

黏玉米谷氨酰胺酶的酵母表达及其对乳蛋白的作用

韩秀娥, 秦兰霞*, 任浩威
(东北农业大学食品学院 哈尔滨 150030)

摘要 为得到大量的具有生物学功能特性的黏玉米谷氨酰胺酶, 首先通过分子生物学技术将前期构建的重组质粒 pPIC9K-TGase 经双酶切及 PCR 鉴定正确后, Sac I 线性化处理, 电转入巴斯德毕赤酵母 GS115, 用体积分数为 1% 的甲醇诱导其分泌表达。结果: 通过 SDS-PAGE 电泳分析, 与对照组相比, 在分子质量约为 60 ku 处, 出现 1 条特异的蛋白带, 即目的蛋白。将酵母表达 TGase 与 0.2% 酪蛋白溶液反应 2 h, SDS-PAGE 电泳显示, 酪蛋白被聚合生成不同分子质量的聚合物, 表明黏玉米 TGase 对酪蛋白具有很好的交联作用。将酵母表达的 TGase 添加到酸奶中, 通过扫描电镜观察发现, 添加酵母表达的 TGase 酸奶网络结构变得比较致密。结论: 本研究获得的酵母表达的黏玉米谷氨酰胺酶具有交联乳蛋白的生物学活性。

关键词 粘玉米; 谷氨酰胺转氨酶; 酵母; 乳蛋白

文章编号 1009-7848(2023)01-0110-06 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.01.011

谷氨酰胺转氨酶(TGase)能催化蛋白质与多肽链中谷氨酰胺残基的 γ -酰胺基与一级氨基之间的酰胺基转移反应, 即催化蛋白质之间的交联反应^[1-7]。TGase 作用的底物包括乳清蛋白、麦胚蛋白、大豆蛋白、牛肌球蛋白和家禽肌球蛋白等^[7-20]。在乳制品中, 其能提高奶酪的产量、酸奶的品质; 在肉制品和鱼制品中, 可以改善产品的外观和质构; 并通过引入赖氨酸提高蛋白质的营养价值, 使蛋白类食品在营养、质构、外观和风味等方面得到改善, 满足人们日益增长的对食品的口感、风味和营养的需求^[21-29]。随着食品工业的蓬勃发展, 对食品添加剂的需求量也逐年增加, 而谷氨酰胺转氨酶是蛋白质, 作为食品添加剂可以直接被人体消化吸收, 与其它人工合成添加剂相比, 具有无法比拟的优越性^[29-35]。本文研究的 TGase, 是理想的天然食品添加剂, 可以替代目前使用的人工食品添加剂。目前, 谷氨酰胺转氨酶在中国食品工业中还没有得到广泛应用, 主要是由于产量与来源受限, 不能满足市场需求。急需获得 1 株高产谷氨酰胺转氨酶的菌株。

本研究目的是利用生物化学和分子生物学的

技术和手段, 克隆玉米氨酰胺转氨酶基因, 将其连接入毕赤酵母表达载体, 并在酵母中表达, 筛选获得高产菌株, 并对酶的生物功能特性进行研究。采用酶技术来改善传统蛋白食品的功能特性和营养特性, 具有极大的发展潜力。这是因为酶反应专一, 条件温和, 易于控制, 越来越受到食品领域的重视。应用生物酶制剂进行蛋白质的生物改性, 提高食品的营养、质构、风味, 是未来发展趋势。

1 材料与amp;方法

1.1 菌种与试剂

巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)GS115 和质粒酵母表达载体 pPIC9K-TGase 由东北农业大学乳品重点实验室保存; 酵母基因组 DNA 提取试剂盒, TIANGEN(中国); *ExTaq* DNA 聚合酶、*EcoRI*、*Not I*、*Sac I*, 中国大连 TaKaRa 公司。胰蛋白酶、酵母提取物, OXOID 公司(英国); 异丙基硫代半乳糖苷(IPTG), 中国上海华舜生物工程有限公司; *N,N'* 亚甲基双丙烯酰胺、丙烯酰胺、十二烷基磺酸钠(SDS)、Tris-Base、四甲基已二铵(TEMED)、二硫苏糖醇(DTT)、过硫酸铵(APS)、甘氨酸、酵母氮源培养基(YNB), GIBCO 公司(美国); 蛋白分子量标准, Fermentas; TritonX-100、EB(溴化乙锭), Sigma 公司(美国)。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒 pPIC9K-TGase 的 PCR 鉴定 以

收稿日期: 2022-01-24

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目(LH2019C030)

第一作者: 韩秀娥, 女, 博士, 副研究员

通信作者: 秦兰霞 E-mail: 1298214879@qq.com

质粒 pPIC9K-TGase, 以上游引物:5'-ATC GAATTCATGGCTCATCGTGGACATCTAGA-3' 和下游引物:5'-GTCAGCGGCCGCGATTTTCAC CATATTTGTCTGC-3' 为引物进行 PCR 扩增, 扩增片段长度为 1 630 bp。使用高保真的 *ExTaq* DNA 聚合酶, 进行 PCR。条件为:94 °C 2 min, 94 °C 35 s, 62 °C 40 s, 72 °C 100 s, 29 个循环;72 °C 延伸 11 min。反应结束, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳对产物进行鉴定。

1.2.2 质粒 pPIC9K-TGase 的双酶切鉴定 用 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切质粒 pPIC9K-TGase。酶切反应条件:37 °C 酶切 2 h。反应结束后, 取酶切产物 5 μL 进行琼脂糖凝胶电泳, 在紫外灯光下观察电泳结果并拍照。

1.2.3 质粒 pPIC9K-TGase 的线性化及电转化 将经酶切、PCR 鉴定后的重组表达质粒 pPIC9K-TGase, 用 *Sac* I 进行单酶切线性化反应。然后, 将线性化产物电转化至感受态细胞毕赤酵母 GS115 中。取转化物均匀涂布于含 100 μg/mL 博来霉素 (Zeocin) 的 YPDS 选择平板上。

1.2.4 粘玉米 TGase 基因在酵母中的表达 接种一单菌落到 25 mL 的 BMGY 培养基中, 培养到 $OD_{600nm} = 2\sim 6$; 离心 (12 000 r/min, 10 min), 收集细胞, 移入 BMMY 培养基中, 置 28 °C 摇床培养; 每 24 h 向培养基中添加 100% 甲醇, 使其最终体积分数达 0.5%; 每隔一段时间取样 1 mL 分析表达水平, 以确定最佳诱导时间。取样时间点为 (h): 0, 24 (1 d), 48 (2 d), 72 (3 d), 96 (4 d); 在样品中加入 100 μL ddH₂O, 混匀并加入 25 μL 5×SDS 凝胶加样缓冲液, 混合 20 s。样品经沸水浴处理后进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.2.5 酵母表达产物的纯化 将酵母工程菌 GS115/pPIC9k-TGase 诱导表达, 培养液 (BMMY) 4 °C 10 000 r/min 离心 10 min, 将上清液上样于经 50 mmol/L, pH 5.0 磷酸钠缓冲液预平衡的 SP Sepharose Fast Flow 阳离子交换层析柱, 然后以含 0.2 mol/L 氯化钠的 0.02 mol/L pH 6.5 的磷酸钠缓冲液梯度洗脱, 收集含目的蛋白的洗脱液, 凝胶过滤后, 收集到的活性峰溶液较稀, 离子强度大, 需经过浓缩和透析, 经 0.02 mol/L pH 6.5 的磷酸钠缓冲液透析后, 采用阳离子交换柱

HiPrep16/10 纯化, 平衡缓冲液为 0.02 mol/L pH 6.5 的磷酸钠缓冲液, 上样结束后用平衡液洗至基线, 进行氯化钠梯度洗脱, 以含 0.2 mol/L 氯化钠的 0.02 mol/L pH 6.5 的磷酸钠缓冲液梯度洗脱。收集含目的蛋白的洗脱峰。以考马斯亮蓝染色法对纯化后的目的蛋白进行浓度测定, SDS-PAGE 电泳。

1.2.6 酵母表达的 TGase 对酪蛋白的改性 取 0.2% (体积分数) pH 6.5 的酪蛋白溶液 2 mL, 纯化的 TGase 酵母表达蛋白浓缩液 2 mL, 于 37 °C 反应 2.0 h, 取 60 μL 反应液, 加入等体积的 2×SDS 样品缓冲液, 沸水浴 6 min, 然后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。

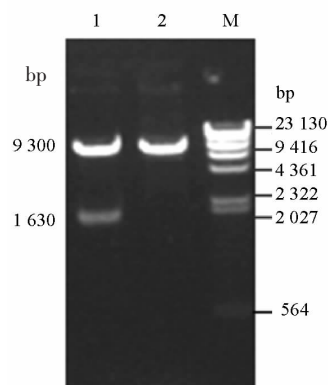
1.2.7 酵母表达的 TGase 对酸奶超微结构的改变

酵母表达的 TGase 按一定比例加入酸奶中, 以不加 TGase 为对照, 于 43 °C 恒温箱中进行保温发酵, 大约 2.5 h 后, pH 值达到 4.7 左右时, 停止发酵, 在 4 °C 冰箱中贮存待用。然后, 按要求制作电泳样品, 在扫描电镜下观察、拍照。

2 结果与分析

2.1 重组质粒 pPIC9K-TGase 的双酶切鉴定

将 pPIC9K-TGase 质粒转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞中, 提取质粒用 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切鉴定, 鉴定结果如图 1 所示。

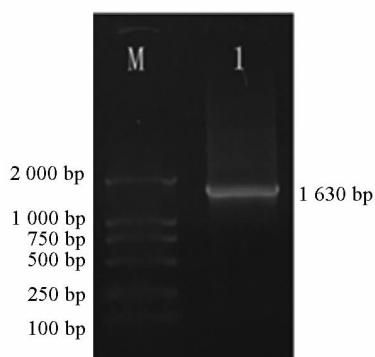


注: 1. pPIC9K-TGase 双酶切; 2. 空质粒 pPIC9K 双酶切; M. DNA 分子 Marker λ -HindIII。

图 1 重组质粒 pPIC9K-TGase 的双酶切鉴定
Fig.1 Identification of recombinant plasmid pPIC9K-TGase by double digestion

2.2 重组质粒 pPIC9K-TGase 的 PCR 鉴定

以质粒 pPIC9K-TGase 为模板, 以 TGase-up



注:M. DL-2000 分子质量标准;1. PCR 扩增的 TGase 片段。

图 2 重组质粒 pPIC9K-TGase 的 PCR 鉴定

Fig.2 PCR identification of recombinant plasmid pPIC9K-TGase

和TGase-down 为引物进行 PCR 扩增,电泳结果见图 2,扩增的 DNA 条带大小约为 1 630 bp,与预期大小相符。结果表明,目的基因已插入到表达载体 pPIC9K 中。

2.3 重组酵母的诱导表达

与对照组比较,重组菌诱导表达上清液在分子质量约 60 ku 处,有明显特征性条带出现(图 3 中箭头所示),与预期的 TGase 分子质量大小相符,表明 TGase 蛋白在酵母中得到表达。通过对蛋白浓度计算,培养基中目的蛋白表达量为 85 mg/L,酶活为 6.5 U/mL。

2.4 重组蛋白的纯化

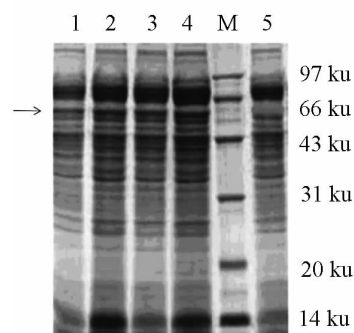
酵母工程菌 GS115/pPIC9k-TGase 表达的上清,经 SP Sepharose Fast Flow 阳离子交换层析柱,阳离子交换柱 HiPrep16/10 纯化后,上样于聚丙烯凝胶上进行 SDS-PAGE 电泳,结果见图 4。酵母工程菌 GS115/pPIC9k-TGase 培养液上清,经凝胶过柱后,可以得到纯化蛋白。经薄层扫描分析,纯化蛋白的纯度可达 85%。

2.5 毕赤酵母表达的 TGase 对酪蛋白的改性

毕赤酵母表达的 TGase 对酪蛋白具有很强的聚合作用,使酪蛋白交联成较大的聚合物,很大部分聚集在浓缩胶和分离胶的界面,小部分形成了不同分子质量的蛋白聚合物,分布在分子质量在 45 ku 以上,结果见图 5。

2.6 毕赤酵母表达的 TGase 对酸奶超微结构的改变

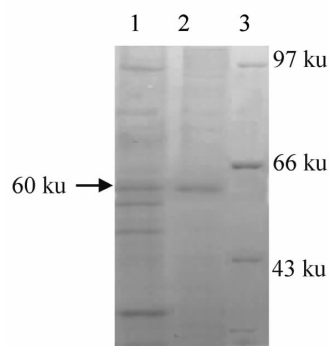
将酵母表达的 TGase 加入酸奶中,酸奶样品



注:M. 蛋白质分子质量 Marker;1~4. 诱导 GS115/pPIC9K-TGase 培养上清蛋白;5. GS115/pPIC9K 对照。

图 3 酵母转化子表达上清 SDS-PAGE

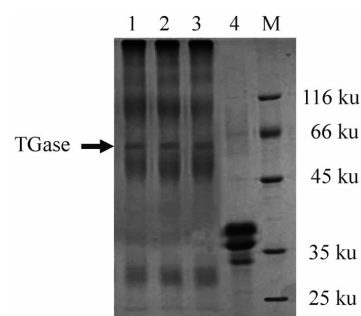
Fig.3 SDS-PAGE of yeast transformant expressing supernatant



注:1. 酵母表达上清;2. 纯化蛋白;3. 蛋白分子质量标准。

图 4 纯化蛋白的 SDS-PAGE 电泳

Fig.4 SDS-PAGE electrophoresis of purified proteins



注:1~3. TGase 对酪蛋白的改性;4. 酪蛋白;M. 低分子质量标准蛋白。

图 5 酵母表达的 TGase 催化酪蛋白聚合反应

Fig.5 Casein polymerization catalyzed by TGase expressed by yeast

经处理后,放于扫描电镜下观察。结果见图 6a 和图 6b,放大倍数为 5 000 倍。由图 6a 可知,没有加酶的酸奶形成大孔径的纤维网络结构,这些网络

结构是由变性的酪蛋白微粒以丛状、链状连接在一起堆积而成, 这些微孔的直径一般在 $9\ \mu\text{m}$ 以

上;图 6b 可见,添加酵母表达的 TGase,网络结构变得较致密,空隙直径在 $3\ \mu\text{m}$ 左右。

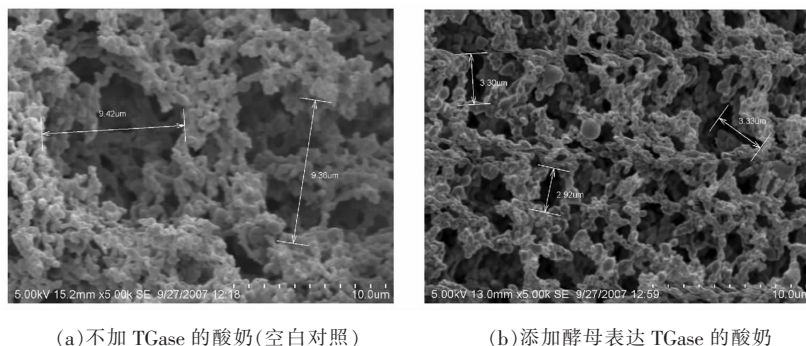


图 6 酸奶的超微结构

Fig.6 Ultrastructure of yogurt

3 结论

本研究将前期已经构建好的重组质粒 pPIC9K-TGase 经双酶切及 PCR 鉴定正确后, Sac I 线性化处理, 电转入巴斯德毕赤酵母 GS115, 利用 1%(体积分数) 甲醇诱导其分泌表达。SDS-PAGE 电泳可检测到特异的蛋白带。通过对蛋白浓度的计算, 培养基中目的蛋白表达量为 $85\ \text{mg/L}$, 酶活为 $6.5\ \text{U/mL}$ 。通过酪蛋白改性试验证明: 毕赤酵母表达的 TGase, 都能使酪蛋白聚合生成不同分子质量的聚合物; 通过扫描电镜观察: 添加酵母表达 TGase 的酸奶凝胶网络结构变得较致密, 孔隙也变得较小。

参 考 文 献

- [1] SEYED-MOSLEMI S A, HESARI J, PEIGHAMBARDOUST S H, et al. Effect of microbial lipase and transglutaminase on the textural, physicochemical, and microbial parameters of fresh quark cheese [J]. Journal of Dairy Science, 2021, 104(7): 7489-7499.
- [2] AKBARI M, RAZAVI S H, KIELISZEK M. Recent advances in microbial transglutaminase biosynthesis and its application in the food industry[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 110(4): 458-469.
- [3] QAZANFARZADEH Z, KADIVAR M, SHEKAR-CHIZADEH H, et al. Secalin enzymatically cross-linked by either papain and *N*-acetyl-DL-homocysteine thiolactone or transglutaminase: Improving of protein functional properties and film manufacturing [J]. Food Hydrocolloids, 2021, 120(11): 106912.
- [4] HU X, AMAKYE W K, HE P, et al. Effects of microfluidization and transglutaminase cross-linking on the conformations and functional properties of arachin and conarachin in peanut[J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 146(7): 111438.
- [5] ZHANG Q, CHENG Z, WANG Y, et al. Combining alcalase hydrolysis and transglutaminase-cross-linking improved bitterness and techno-functional properties of hypoallergenic soybean protein hydrolysates through structural modifications[J]. LWT, 2021, 151(11): 112096.
- [6] CADAVID A M, BOHIGAS L, TOLDRÀ M, et al. Improving quark-type cheese yield and quality by treating semi-skimmed cow milk with microbial transglutaminase[J]. LWT- Food Science and Technology, 2020, 131(9): 109756.
- [7] LAAA B, THM A, MIAO Z A, et al. Improving sweet potato protein gel properties through ϵ -(γ -glutamyl)-lysine isopeptide cross-link catalyzed by transglutaminase[J]. Food Bioscience, 2020, 39(1): 100828.
- [8] GLODOWSKY A P, RUBERTO L A, MARTORELL M M, et al. Cold active transglutaminase from antarctic *Penicillium chrysogenum*: Partial purification, characterization and potential application in food technology [J]. Biocatalysis and Agricultural

- Biotechnology, 2020, 29(10): 101807.
- [9] ALI F, WANG Z X. Effect of pasteurization on the enzymatic cross-linking of milk proteins by microbial transglutaminase in view of milk fat globule membrane isolation[J]. Food Bioscience, 2021, 43(10): 101100.
- [10] ZHANG T, ZHAO Y, TIAN X, et al. Effect of ultrasound pretreatment on structural, physicochemical, rheological and gelation properties of transglutaminase cross-linked whey protein soluble aggregates[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2021, 74(6): 105553.
- [11] LI H, LI C, LIU T, et al. Textural performance of *Zea mays* transglutaminase modified milk protein concentrate in stirred yoghurt[J]. LWT- Food Science and Technology, 2021, 147(S1): 111625.
- [12] AHAMMED S, LIU F, WU J, et al. Effect of transglutaminase crosslinking on solubility property and mechanical strength of gelatin-zein composite films[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 116(4): 106649.
- [13] NIVALA O, NORDLUND E, KRUIUS K, et al. The effect of heat and transglutaminase treatment on emulsifying and gelling properties of Faba bean protein isolate-ScienceDirect[J]. LWT, 2020, 139(6): 110517.
- [14] LIANG X, MA C, YAN X, et al. Structure, rheology and functionality of whey protein emulsion gels: Effects of double cross-linking with transglutaminase and calcium[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 102(5): 105569.
- [15] WANG M, ZHAO Z, NIU M, et al. Thermomechanical behaviors and protein polymerization in bread dough modified by bran components and transglutaminase[J]. LWT- Food Science and Technology, 2020, 133(7): 109894.
- [16] MATTICE K D, MARANGONI A G. Physical properties of zein networks treated with microbial transglutaminase[J]. Food Chemistry, 2021, 338(2): 128010.
- [17] LIU K, XU X, LIU H, et al. Mechanical properties and water sensitivity of soybean protein isolate film improved by incorporation of sodium caseinate and transglutaminase[J]. Progress in Organic Coatings, 2021, 153(1): 106154.
- [18] ROMEIH E, WALKER G. Recent advances on microbial transglutaminase and dairy application [J]. Trends in Food Science & Technology, 2017, 62(4): 133-140.
- [19] RACHEL N, PELLETIER J. Biotechnological applications of transglutaminases[J]. Biomolecules, 2013, 3(4): 3040870.
- [20] SOUZA C F V D, VENZKE J G, FLORES S H, et al. Enzymatic properties of transglutaminase produced by a new strain of *Bacillus circulans* BL32 and its action over food proteins[J]. LWT-Food Science and Technology, 2011, 44(2): 443-450.
- [21] WARISUL F S, KHARE S K. Current insight and futuristic vistas of microbial transglutaminase in nutraceutical industry [J]. Microbiological Research, 2018, 215(10): 7-14.
- [22] MCDERMOTT M K, CHEN T, WILLIAMS C M, et al. Mechanical properties of biomimetic tissue adhesive based on the microbial transglutaminase-catalyzed crosslinking of gelatin[J]. Biomacromolecules, 2004, 5(4): 1270.
- [23] GAUCHE C, VIEIRA J T C, OGLIARI P J, et al. Crosslinking of milk whey proteins by transglutaminase [J]. Process Biochemistry, 2008, 43(7): 788-794.
- [24] ENVELOPE P S P, MARELLA C, AMAMCHARLA J K, et al. Use of micellar casein concentrate and milk protein concentrate treated with transglutaminase in imitation cheese products-unmelted texture [J]. Journal of Dairy Science, 2022, 105(10): 7891-7903.
- [25] AROGUNDADE L A, MU T H, ZHANG M, et al. Improving sweet potato protein gel properties through ϵ -(γ -glutamy)-lysine isopeptide cross-linkcatalyzed by transglutaminase[J]. Food Bioscience, 2020, 39(1): 100828.
- [26] CADAVID A M, BOHIGAS L, TOLDRÀ M, et al. Improving quark-type cheese yield and quality by treating semi-skimmed cow milk with microbial transglutaminase[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 131(9): 109756.
- [27] MATTICE K D, MARANGONI A G. Physical properties of zein networks treated with microbial transglutaminase[J]. Food Chemistry, 2021, 338(2): 128010.
- [28] SATO R, MINAMIHATA K, ARIYOSHI R, et al. Recombinant production of active microbial transglutaminase in *E. coli* by using self-cleavable zymogen with mutated propeptide[J]. Protein Expression and Purification, 2020, 176(8): 105730.
- [29] 仪朝印, 张东杰, 王颖. 茂源链霉菌转谷氨酰胺酶基

因工程菌的构建及表达[J]. 中国食品学报, 2014, 14(2): 42-46.

YI C Y, ZHANG D J, WANG Y. Expression and construction of transglutaminase gene engineering bacteria from *Streptomyces mobaraensis*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology,

2014, 14(2): 42-46.

[30] LUISA A, GASPAR C, DE GOES-FAVONI S P. Action of microbial transglutaminase (MTGase) in the modification of food proteins: A review[J]. Food Chemistry, 2015, 171: 315-322.

Yeast Expression of Glutaminase from Maize and Its Effects on Milk Protein

Han Xiue, Qin Lanxia*, Ren Haowei

(College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

Abstract In order to obtain a large amount of corn glutaminase with biological functions, the recombinant plasmid pPIC9K-TGase was first identified by double enzyme digestion and PCR using molecular biology techniques, then linearized by *Sac* I, electrotransferred into *Pichia pastoris* GS115, and its expression was induced by 1% methanol. Results by SDS-PAGE analysis, compared with the control, there was a specific protein band at the molecular weight of about 60 ku, which was the target protein. Then, the yeast expressed TGase was reacted with 0.2% casein solution for 2 hours, and SDS-PAGE showed that casein was polymerized into polymers with different molecular weights, indicating that the expressed protein had a good cross-linking effect on casein. Moreover, the TGase from yeast expressed was added to yogurt, and it was observed by scanning electron microscope that the yogurt network structure with yeast expressed TGase became relatively dense. Conclusion: The yeast expressed glutaminase has the biological activity of crosslinking milk protein.

Keywords corn; transglutaminase; yeast; milk protein