# 优化前体供给与细胞膜通透性强化大肠杆菌合成麦角硫因

陈佳敏[1,3]，王 阳[1,3]，堵国成[2,3]，康 振[*1,2,3]

（1. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 糖化学与生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122；3. 江南大学 未来食品科学中心，江苏 无锡 214122）

**摘要：** 麦角硫因（Ergothioneine，ERG）具有抗氧化、抗炎、辐射保护等多种生理功能，广泛应用于食品、医药和化妆品领域。微生物发酵生产麦角硫因具有极大潜力，然而，由于工程菌株前体供应不充足等因素，麦角硫因的发酵质量浓度以及生产强度低下。作者旨在探究麦角硫因生产不同阶段中的前体限制，并通过优化前体供应解除限制，进而提高大肠杆菌麦角硫因合成能力。在证明组氨酸是限制麦角硫因合成的关键因素基础上，通过优化组氨酸供给，麦角硫因在摇瓶水平的发酵质量浓度达到 175.81 mg/L；通过正交试验组合优化了半胱氨酸、柠檬酸铁胺和维生素 B6 的添加量，发酵质量浓度提高至 182.61 mg/L；通过优化甲基供体的添加（1.5 g/L 甲硫氨酸与 0.6 g/L 甜菜碱）以及通过添加 0.2 g/dL 的 $CaCl_2$ 提高细胞膜通透性，麦角硫因的发酵质量浓度最终提高至 243.06 mg/L。采用分批补料发酵培养 108 h 后，麦角硫因在 3 L 发酵罐上的发酵水平达到 2.01 g/L，生产强度为 18.61 mg/(L·h)，为麦角硫因的规模化工业生产奠定了基础。

**关键词：** 麦角硫因；大肠杆菌；前体供应；外源添加；发酵优化

**中图分类号：**Q 815　**文章编号：**1673-1689(2022)08-0043-10　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2022.08.005

# Enhancement of Ergothioneine Synthesis in *Escherichia coli* via Optimization of Precursor Supply and Cell Membrane Permeability

*CHEN Jiamin*[1,3]，*WANG Yang*[1,3]，*DU Guocheng*[2,3]，*KANG Zhen*[*1,2,3]

（1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. The Science Center for Future Foods, Jiangnan University, Wuxi 214122, China）

**Abstract：** Ergothioneine (Ergothioneine, ERG) has various physiological functions such as antioxidant, anti-inflammatory and radiation protection, widely applied in food, medicine and cosmetic industries. Microbial fermentation of ergothioneine is of great potential, but engineered strains often have problems such as insufficient precursor supply, resulting in low fermentation concentration and production performance. This study aimed to explore the precursor limitation in different stages of ergothioneine synthesis, and to improve the ergothioneine synthesis capacity of

**收稿日期：** 2022-06-16

**基金项目：** 国家自然科学基金面上项目（31970085）；国家自然科学基金青年科学基金项目（32000058）；江苏省杰出青年基金项目（BK20200025）；江苏省科技支撑项目(BE2019630)。

* **通信作者：** 康 振(1982—)，男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事微生物合成生物学和代谢工程方面的研究。E-mail：zkang@jiangnan.edu.cn

*Escherichia coli* by optimizing precursor supply and removing the limitation. On the basis of proving that histidine was the key factor limiting the synthesis of ergothioneine, the fermentation concentration of ergothioneine at shake flask level reached 175.81 mg/L by optimizing the supply of histidine. On this basis, additions of cysteine, ammonium ferric citrate and vitamin $B_6$ were orthogonally optimized, and the fermentation concentration was increased to 182.61 mg/L. By further optimizing the additions of methyl donors (1.5 g/L methionine and 0.6 g/L betaine) and by adding 0.2 g/dL $CaCl_2$ to improve the permeability of the cell membrane, the final fermentation concentration of ergothioneine at shake flask level was further increased to 243.06 mg/L. Through fed-batch fermentation for 108 h, the fermentation level of ergothioneine reached 2.01 g/L in a 3 L fermenter, and the titer reached 18.61 mg/L/h. This study could lay a foundation for the large-scale industrial production of ergothioneine.

**Keywords:** Ergothioneine, *Escherichia coli*, precursor supply, exogenous addition, fermentation optimization

麦角硫因(Ergothioneine,ERG)是组氨酸衍生的硫醇化合物,由于其较高的氧化还原电位,麦角硫因相比其他巯基化合物如谷胱甘肽(Glutathione,GSH)具有更高的热稳定性、pH稳定性和极高的水溶性,在水溶液中通常以硫酮的形式存在[1-2]。此外麦角硫因是一种天然强抗氧化剂,具有独特的生物学功能和药理活性,包括清除自由基[3]、抗氧化[4]、缓解炎症和多种疾病[5]、防止辐射损伤[6-8]、细胞生理保护[9]等,在医药、化妆品和功能食品等领域展现出广阔的应用前景。

目前麦角硫因的制备方法有提取法、化学合成法和微生物发酵法。提取法主要从食用菌的子实体、麦角和谷物等原料中获取,原料消耗大,目标产物含率低且杂质多,产出比低,限制了麦角硫因的产业化应用[10];化学合成法不仅原料昂贵、合成步骤多、处理难度大[11],而且副产物对环境的污染严重,产品的安全性难以保证,影响了麦角硫因的规模化生产;然而,重组微生物生产麦角硫因具有绿色安全、发酵周期短、产率高、成本低等优点,并且通过代谢调控、发酵优化等手段可以有效提高麦角硫因的生产效率,是工业化生产麦角硫因的最优选择。

目前已知麦角硫因可由分枝杆菌[12-13]、甲基杆菌[14]、丝状真菌和蓝细菌[15]等少数微生物合成[16],但由于产量低较难达到工业化生产的要求。在分枝杆菌中麦角硫因的合成路线需要5种酶的协同顺序催化,首先组氨酸甲基转移酶EgtD将S-腺苷甲硫氨酸(S-Adenosyl-L-Methionine Disulfate Tosylate,SAM)的3个甲基转移至组氨酸(Histidine,His)生成组氨酸甜菜碱(Hercynine,HER),γ-谷氨酰半胱氨酸合成酶EgtA或GshA催化半胱氨酸(Cysteine,Cys)与谷氨酸(Glutamic acid,Glu)发生缩合反应,生成γ-谷氨酰半胱氨酸(γ-glutamycyeteine,γ-GC),在γ-谷氨酰乙酰半胱氨酸硫-氧化物合酶EgtB的催化作用下,与HER间形成C—S键,生成中间体海西烯基-γ-谷氨酰半胱氨酸亚砜(Hercynyl-γ-glutamycyeteine sulfoxide,γ-GC-HER),再由γ-谷氨酰巯基半胱氨酸硫氧化物水解酶EgtC水解除去Glu部分,最后由硫氧化物裂解酶EgtE断开庚基半胱氨酸亚砜(Hercynylcyeteine sulfoxide,Cys-HER)的C—S键,切割掉半胱氨酸残基,形成终产物麦角硫因。

重组微生物发酵生产是提高麦角硫因生产效率的重要策略[17],目前已在大肠杆菌、酿酒酵母、米曲霉[18]等微生物中得到了验证。有研究者在酿酒酵母中整合了粗糙脉孢菌来源的麦角硫因合成酶NcEgt1和麦角菌来源的麦角硫因合成酶CpEgt2,在1 L反应器中分批补料发酵84 h后麦角硫因产量达到598 mg/L[19];在此基础上,进一步利用有毒的组氨酸类似物筛选TRA抗性菌株,基因组整合单拷贝的MET14并敲除*SPE2*基因,1 L反应器分批补料发酵160 h后,产量提高到了2.39 g/L[20]。Osawa等在大肠杆菌异源表达了耻垢分枝杆菌中麦角硫因的合成基因簇*egtBDCE*,通过直接添加硫代硫酸盐解除底物供应限制,麦角硫因产量达到24 mg/L[21];

Tanaka 等[22]在此基础上通过重组大肠杆菌过表达 *egtA*,敲除编码 Met 代谢转录抑制因子 *metJ*,并增强半胱氨酸与 S-腺苷甲硫氨酸的生物合成提高代谢通量,分批补料发酵 216 h 后麦角硫因产量进一步增加到了 1.31 g/L。Chen 等[23]在大肠杆菌中共表达里氏木霉来源的麦角硫因合成基因 *tregt1* 和 *tregt2*,通过 2 L 罐分批补料发酵,培养 143 h 后麦角硫因产量达到 4.34 g/L,是目前国内外报道的最高水平。

本研究团队前期在 *Escherichia coli* BL21(DE3)中异源成功表达了耻垢分枝杆菌来源的 *egtBDCE* 合成基因簇与粟酒裂殖酵母来源的麦角硫因合成酶 Egt1,同时强化表达了 GshA 的同工酶 EgtA 与前体氨基酸代谢途径中的关键酶,包括天冬氨酸激酶 ThrA 和磷酸甘油酸脱氢酶 SerA;利用 3 L 罐分批补料发酵,培养 108 h 时麦角硫因的产量达到 710 mg/L[24]。在此基础上,通过优化前体供应进一步提高发酵强化工程菌生产麦角硫因的效率。

为了使菌体具有更高的代谢活力,增强麦角硫因的生产效率,作者以 E1-A1-*thrA*-*serA*$^{c.g*}$ 菌株[24]为出发菌株,首先通过外源添加组氨酸强化前体供应,接着为了平衡代谢合成通路,对工程菌发酵的胞内外氨基酸浓度进行了分析,采取三因素五水平正交试验策略,组合添加半胱氨酸、柠檬酸铁胺和维生素 $B_6$ 对培养基组分进行优化,增强酶催化性能;进一步添加甲基供体甲硫氨酸与甜菜碱强化麦角硫因的合成;最后加入 $CaCl_2$ 增强大肠杆菌细胞膜的通透性、促进物质运输、提高麦角硫因的产量,见图 1。在全部优化的基础上,通过 3 L 发酵罐分批补料发酵放大优化结果,培养 108 h 最终麦角硫因的发酵水平为 2.01 g/L,生产强度为 18.61 mg/(L·h),实现了麦角硫因短周期的高效生产,为麦角硫因的规模化工业化生产奠定了基础。

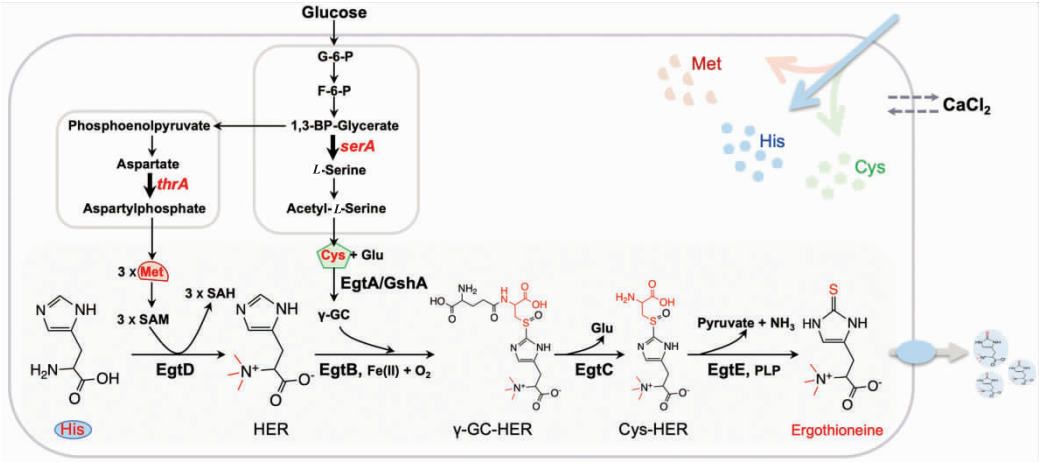



**图 1　麦角硫因的合成示意**

**Fig. 1　Biosynthesis diagram of ergothioneine**

## 1　材料与方法

### 1.1　材料与试剂

**1.1.1　菌株**　*Escherichia coli* E1-A1-*thrA*-*serA*$^{c.g*}$ 为作者所在实验室保藏菌株[24]。

**1.1.2　试剂**　麦角硫因标准样品:购于上海麦克林生化科技有限公司;蛋白胨、酵母粉:购于美国 OXOID 公司;各类氨基酸标准品、异丙基-*β*-*D*-硫代半乳糖苷(Isopropyl *β*-*D*-Thiogalactoside,IPTG)、硫酸卡那霉素(Kanamycin,Kana)、链霉素(Streptomycin,Str):购于上海生工生物工程公司;其余试剂均为国产分析纯试剂。

**1.1.3　培养基**

1)LB 培养基:蛋白胨 10 g/L,酵母提取物 5 g/L,氯化钠 10 g/L,蒸馏水 1 L;固体培养基另添加琼脂粉 1.5 g/dL。

2)微量元素:六水合氯化铁 2.4 g/L,六水合氯化钴 0.8 g/L,二水合氯化铜 0.15 g/L,氯化锌 0.3 g/L,二水合钼酸钠 0.3 g/L,硼酸 0.075 g/L,硫酸锰 1.2 g/L,二水合氯化钙 10 g/L;120 mmol/L 盐酸 1 L,过滤除菌。

3)发酵培养基:葡萄糖 20 g/L,酵母提取物 6 g/L,蛋白胨 4 g/L,柠檬酸 2 g/L,硫酸铵 6 g/L,十二水合磷酸氢二钠 25 g/L,磷酸二氢钾 4 g/L,七水硫酸镁

1 g/L,维生素 H $1\times10^{-4}$ g/L,微量元素 1 mL,蒸馏水 1 L;pH 6.8~7.0。

4)补料培养基:葡萄糖 500 g/L,酵母提取物 6 g/L,蛋白胨 4 g/L,蒸馏水 1 L。

所有配制的培养基中均要加入 50 mg/L 的硫酸卡那霉素和链霉素对菌株进行发酵培养。

### 1.2 仪器与设备

Agilent1260 高效液相色谱仪:美国安捷伦公司产品;UV2450 紫外分光光度计:日本 Shimadzu 公司产品;蒸汽灭菌器:致微(厦门)公司产品;台式振荡培养箱 ZQTY-70:上海知楚仪器有限公司产品;葡萄糖-乳酸生物传感分析仪:深圳西尔曼科技有限公司产品;Avanti J-26XP 低温高速冷冻离心机:美国 Beckman 公司产品;VCX750 型超声破碎仪:美国 Sonics 公司产品;3 L 全自动发酵罐:迪必尔上海生物工程有限公司产品。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 摇瓶发酵** 种子液的制备:挑取活化平板上的单菌落接种于 5 mL 液体 LB 中,置于 37 ℃、220 r/min 弹簧摇床中过夜培养 8~10 h。

摇瓶发酵:种子液接种体积分数为 2%,250 mL 摇瓶装液量为 25 mL,置于 37 ℃、220 r/min 条件下培养至菌体 $OD_{600}$ 为 0.8~1.0,此时添加浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG 诱导,并提前将摇瓶培养温度降低至 25 ℃进行低温诱导表达 108 h。

**1.3.2 发酵罐发酵**

1)一级种子液的制备 同 1.3.1 种子液的制备。

2)二级种子液的制备 一级种子液转接体积分数为 1%,500 mL 摇瓶装液量为 50 mL,置于 37 ℃、220 r/min 条件下培养 8~9 h。

3)发酵罐发酵 使用 3 L 发酵罐进行分批补料发酵,二级种子液转接体积分数为 20%,3 L 发酵罐装液量为 1.5 L。发酵初始培养温度为 37 ℃,当菌体生长至 $OD_{600}$ 为 20 左右时,提前将温度降低至 25 ℃,并添加浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG 诱导。用体积分数 50%的氨水自动调控 pH 在 6.8 左右,通过控制搅拌桨转速及通气量来控制溶氧在 35%左右。当发酵培养基中的初始葡萄糖消耗完毕之后,开始补料流加以维持发酵液中的葡萄糖质量浓度在 5~10 g/L 最佳。发酵过程中定期取样测量相关参数,记录备用。

**1.3.3 发酵样品处理** 发酵结束后,将发酵液于 10 000 r/min 转速下离心 10 min,上清液稀释适当倍数后经 0.22 μm 水系滤膜过滤,保留于液相瓶中待测;菌体沉淀首先用 pH 7.4 的 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液洗涤并重悬恢复至原体积,随后放置在冰上低温超声破碎(功率 300 W,工作 4 s,间歇 6 s,10 min),对细胞裂解液离心取上清液过膜,保留于液相瓶中待测。

**1.3.4 麦角硫因定量测定** 高效液相色谱法(High Performance Liquid Chromatography,HPLC)测定麦角硫因质量浓度。使用 Agilent 1200 高效液相检测系统,C18 柱(Thermo Scientific Hypersil GOLD AQ,250 mm×4.6 mm,5 μm),UV 检测器,检测波长为 257 nm,体积分数 1%甲醇为流动相,纯甲醇为有机相,进样流量为 0.7 mL/min,进样体积为 5 μL,单样分析时长为 20 min,全程控制柱温保持 30 ℃。

麦角硫因的标准曲线:分别配置质量浓度为 5、25、50、100、200 mg/L 的麦角硫因标准样品。根据 HPLC 法分别测定各个质量浓度下对应的峰面积,以麦角硫因标准样品的质量浓度为横坐标,对应的峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。

**1.3.5 其他参数测定**

1)菌体生长情况 定期取样,稀释适当倍数后使用紫外分光光度计测定 $OD_{600}$ 的值。

2)葡萄糖质量浓度 定期取样,10 000 r/min 转速下离心 2 min,取上清液并稀释适当倍数,使用葡萄糖-乳酸生物传感分析仪测定发酵液中各个阶段剩余的葡萄糖质量浓度。

本实验中,所有样品相关参数的测定均进行 3 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 添加关键前体组氨酸促进麦角硫因的合成

麦角硫因属于次生代谢产物,一般涉及的合成路径与代谢途径较为复杂,因此一些前体氨基酸、维生素和辅因子等通常是此类代谢物生物合成的营养因子与调节因子[25]。麦角硫因合成过程中涉及 3 个前体氨基酸,分别为组氨酸提供骨架、半胱氨酸提供巯基和甲硫氨酸(Methionine,Met)提供甲基。

向培养基中直接添加氨基酸前体是提高前体供应最直接的策略。为探究初始状态下麦角硫因合成的主要前体限制,分别向发酵初始培养基中外源加入 0.1 g/L 的组氨酸、半胱氨酸和甲硫氨酸,结果见图 2 (a)。添加组氨酸显著提高了麦角硫因的产

量,而添加其他 2 种氨基酸产量并没有明显提高,说明组氨酸的缺乏是限制麦角硫因的合成效率的最主要因素。进一步探究组氨酸的梯度添加情况下麦角硫因的产量变化及菌体生长情况,见图 2(b)。当外源添加 0.1 g/L 组氨酸时,麦角硫因在摇瓶水平上的发酵质量浓度最高,达到(175.81±1.19) mg/L,相比初始麦角硫因工程菌产量(143.82±1.18) mg/L 提高了 22.3%。由于组氨酸是麦角硫因结构的基本骨架,其咪唑环和侧链来源也是合成麦角硫因的直接前体,因此组氨酸的充足供应是麦角硫因高效合成的基本保证。

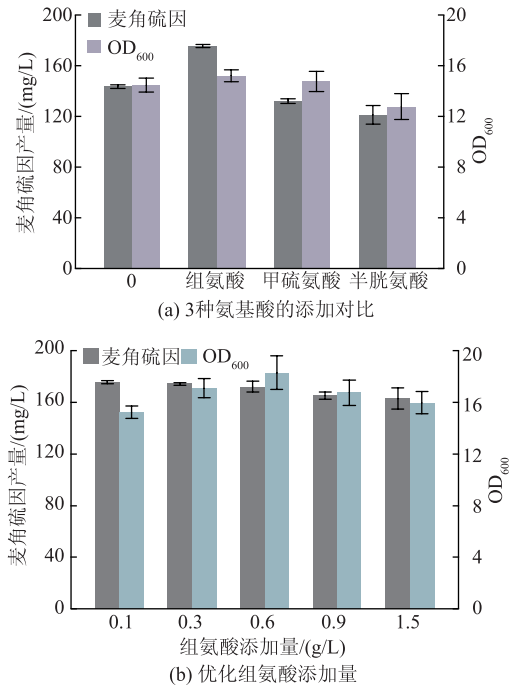



**图 2 不同氨基酸添加量对麦角硫因发酵的影响**

**Fig. 2 Effects of different additions of amino acids on ergothioneine fermentation**

为了初步验证麦角硫因工程菌株的生产能力,根据外源添加前体氨基酸的最优结果,向发酵培养基中添加 0.1 g/L 组氨酸,初步采取 3 L 发酵罐发酵策略进行分批补料发酵,实现发酵放大,结果见图3。菌体在 0~18 h 生长迅速,培养 36 h 时 $OD_{600}$ 的值超过了 60,36 h 后 $OD_{600}$ 趋于稳定;葡萄糖消耗速率自 36 h 开始逐渐下降,48 h 后保持稳定,整个发酵过程共消耗 136 g/L 葡萄糖;麦角硫因在前 48 h 积累迅速,后期产量变化增幅较小,发酵 108 h 时麦角硫因的发酵水平达到了 1.25 g/L,有效提高了麦角硫因的生产效率。

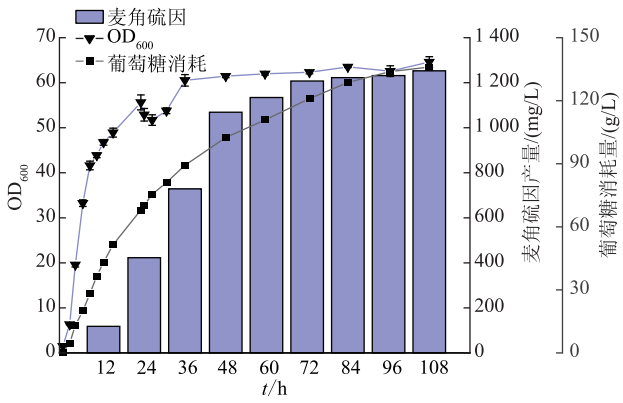



**图 3 分批补料发酵过程曲线图**

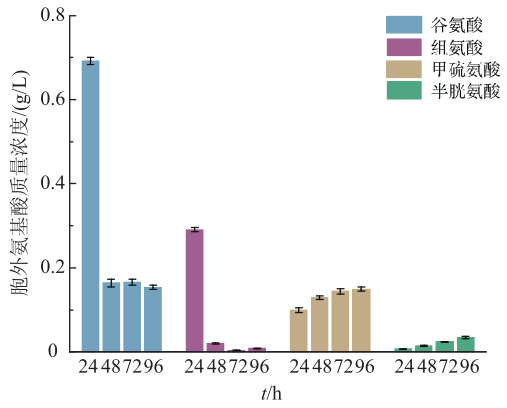
**Fig. 3 Time courses of ergothioneine production under fed-batch fermentation**

## 2.2 胞内外氨基酸质量浓度的定量化分析

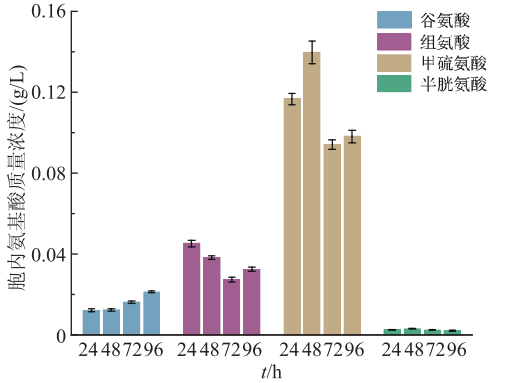
对分批补料发酵合成麦角硫因过程中各个时间点胞内外相关重要氨基酸质量浓度的变化情况进行了分析,进一步探究氨基酸前体限制,从而针对性地提高麦角硫因的产量,结果见图 4。甲硫氨酸作为麦角硫因合成过程中的甲基供体,整个发酵过程中胞内外的质量浓度较为平衡,始终保持 0.1 g/L 左右的水平。同时,半胱氨酸的胞外和胞内质量浓度都很低,胞外半胱氨酸随着发酵时间的推移逐渐呈上升趋势,而胞内半胱氨酸大体呈下降趋势,都在 0.002 g/L 左右浮动,存在严重缺乏,表明除了前体组氨酸外,前体半胱氨酸是目前限制麦角硫因生产的另一关键氨基酸。

## 2.3 正交试验优化组分添加提高麦角硫因的产量

柠檬酸铁胺(Ammonium Ferric Citrate,AFC)是一种有机化合物,其有助于蛋白质表达,并可适用于微生物培养[26]。麦角硫因合成途径中间步骤的关键酶 EgtB 是一种单核非血红素铁酶,其活性需要特定的辅因子即 $Fe^{2+}$的存在[27]。由于发酵培养基中包含柠檬酸和硫酸铵,为避免引入其他有机离子,采取向培养基中添加柠檬酸铁胺以提高酶的催化活性,促进 γ-GC 最大程度向 γ-GC-HER 的转化。维生素 $B_6$(Vitamin $B_6$,$VB_6$),又称吡哆素,是一种水溶性维生素,维生素常以辅酶形式参与酶的催化,能帮助和促进微生物体内氨基酸的合成。麦角硫因合成过程中的 EgtE 为 5-磷酸吡哆醛(Pyridoxal-5′-phosphate,PLP)依赖性 β-裂解酶,而 PLP 又是维生素 $B_6$ 的代谢活性形式,主要负责参与氨基酸代谢中的大量生物转化。为了增强 EgtE 酶的催化活性,促




(a) 不同时间点胞外氨基酸质量浓度




(b) 不同时间点胞内氨基酸质量浓度

**图 4　胞内外氨基酸分析图**

**Fig. 4　Analysis of intracellular and extracellular amino acids**

进终产物麦角硫因的不断产生,考虑向培养基中另外添加维生素 $B_6$。

通过以上分析，采取正交组合添加半胱氨酸、柠檬酸铁胺与维生素 $B_6$ 的策略,促进代谢流向增强麦角硫因合成的方向进行,提高麦角硫因产量。

以麦角硫因的产量作为考察指标,在培养基添加 0.1 g/L 组氨酸的基础上，采用正交设计助手 LATIN 3.1 按照 $L_{25}(5^6)$展开三因素五水平正交试验并进行分析，考察对麦角硫因最终合成的影响,因素水平见表 1。

麦角硫因发酵正交试验数据见表 2。由极差分析可知，各因素影响的主次顺序为 Cys>AFC>$VB_6$ ($A>B>C$);由方差分析结果所示,半胱氨酸影响最为显著,AFC 和 $VB_6$ 对麦角硫因产量的影响较小。在 25 个组合中,最优组合为序列号 2,即添加 0.01 g/L Cys、0.01 g/L AFC、0.01 g/L $VB_6$，产量达到 178.56 mg/L，对正交试验的筛选结果进行重复验证,重复 3 次,最终麦角硫因平均的发酵质量浓度为(182.61±3.92) mg/L,重复验证结果与正交试验结果一致。

**表 1　正交试验设计因素及水平**

**Table 1　Factors and levels of orthogonal experimental design**

| 水平 | 因素 | | |
|---|---|---|---|
| | *A* 半胱氨酸 质量浓度/(g/L) | *B* 柠檬酸铁胺 质量浓度/(g/L) | *C* 维生素 $B_6$ 质量浓度/(g/L) |
| 1 | 0.01 | 0.005 | 0.005 |
| 2 | 0.02 | 0.010 | 0.010 |
| 3 | 0.03 | 0.020 | 0.020 |
| 4 | 0.06 | 0.040 | 0.040 |
| 5 | 0.09 | 0.060 | 0.060 |

**表 2　正交试验结果**

**Table 2　Results of orthogonal test**

| 序列号 | 因素/% | | | | | | 麦角硫因 产量/(mg/L) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *A* 半胱氨酸 质量浓度/(g/L) | *B* 柠檬酸铁胺 质量浓度/(g/L) | *C* 维生素 $B_6$ 质量浓度/(g/L) | *D* 空列 | *E* 空列 | *F* 空列 | |
| 1 | 0.01 | 0.005 | 0.005 | 1 | 1 | 1 | 176.45 |
| 2 | 0.01 | 0.010 | 0.010 | 2 | 2 | 2 | 178.56 |
| 3 | 0.01 | 0.020 | 0.020 | 3 | 3 | 3 | 166.41 |
| 4 | 0.01 | 0.040 | 0.040 | 4 | 4 | 4 | 167.76 |
| 5 | 0.01 | 0.060 | 0.060 | 5 | 5 | 5 | 141.80 |
| 6 | 0.02 | 0.005 | 0.010 | 3 | 4 | 5 | 146.78 |
| 7 | 0.02 | 0.010 | 0.020 | 4 | 5 | 1 | 177.36 |
| 8 | 0.02 | 0.020 | 0.040 | 5 | 1 | 2 | 153.80 |

续表 2

| 序列号 | 因素/% | | | | | | 麦角硫因产量/(mg/L) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *A* 半胱氨酸质量浓度/(g/L) | *B* 柠檬酸铁胺质量浓度/(g/L) | *C* 维生素 $B_6$ 质量浓度/(g/L) | *D* 空列 | *E* 空列 | *F* 空列 | |
| 9 | 0.02 | 0.04 | 0.060 | 1 | 2 | 3 | 147.19 |
| 10 | 0.02 | 0.06 | 0.005 | 2 | 3 | 4 | 155.84 |
| 11 | 0.03 | 0.005 | 0.020 | 5 | 2 | 4 | 120.73 |
| 12 | 0.03 | 0.010 | 0.040 | 1 | 3 | 5 | 170.77 |
| 13 | 0.03 | 0.020 | 0.06 | 2 | 4 | 1 | 130.78 |
| 14 | 0.03 | 0.040 | 0.005 | 3 | 5 | 2 | 161.98 |
| 15 | 0.03 | 0.060 | 0.010 | 4 | 1 | 3 | 174.95 |
| 16 | 0.06 | 0.005 | 0.040 | 2 | 5 | 3 | 103.42 |
| 17 | 0.06 | 0.010 | 0.060 | 3 | 1 | 4 | 85.04 |
| 18 | 0.06 | 0.020 | 0.005 | 4 | 2 | 5 | 79.44 |
| 19 | 0.06 | 0.040 | 0.010 | 5 | 3 | 1 | 97.22 |
| 20 | 0.06 | 0.060 | 0.020 | 1 | 4 | 3 | 126.07 |
| 21 | 0.09 | 0.005 | 0.060 | 4 | 3 | 2 | 91.85 |
| 22 | 0.09 | 0.010 | 0.005 | 5 | 4 | 3 | 98.88 |
| 23 | 0.09 | 0.020 | 0.010 | 1 | 5 | 4 | 84.69 |
| 24 | 0.09 | 0.040 | 0.020 | 2 | 1 | 5 | 90.27 |
| 25 | 0.09 | 0.060 | 0.040 | 3 | 2 | 1 | 118.5 |
| $K_1$ | 166.196 | 127.846 | 134.518 | 141.034 | 136.102 | 140.062 | |
| $K_2$ | 156.194 | 142.122 | 136.440 | 131.774 | 128.884 | 146.548 | |
| $K_3$ | 151.842 | 123.024 | 136.168 | 135.742 | 136.418 | 136.153 | |
| $K_4$ | 98.238 | 132.884 | 142.850 | 138.272 | 134.054 | 122.812 | |
| $K_5$ | 96.838 | 143.432 | 119.332 | 122.486 | 133.850 | 125.812 | |
| *R* | 69.358 | 20.408 | 23.518 | 18.548 | 7.534 | 23.736 | |

表 3　正交试验方差分析

Table 3　Variance analysis of orthogonal test

| 因素 | 偏差平方和 | 自由度 | *F* 值 | 显著性 |
|---|---|---|---|---|
| *A* | 22 536.661 | 4 | 2.638 | * |
| *B* | 1 572.117 | 4 | 0.184 | |
| *C* | 1 521.495 | 4 | 0.178 | |
| 误差 | 2 5630.27 | 12 | | |

## 2.4　补充甲基供体甲硫氨酸与甜菜碱强化麦角硫因的合成

在已补充前体组氨酸和前体半胱氨酸的基础上,进一步向培养基中补充甲基供体以增强麦角硫因的生成,在培养基基础上分别直接加入 0.1、0.3、0.6、0.9、1.5 g/L 的甲硫氨酸,由图 5(a)发现,添加 1.5 g/L 甲硫氨酸时,摇瓶发酵质量浓度达到(190.46±0.89) mg/L,提高了 4.3%。

甜菜碱(Betaine)是一种季铵碱类物质,1 分子甜菜碱包括 3 个非稳态甲基,是有效且高效的甲基供体,且麦角硫因的分子中包含有甜菜碱的结构[25],因此,甜菜碱具有替代甲硫氨酸提供甲基的功能。在培养基基础上平行添加相同质量浓度梯度的甜菜碱,从图 5(b) 可知,当添加 0.6 g/L 甜菜碱时,发酵质量浓度达到(191.26±2.10) mg/L,提高了4.7%。在此基础上,组合添加 1.5 g/L 甲硫氨酸与0.6 g/L 甜菜碱,最终摇瓶发酵质量浓度为 (199.33±4.96) mg/L,相比未添加甲基供体提高了11.9%,相比初始产量提高了 38.6%,见图 5(c)。说明甲基供体的补充是非常重要的,前体的充足供应有益于麦角硫因的生产。

## 2.5　增加细胞膜通透性提高麦角硫因的产量

据报道,许多表面活性剂已用于氨基酸类物质的生产,江洁等[28]通过添加 0.3%曲拉通 X-100 可以改善酿酒酵母中谷胱甘肽的胞外分泌;张媛媛

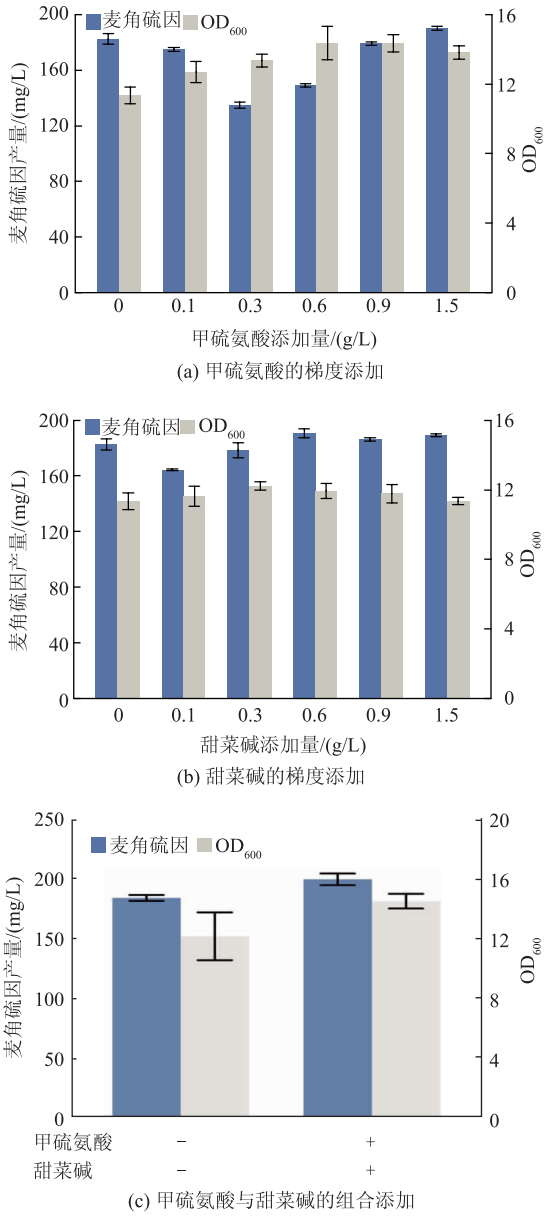



**图 5　甲基供体添加对麦角硫因发酵的影响**

**Fig. 5　Effects of additions of methyl donor on ergothioneine fermentation**

等[29]添加 0.1 g/L 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)后大肠杆菌发酵生产 *L*-鸟氨酸提高了 1.25 倍。表面活性剂的适量添加能够提高大肠杆菌细胞外膜的渗透性,促进胞内外物质的传递运输,加强细胞与外界物质的交换,最终达到增强麦角硫因胞外分泌的目的,提高麦角硫因产量。在摇瓶发酵诱导后,向已优化的发酵培养基中继续补充添加 0.2 g/dL 的十二烷基磺酸钠(SDS)、吐温 80(Tween-80)、曲拉通 X-100、甘氨酸(Glycine)和 $CaCl_2$,考察以上能够增强细胞膜通透性的物质对麦角硫因合成及菌体生长的影响,见图 6。添加 $CaCl_2$ 整体效果较好,其对菌体的生长情况影响较小,最终摇瓶发酵质量浓度达到(243.06±7.85) mg/L,提高了 21.9%,相比初始产量提高了 69.0%。

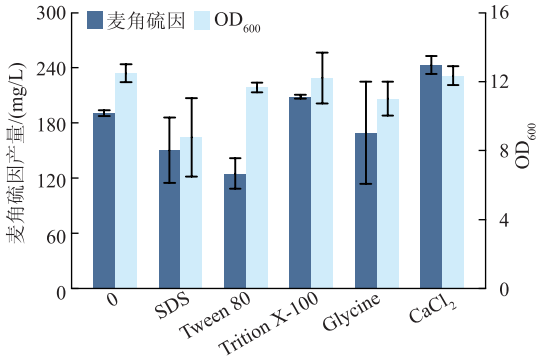



**图 6　改善细胞膜通透性对麦角硫因发酵的影响**

**Fig. 6　Effects of improving cell membrane permeability on ergothioneine fermentation**

## 2.6　分批补料发酵生产麦角硫因

为了验证麦角硫因高产菌株经过一系列培养基优化之后实际的工业化生产能力，采取 3 L 发酵罐发酵策略进行分批补料发酵，实现发酵放大,结果见图 7。菌体在前 24 h 生长迅速,$OD_{600}$ 超过了 60,最高可达到 65,后期 $OD_{600}$ 趋于稳定,84 h 后菌体开始降解；葡萄糖消耗速率自 24 h 开始下降,在 30~72 h 保持稳定，与麦角硫因的产量积累速率一致,72 h 后葡萄糖消耗速率逐渐降低，整个发酵过程共消耗 235.9 g/L 葡萄糖。麦角硫因在前期快速积累,后期产量相对小幅提升,发酵 108 h,麦角硫因的发酵水平达到了 2.01 g/L，生产强度为 18.61 mg/(L·h),在较短周期内实现了麦角硫因的高效生产,为实现稳定可靠的大规模工业化生产奠定了基础。

## 3　结　语

在本研究中,对麦角硫因合成过程中涉及的氨基酸前体以及途径酶所需的活性物质的添加量进行了优化。首先,为了增加麦角硫因代谢通路的前体供应量，通过外源添加 0.1 g/L 的前体组氨酸,麦角硫因摇瓶水平上的发酵质量浓度达到（175.81±1.19) mg/L,相比初始菌株产量提高了 22.3%,并通过 3 L 发酵罐放大培养，分析了工程菌发酵的胞内外相关氨基酸质量浓度,通过三因素五水平正交试

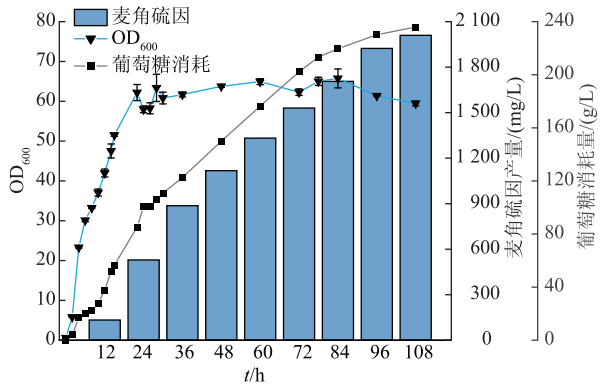



图 7　分批补料发酵生产麦角硫因

**Fig. 7　Ergothioneine production under fed-batch fermentation**

验,组合添加 0.01 g/L 的半胱氨酸、柠檬酸铁胺和维生素 $B_6$,解除了氨基酸前体供应限制,产量达到(182.61±3.92) mg/L;在此基础上,进一步补充甲基供体,优化添加 1.5 g/L 甲硫氨酸与 0.6 g/L 甜菜碱后,产量提高到(199.33±4.96) mg/L,进一步提高了 11.9%。最后,为了增强大肠杆菌细胞膜通透性,提高胞内外物质的运输强度,摇瓶诱导后培养基中添加 0.2 g/dL $CaCl_2$,最终摇瓶水平的发酵质量浓度达到(243.06±7.85) mg/L,相比初始工程菌产量提高了 69.0%。以优化后的培养基进行 3 L 发酵罐分批补料发酵策略结合外源物质的添加,最终在发酵培养 108 h 时,麦角硫因的发酵水平达到了 2.01 g/L,生产强度为 18.61 mg/(L·h),为实现麦角硫因的规模化工业生产奠定了基础。

## 参考文献:

[1] QIU Y,CHEN Z,SU E,et al. Recent strategies for the biosynthesis of ergothioneine[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2021,69(46):13682-13690.

[2] CUMMING B M,CHINTA K C,REDDY V P,et al. Role of ergothioneine in microbial physiology and pathogenesis[J]. **Antioxidants & Redox Signaling**,2018,28(6):431-444.

[3] 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[J]. **Free Radical Biology & Medicine**,2016,96:211-222.

[4] CHEAH I K,HALLIWELL B. Ergothioneine;antioxidant potential,physiological function and role in disease[J]. **Biochimica et Biophysica Acta(BBA) – Molecular Basis of Disease**,2012,1822(5):784-793.

[5] CHEAH I K,HALLIWELL B. Ergothioneine,recent developments[J]. **Redox Biology**,2021,42:101868.

[6] MARKOVA N,YAROSH D,SMILES K,et al. The natural antioxidant *L*-ergothioneine is integral to the skin's defense against ultraviolet-induced oxidative damage[J]. **Journal of the American Academy of Dermatology**,2009,60(3):AB156.

[7] The natural antioxidant L-ergothioneine and its receptor/transporter OCTN-1 participate in the skin's response to UVA-induced oxidative damage[J]. **Journal of the American Academy of Dermatology**,2008,58(Supplement 2):AB111.

[8] KO H J,KIM J,AHN M,et al. Ergothioneine alleviates senescence of fibroblasts induced by UVB damage of keratinocytes via activation of the Nrf2/HO-1 pathway and HSP70 in keratinocytes[J]. **Experimental Cell Research**,2021,400(1):112516.

[9] PAUL B D,SNYDER S H. The unusual amino acid L-ergothioneine is a physiologic cytoprotectant[J]. **Cell Death & Differentiation**,2010,17(7):1134-1140.

[10] CHEN S Y,HO K J,HSIEH Y J,et al. Contents of lovastatin,γ-aminobutyric acid and ergothioneine in mushroom fruiting bodies and mycelia[J]. **LWT – Food Science and Technology**,2012,47(2):274-278.

[11] XU J,YADAN J C. Synthesis of L-(+)-Ergothioneine[J]. **The Journal of Organic Chemistry**,1995,60(20):6296-6301.

[12] SAO EMANI C,WILLIAMS MONIQUE J,WIID IAN J,et al. Ergothioneine is a secreted antioxidant in *Mycobacterium smegmatis*[J]. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**,2013,57(7):3202-3207.

[13] RICHARD-GREENBLATT M,BACH H,ADAMSON J,et al. Regulation of ergothioneine biosynthesis and its effect on *Mycobacterium tuberculosis* growth and infectivity[J]. **Journal of Biological Chemistry**,2015,290(38):23064-23076.

[14] ALAMGIR K M,MASUDA S,FUJITANI Y,et al. Production of ergothioneine by *Methylobacterium* species[J]. **Frontiers in Microbiology**,2015,6:1185.

[15] PFEIFFER C,BAUER T,SUREK B,et al. Cyanobacteria produce high levels of ergothioneine[J]. **Food Chemistry**,2011,129(4):1766-1769.

[16] FUJITANI Y,ALAMGIR K M,TANI A. Ergothioneine production using *Methylobacterium* species,yeast,and fungi[J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**,2018,126(6):715-722.
[17] LUO Y,LI BZ,LIU D,et al. Engineered biosynthesis of natural products in heterologous hosts[J]. **Chemical Society Reviews**,2015,44(15):5265-5290.
[18] TAKUSAGAWA S,SATOH Y,OHTSU I,et al. Ergothioneine production with *Aspergillus oryzae*[J]. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**,2019,83(1):181-184.
[19] VAN DER HOEK S A,DARBANI B,ZUGAJ K E,et al. Engineering the yeast *Saccharomyces cerevisiae* for the production of *L*-(+)-ergothioneine[J]. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**,2019,7:262.
[20] VAN DER HOEK S A,RUSNAK M,WANG G,et al. Engineering precursor supply for the high-level production of ergothioneine in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Metabolic Engineering**,2022,70:129-142.
[21] OSAWA R,KAMIDE T,SATOH Y,et al. Heterologous and high production of Ergothioneine in *Escherichia coli*[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2018,66(5):1191-1196.
[22] TANAKA N,KAWANO Y,SATOH Y,et al. Gram-scale fermentative production of ergothioneine driven by overproduction of cysteine in *Escherichia coli*[J]. **Scientific Reports**,2019,9(1):1895.
[23] CHEN Z,HE Y,WU X,et al. Toward more efficient ergothioneine production using the fungal ergothioneine biosynthetic pathway[J]. **Microbial Cell Factories**,2022,21(1):76.
[24] 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.
[25] 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[J]. 食品研究与开发,2015,36(15):108-112.
[26] 田宁,咸漠,胡仰栋,等.产香叶醇重组大肠杆菌发酵培养基的优化[J]. 林产化学与工业,2015,35(4):131-137.
[27] GONCHARENKO K V,VIT A,BLANKENFELDT W,et al. Structure of the sulfoxide synthase *EgtB* from the ergothioneine biosynthetic pathway[J]. **Angewandte Chemie International Edition**,2015,54(9):2821-2824.
[28] 丁闰蓉,李兆丰,李金根,等. 表面活性剂对大肠杆菌胞外生产 α- 环糊精葡萄糖基转移酶的影响[J]. 中国生物工程杂志,2009,29(7):56-61.
[29] 张媛媛. 表面活性剂对大肠杆菌产 *L*- 鸟氨酸的影响[J]. 中国食品添加剂,2012,2:122-125.

## 科　技　信　息

**日本拟修订 3 项食品标准**

2022 年 7 月 12 日,日本农林水产省发布 550003518、550003519、550003520 号咨询文件,拟修订 3 项食品标准。主要修订内容为:1)《胡萝卜汁及其混合果汁农林标准》修订了胡萝卜混合果汁的分类及其成分要求,如食品添加剂含量应不超过 3%,并新增了产品中总胡萝卜素测定方法;2)《果汁饮料农林标准》新增果汁饮料标准的引用标准,修订果汁饮料产品标签通用要求(如标签应标注名称、保质期、储存方法、原料、添加剂、原产国等 9 项基本信息),新增浓缩果汁和混合果汁等产品标签的标注方法;3)《苹果汁农林标准》修订苹果果汁定义,即苹果经过压榨、过滤等工艺得到的液体,其中不得添加抗氧化剂,同时修订成品糖度和酸度的检验方法;补充规定苹果果汁原材料来源于经认证的特定产地时,标签允许标注"使用 XX(地名)苹果"或"使用 XX(国名)苹果"或类似用语等。上述咨询文件意见反馈期截至 2022 年 8月11日。

[信息来源]海关总署.日本拟修订 3 项食品标准[EB/OL]. (2022-7-19). http://www.tbt.org.cn/warningDetail.html?id=COZoSK6uTFDxEEbCskbd8dzGnn8UEg3GLRUXsMN