

BIOSYNTHESIS AND THE POSSIBILITY OF USING ECTOINE AND HYDROXYECTOINE IN HEALTH CARE

Weronika Goraj, Zofia Stępniewska, Anna Szafranek-Nakonieczna*

The John Paul II Catholic University of Lublin, Institute of Biotechnology,
Department of Biochemistry and Environmental Chemistry

Received in March 2019, accepted in July 2019

Abstract: The global production of L-amino acids is largely based on microbiological synthesis. The largest bioproduction concerns L-glutamic acid (1.5 million tons per year), and L-lysine (850,000 tons per year). Among other amino acids, ectoine and hydroxyectoine are mentioned in the growing demand. Currently, the main producer of ectoine based on the biotechnology process is the German company Bitop. The organism used in the ectoine production is *Halomonas elongata* isolated from a solar salt facility on Bonaire, Netherlands Antilles. The production of ectoine described in the literature is based on the so-called “milking” process. The great demand for amino acids is related to their properties and potential use. Ectoine, as a kosmotropic substance, has the property of stabilizing the structure of water molecules. Just like other osmolytes in aqueous solutions, ectoine increases the hydration of macromolecules, preventing them from denaturation. The industrial use of ectoine is based mainly on the ability to protect the skin and alleviate its inflammation but also applies to other, broad possibilities of its application in biotechnology, cosmetology, medicine and pharmacy.

1. Introduction. 2. Properties of ectoine. 3. The use of ectoine. 4. Chemical and biotechnological production of ectoine 5. Microorganisms synthesizing ectoine. 5.1. Methanotrophic bacteria. 6. Summary

BIOSYNTETA I MOŻLIWOŚCI ZASTOSOWANIA EKTOINY I HYDROKSYEKTOINY W OCHRONIE ZDROWIA

Streszczenie: Światowa produkcja L-aminokwasów w dużej mierze opiera się na syntezie mikrobiologicznej. Największa bioprodukcja dotyczy kwasu L-glutaminowego (1,5 mln ton rocznie), oraz L-lizyny (850 tys. ton rocznie). Wśród innych aminokwasów, o wciąż rosnącym popycie wymienia się ektoinę jak również hydroksyektoinę. Obecnie głównym producentem ektoiny w oparciu o proces biotechnologiczny, jest niemiecka firma Bitop. Organizmem wykorzystywanym w produkcji ektoiny jest *Halomonas elongata* wyizolowany z systemów wykorzystywanych przy produkcji soli na holenderskiej wyspie Bonaire na Morzu Karaibskim. Produkcja opisana w literaturze, oparta jest na tzw. procesie „milking”. Duże zapotrzebowanie na aminokwasy związane jest z ich właściwościami i potencjalnym zastosowaniem. Ektoina jako substancja kosmotropowa posiada właściwości stabilizujące strukturę cząsteczek wody. Tak jak i inne osmolity w roztworach wodnych ektoina zwiększa hydratację makromolekuł zapobiegając przed ich denaturacją. Przemysłowe wykorzystanie ektoiny opiera się głównie na możliwości ochrony skóry i łagodzenia jej stanów zapalnych ale dotyczy też innych, szerokich możliwości zastosowania jej w biotechnologii, kosmetologii, medycynie i farmacji.

1. Wprowadzenie. 2. Właściwości ektoiny. 3. Zastosowanie ektoiny. 4. Chemiczna i biotechnologiczna produkcja ektoiny. 5. Mikroorganizmy syntetyzujące ektoinę. 5.1. Bakterie metanotroficzne. 6. Podsumowanie

Słowa kluczowe: ektoina, halophile, *Halomonas elongata*, hydroksyektoina, metanotrofy

Key words: ectoine, halophile, *Halomonas elongata*, hydroxyectoine, methanotrophs

1. Introduction

Many authors believe that amino acids such as ectoine and hydroxyectoine provide much more effective protection against the effects of osmotic or temperature stress than other osmolytes known to date. These amino acids have a strong protective effect for enzymes and proteins. Their accumulation in the cell occurs through *de novo* synthesis or transportation from the external environment. Ectoine (1,4,5,6-tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid) and its hydroxylated derivative hydroxyectoine are cyclic amino acids produced by microorganisms under stress conditions such

as: salinity, high temperature, low water content environment or UV radiation. Ectoine was first isolated by Galiński *et al.* in 1985 [32]. This discovery took place during the study of halophilic purple bacteria *Ectothiorhodospira halochloris*, autotrophs which use light energy for the production of organic compounds. Ectoine and hydroxyectoine have a similar chemical structure. Hydroxyectoine differs from 1,4,5,6-tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidine carboxylic acid by the presence of a hydroxyl group at one of the carbon atoms in the aromatic ring. In all probability, microorganisms exposed to high temperature stress produce mainly hydroxyectoine [78]. In the case of salt stress, it was shown that the

* Corresponding author: Anna Szafranek-Nakonieczna, Department of Biochemistry and Environmental Chemistry, Institute of Biotechnology, Faculty of Biotechnology and Environmental Sciences, The John Paul II Catholic University of Lublin, Str. Konstantynów 11, 20-708 Lublin, Poland; phone + 48 81 454 54 61; e-mail: anna.szafranek@kul.pl

biosynthesis of hydroxyectoine occurs much later than the one of ectoine. This was confirmed by proving that the expression of the *ectABC* genes responsible for ectoine synthesis occurs earlier than the one of the *ectD* gene responsible for the synthesis of hydroxyectoine [91].

2. Properties of ectoine

Ectoine belongs to the so-called compensating substances meaning that it protects against changes in the cell resulting from osmotic stress. This molecule is also referred to as a kosmotropic substance. Salt ions may have a kosmotropic effect on water, causing stabilization of the quasi-crystalline water structure or a chaotropic effect, affecting the disorganization of this structure, disturbing the polar structure of water. This is due to the interaction of a free pair of electrons with the cation and hydrogen atoms with the anion, which creates electrostatically stabilized hydration shells around the ions. Such immobilized water molecules are inaccessible to macromolecules exhibiting a hydrophobic character (e.g. proteins), because the polar solvent (water) is more strongly held by the electric field of ions with a higher charge-to-radius ratio [46]. Ectoine as a kosmotropic substance has the properties of stabilizing water molecules. The kosmotropic effect is manifested as a reduction in contact surface between water molecules and phospholipids of cell membranes. Derived from Greek κόσμος, it denotes order and refers to the ability to create orderly structures by strengthening the structure of water [31]. This phenomenon is explained by model tests carried out by Graf *et al.* in 2008. The dynamic simulation clearly indicates that the addition of ectoine causes a strong compensating effect consisting in the ability to re-arrange water molecules by expanding the hydrogen bond network between them [35].

Compounds having compensatory character are removed outside the hydration layer of proteins (the

so-called preferential exclusion model), which explains the stabilising effect of proteins, resulting from the reduction of the surface of interaction (a phenomenon being more beneficial from the point of view of entropy) [86]. The “preferential exclusion model” is a hypothesis explaining the biophysical mechanism of the impact of ectoine on macromolecules, according to which osmoprotectants in aqueous solutions do not interact directly with macromolecules but increase the hydration of the molecule, preventing its denaturation [14, 45]. Hahn *et al.* showed the opposite effect of ectoine and NaCl on water molecules, using resonance Raman spectroscopy. These studies are another aspect that justifies the presence of high concentrations of osmolytes in halotolerant bacteria [38].

It turned out that the influence of ectoine and hydroxyectoine on macromolecules and cells in some aspects is mutually antagonistic [86].

3. The use of ectoine

The properties of ectoine cause this amino acid to be multifunctional and have a wide spectrum of applications in many industries, mainly in medicine, pharmacy, cosmetology or biotechnology. The industrial use of ectoine is based primarily on the possibility of protecting the skin and relieving inflammation (Table I), stabilizing enzymes; protection of cells and macromolecules against osmotic and temperature stress, UV radiation, desiccation (Table II, Table IV). The protective effect of ectoine described on the example of microorganisms capable of its synthesis can be also used in relation to higher organisms: human, animal and also plants.

The use of ectoine in cosmetics is based on its protective effect on the skin. It is used as a component of anti-wrinkle and moisturizing cosmetics. Human skin is a barrier between the body and the environment,

Table I
Potential possibilities of practical use of ectoine in skin protection

Effect	References
Anti-aging effect (<i>in vivo</i>)	[41]
Skin protection against desiccation (<i>in vivo</i>)	[35]
Anti-aging activity (<i>in vitro</i>), mitochondrial DNA protection and inhibition of skin inflammation caused by ceramides	[17]
Inducing thermal shock proteins and mediation in the proinflammatory response of human epidermal keratinocytes	[19]
Photoprotection against visible light (<i>in vitro</i>)	[13]
Moisturising factor (<i>in vivo</i>)	[71]
UV protection of Langerhans cells (<i>in vivo</i>)	[10]
Blocking the release of ceramides in human epidermal keratinocytes under the influence of UVA	[36]
Skin protection against dehydration caused by surfactants (<i>in vivo</i>)	[18]
Inhibition of melanogenesis	[96]

Author's own modification following [74].

so it is exposed to many external factors. The stratum corneum of the epidermis is particularly important in this regard. It has a double function in maintaining skin hydration. First, keratinized cells of the stratum corneum form a hydrophobic barrier that prevents water from entering the body through skin. Secondly, with respect to the internal environment, it maintains hydration thanks to its Natural Moisturizing Factor (NMF). It keeps water in the skin and protects it from evaporation [79]. Many environmental factors can have a destructive effect on this natural barrier, causing the skin to lose water. Skin desiccation may result, among others, from exposure to extreme temperatures, dry air, solar radiation, wind or frequent use of detergents. All this causes the skin to dry out and accelerates its aging. There are many examples in the literature confirming the anti-aging and moisturizing effect of ectoine on the skin (Table I). The first commercial use of ectoine for skin protection was related to protection against solar

radiation and anti-aging activity [18]. Also, now, ectoine is widely used for this purpose [3, 4, 35]. It has been proved that ectoine protects Langerhans cells from UV radiation [10] and is responsible for blocking the release of ceramides in human epidermal keratinocytes under the influence of UVA [36]. Exposure of keratinocytes to UVA radiation, especially in humans, results in elevated levels of ceramides, and consequently activates the intracellular signalling cascade, leading to the expression of intercellular adhesion molecules. These negative effects can be effectively prevented by using ectoine, which is capable of “extinguishing” singlet oxygen [17, 36]. Büenger and Driller exposed human keratinocytes to 1 mM ectoine and UV radiation (30 J/cm²) for 24 hours. Then, they examined the release of inflammatory agents such as AP-2, ICAM-1, ceramides and showed that the initial effect of ectoine on keratinocytes leads to a decrease in the release of AP-2 inflammatory factor and increased expression of ICAM-1 adhesion molecules [17].

Table II
Potential possibilities of the practical use of ectoine and hydroxyectoine for protecting macromolecules

Effect	References
Ectoine	
Ensuring thermostability of cyanophycin synthetase	[39]
Ensuring the thermostability of the phytase (90° C)	[100]
Antibodies protection against proteolytic degradation	[9]
Lowering the melting temperature of DNA	[58]
Limiting the formation of infectious prions (PrP ¹⁰⁶⁻¹²⁶) causing encephalopathy (<i>in vitro</i>)	[47]
Activation of proinflammatory reactions in the lung epithelium by stabilizing the membrane signalling platform (<i>ex vivo</i>)	[93]
Neutrophil apoptosis restoration during pneumonia (<i>in vivo</i> and <i>in vitro</i>)	[88, 89]
Limiting the penetration of neutrophils into the muscle layer of the intestine after transplantation (<i>in vivo</i>) due to the ability to stabilize macromolecules on the cell surface	[75]
Macromolecule protection against proteolytic factors (<i>in vitro</i>)	[54]
Inhibition of HIV replication	[58]
Stabilization of retrovirus vectors in gene therapy	[26]
Hydroxyectoine	
Recombinant proteins protection against degradation, aggregation, change of conformation and freezing	[6]
Protection of immunotoxins against stress related to freezing and defrosting	[6]
Increasing the melting temperature of DNA	[57]
Improving the quality of DNA microarrays	[68]
Lowering AST level after liver reperfusion (as an ingredient of organ storage solution), (<i>ex vivo</i>)	[11]
Increase in bile production after reperfusion (as an ingredient of organ storage solution), (<i>ex vivo</i>)	[11]
Pressure reduction in the portal vein after reperfusion (as an ingredient of the organ storage solution), (<i>ex vivo</i>)	[11]
Reduction of cellular apoptosis after liver transplantation (as an ingredient of organ storage solution), (<i>ex vivo</i>)	[11]
Ectoine and hydroxyectoine	
Enzymes protection against high temperature, freezing and desiccation	[62]
Reduction of protein fibrillation (A β 42) in Alzheimer's disease (<i>in vitro</i>)	[47, 53, 81]
Cryoprotection of umbilical cord blood cells (<i>ex vivo</i>)	[12]
Reduction of ulcerative areas and inflammatory mediators during colitis due to the ability to stabilize macromolecules (<i>in vivo</i>)	[1]

Author's own modification following [74].

The cosmetics industry also uses the fact that ectoine has a stronger moisturizing effect than glycerol and ensures longer skin hydration [35]. It has been proven that the addition of 2% ectoine improves the care properties of products, causes better skin hydration, significant improvement of its elasticity and regeneration of the structure [41, 56]. Clinical studies ordered by Langsteiner LEK-Pharmaceutical company producing ectoine confirm that after 3–4 weeks of treatment, the preparation based on ectoine reduces skin dryness by up to 86% and skin desquamation by up to 70%.

The use of ectoine in pharmacy, medicine and biotechnology was influenced by its ability to protect macromolecules (Table II). Numerous studies have shown that ectoine, by forming a complex with water molecules, increases the stability of enzymes and thus reduces the susceptibility of protein to denaturation [97]. It was also shown that ectoine, like other compatible solutes, strengthens the intramolecular interactions important for protein stability [80]. Ectoine reduces the denaturation of enzymes induced by elevated temperature. It prolongs the activity of enzymes sensitive to freezing-defrosting, heating and freeze-drying, such as: lactate dehydrogenase (LDH) and phosphofructokinase [62]. In addition, it increases the stability of phytase, ribonuclease-A and DNA polymerase at elevated temperature [100]. In addition, it has been shown that an ectoine derivative – hydroxyectoine – has a better ability to protect proteins in the conditions of raised temperature [29, 90] (Table III). Ectoine can also protect macromo-

lecules from proteolytic factors. For example, zymogen, trypsinogen and chymotrypsinogen become resistant to enteropeptidase [54]. In addition, it has been shown that ectoine and some polyols can inhibit HIV replication [58] and stabilize retrovirus vectors in gene therapy [26].

Other applications of ectoine are associated with its ability to relieve inflammation. Its protective properties have been demonstrated in the case of neutrophilic pneumonia in humans [88, 89, 93] and experimentally induced colitis in rats [1]. The administration of ectoine inhibits signalling caused by the presence of nanoparticles, which is known to be responsible for proinflammatory reactions in the epithelial cells of rat lungs. The animals which were administered the ectoine solution intrathecally prior to the introduction of carbon nanoparticles exhibited lower IL-8 expression, lower neutrophil counts in the lung, modulation of the cytokine profile, and reduced MAP kinase activation. These observations have been supported and extended by experiments on cultured human bronchial cells in which ectoine inhibited cell signalling triggered by nanoparticles and limited IL-8 induction [88, 89, 93].

Ectoine can also be used to protect the small intestine from ischaemia and reperfusion in transplantology [1]. Alleviation of the inflammatory reaction is associated with the stabilization of the intestinal barrier and the reduction of cytokine production [75]. In 2015 Bilstain *et al.* patented the composition of the organ storage solution with the addition of ectoine and hydroxyectoine. Further research has proved that the organ

Table III
Proteins protected under stress conditions by ectoine and hydroxyectoine

Protein	Stress	Protein concentration	Concentration of osmolytes	Activity of protein (%)
Lactate dehydrogenase	fast freezing/slow defrosting (4x)	52 µg/ml	1.0 M hydroxyectoine	100
Phosphofructokinase		75 µg/ml	1.0 M ectoine	100
Enolase		50 µg/ml	0.4 M ectoine	100
Glutamate dehydrogenase		350 µg/ml	0.5 M hydroxyectoine	85
Carboxylesterase		200 µg/ml	0.5 M hydroxyectoine	100
Binding protein CD30		1 µg/ml	1.0 M hydroxyectoine	89
Lactate dehydrogenase	incubation at elevated temperature:	52 µg/ml	0.5 M hydroxyectoine	90
Phosphofructokinase		75 µg/ml	1.0 M hydroxyectoine	100
Enolase		50 µg/ml	0.1 M hydroxyectoine	88
Carboxylesterase		200 µg/ml	2.0 M hydroxyectoine	65
<i>Taq</i> polymerase		20 IU/ml	1.0 M hydroxyectoine	45
Monoclonal antibody		–	0.5 M hydroxyectoine	active
RNase A	melting	1 mg/ml	3.0 M hydroxyectoine	increase in T _m by 12 K
Lactate dehydrogenase	freeze-drying	52 µg/ml	1.0 M ectoine	61
Phosphofructokinase		75 µg/ml	1.0 M hydroxyectoine	68
Enolase		50 µg/ml	0.4 M hydroxyectoine	97
Lactate dehydrogenase	H ₂ O ₂ oxidation	200 µg/ml	0.5 M hydroxyectoine	95

Table IV
Potential possibilities of practical use of ectoine and hydroxyectoine to protect cells

Effect	References
Ectoine	
Supporting the ethanol fermentation process by <i>Zymomonas mobilis</i>	[99]
<i>Halomonas</i> participation in phenol detoxification	[69]
Maintenance of <i>E. coli</i> respiratory activity (<i>in vivo</i>)	[72]
Osmoprotective effect on lactic acid bacteria	[5]
Tolerance to the salinity of transformed tobacco plants	[70]
Increase in the fluidity of cell membranes under extreme conditions	[40]
Increases the distance between lipid molecules and improves the membrane fluidity	[28]
Effect on the synthesis of chaperone proteins (<i>in vivo</i> and <i>in vitro</i>)	[7, 19]
Enterocytes protection against alpha haemolysin of <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>in vivo</i>)	[15]
Hydroxyectoine	
Protection of <i>Pseudomonas putida</i> against desiccation	[65]
Protection of <i>E. coli</i> against desiccation	[66, 67]
Induction of thermotolerance in <i>E. coli</i>	[64]
Ectoine and hydroxyectoine	
Stabilization of <i>E. coli</i> during drying and storage	[63]

Author's own modification following [74].

storage solution intended for transplantation – HTK (histidine-tryptophan-ketoglutarate) – modified by the addition of ectoine and hydroxyectoine exerts a beneficial effect enabling liver transplantation after cardiac arrest [84]. Cryoprotection capacity was also confirmed in umbilical cord blood cells [12] and erythrocytes [30].

Some pathological processes, such as the formation and aggregation of amyloid, trigger neurodegenerative diseases. It was found that both ectoine and hydroxyectoine prevent the formation of amyloid (A β 42) and delay the progression of Alzheimer's disease [48, 53, 81].

Preparations containing ectoine ensure adequate long-term moisturization of mucous membranes. Ectoine is also a natural substance performing a cell-protective function and inhibits immune reactions, including allergic reactions. Among other things, it has been investigated whether intra-tracheal administration of ectoine exerts protective effect on allergic asthma based on early allergic response (EAR), airway hyperresponsiveness (AHR) and inflammation experimentally induced in rats. The results of the study are promising, because they prove that ectoine has a significant therapeutic effect on EAR, AHR and inflammatory response in the animal model of asthma [43]. This aspect supports potential preventive and therapeutic utility of inhaling ectoine in cases of allergy and/or asthma.

It has also been demonstrated that ectoine can protect entire cells (Table IV). It increases the fluidity of cell membranes under extreme conditions [40] and increases the distance between lipid molecules, which improves membrane fluidity [28]. Other researchers report that ectoine may affect the synthesis of chape-

rone proteins such as heat shock proteins (Hsp), and it is also assumed that the ectoine itself may act as a chaperone molecule [7, 19]. Ectoine and some polyols make human erythrocytes more resistant to damage caused by surfactants [18]. It has been shown that this effect is stronger than in the case of lecithin (phosphatidylcholine), whose stabilizing properties are already well understood. Graf *et al.* studied the effect of ectoine concentration and its duration on this stabilizing effect. They proved that the higher the concentration of ectoine, the stronger the protective effect preventing damage to the membrane. A longer contact caused the membrane stability to increase by 30% after 6 hours and 60% after 24 hours. Thus, the longer cells are exposed to ectoine, the stronger the protective effect is [35]. Recently, Bownik and Stępniewska demonstrated the possibility of protecting bovine enterocytes against alpha-haemolysin of *Staphylococcus aureus*, which forms protein channels in the membranes of target cells [15, 16].

4. Chemical and biotechnological production of ectoine

The current annual world production of L-amino acids significantly exceeds 2 million tons. In the industry microbiological synthesis with the participation of production strains, as well as the enzymatic and chemical synthesis method are used for production of amino acids.

The chemical synthesis of ectoine consists of the thermal cyclization of *N*-acetyl-benzaminobutyric

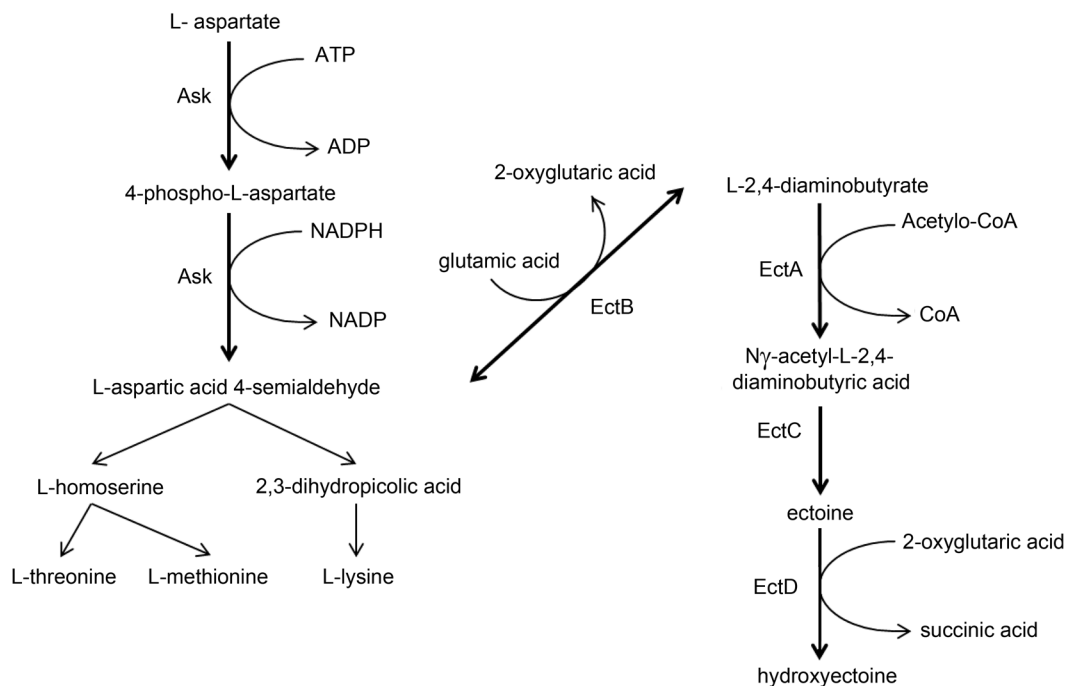


Fig. 1. Biosynthetic pathway for ectoine and hydroxyectoine. Author's own modification following [77, 92].

acid (*N*-acetyl-DABA), which is formed by acetylation of *L*-diaminobutyric acid (*L*-DABA) with the participation of *p*-nitrophenyl acetate [59]. *N*-acetyl-DABA, *n*-butanol and triethylamine are then heated to the point of boiling for 48 hours. In this process, ectoine (60%) and *N*-acetyl-DABA (40%) are obtained [8]. A similar cyclization reaction takes place when the mixture of butanol and xylene (30:70, v/v) is reacted and under a reflux condenser in the presence of *p*-toluenesulfonic acid (20%, w/v) for 48 hours. In this case, however, less ectoine (44%) and more *N*-acetyl-DABA (56%) [8, 44] are obtained. The method of synthesising this compound developed and patented by Koichi *et al.* in 1991 is also known. This Japanese patent published under number JP-A-03031265 (Takeda Chemical Ind) concerns the chemical synthesis of ectoine from *o*-acetic acid trimethyl ester and various diamino carbon acids [60]. Due to the properties of ectoine and growing market interest, scientists are searching for and patenting new methods for the synthesis of ectoine. American scientists, on the basis of the method developed by Koichi *et al.*, carried out the reaction of *o*-trimethyl acetate with 2,4-diaminobutyric acid [60]. Each method of chemical synthesis of amino acids is burdened with high costs resulting from expensive precursor compounds and the necessity to purify the obtained product. Moreover, the chemical synthesis method always results in a racemate, i.e. an equimolar mixture of a pair of the *D* and *L* amino acid enantiomers, with only the *L*-form being biologically active. Chemical synthesis therefore requires separation of the resulting enantiomeric mixture. Currently, due to the low production

costs and the lack of an efficient biological alternative, the chemical method is used mainly for the production of *D*, *L*-methionine (350,000 tonnes/year).

A combination method based on the biological isomerization of a chemically obtained product may also be used for the synthesis of amino acids. Enzymatic synthesis is also possible, which has found application in industry in the production of aspartic acid, tryptophan and serine [61]. Due to the limitations of the above-mentioned methods, manufacturers are searching for other, more economical methods of biotechnological production of amino acids, including ectoine [92].

The most commonly used method of obtaining amino acids is their microbiological synthesis. The largest share on the amino acid market is currently accounted for by the bioproduction of *L*-glutamic acid (1.5 million tonnes per year) and *L*-lysine (850 thousand tonnes per year) [34]. Currently, there is also a growing demand for other amino acids, including ectoine and hydroxyectoine. Biotechnological production of these amino acids is based on the use of the possibility of their synthesis by microorganisms. It is believed that ectoine is currently one of the most valuable products synthesized by microorganisms. The global consumption of ectoine is 15,000 tons per year and retail sales, only in the pharmaceutical industry, are estimated at 1,000 USD per kg [25, 87]. The mechanism of the biosynthesis of ectoine and hydroxyectoine is similar to that of other amino acids such as: *L*-lysine, *L*-methionine, *L*-threonine (Fig. 1). The first stage of the synthesis is the phosphorylation of *L*-aspartate and its conversion to 4-phospho-*L*-aspartate by aspartate kinase (Ask

enzyme). Then, from 4-phospho-L-aspartate, L-aspartic acid 4-semialdehyde is formed. This reaction is catalyzed by L-aspartate- β -semialdehyde dehydrogenase (Asd enzyme). In turn, L-aspartic acid 4-semialdehyde is converted to L-2,4-diaminobutyrate by diaminobutyric acid aminotransferase (enzyme EctB). The next stage is the transformation of the resulting acid by diaminobutyric acid acetyltransferase (EctA enzyme) to N γ -acetyl-L-2,4-diaminobutyric acid. Another enzyme involved in the biosynthesis of ectoine is ectoine synthase (EctC), which converts N γ -acetyl-L-2,4-diaminobutyric acid to 1,4,5,6-tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidine carboxylic acid (ectoine). Some bacteria contain ectoine hydroxylase (EctD), which allows the transformation of ectoine to hydroxyectoine (Fig. 1) [77, 92].

Biotechnological production of ectoine on an industrial scale consists of several stages. The stage of preparing the inoculum, usually it is a laboratory phase, in which the production strain is revived, and the culture is prepared in a volume of a few litres in small laboratory fermenters. The second stage is the main biosynthesis process. At each of these stages monitoring of the growth of microorganisms and control of physicochemical parameters of the culture is required. The proper biosynthesis process includes: the upstream stage, i.e. fermentation and production of the substance and the downstream stage, in which the desired substance is isolated, purified and analysed [74, 86].

The first process developed for the biotechnological production of ectoine, the so-called “bacterial milking”, was developed by Sauer and Galinski in 1998 and is currently used on an industrial scale. It allows release of synthesized osmolytes outside the cell, without degradation of the bacterial biomass. The water solubility of ectoine at 25°C is 6.5 mol/kg and it is collected in the cytoplasm of bacterial cells at a concentration up to 1 M [42]. Halophilic bacteria (e.g. *Halomonas elongata*), not only have adaptation mechanisms that enable them to function in an environment with a high salinity but are also adapted to a sudden drop in salinity caused by, among others, rainfall or floods. In this situation, the concentration of salt in the cytoplasm of these organisms is higher than outside the cell and there may be a sudden inflow of water from the external environment to the bacterial cell. In order to avoid lysis, the cell releases ectoine and other osmolytes outside. This is probably possible owing to mechanosensitive channels. In the case of *H. elongata*, three MscS channels (mechanosensitive channel of small conductance) and one MscK channel (potassium-dependent mechanosensitive channel) has been found to be present [56]. Therefore, the main factors in the process of “bacterial milking” are the induction of osmotic shock followed by the introduction into a substrate with a higher chemical potential (lower osmolarity). Gram-negative

bacteria are more sensitive to external salinity changes [63], while Gram-positive bacteria due to the multi-layered structure of murein are not so sensitive to osmotic changes and do not secrete osmoprotectants accumulated intracellularly during the “milking” process [74].

Biosynthesis of ectoine on an industrial scale is currently done mainly by the German company Bitop (Witten, Germany) which uses *Halomonas elongata*, isolated from the systems used for salt production on the Dutch island of Bonaire in the Caribbean Sea [94], in the production of ectoine. Bacteria are cultivated in fermenters with a capacity of 1000 and 3500 l, at a temperature of 25–40°C. They exhibit optimum growth at NaCl concentration between 3 and 6% NaCl but are able to grow on the substrate with the addition of up to 20% NaCl. Bacteria reach high cell density > 40 g dry weight per litre of culture. Ectoine is obtained in the above-described process of “bacterial milking”, in which bacteria grown in the presence of 10% NaCl are subjected to osmotic shock by lowering the salinity to 2% NaCl. As a result, 80% of the produced ectoine is released into the medium outside the cell. In this way through the application of *Halomonas elongata* ectoine is produced in an amount of over 10 g/l [56]. The above-described biotechnological production of this osmolyte by *H. elongata*, although being a process which supplies a relatively large amount of the product, is also a long-term (120 hours) and quite an expensive process, mainly due to the high quality requirements of the substrate and costs associated with purification or final preparation of the product [25, 56, 74]. Therefore, all work related to the search for new, efficient, easy to cultivate strains for the production of ectoine is justified and much needed.

5. Microorganisms synthesizing ectoine

In addition to the *Halomonas elongata* which is used to produce ectoine on an industrial scale, many microorganisms have the ability to synthesize this osmolyte. The synthesis of ectoine and hydroxyectoine in response to high osmolarity of the environment is widespread mainly among bacteria. The analysis of 557 genomes of the representatives of *Archaea* domain showed that only 12 strains of the genera: *Nitrosopumilus*, *Methanotrix* and *Methanobacterium* have a gene cluster responsible for the synthesis of ectoine and hydroxyectoine [95]. Among the bacteria able to synthesize ectoine and/or hydroxyectoine, representatives of both *Actinobacteria*, *Firmicutes*, as well as alpha-, gamma-, delta-*Proteobacteria* types are listed. Most of them are microorganisms which use sugars as a source of carbon, among others, bacteria of the genera *Streptomyces*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Chromohalobacter* or *Halomonas*.

Within the genus *Halomonas*, apart from *H. elongata*, other species are also characterized by relatively

high production of ectoine, but a much lower level of its excretion outside the cell. Zhang *et al.* proved that *H. salina* produces about 923 mg/l, but the level of extracellular ectoine remains small, i.e. about 11% of the total ectoine. Moreover, it has been shown that in this case the synthesis does not proceed directly in proportion to the salinity, and the maximum synthesis was obtained at a salt concentration of 1.4% NaCl [98]. However, *Halomonas boliviensis* bacteria accumulate ectoine inside cells at a maximum level of 0.74 g/l in the presence of 10–15% (w/v) NaCl, while the synthesis of hydroxyectoine under these conditions is 50 mg/l [37].

In addition, as proved by Bursy *et al.*, *Streptomyces coelicolor*, at the optimum growth temperature in the presence of 1.4% NaCl produces ectoine at the level of 10–55 $\mu\text{mol/g}_{\text{dw}}$. In turn, at elevated temperature, i.e. 39°C the synthesis of the hydroxyl derivative of ectoine predominates, reaching about 60 $\mu\text{mol/g}_{\text{dw}}$ [20]. Also the bacteria of the genus *Bacillus* [21] are known as producers of ectoine. Kuhlmann and Bremer demonstrated that *B. pasteurii* strain (DSM 33T) synthesizes ectoine at the level of 0.36 to 0.59 $\text{mmol/g}_{\text{dw}}$ [2, 55]. Other bacteria commonly occurring in the environment, in which the ability to synthesize ectoine was confirmed, are bacteria of the genus *Pseudomonas*. Seip *et al.* demonstrated that they synthesize ectoine at a maximum level of about 50 $\mu\text{mol/g}_{\text{dw}}$ and that its concentration increases along with an increase in salinity in the range of 2–7.5% NaCl [82]. Another example are bacteria of the genus *Chromohalobacter* [22, 33, 73, 83]. It has been shown that these bacteria produce a maximum of 1.2 mmol of ectoine per gram of dry weight of bacteria, which makes them more efficient in the production of ectoine than the above-described *Streptomyces* sp., *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp.

5.1. Methanotrophic bacteria

Ectoine producers known in the literature are also methanotrophic microorganisms. Current literature reports concern mainly halotolerant methanotrophs, i.e.: *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z, *M. kenyense*, *M. buryatense* [23, 50, 51]. Reshetnikov together with colleagues distinguished two types of gene organisation responsible for the synthesis of ectoine related to the tolerance of microorganisms to the salinity and the production of this osmolyte. *Methylomicrobium marinus* 7C and *M. kenyense* AMO1 strains have *ectABC* genes and accumulate ectoine in the amount up to 70 mg per g dry weight of bacteria. These bacteria are capable of growth in the presence of 4–5% NaCl [52, 76]. In the case of *M. alcaliphilum* 20Z strain, equipped with the *ectABC-ask* operon, the possibility of growth in higher salinity (up to 10% NaCl) and the accumulation of more ectoine (> 120 mg/g_{dw} have been found). Which

means that the specific aspartic kinase plays an important role in the synthesis of ectoine [76]. The conversion of aspartate to β -aspartyl phosphate by aspartate kinase (Ask) is the starting point in the biosynthesis of aspartate family amino acids and ectoine. Khmelenina *et al.* demonstrated that the halotolerant strain *M. alcaliphilum* 20Z, isolated from the alkaline lake of Tuva in Russia, in the presence of 6% NaCl, produces osmolytes such as: ectoine, sucrose and 5-oxo-1-proline respectively at the level of 739–1021, 175–401 and 426–560 $\text{nmol/mg}_{\text{dw}}$ depending on the concentration and form of nitrogen in the substrate [50].

Khmelenina and Reshetnikov together with their team focused on the genetic aspect by identifying the organisation of genes responsible for the synthesis of ectoine [52, 76, 77]. However, little attention was given to process optimization and refinement of the synthesis and extraction conditions of this compound. Recently, this topic has gained increasing interest on the part of Spanish scientists. Papers published in 2017 include the technological aspects of ectoine production by *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z. The production was tested on a laboratory scale in bioreactors which work in a continuous mode. During cultivation the NaCl concentration was increased from 3 to 6% and the maximum of intracellular ectoine biosynthesis at the level of 37.4 mg/g_{dw} was reached. The study examined the influence of mixing speed and Cu^{2+} concentration on the production of this osmolyte [23]. Cantera *et al.* also conducted experiments involving the reduction of the NaCl concentration during the progress of cultivation from 6 to 0% and concluded that such a rapid change of culture conditions resulted in a higher production of ectoine to $70.4 \pm 14.3 \text{ mg/g}_{\text{sm}}$. It was also shown that about 70% of produced osmolyte is excreted outside the cell [24]. These results prove that the optimization of efficiency and synthesis time, and therefore the reduction of financial expenses, gives the opportunity of producing ectoine by *M. alcaliphilum* 20Z on a larger scale. In addition, attention should be given to other methanotrophs, i.e. of the genera *Methylomicrobium*, *Methylobacter* and *Methylohalobius*, which are also capable of synthesizing ectoine [49, 77, 85].

Methanotrophic bacteria in addition to the possibility of providing an amino acid like ectoine, being valuable to the medicine, the pharmaceutical and cosmetics industry, show many environmental benefits. In this case the process of producing ectoine can be combined with the simultaneous production of other compounds, among others, biopolymers, phospholipids, sucrose, metal chelating proteins and many other ones. The use of methanotrophs on an industrial scale is also supported by the fact of simultaneous utilization of waste compounds, such as methane, which is a source of coal and energy for them [25, 87].

6. Summary

Halophiles are microorganisms with a high biotechnological potential associated with the production of enzymes, β -carotene or osmolytes. In order to maintain the osmotic balance between the cytoplasm and the substrate in high salinity conditions, these microorganisms developed two basic strategies. The first mechanism concerns the maintenance of high concentration of potassium ions inside the cell. The second strategy involves the biosynthesis of organic osmotic solutes such as sugars (e.g. trehalose), amino acids (e.g. glycine, betaine, glutamic acid, L-proline, ectoine, hydroxyectoine) and polyols (e.g., glycerol). The protective effect of compatible compounds described on the example of microorganisms capable of synthesizing them may also be used in relation to other organisms: human, animals or plants. In recent years, a rapid increase in the demand for ectoine has been observed, mainly due to its properties related to the health protection, and especially that of skin and mucous membranes. Pharmaceutical companies are increasingly willing to test and introduce products in which ectoine is the active substance.

Acknowledgements

This project was financed by the National Science Centre (Poland), granted on the basis of decision DEC-2014/15/N/NZ8/00315.

The article was translated by EURO-ALPHABET from Polish into English under agreement 659 / P-DUN / 2018 and funded by the Ministry of Science and Higher Education.

References

- Abdel-Aziz H., Wadie W., Abdallah D.M., Lentzen G., Khayyal M.T.: Novel effects of ectoine, a bacteria-derived natural tetrahydropyrimidine, in experimental colitis. *Phytomedicine*, **20**, 585–591 (2013)
- Rajan L.A., Joseph T.C., Thampuran N., James R., Kumar K.A., Viswanathan C., Bansal K.C.: Cloning and heterologous expression of ectoine biosynthesis genes from *Bacillus halodurans* in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* **30**, 1403–1407 (2008)
- Andrei A-Ş., Banciu H.L., Oren A.: Living with salt: metabolic and phylogenetic diversity of archaea inhabiting saline ecosystems. *FEMS Microbiol. Lett.* **330**, 1–9 (2012)
- Anzali S., Von Heydebreck A., Herget T.: Elucidation of the anti-aging effects of ectoine using cDNA microarray analysis and signaling pathway evaluation. *Int. J. Cosmet. Sci.* **32**, 319–319 (2010)
- Baliarda A., Robert H., Jebbar M., Blanco C., Deschamps A., Le Marrec C.: Potential osmoprotectants for the lactic acid bacteria *Pediococcus pentosaceus* and *Tetragenococcus halophila*. *Int. J. Food. Microbiol.* **84**, 13–20 (2003)
- Barth S., Huhn M., Matthey B., Klimka A., Galinski E.A., Engert A.: Compatible-solute-supported periplasmic expression of functional recombinant proteins under stress conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1572–1579 (2000)
- Becker J., Schäfer R., Kohlstedt M., Harder B.J., Borchert N.S., Stöveken N., Bremer E., Wittmann C.: Systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for production of the chemical chaperone ectoine. *Microb. Cell Fact.* **12**, 110 (2013)
- Bernard T., Jebbar M., Rassouli Y., Himdikabbab S., Hamelin J., Blanco C.: Ectoine accumulation and osmotic regulation in *Brevibacterium linens*. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 129–136 (1993)
- Bersch S., Vangala M., Schwarz T., Kaufmann M.: Protection of antibodies against proteolytic degradation by compatible solutes (in) 2nd international conference on protein stabilisation/biomolecule stabilisation, Lissabon, 2000
- Beyer N., Driller H.: Ectoin: a innovative, multi-functional active substance for the cosmetic industry. *SÖfw-journal*, **126**, 26–29 (2000)
- Bilstein A., Lentzen G., Tolba R., Quesnel F.: Organ storage solution. Google Patents. <https://patents.google.com/patent/US20150104781A1/en> (Dostęp 2.02.2019), (2015)
- Bissoyi A., Pramanik K.: Effects of non-toxic cryoprotective agents on the viability of cord blood derived MNCs. *Cryoletters*, **34**, 453–465 (2013)
- Botta C., Di Giorgio C., Sabatier A.-S., De Méo M.: Genotoxicity of visible light (400–800 nm) and photoprotection assessment of ectoin, l-ergothioneine and mannitol and four sunscreens. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* **91**, 24–34 (2008)
- Bownik A., Stępniewska Z.: Ectoine as a promising protective agent in humans and animals. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* **67**, 260–265 (2016)
- Bownik A., Stępniewska Z.: Protective effects of bacterial osmoprotectant ectoine on bovine erythrocytes subjected to staphylococcal alpha-haemolysin. *Toxicol.* **99**, 130–135 (2015)
- Bownik A., Stępniewska Z.: Zastosowanie ektoiny jako czynnika ochronnego przed działaniem toksyny bakteryjnej. Patent nr P412197 (2018)
- Buenger J., Driller H.: Ectoin: An effective natural substance to prevent UVA-induced premature photoaging. *Skin Pharmacol. Physiol.* **17**, 232–237 (2004)
- Bunger J.: Ectoin added protection and care for the skin. *Euro Cosmet.* **7**, 22–24 (1999)
- Buommino E., Schiraldi C., Baroni A., Paoletti I., Lamberti M., De Rosa M., Tufano M.A.: Ectoine from halophilic microorganisms induces the expression of hsp70 and hsp70B' in human keratinocytes modulating the proinflammatory response. *Cell Stress Chaperones*, **10**, 197–203 (2005)
- Bursy J., Kuhlmann A.U., Pittelkow M., Hartmann H., Jebbar M., Pierik A.J., Bremer E.: Synthesis and uptake of the compatible solutes ectoine and 5-hydroxyectoine by *Streptomyces coelicolor* A3(2) in response to salt and heat stresses. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 7286–7296 (2008)
- Bursy J., Pierik A.J., Pica N., Bremer E.: Osmotically induced synthesis of the compatible solute hydroxyectoine is mediated by an evolutionarily conserved ectoine hydroxylase. *J. Biol. Chem.* (2007)
- Cánovas D., Vargas C., Calderón M.I., Ventosa A., Nieto J.J.: Characterization of the genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata* DSM 3043. *Syst. Appl. Microbiol.* **21**, 487–497 (1998)
- Cantera S., Lebrero R., Rodríguez E., García-Encina P.A., Muñoz R.: Continuous abatement of methane coupled with ectoine production by *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z in stirred tank reactors: A step further towards greenhouse gas biorefineries. *J. Clean. Prod.* **152**, 134–141 (2017)
- Cantera S., Lebrero R., Rodríguez S., García-Encina P.A., Muñoz R.: Ectoine bio-milking in methanotrophs: A step further towards methane-based bio-refineries into high added-value products. *Chem. Eng. J.* **328**, 44–48 (2017)
- Cantera S., Muñoz R., Lebrero R., López J.C., Rodríguez Y., García-Encina P.A.: Technologies for the bioconversion of

- methane into more valuable products. *Curr. Opin. Biotechnol.* **50**, 128–135 (2018)
26. Cruz P.E., Silva A.C., Roldão A., Carmo M., Carrondo M.J.T., Alves P.M.: Screening of novel excipients for improving the stability of retroviral and adenoviral vectors. *Biotechnol. Prog.* **22**, 568–576 (2006)
 27. Detkova E.N., Boltysanskaya Y.V.: Osmoadaptation of haloalkaliphilic bacteria: Role of osmoregulators and their possible practical application. *Microbiol.* **76**, 511–522 (2007)
 28. Dwivedi M., Brinkkötter M., Harishchandra R.K., Galla H.-J.: Biophysical investigations of the structure and function of the tear fluid lipid layers and the effect of ectoine. Part B: Artificial lipid films. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.* **1838**, 2716–2727 (2014)
 29. Ectoine / Hydroxyectoine. [http://artimmun.de/fileadmin/user_upload/temp_jpegs_and_data/raw_material/BioStab_Ectoin_u_Hydroxyectoin.pdf] (Dostęp 2.02.2019)
 30. El Assal R., Demirci U. *et al.*: Bio-inspired cryo-ink preserves red blood cell phenotype and function during nanoliter vitrification. *Adv. Mater.* **26**, 5815–5822 (2014)
 31. Empadinhas N., da Costa M.S.: Osmoadaptation mechanisms in prokaryotes: distribution of compatible solutes. *Int. Microbiol.* **11**, 151–161 (2008)
 32. Galinski E.A., Pfeiffer H.-P., Truper H.G.: 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid. A novel cyclic amino acid from halophilic phototrophic bacteria of the genus *Ectothiorhodospira*. *Eur. J. Biochem.* **149**, 135–139 (1985)
 33. García-Esteva R., Argandoña M., Reina-Bueno M., Capote N., Iglesias-Guerra F., Nieto J.J., Vargas C.: The ectD gene, which is involved in the synthesis of the compatible solute hydroxyectoine, is essential for thermoprotection of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *J. Bacteriol.* **188**, 3774–3784 (2006)
 34. Gołabczak J.: Biochemiczne, genetyczne i technologiczne podstawy biosyntezy L-lizyny. *Biotechnologia*, **1**, 53–70 (2008)
 35. Graf R., Anzali S., Buenger J., Pfluecker F., Driller H.: The multifunctional role of ectoine as a natural cell protectant. *Clin. Dermatol.* **26**, 326–333 (2008)
 36. Grether-Beck S., Timmer A., Felsner I., Brenden H., Brammertz D., Krutmann J.: Ultraviolet A-induced signaling involves a ceramide-mediated autocrine loop leading to ceramide de novo synthesis. *J. Invest. Dermatol.* **125**, 545–553 (2005)
 37. Guzmán H., Van-Thuoc D., Martín J., Hatti-Kaul R., Quillaguanán J.: A process for the production of ectoine and poly(3-hydroxybutyrate) by *Halomonas boliviensis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **84**, 1069–1077 (2009)
 38. Hahn M.B., Uhlig F., Solomun T., Smiatek J., Sturm H.: Combined influence of ectoine and salt: spectroscopic and numerical evidence for compensating effects on aqueous solutions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18**, 28398–28402 (2016)
 39. Hai T., Oppermann-Sanio F.B., Steinbüchel A.: 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 (2002)
 40. Harishchandra R.K., Wulff S., Lentzen G., Neuhaus T., Galla H.-J.: The effect of compatible solute ectoines on the structural organization of lipid monolayer and bilayer membranes. *Biophys. Chem.* **150**, 37–46 (2010)
 41. Heinrich U., Garbe B., Tronnier H.: *In vivo* Assessment of Ectoin: A randomized, vehicle-controlled clinical trial. *Skin Pharmacol. Physiol.* **20**, 211–218 (2007)
 42. Held C., Neuhaus T., Sadowski G.: Compatible solutes: Thermodynamic properties and biological impact of ectoines and prolines. *Biophys. Chem.* **152**, 28–39 (2010)
 43. Hoymann H.G., Bilstein A., Bernal F., Stoehr T., Lentzen G.: Therapeutic effect of ectoine in an experimental model of allergic asthma. (in) XXVIII Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. Warsaw (2009)
 44. Inbar L., Lapidot A.: The structure and biosynthesis of new tetrahydropyrimidine derivatives in actinomycin D producer *Streptomyces parvulus*. Use of ¹³C- and ¹⁵N-labeled L-glutamate. *J. Biol. Chem.* **263**, 16014–1622 (1988)
 45. Yu I., Jindo Y., Nagaoka M.: Microscopic understanding of preferential exclusion of compatible solute ectoine: direct interaction and hydration alteration. *J. Phys. Chem. B.* **111**, 10231–10238 (2007)
 46. Jakubowska A.: Wiązanie jonów na granicy faz oraz specyficzne efekty jonowe. *Wiadomości Chem.* 193–208 (2012)
 47. Kanapathipillai M., Ku S.H., Girigoswami K., Park C.B.: Small stress molecules inhibit aggregation and neurotoxicity of prion peptide 106–126. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **365**, 808–813 (2008)
 48. Kanapathipillai M., Lentzen G., Sierks M., Park C.B.: Ectoine and hydroxyectoine inhibit aggregation and neurotoxicity of Alzheimer's β -amyloid. *FEBS Lett.* **579**, 4775–4780 (2005)
 49. Khmelenina V.N., Kalyuzhnaya M.G., Starostina N.G., Suzina N.E., Trotsenko Y.A.: Isolation and characterization of halotolerant alkaliphilic methanotrophic bacteria from Tuva Soda Lakes. *Curr. Microbiol.* **35**, 257–261 (1997)
 50. Khmelenina V.N., Sakharovskii V.G., Reshetnikov A.S., Trotsenko Y.A.: Synthesis of osmoprotectants by halophilic and alkaliphilic methanotrophs. *Microbiology*, **69**, 381–386 (2000)
 51. Khmelenina V.N., Suzina N.E., Trotsenko Y.A.: Surface layers of methanotrophic bacteria. *Microbiology*, **82**, 529–541 (2013)
 52. Khmelenina V.N., Mustakhimov I.I., Reshetnikov A.S., Kalyuzhnaya M.G., Trotsenko Y.: Genetic and biochemical aspects of ectoine biosynthesis in moderately halophilic and halotolerant methylotrophic bacteria. *Am. J. Agric. Biol. Sci.* **5**, 446–458 (2010)
 53. Khurana R., Coleman C., Ionescu-Zanetti C., Carter S.A., Krishna V., Grover R.K., Roy R., Singh S.: Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. *J. Struct. Biol.* **151**, 229–238 (2005)
 54. Kolp S., Pietsch M., Galinski E.A., Gütschow M.: Compatible solutes as protectants for zymogens against proteolysis. *Biochim. Biophys. Acta. Proteins. Proteomics*, **1764**, 1234–1242 (2006)
 55. Kuhlmann A.U., Bremer E.: Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in *Bacillus pasteurii* and related *Bacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 772–783 (2002)
 56. Kunte H., Lentzen G., Galinski E.: Industrial production of the cell protectant ectoine: protection mechanisms, processes, and products. *Curr. Biotechnol.* **3**, 10–25 (2014)
 57. Kurz M.: Compatible solute influence on nucleic acids: Many questions but few answers. *Saline Systems*, **4**, 6 (2008)
 58. Lapidot A., Ben-Asher E., Eisenstein M.: Tetrahydropyrimidine derivatives inhibit binding of a Tat-like, arginine-containing peptide, to HIV TAR RNA *in vitro*. *FEBS Lett.* **367**, 33–38 (1995)
 59. Leclerc J., Benoiton L.: On the selectivity of acylation of unprotected diamino acids. *Can. J. Chem.* **46**, 1047–1051 (1968)
 60. Lentzen G., Neuhaus T.: Synthesis of cyclic amidines. U.S. Patent No. 8,598,346. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office (2013)
 61. Libudzisz Z., Kowal K.: *Mikrobiologia techniczna*. Wydaw. PŁ. (2000)
 62. Lippert K., Galinski E.: Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 61–65 (1992)
 63. Louis P., Truper H.G., Galinski E.A.: Survival of *Escherichia coli* during drying and storage in the presence of compatible solutes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**, 684–688 (1994)

64. Malin G., Lapidot A.: Induction of synthesis of tetrahydropyrimidine derivatives in Streptomyces strains and their effect on *Escherichia coli* in response to osmotic and heat stress. *J. Bacteriol.* **178**, 385–395 (1996)
65. Manzanera M., García de Castro A., Tøndervik A., Rayner-Brandes M., Strøm A.R., Tunnacliffe A.: Hydroxyectoine is superior to trehalose for anhydrobiotic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4328–4333 (2002)
66. Manzanera M., Vilchez S., Tunnacliffe A.: High survival and stability rates of *Escherichia coli* dried in hydroxyectoine. *FEMS Microbiol Lett.* **233**, 347–352 (2004)
67. Manzanera M., Vilchez S., Tunnacliffe A.: Plastic encapsulation of stabilized *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 3143–3145 (2004)
68. Mascellani N., Volinia S. *et al.*: Compatible solutes from hyperthermophiles improve the quality of DNA microarrays. *BMC Biotechnol.* **7**, 82 (2007)
69. Maskow T., Kleinstüber S.: Carbon and energy fluxes during haloadaptation of *Halomonas* sp. EF11 growing on phenol. *Extremophiles*, **8**, 133–1341 (2004)
70. Moghaieb R.E.A., Fujita K. *et al.*: Characterization of salt tolerance in ectoine-transformed tobacco plants (*Nicotiana tabacum*): photosynthesis, osmotic adjustment, and nitrogen partitioning. *Plant, Cell Environ.* **29**, 173–182 (2006)
71. Motitschke L., Driller H., Galinski E.: Ectoin and ectoin derivatives as moisturizers in cosmetics. U.S. Patent No. 6,060,071. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office (2001)
72. Nagata S., Maekawa Y., Ikeuchi T., Wang Y.B., Ishida A.: Effect of compatible solutes on the respiratory activity and growth of *Escherichia coli* K-12 under NaCl stress. *Rep. Res. Inst. Mar. Cargo. Transp.* **11**, 75–80 (2003)
73. Pastor J.M., Cánovas M. *et al.*: Role of central metabolism in the osmoadaptation of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *J. Biol Chem.* **288**, 17769–17781 (2013)
74. Pastor J.M., Cánovas M. *et al.*: Ectoines in cell stress protection: Uses and biotechnological production. *Biotechnol Adv.* **28**, 782–801 (2010)
75. Pech T., Schaefer N. *et al.*: A natural tetrahydropyrimidine, ectoine, ameliorates ischemia reperfusion injury after intestinal transplantation in rats. *Pathobiology*, **80**, 102–110 (2013)
76. Reshetnikov A.S., Khmelenina V.N., Mustakhimov I.I., Kalyuzhnaya M., Lidstrom M., Trotsenko Y.A.: Diversity and phylogeny of the ectoine biosynthesis genes in aerobic, moderately halophilic methylotrophic bacteria. *Extremophiles*, **15**, 653–663 (2011)
77. Reshetnikov A.S., Khmelenina V.N., Mustakhimov I.I., Trotsenko Y.A.: Genes and enzymes of ectoine biosynthesis in halotolerant methanotrophs. 1st edition. Elsevier Inc. (2011)
78. Reuter K., Pittelkow M., Bursy J., Heine A., Craan T., Bremer E.: Synthesis of 5-hydroxyectoine from ectoine: Crystal structure of the non-heme iron(II) and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase EctD. *PLoS One*, **5**, e10647 (2010)
79. Robinson M., Visscher M., Laruffa A., Wickett R.: Natural moisturizing factors (NMF) in the stratum corneum (SC). I. Effects of lipid extraction and soaking. *J. Cosmet. Sci.* **61**, 13–22 (2010)
80. Roychoudhury A., Bieker A., Häussinger D., Oesterhelt F.: Membrane protein stability depends on the concentration of compatible solutes – a single molecule force spectroscopic study. *Biol Chem.* **394**, 1465–1474 (2013)
81. Ryu J., Kanapathipillai M., Lentzen G., Park C.B.: Inhibition of β -amyloid peptide aggregation and neurotoxicity by α -D-mannosylglycerate, a natural extremolyte. *Peptides*, **29**, 578–584 (2008)
82. Seip B., Galinski E.A., Kurz M.: Natural and engineered hydroxyectoine production based on the *Pseudomonas stutzeri* ectABCD-ask gene cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 1368–1374 (2011)
83. Severin J., Wohlfarth A., Galinski E.A.: The predominant role of recently discovered tetrahydropyrimidines for the osmoadaptation of halophilic eubacteria. *Microbiology*, **138**, 1629–1638 (1992)
84. Srinivasan P.K., Fet N., Bleilevens C., Afify M., Doorschodt B., Yagi S., Tolba R.H.: Hydroxyectoine ameliorates preservation injury in deceased after cardiac death donors in experimental liver grafts. *Ann. Transplant.* **19**, 165–173 (2014)
85. Stępniewska Z., Goraj W., Kuźniar A., Pytlak A., Ciepelski J., Frączek P.: Biosynthesis of ectoine by the methanotrophic bacterial consortium isolated from Bogdanka coalmine (Poland). *Appl. Biochem. Microbiol.* **50**, 594–600 (2014)
86. Stępniewska Z., Kuźniar A., Pytlak A., Ciepelski J.: Ektoina – przeciwstresowa cząsteczka przyszłości. *Kosmos*, **63**, 25–35 (2014)
87. Strong P.J., Kalyuzhnaya M., Silverman J., Clarke W.P.: A methanotroph-based biorefinery: Potential scenarios for generating multiple products from a single fermentation. *Bioresour Technol.* **215**, 314–323 (2016)
88. Sydlík U., Gallitz I., Albrecht C., Abel J., Krutmann J., Unfried K.: The compatible solute ectoine protects against nanoparticle-induced neutrophilic lung inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **180**, 29–35 (2009)
89. Sydlík U., Bilstein A.: Recovery of neutrophil apoptosis by ectoine: a new strategy against lung inflammation. *Eur. Respir. J.* **41**, 433–442 (2013)
90. Tanne C., Golovina E.A., Hoekstra F.A., Meffert A., Galinski E.A.: Glass-forming property of hydroxyectoine is the cause of its superior function as a desiccation protectant. *Front. Microbiol.* **5**, 150 (2014)
91. Tao P., Li H., Yu Y., Gu J., Liu Y.: Ectoine and 5-hydroxyectoine accumulation in the halophile *Virgibacillus halodenitrificans* PDB-F2 in response to salt stress. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 6779–6789 (2016)
92. Trotsenko Y.A., Doronina N.V., Khmelenina V.N.: Biotechnological potential of aerobic methylotrophic bacteria: A review of current state and future prospects. *Appl Biochem Microbiol.* **41**, 433–441 (2005)
93. Unfried K., Kroker M., Autengruber A., Gotić M., Sydlík U.: The compatible solute ectoine reduces the exacerbating effect of environmental model particles on the immune response of the airways. *J. Allergy.* **2014**, 1–7 (2014)
94. Vreeland R.H., Litchfield C.D., Martin E.L., Elliot E.: *Halomonas elongata*, a new genus and species of extremely salt-tolerant bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **30**, 485–495 (1980)
95. Widderich N., Hopfner A., Pittelkow M., Heider J., Smits S.H.J., Bremer E.: Biochemical properties of ectoine hydroxylases from extremophiles and their wider taxonomic distribution among microorganisms. *PLoS One*, **9**, e93809 (2014)
96. Yao C.-L., Lin Y.-M., Mohamed M.S., Chen J.-H.: Inhibitory effect of ectoine on melanogenesis in B16-F0 and A2058 melanoma cell lines. *Biochem. Eng. J.* **78**, 163–169 (2013)
97. Zaccai G., Martel A. *et al.*: Neutrons describe ectoine effects on water H-bonding and hydration around a soluble protein and a cell membrane. *Sci. Rep.* **6**, 31434 (2016)
98. Zhang L.H., Lang Y.J., Nagata S.: Efficient production of ectoine using ectoine-excreting strain. *Extremophiles*, **13**, 717–724 (2009)
99. Zhang L., Lang Y., Wang C., Nagata S.: Promoting effect of compatible solute ectoine on the ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis* CICC10232. *Process. Biochem.* **43**, 642–646 (2008)
100. Zhang L., Wang Y., Zhang C., Wang Y., Zhu D., Wang C., Nagata S.: Supplementation effect of ectoine on thermostability of phytase. *J. Biosci. Bioeng.* **102**, 560–563 (2006)

BIOSYNTETA I MOŻLIWOŚCI ZASTOSOWANIA EKTOINY I HYDROKSYEKTOINY W OCHRONIE ZDROWIA

Weronika Goraj, Zofia Stępniewska, Anna Szafranek-Nakonieczna*

Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, Instytut Biotechnologii, Katedra Biochemii i Chemii Środowiska

Wpłynęło w marcu, zaakceptowano w czerwcu 2019 r.

Streszczenie: Światowa produkcja L-aminokwasów w dużej mierze opiera się na syntezie mikrobiologicznej. Największa bioprodukcja dotyczy kwasu L-glutaminowego (1,5 mln ton rocznie), oraz L-lizyny (850 tys. ton rocznie). Wśród innych aminokwasów, o wciąż rosnącym popycie wymienia się ektoinę jak również hydroksyektoinę. Obecnie głównym producentem ektoiny w oparciu o proces biotechnologiczny, jest niemiecka firma Bitop. Organizmem wykorzystywanym w produkcji ektoiny jest *Halomonas elongata* wyizolowany z systemów wykorzystywanych przy produkcji soli na holenderskiej wyspie Bonaire na Morzu Karaibskim. Produkcja opisana w literaturze, oparta jest na tzw. procesie „milking”. Duże zapotrzebowanie na aminokwasy związane jest z ich właściwościami i potencjalnym zastosowaniem. Ektoina jako substancja kosmotropowa posiada właściwości stabilizujące strukturę cząsteczek wody. Tak jak i inne osmolyty w roztworach wodnych ektoina zwiększa hydratację makromolekuł zapobiegając przed ich denaturacją. Przemysłowe wykorzystanie ektoiny opiera się głównie na możliwości ochrony skóry i łagodzenia jej stanów zapalnych ale dotyczy też innych, szerokich możliwości zastosowania jej w biotechnologii, kosmetologii, medycynie i farmacji.

1. Wprowadzenie. 2. Właściwości ektoiny. 3. Zastosowanie ektoiny. 4. Chemiczna i biotechnologiczna produkcja ektoiny. 5. Mikroorganizmy syntetyzujące ektoinę. 5.1. Bakterie metanotroficzne. 6. Podsumowanie

BIOSYNTHESIS AND THE POSSIBILITY OF USING ECTOINE AND HYDROXYECTOINE IN HEALTH CARE

Abstract: The global production of L-amino acids is largely based on microbiological synthesis. The largest bioproduction concerns L-glutamic acid (1.5 million tons per year), and L-lysine (850,000 tons per year). Among other amino acids, ectoine and hydroxyectoine are mentioned in the growing demand. Currently, the main producer of ectoine based on the biotechnology process is the German company Bitop. The organism used in the ectoine production is *Halomonas elongata* isolated from a solar salt facility on Bonaire, Netherlands Antilles. The production of ectoine described in the literature is based on the so-called “milking” process. The great demand for amino acids is related to their properties and potential use. Ectoine, as a kosmotropic substance, has the property of stabilizing the structure of water molecules. Just like other osmolytes in aqueous solutions, ectoine increases the hydration of macromolecules, preventing them from denaturation. The industrial use of ectoine is based mainly on the ability to protect the skin and alleviate its inflammation but also applies to other, broad possibilities of its application in biotechnology, cosmetology, medicine and pharmacy.

1. Introduction. 2. Properties of ectoine. 3. The use of ectoine. 4. Chemical and biotechnological production of ectoine 5. Microorganisms synthesizing ectoine. 5.1. Methanotrophic bacteria. 6. Summary

Słowa kluczowe: ektoina, halofile, *Halomonas elongata*, hydroksyektoina, metanotrofy

Key words: ectoine, halophile, *Halomonas elongata*, hydroxyectoine, methanotrophs

1. Wprowadzenie

Wielu autorów uważa, iż aminokwasy takie jak ektoina i hydroksyektoina zapewniają znacznie skuteczniejszą ochronę przed działaniem stresu osmotycznego, czy temperaturowego niż inne znane dotychczas osmolyty. Aminokwasy te wykazują silne działanie protekcyjne w stosunku do enzymów i białek. Ich akumulacja w komórce zachodzi poprzez syntezę *de novo* lub transport ze środowiska zewnętrznego. Ektoina (kwas 1,4,5,6-tetrahydro-2-metylo-4-pyrimidinokarboksyłowy) oraz jej hydroksylowa pochodna hydroksyektoina, są amino-

kwasami cyklicznymi, produkowanymi przez mikroorganizmy w warunkach stresowych, takich jak: zasolenie, wysoka temperatura, niska zawartość wody w środowisku, czy promieniowanie UV. Ektoina po raz pierwszy została wyizolowana przez Galińskiego i wsp. w 1985 roku [32]. Odkrycie to miało miejsce przy okazji badań nad halofilnymi bakteriami purpurowymi *Ectothiorhodospira halochloris*, autotrofami wykorzystującymi energię świetlną do produkcji związków organicznych. Ektoina i hydroksyektoina mają podobną budowę chemiczną. Hydroksyektoina różni się od kwasu 1,4,5,6-tetrahydro-2-metylo-4-pyrimidinokarboksyłowego

* Autor korespondencyjny: Anna Szafranek-Nakonieczna, Katedra Biochemii i Chemii Środowiska, Instytut Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Nauk o Środowisku, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, ul. Konstantynów 11, 20-708 Lublin; tel. 81 454 54 61; e-mail: anna.szafranek@kul.pl

obecnością grupy hydroksylowej przy jednym z atomów węgla w pierścieniu aromatycznym. Prawdopodobnie mikroorganizmy narażone na stres wywołany wysoką temperaturą produkują głównie hydroksyektoinę [78]. W przypadku stresu solnego wykazano, iż biosynteza hydroksyektoiny zachodzi dużo później niż ektoiny. Potwierdzono to udowadniając, że ekspresja genów *ectABC*, odpowiedzialnych za syntezę ektoiny, następuje wcześniej niż genu *ectD* odpowiedzialnego za syntezę hydroksyektoiny [91].

2. Właściwości ektoiny

Ektoina zaliczana jest do tzw. substancji kompensujących co oznacza, że chroni przed zmianami w komórce, wynikającym ze stresu osmotycznego. Częsteczkę tę określa się również jako substancję kosmotropową. Jony soli mogą oddziaływać na wodę kosmotropowo, powodując stabilizację quasikrystalicznej struktury wody lub chaotropowo, wpływając na dezorganizację tej struktury, zaburzając polarną budowę wody. Spowodowane jest to oddziaływaniem wolnej pary elektronów z kationem oraz atomów wodorowych z anionem, przez co tworzą się 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 [46]. Ektoina jako substancja kosmotropowa posiada właściwości stabilizujące cząsteczki wody. Działanie kosmotropowe przejawia się jako zmniejszenie powierzchni kontaktu między cząsteczkami wody, a fosfolipidami błon komórkowych. Z greckiego κόσμος, oznacza porządek i dotyczy zdolności do tworzenia struktur uporządkowanych, poprzez

wzmacnianie struktury wody [31]. Zjawisko to wyjaśniają badania modelowe przeprowadzone przez Graf i wsp. w 2008 roku. Dynamiczna symulacja wskazuje wyraźnie, że dodatek ektoiny powoduje silne działanie kompensujące polegające na zdolności do powtórnego uporządkowania cząsteczek wody poprzez rozbudowanie pomiędzy nimi sieci wiązań wodorowych [35].

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) [86]. „Preferencyjny model wykluczenia” jest hipotezą wyjaśniającą biofizyczny mechanizm oddziaływania ektoiny na makrocząsteczki, zgodnie z którym osmoprotektanty w roztworach wodnych nie oddziałują bezpośrednio z makromolekułami ale zwiększają hydratację cząsteczki, zapobiegając przed jej denaturacją [14, 45]. Hahn i wsp. pokazali przeciwny wpływ ektoiny i NaCl na cząsteczki wody, stosując rezonansową spektroskopię Ramana. Badania te stanowią kolejny aspekt uzasadniający obecność wysokich stężeń osmolitów u bakterii halotolerancyjnych [38].

Okazało się, że wpływ ektoiny i hydroksyektoiny na makromolekuły i komórki w niektórych aspektach jest względem siebie antagonistyczny [86].

3. Zastosowanie ektoiny

Właściwości ektoiny sprawiają, że aminokwas ten jest wielofunkcyjny i posiada szerokie spektrum zastosowania w wielu gałęziach przemysłu, głównie w medycynie, farmacji, kosmetologii, czy biotechnologii. Przemysłowe wykorzystanie ektoiny opiera się przede wszystkim na możliwości ochrony skóry i łagodzeniu stanów zapalnych (Tabela I), stabilizacji enzy-

Tabela I
Potencjalne możliwości praktycznego zastosowania ektoiny w celu ochrony skóry

Efekt działania	Piśmiennictwo
Działanie przeciwstarzeniowe (<i>in vivo</i>)	[41]
Ochrona skóry przed wysychaniem (<i>in vivo</i>)	[35]
Działanie przeciwstarzeniowe (<i>in vitro</i>), ochrona mitochondrialnego DNA i inhibicja zapalenia skóry wywołanego przez ceramidę	[17]
Indukcja białek szoku termicznego i pośredniczenie w odpowiedzi prozapalnej keratynocytów ludzkiego naskórka	[19]
Fotoochrona przed światłem widzialnym (<i>in vitro</i>)	[13]
Czynnik nawilżający (<i>in vivo</i>)	[71]
Ochrona przed promieniowaniem UV komórek Langerhansa (<i>in vivo</i>)	[10]
Blokowanie uwalniania ceramidów w keratynocytach ludzkiego naskórka pod wpływem UVA	[36]
Ochrona skóry przed dehydratacją wywołaną przez surfaktanty (<i>in vivo</i>)	[18]
Hamowanie procesu melanogenezy	[96]

mów; ochronie komórek i makromolekuł przed stresem osmotycznym, temperaturowym, promieniowaniem UV, wysuszeniem (Tabela II, Tabela IV). Ochronne działanie ektoiny opisane na przykładzie mikroorganizmów zdolnych do jej syntezy może być więc wykorzystane również w odniesieniu do organizmów wyższych: człowieka, zwierząt, a także roślin.

Zastosowanie ektoiny w kosmetyce polega na jej ochronnym działaniu na skórę. Używana jest jako składnik kosmetyków przeciw-zmarszczkowych i nawilżających. Ludzka skóra stanowi barierę pomiędzy organizmem a środowiskiem, jest więc narażona na wiele czynników zewnętrznych. Szczególnie ważna w tym względzie jest warstwa rogowa naskórka. Pełni ona podwójną funkcję w utrzymaniu nawilżenia skóry. Po pierwsze skeratynizowane komórki warstwy rogowej naskórka tworzą hydrofobową barierę, która uniemożliwia przedostanie się wody przez skórę do organizmu. Po drugie, w odniesieniu do środowiska wewnętrznego, utrzymuje nawilżenie dzięki swojemu naturalnemu czynnikowi nawilżającemu (NMF – Natural Moisturizing Factor), powstrzymując wodę w skórze chroni przed jej parowaniem [79]. Wiele czynników środowiskowych może działać niszcząco na tę naturalną barierę, powodując utratę wody ze skóry. Wysuszenie skóry może wynikać m.in., z ekspozycji na ekstremalne temperatury, suche powietrze, promieniowanie słoneczne, wiatr, czy z częstego korzystania z detergentów. Wszystko to powoduje wysuszenie skóry oraz przyspiesza jej starzenie się. W literaturze odnaleźć można wiele przykładów potwierdzających przeciwstarzeniowe i nawilżające działanie ektoiny na skórę (Tabela I). Pierwsze komercyjne zastosowanie ektoiny do ochrony skóry dotyczyło ochrony przed promieniowaniem słonecznym i działania przeciwstarzeniowego [18]. Również obecnie ektoina jest szeroko stosowana w tym celu [3, 4, 35]. Dowiedziono, że ektoina chroni komórki Langerhansa przed promieniowaniem UV [10] i odpowiedzialna jest za blokowanie uwalniania ceramidów w keratynocytach ludzkiego naskórka pod wpływem UVA [36]. Ekspozycja keratynocytów na promieniowanie UVA, szczególnie u człowieka, powoduje podwyższony poziom ceramidów, a w konsekwencji aktywuje wewnątrzkomórkową kaskadę sygnalizacyjną, prowadząc do ekspresji cząsteczek adhezji międzykomórkowej. Tym negatywnym skutkom można skutecznie zapobiegać stosując ektoinę, która jest zdolna do „gaszenia” tlenu singletowego [17, 36]. Büenger i Driller, poddawali ludzkie keratynocyty działaniu 1 mM ektoiny i przez 24 godziny naświetlali promieniami UV (30 J/cm²). Następnie, zbadali uwalnianie czynników zapalnych takich jak: AP-2, ICAM-1, ceramidów i wykazali, że wstępne działanie ektoiny na keratynocyty prowadzi do spadku uwalniania czynnika zapalnego AP-2 i nasilonej ekspresji cząsteczek adhezyjnych ICAM-1 [17].

Przemysł kosmetyczny wykorzystuje również fakt, iż ektoina działa silniej nawilżająco niż glicerol i zapewnia dłuższe nawilżenie skóry [35]. Dowiedziono, że dodatek 2% ektoiny powoduje poprawę właściwości pielęgnacyjnych produktów, lepsze nawilżenie skóry, znaczną poprawę jej elastyczności i regenerację struktury [41, 56]. Badania kliniczne, zlecane przez firmę Langsteiner LEK-Pharmaceutical produkującą ektoinę potwierdzają, że po 3-4 tygodniach leczenia preparat na bazie ektoiny redukuje suchość skóry nawet o 86% oraz łuszczenie skóry – o nawet 70%.

Na zastosowanie ektoiny w farmacji, medycynie i biotechnologii wpłynęła jej zdolność do ochrony makromolekuł (Tabela II). Liczne badania wykazały, że ektoina tworząc kompleks z cząsteczkami wody zwiększa stabilność enzymów i tym samym zmniejsza podatność białka na denaturację [97]. Wykazano również, że ektoina, podobnie jak inne kompatybilne substancje rozpuszczone, wzmacnia wewnątrzcząsteczkowe interakcje istotne dla stabilności białka [80]. Ektoina zmniejsza denaturację enzymów indukowaną przez podwyższoną temperaturę. Przedłuża aktywność enzymów wrażliwych na zamrażanie-rozmrażanie, ogrzewanie i suszenie sublimacyjne, takich jak: dehydrogenaza mleczanowa (LDH) i fosfofruktokinaza [62]. Ponadto zwiększa stabilność fitazy, rybonukleazy-A i polimerazy DNA w podwyższonej temperaturze [100]. Dodatkowo wykazano, że pochodna ektoiny – hydroksyektoina posiada lepszą zdolność do ochrony białek w warunkach podwyższonej temperatury [29, 90] (Tabela III). Ektoina może również chronić makrocząsteczki przed czynnikami proteolitycznymi. Na przykład, zymogen, tripsynogen i chymotrypsynogen, stają się odporne na enteropeptydazę [54]. Ponadto wykazano, że ektoina i niektóre poliole mogą hamować replikację HIV [58] oraz stabilizować wektory retrowirusów w terapii genowej [26].

Kolejne zastosowania ektoiny wiążą się z jej zdolnością do łagodzenia stanów zapalnych. Wykazano jej ochronne właściwości w przypadku neutrofilowego zapalenia płuc u ludzi [88, 89, 93] oraz eksperymentalnie indukowanego zapalenia okrężnicy u szczurów [1]. Podawanie ektoiny hamuje sygnalizację wywołowaną obecnością nanocząsteczek, o której wiadomo, że jest odpowiedzialna za reakcje prozapalne w komórkach nabłonkowych płuc szczurów. Zwierzęta, którym dotchawczo podano roztwór ektoiny przed wprowadzeniem nanocząstek węglowych, wykazywały niższą ekspresję IL-8, niższą liczebność neutrofilów w płucach, modulację profilu cytokin oraz zmniejszoną aktywność kinazy MAP. Spostrzeżenia te zostały wsparte i rozszerzone doświadczeniami na hodowanych ludzkich komórkach oskrzelowych, w których ektoina hamowała sygnalizację komórkową, wyzwalaną przez nanocząsteczki oraz ograniczała indukcję IL-8 [88, 89, 93].

Tabela II
Potencjalne możliwości praktycznego zastosowania ektoiny i hydroksyektoiny w celu ochrony makromolekuł

Efekt działania	Piśmiennictwo
Ektoina	
Zapewnienie termostabilności syntetazy cyjanoficyny	[39]
Zapewnienie termostabilności fitazy (90°C)	[100]
Ochrona przeciwiiał przed degradacją proteolityczną	[9]
Obniżenie temperatury topnienia DNA	[58]
Ograniczenie powstawania infekcyjnych prionów (PrP ¹⁰⁶⁻¹²⁶) powodujących encefalopatię (<i>in vitro</i>)	[47]
Aktywacja reakcji prozapalnych w nabłonku płuc poprzez stabilizację błonowej platformy sygnalizacyjnej (<i>ex vivo</i>)	[93]
Przywrócenie apoptozy neutrofilii przy zapaleniu płuc (<i>in vivo</i> i <i>in vitro</i>)	[88, 89]
Ograniczenie wnikania neutrofilii do warstwy mięśniowej jelita po przeszczepie (<i>in vivo</i>), dzięki zdolności do stabilizacji makrocząsteczek na powierzchni komórki	[75]
Ochrona makrocząsteczki przed czynnikami proteolitycznymi (<i>in vitro</i>)	[54]
Hamowanie replikacji HIV	[58]
Stabilizacja wektorów retrovirusów w terapii genowej	[26]
Hydroksyektoina	
Ochrona białek rekombinowanych przed degradacją, agregacją, zmianą konformacji, zamrażaniem	[6]
Ochrona immunotoksyn przed stresem związanym z zamrażaniem i rozmrażaniem	[6]
Podwyższenie temperatury topnienia DNA	[57]
Poprawa jakości mikromacierzy DNA	[68]
Obniżenie poziomu AST po reperfuzji wątroby (jako składnik roztworu do przechowywania organów), (<i>ex vivo</i>)	[11]
Zwiększenie produkcji żółci po reperfuzji (jako składnik roztworu do przechowywania organów), (<i>ex vivo</i>)	[11]
Obniżenie ciśnienia w żyłę wrotnej po reperfuzji (jako składnik roztworu do przechowywania organów), (<i>ex vivo</i>)	[11]
Zmniejszenie apoptozy komórek po przeszczepie wątroby (jako składnik roztworu do przechowywania organów), (<i>ex vivo</i>)	[11]
Ektoina i hydroksyektoina	
Ochrona enzymów przed wysoką temperaturą, zamrażaniem, wysuszeniem	[62]
Ograniczenie fibrylacji białek (Aβ42) w chorobie Alzheimera (<i>in vitro</i>)	[47, 53, 81]
Krioprotekcja komórek krwi pępowinowej (<i>ex vivo</i>)	[12]
Redukcja obszarów wrzodzących i mediatorów zapalnych podczas zapalenia jelita grubego, dzięki zdolności do stabilizacji makrocząsteczek (<i>in vivo</i>)	[1]

Modyfikacja własna za [74].

Ektoinę można stosować również w celu ochrony jelita cienkiego przed niedokrwieniem i reperfuzją w transplantologii [1]. Łagodzenie reakcji zapalnej jest związane ze stabilizacją bariery jelitowej i redukcją produkcji cytokiny [75]. Bilstain i wsp. w 2015 roku opatentowali skład roztworu do przechowywania organów z dodatkiem ektoiny i hydroksyektoiny. Dalsze badania dowodzą, że roztwór do przechowywania organów przeznaczonych do przeszczepów – HTK (histidine-tryptophan-ketoglutarate) zawierający histydynę, tryptofan, kwas ketoglutaryny, zmodyfikowany dodatkiem ektoiny i hydroksyektoiny wywiera korzystny wpływ umożliwiający przeszczep wątroby po zatrzymaniu krążenia [84]. Zdolność do krioprotekcji została potwierdzona również w przypadku komórek krwi pępowinowej [12] oraz erytrocytów [30].

Niektóre procesy patologiczne, takie jak powstawanie i agregacja amyloidu wywołują choroby neuro-

degeneracyjne. Stwierdzono, że zarówno ektoina jak i hydroksyektoina zapobiegają tworzeniu się amyloidu (Aβ42) i opóźniają postępowanie choroby Alzheimera [48, 53, 81].

Preparaty zawierające ektoinę zapewniają odpowiednio długotrwałe nawilżenie błon śluzowych. Ektoina jest ponadto naturalną substancją pełniącą funkcję ochronną w stosunku do komórek oraz hamującą reakcje immunologiczne, w tym reakcje alergiczne. Zbadano między innymi, czy dotchawicze podawanie ektoiny wywiera wpływ ochronny na astmę alergiczną na podstawie eksperymentalnie wywoływanej u szczurów wczesnej odpowiedzi na alergen (EAR – early allergic reaction), późnej nadmiernej reaktywności dróg oddechowych (AHR – airway hyperresponsiveness) oraz stanu zapalnego. Wyniki badań są obiecujące, dowodzą bowiem, że ektoina wykazuje znaczący wpływ terapeutyczny na EAR, AHR oraz odpowiedź zapalną w zwie-

Tabela III
Białka chronione w warunkach stresowych przez ektoinę i hydroksyektoinę

Białko	Stres	Stężenie białka	Stężenie osmolitów	Aktywność białka (%)
Dehydrogenaza mleczanowa	szybkie zamrażanie/ powolne rozmrażanie (4x)	52 µg/ml	1,0 M hydroksyektoina	100
Fosfofruktokinaza		75 µg/ml	1,0 M ektoina	100
Enolaza		50 µg/ml	0,4 M ektoina	100
Dehydrogenaza glutaminianowa		350 µg/ml	0,5 M hydroksyektoina	85
Karboksylesteraza		200 µg/ml	0,5 M hydroksyektoina	100
Białko wiążące CD30		1 µg/ml	1,0 M hydroksyektoina	89
Dehydrogenaza mleczanowa	inkubacja w podwyższonej temperaturze:	52 µg/ml	0,5 M hydroksyektoina	90
Fosfofruktokinaza		75 µg/ml	1,0 M hydroksyektoina	100
Enolaza		50 µg/ml	0,1 M hydroksyektoina	88
Karboksylesteraza		200 µg/ml	2,0 M hydroksyektoina	65
Polimeraza <i>Taq</i>		20 IU/ml	1,0 M hydroksyektoina	45
Przeciwciała monoklonalne		–	0,5 M hydroksyektoina	aktywne
RNaza A	topnienie	1 mg/ml	3,0 M hydroksyektoina	wzrost T _m o 12 K
Dehydrogenaza mleczanowa	liofilizacja	52 µg/ml	1,0 M ektoina	61
Fosfofruktokinaza		75 µg ml	1,0 M hydroksyektoina	68
Enolaza		50 µg ml	0,4 M hydroksyektoina	97
Dehydrogenaza mleczanowa	utlenianie H ₂ O ₂	200 µg/ml	0,5 M hydroksyektoina	95

Modyfikacja własna za [29].

rzęcym modelu astmy [43]. Aspekt ten przemawia za potencjalną profilaktyczną i terapeutyczną użytecznością wziewnej ektoiny w przypadkach alergii i/lub astmy.

Wykazano również, że ektoina może ochraniać całe komórki (Tabela IV). Powoduje ona zwiększenie płynności błon komórkowych w warunkach ekstremalnych

[40] oraz zwiększa odległość między cząsteczkami lipidów co poprawia płynność błony [28]. Inni badacze donoszą, iż ektoina może wpływać na syntezę białek opiekuńczych takich jak białka szoku cieplnego (Hsp), a także przypuszcza się, że sama ektoina może działać jako cząsteczka białka opiekuńczego [7, 19]. Ektoina

Tabela IV
Potencjalne możliwości praktycznego zastosowania ektoiny i hydroksyektoiny w celu ochrony komórki

Efekt działania	Piśmiennictwo
Ektoina	
Wspieranie procesu fermentacji etanolowej przez <i>Zymomonas mobilis</i>	[99]
Udział w detoksykacji fenolu przez <i>Halomonas</i>	[69]
Utrzymanie aktywności oddechowej <i>E. coli</i> (<i>in vivo</i>)	[72]
Działanie osmoprotekcyjne na bakterie kwasu mlekowego	[5]
Tolerancja na zasolenie transformowanych roślin tytoniu	[70]
Zwiększenie płynność błon komórkowych w warunkach ekstremalnych	[40]
Zwiększa odległość między cząsteczkami lipidowymi i poprawia płynność błony	[28]
Wpływ na syntezę białek opiekuńczych (<i>in vivo</i> i <i>in vitro</i>)	[7, 19]
Ochrona enterocytów przed hemolizyną alfa gronkowca złocistego (<i>in vivo</i>)	[15]
Hydroksyektoina	
Ochrona przed wysychaniem <i>Pseudomonas putida</i>	[65]
Ochrona przed wysychaniem <i>E. coli</i>	[66, 67]
Indukcja termotolerancji u <i>E. coli</i>	[64]
Ektoina i hydroksyektoina	
Stabilizacja <i>E. coli</i> podczas suszenia i przechowywania	[63]

Modyfikacja własna za [74].

i niektóre poliole powodują, iż ludzkie erytrocyty są bardziej odporne na uszkodzenia wywołane przez środki powierzchniowo czynne [18]. Wykazano, że działanie to jest silniejsze niż w przypadku lecytyny (fosfatydylocholiny), której stabilizujące właściwości są już dobrze poznane. Graf i wsp. badali wpływ stężenia ektoiny i czasu jej działania na ten stabilizujący efekt. Dowiedli, że im wyższe stężenie ektoiny, tym silniejszy wpływ ochronny zapobiegający uszkodzeniu błony. Dłuższy kontakt powodował podniesienie stabilności błony o 30% po 6 godzinach i o 60% po 24 godzinach. Tak więc, im dłużej komórki są poddawane działaniu ektoiny, tym silniejszy jest efekt ochronny [35]. Niedawno Bownik i Stępniewska wykazali możliwość ochrony enterocytów bydłęcych przed alfa hemolizyną gronkowca złocistego, formującą kanały białkowe w błonach komórek docelowych [15, 16].

4. Chemiczna i biotechnologiczna produkcja ektoiny

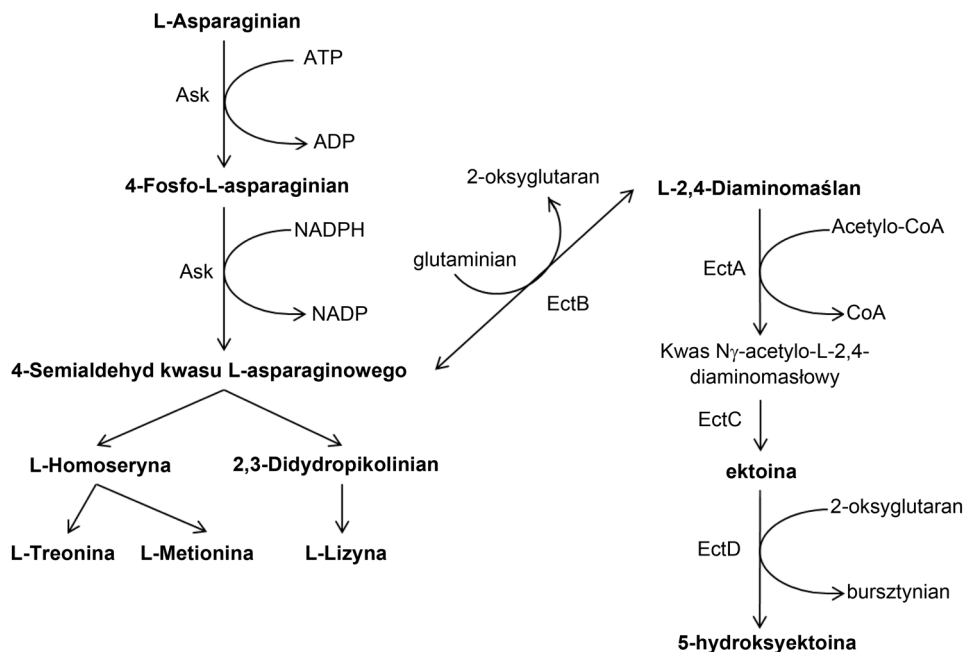
Aktualna światowa roczna produkcja L-aminokwasów znacznie przekracza 2 mln ton. W przemyśle do produkcji aminokwasów wykorzystuje się syntezę mikrobiologiczną przy udziale szczepów produkcyjnych, a także metodę syntezy enzymatycznej i chemicznej.

Chemiczna synteza ektoiny polega na termicznej cyklizacji kwasu *N*-acetylodiaminomasłowego (*N*-acetyl-DABA), który powstaje przez acetylowanie kwasu L-diaminomasłowego (L-DABA) z udziałem octanu *p*-nitrofenylu [59]. Następnie ogrzewa się do wrzenia *N*-acetyl-DABA, *n*-butanol oraz trietyloaminę przez 48 godzin. W procesie tym otrzymuje się ektoinę (60%) i *N*-acetyl-DABA (40%) [8]. Podobna reakcja cyklizacji ma miejsce kiedy prowadzi się reakcję mieszaniny butanolu i ksyleny (30:70, v/v) i pod chłodnicą zwrotną w obecności kwasu *p*-toluenosulfonowego (20%, w/v) przez 48 godzin. W tym wypadku otrzymuje się jednak mniej ektoiny (44%) i więcej *N*-acetyl-DABA (56%) [8, 44]. Znana jest również metoda syntezy tego związku opracowana i opatentowana przez Koichi i wsp. w 1991 roku. Ten japoński patent opublikowany pod numerem JP-A-03031265 (Takeda Chemical Ind) dotyczy chemicznej syntezy ektoiny z estru trimetylowego kwasu *o*-octowego oraz różnych kwasów diamino węglowych [60]. W związku z właściwościami ektoiny i rosnącym zainteresowaniem na rynku, naukowcy poszukują i patentują nowe metody syntezy ektoiny. Amerykańscy naukowcy wzorując się na metodzie opracowanej przez Koichi i wsp. przeprowadzili reakcję octanu *o*-trimetylowego z kwasem 2,4-diaminomasłowym [60]. Każda metoda chemicznej syntezy aminokwasów obciążona jest wysokimi kosztami wynikającymi z drogich związków prekursorowych

oraz konieczności oczyszczania otrzymanego produktu. Dodatkowo metoda syntezy chemicznej prowadzi zawsze do otrzymania racematu, czyli równomolowej mieszaniny pary enancjomerów D i L aminokwasu, przy czym tylko forma L jest aktywna biologicznie. Chemiczna synteza wymaga zatem rozdziału powstałej mieszaniny enancjomerów. Obecnie, ze względu na niskie koszty produkcji i brak wydajnej biologicznej alternatywy, metodę chemiczną stosuje się głównie do produkcji D, L-metioniny (350 tys. ton/rok).

Do syntezy aminokwasów zastosować można również metodę kombinowaną, polegającą na biologicznej izomeryzacji chemicznie otrzymanego produktu. Możliwa jest również synteza enzymatyczna, co znalazło zastosowanie w przemyśle, w przypadku produkcji kwasu asparaginowego, tryptofanu i seryny [61]. W związku z ograniczeniami powyższych metod, producenci poszukują więc innych bardziej ekonomicznych metod biotechnologicznej produkcji aminokwasów, w tym również ektoiny [92].

Najpowszechniej stosowanym sposobem otrzymywania aminokwasów jest ich mikrobiologiczna synteza. Największy udział na rynku aminokwasów przypada obecnie na bioprodukcję kwasu L-glutaminowego (1,5 mln ton rocznie), oraz L-lizyny (850 tys. ton rocznie) [34]. Obecnie rośnie również zapotrzebowanie na inne aminokwasy w tym ektoinę i hydroksyektoinę. Biotechnologiczna produkcja tych aminokwasów opiera się na wykorzystaniu możliwości ich syntezy przez mikroorganizmy. Uważa się, że ektoina jest obecnie jednym z najbardziej wartościowych produktów syntetyzowanych przez mikroorganizmy. Globalna konsumpcja ektoiny wynosi 15 000 ton rocznie a sprzedaż detaliczną, tylko w przemyśle farmaceutycznym, szacuje się na 1 000 dolarów za kg [25, 87]. Mechanizm biosyntezy ektoiny i hydroksyektoiny przebiega podobnie jak innych aminokwasów takich jak: L-lizyna, L-metionina, L-treonina (Ryc. 1). Pierwszym etapem syntezy jest fosforylacja L-asparagianu i jego konwersja do 4-fosfo-L-asparagianu przez kinazę asparagianową (enzym Ask). Następnie z 4-fosfo-L-asparagianu powstaje 4-semialdehyd kwasu L-asparaginowego. Reakcja ta katalizowana jest przez dehydrogenazę L-asparagiano- β -semialdehydu (enzym Asd). Z kolei 4-semialdehyd kwasu L-asparaginowego przekształcany jest do L-2,4-diaminomasłanu przez aminotransferazę kwasu diaminomasłowego (enzym EctB). Kolejnym etapem jest transformacja powstałego kwasu przez acetylotransferazę kwasu diaminomasłowego (enzym EctA) do kwasu *N* γ -acetylo-L-2,4-diaminomasłowego. Kolejnym enzymem biorącym udział w biosyntezie ektoiny jest syntetaza ektoiny (EctC), która przekształca kwas *N* γ -acetylo-L-2,4-diaminomasłowy, do kwasu 1,4,5,6-tetrahydro-2-metylo-4-pyrimidyno karboksylowego (ektoiny). U niektórych bakterii występuje



Ryc. 1. Szlak biosyntezy ektoiny i hydroksyektoiny. Modyfikacja własna za [77, 92]

hydroksylaza ektoiny (EctD), która umożliwia transformację ektoiny do hydroksyektoiny (Ryc. 1) [77, 92].

Biotechnologiczna produkcja ektoiny na skalę przemysłową obejmuje kilka etapów. Etap przygotowania inokulum, jest to zwykle faza laboratoryjna, w której ożywia się szczep produkcyjny i przygotowuje hodowlę w objętości kilku litrów w małych fermentatorach laboratoryjnych. Drugim etapem jest główny proces biosyntezy. Na każdym z etapów wymagany jest monitoring wzrostu mikroorganizmów i kontrola parametrów fizykochemicznych hodowli. Właściwy proces biosyntezy obejmuje etap: górnostrumieniowy (upstream), czyli fermentację i wytwarzanie substancji oraz dolnostrumieniowy (downstream), w którym pożądana substancja jest izolowana, oczyszczana i analizowana [74, 86].

Pierwszy proces opracowany dla biotechnologicznej produkcji ektoiny tzw. „dojenie bakterii” (bacterial milking) został opracowany przez Sauer i Galinski w 1998 roku i stosowany jest obecnie na skalę przemysłową. Umożliwia on uwalnianie syntetyzowanych osmolitów na zewnątrz komórki, bez degradacji biomasy bakteryjnej. Rozpuszczalność ektoiny w wodzie o temperaturze 25°C wynosi 6,5 mol/kg i gromadzona jest w cytoplazmie komórek bakteryjnych w stężeniu do 1 M [42]. Bakterie halofilne (np. *Halomonas elongata*), posiadają nie tylko mechanizmy adaptacji umożliwiające im funkcjonowanie w środowisku o dużym zasoleniu, ale dostosowane są też do nagłego spadku zasolenia spowodowanego m.in. przez opady lub powodzie. W tej sytuacji stężenie soli w cytoplazmie tych organizmów jest wyższe niż na zewnątrz komórki i może nastąpić nagły napływ wody ze środowiska zewnętrznego do komórki bakteryjnej. Aby uniknąć lizy, komórka uwalnia ekto-

inę i inne osmolity na zewnątrz. Prawdopodobnie jest to możliwe dzięki kanałom mechanosensytywnym. W przypadku *H. elongata* stwierdzono obecność trzech kanałów MscS (mechanosensitive channel of small conductance) i jednego kanału MscK (potassium-dependent mechanosensitive channel) [56]. W związku z tym głównymi czynnikami w procesie „bacterial milking” jest indukcja szoku osmotycznego a następnie wprowadzenie do podłoża o wyższym potencjale chemicznym (niższej osmolarności). Bakterie Gram-ujemne są bardziej wrażliwe na zewnętrzne zmiany zasolenia [63], natomiast bakterie Gram-dodatnie ze względu na wielowarstwową budowę mureiny nie są tak wrażliwe na zmiany osmotyczne oraz nie wydzielają nagromadzonych wewnątrzkomórkowo osmoprotektantów podczas procesu „milking” [74].

Biosyntezą ektoiny na skalę przemysłową zajmuje się obecnie głównie niemiecka firma Bitop (Witten, Germany) wykorzystująca w produkcji ektoiny *Halomonas elongata*, wyizolowane z systemów wykorzystywanych przy produkcji soli na holenderskiej wyspie Bonaire na Morzu Karaibskim [94]. Bakterie hodowane są w fermentatorach o pojemności 1000 i 3500 l, w temperaturze 25–40°C. Optimum wzrostu wykazują przy stężeniu NaCl między 3 i 6% NaCl, ale zdolne są do wzrostu na podłożu z dodatkiem do 20% NaCl. Bakterie osiągają dużą gęstość komórkową > 40 g suchej masy na litr hodowli. Ektoina pozyskiwana jest w opisanym powyżej procesie „bacterial milking”, gdzie bakterie hodowane w obecności 10% NaCl poddawane są szokowi osmotycznemu poprzez obniżenie zasolenia do 2% NaCl. W rezultacie 80% wytworzonej ektoiny uwalniane jest do medium na zewnątrz komórki. W ten

sposób z wykorzystaniem *Halomonas elongata* ektoina produkowana jest w ilości ponad 10 g/l [56]. Opisana powyżej biotechnologiczna produkcja tego osmolitu przez *H. elongata*, chociaż jest procesem dostarczającym stosunkowo dużej ilości produktu to jest też procesem długotrwałym (120 godzin) i dość kosztownym, głównie ze względu na wysokie wymagania jakościowe podłoża oraz koszty związane z oczyszczaniem, czy ostatecznym przygotowaniem produktu [25, 56, 74]. W związku z tym wszelkie prace związane z poszukiwaniem nowych, wydajnych, łatwych w hodowli szczepów do produkcji ektoiny są uzasadnione i bardzo potrzebne.

5. Mikroorganizmy syntetyzujące ektoinę

Oprócz *Halomonas elongata* wykorzystywanego do produkcji ektoiny na skalę przemysłową, zdolność do syntezy tego osmolitu posiada wiele mikroorganizmów. Synteza ektoiny i hydroksyektoiny w odpowiedzi na wysoką osmolarność środowiska jest szeroko rozpowszechniona głównie u bakterii. Analiza 557 genomów przedstawicieli domeny *Archaea* pokazało, że tylko 12 szczepów z rodzajów: *Nitrosopumilus*, *Methanotherix* i *Methanobacterium* posiada klaster genów odpowiedzialny za syntezę ektoiny i hydroksyektoiny [95]. Wśród bakterii zdolnych do syntezy ektoiny i/lub hydroksyektoiny wymienia się przedstawicieli zarówno typu *Actinobacteria*, *Firmicutes*, jak i α -, γ -, δ -*Proteobacteria*. W większości są to mikroorganizmy wykorzystujące jako źródło węgla cukry, m.in. bakterie z rodzaju: *Streptomyces*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Chromohalobacter* czy *Halomonas*.

W obrębie rodzaju *Halomonas*, poza *H. elongata* również inne gatunki charakteryzują się stosunkowo wysoką produkcją ektoiny, ale dużo niższym poziomem wydzielania jej na zewnątrz komórki. Zhang i wsp. dowiedli, iż *H. salina* produkuje około 923 mg/l, ale poziom zewnątrzkomórkowej ektoiny pozostaje niewielki, tj. około 11% całkowitej ektoiny. Ponadto wykazano, że w tym przypadku synteza nie przebiega wprost proporcjonalnie do zasolenia, a maksimum syntezy uzyskano przy stężeniu soli 1,4% NaCl [98]. Bakterie *Halomonas boliviensis* natomiast, akumuluje ektoinę wewnątrz komórek na maksymalnym poziomie 0,74 g/l w obecności 10–15% (w/v) NaCl, podczas gdy synteza hydroksyektoiny w tych warunkach wynosi 50 mg/l [37].

Ponadto, jak udowodnili Bursy i wsp., *Streptomyces coelicolor*, w optymalnej temperaturze wzrostu w obecności 1,4% NaCl produkuje ektoinę na poziomie 10–55 $\mu\text{mol/g}_{\text{sm}}$. Natomiast w podwyższonej temperaturze, tj. 39°C przeważa synteza hydroksylowej pochodnej ektoiny, która wynosi około 60 $\mu\text{mol/g}_{\text{sm}}$ [20]. Znanymi producentami ektoiny są też bakterie

z rodzaju *Bacillus* [21]. Kuhlmann i Bremer wykazali, iż szczep *B. pasteurii* (DSM 33T) syntetyzuje ektoinę na poziomie 0,36 do 0,59 $\text{mmol/g}_{\text{sm}}$ [2, 55]. Innymi powszechnie występującymi w środowisku bakteriami, u których potwierdzono zdolność do syntezy ektoiny są bakterie z rodzaju *Pseudomonas*. Seip wraz ze współpracownikami dowiedli, iż syntetyzują one ektoinę na poziomie maksymalnie około 50 $\mu\text{mol/g}_{\text{sm}}$, a jej stężenie wzrasta wraz ze wzrostem zasolenia w przedziale 2–7,5% NaCl [82]. Kolejnym przykładem są bakterie z rodzaju *Chromohalobacter* [22, 33, 73, 83]. Wykazano, iż bakterie te wytwarzają maksymalnie 1,2 mmol ektoiny w przeliczeniu na g suchej masy bakterii, co czyni je wydajniejszymi w produkcji ektoiny niż wyżej opisane *Streptomyces* sp., *Bacillus* sp. i *Pseudomonas* sp.

5.1. Bakterie metanotroficzne

Znanymi w literaturze producentami ektoiny są również mikroorganizmy metanotroficzne. Obecne doniesienia literaturowe dotyczą głównie halotolerancyjnych metanotrofów tj.: *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z, *M. kenyense*, *M. buryatense* [23, 50, 51]. Reshetnikov wraz ze współpracownikami wyróżnili dwa typy organizacji genów odpowiedzialnych za syntezę ektoiny, związanych z tolerancją mikroorganizmów na zasolenie i wytwarzaniem tego osmolitu. Szczepy *Methylobacterium marinum* 7C i *M. kenyense* AMO1 posiadają geny *ectABC* i akumulują ektoinę w ilości do 70 mg na g suchej masy bakterii. Bakterie te zdolne są do wzrostu w obecności 4–5% NaCl [52, 76]. W przypadku szczepu *M. alcaliphilum* 20Z, wyposażonego w operon *ectABC-ask*, stwierdzono możliwość wzrostu przy wyższym zasoleniu (do 10% NaCl) i akumulację większej ilości ektoiny (>120 mg/g_{sm}). Co oznacza, iż istotną rolę w syntezie ektoiny odgrywa specyficzna kinaza asparaginowa [76]. Konwersja asparagianu do fosforanu β -aspartylu przez kinazę asparagianową (*Ask*) stanowi punkt wyjścia w biosyntezie aminokwasów z rodziny asparagianowej i ektoiny. Khmelenina i wsp. wykazali, że halotolerancyjny szczep *M. alcaliphilum* 20Z, wyizolowany z alkalicznego jeziora Tuva w Rosji, w obecności 6% NaCl wytwarza osmolity takie jak: ektoina, sacharoza i 5-oxo-1-prolina odpowiednio na poziomie 739–1021, 175–401 i 426–560 $\text{nmol/mg}_{\text{sm}}$ w zależności od stężenia i formy azotu w podłożu [50].

Khmelenina i Reshetnikov wraz ze swoim zespołem skupili się na aspekcie genetycznym, poprzez rozpoznanie organizacji genów odpowiedzialnych za syntezę ektoiny [52, 76, 77]. Mało uwagi poświęcono natomiast na optymalizację procesu i dopracowanie warunków syntezy oraz ekstrakcji tego związku. W ostatnim czasie tematyka ta spotkała się ze wzmożonym zainteresowaniem ze strony hiszpańskich naukowców. Prace opublikowane w 2017 roku uwzględniają aspekty tech-

nologiczne produkcji ektoiny przez *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z. Produkcję testowano w skali laboratoryjnej w bioreaktorach pracujących w sposób ciągły. Podczas hodowli zwiększono stężenie NaCl z 3 do 6% i osiągnięto maksimum biosyntezy ektoiny wewnątrzkomórkowej na poziomie $37,4 \text{ mg/g}_{\text{sm}}$. W pracy badano wpływ szybkości mieszania i stężenia Cu^{2+} na produkcję tego osmolitu [23]. Cantera i wsp. przeprowadzili również doświadczenia polegające na zmniejszeniu stężenia NaCl podczas trwania hodowli z 6 do 0% i stwierdzili, że taka gwałtowna zmiana warunków hodowli skutkuje wyższą produkcją ektoiny do $70,4 \pm 14,3 \text{ mg/g}_{\text{sm}}$. Wykazano również, iż około 70% wytwarzanego osmolitu wydzielane jest na zewnątrz komórki [24]. Wyniki te udowadniają, iż optymalizacja wydajności i czasu syntezy a co za tym idzie redukcja nakładów finansowych daje możliwość produkcji ektoiny przez *M. alcaliphilum* 20Z na szerszą skalę. Ponadto należy zwrócić uwagę na inne metanotrofy tj. z rodzaju *Methylobacterium*, *Methylobacter* i *Methylohalobius*, które również są zdolne do syntezy ektoiny [49, 77, 85].

Bakterie metanotroficzne oprócz możliwości dostarczenia cennego dla medycyny, przemysłu farmaceutycznego i kosmetycznego, aminokwasu jakim jest ektoina, wykazują wiele środowiskowych korzyści. Proces wytwarzania ektoiny w tym przypadku może być połączony z jednoczesną produkcją innych związków m. in., biopolimerów, fosfolipidów, sacharozy, białek helatujących metale i wielu innych. Za wykorzystaniem metanotrofów na skalę przemysłową przemawia również fakt jednoczesnej utylizacji związków odpadowych, takich jak metan, który jest dla nich źródłem węgla i energii [25, 87].

6. Podsumowanie

Halofile to mikroorganizmy o dużym potencjale biotechnologicznym związanym z produkcją enzymów, β -karoten czy osmolitów. W celu zachowania równowagi osmotycznej między cytoplazmą a podłożem w warunkach dużego zasolenia mikroorganizmy te rozwinęły dwie podstawowe strategie. Pierwszy mechanizm dotyczy zachowania wysokiego stężenia jonów potasu wewnątrz komórki. Druga strategia polega na biosyntezie organicznych osmotycznych substancji rozpuszczonych takich jak: cukry (np. trehaloza), aminokwasy (np. glicyna, betaina, kwas glutaminowy, L-prolina, ektoina, hydroksyektoina) oraz poliole (np. glicerol). Ochronne działanie związków zgodnych opisane na przykładzie mikroorganizmów zdolnych do ich syntezy może być wykorzystane również w odniesieniu do innych organizmów: człowieka, zwierząt, czy roślin. W ostatnich latach obserwuje się gwałtowny wzrost popytu na ektoinę, głównie ze względu na jej właści-

wości związane z ochroną zdrowia, a przede wszystkim skóry i błon śluzowych. Firmy farmaceutyczne coraz chętniej testują i wprowadzają produkty, w których substancją czynną jest ektoina.

Praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego o nr DEC-2014/15/N/NZ8/00315 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki.

Piśmiennictwo

1. Abdel-Aziz H., Wadie W., Abdallah D.M., Lentzen G., Khayyal M.T.: Novel effects of ectoine, a bacteria-derived natural tetrahydropyrimidine, in experimental colitis. *Phytomedicine*, **20**, 585–591 (2013)
2. Rajan L.A., Joseph T.C., Thampuran N., James R., Kumar K.A., Viswanathan C., Bansal K.C.: Cloning and heterologous expression of ectoine biosynthesis genes from *Bacillus halodurans* in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* **30**, 1403–1407 (2008)
3. Andrei A-Ş., Banciu H.L., Oren A.: Living with salt: metabolic and phylogenetic diversity of archaea inhabiting saline ecosystems. *FEMS Microbiol. Lett.* **330**, 1–9 (2012)
4. Anzali S., Von Heydebreck A., Herget T.: Elucidation of the anti-aging effects of ectoine using cDNA microarray analysis and signaling pathway evaluation. *Int. J. Cosmet. Sci.* **32**, 319–319 (2010)
5. Baliarda A., Robert H., Jebbar M., Blanco C., Deschamps A., Le Marrec C.: Potential osmoprotectants for the lactic acid bacteria *Pediococcus pentosaceus* and *Tetragenococcus halophila*. *Int. J. Food. Microbiol.* **84**, 13–20 (2003)
6. Barth S., Huhn M., Matthey B., Klimka A., Galinski E.A., Engert A.: Compatible-solute-supported periplasmic expression of functional recombinant proteins under stress conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1572–1579 (2000)
7. Becker J., Schäfer R., Kohlstedt M., Harder B.J., Borchert N.S., Stöveken N., Bremer E., Wittmann C.: Systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for production of the chemical chaperone ectoine. *Microb. Cell Fact.* **12**, 110 (2013)
8. Bernard T., Jebbar M., Rassouli Y., Himdikabbab S., Hamelin J., Blanco C.: Ectoine accumulation and osmotic regulation in *Brevibacterium linens*. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 129–136 (1993)
9. Bersch S., Vangala M., Schwarz T., Kaufmann, M.: Protection of antibodies against proteolytic degradation by compatible solutes (w) 2nd international conference on protein stabilisation/biomolecule stabilisation, Lissabon, 2000
10. Beyer N., Driller H.: Ectoin: a innovative, multi-functional active substance for the cosmetic industry. *SÖfw-journal*, **126**, 26–29 (2000)
11. Bilstein A., Lentzen G., Tolba R., Quesnel F.: Organ storage solution. Google Patents. <https://patents.google.com/patent/US20150104781A1/en> (Dostęp 2.02.2019), (2015)
12. Bissoyi A., Pramanik K.: Effects of non-toxic cryoprotective agents on the viability of cord blood derived MNCs. *Cryoletters*, **34**, 453–465 (2013)
13. Botta C., Di Giorgio C., Sabatier A.-S., De Méo M.: Genotoxicity of visible light (400–800 nm) and photoprotection assessment of ectoin, l-ergothioneine and mannitol and four sunscreens. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* **91**, 24–34 (2008)
14. Bownik A., Stepińska Z.: Ectoine as a promising protective agent in humans and animals. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* **67**, 260–265 (2016)

15. Bownik A., Stępniewska Z.: Protective effects of bacterial osmoprotectant ectoine on bovine erythrocytes subjected to staphylococcal alpha-haemolysin. *Toxicol.* **99**, 130–135 (2015)
16. Bownik A., Stępniewska Z.: Zastosowanie ektoiny jako czynnika ochronnego przed działaniem toksyny bakteryjnej. Patent nr P412197 (2018)
17. Buenger J., Driller H.: Ectoin: An effective natural substance to prevent UVA-induced premature photoaging. *Skin Pharmacol. Physiol.* **17**, 232–237 (2004)
18. Bunger J.: Ectoin added protection and care for the skin. *Euro Cosmet.* **7**, 22–24 (1999)
19. Buommino E., Schiraldi C., Baroni A., Paoletti I., Lamberti M., De Rosa M., Tufano M. A.: Ectoine from halophilic microorganisms induces the expression of hsp70 and hsp70B' in human keratinocytes modulating the proinflammatory response. *Cell Stress Chaperones*, **10**, 197–203 (2005)
20. Bursy J., Kuhlmann A.U., Pittelkow M., Hartmann H., Jebbar M., Pierik A.J., Bremer E.: Synthesis and uptake of the compatible solutes ectoine and 5-hydroxyectoine by *Streptomyces coelicolor* A3(2) in response to salt and heat stresses. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 7286–7296 (2008)
21. Bursy J., Pierik A.J., Pica N., Bremer E.: Osmotically induced synthesis of the compatible solute hydroxyectoine is mediated by an evolutionarily conserved ectoine hydroxylase. *J. Biol. Chem.* (2007)
22. Cánovas D., Vargas C., Calderón M.I., Ventosa A., Nieto J.J.: Characterization of the genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata* DSM 3043. *Syst. Appl. Microbiol.* **21**, 487–497 (1998)
23. Cantera S., Lebrero R., Rodríguez E., García-Encina P.A., Muñoz R.: Continuous abatement of methane coupled with ectoine production by *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z in stirred tank reactors: A step further towards greenhouse gas biorefineries. *J. Clean. Prod.* **152**, 134–141 (2017)
24. Cantera S., Lebrero R., Rodríguez S., García-Encina P.A., Muñoz R.: Ectoine bio-milking in methanotrophs: A step further towards methane-based bio-refineries into high added-value products. *Chem. Eng. J.* **328**, 44–48 (2017)
25. Cantera S., Muñoz R., Lebrero R., López J.C., Rodríguez Y., García-Encina P.A.: Technologies for the bioconversion of methane into more valuable products. *Curr. Opin. Biotechnol.* **50**, 128–135 (2018)
26. Cruz P.E., Silva A.C., Roldão A., Carmo M., Carrondo M.J.T., Alves P.M.: Screening of novel excipients for improving the stability of retroviral and adenoviral vectors. *Biotechnol. Prog.* **22**, 568–576 (2006)
27. Detkova E.N., Boltysanskaya Y.V.: Osmoadaptation of haloalkaliphilic bacteria: Role of osmoregulators and their possible practical application. *Microbiol.* **76**, 511–522 (2007)
28. Dwivedi M., Brinkkötter M., Harishchandra R.K., Galla H.-J.: Biophysical investigations of the structure and function of the tear fluid lipid layers and the effect of ectoine. Part B: Artificial lipid films. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.* **1838**, 2716–2727 (2014)
29. Ectoine / Hydroxyectoine. [http://artimmun.de/fileadmin/user_upload/temp_jpegs_and_data/raw_material/BioStab_Ectoin_u_Hydroxyectoin.pdf] (Dostęp 2.02.2019)
30. El Assal R., Demirci U. i wsp.: Bio-inspired cryo-ink preserves red blood cell phenotype and function during nanoliter vitrification. *Adv. Mater.* **26**, 5815–5822 (2014)
31. Empadinhas N., da Costa M.S.: Osmoadaptation mechanisms in prokaryotes: distribution of compatible solutes. *Int. Microbiol.* **11**, 151–161 (2008)
32. Galinski E.A., Pfeiffer H-P., Truper H.G.: 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid. A novel cyclic amino acid from halophilic phototrophic bacteria of the genus *Ectothiorhodospira*. *Eur. J. Biochem.* **149**, 135–139 (1985)
33. García-Esteva R., Argandoña M., Reina-Bueno M., Capote N., Iglesias-Guerra F., Nieto J.J., Vargas C.: The ectD gene, which is involved in the synthesis of the compatible solute hydroxyectoine, is essential for thermoprotection of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *J. Bacteriol.* **188**, 3774–3784 (2006)
34. Gołabczak J.: Biochemiczne, genetyczne i technologiczne podstawy biosyntezy L-lizyny. *Biotechnologia*, **1**, 53–70 (2008)
35. Graf R., Anzali S., Buenger J., Pfluecker F., Driller H.: The multifunctional role of ectoine as a natural cell protectant. *Clin. Dermatol.* **26**, 326–333 (2008)
36. Grether-Beck S., Timmer A., Felsner I., Brenden H., Brammertz D., Krutmann J.: Ultraviolet A-induced signaling involves a ceramide-mediated autocrine loop leading to ceramide de novo synthesis. *J. Invest. Dermatol.* **125**, 545–553 (2005)
37. Guzmán H., Van-Thuoc D., Martín J., Hatti-Kaul R., Quillaguamán J.: A process for the production of ectoine and poly(3-hydroxybutyrate) by *Halomonas boliviensis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **84**, 1069–1077 (2009)
38. Hahn M.B., Uhlig F., Solomun T., Smiatek J., Sturm H.: Combined influence of ectoine and salt: spectroscopic and numerical evidence for compensating effects on aqueous solutions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18**, 28398–28402 (2016)
39. Hai T., Oppermann-Sanio F.B., Steinbüchel A.: 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 (2002)
40. Harishchandra R.K., Wulff S., Lentzen G., Neuhaus T., Galla H.-J.: The effect of compatible solute ectoines on the structural organization of lipid monolayer and bilayer membranes. *Biophys. Chem.* **150**, 37–46 (2010)
41. Heinrich U., Garbe B., Tronnier H.: *In vivo* Assessment of Ectoin: A randomized, vehicle-controlled clinical trial. *Skin Pharmacol. Physiol.* **20**, 211–218 (2007)
42. Held C., Neuhaus T., Sadowski G.: Compatible solutes: Thermodynamic properties and biological impact of ectoines and prolines. *Biophys. Chem.* **152**, 28–39 (2010)
43. Hoymann H.G., Bilstein A., Bernal F., Stoehr T., Lentzen G.: Therapeutic effect of ectoine in an experimental model of allergic asthma. (w) XXVIII Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. Warsaw (2009)
44. Inbar L., Lapidot A.: The structure and biosynthesis of new tetrahydropyrimidine derivatives in actinomycin D producer *Streptomyces parvulus*. Use of ¹³C- and ¹⁵N-labeled L-glutamate. *J. Biol. Chem.* **263**, 16014–1622 (1988)
45. Yu I., Jindo Y., Nagaoka M.: Microscopic understanding of preferential exclusion of compatible solute ectoine: direct interaction and hydration alteration. *J. Phys. Chem. B.* **111**, 10231–10238 (2007)
46. Jakubowska A.: Wiązanie jonów na granicy faz oraz specyficzne efekty jonowe. *Wiadomości Chem.* 193–208 (2012)
47. Kanapathipillai M., Ku S.H., Girigoswami K., Park C.B.: Small stress molecules inhibit aggregation and neurotoxicity of prion peptide 106–126. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **365**, 808–813 (2008)
48. Kanapathipillai M., Lentzen G., Sierks M., Park C.B.: Ectoine and hydroxyectoine inhibit aggregation and neurotoxicity of Alzheimer's β-amyloid. *FEBS Lett.* **579**, 4775–4780 (2005)
49. Khmelenina V.N., Kalyuzhnaya M.G., Starostina N.G., Suzina N.E., Trotsenko Y.A.: Isolation and characterization of halotolerant alkaliphilic methanotrophic bacteria from Tuva Soda Lakes. *Curr. Microbiol.* **35**, 257–261 (1997)

50. Khmelenina V.N., Sakharovskii V.G., Reshetnikov A.S., Trotsenko Y.A.: Synthesis of osmoprotectants by halophilic and alkaliphilic methanotrophs. *Microbiology*, **69**, 381–386 (2000)
51. Khmelenina V.N., Suzina N.E., Trotsenko Y.A.: Surface layers of methanotrophic bacteria. *Microbiology*, **82**, 529–541 (2013)
52. Khmelenina V.N., Mustakhimov I.I., Reshetnikov A.S., Kalyuzhnaya M.G., Trotsenko Y.: Genetic and biochemical aspects of ectoine biosynthesis in moderately halophilic and halotolerant methylotrophic bacteria. *Am. J. Agric. Biol. Sci.* **5**, 446–458 (2010)
53. Khurana R., Coleman C., Ionescu-Zanetti C., Carter S.A., Krishna V., Grover R.K., Roy R., Singh S.: Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. *J. Struct. Biol.* **151**, 229–238 (2005)
54. Kolp S., Pietsch M., Galinski E.A., Gütschow M.: Compatible solutes as protectants for zymogens against proteolysis. *Biochim. Biophys. Acta. Proteins. Proteomics*, **1764**, 1234–1242 (2006)
55. Kuhlmann A.U., Bremer E.: Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in *Bacillus pasteurii* and related *Bacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 772–783 (2002)
56. Kunte H., Lentzen G., Galinski E.: Industrial production of the cell protectant ectoine: protection mechanisms, processes, and products. *Curr. Biotechnol.* **3**, 10–25 (2014)
57. Kurz M.: Compatible solute influence on nucleic acids: Many questions but few answers. *Saline Systems*, **4**, 6 (2008)
58. Lapidot A., Ben-Asher E., Eisenstein M.: Tetrahydropyrimidine derivatives inhibit binding of a Tat-like, arginine-containing peptide, to HIV TAR RNA *in vitro*. *FEBS Lett.* **367**, 33–38 (1995)
59. Leclerc J., Benoiton L.: On the selectivity of acylation of unprotected diamino acids. *Can. J. Chem.* **46**, 1047–1051 (1968)
60. Lentzen G., Neuhaus T.: Synthesis of cyclic amidines. U.S. Patent No. 8,598,346. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office (2013)
61. Libudzisz Z., Kowal K.: Mikrobiologia techniczna. Wydaw. PŁ. (2000)
62. Lippert K., Galinski E.: Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 61–65 (1992)
63. Louis P., Truper H.G., Galinski E.A.: Survival of *Escherichia coli* during drying and storage in the presence of compatible solutes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**, 684–688 (1994)
64. Malin G., Lapidot A.: Induction of synthesis of tetrahydropyrimidine derivatives in *Streptomyces* strains and their effect on *Escherichia coli* in response to osmotic and heat stress. *J. Bacteriol.* **178**, 385–395 (1996)
65. Manzanera M., García de Castro A., Tøndervik A., Rayner-Brandes M., Strøm A.R., Tunnacliffe A.: Hydroxyectoine is superior to trehalose for anhydrobiotic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4328–4333 (2002)
66. Manzanera M., Vilchez S., Tunnacliffe A.: High survival and stability rates of *Escherichia coli* dried in hydroxyectoine. *FEMS Microbiol Lett.* **233**, 347–352 (2004)
67. Manzanera M., Vilchez S., Tunnacliffe A.: Plastic encapsulation of stabilized *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 3143–3145 (2004)
68. Mascellani N., Volinia S., i wsp.: Compatible solutes from hyperthermophiles improve the quality of DNA microarrays. *BMC Biotechnol.* **7**, 82 (2007)
69. Maskow T., Kleinstaub S.: Carbon and energy fluxes during haloadaptation of *Halomonas* sp. EF11 growing on phenol. *Extremophiles*, **8**, 133–1341 (2004)
70. Moghaieb R.E.A., Fujita K. i wsp.: Characterization of salt tolerance in ectoine-transformed tobacco plants (*Nicotiana tabacum*): photosynthesis, osmotic adjustment, and nitrogen partitioning. *Plant, Cell Environ.* **29**, 173–182 (2006)
71. Motitschke L., Driller H., Galinski E.: Ectoin and ectoin derivatives as moisturizers in cosmetics. U.S. Patent No. 6,060,071. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office (2001)
72. Nagata S., Maekawa Y., Ikeuchi T., Wang Y.B., Ishida A.: Effect of compatible solutes on the respiratory activity and growth of *Escherichia coli* K-12 under NaCl stress. *Rep. Res. Inst. Mar. Cargo. Transp.* **11**, 75–80 (2003)
73. Pastor J.M., Cánovas M. i wsp.: Role of central metabolism in the osmoadaptation of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *J. Biol. Chem.* **288**, 17769–17781 (2013)
74. Pastor J.M., Cánovas M. i wsp.: Ectoin in cell stress protection: Uses and biotechnological production. *Biotechnol Adv.* **28**, 782–801 (2010)
75. Pech T., Schaefer N. i wsp.: A natural tetrahydropyrimidine, ectoine, ameliorates ischemia reperfusion injury after intestinal transplantation in rats. *Pathobiology*, **80**, 102–110 (2013)
76. Reshetnikov A.S., Khmelenina V.N., Mustakhimov I.I., Kalyuzhnaya M., Lidstrom M., Trotsenko Y.A.: Diversity and phylogeny of the ectoine biosynthesis genes in aerobic, moderately halophilic methylotrophic bacteria. *Extremophiles*, **15**, 653–663 (2011)
77. Reshetnikov A.S., Khmelenina V.N., Mustakhimov I.I., Trotsenko Y.A.: Genes and enzymes of ectoine biosynthesis in halotolerant methanotrophs. 1st edition. Elsevier Inc. (2011)
78. Reuter K., Pittelkow M., Bursy J., Heine A., Craan T., Bremer E.: Synthesis of 5-hydroxyectoine from ectoine: Crystal structure of the non-heme iron(II) and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase EctD. *PLoS One*, **5**, e10647 (2010)
79. Robinson M., Visscher M., Laruffa A., Wickett R.: Natural moisturizing factors (NMF) in the stratum corneum (SC). I. Effects of lipid extraction and soaking. *J. Cosmet. Sci.* **61**, 13–22 (2010)
80. Roychoudhury A., Bieker A., Häussinger D., Oesterheld F.: Membrane protein stability depends on the concentration of compatible solutes – a single molecule force spectroscopic study. *Biol. Chem.* **394**, 1465–1474 (2013)
81. Ryu J., Kanapathipillai M., Lentzen G., Park C.B.: Inhibition of β -amyloid peptide aggregation and neurotoxicity by α -D-mannosylglycerate, a natural extremolyte. *Peptides*, **29**, 578–584 (2008)
82. Seip B., Galinski E.A., Kurz M.: Natural and engineered hydroxyectoine production based on the *Pseudomonas stutzeri* ectABC-ask gene cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 1368–1374 (2011)
83. Severin J., Wohlfarth A., Galinski E.A.: The predominant role of recently discovered tetrahydropyrimidines for the osmoadaptation of halophilic eubacteria. *Microbiology*, **138**, 1629–1638 (1992)
84. Srinivasan P.K., Fet N., Bleilevens C., Afify M., Doorschodt B., Yagi S., Tolba R.H.: Hydroxyectoine ameliorates preservation injury in deceased after cardiac death donors in experimental liver grafts. *Ann. Transplant.* **19**, 165–173 (2014)
85. Stępniewska Z., Goraj W., Kuźniar A., Pytlak A., Ciepielski J., Frączek P.: Biosynthesis of ectoine by the methanotrophic bacterial consortium isolated from Bogdanka coalmine (Poland). *Appl. Biochem. Microbiol.* **50**, 594–600 (2014)
86. Stępniewska Z., Kuźniar A., Pytlak A., Ciepielski J.: Ektoina – przeciwstresowa cząsteczka przyszłości. *Kosmos*, **63**, 25–35 (2014)
87. Strong P.J., Kalyuzhnaya M., Silverman J., Clarke W.P.: A methanotroph-based biorefinery: Potential scenarios for generating multiple products from a single fermentation. *Bioresour Technol.* **215**, 314–23 (2016)
88. Sydlik U., Gallitz I., Albrecht C., Abel J., Krutmann J., Unfried K.: The compatible solute ectoine protects against

- nanoparticle-induced neutrophilic lung inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **180**, 29–35 (2009)
89. Sydlík U., Bilstein A.: Recovery of neutrophil apoptosis by ectoine: a new strategy against lung inflammation. *Eur. Respir. J.* **41**, 433–442 (2013)
90. Tanne C., Golovina E.A., Hoekstra F.A., Meffert A., Galinski E.A.: Glass-forming property of hydroxyectoine is the cause of its superior function as a desiccation protectant. *Front. Microbiol.* **5**, 150 (2014)
91. Tao P., Li H., Yu Y., Gu J., Liu Y.: Ectoine and 5-hydroxyectoine accumulation in the halophile *Virgibacillus halodenitrificans* PDB-F2 in response to salt stress. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 6779–6789 (2016)
92. Trotsenko Y.A., Doronina N.V., Khmelenina V.N.: Biotechnological potential of aerobic methylotrophic bacteria: A review of current state and future prospects. *Appl Biochem Microbiol.* **41**, 433–441 (2005)
93. Unfried K., Kroker M., Autengruber A., Gotić M., Sydlík U.: The compatible solute ectoine reduces the exacerbating effect of environmental model particles on the immune response of the airways. *J. Allergy.* **2014**, 1–7 (2014)
94. Vreeland R.H., Litchfield C.D., Martin E.L., Elliot E.: *Halomonas elongata*, a new genus and species of extremely salt-tolerant bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **30**, 485–495 (1980)
95. Widderich N., Hopöpner A., Pittelkow M., Heider J., Smits S.H.J., Bremer E.: Biochemical properties of ectoine hydroxylases from extremophiles and their wider taxonomic distribution among microorganisms. *PLoS One*, **9**, e93809 (2014)
96. Yao C.-L., Lin Y.-M., Mohamed M.S., Chen J.-H.: Inhibitory effect of ectoine on melanogenesis in B16-F0 and A2058 melanoma cell lines. *Biochem. Eng. J.* **78**, 163–169 (2013)
97. Zaccai G., Martel A. i wsp.: Neutrons describe ectoine effects on water H-bonding and hydration around a soluble protein and a cell membrane. *Sci. Rep.* **6**, 31434 (2016)
98. Zhang L.H., Lang Y.J., Nagata S.: Efficient production of ectoine using ectoine-excreting strain. *Extremophiles*, **13**, 717–724 (2009)
99. Zhang L., Lang Y., Wang C., Nagata S.: Promoting effect of compatible solute ectoine on the ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis* CICC10232. *Process. Biochem.* **43**, 642–646 (2008)
100. Zhang L., Wang Y., Zhang C., Wang Y., Zhu D., Wang C., Nagata S.: Supplementation effect of ectoine on thermostability of phytase. *J. Biosci. Bioeng.* **102**, 560–563 (2006)