

化学修饰提高谷氨酰胺转氨酶活性与热稳定性

刘 松^{1,2}, 堵国成^{*1,2}, 陈 坚^{1,2}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 谷氨酰胺转氨酶(EC 2.3.2.13, 简称 TGase) 是一种催化转酰基反应, 导致蛋白质分子间发生交联的酶, 广泛应用于食品、纺织、皮革、医药等领域。为提高 TGase 比活力与热稳定性, 作者以邻苯二甲酸酐为修饰剂, 对重组吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*) TGase 分子赖氨酸残基进行化学修饰。确定最佳修饰条件为: pH 8.0、20 °C 修饰反应 2 h、TGase 表面氨基与 PA 摩尔比为 1:2。无胱胺 (TGase 的竞争性抑制剂) 存在时, PA 修饰使 TGase 比活力提高 48.3%; 10 mmol/L 胱胺存在时, PA 修饰使 TGase 热稳定性提高 31.3%。晶体模拟结构显示, 21 个赖氨酸残基位于 *S. hygroscopicus* TGase 分子表面, 其中 5 个位于催化活性中心附近区域。表面疏水性分析发现, 不同条件的 PA 修饰使 TGase 分子表面疏水度降低 9.46%~21.13%。因此, PA 可能通过改变 TGase 分子不同区域的疏水性来提高其比活力和热稳定性的。上述结果表明, PA 修饰是一种改进 TGase 酶学性质的有效策略, 为其后续分子改造提供了一定的理论参考。

关键词: 谷氨酰胺转氨酶; 邻苯二甲酸酐; 比活力; 热稳定性; 表面疏水度

中图分类号: Q 814 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2015)11—1135—06

Chemical Modification of Transglutaminase for Improving Specific Activity and Thermal Stability

LIU Song^{1,2}, DU Guocheng^{*1,2}, CHEN Jian^{1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;
2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Transglutaminase (EC 2.3.2.13, TGase) can catalyze the acyl transfer reaction and leads to the crosslinking among proteins. It has been widely used in food, textile, leather, and pharmaceutical industry. In order to improve the specific activity and thermal stability, a recombinant *Streptomyces hygroscopicus* TGase chemically was modified by phthalic anhydride (PA) in this study. The optimal modification condition of the cultivation was at pH 8.0, 20 °C for 2 h, and the molar ratio of surface-amine to phthalic anhydride 1:2. In the presence of 10 mmol/L of cystamine, which is a competitive inhibitor of the TGase, the thermal stability of TGase was increased 31.3%

收稿日期: 2014-06-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(31171639); 江苏省自然科学基金项目(BK20130132)。

作者简介: 刘 松(1981—), 男, 湖南永州人, 工学博士, 主要从事发酵工程方面的研究。E-mail: liusong@jiangnan.edu.cn

* 通信作者: 堵国成(1965—), 男, 江苏常州人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事代谢工程、发酵过程优化与控制等方面的研究。E-mail: gcdu@jiangnan.edu.cn

after the PA modification, whereas specific activity of the TGase increased 48.3% in the absence of the cystamine. The modeling crystal structure showed that 21 lysine residues existed in surface of *S. hygroscopicus* TGase, and five of them located at region close the active site. The analysis of surface hydrophobicity indicated that PA modification reduced the surface hydrophobicity from 9.46% to 21.13%. Thus, PA may improve the specific activity and thermal stability of TGase by modifying the surface hydrophobicity at different regions. These results suggested that PA modification was an effective way to improve the catalytic properties of TGase, which provided a theoretical reference for molecular modification.

Keywords: transglutaminase, phthalic anhydride, specific activity, thermal stability, surface hydrophobicity

谷氨酰胺转氨酶(EC 2.3.2.13,简称 TGase)是一种可以催化转酰基反应,从而导致蛋白质(或多肽)之间发生共价交联的酶。由于 TGase 具有独特的催化功能,已在众多领域得到应用。其中 TGase 在食品加工领域中的应用最为广泛,少量添加即可显著提高肉制品、水产品和豆制品等食品的口感品质或营养价值^[1-2]。近年来, TGase 在一些非食品加工领域也具有很大的应用前景,包括组织工程、纺织与皮革加工和蛋白质工程等,成为羊毛纤维强化、皮革填充和组织工程的关键用酶^[3]。基于应用性能和生产成本的优势,微生物发酵(如链霉菌等)是 TG 工业化生产的首选方法。随着应用领域的拓展,各种应用环境对 TGase 酶分子稳定性和催化活性不断提出新的要求^[3]。如何获得高稳定性、高催化的 TGase 成为国外研究者关注的热点。

一系列分子改策略已应用于 TGase 热稳定性和催化活性的改造,如基于分子柔性区域分析的定点突变、基于水接触表面热点区域的定点突变、基于易错 PCR 的定向进化技术等^[4]。通过上述分子改造,链霉菌 TGase 的热稳定性和催化活性获得不同程度的提高。然而,基于基因工程的酶分子改造策略仅能使关键氨基酸位点产生 20 种主要的氨基酸更替,修饰程度有限。酸酐等化学修饰剂对蛋白质中氨基酸侧链的修饰,可引入几乎无限种的基团,被广泛用于酶分子稳定性、底物亲和性、催化效率和底物选择性的改进^[5]。因此,化学修饰可能是一种提高 TGase 热稳定性和催化活性的有效策略。

在前期研究中,作者将吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*)TGase 成功表达于大肠杆菌^[6],为发酵法制备 TGase 提供了高效生产菌株。

为进一步提高 *S. hygroscopicus* TGase 的应用性能,作者将重组 *S. hygroscopicus* TGase 纯化后,考察了常用氨基修饰剂——邻苯二甲酸酐(PA)对其比酶活力及热稳定性的影响,并探讨了其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 菌株 *E. coli* (pET-22b/*spro-stg*)为作者所在实验室保藏,用于发酵生产重组 *S. hygroscopicus* TGase^[7]。

1.1.2 主要试剂 N-carboxybenzoyl-L-glutaminyglycine (N-CBZ-Gln-Gly) 和 L-谷氨酸- γ -单羟胺酸:购自 Sigma-Aldrich 公司(上海);谷胱甘肽(还原型):购自华美生物工程有限公司;标准相对分子质量蛋白质、蛋白质上样缓冲液、制胶试剂:均购自碧云天公司;胰蛋白酶和酵母粉:购自 Oxoid(英国)公司;其它试剂均为国产或进口分装。

1.1.3 培养基

1)LB 培养基:10 g/L 蛋白胨、5 g/L 酵母提取物、10 g/L NaCl,高压蒸汽灭菌。

2)TB 培养基:12 g/L 蛋白胨、24 g/L 酵母提取物、10 g/L 甘油;磷酸盐缓冲液:17 mmol/L KH_2PO_4 、72 mmol/L K_2HPO_4 。将前三者按比例配好后,高压蒸汽灭菌,与经高压蒸汽灭菌后的磷酸盐缓冲液按 10:1 比例混合。

1.2 方法

1.2.1 重组 TGase 的制备

1)重组 TGase 粗酶液制备:根据前期研究中的产酶条件^[7],对 *E. coli* (pET-22b/*spro-stg*)进行摇瓶发酵。取 *E. coli* BL21(DE3) (pET-22b/*spro-stg*)发

酵液于4℃、10 000 r/min离心10 min收集菌体。每克湿菌体用10 mL结合缓冲液(pH 7.4, 20 mmol/L Na_2HPO_4 , 200 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑)重悬, 超声破碎至菌体完全裂解。裂解液于4℃、10 000 r/min离心10 min, 取上清液过0.22 μm 膜制成粗酶液。

2)亲和层析:将样品注入经结合缓冲液平衡的亲合层析柱(HisTrap™ FF crude, GE),并用结合缓冲液洗去未结合蛋白;随后以0~500 mmol/L 咪唑溶液进行梯度洗脱,流速为1.0 mL/min,收集含有TGase催化活性的部分。

3)凝胶过滤:用pH 7.0、50 mmol/L磷酸缓冲液平衡凝胶柱,将亲和纯化后的样品注入凝胶柱(Superdex 75 10/300 GL, GE),用平衡缓冲液洗脱,流速0.5 mL/min,收集含有TGase催化活性的部分。

1.2.2 重组TGase的化学修饰 分别在含10 mmol/L 脬胺和不含脬胺的情况下,按照修饰剂邻苯二甲酰酐(PA)与TGase表面氨基1:1、2:1和5:1的比例向2 mL TGase酶液(质量浓度1 mg/mL,含100 mmol/L 硼酸盐, pH 8.0)中添加PA, 20℃反应2 h,并将反应产物在50 mmol/L Tris-HCl(pH 7.0)缓冲液中透析过夜。

1.2.3 TGase温度稳定性的测定 将酶液在不同温度下保温不同时间,迅速冷却, pH 6.0、37℃测定残余TGase酶活,以未保温的酶活力为相对酶活100%,计算相对酶活力。

1.2.4 酶分子表面疏水度测定 采用疏水性荧光探头1-苯胺基-8-萘磺酸(ANS)测定蛋白质表面疏水度^[8]。将TGase酶液(1 mg/mL)稀释至0.5~0.005 mg/mL,每3 mL TGase稀释液中添加40 μL 8.0 mmol/L ANS溶液(0.1 mol/L、pH 7.0磷酸缓冲溶液)。在365 nm(激发)和484 nm(发射)下测定样品的荧光吸收强度。荧光强度对蛋白质浓度的初始斜率(通过线性回归计算)作为酶蛋白表疏水度指数。

1.2.5 酶分子表面氨基修饰度的测定 采用三硝基苯磺酸(TNBS)显色法测定TGase分子表面自由氨基的修饰度^[9]。将0.5 mL(0.5 mg/mL)样品溶液加至0.5 mL 硼砂-NaOH缓冲液中,再加入20 μL (1.8 mol/L TNBS),并迅速混合。反应5 min后,加2 mL终止液终止反应,于420 nm下测定吸光值。吸光值对应TGase分子表面残余的自由氨基数量,天然TGase在420 nm吸光值对应23个氨基。化学修饰度以修饰后酶分子表面残余自由氨基数目表示。

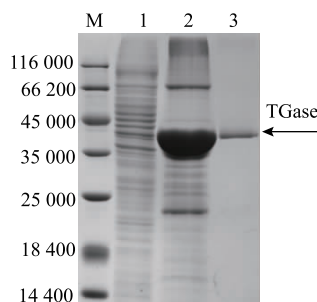
1.2.6 蛋白质浓度与SDS-PAGE电泳检测 采用Bradford法测定蛋白质浓度^[10]。SDS-PAGE电泳凝胶采用碧云天试剂盒制备,具体操作参考产品说明书和文献^[11]。使用浓缩胶质量浓度为5 g/dL,分离胶质量浓度为12 g/dL,以0.1%考马斯亮蓝R-250进行染色。

1.2.7 TGase酶活测定 比色法测定酶活^[12]。用 α -N-CBZ-Gln-Gly为作用底物,L-谷氨酸- γ -单羟胺做标准曲线。1个单位TGase酶活定义为:37℃每分钟催化底物形成1 μmol L-谷氨酸- γ -单羟胺的酶量(U/mL)。酶活测定条件:37℃条件下反应10 min。

2 结果与分析

2.1 重组*S. hygroscopicus* TG的制备

E. coli BL21(DE3)(pET-22b/protg)重组菌经离心、破壁、膜过滤等预处理后,进行亲和层析和凝胶过滤纯化。SDS-PAGE分析见图1,纯化后重组TGase的相对分子质量为38 000,与*S. hygroscopicus*天然TGase基本一致^[13]。重组TGase的比酶活从0.57 U/mg提高到19.1 U/mg,纯化33.8倍,回收率为32%。



M:蛋白质标准相对分子质量;1:粗酶液;2:亲和层析;3:凝胶过滤层析。

图1 重组*S. hygroscopicus* TGase的SDS-PAGE电泳分析
Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the purified recombinant TGase

2.2 PA修饰反应条件的确定

PA修饰反应条件包括反应pH、温度和时间等,见图2。为确保蛋白质分子表面氨基不带电荷,修饰反应体系的pH值不能偏低。结合*S. hygroscopicus* TGase的最适反应pH和pH稳定范围^[13],确定PA修饰反应体系的pH值为8.0。在pH 8.0、PA与TGase表面氨基比例为2:1(摩尔比)时,PA修饰反

应温度和时间对 TGase 活力的影响见图 3。修饰温度较低时(10 ℃),TGase 活力变化较小;修饰温度较高时(37 ℃),TGase 活力下降;过长的修饰时间

(120 min)同样导致 TGase 活力降低。因此,确定 PA 修饰 TGase 的条件:pH 8.0、20 ℃修饰 2 h。

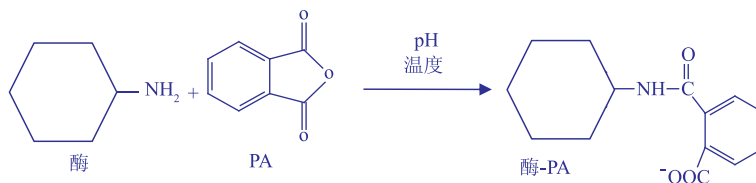


图 2 PA 修饰酶分子自由氨基

Fig. 2 Chemical modification of free amino-group of enzyme by phthalic anhydride

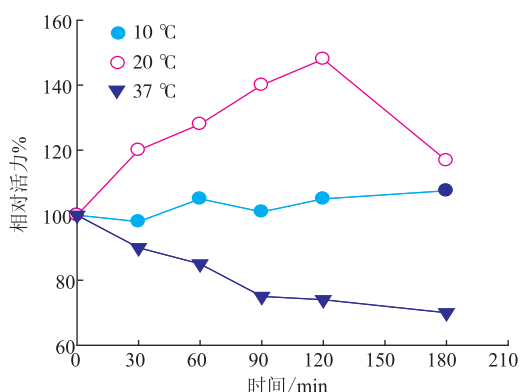


图 3 PA 修饰时间和温度对 TGase 活力的影响

Fig. 3 Effects of PA modification time and temperature on TGase activity

2.3 PA 对 TGase 酶学性质的影响

选取三个浓度的 PA 对 TGase 分子进行修饰。胱胺是 TGase 的竞争性抑制剂^[14],其与 TGase 的结合可能影响 PA 对酶活性中心附近氨基的修饰。因此,考察了胱胺对 PA 修饰 TGase 的影响。结果显示,无胱胺存在时,经 PA 修饰 TGase 的比酶活力有明显提高,且热稳定性也略有提高;其中,TGase 表面氨基与 PA 摩尔比为 1:2 时,TGase 比活力较天然酶提高 48.3%,见图 4(a)。存在 10 mmol/L 胱胺时,PA 修饰使 TGase 的热稳定性有不同程度的提高;TGase 表面氨基与 PA 摩尔比为 1:2 时热稳定性提高 31.3%,见图 4(b)。

2.4 PA 修饰的作用机制解析

S. hygroscopicus TGase 的模拟结构显示,其催化活性基团 Cys65 位于酶分子裂缝底部,5 个赖氨酸残基 (Lys295、Lys 270、Lys328、Lys38、Lys217 和 Lys237) 位于裂缝附近的分子表面,见图 5。在 *S. mobaraensis* TGase 分子中,将其裂缝表面的氨基酸残基突变为疏水性氨基酸残基(Ser299Phe 等)可

提高酶对含苯环底物 CBZ-Gln-Gly 的催化活性^[15],暗示裂缝表面是 TGase 的底物结合位点。PA 对裂缝表面赖氨酸残基的修饰同样增加了疏水性的苯环,该区域疏水性提高显然有利于其与 CBZ-Gln-Gly 的结合,最终使 TGase 催化活性提高。然而,胱胺与 TGase 催化活性中心的结合可能阻碍了 PA 对该区域的修饰,因此 TGase 催化活性变化较小。

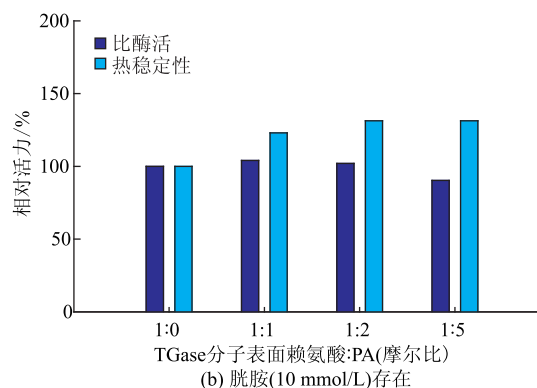
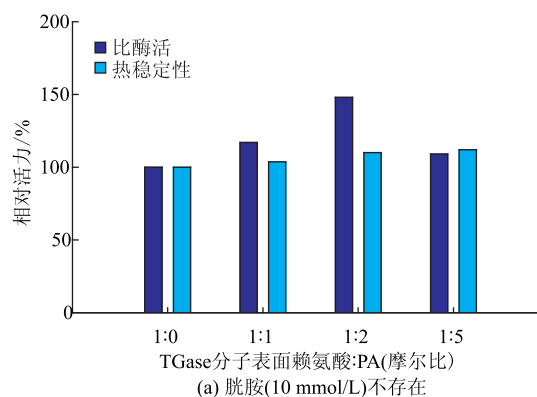


图 4 胱胺(10 mmol/L)不存在(a)或存在(b)时 PA 修饰对 TGase 催化活力及热稳定性的影响

Fig. 4 Effects of phthalic anhydride modification on TGase activity and thermal stability in the absence (a) or presence (b) of cystamine (10 mmol/L)

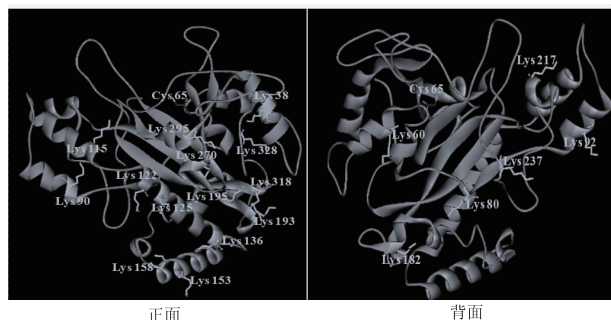


图 5 位于 *S. hygroscopicus* TGase 分子表面 (模拟结构) 的赖氨酸残基

Fig. 5 Lysine residues on surface of *S. hygroscopicus* TGase(modeling structure)

PA 修饰对酶分子热稳定的提高一般基于两个方面的原因:1) PA 修饰引入的苯甲酸基团易于与其基团形成氢键,使分子结构稳定性提高^[16];2) PA 修饰带入的电荷可增强酶分子间的静电斥力,抑制高温条件下酶分子的聚集^[17]。此外,分子表面疏水性的降低也有可能促进酶热稳定性的提高^[18]。表 1 显示,无论脬胺是否存在,PA 修饰均可提高 TGase 分子表面亲水性。脬胺不存在时,TGase 表面氨基与 PA 摩尔比为 1:1、1:2 和 1:5 时,PA 修饰度随 PA 比例的提高而增加,相应 TGase 分子分表面疏水度下降了 9.46%、17.74%和 21.13%;在含 10 mmol/L 脬胺的体系中,TGase 表面氨基与 PA 摩尔比为 1:1、1:2 和 1:5 时,PA 修饰度随 PA 比例的提高同样增加,相应 TGase 分子分表面疏水度分别下降了 15.01%、19.67%和 21.38%。结果表明,PA 修饰后对 TGase 热稳定性的提高可能与其表面亲水性的增加有关。值得注意的是,随着酶分子表面疏水度的下降,TGase 在无脬胺存在时热稳定性提高并不明显。这可能是由于,在无脬胺存在时 PA 对 TGase 催化活性中心的修饰降低了酶分子的热稳定性,从而一定程度上抵消了表面疏水下降引起的热稳定性增量。

3 结 语

1989 年,日本味之素公司首次在土壤中分离到

参考文献:

- [1] Motoki M, Seguro K. Transglutaminase and its use for food processing [J]. *Trends in Food Science and Technology*, 1998, 9: 204-210.
- [2] Santos M, Torne J M. Recent patents on transglutaminase production and applications: a brief review [J]. *Recent Patents on Biotechnology*, 2009, 3(3): 166-174.

表 1 PA 对 TGase 分子表面疏水度的影响

Table 1 Effect of PA modification on the surface hydrophobicity of TGase molecule

修饰反应体系	TGase : PA (摩尔比)	修饰度 (赖氨酸)	表面疏水度
未添加脬胺	1 : 0	21	40.37
	1 : 1	19	36.55
	1 : 2	17	33.21
	1 : 5	16	31.84
10 mmol/L 脬胺	1 : 0	21	40.37
	1 : 1	15	34.31
	1 : 2	13	32.43
	1 : 5	14	31.74

TGase 生产菌株, *Streptoverticillium mobaraense* S-8112^[19]。此后,研究者不断分离到新的 TGase 生产菌株,包括 *Sv. ladakanum*^[20], *Streptomyces hygroscopicus*^[21], *Bacillus circulans*^[22], *Bacillus subtilis*^[23]等,生产周期短、成本优势明显的微生物发酵成为 TGase 的主要来源。随着应用成本的下降, TGase 应用领域不断拓展,包括食品、纺织、皮革、医药等领域。如何提高热稳定性、比酶活力等应用性能,成为 TGase 研究的重要方向。本研究首次采用 PA 对重组 *S. hygroscopicus* TGase 氨基进行化学修饰,使其比活力和热稳定性分别提高 48.3%和 31.3%,表明化学修饰是一种改进 TGase 酶学性质的有效策略。目前,已有多种酸酐类化学修饰剂(如柠康酐、琥珀酸酐、马来酐等)用于辣根过氧化物酶^[24]、木瓜蛋白酶^[25]等酶的耐有机环境性能、pH 稳定和热稳定性等酶学性质的改造,获得了较好的研究结果。因此,全面考察柠康酐、琥珀酸酐、马来酐等修饰剂对 TGase 酶学性质的影响,可能进一步获得多种酶学性质改良的 TGase 酶。作者还发现了表面亲水性与 TGase 的正相关性,将为 TGase 分子的理性改造提供明确靶点。基于此,可采用定点突变的策略将 TGase 分子表面赖氨酸残基突变为其它亲水性更强的氨基酸残基(如谷氨酸残基),以提高酶的热稳定性。

- [3] Zhu Y, Tramper J. Novel applications for microbial transglutaminase beyond food processing [J]. **Trends in Biotechnology**, 2008, 26(10):559-565.
- [4] 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[J]. 生物工程学报, 2011, 27(12):1681-1689.
- [5] Davis B G. Chemical modification of biocatalysts[J]. **Current Opinion in Biotechnology**, 2003, 14(4):379-386.
- [6] Liu S, Zhang D X, Wang M, et al. The pro-region of *Streptomyces hygroscopicus* transglutaminase affects its secretion by *Escherichia coli*[J]. **FEMS Microbiology Letters**, 2011, 324(2):98-105.
- [7] Liu S, Zhang D X, 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[J]. **Microbial Cell Factories**, 2011, 10:112.
- [8] Kato A, Nakai S. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins[J]. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1980, 624(1):13-20.
- [9] Habeeb A F. Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid [J]. **Analytical Biochemistry**, 1966, 14(3):328-336.
- [10] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. **Analytical Biochemistry**, 1976, 72:248-254.
- [11] Walker J M, The Protein Protocols Handbook[M]. Hatfield:Humana Press, 2002.
- [12] Grossowicz N, Wainfan E, Borek E, et al. The enzymatic formation of hydroxamic acids from glutamine and asparagine[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 1950, 187(1):111-125.
- [13] Cui L, Du G C, Zhang D X, et al. Purification and characterization of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygroscopicus*[J]. **Food Chemistry**, 2007, 105(2):612-618.
- [14] Hsu T C, Huang C Y, Chiang S Y, et al. Transglutaminase inhibitor cystamine alleviates the abnormality in liver from NZB/W F1 mice[J]. **European Journal of Pharmacology**, 2008, 579(1-3):382-389.
- [15] Yokoyama K, Utsumi H, Nakamura T, et al. Screening for improved activity of a transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* created by a novel rational mutagenesis and random mutagenesis [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2010, 87(6):2087-2096.
- [16] Gouda M D, Singh S A, Rao A G, et al. Thermal inactivation of glucose oxidase. mechanism and stabilization using additives[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2003, 278(27):24324-24333.
- [17] Sangeetha K, Abraham T E. Chemical modification of papain for use in alkaline medium [J]. **Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic**, 2006, 38(3-6):171-177.
- [18] Pakula A A, Sauer R T. Reverse hydrophobic effects relieved by amino-acid substitutions at a protein surface [J]. **Nature**, 1990, 344(6264):363-364.
- [19] Ando H, Adachi M, Umeda K, et al. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms[J]. **Agricultural and Biological Chemistry**, 1989, 53(10):2613-2617.
- [20] Lin Y S, Chao M L, Liu C H, et al. Cloning and expression of the transglutaminase gene from *Streptomyces lividans* in *Streptomyces lividans*[J]. **Process Biochemistry**, 2004, 39(5):591-598.
- [21] Cui L, Du G, Zhang D, et al. Thermal stability and conformational changes of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygroscopicus*[J]. **Bioresource Technology**, 2008, 99(9):3794-3800.
- [22] de Barros Soares LH, Assmann F, Zachia Ayub MA. Purification and properties of a transglutaminase produced by a *Bacillus circulans* strain isolated from the Amazon environment[J]. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 2003, 37(3):295-299.
- [23] Suzuki S, Izawa Y, Kobayashi K, et al. Purification and characterization of novel transglutaminase from *Bacillus subtilis* spores[J]. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, 2000, 64(11):2344-2351.
- [24] Liu J Z, Wang T L, Huang M T, et al. Increased thermal and organic solvent tolerance of modified horseradish peroxidase[J]. **Protein Engineering, Design & Selection**, 2006, 19(4):169-173.
- [25] Sangeetha K, Abraham T E. Chemical modification of papain for use in alkaline medium[J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2006, 38:171-177.