



***Streptomyces* Türlerine Ait Transglutaminaz Üretimine Fermantasyon Koşulları ve Stres Faktörlerinin Etkisi**

Mehmet Tokathı, Gökhan Domurcuk, Hilal İşleroglu *

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 60150 Tokat, Türkiye

MAKALE BİLGİSİ

ÖZ

Derleme Makale

Geliş 25 Haziran 2018
Kabul 12 Ekim 2018

Anahtar Kelimeler:

Mikrobiyal transglutaminaz
Enzim üretimi
Streptomyces sp.
Substrat optimizasyonu
Stres faktörleri

***Sorumlu Yazar:**

E-mail: hilal.isleroglu@gop.edu.tr

Gıda proseslerinde transglutaminaz (TG) enziminin kullanımı çapraz bağlanma reaksiyonları aracılığı ile proteinlerin fonksiyonel özelliklerinde önemli değişimler meydana getirmektedir. TG enzimi bu değişimleri, açıl transfer reaksiyonlarını katalizleyerek proteinler, peptidler, çeşitli primer aminler arasında kovalent çapraz bağlar oluşturarak gerçekleştirmektedir. Hayvansal ve mikrobiyal kaynaklar (*Streptomyces sp.*) transglutaminaz enziminin ticari olarak üretiminde kullanılabilir. Hayvansal kaynaklı TG enziminin kalsiyum iyonlarına ihtiyaç duyması ve üretiminin daha maliyetli olması sebebi ile mikrobiyal kaynaklı TG enzimi gıda ve diğer endüstrilerde kullanım açısından öncelik kazanmaktadır. Mikrobiyal TG (mTG) enzimi ve üretiminin artırılmasına yönelik çalışmalar, son derece dinamik bir araştırma alanı olup sürekli gelişim göstermektedir. Son yıllarda farklı fermantasyon stratejileri ve rekombinant DNA teknikleri kullanılarak üretim prosesleri yeniden optimize edilmeye çalışılmaktadır. Mikrobiyal TG enzim üretiminde temel olarak substrat optimizasyonu, metabolik optimizasyon ve fermantasyon şartlarının kontrolü (pH, çözünmüş oksijen, sıcaklık, karıştırma ve havalandırma hızı, vb.) gibi bazı klasik stratejiler üzerinde oldukça yoğun ve farklı çalışmalar yapılmaktadır. Diğer taraftan sınırlı sayıda yapılan bazı çalışmalarda mTG üretiminin artırılmasına yönelik yeni bir strateji olarak mikrobiyal stres faktörlerinin (ani sıcaklık ve pH değişimi, bazı tuz ve alkollerin varlığı, vb.) etkisi de incelenmeye ve çalışılmaya başlanmıştır. Bu derlemede birçok alanda giderek kullanımı artan mTG enzim üretiminin daha verimli ve düşük maliyetli gerçekleştirilmesi için, enzim biyosentezinin artırılmasına yönelik bazı stratejiler üzerinde durulmuştur.

Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology, , 6(11): 1607-1616, 2018

The Effect of Fermentation Conditions and Stress Factors on Production of Transglutaminase by *Streptomyces* spp.

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Review Article

Received 25 June 2018
Accepted 12 October 2018

Keywords:

Microbial transglutaminase
Enzyme production
Streptomyces sp.
Substrate optimization
Stress factors

***Corresponding Author:**

E-mail: hilal.isleroglu@gop.edu.tr

The use of transglutaminase (TG) enzyme in food processing has led to considerable changes in the functional properties of proteins through cross-linking reactions. The TG enzyme catalyses the acyl transfer reactions leading to the formation of covalent cross-links between various primary amines, peptides, and proteins, thereby causing these changes. Animal and microbial sources (*Streptomyces sp.*) can be used for commercial production of transglutaminase. Microbial-derived TG enzyme takes priority in food and other industries because of the need for calcium ions of animal-derived TG enzyme and the cost of production. Efforts to increase microbial transglutaminase (mTG) enzyme production are continuously developing and are a highly dynamic research area. In recent years, attempts have been made to re-optimize production processes using different fermentation strategies and recombinant DNA techniques. For mTG enzyme production, intensive and different studies are being carried out on some classical strategies such as substrate optimization, metabolic optimization and control of fermentation conditions (pH, dissolved oxygen, temperature, mixing and aeration rate, etc.). On the other hand, the impact of microbial stress factors (rapid change of temperature and pH, presence of certain salts and alcohols, etc.) as a new strategy to increase mTG production has also begun to be investigated and studied in a limited number of studies. In this review, several strategies for increasing the biosynthesis of the enzyme have been emphasized in order to make the production of mTG enzymes more efficient and cost-effective by increasing the use in many fields.

DOI: <https://doi.org/10.24925/turjaf.v6i11.1607-1616.2092>

Giriş

Gıdalarda işlevsellik, ürünlerin duyuşal ve besleyici kalitesini etkilemesinden dolayı son yıllarda araştırmacılar ve gıda endüstrisi, gıda makro moleküllerinin teknolojik ve fonksiyonel özelliklerini değiştirebilecek yöntem ve ürün arayışlarını yoğunlaştırmışlardır. Proteinlerin organik materyallerin ana yapı taşı olmasından dolayı; enzimatik, kimyasal veya fiziksel olarak proteinlerin modifikasyonu, gıdaların fonksiyonel özelliklerinin iyileştirilmesi ve geliştirilmesi için alternatif bir yöntem olabilmektedir (Min ve Green, 2008; Gaspar ve Goes-Favoni, 2015). Dünya genelinde yeni protein kaynaklarının aranması ve mevcut proteinlerin insan tüketimi için potansiyelini genişletmek son derece ilgi çekici bir konudur. Dolayısıyla, özellikle proteinlerin modifikasyonunda rol oynayan mikrobiyal enzimler, mevcut olan gıda proteinlerinin fonksiyonel özelliklerini ve besleyici değerini geliştirmek için büyük önem arz etmektedir. Enzimatik modifikasyon, hem ucuz olması, hem de sağlık açısından herhangi bir risk taşıması gibi nedenlerle sıklıkla tercih edilmektedir. Gıda proteinlerinin enzimatik modifikasyonunda kullanılabilen enzimlerin sayısı ise oldukça sınırlıdır (Romeih ve Walker, 2017). Tirozinaz, lisil oksidaz, lakkaz, sortaz A ve transglutaminaz (TG) gibi bazı oksidaz ve açıl transferaz grubu enzimlerin in vitro şartlarda protein moleküllerinin modifikasyonunda (çapraz bağlama reaksiyonları) görev aldığı bilinmektedir. Tüm bu çapraz bağlayıcı enzimler farklı reaksiyon mekanizmaları ile proteinlerdeki aminoasit kalıntılara etki etmektedir. Çapraz bağlama, doğrudan enzimatik reaksiyonun sonucu olarak veya enzimatik reaksiyon ile oluşan H₂O₂ ve lipid radikallerinin çapraz bağlama etkisi ile gerçekleşebilir. Proteinler, çapraz bağlayıcı bu enzimler için reaktif olan glutamin, lizin, tirozin ve sistein kalıntıları gibi gruplara sahiptirler. Ancak bu enzimlerden birçoğunun kofaktörlere ihtiyaç duyması, enzimatik aktivitelerinin yetersiz olması ve üretimlerinin kısıtlı olması gibi faktörlerden dolayı gıda proseslerinde kullanımı sınırlıdır (Lantto, 2007; Heck ve ark., 2013). Elde edilen reaksiyonların başarısı, kullanılan enzim tipine, hedef reaktif grupların erişilebilirliğine ve kullanılan işlem koşullarına bağlıdır. Bu enzimler içerisinde özellikle TG enziminin protein içeren tüm gıdalarda kullanıma uygun olması ve endüstriyel olarak üretilebilmesi, gıda endüstrisinde önemini giderek arttırmaktadır. Hem akademik hem de endüstri açısından ilgi gören TG enzimi, çapraz bağlama teknolojisinde çoğu ticari uygulamalarda kullanılmaktadır (Romeih ve Walker, 2017).

Transglutaminaz enzimi hayvansal, bitkisel ve mikrobiyal olarak üretilebilmektedir. Yakın zamana kadar ticari olarak satılan TG enzimi sadece hayvansal kaynaklardan elde edilirken özellikle son yıllarda mikrobiyal kaynaklardan TG eldesi üretim maliyetini düşürmek amacıyla çalışılmaya başlanmıştır. Çeşitli mikroorganizmalardan elde edilen mikrobiyal kaynaklı transglutaminaz (mTG), hayvansal kaynaklı transglutaminazdan farklı olarak aktivasyonunun kalsiyum iyonlarından bağımsız olması nedeniyle gıda endüstrisinde yaygın olarak tercih edilmektedir. TG üretimi için en uygun olan mikroorganizma *Streptomyces* türleridir (Motoki ve Seguro, 1998). *Streptomyces* türleri tarafından mTG üretiminin diğer mikroorganizma

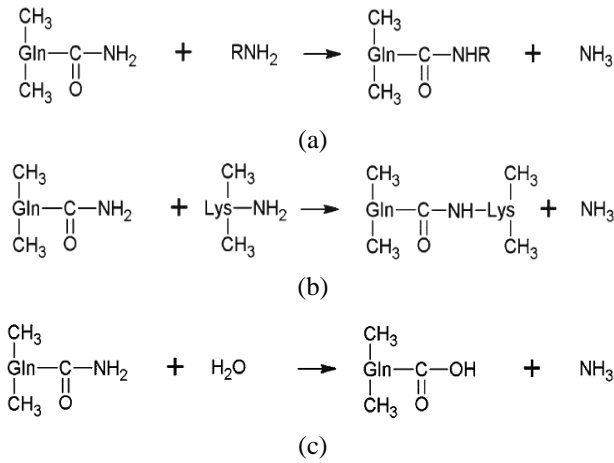
cinslerine göre önemli ölçüde fazla olduğu bilinmekte ve günümüzde endüstriyel olarak mTG üretimlerinde bu türler kullanılmaktadır. Bu yüzden *Streptomyces* türleri ile mTG verimini arttırmaya yönelik, substrat optimizasyonu, metabolik optimizasyon ve dış faktörlerin kontrolü (pH, çözünür oksijen ve sıcaklık) gibi bazı stratejiler üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Fermantasyonla ilgili bazı parametrelerin değiştirilmesi enzim üretiminde önemli değişikliklere sebep olabilmekte ve enzim verimindeki artışların maliyet açısından olumlu etkisi bulunabilmektedir (Zhang ve ark. 2009).

Bu derlemede, mTG enzimi sentezi ve genel özellikleri ile birlikte enzimin mikrobiyal olarak üretilmesi, üretim koşullarının geliştirilmesi, enzim üretimine etki eden inkübasyon koşulları ile stres faktörleri irdelenmiştir. Böylece, pahalı ve saflaştırma basamakları zor olan hayvansal kaynaklı TG enzimi için alternatif mikrobiyal kaynaklardan üretim süreçlerinin belirlenmesi ve optimizasyonu gibi konularda literatür bilgisi sağlayacaktır.

Transglutaminaz Enzimi

Transglutaminaz (protein-glutamine gamma-glutamyltransferase, EC 2.3.2.13), açıl transfer, çapraz bağlama ve deaminasyon reaksiyonlarını katalizleyen bir transferaz grubu enzimdir (Şekil 1). Transglutaminaz (TG) terimi ilk olarak, Gine domuz karaciğerinde gözlemlenen transamidasyon aktiviteyi tarif etmek üzere Clarke ve ark. (1959) tarafından kullanılmıştır. TG, protein molekülünde birinci derecede ε-amin grupları (alıcı) ve glutamin (verici) kalıntılarının γ-amino karbonil grupları arasında izopeptid bağı oluşumunu katalizleyerek açıl transfer reaksiyonlarını oluşturmaktadır (Kieliszek ve Misiewicz, 2014). TG tarafından gerçekleştirilen farklı reaksiyonlar ile proteinlerde meydana gelen bu büyük değişimler sonucu gıdaların, pH, renk, tat-koku ve besinsel kalitesinde herhangi bir olumsuz değişim olmaksızın, doku ve stabilitesinde (termal stabilite, viskozite, sinerisis, emülsifikasyon, jelleşme, su tutma kapasitesi, vb.) önemli bir iyileşme meydana gelmektedir. Ayrıca, esansiyel aminoasitlerin proteinlerin yapısına bu reaksiyonlar sonucu katılabilmesi, bu aminoasitlerce fakir olan gıdaların besleyici değerinin artırılmasını da sağlamaktadır (Ando ve ark., 1989; Kuraishi ve ark., 2001; Gaspar ve Goes-Favoni, 2015). Diğer taraftan TG ile gerçekleştirilen bu reaksiyonlardan, sentetik polimer film, enzim immobilizasyonu ve tekstil gibi diğer alanlarda da faydalanılmaktadır (Cui ve ark., 2007; Nagy ve Szakacs, 2008).

TG doğada yaygın olarak memeli dokularında, mikrobiyal hücrelerde, omurgasızlarda ve bitkisel dokularda (soya, yer elması) bulunmaktadır. Organizmada birçok fizyolojik fonksiyona sahip olan TG, kanın pıhtılaşması, bağışıklık sistemi ve fotosentez gibi olaylarda önemli rol oynamaktadır (Ando ve ark., 1989; Kashiwagi ve ark., 2002; Cui ve ark., 2007). Hayvansal ve bitkisel TG, mikrobiyal TG (mTG) ile aminoasit kompozisyonları benzer bir homoloji göstermese de bu enzimlerin katalitik aktiviteleri ve biyokimyasal özellikleri birbirlerine çok benzerdir (Luciano ve Arntfield, 2012).



Şekil 1 Transglutaminaz enziminin katalizlediği reaksiyonlar (a) Açıl transfer reaksiyonu (b) Protein veya peptitlerde bulunan glutamin ve lizin kalıntıları arasında çapraz bağlanma reaksiyonu (c) Deamidasyon (Kieliszek ve Misiewicz, 2014)

Figure 1 Catalyzed reactions by transglutaminase (a) Acyl transfer reaction (b) Cross-linking reaction between glutamine and lysine residues in protein or peptide (c) Deamidation (Kieliszek and Misiewicz, 2014)

Mikrobiyal Transglutaminaz (mTG) Enzimi ve Biyosentezi

İlk olarak Ando ve ark. (1989) yaptıkları çalışmada topraktan izole ettikleri *Streptovorticillium* S-8112 suşundan mTG enzimini elde etmişlerdir. Bu mikroorganizma sıvı besiyerinde enzimi hücre dışına salgıladığı için hücre parçalanmasına gerek duyulmadan kolaylıkla enzim saflaştırılabilmiş ve karakterize edilmiştir (Zhu ve ark., 1995). Diğer mikroorganizmalar tarafından üretilse de ticari olarak mTG, *Streptovorticillium moboarensense* (*Streptomyces moboarensense*) tarafından fermantasyon yolu ile üretilmektedir (Ando ve ark., 1989). İlk ticari mTG (Activa_{TM} MP) *Streptovorticillium moboarensense* fermantasyonu ile Ajinomoto (Japonya) firması tarafından süt ürünlerinde kullanılmak üzere üretilmiştir. Mikrobiyal TG'nin Ca²⁺'den bağımsız bir enzim olması, kazein, soya proteinleri ve miyosin gibi kalsiyuma duyarlı gıda proteinlerinin fonksiyonlarının modifiye edilmesine olanak sağlamaktadır. Ayrıca mTG iki farklı gıda proteini arasında çapraz bağlar oluşturabilmekte, böylelikle daha yüksek molekül ağırlıklı proteinlerin oluşumunu sağlayabilmektedir (Yıldırım ve Hettiarachchy, 1998; Motoki ve Seguro, 1998; Zhang ve ark., 2009). Ayrıca mTG'nin aktivite için trombine ihtiyaç duymaması da gıdalarda kullanımında renk bakımından herhangi bir sorun yaratmamaktadır. Mikrobiyal TG, kültür besiyerine salgılandığı için hayvansal TG enzimine göre saflaştırma işlemi daha kolay gerçekleştirilmektedir (Motoki ve Seguro, 1998). Mikrobiyal TG enziminin, 1998'den beri FDA (Gıda ve İlaç İdaresi) tarafından insan beslenmesi için güvenli bir madde olarak (GRAS- Genel Olarak Güvenli Olduğu Kabul Edilen) tanınmasıyla birlikte, gıda endüstrisi için çok çekici bir hale gelmiştir (Aalami ve Leelavathi, 2008; Gaspar ve Goes-Favoni, 2015). Enzimin, doğrudan TG üreten mikroorganizma kültürleri veya genetik modifiye edilmiş *E.coli*, *Bacillus*, *Aspergillus* ve bazı mayalardan mikrobiyal yolla ticari

olarak üretilmesi temel yaklaşımlar olup, genetik modifikasyon yolu ile üretilerek ticari ürün haline getirilmiş enzim henüz bulunmamaktadır (Zhang ve ark., 2009).

Mikrobiyal TG enziminin kimyasal yapısı incelendiğinde 331 adet aminoasit kalıntısından ve tek bir polipeptid (monomerik) zincirden oluştuğu ve moleküler ağırlığının ise yaklaşık 38 kDa olduğu belirlenmiştir (Ando ve ark., 1989; Kieliszek ve Misiewicz, 2014). Kimyasal yapı olarak mTG, daha yüksek katalitik aktivite, daha küçük boyut, daha geniş substrat spesifitesi ve daha düşük deamidasyon aktivitesi gibi ticari amaçlar için değerli olarak kabul edilen biyokimyasal özellikler göstermektedir (Kashiwagi ve ark., 2002).

Mikrobiyal TG enzimi geniş bir pH aralığında çalışmakla birlikte optimum çalışma pH aralığı 5,0-8,0 arasındadır. Ayrıca pH 4,0 ve 9,0'da az da olsa enzimatik aktiviteye sahiptir. Mikrobiyal TG'nin izoelektrik noktası yaklaşık pH 8,9'dur. Birçok hayvansal TG'nin optimum çalışma ortamı 40°C ve pH 5,5'tir (Ho ve ark., 2000). *Streptomyces* sp. tarafından üretilen mTG'nin enzimatik aktivite açısından optimum çalışma sıcaklığı 45-50°C'dir ve aktivitesini 50°C'de 10 dakika boyunca sürdürebilmektedir. Diğer taraftan sıcaklığın 70°C'ye yükselmesi ile aktivitesini birkaç dakika içinde kaybedebilmektedir. Mikrobiyal TG, 10°C ve donma noktasında da bir miktar aktivite gösterebilmektedir (Zhu ve ark., 1995; Motoki ve Seguro, 1998). Cu²⁺, Zn²⁺, Pb²⁺ ve Li⁺ gibi metal iyonları mTG'yi önemli ölçüde inhibe etmektedir. Çünkü ağır metaller mTG'nin aktif bölgelerinin bir parçası olan sistein uçlarındaki tiyol gruplarını bloke etmektedir (Yüksel ve Erdem, 2007).

Motoki ve ark. (1989) *S. griseocarneauum*, *S. cinnamoneum* ve *S. moboarensense* gibi diğer bazı *Streptovorticillium* suşlarının da TG üretme kabiliyetine sahip olduğunu bildirmişlerdir. TG aktivitesi *Candida albicans*, *Phytophthora soja* ve *Saccharomyces cerevisiae* gibi mikroorganizmalarda hücre duvarında lokalize olarak bulunmaktadır. Bu durum enzimin hücre duvarının stabilizasyonuna ve miselyumların büyümesi sırasında hif oluşumuna katıldığına işaret etmektedir (Mariniello ve ark., 2008). *Streptomyces* tarafından üretilen TG enziminin aktivasyon mekanizması Pasternack ve ark. (1998) tarafından açıklanmıştır. Yaptıkları çalışmada TG enziminin bakteri tarafından pro-transglutaminaz (pro-TG) formunda sentezlendiğini ve enzimin aktifleştirilmesinde bazı ekzojen proteazların (tripsin, kimotripsin) görev aldığını belirlemişlerdir.

Mikrobiyal TG Biyosentezini ve Aktivitesini Etkileyen Faktörler

Mikrobiyal TG üretimi için gerekli olan fermantasyon şartları ile enzim üreticisi hücrelerin gelişimi için gerekli olan şartlar farklı olabilmektedir. Kesikli bir kültürde mTG oluşum hızı, aktivitesi ve verimliliği; pH, sıcaklık, çözülmüş oksijen (DO) gibi çevresel parametrelere ve ortam bileşimine göre değişebilmektedir. Mikrobiyal TG sentezi konusunda giderek artan bilgiler ışığında, biyosentez sürecini daha doğru bir şekilde kontrol edebilmek için farklı teknikler ve stratejiler geliştirilmiştir. Bu teknikler temelde, üretici mikroorganizma türü, fermantasyon tekniği ile şartlarının kontrolü, besiyeri bileşiminin optimizasyonu ve stres

faktörleri gibi unsurları kapsamaktadır (Tablo 1) (Zheng ve ark., 2002a; Zheng ve ark., 2002b; Yan ve ark., 2005; Zhang ve ark., 2009).

Mikroorganizma türü: Yüksek oranda mTG üreten temel bakteri aileleri arasında *Streptomycetaceae*, *Micrococaceae*, *Bacillaceae* ve *Pseudomonadaceae* yer almaktadır (Tablo 2). Mikrobiyal TG enzim üreticisi mikroorganizmaların belirlenmesi için yapılan çalışmalar ile birlikte üretici kültürler arasında *S. cinnamomeum*, *S. ladakanum*, *S. lividans*, *S. platensis*, *S. sioyansensis*, *S. hygroscopicus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida*, *Zygomonas mobilis* gibi mikroorganizma türleri dahil olmuştur. (Zhu ve ark., 1995; Lin ve ark., 2006; Cui ve ark., 2007; Bourneow ve ark., 2012; Kieliszek ve Misiewicz, 2014). Özellikle gıda endüstrisinde ticari olarak mTG enzim üretimi için *Streptomyces* türlerinin önemi bilinmektedir. Bu türler arasında yer alan *Streptomyces mobaraensis* suşları ticari TG üretiminde büyük bir paya sahiptir (Ando ve ark., 1989). Bazı araştırmacılar ise son yıllarda *S. ladakanum* ve *S. lividans* suşlarının genetik modifikasyonu ile başarılı bir şekilde enzim üretimini gerçekleştirmişlerdir (Lin ve ark., 2006; Kieliszek ve Misiewicz, 2014).

Streptomyces türleri ilk kez 1943'te Waksman ve Henrici tarafından tanımlanmıştır (Williams ve ark., 1983). *Streptomyces* cinsi *Streptomycetaceae* ailesine aittir. Tanımlanan türlerin sayısı ve çeşitliliği açısından, *Streptomyces* türleri Actinomycetes sınıfının en büyük taksonomik öğelerinden birini temsil etmektedir (Bhattacharyya ve ark., 1998; Hasani ve ark., 2014). *Streptomyces* türleri, ikincil metabolitlerin üretimi açısından iyi bir kaynak olması nedeniyle, uzun zamandır bu amaçlar doğrultusunda kullanılmaktadır. Birçok yaşam alanına sahip *Streptomyces*'ler, hem potansiyel ürünleri için hem de bazı diğer metabolitler için konakçı olarak kullanılmaktadır. Saprofitik yaşam döngüleri sayesinde *Streptomyces* türlerinin yüksek miktarda protein (enzim) sentezleyerek makro boyuttaki hücresel substratları

kullanma yetenekleri gelişmiştir (Rattleff, 2013). *Streptomyces* türlerinin sıvı besi ortamlarında substrat miselyumları oluşturarak çoğalmaları, hücresel çökelti veya öbekler oluşturarak kültür ortamında kütle transferi problemlerine sebep olmaktadır. Kültür ortamında meydana gelen bu karmaşık morfolojik davranış kültür ortamında heterojenlik yaratarak örneklerde ve verilerin analizinde zorluk oluşturabilmektedir (Manteca ve ark., 2010; Rattleff, 2013; Chen ve ark., 2013). Ayrıca TG üreticisi *Streptomyces* suşlarında meydana gelen bu morfolojik değişim ve misel gelişimi ile birlikte enzim aktivitesinde bir artış olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur. Ancak bu durumun TG enzimi ile ilişkili olan mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (Negus, 2001).

Besiyeri çeşidi ve bileşimi: Fermantasyon ortamı mTG üretim maliyetlerinin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır. Besiyeri bileşimi mikroorganizmalar tarafından üretilen TG enzim sentezini etkilemektedir (Souza ve ark., 2006; Kieliszek ve Misiewicz, 2014). Besiyeri kompozisyonunun doğru olarak belirlenmesi gerek maliyetlerin azaltılması gerekse üretim veriminin artırılması bakımından önemlidir. Mikrobiyal TG üretimini etkileyen besiyeri bileşenlerinin geleneksel yöntemlerle tek tek optimize edilerek belirlenmesi daha basit ve ayrıca değişkenlerin enzim üretimi üzerindeki etkilerinin grafik üzerinde kompleks istatistiksel analizlere ihtiyaç duymadan yorumlamak daha kolaydır (Macedo ve ark., 2007).

Streptomyces türlerinden mTG üretiminde kullanılan besiyerlerinin bileşimi çoğunlukla benzer bir bileşime (maya ekstraktı, pepton, sodyum fosfat, potasyum fosfat, magnezyum sülfat ve bir karbon kaynağı) sahiptir. Burada özellikle pepton ve maya ekstraktı gibi bileşenler ekonomik olarak yüksek maliyet oluşturmaktadır (Kieliszek ve Misiewicz, 2014). Kültür ortamının hazırlanmasında kullanılan karbon ve azot kaynakları mTG verimliliğini etkileyen temel bileşenler arasında yer almaktadır (Şekil 2).

Tablo 1 Mikrobiyal TG üretiminde kullanılan bazı stratejiler (Zhu ve Tramper, 2008)

Table 1 Some strategies used in microbial TG production (Zhu and Tramper, 2008)

Suş	Strateji	UA	Kaynak
<i>S. mobaraense</i>	Mikroorganizma tür seçimi	2,00	Ando ve ark. (1989)
<i>S. mobaraense</i>	Fermantasyon şartlarının kontrolü	3,37	Zheng ve ark. (2001)
<i>S. ladakanum</i>	Besiyeri bileşen optimizasyonu	0,73	Téllez-Luis ve ark. (2004b)
<i>Bacillus circulans</i>	Mikroorganizma tür seçimi ve besiyeri bileşen optimizasyonu	0,31	Souza ve ark. (2006)
<i>S. ladakanum</i>	Mikroorganizma tür seçimi	0,35	Téllez-Luis ve ark. (2004a)
<i>Streptomyces</i> sp.	Mikroorganizma tür seçimi ve besiyeri bileşen optimizasyonu	1,40	Macedo ve ark., 2007

UA: Ulaşılan aktivite (Ünite/ml)

Tablo 2 Transglutaminaz enzim üreticisi mikroorganizmalar (Bech ve ark., 2001)

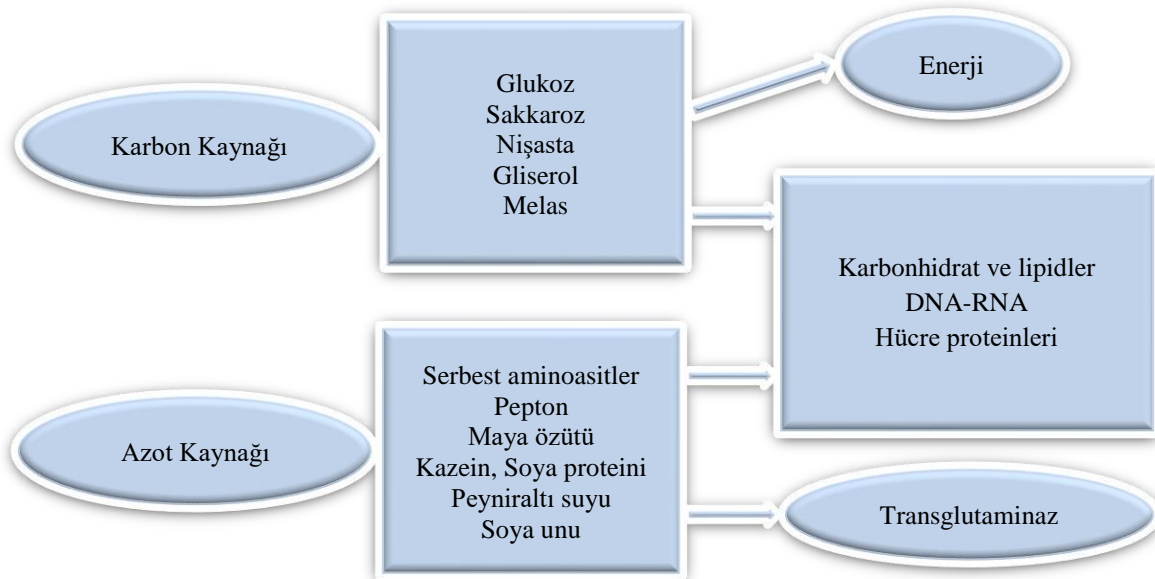
Table 2 Transglutaminase enzyme producer microorganisms (Bech et al., 2001)

Mikroorganizma	Ulaşılan aktivite (Ünite/ml)
<i>S. mobaraensis</i>	3,37
<i>S. lydicus</i>	1,30
<i>S. ladakanum</i>	0,35
<i>S. sioyansensis</i>	3,30
<i>S. platensis</i>	1,40
<i>Enterobacter</i> sp. C2361	0,77
<i>B. aneurinolyticus</i>	0,80
<i>P. putida</i>	1,40

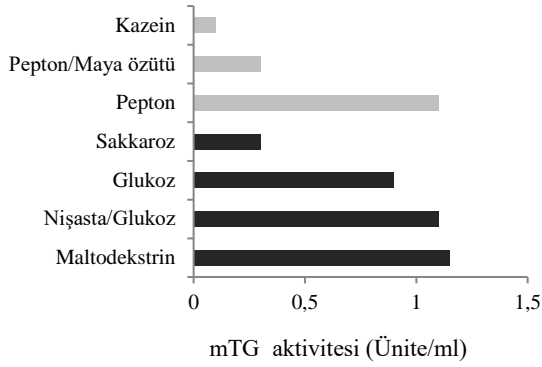
Pepton, maya ekstraktı, kazein, üre gibi temel bileşenler TG sentezinde kullanılan yaygın azot kaynaklarını oluşturmaktadır. Ayrıca inorganik amonyum tuzları da azot kaynağı olarak kullanılabilir ancak bu tuzların enzim üretimi için daha az kullanışlı oldukları bildirilmektedir. İnorganik azot kaynaklarının ortamda bulunması mikroorganizmalar tarafından sentezi mümkün olmayan aminoasitlere ulaşımını engelleyeceği için mTG sentezinde yapıya katılacak olan elzem aminoasitlerin eksikliğine yol açacaktır. Literatürde yapılan çalışmalarda soya, pirinç, mısır, buğday unu, mısır şurubu ve malt ekstraktı gibi bitkisel kaynakların da enzim üretiminde azot kaynağı olarak besiyerinde kullanılabilirliği önerilmektedir (Kieliszek ve Misiewicz, 2014; Zilda, 2014). Tüm azot kaynakları arasında pepton *Streptomyces* türleri için mTG üretiminde temel azot kaynağını oluşturmaktadır (Zhu ve ark., 1996; Macedo ve ark., 2007). Zhu ve ark. (1998) yaptıkları çalışma sonucunda pepton ve nişasta gibi bileşenlerin besiyerinde kullanımı ile proteaz, amilaz gibi bazı indükleyici enzimlerin sentezini uyararak mTG sentezi için gerekli öncül bileşiklerin oluşumunu sağlayacağını belirtmişlerdir. Karbon kaynağı olarak ise özellikle patates nişastası, glukoz ve maltodekstrin gibi bileşenlerin *S. mobaraensis* ile gerçekleştirilen üretimlerde yüksek enzim aktivitesi sağladığı belirtilmektedir (Şekil 3) (Macedo ve ark., 2007). Ayrıca, yapılan bazı çalışmalarda şeker melası ve gliserol gibi karbon kaynaklarının sinerjistik etki oluşturarak *S. ladakanum* ile gerçekleştirilen mTG üretimini arttırdığı gözlemlenmiştir. Bu çalışmalarda mTG fermantasyonu sırasında şekerlerin (glukoz, fruktoz, sakkoroz) ve gliserolün kültür tarafından farklı oranlarda kullanıldığı belirlenmiştir. Diğer taraftan besiyeri bileşiminde gliserol ve kazeinin birlikte kullanımının da enzim üretimini arttırdığı deneysel olarak belirlenmiştir

(Bourneow ve ark., 2012; Téllez-Luis ve ark., 2004b). Ayrıca bazı çalışmalarda besiyerinde gliserol kullanımı ile viskozitede bir artışın meydana geldiği ve bu durumun da aktiviteyi olumsuz etkilediğini bildirilmektedir (Portilla-Rivera ve ark., 2009). Bu duruma karşıt bir olgu olarak besiyerindeki peptitlerin veya proteinlerin kendi aralarında mTG tarafından çapraz bağlanma reaksiyonuna maruz kalmaları sonucunda, bu tür azot kaynaklarının mikroorganizmalar tarafından kullanımının zorlaşacağı gerçeği de ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle ortamda bulunan serbest aminoasitler mTG sentezi ve hücre gelişimi açısından temel sınırlayıcı faktör olmaktadır (Zhu ve ark., 1996; Zhu ve ark., 1998; Bourneow ve ark., 2012).

Fermantasyon sıcaklığı ve pH: Yapılan çalışmalarda mTG üretiminde sıcaklığın ve pH'nın önemli bir rol oynadığı ve bu iki faktörün hücre büyümesini ve ürün oluşumunu etkileyen en önemli çevresel parametreler olduğu bildirilmektedir. Sıcaklık ve pH'nın mTG üretimi üzerine etkileri ile ilgili kinetik veriler daha iyi bir fermantasyon sürecinin planlanmasını kolaylaştırmaktadır (Zheng ve ark., 2002a; Yan ve ark., 2005). Mikroorganizmaların spesifik gelişme hızları sıcaklıktan önemli ölçüde etkilenmektedir. Birçok kinetik model inkübasyon sıcaklığı ile spesifik gelişme arasındaki ilişkiyi açıklamak için öngörülebilir bulunmaktadır. Schoolfield ve ark. (1981) spesifik gelişme hızını sıcaklığın bir fonksiyonu olarak tanımlayan doğrusal olmayan bir Arrhenius modeli önermiştir. Yapılan çalışmalar sıcaklığın mTG fermantasyonunda önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Buna rağmen, *S. mobaraense* suşlarının hücre gelişimine ve mTG sentezine inkübasyon sıcaklığının etkileri ile ilgili kinetik modeller hakkında çok az bilgi bulunmaktadır (Zheng ve ark., 2001; Zheng ve ark., 2002b).



Şekil 2 Besiyeri karbon ve azot kaynaklarının mTG enzim sentezinde kullanımı (Zhu ve ark., 1996)
Figure 2 Use of carbon and nitrogen sources of medium in mTG enzyme synthesis (Zhu et al., 1996)



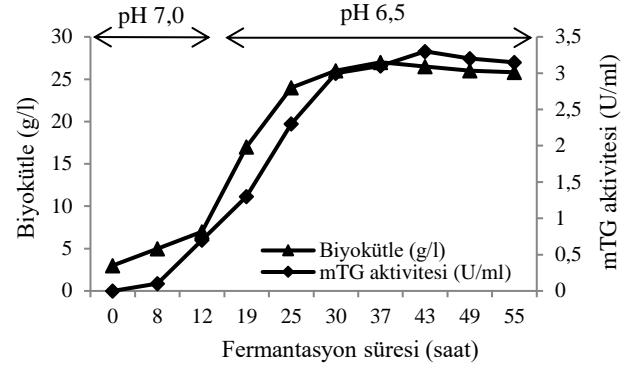
Şekil 3 Besiyeri karbon ve azot kaynaklarının mTG enzim aktivitesine etkisi (Macedo ve ark., 2007)

Figure 3 Effects of carbon and nitrogen sources of medium on mTG enzyme activity (Macedo et al., 2007)

Sıcaklığın mTG sentezine olan etkisi ile ilgili yapılan çalışmalar inkübasyon sıcaklıklarının hem hücre gelişimini hem de mTG sentezini doğrudan etkileyebildiğini bildirmektedir (Zheng ve ark., 2001; Yan ve ark., 2005). Zheng ve ark. (2002b) farklı inkübasyon sıcaklıklarının (25-35°C) *S. mobaraensis* suşunun mTG enzim üretim miktarına etkisini araştırdıkları bir çalışmada en iyi üretimi 30°C'de başarılı bir şekilde (2,94 Ünite/ml) gerçekleştirmişlerdir. Düşük sıcaklık değerlerinde mikrobiyal gelişimin durması ile birlikte enzim sentezinin de durduğunu, daha yüksek sıcaklık değerlerinde ise mikrobiyal gelişimin durmasına rağmen 6 saat boyunca enzim üretiminin devam ettiğini bildirmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar yaptıkları bu çalışmada inkübasyonda kullanılan tek sıcaklık değerlerinin spesifik hücre gelişim ve mTG sentez evrelerine farklı oranlarda etkide bulduklarını da göstermişlerdir. Diğer taraftan Portilla-Rivera ve ark. (2009) *S. ladakanum* suşu ile 26°C'de enzim üretimini gerçekleştirmişlerdir.

S. mobaraense WSH-Z2 suşu kullanılarak enzim üretim sürecinde pH değerindeki değişim ile ilgili yapılan bir çalışmada fermantasyonun ilk aşamalarında besiyeri pH değerinin düşüğü (pH 6,5), daha sonra ise kademeli olarak arttığı (pH 7,2) belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar besiyeri pH değerinin kültür ortamında fermantasyonun evrelerine bağlı olarak değişim içerisinde olduğunu ve bu durumun mTG enzim üretimine önemli etkisi olduğunu göstermiştir. Aynı çalışmada pH 6,5'te en yüksek enzim aktivitesi 48 saatlik inkübasyon sonucunda 2,90 Ünite/ml olarak bulunmuştur. Enzim aktivitesinin artırılması amacıyla, ortam pH'sı fermantasyonun başlarında (ilk 13 saat) pH 7,0'de daha sonra pH 6,5'te sabit tutulmuş ve böylece en yüksek aktivite değerine (3,4 Ünite/ml) ulaşılmıştır (Şekil 4) (Zheng ve ark., 2002a). Benzer şekilde Ryszka ve ark. (2009) *S. mobaraense* suşu ile pH 6,5-7,0'da 2,0 Ünite/ml değerinde enzim aktivitesi elde etmişlerdir.

Karıştırma Hızı ve Şekli: Sıvı kültürlerin karıştırılmasında temelde iki farklı karıştırma şekli uygulanabilmektedir. Bunlardan ilki orbital olarak kültür ortamının karıştırıldığı sistemler ikincisi ise ortamının mekanik, konveksiyon, pnömatik veya sürekli gaz fazı sistemleri aracılığı ile karıştırıldığı derin kültür sistemlerdir. Orbital karıştırma sistemleri basit ve ucuz olup, daha ılımlı bir karıştırmanın gerçekleştirilmesine



Şekil 4 İki kademeli besiyeri pH ayarlamasının biyokütle ve mTG aktivitesine etkisi (Zheng ve ark., 2002a)

Figure 4 The effect of two-stage pH adjustment of medium on biomass and mTG activity (Zheng et al., 2002a)

olanak sağlamakla birlikte, kütle (besiyeri bileşenleri ve O₂) ve ısı transferi açısından zayıf kalabilmektedir (Henzler ve Schedel, 1991). Bu sebeple kontrollü fermantasyon işlemlerinin gerçekleştirildiği biyoreaktörler (fermentör) ısı ve kütle transferinin iyileştirilmesi açısından tercih edilmektedir. Ayrıca fermentörde gerçekleştirilen enzim üretiminin artırılması için geri beslemeli sistemler de kullanılabilir ve böylelikle enzim miktarında ~%80 ve hücre kuru ağırlıklarında ~%30 oranında artış sağlanabilmektedir (Whitaker, 1980; Zhu ve ark., 1998).

Mikrobiyal TG üretiminde besiyeri kompozisyonu ve fermantasyon koşulları (pH, sıcaklık ve DO) önemli faktörler arasında yer almaktadır. Sıklıkla hücresel gelişim ve enzim üretimi için belirlenen en uygun şartlar birbirinden farklı olabilmektedir. Bu yüzden bu parametrelerin yüksek enzim üretim oranı, yüksek aktivite ve yüksek verimlilik için optimize edilmesi gerekliliğini doğurmaktadır. Özellikle DO miktarı hücresel gelişimi ve enzim üretimini etkileyen en önemli çevresel faktörler arasında yer almaktadır. Fermantasyon esnasında uygulanan karıştırma hızı veya havalandırma oranı, gerek DO miktarını etkilemesi gerekse kütle ve ısı transferine katkı sağlaması açısından önemli bir parametreyi oluşturmaktadır (Yan ve ark., 2005). Büyük ölçeklerde hücre gelişimini kontrol etmek için aşılama konsantrasyonu, pH, sıcaklık ve karıştırma hızı dahil olmak üzere biyoreaktörde kullanılan fiziksel parametreler işlem üzerinde önemli bir etkiye sahiptir ve koşulların optimizasyonu önem arz etmektedir. Bu nedenle, enzim üretimi ile ilgili etkili ve tekrarlanabilir bir yöntem oluşturmak için temel kurallar belirlenmelidir (Kieser, 2000; Wang ve ark., 2005; Celler ve ark., 2012; Rattleff, 2013).

Bourneow ve ark. (2012), 150 rpm orbital karıştırma hızlarında *S. mobaraensis* suşu kullanarak yaptıkları çalışmada 48 saatlik inkübasyon sonunda enzim aktivitesini 0,85 (±0,01) Ünite/ml olarak belirlemişlerdir. Aynı çalışmada daha büyük hacimde besiyeri kullanıldığında, aynı aktivite değerine 18 saat sonunda ulaşılmıştır. Portilla-Rivera ve ark. (2009), farklı orbital karıştırma hızlarının (200, 300, 400 rpm) *S. ladakanum*'un enzim üretimine etkilerini araştırdıkları çalışmada, melas ve gliserol ile hazırlanan besiyerinde 300 rpm karıştırma hızlarında en yüksek enzim

aktivitesine (0,460 Ünite/ml, 72 saat) ulaştıklarını, daha yüksek karıştırma hızlarında enzimin denatüre olması sonucu ve daha düşük hızlarda ise difüzyon problemlerinden dolayı aktivitenin azaldığını bildirmişlerdir. Yüksek karıştırma hızları kütle ve oksijen transferi açısından mikrobiyal gelişmeyi olumlu yönde etkilerken, mekanik stres ve oksijen stresi gibi unsurlar mTG enzim aktivitesini olumsuz etkileyebilmektedir.

Yan ve ark. (2005), *S. mobaraense* WSH-Z2 suşu ile fermentörde farklı karıştırma hızlarında (250, 350, 450 rpm) ve kontrollü şartlarda (1 v/v/dak hava, 30°C, pH 6,7-7,2) gerçekleştirdikleri mTG üretimlerinde, fermentasyon süresince besiyerindeki DO miktarının ilk evrede hızlı bir şekilde azaldığını ve son evrede stabil kaldığını gözlemlemişlerdir. Bu durum ilk evrede hücrelerin oksijen tüketim hızlarının oksijen transfer hızından daha yüksek olması ve daha sonra dengeye ulaşılması ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca araştırmacılar sabit karıştırma hızında (350 rpm) hava akış hızlarını değiştirerek (0,75-2,0 v/v/dak) iki kademeli DO kontrol stratejisi ile mTG üretimini arttırmaya yönelik yaptıkları çalışmada ise mTG aktivitesinde yaklaşık %15'lik bir artış sağlamışlardır.

Mikrobiyal stres faktörleri: Stres aracılı bir biyoproses biyolojik hedef verimliliğini arttırmak için tasarlanmış bir diğer stratejidir. Besiyeri bileşiminde bulunan karbon, azot veya fosfat gibi kaynakların tükenmesi ile hücre gelişimi kısıtlanır ve bu sayede ikincil metabolitlerin üretimi sağlanabilir. Stres faktörleri göz önünde bulundurularak oluşturulan fermentasyon sistemleri ile istenen metabolitin üretimi artırılabilir (Tablo 3). Stres faktörleri arasında, ısıl şok bakteriler gibi biyolojik hücreler için hassas ve yararlı bir uyarıcıdır. Sıcaklık, tuz, alkol ve pH ikincil metabolit üretimini etkileyen önemli beslenme dışı stres faktörlerindedir. Mikrobiyal TG gibi ikincil metabolit olan antibiyotikler üzerine yapılmış çalışmalarda ısıl şok, alkol ve tuz uygulaması gibi stres faktörlerinin üretimi olumlu yönde etkilediği görülmüştür (Rigali ve ark., 2008). *Streptomyces* türlerinin karmaşık sinyal iletim sistemlerine sahip olduğu bilinmektedir. *Streptomyces* suşlarının farklı stres türlerine farklı sigma faktörleri ile tepki verdiği ve çevresel şok türlerine bağlı olarak bir dizi benzersiz sinyal iletim mekanizmasını devreye soktuğu düşünülmektedir (Kim ve ark., 2008).

Tablo 3 Bazı mikrobiyal ürünlerin sentezinde artış sağlayan stres faktörleri

Table 3 Stress factors that increase the synthesis of some microbial products

Stres Faktörü	Suş	Ürün	Kaynak
Isıl şok	<i>E. coli</i>	β -galaktosidaz	Umakoshi ve ark. (1998)
Isıl şok- alkol	<i>S. venezuelae</i>	Jedomisin b	Doull ve ark. (1994)
Isıl şok- alkol- Tuz	<i>P. fluorescens</i> S272	Antibiyotik	Nakata ve ark. (1999)
Isıl şok- alkol-Tuz	<i>Micromonospora</i> sp.	Gentamisin	Himabindu ve ark. (2007)
Isıl şok- alkol-Tuz	<i>S. mobaraensis</i>	Transglutaminaz	Zhang ve ark. (2012a,b)
Isıl şok- Oksidatif stres	<i>S. griseus</i>	Kitosanaz	Ngo ve ark. (2009)
Oksidatif stres	<i>S. coelicolor</i>	Peroksidaz Glutation redüktaz	Lee ve ark. (1993)
Alkol	<i>Aspergillus niger</i>	Sitrik asit	Haq ve ark. (2003)

Örneğin *Bacillus* cinsine ait bakteri türleri besinsel yokluk, sıcaklık ve nem değişiklikleri, oksidatif stres, tuz konsantrasyonunda ani yükselme gibi ani olumsuz çevresel değişikliklere karşı korunmak için oldukça karmaşık düzenleyici sistemler geliştirmişlerdir. *Bacillus subtilis* hücreleri spor oluşturarak, degradatif enzim ve/veya genel stres proteinleri sentezleyerek çevresel stres faktörlerine karşı cevap verebilmektedir. Bir toprak bakterisi olan *B. subtilis* özellikle tuz stresine karşı adaptasyon mekanizmaları geliştirmiştir. Bu düzenleyici mekanizmalar çok sayıda genin ifadesinde meydana gelen değişimleri içermektedir. *B. subtilis* için en az üç ayrı tuz stres uyarım mekanizması bildirilmiştir (Gabbrakmanova ve ark., 2005).

Stres ortamı genellikle bakteriyel hücrelerin potansiyel davranışını açığa çıkarabilir. Özellikle ısıl şokların iyi bir uyarıcı olduğu bilinmektedir. Bazı bakterilerde var olduğu bilinen ısıl şok proteinlerinin, proteinlerin yeniden katlanma ve translokasyonunda önemli rolleri olduğu tanımlanmıştır (Ngo ve ark., 2009). Bazı mikroorganizmalar sıcaklık stresine bağlı olarak stres proteinlerini sentez eğiliminde olmakta ve bu durum özellikle mikroorganizmaların doğada stres koşullarına karşı adaptasyonundan kaynaklanmaktadır (Völker ve ark., 1992). Mikrobiyal TG enziminin sıcaklık şoklarına karşı stres proteini olarak sentez edilmesi durumunda

enzim aktivitesinde bir artışın beklenmesi söz konusu olabilmektedir (Zhang ve ark., 2012b).

Isıl şok uygulamasının mTG enziminin üretimine etkilerinin incelendiği bir çalışmada, *S. mobaraensis* suşu ile mTG üretiminde ısıl şok uygulaması için kültürler 50, 60 ve 70°C sıcaklıklarda 1 dakika su banyosunda tutulmuş ve enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Sonuçta, 60°C'de uygulanan ısıl şok (1 dak) ile kontrole göre en yüksek enzim aktivitesine (1,16 Ünite/ml) ulaşılmıştır. Ayrıca yüksek sıcaklık uygulamasının (60 ve 70°C) hücre gelişimini yavaşlattığı belirlenmiştir. Araştırmacılar, ısıl şok uygulamalarının, mikrobiyal gelişme evresi tamamlandıktan sonra uygulanmasının etkili olduğunu bildirmişlerdir (Zhang ve ark., 2012b). Ngo ve ark. (2005), ısıl işlemin *S. griseus* fermentasyonunda hücre büyümesini ve kitosanaz enzim üretimini etkilediğini bulmuşlardır. Yaptıkları çalışmada ısıl şok uygulamasının, *S. griseus* suşunun hücre büyümesinde 1,2 kat ve kitosanaz aktivitesinde ise 1,8 kat bir artış meydana getirdiğini bulmuşlardır.

Tuz stresi, *Streptomyces* türlerinde SigB, SigN ve SigH benzeri genel stres cevabı proteinlerinin ifadesini aktive edebilen ve bazı bakterilerde sekonder metabolitleri uyarıcı önemli bir faktördür (Novotna ve ark., 2003; Wang ve ark., 2010). Tuzlar tarafından oluşturulan stres şartları özellikle bakterilerde ikincil

metabolitlerin sentezini uyaran regüle edici proteinlerin aktivasyonunda rol oynayarak enzim sentezinde artış sağlayabilmektedir. Diğer taraftan bu gibi stres ortamlarının mikrobiyal gelişmeyi baskıladığı da bilinmektedir (Zhang ve ark., 2012b). *Streptomyces* türleri tarafından öncül enzimler (pro-mTG) olarak sentezlenen mTG enziminin aktifleştirilmesi amacı ile sentezlenen proteaz enzimleri de tuz stresi altında kontrol edilebilmektedir (Zhang ve ark., 2012b). Zhang ve ark. (2012a) farklı NaCl konsantrasyonlarında yaptıkları çalışmada 0,2 mol/l başlangıç tuz konsantrasyonunda mTG enzim aktivitesinde 2,4 kat artışı sağlamışlardır. Aynı araştırmacılar sekiz farklı tuzu (MgCl₂, NaCl, KCl, Na₂SO₄, C₆H₅Na₃O₇, Na₃PO₄, CH₃COONa ve CaCl₂) 0.2 mol/l konsantrasyonunda besiyerine ilave etmişler ve bu tuzların aktivite üzerine etkisini incelemişlerdir. Çalışmada en yüksek mTG aktivitesi artışı MgCl₂ varlığında belirlenmiştir.

Reaktif oksijen türleri tarafından indüklenen oksidatif stres de kapsamlı olarak incelenmiştir. Hidrojen peroksitin, antijen reseptöründeki sinyalleme başlatılmasında ve çoğaltılmasında ikincil haberci olarak önemli roller oynayabileceği bildirilmiştir (Ngo ve ark., 2009). Bakteriyel hücrelerin oksidatif strese verdiği yanıtlar çoğunlukla *Escherichia coli* ve *Salmonella typhimurium*'de çalışılmıştır. *E. coli*'de birçok oksidatif savunma proteinleri ve genleri bulunmuştur. Bu proteinler ve enzimler H₂O₂ veya serbest radikallerin neden olduğu DNA hasarını onarabilmekte, hücreleri lipid peroksidasyonu gibi zarara karşı koruyabilmektedir. Oksidatif hasarı önlemek veya onarmak için bu tür savunma mekanizmalarının evrimi, aerobik yaşam formlarının hayatta kalması için kritik öneme sahiptir. Hücreleri düşük dozlarda H₂O₂ veya radikal üreten oksitleyicilere maruz bırakmak savunma proteinlerinin uyarılmasını sağlamaktadır (Lee ve ark., 1993). Benzer mekanizmaların mTG enziminin veya pro-mTG aktifleştirilmesinde görevli proteolitik enzimlerin sentezinin uyarılması içinde geçerli olabileceği düşünülmektedir. Lee ve ark. (1993) yaptıkları bir çalışmada, *Streptomyces coelicolor* suşunun 100 µM H₂O₂ ilave edilmiş kültür ortamında farklı oksidatif savunma enzim aktivitelerindeki değişimleri incelemişler ve peroksidaz enziminde 2-4 kat, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminde %60, glutation reduktaz enziminde ise %80'lik bir aktivite artışı sağlandığını bildirmişlerdir.

Yapılan bazı çalışmalarda antibiyotikler ve bazı enzimler için alkol stresinin üretimde bir artış yapabileceği belirtilmektedir. Zhang ve ark. (2012b) farklı alkollerin mTG üretimine etkilerini belirlemek için kültürler fermentasyonun başlangıcında %1, 2 ve 3 oranlarında etanol ve metanol ilave etmişlerdir. Araştırmacılar yaptıkları çalışmada farklı konsantrasyonlarda uygulanan alkol stresinin mTG aktivitesini kontrol örneğine (0,73 Ünite/ml) göre arttırarak; %1 metanol uygulaması ile 1,76 Ünite/ml'ye, %1 etanol uygulaması ile 1,47 Ünite/ml'ye yükseltmişlerdir. Fernández ve ark. (1999), metanol veya etanol varlığında *S. clavuligerus* NP1'in gelişiminin ve durgun fazda hücreler tarafından sentezlenen sefalosporin üretiminde belirgin bir artışın olduğunu bulmuşlardır. Haq ve ark. (2003), metabolitlerin sentezinde alkollerin uyarıcı

etkilerini inceledikleri bir çalışmada, %1,0 (v/v)'lik metanolün, *Aspergillus niger* GCB-47'in sitrik asit üretimini kontrol örneğine göre 1,96 kat yükselttiğini belirlemişlerdir.

TG enzimi tarafından proteinlerde oluşturulan izopeptid bağlarının organizmada fizyolojik önemi bulunmaktadır. Mikroorganizmalar tarafından hücrede oluşturulan çapraz bağlanmış yapılar özellikle ekzojen enzimlere karşı oldukça dayanıklı olup, hidrolizasyona karşı korunmaktadır. Bu nedenle mikroorganizmalar tarafından sentezlenen kılıf, hücre duvarı ve çekirdek proteinleri gibi yapıların ekzojen proteolitik enzimlere karşı korunmasında TG enziminin önemli bir fonksiyonu olabilmektedir (Mehta ve Eckert, 2005).

Sonuç

Özellikle gıda sanayinde birçok alanda geniş kullanım alanı bulan TG enziminin biyosentezi için daha ucuz kaynakların ortaya çıkarılması büyük önem arz etmektedir. Mikrobiyal kaynakların bu konuda önemli bir hedef haline gelmesi, enzimin bu kaynaklardan üretilmesi konusunda daha fazla araştırma ve bilgiye ihtiyaç doğurmaktadır. Bundan sonra yapılacak çalışmalar mikroorganizmalardan mTG enzim üretiminin artırılması ve üretim maliyetlerinin azaltılması yönünde olacağı bir gerçektir. Daha verimli ve etkin bir enzim üretimi, mTG'nin birçok alanda kullanımını ve yaygınlığını arttırmasını sağlayacaktır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalar ışığında, mTG üretiminin verimli hale getirilmesi amacı ile özellikle üretici mikroorganizma tür seçimi, besiyeri bileşen optimizasyonu, uygun fermentasyon şartlarının belirlenmesi, fermentasyon tekniği ve sistemlerinin dizaynı ile genetik yaklaşımlar gibi birçok strateji çalışılmıştır. Biyoproses mühendisliği ve genetik mühendisliği alanında atılan adımlar bu hedefler doğrultusunda büyük gelişmeler kaydetmektedir. *Streptomyces* türlerinden mTG enzim üretimindeki başarı, enzim sentezindeki biyolojik mekanizmanın tam olarak ortaya konmasına bağlıdır. Diğer taraftan enzimin etkin ve verimli bir şekilde üretimi tek başına yeterli olmamakla birlikte saflaştırma teknikleri ve karakterizasyon konusu mTG enziminin endüstriyel anlamda başarıya ulaşmasında kilit rol oynayacaktır.

Teşekkür

Bu çalışma TÜBİTAK (Proje no:1150216) ve Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (Proje no: 2016/59) tarafından maddi olarak desteklenen yüksek lisans tezi kapsamında derlenmiştir.

Kaynaklar

- Aalami M, Leelavathi K. 2008. Effect of microbial transglutaminase on spaghetti quality. J. Food Sci., 73 (5): DOI:10.1111/j.1750-3841.2008.00741.x; PMID:18576974.
- Ando H, Adachi M, Umeda K. 1989. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. Agr. Biol. Chem., 53: 2613-2617. DOI:10.1271/bbb1961.53.2613.
- Bech L, Nørrevang IA, Halkier T, Rasmussen G, Schäfer T, Andersen JT. 2001. U.S. Patent No. 6,190,879. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

- Bhattacharyya B, Pal S, Sen S. 1998. Antibiotic production by *Streptomyces hygroscopicus* D1.5, cultural effect. Rev. Microbiol., 29(3): 254-257. DOI:10.1590/S0001-37141998000300003.
- Bourneow C, Benjakul S, Sumpavapol P, Kittikun A. 2012. Isolation and Cultivation of transglutaminase producing bacteria from seafood processing factories. Innov. Rom. Food Biotechnol., 10: 28-39.
- Celler K, Picioreanu C, van Loosdrecht MCM, van Wezel GP. 2012. Structured morphological modeling as a framework for rational strain design of *Streptomyces* species. Antonie Van Leeuwenhoek, 102(3): 409-423. DOI:10.1007/s10482-012-9760-9; PMID:22718122.
- Chen C, Wang J, Guo H, Hou W, Yang N, Ren B, Zhang L. 2013. Three antimycobacterial metabolites identified from a marine-derived *Streptomyces* sp. MS100061. Appl. Microbiol. Biotechnol., 97(9): 3885-3892. DOI:10.1007/s00253-012-4681-0; PMID:23324803.
- Clarke D, Mycek M, Neidle A, Waelsch H. 1959. The incorporation of amines into protein. Arch. Biochem. Biophys., 79: 338-354. DOI:10.1016/0003-9861(59)90413-8.
- Cui L, Du G, Zhang D, Liu H, Chen J. 2007. Purification and characterization of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygroscopicus*. Food Chem., 105 (2): 612-618. DOI:10.1016/j.foodchem.2007.04.020.
- Doull JL, Singh AK, Hoare M, Ayer SW. 1994. Conditions for the production of jadomycin B by *Streptomyces venezuelae* ISP5230: Effects of heat shock, ethanol treatment and phage infection. J. Ind. Microbiol., 13(2): 120-125. DOI:10.1007/BF01584109; PMID:7764672.
- Fernández MJ, Adrio JL, Piret JM, Wolfe S, Ro S, Demain AL. 1999. Stimulatory effect of growth in the presence of alcohols on biotransformation of penicillin G into cephalosporin-type antibiotics by resting cells of *Streptomyces clavuligerus* NP1. Appl. Microbiol. Biotechnol., 52: 484-488. DOI:10.1007/s002530051549; PMID:10570794.
- Gabdrakhmanova L, Vishniakov I, Sharipova M, Balaban N, Kostrov S, Leshchinskaya I. 2005. Salt stress induction of glutamyl endopeptidase biosynthesis in *Bacillus intermedius*. Microbiol. Res., 160: 233-242. DOI:10.1016/j.micres.2004.05.005; PMID:16035234.
- Gaspar ALC, Goes-Favoni DSP. 2015. Action of microbial transglutaminase (MTGase) in the modification of food proteins: A review. Food Chem., 171: 315-322. DOI:10.1016/j.foodchem.2014.09.019; PMID:25308675.
- Haq I, Sikander A, Qadeer MA, Javed I. 2003. Stimulatory effect of alcohols (methanol and ethanol) on citric acid productivity by a 2-deoxy d-glucose resistant culture of *Aspergillus niger* GCB-47. Bioresource Technol., 86: 227-233. DOI:10.1016/S0960-8524(02)00172-4; PMID:12688464.
- Hasani A, Kariminik A, Issazadeh K. 2014. Streptomycetes: characteristics and their antimicrobial activities. Int. J. Adv. Biol. Biomed. Res., 2: 63-75.
- Heck T, Faccio G, Richter M, Thöny-Meyer L. 2013. Enzyme-catalyzed protein crosslinking. Appl. Microbiol. Biotechnol., 97(2): 461-475. DOI:10.1007/s00253-012-4569-z; PMID:23179622.
- Henzler HJ, Schedel M. 1991. Suitability of the shaking flask for oxygen supply to microbiological cultures. Bioprocess. Eng., 7(3): 123-131. DOI:10.1007/BF00369423.
- Himabindu M, Potumarthi R, Jetty A. 2007. Enhancement of gentamicin production by mutagenesis and non-nutritional stress conditions in *Micromonospora echinospora*. Process Biochem., 42(9): 1352-1356. DOI:10.1016/j.procbio.2007.05.002.
- Ho ML, Leu SZ, Hsieh JF, Jiang ST. 2000. Technical approach to simplify the purification method and characterization of microbial transglutaminase produced from *Streptovorticillium ladakanum*. J. Food Sci., 65 (1): 76-80. DOI:10.1111/j.1365-2621.2000.tb15959.x.
- Kashiwagi T, Yokoyama KI, Ishikawa K, Ono K, Ejima D, Matsui H, Suzuki EI. 2002. Crystal structure of microbial transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*. J. Biol. Chem., 277(46): 44252-44260. DOI:10.1074/jbc.M203933200; PMID:1222108.
- Keiser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. 2000. General introduction to actinomycete biology. In: 'Practical Streptomyces Genetics'. The John Innes Foundation, Basim Yeri: England. ISBN 0-7084-0623-8.
- Kieliszek M, Misiewicz A. 2014. Microbial transglutaminase and its application in the food industry: A review. Folia Microbiol., 59 (3): 241-250. DOI:10.1007/s12223-013-0287-x; PMID:24198201.
- Kim ES, Song JY, Kim DW, Chater KF, Lee KJ. 2008. A possible extended family of regulators of sigma factor activity in *Streptomyces coelicolor*. J. Bacteriol., 190(22): 7559-7566. DOI:10.1128/JB.00470-08; PMID:18790871.
- Kuraishi C, Yamazaki K, Susa Y. 2001. Transglutaminase: its utilization in the food industry. Food Rev. Int., 17 (2): 221-246. DOI:10.1081/FRI-100001258.
- Lantto R. 2007. Protein cross-linking with oxidative enzymes and transglutaminase: effects in meat protein systems. VTT Publ., 642: 1-114.
- Lee JS, Hah YC, Roe JH. 1993. The induction of oxidative enzymes in *Streptomyces coelicolor* upon hydrogen peroxide treatment. Microbiology, 139(5): 1013-1018. DOI:10.1099/00221287-139-5-1013.
- Lin YS, Chao ML, Liu CH, Tseng M, Chu WS. 2006. Cloning of the gene coding for transglutaminase from *Streptomyces platensis* and its expression in *Streptomyces lividans*. Process Biochem., 41(3): 519-524. DOI:10.1016/j.procbio.2005.09.009.
- Luciano FB, Arntfield SD. 2012. Use of transglutaminases in foods and potential utilization of plants as a transglutaminase source;review. Biotemas, 25(4): 1-11. DOI: 10.5007/2175-7925.2012v25n4p1.
- Macedo JA, Sette LD, Sato HH. 2007. Optimization of medium composition for transglutaminase production by a Brazilian soil Streptomyces sp. Electron. J. Biotechnol., 10(4): 618-626. DOI: 10.2225/vol10-issue4-fulltext-10.
- Macedo JA, Cavallieri ALF, Da Cunha RL, Sato HH. 2010. The effect of transglutaminase from *Streptomyces* sp. CBMAI 837 on the gelation of acidified sodium caseinate. Int. Dairy J., 20 (10): 673-679. DOI:10.1016/j.idairyj.2010.03.014.
- Manteca A, Sanchez J, Jung HR, Schwämmle V, Jensen ON. 2010. Quantitative proteomics analysis of *Streptomyces coelicolor* development demonstrates that onset of secondary metabolism coincides with hypha differentiation. Mol. Cell Proteomics, 9(7): 1423-1436. DOI:10.1074/mcp.M900449-MCP200; PMID:20224110.
- Mariniello L, DiPierro P, Giosafatto CVL, Sorrentino A, Porta R. 2008. Transglutaminase in food biotechnology. In Recent Research Developments in Food Biotechnology. Enzymes as Additives or Processing Aids, Edited by: Porta, R., Di Pierro, P. and Mariniello, L. 185-211. Kerala, India: Research Signpost, Fort P.O.
- Mehta K, Eckert RL. 2005. Transglutaminases: family of enzymes with diverse functions (Vol. 38). USA, Karger Medical and Scientific Publishers, ISBN:1660-8984.
- Min B, Green BW. 2008. Use of microbial transglutaminase and nonmeat proteins to improve functional properties of low NaCl, phosphate-free patties made from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) belly flap meat. J. Food Sci., 73(5): 218-226. DOI:10.1111/j.1750-3841.2008.00758.x; PMID:18576994.
- Motoki M, Seguro K. 1998. Transglutaminase and its use for food processing. Trends Food Sci. Tech., 9(5): 204-210. DOI:10.1016/S0924-2244(98)00038-7.

- Nagy V, Szakacs G. 2008. Production of transglutaminase by *Streptomyces* isolates in solid state fermentation. Lett. Appl. Microbiol., 47(2): 122-127. DOI:10.1111/j.1472-765X.2008.02395.x; PMID:18673432.
- Nakata K, Yoshimoto A, Yamada Y. 1999. Promotion of antibiotic production by ethanol, high NaCl concentration, or heat shock in *Pseudomonas fluorescens* S272. Biosci. Biotechnol. Biochem., 63: 293-297. DOI:10.1271/bbb.63.293; PMID:10192908.
- Negus SS. 2001. A Novel Microbial Transglutaminase Derived From *Streptovorticillium baldacii*. Doctoral dissertation, Australia, Griffith University.
- Ngo KX, Umakoshi H, Ishi H, Bui HT, Shimanouchi T, Kuboi R. 2009. Oxidative/heat stress enhanced production of chitosanase from *Streptomyces griseus* cells through its interaction with liposome. J. Biosci. Bioeng., 108: 471-476. DOI:10.1016/j.jbiosc.2009.06.010; PMID:19914578.
- Ngo KX, Umakoshi H, Shimanouchi T, Jung HS, Morita S, Kuboi R. 2005. Heat-enhanced production of chitosanase from *Streptomyces griseus* in the presence of liposome. J. Biosci. Bioeng., 100: 495-501. DOI:10.1263/jbb.100.495; PMID:16384787.
- Novotna J, Vohradsky J, Berndt P, Gramajo H, Langen H, Li X, Thompson CJ. 2003. Proteomic studies of diauxic lag in the differentiating prokaryote *Streptomyces coelicolor* reveal a regulatory network of stress induced proteins and central metabolic enzymes. Mol. Microbiol., 48(5): 1289-1303. DOI:10.1046/j.1365-2958.2003.03529.x; PMID:12787356.
- Pasternack R, Dorsch S, Otterbach JT, Robonek IR, Wolf S, Fuchbauer HL. 1998. Bacterial pro-TGase from *Streptovorticillium mobaraense* purification, characterization and sequence of the zymogen. Eur. J. Biochem., 257: 570-576. DOI:10.1046/j.1432-1327.1998.2570570.x; PMID:9839945.
- Portilla-Rivera OM, Téllez-Luis SJ, Ramírez de León JA, Vázquez M. 2009. Production of microbial transglutaminase on media made from sugar cane molasses and glycerol. Food Technol. Biotechnol., 47(1): 19-26. ISSN 1330-9862.
- Rattleff S. 2013. Heterologous protein production in *Streptomyces lividans*. Doctoral dissertation, Phd thesis, Technical University of Denmark, Denmark.
- Rigali S, Titgemeyer F, Barends S, Mulder S, Thomae AW, Hopwood DA, Van Wezel GP. 2008. Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. EMBO reports, 9(7): 670-675. DOI:10.1038/embor.2008.83; PMID:18511939.
- Romeih E, Walker G. 2017. Recent advances on microbial transglutaminase and dairy application. Trends Food Sci. Tech., 62, 133-140. DOI:10.1016/j.tifs.2017.02.015.
- Ryzka L, Krakowiak A, Trzcinska M, Czajak J. 2009. Effect of culture conditions on biosynthesis of transglutaminase by *Streptovorticillium mobaraense*. Pamiętnik Puławski, 151(2).
- Schoolfield RM, Sharpe PJH, Magnuson CE. 1981. Non-linear regression of biological temperature-dependent rate models based on absolute reaction-rate theory. J. Theor. Biol., 88(4): 719-731. DOI:10.1016/0022-5193(81)90246-0.
- Souza, C.F.De., Flôres, S.H., ve Ayub, M.A.Z., 2006. Optimization of medium composition for the production of transglutaminase by *Bacillus circulans* BL32 using statistical experimental methods. Process Biochem., 41(5): 1186-1192.
- Téllez-Luis SJ, González-Cabrales JJ, Ramírez JA, Vázquez M. 2004a. Production of transglutaminase by *Streptovorticillium ladakanum* NRRL-3191 grown on media made from hydrolysates of sorghum straw. Food Technol. Biotechnol., 42(1): 1-4. ISSN 1330-9862.
- Téllez-Luis SJ, Ramírez JA, Vázquez M. 2004b. Production of transglutaminase by *Streptovorticillium ladakanum* NRRL-3191 using glycerol as carbon source. Food Technol. Biotechnol., 42(2): 75-81. ISSN 1330-9862.
- Umakoshi H, Kuboi R, Komasa I, Tsuchido T, Matsumura Y. 1998. Heat-induced translocation of cytoplasmic β -galactosidase across inner membrane of *Escherichia coli*. Biotechnol. Prog., 14: 210-217. DOI:10.1021/bp970111a; PMID:9548771.
- Völker U, Mach H, Schmid R, Hecker M. 1992. Stress proteins and cross-protection by heat shock and salt stress in *Bacillus subtilis*. Microbiology, 138(10): 2125-2135. DOI:10.1099/00221287-138-10-2125; PMID:1362210.
- Wang C, Long X, Mao X, Dong H, Xu L, Li Y. 2010. SigN is responsible for differentiation and stress responses based on comparative proteomic analyses of *Streptomyces coelicolor* wild-type and sigN deletion strains. Microbiol. Res., 165(3): 221-231. DOI:10.1016/j.micres.2009.05.003; PMID:19700271.
- Wang L, Ridgway D, Gu T, Moo-Young M. 2005. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. Biotechnol. Adv., 23(2): 115-129. DOI:10.1016/j.biotechadv. 2004. 11.001; PMID:15694123.
- Whitaker A. 1980. Fed-batch culture. Process Biochem., 15(4): 10-18.
- Williams S, Goodfellow M, Alderson G, Wellington E, Sneath P, Sackin M. 1983. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. J. Gen. Microbiol., 129: 1743-1813. DOI:10.1099/00221287-129-6-1743; PMID:663 1406.
- Yan G, Du G, Li Y, Chen J, Zhong J. 2005. Enhancement of microbial transglutaminase production by *Streptovorticillium mobaraense*: application of a two-stage agitation speed control strategy. Process Biochem., 40(2): 963-968. DOI:10.1016/j.procbio.2004.04.002.
- Yildirim M, Hettiarachchy N. 1998. Properties of films produced by Cross-linking whey proteins and 11S globulin using transglutaminase. J. Food Sci., 63(2): 248-252. DOI:10.1111/j.1365-2621.1998.tb15719.x.
- Yüksel Z, Erdem YK. 2007. Gıda endüstrisinde transglutaminaz uygulamaları: 1- Enzimin genel özellikleri. Gıda, 32 (6): 287-292.
- Zhang D, Zhu Y, Chen J. 2009. Microbial transglutaminase production: Understanding the mechanism. Biotechnol. Genet. Eng., 26 (1): 205-222. DOI:10.5661/bger-26-205.
- Zhang L, Zhang L, Han X, Du M, Zhang Y, Feng Z, Zhang Y. 2012a. Enhancement of transglutaminase production in *Streptomyces mobaraensis* as achieved by treatment with excessive MgCl₂. Appl. Microbiol. Biotechnol., 93(6): 2335-2343. DOI:10.1007/s00253-011-3790-5; PMID: 22170107.
- Zhang L, Zhang L, Yi H, Du M, Zhang Y, Han X, Feng Z, Li J, Jiao Y, Zhang Y, Guo C. 2012b. Enhancement of transglutaminase production in *Streptomyces mobaraensis* DSM 40587 by non-nutritional stress conditions: Effects of heat shock, alcohols, and salt treatments. Korean J. Chem. Eng., 29: 913-917. DOI:10.1007/s11814-011-0274-3.
- Zheng M, Du G, Chen J. 2002a. pH control strategy of batch microbial transglutaminase production with *Streptovorticillium mobaraense*. Enzyme Microb. Technol., 31(4): 477-481. DOI:10.1016/S0141-0229(02) 00127-8.
- Zheng M, Du G, Chen J, Lun S. 2002b. Modelling of temperature effects on batch microbial transglutaminase fermentation with *Streptovorticillium mobaraense*. World J. Microbiol. Biotechnol., 18(8): 767-771. DOI:10.1023/A: 1020472908615.

- Zheng M, Du G, Guo W, Chen J. 2001. A temperature-shift strategy in batch microbial transglutaminase fermentation. *Process Biochem.*, 36(6): 525-530. DOI:10.1016/S0032-9592(00)00229-6.
- Zhu Y, Rinzema A, Tramper J, Bol J. 1995. Microbial transglutaminase: a review of its production and application in food processing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 44(3-4): 277-282. DOI:10.1007/BF00169916.
- Zhu Y, Rinzema A, Tramper J, Bol J. 1996. Medium design based on stoichiometric analysis of microbial transglutaminase production by *Streptovercillium mobaraense*. *Biotech. Bioeng.*, 50(3): 291-298. DOI:10.1002/(SICI)1097-0290(19960505)50:3<291:AID-BIT8>3.0.CO;2-B; PMID:18626957.
- Zhu Y, Rinzema A, Tramper J, Bruin ED, Bol J. 1998. Fed-batch fermentation dealing with nitrogen limitation in microbial transglutaminase production by *Streptovercillium mobaraense*. *Appl. Microbiol. Biot.*, 49: 251-257. DOI:10.1007/s002530051165.
- Zhu Y, Tramper J. 2008. Novel applications for microbial transglutaminase beyond food processing. *Trends Biotechnol.*, 26: 559-565. DOI:10.1016/j.tibtech.2008.06.006; PMID:18706723.
- Zilda DZ. 2014. Microbial transglutaminase: source, production and its role to improve surimi properties. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*, 9(1): 35-44. DOI:10.15578/squalen.v9i1.82.