



麦角硫因在游动放线菌底盘中的高效合成

刘震^{1#}, 常莹莹^{1#}, 邓子新², 刘天罡^{1,2*}

1 武汉大学药学院 组合生物合成与新药发现教育部重点实验室, 湖北 武汉 430071

2 上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240

刘震, 常莹莹, 邓子新, 刘天罡. 麦角硫因在游动放线菌底盘中的高效合成[J]. 微生物学报, 2024, 64(8): 2752-2767.
LIU Zhen, CHANG Yingying, DENG Zixin, LIU Tiangang. Efficient synthesis of ergothioneine in *Actinoplanes* sp.[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(8): 2752-2767.

摘要:【目的】麦角硫因是一种稀有的天然氨基酸类强抗氧化剂, 在机体内发挥着重要的生理功能, 并在食品、医药、化妆品领域得到广泛应用。然而, 传统的从蕈菇中提取和化学合成的方法存在收率低、成本高等问题, 本研究期望利用代谢工程改造, 提高游动放线菌(*Actinoplanes* sp.) HS 中麦角硫因的产量。【方法】首先通过生物信息学分析, 锁定了 *Actinoplanes* sp. HS 中可能参与麦角硫因合成的基因; 接着在大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)中进行异源表达, 进一步鉴定了这些基因的功能; 最后将鉴定功能的基因组合后在 *Actinoplanes* sp. HS 中进行高表达, 对突变株产量进行测定, 并通过在发酵培养基中添加不同浓度的前体, 探究其对发酵产量的影响。【结果】*Actinoplanes* sp. HS 中基因 BC03-04016、BC03-04015、BC03-04014、BC03-04013 所编码的酶可以合成麦角硫因前体组氨酸甜菜碱半胱氨酸亚砷(hercynine-cysteine-sulphoxide, HER-Cys-Sul), 基因 BC03-04046 和 BC03-04917 所编码的酶都具有裂解碳硫键的功能, 可以催化前体 HER-Cys-Sul 形成终产物麦角硫因。将编码麦角硫因合成的基因高表达后得到的突变株 YC313 和 YC314, 其麦角硫因产量分别达到 125 mg/L 和 108 mg/L, 较出发菌株 *Actinoplanes* sp. HS 分别提高至 2.9 倍和 2.5 倍。在发酵培养基中额外添加 0.35 g/L 的甲硫氨酸后, YC313 菌株的麦角硫因产量相较于原始培养基提高了 24%; 额外添加 10 g/L 的黄豆饼粉后, 相较于原始培养基麦角硫因产量提高了 19%。【结论】本研究对 *Actinoplanes* sp. HS 中麦角硫因合成的相关基因及其功能进行了鉴定, 通过代谢工程改造得到了两株麦角硫因高产菌株, 并进一步研究了前体供应对麦角硫因产量的影响, 为以游动放线菌为底盘生产麦角硫因提供了策略支持。

资助项目: 武汉合生科技有限公司创新研发基金(T20220101)

This work was supported by the Wuhan Hesheng Technology Co., Ltd. Innovation Fund (T20220101).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: liutg@whu.edu.cn

Received: 2024-01-08; Accepted: 2024-03-07; Published online: 2024-03-12

关键词: 麦角硫因; 游动放线菌; 高产菌株

Efficient synthesis of ergothioneine in *Actinoplanes* sp.

LIU Zhen^{1#}, CHANG Yingying^{1#}, DENG Zixin², LIU Tiangang^{1,2*}

1 Key Laboratory of Combinatorial Biosynthesis and Drug Discovery, Ministry of Education, School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei, China

2 State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: [Objective] Ergothioneine, a rare natural amino acid, is a powerful antioxidant with important physiological functions in the body. It has been widely used in the fields of food, medicine, and cosmetics. However, extracting ergothioneine from mushrooms and chemical synthesis suffer from low yields and high costs. This study aims to use metabolic engineering approaches to improve the yield of ergothioneine in *Actinoplanes* sp. HS. **[Methods]** Firstly, we locked onto the genes potentially involved in ergothioneine synthesis in *Actinoplanes* sp. HS by bioinformatics analysis. Then, we identified the functions of these genes by heterologous expression in *Escherichia coli* BL21(DE3). Finally, the identified functional genes were combined and overexpressed in *Actinoplanes* sp. HS, and the yields of ergothioneine in the mutant strains were measured. By adding different concentrations of precursors to the fermentation medium, we investigated the impact of precursor concentration on the yield of ergothioneine. **[Results]** The enzymes encoded by *BC03-04016*, *BC03-04015*, *BC03-04014*, and *BC03-04013* in *Actinoplanes* sp. HS could synthesize the ergothioneine precursor hercynine-cysteine-sulphoxide (HER-Cys-Sul). The enzymes encoded by *BC03-04046* and *BC03-04917* had the function of cleaving carbon-sulfur bonds, which could catalyze the formation of the final product ergothioneine from HER-Cys-Sul. The mutant strains YC313 and YC314 obtained through overexpression of genes in ergothioneine synthesis showed ergothioneine yields of 125 mg/L and 108 mg/L, respectively, which were 2.9 times and 2.5 times that of the wild-type strain *Actinoplanes* sp. HS. Additional supplementation of 0.35 g/L methionine in the fermentation medium increased the ergothioneine yield of YC313 by 24% compared with that in the original medium, and the addition of 10 g/L soybean meal resulted in a 19% increase in the ergothioneine yield. **[Conclusion]** In this study, we identified the genes and their functions in ergothioneine synthesis in *Actinoplanes* sp. HS and obtained two strains with high yields of ergothioneine through metabolic engineering. Furthermore, we investigated the impact of precursor supply on the yield of ergothioneine, which provided strategic support for the production of ergothioneine by *Actinoplanes* sp.

Keywords: ergothioneine; *Actinoplanes* sp.; high-yield strains

麦角硫因(ergothioneine, EGT), 即 2-巯基组氨酸三甲基甜菜碱, 是一种由组氨酸衍生而来的

含硫非蛋白源氨基酸^[1], 1909 年首次由 Charles Tanret 在研究麦角菌(*Claviceps purpurea*)时发

现^[2]。在包括人类在内的哺乳动物体内，其优先分布在肝脏、肾脏、红细胞、眼晶状体等易受高水平氧化应激和炎症影响的器官、细胞和分泌物中^[3]。麦角硫因具有抗氧化、抗炎、抵抗紫外线辐射、护色等生理功能，同时也是一种重要的细胞生理保护剂^[4]，被推荐为十大延年益寿的维生素之一^[5]，其在食品、医药以及化妆品等领域有着广泛的应用。

人体不能够直接合成麦角硫因，只能通过特定的选择性转运蛋白从饮食中摄取并输送到各组织中^[6]。目前麦角硫因主要通过3种方式获取：化学合成、食用菌提取和微生物发酵。其中化学合成法不仅工艺复杂，而且常常导致局部或全部的外消旋化，这无疑增加生产成本，而且容易产生带毒性的杂质，从而无法保障产品安全性^[7]；

而利用食用菌提取也存在着麦角硫因含量低、提取过程困难、生产周期长、成本高等问题^[8]。工程菌株的构建和微生物发酵生产的方法，因其具有高产量且成本低的优点，已成为当前的研究热点。自然界中，麦角硫因可由蕈菌^[9]、蓝藻细菌^[10]、裂殖酵母^[11]、放线菌^[12]和甲基杆菌^[11]等天然合成。多种微生物的麦角硫因生物合成途径已被鉴定，主要可分为以耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)为代表的细菌途径和以粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)为代表的真菌途径^[13-14]。如图1所示，在真菌中，麦角硫因的生物合成仅需要 Egt1 和 Egt2 两个酶，其中 Egt1 作为一种双功能酶，可以催化 S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosylmethionine, SAM)上的甲基转移至 L-组氨酸，合成 L-组氨酸甜菜碱(L-hercynine, HER)^[15]，

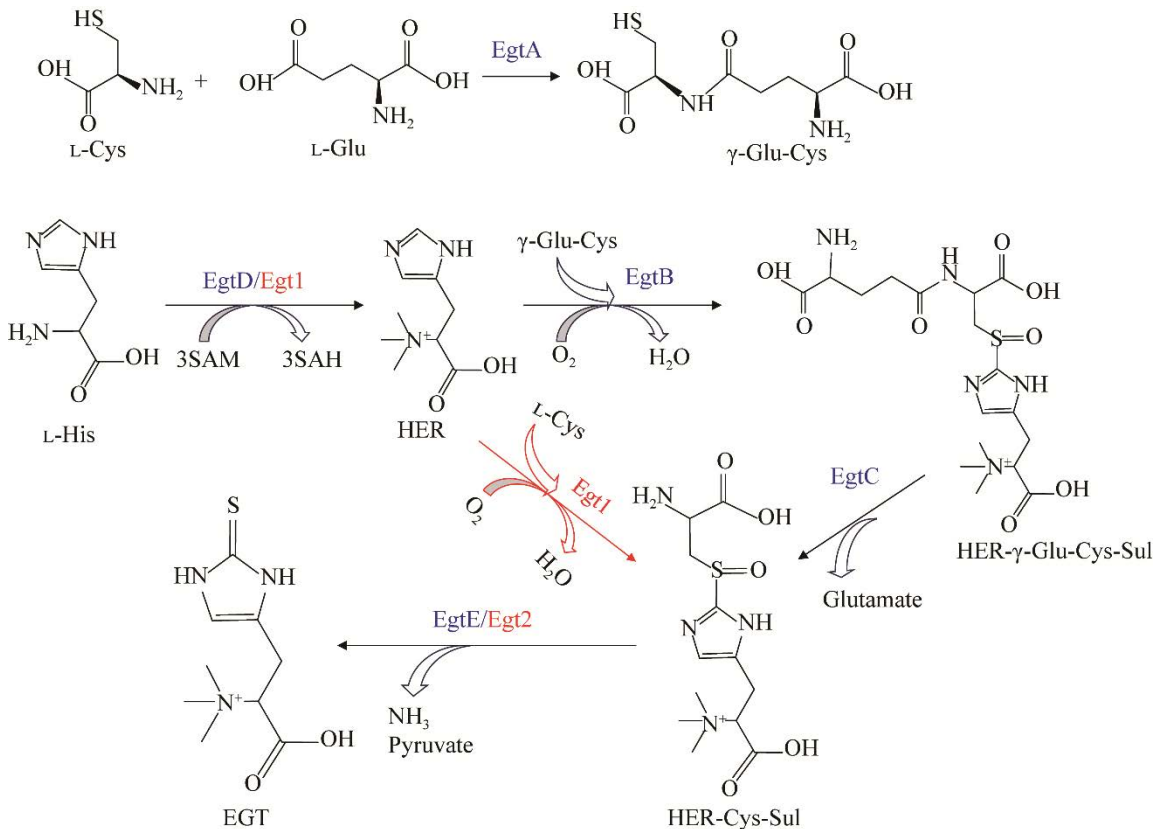


图1 麦角硫因生物合成途径^[13-14]

Figure 1 Ergothioneine biosynthesis pathway^[13-14].

随后继续催化 HER 与半胱氨酸间 C-S 键的生成, 形成组氨酸甜菜碱半胱氨酸亚砷(hercynine-cysteine-sulphoxide, HER-Cys-Sul)^[16], Egt2 裂解 HER-Cys-Sul 中的 C-S 键, 得到终产物麦角硫因^[11]。在 *M. smegmatis* 中, 麦角硫因的生成需要五步酶催化反应, 这些酶由基因簇 *egtABCDE* 编码: EgtD 以 S-腺苷甲硫氨酸作为甲基供体将 L-组氨酸甲基化形成 HER; EgtA 将谷氨酸与半胱氨酸连接合成 γ -谷氨酰半胱氨酸(γ -glutamyl-cysteine, γ -Glu-Cys); EgtB 是一种单核非血红素铁酶, 以 γ -Glu-Cys 为硫供体, 可将 HER 转化为海西烯基- γ -谷氨酰半胱氨酸亚砷(hercynine- γ -glutamyl-cysteine-sulphoxide, HER- γ -Glu-Cys-Sul); 之后, 谷氨酰胺酰胺水解酶 EgtC 除去 HER- γ -Glu-Cys-Sul 中的 L-谷氨酸部分, 生成 HER-Cys-Sul; 最后 HER-Cys-Sul 在磷酸吡哆醛依赖的碳硫裂解酶 EgtE 的作用下, 裂解 C-S 键, 形成终产物麦角硫因^[17]。

根据其合成途径, 研究者们通过代谢工程手段, 实现了麦角硫因在不同底盘菌株中的合成与高产。Pluskal 等^[11]通过高表达 Egt1, 使粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)中麦角硫因产量提升至 368 mg/L。van der Hoek 等^[18]对酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的氨基酸代谢途径进行了设计, 并在该工程菌株中组合表达了麦角硫因合成途径, 采用不添加氨基酸的补料分批发酵培养, 160 h 麦角硫因的发酵产量可达 2.4 g/L。Xiong 等^[19]在新金色分枝杆菌(*Mycobacterium neoaurum*)中通过增加前体 L-组氨酸和甲基供体 S-腺苷甲硫氨酸的供应, 以及对麦角硫因降解酶进行失活, 使得麦角硫因的产量提高到 1.56 g/L。Hirasawa 等^[20]将耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)的 EgtDE 和甲基杆菌属(*Methylobacterium* sp.)的 EgtB 在谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)中进

行表达, 发酵 2 周后, 其生产水平达到 100 mg/L 以上。另外, 在解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)中表达来源于粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)的生物合成酶 Egt1 和麦角菌(*Claviceps purpurea*)的 Egt2 后, 在 1 L 生物反应器中进行磷酸盐限制补料分批发酵, 220 h 内产量达到 1.63 g/L^[21]。Zhang 等^[22]将一个组合的麦角硫因合成途径引入到大肠杆菌(*Escherichia coli*)中, 并对参与麦角硫因合成的关键酶进行修饰, 在 5 L 生物反应器中进行补料分批发酵, 在添加氨基酸和甘油培养 94 h 后, 麦角硫因产量达到 5.4 g/L。

虽然在这些底盘菌株中通过引入麦角硫因合成过程中的相关基因, 实现了麦角硫因的异源合成, 但相比于异源表达, 以能天然合成麦角硫因的菌株为底盘构建高产菌株, 更有望突破底物耐受性的限制, 在产量上有更高的提升空间。基于此, 本研究以一种能够内源合成麦角硫因且生物安全性较高的游动放线菌(*Actinoplanes* sp.) HS 为底盘, 在 *E. coli* BL21 中异源表达, 鉴定了其中的麦角硫因生物合成酶, 并增加其对应合成基因的拷贝数, 得到突变株 YC313 和 YC314, 其麦角硫因产量相较于出发菌株有了明显提升, 此外也探究了在发酵过程中不同前体的添加对产量的影响。这为以放线菌为底盘生产麦角硫因的工业化应用提供了支持, 也为通过增加前体供应进一步提高麦角硫因产量的改造策略提供了指导。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

本研究所用的菌株、质粒和引物分别如表 1 和表 2 所示。*Actinoplanes* sp. HS 为本实验室来源的一株能够内源合成麦角硫因的游动放线菌, 其保藏编号为 CCTCC No: M 2022390。

表 1 本研究所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Name	Description
Strains	
<i>Actinoplanes</i> sp. HS	Wild-type
ET12567-pUZ8002	<i>recF</i> , <i>dam</i> , <i>dcm</i> , <i>hsdS</i> , for intergeneric conjugation
<i>Escherichia coli</i> BL21 Star TM (DE3)	<i>F⁻ dcm ompT hsdS (rB⁻ mB⁻) galλ (DE3)</i>
YC300	<i>E. coli</i> BL21(DE3) with plasmid pETDuet-1
YC301	<i>E. coli</i> BL21(DE3) with plasmid pCIL001
YC303	<i>E. coli</i> BL21(DE3) with plasmid pCIL003
YC308	<i>E. coli</i> BL21(DE3) with plasmid pCIL008
YC313	Integrated the plasmid pCIL013 in the genome of <i>Actinoplanes</i> sp. HS
YC314	Integrated the plasmid pCIL014 in the genome of <i>Actinoplanes</i> sp. HS
Plasmids	
pETDuet-1	Protein expression vectors for <i>E. coli</i>
pBBR1MCS-2	Protein expression vectors for <i>E. coli</i>
pSET152	<i>E. coli</i> replicon, <i>att</i> , <i>oriT</i> , <i>aac(3)IV</i>
pIB139	<i>E. coli</i> replicon, <i>att</i> , <i>oriT</i> , <i>aac(3)IV</i> , <i>ermE</i> *
pCIL001A	pETDuet-1 carries <i>BC03-04016-BC03-04015</i> under the control of T7 promoter
pCIL001	pCIL001A carries <i>BC03-04014-BC03-04013</i> under the control of T7 promoter
pCIL003	pBBR1MCS-2 carries <i>BC03-04046</i> under the control of T3 promoter
pCIL008	pBBR1MCS-2 carries <i>BC03-04917</i> under the control of T3 promoter
pCIL013	pSET152 carries <i>BC03-04016-BC03-04015-BC03-04014-BC03-04013</i> under the control of <i>ermE</i> * promoter and <i>BC03-04046</i> under the control of <i>ermE</i> * promoter
pCIL014	pSET152 carries <i>BC03-04016-BC03-04015-BC03-04014-BC03-04013</i> under the control of <i>ermE</i> * promoter and <i>BC03-04917</i> under the control of <i>ermE</i> * promoter

1.1.2 培养基

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0, 用于 *E. coli* 培养。

LA 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0, 琼脂粉 20.0, 用于 *E. coli* 平板培养。

SFM 固体培养基(g/L): 黄豆饼粉 20.0, 甘露醇 20.0, 琼脂 16.0, pH 7.2, 用于 *Actinoplanes* sp. HS 平板培养。

种子培养基(g/L): 葡萄糖 10.0, 黄豆饼粉 40.0, 甘油 10.0, 可溶性淀粉 10.0, CaCO₃ 2.0, pH 7.0, 用于 *Actinoplanes* sp. HS 及其突变株种子培养。

发酵培养基(g/L): 麦芽糖 30.0, 葡萄糖 30.0,

黄豆饼粉 10.0, 酵母粉 3.0, K₂HPO₄·3H₂O 1.0, FeCl₃ 1.5, CaCl₂ 2.5, CaCO₃ 2.5, pH 6.5, 用于 *Actinoplanes* sp. HS 及其突变株发酵。

大肠杆菌发酵培养基(g/L): 葡萄糖 20.0, 酵母提取物 2.0, (NH₄)₂SO₄ 16.0, Na₂HPO₄·12H₂O 16.0, KH₂PO₄ 3.0, MgSO₄ 0.6, CaCl₂ 0.01, pH 6.8–7.0, 用于 *E. coli* 发酵。

1.2 基因组测序及分析

Actinoplanes sp. HS 全基因组测序由武汉未来组生物科技有限公司使用 PromethION 测序平台完成, 测序了 1 个 cell, 质控后的数据用 flye (参数: --nano-raw) 进行组装后, 用 racon (参数: default) 结合三代测序数据进行矫正, 用 pilon (参数: default) 和 nextpolish (参数: default) 结合二

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primers name	Primer Sequences (5'→3')
Primer 1	TTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCATGAGTTCGGCCGATCGAGTGC
Primer 2	CATGGTTAATTCTCCTTCATCGAGCGTTCCCTTC
Primer 3	TGAAGGAGGAATTAACCATGATCAACCCCGACAAGAACCTG
Primer 4	CCTGCAGGCGCGCCGAGCTCGAATTCGGATCCTCAGACGAGCTCCCGCGCGCACCG
Primer 5	AAGTATAAGAAGGAGATATACATATGTGCCGCCACCTGGCCTACC
Primer 6	TCATAGTGTAATCCTCCTTCACAGCTCTCCTAATTCCACCG
Primer 7	TGAAGGAGGATTACACTATGACTTCGCTGGAGAAGCATC
Primer 8	GCAGCGTTTTCTTTACCAGACTCGAGTCAATCAGTGACGGCCTGGGCCAGGGAG
Primer 9	CGCCATATGGAGCTCCAATTCGCCCTATAG
Primer 10	CGCCATATGGGTAAATTCCTCCTACTGCAGG
Primer 11	ACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCTACAACGGCTTGGTGACCATGGCGCTG
Primer 12	TGCAGTAGGAGGAATTAACCCATATGATGGACGTCGACGCACTCCGGGCCGGCAC
Primer 13	ACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCCTACCACTGCCAGTGGTGCAGC
Primer 14	TGCAGTAGGAGGAATTAACCCATATGATGAGCGCCGAAGATCCACC
Primer 15	CGGCCAGTGCCAAGCTTGGGCTGCAGGTCGACTCTAGAGCGAGTGTCCGTTTCGAGTGGC
Primer 16	CGGCTCCCCGCGCACTCGATCGGCCGAATCATTGGATCCTACCAACCGGCACGATTG
Primer 17	CTGTTGTGGGCACAATCGTGCCGGTTGGTAGGATCCAATGAGTTCGGCCGATCGAGTGC
Primer 18	TCGGGCGCAAGCCGCCACTCGAACGGACACTCGCTCAATCAGTGACGGCCTGGGCCAGG
Primer 19	GGCCCAGGCCGTCACTGATTGAGCGAGTGTCCGTTTCGAGTGGCGGCTTTCGCCCGATGC
Primer 20	CAGCCCGGAGTGCCGGCCGGAGTGCCTGACGTCCTATTGGATCCTACCAACCGGCACG
Primer 21	GGGCACAATCGTGCCGGTTGGTAGGATCCAATGGACGTCGACGCACTCCGGGCCGGCAC
Primer 22	ACAGCTATGACATGATTACGAATTCGATATCTACAACGGCTTGGTGACCATGGCGCTG
Primer 23	CGGCAATGGGCTGCGGTGGATCTTCGGCGCTCATTGGATCCTACCAACCGGCACGATTG
Primer 24	TTGTGGGCACAATCGTGCCGGTTGGTAGGATCCAATGAGCGCCGAAGATCCACCGCAGC
Primer 25	CAGGAAACAGCTATGACATGATTACGAATTCGATATCCTACCACTGCCAGTGGTGCAGC
Primer 26	ACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCTCAGCCGAACACCTTCCGCACC
Primer 27	TGCAGTAGGAGGAATTAACCCATATGATGAGCTACGACGTCGCGCGGGTGCGCAAAG
Primer 28	ACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCTCAGAACCCGGCCTCCTTCCGGATC
Primer 29	TGCAGTAGGAGGAATTAACCCATATGGTGGATTACACAGGCGATCCGCCGGTC
Primer 30	GACGAATTCCTGCAGTAGGAGGAATTAACCCATATGATGGCCTACCTCGATCATGCG
Primer 31	GACGAGCTCCTAACGGGGCGTCTTCCAGGACCCCGCCGTCG
Primer 32	ACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCTCAGGAGCGAACTGTGTCCGCCAG
Primer 33	TGCAGTAGGAGGAATTAACCCATATGATGTCGGCTCTCGACATCGTCGGCGACG

代测序数据进行校正。编码基因用 *prodigal* (参数: -p None-g 11) 进行预测, 保留完整的编码序列(coding sequence, CDS)。利用直系同源基因簇(clusters of orthologous genes, COG)、京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)、基因本体论(gene ontology,

GO)、美国国家生物技术信息中心参考序列数据库(NCBI reference sequence database)、蛋白质家族数据库(protein families database)和基因组研究所蛋白质家族数据库(the institute for genomic research's database of protein families, TIGRFAMs)对编码蛋白进行功能注释。使用 *antiSMASH 3.0* 软件预测

次级代谢产物合成基因簇。

1.3 质粒构建

pCIL001A 质粒构建：以 pETDuet-1 质粒作为载体，使用 *Nco* I/*Eco*R I 双酶切得到片段化载体，以 *Actinoplanes* sp. HS 菌株基因组为模板，以 Primer 1/Primer 2 为引物扩增得到片段 BC03-04016，以 Primer 3/Primer 4 为引物扩增得到片段 BC03-04015，上述片段化载体和 2 个扩增片段使用多片段一步法快速克隆试剂盒(上海翊圣生物科技有限公司)进行组装，通过菌落 PCR 验证以及酶切验证后，将构建好的质粒进行测序，测序结果正确即 pCIL001A 质粒构建成功。

pCIL001 质粒构建：以 pCIL001A 质粒作为载体，使用 *Nde* I/*Xho* I 双酶切得到片段化载体，以 *Actinoplanes* sp. HS 菌株基因组为模板，以 Primer 5/Primer 6 为引物扩增得到片段 BC03-04014，以 Primer 7/Primer 8 为引物扩增得到片段 BC03-04013，上述片段化载体和 2 个扩增片段使用多片段一步法快速克隆试剂盒(上海翊圣生物科技有限公司)进行组装，通过菌落 PCR 验证以及酶切验证后，将构建好的质粒进行测序，测序结果正确即 pCIL001 质粒构建成功。

pCIL003-pCIL008 质粒构建：以 pBBR1MCS-2 质粒作为载体，使用 Primer 9/Primer 10 为引物扩增得到载体片段后，使用 *Nde* I/*Sac* I 双酶切，得到片段化的载体片段。以 *Actinoplanes* sp. HS 菌株基因组为模板，分别以 Primer 11/Primer 12、Primer 26/Primer 27、Primer 28/Primer 29、Primer 30/Primer 31、Primer 32/Primer 33、Primer 13/Primer 14 为引物扩增得到片段 BC03-04046、BC03-00348、BC03-00103、BC03-05049、BC03-00781、BC03-04917，上述片段化载体分别与 6 个扩增片段使用多片段一步法快速克隆试剂盒(上海翊圣生物科技有限公司)进行组装，

通过菌落 PCR 验证以及酶切验证后，将构建好的质粒进行测序，测序结果正确即得到质粒 pCIL003、pCIL004、pCIL005、pCIL006、pCIL007、pCIL008。

pCIL013 质粒构建：以 pSET152 质粒作为载体，使用 *Xba* I/*Eco*32 I 双酶切得到片段化的载体片段，标记为 152-XE，以 pIB139 质粒为模板，Primer 15/Primer 16 为引物扩增得到启动子片段 *ermE**(1)，以 *Actinoplanes* sp. HS 菌株基因组为模板，Primer 17/Primer 18 为引物扩增得到片段 BC03-04016-BC03-04015-BC03-04014-BC03-04013；以 pIB139 质粒为模板，Primer 19/Primer 20 为引物扩增得到启动子片段 *ermE**(2)，以 *Actinoplanes* sp. HS 菌株基因组为模板，Primer 21/Primer 22 为引物扩增得到片段 BC03-04046，上述扩增片段 *ermE**(1)和 BC03-04016-BC03-04015-BC03-04014-BC03-04013 使用 Primer 15/Primer 18 引物进行重叠延伸 PCR (overlap extension polymerase chain reaction, OE-PCR)，得到拼接片段 *ermE**-BC03-04016-BC03-04015-BC03-04014-BC03-04013，标记为 K16-13，扩增片段 *ermE**(2)和 BC03-04046 使用 Primer 19/Primer 22 引物进行 OE-PCR 得到拼接片段 *ermE**-BC03-04046，标记为 E-46。上述片段 152-XE、K16-13 和 E-46 使用多片段一步法快速克隆试剂盒(上海翊圣生物科技有限公司)进行组装，通过菌落 PCR 验证以及酶切验证后，将构建好的质粒进行测序，测序结果正确即 pCIL013 质粒构建成功。

pCIL014 质粒构建：以 pIB139 质粒为模板，Primer 19/Primer 23 为引物扩增得到启动子片段 *ermE**(3)，以 *Actinoplanes* sp. HS 菌株基因组为模板、Primer 24/Primer 25 为引物扩增得到片段 BC03-04917，上述扩增片段 *ermE**(3)和 BC03-04917 使用 Primer 19/Primer 25 引物进行

OE-PCR 得到拼接片段 *ermE**-BC03-04917, 标记为 E-17。上述片段 152-XE、K16-13 和 E-17 使用多片段一步法快速克隆试剂盒(上海翊圣生物科技有限公司)进行组装, 通过菌落 PCR 验证以及酶切验证后, 将构建好的质粒进行测序, 测序结果正确即 pCIL014 质粒构建成功。

1.4 突变株构建

1.4.1 *E. coli* BL21(DE3)中异源表达菌株的获得

取适量 *E. coli* BL21(DE3)甘油菌于 LA 平板分离单菌落, 挑取单菌落于 10 mL LB 培养基中, 37 °C、220 r/min 振荡培养过夜, 以 1%转接量转接至 200 mL LB 培养基中, 37 °C、220 r/min 振荡培养至 OD_{600} 为 0.4–0.6, 收集菌液, 冰上预冷 10 min, 4 °C、3 500 r/min 离心 10 min, 去上清, 加 30 mL CCC1 溶液(30 mmol/L KAc, 80 mmol/L CaCl₂, pH 值约 5.8)重悬, 4 °C、3 500 r/min 离心 10 min, 去上清, 将细胞重悬于 30 mL CCC1 中, 冰浴 1–2 h, 4 °C、3 500 r/min 离心 10 min, 去上清, 将细胞重悬于 6 mL CCC2 (CCC1+10% 甘油)中, 每个 1.5 mL 无菌离心管中分装 70 μ L, 液氮速冻, 即得 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞。

将 pCIL001 和 pETDuet-1 分别通过钙转法转化入 *E. coli* BL21(DE3)感受态中, 得到菌株 YC301 和 YC300, 其中, YC301 为异源表达菌株, YC300 为对照菌株。

取上述得到的 YC301 菌株的甘油菌于含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LA 平板分离单菌落, 挑取单菌落于 10 mL 含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37 °C、220 r/min 振荡培养过夜。以 1%转接量转接至 200 mL 含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37 °C、220 r/min 振荡培养至 OD_{600} 为 0.4–0.6, 收集菌液, 后续 YC301 菌株感受态细胞制备过程同 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞制备过程。

将构建的 pCIL003、pCIL008 质粒分别通过钙转法转化入至 YC301 菌株感受态中, 得到菌株 YC303 和 YC308。

1.4.2 *Actinoplanes* sp. HS 中高表达菌株的获得

pCIL013、pCIL014 质粒测序验证正确后, 分别转化至 ET12567-pUZ8002 菌株中, 挑取单克隆于含有 50 μ g/mL 安普霉素、50 μ g/mL 卡那霉素、25 μ g/mL 氯霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C、220 r/min 培养过夜, 过夜培养菌液以 1/100 (体积比)转接至 4 mL 含 50 μ g/mL 安普霉素、50 μ g/mL 卡那霉素、25 μ g/mL 氯霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C、220 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.6–0.8, 离心收集菌体, 等体积无抗 LB 液体培养基洗涤菌体 3 次后, 用 100 μ L 无抗 LB 液体培养基重悬, 得大肠杆菌悬浮液, 作为供体菌。收集 SFM 固体培养基 28 °C 培养 7 d 的 *Actinoplanes* sp. HS 菌体, 30 mL LB 液体培养基洗涤菌体 2 次, 3 mL 无抗 LB 液体培养基重悬, 作为受体菌。

将上述 100 μ L 供体菌和 100 μ L 受体菌悬液混合, 均匀涂布于含有 10 mmol/L MgCl₂ 的 SFM 固体培养基上, 28 °C 培养 16–18 h, 使用安普霉素(25 μ g/mL)和甲氧苄啶(40 μ g/mL)覆盖平板, 28 °C 继续培养 7 d, 长出的接合子于含有 50 μ g/mL 安普霉素的 SFM 固体培养基上分离单菌落, 单菌落涂布于含有 50 μ g/mL 安普霉素的 SFM 平板上, 长出的菌落取适量于 50 μ L ddH₂O 中, 沸水煮 5 min 后冰浴 5 min, 重复 3 次, 短暂离心后取上清液进行 PCR 验证, 验证正确突变株命名为 YC313 和 YC314。

1.5 菌株发酵

1.5.1 *E. coli* BL21(DE3)中异源表达菌株发酵

取 YC300、YC301 菌株分别于含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LA 平板分离单菌落, 分别挑取其单克隆于 10 mL 含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素

的 LB 液体培养基中, 37 °C、220 r/min 培养过夜, 以 1% 转接量转接至 50 mL 含有 100 µg/mL 氨苄青霉素的大肠杆菌发酵培养基中, 37 °C、220 r/min 培养至 OD_{600} 值约为 0.8, 加入终浓度 0.2 mmol/L 的 IPTG 诱导, 改变温度至 25 °C、220 r/min 继续培养 120 h。

YC303、YC308 菌株分别于含有 100 µg/mL 氨苄青霉素和 50 µg/mL 卡那霉素的 LA 平板分离单菌落, 分别挑取其单克隆于 10 mL 含有 100 µg/mL 氨苄青霉素和 50 µg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C、220 r/min 培养过夜, 以 1% 转接量转接至含有 100 µg/mL 氨苄青霉素和 50 µg/mL 卡那霉素的发酵培养基(同 YC301 菌株的发酵培养基)中, 37 °C、220 r/min 培养至 OD_{600} 值约为 0.8, 加入终浓度 0.2 mmol/L IPTG 诱导, 改变温度至 25 °C、220 r/min 继续培养 120 h, 在诱导后 24、48 和 120 h 取样。

1.5.2 *Actinoplanes* sp. HS 及突变株发酵

取 *Actinoplanes* sp. HS 的甘油菌于 SFM 固体培养基分离单菌落, 28 °C 培养 5–7 d, 单菌落长出后, 挑取单菌落于 SFM 固体培养基上涂板培养, 28 °C 培养 7 d。从生长 7 d 的 SFM 固体培养基上刮取菌体(1.5 cm×1.5 cm)接入 25 mL 种子培养基中, 28 °C、250 r/min 振荡培养 48 h, 将生长 48 h 的种子液, 取 2.5 mL 接入 25 mL 发酵培养基中, 28 °C、250 r/min 振荡培养 7 d, 获得发酵液。

1.6 产量检测

1.6.1 发酵液中产物鉴定

大肠杆菌发酵液产物检测: 取菌株 120 h 发酵液 1 mL, 10 000 r/min 离心 5 min, 所得上清液使用 0.22 µm 滤膜过滤后直接进行高效液相色谱-高分辨质谱 (high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry, HPLC-HRMS) 检测, 菌体使用 1 mL 50% 乙腈重悬, 600 W 超声破碎 30 min 后, 10 000 r/min 离

心 5 min, 所得上清液使用 0.22 µm 滤膜过滤后进行 HPLC-HRMS 检测。

放线菌发酵液产物检测: 取发酵 7 d 后的发酵液 5 mL, 加入 5 mL 纯乙腈, 混合均匀, 600 W 超声破碎 30 min, 4 000 r/min 离心 15 min, 所得上清液稀释 10 倍后使用 0.22 µm 滤膜过滤并使用 HPLC-HRMS 进行检测。

HPLC-HRMS 检测方法: 色谱柱为 Thermo Scientific Hypersil GOLD aQ (150 mm×2.1 mm, 3 µm); 流动相: A 相为 0.1% 甲酸的水溶液, B 相为 0.1% 甲酸的乙腈溶液, 洗脱梯度: 0–1 min, A 相: B 相=99:1; 1–10 min, A 相 99%–10%, B 相 1%–90%; 10–15 min, A 相: B 相=10:90; 15–15.5 min, A 相 10%–99%, B 相 90%–1%; 15.5–20 min, A 相: B 相=99:1; 流速 0.2 mL/min; 进样体积 2 µL。

1.6.2 产物定量分析

发酵液中麦角硫因定量使用高效液相色谱-紫外可见分光光度检测器检测, 检测方法如下: 色谱柱为 Dionex Acclaim™ 120 C18 (250 mm×4.6 mm, 5 µm); 流动相: A 相为纯乙腈溶液, B 相为纯水溶液, 洗脱梯度: 0–15 min, A 相: B 相=3:97; 15–18 min, A 相 3%–100%, B 相 97%–0%; 18–19 min, A 相 100%, B 相 0%; 19–20 min, A 相 100%–0%, B 相 0%–97%; 20–30 min, A 相: B 相=3:97; 流速 0.8 mL/min; 进样体积 20 µL。用麦角硫因标准品(上海阿拉丁生化科技股份有限公司)绘制标准曲线进行定量。

2 结果与分析

2.1 *Actinoplanes* sp. HS 中麦角硫因合成酶的鉴定

2.1.1 基因筛选

研究指出 *egtABCDE* 组成的麦角硫因合成基因簇仅存在于放线菌门, 而且大部分属于弗兰克氏菌亚目和棒杆菌亚目的菌株含有 *EgtE* 同源

蛋白,属于小单孢菌亚目、丙酸杆菌亚目、假诺卡氏菌亚目、链霉菌亚目和链孢子囊亚目的菌株缺失 *egtE* 基因^[23]。以 *M. smegmatis* MC² 155 的麦角硫因合成基因 *egtABCDE* 为比对序列,使用交互的 BLASTp^[24]来搜索 *Actinoplanes* sp. HS 基因组中分别对应的可能同源蛋白,通过生物信息学预测分析,寻找到可能参与麦角硫因合成的酶的编码基因,如表 3 所示。*Actinoplanes* sp. HS 中具有 *egtA*、*egtB*、*egtC*、*egtD* 功能基因,这 4 个基因在 *Actinoplanes* sp. HS 基因组上成簇排列,其中 *BC03-04015* 和 *BC03-04013* 分别与 *egtB* 和 *egtD* 具有较高的同源性。然而通过比对,未发现与 *egtE* 功能完全一致的基因。

2.1.2 基因功能鉴定

为了进一步确定 *Actinoplanes* sp. HS 基因组中比对出的可能参与麦角硫因合成的基因的功能,将其在异源宿主 *E. coli* BL21(DE3)中进行了表达,随后进行了摇瓶发酵和产物测定。

首先对麦角硫因前体 HER-Cys-Sul 合成相关酶的功能进行了鉴定,将基因 *BC03-04016*、*BC03-04015*、*BC03-04014*、*BC03-04013* 克隆至载体 pETDuet-1 上得到质粒 pCIL001,进而将质

粒转入 *E. coli* BL21(DE3)中得到异源表达菌株 YC301,同时以空载体转化得到的菌株 YC300 作为对照。对这 2 个菌株进行发酵后用高分辨质谱检测产物,如图 2 所示。结果表明,对照菌株 YC300 不能合成中间体 HER-Cys-Sul,而异源表达 *BC03-04016*、*BC03-04015*、*BC03-04014*、*BC03-04013* 的菌株 YC301 可产生 HER-Cys-Sul,从而证实 *Actinoplanes* sp. HS 中基因 *BC03-04016*、*BC03-04015*、*BC03-04014*、*BC03-04013* 所编码的蛋白(酶)可以合成麦角硫因前体 HER-Cys-Sul。

麦角硫因合成的最后一步为 HER-Cys-Sul 在磷酸吡哆醛依赖的碳硫裂解酶 EgtE 的作用下,裂解 C-S 键^[20],并获得终产物麦角硫因。将比对到的 5 个候选基因 *BC03-04046*、*BC03-00348*、*BC03-00103*、*BC03-05049*、*BC03-00781*、*BC03-04917* 分别进行碳硫裂解酶的功能鉴定。将其分别克隆至载体 pBBR1MCS-2 上得到质粒 pCIL003、pCIL004、pCIL005、pCIL006、pCIL007、pCIL008,将质粒分别转入 YC301 中得到菌株 YC303、YC304、YC305、YC306、YC307、YC308,以 YC301 作为对照进行摇瓶发酵和产物测定。

表 3 *Actinoplanes* sp. HS 中基因比对

Table 3 Gene alignment in *Actinoplanes* sp. HS

Query ID	Subject ID	Subject description	Identity (%)
<i>egtA</i>	<i>BC03-04016</i>	Ergothioneine biosynthesis glutamate-cysteine ligase EgtA	40.45
<i>egtB</i>	<i>BC03-04015</i>	Ergothioneine biosynthesis protein EgtB	54.99
<i>egtC</i>	<i>BC03-04014</i>	Ergothioneine biosynthesis protein EgtC	43.15
<i>egtD</i>	<i>BC03-04013</i>	L-histidine N(alpha)-methyltransferase	60.44
<i>egtE</i>	<i>BC03-04046</i>	Aminotransferase class V-fold PLP-dependent enzyme	30.87
	<i>BC03-00348</i>	Cysteine desulfurase	25.65
	<i>BC03-00103</i>	Aminotransferase class V-fold PLP-dependent enzyme	46.15
	<i>BC03-05049</i>	Cysteine desulfurase	29.73
	<i>BC03-00781</i>	Aminotransferase class V-fold PLP-dependent enzyme	27.55
	<i>BC03-04917</i>	Aminotransferase class V-fold PLP-dependent enzyme	27.23

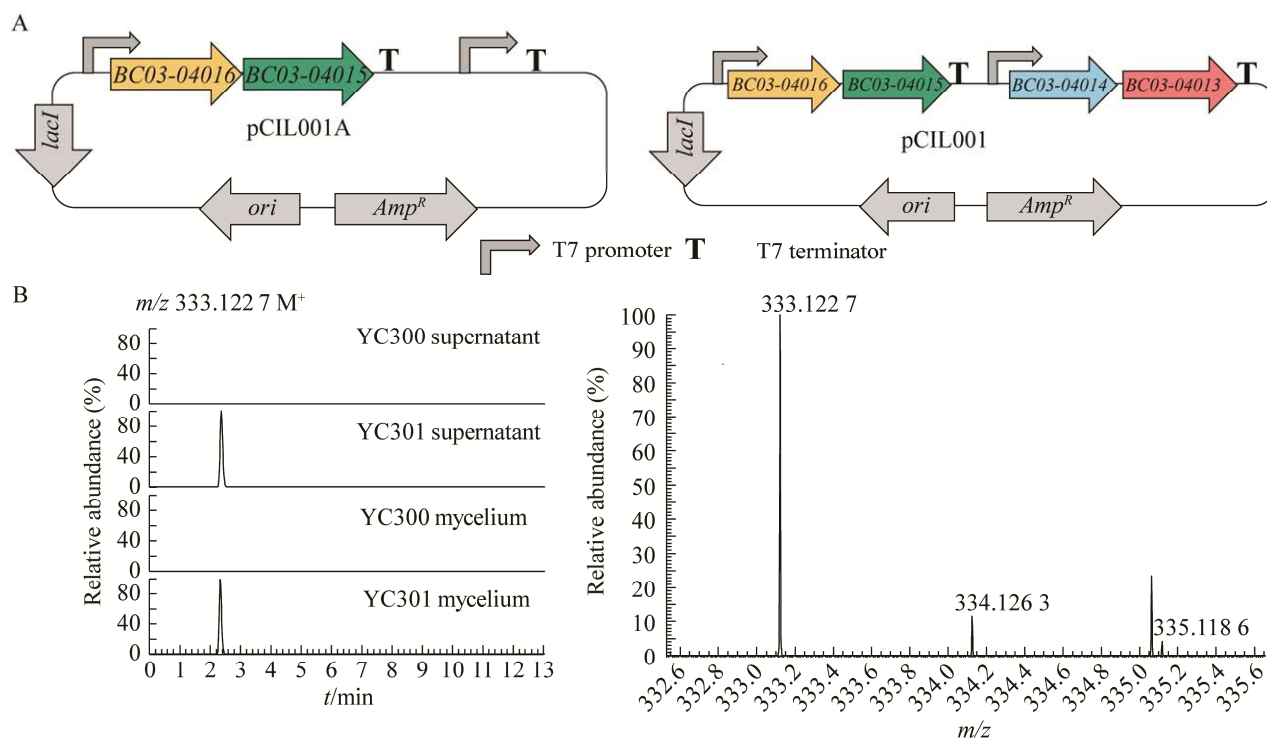


图 2 HER-Cys-Sul 合成基因质粒构建及异源表达菌株中产物检测

Figure 2 Plasmid construction of HER-Cys-Sul synthesis gene and detection of products in heterologous expression strain. A: Schematic diagram of the structure of plasmids pCIL001A and pCIL001. B: Accurate molecular weight extraction ion chromatograms of HER-Cys-Sul.

对发酵液上清和菌体中检测发现,在 YC301 菌株中表达 *BC03-04046* (YC303)、*BC03-04917* (YC308)后,中间体 HER-Cys-Sul 已检测不到,而在对照菌株 YC301 以及表达 *BC03-00348* (YC304)、*BC03-00103* (YC305)、*BC03-05049* (YC306)、*BC03-00781* (YC307)后仍可以检测到中间体 HER-Cys-Sul。通过二级质谱碎片比对,如图 3C 所示,表明 YC303 菌株和 YC308 菌株中生成了麦角硫因。YC303 菌株和 YC308 菌株中不同时间发酵液的上清液和菌体中麦角硫因含量如图 3D 所示, YC303、YC308 菌株发酵液中有麦角硫因积累。该结果表明基因 *BC03-04046* 和 *BC03-04917* 编码的酶具有碳硫裂解酶功能,可以催化前体 HER-Cys-Sul 形成麦角硫因。

2.2 麦角硫因高产菌株的获得

通过增加合成过程中关键基因的拷贝数是

提高天然化合物产量常用的改造策略之一,因此为有效提升麦角硫因产量,进行了 *Actinoplanes* sp. HS 中麦角硫因合成相关基因的高表达。将已鉴定的麦角硫因前体 HER-Cys-Sul 合成相关基因 *BC03-04016-BC03-04015-BC03-04014-BC03-04013* 与具有碳硫裂解酶功能的基因 *BC03-04046* 和 *BC03-04917* 分别组合后构建至载体 pSET152 上,得到质粒 pCIL013 和 pCIL014,然后使用两亲本接合转移通过 *attB/attP* 位点整合到 *Actinoplanes* sp. HS 中,得到高表达菌株 YC313 和 YC314。将其进行发酵并以 *Actinoplanes* sp. HS 作为对照,结果如图 4 所示, YC313、YC314 菌株麦角硫因产量分别达到 125 mg/L 和 108 mg/L,较出发菌株 *Actinoplanes* sp. HS 的麦角硫因产量(43 mg/L)分别提高至 2.9 倍和 2.5 倍。

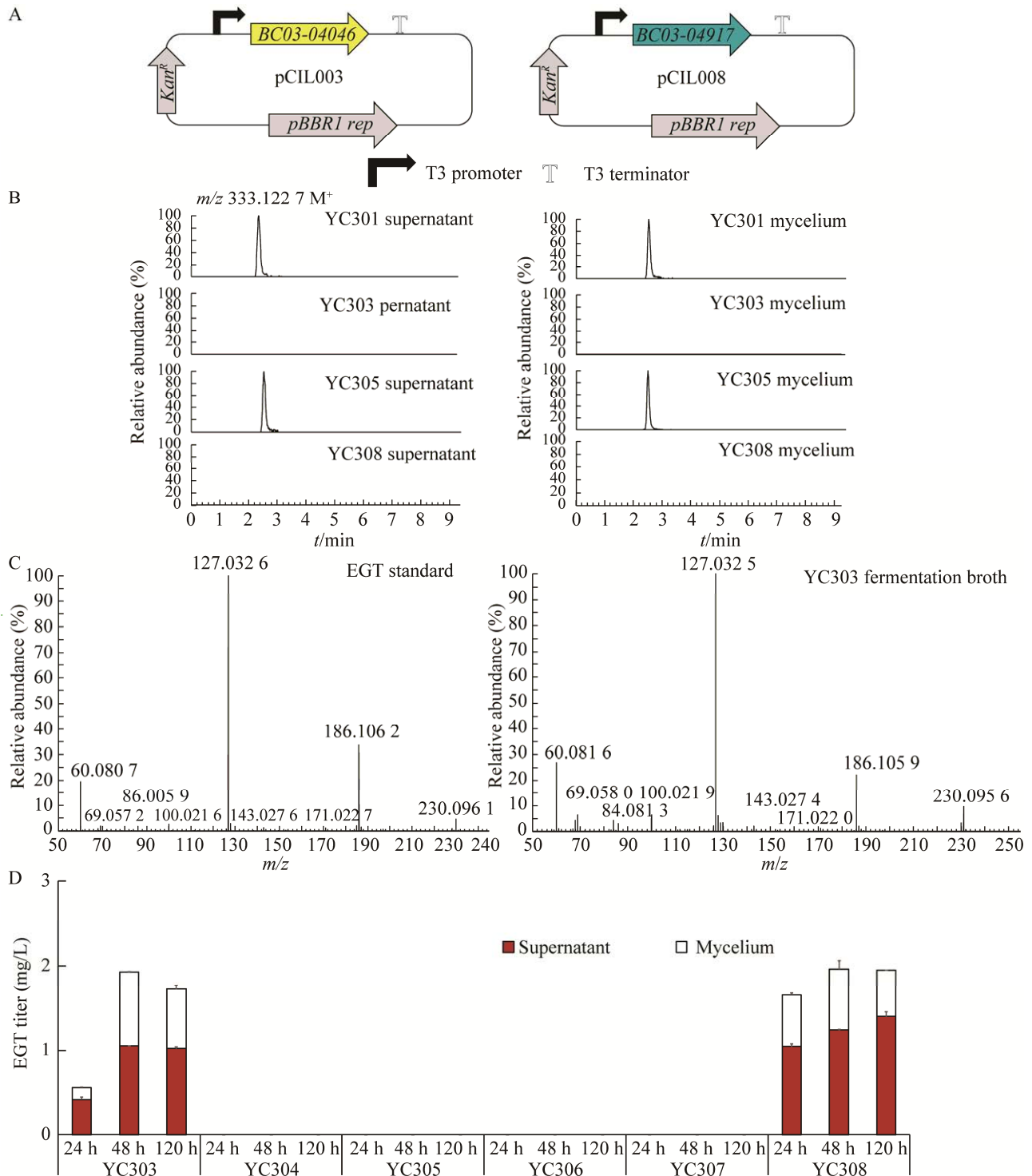


图 3 碳硫裂解酶基因质粒构建及异源表达菌株中产物检测

Figure 3 Plasmid construction of carbon-sulfur lyase gene and detection of products in heterologous expression strains. A: Schematic diagram of the structure of plasmids pCIL003 and pCIL008. B: Accurate molecular weight extraction ion chromatogram of HER-Cys-Sul in different mutant strains fermentation broth. C: Comparison of secondary mass spectrometry fragments from fermentation broth of YC303 strain and ergothioneine standard. D: Titer of ergothioneine in different mutant strains.

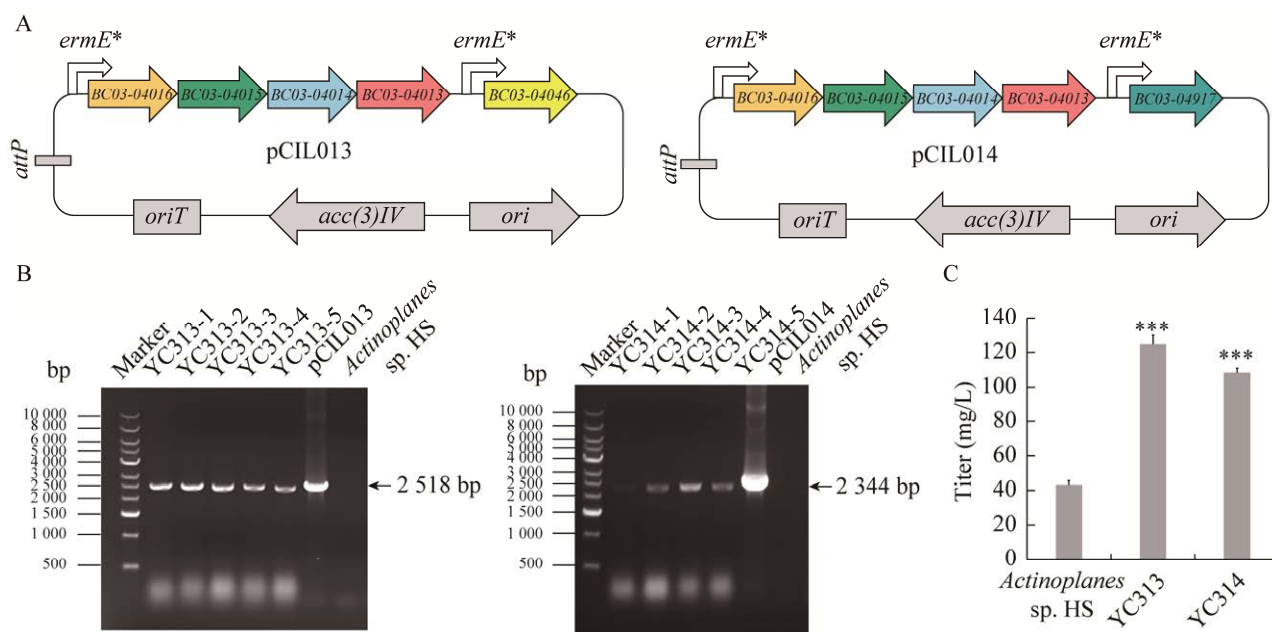


图 4 麦角硫因高产菌株的构建及突变株验证

Figure 4 Construction of ergothioneine high-yield strains and verification of mutant strains. A: Schematic diagram of overexpression plasmid construction. B: PCR verification of overexpression strains YC313 and YC314 agarose gel electrophoresis. C: Titer of overexpressed strains YC313 and YC314 with the original strains of ergothioneine. ***: $P < 0.001$.

2.3 前体及底物添加

组氨酸、半胱氨酸和甲硫氨酸是直接参与麦角硫因合成的重要氨基酸。此外，*O*-乙酰高丝氨酸(*O*-acetylhomoserine)是麦角硫因底物 SAM 和半胱氨酸的合成前体，在 *O*-乙酰高丝氨酸合成过程中，乙酰辅酶 A (acetyl coenzyme A, acetyl-CoA)起着关键作用，而泛酸又是合成辅酶 A (coenzyme A, CoA)过程中所必需的^[25]。基于此，尝试了在 *Actinoplanes* sp. HS 发酵培养基中添加不同浓度的麦角硫因合成前体组氨酸、半胱氨酸、甲硫氨酸以及泛酸钙，以探究 *Actinoplanes* sp. HS 中前体供应对麦角硫因产量的影响。以 2.2 获得的高产菌株 YC313 作为发酵菌株，以 1.1.2 中发酵培养基作为对照，在发酵 2 d 和 7 d 时分别测定发酵液产量，结果如图 5A 所示，在添加了半胱氨酸和甲硫氨酸后，7 d 产量均有了

一定程度的提升，在甲硫氨酸添加量为 0.35 g/L 时，相较于原始培养基产量提升幅度最大，提高了 24%，而在添加 0.01 g/L 的泛酸钙后，产量有近 7%的提升，但是在添加组氨酸后，产量并没有提高，反而有一定程度的降低。这些结果表明，在该菌株麦角硫因合成过程中的组氨酸供给可能是充足的，而半胱氨酸和甲硫氨酸的供应可能不够。

此外，在发酵过程中，发酵培养基中的黄豆饼粉为菌株氨基酸、蛋白质、核酸等含氮物质代谢提供了主要的氮源，本研究对其含量进行了优化。如图 5B 所示，在原始培养基中额外添加不同含量的黄豆饼粉进行比较，结果表明，当黄豆饼粉添加量达到 10 g/L 时，相比于原始培养基产量有了 19%的提升。这表明原始培养基中的氮源可能不足。

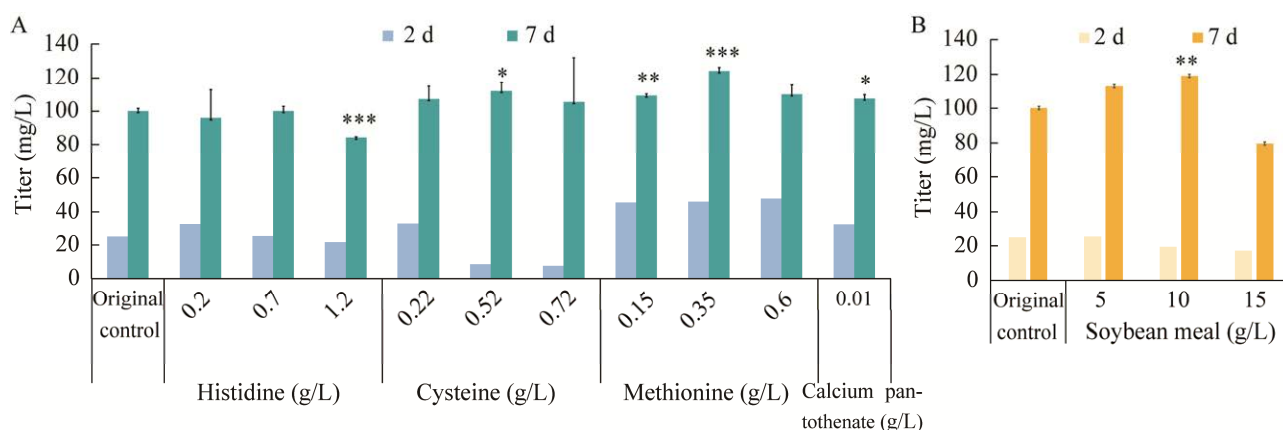


图 5 不同前体和培养基成分添加对麦角硫因产量的影响

Figure 5 Effect of different precursors (A) and culture media components (B) on ergothioneine titer. The original culture medium is used as the control. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

3 讨论与结论

麦角硫因作为一种稀有的天然氨基酸类强抗氧化剂^[1],在机体内发挥着重要的生理功能^[4],在食品、医药、化妆品领域有着广泛的应用。传统的从蕈菇中提取和化学合成的方法存在收率低、成本高等问题^[8],利用工程菌株的构建和微生物发酵生产的方法可以很好地解决这个问题。

基于此,本研究以一种可以天然生产麦角硫因的菌株 *Actinoplanes* sp. HS 为出发菌株,通过生物信息学分析以及在大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)中异源表达,对中间体和终产物进行检测,鉴定了该菌株中麦角硫因合成的相关基因 *BC03-04016*、*BC03-04015*、*BC03-04014*、*BC03-04013*、*BC03-04046* 和 *BC03-04917* 的功能。其中基因 *BC03-04016*、*BC03-04015*、*BC03-04014*、*BC03-04013* 所编码的酶可以合成麦角硫因前体 HER-Cys-Sul, 基因 *BC03-04046* 和 *BC03-04917* 都具有碳硫裂解酶功能,可以催化前体 HER-Cys-Sul 形成终产物麦角硫因。随后,将 *BC03-04016-BC03-04015-BC03-04014-BC03-04013* 和 2 种碳硫裂解酶基因 *BC03-04046*、

BC03-04917 分别组合后,在 *Actinoplanes* sp. HS 中进行高表达,得到突变株 YC313 和 YC314,其对应的麦角硫因产量为 125 mg/L 和 108 mg/L,较出发菌株 *Actinoplanes* sp. HS 的产量(43 mg/L)分别提高至 2.9 倍和 2.5 倍。

通过培养基中不同浓度的麦角硫因合成前体添加实验发现,在添加了不同含量的泛酸钙、半胱氨酸和甲硫氨酸后,产量均有一定程度的提升,在甲硫氨酸添加量为 0.35 g/L 时,麦角硫因产量相较于原始培养基产量提升幅度最大,进一步提高了 24%,这表明在该菌株的麦角硫因合成过程中,前体物质半胱氨酸和甲硫氨酸的供应可能不足。因此,后续可考虑对氨基酸代谢途径进行理性设计,增加半胱氨酸和甲硫氨酸的供应,有望实现产量的进一步提升。此外,在原始发酵培养基中额外添加 10 g/L 的氮源黄豆饼粉后发现,麦角硫因的产量也提升了 19%,这表明继续对发酵培养基进行优化,麦角硫因的产量仍有进一步提升的空间。综上所述,本研究为以游动放线菌为底盘生产麦角硫因提供了依据,也为在其他内源生产麦角硫因的菌株中进行代谢工程改造的策略提供了借鉴。

参考文献

- [1] ALAMGIR KM, MASUDA S, FUJITANI Y, FUKUDA F, TANI A. Production of ergothioneine by *Methylobacterium* species[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 1185.
- [2] TIAN XY, THORNE JL, MOORE JB. Ergothioneine: an underrecognised dietary micronutrient required for healthy ageing?[J]. *British Journal of Nutrition*, 2023, 129(1): 104-114.
- [3] CHEAH IK, TANG RMY, YEW TSZ, LIM KHC, HALLIWELL B. Administration of pure ergothioneine to healthy human subjects: uptake, metabolism, and effects on biomarkers of oxidative damage and inflammation[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2017, 26(5): 193-206.
- [4] 张晓娜, 徐鹤然, 化璟琳, 王旭楠, 王敏, 赵华. 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, WANG XN, WANG M, ZHAO H. The biological function and application of ergothioneine in cosmetic efficacy raw materials[J]. *Modern Chemical Research*, 2021(16): 154-158 (in Chinese).
- [5] AMES BN. Prolonging healthy aging: longevity vitamins and proteins[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(43): 10836-10844.
- [6] MICHELS AJ, HAGEN TM, FREI B. Human genetic variation influences vitamin C homeostasis by altering vitamin C transport and antioxidant enzyme function[J]. *Annual Review of Nutrition*, 2013, 33: 45-70.
- [7] 马晓雪, 陈旭东, 吴志文, 杨洋, 齐赛男, 葛唱, 汪绪龙, 隋强. 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, YANG Y, QI SN, GE C, WANG XL, SUI Q. Process research of natural antioxidant ergothioneine[J]. *Chinese Journal of Synthetic Chemistry*, 2022, 30(9): 743-748 (in Chinese).
- [8] 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[J]. *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[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(4): 1408-1420 (in Chinese).
- [9] ITO T, KATO M, TSUCHIDA H, HARADA E, NIWA T, OSAWA T. Ergothioneine as an anti-oxidative/anti-inflammatory component in several edible mushrooms[J]. *Food Science and Technology Research*, 2011, 17(2): 103-110.
- [10] PFEIFFER C, BAUER T, SUREK B, SCHÖMIG E, GRÜNDEMANN D. Cyanobacteria produce high levels of ergothioneine[J]. *Food Chemistry*, 2011, 129(4): 1766-1769.
- [11] 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(7): e105177.
- [12] GENGHOF DS. Biosynthesis of ergothioneine and hercynine by fungi and *Actinomycetales*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1970, 103(2): 475-478.
- [13] BELLO MH, BARRERA-PEREZ V, MORIN D, EPSTEIN L. 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[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2012, 49(2): 160-172.
- [14] HU W, SONG H, SAE HER A, BAK DW, NAOWAROJNA N, ELLIOTT SJ, QIN L, CHEN XP, LIU PH. Bioinformatic and biochemical characterizations of C-S bond formation and cleavage enzymes in the fungus *Neurospora crassa* ergothioneine biosynthetic pathway[J]. *Organic Letters*, 2014, 16(20): 5382-5385.
- [15] MELVILLE DB, LUDWIG ML, INAMINE E, RACHELE JR. Transmethylation in the biosynthesis of ergothioneine[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1959, 234(5): 1195-1198.
- [16] ISHIKAWA Y, ISRAEL SE, MELVILLE DB. Participation of an intermediate sulfoxide in the enzymatic thiolation of the imidazole ring of hercynine to form ergothioneine[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1974, 249(14): 4420-4427.
- [17] SEEBECK FP. *In vitro* reconstitution of mycobacterial ergothioneine biosynthesis[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132(19): 6632-6633.
- [18] van der HOEK SA, RUSNÁK M, WANG GK, STANCHEV LD, de FÁTIMA ALVES L, JESSOP-FABRE MM, PARAMASIVAN K, JACOBSEN IH, SONNENSCHN N, MARTÍNEZ JL, DARBANI B, KELL DB, BORODINA I.

- Engineering precursor supply for the high-level production of ergothioneine in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 70: 129-142.
- [19] XIONG LB, XIE ZY, KE J, WANG L, GAO B, TAO XY, ZHAO M, SHEN YL, WEI DZ, WANG FQ. Engineering *Mycolicibacterium neoaurum* for the production of antioxidant ergothioneine[J]. *Food Bioengineering*, 2022, 1(1): 26-36.
- [20] HIRASAWA T, SHIMOYAMADA Y, TACHIKAWA Y, SATOH Y, KAWANO Y, DAIRI T, OHTSU I. Ergothioneine production by *Corynebacterium glutamicum* harboring heterologous biosynthesis pathways[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2023, 135(1): 25-33.
- [21] van der HOEK SA, RUSNÁK M, JACOBSEN IH, MARTÍNEZ JL, KELL DB, BORODINA I. Engineering ergothioneine production in *Yarrowia lipolytica*[J]. *FEBS Letters*, 2022, 596(10): 1356-1364.
- [22] ZHANG LW, TANG JW, FENG MQ, CHEN SX. Engineering methyltransferase and sulfoxide synthase for high-yield production of ergothioneine[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(1): 671-679.
- [23] JONES GW, DOYLE S, FITZPATRICK DA. The evolutionary history of the genes involved in the biosynthesis of the antioxidant ergothioneine[J]. *Gene*, 2014, 549(1): 161-170.
- [24] ALTSCHUL SF, MADDEN TL, SCHÄFFER AA, ZHANG JH, ZHANG Z, MILLER W, LIPMAN DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(17): 3389-3402.
- [25] OLZHAUSEN J, SCHÜBBE S, SCHÜLLER HJ. Genetic analysis of coenzyme A biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: identification of a conditional mutation in the pantothenate kinase gene *CABI*[J]. *Current Genetics*, 2009, 55(2): 163-173.