

麦角硫因的生物合成及提取检测

田 缘, 闫更轩, 于 冲, 胡基华, 陈盛宇, 叶 阳, 田洁萍, 潘 钰*

(黑龙江省科学院微生物研究所, 哈尔滨 150010)

摘要: 麦角硫因是一种独特的天然手性氨基酸, 通常由细菌和真菌生物合成。作为一种食品来源的抗氧化剂和细胞保护剂, 它在食品、保健品、化妆品、生物医学等领域展现出广阔的应用前景。本文总结了麦角硫因生物合成途径及几种高效提取、检测麦角硫因的方法, 旨在由分子层面深入了解麦角硫因生物合成的调控机理, 进而结合代谢调控提高麦角硫因的生物合成水平, 为生物活性物质的合理开发和利用奠定基础。

关键词: 麦角硫因; 生物合成; 提取; 检测

The biosynthesis, extraction and detection of ergothioneine

TIAN Yuan, YAN Gengxuan, YU Chong, HU Jihua, CHEN Shengyu, YE Yang,

TIAN Jieping, PAN Yu*

(Institute of Microbiology, Heilongjiang Academy of Sciences, Harbin 150010, China)

Abstract: Ergothioneine is a unique natural chiral amino acid that is normally biosynthesized by bacteria and fungi. As a food-derived antioxidant and cell protectant, it shows broad application prospects in the fields of food, health products, cosmetics and biomedicine. This paper summarizes the biosynthetic pathway of ergothioneine and its extraction and detection methods, aiming to deeply understand the regulatory mechanism of ergothioneine biosynthesis at the molecular level, and then combine metabolic regulation to improve the level of ergothioneine biosynthesis, which lays the foundation for the rational development and utilization of biologically active substances.

Key Words: ergothioneine; biosynthesis; extraction; detection

二十世纪初, Tanret^[1]在麦角真菌中发现了一种结晶含硫化合物, 后被命名为麦角硫因(ergothioneine, EGT)。EGT是一种天然而珍贵的含硫氨基酸, 无色无味, 极易溶于水、甲醇和乙醇。EGT在液体中具有硫酮与硫醇两种不同的结构, 但由于两者的稳定性存在差异, 因此在生理pH及具有大量碱性阴离子的条件下以呈现硫酮状态为主^[2]。不同于其他抗氧化剂, EGT的氧化还原

电势相对较高, 故而稳定性更强。除了麦角真菌, EGT还存在于许多其他生物中。1956年, 从粗糙脉孢菌中分离到EGT晶体^[3]。随后, Melville等^[3]发现, 分枝杆菌能将组氨酸转化为EGT, 并通过同位素示踪研究揭示了EGT的细菌合成途径^[4]。许多放线菌^[5]、蓝藻^[6]、粟酒裂殖酵母^[7]和某些甲基杆菌也被报道能够合成EGT, 但产量相对较低, 仅达到0.069~2.000 mg/L。研究人员在大多数哺乳

收稿日期: 2022-04-02

基金项目: 黑龙江省自然科学基金重点项目(ZD2020C010); 黑龙江省科学院青年创新基金项目(CXMS2022SW01)

第一作者: E-mail: magic yuan1995@163.com

*通信作者: E-mail: 236183617@qq.com

动物的红细胞、骨髓、肝脏、肾脏、晶状体和精液中同样发现了大量的EGT^[8]。除此之外, 美味牛肝菌、糙皮侧耳、双孢蘑菇、香菇等食用菌的子实体、菌丝体、下脚料中也含有丰富的EGT, 故而常用作提取EGT的精良原料^[9]。植物可以利用共生固氮体系以及土壤真菌摄取EGT, 但人与其他脊椎动物无法直接合成EGT, 仅能利用食物链方式通过饮食途径获得, 并依靠特定转运蛋白进行吸收^[10]。EGT具有抗氧化、抗衰老、抑制心血管疾病、维持DNA生物合成、清除自由基、促进神经细胞生成等多种功效, 在各种疾病模型中对细胞和组织损伤都有较好的保护作用, 因此常作为一种可以在细胞间转运的抗氧化剂发挥作用^[11]。近年来, 人类对健康问题的普遍关注导致富含天然抗氧化剂的食物、营养补品、化妆品需求量大量增加。开发出经济高效的方法来合成或增产天然抗氧化剂成为当下研究热点。本文从生物合成途径、合成关键基因及提取、检测方法等角度对EGT的研究进展进行了阐述, 并对其进一步发展和产业潜力进行了展望, 为EGT的高效、绿色产业化提供参考和指导。

1 EGT的生物合成途径

1.1 EGT的生物合成途径

1964年, Genghof等^[4]发现, 除了麦角真菌外, 在耻垢分枝杆菌中也可以发现EGT和组氨酸甜菜碱。并且, 不仅局限于一种分枝杆菌, 在多达一百余种分枝杆菌科中都存在这种现象。然而, 在现有的理论基础上, 催化生物合成反应的酶无论是结构还是反应条件都尚不清楚, 直至Seebeck^[12]确定了每种酶的相应基因、催化能力和反应底物, 并在体外模拟了耻垢分枝杆菌的EGT生物合成, 其合成途径才被彻底揭示。研究发现, 一个由五个基因组成的基因簇在分枝杆菌EGT的生物合成中起着至关重要的作用, 并将其分别命名为: 麦角硫因蛋白A(EGTA)、麦角硫因蛋白B(EGTB)、麦角硫因蛋白C(EGTC)、麦角硫因蛋白D(EGTD)和麦角硫因蛋白E(EGTE)。分枝杆菌中EGT的生物合成可概括如下: 首先, EGTD将S-腺苷基甲硫氨酸中的三个甲基转移到组氨酸中, 形成组氨酸甜菜碱^[13]; L-半胱氨酸与谷氨酸作为底

物, 在EGTA的催化下进行缩合反应, 合成 γ -谷氨酰-半胱氨酸; EGTB是依赖 Fe^{2+} 的硫氧化酶, 在 O_2 和硫酸亚铁存在下以非血红素铁酶的形式存在, 催化氧化偶联反应, 将 γ -谷氨酰-半胱氨酸的硫醇基团添加到组氨酸甜菜碱的侧链上, 形成C-S键, 最终合成 γ -谷氨酰-组氨酸甜菜碱亚砷; 在EGTC的进一步催化下, 上个环节的产物脱去谷氨酸, 形成组氨酸甜菜碱半胱氨酸亚砷; 再由EGTE裂解组氨酸甜菜碱半胱氨酸亚砷上的C-S键, 脱去丙酮酸与氨, 最终形成EGT(图1)。值得注意的是, 虽然在各个环节中不同基因都发挥重要的作用, 但最为关键的两个步骤是底物经EGTD的催化发生甲基化反应和EGTB催化底物进而产生的氧化硫化反应。因此, 可以归纳出, 在这些基因中, EGTB和EGTD是EGT生物合成的关键调控基因。在前人的基础上, Osawa等^[14]利用重组DNA技术将耻垢分枝杆菌中的EGTA、EGTB、EGTC、EGTD和EGTE五个基因在大肠杆菌中异源表达, 重组菌中EGT的产量为24 mg/L。

1.2 真核生物中EGT的生物合成途径

与细菌相比, 真菌中EGT的生物合成途径更为简单。Bello等^[15]通过比较EGT合成基因簇与耻垢分枝杆菌的同源序列, 鉴定了粗糙脉孢菌中一种特异性的EGT生物合成酶——NcEGT-1, 并通过基因敲除得到了验证。NcEGT-1含有与耻垢分枝杆菌中EGTB和EGTD相似的结构域^[16]。EGT1是一种非血红素铁酶, 可以同时催化两个反应, 包括: 组氨酸甲基化生成组氨酸甜菜碱; 组氨酸甜菜碱与半胱氨酸形成C-S键, 转化为组氨酸甜菜碱半胱氨酸亚砷。进一步从生物信息学和生化特征角度对粗糙脉孢菌EGT生物合成过程中C-S键的形成进行探究, 发现相较于以 γ -谷氨酰-半胱氨酸作为底物, EGT1更倾向于底物为半胱氨酸的反应^[17]。为了进一步探究EGT合成的关键步骤, 利用基因敲除进行了相关验证。结果表明, 在SPBC660.12c(EGT2)基因缺陷菌株中, EGT生物合成大大降低, 证明EGT2参与了EGT生物合成的第二步^[7]。与EGTE类似, 在C-S键形成后, EGT2对C-S键进行裂解, 与组氨酸甜菜碱半胱氨酸亚砷结合形成EGT(图1)。除了粗糙脉孢菌, 学者在粟酒裂殖酵

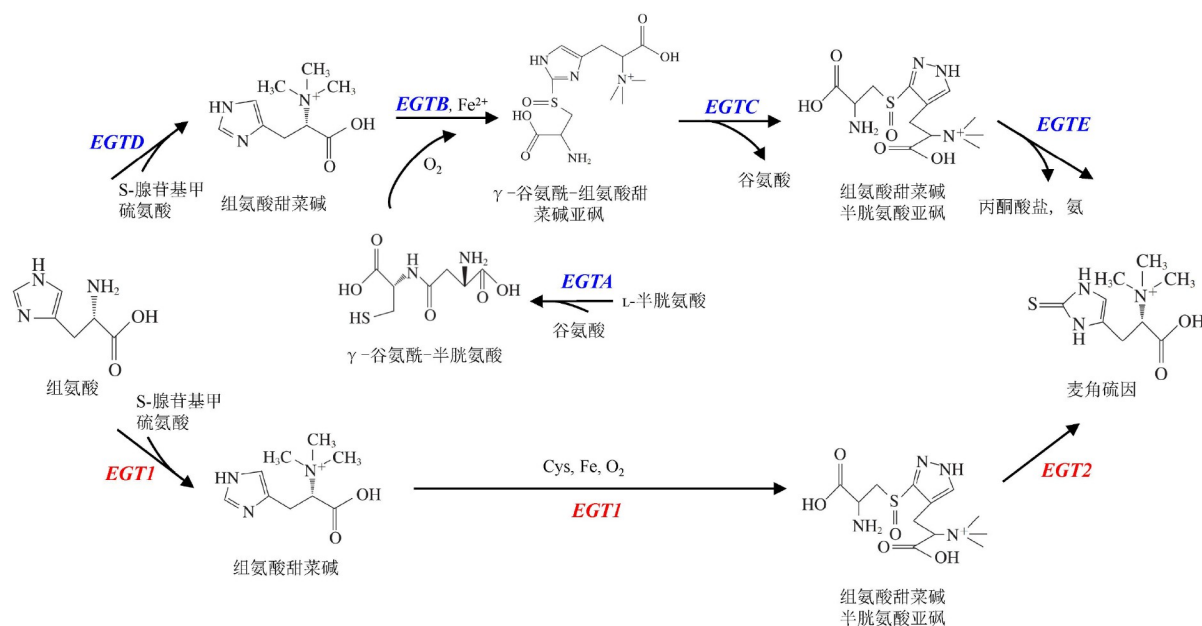


图1 EGT的生物合成途径

母、海洋胶红酵母和黑酵母中也发现了相关的代谢途径^[7]。这种真菌途径只涉及两种酶，而且不需要 γ -谷氨酰-半胱氨酸参与反应，因此在一定程度上消除了EGT与谷胱甘肽之间的生物合成竞争，故而比细菌途径更有效^[18]。

富含EGT的真菌数量众多，但在人类日常饮食中，最丰富的来源便是食用菌，金针菇、糙皮侧耳都是典型的代表。大多数食用菌中EGT的生物合成是以EGT1和EGT2作为关键基因，但在金针菇中，三个基因FvEGT1、FvEGT2和FvEGT3主要参与了EGT的合成^[19]。不同于粗糙脉孢菌，在金针菇中组氨酸甜菜碱半胱氨酸亚砷的脱硫反应涉及两个半胱氨酸脱硫酶参与。在这些EGT合成酶的共同作用下，以组氨酸、半胱氨酸、S-腺苷基甲硫氨酸和硫酸亚铁为底物，成功合成了EGT^[20]。这些合成关键基因的发现为EGT的高效异源表达和生产应用提供了更多的便利和基础。此外，研究人员还从耐热细菌中发现提取了一种特殊的EGTB，并对其晶体结构和活性部位进行了分析^[21]。有研究发现，该菌的EGTB可以利用半胱氨酸作为硫供体，将组氨酸甜菜碱转化为组氨酸甜菜碱半胱氨酸亚砷，从而将细菌EGT的生物合成途径从五步减少到三步^[22]。

2 EGT的提取、检测方法

2.1 EGT的提取

天然活性物质的提取方式种类繁多，如溶剂提取法、超声提取法、连续相变萃取法、酶提取法、高压脉冲提取法、联合提取法等。选用正确的提取技术往往能极大地提高产率。食用菌中EGT含量丰富，但提取方式尤为重要。Bao等^[23]以冻干粉碎的金针菇为原料、70%丙酮为萃取剂，进行4 min匀浆操作，以使所有样品均一化。随后离心，并将所得的聚沉固体继续用丙酮匀浆。最终将两次离心所得的上清液混合作为萃取物，经检测子实体的EGT含量为 3.03 ± 0.07 mg/g干重。Nguyen等^[24]探究了提取溶剂、煮沸、蒸汽和微波等提取手段、贮藏条件对金针菇子实体及其热水提取物中EGT含量的影响。实验结果表明，在鲜菇中EGT含量达2 mg/g干重，微波处理后约损失1/5；煮沸可以最显著地促进鲜菇中EGT的外流；此外，70% (V/V)的乙醇可以显著增加EGT的含量并有效地去除其他化合物。Ey等^[25]将多种蘑菇样品置于液氮中均质后，在高氯酸中同时进行震荡和超声提取处理，处理时间分别为15 min和10 min。随后采用两步法离心，先以4 °C、3 000 ×g离心10 min，接着在20 °C、40 000 ×g的条件下超速离心30 min进

一步提纯上清液。利用LC-MS/MS进行定量测定发现,在美味牛肝菌和平菇中EGT浓度相对较高,达528.14 mg/kg湿重和118.91 mg/kg湿重。此外,在某些肉类产品(肝脏和肾脏)和特殊植物产品(黑豆和红豆以及燕麦麸皮)中也发现了丰富的EGT。EGT的浓度在不同生物之间以及在同一生物不同组织之间均表现出高度可变性。Tepwong等^[26]用70%乙醇从小孢鳞伞、平菇、灰树花、香菇等食用菌中提取EGT。经浓缩、干燥、复溶等步骤后,利用离子交换柱进行层析。随后,用水与吡啶的混合溶剂进行洗脱,收集(水:吡啶=10:1)。经定性分析后,采用乙醇梯度洗脱进行硅胶柱层析分离,获得EGT。除了传统的化学提取方法外,高效而又温和的酶解方法也被广泛应用。Cremades等^[27]以双孢蘑菇子实体为原料,利用酶和膜技术开发了一种高效的浓缩工艺。在酸液洗涤、搅打成糊后,加入葡聚糖酶、几丁质酶和纤维素酶的混合物,待完全反应后马上进行升温、调pH、水解等步骤,最后将匀浆和酶解后的蘑菇水溶液进行离心,利用超滤膜进行分离,得到的EGT回收率达85.31%。虽然这种酶法能有效去除细胞壁,但由于酶反应的最适温度和酸碱度范围相对较小,提取条件严苛,提取成本较高。因此,尽管近年来开发了更高效的提取技术,但大规模提取EGT仍然存在许多问题。

2.2 EGT的检测方法

在EGT生产过程中,建立高效、快速、准确、稳定的检测方法是研究的关键。1928年,

Hunter^[28]利用重氮化的对氨基苯磺酸,通过显色反应特异性地实现了EGT的含量检测,避免了实验中剧毒物质氰化钠的使用。随后,比色法和分光光度法^[29]开始流行。自20世纪70年代以来,高效液相色谱法(HPLC)被广泛应用于EGT的检测(表1)。目前,EGT的检测方法主要有HPLC、液相色谱-质谱串联法(HPLC-MS)、分光光度法、层析法等。

在对食用菌的EGT进行测定时,由于不同种类的食用菌中EGT含量普遍较高,通常用HPLC进行定量检测,但对于捕获含量极低的EGT该方法并不适用^[30]。利用7-二乙氨基-3-(4'-马来酰亚胺苯基)-4-甲基香豆素(DCIA)与5-碘乙酰胺基荧光素(5-IAF),对EGT的硫醇基团进行衍生化,还可以捕获微量的EGT^[31]。此外,虽然极性化合物在C8和C18柱上可以被分离,但存在一定难度。HPLC-MS虽然具有卓越的分离特性以及检测阈值较低等优势特色,但鉴于EGT对水的亲和力较强,在质谱测定过程中电喷雾能率将相对较低,EGT分子的盐化物也会对定量测定造成影响^[32]。Sotgia等^[33]提出,利用亲水作用液相色谱法(HILIC)可以提高对极性溶质的选择性和保留率,在优化层析条件后,EGT的平均回收率达到了96.34%。Wang等^[34]通过HPLC-MS验证了一种灵敏的分析方法,利用C18柱对EGT进行梯度洗脱,并采用正离子检测模式的电喷雾电离方式,对人体血浆和红细胞中的EGT进行药代动力学检测。结果表明,EGT含量在10~10 000 ng/mL限度内呈现出优越的比例关系。对五名健康受试者的生物样本进行测定,血浆和红细胞中EGT

表1 HPLC在EGT检测中的应用

样品	检测方法	色谱柱	流速(mL/min)	流动相	参考文献
赤盖芝	HPLC	C18色谱柱	0.7	50 mmol/L磷酸钠(含3%乙腈和0.1%三乙胺)	[37]
香菇	HPLC-MS	C30-UG-5 反相色谱柱	0.2	A相: 10%甲醇 B相: 0.1%乙酸	[26]
11种食用菌	HPLC	HG-5	0.8	0.1%三乙胺	[38]
血浆	HPLC	C18色谱柱	1.2	A相: 100 mmol/L磷酸氢二钾/乙腈/甲醇/水(40:7:3:50) B相: 100 mmol/L磷酸氢二钾/乙腈/甲醇/水(40:20:3:37)	[31]
糙皮侧耳发酵液	HILIC	HILIC色谱柱 (VH510525BXN0105)	1.0	A相: 乙腈 B相: 20 mmol/L乙酸铵	[39]
糙皮侧耳发酵液	HPLC	Zorbax SB-Aq 色谱柱	0.7	A相: 1%甲醇 B相: 甲醇	[40]
9种药用真菌	HPLC	Kromasil 100-5NH ₂ 色 谱柱	1.0	A相: 乙腈 B相: 5 mmol/L醋酸铵	[41]

的平均浓度分别为 107.4 ± 20.5 ng/mL和 1285.0 ± 1363.0 ng/mL,所有样品的准确度稳定在94.5%以上。大多数待测样品都不是单一组分,其中包含的各种物质的含量、分子结构、理化性质等都不相同。在复杂的基质中,若成分中含有与EGT类似的强极性硫化物,则会干扰检测。Kroepfl等^[35]基于反相高效液相色谱与质谱联用(电感耦合等离子体三重四极杆质谱,ICP-QQQ-MS)的技术手段,以氧气为反应气体对复杂生物基质中的EGT进行选择测定,该方法的精密度可达1%。在水溶液中,优化方法的检测限和定量限分别为 0.23 μ g/L和 0.80 μ g/L;在复杂基质(人肝癌细胞HepG2)中进行测定,检测限和定量限分别为 0.6 μ g/L,LOQ为 2.3 μ g/L。Horie等^[36]开发了一种液相色谱-电喷雾电离串联质谱(LC/ESI-MS/MS)方法来鉴定和量化米曲霉发酵后的米糠中的EGT。在发酵米糠中的EGT含量为 176 ± 39 μ g/g,高于发酵白米(59.8 ± 20.4 μ g/g)和糙米(85.5 ± 32.3 μ g/g),发酵45 h可使米糠中的EGT含量提高140倍。与衍生化结合,进一步提高了液相色谱的保留度和电喷雾串联质谱仪的灵敏度,实现了灵敏(定量限达 0.080 μ g/g)、精确(相对标准偏差5.8%)、准确(准确度达94.9%~100.0%)的测定。

3 总结与展望

作为一种安全、无毒、多功能的硫代组氨酸衍生物,EGT具有抗衰老、抗氧化、抗炎症、延长细胞生存周期、促进神经细胞形成等多种功效,是一种独特的抗氧化剂。欧洲食品安全局(EFSA)已批准EGT用作孕妇和哺乳期妇女、儿童和婴儿的营养补充剂^[42]。

EGT的生物合成途径可分为好氧和厌氧两大类,前者更为普遍且效率较高。在原核生物中,主要是由五个基因组成的基因簇控制EGT的生物合成。而在真核生物中合成途径则相对简单,主要涉及两个关键酶,且EGT的生物合成与谷胱甘肽不存在竞争关系。利用食用菌进行液体发酵工艺,是目前商品化EGT的主要来源。代谢工程技术的发展,极大地促进了EGT产业化的进步和升级。利用基因工程菌株发酵生产EGT更具有优势,有利于胞外EGT的积累和纯化,且发酵周期短、产量高。一

些模式生物如大肠杆菌、酿酒酵母和米曲霉已成功用于EGT合成。筛选或开发更有效的组氨酸底盘菌株,对于异源生产EGT非常重要。此外,优化和改进组氨酸、S-腺苷蛋氨酸、半胱氨酸等EGT前体的合成模块,并使它们协同工作,也是EGT生物合成的主要挑战。近年来,CRISPR衍生的基因组编辑技术^[43]包括CRISPR-Cas^[44]、CRISPRi技术^[45]、CRISPR相关转座酶系统^[46]。CRISPR介导的碱基编辑系统^[47]也将为改善前体物质代谢通量、协调EGT生物合成中的代谢平衡等具体研究提供新的技术支持。EGT的提取技术虽然在不断优化,但是相对于其他活性物质的分离提取仍存在效率低、耗时长、操作复杂、普适性不强等问题亟待解决。HPLC法与其他技术联用是精准检测EGT含量的有效手段,建立稳定性好、精准度高、适用性广且绿色可持续的检测方法也是未来研究的重点。

EGT独特的化学结构使其具有高度的稳定性,能够在组织和细胞中进行积累,并在人类发育和维护机体健康中发挥关键作用。尽管有证据表明EGT存在于新生儿和婴儿的血液、尿液和脑中^[48],但对EGT在婴儿发育过程中保护作用的分子机制几乎一无所知。细胞培养和动物模型的多项研究表明,EGT不仅可以调节炎症细胞因子,减轻氧化或亚硝化损伤,还可以发挥减缓或防止纤维化的作用^[49]。据此,有学者提出EGT可以改善新冠肺炎患者的预后,保护主要器官降低过度活跃的免疫反应导致的损伤,并防止永久性损害(如肺纤维化)^[50]。未来,可对EGT在细胞和组织保护中的机制及其潜在的治疗机理开展深入研究,促进EGT在医学、食品、化妆品等各领域发挥重要价值。

参考文献

- [1] Tanret C. The new base drawn from rye ergot, ergothioneine. *C R Hebd Seances Acad Sci*, 1909, 25: 222-224
- [2] Halliwell B, Cheah IK, Tang RMY. Ergothioneine—a diet-derived antioxidant with therapeutic potential. *FEBS Lett*, 2018, 592(20): 3357-3366
- [3] Melville DB, Genghof DS, Inamine E, et al. Ergothioneine in microorganisms. *J Biol Chem*, 1956, 223(1): 9-17
- [4] Genghof DS, Damme OV. Biosynthesis of ergothioneine and hercynine by mycobacteria. *J Bacteriol*, 1964, 87(4):

- 852-862
- [5] Genghof DS. Biosynthesis of ergothioneine and hercynine by fungi and *Actinomycetales*. *J Bacteriol*, 1970, 103(2): 475-478
- [6] Pfeiffer C, Bauer T, Surek B, et al. Cyanobacteria produce high levels of ergothioneine. *Food Chem*, 2011, 129(4): 1766-1769
- [7] Pluskal T, Ueno M, Yanagida M. Genetic and metabolic dissection of the ergothioneine and selenoneine biosynthetic pathway in the fission yeast, *S. pombe*, and construction of an overproduction system. *PLoS One*, 2014, 9(5): e97774
- [8] Sotgia S, Taras A, Zinellu A, et al. Hercynine, ergothioneine and redox state in stallion's seminal plasma. *Antioxidants*, 2020, 9(9): 855
- [9] 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. *食用菌学报*, 2021, 28(1): 115-123
- [10] Cheah IK, Halliwell B. Ergothioneine, recent developments. *Redox Biol*, 2021, 42: 101868
- [11] D'Onofrio N, Servillo L, Giovane A, et al. Ergothioneine oxidation in the protection against high-glucose induced endothelial senescence: involvement of SIRT1 and SIRT6. *Free Radical Biol Med*, 2016, 96: 211-222
- [12] Seebeck FP. *In vitro* reconstitution of mycobacterial ergothioneine biosynthesis. *J Am Chem Soc*, 2010, 132(19): 6632-6633
- [13] 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
- [14] 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
- [15] 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
- [16] Qiu Y, Chen Z, Su E, et al. Recent strategies for the biosynthesis of ergothioneine. *J Agric Food Chem*, 2021, 69(46): 13682-13690
- [17] 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
- [18] Naowarojna N, Irani S, Hu W, 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
- [19] Yang X, Lin S, Lin J, et al. The biosynthetic pathway of ergothioneine in culinary-medicinal winter mushroom, *Flammulina velutipes* (Agaricomycetes). *Int J Med Mushrooms*, 2020, 22(2): 171-181
- [20] Yen MT, Chang YH, Huang SJ, et al. Extraction of ergothioneine from *Pleurotus eryngii* and *P. citrinopileatus* (Agaricomycetes) and preparation of its product. *Int J Med Mushrooms*, 2018, 20(4): 381-392
- [21] Goncharenko KV, Vit A, Blankenfeldt W, et al. Struktur der sulfoxid-synthase egtb aus der ergothionein-biosynthese. *Angew Chem*, 2015, 127(9): 2863-2866
- [22] 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
- [23] Bao HND, Ushio H, Ohshima T. Antioxidative activity and antidiscoloration efficacy of ergothioneine in mushroom (*Flammulina velutipes*) extract added to beef and fish meats. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(21): 10032-10040
- [24] Nguyen TH, Nagasaka R, Ohshima T. Effects of extraction solvents, cooking procedures and storage conditions on the contents of ergothioneine and phenolic compounds and antioxidative capacity of the cultivated mushroom *Flammulina velutipes*. *Int J Food Sci Tech*, 2012, 47(6): 1193-1205
- [25] Ey J, Schömig E, Taubert D. Dietary sources and antioxidant effects of ergothioneine. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(16): 6466-6474
- [26] 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
- [27] Cremades O, Diaz-Herrero MM, Carbonero-Aguilar P, et al. White button mushroom ergothioneine aqueous extracts obtained by the application of enzymes and membrane technology. *Food Biosci*, 2015, 10: 42-47
- [28] Hunter G. A new test for ergothioneine upon which is based a method for its estimation in simple solution and in blood-filtrates. *Biochem J*, 1928, 22(1): 4-10
- [29] Carlsson J, Kierstan MPJ, Brocklehurst K. A convenient spectrophotometric assay for the determination of^t-ergothioneine in blood. *Biochem J*, 1974, 139(1): 237-242
- [30] Dubost NJ, Beelman RB, Peterson D, et al. Identification and quantification of ergothioneine in cultivated mushrooms by liquid chromatography-mass spectroscopy. *Int J Med Mushr*, 2006, 8(3): 215-222
- [31] Sotgia S, Pisanu E, Pintus G, et al. Plasma l-ergothioneine

- measurement by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis after a pre-column derivatization with 5-iodoacetamidofluorescein (5-IAF) and fluorescence detection. *PLoS One*, 2013, 8(7): e70374
- [32] Dubost N, Ou B, Beelman R. Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. *Food Chem*, 2007, 105(2): 727-735
- [33] Sotgia S, Zinellu A, Pintus G, et al. Quantification of L-ergothioneine in whole blood by hydrophilic interaction ultra-performance liquid chromatography and UV-detection. *J Sep Sci*, 2013, 36(6): 1002-1006
- [34] Wang LZ, Thuya WL, Toh DSL, et al. Quantification of L-ergothioneine in human plasma and erythrocytes by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, 2013, 48(3): 406-412
- [35] Kroepfl N, Marschall TA, Francesconi KA, et al. Quantitative determination of the sulfur-containing antioxidant ergothioneine by HPLC/ICP-QQQ-MS. *J Anal At Spectrom*, 2017, 32(8): 1571-1581
- [36] Horie Y, Goto A, Imamura R, et al. Quantification of ergothioneine in *Aspergillus oryzae*-fermented rice bran by a newly-developed LC/ESI-MS/MS method. *LWT*, 2020, 118: 108812
- [37] 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
- [38] Ito T, Kato M, Tsuchida H, et al. Ergothioneine as an anti-oxidative/anti-inflammatory component in several edible mushrooms. *FSTR*, 2011, 17(2): 103-110
- [39] Liu Q, Zhang W, Wang H, et al. Validation of a HILIC method for the analysis of ergothioneine in fermentation broth. *J Chromatogr Sci*, 2016, 54(6): 934-938
- [40] 许晟, 刘琦, 姜文侠, 等. 高效液相色谱分析真菌液态发酵产物中的麦角硫因. *食品工业科技*, 2018, 39(18): 238-243
- [41] 赵艳敏, 雷智东, 刘成航, 等. 高效液相色谱法测定多种真菌中麦角硫因含量. *食品研究与开发*, 2016, 37(2): 117-119
- [42] Turck D, Bresson JL, Burlingame B, 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. *EFS2*, 2017, 15(11): e05060
- [43] Nishida K, Kondo A. CRISPR-derived genome editing technologies for metabolic engineering. *Metab Eng*, 2021, 63: 141-147
- [44] Qiu Y, Zhu Y, Sha Y, et al. Development of a Robust *Bacillus amyloliquefaciens* Cell Factory for Efficient Poly (γ -glutamic acid) Production from Jerusalem Artichoke. *ACS Sustain Chem Eng*, 2020, 8(26): 9763-9774
- [45] Sha Y, Qiu Y, Zhu Y, et al. CRISPRi-based dynamic regulation of hydrolase for the synthesis of poly- γ -glutamic acid with variable molecular weights. *ACS Synth Biol*, 2020, 9(9): 2450-2459
- [46] Strecker J, Ladha A, Gardner Z, et al. RNA-guided DNA insertion with CRISPR-associated transposases. *Science*, 2019, 365(6448): 48-53
- [47] Nelson JW, Randolph PB, Shen SP, et al. Engineered pegRNAs improve prime editing efficiency. *Nat Biotechnol*, 2022, 40(3): 402-410
- [48] Graham SF, Chevallier OP, Kumar P, et al. Metabolomic profiling of brain from infants who died from sudden infant death syndrome reveals novel predictive biomarkers. *J Perinatol*, 2017, 37(1): 91-97
- [49] Shinozaki Y, Furuichi K, Toyama T, et al. Impairment of the carnitine/organic cation transporter 1–ergothioneine axis is mediated by intestinal transporter dysfunction in chronic kidney disease. *Kidney Int*, 2017, 92(6): 1356-1369
- [50] Cheah IK, Halliwell B. Could ergothioneine aid in the treatment of coronavirus patients? *Antioxidants*, 2020, 9(7): 595