

# 生物合成法生产麦角硫因的研究进展

李亮 徐姗姗 姜艳军

(河北工业大学化工学院, 天津 300130)

**摘要:** 麦角硫因 (ergothioneine, ERG) 作为一种稀有的天然含硫组氨酸衍生物, 已被证明具有强大的抗氧化性和诸多生物学功能。因此, ERG 受到越来越多研究人员和产品开发人员的关注。目前, ERG 已被广泛应用于食品、化妆品和医疗等行业。研究表明只有少数细菌和真菌可体内合成 ERG, 植物、动物和人类自身均不能直接合成 ERG, 只能从其他来源获取。ERG 可通过生物提取法、化学合成法以及生物合成法获得, 但由于传统生产方式 (生物提取法和化学合成法) 存在产量低、生产效率差和生产成本较高等问题, 限制了该产品的规模化生产和应用。因此, 亟需开发一种高效、经济且安全、可靠的 ERG 生产方式以满足市场的需求。近年来合成生物学快速发展, 利用基因工程、蛋白质工程和代谢工程等技术提高生物合成法生产 ERG 的能力已逐渐成为研究热点。本文将论述 ERG 的生物学活性和功能, 介绍 ERG 生物合成途径和 ERG 在食品、化妆品和医疗等行业的应用前景, 比较 ERG 主要的生产方式, 总结并梳理近年来采取各种工程策略通过生物合成法生产 ERG 的研究进展; 并就如何利用基因工程、蛋白质工程和代谢工程提高 ERG 产量提出几点工程策略, 以期期为生物合成法高产 ERG 提供理论参考和研究思路。

**关键词:** 麦角硫因; 生物合成法; 生物合成途径; 基因工程; 蛋白质工程; 代谢工程; 发酵

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2023-0663

## Research Progress in the Production of Ergothioneine by Biosynthesis

LI Liang XU Shan-shan JIANG Yan-jun

(School of Chemical Engineering and Technology, Hebei University of Technology, Tianjin 300130)

**Abstract:** Ergothioneine (ERG), a rare natural sulfur-containing histidine derivative, has been proved to have strong antioxidant property and many biological functions. Therefore, ERG has been received much more attention from researchers and product developers. Currently, ERG has been widely used in food, cosmetics and medical industries. Research shows that ERG only can be synthesized by a few bacteria and fungi. Plants, animals and humans cannot synthesize ERG directly, but it could be obtained by other sources. ERG can be obtained by bioextraction, chemical synthesis, and biosynthesis. However, because of the low yield and poor production efficiency of the traditional methods (bioextraction and chemical synthesis), the large-scale production and application of ERG is limited. Therefore, there is an urgent need for an efficient, economical, safe and reliable ERG synthesis method to meet market needs. With the rapid development of synthetic biology, the use of genetic engineering, protein engineering and metabolic engineering to improve the ability of ERG biosynthesis has gradually become an increasingly favored method. This paper will elaborate the biological characteristics and functions, briefly introduce the biosynthetic pathways of ERG and application prospects of ERG in food, cosmetics and medical industries, compare the main production methods of ERG, and summarize and sort the research progress of adopting various engineering strategies to produce ERG by biosynthesis in recent years, and propose several engineering strategies on how to use genetic engineering, protein engineering and metabolic engineering to increase the yield of ERG, which aims to provide theoretical reference and research ideas for biosynthesis high-yield of ERG.

**Key words:** ergothioneine; biosynthesis; biosynthetic pathway; genetic engineering; protein engineering; metabolic engineering; fermentation

收稿日期: 2023-07-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31801948), 河北省省级科技计划 (19226505D), 河北省自然科学基金项目 (C2021202005)

作者简介: 李亮, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 生物工程; E-mail: liangli@hebut.edu.cn

通讯作者: 姜艳军, 男, 博士, 教授, 研究方向: 生物催化与转化、环境友好的化工过程; E-mail: yanjunjiang@hebut.edu.cn

1909年, Tanret<sup>[1]</sup>在黑麦谷物的麦角真菌(*Claviceps purpurea*)中发现并分离出麦角硫因(ergothioneine, ERG), ERG学名为2-巯基组氨酸三甲基内盐, 无色无味, 易溶于水(25℃时溶解极限值为0.9 mol/L)<sup>[2]</sup>, 是一种公认安全、无毒、功能强大的含硫组氨酸衍生物。自然界ERG的来源主要通过特定的细菌和真菌合成, 属于一种稀有的天然手性氨基酸<sup>[3]</sup>。植物、动物和人体自身不能合成, 只能从其他来源获取<sup>[4]</sup>。ERG作为机体内重要的生理活性物质, 具有强大的抗氧化特性以及诸多生物学功能, 目前已被广泛用于食品、化妆品和医疗等不同行业<sup>[2, 5-12]</sup>。

传统ERG生产方式主要是生物提取法<sup>[13]</sup>和化学合成法<sup>[14]</sup>, 目前市场来源主要依靠化学合成法。传统ERG生产方式存在产量低、生产效率差等问题, 因此, 开发高效、经济且绿色、可靠的ERG生产方式成为主要的研究方向。随着生物学技术的不断发展和进步, 利用生物合成法生产ERG得到广泛关注和重视。生物合成法包括微生物液体深层发酵<sup>[15]</sup>、生物转化<sup>[16]</sup>以及借助代谢工程、发酵工程和合成生物学等技术构建ERG工程菌进行发酵<sup>[17]</sup>3种方式, 其中利用ERG工程菌株进行发酵是生物合成法中最具潜力的生产方式, 有望实现生物合成法高效生产ERG, 这也是目前ERG生物合成研究的热点。

本文总结了ERG广泛的生物学功能、应用前景以及生产方式, 从不同底盘菌株出发, 梳理了近年来通过构建ERG工程菌生产ERG的研究进展, 比较了不同底盘菌株的构建策略和ERG生产效率, 提出几点工程策略, 为后续选择合适底盘菌株和工程策略提供更清晰的方向, 为高效和绿色生产ERG提供理论参考和研究思路。

## 1 ERG的生物学功能及应用

### 1.1 ERG的生物学功能

ERG是一种对细胞具有高度保护作用的天然抗氧化剂, 在溶液中, ERG以硫醇(thiol)和硫酮(thione)的互变异构体形式存在(图1)<sup>[2]</sup>, 由于巯基的稳定性不如硫羰基高, 故在生理条件下主要以硫酮的形式存在。其次, ERG具有较高的氧化还原电位(-0.06 V), 相比其他硫醇抗氧化剂如谷胱甘肽

(-0.2- -0.32 V)更稳定, 具有更好的抗氧化性能<sup>[10]</sup>, 这两种特性结合赋予ERG在生理条件下更高的稳定性。目前已有较多关于ERG抗氧化特性和作用机制的相关报道。简而言之, ERG抗氧化特性主要表现在4个方面<sup>[2, 7-8, 11-12, 18-19]</sup>: (1)通过其高氧化还原电位清除自由基、结合多种自由电子发挥强抗氧化特性; (2)与其他天然抗氧化酶相互作用(激活或抑制)发挥抗氧化功能; (3)螯合各种二价金属阳离子形成无氧化还原活性的络合物, 抑制活性氧(ROS)的形成, 保护细胞免受炎症; (4)抑制肌红蛋白和血红蛋白的过氧化, 保护细胞免受氧化损伤。由于具有抗氧化特性, ERG在维持生物体氧化还原稳态过程中发挥重要作用。

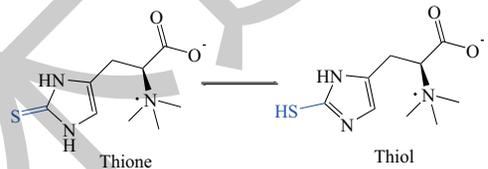


图1 麦角硫因的互变异构体

Fig. 1 Tautomers of ergothioneine

大量研究表明, ERG除了具有强大的抗氧化特性, 还具有吸收紫外线、护色、调节细胞能量、抗炎、抗抑郁、促进神经元分化、调节免疫和抗衰老等多种生物学功能<sup>[10-12, 19]</sup>。自从ERG被发现以来, 科研工作者对其性质和生物学功能不断探索, 但其更多生理功能仍有待于进一步挖掘; 另外目前的研究仍以体外研究为主, 其发挥生物学功能的体内分子作用机制尚不清楚。

### 1.2 ERG的应用

ERG因其独特而显著的生物学功能, 在各个行业具有广泛的应用和市场前景(图2)。

首先, ERG作为一种新型、无毒的天然食品防腐剂, 在食品行业具有广阔的应用前景。Kitsanayanyong等<sup>[6]</sup>和何鑫怡等<sup>[7]</sup>指出ERG具有护色、抗脂质过氧化和保护其他生物活性成分等作用, 在各类食品中起到保鲜和延长贮藏期的效果。除此之外, ERG还可抑制蘑菇、鱼类以及虾类中相关酶基因的表达, 利于蘑菇和鱼虾的保存。ERG的安全性

已经得到欧洲食品安全局和美国食品药品监督管理局的认可, 被批准用于食品添加剂和补充剂, 并可以加入到婴幼儿、孕妇和哺乳期女性的食品中<sup>[18]</sup>。

其次, 在化妆品行业中, ERG 被证明是安全的、无致痘风险且对皮肤有益的活性成分<sup>[8]</sup>。研究表明, ERG 具有一定的美白功效, 能够抑制黑色素过度产生<sup>[20-21]</sup>和酪氨酸酶的活性<sup>[22]</sup>, 避免色素形成和沉着, 起到美白和提亮肤色的作用。此外, ERG 还可通过抑制肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 和 MMP-1 的表达<sup>[23]</sup>, 调节线粒体 ROS 水平<sup>[9]</sup>, 抵抗光老化, 起到抗衰老的功效。国家市场监督管理总局将 ERG 列入《已使用化妆品原料目录》(2015 版), 作为功效成分添加到不同类型化妆品中, 并且不受特定配方体系的限制<sup>[8]</sup>。但因 ERG 原料成本较高, 目前仅局限在高端品牌化妆品中, 这表明更安全、可靠且经济、高效的 ERG 生产技术有待研发。

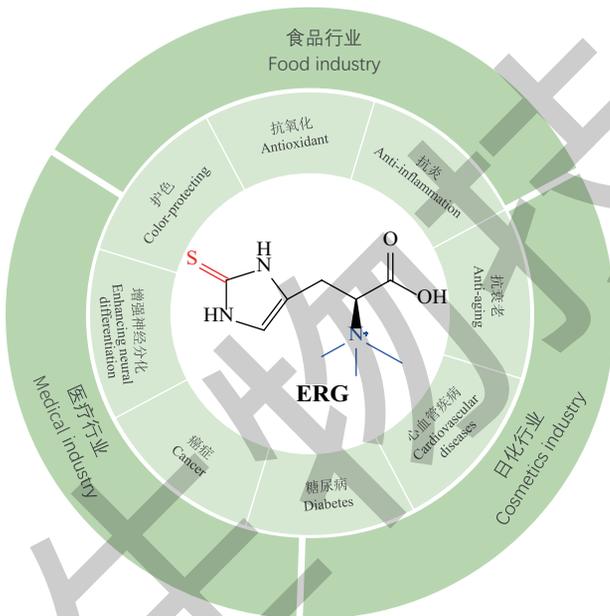


图 2 麦角硫因的功能和应用

Fig. 2 Functions and applications of ergothioneine

另外, 研究表明 ERG 在预防眼部疾病<sup>[24]</sup>、治疗心血管、癌症、糖尿病、神经退行性疾病<sup>[25]</sup>和先兆子痫<sup>[26]</sup>等方面起着积极的作用。现已有多个文献阐明 ERG 干预氧化应激相关疾病的作用机制及研究进展<sup>[2, 10-12]</sup>, 表明 ERG 对许多氧化应激相关疾病

的预防和治疗具有巨大潜力。通过研究 ERG 与新型冠状病毒感染 (Corona virus disease 2019, COVID-19) 病理的相关性, 表明 ERG 可能会缓解 COVID-19 患者的症状并改善愈后效果<sup>[27]</sup>。总之, ERG 作为安全、天然的抗氧化剂, 其对于人体疾病的治疗潜力巨大, 但仍需要开展更多关于体内作用机制的研究和足够有效的临床试验结果来验证, 以期推进 ERG 在医疗上的应用。

## 2 ERG 的生产方式

尽管 ERG 已在食品、化妆品和医疗等行业展现出广阔的应用前景, 但市场上 ERG 产品纯度良莠不齐、价格昂贵, 问题关键在于没有成熟的 ERG 生产技术。因此亟需开发一种安全、可靠且经济、高效的生产方式, 以便提高产品纯度并降低原料成本大规模生产 ERG。

ERG 生产方式主要分为 3 种: 生物提取法、化学合成法以及生物合成法。目前一些生产商已利用化学合成法和微生物液体深层发酵生产 ERG, 其中化学合成法仍是 ERG 的主要来源<sup>[28]</sup>。本文对 3 种生产方式的优缺点进行了比较 (表 1)。

### 2.1 生物提取法

生物提取法的原料一般是食用菌的子实体、植物种子和动物组织细胞等。首先通过选用合适正确的提取方式有效提高提取效率, 再对粗提取液进一步分离纯化, 从而获得高纯度 ERG。近年来应用广泛的提取方式有回流提取法、酶解提取法以及超声微波联合法<sup>[13]</sup>。但提取方式存在局限, 提取原料来源不足且其含量较低、含有大量杂质, 并且由于原料可能存在农药和重金属超标等问题, 即在保证产品质量的同时势必要增加提取成本, 因此利用提取法仍无法大规模获得 ERG。

### 2.2 化学合成法

化学合成法目前报道主要有 5 种<sup>[14]</sup>: 路线 (1) 以 L-组氨酸甲酯盐酸盐 (L-histidine methyl ester dihydrochloride) 为原料, 经过 5 步反应产生 ERG, 总收率 31.66%; 路线 (2) 以组氨酸 (L-histidine, L-His) 为起始原料, 经过 8 步反应获得 ERG, 总收率 21.39%; 路线 (3) 原料为 N-叔丁氧羰基-1-苄基-L-组氨酸 (N-tert-butoxycarbonyl-1-phenylmethyl-

表 1 麦角硫因生产方式对比

Table 1 Comparison of ergothioneine production methods

生产方式 Production method	分类 Classification	优点 Advantages	缺点 Disadvantages	参考文献 Reference
生物提取法 Bioextraction	回流提取法 Reflux extraction	针对性强, 收率较高 High pertinence, and high yield	相对耗时 Relatively time-consuming	[ 13 ]
	酶解提取法 Enzymatic extraction	提取速度快, 条件温和 Fast extraction speed, and moderate conditions	酶活范围较窄, 提取条件苛刻 Narrow enzyme activity range, hash extraction condition	[ 13 ]
	超声微波联合法 Ultrasonic and microwave extraction	减少萃取溶剂和能耗, 提取效率高 Lower extraction solvent and energy consumption, and high extraction efficiency	产量低 Low yield	[ 13 ]
化学合成法 Chemical synthesis	路线 (1) 和 (2) Route (1) and (2)	—	路线冗长复杂, 反应温度较高, 资源浪费, 收率低 Long and complex route, high reaction temperature, waste of resource, and low yield	[ 14 ]
	路线 (3) Route (3)	收率高于路线 (1) 和 (2) Yields higher than that in route (1) and (2)	原料昂贵; 中间体纯化使用两次反向层析柱, 导致成本增加; 毫克级别 High feedstock cost; intermediate purification uses two reverse chromatography columns, which increases cost; milligram level	[ 14 ]
	路线 (4) Route (4)	“一锅法”制备, 路线短; 无中间纯化过程 Prepared by one-pot method, short route; no intermediate purification	原料昂贵且来源少 Expensive and few feedstock	[ 14 ]
	路线 (5) Route (5)	操作简单, 原料低廉易得, 步骤简短, 条件相对温和可控, 产量较高 Simple operation, cheap and readily available feedstock, short route, relatively moderate and controllable conditions, and high yield	使用具有危害性的化学试剂, 增加废液和废物处理成本 Use hazardous chemical reagents, increase waste liquid and waste disposal costs	[ 14 ]
	生物合成法 Biosynthesis	微生物液体发酵 Microbial liquid fermentation	可食用菌发酵, 天然属性, 安全性高 Edible mushroom fermentation, natural properties and high safety	发酵周期长, 产率低 Long fermentation period, and low yield
	生物转化 Biotransformation	直接以前体氨基酸作为底物, 原料成本低; 工艺简单; 产品浓度较高 Direct precursor amino acids as substrates, low feedstock cost; simple technology; higher product concentration	产率低; 表达复合酶体外催化, 经济适用性差 Low yield, <i>in vitro</i> catalysis of expression complex enzymes, and low economic practicality	[ 16 ]
	ERG 工程菌株的发酵 Fermentation of ERG engineered strains	以常见菌株作为底盘菌, 方便获得; 减少外源添加, 原料成本低; 无有害试剂, 环境友好; 发酵周期短; 操作简单 Common strains are chassis bacteria, which are readily available; reduce exogenous additions, low feedstock cost; no hazardous chemical reagents, environment-friendly; short fermentation period; simple operation	-	[ 17 ]

L-histidine), 经过 5 步反应产生 ERG, 总收率为 51.53%; 路线 (4) 直接以组氨酸甜菜碱 (hercynine, HER) 为原料, 与半胱氨酸 (L-cysteine, L-Cys)、3-巯基丙酸 (3-mercaptopropionic acid, 3-MPA) 经“一

锅法”产生 ERG, 总收率 40.00%; 路线 (5) 采用仿生合成法在路线 (4) 的合成工艺上进行改进, 以 L-His 为原料, 先与稀硫酸、氢气和甲醛发生还原氨化, 再与碘甲烷发生甲基化得到中间体, 最后与

L-Cys、3-MPA 经“一锅法”制得 ERG。其中稀硫酸作为质子化试剂，甲醇作为 ERG 的重结晶溶剂，此时收率提高到 50.03%，化学纯度为 99.56%。其中路线（1）和（2）均采用巯基化-巯基保护-甲基化-脱保护策略，导致路线复杂冗长，同时，脱保护过程反应温度较高，3-MPA 用量过大造成资源浪费。路线（3）和（4）均存在合成复杂、原料价格昂贵和收率较低等缺点。路线（5）具备一定的优势，适用于百克级 ERG 的制备，可代替先前的化学合成路线，能够作为 ERG 大规模制备的一种合成方式。

### 2.3 生物合成法

生物合成法分为 3 种：（1）利用具有 ERG 合成能力的天然微生物直接进行液体深层发酵，如可食用蕈菌<sup>[15]</sup>；（2）通过质粒表达 ERG 合成酶类，以 L-His、L-Cys 和蛋氨酸（L-methionine, L-Met）为底物，通过生物转化的方式合成 ERG<sup>[16]</sup>；（3）利用 ERG 工程菌株进行发酵<sup>[17]</sup>，将合成生物学技术引入 ERG 合成模块，对 ERG 合成酶和前体氨基酸合成代谢途径中的关键酶进行合理改造以期达到高效组合，并结合代谢工程、发酵工程调控前体物质代谢通量和发酵培养条件，有望实现生物合成法高效生产 ERG。相比化学合成法中的路线（5），生物合成法最大的优势就是 ERG 产品的安全性得到了保证，无需使用工艺中涉及的甲醛、碘甲烷和甲醇等有毒、有害和腐蚀性的有机合成试剂，大大减少了对人体和环境产生的不良影响，并且降低了化学合成中产生的废液和废物处理成本。生物合成法中 ERG 生产路线愈加简短，生产周期不断缩短，未来可利用合成生物学技术构建稳定高产的 ERG 工程菌，并结合现代化基因工程、代谢工程和发酵工程技术实现 ERG 规模化生产。

利用生物合成法合成 ERG 涉及到微生物中的 ERG 生物合成途径。如今，许多微生物中的 ERG 生物合成途径已经被阐明，少数细菌如耻垢分枝杆菌（*Mycobacterium smegmatis*）、大多数真菌如粗糙脉孢菌（*Neurospora crassa*）以及厌氧菌如泥生绿菌（*Chlorbium limicola*）生物合成途径所涉及的酶也被不断揭示和解析。迄今为止已被报道的 ERG 生物合成途径主要有 4 种<sup>[15]</sup>，均以 L-His、L-Cys 和 L-Met

作为前体物质（图 3），其中研究最广泛的两种生物合成途径为具有 *egtABCDE* 基因簇（分别编码 EgtA、EgtB、EgtC、EgtD 和 EgtE 五个 ERG 合成酶）的 *M. smegmatis* 途径与具有 Egt1 和 Egt2 的 *N. crassa* 途径。*N. crassa* 途径中的 Egt1 酶包含两个功能结构域，分别对应 EgtB 和 EgtD 的功能，免除了谷氨酸（L-glutamic acid, L-Glu）的参与，即真菌途径比细菌途径更加简短，同时 *N. crassa* 途径又消除了中间体  $\gamma$ -谷氨酰-半胱氨酸（ $\gamma$ -glutamyl-cysteine,  $\gamma$ GC），从而摆脱了 ERG 和 GSH 之间的生物合成竞争，显著的促进了 ERG 生物合成效率<sup>[29]</sup>。

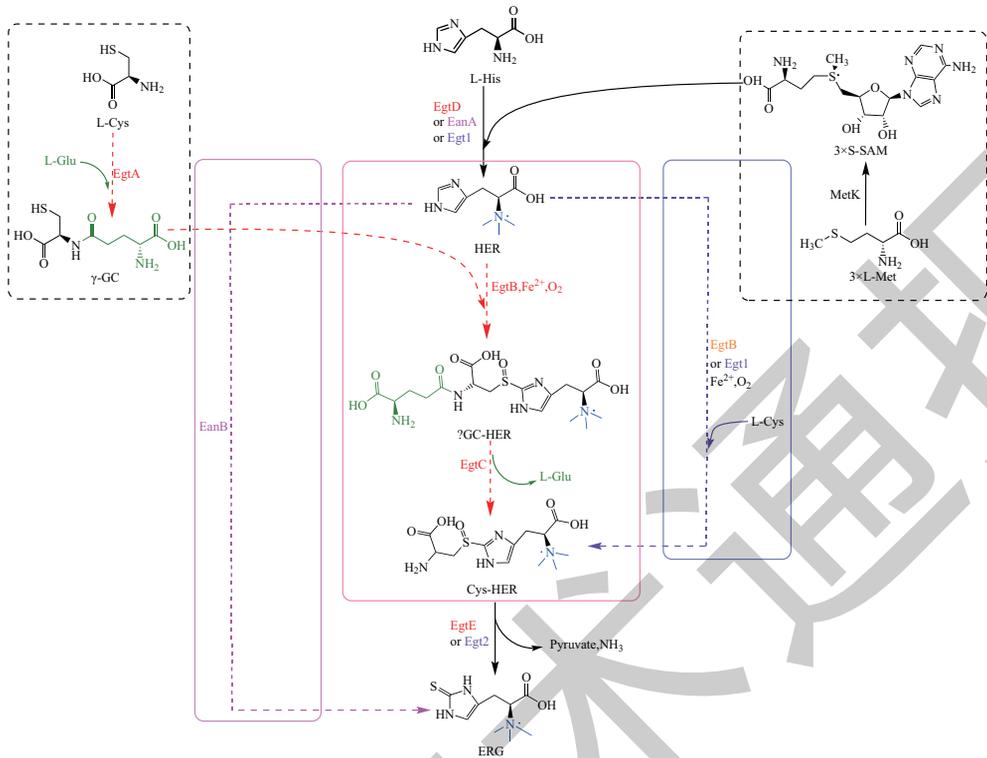
## 3 工程菌株的构建

虽然多种微生物已被报道具有合成 ERG 的能力，但野生型菌株的自我生产远远不能满足工业化生产的需要。将微生物的生物合成途径与基因工程、代谢工程和合成生物学等相关技术结合，是构建工程菌提高目标产物产量的常用方法。目前 ERG 工程菌的构建一方面可以选择本身具有 ERG 生产性能的菌株如 *Methylobacterium* 作为基础菌，直接对 ERG 合成途径的关键酶进行强化，增强 ERG 的合成通路；另一方面可以选择大肠杆菌（*Escherichia coli*）、酵母和谷氨酸棒状杆菌（*Corynebacterium glutamicum*）这类遗传背景清晰、基因改造方便和代谢能力优越的菌株作为底盘菌，将各种细菌和真菌 ERG 合成酶重新组合，在优良宿主内表达。很多研究者已尝试用各种微生物生产 ERG，其中在一些模式微生物体内成功实现了 ERG 合成酶的异源表达，并且基于理性和非理性设计对前体氨基酸的合成代谢通路进行改造，构建了一系列高效生产 ERG 的工程菌，显现出低成本、高产量、易纯化的优势（表 2）。

### 3.1 *E. coli* 底盘中的 ERG 合成

*E. coli* 是一种应用广泛的模式菌株，因其具有遗传系统清晰、分子遗传学背景清楚、易于培养以及操作简单等优势，常被用于基因工程受体菌。

Osawa 等<sup>[17]</sup>在 *E. coli* 异源表达 EgtBCDE 合成酶和 EgtA 同工酶 GshA，通过鉴定中间体，优化前体供应，发酵培养 72 h 后 ERG 产量由 0.2 mg/L 提高到 24 mg/L，提高了 120 倍。由于中间体 HER 存在积累的情况，怀疑可能是 L-Cys 供应不足抑或是天



SAM: S-腺苷蛋氨酸;  $\gamma$ -GC:  $\gamma$ -谷氨酰-半胱氨酸; HER: 组氨酸甜菜碱;  $\gamma$ GC-HER:  $\gamma$ -谷氨酰-组氨酸甜菜碱亚砷; Cys-HER: 组氨酸甜菜碱半胱氨酸亚砷; MetK: S-腺苷蛋氨酸合成酶; 黑色代表两条或两条以上的公共生物合成途径; 红色代表 ERG 在 *M. smegmatis* 中的生物合成途径 (EgtA:  $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸连接酶; EgtB: 单核非血红素依赖性氧化酶; EgtC: 酰胺转移酶; EgtD: SAM 依赖性组氨酸甲基转移酶; EgtE: PLP 依赖性 C-S 裂解酶); 紫色代表 ERG 在 *N. crassa* 中的生物合成途径 [Egt1: 双功能酶 (SAM 依赖性组氨酸甲基转移酶和单核非血红素依赖性氧化酶); Egt2: PLP 依赖性 C-S 裂解酶]; 橙色代表 ERG 在甲基杆菌等细菌中的生物合成途径 (EgtB: 类似真菌 Egt1); 粉色代表 ERG 在厌氧菌中的生物合成途径 (EanA: 甲基转移酶; EanB: 硫转移酶); 绿色代表 L-Glu 在 *M. smegmatis* 生物合成途径中的参与

SAM: S-adenosylmethionine;  $\gamma$ -GC:  $\gamma$ -glutamyl-cysteine; HER: hercynine;  $\gamma$ GC-HER: hercynyl- $\gamma$ -glutamyl-cysteine sulfoxide; Cys-HER: hercynyl-cysteine sulfoxide; MetK: S-adenosylmethionine synthetase. Black represents two or more public biosynthetic pathways. Red represents biosynthetic pathways of ERG in *M. smegmatis* (EgtA:  $\gamma$ -glutamyl cysteine synthase; EgtB: mononuclear non-heme iron enzyme; EgtC: amidotransferase; EgtD: SAM-dependent histidine methyltransferase; EgtE: PLP-mediated C-S lyase). Purple represents biosynthetic pathways of ERG in *N. crassa* [Egt1: Bifunctional enzymes (SAM-dependent histidine methyltransferase and mononuclear non-heme iron enzyme); Egt2: PLP-mediated C-S lyase]. Orange represents biosynthetic pathways of ERG in *Methylobacterium* (EgtB: Similar to fungi Egt1). Pink represents biosynthetic pathways of ERG in anaerobic bacteria (EanA: Methyltransferase; EanB: rhodanese-like sulfur transferase). Green represents the participation of L-Glu in *M. smegmatis* biosynthetic pathway

图 3 麦角硫因的生物合成途径

Fig. 3 Biosynthetic pathway of ergothioneine

然 EgtB 酶活性较低。该团队为进一步改进 ERG 生产系统, 在该菌株中共表达 EgtA; 过表达反馈抑制不敏感的丝氨酸乙酰基转移酶 CysE 和磷酸甘油酸脱氢酶 SerA 获得高产 L-Cys 菌株; 同时破坏转录抑制基因 *metJ*, 增强 L-Met 和 SAM 的代谢通量; 进一步添加营养因子, 分批补料发酵培养 216 h 后, ERG 产量达到 1.31 g/L, 生产效率为 6.1 mg/(L·h)<sup>[34]</sup>。经过对前体氨基酸合成代谢途径改造获得较高 ERG 产量, 但该过程 HER 仍然积累, 猜测可能是 EgtB

的活性较弱。为解决这个问题, 该团队筛选甲基杆菌属中的 EgtBs, 在野生菌株中共表达来自假痂甲基杆菌 (*Methylobacterium pseudosasicola*) 的 EgtB 酶 (Mp\_EgtB) 和来自 *M. smegmatis* 的 EgtDE, 其中 Mp\_EgtB 功能类似真菌的 Egt1, 摇瓶培养 192 h 后 ERG 产量为 657 mg/L<sup>[31]</sup>。相比之前研究<sup>[34]</sup>, ERG 产量并没有进一步提高, 并且由于重组体生长出现抑制甚至死亡, 无法进行分批补料发酵。分析原因可能是外源基因在不产 ERG 的菌株过量表达, 导致

表 2 麦角硫因基因工程菌株的发酵水平

Table 2 Fermentation levels of genetically engineered strains for ergothioneine

菌株 Strain	关键策略 Key strategy	发酵时间 Fermentation period/h	产量 Yield	生产效率 Production efficiency/ (mg · L <sup>-1</sup> · h <sup>-1</sup> )	参考文献 Reference
大肠杆菌 <i>E. coli</i> BW25113	过表达 <i>egtBCDE<sub>M</sub></i> 和 <i>gshA</i> 基因	72	24 mg/L	0.3	[17]
大肠杆菌 <i>E. coli</i> MG1655	优化表达 <i>egtABCDE</i> 基因	60	437.6 mg/L	7.3	[30]
大肠杆菌 <i>E. coli</i> BW25113	过表达 <i>egtDE<sub>M</sub></i> 和 <i>egtB<sub>Mp</sub></i> 基因；表达 <i>cysE<sup>*</sup></i> 、 <i>serA<sup>*</sup></i> 和 <i>ydeD</i> 基因；敲除 <i>metJ</i> 基因	192	657 mg/L	3.4	[31]
大肠杆菌 <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	表达 <i>egtBCDE<sub>M</sub></i> 、 <i>egtI<sub>Sp</sub></i> 和 <i>egtA</i> 基因；过表达 <i>thrA</i> 和 <i>serA<sup>T410STOP</sup></i> 基因	108	710.53 mg/L	6.6	[32]
大肠杆菌 <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	过表达 <i>egtBCDE<sub>M</sub></i> 、 <i>egtI<sub>Sp</sub></i> 、 <i>egtA</i> 、 <i>thrA</i> 和 <i>serA<sup>T410STOP</sup></i> 基因	108	1.1 g/L	10.2	[33]
大肠杆菌 <i>E. coli</i> BW25113	过表达 <i>egtABCDE<sub>M</sub></i> 基因；表达 <i>gshA</i> 、 <i>cysE<sup>*</sup></i> 、 <i>serA<sup>*</sup></i> 和 <i>ydeD</i> 基因；敲除 <i>metJ</i> 基因	216	1.31 g/L	6.1	[34]
大肠杆菌 <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	表达 <i>egtBCDE<sub>M</sub></i> 和 <i>egtI<sub>Sp</sub></i> 基因；过表达 <i>egtA<sub>M</sub></i> 、 <i>thrA</i> 和 <i>serA<sup>T410STOP</sup></i> 基因	108	2.01 g/L	18.6	[35]
大肠杆菌 <i>E. coli</i> MG1655	表达 <i>egtBCDE<sub>M</sub></i> 、 <i>egtB<sup>*</sup><sub>M</sub></i> 、 <i>egt2<sub>Nc</sub></i> 和 <i>hisG<sup>*</sup></i> 基因；双拷贝表达 <i>gshA</i> ；过表达 <i>hisDBCHAF1</i> 基因	52	2.9 g/L	55.8	[36]
大肠杆菌 <i>E. coli</i> BW25113	过表达 <i>tregt1</i> 和 <i>tregt2</i> 基因	143	4.34 g/L	30.4	[37]
大肠杆菌 <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	表达 <i>egtE<sub>M</sub></i> 基因；半理性设计和随机突变 <i>E<sub>gtD</sub></i> 和 <sup>T</sup> NcEgt1	96	5.4 g/L	56.3	[38]
酿酒酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	过表达 <i>Poegt1</i> 、 <i>Peegt1</i> 和 <i>Ptegt1</i> 基因	—	2.5 mg/L	—	[39]
酿酒酵母 <i>S. cerevisiae</i>	过表达 <i>egtI<sub>Cf</sub></i> 和 <i>egt2<sub>Cf</sub></i> 基因	168	20.61 mg/L	0.1	[40]
酿酒酵母 <i>S. cerevisiae</i>	共表达双拷贝 <i>egtI<sub>Nc</sub></i> 和 <i>egt2<sub>Cp</sub></i> 基因	84	598 mg/L	7.1	[41]
圆冬孢酵母 <i>Rhodotorula toruloides</i>	表达 <i>egtI<sub>Nc</sub></i> 基因	96	1.5 g/L	15.6	[42]
解脂耶氏酵母 <i>Yarrowia lipolytica</i>	共表达双拷贝 <i>egtI<sub>Nc</sub></i> 和 <i>egt2<sub>Cp</sub></i> 基因	220	1.63 g/L	7.4	[43]
酿酒酵母 <i>S. cerevisiae</i>	共表达双拷贝 <i>egtI<sub>Nc</sub></i> 和 <i>egt2<sub>Cp</sub></i> 基因；过表达 MET14；敲除 <i>spe2</i> 基因	160	2.4 g/L	15	[44]
粟酒裂殖酵母 <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	经过多轮紫外线和氯化锂突变处理	148	12.5 g/L	84.5	[45]
谷氨酸棒状杆菌 <i>C. glutamicum</i>	过表达 <i>egtDE<sub>M</sub></i> 和 <i>egtB<sub>Mp</sub></i> 基因	336	100 mg/L	0.3	[46]
谷氨酸棒状杆菌 <i>C. glutamicum</i>	表达 <i>egtI<sub>Sp</sub></i> 和 <i>egt2<sub>Sp</sub></i> 基因；过表达 <i>cysE</i> 、 <i>cysK</i> 和 <i>cysR</i> 基因；加强硫同化和磷酸戊糖途径；敲除 <i>sdaA</i> 基因	36	264 mg/L	7.3	[47]
甲基杆菌属 <i>Methylobacterium aquaticum</i>	过表达 <i>egtBD<sub>M</sub></i> 基因；敲除 <i>hutH</i> 基因	168	7.0 mg/g 干重 Dry weight	—	[48]

续表 2 Table 2 continued

菌株 Strain	关键策略 Key strategy	发酵时间 Fermentation period/h	产量 Yield	生产效率 Production efficiency/ (mg · L <sup>-1</sup> · h <sup>-1</sup> )	参考文献 Reference
米曲霉 <i>Aspergillus oryzae</i>	过表达 <i>egt1<sub>Nc</sub></i> 和 <i>egt2<sub>Nc</sub></i> 基因	—	231 mg/kg 培养基 Medium	—	[49]
蛹虫草 <i>Cordyceps militaris</i>	过表达 <i>EgtD<sub>M</sub></i> 、 <i>CmE1B</i> 和 <i>CmEgt2</i>	—	2.5 g/kg 干重 Dry weight	—	[50]
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	优化表达 <i>egtABCDE</i> 基因	60	568.4 mg/L	9.5	[30]
新金色分枝杆菌 <i>Mycolicibacterium neoaerum</i>	过表达 <i>egtABCDE<sub>Mn</sub></i> 、 <i>hisG</i> 、 <i>hisC</i> 和 <i>allB1</i> 基因； 敲除假定裂解酶基因 <i>Mn_3042</i> ；过表达 <i>metK</i> 和 <i>ahcY</i> 基因	216	1.56 g/L	7.2	[51]

菌株本身难以承受高浓度的产物而出现生长抑制和裂解死亡，因此后期可对 *E. coli* 开展 ERG 转运蛋白的挖掘研究，促进 ERG 输出等方面工作促进重组体生长，提高 ERG 产量。

康振等<sup>[32]</sup>以 *E. coli* 为出发菌株，引入 EgtABCDE 合成酶和来自 *S. pombe* 的 Egt1，构建重组菌株 E1-A1，过表达天冬氨酸激酶 ThrA 和反馈抑制不敏感的 SerA，分批补料发酵 108 h 后，获得 710.53 mg/L 和 1.1 g/L<sup>[33]</sup> 的 ERG，生产效率分别为 6.58 mg/(L · h) 和 10.2 mg/(L · h)。为了使该菌株具有更高的代谢通量，进一步提高 ERG 的生产效率，该团队以菌株 E1-A1 为出发菌株，外源添加前体氨基酸和营养因子，增强前体氨基酸和甲基供体供应，ERG 产量明显提高；添加 CaCl<sub>2</sub> 提高胞内外物质的运输速率，培养 108 h 后，ERG 产量达到 2.01 g/L，生产效率为 18.61 mg/(L · h)<sup>[35]</sup>。另一研究团队<sup>[36]</sup>在 *E. coli* 引入不同来源的 ERG 合成酶，重构了一条非天然 ERG 合成途径，通过在宿主基因组整合 *hisG<sup>\*</sup>* 以及增加 L-His 操纵子基因的拷贝数，获得高产 L-His 工程菌株，在无需外源添加 L-His 的 5 L 生物反应器中培养 52 h，产得 ERG 2.9 g/L，同时可产 L-His 14.77 g/L。由此看来，增强胞内前体氨基酸供应和提高胞内外物质运输速率能够有效提高 ERG 生产效率，极大地促进了目标产物合成。Chen 等<sup>[37]</sup>直接在 *E. coli* 异源共表达来自真菌里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 的 ERG 合成基因 *tregt1* 和 *tregt2*，分批补料发酵 143 h 后，ERG 产量达到 4.34

g/L，生产效率为 30.35 mg/(L · h)。然而目前报道的 ERG 合成酶大多为野生型，存在催化活性差、表达水平低的缺陷，研究人员可利用酶工程、蛋白质工程和机器学习等技术挖掘改造 ERG 合成酶，提高其酶活和表达水平。Zhang 等<sup>[38]</sup>在 *E. coli* 异源表达 EgtE 以及基于蛋白质工程改造的 EgtD 和双功能酶 NcEgt1 (<sup>1</sup>NcEgt1)，分批补料发酵 96 h 后，获得 5.4 g/L 的 ERG，生产效率为 56.3 mg/(L · h)。这是目前利用 *E. coli* 发酵生产 ERG 的最高水平，该研究通过随机突变和理性设计相结合的方法对 ERG 合成关键酶进行修饰，获得高酶活、高催化性能的酶，显著提高了 ERG 产量，在短时间内实现了 ERG 高效生产。

目前，利用 *E. coli* 作为底盘菌株生产 ERG 的研究主要集中在合成酶的筛选与异源表达、促进前体物质合成相关基因的过表达以及支路代谢途径的调控，但 *E. coli* 体内前体物质的合成代谢途径涉及众多其他代谢，对于如何合理协调多个前体物质合成代谢模块与细胞生长代谢平衡需要借助基因组学技术、代谢网络模型等系统生物学方法展开深入的研究；以 *E. coli* 作为出发菌株，其产生的内毒素对细胞生长和后续产品提纯有很大影响，需要借助层析方法和过滤法多种组合方式降低样品中的内毒素杂质提高产品安全性；并且利用 *E. coli* 发酵时，其发酵条件比较复杂，需要添加前体氨基酸和各种微量元素，显著增加了生产成本，后期可针对培养条件进行优化，降低成本。但以上研究综合表明通过筛选和异源表达高催化活性 ERG 合成关键酶<sup>[37-38]</sup>、

过表达或敲除前体物质合成代谢相关基因促进前体氨基酸代谢通量<sup>[52-54]</sup>以及优化培养条件<sup>[34-35, 38]</sup>可以有效提高 ERG 产量, 增强生产效率。

### 3.2 酵母菌底盘中的ERG合成

据报道, 在一些酵母菌株中检测到微量的 ERG<sup>[55]</sup>。酵母作为一种单细胞真菌, 具有遗传系统简单、培养方法简单、技术成熟和安全等优点, 已成为广泛用于构建真核表达系统的工程菌。

Yu 等<sup>[40]</sup>发现灰树花 (*Grifola frondosa*) 是一种含有多种活性物质的蘑菇, ERG 含量较高 (0.29–1.11 mg/g), 随即 Yu 等<sup>[40]</sup>在 *S. cerevisiae* 成功表达 *G. frondosa* 中的两个 ERG 合成酶 (*GfEgt1* 和 *GfEgt2*)。通过发酵工艺的优化, 培养 168 h 后, ERG 产量为 20.61 mg/L。随后该团队<sup>[39]</sup>还在 *S. cerevisiae* 成功表达侧耳属平菇、杏鲍菇和白灵菇 ERG 合成酶 *PoEgt1*、*PeEgt1* 和 *PtEgt1*, 产量为 (2.5 ± 0.08) mg/L。尽管 ERG 产量很低, 但上述研究表明 *GfEgt1*<sup>[40]</sup> 和 *PoEgt1*、*PeEgt1* 和 *PtEgt1*<sup>[39]</sup> 具有单基因合成 ERG 的活性, 从大型真菌中克隆一个或两个 ERG 合成酶基因便可在 *S. cerevisiae* 成功合成 ERG, 比构建表达 5 个基因的工程菌更简单<sup>[17]</sup>, 这为高效经济合成 ERG 提供了新的研究方向。

van der Hoek 等<sup>[41]</sup>优化真菌和细菌 ERG 合成酶的各种组合, 在 *S. cerevisiae* 菌株中表达了 *N. crassa* 来源的 *Egt1* 和 *C. purpurea* 来源的 *Egt2*, 分批补料发酵 84 h 后, ERG 产量达到 598 mg/L, 生产效率为 7.12 mg/(L·h)。该团队为进一步提高 ERG 生产效率, 对 *S. cerevisiae* 氮代谢调节系统的众多靶基因进行筛选, 最终确定了增强 ERG 产量的靶基因。此外, 通过表达假定的 ERG 转运蛋白, 分批补料发酵 160 h 后, ERG 产量达到 2.4 g/L, 生产效率为 15 mg/(L·h)<sup>[44]</sup>。由此说明合理调节前体物质代谢网络, 能够保证合成目标产物所需的前体充足, 达到简化培养基成分、节约成本, 提高 ERG 产量的要求, 并且改造 ERG 转运蛋白能有效促进其输出, 避免在胞内积累。浙江华睿生物技术有限公司根据文献筛选能够产生 ERG 的食品安全性微生物, 锁定 *R. toruloides*, 在该菌株表达不同来源的 *Egt1* 发

现, *N. crassa* 来源的 *Egt1* 最优, 在不添加前体物质的前提下培养 120 h 获得 1.5 g/L 的 ERG, 生产效率为 12.5 mg/(L·h)<sup>[42]</sup>。另一研究团队直接选择具有 ERG 合成能力的 *S. pombe*, 经过多轮紫外和氯化锂突变, 筛选出高效合成 ERG 的菌株 OMK-79, 优化培养 148 h 后, ERG 产量为 12.5 g/L, 生产效率为 84.5 mg/(L·h)<sup>[45]</sup>。这是目前利用酵母作为底盘菌株生产 ERG 的最高水平, 但其突变伴随世代积累会产生大量不理想的突变体, 并且大多数菌株都是营养缺陷型和遗传不确定性的, 阻碍了菌株的进一步改良。

以上研究表明利用酵母作为真核底盘菌株生产 ERG, 更多集中于挖掘新的 ERG 合成酶<sup>[39-40]</sup>和具有 ERG 生产能力的酵母菌株<sup>[42-43]</sup>, 这在丰富 ERG 合成酶种类的同时也扩大了宿主细胞选择范围, 但较少地针对菌株本身进行工程改造, 这可能跟真核生物的复杂代谢调控系统有关; 其次通过对酵母菌株的筛选以及工程改造后, 其发酵条件相比 *E. coli* 工程菌株发酵更加简化, 避免了前体氨基酸添加, 降低了生产成本<sup>[43-44]</sup>。但整体而言, 其总体 ERG 生产水平低于上述 *E. coli* 工程菌株 ERG 生产水平, 发酵周期也相对较长。因此, 利用酵母作为底盘菌株生产 ERG, 在筛选表达高效 ERG 合成酶的同时可深入挖掘优化菌株本身的前体物质合成代谢途径, 缩短发酵周期, 提高 ERG 产量。

### 3.3 *C. glutamicum* 底盘中的 ERG 合成

除了利用 *E. coli* 和酵母合成 ERG, 研究人员还挖掘了新的表达宿主。*C. glutamicum* 具有更好的抗逆性、更高的安全性、更低的致病性, 且高效产生前体氨基酸, 可作为 ERG 生物合成的优秀宿主菌。Kim 等<sup>[47]</sup>首次报道将来自 *S. pombe* 的 *egt1* 和 *egt2* 基因导入 *C. glutamicum*; 通过增强硫代谢和磷酸戊糖途径 (PP 途径) 以及过表达 *cysEKR*, 敲除 *sdaA* 基因以积累 L-His 和 L-Cys, 分批补料发酵 36 h 后, 获得 264 mg/L 的 ERG, 生产效率为 7.3 mg/(L·h)。这项研究仅使用葡萄糖为碳源, 通过增强前体氨基酸代谢通量消除外源添加, 大大缩短了培养时间。在 *C. glutamicum*<sup>[46]</sup> 引入其他 ERG 合

成基因<sup>[31]</sup>，获得 100 mg/L ERG 需要两周（336 h）的时间，这比 *E. coli*（100 mg/L 为 120 h）<sup>[34]</sup> 和 *S. cerevisiae*（106 mg/L 为 72 h）<sup>[44]</sup> 更耗时。经过工程改造的 *C. glutamicum* 底盘菌株有效简化了发酵条件，但其 ERG 产量仍较低，周期也很长。考虑到工业应用，*C. glutamicum* ERG 生产水平有待进一步提高。利用 *C. glutamicum* 作为底盘生产 ERG 的研究相比 *E. coli* 和酵母较少，研究人员可以采取更多的工程策略，如筛选并表达高酶活 ERG 合成酶、挖掘菌体转运蛋白增加胞外 ERG 输出、优化培养基条件以及进一步改造菌株增加前体物质代谢通量等方式提高 *C. glutamicum* 生产 ERG 的效率。

#### 3.4 其他底盘菌株中的 ERG 合成

除了以上常用的底盘菌株，其他菌株也被改造用于生产 ERG，如 *M. aquaticum*、*A. oryzae*、*M. neoaurum* 和 *C. militaris* 等。最初，Alamgir 等<sup>[56]</sup> 根据代谢组学分析，从苔藓中发现了高产 ERG 的菌株（甲基杆菌菌株 22A），它在 38 d 产生 6.3 mg/g（干重）ERG。随后通过增加 *egtBD* 的基因拷贝数，敲除组氨酸氨化酶基因（*hutH*），将 ERG 产量提高到 7.0 mg/g（干重）<sup>[48]</sup>。研究表明在丝状真菌 *A. oryzae* 基因组中整合多拷贝 *egt1* 和 *egt2* 基因，最终于培养基中获得 231 mg/kg 的 ERG，这是野生型产量的 20 倍<sup>[49]</sup>，同时也高于 *E. coli* 工程菌（24 mg/L）的 ERG 含量<sup>[17]</sup>。另有研究表明在 *M. neoaurum* 过表达自身 ERG 合成基因簇和促进 L-His 合成的关键酶，ERG 产量提高到 100 mg/L；通过敲除假定的 ERG 裂解酶，过表达同型半胱氨酸水解酶，培养 216 h 后，ERG 产量达到 1.56 g/L，生产效率为 7.2 mg/（L·h）<sup>[51]</sup>。这是通过对分枝杆菌菌株内源性途径代谢修饰改造后获得的最高 ERG 产量，该研究为高效生产 ERG 提供了一种可行的天然内源性途径改造策略。此外，研究人员在 *C. militaris* 中发现 ERG 合成酶，并对其基因进行修饰，进而构建了一条新的 ERG 合成途径，成功提高了 ERG 产量，达到 2.5 g/kg（干重）<sup>[50]</sup>。ERG 代谢途径的发现和调节提高了 *C. militaris* 中 ERG 产量，揭示了可食用蕈菌生产 ERG 的潜力，同时也表明合理修饰真菌菌体内 ERG 合成酶，并将其改造为高产 ERG 的优秀宿主将任重

道远。

## 4 总结与展望

目前 ERG 工程菌的生产周期整体已控制在 2–9 d，最高生产水平已达到 12.5 g/L，但生产周期较长（6 d），且菌株工程策略为多轮的随机突变，其有利突变具有不确定性<sup>[45]</sup>。

通过上述综合比较，生物提取法存在提取效率低、耗时间长、难以产业化等问题，化学合成法存在产品安全难以保证、原料成本高昂等缺点，难以满足 ERG 市场需求，因此借助基因工程、蛋白质工程和代谢工程等技术利用生物合成法生产 ERG 在缩短周期，增加产量方面具有广阔前景。根据已有报道，*E. coli* 构建的工程菌获得的 ERG 产量较高，*C. glutamicum* 和酵母作为食品安全菌株，具有更高的安全性。然而，已报道的工程菌培养周期仍偏长，且获得的 ERG 产量偏低，难以实现规模化生产，无法推进 ERG 的商业化。这些工程菌株的 ERG 生产性能偏低的主要原因是天然 ERG 合成酶的酶活较低，异源表达存在问题；ERG 前体氨基酸的需求量大，但它们在菌株中的合成通量较低；整个 ERG 合成通路复杂，涉及菌株中心代谢、分支代谢、能量代谢以及辅酶代谢，平衡细胞生长和产物合成，协同提高前体氨基酸合成通量难度较大；ERG 作为异源合成产物，在体内过度积累影响细胞生长。

基于上述文献梳理，本文提出几点提高 ERG 产量的工程策略（图 4）。首先基于细菌途径，EgtB 酶和 EgtD 酶是合成途径中的关键酶，可结合基因信息、人工智能和大数据分析等方法，通过对基因组深入挖掘，获得更高催化活性的酶；也可利用其结构信息、人工智能和蛋白质定向进化等方法对已有 ERG 合成酶设计改造，提高酶的催化性能<sup>[28]</sup>。相比于 *M. smegmatis* 等原核细菌，*N. crassa* 以及天然可食用蕈菌等真菌具备更加简短的 ERG 生物合成途径，可挖掘鉴定更多与 Egt1 功能相似的酶<sup>[15]</sup>，为真菌合成 ERG 的理论研究提供借鉴。这是通过基因工程和蛋白质工程提高 ERG 产量的有效方法之一。

另外，L-His、L-Cys 和 L-Met 作为 ERG 合成的前体，它们的供应直接影响 ERG 的合成。可借助基因元件调控、高通量筛选等技术优化和改善底盘菌

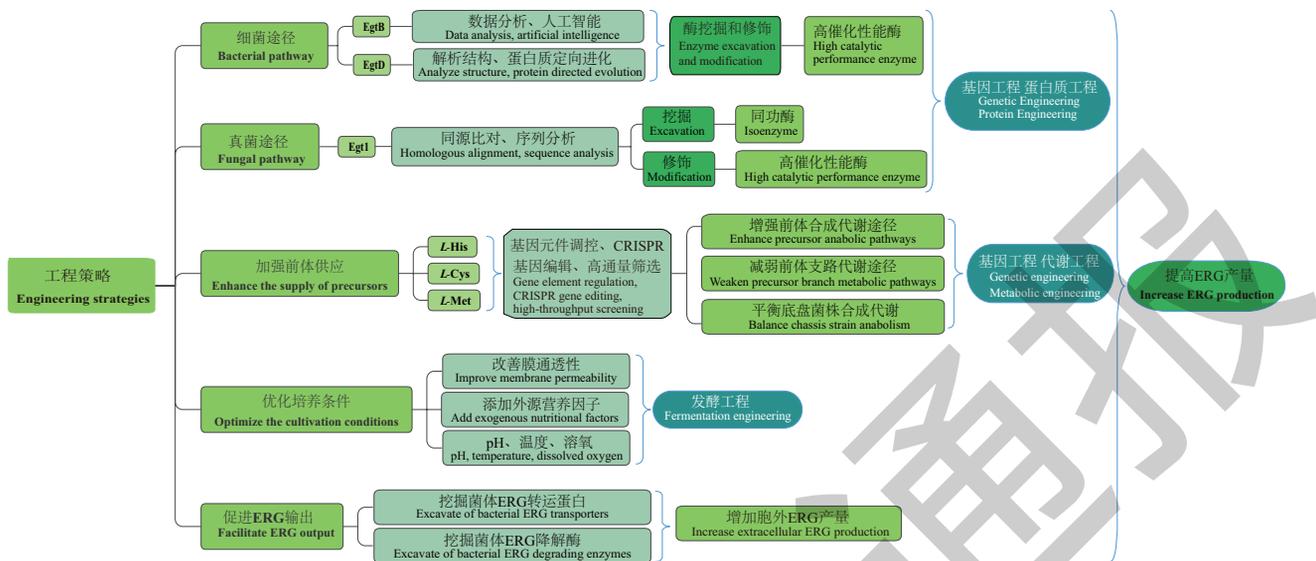


图4 提高麦角硫因产量的工程策略

Fig. 4 Engineering strategies to increase ergothioneine production

株前体氨基酸合成和代谢, 保证生物体代谢平衡。同时, 近年来, 基于 CRISPR 衍生的基因组编辑技术<sup>[57-58]</sup>为基因工程研究提供了新的技术支持, 利用此技术可提高前体物质的代谢通量和阻断前体物质其他竞争性代谢途径以增加 ERG 积累。此外, 挖掘底盘菌株新的特异性 ERG 转运输出蛋白<sup>[44]</sup>或 ERG 降解酶<sup>[51]</sup>, 使工程菌大部分产物分泌到胞外, 这不仅避免了细胞内 ERG 积累或降解, 增加胞外 ERG 产量, 而且还简化了后续 ERG 的分离纯化过程<sup>[59]</sup>。最后可通过优化培养基组成, 添加适量外源营养因子并改善底盘菌株细胞膜通透性等方式提高 ERG 产量<sup>[35]</sup>。

麦角硫因作为一种独特的氨基酸衍生物, 因其在食品、化妆品和医疗等方面具有广泛应用前景, 人们对其需求也不断增加, 这就要求研究人员对 ERG 生产给予更多的投入。相信随着研究不断深入, 各个瓶颈问题不断突破, ERG 生产水平将会不断提高, 满足市场的多方面需求, 并将促进 ERG 在更多行业的应用开发。

#### 参考文献

[1] Tanret C. The new base drawn from rye ergot, ergothioneine [J]. *Compt Rend*, 1909, (149): 222-224.

[2] 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 [J]. *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 [J]. *Food Sci*, 2019, 40 (23): 334-340.

[3] 林陈水, 付水星, 黎小军, 等. 一种稀有的天然氨基酸 - 麦角硫因 [J]. *氨基酸和生物资源*, 2006, 28 (1): 63-67.

Lin CS, Fu SX, Li XJ, et al. Ergothioneine-a rare natural amino acid [J]. *Amino Acids Biotic Resour*, 2006, 28 (1): 63-67.

[4] Kalaras MD, Richie JP, Calcagnotto A, et al. Mushrooms: a rich source of the antioxidants ergothioneine and glutathione [J]. *Food Chem*, 2017, 233: 429-433.

[5] 木开代斯·买合木提, 陈建, 焦春伟, 等. *L*-麦角硫因生物合成与应用研究进展 [J]. *天然产物研究与开发*, 2022, 34 (4): 713-721.

Mukaidaisi M, Chen J, Jiao CW, et al. Progress in biosynthesis and application of *L*-ergothioneine [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2022, 34 (4): 713-721.

[6] Kitsanayanyong L, Ohshima T. Ergothioneine: a potential antioxidative and antimelanosis agent for food quality preservation [J]. *FEBS Lett*, 2022, 596 (10): 1330-1347.

[7] 何鑫怡, 周子艺, 陈媛媛, 等. 麦角硫因生物活性及其在食品工

- 业中的应用 [J]. 食品与发酵工业, 2023, 49 (10): 285-292.
- He XY, Zhou ZY, Chen YY, et al. Bioactivity of ergothioneine and its application in food industry: a review [J]. Food Ferment Ind, 2023, 49 (10): 285-292.
- [8] 张晓娜, 徐鹤然, 化璟琳, 等. 麦角硫因生物学功能及在化妆品功效原料中的应用 [J]. 当代化工研究, 2021 (16): 154-158.
- Zhang XN, Xu HR, Hua JL, et al. The biological function and application of ergothioneine in cosmetic efficacy raw materials [J]. Mod Chem Res, 2021 (16): 154-158.
- [9] Liu HM, Tang W, Wang XY, et al. Safe and effective antioxidant: the biological mechanism and potential pathways of ergothioneine in the skin [J]. Molecules, 2023, 28 (4): 1648.
- [10] Cheah IK, Halliwell B. Ergothioneine; antioxidant potential, physiological function and role in disease [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1822 (5): 784-793.
- [11] 高青莹, 徐建雄. 麦角硫因的抗氧化特性及其干预氧化应激相关疾病的研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2023, 35 (6): 1081-1087.
- Gao QY, Xu JX. Antioxidative properties of ergothioneine and research progress of its intervention in oxidative stress-related diseases [J]. Nat Prod Res Dev, 2023, 35 (6): 1081-1087.
- [12] Fu TT, Shen L. Ergothioneine as a natural antioxidant against oxidative stress-related diseases [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 850813.
- [13] 冯路路, 鄂恒超, 张艳梅, 等. 食用菌中麦角硫因提取分离和检测方法研究进展 [J]. 食用菌学报, 2021, 28 (1): 115-123.
- Feng LL, E HC, Zhang YM, et al. Research progress on extraction, separation and detection of ergothioneine in edible fungi [J]. Acta Edulis Fungi, 2021, 28 (1): 115-123.
- [14] 马晓雪, 陈旭东, 吴志文, 等. 天然抗氧化剂麦角硫因的合成工艺研究 [J]. 合成化学, 2022, 30 (9): 743-748.
- Ma XX, Chen XD, Wu ZW, et al. Process research of natural antioxidant ergothioneine [J]. Chin J Synth Chem, 2022, 30 (9): 743-748.
- [15] 刘琦, 毛雨丰, 廖小平, 等. 麦角硫因生物合成研究的新进展 [J]. 生物工程学报, 2022, 38 (4): 1408-1420.
- Liu Q, Mao YF, Liao XP, et al. Recent progress in ergothioneine biosynthesis: a review [J]. Chin J Biotechnol, 2022, 38 (4): 1408-1420.
- [16] 黄明汝, 潘俊锋, 刘建. 复合酶及其在制备麦角硫因中的应用: CN112301013B [P]. 2022-11-08.
- Huang MR, Pan JF, Liu J. Compound enzyme and application thereof in preparation of ergothioneine: CN112301013B [P]. 2022-11-08.
- [17] Osawa R, Kamide T, Satoh Y, et al. Heterologous and high production of ergothioneine in *Escherichia coli* [J]. J Agric Food Chem, 2018, 66 (5): 1191-1196.
- [18] EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), Turek 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 [J]. EFSA J, 2017, 15 (11): e05060.
- [19] 周波. 麦角硫因的营养学研究概述 [J]. 沈阳医学院学报, 2021, 23 (3): 193-197.
- Zhou B. An outline review of the nutritional research on ergothioneine [J]. J Shenyang Med Coll, 2021, 23 (3): 193-197.
- [20] Kohl E, Steinbauer J, Landthaler M, et al. Skin ageing [J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2011, 25 (8): 873-884.
- [21] Gründemann D, Harlfinger S, Golz S, et al. Discovery of the ergothioneine transporter [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102 (14): 5256-5261.
- [22] Liao WC, Wu WH, Tsai PC, et al. Kinetics of ergothioneine inhibition of mushroom tyrosinase [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2012, 166 (2): 259-267.
- [23] Obayashi K, Kurihara K, Okano Y, et al. L-Ergothioneine scavenges superoxide and singlet oxygen and suppresses TNF- $\alpha$  and MMP-1 expression in UV-irradiated human dermal fibroblasts [J]. J Cosmet Sci, 2005, 56 (1): 17-27.
- [24] Shukla Y, Kulshrestha OP, Khuteta KP. Ergothioneine content in normal and senile human cataractous lenses [J]. Indian J Med Res, 1981, 73: 472-473.
- [25] Paul BD. Ergothioneine: a stress vitamin with antiaging, vascular, and neuroprotective roles? [J]. Antioxid Redox Signal, 2022, 36 (16/17/18): 1306-1317.
- [26] Kerley RN, McCarthy C, Kell DB, et al. The potential therapeutic effects of ergothioneine in pre-eclampsia [J]. Free Radic Biol Med, 2018, 117: 145-157.
- [27] Cheah IK, Halliwell B. Could ergothioneine aid in the treatment of

- coronavirus patients? [J]. *Antioxidants*, 2020, 9 (7): 595.
- [28] Han YW, Tang XY, Zhang YT, et al. The current status of biotechnological production and the application of a novel antioxidant ergothioneine [J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2021, 41 (4): 580-593.
- [29] Hu W, Song H, Her AS, et al. Bioinformatic and biochemical characterizations of C-S bond formation and cleavage enzymes in the fungus *Neurospora crassa* ergothioneine biosynthetic pathway [J]. *Org Lett*, 2014, 16 (20): 5382-5385.
- [30] 康振, 陈坚, 堵国成, 等. 一种发酵合成麦角硫因的工程菌株及其构建方法: CN110358719B [P]. 2021-05-04.  
Kang Z, Chen J, Du GC, et al. Engineering strain for fermented synthesis of ergothioneine and construction method thereof: CN110358719B [P]. 2021-05-04.
- [31] Kamide T, Takusagawa S, Tanaka N, et al. High production of ergothioneine in *Escherichia coli* using the sulfoxide synthase from *Methylobacterium* strains [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68 (23): 6390-6394.
- [32] 王丽, 王阳, 李江华, 等. 产麦角硫因大肠杆菌工程菌株的构建与优化 [J]. *生物工程学报*, 2022, 38 (2): 796-806.  
Wang L, Wang Y, Li JH, et al. Construction and optimization of ergothioneine-producing *Escherichia coli* [J]. *Chin J Biotechnol*, 2022, 38 (2): 796-806.
- [33] 康振, 王阳, 王丽, 等. 高效合成麦角硫因的工程菌的构建方法与应用: CN113234652B [P]. 2022-09-27.  
Kang Z, Wang Y, Wang L, et al. Construction method of engineering bacteria for efficiently synthesizing ergothioneine and application thereof: CN113234652B [P]. 2022-09-27.
- [34] Tanaka N, Kawano Y, Satoh Y, et al. Gram-scale fermentative production of ergothioneine driven by overproduction of cysteine in *Escherichia coli* [J]. *Sci Rep*, 2019, 9 (1): 1895.
- [35] 陈佳敏, 王阳, 堵国成, 等. 优化前体供给与细胞膜通透性强化的大肠杆菌合成麦角硫因 [J]. *食品与生物技术学报*, 2022, 41 (8): 43-52.  
Chen JM, Wang Y, Du GC, et al. Enhancement of ergothioneine synthesis in *Escherichia coli* via optimization of precursor supply and cell membrane permeability [J]. *J Food Sci Biotechnol*, 2022, 41 (8): 43-52.
- [36] 马倩, 田道光, 谢希贤, 等. 一种生产麦角硫因的基因工程菌株及其应用: CN112251392B [P]. 2022-09-09.  
Ma Q, Tian DG, Xie XX, et al. Genetically engineered strain for producing ergothioneine and application: CN112251392B [P]. 2022-09-09.
- [37] Chen ZH, He YZ, Wu XY, et al. Toward more efficient ergothioneine production using the fungal ergothioneine biosynthetic pathway [J]. *Microb Cell Fact*, 2022, 21 (1): 76.
- [38] Zhang LW, Tang JW, Feng MQ, et al. Engineering methyltransferase and sulfoxide synthase for high-yield production of ergothioneine [J]. *J Agric Food Chem*, 2023, 71 (1): 671-679.
- [39] 潘涛, 林金德, 余颖豪, 等. 酿酒酵母表达侧耳源单基因生物合成麦角硫因 [J]. *食品科学*, 2022, 43 (10): 214-219.  
Pan T, Lin JD, Yu YH, et al. Expression in *Saccharomyces cerevisiae* of single ergothioneine synthase genes from *Pleurotus* [J]. *Food Sci*, 2022, 43 (10): 214-219.
- [40] Yu YH, Pan HY, Guo LQ, et al. Successful biosynthesis of natural antioxidant ergothioneine in *Saccharomyces cerevisiae* required only two genes from *Grifola frondosa* [J]. *Microb Cell Fact*, 2020, 19 (1): 164.
- [41] van der Hoek SA, Darbani B, Zugaj KE, et al. Engineering the yeast *Saccharomyces cerevisiae* for the production of L-(+)-ergothioneine [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2019, 7: 262.
- [42] 范文超, 高书良, 王金刚, 等. 一种构建麦角硫因生产菌的方法: CN111534535B [P]. 2022-02-22.  
Fan WC, Gao SL, Wang JG, et al. Method for constructing ergothioneine producing strain: CN111534535B [P]. 2022-02-22.
- [43] van der Hoek SA, Rusnák M, Jacobsen IH, et al. Engineering ergothioneine production in *Yarrowia lipolytica* [J]. *FEBS Lett*, 2022, 596 (10): 1356-1364.
- [44] van der Hoek SA, Rusnák M, Wang GK, et al. Engineering precursor supply for the high-level production of ergothioneine in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Metab Eng*, 2022, 70: 129-142.
- [45] Zhou LQ, Xiang T, Yang MX, et al. Yeast strain and use thereof and preparation method of ergothioneine: US20230220428 [P]. 2023-07-13.
- [46] Hirasawa T, Shimoyamada Y, Tachikawa Y, et al. Ergothioneine production by *Corynebacterium glutamicum* harboring heterologous biosynthesis pathways [J]. *J Biosci Bioeng*, 2023, 135 (1): 25-33.
- [47] Kim M, Jeong DW, Oh JW, et al. Efficient synthesis of food-derived

- antioxidant L-ergothioneine by engineered *Corynebacterium glutamicum* [J]. *J Agric Food Chem*, 2022, 70 (5) : 1516-1524.
- [48] Fujitani Y, Alamgir KM, Tani A. Ergothioneine production using *Methylobacterium* species, yeast, and fungi [J]. *J Biosci Bioeng*, 2018, 126 (6) : 715-722.
- [49] Takusagawa S, Satoh Y, Ohtsu I, et al. Ergothioneine production with *Aspergillus oryzae* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2019, 83 (1) : 181-184.
- [50] Chen BX, Xue LN, Wei T, et al. Enhancement of ergothioneine production by discovering and regulating its metabolic pathway in *Cordyceps militaris* [J]. *Microb Cell Fact*, 2022, 21 (1) : 169.
- [51] Xiong LB, Xie ZY, Ke J, et al. Engineering *Mycolicibacterium neoaurum* for the production of antioxidant ergothioneine [J]. *Food Bioeng*, 2022, 1 (1) : 26-36.
- [52] Wu HY, Tian DG, Fan XG, et al. Highly efficient production of L-histidine from glucose by metabolically engineered *Escherichia coli* [J]. *ACS Synth Biol*, 2020, 9 (7) : 1813-1822.
- [53] Liu H, Fang GC, Wu H, et al. L-cysteine production in *Escherichia coli* based on rational metabolic engineering and modular strategy [J]. *Biotechnol J*, 2018, 13 (5) : e1700695.
- [54] Li H, Wang BS, Li YR, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* W3110 for the production of L-methionine [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2017, 44 (1) : 75-88.
- [55] Pluskal T, Ueno M, Yanagida M. Genetic and metabolomic dissection of the ergothioneine and selenoneine biosynthetic pathway in the fission yeast, *S. pombe*, and construction of an overproduction system [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (5) : e97774.
- [56] Alamgir KM, Masuda S, Fujitani Y, et al. Production of ergothioneine by *Methylobacterium* species [J]. *Front Microbiol*, 2015, 6: 1185.
- [57] Wu YK, Liu YF, Lv XQ, et al. Applications of CRISPR in a microbial cell factory: from genome reconstruction to metabolic network reprogramming [J]. *ACS Synth Biol*, 2020, 9 (9) : 2228-2238.
- [58] Ye CC, Yang YT, Chen X, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* BW25113 for the production of 5-Aminolevulinic Acid based on CRISPR/Cas9 mediated gene knockout and metabolic pathway modification [J]. *J Biol Eng*, 2022, 16 (1) : 26.
- [59] Sao Emani C, Williams MJ, Wiid IJ, et al. Ergothioneine is a secreted antioxidant in *Mycobacterium smegmatis* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57 (7) : 3202-3207.

(责任编辑 高洁)