

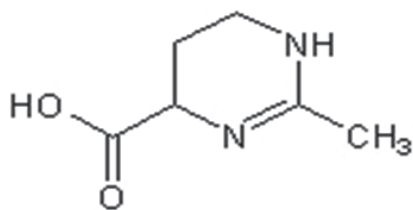
ZOFIA STĘPNIEWSKA, AGNIESZKA KUŹNIAR, ANNA PYTLAK, JAKUB CIEPIELSKI

*Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II
Katedra Biochemii i Chemii Środowiska
Konstantynów 11, 20-708 Lublin
E-mail: agawoloszyn@kul.lublin.pl*

EKTOINA – PRZECIWSTRASOWA CZĄSTECZKA PRZYSZŁOŚCI

CHARAKTERYSTYKA SUBSTANCJI

Ektoina jest cyklicznym aminokwasem produkowanym przez mikroorganizmy w celu ochrony komórki i jej organelli przed niekorzystnym wpływem środowiska. Wzór sumaryczny ektoiny to $C_6H_{10}N_2O_2$, natomiast jej masa molowa wynosi 142,2 g/mol. Jest to substancja bezbarwna, krystaliczna, wykazująca właściwości lekko higroskopijne, o temperaturze topnienia 280°C. Kwas 1,4,5,6-tetrahydro-2-metylo-4-pyrimidyno karboksylowy (Ryc. 1) charakteryzuje się



Ryc. 1. Wzór półstrukturalny ektoiny (kwas 1,4,5,6-tetrahydro-2-metylo-4-pyrimidyno karboksylowy).

wysoką rozpuszczalnością w rozpuszczalnikach polarnych jak woda czy metanol, stabilnością w szerokim zakresie pH 1–9, natomiast przy pH obojętnym występuje w postaci jonu obojnaczego. Ektoina wykazuje trwałość w wysokich temperaturach, np. w 190°C przez 6 h.

Ektoina należy do osmoprotektantów, określanych jako kompatybilne substancje rozpuszczone. Po raz pierwszy wyizolował

ten związek GALIŃSKI i współaut. (1985) z ekstremofilnych, halofilnych, fototroficznych bakterii purpurowych *Ectothiorhodospira halochloris*, żyjących w Wadi Natrun (Egipt). Opisany związek okazał się być polarnym, dobrze rozpuszczalnym i obojętnym elektrycznie (w pH fizjologicznym) (GALIŃSKI 1993). Osmoprotektanty wytwarzane są, gdy ciśnienie osmotyczne wewnątrz komórki jest zbyt duże (DÖTSCH i współaut. 2008), zapobiegając utracie wody z komórki, jednocześnie nie wpływając na metabolizm mikroorganizmu nawet przy wysokiej koncentracji w cytoplazmie (TROTSSENKO i współaut. 2005). Stężenie ektoiny w komórce, podczas występowania wysokiego zasolenia w podłożu, może sięgać co najmniej 250mM (0,2 g/ml materiału komórkowego), stanowiąc ok. 10% wszystkich osmoprotektantów (GALIŃSKI i współaut. 1985).

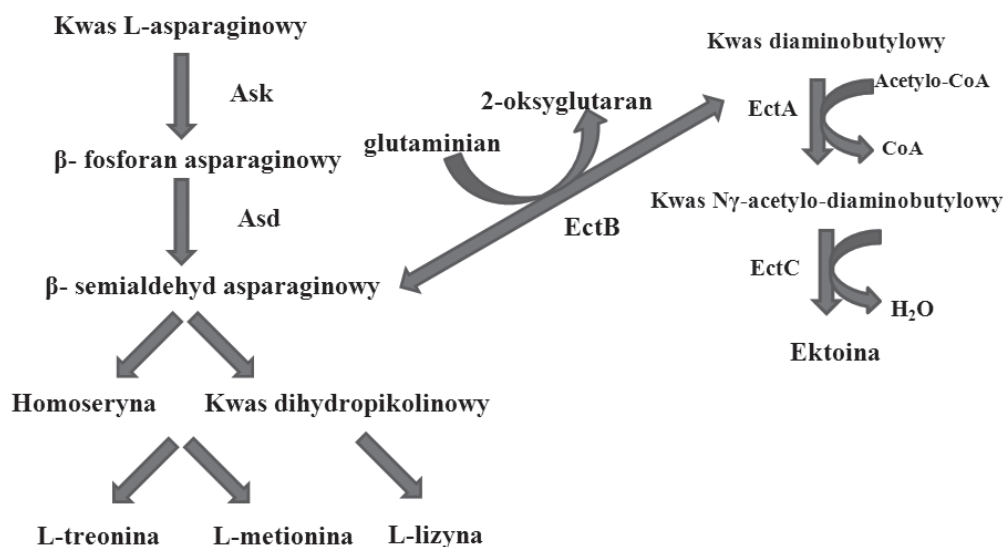
Strukturę tego związku poznano stosując technikę NMR (ang. nuclear magnetic resonance, rezonans jądrowo-magnetyczny) oraz spektroskopię mas z techniką bombardowania szybkimi atomami FAB-MS (ang. fast-atom bombardment mass spectroscopy). Analiza elementarna wykazała stosunek C:H:N:O równy 3:5:1:1 (GALIŃSKI i współaut. 1985). Dla utrzymania stabilności cząsteczki ektoinę należy przechowywać w szczelnie zamkniętych opakowaniach w temperaturze 15–25°C. Trwałość przechowywania w takich warunkach wynosi ok. 4 lat.

PROCES SYNTEZY EKTOINY

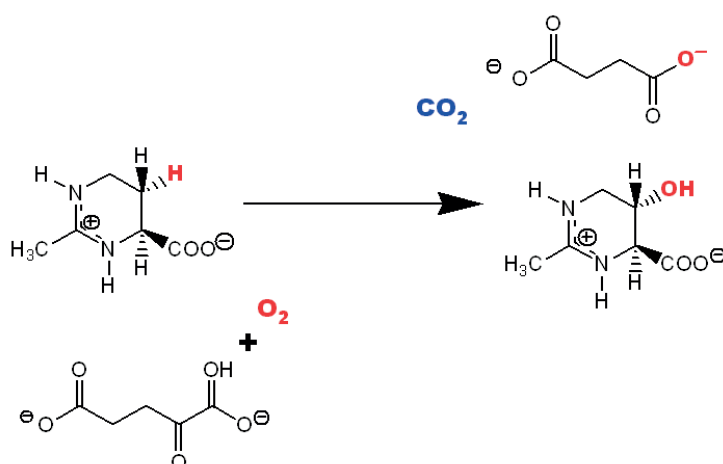
Synteza ektoiny jest inicjowana przez ekstremalne warunki środowiska mikroorganizmów, a hamowana, gdy czynnik stresowy zaniknie, stanowiąc rodzaj systemu obronnego. Skrajne warunki środowiska, sprzyjające produkcji ektoiny przez mikroorganizmy to: bardzo wysoka lub niska temperatura, wysokie zasolenie czy też występowanie substancji niesprzyjających wzrostowi. Kwas 1,4,5,6-tetrahydro-2-metylo-4-pyrimidyno karboksylowy syntetyzowany jest analogicznie, jak inne aminokwasy cykliczne takie jak: L-treonina, L-lizyna i L-metionina. Szlak biosyntezy ektoiny został opisany na podstawie kilku gatunków bakterii halofilnych (TROTSSENKO i współaut. 2005). Pierwszym etapem syntezy jest fosforylacja kwasu L-asparaginowego oraz następnie konwersja kwasu L-asparaginowego do L-asparaginiano-fosforanu przez kinazę asparaginianową (enzym Ask). Dalej odbywa się synteza L-asparaginiano- β -semialdehydu z L-asparaginiano-fosforanu, katalizowana przez dehydrogenazę L-asparaginiano- β -semialdehydu (enzym Asd). Następnie L-asparaginiano- β -semialdehyd jest przekształcany przez aminotransferazę kwasu diaminomasłowego (enzym EctB) do kwasu L-2,4-diaminomasłowego (DABA, diaminobutyric acid, kwas diaminomasłowy). Kolejnym etapem jest transformacja powstałego wcześniej kwasu DABA przez acetylotransferazę kwasu diaminobutyłowego (enzym EctA) do kwasu N γ -acetylodiaminobutyłowego (Ryc. 2) (TROTSSENKO i współaut. 2005, RESHETNIKOV i współaut. 2011). Kolejny enzym szlaku pro-

dukcji ektoiny to syntetaza ektoiny (EctC), która przekształca wcześniejszy produkt, kwas N γ -acetylodiaminobutyłowy, do ostatecznej formy kwasu 1,4,5,6-tetrahydro-2-metylo-4-pyrimidyno karboksylowego (Ryc. 2) (TROTSSENKO i współaut. 2005, RESHETNIKOV i współaut. 2011). W niektórych przypadkach w komórkach mikroorganizmów wytwarzany jest jeszcze jeden dodatkowy enzym, hydroksylaza ektoiny (EktD), którego działanie prowadzi do transformacji ektoiny w hydroksyektoinę. Podczas procesu hydroksylacji następuje dekarboksylacja 2-oksoglutaminianu (Ryc. 3). Gen kodujący enzym EktD został zidentyfikowany w 67 gatunkach mikroorganizmów, np. *Chromohalobacter salexigens*, *Streptomyces coelicolor* oraz *Marinococcus*. Ektoina i hydroksyektoina pod względem chemicznym są do siebie bardzo podobne i oba związki pełnią funkcje kompatybilnych substancji rozpuszczonych. Ich oddziaływanie na makromolekuły komórki może się różnić. Na przykład interakcja ektoiny z kwasem deoksyrybonukleinowym (DNA, kwas deoksyrybonukleinowy) obniża temperaturę topnienia, podczas gdy jej pochodna, hydroksyektoina, podwyższa. Przypuszcza się, że mikroorganizmy narażone na działanie wysokich temperatur syntetyzują właśnie hydroksyektoinę (REUTER i współaut. 2010).

U niektórych mikroorganizmów zidentyfikowano szlak degradacji ektoiny, np. w halofilnych bakteriach *Halomonas elongata* i *Chromohalobacter salexigens* (SCHWIBBERT i współaut. 2011). Wówczas to



Ryc. 2. Schemat syntezy ektoiny (wg RESHETNIKOV i współaut. 2011, zmieniona).



Ryc. 3. Schemat reakcji transformacji ektoiny do hydroksyektoiny poprzez działanie EktC. (wg REUTER i współaut. 2010, zmieniona).

kwasy 4,5,6,7-tetrahydro-2-metylo-1H-[1,3]-diazepino-4-S-karboksylowy nie tylko spełnia rolę osmoprotektanta, ale stanowi również źródło węgla, azotu i energii dla komórki (PASTOR i współaut. 2010). Degradacja ektoiny odbywa się z udziałem grupy enzymów DoeABCD (ang. degradation of ectoine ABCD, enzymy degradacji ektoiny ABCD) do kwasu L-asparaginowego. Na pewnym etapie degradacji powstały związek może być ponownie włączony w szlak syntezy ektoiny. Okazało się, że kwas L-diaminobutylowy jest związkiem łączącym oba procesy; może tworzyć wspólny cykl syntezy-degradacji. W pierwszym etapie degradacji odnotowano działanie hydrolazy ektoiny (enzym DoeA), prowadzące do powstania kwasu N α -acetylo-

L-2,4-diaminobutylowego. Następnie odbywa się transformacja kwasu N α -acetylo-L-2,4-diaminobutylowego (enzym DoeB) do kwasu L-diaminobutylowego z udziałem enzymu deacylazy N α -acetylo-L-2,4-diaminobutylowego. Kolejnym etapem jest reakcja transaminacji (transaminaza kwasu L-2,4-diaminomasłowego – enzym DoeD), w wyniku której powstaje semialdehyd kwasu L-asparaginowego. Cykl degradacji ektoiny kończy się utlenieniem powstałego semialdehydu do L-asparaginy przez dehydrogenazę semialdehydu kwasu asparaginowego (enzym DoeC) (SCHWIBBERT i współaut. 2011). Powstały aminokwas może być ponownie wykorzystany w metabolizmie mikroorganizmu.

ZDOLNOŚCI OCHRONNE EKTOINY I INNYCH SUBSTANCJI KOMPENSUJĄCYCH

Ektoina i inne związki kompensujące (np. alkohole wielowodorotlenowe, trehaloza, betaina, prolina) swoje szczególne właściwości zawdzięczają budowie cząsteczki oraz naturze możliwych oddziaływań. Obecność soli w roztworach wodnych zaburza strukturę ciekłej wody przez oddziaływania wolnej pary elektronów z kationem oraz atomów wodorowych z anionem, tworząc ustabilizowane elektrostatycznie otoczki hydratacyjne wokół jonów. Tak unieruchomione cząsteczki wody są niedostępne dla makrocząsteczek wykazujących charakter hydrofobowy (np. białka), gdyż rozpuszczalnik polarny (woda) jest mocniej utrzymywany przez pole elektryczne jonów o wyższym stosunku ładunku do promienia (JAKUBOWSKA 2012).

Gdy do takiego układu wprowadzi się substancje kompensujące oddziaływanie jon-cząsteczki wody, wówczas pojawia się efekt protekcyjny, związany ze zdolnością do powtórnego uporządkowania cząsteczek wody poprzez rozbudowanie pomiędzy nimi sieci wiązań wodorowych. Związki o charakterze kompensującym usuwane są poza powłokę hydratacyjną białek (tzw. model preferencyjnego wykluczenia), co tłumaczy efekt stabilizacji białek, wynikający ze zmniejszenia powierzchni oddziaływania (zjawisko bardziej korzystne z punktu widzenia entropii). Zdolność tę określa się mianem kosmotropii (z grek. *κοσμος*, porządek), odnosi się ona do tworzenia struktur uporządkowanych, poprzez wzmacnianie struktury wody. Prawdo-

podobnie powodem preferencyjnego wykluczenia jest silne powinowactwo substancji kompensujących (osmolitów) wobec cząsteczek wody (MOELBERT i współaut. 2004, EMPADINHAS i DA COSTA 2008).

Osmolity nie wykazują bezpośredniego oddziaływania z białkami enzymatycznymi, dzięki czemu aktywność katalityczna jest niezakłócona. Potwierdzają to badania prowadzone przez YU i NAGAOKA (2004), w których wykazano, że ektoina spowalnia dyfuzję cząsteczek wody wokół białka. Poprzez substancję kompensującą, która blokuje wymianę protonów grupy amidowej, potwierdzono wpływ na stabilizację inhibitora 2-chymotrypsyny oraz fakt, że ektoina nie wchodzi w interakcje z powierzchnią białka lub nie zmienia jego otoczki hydratacyjnej (YU i NAGAOKA 2004, LENTZEN i SCHWARZ 2006).

Poza zdolnością do tworzenia otoczki hydratacyjnej białek, substancje kompensujące wpływają także na stabilizację takich makrocząstek jak DNA. Na ogół, wysokie stężenie substancji kompensujących w postaci jonów obojnych, powoduje zwiększenie stałej

dielektrycznej roztworu, zmniejszając w ten sposób oddziaływanie jonowe i wpływa na stabilność helisy DNA. Wykazano, że ektoina, podobnie jak jej hydroksylowa pochodna, obniża temperaturę topnienia dwuniciowego DNA, a dodatkowo zwiększa stabilność termiczną polimerazy DNA w wyższych temperaturach, a zatem może być stosowana w celu poprawy etapu elongacji lub całej reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR), czy sekwencjonowania. Stwierdzono także, że ektoina i hydroksyektoina uczestniczą w mechanizmie obronnym *Streptomyces* sp., chroniąc DNA bakterii przed interakcją z aktynomycyną D, będącą produktem ich metabolizmu (LENTZEN i SCHWARZ 2006).

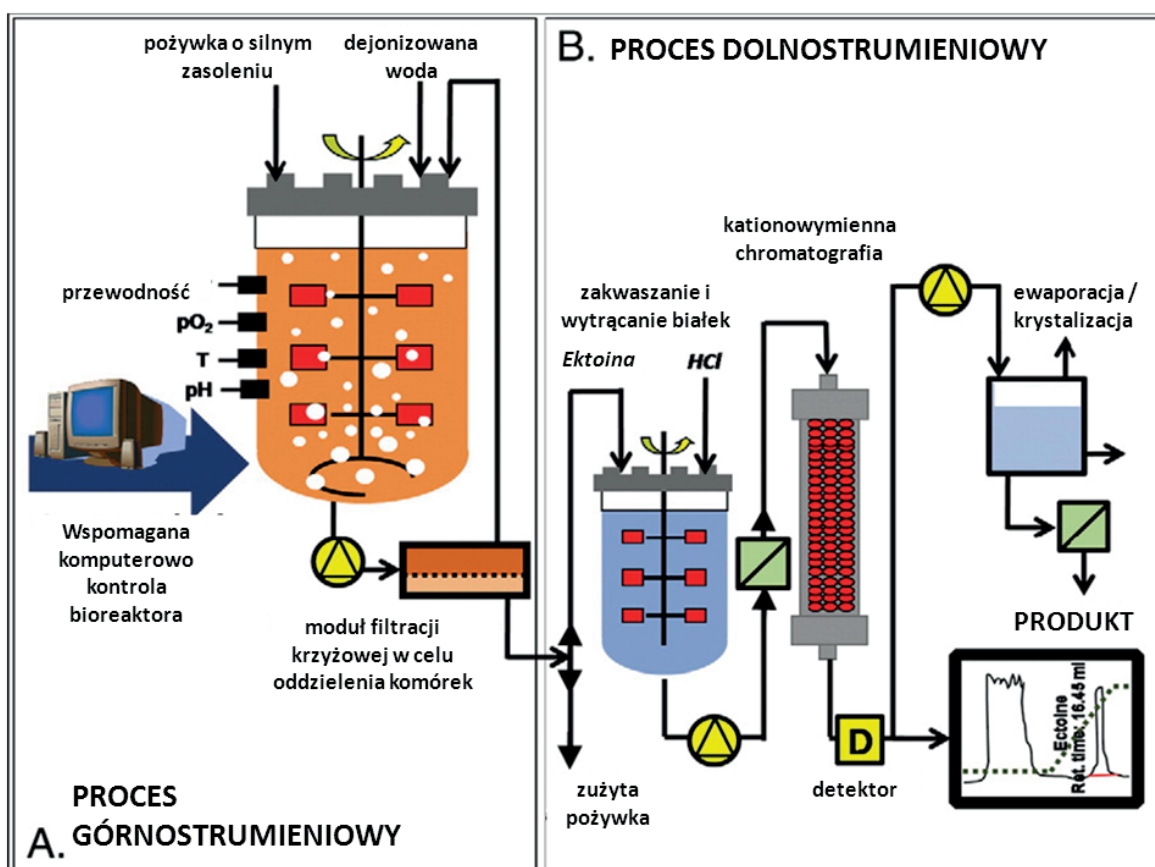
Rozpoznano ponadto, że ektoina i jej pochodne hamują wpływ rodników hydroksylowych, poprzez zabezpieczenie kwasów nukleinowych przed uszkodzeniem w warunkach *in vitro*, a także w mitochondriach czy komórkach fibroblastów, przeciwdziałając uszkodzeniom, wywołanym przez promieniowanie UV (LENTZEN i SCHWARZ 2006).

BIOTECHNOLOGICZNA PRODUKCJA EKTOINY

Do połowy lat 90. nie opracowano wydajnych sposobów wytwarzania ektoiny w ilości wystarczającej na komercyjne zastosowanie. Jedyną metodą otrzymywania kwasu 1,4,5,6-tetrahydro-2-metylo-4-pyrimidyno karboksylowego była synteza chemiczna. Rosnące zapotrzebowanie handlowe doprowadziło do szeregu działań zmierzających do zwiększenia wydajności naturalnej biosyntezy (PASTOR i współaut. 2010). Zaletami tej metody jest wyższa specyficzność otrzymanego produktu oraz stosowanie łagodniejszych warunków w porównaniu z syntezą chemiczną. Ponadto, biotechnologiczne procesy są bardziej przyjazne dla środowiska, gdyż nie generują toksycznych odpadów. Z drugiej strony jednak wymagają wysokiej klasy składników odżywczych dla mikroorganizmów oraz zapewnienia odpowiednich warunków wzrostu, takich jak: optymalne pH, temperatura, napowietrzanie (PASTOR i współaut. 2010).

Produkcja ektoiny na skalę przemysłową obejmuje procesy: „upstream” (z ang. górnostrumieniowy) obejmujące etap fermentacji i wytwarzania substancji biologicznie czynnych oraz „downstream” (z ang. dolnostrumieniowy), w którym pożądana substancja jest izolowana, oczyszczana, analizowana i

przygotowywana do sprzedaży (Ryc. 4). Ponieważ ektoina gromadzi się wewnątrz komórek w celu wyrównania zewnętrznego ciśnienia osmotycznego, dlatego też istnieje konieczność zastosowania procesu ekstrakcji. Obecnie stosowana jest metoda tzw. „downshock” (z ang. „dojenie”), używana do uwalniania ektoiny z wnętrza komórek bakteryjnych. Głównymi czynnikami w tym procesie są zmiany podłoża oraz szok osmotyczny. Najbardziej korzystnym rozwiązaniem jest zastosowanie bakterii Gram-ujemnych, które są znacznie bardziej wrażliwe na zewnętrzne zmiany zasolenia, a także posiadają mniejszy współczynnik przeżywalności (LOUIS i współaut. 1994), który zależy od sposobu procesu „dojenia”, dotyczy to zwłaszcza zmian zakresu zasolenia podłoża. Dla porównania, bakterie Gram-dodatnie nie są wrażliwe na zmiany osmotyczne ze względu na ich sztywną ścianę komórkową oraz nie wydzielają nagromadzonych wewnątrzkomórkowo osmoprotektantów podczas procesu „dojenia”. W przypadku bakterii Gram-dodatnich wymagane jest odsalanie podłoża przed rozpoczęciem ekstrakcji ektoiny innymi metodami (PASTOR i współaut. 2010). Główną zaletą procesu „dojenia” bakterii jest możliwość wydobycia



Ryc. 4. Ogólny schemat technologiczny bioprodukcji ektoiny (wg PASTOR i współaut. 2010).

danego produktu wielokrotnie, bez znaczącej utraty żywotności komórek, natomiast ograniczeniem jest fakt, iż proces ten może być zastosowany jedynie u bakterii Gram-ujemnych. System „dojenia” nakłada również pewne restrykcje dotyczące wydajności. W związku z tym, pożądane jest wykorzystywanie mikroorganizmów, które są w stanie wydzielać ektoinę bez konieczności stosowania procesu ekstrakcji, lecz wyłącznie poprzez zmianę zewnętrznego zasolenia (PASTOR i współaut. 2010).

Istnieją dwa główne systemy biologicznej bioprodukcji ektoiny, wykorzystujące nie-halofilne mikroorganizmy, posiadające heterologiczne geny odpowiedzialne za syntezę ektoiny oraz halofilne, naturalnie występujące mikroorganizmy. W większości przypadków okazuje się, że naturalni producenci syntetyzują dużą ilość ektoiny, częściowo z powodu braku metabolicznych przeszkód, wywołanych przez główny metabolizm mikroorganizmów oraz wykazują optymalną wydajność w systemach heterologicznych. Stosowanie mikroorganizmów nie-halofilnych wiąże się z ograniczeniami związanymi z wykorzysta-

niem plazmidów, jako wektorów genów kodujących enzymy szklaku syntezy ektoiny. Opracowanie właściwej pożywki, strategii odżywiania, utrzymywanie wysokiej gęstości komórek w hodowli mikroorganizmów oraz umożliwi optymalną syntezę ektoiny i jej efektywne pozyskiwanie (PASTOR i współaut. 2010).

Inną strategią zwiększenia skali syntezy ektoiny jest zastosowanie halofilnych mikroorganizmów uzyskiwanych drogą inżynierii genetycznej. Na przykład wykorzystanie bakterii *Halomonas elongata*, do których wprowadzono gen *thpD*, pochodzący ze *Streptomyces crysomalum*, dzięki którym ulepszono wydajność syntezy hydroksyektoiny (PRABHU i współaut. 2004). Obecnie najefektywniejszym procesem syntezy ektoiny jest wykorzystanie naturalnych producentów oraz techniki „dojenia” bakterii. Dlatego też doskonalenie szczepów i optymalizacja syntezy ektoiny jest niezbędna celem zwiększenia wydajności, minimalizacji wad klasycznych bioprocessów oraz zmniejszenia ceny produktu (PASTOR i współaut. 2010).

Tabela 1. Mikroorganizmy produkujące ektoinę (wg PASTOR i współaut. 2010).

Mikroorganizm	Kompatybilna substancja rozpuszczona	Stężenie soli (M)
Actinobacteria		
<i>Brevibacterium epidermie</i> DSM 20659	Ektoina	1
<i>Brevibacterium linens</i>	Ektoina	1
<i>Brevibacterium</i> sp. strain JCM 6894	Ektoina	2
<i>Kocuria varians</i> CCM3316	Ektoina, betaina, trehaloza, hydroksyektoina	1,71
<i>Nesterenkonia halobia</i> DSM 20541T	Ektoina, betaina, trehaloza, hydroksyektoina	1,71
<i>Nocardiopsis</i> sp. A5-1	Ektoina, trehaloza, hydroksyektoina	1,71
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3 (2)	Ektoina, hydroksyektoina	0,5
<i>Streptomyces griseolus</i> DSM 40067T	Hydroksyektoina, betaina, trehaloza	0,86
Firmicutes		
<i>Bacillus alcalophilus</i> DSM 485T	Ektoina, glutaminian	1
<i>Bacillus agaradhaerens</i> DSM 8721T	Glutaminian, ektoina, β -glutaminian	1,3
<i>Bacillus clarkii</i> DSM 8720T	Glutaminian, ektoina, hydroksyektoina, β -glutaminian	1,8
<i>Bacillus halodurans</i> DSM 497T	Glutaminian, ektoina, β -glutaminian	1,6
<i>Bacillus mojavenis</i> DSM 9205T	Glutaminian, prolina, ektoina	1,5
<i>Bacillus pseudocaliphilus</i> DSM 8725T	Glutaminian, ektoina	1
<i>Bacillus pseudofirmus</i> DSM 8715T	Glutaminian, prolina, ektoina, alanina	1,6
<i>Gracilibacillus halotolerans</i> DSM 11805T	Glutaminian, ektoina, hydroksyektoina	2
<i>Halobacillus halophilus</i> DSMZ 2266T	Ektoina, prolina, glutaminian glutamina	3
<i>Halobacillus trueperi</i> DSM 10404T	Glutaminian, ektoina, hydroksyektoina, N- ϵ -acetylo lizyna	2,5
<i>Marinococcus halophilus</i> DSM 20408T	Ektoina, hydroksyektoina	1,71
<i>Marinococcus</i> sp. M52	Hydroksyektoina	1,54
<i>Salimicrobium albus</i> DSM 20748T	Ektoina, alanina, hydroksyektoina	1,71
<i>Sporosarcina pasteurii</i> DSM 33T	Ektoina, glutaminian	0,68
<i>Sporosarcina psycrophila</i> DSM 3T	Ektoina, glutaminian	1
<i>Virgibacillus marismortui</i> DSM 12325T	Glutaminian, ektoina, hydroksyektoina	1,8
<i>Virgibacillus pantothenicus</i> DSM 26	Ektoina, glutaminian, hydroksyektoina	1
<i>Virgibacillus salexigens</i> DSM 11438	Ektoina, glutaminian	3,4
Proteobacteria		
α -Proteobacteria		
<i>Rhodovibrio salinarum</i> BN 40	Betaina, ektoina	3,42
<i>Rhodovulum sulfidophilum</i> DSM 1374T	Ektoina	1,71
γ -Proteobacteria		
<i>Chromohalobacter marismortui</i> ATCC 17056	Ektoina, betaina	1,71
<i>Chromohalobacter salexigens</i> DSM 3043T	Ektoina, hydroksyektoina, glutaminian, glutamina	3
<i>Halomonas boliviensis</i> DSM 15516T	Ektoina, hydroksyektoina	2,58
<i>Halomonas campisalis</i> ATCC 700597	Ektoina, hydroksyektoina, glicyna, betaina	3
<i>Halomonas elongata</i> ATTC 33173T	Ektoina, glutaminian, glicyna, betaina, alanina, hydroksyektoina	1,3-1,7-4,3
<i>Halomonas elongata</i> DSM 142	Ektoina, glutaminian, alanina, NADA, hydroksyektoina	2,56
<i>Halomonas elongata</i> K63	Ektoina, alanina, NADA, hydroksyektoina	2,56
<i>Halomonas halmophila</i> CCM 2833T	Ektoina, glutaminian, alanina	1,71
<i>Halomonas halophila</i> CCM 3662T	Ektoina, glutaminian	1,71
<i>Halomonas halodenitrificans</i> DSM 735T	Ektoina	1,71
<i>Halomonas variabilis</i> DSM 3051T	Hydroksyektoina, betaina, ektoina, trehaloza	1,71

<i>Halorhodospira abdelmalekii</i> DSM 2110T	Betaina, ektoina, trehaloza	3,42
<i>Halorhodospira halochloris</i> DSM 1059T	Ektoina	3,42
<i>Halorhodospira halophila</i> DSM 244T	Betaina, ektoina, trehaloza	3,42
<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	Ektoina, betaina, glutaminian, β -glutaminian	1,5
<i>Pantoea agglomerans</i> strain CPA-2	Ektoina, glicyna, betaina	1,2
<i>Pseudomonas halophila</i> DSM 3050T	Betaina, hydroksyektoina, ektoina	1,71
<i>Pseudomonas halosaccharolytica</i> CCM 2851	Ektoina, alanina, hydroksyektoina	1,71
<i>Thioalkalibacter halophilus</i> DSMZ 19224	Ektoina, glicyna, betaina	3
<i>Vibrio alginolyticus</i> DSM 2171T	Ektoina, alanina	1,71
<i>Vibrio cholerae</i> O139 strain MO10	Ektoina	0,5
<i>Vibrio costicola</i> CCM 2811	Ektoina, betaina	1,71
<i>Vibrio fischeri</i> DSM 507	Ektoina, glutaminian, betaina	0,86
<i>Vibrio fischeri</i> DSM 7151	Glutaminian, ektoina, betaina	0,86
<i>Vibrio harveyi</i> DSM 2165	Ektoina, GABA, glutaminian, alanina	0,86
<i>Vibrio harveyi</i> DSM 6904	Ektoina, glutaminian	0,86
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> RIMD2210633	Ektoina	1

Ważnym czynnikiem, zapewniającym wysoką produkcję ektoiny jest osiągnięcie wysokiej gęstości komórek w fermentatorze. Wysoka gęstość komórek hodowli HCDC (ang. high cell-density cultivations) stosowana jest do bioprodukcji antybiotyków, rekombinowanych białek, metabolitów, polimerów (CANOVAS i współaut. 2003, SHILOACH i FASS 2005, BERNAL i współaut. 2007). Maksymalne zagęszczenie komórek w optymalnych warunkach jest zróżnicowane w zależności od rodzaju mikroorganizmów. Tradycyjne HCDC u mezofili i drożdży pozwala osiągnąć wartość biomasy w granicach 100–250 g_{SM}·L⁻¹ (RIESENBERG i GUTHKE 1999), natomiast u halofili wartości te są zazwyczaj niższe do 61 g_{SM}·L⁻¹ (GUZMAN i współaut. 2009, FALLET i współaut. 2010, VAN-THUOC i współaut. 2010).

Zdolność do syntezy ektoiny jest najbardziej rozpowszechniona wśród α i γ -*Proteobacterii* i *Actinobacteria*. Zaobserwowano ją również u β -, δ - i ϵ -*Proteobacteria*, *Firmicutes* i *Plantomycete* (Tabela 1).

Jest ona możliwa również u fotosyntetycznych bakterii z rodzaju *Halorhodospira*, jak również chemoheterotroficznych bakterii z rodzaju *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Vibrio*, *Pseudomonas* i *Marinobacter* (ROBERTS 2005, VAN-THUOC i współaut. 2009), *Actinobacteria* w tym kilka gatunków z rodzaju *Brevibacterium* i *Streptomyces*, *Firmicutes* w tym kilka gatunków z rodzaju *Bacillus* i blisko spokrewnionych rodzajów, takich jak *Virgibacillus*, *Salibacillus*, *Halobacillus* (KUHLMANN i BREMER 2002, HEERMANN i JUNG 2004) i *Marinococcus halophilus* (LOUIS i GALIŃSKI 1997, HAGEMANN 2011).

ZASTOSOWANIE EKTOINY

Bioprotektanty mają wiele zastosowań, gdyż łagodzą skutki działania zmian temperatury, przegrzania, chłodzenia, odwadniania, wysokiego zasolenia, promieniowania i innych czynników wpływających negatywnie na stabilność białek, kwasów nukleinowych biomembran, a nawet całych komórek. Spośród wielu różnych substancji dotychczas zbadanych największe właściwości stabili-

zujące wykazuje ektoina (CATH i współaut. 2006, PASTOR i współaut. 2010).

W biotechnologii ektoina oraz jej pochodna hydroksyektoina są wykorzystywane m.in. do stabilizacji enzymów, ochrony struktury DNA i struktury białek. Stabilizujące właściwości ektoiny były testowane w różnych procesach enzymatycznych.

Do najważniejszych zastosowań można zaliczyć:

– ochronę przed degradacją białek rekombinowanych, agregacją i zamrażaniem (BARTH i współaut. 2000);

– termostabilizację syntetazy cyjanoficynowej *in vitro*; stanowiącą materiał zapasowy sinic (HAI i współaut. 2002);

– termostabilizację fitazy (90°C), która należy do enzymów o właściwościach katalitycznych, regulujących przebieg procesów życiowych, wytwarzanych przez każdy żywy organizm. Prawie wszystkie pasze roślinne zawierają fitazę różniącą się aktywnością. Najwyższą aktywnością fitazy charakteryzuje się żyto, pszenica i otręby pszenne, najniższą zaś owies, kukurydza i groch. Ektoina wyraźnie stabilizuje katalityczną wydajność fitazy w wysokiej temperaturze wykazując siedmiokrotny wzrost w porównaniu do fitazy niewspomaganej przez ektoinę (ZHANG i współaut. 2006);

– ochronę przed stresem zamrażania i rozmrażania immunotoksyn. Nierozpuszczalne i nienatywne białka ulegające nadekspresji często mogą być częściowo zdenaturowane, a w obecności osmoprotektantów regenerują się (BARTH i współaut. 2000);

– rolę wzmacniacza w reakcjach PCR (ang. polymerase chain reaction, reakcja łańcuchowa polimerazy). Homoektoina, nowa syntetyczna pochodna ektoiny, zwiększa specyficzność PCR o 100% (SCHNOOR i współaut. 2004),

– poprawę jakości mikromacierzy DNA. Niskie stężenie milimolowe hydroksyektoiny, fosforanu diglicerolu potasu oraz mannosylu glicerolu potasu zmniejszają tło mikromacierzy DNA oraz zapewniają efektywność hybrydyzacji (MASCCELLANI i współaut. 2007);

– ochronę białek LDH (ang. lactate dehydrogenase, dehydrogenaza mleczanowa) oraz fosfofruktokinazy przed stresem oksydacyjnym (ANDERSSON i współaut. 2000);

– zwiększenie stabilności i temperatury topnienia RNazy. Znacząca stabilizacja RNazy A przez hydroksyektoinę czyni ją dobrym stabilizatorem w procesach biotechnologicznych, w których wykorzystuje się enzymy w obecności czynników denaturujących, np. wysokiej temperatury (KNAPP i współaut. 1999);

– stabilizację kompleksu zawierającego LRP (ang. leucine rich repeats, powtórzenia bogate w aminokwas leucynę). Wykazano, że DNA wiążące się z białkami H-NS (ang. histo-

ne-like nucleoid structuring protein, histonopodobne białka) stymuluje kompleks LRP, tak jak ektoina, zapewniając jednokomórkowym mikroorganizmom odpowiedni poziom nawilżenia, także stymuluje wiązanie LRP (PUL i współaut. 2007);

– ochronę błony komórkowej przed środkami powierzchniowo czynnymi (GRAF i współaut. 2008).

W medycynie oraz kosmetyce ektoina ma bardzo szerokie zastosowanie. Może być wykorzystywana w celu ochrony lub zapobiegania przed niektórymi chorobami, posiada bowiem duży potencjał jeśli chodzi o ochronę skóry, komórek, stabilizację białek w organizmie czy też reakcji alergicznej. Do potencjalnych zastosowań terapeutycznych należy:

– ochrona przed nanocząsteczkami, wywołującymi zapalenie płuc. Podawanie ektoiny hamuje powstawanie nanocząsteczek, które wysyłają sygnał odpowiedzialny za powstawanie prozapalnych reakcji w komórkach nabłonka płuc (SYDLIK i współaut. 2009);

– ochrona komórek nerwowych przed powstawaniem toksycznych form białek z łańcuchami poliglutaminianu, które wywołują zmiany konformacyjne białka powodując tworzenie agregatów, a następnie śmierć komórek (FURUSHO i współaut. 2005);

– hamowanie agregacji oraz neurotoksyczności β -amyloidu w chorobie Alzheimera; może stanowić więc potencjalną terapię antyamyloidową w leczeniu choroby Alzheimera, hamując powstawanie amyloidu A β 42 (ang. amyloid β 42 amino acids) *in vitro* i zmniejsza jego toksyczność w stosunku do ludzkich komórek neuroblastomy (KANAPATHIPILLAI i współaut. 2008);

– zahamowanie agregacji i neurotoksyczności peptydu prion 106-206 odpowiedzialnego za chorobę Creutzfeldta-Jakoba. Priony agregują do odpornych na proteazy włókien amyloidowych, tym samym powodując śmierć neuronów poprzez apoptozę oraz rozprzestrzenianie i przerost komórek glejowych; komórki neuroblastoma inkubowane z ektoiną i prionami wykazują wyższy wskaźnik przeżycia w porównaniu z próbą kontrolną (KANAPATHIPILLAI i współaut. 2008);

– hamowanie powstawania amyloidu insuliny. Agregacja białek prowadzi do powstania wysoce regularnych agregatów określanych jako amyloidy; wykazano, że ektoina bardzo skutecznie hamuje powstawanie amyloidu, zmniejszając jego inicjację i fazę elongacji amyloidu insuliny *in vitro* (ARORA i współaut. 2004);

– ochrona jelita cienkiego przed niedokrwieniem i reperfuzją. Niedokrwienie i późniejsze uszkodzenia reperfuzyjne pozostają głównym ograniczeniem w pomyślnej transplantacji jelita cienkiego. Uznaje się powszechnie, że uszkodzenia reperfuzyjne są podstawowym patofizjologicznym mechanizmem uszkodzenia śluzówki jelita, mimo że błona śluzowa jelit ma wysoką zdolność regeneracyjną. Wykazano, że morfologiczne odzyskanie uszkodzonej błony śluzowej po 24 godzinach przechowywania w niskiej temperaturze wymaga co najmniej 1 miesiąca. To długotrwałe uszkodzenie przyczynia się nie tylko do odrzucenia przeszczepu, ale także do różnych powikłań pooperacyjnych, takich jak translokacja bakteryjnej czy absorpcji endotoksyn.

Ektoina skutecznie chroni:

– błonę śluzową jelit poprzez zmniejszenie stężenia ceramidu, który jest mediatorem

apoptozy i stresu oksydacyjnego, poprawiając tym samym funkcjonalność bariery błony śluzowej (WEI i współaut. 2009);

– skórę u ludzi przed starzeniem się (skumulowany efekt czynników zewnętrznych takich jak promieniowanie, wiatr, wilgoć, ekstremalne temperatury prowadzi do starzenia się skóry) i przed czynnikami stresowymi, które zazwyczaj prowadzą do jej odwodnienia (BUNGER 1999, GRAF i współaut. 2008), a także przed światłem widzialnym (światło widzialne powoduje uszkodzenie DNA). Wykazano, że te uszkodzenia są mniejsze przy zastosowaniu ektoiny o 92,7% wobec światła widzialnego i 68,9% wobec promieniowania UV/VIS (BOTTA i współaut. 2008);

– stabilizuje błonę komórki przed szkodliwym wpływem substancji powierzchniowo czynnych.

WYROBY MEDYCZNE ZAWIERAJĄCE EKTOINĘ

W ostatnich latach co raz większym zainteresowaniem cieszą się produkty zawierające ektoinę. Ochronę prawną zyskały między innymi:

– rozjaśniacze do włosów (Patent US832-8882; EP2477701A2),

– kosmetyki nawilżające (Patent US60-60071; US7160560),

– środki do pielęgnacji jamy ustnej (Patent US7048910),

– filtry UV (Patent US20080171004).

Wśród dostępnych na rynku farmaceutyków, zawierających ektoinę znajdują także krople do nosa i oczu łagodzące objawy alergii oraz kremy łagodzące stany zapalne skóry.

Szerokie zainteresowanie ektoiną sprawiło, iż wiele zastosowań medycznych tego związku oraz formuły zawierających ektoinę farmaceutyków zostało objętych ochroną patentową. Prawo chroni min. zastosowanie ektoiny w leczeniu i profilaktyce:

– immunosupresji wywołanej promieniowaniem UV (Patent US20030198609),

– w leczeniu i profilaktyce przeciwnowotworowej (Patent US20030199446),

– w profilaktyce i leczeniu chorób układu oddechowego i krwionośnego (Patent US20060246007).

EKTOINA – PRZECIWSTRASOWA CZĄSTECZKA PRZYSZŁOŚCI

Streszczenie

Mikroorganizmy występują zarówno w środowiskach glebowych, jak i w ekstremalnych, m.in. w słonych jeziorach oraz kopalniach węgla czy soli. Przetrawanie w tak niekorzystnych warunkach umożliwia im obecność jednego z osmoprotektantów – ektoiny. Związek ten zapobiega utracie wody z komórek, reguluje ich turgor, nie zakłócając metabolizmu. Ektoina syntetyzowana jest przez mikroorganizmy w celu ochrony przed różnego rodzaju stresem środowiskowym, np. promieniowaniem UV lub wysoką temperaturą.

Ektoina jest rzadkim aminokwasem, kwasem 1,4,5,6-tetrahydro-2-metylo-4-pyrimidyno karboksylo-

wym o charakterze amfoterycznym. W dzisiejszych czasach znalazła szerokie zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu. Rosnące zapotrzebowanie handlowe na ektoinę doprowadziło do szeregu działań zwiększających wydajność naturalnej biosyntezy w porównaniu do technologii chemicznych.

Wśród wielu zastosowań ektoiny bardzo istotne jest wykorzystanie w medycynie, gdzie stosowana jest w celu ochrony zdrowych komórek podczas chemio- i radioterapii. Duże znaczenie posiada również w kosmetyce, gdzie dodawana jest do kremów nawilżających i produktów chroniących skórę przed promieniowaniem UV i efektem przedwczesnego fo-

to-starzenia skóry. W biologii molekularnej wykorzystywana jest do termostabilizacji enzymów i kwasów

nukleinowych, kompleksów białek-DNA i całych komórek.

ECTOINE – ANTI-STRESS MOLECULE OF THE FUTURE

Summary

Microorganisms occur in soil environments as well as in extreme environments, such as saline lakes, coal and salt mines. Their survival under unfavorable conditions is possible due to the presence of an osmoprotectant – ectoine. This compound prevents the cells from water loss and regulates their turgor without disturbing their metabolism. Ectoine is synthesized by microorganisms, in order to protect them against various types of environmental stresses such as UV radiation or heat stress.

Ectoine is a rare amino acid, 1,4,5,6-tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid of amphoteric character. Nowadays ectoine has found wide appli-

cations in different branches of the industry. The increasing demand for ectoine led to a number of actions enhancing an efficiency of its biosynthesis compared to chemical technologies.

Ectoine is commonly used in medicine to protect healthy cells during chemotherapy and radiotherapy. It is also a very important compound in cosmetics as the component of moisturizers and products used for skin protection against UV radiation and prevention from its early photoaging. In molecular biology it is used for thermal stabilization of enzymes and nucleic acids, protein-DNA complexes and whole cells.

LITERATURA

- ANDERSSON M. M., BRECCIA J. D., HATTI-KAUL R., 2000. *Stabilizing effect of chemical additives against oxidation of lactate dehydrogenase*. Biotechnol. Appl. Biochem. 32, 145–153.
- ARORA A., HA C., PARK C. B., 2004. *Inhibition of insulin amyloid formation by small stress molecules*. FEBS Lett. 564, 121–125.
- BARTH S., HUHN M., MATTHEY B., KLIMKA A., GALINSKI E. A., ENGERT A., 2000. *Compatible-solutes supported periplasmic expression of functional recombinant proteins under stress conditions*. Appl. Environ. Microbiol. 66, 1572–1579.
- BERNAL V., SEVILLA A., CANOVAS M., IBORRA J. L., 2007. *Production of L-carnitine by secondary metabolism of bacteria*. Microb. Cell Fact. 6, 31.
- BOTTA C., DI GIORGIO C., SABATIER A.S., DE MEO M., 2008. *Genotoxicity of visible light (400–800 nm) and photoprotection assessment of ectoin, L-ergothioneine and mannitol and four sunscreens*. J. Photochem. Photobiol. 91, 24–34.
- BUNGER J., 1999. *Ectoine added protection and care for the skin*. Euro Cosmet. 7, 22–24.
- CANOVAS M., MAIQUEZ J., DE DIEGO T., BUENDIA B., ESPINOSA G., IBORRA J. L., 2003. *Membrane cell retention systems for continuous production of L-carnitine using Proteus sp.* J. Membr. Sci. 214, 101–111.
- CATH T. Y., CHILDRESS A. E., ELIMELECH M., 2006. *Forward osmosis: principles, applications, and recent developments*. J. Membr. Sci. 281, 70–87.
- DÖTSCH A., SEVERIN J., ALT W., GALIŃSKI A. E., KREFT J. U., 2008. *A mathematical model for growth and osmoregulation in halophilic bacteria*. Microbiology 154, 2956–2969.
- EMPADINHAS N., DA COSTA M. S., 2008. *Osmoadaptation mechanisms in prokaryotes: distribution of compatible solutes*. Int. Microbiol. 11, 151–161.
- FALLET C., ROHE P., FRANCO-LARA E., 2010. *Process optimization of the integrated synthesis and secretion of ectoine and hydroxyectoine under hyper/hypo osmotic stress*. Biotechnol. Bioengin. 107, 124–133.
- FURUSHO K., YOSHIZAWA T., SHOJI S., 2005. *Ectoine alters subcellular localization of inclusions and reduces apoptotic cell death induced by the truncated Machado-Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch*. Neurobiol. Disease 20, 170–178.
- GALIŃSKI A. E., 1993. *Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, watersoluble interaction, stress protection*. Cell. Mol. Life Sci. 49, 487–496.
- GALIŃSKI A. E., PFEIFFER H., TRUPER G. H., 1985. *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. 149, 135–139.
- GALIŃSKI A. E., STEIN M., AMENDT B., KINDER M., 1997. *The kosmotropic (structure-forming) effect of compensatory solutes*. Comp. Biochem. Physiol. Part A, Physiol. 117, 357–365.
- GRAF R., ANZALI S., BUENGER J., PFLUECKER F., DRILLER H., 2008. *The multifunctional role of ectoine as a natural cell protectant*. Clin. Dermatol. 26, 326–333.
- GUZMAN H., VAN-THUOC D., MARTIN J., HATTI-KAUL R., QUILLAGUAMAN J., 2009. *A process for the production of ectoine and poly(3-hydroxybutyrate) by Halomonas boliviensis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 84, 1069–1077.
- HAGEMANN M., 2011. *Molecular biology of cyanobacterial salt acclimation*. FEMS Microbiol. Rev. 35, 87–123.
- HAI T., OPPERMANN-SANIO F. B., STEINBUCHER A., 2002. *Molecular characterization of a thermostable cyanophycin synthetase from the thermophilic cyanobacterium Synechococcus sp. strain MA19 and in vitro synthesis of cyanophycin and related polyamides*. Appl. Environ. Microbiol. 68, 93–101.
- HEERMANN R., JUNG K., 2004. *Structural features and mechanisms for sensing high osmolarity in microorganisms*. Curr. Opin. Microbiol. 7, 168–174.
- JAKUBOWSKA A., 2012. *Wiązanie jonów na granicy faz oraz specyficzne efekty jonowe*. Wiadomości Chemiczne 66, 3–4.
- KANAPATHIPILLAI M., KU S. H., GIRIGOSWAMI K., PARK C. B., 2008. *Small stress molecules inhibit aggregation and neurotoxicity of prion peptide 106–126*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 365, 808–813.

- KNAPP S., LADENSTEIN R., GALIŃSKI A. E., 1999. *Extrinsic protein stabilization by the naturally occurring osmolytes beta-hydroxyectoine and betaine*. *Extremophiles* 3, 191–198.
- KUHLMANN A. U., BREMER E., 2002. *Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in Bacillus pasteurii and related Bacillus spp.* *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 772–783.
- LENTZEN G., SCHWARZ T., 2006. *Extremolytes: natural compounds from extremophiles for versatile applications*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 623–634.
- LOUIS P., GALIŃSKI E. A., 1997. *Characterization of genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine from Marinococcus halophilus and osmoregulated expression in Escherichia coli*. *Microbiology* 143, 1141–1149.
- LOUIS P., TRÜPER H. G., GALIŃSKI E. A., 1994. *Survival of Escherichia coli during drying and storage in the presence of compatible solutes*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41, 684–688.
- MASCELLANI N., LIU X., ROSSI S., MARCHESINI J., VALENTINI D., ARCELLI D., TACCIOLI C., CITTERICH M. H., LIU C. G., EVANGELISTI R., RUSSO G., SANTOS J. M., CROCE C. M., VOLINIA S., 2007. *Compatible solutes from hyperthermophiles improve the quality of DNA microarrays*. *BMC Biotechnology* 7, 82.
- MOELBERT S., NORMAND B., RIOS P., 2004. *Kosmotropes and chaotropes: modelling, preferential exclusion, binding and aggregate stability*. *Biophys. Chem.* 112, 45–57.
- PASTOR J. M., SALVADOR M., ARGANDOÑA M., BERNAL V., REINA-BUENO M. L., CSONKA N., IBORRA J. L., VARGAS C., NIETO J. J., CÁNOVAS M., 2010. *Ectoines in cell stress protection: Uses and biotechnological production*. *Biotechnol. Adv.* 28, 782–801.
- PRABHU J., SCHAUWECKER F., GRAMMEL N., KELLER U., BERNHARDT M., 2004. *Functional expression of the ectoine hydroxylase gene (thpD) from Streptomyces chrysomallus in Halomonas elongata*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3130–3132.
- PUL U., WURM R., WAGNER R., 2007. *The role of LRP and H-NS in transcription regulation: involvement of synergism*. *J. Mol. Biol.* 366, 900–915.
- RESHETNIKOV A. S., KHMELLENINA V. N., MUSTAKHIMOV I. I., KALYUZHNAJA M., LIDSTROM M., TROTSSENKO Y. A., 2011. *Diversity and phylogeny of the ectoine biosynthesis genes in aerobic, moderately halophilic methylotrophic bacteria*. *Extremophiles* 15, 653–663.
- REUTER K., PITTELKOW M., BURSLEY J., HEINE A., CRAAN T., BREMER E., 2010. *Synthesis of 5-hydroxyectoine from ectoine: crystal structure of the non-heme iron(II) and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase EctD*. *PLOS ONE* 5, 1–10.
- RIESENBERG D., GUTHKE R., 1999. *High-cell-density cultivation of microorganisms*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 422–430.
- ROBERTS M. F., 2005. *Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms*. *Saline Systems* 1, 5.
- SCHNOOR M., VOSS P., CULLEN P., BOKING T., GALLA H. J., GALIŃSKI A. E., LORKOWSKI S., 2004. *Characterization of the synthetic compatible solute homo-ectoine as a potent PCR*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 867–872.
- SCHWIBBERT K., MARIN-SANGUINO A., BAGYAN I., HEIDRICH G., LENTZEN G., SEITZ H., RAMPP M., SCHUSTER S. C., KLENK H. P., PFEIFFER F., OESTERHELT D., KUNTE H. J., 2011. *A blueprint of ectoine metabolism from the genome of the industrial producer Halomonas elongata DSM 2581T*. *Environ. Microbiol.* 13, 1973–1994.
- SHILOACH J., FASS R., 2005. *Growing E. coli to high cell density – a historical perspective on method development*. *Biotechnol. Adv.* 23, 345–357.
- SYDLIK U., GALLITZ I., ALBRECHT C., ABEL J., KRUTMANN J., UNFRIED K., 2009. *The compatible solute ectoine protects against nanoparticle-induced neutrophilic*. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 180, 29–35.
- TROTSSENKO Y. A., RESHETNIKOV A. S., KHMELLENINA V. N., 2005. *Characterization of the ectoine biosynthesis genes of haloalkalotolerant obligate methanotroph „Methylomicrobium alcaliphilum 20Z”*. *Arch. Microbiol.* 184, 286–297.
- VAN-THUOC D., GUZMAN H., GUILLAGUAMAN J., HATTI-KAUL R., 2010. *High productivity of ectoines by Halomonas boliviensis using a combined two-step fed-batch culture and mil king process*. *J. Biotechnol.* 147, 46–51.
- VAN-THUOC D., GUZMAN H., THI-HANG M., HATTI-KAUL R., 2009. *Ectoine production by Halomonas boliviensis: optimization using response surface methodology*. *Marine Biotechnol.* 12, 586–593.
- WEI L., WEDEKING A., BUTTNER R., KALFF J.C., TOLBA R. H., VAN ECHTEN-DECKERT G., 2009. *A natural tetrahydropyrimidine protects small bowel from cold ischemia and subsequent warm in vitro reperfusion injury*. *Pathobiology* 76, 212–220.
- YU I., NAGAOKA M., 2004. *Slowdown of water diffusion around protein in aqueous solution with ectoine*. *Chem. Phys. Lett.* 388, 316–321.
- ZHANG L., WANG Y., ZHANG C., WANG Y., ZHU D., WANG C., NAGATA S., 2006. *Supplementation effect of ectoine on thermostability of phytase*. *J. Biosci. Bioeng.* 102, 560–563.