

# MİKROBİYAL TRANSGLUTAMİNAZIN ÖZELLİKLERİ VE GIDA SANAYİNDE KULLANILMA OLANAKLARI

## PROPERTIES OF MICROBIAL TRANSGLUTAMINASE AND APPLICATION ON FOOD PROCESSING

Zübeyde ÖNER<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, 32260 Isparta

**ÖZET:** Bu çalışmada *Streptovorticillum mobaraense* kullanılarak elde edilen transglutaminaz enziminin özellikleri ve uygulama olanakları üzerinde durulmuştur. Mikrobiyal transglutaminaz kazein, soya fasulyesi globulini, gluten, aktin, miyosin ve yumurta proteini gibi birçok gıda proteinleri ile çapraz bağlar meydana getirir, ancak diğer transglutaminazlardan farklı olarak bağlantı yapmak için Ca 'a ihtiyaç duymaz ve düşük molekül ağırlığına sahiptir. Mikrobiyal transglutaminazın et, balık, unlu mamüller ve süt endüstrisinde kullanım olanakları üzerinde birçok çalışma ortaya konmuştur .

**Anahtar Kelimeler:** Mikrobiyal transglutaminaz, çapraz bağlama, kazein, jelleşme

**ABSTRACT:** In this study, some properties and applications of the transglutaminase (TGase) referred to as microbial TGase (MTGase), derived from a variant of *Streptovorticillum mobaraense* are described. MTGase cross-linked most food proteins, such as caseins, soybean globulins, gluten, actin, myosins, and egg proteins, as efficiently as mammalian TGases by forming lysine bond. However, unlike many other TGases, MTGase is calcium-independent and has a relatively low molecular weight. Both of these properties are of advantage in industrial applications; a number of studies have illustrated the potential of MTGase in fish, meat, baked food and milk products.

**Keywords:** Microbial transglutaminase, cross-linking, casein, gelation

### GİRİŞ

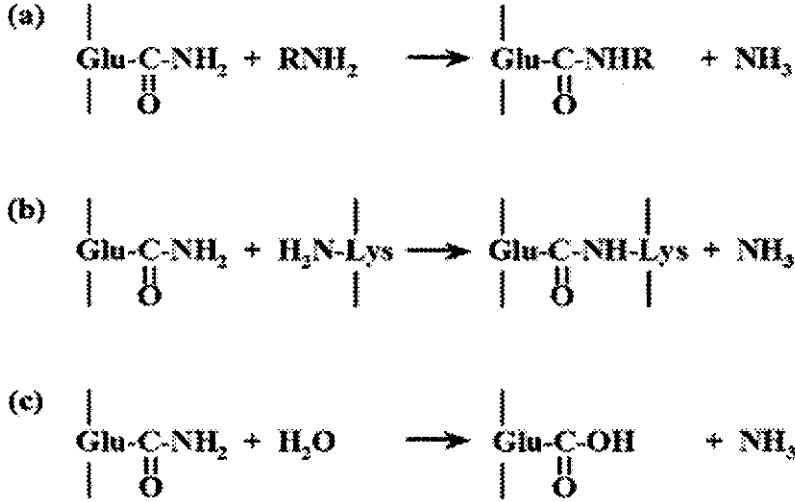
Mikrobiyal transglutaminaz (MTG ; protein-glutamine  $\gamma$ -glutamyl transferase EC 2. 3. 2. 13) son zamanlarda geliştirilmiş bir enzimdir. Bu enzim açıl-transferaz reaksiyonları ile kovalent çapraz bağlanmayı katalize eder ve yüksek moleküllü polimerler yaratır. Farklı kaynaklardan elde edilebilir, bakteriden, bitkilerden ve memelilerden saflaştırılabilir. Ancak farklı kaynaklardan elde edilen transglutaminaz (TG) enzimlerinin strüktürel özellikleri ve oynadıkları rol birbirinden oldukça farklıdır. TG arasında plazma transglutaminaz (memeli ve insanlardan sağlanan faktör XIII a) en fazla çalışılan enzimlerden biridir. Bu enzim kan pıhtılaşma işleminde önemli rol oynar, fibrin yapısının kuvvetlenmesinde fibrin moleküllerini çapraz bağlayarak gerekli ağ yapısını oluşturur. Doku TG enziminin ise birçok hastalıkla ilgisi olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur. (Citron vd 2002, Karpuj, Becher, Steinman 2002, De Jong, Wijngaards ve Koppelman 2003). *Streptovorticillum griseoconum*, *Streptovorticillum cimomoneum* subsp.*cinnanoneum* ve *Streptovorticillum morbaraense* MTG elde edilmek için kullanılan mikroorganizmalardır.

*Streptovorticillum mobaraense*'nin aşırı miktarda TG üretimi bu enzimin gıda endüstrisinde ekonomik olarak kullanımının yaygınlaşmasına neden olmuştur. Et üretiminde salam tipi sosislerde ve balık ezmelerinde elastikiyeti artırır ve jelin sıklığını sağlar. Süt ürünlerinde kazeinin TG için iyi bir substrat olduğu gösterilmiştir. Peynir, yoğurt ve düşük kalorili dondurma için kullanımı oldukça uygundur (Lauber, Henle ve Klastermayer 2000).

### Transglutaminaz Reaksiyonları

Transglutaminazlar proteinlerin içinde glutamin ve lizin arasında kalan kısma izopeptid bağlarla bağlanarak, hücre içi ve hücreler arası kovalent çapraz bağlar meydana getirirler. Proteinlerin çapraz bağlanması yüksek molekül ağırlıklı polimerlerin oluşmasına sebep olur. Bu reaksiyonun yanı sıra TG tarafından katalizlenen iki reaksiyon daha vardır. Bunlardan birincisi, TG'ların primer aminlerin bulunduğu ortamlarda proteinin glu-

taminlerini aminlere çapraz bağlayabildiği açıl-transfer reaksiyonlardır. İkincisi ise lisin ve primer aminlerin bulunmadığı ortamlarda suyun nükleotid gibi reaksiyona girmesi ve glutaminlerin deamidasyonudur (Ohtsuka, Umezawa, Nio ve Kubato 2001). Bu üç TG reaksiyonu gıda proteinlerinin fonksiyonel özelliklerini modifiye etmede kullanılabilir (Şekil 1).



Şekil 1 : Transglutaminaz ile katalizlenen mekanizmalar, a. Acil transfer b. Protein veya peptidlerde Gln ve Lys çapraz bağlantısı c. Deamidasyon (Kashiwagi vd 2002)

TG'lar tarafından oluşturulan proteinlerin hücre içi ve hücre arası çapraz bağlantılarını SDS-PAGE ile tespit etmek mümkündür. Çapraz bağlamanın miktarı ile ilgili bilgi elde etmenin bir yolu da amonyak üretimidir. TG reaksiyonunda oluşan amonyağı tespit eden bu yöntem SDS-PAGE analizlerinin doğru sonuç vermediği noktada çapraz bağlanmanın hızı hakkında bilgi verir. Amonyak ölçümünün dezavantajı analizin çapraz bağlanma, açıl transfer ve deamidasyonu ayırt edebilme özelliğinin olmamasıdır.

### Substrat Spesifikliği

Transglutaminazların substratlara özgü olduğu bilinmektedir. *Streptovercillium*'dan elde edilen TG 'lar memeli kanından elde edilen plazma ve eritrosit transglutaminazlarından daha yüksek sayıda substrat proteinleri ile reaksiyona girmektedir. Çizelge 1' de gıda proteinleri ile ilgili olan TG 'ların substrat spesifikliğini gösteren bilgiler bulunmaktadır.

Plazma TG ve kan TG ile mikrobiyal TG arasında önemli farklardan bir tanesi kan plazma TG lar kanda pro-enzim şeklinde meydana gelmesidir. Kanın pıhtılaşmasındaki fizyolojik fonksiyonu aktif enzimi oluşturmak için parçalanmaya ihtiyaç duyar. Bu amaç için aktive olmuş proteaz trombindir. Gıdadaki uygulamalar için hayvan kanından elde edilen trombinin ilavesi ile pro-enzim aynı şekilde aktive olur. Eritrosit TG'ın aktivitesi için sisteinin ortamda bulunması temeldir.

Substrat proteinlerinden glutaminin ve lisinin kullanımı TG'lar ile çapraz bağ oluşturması ile ilişkilidir. Kazein ve jelatin gibi bazı proteinler bakterial TG'lar ile kullanıma hazır lisin ve glutamin içerdikleri için kolayca çapraz bağlanabilirler. Glutamin ve lisinin reaksiyona girebilme olanağını artırabilmek için indirgeyici madde ilavesi yapılır. Bu madde DTT (dithiotreitol) dir. DTT ilavesi ile disülfid bağları azalır protein yapısı açılır ve TG' ler ile çapraz bağlanma meydana gelir. A-laktoalbumin ve b-laktoglobulin gibi birçok protein DTT ilavesinden sonra çapraz bağlanabilir.

**Transglutaminaz İnhibitörleri**

Yapmış oldukları reaksiyonların çeşitliliği nedeniyle TG inhibitörlere ilgi oldukça fazladır. Cystamine, N-ethyl mole-imide, iodoacetate ve paramercuribenzoik asit benzeri inhibitörlerin TG aktivitesini inhibe ettiği çok iyi bilinmektedir. Bunlar tiol grup üzerindeki reaksiyonla TG'in aktif tarafını bloklar (Kobayashi vd 1996, De Jong, Wijngaards ve Koppelman 2003).

Transglutaminazların doğal inhibitörleri nadir bulunur. Belirli peptidlerin

plazma TG aktivitesini inhibe ettiği bilinmektedir (Finney, Seale, Sawyer, Wallis 1997, De Jong Wijngaards ve Koppelman 2003). Ancak funguslar tarafından üretilen antimikrobiyal cerulen'in plazma TG'in doğal peptid olmayan inhibitörü olduğu belirtilmiştir. Son zamanlarda funguslardan izole edilen alutacenoic asitlerinde plazma TG için güçlü bir inhibitör olduğu gösterilmiştir (Kogen vd 2000).

**Mikrobiyal Transglutaminazın Özellikleri**

MTG oldukça geniş pH aralığında ( pH 4-9) çalışır. Enzimatik aktivite için optimum sıcaklık 50 °C dir ve bu sıcaklıkta 10 dak. aktivite kaybı olmaz ancak, 70 °C' de birkaç dakika içinde aktivitesini kaybeder.

Substrat aktivitesi ile ilgili olarak birçok gıda proteinleri, baklagil proteinleri, buğday gluteni, yumurta sarısı, yumurta beyazı proteinleri, aktinler, myosin, fibrin, kazein, a-laktoalbumin ve b-laktoglobulin ve diğer birçok albuminler MTG ile çapraz bağlanabilir.

TG'ların enzimatik aktivitesini gösterebilmesi için Ca<sup>2+</sup> iyonlarına ihtiyaç duyarlar ancak *Streptoverticillium mobarense*'den elde edilen MTG Ca<sup>2+</sup> ihtiyaç duymaz. Bu bakımdan diğer TG enzimlerinden farklıdır. Cu, Zn, Pb ve Li gibi ağır metaller sisteinin thiol grubunu bağladıkları için mikrobiyal transglutaminazı inhibe eder.

**Gıda İşletmelerinde MTG Uygulamaları**

Birçok gıda proteini MTG ile inkübe edildiğinde jel yapısı oluşturur. Jel oluşum karakteristiği ve jel oluşumu şu şekildedir:

- Isıtma ile jelleşmeyen proteinler jelleşebilir.
- Normal olarak eriyen jeller TG jelasyonundan sonra artık erimez.
- Su-yağ emülsiyonlarındaki protein şeker ve/veya tuz ortamında jelleşebilir.
- Isıtma işleminden sonra jel sıklığı artar.
- Deterjanlarla bu jeller çözünemez.

Bu özelliklerinden dolayı film uygulamalarında kolaylıkla kullanılabilir ve protein tekstürü için çok yararlıdır (Motoki ve Seguro 1994, 1998 ).

**Süt Ürünlerinde MTG Uygulamaları**

Geleneksel olarak süt jelleri asitlendirme veya rennet ile oluşur. Bu jellerin zayıf kovalent olmayan bağlarla oluştuğu düşünülür. Süt asitlendiği zaman kazein misellerinde kompleks fiziko-kimyasal miseller oluşur. Bunun oluşum pH ve sıcaklığa bağlıdır (Heertje, Visser ve Smits 1985, Roefs, Walstra, Dalgleish ve Horne 1985, Fox ve Mulvihill 1990, Schorsch, Carrie, Clark ve Norton 2000). Asitlendirme süresince ilk adım k-kazeinin nötralizasyonu sonucu oluşan çökme olayıdır. Bu kalsiyum fosfat ile ilişkilidir. Diğer taraftan sütün rennet ile pıhtısı iki kademeli işlemdir. Birinci basamak k-kazeinin, para k-kazein ve peptidlere enzimatik olarak parçalanmasını içerir. Bu durumda kalsiyum karşısında a<sub>s1</sub> ve b kazeinleri stabilitesi bozulur, ikinci basamakta ise stabilize olmayan miseller çöker. Asitlendirme ile oluşan jel yapısı rennet ile oluşan jel yapısından farklıdır.

Birçok araştırmacı süt kazeininin ısıtma ile jel oluşturmadığını ve MTG ile jel oluşturduğunu göstermiştir. Yoğurt üretiminde laktik kültür asit oluşturarak asidik jel meydana getirir ancak, fiziksel etkilerle ve sıcaklık de-

**Çizelge 1. Bazı TG'lerin Gıda Proteinleri ile Substrat Spesifliği**

	Eritrosit TG	Plazma TG	Bakteriyel TG
a-laktoalbumin	±	±	++
b-laktoglobulin	-	±	++
BSA	+	+	++
Kazein	++	++	++
Hemoglobin	-	±	±
Miyosin	-	++	++
Soyaglisin	++	-	++

-, çapraz bağlanma yok; ±, düşük çapraz bağlanma; +, orta çapraz bağlanma, ++, hızlı çapraz bağlanma (de Jong vd.2001).

ğişiminde serum ayrılması mümkündür. MTG su tutma kapasitesine sahip olduğu için bu sorunu ortadan kaldırır. Aynı şekilde dondurma, peynir gibi düşük yağlı veya yağsız kuru maddesi azaltılmış ürünlerde başarı ile kullanılabilir (Motoki ve Seguro 1998).

#### **Balık Ürünlerinde MTG Uygulamaları**

MTG enziminin düşük sıcaklıkta uygulanması ile balık ezmelerinde ve bazı geleneksel Japon balık ürünlerinde jel yapısının ve viskoelastik özelliklerin olumlu yönde etkilendiği birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir (Seki vd 1990, Kumazawa, Nakanishi, Yasueda ve Motoki 1996).

#### **Unlu Mamüllerde MTG Uygulamaları**

MTG kullanımı ile unlu mamüllerde meydana gelebilen tekstür bozukluklarını önlediği Sakamoto vd (1996) tarafından belirtilmiştir. Ekmek yapımında MTG kullanımı hacim artışına sebep olur ve ekmeğin içine katılması ile bileşiminde zenginleşme meydana gelir.

#### **Soya Ürünlerinde MTG Uygulaması**

MTG reaksiyonları için soya proteinleri 11S ve 7S globulinler iyi substrattır. Soya proteininden üretilen tofu uzun süre depolanması zor olan bir gıdadır, ancak MTG kullanımı ile hazırlanan tofu'nun uzun süre bozulmadan saklandığı belirtilmiştir (Yokoyama, Nio ve Kikuchi 2004).

### **KAYNAKLAR**

- Citron B A, Suo Z, Santacruz K, Davies P J Qin E and Festoff B W. 2002. Protein crosslinking,tissue transglutaminase, alternative splicing and neurodegeneration. *Neurochemical Int*, 40:69-78.
- De Jong G A, Wijngaards H G, Boumans H, Koppelman S J and Hessing M. 2001. Purification and substrate specificity of transglutaminases from blood and Streptovorticillium mobaraense. *J Agricultural Food Chem*, 49:3389-3393.
- De Jong G A, Wijngaards H G and Koppelman S J. 2003. Transglutaminase Inhibitor from milk. *J of Food Sci*, 68(3): 820-825.
- Finney S, Seale L, Sawyer R T, and Wallis R B. 1997. Tridegin, a new peptidic inhibitor of factor XIIIa, from the blood-sucking leech Haementeria ghilianii. *Biochem J*, 324:797-805.
- Fox P and Mulvihill F D M. 1990. Casein. In P. Harris, *Food gels London: Elsevier Appl Sci*.
- Heertje I, Visser J and Smits P. 1985. Structure formation in acid gels. *Food Microstructure*, 4: 267-277.
- Karpuj M V, Becher M W and Steinman L. 2002. Evidence for a role for transglutaminase in Huntington's disease and the potential therapeutic implications. *Neurochemical Int*, 40: 31-36.
- Kashiwagi T, Yokoyama K, Ishikawa K, Ono K, Ejima D, Matui H and Suzuki E. 2002. Crystal structure of microbial transglutaminase from Streptovorticillium mobaraense. *J Biol Chem*, 277 (46): 44252-44260
- Kobayashi K, Yuko T, Yuzuru E, Kiyoshi M, Shunichi S, Kenzo Y, Kenichi H and Shiguru Y. 1996.14 Aug.Bacillus-derived transglutaminase JP patent, 9131180.
- Kogen H, Kiho T, Tago K, Miyasomato S, Otsuka N, Suzuki-Konagai and K, Ogita T. 2000. Alutacenoic acids A and B,rare naturally occurring cyclopropanone derivatives isolated from fungi:Potent non-peptide factor XIIIa inhibitors.*J American Chem Soc*, 122:1842-1843.
- Kumazawa Y, Nakanishi K, Yasueda H and Motoki M. 1996. Purification and characterization of transglutaminase from walleye pollack liver. *Fish Sci*, 62:959-964
- Lauber S, Henle T and Klastermayer H. 2000. Relationship between the croslinking of caseins by transglutaminase and the gel strength of yoghurt. *Europen Food Res Tech*, 210:305-309.
- Motoki M and Seguro K. 1994. Trends in Japanese Soy Protein Research Inform. 5:308-313.
- Motoki M and Seguro K. 1998. Transglutaminase and its us efor food processing. *Trends in Food Sci and Tech*, 9: 204-210.
- Ohtsuka T, Umezawa Y, Nio N and Kubato K. 2001. Comparison of deamidation activity of transglutaminases. *J Food Sci*, 66: 25-29.
- Roefs S P, Walstra P, Dalglish D G and Horne D S. 1985. Preliminary note on the change of casein micelles caused by acidification. *Neth Milk and Dairy J*, 39: 119-122.
- Sakamoto H, Yamazaki K, Kaga C, Yamamoto Y, Ito R and Kurosawa Y. 1996. Strength enhancement by addition of microbial transglutaminase during Chinese noodle processing. *Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi*. 43:598-602.
- Schorsch, C, Carrie H, Clark A H and Norton I. T. 2000. Cross-linking casein micelles by a microbial transglutaminase conditions for formation of transglutaminase-induced gels. *Int Dairy J*, 10:519-528.
- Seki N, Uno H, Lee Nh, Kimura I, Toyoda K, Fujita T and Arai K. 1990. Transglutaminase activity in Alaska pollack muscle and surimi, and its reaction with myosin b. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56:125-132
- Yokoyama K, Nio N and Kikuchi Y. 2004. Properties and applications of microbial transglutaminase. *App Micro and Biotec*, 1-17.