

· 综 述 ·

麦角硫因生物合成研究的新进展

刘琦, 毛雨丰, 廖小平, 罗家豪, 马红武, 姜文侠

中国科学院天津工业生物技术研究所 天津市工业生物系统与过程工程重点实验室, 天津 300308

刘琦, 毛雨丰, 廖小平, 罗家豪, 马红武, 姜文侠. 麦角硫因生物合成研究的新进展. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1408-1420.
LIU Q, MAO YF, LIAO XP, LUO JH, MA HW, JIANG WX. Recent progress in ergothioneine biosynthesis: a review. Chin J Biotech, 2022, 38(4): 1408-1420.

摘 要: 麦角硫因是一种独特的细胞生理保护剂, 在食品、饮料、化妆品和医药等行业具有广阔的应用前景。生物合成法是麦角硫因制备方法的研究热点。文中介绍了近年来在麦角硫因生物合成途径的鉴定、生物合成关键酶的挖掘、天然可食用菌种以及高产工程菌的开发等方面取得的新进展, 以期从分子层面深入认识麦角硫因生物合成的调控机制, 进而利用发酵工程、代谢工程和合成生物学的新技术大幅度提升麦角硫因的生物合成水平。

关键词: 麦角硫因; 生物合成; 天然蕈菌; 发酵工程; 代谢工程

Recent progress in ergothioneine biosynthesis: a review

LIU Qi, MAO Yufeng, LIAO Xiaoping, LUO Jiahao, MA Hongwu, JIANG Wenxia

Tianjin Key Laboratory for Industrial Biological Systems and Bioprocessing Engineering, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

Abstract: Ergothioneine is a multifunctional physiological cytoprotector, with broad application in foods, beverage, medicine, cosmetics and so on. Biosynthesis is an increasingly favored method in the production of ergothioneine. This paper summarizes the new progress in the identification of key pathways, the mining of key enzymes, and the development of natural edible mushroom species and high-yield engineering strains for ergothioneine biosynthesis in recent years. Through this review, we aim to reveal the molecular mechanism of ergothioneine biosynthesis and then employ the methods of fermentation engineering, metabolic engineering, and synthetic biology to greatly increase the yield of ergothioneine.

Keywords: ergothioneine; biosynthesis; natural mushroom; fermentation engineering; metabolic engineering

Received: October 21, 2021; **Accepted:** January 7, 2022; **Published online:** January 12, 2022

Corresponding author: JIANG Wenxia. E-mail: jiang_wx@tib.cas.cn

麦角硫因 (L-ergothioneine, EGT) 是稀有的天然手性氨基酸类强抗氧化剂, 极易溶于水, 是至今发现的唯一天然的 2-硫代咪唑氨基酸。由于麦角硫因具有特殊的硫酮结构和较高的氧化还原电势, 它在生理 pH 条件下不易发生自氧化, 与其他硫醇类抗氧化剂 (如: 谷胱甘肽) 相比更加稳定^[1-2]。麦角硫因具有清除自由基、解毒、维持 DNA 的生物合成、细胞的正常生长、细胞免疫、抗辐射、美白及抗衰老等诸多功能, 尤其在抗氧化和能量调节等方面起到重要的作用, 是一种多功能的细胞生理保护剂^[3-4]。

人体自身不能合成麦角硫因, 只能通过其转运体 (ergothioneine transporter, ETT) 从饮食中摄取, 且在特定的人体组织和细胞中富集^[5-6], 由于 ETT 的存在, 使麦角硫因成为可以在细胞间运输的抗氧化剂。在美国麦角硫因是属于公认安全的 (generally recognized as safe, GRAS) 产品。2017 年欧洲食品安全局 (EFSA) 通过了《关于 L-麦角硫因安全性的科学意见》^[7], 2018 年欧盟委员会 ((EU) 2018/462) 批准法国四面体公司合成的 L-麦角硫因可以在表 1 列出的食品中使用 (https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_impl/2018/462/oj)。保健食品市场已有麦角硫因营养补充剂 L-ERGOTHIONEINE、ErgoActive、

ERGO+ 等。此外, 市场上有多种含有麦角硫因的高端化妆品。

麦角硫因的制备方法包括天然生物提取法、化学合成法和生物合成法^[8-9]。生物合成法具有成本低、原料易获取、产量易扩大等优点, 是麦角硫因制备方法的发展方向。Han 等^[10]在综述中概述了麦角硫因的功能、应用、生物合成、提取和检测方法等。已发现自然界存在麦角硫因的好氧生物合成途径和厌氧生物合成途径, 组氨酸、蛋氨酸和半胱氨酸是合成麦角硫因的前体^[11-14]。文本重点对麦角硫因生物合成的关键酶、生物合成途径, 天然可食用菌种和高产工程菌的开发等方面进行了阐述。

1 麦角硫因的好氧生物合成途径

1.1 原核生物中麦角硫因的生物合成

2010 年 Seebeck^[15]首次发现了原核生物耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis*) 中含有 *egtA*、*egtB*、*egtC*、*egtD* 和 *egtE* 基因的基因簇, 该基因簇编码合成麦角硫因的 5 个酶: EgtA—— γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶 (γ -glutamyl cysteine synthase)、EgtB——单核非血红素铁酶 (mononuclear non-heme iron enzyme)、EgtC——酰胺转移酶 (amidotransferase)、EgtD——SAM (S-腺苷蛋氨酸) 依赖型组氨酸

表 1 新食品 L-麦角硫因的使用要求

Table 1 Requirement for application of L-ergothioneine in foods

Specified food category	Maximum levels	Additional specific labelling requirements
Alcohol-free beverages	0.025 g/kg	The designation of the novel food on the labelling of the foodstuffs containing it shall be "L-ergothioneine"
Milk-based drinks	0.025 g/kg	
'Fresh' milk products (*)	0.040 g/kg	
Cereal bars	0.200 g/kg	
Chocolate confectionery	0.250 g/kg	
Food supplements as defined in directive 2002/46/EC	0 mg/d for general population (excluding pregnant and lactating women) 20 mg/d for children older than 3 years	

Note: (*) When used in milk products L-ergothioneine may not replace in whole or in part, any milk constituent.

甲基转移酶 (SAM-dependent histidine methyltransferase) 和 EgtE—PLP 结合型 C-S 裂解酶 (PLP-mediated C-S lyase), 这些酶组成了原核生物中的麦角硫因好氧合成途径 (图 1)。Jones 等发现该基因簇也广泛分布在放线菌中^[16], 而 *egtD* 和 *egtB* 的同源基因还存在于如蓝细菌、酸杆菌、厚壁菌和变形菌等多种原核生物中^[17-18]。

在发现合成麦角硫因的基因簇后, Seebeck 在体外重构了分枝杆菌麦角硫因的合成途径^[15], 如图 1 所示, 首先半胱氨酸与谷氨酸经 EgtA 催化发生缩合反应, 生成 γ -谷氨酰半胱氨酸 (γ -GC), γ -GC 作为中间产物参与麦角硫因的合成。麦角硫因合成的起始步骤是 EgtD 催化组氨酸和 S-腺苷蛋氨酸 (SAM) 合成组氨酸三甲基内盐 (HER); 在 Fe^{2+} 和 O_2 存在的条件下, EgtB 催化 HER 与 γ -GC 发生氧化硫化合成 γ -谷氨酰-组氨酸三甲基内盐基半胱氨酸亚砷 (γ GC-HER); 再由 EgtC 催化 γ GC-HER 脱去谷氨酸, 生成组氨酸三甲基内盐基半胱氨酸亚砷 (Cys-HER); 最后 EgtE 催化 Cys-HER 脱去丙酮

酸和氨, 生成麦角硫因。但由于耻垢分枝杆菌中的 EgtE 难以过量表达, Seebeck 使用 β -裂解酶替代 EgtE 重构了分枝杆菌中麦角硫因的合成过程。

近年来, EgtB、EgtC、EgtD 和 EgtE 的结构和动力学特性、作用机制陆续被解析^[20-27]。Tian 等^[22]研究了耐高温分枝杆菌 (*Mycobacterium thermoresistibile*) EgtB 的催化机制, EgtB 在麦角硫因生物合成过程中起到两个催化作用, 使硫原子发生氧化以及在 γ -GC 与 HER 之间形成 C-S 键。首先发生硫氧化反应, 后形成 C-S 键, 此过程同时需要 Fe^{2+} 和 O_2 的参与。EgtC 催化 γ GC-HER 脱去谷氨酸, Vit 等^[23]解析了耻垢分枝杆菌 EgtC 的结构。EgtC 与底物特异性结合的活性位点残基是高度保守的序列, 尽管此催化活性可能是放线菌麦角硫因生物合成所特有的, 但类 EgtC 酶广泛分布于细菌和真菌中, 暗示 EgtC 可能具有其他的功能^[24]。EgtD 催化 SAM 上的甲基转移至组氨酸生成 HER, Misson 等^[25]研究了耻垢分枝杆菌 EgtD 与底物的结合机制, 与大多数甲基转移酶不同, EgtD 以甲基

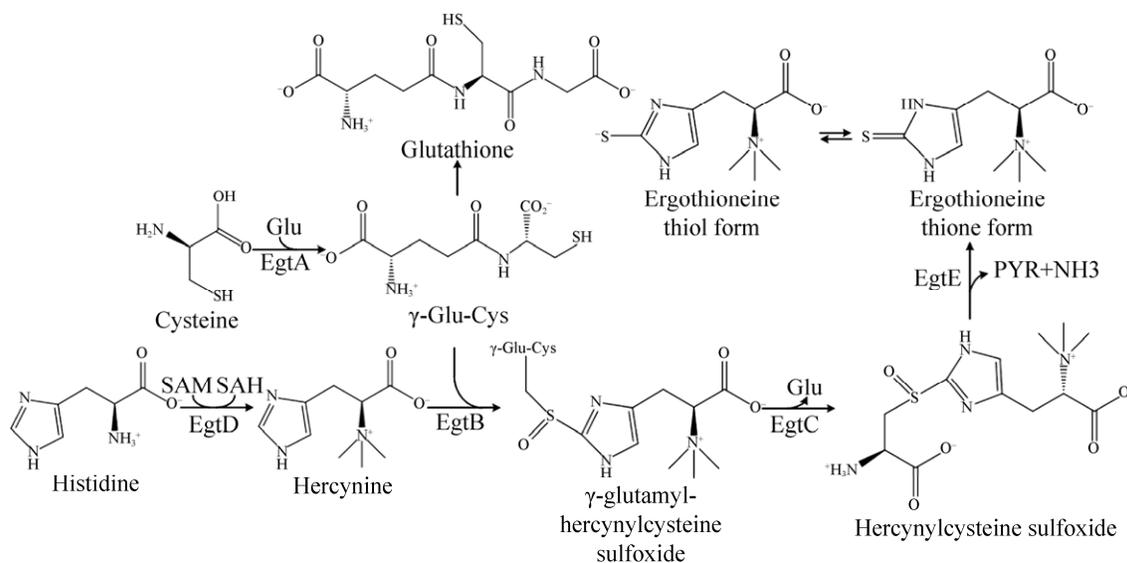


图 1 麦角硫因在分枝杆菌中的生物合成途径^[19]

Figure 1 Biosynthetic pathway of ergothioneine in mycobacteria^[19].

受体为主要底物, 严格遵循一种顺序结合机制, EgtD 通过抑制产物来调节麦角硫因的合成, 并通过抑制甲基中间体和二甲基中间体的积累促使底物发生全甲基化。

Song 等^[27]对耻垢分枝杆菌中编码 EgtE 的基因进行了克隆表达, 研究 EgtE 的作用机制发现它可分别以亚砷和硫醚作为底物。由图 2 可见, 在不添加还原剂时, EgtE 催化 Cys-HER 合成硫代亚磺酸硫醇酯; 在添加还原剂二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT) 时, EgtE 催化 Cys-HER 得到的产物是麦角硫因; 无论是否存在还原剂, EgtE 催化组氨酸三甲基内盐基半胱氨酸硫醚得到的产物均是麦角硫因。EgtE 催化 Cys-HER 除生成麦角硫因外, 还生成丙酮酸和氨 (图 1), 3 种产物的摩尔比是 1:1:1。通过测定 EgtE 的动力学参数发现 Cys-HER 是 EgtE 的最适底物。在生物体内, 天然硫醇 (如半胱氨酸、谷胱甘肽或真菌硫醇) 可以作为还原剂来发挥作用, 因此, 在生物体内 EgtE 催化

Cys-HER 生成的产物是麦角硫因而非硫代亚磺酸硫醇酯^[27]。

1.2 真核生物中麦角硫因的生物合成

1.2.1 粗糙脉孢菌中合成麦角硫因的关键酶

Bello 等^[28]首次鉴定了粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*) 中的麦角硫因合成的关键基因 *NCU04343* (被命名为 *NcEgt-1*)。进一步通过同源序列比对, 发现霉菌、担子菌和子囊菌等能够天然合成麦角硫因的真菌均含有 *NcEgt-1* 的同源基因^[29-32], 但是对于多数不能合成麦角硫因的酵母菌 (如酿酒酵母、毕赤酵母、假丝酵母) 中未发现 *NcEgt-1* 的同源基因^[30-31]。*NcEgt-1* 编码的酶 NcEgt-1 是一个多域蛋白, N 末端是 SAM 依赖型甲基转移酶, 与鸟型分枝杆菌 (*Mycobacterium avium*) 的 EgtD 有 27% 的同源性; C 末端与鸟型分枝杆菌的 EgtB 有 24% 的同源性^[28]。*egtD* 和 *egtB* 的同源基因在多数原核生物中是相邻的基因, 推测 *NcEgt-1* 可能衍生于 *egtD* 和 *egtB* 2 个基因的融合基因^[28]。

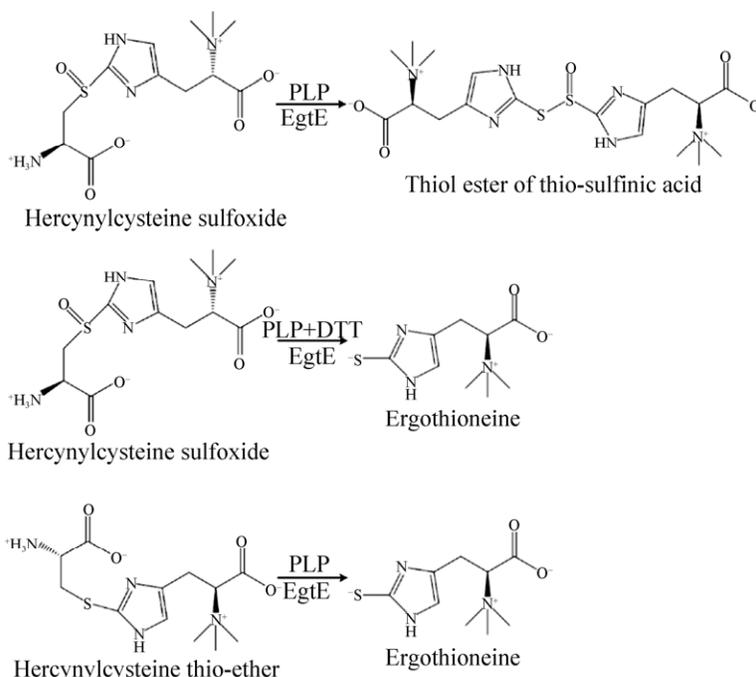


图 2 EgtE 在体外不同条件下的催化反应^[27]

Figure 2 EgtE reactions under different *in vitro* conditions^[27].

在真核生物中由 *NcEgt-1* 的同源基因编码的酶被命名为 Egt1, Egt1 的 DinB_2 结构域含有铁结合基序, 铁结合基序同时存在于 EgtB 中, 这两种酶的区别之一在于底物的特异性不同。动力学研究表明, Egt1 的最适底物是 HER 和半胱氨酸, Egt1 可催化 92% 的半胱氨酸转化为 Cys-HER, 另外 8% 的半胱氨酸转化为半胱氨酸亚磺酸 (cysteine sulfinic acid); EgtB 则仅能以 HER 和 γ -GC 作为底物^[19]。由于分枝杆菌含有 EgtB, 在分枝杆菌中半胱氨酸首先与谷氨酸合成 γ -GC, 再由 EgtB 催化 γ -GC 参与到麦角硫因的生物合成途径。进一步研究 Egt1 的功能发现它是一种双功能酶, 在麦角硫因的合成途径中参与两步反应。首先 Egt1 催化组氨酸转化为 HER, 再催化 HER 与半胱氨酸合成 Cys-HER^[19]。由于 Egt1 的特性, 真核生物中麦角硫因的合成途径比原核中的麦角硫因合成途

径更加简单。此外, γ -GC 是分枝杆菌中麦角硫因和谷胱甘肽合成途径中共同的中间体, 因此分枝杆菌中的麦角硫因和谷胱甘肽的合成存在竞争关系。而在真核生物中, 麦角硫因和谷胱甘肽的生物合成途径中不存在共同的中间体, 因此不存在竞争关系。

NcEgt-1 被鉴定后, Hu 等^[19]挖掘了粗糙链孢菌中 *egtE* 的同源基因 *NCU11365*, 它编码的蛋白是 PLP 结合型 C-S 裂解酶, 能够催化 Cys-HER 转化为麦角硫因, 被命名为 Egt2。Irani 等^[33]对 Egt2 的作用机制进行了研究(图 3), 首先 Egt2 催化 PLP 辅因子和 Cys-HER 结合形成醛亚胺中间体, 醛亚胺中间体的 α -碳再发生去质子化生成醌类中间体; 随后醌类中间体的 C-S 键断裂生成麦角硫因亚磺酸和 PLP 结合型氨基丙烯酸酯; 当麦角硫因亚磺酸被释放后, 底物结合位置的 C156 继续捕获麦角硫因

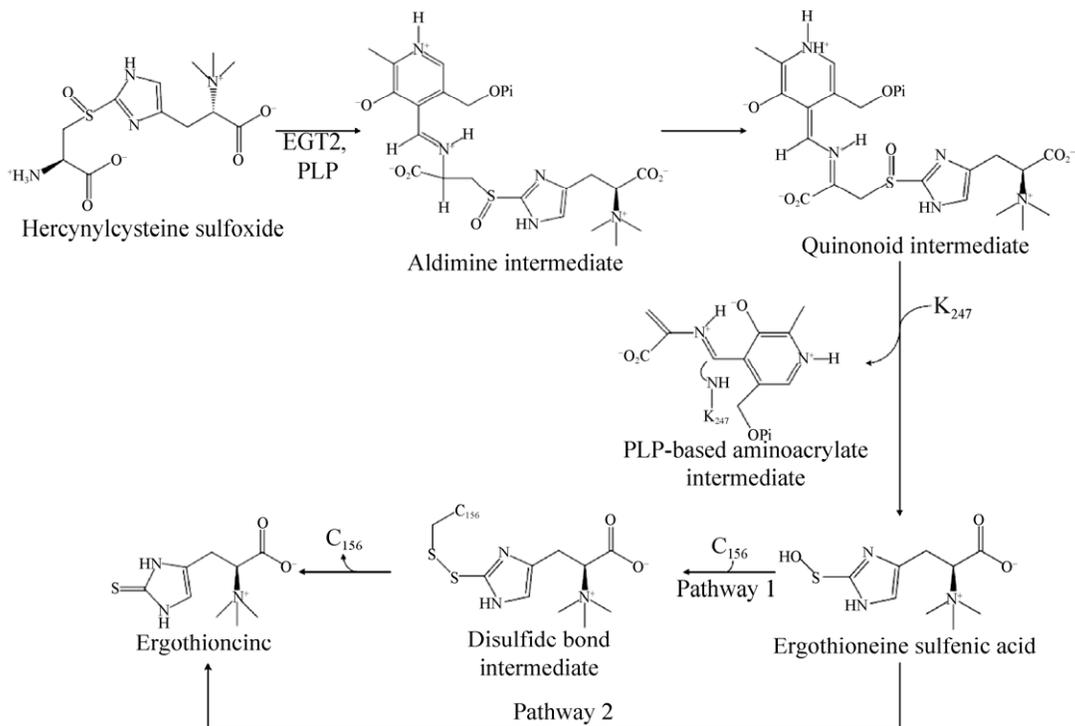


图 3 Egt2 的催化机制模型^[33]

Figure 3 The model for catalysis mechanism of Egt2^[33].

亚磺酸，形成二硫键中间体；二硫键中间体可被还原剂（例如 DTT）或硫醇还原系统（例如硫氧还蛋白/硫氧还蛋白还原酶）进一步还原，释放终产物麦角硫因，并再生 C156 用于下一次的循环途径（途径 I）。或者，麦角硫因亚磺酸直接从活性部位释放到溶液中，然后通过硫醇还原系统（例如，谷胱甘肽或硫氧还蛋白/硫氧还蛋白还原酶）还原生成麦角硫因（途径 II）。

至此，粗糙脉孢菌麦角硫因的生物合成途径得到解析，其麦角硫因合成主要涉及 Egt1 和 Egt2 两个关键酶，在 Fe^{2+} 和 O_2 存在的条件下，Egt1 催化 HER 和半胱氨酸合成 Cys-HER，再由 Egt2 催化 Cys-HER 转化为麦角硫因（图 4）^[33]。与分枝杆菌相比，粗糙脉孢菌中麦角硫因的合成途径更加简短，并且不需要谷氨酸和 ATP 的参与。

1.2.2 金针菇中麦角硫因的合成酶

如上所述，真核生物中麦角硫因的合成主要涉及两个关键酶的参与：具有甲基转移酶与亚磺合酶活性的双功能酶和 PLP 依赖型 C-S 裂解酶。Yang 等^[34]发现金针菇 (*Flammulina velutipes*) 麦角硫因的生物合成需要 3 个酶参与，分别是 FvEgt1、FvEgt2 和 FvEgt3。FvEgt1 与 Egt1 类似，同时具有甲基转移酶与组氨酸三甲基内盐基半胱氨酸亚磺合酶的活性。FvEgt2 和 FvEgt3 则是两种作用机制不同的半胱氨酸脱硫酶，如图 5。FvEgt2 被命名为半胱氨酸-半胱氨酸脱硫酶，在与半胱氨酸结合后激活 S-H 键，形成硫阴离子。FvEgt3 是 PLP 依赖型半胱氨酸脱硫酶，催化 PLP 与 Cys-HER 合成酮亚胺复合物。随后，活化的硫阴离子亲核攻击酮亚胺复合物，得到麦角硫因。

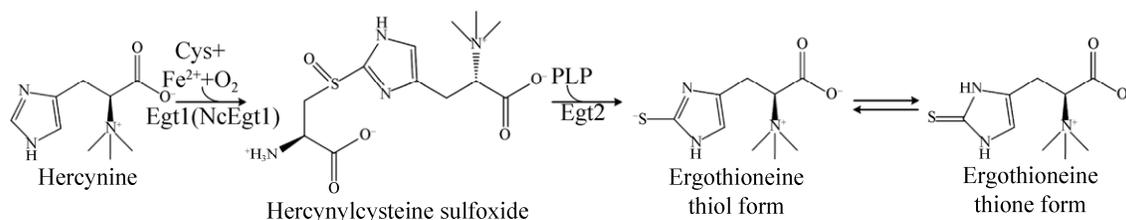


图 4 麦角硫因在粗糙脉孢菌中的生物合成途径

Figure 4 Biosynthetic pathway of ergothioneine in *Neurospora crassa*.

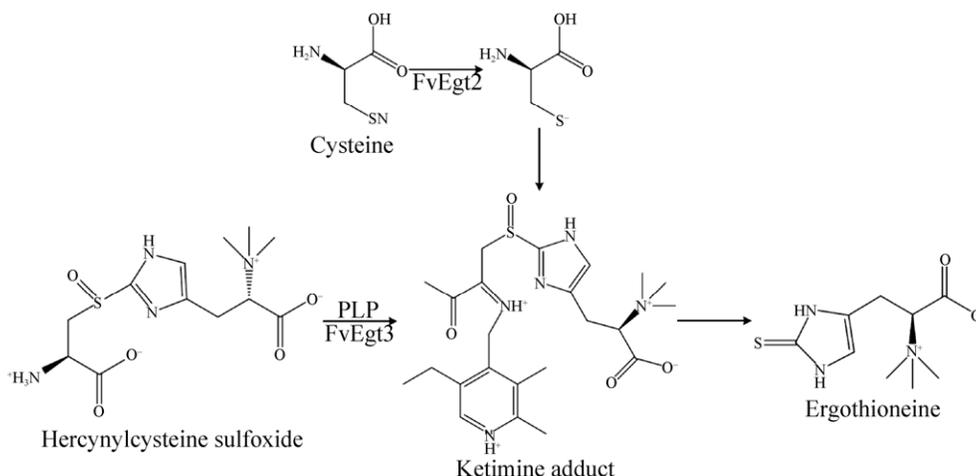


图 5 FvEgt2 和 FvEgt3 的作用机制假说^[34]

Figure 5 The hypothetic desulfurization mechanism of FvEgt2 and FvEgt3^[34].

随后, Yang 重构了金针菇麦角硫因的生物合成途径 (图 6)。首先, 在 Fe^{2+} 和 O_2 存在时 FvEgt1 催化组氨酸、SAM 和半胱氨酸合成 Cys-HER, 然后, 在 PLP 的参与下, FvEgt2 和 FvEgt3 共同催化 Cys-HER 发生脱硫反应生成麦角硫因。

金针菇合成麦角硫因的途径与粗糙脉孢菌合成麦角硫因途径的主要不同之处在于 Cys-HER 的脱硫反应: 金针菇中麦角硫因的合成途径涉及两个半胱氨酸脱硫酶参与 Cys-HER 的脱硫反应, 粗糙脉孢菌中仅有一个 C-S 裂解酶参与麦角硫因的合成。对金针菇麦角硫因生物合成途径的研究为天然可食用蕈菌合成麦角硫因的理论研究提供了借鉴。

上述对麦角硫因生物合成关键酶的结构、催化机制等的研究为新技术的实施奠定了基础。未来可使用人工智能和大数据分析等挖掘与设计麦角硫因合成酶的基因序列, 结合基于计算技术的酶设计方法, 利用三密码子饱和突变、活性位点组合突变及迭代突变等技术改造麦角硫因合成酶, 提高酶的催化性能, 进而提升麦角硫因的生物合成水平。

2 麦角硫因的厌氧生物合成途径

自然界还存在麦角硫因的厌氧生物合成途

径。Burn 等^[35]发现并鉴定了一株厌氧菌——泥生绿菌 (*Chlorobium limicola*) 中两个相邻的蛋白 Clim_1148 和 Clim_1149, 将其命名为 EanA 和 EanB。EanA 是一种甲基转移酶, 其序列与耻垢分枝杆菌的 EgtD 序列有 33% 的同源性。EanB 被认定是类似硫氰酸酶的硫转移酶 (rhodanese-like sulfur transferase), 硫氰酸酶 (rhodanese) 是催化氰化物和硫代硫酸盐反应生成硫氰酸盐和亚硫酸盐的一类酶, 存在于枯草芽孢杆菌、致黑脱硫肠状菌、硫杆菌和某些光合细菌等多种细菌中。Leisinger 等^[36]对 EanB 进行了结构与作用机制的解析, 发现它能够催化较高活性基团中的硫原子转移至未活化的碳原子上^[37]。

EanA 和 EanB 的发现揭示了麦角硫因的厌氧生物合成途径 (图 7)。首先 EanA 催化组氨酸转化为 HER, 随后 EanB 在无氧的条件下直接将硫原子转移至 HER 的咪唑环, 生成麦角硫因。Burn 发现 20 余种厌氧细菌和古细菌中含有 EanA 和 EanB 的同源蛋白^[35]。尽管厌氧生物合成途径更加简单, 但已鉴定的 EanA 和 EanB 的催化速率 ($k_{\text{cat}}=3.8 \text{ min}^{-1}$ 和 0.5 min^{-1}) 远低于已报道的好氧途径中 EgtD 和 EgtB 的催化速率 ($k_{\text{cat}}=35 \text{ min}^{-1}$ 和 72 min^{-1})^[35]。当下对麦角硫因生物合成的研究仍然主要集中在催化效率较高的好氧合成途径。

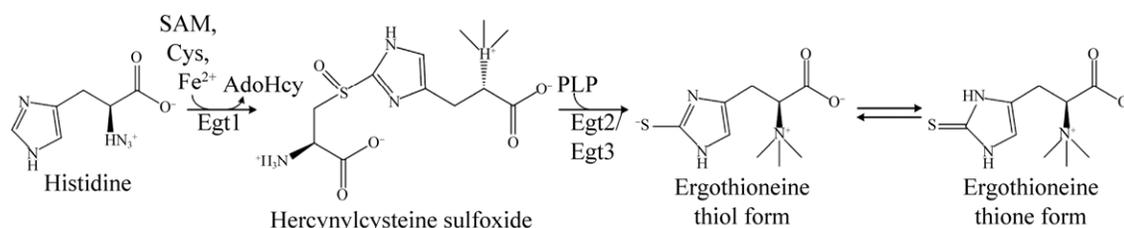


图 6 麦角硫因在金针菇中的生物合成途径^[34]

Figure 6 The biosynthesis pathway of EGT in *Flammulina velutipes*^[34].

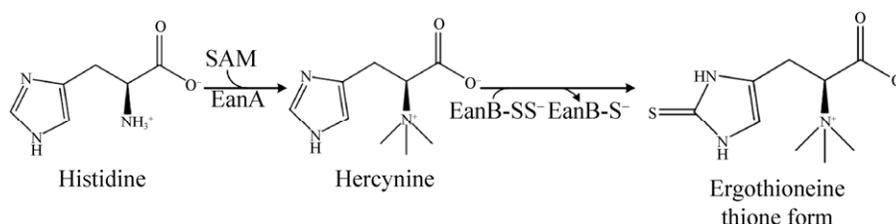


图7 麦角硫因的厌氧生物合成途径^[35]

Figure 7 Oxygen-independent biosynthesis of ergothioneine^[35].

3 利用天然可食用蕈菌发酵制备麦角硫因

多种天然蕈菌能够合成麦角硫因, 不仅有前述提到的金针菇^[38], 还包括平菇 (*Pleurotus ostreatus*)^[39]、香菇 (*Lentinus edodes*)^[40]、紫黑灵芝 (*Ganoderma neo-japonicum*)^[41]、美味牛肝菌 (*Boletus edulis*)^[42]、双孢蘑菇 (*Agaricus bisporus*)^[43]、杏鲍菇 (*Pleurotus eryngii*)^[44]、金顶侧耳 (*Pleurotus citrinopileatus*)^[45]等。Tepwong 等^[40]研究了香菇菌丝体生产麦角硫因的发酵工艺, 当使用 25 g/L 的果糖和 1 g/L 的天冬氨酸作为碳源时, 菌丝体中麦角硫因的产量达 1.89 mg/g DW, 是对照组的 3.15 倍。向培养基中添加 2 mmol/L 蛋氨酸, 发酵 15 d 菌丝体中麦角硫因的产量可达 3.45 mg/g DW。Lee 等^[41]在研究紫黑灵芝菌丝体发酵合成麦角硫因的工艺时, 发现不同种类和不同浓度的氨基酸对麦角硫因合成积累的影响具有很大差异, 其中蛋氨酸对麦角硫因积累的促进作用最为明显, 其次是半胱氨酸和组氨酸, 向培养基中添加 2 mmol/L 的蛋氨酸、半胱氨酸和组氨酸, 发酵 10 d 菌丝体中麦角硫因的含量达到 1.86 mg/g DW, 折算到发酵液中麦角硫因的含量为 15.42 mg/L。Liang 等^[44]研究了 10 L 罐规模的杏鲍菇菌丝体发酵生产麦角硫因的工艺, 装液量和接种量设定为 70%和 10%, 在发酵第 5 天向培养基中添加 4 mmol/L 的组氨酸、

1 mmol/L 的半胱氨酸和 1 mmol/L 的蛋氨酸, 发酵第 18–20 天菌丝体中麦角硫因的含量达到 5.76–5.84 mg/g DW, 折算到发酵液中麦角硫因的含量约为 64.2 mg/L。Lin 等^[45]利用金顶侧耳菌丝体深层发酵制备麦角硫因, 通过培养基优化得到麦角硫因发酵的最适碳源和最适氮源为葡萄糖和胰蛋白胨。在发酵第 7 天添加 8 mmol/L 的半胱氨酸、4 mmol/L 的组氨酸和 0.5 mmol/L 的蛋氨酸, 发酵 16 d 时菌丝体中麦角硫因的含量达 12.99 mg/g DW, 折算到发酵液中麦角硫因的含量为 97.69 mg/L。汤葆莎等^[46]研究了杏鲍菇深层发酵合成麦角硫因的培养基优化工艺, 发现添加天冬氨酸、半胱氨酸、组氨酸、精氨酸和谷氨酸可提高麦角硫因的积累, 其中组氨酸的促进效果最为显著。通过优化培养基成分得到最佳碳、氮源为玉米糝粉和蛋白胨, 发酵 7 d 麦角硫因的产量达到 20.5 mg/L。

笔者通过筛选获得高产麦角硫因的平菇菌种, 研究了氨基酸、前体和外源营养因子等对麦角硫因合成积累的影响^[39], 使用可以食用的培养基成分, 建立了高强度积累麦角硫因的深层发酵控制策略, 摇瓶发酵液中麦角硫因的积累量超过 500 mg/L, 完成了一株高产菌的吨级罐发酵中试。此外, 由于微生物合成的麦角硫因大多积累在细胞内, 只有将其移至胞外才能进行检测和利用。为适应生产安全及多个领域对产品安全的要求, 笔者所在研究团队还建立了

胞内麦角硫因的全水相浸提工艺^[47], 使用热水代替有机溶剂作为浸提剂将胞内的麦角硫因浸提到胞外, 浸提工艺优化后的浸提率达到 97.1%。

利用未经基因工程改造的天然可食用蕈菌发酵制备麦角硫因, 最大的优势是菌种和产品的食品安全性, 如果培养基的成分都是可食用的, 则麦角硫因发酵液的安全性更高。相比于基因组、转录组等组学, 蕈菌代谢组学的研究相对较少, 通过分析发酵过程的代谢组指导发酵过程优化, 将进一步提高麦角硫因的发酵积累水平, 降低生产成本。

4 麦角硫因工程菌的构建

基于麦角硫因生物合成途径与关键酶解析的理论指导, 研究者们在一些模式微生物 (大肠杆菌、酿酒酵母等) 内实现了麦角硫因生物合成酶的异源表达, 构建了一系列的麦角硫因工程菌。Osawa 等^[48]将耻垢分枝杆菌基因 *egtA*、*egtB*、*egtC*、*egtD*、*egtE* 克隆至大肠杆菌 (*Escherichia coli*), 高效表达了酶 EgtA、EgtB、EgtC、EgtD 和 EgtE。通过添加硫代硫酸盐 (半胱氨酸的硫供体) 促进了 γ -GC 的合成, 发酵优化后麦角硫因的产量由 0.2 mg/L 提高到 24 mg/L, 提高了 120 倍。EgtB 和 EgtD 是麦角硫因生物合成的关键酶^[49], Fujitani 等^[49]通过对麦角硫因的合成基因 *egtB* 和 *egtD* 进行过表达, 并敲除调控组氨酸代谢的组氨酸氨解酶基因 *hutH*, 构建了一株生产麦角硫因的水生甲基杆菌 (*Methylobacterium aquaticum*) 22A, 发酵 7 d 麦角硫因的积累量达到 20 mg/L, 比出发菌株发酵积累麦角硫因的水平提高了 12 倍以上。Kamide 等^[50]发现了甲基杆菌 (*Methylobacterium* sp.) 中含有一种特殊的 EgtB, 功能类似于真菌的 Egt1, 能够以半胱氨酸为底物, 催化半胱氨酸与 HER 合成

Cys-HER。Kamide 将编码 EgtB 的基因克隆至大肠杆菌, 应用该工程菌在发酵罐中分批补料培养, 通过优化发酵培养基, 发酵 216 h 麦角硫因的产量达到 657 mg/L。表明 EgtB 及其相关调控能够影响麦角硫因的高效合成, 可针对 EgtB 的酶活与异源表达等开展深入研究。

除关键酶的调控外, 前体氨基酸的合成途径改造与优化也是提高麦角硫因合成效率的有效途径。王丽^[51]在大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3) 中异源表达了两种不同来源的麦角硫因合成途径, 发现在表达耻垢分枝杆菌基因簇 *egtBCDE* 的基础上, 表达粟酒裂殖酵母基因 *egt1* 可提高麦角硫因的产量。通过前体氨基酸合成途径改造策略进一步提高了麦角硫因的积累, 利用 3 L 罐进行补料分批发酵, 108 h 麦角硫因的积累量达到 710.53 mg/L。Tanaka 等^[52]通过激活大肠杆菌的半胱氨酸合成与分泌系统, 获得了一株高产半胱氨酸的菌株, 将耻垢分枝杆菌基因 *egtA*、*egtB*、*egtC*、*egtD*、*egtE* 克隆至该菌株, 并敲除了影响蛋氨酸合成的 *metJ* 基因。改造后的菌株在 3 L 发酵罐中进行分批补料培养, 发酵过程中添加组氨酸、蛋氨酸、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 等, 发酵 216 h 麦角硫因的产量达到 1.3 g/L, 这是目前公开报道的工程菌发酵制备麦角硫因的最高发酵水平。

真菌麦角硫因的合成主要涉及两个关键酶, 可大大简化合成途径的代谢调控, 将来可能成为异源合成麦角硫因的主攻方向。Takusagawa 等^[53]在米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 中异源表达了粗糙脉孢菌的麦角硫因合成基因 *NCU04343* 和 *NCU11365*, 利用该工程菌固体发酵制备麦角硫因, 发酵优化后麦角硫因的产量为 231 mg/kg 培养基, 比出发菌株发酵合成麦角硫因的水平提高了 20 倍。Van Der Hoek 等^[54]将多种来源的麦角硫因合成基因克隆至酿酒酵

母 (*Saccharomyces cerevisiae*), 通过筛选发现含有 NcEgt1 (粗糙脉孢菌麦角硫因合成酶 1) 和 CpEgt2 (麦角菌麦角硫因合成酶 2) 的菌株合成麦角硫因的能力最强, 并发现增加 NcEgt1 的拷贝数能够提高麦角硫因的产量, 而增加 NcEgt2 的拷贝数不能促进麦角硫因的积累, 表明 Egt1 催化的反应对麦角硫因合成代谢通量的控制起主导作用。该酿酒酵母菌株在 1 L 发酵罐中采用分批补料培养, 发酵过程中添加组氨酸、蛋氨酸、吡哆醇等, 发酵 84 h 麦角硫因的

产量达到 598 mg/L, 其中 59% 的麦角硫因分泌到了细胞外。Yu 等^[55]鉴定了蕈菌灰树花 (*Grifola frondosa*) 中合成麦角硫因的基因 *Gfegt1* 和 *Gfegt2*, 在酿酒酵母中重组表达了这 2 个基因, 并利用该重组菌深层发酵合成麦角硫因。通过发酵工艺优化, 发现与葡萄糖、果糖、麦芽糖和蔗糖相比, 添加甘油更易促进麦角硫因的积累。发酵过程中每天向培养基中添加 1% 的甘油, 麦角硫因的发酵水平提高了 74.7%。

表 2 汇总了天然可食用蕈菌和工程菌的麦

表 2 天然可食用蕈菌和工程菌的麦角硫因发酵水平

Table 2 Studies of ergothioneine production by fermentation of natural edible mushrooms and engineered strains

Microorganisms	Operating mode	Fermentation period	Key strategies	EGT yield	References
<i>Lentinula edodes</i>	Shake flask	15 d	Optimization of medium and adding Met	3.45 mg/g DW	[40]
<i>Ganoderma neo-japonicum</i>	Shake flask	10 d	Adding Met, Cys, His	15.42 mg/L	[41]
<i>Pleurotus eryngii</i>	Fed-batch	18–20 d	Optimization of fermentation process and adding Met, Cys, His	5.76–5.84 mg/g DW (64.2 mg/L)	[44]
<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	Shake flask	16 d	Optimization of medium and adding Met, Cys, His	12.99 mg/g DW (97.69 mg/L)	[45]
<i>Pleurotus eryngii</i>	Shake flask	7 d	Optimization of medium and adding His	20.50 mg/L	[46]
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Shake flask	18 d	Optimization of medium and fermentation process	>500.00 mg/L	Our study
<i>Escherichia coli</i>	Shake flask	72 h	Using <i>egtABCDE</i> from <i>Mycobacterium smegmatis</i> by high production of each of EgtABCDE	24.00 mg/L	[48]
<i>Methylobacterium aquaticum</i>	Shake flask	7 d	Overexpression <i>egtBD</i> and knock out of <i>hutH</i>	20.00 mg/L	[49]
<i>Escherichia coli</i>	Fed-batch	216 h	<i>egtB</i> from <i>Methylobacterium pseudosasicola</i> and optimization of medium	657.00 mg/L	[50]
<i>Escherichia coli</i>	Fed-batch	108 h	<i>egtBCDE</i> from <i>Methylobacterium smegmatis</i> and <i>egt1</i> from <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	710.53 mg/L	[51]
<i>Escherichia coli</i>	Fed-batch	216 h	<i>egtBCDE</i> from <i>Methylobacterium smegmatis</i> and knock out of <i>metJ</i>	1.30 g/L	[52]
<i>Aspergillus oryzae</i>	Solid fermentation	—	<i>egt1</i> and <i>egt2</i> from <i>Neurospora crassa</i>	231.00 mg/kg of media	[53]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Fed-batch	84 h	<i>egt1</i> from <i>Neurospora crassa</i> and <i>egt2</i> from <i>Claviceps purpurea</i>	598.00 mg/L	[54]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Shake flask	7 d	<i>egt1</i> and <i>egt2</i> from <i>Grifola frondosa</i>	20.61 mg/L	[55]

角硫因发酵合成水平。目前对于工程菌生产麦角硫因的研究主要集中在合成酶的筛选与异源表达,对于前体物的合成与降解、麦角硫因的降解以及麦角硫因生物合成途径的调控等未展开系统的研究,可借助组学技术、代谢网络模型等系统生物学方法对麦角硫因的合成途径和调控网络进行理性设计与改造。

5 结语

利用天然可食用蕈菌和食品级的原料发酵生产麦角硫因,符合食品应用的安全要求,在发酵物全组分利用方面具有优势,可以考虑与人造肉、调味品等食物结合。天然蕈菌发酵制备麦角硫因的最高发酵水平已超过 500 mg/L,发酵周期通常在 10–20 d。工程菌的发酵周期控制在 3–9 d,最高发酵水平已达到 1.3 g/L,但是产物需经提纯后使用。

未来深入挖掘与优化合成麦角硫因的特征元件,解析菌株高产麦角硫因的遗传机制,一方面,为麦角硫因发酵过程优化提供理论指导;另一方面,借助基因编辑、多组学协同精准分析、高通量筛选等技术对底盘细胞进行改良,优化麦角硫因合成元件与底盘细胞的适配性,结合代谢网络模型调控优化麦角硫因合成途径中关键酶的合理协同表达,构建更加高效地合成麦角硫因的细胞工厂。

麦角硫因的生理作用与其理化性质,决定了它在食品、功能食品、饮料、化妆品和医药等行业具有广阔的应用前景,良好的水溶性和稳定性等独特之处,使麦角硫因在剂型的制备、保存及肠道吸收等方面更有优势。随着麦角硫因生产水平的提高及对其应用研究的深入,将促进麦角硫因在更多领域的应用开发,会涌现更多的麦角硫因产品,满足多方面高端市场需求。

REFERENCES

- [1] Cumming BM, Chinta KC, Reddy VP, et al. Role of ergothioneine in microbial physiology and pathogenesis. *Antioxid Redox Signal*, 2018, 28(6): 431-444.
- [2] Halliwell B, Cheah IK, Tang RMY. Ergothioneine—a diet-derived antioxidant with therapeutic potential. *FEBS Lett*, 2018, 592(20): 3357-3366.
- [3] 潘虹余, 郭丽琼, 林俊芳. 麦角硫因机体内的分布与代谢和其在疾病中的作用研究进展. *食品科学*, 2019, 40(23): 334-340.
Pan HY, Guo LQ, Lin JF. Recent advances in understanding the *in vivo* distribution and metabolism of ergothioneine and its roles in disease prevention. *Food Sci*, 2019, 40(23): 334-340 (in Chinese).
- [4] Borodina I, Kenny LC, McCarthy CM, et al. The biology of ergothioneine, an antioxidant nutraceutical. *Nutr Res Rev*, 2020, 33(2): 190-217.
- [5] Grundemann D, Harlfinger S, Golz S, et al. Discovery of the ergothioneine transporter. *PNAS*, 2005, 102(14): 5256-5261.
- [6] Gründemann D. The ergothioneine transporter controls and indicates ergothioneine activity—a review. *Prev Med*, 2012, 54: S71-S74.
- [7] EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), Turck D, et al. Statement on the safety of synthetic L-ergothioneine as a novel food-supplementary dietary exposure and safety assessment for infants and young children, pregnant and breastfeeding women. *Efsa J*, 2017, 15(11): e05060.
- [8] Xu JZ, Yadan JC. Synthesis of L-(+)-ergothioneine. *J Org Chem*, 1995, 60(20): 6296-6301.
- [9] 刘琦, 张维亚, 姜文侠. 麦角硫因的合成与降解代谢. *天然产物研究与开发*, 2015, 27(6): 1112-1117, 1002.
Liu Q, Zhang WY, Jiang WX. Biosynthesis and catabolism of L-ergothioneine. *Nat Prod Res Dev*, 2015, 27(6): 1112-1117, 1002 (in Chinese).
- [10] Han Y, Tang X, Zhang Y, et al. The current status of biotechnological production and the application of a novel antioxidant ergothioneine. *Crit Rev Biotechnol*, 2021, 41(4): 580-593.
- [11] Melville D B. Ergothioneine. *Vitamins and Hormones*, 1959: 155-204.
- [12] Melville DB, Eich S, Ludwig ML. The biosynthesis of

- ergothioneine. *J Biol Chem*, 1957, 224(2): 871-877.
- [13] Melville DB, Ludwig ML, Inamine E, et al. Transmethylation in the biosynthesis of ergothioneine. *J Biol Chem*, 1959, 234(5): 1195-1198.
- [14] Shepherd CJ. Pathways of cysteine synthesis in *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol*, 1956, 15(1): 29-38.
- [15] Seebeck FP. *In vitro* reconstitution of mycobacterial ergothioneine biosynthesis. *J Am Chem Soc*, 2010, 132(19): 6632-6633.
- [16] Jones GW, Doyle S, Fitzpatrick DA. The evolutionary history of the genes involved in the biosynthesis of the antioxidant ergothioneine. *Gene*, 2014, 549(1): 161-170.
- [17] Liao C, Seebeck FP. Convergent evolution of ergothioneine biosynthesis in cyanobacteria. *Chembiochem*, 2017, 18(21): 2115-2118.
- [18] Goncharenko KV, Vit A, Blankenfeldt W, et al. Structure of the sulfoxide synthase EgtB from the ergothioneine biosynthetic pathway. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015, 54(9): 2821-2824.
- [19] Hu W, Song H, Sae Her A, et al. Bioinformatic and biochemical characterizations of C-S bond formation and cleavage enzymes in the fungus *Neurospora crassa* ergothioneine biosynthetic pathway. *Org Lett*, 2014, 16(20): 5382-5385.
- [20] Naowarajna N, Irani S, Hu WY, et al. Crystal structure of the ergothioneine sulfoxide synthase from *Candidatus Chloracidobacterium thermophilum* and structure-guided engineering to modulate its substrate selectivity. *ACS Catal*, 2019, 9(8): 6955-6961.
- [21] Stampfli AR, Goncharenko KV, Meury M, et al. An alternative active site architecture for O₂ activation in the ergothioneine biosynthetic EgtB from *Chloracidobacterium thermophilum*. *J Am Chem Soc*, 2019, 141(13): 5275-5285.
- [22] Tian G, Su H, Liu YJ. Mechanism of sulfoxidation and C-S bond formation involved in the biosynthesis of ergothioneine catalyzed by ergothioneine synthase (EgtB). *ACS Catal*, 2018, 8(7): 5875-5889.
- [23] Vit A, Mashabela GT, Blankenfeldt W, et al. Structure of the ergothioneine-biosynthesis amidohydrolase EgtC. *Chembiochem*, 2015, 16(10): 1490-1496.
- [24] Vit A, Misson L, Blankenfeldt W, et al. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the ergothioneine-biosynthetic methyltransferase EgtD. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*, 2014, 70(pt 5): 676-680.
- [25] Misson L, Burn R, Vit A, et al. Inhibition and regulation of the ergothioneine biosynthetic methyltransferase EgtD. *ACS Chem Biol*, 2018, 13(5): 1333-1342.
- [26] Maurer A, Seebeck FP. Reexamination of the ergothioneine biosynthetic methyltransferase EgtD from *Mycobacterium tuberculosis* as a protein kinase substrate. *Chembiochem*, 2020, 21(20): 2908-2911.
- [27] Song H, Hu W, Naowarajna N, et al. Mechanistic studies of a novel C-S lyase in ergothioneine biosynthesis: the involvement of a sulfenic acid intermediate. *Sci Rep*, 2015, 5: 11870.
- [28] Bello MH, Barrera-Perez V, Morin D, et al. The *Neurospora crassa* mutant NcΔEgt-1 identifies an ergothioneine biosynthetic gene and demonstrates that ergothioneine enhances conidial survival and protects against peroxide toxicity during conidial germination. *Fungal Genet Biol*, 2012, 49(2): 160-172.
- [29] Dubost NJ, Ou BX, Beelman RB. Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. *Food Chem*, 2007, 105(2): 727-735.
- [30] Ey J, Schömig E, Taubert D. Dietary sources and antioxidant effects of ergothioneine. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(16): 6466-6474.
- [31] Genghof DS. Biosynthesis of ergothioneine and hercynine by fungi and Actinomycetales. *J Bacteriol*, 1970, 103(2): 475-478.
- [32] Melville DB, Eich S. The occurrence of ergothioneine in plant material. *J Biol Chem*, 1956, 218(2): 647-651.
- [33] Irani S, Naowarajna N, Tang Y, et al. Snapshots of C-S cleavage in Egt2 reveals substrate specificity and reaction mechanism. *Cell Chem Biol*, 2018, 25(5): 519-529.e4.
- [34] Yang XQ, Lin SX, Lin JD, et al. The biosynthetic pathway of ergothioneine in culinary-medicinal winter mushroom, *Flammulina velutipes* (Agaricomycetes). *Int J Med Mushrooms*, 2020, 22(2): 171-181.
- [35] Burn R, Misson L, Meury M, et al. Anaerobic origin of ergothioneine. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56(41): 12508-12511.
- [36] Leisinger F, Burn R, Meury M, et al. Structural and mechanistic basis for anaerobic ergothioneine biosynthesis. *J Am Chem Soc*, 2019, 141(17):

- 6906-6914.
- [37] Cipollone R, Ascenzi P, Visca P. Common themes and variations in the rhodanese superfamily. *IUBMB Life*, 2007, 59(2): 51-59.
- [38] Bao HN, Ochiai Y, Ohshima T. Antioxidative activities of hydrophilic extracts prepared from the fruiting body and spent culture medium of *Flammulina velutipes*. *Bioresour Technol*, 2010, 101(15): 6248-6255.
- [39] 梅保良, 刘琦, 姜文侠, 等. 营养因子强化麦角硫因生物合成的研究. *食品研究与开发*, 2015, 36(15): 108-112.
- Mei BL, Liu Q, Jiang WX, et al. Study on the biosynthesis of L-ergothioneine by enhancement of nutritional factors. *Food Res Dev*, 2015, 36(15): 108-112 (in Chinese).
- [40] Tepwong P, Giri A, Sasaki F, et al. Mycobial enhancement of ergothioneine by submerged cultivation of edible mushroom mycelia and its application as an antioxidative compound. *Food Chem*, 2012, 131(1): 247-258.
- [41] Lee WY, Park EJ, Ahn JK. Supplementation of methionine enhanced the ergothioneine accumulation in the *Ganoderma neo-japonicum* mycelia. *Appl Biochem Biotechnol*, 2009, 158(1): 213-221.
- [42] Kalaras MD, Richie JP, Calcagnotto A, et al. Mushrooms: a rich source of the antioxidants ergothioneine and glutathione. *Food Chem*, 2017, 233: 429-433.
- [43] Dubost NJ, Beelman RB, Royse DJ. Influence of selected cultural factors and postharvest storage on ergothioneine content of common button mushroom *Agaricus bisporus* (J. Ige) imbach (Agaricomycetidae). *Int J Med Mushr*, 2007, 9(2): 163-176.
- [44] Liang CH, Huang LY, Ho KJ, et al. Submerged cultivation of mycelium with high ergothioneine content from the culinary-medicinal king oyster mushroom *Pleurotus eryngii* (higher Basidiomycetes) and its composition. *Int J Med Mushrooms*, 2013, 15(2): 153-164.
- [45] Lin SY, Chien SC, Wang SY, et al. Submerged cultivation of mycelium with high ergothioneine content from the culinary-medicinal golden oyster mushroom, *Pleurotus citrinopileatus* (higher Basidiomycetes). *Int J Med Mushrooms*, 2015, 17(8): 749-761.
- [46] 汤葆莎, 吴俐, 翁敏劼, 等. 杏鲍菇 528 深层发酵生物合成麦角硫因的培养基优化. *福建农业学报*, 2021, 36(6): 728-734.
- Tang BS, Wu L, Weng MJ, et al. Optimization of medium for biosynthesis of ergothioneine by submerged fermentation of *Pleurotus eryngii* 528. *Fujian J Agric Sci*, 2021, 36(6): 728-734 (in Chinese).
- [47] Zhang W, Liu Q, Zhou T, et al. Aqueous extraction of ergothioneine from mycelia of *Pleurotus ostreatus* and ergothioneine accumulation regularity during submerged fermentation. *Research & Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2016, 5(1): 1-8.
- [48] Osawa R, Kamide T, Satoh Y, et al. Heterologous and high production of ergothioneine in *Escherichia coli*. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(5): 1191-1196.
- [49] Fujitani Y, Alamgir KM, Tani A. Ergothioneine production using *Methylobacterium* species, yeast, and fungi. *J Biosci Bioeng*, 2018, 126(6): 715-722.
- [50] Kamide T, Takusagawa S, Tanaka N, et al. High production of ergothioneine in *Escherichia coli* using the sulfoxide synthase from *Methylobacterium* strains. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(23): 6390-6394.
- [51] 王丽. 产麦角硫因大肠杆菌工程菌株的构建与优化[D]. 无锡: 江南大学, 2021.
- Wang L. Construction and optimization of ergothioneine-producing *Escherichia coli*[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021 (in Chinese).
- [52] Tanaka N, Kawano Y, Satoh Y, et al. Gram-scale fermentative production of ergothioneine driven by overproduction of cysteine in *Escherichia coli*. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 1895.
- [53] Takusagawa S, Satoh Y, Ohtsu I, et al. Ergothioneine production with *Aspergillus oryzae*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2019, 83(1): 181-184.
- [54] Van Der Hoek SA, Darbani B, Zugaj KE, et al. Engineering the yeast *Saccharomyces cerevisiae* for the production of L-(+)-ergothioneine. *Front Bioeng Biotechnol*, 2019, 7: 262.
- [55] Yu YH, Pan HY, Guo LQ, et al. Successful biosynthesis of natural antioxidant ergothioneine in *Saccharomyces cerevisiae* required only two genes from *Grifola frondosa*. *Microb Cell Fact*, 2020, 19(1): 164.

(本文责编 陈宏宇)