

研究报告

茂源链霉菌谷氨酰胺转氨酶在毕赤酵母中的高效表达及性质

田雪婷¹, 薛意斌¹, 闫巧娟², 曾龙达¹, 江正强^{1*}

1 中国轻工业食品生物工程重点实验室 中国农业大学 食品科学与营养工程学院, 北京 100083

2 中国农业大学 工学院, 北京 100083

田雪婷, 薛意斌, 闫巧娟, 曾龙达, 江正强. 茂源链霉菌谷氨酰胺转氨酶在毕赤酵母中的高效表达及性质[J]. 微生物学通报, 2026, 53(1): 389-401.

TIAN Xueting, XUE Yibin, YAN Qiaojuan, ZENG Longda, JIANG Zhengqiang. High-level expression and characterization of the transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* in *Komagataella phaffii*[J]. Microbiology China, 2026, 53(1): 389-401.

摘要: 【背景】谷氨酰胺转氨酶(TGase)在食品工业具有重要应用价值, 但异源表达水平仍较低。

【目的】通过多组合策略实现茂源链霉菌(*Streptomyces mobaraensis*)谷氨酰胺转氨酶(*SmTGase*)在毕赤酵母(*Komagataella phaffii*)中高水平表达。【方法】采用酶原区和成熟区共表达、共表达分子伴侣和过表达翻译起始因子的组合策略提高 *SmTGase* 在毕赤酵母中的表达水平, 通过甘油-甲醇共补料策略进行 5 L 发酵罐高密度发酵实现 *SmTGase* 的高效生产, 利用强阴离子交换柱对 *SmTGase* 进行纯化, 测定其酶学性质。【结果】重组菌株摇瓶发酵酶活力为 5.67 U/mL。在 5 L 发酵罐中高密度发酵酶活力为 80.5 U/mL, 蛋白含量为 7.68 g/L。纯化后该酶的最适催化条件为 pH 7.0 和 55 °C, 在 pH 5.5-8.0 范围内及 45 °C 以下具有良好稳定性。【结论】本研究为谷氨酰胺转氨酶在毕赤酵母中高水平表达提供了重要参考。

关键词: 茂源链霉菌; 谷氨酰胺转氨酶; 毕赤酵母; 高效表达

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFD2101400)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFD2101400).

*Corresponding author. E-mail: zhqjiang@cau.edu.cn

Received: 2025-06-02; Accepted: 2025-06-22; Published online: 2025-07-16

High-level expression and characterization of the transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* in *Komagataella phaffii*

TIAN Xueting¹, XUE Yibin¹, YAN Qiaojuan², ZENG Longda¹, JIANG Zhengqiang^{1*}

¹ Key Laboratory of Food Bioengineering (China National Light Industry), College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

² College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

Abstract: [Background] Transglutaminases (TGases) play a significant role in the food industry, while their heterologous expression levels remain low. [Objective] This study aimed to achieve high-level expression of *SmTGase* from *Streptomyces mobaraensis* in *Komagataella phaffii* through a combinatorial strategy. [Methods] The combinatorial strategy involving co-expression of the propeptide and mature domains, co-expression of molecular chaperones, and overexpression of translation initiation factors was employed to enhance the expression level of *SmTGase* in *K. phaffii*. High-cell-density fermentation was carried out in a 5 L bioreactor with a glycerol-methanol co-feeding strategy for the efficient production of *SmTGase*. *SmTGase* was purified *via* a one-step strong anion-exchange column, and the enzymatic properties of *SmTGase* were characterized. [Results] The recombinant strain yielded an enzyme activity of 5.67 U/mL in a shake flask. Through the high-cell density fermentation in a 5 L bioreactor, the recombinant strain produced an enzyme activity of up to 80.5 U/mL with a protein titer of 7.68 g/L. The purified *SmTGase* exhibited the highest activity at pH 7.0 and 55 °C, and it was stable within pH 5.5–8.0 and at temperatures below 45 °C. [Conclusion] This study provides a valuable reference for the high-level expression of TGases in *K. phaffii*.

Keywords: *Streptomyces mobaraensis*; transglutaminase; *Komagataella phaffii*; high-level expression

谷氨酰胺转氨酶(transglutaminase, TGase, E.C. 2.3.2.13)是一类催化蛋白质交联的酶,能够催化蛋白质或多肽分子中的谷氨酰胺残基(Gln)与赖氨酸残基(Lys)之间形成共价 ϵ -(γ -谷氨酰)-赖氨酰键(isopeptide bond),从而改变蛋白质的功能特性^[1]。这种交联反应在食品^[2]、医药^[3]和生物材料^[4]等领域具有广泛的应用价值。TGase广泛分布于动物^[5]、植物^[6]和微生物^[7]中,微生物来源的 TGase 因其高产、易于基因工程改造和工业化生产等特点而备受关注。

目前,许多谷氨酰胺转氨酶(TGase)基因已成功在多种宿主中异源表达,包括大肠杆菌(*Escherichia coli*)^[8]、链霉菌(*Streptomyces*)^[9]、

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)^[10]、毕赤酵母(*Komagataella phaffii*)^[11]、曾用名 *Pichia pastoris*)以及谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)^[12]等。毕赤酵母作为一种高效的真核表达系统,因其具备强大的蛋白质翻译后修饰能力、高效的甲醇诱导型启动子以及成熟的高密度发酵工艺,成为 TGase 异源表达的理想宿主^[13]。然而,在表达过程中, TGase 通常以无活性的酶原形式(pro-TGase)分泌,需通过切除 N 端酶原区(pro-peptide)才能转化为具有催化活性的成熟 TGase^[14]。这一特性为 TGase 的高效表达和活性调控带来了挑战。

许多研究表明,酶原区对 TGase 的活性表

达具有关键作用。酶原区不仅可以通过分子内作用促进 TGase 的活性表达, 还可以通过分子间作用发挥功能^[15]。Liu 等^[16]研究发现, 缺失酶原区前 6 个氨基酸会导致酶原在细胞质中的分泌显著减少, 而缺失前 10 个氨基酸则导致不溶性 TGase 的积累, 表明酶原区在促进 TGase 分泌和正确折叠中发挥重要作用。近年来, 针对异源表达活性 TGase 的策略主要包括启动子优化、共表达激活蛋白酶及共表达酶原区等。例如, Noda 等^[17]利用肉桂链霉菌(*Streptomyces cinnamoneus*)磷脂酶 D 强启动子在 *S. lividan* 1326 中表达肉桂链霉菌(*S. cinnamoneus*)来源 ScTGase, 产酶活力为 12.03 U/mg。Yang 等^[18]在 *K. phaffii* GS115 中表达弗式链霉菌(*Streptomyces fradiae*)来源 SfTGase, 经胰蛋白酶激活后产酶活力仅为 0.7 U/mL。Türkanoglu Özçelik 等^[11]在 *K. phaffii* X33 中表达茂源链霉菌(*Streptomyces mobaraensis*)来源 SmTGase, 经 dispase I 激活后产酶活力为 37.64 U/mL。激活体系中残余蛋白酶可能会继续影响 TGase 活性。因此, 开发无需体外激活直接获得活性 TGase 的高效表达策略具有十分重要的意义。针对这一问题, Yurimoto 等^[15]将茂源链霉菌(*S. mobaraensis*)来源 SmTGase 酶原区和成熟区共表达, 实现了在博伊丁假丝酵母菌(*Candida boidinii*)的活性表达, 但酶活力仅为 0.34 U/mL。李鹏飞等^[19]进一步改进该策略, 通过优化 TGase 基因拷贝数及发酵培养条件使产酶活力提高至 7.3 U/mL。任蕊蕊^[20]在解脂耶式酵母(*Yarrowia lipolytica*)表达茂源链霉菌(*S. mobaraensis*)来源 SmTGase, 通过共表达金属蛋白酶 TAMEP 和插入蛋白酶 Kex2 切割位点 2 种策略成功实现 SmTGase 的活性表达, 产酶活力分别为 6.77 U/mL 和 5.26 U/mL。以上研究结果为 TGase 的高效异源表达提供了重要的理论依据和技术支持。目前 TGase 在毕赤酵母中表达水平仍较低, 最高酶活报道为 47.96 U/mL^[21]。因此, 寻找合适策略实现 TGase 在毕赤酵母中的高水平表达具有十分重要的意义。

根据规定^[22], 茂源链霉菌已被批准用于生产 TGase。本研究将茂源链霉菌来源的谷氨酰胺转氨酶在毕赤酵母中进行异源活性表达, 并采用多组合策略进一步提高谷氨酰胺转氨酶的表达水平, 以期谷氨酰胺转氨酶(TGase)的高效表达提供重要支持。

1 材料与amp;方法

1.1 样品

茂源链霉菌(*S. mobaraensis*)和巴斯德毕赤酵母(*K. phaffii*) GS115, 实验室保藏; 表达载体 pPIC9K 和 pGAPZ(α)A, 实验室保藏; 克隆宿主大肠杆菌 DH5 α , 北京全式金生物技术股份有限公司。

1.2 培养基、主要试剂和仪器

LB 固体培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0, 琼脂 20.0; 缓冲甘油复合培养基(BMGY 液体培养基) (g/L): 酵母提取物 10.0, 蛋白胨 20.0, 甘油 10.0, 酵母基础氮源(yeast nitrogen base, YNB) 13.4, 生物素 4×10^{-4} , 磷酸氢二钾-磷酸二氢钾(100 mmol/L, pH 6.0)定容; 缓冲甲醇复合培养基(BMMY 液体培养基) (g/L): 酵母提取物 10.0, 蛋白胨 20.0, 甲醇 5.0, YNB 13.4, 生物素 4×10^{-4} , 磷酸氢二钾-磷酸二氢钾(100 mmol/L, pH 6.0)定容; YPD 固体培养基(g/L): 蛋白胨 20.0, 酵母提取物 10.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂 20.0; BSM 培养基(g/L): K₂SO₄ 27.3, CaSO₄·2H₂O 1.0, (NH₄)₂SO₄ 11.1, MgSO₄·7H₂O 16.6, 甘油 40.0, 85%磷酸 12 mL。

Blunt Simple 载体、FastPfu DNA Polymerase 试剂盒, 北京全式金生物技术股份有限公司; Xba I、Avr II 和 Bgl II 内切酶, New England Biolabs 公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒, 苏州优逸兰迪生物科技有限公司; 质粒提取试剂盒, 北京聚合美生物科技有限公司; N-carboxybenzoyl-L-glutaminyl-glycine (N-CBZ-Gln-Gly), 吉尔生化(上海)有限公司; L-谷氨

酸- γ -单羟胺酸, Sigma-Aldrich 公司; 还原型谷胱甘肽, 上海麦克林生化科技股份有限公司; 盐酸羟胺, 上海源叶生物科技有限公司; 三氟乙酸, 阿拉丁试剂(上海)有限公司; 博来霉素和潮霉素, 北京百瑞极生物科技有限公司。

紫外-可见分光光度计, 北京普析通用仪器设备有限公司; 超净工作台, 北京悠帆生物科技有限公司; 高速台式离心机, 上海安亭科学仪器厂; 恒温水浴锅, 北京市长风仪器仪表公司; PCR MyCycler 自动扩增仪, Applied Biosystems 公司; 单层玻璃上机械搅拌发酵罐, 上海国强生化工程装备有限公司。

1.3 茂源链霉菌谷氨酰胺转氨酶(*SmTGase*)基因的克隆与表达

采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取茂源链霉菌基因组 DNA, 以茂源链霉菌基因组 DNA 为模板, 设计引物 MTG-F (5'-GCTGAAGCTTACGTAGAATTCGACAATGGCGCGGGGG-3') 和 MTG-R (5'-AGGCGAATTAATTCGCGGCCGCTCACGGCCAGCCCTGC-3') 进行 PCR 扩增得到目的基因片段 mproMTG, 将其克隆至 pPIC9K 载体, 构建 pPIC9K-mproMTG 重组质粒。PCR 反应体系(50 μ L): 5 \times TransStart *FastPfu* buffer 10 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μ L, MTG-F (10 μ mol/L) 1 μ L, MTG-R (10 μ mol/L) 1 μ L, *FastPfu* DNA Polymerase 1 μ L, 基因组 DNA 1 μ L, H₂O 32 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 20 s, 55 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 34 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min; 4 $^{\circ}$ C 10 min。采用 *Xba* I 酶切线性化质粒并电转化至 *K. phaffii* GS115 感受态细胞, 得到 *K. phaffii* GS115-mproTGase (RS-1) 重组菌株。将重组菌株接种至 BMGY 培养基中, 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养 24 h 后转接至 BMMY 培养基中, 每 24 h 添加 1.0% 甲醇, 诱导 5 d 后测定酶活力。

1.4 插入 KR 蛋白酶切割位点对谷氨酰胺转氨酶表达的影响

以 mproMTG 为模板, 设计引物 mpro-F (5'-GCTGAAGCTTACGTAGAATTCGACAATG

GCGCGGGGG-3') 和 mpro-R (5'-AGGCGAATT AATTCGCGGCCGCGGGGGCCCGGAACG-3'), 以及引物 TG-F (5'-CCGGGCCCCCAAAGAGACT CCGACGACAGGGTCAC-3') 和引物 TG-R (5'-CCGGGCCCCCAAAGAGACTCCGACGACAGGGTCAC-3') 进行 PCR 扩增分别获得 mpro 和 MTG 基因片段, 将其克隆至 pPIC9K 载体, 分别构建 pPIC9K-mpro 和 pPIC9K-MTG 重组质粒。以 mpro 片段为模板, PCR 扩增得到含有蛋白酶 Kex2 切割位点序列 KR (AAAAGA) 的 mpro (KR) 片段并克隆至 pPIC9K-MTG 质粒上, 构建 pPIC9K-mpro(KR)-MTG 重组质粒。将该质粒用 *Xba* I 酶切线性化, 并电转化至 *K. phaffii* GS115 感受态细胞, 得到 *K. phaffii* GS115-mpro(KR)-TGase (RS-2) 重组菌株。将上述菌株进行摇瓶发酵产酶, 具体方法参考 1.3。

1.5 酶原区对谷氨酰胺转氨酶表达的影响

含有吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*) 的酶原区 hpro 的基因(GenBank: EU477523.1) 片段由北京擎科生物科技有限公司合成, 获得 pPIC9K-hpro 载体。以质粒 pPIC9K-mpro 和 pPIC9K-hpro 为模板, 设计引物 AOX1-F (5'-TCCCGAAAAGTGCCACCTGACG-3') 和 AOX1-R (5'-TGATAATAATGGTTTCTTAGA-3') 进行 PCR 扩增得到 P_{AOX1}-mpro-T_{AOX1} 和 P_{AOX1}-hpro-T_{AOX1} 表达盒, 分别克隆至 pPIC9K-MTG 质粒上, 构建 pPIC9K-mpro-MTG 和 pPIC9K-hpro-MTG 重组质粒。质粒用 *Xba* I 酶切线性化后, 电转化至 *K. phaffii* GS115 感受态细胞, 并在含浓度为 1-4 mg/mL G418 遗传霉素的 YPD 平板上筛选得到高拷贝转化子, 分别得到 *K. phaffii* GS115-mpro-TGase (RS-3) 和 *K. phaffii* GS115-hpro-TGase (RS-4) 重组菌株。将上述菌株进行摇瓶发酵产酶, 具体方法参考 1.3。

1.6 分子伴侣共表达对谷氨酰胺转氨酶表达的影响

以分子伴侣表达载体质粒 pGAPZA-*Pdi1*

构建为例,以毕赤酵母 GS115 基因组为模板,设计引物 Pdi1-F (5'-TCAATTGAACAACACTATTTCGAAatgaagtactatctcttgccactctg-3') 和 Pdi1-R (5'-GTTCTAGAAAGCTGCGGCCGCctataattcgtcgtgattttggttct-3') (大写字母表示同源臂序列,小写字母表示扩增区序列)进行 PCR 扩增分子伴侣基因 *Pdi1* 片段并克隆至 pGAPZ(α)A 载体上,经测序正确获得阳性转化子。类似地,构建 pGAPZA-*Kar2*、pGAPZA-*Hrd1*、pGAPZA-*Ero1* 和 pGAPZA-*Are1* 重组质粒。将上述重组质粒用 *Avr* II 线性化并电转化至重组 RS-4 感受态细胞,分别得到重组菌株 *K. phaffii* GS115-hpro-TGase-*Hrd1* (RS-5)、*K. phaffii* GS115-hpro-TGase-*Pdi1* (RS-6)、*K. phaffii* GS115-hpro-TGase-*Kar2* (RS-7)、*K. phaffii* GS115-hpro-TGase-*Ero1* (RS-8) 和 *K. phaffii* GS115-hpro-TGase-*Are1* (RS-9)。将带有分子伴侣共表达的重组菌株接种至摇瓶发酵产酶,具体方法参考 1.3。

1.7 翻译起始因子过表达对谷氨酰胺转氨酶表达的影响

扩增 P_{TEFI} -*HygB*- T_{CYC11} 表达盒连接至 Blunt Simple 质粒,得到重组质粒 Blunt Simple-*HygB*。以重组质粒 Blunt Simple-*HygB-eIF4E* 构建为例,设计引物 eIF4E-F (5'-ACTAATTATTCGAAGGATCCatgtcagagactgaaaacgctcc-3') 和 eIF4E-R (5'-GCGAATTAATTCGCGGCCGCctaaatgctgaaagaggtacgttcttc-3') (大写字母表示同源臂序列,小写字母表示扩增区序列),以毕赤酵母 GS115 基因组为模板,PCR 扩增得到翻译起始因子 *eIF4E*,并连接至 pPIC9K 载体上,构建 pPIC9K-*eIF4E* 重组质粒。再以 pPIC9K-*eIF4E* 为模板,PCR 扩增含有翻译因子的表达盒 P_{AOX1} -*eIF4E*- T_{AOX1} ,并克隆至 Blunt Simple-*HygB* 载体,经测序正确得到 Blunt Simple-*HygB-eIF4E* 重组质粒。类似地,构建 Blunt Simple-*HygB-eIF4A*、Blunt Simple-*HygB-eIF4G* 和 Blunt Simple-*HygB-Pab1* 重组质粒。将上述重组质粒用 *Bgl* II 酶切线性化并电转化至重组 RS-6 感受态细胞中,分别得到重组菌株 *K. phaffii* GS115-hpro-

TGase-*Pdi1-eIF4E* (RS-10)、*K. phaffii* GS115-hpro-TGase-*Pdi1-Pab1* (RS-11)、*K. phaffii* GS115-hpro-TGase-*Pdi1-eIF4G* (RS-12) 和 *K. phaffii* GS115-hpro-TGase-*Pdi1-eIF4A* (RS-13)。将带有翻译起始因子过表达的重组菌株接种至摇瓶发酵产酶,具体方法参考 1.3。

1.8 高密度发酵产 *Sm*TGase 及纯化

采用重组菌株 RS-13,在 5 L 发酵罐中进行高密度发酵产 *Sm*TGase。高密度发酵方法在 Aqeel 等^[21]的基础上稍作修改,整个过程分为分批培养、甘油流加培养和甘油-甲醇同时流加诱导培养 3 个阶段。将重组菌株 RS-13 接种至 YPD 培养基,30 °C、200 r/min 振荡培养至 OD_{600} 达到 10.0 左右,获得种子液。将 200 mL 种子液接种至含有 2 L BSM 培养基的 5 L 发酵罐中进行高密度发酵。在补料分批诱导阶段期(pH 6.0, 800 r/min, 25 °C),使用含有 12 mL/L PTM₁ 痕盐溶液的 100% 甲醇和含有 12 mL/L PTM₁ 痕盐溶液的 50% 甘油进行共补料,通过控制空气通量和进料速率将溶解氧(dissolved oxygen, DO)浓度保持在 >20%。每隔 12 h 取样,测定 *Sm*TGase 酶活力、蛋白浓度和菌体湿重。

*Sm*TGase 的纯化:发酵液于 4 °C、10 000 r/min 低温离心 15 min 获得粗酶液,粗酶液在 200 mmol/L pH 8.5 的磷酸盐缓冲液中透析,上样于相同缓冲液预先平衡的 QSFF 强阴离子交换柱,洗脱杂蛋白后再用含 0–500 mmol/L NaCl 的磷酸盐缓冲液线性洗脱,监测洗脱液 OD_{280} ,收集目的蛋白。测定各管 *Sm*TGase 酶活力,并进行 SDS-PAGE 分析。采用 Endo H 对纯化的 *Sm*TGase 进行去糖基化处理。

1.9 *Sm*TGase 酶活力与蛋白含量测定

酶活力测定:采用异氧肟酸比色法(谷氨酰胺转氨酶活性检测方法:GB/T 34795—2017)^[23]。取 200 μ L 适当稀释后的样品加入 500 μ L 底物溶液(100 mmol/L 盐酸羟胺、10 mmol/L 还原型谷胱甘肽、30 mmol/L N-CBZ-Gln-Gly,溶于 200 mmol/L pH 6.0 Tris-HCl 溶液),于 37 °C 反

应 10 min 后加入 200 μL 终止剂(12%三氟乙酸:5% $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$:3 mol/L HCl =1:1:1), 反应液在 OD_{525} 测定吸光度。酶活力单位定义为: 每分钟催化 N-CBZ-Gln-Gly 和羟胺生成 1 μmol 的 L-谷氨酸- γ 单羟胺酸所需的酶量为 1 个酶活力单位(U)。

蛋白含量的测定: 参考文献[24]以牛血清白蛋白为标准蛋白。SDS-PAGE 参照文献[25]。

1.10 *SmTGase* 的酶学性质

最适 pH 测定: 在 40 $^{\circ}\text{C}$, 使用不同 pH 值的缓冲液(50 mmol/L)配制的底物溶液测定 *SmTGase* 的最适 pH。计算不同 pH 缓冲体系下的相对酶活力。缓冲液包括: 柠檬酸缓冲液(pH 4.0–6.0)、Tris-HCl 缓冲液(pH 6.0–8.0)和 Na_2CO_3 -NaOH (pH 8.0–10.0)。pH 稳定性测定: 酶液用上述缓冲液稀释后于 40 $^{\circ}\text{C}$ 保温 30 min, 按照标准方法(50 mmol/L Tris-HCl pH 7.0, 55 $^{\circ}\text{C}$)测定残余酶活力, 以未经处理的酶液为 100%, 计算各 pH 值下的相对酶活力。最适温度测定: 在温度 20–80 $^{\circ}\text{C}$ 范围内按照标准方法测定酶活

力, 以酶活力最高点为 100%, 计算不同温度下的相对酶活力。温度稳定性测定: 稀释后的酶液于 35–80 $^{\circ}\text{C}$ 保温 30 min, 按照标准方法测定残余酶活力, 以未经处理的酶液为 100%, 计算不同温度下的相对酶活力。

1.11 数据分析

采用 Excel 2019 和 Origin 2025 软件对数据进行处理、分析及绘图。样品指标测定如无特别说明, 均重复 3 次, 双尾 t 检验证明组间显著性差异。

2 结果与分析

2.1 不同表达模式对 *SmTGase* 在毕赤酵母中表达的影响

SmTGase 不同表达模式的质粒构建策略如图 1A 所示, 各重组菌株摇瓶发酵产 *SmTGase* 酶活力如图 1B 所示。结果显示, 直接表达含酶原区的茂源链霉菌谷氨酰胺转氨酶的 RS-1 菌株未检测出 *SmTGase* 酶活力。在酶原区(mpro)和成熟区(MTG)之间引入 Kex2 蛋白酶酶切位

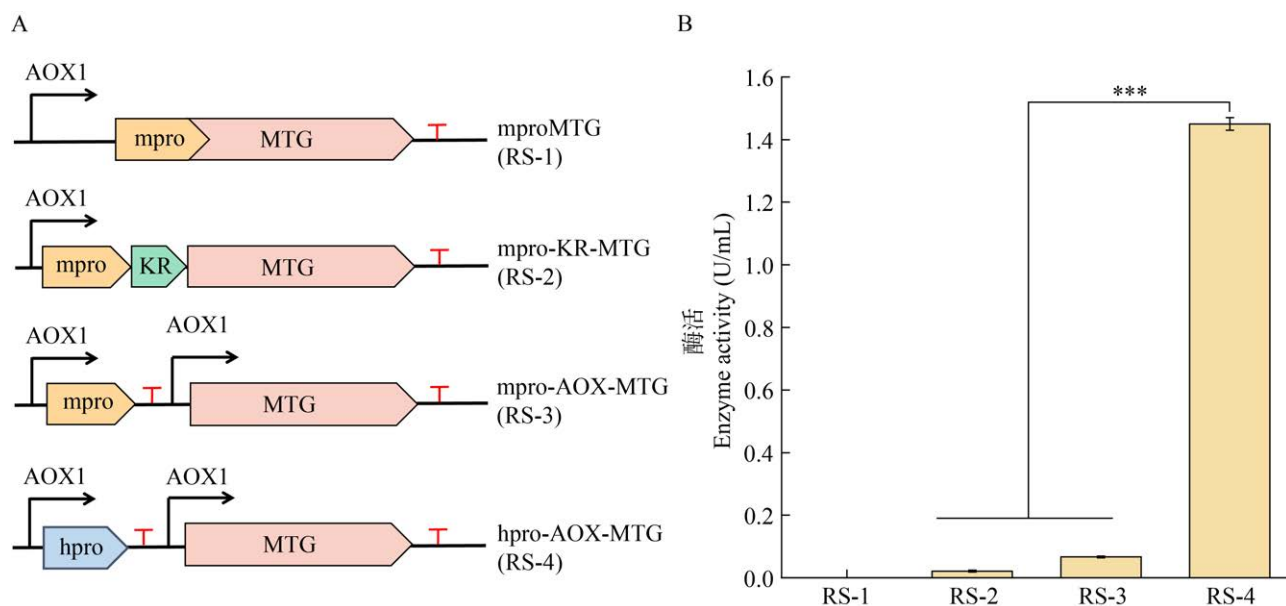


图 1 不同表达模式对 *SmTGase* 在毕赤酵母中表达的影响 A: 不同表达模式质粒构建示意图; B: 重组菌株产 *SmTGase* 酶活力。

Figure 1 Effects of expression modes on *SmTGase* expression in *K. phaffii*. A: Diagram of plasmid construction for different expression strategies; B: *SmTGase* activity produced by recombinant strains. ***: $P < 0.001$.

点的 RS-2 菌株产酶活力为 0.021 U/mL。采用酶原区和成熟区共表达模式的 RS-3 菌株摇瓶发酵产酶活力为 0.067 U/mL。将酶原区替换为吸水链霉菌酶原区的 RS-4 菌株摇瓶发酵产酶活力为 1.45 U/mL。

2.2 共表达分子伴侣对 *SmTGase* 的分泌表达影响

共表达分子伴侣质粒构建示意图如图 2A 所示。各重组菌株摇瓶发酵产 *SmTGase* 酶活力如图 2B 所示。共表达 *Pdi1* 的 RS-6 菌株, 摇瓶发酵产酶活力显著提高至 1.62 U/mL。相比之下, 共表达 *Hrd1*、*Kar2* 和 *Ero1* 的 RS-5、RS-7 和 RS-9 菌株, *SmTGase* 的分泌表达水平降低, 酶活力分别为 1.39、1.11、1.18 U/mL。此外, 共表达 *Are1* 的 RS-8 菌株, 其产酶活力未发生显著变化。因此, 选择 RS-6 菌株进行后续实验。

2.3 过表达真核翻译起始因子对 *SmTGase* 的表达影响

过表达真核翻译起始因子质粒构建示意图如图 3A 所示, 各重组菌株摇瓶发酵产 *SmTGase* 酶

活力如图 3B 所示。在 RS-6 菌株中分别过表达真核翻译起始因子基因 *eIF4E*、*eIF4A*、*eIF4G* 和 *Pab1* 后, *SmTGase* 的表达水平均显著提升。其中, 过表达 *eIF4G* 和 *eIF4A* 的 RS-12 和 RS-13 菌株产酶活力提升最为显著, 酶活力分别为 5.20 U/mL 和 5.67 U/mL。分别过表达 *eIF4E*、*Pab1* 的 RS-10 和 RS-11 重组菌株, *SmTGase* 酶活提高至 2.22 U/mL 和 2.81 U/mL, 分别提高了 1.37 倍和 1.73 倍。

2.4 高密度发酵产 *SmTGase* 及其纯化

重组菌株 RS-13 在 5 L 发酵罐中进行高密度发酵, 发酵 192 h 时, 发酵液中 *SmTGase* 酶活力达 80.5 U/mL, 蛋白含量为 7.68 g/L, 菌体湿重为 383.5 g/L (图 4A)。随着发酵时间的延长, 发酵上清液中分泌的目标蛋白含量逐渐增加(图 4B)。

粗酶液经 QSFF 柱纯化得到电泳级纯酶(图 5), *SmTGase* 比酶活从 60.9 U/mg 增加至 157.1 U/mg。纯化倍数和回收率分别为 1.0 和 50% (表 1)。纯化后的 *SmTGase* 在 38 kDa 和 40 kDa 处有 2 条明显的电泳条带, 经去糖基化酶 Endo

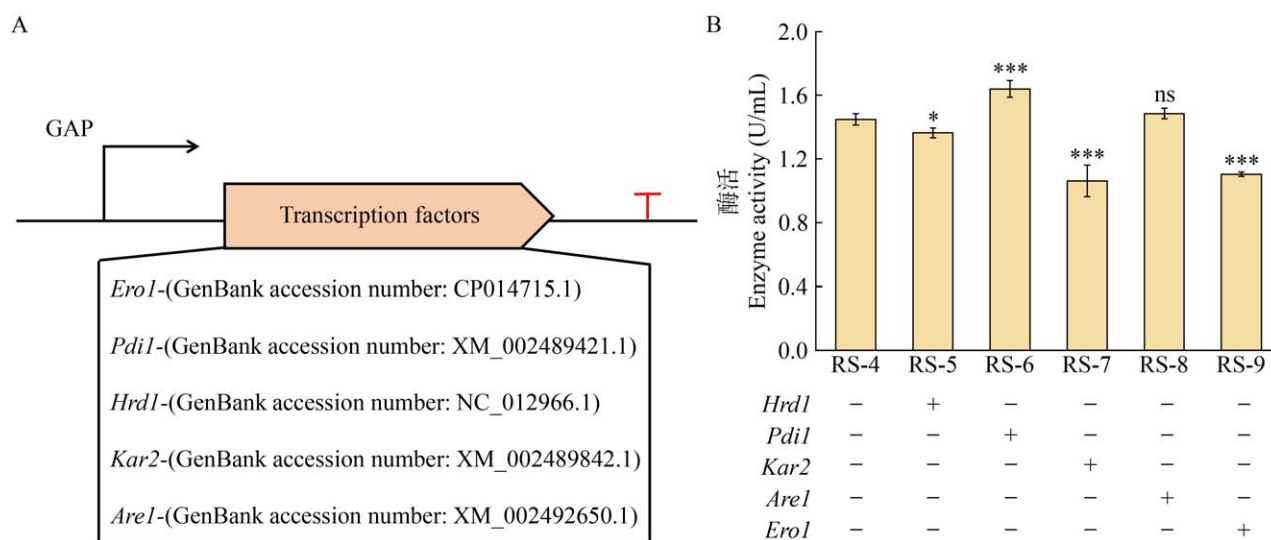


图 2 不同分子伴侣共表达对 *SmTGase* 表达的影响
株产 *SmTGase* 酶活力。

A: 分子伴侣表达质粒构建示意图; B: 重组菌株产 *SmTGase* 酶活力。

Figure 2 Influence of co-expression of different chaperones on *SmTGase* expression. A: Schematic diagram of chaperone co-expression plasmids construction; B: *SmTGase* activity produced by recombinant strains. *: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$; ns: No significant difference.

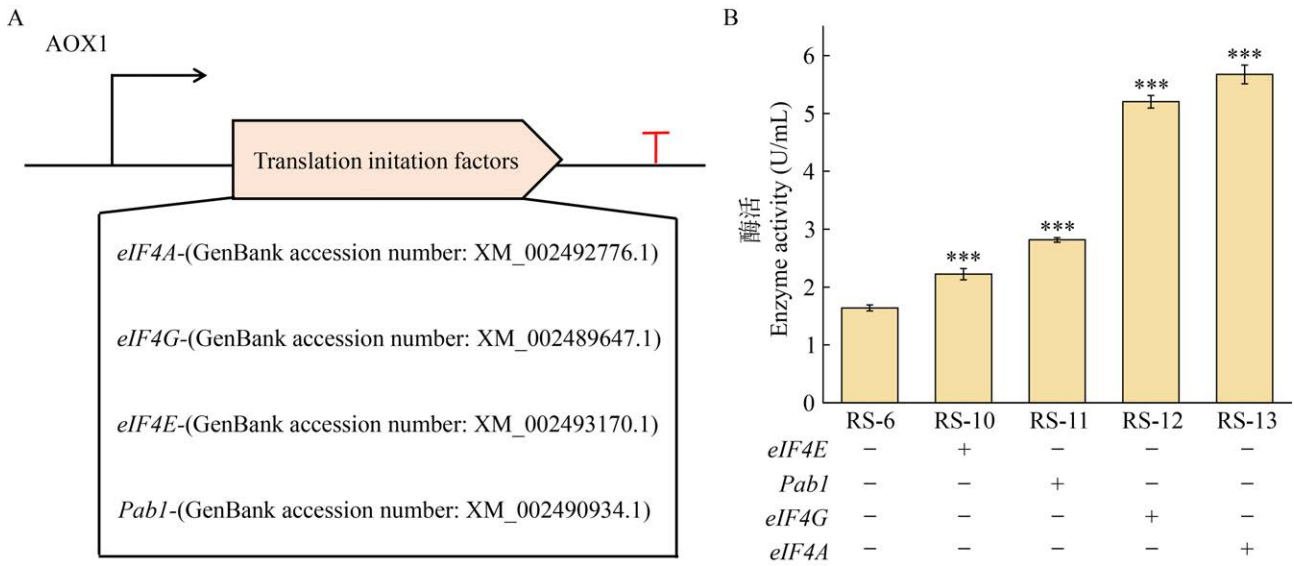


图3 过表达真核翻译起始因子对 *SmTGase* 的表达影响 A: 真核翻译起始因子过表达质粒构建示意图; B: 重组菌株产 *SmTGase* 酶活力测定。

Figure 3 Effect of eukaryotic translation initiation factor overexpression on *SmTGase* expression. A: Schematic diagram for plasmid construction of eukaryotic translation initiation factor overexpression; B: *SmTGase* activity produced by recombinant strains. ***: $P < 0.001$.

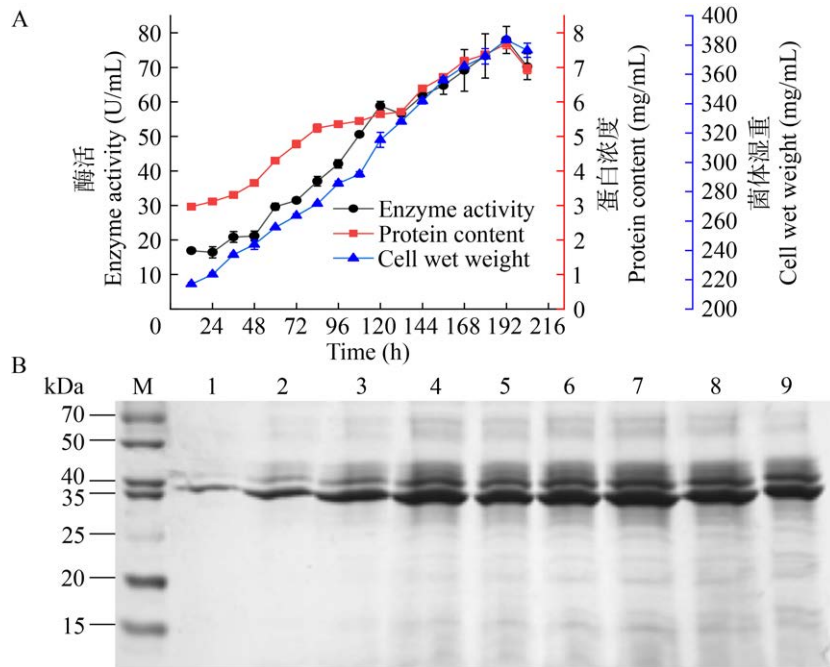


图4 重组菌株 RS-13 高密度发酵产 *SmTGase* 的时间历程(A)和胞外分泌蛋白的 SDS-PAGE (B) M: 标准分子量蛋白; 1-9: 24、48、72、96、120、144、168、192、216 h 发酵上清液。

Figure 4 Time-course of *SmTGase* production by high-cell density fermentation using recombinant strain RS-13 (A) and SDS-PAGE of extracellular secreted proteins (B). M: Protein molecular weight marker; 1-9: Fermentation supernatants withdrawn at 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 h, respectively.

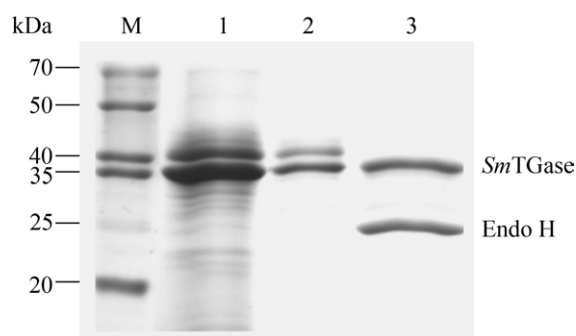


图5 *SmTGase* 的纯化图 M:标准分子量蛋白; 1:粗酶液; 2:纯酶; 3:去糖基化。

Figure 5 SDS-PAGE of the purified *SmTGase*. M: Protein molecular weight marker; 1: Crude enzyme solution; 2: Purified *SmTGase*; 3: Deglycosylation of purified *SmTGase*.

H处理后,仅在38 kDa处观察到明显电泳条带,表明该酶在毕赤酵母中表达时发生了糖基化。

2.5 *SmTGase* 的酶学性质结果

纯化后 *SmTGase* 的最适 pH 值为 7.0 (图 6A), 在 pH 5.5–8.0 范围内保持稳定(图 6B)。该酶的最适温度为 55 °C (图 6C), 在 45 °C 处理 30 min 仍保留 80% 以上的酶活力(图 6D)。

3 讨论

TGase 因具有独特的交联特性而广泛应用于食品领域,但目前其异源表达水平仍较低。本文采用组合策略针对茂源链霉菌(*S. mobaraensis*) 来源谷氨酰胺转氨酶(*SmTGase*) 在毕赤酵母中的高效表达进行了系统研究。以前研究表明,

TGase 在酵母中通常以无催化活性的酶原形式分泌至胞外,需要经过酶原切割后激活^[14]。本研究采用 2 种表达策略:(1) 将酶原区和成熟区独立表达;(2) 在成熟区与酶原区之间插入 Kex2 蛋白酶酶切位点,均成功获得了具有活性的 *SmTGase*。在酶原区与成熟区之间引入 Kex2 蛋白酶识别位点后,产生了有活性的 *SmTGase*, 这可能由于该酶在分泌过程中经历了 Kex2 依赖性的切割成熟过程^[15,20]。此外,酶原区可能通过分子内相互作用(pro-TGase 形式)或分子间相互作用(共表达体系)辅助 *SmTGase* 的正确折叠与活化^[18]。在解脂耶氏酵母表达系统中,将原始酶原区(mpro)替换为吸水链霉菌酶原区(hpro)后,TGase 的分泌表达水平提高了 106 倍^[20]。基于酶原区对 *SmTGase* 分泌表达的关键作用,本研究将酶原区 mpro 替换为 hpro,成功使 *SmTGase* 在毕赤酵母 GS115 中的分泌表达水平提高了 21.6 倍(图 1B)。

内质网蛋白质折叠效率是毕赤酵母异源蛋白分泌表达的关键限速步骤^[26]。当内质网稳态失衡时,细胞会通过未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)激活 *Hac1p* 转录因子,进而上调 *Kar2*、*Pdi1* 和 *Ero1* 等分子伴侣的表达协助蛋白折叠;而无法修复的错误折叠蛋白则经由内质网相关降解途径清除,这一过程可能导致异源蛋白表达量下降^[27]。因此,提高 UPR 途径关键因子的表达水平可能有助于提升 TGase 的表达。在毕赤酵母中共表达 *Pdi1* 转录

表 1 *SmTGase* 纯化表

Table 1 Purification summary of *SmTGase*

项目 Item	粗酶液 Crude enzyme	QSFF 柱 Strong anion-exchange column
总酶活 Total enzyme activity (U) ^a	1 3297.7±234.7	6 650.8±81.3
总蛋白 Total protein (mg) ^b	218.3±2.6	42.4±2.5
比活力 Specific enzyme activity (U/mg)	60.9±1.6	157.1±8.2
纯化倍数 Fold purification	1.0	1.9
回收率 Recovery yield (%)	100.0	50.0

^a: 总酶活力在 55 °C、50 mmol/L pH 7.0 Tris-HCl 缓冲液条件下测定; ^b: 总蛋白含量参照文献[24]测定蛋白浓度。

^a: Enzyme activity was assessed in 50 mmol/L Tris-HCl buffer pH 7.0 at 55 °C; ^b: Protein concentration was determined by the Lowry's method^[24].

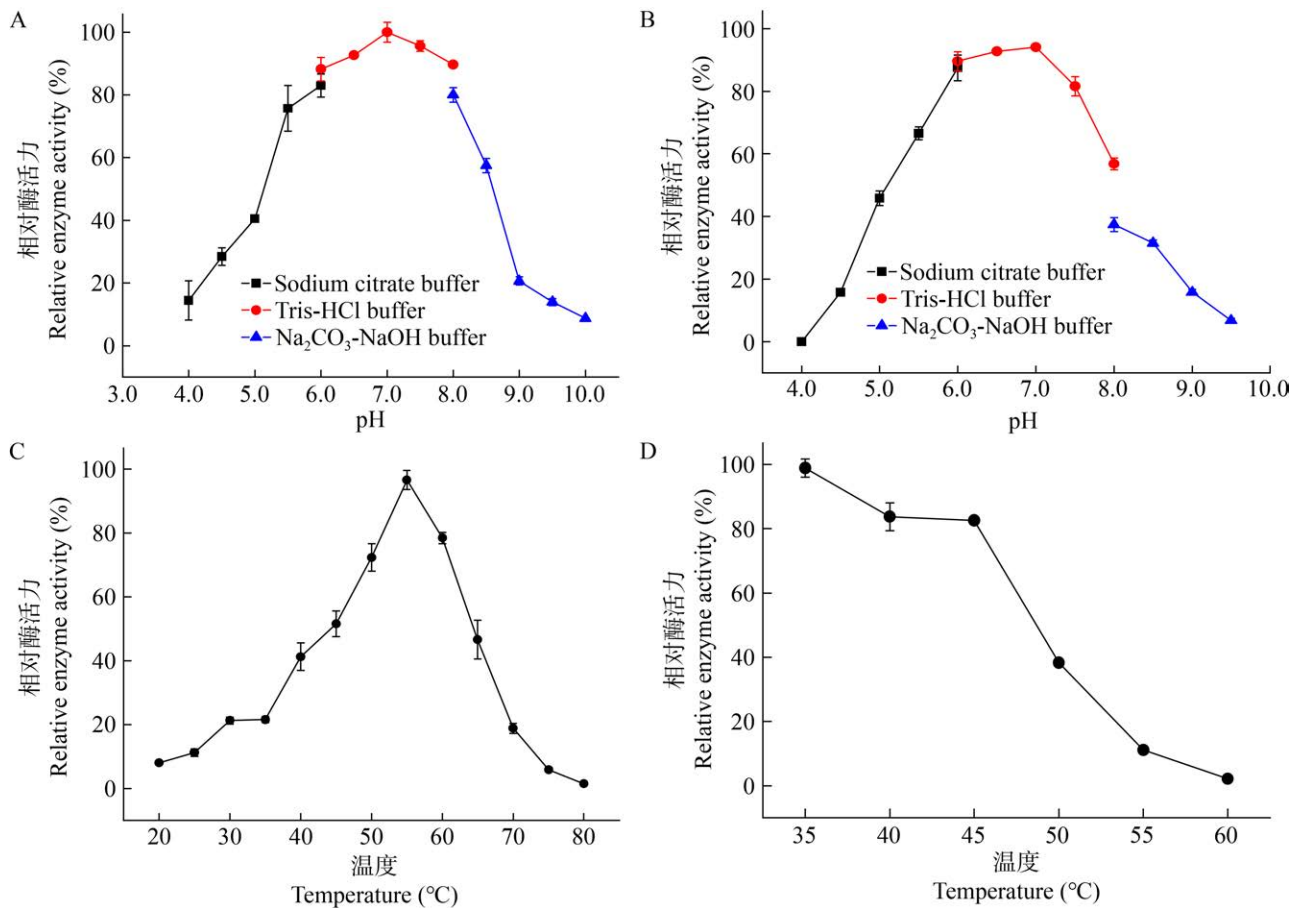


图6 *SmTGase* 的酶学性质测定 A: 最适 pH; B: pH 稳定性; C: 最适温度; D: 温度稳定性。

Figure 6 Determination of enzyme properties of *SmTGase*. A: Optimal pH; B: pH stability; C: Optimal temperature; D: Thermal stability.

因子, 脂肪酶和人源溶菌酶表达水平分别提高 2.02 倍和 1.31 倍^[28-29]。本研究中, 共表达 *Pdi1* 后, 菌株 RS-6 产 *SmTGase* 酶活力比菌株 RS-4 产酶活力提高 1.12 倍。这可能是由于 *Pdi1* 在催化 TGase 二硫键正确氧化、还原和异构化方面发挥了重要作用, 同时抑制了错误折叠蛋白的聚集, 从而提高了 TGase 的表达水平^[30]。然而, 共表达分子伴侣基因 *Kar2*、*Hrd1* 和 *Eor1* 后, *SmTGase* 的表达水平反而下降, 这可能归因于它们的共表达扰乱了 UPR 的平衡, 未能有效协助 *SmTGase* 正确折叠, 从而导致其表达水平下降^[26-27]。翻译起始作为酵母异源蛋白表达的关键限速步骤, 其 mRNA 翻译效率受翻译起始因子(eIFs)表达水平的调控^[31]。过表达翻译起始因

子基因 *eIF4A*、*eIF4G*、*eIF4E* 和 *Pab1* 均能不同程度地提高木聚糖酶 FXYL 在毕赤酵母中的表达水平^[32]。本研究中过表达 *eIF4A*、*eIF4G*、*eIF4E* 及 *Pab1* 后, *SmTGase* 酶活力分别提高了 3.5、3.2、1.37、1.73 倍, 其中 *eIF4A* 过表达效果最为显著。这可能由于 *eIF4A* 编码的 ATP 依赖性 RNA 解旋酶与 ATP 结合产生活性, 特异性识别 mRNA 5'端帽结构并消除 5'端 UTR 二级结构屏障, 从而显著提高了 mRNA 翻译成多肽链的效率, 最终促进了 *SmTGase* 的分泌表达水平^[33]。

本研究通过优化培养工艺, 采用甘油-甲醇共流加诱导策略, 最终实现了 *SmTGase* 的高效生产(80.5 U/mL)。产酶水平显著高于目前文献已报道的 TGase 在酵母的表达水平(表 2)。这可

表 2 *SmTGase* 在酵母中的异源表达水平Table 2 Heterologous expression level of *SmTGase* in yeast

来源 Source	表达宿主 Expression host	摇瓶酶活 Shake-flask enzyme activity (U/mL)	发酵罐酶活 Bioreactor enzyme activity (U/mL)	参考文献 Reference
<i>S. mobaraensis</i>	<i>K. phaffii</i> GS115	5.7	80.5	本研究 This study
<i>S. mobaraensis</i>	<i>K. phaffii</i> GS115	10.1	48.0	[21]
<i>S. mobaraensis</i>	<i>Y. lipolytica</i>	11.7	41.2	[20]
<i>S. mobaraensis</i>	<i>K. phaffii</i> GS115	–	3.1	[34]
<i>S. mobaraensis</i>	<i>K. phaffii</i> X33	9.1	37.6	[11]
<i>S. mobaraensis</i>	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	–	49.0	[12]
<i>S. fradiae</i>	<i>K. phaffii</i> GS115	0.7	–	[18]
<i>S. netropsis</i>	<i>K. phaffii</i> X33	26.2 U/mg	–	[35]
<i>S. hygrosopicus</i>	<i>Y. lipolytica</i> Po1h	7.8	35.3	[36]
<i>S. cinnamoneus</i>	<i>S. lividans</i> 1326	12.0 U/mg	–	[17]

能得益于甘油的添加有效缓解了甲醇代谢对酵母细胞的毒性作用^[20]。纯化后 *SmTGase* 比酶活力达到 157.1 U/mg, 显著高于其他表达系统, 如大肠杆菌(49.6 U/mg)^[8]、茂源链霉菌(16.9 U/mg)^[9]和枯草芽孢杆菌(63.7 U/mg)^[10]等。*SmTGase* 具有优越的催化特性: 最适 pH 值为 7.0 (图 6A), 最适温度为 55 °C (图 6C), 并且在 45 °C 以下 (图 6D) 和 pH 5.5–8.0 范围内 (图 6B) 均表现出良好的稳定性。相较于 *S. hygrosopicus* (最适 pH 6.0–7.0, 最适温度 45 °C)^[37]、纺锤雷素链霉菌 (*Streptomyces netropsis*) (最适 pH 6.0, 最适温度 45 °C)^[38] 和 *S. cinnamoneus* (最适 pH 7.0, 最适温度 40 °C)^[39] 来源的 *TGase*, *SmTGase* 具有良好的稳定性, 为其在食品中的广泛应用创造了条件。尽管目前谷氨酰胺转氨酶 (*SmTGase*) 在毕赤酵母中的异源表达已取得一定成果, 但仍有诸多方面值得进一步探索和优化。例如在酶学性质上, 可通过理性设计或定向进化改造 *SmTGase*, 提高其热稳定性和催化效率。

4 结论

通过组合工程策略, 成功实现了茂源链霉菌来源的谷氨酰胺转氨酶 *SmTGase* 在毕赤酵母中的高水平分泌表达。5 L 发酵罐高密度发酵

后, 产酶水平达 80.5 U/mL, 为已报道的最高水平。纯化后 *SmTGase* 的最适催化条件为 pH 7.0 和 55 °C, 且在 pH 5.5–8.0 及 45 °C 以下保持稳定。本研究为 *TGase* 在毕赤酵母中的高水平表达提供了重要参考。

作者贡献声明

田雪婷: 实验操作, 撰写文章; 薛意斌: 提出概念, 方法论; 闫巧娟: 项目管理, 提供资源; 曾龙达: 数据收集与监管; 江正强: 提供资源, 获取基金, 研究指导, 审阅, 修改文章。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] KOLOTYLO V, PIWOWAREK K, KIELISZEK M. Microbiological transglutaminase: biotechnological application in the food industry[J]. Open Life Sciences, 2023, 18(1): 20220737.
- [2] 杨聪, 郭丽琼, 万华, 邹苑, 郑倩望, 林俊芳. 谷氨酰胺转氨酶及其在食品工业上的应用研究进展[J]. 食品工业科技, 2021, 42(10): 370-377. YANG C, GUO LQ, WAN H, ZOU Y, ZHENG QW, LIN JF. Research advances on transglutaminases and their applications in food industry[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(10): 370-377 (in Chinese).
- [3] DOTI N, CAPORALE A, MONTI A, SANDOMENICO

- A, SELIS F, RUVO M. A recent update on the use of microbial transglutaminase for the generation of biotherapeutics[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2020, 36(4): 53.
- [4] ZHAO KY, DU YX, CAO HM, SU LY, SU XL, LI X. The biological macromolecules constructed matrigel for cultured organoids in biomedical and tissue engineering[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2025, 247: 114435.
- [5] CLARKE DD, NEIDLE A, SARKAR NK, WAELSCH H. Metabolic activity of protein amide groups[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1957, 71(1): 277-279.
- [6] ICEKSON I, APELBAUM A. Evidence for transglutaminase activity in plant tissue[J]. *Plant Physiology*, 1987, 84(4): 972-974.
- [7] ANDO H, ADACHI M, UMEDA K, MATSUURA A, NONAKA M, UCHIO R, TANAKA H, MOTOKI M. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1989, 53(10): 2613-2617.
- [8] LI ZT, XING S, LIU J, WU XC, ZHANG SC, MA D, LIU XW. Chaperonin co-expression and chemical modification enables production of active microbial transglutaminase from *E. coli* cytoplasm[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 253: 127355.
- [9] CHANG HN, ZHENG ZY, LI H, XU YQ, ZHEN GY, ZHANG Y, REN XD, LIU XL, ZHU DQ. Multi-omics investigation of high-transglutaminase production mechanisms in *Streptomyces mobaraensis* and co-culture-enhanced fermentation strategies[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2025, 16: 1525673.
- [10] WANG ST, YANG ZG, LI ZJ, TIAN YQ. Heterologous expression of recombinant transglutaminase in *Bacillus subtilis* SCK6 with optimized signal peptide and Codon, and its impact on gelatin properties[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2020, 30(7): 1082-1091.
- [11] TÜRKANOĞLU ÖZÇELİK A, ERSÖZ F, İNAN M. Extracellular production of the recombinant bacterial transglutaminase in *Pichia pastoris*[J]. *Protein Expression and Purification*, 2019, 159: 83-90.
- [12] ZHANG N, ZHANG S, HE YZ, CHEN X, ZHANG YF, DONG ZY. Intein-mediated intracellular production of active microbial transglutaminase in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2020, 142: 109680.
- [13] BARONE GD, EMMERSTORFER-AUGUSTIN A, BIUNDO A, PISANO I, COCCETTI P, MAPELLI V, CAMATTARI A. Industrial production of proteins with *Pichia pastoris*: *Komagataella phaffii*[J]. *Biomolecules*, 2023, 13(3): 441.
- [14] ZOTZEL J, PASTERNAK R, PELZER C, ZIEGERT D, MAINUSCH M, FUCHSBAUER HL. Activated transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* is processed by a tripeptidyl aminopeptidase in the final step[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2003, 270(20): 4149-4155.
- [15] YURIMOTO H, YAMANE M, KIKUCHI Y, MATSUI H, KATO N, SAKAI Y. The pro-peptide of *Streptomyces mobaraensis* transglutaminase functions in *cis* and in *trans* to mediate efficient secretion of active enzyme from methylotrophic yeasts[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2004, 68(10): 2058-2069.
- [16] LIU S, ZHANG DX, WANG M, CUI WJ, CHEN KK, LIU Y, DU GC, CHEN J, ZHOU ZM. The pro-region of *Streptomyces hygrosopicus* transglutaminase affects its secretion by *Escherichia coli*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2011, 324(2): 98-105.
- [17] NODA S, ITO Y, SHIMIZU N, TANAKA T, OGINO C, KONDO A. Over-production of various secretory-form proteins in *Streptomyces lividans*[J]. *Protein Expression and Purification*, 2010, 73(2): 198-202.
- [18] YANG XQ, ZHANG YM. Expression of recombinant transglutaminase gene in *Pichia pastoris* and its uses in restructured meat products[J]. *Food Chemistry*, 2019, 291: 245-252.
- [19] 李鹏飞, 孙红兵, 游丽金, 巩伏雨, 陈藻, 张爱联, 朱泰承. 利用毕赤酵母系统直接分泌表达具有活性的谷氨酰胺转氨酶[J]. *生物工程学报*, 2013, 29(2): 180-188.
- LI PF, SUN HB, YOU LJ, GONG FY, CHEN Z, ZHANG AL, ZHU TC. Direct secretory expression of active microbial transglutaminase in *Pichia pastoris*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2013, 29(2): 180-188 (in Chinese).
- [20] 任蕊蕊. *Streptomyces mobaraense* 谷氨酰胺转氨酶在解脂耶氏酵母中的高效表达及分子改造[D]. 无锡: 江南大学, 2018.
- REN RR. High-level expression and molecular modification of *Streptomyces mobaraense* transglutaminase in *Yarrowia lipolytica*[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2018 (in Chinese).
- [21] AQEEL SM, ABDULQADER AA, DU GC, LIU S. Integrated strategies for efficient production of *Streptomyces mobaraensis* transglutaminase in *Komagataella phaffii*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 273: 133113.
- [22] 国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准: GB 2760—2024[S]. 北京: 中国标准出版社, 2024.
- National Health Commission of the People's Republic of China, State Administration for Market Regulation. National Food Safety Standard. Standards for the Use of Food Additives: GB 2760—2024[S]. Beijing: Standards Press of China, 2024 (in Chinese).
- [23] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 谷氨酰胺转氨酶活性检测方法: GB/T 34795—2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. Determination of the activity of transglutaminase: GB/T 34795—2017[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017 (in Chinese).
- [24] LOWRY O, ROSEBROUGH N, FARR AL, RANDALL R. Protein measurement with the folin phenol reagent[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1951, 193(1): 265-275.
- [25] LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. *Nature*, 1970, 227(5259): 680-685.

- [26] RASCHMANOVÁ H, WENINGER A, KNEJZLÍK Z, MELZOCH K, KOVAR K. Engineering of the unfolded protein response pathway in *Pichia pastoris*: enhancing production of secreted recombinant proteins[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105(11): 4397-4414.
- [27] KRUSE KB, BRODSKY JL, McCracken AA. Autophagy: an ER protein quality control process[J]. Autophagy, 2006, 2(2): 135-137.
- [28] HUANG JJ, ZHAO QY, CHEN LX, ZHANG CM, BU W, ZHANG X, ZHANG KN, YANG Z. Improved production of recombinant *Rhizomucor miehei* lipase by coexpressing protein folding chaperones in *Pichia pastoris*, which triggered ER stress[J]. Bioengineered, 2020, 11(1): 375-385.
- [29] 王儒昕, 韩琴, 陈园园, 吴菁, 闫达中, 刘军, 李鑫. 共表达分子伴侣 PDI 和转录因子 Aft1 对毕赤酵母表达人溶菌酶的影响[J]. 食品科学, 2020, 41(10): 124-130.
WANG RX, HAN Q, CHEN YY, WU J, YAN DZ, LIU J, LI X. Effect of co-expression of chaperone PDI and transcription factor Aft1 on the expression of recombinant human lysozyme in *Pichia pastoris*[J]. Food Science, 2020, 41(10): 124-130 (in Chinese).
- [30] SALLADA ND, HARKINS LE, BERGER BW. Effect of gene copy number and chaperone coexpression on recombinant hydrophobin HFBI biosurfactant production in *Pichia pastoris*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2019, 116(8): 2029-2040.
- [31] STAUDACHER J, REBNEGGER C, DOHNAL T, LANDES N, MATTANOVICH D, GASSER B. Going beyond the limit: increasing global translation activity leads to increased productivity of recombinant secreted proteins in *Pichia pastoris*[J]. Metabolic Engineering, 2022, 70: 181-195.
- [32] LIU C, ZHANG YP, YE CT, ZHAO FG, CHEN YA, HAN SY. Combined strategies for improving the heterologous expression of a novel xylanase from *Fusarium oxysporum* Fo47 in *Pichia pastoris*[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2024, 9(3): 426-435.
- [33] JIA XF, ZHOU H. Small-molecule inhibitors targeting eIF4A in leukemia[J]. Current Protein & Peptide Science, 2021, 22(7): 559-566.
- [34] 宋小平, 王雅洁, 蔡晶晶, 余银, 管利, 张宇亭. 基因拷贝数对重组毕赤酵母产谷氨酰胺转氨酶的影响[J]. 生物工程学报, 2020, 36(8): 1679-1688.
SONG XP, WANG YJ, CAI JJ, YU Y, GUAN L, ZHANG YT. Impact of gene dosage on recombinant transglutaminase production of *Pichia pastoris*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2020, 36(8): 1679-1688 (in Chinese).
- [35] SHEN ML, CIOU JY, HSIEH LS, HSU CL. Recombinant *Streptomyces netropsis* transglutaminase expressed in *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) and applied in plant-based chicken nugget[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2023, 39(8): 200.
- [36] LIU S, WAN D, WANG M, MADZAK C, DU GC, CHEN J. Overproduction of pro-transglutaminase from *Streptomyces hygroscopicus* in *Yarrowia lipolytica* and its biochemical characterization[J]. BMC Biotechnology, 2015, 15(1): 75.
- [37] WAN WJ, HE DL, XUE ZJ, ZHANG ZW. Specific mutation of transglutaminase gene from *Streptomyces hygroscopicus* H197 and characterization of microbial transglutaminase[J]. Journal of Biosciences, 2017, 42(4): 537-546.
- [38] YU YJ, WU SC, CHAN HH, CHEN YC, CHEN ZY, YANG MT. Overproduction of soluble recombinant transglutaminase from *Streptomyces netropsis* in *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 81(3): 523-532.
- [39] DURAN R, JUNQUA M, SCHMITTER JM, GANCET C, GOULAS P. Purification, characterisation, and gene cloning of transglutaminase from *Streptoverticillium cinnamomeum* CBS 683.68[J]. Biochimie, 1998, 80(4): 313-319.