



UNICAMP

RICARDO RODRIGUES DE MELO

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA
DE UMA NOVA TRANSGLUTAMINASE
MICROBIANA**

***PRODUCTION AND BIOCHEMICAL
CHARACTERIZATION OF A NEW MICROBIAL
TRANSGLUTAMINASE***

**CAMPINAS
2013**



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

RICARDO RODRIGUES DE MELO

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA NOVA TRANSGLUTAMINASE MICROBIANA

Orientadora: Profa. Dra. Hélia Harumi Sato

PRODUCTION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF A NEW MICROBIAL TRANSGLUTAMINASE

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Masters thesis presented to the Food Science Postgraduation Programme of the School of Food Engineering of the University of Campinas to obtain the Master grade in Food Science.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO RICARDO
RODRIGUES DE MELO E ORIENTADO PELA
PROFESSORA. DRa. HÉLIA HARUMI SATO

Assinatura do Orientador

**CAMPINAS
2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MÁRCIA REGINA GARBELINI SEVILLANO – CRB8/3647- BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

M491p Melo, Ricardo Rodrigues de, 1985-
Produção e caracterização bioquímica de uma nova
transglutaminase microbiana / Ricardo Rodrigues de
Melo. -- Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Hélia Harumi Sato.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Transglutaminase microbiana. 2. *Streptomyces*
sp. – Caracterização. 3. Delineamento de experimentos.
4. Taxonomia. 5. Isolamento. I. Sato, Hélia Harumi,
1952-. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Production and biochemical characterization of a new
microbial transglutaminase

Palavras-chave em inglês:

Microbial transglutaminase

Streptomyces sp. – Characterization

Design of experiments

Taxonomy

Isolation

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Hélia Harumi Sato [Orientador]

Juliana Alves Macedo

Luciana Francisco Fleuri

Data da defesa: 06-08-2013

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato
Orientadora

Profa. Dra. Juliana Alves Macedo
Membro Titular (FEA-DEPAN - UNICAMP)

Profa. Dra. Luciana Francisco Fleuri
Membro Titular (INST. BIOCÊNCIAS BOTUCATU – UNESP)

Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso
Membro Suplente (FEA – UNICAMP)

Prof. Dr. Severino Matias de Alencar
Membro Suplente (ESALQ - USP)

Dedico este trabalho à Deus, que me permitiu desenvolvê-lo, aos meus familiares e amigos, pelo apoio e incentivo e a Micaela, que sempre esteve ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento deste projeto de pesquisa foi possível graças à colaboração de várias pessoas tanto da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), como da EMBRAPA meio ambiente.

Agradeço à Profa. Dra. Hélia Harumi Sato, pela orientação e incentivo ao desenvolvimento da pesquisa.

Agradeço também ao Pesquisador. Dr. Tiago Domingos Zucchi, pelos estudos de identificação taxonômicos da linhagem de *Streptomyces* sp. B6 produtora de transglutaminase.

. Agradeço aos pesquisadores e colegas do Laboratório de Bioquímica de Alimentos que sempre estiveram ao meu lado e compartilharam os momentos bons e àqueles nem tão bons. Sem a presença de vocês, não teria tido a menor graça! Obrigado pelo carinho.

Aos queridos funcionários do Laboratório de Bioquímica de Alimentos, por toda amizade e suporte.

À Micaela por todo apoio nos momentos mais difíceis e também nos momentos alegres, por todo amor e companheirismo em minha vida.

À banca examinadora pelas contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

*“Aprender é a única coisa de que a mente
nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se
arrepende.”*

Leonardo da Vinci

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xxi
LISTA DE TABELAS	xxv
RESUMO GERAL	xxix
GENERAL ABSTRACT	xxxiii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPÍTULO 1 – Revisão Bibliográfica - Propriedades, produção e aplicações de transglutaminase microbiana em alimentos.....	5
Resumo	5
Abstract	7
1. Revisão Bibliográfica	8
1.1. Transglutaminase	8
1.1.1 Definição	8
1.1.2 Características e propriedades da transglutaminase	12
1.1.3 Produção da transglutaminase microbiana (MTGase)	15
1.1.4 Aplicações da transglutaminase no processamento dos alimentos	19
1.1.4.1. Produtos cárneos	20
1.1.4.2. Produtos lácteos.....	21
1.1.4.3. Produtos derivados da soja	22
1.1.4.4. Produtos à base de trigo	23
1.1.4.5. Bioavaliação das ligações produzidas pela transglutaminase	24
1.1.5. Outras aplicações da transglutaminase.....	25
2. Referências Bibliográficas	27

CAPÍTULO 2 - Optimization of the composition of the medium using statistical experimental methods and the biochemical characterization of the transglutaminase produced by *Streptomyces* sp. B6..... 43

Abstract	45
1. Introduction	46
2. Materials and Methods.....	47
2.1. Collection of soil samples (ver ANEXO I)	47
2.2. Screening method and preservation of microorganisms	47
2.3. Screening of transglutaminase producing microorganisms	48
2.4. Transglutaminase activity	49
2.5. The 16S rRNA gene sequence and the phylogenetic analysis.....	49
2.6. Dry cell weight determination	49
2.7. Study of transglutaminase production by <i>Streptomyces</i> sp. B6 (ver ANEXO III).....	50
2.7.1. Selection of carbon and nitrogen sources.....	50
2.7.2. Identification of significant components using a Plackett-Burman design.....	51
2.7.3. Optimization of the ingredients using a central composite design (CCD).....	51
2.7.4. Validation of the experimental design results.....	52
2.8. Statistical analysis	53
2.9. Biochemical characterization of the transglutaminase.....	54
2.9.1. Effect of pH on transglutaminase activity and stability	54
2.9.2. Effect of temperature on transglutaminase activity and stability	54
3. Results and discussion	55

3.1. Screening of transglutaminase producing microorganisms and identification of the isolate B6 (ver ANEXO I e II)	55
3.2. Study of transglutaminase production by <i>Streptomyces</i> sp. B6 (ver ANEXO III).....	57
3.2.1. Effect of carbon sources on MTGase production.....	57
3.2.2. Effect of different nitrogen sources on MTGase production.....	57
3.2.3. Study of the effect of the different medium components on MTGase production using a Plackett-Burman design.....	59
3.2.4. Optimization of the medium composition for transglutaminase production using a central composite design (CCD)	60
3.2.5. Validation of the experimental design results.....	63
3.3. Biochemical characterization of the MTGase (ver ANEXO IV)	64
3.3.1. Effect of pH on the transglutaminase activity and stability	64
3.3.2. Effect of temperature on the transglutaminase activity and stability ..	64
4. Conclusions	66
5. Acknowledgements.....	66
6. References	67
CONCLUSÕES FINAIS	73
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	75
ANEXOS – CAPÍTULO 2.....	77
ANEXOS	79
ANEXO I - Isolamento e seleção de micro-organismos produtores de transglutaminase.....	81
ANEXO II – Efeito do tempo de fermentação das linhagens B3 e B6 na produção de transglutaminase em frascos agitados a 30°C.....	87
ANEXO III - Efeito da adição de sais no meio de cultura para a produção de transglutaminase pela linhagem B6	91

ANEXO IV - Efeito de vários compostos na atividade de transglutaminase da linhagem de <i>Streptomyces</i> sp. B6	95
ANEXOS V – Reagentes e materiais específicos.....	99

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1-1 - Reações gerais catalisadas pela transglutaminase (Gerrard et al., 2001)	9
--	---

CAPÍTULO 2

Figure 2-1 - Neighbor-joining tree based on 16S rRNA gene sequences (approx. 1100 bp) showing the relationships between the isolate B6 and strains of phylogenetically closely related members of the genus <i>Streptomyces</i>	56
Figure 2-2 - Effect of different carbon sources (a) and nitrogen sources (b) on MTGase production and dry cell weight.	58
Figure 2-3 – Contour diagrams for the MTGase activity as a function of: (a) glucose <i>versus</i> casein peptone; (b) $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ <i>versus</i> casein peptone; (c) $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ <i>versus</i> glucose concentrations after 96 h of fermentation, according to the CCD.	62
Figure 2-4 – Time course of transglutaminase production by <i>Streptomyces</i> sp. B6 cultivated in the medium after optimization (●) MTGase activity, (▲) dry cell weight, and in the medium before optimization (○) MTGase activity, (Δ) dry cell weight.....	63

Figure 2-5 - The effect of pH on (a) the activity and (b) the stability of crude MTGase from <i>Streptomyces</i> sp. B6. The effect of temperature on (c) the activity and (d) the stability of crude MTGase from <i>Streptomyces</i> sp. B6.....	65
---	----

ANEXO II

Figura II-1 - Efeito do tempo de fermentação na produção de transglutaminase pela linhagem B3, em frascos de Erlenmeyer a 30°C.	88
--	----

Figura II-2 - Efeito do tempo de fermentação na produção de transglutaminase pela linhagem B6, em frascos de Erlenmeyer a 30°C.	88
--	----

ANEXO III

Figura III-1 - Efeito da adição de diferentes fontes de sais no meio de cultura, na produção de transglutaminase e no crescimento da linhagem de <i>Streptomyces</i> B6.....	92
--	----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1-1 – Características das transglutaminases de diferentes origens.	14
--	----

CAPÍTULO 2

Table 2-1 - Coded levels and real values (between brackets) for the experimental design and the results of the Plackett Burman design.....	52
Table 2-2 - Coded levels and real values (between brackets) for the experimental design and results of the CCD.....	53
Table 2-3 - Estimated effects for transglutaminase activity from the results of the P-B design after 72 h of fermentation..	60
Table 2-4 - Analysis of variance and regression analyses for the surface response of the central composite design of transglutaminase production.....	61

ANEXO I

Tabela I-1 - Origem das amostras de solo utilizadas no isolamento de micro-organismos produtores de transglutaminase... ..	82
--	----

Tabela I-2 - Atividade de transglutaminase das linhagens de micro-organismos isolados de amostras de solo a 30 °C.....	83
--	----

Tabela I-3 - Atividade de transglutaminase das linhagens de micro-organismos isolados de amostras de solo a 40 °C.....	84
--	----

ANEXO IV

Tabela IV-1 – Influência de sais, EDTA, L-cisteína e glutatona na atividade de transglutaminase da linhagem <i>Streptomyces</i> sp. B6.....	96
---	----

RESUMO GERAL

Transglutaminase é uma enzima capaz de catalisar a formação de ligações cruzadas intra- e intermoleculares entre proteínas, peptídeos e aminas primárias por meio de ligações covalentes entre resíduos de lisina e glutamina. Desta forma, transglutaminase pode ser utilizada em diversos setores industriais para o desenvolvimento de novos produtos ou para a modificação de suas características. A linhagem B6 isolada de amostra de solo coletada na região do Estado de Minas Gerais foi identificada como tendo características morfológicas típicas de actinomicetos e pela análise da região 16S rRNA há colocou na subclasse *Streptomyces* próximo a linhagem *Streptomyces angustmycinicus* NBRC 3934^T. A fim de aumentar a produção de transglutaminase (2,75 U/mL) pela linhagem *Streptomyces* sp. B6, o meio de fermentação foi submetido a processos de otimização. Como primeiro passo da otimização, o crescimento do micro-organismo e a produção da enzima foram estudados através de uma pré-seleção de fontes de carbono, nitrogênio e sais no meio de produção. Após as análises das diferentes fontes, um delineamento experimental do tipo Plackett-Burman foi utilizado para a seleção dos componentes do meio de cultivo que afetam a produção de transglutaminase. Os resultados do delineamento experimental indicaram que a produção de transglutaminase foi influenciada negativamente pela peptona bacteriológica e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, positivamente pelo amido de batata, glicose, peptona de caseína e $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e não foi influenciada pelo farelo de soja, considerando um nível de confiança de 95%. A concentração de amido de batata foi fixada no maior nível testado no planejamento Plackett-Burman devido à gelificação do meio de fermentação em concentrações maiores. Assim, os três fatores que influenciaram a produção de transglutaminase (glicose, peptona de caseína e $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) foram otimizados para obter o máximo de produção da enzima utilizando delineamento composto central. Sob a condição otimizada, a qual continha 25 g/L de farinha de soja, 35 g/L de amido de batata, 5 g/L de glicose, 24,5 g/L de peptona de caseína e 8 g/L de $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, a atividade

enzimática atingiu 6,13 U/mL, apresentando 125% à mais de atividade em relação á obtida no meio antes da otimização. A transglutaminase microbiana produzida pela linhagem *Streptomyces* sp. B6 exibiu atividade ótima em 45°C e em pH de 6,5 e 11,0. A enzima manteve-se estável na faixa de pH 3,0-11,0 durante 60 minutos à 40°C durante 3 horas. A transglutaminase não foi inibida por Ca^{2+} , Na^{+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , K^{+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , EDTA, L-cisteína e glutatona na concentração de 5 mM, mas foi inibida na presença de Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} e Fe^{2+} na concentração de 5mM. A linhagem *Streptomyces* sp. B6 é uma nova fonte de transglutaminase com características interessantes para aplicações biotecnológicas.

Palavras-chaves: isolamento; transglutaminase microbiana; *Streptomyces* sp.; delineamento composto central; delineamento Plackett-Burman; caracterização bioquímica

GENERAL ABSTRACT

Transglutaminase is an enzyme capable of catalyzing the forming intra-and intermolecular cross-linking between proteins, peptides and primary amines by covalent bonds between lysine and glutamine residues. Thus, transglutaminase can be used in food processing industries to develop new products and modify their characteristics. The B6 strain was isolated from soil sample collected in the region state of Minas Gerais was identified as having morphological characteristics typical of the actinomycetes, and the 16S rRNA analysis placed it in the *Streptomyces* subclade, closely related to *Streptomyces angustmycinicus* NBRC 3934^T. In order to increase the transglutaminase production (2.75 U/mL) from *Streptomyces* sp. B6 strain, the fermentation medium was subjected to optimization processes. In the first step of optimization, the micro-organism growth and enzyme production were studied through a pre-selection of carbon, nitrogen and salts sources in the culture medium. After analysis of different sources, the Plackett–Burman experimental design was used for screening the components of the culture medium that affect the transglutaminase production. Results of the experiment indicated that production of transglutaminase was negatively influenced by bacteriological peptone and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, positively influenced by potato starch, glucose, casein peptone and $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and was not influenced by soybean meal, considering 95% of confidence level. The potato starch concentration was fixed at the highest level tested in Plackett–Burman design due to gelation of the fermentation medium in higher concentrations. Thus, the three factors that influence the transglutaminase production (glucose, casein peptone and $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ concentrations) were optimized to obtain the maximum transglutaminase production using central composite design. Under the proposed optimized condition, which contained 25 g/L soybean meal, 35 g/L potato starch, 5 g/L glucose, 24.5 g/L casein peptone and 8 g/L $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, the enzyme activity reached 6.13 U/mL, which was 125% more than the activity in relative obtained medium before optimization. The microbial transglutaminase produced by

Streptomyces sp. B6 strain exhibited optimal activity at 45 °C and at pH 6.5 and 11.0. The enzyme remained stable in the pH range from 3.0 - 11.0 for 60 minutes and at 40 °C temperature for 3 hours. The transglutaminase was not inhibited by Ca^{2+} , Na^+ , Co^{2+} , Mn^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Ba^{2+} , EDTA, L-cysteine and glutathione in concentration 5 mM, but was inhibited in the presence of Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} and Fe^{2+} in concentration 5 mM. In conclusion, *Streptomyces* sp. B6 strain is a new source of transglutaminase with interesting features for biotechnological applications.

Keywords: Isolation; microbial transglutaminase; *Streptomyces* sp.; central composite design; Plackett-Burman design; biochemical characterization

INTRODUÇÃO GERAL

A transglutaminase (TGase, EC 2.3.2.13) é uma enzima que catalisa reações de transferência de grupos acil formando ligações cruzadas entre proteínas, peptídeos e aminas primárias, principalmente através de ligações covalentes entre resíduos de glutamina e lisina (MOTOKI; SEGURO, 1998).

A formação de ligações cruzadas entre proteínas utilizando a enzima transglutaminase leva a formação de agregados proteicos irreversíveis, sendo desta forma, utilizada para a melhoria das propriedades funcionais de proteínas vegetais e animais, permitindo a formação de produtos com melhores propriedades reológicas e sensoriais. A formação de ligações cruzadas pode resultar em diferentes alterações nas propriedades e nas características das proteínas, tais como: alterações na solubilidade, hidratação, capacidade emulsificante, bem como o melhoramento da estabilidade térmica dos alimentos. As alterações estruturais das proteínas alimentares promovidas pela transglutaminase permitem o desenvolvimento de novos produtos e novas tecnologias de processamento para a obtenção de alimentos com maior valor agregado e nutricional (ZHU et al., 1995; MOTOKI; SEGURO, 1998; YOKOYAMA et al., 2004).

Além da aplicação da transglutaminase no setor de alimentos, um novo campo de aplicação tem emergido na última década. Vários estudos têm aplicado a transglutaminase nas áreas da engenharia biomédica, ciências dos materiais, têxteis, processamento de couro (ZHU; TRAMPER, 2008) e farmacêutica (COLLIGHAN et al., 2002).

A transglutaminase está amplamente difundida na natureza, sendo encontrada em animais, plantas e micro-organismos. Até o final da década de 80, a principal fonte comercial de transglutaminase era obtida de tecidos de animais, principalmente de fígado de porquinhos da Índia. A enzima transglutaminase extraída de mamíferos não demonstrou ser viável para a aplicação em processos industriais em larga escala devido à sua obtenção, separação e purificação serem muito complexas, deixando o custo de produção final da enzima muito alto (YAN

et al., 2005; CUI et al., 2007). A fim de resolver os problemas encontrados na transglutaminase de mamíferos, Ando et al. (1989) iniciaram estudos de produção de transglutaminase com micro-organismos. A transglutaminase produzida pelo micro-organismo *Streptoverticillium mobaraensis* é excretada na forma extracelular, não sendo necessária a lise celular para a extração, além de ser Ca^{2+} - independente, propriedade esta muito importante para sua aplicação em alimentos, já que muitas proteínas dos alimentos precipitam na presença de sais de cálcio (ANDO et al., 1989; ZHU et al., 1995; TSAI et al., 1996; MOTOKI; SEGURO, 1998; YOKOYAMA et al., 2004). Desde a descoberta da transglutaminase produzida por micro-organismos, a enzima microbiana vem sendo a principal fonte utilizada em processos biotecnológicos em escala industrial, pois a sua facilidade de extração, separação e purificação, resultou em uma diminuição do custo de produção, tornando possível a sua aplicação tanto na indústria de processamento de alimentos quanto em áreas não alimentícias.

Este trabalho visou à produção de transglutaminase com intuito de se obter uma nova fonte da enzima para o mercado nacional. Neste contexto, os objetivos do projeto foram: isolar e selecionar novas linhagens de micro-organismos produtores de transglutaminase, bem como, estudar a identificação taxonômica da linhagem B6 e otimizar o meio de cultura para fermentação e produção da enzima pela linhagem selecionada. Após a otimização do meio de cultivo foi realizado o estudo das condições ótimas de pH, e temperatura de atividade e estabilidade da transglutaminase, além do efeito de alguns inibidores e ativadores na atividade da enzima.

Referências Bibliográficas

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. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 2613-2617, 1989.

COLLIGHAN, R.; CORTEZ, J.; GRIFFIN, M. The biotechnological applications of transglutaminases. **Minerva Biotechnologica**, v. 14, p. 143-148, 2002.

CUI, L.; DU, G.; ZHANG, D.; LIU, H.; CHEN, J. Purification and characterization of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygroscopicus*. **Food Chemistry**, v. 105, n. 2, p. 612-618, 2007.

MACEDO, J. A.; SETTE, L. D.; SATO, H. H. Optimization of medium composition for transglutaminase production by a Brazilian soil *Streptomyces* sp. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 618-626, 2007.

MOTOKI, M.; SEGURO, K. Transglutaminase and its use for food processing. **Trends in Food Science and Technology**, v. 9, n. 5, p. 204-210, 1998.

TSAI, G. J.; LIN, S. M.; JIANG, S. T. Transglutaminase from *Streptoverticillium ladakanum* and application to minced fish product. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 6, p. 1234-1238, 1996.

YAN, G.; DU, G.; LI, Y.; CHEN, J.; ZHONG, J. Enhancement of microbial transglutaminase production by *Streptoverticillium mobaraense*: application of a two-stage agitation speed control strategy. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 963-968, 2005.

YOKOYAMA, K.; NIO, N.; KIKUCHI, Y. Properties and applications of microbial transglutaminase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 4, p. 447-454, 2004.

ZHU, Y.; RINZEMA, A.; TRAMPER, J.; BOL, J. Microbial transglutaminase - A review of its production and application in food processing. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 44, n. 3-4, p. 277-282, 1995.

ZHU, Y.; TRAMPER, J. Novel applications for microbial transglutaminase beyond food processing. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 559-65, Oct 2008.

CAPÍTULO 1 – Revisão Bibliográfica - Propriedades, produção e aplicações de transglutaminase microbiana em alimentos

Resumo

A transglutaminase (proteína-glutamina γ -glutaminil transferase) pertence a uma classe de enzimas que possuem a capacidade de catalisar reações de transferência de grupos acil utilizando resíduos de glutamina presentes em peptídeos e proteínas (doadores de grupos acil), e diversas aminas primárias (receptores de grupo acil). As ligações cruzadas formadas pela transglutaminase promovem a formação de agregados proteicos irreversíveis, possibilitando mudanças nas propriedades e características das proteínas. A transglutaminase vem sendo utilizada nas indústrias de processamento de alimentos para o desenvolvimento de novos produtos e modificação de características como: alteração da textura, modificação da capacidade de gelificação, aumento da viscosidade e elasticidade do gel, melhoramento da estabilidade térmica, aumento da capacidade de retenção de água, além de possibilitar o aumento do valor nutricional por meio da incorporação de aminoácidos essenciais em proteínas. Embora as aplicações da transglutaminase se concentrem no setor de alimentos, há possibilidades de utilização da enzima nas áreas da engenharia biomédica, ciências dos materiais, têxteis, processamento de couro e farmacêutica. A transglutaminase está amplamente difundida na natureza, sendo encontrada em animais, plantas e micro-organismos. Dentre as diversas fontes, os micro-organismos se destacam para a produção de transglutaminase comercial em grande parte devido à excreção da enzima na forma extracelular, além de ser Ca^{2+} -independente. Nesse contexto, este capítulo ilustra as diversas vantagens da obtenção, produção e das aplicações da transglutaminase microbiana em diferentes áreas da indústria.

Palavras-chaves: transglutaminase microbiana; produção; aplicações; caracterização; *Streptomyces* sp.

Abstract

Transglutaminase (protein-glutamine γ -glutamyl transferase) belongs to a class of enzymes that have the ability to catalyze the transfer of acyl groups reaction using protein or peptide-bond glutamine residues (acyl groups donor) and various primary amines (acyl groups receptors). The cross-links formed by transglutaminase promote the formation of protein aggregates irreversible, enabling changes in the properties and characteristics of the proteins. Transglutaminase have been used in food processing industries to development of new products and modification of characteristics, such as change of texture, modification of gelling ability, increased viscosity and elasticity of the gel, improvement of thermal stability, increased water retention capacity, besides enabling an increase in the nutritional value through the incorporation of essential amino acids in proteins. Although the transglutaminase applications have much attention in food sector, there are possibilities of using of the enzyme in the areas of biomedical engineering, material science, textiles, leather processing and pharmaceuticals. Transglutaminase is widespread in nature, being found in animals, plants and micro-organisms. Among the several of sources, microorganisms stand out for the production of commercial transglutaminase, largely due to excretion of enzyme in extracellular form, and it also Ca^{2+} -independent. In this context, this chapter illustrates several advantages of obtaining, production and applications of microbial transglutaminase in different areas of industry.

Keywords: microbial transglutaminase, production, applications, characterization, *Streptomyces* sp.

1. Revisão Bibliográfica

1.1. Transglutaminase

1.1.1 Definição

A enzima transglutaminase foi descoberta em 1957 quando Waelsch e colaboradores descreveram a presença de uma enzima ativada por cálcio na fração solúvel do fígado de mamíferos que catalisava a incorporação de uma ampla variedade de aminas em proteínas (FESUS; PIACENTINI, 2002).

A transglutaminase (TGase, EC 2.3.2.13; proteína-glutamina γ -glutaminil transferase) pertence a uma classe de enzimas que possuem a capacidade de catalisar reações de acil-transferência entre grupos γ -carboxiamida de resíduos de glutamina e uma variedade de aminas primárias, incluindo grupos ϵ -amino de resíduos de lisina em certas proteínas (MOTOKI; SEGURO, 1998).

As ligações isopeptídicas ϵ -(γ -glutaminil)lisina resultantes da reação entre os resíduos de glutamina (acil-doadores) e a amina terminal de resíduos de lisina pertencente a um substrato proteico (acil-aceptores), formam ligações cruzadas intra- e intermoleculares entre cadeias proteicas. A formação de ligações cruzadas pode alterar a textura, capacidade de formação de gel e retenção de água nas proteínas. Na presença de aminas primárias, como acil-aceptores, o resultado é a incorporação de aminas na cadeia polipeptídica, com consequente alteração da hidrofobicidade da superfície proteica. Na ausência de substratos aminas, a TGase catalisa a desaminação de resíduos de glutamina formando resíduos de glutamato, o que resulta em alterações da carga das proteínas (Figura 1-1) (FOLK; FINLAYSON, 1977; KURAISHI et al., 2001).

As transglutaminases estão amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em animais, plantas e micro-organismos. Sua atividade foi inicialmente observada em tecidos animais (CLARKE et al., 1959; DERRICK; LAKI, 1966) e fluidos corporais (GINSBURG et al., 1963; PINCUS; WAELSCH, 1968). Estudos posteriores revelaram a presença da transglutaminase em folhas

de beterraba (SIGNORINI et al., 1991), milho, soja (FALCONE et al., 1993; SERAFINI-FRACASSINI et al., 2009) e girassol (DEL DUCA et al., 1995), além de bactérias, fungos e leveduras (ANDO et al., 1989; KLEIN et al., 1992; SUZUKI et al., 2000; IRANZO et al., 2002).

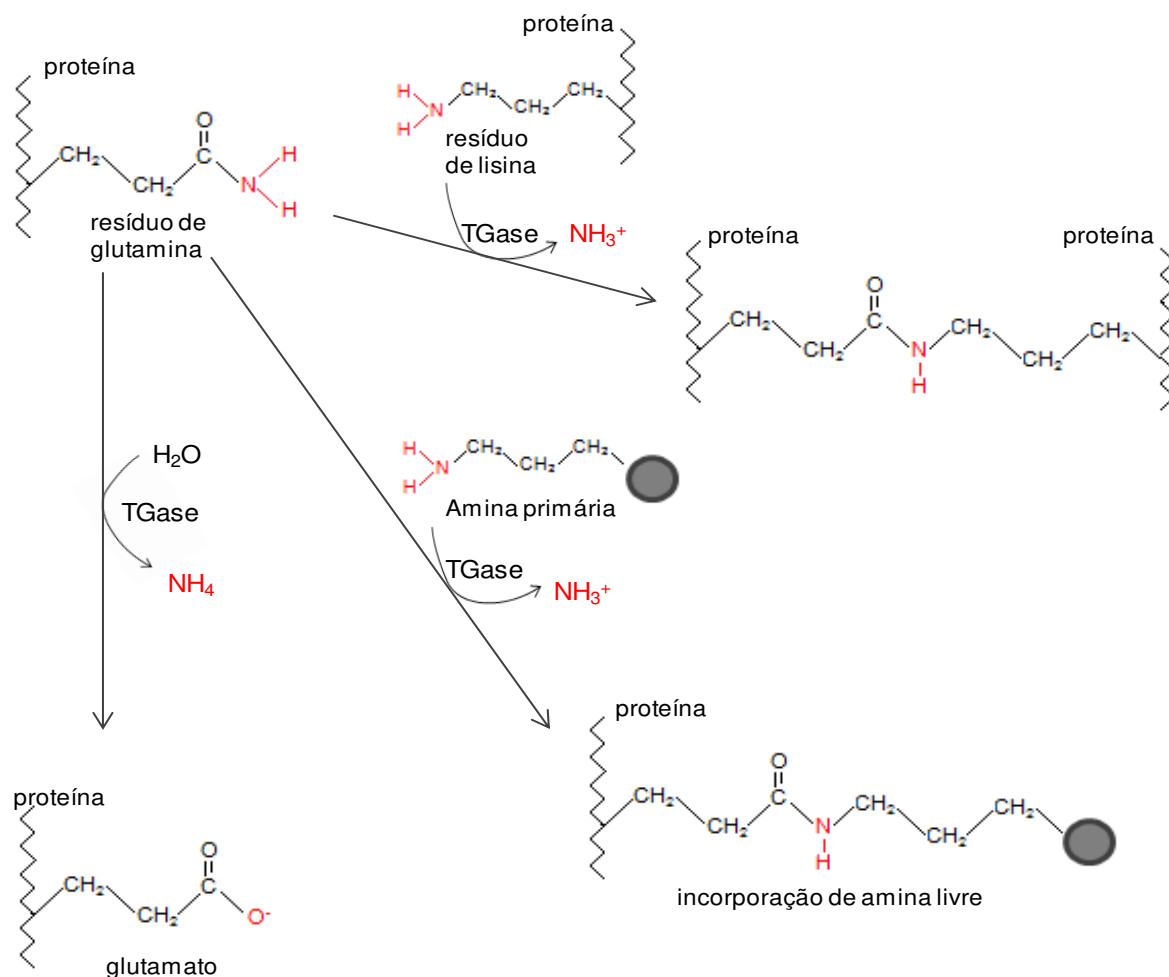


Figura 1 –1 - Reações gerais catalisadas pela transglutaminase (GERRARD et al., 2001).

As funções fisiológicas desempenhadas pelas transglutaminases isoladas dessas diversas fontes têm sido investigadas e parecem estar envolvidas em várias reações envolvendo proteínas.

Nos animais, as TGases têm sido relacionadas com os processos de regulação do crescimento, diferenciação e proliferação de células; processos de

cicatrização; e de coagulação sanguínea, na qual a formação de ligações cruzadas entre as proteínas é catalisada pelo fator XIIIa, uma forma ativa da transglutaminase do plasma sanguíneo (CHUNG et al., 1974; FOLK, 1980; FRIEDRICH; ASZODI, 1992; MOTOKI; SEGURO, 1998).

Nas plantas, as TGases possuem o papel de estabilização dos complexos fotossintéticos nos cloroplastos, modificação das proteínas do citoesqueleto, e da morte programada das células nas plantas (SERAFINI-FRACASSINI; DEL DUCA, 2008).

Em micro-organismos as funções desempenhadas pela transglutaminase ainda não são totalmente conhecidas. Ragkousi e Setlow (2004), sugeriram que a enzima catalisa principalmente reações envolvendo a reticulação das proteínas dos esporos, contribuindo para a resistência física e química dos esporos da bactéria. Em micro-organismos do gênero *Streptomyces*, acredita-se que a enzima está envolvida na formação de ligações covalentes entre diferentes proteínas da parede celular, desta forma, auxiliando o crescimento micelial característico destes micro-organismos (ZOTZEL et al., 2003).

Além das várias funções fisiológicas desempenhadas pela transglutaminase nos diferentes organismos, esta enzima vêm apresentando um grande potencial de aplicação em alimentos proteicos.

A partir dos anos 80, estudos começaram a demonstrar a possibilidade de promover a modificação das propriedades funcionais das proteínas, como por exemplo, das caseínas do leite e das globulinas da soja utilizando as TGases presentes em fígado de porquinho da índia e do plasma bovino (KURTH; ROGERS, 1984; IKURA et al., 1992). Nestes estudos, as ligações formadas entre as proteínas de diferentes origens e a incorporação de aminoácidos ou peptídeos foram utilizados visando corrigir a carência desses componentes indispensáveis.

No mesmo período, Motoki e colaboradores iniciaram vários experimentos com a utilização da enzima transglutaminase extraída de porquinhos da índia, na investigação da viabilidade da enzima na modificação das proteínas alimentares (MOTOKI; NIO, 1983; MOTOKI et al., 1984; NIO et al., 1985; MOTOKI et al., 1986; NIO; MOTOKI, 1986a; NIO et al., 1986b; MOTOKI et al., 1987a; MOTOKI et al.,

1987b). Os estudos concluíram que esta enzima possui a capacidade de gelatinizar um amplo número de substratos, com subsequente, melhorias na solubilidade, capacidade de retenção de água e estabilidade térmica dos substratos testados.

Portanto, com base nestes estudos que demonstram a grande capacidade de aplicação da transglutaminase em alimentos, iniciou-se uma procura incessante por processos de obtenção da enzima para aplicação em escala industrial.

Até o final da década de 80, as fontes de transglutaminase mais bem estudadas era o fígado de porquinhos da índia e plasma do sangue bovino (KURTH; ROGERS, 1984; IKURA et al., 1992). Mas, as TGases extraídas de mamíferos não se mostraram viáveis para a aplicação em larga escala nas indústrias de alimentos, pelo fato do processo de obtenção da matéria prima e purificação da enzima ser difícil, o que elevava os custos da produção em escala comercial. Além disso, essas TGases não eram estáveis durante um longo tempo de armazenamento e eram Ca^{2+} -dependentes (KASHIWAGI et al., 2002; YAN et al., 2005). As TGases de mamíferos não tiveram ampla aplicabilidade nas indústrias, já que muitas proteínas dos alimentos, como caseínas do leite, globulinas da soja e miosinas da carne podem ser precipitadas na presença de sais de cálcio. Outros dois fatores que inviabilizaram a utilização da TGase de mamíferos foi a necessidade de ativação pela trombina e a coloração avermelhada, que pode interferir na aparência de alguns alimentos (MOTOKI; SEGURO, 1998).

Os tecidos de origem vegetal constituem outra alternativa para se obter a enzima transglutaminase. Muitos vegetais como a soja, o milho e as folhas de beterraba, podem ser utilizados para obtenção desta enzima (SIGNORINI et al., 1991; FALCONE et al., 1993; MOTOKI; KUMAZAWA, 2000; SERAFINI-FRACASSINI et al., 2009).

A enzima transglutaminase pode ser produzida através de processos fermentativos, utilizando-se os micro-organismos (ANDO et al., 1989).

A transglutaminase extraída de micro-organismos (MTGase) em geral é uma enzima extracelular presente no meio de cultivo, com exceção da extraída de linhagens de *Physarum polycephalum* a qual é intracelular (KLEIN et al., 1992) e, portanto, pode ser obtida a partir da centrifugação e separação das células intactas do material sólido e no caso da fermentação semi-sólida após a extração da enzima do meio de cultivo e filtração para separação do material sólido, não sendo necessária uma etapa de ruptura celular para obtenção da enzima (ZHU et al., 1995; TSAI et al., 1996; MACEDO et al., 2007).

Nas últimas décadas, vários pesquisadores têm direcionados seus esforços na expressão heteróloga dos genes que codificam a transglutaminase, visando o aumento da produtividade da enzima e diminuição dos custos (YOKOYAMA et al., 2004). Os genes que codificam a enzima transglutaminase já foram clonados em diversos micro-organismos hospedeiros incluindo *Escherichia coli*. e leveduras (YOKOYAMA et al., 2004). Ikura et al. (1988) conseguiram superexpressar a enzima transglutaminase de fígado de cobaia em *E. coli* Bishop (1990) obtiveram a expressão da enzima transglutaminase do fator XIII do sangue humano utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como hospedeiro. Takehana et al. (1994) expressaram o gene da TGase de *Streptomyces* em *E. coli*. Yasueda et al. (1995) expressaram a TGase do músculo de peixe em *E. coli*. Kobayashi et al. (1998) usaram o hospedeiro *E. coli* para expressar a TGase de *Bacillus subtilis*. Lin et al. (2004; 2006) clonaram o gene da transglutaminase de *Streptoverticillium ladakanum* e de *Streptomyces platensis* em *Streptomyces lividans*.

1.1.2 Características e propriedades da transglutaminase

Com relação às características moleculares das transglutaminases, vários autores relatam que esta enzima possui propriedades diferentes dependendo da sua origem. Estas diferenças foram observadas a partir da identificação da estrutura primária da enzima, onde se relatou que o centro ativo da enzima, pode conter um, ou mais, resíduos de cisteína, porém quanto ao grupo de aminoácidos que estão ao redor do resíduo de cisteína no centro ativo, podem se diferir

dependendo da sua origem (FOLK; GROSS, 1971; FOLK, 1980; ANDO et al., 1989; KANAJI et al., 1993).

As TGases presentes em vertebrados apresentam uma estrutura de multidomínios, e são cálcio dependente, enquanto as enzimas presentes em micro-organismos, em geral apresentam apenas um único domínio, além de não necessitarem do íon cálcio para se tornar ativa (FOLK, 1980; ANDO et al., 1989; KASHIWAGI et al., 2002; WADA et al., 2002; CUI et al., 2007). Nos vegetais, as enzimas transglutaminases apresentam estruturas tanto monoméricas quanto oligoméricas, característica esta dependente da localização da enzima nas plantas (SERAFINI-FRACASSINI et al., 1995).

As transglutaminases de origem microbiana, na sua grande maioria, apresentam um pH ótimo entre 5 e 8, entretanto podem apresentar atividade em uma faixa de pH de 4 a 9. As MTGases descritas na literatura apresentam atividade ótima na faixa 35°C a 60°C (ANDO et al., 1989; TSAI et al., 1996; KOBAYASHI et al., 1998; HO et al., 2000; SUZUKI et al., 2000; UMEZAWA et al., 2002; DE BARROS SOARES et al., 2003; LU et al., 2003; MACEDO et al., 2010). As TGases de origem animal, possuem atividade ótima entre pH 7,5 a 9,5 e temperatura ótima entre 37°C a 55°C (JIANG; LEE, 1992; YASUEDA et al., 1994; WORRATAO; YONGSAWATDIGUL, 2005; WU et al., 2005). As TGases de plantas, apresentam atividade ótima na faixa de pH 7,5 a 8,5, valores estes próximos aos encontrados para TGases de mamíferos (SERAFINI-FRACASSINI et al., 2009). A Tabela 1-1 ilustra as características de algumas transglutaminases descritas na literatura.

Em relação ao efeito dos íons na atividade, as TGase microbianas são fortemente inibidas na presença de íons como Pb^{2+} , Zn^{2+} e Cu^{2+} , e moderadamente inibida por Ni^{2+} , Co^{2+} e Fe^{2+} . Entretanto, K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} e Ba^{2+} não afetam a atividade das MTGases (ANDO et al., 1989; TSAI et al., 1996; MOTOKI; SEGURO, 1998; CUI et al., 2007).

Tabela 1-1 – Características das transglutaminases de diferentes origens.

Fontes de transglutaminase	Massa molecular (KDa)	pH ótimo de atividade	pH de estabilidade	Temperatura ótima da atividade (°C)	Referências Bibliográficas
<i>Streptomyces mobaraensis</i> S-8112	40	6,0 – 7,0	5,0 – 9,0	50	Ando et al. (1989)
<i>Streptomyces mobaraensis</i> WSH-Z2	40	6,0	4,5 – 6,5	52	Lu et al. (2003)
<i>Streptomyces libani</i>	37,9	5,0	5,0 – 7,0	53	Umezawa et al. (2002)
<i>Bacillus circulans</i>	45	7,0	6,0 – 8,5	47	De Barros Soares et al. (2003)
<i>Bacillus subtilis</i>	29	8,2	7,5 – 8,5	60	Suzuki et al. (2000)
<i>Bacillus subtilis</i>	23	8,0	7,4 – 8,2	50	Kobayashi et al. (1998)
<i>Streptomyces ladakanum</i>	39	5,5	4,8 – 6,2	40	Ho et al. (2000)
<i>Streptomyces ladakanum</i>	37,5	6,0	4,6 – 8,0	50	Tsai et al. (1996)
<i>Streptomyces</i> sp. CBMAI 837	45	6,0 – 6,5	4,5 – 8,0	35 – 40	Macedo et al. (2010)
Fator XIIIa do plasma de porco	75	-	-	55	Jiang e Lee (1992)
<i>Pagrus major</i>	78	9,0 – 9,5	-	55	Yasueda et al. (1994)
Fígado de <i>Nemipterus</i> sp.	95	8,5 – 9,0	-	50	Wu et al. (2005)
Tilápias tropicais (<i>Oreochromis niloticus</i>)	85	7,5	-	37	Worratao e Yongsawatdigul (2005)
Esporos de <i>Physarum polycephalum</i>	77	7,5	-	-	Klein et al. (1992)
<i>Zea mays</i>	39	8,5	-	-	Della Mea et al. (2004a); Della Mea et al. (2004b)
Pólen de <i>Malus domestica</i>	80	7,8	-	-	Bregoli et al. (1994)

Assim como as TGases microbianas, a enzima oriunda de mamíferos é fortemente inibida por íons Cu^{2+} , Zn^{2+} , Li^{+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} e por EDTA (WORRATAO; YONGSAWATDIGUL, 2005), entretanto, são fortemente ativadas pelo íon Ca^{2+} (MOTOKI; SEGURO, 1998).

As TGases de origem vegetal podem ser inibidas por EGTA, EDTA e GTP, entretanto, a adição de K^{+} , Na^{+} e Mg^{2+} não interferem na reação. O íon Ca^{2+} nem sempre é essencial para a atividade enzimática, no entanto, este íon pode ser utilizado para favorecer a atividade da transglutaminase das plantas (KANG; CHO, 1996; DELLA MEA et al., 2004a).

Neste contexto, pode ser observado que as diferentes fontes de transglutaminase podem apresentar diferentes características bioquímicas, porém, a forma mais promissora de se obter a enzima TGase vem sendo por meio de micro-organismos. As enzimas microbianas em geral apresentam elevada estabilidade térmica, podendo atuar em baixas e elevadas temperaturas, além de possuir uma ampla estabilidade em diversos valores de pH, serem enzimas cálcio independentes e os custos efetivos de produção e purificação serem baixos. Desta forma, a MTGase tem grande potencial de aplicação em produtos tanto na indústria de alimentos quanto em outros ramos de atuação.

1.1.3 Produção da transglutaminase microbiana (MTGase)

A utilização de micro-organismos para obtenção comercial de transglutaminase iniciou-se com os trabalhos realizados por Ando et al. (1989), utilizando-se *Streptoverticillium mobaraensis* S-8112, (atualmente denominado *Streptomyces mobaraensis* S-8112). Para a preparação do pré-inóculo, o micro-organismo foi incubado em frascos de Erlenmeyer contendo 2,0 g/L de polipeptona; 5,0 g/L de glicose; 2,0 g/L de K_2HPO_4 e 1,0 g/L de MgSO_4 , pH 7,0 a 30°C, com agitação por 48 horas. Posteriormente, o pré-inóculo foi transferido assepticamente para um reator de 20 L, contendo o meio de cultura composto por: 20 g/L de polipeptona; 20 g/L de amido solúvel; 2,0 g/L de K_2HPO_4 ; 1,0 g/L de MgSO_4 ; 2,0 g/L de extrato de levedura e 0,05 g/L de surfactante, pH 7,0, e a

fermentação foi realizada a 30°C, aeração de 10 L/min e agitação de 250 rpm, sendo obtida atividade de transglutaminase igual a 2,5 U/mL.

Após a descoberta da transglutaminase microbiana, diversos estudos envolvendo isolamento de micro-organismos e melhorias dos processos fermentativos têm sido realizados, visando à obtenção da enzima. O grande interesse sobre esta forma de obtenção da transglutaminase se deve ao fato da enzima ser extracelular, não necessitando de etapas de ruptura, além de ser Ca^{2+} -independente, propriedade esta muito importante para sua aplicação em alimentos, já que muitas proteínas dos alimentos precipitam na presença de sais de cálcio (MOTOKI; SEGURO, 1998; YOKOYAMA et al., 2004).

Gerber et al. (1994) estudaram a produção da MTGase de *Streptoverticillium mobaraense* e obtiveram atividade de 2,0 U/mL utilizando o meio de cultura composto por 20 g/L polipeptona; 25 g/L amido solúvel; 2,0 g/L K_2HPO_4 ; 2,0 g/L extrato de levedura; 1,0 g/L MgSO_4 e 10 g/L glicose.

Junqua et al. (1997) estudaram a otimização da composição do meio de cultura para a produção de transglutaminase de *Streptoverticillium cinnamoneum* CBS 683.68. Inicialmente, utilizando metodologia univariável foram avaliadas várias fontes de carbono e nitrogênio, uma de cada vez. A seguir, os autores estudaram os efeitos dos nutrientes previamente selecionados, caseína, glicerol, peptona e extrato de levedura na produção de transglutaminase. Após sucessivos planejamentos experimentais, os autores utilizaram o meio de cultivo otimizado composto de 10,5 g/L de peptona; 31,2 g/L de glicerol; 2,5 g/L de extrato de levedura, 38,4 g/L de caseína; 0,5 g/L de MgSO_4 ; 2,0 g/L de KH_2PO_4 e 5,0 g/L de Na_2HPO_4 , para fermentar o micro-organismo a 28°C e 140 rpm e obtiveram atividade de transglutaminase de 0,331 U/mL.

Kim et al. (2000) descreveram o isolamento da linhagem *Actinomadura* sp. T- 2 produtora de transglutaminase e a otimização do meio para o cultivo do micro-organismo. Após a realização de testes aleatórios com várias fontes de carbono, nitrogênio e sais minerais, os autores utilizaram o meio composto por 20 g/L de glicose; 5,0 g/L de polipeptona; 5,0 g/L de Soytone e 1,0 g/L de MnCl_2 a 28°C, 150 rpm, sendo obtido atividade de MTGase entre 4,0 U/mL e 5,0 U/mL.

Téllez-Luis et al. (2004) desenvolveram um meio de cultura para a produção de TGase pelo micro-organismo *Streptoverticillium ladakanum* NRRL-3191, utilizando-se de planejamentos estatísticos e de metodologias de superfície de resposta. Neste trabalho, primeiramente foram definidas as condições ótimas de agitação e tempo de cultivo. Na etapa seguinte, com agitação constante de 250 rpm e tempo de cultivo de 72 h, foram otimizados as concentrações do glicerol, xilose e caseína, a fim de maximizar a produção de TGase pelo micro-organismo, uma vez que a concentração destes nutrientes apresentaram um efeito positivo na atividade enzimática. Utilizando o meio de cultivo otimizado composto de 10,5 g/L de peptona; 2,5 g/L de extrato de levedura; 20,0 g/L de caseína; 50,5 g/L de glicerol; 0,5 g/L de $MgSO_4$; 2,0 g/L de KH_2PO_4 e 5,0 g/L de Na_2HPO_4 , os autores obtiveram atividade de transglutaminase de 0,725 U/mL.

Yan et al. (2005) estudaram o efeito da alteração da velocidade da agitação durante o cultivo de uma linhagem mutante de *Streptoverticillium mobaraense*, em fermentador de 5 L na produção de transglutaminase. No trabalho, os autores inicialmente cultivaram o micro-organismo em um pré-inóculo composto por 20 g/L de amido; 20 g/L de peptona; 2,0 g/L de extrato de levedura; 2,0 g/L de $MgSO_4$; 2,0 g/L de KH_2PO_4 e 2,0 g/L de K_2HPO_4 , pH 6,8 a 30°C por 24 horas a 200 rpm. O pré-inóculo foi então transferido (8%, v/v) para um fermentador de 5 L, contendo meio de cultura composto de 15 g/L de amido; 15 g/L de glicose; 25 g/L de peptona; 4,0 g/L de extrato de levedura; 2,0 g/L de $MgSO_4$; 2,0 g/L de KH_2PO_4 e 2,0 g/L de K_2HPO_4 , pH 6,5. A agitação utilizada no processo de otimização foi de 450 rpm nas primeiras 24 horas e então alterada para 350 rpm e mantida até o final. O uso do processo de otimização da agitação resultou em um aumento de 15,3% na atividade enzimática, sendo obtida atividade de transglutaminase de 3,32 U/mL no caldo fermentado.

Souza et al. (2006) utilizando a linhagem de *Bacillus circulans* BL 32, realizaram um processo de otimização dos componentes do meio de cultura utilizando métodos experimentais estatísticos, visando o aumento da produtividade da MTGase extracelular. O cultivo do micro-organismo no meio obtido a partir dos processos de otimização, composto de 9,0 g/L de glicerol; 2,0 g/L de sacarose; 7,0

g/L de peptona; 1,0 g/L de triptona; 1,0 g/L de Na_2HPO_4 ; 1,0 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,1 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, resultou em uma atividade máxima de 0,306 U/mL.

Cui et al. (2007) isolaram um actinomiceto produtor de transglutaminase extracelular, o qual foi classificado como *Streptomyces hygrosopicus* WSH03-13. Para a produção da enzima o micro-organismo foi inoculado em um pré-inóculo composto por 20 g/L de amido; 20 g/L de peptona; 5,0 g/L de extrato de levedura; 2,0 g/L de MgSO_4 ; 2,0 g/L de KH_2PO_4 e 2,0 g/L de K_2HPO_4 , pH 6,8 e incubado por 24 horas a $32 \pm 1^\circ\text{C}$ e 200 rpm. O pré-inóculo foi então transferido (8%, v/v) para um fermentador de 7 L, contendo meio de cultura composto de 5,0 g/L de amido; 5,0 g/L de glicose; 10,0 g/L de glicerina; 15 g/L de peptona; 20 g/L de soja em pó; 5,0 g/L de extrato de levedura; 2,0 g/L de MgSO_4 ; 2,0 g/L de KH_2PO_4 , 2,0 g/L de K_2HPO_4 e 5,0 g/L de CaCO_3 , pH 6,5. A agitação foi mantida a 200 rpm e a $32^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. O caldo produzido foi centrifugado e o sobrenadante apresentou atividade específica de 0,25 U/mg de proteína após 42 horas de fermentação.

Macedo et al. (2007) isolaram de amostras de solo brasileiro um actinomiceto com atividade de TGase, o qual foi identificado como *Streptomyces* sp. CBMAI 837. Por meio de metodologias estatísticas foi realizado a otimização do meio de cultivo com objetivo de se elevar a produção da enzima pelo micro-organismo. A fermentação do micro-organismo em meio de cultura obtido pelo processo de otimização composto de 25 g/L de farinha de soja; 10 g/L de peptona bacteriológica; 1,0 g/L de glicose; 20 g/L de amido de batata; 4,0 g/L de KH_2PO_4 e 2,0 g/L de MgSO_4 , agitados a 150 rpm e 30°C , resultou em atividade máxima de 1,4 U/mL.

Zhang et al. (2012) estudaram a capacidade de oito diferentes sais atuarem no estresse do micro-organismo *Streptomyces mobaraensis* DSM 40587, mediando o aumento da produção de transglutaminase. Os autores utilizaram para a produção da enzima, um pré-inóculo composto por 20 g/L de polipeptona; 2,0 g/L de K_2HPO_4 ; 2,0 g/L de KH_2PO_4 e 2,0 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7,0, qual foi mantido por 48 horas a 30°C , 180 rpm. O pré-inóculo foi então inoculado (10%, v/v) em 50 mL de meio cultura de fermentação composto de 30 g/L de polipeptona; 10 g/L de amido solúvel; 10 g/L de frutose; 2,0 g/L de K_2HPO_4 ; 2,0 g/L

de KH_2PO_4 e 2,0 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7,0 com agitação de 180 rpm, 30°C. Posteriormente, foram testados o efeito da adição individual de oito diferentes sais (MgCl_2 , NaCl , KCl , Na_2SO_4 , $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$, Na_3PO_4 , CH_3COONa e CaCl_2) na concentração 0,2 M, no meio de cultura para a produção de transglutaminase. Os autores verificaram após diversos testes que o MgCl_2 na concentração 0,1 M promoveu um aumento de 104% na produção da enzima, sendo obtido 4,3 U/mL de transglutaminase.

Bagagli e Sato (2013) utilizando a linhagem de *Streptomyces* sp. CBMAI 837, realizaram um estudo de otimização para investigar o efeito da temperatura, agitação e aeração sobre a produção de transglutaminase em um fermentador de 6,0 L. No trabalho, os autores inicialmente cultivaram o micro-organismo em um pré-inóculo composto por 2,5% de farinha de soja; 2,0% de amido de batata; 0,1% de glicose; 1,0% de peptona; 0,4% de KH_2PO_4 e 0,2% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7,0 a 30°C por 3 dias a 100 rpm. Posteriormente, 300 mL do pré-inóculo foi transferido para um fermentador de 6,0 L contendo 2,7 L de meio de fermentação composto de: 0,2% de KH_2PO_4 ; 0,1% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 2% de solução filtrada de farinha de soja; 2% de amido de batata; 0,2 % de glicose e 2% de peptona. A temperatura, agitação e aeração utilizadas no processo de otimização foi de 34°C, 350 rpm e 1,1 vvm nas primeiras 24 horas de fermentação e depois foi utilizado 26°C, 150 rpm e 1,1 vvm até o termino do processo de fermentativo. O estudo de otimização da temperatura e agitação resultou em um aumento de 2 vezes na atividade enzimática, sendo obtida atividade de transglutaminase de 2,18 U/mL no caldo fermentado.

1.1.4 Aplicações da transglutaminase no processamento dos alimentos

A capacidade da transglutaminase em catalisar a formação de ligações covalentes entre resíduos de lisina e glutamina de proteínas pode ser utilizada para modificar uma ampla variedade de proteínas, com objetivos diversos em vários setores industriais (ZHU et al., 1995). Entretanto, a sua aplicação mais expressiva se concentra nas alterações das propriedades funcionais e nutricionais

de diversos alimentos, como produtos cárneos (reestruturados, emulsionados e injetados), produtos a base de carne de peixe (surimi), produtos lácteos (queijos, sorvetes e iogurtes), produtos a base de trigo (pães e massas), produtos à base de soja (tofu) e gelatinas (NIELSEN, 1995; MOTOKI; SEGURO, 1998; KURAISHI et al., 2001; YOKOYAMA et al., 2004).

A TGase em alimentos proporciona melhora da textura e da elasticidade, capacidade emulsificante, capacidade de retenção de água, capacidade de formar géis termoestáveis, capacidade de reestruturação, aumento da firmeza e possibilidade de incorporação de aminoácidos essenciais em proteínas (ZHU et al., 1995; KURAISHI et al., 2001).

Segundo a resolução nº 26, de 26 de maio de 2009 da ANVISA, a MTGase está incluída na lista de enzimas permitidas para uso em alimentos destinados ao consumo humano cujo parágrafo único informa que o limite de uso dessa enzima será em “*quantum satis*”, ou seja, quantidade suficiente para obter o efeito desejado no alimento (ANVISA, 2009).

1.1.4.1. Produtos cárneos

Nos produtos à base de carne, a TGase catalisa a polimerização principalmente das proteínas miosina, actina proporcionando a formação de ligações tanto intra- como intermoleculares, as quais são responsáveis por melhorar a textura dos produtos cárneos, além de deixá-los mais resistentes ao cozimento e ao congelamento (HUANG et al., 1992; MUGURUMA et al., 2003). O uso da transglutaminase na elaboração de produtos cárneos, reestruturados ou emulsionados, resulta na redução da adição de sal ou fosfatos, com aumento da capacidade de retenção de água e da textura, proporcionando a fabricação de produtos mais saudáveis (KURAISHI et al., 2001).

Sakamoto et al. (1995) relataram que a adição de transglutaminase na produção de surimi, um produto a base de peixe, resulta em um gel com grande tensão ao quebramento e aumenta a elasticidade do produto fazendo com que atinja um maior valor de mercado.

Souza et al. (2009) estudaram os efeitos nutricionais das ligações formadas pela TGase em proteínas de carne bovina e nas proteínas de soja, sobre o crescimento de ratos. As ligações formadas no processo enzimático resultaram em aumento da digestibilidade das proteínas da soja e diminuição da digestibilidade das proteínas da carne. Os autores relataram que este efeito na digestibilidade provavelmente estava relacionado com as mudanças conformacionais das proteínas devido a ação da TGase. Entretanto, os parâmetros nutricionais não foram afetados quando comparados com as proteínas não modificadas pela TGase.

Sun e Arntfield (2011) avaliaram o efeito da adição da transglutaminase nas propriedades de gelificação das proteínas miofibrilares de carne de frango. A adição de transglutaminase na carne de frango resultou em aumento da resistência do gel e também da sua termoestabilidade, sugerindo aumento do número de ligações ϵ -(γ -glutaminil)lisina entre as proteínas miofibrilares.

1.1.4.2. Produtos lácteos

O setor de laticínios vem se destacando como um importante mercado, no qual a enzima transglutaminase pode contribuir de forma significativa na elaboração de novos produtos (ÖZRENK, 2006). Em parte, isto se deve as caseínas, principais proteínas do leite, que possuem uma estrutura terciária flexível, a qual reage facilmente com a transglutaminase, sendo particularmente um bom substrato (FÆRGEMAND et al., 1999; O'CONNELL; DE KRUIF, 2003). As proteínas presentes no soro do leite, também possuem a capacidade de reagir com a TGase, porém devido à sua estrutura globular compacta, tendem a formar ligações transversais menos eficientes (SHARMA et al., 2002).

Şanlı et al. (2011) analisaram o efeito do uso da transglutaminase nas propriedades físicas, químicas e sensoriais nos iogurtes, e evidenciaram que as amostras tratadas com a enzima promoveram a diminuição da sinerese e o aumento da viscosidade do produto em relação ao controle. Além disso, os autores constataram que o tratamento com TGase não afetaram a formação de

acetaldeído (composto aromático principal do iogurte) e das propriedades sensoriais do produto.

O uso da transglutaminase em produtos derivados do leite pode proporcionar efeitos positivos devido à redução de descartes de efluentes no meio ambiente e diminuição de custos, decorrente da utilização do soro do leite ao invés do leite em algumas formulações. Gauche et al. (2009) testaram a aplicação da enzima transglutaminase em iogurtes formulados com 20% e 30% de soro de leite em sua composição, e relataram que o produto composto com 20% de soro apresentou o mesmo nível de sinerese, viscosidade e firmeza do produto formulado com 100% de leite sem TGase.

Macedo et al. (2010) testaram o efeito da transglutaminase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 sobre a gelificação géis de caseinato de sódio acidificado. No trabalho, os autores compararam os parâmetros de textura dos géis de caseinato de sódio preparados com TGase comercial, com os géis formados utilizando a transglutaminase produzida pela *Streptomyces* sp. CBMAI 837, e observaram que a adição da transglutaminase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 levou à formação de géis mais rígidos e deformáveis (menos elásticos), enquanto a adição de TGase comercial promoveu a formação de géis mais elásticos e macios.

Outras aplicações da transglutaminase podem ser encontradas em estudos de produção de queijos e sorvetes, onde a enzima viabiliza a obtenção de produtos com baixo teor de gordura, e com melhor estabilidade térmica e textura (YOKOYAMA et al., 2004).

1.1.4.3. Produtos derivados da soja

A transglutaminase também pode ser utilizada na fabricação de produtos à base de soja. As proteínas da soja são largamente utilizadas no preparo de produtos como salsicha, presunto, surimi, tofu, mortadela e hambúrguer devido à sua capacidade de melhorar a textura dos produtos (KURAISHI et al., 2001).

O tofu, um típico produto feito à base de soja e preparado pela coagulação das proteínas da soja com adição de Ca^{2+} e Mg^{2+} e ou glucono- δ -lactona, é um produto muito difícil de armazenar, uma vez que a sua textura macia e lisa é facilmente destruída no processo de fabricação. Desta forma, o uso da TGase pode elevar a vida útil do produto, tornando o gel mais resistente à ação da temperatura utilizada no processo de fabricação (YOKOYAMA et al., 2004).

1.1.4.4. Produtos à base de trigo

Massas alimentícias desempenham um papel importante na alimentação da população mundial. Portanto, existe uma crescente procura por este produto e uma consequente necessidade de pesquisas para melhoramento de sua qualidade (TAKÁCS et al., 2008). Desta forma, os produtos a base de trigo é outro campo onde a aplicação da transglutaminase vêm sendo estudada.

No caso dos produtos farináceos, a enzima TGase reage com o glúten, a principal fração proteica do trigo, induzindo a formação de polímeros de alta massa molecular, apesar do baixo conteúdo de lisina. A formação de ligações cruzadas entre as proteínas do glúten reforça a estrutura da rede e modifica as propriedades viscoelásticas da massa (LARRÉ et al., 1998). Também é sugerido que o volume de crescimento de muitos pães poderia ser aumentado com o uso desta enzima (KURAISHI et al., 2001; YOKOYAMA et al., 2004).

Sakamoto et al. (1995) utilizaram a TGase no preparo de macarrões instantâneos e outras massas, e observaram que a enzima promoveu a preservação da textura das massas após o cozimento, mesmo quando a farinha de trigo utilizada era de baixa qualidade.

Gujral e Rosell (2004) avaliaram o efeito da adição da TGase em farinha de arroz. A farinha de arroz não é um produto muito utilizado na fabricação de pães, pois as proteínas presentes no arroz não formam a rede de glúten e, consequentemente, são incapazes de reter o gás produzido durante a fermentação. Foi observado que a adição da enzima melhorou as propriedades

reológicas da massa, resultando em um aumento da viscosidade e elasticidade, permitindo a obtenção de pães com maior volume.

Gragnani e Collares-Queiroz (2010) utilizaram a enzima transglutaminase microbiana para corrigir alterações em pães de forma causadas pela substituição da farinha de trigo por farinha de tritcale. A substituição de até 71,28% da farinha de trigo por farinha de tritcale foi possível adicionando-se 0,8% de transglutaminase na formulação dos referidos pães. Em comparação ao pão de forma padrão, com 100% de farinha de trigo, o produto desenvolvido apresentou parâmetros muito semelhantes como: volume específico, firmeza, umidade e atividade de água.

1.1.4.5. Bioavaliação das ligações produzidas pela transglutaminase

Devido às várias aplicações da transglutaminase microbiana em produtos alimentares, tem aumentado o interesse sobre o efeito potencial das ligações isopeptídicas formadas entre as proteínas na saúde dos consumidores, e em possíveis efeitos no valor nutricional. O consumo de produtos com ligações isopeptídicas pelo ser humano já ocorre há muito tempo, indicando que a ingestão deste tipo de ligação não poderia trazer risco à saúde humana, pois ligações isopeptídicas (glutamina–lisina) são formadas pela ação da transglutaminase presentes em produtos naturais (carne, peixes e frutos do mar) e ou em alimentos processados (kamaboko, presunto, frango frito, etc), com exceção dos produtos lácteos (MOTOKI; SEGURO, 1998; YOKOYAMA et al., 2004).

Em relação à degradação das ligações isopeptídicas de proteínas ingeridas pelos mamíferos, estudos têm relatado que este tipo de ligação não é degradada pelas enzimas digestivas, entretanto, tem sido observado a existência de duas enzimas capazes de degradar essas ligações *in vivo*. As enzimas γ -glutamilamina ciclotransferase, encontrada no rim, e a γ -glutamiltransferase (EC 2.3.2.2), encontrada nas membranas do intestino, rins e sangue, são capazes de clivar as ligações isopeptídicas com liberação dos resíduos lisina e glutamato. Portanto, as ligações isopeptídicas formadas pela TGase não reduz o valor nutricional das

proteínas alimentares, desta forma, a lisina, um aminoácido essencial oriundo da quebra desta ligação, pode ser absorvido pelo organismo humano (FINK et al., 1980; MEISTER et al., 1981; MOTOKI; SEGURO, 1998; YOKOYAMA et al., 2004).

De Souza et al. (2011) avaliaram a citotoxicidade, genotoxicidade e os efeitos mutagênicos da enzima transglutaminase produzida por *Bacillus circulans* BL32 em ratos machos do tipo Wistar, e relataram que a adição da enzima à alimentação dos animais não apresentou diferenças estatísticas significativas entre os grupos para o ganho de peso relativo e para os valores hematológicos e de bioquímica clínica. Desta forma, os autores sugeriram que a transglutaminase produzida pelo *B. circulans* BL32 é segura para a aplicação em alimentos.

1.1.5. Outras aplicações da transglutaminase

Além da aplicação da transglutaminase no setor de alimentos, um novo campo de aplicação tem emergido durante a última década. Vários estudos têm demonstrado a aplicação da transglutaminase nas áreas da engenharia biomédica, ciências dos materiais, têxteis e processamento de couro (ZHU; TRAMPER, 2008).

A engenharia de tecidos, originalmente definida por Langer e Vacanti (1993), é um campo interdisciplinar que aplica princípios da engenharia e da ciência da vida para o desenvolvimento de substituintes biológicos para restabelecer, manter ou melhorar a função de tecidos ou mesmo de um órgão inteiro. A transglutaminase não pode contribuir diretamente para o crescimento dos tecidos, mas pode facilitar a construção de suportes proteicos (de colágeno ou gelatina), que são capazes de suportar o desenvolvimento de tecidos (ZHU; TRAMPER, 2008).

Chau et al. (2005) compararam os suportes feitos de colágenos de pele bovina com suportes feitos com colágeno adicionado da enzima transglutaminase. Os suportes feitos com colágeno e TGase foram mais resistentes a degradação pelas proteases endógenas em relação aos suportes sem TGase.

Barbetta et al. (2006) observaram que suportes proteicos feitos com gelatina e transglutaminase demonstraram reduzida citotoxicidade, além disso, hepatócitos cultivados neste suporte exibiram maior diferenciação fenotípica do que os suportes somente feitos com gelatina.

Uma área menos explorada para a aplicação da transglutaminase é a sua utilização em tecidos de lã e no processamento do couro (CORTEZ et al., 2004; TAYLOR et al., 2006).

Du et al. (2007) reportaram a aplicação da enzima transglutaminase de *Streptomyces hygroscopicus* no processamento da lã. A lã tratada com a enzima melhorou as propriedades de feltragem, além de diminuir a perda de resistência à tração.

No processamento do couro, há a necessidade de se introduzir materiais em espaços vazios entre as fibras do couro, onde geralmente, são utilizados produtos naturais como farinha, glicose e goma (ZHU; TRAMPER, 2008). Taylor et al. (2006) e Taylor et al. (2007), demonstraram que a gelatina e a caseína poderiam ser utilizadas efetivamente no processamento do couro. Em outro experimento, os autores observaram que o tratamento com caseína e transglutaminase implicou em resultados semelhantes ao uso da gelatina e a caseína, sugerindo que o tratamento com transglutaminase microbiana, poderia substituir os tratamentos com materiais mais caros de preenchimento utilizados atualmente.

A transglutaminase também pode ser aplicada na área farmacêutica. Collighan et al. (2002) relataram o uso da enzima transglutaminase, como adesivo de tecidos na adsorção celular de proteínas em implantes médicos, enquanto que Green e Dijan (1996) sugeriram a aplicação da TGase na diferenciação da epiderme para melhorar a aparência da pele.

2. Referências Bibliográficas

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. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 2613-2617, 1989.

ANVISA. Aprova a lista de enzimas permitidas para uso em alimentos destinados ao consumo humano conforme a sua origem, em substituição ao Anexo I da Resolução RDC nº 205 de 14 de novembro de 2006. **Disponível em:** <http://www.anvisa.gov.br>. **Acesso em: Março 2013**, 2009.

BAGAGLI, M. P.; SATO, H. H..Two-staged temperature and agitation strategy for the production of transglutaminase from a *Streptomyces* sp. isolated from Brazilian soils. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, n. 5, p. 1057-1065, 2013.

BARBETTA, A.; MASSIMI, M.; DEVIRGILIIS L.C, L. C.; DENTINI, M. Enzymatic cross-linking versus radical polymerization in the preparation of gelatin polyHIPEs and their performance as scaffolds in the culture of hepatocytes. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 11, p. 3059-3068, 2006.

BISHOP, P. D. Expression, purification and characterization of human factor XIII in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemistry**, p. 1861-1869, 1990.

BREGOLI, A. M.; DEL DUCA, S.; BERGAMINI, C.; SERAFINI-FRACASSINI, D. Proceedings of the fourth international conference on transglutaminase and protein crosslinking reactions. **Debrecen, Hungary** p. 68, 1994.

CARVAJAL-VALLEJOS, P. K.; CAMPOS, A.; FUENTES-PRIOR, P.; VILLALOBOS, E.; ALMEIDA, A. M.; BARBERÀ, E.; TORNÉ, J. M.; SANTOS, M.

Purification and in vitro refolding of maize chloroplast transglutaminase over-expressed in *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 8, p. 1255-1262, 2007.

CHAU, D. Y. S.; COLLIGHAN, R. J.; VERDERIO, E. A. M.; ADDY, V. L.; GRIFFIN, M. The cellular response to transglutaminase-cross-linked collagen. **Biomaterials**, v. 26, n. 33, p. 6518-6529, 2005.

CHUNG, S. I.; LEWIS, M. S.; FOLK, J. E. Relationships of the catalytic properties of human plasma and platelet transglutaminases (activated blood coagulation factor XIII) to their subunit structures. *Journal of Biological Chemistry*, v. 249, n. 3, p. 940-50, 1974.

CLARKE, D. D.; MYCEK, M. J.; NEIDLE, A.; WAELSCH, H. The incorporation of amines into protein. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 79, n. 0, p. 338-354, 1959.

COLLIGHAN, R.; CORTEZ, J.; GRIFFIN, M. The biotechnological applications of transglutaminases. **Minerva Biotechnologica**, v. 14, p. 143-148, 2002.

CORTEZ, J.; BONNER, P. L. R.; GRIFFIN, M. Application of transglutaminases in the modification of wool textiles. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, n. 1, p. 64-72, 2004.

CUI, L.; DU, G.; ZHANG, D.; LIU, H.; CHEN, J. Purification and characterization of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygroscopicus*. **Food Chemistry**, v. 105, n. 2, p. 612-618, 2007.

DE BARROS SOARES, L. H.; ASSMANN, F.; AYUB, M. A. Z. Purification and properties of a transglutaminase produced by a *Bacillus circulans* strain isolated

from the Amazon environment. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 37, n. 3, p. 295-299, 2003.

DE SOUZA, C. F. V.; VENZKE, J. G.; ROSA, R. M.; HENRIQUES, J. A. P.; DALLEGRAVE, E.; FLÔRES, S. H.; AYUB, M. A. Z. Toxicological evaluation for food applications of transglutaminase from a newly isolated *Bacillus circulans* BL32. **American Journal of Food Technology**, v. 6, n. 6, p. 460-471, 2011.

DEL DUCA, S.; BENINATI, S.; SERAFINI-FRACASSINI, D. Polyamines in chloroplasts: Identification of their glutamyl and acetyl derivatives. **Biochemical Journal**, v. 305, n. 1, p. 233-237, 1995.

DELLA MEA, M.; CAPARRÓS-RUIZ, D.; CLAPAROLS, I.; SERAFINI-FRACASSINI, D.; RIGAU, J. The first plant transglutaminase. **Plant physiology**, v. 135, n. 4, p. 2046-2054, 2004b.

DELLA MEA, M.; DI SANDRO, A.; DONDINI, L.; DEL DUCA, S.; VANTINI, F.; BERGAMINI, C.; BASSI, R.; SERAFINI-FRACASSINI, D. A Zea mays 39-kDa thylakoid transglutaminase catalyses the modification by polyamines of light-harvesting complex II in a light-dependent way. **Planta**, v. 219, n. 5, p. 754-64, 2004a.

DERRICK, N.; LAKI, K. Enzymatic labelling of actin and tropomyosin with 14 C-labelled putrescine. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 22, n. 1, p. 82-8, 1966.

DU, G.; CUI, L.; ZHU, Y.; CHEN, J. Improvement of shrink-resistance and tensile strength of wool fabric treated with a novel microbial transglutaminase from *Streptomyces hygroscopicus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 7, p. 1753-1757, 2007.

FÆRGEMAND, M.; SØRENSEN, M. V.; JØRGENSEN, U.; BUDOLFSEN, G.; QVIST, K. B. Transglutaminase: Effect on instrumental and sensory texture of set style yoghurt. **Milchwissenschaft**, v. 54, n. 10, p. 563-566, 1999.

FALCONE, P.; SERAFINI-FRACASSINI, D.; DEL DUCA, S. Comparative studies of transglutaminase activity and substrates in different organs of *Helianthus tuberosus*. **Journal of Plant Physiology**, v. 142, n. 3, p. 265-273, 1993.

FESUS, L.; PIACENTINI, M. Transglutaminase 2: An enigmatic enzyme with diverse functions. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 27, n. 10, p. 534-539, 2002.

FINK, K. L.; CHUNG, S.; FOLK, J. E. γ -Glutamyl cyclotransferase: Specificity toward ϵ -(γ -glutamyl)-L-lysine and related compounds. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 77, p. 4564-568, 1980.

FOLK, J. E. Transglutaminases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 49, p. 517-531, 1980.

FOLK, J. E.; FINLAYSON, J. S. The ϵ -(γ -glutaminyll)lysine crosslink and the catalytic role of transglutaminases. **Advances in Protein Chemistry**, v. 31, p. 1-133, 1977.

FOLK, J. E.; GROSS, M. Mechanism of action of guinea pig liver transglutaminase. 8. Active site studies with "reporter" group-labeled halomethyl ketones. **Journal of Biological Chemistry**, v. 246, n. 21, p. 6683-6691, 1971.

FRIEDRICH, P.; ASZODI, A. Calcium dependent proteolysis and isopeptide bond formation: Calpains and transglutaminases. **Pure and Applied Chemistry**, v. 64, p. 1093-1097, 1992.

GAUCHE, C.; TOMAZI, T.; BARRETO, P. L. M.; OGLIARI, P. J.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Physical properties of yoghurt manufactured with milk whey and transglutaminase. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 1, p. 239-243, 2009.

GERBER, U.; JUCKNISCHKE, U.; PUTZIEN, S.; FUCHSBAUER, H. L. A rapid and simple method for the purification of transglutaminase from *Streptoverticillium mobaraense*. **Biochemical Journal**, v. 299, n. 3, p. 825-829, 1994.

GERRARD, J. A.; FAYLE, S. E.; BROWN, P. A.; SUTTON, K. H.; SIMMONS, L.; RASIAH, I. Effects of microbial transglutaminase on the wheat proteins of bread and croissant dough. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 6, p. 782-786, 2001.

GINSBURG, M.; WAJDA, I.; WAELSCH, H. Transglutaminase and histamine incorporation in vivo. **Biochemical Pharmacology**, v. 12, n. 3, p. 251-264, 1963.

GRAGNANI, M. A. L.; COLLARES-QUEIROZ, F. P. Produção e avaliação de pão de forma com tritcale e enzima transglutaminase microbiana. **Tese de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP**, v. [s.n], 2010.

GREEN, H.; DIJAN, P. Cosmetic concontaining corneocyte proteins and transglutaminase, and method of application. **US Patent: US552536**, 1996.

GUJRAL, H. S.; ROSELL, C. M. Functionality of rice flour modified with a microbial transglutaminase. **Journal of Cereal Science**, v. 39, n. 2, p. 225-230, 2004.

HO, M. L.; LEU, S. Z.; HSIEH, J. F.; JIANG, S. T. Technical approach to simplify the purification method and characterization of microbial transglutaminase

produced from *Streptovorticillium ladakanum*. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 1, p. 76-80, 2000.

HUANG, Y. P.; SEGURO, K.; MOTOKI, M.; TAWADA, K. Cross-linking of contractile proteins from skeletal muscle by treatment with microbial transglutaminase. **Journal of Biochemistry**, v. 112, n. 2, p. 229-234, 1992.

IKURA, K.; NASU, T. A.; YOKOTA, H.; TSUCHIYA, Y.; SASAKI, R.; CHIBA, H. Amino acid sequence of guinea pig liver transglutaminase from its cDNA sequence. **Biochemistry**, v. 27, n. 8, p. 2898-2905, 1988.

IKURA, K.; SASAKI, R.; MOTOKI, M. Use of transglutaminase in quality-improvement and processing of food proteins. **Comments Agriculture ; Food Chemistry**, v. 2, p. 389–407, 1992.

IRANZO, M.; AGUADO, C.; PALLOTTI, C.; CAÑIZARES, J. V.; MORMENEO, S. Transglutaminase activity is involved in *Saccharomyces cerevisiae* wall construction. **Microbiology**, v. 148, n. 5, p. 1329-1334, 2002.

JIANG, S. T.; LEE, J. J. Purification, characterization, and utilization of pig plasma factor XIIIa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 7, p. 1101-1107, 1992.

JUNQUA, M.; DURAN, R.; GANCET, C.; GOULAS, P. Optimization of microbial transglutaminase production using experimental designs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 48, n. 6, p. 730-734, 1997.

KANAJI, T.; OZAKI, H.; TAKAO, T.; KAWAJIRI, H.; IDE, H.; MOTOKI, M.; SHIMONISHI, Y. Primary structure of microbial transglutaminase from *Streptovorticillium* sp. strain s-8112. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 16, p. 11565-11572, 1993.

KANG, H.; CHO, Y. D. Purification and properties of transglutaminase from soybean (*Glycine max*) leaves. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 223, n. 2, p. 288-292, 1996.

KASHIWAGI, T.; YOKOYAMA, K.; ISHIKAWA, K.; ONO, K.; EJIMA, D.; MATSUI, H.; SUZUKI, E. Crystal structure of microbial transglutaminase from *Streptoverticillium mobaraense*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 46, p. 44252-60, 2002.

KIM, H. S.; JUNG, S. H.; LEE, I. S.; YU, T. S. Production and characterization of a novel microbial transglutaminase from *Actinomadura* sp. T-2. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 187-194, 2000.

KLEIN, J. D.; GUZMAN, E.; KUEHN, G. D. Purification and partial characterization of transglutaminase from *Physarum polycephalum*. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 8, p. 2599-2605, 1992.

KOBAYASHI, K.; SUZUKI, S. I.; IZAWA, Y.; YOKOZEKI, K.; MIWA, K.; YAMANAKA, S. Transglutaminase in sporulating cells of *Bacillus subtilis*. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 85-91, 1998.

KURAISHI, C.; YAMAZAKI, K.; SUSA, Y. Transglutaminase: Its utilization in the food industry. **Food Reviews International**, v. 17, n. 2, p. 221-246, 2001.

KURTH, L.; ROGERS, P. J. Transglutaminase catalyzed cross-linking of myosin to soya protein, casein and gluten. **Journal of Food Science**, v. 49, n. 2, p. 573-576, 1984.

LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue engineering. **Science**, v. 260, n. 5110, p. 920-926, 1993.

LARRÉ, C.; DESHAYES, G.; LEFEBVRE, J.; POPINEAU, Y. Hydrated gluten modified by a transglutaminase. **Food / Nahrung**, v. 42, n. 03-04, p. 155-157, 1998.

LIN, Y. S.; CHAO, M. L.; LIU, C. H.; CHU, W. S. Cloning and expression of the transglutaminase gene from *Streptoverticillium ladakanum* in *Streptomyces lividans*. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 5, p. 591-598, 2004.

LIN, Y. S.; CHAO, M. L.; LIU, C. H.; TSENG, M.; CHU, W. S. Cloning of the gene coding for transglutaminase from *Streptomyces platensis* and its expression in *Streptomyces lividans*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 3, p. 519-524, 2006.

LU, S. Y.; ZHOU, N. D.; TIAN, Y. P.; LI, H. Z.; CHEN, J. Purification and properties of transglutaminase from *Streptoverticillium mobaraense*. **Journal of Food Biochemistry**, v. 27, n. 2, p. 109-125, 2003.

MACEDO, J. A.; SETTE, L. D.; SATO, H. H. Optimization of medium composition for transglutaminase production by a Brazilian soil *Streptomyces* sp. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 618-626, 2007.

MACEDO, J. A.; CAVALLIERI, A. L. F.; CUNHA, R. L.; SATO, H. H. The effect of transglutaminase from *Streptomyces* sp. CBMAI 837 on the gelation of acidified sodium caseinate. **International Dairy Journal**, V. 20, P.673-679, 2010.

MACEDO, J. A.; SETTE, L. D.; SATO, H. H. A comparative biochemical characterization of microbial transglutaminases: commercial vs. a newly isolated enzyme from *Streptomyces* sp. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 2, p. 308-314, 2010.

MEISTER, A.; TATE, S. S.; GRIFFITH, O. W. γ -Glutamyl transpeptidase. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 237-253, 1981.

MOTOKI, M.; ASO, H.; SEGURO, K.; NIO, N. α s1-casein film prepared using transglutaminase. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 51, n. 4, p. 993-996, 1987a.

MOTOKI, M.; KUMAZAWA, Y. Recent research trends in transglutaminase technology for food processing. **Food Science and Technology Research**, v. 6, n. 3, p. 151-160, 2000.

MOTOKI, M.; NIO, N. Crosslinking between different food proteins by transglutaminase. **Journal of Food Science**, v. 48, n. 2, p. 561-566, 1983.

MOTOKI, M.; NIO, N.; TAKINAMI, K. Functional properties of food proteins polymerized by transglutaminase. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 48, p. 1257-1261, 1984.

MOTOKI, M.; NIO, N.; TAKINAMI, K. Functional properties of heterologous polymer prepared by transglutaminase. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 51, p. 237-238, 1987b.

MOTOKI, M.; SEGURO, K. Transglutaminase and its use for food processing. **Trends in Food Science and Technology**, v. 9, n. 5, p. 204-210, 1998.

MOTOKI, M.; SEGURO, K.; NIO, N.; TAKINAMI, K. Glutamine-specific deamidation of α s1-casein by transglutaminase. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 50, n. 12, p. 3025-3030, 1986.

MUGURUMA, M.; TSURUOKA, K.; KATAYAMA, K.; ERWANTO, Y.; KAWAHARA, S.; YAMAUCHI, K.; SATHE, S. K.; SOEDA, T. Soybean and milk proteins modified by transglutaminase improves chicken sausage texture even at reduced levels of phosphate. **Meat Science**, v. 63, n. 2, p. 191-197, 2003.

NIELSEN, P. M. Reactions and potential industrial applications of transglutaminase. Review of literature and patents. **Food Biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 119-156, 1995/11/01 1995.

NIO, N.; MOTOKI, M. Gelation of protein emulsion by transglutaminase. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 50, p. 1409-1412, 1986a.

NIO, N.; MOTOKI, M.; TAKINAMI, K. Gelation of casein and soybean globulins by transglutaminase. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 49, p. 851-855, 1985.

NIO, N.; MOTOKI, K; TAKINAMI, K. Gelation mechanism of protein solution by transglutaminase. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 48, p. 851-855, 1986b.

NONAKA, M.; TANAKA, H.; OKIYAMA, A.; MOTOKI, M.; ANDO, H.; UMEDA, K.; MATSUURA, A. Polymerization of several proteins by Ca^{2+} -independent transglutaminase derived from microorganisms. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 2619-2623, 1989.

O'CONNELL, J. E.; DE KRUIF, C. G. β -Casein micelles; cross-linking with transglutaminase. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 216, n. 1-3, p. 75-81, 2003.

ÖZRENK, E. The use of transglutaminase in dairy products. **International Journal of Dairy Technology**, v. 59, n. 1, p. 1-7, 2006.

PINCUS, J. H.; WAELSCH, H. The specificity of transglutaminase. I. Human hemoglobin as a substrate for the enzyme. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 126, n. 1, p. 34-43, 1968.

RAGKOUSI, K.; SETLOW, P. Transglutaminase-mediated cross-linking of GerQ in the coats of *Bacillus subtilis* spores. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 17, p. 5567-5575, 2004.

SAKAMOTO, H.; KUMAZAWA, Y.; TOIGUCHI, S.; SEGURO, K.; SOEDA, T.; MOTOKI, M. Gel strength enhancement by addition of microbial transglutaminase during onshore surimi manufacture. **Journal of Food Science**, v. 60, n. 2, p. 300-304, 1995.

SAKAMOTO, H.; YAMAZAKI, K.; KAGA, C.; YAMAMOTO, Y.; ITO, R.; KUROSAWA, Y. Strength enhancement by addition of microbial transglutaminase during Chinese noodle processing. **Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi**, v. 43, n. 5, p. 598-602, 1996.

ŞANLI, T.; SEZGIN, E.; DEVECI, O.; ŞENEL, E.; BENLİ, M. Effect of using transglutaminase on physical, chemical and sensory properties of set-type yoghurt. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 6, p. 1477-1481, 2011.

SERAFINI-FRACASSINI, D.; DEL DUCA, S. Transglutaminases: Widespread cross-linking enzymes in plants. **Annals of Botany**, v. 102, n. 2, p. 145-152, 2008.

SERAFINI-FRACASSINI, D.; DEL DUCA, S.; BENINATI, S. Plant transglutaminases. **Phytochemistry**, v. 40, n. 2, p. 355-365, 1995.

SERAFINI-FRACASSINI, D.; DELLA MEA, M.; TASCO, G.; CASADIO, R.; DEL DUCA, S. Plant and animal transglutaminases: Do similar functions imply similar structures? **Amino Acids**, v. 36, n. 4, p. 643-657, 2009.

SHARMA, R.; ZAKORA, M.; QVIST, K. B. Susceptibility of an industrial α -lactalbumin concentrate to cross-linking by microbial transglutaminase. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 12, p. 1005-1012, 2002.

SIGNORINI, M.; BENINATI, S.; BERGAMINI, C. M. Identification of transglutaminase activity in the leaves of silver beet (*Beta vulgaris* L.). **Journal of Plant Physiology**, v. 137, n. 5, p. 547-552, 1991.

SOUZA, C. F. D.; FLÔRES, S. H.; AYUB, M. A. Z. Optimization of medium composition for the production of transglutaminase by *Bacillus circulans* BL32 using statistical experimental methods. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1186-1192, 2006.

SOUZA, C. F. V.; VENZKE, J. G.; FLÔRES, S. H.; AYUB, M. A. Z. Nutritional effects of mechanically deboned chicken meat and soybean proteins cross-linking by microbial transglutaminase. **Food Science and Technology International**, v. 15, n. 4, p. 337-344, 2009.

SUN, X. D.; ARNTFIELD, S. D. Gelation properties of chicken myofibrillar protein induced by transglutaminase crosslinking. **Journal of Food Engineering**, v. 107, n. 2, p. 226-233, 2011.

SUZUKI, S.; IZAWA, Y.; KOBAYASHI, K.; ETO, Y.; YAMANAKA, S.; KUBOTA, K.; YOKOZEKI, K. Purification and characterization of novel transglutaminase from *Bacillus subtilis* spores. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 64, n. 11, p. 2344-2351, 2000.

TAKÁCS, K.; GELENCSEÉR, É.; KOVÁCS, E. T. Effect of transglutaminase on the quality of wheat-based pasta products. **European Food Research and Technology**, v. 226, n. 3, p. 603-611, 2008.

TAKEHANA, S.; WASHIZU, K.; ANDO, K.; KOIKEDA, S.; TAKEUCHI, K.; MATSUI, H.; MOTOKI, M.; TAKAGI, H. Chemical synthesis of the gene for microbial transglutaminase from *Streptoverticillium* and its expression in

Escherichia coli. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 58, n. 1, p. 88-92, 1994.

TAYLOR, M. M.; BUMANLAG, L.; MARMER, W. N.; BROWN, E. M. Use of enzymatically modified gelatin and casein as fillers in leather processing. **Journal of the American Leather Chemists Association**, v. 101, n. 5, p. 169-178, 2006.

TAYLOR, M. M.; MARMER, W. N.; BROWN, E. M. Evaluation of polymers prepared from gelatin and casein or whey as potential fillers. **Journal of the American Leather Chemists Association**, v. 102, n. 4, p. 111-120, 2007.

TÉLLEZ-LUIS, S. J.; RAMÍREZ, J. A.; VÁZQUEZ, M. Production of transglutaminase by *Streptoverticillium ladakanum* NRRL-3191 using glycerol as carbon source. **Food Technology and Biotechnology**, v. 42, n. 2, p. 75-81, 2004.

TSAI, G. J.; LIN, S. M.; JIANG, S. T. Transglutaminase from *Streptoverticillium ladakanum* and application to minced fish product. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 6, p. 1234-1238, 1996.

UMEZAWA, Y.; OHTSUKA, T.; YOKOYAMA, K.; NIO, N. Comparison of enzymatic properties of microbial transglutaminase from *Streptomyces* sp. **Food Science and Technology Research**, v. 8, n. 2, p. 113-118, 2002.

WADA, F.; NAKAMURA, A.; MASUTANI, T.; IKURA, K.; MAKI, M.; HITOMI, K. Identification of mammalian-type transglutaminase in *Physarum polycephalum*: Evidence from the cDNA sequence and involvement of GTP in the regulation of transamidating activity. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 14, p. 3451-3460, 2002.

WORRATAO, A.; YONGSAWATDIGUL, J. Purification and characterization of transglutaminase from Tropical tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Food Chemistry**, v. 93, n. 4, p. 651-658, 2005.

WU, Y. W.; LAI, W. F. T.; TSAI, Y. H. Characterization of purified rat testicular transglutaminase and age-dependent changes of the enzyme activities. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 37, n. 2, p. 386-396, 2005.

YAN, G.; DU, G.; LI, Y.; CHEN, J.; ZHONG, J. Enhancement of microbial transglutaminase production by *Streptoverticillium mobaraense*: application of a two-stage agitation speed control strategy. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 963-968, 2005.

YASUEDA, H.; KUMAZAWA, Y.; MOTOKI, M. Purification and characterization of a tissue-type transglutaminase from red sea bream (*Pagrus major*). **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 58, n. 11, p. 2041-5, 1994.

YASUEDA, H.; NAKANISHI, K.; KUMAZAWA, Y.; NAGASE, K.; MOTOKI, M.; MATSUI, H. Tissue-type transglutaminase from red sea bream (*Pagrus major*). Sequence analysis of the cDNA and functional expression in *Escherichia coli*. **Eur J Biochem**, v. 232, n. 2, p. 411-9, 1995.

YOKOYAMA, K.; NIO, N.; KIKUCHI, Y. Properties and applications of microbial transglutaminase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 4, p. 447-454, 2004.

ZHANG, L.; HAN, X.; DU, M.; ZHANG, Y.; FENG, Z.; YI, H. Enhancement of transglutaminase production in *Streptomyces mobaraensis* as achieved by treatment with excessive $MgCl_2$. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 6, p. 2335-2343, 2012.

ZHU, Y.; RINZEMA, A.; TRAMPER, J.; BOL, J. Microbial transglutaminase - A review of its production and application in food processing. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 44, n. 3-4, p. 277-282, 1995.

ZHU, Y.; TRAMPER, J. Novel applications for microbial transglutaminase beyond food processing. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 559-65, Oct 2008.

ZOTZEL, J.; KELLER, P.; FUCHSBAUER, H. L. Transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* is activated by an endogenous metalloprotease. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 15, p. 3214-3222, 2003.

CAPÍTULO 2 - Optimization of the composition of the medium using statistical experimental methods and the biochemical characterization of the transglutaminase produced by *Streptomyces* sp. B6

Ricardo Rodrigues de Melo¹; Tiago Domingues Zucchi²; Wallace Rafael de Souza²; Hélia Harumi Sato¹

¹Department of Food Science, College of Food Engineering, State University Campinas, Monteiro Lobato Street, 80, 13083-862, Campinas, SP, Brazil.

²Environmental Microbiology Laboratory, EMBRAPA Meio Ambiente, Rodovia SP 340, Km 127,5, CP 69, 13820-000, Jaguariúna, SP, Brazil.

To be submitted to **Biochemical Engineering Journal**

Abstract

A high transglutaminase producing bacterium (isolate B6) was isolated from Brazilian soil. The isolate had morphological properties typical of the actinomycetes, and the 16S rRNA analysis placed it in the *Streptomyces* subclade, closely related to *Streptomyces angustmycinicus* NBRC 3934^T. The growth conditions for transglutaminase production were studied by screening different sources of carbon and nitrogen. The best medium for higher production was chosen using a Plackett-Burman design, and the medium components which most influenced the production of transglutaminase were optimized using a central composite design. Thus the optimized medium contained 2.5 % soybean meal, 3.5 % potato starch, 0.5 % glucose, 2.45 % casein peptone and 0.8 % $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. In this medium the enzyme activity reached 6.13 U/mL, a value 125 % higher than that found before medium optimization. Furthermore, the best enzyme activity was observed at a temperature of 45 °C and pH values of 6.5 and 11.0. The enzyme remained stable in the pH range from 3.0 - 11.0 for 60 minutes, and at 40 °C for 3 hours. In conclusion, *Streptomyces* sp. B6 is a new source of transglutaminase with interesting features for biotechnological applications.

Keywords: optimization; submerged culture; enzyme production; fermentation; microbial transglutaminase; biochemical characterization.

1. Introduction

Transglutaminase (protein- glutamine γ - glutamyl – transferase; EC 2.3.2.13) is an enzyme capable of catalyzing acyl transfer reactions between γ -carboxyamide groups of glutamine residues and a variety of primary amines, including the ϵ -amino groups of lysine residues in certain proteins [1]. These transglutaminase-catalyzed reactions can be used to introduce covalent cross-links between proteins, peptides and various primary amines [2]. Therefore transglutaminase can be used in food processing industries to modify the properties of food proteins, such as their solubility, hydration and their rheological and emulsifying properties, as well as modifying their heat stability in various model systems [3]. Besides its potential applications in food industries, transglutaminase can also be used in the areas of material science, biomedical engineering, textiles, leather processing and pharmaceuticals [4, 5]. Due to this variety of applications, industrial interest in this type of enzyme has increased considerably, and many screening programs are now in progress to access potential transglutaminase producers.

These enzymes are present in a wide range of organisms including animal tissues and body fluids, as well as in plants and microorganisms. However, plants and animals have been shown to be unreliable sources for the exploitation of transglutaminase since they yield relatively small amounts of enzyme and the separation and purification procedures are usually complicated. Thus, other potential sources have been investigated and microorganisms have proved to be very efficient and inexpensive sources of this enzyme [6-8].

The production of microbial transglutaminase (MTGase) has been reported in many researches and some bacterial genera (e.g. *Streptoverticillium*, *Bacillus* and *Streptomyces*) have yielded interesting amounts of these enzymes [9-11]. Furthermore, good increments in the transglutaminase produced by these bacteria have been obtained by using more appropriate growth conditions or optimizing the composition of the medium [3, 8, 12]. In addition, besides increasing the transglutaminase yield, these features, together with a search for new

transglutaminase-producing bacteria and genetic modifications of the strains, can reduce production costs.

Response surface methodology (RSM) is a powerful technique used to overcome drawbacks related to low productivity by determining the optimal operating conditions. The main advantages of RSM are the reduced numbers of experimental trials required to evaluate multiple parameters and their interactions. RSM is a methodology in which mathematical and statistical techniques are used to design experiments, evaluating the effects of the different factors, building models and searching for the optimum conditions to obtain the desired responses [10, 13, 14]. Several researchers have applied these techniques to the optimization of the various parameters for the production of transglutaminase [10-12, 15].

The present research group has studied the screening of microorganisms [10], process optimization and its application in order to commercialize MTGase [16-19]. In this context, the aims of this study were to isolate and select microorganisms from Brazilian soil with high extracellular transglutaminase producing capacity, and then optimize the culture medium in order to maximize the transglutaminase yield as well as characterizing the MTGase produced by the bacterial isolate.

2. Materials and Methods

2.1. Collection of soil samples (ver ANEXO I)

Several soil samples were collected close to farms, rivers and lakes in the states of Minas Gerais, São Paulo and Ceará (Brazil). The soil samples were collected after removing the superficial layer (approximately 5 cm) and then stored under refrigeration at 4 °C (± 2 °C).

2.2. Screening method and preservation of microorganisms

The actinomycete strains were isolated by the method described by El-Nakeeb and Lechevalier [20], with modifications. The soil samples, approximately 2.0 g, were transferred to Petri dishes, incubated at 40 °C for 6 hours, mixed with 2.0 g of CaCO₃ and incubated again for 7 days at 30 °C. They were then transferred to conical flasks containing 50 mL of sterile distilled water and incubated in an orbital shaker incubator (New Brunswick Scientific Co., Inc., USA) at 30 °C for 60 min with constant shaking (180 rpm). The mixtures obtained were serially diluted and 200 µL of each dilution inoculated onto inorganic salts-starch agar (ISP4 medium) [21]. The plates were incubated at different temperatures (30 °C and 40 °C) for 3 days. Colonies showing the morphological characteristics of actinomycetes were transferred to Petri dishes containing yeast extract-malt extract agar (ISP2 medium) [21] and incubated at 30 °C or 40 °C for 7 days. The microorganisms were re-isolated until pure cultures were obtained. The pure organisms were maintained on ISP2 agar and as mixtures of mycelial fragments and spores in 20 % (v/v) glycerol at -80 °C.

2.3. Screening of transglutaminase producing microorganisms

The isolated microorganisms were cultivated in Petri dishes containing ISP2 agar at 30 °C or 40 °C for 6 days. The cultures obtained were used to inoculate the fermentation medium flasks.

The fermentation medium was prepared in 250 mL conical flasks containing 50 mL of culture medium composed of (w/v): 2.5 % soybean meal, 2.0 % potato starch, 0.1 % glucose, 1.0 % bacteriological peptone, 0.4 % KH₂PO₄·7H₂O and 0.2 % MgSO₄·7H₂O, pH 7.0 [10]. After sterilization, the flasks were inoculated with six cylinders (0.6 cm diameter) of agar covered with the freshly grown microorganism as described above. The flasks were incubated at 30 °C with constant agitation (150 rpm). Aliquots of 2 mL culture medium were collected at 72 h and 120 h of fermentation, centrifuged at 20,600 x g for 10 min at 4 °C and the supernatant used for determining MTGase activity.

2.4. Transglutaminase activity

Transglutaminase activity was determined from the formation of hydroxamate from the specific substrate *N*-carbobenzoxy-L-glutamyl glycine (*N*-CBZ-Gln-Gly) according to Folk and Cole [22], with some modifications. The calibration curve was prepared with L-glutamic acid γ -monohydroxamate. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme required to produce 1 μ mol of hydroxamic acid per minute at 37 °C. The enzyme activity was expressed as the volumetric activity (U/mL medium).

2.5. The 16S rRNA gene sequence and the phylogenetic analysis

Genomic DNA was extracted from the MTGase producer isolate using the PureLink™ Genomic DNA kit (Invitrogen) following the manufacturer's protocol. PCR amplification and 16S rRNA gene sequencing were carried out according to the methods of Zucchi et al. [23]. The almost complete 16S rRNA gene sequence was aligned manually using the MEGA version 5 software [24] against corresponding sequences of *Streptomyces* type species retrieved from the GenBank database using the EzTaxon-e web-based tool [25]. Phylogenetic trees were inferred by using the maximum-likelihood [26], maximum-parsimony [27] and neighbor-joining [28] tree-making algorithms drawn from the MEGA 5 and PHYL [24, 29] packages. An evolutionary distance matrix for the neighbor-joining algorithm was generated using the Jukes and Cantor [30] model. The topologies of the evolutionary trees were evaluated by a bootstrap analysis [31] of the neighbor-joining method based on a 1,000 replicates using the MEGA 5 software. The root position of the neighbor-joining tree was inferred by using *Streptomyces albus* subsp. *albus* DSM 40313^T (GenBank accession no. AJ621602) and *Streptacidiphilus albus* DSN 41753^T (AF074415) as the outgroups.

2.6. Dry cell weight determination

The biomass produced by the microorganism was estimated using the dry cell weight (DCW) analysis [8]. Aliquots of 1 mL of culture broth were collected and centrifuged at $20,600 \times g$ for 10 min at 4 °C. The supernatant was discarded, the residue washed twice with distilled water, and then dried to constant weight at 70 °C. The biomass weight was obtained by subtracting the total mass from the blank mass (culture medium without the microorganism), and the result expressed in grams of dry cell weight per liter of culture broth.

2.7. Study of transglutaminase production by *Streptomyces* sp. B6 (ver ANEXO III)

2.7.1. Selection of carbon and nitrogen sources

As a first optimization step, microbial growth and enzyme production were studied using a pre-selection of carbon and nitrogen sources in the production medium. For this, all fermentations were carried out in an initial medium containing (w/v): 2.5 % soybean meal, 0.4 % $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 0.2 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, at pH 7.0, 150 rpm and 30 °C. The carbon sources were investigated by supplementing the initial medium described above with 1.0 % of bacteriological peptone and adding different carbon sources (2.0 % sucrose; 2.0 % maltodextrin; 2.0 % soluble starch; 2.0 % glycerol and 2.0 % potato starch plus 0.1 % glucose), testing each carbon source individually. In the case of the nitrogen sources, the initial medium described above was supplemented with the optimal carbon source as selected in the previous step, and the added different nitrogen sources (2.0 % tryptone; 2.0 % bacteriological peptone; 2.0 % yeast extract; 2.0 % casein and 1.0 % casein peptone plus 1.0 % bacteriological peptone), each nitrogen source was tested separately. The MTGase activity and dry cell weight were determined in all the experiments.

2.7.2. Identification of significant components using a Plackett-Burman design

The Plackett-Burman design (P-B design), with the matrix shown in Table 2-1, was used to determine the nutrients that had a significant effect on MTGase production. In this experiment, seven variables were evaluated in 15 trials. Each variable was examined at levels -1 (lowest value of the experimental conditions used), +1 (highest value of the experimental conditions), and 0 (central point condition, defined as the intermediate value in the range of each variable). The enzyme activity was measured after 48, 72 and 96 h of fermentation. Variables with confidence levels major than 95 % were considered to influence MTGase production significantly.

2.7.3. Optimization of the ingredients using a central composite design (CCD)

The culture medium components that most influenced the production of transglutaminase were studied using a CCD (central composite design). The independent variables selected by the P-B design were glucose concentration [% (w/v)], casein peptone concentration [% (w/v)] and $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ concentration [% (w/v)]. The variables were coded according to Equation 1:

$$x_i = \left(\frac{X_i - X_o}{\Delta X_i} \right) \quad (\text{Equation 1})$$

where x_i is the coded variable, X_i is the real value of the i th independent variable, X_o is the real value at the center point, and ΔX_i the step change value. The variables and levels are shown in Table 2 - 2.

The CCD design for three factors consisting of 14 combinations plus the replicates at the center point (8 cubic points, 7 star points and 2 replicates at the

center point) to estimate the experimental error and investigate the suitability of the proposed model. The details can be seen in Table 2 - 2.

Table 2-1 - Coded levels and real values (between brackets) for the experimental design and the results of the Plackett Burman design.

Trial	Soybean meal	Potato starch	Glucose	Bacteriological peptone	Casein peptone	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄	MTGase activity (U/mL)		
	[(w/v) %]	[(w/v) %]	[(w/v) %]	[(w/v) %]	[(w/v) %]	7H ₂ O	7H ₂ O			
	xi (Xi) ^a	xi (Xi) ^a	xi (Xi) ^a	xi (Xi) ^a	xi (Xi) ^a	[(w/v) %] xi (Xi) ^a	[(w/v) %] xi (Xi) ^a	48 h	72 h	96 h
1	1 (4.0)	-1 (0.5)	1 (0.2)	-1 (0.0)	-1 (0.5)	-1 (0.0)	1 (0.4)	0.857	0.215	0.107
2	1 (4.0)	1 (3.5)	-1 (0.0)	1 (2.0)	-1 (0.5)	-1 (0.0)	-1 (0.0)	0.113	0.132	0.105
3	-1 (1.0)	1 (3.5)	1 (0.2)	-1 (0.0)	1 (1.5)	-1 (0.0)	-1 (0.0)	1.365	2.471	1.752
4	1 (4.0)	-1 (0.5)	1 (0.2)	1 (2.0)	-1 (0.5)	1 (0.8)	-1 (0.0)	0.350	0.539	0.395
5	1 (4.0)	1 (3.5)	-1 (0.0)	1 (2.0)	1 (1.5)	-1 (0.0)	1 (0.4)	0.076	0.062	0.019
6	1 (4.0)	1 (3.5)	1 (0.2)	-1 (0.0)	1 (1.5)	1 (0.8)	-1 (0.0)	0.844	3.148	3.868
7	-1 (1.0)	1 (3.5)	1 (0.2)	1 (2.0)	-1 (0.5)	1 (0.8)	1 (0.4)	0.076	0.190	1.331
8	-1 (1.0)	-1 (0.5)	1 (0.2)	1 (2.0)	1 (1.5)	-1 (0.0)	1 (0.4)	0.058	0.085	0.051
9	-1 (1.0)	-1 (0.5)	-1 (0.0)	1 (2.0)	1 (1.5)	1 (0.8)	-1 (0.0)	0.075	0.088	0.019
10	1 (4.0)	-1 (0.5)	-1 (0.0)	-1 (0.0)	1 (1.5)	1 (0.8)	1 (0.4)	0.334	0.701	0.467
11	-1 (1.0)	1 (3.5)	-1 (0.0)	-1 (0.0)	-1 (0.5)	1 (0.8)	1 (0.4)	0.158	0.694	0.761
12	-1 (1.0)	-1 (0.5)	-1 (0.0)	-1 (0.0)	-1 (0.5)	-1 (0.0)	-1 (0.0)	0.117	0.043	0.030
13	0 (2.5)	0 (2.0)	0 (0.1)	0 (1.0)	0 (1.0)	0 (0.4)	0 (0.2)	0.780	5.346	4.121
14	0 (2.5)	0 (2.0)	0 (0.1)	0 (1.0)	0 (1.0)	0 (0.4)	0 (0.2)	1.050	5.306	4.153
15	0 (2.5)	0 (2.0)	0 (0.1)	0 (1.0)	0 (1.0)	0 (0.4)	0 (0.2)	1.121	5.327	4.733

^a x_i is the coded value and X_i is the real value of the i th independent variable. The conversion between X_i and x_i is described in Equation 1.

2.7.4. Validation of the experimental design results

In order to validate the results of the experimental design, the growth kinetics of the *Streptomyces* sp. B6 strain was carried out in triplicate with the optimized

levels of nutrients indicated by the model (2.5 % soybean meal; 3.5 % potato starch; 0.5 % glucose; 2.45 % casein peptone and 0.8 % $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7.0) at 30°C and 150 rpm. The microbial growth and production of MTGase by *Streptomyces* sp. B6 was also tested using the medium before optimization (2.5 % soybean meal; 2.0 % potato starch; 0.1 % glucose; 1.0 % bacteriological peptone; 0.4 % $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 0.2 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7.0) at 30 °C and 150 rpm.

Table 2-2 - Coded levels and real values (between brackets) for the experimental design and results of the CCD.

Trial	Glucose	Casein peptone	$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	MTGase activity
	[(w/v) %]	[(w/v) %]	[(w/v) %]	96 h
1	-1 (0.2)	-1 (1.1)	-1 (0.3)	2.135
2	1 (0.8)	-1 (1.1)	-1 (0.3)	2.196
3	-1 (0.2)	1 (2.9)	-1 (0.3)	6.118
4	1 (0.8)	1 (2.9)	-1 (0.3)	4.717
5	-1 (0.2)	-1 (1.1)	1 (1.3)	4.015
6	1 (0.8)	-1 (1.1)	1 (1.3)	5.007
7	-1 (0.2)	1 (2.9)	1 (1.3)	3.386
8	1 (0.8)	1 (2.9)	1 (1.3)	3.786
9	-1.68 (0.0)	0 (2.0)	0 (0.8)	5.111
10	1.68 (1.0)	0 (2.0)	0 (0.8)	4.805
11	0 (0.5)	-1.68 (0.5)	0 (0.8)	2.986
12	0 (0.5)	1.68 (3.5)	0 (0.8)	3.905
13	0 (0.5)	0 (2.0)	-1.68 (0.0)	3.286
14	0 (0.5)	0 (2.0)	1.68 (1.6)	3.884
15	0 (0.5)	0 (2.0)	0 (0.8)	5.407
16	0 (0.5)	0 (2.0)	0 (0.8)	5.405
17	0 (0.5)	0 (2.0)	0 (0.8)	5.398

^a x_i is the coded value and X_i is the real value of the i th independent variable. The conversion between x_i and X_i is described in Equation 1.

2.8. Statistical analysis

The Statistica 8.0 software (Statsoft. Inc., Tulsa, *Oklahoma*, USA) was used in all the statistical experimental designs and in the analyses of the results. The

analysis of variance (ANOVA) was carried out to evaluate the statistical significance of the model. The significance of the regression coefficients and the associated probabilities $p(t)$ were determined using the Student t-test, and the significance of the second order model equation determined by Fisher's F -test. The adequacy of the model was explained by the multiple determination coefficient R^2 . The response model was expressed in terms of coded variables, ignoring the statistically non-significant terms.

2.9. Biochemical characterization of the transglutaminase

2.9.1. Effect of pH on transglutaminase activity and stability

The effect of pH on MTGase activity was determined under standard assay conditions using 50 mM sodium citrate buffer (pH 3.0 - 6.5), 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0 - 9.0), 50 mM Glycine-NaOH buffer (pH 10.0 - 11.0) and also 0.05 M NaOH solution (pH 12.5). The enzyme activity was measured after 60 min at 37 °C.

The effect of pH on transglutaminase stability was determined using the previously mentioned buffer systems over the pH range from 3.0 - 11.0. The enzyme solutions were incubated at the various pH values for 60 min at 5 °C with no substrate, and the remaining enzyme activity then was measured at 37 °C using *N*-CBZ-Gln-Gly in a sodium citrate buffer at pH 6.0. The relative activities were determined considering the maximal activity of the enzyme at a specific pH value as 100 %.

2.9.2. Effect of temperature on transglutaminase activity and stability

The effect of temperature on MTGase activity was tested by assaying the activity at various different temperatures (5 °C and over the range from 25 °C to 70 °C at pH 6.0). The thermal stability of the enzyme was determined by incubating the enzyme solution from 0 to 180 min between 30 and 70 °C, and the remaining transglutaminase activities measured at 37 °C.

3. Results and discussion

3.1. Screening of transglutaminase producing microorganisms and identification of the isolate B6 (ver ANEXO I e II)

A total of 84 strains were isolated and B3 (1.52 U/mL) and B6 (2.75 U/mL) strains produced the highest transglutaminase activities. The isolate B6 was selected for further analysis due to its greater capacity to produce transglutaminase.

The classification of strain B6 in the genus *Streptomyces* was confirmed by its assignment to the *Streptomyces lydicus* subclade, the taxonomic integrity of which was underpinned by all of the tree-making algorithms and by a 66 % bootstrap value (Figure 2-1). Strain B6 and its nearest neighbor, *Streptomyces angustmycinicus* NRBC 3934^T, formed a group towards the periphery of the *S. lydicus* subclade that was also supported by the maximum-parsimony algorithm and a bootstrap value of 77 %; the two strains shared a 16S rRNA gene sequence similarity of 99.7 %, a value corresponding to 3 nt differences at 1117 locations. Strain B6 also shared relatively high 16S rRNA gene similarities (99.6 %, 5 nt differences) with *Streptomyces nigrescens* NBRC 12894^T, *Streptomyces tubercidicus* DSM 40261^T, *Streptomyces libani* subsp. *libani* NBRC 13452^T and *Streptomyces angustmyceticus* NRRL B-2347^T.

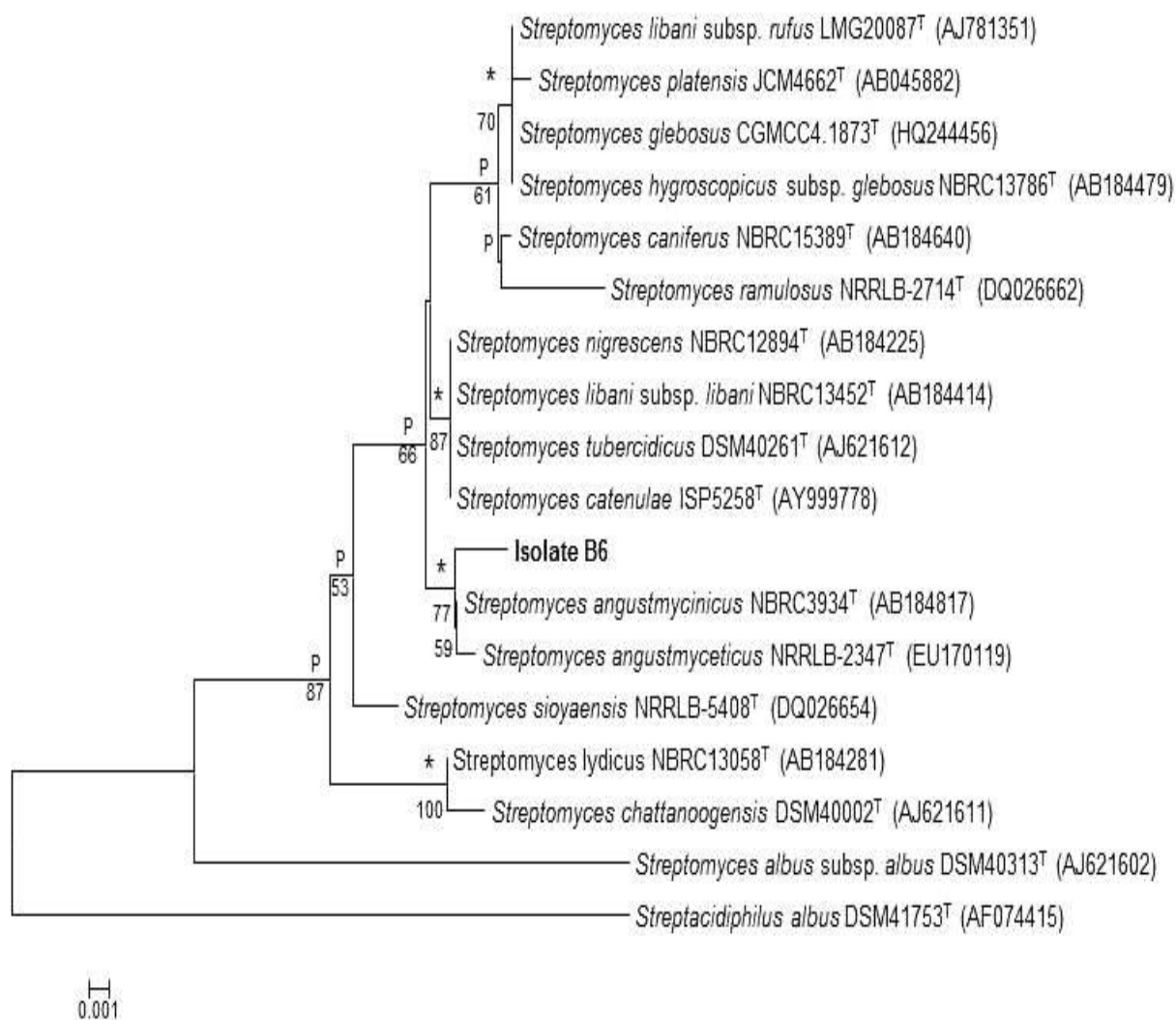


Figure 2-1 - Neighbor-joining tree based on 16S rRNA gene sequences (approx. 1100 bp) showing the relationships between the isolate B6 and strains of phylogenetically closely related members of the genus *Streptomyces*. Asterisks indicate branches of the tree that were also recovered with the maximum-likelihood and maximum-parsimony tree-making algorithms; P indicates a branch which was also recovered using the maximum-parsimony tree-making algorithm. The numbers at the nodes are percentage bootstrap values based on a neighbor-joining analysis of 1000 re-sampled datasets; only values >50 % are shown. *Streptomyces albus* subsp. *albus* DSM 40313^T (GenBank accession no. AJ621602) and *Streptacidiphilus albus* DSN 41753^T (AF074415) were used as outgroups. Bar, 0.001 substitutions per nucleotide position.

3.2. Study of transglutaminase production by *Streptomyces* sp. B6 (ver ANEXO III)

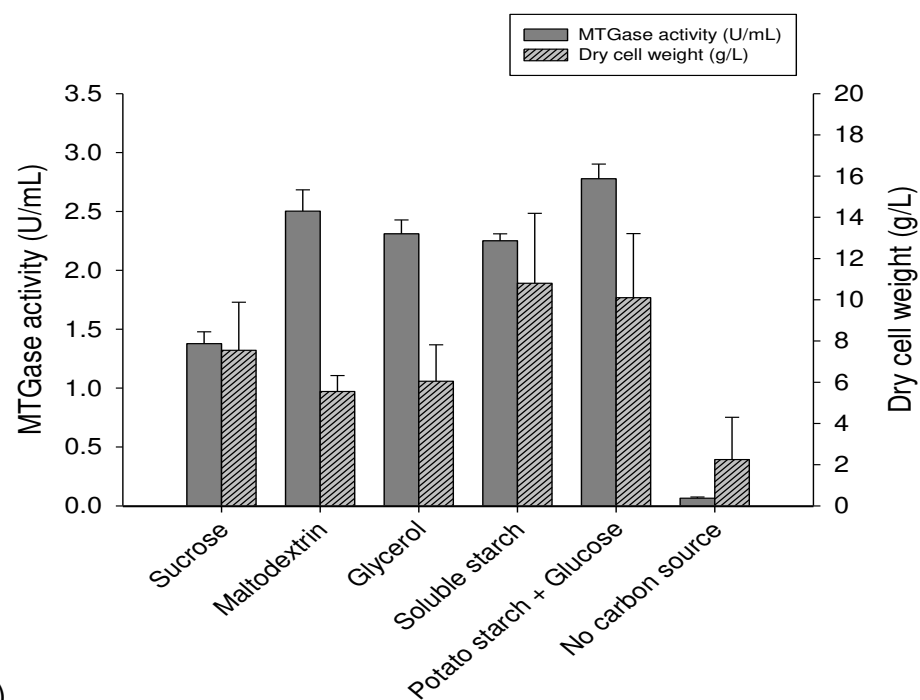
3.2.1. Effect of carbon sources on MTGase production

Of all the carbon sources tested, the mixture of potato starch (2.0 %) and glucose (0.1 %) was the best one for MTGase production, and the enzyme activity reached 2.78 U/mL after 72 hours incubation at 150 rpm and 30 °C, with a biomass of 10.1 g/L (Figure 2-2a). Téllez-Luis et al. [12] studied the production of MTGase by *Streptoverticillium ladakanum* NRRL-3191 and found that a carbon source of glycerol had the highest effect on transglutaminase production. On the other hand, Macedo et al. [10] also obtained higher production of MTGase (1.4 U/mL) from *Streptomyces* sp. using a mixture of 2.0 % potato starch and 0.2 % glucose as the carbon source. Thus for the subsequent experiments, 2.0 % potato starch and 0.1 % glucose were used as the carbon source.

3.2.2. Effect of different nitrogen sources on MTGase production

A mixture of potato starch (2.0 %) and glucose (0.1 %) was selected for the trials using different nitrogen sources. A mixture of casein peptone (1.0 %) and bacteriological peptone (1.0 %) showed the highest MTGase activity (5.33 U/mL) and biomass (26.5 g/L) (Figure 2-2b). Zhu et al. [32] tested the effect of different nitrogen sources on MTGase production by *Streptoverticillium mobaraense* and found that inorganic nitrogen sources and free amino acids failed to induce MTGase synthesis. This result suggested that some amino acids present in complex nitrogen sources such as peptone can improve enzyme production. The present findings corroborated this hypothesis, and therefore casein peptone (1.0 %) plus bacteriological peptone (1.0 %) was used as the nitrogen source for the following experiments.

(a)



(b)

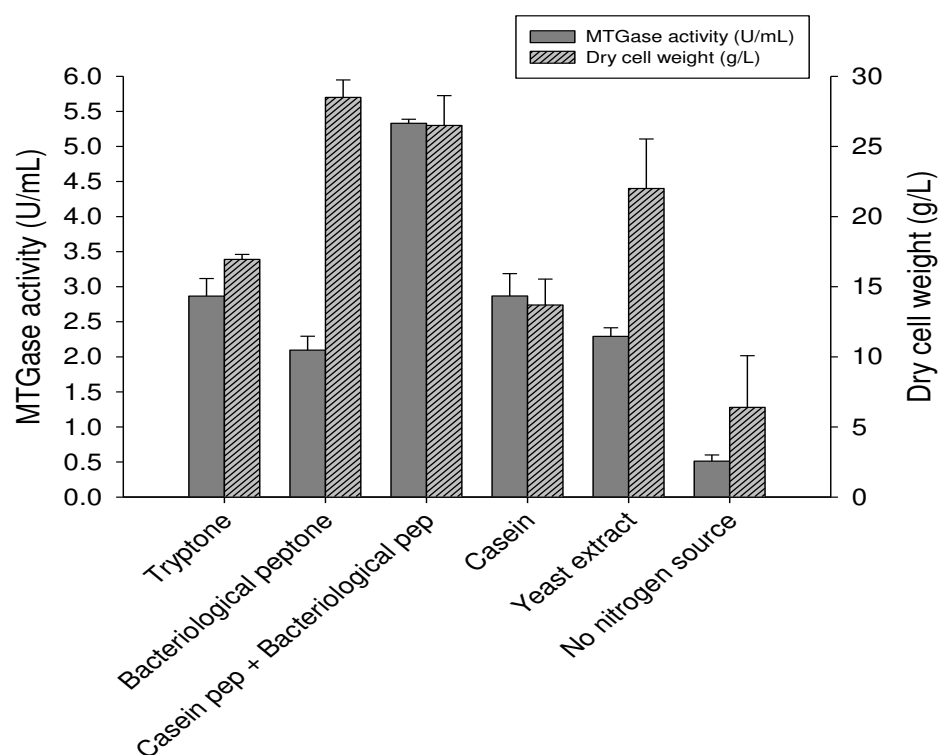


Figure 2-2 - Effect of different carbon sources (a) and nitrogen sources (b) on MTGase production and dry cell weight.

3.2.3. Study of the effect of the different medium components on MTGase production using a Plackett-Burman design

The Plackett-Burman experimental design was used to evaluate the impact of soybean meal, potato starch, glucose, casein peptone, bacteriological peptone, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ on MTGase production by *Streptomyces* sp. B6. The MTGase production varied in the range from 0.01 to 5.34 U/mL according to the different component combinations used in the production medium. The statistical analysis was carried out using the data obtained after 72 h of fermentation, since in the majority of the experiments there was no significant increase in transglutaminase activity after this time (Table 2-1). The effects estimated for each variable were determined and reported in Table 2-3. The results were analyzed at a 95 % confidence level to test the hypothesis, and variables with $p < 0.05$ were considerable significant for MTGase activity. The most relevant variables for transglutaminase activity were potato starch, glucose, casein peptone, bacteriological peptone, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Table 2-3). Increases in bacteriological peptone and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ concentration had a negative influence on transglutaminase activity. Thus, the bacteriological peptone and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ concentrations were fixed at the minimum values (level -1; Table 2-1). On the other hand, potato starch, glucose, casein peptone and $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ increased transglutaminase activity. Variation in the soybean meal concentration was not statistically significant at a 95 % confidence level, and thus it was fixed at the intermediary level (level 0; Table 2-1). Despite the positive influence of increase in the potato starch concentration in transglutaminase activity, the concentration of this component has not been studied in ranges concentrations higher in the next phase of the study because occurred gelatinization of the culture medium under these conditions. Thus, the potato starch concentration was fixed at the highest level (level +1; Table 2-1).

Table 2-3 – Estimated effects for transglutaminase activity from the results of the P-B design after 72 h of fermentation.

Factor	Effect	Std Err.	t-value	p-value
Soybean meal	0.2043	0.0848	2.4077	0.05273
Potato starch	0.8376	0.0848	9.8704	0.00006 ^a
Glucose	0.8213	0.0848	9.6780	0.00007 ^a
Bacteriological peptone	-1.0293	0.0848	-12.1289	0.00001 ^a
Casein peptone	0.7903	0.0848	9.3127	0.00008 ^a
KH ₂ PO ₄ .7H ₂ O	0.3920	0.0848	4.6190	0.00361 ^a
MgSO ₄ .7H ₂ O	-0.7456	0.0848	-8.7864	0.00012 ^a

^a Significant factors (p < 0.05).Coefficient of determination: $R^2 = 0.997$

3.2.4. Optimization of the medium composition for transglutaminase production using a central composite design (CCD)

The response surfaces of the central composite design were used to optimize the glucose, casein peptone and KH₂PO₄.7H₂O concentrations (Table 2-2). The data obtained after 96 h of fermentation was used in the CCD, since this was the fermentation time when most of the experiments reached their maximum transglutaminase activity.

The quadratic model calculated for maximum transglutaminase activity after eliminating the statistically non-significant terms (p > 0.1) was:

$$Y = 5.4021 - 0.1532 x_1^2 + 0.4598 x_2 - 0.6879 x_2^2 + 0.1431 x_3 - 0.6386 x_3^2 - 0.2668 x_1 x_2 + 0.3515 x_1 x_3 - 1.0543 x_2 x_3$$

where Y is the predicted response; and x_1 , x_2 and x_3 are the coded values for the glucose, casein peptone and KH₂PO₄.7H₂O concentrations, respectively.

The analysis of variance is presented in Table 2-4. The pure error was small, indicating sufficient reproducibility of data obtained. The correlation coefficient indicated that the model could explain 97.7 % ($R^2 = 0.977$) of response variation, and the F -test (Fisher's test) showed that the model was adequate to represent the relationship between the variables studied and transglutaminase activity, since the tabulated value for F_t ($F_{10.1; 8; 8} = 2.59$) was lower than the computed value ($F_c = 42.41$) for regression at a 90 % confidence level. It can be seen from Figure 2-3 that the trend lines of the contour diagrams showed that the highest values for transglutaminase activity were obtained at the central region for glucose and $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and to the casein peptone in regions with values above the central region. From analysis of the contour diagrams was defined the optimal concentrations of the components in the fermentation medium as: 0.5 % glucose, 2.45 % casein peptone and 0.8 % $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, obtaining a transglutaminase activity of 6.13 U/mL in this medium.

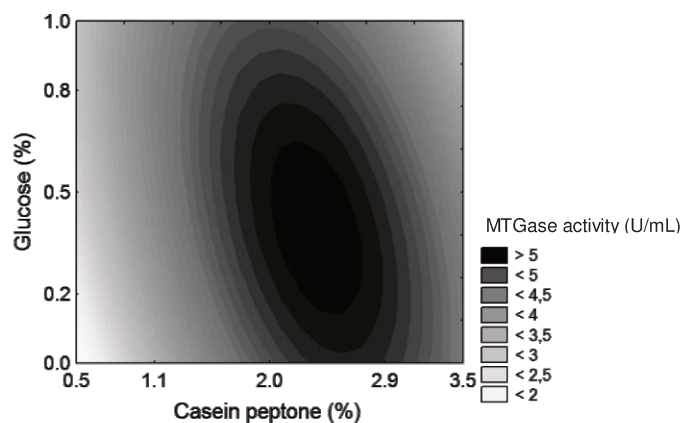
The transglutaminase activity obtained in this study (6.13 U/mL) was higher than the results described by Zhang et al. [3], who obtained 4.3 U/mL after 96 h of fermentation at 30 °C with *Streptomyces mobaraensis* DSM 40587, and significantly higher than the 1.4 U/mL reported by Macedo et al. [10], who produced transglutaminase from *Streptomyces* sp. in a fermentation medium containing a mixture of potato starch and glucose at 30 °C for 120 h.

Table 2-4 - Analysis of variance and regression analysis for the surface response of the central composite design of transglutaminase production.

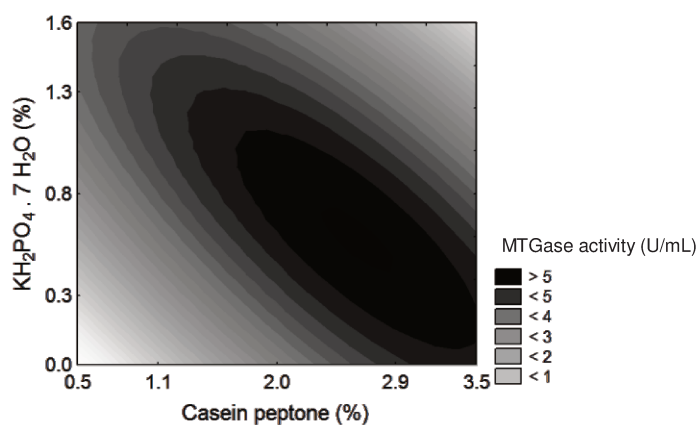
Source of variation	Sum of squares	Degrees of Freedom	Mean squares	F_t	F_c
Regression	21.58327	8	2.69791	42.41	2.59
Residual	0.50880	8	0.06360		
Lack of fit	0.50876	6	0.08479		
Pure error	0.00004	2	0.00002		
Total	22.09207	16			

Coefficient of determination: $R^2 = 0.977$

a)



(b)



(c)

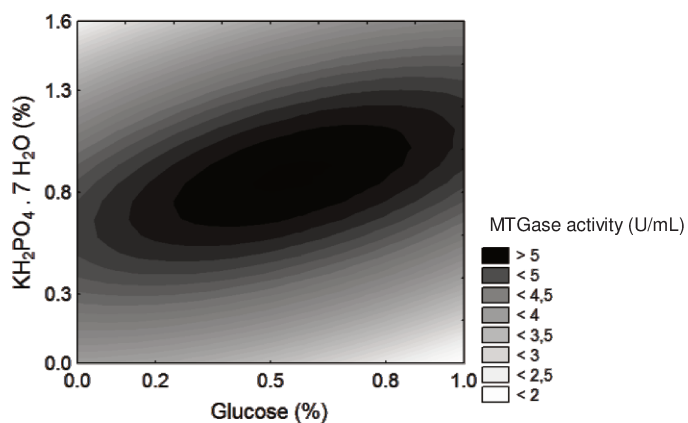


Figure 2-3 – Contour diagrams for the MTGase activity as a function of: (a) glucose *versus* casein peptone; (b) $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ *versus* casein peptone; (c) $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ *versus* glucose concentrations after 96 h of fermentation, according to the CCD.

3.2.5. Validation of the experimental design results

The *Streptomyces* sp. B6 strain produced $6.13 \text{ U/mL} \pm 0.05$ of transglutaminase after fermentation in an optimized medium containing (w/v); 2.5 % soybean meal, 3.5 % potato starch, 0.5 % glucose, 2.45 % casein peptone and 0.8 % $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, at pH 7.0, 30 °C and 150 rpm. This optimization strategy led an increase of 125 % higher than the MTGase activity obtained before optimization ($2.73 \text{ U/mL} \pm 0.16$; Figure 2-4).

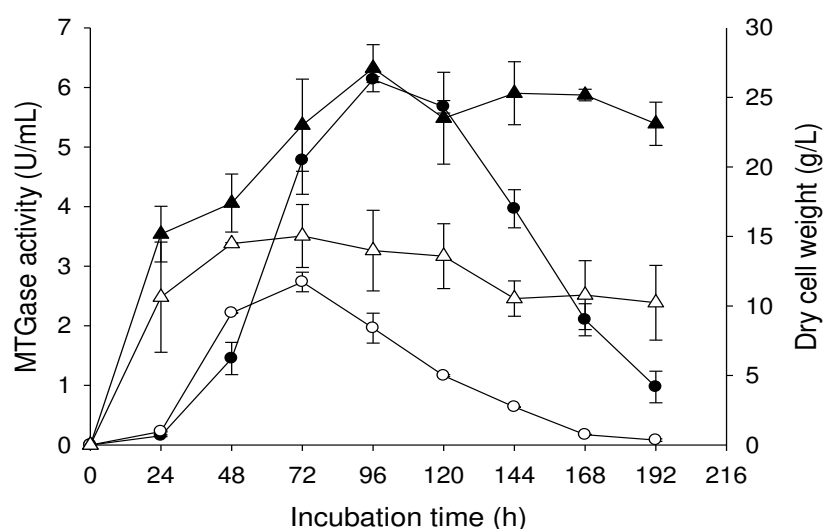


Figure 2-4 – Time course of transglutaminase production by *Streptomyces* sp. B6 cultivated in the medium after optimization (●) MTGase activity, (▲) dry cell weight, and in the medium before optimization (○) MTGase activity, (Δ) dry cell weight.

The enzymatic kinetic used to validation of the experimental design showed that the high values for MTGase activity in the medium before optimization and medium after optimization were obtained with very different fermentation times (72 h and 96 h, respectively) (Figure 2-4). From an analysis of the biomass dry weight in the experiment can be observed that the *Streptomyces* sp. B6 grew rapidly reaching stationary phase after 48 h of fermentation in the medium before optimization, but only after 96 h in the medium after optimization. These results showed that the transglutaminase activity increased occurs during the exponential

phase of microbial growth, with maximum activity at the end of exponential phase. Similar behavior with respect to the production of the transglutaminase was found by Junqua et al. [15], where reported that enzyme activity of *S. cinnamoneum* reached its maximum at the end of exponential phase.

3.3. Biochemical characterization of the MTGase (ver ANEXO IV)

3.3.1. Effect of pH on the transglutaminase activity and stability

The transglutaminase from *Streptomyces* sp. B6 exhibited optimal activity for the reaction with *N*-CBZ-Gln-Gly and hydroxylamine at both pH 6.5 and 11.0 (Figure 2-5a). Macedo et al. [18] verified that the crude extract of transglutaminase obtained from *Streptomyces* sp. showed activity at both pH 6.0 and 10.0, suggesting the presence of an isoenzyme in the crude extract. The transglutaminase from *Streptomyces* sp. B6 retained more than 65 % of its initial activity after 60 min incubation in a pH range from 3 to 11.0 at 5 °C (Figure 2-5b). The pH stability found in the present study was higher than that obtained for transglutaminase from *Streptomyces* sp., which showed to be stable in a pH range from 5.0 to 8.0 [18].

3.3.2. Effect of temperature on the transglutaminase activity and stability

The enzyme exhibited optimum activity for the catalytic reaction with *N*-CBZ-Gln-Gly and hydroxylamine at 45 °C (Figure 2-5c). The activity increased gradually with temperature up to 45 °C, but declined sharply with temperatures over 55 °C. The optimum temperature found in the present study was higher than that obtained for the crude enzyme from *Streptomyces* sp. (optimum temperature at 35°C) [18] but similar to that observed for *Streptomyces hygroscopicus* (37- 45 °C) [6]. The transglutaminase from *Streptomyces* sp. B6 retained respectively 86 % and 64 % of the initial activity after 30 and 180 minutes of incubation at 40 °C. The enzyme

retained 51 % of the initial activity after 30 minutes of incubation at 50 °C but it decreased sharply at 60 °C to 5.8 % of the initial activity after 10 min of incubation (Figure 2-5d). In comparison with other MTGases from different sources, the thermal stability of this transglutaminase at 40 °C was higher than that from *Streptomyces hygroscopicus*, which retained 80 % of its activity when incubated at 40 °C for 30 min [6], and of *Streptomyces* sp., which maintained 80 % of its activity after incubation at 40 °C for 30 min [18].

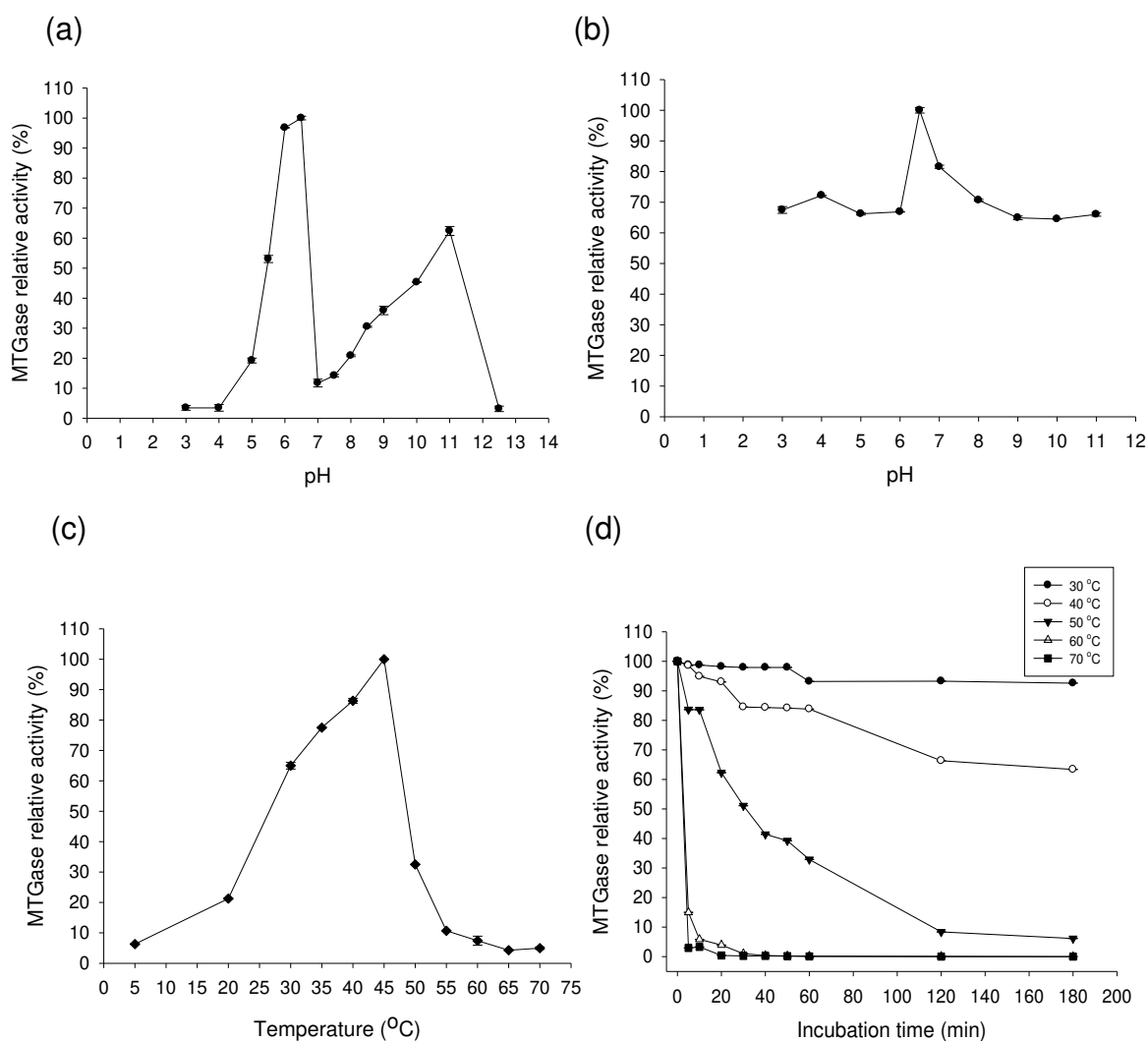


Figure 2-5 - The effect of pH on (a) the activity and (b) the stability of crude MTGase from *Streptomyces* sp. B6. The effect of temperature on (c) the activity and (d) the stability of crude MTGase from *Streptomyces* sp. B6.

4. Conclusions

In the present study, *Streptomyces* sp. B6 showed a great potential for further investigation for MTGase production. The analysis of the production of transglutaminase using statistical experimental methods promoted an increase of 125 % as compared to the activity found in the medium before optimization. Furthermore, the biochemical characterization of the transglutaminase produced by the *Streptomyces* sp. B6 exhibited optimal activity at 45 °C and at pH values of 6.5 and 11.0. The transglutaminase of the new microorganism also showed high temperature and pH stability, demonstrating its possible application in industrial processes. The use of this microorganism for the production of transglutaminase may allow for an increase in the use this enzyme in biotechnologies processes, for example in the food industry and others.

5. Acknowledgements

The authors are grateful to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the financial support received. The authors are also indebted to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for providing a fellowship to WRS (Proc. 2012/03363-4) and for research funds awarded to TDZ (Proc. 2011/50243-1).

6. References

- [1] M. Motoki, K. Seguro, Transglutaminase and its use for food processing, Trends in Food Science and Technology, 9 (1998) 204-210.
- [2] M. Nonaka, H. Tanaka, A. Okiyama, M. Motoki, H. Ando, K. Umeda, A. Matsuura, Polymerization of several proteins by Ca^{2+} -independent transglutaminase derived from microorganisms, Agricultural and Biological Chemistry, 53 (1989) 2619-2623.
- [3] L. Zhang, X. Han, M. Du, Y. Zhang, Z. Feng, H. Yi, Enhancement of transglutaminase production in *Streptomyces mobaraensis* as achieved by treatment with excessive MgCl_2 , Applied Microbiology and Biotechnology, 93 (2012) 2335-2343.
- [4] Y. Zhu, J. Tramper, Novel applications for microbial transglutaminase beyond food processing, Trends in Biotechnology, 26 (2008) 559-565.
- [5] B.K. Bernard, S. Tsubuku, S. Shioya, Acute toxicity and genotoxicity studies of a microbial transglutaminase, International Journal of Toxicology, 17 (1998) 703–721.
- [6] L. Cui, G. Du, D. Zhang, H. Liu, J. Chen, Purification and characterization of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygroscopicus*, Food Chemistry, 105 (2007) 612-618.
- [7] M. Motoki, Y. Kumazawa, Recent research trends in transglutaminase technology for food processing, Food Science and Technology Research, 6 (2000) 151-160.

-
- [8] G. Yan, G. Du, Y. Li, J. Chen, J. Zhong, Enhancement of microbial transglutaminase production by *Streptoverticillium mobaraense*: application of a two-stage agitation speed control strategy, *Process Biochemistry*, 40 (2005) 963-968.
- [9] H. Ando, M. Adachi, K. Umeda, A. Matsuura, M. Nonaka, R. Uchio, H. Tanaka, M. Motoki, Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms, *Agricultural and Biological Chemistry*, 53 (1989) 2613-2617.
- [10] J.A. Macedo, L.D. Sette, H.H. Sato, Optimization of medium composition for transglutaminase production by a Brazilian soil *Streptomyces* sp, *Electronic Journal of Biotechnology*, 10 (2007) 618-626.
- [11] C.F.d. Souza, S.H. Flôres, M.A.Z. Ayub, Optimization of medium composition for the production of transglutaminase by *Bacillus circulans* BL32 using statistical experimental methods, *Process Biochemistry*, 41 (2006) 1186-1192.
- [12] S.J. Téllez-Luis, J.A. Ramírez, M. Vázquez, Production of transglutaminase by *Streptoverticillium ladakanum* NRRL-3191 using glycerol as carbon source, *Food Technology and Biotechnology*, 42 (2004) 75-81.
- [13] Y. Song, B. Du, T. Zhou, B. Han, F. Yu, R. Yang, X. Hu, Y. Ni, Q. Li, Optimization of extraction process by response surface methodology and preliminary structural analysis of polysaccharides from defatted peanut (*Arachis hypogaea*) cakes, *Carbohydrate Research*, 346 (2011) 305-310.
- [14] G. Box, K. Wilson, On the experimental attainment of optimum condition, *Journal of the Royal Statistical Society*, 13 (1951) 1-51.

-
- [15] M. Junqua, R. Duran, C. Gancet, P. Goulas, Optimization of microbial transglutaminase production using experimental designs, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48 (1997) 730-734.
- [16] J.A. Macedo, A.L. Fazani Cavallieri, R. Lopes da Cunha, H.H. Sato, The effect of transglutaminase from *Streptomyces* sp. CBMAI 837 on the gelation of acidified sodium caseinate, *International Dairy Journal*, 20 (2010) 673-679.
- [17] J.A. Macedo, H.H. Sato, Propriedades e aplicações da transglutaminase microbiana em alimentos, *Alim. Nutr.*, Araraquara, 16 (2005) 413-419.
- [18] J.A. Macedo, L.D. Sette, H.H. Sato, A comparative biochemical characterization of microbial transglutaminases: commercial vs. a newly isolated enzyme from *Streptomyces* sp., *Food and Bioprocess Technology*, 3 (2010) 308-314.
- [19] J.A. Macedo, L.D. Sette, H.H. Sato, Purification and characterization of a new transglutaminase from *Streptomyces* sp. isolated in brazilian soil, *Journal of Food Biochemistry*, 35 (2011) 1361-1372.
- [20] M.A. El-Nakeeb, H.A. Lechevalier, Selective isolation of aerobic Actinomycetes, *Applied Microbiology*, 11 (1963) 75-77.
- [21] E.B. Shirling, D. Gottlieb, Methods for characterization of *Streptomyces* species, *International Journal of Systematic Bacteriology* 16 (1966) 313-340.
- [22] J.E. Folk, P.W. Cole, Transglutaminase: Mechanistic features of the active site as determined by kinetic and inhibitor studies, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology and Biological Oxidation*, 122 (1966) 244-264.

-
- [23] T.D. Zucchi, L.G. Almeida, F.L. Cônsoli, Culturable bacterial diversity associated with cysts of *Eurhizococcus brasiliensis* (Hempel) (Hemiptera: Margarodidae), *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27 (2011) 791-797.
- [24] K. Tamura, D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, S. Kumar, MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods, *Molecular Biology and Evolution*, 28 (2011) 2731-2739.
- [25] O.S. Kim, Y.J. Cho, K. Lee, S.H. Yoon, M. Kim, H. Na, S.C. Park, Y.S. Jeon, J.H. Lee, H. Yi, S. Won, J. Chun, Introducing EzTaxon-e: A prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62 (2012) 716-721.
- [26] J. Felsenstein, Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach, *Journal of Molecular Evolution*, 17 (1981) 368-376.
- [27] W.M. Fitch, Toward defining the course of evolution: minimum change for specific tree topology, *Systematic Biology* 20 (1971) 406-416.
- [28] N. Saitou, M. Nei, The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, *Molecular Biology and Evolution*, 4 (1987) 406-425.
- [29] S. Guindon, O. Gascuel, A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood, *Systematic Biology*, 52 (2003) 696-704.
- [30] T.H. Jukes, C.R. Cantor, Evolution of protein molecules. In: Munro, H.N., (Ed.), *Mammalian Protein Metabolism*, Academic Press, New York, (1969) 21-123.

[31] J. Felsenstein, Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap, *Evolution*, 39 (1985) 783-791.

[32] Y. Zhu, A. Rinzema, J. Tramper, J. Bol, Medium design based on stoichiometric analysis of microbial transglutaminase production by *Streptovercillium mobaraense*, *Biotechnology and Bioengineering*, 50 (1996) 291-298.

CONCLUSÕES FINAIS

Com este trabalho que vislumbra prioritariamente, o desenvolvimento de uma nova fonte de transglutaminase com intuito de aplicação em processos biotecnológicos, pode se concluir que:

- No estudo foram isolados 86 linhagens a partir de solo dos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Ceará, dentre as quais a linhagem B3 (1,52 U/mL) e B6 (2,75 U/mL) foram capazes de produzir elevada concentração de transglutaminase;
- A linhagem B6 foi selecionada para a próxima etapa do trabalho devido a sua maior atividade de transglutaminase;
- A identificação da linhagem B6 foi realizada pelo sequenciamento do gene 16S rRNA do micro-organismo e a partir de análises de filogenéticas pode-se concluir que tem características típicas do gênero actinomiceto e próxima ao *Streptomyces angustmycinicus* NBRC 3934^T;
- Os métodos de otimização do meio de fermentação; seleção de fontes de carbono, Plackett-Burman e Delineamento Composto Central, promoveram um aumento de 125% na atividade de transglutaminase (6,13 U/mL) utilizando o meio de cultura composto de 2,5% de farelo de soja; 3,5% de amido de batata; 0,5% de glicose; 2,45% de peptona de caseína e 0,8% de $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7,0, 150 rpm à 30°C, em relação ao meio de cultura inicial composto de 2,5% de farelo de soja ; 2,0% de amido de batata; 0,1% de glicose; 1,0% peptona bacteriológica; 0,4% de $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,2% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7,0, 150 rpm há 30°C (2,95

U/mL), utilizado no processo de seleção de micro-organismo produtores de transglutaminase;

- A enzima transglutaminase produzida pela linhagem *Streptomyces* sp. B6 exibiu atividade ótima em 45°C e em pH de 6,5 e 11,0. A enzima manteve-se estável na faixa de pH 3,0-11,0 durante 60 minutos à 40°C durante 3 horas;
- A transglutaminase não foi inibida por Ca^{2+} , Na^+ , Co^{2+} , Mn^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Ba^{2+} , EDTA, L-cisteína e glutathione, mas foi inibida na presença de Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} e Fe^{2+} .

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Aumento de escala da produção da transglutaminase de *Streptomyces* sp. B6 em fermentador 6,6 L.
- Produção da transglutaminase de *Streptomyces* sp. B6 em meio semi-sólido, com a finalidade de utilização de resíduos industriais;
- Purificação e caracterização da transglutaminase purificada;
- Sequenciamento e clonagem da transglutaminase de *Streptomyces* sp. B6 visando à expressão em alta concentração;
- Identificação taxonômica do isolado B6 até nível de espécie;
- Aplicação da enzima transglutaminase produzida pela linhagem *Streptomyces* sp. B6 em alimentos.

ANEXOS – CAPÍTULO 2

ANEXOS

O objetivo da inclusão dos anexos seguintes ao corpo deste trabalho é de registrar parte do trabalho experimental desenvolvido, mas que não está descrito no artigo do capítulo anterior. Nestes anexos estão contidas informações sobre resultados que não foram apresentados no artigo científico, mas que podem ter importância para definição de futuros projetos de pesquisa nessa área.

ANEXO I - Isolamento e seleção de micro-organismos produtores de transglutaminase

No anexo I estão apresentados os locais de coleta das amostras de solo e a atividade de transglutaminase das linhagens de micro-organismos isolados a 30°C e a 40°C.

Material e Métodos

As linhagens de micro-organismos isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio ISP2 (0.4% de extrato de levedura, 1% de extrato de malte, 0,4% de glicose e 1,5% de ágar, pH 7,0 $\pm$ 0,02), durante 6 dias a 30°C. Após o crescimento dos micro-organismos, seis cilindros (0,6 cm de diâmetro) foram recortados e transferidos para frascos de Erlenmeyer contendo 50 mL de meio de cultivo descrito por Macedo et al. (2007). Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 30°C, a 150 rpm. Alíquotas de 2,0 mL do meio foram coletadas nos tempos de 72 e 120 horas de fermentação, centrifugadas a 20 600 x *g* por 10 minutos a 4°C e a atividade de transglutaminase foi determinada como descrito por Folk e Cole (1966), com algumas modificações.

Resultados e Discussão

A Tabela I-1 mostra as localidades onde foram coletadas as amostras de solo utilizadas no isolamento de micro-organismos produtores de transglutaminase. No estudo foram isoladas 86 linhagens (Tabelas I-2 e I-3) a partir de solo dos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Ceará, dentre as quais a linhagem B3 (1,918 U/mL) e B6 (2,956 U/mL) demonstraram elevada capacidade em produzir a enzima transglutaminase.

Tabela I-1 – Origem das amostras de solo utilizadas no isolamento de micro-organismos produtores de transglutaminase.

Numero das amostras de solo	Origem
1	Solo coletado próximo a EMBRAPA (UNICAMP, SP)
2	Solo coletado próximo a FEAGRI (UNICAMP, SP)
3	Solo coletado próximo ao campo da FEAGRI 1 (UNICAMP, SP)
4	Solo coletado próximo ao campo da FEAGRI 2 (UNICAMP, SP)
5	Solo coletado próximo à reserva do bairro Barão Geraldo, SP
6	Solo coletado próximo ao campo do bairro Barão Geraldo, SP
7	Solo coletado próximo ao rio do município de Fortaleza, CE
8	Solo de cultivo de pimenta do município de Fortaleza, CE
9	Solo coletado no município de Fortaleza, CE
10	Solo coletado no município de Betim, MG
11	Solo coletado no município de Capitólio, MG
12	Solo coletado no município de Capitólio (pasto 1), MG
13	Solo coletado no município de Capitólio (pasto 2), MG
14	Solo de cultivo de pimenta de Santo Antonio de Posse, SP
15	Solo de cultivo de pepino de Santo Antonio de Posse, SP

Tabela I-2 – Atividade de transglutaminase das linhagens de micro-organismos isolados de amostras de solo a 30°C.

Micro-organismo	Temperatura de cultivo para o isolamento do micro-organismo	Amostra de solo	Atividade Enzimática (U/mL)*
Isolado A1	30°C	3	0,014 ^{3 dias}
Isolado A2	30°C	4	ND
Isolado A3	30°C	1	0,007 ^{5 dias}
Isolado A4	30°C	4	0,005 ^{3 dias}
Isolado A5	30°C	1	0,011 ^{5 dias}
Isolado A6	30°C	2	0,007 ^{3 dias}
Isolado A7	30°C	1	0,002 ^{3 dias}
Isolado A8	30°C	6	0,003 ^{3 dias}
Isolado A9	30°C	2	0,015 ^{3 dias}
Isolado A10	30°C	1	0,013 ^{3 dias}
Isolado A11	30°C	1	0,018 ^{3 dias}
Isolado A12	30°C	4	0,004 ^{5 dias}
Isolado A13	30°C	6	0,004 ^{3 dias}
Isolado A14	30°C	4	0,019 ^{5 dias}
Isolado A15	30°C	1	0,013 ^{5 dias}
Isolado A16	30°C	6	0,005 ^{5 dias}
Isolado A17	30°C	4	0,008 ^{5 dias}
Isolado A18	30°C	1	0,007 ^{3 dias}
Isolado B1	30°C	10	0,013 ^{3 dias}
Isolado B2	30°C	13	0,004 ^{5 dias}
Isolado B3	30°C	11	1,918 ^{3 dias}
Isolado B4	30°C	10	0,042 ^{5 dias}
Isolado B5	30°C	13	0,005 ^{5 dias}
Isolado B6	30°C	10	2,956 ^{3 dias}
Isolado B7	30°C	13	0,006 ^{3 dias}
Isolado B8	30°C	10	0,005 ^{5 dias}
Isolado B9	30°C	13	0,005 ^{3 dias}
Isolado B10	30°C	12	0,008 ^{3 dias}
Isolado B11	30°C	10	0,001 ^{5 dias}

continua ...

Micro-organismo	Temperatura de cultivo para o isolamento do micro-organismo	Amostra de solo	Atividade Enzimática (U/mL)*
Isolado B12	30°C	12	ND
Isolado B13	30°C	13	0,007 ^{3 dias}
Isolado B14	30°C	12	0,006 ^{3 dias}
Isolado B15	30°C	13	0,006 ^{3 dias}
Isolado B17	30°C	13	ND
Isolado E1	30°C	7	0,006 ^{3 dias}
Isolado E2	30°C	7	0,005 ^{5 dias}
Isolado E3	30°C	14	0,009 ^{5 dias}
Isolado E5	30°C	9	0,009 ^{3 dias}
Isolado E7	30°C	15	ND

* O número sobrescrito nos valores de atividade enzimática indica o tempo de fermentação em que foi obtida a maior atividade da enzima.

ND – Representa atividade enzimática não detectada no isolado.

Tabela I-3 – Atividade de transglutaminase das linhagens de micro-organismos isolados de amostras de solo a 40°C.

Micro-organismo	Temperatura de cultivo para o isolamento do micro-organismo	Amostra de solo	Atividade Enzimática (U/mL)*
Isolado A20	40°C	3	ND
Isolado A22	40°C	3	0,002 ^{3 dias}
Isolado A23	40°C	3	0,005 ^{5 dias}
Isolado A24	40°C	1	0,003 ^{3 dias}
Isolado A25	40°C	4	0,003 ^{3 dias}
Isolado A26	40°C	3	0,004 ^{3 dias}
Isolado A27	40°C	4	0,006 ^{3 dias}
Isolado A28	40°C	6	0,006 ^{3 dias}
Isolado A29	40°C	6	0,010 ^{3 dias}
Isolado A31	40°C	5	ND
Isolado A33	40°C	6	0,034 ^{5 dias}
Isolado A34	40°C	6	ND
Isolado A35	40°C	3	0,007 ^{3 dias}
Isolado A36	40°C	4	0,008 ^{5 dias}

continua ...

Micro-organismo	Temperatura de cultivo para o isolamento do micro-organismo	Amostra de solo	Atividade Enzimática (U/mL)*
Isolado A37	40°C	4	0,011 ^{5 dias}
Isolado A38	40°C	2	ND
Isolado A39	40°C	4	0,008 ^{5 dias}
Isolado A40	40°C	4	0,015 ^{5 dias}
Isolado A41	40°C	4	0,003 ^{3 dias}
Isolado A42	40°C	4	0,005 ^{3 dias}
Isolado A43	40°C	4	ND
Isolado A44	40°C	3	ND
Isolado A45	40°C	3	ND
Isolado A46	40°C	4	0,011 ^{3 dias}
Isolado C1	40°C	13	0,005 ^{3 dias}
Isolado C2	40°C	11	0,004 ^{3 dias}
Isolado C3	40°C	13	0,002 ^{3 dias}
Isolado C4	40°C	10	0,002 ^{3 dias}
Isolado C5	40°C	8	0,004 ^{3 dias}
Isolado C6	40°C	8	0,001 ^{3 dias}
Isolado C7	40°C	13	0,004 ^{5 dias}
Isolado C8	40°C	13	ND
Isolado C9	40°C	13	0,008 ^{5 dias}
Isolado C10	40°C	13	ND
Isolado C11	40°C	13	0,005 ^{3 dias}
Isolado C12	40°C	11	ND
Isolado C13	40°C	8	ND
Isolado F1	40°C	15	ND
Isolado F3	40°C	14	0,009 ^{3 dias}
Isolado F4	40°C	9	0,002 ^{5 dias}
Isolado F5	40°C	14	ND
Isolado F7	40°C	9	0,012 ^{5 dias}
Isolado F8	40°C	14	0,002 ^{3 dias}
Isolado F9	40°C	14	0,001 ^{5 dias}
Isolado F11	40°C	9	ND

* O número sobrescrito nos valores de atividade enzimática indica o tempo de fermentação em que foi obtida a maior atividade da enzima.

ND – Representa atividade enzimática não detectada no isolado

Referências Bibliográficas

MACEDO, J. A.; SETTE, L. D.; SATO, H. H. Optimization of medium composition for transglutaminase production by a Brazilian soil *Streptomyces* sp. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 618-626, 2007.

FOLK, J.E. and COLE, P.W.. Transglutaminase: Mechanistic features of the active site as determined by kinetic and inhibitor studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology and Biological Oxidation*. v. 122(2),p. 244-264, 1966.

ANEXO II – Efeito do tempo de fermentação das linhagens B3 e B6 na produção de transglutaminase em frascos agitados a 30°C

Foi estudado o efeito do tempo de fermentação das linhagens B3 e B6 na produção de transglutaminase em frascos de Erlenmeyer agitados contendo o meio descrito por Macedo et al. (2007).

Material e Métodos

As linhagens de micro-organismos B3 e B6 foram cultivadas em placas de Petri contendo meio ISP2 (0.4% de extrato de levedura, 1% de extrato de malte, 0,4% de glicose e 1,5% de ágar, pH $7,0 \pm 0,02$), durante 6 dias a 30°C. Após o crescimento dos micro-organismos, seis cilindros (0,6 cm de diâmetro) foram recortados e transferidos para frascos de Erlenmeyer contendo 50 mL de meio de cultivo descrito por Macedo et al. (2007). Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 30°C, a 150 rpm. Alíquotas de 2,0 mL do meio foram coletadas nos tempos de 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 192 horas de fermentação, centrifugadas a $20,600 \times g$ por 10 minutos a 4°C e atividade de transglutaminase foi determinada como descrito por Folk e Cole (1966), com algumas modificações.

Resultados e Discussão

As linhagens B3 e B6 apresentaram atividade de transglutaminase de 1,52 U/mL e 2,75 U/mL, respectivamente, após 72 h de fermentação (Figuras II-1 e II-2). A linhagem B6 que apresentou maior atividade de transglutaminase foi escolhida para a continuidade dos estudos da dissertação de mestrado.

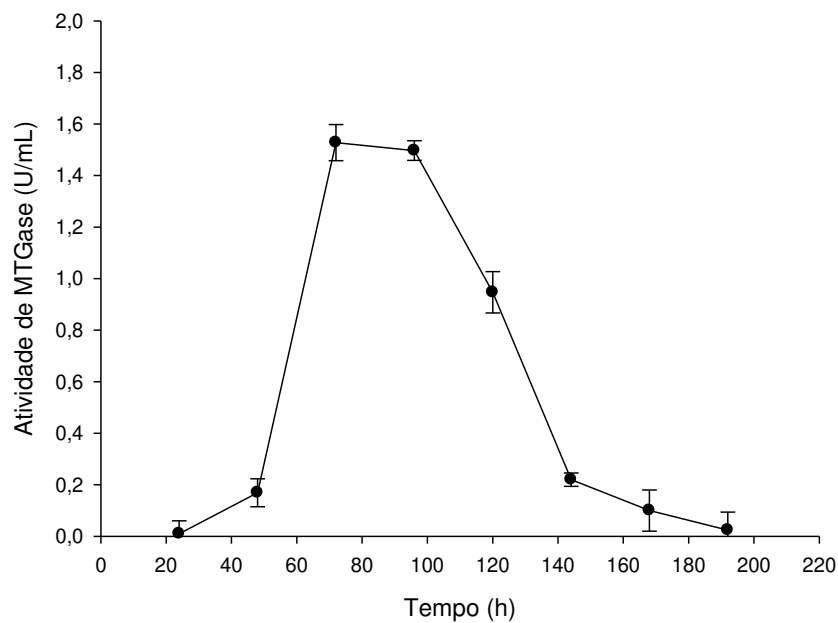


Figura II-1 – Efeito do tempo de fermentação na produção de transglutaminase pela linhagem B3, em frascos de Erlenmeyer a 30°C.

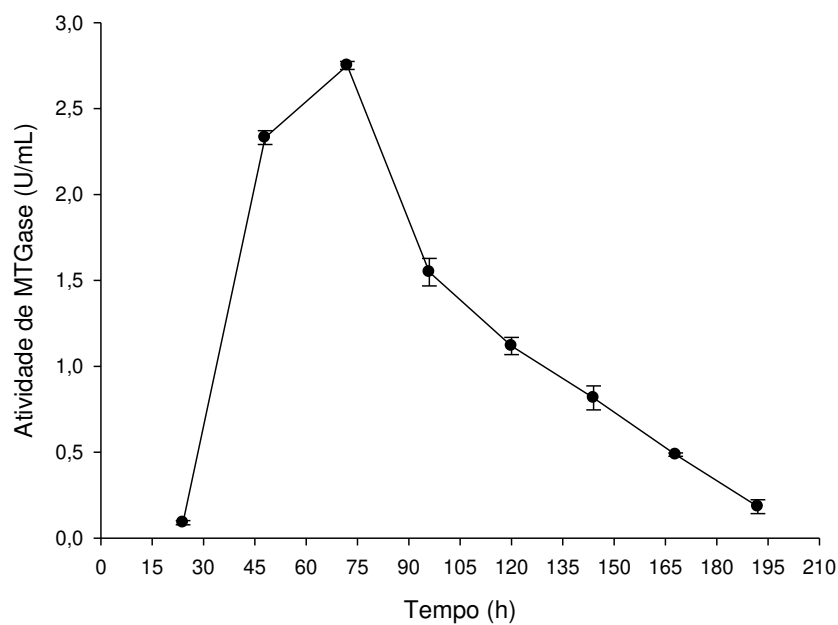


Figura II-2 – Efeito do tempo de fermentação na produção de transglutaminase pela linhagem B6, em frascos de Erlenmeyer a 30°C.

Referências Bibliográficas

MACEDO, J. A.; SETTE, L. D.; SATO, H. H. Optimization of medium composition for transglutaminase production by a Brazilian soil *Streptomyces* sp. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 618-626, 2007.

FOLK, J.E. and COLE, P.W.. Transglutaminase: Mechanistic features of the active site as determined by kinetic and inhibitor studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology and Biological Oxidation*. v. 122(2),p. 244-264, 1966.

ANEXO III - Efeito da adição de sais no meio de cultura para a produção de transglutaminase pela linhagem B6

Foi estudado o efeito da adição de sais MgCl_2 ; NaCl ; KCl ; Na_2SO_4 ; $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$; CaCl_2 e CH_3COONa , no meio de cultura para a produção de transglutaminase produzida pela linhagem B6.

Material e Métodos

A linhagem B6 foi cultivada em placas de Petri contendo meio ISP2, durante 6 dias a 30°C. Na investigação da melhor fonte de sais foi utilizado o meio inicial composto (m/v): de 2,5% de farelo de soja; 0,2% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,4 % de $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7,0. Na avaliação das fontes de sais, o meio inicial foi suplementado com melhor fonte de carbono (2% de amido de batata com 0,1% de glicose), melhor fonte de nitrogênio (1% de mistura de peptona bacteriológica com 1% de peptona de caseína), o qual foram selecionadas nos testes anteriores, e adicionado com diferentes fontes de sais (0,2 M MgCl_2 ; 0,2 M NaCl ; 0,2 M KCl ; 0,2 M Na_2SO_4 ; 0,2 M $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$; 0,2 M CaCl_2 e 0,2 M CH_3COONa), sendo que cada uma foi adicionada separadamente. A atividade de MTGase e a massa celular seca foram determinadas como descrito anteriormente. A fermentação da linhagem B6 em frascos Erlenmeyer foi realizada como descrito no Anexo II, em agitador rotatório à 30°C, 150 rpm.

Resultados e Discussão

A Figura III-1 mostra que a adição dos sais na concentração de 0,2 M no meio de cultura não resultou em um aumento na produção de transglutaminase. Zhang et al. (2012) testaram o efeito da adição alta concentração de oito diferentes sais na produção de transglutaminase pela linhagem *Streptomyces*

mobaraensis DSM 40587, e verificaram que a adição de MgCl na concentração de 0,1 M elevou a produção da enzima em 104%.

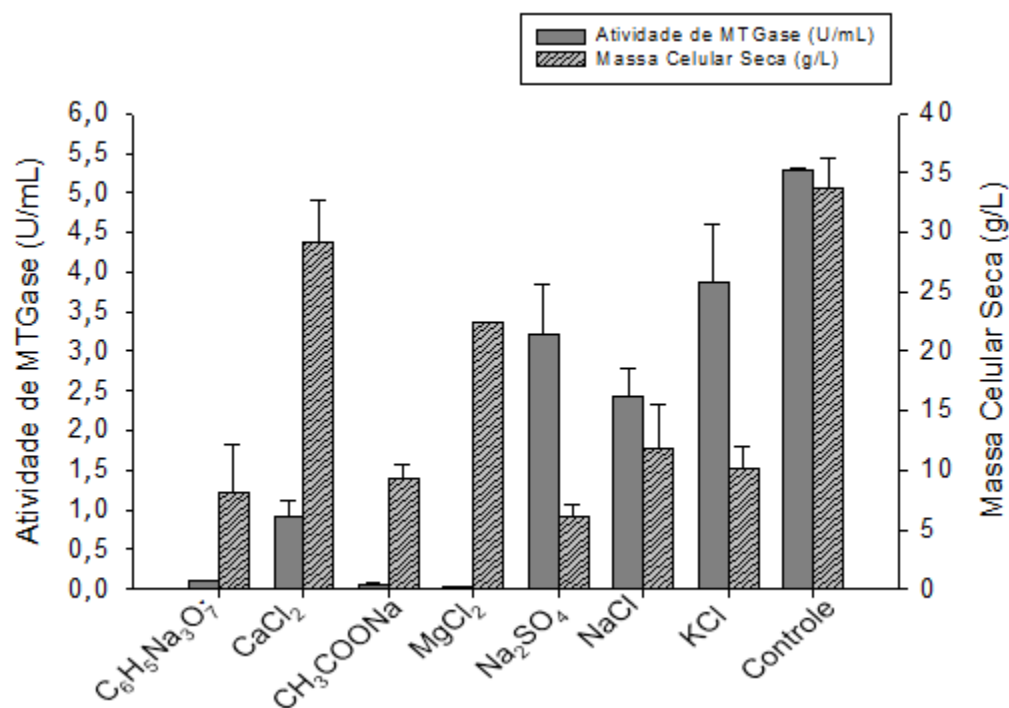


Figura III-1 – Efeito da adição de diferentes fontes de sais no meio de cultura, na produção de transglutaminase e no crescimento da linhagem de *Streptomyces* B6.

Referências Bibliográficas

ZHANG, L.; HAN, X.; DU, M.; ZHANG, Y.; FENG, Z.; YI, H. Enhancement of transglutaminase production in *Streptomyces mobaraensis* as achieved by treatment with excessive $MgCl_2$. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 6, p. 2335-2343, 2012.

ANEXO IV - Efeito de vários compostos na atividade de transglutaminase da linhagem de *Streptomyces* sp. B6

Material e Métodos

O efeito de vários compostos sobre a atividade da linhagem *Streptomyces* sp. B6 foi estudado com a pré-incubação de 2,0 mL da enzima (com atividade de 6,13 U/mL) com vários íons metálicos e outros reagentes (HgCl₂, CaCl₂, NaCl, ZnCl₂, CoCl₂, MnCl₂, FeCl₃, KCl, MgCl₂, BaSO₄, CuSO₄, ácido etilenodiamino tetra-acético, L-cisteína e glutatona), na concentração final de 5 mM à 37°C por 30 minutos. A atividade residual foi mensurada a 37°C usando o substrato *N*-CBZ-Gln-Gly e tampão citrato pH 6,0 como descrito anteriormente. Como controle foi utilizado à atividade da transglutaminase sem o tratamento com os compostos descritos acima.

Resultados e Discussão

Foi observado que a MTGase produzida pela linhagem *Streptomyces* sp. B6 foi fortemente inibida por HgCl₂ e CuSO₄ e significativamente inibida por ZnCl₂ e FeCl₃. Por outro lado, a presença de CaCl₂, NaCl, CoCl₂, MnCl₂, KCl, MgCl₂, BaSO₄, EDTA, L-cisteína e glutatona não inibiram a atividade da transglutaminase (Tabela IV-1). A adição de EDTA e do CaCl₂ não resultou em alteração significativa da atividade da transglutaminase, o que é similar a vários estudos, os quais relatam que a enzima não requer a presença de nenhum íon para ser ativada (ANDO et al., 1989; MOTOKI; SEGURO, 1998; CUI et al., 2007; MACEDO et al., 2010). Esta propriedade é muito útil para modificação das proteínas alimentares, tais como, as caseínas do leite, globulinas e miosinas da soja, os quais são sensíveis e facilmente precipitam na presença de íons Ca²⁺ (YOKOYAMA et al., 2004).

Tabela IV-1 – Influência de sais, EDTA, L-cisteína e glutatona na atividade de transglutaminase da linhagem *Streptomyces* sp. B6.

Compostos (5 mM)	Atividade Relativa (%)
Controle	100,0 ± 0,009
HgCl ₂	0,4 ± 0,027
CaCl ₂	99,4 ± 0,025
NaCl	100,9 ± 0,048
ZnCl ₂	84,6 ± 0,011
CoCl ₂	94,8 ± 0,027
MnCl ₂	102,8 ± 0,030
FeCl ₃	85,3 ± 0,035
KCl	98,7 ± 0,039
MgCl ₂	98,3 ± 0,029
CuSO ₄	2,3 ± 0,037
BaSO ₄	102,9 ± 0,030
EDTA	116,6 ± 0,037
L-cisteína	104,8 ± 0,041
glutatona	100,6 ± 0,038

Referências Bibliográficas

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. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 2613-2617, 1989.

CUI, L.; DU, G.; ZHANG, D.; LIU, H.; CHEN, J. Purification and characterization of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygroscopicus*. **Food Chemistry**, v. 105, n. 2, p. 612-618, 2007.

MACEDO, J. A.; SETTE, L. D.; SATO, H. H. A comparative biochemical characterization of microbial transglutaminases: commercial vs. a newly isolated enzyme from *Streptomyces* sp. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 2, p. 308-314, 2010.

MOTOKI, M.; SEGURO, K. Transglutaminase and its use for food processing. **Trends in Food Science and Technology**, v. 9, n. 5, p. 204-210, 1998.

YOKOYAMA, K.; NIO, N.; KIKUCHI, Y. Properties and applications of microbial transglutaminase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 4, p. 447-454, 2004.

ANEXOS V – Reagentes e materiais específicos

Reagentes químicos: Citrato de sódio (Synth), Ácido cítrico (Nuclear), Ácido tricloroacético TCA (Merck), NaOH (Merck), HCl (Vetec) Sais minerais; HgCl₂ (Vetec), CaCl₂ (Synth), NaCl (Synth), ZnCl₂ (Synth), CoCl₂ (Ecibra), MnCl₂ (Ecibra), FeCl₃ (Merck), KCl (Merck), MgCl₂ (Synth), BaSO₄ (Ecibra), CuSO₄ (Ecibra), ácido etilenodiamino tetra-acético (Merck), CaCO₃ (Synth), MgSO₄·7H₂O (Synth) e KH₂PO₄·7H₂O (Merck), tris(hidroximetil)aminometano (Merck).

Reagentes específicos: *N*-carbobenzoxym-L-glutaminy glycine (*N*-CBZ-Gln-Gly) (Sigma/Aldrich), Glutathione (Sigma/Aldrich), L-cisteína (Sigma/Aldrich), L-ácido glutâmico γ -monohidroxamato (Sigma/Aldrich), Cloridrato de hidroxilamida (Synty), PureLink™ Genomic DNA kit (Invitrogen).

Meios de Cultura: Peptona bacteriológica (Oxoid), Peptona de caseína (Difco), Extrato de levedura (Oxoid), Extrato de malte (Oxoid), Glicose (Synth), Ágar (Merck), Amido de batata (Yoki), Farelo de soja (Bunge), Glicerol (Biotec), Sacarose (Nuclear), Maltodextrina (Corn products internacional), Amido solúvel (Synth), Triptona (Difco), Caseína (Riedel-de Haen), Glicerina (Merck).

