



茂原链霉菌 XM4 的 TGase 酶学性质分析及其高产菌株的构建

修涵^{1,2#}, 李子龙^{2#}, 袁方^{3,4}, 李国莹⁴, 王为善^{2*}, 毛淑红^{1*}

1 天津科技大学 生物工程学院, 天津 300450

2 中国科学院微生物研究所, 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101

3 江南大学, 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

4 江苏一鸣生物股份有限公司, 江苏 泰兴 225400

修涵, 李子龙, 袁方, 李国莹, 王为善, 毛淑红. 茂原链霉菌 XM4 的 TGase 酶学性质分析及其高产菌株的构建[J]. 微生物学报, 2024, 64(10): 3735-3748.

XIU Han, LI Zilong, YUAN Fang, LI Guoying, WANG Weishan, MAO Shuhong. Enzymatic properties of TGase from *Streptomyces mobaraensis* XM4 and construction of a high-yield strain of TGase[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(10): 3735-3748.

摘要: 【目的】系统地分析茂原链霉菌 CGMCC 4.1851 (菌株 XM4)谷氨酰胺转氨酶(TGase)的酶学性质, 随后对该菌株进行改造以构建高产菌株, 实现 TGase 在链霉菌内高效表达并缩短发酵周期、提高 TGase 生产效率。【方法】通过测定发酵液 pH 和 TGase 研究菌株 XM4 的发酵特性, 采用醇沉结合离子层析纯化菌株 XM4 的 TGase, 测定酶的适宜反应条件(pH、温度、金属离子)和酶动力学等指标, 并通过结合酪蛋白交联实验评价其催化效率; 然后利用基因工程技术, 通过异源表达、替换核糖体结合位点(ribosome binding sites, RBS)提高改造原始菌株, 测定 TGase 产量。【结果】菌株 XM4 的 TGase 在 pH 4.0–11.0 范围内具有良好的活性和稳定性, 其中最适反应温度为 50 °C, 最适 pH 值为 10.0; 在改造后的表达系统中实现了 TGase 在链霉菌中的高效表达, 产量相较于原始菌株提升了 103.3%, 同时发酵时间缩短至 24 h。【结论】菌株 XM4 的 TGase 具有良好的耐酸碱性和热稳定性, 在食品工业特别是乳制品加工中具有广阔的应用前景。同时, 改造菌株可实现 TGase 的高效生产, 为 TGase 的工业化生产与应用提供了新的选择。

关键词: 茂原链霉菌; 谷氨酰胺转氨酶; 酪蛋白交联; 酶学特性; 食品工业

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFD2101403)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFD2101403).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. E-mail: WANG Weishan, wangws@im.ac.cn; MAO Shuhong, shuhongmao@tust.edu.cn

Received: 2024-03-22; Accepted: 2024-06-03; Published online: 2024-06-18

Enzymatic properties of TGase from *Streptomyces mobaraensis* XM4 and construction of a high-yield strain of TGase

XIU Han^{1,2#}, LI Zilong^{2#}, YUAN Fang^{3,4}, LI Guoying⁴, WANG Weishan^{2*}, MAO Shuhong^{1*}

1 School of Biological Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300450, China

2 State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

3 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

4 Jiangsu Yiming Biological Technology Co., Ltd., Taixing 225400, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] To systematically analyze the enzymatic properties of transglutaminase (TGase) from *Streptomyces mobaraensis* CGMCC 4.1851 (strain XM4) and subsequently develop a high-yielding strain by engineering for achieving efficient expression of TGase in *Streptomyces* with reduced fermentation duration and enhanced production efficiency. **[Methods]** The pH of the fermentation broth and TGase activity were measured to assess the fermentation characteristics of strain XM4. TGase from XM4 was purified by alcohol precipitation combined with ion-exchange chromatography. The reaction conditions (pH, temperature, metal ions) were optimized for the enzyme, and the enzymatic kinetics were tested. The catalytic efficiency was evaluated by casein cross-linking experiments. Subsequently, genetic engineering was employed to enhance the modified strain through heterologous expression and replacement of the ribosome-binding site (RBS), followed by measurement of TGase production. **[Results]** TGase from strain XM4 exhibited good activity and stability within the range of pH 4.0–11.0, with the highest activity at 50 °C and pH 10.0. The modification realized efficient expression of TGase in *S. mobaraensis*, increasing the production by 103.3% compared with the original strain and reducing the fermentation time to 24 h. **[Conclusion]** TGase from strain XM4 demonstrates excellent acid-base tolerance and thermal stability, demonstrating broad application prospects in the food industry, especially dairy processing. Additionally, the engineered strain enables efficient production of TGase, providing new options for the industrial production and application of TGase.

Keywords: *Streptomyces mobaraensis*; transglutaminase; casein cross-linking; enzymatic properties; food industry

谷氨酰胺转氨酶 (EC 2.3.2.13, transglutaminase, 全称 R-glutaminyl-peptide amine-g-glutamyl-transferase, 简称 TGase), 是一

类以形成异肽键 ϵ -(γ -谷氨酰基)-赖氨酸的方式催化肽或蛋白质伯胺之间的 γ -羧酰胺基团与酰胺基团发生酰基转移反应的酶。该酶可使蛋白质

或者多肽发生交联并形成稳定的蛋白质网络,在食品、生物医药、化妆品及纺织业等领域均有广泛的应用^[1-2]。尤其是在食品加工中, TGase 可以作为常用的交联剂催化蛋白质交联,提升食品感官特性及其功能性^[3]。例如, TGase 可提升意大利面烹调特性、优化其营养价值^[4]; 开发新型非肉蛋白复合凝胶模拟肉制品^[5]; 改善酸奶的口感及异味问题^[6]。

TGase 具有广阔的应用前景。目前,工业生产的 TGase 主要来源于动物与微生物,动物源 TGase 的生产面临着成本高昂、分离困难、生产力低下等难题。微生物源 TGase 主要通过重组大肠杆菌、葡萄球菌等进行生产^[7]。相比于动物来源,微生物来源的 TGase 具有非钙离子依赖性、底物特异性且催化效率高优势,同时其生产周期短,工艺简单且成本低^[2]。然而, TGase 的工业生产中仍存在酶活低、性能差、发酵周期长等问题^[7]。因此,筛选 TGase 优势菌株并改造建立高产菌株成为提高 TGase 产量、酶活和稳定性、降低成本的重要研究方向。通过分子手段,建立高效表达体系以提高 TGase 生产效率具有重要的研究价值。Washizu 等研究表明,异源表达、更换启动子、调整信号肽以及增加基因拷贝数等策略可有效提升链霉菌中 TGase 产量^[8],如 Liu 等优化启动子及密码子后提高了变铅青链霉菌(*Streptomyces lividans*)的 TGase 产量^[9],而 Liu 等则通过克隆弗拉迪氏链霉菌(*Streptomyces fradiae*)中的 TGase 基因大幅提高了 TGase 产量^[10]。此外, Yin 等使用随机突变和定向改造策略提高了茂原链霉菌(*Streptomyces mobaraensis*)的 TGase 产量^[11]。另一方面, Yokoyama 等和 Wang 等通过诱变和筛选系统获得了活性增强的 TGase 突变体,并结合人工二硫桥设计提高其热稳定性^[12-13]。同样, Wang 等还利用自由能变化,通过虚拟饱和诱变,获得了热稳定性明显提升的

TGm1 变体^[14]。因此,应用 TGase 原始优势菌株,通过基因工程改造,实现 TGase 高效表达是解决当前 TGase 生产水平低下的有效方案。

茂原链霉菌是 TGase 的主要生产源之一,其 TGase 活性范围为 0.28–3.40 U/mL^[2]。菌株的种类是影响 TGase 表达效率的重要因素之一。前期研究已揭示,茂原链霉菌(CGMCC 4.1851)具有较高的 TGase 表达能力(产生的酶具有耐热特性),可以作为原始优势菌株,具有重要的改造和优化价值。因此,本文研究了该菌株产 TGase 的能力,并对其酶学特性进行了系统的分析。进一步对其核糖体结合位点(ribosome binding sites, RBS)进行优化,通过异源表达的手段实现 TGase 在链霉菌内高效表达,显著缩短其发酵周期,为 TGase 的工业生产提供新的选择。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株和质粒

菌株 XM4 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心(保藏号: CGMCC 4.1851 T),工业菌购自江苏一鸣生物股份有限公司(保藏号: DSM 40587 T)。pSET156 为商业化载体,购自 Addgene 公司。

1.1.2 培养基

种子培养基(g/L):甘油 20.0,鱼蛋白胨 20.0,酵母粉 5.0, MgSO₄·7H₂O 2.0, K₂HPO₄·3H₂O 2.0, NaOH 调至 pH 7.0;

发酵培养基(g/L):甘油 20.0,大豆蛋白胨 75.0,酵母粉 5.0,玉米浆粉 5.5, (NH₄)₂SO₄ 5.5, MgSO₄·7H₂O 2.0, K₂HPO₄·3H₂O 2.0, H 料 10.0, NaOH 调至 pH 7.0。

本研究使用的所有试剂均为市售分析试剂。

1.1.3 引物

本研究所用引物均为北京擎科生物科技股份有限公司合成,序列见表 1。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primers name	Primer sequences (5'→3')
pSET-TGXM4-F	AGGATCCGCGGCCGCGCGCGATGGGTGGAGGGGAGCCGGGC
pSET-PtgB-R	GACATGATTACGAATTTCGATGTTTTGGAGCCGTGGTGTT
OE-156-TGXM4-SR41-F	GATCCTCTAAGTAAGGAGTAGGCTGATGCGCATAACGCCGAGAGC
OE-156-TGXM4-SR41-R	TACTCCTACTTAGAGGATCCTCGCTACGAGAAGTGATTAT
SR41-TGXM4-F	AATCACGACCCGTCCAGG
SR41-TGXM4-R	AAGATGAACGGCAGCACCC

1.2 菌株培养和粗酶制备

将菌株 XM4 接种于 ISP2 固体培养基上,置于 30 °C 培养箱活化培养 3 d, 活化后的 XM4 菌接种至种子培养基中进行摇瓶发酵, 条件设定为 30 °C、250 r/min。当菌体生物量的体积分数达到 12% 以上时, 接种到 5 L 发酵罐中。发酵每阶段进行定期采样, 测定样品的酶活性及蛋白质含量。

1.3 酶活性和蛋白质含量

TGase 活性测定方法基于特定底物 N-羧基苯甲酰基-L-谷氨酰胺-尼龙甘氨酸(N-CBZ-Gln-Gly)的转化。首先, 准备底物溶液, 其中包含 0.2 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 6.0)、0.1 mol/L 羟胺、0.01 mol/L 还原型谷胱甘肽和 0.15 mol/L N-CBZ-Gln-Gly。其次, 取 20 μL 经适当稀释的酶液加入到 200 μL 的底物溶液中, 混合后在 37 °C 条件下孵育 10 min。随后加入等体积的氯化铁三氯乙酸试剂(由 12% 盐酸、12% 三氯乙酸和 5% 三氯化铁在 0.1 mol/L 盐酸中混合而成)终止反应, 并在 10 000×g 下离心 5 min, 以沉淀未反应的底物和蛋白质。最后, 测定上清液在 525 nm 处的吸光度, 以 L-谷氨酸-γ-单羟肟酸酯作为标准品进行校准。定义 1 个单位(U)的 TGase 活性为每分钟转化 1 μmol 底物的量。

蛋白质含量测定采用 Bradford 法^[15], 以牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)为标准蛋白质。每毫克蛋白质的酶活性定义为比活性(U/mg)。

1.4 TGase 的纯化

发酵液 4 °C、5 000 r/min 离心 30 min 取上清, 缓慢搅拌向上清中加入预冷的 4 °C 乙醇至最终体积分数为 50%。混合物在 4 °C 下静置 30 min, 使 TGase 充分沉淀。4 °C、5 000 r/min 离心 30 min 收集沉淀中的 TGase, 随后在 PBS 缓冲液(50 mmol/L 的磷酸盐缓冲液, pH 6.0)中重新溶解, 加载到用 PBS 缓冲液预平衡的 Capto S 离子交换柱上。首先通过 PBS 缓冲液洗涤未结合的蛋白质, 其次使用 0.1 mol/L NaCl 浓度的洗脱缓冲液(50 mmol/L 的磷酸盐缓冲液, 1 mol/L NaCl, pH 6.0), 1 mL/min 的流速洗脱 TGase。最后利用 12% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析 TGase 纯度。电泳完成后, 凝胶染色(考马斯亮蓝 R-250)以清晰显示蛋白质条带。

1.5 TGase 的酶学性质及动力学参数测定

TGase 的最佳 pH 及稳定性根据在不同 pH 值缓冲液(pH 3.0–6.0, 0.2 mol/L 乙酸缓冲液; pH 6.0–10.0, 0.2 mol/L Tris-HCl 缓冲液; pH 11.0–12.0, 0.2 mol/L NaOH 缓冲液)中 TGase 活性进行测定。将 TGase 在相应的缓冲液中于 25 °C 孵育 2 h。孵育后, 直接在原有 pH 值下与底物溶液混合, 测定酶活性以评估 pH 稳定性。

TGase 的最佳温度及稳定性是根据最佳 pH 值, 在不同温度(4–65 °C)下的酶活性测定。通过将 TGase 在不同温度下预先孵育 2 h 测定酶活性以评估其稳定性。

动力学参数, 如米氏常数(K_m)和最大速率(V_{max}), 通过在反应混合物中使用不同浓度 N-CBZ-Gln-Gly (0–150 mmol/L) 进行测定, 利用 Prism 9 软件分析数据。所有测定中 TGase 使用浓度为 1 U/mL。

1.6 金属离子对 TGase 活性的影响

将 TGase (1 U/mL) 与各种金属离子(Ca^{2+} 、 K^+ 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Na^+ 和 Zn^{2+}) 在 37 °C 下孵育 10 min, 测定酶活性以评估残留 TGase 活性。相对活性以无添加剂条件下的样品酶活性为 100% 进行比较。

1.7 TGase 催化酪蛋白交联

在 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 4.0)中, 将酪蛋白溶解至最终浓度为 3 mg/mL, 并添加 TGase 至最终浓度为 1 U/mL。设定 40 °C 和 50 °C 两个不同的反应温度, 将反应混合物在设定温度下孵育, 并在 0、5、10、15、20、25 和 30 min 时间点取样。每次取样后, 立即煮沸样品 15 min 以终止反应。取煮沸后的样品进行 SDS-PAGE 分析, 评估酪蛋白的交联情况。

1.8 高产菌株 SR41 的构建

为获得高质量的模板 DNA, 使用氯仿法从菌株 XM4 中提取总 DNA。收集并悬浮 XM4 细胞于无菌环境中, 加入细胞裂解液和蛋白酶 K, 在室温下裂解细胞壁和细胞膜, 释放 DNA。通过加入等体积的苯酚-氯仿-异戊醇混合液(体积比为 25:24:1)进行抽提, 轻轻颠倒离心管数次后静置分层, 转移上层水相并重复此步骤以去除蛋白质。之后, 加入两倍体积的无水乙醇使 DNA 沉淀, 并转移至新管中。使用 70% 乙醇洗涤 DNA 沉淀, 去除杂质, 随后干燥沉淀。最后, 将干燥的 DNA 溶解于 TE 缓冲液中, 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳进行纯度和完整性检验, 并使用纳米光度计测定其浓度和纯度。

利用 PCR 扩增 XM4 菌 TGase 基因序列。引物为 pSET-TGXM4-F 和 pSET-PtgB-R (表 1)。PCR 反应体系(20 μ L): DNA 模板 1 μ L, 5 \times PCR 缓冲液 5 μ L, dNTPs 混合液(2.5 mmol/L) 1 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ L, 高保真 DNA 聚合酶(2 U/ μ L) 5 μ L, ddH₂O 7 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 2 min; 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。扩增产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检验, 并使用凝胶回收试剂盒回收目的条带。

选用 pSET156 作为表达载体, 通过酶切连接反应将扩增得到的 TGase 基因插入载体。载体和插入片段均使用相应的限制性内切酶进行酶切, 使用凝胶回收试剂盒纯化。连接反应采用 T4 DNA 连接酶, 在 16 °C 下过夜进行。连接产物通过转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞进行扩增, 并使用 LB 固体培养基筛选阳性克隆。筛选得到的阳性克隆通过菌落 PCR 和限制性酶切分析确认载体构建的正确性。最终, 通过测序验证插入序列的准确性。

设计包含 SR41 序列的引物 OE-156-TGXM4-SR41-F、OE-156-TGXM4-SR41-R (表 1), 将高响应的 SR41 序列(5'-tctaagtaaggagtaggctga-3')通过重组替换链霉菌工业底盘菌株 Δ TG (*S. mobaraensis* DSM 40587 缺失 tg, 本课题组构建)中原有的 RBS。将构建成功的接合子培养至生长旺盛期。随后, 6 000 r/min 离心 5 min 收集细胞, 洗涤细胞沉淀去除多余的培养基, 重复此洗涤步骤 2–3 次。将洗涤后的大肠杆菌 JM109 和链霉菌 Δ TG 细胞按 1:1 的比例混合, 然后将混合细胞涂布于有 Apramycin 抗性的 ISP4 固体培养基上, 30 °C 培养 24–48 h。利用其抗性基因筛选成功接合的 SR41 改造菌。最后, 通过 PCR 与测序对筛选出的 SR41 改造菌进行验证, 确认目标基因已成功转移并整合到链霉菌的基因组中。

2 结果与分析

2.1 菌株 XM4 发酵特征及产 TGase 的研究

菌株 XM4 可作为产 TGase 的优势原始菌株进一步开发, 有望提高 TGase 的生产效率。了解菌株的发酵特征, 对 TGase 的大规模生产以及菌株优势的合理利用具有指导意义。然而, 菌株 XM4 的发酵特征还不明确。因此, 需要对 XM4 的发酵特征进行研究, 包括发酵 50 h 内发酵液的 pH 变化和发酵上清液 TGase 的活性测定。结果如图 1 所示, TGase 活性随发酵时间呈现先上升后下降的总体趋势。在 0–10 h, 发酵液中 TGase 活性极低, 此时菌株 XM4 正在表达 TGase 前体形式(Pro-TG)。从第 10 h 开始, 发酵液的 TGase 活性显著上升($P < 0.05$), 至 28 h 左右达到最高值, 最高酶活为 3.97 U/mL, 比活力为 9.93 U/mg。表明发酵第 10 h 时 Pro-TG 开始向成熟 TGase 转化, 使 TGase 的产量迅速增加。28–34 h 左右, TGase 活性趋于平稳, 随后开始下降。约 44 h 后, 可能由于发酵液中营养枯竭或副产物积累, 使 TGase 活性急剧下降。从图 1 中进一步发现, 0–22 h 发酵液的 pH 呈现缓慢下降趋势, 而在 22–26 h 发酵液 pH 大幅降低。如前所述, 此阶段 TGase 活性显著提高, 表明 Pro-TG 正快速向成熟 TGase 转化。第 26 h 发酵

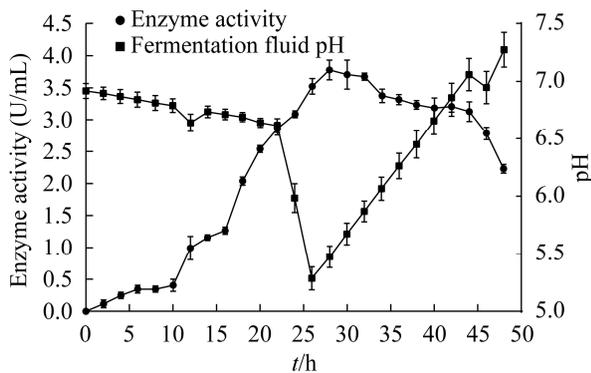


图 1 菌株 XM4 TGase 发酵进程

Figure 1 Fermentation process for Tgase production by the XM4 Strain.

液 pH 开始回升, 而第 28 h TGase 活性达到最高并平稳, 说明 TGase 活性相比 pH 存在约 2 h 的滞后性。

对菌株 XM4 的发酵特征进行研究后, 继续对其发酵代谢产物 TGase 进行分析。TGase 以 Pro-TG 分泌到胞外, 在胞外进行切割产生成熟的 TGase。对该菌株发酵不同时间段的发酵上清液进行蛋白凝胶电泳, 如图 2 所示, 发酵 10 h 内, 发酵液中无 Pro-TG 与 TGase 存在。10–27 h 之间, 同时观察到 45 kDa 和 38 kDa 蛋白条带, 分别对应 Pro-TG 与 TGase, 表明此时正在进行成熟 TGase 的转化。29 h 时, 仅存在单一 TGase 条带, 发酵液中已经无 Pro-TG 存在, 表明发酵上清液中的 Pro-TG 全部转化为成熟的 TGase。

2.2 TGase 的纯化

TGase 的分离纯化是实现其工业化生产和应用的关键步骤。因此, 本研究建立了发酵液中 TGase 的纯化方法。当 TGase 达到最高浓度时, 收集发酵上清液, 采取先醇沉粗提, 后离子交换的方法纯化 XM4 菌 TGase, 通过 SDS-PAGE 分析确定实验参数。首先, 比较不同浓度乙醇的醇沉效果, 结果如图 3 所示, 成熟 TGase 的分子量为 38 kDa, 利用 50%乙醇沉淀和在 50%乙醇沉淀基础上再次进行 70%乙醇沉淀, 均可得到大量的 TGase, 2 次乙醇沉淀虽然可以保留更多的 TGase (图 3, 泳道 5), 但与 50%乙醇单次沉淀(图 3, 泳道 3)相比, 杂蛋白并未减少。因此, 考虑到纯化成本, 本研究选用 50%乙醇作为 XM4 菌 TGase 的提取液。

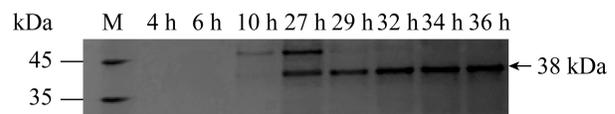


图 2 菌株 XM4 胞外蛋白的 SDS-PAGE 分析

Figure 2 SDS-PAGE analysis of the extracellular proteins of XM4 strain. M: Marker.

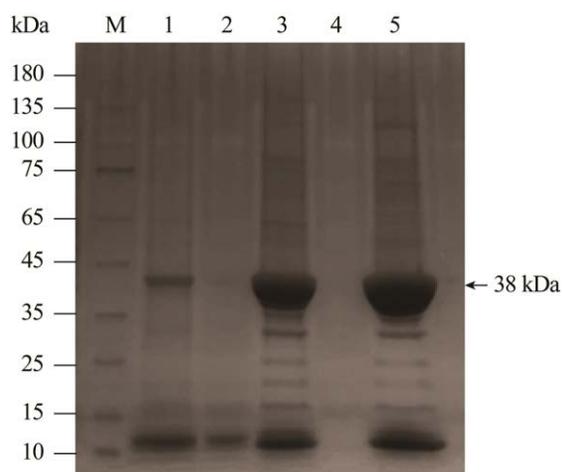


图 3 粗酶提纯 SDS-PAGE M: 标准蛋白; 1: 发酵液; 2: 50%乙醇沉淀上清液; 3: 50%乙醇沉淀蛋白质; 4: 50%乙醇沉淀后再次进行 70%乙醇沉淀上清液; 5: 50%乙醇沉淀后再次进行 70%乙醇沉淀蛋白

Figure 3 SDS-PAGE of crude enzyme purification. M: Protein marker; 1: Fermentation broth stock; 2: 50% (V/V) ethanol precipitated supernatant; 3: 50% (V/V) ethanolprecipitated protein; 4: 50% (V/V) ethanol precipitated protein and then 70% (V/V) ethanol precipitated supernatant was used; 5: 50% (V/V) ethanol precipitated protein and then 70% (V/V) ethanol precipitated protein was used.

此外,离子交换柱是影响蛋白质洗脱效率的重要因素之一,而且离子交换柱种类多样。其中 Capto S 与 SP70,为强阳离子交换柱; Capto MMC,为耐盐-弱阳离子交换柱。因此,本研究对比了以上 3 种不同离子交换柱对菌株 XM4TGase 的洗脱效果,以进一步纯化 TGase。

表 2 菌株 XM4 的 TGase 纯化产量

Table 2 Purification yield of TGase from XM4 strain

Steps	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Culture filtrate	4 743.75	11 913	2.51	1.00	100.0
Ethanol precipitate	1 364.34	10 359	7.59	3.02	87.0
Capto S	113.81	2 851	25.05	9.98	23.9
SP70	90.31	1 427	15.80	2.08	12.0
Capto MMC	194.25	1 605	8.26	0.33	13.5

如图 4 所示, Capto S 纯化效果最好,利用 0.1 mol/L NaCl 洗脱液即可完全洗脱 TGase,比活力为 25.05 U/mg。Capto MMC 虽然也获得了单一条带,但在约 0.6 mol/L NaCl 浓度下才能完全洗脱,比活力仅为 8.26 U/mg,推测高盐浓度可能使 TGase 失活^[16]。SP70 虽然同为强阳离子交换柱,但在 0.1 mol/L NaCl 浓度下并不能得到纯净的 TGase,需要进行 2 次离子交换层析,步骤烦琐。因此,本研究采用 Capto S 离子交换柱对粗酶进一步纯化。

表 2 展示了 3 种离子交换柱纯化 TGase 的效果。采取乙醇沉淀结合离子交换层析的策略,此

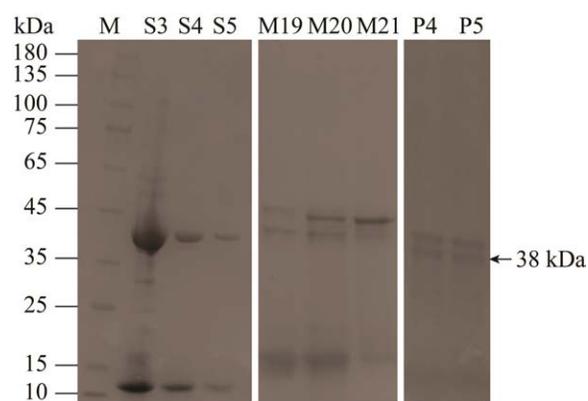


图 4 不同离子交换柱效果对比 M: 标准蛋白; S3、S4 和 S5: Capto S; M19、M20 和 M21: Capto MMC; P4 和 P5: SP70

Figure 4 Comparison of the effect of different ion exchange columns. M: Protein marker; S3, S4, and S5: Capto S; M19, M20, and M21: Capto MMC; P4 and P5: SP70.

纯化方法仅需进行 1 次操作就能成功获得纯净的 TGase, 极大地优化其纯化过程。使用此方法纯化菌株 XM4 获得的 TGase 比活力为 25.05 U/mg, 并且乙醇沉淀发酵上清液的回收率高达 87.0%。

通过上述一系列操作, 最终可以确定 50% 乙醇结合 Capto S 离子交换层析, 可以将发酵上清液中的 TGase 纯化, 回收率可达 23.9%。

2.3 TGase 的最适 pH 及 pH 稳定性

pH 是食品加工中的控制关键点之一。TGase 的 pH 适用范围及稳定性, 对其在食品加工中的应用具有决定性作用。因此, 本研究对纯化得到的菌株 XM4 的 TGase 的适宜反应 pH 进行分析。由图 5A 可知, 菌株 XM4 和工业菌株的 TGase 最适 pH 分别为 10.0 和 6.0, 二者在酸性到碱性范围内(pH 4.0–10.0)具有较高活性(>80%)。这一结果表明 2 种 TGase 在不同 pH 条件下的适应性差异, 为食品加工和其他应用中酶的选择提供了重要的参考依据。

进一步研究菌株 XM4 的 TGase 和工业菌 TGase 的 pH 稳定性, 结果见图 5B, 在 pH 6.0–9.0 时, 2 种 TGase 放置 2 h 后均保持较高(80%以上)的活性。在此范围外, 即 pH 为 4.0、5.0 和 10.0 时的极端条件下, 菌株 XM4 的 TGase 在孵育 2 h 后残余活性分别为 74.60%、78.18%、96.59%,

比工业菌 TGase 具有更高的 pH 稳定性, 相对活性高出 20%–40%。

食品加工中, pH 影响鱼糜蛋白质的溶解性、凝胶形成能力和最终产品的质地。因此, 鱼糜制品的加工需要严格控制 pH 值。鱼肉蛋白在接近其等电点时(pH 5.5–6.0)凝胶性最强。以上结果显示, 相比于工业菌的 TGase, 菌株 XM4 的 TGase 在广泛的 pH 范围内具有更高的活性。菌株 XM4 的 TGase 在鱼糜食品加工中具有更好的应用潜力。

2.4 TGase 的最佳温度及温度稳定性

除 pH 外, 温度也是食品加工中的控制关键点, TGase 的适用温度范围及热稳定性决定了其在食品加工中的应用性。因此, 本研究同样对菌株 XM4 的 TGase 适宜反应温度进行分析。如图 6A 所示, 源于菌株 XM4 和工业菌的 TGase 最佳反应温度均为 50 °C。在 37–50 °C, 来源于菌株 XM4 的 TGase 具有比工业菌 TGase 更高的活性, 其中在 37 °C 和 40 °C 时, 比工业菌 TGase 的活性高约 20%。当温度超过 50 °C 时, 源于菌株 XM4 的 TGase 和工业菌的 TGase 活性均急剧下降。菌株 XM4 的 TGase 在 37–50 °C 范围内具有良好活性, 使其特别适用于需要温度控制的食物加工过程, 如提高面团的强度和改善肉制品的质感。

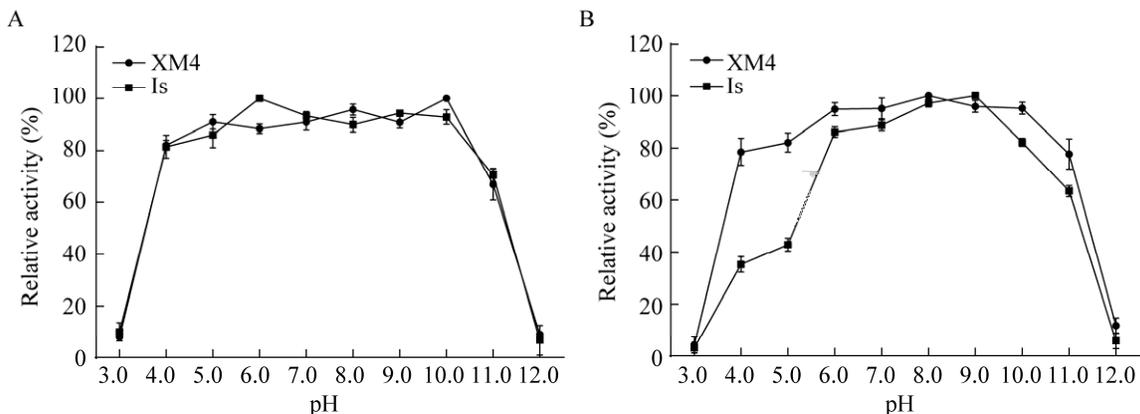


图 5 TGase 的最适 pH (A) 和 pH 稳定性 (B)

Figure 5 Optimal pH (A) and pH stability (B) of TGase. Is: Industrial strain.

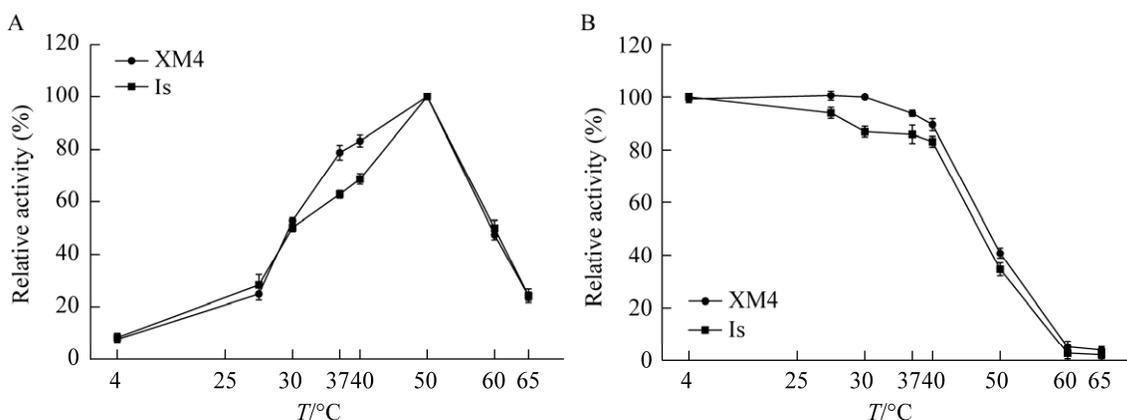


图 6 TGase 的最适温度(A)和热稳定性(B)

Figure 6 Optimal temperature (A) and temperature stability (B) of TGase.

进一步研究两种 TGase 的热稳定性。如图 6B 所示, 在 4–40 °C 范围内, 菌株 XM4 和工业菌株的 TGase 均较稳定, 经 2 h 孵育后仍保留了 80% 以上的活性。在 30 °C 和 37 °C 孵育 2 h 后, 菌株 XM4 的 TGase 活性分别保留了 100.00% 和 93.49%, 相对于工业菌株的 TGase 活性分别高出 11.34% 和 7.19%。菌株 XM4 的 TGase 因其良好的热稳定性, 比工业菌株 TGase 更好地维持其催化活性, 从而保证产品质量和加工效率。

2.5 金属离子对 TGase 活性的影响

金属离子是影响微生物 TGase 活性的重要因素之一。金属离子可以通过与酶的活性中心或者底物结合, 改变酶的立体构型, 从而影响其催化活性。如表 3 所示, 低浓度(1 mmol/L) Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Fe^{3+} 明显抑制了 XM4 菌 TGase 活性, 分别导致其活性降低了 38.76%、10.05%、19.62% 和 67.20%, 而当浓度为 5 mmol/L 时, 菌株 XM4 的 TGase 活性分别降低了 91.50%、9.95%、53.64% 和 83.98%。工业菌 TGase 活性同样受到 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Fe^{3+} 的抑制。除此之外, 工业菌 TGase 还受到 Mg^{2+} 、 K^{+} 、 Ca^{2+} 抑制, 1 mmol/L 浓度时其活性分别降低了 33.02%、11.32% 和 28.47%, 而 5 mmol/L 浓度时分别降低

了 29.86%、12.08% 和 22.12%。相比之下, 相同浓度的 Mg^{2+} 、 K^{+} 、 Ca^{2+} 对菌株 XM4 的 TGase 活性的影响较小。相同浓度的 Na^{+} 对两种来源的 TGase 活性有轻微的促进作用, Na^{+} 可能诱导酶的构象发生改变, 暴露出半胱氨酸活性基团, 从而促进了酶与底物的结合。

表 3 金属离子对 TGase 活性的影响

Table 3 The effect of metal ions on TGase activity

Metal ion	Relative activity (%)	
	XM4	Is
None	100.00	100.00
1 mmol/L $ZnCl_2$	61.24	82.72
5 mmol/L $ZnCl_2$	8.50	53.39
1 mmol/L $MgCl_2$	96.65	66.98
5 mmol/L $MgCl_2$	90.05	70.14
1 mmol/L $CuCl_2$	89.95	90.61
5 mmol/L $CuCl_2$	2.91	7.30
1 mmol/L KCl	99.04	88.68
5 mmol/L KCl	97.09	87.92
1 mmol/L $CaCl_2$	94.98	71.53
5 mmol/L $CaCl_2$	92.57	77.88
1 mmol/L NaCl	98.56	104.23
5 mmol/L NaCl	103.40	106.67
1 mmol/L $MnCl_2$	80.38	56.19
5 mmol/L $MnCl_2$	46.36	47.57
1 mmol/L $FeCl_3$	32.80	21.39
5 mmol/L $FeCl_3$	16.02	2.71

2.6 TGase 酶动力学参数的测定

对菌株 XM4 的 TGase 酶动力学参数进行测定,结果见表 4。由表 4 可知,菌株 XM4 的 TGase 的 K_m 值为 56.62 mmol/L, 而工业菌 TGase 的 K_m 值为 21.80 mmol/L, 相比之下工业菌 TGase 显示出更高的底物亲和力。 V_{max} 值显示菌株 XM4 的 TGase 最大反应速率为 0.182 $\mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{min})$, 而工业菌的 V_{max} 为 0.044 $\mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{min})$, 表明菌株 XM4 的 TGase 催化效率更高。比活性常数 (k_{cat}/K_m) 结合了酶的转化数 (k_{cat}) 和亲和力 (K_m), 是衡量酶效率的指标。菌株 XM4dTGase 在单位时间内转化单位浓度底物的效率远高于工业菌 TGase。

2.7 TGase 催化酪蛋白交联

TGase 催化酪蛋白交联的作用研究有助于乳制品加工技术的提升,同时也为食品科学领域中蛋白质交联剂的开发提供理论依据。如图 7 所示,在 40 °C 环境下, XM4 菌 TGase 交联酪蛋

白所需时间为 20 min, 工业菌 TGase 需 40 min 才能完全交联。在 50 °C 环境下, XM4 菌 TGase 交联酪蛋白时间为 15 min, 工业菌 TGase 为 20 min。这一结果表明 XM4 菌 TGase 具有优异的催化效率, 尤其是在 40 °C 环境下, 可大幅缩减工业生产时间。

2.8 高产菌株 SR41 构建及表达

研究已表明 XM4 菌 TGase 酶学特性优于工业菌 TGase。野生菌株中 TGase 的产量受限于宿主细胞的表达水平, 同时在实际生产中存在发酵周期长的问题。因此, 为了缩短发酵时间, 提高生产效率并降低 TGase 生产成本, 可利用基因

表 4 菌株 XM4 酶动力学参数

Strain	K_m (mmol/L)	V_{max} [$\mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{min})$]	k_{cat}/K_m [$\text{L}/(\text{mol}\cdot\text{s})$]
XM4	56.62	0.182	431
Is	21.80	0.044	174

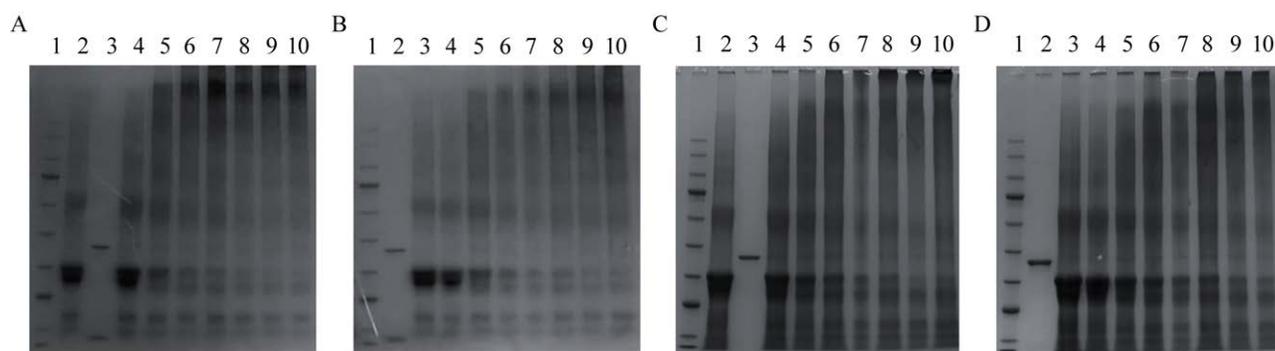


图 7 TGase 催化交联酪蛋白效果

Figure 7 The effect of TGase catalysis on the crosslinking of casein. A: Cross-linking of TGase with casein at 50 °C. 1: Standard protein; 2: Casein (3 mg/mL); 3: XM4 strain TGase (1 U/mL); 4–10: XM4 strain TGase cross-linked with casein 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 min. B: Cross-linking of TGase with casein at 40 °C. 1: Standard protein; 2: XM4 strain TGase (1 U/mL); 3: Casein (3 mg/mL); 4–10: XM4 strain TGase cross-linked with casein 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 min. C: Cross-linking of TGase with casein at 50 °C. 1: Standard protein; 2: Industrial strain TGase (1 U/mL); 3: Casein (3 mg/mL); 4–10: Industrial strain TGase cross-linked with casein 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 min. D: Cross-linking of TGase with casein at 40 °C. 1: Standard protein; 2: Industrial strain TGase (1 U/mL); 3: Casein (3 mg/mL); 4–10: Industrial strain TGase cross-linked with casein 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 min.

工程手段对 XM4 菌进行改造。如图 8 所示, 构建了 TGase 表达质粒 pSET156-TGXM4-RBS (SR41)。通过替换 RBS 来增强 TGase 在链霉菌中的表达效率, 将具有高响应的 RBS 序列 SR41, 替换到原有 TGXM4 基因上游的 RBS 区。构建完成后, 将表达质粒 pSET156-TGXM4-RBS (SR41) 转入 Δ TG 链霉菌底盘宿主中, 利用发酵工艺进行 TGase 的表达和生产。

提高微生物系统的 TGase 生产效率对于工业生产具有重要的经济价值。如图 9 所示, 通过

对 SR41 序列进行精确的改造, 发现在整个发酵过程中, TGase 的活性得到了显著提升 ($P < 0.05$)。具体而言, SR41 表达系统在发酵初期就能快速达到酶活性的峰值, 高达 8.07 U/mL, 比原始菌株 XM4 发酵液中的最高酶活性提高了 103.3%, 体现出改造后表达系统的高效性。

如图 10 所示, 通过 SDS-PAGE 进一步分析原始菌株 XM4 与改造菌株 SR41 的蛋白表达水平差异。与图 9 中活性测定结果一致, 改造菌株 SR41 的发酵上清液中 TGase 蛋白浓度明显增加,

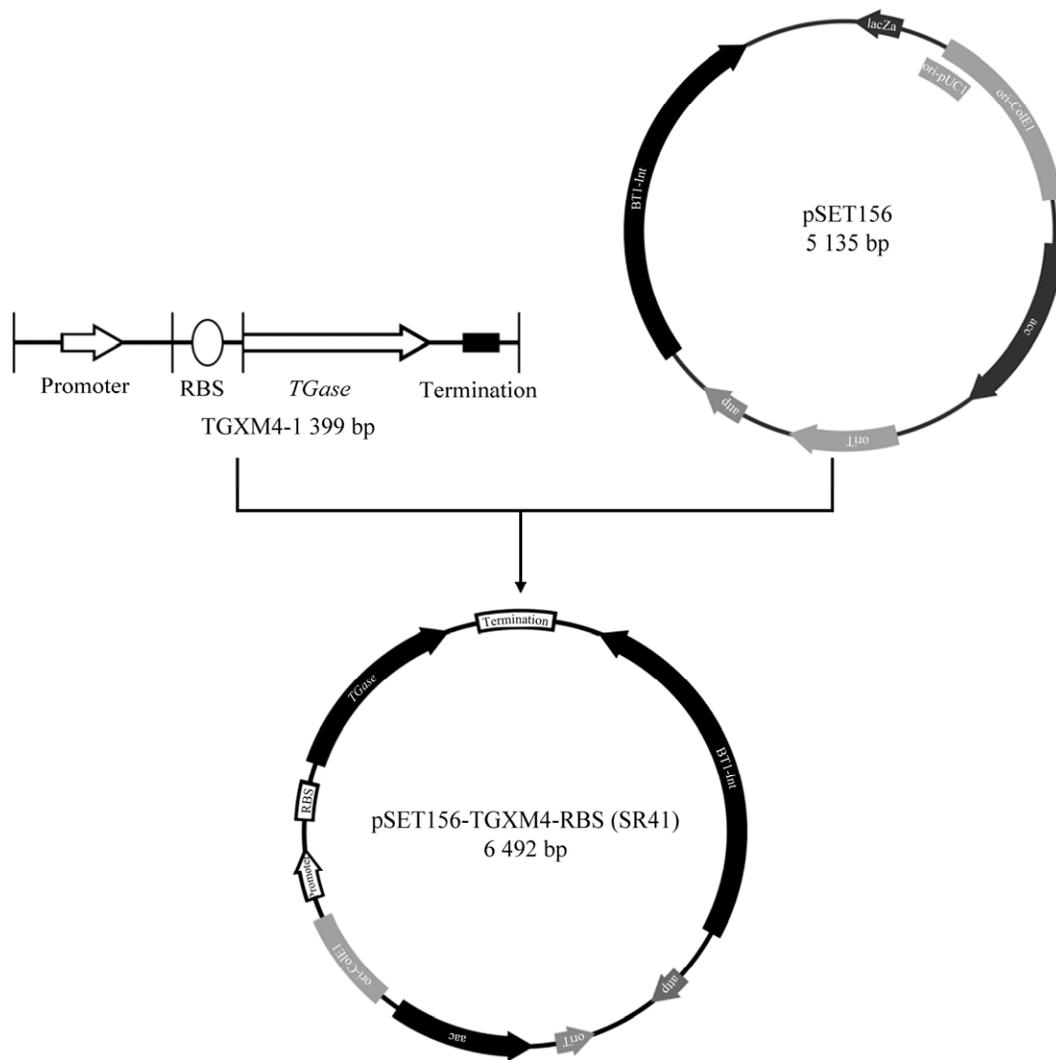


图 8 构建 TGase 表达质粒 pSET156-TGXM4-RBS (SR41)

Figure 8 Construction of TGase expression plasmid pSET156-TGXM4-RBS (SR41).

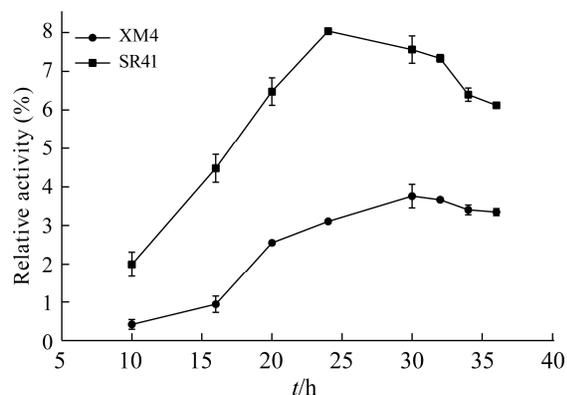


图9 SR41与XM4菌株TGase活性对比

Figure 9 Comparison of TGase activity between SR41 and XM4 strains.

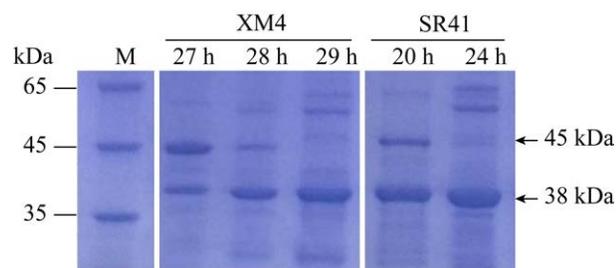


图10 SDS-PAGE分析SR41与XM4菌中的TGase

Figure 10 SDS-PAGE analysis of TGase in SR41 and XM4. M: Protein marker; XM4: TGXM4; SR41: pSET156-TGXM4-RBS.

其蛋白浓度为 0.5 mg/mL, 产量达到 16.14 U/mg, 与原始菌株 XM4 的 TGase 相比提高了 1.6 倍。通过 SR41 优化后的表达系统, Pro-TG 的有效转化仅需 24 h。以上数据表明, 改造 RBS 提高链霉菌 TGase 的产量具有可行性。

3 讨论与结论

茂原链霉菌作为 TGase 的主要生产源, 其 TGase 活性范围为 0.28–3.40 U/mL^[2]。本研究通过发酵特性研究, 发现一株茂原链霉菌可产 TGase, 其 TGase 活性高达 3.97 U/mL, 因此具备开发潜力, 命名为 XM4。为评估其工业应用

潜力, 对菌株 XM4 产生的 TGase 进行一系列酶学特性分析, 并与工业菌 TGase 的酶学性质进行比较。结果表明, 在 pH 4.0–10.0 范围内, 菌株 XM4 来源的 TGase 能维持 80% 以上活性, 并在 pH 4.0 和 5.0 环境下活性超出工业菌 TGase 活性的 20%–40%。在实际食品加工中, 工业菌 TGase 在酸性基质中易失活^[17], 而菌株 XM4 TGase 则可以弥补这一缺陷, 应用于酸性条件的食品加工。另一方面, 在 37–55 °C 条件下, XM4 菌 TGase 活性高于工业菌 TGase, 具有良好的热稳定性。

链霉菌生产 TGase 发酵时间长, 需要严格把控发酵时间, 避免由于时间过长导致酶降解, 因此 TGase 生产成本较高^[18]。据 Fuchsbaauer 等^[19]对近 30 年链霉菌提取 TGase 的研究, 当 *S. mobaraensis* DSM 40847 摇瓶发酵时, Pro-TG 激活在 35–45 h 后开始, 通常需 2 d 才能全部转化为成熟酶, 并且培养超过 70–90 h 会引起 TGase 降解, 丧失酶活性。因此, 寻找产 TGase 的优势链霉菌原始菌株, 并对其进行基因工程改造, 从而开发缩短发酵时长的 TGase 高产菌株, 具有重要的现实意义。Yin 等^[11]和 Huang 等^[20]研究的诱导突变菌株也在 80 h 和 32 h 才能完全转化为成熟酶。本研究的结果表明, XM4 菌发酵时间短, 仅需 29 h 即可完成 TGase 成熟酶转化并达到最高酶活, 与传统菌株(70 h)相比, 缩短至少 40 h^[21], 具有开发价值。因此, 对 XM4 菌进行基因工程改造研究。结合 Liu 等^[10]通过组成型强启动子“ermE up”驱动, 实现 TGase 活性提高 1.3 倍的研究, 本研究进一步探索 RBS 在调节 TGase 表达中的作用。众所周知, 在细菌中 RBS 是有效的翻译起始和蛋白表达控制元件^[22–23]。根据 Bai 等鉴定的 192 个 RBS 响应水平研究^[24], 本研究将响应最强的 RBS(SR41)替代 XM4 菌 RBS。替换后, XM4 菌的发酵周期由 29 h 缩短为 24 h,

TGase 活性比原始菌株 (3.97 U/mL) 提高了 103.3%, 达到 8.07 U/mL。SR41 改造菌株不仅可以缩短发酵时间, 还可以提高链霉菌 TGase 的产量, 在提高 TGase 生产效率并降低其生产成本^[18] 方面优势显著。

在 40 °C 和 pH 4.0 条件下, XM4 菌 TGase 保留了 89.21% 活性, 具有良好的耐酸性和高效的蛋白质交联能力。在乳制品加工, 尤其是酸奶发酵中, 具有重要的应用价值。Al-Shawk 等^[25] 的研究表明添加 TGase 能显著改善酸奶的理化特性和感官评价。然而, 在传统的酸奶生产发酵过程中 pH 值持续降低^[26], 这对功能性添加剂的稳定性和活性具有负面影响^[27-29]。然而, 耐酸性的 XM4 菌 TGase 可以应用于乳品加工, 能够在较低 pH 条件下有效促进蛋白质交联, 进而改善酸奶的质地、减少水分分离析现象, 并可能提高最终产品的整体感官接受度。耐酸性的 XM4 菌 TGase, 对于提升发酵乳制品的加工和品质提供了新的选择, 这有助于开发出更具竞争力和消费者喜爱的高品质发酵乳制品。

综上所述, 本研究系统地研究了优势原始菌株——XM4 菌的 TGase 酶学性质, 其优越的耐酸性进一步提升了 TGase 与酪蛋白交联的应用价值。利用异源表达技术和优化 RBS 的基因工程策略, 成功构建高产 TGase 菌株 SR41, 使 XM4 菌 TGase 产量显著提升 103.3%, 同时将发酵周期缩短至 24 h。本研究不仅提高了 TGase 的产量和生产效率, 也为利用基因工程优化 TGase 表达提供新的策略和途径。

参考文献

[1] GASPARGALC, de GÓES-FAVONI SP. Action of microbial transglutaminase (MTGase) in the modification of food proteins: a review[J]. Food Chemistry, 2015, 171: 315-322.

[2] KIELISZEK M, MISIEWICZ A. Microbial

transglutaminase and its application in the food industry. a review[J]. Folia Microbiologica, 2014, 59: 241-250.

[3] LIU J, XIE HP, GAO Y, ZHU YD, ZHAO HF, ZHANG BL. Soybean protein isolate treated with transglutaminase (TGase) enhances the heat tolerance of selected lactic acid bacteria strains to spray drying[J]. Food Chemistry, 2023, 404: 134676.

[4] GHARIBZAHEDI SMT, YOUSEFI S, CHRONAKIS IS. Microbial transglutaminase in noodle and pasta processing[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2019, 59(2): 313-327.

[5] WU MG, YIN Q, BIAN JJ, XU YY, GU C, JIAO JY, YANG JJ, ZHANG YL. Effects of transglutaminase on myofibrillar protein composite gels with addition of non-meat protein emulsion[J]. Gels, 2023, 9(11): 910.

[6] ZHANG L, ZHANG L, YI H, DU M, MA C, HAN X, FENG Z, JIAO Y, ZHANG Y. 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.

[7] WANG LM, YU B, WANG RX, XIE JC. Biotechnological routes for transglutaminase production: recent achievements, perspectives and limits[J]. Trends in Food Science & Technology, 2018, 81: 116-120.

[8] WASHIZU K, ANDO K, KOIKEDA S, HIROSE S, MATSUURA A, TAKAGI H, MOTOKI M, TAKEUCHI K. Molecular cloning of the gene for microbial transglutaminase from *Streptovorticillium* and its expression in *Streptomyces lividans*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1994, 58(1): 82-87.

[9] LIU S, WANG M, DU GC, CHEN J. Improving the active expression of transglutaminase in *Streptomyces lividans* by promoter engineering and codon optimization[J]. BMC Biotechnology, 2016, 16: 1-9.

[10] LIU XQ, YANG XQ, XIE FH, QIAN SJ. Cloning of transglutaminase gene from *Streptomyces fradiae* and its enhanced expression in the original strain[J]. Biotechnology Letters, 2006, 28: 1319-1325.

[11] YIN XQ, LI YY, ZHOU JW, RAO SQ, DU GC, CHEN J, LIU S. Enhanced production of transglutaminase in *Streptomyces mobaraensis* through random mutagenesis and site-directed genetic modification[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(10): 3144-3153.

- [12] YOKOYAMA K, OGAYA D, UTSUMI H, SUZUKI M, KASHIWAGI T, SUZUKI E, TAGUCHI S. Effect of introducing a disulfide bridge on the thermostability of microbial transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105: 2737-2745.
- [13] WANG HJ, CHEN HQ, LI QB, YU F, YAN YR, LIU S, TIAN J, TAN JX. Enhancing the thermostability of transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* based on the rational design of a disulfide bond[J]. *Protein Expression and Purification*, 2022, 195: 106079.
- [14] WANG XL, DU JH, ZHAO BC, WANG HY, RAO SQ, DU GC, ZHOU JW, CHEN J, LIU S. Significantly improving the thermostability and catalytic efficiency of *Streptomyces mobaraensis* transglutaminase through combined rational design[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(50): 15268-15278.
- [15] BRADFORD MM. 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(1-2): 248-254.
- [16] STRUCTURAL GENOMICS C, CHINA STRUCTURAL GENOMICS C, NORTHEAST STRUCTURAL GENOMICS C, GRÄSLUND S, NORDLUND P, WEIGELT J, HALLBERG BM, BRAY J, GILEADI O, KNAPP S, OPPERMANN U, ARROWSMITH C, HUI R, MING J, DHE-PAGANON S, PARK HW, SAVCHENKO A, YEE A, EDWARDS A, VINCENNELLI R, et al. Protein production and purification[J]. *Nature Methods*, 2008, 5(2): 135-146.
- [17] RAAK N, ROHM H, JAROS D. Enzymatic cross-linking of casein facilitates gel structure weakening induced by overacidification[J]. *Food Biophysics*, 2017, 12: 261-268.
- [18] CHEN GQ, LIU XY. On the future fermentation[J]. *Microbial Biotechnology*, 2021, 14(1): 18-21.
- [19] FUCHSBAUER HL Approaching transglutaminase from *Streptomyces* bacteria over three decades[J]. *The FEBS Journal*, 2022, 289(16): 4680-4703.
- [20] HUANG YM, JIN MF, YAN WJ, WU QH, NIU YN, ZOU CJ, JIA CF, CHANG ZY, HUANG J, JIANG DM, GAO HL. A point mutant in the promoter of transglutaminase gene dramatically increased yield of microbial transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* TX1[J]. *Process Biochemistry*, 2022, 112: 92-97.
- [21] ANDO H, ADACHI M, UMEDA K, MATSUURA A, NONAKA M, UCHIO R, TANAKA H, MOTOKI M. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1989, 53(10): 2613-2617.
- [22] SALIS HM, MIRSKY EA, VOIGT CA. Automated design of synthetic ribosome binding sites to control protein expression[J]. *Nature Biotechnology*, 2009, 27: 946-950.
- [23] DING NN, YUAN ZQ, ZHANG XJ, CHEN J, ZHOU SH, DENG Y. Programmable cross-ribosome-binding sites to fine-tune the dynamic range of transcription factor-based biosensor[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(18): 10602-10613.
- [24] BAI CX, ZHANG Y, ZHAO XJ, HU YL, XIANG SH, MIAO J, LOU CB, ZHANG LX. Exploiting a precise design of universal synthetic modular regulatory elements to unlock the microbial natural products in *Streptomyces*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(39): 12181-12186.
- [25] AL-SHAWK EH, AL-TAI AAA, HUSSAIN MH. Effect of addition of transglutaminase enzyme and whey proteins on the physiochemical and sensory properties of yogurt[J]. *Plant Archives*, 2021, 21(1): 1345-1349.
- [26] NAGAOKA S. *Yogurt Production[M]//Lactic Acid Bacteria: Methods and Protocols*. New York: Springer New York, 2019: 45-54.
- [27] LOVEDAY SM, SARKAR A, SINGH H. Innovative yoghurts: novel processing technologies for improving acid milk gel texture[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2013, 33(1): 5-20.
- [28] VASIĆ K, KNEZ Ž, LEITGEB M. Transglutaminase in foods and biotechnology[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(15): 12402.
- [29] AL-ASMAR A, GIOSAFATTO CVL, PANZELLA L, MARINIELLO L. The effect of transglutaminase to improve the quality of either traditional or pectin-coated falafel (fried middle eastern food)[J]. *Coatings*, 2019, 9(5): 331.