

蛹虫草中谷氨酰胺转氨酶基因的克隆及在毕赤酵母中的表达

杨 聪^{1,2}, 郭丽琼^{1,2}, 叶志伟^{1,2}, 邹 苑^{1,2}, 余颖豪^{1,2}, 林俊芳^{1,2*}

(¹华南农业大学食品学院生物工程系 广州 510640

²广东省微生态制剂工程技术研究中心 广州 510640)

摘要 谷氨酰胺转氨酶(TGase 或 TG)是一种可催化蛋白质间形成异肽键,使蛋白质改性的天然酶制剂。本文以蛹虫草基因组为模板,通过 PCR 扩增得到 TGase 相似蛋白的基因片段 *tgM*,将其与大肠杆菌-毕赤酵母穿梭表达载体 pPIC9K 连接,构建重组表达载体 pPIC9K-TG,在毕赤酵母中进行表达,实现目的蛋白的胞外分泌表达,结果发酵液中重组 TGase 的酶活力为 100 U/L。本研究为 TGase 的异源表达及潜在的工业应用提供参考。

关键词 谷氨酰胺转氨酶; 毕赤酵母; 异源表达; 蛹虫草

文章编号 1009-7848(2022)02-0107-07 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2022.02.012

虫草菌是我国传统医药用真菌,属于大型药食同源真菌。蛹虫草【*Cordyceps militaris* (Vuill.) Fr.】,又名迷力菌、虫草花,是麦角菌科(Clavicipitaceae)虫草属(*Cordyceps*)的模式种^[1],富含虫草素、虫草多糖、甾醇等对人体有益的活性物质及微量元素,具多种抗性,有免疫调节活性^[2]。蛹虫草在卫生部 2009 年底 3 号公告中被正式批准为新资源食品,在 2014 年被纳入新食品原料^[3]。

谷氨酰胺转氨酶(又称转谷氨酰胺酶)是一种天然蛋白质交联剂,能催化蛋白质中谷氨酰胺残基的 γ -羟胺基团与伯胺化合物(酰基受体)之间发生酰基转移反应,使蛋白质发生共价交联,通过胺的导入、交联及脱胺 3 种途径对蛋白质进行改性^[4],被誉为“21 世纪超级黏合剂”。该酶广泛存在于生物界中,来源于微生物的 TGase (Microbial transglutaminase, MTG)属胞外酶,底物特异性低,在无 Ca^{2+} 存在的条件下仍有催化活性^[5],工业上主要通过微生物发酵制备,原料廉价、周期短,利于大规模工业制备,用于食品工业改善蛋白质功能性质。目前 MTGase 最主要的微生物来源是链霉菌属,如茂源链霉菌、吸水链霉菌等,然而链霉菌来源的 MTGase 在食品工业中应用的安全性有待

考证,尚有争议。从大型食用真菌虫草属的蛹虫草 CM01 中获取,其来源是食用真菌,食品安全性得到保证。目前 MTGase 的食用真菌来源只有香菇^[6]。近年来,对 TGase 研究集中在应用领域的拓展及对 TGase 进行基因改造,用重组表达系统来实现酶的高表达。

巴斯德毕赤酵母,是甲醇营养型酵母,以甲醇为唯一碳源,有良好的基因遗传稳定性,翻译后修饰能力,自身蛋白分泌较少,外源蛋白是其发酵液中主要蛋白,分离纯化简单等^[7]。甲基营养型酵母毕赤酵母(*Pichia pastoris*)是近 20 年发展起来的一种异源蛋白表达的首选系统^[8],已具有成熟的高密度培养技术。近年来用重组表达系统来生产 TGase 成为工业化生产的主要方式,应用最为成功的表达系统有大肠杆菌表达系统^[9]、棒杆菌表达系统^[10-11]和甲基营养型酵母表达系统^[12]。本文所用毕赤酵母 GS115 就是甲基营养型酵母,毕赤酵母不仅可以做到外源蛋白的高表达、高分泌,而且其工程菌株稳定性高,能进行多种翻译后加工修饰,如糖基化、磷酸化等,是当前最适合用来表达蛋白的表达系统^[13]。

本文拟从蛹虫草 CM01 中获取 TGase 相似蛋白的编码基因片段 *tgM*,转化入毕赤酵母构建工程菌株,进行异源表达,并对其发酵液做 TGase 酶活试验,以此验证蛹虫草中是否有表达 TGase 的能力,为 TGase 的工业用菌提供新的食用菌来源。

收稿日期: 2021-02-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(31772373, 32072646, 31901693)

作者简介: 杨聪(1995—),女,硕士生

通信作者: 林俊芳 E-mail: linjf@scau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 蛹虫草菌株 CM01、大肠杆菌 *E. coli* DHK、毕氏酵母 GS115、pMD18-T 载体质粒、表达载体 pPIC9K 质粒,均为本实验室保存。

1.1.2 试剂 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶、限制性核酸内切酶 *EcoR* I、*Not* I、*Sal* I, Takara 公司;核酸 Marker、蛋白 Marker, Thermo Fisher Scientific 公司;Trizol 试剂盒、质粒提取试剂盒、反转录试剂盒、小片段回收试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒, Omega 公司;蛋白胨、酵母浸膏, Oxoid 公司;引物及 DNA 测序由北京擎科生物有限公司完成;*N*- α -CBZ-Gln-Gly、*L*-谷氨酸- γ -单羟肟酸, Sigma 公司;其它试剂均为分析纯级。

1.1.3 培养基

1) PDA 固体培养基(按 1 L 剂量配制) 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 15~20 g;

2) LB 固体培养基(按 1 L 剂量配制) 酵母提取物 5 g, 胰蛋白胨 10 g, NaCl 10 g, 琼脂 15 g;

3) YPD 固体培养基(按 1 L 剂量配制) 酵母提取物 10 g, 蛋白胨 20 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g;

4) MD 培养基(按 1 L 剂量配制) 葡萄糖 20 g, 琼脂 15 g, YNB 13.4 g, 生物素 0.04 g;

5) BMGY 液体培养基(按 1 L 剂量配制) 酵母提取物 10 g, 蛋白胨 20 g, 10 \times YNB(无氨基酵母氮源) 100 mL, 10 \times 甘油 100 mL, 500 \times 生物素 2 mL; 无菌水 700 mL; 1 mol/L 磷酸盐缓冲液 100 mL;

6) BMMY 液体培养基(按 1 L 剂量配制) 酵母提取物 10 g, 蛋白胨 20 g, 10 \times YNB 100 mL, 500 \times 生物素 2 mL; 1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.0) 100 mL, 甲醇 5 mL, 无菌水 800 mL。

1.2 方法

1.2.1 蛹虫草 CM01 的 TGase 目的基因克隆 将蛹虫草 CM01 进行液体摇瓶发酵培养菌丝, 收集菌丝用 trizol 试剂盒提取 RNA, 用反转录试剂盒进行反转录获得 cDNA, 根据 NCBI 查找得到的 TGase 相似蛋白基因序列(基因库查询号 NO. NW_006271971.1), 设计 TGase 基因的扩增引物 TGF 和 TGR(添加 6 个组氨酸标签, 便于后期纯

化), 以蛹虫草 CM01 的基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 TGase 基因的目的片段。PCR 条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s; 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s; 68 $^{\circ}$ C 延伸 2 min; 30 个循环; 4 $^{\circ}$ C 保存 20 min; 将 PCR 产物纯化回收, 将纯化后的 TGase 基因片段与 pMD18-T 载体通过 DNA 连接酶连接, 在含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素(Amp)的平板培养基中对转入重组载体的大肠杆菌 DHK 感受态细胞进行筛选, 37 $^{\circ}$ C 培养 12~16 h。挑取阳性转化子以 TGT 和 TGB 为引物, 进行菌落 PCR, 扩增产物经凝胶电泳验证, 将可以扩增出目的条带大小的转化子进行测序。

1.2.2 重组质粒的构建 将分泌型表达载体 pPIC9K 用 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切, 酶切体系: *EcoR* I 1.0 μ L, *Not* I 1.0 μ L, 质粒 pPIC9K 10.0 μ L, 10 \times 缓冲液 2.0 μ L, ddH₂O 定容到 20 μ L, 37 $^{\circ}$ C 酶切 1 h, 酶切产物经由 1% 琼脂糖凝胶电泳回收后获得线性化质粒载体, 测定浓度。设计 TG-9KF(引入 *EcoR* I 酶切位点)和 TG-9KR(引入 *Not* I 酶切位点)引物, 对目的片段进行 PCR 扩增, 同时引入 pPIC9K 载体的同源臂。将带有表达载体同源臂的目的片段与双酶切后的 pPIC9K 通过重组试剂盒进行连接, 转化入大肠杆菌 DHK 感受态细胞, 于含 100 μ g/mL Amp 平板培养基进行筛选, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养。挑取单菌落送测序, 鉴定连接成功, 提取重组表达载体 pPIC9K-TG。

1.2.3 酵母的电转化及重组子的筛选 将构建成功的 pPIC9K-TG 表达载体用 *Sal* I 单酶切线性化, 产物纯化回收后获得线性化质粒, 用 NanoDrop 测定 DNA 浓度。酶切体系: *Sal* I 1.0 μ L; 10 \times 缓冲液 2.0 μ L; 线性化质粒 17.0 μ L; 37 $^{\circ}$ C 酶切过夜; 毕赤酵母感受态的制备和电转化方法参照文献[14]。将酵母转化子涂布于组氨酸缺乏的 MD 平板培养基筛选重组子。选取成功长出的重组子用 GS115 通用引物 α -factor primer 和 3'AOX1 primer 进行菌落 PCR 和凝胶电泳, 判断目的基因是否成功整合到毕赤酵母 GS115 的基因组中。

1.2.4 重组酵母的摇瓶表达及 TGase 酶活测定 将得到的酵母重组子用 BMGY 培养基活化, 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 摇床培养至 OD_{600nm}=2~6, (16~18 h),

表 1 引物列表
Table 1 List of primer

引物名称	引物序列(5'-3')	引物大小/bp
TGF	ATGCCCGAAACGGAGGAGCC	22
TGR	TAGTGGTGCTGCTGCTGCTGCTGAAGTACCCACTGCCGTCAG(加组氨酸标签)	42
TG-9KF	GAGAGGCTGAAGCTTACGTAGAAATTCATGCCCGAAACGGAGGAGCC	46
TG-9KR	TGTCTAAGGCCAATTAATTCGCGGCCGCTTAGTGCTGCTGCTGCTGCTGAAGT ACCCACTGCCGTCAGAAT	74
α -factor primer	TACTATTGCCAGCATTGCTGC	21
3'AOX1 primer	GCAAATGGCATTCTGACATCC	21

离心取菌体,将收集到的菌体用 BMMY 重悬至 $OD_{600nm}=1.0$,进行诱导表达。摇瓶发酵培养条件为 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 200 r/min 、每 24 h 加甲醇至甲醇质量分数为 0.5%,诱导表达 7 d 后得到重组酵母的发酵液。

1.2.5 TGase 蛋白纯化 TGase 的蛋白纯化采用镍柱纯化亲和层析法,步骤如下:将体积为 2.0 mL 的 Ni 树脂装入合适的纯化柱中,用预冷的平衡缓冲液平衡树脂,将平衡后的树脂与粗酶液混合,置于磁力搅拌器上搅拌 40~60 min 使二者混合,环境温度 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$;将树脂与粗酶液的混合液过柱;将 20 mL 预冷的洗涤缓冲溶液加入到柱子清洗杂蛋白;用 5 mL 含 500 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲溶液洗脱,洗脱液进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.6 TGase 酶活测定 酶活测定采用 Cross-iciz 比色法,以 N - α -CBZ-Gln-Gly 为底物,以 L -谷氨酸- γ -单羟脂肪酸制作标准曲线,具体步骤参照参考文献[15]。酶活定义为:37 $^{\circ}\text{C}$ 时 TGase 每分钟催化底物生成 1.0 μmol L -谷氨酸-单羟脂肪酸(羟脂肪酸)为 1 个酶活单位。

2 结果与分析

2.1 目的基因的验证

以蛹虫草的基因组 cDNA 为模板利用引物 TGF 和 TGR 通过 PCR 扩增获得 TGase 基因(*tgM*),如图 1 所示,可见距离 1 200 bp 处有一条单一、明亮条带,与 *tgM* 片段 1 023 bp 符合,电泳结果显示与预期相符。PCR 产物与 pMD18-T 载体连接,转化入大肠杆菌 DHK 感受态细胞,获得转化子后提质粒后测序,测序结果表明 *tgM* 基因与 NCBI 公布序列完全吻合。



图 1 *tgM* 目的片段 PCR 结果

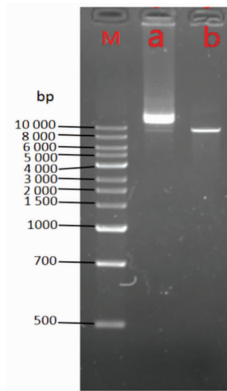
Fig.1 PCR results of *tgM* target fragment

2.2 重组表达载体 pPIC9K-TG 的构建

按 1.2.2 节的方法所述,对表达载体 pPIC9K 进行双酶切和回收后,得质量浓度为 $100\text{ ng}/\mu\text{L}$ 的产物。如图 2 所示,在 8 000~10 000 bp 之间有一明显条带 b 与 pPIC9K 的 9 276 bp 大小符合。将目的片段与线性化载体连接,转化入大肠后,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜后进行菌落 PCR,挑单菌落送测序,测序结果表明 pPIC9K-TG 重组表达载体(如图 3)构建成功。经 *Sal* I 单酶切后电泳图如图 2 的 a 条带所示,在 10 000 bp 附近有一条单一、明亮条带,与 pPIC9K-TG 片段 10 311 bp 符合,证明基因和载体在大小上基本正确,可进行下一步酶连。

2.3 酵母的电转化及重组酵母菌的构建与验证

将 pPIC9K-TG 电转化转入毕赤酵母 GS115 中,涂布于 MD 平板以筛选菌落。随机选取筛选平板阳性菌落,用 pPIC9K 通用引物 α -factor primer 和 3'AOX1 primer 进行菌落 PCR。菌落 PCR 结果如图 4 所示,选取的两个样品均在 1 200~2 000



注:M. Marker;a. pPIC9K-TG;b. pPIC9K。

图2 质粒与 pPIC9K-TG 重组质粒酶切检测
Fig.2 Enzyme digestion identification of plasmid and pPIC9K-TG recombinant plasmid

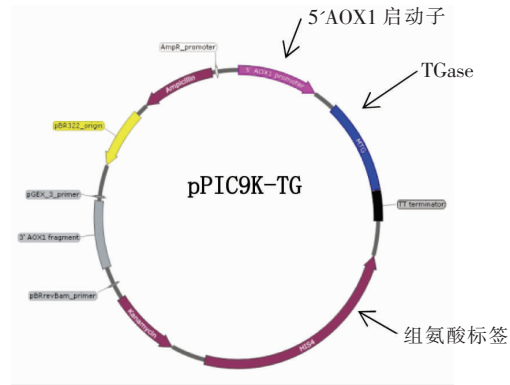
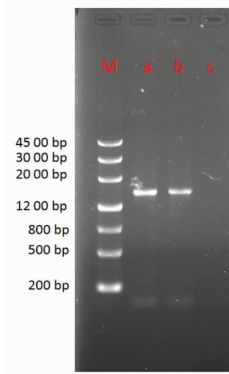


图3 重组质粒 pPIC9K-TG 的构建策略
Fig.3 Construction strategy of recombinant plasmid pPIC9K-TG



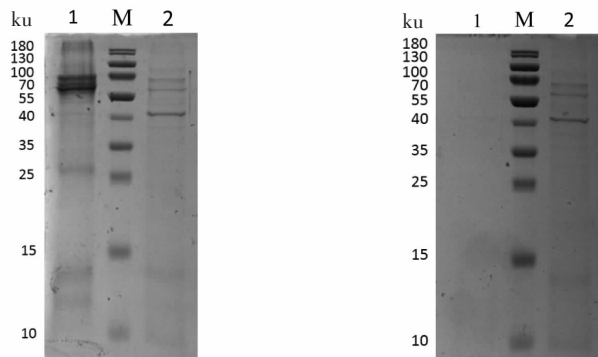
注:M 为 DNA Marker;a,b 分别为 2 个阳性转化子的 PCR 产物;c 为阴性对照。

图4 转化子 PCR 鉴定结果
Fig.4 Identification of transformants by PCR amplification

bp 之间有一条明亮条带,与用 pPIC9K-TG 通用引物 PCR 获得的 *tgM* 片段 1 528 bp 相符合,说明随机选取的两个菌落均为阳性重组菌落。阴性对照 c 无明显条带。说明 *tgM* 基因已成功整合到毕赤酵母 GS115 的基因组中。

2.4 重组菌株的诱导表达及纯化

将得到的重组菌株用 BMGY 培养基活化至 $OD_{600nm}=2\sim6$, 收集菌体用 BMMY 重悬进行诱导表达。在保证甲醇终质量分数为 0.5% 的情况下,诱导表达 7 d 取发酵上清液及纯化后洗脱液进行纯化后对其 SDS-PAGE 分析,如图 5a 所示,2 泳道为重组酵母的发酵液,在 40 ku 附近有一明显条带,对应 Marker,可知条带大小为 38 ku。而转入 pPIC9K 空载体的 GS115 发酵上清液的 1 泳道则无此条



(a) 发酵上清液的 SDS-PAGE 检测 (b) 经纯化后的 SDS-PAGE 检测

注:M. 蛋白 Marker;1. 转入空载体的酵母的发酵上清液;2. 重组酵母发酵上清液。

图5 SDS-PAGE 检测毕赤酵母 TGase 表达结果
Fig.5 Expression results of TGase in *Pichia pastoris* detected by SDS-PAGE

带,说明该条带为酵母表达出的目的蛋白,证明目的基因在毕赤酵母 GS115 中成功实现胞外表达。

取发酵上清液进行酶活测定,以 GS115 的发酵上清液为空白对照,测定内含 pPIC9K 空载体的 GS115 及重组酵母的发酵上清液的酶活。酶活测定结果为内含空载体的 GS115 的发酵上清液无酶活,重组酵母发酵上清液的酶活为 100 U/L,说明该目的基因编码表达的目的蛋白确有酶活,证明从蛹虫草基因组中克隆的 *tgM* 基因具有表达 TGase 的功能。

3 讨论与结论

由 SDS-PAGE 分析的结果看,蛋白表达量不高,可能的原因有:1)不同种生物对于密码子的偏好性存在差别,蛹虫草 TGase 编码基因与毕赤酵母常用密码子存在偏好性差异,若本试验的目的基因在翻译中用到毕赤酵母的稀有密码子,则可能会影响翻译的顺利进行,使得表达产物减少;2)本试验仅单拷贝表达,也可能是表达量低的原因之一。针对蛋白表达量低可采取的解决办法:1)确定编码基因后对目的基因进行重新设计,将目的基因的密码子优化为 GS115 偏好的密码子,可使该基因的蛋白表达量增加。李洪波^[16]对 TGase 进行密码子优化,优化后的酶活是优化前的 2.8 倍,产量是优化前的 3.1 倍。2)可采用不同信号肽,与分子伴侣共表达等方法对目的基因进行改造,进一步提高 TGase 的表达量。Li 等^[17]用食品级枯草芽孢杆菌分泌表达 TGase 时,换用 SP_{sacB} 取代了天然信号肽,使其能分泌到胞外,对前肽进行定点诱变后,上清液中酶活由 1.6 U/mg 上升到 7.60 U/mg,且具有良好的 Ca²⁺稳定性和温度稳定性;李鹏飞等^[18]将含酶原的 TGase 的 Pro 序列与成熟 MTG 进行共表达,成功直接表达了成熟有活性的茂源链霉菌来源的 TGase,单拷贝菌株的酶活值为 0.18 U/mL;3)可通过增加外源基因拷贝数来提高表达量,李鹏飞等^[18]对目的基因进行了单拷贝和多拷贝表达后发现,增加拷贝数可明显提高表达量。

由酶活试验的结果来看,酶活性不高,可能的原因有:1)取发酵上清液进行酶活试验,上清液内的酶浓度不高,导致酶活较低;2)当前发酵条件不

是最适发酵条件,针对酶活低可采用的解决办法:1)对发酵上清液进行进一步的分离提纯,提高酶浓度;2)优化发酵条件、进行高密度发酵、筛选合适的酵母菌株等都提高产酶量。李鹏飞等^[18]对多拷贝子进行发酵优化后进行高密度发酵, TGase 的产量达到了 7.3 U/mL,比摇瓶产量提高了近 30 倍,说明对其进行发酵最适条件优化可显著提高其蛋白表达量。

本试验验证了基因和载体序列的正确性,从蛹虫草 CM01 中克隆得到 *tgM* 基因片段,构建了重组载体 pPIC9K-TG,并在毕赤酵母成功实现了异源表达,SDS-PAGE 检测试验确定目的蛋白的大小理论值在 38 Ku 左右。酶活试验证实该蛋白具有 TGase 催化活性,确定 *tgM* 基因即为蛹虫草 CM01 中编码 TGase 的基因序列。谷氨酰胺转氨酶现已为国际公认的食品安全用酶,但其来源多为霉菌,本试验获得了大型食用真菌来源的 TGase,确保了该酶的在食品行业应用的安全性,丰富了 TGase 的微生物来源。

参 考 文 献

- [1] DAS S K, MASUDA M, SAKURAI A, et al. Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: Current state and prospects[J]. *Fitoterapia*, 2010, 81(8), 961-968.
- [2] ZHANG J X, WEN C T, DUAN Y Q, et al. Advance in *Cordyceps militaris* (Linn) Link polysaccharides: Isolation, structure, and bioactivities: A review[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 132: 906-914.
- [3] 王智民, 刘晓谦, 高慧敏, 等. 发展大健康产业过程中的药食两用中药研发[J]. *中国药学杂志*, 2017, 52(5): 333-336.
WANG Z M, LIU X Q, GAO H M, et al. Brief introduction of dietary Chinese medicines[J]. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2017, 52(5): 333-336.
- [4] GASPAR A L, DE GÓES-FAVONI S P. Action of microbial transglutaminase (MTGase) in the modification of food proteins: A review[J]. *Food Chemistry*, 2015, 171: 315-322.
- [5] 杨聪, 郭丽琼, 万华, 等. 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*,

- (2020-10-13)[2020-10-28]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1759.TS.20201013.1445.018.html>.
- YANG C, GUO L Q, WAN H, et al. Research advances on transglutaminases and their applications in food industry[J]. Science and Technology of Food Industry, (2020-10-13)[2020-10-28]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1759.TS.20201013.1445.018.html>.
- [6] 邹佩贞, 朱必凤, 彭凌, 等. 香菇谷氨酰胺转氨酶的分离和动力学研究[J]. 微生物学杂志, 2008(5): 46-51.
- ZOU P Z, ZHU B F, PENG L, et al. Purification and dynamics of transglutaminase from *Lentinus edodes*[J]. Journal of Microbiology, 2008(5): 46-51.
- [7] CREGG J M, CEREGHINO J L, SHI J, et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*[J]. Mol Biotechnol, 2000, 1(16): 23-52.
- [8] ZHU T C, YOU L J, GONG F Y, et al. Combinatorial strategy of sorbitol feeding and low-temperature induction leads to high-level production of alkaline-mannanase in *Pichia pastoris*[J]. Enzyme Microb Tech, 2011, 49(4): 407-412.
- [9] ZHAO X, SHAW A C, WANG J, et al. A novel high-throughput screening method for microbial transglutaminase with high specificity toward Gln141 of human growth hormone[J]. J Biomol Screen, 2010, 15(2): 206-212.
- [10] MASAYO D, KEI-ICHI Y, YUKIKO U, et al. High level expression of *Streptomyces mobaraensis* transglutaminase in *Corynebacterium glutamicum* using achimeric pro-region from *Streptomyces cinnamonensis* transglutaminase[J]. J Biotechnol, 2004, 3(110): 219-226.
- [11] DATE M, YOKOYAMA K, UMEZAWA Y, et al. Production of native-type *Streptoverticillium mobaraense* transglutaminase in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(5): 3011-3014.
- [12] YURIMOTO H, YAMANE M, KIKUCHI Y, et al. The pro-peptide of *Streptomyces mobaraensis* transglutaminase functions in cis and in trans to mediate efficient secretion of active enzyme from methylotrophic yeasts[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2004, 68(10): 2058-2069.
- [13] 王坤. 茂源链霉菌转谷氨酰胺酶的异源表达研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2013.
- WANG K. Study on the heterologous expression of transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2013.
- [14] 许婧. 耐高温 α -淀粉酶基因的克隆及其在毕赤酵母中的表达[D]. 成都: 四川农业大学, 2013.
- XU J. Thermostable alpha-amylase gene cloning and expression in *Pichia pastoris*[D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2013.
- [15] 包莹玲, 潘力. 微生物谷氨酰胺转氨酶作用机制及检测方法研究进展[J]. 食品工业科技, 2008, 29(7): 265-268.
- BAO Y L, PAN L. Research progress of mechanism and activity assay of microbial transglutaminase[J]. Science and Technology of Food Industry, 2008, 29(7): 265-268.
- [16] 李洪波. 黏玉米谷氨酰胺转氨酶微生物异源表达及其酶学性质研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2014.
- LI H B. Microbial heterologous expression and enzymatic characterization of transglutaminase from zeamays [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2014.
- [17] LI H F, JIAN S J, HAMED M, et al. Extracellular production of *Streptomyces ladakanum* transglutaminase in a food-grade strain, *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Food Science & Technology, 2020.
- [18] 李鹏飞, 孙红兵, 游丽金, 等. 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 P F, SUN H B, YOU L J, et al. Direct secretory expression of active microbial transglutaminase in *Pichia pastoris*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2013, 29(2): 180-188.

Cloning of the Transglutaminase Gene from *Cordyceps militaris* and Its Expression in *Pichia pastoris*

Yang Cong^{1,2}, Guo Liqiong^{1,2}, Ye Zhiwei^{1,2}, Zou Yuan^{1,2}, Yu Yinghao^{1,2}, Lin Junfang^{1,2*}

(¹College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510640

²Research Center for Micro-Ecological Agent Engineering and Technology of Guangdong Province, Guangzhou 510640)

Abstract Transglutaminase (TGase or TG), one of the natural food cross-linking agents with strong cross-linking function, form network structures among proteins via ϵ -(γ -glutamyl)-lysine (G-L) bonds. The gene *tgM* of TGase was obtained from the genomic DNA of *Cordyceps militaris* through PCR amplification. It was inserted into an *E.coli*-*P. pastoris* shuttle vector pPIC9K to construct recombinant plasmid pPIC9K-TG. The recombinant TGase was successfully expressed in *P.pastoris* and secreted into the culture medium. In optimized fermentation conditions, the activity of TGase in fermentation broth was up to 100 U/L. The results could provide guidance for the heterologous expression and potential industrial application of TGase.

Keywords transglutaminase; *Pichia pastoris*; heterologous expression; *Cordyceps militaris*