



四氢嘧啶微生物合成与应用研究进展

张山^{1#}, 胡萌^{2,3#}, 何永志^{2,3}, 董志扬^{2,3*}

¹深圳中科欣扬生物科技有限公司, 广东 深圳 518116

²中国科学院微生物研究所, 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101

³中国科学院大学生命科学学院, 北京 100049

摘要: 极端环境微生物定义了生命的边界。为了适应各种极端环境, 极端环境微生物通过合成许多独特的活性化合物来保护自己。四氢嘧啶就是其中一种代表性的保护性物质。它最早是从极端嗜盐菌中发现的, 作为调节细胞渗透压的一类相容性溶质, 可以帮助微生物适应高盐等恶劣环境。研究发现四氢嘧啶不仅是一种重要的渗透压调节剂, 还是一种高效的生物保护剂, 可以帮助蛋白、核酸、生物膜乃至整个细胞对抗高温、干燥、冷冻和辐射等多种逆境。因此, 四氢嘧啶在生物保护、生物医药和生物科技等众多领域展现出广阔的商业化应用前景。随着合成生物学和代谢工程技术的快速发展, 传统的嗜盐菌四氢嘧啶生产方法已逐步被产率更高、环境更友好的生物工程菌及技术所取代。本文围绕四氢嘧啶的微生物合成及其应用研究进行综述, 为后续四氢嘧啶的开发和应用提供重要参考。

关键词: 四氢嘧啶, 微生物合成, 细菌挤奶, 嗜盐微生物, 异源合成

四氢嘧啶(ectoine, Ect)及其衍生物羟基四氢嘧啶(hydroxyectoine, 5-Hect)最初是从嗜盐和耐盐微生物中发现的一类重要的相容性溶质(compatible solutes)。四氢嘧啶可以帮助嗜盐和耐盐微生物适应高盐、高渗透压和紫外辐射等环境, 维持其在逆境中的正常生长^[1]。目前, 通常认为四氢嘧啶是通过“优先排阻”(preferential exclusion)机制来实现其保护作用^[2-4]。四氢嘧啶作为相容性溶

质与变性溶质(denaturing solutes)发挥着相反的作用。变性溶质通过破坏大分子物质(如蛋白质、核酸和生物膜等)周围的水化层, 与大分子物质发生相互作用, 进而破坏大分子的结构。与之相反, 四氢嘧啶不易与生物大分子物质发生相互作用, 被“优先排阻”在生物大分子物质之外, 从而在四氢嘧啶和生物大分子物质之间形成一层水化层。另外, 由于四氢嘧啶具有非常强的锁水功能, 会

基金项目: 国家自然科学基金(31770103, 31100066)

#并列第一作者。

*通信作者。Tel/Fax: +86-10-64807337; E-mail: dongzy@im.ac.cn

收稿日期: 2020-09-10; 修回日期: 2020-12-25; 网络出版日期: 2021-03-18

进一步在生物大分子物质的周围形成更厚的水化层(图 1)。因此,四氢嘧啶通常不与所保护的生物大分子物质发生相互作用,不但不会影响大分子物质的功能,而且会对蛋白质、核酸、生物膜乃至整个细胞起到保护作用。四氢嘧啶可以增强细胞在多种逆境(如高盐、热、干燥和冷冻等)中的耐受性,因此在生物保护、生物医药以及生物科技等领域都展现出广阔的应用前景^[5]。伴随着四氢嘧啶商业化应用的快速发展,四氢嘧啶的微生物合成研究一直是四氢嘧啶研究的重点和热点。本文围绕四氢嘧啶的微生物合成及其应用进行了系统的综述,为四氢嘧啶这一重要生物活性物质的开发和应用提供参考。

1 四氢嘧啶的发现及其合成途径的解析

Galinski 等早在 1985 年从嗜盐光合细菌 *Ectothiorhodospira halochloris* 中发现了四氢嘧啶,并通过核磁共振、质谱和红外光谱确定了四氢嘧啶的结构^[6]。羟基四氢嘧啶则是在 1988 年由 Inbar

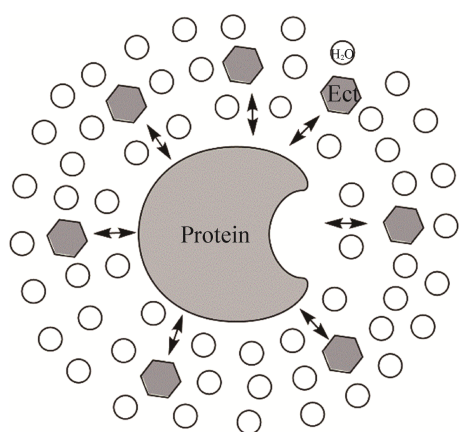


图 1. 四氢嘧啶的“优先排阻”效应

Figure 1. The preferential exclusion model for ectoine.

等研究 *Streptomyces parvulus* 放线菌素 D 的合成与调控过程中偶然发现的^[7-8]。随后在 1990 年, Peters 等通过生化实验详细阐述了 *E. halochloris* 和 *Halomonas elongata* 中四氢嘧啶的合成途径^[9]。研究表明,四氢嘧啶的生物合成途径是以 L-天冬氨酸(L-aspartate)为前体,利用天冬氨酸家族氨基酸合成途径的前 2 个酶:天冬氨酸激酶(AK)和 L-天冬氨酸- β -半醛脱氢酶(asd)依次将 L-天冬氨酸转化为磷酸化 L-天冬氨酸(L-aspartatyl-P)和 L-天冬氨酸- β -半醛(L-aspartate- β -semialdehyde)。紧接着从 L-天冬氨酸- β -半醛开始,进入四氢嘧啶特异性的合成途径。首先, L-天冬氨酸- β -半醛在 L-二氨基丁酸转氨酶(ectB)的催化下生成 L-二氨基丁酸(diaminobutyric acid, DABA);然后, DABA 经 L-二氨基丁酸乙酰基转移酶(ectA)乙酰化为 N γ -乙酰二氨基丁酸(N- γ -acetyldiaminobutyric acid, ADABA);最后, ADABA 在四氢嘧啶合成酶(ectC)催化下环化生成四氢嘧啶^[10]。羟基四氢嘧啶的合成是在四氢嘧啶合成的基础上,由四氢嘧啶羟化酶(ectD)将四氢嘧啶羟化为羟基四氢嘧啶(图 2)。羟基四氢嘧啶与四氢嘧啶仅相差一个羟基。尽管有研究指出,四氢嘧啶在渗透压保护方面发挥着更重要的作用,而羟基四氢嘧啶可能在热激保护方面表现出更好的作用,但总体来说两者具有很高的化学相似性和功能相似性。同时,由于四氢嘧啶是羟基四氢嘧啶的合成前体,因而在羟基四氢嘧啶的生产过程中,通常会有四氢嘧啶的积累。另外,由于四氢嘧啶和羟基四氢嘧啶具有非常相似的分子结构和物理化学性质,从而增加了两者的分离难度。因此,目前四氢嘧啶的微生物合成研究受到更多的关注^[1]。

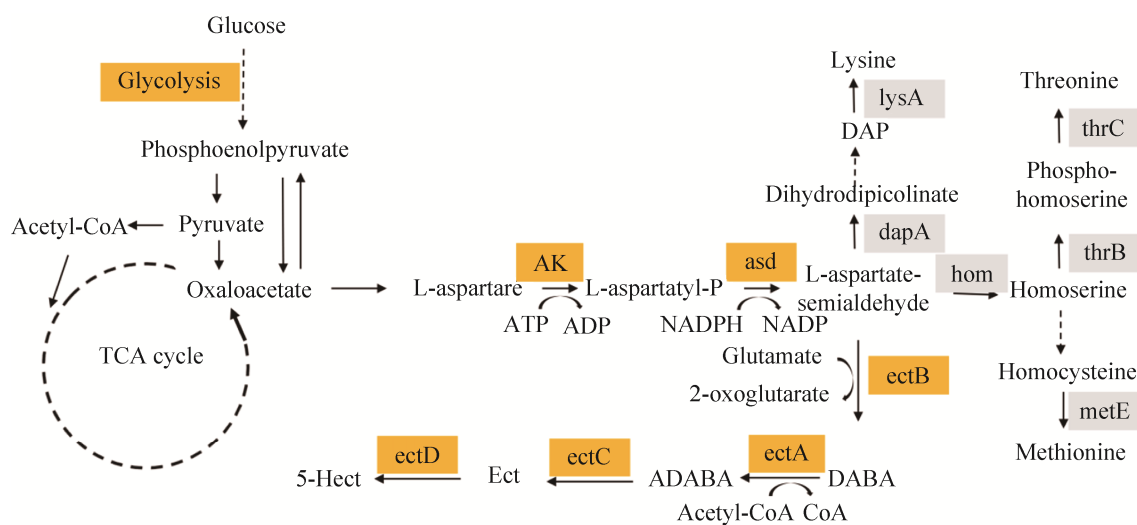


图 2. 四氢嘧啶合成途径

Figure 2. The ectoine biosynthetic pathway.

尽管生化实验较早地解析了四氢嘧啶的合成途径,但参与四氢嘧啶合成的3个关键酶基因(*ectA*、*ectB*和*ectC*)直到1997年才被完整地从小盐杆菌(*H. elongata*)基因组中克隆出来^[11]。而四氢嘧啶羟化酶基因*ectD*则是在2004年和2006年分别从嗜盐菌(*E. halochloris*)和盐杆菌(*Chromohalobacter salexigens*)中被克隆出来^[12-13]。序列分析表明,*ectA*、*ectB*和*ectC*通常是以基因簇的形式存在,但*ectD*在有些菌株中是与*ectABC*位于同一基因簇中,而在另外一些菌株中*ectD*则是远离*ectABC*基因簇,以独立的基因形式存在^[14]。至此,四氢嘧啶和羟基四氢嘧啶的合成途径被完整地解析出来(图3)。四氢嘧啶和羟基四氢嘧啶合成途径的解析为系统改造四氢嘧啶合

成菌株提供了理论基础,同时也为代谢工程改造各种微生物细胞工厂,实现四氢嘧啶异源合成提供了理论指导和依据。

2 四氢嘧啶的微生物合成

2.1 野生菌株用于四氢嘧啶合成

*H. elongata*等嗜盐菌在高盐环境下能够迅速合成四氢嘧啶以维持细胞渗透压,在低盐环境下可以快速感知外界的低渗刺激,释放胞内的四氢嘧啶。高盐环境和低盐环境的反复循环,对应着四氢嘧啶的合成与释放过程的循环往复,该过程被形象地称为“细菌挤奶”。1998年Sauer等最先

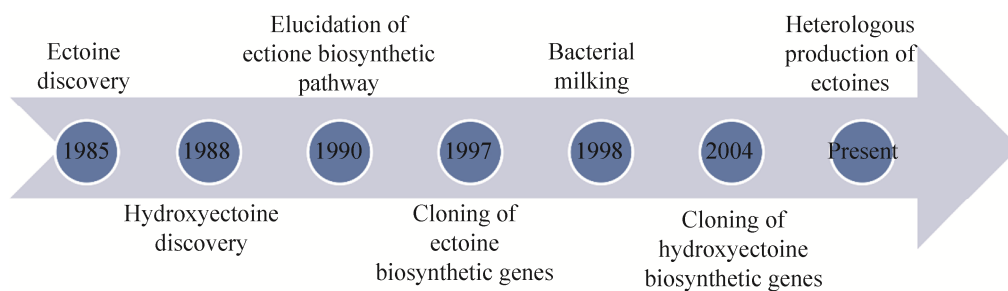


图 3. 四氢嘧啶微生物合成相关研究时间轴

Figure 3. The timeline of research on ectoine biosynthesis.

将“细菌挤奶”技术应用于四氢嘧啶的生产中。*H. elongata* 首先在高盐(15%–20% NaCl)培养基中进行发酵, 发酵 120 h 后, 细胞干重达 48 g/L。接着通过微滤浓缩收集菌体并转入 3% NaCl 的低渗溶液中进行冲击, 此时胞内的四氢嘧啶迅速释放。紧接着将细胞重新转移至高盐培养基中, 诱导四氢嘧啶的合成。然后再次进行低渗冲击释放四氢嘧啶。此过程可以重复循环 9 次, 最终四氢嘧啶的产量可达 7.4 g/L, 单次循环单位菌体的最高产量为 155 mg/g dcw^[15]。

此后, 众多嗜盐菌包括 *H. boliviensis* DSM 15516^[16]、*C. salexigens* DSM 3043^[17]、*H. salina* DSM 5928^[18]、*H. salina* BCRC17875^[19] 和 *H. hydrothermalis* Y2^[20] 都被尝试用于四氢嘧啶的生产。这些嗜盐菌四氢嘧啶的产量在 8–15 g/L 不等, 其中 *H. salina* DSM 5928 的四氢嘧啶产量可达 14.86 g/L, 单位时间产率可达 7.75 g/(L·d) (表 1)。此外, Nagata 等发现耐盐菌 *Brevibacterium* sp. JCM 6894 不仅可以产生四氢嘧啶, 而且具有在高盐低盐反复冲击下不易破裂的优点, 适用于“细菌挤

奶”法生产四氢嘧啶。但是 *Brevibacterium* sp. JCM 6894 四氢嘧啶的产量较低, 仅为 2.4 g/L^[21]。

另外, 有些嗜盐菌不仅是四氢嘧啶的天然生产菌株, 也是聚羟基脂肪酸酯 [poly(3-hydroxybutyrate), PHB] 的重要生产菌株。因此, 多种嗜盐菌包括 *H. boliviensis* 15516^[22]、*H. salina* 5928^[23] 和 *H. bluephagenesis* TD-ADEL-58^[24] 被用来同时生产四氢嘧啶和 PHB。其中 *H. boliviensis* 15516 可以产生 5.7 g/L 四氢嘧啶和 68.5% 细胞干重的 PHB^[22]。在 *H. salina* 5928 中, 四氢嘧啶和 PHB 的产量分别达到 8.6 g/L 和 35.3 g/L^[23]。另外, Ma 等在 *H. bluephagenesis* 中, 通过调节四氢嘧啶合成相关基因(*ectABC*、*lysC* 和 *asd*)的转录水平, 并敲除四氢嘧啶合成的竞争途径, 最终获得了 *H. bluephagenesis* TD-ADEL-58 菌株。该菌株发酵 28 h 可以产生 28 g/L 的四氢嘧啶。同时, 通过控制氮源, *H. bluephagenesis* TD-ADEL-58 则可以同时产生 8 g/L 的四氢嘧啶和 75% 细胞干重的 PHB。因此, *H. bluephagenesis* TD-ADEL-58 菌株既可以实现四氢嘧啶的高产, 也可以实现四氢嘧啶和 PHB 的同时生产(表 1)。

表 1. 嗜盐和耐盐菌株四氢嘧啶生产情况

Table 1. Halophilic and halotolerant bacteria used for ectoine production

Strains	Titer/(g/L)	Yield/(g/g dcw)	Volumetric productivity/[g/(L·d)]	PHB/wt%	Carbon sources	References
<i>H. elongata</i> DSM2581	7.40	0.155	5.30	–	Glucose	[15]
<i>H. boliviensis</i> DSM 15516	9.60	–	9.10	–	Glucose and glutamate	[16]
<i>C. salexigens</i> DSM 3043	8.20	0.54	–	–	Glucose	[17]
<i>H. salina</i> DSM 5928	14.86	–	7.75	–	Glutamate	[18]
<i>H. salina</i> BCRC17875	14.00	–	7.00	–	Glutamate and yeast extract	[19]
<i>H. hydrothermalis</i> Y2	10.50	0.22	2.50	–	Glucose and glutamate	[20]
<i>B. sp.</i> JCM 6894	2.40	0.15	0.34	–	Peptone and yeast extract	[21]
<i>H. boliviensis</i> 15516	5.70	0.17	3.40	68.5	Glucose and glutamate	[22]
<i>H. salina</i> DSM 5928	8.60	–	–	35.3 ^a	Glucose and glutamate	[23]
<i>H. bluephagenesis</i> TD-ADEL-58	28.00	–	–	<10.0	Glucose and yeast extract	[24]
<i>H. bluephagenesis</i> TD-ADEL-58	8.00	–	–	75.0	Glutamate and yeast extract	[24]
<i>B. epidermis</i> DSM 20659	8.00	0.05	2.00	–	Glutamate and yeast extract	[26]

^a: unit of measurement is gram.

“细菌挤奶”法巧妙地利用了嗜盐菌在高盐条件下合成四氢嘧啶、低盐条件下释放四氢嘧啶的特点，成功地应用于四氢嘧啶的工业化生产。但是，“细菌挤奶”生产工艺中使用的高盐培养基不仅会对设备造成腐蚀，而且也会增加四氢嘧啶下游处理的难度。另外，高盐和低盐的反复冲击会减慢菌体生长速度，从而导致四氢嘧啶产量的降低。为克服“细菌挤奶”的这些不足，一方面可以通过筛选新的四氢嘧啶生产菌株，在低盐环境下实现四氢嘧啶的生产，另一方面也可以通过异源合成四氢嘧啶，避免四氢嘧啶生产对高盐条件的依赖。

2.2 筛选在低盐条件下生产四氢嘧啶的天然菌株

Onraedt 等发现耐盐菌 *B. epidermis* DSM 20659 可以耐受 2 mol/L NaCl，但其在 1 mol/L NaCl (5.8% NaCl)的条件下，四氢嘧啶合成量最高^[25]。因此，Onraedt 等将该菌株作为生产菌株，在含有 5.8% NaCl (远低于 15%–20% NaCl)的培养基中，以谷氨酸和酵母提取物为底物，经过补料分批发酵，在低盐条件下，实现了四氢嘧啶的合成，四氢嘧啶总浓度可达 8 g/L，四氢嘧啶产率达到 2 g/(L·d)。而且该菌还具有不产生羟基四氢嘧啶副产物的优点，进一步简化了四氢嘧啶的下游纯化工作。另外，Onraedt 等还成功建立了四氢嘧啶分离纯化和结晶的工艺，为四氢嘧啶的工业化生产奠定了重要的基础^[26]。

另外，Zhang 等发现 *H. salina* DSM 5928 在恒定的胞外渗透压下即可以实现四氢嘧啶的外泌。*H. salina* DSM 5928 胞内和胞外四氢嘧啶的合成总量不受培养基中 NaCl 浓度的影响，而且在低盐浓度下更有利于四氢嘧啶的分泌，因此，非常适合在低盐条件下进行四氢嘧啶的生产^[27]。在此基础上，Lang 等利用 *H. salina* DSM 5928 在低浓度

盐离子浓度下(0.5 mol/L NaCl)生产四氢嘧啶，最终四氢嘧啶的产量达到 14.86 g/L，四氢嘧啶产率达到 7.75 g/(L·d)^[18]。

2.3 四氢嘧啶的异源合成

伴随四氢嘧啶合成途径的解析以及代谢工程技术的发展，人们也纷纷尝试将嗜盐菌中的四氢嘧啶合成通路引入非嗜盐微生物细胞工厂，实现四氢嘧啶的异源合成。与嗜盐菌相比，四氢嘧啶异源合成有效地避免了高盐培养基对设备的腐蚀和对下游纯化的影响。而且普通微生物细胞工厂通常具有非常成熟的发酵和下游加工工艺，便于建立规模化的四氢嘧啶生产工艺。另外，很多嗜盐菌都存在四氢嘧啶的降解途径。在该降解途径中，四氢嘧啶首先被四氢嘧啶水解酶 DoeA 水解成 α -乙酰二氨基丁酸(α -Ac-diaminobutyrate)和 γ -乙酰二氨基丁酸(γ -Ac-diaminobutyrate)两种产物；前者在脱乙酰酶 DoeB 的作用下脱去乙酰基生成二氨基丁酸。而后者不能作为 DoeB 的底物，重新进入四氢嘧啶合成途径。二氨基丁酸经转氨酶 DoeD 催化生成天冬氨酸- β -半醛，紧接着天冬氨酸- β -半醛经脱氢酶 DoeC 催化生成天冬氨酸^[4]。因此，利用嗜盐菌生产四氢嘧啶通常需要通过敲除四氢嘧啶降解相关基因，阻断四氢嘧啶的降解途径。而用于异源合成四氢嘧啶的宿主菌通常不存在参与四氢嘧啶降解的相关基因，可以有效地避免四氢嘧啶的内源性降解。目前最常用的四氢嘧啶的异源合成宿主是大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌。

2.3.1 四氢嘧啶在大肠杆菌中的异源合成：

截至目前，已有至少 10 篇文章尝试在大肠杆菌中实现四氢嘧啶的异源合成(表 2)。不同来源的四氢嘧啶合成基因簇被导入大肠杆菌，虽然实现了四氢嘧

表 2 异源合成四氢嘧啶
Table 2. Heterologous production of ectoines

Strains	Gene sources	Titer/(g/L)	Yield/ (g/g dwt)	Volumetric productivity/[g/(L·d)]	Carbon sources	Hydroxyectoines	References
<i>E. coli</i>							
<i>E. coli</i> M15	<i>Bacillus halodurans</i>	0.046	–	–	Peptone and yeast extract	–	[28]
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>M. halophilus</i>	ND	0.570	–	Glucose	–	[29]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>Halomonas</i> sp. <i>QHL1</i>	ND	0.025	–	Peptone and yeast extract	–	[30]
<i>E. coli</i> SK51	<i>P. stutzeri</i>	1.500	1.000	–	Glucose and L-aspartate	–	[31]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>H. elongata</i>	0.750	0.418	–	Glucose	–	[32]
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>A. cryptum</i>	1.700	2.900	–	Glycerin	–	[33]
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>C. salexigens</i>	6.00	0.300	0.96	Glucose	–	[34]
<i>E. coli</i> BW25113	<i>H. elongata</i>	25.100	4.048	25.10	L-aspartate and glycerin	–	[36]
<i>E. coli</i> W3110	<i>H. elongata</i>	25.100	0.800	20.10	Glucose and yeast extract	–	[38]
<i>E. coli</i> MG1655	<i>H. elongata</i>	12.700	–	12.70	L-aspartate and glycerin	–	[42]
<i>C. glutamicum</i>							
<i>C. glutamicum</i> ECT-2	<i>P. stutzeri</i>	4.500	–	6.70	Glucose and yeast extract	5 $\mu\text{mol}(\text{g}_{\text{cdm}})$	[39]
<i>C. glutamicum</i> ectABC ^{opt}	<i>P. stutzeri</i>	65.300	–	27.80	Glucose and yeast extract	–	[40]
<i>C. glutamicum</i> Ecto5	<i>C. salexigens</i>	22.000	–	7.68	Glucose	–	[41]

啶在大肠杆菌中的异源合成, 但很多重组菌株四氢嘧啶合成水平都较低^[28–33], 难以满足大规模工业化生产四氢嘧啶的要求。Schubert 等最早将来源于 *C. Saalexigens* 的 *ectABC* 导入大肠杆菌, 利用 tet 启动子成功实现了 *ectABC* 的表达, 通过高密度发酵, 连续诱导 160 h 后四氢嘧啶的产量可达到 6 g/L, 而且大部分四氢嘧啶分泌至胞外。尽管该工作中四氢嘧啶在大肠杆菌中的产量有所提高, 但四氢嘧啶的产率仅为 0.9 g/(L·d), 与野生菌相比仍显效率低下^[34]。

本实验室围绕四氢嘧啶开展了系列工作^[35–37]。我们将来源于 *H. elongata* 的 *ectABC* 导入 *E. coli* BW25113 中, 利用阿拉伯糖启动子表达 *ectABC*

基因簇, 实现了四氢嘧啶合成关键基因在大肠杆菌中的异源表达, 获得了四氢嘧啶异源合成大肠杆菌的重组菌株。利用该菌株, 以天冬氨酸和甘油为底物进行全细胞催化, 实现了四氢嘧啶的高水平合成。发酵 24 h, 四氢嘧啶产量高达 25.1 g/L, 单位菌体的合成量可达 4.048 g/g cdw, 为已报道的四氢嘧啶异源合成工程菌中的最高水平。而且该重组菌株可以实现多轮的全细胞催化合成四氢嘧啶。循环转化实验表明, 该重组细胞至少可以连续使用 3 次, 连续转化 3 次后, 四氢嘧啶合成总量可达到 63.4 g/L^[36]。

此后, Ning 等也选择将 *H. elongata* 的 *ectABC* 基因簇导入大肠杆菌, 构建了四氢嘧啶异

源合成的大肠杆菌菌株。在此基础上 Ning 等通过代谢工程改造该菌株, 实现了四氢嘧啶的从头合成。重组菌在 7.5 L 的发酵罐中, 发酵 30 h 后, 四氢嘧啶产量达到 25.1 g/L, 单位菌体的合成量可达 0.8 g/g cdw^[38]。

2.3.2 四氢嘧啶在谷氨酸棒杆菌中的异源合成:

谷氨酸棒杆菌作为氨基酸生产的重要工业菌株, 也被尝试用于进行四氢嘧啶的异源合成。Becker 等最早将来源于 *P. stutzeri* 的羟基四氢嘧啶合成基因簇 *ectABCD* 在密码子优化后, 整合到谷氨酸棒杆菌基因组中, 利用谷氨酸棒杆菌强启动子 *tuf*, 实现四氢嘧啶合成基因簇 *ectABCD* 的组成型表达。重组菌 *C. glutamicum* Ect-2 培养 16 h 后, 四氢嘧啶产量可达 4.5 g/L, 产率为 6.7 g/(L·d)^[39]。在此基础上, Gießelmann 等对重组菌 *C. glutamicum* Ect-2 进行了升级改造。为了实现四氢嘧啶合成相关基因的协调表达, 他们将 19 个人工合成启动子和 3 个连接肽与四氢嘧啶合成基因进行随机组合, 构建了一个含有 185193 个突变子的突变体文库。筛选获得了 1 株四氢嘧啶高产菌株 *C. glutamicum* ectABC^{opt}。该重组菌株发酵 56 h, 可产生 65 g/L 的四氢嘧啶, 四氢嘧啶产率为 1.16 g/(L·h)^[40]。另外, Pérez-García 等将 *C. salexigens* 四氢嘧啶合成基因簇引入谷氨酸棒杆菌, 同时敲除了谷氨酸棒杆菌自身的 *sugR* 和 *ldhA*, 获得了 Ecto5 菌株。该菌株发酵 69 h, 可产生 22 g/L 的四氢嘧啶, 产率可达 0.32 g/(L·h)。在此基础上, Pérez-García 等进一步改造了 Ecto5 菌株, 使其能够以甘油、葡萄糖胺、木糖、阿拉伯糖或者可溶性淀粉为碳源生产四氢嘧啶, 从而为四氢嘧啶的生产提供更多的选择^[41]。

3 四氢嘧啶的功能和应用

四氢嘧啶不仅是一种重要的渗透压调节剂, 还是一种高效的生物保护剂, 可以帮助蛋白、核酸、生物膜乃至整个细胞对抗高温、干燥、冷冻和辐射等多种逆境。因此, 四氢嘧啶在生物保护、生物医药和生物科技等众多领域展现出广阔的商业化应用前景(表 3)。

3.1 生物保护

四氢嘧啶可以提高酶和蛋白质的稳定性^[43-46], 在酶的制备、生产和应用过程中具有重要的意义。同时, 四氢嘧啶可以保护生物膜的稳定性。Harishchandra 等研究表明四氢嘧啶可以增加磷脂单分子层和磷脂双分子层表面的水化层, 进而可以增强磷脂分子头部的活动性以及磷脂双分子层的流动性。磷脂双分子层的流动性有助于增强细胞的抗逆性, 同时也有助于增强生物膜在逆境下的修复作用^[47-48]。同时, 四氢嘧啶可以有效阻挡可见光辐射、紫外线辐射以及电离辐射对 DNA 的损伤^[49-51]。此外, 四氢嘧啶可以有效地保护微生物细胞以及人和动物细胞^[52-54]。

四氢嘧啶不仅可以对蛋白、生物膜、核酸以及细胞发挥保护性作用, 还可以作为保湿因子和防晒因子, 添加到化妆品中, 用于皮肤的保护。四氢嘧啶具有长效保湿和抵抗辐射的作用, 因此被广泛应用于化妆品行业, 用于保湿、防晒和美白。一方面, 四氢嘧啶作为长效保湿剂, 可防止表皮脱水, 其保湿效果甚至优于磷脂酰胆碱^[55]。另一方面, 四氢嘧啶通过抵抗辐射, 有效地减少黑色素的沉积, 起到美白的作用^[56]。另外, 四氢嘧啶可以提高清洁类化妆品的产品安全性。Bujak 等发现四氢嘧啶可以减少阴离子表面活性剂对皮

表 3 四氢嘧啶的功能及应用
Table 3. The function and application of ectoines

Functions	Applications	References
Biological protection	Protein	
	Enhance the stability of lactate dehydrogenase and phosphofructokinase under heating, freezing and drying	[43–44]
	Improve the activity of milk catalase and enhance its stability	[45]
	Biofilm	
	Enhance the fluidity of cell membrane and enhance the resistance of cells	[46]
	DNA	
	Reduce genotoxicity caused by visible light and ultraviolet radiation	[47–48]
	Prevent DNA double-strand breaks caused by ionizing radiation	[49]
	Cell	
	Relieve the growth inhibition of <i>E. coli</i> caused by high salt and heat	[50]
	Induction of hsp70 expression in human keratinocytes	[52]
	Prevention and treatment of <i>Staphylococcus aureus</i> infection	[53]
	Application on cosmetics	
Long term moisturizer to prevent skin dry and dehydration	[54]	
Reduce melanin deposition and whiten skin	[55]	
Reduce the skin damage caused by anionic surfactants and improve the safety of cleaning cosmetics	[56–57]	
Biomedicine	Treatment of allergic rhinitis, allergic dermatitis, chronic obstructive pneumonia, acute pharyngitis and inflammatory enteritis	[58]
	Prevent neutrophil pneumonia caused by nanoparticles	[59]
	Inhibit the formation of insulin amyloid	[60–61]
	Treatment of dry eye	[62]
	Scavenge hydroxyl free radicals, protect cells from oxidative damage	[63]
Biotechnology	Used in microbial fuel cells to increase the power of microbial fuel cells	[64]
	Used in the production of biodiesel	[65]
	Improve tobacco salt tolerance	[66]
	As a PCR reaction enhancer, improve amplification efficiency	[67]

肤细胞的损伤。加入四氢嘧啶，阴离子表面活性剂对皮肤的刺激性下降约 20%，脂质溶解降低约 10%–20%，细胞毒性降低 60%^[57]。

3.2 生物医药

四氢嘧啶具有消炎、防止蛋白变性和聚集、高效保湿以及消除自由基的功能，因此也具有非常好的生物医药开发的潜力。四氢嘧啶已经被尝试用于治疗多种炎症反应，如过敏性鼻炎、过敏性皮炎、慢性阻塞性肺病、急性咽喉炎以及炎症性肠炎^[58]。除此之外，四氢嘧啶还可以用于预防和治疗鳞状细胞癌病人化疗过程中常出现的口腔黏膜炎^[58]。另外，Sydlik 等研究表明四氢嘧啶可以预防纳米颗粒导致的中性粒细胞肺炎，并推

测四氢嘧啶可以用于预防呼吸道相关炎症^[59]。

四氢嘧啶具有防止蛋白质的变性和聚集的功能，因此被用于预防和治疗神经退化性疾病。Kanapathipillai 等研究表明四氢嘧啶可以抑制阿尔茨海默氏病 β -淀粉样肽 A β 42 和阮病毒蛋白 PrP106–126 淀粉样蛋白的聚集和毒性^[60–61]。Arora 等也发现四氢嘧啶可以抑制胰岛素淀粉样蛋白的形成^[62]。这些研究都表明四氢嘧啶有望应用于预防和治疗神经退化性相关的疾病。

干眼症是一种最常见的眼部疾病，其原因是泪膜不稳定和高渗透压会导致眼表炎症加重和神经感觉异常。四氢嘧啶可以通过与水分子紧密结合形成水合物屏障，防止眼部细胞脱水，稳定泪

膜的脂质层,从而达到治疗干眼症的目的。Nosch 等评估了一种四氢嘧啶的眼部喷雾剂(EES090; bitop AG),治疗干眼症的效果良好,为治疗干眼症提供了新的选择^[63]。

此外最新研究表明四氢嘧啶能清除羟基自由基,通过与羟基自由基反应以保护细胞免受氧化损伤。四氢嘧啶与自由基反应生成 N-乙酰亚胺-天冬氨酸和 N-乙酰亚胺-β-丙氨酸两种主要产物,推测其反应机理是四氢嘧啶开环后在碳端被进一步氧化。尽管四氢嘧啶与自由基反应的具体机理还有待进一步研究,但四氢嘧啶确定能和自由基发生反应这一结果的发现,为四氢嘧啶在医药领域的应用奠定了坚实的理论基础^[64]。

3.3 生物科技

四氢嘧啶的应用范围十分广泛,除了在生物保护和生物医药领域,四氢嘧啶还可应用于生物科技领域。Tan 等报道将四氢嘧啶应用于微生物燃料电池中。微生物燃料电池发电的同时能净化废水,十分环保,但废水的高盐环境会抑制微生物的生长,导致产电量降低。四氢嘧啶可以提高燃料电池系统中微生物的耐盐性,进而提高微生物燃料电池的电量。研究表明加入四氢嘧啶,微生物燃料电池的平均输出电压提高了 60.4%左右^[65]。此外,四氢嘧啶还被应用于生物柴油的生产。Wang 等发现在生物柴油的醇解反应中,甲醇会抑制脂肪酶的活性。加入适量的四氢嘧啶可以降低脂肪酶与甲醇的亲合力,增加甘油三酯与甲醇的亲合力,进而提高脂肪酶催化合成生物柴油的产率^[66]。四氢嘧啶还可以提高植物的耐盐性,Nakayama 等成功地将来源于 *H. elongata* 的四氢嘧啶合成基因簇转入到烟草中,成功提高烟草的耐盐能力^[67]。四氢嘧啶提高烟草的耐盐能力是通

过两个方面来实现的。一方面四氢嘧啶通过维持烟草根部的耐盐功能,为烟草吸收水分提供了重要保障;另一方面,四氢嘧啶还能够增加蒸腾作用并保护 Rubisco 蛋白,提高烟草的光合作用效率,增加叶片氮源的供应^[68]。此外,四氢嘧啶还能够用于科研工作中提高 PCR 的扩增效率。Schnoor 等利用四氢嘧啶及其衍生物高四氢嘧啶(homoctoine)作为 PCR 反应的增强剂,显著提高了高 GC 含量模板 PCR 的扩增效率^[69]。

4 结论和展望

四氢嘧啶是微生物为适应高盐、高渗透压以及紫外辐射等恶劣环境而产生的一类重要的天然保护性物质。四氢嘧啶广泛存在于众多嗜盐菌和耐盐菌中。利用这些天然菌株,借助“细菌挤奶”法,成功实现了四氢嘧啶的大规模生产。另外,为了克服“细菌挤奶”生产四氢嘧啶过程中高盐培养基带来的一系列问题,人们开始尝试将四氢嘧啶合成途径引入非嗜盐微生物中,实现四氢嘧啶在普通微生物中的异源合成。目前,四氢嘧啶的异源合成主要是在大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌中进行。早期,四氢嘧啶的异源合成普遍存在产量低的问题。本实验室率先利用大肠杆菌全细胞转化的方法,有效地解决了大肠杆菌中四氢嘧啶异源合成产量低的问题,成功实现了四氢嘧啶在大肠杆菌中的高水平合成。四氢嘧啶的高水平合成势必与天冬氨酸家族氨基酸的合成相竞争,我们在研究的过程中也确实发现了四氢嘧啶快速合成会导致菌体生长速度的减慢。因此,如何协调四氢嘧啶和天冬氨酸家族氨基酸的合成,实现四氢嘧啶合成通路和天冬氨酸合成通路代谢流的动态平衡,将有望进一步提高四氢嘧啶的异源合成水

平。四氢嘧啶具有稳定蛋白质、核酸、生物膜以及整个细胞的功能,可以增强细胞在多种逆境(如高盐、热、干燥和冷冻等)中的耐受性。四氢嘧啶是微生物提供给人类的一类宝贵的资源,在生物保护、生物制药和生物科技等众多领域展现出广阔的商业化应用前景。但相比于四氢嘧啶商业化应用的快速发展,对于四氢嘧啶的保护机制的研究还相对滞后,相关研究还比较零散,甚至还存在相互矛盾的地方。因此,有必要对四氢嘧啶的保护作用机制进行更为深入的研究,为四氢嘧啶的商业化应用提供更加坚实的理论基础和实践指导。

参考文献

- [1] 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(6): 782–801.
- [2] Di Gioacchino M, Bruni F, Sodo A, Imberti S, Ricci MA. Ectoine hydration, aggregation and influence on water structure. *Molecular Physics*, 2019, 117(22): 3311–3319.
- [3] Zaccai G, Bagyan I, Combet J, Cuello GJ, Demé B, Fichou Y, Gallat FX, Galvan Josa VM, von Gronau S, Haertlein M, Martel A, Moulin M, Neumann M, Weik M, Oesterhelt D. Neutrons describe ectoine effects on water H-bonding and hydration around a soluble protein and a cell membrane. *Scientific Reports*, 2016, 6: 31434.
- [4] Graf R, Anzali S, Buenger J, Pfluecker F, Driller H. The multifunctional role of ectoine as a natural cell protectant. *Clinics in Dermatology*, 2008, 26(4): 326–333.
- [5] Becker J, Wittmann C. Microbial production of extremolytes—high-value active ingredients for nutrition, health care, and well-being. *Current Opinion in Biotechnology*, 2020, 65: 118–128.
- [6] Galinski EA, Pfeiffer HP, Truper 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.
- [7] Inbar L, Lapidot A. The structure and biosynthesis of new tetrahydropyrimidine derivatives in actinomycin D producer *Streptomyces parvulus*. Use of ^{13}C - and ^{15}N -labeled L-glutamate and ^{13}C and ^{15}N NMR spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry*, 1988, 263(31): 16014–16022.
- [8] Inbar L, Lapidot A. Metabolic regulation in *Streptomyces parvulus* during actinomycin D synthesis, studied with ^{13}C - and ^{15}N -labeled precursors by ^{13}C and ^{15}N nuclear magnetic resonance spectroscopy and by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Bacteriology*, 1988, 170(9): 4055–4064.
- [9] Peters P, Galinski EA, Trüper HG. The biosynthesis of ectoine. *FEMS Microbiology Letters*, 1990, 71(1/2): 157–162.
- [10] Ono H, Sawada K, Khunajakr N, Tao T, Yamamoto M, Hiramoto M, Shinmyo A, Takano M, Murooka Y. Characterization of biosynthetic enzymes for ectoine as a compatible solute in a moderately halophilic *Eubacterium*, *Halomonas elongata*. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(1): 91–99.
- [11] Cánovas D, Vargas C, Iglesias-Guerra F, Csonka LN, Rhodes D, Ventosa A, Nieto JJ. Isolation and characterization of salt-sensitive mutants of the moderate halophile *Halomonas elongata* and cloning of the ectoine synthesis genes. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(41): 25794–25801.
- [12] García-Esteva R, Argandoña M, Reina-Bueno M, Capote N, Iglesias-Guerra F, Nieto JJ, Vargas C. The ectD gene, which is involved in the synthesis of the compatible solute hydroxyectoine, is essential for thermoprotection of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(11): 3774–3784.
- [13] Prabhu J, Schauwecker F, Grammel N, Keller U, Bernhard M. Functional expression of the ectoine hydroxylase gene (thpD) from *Streptomyces chrysomallus* in *Halomonas elongata*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(5): 3130–3132.
- [14] 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 2581T. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(8): 1973–1994.
- [15] Sauer T, Galinski EA. Bacterial milking: a novel bioprocess for production of compatible solutes. *Biotechnology and Bioengineering*, 1998, 57(3): 306–313.

- [16] Van-Thuoc D, Guzmán H, Quillaguamán J, Hatti-Kaul R. High productivity of ectoines by *Halomonas boliviensis* using a combined two-step fed-batch culture and milking process. *Journal of Biotechnology*, 2010, 147(1): 46–51.
- [17] Fallet C, Rohe P, Franco-Lara E. Process optimization of the integrated synthesis and secretion of ectoine and hydroxyectoine under hyper/hypo-osmotic stress. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, 107(1): 124–133.
- [18] Lang YJ, Bai L, Ren YN, Zhang LH, Nagata S. Production of ectoine through a combined process that uses both growing and resting cells of *Halomonas salina* DSM 5928^T. *Extremophiles*, 2011, 15(2): 303–310.
- [19] Chen WC, Hsu CC, Lan JCW, Chang YK, Wang LF, Wei YH. Production and characterization of ectoine using a moderately halophilic strain *Halomonas salina* BCRC17875. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2018, 125(5): 578–584.
- [20] Zhao Q, Li SN, Lv P, Sun SM, Ma CQ, Xu P, Su HJ, Yang CY. High ectoine production by an engineered *Halomonas hydrothermalis* Y2 in a reduced salinity medium. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 1–12.
- [21] Nagata S, Wang YQ, Oshima A, Zhang LH, Miyake H, Sasaki H, Ishida A. Efficient cyclic system to yield ectoine using *Brevibacterium* sp. JCM 6894 subjected to osmotic downshock. *Biotechnology and Bioengineering*, 2008, 99(4): 941–948.
- [22] Guzmán H, Van-Thuoc D, Martín J, Hatti-Kaul R, Quillaguamán J. A process for the production of ectoine and poly(3-hydroxybutyrate) by *Halomonas boliviensis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 84(6): 1069–1077.
- [23] Chen Q, Zhang LH, Li XL, Liu S, Li DN. Poly-β-hydroxybutyrate/ectoine co-production by ectoine-excreting strain *Halomonas Salina*. *Process Biochemistry*, 2014, 49(1): 33–37.
- [24] 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. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 3313.
- [25] Onraedt A, De Muyenck C, Walcarius B, Soetaert W, Vandamme E. Ectoine accumulation in *Brevibacterium epidermis*. *Biotechnology Letters*, 2004, 26(19): 1481–1485.
- [26] Onraedt AE, Walcarius BA, Soetaert WK, Vandamme EJ. Optimization of ectoine synthesis through fed-batch fermentation of *Brevibacterium epidermis*. *Biotechnology Progress*, 2005, 21(4): 1206–1212.
- [27] Zhang LH, Lang YJ, Nagata S. Efficient production of ectoine using ectoine-excreting strain. *Extremophiles*, 2009, 13(4): 717–724.
- [28] Anbu Rajan L, Joseph TC, Thampuran N, James R, Ashok Kumar K, Viswanathan C, Bansal KC. Cloning and heterologous expression of ectoine biosynthesis genes from *Bacillus halodurans* in *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, 2008, 30(8): 1403–1407.
- [29] Bestvater T, Louis P, Galinski EA. Heterologous ectoine production in *Escherichia coli*: by-passing the metabolic bottle-neck. *Saline Systems*, 2008, 4: 12.
- [30] Zhu DR, Liu J, Han R, Shen GP, Long QF, Wei XX, Liu DL. Identification and characterization of ectoine biosynthesis genes and heterologous expression of the *ectABC* gene cluster from *Halomonas* sp. QHL1, a moderately halophilic bacterium isolated from Qinghai Lake. *Journal of Microbiology*, 2014, 52(2): 139–147.
- [31] Czech L, Poehl S, Hub P, Stöveken N, Bremer E. Tinkering with osmotically controlled transcription allows enhanced production and excretion of ectoine and hydroxyectoine from a microbial cell factory. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(2): e01772–17.
- [32] Parwata IP, Wahyuningrum D, Suhandono S, Hertadi R. Heterologous ectoine production in *Escherichia coli*: optimization using response surface methodology. *International Journal of Microbiology*, 2019, 2019: 5475361.
- [33] Bethlehem L, Moritz KD. Boosting *Escherichia coli*'s heterologous production rate of ectoines by exploiting the non-halophilic gene cluster from *Acidiphilium cryptum*. *Extremophiles*, 2020, 24(5): 733–747.
- [34] Schubert T, Maskow T, Benndorf D, Harms H, Breuer U. Continuous synthesis and excretion of the compatible solute ectoine by a transgenic, nonhalophilic bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(10): 3343–3347.
- [35] Chen W, Zhang S, Jiang PX, Yao J, He YZ, Chen LC, Gui XW, Dong ZY, Tang SY. Design of an ectoine-responsive AraC mutant and its application in metabolic engineering of ectoine biosynthesis. *Metabolic Engineering*, 2015, 30: 149–155.
- [36] 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*. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14: 55.
- [37] Yu QL, Cai HL, Zhang YF, He YZ, Chen LC, Merritt J, Zhang S, Dong ZY. Negative regulation of ectoine uptake and catabolism in *Sinorhizobium meliloti*: characterization of the EhuR gene. *Journal of Bacteriology*, 2017, 199(1): e00119–e00116.
- [38] Ning YK, Wu XJ, Zhang CL, Xu QY, Chen N, Xie XX. Pathway construction and metabolic engineering for fermentative production of ectoine in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 2016, 36: 10–18.
- [39] Becker J, Schäfer R, Kohlstedt M, Harder BJ, Borchert NS, Stöveken N, Bremer E, Wittmann C. Systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for production of the chemical chaperone ectoine. *Microbial Cell Factories*, 2013, 12(1): 1–16.
- [40] Giebelmann G, Dietrich D, Jungmann L, Kohlstedt M, Jeon EJ, Yim SS, Sommer F, Zimmer D, Mühlhaus T, Schroda M, Jeong KJ, Becker J, Wittmann C. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for high-level ectoine production: design, combinatorial assembly, and implementation of a transcriptionally balanced heterologous ectoine pathway. *Biotechnology Journal*, 2019, 14(9): 1800417.
- [41] Pérez-García F, Ziert C, Risse JM, Wendisch VF. Improved fermentative production of the compatible solute ectoine by *Corynebacterium glutamicum* from glucose and alternative carbon sources. *Journal of Biotechnology*, 2017, 258: 59–68.
- [42] 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. *Current Microbiology*, 2020, 77(8): 1412–1418.
- [43] Lippert K, Galinski EA. Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1992, 37(1): 61–65.
- [44] Boroujeni MB, Nayeri H. Stabilization of bovine lactoperoxidase in the presence of ectoine. *Food Chemistry*, 2018, 265: 208–215.
- [45] Roychoudhury A, Haussinger D, Oesterhelt F. Effect of the compatible solute ectoine on the stability of the membrane proteins. *Protein and Peptide Letters*, 2012, 19(8): 791–794.
- [46] Barth S, Huhn M, Matthey B, Klimka A, Galinski EA, Engert A. Compatible-solute-supported periplasmic expression of functional recombinant proteins under stress conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(4): 1572–1579.
- [47] Harishchandra RK, Wulff S, Lentzen G, Neuhaus T, Galla HJ. The effect of compatible solute ectoines on the structural organization of lipid monolayer and bilayer membranes. *Biophysical Chemistry*, 2010, 150(1/2/3): 37–46.
- [48] Herzog M, Dwivedi M, Kumar Harishchandra R, Bilstein A, Galla HJ, Winter R. Effect of ectoine, hydroxyectoine and β -hydroxybutyrate on the temperature and pressure stability of phospholipid bilayer membranes of different complexity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2019, 178: 404–411.
- [49] Botta C, Di Giorgio C, Sabatier AS, De Mèo M. Genotoxicity of visible light (400–800 nm) and photoprotection assessment of ectoin, L-ergothioneine and mannitol and four sunscreens. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2008, 91(1): 24–34.
- [50] Schröter MA, Meyer S, Hahn MB, Solomun T, Sturm H, Kunte HJ. Ectoine protects DNA from damage by ionizing radiation. *Scientific Reports*, 2017, 7: 15272.
- [51] Hahn MB, Meyer S, Schröter MA, Kunte HJ, Solomun T, Sturm H. DNA protection by ectoine from ionizing radiation: molecular mechanisms. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2017, 19(37): 25717–25722.
- [52] Malin G, Lapidot A. Induction of synthesis of tetrahydropyrimidine derivatives in *Streptomyces* strains and their effect on *Escherichia coli* in response to osmotic and heat stress. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(2): 385–395.
- [53] Buommino E, Schiraldi C, Baroni A, Paoletti I, Lamberti M, de Rosa M, Tufano MA. Ectoine from halophilic microorganisms induces the expression of hsp70 and hsp70B' in human keratinocytes modulating the proinflammatory response. *Cell Stress & Chaperones*, 2005, 10(3): 197.
- [54] Bownik A, Stępniewska Z. Protective effects of bacterial osmoprotectant ectoine on bovine erythrocytes subjected to staphylococcal alpha-haemolysin. *Toxicon*, 2015, 99: 130–135.
- [55] Bownik A, Stępniewska Z. Ectoine as a promising protective agent in humans and animals. *Arhiv Za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 2016, 67(4): 260–265.
- [56] Hseu YC, Chen XZ, Vudhya Gowrisankar Y, Yen HR, Chuang JY, Yang HL. The skin-whitening effects of ectoine

- via the suppression of α -MSH-stimulated melanogenesis and the activation of antioxidant Nrf2 pathways in UVA-irradiated keratinocytes. *Antioxidants*, 2020, 9(1): 63.
- [57] Bujak T, Zagórska-Dziok M, Nizioł-Lukaszewska Z. Complexes of ectoine with the anionic surfactants as active ingredients of cleansing cosmetics with reduced irritating potential. *Molecules*, 2020, 25(6): 1433.
- [58] Rieckmann T, Gatzemeier F, Christiansen S, Rothkamm K, Münscher A. The inflammation-reducing compatible solute ectoine does not impair the cytotoxic effect of ionizing radiation on head and neck cancer cells. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 6594.
- [59] Sydlik U, Gallitz I, Albrecht C, Abel J, Krutmann J, Unfried K. The compatible solute ectoine protects against nanoparticle-induced neutrophilic lung inflammation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2009, 180(1): 29–35.
- [60] Kanapathipillai M, Lentzen G, Sierks M, Park CB. Ectoine and hydroxyectoine inhibit aggregation and neurotoxicity of Alzheimer's β -amyloid. *FEBS Letters*, 2005, 579(21): 4775–4780.
- [61] Kanapathipillai M, Ku SH, Girigoswami K, Park CB. Small stress molecules inhibit aggregation and neurotoxicity of prion peptide 106-126. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 365(4): 808–813.
- [62] Arora A, Ha C, Park CB. Inhibition of insulin amyloid formation by small stress molecules. *FEBS Letters*, 2004, 564(1/2): 121–125.
- [63] Nosch DS, Joos RE, Job M. Prospective randomized study to evaluate the efficacy and tolerability of Ectoin® containing Eye Spray (EES09) and comparison to the liposomal Eye Spray Tears Again® (TA) in the treatment of dry eye disease. *Contact Lens and Anterior Eye*, 2021, 44(3): 101318.
- [64] Brands S, Schein P, Castro-Ochoa KF, Galinski EA. Hydroxyl radical scavenging of the compatible solute ectoine generates two N-acetimides. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2019, 674: 108097.
- [65] Tan FX, Zhang LH, Liu WF, Zhu YM. Osmotic pressure compensated solute ectoine improves salt tolerance of microbial cells in microbial fuel cells. *Fuel Cells*, 2019, 19(5): 616–622.
- [66] Wang Y, Zhang LH. Ectoine improves yield of biodiesel catalyzed by immobilized lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2010, 62(1): 90–95.
- [67] Nakayama H, Yoshida K, Ono H, Murooka Y, Shinmyo A. Ectoine, the compatible solute of *Halomonas elongata*, confers hyperosmotic tolerance in cultured tobacco cells. *Plant Physiology*, 2000, 122(4): 1239–1248.
- [68] Moghaieb REA, Tanaka N, Saneoka H, Murooka Y, Ono H, Morikawa H, Nakamura A, Nguyen NT, Suwa R, Fujita K. Characterization of salt tolerance in ectoine-transformed tobacco plants (*Nicotiana tabacum*): photosynthesis, osmotic adjustment, and nitrogen partitioning. *Plant, Cell & Environment*, 2006, 29(2): 173–182.
- [69] Schnoor M, Voß P, Cullen P, Böking T, Galla HJ, Galinski EA, Lorkowski S. Characterization of the synthetic compatible solute homoectoine as a potent PCR enhancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 322(3): 867–872.

Research progress in microbial production and application of ectoines

Shan Zhang^{1#}, Meng Hu^{2,3#}, Yongzhi He^{2,3}, Zhiyang Dong^{2,3*}

¹ Shenzhen SIYOMICRO BIO-Tech CO., LTD, Shenzhen 518116, Guangdong Province, China

² State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

³ College of Life Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: Extremophiles thrive in environments considered extreme for human life. To adapt to the extreme environments, a distinct abundant group of microbial bioactive molecules was produced in the extremophiles. Ectoine, as a compatible solute, was discovered originally in the halophilic bacterium and enable the bacteria to survive in salty environments. In addition to be functional as an osmotic counterweight, ectoine was able to protect proteins, nucleic acids, cell membranes and even the whole cells against various stressors such as heating, drying, freezing and radiation. Therefore, ectoines exhibit great potential for the application in the fields of biomolecule protection, biomedicine and biotechnology. With the development of synthetic biology and metabolic engineering, the traditional approach for ectoine production in halophilic bacteria was replaced by heterologous production of ectoines in the non-halophilic bacteria. In this paper, we overviewed the research progress on the microbial production and application of ectoines, which provides an important reference for the future development and commercial application of ectoines.

Keywords: ectoines, microbial production, bacteria milking, halophiles, heterologous production

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31770103, 31100066)

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-10-64807337; E-mail: dongzy@im.ac.cn

Received: 10 September 2020; Revised: 25 December 2020; Published online: 18 March 2021