

· 合成生物技术 ·

产麦角硫因大肠杆菌工程菌株的构建与优化

王丽^{1,2}, 王阳^{1,3}, 李江华^{2,3}, 堵国成^{2,3}, 康振^{1,2,3}

1 江南大学 生物工程学院, 糖化学与生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

3 江南大学 未来食品中心, 江苏 无锡 214122

王丽, 王阳, 李江华, 堵国成, 康振. 产麦角硫因大肠杆菌工程菌株的构建与优化. 生物工程学报, 2022, 38(2): 796-806.

WANG L, WANG Y, LI JH, DU GC, KANG Z. Construction and optimization of ergothioneine-producing *Escherichia coli*. Chin J Biotech, 2022, 38(2): 796-806.

摘要: 麦角硫因 (ergothioneine, ERG) 是一种天然的抗氧化剂, 广泛应用于化妆品、食品以及医药领域。相比于传统植物提取和化学合成方法, 微生物发酵合成麦角硫因具有周期短、成本低等优点, 因而受到广泛关注。为构建高产麦角硫因的大肠杆菌工程菌株, 本研究以大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21(DE3) 为出发菌株, 通过引入耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis*) 来源的麦角硫因合成基因簇 *egtABCDE* 以及粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 来源的 Egt1, 构建了从头发酵合成麦角硫因的工程菌株 E1-A1, 麦角硫因发酵浓度为 (95.58±3.20) mg/L。为进一步提高麦角硫因的产量, 对前体氨基酸组氨酸、甲硫氨酸以及半胱氨酸合成路径中关键酶的表达进行了强化, 结果表明, 单一表达基因 *serA*^{T410STOP}、*thrA* 以及两者共表达时, 麦角硫因发酵浓度分别提高至 (134.83±4.22) mg/L、(130.26±3.34) mg/L 以及 (144.97±5.40) mg/L。最后, 采用分批补料发酵策略, 菌株 E1-A1-*thrA-serA*^{*} 在无机盐培养基和丰富培养基培养中的产量分别为 548.75 mg/L 和 710.53 mg/L。

关键词: 麦角硫因; 代谢工程; 大肠杆菌; 氨基酸; 分批补料发酵

Received: February 26, 2021; **Accepted:** May 25, 2021

Supported by: Jiangsu Province Natural Science Fund for Distinguished Young Scholars, Chian (BK20200025); National Natural Science Foundation of China (32000058, 31970085); National First-class Discipline Program of Light Industry Technology and Engineering, China (LITE2018-16)

Corresponding author: KANG Zhen. Tel: +86-510-85918307; Fax: +86-510-85918309; E-mail: zkang@jiangnan.edu.cn

基金项目: 江苏省杰出青年基金项目 (BK20200025); 国家自然科学基金面上项目 (32000058, 31970085); 国家轻工技术与工程一流学科自主课题 (LITE2018-16)

Construction and optimization of ergothioneine-producing *Escherichia coli*

WANG Li^{1,2}, WANG Yang^{1,2}, LI Jianghua^{2,3}, DU Guocheng^{2,3}, KANG Zhen^{1,2,3}

1 Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 Science Center for Future Foods, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Ergothioneine (ERG) is a natural antioxidant that has been widely used in the fields of food, medicine and cosmetics. Compared with traditional plant extraction and chemical synthesis approaches, microbial synthesis of ergothioneine has many advantages, such as the short production cycle and low cost, and thus has attracted intensive attention. In order to engineer an ergothioneine high-yielding *Escherichia coli* strain, the ergothioneine synthesis gene cluster *egtABCDE* from *Mycobacterium smegmatis* and *egtI* from *Schizosaccharomyces pombe* were introduced into *E. coli* BL21(DE3) to generate a strain E1-A1 harboring the ergothioneine biosynthesis pathway. As a result, (95.58±3.2) mg/L ergothioneine was produced in flask cultures. To further increase ergothioneine yield, the relevant enzymes for biosynthesis of histidine, methionine, and cysteine, the three precursor amino acids of ergothioneine, were overexpressed. Individual overexpression of *serA*^{T410STOP} and *thrA* resulted in an ergothioneine titer of (134.83±4.22) mg/L and (130.26±3.34) mg/L, respectively, while co-overexpression of *serA*^{T410STOP} and *thrA* increased the production of ergothioneine to (144.97±5.40) mg/L. Eventually, by adopting a fed-batch fermentation strategy in 3 L fermenter, the optimized strain E1-A1-*thrA-serA** produced 548.75 mg/L and 710.53 mg/L ergothioneine in glucose inorganic salt medium and rich medium, respectively.

Keywords: ergothioneine; metabolic engineering; *Escherichia coli*; amino acids; fed-batch fermentation

麦角硫因 (ergothioneine, ERG) 是一种天然氨基酸衍生物, 是由组氨酸衍生而来的硫醇化合物^[1], 研究表明麦角硫因具有多种生物学功能, 它不仅具有很强的有抗氧化活性: 可以清除羟自由基、螯合二价金属离子以及激活抗氧化酶、抑制超氧化物歧化酶等^[2], 而且也具有抗炎和保护细胞的作用^[3], 因此, 麦角硫因在食品、医药以及化妆品领域中得到了广泛应用^[4]。目前, 生产麦角硫因的方法主要有提取法、化学合成法以及微生物生物合成法^[5]。其中, 提取法制备得到的麦角硫因杂质多、产

出比低, 难以实现大规模工业化生产; 化学合成法合成麦角硫因则具有成本高、难度大、产品安全性难以得到保证等缺点; 相比之下, 微生物合成法具有成本低、生产周期短且绿色环保等诸多优点, 因此利用微生物合成麦角硫因具有十分广阔的前景^[6]。

目前, 如图 1A 所示, 在耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis*) 中, 麦角硫因的合成途径包含 5 步酶催化反应, 这些酶由基因簇 *egtABCDE* 编码。首先, EgtD 将 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 的 3 个甲基转移至 L-组氨酸 (L-His)

来催化合成 L-组氨酸甜菜碱 (HER) 的形成。其次, EgtA 作为 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶将谷氨酸 (L-Glu) 与半胱氨酸 (L-Cys) 连接为 γ -谷氨酰半胱氨酸 (γ GC)。接着, EgtB 催化 γ GC 和 HER 之间 C-S 键的形成, 以形成海西烯基- γ -谷氨酰半胱氨酸亚砷 (γ GC-HER)。然后, EgtC 除去 γ GC-HER 中的 L-谷氨酸 (L-Glu) 部分, 生成庚基半胱氨酸亚砷 (Cys-HER)。最后, EgtE 裂解 C-S 键, 最终生成 ERG, 同时产生副产物丙酮酸和氨^[7]。而在真菌中, 如图 1B 所示, 麦角硫因的生物合成, 仅需要两个酶 Egt1 和 Egt2。Egt1 先催化 L-组氨酸生成 HER, 再直接利用 L-Cys 与 HER 生成 Cys-HER, 最后, Egt2 裂解 Cys-HER 中的 C-S 键, 形成 ERG^[8]。

利用微生物生产麦角硫因已有相关报道, 但是普遍存在麦角硫因产量低、生产周期长的问题。到目前为止, 已经报道了通过细菌和丝状真菌发酵生产麦角硫因, 包括水产甲基杆菌 (*Methylobacterium aquaticum*) 22A^[9]、普氏金黄色葡萄球菌 (*Aureobasidium pullulans*)^[10]、粘枝

红假单胞菌 (*Rhodotorula mucilaginosa*)^[10]、蓝细菌 (*Cyanobacteria*)^[11]、米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)^[12] 和大肠杆菌 (*Escherichia coli*)^[13-14]。在水生甲基杆菌中, 敲除基因 *hutH* 后, 麦角硫因产量为 7.0 mg ERG/g 干细胞重量^[10]。在丝状真菌米曲霉的基因组中整合多个拷贝的 *egt1* 和 *egt2*, 该工程菌株每千克固体培养基合成 231 mg 麦角硫因^[15]。在大肠杆菌中, 通过表达耻垢分枝杆菌的基因簇 *egtBCDE* 并结合培养基优化, 麦角硫因产量为 24 mg/L^[13]。在此基础上, 利用大肠杆菌的高半胱氨酸生产系统, 以及引入基因 *egtA*, 敲除基因 *metJ*, 通过补料分批发酵, 麦角硫因产量提高至 1.3 g/L^[14], 但生产周期过长 (216 h), 麦角硫因产率仅为 6.02 mg/(L·h)。在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中, 引入并整合不同来源的麦角硫因合成途径, 在 1 L 发酵罐分批补料培养中得到 (598±18) mg/L 麦角硫因^[16]。因此, 获得生产周期短同时能高效生产麦角硫因的工程菌株具有重要意义。

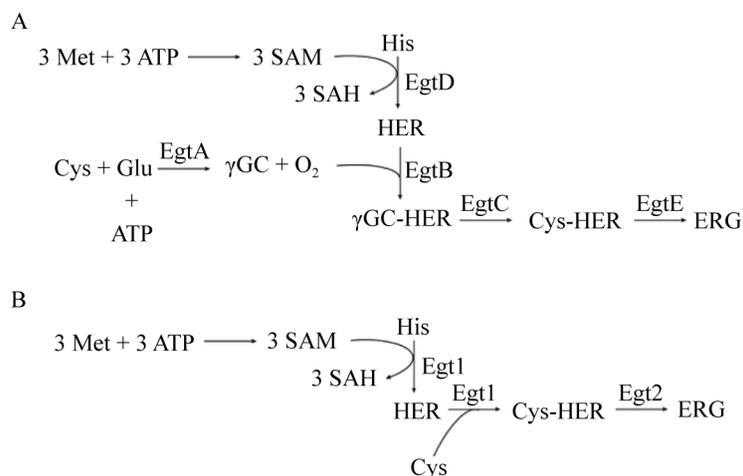


图 1 麦角硫因合成途径示意图 A: 耻垢分枝杆菌来源; B: 真菌来源

Figure 1 Ergothioneine biosynthesis pathway from *M. smegmatis* (A) and from fungus (B).

本研究以大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3) 为出发菌株, 构建了从头合成麦角硫因的工程菌株。并在此基础上对前体氨基酸代谢途径进行改造, 优化了组氨酸、甲硫氨酸以及半胱氨酸合成途径中的关键酶的表达, 进一步提高了工程菌株合成麦角硫因的能力。最后, 为了探究工程菌株规模化生产麦角硫因的潜力, 实现了在 3 L 发酵罐中高强度麦角硫因的生产。

1 材料与方 法

1.1 菌株和质粒

本实验所有的质粒构建均在 *E. coli* JM109 菌株中进行, *E. coli* BL21(DE3) 为合成麦角硫因的表达菌株。*E. coli* BL21(DE3)、谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 13032 和粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 基因组被用于扩增目的基因。*S. pombe* 购于中国工业微生物菌种保藏管理中心, 编号为 CGMCC 2.1348, 其余菌株均由本实验室保存。本实验中使用的菌株和质粒见表 1。

1.2 培养基

LB 培养基: 5 g/L 酵母粉, 10 g/L 胰蛋白胨, 10 g/L NaCl; LB 固体培养基中需另加 1.5% (*M/V*) 琼脂粉。摇瓶培养基: 20 g/L 葡萄糖, 16 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 16 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 3 g/L KH_2PO_4 , 2 g/L 酵母粉, 5 mmol/L MgSO_4 , 0.1 mmol/L CaCl_2 (pH 6.8–7.0)。无机盐培养基: 同摇瓶培养基。丰富培养基: 20 g/L 葡萄糖, 6 g/L 酵母粉, 4 g/L 胰蛋白胨, 25 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 6 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4 g/L KH_2PO_4 , 2 g/L 柠檬酸, 0.1 mg/L 维生素 H, 1 mL 微量元素 (pH 6.8–7.0)。微量元素: 2.4 g/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.8 g/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.15 g/L $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,

0.3 g/L ZnCl_2 , 0.3 g/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.075 g/L H_3BO_3 , 1.2 g/L MnSO_4 , 10 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 溶解于 120 mmol/L HCl 中, 过滤除菌。

1.3 重组质粒的构建

基因 *egtBCDE* 由天霖生物科技 (无锡) 有限公司合成, 基因 *egtA* 由金唯智 (苏州) 生物有限公司合成, 基因 *egt1* 和 *egt2* 从 *S. pombe* 基因组上扩增, 基因 *metA*、*thrA*、*nrdH*、*cysK*、*cysE* 均从 *E. coli* BL21(DE3) 基因组上扩增, 基因 *hisG* 和 *serA* 从 *C. glutamicum* ATCC 13032 基因组上扩增。使用一步克隆酶或 Gibson 多片段组装酶构建质粒, 通过菌落 PCR 及测序验证质粒是否构建成功。将合成的基因簇 *egtBCDE* 连接在质粒 pRSFDuet-1 上, 构建得到重组质粒 pRSF-*egtBCDE*。将基因 *egtB* 与 *egtD* 融合成一个片段, 中间用 RBS (5'-GAAGGAGATATAACC-3') 连接, 连接在质粒 pRSFDuet-1 第一个多克隆位点的 *Nco* I 和 *Hind* III 两个酶切位点之间, 同样的将基因 *egtC* 与 *egtE* 融合成一个片段, 中间用 RBS 连接, 连接在质粒 pRSFDuet-1 第二个多克隆位点的 *Nde* I 和 *Pac* I 两个酶切位点之间。在质粒 pRSF-*egtBCDE* 的基础上, 通过 PCR 扩增获得线性质粒载体和基因 *egt1* 和 *egt2*, 连接后获得质粒 pRSF-*egt1-E* 和 pRSF-*egtBCD-2*。采用类似方法获得质粒 pCDF-*egt1*、pCDF-*egt2*、pCDF-*egtA*、pCDF-*egtA-1*、pCDF-*egtA-1-hisG*、pCDF-*egtA-1-metA*、pCDF-*egtA-1-thrA*、pCDF-*egtA-1-cysK*、pCDF-*egtA-1-nrdH*、pCDF-*egtA-1-cysE*、pCDF-*egtA-1-serA*。对质粒 pCDF-*egtA-1-hisG*、pCDF-*egtA-1-cysE*、pCDF-*egtA-1-serA* 进行改造后, 获得质粒 pCDF-*egtA-1-hisG*^{G233H,T235Q}、pCDF-*egtA-1-cysE*^{T167A}、pCDF-*egtA-1-serA*^{T410STOP}。

表 1 本文所用质粒和菌株

Table 1 Plasmids and strains used in this study

Names	Description	Sources
Plasmids		
pRSFDuet-1	Expression vector, <i>Kan</i> ^R	Lab stock
pCDFDuet-1	Expression vector, <i>Str</i> ^R	Lab stock
pRSF- <i>egtBCDE</i>	pRSFDuet-1 containing <i>egtBCDE</i>	This work
pRSF- <i>egt1-E</i>	pRSFDuet-1 containing <i>egt1</i> and <i>egtE</i>	This work
pRSF- <i>egtBCD-2</i>	pRSFDuet-1 containing <i>egtBCD</i> and <i>egt1</i>	This work
pCDF- <i>egt1</i>	pCDFDuet-1 containing <i>egt1</i>	This work
pCDF- <i>egt2</i>	pCDFDuet-1 containing <i>egt2</i>	This work
pCDF- <i>egtA</i>	pCDFDuet-1 containing <i>egtA</i>	This work
pCDF- <i>egtA-1</i>	pCDFDuet-1 containing <i>egtA</i> and <i>egt1</i>	This work
pCDF- <i>egtA-1-hisG</i>	pCDFDuet-1 containing <i>egtA</i> , <i>egt1</i> and <i>hisG</i>	This work
pCDF- <i>egtA-1-hisG</i> ^{G233H, T235Q}	pCDFDuet-1 containing <i>egtA</i> , <i>egt1</i> and <i>hisG</i> ^{G233H, T235Q}	This work
pCDF- <i>egtA-1-metA</i>	pCDFDuet-1 containing <i>egtA</i> , <i>egt1</i> and <i>metA</i>	This work
pCDF- <i>egtA-1-thrA</i>	pCDFDuet-1 containing <i>egtA</i> , <i>egt1</i> and <i>thrA</i>	This work
pCDF- <i>egtA-1-cysK</i>	pCDFDuet-1 containing <i>egtA</i> , <i>egt1</i> and <i>cysK</i>	This work
pCDF- <i>egtA-1-nrdH</i>	pCDFDuet-1 containing <i>egtA</i> , <i>egt1</i> and <i>nrdH</i>	This work
pCDF- <i>egtA-1-cysE</i> ^{T167A}	pCDFDuet-1 containing <i>egtA</i> , <i>egt1</i> and <i>cysE</i> ^{T167A}	This work
pCDF- <i>egtA-1-serA</i> ^{T410STOP}	pCDFDuet-1 containing <i>egtA</i> , <i>egt1</i> and <i>serA</i> ^{T410STOP}	This work
pCDF- <i>egtA-1-thrA-serA</i> ^{T410STOP}	pCDFDuet-1 containing <i>egtA</i> , <i>egt1</i> , <i>thrA</i> and <i>serA</i> ^{T410STOP}	This work
Strains		
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Expression host	Lab stock
E1	<i>E. coli</i> BL21(DE3) harboring pRSF- <i>egtBCDE</i>	This work
E2	<i>E. coli</i> BL21(DE3) harboring pRSF- <i>egt1-E</i>	This work
E3	<i>E. coli</i> BL21(DE3) harboring pRSF- <i>egtBCD-2</i>	This work
E1-1	E1 harboring pCDF- <i>egt1</i>	This work
E1-2	E1 harboring pCDF- <i>egt2</i>	This work
E1-A	E1 harboring pCDF- <i>egtA</i>	This work
E1-A1	E1 harboring pCDF- <i>egtA-1</i>	This work

1.4 麦角硫因生产菌株的发酵条件

1.4.1 摇瓶培养

挑取平板上的单菌落接种于 2 mL 液体 LB 培养基,于 37 °C、220 r/min 过夜培养。按 2% (V/V) 接种量将种子液接种于含有 25 mL 摇瓶培养基的 250 mL 摇瓶中,37 °C、220 r/min 培养菌体 OD_{600} 至 1.0 左右时,添加终浓度为 0.2 mmol/L 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG),并降低摇床温度至 25 °C 进行诱导培养,培养 96 h。各培养过程中

添加卡那霉素和链霉素,终浓度均为 50 mg/L。

1.4.2 3 L 发酵罐补料发酵

挑取单菌落接种于 2 mL 液体 LB 培养基中,37 °C、220 r/min 过夜培养。再将 1 mL 培养液接种于 50 mL LB 培养基中,37 °C、220 r/min 培养 10 h。然后将 150 mL 种子液接种到装有 1.2 L 发酵培养基的 3 L 发酵罐中,在 37 °C、pH 6.8、溶氧 35%的条件下发酵,菌体生长 6 h 后降低温度至 25 °C 并添加终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG 诱导培养,发酵过程以氨水控制 pH。

各培养过程中, 添加终浓度分别为 50 mg/L 的卡那霉素和 50 mg/L 的链霉素。定时取样检测菌体生长情况, 残糖和麦角硫因的产量。

1.5 分析方法

1.5.1 液相色谱质谱联用 (LC-MS) 法鉴定麦角硫因的合成

LC 洗脱条件为: 60 min 内甲醇浓度由 0 线性上升至 40%; MS 的检测条件为: 在负离子的模式下对样品进行 100–900 m/z 的扫描, 选择氮气为载气。

1.5.2 高效液相色谱 (HPLC) 法检测麦角硫因含量

麦角硫因的 HPLC 法检测, 采用 Agilent 1200 高效液相检测系统, UV 检测器, C18 柱 (Agilent ZORBAX Eclipse Plus, 250 mm×4.6 mm, 5 μm)。流动相比例: 水/甲醇=99/1, 流速: 0.7 mL/min, 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$, 紫外吸收: 257 nm, 进样体积: 5 μL , 检测时长: 20 min。

配制浓度分别为 5 mg/L、25 mg/L、50 mg/L、100 mg/L、200 mg/L 和 500 mg/L 的麦角硫因标准品, 利用上述 HPLC 检测方法, 以麦角硫因标准品浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。标准曲线线性方程为 $y=35.484x-49.415$, $R^2=1.0$ 。

1.5.3 麦角硫因样品处理

将发酵液在 10 000 r/min 转速下离心 2 min, 上清稀释适当倍数后过 0.22 μm 的水系膜待测, 沉淀破壁处理后, 同样离心取上清, 同发酵上清一样处理待测。

1.5.4 其他检测方法

细胞菌体量测量方法: 菌液稀释适当倍数后, 使用分光光度计测定在 OD_{600} 的吸收值; 葡萄糖浓度: 将发酵液在 10 000 r/min 转速下离心 2 min, 取上清稀释适当倍数, 采用 SBA-40E 系列生物传感分析仪测定发酵液中葡萄糖浓度。

2 结果与分析

2.1 麦角硫因合成途径的构建

质粒 pRSFDuet-1 和 pCDFDuet-1 为大肠杆菌中的兼容质粒, 且都含有双 T7 启动子, 由于本研究中需表达的基因数较多, 因此选用这两个质粒作为载体。质粒 pRSFDuet-1 用于构建耻垢分枝杆菌来源的麦角硫因合成途径 (图 2A), 将质粒 pRSF-*egtBCDE* 化学法转化进宿主菌 *E. coli* BL21(DE3) 中, 获得重组菌株 E1, 摇瓶培养菌株 E1, 通过 LC-MS 验证菌株 E1 是否能够合成麦角硫因, 结果如图 2B 所示。通过对比麦角硫因标品和样品的 LC-MS 检测结果可知, 两者出峰时间相同, 所检测样品的质荷比 ($m/z=230.1$) 与标准品一致, 该结果表明重组菌株 E1 成功合成麦角硫因。根据标准曲线进行计算, 菌株 E1 合成麦角硫因的产量为 (58.87 ± 2.31) mg/L。

2.2 麦角硫因合成途径的优化

在研究了耻垢分枝杆菌中麦角硫因合成途径的基础上, 本研究进一步考察了粟酒裂殖酵母中麦角硫因的合成途径。粟酒裂殖酵母中实现麦角硫因的合成仅需要两个途径酶 Egt1 和 Egt2 (图 3A)。在耻垢分枝杆菌来源途径合成麦角硫因的基础上, 分别将 Egt1 和 Egt2 替代相应的催化步骤, 验证 Egt1 和 Egt2 是否具有相应的催化功能。分别用 Egt1 取代 EgtBCD, 得到重组菌株 E2, 用 Egt2 取代 EgtE, 得到重组菌株 E3。通过摇瓶培养及 LC-MS 检测, 重组菌株 E2 和 E3 均能合成产物麦角硫因, 产量分别为 (29.05 ± 1.60) mg/L 和 (26.34 ± 2.90) mg/L (图 3B)。该结果说明, Egt1 和 Egt2 均能催化相应反应。因此, 本研究在重组菌株 E1 的基础上引入 Egt1 或 Egt2, 构建菌株 E1-1 和 E1-2, 以提高麦角硫因合成途径中相应反应的代谢流。同时, 本

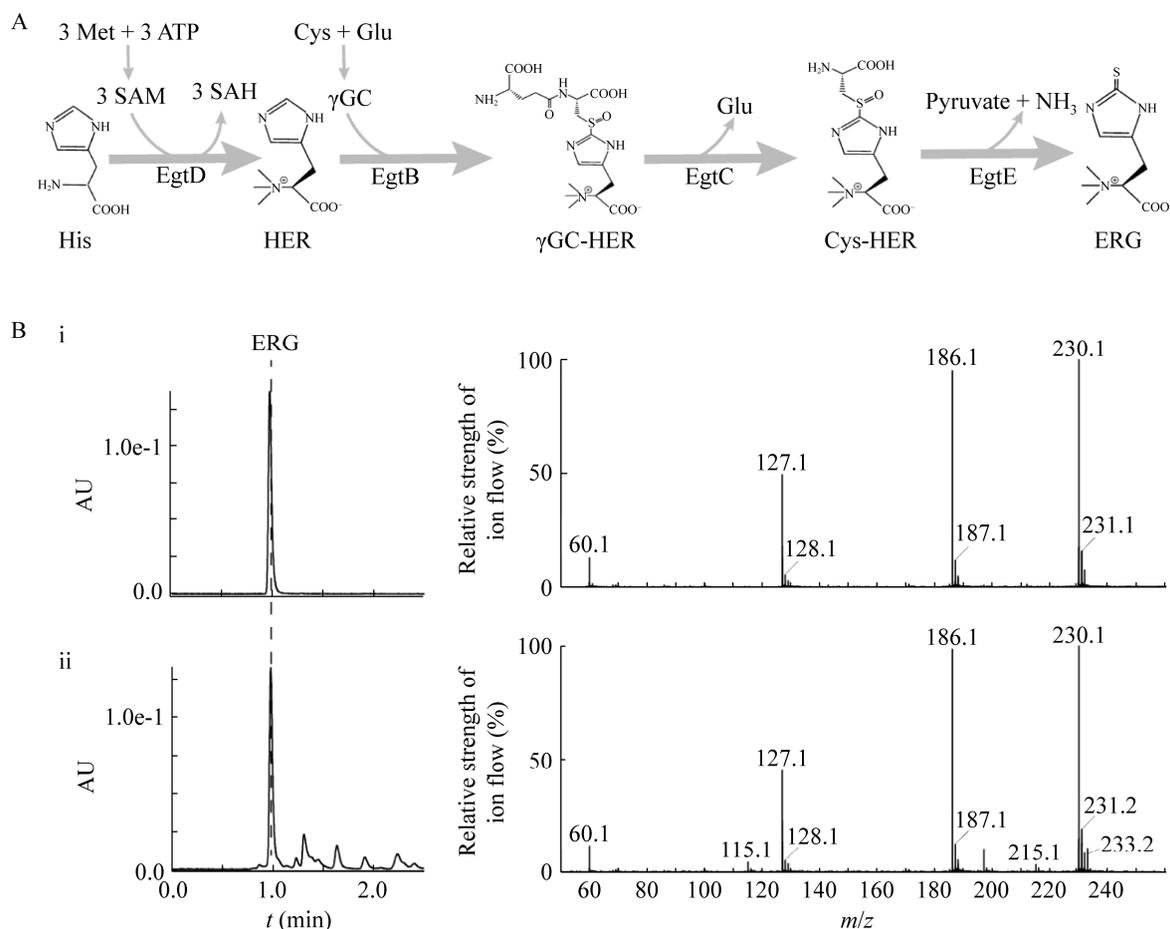


图2 耻垢分枝杆菌来源麦角硫因合成途径的构建 A: 合成途径示意图; B: LC-MS 检测结果

Figure 2 Construction of the ergothioneine biosynthetic pathway derived from *M. smegmatis* (A) and LC-MS profile (B). i: LC-MS results of standard samples; ii: LC-MS results of samples. Met: methionine; ATP: adenosine-triphosphate; SAM: S-adenosylmethionine; SAH: S-adenosylhomocysteine; His: histidine; Cys: cysteine; Glu: glutamate; HER: hercynine; γ -GC: γ -glutamylcysteine; γ -GC-HER: hercynyl- γ -glutamylcysteine sulfoxide; Cys-HER: hercynylcysteine sulfoxide; ERG: ergothioneine.

研究还考察了前体物质 γ -谷氨酰半胱氨酸的合成反应, 在 *E. coli* BL21(DE3) 基因组上具有 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶 GshA 的基础上, 进一步引入耻垢分枝杆菌来源的同工酶 EgtA, 构建菌株 E1-A。

如图 3B 所示, 在菌株 E1 中表达 Egt2 并没有提高产量, 而表达 Egt1、EgtA 分别使得产量由 (58.87 ± 2.31) mg/L 提高至 (64.74 ± 4.83) mg/L 和 (84.55 ± 1.73) mg/L。因此, 在菌株 E1 中同

时引入 Egt1 和 EgtA, 将该菌株命名为 E1-A1, 产量提高至 (95.58 ± 3.20) mg/L, 为出发菌株的 1.62 倍。

2.3 增强前体氨基酸积累

麦角硫因合成过程中需要利用 4 种氨基酸, 分别为组氨酸、甲硫氨酸、半胱氨酸以及谷氨酸, 其中谷氨酸是循环利用, 因此, 本研究主要考察了提高组氨酸、甲硫氨酸和半胱氨酸的积累对于麦角硫因合成的影响, 代谢途径

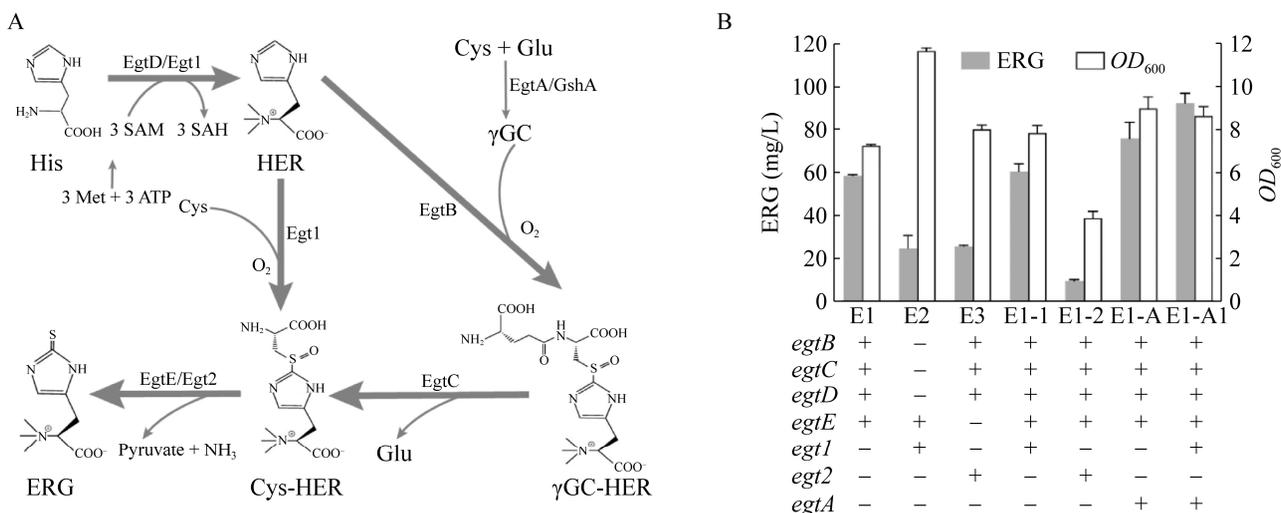


图3 麦角硫因合成途径的优化 A: 途径优化示意图; B: 工程菌株生长情况及麦角硫因产量

Figure 3 Optimization of the ergothioneine biosynthesis pathway (A) and the growth and ergothioneine production of different engineered strains (B). All data and standard deviations in (B) were derived from three independent biological replicates.

见图4A。首先,在组氨酸的代谢途径中,关键酶 HisG 所受的反馈抑制作用是影响组氨酸积累的最主要因素^[17]。但由于组氨酸的合成过程十分耗能^[18],因此 HisG 的活性不宜过强,避免占用细胞大量的资源,影响组氨酸的积累以及它的突变体 (G233H, T235Q) 的生长^[17]。接着,在甲硫氨酸的代谢途径中,天冬氨酸激酶 (ThrA)^[19]和高丝氨酸酰基转移酶 (MetA)^[20]是甲硫氨酸合成途径的主要合成酶,因此对这两个酶进行了过表达。因此本实验选择了谷氨酸棒杆菌来源的 HisG。最后,在半胱氨酸的代谢途径中,半胱氨酸的生物合成主要取决于碳源和硫源,其中乙酰基-L-丝氨酸 (acetyl-L-serine) 是碳代谢和硫代谢之间的关键节点^[21],而 *E. coli* BL21(DE3) 基因组中的磷酸甘油酸脱氢酶 SerA 和丝氨酸乙酰转移酶 CysE 均会受到相应产物的反馈抑制^[22],因此本实验选用了谷氨酸棒杆菌来源的基因 *serA* 并对其进行了截短,对 *E. coli* BL21(DE3) 自身的基因 *cysE* 进行了突变 (T167A)^[22],除此之外,本实验还过

表达了半胱氨酸合酶 NrdH 和 CysK^[23]。如图4B所示,在菌株 E1-A1 的基础上分别表达上述基因,其中表达谷氨酸棒杆菌来源的 *hisG*^{G233H, T235Q} 和 *serA*^{T410STOP}、丝氨酸乙酰转移酶突变体 *cysE*^{T167A} 以及 *thrA* 使麦角硫因的产量得到了提高,产量分别为 (104.90±2.91) mg/L、(130.26±3.34) mg/L、(110.41±3.61) mg/L 和 (134.83±4.22) mg/L,结果表明,表达 *serA*^{T410STOP} 和 *thrA* 对麦角硫因产量有明显提高,于是将两个基因进行共表达,将此菌株命名为 E1-A1-*thrA-serA*^{c.g*},最终使麦角硫因产量进一步提高至 (144.97±5.40) mg/L。

2.4 3 L 发酵罐补料发酵与培养基优化

为了评估麦角硫因规模化生产的潜力,根据前期研究,选定最优菌株 E1-A1-*thrA-serA*^{c.g*} 在 3 L 发酵罐中进行补料发酵。本研究采取了两种不同的培养基进行发酵比较。由于麦角硫因是氨基酸衍生物,在营养匮乏条件下,菌体会不断合成各种氨基酸,为麦角硫因的不断合成提供可能,因此选择无机盐培养基;为与之

比较,选择营养丰富培养基,在营养丰富条件下,菌体生长 OD_{600} 可达到更高水平,可提高各种前体氨基酸的积累,从而促进麦角硫因的合成。采用无机盐培养基发酵培养时,菌体 OD_{600} 最高达到 30.18,在发酵培养 108 h 时,麦角硫因产量为 548.75 mg/L (41.01 mg ERG/g 细胞干重) (图 5A)。采用丰富培养基培养时,最高菌体 OD_{600} 提高至 45.7,是无机盐培养基条件下的 1.51 倍。发酵培养至 72 h 时,麦角硫因的生产进入稳定期,在 108 h 最高产量达到 710.53 mg/L (35.05 mg ERG/g 细胞干重) (图 5B),是摇瓶产量的 4.91 倍,麦角硫因产率为 6.58 mg/(L·h)。

3 讨论

麦角硫因具有抗氧化、抗炎、保护细胞等生理功能,广泛应用于食品、医药以及化妆品等领域,因此构建能够高效合成麦角硫因的工程菌株具有重要意义。大肠杆菌不具备合成麦角硫因的能力,但其能够合成麦角硫因合成途径中所需的各类前体氨基酸,为构建麦角硫因大肠杆菌工程菌株提供了可能。

本研究首先在 *E. coli* BL21(DE3) 中利用

高拷贝质粒 pRSFDuet-1 异源表达耻垢分枝杆菌来源的基因簇 *egtBCDE*,获得重组菌株 E1,实现了麦角硫因在大肠杆菌中的合成。然后,在 E1 的基础上引入其他来源的麦角硫因合成途径酶 *Egt1* 和 *EgtA*,构建重组菌株 E1-1 和 E1-A,两者的引入能促进麦角硫因的直接前体庚基半胱氨酸亚砷的合成,有效地提高了麦角硫因的产量。同时引入 *Egt1* 和 *EgtA*,获得了更高产量的重组菌株 E1-A1。在此基础上,对间接前体组氨酸、甲硫氨酸以及半胱氨酸合成路径中关键酶的表达进行了强化,提升了麦角硫因的产量。本研究表明,提高前体的供给可有效促进麦角硫因的合成,在后续的研究中可进一步优化途径酶 *EgtB* 和 *EgtC* 的表达,或者抑制竞争途径,从而有效提升麦角硫因的产量。此外,对于麦角硫因合成转运机制的研究较少,解析并改造其转运体系同样具有重要意义。最后,本研究考察了重组菌株麦角硫因规模化生产能力,采用 3 L 发酵罐补料发酵,在丰富培养基培养下,获得了更高浓度的麦角硫因,该结果表明菌体密度对麦角硫因产量影响明显,为获得更高浓度的麦角硫因,可进一步优化培养基的成分,提高菌体密度,从而提高麦角硫因

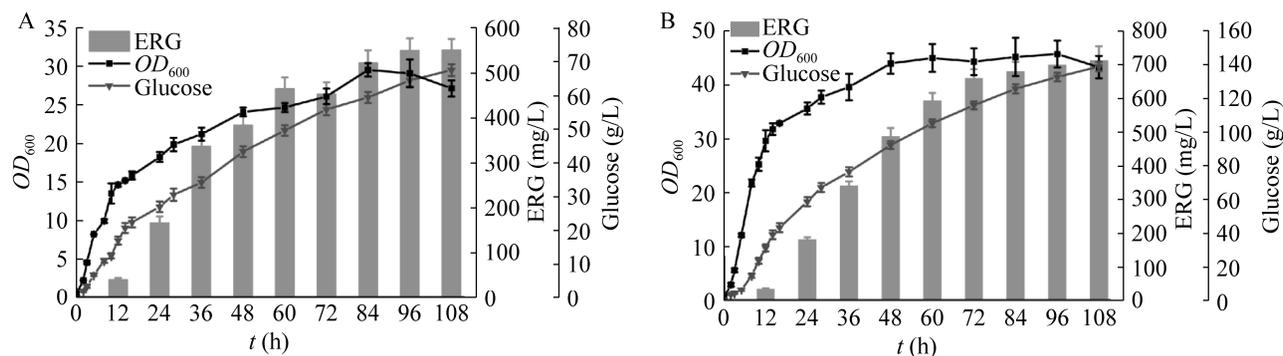


图 5 3 L 罐分批补料发酵

Figure 5 Fed-batch production of ergothioneine in a 3 L bioreactor using medium 1 (A) and medium 2 (B). All data and standard deviations were derived from three independent biological replicates.

产量。目前报道合成麦角硫因产量最高的大肠杆菌发酵周期长达 216 h, 产率为 6.02 mg/(L·h), 而本研究构建的麦角硫因工程菌发酵周期短 (108 h)、产率高 (6.58 mg/(L·h))。

综上, 本研究通过代谢工程改造大肠杆菌, 构建了合成麦角硫因的工程菌株, 实现了麦角硫因的高强度生产, 为麦角硫因的工业化生产奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Melville DB. Ergothioneine. *Vitamins Horm*, 1959, 17: 155-204.
- [2] Akanmu D, Cecchini R, Aruoma OI, et al. The antioxidant action of ergothioneine. *Arch Biochem Biophys*, 1991, 288(1): 10-16.
- [3] Paul BD, Snyder SH. The unusual amino acid L-ergothioneine is a physiologic cytoprotectant. *Cell Death Differ*, 2010, 17(7): 1134-1140.
- [4] Markova NG, Karaman-Jurukovska N, Dong KK, et al. Skin cells and tissue are capable of using L-ergothioneine as an integral component of their antioxidant defense system. *Free Radic Biol Med*, 2009, 46(8): 1168-1176.
- [5] Barry H. Reflections of an aging free radical. *Free Radic Biol Med*, 2020, 161: 234-245.
- [6] Wang J, Guleria S, Koffas MA, et al. Microbial production of value-added nutraceuticals. *Curr Opin Biotechnol*, 2016, 37: 97-104.
- [7] Seebeck FP. *In vitro* reconstitution of *Mycobacterial* ergothioneine biosynthesis. *J Am Chem Soc*, 2010, 132(19): 6632-6633.
- [8] 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. *PLoS One*, 2014, 9(5): e97774.
- [9] Alamgir KM, Masuda S, Fujitani Y, et al. Production of ergothioneine by *Methylobacterium* species. *Front Microbiol*, 2015, 6: 1185.
- [10] Fujitani Y, Alamgir KM, Tani A. Ergothioneine production using *Methylobacterium* species, yeast, and fungi. *J Biosci Bioeng*, 2018, 126(6): 715-722.
- [11] Pfeiffer C, Bauer T, Surek B, et al. Cyanobacteria produce high levels of ergothioneine. *Food Chem*, 2011, 129(4): 1766-1769.
- [12] Albaek MO, Gernaey KV, Hansen MS, et al. Modeling enzyme production with *Aspergillus oryzae* in pilot scale vessels with different agitation, aeration, and agitator types. *Biotechnol Bioeng*, 2011, 108(8): 1828-1840.
- [13] 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.
- [14] Tanaka N, Kawano Y, Satoh Y, et al. Gram-scale fermentative production of ergothioneine driven by overproduction of cysteine in *Escherichia coli*. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 1895.
- [15] Takusagawa S, Satoh Y, Ohtsu I, et al. Ergothioneine production with *Aspergillus oryzae*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2019, 83(1): 181-184.
- [16] Van Der Hoek SA, Darbani B, Zugaj KE, et al. Engineering the yeast *Saccharomyces cerevisiae* for the production of L-(+)-ergothioneine. *Front Bioeng Biotechnol*, 2019, 7: 262.
- [17] Wu H, Tian D, Fan X, et al. Highly efficient production of L-histidine from glucose by metabolically engineered *Escherichia coli*. *ACS Synth Biol*, 2020, 9(7): 1813-1822.
- [18] Winkler ME, Ramos-Montañez S. Biosynthesis of histidine. *Ecosal Plus*, 2009, 3(2): 1-34.
- [19] Niu K, Xu YY, Wu WJ, et al. Effect of dissolved oxygen on L-methionine production from glycerol by *Escherichia coli* W3110BL using metabolic flux analysis method. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2020, 47(3): 287-297.
- [20] Shen W, Gao C, Cueto R, et al. Homocysteine-methionine cycle is a metabolic sensor system controlling methylation-regulated pathological signaling. *Redox Biol*, 2020, 28: 101322.
- [21] Liu W, Zhu X, Lian J, et al. Efficient production of glutathione with multi-pathway engineering in *Corynebacterium glutamicum*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2019, 46(12): 1685-1695.
- [22] Liu H, Fang G, Wu H, et al. L-cysteine production in *Escherichia coli* based on rational metabolic engineering and modular strategy. *Biotechnol J*, 2018, 13(5): e1700695.
- [23] Liu H, Hou YH, Wang Y, et al. Enhancement of sulfur conversion rate in the production of L-cysteine by engineered *Escherichia coli*. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(1): 250-257.

(本文责编 郝丽芳)