

一种生物发酵合成制备麦角硫因的方法

杨家森

南京纽邦生物科技优先公司 江苏 南京 210034

【摘要】：麦角硫因属于细胞生理保护剂的一种，常用于食品、饮料、化妆品、药品等。该行业具有广阔的应用前景，现生物合成成为研究麦角硫因制备方法的热点。近年来，在发现麦角硫因生物的合成途径、生物合成关键酶的提取、天然食用真菌方面有了新的进展。高产工程菌的开发也在研制进程中。从分子层面深入认识麦角硫因生物的合成调节机制，并以此利用发酵、新陈代谢和合成生物学的新技术，以期大幅度增加麦角硫因的生物合成水平。

【关键词】：发酵工程；生物合成；麦角硫因；代谢工程

已有的研究表明，麦角硫因的抗氧化性可以抑制 H_2O_2 的形成，清除自由基（羟基、四氯化碳过氧化物、跌单化合物）的产生。Asmus 等发现麦角硫因能有效清除自由基并且促进 Vc 的再生进而促进生育酚和生育醌转化为 Ve^[1]。Ve 可降低胎儿畸形的发生率，因此麦角硫因能够抑制及治疗由氧化应激反应引起的发育性缺陷，也有学者报道麦角硫因对糖尿病以及参与调节甲状腺及抗甲状腺的作用^[2]。除此之外，麦角硫因可螯合铜离子，形成不具有氧化还原活性的螯合物，从而抑制铜离子氧化生物大分子如 DNA 和蛋白质的损伤。因此麦角硫因可以治疗由铜离子所导致的包括老年痴呆等病症^[3]。生物体内存在麦角硫因的转运体（Ergothioneine Transporter），因此它成为了唯一可以在细胞间运输的抗氧化剂，而麦角硫因可以抑制神经组织退化类，包括帕金森在内的由于过氧化物或超氧化物造成的 DNA 损伤的疾病。在有机生物体内，口服麦角硫因可以防止亚氯酸氧化 α 1-抗蛋白酶体，从而使 α 1-抗蛋白酶体保持自身活性。麦角硫因可以抑制药物引起的脂质过氧化反应，从而保护肝细胞膜，以及对红细胞生成素和 H_2O_2 的过氧化物反应，导致花生四烯酸的产生。除此之外麦角硫因也有抗炎功能。Ito 发现麦角硫因可抑制有肿瘤坏死引发的脂肪细胞炎症因子的产生。Aruoma 等证实了麦角硫因可以在抑制 A549 细胞中肿瘤坏死因子生成的同时抑制由棕榈酸介导的白细胞介素-6 的产生^[4]。麦角硫因自被发现以来，许多学者均尝试阐述其抗氧化以及参与细胞调节的机理，但目前仍无法完全确定其生理机能。

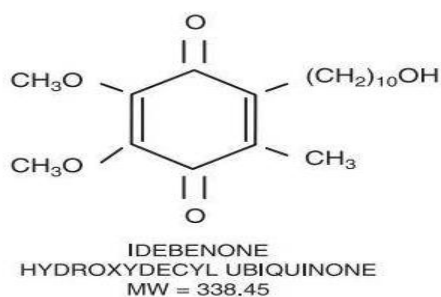


图1 麦角硫因的转化过程化学图

1 麦角硫因好氧生物的合成方法

1.1 麦角硫因好氧的生物合成

Seebeck 在 2010 年首次发现了一个基因簇，其中包含 EGTA、EGTB、EGTC、EGTD 和 EGTE 基因，其中基因簇编码五种酶，海角磺胺合成酶：EGTA- γ -谷氨酰胺-半胱氨酸酶、EGTB 单核腺苷酶、EGTC-酰胺转移酶，EGTD-SAM 依赖性甲基苯丙胺组胺和 EGTE-PLP 是 C-S 裂解酶的结合，这两种酶形成了原核合成灰核桃的土壤。同时，EGTD 和 EGTB 的同源基因也存在于蓝细菌、酸杆菌、厚壁细菌和变形细菌等多种基因中。在介子角合成硫化物的遗传多样性被发现后，泽贝克在体外水平上重建了硫丹。ERGOT 硫合成的第一步是从 EGTD 催化组胺和从合成组胺

酸中 S-腺苷-蛋氨酸；在 Fe^{2++} 和 O_2 存在的情况下，EGTB 催化 HER γ 合成半胱氨酸盐内氧化 γ -硫化氢-组胺三甲基；EGTC γ GC-HER 催化-谷氨酸脱水，在三甲基硫酸盐基础上形成升华半胱氨酸（CYS-HER）；最后，EGTE 催化 CYS-HER，去除丙酮酸和氨，形成硫分子。但由于耻垢分枝杆菌中的 EGTE 难以传递，塞贝用裂解 β 酶代替 EGTE 重建了分枝杆菌中介素的合成过程。

1.2 真核生物中麦角硫因的生物合成

1.2.1 粗糙脉孢菌中合成麦角硫因的关键酶

Bello 等首次鉴定了粗糙脉孢菌中的麦角硫因合成的关键基因 NCU04343。进一步通过同源序列比对，发现霉菌、担子菌和子囊菌等能够天然合成麦角硫因的真菌均含有 NcEgt-1 的同源基因，但是对于多数不能合成麦角硫因的酵母菌中未发现 NcEgt-1 的同源基因。NcEgt-1 编码的酶 NcEgt-1 是一个多域蛋白，N 末端是 SAM 依赖型甲基转移酶，与鸟型分枝杆菌的 EgtD 有 27% 的同源性；C 末端与鸟型分枝杆菌的 EgtB 有 24% 的同源性。egtD 和 egtB 的同源基因在多数原核生物中是相邻的基因，推测 NcEgt-1 可能衍生于 egtD 和 egtB 两个基因的融合基因。在真核生物中由 NcEgt-1 的同源基因编码的酶被命名为 Egt1，Egt1 的 DinB_2 结构域含有铁结合基序，铁结合基序同时存在于 EgtB 中，这两种酶的区别之一在于底物的特异性不同。动力学研究表明，Egt1 的最适底物是 HER 和半胱氨酸，Egt1 可催化 92% 的半胱氨酸转化为 Cys-HER，另外 8% 的半胱氨酸转化为半胱氨酸亚磺酸；EgtB 则仅能以 HER 和 γ -GC 作为底物。由于分枝杆菌含有 EgtB，在分枝杆菌中半胱氨酸首先与谷氨酸合成 γ -GC，再由 EgtB 催化 γ -GC 参与到麦角硫因的生物合成途径。进一步研究 Egt1 的功能发现它是一种双功能酶，在麦角硫因的合成途径中参与两步反应。首先 Egt1 催化组氨酸转化为 HER，再催化 HER 与半胱氨酸合成 Cys-HER。由于 Egt1 的特性，真核生物中麦角硫因的合成途径比原核中的麦角硫因合成途径更加简单。此外， γ -GC 是分枝杆菌中麦角硫因和谷胱甘肽合成途径中共同的中间体，因此分枝杆菌中的麦角硫因和谷胱甘肽的合成存在竞争关系。而在真核生物中，麦角硫因和谷胱甘肽的生物合成途径中不存在共同的中间体，因此不存在竞争关系。

1.2.2 金针菇中麦角硫因的合成酶

如上述，真核生物中麦角硫因的合成主要涉及两个关键酶的参与：具有甲基转移酶与亚磺合酶活性的双功能酶和 PLP 依赖型 C-S 裂解酶。金针菇麦角硫因的生物合成需要三个酶参与，分别是 FvEgt1、FvEgt2 和 FvEgt3。FvEgt1 与 Egt1 类似，同时具有甲基转移酶与组氨酸三甲基内盐基半胱氨酸亚磺合酶的活性。FVEGT2 和 FVEGT3 是两种不同的半胱氨酸脱硫机理，FVEGT2 称为半胱氨酸半胱氨酸脱硫酶，结合半胱氨酸激活 S-H，形成硫阴离子，FVEGT3 依赖于 PLP 半胱氨酸脱硫酶、催化 PLP 和 CYS-HER 合成，然后活性硫阴离子亲核物质攻击酮酰胺，得到麦角硫因。

2 麦角硫因的厌氧生物合成途径

自然界还存在麦角硫因的厌氧生物合成途径。泥生绿厌氧菌中两个相邻的蛋白 Clim_1148 和 Clim_1149, 将其命名为 EanA 和 EanB。EanA 是一种甲基转移酶, 其序列与耻垢分枝杆菌的 EgtD 序列有 33% 的同源性。EanB 被认定是类似硫氰酸酶的硫转移酶, 硫氰酸酶是催化氰化物和硫代硫酸盐反应生成硫氰酸盐和亚硫酸盐的一类酶, 存在于枯草芽孢杆菌、致黑脱硫肠杆菌、硫杆菌和某些光合细菌等多种细菌中。

Leisinger 等对 EanB 进行了结构与作用机制的解析, 发现它能够催化较高活性基团中的硫原子转移至未活化的碳原子上。

3 利用天然可食用霉菌发酵制备麦角硫因

多种天然霉菌能够合成麦角硫因, 不仅有前述提到的金针菇, 还包括平菇、香菇、紫黑灵芝、美味牛肝菌、双孢蘑菇、杏鲍菇、金顶侧耳等。Tepwong 等研究了香菇菌丝体生产麦角硫因的发酵工艺, 当使用 25g/L 的果糖和 1g/L 的天冬氨酸作为碳源时, 菌丝体中麦角硫因的产量达 1.89mg/g DW, 是对照组的 3.15 倍。向培养基添 2mmol/L 蛋氨酸, 发酵 15d 菌丝体中麦角硫因的产量可达 3.45mg/g DW。不同种类和不同浓度的氨基酸对麦角硫因合成积累的影响具有很大差异, 其中蛋氨酸对麦角硫因积累的促进作用最为明显。其次是半胱氨酸和组氨酸, 向培养基添加 2mmol/L 的蛋氨酸、半胱氨酸和组氨酸, 发酵 10d 菌丝体中麦角硫因的含量达到 1.86mg/g DW, 折算到发酵液中麦角硫因的含量为 15.42mg/L。Liang 等研究了 10L 罐规模的杏鲍菇菌丝体发

酵生产麦角硫因的工艺, 装液量和接种量设定为 70% 和 10%, 在发酵第 5 天向培养基中添加 4mmol/L 的组氨酸、1mmol/L 的半胱氨酸和 1mmol/L 的蛋氨酸, 发酵第 18–20 天菌丝体中麦角硫因的含量达到 5.76–5.84mg/g DW, 折算到发酵液中麦角硫因的含量约为 64.2mg/L。

Lin 等利用金顶侧耳菌丝体深层发酵制备麦角硫因, 通过培养基优化得到麦角硫因发酵的最适碳源和最适氮源为葡萄糖和胰蛋白胨。在发酵第 7 天添加 8mmol/L 的半胱氨酸、4mmol/L 的组氨酸和 0.5mmol/L 的蛋氨酸, 发酵 16 d 时菌丝体中麦角硫因的含量达 12.99mg/g DW, 折算到发酵液中麦角硫因的含量为 97.69mg/L。通过优化培养基成分得到最佳碳、氮源为玉米糝粉和蛋白胨, 发酵 7d 麦角硫因的产量达到 20.5mg/L 利用未经基因工程改造的天然可食用霉菌发酵制备麦角硫因, 最大的优势是菌种和产品的食品安全性, 如果培养基的成分都是可食用的, 则麦角硫因发酵液的安全性更高。相比于基因组、转录组等组学, 霉菌代谢组学的研究相对较少, 通过分析发酵过程的代谢组指导发酵过程优化, 将进一步提高麦角硫因的发酵积累水平, 降低生产成本。

4 小结

利用天然可食用霉菌和食品级的原料发酵生产麦角硫因, 符合食品应用的安全要求, 在发酵物全组分利用方面具有优势, 可以考虑与人造肉、调味品等食物结合。天然霉菌发酵制备麦角硫因的最高发酵水平已超过 500mg/L, 发酵周期通常在 10–20d。工程菌的发酵周期可控制在 3–9d, 最高发酵水平已达到 1.3g/L, 但是产物需经提纯后使用。

参考文献:

- [1] 周子振, 李健, 张进城, 等. 一种多级搅拌的生物发酵合成法制备麦角硫因用菌丝体混合液储罐: CN209243038U[P]. 2019.
- [2] 汤葆莎, 吴俐, 翁敏劫, 等. 杏鲍菇 528 深层发酵生物合成麦角硫因的培养基优化[J]. 福建农业学报, 2021, 36(6): 7.
- [3] 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[J]. 食品工业科技, 2018, 39(18): 6.
- [4] 张怡馨. 金针菇中麦角硫因的提取、纯化及包埋研究[D]. 华南农业大学, 2017.
- [5] 木开代斯·买合木提, 陈建, 焦春伟, 谢意珍. L-麦角硫因生物合成与应用研究进展[J/OL]. 天然产物研究与开发: 1–16[2022-04-24].
- [6] 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[J]. 生物工程学报, 2022, 38(02): 796–806.
- [7] 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/OL]. 生物工程学报: 1–15[2022-04-24].