

玉米谷氨酰胺酶基因在毕赤酵母中表达条件的优化

韩秀娥, 秦兰霞*, 邵红, 任浩威

(东北农业大学食品学院 哈尔滨 150030)

摘要 为确定玉米谷氨酰胺转氨酶基因在毕赤酵母中的最佳诱导表达条件,将构建好的重组表达载体 pPIC9K-TGZ 经 *Sac I* 线性化处理,电转入巴斯德毕赤酵母 GS115,利用抗生素 Zeocin 筛选阳性克隆,聚合酶链式反应扩增验证,甲醇诱导表达。通过正交试验确定工程菌最佳表达条件:表达培养基 BMMY,诱导表达时间 96 h,初始表达 pH 值 6.0,菌体起始诱导 OD_{600nm} 值 4.0,诱导温度 24 ℃,甲醇添加量 0.6%(体积分数)、甲醇流加时间间隔 12 h/次,诱导 48 h 后每 24 h 添加 1 g/L 甘油。采用优化的条件得到培养基上清的最高酶活达 7.51 U/mL。

关键词 玉米;谷氨酰胺转氨酶;毕赤酵母;表达;表达条件优化

文章编号 1009-7848(2022)04-0076-07 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.04.008

谷氨酰胺转氨酶(Transglutaminase.EC2.3.2.13, TGase),又称转谷氨酰胺酶,广泛存在于哺乳动物、鱼类、植物、细菌、真菌和绿藻等生物中^[1-9],具有催化蛋白质分子内和分子间交联,蛋白质和氨基酸间连接,以及蛋白质分子内谷氨酰胺酰胺基的水解功能。通过 TGase 催化反应能提高蛋白质的弹性、发泡性、溶解性、乳化性、持水性和热稳定性,从而改善蛋白质功能特性,在食品工业中具有很好的应用前景^[9-19]。

国内使用的产谷氨酰胺转氨酶菌株的产酶量低,酶活低。为解决目前谷氨酰胺转氨酶的生产成本过高,产量不能满足市场需求等问题,需要获得一株高产谷氨酰胺转氨酶的菌株。随着基因工程的飞速发展,利用基因工程手段生产酶制剂和生物制药得到广泛应用^[20-25]。采用基因工程的方法获得具有自主知识产权的产谷氨酰胺转氨酶菌株,是解决目前问题的一个重要手段。

毕赤酵母是一种单细胞的真核生物,在小量培养基和大规模生物反应器中都能快速生长。同其它表达系统一样,在实际应用和生产中,毕赤酵母高效生产外源蛋白受许多因素的影响^[26-30]。本课题的主要目的是将前期构建的重组表达质粒 pPIC9K-TGZ,经 *Sac I* 线性化处理,电转入巴斯德

毕赤酵母 GS115,优选出最佳表达条件,为下游蛋白提纯及酶的生物功能特性研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌种与试剂

巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)GS115、质粒酵母表达载体 pPIC9K-TGZ,东北农业大学乳品重点实验室。各种限制性内切酶,TaKaRa 公司;酵母基因组 DNA 提取试剂盒,TIANGEN。

异丙基硫代半乳糖苷(IPTG),上海华舜生物工程公司;胰蛋白胨、酵母提取物,OXOID 公司;丙烯酰胺、*N,N'*-亚甲基双丙烯酰胺、十二烷基磺酸钠(SDS)、二硫苏糖醇(DTT)、Tris-Base、四甲基已二铵(TEMED)、过硫酸铵(APS)、甘氨酸、酵母氮源培养基(YNB),GIBCO 公司;蛋白分子量标准,Fermentas;TritonX-100、EB(溴化乙锭),美国 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 毕赤酵母的转化及筛选 毕赤酵母转化采用电转化法。重组质粒 pPIC9K-TGZ 经 *Sac I* 线性化处理电转化至感受态细胞毕赤酵母 GS115。以空质粒 pPIC9K 作为阴性对照。电转化参数为:电压 2 000 V,脉冲 5 ms,温度 0 ℃。电击结束后,立即加入 1 mL 预冷的 1 mol/L 山梨醇。将混合物转移到灭菌离心管中,30 ℃静置培养 1.5 h,取转化物均匀涂布于含 100 μg/mL 博来霉素的酵母浸出粉葡萄糖选择平板上。

1.2.2 酵母重组子的聚合酶链式反应(Polymerase

收稿日期:2021-04-18

基金项目:黑龙江省自然科学基金项目(LH2019C030)

作者简介:韩秀娥(1978—),女,博士,副研究员

通信作者:秦兰霞 E-mail: 1298214879@qq.com

chain reaction, PCR) 鉴定 以重组酵母菌 GS115/pPIC9K-TGZ DNA 作为模板, 以 α -因子引物: 5'-TACTATTGCCAGCATTGCTGC-3'; 3' AOX1 基因家族: 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3' 作为引物进行 PCR 鉴定。挑取一个空白表达载体 pPIC9K 转化的重组菌 GS115/pPIC9K 作为对照, 进行相同处理。PCR 反应程序为: 94 °C 预变性 1 min; 94 °C 变性 1 min, 56 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.2.3 玉米 TGase 基因在酵母中的表达 Mut+型胞内或分泌表达(空载体作对照): (1) 接种一单菌落到 25 mL 的 BMGY 培养基中, 28~30 °C 培养 (250~300 r/min), 使 $OD_{600nm}=2\sim6$ (约 16~18 h), 细胞处于对数生长期; (2) 1 500×g 室温离心 5 min, 收集细胞, 移入 100 mL BMMY 培养基中, 用 3~4 层灭菌纱布封口, 置于 28 °C 摇床培养; (3) 每 24 h 向培养基中添加 100% 甲醇, 使其添加量为 0.5% (体积分数), 维持诱导; (4) 按下面时间间隔每隔一定时间取样 1 mL 来分析表达水平, 以确定最佳诱导时间。以最大转速在室温条件下离心 2~3 min 收集菌体; (5) 取样时间点为 (h): 0, 24, 48, 72, 96; (6) 对分泌型表达来说, 应将上清转移至单独的管中, 并将其与细胞沉淀同时贮于 -80 °C 直至检测。可快速冻于液氮或干冰中。对胞内表达而言, 弃上清, 仅需将细胞沉淀贮于 -80 °C 直至检测。沉淀中加入 100 μ L ddH₂O, 涡旋振荡混匀后加入 25 μ L 5×SDS 凝胶加样缓冲液, 继续混合 20 s。样品经沸水浴处理 5 min 后进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.2.4 重组 TGase 表达条件的优化

1) 最佳诱导表达时间的确定 接种一酵母工程菌 GS115/pPIC9k-TGZ 单菌落到 25 mL 的 BMGY 培养基中, 28 °C 摇床培养 (250~300 r/min), 使 $OD_{600nm}=2\sim6$ (约 16~18 h), 细胞处于对数生长期, 1 500×g 室温离心 5 min 收集细胞, 移入 100 mL BMMY 培养基中, 用 3~4 层灭菌纱布封口, 置于 28 °C 摇床培养, 每 24 h 加入培养基体积 0.5% 的甲醇, 维持诱导; 按 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 h 的时间间隔取样, 以 12 000×g 离心 2~3 min 收

集上清, 测酶活, 确定诱导表达的最佳时间。

2) 菌体起始诱导密度对目的蛋白表达的影响 按(1)的方法诱导表达, 当菌体生长 24 h 后, 离心收集细胞, 按不同光密度值的菌种量转入表达培养基 BMMY (pH 6.0) 中培养 96 h, 每隔 24 h 加入培养基体积 0.5% 的甲醇, 以 12 000×g, 离心 2~3 min 收集上清, 测酶活, 确定菌体起始诱导密度对目的蛋白表达的影响。

3) 起始 pH 值对目的蛋白表达水平的影响 按(1)的方法培养细胞、诱导表达, 接种的表达培养基 pH 值分别为 5.0, 5.25, 5.5, 5.75, 6.0, 6.25, 6.5, 6.75, 7.0, 确定不同起始 pH 值对目的蛋白表达水平的影响。

4) 不同氮源对目的蛋白表达水平的影响 按(1)的方法培养细胞、诱导表达, 分别接入 BMMY、BMM、BMM+AA (分别添加 20 种氨基酸, 20 mg/种) 表达培养基中培养, 检测不同氮源对目的蛋白表达水平的影响。

5) 甲醇浓度对目的蛋白表达的影响 按(1)的方法培养细胞、诱导表达, 每隔 24 h 加入甲醇使其占培养基体积分别为: 0.2%, 0.4%, 0.6%, 0.8%, 1.0%, 1.2%。以 12 000×g, 离心 2~3 min 收集上清, 测酶活, 确定不同甲醇浓度对目的蛋白表达的影响。

6) 诱导温度对目的蛋白表达量的影响 按(1)的方法培养细胞、诱导表达, 诱导温度分别从 15~30 °C, 确定表达量。

7) 甲醇流加方式对目的蛋白表达量的影响 按(1)的方法培养细胞、诱导表达, 分别设定每隔 8, 12, 16, 20, 24 h 流加甲醇, 至其占培养基体积的 0.6%, 24 °C 诱导, 确定添加甲醇的最佳时间。

8) 诱导后阶段添加适量甘油对表达的影响 按(1)的方法培养细胞诱导表达, 在诱导的 48 h 开始每 24 h 添加甘油, 甘油的添加量分别为 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 g/L, 确定甘油的最佳添加量。

9) 酵母工程菌表达条件的正交优化 将甲醇添加量、诱导时间、菌体起始密度及起始 pH 值按照 4 因素 5 水平 $L_{25}(5^4)$ 设计正交试验, 因素水平设计见表 1。

表1 毕赤酵母基因工程菌表达条件正交设计

Table 1 The orthogonal design of expression condition of *Pichi* yeast

水平	A(甲醇添加量/%)	B(诱导时间/h)	C(菌体起始密度 OD _{600nm})	D(起始 pH 值)
1	0.2	24	2.5	5.50
2	0.4	48	3.0	5.75
3	0.6	72	3.5	6.00
4	0.8	96	4.0	6.25
5	1.0	120	4.5	6.50

2 结果与分析

2.1 重组酵母菌株的 PCR 鉴定

由图1可以看出,利用 TGase 特异性引物,从 GS115/pPIC9K-TGase 转化酵母菌的基因组中 PCR 得到目的片段,而从 pPIC9K 空载体转化酵母菌基因组中,并没有扩增到相应的目的带,说明目的基因已很好的整合到酵母染色体中。

2.2 重组蛋白的表达

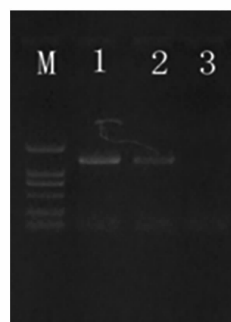
挑取 pPIC9K-TGZ 酵母单菌落,用 1% 甲醇诱导表达,以转化 pPIC9K 空质粒的菌株同样条件培养作对照,诱导 96 h 后取上清进行 SDS-PAGE 电泳,与对照组比较,重组菌诱导表达上清液在分子量约 60 ku 处有明显特异性条带出现(图2箭头所示),与预期的 TGase 分子量大小相符,表明 TGase 蛋白在酵母中得到了表达。通过对培养基中总蛋白浓度的测定以及对 SDS-PAGE 电泳薄层扫描,可知表达蛋白的量占培养基上清液中可溶性蛋白的 2%,培养基中的目的蛋白的浓度为 85 mg/L,酶活为 6.5 U/mL。

2.3 重组蛋白表达条件的优化

2.3.1 最佳诱导表达时间的确定 从图3可见, TGase 酵母工程菌经甲醇诱导表达后,表达上清的酶活逐渐上升至 96 h 达到最高,在培养 96 h 后,目的蛋白的含量略有上升,而幅度很小。确定 96 h 为最佳诱导表达时间。

2.3.2 菌体起始诱导密度对目的蛋白表达的影响

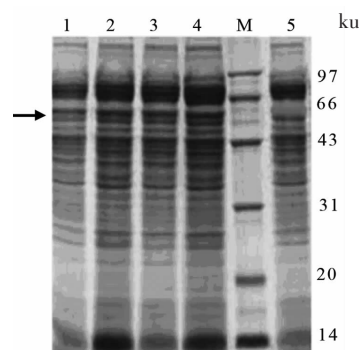
由图4可见,从表达开始至发酵结束时,细胞光密度 OD_{600nm} 值随着接种量的增加而呈上升趋势。当 OD_{600nm} 值在 2~4 范围内,随着诱导起始菌体浓度的增加,目的蛋白表达量逐渐增加,而 OD_{600nm} 值



注:M: DL-2000 分子量标准;1,2: 阳性转化菌 PCR;3: 空载体转化菌 PCR。

图1 重组菌株的 PCR 鉴定

Fig.1 Identification of GS115/pPIC9k-TGZ by PCR



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

图2 酵母转化子表达上清 SDS-PAGE 及 Western blotting 检测

Fig.2 SDS-PAGE of TGase expression supernatant and Western blotting

超过 4 后,蛋白表达量开始下降。

2.3.3 不同起始 pH 值对目的蛋白表达水平的影响 选择一个合适的 pH 值,使目的蛋白的表达量最高。由图5可见,pH 值为 6.0 时,酶活最高,表明蛋白表达量最高。

2.3.4 不同氮源对目的蛋白表达水平的影响 由图6可见,选择的 3 种氮源,其中 BMM+AA 对基因工程菌表达 TGase 表达量最大。而三者差异很小,为节约成本,选用 BMMY 培养基。

2.3.5 甲醇添加量对目的蛋白表达的影响 如果甲醇浓度过低,不足以完全启动 AOX1 的转录,当甲醇浓度过高,会抑制 AOX1 的转录水平,甲醇主要作为表达阶段菌体生长的唯一碳源,浓度过高

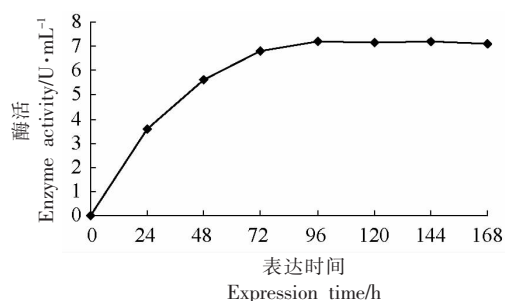


图 3 表达时间对产酶的影响

Fig.3 The effect of enzyme amount at different time

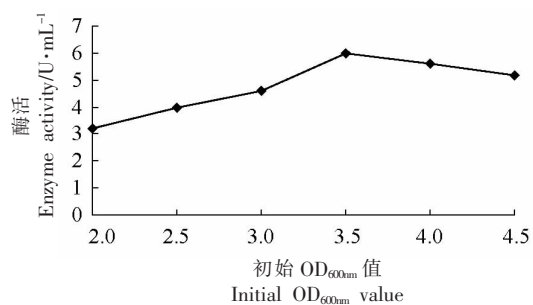


图 4 诱导初始菌体浓度对产酶的影响

Fig.4 The effect of enzyme with different primary yeast concentration

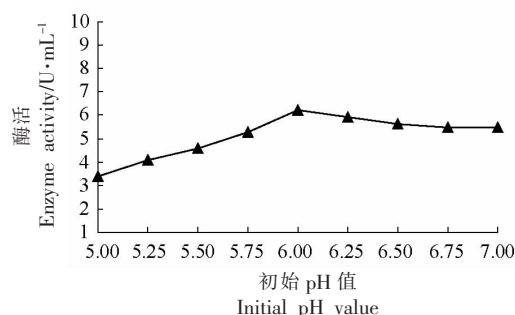


图 5 初始 pH 值对产酶的影响

Fig.5 The effect of enzyme with different primary pH value

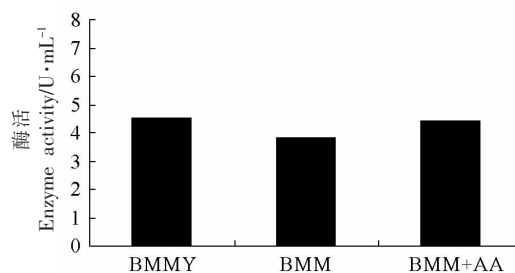


图 6 不同氮源对产酶的影响

Fig.6 The effect of enzyme with different nitrogen sources

会造成毒性,抑制细胞生长和外源蛋白的表达,由图 7 可见,甲醇添加量为 0.6%(体积分数)时酶活最高。

2.3.6 诱导温度对目的蛋白表达量的影响 由图 8 可见,低温可以降低目标蛋白的降解,提高表达量,而低温条件需要消耗更多的能量,进而提高成本,因此确定诱导的最佳温度为 24 ℃。

2.3.7 甲醇流加方式对目的蛋白表达量的影响 由图 9 可见,每 12 h 添加培养基体积分数 0.6% 的甲醇, TGase 的表达量最大。

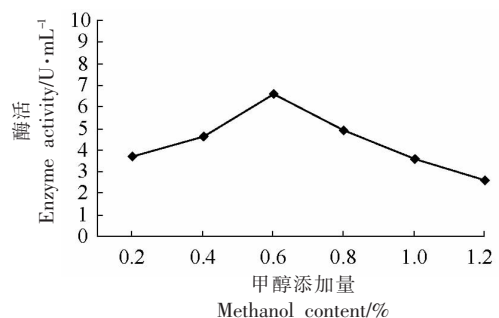


图 7 不同甲醇添加量对产酶的影响

Fig.7 The effect of enzyme with different methanol content

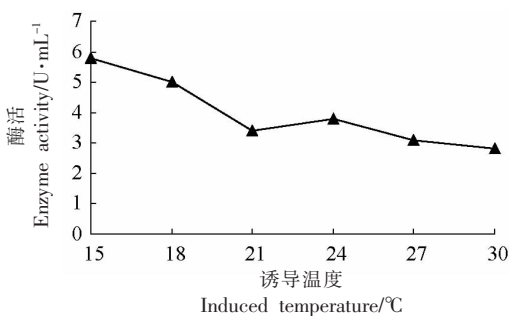


图 8 不同诱导温度对产酶蛋白的影响

Fig.8 The effect of enzyme with different induced temperature

2.3.8 在诱导后阶段甘油添加量对表达的影响 由图 10 可见,在诱导 48 h 后,每隔 24 h 添加甘油,甘油质量浓度过高对表达有抑制作用,可知甘油添加量为 1 g/L 最佳。

2.3.9 工程菌表达条件的正交优化 从表 2 结果的极差分析可知,对毕赤酵母基因工程菌表达条件的影响因素由强至弱依次为:诱导时间>初始 pH 值>甲醇添加量>菌体起始密度。从方差分析结果可知,诱导时间、甲醇添加量均达到显著差异水平($\alpha=0.1$),而菌体起始密度、初始 pH 值则为差异

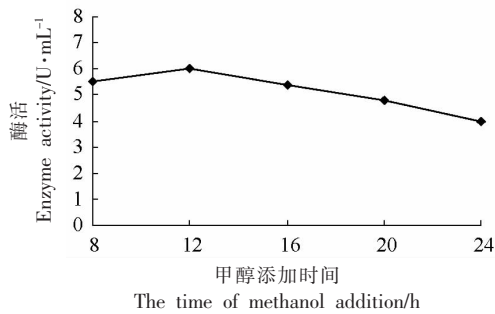


图9 不同甲醇添加时间间隔对表达目的蛋白的影响
Fig.9 The effect of expression protein with different time adding methanol

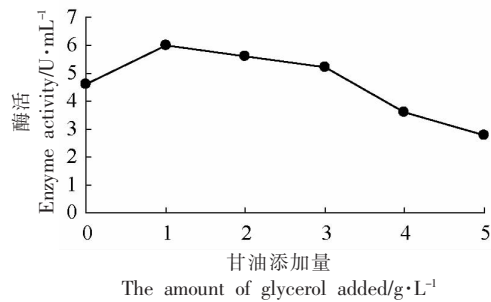


图10 诱导后阶段甘油添加量对产酶的影响
Fig.10 Effect of glycerin addition on enzyme production in post-induction stage

不显著。最终确定毕赤酵母基因工程菌摇瓶最佳条件为 $A_3B_4C_4D_3$, 即诱导时间 96 h, 初始 pH 6.0, 甲醇添加量为 0.6% (体积分数), 菌体起始密度

$OD_{600nm} = 4.0$ 。在此最优条件下测得酶活为 7.51 U/mL。

表2 毕赤酵母基因工程菌表达条件正交优化试验结果

Table 2 Experimental results of orthogonal optimization of expression condition of *Pichia pastoris* gene engineering strain

试验号	甲醇添加量/%	诱导时间	菌体起始密度	初始 pH 值	酶活/U·mL ⁻¹	试验号	甲醇添加量/%	诱导时间	菌体起始密度	初始 pH 值	酶活/U·mL ⁻¹
1	1	1	1	1	4.95	19	4	4	2	5	6.63
2	1	2	2	2	4.75	20	4	5	3	1	6.14
3	1	3	3	3	5.77	21	5	1	5	4	4.25
4	1	4	4	4	4.88	22	5	2	1	5	4.21
5	1	5	5	5	5.92	23	5	3	2	1	4.62
6	2	1	2	3	4.23	24	5	4	3	2	5.86
7	2	2	3	4	4.67	25	5	5	4	3	6.67
8	2	3	4	5	6.34	K_1	26.27	24.12	26.98	28.3	
9	2	4	5	1	5.83	K_2	26.43	26.07	25.7	28.54	
10	2	5	1	2	5.36	K_3	30.87	28.32	27.11	29.77	
11	3	1	3	5	4.67	K_4	29.51	30.62	30.67	24.31	
12	3	2	4	1	6.76	K_5	25.61	29.56	28.23	27.77	
13	3	3	5	2	6.55	R	5.26	6.50	4.97	5.46	
14	3	4	1	3	7.42	S	4.269	5.567	2.792	3.368	
15	3	5	2	4	5.47	自由度	4	4	4	4	
16	4	1	4	2	6.02	均方	1.067	1.392	0.698	0.842	
17	4	2	5	3	5.68	F 值	2.854※	3.325※	1.668	2.012	
18	4	3	1	4	5.04						

注: $F_{0.90}(4,8)=2.81$, $F_{0.95}(4,8)=3.84$ 。

3 结论

毕赤酵母表达系统在表达异源蛋白上有诸多优点。本试验对最佳诱导表达时间、菌体起始诱导密度、不同起始 pH 值、不同氮源、甲醇添加量、诱

导温度、甲醇流加方式、在诱导后阶段甘油添加量表达条件进行优化。确定了工程菌最佳表达条件为: 表达培养基为 BMMY, 诱导表达时间 96 h, 初始表达 pH 值 6.0, 菌体起始诱导 OD_{600nm} 值达 4.0,

诱导温度 24 ℃, 甲醇添加量为 0.6% (体积分数), 甲醇流加 12 h/次、诱导 48 h 后每 24 h 添加 1 g/L 的甘油。采用优化条件后培养基上清的最高酶活可达 7.51 U/mL。

由此可见, 本研究获得了玉米谷氨酰胺转氨酶的最佳表达条件, 为下游蛋白提纯及酶生物功能特性研究奠定基础。本研究为新型食品的应用开发奠定了理论和实践基础, 也为下一步利用计算机模拟技术找出酶的活性中心, 利用蛋白质工程技术对酶进行修饰, 以提高酶的催化效率, 提高酶的稳定性, 以及酶分子改造奠定基础, 从而建立模型, 为酶制品的生产和应用提供思路。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] CHEN C C, HSIEH J F. Microwave-assisted cross-linking of milk proteins induced by microbial transglutaminase[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 39040.
- [3] AROGUNDADE L A, MU T H, ZHANG M, et al. Improving sweet potato protein gel properties through ϵ -(γ -glutamyl)-lysine isopeptide cross-link catalyzed by transglutaminase[J]. Food Bioscience, 2020, 39: 100828.
- [4] 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: 109756.
- [5] MATTICE K D, MARANGONI A G. Physical properties of zein networks treated with microbial transglutaminase[J]. Food Chemistry, 2020, 338: 128010.
- [6] 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: 105730.
- [7] GASPAR A L C, DE GÓES-FAVONI, SILVANA P. Action of microbial transglutaminase (MTGase) in the modification of food proteins: A review[J]. Food Chemistry, 2015, 171: 315-322.
- [8] GHARIBZAHEDI S M T, CHRONAKIS I S. Crosslinking of milk proteins by microbial transglutaminase: Utilization in functional yogurt products[J]. Food Chemistry, 2017, 245: 620-632.
- [9] GHARIBZAHEDI S M T, JAFARI S M. The importance of minerals in human nutrition: Bioavailability, food fortification, processing effects and nanoencapsulation[J]. Trends in Food Science & Technology, 2017, 62: 119-132.
- [10] LIMIN W, BO Y, RUIXUAN W, et al. Biotechnological routes for transglutaminase production: Recent achievements, perspectives and limits[J]. Trends in Food Science & Technology, 2018, 81: 116-120.
- [11] ÖZÇELİK A T, ERSÖZ F, İNAN M. Extracellular production of the recombinant bacterial transglutaminase in *Pichia pastoris*[J]. Protein Expression & Purification, 2019, 159: 83-90.
- [12] LIU Y H, LIN S, ZHANG X Q, et al. A novel approach for improving the yield of *Bacillus subtilis* transglutaminase in heterologous strains[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2014, 41(8): 1227-1235.
- [13] MACAULEY-PATRICK S, FAZENDA M L, MCNEIL B, et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system[J]. Yeast, 2005, 22(4): 249-270.
- [14] ROMEIH E, WALKER G. Recent advances on microbial transglutaminase and dairy application[J]. Trends in Food Science & Technology, 2017, 62: 133-140.
- [15] YANG X Q, ZHANG Y M. Expression of recombinant transglutaminase gene in *Pichia pastoris* and its uses in restructured meat products[J]. Food Chemistry, 2019, 291: 245-252.
- [16] DARNAY L, LEN A, KONCZ Á, et al. Small angle neutron scattering study of nanostructural changes in microbial transglutaminase-treated low-fat yogurt during fermentation[J]. Food Science and Biotechnology, 2015, 24(6): 2125-2128.
- [17] ITO Y, TATSUKAWA H, YAMAGUCHI H, et al. Detection and identification of potential transglutaminase 2 substrates in the mouse renal glomeruli author names and affiliations[J]. Archives of Biochem-

- istry & Biophysics, 2018, 660: 1.
- [18] ZHANG L, RAO W, MUHAYIMANA S, et al. Purification and biochemical characterization of a novel transglutaminase from *Mythimna separata* larvae (Noctuidae, Lepidoptera)[J]. Journal of Biotechnology, 2018, 265: 1–7.
- [19] FERNANDEZ-BATS I, DI PIERRO P, VILLALONGA-SANTANA R, et al. Bioactive mesoporous silica nanocomposite films obtained from native and transglutaminase-crosslinked bitter vetch proteins[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 82: 106–115.
- [20] GHARIBZAHEDI S M T, KOUBAA M, BARBA F J, et al. Recent advances in the application of microbial transglutaminase crosslinking in cheese and ice cream products: A review[J]. International Journal of Biological Macromolecules Structure Function & Interactions, 2018.
- [21] GRIGOLETTO A, MERO A, YOSHIOKA H, et al. Covalent immobilisation of transglutaminase: Stability and applications in protein pegylation[J]. Journal of Drug Targeting, 2017, 25: 1363211.
- [22] WANG J H, TANG M Z, YU X T, et al. Site-specific, covalent immobilization of an engineered enterokinase onto magnetic nanoparticles through transglutaminase-catalyzed bioconjugation[J]. Colloids and Surfaces B, Biointerfaces, 2019, 177: 506–511.
- [23] LIU L, WEN H, RAO Z, et al. Preparation and characterization of chitosan – collagen peptide / oxidized konjac glucomannan hydrogel[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 108: 376–382.
- [24] MARX C K, HERTEL T C, PIETZSCH M. Purification and activation of a recombinant histidine – tagged pro-transglutaminase after soluble expression in *Escherichia coli* and partial characterization of the active enzyme[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2008, 42(7): 568–575.
- [25] SPIDEL J L, VAESSEN B, ALBONE E F, et al. Site –specific conjugation to native and engineered lysines in human immunoglobulins by microbial transglutaminase [J]. Bioconjugate Chemistry, 2017, 28: 2471–2484.
- [26] SERAFINI-FRACASSINI D, DEL DUCA S. Transglutaminases: Widespread cross –linking enzymes in plants[J]. Annals of Botany, 2008, 102(2): 145–152.
- [27] VILLALOBOS E, TORNÉ J M, RIGAU J, et al. Immunogold localization of a transglutaminase related to grana development in different maize cell types[J]. Protoplasma, 2001, 216(3/4): 155–163.
- [28] WARISUL F S, KHARE S K. Current insight and futuristic vistas of microbial transglutaminase in nutraceutical industry [J]. Microbiological Research, 2018, 215: 7–14.
- [29] LIU Y, HUANG L, ZHENG D, et al. Characterization of transglutaminase from *Bacillus subtilis* and its cross-linking function with a bovine serum albumin model[J]. Food Funct, 2018, 9(11): 5560–5568.
- [30] ZHU C, LEI H, FAN D, et al. Novel enzymatic crosslinked hydrogels that mimic extracellular matrix for skin wound healing[J]. Journal of Materials Science, 2018, 53(3): 5909–5928.

Optimization of Expression Conditions of *Zea mays* Transglutaminase Gene in *Pichia pastoris*

Han Xiue, Qin Lanxia*, Shao Hong, Ren Haowei

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

Abstract In order to determine the optimal inducible expression conditions of *zea mays* transglutaminase gene in *Pichia pastoris*, pPIC9K-TGZ was introduced into the component *P. pastoris* GS115 strains by the electroporation method, screening positive clones with antibiotics, PCR amplification verification, IPTG induced expression, optimize the best expression conditions. In this study, the optimal expression conditions of engineering bacteria were determined by orthogonal experiment. The expression medium was BMMY and the induced expression time was 96 h, initial expression of pH 6.0, the initial induction OD_{600nm} of the bacteria was 4.0; the induction temperature was 24 °C; the methanol content was 0.6% (volume fraction); methanol flow was added once/12 h; glycerol of 1 g/L was added every 24 hours after 48 h induction. The maximum enzyme activity of medium supernatant under optimized conditions was 7.51 U/mL.

Keywords *Zea mays*; transglutaminase; *Pichia pastoris*; expression; optimization of expression conditions