

His-etiketli pro-Mikrobiyal Transglutaminaz Enziminin *Pichia pastoris*'te Üretim Şartlarının Optimizasyonu

Aysun TÜRKAN OĞLU ÖZÇELİK*

ÖZET: Transglutaminazlar doğada birçok organizmada bulunan ve çeşitli biyolojik işlemlerde rol alan enzimlerdir. Glutamin ve lizin aminoasitleri arasında kovalent bağ oluşumunu katalizleyerek çapraz bağ oluştururlar. Bu özelliklerinden dolayı gıda ürünlerinin fiziksel ve kimyasal özelliklerini geliştirmek amacıyla kullanılırlar. Bu çalışmada, gıda endüstrisinde kullanılan mikrobiyal transglutaminaz (MTGaz) enziminin, *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) mayasında yapısal GAP promotörü altında üretim şartlarının optimizasyonu yapılmıştır. Bu amaçla, üç farklı sıcaklık (20°C, 25°C, 28°C) ve üç farklı pH'dan (pH 3, 5.75, 7.44) oluşan dokuz farklı koşul altında pro-MTGaz enziminin üretimi çalkalamalı erlenmayerlerde yapılmıştır. 40 saatlik protein üretimi sonrasında elde edilen sonuçlar, pro-MTGaz üretimi için 25°C sıcaklık ve 7.44 pH'nın optimum koşullar olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: mikrobiyal transglutaminaz, rekombinant protein üretimi, *Pichia pastoris*

Optimization of Production Conditions of His-tagged pro-Microbial Transglutaminase Enzyme in *Pichia pastoris*

ABSTRACT: Transglutaminases are enzymes involved in various biological processes and found in many organisms in nature. They form a cross-link by catalyzing the formation of covalent bonds between the amino acids glutamine and lysine. Due to these properties, they are used to improve the physical and chemical properties of food products. In this study, the production conditions of microbial transglutaminase (MTGase) enzyme, used in the food industry, in *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) yeast under the structural GAP promoter were optimized. For this purpose, the production of the pro-MTGase enzyme under nine different conditions consisting of three different temperatures (20°C, 25°C, 28°C) and three different pHs (pH 3, 5.75, 7.44) was carried out by shake flask experiments. The results obtained after 40 hours of protein production showed that; the optimum conditions were 25°C temperature and pH 7.44 for pro-MTGase production.

Keywords: microbial transglutaminase, recombinant protein production, *Pichia pastoris*

¹ Aysun TÜRKAN OĞLU ÖZÇELİK (Orcid ID: 0000-0003-2537-4220), Akdeniz Üniversitesi, Gıda Güvenliği ve Tarımsal Araştırmalar Merkezi, Antalya, Türkiye

* Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Aysun TÜRKAN OĞLU ÖZÇELİK, e-mail: aysunozcelik@akdeniz.edu.tr

GİRİŞ

Transglutaminazlar (EC 2.3.2.13) (TGaz) glutamin ve lizin aminoasitleri arasında izopeptid bağı oluşumunu katalizleyen enzimlerdir. Protein içi ya da proteinler arası çapraz bağ oluşumuyla proteinlerin fiziksel, kimyasal ve besinsel karakterizasyonlarında değişikliğe neden olan kompleks polimerler oluşturabilmektedirler. TGaz'lar hayvan dokuları (Beninati ve ark., 2009), bitkiler (Ickson ve Apelbaum, 1987) ya da mikroorganizmalardan (Yokoyama ve ark., 2004; Washizu ve ark., 1994) elde edilebilmektedir. Mikroorganizmalardan elde edilen enzim mikrobiyal transglutaminaz (MTGaz) olarak adlandırılmaktadır.

MTGaz'lar gıda endüstrisinde özellikle et, süt ve fırıncılık ürünlerinde kullanılmaktadırlar. Et endüstrisinde yeni ürün geliştirmek amacıyla MTGaz'lar birleştirici ajan olarak kullanılmalarının yanı sıra, elde edilen ürünün depolama esnasında stabil kalmasına yardımcı oldukları yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Moreno ve ark. 2010; Romero de Avilla ve ark., 2010). Bu enzimin süt ürünlerinde, özellikle yoğurt ve dondurmada istenilen bir özellik olan proteinlerin jel oluşturma ve su bağlama kapasitelerini arttırdığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (Gauche ve ark., 2009; Rossa ve ark., 2012). Ayrıca fırıncılıkta, MTGaz'ın buğdaydaki glutenin proteinlerinin kimyasal ve fonksiyonel özelliklerini değiştirdiği böylece hamur gücünü ve ekmek hacmini geliştirdiği gösterilmiştir (Seravalli ve ark., 2011).

Deniz ürünleri işleme endüstrisi yapılan son çalışmalarla, MTGaz'ların yeni bir kullanım alanı olarak literatüre geçmiştir (Yerlikaya ve ark., 2015; Yerlikaya ve ark., 2017). MTGaz ilave edilen balık kıyması ile yapılan çalışmalarda, deniz ürününün kimyasal, mikrobiyolojik ve duyuşal özelliklerinin korunduğu raf ömrünün uzadığı bildirilmiştir.

Gıda endüstrisinde bu kadar çok alanda kullanımı olan; TGaz enzimi hayvan ya da bitki dokularından izole edilebilmektedir, ancak elde edilen enzim miktarı endüstriyel ihtiyacı karşılamak için yeterli olmamaktadır. Dolayısıyla, gelişen genetik mühendisliği teknikleriyle birlikte endüstriyel enzimlerin yüksek miktarlarda üretimi rekombinant DNA teknolojisi ile mümkün hale gelmiştir. Bu amaçla; bakteri ya da maya hücrelerinde rekombinant protein üretimi yapılabilmektedir. Dolayısıyla; bu çalışma kapsamında gıda endüstrisi için büyük bir öneme sahip bu enzimin metilotrofik bir maya olan *Pichia pastoris*'te yapısal GAP promotörü altında üretim koşulları optimize edilmiş ve sanayi ölçeğinde rekombinant MTGaz üretimi için endüstriyel olarak kullanılabilir bir suş ve büyük ölçekte üretim için veriler elde edilmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Kimyasallar ve enzimler

E. coli XL1-Blue ve *P. pastoris* suşları için besiyeri içerikleri Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, ABD) firmasından temin edilmiştir. Restriksiyon enzimleri Fermentas (Fermentas, MD, ABD) ve Hot-start KOD DNA polimeraz enzimi Novagen (Darmstadt, Almanya) firmalarından alınmıştır. Çalışmada kullanılan bütün kimyasallar Sigma-Aldrich (MO, ABD'de)'ten satın alınmıştır.

Suşlar ve gelişme ortamları

E. coli XL1-Blue hücreleri plazmitin çoğalması amacıyla, *P. pastoris* X33 suşu ise rekombinant protein üretiminde konukçu organizma olarak kullanılmıştır. Plazmit içeren *E. coli* hücreleri 25 µg/mL zeosin antibiyotiği ihtiva eden LB lennox (%1 tripton, %0.5 maya özütü ve %0.5 sodyum klorit) besiyerinde geliştirilmişlerdir. *P. pastoris* hücreleri ise %1 maya özütü, %2 pepton ve %2 dekstroz içeren YPD sıvı besiyerinde ve %1.5 agar içeren YPD agar plakalarda geliştirilmişlerdir. YPD agar

plakalara transformant hücreleri seçebilmek için 100 µg/mL zeosin antibiyotiği eklenmiştir.

Ekspresyon vektörünün oluşturulması

pro-MTGaz enziminin ekspresyonu için *Streptomyces mobaraensis* gen kaynağı olarak seçilmiş ve pGAPZαA plazmiti kullanılmıştır. 1131 bç büyüklüğündeki pro-MTGaz kodlayan geni içeren plazmit ve pGAPZαA plazmiti *XhoI* ve *XbaI* enzimleriyle kesilerek ligasyon işlemi yapılmıştır. Yeni oluşan plazmit pGAPZα-proMTGaz olarak isimlendirilmiştir. Rekombinant plazmitin *E. coli* XL1-Blue hücrelerine transformasyonu yapılmış ve klonlanma DNA dizi analizi ile doğrulanmıştır.

P. pastoris hücrelerine transformasyon

Ekspresyon plazmiti *AvrII* restriksiyon enzimi ile lineer hale getirilmiş ve elektroporator (Eppendorf, Almanya) yardımıyla elektrokompotent *P. pastoris* X33 hücrelerine transformasyonu 1.5 Kv da yapılmıştır. Transformant hücreler 100 µg/mL zeosin içeren YPD agar plakalara ekilerek 30°C'de 3 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. YPD plakalarda oluşan tek kolonilerden 3 mL YPD sıvı besiyerine ekim yapılmış ve 2 mL'sinden genomik DNA izolasyonu, 1 mL'sinden ise stok kültür hazırlanarak -80°C'de saklanmıştır. İzole edilen genomik DNA pro-MTGaz geninin varlığının kontrolü için *PagI*, *EcoRI*, *EcoNI* ve *SmaI* restriksiyon enzimleriyle kesilmiş ve doğrulanan klonlar protein üretiminde kullanılmıştır.

Çalkalamalı erlenmayerde protein üretim çalışmaları

pGAPZα-proMTGaz ekspresyon kasetini genomunda bulduran klonlar öncelikle 3 mL YPD broth besiyeri içeren test tüplerinde 28 °C'de 220 rpm çalkalamalı inkübatörde gece boyu geliştirilmiştir. Ertesi gün OD₆₀₀ değerleri ölçülerek 30 mL BYED besiyerine (%3 maya özütü, %2 glukoz, %1.34 aminoasitsiz maya nitrojen baz, %4x10⁻⁵ biotin ve pH 3, 5.75 ve

7.44 için uygun tampon) 0.1 OD₆₀₀ olacak şekilde inoküle edilmiş ve 40 saat boyunca 220 rpm çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmışlardır. Bu esnada 3, 5.75 ve 7.44 pH'larda hazırlanmış BYED besiyerinde 20°C, 25°C ve 28°C'de hücreler geliştirilerek optimum üretim şartlarının belirlenebilmesi için protein ekspresyonu yapılmıştır. pH 3 için 1 M sitrik asit tamponu, pH 5.75 ve 7.44 için 1 M potasyum fosfat tamponu kullanılmıştır. 40 saat sonunda hücreler hasat edilerek, 6000 g'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve hücrelerden ayrılan süpernatant filtre edilerek SDS-PAGE ve enzim aktivite analizi yapılanaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Histidin etiketli proteinin saflaştırılması

Çalkalamalı erlenmayerde üretilen pro-MTGaz enzimi 40. saat sonunda hasat edilip 6000 g'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra 0.45 µm filtreden geçirilerek eşit hacimde 10 mM imidazol içeren equilibration tamponu ile karıştırılarak dengeye getirilmiştir. 1 mL Ni-NTA rezin 5 mL dengeye getirilmiş süpernatant örneğine eklenerek 30 dakika boyunca histidin etiketli proteinin rezine tutunması sağlanmıştır. Rezine birlikte süpernatant boş bir kolona yüklenmiş ve akan kısım bir tüpün içine toplanmıştır. Daha sonra kolon 25 mM imidazol içeren yıkama tamponu ile yıkanmış, ve elde edilen örnek tüp içine toplanmıştır. Sonra 200 mM imidazol içeren elüsyon tamponu ile rezinden geri alınmıştır. Tüm bu işlemler sırasında toplanan yıkama ve elüsyon fraksiyonları SDS - PAGE analizi ile kontrol edilmiştir.

SDS-PAGE analizi

Toplanan süpernatant örnekleri 4X SDS jel yükleme tamponu (200 mM Tris-Cl, pH 6.8, %8 SDS, %0.4 Bromphenol Blue, %40 gliserol, 100 mM DTT) ile karıştırılarak 70°C'de 10 dakika bekletilerek jelle yüklemeye hazır hale getirilmişlerdir. Hazırlanan örnekler %10'luk

gardient poliakrilamit jelinde ayrılmışlardır. Elektroforez işleminden sonra jel coomasie brillant blue R250 (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD) kullanılarak 1 saat boyunca orbital çalkalayıcıda boyanmıştır. Boyanan jel daha sonra 1 saat boyunca destaining solüsyonuna alınarak fazla boyanın uzaklaştırılması sağlanmış ve 15 dakikada saf su ile yıkandıktan sonra Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR, Lincoln, NE, ABD) ile görüntülenmiştir.

Toplam protein ölçümü

Süpernatant örneklerinin toplam protein konsantrasyonu Bradford Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) kullanılarak protokolüne uygun olarak yapılmıştır. Bovine serum albümin standart olarak kullanılmış ve absorbans değerleri 595 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunarak protein konsantrasyonları hesaplanmıştır.

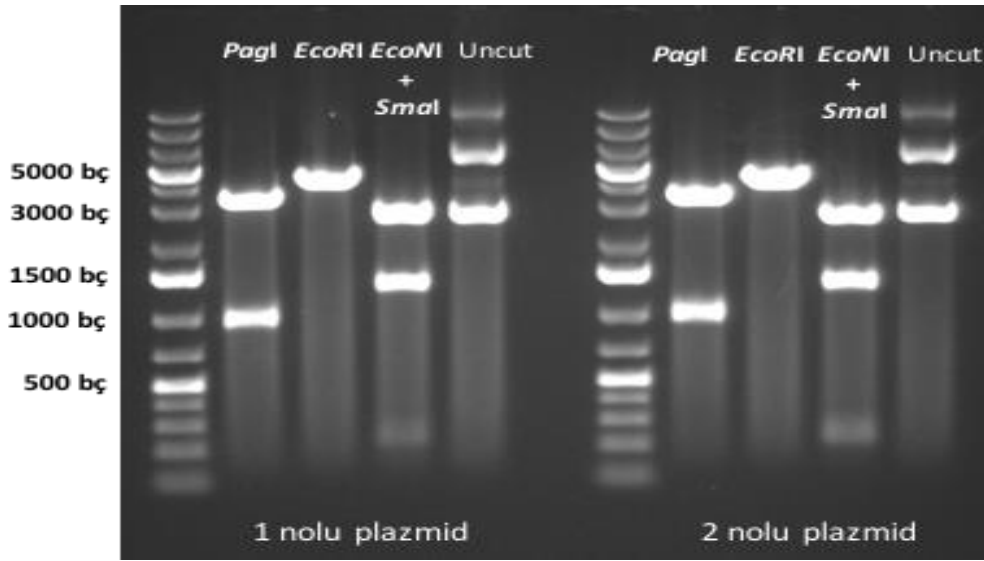
Transglutaminaz enzim aktivitesi ölçümü

Enzim aktivitesi ölçümünden önce, pro-MTGaz şeklinde üretilen enzimi aktif formuna dönüştürmek için DispazI adı verilen proteaz enzimi ile aktivasyon işlemi daha önce Sommer ve ark. (2012) tarafından tanımlanan metoda göre yapılmış ve MTGaz aktivitesi kolorimetrik hidroksimet metoduna göre spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Bu metoda göre Z-glutaminilglisin (Z-Gln-Gly), hidroksilamin ve L-glutamik asit- γ -monohidroksimet sırasıyla, amin alıcı substrat, amin verici substrat ve standart olarak kullanılmış ve 200 μ L reaksiyon karışımı (Z-Gln-Gly, 1 M Tris buffer pH 6 ve 200 mM hidroksilamin 20 mM reduced glutatyon) 37 °C'de bir müddet bekletilmiştir. Daha sonra, 30 μ L süpernatant örneği eklenerek 37 °C'de 10 dakika inkübe edilmiş ve 10 dakika sonunda, 1 mL durdurma solüsyonu eklenerek (1 hacim 3 M HCl, 1 hacim %12 TCA, 1 hacim %5 FeCl₃) MTGaz enziminin katalizlediği reaksiyon durdurulmuştur. Bu işlem yapıldıktan sonra reaksiyon karışımı 4000 g'de 5 dakika santrifüj

edilmiş ve karışım küvete alınarak 525 nm. dalga boyunda spektrofotometrede ölçümü yapılmıştır. Bu işlemler uygulanarak ölçümü yapılan örnekler test olarak adlandırılmıştır. Ayrıca test körü tüplerini hazırlamak için aynı şekilde reaksiyon karışımı ve süpernatant örneği karıştırılmış ancak 37 °C'de 10 dakika inkübe edilmeden reaksiyon durdurma solüsyonu eklenerek santrifüj edildikten sonra hemen spektrofotometrede ölçümü yapılmıştır. Standart tüplerine ise, 1-10 mM aralığında değişen konsantrasyonlarda 100 μ L L-glutamik asit - γ -monohidroksimet solüsyonu eklendikten sonra inkübasyon yapılmadan 1 mL durdurma solüsyonu eklenerek santrifüj edilip ölçümü yapılmıştır. Standart körü hazırlamak için standart solüsyonu yerine 100 μ L saf su konulmuştur. 1 ünite enzim aktivitesi verilen koşullar altında dakikada oluşan 1 μ mol hidroksimet olarak tanımlanmış ve enzim aktivitesi U/mL olarak ifade edilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

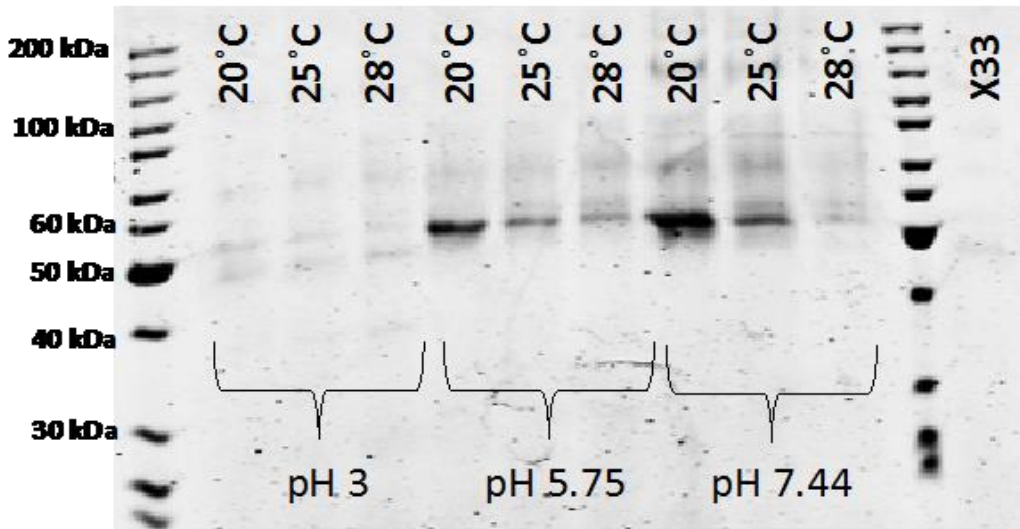
pGAPZ α -proMTGaz ekspresyon kasetini içeren plazmitlerin yetenekli *P. pastoris* X33 hücrelerine transformasyonları elektroporasyon yöntemiyle yapıldıktan sonra hücreler YPD agar plakalarda geliştirilmiş ve oluşan kolonilerden plazmit izolasyonu yapılarak restriksiyon enzimleriyle kesilmiş ve transformant hücreler doğrulanmıştır. Restriksiyon analizi için *PagI*, *EcoRI*, *EcoNI* ve *SmaI* enzimleri kullanılmış ve *PagI* ile DNA'nın kesilmesi sonucunda 943 ve 3305 bp, *EcoRI* ile 4248 bp ve *EcoNI* ve *SmaI* enzimleri ile aynı anda kesilmesi sonucunda ise 229, 1321 ve 2698 bp'den oluşan fragmentlerin jelde görülmesi hedeflenmiştir. Yapılan restriksiyon analizi sonucunda beklenen fragmentler elde edilerek, plazmitlerin pro-MTGaz genini taşıdığı doğrulanmış (Şekil 1) ve 1 nolu klon seçilerek üretim çalışmaları yapılmıştır.



Şekil 1: Restriksiyon enzimleriyle kesimleme sonrası agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

Çalkalamalı erlenmayerde yapılan protein ekspresyonu çalışmalarında üç farklı pH ve üç farklı sıcaklıktan oluşan 9 farklı şart denenmiş ve 40 saat süren üretim çalışması sonunda hücre kültürleri hasat edilerek SDS-PAGE (Şekil 2) ve enzim aktivitesi (Çizelge 1) analizleri yapılmıştır. Ancak üretilen enzim inaktif pro-MTGaz formunda olduğu için öncelikle

süpernatant örneklerine dispazI enzimi ile muamele edilerek aktif MTGaz enzimi elde edilmiş daha sonra aktiviteleri ölçülmüştür. Yapılan SDS-PAGE analizi sonuçlarına göre; pH 3'te bütün sıcaklıklarda protein üretiminin oldukça az olduğu görülmektedir. Ayrıca pH 3 koşullarında yapılan üretimlerden elde edilen örneklerde enzim aktivitesi tespit edilememiştir.



Şekil 2: SDS-PAGE analizi jel görüntüsü. pH 3, 5.75 ve 7.44 BYED besiyeri kullanılarak 20, 25 ve 28°C sıcaklıklarda protein üretimi yapılarak 40. saat sonunda elde edilen süpernatant örnekleri SDS-PAGE ile analiz edilmiştir. Yaklaşık 50 kDa büyüklüğünde pro-MTGaz enziminin üretildiği görülmektedir. Negatif kontrol olarak kullanılan X33 hücresinin süpernatant örneğinde ise herhangi bir bant görülmemektedir.

Ancak, hem enzim aktivitesi hem de SDS-PAGE analizi sonuçları pro-MTGaz enziminin üretimi için en uygun koşulların pH 7.44 ve 25°C sıcaklık olduğunu göstermiştir. Bu şartlar

altında çalkalamalı erlenmayerde en yüksek enzim aktivitesi 14.34 U/mL olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 1: Farklı pH ve sıcaklıklarda yapılan protein üretiminden elde edilen enzim aktivitesi sonuçları.

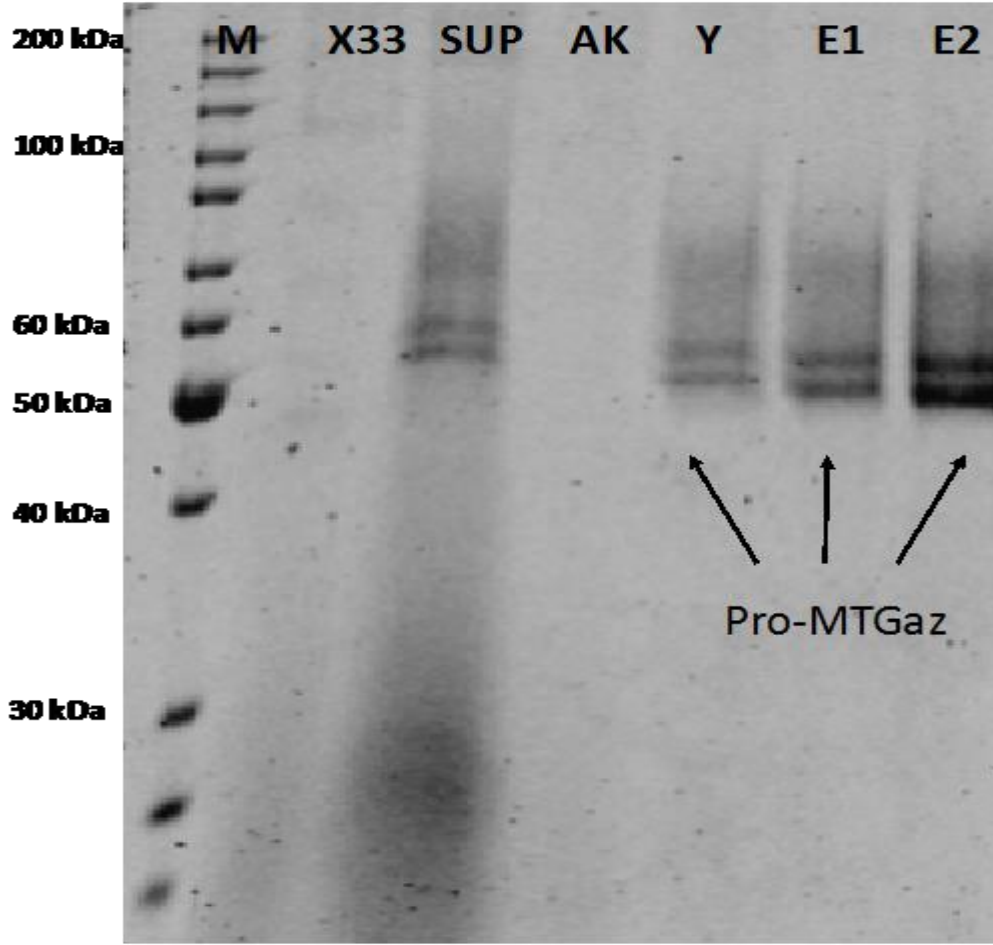
pH	Enzim aktivitesi (U/mL)		
	Sıcaklık		
	20°C	25°C	28°C
3	ND	ND	ND
5.75	7.72±0	7.81±0	6.33±0.11
7.44	10.39±0.17	14.34±2.96	7.60±0.41

ND: Belirlenemedi. Aktiviteler duplike olarak ölçülmüştür.

40. saat sonunda en yüksek protein ve enzim aktivitesi elde edilen supernatan örneği Ni-NTA rezin kullanılarak saflaştırılmış ve SDS-PAGE ile analiz edilmiştir (Şekil 3). Üretilen protein saflaştırmada kolaylık sağlaması açısından C-terminal ucunda 8 adet Histidin taşımaktadır. Bu etiket sayesinde protein Ni-NTA rezine kolaylıkla tutunabilmekte ve böylece saf protein elde edilebilmektedir. Şekil 3'de görüldüğü üzere iki kez yapılan elüsyon sonrasında protein saf bir şekilde elde edilmiştir.

Pichia pastoris'te rekombinant transglutaminaz enzimi üretmek için mısır (*zea mays*) bitkisinin transglutaminaz gen kaynağı olarak kullanıldığı çalışmanın yanı sıra (Li ve ark., 2013) mikrobiyal gen kaynakları kullanılarak yapılan çalışmalar da literatürde mevcuttur (Yurimoto ve ark., 2004; Gündüz, 2012). Yurimoto ve ark., (2004) yaptıkları çalışmada pro-MTGaz enzimini metanol ile

indüklenen *AOX1* promotoru kontrolünde üretmeye çalışmışlar ancak rekombinant *P. pastoris* hücrelerinde çok düşük enzim aktivitesi elde ettiklerini rapor etmişler ve bunun sebebini yüksek oranda glikolizasyona bağlamışlardır. Gündüz (2012) tarafından yapılan çalışmada ise; yine aynı promotor altında 4448 U/L enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. Fakat, *GAP* promotoru kullanılarak yapılan bu çalışmanın sonuçlarına göre 14340 U/L enzim aktivitesi çalkalamalı erlenmayer koşullarında elde edilmiştir. Bu sonuç ile literatürdeki diğer çalışmaların üretmiş oldukları enzim miktarının üstüne çıkıldığı görülmektedir. Ayrıca, ileride yapılacak olan biyoreaktörde büyük ölçekli üretim için sıcaklık 25°C ve pH 7.44 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, optimize edilen koşullar altında biyoreaktörde üretim yapılarak daha yüksek miktarlarda enzim üretimi yapılabileceğini göstermektedir.



Şekil 3: pro-MTGaz enziminin his-taq saflaştırması sonrası SDS-PAGE analizi jel görüntüsü. M: Page ruler unstained protein marker, X33: negatif kontrol olarak kullanılan hedef gen içermeyen *Pichia pastoris* suşu, SUP: 40. Saat sonunda hasat edilen kültürün süpernatant kısmı, AK: akan kısım, Y: yıkama, E1: 1. elüsyon, E2: 2. elüsyon.

SONUÇ

Mikrobiyal transglutaminaz enzimi gıda endüstrisinde kullanım alanı olan bir enzimdir. Endüstriyel ihtiyacı karşılamak için, rekombinant protein üretimi yapılarak yüksek miktarlarda enzim elde etmek mümkündür. Metilotrofik bir maya olan *P. pastoris* rekombinant protein üretiminde sıkça kullanılan başarılı bir ekspresyon sistemidir. Metanol ile indüklenebilir *AOX1* promotorunun dışında yapısal *GAP* promotoru da protein ekspresyonu çalışmalarında kullanılabilir. Endüstriyel boyutta rekombinant protein üretiminde *AOX1* promotoru metanol ile indüklenmesinden dolayı yangın tehlikesi söz konusu olduğu için tercih edilmemektedir. Bu gibi durumlarda *GAP*

promotoru iyi bir alternatif olmaktadır. Bu çalışmada, histidin etiketli pro-MTGaz enziminin *P. pastoris*'te yapısal *GAP* promotoru altında rekombinant üretimi için optimum sıcaklık ve pH koşulları belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, 25°C sıcaklık ve 7.44 pH koşulları altında *GAP* promotorunun pro-MTGaz üretimi için *AOX1*'dan daha başarılı bir promotor olduğunu göstermiştir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FBA-2017-2474 proje numarasıyla desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Beninati S, Bergamini CM, Piacentini S, 2009. An overview of the first 50 years of transglutaminase research. *Amino Acids*, 36(4): 591-598.
- Gauche C, Tomazi T, Barreto PLM, Ogliari PJ, 2009. Physical properties of yoghurt manufactured with milk whey and transglutaminase. *LWT - Food Science and Technology*, 42(1): 239-243.
- Gündüz B, 2012. Recombinant transglutaminase production by metabolically engineered *Pichia pastoris*. MSc Thesis, Middle East Technical University, Ankara, Turkey.
- Icekson I, Apelbaum A, 1987. Evidence for transglutaminase activity in plant tissue. *Plant Physiology*, 84: 972-974.
- Li H, Zhang L, Cui Y, Luo X, Xue C, Wang S, 2013. Expression of soluble recombinant transglutaminase from *Zea mays* in *Pichia pastoris*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29:939-947.
- Moreno HM, Carballo J, Borderias AJ, 2010. Use of microbial transglutaminase and sodium alginate in the preparation of restructured fish models using cold gelation: Effect of frozen storage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11: 394-400.
- Romero de A, Ordonez JA, Hoz L, Herrero AM, Cambero MI, 2010. Microbial transglutaminase for cold-set binding of unsalted/salted pork models and restructured dry ham. *Meat Science*, 84: 747-754.
- Rossa NP, Burin VM, Bordignon-Luiz MT, 2012. Effect of microbial transglutaminase on functional and rheological properties of ice cream with different fat contents. *LWT - Food Science and Technology*, 48: 224-230.
- Seravalli EAG, Iguti AM, Santana IA, Filho FF, 2011. Effects of application of transglutaminase in wheat proteins during the production of bread. *Procedia Food Science*, 1: 935-942.
- Sommer C, Hertel TC, Schmelzer CEH, Pietzsch M, 2012. Investigations on the activation of recombinant microbial pro-transglutaminase: in contrast to proteinase K, dispase removes the histidine-taq. *Amino acids*, 42: 997-1006.
- Washizu K, Ando K, Koikeda S, Hirose S, Matsuura A, Takagi H, Motoki M, Takeuchi K, 1994. Molecular cloning of the gene for microbial transglutaminase from *Streptovercillium* and its expression in *Streptomyces lividans*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 58(1): 82-87.
- Yerlikaya P, Gokoglu N, Ucak İ, Yatmaz HA, Benjakul S, 2015. Suppression of the formation of biogenic amines in mackerel mince by microbial transglutaminase. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95: 2215-2221.
- Yerlikaya P, Yatmaz HA, Gokoglu N, Ucak İ, 2017. The quality alterations of rainbow trout mince treated with transglutaminase. *LWT-Food Science and Technology*, 84: 815-820.
- Yokoyama K, Nio N, Kikuchi Y, 2004. Properties and applications of microbial transglutaminase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(4): 447-454.
- Yurimoto H, Yamane M, Kikuchi Y, Matsui H, Kato N, Sakai Y, 2004. The Pro-peptide of *Streptomyces mobaraensis* Transglutaminase Functions in cis and in trans to Mediate Efficient Secretion of Active Enzyme from Methylophilic Yeasts. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 68(10): 2058-2069.