

· 综 述 ·

四氢嘧啶生物合成及其关键酶生化特性研究进展

许慧娴¹, 陈永涛¹, 黄建忠¹, 陶勇², 柯崇榕^{1,2*}, 杨欣伟^{1*}

1 福建师范大学生命科学学院 工业微生物发酵技术国家地方联合工程研究中心 工业微生物教育部工程研究中心, 福建 福州 350108

2 中国科学院微生物研究所 中国科学院微生物生理与代谢工程重点实验室, 北京 100101

许慧娴, 陈永涛, 黄建忠, 陶勇, 柯崇榕, 杨欣伟. 四氢嘧啶生物合成及其关键酶生化特性研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1620-1643.

XU Huixian, CHEN Yongtao, HUANG Jianzhong, TAO Yong, KE Chongrong, YANG Xinwei. Advances in ectoine biosynthesis and biochemical characteristics of key enzymes[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1620-1643.

摘 要: 相容性溶质是微生物分泌的一类高水溶性有机渗透物, 以适应高盐度和高渗透压等极端环境。四氢嘧啶(ectoine)作为一种重要的相容性溶质, 对核酸、蛋白、生物膜以及细胞具有修复和保护作用, 广泛应用于化妆品、生物制剂、酶工业和医疗等领域, 每公斤市场售价约为 1 000 美元, 全球每年需求量高达 1.5 万 t。嗜盐菌是四氢嘧啶天然合成的微生物来源, 但其需在高盐培养基中生长, 工业化生产存在设备腐蚀以及成本高昂等问题。随着功能基因组学、系统生物学和合成生物学的快速发展, 利用代谢工程等手段构建四氢嘧啶高产细胞工厂成为当前重要的研究方向, 工程化大肠杆菌的四氢嘧啶最高产量已达 131.8 g/L, 产率为 1.37 g/(L·h)。本文主要围绕四氢嘧啶的合成途径、关键酶的生化特性以及四氢嘧啶生物合成等方面进行综述, 以期阐明其研究现状并为四氢嘧啶的工业生产提供思路和方向。

关键词: 四氢嘧啶; 相容性溶质; 生物合成; 代谢工程

资助项目: 福建省自然科学基金(2021J01170, 2021J01172); 中国博士后科学基金(2020M670495)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province (2021J01170, 2021J01172) and the China Postdoctoral Science Foundation (2020M670495).

*Corresponding authors. E-mail: YANG Xinwei, npkace@fjnu.edu.cn; KE Chongrong, kechr@fjnu.edu.cn

Received: 2023-09-18; Accepted: 2023-12-13; Published online: 2023-12-20

Advances in ectoine biosynthesis and biochemical characteristics of key enzymes

XU Huixian¹, CHEN Yongtao¹, HUANG Jianzhong¹, TAO Yong², KE Chongrong^{1,2*}, YANG Xinwei^{1*}

1 Engineering Research Center of Industrial Microbiology, Ministry of Education; National and Local United Engineering Research Center of Industrial Microbiology and Fermentation Technology; College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, Fujian, China

2 CAS Key Laboratory of Microbial Physiological and Metabolic Engineering, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: Compatible solutes are highly water-soluble organic osmolytes produced by microorganisms to adapt to extreme environments, such as high salinity and osmotic pressure. Among these, ectoine plays a crucial role in repairing and protecting nucleic acids, protein, biofilms, and cells. As a result, it has found widespread applications in cosmetics, biological agents, the enzyme industry, medicine, and other fields. Currently, the market value of ectoine is around US\$ 1 000/kg, with a global demand reaching 15 000 tons per year. Although halophilic bacteria serve as the natural source of ectoine synthesis, its production in high-salinity media presents challenges such as equipment corrosion and high cost for industrial production. Advancements in functional genomics, systems biology, and synthetic biology have paved the way for the development of high-yielding cell factories through metabolic engineering, leading to significant progress. For example, engineered *Escherichia coli* achieved a maximum ectoine titer of 131.8 g/L, with a productivity of 1.37 g/(L·h). This review aims to explore the biosynthetic pathway, biochemical characteristics of key enzymes, and the biosynthesis of ectoine, shedding light on current research status and offering insights for industrial-scale ectoine production.

Keywords: ectoine; compatible solute; biosynthesis; metabolic engineering

四氢嘧啶 (1,4,5,6-tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid, or ectoine)是一种亲水性环状氨基酸衍生物,具有氨基和羧基基团,分子式为 C₆H₁₀N₂O₂, 分子量为 142.16 (图 1)。Galinski 等^[1]于 1985 年在极端嗜盐的盐绿外硫红螺菌(*Ectothiorhodospira halochloris*)中首次发现四氢嘧啶,随后通过核磁共振波谱法(nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR)发现四氢嘧啶广泛存在于适应高盐度环境的细菌中^[2]。进一步研究表明,细菌域和部分古细菌域的微生物都合成四氢嘧啶作为细胞保护剂来应对高渗、高

盐 and 高温等极端环境的胁迫^[3]。最近,有文献报道在一些单细胞真核生物中,也检测到了四氢嘧啶的存在^[4]。

四氢嘧啶属于高度水溶性的有机化合物,可以在不影响细胞代谢的情况下积累到非常高的浓度^[5],抵消高渗透压环境下引起的细胞内水分

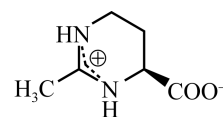


图 1 四氢嘧啶结构图

Figure 1 The structure of ectoine.

外流、膨胀性下降以及过度增加造成的分子拥挤^[6-7]。四氢嘧啶的积累为细胞提供了一种灵活的方式,使其能够适应各种环境盐度和摩尔渗透压浓度。然而四氢嘧啶的合成非常耗能,比如当细胞以葡萄糖为碳源进行异养生长时,合成一分子四氢嘧啶需要消耗约 40 个高能键;而以二氧化碳为碳源进行自养生长时则需要 50 个左右的高能键^[8]。高盐条件下形成的相容性溶质已被工业界视为“未开发的金矿”^[9]。四氢嘧啶作为相容性溶质不仅能够保护细菌在高渗透环境中生长,还可以作为共溶剂提高水-水相互作用结构的稳定性,缓解高渗、高温、冻融、干燥和辐射等极端条件以及化学试剂对蛋白、核酸、生物膜及整个细胞的毒害作用^[10-12]。

四氢嘧啶具有优良的渗透压保护和生物稳定作用两大优点,广泛应用于化妆品、生物制剂、酶工业和医疗等领域(图 2)。例如,四氢嘧啶能够增加皮肤表面的水合作用并稳定脂质层,保护人体皮肤免受过敏原、紫外线、热和干燥的伤害^[13-17];高温条件下维持核酸双螺旋结构稳定的特性,使其能作为热保护剂在 PCR 过程中稳定

聚合酶活性,提高核酸的扩增量^[18]。同时,四氢嘧啶具有很强的抗炎特性,是预防和治疗与蛋白质或核酸构象病变相关疾病的潜在药物^[19]。例如,四氢嘧啶能够加快中性粒细胞的凋亡,有效预防中性粒细胞性肺部炎症^[20];体外实验中,四氢嘧啶阻止了淀粉样蛋白的形成,可缓解因大脑中淀粉样蛋白斑块和缠结造成的阿尔兹海默病^[21]。四氢嘧啶作为一种具有良好耐受性和安全性的天然物质,在眼表炎症^[22]、鼻窦炎^[23]、口腔黏膜炎^[24]和皮肤炎^[25]等炎症治疗中也具有良好的疗效。值得一提的是,李越等^[26]提出四氢嘧啶可作为一种新型抗冻剂用于冷冻面团的生产,为其在食品领域的应用提供了理论基础。

四氢嘧啶作为一种多功能物质引起了科研人员的兴趣,越来越受到各界人员的关注,市场规模潜力巨大^[27]。1993 年,德国生物技术公司 Bitop 便开展了四氢嘧啶生产技术研究,随后与德国默克医药公司合作,利用嗜盐菌发酵生产四氢嘧啶,开启了四氢嘧啶的商业化进程。1999 年,默克掌握了四氢嘧啶的生产和应用专有技术,申请了“化妆品配方中使用四氢嘧啶或者四氢嘧啶

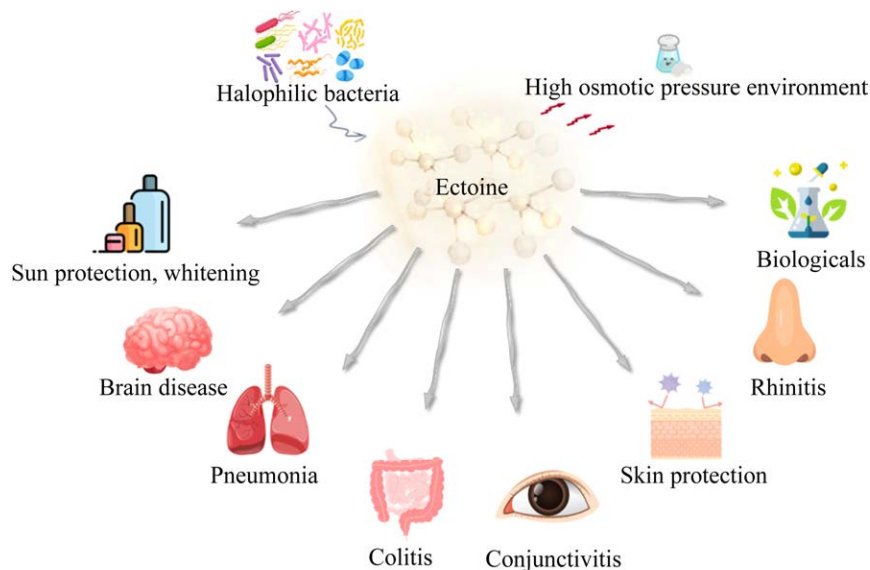


图 2 四氢嘧啶功能的多样性

Figure 2 The diverse functions of ectoine.

衍生物”的国际专利(WO 00/07560A)^[28], 占领了全球 90%以上的市场。2019 年上述专利到期后, 四氢嘧啶的价格逐渐走低, 应用研究逐步增多, 其在化妆品、生物医药、生物制造和精细化工等领域的应用潜力迅速引起关注。四氢嘧啶逐步成为上述领域产品成分的“新晋网红”, 尤其在化妆品与医疗领域。例如国内合成生物学企业——华熙生物开发了嗜盐菌发酵生产四氢嘧啶的工艺, 申请了 30 余项国家发明专利, 推出了系列相关产品, 销售收入翻倍增长。中科欣扬、福瑞达、普利制药等公司抓紧时机, 共同加入这个新赛道。中科欣扬实现四氢嘧啶在谷氨酸棒杆菌中异源合成产业化(66.3 g/L)^[29], 打破了以嗜盐菌为主的国外技术垄断; 福瑞达同样选择利用谷氨酸棒杆菌自主研发四氢嘧啶的生产技术(70 g/L)^[30], 并且成功通过美国食品和药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)的原料药备案; 普利制药则选择通过大肠杆菌发酵生产四氢嘧啶(78 g/L)^[31], 实现四氢嘧啶产业化开发。本文旨在综述近年来国内外四氢嘧啶的相关研究, 包括四氢嘧啶的生物合成途径、关键酶的生化特性、生物合成策略等多方面的研究进展, 希望为四氢嘧啶领域的深入研究与工业化生产提供思路 and 方向。

1 四氢嘧啶的生物合成途径

四氢嘧啶含有一个手性碳原子, 难以采用化学合成法获得单一构象的高纯度四氢嘧啶^[32], 同时, 化学合成法还存在高能耗和环境污染等问题^[33], 因而生物法合成四氢嘧啶成为主流。四氢嘧啶生物合成途径最初是在 1990 年由 Peters 等^[34]在 *E. halochloris* 和延长盐单胞菌(*Halomonas elongata*)中通过同位素标记以及 NMR 等方法解析。四氢嘧啶的合成始于 L-天冬氨酸- β -半醛(L-aspartate- β -semialdehyde, L-ASA),

L-ASA 是微生物的中心代谢枢纽, 参与许多生物合成途径, 作为氨基酸(赖氨酸、苏氨酸、甲硫氨酸)、细胞壁和抗生素合成的前体^[35]。L-ASA 可以由天冬氨酸(L-Asp)通过天冬氨酸激酶(Ask; EC 2.7.2.4)和天冬氨酸半醛脱氢酶(Asd; EC 1.2.1.11)的顺序酶促反应合成^[34,36-38]。四氢嘧啶合成途径由 3 种酶介导, 分别是 L-2,4-二氨基丁酸转氨酶(EctB; EC 2.6.1.76)、L-2,4-二氨基丁酸乙酰转移酶(EctA; EC 2.3.1.178)和四氢嘧啶合成酶(EctC; EC 4.2.1.108)^[39-41]。首先, EctB 通过转氨作用将 L-ASA 转化为 L-2,4-二氨基丁酸(L-2,4-diaminobutyric acid, L-DABA), 再经 EctA 的乙酰化将 DABA 催化形成 N- γ -乙酰-L-2,4-二氨基丁酸(N- γ -acetyl-L-2,4-diaminobutyric acid, N- γ -ADABA), 最后 EctC 催化 N- γ -ADABA 进行分子内脱水缩合生成四氢嘧啶^[34,40-45]。此外, 有部分嗜盐菌在一定的应激条件下通过四氢嘧啶羟基化酶(EctD; EC 1.14.11.55)将四氢嘧啶进行位置立体特异性羟基化转化为 5-羟基四氢嘧啶(5-hydroxyectoine)^[3]。5-羟基四氢嘧啶具有更高的玻璃化转变温度, 即更优良的大分子结构保护能力, 是一种比四氢嘧啶更优越的干燥保护剂^[46-49]。当高盐应激解除后, 部分微生物又会通过四氢嘧啶水解酶(DoeA; EC 3.5.4.44)将四氢嘧啶水解为 N- γ -ADABA 与其异构体 N- α -乙酰-L-2,4-二氨基丁酸(N- α -acetyl-L-2,4-diaminobutyric acid, N- α -ADABA); N- γ -ADABA 重新进入四氢嘧啶合成途径, 而 N- α -ADABA 在二氨基丁酸去乙酰化酶(DoeB; EC 3.5.1.125)的作用下脱去乙酰基形成 L-DABA; 接着二氨基丁酸转氨酶(DoeD; EC 2.6.1.76)进一步催化 L-DABA 生成 L-ASA, 最终经天冬氨酸半醛脱氢酶(DoeC; EC 1.2.1.-)降为 L-Asp 供细胞生长使用(图 3)^[50]。

四氢嘧啶的合成基因 *ectB*、*ectA* 和 *ectC* 一般以基因簇的形式存在于基因组中, 迄今为止尚

未在其他生化途径中发现 EctC 的同工酶, 因而 EctC 被认为是四氢嘧啶生产菌的决定性酶^[3]。*ectABC* 基因簇在基因组上的排列方式并不唯一(图 4), 且部分微生物除了在基因组上形成 *ectABC* 基因簇外, 还存在独立的 *ectA*、*ectB*、*ectC* 基因多拷贝^[3,36,38,42,50-51]。Czech 等^[42]对全基因组测序的 510 株四氢嘧啶产生菌(499 株细菌和 11 株古细菌)分析发现, 582 个潜在的 EctC 蛋白编码基因中只有 437 个 *ectC* 基因存在于 *ectABC* 基因簇中, 另外 145 个 *ectC* 基因则单独存在; 其中 133 个基因簇含有 *ask_ect* 基因, *ectABC* 基因簇中的 *ask_ect* 与 *ectABC* 基因的共表达确保了渗透胁迫条件下四氢嘧啶前体 L-ASA 的供应^[36,38]。510 株四氢嘧啶

产生菌中仅有 97 株含有转录调控因子 EctR 的编码基因^[36,38,40,42,52-54]。据文献报道, 微生物中含有多种不同类型的天冬氨酸激酶基因, 比如 *lysC*、*metL* 和 *ask_ect*, 分别作用于赖氨酸、高丝氨酸和四氢嘧啶途径中 L-4-天冬氨酸磷酸(L-4-aspartyl-phosphate, L-ASP-P)的合成, 其酶活性通常受到特定产物的反馈抑制^[42]。天冬氨酸半醛脱氢酶作为天冬氨酸衍生物代谢途径的关键酶, 其编码基因 *asd* 通常单独存在于基因组的其他位点, 不与 *ectABC* 基因簇相邻。生物信息学分析发现, 仅坐皮肤球菌(*Kytococcus sedentarius*)的 *ask_ect* 和 *asd* 在基因组上相连并位于 *ectABC* 基因的上游^[42](图 4)。

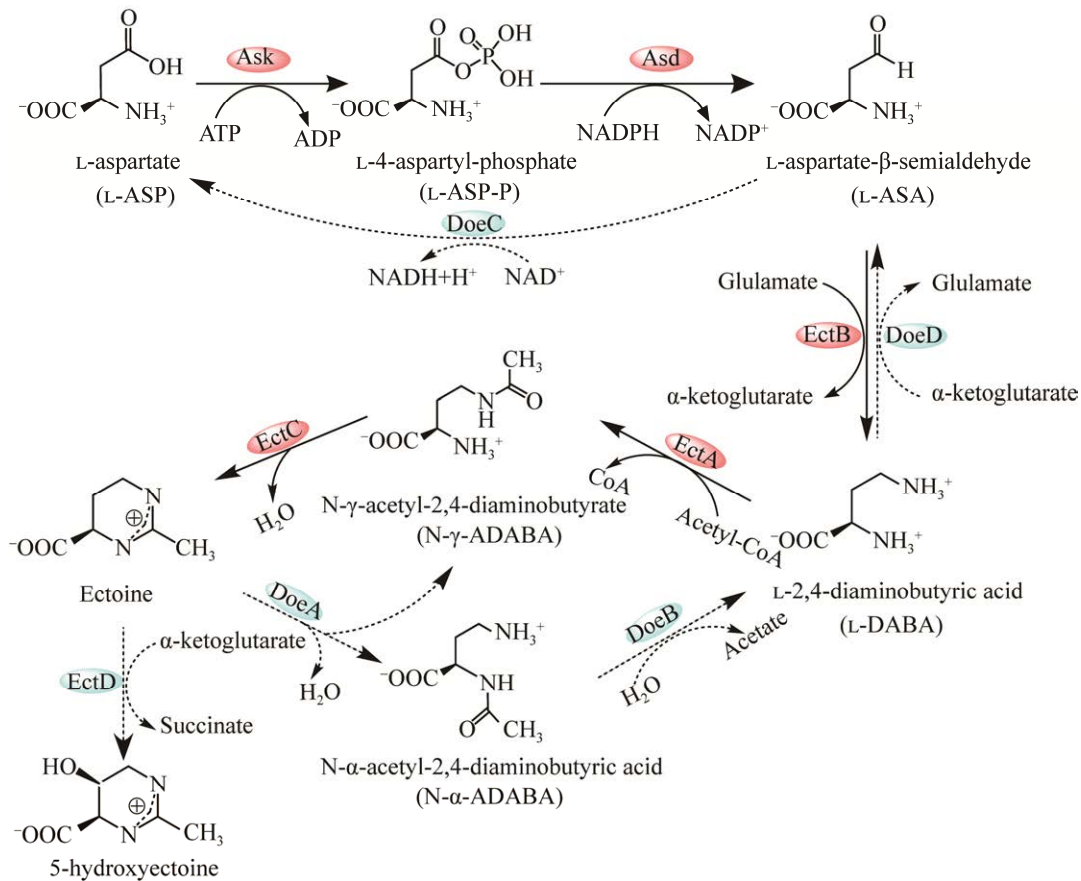


图 3 四氢嘧啶合成及降解途径

Figure 3 The biosynthetic and degradation pathway of ectoine.

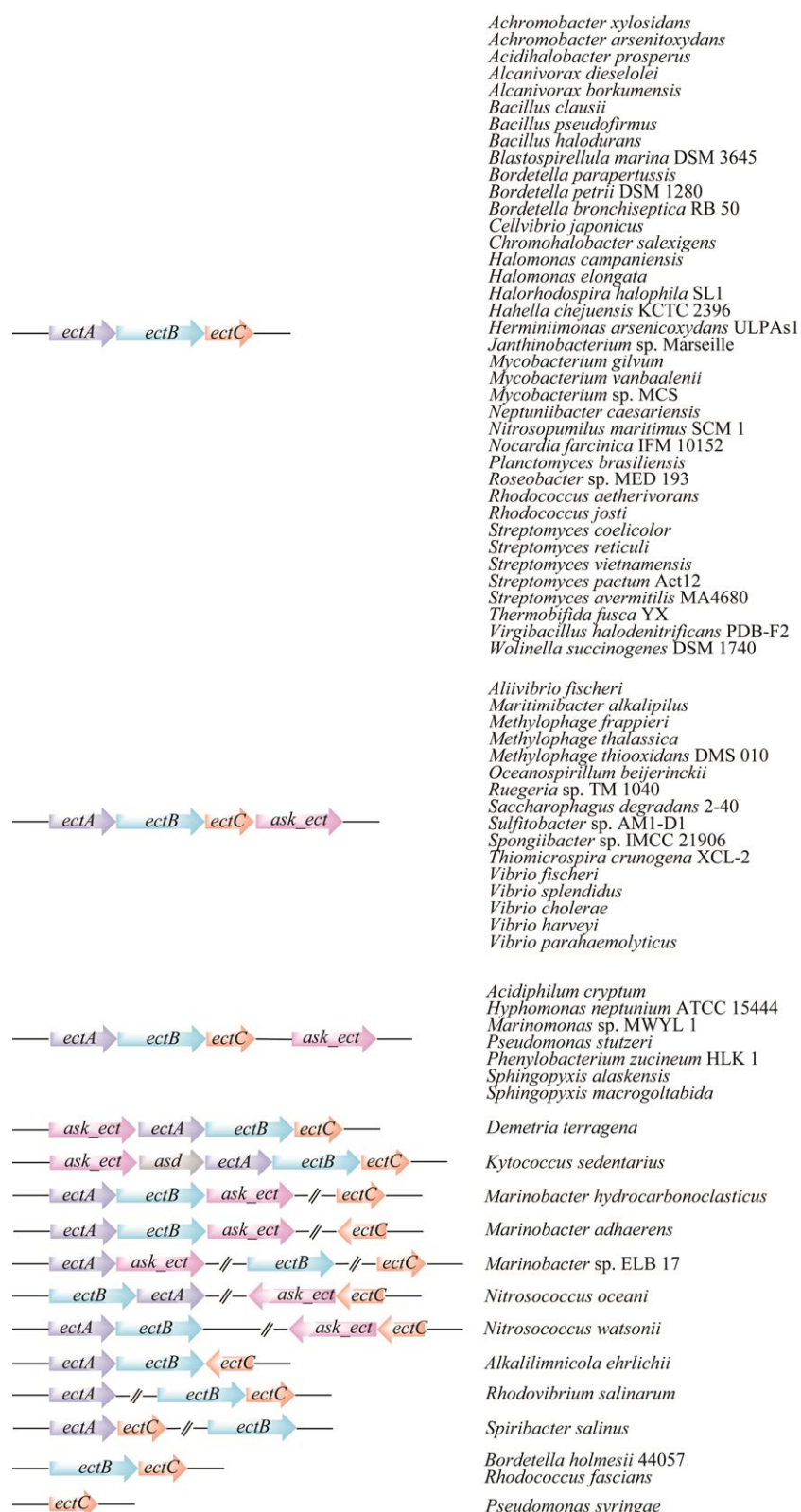


图 4 微生物基因组中四氢嘧啶生物合成基因簇基因结构的多样性

Figure 4 Variation in the genetic organization of ectoine biosynthetic gene clusters in microbial genomes.

2 四氢嘧啶关键酶的生化特性

EctB 是催化 L-ASA 合成四氢嘧啶的第一步酶,也是四氢嘧啶合成途径的限速酶^[43,55-56]。EctB 属于吡哆醛-5'-磷酸(pyridoxal-5'-phosphate, PLP)依赖型末端氨基转移酶,能以谷氨酸提供的氨基为供体催化受体分子 ASA 加氨形成 DABA^[43,57-58]。EctB 属于 PLP-折叠I型的III类氨基转移酶,具有双重底物识别的催化特性,即能在同一个活性位点识别和结合大小、形状或性质

不同的底物^[59-61]。EctB 催化的转氨反应是可逆的,也能以 α -酮戊二酸(α -ketoglutarate, KG)作为氨基供体逆向催化 DABA 形成 ASA。Hillier 等^[43]对来源于需盐色盐杆菌(*Chromohalobacter salexigens* DSM 3043)的 EctB 进行晶体结构解析时发现,该酶活性位点存在 O-口袋(O-pocket)和 P-口袋(P-pocket)这 2 个底物结合区域,从结构上证明了 EctB 具有双底物识别特性的分子基础。EctB 以 PLP 为辅酶催化底物远端 ω -位胺的形成过程可分为两个半反应(图 5): EctB 在静

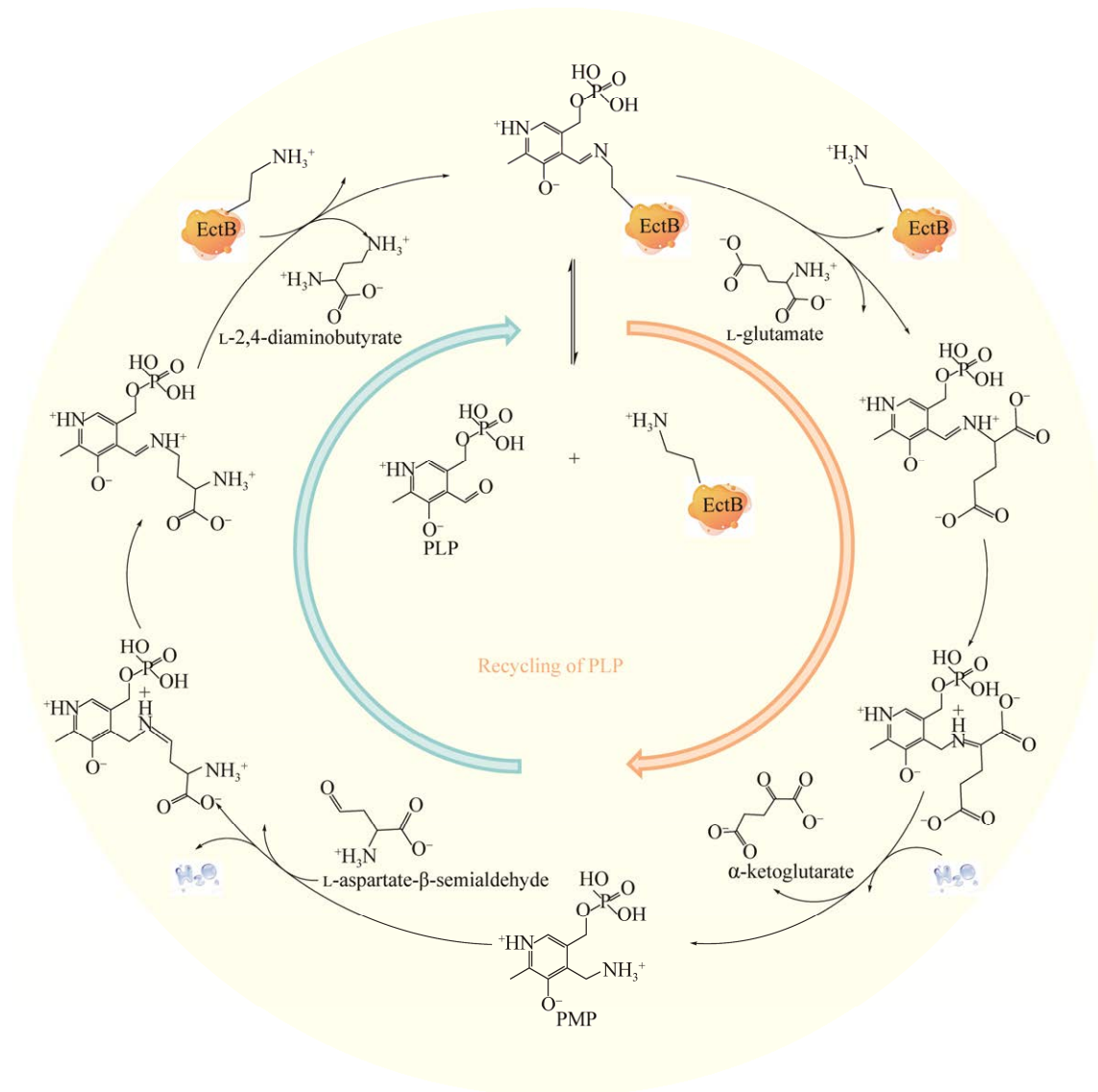


图 5 EctB 酶的催化机制

Figure 5 Catalytic mechanism of EctB enzyme.

息状态下与 PLP 通过特定赖氨酸残基相连形成席夫碱“内醛亚胺”;第 1 个半反应中,底物谷氨酸提供氨基给 PLP-EctB 形成“外醛亚胺”,进一步转化为酮亚胺,随后水解形成修饰的吡哆胺-5'-磷酸(pyridoxamine-5'-phosphate, PMP),并释放 1 分子的 KG;第 2 个半反应中, PMP-EctB 以底物 ASA 为氨基受体,经过酮亚胺、“外醛亚胺”逆向反应形成 DABA 并重新释放 PLP,在此反应过程中 PLP 可以循环利用^[62-63]。不同来源的 EctB 生化特性研究发现, *H. elongata* 的 EctB 是同源六聚体蛋白^[39],而 *C. salexigens*、灿烂类芽胞杆菌(*Paenibacillus lautus*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)和鲍氏不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)等的 EctB 为同源四聚体蛋白^[43,62,64-65]。Ono 等^[39]在纯化 *H. elongata* 的 EctB 时发现,缺乏 KCl 时酶活性大大降低,重新添加 KCl 后,能够恢复部分酶活力,推测其可能类似于其他 PLP 依赖型氨基转移酶,稳定性和转氨活性需要 K⁺参与。不同来源的 EctB 酶学性质差异显著,如 Hillier 等^[43]与 Richter 等^[62]发现 *P. lautus* 和 *C. salexigens* 的 EctB 比 *H. elongata* 的 EctB 具有更高的盐浓度、pH 和温度耐受性(表 1)。

EctA 属于一般控制非压抑蛋白 5 (general

control non-depressible protein 5, GCN5)相关的 N-乙酰转移酶(GCN5-related N-acetyltransferases, GNAT)超家族,催化乙酰基从供体乙酰辅酶 A (acetyl coenzyme A, acetyl-CoA)中转移至受体分子 DABA 的氨基中形成 N-γ-ADABA^[66-67]。Ono 等^[37,39,44]探究了来源于 *H. elongata* 的 EctA 酶学性质,发现 EctA 是一种稳定的二聚体结构蛋白,在偏碱性时活性更高(表 2)。目前,相较于 EctB 和 EctC, EctA 的结构和功能研究较少。Richter 等^[44]分析了来源于 *P. lautus* Y4.12MC10 的 EctA 晶体结构,进一步证实 EctA 属于同源二聚体蛋白;与其他 GNAT 超家族蛋白类似,CoA 的结合位点在进化上高度保守;EctA 中 2 个氨基酸残基单体形成结合袋供底物 DABA 结合;EctA 与辅因子 CoA、底物 DABA 共结合,形成一种三元复合物过渡态;产物 N-γ-ADABA 与底物 DABA 在 EctA 中的空间占位及取向基本一致。此外,与 EctB 和 EctC 具有嗜盐性不同, EctA 耐盐能力与其宿主的生理特征息息相关。例如,来源于甲基厌氧菌(*Methylophaga thalassica*、*Methylophaga alcalica*)和 *P. lautus* 的 EctA 乙酰基转移活性会被 NaCl 或 KCl 抑制^[68],而来源于嗜甲烷菌(*Methylophilum alcaliphilum*)的 EctA

表 1 不同菌株中 EctB 酶性质

Table 1 The properties of some EctBs from various bacteria

Organism	pH _{opt}	T _{opt} (°C)	K _m (mmol/L)	Molecular mass (SDS-PAGE) (kDa)	Optimum salt (mol/L)	References
<i>H. elongata</i> OUT30018	8.60	25.00	9.10 (Glu) 4.50 (ASA)	44.00	0.50 (NaCl)	[39]
<i>C. salexigens</i> DSM 3043	8.00	60.00	NA	47.00	0.30 (NaCl)	[43]
<i>P. lautus</i> Y4.12MC10	6.50	45.00	9.00 (KG) 0.40 (DABA)	49.10	0.20 (NaCl) 0.35 (KCl)	[62]
<i>A. baumannii</i>	8.25-8.75	NA	1.46 (KG) 4.30 (DABA)	45.00	NA	[64]
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	NA	NA	0.18±0.01 (KG) 0.26±0.01 (DABA)	50.00	NA	[65]

NA: Not available; pH_{opt}: Optimum pH; T_{opt}: Optimum temperature.

表 2 不同菌株中 EctA 酶性质

Table 2 The properties of some EctAs from various bacteria

Organism	pH _{opt}	T _{opt} (°C)	K _m (mmol/L)	Molecular mass (SDS-PAGE) (kDa)	Optimum salt (mol/L)	References
<i>H. elongata</i> OUT30018	8.20	20.00	NA	NA	0.40 (NaCl)	[39]
<i>M. alcalica</i>	9.50	30.00	0.38 (DABA) 0.03 (acetyl-CoA)	20.00	0.00 (KCl) 0.00 (NaCl)	[68]
<i>M. thalassica</i>	9.00	30.00	0.37 (DABA) 0.08 (acetyl-CoA)	20.00	0.00 (KCl) 0.00 (NaCl)	[68]
<i>M. alcaliphilum</i> 20Z	9.50	20.00	0.47 (DABA) 0.04 (acetyl-CoA)	20.00	0.25 (KCl) 0.10–0.20 (NaCl)	[69]
<i>P. lautus</i> Y4.12MC10	8.50–9.50	NA	0.13±0.03 (DABA) 2.79±0.73 (acetyl-CoA)	20.68	NA	[44]

NA: Not available; pH_{opt}: Optimum pH; T_{opt}: Optimum temperature.

则需要 0.2 mol/L NaCl 或 0.25 mol/L KCl 才能激活其乙酰基转移活性^[69]。

EctC 催化四氢嘧啶合成的最后一步, 通过消除底物 N-γ-ADABA 中羰基键水分子并催化分子内亚氨基键的闭环形成四氢嘧啶。EctC 蛋白属于金属依赖性的 Cupin 蛋白超家族^[42,45,70], 催化过程需要铁、铜、锌、锰、钴或镍等金属离子参与形成具有催化作用的金属过渡态。该家族蛋白包含两个金属结合基序: G(X)₅HXHX(X)_{3,4}E(X)₆G 和 G(X)₅PXG(X)₂H(X)₃N, 共同参与金属离子的结合^[71-74]。研究表明, 参与 EctC 催化活性的金属离子很可能是 Fe²⁺^[42,45,71,75-76]。Widderich 等^[71]对来自 16 个细菌门和 3 个古菌门的 440 个 EctC 蛋白序列进行比对发现, 其包含的 Cupin 蛋白超家族金属结合基序虽然存在一定的差异, 但是与金属结合的 3 个残基(谷氨酸 Glu、酪氨酸 Tyr 和组氨酸 His)是高度保守的。Czech 等在 *P. lautus* Y412MC10 中也发现 EctC 金属结合区的 3 个氨基酸残基高度保守^[45]。EctC 是一种二聚体蛋白^[39,45,77], 其酶活性在偏碱性时更高, 对盐浓度有不同的耐受能力, 比如来源于 *H. elongata*^[39] 和氨氧化奇古菌(*Nitrosopumilus maritimus* SCM1)^[77] 的 EctC 对盐耐受度较高, 而来源于 *P. lautus* Y412MC10^[45] 和隐窝嗜酸菌(*Acidiphilium cryptum*

DSM 2389T)^[78] 的 EctC 在 0.2 mol/L NaCl 低盐浓度时活性最高(表 3)。EctC 蛋白的晶体结构解析^[45,71]表明, 其催化核心位于桶状结构底部, 保守的羧基末端片段在入口处形成一个盖子, 盖子为底物 N-γ-ADABA 和产物四氢嘧啶进出的载体; 而盖子区域的打开和关闭可能与具有重要催化作用的金属离子有关。Andrys-Olek 等^[76]对各种可能被底物占据的二聚体以及催化铁离子周围的两种可能的配位几何形状(四面体和八面体)进行了分子动力学模拟, 提出了有关 EctC 与 N-γ-ADABA 相互作用的信息, 为 EctC 催化机制的进一步解析提供支持。关于 EctC 的底物谱研究, Witt 等^[70]发现 L-谷氨酰胺可以被 *H. elongata* 的 EctC 缓慢可逆地转化为 5-氨基-3,4-二氢-2H-吡咯-2-羧酸酯(5-amino-3,4-dihydro-2H-pyrrole-2-carboxylate, ADPC), 也能够水解四氢嘧啶衍生物 homoeoctoine 和 4,5-二氢-2-甲基咪唑-4-羧酸酯(4,5-dihydro-2-methylimidazole-4-carboxylate, DHMICA), Moritz 等研究的来源于 *A. cryptum* 的 EctC 证实了上述论点^[78]。此外, Widderich 等^[71]发现来源于阿拉斯加鞘氨醇盒菌(*Sphingopyxis alaskensis*)的 EctC 能够以天然底物 N-γ-ADABA 的异构体 N-α-ADABA 为底物进行缩合反应。上述结果表明, EctC 的活性结构域具有一定的可塑性。

表 3 不同菌株中 EctC 酶性质

Table 3 The properties of some EctCs from various bacteria

Organism	pH _{opt}	T _{opt} (°C)	K _m (mmol/L) (N-γ-ADABA)	Molecular mass (SDS-PAGE) (kDa)	Optimum salt (NaCl) (mol/L)	References
<i>H. elongata</i> OUT30018	8.50–9.00	0.00–10.00 (NaCl 0.05 mol/L) 15.00 (NaCl 0.77 mol/L) 30.00 (NaCl 3.00 mol/L)	11.00 (NaCl 0.05 mol/L) 8.40 (NaCl 0.77 mol/L)	19.00	0.50 (15.00 °C)	[39]
<i>H. elongata</i> DSM 2581T	8.00–9.00	NA	NA	15.50	0.50–1.00	[78]
<i>H. elongata</i> KB1	8.50	21.00	0.03 (homoectoine)	16.52	NA	[70]
<i>A. cryptum</i> DSM 2389T	9.00	NA	NA	14.70	0.00	[78]
<i>P. lautus</i> Y4.12MC10	8.50	30.00	7.80±1.00	15.87	0.05	[45]
<i>S. alaskensis</i>	8.50	15.00	4.90±0.50 (N-α-ADABA) 25.40±2.90	16.30	0.25	[71]
<i>N. maritimus</i>	7.00	30.00	6.40±0.60	15.90	0.63	[77]

NA: Not available; pH_{opt}: Optimum pH; T_{opt}: Optimum temperature.

3 四氢嘧啶生物合成研究现状

3.1 嗜盐菌中四氢嘧啶的生物合成

Halomonas 属中的许多菌株是研究者们首先考虑的生产菌^[42], 其中, *H. elongata* 作为优良的生产菌开启了四氢嘧啶生物法合成的进程。Wohlfarth 等在含有 20% (质量体积分数) NaCl 的葡萄糖/矿物质培养基中培养 *H. elongata*, 发现其四氢嘧啶的含量远高于其他嗜盐菌, 可以达到 1.83 μmol/(mg dry wt)^[1,79]。Sauer 等^[80]首次采用“细菌挤奶”(hypo-osmotic shock)工艺用于嗜盐菌生产四氢嘧啶, “细菌挤奶”即先用高盐培养基刺激细菌合成四氢嘧啶, 再用低盐刺激细菌将四氢嘧啶迅速释放到培养基中。该方法使 *H. elongata* 的四氢嘧啶产量显著提高, 经过 9 轮“细菌挤奶”过程最终产出 7.4 g/L 的四氢嘧啶。四氢嘧啶通过特定的转运蛋白运输到外周质^[81], 然后通过编码 *TeaABC* 操纵子中的 TRAP 外质特异性转运蛋白吸收。Kunte 等^[82]通过敲除转运蛋白编码基因 *TeaABC* 避免四氢嘧啶被细胞吸收, 破坏四氢嘧啶水解酶基因 *doeA* 减少四氢嘧啶的降

解, 构建了一株“泄漏突变”的 *H. elongata* 菌株, 该突变株能够将合成的四氢嘧啶大量转运至培养基中。Hobmeier 等^[83]在此基础上通过增强前体草酰乙酸(oxaloacetic acid, OAA)的供应, 过表达 *TeaBC* 转运蛋白编码基因等精细的细胞代谢调控增加四氢嘧啶产量, 并发现在没有 *TeaA* 的情况下, *TeaBC* 两种跨膜蛋白都可以潜在地促进四氢嘧啶的双向转运。随着研究的进一步深入, 嗜盐浓度更低[2.9% (质量体积分数) NaCl]且四氢嘧啶分泌能力更强的盐单胞菌(*Halomonas salina*)逐渐替代高嗜盐菌 *H. elongata*, 缓解了“细菌挤奶”生产工艺导致的高盐发酵弊端。徐蕊等^[84]发现, *H. salina* DSM 5928 在 0.5 mol/L NaCl 的盐浓度下能够产生 6.9 g/L 的四氢嘧啶, 进一步敲除 *TeaABC* 基因产量提高至 9.1 g/L。Lang 等^[85]以 *H. salina* DSM 5928^T 作为生产菌株, 开发了一种以谷氨酸钠为底物, 结合生长细胞分批发酵和静态细胞批量转化的新工艺, 使四氢嘧啶产量达到了 14.86 g/L。该生产工艺中, 谷氨酸钠作为四氢嘧啶合成途径中 ASA 转为 DABA 的

氨基供体。除此之外,热液口盐单胞菌(*Halomonas hydrothermalis*)也是研究者们运用较多的生产菌之一。Zhao等^[86]通过敲除嗜盐菌*H. hydrothermalis* Y2的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因 mrp ,使突变株对盐环境更敏感,能够在较低盐浓度下产生四氢嘧啶,并敲除 $ectD$ 和 $doeA$ 基因阻断四氢嘧啶降解,最终突变株的四氢嘧啶产量达到10.5 g/L。Li等^[87]在此基础上将*H. hydrothermalis* Y2的 $ectA$ 基因启动子替换为外膜孔蛋白E中的启动子P265,显著降低了突变株的盐依赖性,且四氢嘧啶产量提高至11.5 g/L。蓝嗜盐单胞菌(*Halomonas bluephagenesis*)则是一种联合生产各种化学品的出色底盘,其中四氢嘧啶和聚羟基丁酸酯(polyhydroxybutyrate, PHB)与聚羟基烷酸酯(polyhydroxyalkanoates, PHA)的联合生产策略取得了重要成果。Ma等^[88]在敲除*H. bluephagenesis*的 $ectD$ 和 $doeA$ 基因基础上,使用T7强启动子提高 $ectABC$ 基因表达量,并引入谷氨酸棒杆菌的天冬氨酸激酶基因 $lysC$ 和天冬氨酸半醛脱氢酶基因 asd ,最终工程菌株以

尿素为氮源发酵28 h可合成28 g/L的四氢嘧啶,目前该产量是迄今为止在嗜盐菌中最高报道。Zhang等^[89]利用常压和室温等离子体技术以及经过基因改造的PHA菌株(包括合成操纵子在染色体上的整合和相关基因的缺失)构建了一株更具工业化生产潜力的升级底盘*H. bluephagenesis* TDH4A1B5P,四氢嘧啶的分泌率提高了50%。最近,也有研究者探究了坎帕尼亚盐单胞菌(*Halomonas campaniensis*)四氢嘧啶的合成。比如,Wang等^[90]通过连续多轮紫外线诱变大幅提高了*H. campaniensis*的四氢嘧啶产量。Shu等^[91]为了增加重要前体ASA的量,敲除*H. campaniensis* XH26中编码高丝氨酸脱氢酶的基因 hom ,使产量提高了52%。当然,除了以上提到的*Halomonas*属生产菌,还有研究者选择了其他属的菌株如*C. salexigens*、表皮短杆菌(*Brevibacterium epidermis*)等进行研究(表4)。

近年来利用生活、农业、工业废弃物作为低成本的培养基生产四氢嘧啶,成为了与环境治理相结合的新策略。Omara等^[98]利用农业废弃物水

表4 嗜盐菌中四氢嘧啶的产量

Table 4 The production of ectoine in halophilic bacteria

Organism	NaCl concentration (mol/L)	Titer (g/L)	Productivity (g/(L·h))	References
<i>H. bluephagenesis</i> TD-ADEL-58 (PHB co-production)	1.03	28.00	1.00	[88]
<i>H. salina</i> DSM 5928T	0.50	14.86	0.32	[85]
<i>H. venusta</i> DSM 4743	1.50	14.70	0.09	[92]
<i>H. salina</i> BCRC17875	2.00	13.96	0.29	[93]
<i>H. hydrothermalis</i> Y2 (p/ $\Delta ectD/\Delta doeA$)	1.03	11.50	0.32	[87]
<i>H. hydrothermalis</i> Y2 ($\Delta ectD/\Delta doeA$)	1.03	10.50	0.22	[86]
<i>H. salina</i> DSM 5928T ($\Delta teaABC$)	1.03	9.10	0.41	[84]
<i>C. salexigens</i> DSM 3043	1.85	8.20	NA	[94]
<i>B. epidermis</i> DSM 20659	1.00	8.00	0.08	[95]
<i>H. elongata</i> DSM 142T	2.57	7.40	0.22	[80]
<i>H. salina</i> DSM 5928	0.50	6.90	0.33	[96]
<i>Marinococcus</i> sp. MAR2	NA	5.60	0.16	[97]

NA: Not available; p: The promoter of $ectA$ is replaced; Δ : Deletion of the gene.

解玉米面筋粉生产四氢嘧啶。Chen 等^[99]以玉米浆和大豆水解液为原料合成四氢嘧啶。Cantera 等^[100-102]首次实现以 CO₂ 及甲烷等温室气体为底物合成四氢嘧啶。Cho 等^[103]与 Pham 等^[104]通过代谢工程改造嗜盐的甲烷营养菌,成功提高了甲烷转化为四氢嘧啶的产量。上述研究结果为温室气体排放过量导致全球变暖的问题提供了可行的解决思路。

目前,嗜盐菌生产四氢嘧啶的研究已经从生产工艺、培养条件优化到代谢工程改造层面,但低产量及其所需的高盐培养基对发酵罐和相关设备的高要求及腐蚀,以及废液处理的高昂成本,依旧是嗜盐菌生产四氢嘧啶最突出的问题。虽然代谢工程改造嗜盐菌缺失 Na⁺/H⁺逆向转运功能可以有效降低培养盐度,为嗜盐菌的低盐浓度生产四氢嘧啶提供了思路,但是想要彻底解决高盐培养所带来的问题还需要对嗜盐菌高盐诱导机制进行深入的探究。

3.2 异源生物合成四氢嘧啶

嗜盐菌的高盐诱导特性和成熟基因编辑手段技术的缺失成为其四氢嘧啶产量提高的瓶颈。大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌遗传操作体系成熟、易于培养,且最适生长盐浓度为 0.5% (质量体积分数) NaCl,比 *H. elongata* 所需的盐浓度低 30 倍左右,是低盐环境下生产四氢嘧啶的理想宿主。同时,异源宿主本身不具有四氢嘧啶的代谢途径,不存在羟基四氢嘧啶等副产物产生以及产物降解等问题,能够简化中下游的分离纯化及精制工序,有效提高产品得率。研究者们采用基因工程手段改造宿主菌,提高四氢嘧啶的异源表达产量,也有前人对此做出总结^[33,105-107]。本文围绕以下 3 个方面展开(图 6): (1) 平衡四氢嘧啶特有途径关键酶编码基因 *ectABC* 的转录水平,重点关注限速酶 EctB; (2) 通过敲除或过表达等基因工程手段调控前体物质[DABA、ASA、Asp、

OAA 以及磷酸烯醇式丙酮酸(phosphoenolpyruvate, PEP)等]的分支途径,平衡细胞生长和增加前体池; (3) 优化发酵法与全细胞催化法等生产方式,提高四氢嘧啶的产量和碳原子转化率。接下来将对所提策略进行具体介绍。

3.2.1 大肠杆菌

大肠杆菌(*Escherichia coli*)拥有清晰的遗传背景,操作简便、异源蛋白排斥性低,因此通常被作为微生物转化的细胞工厂^[106]。Louis 等^[108]首先利用 *E. coli* 表达了来源于中度嗜盐海洋细菌(*Marinococcus halophilus*)的 *ectABC* 基因簇,产生 1 mmol/(g dry wt)四氢嘧啶,拉开了 *E. coli* 异源生产四氢嘧啶的序幕。Schubert 等^[109]引入了来源 *C. salexigens* 的 *ectABC* 基因簇,利用诱导型启动子产生了 6 g/L 的四氢嘧啶,但产率仅为 0.04 g/(L·h)。随后,研究者们不再局限于将四氢嘧啶合成基因簇从嗜盐菌中引入 *E. coli*,也开始利用代谢工程的手段改造宿主代谢途径。Ning 等^[110]进行了两大层面的代谢改造:第一,增强 ASA 池,敲除双功能酶天冬氨酸激酶/高丝氨酸脱氢酶编码基因 *thrA*,引入抗反馈抑制的天冬氨酸激酶基因 *lysC_{cgI}^{G1A,C932T}*;第二,增强 OAA 池,利用 *trc* 启动子替换磷酸烯醇丙酮酸羧化酶 *ppc* 基因启动子,敲除乙醛酸循环抑制 *iclR* 基因。通过上述改造,最终合成 25.1 g/L 的四氢嘧啶,产率也得到了很大提升,达到了 0.84 g/(L·h)。因此,对 ASA 与 OAA 两个前体的代谢流调控具有重要的借鉴意义。Zhang 等^[111]同样选择 *thrA*、*lysC*、*ppc* 和 *iclR* 等基因加强 ASA 与 OAA 池,通过敲除磷酸转移酶系统(phosphotransferase system, PTS)葡萄糖特异性酶 II 结构域 A 的基因 *crr* 进一步加强 PEP 池,同时引入来源于 *P. aeruginosa* PAO1 的天冬氨酸脱氢酶基因 *aspDH* 以强化 OAA 向 Asp 的转化,分批补料发酵后得到 30.37 g/L 的四氢嘧啶,产率为 0.84 g/(L·h)。

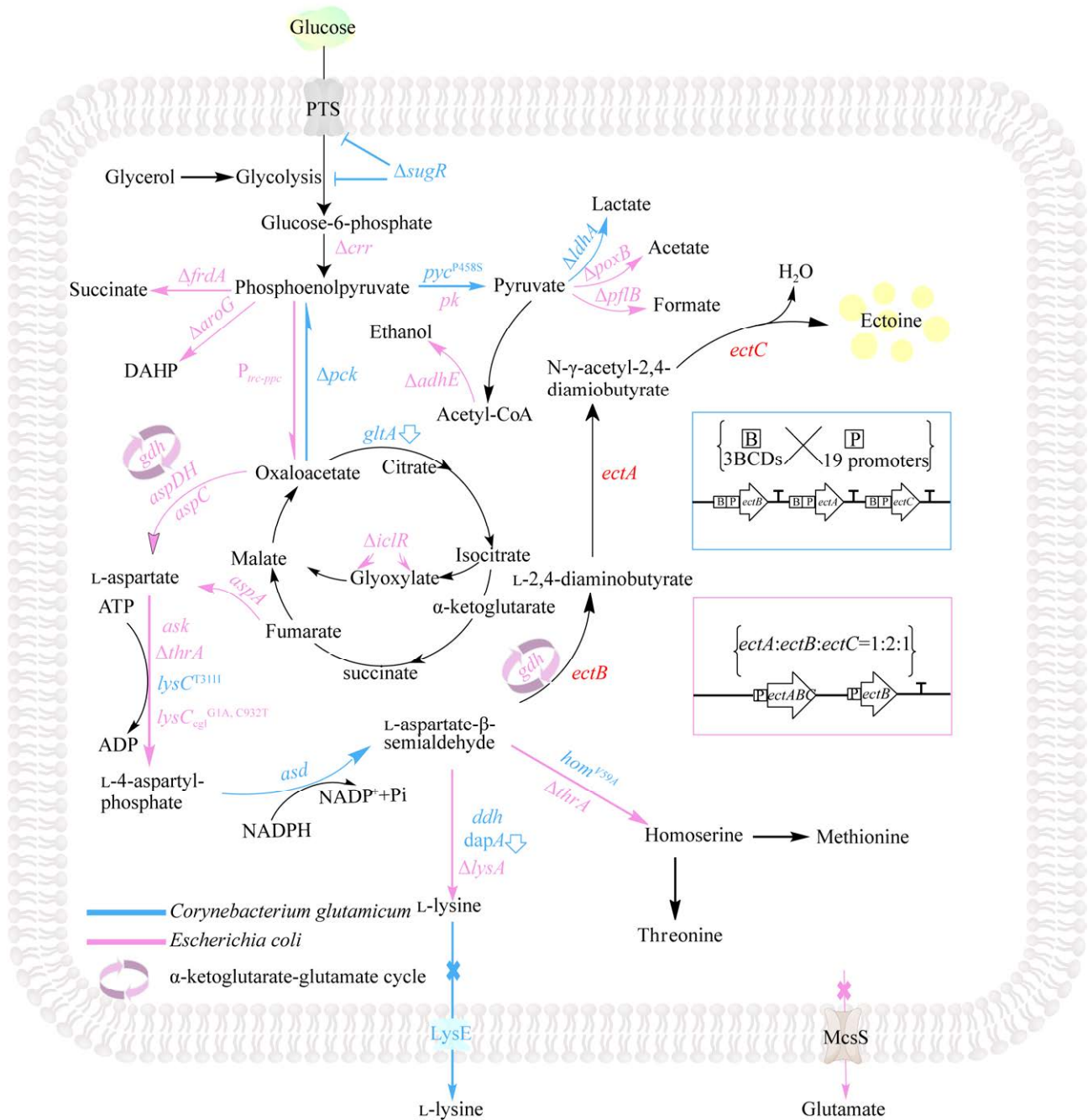


图6 异源生物合成四氢嘧啶的细胞工厂 蓝色线路表示文章所提到的谷氨酸棒杆菌的代谢调控, 粉色则代表大肠杆菌的代谢调控. 蓝色方框内是谷氨酸棒杆菌内四氢嘧啶相关基因单顺反子文库, 该文库由3个双电子设计元件(dual electronic design elements, BCD)、19个启动子组成. 粉色方框是大肠杆菌内四氢嘧啶相关基因表达平衡策略($ectA:ectB:ectC=1:2:1$)

Figure 6 A cell factory for heterologous biosynthesis of ectoine. The blue lines represent the metabolic regulation of *C. glutamicum*, and the pink lines represent the metabolic regulation of *E. coli* mentioned in the article. The blue box contains the monocistronic library of individual ectoine genes in *C. glutamicum*, which consists of 3 BCDs and 19 promoters. The pink box contains the transcriptional balancing strategy of ectoine-related genes in *E. coli* ($ectA:ectB:ectC=1:2:1$).

随后, Li 等^[112]在此基础上, 敲除了富马酸还原酶基因 *frdA*、3-脱氧-7-磷酸庚酸(3-deoxy-D-arobino-heptulosonate-7-phosphate, DAHP)合成酶基因 *aroG*、丙酮酸合成酶基因 *pflB*、丙酮酸氧化酶基因 *poxB* 和乳酸脱氢酶基因 *ldhA* 以加强前体 PEP 向 OAA 的转化; 敲除乙醇脱氢酶基因 *adhE* 以增加 acetyl-CoA 存量, 为 EctA 酶提供底物; 他们还提出, *E. coli* 中谷氨酸的转运可能是由机械敏感通道蛋白 MscS 介导的, 因此敲除 *mscS* 基因能够为 EctB 酶提供氨基供体, 增加前体 DABA 的积累。最终, 经分批补料发酵, 四氢嘧啶产量和产率分别为 34.27 g/L 与 0.57 g/(L·h), 葡萄糖转化率达到 0.34 g/g。最近, Xu 等^[113]将 *H. hydrothermalis* 的 *ectABC* 基因簇引入 *E. coli*, 并利用 T7 启动子提高表达量。随后, 进行一系列能够加强前体池的代谢工程改造, 包括过表达 *ppc* 基因、丙酮酸羧化酶基因 *pyc*、丙酮酸激酶 *pk* 基因以增加 OAA 池; 过表达天冬氨酸转氨酶基因 *aspC*、天冬氨酸酶 *aspA* 基因以增加 Asp 池; 过表达谷氨酸脱氢酶 *gdh* 基因、*ask*、*asd* 基因以增加 DABA 池。最后, 在分批补料发酵过程中, 通过调节不同时间段葡萄糖的补料速率来优化细胞密度, 96 h 后产生 131.8 g/L 的四氢嘧啶, 产率达到 1.37 g/(L·h), 为目前 *E. coli* 生产四氢嘧啶产量的最高水平。

发酵过程的优化也为四氢嘧啶产量的提升提供了一定的空间。Dong 等^[114]将来源于美丽盐单胞菌(*Halomonas venusta* ZH)的 *ectABC* 基因簇引入 *E. coli*, 通过动力学分析建立了溶解氧控制策略, 并与分批补料式策略相结合, 形成一种有利于四氢嘧啶产生的联合发酵策略, 四氢嘧啶的产量和产率分别为 47.8 g/L 和 1 g/(L·h), 葡萄糖转化率为 0.3 g/g。Zhang 等^[115]利用以上的联合发酵策略, 以敲除副产物赖氨酸和丙酮酸代谢途

径, 优化关键基因 *ectA*、*ectB* 和 *ectC* 拷贝数 (*ectA:ectB:ectC*=1:2:1)的重组菌株为对象, 外加硫酸铵为氨基供体, 微调 *ectABC* 基因的转录水平使四氢嘧啶的产量和产率分别达到 53.2 g/L 和 1.11 g/(L·h), 葡萄糖转化率为 0.33 g/g。

近年来, 研究者们除了运用发酵法利用 *E. coli* 异源生产四氢嘧啶外, 还运用了另一种方法全细胞生物催化法(whole-cell biocatalysis)来进行生产。全细胞催化技术以天冬氨酸和甘油作为直接底物, 将途径优化后的微生物完整生物有机体作为反应催化剂, 产率相对较高, 并极大地减轻了下游纯化工作量, 得到了产业界的青睐。He 等^[116]首先利用诱导型启动子表达了 *H. elongata* 的 *ectABC* 基因, 以天冬氨酸为底物两步转化合成前体 ASA, 以甘油为乙酰基和能量供体, 使用全细胞催化法在发酵罐中合成 25.1 g/L 的四氢嘧啶, 产率为 1.04 g/(L·h), 且该菌体可重复使用 3 轮, 四氢嘧啶的批次总产量为 63.4 g/L。Chen 等^[117]敲除二氨基苯甲酸脱羧酶 *lysA* 基因以增加 ASA 前体积累, 利用全细胞催化法产生 12.7 g/L 的四氢嘧啶。Su 等^[118]首次选用来自海洋栖盐田菌(*Salinicola salaries*) 1A01339 的一种新型四氢嘧啶合成基因簇, 采用全细胞生物催化法得到 3.28 g/L 的四氢嘧啶, 最后利用分批补料发酵法使产量和产率达到 22.5 g/L 和 0.94 g/(L·h), 其优势在于重组菌株表现出较低的催化温度(25 °C)以及对底物天冬氨酸(300 mmol/L)的高耐受性。

3.2.2 谷氨酸棒杆菌

谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)是近 40 年来全球用于氨基酸发酵工业的主要生产菌, 用于生产赖氨酸、谷氨酸、苏氨酸等氨基酸。上述氨基酸都属于天冬氨酸家族, ASA 是它们共同的前体, 四氢嘧啶作为天冬氨酸衍生物, 因此研究者们认为谷氨酸棒杆菌很有可能成

为四氢嘧啶异源生产的优良底盘。Becker 等^[119]首先选择了一株含有 *lysC*^{T3111} 基因的赖氨酸高产菌 *C. glutamicum* LYS-1 作为生产四氢嘧啶的底盘,它能够解除反馈抑制,产生大量的前体 ASA,随后,将经过密码子优化的来源于 *P. stutzeri* A1501 的 *ectABCD* 基因簇在强启动子 *tuf* 控制下整合到编码二氨基酰脱氢酶基因 *ddh* 的位点,以减少赖氨酸的竞争碳通量;进一步敲除赖氨酸分泌转运体 *LysE* 的编码基因,增加 ASA 池,得到工程菌株的四氢嘧啶产量和产率分别为 4.5 g/L 和 0.28 g/(L·h)。Pérez-García 等^[120]选择另一株赖氨酸高产菌 *C. glutamicum* DM1729 作为底盘细胞,引入 *C. salexigens* DSM 3043T 的 *ectABC* 基因用于合成四氢嘧啶,该菌除了含有 *lysC*^{T3111},还超表达了两个关键基因的突变体(*pyc*^{P458S} 和高丝氨酸脱氢酶基因 *hom*^{V59A});其中, *pyc*^{P458S} 是为了在赖氨酸生物合成中提供更多 PEP 前体,而 *hom*^{V59A} 则增强了前体 ASA 的供应。Pérez-García 等^[120]进而选择敲除 PTS 的抑制基因 *sugR* 以加强对葡萄糖的利用,敲除 *ldhA* 基因减少副产物乳酸的形成,增加了 PEP 前体池。该菌株经发酵后最终得到 22 g/L 四氢嘧啶,产率为 0.32 g/(L·h),但该菌产生大量赖氨酸副产物(6 g/L)。Gießelmann 等^[56]选择了赖氨酸高产菌 *C. glutamicum lysC*^{lbr} 为底盘细胞,在敲除 *lysE* 基因的基础上,他们关注到 *ectABC* 基因的转录平衡,利用 19 个不同的启动子和 3 个不同的连接元件随机组合形成 185 193 个不同的单顺反子文库,从约 400 个突变体中筛选出最佳突变株 *C. glutamicum ectABC*^{opt},结果显示低总量四氢嘧啶途径酶 EctABC 的表达和低 EctA:EctB 比值以及高表达 EctB 是高效生产四氢嘧啶的关键,经分批补料发酵后能够合成 65 g/L 的四氢嘧啶,产率达到 1.16 g/(L·h),葡萄糖转化率为 0.19 g/g。这个产量对于低盐水

平下工业化四氢嘧啶生产具有里程碑的意义。随着研究者调节基因表达的手段愈加精细, Jiang 等^[121]利用抑制因子库策略,成功设计了一个高效合成四氢嘧啶的细胞工厂。他们首先确定了一株赖氨酸高产菌 *C. glutamicum* K02 为底盘细胞,通过敲除编码 PEP 羧激酶基因 *pck*, *sugR* 基因、过表达 *lysC*^{S301Y} 和 *asd* 基因增加四氢嘧啶前体 PEP 与 ASA 的供应。然后,利用抑制因子库(阻遏因子的同源启动子引入靶基因的上游)对二氢二吡啶甲酸合成酶基因 *dapA* 与柠檬酸合成酶基因 *gltA* 进行了微调,成功达到精确控制代谢通量的目的,使赖氨酸合成通量与 TCA 循环通量受到影响,增加了 OAA 与 ASA 前体池。最终,四氢嘧啶的产量为 45.52 g/L,产率为 0.63 g/(L·h),葡萄糖转化率达到 0.25 g/g。这是迄今为止 *C. glutamicum* 以葡萄糖为碳源生产四氢嘧啶的最高转化率。

以上研究结果表明,通过选用低盐水平生长的 *E. coli* 和 *C. glutamicum* 作为宿主菌生产四氢嘧啶,能有效提高四氢嘧啶的产量(表 5),解决嗜盐菌中高盐诱导造成的额外成本问题。其中, *E. coli* 较早应用于四氢嘧啶生产,由于其具有多基因或多靶点高效的编辑工具,四氢嘧啶合成所需的 5 个重要前体池(DABA、ASA、Asp、OAA 和 PEP)的研究更为充分。因此,不仅得到了较高的产量(131.8 g/L),同时葡萄糖转化率最高也达到了 0.34 g/g。而 *C. glutamicum* 被应用于四氢嘧啶生产则依赖于高产赖氨酸菌株的构建,由于该菌株具备高碳代谢通量的天冬氨酸分支途径,能够为四氢嘧啶的生物合成提供足够 L-ASA 前体^[119]。此外, *E. coli* 作为目前使用最为广泛的异源蛋白表达系统^[122],通常被选择作为全细胞催化生产四氢嘧啶的底盘,而 *C. glutamicum* 则以发酵生产为主。*E. coli* 的缺点在于会产生细菌

表 5 异源生物合成四氢嘧啶的产量

Table 5 The heterologous production of ectoine

Strain	Source of <i>ectABC</i> gene	Titer (g/L)	Productivity (g/(L·h))	Glucose conversion (g/g)	Method	Carbon source	References
<i>E. coli</i> Bct08	<i>H. elongata</i>	131.80	1.37	0.26	Fermentation	Glucose	[113]
<i>C. glutamicum</i> <i>ectABC</i> ^{opt}	<i>P. stutzeri</i>	65.30	1.16	NA	Fermentation	Glucose and molasses	[56]
<i>E. coli</i> ET11	<i>H. venusta</i> ZH	53.20	1.11	0.33	Fermentation	Glucose	[115]
<i>E. coli</i> ET01	<i>H. venusta</i> ZH	47.80	1.00	0.30	Fermentation	Glucose	[114]
<i>C. glutamicum</i> CB5L6	<i>P. stutzeri</i>	45.52	0.63	0.25	Fermentation	Glucose	[121]
<i>E. coli</i> MWL009	<i>H. elongata</i>	34.27	0.57	0.34	Fermentation	Glucose	[112]
<i>E. coli</i> MWZ003	<i>H. elongata</i>	30.37	0.84	0.13	Fermentation	Glucose	[111]
<i>E. coli</i> BW25113	<i>H. elongata</i> DSM 2581	25.10	1.04	NA	Whole-cell catalysis	Glycerol and aspartate	[116]
<i>E. coli</i> Ect05	<i>H. elongata</i>	25.10	0.84	0.11	Fermentation	Glucose	[110]
<i>E. coli</i> BL-SsEct	<i>S. salarius</i>	22.50	0.94	NA	Fermentation	Glucose and aspartate	[118]
<i>C. glutamicum</i> Ecto5	<i>C. salexigens</i> DSM 3043T	22.00	0.32	0.16	Fermentation	Glucose	[120]
<i>E. coli</i> ECT2	<i>H. elongata</i>	12.70	0.53	NA	Whole-cell catalysis	Glycerol and aspartate	[117]
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>C. salexigens</i> DSM 3043	6.00	0.04	NA	Fermentation	Glucose	[109]
<i>C. glutamicum</i> Ect-2	<i>P. stutzeri</i> A1501	4.50	0.28	NA	Fermentation	Glucose	[119]

NA: Not available.

内毒素,不利于四氢嘧啶在生物制药和食品等领域的应用^[123],而 *C. glutamicum* 则无内毒素产生,具有公认食品安全(generally recognized as safe, GRAS)的特性^[124]。另外, *C. glutamicum* 具有利用木质纤维素水解物的能力,能将木糖、阿拉伯糖、淀粉等作为替代碳源生产四氢嘧啶^[120,124-125]。值得注意的是,在上述两种底盘中,研究者们都运用了全局性控制代谢通量和精细调控代谢节点等策略来提高四氢嘧啶产量。葡萄糖到四氢嘧啶的理论转化率为 0.63 g/g^[110],但合成的过程中涉及复杂的代谢通路,低碳源转化率成为目前研究普遍存在的问题。除了 *E. coli* 与 *C. glutamicum*,研究者们也致力于寻找其余适合四氢嘧啶生产

的异源细胞底盘。酵母作为一种单细胞真核生物,同样具有成熟的遗传操作系统,也被应用于构建微生物细胞工厂^[117]。其中,酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)可能成为四氢嘧啶的新兴生产者^[126]。

4 展望

四氢嘧啶作为微生物在极端环境压力下积累的保护性分子,具有保护大分子、细胞和组织的功能,因此具有公认的商业价值,每公斤市场售价约为 1 000 美元,全球每年需求量高达 1.5 万 t。德国 Bitop 和华熙生物等国内外相关企业均已布局嗜盐菌合成四氢嘧啶的产业,但

通过嗜盐菌发酵生产四氢嘧啶所需的高盐培养环境对发酵设备有腐蚀性,下游废水处理的高昂成本不利于其工业化大规模生产。因此,利用 *E. coli* 和 *C. glutamicum* 等成熟的底盘细胞构建“高产细胞工厂”策略成为其产业化的新赛道,许多国内企业如中科欣扬、福瑞达、普利制药等参与其中,并取得良好进展。随着嗜盐微生物“下一代工业生物技术”的深入开展^[127],低盐底盘细胞四氢嘧啶产量和碳原子转化率的持续提高,四氢嘧啶合成与降解相关调控元件的逐渐清晰,信息化/数字化生产环境的高速匹配,以及多学科知识的交叉应用,必定能够进一步推动四氢嘧啶的工业化进程及产业发展。

REFERENCES

- [1] 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*[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1985, 149(1): 135-139.
- [2] GALINSKI EA. Osmoadaptation in bacteria[J]. *Advances in Microbial Physiology*, 1995, 37: 273-328.
- [3] WIDDERICH N, HÖPPNER A, PITTELKOW M, HEIDER J, SMITS SHJ, BREMER E. Biochemical properties of ectoine hydroxylases from extremophiles and their wider taxonomic distribution among microorganisms[J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e93809.
- [4] HARDING T, ROGER AJ, SIMPSON AGB. Adaptations to high salt in a halophilic protist: differential expression and gene acquisitions through duplications and gene transfers[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 944.
- [5] ZHANG TT, ZHANG X, LI YZ, YANG N, QIAO LJ, MIAO ZQ, XING JW, ZHU DR. Study of osmoadaptation mechanisms of halophilic *Halomonas alkaliphila* XH26 under salt stress by transcriptome and ectoine analysis[J]. *Extremophiles: Life Under Extreme Conditions*, 2022, 26(1): 14.
- [6] BREMER E, KRÄMER R. Responses of microorganisms to osmotic stress[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2019, 73: 313-334.
- [7] van den BERG J, BOERSMA AJ, POOLMAN B. Microorganisms maintain crowding homeostasis[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15(5): 309-318.
- [8] OREN A. Bioenergetic aspects of halophilism[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 1999, 63(2): 334-348.
- [9] BECKER J, WITTMANN C. Microbial production of extremolytes: high-value active ingredients for nutrition, health care, and well-being[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2020, 65: 118-128.
- [10] DA COSTA MS, SANTOS H, GALINSKI EA. An Overview of the Role and Diversity of Compatible Solutes in Bacteria and Archaea[M]. *Biotechnology of Extremophiles*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1998: 117-153.
- [11] LENTZEN G, SCHWARZ T. Extremolytes: natural compounds from extremophiles for versatile applications[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 72(4): 623-634.
- [12] HALLIER DC, SMALES GJ, SEITZ H, BENJAMIN HAHN M. Bio-SAXS of single-stranded DNA-binding proteins: radiation protection by the compatible solute ectoine[J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2023, 25(7): 5372-5382.
- [13] KAUTH M, TRUSOVA OV. Topical ectoine application in children and adults to treat inflammatory diseases associated with an impaired skin barrier: a systematic review[J]. *Dermatology and Therapy*, 2022, 12(2): 295-313.
- [14] FONTBONNE A, TEME BB, ABRIC E, LECERF G, CALLEJON S, MOGA A, CADARS B, GIRAUD F, CHAVAGNAC-BONNEVILLE M, ARDIET N, GUYOUX A, TROMPEZINSKI S. Positive and ecobiological contribution in skin photoprotection of ectoine and mannitol combined *in vivo* with UV filters[J]. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 2023, 00: 1-8.
- [15] GRAF R, ANZALI S, BUENGER J, PFLUECKER F, DRILLER H. The multifunctional role of ectoine as a natural cell protectant[J]. *Clinics in Dermatology*, 2008, 26(4): 326-333.
- [16] BUJAK T, ZAGÓRSKA-DZIOK M, NIZIOŁ-ŁUKASZEWSKA Z. Complexes of ectoine with the anionic surfactants as active ingredients of cleansing cosmetics with reduced irritating potential[J]. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2020, 25(6): 1433.

- [17] 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[J]. *Antioxidants*, 2020, 9(1): 63.
- [18] 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[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 322(3): 867-872.
- [19] SALEM R, EIDYASTI A, AUDETTE GF. Biomedical applications of biomolecules isolated from methanotrophic bacteria in wastewater treatment systems[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(8): 1217.
- [20] BETHLEHEM L, van ECHTEN-DECKERT G. Ectoines as novel anti-inflammatory and tissue protective lead compounds with special focus on inflammatory bowel disease and lung inflammation[J]. *Pharmacological Research*, 2021, 164: 105389.
- [21] BAZAZZADEGAN N, SHASALTANEH MD, SALIMINEJAD K, KAMALI K, BANAN M, NAZARI R, RIAZI GH, KHORSHID HRK. Effects of ectoine on behavior and candidate genes expression in ICV-STZ rat model of sporadic alzheimer's disease[J]. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 2017, 7(4): 629-636.
- [22] BILSTEIN A, HEINRICH A, RYBACHUK A, MÖSGES R. Ectoine in the treatment of irritations and inflammations of the eye surface[J]. *BioMed Research International*, 2021, 2021: 8885032.
- [23] WERKHÄUSER N, BILSTEIN A, MAHLSTEDT K, SONNEMANN U. Observational study investigating Ectoin® Rhinitis Nasal Spray as natural treatment option of acute rhinosinusitis compared to treatment with xylometazoline[J]. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 2022, 279(3): 1371-1381.
- [24] FONDEVILLA A, SERRADILLA A, MORENO-OLMEDO E, MATSKOV K, BELMONTE MJ, SÁEZ A, ACEVEDO MJ, LÓPEZ E. Radiochemotherapy-induced oral mucositis: ectoin solution as a new treatment[J]. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 2022, 14(5): e433-e438.
- [25] ALEXOPOULOS A, DAKOUTROU M, NASI L, THANOPOULOU I, KAKOIROU T, KONTARA L, DOULADIRIS N, GALANI M, XEPAPADAKI P, DOXANI C, MPROTSIS T, ZINTZARAS E, PAPADOPOULOS NG, KANAKA-GANTENBEIN C, CHROUSOS GP. A randomized, observer-blind, vehicle-control, multi-center clinical investigation for assessing the efficacy and tolerability of a 1% ectoine and hyaluronic acid 0.1%-containing medical device in pediatric patients with mild-to-moderate atopic dermatitis[J]. *Pediatric Dermatology*, 2023, 40(1): 78-83.
- [26] 李越, 辛嘉英, 孙莹, 夏春谷. 四氢嘧啶对冷冻面团的保护作用研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(7): 148-154.
- LI Y, XIN JY, SUN Y, XIA CG. Study on the protective effect of frozen dough by ectoine[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2023, 14(7): 148-154 (in Chinese).
- [27] STRONG PJ, KALYUZHAYAYA M, SILVERMAN J, CLARKE WP. A methanotroph-based biorefinery: potential scenarios for generating multiple products from a single fermentation[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 215: 314-323.
- [28] BUNGER J, DRILLER HJ, MARTIN R. Use of ectoine or ectoine derivatives in cosmetic formulations: US20030157040[P]. 2003-08-21.
- [29] 张山, 甘森, 陈永丽, 丁利平. 一种基于乙酰辅酶 A 代谢改造后高效合成四氢嘧啶的基因工程菌的构建和应用: CN114806995A[P]. 2022-07-29.
- ZHANG S, GAN M, CHEN YL, DING LP. Construction and application of genetically engineered bacterium for efficiently synthesizing ectoine based on acetyl-coenzyme A metabolic modification: CN114806995A[P]. 2022-07-29 (in Chinese).
- [30] 胡红涛, 李海军, 张英华, 李珍爱, 郑德强, 张杰, 李艳艳, 王超, 徐波, 张鑫. 一种高产四氢嘧啶的重组谷氨酸棒杆菌及其构建方法和应用: CN115851659A[P]. 2023-03-28.
- HU HT, LI HJ, ZHANG YH, LI ZA, ZHENG DQ, ZHANG J, LI YY, WANG C, XU B, ZHANG X. Recombinant *Corynebacterium glutamicum* with high yield of ectoine as well as construction method and application of recombinant *Corynebacterium glutamicum*: CN115851659A[P]. 2023-03-28 (in Chinese).
- [31] 柴保中, 李晚军, 李伟康, 李娜, 张伟, 廖永康, 王凯航. 一种高产四氢嘧啶的基因重组菌株及其构建方法和应用: CN116904379A[P]. 2023-10-20.
- CAI BZ, LI WJ, LI WK, LI N, ZHANG W, LIAO YK, WANG KH. A recombinant strain with high ectoine yield and its construction method and application: CN116904379A[P]. 2023-10-20 (in Chinese).
- [32] 张欣, 刘静, 朱德锐. 天然产物 Ectoine 与

- Hydroxyectoine 的生物工程及医学应用研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(5): 882-887.
- ZHANG X, LIU J, ZHU DR. Review on bioengineering and biomedical applications of natural products ectoine and hydroxyectoine[J]. Natural Product Research and Development, 2017, 29(5): 882-887 (in Chinese).
- [33] 张鑫, 舒志万, 李永臻, 邢江娃, 王嵘, 沈国平, 朱德锐. 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 ZW, LI YZ, XING JW, WANG R, SHEN GP, ZHU DR. Advances in the microbial production of the compatible solute ectoine: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(3): 868-881 (in Chinese).
- [34] PETERS P, GALINSKI EA, TRÄGER HG. The biosynthesis of ectoine[J]. FEMS Microbiology Letters, 1990, 71(1/2): 157-162.
- [35] LO CC, BONNER CA, XIE G, D'SOUZA M, JENSEN RA. Cohesion group approach for evolutionary analysis of aspartokinase, an enzyme that feeds a branched network of many biochemical pathways[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR, 2009, 73(4): 594-651.
- [36] RESHETNIKOV AS, KHMELENINA VN, TROTSSENKO YA. Characterization of the ectoine biosynthesis genes of haloalkalotolerant obligate methanotroph "*Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z"[J]. Archives of Microbiology, 2006, 184(5): 286-297.
- [37] RESHETNIKOV AS, KHMELENINA VN, MUSTAKHIMOV II, TROTSSENKO YA. Genes and enzymes of ectoine biosynthesis in halotolerant methanotrophs[J]. Methods in Enzymology, 2011, 495: 15-30.
- [38] STÖVEKEN N, PITTELKOW M, SINNER T, JENSEN RA, HEIDER J, BREMER E. A specialized aspartokinase enhances the biosynthesis of the osmoprotectants ectoine and hydroxyectoine in *Pseudomonas stutzeri* A1501[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(17): 4456-4468.
- [39] 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*[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(1): 91-99.
- [40] KUHLMANN AU, BREMER E. Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in *Bacillus pasteurii* and related *Bacillus* spp.[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(2): 772-783.
- [41] BURSRY J, KUHLMANN AU, PITTELKOW M, HARTMANN H, JEBBAR M, PIERIK AJ, BREMER E. Synthesis and uptake of the compatible solutes ectoine and 5-hydroxyectoine by *Streptomyces coelicolor* A3(2) in response to salt and heat stresses[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(23): 7286-7296.
- [42] CZECH L, HERMANN L, STÖVEKEN N, RICHTER AA, HÖPPNER A, SMITS SHJ, HEIDER J, BREMER E. Role of the extremolytes ectoine and hydroxyectoine as stress protectants and nutrients: genetics, phylogenomics, biochemistry, and structural analysis[J]. Genes, 2018, 9(4): 177.
- [43] HILLIER HT, ALTERMARK B, LEIROS I. The crystal structure of the tetrameric DABA-aminotransferase EctB, a rate-limiting enzyme in the ectoine biosynthesis pathway[J]. The FEBS Journal, 2020, 287(21): 4641-4658.
- [44] RICHTER AA, KOBUS S, CZECH L, HOEPPNER A, ZARZYCKI J, ERB TJ, LAUTERBACH L, DICKSCHAT JS, BREMER E, SMITS SHJ. The architecture of the diamino butyrate acetyltransferase active site provides mechanistic insight into the biosynthesis of the chemical chaperone ectoine[J]. Journal of Biological Chemistry, 2020, 295(9): 2822-2838.
- [45] CZECH L, HÖPPNER A, KOBUS S, SEUBERT A, RICLEA R, DICKSCHAT JS, HEIDER J, SMITS SHJ, BREMER E. Illuminating the catalytic core of ectoine synthase through structural and biochemical analysis[J]. Scientific Reports, 2019, 9: 364.
- [46] TANNE C, GOLOVINA EA, HOEKSTRA FA, MEFFERT A, GALINSKI EA. Glass-forming property of hydroxyectoine is the cause of its superior function as a desiccation protectant[J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 150.
- [47] JUNGMANN L, HOFFMANN SL, LANG C, AGAZIO R, BECKER J, KOHLSTEDT M, WITTMANN C. High-efficiency production of 5-hydroxyectoine using metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum*[J]. Microbial Cell Factories, 2022, 21(1): 1-19.
- [48] MA Q, XIA L, WU HY, ZHUO MY, YANG MY, ZHANG Y, TAN M, ZHAO KX, SUN QW, XU QY,

- CHEN N, XIE XX. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for efficient osmotic stress-free production of compatible solute hydroxyectoine[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2022, 119(1): 89-101.
- [49] DABOUS A, D'AMBROSIO S, CIMINI D, SCHIRALDI C. Novel hydroxyectoines based formulations are suitable for preserving viability of *Limosilactobacillus fermentum*, *Levilactobacillus brevis* SP-48 and *Bifidobacterium lactis* HN019 during freeze-drying and storage, and in simulated gastrointestinal fluids[J]. *Drying Technology*, 2023, 41(12): 2062-2073.
- [50] SCHWIBBERT K, MARIN-SANGUINO A, BAGYAN I, HEIDRICH G, LENTZEN G, SEITZ H, RAMPP M, SCHUSTER SC, KLENK HP, PFEIFFER F, OESTERHELT D, KUNTE HJ. A blueprint of ectoine metabolism from the genome of the industrial producer *Halomonas elongata* DSM 2581 T[J]. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(8): 1973-1994.
- [51] REKADWAD BN, LI WJ, REKHA PD. The diversity of unique 1,4,5,6-tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid coding common genes and universal stress protein in ectoine TRAP cluster (UspA) in 32 *Halomonas* species[J]. *BMC Research Notes*, 2021, 14(1): 296.
- [52] 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[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(2): e01772-e01717.
- [53] STILLER L, GALINSKI E, WITT E. Engineering the salt-inducible ectoine promoter region of *Halomonas elongata* for protein expression in a unique stabilizing environment[J]. *Genes*, 2018, 9(4): 184.
- [54] ARAHAL DR, GARCÍA MT, VARGAS C, CÁNOVAS D, NIETO JJ, VENTOSA A. *Chromohalobacter salexigens* sp. nov., a moderately halophilic species that includes *Halomonas elongata* DSM 3043 and ATCC 33174[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, 51(4): 1457-1462.
- [55] CHEN W, ZHANG S, JIANGPX, 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[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 30: 149-155.
- [56] 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[J]. *Biotechnology Journal*, 2019, 14(9): e1800417.
- [57] GRISHIN NV, PHILLIPS MA, GOLDSMITH EJ. Modeling of the spatial structure of eukaryotic ornithine decarboxylases[J]. *Protein Science: a Publication of the Protein Society*, 1995, 4(7): 1291-1304.
- [58] STEFFEN-MUNSBURG F, VICKERS C, KOHLS H, LAND H, MALLIN H, NOBILI A, SKALDEN L, van den BERGH T, JOOSTEN HJ, BERGLUND P, HÖHNE M, BORNSCHEUER UT. Bioinformatic analysis of a PLP-dependent enzyme superfamily suitable for biocatalytic applications[J]. *Biotechnology Advances*, 2015, 33(5): 566-604.
- [59] HIROTSU K, GOTO M, OKAMOTO A, MIYAHARA I. Dual substrate recognition of aminotransferases[J]. *The Chemical Record*, 2005, 5(3): 160-172.
- [60] MANTA BC, CASSIMJEE KE, HIMO F. Quantum chemical study of dual-substrate recognition in ω -transaminase[J]. *ACS Omega*, 2017, 2(3): 890-898.
- [61] ŁYSKOWSKI A, GRUBER C, STEINKELLNER G, SCHÜRMAN M, SCHWAB H, GRUBER K, STEINER K. Crystal structure of an (R)-selective ω -transaminase from *Aspergillus terreus*[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e87350.
- [62] RICHTER AA, MAIS CN, CZECH L, GEYER K, HOEPPNER A, SMITS SHJ, ERB TJ, BANGE G, BREMER E. Biosynthesis of the stress-protectant and chemical chaperon ectoine: biochemistry of the transaminase EctB[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2811.
- [63] OLIVEIRA EF, CERQUEIRA NMFS, FERNANDES PA, RAMOS MJ. Mechanism of formation of the internal aldimine in pyridoxal 5'-phosphate-dependent enzymes[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133(39): 15496-15505.
- [64] IKAI H, YAMAMOTO S. Identification and analysis of a gene encoding L-2,4-diaminobutyrate: 2-ketoglutarate 4-aminotransferase involved in the 1,3-diaminopropane production pathway in *Acinetobacter baumannii*[J]. *Journal of Bacteriology*,

- 1997, 179(16): 5118-5125.
- [65] VANDENENDE CS, VLASSCHAERT M, SEAH SYK. Functional characterization of an aminotransferase required for pyoverdine siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(17): 5596-5602.
- [66] VETTING MW, de CARVALHO LPS, YU M, HEGDE SS, MAGNET S, RODERICK SL, BLANCHARD JS. Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2005, 433(1): 212-226.
- [67] UD-DIN AIMS, TIKHOMIROVA A, ROUJEINIKOVA A. Structure and functional diversity of GCN5-related N-acetyltransferases (GNAT)[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(7): 1018.
- [68] MUSTAKHIMOV II, ROZOVA ON, RESHETNIKOV AS, KHMELENINA VN, MURRELL JC, TROTSSENKO YA. Characterization of the recombinant diamminobutyric acid acetyltransferase from *Methylophaga thalassica* and *Methylophaga alcalica*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2008, 283(1): 91-96.
- [69] RESHETNIKOV AS, MUSTAKHIMOV II, KHMELENINA VN, TROTSSENKO YA. Cloning, purification, and characterization of diamminobutyrate acetyltransferase from the halotolerant methanotroph *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z[J]. Biochemistry (Moscow), 2005, 70(8): 878-883.
- [70] WITT EMHJ, DAVIES NW, GALINSKI EA. Unexpected property of ectoine synthase and its application for synthesis of the engineered compatible solute ADPC[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 91(1): 113-122.
- [71] WIDDERICH N, KOBUS S, HÖPPNER A, RICLEA R, SEUBERT A, DICKSCHAT JS, HEIDER J, SMITS SHJ, BREMER E. Biochemistry and crystal structure of ectoine synthase: a metal-containing member of the cupin superfamily[J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0151285.
- [72] DUNWELL JM, CULHAM A, CARTER CE, SOSA-AGUIRRE CR, GOODENOUGH PW. Evolution of functional diversity in the cupin superfamily[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2001, 26(12): 740-746.
- [73] DUNWELL JM, PURVIS A, KHURI S. Cupins: the most functionally diverse protein superfamily?[J]. Phytochemistry, 2004, 65(1): 7-17.
- [74] AGARWAL G, RAJAVEL M, GOPAL B, SRINIVASAN N. Structure-based phylogeny as a diagnostic for functional characterization of proteins with a cupin fold[J]. PLoS One, 2009, 4(5): e5736.
- [75] HERMANN L, MAIS CN, CZECH L, SMITS SHJ, BANGE G, BREMER E. 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.
- [76] ANDRYS-OLEK J, HEIDER J, BOROWSKI T. Molecular dynamics simulations for the *Michaelis* complex of ectoine synthase (EctC)[J]. Catalysts, 2023, 13(1): 124.
- [77] WIDDERICH N, CZECH L, ELLING FJ, KÖNNEKE M, STÖVEKEN N, PITTELKOW M, RICLEA R, DICKSCHAT JS, HEIDER J, BREMER E. Strangers in the archaeal world: osmostress-responsive biosynthesis of ectoine and hydroxyectoine by the marine thaumarchaeon *Nitrosopumilus maritimus*[J]. Environmental Microbiology, 2016, 18(4): 1227-1248.
- [78] MORITZ KD, AMENDT B, WITT EMHJ, GALINSKI EA. The hydroxyectoine gene cluster of the non-halophilic acidophile *Acidiphilium cryptum*[J]. Extremophiles, 2015, 19(1): 87-99.
- [79] WOHLFARTH A, SEVERIN J, GALINSKI EA. The spectrum of compatible solutes in heterotrophic halophilic eubacteria of the family Halomonadaceae[J]. Journal of General Microbiology, 1990, 136(4): 705-712.
- [80] SAUER T, GALINSKI EA. Bacterial milking: a novel bioprocess for production of compatible solutes[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1998, 57(3): 306-313.
- [81] VANDRICH J, PFEIFFER F, ALFARO-ESPINOZA G, KUNTE HJ. Contribution of mechanosensitive channels to osmoadaptation and ectoine excretion in *Halomonas elongata*[J]. Extremophiles: Life Under Extreme Conditions, 2020, 24(3): 421-432.
- [82] KUNTE H, LENTZEN G, GALINSKI E. Industrial production of the cell protectant ectoine: protection mechanisms, processes, and products[J]. Current Biotechnology, 2014, 3(1): 10-25.
- [83] HOBMEIER K, OPPERMANN M, STASINSKI N, KREMLING A, PFLÜGER-GRAU K, KUNTE HJ, MARIN-SANGUINO A. Metabolic engineering of *Halomonas elongata*: ectoine secretion is increased by demand and supply driven approaches[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 968983.
- [84] 徐蕊, 张苓花. 四氢嘧啶吸收缺陷突变株高效制备

- 四氢嘧啶[J]. 微生物学报, 2012, 52(5): 661-667.
- XU R, ZHANG LH. Construction of ectoine absorption defective mutant for efficient ectoine production[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(5): 661-667 (in Chinese).
- [85] 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[J]. Extremophiles, 2011, 15(2): 303-310.
- [86] ZHAO Q, LI SN, LV PW, SUN SM, MA CQ, XU P, SU HJ, YANG CY. High ectoine production by an engineered *Halomonas hydrothermalis* Y2 in a reduced salinity medium[J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18(1): 184.
- [87] LI SN, SHANG Y, ZHAO Q, LIU YX, DONG XQ, WANG WK, YANG CY. Promoter engineering for high ectoine production in a lower saline medium by *Halomonas hydrothermalis* Y2[J]. Biotechnology Letters, 2021, 43(4): 825-834.
- [88] MA H, ZHAO YQ, HUANG WZ, ZHANG LZ, WU FQ, YE JW, CHEN GQ. Rational flux-tuning of *Halomonas bluephagenesis* for co-production of bioplastic PHB and ectoine[J]. Nature Communications, 2020, 11: 3313.
- [89] ZHANG LZ, LIN Y, YI XQ, HUANG WZ, HU QT, ZHANG ZN, WU FQ, YE JW, CHEN GQ. Engineering low-salt growth *Halomonas Bluephagenesis* for cost-effective bioproduction combined with adaptive evolution[J]. Metabolic Engineering, 2023, 79: 146-158.
- [90] WANG ZB, LI YZ, GAO X, XING JW, WANG R, ZHU DR, SHEN GP. Comparative genomic analysis of *Halomonas campaniensis* wild-type and ultraviolet radiation-mutated strains reveal genomic differences associated with increased ectoine production[J]. International Microbiology, 2023, 26(4): 1009-1020.
- [91] SHU ZW, ZHANG X, WANG R, XING JW, LI YZ, ZHU DR, SHEN GP. Metabolic engineering of *Halomonas campaniensis* strain XH26 to remove competing pathways to enhance ectoine production[J]. Scientific Reports, 2023, 13: 9732.
- [92] 郑昕, 马虹, 阎喜文, 张苓花. *Halomonas venusta* DSM4743 渗透压冲击下四氢嘧啶合成与释放[J]. 微生物学通报, 2010, 37(7): 1090-1096.
- ZHENG X, MA H, YAN XW, ZHANG LH. Ectoine synthesis and release under osmotic shock in *Halomonas venusta* DSM4743[J]. Microbiology China, 2010, 37(7): 1090-1096 (in Chinese).
- [93] 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[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2018, 125(5): 578-584.
- [94] FALLET C, ROHE P, FRANCO-LARA E. Process optimization of the integrated synthesis and secretion of ectoine and hydroxyectoine under hyper/hypo-osmotic stress[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2010, 107(1): 124-133.
- [95] ONRAEDT AE, WALCARIUS BA, SOETAERT WK, VANDAMME EJ. Optimization of ectoine synthesis through fed-batch fermentation of *Brevibacterium epidermis*[J]. Biotechnology Progress, 2005, 21(4): 1206-1212.
- [96] ZHANG LH, LANG YJ, NAGATA S. Efficient production of ectoine using ectoine-excreting strain[J]. Extremophiles, 2009, 13(4): 717-724.
- [97] CHEN WC, YUAN FW, WANG LF, CHIEN CC, WEI YH. Ectoine production with indigenous *Marinococcus* sp. MAR2 isolated from the marine environment[J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2020, 50(1): 74-81.
- [98] OMARA AMA, EL-MONEM M SHARAF A, EL-HELA AA, SHAHIN AAM, EL-BIALY HAA, EL-FOULY MZ. Optimizing ectoine biosynthesis using response surface methodology and osmoprotectant applications[J]. Biotechnology Letters, 2020, 42(6): 1003-1017.
- [99] CHEN PW, CUI ZY, NG HS, LAN JCW. Exploring the additive bio-agent impacts upon ectoine production by *Halomonas salina* DSM5928^T using corn steep liquor and soybean hydrolysate as nutrient supplement[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2020, 130(2): 195-199.
- [100] CANTERA S, LEBRERO R, SADORNIL L, GARCÍA-ENCINA PA, MUÑOZ R. Valorization of CH₄ emissions into high-added-value products: assessing the production of ectoine coupled with CH₄ abatement[J]. Journal of Environmental Management, 2016, 182: 160-165.
- [101] CANTERA S, Di BENEDETTO F, TUMULERO BF, SOUSA DZ. Microbial conversion of carbon dioxide and hydrogen into the fine chemicals hydroxyectoine and ectoine[J]. Bioresource Technology, 2023, 374: 128753.

- [102] CANTERA S, PHANDANOUVONG-LOZANO V, PASCUAL C, GARCÍA-ENCINA PA, LEBRERO R, HAY A, MUÑOZ R. A systematic comparison of ectoine production from upgraded biogas using *Methylobacterium alcaliphilum* and a mixed haloalkaliphilic consortium[J]. Waste Management, 2020, 102: 773-781.
- [103] CHO S, LEE YS, CHAI HY, LIM SE, NA JG, LEE J. Enhanced production of ectoine from methane using metabolically engineered *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z[J]. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 2022, 15(1): 5.
- [104] PHAM DN, NGUYEN AD, MAI DHA, LEE EY. Development of a novel methanotrophic platform to produce ectoine from methane and lignocellulose-derived sugars[J]. Chemical Engineering Journal, 2023, 463: 142361.
- [105] 张山, 胡萌, 何永志, 董志扬. 四氢嘧啶微生物合成与应用研究进展[J]. 微生物学报, 2021, 61(8): 2250-2263.
ZHANG S, HU M, HE YZ, DONG ZY. Research progress in microbial production and application of ectoines[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(8): 2250-2263 (in Chinese).
- [106] LIU MS, LIU H, SHI M, JIANG MY, LI LL, ZHENG YN. Microbial production of ectoine and hydroxyectoine as high-value chemicals[J]. Microbial Cell Factories, 2021, 20(1): 76.
- [107] MA Z, WU CT, ZHU LJ, CHANG RJ, MA WL, DENG YF, CHEN XL. Bioactivity profiling of the extremolyte ectoine as a promising protectant and its heterologous production[J]. 3 Biotech, 2022, 12(12): 331.
- [108] LOUIS P, GALINSKI EA. Characterization of genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine from *Marinococcus halophilus* and osmoregulated expression in *Escherichia coli*[J]. Microbiology (Reading, England), 1997, 143 (Pt 4): 1141-1149.
- [109] SCHUBERT T, MASKOW T, BENNDORF D, HARMS H, BREUER U. Continuous synthesis and excretion of the compatible solute ectoine by a transgenic, nonhalophilic bacterium[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(10): 3343-3347.
- [110] 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*[J]. Metabolic Engineering, 2016, 36: 10-18.
- [111] ZHANG SY, FANG Y, ZHU LF, LI HD, WANG Z, LI Y, WANG XY. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for efficient ectoine production[J]. Systems Microbiology and Biomanufacturing, 2021, 1(4): 444-458.
- [112] LI Y, ZHANG SY, LI HD, HUANG DY, LIU ZW, GONG DK, WANG Y, WANG Z, WANG XY. Metabolic engineering for improving ectoine production in *Escherichia coli*[J]. Systems Microbiology and Biomanufacturing, 2023: 1-11.
- [113] XU SQ, ZHANG B, CHEN WH, YE K, SHEN J, LIU PF, WU JQ, WANG H, CHU XH. Highly efficient production of ectoine via an optimized combination of precursor metabolic modules in *Escherichia coli* BL21[J]. Bioresource Technology, 2023, 390: 129803.
- [114] DONGYS, ZHANG H, WANG XY, MA JJ, LEI P, XU H, LI S. Enhancing ectoine production by recombinant *Escherichia coli* through step-wise fermentation optimization strategy based on kinetic analysis[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2021, 44(7): 1557-1566.
- [115] ZHANG H, LIANG Z, ZHAO M, MA YQ, LUO ZS, LI S, XU H. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for ectoine production with a fermentation strategy of supplementing the amino donor[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022, 10: 824859.
- [116] HE YZ, GONG J, YU HY, TAO Y, ZHANG S, DONG ZY. High production of ectoine from aspartate and glycerol by use of whole-cell biocatalysis in recombinant *Escherichia coli*[J]. Microbial Cell Factories, 2015, 14: 55.
- [117] CHEN J, LIU PF, CHU XH, CHEN JW, ZHANG HW, ROWLEY DC, WANG H. Metabolic pathway construction and optimization of *Escherichia coli* for high-level ectoine production[J]. Current Microbiology, 2020, 77(8): 1412-1418.
- [118] SU Y, PENG WT, WANG T, LI YH, ZHAO LY, WANG XY, LI Y, LIN L. Ectoine production using novel heterologous EctABCs_{S. salarius} from marine bacterium *Salinicola salarius*[J]. Applied Sciences, 2021, 11(15): 6873.
- [119] 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[J]. Microbial Cell Factories, 2013, 12: 110.
- [120] 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[J]. *Journal of Biotechnology*, 2017, 258: 59-68.
- [121] JIANG A, SONG Y, YOU J, ZHANG X, XU MJ, RAO ZM. High-yield ectoine production in engineered *Corynebacterium glutamicum* by fine metabolic regulation via plug-in repressor library[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 362: 127802.
- [122] POURESMAEIL M, AZIZI-DARGAHLLOU S. Factors involved in heterologous expression of proteins in *E. coli* host[J]. *Archives of Microbiology*, 2023, 205(5): 1-18.
- [123] BOBROVSKY PA, KHARLAMPIEVA DD, KIRILLIN SA, BROVINA KA, GRAFSKAIA EN, LAZAREV VN, MANUVERA VA. Upregulation of YciM expression reduces endotoxin contamination of recombinant proteins produced in *Escherichia coli* cells[J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2023, 88(9): 1318-1325.
- [124] ZHAO NN, QIAN L, LUO GJ, ZHENG SP. Synthetic biology approaches to access renewable carbon source utilization in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(22): 9517-9529.
- [125] LI YJ, WEI HB, WANG T, XU QY, ZHANG CL, FAN XG, MA Q, CHEN N, XIE XX. Current status on metabolic engineering for the production of L-aspartate family amino acids and derivatives[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 245(Pt B): 1588-1602.
- [126] 康振, 陈坚, 堵国成, 杜养标, 魏伟伟. 一种发酵合成四氢嘧啶的酿酒酵母工程菌株: CN113151024A[P]. 2021-07-23.
KANG Z, CHEN J, DU GC, DU YB, WEI WW. *Saccharomyces cerevisiae* engineering strain for synthesizing ectoine through fermentation: CN113151024A[P]. 2021-07-23 (in Chinese).
- [127] 何宏韬, 郑爽, 陈国强. 基于嗜盐菌合成生物学的下一代工业生物技术[J]. *集成技术*, 2022, 11(1): 1-12.
HE HT, ZHENG S, CHEN GQ. "next generation industrial biotechnology" based on halophilic bacteria and their synthetic biology[J]. *Journal of Integration Technology*, 2022, 11(1): 1-12 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)