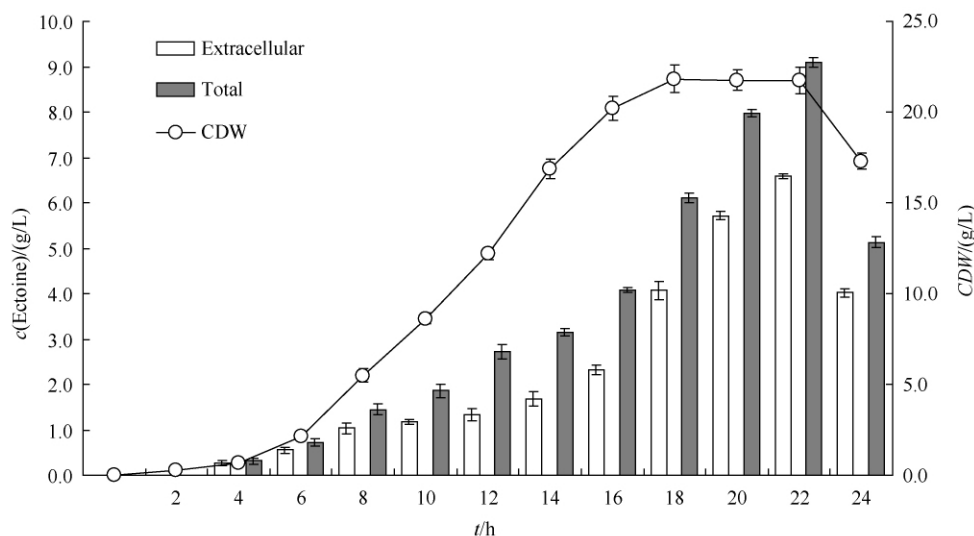


图 4 *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> (*teaABC*<sup>-</sup>) 四氢嘧啶发酵进程图

Fig. 4 Time course of ectoine fermentation by *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> (*teaABC*<sup>-</sup>).

表 3 *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> (*teaABC*<sup>-</sup>) 和 *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> 四氢嘧啶发酵参数比较

Table 3 Comparison of ectoine fermentation parameters between *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> (*teaABC*<sup>-</sup>) and *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup>

Fermentation parameters	<i>H. salina</i> DSM 5928 <sup>T</sup> ( <i>teaABC</i> <sup>-</sup> )	<i>H. salina</i> DSM 5928 <sup>T</sup>
The extracellular concentration of ectoine (g/L)	6.59 (±0.07)	4.22 (±0.17)
The intracellular concentration of ectoine (g/L)	2.51 (±0.16)	2.41 (±0.08)
The total concentration of ectoine (g/L)	9.10 (±0.08)	6.63 (±0.08)
The synthesis efficiency of ectoine (g/L·d)	9.93 (±0.09)	7.58 (±0.10)

## 3 讨论

染色体步移 PCR 方法克隆了 *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> 四氢嘧啶特异性转运蛋白基因 *teaABC*, *H.*

*salina* DSM 5928<sup>T</sup> *teaABC* 基因结构为首次报道。Red 重组敲除 *teaABC*, 获得了四氢嘧啶吸收缺陷突变株 *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> (*teaABC*<sup>-</sup>), 该突变株的四氢嘧啶吸收速率仅为 0.64 (±0.08) mg/g·min, 显著小于野生型菌株 *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> (6.38

( $\pm 0.12$ ) mg/g·min)。 *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> (*teaABC*<sup>-</sup>)还保留了极少的四氢嘧啶吸收功能,推测是通过其它转运蛋白体系(如脯氨酸、甜菜碱等)吸收的<sup>[20]</sup>。本文研究表明野生型的四氢嘧啶分泌型菌株 *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> 也具有一种四氢嘧啶特异性转运蛋白 TeaABC,它们执行四氢嘧啶吸收功能。*H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> 也通过四氢嘧啶输出/吸收的循环调控胞内四氢嘧啶合成。在四氢嘧啶输出/回收的循环中,非分泌型菌株(如 *H. elongata* DSM 2581<sup>T</sup>)四氢嘧啶的输出和吸收相平衡,所以培养基中没有四氢嘧啶积累。而分泌型菌株 *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> 之所以分泌四氢嘧啶,并非因为不具备 TeaABC 系统,可以推测是因为四氢嘧啶的输出大于吸收,从而导致四氢嘧啶在培养基中积累。

四氢嘧啶合成调节有两个关键点,一是与培养基渗透压相平衡的胞内四氢嘧啶浓度,主要由培养基 NaCl 浓度调控;二是 TeaABC 吸收四氢嘧啶导致的负反馈调节<sup>[12]</sup>。Kunte H. J., 等报道了 *H. elongata* DSM 2581<sup>T</sup> TeaBC 缺陷菌株,向培养基中分泌四氢嘧啶。该菌株四氢嘧啶高密度发酵,培养基中积累四氢嘧啶,与野生型菌株相比,四氢嘧啶合成效率显著提高(约为 2.1 g/L·d)<sup>[13]</sup>。但是,该研究仅解除了 TeaABC 吸收四氢嘧啶导致的负反馈调节,四氢嘧啶总浓度(胞内四氢嘧啶浓度)仍由培养基 NaCl 浓度调控。本文以四氢嘧啶分泌型菌株 *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> 为出发菌株构建的四氢嘧啶吸收缺陷突变株 *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> (*teaABC*<sup>-</sup>),解决了上述两个关键点的四氢嘧啶合成调节:一是在 NaCl 浓度为 0.5–2 mol/L 范围内,四氢嘧啶总合成量基本维持恒定,所以能够在较低盐浓度下高效合成四氢嘧啶,从而解除了培养基 NaCl 对四氢嘧啶合成的限制;二是由于四氢嘧啶吸收缺陷,也解除了四氢嘧啶吸收对其合成的负反馈调节,从而进一步提高了四氢嘧啶合成效率。与野生型菌株相比, *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> (*teaABC*<sup>-</sup>) 四氢嘧啶总浓度提高了 37.23 ( $\pm 0.03$ )%,合成效率提高了 31.03 ( $\pm 0.03$ )%。

## 参考文献

[1] Galinski EA, Pfeiffer HP, Trüper HG. 1,4,5,6-tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid. A novel cyclic amino acid from halophilic phototrophic bacteria of the genus *Ectothiorhodospira*. *European Journal of Biochemistry*, 1985, 149(1): 135-139.

- [2] Galinski EA. Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interaction, stress protection. *Experientia*, 1993, 49: 487-496.
- [3] Zhang LH, Wang Y, Zhang C, Wang YJ, Zhu DC, Wang CX, Shinichi N. Supplementation Effect of Ectoine on Thermostability of Phytase. *Journal Of Bioscience And Bioengineering*, 2006, 102(6): 560-563.
- [4] Wang Y, Zhang LH. Ectoine improves yield of biodiesel catalyzed by immobilized lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2010, 62: 91-96.
- [5] Pastor JM, Salvador M, Argandoña M, Bernal V, Reina-Bueno M, Csonka LN, Iborra JL, Vargas C, Nieto JJ, Cánovas M. Ectoines in cell stress protection: Uses and biotechnological production. *Biotechnology Advances*, 2010, 28: 782-801.
- [6] Roberts MF. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems*, 2005, 1: 1-5.
- [7] Onraedt AE, Walcarius BA, Soetaert WK, Vandamme EJ. Optimization of ectoine synthesis through fed-batch fermentation of *Brevibacterium epidermis*. *Biotechnology Progress*, 2005, 21: 1206-1212.
- [8] Sauer T, Galinski EA. Bacterial Milking: A novel bioprocess for production of compatible solutes. *Biotechnol Bioeng*, 1998, 57: 306-313.
- [9] Peters P, Galinski EA, Trüper HG. The biosynthesis of ectoine. *Fems Microbiology Letters*, 1990, 71: 157-162.
- [10] 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<sup>T</sup>. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(8): 1973-1994.
- [11] Grammann K, Volke A, Kunte HJ. New Type of Osmoregulated Solute Transporter Identified in Halophilic Members of the *Bacteria* Domain: TRAP Transporter TeaABC Mediates Uptake of Ectoine and HydroxyEctoine in *Halomonas elongata* DSM 2581<sup>T</sup>. *Journal Of Bacteriology*, 2002, 184: 3078-3085.
- [12] Kunte HJ. Osmoregulation in Bacteria: Compatible Solute Accumulation and Osmosensing. *Environmental Chemistry*, 2006, 3: 94-99.
- [13] Kunte HJ, Galinski EA, Bestvater T, Volke A, Grammann K. Producing compounds, especially ectoin, useful e. g. for stabilizing biological macromolecules, in

- organisms in which uptake systems for the compounds have been deleted. Germany: DE10114189, 2002-09-26.
- [14] Zhang LH, Lang YJ, Nagata S. Efficient production of Ectoine using Ectoine-excreting strain. *Extremophiles*, 2009, 13: 717-724.
- [15] 张苓花, 郎亚军. 利用微生物发酵生产 Ectoine 的方法. 中国: 200810012464.9, 2008-07-22.
- [16] Copeland NG, Jenkins NA, Court DL. Recombineering: a powerful new tool for mouse functional genomics. *Nature reviews Genetics*, 2001, 2(10): 769-779.
- [17] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(12): 6640-6645.
- [18] Sambrook J, Russell D. 分子克隆实验指南. 黄培堂, 等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002: 98-102.
- [19] 张雪, 温廷益. Red 重组系统用于大肠杆菌基因修饰研究进展. 中国生物工程杂志 (*China Biotechnology*), 2008, 28(12): 89-93.
- [20] Kempf B, Bremer E. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Archives of Microbiology*, 1998, 170: 319-330.

## Construction of ectoine absorption defective mutant for efficient ectoine production

Rui Xu, Linghua Zhang\*

Environmental Science and Engineering College, Dalian Maritime University, Dalian 116026, China

**Abstract:** [Objective] To further enhance ectoine (1,4,5,6-tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid) synthesis efficiency. [Methods] We cloned *Halomonas salina* DSM 5928<sup>T</sup> *teaABC* gene of ectoine-specific transporter TeaABC by walking PCR and constructed ectoine absorption defective mutant *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> (*teaABC*<sup>-</sup>) by Red recombination technology. [Results] The total concentration of ectoine and productivity in a 10 L fermentor were 9.10 (±0.08) g/L and 9.93 (±0.09) g/L.d. [Conclusion] The ectoine absorption defect mutant *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup> (*teaABC*<sup>-</sup>) compromised the negative feedback regulation of ectoine synthesis, which can significantly improve the efficiency of ectoine production.

**Keywords:** *H. salina* DSM 5928<sup>T</sup>, ectoine, *teaABC*, Red recombination, absorption defective mutant

(本文责编:王晋芳)