

一种新谷氨酰胺转氨酶的发掘、纯化、酶学性质测定及重组表达

杨科科¹, 李子龙², 修涵¹, 李国莹³, 秦慧民^{*1}, 王为善^{*2}

1 天津科技大学 生物工程学院, 天津 300457

2 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

3 江苏一鸣生物股份有限公司, 江苏 泰兴 225400

杨科科, 李子龙, 修涵, 李国莹, 秦慧民, 王为善. 一种新谷氨酰胺转氨酶的发掘、纯化、酶学性质测定及重组表达[J]. 微生物学通报, 2024, 51(12): 5090-5104.

YANG Keke, LI Zilong, XIU Han, LI Guoying, QIN Huimin, WANG Weishan. Discovery, purification, enzymatic characterization, and recombinant expression of a novel transglutaminase[J]. Microbiology China, 2024, 51(12): 5090-5104.

摘要:【背景】谷氨酰胺转氨酶(transglutaminase, EC 2.3.2.13)简称TG酶, 能够催化谷氨酰胺残基的 γ -羧酰胺基基团与赖氨酸残基的 ϵ -氨基基团之间交联, 形成异性肽键, 从而改变蛋白质的构象和功能。目前TG酶已经广泛应用到食品、生物医药、纺织、皮革加工等领域。【目的】从天然茂原链霉菌中挖掘性能优异的TG酶, 并将其在工业底盘菌株中重组表达以提高产量。【方法】通过发酵测定了一株茂原链霉菌(*Streptomyces mobaraensis*) CGMCC 4.266的TG酶生产能力。使用Capto S阳离子交换层析柱对该TG酶(TGe)进行纯化。通过测定TGe的最适pH和pH稳定性、最适温度和温度稳定性以及交联酪蛋白的能力来分析其酶学性质。将工业茂原链霉菌内源 tg 基因进行敲除构建 Δtg , 然后将 tge 基因在 Δtg 中重组表达。【结果】TGe最适pH值为5.0, 在pH 4.0–10.0范围内保持较高的活性。最适反应温度为50℃, 与商品化酶相当, 在4–40℃范围内TGe稳定性较好, 在40–65℃范围内TGe活性略优于商品化酶。酪蛋白交联实验表明, 在50℃条件下, TGe交联能力明显优于商品化酶。 tge 在 Δtg 中重组表达, TGe产量显著提高可达6.3 U/mL, 相较野生菌株提高162.5%, 并且TGe催化活性不受影响。【结论】对天然茂原链霉菌中的TG酶进行挖掘表征, 是获取性能更加优异TG酶的有效方式。异源TG酶在成熟工业菌株中成功表达为提高茂原链霉菌TG酶的产量提供了新策略。

关键词: 谷氨酰胺转氨酶; 酶学性质; 纯化; 重组表达

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFD2101403)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFD2101403).

*Corresponding authors. E-mail: QIN Huimin, huiminqin@tust.edu.cn; WANG Weishan, wangws@im.ac.cn

Received: 2024-04-03; Accepted: 2024-05-13; Published online: 2024-06-13

Discovery, purification, enzymatic characterization, and recombinant expression of a novel transglutaminase

YANG Keke¹, LI Zilong², XIU Han¹, LI Guoying³, QIN Huimin^{*1}, WANG Weishan^{*2}

¹ College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

² Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

³ Jiangsu Yiming Biological Technology Co., Ltd., Taixing 225400, Jiangsu, China

Abstract: [Background] Transglutaminase EC 2.3.2.13 (TGase) catalyzes cross-linking between the γ -carboxamido group of glutamine residues and the ϵ -amino group of lysine residues. This process leads to the formation of an isopeptide bond, which modulates the conformation and functions of proteins. TGases play a crucial role in food, pharmaceutical, textile, and leather processing industries. **[Objective]** To mine a high-performance TGase from natural *Streptomyces mobaraensis* and enhance the titer of this enzyme by recombinant expression in the industrial chassis. **[Methods]** The TGase production potential of *S. mobaraensis* (CGMCC 4.266) was evaluated by shake-flask fermentation. The TGase (TGe) was purified by Capto S cation exchange chromatography. The enzymatic properties including optimal pH, pH stability, optimal temperature, thermal stability, and cross-linking ability with casein were evaluated. We knocked out *tg* from industrial *S. mobaraensis* and obtained Δtg , in which *tge* was introduced and expressed. **[Results]** TGe showcased the optimal pH 5.0, with high activity within the range of pH 4.0–10.0. This enzyme achieved the highest activity at approximately 50 °C, which was comparable to that of commercially available TGases. TGe exhibited good stability within 4–40 °C, and its activity surpassed those of commercial TGases at 40–65 °C. In addition, TGe demonstrated higher cross-linking ability with casein at 50 °C than commercial TGases. The recombinant expression of *tge* in Δtg increased the TGe titer (6.3 U/mL) by 162.5% compared with the wild-type strain, without compromising the catalytic activity of TGe. **[Conclusion]** High-performance TGases can be mined from natural *S. mobaraensis*. The heterologous expression of TGases in mature industrial strains gives a novel insight into enhancing the TGase titer of *S. mobaraensis*.

Keywords: transglutaminase; enzymatic properties; purification; recombinant expression

谷氨酰胺转氨酶 (Transglutaminase, EC 2.3.2.13) 简称 TG 酶, 属于蛋白质修饰酶家族, 是一种具有多种催化活性的酶^[1], 已经成为现代研究和生物技术中的重要工具。TG 酶能够催化多肽链中谷氨酰胺残基的 γ -羧酰胺基团与赖氨酸残基的 ϵ -氨基基团之间的交联, 产生 ϵ -(γ -谷氨酰)赖氨酸(G-L)异肽键, 从而交联蛋白质, 改变蛋白质的构象和功能^[2]。在食品工业中, TG 酶已得到广泛应用, 它可以增加牛排等肉制品

的硬度^[3], 减少在烹饪过程中的质量损失。近年来, TG 酶在医药生产^[4]、纺织^[5]、皮革^[6]加工等领域也展现出卓越的应用前景^[7]。TG 酶广泛存在于动物^[8-9]、植物^[10]及微生物^[11]。相较于动、植物来源的 TG 酶, 微生物 TG 酶具有非钙离子依赖性、成本低、易获得及催化效率高等优点^[12]。目前市场上的 TG 酶主要由茂原链霉菌(*Streptomyces mobaraensis*)发酵生产, 在发酵过程中, TG 酶以酶原 pro-TG 酶的形式分泌到

胞外, 然后经培养液中金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶等作用转化为成熟的有活性的 TG 酶^[13-14]。

茂原链霉菌 TG 酶存在产量不够高和催化性能低下的问题, 因此不能满足应用需求。目前, 一系列的理性和随机诱变半理性策略已经被应用于提高 TG 酶的稳定性、催化效率和产量^[15]。例如, Wang 等^[16]在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中通过组合合理设计提高了 TG 酶的热稳定性和催化效率。为了提高 TG 酶的表达量, 研究人员应用密码子优化、融合 PCR、蛋白酶共表达等技术在大肠杆菌中提高了 TG 酶产量^[17-18]。Liu 等^[19]通过将来源于茂原链霉菌的 pro-TG 酶基因置于强启动子 PsodA 和 PydzA 调控下, 在枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)中实现了表达, pro-TG 酶表达量可达 87.6 U/mL 和 70.7 U/mL。Özçelik 等^[20]将来源于茂原链霉菌的 pro-TG 酶基因通过添加 GPA 强启动子在巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*) X33 中成功表达, 表达量可达到 37.64 U/mL。

在异源宿主中通过各种策略在不同程度上提高了 TG 酶的表达量, 但大多只能表达 pro-TG 酶, 仍需要在体外添加中性蛋白酶、胰蛋白酶等蛋白酶使其转化为成熟的 TG 酶^[21-22]。以茂原链霉菌为宿主来生产 TG 酶的过程中, 研究人员已经通过基因工程改造及蛋白质工程和进化等策略提高了 TG 酶产量, 促进了其在工业生产中的应用。Yin 等^[23]通过常压室温等离子体(atmospheric and room temperature plasma, ARTP)诱变, 从茂原链霉菌突变菌株中筛选到 TG 酶表达量高的变体, 产量可达 19.7 U/mL, 是野生菌株的 5.5 倍。Washizu 等^[24]将菌株 S-8112 中的 TG 酶基因克隆, 并在变铅青链霉菌(*Streptomyces lividans*)中表达, 在培养上清液中检测到酶活, 说明该菌株存在 TG 酶活化蛋白酶, 变铅青链霉菌可作为表达 TG 酶的底盘。Liu 等^[25]通过启动子工程和密码子优化来提高

TG 酶在变铅链霉菌中的产量。基于其内源 TG 酶激活系统, Xue 等^[26]通过增加 TG 酶基因的拷贝数过表达 pro-TG 酶基因, 使茂原链霉菌中 TG 酶产量提高了 5.88 倍。

获取优异的 TG 酶除了对现有 TG 酶基因进行改造外, 从新的物种中发掘新的 TG 酶菌株和基因也是一个重要的方式。本研究对 *S. mobaraensis* (CGMCC 4.266) 进行发酵产 TG 酶验证, 并对该 TG 酶进行酶学性质测定, 以期获得性能优异的 TG 酶, 进一步将该 TG 酶基因在工业底盘菌株中重组表达, 以提高其产量。本研究旨在为提高 TG 酶产量提供较好的策略, 也为表达链霉菌源蛋白提供一定的指导意义。

1 材料与方法

1.1 样品

Streptomyces mobaraensis (CGMCC 4.266), 中国普通微生物菌种保藏管理中心, 将其命名为 smE2021。工业菌株 *Streptomyces mobaraensis* DSM 40587、商品化 TG 酶 TG_i 来源于江苏一鸣生物股份有限公司, *Streptomyces mobaraensis* DSM 40847、大肠杆菌 JM109 和 ET12567/pUZ8002 均来自本实验室, 其余菌株及质粒、引物见表 1 和表 2。

1.2 培养基

LB 培养基、2×YT 培养基参考文献[27]配制; ISP2 培养基、ISP4 培养基参考文献[28]配制; MS 培养基参考文献[29]配制; 种子培养基、发酵培养基参考文献[30]配制。

PDA 培养基: 马铃薯 200.0 g/L, 加水煮沸 30 min, 过滤留滤液, 加入 20.0 g/L 葡萄糖, 加入 20.0 g/L 琼脂粉。115 °C 灭菌 20 min。

1.3 主要试剂和仪器

限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶, New England Biolabs 公司; KOD One™ PCR Master

表 1 本文所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strain/Plasmid	Description	Source
Strain		
Δtg	<i>tg</i> deletion in <i>Streptomyces mobaraensis</i> DSM 40587	This study
$\Delta tg::pSET156-tge$	Recombinant expression of <i>tge</i> in Δtg	This study
Plasmid		
pKC1132-GFP- Δtg	<i>tg</i> deletion vector based on pKC1132	This study
pSET156	Integrative <i>Escherichia coli</i> - <i>Streptomyces</i> shuttle vector ($\phi BT1$)	This lab
pSET156- <i>tge</i>	Plasmid for the recombinant expression of <i>tge</i>	This study

表 2 本文所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')
tguf	GATCGAGATCTCCGGGACATC
tgdr	CATCCTCATGTTCTGAACCCAC
tg-up-F	AAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGGGCTGCAGGTCTAGAGGCCACGGCGTAGGC
tg-up-R	CTCCCCTCCCCTCCCCGCTTATGTCGTCGACGTCATCCG
tg-down-F	GCGGATGACGTGACGACATAAGCGGGAGGGGAGGGGAGG
tg-down-R	GCATGTTGTCAAAGCAGAGACGGTTCGAATGTGAACAGATATCGTCGACGTGGGCCGAC
dtg-YZ-F	GCGGGAGAACTCTCGTCTTC
dtg-YZ-R	TCCTTCGACGACGTCTACAG
tge-F	GATCCTCTAAGTAAGGAGTAGGCTGATGCGCATAACGCCGGAGAGC
tge-R	TGGAGGGGAGCCGGGCAACCGGCTCCCCTCCACCCCGCTCACATCACGGCCAGCCCTGCTTTAC
P _{tg} -F	GACATGATTACGAATTCGATGTTTTGGAGCCGTGGTGT
P _{tg} -R	TACTCCTTACTTAGAGGATCCTCGCTACGAGAAGTGATTAT

Mix, 东洋纺(上海)生物科技有限公司; 2×M5 HiPer plus *Taq* HiFi PCR Mix、DNA marker 和蛋白 marker, 北京聚合美生物科技有限公司; Bradford 蛋白含量测定试剂盒, 北京迈瑞达科技有限公司; 质粒提取试剂盒、基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; Gel&PCR Clean Up Kit, Omega Bio-Tek 公司; SDS-PAGE 蛋白预制胶, 北京兰博利德商贸有限公司。

恒温恒湿培养箱, 施都凯仪器设备(上海)有限公司; 全温振荡培养箱, 上海知楚仪器有限公司; 5 L 生物反应器, 上海百仑生物科技有限公司; AKTA 蛋白纯化仪, GE HealthCare 公司; 多功能酶标仪, 伯腾仪器有限公司。

1.4 茂原链霉菌培养基优化

取 20 μ L 保存的 smE2021 菌液分别涂布于 MS、ISP2、ISP4、PDA 固体培养基上, 于 30 °C 培养 5 d, 观察该菌株在不同培养基中的长势。

1.5 TG 酶基因的克隆及测序

以 smE2021 菌株基因组 DNA 为模板, 在 TG 酶基因保守上下游区域合成一对引物 tguf、tgdr, 克隆目的片段并进行一代测序。将目的片段序列与来源于 *S. mobaraensis* DSM 40587 的 TG 酶基因序列进行比对分析。PCR 反应体系 (50 μ L): 引物 tguf/tgdr (10 μ mol/L)各 1.5 μ L, 基因组 DNA 模板(100 mg/L) 0.5 μ L, DMSO 2.5 μ L, KOD One™ PCR Master Mix 25 μ L, ddH₂O 19 μ L。PCR 反应条件: 98 °C 3 min; 98 °C 10 s, 56 °C

5 s, 68 °C 10 s, 32 个循环; 68 °C 4 min, 4 °C 保存。

1.6 茂原链霉菌产 TG 酶发酵验证

将 *S. mobaraensis* 接种在 PDA 培养基, 于 30 °C 条件下培养 4–5 d, 将收集的孢子接种于含有 25 mL 种子培养基的 250 mL 摇瓶中, 30 °C、220 r/min 培养 24 h。取 2 mL 种子液接种于含有 25 mL 发酵培养基的 250 mL 摇瓶中, 30 °C、220 r/min 培养, 定期采集等体积的发酵液进行酶活测定^[31]及 SDS-PAGE 分析。

1.7 TG 酶酶活力的测定

使用 N-CBZ-Gln-Gly 和盐酸羟胺作为底物, 采用比色法来测定 TG 酶活性^[31]。TG 酶将伯胺羟基引入到合成基质 CBZ-Gln-Gly, 生成氧肟酸, 氧肟酸的量则可通过检测其与 FeCl₃-TCA 形成的红色络合物在 525 nm 的吸光度来确定。将 20 μL TG 酶溶液和 200 μL 底物溶液(30 mmol/L N-CBZ-Gln-Gly、100 mmol/L 盐酸羟胺、10 mmol/L 谷胱甘肽、200 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 6.0)在 37 °C 孵育 10 min 后, 向反应液中加入 200 μL 终止液[3 mol/L 盐酸(HCl)、12%三氯乙酸(TCA)、5% FeCl₃·6H₂O]测定混合物在 525 nm 处吸光度。1 个 TG 酶活性单位定义为在 37 °C 下每分钟催化 CBZ-Gln-Gly 和羟胺产生 1 μmol 异羟肟酸所需的酶量。

1.8 TG 酶的纯化

将 smE2021 在 5 L 生物反应器中扩大培养 30 h, 将发酵液在 4 °C、8 000 r/min 离心 30 min, 收集上清液。使用乙醇沉淀法对 TG 酶进行粗提, 向上清中加入预冷至 4 °C 的乙醇至最终体积比为 50%。混合物在 4 °C 静置 30 min, 使 TG 酶充分沉淀。然后将乙醇沉淀物迅速复溶在 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 6.0)中。将复溶物加载到用 PBS 缓冲液预平衡的 Capto S 柱上。通过梯度洗脱确定最终洗脱盐浓度为 0.1 mol/L NaCl 浓度。使用 0.1 mol/L NaCl, 以 1 mL/min 的流

速洗脱 TG 酶。采用 SDS-PAGE 检测目的蛋白的纯化质量, 使用 Bradford 蛋白含量测定试剂盒测定蛋白质浓度。

1.9 TG 酶酶学性质测定

TG 酶的最适 pH: 为测定 TG 酶的最适 pH, 用不同 pH 值(3.0–11.0, 间隔 1.0)的 Tris-HCl 稀释 TG 酶至一定浓度, 在 37 °C 孵育 10 min 后测定其活性。采用氧肟酸比色法在最适反应条件下进行酶活力的测定。酶活力最大值对应的 pH 值即为该酶的最适 pH 并将其设为 100%, 以此为基础计算其余 pH 值下的相对酶活力。

pH 稳定性: 为测试 TG 酶在不同 pH 条件下的稳定性, 将其在不同 pH 条件的缓冲液中孵育 1 h。孵育后直接在原有 pH 值下与底物溶液混合, 测定酶活性。相对活性以各自 pH 下 TG 酶的最大活性为基准(设为 100%)来计算。

TG 酶的最适温度: 为了探究温度对 TG 酶活性的影响, 将酶样品在 pH 5.0 条件下, 于不同温度(4、25、37、40、50、60、65 °C)分别孵育 10 min, 并测定酶活性。相对酶活性以在各个温度点测得的最大活性为 100% 来确定。

温度稳定性: 将酶样品在最适 pH 条件下, 于不同温度(4、25、37、40、50、60、65 °C)预先孵育 1 h, 随后立刻测定酶活性来评估。相对活性以测得的最高酶活样品为基准(设为 100%)。

TG 酶与酪蛋白交联: 用 Tris-HCl 缓冲液(0.2 mol/L, pH 7.0)将 β-酪蛋白稀释至 3 mg/mL, 将 TG 酶活力稀释为 1 U/mL。在 50 °C 条件下, 向 1.5 mL EP 管中加入 100 μL β-酪蛋白、再加 5 μL 的 TG 酶进行交联反应。并在 0、5、10、15、20 和 25 min 进行取样, 将反应后样品立即煮沸失活。取煮沸后样品进行 SDS-PAGE 分析, 以评定 TG 酶的交联能力。

1.10 接合转移

将用 2×YT 收集的茂原链霉菌新鲜孢子与

ET12567/pUZ8002 大肠杆菌细胞按一定比例混合,然后在终浓度为 60 mmol/L CaCl₂、60 mmol/L MgCl₂的 ISP4 琼脂培养基上培养,于 30 °C 条件下培养 6–10 d,用终浓度为 60 µg/mL 的安普霉素及 50 µg/mL 的萘啶酮酸筛选接合子。

1.11 TG 酶基因缺失突变株的构建

为构建 TG 酶基因缺失突变株,以 *S. mobaraensis* DSM 40587 基因组为模板,用引物 tg-up-F/tg-up-R 扩增 tg 上游同源臂 3 000 bp;用引物 tg-down-F/tg-down-R 扩增 tg 下游同源臂 3 000 bp,将上下同源臂经过纯化,然后与非复制性大肠杆菌-链霉菌穿梭质粒 pKC1132-GFP (*Xba* I/*Hind* III-HF 酶切)通过同源重组的方法^[32]进行组装,转化至大肠杆菌 JM109 中,经菌落 PCR、测序验证获得正确的缺失载体 pKC1132-GFP- Δ tg。将构建好的 pKC1132-GFP- Δ tg 质粒转化到甲基化缺陷型大肠杆菌 ET12567/pUZ8002 中,然后再通过接合转移的方法转至 *S. mobaraensis* DSM 40587 中。绿色荧光蛋白作为 Marker 筛选到接合转移接合子,然后在含有安普霉素的 PDA 平板上培养以保证发生第一次同源交换并整合到基因组上。在不含抗生素的 PDA 培养基上松弛培养 5 d,以保证其发生第二次同源交换。通过 PCR 筛选发生第二次同源交换的菌株(即无荧光单克隆),如果第二次同源交换成功,则 tg 基因与非复制性质粒 pKC1132-GFP 骨架一起丢失。PCR 反应体系(10 µL): 引物 dtg-YZ-F/R (10 µmol/L) 各 0.25 µL,基因组 DNA 模板(50 mg/L) 0.5 µL, DMSO 0.5 µL, 2×M5 HiPer plus Taq HiFi PCR Mix 5 µL, ddH₂O 3.5 µL。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 94 °C 25 s, 58 °C 25 s, 72 °C 30 s, 32 个循环; 72 °C 5 min, 4 °C 保存。

1.12 TG 酶基因整合载体及 TG 酶重组表达菌株的构建

为构建 TG 酶基因整合载体,使用引物对

tge-F、tge-R 将 tge 基因克隆下来,然后通过融合 PCR 技术将克隆的 tge 片段与 P_{tg} 启动子及终止子融合得到 tge 表达框,通过 Gibson 组装技术^[32]将该表达框克隆至 pSET156 的 *Eco*R V 位点,生成质粒 pSET156-tge。

为构建 TG 酶重组表达菌株,将上述构建好的质粒 pSET156-tge 转至 ET12567/pUZ8002 感受态,再通过接合转移方法转至 Δ tg 工业级底盘菌株中得到 TG 酶重组表达菌株 Δ tg::pSET156-tge 菌株。将该菌株与 smE2021 按照 1.6 中方法发酵,取相应时间点样品进行 SDS-PAGE 分析和酶活力测定。

2 结果与分析

2.1 菌株 smE2021 产 TG 酶发酵验证结果

为找到适合菌株 smE2021 的培养条件,将菌株 smE2021 分别在链霉菌常用的 MS、ISP2、PDA 和 ISP4 培养基上培养,进行培养基优化(图 1A)。结果显示该菌株在 ISP4、MS 琼脂培养基上产孢效果较差,而在 PDA 与 ISP2 琼脂培养基上产孢效果较好,并且在 PDA 培养基培养效果要优于 ISP2 培养基,后续将选用 PDA 培养基进行后续研究。为确认该菌株是否产 TG 酶,对该菌株进行产 TG 酶发酵验证,结果如图 1B 所示。发酵结果表明该菌株产 TG 酶,46 h 具有最高酶活 2.4 U/mL。SDS-PAGE 结果反映了 TG 酶成熟过程(图 1C),在发酵前期 TG 酶主要通过酶原的形式分泌到胞外,部分酶原逐渐被外泌的 TG 酶激活蛋白酶加工转化为成熟的酶。随着发酵时间延长,分泌到胞外的酶原在 36 h 左右就已经完全转化为成熟酶。

2.2 TGe 的纯化

将菌株 smE2021 在 5 L 生物反应器中扩大培养,在发酵 30 h 时 TGe 产量可达 2 563 U/L。选用 Capto S 强阳离子交换柱进行层析,以 0.1 mol/L

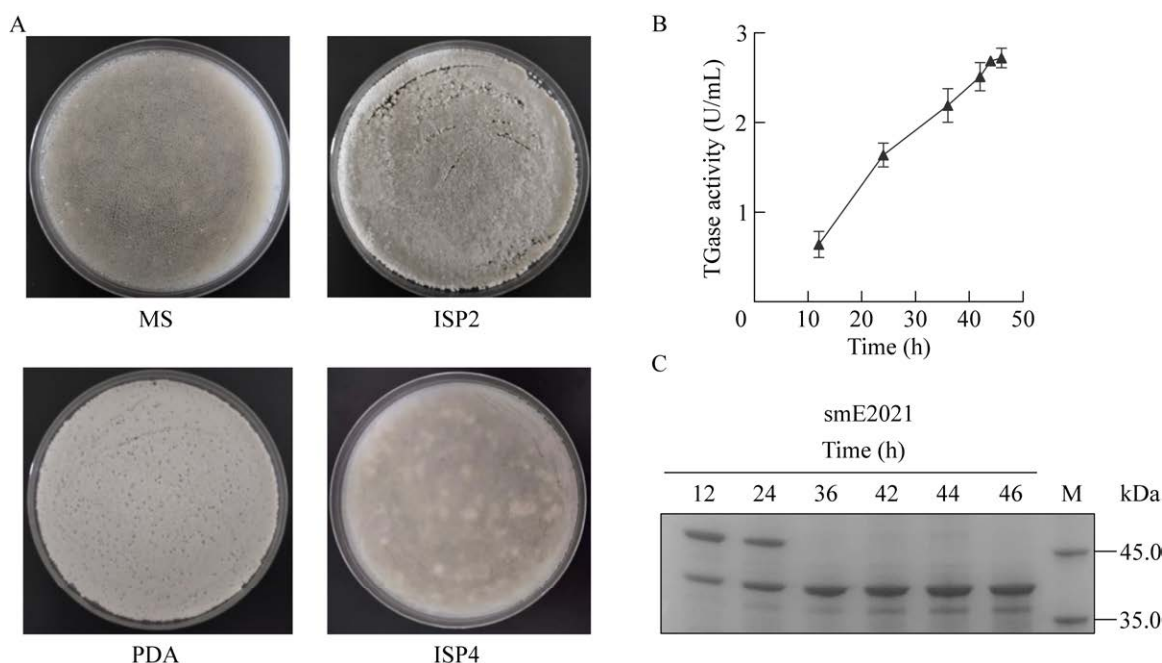


图1 smE2021 发酵产 TG 酶验证 A: smE2021 生长培养基优化; B: 酶活测定; C: 发酵产 TG 酶 SDS-PAGE 验证

Figure 1 Validation of TGase production by fermentation of smE2021. A: Optimization of smE2021 growth medium; B: TGase activity measurement; C: SDS-PAGE analysis of TGase produced by fermentation.

NaCl 对 TG 酶进行洗脱, 收集洗脱样品进行 SDS-PAGE 分析(图 2), 可见蛋白条带清晰且单一, 大小为 38.0 kDa, 与理论值吻合。纯化得到 4 305 U 的 TGe, 其比活力为 15.64 U/mg。

2.3 最适 pH 及 pH 稳定性

为研究 TGe 在不同环境中的催化性能, 我们选用商品化 TG_i 与 TGe 对比研究其最适 pH 及 pH 稳定性。由图 3A 可知, TGe 和 TG_i 分别在 pH 5.0 和 pH 6.0 时相对酶活最高, TGe 和 TG_i 最适 pH 值分别为 5.0 和 6.0。由图 3B 可知, 在 pH 4.0–10.0 之间 TGe 活性可达最高酶活的 80% 以上, 相对稳定。在 pH 6.0–10.0 范围内, TG_i 活性可保持最高酶活的 80% 以上。在 pH 3.0–6.0 之间 TGe 相对酶活要显著高于 TG_i。肉制品的 pH 值一般在 5.5–6.5 之间。由此可见, TGe 有更好的加工稳定性。

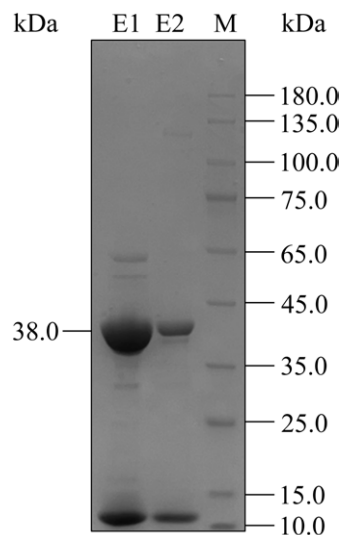


图2 smE2021 来源 TG 酶(TGe)的纯化 M: 蛋白 marker; E1–E2: 0.1 mol/L NaCl 洗脱液

Figure 2 Purification of smE2021-derived TGase (TGe). M: Protein marker; E1–E2: 0.1 mol/L NaCl elution fluid.

2.4 最适温度及温度稳定性

TG 酶在食品加工中发挥着关键作用,尤其是在肉制品和面制品的生产中。随着 TG 酶的广泛应用,对其稳定性提出了更高的要求。为进一步确定温度对 TGe 的影响,在不同温度条件下测定其相对酶活力,结果见图 4A。TGe 与商品化 TGi 在 50 °C 时表现出了最大的催化活性,这表明其最适反应温度都是 50 °C。在 4–50 °C 范围内, TGe 与 TGi 的活力均随温度的

升高而增加。同时, TGe 的酶活力在该温度范围内略高于 TGi。当温度超过 50 °C 时,两者 TG 酶活力都随着温度的升高而迅速下降。为进一步研究温度稳定性,在 pH 5.5 条件下,将 TG 酶在不同温度下预先孵育 1 h,然后再测定其酶活。TGe 与 TGi 在 4–40 °C 范围内稳定性较好,均可达最高酶活的 80% (图 4B)。在 40–50 °C 范围内可达最高酶活的 50%–80%。而且 TGe 稳定性要略优于 TGi,最大相对酶活比商品化酶高 15%。

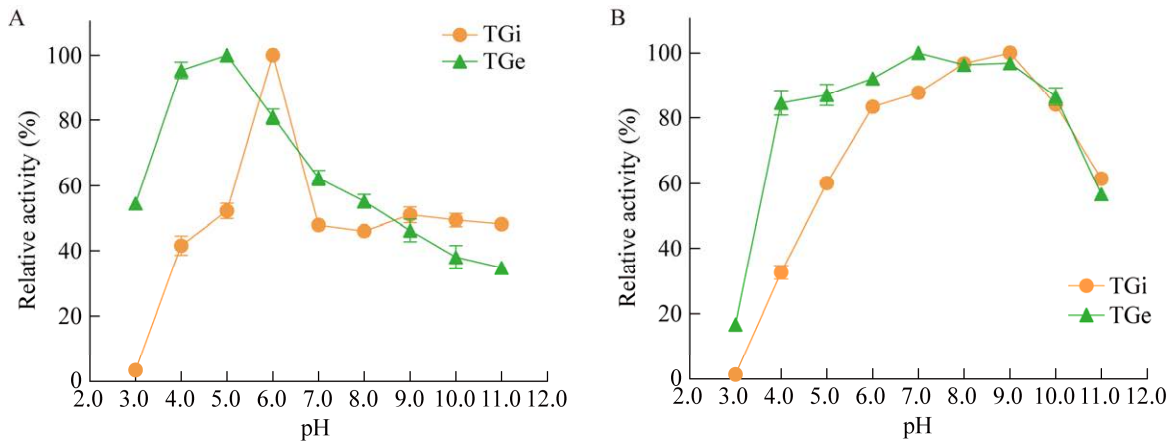


图 3 TGe 与 TGi 最适 pH (A)及 pH 稳定性(B)测定 TGe: 菌株 smE2021 发酵纯化所得 TG 酶; TGi: 商品化 TG 酶

Figure 3 Determination of the optimal pH (A) and pH stability (B) for TGe and TGi. TGe: TGase purified from fermentation of strain smE2021; TGi: Commercial TGase.

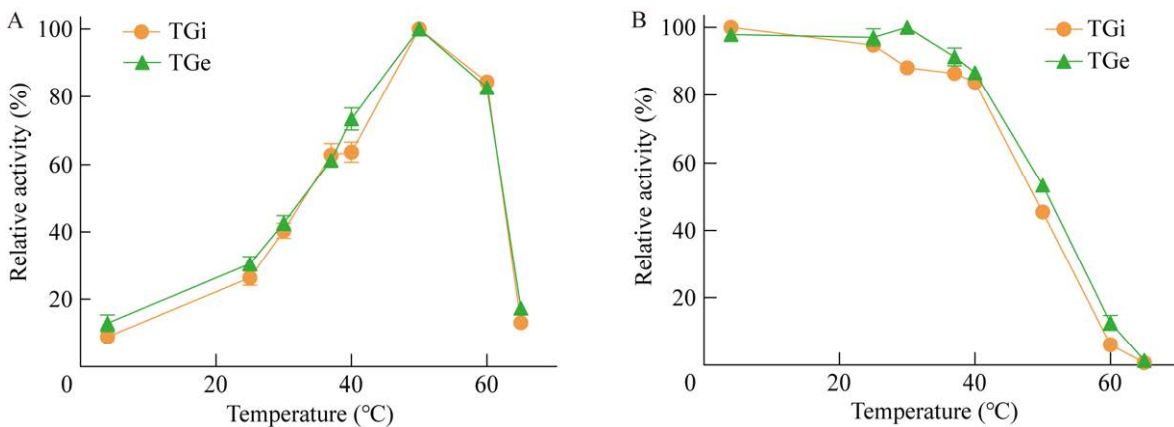


图 4 TGe 与 TGi 最适温度(A)及温度稳定性(B)测定

Figure 4 Determination of the optimal temperature (A) and thermal stability (B) for TGe and TGi.

2.5 蛋白交联活力实验

以酪蛋白为底物进行催化反应, 验证 TGe 和商品化 TGi 的交联蛋白质能力。在 50 °C 条件下, 通过加入等量 3 mg/mL 的酪蛋白和等量 1 U/mL TG 酶在 Tris-HCl 缓冲液中进行交联反应, 由图 5 中泳道 3-8 可知, 在催化反应过程中酪蛋白的条带逐渐消失, 并且许多蛋白质条带在胶孔上方位置积累代表着蛋白之间的交联, 分子量变大。在反应 15 min 时, TGe 催化的反应中酪蛋白条带逐渐消失, 大部分已经转变为交联条带(图 5A)。但在 TGi 催化的反应中, 在反应 20 min 时仍然能看到很清晰的酪蛋白条带(图 5B)。以上结果表明, TGe 对酪蛋白交联能力要优于商品化 TGi。

2.6 TG 酶基因测定及序列比对

为进一步确定 smE2021 所含 TG 酶基因序列, 对该菌株进行了基因组提取(图 6A)。并根据本实验室保存的 *S. mobaraensis* DSM 40847 基因组 TG 酶基因上下游保守区域设计引物对 tguf、tgdr, 以该菌株基因组为模板进行扩增(图 6B), 得到 2 069 bp 长度的 PCR 产物。将扩增的目的片段进行一代测序, 得到一个新的 TG 酶编码基因, 核酸序列数据 NMDCN0003ABJ 存储在国家微生物科学数据中心(NMDC) (<https://nmdc.cn/resource/genomics/sequence/detail/NMDCN0003ABJ>)。将新 TG 酶(TGe)与工业 TG 酶(TGi)进行氨基酸序列比对(图 6C), 发现两者同源性达 87.8%, 成熟区域有 21 个氨基酸不同。

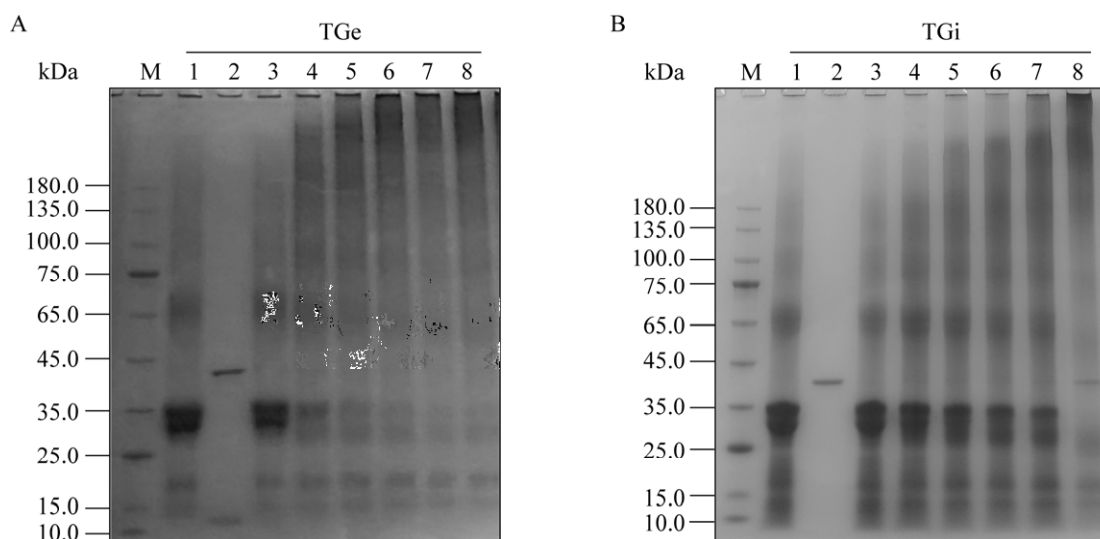


图 5 50 °C条件下 TG 酶与酪蛋白交联实验 A: TGe 在 50 °C条件下与酪蛋白交联实验. M: 蛋白 marker; 1: 3 mg/mL 酪蛋白; 2: 1 U/mL TGe; 3-8: 分别代表 TGe 与酪蛋白交联 0、5、10、15、20、25 min. B: 商品化 TGi 在 50 °C条件下与酪蛋白交联实验. M: 蛋白 marker; 1: 3 mg/mL 酪蛋白; 2: 1 U/mL TGi; 3-8: 分别代表 TGi 与酪蛋白交联 0、5、10、15、20、25 min

Figure 5 TGase cross-linking experiment with casein at 50 °C. A: TGe cross-linking experiment with casein at 50 °C. M: Protein marker; 1: 3 mg/mL casein; 2: 1 U/mL TGe; 3-8: represent TGe cross-linking with casein for 0, 5, 10, 15, 20, 25 min, respectively. B: Commercialized TGi cross-linking experiment with casein at 50 °C. M: Protein marker; 1: 3 mg/mL casein; 2: 1 U/mL TGi; 3-8: Represent TGi crosslinked with casein for 0, 5, 10, 15, 20, 25 min, respectively.

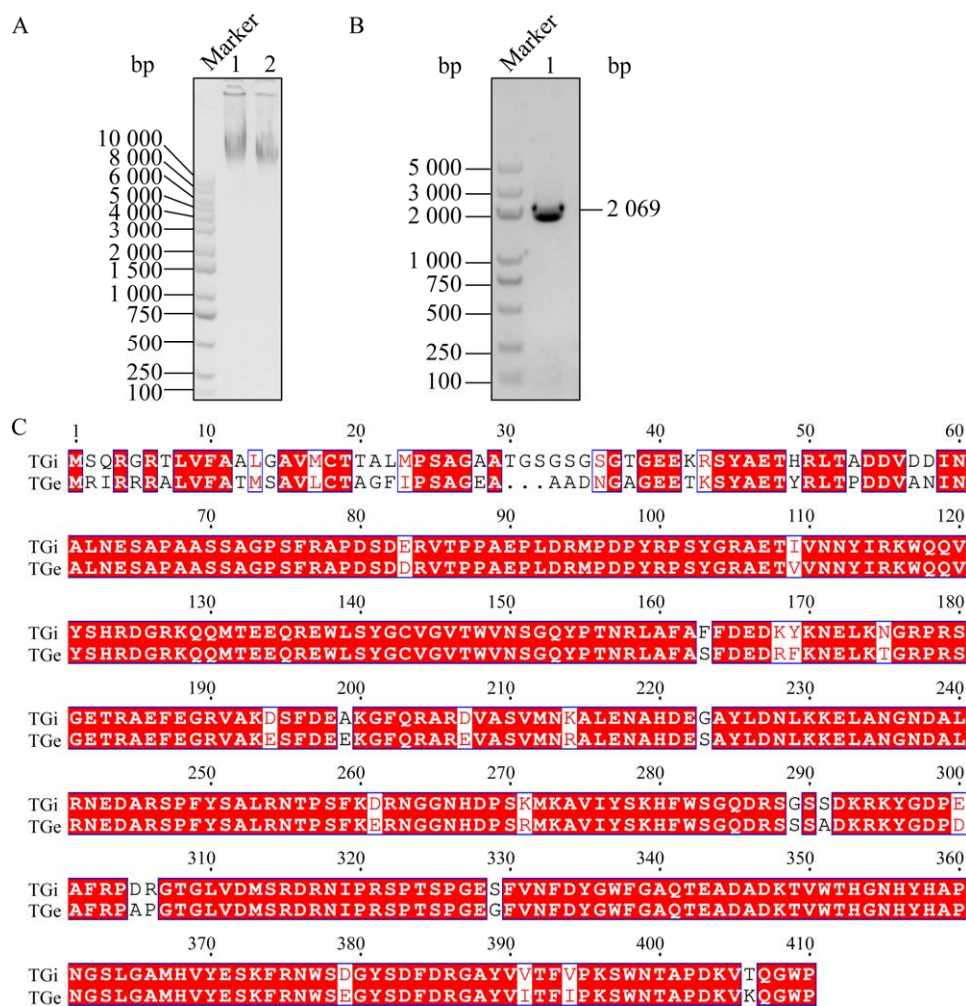


图 6 *tge* 序列测定及比对 A: smE2021 基因组提取. 1: 阳性对照; 2: smE2021 基因组. B: 保守区域引物对 *tguf*、*tgdr* 克隆目的片段. C: TGe 与 TGi 氨基酸序列比对

Figure 6 Sequences determination and alignment of *tge*. A: smE2021 genome extraction. 1: Positive control; 2: smE2021 genome. B: Cloning of target fragments with conserved region primers of *tguf* and *tgdr*. C: Amino acid sequences comparison of TGe and TGi.

2.7 TG 酶基因缺失突变株 Δtg 的构建

目前研究人员通过理性设计和进化等手段在异源宿主和茂原链霉菌中提高 TG 酶的稳定性和催化能力,但由于表达量较低从而限制了其工业化生产。工业上的 TG 酶主要来源于天然茂原链霉菌,虽存在稳定性差、催化效率低下的问题,但产量相对较高。工业茂原链霉菌具有较好的表达 TG 酶的能力,为了高效合成性能优异的 TG 酶,我们将本实验产 TG 酶的工

业茂原链霉菌(*S. mobaraensis* DSM 40587)进行 TG 酶基因的缺失以防止内源 TG 酶的干扰,构建 TG 酶基因缺失底盘菌株 Δtg ,构建原理示意图见图 7A)。根据同源双交换原理,以 sfGFP 荧光蛋白作为单交换接合子的筛选 Marker 以及双交换的反筛 Marker。在安普抗性的 PDA 培养基上培养确保其发生第一次交换。然后在无抗的 PDA 培养基上进行松弛培养,挑选无荧光的单克隆进行 PCR 验证,PCR 扩增目的条带 574 bp,

大小符合双交换特征(图 7B)。通过 SDS-PAGE 分析(图 7C), Δtg 未呈现出 TG 酶的成熟条带, 通过酶活测定(图 7D), Δtg 未能检测到 TG 酶活。为进一步确认 TG 酶基因的缺失是否影响茂原链霉菌的生长, 我们对缺失菌株进行了发酵, 在相应时间点取样进行生物量测定(图 7E), 发现 TG 酶基因的缺失并不影响菌株生物量的变化。以上结果表明缺失 TG 酶基因缺失底盘突变株已经构建成功。

2.8 在工业底盘菌株 Δtg 中表达 TGe

本研究发现 TGe 有更好的稳定性和蛋白交联能力, 优于商品化酶。但 TGe 原始菌株产量较少, 远低于工业化生产水平。为了提高 TGe 的表达量, 我们构建了 TG 酶基因重组表达整合载体, 并通过接合转移方法将其转入本研究构建成功的 Δtg 工业级底盘菌株基因组上, 得到了 TGe 异源表达菌株。将野生型菌株与重组表达菌株一同发酵(图 8), 结果显示, 在发酵 46 h 产量达到最高 6.3 U/mL, 较菌株 smE2021 提高了 162.5%。由 SDS-PAGE 图可知 TGe 在工业级 Δtg 底盘菌株中成功表达, 随着发酵的进行 pro-TG 酶逐渐的转化为成熟的 TG 酶, 且完全成熟时间比 smE2021 提前近 8 h, 推测其原因可能是 Δtg 菌株自身较强的表达系统, TG 酶活化蛋白酶在该菌株中具有较高的表达量, 从而促使 pro-TG 酶成熟提前。为进一步研究 Δtg 中重组表达的 TGe 的催化活性, 我们在 50 °C 条件下探索了其酪蛋白的交联能力, 结果如图 8C。在重组表达的 TGe 催化下, 反应进行 15 min 时, 酪蛋白条带逐渐消失, 绝大部分已经转变为交联条带, 表现出与野生型菌株来源的 TGe 相似的交联酪蛋白的能力。以上结果表明, TGe 在 Δtg 中成功表达为在茂原链霉菌中提高 TG 酶产量提供了很好的策略, 且 TG 酶特性不会受到影响。

3 讨论与结论

TG 酶由于其独特的催化特性已经广泛地应用于食品、生物制药、组织工程等各个领域。市场上急需催化活力好、表达量高的 TG 酶。目前大多数研究都集中于对现有 TG 酶基因进行改造以提高其产量和催化活力, 而挖掘新的 TG 酶基因无疑也是很重要的方式。Télléz-Luis 等^[33]通过发酵条件优化将 TG 酶产量提高至 0.725 U/mL。Kanaji 等^[34]分离的链轮丝菌属 (*Streptoverticillium* sp. strain s-8112) 菌株 TG 酶产量为 1.46 U/mL。在本研究中我们对 smE2021 进行发酵, 测得 TG 酶最高产量可达 2.4 U/mL, 与其他出发菌株相比具有较高的酶活, 可作为出发菌株以进行进一步研究。

经酶学性质测定, TGe 最适 pH 5.0, 在 pH 4.0–10.0 之间 TGe 酶活可达最高酶活的 80%, 相对稳定。在 pH 3.0–4.0 之间 TGe 相对酶活要显著高于 TG_i, 比商品化的 TG 酶更适用于酸性环境的应用。在酸奶的加工中, 通过添加微生物源 TG 酶 MTG 可以避免由于温度变化或物理影响而产生的协同作用^[35]。最适温度在 50 °C 左右, 与商品化 TG_i 相当; 在 4–40 °C 范围内稳定性较好, 且 TGe 稳定性略优于商品化 TG 酶。在奶酪制备过程中添加 MTG 酶可能会增加水分含量, 从而改变不同奶酪产品的适口性和产量。MTG 酶在乳制品中的优势在于提高凝胶强度、高储存稳定性和黏度, 本研究与酪蛋白交联实验表明, 在 50 °C 条件下, TGe 交联能力更优于商品化 TG_i, 为工业生产提供了一种可参考的基因来源。

研究人员通过理性设计和进化等手段在异源宿主中提高了其产量及稳定性, 但由于异源表达宿主中只得到无活性的 pro-TG 酶。虽然通过与 TG 酶活化蛋白酶共表达可以得到有活性

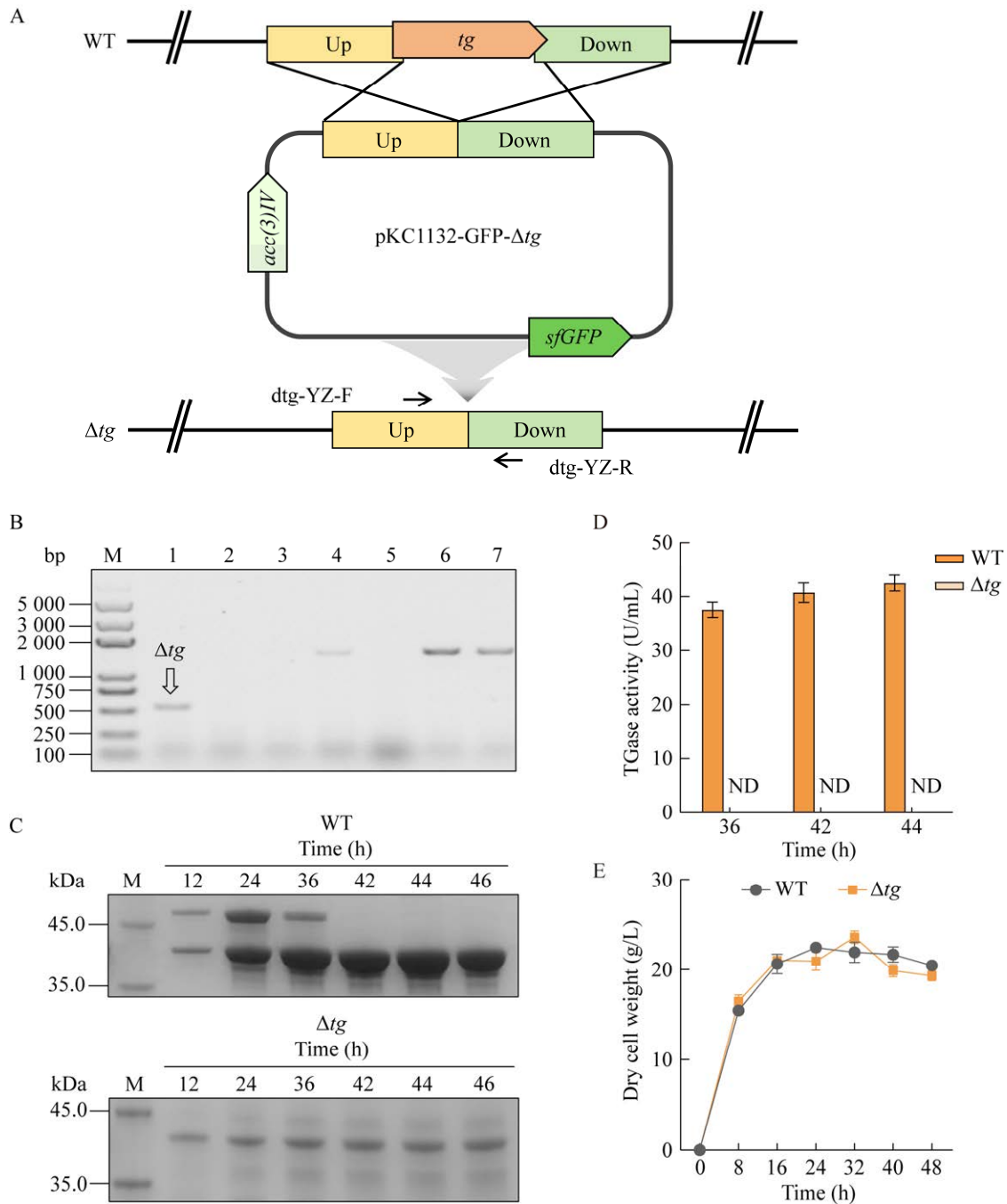


图7 TG 基因缺失突变株 Δtg 的构建及验证 A: TG 酶基因缺失突变株构建原理示意图. B: 菌落 PCR 验证. M: DNA marker; 1-7: 挑取的接合子. C: WT 和 Δtg 突变株发酵 SDS-PAGE 分析. D: WT 和 Δtg 突变株发酵酶活测定. ND: Δtg 在 36、42、44 h 未检测到 TG 酶活. E: 生物量测定

Figure 7 Construction and validation of *tg* deletion mutant strain Δtg . A: Schematic diagram of the construction principle of TGase gene deletion mutant strain. B: Colony PCR validation. M: DNA marker; 1-7: Represent the selected conjugants. C: SDS-PAGE analysis of fermentation of WT and Δtg mutants. D: Determination of fermentation TGase activity of WT and Δtg mutant strains. ND: No TGase activity was detected in Δtg at 36, 42, and 44 h. E: Biomass assay.

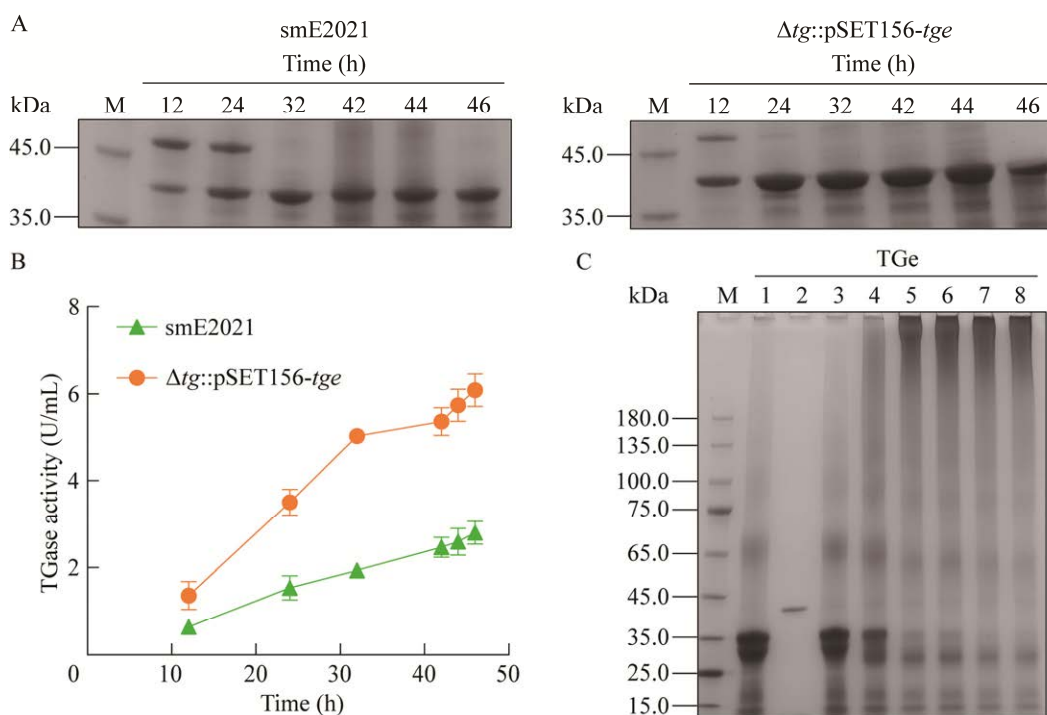


图 8 工业底盘菌株 Δtg 中表达 TGase 发酵验证 A: TGase 重组表达菌株及 smE2021 发酵 SDS-PAGE 分析. B: TG 酶活测定. C: 在 Δtg 中表达的 TGase 于 50 °C 条件下与酪蛋白交联实验. M: Protein marker; 1: 3 mg/mL 酪蛋白; 2: 1 U/mL TGase; 3–8: 分别代表 TGase 与酪蛋白交联 0、5、10、15、20、25 min

Figure 8 Fermentation validation of TGase expression in industrial chassis strain Δtg . A: SDS-PAGE analysis of TGase recombinant expression strain and smE2021 fermentation. B: TGase activity measurement. C: The TGase expressed in Δtg was subjected to cross-linking experiments with casein under 50 °C conditions. M: Protein marker; 1: 3 mg/mL casein; 2: 1 U/mL TGase; 3–8: Represent TGase cross-linking with casein for 0, 5, 10, 15, 20, 25 min, respectively.

的 TG 酶,但产量相对较低限制了其应用。工业茂原链霉菌具有较好的表达 TG 酶的能力,本研究通过构建工业级底盘菌株 Δtg ,然后将 *tge* 整合到工业级 Δtg 底盘菌株中,得到高表达量的 TGase,酶活提高 162.5%,最高可达 6.3 U/mL。同时 Pro-TG 酶成熟时间较 WT 比提前近 8 h,这可能是由于工业级底盘菌株 Δtg 具有较高的表达系统,可以表达较多的 TG 酶活化蛋白酶。通过提高 TG 酶活化蛋白酶表达量缩短发酵周期,这也为解决传统发酵周期长问题提供一定指导。另外,本研究只是通过将 *tge* 整合到工业级菌株基因组上,如果将其在 *tg* 原位表达,

有望进一步提高 TGase 的表达量。在工业底盘中表达性能优良的 TG 酶为提高 TG 产量提供了新的策略,也为表达链霉菌源功能蛋白提供了一定的参考。

REFERENCES

- [1] YANG PH, WANG XL, YE JC, RAO SQ, ZHOU JW, DU GC, LIU S. Enhanced thermostability and catalytic activity of *Streptomyces mobaraenesis* transglutaminase by rationally engineering its flexible regions[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(16): 6366-6375.
- [2] MIWA N. Innovation in the food industry using microbial transglutaminase: keys to success and future prospects[J]. Analytical Biochemistry, 2020, 597: 113638.

- [3] FATIMA SW, KHARE SK. Current insight and futuristic vistas of microbial transglutaminase in nutraceutical industry[J]. *Microbiological Research*, 2018, 215: 7-14.
- [4] AESCHLIMANN D, PAULSSON M. Transglutaminases: protein cross-linking enzymes in tissues and body fluids[J]. *Thrombosis and Haemostasis*, 1994, 71(4): 402-415.
- [5] TESFAW A, ASSEFA F. Applications of transglutaminase in textile, wool, and leather processing[J]. *International Journal of Textile Science*, 2014, 3: 64-69.
- [6] LIU Q, LIU L, LI J, ZHANG D, SUN J, DU G, CHEN J. Influence of microbial transglutaminase modified gelatin-sodium caseinate, as a filler, on the subjective mechanical and structural properties of leather[J]. *Journal of the American Leather Chemists Association*, 2011, 106(6): 200-207.
- [7] DUARTE L, MATTE CR, BIZARRO CV, AYUB MAZ. Review transglutaminases: part II—industrial applications in food, biotechnology, textiles and leather products[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2019, 36(1): 11.
- [8] AESCHLIMANN D, PAULSSON M. Transglutaminases: protein cross-linking enzymes in tissues and body fluids[J]. *Thrombosis and Haemostasis*, 1994, 71(4): 402-415.
- [9] SIEKEVITZ P. Uptake of radioactive alanine *in vitro* into the proteins of rat liver fractions[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1952, 195(2): 549-565.
- [10] DEL DS, ALOISI I, PARROTTA L, CAI G. Cytoskeleton, transglutaminase and gametophytic self-incompatibility in the malinae (Rosaceae)[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(1): 209.
- [11] 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.
- [12] SANTHI D, KALAIKANNAN A, MALAIRAJ P, PRABHU SA. Application of microbial transglutaminase in meat foods: a review[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2017, 57(10): 2071-2076.
- [13] ZOTZEL J, KELLER P, FUCHSBAUER HL. Transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* is activated by an endogenous metalloprotease[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2003, 270(15): 3214-3222.
- [14] ZHANG DX, WANG M, WU J, CUI L, DU GC, CHEN J. Two different proteases from *Streptomyces hygroscopicus* are involved in transglutaminase activation[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(21): 10261-10264.
- [15] CHICA RA, DOUCET N, PELLETIER JN. Semi-rational approaches to engineering enzyme activity: combining the benefits of directed evolution and rational design[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2005, 16(4): 378-384.
- [16] WANG XL, DU JH, ZHAO BC, WANG HY, RAO SQ, DU GC, ZHOU JW, CHEN J, LIU S. Significantly improving the thermostability and catalytic efficiency of *Streptomyces mobaraensis* transglutaminase through combined rational design[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(50): 15268-15278.
- [17] XUE T, ZHENG XH, SU XM, CHEN D, LIU K, YUAN X, LIN RH, HUANG LQ, HE WJ, ZHU JM, CHEN YQ. Directed evolution of the transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* and its enhanced expression in *Escherichia coli*[J]. *Food Biotechnology*, 2020, 34(1): 42-61.
- [18] SATO R, MINAMIHATA K, ARIYOSHI R, TANIGUCHI H, KAMIYA N. Recombinant production of active microbial transglutaminase in *E. coli* by using self-cleavable zymogen with mutated propeptide[J]. *Protein Expression and Purification*, 2020, 176: 105730.
- [19] LIU X, WANG H, WANG B, PAN L. High-level extracellular protein expression in *Bacillus subtilis* by optimizing strong promoters based on the transcriptome of *Bacillus subtilis* and *Bacillus megaterium*[J]. *Protein Expression and Purification*, 2018, 151: 72-77.
- [20] ÖZÇELİK AT, ERSÖZ F, İNAN M. Extracellular production of the recombinant bacterial transglutaminase in *Pichia pastoris*[J]. *Protein Expression and Purification*, 2019, 159: 83-90.
- [21] TAGUCHI S, ARAKAWA K, YOKOYAMA K, TAKEHANA S, TAKAGI H, MOMOSE H. Overexpression and purification of microbial pro-transglutaminase from *Streptomyces cinnamomeum* and *in vitro* processing by *Streptomyces albogriseolus* proteases[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2002, 94(5): 478-481.
- [22] YANG HL, PAN L, LIN Y. Purification and on-column

- activation of a recombinant histidine-tagged pro-transglutaminase after soluble expression in *Escherichia coli*[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2009, 73(11): 2531-2534.
- [23] YIN XQ, LI YY, ZHOU JW, RAO SQ, DU GC, CHEN J, LIU S. Enhanced production of transglutaminase in *Streptomyces mobaraensis* through random mutagenesis and site-directed genetic modification[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(10): 3144-3153.
- [24] WASHIZU K, ANDO K, KOIKEDA S, HIROSE S, MATSUURA A, TAKAGI H, MOTOKI M, TAKEUCHI K. Molecular cloning of the gene for microbial transglutaminase from *Streptoverticillium* and its expression in *Streptomyces lividans*[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1994, 58(1): 82-87.
- [25] LIU S, WANG M, DU GC, CHEN J. Improving the active expression of transglutaminase in *Streptomyces lividans* by promoter engineering and codon optimization[J]. *BMC Biotechnology*, 2016, 16(1): 75.
- [26] XUE T, SUN MM, CHEN D, YUAN X, LIU K, CHEN JN, YE HY, FANG JP, HE WJ, CHEN YQ. Molecular cloning and overexpression of the transglutaminase gene from *Streptomyces mobaraensis*[J]. *Food Science and Technology Research*, 2019, 25(5): 687-694.
- [27] SAMBROOK J, RUSSELL DW. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*[M]. 3rd Edition. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [28] SHIRLING EB, GOTTLIEB D. Methods for characterization of *Streptomyces* species[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1966, 16(3): 313-340.
- [29] KIESER T, BIBB MJ, BUTTNER MJ, CHATER KF, HOPWOOD DA. *Practical Streptomyces Genetics*[M]. The United Kingdom: The John Innes Foundation, 2000.
- [30] YE JC, YANG PH, ZHOU JW, DU GC, LIU S. Efficient production of a thermostable mutant of transglutaminase by *Streptomyces mobaraensis*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(8): 4207-4216.
- [31] GROSSOWICZ N, WAINFAN E, BOREK E, WAELSCH H. The enzymatic formation of hydroxamic acids from glutamine and asparagine[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1950, 187(1): 111-125.
- [32] GIBSON DG, YOUNG L, CHUANG RY, VENTER JC, HUTCHISON CA, SMITH HO. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases[J]. *Nature Methods*, 2009, 6: 343-345.
- [33] TÉLLEZ-LUIS SJ, RAMÍREZ JA, VÁZQUEZ M. Production of transglutaminase by *Streptoverticillium ladakanum* NRRL-3191 using glycerol as carbon source[J]. *Food Technology and Biotechnology*, 2004, 42(2): 75-81.
- [34] KANAJI T, OZAKI H, TAKAO T, KAWAJIRI H, IDE H, MOTOKI M, SHIMONISHI Y. Primary structure of microbial transglutaminase from *Streptoverticillium* sp. strain s-8112[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268(16): 11565-11572.
- [35] YOKOYAMA K, NIO N, KIKUCHI Y. Properties and applications of microbial transglutaminase[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 64(4): 447-454.