

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

李鹏飞¹, 孙红兵³, 游丽金³, 巩伏雨³, 陈藻⁴, 张爱联², 朱泰承³

1 海南大学农学院, 海南 海口 570228

2 中国热带农业科学院热带生物技术研究所 农业部热带作物生物技术重点开放实验室, 海南 海口 571101

3 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

4 厦门大学化学化工学院, 福建 厦门 361005

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. 生物工程学报, 2013, 29(2): 180–188.

Li PF, Sun HB, You LJ, et al. Direct secretory expression of active microbial transglutaminase in *Pichia pastoris*. Chin J Biotech, 2013, 29(2): 180–188.

摘要: 使用异源表达系统直接分泌表达具有活性的微生物谷氨酰胺转氨酶 (Microbial transglutaminase, MTG) 是目前最具前景的 MTG 生产方法之一, 但由于产量较低无法实现工业化生产。毕赤酵母是近年来发展出的高效蛋白表达系统。通过采用 pro 序列与成熟 MTG 基因共表达的策略, 成功地实现了用重组毕赤酵母分泌表达具有活性的茂原链霉菌 *Streptomyces mobaraense* MTG。进一步通过对 pro 序列和 MTG 基因拷贝数以及重组酵母培养条件的优化, 最终使得 MTG 在 1 L 发酵罐中高密度发酵的酶活达到 7.3 U/mL, 为 MTG 的工业化生产奠定了基础。

关键词: 谷氨酰胺转氨酶, 毕赤酵母, 拷贝数, 共表达, 高密度发酵, 酶原序列

Received: August 6, 2012; **Accepted:** December 11, 2012

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31000026), Knowledge Innovation Program of the Chinese Academy of Sciences (No. KSCX2-EW-G-15-03).

Corresponding author: Taicheng Zhu. Tel: +86-10-64807351; E-mail: zhutc@im.ac.cn

Ailian Zhang. Tel: +86-898-66989251; E-mail: zhangailian6@yahoo.com.cn

国家自然科学基金 (No. 31000026), 中国科学院“知识创新”工程重要方向项目 (No. KSCX2-EW-G-15-03) 资助。

Direct secretory expression of active microbial transglutaminase in *Pichia pastoris*

Pengfei Li¹, Hongbing Sun³, Lijin You³, Fuyu Gong³, Zao Chen⁴, Ailian Zhang², and Taicheng Zhu³

¹ College of Life Science and Agriculture, Hainan University, Haikou 570228, Hainan, China

² Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology, Ministry of Agriculture, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, Hainan, China

³ Institute of Microbiology, China Academy of Sciences, Beijing 100101, China

⁴ College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China

Abstract: Direct secretory expression of active microbial transglutaminase (MTG) using heterologous hosts is a promising strategy, although its production level still needs to be improved for industrial production. *Pichia pastoris* is one of the most efficient expression systems developed in recent years. In this study, secretory expression of active MTG was successfully achieved by co-expressing the pro sequence and mature MTG genes in *P. pastoris*. Furthermore, we optimized the copy number of pro/MTG expression cassettes and the fermentation conditions. MTG production level reached 7.3 U/mL in 1-liter fermentor through high density fermentation, providing the feasibility for industrial scale preparation of MTG.

Keywords: microbial transglutaminase, *Pichia pastoris*, copy number, co-expression, high density fermentation, pro sequence

谷氨酰胺转氨酶 (Transglutaminase, 又称转谷氨酰胺酶, EC 2.3.2.13, TGase 或 TG) 能够催化蛋白质肽链中谷氨酰胺残基的 γ -羧酰胺基与各种酰基受体发生酰胺基转移反应, 是一种有效的蛋白质交联剂^[1-2]。TG 广泛存在于人体、动物、植物和微生物中, 特别是微生物来源的 TG (Microbial transglutaminase, MTG), 在无 Ca^{2+} 的条件下依然可以表现出催化活性, 被广泛用于食品工业以改善蛋白质的功能性质、提高营养价值^[1]。近些年, MTG 在化妆品行业、纺织业、皮革业及生物材料领域也表现出良好的应用前景^[1,3]。

MTG 在工业上是通过微生物发酵法制备, 生产菌株最初是从土壤中筛选到的链霉菌, 如茂原链霉菌 *Streptomyces mobaraense*^[4]、吸水链霉

菌 *Streptomyces hygroscopicus*^[5]等。链霉菌 MTG 是一种胞外酶, 以无活性的酶原 (pro-MTG) 形式分泌, pro-MTG 被胞外蛋白酶 SAM-P45 切除 N-端酶原区 (pro 序列) 后, 转化成成熟的具有活性的 MTG^[6]。近些年, 用重组表达系统来生产 MTG 成为研究的主要方向, 最为成功的系统有大肠杆菌^[7-9]、棒杆菌^[10-11]和甲基营养型酵母^[12]。迄今为止, 直接克隆表达成熟 MTG 编码区的策略均未获得成功^[2]。因此, 目前 MTG 的表达策略主要分为两类, 第一类是以酶原形式表达 (或无活性表达) 在体外用 SAM-P45 蛋白酶去除 pro 序列获得活性 MTG^[13-14]。虽然以酶原形式表达目前可以积累高达 2.5 g/L 的酶原蛋白^[13], 但体外蛋白酶的处理步骤无疑提高了生产成本和操作的复杂度。第二类是以成熟 MTG 形式表达 (或活

性表达)。早期的工作是将 pro-MTG 与 SAM-P45 蛋白酶在异源宿主中共同分泌表达^[15-16], 但该策略表达水平很低, 且蛋白酶的后续去除也会提高分离纯化的成本。2004 年, Yurimoto 等首先采用了将 MTG 酶原的 pro 序列和成熟 MTG 编码区作为两个独立的元件进行共表达的策略, 成功地实现了用甲基营养型酵母 *C. boidinii* 分泌表达活性 MTG^[12], 产量达到 1.83 U/mL。采用此策略, Liu 等也在大肠杆菌中获得了 MTG 的活性表达^[17], 产量达到 0.13 U/(mL·OD₆₀₀)。但目前报道的共表达策略酶活水平仍然较低, 离工业化应用还有较大的差距。

甲基营养型酵母毕赤酵母 *Pichia pastoris* 是近 20 年发展起来的一种高效异源蛋白表达系统, 它的许多优良特点^[18-19]使其成为蛋白分泌表达的首选系统之一。本研究通过使用重组毕赤酵母菌株表达 MTG 并对重组菌株发酵条件进行优化, 使得 MTG 在 1 L 发酵罐中的产量达到 7.3 U/mL, 初步证明了利用毕赤酵母直接分泌表达具有活性的 MTG 的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 、*Pichia pastoris* GS115 以及质粒 pAO α ^[20]均为本实验室保存。

1.1.2 酶、试剂、引物和 DNA 序列测定

所有核酸限制性内切酶购自 NEB 公司。DNA 连接酶 (Solution)、DNA Marker、*Taq* DNA 聚合酶以及蛋白 Marker 购自 TaKaRa 公司。质粒提取试剂盒、小片段 DNA 回收试剂盒以及琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自 OMEGA 公

司。引物合成和 DNA 测序由北京擎科生物有限公司完成。

1.1.3 培养基

大肠杆菌培养用 LB 和 LLB 培养基, 毕赤酵母菌培养用的培养基 YPD、MD、BMGY、BMMY、BSM 配方见 Invitrogen 公司提供的操作手册^[21]。

1.2 方法

1.2.1 成熟谷氨酰胺转氨酶 (MTG) 基因和 pro 序列基因的克隆

根据 GenBank 提供的 pro-MTG 基因序列 (GenBank Accession No. AY502065.1), 分别设计成熟 MTG 基因的扩增引物 mtgF (引入 *Xho*) 和 mtgR (引入 *EcoR*), 以及 pro 序列的扩增引物 proF (引入 *Xho*) 和 proR (引入 *EcoR*)。

以茂原链霉菌菌株基因组为模板, PCR 扩增 MTG 基因。PCR 条件为: 95 预变性 5 min; 94 30 s, 55 30 s, 72 80 s, 30 个循环; 72 延伸 10 min。PCR 产物纯化后与 pMD19-T simple 载体连接, 转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 提取阳性转化子的质粒, 经 *Xho* 和 *EcoR* 双酶切, 胶回收后得到 MTG 片段。利用同样的方法得到 pro 片段, PCR 条件中延伸时间为 20 s。

1.2.2 pro/MTG 共表达载体 pAO α -pro-MTG 的构建

将分泌型表达载体 pAO α 利用 *Xho* 和 *EcoR* 双酶切后, 通过胶回收得到线性化质粒载体, 然后与得到的 MTG 片段通过 DNA 连接酶 Solution 连接后转化大肠杆菌 DH5 α , 获得 MTG 基因单拷贝诱导表达载体 pAO α -MTG。利用同样的方法获得载体 pAO α -pro。将得到的载

表 1 引物列表

Table 1 List of primers

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
mtgF	ATCT <u>CTCGAG</u> AAAAGAGACTCCGACGAC	28
mtgR	AAGGCGAATTCACGGCCAGCCCTGCT	26
proF	TCT <u>CTCGAG</u> AAAAGAGACAATGGCGCG	27
proR	GGCGAATTCAGGGGGCCCGGAA	22

Underlined characters are restriction enzyme cutting sites.

体 pAO α -pro 利用 *Bam*H 线性化后,通过胶回收得到线性化质粒载体;同时将构建的载体 pAO α -MTG 利用 *Bam*H 和 *Bgl*I 双酶切,胶回收 MTG 基因表达盒;将线性化质粒载体与 MTG 基因表达盒通过 Solution 连接酶连接后转化大肠杆菌 DH5 α ,获得 pro/MTG 共表达载体 pAO α -pro-MTG。

1.2.3 多拷贝 pro/MTG 共表达载体的构建

将得到的载体 pAO α -pro-MTG 利用 *Bam*H 线性化后,通过胶回收得到线性化质粒载体;同时将 pAO α -pro-MTG 利用 *Bam*H 和 *Bgl*I 双酶切,胶回收 pro/MTG 基因表达盒;将该表达盒与线性化质粒载体通过 Solution 连接酶连接后转化大肠杆菌 DH5 α ,获得 2 拷贝 pro/MTG 共表达载体 pAO α -2pro-2MTG。同样的策略,得到 3 拷贝 pro/MTG 共表达载体 pAO α -3pro-3MTG。

1.2.4 酵母的电转化及重组子的筛选

将构建的表达载体 pAO α -pro-MTG、pAO α -2pro-2MTG、pAO α -3pro-3MTG 分别通过限制性内切酶 *Stu*I 单酶切后,胶回收得到线性化质粒,电转化毕赤酵母 GS115 感受态细胞。具体操作参照 Invitrogen 公司提供的操作手册^[21]。将得到的重组子通过 PCR 鉴定,从而得到含有 MTG 基因的重组毕赤酵母表达菌株。

1.2.5 重组菌株的摇瓶表达及 MTG 酶活测定

将得到的重组菌株利用 BMGY 培养基活化,然后以相同的接种量转移菌体到 BMMY 中进行诱导表达。摇瓶发酵表达 MTG 的方法按照 Invitrogen 公司提供的操作手册。摇瓶培养条件为 30 $^{\circ}$ C、200 r/min,每 12 h 添加 8% 甲醇,共诱导 96 h。得到的发酵上清液用于酶活测定。MTG 酶活的定义为:37 $^{\circ}$ C 时 MTG 每分钟催化底物 (N-CBZ-Gln-Gly, Sigma 公司) 生成 1 mmol/mL 谷氨酸-单羟胺酸 (氧肟酸) 为 1 个酶活单位。MTG 酶活的测定方法按照参考文献^[21]进行。

1.2.6 重组菌株 GS2MTG 摇瓶发酵培养基优化

从 pH 和培养基两方面优化 GS2MTG 表达 MTG 的发酵条件。pH 优化方面,将 GS2MTG 在 YPD 中培养 24 h,收集菌体并分别接种至不同 pH 的 BMMY 培养基中,将 pH 调至 4.0、5.0、6.0、7.0 和 8.0,诱导培养 96 h 后,取样测定 OD_{600} 和酶活。培养基优化方面,将 GS2MTG 在 YPD 中培养 24 h,收集菌体并分别接种至 BMMY、BSM 和 12% 麦芽汁培养基 (麦芽汁 12 g,加蒸馏水溶解定容至 100 mL),诱导培养 96 h 后,取样测定 OD_{600} 和酶活。

1.2.7 1 L 发酵罐高密度培养

高密度发酵在 1 L 发酵罐中进行,将经过摇

瓶活化的重组子菌液作为种子液接种于 700 mL 发酵培养基中,将发酵的参数设定为 pH 6.0,搅拌转速 100~750 r/min,通气量 1 L/min 和温度 30 。发酵约 24 h 后,当溶氧值升高并维持较高水平时,开始采用流加策略补加 50% 甘油,维持溶氧值在 10% 左右。待发酵液 OD_{600} 值达到 250~300 时停止补料,开始补加 100% 甲醇诱导,根据溶氧水平控制补料速率,整个发酵过程中控制溶氧水平为 5%~10%。发酵过程中每 24 h 取样测定 OD_{600} 和酶活。

2 结果与分析

2.1 基因克隆和载体构建

以茂原链霉菌菌株基因组为模板,利用引物 mtgF 和 mtgR, proF 和 proR 通过 PCR 得到 MTG 成熟肽基因和 pro 基因,PCR 产物大小分别为 1 021 bp 和 160 bp,电泳结果显示与预期相符(结果未显示)。PCR 产物分别连接 T 载体转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,提质粒后测序,确认 MTG 基因和 pro 基因序列与公布序列完全一致。按方法 1.2.2 所述,构建获得 pro/MTG 共表达载体 pAO α -pro-MTG(图 1),作为基本的表达单元。为考察拷贝数对 MTG 产量的影响,进一步按方法 1.2.2 所述,分别构建得到 2 拷贝、3 拷贝表达载体,分别命名为 pAO α -2pro-2MTG、pAO α -3pro-3MTG 并通过 BamH 和 Bgl 双酶切验证,切出片段大小与理论值完全相符(结果未显示)。

2.2 重组毕赤酵母菌株的构建和 pro/MTG 拷贝数的优化

将得到的质粒载体 pAO α -pro-MTG、pAO α -2pro-2MTG、pAO α -3pro-3MTG 分别利用 *Stu* 在 HIS 基因处线性化,通过双交换整合到毕赤酵

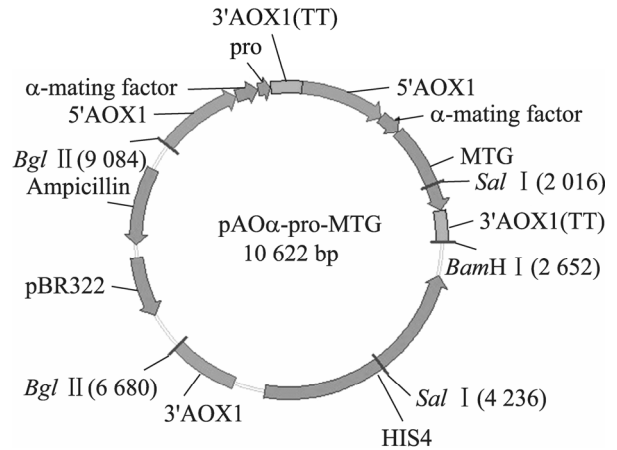


图 1 共表达载体 pAO α -pro-MTG 质粒图

Fig. 1 Plasmid map of co-expression vector pAO α -pro-MTG

母基因组中。双交换会使毕赤酵母从组氨酸营养缺陷型菌株转变为非缺陷型菌株,从而使重组菌株可以在缺乏组氨酸的 MD 平板上生长。每个平板挑取 3~5 个单菌落,利用 YPD 培养基培养后提取基因组,通过 PCR 证明 MTG 基因已经整合到毕赤酵母基因组中,通过定量 PCR 验证所整合的 MTG 基因拷贝数与预想值一致(结果未显示),得到的 1~3 拷贝的重组酵母菌株分别命名为 GS1MTG、GS2MTG 和 GS3MTG。

将以上 3 株菌株分别接种 BMMY 进行摇瓶发酵,以 GS115 作为对照。摇瓶诱导发酵 96 h 后测酶活,结果如图 2 所示。GS1MTG、GS2MTG 和 GS3MTG 均实现了活性表达,它们的酶活分别达到 0.18、0.25 和 0.22 U/mL,其中以 2 拷贝菌株 GS2MTG 产量最高,因此选取 GS2MTG 作为后续研究。

2.3 发酵培养条件的优化

首先考察了不同 pH 值对毕赤酵母生长及 MTG 生产水平的影响。将 GS2MTG 菌株分别在 pH 4.0、5.0、6.0、7.0 和 8.0 的 BMMY 中诱导培

养 96 h, 发酵结束后检测菌体的光密度值和 MTG 酶活。由图 3 可以看出, pH 值的变化对于菌体生长的影响并不显著, 但对 MTG 产量的影响显著。在 pH 值为 6.0 和 7.0 时, 产酶量最高。特别是当 pH 偏酸时会显著降低 MTG 的酶活产量。

由于 BMMY 培养基成本较高, 考察了替代培养基: 盐培养基 (BSM) 和麦芽汁培养基对于菌株生长和产酶的影响。由图 4 可以看出, 在诱

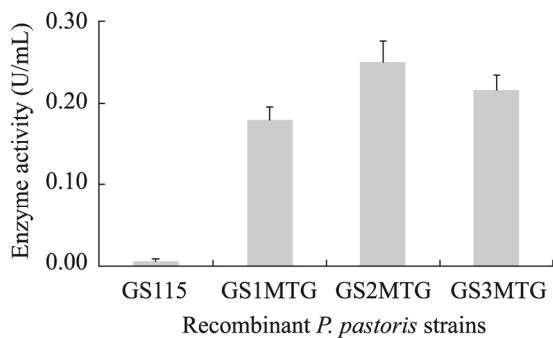


图 2 各重组毕赤酵母菌株表达 MTG 酶活的比较 (GS115 为阴性对照, GS1MTG、GS2MTG 和 GS3MTG 分别为含有 pro/mtg 共表达盒 1 拷贝、2 拷贝和 3 拷贝重组菌株)

Fig. 2 MTG activities of constructed recombinant *Pichia pastoris* strains. GS115 is utilized as negative control, GS1MTG, GS2MTG and GS3MTG are recombinant strains that contain one copy, two copies and three copies of pro/mtg co-expression cassettes.

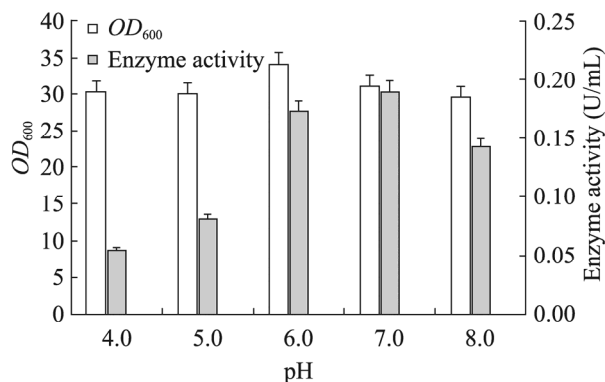


图 3 不同 pH 对 GS2MTG 生长和产酶的影响

Fig. 3 Effect of different pH on GS2MTG growth and enzyme production.

导培养 96 h 后, BSM 培养基和麦芽汁培养基的细胞量分别比 BMMY 培养基低 39% 和 8%。从 MTG 产量方面, 麦芽汁培养基中的 MTG 活性为 BMMY 培养基的 78%, 而 BSM 培养基中仅能检测到微量的酶活。

2.4 重组毕赤酵母 GS2MTG 在 1 L 发酵罐中 MTG 的产量评估

为评估毕赤酵母菌株分泌表达活性 MTG 的潜力, 综合以上研究结果, 将 GS2MTG 菌株在 pH 6.0 的条件下, 以 BMMY 和 BSMY 为培养基诱导发酵, 发酵结果见图 5。整个诱导过程持续 120 h, 酶活最终达到 7.3 U/mL。

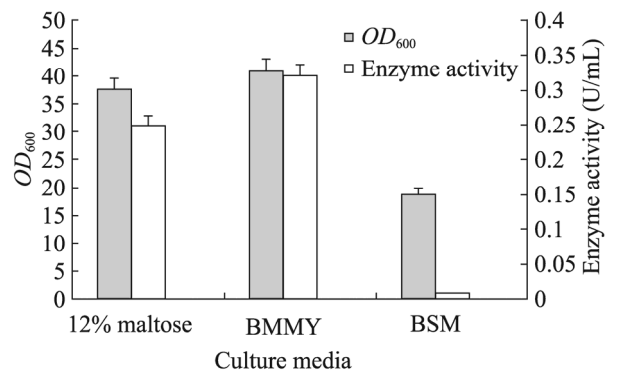


图 4 不同培养基对 GS2MTG 生长和产酶影响

Fig. 4 Effects of alternative media on GS2MTG growth and enzyme production.

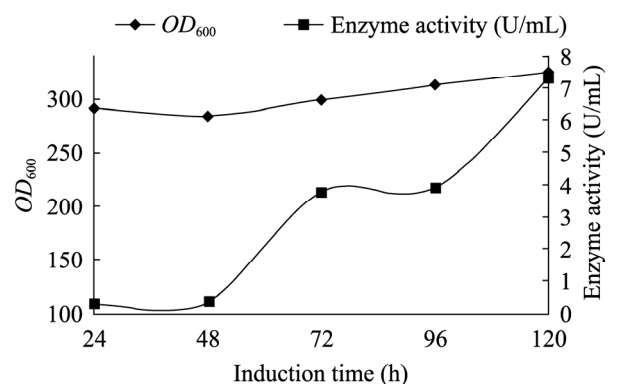


图 5 不同诱导时间 GS2MTG 的生长和产酶情况

Fig. 5 Growth and enzyme production of GS2MTG at different induction time.

3 讨论

Yurimoto 等首先采用了 MTG 的 pro 序列和 MTG 成熟编码区共表达的策略, 实现了在甲基营养型酵母 *C. Boidinii* 中分泌表达具有活性的 MTG^[12]。鉴于毕赤酵母在蛋白表达上的成功应用, 本研究将此共表达策略应用于毕赤酵母中, 成功地实现了 MTG 的活性分泌表达。本研究还对 pro/MTG 的拷贝数进行了优化, 结果表明 2 拷贝的 pro/MTG 菌株 GS2MTG, 比单拷贝菌株的产量提高了约 40%。但是进一步提高拷贝数没有提高 MTG 的表达量, 反而使其有所下降。前人研究表明, 增加外源基因拷贝数可以有效提高其蛋白分泌表达量, 但过高的拷贝数有可能会对蛋白的表达乃至酵母宿主的生长产生负影响^[22-23]。本研究结果表明, 对于毕赤酵母分泌表达 MTG, 2 拷贝的 pro/MTG 是最优结果。此时基因剂量已经不再是 MTG 分泌表达的主要限制性因素, 而蛋白表达的其他环节如蛋白翻译、分泌等, 可能会成为影响 MTG 产量的主要瓶颈。

从培养条件的初步优化实验可以看出, pH 值对于 MTG 的酶活有显著影响, pH 值低于 6.0 和高于 7.0 都会使酶活降低, 特别是在低于 6.0 时, 酶活下降显著, 这意味着在 MTG 发酵培养中对于 pH 值的控制是十分重要的。蛋白电泳结果表明在低 pH 的情况下 MTG 蛋白表达量显著降低 (结果未显示), 这说明 pH 是在蛋白质表达水平影响 MTG 产量的。pH 对 MTG 表达的影响可能跟 MTG 的降解过程有关, 合适的 pH 可抑制酵母蛋白酶活力从而抑制其对外源蛋白的降解^[24]。

从培养基优化结果来看, 12% 的麦芽汁培养

基与 BMMY 培养基相比, 无论是细胞量还是最终 MTG 产量, 都只比 BMMY 培养基略低, 一定程度上可以代替 BMMY 培养基。而用廉价的 BSM 培养基替代 BMMY 培养基的实验并不成功, 不但菌株生长明显减缓, 更重要的是在 BSM 培养基中仅能检测到微弱的 MTG 活性, 蛋白电泳的结果也显示 MTG 的条带很微弱 (结果未显示)。这是因为在外源蛋白表达过程中, 宿主细胞为外源蛋白提供前体和能量, 其良好的生长状态是实现外源蛋白高效表达的必要条件^[25]。BMMY 和 12% 的麦芽汁培养基与 BSM 培养基相比, 含丰富的有机氮源, 酵母菌在此两种富营养培养基中生长更加迅速, 前体和能量供给更加充沛, 因此 MTG 的表达量更高。另外, 有机氮源如酵母提取物、蛋白胨可以作为蛋白酶的底物, 从而减少对目的蛋白的降解^[26]。

最后, 用最优的菌株 GS2MTG 在优化后的培养条件下进行了高密度发酵, 经诱导 120 h, MTG 产量达到 7.3 U/mL, 比摇瓶产量提高了近 30 倍, 这也表明了发酵过程中严格控制的 pH 值、良好的溶氧环境, 对于 MTG 的产量提高是至关重要的。该产量也是迄今为止, 采用活性表达策略的报道中最高的。研究同时也表明了毕赤酵母作为 MTG 生产菌株的良好应用前景。

REFERENCES

- [1] Yokoyama K, Nio N, Kikuchi Y. Properties and applications of microbial transglutaminase. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 64(4): 447-454.
- [2] Liu S, Zhang DX, Du GC, et al. Progress in expression and molecular modification of microbial transglutaminase. *Chin J Biotech*, 2011, 12(27): 1681-1689 (in Chinese).

- 刘松, 张东旭, 堵国成, 等. 微生物谷氨酰胺转氨酶的表达及分子改造研究进展. 生物工程学报, 2011, 12(27): 1681–1689.
- [3] Zhu Y, Tramper J. Novel applications for microbial transglutaminase beyond food processing. Trends Biotechnol, 2008, 26(10): 559–565.
- [4] Ando H, Adachi M, Umeda K, et al. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. Trends Biotechnol, 1989, 10(53): 2613–2617.
- [5] Cui L, Du G, Zhang D, et al. Thermal stability and conformational changes of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygrosopicus*. Bioresour Technol, 2008, 99(9): 3794–3800.
- [6] Pasternack R, Dorsch S, Otterbach JT, et al. Bacterial pro-transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense* purification, characterisation and sequence of the zymogen. Eur J Biochem, 1988, 257(3): 570–576.
- [7] Zhao X, Shaw AC, Wang J, et al. A novel high-throughput screening method for microbial transglutaminase with high specificity toward Gln141 of human growth hormone. J Biomol Screen, 2010, 15(2): 206–212.
- [8] Liu XQ, Yang XQ, Xie FH, et al. On-column refolding and purification of transglutaminase from *Streptomyces fradiae* expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli*. Protein Expr Purif, 2007, 51(2): 179–186.
- [9] Yang H, Pan L, Lin Y. Purification and on-column activation of a recombinant histidine-tagged pro-transglutaminase after soluble expression in *Escherichia coli*. Biosci Biotechnol Biochem, 2009, 73(11): 2531–2534.
- [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 cinnamoneus* transglutaminase. J Biotechnol, 2004, 3(110): 219–226.
- [11] Date M, Yokoyama K, Umezawa Y, et al. Production of native-type *Streptovorticillium mobaraense* transglutaminase in *Corynebacterium glutamicum*. 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. Biosci Biotechnol Biochem, 2004, 68(10): 2058–2069.
- [13] Itaya H, Kikuchi Y. Secretion of *Streptomyces mobaraensis* pro-transglutaminase by coryneform bacteria. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 78(4): 621–625.
- [14] Sommer C, Volk N, Pietzsch M. Model based optimization of the fed-batch production of a highly active transglutaminase variant in *Escherichia coli*. Protein Expr Purif, 2011, 77(1): 9–19.
- [15] Zhao X, Shaw AC, Wang JH, et al. A novel high-throughput screening method for microbial transglutaminases with high specificity toward Gln141 of human growth hormone. J Biomol Screen, 2010, 15(2): 206–212.
- [16] Kikuchi Y, Date M, Yokoyama K, et al. Secretion of active-form *Streptovorticillium mobaraense* transglutaminase by *Corynebacterium glutamicum*: processing of the pro-transglutaminase by a cosecreted subtilisin-like protease from *Streptomyces albogriseolus*. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(1): 358–266.
- [17] Liu S, Zhang DX, Wang M, et al. The order of expression is a key factor in the production of active transglutaminase in *Escherichia coli* by co-expression with its pro-peptide. Microb Cell Fact, 2011, 23(10): 112.
- [18] Cereghino J L, Cregg J M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Microbiol Rev, 2000, 1(24): 45–46.
- [19] Cregg J M, Cereghino J L, Shi J, et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. Mol Biotechnol, 2000, 1(16): 23–52.
- [20] Zhu TC, You LJ, Gong FY, et al. Combinatorial

strategy of sorbitol feeding and low-temperature induction leads to high-level production of alkaline-mannanase in *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb Tech*, 2011, 49(4): 407–412.

- [21] Bao YL, Pan L. Research progress of mechanism and activity assay of microbial transglutaminase. *Sci Technol Food Ind*, 2008, 29(7): 265–268 (in Chinese).
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. *食品工业科技*, 2008, 29(7): 265–268.
- [22] Zhu T, Guo M, Tang Z, et al. Efficient generation of multi-copy strains for optimizing secretory expression of porcine insulin precursor in yeast *Pichia pastoris*. *J Appl Microbiol*, 2009, 107: 954–963.
- [23] Guo MJ, Zhu TC, Zhang M, et al. Influences of methanol utilization phenotype and gene dosage on heterologous protein expression in recombinant *Pichia pastoris*. *China Biotechnol*, 2007, 27(7): 7–11 (in Chinese).
郭美锦, 朱泰承, 张明, 等. 重组毕赤酵母甲醇利用表型与基因拷贝数对外源基因表达的影响. *中国生物工程杂志*, 2007, 27(7): 7–11.
- [24] Lin JH. High density fermentation control of *Pichia pastoris*. *China Biotechnol*, 2009, 29(5): 120–125 (in Chinese).
林俊涵. 毕赤酵母高密度发酵工艺的研究. *中国生物工程杂志*, 2009, 29(5): 120–125.
- [25] Cos Q, Ramon R, Montesinos JL, et al. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: a review. *Microb Cell Fact*, 2006, 5: 17.
- [26] Sinha J, Plants BA, Inan M, et al. Causes of proteolytic degradation of secreted recombinant proteins produced in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: case study with recombinant ovine interferon-tau. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 89: 102–112.

(本文责编 郝丽芳)