

Halomonas venusta DSM4743 渗透压冲击下 四氢嘧啶合成与释放

郑昕 马虹 阎喜文 张苓花*

(大连海事大学环境科学与工程学院 辽宁 大连 116026)

摘要: 选择耐受较高 NaCl 浓度, 而且四氢嘧啶胞内浓度阈值较高的菌株, 研究其四氢嘧啶发酵条件和工艺, 对于提高四氢嘧啶的制备效率具有实际意义。考察了碳源、NaCl 浓度、酵母膏添加量对 *Halomonas venusta* DSM4743 四氢嘧啶合成的影响, 考察了优化条件下的四氢嘧啶分批发酵进程, 并利用“细菌挤奶”工艺制备四氢嘧啶。结果表明: 谷氨酸单钠为唯一碳氮源、NaCl 浓度为 1.5 mol/L、酵母膏添加量为 0.5% 的条件有利于四氢嘧啶合成。在优化条件下 10 L 发酵罐分批发酵, 四氢嘧啶最大合成量为 3.2 g/L, 合成效率为 2.7 g/(L·d)。通过“细菌挤奶”工艺制备四氢嘧啶, 6 个渗透压冲击循环后, 四氢嘧啶总合成量为 14.7 g/L, 总释放量为 14.3 g/L, 平均释放率为 97%, 合成效率 2.1 g/(L·d)。中度嗜盐菌 *Halomonas venusta* DSM4743 耐受较高浓度的 NaCl, 而且四氢嘧啶胞内浓度阈值较高, 优化的发酵条件及“细菌挤奶”工艺, 获得了较高的四氢嘧啶制备效率。
关键词: 中度嗜盐菌, *Halomonas venusta* DSM4743, 四氢嘧啶, 细菌挤奶, 渗透压冲击

Ectoine Synthesis and Release Under Osmotic Shock in *Halomonas venusta* DSM4743

ZHENG Xin MA Hong YAN Xi-Wen ZHANG Ling-Hua*

(Environmental Science and Engineering College Dalian Maritime University, Dalian, Liaoning 116026, China)

Abstract: In order to improve the productivity of Ectoine, the strain which could resist to higher halostress of NaCl concentration and synthesize higher intracellular Ectoine concentration was adopted. The fermentation conditions and processes of Ectoine were assessed. The impacts of carbon source and concentration of NaCl and yeast extract on the synthesizing Ectoine with *Halomonas venusta* DSM4743 were investigated. The batch fermentation processes of Ectoine was investigated under the optimum conditions and the Ectoine was produced by “bacterial milking”. As the results showed, the amount of synthesized Ectoine could be enhanced when the medium adopted monosodium glutamate as the sole source of carbon and nitrogen, and at the same time in 1.5 mol/L NaCl and 0.5% yeast extract. Under optimal conditions, batch fermentations were performed in a 10-liter fermentor. The maximum Ectoine concentration and the Ectoine productivity were 3.2 g/L and 2.7 g/(L·d), respectively. Ectoine was produced by *Halomonas venusta* DSM4743 with “bacterial milking”. The total concentration of synthe-

sized and released Ectoine were 14.7 g/L and 14.3 g/L, respectively. The average release rate of Ectoine was 97% and the Ectoine productivity was 2.1 g/(L·d) after six cycles of osmotic shock. Moderately halophilic bacterial strain *Halomonas venusta* DSM4743 was tolerant to higher NaCl concentrations and had the higher threshold of intracellular Ectoine concentration. The higher Ectoine productivity was obtained with the optimization of fermentation conditions and “bacterial milking”.

Keywords: Moderately halophilic bacterial strain, *Halomonas venusta* DSM4743, Ectoine, Bacterial milking, Osmotic shock

中度嗜盐菌作为极端微生物的类群之一, 能够耐受极端的环境条件, 在高渗透压胁迫下, 通过在细胞内积累的渗透压补偿溶质来抵抗细胞外的高渗透压, 维持细胞的形态、结构和生理功能。四氢嘧啶(1,4,5,6-四氢-2-甲基-4-嘧啶羧酸)是在极度嗜盐光合细菌(*Ectothiorhodospira halochloris* strain DSM 1059)菌株中首次发现的环状氨基酸^[1], 是中度嗜盐细菌中主要的渗透压补偿性溶质。四氢嘧啶不但能够平衡细胞的渗透压, 而且在高温、冷冻和干燥等逆境下, 对酶、DNA、细胞膜和整个细胞提供保护作用^[2-7], 因此在化妆品、生物制剂、酶制剂和制药等领域具有广泛的应用前景。由于四氢嘧啶含有一个手性碳原子, 很难用化学方法合成, 因此利用微生物发酵提高四氢嘧啶制备效率的问题受到重视。

截止到目前, 关于四氢嘧啶制备效率的研究, 主要集中在菌株筛选及制备工艺方面。嗜盐海球菌(*Marinococcus halophilus*)、肋生盐弧菌(*V. costicola*)、盐单胞菌科(*Halomonas*)及芽孢杆菌属(*Bacillus*)等多种微生物的四氢嘧啶合成研究被报道^[8-12]。Thomas Sauer 等人采用“细菌挤奶(Bacterial milking)”工艺, 大幅度地提高了四氢嘧啶的合成量, 整个细菌挤奶工艺四氢嘧啶的合成效率为 3.3 g/(L·d)^[8]。Annelies E. Onraedt 等人优化了碳源浓度、酵母膏添加量等培养条件对表皮短杆菌 DSM 20659 (*Brevibacterium epidermis* DSM 20659)四氢嘧啶发酵的影响, 1 mol/L NaCl 下分批发酵(非补料的), 最大细胞干重为 19.6 g/L, 单位质量细胞四氢嘧啶合成量为 0.1 g/g, 四氢嘧啶最大合成量为 1.6 g/L, 合成效率为 1.1 g/(L·d)^[12]。绝大多数报道的四氢嘧啶合成菌株有如下特点: (1) 单位质量细胞的四氢嘧啶合成量与胞外渗透压呈正相关性, 即四氢嘧啶合成量随渗透压的增加而增加, 然而高渗透压(如高浓度 NaCl)会导致细胞生长缓慢或生长量低下。(2)

当细胞内四氢嘧啶达到一定浓度时, 其合成便受到抑制, 即四氢嘧啶的合成量受胞内四氢嘧啶浓度阈值的限制^[13]。因此, 选择耐受较高 NaCl 浓度的, 而且四氢嘧啶胞内浓度阈值较高的菌株, 对于提高四氢嘧啶的制备效率具有实际意义。

本文报道菌株 *Halomonas venusta* DSM4743 (*H. venusta* DSM4743)在 NaCl 诱导下合成四氢嘧啶, 而且该菌株生长最适 NaCl 浓度较高、单位质量细胞四氢嘧啶合成量也较高。优化了碳源、NaCl 浓度、酵母膏添加量对 *H. venusta* DSM4743 四氢嘧啶合成的影响。在优化条件下 10 L 发酵罐分批发酵, 最大细胞干重为 18.6 g/L, 单位质量细胞四氢嘧啶合成量为 0.2 g/g, 四氢嘧啶最大合成量为 3.2 g/L, 合成效率为 2.7 g/(L·d)。通过“细菌挤奶”工艺制备四氢嘧啶, 6 次渗透压冲击循环, *H. venusta* DSM4743 四氢嘧啶总合成量为 14.7 g/L, 总释放量为 14.3 g/L, 平均释放率为 97%, 合成效率 2.1 g/(L·d)。

1 材料与方法

1.1 菌株

H. venusta DSM4743, 购自德国 DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)公司。

1.2 培养基

MG 培养基: L-monosodium glutamate 200 mmol/L, 无机盐混合液组成(%, *W/V*): KH_2PO_4 0.30, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1.18, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.001, 酵母膏 0.5%。NaCl 浓度由实验条件确定。pH 7.0。

MM63 培养基(mmol/L): KH_2PO_4 100, KOH 75, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40, MgSO_4 1, FeSO_4 0.01, D-Glucose 200。NaCl 浓度由实验条件确定。pH 7.0。

MGG 培养基(mmol/L): KH_2PO_4 100, KOH 75, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 30, MgSO_4 1, FeSO_4 0.01, D-Glucose 150, L-monosodium glutamate 50。NaCl 浓度由实验条件

确定。pH 7.0。

1.3 四氢嘧啶的诱导培养

菌株 30°C、摇床 120 r/min 培养 24 h 后, 按 1% 接菌量转接至三角瓶(30 mL/300 mL) 30°C、120 r/min 摇床培养。

1.4 四氢嘧啶的测定

HPLC 测定方法: 取发酵液 1 mL, 4°C、12000 r/min 离心 15 min, 弃上清; 用含有 NaCl 的 K₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲溶液(100 mmol/L, pH 7.0, NaCl 浓度与培养基浓度相同)洗涤菌体, 离心沉淀中加入 1 mL 80%乙醇, 悬浮, 室温静置过夜。悬浮液再离心, 取上清液用于 HPLC 测定。采用 TOSOH TSK-GEL 反相色谱柱, 50 mmol/L K₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲溶液为流动相, 柱温 35°C, 流速 1 mL/min, 紫外检测, 检测波长 210 nm。由四氢嘧啶标准品(纯度 > 97%, 德国 BIOMOL 公司)确定出峰时间。

核磁共振(NMR)测定方法: 用于 HPLC 测定的样品, 减压蒸发浓缩, 重新悬浮于重水(D₂O)中, 用于 NMR 测量^[14]。NMR 测定在核磁共振波谱仪(Varian INOVA 400 M, Varian 公司, 美国)上进行, 四甲基硅烷(TMS)为内标物, 400 MHz 下记录 ¹³C-NMR 波谱。测定样品与文献[1]报道的四氢嘧啶的 ¹³C-NMR 波谱的化学位移值比较鉴定。

1.5 细胞干重的测定

取发酵液, 4°C、12000 r/min 离心 15 min, 菌体用含有 NaCl 的 K₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲溶液(100 mmol/L, pH 7.0, NaCl 浓度与培养基浓度相同)洗涤, 离心后沉淀 90°C 烘干至恒重, 称量。

1.6 发酵罐分批发酵

10 L 发酵罐中培养基装量 4.5 L, 接种量 5%, 恒定 pH 7.0, 恒温 30°C, 保持溶解氧水平在 20% 以上, 添加消泡剂泡敌(0.015%, 中国旅顺化工厂)避免起泡。

1.7 “细菌挤奶”工艺制备四氢嘧啶

H. venusta DSM4743 在 1.5 mol/L NaCl 的 MG 培养基中培养 48 h, 发酵液于 4°C、12000 r/min 离心 15 min, 离心收集的菌体重新悬浮于等体积的纯水中, 20°C 静置 15 min, 释放四氢嘧啶。再次离心收集的菌体被重新悬浮于新鲜的 MG 培养基(1.5 mol/L NaCl)中, 继续培养 24 h 后进行低渗冲击。重复上述的循环。

2 结果

2.1 *H. venusta* DSM4743 在 NaCl 诱导下合成四氢嘧啶

菌株 *H. venusta* DSM4743 在含 1.5 mol/L NaCl 的 MG 培养基中三角瓶摇瓶培养, 取 36 h 的发酵液, 按方法“1.4”进行 HPLC 测定, 呈现四氢嘧啶特征峰。同时按方法“1.4”进行四氢嘧啶的 NMR 鉴定, 结果见图 1(特征波谱用 C-1、C-2、C-3、C-4、C-5、C-6 标记), 被检测样品的 ¹³C-NMR 波谱图与文献[1]中四氢嘧啶的谱图一致, 表明 *H. venusta* DSM4743 在 NaCl 诱导下合成四氢嘧啶。

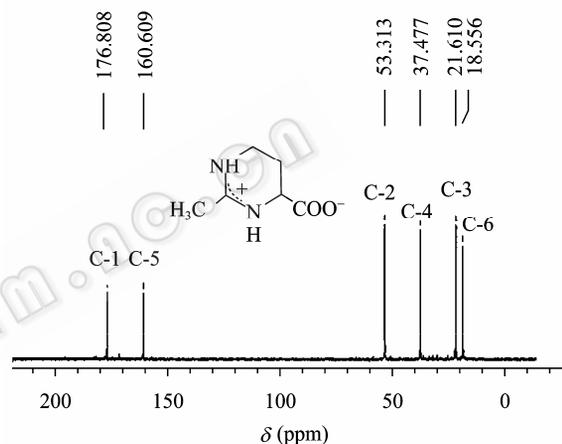


图 1 *H. venusta* DSM4743 合成四氢嘧啶 NMR 鉴定
Fig. 1 NMR spectra of synthesized Ectoine by *H. venusta* DSM4743

2.2 培养基成分对四氢嘧啶合成的影响

2.2.1 不同碳源对四氢嘧啶合成的影响: 采用 10 L 发酵罐分批发酵, 分别考察了培养基 MM63、MG 和 MGG 对四氢嘧啶合成的影响, 结果见图 2 和表 1。这 3 种培养基中的碳源分别是葡萄糖、谷氨酸单钠和葡萄糖与谷氨酸单的钠混合物。MG 培养基有最高的四氢嘧啶合成量(3.2 g/L)、最高的单位细胞四氢嘧啶合成量(0.2 g/g)、最高的底物转化率(0.093 g/g)。以谷氨酸单钠为唯一碳氮源的 MG 培养基有利于 *H. venusta* DSM4743 合成四氢嘧啶, 为优化的培养基。从表 1 还可看出, 葡萄糖为碳源的 MM63 培养基, 细胞干重最大(32.6 g/L); 葡萄糖和谷氨酸单钠混合碳源的培养基 MGG, 达到细胞干重最大值和四氢嘧啶最大合成量的时间较快(26 h)。

表 1 碳源对四氢嘧啶合成的影响
Table 1 Effect of carbon source medium on synthesized Ectoin

	MM63 培养基 MM63 medium	MGG 培养基 MGG medium	MG 培养基 MG medium
最大细胞干重 Maximum of cell dry weight (g/L)	32.6 (28 h)	22.6 (26 h)	18.6 (28 h)
最大四氢嘧啶合成量 Maximum of synthesized Ectoine (g/L)	2.2 (28 h)	3.1 (26 h)	3.2 (28 h)
单位细胞四氢嘧啶合成量 The amount of Ectoine synthesized by per gram cell dry weight (g/g)	0.1	0.1	0.2
四氢嘧啶合成效率 The productivity of synthesized Ectoine [g/(L·d)]	1.9	2.8	2.7
转化率 The conversion rate of Ectoine on substrate (g/g)	0.045	0.07	0.093

注: 培养基的 NaCl 浓度为 1.5 mol/L; 括号中的数据为达到最大细胞干重和达到最大四氢嘧啶合成量的培养时间(h).

Note: The NaCl concentration was 1.5 mol/L on MG medium. The culture time were marked with brackets when the maximum cell dry weight and the maximum amount of Ectoine were reached and the unit was hour (h).

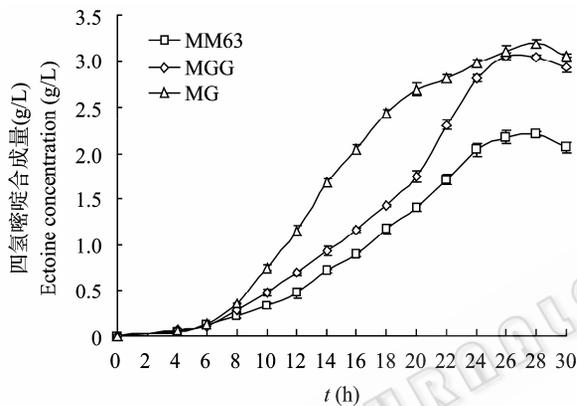


图 2 碳源对 *H. venusta* DSM4743 四氢嘧啶合成的影响
Fig. 2 The influence of carbon source medium on synthesized Ectoine of *H. venusta* DSM4743

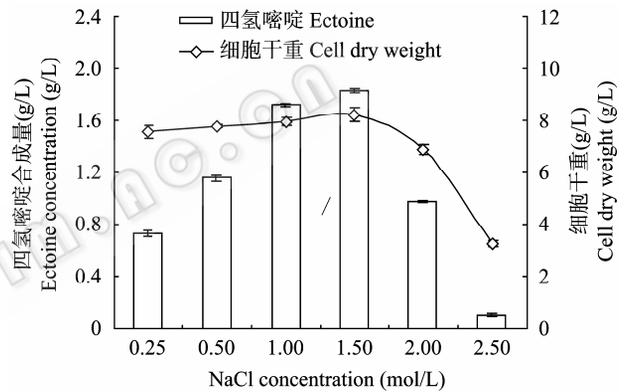


图 3 NaCl 浓度对 *H. venusta* DSM4743 四氢嘧啶合成的影响
Fig. 3 The influence of NaCl concentrations on synthesized Ectoine of *H. venusta* DSM4743

2.2.2 NaCl 浓度对四氢嘧啶合成的影响: 调整 MG 培养基中的 NaCl 浓度分别为 0.25、0.50、1.00、1.50、2.00、2.50 mol/L, 三角瓶摇瓶培养 48 h, 测定不同 NaCl 浓度诱导合成的四氢嘧啶产量, 结果见图 3。当培养基中 NaCl 浓度为 1.50 mol/L 时, 细胞干重及四氢嘧啶合成量均为最高, 分别为 8.2 g/L 和 1.8 g/L。当 NaCl 浓度超过 2.00 mol/L 时, 细胞生长量降低, 因此四氢嘧啶合成量减少。

2.2.3 酵母膏添加量对四氢嘧啶合成的影响: 以 1.50 mol/L NaCl 的 MG 培养基为基础, 分别添加 0.5%、1%、1.5% 的酵母膏, 三角瓶摇瓶培养 48 h, 考察酵母膏添加量对四氢嘧啶合成的影响, 结果见图 4。细胞生长量随酵母膏添加量的增加而显著增加, 然而 0.5% 的酵母膏添加量最有利于四氢嘧啶的合

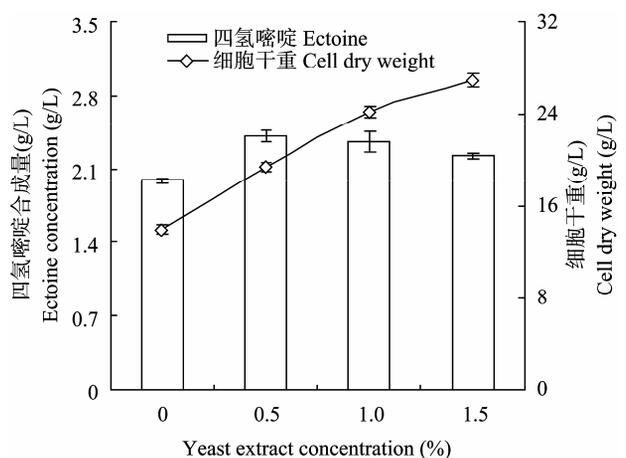


图 4 酵母膏添加量对 *H. venusta* DSM4743 四氢嘧啶合成的影响
Fig. 4 The influence of yeast extract concentrations on synthesized Ectoine of *H. venusta* DSM4743

成, 四氢嘧啶合成量为 2.4 g/L; 较未添加酵母膏的四氢嘧啶合成量提高了 31.7%。而当酵母膏添加量高于 1%时, 四氢嘧啶合成量减少。

2.3 优化条件下四氢嘧啶发酵进程

在 10 L 发酵罐中考察优化条件下四氢嘧啶发酵进程, 结果如图 5 所示。菌株 *H. venusta* DSM4743 经 6 h 延迟期, 进入对数生长期, 26 h 达到平衡期, 30 h 平衡期结束。细胞干重最大值为 18.6 g/L。四氢嘧啶合成量随细胞生长进程而增加, 在达到最大细胞干重时四氢嘧啶合成量达到最大值为 3.2 g/L, 单位细胞四氢嘧啶的合成量为 0.2 g/g; 四氢嘧啶合成效率 2.7 g/(L·d)。

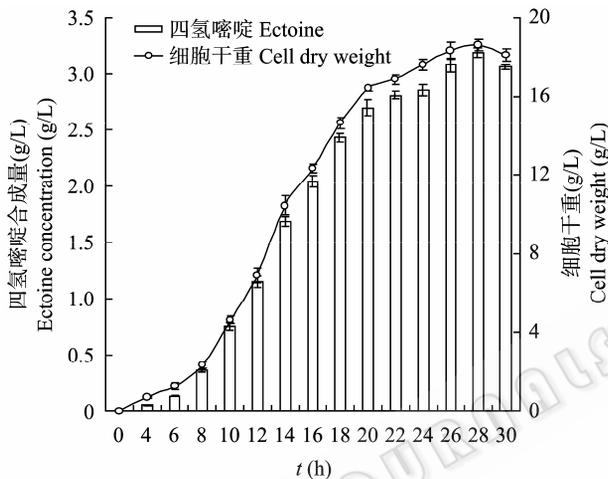


图 5 *H. venusta* DSM4743 四氢嘧啶发酵进程

Fig. 5 Time course of *H. venusta* DSM4743 batch fermentation with synthesized Ectoine

2.4 “细菌挤奶”工艺制备四氢嘧啶

在高渗透压胁迫下 *H. venusta* DSM4743 发酵合成四氢嘧啶(培养 48 h, 四氢嘧啶合成量为 2.3 g/L), 当细胞受低渗透压冲击时, 会快速释放胞内的四氢嘧啶, 释放率约为 94.6%。当细胞重悬至高渗透压的培养基后, 能够重新合成四氢嘧啶。*H. venusta* DSM4743 具备了“细菌挤奶”工艺制备四氢嘧啶的条件。按方法“2.7”利用 *H. venusta* DSM4743 “细菌挤奶”工艺制备四氢嘧啶, 结果见图 6。共进行了 6 次渗透压冲击循环, 1.5 mol/L NaCl 高渗透冲击下, *H. venusta* DSM4743 四氢嘧啶的平均合成量为 2.5 g/L; 低渗透压冲击, 四氢嘧啶平均释放量为 2.4 g/L。6 个循环后四氢嘧啶总合成量为 14.7 g/L, 总释放量为 14.3 g/L, 平均释放率为 97%, 合成效率 2.1 g/(L·d)。

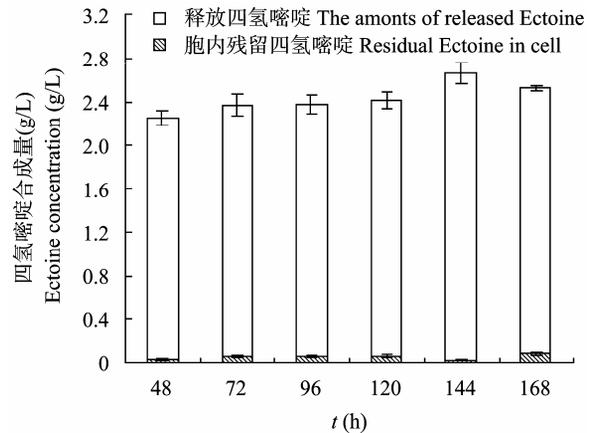


图 6 *H. venusta* DSM4743“细菌挤奶”工艺中四氢嘧啶的合成与释放

Fig. 6 Synthesis and release of Ectoine with “bacterial milking” of *H. venusta* DSM4743

3 讨论

本文首次报道菌株 *H. venusta* DSM4743 能够在 NaCl 诱导下合成四氢嘧啶。该菌株生长最适 NaCl 浓度较高及单位质量细胞四氢嘧啶合成量较高, 因此四氢嘧啶合成量较高。在优化条件下 10 L 发酵罐发酵, 最大细胞干重为 18.6 g/L, 单位质量细胞四氢嘧啶合成量为 0.2 g/g, 四氢嘧啶最大量为 3.2 g/L, 合成效率为 2.7 g/(L·d), 为目前文献报道的较高水平。*H. venusta* DSM4743“细菌挤奶”工艺制备四氢嘧啶, 四氢嘧啶总合成量为 14.7 g/L, 总释放量为 14.3 g/L, 合成效率 2.1 g/(L·d)。

不同碳源对四氢嘧啶合成的影响与四氢嘧啶的合成途径与合成反应有关。四氢嘧啶的合成途径是草酰乙酸经过天冬氨酸、天冬氨酸-β-磷酸、天冬氨酸-β-半醛、L-2,4-二氨基丁酸、N γ -乙酰-2,4-二氨基丁酸, 而后转变为四氢嘧啶^[15-17]。其中草酰乙酸转变为天冬氨酸的反应和天冬氨酸-β-半醛转变为 L-2,4-二氨基丁酸的反应, 均需要谷氨酸脱氨提供氨基。其中当以葡萄糖为唯一碳源时, 葡萄糖经过 HMP 途径和 EMP 途径生成能量、进入三羧酸循环, 因而有利于细胞生长; 当以谷氨酸单钠为唯一碳源时, 谷氨酸通过脱氨基生成 α -酮戊二酸后进入三羧酸循环, 然后经过若干步骤转化为草酰乙酸。其中还需经过糖异生途径形成糖原, 以满足生长代谢需求。因此, 谷氨酸单钠为碳源的 MG 培养基, 其细胞生长量显著少于葡萄糖为碳源的 MM63 培养基;

但是, MG 培养基中的谷氨酸单钠为四氢嘧啶合成途径中的草酰乙酸转变为天冬氨酸的反应和天冬氨酸- β -半醛转变为 L-2,4-二氨基丁酸的反应, 提供了丰富的氨基, 因此, 四氢嘧啶合成量高。葡萄糖与谷氨酸单钠混合的 MGG 培养基, 较单纯的谷氨酸单钠为碳源的 MG 培养基, 提高了细胞生长量和生长速度, 四氢嘧啶合成量也比较高, 预示着以 MM63 为基础培养基、进行谷氨酸单钠补料发酵, 具有提高四氢嘧啶合成量和合成效率的可能性。

已报道的四氢嘧啶发酵罐分批(非补料)发酵研究中, Annelies E. Onraedt 等人利用 *Brevibacterium epidermis* DSM 20659 菌, 合成效率为 1.1 g/(L·d)^[12]。Thomas Sauer 人报道的 *Halomonas elongata* DSM 142^{Tc}“细菌挤奶”工艺中, 其“细菌挤奶”前的指数流加分批发酵工艺阶段, 四氢嘧啶合成效率为 1.1 g/(L·d)^[8]。何健等报道了以四氢嘧啶为主要相容性溶质的中度嗜盐菌 I15 的分离和特性, 低渗冲击时该菌株能够快速释放四氢嘧啶到细胞外, 释放量为 1.608 mmol/g CDW, 约占总合成量的 70%^[18]。姜蔚宇报道的 *Halomonas salina* TA-4 经 15% NaCl 培养基培养合成四氢嘧啶 60.3 mg/g CDW, 离子水中进行低渗冲击 40 min 后, 释放四氢嘧啶 57.3 mg/g CDW, 为总合成量的 95%, 细胞存活率 88.9%^[19]。上述两个报道, 表明了中度嗜盐菌 I15 和 *Halomonas salina* TA-4 具备了“细菌挤奶工艺”制备四氢嘧啶的基本条件。

本文报道的 *H. venusta* DSM4743 四氢嘧啶挤奶工艺有如下特点: (1) 四氢嘧啶合成效率较高 [2.7 g/(L·d)], 每个循环中四氢嘧啶合成量较高, 平均为 2.5 g/L (1.956 mmol/g CDW, 277.8 mg/g CDW)。(2) 四氢嘧啶释放率高(97%); Thomas Sauer 等人的 *Halomonas elongata* DSM 142^{Tc}“细菌挤奶”研究, 四氢嘧啶释放率仅为 60%; Nagata 等人研究了 *Brevibacterium* sp. JCM 6894 的“细菌挤奶”工艺, 四氢嘧啶平均释放率为 48.9%^[14]; 何健等报道的中度嗜盐菌 I15 低渗冲击释放率约 70%^[18]。(3) 耐受低渗透压冲击, 在纯水中释放四氢嘧啶后, 重新悬浮于 1.5 mol/L NaCl 的培养基中, 即低渗透压冲击后恢复到高渗透压培养基中, *H. venusta* DSM4743 仍能高效合成四氢嘧啶, 前 5 次循环中, 四氢嘧啶合成量依次有所提高; Thomas Sauer 等人的研究, 为

了保持必要的存活率, 在 3% NaCl 溶液中释放四氢嘧啶, 其释放率显著降低(约 60%)^[8]。*H. venusta* DSM4743 用于“细菌挤奶”具有显著的综合优势。

参 考 文 献

- [1] Galinski EA, Pfeiffer HP, Trüper HG. 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid a novel cyclic amino acid from halophilic phototrophic bacteria of the genus *Ectothiorhodospira*. *Eur J Biochem*, 1985(149): 135-139.
- [2] Lippert K, Galinski EA. Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Appl Microbial Biotechnol*, 1992, 37(1): 61-65.
- [3] Kanapathipillai M, Lentzen G, Sierks M, et al. Ectoine and hydroxyectoine inhibit aggregation and neurotoxicity of Alzheimer's β -amyloid. *FEBS Lett*, 2005(579): 4775-4780.
- [4] Ventosa A, Nieto JJ, Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998(62): 504-544.
- [5] Zhang LH, Wang Y, Zhang CY, et al. Supplementation effect of ectoine on thermostability of phytase. *J Biosci Bioeng*, 2006(102): 560-563.
- [6] Ventosa A, Nieto JJ. Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. *World J Microbiol Biotech*, 1995(11): 85-94.
- [7] Lentzen G, Schwarz T. Extremolytes: natural compounds from extremophiles for versatile applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006(72): 623-634.
- [8] Thomas Sauer, Erwin A Galinski. Bacterial milking: a novel bioprocess for production of compatible solutes. *Biotechnology and Bioengineering*, 1998, 57(3): 306-313.
- [9] Galinski EA, Trüper HG. Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, 1994, 15(2/3): 95-108.
- [10] Frings E, Kunte HJ, Galinski EA. Compatible solutes in representatives of the genera *Brevibacterium* and *Corynebacterium*: occurrence of tetrahydropyrimidines and glutamine. *FEMS Microbiology Letters*, 1993, 109(1): 25-32.
- [11] Severin J, Wohlfarth A, Galinski EA. The predominant role of recently discovered tetrahydropyrimidines for the osmoadaptation of halophilic eubacteria. *Journal of General Microbiology*, 1992, 138(8): 1629-1638.
- [12] Annelies E Onraedt, Bart A Walcarus, Wim K Soetaert, et al. Optimization of ectoine synthesis through fed-batch fermentation of *Brevibacterium epidermis*. *Biotechnol Prog*, 2005, 21(4): 1206-1212.
- [13] Grammann K, Volke A, Kunte HJ. New type of osmo-regulated solute transporter identified in halophilic members of the bacteria domain: TRAP-transporter TeaABC

- mediates the uptake of ectoine and hydroxyectoine in *Halomonas elongata* DSM 2581^T. *J Bacteriol*, 2002(184): 3078–3085.
- [14] Shinichi Nagata, Yaoqiang Wang, Akinobu Oshima, *et al.* Efficient cyclic system to yield ectoine using *Brevibacterium* sp. JCM 6894 subjected to osmotic downshock. *Biotechnology and Bioengineering*, 2008, **99**(4): 941–948.
- [15] M Isabel Calderon, Carmen Vargas, Fernando Rojo, *et al.* Complex regulation of the synthesis of the compatible solute ectoine in the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens* DSM3043^T. *Microbiology*, 2004(150): 3051–3063.
- [16] Cánovas D, Borges N, Vargas C, *et al.* Role of *N*_γ-acetyldiaminobutyrate as an enzyme stabilizer and an intermediate in the biosynthesis of hydroxyectoine. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, **65**(9): 3777–3779.
- [17] Petra louis, Erwin A Galinski. Characterization of genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine from *Marinococcus halophilus* and osmoregulated expression in *E. coli*. *Microbiology*, 1997(143): 1141–1149.
- [18] 何健, 汪婷, 孙纪全, 等. 以四氢嘧啶为主要相容性溶质的中度嗜盐菌 I15 的分离和特性研究. *微生物学报*, 2005, **45**(6): 900–904.
- [19] 姜蔚宇. 中度嗜盐菌 *Halomonas* sp. TA-4 产四氢嘧啶发酵条件的优化及四氢嘧啶生物学功能初探. 厦门大学硕士学位论文, 2007.

JOURNALS.IM.AC.CN