

微生物源谷氨酰胺转氨酶基因工程菌株的研究进展

李洪波¹, 张兰威^{1,*}, 崔艳华¹, 张莉丽²

(1. 哈尔滨工业大学食品科学与工程学院, 黑龙江哈尔滨 150090;

2. 东北农业大学食品学院, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要:微生物源谷氨酰胺转氨酶(mTGase)是一种催化酰基转移反应的酶,它可以催化蛋白质分子内、分子间的交联,进行蛋白质翻译后修饰,从而改变蛋白质的功能特性,在食品、生物医学、纺织等领域有着广泛的应用前景。本文综述了构建产微生物源谷氨酰胺转氨酶的基因工程菌株的相关技术、研究进展,并对未来研究方向提出建议。

关键词:谷氨酰胺转氨酶,基因工程菌株,蛋白表达

Research progress in genetically engineered strains of microbial transglutaminase

LI Hong-bo¹, ZHANG Lan-wei^{1,*}, CUI Yan-hua¹, ZHANG Li-li²

(1. School of Food Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China;

2. College of Food Science, Northeast Agriculture University, Harbin 150030, China)

Abstract: Microbial transglutaminases (MTG) are a family of enzymes that catalyze post-translational modification of proteins by inter or intra-molecular crosslinking through acyl-transfer reaction. Because of the modification of protein functional properties, MTG showed a broad range of applications in the food industry, biomedicine and textile industry. In this paper, correlation techniques, research progress of constructing engineered strains which can produce microbial transglutaminase were reviewed and direction of future research was discussed detailed.

Key words: Transglutaminase; genetically engineered strains; protein expression

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)17-0389-06

谷氨酰胺转氨酶(Transglutaminase, TGase, EC 2.3.2.13)是一种催化酰基转移反应的酶,它能催化谷氨酰胺残基的 γ -羧酰胺基和赖氨酸残基的 ϵ -氨基或其它伯胺基之间的酰基转移反应^[1]。通过这种催化作用,实现蛋白质分子内、分子间的交联、蛋白质和氨基酸之间的连接以及蛋白质分子内谷氨酰胺基的水解,从而进一步改善蛋白质的功能性质,提高蛋白质的营养价值。微生物来源的TGase(MTG)属于胞外酶,可直接分泌到培养基中,与凝血因子XIII、豚鼠肝脏TGase相比分离纯化容易、底物特异性低,并且微生物发酵原料廉价、产酶周期短,因此可以利用微生物发酵进行大规模生产。近几年MTG正逐渐取代动物来源的TGase,成为商业生产上主要的TGase来源^[2]。MTG分子量在23~45ku之间,具有较强的热稳定性和pH稳定性^[3]。同时MTG的活性不依赖钙离子,而 Ca^{2+} 容易使含有酪蛋白、大豆球蛋白、肌浆球蛋白的食品产生蛋白凝集,因此这一特性

在修饰蛋白食品时非常有利^[4]。目前,获得MTG的方法主要有两种:筛选产MTG的微生物,利用发酵生产MTG^[5-7];利用基因工程方法构建产MTG的高产菌株^[8-10]。近几年,国内外研究者为了提高MTG的产量,积极构建基因工程菌株,将不同来源的MTG在不同宿主中表达,通过发酵获得高产量的重组MTG。本文主要对微生物源TGase的基因工程菌株的构建进展加以阐述。

1 大肠杆菌基因工程菌株的构建

1.1 工程菌构建及表达

大肠杆菌不仅具有遗传背景清楚、操作简单、生长繁殖快、成本低廉,转化和转导效率高,可以大规模表达目的蛋白等优点,同时表达的重组蛋白水平远高于其它基因表达系统,因此大肠杆菌是目前应用最广泛的原核表达系统。但是运用该系统表达MTG遇到很多困难,主要表现为两个方面:一是MTG的宿主细胞毒性。大肠杆菌表达的MTG可能会催化细胞中蛋白质之间的交联,从而抑制宿主细胞的增殖,进一步影响MTG的表达。二是MTG的低活性。由于MTG主要以无活性的酶原形式存在,所以表达出来的蛋白活性较低,难以实现大量表达。尽管如此,研究者还是进行了很多有益尝试,成功构建

收稿日期:2013-03-05 *通讯联系人

作者简介:李洪波(1986-),女,博士研究生,研究方向:分子克隆与表达。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30972041/C110602)

出一系列基因工程菌株。

1994年,Takehana等人^[11]首次利用化学法合成放线菌 *Streptovorticillium* S-8112 的 MTG 基因。该基因在 ompA 信号肽的引导下,在大肠杆菌中成功表达。但是 MTG 的表达抑制宿主细胞的增殖,从而限制了重组蛋白的表达,表达量只达到 5mg/L,比活为 0.22U/mg,为原始菌株产 MTG 酶活性的 1%。随后, Kawai 等人^[12]将化学合成的 MTG 基因与噬菌体 T7 基因 10 前导肽共表达,通过蛋白酶水解获得有活性的 MTG。但是由于蛋白质折叠效率较低,重组蛋白的比活为 3U/mg,仅有原始 MTG 的 20%。Yokoyama 等人^[13]根据大肠杆菌密码子偏好性优化了 *Streptovorticillium* S-8112 菌株的 MTG 基因,并表达出两种含有不同 N-端氨基酸残基(一种是成熟 MTG 氨基酸序列的第一个氨基酸残基,甲硫氨酸;另一种是第二个氨基酸残基,丝氨酸)的重组蛋白。研究发现这两种 MTG 活性相似,只有原始 MTG 的 15%,这进一步表明 N-端甲硫氨酸残基的缺失并不影响 MTG 的活性。

21 世纪开始,MTG 在大肠杆菌中的表达有了飞速发展,表达水平和酶活性都有了显著提高。Marx 等人^[14]报道了 *Streptomyces mobaraensis* 来源的 MTG 酶原(pro-MTG)在大肠杆菌中的可溶性表达。结果表明乳糖诱导或 IPTG 低温诱导,可溶性 MTG 均达到 90%,表达量分别为 65mg/L 和 4.5mg/L,比活分别为 627U/g 和 447U/g,IPTG 诱导的产量及酶活性显著低于乳糖诱导。Yu 等^[10]报道了一种分离于 *Streptomyces netropsis* BCRC 12429 菌株的新的 MTG (Sn TGase)。氨基酸序列分析表明,该蛋白与 *Streptomyces* spp.来源的 MTG 有着 78.9%~89.6% 的同源性。同时,该课题组将 Sn TGase N 端的前导序列与硫氧还蛋白基因在大肠杆菌中共表达。重组表达蛋白(Trx-proTGase)主要以无活性的酶原形式存在,表达量为 180mg/L,经牛胰蛋白酶水解后,重组蛋白的比活可达到 24.9U/mg。Liu 等^[9]研究了 *Streptomyces hygroscopicus* 来源的 MTG 的前导区域(pro-region)对其在大肠杆菌中分泌和溶解性的影响。通常,蛋白质在 *Escherichia coli* 中的分泌需要三个步骤,分别是细胞质膜的跨膜运输,外周胞质中信号肽的裂解和外膜的跨膜运输^[15]。当通过 N 末端缺失突变去掉 MTG pro-region N 端的 6 个氨基酸残基时,尽管相应的 pro-MTG 衍生物的分泌降低,但细胞内仍有可溶性的 pro-MTG 衍生物的积累。同时只在外周胞质检测到 MTG 活性,这表明细胞内的 pro-MTG 衍生物只转运到外周胞质中,进一步说明这 6 个氨基酸可能通过提高跨膜运输速率来影响 pro-MTG 的分泌。而进一步去掉 N 端的 10 个氨基酸残基时,细胞内及细胞外均没有可溶性的 pro-MTG 衍生物的分泌。结构分析表明这 10 个氨基酸中包含了构成 pro-region 首个 α -螺旋的 5 个保守氨基酸序列,同时 12 位的酪氨酸与成熟序列 334 位及 362 位的天冬酰胺通过氢键相互作用。由于 pro-region 的 α -螺旋可能通过氢键间的相互作用协助成熟 MTG 的正确折叠,因此这些氨基酸的缺失使得 pro-MTG

的衍生物以不可溶的形式出现^[9]。

1.2 表达酶原的后续加工

由于重组 MTG 主要以无活性的酶原形式存在,所以表达的重组 pro-MTG,需要用蛋白酶将其水解激活。Marx 等人^[16]研究了不同蛋白酶对酶原的激活作用,同时研究了 C 端组氨酸标签对重组蛋白活性和稳定性的影响。研究发现,胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、蛋白酶 K 在激活酶原的过程中使 MTG 发生降解,进而降低酶活,而组织蛋白酶 B、微生物中性蛋白酶和凝血酶却能特异水解酶原产生具有活性的 MTG,其作用同 *S. mobaraensis* 内生的金属蛋白酶(TAMEP)对酶原的水解作用类似。TAMEP 是从 *S. mobaraensis* DSM 40587 中分离纯化的一种金属蛋白酶,它能激活内源 MTG,使 MTG 的 N 端多出四个氨基酸残基(FRAP),形成具有交联活性的 FRAP-MTG^[17]。培养基中的 FRAP-MTG 进一步被氨基肽酶(SM-TAP)水解,去掉 FRAP,形成成熟的 MTG^[18]。对重组蛋白酶学性质的研究表明,重组 pro-MTG-His₆ 蛋白经 TAMEP 激活后比活为 23U/mg,最适反应温度为 50℃,与 *S. mobaraensis* 来源的 MTG 的相似,这进一步说明 C 端的组氨酸标签既不影响酶的活性也不影响酶的稳定性。胰蛋白酶在酶原激活过程中导致 MTG 的降解,使酶活性降低,但该酶价格低廉,因此在酶原激活过程中受到研究者的青睐。Yang 等^[19]将胰蛋白酶的激活和亲和层析相结合,使 88.9% 重组的 pro-MTG-His₆ 转化成有活性的酶,比活为 483.20U/g,表达量为 465.12mg/L。同时在胰蛋白酶将酶原激活后,可通过纯化过程快速除去胰蛋白酶,防止其对 MTG 的进一步降解,提高了 MTG 的稳定性。Sommer 等^[20]利用中性蛋白酶激活 2 位丝氨酸被脯氨酸取代的 MTG 突变体酶原 rMTG(S2P),发现该酶不仅能使酶原激活,还能切割 C 端的组氨酸标签,使得中性蛋白酶和活性 MTG 不能充分分离。蛋白酶 K 却可以不切割组氨酸标签而激活 MTG 酶原,并能通过固定化金属亲和层析快速分离蛋白酶 K 和 MTG,纯化后的 rMTG(S2P)的比活为 43.9U/mg。

1.3 酶的热稳定性改良

目前,商品化的 MTG 主要是由 *S. mobaraensis* 的发酵生产获得。但是每克商品化 MTG 中仅有 1% 的 MTG 粉末,为了维持 MTG 的热稳定性,其余的 99% 为麦芽糖糊精。为了获得更加稳定的 MTG,Marx 等^[21]对 *S. mobaraensis* 来源的 MTG 基因进行易错 PCR,从 5500 株重组子中筛选热稳定性增加的突变体。MTG 的二级结构含有 11 个 α -螺旋和 8 个 β -折叠结构,同时蛋白折叠成盘状,在分子的边缘有一个深的裂缝。催化位点是由一个催化反应三联体 C₆₄-D₂₅₅-H₂₇₄组成,其中,C₆₄是该酶的活性中心,位于裂缝底部,D₂₅₅和 H₂₇₄分别位于 β_5 和 β_6 折叠上^[22]。研究表明,所有导致热稳定性改变的点突变都位于 N 端区域,这主要是由于 N 端区域与 β_1 折叠相连同时与 β_6 和 β_7 折叠之间的环状结构相互作用。而在所有突变体中,靠近 N 端的 2 位丝氨酸被脯氨酸取代

的突变体 rMTG (S2P) 在 60℃ 具有更好的热稳定性, 这说明该突变使得 β_6 和 β_7 折叠之间的相互作用更加稳定。同时与重组的原始 MTG 相比, S2P 的半衰期增加了 270%, 活性增加了一倍, 达到 46.1U/mg。为了进一步提高 MTG 的热稳定性, 该课题组^[23] 利用饱和突变和定点突变对可能影响 MTG 热稳定性的 7 个位点的氨基酸 (包括 2 位 S、23 位 S、24 位 Y、257 位 G、269 位 K、289 位 H 和 294 位 K) 进行突变。研究发现, 四个位点 (2 位 S、23 位 S、269 位 K 和 294 位 K) 的突变可以提高热稳定性。同时通过 DNA 改组对单一氨基酸突变的突变体进行重组, 发现三个位点突变的突变体 (S23V-Y24N-K294L) 具有最好的热稳定性, 在 60 和 50℃ 时, 其半衰期分别是原始的重组 MTG 的 12 和 10 倍。进一步的研究表明, 294 位的赖氨酸残基对 MTG 的热稳定性至关重要。

虽然有很多 MTG 在大肠杆菌中表达的报道, 但是其主要以酶原形式存在, 需要进一步的水解激活过程。而且以大肠杆菌为宿主的工程菌不宜用于生产食品和药品所需的 MTG, 但对酶学性质、蛋白质工程和基因表达的研究具有重要意义。

2 棒状杆菌基因工程菌株的构建

棒状杆菌是一种在自然界分布广泛、不产芽孢、短杆状的革兰氏阳性菌。由于该菌的非致病性, 使得其广泛用于发酵生产各种食源性氨基酸, 如谷氨酸盐、赖氨酸。由于棒状杆菌简便的生物技术属性, 使得利用棒状杆菌作为宿主细胞表达外源基因成为新的研究热点。研究发现, 棒状杆菌在培养过程中分泌两个细胞表面蛋白 CspA 和 CspB, 这两种表面蛋白的启动子和信号肽已经用于异源蛋白的合成^[24]。

近年来, 棒状杆菌作为新的表达系统, 可以高效表达可溶性的 MTG, 使产量有了极大的提高。Kikuchi 等^[25] 首次将来自 *Streptovorticillium mobaraense* 的 pro-MTG 在谷氨酸棒状杆菌中表达。他们比较了 MTG 信号肽, 谷氨酸棒状杆菌 CspB 信号肽, CspA 信号肽及产氨棒状杆菌 CspA 信号肽对 pro-MTG 合成的影响。结果表明, 在谷氨酸棒状杆菌中, MTG 信号肽不能诱导 pro-MTG 的合成, 而不同来源的 CspB 和 CspA 信号肽只能诱导合成没有活性的重组蛋白。当他们将含有来自 *Streptomyces albogriseolus* 的枯草杆菌蛋白酶类水解酶基因 SAM-P45 的质粒与含有 pro-MTG 基因的质粒在谷氨酸棒状杆菌中共表达时, pro-MTG C 端的 41 位氨基酸残基被丝氨酸蛋白酶水解, 使其转化为有活性的 MTG, 产量可达 142mg/L, 比活最高可达到 78.2U/L。但是, 水解后的谷氨酰胺转氨酶 N 端氨基酸序列与来自 *S.mobaraense* 的 MTG 相比, 多出 Phe-Arg-Ala-Pro 四个氨基酸。所以 Date 等人^[26] 通过定点突变将 pro 序列 C 端碱基突变为 SAM-P45 的最佳水解位点, 使其水解后产生原始的 MTG。对 *S.mobaraense* 分泌的 MTG 和棒状杆菌表达的原始 MTG 及多出四个氨基酸残基的 MTG 的活性进行了比较, 发现这三种酶的比活差异不显著, 分别为 26、26 和 30U/mg。这进一步说明了来自 *S.mobaraensis* 的 pro 序列的 N 端和中心区域对 pro-

MTG 的分泌起着至关重要的作用。随后, Date 等人^[27] 研究了 pro 序列 C 端的改变对谷氨酸棒状杆菌分泌 pro-MTG 产量的影响。他们将来自 *S.mobaraensis* 和 *Streptomyces cinnamomeus* 的 MTG 基因的 pro 序列嵌合到一起, 比较了嵌合 pro 序列和原始 pro 序列对酶产量的影响。结果表明, 使用嵌合的 pro 序列时, MTG 的产量高达 626mg/L, 而且经枯草杆菌蛋白酶类水解酶处理后, 酶的第一个氨基酸残基为 Asp, 这与原始的 MTG 相同, 同时纯化后 MTG 的比活大约为 26U/mg 蛋白质, 这也与原始酶活性相似。

虽然 pro-MTG 成功地在谷氨酸棒状杆菌 ATCC13869 中表达^[25-26], 但为了研究其它棒状杆菌是否有更高的产量, Itaya 和 Kikuchi^[28] 将 pro-MTG 基因在不同的棒状杆菌中进行了表达, 发现大多种类的棒状杆菌能高效合成 pro-MTG, 尤其 *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC6872 在发酵 71h 时, pro-MTG 的产量高达 2500mg/L, 酶活与原始酶活相似。这些结果表明, 其它种类的棒状杆菌亦是工业化生产外源蛋白的潜在宿主。Umakoshi 等人^[8] 基于重组菌株的¹³C 代谢通量分析来提高 MTG 的产量。根据¹³C 同位素标记实验和蛋白质氨基酸中¹³C 含量的测定发现 MTG 产量在菌体稳定初期开始增加, 而到了稳定后期, 产量开始下降。同时伴随着 MTG 的分泌, 代谢逐渐从糖酵解过度到三羧酸循环, 这是由于细胞中 NADH/NAD⁺ 比率增加, 使三羧酸循环加快, 从而导致稳定期糖的摄取量降低。所以 Umakoshi 等人认为降低 NADH/NAD⁺ 比率可以提高 MTG 产量, 他们通过向培养基中添加乳酸来降低重组棒状杆菌培养基中的 pH, 进而降低细胞中 NADH 的含量, 使得 MTG 的产量增加了 1.4 倍。

迄今为止, 关于谷氨酸棒状杆菌表达异种蛋白的报道较少。但是研究发现谷氨酸棒状杆菌中存在一种新的蛋白分泌途径, twin-arginine translocation (Tat) 途径^[29], 它能分泌 Sec 途径不能表达的蛋白^[30]。这进一步说明, 谷氨酸棒状杆菌能成为大规模生产异种蛋白的宿主菌株。

3 链霉菌基因工程菌株的构建

目前, 虽然对 MTG 在大肠杆菌和棒状杆菌中的表达的研究较为关注, 但是为了进一步提高 MTG 产量, 也有研究者研究 MTG 在链霉菌中的表达, 取得了一定的进展。

Lin 等人^[31] 将菌株 *Streptovorticillium ladakanum* B1 的 MTG 基因 (tgB1) 在 *Streptomyces lividans* JT46 中进行表达, Western-blotting 分析发现表达产物中除了 MTG 和 pro-MTG 外, 还有一些小分子蛋白, 这说明重组的 TgB1 在分泌过程中不能被正确的加工。这可能是由于 TgB1 有一个由 79 个氨基酸残基组成的信号肽, 而 *S.lividans* JT46 分泌的信号肽酶对该信号肽的底物特异性不强, 导致切割片段大小不等。而 Washizu 等人^[32] 在使用酪氨酸酶启动子在 *S.lividans* 3131-TS 中表达 *Streptovorticillium* sp.S-8112 来源的 MTG 时, 表达产物得到了正确折叠, 所以启动子对 tgB1 在 *S.lividans* 中表达的影响还需进一步

的研究。Lin 等人^[33]同时将 *Streptomyces platensis* M5218 来源的 MTG 基因 (*mtgA*) 在 *S.lividans* 中进行表达。对重组蛋白酶的活性测定发现,该重组蛋白的活性为 *S.platensis* M5218 菌株分泌 MTG 的 3.3 倍,这说明 *mtgA* 在 *S.lividans* 中高效表达,同时重组蛋白进行了正确的加工修饰。研究表明 *tgB1* 和 *mtgA* 在开放阅读框上游均有两个富含 A + T 的序列,但是 *mtgA* 不含有启动子上游的 -10 和 -35 序列,这可能是 *MtgA* 可以高效表达并被正确修饰的原因之一。Liu 等人^[34]为了提高 MTG 产量,将一个 *Streptomyces fradiae* 来源的 MTG 基因重组到其原始菌株中,在强启动子 *ermE up* 的调控下,重组菌株的表达水平显著提高,是原始菌株比活的 2.0 倍,达到 3.8U/mg。同时 *S.fradiae* 生长迅速并能利用廉价培养基,使得该菌适合工业化发酵生产。

4 真核生物工程菌的构建与表达

甲醇营养型毕赤酵母是近二十年发展起来的真核表达系统,它具有翻译后修饰功能,成熟的高密度培养技术,易于外源蛋白的分离纯化,基因遗传稳定性好等优点。因此毕赤酵母成为蛋白表达的首选系统之一。Yurimoto 等人^[35]将 *S.mobaraensis* 的 pro-MTG 基因在甲醇酵母中表达。为了获得有活性的 MTG,他们在成熟的 MTG 和 pro 序列之间加入了 Kex2 肽链内切酶识别位点,使得 MTG 成功表达,这说明,MTG 前导序列不仅在细胞内发挥作用,在细胞间也同样发挥作用。该课题组为了进一步提高 MTG 产量,通过定点突变改变 N-糖基化位点,最后筛选出重组菌株博伊丁假丝酵母 (*Candida boidinii*),该菌株在发酵 119h 后,MTG 产量达到 90mg/L,比活为 22U/mg。李寅等^[36]将 pro-MTG 基因和枯草杆菌蛋白酶类水解酶基因 SAM-P45 在甲醇营养型酵母中共表达。这样,pro-MTG 在发酵液中被同时分泌的蛋白酶类水解酶切割,从而转化为成熟的 MTG。结果表明,巴斯德毕赤酵母在诱导发酵 72h 时,MTG 的比活达 0.43U/mL。

大肠杆菌表达载体表达的蛋白主要以酶原形式存在,需要进一步的水解激活过程。但是近年来,低温诱导表达可溶性的 MTG 及不同蛋白酶对重组的 pro-MTG 的激活,使酶的活性和产量大幅度提高。同时重组的 MTG 与商品化酶相比具有更好的热稳定性。而通过将枯草杆菌蛋白酶类水解酶基因与 pro-MTG 基因在棒状杆菌中的共表达,可以获得有活性的 MTG,产量可达 142mg/L,比活可达 78.2U/L。这与大肠杆菌表达系统相比,省去了表达后酶原的进一步水解激活过程,降低了生产成本,可以进行大规模生产。虽然 MTG 在真核表达系统毕赤酵母中可溶性表达,但是原核表达系统相比,其表达水平较低,发酵周期长,同时利用易燃的甲醇做为诱导剂,表达产物的卫生安全性需要考虑,不适合工业化生产。

5 展望

目前世界很多国家都开展了微生物发酵法生产 MTG 的研究,但是只有几个国家实现了产业化生产,这主要是由于天然菌株的产酶能力不高,很难达到

工业生产的需求。构建基因工程菌株是一种提高 MTG 产量的有效手段,但是基因工程菌产酶量尚未达到工业化生产水平,通过多种方式提高酶的表达量是今后研究的热点。主要包括以下几个方面:继续筛选新的产 MTG 菌株,以获得更有经济价值的新基因;优化发酵条件及培养基成分,利用微生物发酵法生产 MTG;提高基因工程菌的稳定性和表达量。基因工程菌株的稳定性及异源蛋白表达量远低于内源表达等问题是异源蛋白表达的难点,今后可以采取不同技术相结合的策略,将融合表达,定点突变,基因敲除等技术与细胞固定化技术相结合,提高基因工程菌株的稳定性和 MTG 合成的相关酶活力,进一步提高 MTG 产量;基因工程菌株中可能会有一些抗性基因,这些基因在生产过程中可能会转移到其它致病菌中,给人类带来危害,导致安全性问题进而限制了其工业化生产。我们可以进一步从分子水平对 MTG 进行修饰和改造,提高菌株的耐受性,提高生产效率和产品的安全性;通过酶学修饰和改造等方法对 MTG 进行修饰,进而提高酶的活性和催化效率、扩展应用范围。相信随着对 MTG 认识的不断深入,以及基因工程技术的不断发展,进一步提高 MTG 的产量将不会遥远。

参考文献

- [1] Zhang L, Zhang L, Yi H, et al. Enzymatic characterization of transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* DSM 40587 in high salt and effect of enzymatic cross-linking of yak milk proteins on functional properties of stirred yogurt [J]. *Journal of Dairy Science*, 2012, 95(7): 3559-3568.
- [2] Zhu Y, Tramper J. Novel applications for microbial transglutaminase beyond food processing [J]. *Trends in Biotechnology*, 2008, 26(10): 559-565.
- [3] 崔艳华, 张兰威. 谷氨酰胺转氨酶研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2009(1): 31-36.
- [4] Lorand L, Graham R M. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2003, 4(2): 140-156.
- [5] Zhang L, Zhang L, Yi H, et al. Enhancement of transglutaminase production in *Streptomyces mobaraensis* DSM 40587 by non-nutritional stress conditions; Effects of heat shock, alcohols, and salt treatments [J]. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 2011, 1-5.
- [6] Zhang L, Zhang L, Han X, et al. Enhancement of transglutaminase production in *Streptomyces mobaraensis* as achieved by treatment with excessive $MgCl_2$ [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 1-9.
- [7] Yan G, Du G, Li Y, et al. Enhancement of microbial transglutaminase production by *Streptomyces mobaraensis*: application of a two-stage agitation speed control strategy [J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40(2): 963-968.
- [8] Umakoshi M, Hirasawa T, Furusawa C, et al. Improving protein secretion of a transglutaminase-secreting *Corynebacterium glutamicum* recombinant strain on the basis of $^{13}C^m$ metabolic flux

- analysis [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2011, 112 (6) :595-601.
- [9] Liu S, Zhang D, 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.
- [10] Yu Y J, Wu S C, Chan H H, *et al.* Overproduction of soluble recombinant transglutaminase from *Streptomyces netropsis* in *Escherichia coli* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 81 (3) :523-532.
- [11] Takehana S, Washizu K, Ando K, *et al.* Chemical synthesis of the gene for microbial transglutaminase from *Streptovorticillium* and its expression in *Escherichia coli* [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1994, 58 (1) :88-92.
- [12] Kawai M, Takehana S, Takagi H. High - level expression of the chemically synthesized gene for microbial transglutaminase from *Streptovorticillium* in *Escherichia coli* [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1997, 61 (5) :830-835.
- [13] Yokoyama K, Nakamura N, Seguro K, *et al.* Overproduction of microbial transglutaminase in *Escherichia coli*, *in vitro* refolding, and characterization of the refolded form [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2000, 64 (6) :1263-1270.
- [14] Marx C K, Hertel T C, Pietzsch M. Soluble expression of a pro - transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* in *Escherichia coli* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 40 (6) :1543-1550.
- [15] Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli* [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 1999, 10 (5) :411-421.
- [16] 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.
- [17] Zotzel J, Keller P, Fuchsbaue H L. Transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* is activated by an endogenous metalloprotease [J]. *European Journal of Biochemistry*, 2003, 270 (15) :3214-3222.
- [18] Zotzel J, Pasternack R, Pelzer C, *et al.* Activated transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* is processed by a tripeptidyl aminopeptidase in the final step [J]. *European Journal of Biochemistry*, 2003, 270 (20) :4149-4155.
- [19] Yang H L, Pan L, Lin Y. Purification and on - column activation of a recombinant histidine - tagged pro - transglutaminase after soluble expression in *Escherichia coli* [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2009, 73 (11) :2531-2534.
- [20] Sommer C, Hertel T C, Schmelzer C E H, *et al.* Investigations on the activation of recombinant microbial pro - transglutaminase: in contrast to proteinase K, dispase removes the histidine - tag [J]. *Amino Acids*, 2012, 42 (2) :997-1006.
- [21] Marx C K, Hertel T C, Pietzsch M. Random mutagenesis of a recombinant microbial transglutaminase for the generation of thermostable and heat - sensitive variants [J]. *Journal of Biotechnology*, 2008, 136 (3) :156-162.
- [22] Kashiwagi T, Yokoyama K, Ishikawa K, *et al.* Crystal Structure of Microbial Transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277 (46) :44252-44260.
- [23] Buettner K, Hertel T C, Pietzsch M. Increased thermostability of microbial transglutaminase by combination of several hot spots evolved by random and saturation mutagenesis [J]. *Amino Acids*, 2012, 42 (2) :987-996.
- [24] Yamagata H, Nakahama K, Suzuki Y, *et al.* Use of *Bacillus brevis* for efficient synthesis and secretion of human epidermal growth factor [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1989, 86 (10) :3589.
- [25] Kikuchi Y, Date M, Yokoyama K I, *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* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69 (1) :358-366.
- [26] Date M, Yokoyama K I, Umezawa Y, *et al.* Production of native - type *Streptovorticillium mobaraense* transglutaminase in *Corynebacterium glutamicum* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69 (5) :3011-3014.
- [27] Date M, Yokoyama K - I, Umezawa Y, *et al.* High level expression of *Streptomyces mobaraensis* transglutaminase in *Corynebacterium glutamicum* using a chimeric pro - region from *Streptomyces cinnamoneus* transglutaminase [J]. *Journal of Biotechnology*, 2004, 110 (3) :219-226.
- [28] Itaya H, Kikuchi Y. Secretion of *Streptomyces mobaraensis* pro - transglutaminase by coryneform bacteria [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 78 (4) :621-625.
- [29] Kikuchi Y, Date M, Itaya H, *et al.* Functional analysis of the twin - arginine translocation pathway in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72 (11) :7183-7192.
- [30] Kikuchi Y, Itaya H, Date M, *et al.* Production of *Chryseobacterium proteolyticum* protein - glutaminase using the twin - arginine translocation pathway in *Corynebacterium glutamicum* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 78 (1) :67-74.
- [31] Lin Y - S, Chao M - L, Liu C - H, *et al.* Cloning and expression of the transglutaminase gene from *Streptovorticillium ladakanum* in *Streptomyces lividans* [J]. *Process Biochemistry*, 2004, 39 (5) :591-598.
- [32] Washizu K, Ando K, Koikeda S, *et al.* Molecular cloning of the gene for microbial transglutaminase from *Streptovorticillium* and its expression in *Streptomyces lividans* [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1994, 58 (1) :82.
- [33] Lin Y - S, Chao M - L, Liu C - H, *et al.* Cloning of the gene coding for transglutaminase from *Streptomyces platensis* and its expression in *Streptomyces lividans* [J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41 (3) :519-524.
- [34] Liu X, Yang X, Xie F, *et al.* Cloning of transglutaminase gene

方便米饭研究现状及问题应对探讨

冯叙桥^{1,2},段小明¹,宋立¹,张蓓¹,蔡茜彤¹,李萌萌¹,梁洁玉¹

(1.渤海大学食品科学研究院,辽宁省食品安全重点实验室,辽宁锦州 121013;

2.沈阳农业大学食品学院,辽宁沈阳 110866)

摘要:本文从方便米饭原料适应性、大米加工工艺、米饭老化、米饭品质改良剂、脱水米饭干燥工艺、米饭挥发性气味成分、米饭品质评价方法和米饭中淀粉体外消化特性等八方面对方便米饭的研究现状进行了概述,指出了方便米饭在研发中存在的问题并探讨其解决方法,展望了方便米饭的发展前景和趋势。

关键词:方便米饭,现状,问题,品质,老化

Status quo of advances on instant rice research and analysis on related problems

FENG Xu-qiao^{1,2}, DUAN Xiao-ming¹, SONG Li¹, ZHANG Bei¹, CAI Xi-tong¹, LI Meng-meng¹, LIANG Jie-yu¹

(1.Food Science Research Institute of Bohai University, Food Safety Key Lab of Liaoning Province, Jinzhou 121013, China;

2.College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: The research advances on the aspects of instant rice, including material adaptability, processing technology, rice retrogradation, agents for improving quality, rice dehydration technology, composition of rice volatile odor, methods of quality evaluation and *in vitro* digestibility of starch in cooked rice, were firstly reviewed and then problems regarding the development of instant rice were analyzed and their solutions were suggested. Furthermore, the development and trend of instant rice were prospected.

Key words: instant rice; present situation; problems; quality; retrogradation

中图分类号: TS213.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)17-0394-06

方便米饭是指由工业化大规模生产的,食用前只需做简单烹调或者直接可食用,外形、风味、口感与普通米饭一致的主食食品^[1]。美国早在“二战时期”就开始研制方便米饭,并将其作为军需食品;到了20世纪80年代初,日本和欧美国家的方便米饭生产设备已经较为成熟,生产的方便米饭也开始供应市场^[2]。不久后我国也引进发达国家方便米饭生产线,经过几十年的发展,出现了一些区域性的方便米饭品牌^[1-2]。方便米饭是中餐工业化生产中最重要的一种方便食品,与现有的方便面、饼干和面包等方便食品相比,具有营养、迎合以米饭为主食的人群等特点。但由于技术和设备的原因,方便米饭的生产和加工尚面临着成本高、感官品质不佳等问题,因

此,目前我国方便米饭的市场化程度并不高。本综述旨在阐述国内外方便米饭的研究现状,指出方便米饭研发中存在的一些问题,并针对这些问题探讨解决的方法和途径。

1 方便米饭的研究现状

1.1 方便米饭原料适应性研究

确定方便米饭适宜的生产原料有利于生产者获得品质良好的产品,是进行方便米饭生产首先要考虑的因素。大米品种、大米理化指标对方便米饭的食用品质有一定影响,表1列出了大米理化指标对不同种类方便米饭感官品质的影响及不同种类方便米饭对原料米的要求。从中可以看出,原料米的直链淀粉含量对多种方便米饭的品质影响显著;粳米更适合方便米饭的生产。

此外,大米预处理方法和采后因素也影响方便米饭的品质。Payakapol等^[3]研究了碾磨比率对泰国香米制得米饭质构品质和糊化度的影响,结果表明米饭的硬度、弹性、咀嚼性随着碾磨比率的增大而降

收稿日期:2013-03-20

作者简介:冯叙桥(1961-),男,博士,教授,研究方向:农产品加工与贮藏工程。

基金项目:渤海大学人才引进基金项目(BHU20120301)。

from *Streptomyces fradiae* and its enhanced expression in the original strain [J]. *Biotechnology Letters*, 2006, 28 (17): 1319-1325.

[35] 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]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2004, 68 (10): 2058-2069.

[36] 李寅,朱泰承,游丽金.表达谷氨酰胺转氨酶的重组菌及其应用.中华人民共和国:CN 101633897A [P], 2010, 1, 27.