

· 综述 ·

## 相容溶质四氢嘧啶的微生物合成研究进展

张鑫, 舒志万, 李永臻, 邢江娃, 王嵘, 沈国平, 朱德锐

青海大学医学院 基础医学研究中心, 青海 西宁 810016

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. 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. Chin J Biotech, 2022, 38(3): 868-881.

**摘要:** 四氢嘧啶 (ectoine) 作为一种氨基酸的衍生物, 是嗜盐微生物胞内重要的天然次级代谢物, 具有保护细胞和稳定生物大分子的功能, 可广泛应用于药物制备佐剂、器官移植与保存、皮肤创伤修复与新型化妆品研发等生物医学领域。由于四氢嘧啶的医用价值和商业市场需求, 文中从野生菌株的筛选与诱变育种、构建基因工程菌株与系统代谢整合工程菌株、四氢嘧啶的优化发酵与生产工艺以及抽提纯化工工艺等方面, 系统论述了四氢嘧啶高效积聚和过量化生产研究策略, 并展望多组学、计算生物学及“细胞工厂”等技术在后续四氢嘧啶高效生产上的应用前景。

**关键词:** 四氢嘧啶; 紫外诱变; 基因工程; 系统代谢; 分批发酵

## Advances in the microbial production of the compatible solute ectoine: a review

ZHANG Xin, SHU Zhiwan, LI Yongzhen, XING Jiangwa, WANG Rong, SHEN Guoping, ZHU Derui

Research Center of Basic Medical Science, Medical College of Qinghai University, Xining 810016, Qinghai, China

**Abstract:** Ectoine is an amino acid derivative and an important natural product in halophilic

**Received:** May 20, 2021; **Accepted:** November 11, 2021; **Published online:** February 10, 2022

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (31860030, 21967018); Key Research Foundation of Development and Transformation of Qinghai Province, China (2019SF121); Basic Applied Research Plan of Qinghai Province, China (2020ZJ767); Team's Research Program of Microbial Resources in Salt-lakes of Qinghai-Tibetan Plateau, China (2018KYT1)

**Corresponding author:** ZHU Derui. E-mail: zhuderui2005@126.com

**基金项目:** 国家自然科学基金 (31860030, 21967018); 青海省重点研发与转化计划 (2019SF121); 青海省基础应用研究计划 (2020ZJ767); 高原特色盐湖生物资源的集成研发与转化团队计划 (2018KYT1)

microorganisms. It plays an important role in protecting cells and stabilizing biological macromolecules, and can be widely used in biomedical fields such as drug preparation adjuvants, organ transplantation and preservation, skin wound repair and cosmetics. Due to the medical value and commercial market demand of ectoine, this article summarized the recent advances in the microbial production of ectoine, including the mutation and breeding of hyper-producing strains, construction of genetically and metabolically engineered strains, optimization of fermentation processes, and extraction and purification processes. The application of multi-omics technologies and computational biology to develop an ectoine producing cell factory was prospected, with the aim to provide a reference for ectoine overproduction.

**Keywords:** ectoine; UV mutagenesis; genetic engineering; system metabolism; batch fermentation

相容溶质四氢嘧啶 (Ectoine, 1,4,5,6-tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid), 作为细胞保护剂和稳定剂, 在中度嗜盐菌或耐盐菌胞内大量积聚, 可抵抗高渗透压的冲击, 是嗜盐微生物或耐盐微生物适应高盐或超盐环境的一种应对策略<sup>[1]</sup>。Ectoine 分子量为 142.16, 极具亲水性, 属于两性离子特征的有机小分子 (图 1)。诸多研究表明: Ectoine 通过协助细胞胞内外的渗透压平衡, 提高脂膜表面的水合作用, 增强脂膜流态化, 维持蛋白质和核酸结构, 提高细胞承受极端环境的能力, 从而抵抗冷冻、高温、高盐、高压、干旱和辐射等各种逆境因素的影响<sup>[2]</sup>。近年来, Ectoine 作为嗜盐微生物重要的次级代谢产物, 国外研究者已将其广泛应用于消化道疾病、干眼综合征、鼻炎、过敏性鼻炎、器官移植与脏器保存、皮肤创伤与保健美容等生物医学领域, 其开发诸如消化道药物、滴眼液、鼻喷剂、呼吸道渗

透剂、皮肤创伤药以及新型生物化妆品等产品, 成为生物制剂研发的热点<sup>[3]</sup>。

Ectoine 化学结构中存在手性碳原子结构, 化学合成 Ectoine 具有一定难度, 且工业高能耗, 具有潜在的环境污染风险。目前, 工业生产 Ectoine 多采用积聚菌株发酵分离获得, 促进了优良工业化菌株的筛选、过量化生产菌株的改造、基因工程菌株以及系统代谢工程菌株的构建等相关研究。通常从自然界直接筛选获得的野生菌株, 其产物积聚能力有限, 无法满足实际的生产需要。同时, 利用野生菌株生产 Ectoine 的成本趋高, 以致 Ectoine 的高积聚生产难以实现。国内外研究人员积极开展 Ectoine 过量化生产的策略研究, 如发酵工程法、酶催化反应法、基因工程或系统代谢工程 (碳/氮代谢流) 等, 可在一定程度上提高 Ectoine 的产量。本文系统阐述了 Ectoine 高效积聚和过量化生产的主要策略, 主要涉及野生菌株的筛选与诱变育种、基因工程菌构建 (以合成基因簇 *ectABC* 或 *ectABCD-ask* 为主)、系统代谢工程菌构建 (涉及碳/氮代谢流的基因整合或基因敲除)、发酵工程优化 (批式发酵、补料批式发酵或细菌挤奶等) 以及抽提与纯化工艺, 可为后续合成生物学在 Ectoine 的高效积聚, 或过量化生产的实际应用提供理论参考依据。

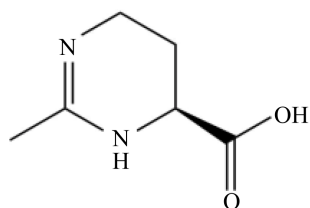


图 1 Ectoine 的分子结构<sup>[2]</sup>

Figure 1 Molecular structure of ectoine<sup>[2]</sup>.

## 1 野生菌株筛选与分离

耐盐或嗜盐细菌、古菌、放线菌以及真菌等微生物胞内均可积聚 Ectoine, 具有 Ectoine 工业生产的潜力。自然盐环境分离获得的野生细菌菌株是 Ectoine 积聚生产的主要类群, 如隶属于变形菌门 (Proteobacteria, 比例为 61.2%) 中的盐红螺菌属 (*Halorhodospira*)、色盐杆菌属 (*Chromohalobacter*)、盐单胞菌属 (*Halomonas*)、肠弧菌属 (*Enterovibrio*) 和嗜碱菌属 (*Alcanivorax*) 等; 厚壁菌门 (Firmicutes, 比例为 23.9%) 中的嗜盐海球菌属 (*Marinococcus*)、盐水球菌属 (*Salinicoccus*)、碱球菌属 (*Alkalicoccus*) 和芽孢杆菌属 (*Bacillus*); 螺旋体门 (Spirochaetes, 比例为 1.5%) 中的螺旋碱藻属 (*Spirochaetaalkalica*); 脱铁杆菌门 (Deferribacteres, 比例为 1.5%) 中的嗜热菌属 (*Flexistipes*); 放线菌门 (Actinobacteria, 比例为 11.2%) 中的链霉菌属 (*Streptomyces*)、拟诺卡氏菌属 (*Nocardiopsis*) 和嗜盐糖霉菌属 (*Haloglycomyces*) 等。此外, 古菌中的亚硝化细菌属 (*Nitrosopumilus*)、甲烷丝菌属 (*Methanotrix*) 和甲烷杆菌属 (*Methanobacterium*); 耐盐真菌中的黑曲霉菌 (*Aspergillus montevicensis*) 亦可积聚 Ectoine。然而, 从已知的嗜盐光合细菌到化学异养细菌等嗜盐/耐盐微生物之中, 因生物合成代谢途径、基因组多元化及代谢调控方式的差异, 不同菌株的 Ectoine 积聚量存在明显差异<sup>[4]</sup>。

目前, 广泛应用于 Ectoine 工业规模生产的模式菌株主要集中在  $\gamma$ -变形菌纲盐单胞菌科 (Halomonadaceae), 尤以盐单胞菌属 (*Halomonas*) 和色盐杆菌属 (*Chromohalobacter*) 居多 (表 1), 其典型代表有延长盐单胞菌 *H. elongata* DSM2581<sup>T</sup> 与需盐色盐杆菌 *C. salexigens* DSM3043<sup>T[5-7]</sup>。截至 2021 年 9 月,

LPSN 数据库 (<http://www.bacterio.net/halomonas.html>) 收录盐单胞菌属共计 151 个种, 成为种数最多的嗜盐菌属群之一, 均可积聚 Ectoine。为了筛选获得高产 Ectoine 的野生菌株, 笔者实验室曾在青海湖、小/大柴旦湖、察尔汗盐场、柯柯盐湖和茶卡盐湖进行菌株资源挖掘, 获得 Ectoine 积聚野生菌株 *Halomonas* (26 株/7 个种) 和 *Bacillus* (42 株/6 个种), 但野生菌株的 Ectoine 产量有限 (0.03–0.27 g/L), 其中野生菌株 *H. campaniensis* XH26 通过优化发酵底物条件后 (L-谷氨酸钠 35 mmol/L、酶水解酪素 7.5 g/L, Na<sup>+</sup> 1.0 mol/L、Mg<sup>2+</sup> 0.1 mol/L、K<sup>+</sup> 0.75 mol/L, 接种量 1%, 装液量 40%, 发酵时间 24 h, 发酵 pH 8.0 以及温度 35 °C), 单次摇瓶发酵的 Ectoine 产量达 0.49 g/L<sup>[8]</sup>。建议后续野生菌株筛选原则: 优先考虑以咸水湖或中盐盐湖 (盐度 150 g/L) 为研究对象, 目标菌株应具备增殖传代快 ( $\leq 2$  h)、Ectoine 原始积聚量大 ( $\geq 0.50$  g/L) 和生长适应盐度宽泛 (0–3 mol/L NaCl) 等特点。

## 2 积聚菌株诱变育种

通常, 野生菌株胞内 Ectoine 的积聚量偏低 ( $< 0.4$  g/L), 且自然突变率低, 无法实现 Ectoine 的高积聚和产量突破。基于诱变育种技术使菌株发生基因突变, 继而筛选正向突变菌株, 可有效提高 Ectoine 的积聚量。目前, 常用的诱变方法主要包括物理诱变 (如紫外线、x 射线、微波、复合磁场和高能电子流等)、化学诱变 (硫酸二乙酯、亚硝酸、金属盐氯化锂或硫酸锰类等) 以及生物诱变 (如噬菌体或基因重组交换等)。紫外诱变 (UV mutagenesis) 是一种经典的物理诱变方法, 利用紫外线照射引起细菌核酸序列改变, 导致菌株发生基因突变 (嘧啶二聚体), 从而有效地提高菌株产量。王冠凤等<sup>[25]</sup>采用 UV 和亚硝基胍复合诱变处理盐单胞菌

表 1 不同微生物生产四氢嘧啶概览

Table 1 Production of ectoine by different microbial strains

Genus	Strain	NaCl (mol/L)	Ectoine (g/L)	Carbon and nitrogen sources	Fermentation method	References
	<i>H. campaniensis</i> XH26	1.02	0.49	Glutamate+yeast extract	Shake flasks	[8]
	<i>Halomonas</i> sp. SL07	0.50	0.16	Glucose	Shake flasks	[9]
	<i>H. salina</i> DSM 5928 <sup>T</sup>	1.00	6.90	Glucose	Batch fermentation	[10]
	<i>H. salina</i> BCRC17875	2.00	9.20	Glutamate+yeast extract	Fed-batch fermentation	[11]
<i>Halomonas</i>	<i>H. venusta</i> ZH	1.50	0.32	Glucose	Shake flasks	[12]
	<i>H. elongate</i> 1A01717	0.50	15.90	NH <sub>4</sub> Cl+glucose+yeast extract	Fed-batch fermentation	[13]
	<i>Halomonas</i> sp. W2	1.00	0.06	Glucose	Single fermentation	[14]
<i>Bacillus</i>	<i>B. strain</i> YTM-5	1.00	0.21	Yeast extract	Shake flasks	[15]
	<i>B. alkalophilus</i> DSM485 <sup>T</sup>	1.00	0.34	Glutamate	Shake flasks	[16]
	<i>B. pasteurii</i> DSM33 <sup>T</sup>	1.00	0.59	Yeast extract	Shake flasks	[17]
<i>Corynebacterium</i>	<i>C. glutamicum</i> LYS-1	0.50	4.50	Glucose	Batch fermentation	[18]
	<i>C. glutamicum</i> LYS-1	0.50	6.70	Glucose+glutamate	Batch fermentation	[18]
<i>Chromohalobacter</i>	<i>C. salexigens</i> DSM 3043 <sup>T</sup>	1.50	0.16	Glucose	Batch fermentation	[19]
<i>Methylobacterium</i>	<i>M. alcaliphilum</i> 20Z	1.00	0.04	Yeast extract	Single fermentation	[20]
<i>Marinococcus</i>	<i>M. halophilus</i> MAR2	2.00	3.50	Yeast extract	Batch fermentation	[21]
	<i>M. halophilus</i> DSM20408 <sup>T</sup>	2.50	0.36	Yeast extract	Shake flasks	[22]
<i>Streptomyces</i>	<i>S. pactum</i> Act12	0.42	0.07	Soy peptone	Shake flasks	[23]
	<i>S. mutabilis</i> TRM45540	0.85	0.15	Peptone	Shake flasks	[24]

*H. neptunia* BAA-805, 突变菌株经补料发酵, Ectoine 的产量达到 1.8 g/L, 较原始菌株产量提高 53.8%。田磊等<sup>[8]</sup>利用紫外诱变处理盐单胞菌 *H. campaniensis* sp. XH26, 经过 6 轮循环紫外诱变, 获得高产菌株 3 株, 经单批次摇瓶发酵 Ectoine 的产量达到 1.35 g/L, 与原始菌株相比, 产量增加了 290%。汤佳鹏等<sup>[26]</sup>用 UV-硫酸乙酯复合诱变处理蛹虫草 (*Cordyceps militaris*) CICC14014 菌株, 并用 96 孔板筛选高产菌株, 经过 20 次传代培养获得稳定突变菌株, 经补料发酵 Ectoine 的产量达到 11.32 g/L, 较原始菌株提高 108%。由此表明, 野生菌株对紫外诱变因素比较敏感, 且易获得突变株, 可快速提高 Ectoine 的产量。近年来, 物理诱变还多采用常压室温等离子体技术 (atmospheric room temperature plasma, ARTP), 即利用均匀分布的高浓度中性

活性粒子直接改变核苷酸分子结构, 或利用细胞损伤后启动 DNA 修复机制 (SOS 修复机制), 进而造成遗传物质及代谢途径的改变<sup>[27]</sup>。ARTP 技术现已应用于氨基酸生产菌株诱变(如精氨酸 Arg 和色氨酸 Trp), 可以避免出现其他育种方法引起的菌株易死、易衰和易变异等退化现象, 同时改善微生物菌种对有毒物质的耐受性、抑菌性和抗药性, 但涉及 Ectoine 积聚菌株的 ARTP 诱变应用, 尚未见相关报道。

为了探究突变菌株的 Ectoine 积聚量极限值, 笔者团队以盐单胞菌 *H. campaniensis* sp. XH26 为研究对象, 实施 9 轮紫外循环诱变 (即积聚量最高的菌株再实施紫外诱变), 获得突变菌株 M<sub>9</sub>-72 的 Ectoine 产量最高为 2.22 g/L (单次摇瓶培养 36 h)<sup>[8]</sup>。同时, 分析野生菌株和突变菌株的基因组学差异, 发现紫外诱变导致

30 多个基因突变 (如 *cvfB*、*rpsD*、*yoeB*、*metxA*、*RPD-2948*、*murG*、*hslR*、*ectT*、*moeA*、*hmuV* 及 *paaD* 等), 主要涉及膜蛋白结合位点、16S rRNA 甲基转移酶、氨基酸转氨酶 (鸟氨酸/丝氨酸)、ABC 转运体渗透酶 (如甘氨酸甜菜碱、支链氨基酸、ATP 结合蛋白 C<sub>4</sub>-二羧基)、基因转录调节因子 (Arac) 和丙酮酸氧化还原酶等。但野生菌株与紫外突变菌株 Ectoine 积聚量爆发的分子机制, 正在进行系列基因敲除验证。随着紫外诱变次数的增加, 菌株常会出现生长迟缓、菌落形态改变、遗传稳定性差 (回复突变) 或产量波动变化较大等问题。后续的相关研究, 可设计采用不同类型的诱变方法或各类方法联用进行复合诱变, 如 ARTP 物理诱变育种、化学诱变剂育种、物理诱变 (UV+ARTP) 联用或物理 (UV)+化学诱变 (如氯化锂/亚硝酸钠) 复合联用; 同时, 实施多轮循环诱变, 获得遗传稳定的突变菌体, 以期达到 Ectoine 的高效积聚。

### 3 基因工程菌株的构建

#### 3.1 基因簇重组与异源表达

基因工程菌是利用分子克隆技术进行基因编辑、基因簇整合或基因重组, 从而获得的高产

工程菌株, 该技术应用广泛<sup>[28]</sup>。Ectoine 的生物合成依赖连锁基因簇 (*ectABC* 或 *ectABCD-ask* 操纵子) 编码系列催化酶类, 以天冬氨酸半醛为底物合成; 而分解代谢途径受外部渗透压调节, 由基因簇 *doeABCD* 编码系列水解酶类进行分解<sup>[29-30]</sup>。目前, 诸多文献报道通过基因克隆技术成功构建重组质粒, 可在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 或谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 中异源表达基因簇 *ectABC* 或 *ectABCD-ask* (表 2) 以积聚生产 Ectoine。同时, 研究表明在结构基因 *ectA* 和 *ectC* 上游存在转录起始点, 转录因子有  $\delta^{70}$ 、 $\delta^{38}$  和  $\delta^{54}$ , 如利用基因编辑技术在结构基因簇前替换或插入强启动子, 可增强基因表达与 Ectoine 的产量<sup>[31]</sup>。

构建重组质粒和异源宿主表达基因簇 *ectABC* 或 *ectABCD-ask*, 可能实现 Ectoine 的产量提升。笔者通过构建重组菌株 *E. coli* BL21/*pET-28a(+)-ectABC* 和 *E. coli* BL21/*pCold(I) DNA-promoter-ectABC*, 实现 Ectoine 合成基因簇 *ectABC* 的过量表达, 相比于空载体菌株 *E. coli* 的耐盐度 (0–0.8 mol/L NaCl), 重组菌株的耐盐能力 (0–1.2 mol/L NaCl) 得到有效提升, 但 Ectoine 的合成量并无显著提高。主要原因可能是: 大肠杆菌 *E. coli* 不具备嗜盐菌的遗

表 2 基因工程菌生产四氢嘧啶

Table 2 Genetically engineered bacteria for ectoine production

Microbial strain	Plasmids and genes	Substrate	Fermentation method	Ectoine (g/L)	References
<i>E. coli</i>	<i>pTrc99a-ectABC</i>	NH <sub>4</sub> Cl+glycerol	Fed-batch culture	4.88	[31]
<i>E. coli</i> K-12	<i>pBAD/hisA-ectABC</i>	Aspartate+glycerol	Whole-cell catalysis	25.10	[32]
<i>E. coli</i> MG1655	<i>pTrc99a-lysA-ectABC</i>	Aspartate+glycerol	Batch fermentation	3.05	[33]
<i>E. coli</i> W3110	<i>pSPE2-lysA-thrA-iclR-ppc-ectABC</i>	Aspartate+glutamate	Whole-cell catalysis	12.00	[34]
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	<i>pASK-IBA3+ectABCD</i>	Aspartate	Fed-batch culture	18.00	[35]
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	<i>pKK232-8-doeA-ectD</i>	Yeast extract	Batch fermentation	1.22	[36]
<i>C. glutamicum</i>	<i>pClik int sacB-ectABCD-lysC</i>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> +glucose	Fed-batch culture	6.70	[37]
<i>C. glutamicum</i>	<i>pWUB01-ectABC</i>	Aspartate+glycerol	Fed-batch culture	23.00	[38]

传背景,高盐刺激下未完全启动 Ectoine 合成所需的上游底物储备,尤其涉及天冬氨酸(或草酰乙酸)转化生成天冬氨酸- $\beta$ -半醛等;盐刺激下 *E. coli* 可能选择合成其他的相容溶质,以替代 Ectoine 行使渗透压抵抗;嗜盐菌基因簇中的渗透压控制启动子  $\delta^{38}$  序列,可能未被 *E. coli* 的相关转录起始因子有效激活<sup>[32]</sup>。为了大幅提高重组菌株的 Ectoine 合成水平,满足实际的生产需求,后续研究可以考虑以下几种策略:(1) 选择 Ectoine 合成基因簇 *ectABC* 或 *ectABCD-ask* 上游区域,重组增加渗透压调节参与的表达调控元件和调节基因,如  $\delta^{38}$ 、 $\rho^s$ 、OmpR 家族或 MarR 型家族转录调节因子等;(2) 探究高效的质粒转化方法,将重组质粒转化至具有嗜盐菌遗传背景(或进化近源属种)的表达宿主,如轻度盐单胞菌或色盐杆菌等,增强目标基因簇的过量表达;(3) 结合计算生物学构建适合的细胞工厂,增强 Ectoine 全局代谢流通路(如谷草转氨酶+*lysC*+*asd*+*ectABC* 重组基因簇),辅以特殊的中间代谢物或前体底物进行发酵(如天冬氨酸钠与谷氨酸钠),提高 Ectoine 生物合成量。

### 3.2 基因缺陷与表达调控

研究表明种属不同的细菌,虽然 Ectoine 合成基因簇均为 *ectABC* 或 *ectABCD-ask*,但启动子的数量和位置却存在一定差异,致使转录调控机制以及盐激条件下的适应性机制存在显著差异。目前,Ectoine 高积聚的流行基因工程策略主要侧重于构建基因缺陷菌株以及调节基因簇的启动子区或靶蛋白编码序列的上游区,以期提高 Ectoine 的产量。如吴雪娇等<sup>[34]</sup>运用 Red 同源重组技术敲除 *C. glutamicum* 菌株苏氨酸、丝氨酸合成的关键基因 *thrA* 与 *iclR*,构建基因缺陷菌株,利用分批补料发酵实现 Ectoine 高产(5.0 g/L)。Zhao 等<sup>[38]</sup>将盐单胞菌 *H. hydrothermalis* Y2 的 *ectA* 上游  $\delta^{70}$  与  $\delta^{38}$  控制

的启动子替代为外膜孔蛋白 E 的启动子  $P_{265}$ ,同时利用基因缺陷菌株 Y2 ( $\Delta ectD/doiA$ ) 和表达载体 *pKK232-8* 构建新的基因工程菌株 Y2/*pKK232-8-ectD+doiA*,并在 60.0 g/L NaCl 的条件下进行分批发酵,Ectoine 产量达 11.5 g/L。Xie 等<sup>[39]</sup>将磷酸烯醇式丙酮酸激酶编码基因的 *ppc* 启动子替换为 *trc* 启动子,并敲除乙醛酸循环控制基因 *iclR* 构建基因缺陷菌株,进行缺陷菌株连续发酵,Ectoine 产量达 12.0–18.0 g/L。Garcia-Aguirre 等<sup>[40]</sup>在 *C. glutamicum* 的 Ectoine 合成基因簇 *ectABC* 的上游区域,随机组合 19 个合成启动子和 3 个单顺反子的连接元件,构建含有 185 193 个突变体的表达文库,筛选获得高产基因工程菌 *C. glutamicum* (*ectABC*<sup>opt</sup>),连续发酵 Ectoine 产量达 65.0 g/L,较原始菌株提高约 5 倍。构建基因缺陷与表达调控菌株,可在短时间内大量积聚 Ectoine,并解决高浓度 NaCl 溶液对发酵设备的腐蚀和发酵废液的环境污染等问题,提高 Ectoine 的生产效率,具有较好的工业应用前景。

利用 KEGG 数据库分析 Ectoine 合成代谢通路(图 2),基于 OptCouple/OptORF 算法筛选合适的关键基因靶点,敲除相关竞争途径的关键基因,或敲除代谢分流途径的节点基因,有可能实现 Ectoine 合成高产。笔者团队研究发现:在低盐度条件下,胞内相容溶质甜菜碱(betaine)的生物合成会抑制 Ectoine 的合成代谢;高盐度时(1.5 mol/L NaCl),Ectoine 的生物合成量趋于最高,但从节点(天冬氨酸- $\beta$ -半缩醛)分流合成 betaine,致使代谢通路流量有所消耗。我们利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除盐单胞菌 *H. campanienseis* XH26 的同型丝氨酸合成基因 *hom*,以去除 betaine 的分支合成干扰,基因缺陷菌株 ( $\Delta hom$ ) Ectoine 合成量的影响效果尚在进行中。为了减少 Ectoine 的合

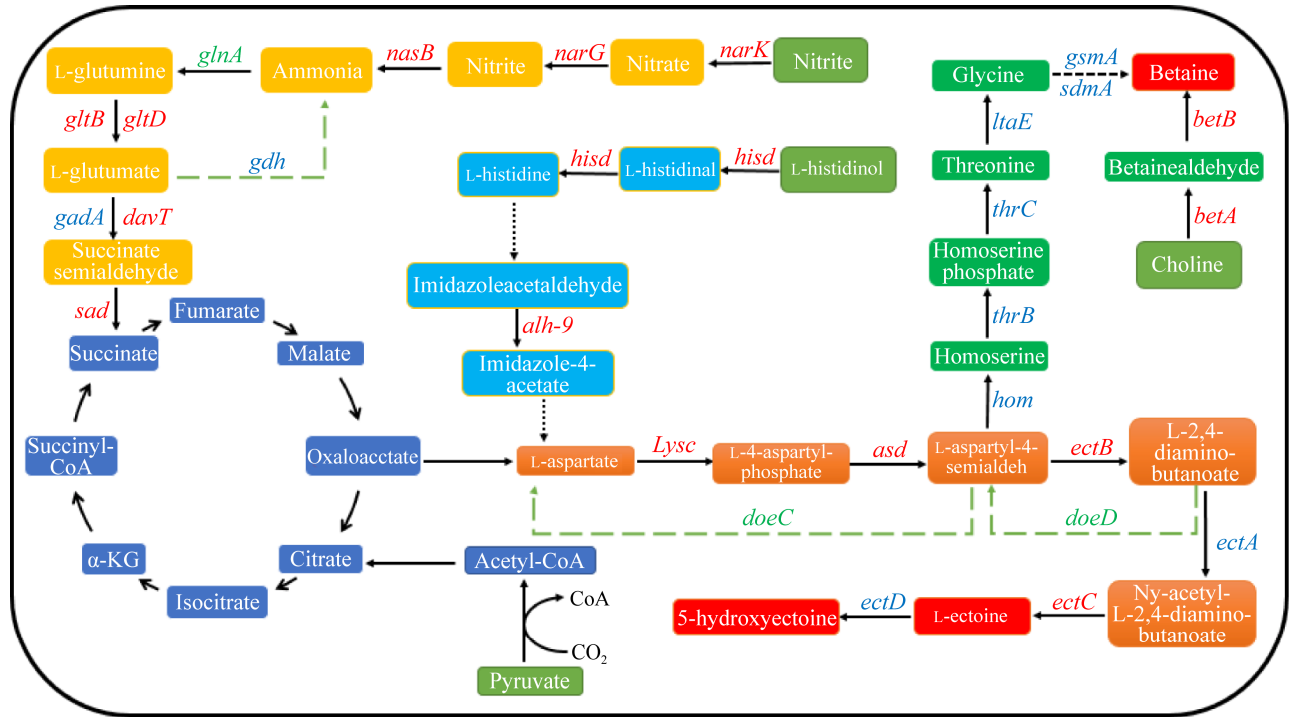


图 2 Ectoine 生物合成代谢通路

Figure 2 Metabolic pathway for ectoine biosynthesis.

成代谢分流, 以及实现低盐度条件下的 Ectoine 高产目的, 后续相关研究有待探索: (1) 构建适用于盐单胞菌的基因敲除系统 (CRISPR/Cas9 骨架载体 PX458); (2) 构建盐单胞菌基因缺陷菌株 ( $\Delta$ *doeA/doeB/doeC/doeD*), 阻遏 Ectoine 的分解代谢; (3) 敲除部分氨基酸合成代谢通路, 如丝氨酸、缬氨酸与异亮氨酸等, 以减少代谢通路中重要代谢中间物的流量损耗。

#### 4 系统代谢工程与通路控制

系统代谢工程是将系统生物学、合成生物学和进化工程策略与传统代谢工程相结合的一门综合学科, 即通过组学工具、电子代谢模拟、遗传基因组工程以及高通量筛选等技术手段优化代谢通量, 以提高目标生物产品的产量<sup>[41]</sup>。嗜盐菌 Ectoine 的主要合成途径为: 草酰乙酸→天冬氨酸→天冬氨酸- $\beta$ -半缩醛→醛氨酸

→草酰乙二氨基丁酸→N- $\gamma$ -乙酰二氨基丁酸→Ectoine。基于 Ectoine 生物合成代谢 Pathway 通路和系统代谢工程原理, 通过碳氮源代谢通路整合构建重组质粒, 利用基因敲除改变代谢通路, 并构建 Ectoine 合成代谢基因相关的系统代谢工程菌株, 可实现 Ectoine 异源生产的代谢单通量模型<sup>[42]</sup>。

目前, 合成生物学和计算生物学已能够为所需的化学物质设计特定的代谢途径。首先, 在物质代谢过程中, 需考虑合成途径中的每一步中间体的积聚量 (如碳代谢流集中), 以防积累过多, 进而影响目标产物的产量提升。吴雪娇等<sup>[34]</sup>通过敲除乙醛酸循环控制基因 *iclR* 以打开乙醛酸循环, 从而增强碳源葡萄糖到 L-天冬氨酸 (L-Asp) 的代谢通量, 高产菌株分批发酵 6–8 h, Ectoine 产量可达 12–18 g/L。Zhao 等<sup>[38]</sup>构建大肠杆菌基因工程菌, 以 Asp 为氮源底物



进行补料发酵, 相比对照菌株, Ectoine 的总积累量提高 3.1%。谢希贤等<sup>[39]</sup>通过敲除编码天冬氨酸激酶/高丝氨酸脱氢酶的基因 *thrA* 和乙醛酸分流转录抑制基因 *iclR*, 以加强草酰乙酸库, 在低盐度环境下以葡萄糖为碳源进行发酵培养, Ectoine 产量提高到 25.1 g/L。其次, 即使合成代谢流畅, 但 Ectoine 的产量可能仍难以提升, 需考虑 Ectoine 合成前体和发酵底物是否得到足量供应。Tanimura 等<sup>[42]</sup>利用大肠杆菌异源表达 *H. elongate* 的基因簇 *ectABC*, 构建木糖转运体重组质粒, 增加重组菌株对糖类的消耗, 加强 Ectoine 代谢通路的合成, 并利用木糖启动子诱导噬菌体 T7 的 RNA 聚合酶。同时, 结合 T7 强启动子系统实现目的基因的高效表达, 以木糖为底物分批发酵后, Ectoine 产量较原始菌株提高 1.6 倍。此外, 与上述典型的优化代谢内源途径和重建异源途径相比, 优化前体合成法可能也是提高目标化合物产量的有效代谢策略<sup>[43]</sup>。后续研究可侧重于应用酶和底物化学结构之间的反应规则, 利用酶的专一性进一步设计新的有效合成途径, 简化合成步骤, 以期提高 Ectoine 产量。

目前, 笔者团队利用盐单胞菌 *H. campaniense* sp. XH26 进行基因组学 (4.11 Mb, 3 927 个基因, 53.28% GC)、盐激转录组学和蛋白组学高通量测序, KEGG 分析显示 Ectoine 的生物合成与 Asp、天冬氨酸半缩醛代谢有关, 而这些代谢通路又与天冬氨酸 (Asn)、谷氨酸 (Glu)、谷氨酰胺 (Gln) 与丙氨酸 (Ala) 关联。同时, 碳/氮代谢流又与三羧酸循环 ( $\alpha$ -酮戊二酸、琥珀酸、延胡索酸、苹果酸、草酰乙酸) 和氨基酸 (Glu 与 Asp) 转氨基作用相关联。我们设计了 Ectoine 合成的优化途径和代谢整合通路 (Glu→TCA→Asp→Ectoine), 现已成功构建大片段重组整合质粒 (约 15 kb), 并植入 T7 强启

动子诱导表达代谢通路涉及的相关基因 (*gadA*、*davT*、*sad*、*sdhA*、*fumB*、*mdh*、*nadB1*、*ask/lysC*、*asd*、*ectABC*), 探索 Ectoine 的高产可能性 (图 2)。后续的相关研究涉及几种策略: (1) 利用合成生物学构建相关代谢通路的高表达整合质粒, 如 L-Glu 代谢通路 (*narK*、*narG*、*nasB*、*gltB*、*gltD*、*davT* 与 *sad*) 与 His 代谢通路 (*hisD* 与 *alh-9*), 增加 Ectoine 合成代谢上游底物; (2) 敲除 Ectoine 分解代谢基因簇 *doeABCD*, 重组转化系统代谢通路 (Glu→TCA→Asp→Ectoine), 强化 Ectoine 生物合成; (3) 弱化 ABC 转运蛋白系统的负反馈调控, 重组转化相关应急调节因子, 促进细胞自动分泌 Ectoine; (4) ATP-ABC 转运蛋白与丙酮酸氧化有关, 敲除基因 (*ugpB*、*potA* 与 *yejE*) 后, 可能增加丙酮酸至草酰乙酸的代谢积累, 加速 Ectoine 的代谢流量, 有待深入验证。

## 5 发酵工程与工艺选择

通常, Ectoine 大规模工业发酵前, 需要在实验室内进行发酵罐小规模实验, 以获得 Ectoine 合成的动力学模型、最适发酵条件和工艺技术参数, 并根据这个模型设计中试发酵, 最后放大实现规模生产<sup>[44]</sup>。目前, Ectoine 的工业生产技术主要涉及蛋白胨补料、葡萄糖控制、酸碱度反馈补料和溶解氧水平等不同的条件控制策略, 进行分批发酵、分批补料、连续发酵和细菌挤奶等。

### 5.1 分批发酵

分批发酵是大规模生产 Ectoine 的常用方法, 该方法容易获得嗜盐菌发酵的培养参数、控制方案和工艺顺序等, 操作简单, 易解决 Ectoine 高产菌种退化的问题<sup>[45]</sup>。Chen 等<sup>[46]</sup>利用 2 L 生物反应器以溶解氧 20%、转速 80–400 r/min、pH 7.0 为条件分批发酵盐单胞菌 *H. salina* DSM5928, 获得 Ectoine 的最高浓度为



2.53 g/(L·d), 而摇瓶发酵 36 h Ectoine 的最高浓度仅为 1.32 g/(L·d)。此外, 研究发现利用 *E. coli* 工程菌株 (基因簇 *ectABC* 重组) 进行摇瓶发酵和 5 L 发酵罐分批发酵, 产量分别为 12–16 g/L 和 35–50 g/L, 表明分批发酵产量远高于摇瓶发酵, 且发酵用时较短, 底物利用率较高, 同时连续搅拌可提高溶质的分散能力<sup>[47]</sup>。

## 5.2 分批补料发酵和连续发酵

分批补料发酵是介于分批发酵和连续发酵之间的一种发酵技术, 可提高 Ectoine 高产菌株的细胞密度, 并避免底物抑制; 连续发酵是在 Ectoine 生产模式菌达到对数生长期后, 以恒定的流速向发酵罐中连续添加高浓度碳/氮源, 同时以相同的流速从发酵罐中排出 Ectoine 发酵菌液<sup>[47-48]</sup>。Xie 等<sup>[39]</sup>构建基因工程菌 *E. coli* W3110 (基因簇 *ectABC* 重组), 采用 7.5 L 生物反应器进行分批补料发酵, 同时添加 80% 葡萄糖溶液和 25%  $\text{NH}_4\text{OH}$  溶液, 并保持 20% 溶解氧, Ectoine 的终产量为 25.1 g/L。Pérez-García 等<sup>[49]</sup>以谷氨酸棒状杆菌 *C. glutamicum* 为反应底盘, 以 Asp 为底物进行分批补料发酵, 结果显示在不依赖高盐度培养基的生长条件下,

Ectoine 产量达到 22 g/L。此外, 研究表明以氮源谷氨酸钠为底物, 对盐单胞菌 *H. venusta* DSM4743 分别进行分批发酵和连续发酵, 结果显示分批发酵的 Ectoine 最高产量 (3.2 g/L) 远不及连续发酵 (5.6 g/L)。表明连续发酵法可能更利于 Ectoine 的过量化生产<sup>[50]</sup>。

不同的 Ectoine 发酵技术存在不同的制约因素, 如代谢产物的反馈抑制、高浓度底物的阻遏效应等, 致使 Ectoine 发酵法各具优劣 (表 3)<sup>[51]</sup>。分批发酵可提高 Ectoine 发酵碳氮源底物利用率, 减少模式菌株污染, 但生产周期短、生产效率低。分批补料发酵通常采用自动化控制策略, 减少模式菌株生长, 并解除碳氮源底物抑制和产物反馈抑制。同时, 分批补料发酵也可分段控制溶解氧浓度 (40%  $\text{O}_2$  (0–24 h) 与 20%  $\text{O}_2$  (24–48 h)), 提高碳源利用率、缓解菌株氧中毒, 避免单次发酵投入过多碳氮源, 导致菌体过量生长、Ectoine 产量降低<sup>[52]</sup>。此外, 分批补料发酵加料设备要求精确, 以提供无菌补料液。后续实验可执行不同溶解氧水平下发酵的动力学研究, 或采用分步供氧控制与酸碱反馈相结合的发酵策略, 探究大规模高产 Ectoine 的可能性。

表 3 常用 Ectoine 发酵法比较

Table 3 Comparative analysis of commonly used ectoine fermentation methods

Comparative content	Batch fermentation	(Fed-batch) fermentation	Batch feeding fermentation
Growth period	Short	Long	Long
Aseptic requirements	High	High	Low, easily contaminated
Strain variation	Steady	Susceptible to microbial contamination, high degradation	Variable, less degeneration
Applied range	Extensive range	Narrow range	Extensive range
Fermenter volume	Constant value (2–50 L)	Raise with time	Raise with time
Thallus growth rate	$\mu=1/x \cdot (dx/dt)$	$\mu=1/x \cdot (dx/dt + D_X)$	$X_t = X_0 + Y_{x/s} (S_R - S_T)$
Cost	Low	High	High
Substrate utilization	High	Low	High
Product productivity	Low	High	High

Note: substance (S), thallus (X), thallus growth rate ( $\mu$ ), coefficient of growth yield (total carbon sources consumed  $Y_{x/s}$ ), concentration of growth-limiting matrix ( $[S]$ ), integral number of new medium volume per unit time in total culture medium ( $D_X$ ), substrate consumption per unit volume of culture medium per unit time ( $S_T$ ), the matrix concentration in the culture tank and the released culture medium ( $S_R$ ).

### 5.3 细菌挤奶技术

细菌挤奶技术 (bacteria milking) 是采用反复的高渗环境与低渗环境来刺激菌体, 将胞内积聚的 Ectoine 释放至培养基中, 其中高渗环境刺激菌体大量合成 Ectoine, 而低渗环境促进菌体释放 Ectoine 至胞外<sup>[53]</sup>。细菌挤奶技术现已运用于工业化生产, 合理地利用了嗜盐菌胞内 Ectoine 积聚浓度阈值和 Ectoine 胞外释放的特点, 菌株可多次重复利用, 成为“活细胞工厂”, 从而大幅提高 Ectoine 的产率。Sauer 等<sup>[54]</sup>以盐单胞菌 *H. elongate* DSM142<sup>T</sup> 为发酵反应底盘进行细菌挤奶, 经低渗→高渗→低渗 9 次循环刺激, Ectoine 的终产量为 5.4 g/L。Putu Parwata 等<sup>[55]</sup>采用细菌挤奶将盐单胞菌 *H. elongata* BK-AG25 进行 9 轮连续渗透冲击 (NaCl 浓度 17.5%→1.5%→3.0%), 结果显示菌株的存活率最高, 且 Ectoine 产率约为 88%, Ectoine 产量为 2.26 g/L。在 Ectoine 后续的实验室和工业生产上, 细菌挤奶技术有可能发展成为新技术, 但该技术存在一些弊端, 如增加设备的损耗和受腐蚀程度, 以及需要筛选获得优良的抗高渗-低渗反复冲击特性菌株。

## 6 Ectoine 抽提与纯化工艺

Ectoine 具有亲水性和两性离子特征, 化学抽提 Ectoine 首先需要裂解菌体 (如采用溶菌酶、有机溶剂裂解、超声破碎或机械研磨等), 有机溶剂抽提后采用滤膜和过滤柱纯化 Ectoine。实验室条件下, 抽提 Ectoine 的常用方法是采用有机溶剂裂解菌体, 抽提获得初级 Ectoine。如 Riis 等<sup>[56]</sup>采用有机溶剂甲醇、氯仿及水的混合液破碎高盐度 (150 g/L NaCl) 诱变菌株 *H. elongate* (非分泌型菌株) 合成 Ectoine, 经离子交换法后, 获得 Ectoine 的合成量可达 0.9 g/L。Stepniewska

等<sup>[57]</sup>利用甲醇和水 ( $V:V=1:10$ ) 抽提菌体胞内 Ectoine, 真空下除去甲醇, 然后采用活性炭吸附与水重溶干燥, 经热乙醇洗脱, 最终获得 Ectoine 纯品。田磊<sup>[58]</sup>将菌体冻干, 采用乙醇和水混合溶液 ( $V:V=2:8$ ) 提取 Ectoine, 振荡离心收集上清液, 用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜去除上清液杂质, 振荡离心干燥后收集 Ectoine。实验室纯化 Ectoine, 因原料成本限制, 回收率低、产品纯度低以及环境污染严重等问题, 难以实现工业化规模生产。

目前, 批量化生产 Ectoine 主要集中在过滤柱初级纯化或物理膜分离技术, 膜分离系统与柱分离相比, 处理量大、脱盐充分、能耗低, 且菌体和蛋白截留率高, 现已有相关的应用案例报道。朱道辰<sup>[59]</sup>采用发酵板框过滤菌种发酵液, 利用低渗冲击菌体释放 Ectoine, 使用无机陶瓷滤膜和聚醚砜膜过滤菌体碎片、杂蛋白和多糖等非聚合物, 最后用芳香族聚酰胺复合膜脱盐, 浓缩结晶 Ectoine。范晓光<sup>[60]</sup>利用微滤膜和超滤膜双膜系统滤除菌体、蛋白和色素, 采用阳离子交换树脂 (D061 凝胶型树脂) 吸附 Ectoine, 再用氨水洗脱 Ectoine, 最后经过活性炭脱色、浓缩醇沉、重结晶以及干燥获得 Ectoine 晶体。Chen<sup>[61]</sup>将柱洗脱液分离的粗品 Ectoine, 采用甲醇脱盐提高回收率, 减少废水量的产生; 或将原菌浓缩液加热变性后, 进行陶瓷膜过滤和电渗析, 可减少盐排放, 缓解设备腐蚀, 有利于提高回收率 (93.32%)。笔者团队小批量制备 Ectoine, 常采用细菌溶菌酶裂解、超声破碎和高速组织研磨破碎, 再利用 90%乙醇提取和超滤纯化, 其操作简单, 可快速制备 HPLC 检测样; 大批量制备则采用超高压细胞破碎法 (高压细胞破碎仪 constant systems/TS), 具有单批量大 (5 L)、破碎均匀和效率高等特点。

Ectoine 纯化使用葡萄糖凝胶 LH-20 洗脱柱,易于极性分子分离,采用反向系统溶剂(甲醇-水系统)进行 Ectoine 抽提液过滤纯化,涉及其他洗脱柱的填充物或洗脱溶剂成分及比例研究,尚需摸索实验。

## 7 总结与展望

针对相容溶质 Ectoine 的高效积聚策略和生产技术优化的相关研究,诸多研究人员从上游菌株改造、中游发酵优化和下游 Ectoine 分离纯化等方面入手,获得一系列潜在的应用进展,尤以高效积聚菌株的筛选与基因改造最为突出。其一,应用诱变育种技术改造 Ectoine 积聚模式菌株,如物理诱变(紫外线)、化学诱变(亚硝基胍和硫酸乙酯)、ARTP 技术或多种诱变手段联用<sup>[62]</sup>。因受限于基因突变的随机性和突变 DNA 修复,候选菌株常出现生长速度缓慢、积聚产量不高和菌落形态改变等实际问题。后续研究高产突变菌株的关键性功能(突变)基因群、基因组变异体结构(同源突变基因)、诱变条件正向选择的关联性以及规律特征,有待深入探讨。其二,利用分子技术构建基因工程菌实现基因簇 *ectABC* 或操纵子的异源表达,或增强启动子的调控表达规避高盐常规发酵产生的弊端,实现 Ectoine 的高积累生产。随着整个工业发酵过程的简单化,后续可利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建代谢缺陷菌株或敲除部分代谢分流基因,实现 Ectoine 单一化高效生产。其三,大规模发酵工程条件优化以提升 Ectoine 产量的策略亦颇受关注,如控制搅拌速度、pH 值、盐度和氧气溶解度等参数,实时监测以保证底物与产物的代谢平衡,尤其涉及系统代谢工程技术强化碳氮源利用、能量代谢、合成代谢流量能力、消除无效循环和代谢

溢出等方面。此外, Ectoine 的大规模制备与纯化技术,需要将新型的化学技术和亲水分子材料相结合,建立更完善的膜分离系统,以此突破高纯度 Ectoine 制备的技术壁垒。

随着合成生物学和系统代谢工程的快速发展,以“细胞工厂”为载体,运用多组学整合分析和网络代谢重构技术,精准调控天然次级代谢物的碳/氮源代谢流,有可能实现精准发酵生产 Ectoine 的工业化模式,以解决多产物并存、分离耗时或耗力等实际问题。然而构建 Ectoine “细胞工厂”,尚需多种技术的整合联用。首先,综合运用基因组学、转录组学、蛋白组学、代谢组学和计算生物学等技术,亟需挖掘不同嗜盐菌胞内的大量表达元件和调控基因/簇,监测各类氨基酸的衍生代谢调节,优化 Ectoine 的合成控制,有可能解决大规模化生产 Ectoine 的代谢工程和发酵技术瓶颈。其次,构建“细胞工厂”的过程相当复杂,具体涉及大量基因元件的表达调控、错综复杂的代谢网络/酶促反应、发酵反应器以及外部环境(发酵原料、底物与控制条件等)影响目标产物。再次,构建“细胞工厂”还需关注代谢终产物和代谢中间体存在的负反馈抑制,以及高表达代谢通路优化合成过程中是否存在某一中间产物积聚过多,从而造成菌体生长副作用等诸多问题。最后, Ectoine 代谢网络比较复杂,涉及多种氨基酸的交叉代谢,如能解决工业化 Ectoine 的超量产问题,同时有可能为同类氨基酸(如色氨酸 Trp、脯氨酸 Pro)或其他天然化合物的工业化生产,提供参考性理论指导。未来,随着交叉学科和技术的不断发展,越来越多的代谢途径整合、系统代谢流重构、工业发酵优化以及基因表达的智能调控等工程策略将会更广泛地应用于 Ectoine 的生产技术优化和大规模生产。

## REFERENCES

- [1] Mais CN, Hermann L, Altegoer F, et al. Degradation of the microbial stress protectants and chemical chaperones ectoine and hydroxyectoine by a bacterial hydrolase-deacetylase complex. *J Biol Chem*, 2020, 295(27): 9087-9104.
- [2] Wittmar J, Meyer S, Sieling T, et al. What does ectoine do to DNA? A molecular-scale picture of compatible solute-biopolymer interactions. *J Phys Chem B*, 2020, 124(37): 7999-8011.
- [3] Hahn MB, Smales GJ, Seitz H, et al. Ectoine interaction with DNA: influence on ultraviolet radiation damage. *Phys Chem Chem Phys*, 2020, 22(13): 6984-6992.
- [4] Zhao Q, Meng YW, Li SN, et al. Genome sequence of *Halomonas hydrothermalis* Y2, an efficient ectoine-producer isolated from pulp mill wastewater. *J Biotechnol*, 2018, 285: 38-41.
- [5] Srivastava AK, Sharma A, Srivastava R, et al. Draft genome sequence of halotolerant bacterium *Chromohalobacter salexigens* ANJ207, isolated from salt crystal deposits in pipelines. *Microbiol Resour Announc*, 2019, 8(15): e0004919.
- [6] Wang T, Li Y, Zhang L, et al. Salt tolerance of nitrate reductase in *Halomonas* sp. B01. *Folia Microbiol (Praha)*, 2020, 65(5): 909-916.
- [7] Fatollahi P, Ghasemi M, Yazdian F, et al. Ectoine production in bioreactor by *Halomonas elongata* DSM2581: using mwcnt and fe-nanoparticle. *Biotechnol Prog*, 2021, 37(1): e3073.
- [8] 田磊, 张芳, 沈国平, 等. Ectoine 高产菌株 *Halomonas* sp. XH26 的鉴定及紫外诱变选育. *生物学杂志*, 2020, 37(4): 31-35.
- Tian L, Zhang F, Shen GP, et al. Identification of high-yielding strain *Halomonas* sp. XH26 for producing ectoine and UV mutagenesis breeding. *J Biol*, 2020, 37(4): 31-35 (in Chinese).
- [9] 杨进龙, 郎亚军, 王越. 用耐盐菌 SL07 合成 Ectoine. *大连轻工业学院学报*, 2006, 25(3): 176-178.
- Yang JL, Lang YJ, Wang Y. Synthesis of ectoine by using halotolerant bacteria SL07. *J Dalian Inst Light Ind*, 2006, 25(3): 176-178 (in Chinese).
- [10] Wan PK, Lan JCW, Chen PW, et al. Recovery of intracellular ectoine from *Halomonas salina* cells with poly(propylene) glycol/salt aqueous biphasic system. *J Taiwan Inst Chem Eng*, 2018, 82: 28-32.
- [11] Chen WC, Hsu CC, Lan JC, et al. Production and characterization of ectoine using a moderately halophilic strain *Halomonas salina* BCRC17875. *J Biosci Bioeng*, 2018, 125(5): 578-584.
- [12] Dong Y, Zhang H, Wang X, et al. Enhancing ectoine production by recombinant *Escherichia coli* through step-wise fermentation optimization strategy based on kinetic analysis. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2021, 44(7): 1557-1566.
- [13] Chen RF, Lv LH, Su Y, et al. Purification of (S)-2-methyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidine-4 carboxylic acid from *Halophiles*. *Biomed Res-India*, 2017, 28(12): 5511-5518.
- [14] 姚倩倩, 顾向阳. 中度嗜盐菌 *Halomonas* sp. W2 的分离和鉴定及其高产四氢嘧啶特性研究. *南京农业大学学报*, 2017, 40(1): 109-115.
- Yao QQ, Gu XY. Isolation identification and the high ectoine-producing characteristics of a moderately halophilic bacterium *Halomonas* sp. W2. *J Nanjing Agric Univ*, 2017, 40(1): 109-115 (in Chinese).
- [15] 王磊, 冯二梅, 宿红艳. 烟台海域一株中度嗜盐芽孢杆菌 YTM-5 的鉴定及其耐盐机制研究. *新乡学院学报*, 2010, 27(3): 50-55.
- Wang L, Feng EM, Su HY. Identification of a moderately Halophilic *Bacillus* strain YTM-5 in Yantai sea area and the preliminary study of its salt-tolerant mechanism. *Journal of Xinxiang University*, 2010, 27(3): 50-55 (in Chinese).
- [16] Anburajan L, Meena B, Sreelatha T, et al. Ectoine biosynthesis genes from the deep sea halophilic eubacteria, *Bacillus clausii* NIOT-DSB04: its molecular and biochemical characterization. *Microb Pathog*, 2019, 136: 103693.
- [17] Kuhlmann AU, Bremer E. Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in *Bacillus pasteurii* and related *Bacillus* spp.. *Appl Environ Microbiol*. 2002, 68(2): 772-83.
- [18] Tsuge Y, Matsuzawa H. Recent progress in production of amino acid-derived chemicals using *Corynebacterium glutamicum*. *World J Microbiol Biotechnol*, 2021, 37(3): 49.
- [19] Salar-García MJ, Bernal V, Pastor JM, et al. Understanding the interplay of carbon and nitrogen supply for ectoines production and metabolic overflow in high density cultures of *Chromohalobacter salexigens*. *Microb Cell Fact*, 2017, 16(1): 23.
- [20] Nguyen LT, Lee EY. Biological conversion of methane to putrescine using genome-scale model-guided metabolic engineering of a methanotrophic bacterium *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z. *Biotechnol Biofuels*, 2019, 12: 147.

- [21] Chen WC, Yuan FW, Wang LF, et al. Ectoine production with indigenous *Marinococcus* sp. MAR2 isolated from the marine environment. *Prep Biochem Biotechnol*, 2020, 50(1): 74-81.
- [22] Adamiak J, Bonifay V, Otlewska A, et al. Untargeted metabolomics approach in halophiles: understanding the biodeterioration process of building materials. *Front Microbiol*, 2017, 8: 2448.
- [23] Guo D, Ren C, Ali A, et al. A phytoextraction trial strengthened by *Streptomyces pactum* and plant nutrients: in view of plant bioindicators and phytoextraction indices. *Environ Pollut*, 2020, 265(pt b): 114867.
- [24] 张慧艳, 刘芝瑾, 徐同, 等. 易变链霉菌 TRM 45540 四氢嘧啶合成相关基因的克隆. *西北农业学报*, 2017, 26(3): 471-476.  
Zhang HY, Liu ZJ, Xu T, et al. Cloning of biosynthetic gene cluster of ectoine from *Streptomyces mutabilis* TRM45540. *Acta Agric Boreali-Occidentalis Sin*, 2017, 26(3): 471-476 (in Chinese).
- [25] 王冠凤, 石艳丽, 钱晓路, 等. 四氢嘧啶高产菌株的筛选及发酵条件的优化. *食品与药品*, 2019, 21(1): 49-56.  
Wang GF, Shi YL, Qian XL, et al. Screening of ectoine high-productive strain and optimization of fermentation condition. *Food Drug*, 2019, 21(1): 49-56 (in Chinese).
- [26] 汤佳鹏, 汪建雄. 紫外-硫酸二乙酯复合诱变高通量筛选虫草素高产蛹虫草突变株. *食品工业科技*, 2018, 39(3): 97-100.  
Tang JP, Wang JX. High-throughput screening of *Cordyceps militaris* for cordycepin production by UV-DES compound mutation. *Sci Technol Food Ind*, 2018, 39(3): 97-100 (in Chinese).
- [27] Liu K, Fang H, Cui F, et al. ARTP mutation and adaptive laboratory evolution improve probiotic performance of *Bacillus coagulans*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(14): 6363-6373.
- [28] Liu J, Wu X, Yao M, et al. Chassis engineering for microbial production of chemicals: from natural microbes to synthetic organisms. *Curr Opin Biotechnol*, 2020, 66: 105-112.
- [29] Richter AA, Kobus S, Czech L, et al. The architecture of the diaminovalerate acetyltransferase active site provides mechanistic insight into the biosynthesis of the chemical chaperone ectoine. *J Biol Chem*, 2020, 295(9): 2822-2838.
- [30] Gregory GJ, Morreale DP, Carpenter MR, et al. Quorum sensing regulators AphA and OpaR control expression of the operon responsible for biosynthesis of the compatible solute ectoine. *Appl Environ Microbiol*, 2019, 85(22): e01543-19.
- [31] Ning Y, Wu X, Zhang C, et al. Pathway construction and metabolic engineering for fermentative production of ectoine in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2016, 36: 10-18.
- [32] Ma H, Zhao Y, Huang W, et al. Rational flux-tuning of *Halomonas bluephagenesis* for co-production of bioplastic PHB and ectoine. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 3313.
- [33] Chen J, Liu P, Chu X, et al. Metabolic pathway construction and optimization of *Escherichia coli* for high-level ectoine production. *Curr Microbiol*, 2020, 77(8): 1412-1418.
- [34] 谢希贤, 陈宁, 宁义科, 等. 一种产生四氢嘧啶的基因工程菌及其构建方法与应用: CN105018403A[P]. 2015-11-04.  
Wu XJ, Xu JY, Zhang QY, et al. A genetically engineered bacteria producing ectoine and its construction method and application: CN105018403A[P]. 2015-11-04 (in Chinese).
- [35] Bethlehem L, Moritz KD. Boosting *Escherichia coli*'s heterologous production rate of ectoines by exploiting the non-halophilic gene cluster from *Acidiphilium cryptum*. *Extremophiles*, 2020, 24(5): 733-747.
- [36] Li S, Shang Y, Zhao Q, et al. Promoter engineering for high ectoine production in a lower saline medium by *Halomonas hydrothermalis* Y2. *Biotechnol Lett*, 2021, 43(4): 825-834.
- [37] Gießelmann G, Dietrich D, Jungmann L, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for high-level ectoine production: design, combinatorial assembly, and implementation of a transcriptionally balanced heterologous ectoine pathway. *Biotechnol J*, 2019, 14(9): 1800417.
- [38] Zhao Q, Li S, Lv P, et al. High ectoine production by an engineered *Halomonas hydrothermalis* Y2 in a reduced salinity medium. *Microb Cell Fact*, 2019, 18(1): 184.
- [39] Xie XX, Wu XJ, Chen N, et al. Genetically engineered bacteria using xylose to induce ectoine production and its application: CHN, CN106754603A. 2017-05-31.
- [40] Garcia-Aguirre J, Esteban-Gutiérrez M, Irizar I, et al. Continuous acidogenic fermentation: narrowing the gap between laboratory testing and industrial application. *Bioresour Technol*, 2019, 282: 407-416.
- [41] 张芳, 沈国平, 李永臻, 等. 相容溶质四氢嘧啶与羟基四氢嘧啶的代谢调控研究进展. *微生物学报*, 2020, 60(8): 1548-1562.  
Zhang F, Shen GP, Li YZ, et al. Metabolic regulation of compatible solutes ectoine and 5-hydroxyectoine. *Acta*

- Microbiol Sin, 2020, 60(8): 1548-1562 (in Chinese).
- [42] Tanimura K, Matsumoto T, Nakayama H, et al. Improvement of ectoine productivity by using sugar transporter-overexpressing *Halomonas elongata*. *Enzyme Microb Technol*, 2016, 89: 63-68.
- [43] Parwata IP, Wahyuningrum D, Suhandono S, et al. Heterologous ectoine production in *Escherichia coli*: optimization using response surface methodology. *Int J Microbiol*, 2019, 2019: 5475361.
- [44] Luo H, Yang R, Zhao Y, et al. Recent advances and strategies in process and strain engineering for the production of butyric acid by microbial fermentation. *Bioresour Technol*, 2018, 253: 343-354.
- [45] Liu WC, Inwood S, Gong T, et al. Fed-batch high-cell-density fermentation strategies for *Pichia pastoris* growth and production. *Crit Rev Biotechnol*, 2019, 39(2): 258-271.
- [46] Chen PW, Cui ZY, Ng HS, et al. Exploring the additive bio-agent impacts upon ectoine production by *Halomonas salina* DSM5928<sup>T</sup> using corn steep liquor and soybean hydrolysate as nutrient supplement. *J Biosci Bioeng*, 2020, 130(2): 195-199.
- [47] Vandrich J, Pfeiffer F, Alfaro-Espinoza G, et al. Contribution of mechanosensitive channels to osmoadaptation and ectoine excretion in *Halomonas elongata*. *Extremophiles*, 2020, 24(3): 421-432.
- [48] Cantera S, Phandanouvong-Lozano V, Pascual C, et al. A systematic comparison of ectoine production from upgraded biogas using *Methylobacterium alcaliphilum* and a mixed haloalkaliphilic consortium. *Waste Manag*, 2020, 102: 773-781.
- [49] Pérez-García F, Ziert C, Risse JM, et al. Improved fermentative production of the compatible solute ectoine by *Corynebacterium glutamicum* from glucose and alternative carbon sources. *J Biotechnol*, 2017, 258: 59-68.
- [50] Berlanga M, Gomez-Perez L, Guerrero R. Biofilm formation and antibiotic susceptibility in dispersed cells versus planktonic cells from clinical, industry and environmental origins. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2017, 110(12): 1691-1704.
- [51] Ng HS, Wan PK, Ng TC, et al. Primary purification of intracellular *Halomonas salina* ectoine using ionic liquids-based aqueous biphasic system. *J Biosci Bioeng*, 2020, 130(2): 200-204.
- [52] Chen R, Zhu L, Lv L, et al. Optimization of the extraction and purification of the compatible solute ectoine from *Halomonas elongate* in the laboratory experiment of a commercial production project. *World J Microbiol Biotechnol*, 2017, 33(6): 116.
- [53] Cantera S, Lebrero R, Rodríguez S, et al. Ectoine bio-milking in methanotrophs: a step further towards methane-based bio-refineries into high added-value products. *Chem Eng J*, 2017, 328: 44-48.
- [54] Sauer T, Galinski EA. Bacterial milking: a novel bioprocess for production of compatible solutes. *Biotechnol Bioeng*, 1998, 57(3): 306-313.
- [55] Putu Parwata I, Wahyuningrum D, Suhandono S, et al. Production of ectoine by *Halomonas elongata* BK-AG25 using osmotic shock technique. *IOP Conf Ser: Earth Environ Sci*, 2018, 209: 012017.
- [56] 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(1): 203-207.
- [57] Stępniewska Z, Goraj W, Kuźniar A, et al. Biosynthesis of ectoine by the methanotrophic bacterial consortium isolated from *Bogdanka coalmine* (Poland). *Appl Biochem Microbiol*, 2014, 50(6): 594-600.
- [58] 田磊. *Halomonas* sp. XH26 菌株紫外诱种及 Ectoine 高效积聚基因簇分子差异分析[D]. 西宁: 青海大学, 2020.
- Tian L. Molecular difference analysis of ultraviolet induction and ectoine efficient accumulation gene cluster of *Halomonas* sp. XH26 strain[D]. Xining: Qinghai University, 2020 (in Chinese).
- [59] 朱道辰. 四氢嘧啶及羟基四氢嘧啶的膜技术提取方法: CN102226210A[P]. 2011-10-26.
- Zhu DC. Extraction of ectoine and 5-hydroxectoine by membrane technology: CN102226210A[P]. 2011-10-26 (in Chinese).
- [60] 范晓光. 一种从发酵液中分离提取四氢嘧啶的方法: CN105669560A[P]. 2016-06-15.
- Fan XG. A method for the isolation and extraction of ectoine from fermentation broth: CN105669560A[P]. 2016-06-15 (in Chinese).
- [61] 陈宁. 一种羟基四氢嘧啶的制备方法: CN105177078A[P]. 2015-12-23.
- Chen N. A method for the preparation of 5-hydroxectoine: CN105177078A[P]. 2015-12-23 (in Chinese).
- [62] Gu LS, Tan MZ, Li SH, et al. ARTP/EMS-combined multiple mutagenesis efficiently improved production of raw starch-degrading enzymes in *Penicillium oxalicum* and characterization of the enzyme-hyperproducing mutant. *Biotechnol Biofuels*, 2020, 13(1): 187.

(本文责编 郝丽芳)