

## 综述

# 相容性溶质四氢嘧啶及其羟基化衍生物的研究进展\*

朱道辰<sup>1,3\*\*</sup> 刘杏荣<sup>2</sup>

(1 江苏大学环境学院 镇江 221013 2 江苏大学食品与生物工程学院 镇江 212013)

(3 广东省微生物研究所 广州 510070)

**摘要** 四氢嘧啶类化合物是嗜盐以及耐盐菌胞内合成的一类能够抵御外界高盐胁迫的相容性溶质,概述了四氢嘧啶及其衍生物的理化特征以及在嗜盐微生物中抵御外界高渗透压的作用机理,主要阐述了四氢嘧啶类相容性溶质的生物合成途径、膜运输机理、分泌释放机制、高密度发酵生产等方面在细胞、分子水平上的最新研究进展以及前景展望。并且综述了四氢嘧啶类在精细化工、生物医药及生物制造等行业的应用研究以及发展前景,探讨了未来的研究方向。

**关键词** 四氢嘧啶 羟基化四氢嘧啶 相容性溶质 嗜盐菌 生物合成 运输机制

**中图分类号** Q819

细胞的一个重要生理能力就是对外部环境的快速适应能力,例如外部渗透压变化(高浓度 NaCl 等);真核和原核微生物细胞抵御环境高渗透压胁迫主要的应答策略是通过蓄集有机小分子物质平衡内外渗透压,包括自身合成和从环境中吸收等方式。这类小分子物质(包括氨基酸及其衍生物、季胺、糖类、以及短肽等)的最主要特征为:通常不参与细胞内的中心循环代谢,即便能够蓄积到很高的胞内浓度,因此被称为相容性溶质<sup>[1]</sup>。这些溶质的蓄积能够帮助细胞维持渗透压平衡、细胞体积、以及电解液浓度等细胞增殖的要素<sup>[2-3]</sup>。

四氢嘧啶 [(S)-2-methyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidine-4-carboxylic acid, ectoine, Ec] 作为相容性溶质于 1985 年在极端嗜盐菌 *Ectothiorhodospira halochloris* 中被 Galinski 等<sup>[4]</sup> 所发现并且鉴定结构,1988 年 Inbar 等<sup>[5]</sup> 又在革兰氏阳性土壤细菌 *Streptomyces parvulus* 中发现了四氢嘧啶的羟基化衍生物羟基化四氢嘧啶 [(S,S)-2-methyl-5-hydroxy-1,4,5,6-tetrahydropyrimidine-4-carboxylic acid, Hydroxyectoine, HE]。四氢嘧啶类相容性

溶质 (ectoines, Ecs) 是嗜盐菌中最普遍存在的相容性溶质之一,能够为处于外界高温、冷冻、射线、干燥等极端条件刺激下的细胞、蛋白质、细胞膜、和核酸提供保护作用,因此受到各国研究者的广泛关注<sup>[6-8]</sup>。此外 Ecs 对阿尔兹海默氏症、帕金森病等神经性疾病均有一定的疗效,并且最新研究发现 Ecs 能够提高皮肤的再生能力和延缓皮肤的老化<sup>[9-10]</sup>。因此, Ecs 在精细化工、生物医药及生物制造等行业将具有广泛的应用前景<sup>[11-13]</sup>。

本文旨在综述近年来国际上对相容性溶质 Ecs 的研究,包括生物合成途径、相关合成酶及其基因等在分子水平上的研究、膜转运机理、转运蛋白的转运机制、高密度发酵生产、及其功能应用等领域的研究进展,以阐明研究现状并对未来 Ecs 领域的研究提供思路 and 方向。

## 1 四氢嘧啶及其衍生物的理化特征和鉴定

Ec, HE 的分子量分别为 142.16 和 158.16, 属于亲水性、兼性离子的生物小分子。从结构上来说 Ecs 是环化的氨基酸衍生物,但是由于分子内电子离域化的原因,导致其不能够体现环状氨基酸分子的特征(图 1)。Ecs 在生物学上惰性、不干扰胞内大部分的酶以及结合反应,胞内高耐受性(1M),对热稳定、不易分解、在 3℃

收稿日期:2010-10-13 修回日期:2010-11-28

\* 中国科学院知识创新工程(KSCX2-YW-G-073)、广东省自然科学基金(9451007002003073)资助项目

\*\* 电子信箱:dczhucn@hotmail.com.

水溶液中的溶解度分别为 5.45 mol/kg (Ec) 和 7.04 mol/kg (HE) [14]。

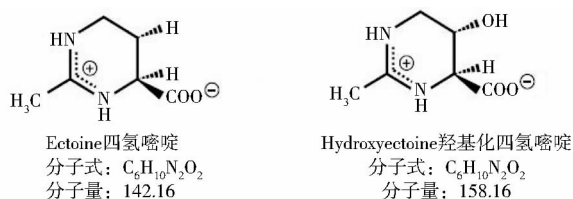


图1 四氢嘧啶和羟基化四氢嘧啶结构图

Fig.1 Structure of ectoine and hydroxyectoine

Ec 和 HE 的分子结构接近,物理化学特征也非常相似,因此分离鉴定也存在一定的困难。Galinski 等[4]用核磁共振以及质谱方法首次检测到 Ecs,并且利用同位素标定以及核磁共振方法(NMR)鉴定了其分子结构,在近年来的研究中,通常用高效液相色谱(HPLC)对其进行定性定量分析,Galinski 等[15]通过示差折光检测仪(RI)检测耐盐菌株中 Ec 的合成,但这种方法由于 RI 检测仪的灵敏度不够高,因而具有局限性。Nagata 等[16]、Eshinimaev 等[17]用 HPLC 以及紫外检测仪分别对耐盐菌 *Brevibacterium* sp. JCM 6894、嗜盐嗜碱甲烷氧化菌 *Methylobacter marinus* 7C 和 *Methylobacterium alcaliphilum* 5S 所合成的 Ec 进行定性和定量分析,结果表明 220~230nm 的紫外波长下显示最大吸收峰值,并且通过标准品的对比能够准确定量到 10mg/L 的浓度,并且谷氨酸盐以及蔗糖等其它相容性溶质的胞内蓄积不干扰 Ec 的定量结果。Kunte 等[18]利用 FMOG 柱前衍生化 HPLC 法能够灵敏地检测到微量的 Ec,利用这种方法甚至能够分析琼脂平板培养基上的单个菌斑的 Ec 的合成。除了 HPLC 方法之外,亦有利用阴离子交换色谱脉冲安培检测法测定 Ecs 的报道,能够灵敏地检测包括 Ecs 在内的大多数相容性溶质,但是样品的处理较复杂,因此未能广泛应用[19]。Ecs 的分子结构通常用核磁共振(NMR)来测定, Nagata 等[20]、Zhu 等[21]用 NMR 的氢谱以及碳谱分析鉴定了耐盐菌 *Brevibacterium* sp. JCM 6894 以及中度嗜盐菌 *Halomonas ventosae* DL7 中 Ec 以及 HE 的结构。目前对于 Ecs 等相容性溶质的最为常用以及便捷的检测及结构鉴定方法主要是 HPLC 和 NMR 方法。

## 2 四氢嘧啶及其衍生物的生物合成途径研究

### 2.1 四氢嘧啶及其衍生物在微生物中的分布

Ecs 作为相容性溶质主要分布在好氧、化学异养的

耐盐或者嗜盐微生物中;一部分极端嗜盐菌,以及大部分中度嗜盐菌和部分耐盐菌均以 Ec 为主要相容性溶质[22]。例如耐盐菌 *Brevibacterium*、*Bacillus*、*Streptomyces*、*Methylobacterium* 等属[16, 23-25],和嗜盐菌的 *Ectothiorhodospira*、*Halomonas*、*Chromohalobacter*、*Vibrio*、*Salinivibrio*、*Halobacillus*、*Marinococcus* 等属种中均能检测到 Ec[4, 26-31]。特别是 *Halomonas* 属中几乎所有种都能够合成 Ecs 作为细胞的主要相容性溶质[32-33];另一方面,许多微生物并不仅仅以单纯的一种化合物来作为相容性溶质,细胞内会同时存在几种能够起到平衡体内外渗透压的化合物,诸如谷氨酸盐、甜菜碱、海藻糖等等,能够蓄积或者合成几种不同相容性溶质的能力使细胞更容易适应更为复杂以及营养贫乏的极端环境[30]。

### 2.2 四氢嘧啶类的合成途径

经过十几年的研究, Ec 的合成途径已经在基因水平和酶水平上有了较为深入的研究,其合成由 3 个基因(*ectA*、*ectB*、*ectC*)编码的 3 个酶来调控[34];HE 的合成由 Ec 经 *ectD*(或者 *thpD*) 基因编码的羟基化酶(*ectD*)催化得到(图 2)[35]。

Peters 等[36]首次阐述了 Ec 在极端嗜盐菌 *Ectothiorhodospira halochloris* 以及中度嗜盐菌 *Halomonas elongata* 中的合成路径,其合成过程分为三步,第一步是天冬氨酸-β-半醛经二氨基丁酸氨基转移酶(*ectA*)催化得到产物 2,4-二氨基丁酸,随之由二氨基丁酸乙酰基转移酶(*ectB*)催化转化为 N'-乙酰基-2,4-二氨基丁酸,最后四氢嘧啶合成酶(*ectC*)将其环化成 Ec[37]。编码参与 Ec 合成的 3 种酶分别由 3 种对应的基因(*ectA*、*ectB*、*ectC*)编码,并且这 3 个编码基因作为一个操纵子形成基因簇[34]。Louis 等[31]将 Ec 合成基因簇在大肠杆菌中异源表达,发现大肠杆菌对盐的耐受性从 3% 提高到 5%,同时发现在 *ectA* 的上游区域存在一段能够调节其合成的必要调控基因。Ec 合成基因簇异源表达的成功使其能够用于植物耐盐碱性的改造使其获得耐受极端环境的能力,在沙漠以及盐碱地的环境治理方面具有应用潜力。

HE 通常作为 Ec 的副产物存在于细菌细胞内,其浓度远远低于 Ec,其合成通常是 Ec 经过羟基化酶(*hydroxylase*)的作用直接转化得到,但是研究发现当人为阻断 Ec 羟基化酶的活性时,胞内仍有少量的 HE 合成,因此也可能存在其它未知的途径[38]。Nagata 等[39]将 Ec 羟基化酶的基因(*thpD*)在大肠杆菌 BL21 中异源

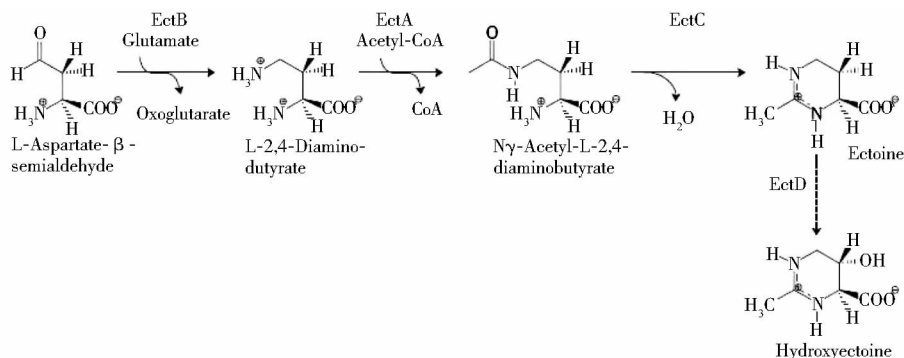


图2 四氢嘧啶以及羟基化四氢嘧啶的合成路径

Fig.2 The biosynthetic pathway of ectoine

The enzymes involved ectoine syntheses are L-diaminobutyric acid transaminase(ectB), L-diaminobutyric acid acetyltransferase(ectA), ectoine synthase(ectC) and ectoine hydroxylase(ectD)

表达,发现重组的大肠杆菌能够蓄积培养基中的 Ec 并且胞内转化率最高达到 96%,这一结果表明羟基化酶是 HE 合成的主要作用酶以及对 Ec 转化为 HE 起主要的作用。

### 3 四氢嘧啶及其衍生物的运输机制及保护机制

#### 3.1 四氢嘧啶类的膜运输与分泌释放机制

细菌通过膜转运系统来吸收或者分泌相容性溶质,达到调节体内外渗透压平衡的目的,次级转运蛋白 MHS(ProP)、以及 BCCT 家族(BetP, EctP, LcoP)作为能够吸收脯氨酸、甜菜碱以及四氢嘧啶的转运系统在大肠杆菌以及土壤细菌中广泛存在,在细菌细胞内它们起到渗透传感器以及渗透调节子的作用<sup>[40-41]</sup>。近年来在革兰氏阴性嗜盐菌中发现的新型渗透压调节系统“TRAP- TeaABC 转运系统”是嗜盐菌中唯一的 Ecs 分泌吸收通道系统,能够根据渗透压的变化调控 HE 和 Ec 的吸收分泌,当环境渗透压过高的时候把相容性溶质泵进胞内,过低的时候再把过量的溶质泵到体外,以维持细胞的平衡<sup>[42-43]</sup>。转运蛋白对于渗透压的改变的感知以及调节作用的时间以毫秒计,造成了在体内难以探测,这也是截止目前膜蛋白如何感应外界高渗透压条件的根本机理仍未得到很好解释的原因之一。

#### 3.2 四氢嘧啶类对细胞的保护机制

Ecs 作为相容性溶质最主要的作用是协助细胞平衡胞内外渗透压,研究发现 Ec 能够通过提高脂膜表面的水合作用增强脂膜流态化,从而提高细胞膜承受极端环境的能力<sup>[44]</sup>。另一方面 Ecs 也能够对生物大分子

例如蛋白质、核酸等起到稳定作用,其原理是胞内高浓度的相容性溶质与蛋白表面相互作用,有助于蛋白的折叠结构的紧凑性并且增强其稳定性<sup>[45]</sup>, Yu 等<sup>[46]</sup>的研究表明 Ec 通过减缓蛋白周围水的扩散达到保持蛋白表面水分的目的,这表明 Ecs 的保护作用不是直接作用于生物大分子本身。Ecs 等相容性溶质也能够提高微生物对热压的耐受性,研究推测可能是其与蛋白质肽骨架结构相互作用引起的<sup>[47]</sup>,与 Ec 相比,HE 拥有一个 -OH 基团,能够部分代替脱水作用的蛋白质表面水分失去,因此具有更有效的保护作用。利用兔肌肉脱氢酶测试四氢嘧啶类对酶热稳定性的结果表明,在 55℃ 能够保护酶免于热失活,其保护原理可能与其嘧啶环帮助组织和保持水分的高表面张力有关<sup>[38]</sup>。Ecs 等相容性溶质能够提高 DNA 的稳定性,可能是高浓度的溶质提高了溶液的电介质的稳定性和降低了离子相互作用影响 DNA 的双螺旋结构的稳定性。此外,HE 能够改变 DNA 结构使其避免核酸外切酶的剪切作用<sup>[48-49]</sup>。因此,Ecs 通过对蛋白、核酸、细胞膜等的保护作用实现对处于极端条件下细胞的保护,最新研究表明 Ec 的蓄积可能是某些海洋细菌具有极快生长速度的原因之一<sup>[50]</sup>。

### 4 四氢嘧啶及其衍生物的生产及其应用研究

#### 4.1 四氢嘧啶类的高密度发酵生产工艺

胞内的 Ecs 通常用 80% 的乙醇溶液裂解细胞进行提取,另外一种能够保护细胞的活性的提取方法是基于分泌通道的渗透调节机制,采用低渗冲击(downshock)的方法,即短时间内将细菌细胞从高渗透

压环境中突然转变到低渗透压下,使溶质迅速从胞内释放出来<sup>[51]</sup>。通过采用低渗冲击的手段发展了相容性溶质的生产技术“细菌挤奶法”,即高渗透压下培养细菌、然后低渗冲击释放溶质、再将菌体重新高渗培养、低渗冲击释放溶质,依次循环多至8~9次,获得产物,利用这种方法高密度发酵获得了Ec的较高产量<sup>[52]</sup>。Doan等<sup>[53]</sup>在此基础上发展了两步分批式流加培养,获得了Ec 6g/L每天和HE 8g/L每天的最高产量。通常在革兰氏阴性嗜盐菌中HE作为Ec的副产物,合成量较低,但有些革兰氏阳性菌能够较大量合成HE,比如*Marinococcus* sp. M52,最高能够合成7g/L,然而阳性菌细胞膜的转运机制不同于TeaABC系统,不能低渗释放HE,所以不能用“细菌挤奶法”生产HE<sup>[51]</sup>。

#### 4.2 羟基化四氢嘧啶的合成与工程菌表达

HE在胞内的浓度远远低于Ec,并且较难分离纯化,导致其生产成本较高,制约了其在各领域的实际应用。因此,研究影响HE在细胞内合成的因子受到研究人员广泛关注,研究发现热刺激能够提高HE的合成量,例如在中度嗜盐菌*Halomonas elongata*以及*Chromohalobacter salexigens*中发现37℃培养条件下HE的胞内浓度显著提高<sup>[22, 34, 54]</sup>。因此,Ec羟化酶的催化效率和反应温度是影响HE合成的重要因素。解决HE高浓度合成和大量分泌的关键在于解除Ec的竞争性抑制和提高Ec羟化酶的活性和胞内含量。此外,Jan等发现Ec羟化酶的活性与二价铁离子、分子氧、和氧化谷胱甘肽的浓度等有关<sup>[55]</sup>。基于此,Prabhu等<sup>[54]</sup>试图通过构建高效表达Ec羟化酶的工程菌的策略来促进Ec向HE的转化,并在中度嗜盐菌*Halomonas elongata*中成功地异源表达了来自放线菌*Streptomyces chrysomallus*的Ec羟化酶基因*thpD*。实验证明含有羟基化酶基因的*Halomonas elongata*工程菌株在37℃培养条件下能够将Ec完全转化为HE,但30℃度时转化率是80.4%,并且在发酵培养中发现经过多次培养循环会发生严重的质粒丢失现象,导致转化率降低。因此,表达系统的不稳定,和最适培养温度下不能高效完全转化Ec为HE是这种表达系统的缺点,目前还没有其它成功构建HE高效表达分泌系统的报道。

#### 4.3 四氢嘧啶类的应用

由于Ecs能够在高温、冷冻、干燥、射线、自由基等不利条件下保护酶、核酸、细胞膜等生物大分子的生物活性等特性,因此在精细化工、生物医药、生物制造等领域将具有广泛的用途。

4.3.1 精细化工行业 由于人类皮肤细胞常常处于极端条件下,诸如炎热的夏季高温日晒,寒冷的冬季风吹、冷冻等,这些因素将会加速皮肤的老化。Ecs对处于极端环境下的细胞具有保护的功能,因此也能够对人类皮肤具有相应的保护作用。研究发现Ecs能够保护紫外线所致的皮肤损伤,并且能够平衡皮肤的微生态环境;同样,由于Ecs对蛋白的保水作用也可以阻止皮肤的失水,起到对皮肤保湿作用。因此Ecs可以作为添加剂用于诸如保湿、抗衰老、防紫外线、防冻伤膏等类别护肤品中<sup>[56-57]</sup>。

4.3.2 生物医药行业 由于Ecs能够稳定蛋白质的结构以及识别错误折叠的蛋白质并抑制蛋白聚合体的形成,因此对于一些蛋白质变性引起的疾病能起到治疗作用,例如阻止在阿尔兹海默氏症发病机理中起着重要作用的A $\beta$ 42聚合体的形成,和作为朊病毒聚合物毒性的抑制剂<sup>[9-10]</sup>。此外,还可以抵抗纳米粒子诱导的肺炎<sup>[58]</sup>。所以Ecs可以用于治疗帕金森病、阿尔茨海默病、疯牛病、以及朊病毒病,还可以在肿瘤放化疗中作为健康细胞的保护剂等。

4.3.3 生物制造行业 Ecs还可用于生物工业中对生物反应器过程中酶反应的保护。Ecs能够在热条件下保护核酸的双螺旋结构的稳定性,因此可以在PCR反应中作为热保护剂,降低PCR反应温度、稳定聚合酶活性,研究证明相容性溶质能够提高PCR反应中核酸的产量<sup>[59-60]</sup>。另外Ecs等相容性溶质可以用于提高植物耐盐碱性,这对环境保护具有重要意义,例如Nakayama等<sup>[61]</sup>研究发现将Ec的基因簇重组到烟草细胞中提高了其对盐碱的耐受性,尽管在烟草细胞中其合成量并不高。

## 5 结论与展望

目前,越来越多的科学家对Ecs相容性溶质的研究产生浓厚兴趣,主要集中在在分子、细胞、组学水平上揭示其渗透适应以及对生物大分子诸如细胞壁、酶、核酸等保护作用机理方面。同时,应用性研究也越来越受到重视,在生命科学研究、生物医药、生物制造、精细化工等领域的应用已经有了不少研究成果。然而,尽管对Ecs已经做了广泛和深入的研究,对于诸多嗜盐微生物中存在Ecs以及其他相容性溶质的选择、适应各种压力因子的机理还没能够阐述清楚,对于相容性溶质的应用范围与作用机理仍然处在初步阶段。因此,在

不久的将来,对 Ecs 相容性溶质的研究将主要聚焦在运用代谢组学、蛋白质组学、分子进化等技术提高其胞内合成量,以及在植物中的异源表达以用于对于旱盐碱环境的治理和保护等领域。

### 参考文献

- [1] Brown A D. Microbial water stress. *Bacteriol Rev*, 1976, 40: 803-846.
- [2] Roberts M F. Osmoadaptation and osmoregulation in archaea: update 2004. *Front Biosci*, 2004, 9: 1999-2019.
- [3] Galinski E A. Osmoadaptation in bacteria. *Adv Microb Physiol*, 1995, 37: 272-328.
- [4] Galinski E A, Pfeiffer H P, Truper H G. 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid. A novel cyclic amino acid from halophilic phototrophic bacteria of the genus *Ectothiorhodospira*. *Eur J Biochem*, 1985, 149: 135-139.
- [5] Inbar L, Lapidot A. The structure and biosynthesis of new tetrahydropyrimidine derivatives in actinomycin D producer *Streptomyces parvulus*. *J Biol Chem*, 1988, 263: 16014-16022.
- [6] Da Costa M S, Santos H, Galinski E A. An overview of the role and diversity of compatible solutes in bacteria and archaea. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 1998, 61: 117-153.
- [7] Lippert K, Galinski E A. Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1992, 37: 61-65.
- [8] Motitschke L, Driller H, Galinski E A. Ectoin and ectoin derivatives as moisturizer in cosmetics. U. S. patent US6060071, 2000.
- [9] Kanapathipillai M, Lentzen G, Sierks M, et al. Ectoine and hydroxyectoine inhibit aggregation and neurotoxicity of Alzheimer's beta-amyloid. *FEBS Lett*, 2005, 579: 4775-4780.
- [10] Kanapathipillai M, Ku S H, Girigoswami K, et al. Small stress molecules inhibit aggregation and neurotoxicity of prion peptide 106-126. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 365: 808-813.
- [11] Graf R, Anzali S, Buenger J, et al. The multifunctional role of ectoine as a natural cell protectant. *Clin Dermatol*, 2008, 26: 326-333.
- [12] Lentzen G, Schwarz T. Extremolytes: natural compounds from extremophiles for versatile applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 72: 623-634.
- [13] Morozkina E V, Slutskaya E S, Fedorova T V, et al. Extremophilic microorganisms: biochemical adaptation and biotechnological application. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 46: 5-20.
- [14] Held C, Neuhaus T, Sadowski G. Compatible solutes: Thermodynamic properties and biological impact of ectoines and pralines. *Biophys Chem*, 2010, 152: 28-39.
- [15] Galinski E A, Herzog R M. The role of trehalose as a substitute for nitrogen-containing compatible solutes (*Ectothiorhodospira halochloris*). *Arch Microbiol*, 1990, 153: 607-613.
- [16] Nagata S, Wang Y B. Accumulation of ectoine in the halotolerant *Brevibacterium* sp. JCM 6894. *J Biosci Bioeng*, 2001, 91: 288-293.
- [17] Eshinimaev B T, Tsyrenzhapova I S, Khmelenina V N, et al. Measurement of the content of the osmoprotectant ectoine in methylophilic bacteria by means of normal-phase high performance liquid chromatography. *App Biochem Microbi*, 2007, 43: 193-196.
- [18] Kunte H J, Galinski E A, Trüper H G. A modified FMOC-method for the detection of amino acid type osmolytes and tetrahydropyrimidines (ectoines). *J Microbiol Methods*, 1993, 17: 129-136.
- [19] Riis V, Maskow T, Babel W. Highly sensitive determination of ectoine and other compatible solutes by anion-exchange chromatography and pulsed amperometric detection. *Anal Bioanal Chem*, 2003, 377: 203-207.
- [20] Nagata S, Adachi K, Sano H. NMR analyses of compatible solutes in a halotolerant *Brevibacterium* sp. *Microbiology*, 1996, 142: 3355-3362.
- [21] Zhu D, Niu L, Wang C, et al. Isolation and characterisation of moderately halophilic bacterium *Halomonas ventosae* DL7 synthesizing ectoine as compatible solute. *Ann Microbiol*, 2007, 57: 401-406.
- [22] Martin D D, Ciulla R A, Roberts M F. Osmoadaptation in archaea. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 1815-1825.
- [23] Jebbar M, von Blohn C, Bremer E. Ectoine functions as an osmoprotectant in *Bacillus subtilis* and is accumulated via the ABC transport system OpuC. *FEMS Microbiol Lett*, 1997, 154: 325-330.
- [24] Bursy J, Kuhlmann A U, Pittelkow M, et al. Synthesis and uptake of the compatible solutes ectoine and 5-hydroxyectoine by *Streptomyces coelicolor* A3(2) in response to salt and heat stresses. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74: 7286-7296.
- [25] Mustakhimov I I, Reshetnikov A S, Glukhov A S, et al. Identification and characterization of EctR1, a new transcriptional regulator of the ectoine biosynthesis genes in the halotolerant methanotroph *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z. *J Bacteriol*, 2010, 192(2): 410-417.
- [26] Canovas D, Vargas C, Iglesias-Guerra F, et al. Isolation and characterization of salt-sensitive mutants of the moderate halophile *Halomonas elongata* and cloning of the ectoine synthesis genes. *J Biol Chem*, 1997, 272: 25794-25801.
- [27] Calderon M I, Vargas C, Rojo F, et al. Complex regulation of the

- synthesis of the compatible solute ectoine in the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043T. Microbiology, 2004, 150: 3051-3063.
- [28] Saum S H, Müller V. Growth phase- dependent switch in osmolyte strategy in a moderate halophile; ectoine is a minor osmolyte but major stationary phase solute in *Halobacillus halophilus*. Environ Microbiol, 2008, 10: 716-726.
- [29] Pflughoeft K J, Kierek K, Watnick P I. Role of ectoine in *Vibrio cholerae* osmoadaptation. Appl Environ Microbiol, 2003, 69: 5919-5927.
- [30] Zhu D, Cui S, Nagata S. Isolation and characterization of salt-sensitive mutants of the moderately halophilic bacterium, *Salinivibrio costicola* subsp. yaniae. Biosci Biotech Biochem, 2008, 72: 1977-1982.
- [31] Louis P, Galinski E A. Characterization of genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine from *Marinococcus halophilus* and osmoregulated expression in *Escherichia coli*. Microbiology, 1997, 143: 1141-1149.
- [32] Guzmán H, Van- Thuoc D, Martín J, et al. A process for the production of ectoine and poly(3- hydroxybutyrate) by *Halomonas boliviensis*. Appl Microbiol Biotechnol, 2009, 84:1069-1077.
- [33] Romano I, Nicolaus B, Lama L, et al. Accumulation of osmoprotectants and lipid pattern modulation in response to growth conditions by *Halomonas pantelleriense*. Syst Appl Microbiol, 2001, 24: 342-352.
- [34] Canovas D, Vargas C, Calderon M I, et al. Characterization of the genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata* DSM 3043. Syst Appl Microbiol, 1998, 21: 487-497.
- [35] Garcia- Estepa R, Argandona M, Reina- Bueno M, et al. The *ectD* gene, which is involved in the synthesis of the compatible solute hydroxyectoine, is essential for thermoprotection of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. J Bacteriol, 2006, 188: 3774-3784.
- [36] Peters P, Galinski E A, TrUper H G. The biosynthesis of ectoine. FEMS Microbiol Lett, 1990, 71: 157-162.
- [37] Ono H, Sawada K, Khunajakr N, et al. Characterization of biosynthetic enzymes for ectoine as a compatible solute in a moderately halophilic eubacterium, *Halomonas elongata*. J Bacteriol, 1999, 181: 91-99.
- [38] Canovas D, Borges N, Vargas C, et al. Role of N $\gamma$ -acetyldiaminobutyrate as an enzyme stabilizer and an intermediate in the biosynthesis of hydroxyectoine. Appl Environ Microbiol, 1999, 65: 3774-3779.
- [39] Nagata S, Zhu D, Cui S, et al. Yield of compatible solute hydroxyectoine through direct synthesis and conversion from ectoine, In: Schafer H A, Wohlbier L M. Diamino Amino Acid Research. Nova Publishers, 2008. 139-153.
- [40] Peter H, Weil B, Burkovski A, et al. *Corynebacterium glutamicum* is equipped with four secondary carriers for compatible solutes; identification, sequencing and characterization of the praline/ectoine uptake system, ProP, and the ectoine/proline/ glycine betaine carrier, EctP. J Bacteriol, 1998, 180: 6005-6012.
- [41] Tondervik A, Strom A R. Membrane topology and mutational analysis of the osmotically activated BetT choline transporter of *Escherichia coli*. Microbiology, 2007, 153: 803-813.
- [42] Grammann K, Volke A, Kunte H J. 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 2581T. J Bacteriol, 2002, 184: 3078-3085.
- [43] Tetsch L, Kunte H J. The substrate- binding protein TeaA of the osmoregulated ectoine transporter TeaABC from *Halomonas elongata*; purification and characterization of recombinant TeaA. FEMS Microbiol Lett, 2002, 211: 213-218.
- [44] Harishchandra R K, Wulff S, Lentzen G, et al. The effect of compatible solute ectoines on the structural organization of lipid monolayer and bilayer membranes. Biophys Chem, 2010, 150: 37-46.
- [45] Bolen D W, Baskakov I V. The osmophobic effect; natural selection of a thermodynamic force in protein folding. J Mol Biol, 2001, 310: 955-963.
- [46] Yu I, Nagaoka M. Slowdown of water diffusion around protein in aqueous solution with ectoine. Chem Phys Lett, 2004, 388: 316-321.
- [47] Liu Y, Bolen D W. The peptide backbone plays a dominant role in protein stabilization by naturally occurring osmolytes. Biochemistry, 1995, 34: 12884-12891.
- [48] Cioni P, Bramanti E, Strambini G B. Effects of sucrose on the internal dynamics of azurin. Biophys J, 2005, 88: 4213-4222.
- [49] Malin G, Iakobashvili R, Lapidot A. Effect of tetrahydropyrimidine derivatives on protein- nucleic acids interaction. Type II restriction endonucleases as a model system. J Biol Chem, 1999, 274: 6920-6929.
- [50] Zhu D, Zhang W, Zhang Q, et al. Accumulation and role of compatible solutes in bacterium *Salinivibrio costicola* subsp. yaniae with fast growth rate. Can J Microbiol, 2010, 56: 1-8.
- [51] Frings E, Sauer T, Galinski E A. Production of hydroxyectoine; high cell-density cultivation and osmotic downshock of *Marinococcus* strain M52. J Biotechnol, 1995, 61: 117-158.
- [52] Sauer T, Galinski E A. Bacterial milking: A novel bioprocess for production of compatible solutes. Biotechnol Bioeng, 1998, 57: 306-313.

- [53] Doan V T, Héctor G, Jorge Q. High productivity of ectoines by *Halomonas boliviensis* using a combined two- step fed- batch culture and milking process. J Biotechnol, 2010, 147: 46- 51.
- [54] Prabhu J, Schauwecker F, Grammel N, et al. Functional expression of the ectoine hydroxylase gene ( *thpD* ) from *Streptomyces chrysomallus* in *Halomonas elongate*. Appl Environ Microbiol, 2004, 70: 3130- 3132.
- [55] Bursy J, Pierik A J, Pica N, et al. Osmotically induced synthesis of compatible solute hydroxyectoine is mediated by an evolutionarily conserved ectoine hydroxylase. J Biol Chem, 2007, 282: 31147- 31155.
- [56] Lentzen G, Schwarz T. Extremolytes: natural compounds from extremophiles for versatile applications, Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 72: 623- 634.
- [57] Orth D S, Appa Y. Glycerine: a natural ingredient for moisturizing skin. In: Loden M, Maibach H I. Dry Skin and Moisturizers. London: CRC Press, 2000. 213- 228.
- [58] Sydlik U, Gallitzl I, Albrecht C, et al. The Compatible solute ectoine protects against nanoparticle- induced neutrophilic lung inflammation. Am J Respir Crit Care Med, 2009, 180: 29- 35.
- [59] Schnoor M, Voss P, Cullen P, Boking T, et al. Characterization of the synthetic compatible solute homoectoine as a potent PCR enhancer. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 322: 867- 872.
- [60] Faria T Q, Lima J C, Bastos M, et al. Protein stabilization by osmolytes from hyperthermophiles: effect of mannosylglycerate on the thermal unfolding of recombinant nuclease A from *Staphylococcus aureus* studied by picosecond time resolved fluorescence and calorimetry. J Biol Chem, 2004, 279: 48680- 48691.
- [61] Nakayama H, Yoshida K, Ono H, et al. Ectoine, the compatible solute of *Halomonas elongata*, confers hyperosmotic tolerance in cultured tobacco cells. Plant Physiol, 2000, 122: 1239- 1247.

## Compatible Solutes Ectoine and Its Derivate Hydroxyectoine

ZHU Dao- chen<sup>1,3</sup> LIU Xing- rong<sup>2</sup>

(1 School of Environmental Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

(2 School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

(3 Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China)

**Abstract** Ectoine and its derivatives are de novo synthesized by halophilic or halotolerant bacteria as compatible solutes. The characteristic of ectoines in biochemical and physiological role of osmotic stress defence in microorganisms was introduced, the protective properties of ectoines for cells were described and transferred to enzyme, nucleic acid, and human skin etc. Data were analyzed and summarized in the synthesis pathway of ectoines and transporters system in the halophilic bacteria on the cell and molecular level, and the production of ectoines by halophilic bacteria was described, such as downshock and milking process. In addition, the applications of ectoines were also summarized, which would be useful in the field of biology industry, medicine treatment and cosmetic for prevent aging of skin etc.

**Key words** Ectoine Hydroxyectoine Compatible solutes Halophilic bacteria Biosynthesis Transport mechanisms