



Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

w Warszawie

Instytut Nauk o Żywności

mgr inż. Vitaliy Kolotylo

Optymalizacja produkcji transglutaminazy przez wybrane promieniowce w zmiennych warunkach hodowlanych

Optimization of transglutaminase production by selected
actinomycetes under variable culture conditions

Rozprawa doktorska

Doctoral thesis

Rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem

Dr hab. inż. Marka Kieliszka, prof. SGGW

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

Instytut Nauk o Żywności, SGGW

Promotor pomocniczy:

Dr Kamil Piwowarek

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

Instytut Nauk o Żywności, SGGW

Warszawa, 2025

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora.

Data 24.10.2025 Czytelny podpis promotora Michał M...

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom/a odpowiedzialności prawnej, w tym odpowiedzialności karnej za złożenie fałszywego oświadczenia, oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została napisana przez mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami prawa, w szczególności z ustawą z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (tj. z dnia 28 października 2022 r., Dz.U. z 2022 r. poz. 2509 ze zm.)

Oświadczam, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej podstawą żadnej procedury związanej z uzyskaniem stopnia naukowego doktora.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Przyjmuję do wiadomości, że rozprawa doktorska poddana zostanie procedurze antyplagiatowej.

Data 24.10.2025 r. Czytelny podpis autora rozprawy Vitaliy Kolotylo

Spis treści

STRESZCZENIE	7
SUMMARY	8
WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ.....	9
1. WSTĘP I UZASADNIENIE PODJĘCIA TEMATU	10
1.1 Charakterystyka transglutaminazy	10
1.2 Transglutaminazy pochodzenia zwierzęcego, roślinnego i mikrobiologicznego ...	12
1.2.1 Transglutaminaza mikrobiologiczna	13
1.3 Wykorzystanie transglutaminazy na skalę przemysłową	15
1.4 Optymalizacja produkcji mikrobiologicznej transglutaminazy.....	18
2. CEL PRACY I HIPOTEZY BADAWCZE	23
3. ZAKRES PRACY, MATERIAŁY I METODYKA.....	24
3.1 Zakres pracy	24
3.2 Materiał i metodyka	27
3.2.1 Materiał badawczy	27
3.2.2 Metody hodowli – etap I (P2)	27
3.2.3 Metody hodowli – etap II (P3)	27
3.2.4 Metody hodowli – etap III (P4)	28
3.2.5 Oznaczanie plonu biomasy	29
3.2.6 Oznaczanie aktywności transglutaminazy	29
3.2.7 Zagęszczanie i oczyszczanie transglutaminazy.....	30
3.2.8 Wytrącanie białek.....	30
3.2.9 Oznaczanie zawartości białek	30
3.2.10 Oznaczenie masy cząsteczkowej enzymu.....	31
3.2.11 Oznaczanie wpływu temperatury i pH na stabilność transglutaminazy	31
3.2.12 Oznaczanie czasowej stabilności termicznej enzymu	31
3.2.13 Metody statystyczne	32
4. NAJWAŻNIEJSZE WYNIKI I DYSKUSJA WYNIKÓW	33
4.1 Badania wstępne	33
4.1.1 Wybór źródła azotu do pożywki doświadczalnej	33
4.1.2 Wybór pożywki inokulacyjnej i jej parametry.....	35
4.1.3 Wpływ początkowego pH pożywki na biosyntezę MTG	40
4.2 Dyskusja do badań wstępnych.....	41
4.3 Optymalizacja warunków hodowli w kolbach laboratoryjnych	46
4.4 Zmiana skali procesu produkcji MTG – hodowla w bioreaktorze laboratoryjnym ..	51

4.4.1	Analiza wpływu parametrów hodowlanych na aktywność enzymatyczną.....	53
4.4.2	Porównanie wyników z II i III etapu.....	55
4.4.3	Weryfikacja optymalnych warunków hodowli w bioreaktorze	58
4.4.4	Właściwości wyizolowanej transglutaminazy	60
4.5	Dyskusja do badań właściwych	64
5.	PODSUMOWANIE I WNIOSKI	71
6.	SPIS LITERATURY	74
7.	DOROBK NAUKOWY	89
8.	PUBLIKACJE STANOWIĄCE ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ ORAZ OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW.....	93

STRESZCZENIE

Optymalizacja produkcji transglutaminazy przez wybrane promieniowce w zmiennych warunkach hodowlanych

Celem rozprawy doktorskiej była optymalizacja warunków biosyntezy mikrobiologicznej transglutaminazy (MTG) z wykorzystaniem promieniowców *Streptoverticillium cinnamoneum* KKP 1658 oraz określenie parametrów produkcji enzymu, zarówno w warunkach laboratoryjnych (kolby), jak i półtechnicznych (bioreaktory). Transglutaminaza poprzez tworzenie wiązań izopeptydowych pomiędzy resztami lizyny i glutaminy, znajduje szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym, poprawiając teksturę, stabilność oraz jakość sensoryczną produktów.

Przeprowadzone badania miały na celu weryfikację następujących hipotez:

(H1) zastosowanie niekonwencjonalnego źródła azotu w podłożu hodowlanym pozwoli zwiększyć aktywność transglutaminazy w porównaniu do standardowego podłoża,

(H2) optymalizacja parametrów hodowli szczepu *S. cinnamoneum* KKP 1658 umożliwi uzyskanie aktywności MTG powyżej 3 U/mL,

(H3) zmiana skali hodowli wpłynie na końcową aktywność enzymu w supernatancie pohodowlanym.

W pierwszej części badań wykazano, że zastosowanie niekonwencjonalnego źródła azotu w postaci odpadowego namoku kukurydzianego, stosowanego w połączeniu z aminobaktem, istotnie zwiększa aktywność MTG w porównaniu do podłoża standardowego. Wyniki te potwierdziły hipotezę H1, wskazując na zasadność wykorzystania surowców odpadowych jako wartościowych i ekonomicznie uzasadnionych komponentów podłoży hodowlanych.

Dalsza optymalizacja obejmowała zastosowanie metod planowania eksperymentu (DoE) i metody powierzchni odpowiedzi (RSM). Dzięki temu możliwe było wyznaczenie optymalnych warunków hodowli, które umożliwiły uzyskanie w warunkach laboratoryjnych (kolby) aktywności MTG na poziomie 6,59 U/mL po 48 godzinach hodowli. W warunkach bioreaktorowych największą aktywność enzymu osiągnięto po 72 godzinach hodowli, uzyskując 4,29 U/mL w supernatancie oraz 22 U/mL po wytrąceniu siarczanem amonu. Wyniki te jednoznacznie potwierdziły hipotezę H2, zakładającą możliwość uzyskania aktywności MTG przekraczającej 3 U/mL – zarówno w obu wariantach hodowli doświadczalnych.

Jednocześnie zaobserwowano, że skalowanie procesu z kolby do bioreaktora prowadzi do obniżenia aktywności w płynie pohodowlanym oraz wydłużenia optymalnego czasu hodowli, co potwierdziło hipotezę H3 dotyczącą wpływu skali procesu na końcową wydajność enzymatyczną.

Dodatkowo, określono właściwości fizykochemiczne enzymu – jego masa cząsteczkowa wynosiła około 43 kDa, a aktywność zachowywana była w szerokim zakresie pH (5,0 – 9,0) i temperatur (20 – 37 °C). Enzym wykazywał pełną dezaktywację dopiero przy temperaturze 60 °C.

Uzyskane wyniki dowodzą, że *S. cinnamoneum* KKP 1658 jest obiecującym producentem MTG. Skuteczna optymalizacja parametrów hodowli, przy jednoczesnym wykorzystaniu odpadów rolnych jako źródła azotu, czyni badany szczep wartościowym kandydatem do zrównoważonej i efektywnej biosyntezy transglutaminazy na skalę przemysłową.

Słowa kluczowe: *Streptoverticillium cinnamoneum* KKP 1658, transglutaminaza, MTG, optymalizacja hodowli, DoE, RSM

SUMMARY

Optimization of transglutaminase production by selected actinomycetes under variable culture conditions

The aim of this doctoral dissertation was to optimize the biosynthesis conditions of microbial transglutaminase (MTG) using the actinomycete *Streptovercillium cinnamoneum* KKP 1658 and to determine the enzyme production parameters under both laboratory (shake flask) and semi-technical (bioreactor) conditions. Transglutaminase catalyzes the formation of isopeptide bonds between lysine and glutamine residues, is widely used in the food industry to improve the texture, stability, and sensory quality of products.

The conducted research aimed to verify the following hypotheses:

(H1) the application of a nonconventional nitrogen source in the culture medium would increase transglutaminase activity compared to a standard medium,

(H2) the optimization of cultivation parameters for the *S. cinnamoneum* KKP 1658 strain would allow MTG activity to exceed 3 U/mL,

(H3) the change in cultivation scale would affect the final enzyme activity in the post-culture supernatant.

In the first part of the study, it was demonstrated that the use of a nonconventional nitrogen source in the form of corn steep liquor, applied in combination with aminobac, significantly increased MTG activity compared to the standard medium. These results confirmed hypothesis H1, highlighting the validity of using waste-derived raw materials as valuable and economically justified components of culture media.

Further optimization involved the application of Design of Experiments (DoE) and Response Surface Methodology (RSM). This approach enabled the determination of optimal cultivation conditions, under which an MTG activity of 6.59 U/mL was achieved in flask cultures after 48 hours. In bioreactor conditions, the highest enzyme activity was obtained after 72 hours of cultivation, reaching 4.29 U/mL in the supernatant and 22 U/mL after ammonium sulfate precipitation. These findings unequivocally confirmed hypothesis H2, which assumed the possibility of achieving MTG activity above 3 U/mL – both in flask and bioreactor cultures.

At the same time, it was observed that scaling up the process from flask to bioreactor resulted in decreased enzyme activity in the post-culture fluid and extended the optimal fermentation time, thus confirming hypothesis H3 regarding the influence of process scale on the final enzymatic yield.

Additionally, the physicochemical properties of the enzyme were determined. The molecular weight was approximately 43 kDa, and the enzyme maintained activity over a wide pH range (5.0 – 9.0) and temperature range (20 – 37 °C). Complete deactivation occurred only at 60 °C.

The results obtained demonstrate that *S. cinnamoneum* KKP 1658 is a promising producer of MTG. Effective optimization of culture parameters, combined with the use of agricultural waste as a nitrogen source, makes the studied strain a valuable candidate for sustainable and efficient industrial-scale biosynthesis of transglutaminase.

Keywords: *Streptovercillium cinnamoneum* KKP 1658, transglutaminase, MTG, optimization, DoE, RSM

WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ

- P1. Kolotylo V.,** Piwowarek K., Kieliszek M. (2023). Microbiological transglutaminase: Biotechnological application in the food industry. *Open Life Sciences*, 18, 1, 20220737. (IF₂₀₂₃: 1,7; MEiN: 40)
- P2. Kolotylo V.,** Piwowarek K., Kieliszek M. (2024). Production of microbial transglutaminase by *Streptoverticillium cinnamoneum* KKP 1658. *EXCLI Journal*, 23, 655-671. (IF₂₀₂₄: 4,9; MEiN: 100)
- P3. Kolotylo V.,** Piwowarek K., Synowiec A., Kieliszek M. (2025). Optimization of fermentation conditions for microbial transglutaminase production by *Streptoverticillium cinnamoneum* KKP 1658 using response surface methodology (RSM). *Folia Microbiologica* 70, 259-269. (IF₂₀₂₄: 3,1; MEiN: 40)
- P4. Kolotylo V.,** Piwowarek K., Synowiec A., Gientka I., Kieliszek M. (2025). Characterisation and optimisation of microbial production of transglutaminase produced by *Streptoverticillium cinnamoneum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 109, 228. (IF₂₀₂₄: 4,3; MEiN: 100)

Sumaryczny IF publikacji wynosi **14**. Liczba punktów ministerialnych wynosi **280** pkt. Wartości współczynników Impact Factor poszczególnych publikacji podano w oparciu o dane udostępnione w Journal Citation Report 2023 i 2024, punkty ministerialne podano w oparciu o „Wykaz czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych wraz z przypisaną liczbą punktów”, stanowiących załącznik do komunikatu Ministra Edukacji i Nauki z dnia 5 stycznia 2024 roku.

1. WSTĘP I UZASADNIENIE PODJĘCIA TEMATU

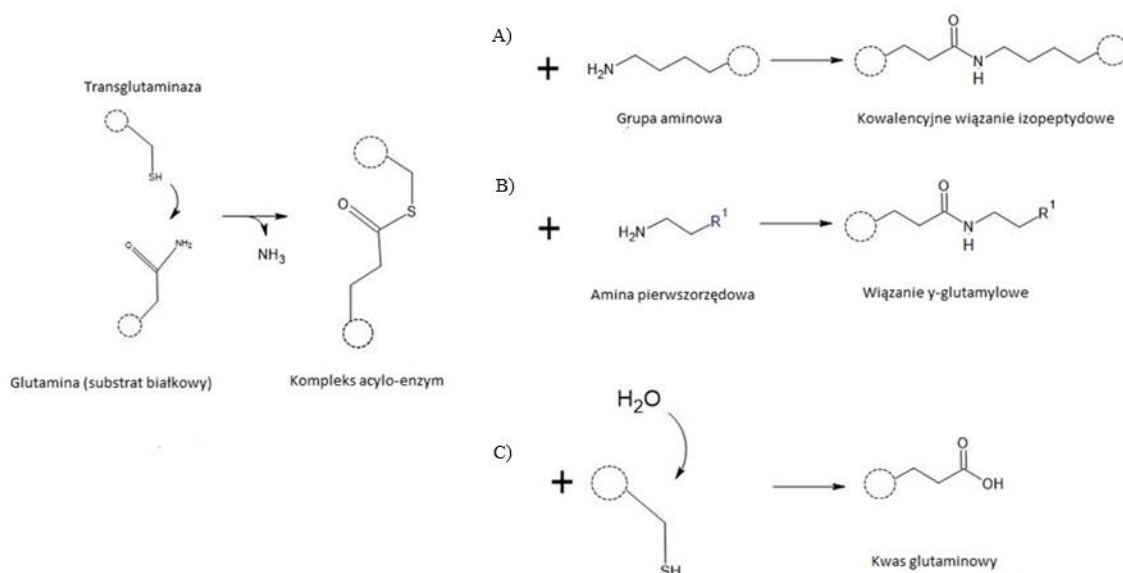
Białko jest nie tylko jednym z głównych makroskładników odżywczych, ale także kluczowym składnikiem strukturalnym wielu produktów spożywczych. W ostatnich dziesięcioleciach, w związku z obawami o globalne niedobory żywności w wyniku wzrostu populacji, rośnie zainteresowanie zaawansowanym wykorzystaniem białek spożywczych (Loveday, 2019). W celu zaspokojenia zróżnicowanych potrzeb żywnościowych konsumentów zalecane są techniki enzymatycznej modyfikacji białek, które w porównaniu z modyfikacją chemiczną mają wiele zalet, w tym wysoką specyficzność reakcji, niską częstotliwość reakcji ubocznych oraz brak potrzeby stosowania warunków wysokiej temperatury i ciśnienia lub rozpuszczalników chemicznych (są przyjazne dla środowiska) (Ryszka i wsp., 2009; Miwa, 2020; Akbari i wsp., 2021).

Do późnych lat 70. proteazy (klasa hydrolaz) były główną klasą enzymów modyfikujących białka, jednak wraz z odkryciem transglutaminazy rozszerzono różnorodność tej technologii (Miwa, 2020). Transglutaminazy to powszechnie występujące enzymy należące do klasy transferaz. Aktywność transglutaminazy po raz pierwszy zaobserwowali Clarke i wsp. (1957), kiedy wyekstrahowali enzym katalizujący reakcję transamidacji w wątrobie świnek morskich (*Cavia porcellus*). Dwa lata później, w 1959 roku, zespół badaczy na czele z Waelsch przypisał nazwę „transglutaminaza” do wyżej opisanego enzymu w celu rozróżnienia danej aktywności enzymatycznej od innych enzymów o podobnych właściwościach (Schomburg i Stephan, 1996). Według Komitetu Nazewnictwa Międzynarodowej Unii Biochemii i Biologii Molekularnej (IUBMB), transglutaminazie przypisano numer EC 2.3.2.13, która należy do aminoacylotransferaz (EC 2.3.2), a te – do acylotransferaz (EC 2.3) (BRENDA – The Comprehensive Enzyme Information System). W dostępnej literaturze naukowej można spotkać nazwę systematyczną (gamma-glutamylotransferaza białkowo-glutaminowa) oraz synonimy danego enzymu, na przykład, fibrynoligaza (Kolotylo i wsp., 2023).

1.1 Charakterystyka transglutaminazy

Transglutaminazy są dużą rodziną pokrewnych i wszechobecnych enzymów, które katalizują potranslacyjne modyfikacje białek w roślinach, zwierzętach i mikroorganizmach (Akbari i wsp., 2021; Wang i wsp., 2022). Transglutaminaza odpowiada za transfer acylu (inaczej, grupy acylowej) między grupą γ -karboksamidową reszt glutaminowych związanych z peptydami (donory acylu) a różnymi pierwszorzędowymi aminami (akceptorami acylu), w tym grupą ϵ -aminową reszt lizynowych w białkach (Fatima i Khare, 2018; Wang i wsp.,

C) Reakcja deaminacji grupy γ -karboksamidowej reszty glutaminyłowej białka/polipeptydu (tzw. kompleks acylo-enzym) następuje wtedy, kiedy substratem jest woda, a produktem kwas glutaminowy.



Wang i wsp. (2022) zaznaczyli, że reakcja sieciowania między glutaminą a lizyną przebiega szybciej niż transfer acylowy i deamidacja w dowolnym systemie opartym na białku

spożywczym. W każdej z przedstawionych reakcji produktem ubocznym jest wolny amoniak. W celu kontroli przebiegu reakcji katalizowanych przez transglutaminazę można oznaczać ilości wytwarzanego amoniaku. Innym sposobem oznaczenia aktywności omawianego enzymu jest zmierzenie zawartości powstającego dipeptydu ϵ -(γ -glutamyl)lizyny metodą HPLC, w którym według naukowców (Kołakowski i Sikorski, 2001 oraz Wang i wsp., 2022) tworzy się kowalencyjne wiązanie izopeptydowe. Masa cząsteczkowa wytwarzanych polimerów peptydowych może również służyć do kontroli reakcji sieciowania białek, taka metoda nazywana jest elektroforetyczną. Metoda reologiczna kontroli reakcji sieciowania polega na oznaczaniu lepkości oraz parametrów strukturalnych, takich jak moduł sprężystości (G'), moduł stratności (G'') czy punkt żelowania, które pozwalają ocenić stopień usieciowania białek w czasie reakcji (Udomrati i wsp., 2024).

1.2 Transglutaminazy pochodzenia zwierzęcego, roślinnego i mikrobiologicznego

Transglutaminazy to enzymy wewnątrz i zewnątrzkomórkowe, które charakteryzują się różnymi funkcjami. Aktywność enzymatyczną transglutaminazy wykryto w tkankach i płynach ustrojowych zwierząt, ryb, roślin i drobnoustrojów (Martins i wsp., 2014; Wang i Wang, 2024; Yongsawatdigul i wsp., 2024). Każdy organizm potrzebuje koniugatów białkowych, które są podstawowymi elementami budulcowymi. Faktem jest, że dane struktury białkowe muszą ze sobą oddziaływać, a dochodzi do tego najczęściej za pomocą wiązań wodorowych, wiązań jonowych lub sił van der Waalsa. Wymienione wiązania i siły międzybiałkowe są zaliczane do stosunkowo słabych. W celu uformowania silniejszych połączeń kowalencyjnych komórka roślinna, zwierzęca czy mikrobiologiczna musi wytworzyć enzymy – transglutaminazy (Martins i wsp., 2018). Jak opisywano wcześniej, powstałe wiązania mogą mieć charakter krzyżowy i odnosić się do modyfikacji pojedynczych struktur lub wielocząsteczkowych koniugatów białkowych. Transglutaminaza wraz z poliaminami alifatycznymi (putrescyna, spermidyna, spermina) bierze udział w procesach fotosyntezy, magazynowania białek i kontroli stabilności błony komórkowej u roślin; embriogenezy, spermatogenezy, formowania kości i krzepnięcia krwi u ssaków; podziału u mikroorganizmów, a także uczestniczy w reakcjach na stres i starzenie się w każdym z wymienionych typów organizmów (Samelak i wsp., 2010; Sadowska i Diowski, 2016).

Transglutaminazy pochodzenia zarówno zwierzęcego (Ebrahimi Samani i wsp., 2024), jak i roślinnego (Parrotta i wsp., 2022) do pełnienia swoich funkcji wymagają obecności jonów wapnia. Jony Ca^{2+} przyłączając się do cząsteczki enzymu pośrednio przyczyniają się do

kontrolowania dostępności substratów w miejscach, gdzie są one wiązane. Pośredni wpływ w danym procesie można wytłumaczyć zmianą konformacyjną cząsteczki białka, która ma miejsce po przyłączeniu jonów wapnia i polega na odsłonięciu reszt aminokwasów w centrum katalitycznym transglutaminazy. Opisana cecha enzymu sprawia, że do utworzenia charakterystycznych wiązań krzyżowych może dojść jedynie w przypadku wystarczającego stężenia jonów wapnia w otoczeniu transglutaminazy (Kolotylo i wsp., 2023). Transglutaminazy roślinne uzależnione są dodatkowo od światła, co stanowi ich odrębną cechę (Sobieszczuk-Nowicka i wsp., 2008; Campos i wsp., 2010). Na tle tych właściwości enzymatycznych wyróżniają się transglutaminazy mikrobiologiczne (MTG), które nie wymagają obecności jonów wapnia, ani światła do aktywności katalitycznej. Dzięki temu są one bardziej wszechstronne i stabilne w zastosowaniach przemysłowych. Warto podkreślić, że niektóre białka (kazeina, miozyna czy globulina sojowa) są wrażliwe na jony wapnia, a ich obecność może spowodować niepożądane wytrącanie białek substratu (Yokoyama i wsp., 2004). Niezależność od czynników zewnętrznych, jak wapń lub światło, sprawia, że transglutaminazy mikrobiologiczne zyskują rosnące znaczenie w przemyśle spożywczym i biotechnologii.

1.2.1 Transglutaminaza mikrobiologiczna

Transglutaminazę pochodzenia mikrobiologicznego (MTG) po raz pierwszy wyizolowano ze szczepu *Streptomyces mobaraensis* (wcześniej klasyfikowanego jako *Streptoverticillium mobaraense*) (Ando i wsp., 1989). Ando i wsp. (1989) przebadali około 500 szczepów wyizolowanych z różnych próbek gleby. Spośród badanych mikroorganizmów, zdolność do syntezy tego enzymu wykazał szczep *Streptoverticillium* S-8112. Badania przeprowadzone przez Motoki i wsp. (1989) pokazały, że dany enzym może być syntetyzowany także przez inne mikroorganizmy z rodzaju *Streptoverticillium*: *S. griseocarneum*, *S. cinamoneum subsp. cinnanoneum* czy *S. mobaraensis* (Zhu i wsp., 1995). Rozwój technik badawczych i analitycznych sprawia, że obecnie świat nauki jest w stanie izolować kolejne szczepy zdolne do produkcji transglutaminazy. Co więcej, niektóre ze znanych mikroorganizmów poddaje się modyfikacjom genetycznym celem stworzenia szczepów cechujących się wydajniejszą syntezą tego enzymu w porównaniu do naturalnych producentów (Wang i wsp., 2018) (**Tab. 1**).

Tab. 1 Mikroorganizmy zmodyfikowane genetycznie zdolne do produkcji transglutaminazy

Nr	Szczep gospodarz	Szczep dawca genu	Podłoża i warunki	Aktywność	Źródło
1	<i>Streptomyces mobaraensis</i> TX1 mutant Sm2-1	<i>Streptomyces mobaraensis</i> TX1	Glicerol, ekstrakt drożdżowy, pepton, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{ H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; pH 7,4	37,5 U/mL	Huang i wsp. (2022)
2	<i>Pichia pastoris</i> X33	<i>Streptomyces mobaraensis</i>	Podłoże BMGY, pożywka z kwasem cytrynowym (glicerol , NH_4HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, KCl , $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$), biotyna; pH 5,0; temp 28 °C	9,1 U/mL	Türkanoğlu Özçelik i wsp. (2019)
3	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)pLysS	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM7	Bulion TB (trypton, ekstrakt drożdżowy, glicerol, KH_2PO_4 , K_2HPO_4)	37 mU/mg	Duarte i wsp. (2020a)
4	<i>Bacillus subtilis</i> 168	<i>Streptomyces mobaraensis</i> CGMCC 4.5591	Skrobia kukurydziana, pepton, mocznik, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{ H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , MgSO_4 , NaCl , sacharoza	29,6 U/mg	Mu i wsp. (2018)
5	<i>Streptomyces lividans</i> TK24	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> WSH03-13	Podłoże R2YE agarowe lub podłoże płynne (glicerol , pepton, ekstrakt drożdżowy, MgSO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , CaCl_2); temp. 30 °C; 200 obr/min; 2-3 dni	5,7 U/mL	Liu i wsp. (2016)
6	<i>Yarrowia lipolytica</i> Po1h	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> WSH03-13	Modyfikowane podłoże PPB (glukoza, ekstrakt drożdżowy, NH_4Cl , KH_2PO_4 , MgSO_4 , tiamina); pH 6,0; temp. 28 °C; 200 obr/min; 5 dni	5,3 U/mL	Liu i wsp. (2015)
7	<i>Pichia pastoris</i> GS115	<i>Escherichia coli</i> DH5	Ekstrakt drożdżowy, pepton, K_2HPO_4 , drożdżowa baza azotowa bez aminokwasów, biotyna, CH_3OH ; temp. 28 °C; 250 obr/min; 96 h	4,4 mg/L; 0,9 U/mg	Li i wsp. (2013)

Początek intensywnego rozwoju badań nad mikrobiologiczną transglutaminazą przypada na koniec lat 80. ubiegłego stulecia (Serafini i wsp., 2009). Współcześnie transglutaminaza pozyskiwana jest głównie z wykorzystaniem gatunku *Streptomyces mobaraensis*. Sekwencjonowanie białek ujawniło, że pierwszorzędowa struktura MTG składa się z 331 aminokwasów w pojedynczym łańcuchu polipeptydowym (Kanaji i wsp., 1993; Yokoyama i wsp., 2004). Struktura drugorzędowa składa się z ośmiu β -harmonijek otoczonych 11 α -helisami, z kolei struktura trzeciorzędowa ma strukturę dyskową z centrum aktywnym w szczelinie apoenzymu, składającą się z triady Cys-Asp-His, co jest kluczem do wydajności

sieciowania (Duarte i wsp. 2020b). MTG posiada tę samą triadę katalityczną co transglutaminaza pochodzenia zwierzęcego, ale inną kolejność sekwencji (MTG: Cys-Asp-His; TGz: Cys-His-Asp) (Yokoyama i wsp., 2004; Jaros i wsp., 2006; Romeih i Walker, 2017; Duarte i wsp., 2020b).

Transglutaminazy mikrobiologiczne wykazują niską masę cząsteczkową (ok. 38 kDa), nie zawierają ugrupowań sacharydowych i lipidowych, co sprawia, że masa cząsteczkowa MTG jest o około połowę mniejsza od TGz (transglutaminaza zwierzęca) (Yokoyama i wsp., 2004; Poulsen i Bindslev-Jensen, 2007). Optymalne pH dla aktywności MTG mieści się w zakresie pH od 5,0 do 8,0. Ando i wsp (1989) udowodnili, że MTG wykazuje aktywność nawet przy wartościach pH 4,0 i 9,0 – enzym jest stabilny w szerokim zakresie pH. Zakwaszenie środowiska poniżej pH 4,0 powoduje, że enzymy ze *Streptomyces* spp. wytrącają się. Jako temperaturę optymalną aktywności enzymatycznej MTG stwierdzono 55 °C (przez 10 min przy pH 6,0) – enzym traci pełną aktywność w temperaturach skrajnych (40 °C oraz 70 °C) (Duarte i wsp., 2020b). Dodatek węglowodanów takich jak maltodekstryna, sacharoza, mannoza, trehaloza czy zredukowany glutation zwiększają stabilność termiczną transglutaminazy. W temperaturach bliskich 0 °C transglutaminaza zachowuje całkowitą aktywność enzymatyczną (Ciu i Zhang, 2007; Kieliszek i Misiewicz, 2014). Nowsze badania (Fuchsbaauer, 2022) dostarczają informacji, że optymalną temperaturą dla transglutaminaz jest 37 °C, a aktywność jest zwykle tracona w temperaturach powyżej 50 °C. Z kolei badanie Yokoyama i wsp. (2004) wykazało, że MTG może również wykazywać aktywność w temperaturze 10 °C. Przedstawione informacje sugerują, że MTG cechuje się aktywnością w szerokim zakresie temperatury, co jest istotną kwestią w kontekście wykorzystania w różnych gałęziach przemysłowych. Tak szerokie zakresy temperatury oraz pH mogą wskazywać na potrzebę prowadzenia dokładniejszych badań, które dostarczą precyzyjnych informacji w zależności od badanego szczepu mikroorganizmu.

1.3 Wykorzystanie transglutaminazy na skalę przemysłową

Transglutaminaza mikrobiologiczna zdobywa coraz większe uznanie w przemyśle spożywczym ze względu na swoją wszechstronność i efektywność. Najpowszechniej stosowana jest mikrobiologiczna transglutaminaza (MTG), pozyskiwana głównie z promieniowców, ze względu na prostotę i szybkość hodowli, wysoką wydajność produkcji oraz niską specyficzność substratową (Sadowska i Diowski, 2016). Krzyżowe wiązania kowalencyjne powstające w wyniku działania transglutaminazy można wykorzystać do

modyfikacji właściwości fizycznych i chemicznych białek, na przykład, ich rozpuszczalności, zdolności zatrzymywania wody, stabilności termicznej, zdolności emulgowania i pienienia, lepkości, elastyczności i żelowania (Poulsen i Bindslev-Jensen, 2007; Ryszka i wsp., 2009; Kieliszek i Misiewicz, 2014). MTG poprawia właściwości funkcjonalne białek spożywczych, wpływając na ich strukturę, teksturę i trwałość bez zmiany smaku czy wartości odżywczej (Wang i wsp., 2022). Modyfikować można wiele białek, do najpopularniejszych można zaliczyć kazeinę mleka, białka serwatkowe, globuliny sojowe, gluten pszeniczny, miozyny mięsne oraz proteiny występujące w jajach kurzych (Akbari i wsp., 2021). Firma Ajinomoto (wciąż działa na rynku) była prekursorem przemysłowego wykorzystania MTG, wdrażając ją w produkcji surimi – produktu, który stał się wizytówką japońskiej innowacyjności (Kolotylo i wsp., 2023). Dodatek MTG poprawia elastyczność, wytrzymałość oraz konsumencką jakość wizualną pasty rybnej, zapewniając jej wysoką białość i spójność struktury produktu końcowego (Romeih i Walker, 2017).

W piekarnictwie MTG poprawia jakość i objętość pieczywa, zwłaszcza z mąk bezglutenowych, wpływając korzystnie na reologię ciast (Diowski i Leszczyńska, 2016) i strukturę chleba (Sadowska i Dziowski, 2020). Badania wskazują na skuteczność MTG w poprawie jakości wypieków z uszkodzonych zbóż oraz w produkcji makaronów i tofu o ulepszonej teksturze (Bonet i wsp., 2005; Duarte i wsp., 2020b).

W przemyśle mięsnym MTG umożliwia restrukturyzację mięsa mielonego, poprawiając teksturę i spoistość bez dodatku fosforanów (Kuraishi i Yamazaki, 1997; Atilgan i Kilic, 2017; Duarte i wsp., 2020b). Enzym ten znajduje zastosowanie w produkcji analogów mięsa na bazie białek roślinnych, wspomagając odwzorowanie struktury mięsa konwencjonalnego (Miwa, 2020; Wen i wsp., 2022).

W mleczarstwie MTG poprawia strukturę jogurtu i sera poprzez sieciowanie białek mlecznych, co prowadzi do zmniejszenia synerezy i zwiększenia wydajności produkcji (Fox i wsp., 2017; Monsalve-Atencio i wsp., 2022). Enzym wspiera także przeżywalność bakterii probiotycznych w procesach suszenia (Gong i wsp., 2019). Transglutaminaza poprawia zdolność zatrzymywania wody, żelowanie i stabilność termiczną mieszanek białek roślinnych, ułatwiając rozwój innowacyjnych produktów spożywczych na bazie roślin (Herz i wsp., 2021; Zhao i wsp., 2023)

Trwają badania nad wykorzystaniem transglutaminazy do wbudowywania odpowiednich aminokwasów w niepełnowartościowe białka (podniesienie wartości odżywczej). Proponuje się także wykorzystanie enzymu do blokowania alergennych, opornych na proteolizę, peptydów w białkach sojowych (Xing i wsp., 2024). Transglutaminaza zyskuje

coraz większe znaczenie jako naturalne narzędzie w poprawie jakości żywności, efektywności produkcji oraz redukcji strat surowcowych, wpisując się w nowoczesne trendy technologii żywności i zrównoważone rolnictwo (Vasić i wsp., 2023).

Transglutaminaza mikrobiologiczna nie tylko jest wykorzystywana w przemyśle spożywczym, ale ma również zastosowania w medycynie (Kim i Keillor, 2020) i inżynierii biomateriałowej (Porta i wsp., 2015). W biotechnologii enzym ten jest używany do modyfikacji białek, a także w badaniach nad terapiami genowymi (Zilda i wsp., 2017). Zastosowanie transglutaminazy w mikrokapsułkowaniu bakterii probiotycznych stanowi innowacyjne podejście do poprawy ich stabilności i przeżywalności podczas przechowywania oraz pasażu przez przewód pokarmowy (Li i wsp., 2021). Li i wsp. (2016) przeprowadzili mikrokapsułkowanie *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG (dawniej *Lactobacillus rhamnosus*) przy użyciu transglutaminazy poprzez usieciowanie izolatu sojowego i późniejszą liofilizację, co przełożyło się na wysoką wydajność mikrokapsułkowania (67,4 %). W badaniu przeprowadzonym przez Heidebach i wsp. (2009) komercyjne szczepy bakterii probiotycznych wykazywały wysoką wydajność mikrokapsułkowania za pomocą usieciowanego transglutaminazą żelu kazeinowego, która wynosiła do 70 % (dla *Lactocaseibacillus paracasei* ssp. *paracasei* F19) i do 93 % (dla *Bifidobacterium lactis* Bb12). Dzięki rozwojowi nowych technik badawczych możliwe jest dokładniejsze poznanie potencjału enzymu, co prowadzi do odkrywania kolejnych obszarów jego zastosowania w przemyśle (Kolotylo i wsp., 2023).

Ze względu na zwiększone zastosowanie transglutaminazy w produkcji żywności, pojawiły się obawy zdrowotne, naciskające na potrzebę wprowadzenia regulacji informujących ludzi o bezpieczeństwie podczas spożywania produktów zawierających ten enzym. Prawie ćwierć wieku temu, na przełomie XX i XXI stulecia, naukowcy z Japonii Motoki i Seguro (1998) wykazali, że jedyną różnicą między białkami poddanymi wpływowi transglutaminazy a białkami natywnymi jest liczba połączeń pomiędzy resztami lizyny i glutaminy (G-L). Taka modyfikacja chemiczna występuje również podczas ogrzewania żywności bogatej w białko, na przykład podczas gotowania. Pod tym względem ludzie spożywają żywność bogatą w reszty G-L od czasu odkrycia ognia i gotowania. Chociaż nie zostało to naukowo udowodnione, można założyć bezpieczeństwo zmodyfikowanego wiązania G-L poprzez długotrwałe spożywanie cząsteczek G-L z żywnością poddawanej obróbce termicznej. Jeżeli chodzi o wchłanianie i biodostępność takich białek, to 99 % izopeptydów w procesach metabolizmu przekształcana jest w przewodzie pokarmowym do glutaminianu. W tym samym czasie amerykański zespół badawczy (Romeih i Walker, 2017) badał mutagenezę i ryzyko toksyczności mikrobiologicznej transglutaminazy, jakie stwarza jej dodatek w preparatach

spożywczych, testowanych na zwierzętach doświadczalnych. Badanie zakończyło się stwierdzeniem, że mikrobiologiczna transglutaminaza nie stanowi zagrożenia dla zdrowia, ponieważ nie zaobserwowano żadnej śmiertelności, zachorowalności ani oznak toksyczności przy dawkach 2 g/kg masy ciała (Diowks i Leszczyńska, 2016; Romeih i Walker, 2017). Nie można zapomnieć o fakcie, że mikrobiologiczna transglutaminaza jest bezpieczna do spożycia przez ludzi i jest uznawana przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (FDA) jako związek o statusie GRAS (Generally Recognized As Safe) od 1998 roku (Lerner i wsp., 2025).

1.4 Optymalizacja produkcji mikrobiologicznej transglutaminazy

Wprowadzenie enzymów przemysłowych do procesów produkcyjnych przyniosło znaczące oszczędności, redukując zużycie energii, wody oraz surowców, a także zmniejszyło emisję gazów cieplarnianych (Roy Choudhury, 2020). W porównaniu z modyfikacjami chemicznymi, enzymy oferują wiele korzyści, m.in. wysoką specyficzność reakcji oraz minimalizację reakcji ubocznych (Vasić i wsp., 2023). Zatem nic dziwnego, że dany sektor wykazuje dynamiczny wzrost. W 2020 roku wartość rynku enzymów spożywczych wyniosła 2,12 miliarda euro, a samego segmentu MTG około 184 milionów euro (Wu i wsp., 2020). Prognozy sugerują, że do 2026 roku rynek mikrobiologicznej transglutaminazy przekroczy 3,04 miliarda euro, a całkowity rynek enzymów (przemysł spożywczy, rolniczy, detergentów, tekstylny, kosmetyczny i biopaliwa) – 13,7 miliarda dolarów do 2027 (Wu i wsp., 2020), co wskazuje na stały wzrost zapotrzebowania na enzymy w przetwórstwie żywności i nie tylko (Kolotyło i wsp., 2023). Takie parametry, jak możliwość poprawy struktury białek oraz wydajność produkcji, sprawiają, że MTG jest jednym z kluczowych narzędzi stosowanych w zaawansowanych technologiach żywnościowych (Zilda i wsp., 2017).

Enzymy na skalę przemysłową są wytwarzane głównie poprzez tlenową biosyntezę przy użyciu mikroorganizmów. Wśród stosowanych gatunków do produkcji mikrobiologicznej transglutaminazy znajdują się m.in. *Streptomyces mobaraensis*, *Streptoverticillium cinnamoneum*, *Streptoverticillium lydicus*, *Streptoverticillium ladakanum*, *Bacillus subtilis* oraz *Bacillus spherules* (Ceresino i wsp., 2018; Akbari i wsp., 2021; Kolotyło i wsp., 2024).

Do produkcji enzymów można wykorzystywać surowce odpadowe jako składniki pożywek mikrobiologicznych, takie jak namok kukurydziany (Kolotyło i wsp., 2025b), ziemniaczana woda sokowa (Bzducha-Wróbel i wsp., 2018), frakcje glicerolowe (Kot i wsp., 2020), melasa trzcinowa (Preichardt i wsp., 2019), młóto browarnicze (Ogidi i wsp., 2020), wyciągi owocowe (Bellucci i wsp., 2021). Guerra-Rodriguez i Vazquez (2014) opracowali

podłoże do produkcji mikrobiologicznej transglutaminazy (dla szczepu *Streptomyces mobaraensis* CECT 3230) składające się wyłącznie z odtłuszczonego mleka (600 g/L), odpadowych ziemniaków (40 g/L) i glicerolu (5 g/L). Po 72 godzinach hodowli otrzymali średnią aktywność MTG na poziomie $2,95 \pm 0,3$ U/mL, a obliczona wydajność ekonomiczna produkcji wyniosła 8,11 euro transglutaminazy uzyskanej z 1 euro wydanego na składniki podłoża (Guerra-Rodríguez i Vázquez, 2014). W **tabeli 2** przedstawiono wybrane wyniki aktywności enzymatycznej mikrobiologicznej transglutaminazy uzyskane na przestrzeni lat przez różne zespoły badawcze.

Tab. 2 Aktywność MTG uzyskana przez różne mikroorganizmy

Nr	Gatunek	Szczep	Podłoża i warunki	Aktywność	Źródło
1	<i>Streptomyces</i> sp.	CBMAI 1617 (SB6)	2,5% śruta sojowa, 2% skrobia ziemniaczana, 0,1% glukoza, 1% pepton bakteriologiczny, 0,4% $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; pH 7,0; temp. 30°C; 96h	6,1 U/mL	Ceresino i wsp. (2018)
2	<i>Streptoverticillium mobaraensis</i>	CBS 20778 (WSH-Z2)	Skrobia, glukoza pepton, ekstrakt drożdżowy, MgSO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 ; pH 6,8; temp. 30°C; 48 h	3,3 U/mL	Yan i wsp. (2005)
3	<i>Streptoverticillium ladakanum</i>	NRRL-3191	Ksyloza, pepton, ekstrakt drożdżowy, kazeinian sodu, MgSO_4 , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 ; temp. 26°C; 120 h	0,3 U/mL	Tellez-Luis i wsp. (2004)
4	<i>Bacillus circulans</i>	BL 32	Skrobia rozpuszczalna, pepton, ekstrakt drożdżowy, MgSO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 ; pH 7,0; temp. 30°C; 24 h	0,69 U/mL	de Barros Soares i wsp. (2003)
5	<i>Streptoverticillium mobaraensis</i>	CBS 20778 (WSH-Z2)	Skrobia, pepton, ekstrakt drożdżowy, MgSO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 ; pH 7,0; temp. 30°C; 7 dni	2,9 U/mL	Zheng i wsp. (2002)
6	<i>Streptoverticillium mobaraensis</i>	S-SI12	Polipeptyd, glukoza, K_2HPO_4 , MgSO_4 ; temp. 30°C; 48 h	2,5 U/mL	Ando i wsp. (1989)

Współczesna optymalizacja medium fermentacyjnego stała się nieodłącznym elementem efektywnej produkcji enzymów na skalę przemysłową. Tradycyjnie stosowana metoda jednoczynnikowa (OFAT), w której składniki są testowane pojedynczo, okazała się czasochłonna i podatna na błędy (Di Masi i wsp., 2024). Nowoczesne podejścia oparte na zaawansowanych narzędziach statystycznych i matematycznych znacząco przyspieszyły ten

proces, umożliwiając maksymalizację wydajności przy jednoczesnym zmniejszeniu liczby eksperymentów (Singh i wsp., 2017).

Obecnie badacze stosują wieloczynnikowe modele optymalizacji, takie jak Plackett-Burman (Ma i wsp., 2016), Taguchi (Freddi i Salmon, 2019), Centralne Plany Kompozycyjne (Central Composite Design - CCD) (Bayuo i wsp., 2020) i Box-Behnken (Kolotyło i wsp., 2025a), które pozwalają na wyłonienie kluczowych czynników i analizę ich wzajemnych interakcji. Wprowadzenie metod takich jak Metoda Powierzchni Odpowiedzi (Response Surface Methodology - RSM) (Ma i wsp., 2016; Bayuo i wsp., 2020; Kolotyło i wsp., 2025b), Sztuczne Sieci Neuronowe (Artificial Neural Networks - ANN) (Agatonovic-Kustrin i Beresford, 2000) oraz Algorytmy Genetyczne (Genetic Algorithms - GA) (Al-Saadi i Al-Jabri, 2020) umożliwia przewidywanie optymalnych warunków hodowli poprzez jednoczesne uwzględnienie wielu zmiennych, takich jak pH, temperatura, wilgotność, źródła węgla i azotu oraz proporcje składników mineralnych. Przedstawione metody nie tylko skracają czas optymalizacji, ale także dostarczają dokładnych prognoz efektywności różnych konfiguracji warunków środowiskowych i składników.

Metoda powierzchni odpowiedzi (RSM) jest szeroko stosowana w biotechnologii do optymalizacji procesów produkcji różnych enzymów i pozostaje aktualnym oraz cenionym narzędziem na przestrzeni lat (Fasim i wsp., 2021). Metoda powierzchni odpowiedzi została z powodzeniem zastosowana w optymalizacjach składu pożywki do produkcji ksantanu i warunków hydrolizy enzymatycznej jeszcze w latach 90. ubiegłego stulecia (Ma i Ooraikul, 1986; Roseiro, 1992). W 2010 metoda została wykorzystana do optymalizacji produkcji pullulanu (Jiang, 2010), w 2023 – do optymalizacji uzyskania stabilności emulsji (Liu i wsp., 2023), w 2024 ukazały się badania nad optymalizacją procesu ekstrakcji cukrów i związków fenolowych (de la Lama-Calvente i wsp., 2024). Dodatkowo, zastosowanie RSM umożliwiło zwiększenie wydajności proteazy produkowanej przez szczep *Bacillus subtilis* K-5 poprzez optymalizację warunków fermentacji, takich jak temperatura, pH i wilgotność substratu (Shad i wsp., 2024). Podobnie, w przypadku lipazy produkowanej przez *Candida rugosa* NCIM 3462, RSM pozwoliła na optymalizację składu pożywki zawierającej serwatkę serową, co skutkowało zwiększoną aktywnością enzymu (Rajendran i Thangavelu, 2013). W innym badaniu, zastosowanie RSM do produkcji proteazy przez *Bacillus subtilis* GCU-8 umożliwiło identyfikację kluczowych czynników wpływających na wydajność enzymu, co pozwoliło na precyzyjną regulację parametrów procesu fermentacji (Adnan i wsp., 2014). Kolejnym przykładem jest synteza α -amylazy przez *Trichoderma virens* DMS1963, gdzie dzięki zastosowaniu RSM zoptymalizowano warunki fermentacji stałej z wykorzystaniem skórek

arbuza jako substratu, co znacząco poprawiło wydajność produkcji enzymu (Abdel-Mageed i wsp., 2022). Te przykłady podkreślają wszechstronność i skuteczność RSM w doskonaleniu procesów biotechnologicznych związanych z produkcją różnorodnych enzymów. Wybrane badania wykorzystujące omawianą metodę optymalizacji udowadniają, że jest ona ponadczasowa i nadal aktualna.

Podsumowując, mikrobiologiczna transglutaminaza jest kluczowym enzymem biotechnologicznym o szerokim spektrum zastosowań, zarówno w przemyśle spożywczym, jak i w innych dziedzinach (Duarte i wsp., 2020a). Skomplikowana procedura separacji i oczyszczania oraz rzadkie źródło enzymu pochodzenia zwierzęcego (wątroby świnek morskich *Cavia porcellus*) przekonały naukowców do poszukiwania nowych źródeł transglutaminazy. Tańszą oraz niezależną od jonów wapniowych alternatywą pozyskiwania enzymu jest jego mikrobiologiczna produkcja w bioreaktorach z wykorzystaniem szczepów *Streptoverticillium/Streptomyces*.

Dzięki zaawansowanym metodom fermentacji oraz optymalizacji warunków produkcji, możliwe jest uzyskanie wysokiej wydajności enzymatycznej przy relatywnie niskich kosztach, co jest osiągane m.in. poprzez zastosowanie odpadowych składników podłoży mikrobiologicznych. Wykorzystanie tanich i łatwo dostępnych surowców nie tylko obniża koszty produkcji, ale także przyczynia się do zrównoważonego rozwoju poprzez redukcję odpadów przemysłowych. Dalsze badania nad transglutaminazą, oraz możliwości jej komercjalizacji, stanowią istotny krok w kierunku rozwoju przemysłu i poprawy jakości produktów żywnościowych na szerszą skalę.

Chociaż minęło już 30 lat od momentu odkrycia mikrobiologicznej transglutaminazy oraz rozwijającego się obecnie trendu inżynierii genetycznej (opracowywanie wysoce wydajnego systemu ekspresji genów wykorzystując szczepy *Escherichia coli*, *Corynebacterium*, *Pichia*, a nawet *Bacillus*) nadal jest potrzebna izolacja nowych mikroorganizmów, optymalizacja pożywek hodowlanych oraz procedury fermentacji w celu uzyskania transglutaminazy o wyższej aktywności. Należy zwrócić uwagę, że mimo licznych zalet inżynierii genetycznej w produkcji MTG (poprawa aktywności, termostabilności i wydajności) (Juettner i wsp., 2018), nadal są pewne wady i trudności. Część społeczeństwa nie popiera procesów inżynierii genetycznej (niektóre kraje wprowadzają zakazy lub surowe ograniczenia) i nieustannie wyraża swój sprzeciw, między innymi, ze względu na kwestie etyczne; niezbadane długoterminowe konsekwencje; przekonanie o wywoływaniu chorób, nowotworów i alergii przez genetycznie modyfikowane mikroorganizmy (GMM) lub ich metabolity (Dzhumanova i Nazarova, 2022). Kolejnymi ograniczeniami w produkcji GMM są

pracochłonność i kosztowność badań, tworzenie mutantów na dużą skalę i nieprzewidziane skutki uboczne (Akbari i wsp., 2021).

Reakcja sieciowania katalizowana przez opisywany enzym może poprawić właściwości fizyczne różnych produktów żywnościowych na bazie białka, a tym samym przyczynić się do produkcji nowej żywności o wysokiej jakości. Z perspektywy zaawansowanego wykorzystania zasobów białkowych, wkład transglutaminazy w przemysł spożywczy będzie bardzo wysoki. Oczekuje się, że rola MTG będzie kluczowa w tworzeniu żywności przyszłości zgodnie z ideą personalizowanej diety i biotechnologii nowej generacji.

2. CEL PRACY I HIPOTEZY BADAWCZE

Głównym celem pracy był dobór optymalnych warunków produkcji mikrobiologicznej transglutaminazy (MTG) wytwarzanej przez promieniowce z rodzaju *Streptoverticillium* w warunkach laboratoryjnych oraz otrzymanie preparatu białkowego o wysokiej aktywności MTG.

Przeprowadzone badania miały na celu weryfikację następujących hipotez:

H1. Zastosowanie niekonwencjonalnego źródła azotu jako składnika podłoża hodowlanego pozwoli zwiększyć aktywność transglutaminazy w porównaniu do standardowego podłoża z aminobakiem.

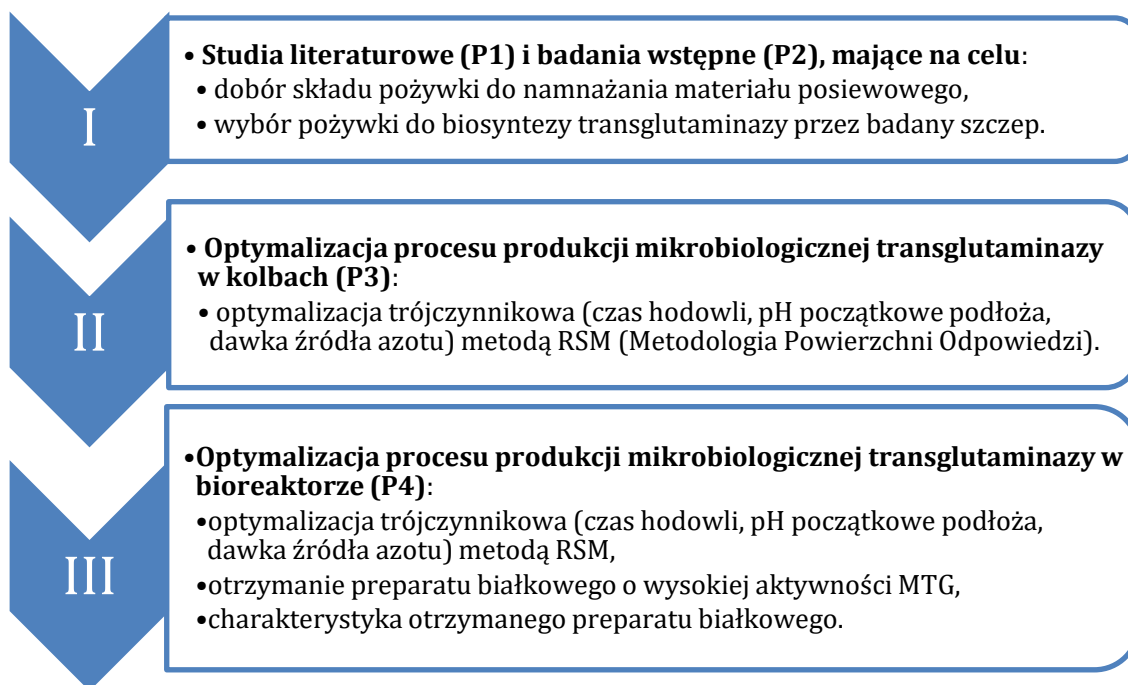
H2. Poprzez dobór odpowiednich parametrów hodowli niemodyfikowanego genetycznie szczepu *Streptoverticillium cinnamoneum* KKP 1648 istnieje możliwość uzyskania aktywności MTG na poziomie przekraczającym 3 U/mL.

H3. Zmiana skali hodowli z kolby do bioreaktora wpłynie na końcową aktywność MTG w supernatancie pohodowlanym.

3. ZAKRES PRACY, MATERIAŁY I METODYKA

3.1 Zakres pracy

Badania będące podstawą naukową niniejszej rozprawy były prowadzone w trzech głównych etapach, które pozwoliły na weryfikację sformułowanych wcześniej hipotez badawczych. Ogólny plan badawczy przedstawiono na **rysunku 2**.



Rys. 2. Schemat organizacji badań z uwzględnieniem artykułów, w których opublikowano wyniki

Etap I obejmował opracowanie literaturowe (**P1**), którego celem było szczegółowe scharakteryzowanie enzymu transglutaminazy (EC 2.3.2.13), jego pochodzenia oraz możliwości zastosowania przemysłowego. W pracy przeglądowej omówiono transglutaminazy pochodzenia zwierzęcego (TGz), roślinnego (TGr) oraz mikrobiologicznego (MTG), koncentrując się na ich właściwościach enzymatycznych, różnicach strukturalnych i funkcjonalnych. W części poświęconej TGz przedstawiono ich klasyfikację, rolę w cyklu γ -glutamylowym, potencjalny związek z celiakią oraz oddziaływanie z mikrobiomem jelitowym człowieka. Szczególną uwagę poświęcono mikrobiologicznym transglutaminazom ze względu na ich szerokie zastosowanie w technologii żywności. Przedstawiono metody ich biosyntezy z udziałem drobnoustrojów, znaczenie ekonomiczne oraz potencjał wykorzystania organizmów modyfikowanych genetycznie w celu zwiększenia wydajności produkcji enzymu. W pracy przeanalizowano również aspekty bezpieczeństwa żywności zawierającej transglutaminazę oraz przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat jej zastosowania

w różnych gałęziach przemysłu: piekarskim, mięsnym, mleczarskim i farmaceutycznym. Opracowanie to stanowiło solidną podstawę teoretyczną dla dalszych etapów badań własnych, wskazując zarówno korzyści, jak i wyzwania związane z wykorzystaniem transglutaminazy w biotechnologii.

W ramach I etapu przeprowadzono również badania wstępne nad możliwością biosyntezy mikrobiologicznej transglutaminazy z udziałem niemodyfikowanych genetycznie szczepów *Streptomyces mobaraensis* KKP 1659 i *Streptoverticillium cinnamoneum* KKP 1648. Już na tym etapie pracy zauważono istotne różnice w efektywności produkcji transglutaminazy mikrobiologicznej między badanymi szczepami promieniowców. Szczep *S. mobaraensis* charakteryzował się bardzo niskim poziomem aktywności enzymatycznej w warunkach zastosowanych doświadczeń laboratoryjnych, co skłoniło do podjęcia decyzji o rezygnacji z jego dalszego wykorzystania na rzecz bardziej perspektywicznego szczepu *S. cinnamoneum*.

W przypadku *S. cinnamoneum* KKP 1658, mimo ograniczonej wiedzy dostępnej w literaturze na temat tego mikroorganizmu, uzyskane wyniki zwróciły uwagę na jego potencjał jako wydajnego producenta transglutaminazy. W badaniach sprawdzano wpływ różnych źródeł azotu (komercyjnych, odpadowych i nieorganicznych) oraz ich kombinacji w podłożu hodowlanym na aktywność produkowanej transglutaminazy. Badano, jaki efekt daje zmienna objętość, wiek i rodzaj inokulum, czas trwania hodowli doświadczalnej oraz początkowe pH pożywki. Analizowano zarówno przyrost biomasy, jak i poziom aktywności enzymatycznej MTG w płynie pohodowlanym, wykorzystując testy oparte na reakcji z substratem Z-Gln-Gly (N-benzylooksykarbonyl-L-glutaminylglycyna) i hydroksyloaminą. Wyniki przeprowadzonych analiz dla szczepu *S. cinnamoneum* KKP 1648 zostały opublikowane w artykule **P2** i posłużyły do weryfikacji **hipotezy 1**.

Przeprowadzone doświadczenia w etapie I stanowiły podstawę do dalszych badań nad zwiększeniem wydajności biosyntezy transglutaminazy w optymalizacyjnych etapach pracy doktorskiej (Etapy II i III).

W drugim etapie pracy doktorskiej skoncentrowano się na określeniu optymalnych warunków fermentacji w kolbach dla biosyntezy mikrobiologicznej transglutaminazy z wykorzystaniem szczepu *S. cinnamoneum* KKP 1648. Do realizacji tego celu zastosowano metodę powierzchni odpowiedzi (RSM). Szczególną uwagę poświęcono takim czynnikom, jak dawka źródła azotu (stosowanego w postaci połączenia aminobaku i namoku kukurydzianego), długość prowadzenia hodowli oraz wartość początkowego pH pożywki. Projekt doświadczeń został zaplanowany w taki sposób, aby możliwa była jednoczesna ocena zarówno

indywidualnego, jak i synergistycznego wpływu tych zmiennych na aktywność enzymatyczną produkowanej MTG. Otrzymane wyniki z tego etapu zostały opublikowane w artykule **P3** i posłużyły do weryfikacji **hipotezy 2**.

W ostatnim etapie (Etap III) pracy doktorskiej zoptymalizowano proces biosyntezy MTG przez *S. cinnamoneum* KKP 1648 w warunkach bioreaktorowych. Z wykorzystaniem metodyki powierzchni odpowiedzi dokonano oceny wpływu tych samych czynników, co w etapie II. Po wyznaczeniu optymalnych warunków hodowli model został zweryfikowany w praktyce – biosyntezę przeprowadzono przy parametrach wskazanych przez model statystyczny. Po zakończeniu hodowli biomasa została poddana procesowi oczyszczania enzymu (ultrafiltracja, frakcjonowanie siarczanem amonu). Kolejnym etapem było oznaczenie masy cząsteczkowej enzymu metodą SDS-PAGE. Przeprowadzono także analizy wpływu temperatury, stabilności termicznej i zakresu pH uzyskanego preparatu białkowego. Wyniki opublikowano w artykule **P4**, na podstawie którego również zweryfikowano **hipotezę 2**. W oparciu o uzyskane dane z etapów opisanych w artykułach **P3** i **P4** zweryfikowano **hipotezę 3**.

3.2 Materiał i metodyka

3.2.1 Materiał badawczy

Badania (**P2**, **P3**, **P4**) zostały przeprowadzone z wykorzystaniem szczepu promieniowców *Streptoverticillium cinnamoneum* KKP 1658 będącego w zasobach Kolekcji Czystych Kultur w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Promieniowce przechowywano w temperaturze -80 °C (Haier Biomedical, Holandia) w bulionie tryptonowo-sojowym z dodatkiem glicerolu.

3.2.2 Metody hodowli – etap I (**P2**)

W badaniach wykorzystano bulion tryptonowo-sojowy (TSB) jako podłoże inokulacyjne. Skład TSB (g/L): pepton kazeinowy - 17; pepton sojowy - 3; NaCl - 5; K₂HPO₄ - 2,5; glukoza - 2,5. Alternatywnie stosowano również pożywkę inokulacyjną O3, zawierającą (g/L): płatki owsiane - 25, aminobak - 2, K₂HPO₄ - 2 oraz MgSO₄ × 7 H₂O - 1 (Pietracha i wsp., 2015). Początkowe pH obu pożywek ustalano na poziomie 7,0 (pH-metr Elmetron CP-505, Poland), a sterylizację przeprowadzano w temperaturze 121 °C przez 15 min w autoklawie (Hirayama, Japonia).

Po 72 godzinach namnażania, hodowlę inokulacyjną (po odwirowaniu) dodawano do podłoża doświadczalnego w objętości odpowiadającej 10 % całkowitej objętości hodowli. Hodowle prowadzono w temperaturze 28 °C w czterech przedziałach czasowych: 24, 48, 72 i 96 godzin. Skład pożywki doświadczalnej wynosił (g/L): skrobia rozpuszczalna - 20, aminobak - 20, ekstrakt drożdżowy - 2, KH₂PO₄ - 2, Na₂HPO₄ - 2, MgSO₄ × 7 H₂O - 1. Początkowe pH pożywki ustalano na poziomie 6,5, a proces sterylizacji przeprowadzano analogicznie - w temperaturze 121 °C przez 15 min (autoklaw Hirayama, Japonia). Wszystkie hodowle wykonano w trzech powtórzeniach.

W celu określenia odpowiedniego źródła azotu, w kolejnych wariantach pożywki doświadczalnej, aminobak zastępowano odpowiednio: siarczanem amonu ((NH₄)₂SO₄), azotanem amonu (NH₄NO₃), namokiem kukurydzianym, aminobakiem z namokiem kukurydzianym. Każde ze źródeł azotu stosowano oddzielnie, przy zachowaniu jednakowej całkowitej zawartości azotu w pożywce (2 g/100 mL).

3.2.3 Metody hodowli – etap II (**P3**)

Przygotowanie inokulum prowadzono dwuetapowo. W pierwszym etapie przygotowano hodowlę startową, zaszczepiając 100 mL podłoża TSB w kolbie o pojemności

500 mL zawiesiną komórek badanego szczepu *Streptoverticillium cinnamoneum* KKP 1658 ($6 - 8 \times 10^7$ jtk/mL). Inkubację prowadzono przez 72 godziny w temperaturze 28°C, na wytrząsarce o ruchu obrotowym (Eppendorf Innova 44 Incubator Shaker, Germany) z prędkością 180 obr./min. W drugim etapie uzyskaną hodowlę startową wykorzystano do przygotowania hodowli inokulacyjnej, przenosząc 10 mL do 90 mL świeżego podłoża TSB. Hodowlę inokulacyjną prowadzono przez 24 godziny w temperaturze 28 °C i przy 180 obr./min. Hodowla startowa służyła do wstępnego namnożenia komórek, natomiast hodowla inokulacyjna stanowiła bezpośrednie źródło komórek do zaszczepiania podłoży doświadczalnych.

W celu rozpoczęcia biosyntezy mikrobiologicznej transglutaminazy hodowlę inokulacyjną odwirowano (3500 obr./min; wirówka MPW-260R, Polska) i przemyto jałową wodą destylowaną. Tak przygotowane inokulum wykorzystywano do zaszczepienia podłoży doświadczalnych (100 mL). Hodowle prowadzono w temperaturze 28 °C, przy 180 obr./min, w trzech jednostkach czasowych: 24, 48 i 72 godziny.

W ramach optymalizacji procesu produkcji mikrobiologicznej transglutaminazy zbadano wpływ trzech różnych dawek azotu (1 %, 2 % i 4 %) w postaci połączenia aminobaku z namokiem kukurydzianym w stosunku 1:1, a także trzech wartości początkowego pH podłoża: 5,5, 6,0 i 6,5. Skład pożywki doświadczalnej o 2 % zawartości źródła azotu wynosił (g/L): skrobia rozpuszczalna - 20, aminobak - 10, namok kukurydziany - 10, ekstrakt drożdżowy - 2, KH_2PO_4 - 2, Na_2HPO_4 - 2, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ - 1. W przypadku pozostałych wariantów (1 % i 4 %) odpowiednio zmieniano ilości aminobaku i namoku przy zachowaniu proporcji 1:1, a pozostałe składniki pożywki pozostawały bez zmian. Podłoża badawcze sterylizowano w temperaturze 121 °C przez 15 min (autoklaw Hirayama, Japonia), po wcześniejszym ustaleniu pH na odpowiednim poziomie.

3.2.4 Metody hodowli – etap III (P4)

Przygotowano 3000 mL podłoża badawczego zawierającego skrobię rozpuszczalną (20 g/L), aminobak (10 g/L), namok kukurydziany (10 g/L), ekstrakt drożdżowy (2 g/L) oraz sole mineralne (KH_2PO_4 – 2 g/L, Na_2HPO_4 – 2 g/L, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ – 1 g/L), w wariantach o pH 5,5, 6,0 i 6,5 oraz zawartości źródła azotu wynoszącej 1 %, 2 % i 4 % (sumarycznie, jako mieszanina namoku kukurydzianego i aminobaku w stosunku 1:1). Podłoże sterylizowano w autoklawie (121 °C, 25 min; Hirayama, Japonia), a następnie pożywkę w bioreaktorze zaszczepiono 24-godzinnym inokulum, uprzednio odwirowanym i przemytym wodą destylowaną (pochodzącym z hodowli na pożywce TSB). Hodowle prowadzono

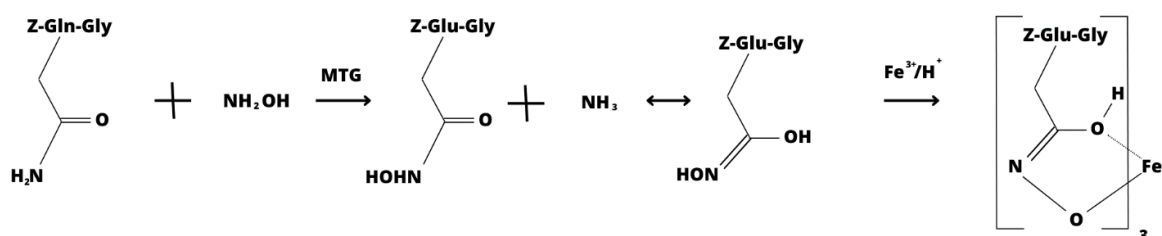
w temperaturze 28 °C, przy mieszaniu z prędkością 200 obr./min oraz napowietrzaniu sprężonym powietrzem o natężeniu przepływu 2,0 vvm. Próbkę do oznaczenia aktywności transglutaminazy pobierano po 24, 48 i 72 godzinach hodowli.

3.2.5 Oznaczanie plonu biomasy

Plon biomasy *S. cinnamoneum* KKP 1658 oznaczano po odwirowaniu 30 mL płynu pohodowlanego (Eppendorf 5810 Centrifuge, Niemcy; 4500 obr./min, 10 min) w suchych, uprzednio zważonych probówkach typu falcon. Uzyskany supernatant oddzielano do oznaczenia aktywności transglutaminazy, natomiast osad suszono w suszarce (Suszarka SML Zalmed, Polska) w temperaturze 80 °C do uzyskania stałej masy. Plon biomasy, po przeliczeniu na 1 L podłoża wyrażano w gramach suchej substancji (g s.s./L) i oznaczano w trzech powtórzeniach.

3.2.6 Oznaczanie aktywności transglutaminazy

Aktywność enzymatyczną transglutaminazy oznaczono z wykorzystaniem zestawu komercyjnego Microbial Transglutaminase Assay Kit Art. No. Z009 (Zedira GmbH, Darmstadt, Germany). Metoda oparta jest na reakcji substratu Z-Gln-Gly (N-benzyloxycarbonyl-L-glutaminylglycine, C₁₅H₁₉N₃O₆), działającego jako akceptor aminy, z hydroksyloaminą, będącą donorem grupy aminowej. W obecności MTG dochodzi do włączenia hydroksyloaminy do substratu Z-Gln-Gly, powstaje Z-glutamylo-hydroksaminoglicyna, która następnie tworzy barwny kompleks z żelazem (III). Kompleks ten wykrywany jest spektrofotometrycznie przy długości fali 525 nm (Spektrofotometr BIO-RAD SmartSpec 3000, Poland) (**Rys. 3**).



Rys. 3 Szereg reakcji chemicznych przedstawiających zasadę działania testu enzymatycznego do wykrywania MTG (Kolotyło i wsp., 2024)

Jednostkę aktywności transglutaminazy [U] zdefiniowano jako ilość enzymu katalizującą powstanie 1 μmola hydroksamianu na minutę, w reakcji pomiędzy Z-Gln-Gly a hydroksyloaminą przy pH 6,0 w temperaturze 37 °C (Folk i Cole, 1966).

$$\text{Aktywność MTG } \left[\frac{U}{mL} \right] = \frac{\Delta E \times V}{\epsilon \times d \times v \times t} = \left[\frac{\mu mol}{min \times mL} \right],$$

gdzie:

ΔE - absorbancja (525 nm); V – objętość całkowita (1050 μL); d – długość kuwety (1 cm); t – czas (10 min); v – objętość próbki (50 μL); ϵ - 0,795/ $\mu mol \times cm$.

3.2.7 Zagęszczanie i oczyszczanie transglutaminazy

Po odwirowaniu płynu pochodowlanego z hodowli bioreaktorowej, supernatant poddawano zagęszczaniu i częściowemu oczyszczaniu metodą ultrafiltracji. Zastosowano system Sartorius Vivaflow 200 (Sartorius AG, Niemcy) z membraną PES (polyethersulfone) o granicznej masie cząsteczkowej (MWCO) 100 kDa i powierzchni filtracyjnej 200 cm^2 . Proces prowadzono zgodnie z instrukcją producenta, w temperaturze ok. 4 °C i przy ciśnieniu do 3 barów, aż do uzyskania objętości odpowiadającej 1/10 początkowej objętości płynu pochodowlanego.

3.2.8 Wytrącanie białek

Do wytrącania białek zastosowano siarczan amonu (Chempur, Polska). Próbkę płynu pochodowlanego umieszczano na mieszadle magnetycznym w warunkach chłodzenia (w lodzie), a następnie dodawano nasycony roztwór $(NH_4)_2SO_4$ (750 g/L) do osiągnięcia końcowego stężenia 10 %. Inkubację prowadzono przez około 2 godziny. Następnie próbkę wirowano przez 15 min przy 10000 obr./min (Eppendorf AG 22331, Niemcy), usuwano supernatant, a osad przemywano zimnym 90 % acetonem i ponownie wirowano. Osad suszono, po czym zawieszano go w sterylnym buforze cytrynianowo-fosforanowym (50 mM, pH 5,6) w objętości odpowiadającej pierwotnej objętości próbki (Duong-Ly i Gabelli, 2014).

3.2.9 Oznaczanie zawartości białek

Stężenie białka oznaczano metodą Lowry’ego (Lowry i wsp., 1951). Do przygotowania odczynnika miedziowego użyto: roztworu A (2 % Na_2CO_3 w 0.1 M NaOH), roztworu B (2 % winian sodowo-potasowy) i roztworu C (1 % $CuSO_4 \times 5 H_2O$), mieszanych w proporcji 98:1:1. Do 1 mL próbki (lub wody - próba ślepa) dodawano 5 mL odczynnika miedziowego. Po 10 minutach dodawano 0,5 mL odczynnika Folina-Ciocalteu (Merck, Niemcy), inkubowano 30 minut w temperaturze pokojowej, a następnie mierzono absorbancję przy 750 nm. Pomiar wykonano trzykrotnie dla każdej próbki.

Krzywą wzorcową opracowano na podstawie roztworów albuminy o stężeniach 100-1000 µg/mL. Uzyskano równanie regresji: $Y = 0,000892838x + 0,130276$, opisujące zależność absorbancji od stężenia białka.

3.2.10 Oznaczenie masy cząsteczkowej enzymu

Masę cząsteczkową enzymu oszacowano metodą SDS-PAGE według procedury Laemmli'ego (Laemmli 1970). Elektroforezę przeprowadzono w układzie żelu poliakrylamidowego 10 % (rozdzielający) i 3 % (zagęszczający). Próbkę białek (25 – 50 µL) mieszano z buforem redukującym (2:1) i ogrzewano przez 5 minut w temperaturze 100 °C (Eppendorf, Thermomixer Comfort). Elektroforezę prowadzono przy natężeniu 40 mA przez 60 min (Bio-Rad PowerPac Universal). Białka wizualizowano przez barwienie błękitem Coomassie R-250, porównując z markerami mas cząsteczkowych (Broad Range, Bio-Rad).

3.2.11 Oznaczanie wpływu temperatury i pH na stabilność transglutaminazy

Aby określić termostabilność mikrobiologicznej transglutaminazy, enzym inkubowano przez 2 godziny w temperaturach od 20 °C do 55 °C w buforze fosforanowym o stężeniu 50 mM i pH 7,0. Po inkubacji zmierzono aktywność resztkową w standardowych warunkach oznaczenia, zgodnie z punktem 3.2.6. Aktywność względną (%) obliczono w odniesieniu do najwyższej zaobserwowanej średniej aktywności.

Stabilność w różnych wartościach pH oceniano w podobny sposób: enzym inkubowano przez 2 godziny w temperaturze 28°C w buforach o zakresie pH 4,0 – 9,0, a następnie mierzono aktywność enzymatyczną (punkt 3.2.6). Wyniki wyrażono jako aktywność resztkową (%) względem wartości maksymalnej.

3.2.12 Oznaczanie czasowej stabilności termicznej enzymu

Czasową stabilność mikrobiologicznej transglutaminazy badano poprzez inkubację enzymu w temperaturze 28°C (Binder, Niemcy) w różnych wariantach czasowych – od 30 do 300 minut – w buforze fosforanowym o stężeniu 50 mM i pH 7,0. Wyniki wyrażono jako aktywność resztkową (%) względem wartości maksymalnej. Aktywność względną (%) obliczono w odniesieniu do najwyższej zaobserwowanej średniej aktywności. W wybranych przedziałach czasowych oznaczano aktywność transglutaminazy zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 3.2.6.

3.2.13 Metody statystyczne

Do optymalizacji warunków produkcji transglutaminazy zastosowano plan eksperymentalny Box-Behnkena, uwzględniający trzy zmienne na trzech poziomach. Dane eksperymentalne w **tabeli 3**.

Tab. 3 Trójczynnikiowy plan Box-Behnken'a – etap II i III (P3 i P4)

Numer doświadczenia	Dawka źródła azotu (%)	pH	Czas (h)
1	1	5,5	48
2	1	6,5	
3	4	5,5	
4	4	6,5	
5	2	5,5	24
6	2	6,5	
7	2	5,5	72
8	2	6,5	
9	1	6,0	24
10	4	6,0	
11	1	6,0	72
12	4	6,0	
13	2	6,0	48
14	2	6,0	
15	2	6,0	

Projektowanie eksperymentów, modelowanie oraz analiza statystyczna zostały przeprowadzone w programie Statistica 13.1 (TIBCO Software Inc.). Istotność różnic pomiędzy średnimi wartościami analizowano za pomocą testu Tukey'a (HSD) przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

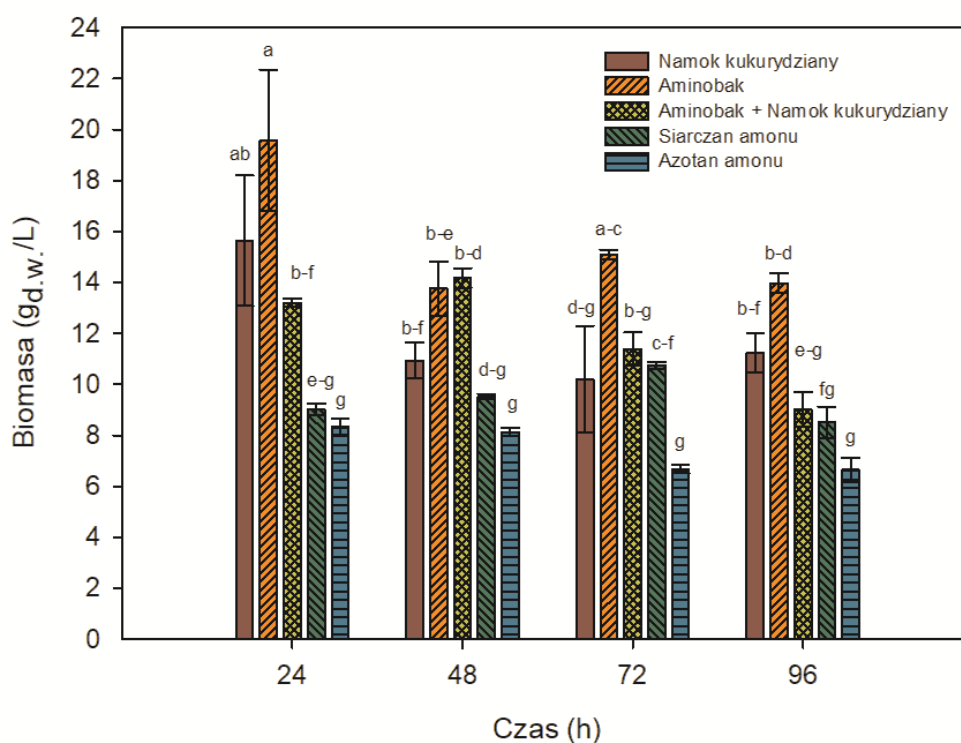
4. NAJWAŻNIEJSZE WYNIKI I DYSKUSJA WYNIKÓW

4.1 Badania wstępne

4.1.1 Wybór źródła azotu do pożywki doświadczalnej

Badania nad *Streptoverticillium cinnamoneum* KKP 1658 wykazały istotny wpływ rodzaju zastosowanego źródła azotu zarówno na plon biomasy, jak i na poziom produkowanej mikrobiologicznej transglutaminazy. Przeprowadzone badania wstępne zostały wykonane w celu weryfikacji **hipotezy 1**, a pełne wyniki zostały opublikowane w artykule **P2** niniejszej rozprawy doktorskiej.

Zbadano jak różne źródła azotu wpłynęły na plon biomasy badanego szczepu promieniowców *Streptoverticillium cinnamoneum* KKP 1658. W badaniu wykorzystano komercyjne źródło azotu (aminobak), odpadowe źródło azotu (namok kukurydziany), połowiczne zastąpienie aminobaku namokiem kukurydzianym, a także nieorganiczne źródła azotu w postaci soli amonowych – siarczanu i azotanu amonu (**rys. 3**). Podłoże z komercyjnym aminobakiem traktowano jako próbę kontrolną. Dodatkowo wykonano hodowlę w podłożu badawczym bez aminobaku (wyniki plonu biomasy 7,6; 7,9; 7,7 i 7,4 g s.s./L, odpowiednio po 24, 48, 72 i 96 godzinach hodowli).

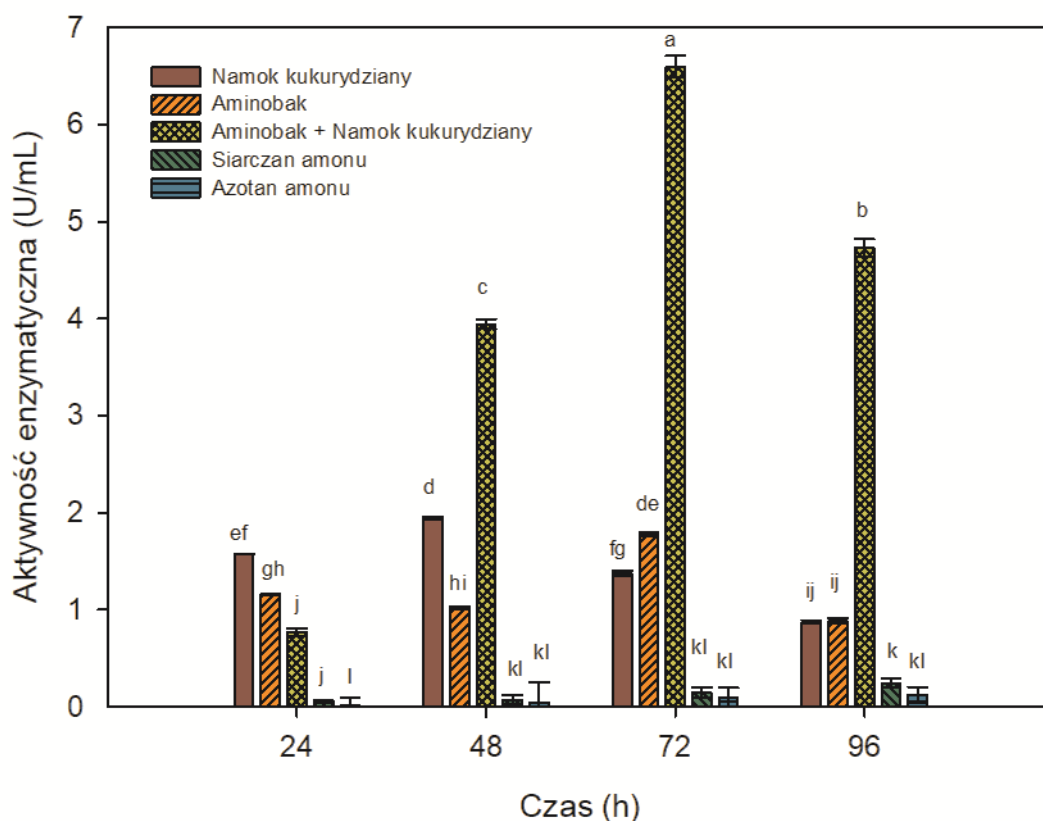


Rys. 3 Wydajność biomasy szczepu *S. cinnamoneum* w warunkach 96-godzinnej hodowli z zastosowaniem różnych źródeł azotu. ^{a-g} Średnie oznaczone tą samą literą nie wykazują istotnych różnic statystycznych

Najwyższe wartości biomasy uzyskano w podłożach zawierających komercyjny aminobak, osiągając po 24 godzinach wartość 19,6 g s.s./L. Wysoki plon biomasy, dla tego samego czasu, odnotowano również przy zastosowaniu namoku kukurydzianego (CSL) (15,6 g s.s./L). Kombinacja tych dwóch źródeł azotu (aminobak + CSL) dawała stabilny plon biomasy, lecz istotnie nie przewyższała samodzielnego wykorzystania jednego z nich.

W przypadku użycia nieorganicznych form azotu, jak siarczany lub azotan amonu, plon biomasy był zdecydowanie niższy (odpowiednio około 9 g s.s./L i 8,3 g s.s./L). Co istotne, przez cały okres hodowli najniższa biomasa była uzyskiwana w pożywkach z azotanem amonu, a różnica ta była często istotna statystycznie względem innych wariantów, a momentami nawet względem pożywek bezazotowych.

Pomimo wysokiej aktywności MTG (**rys. 4**), nie odnotowano proporcjonalnego wzrostu plonu biomasy. Po 24 godzinach hodowli najwyższą aktywność enzymatyczną uzyskano przy zastosowaniu namoku kukurydzianego (1,57 U/mL), zauważalnie wyższą niż dla aminobaku (1,16 U/mL). Po 48 godzinach aktywność MTG dla CSL wzrosła do 1,94 U/mL. Jednak dopiero zastosowanie pożywki będącej mieszaniną aminobaku z CSL w stosunku 1:1 pozwoliło osiągnąć ponadprzeciętne wyniki – po 72 godzinach aktywność MTG wyniosła 6,59 U/mL, a po 96 godzinach utrzymywała się na poziomie 4,73 U/mL. Synergia tych dwóch źródeł azotu miała nie tylko efekt technologiczny, ale również ekonomiczny: zastąpienie połowy drogiego aminobaku odpadowym namokiem kukurydzianym daje redukcję kosztów, a jednocześnie potęguje produkcję enzymu do poziomów wyższych niż w badaniach na innych, niemodyfikowanych szczepach. Tak wysoka aktywność MTG w medium mieszanym stanowi jeden z najwyższych wyników w literaturze dla szczepów niewykorzystujących modyfikacji genetycznych.



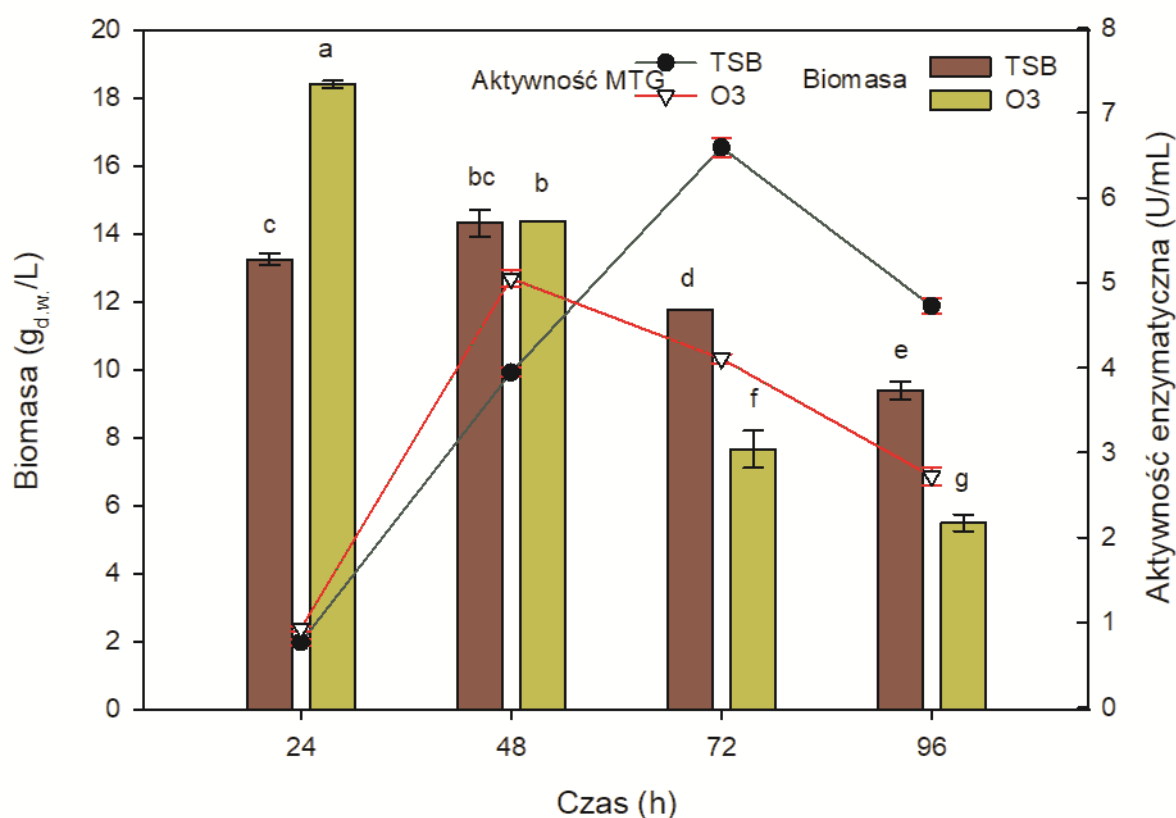
Rys. 4 Aktywność mikrobiologicznej transglutaminazy wytwarzanej przez szczep *S. cinnamoneum* w warunkach 96-godzinnej hodowli z zastosowaniem różnych źródeł azotu. ^{a-l} Średnie oznaczone tą samą literą nie wykazują istotnych różnic statystycznych

Jednocześnie, w pożywkach z aminobakiem lub CSL jako jedynymi źródłami azotu nie uzyskiwano aktywności transglutaminazy przekraczającej 2 U/mL podczas całego okresu hodowli. Co ciekawe, najwyższy przyrost biomasy nie korelował z najefektywniejszą produkcją enzymu – w przypadku medium aminobak + CSL najsilniejsze wydzielanie MTG obserwowano wtedy, gdy biomasa nie była rekordowa. To potwierdza, że warunek szybkiego wzrostu nie przewiduje automatycznie wysokiej syntezy enzymu, a kluczowy pozostaje skład pożywki i czas prowadzenia hodowli.

4.1.2 Wybór pożywki inokulacyjnej i jej parametry

Podłoże wykorzystywane do przednamnażania promieniowców odgrywa istotną rolę w procesie optymalizacji produkcji transglutaminazy (Kieliszek i Misiewicz, 2014). To dzięki doborze odpowiedniego podłoża inokulacyjnego, jego optymalnej dawki i czasu przednamnażania można otrzymać odpowiednie inokulum starterowe do późniejszej produkcji MTG. Zbadano jak proces przednamnażania w podłożu inokulacyjnym (O3) (Pietracha i wsp.,

2015) (o innym składzie niż podłoże TSB) wpływa na plon biomasy i aktywność uzyskanej transglutaminazy (**rys. 5**) badanego szczepu *Streptovercillium cinnamoneum* KKP 1658 w podłożu badawczym z aminobakiem i namokiem kukurydzianym (jako głównymi źródłami azotu).



Rys. 5 Zmiany w wydajności biomasy oraz aktywności mikrobiologicznej transglutaminazy w zależności od zastosowanego podłoża inokulacyjnego, przy użyciu aminobaku i namoku kukurydzianego w stosunku 1:1 jako głównego źródła azotu w 96-godzinnej hodowli. ^{a-g} Średnie oznaczone tą samą literą nie wykazują istotnych różnic statystycznych

Po 24 godzinnej hodowli wykorzystując podłoże inokulacyjne O3 uzyskano największy plon biomasy szczepu *S. cinnamoneum* KKP 1658 wynoszący 18,4 g s.s./L. W przypadku wykorzystania podłoża TSB wynik otrzymanej biomasy był istotnie niższy wobec wyniku dla podłoża O3 i wynosił 13,25 g s.s./L. Po 48 godzinach hodowli uzyskano porównywalne wyniki plonu biomasy dla obu badanych podłoży przednamnażających – 14,32 i 14,39 g s.s./L, odpowiednio dla TSB i O3. W trzeciej dobie hodowli plon biomasy dla obu przypadków znacząco zmalał – do 11,77 i 7,67 g s.s./L, kolejno dla TSB i O3. W ostatnim dniu prowadzenia hodowli odnotowano jeszcze mniejsze wyniki plonu biomasy – 9,39 g s.s./L dla podłoża TSB i 5,5 g s.s./L dla podłoża z płatkami owsianymi. Można zaobserwować proporcjonalną

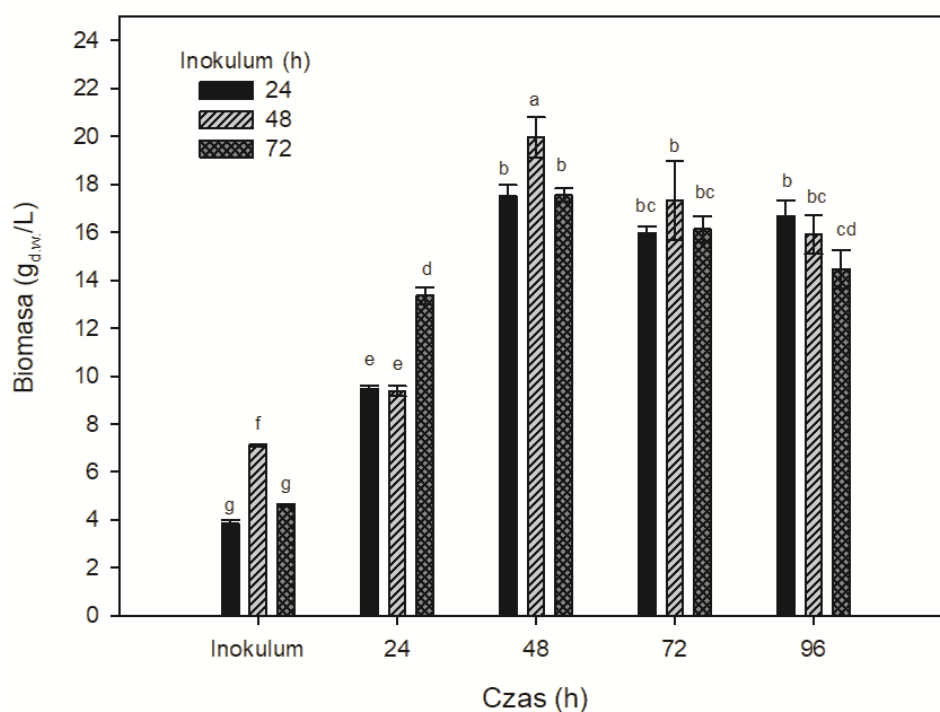
zależność dla wyników plonu biomasy wykorzystując podłoże O3 – wraz ze wzrostem czasu hodowli, zmniejsza się plon badanego szczepu. Dla podłoża inokulacyjnego TSB maksymalny przyrost biomasy stwierdzono po 48 godzinach hodowli, który wraz z ubiegiem czasu hodowli, podobnie jak w przypadku pożywki O3, malał. Uzyskane wartości pozwalają na wyciągnięcie wniosku, że po namnażaniu w podłożu z płatkami owsianymi, badany szczep szybciej osiąga idiofazę. Można przypuszczać, że proces przednamnażania przeprowadzony w podłożu TSB przekłada się na wydłużenie fazy wzrostu logarytmicznego (wydłużona trofofaza) u *S. cinnamoneum* KKP 1658, dlatego idiofaza jest opóźniona względem podłoża inokulacyjnego z płatkami owsianymi.

Niewątpliwie produkcja transglutaminazy jest związana ze wzrostem komórek (Meiying i wsp., 2002), natomiast ważnym elementem w obecnej pracy było sprawdzenie jak każdy zmieniający się parametr badań (podłoże inokulacyjne, jego dawka i wiek; źródło azotu lub parametry prowadzenia hodowli) wpływa na aktywność wydzielanej transglutaminazy. Niezależnie od użytego podłoża przednamnażającego wyniki aktywności MTG po 24 godzinach hodowli nie przekraczały 1 U/mL (0,77 i 0,93 U/mL dla TSB i O3 odpowiednio) i nie różniły się między sobą statystycznie. W kolejnej dobie hodowli wyniki istotnie zwiększyły się, osiągając wartości 3,94 i 5,05 U/mL, odpowiednio dla podłoży inokulacyjnych TSB i O3. Po 72 godzinach hodowli zaobserwowano najwyższą aktywność transglutaminazy, uzyskaną z podłoża TSB do przednamnażania biomasy (6,59 U/mL). Namnażanie biomasy w podłożu z płatkami owsianymi po 72 godzinach hodowli pozwoliło uzyskać aktywność MTG na poziomie 4,1 U/mL, co było istotnie mniejsze względem tego samego podłoża inokulacyjnego z wcześniejszej doby oraz względem podłoża TSB z tej samej jednostki czasowej. Wyniki uzyskane po 96 godzinach hodowli kształtowały się na poziomie 4,73 i 2,72 U/mL, kolejno dla podłoży TSB i O3.

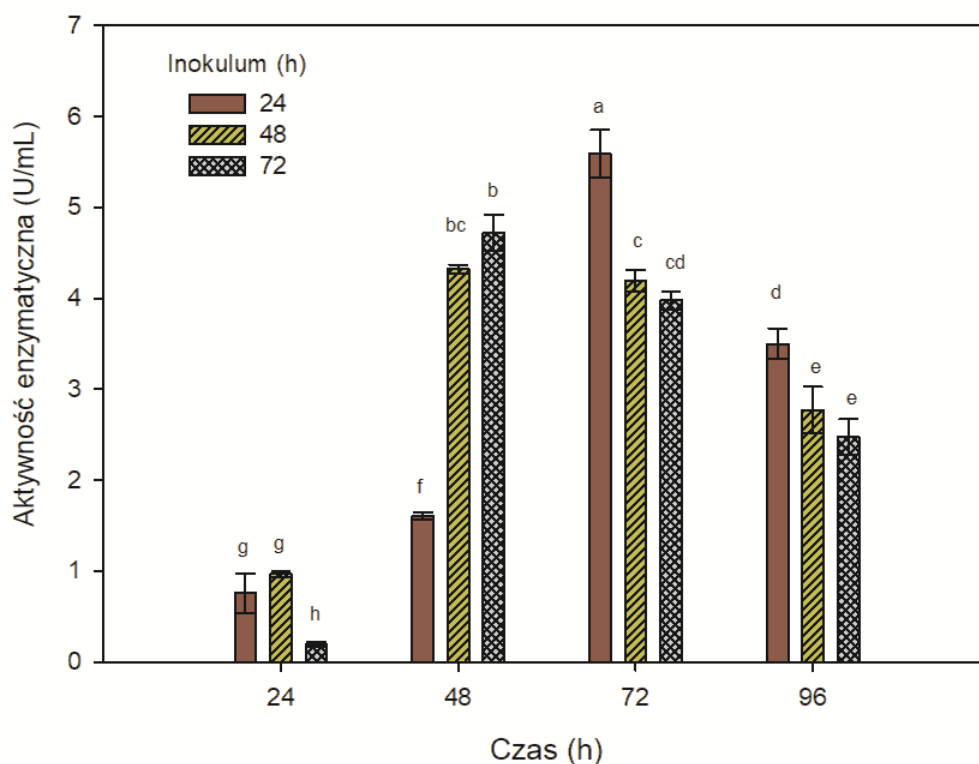
Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić, że wykorzystanie bulionu tryptonowo-sojowego pozwala uzyskać istotnie większe wyniki aktywności transglutaminazy (6,59 U/mL) względem podłoża O3 z płatkami owsianymi (5,05 U/mL). Warto zwrócić uwagę, że wytworzenie maksymalnej aktywności MTG zajęło 72 godziny dla biomasy namnożonej w podłożu TSB i 48 godzin – w podłożu O3. Dana obserwacja jest zgodna z wcześniejszymi wnioskami, że komórki *S. cinnamoneum* KKP 1658 charakteryzują się wydłużoną początkową fazą wzrostu w podłożu badawczym po namnożeniu w podłożu TSB w porównaniu do podłoża O3. Użycie podłoża O3 przekłada się na szybsze opanowanie środowiska i rozpoczęcie produkcji transglutaminazy.

Biorąc pod uwagę powyższe badania, podłoże inokulacyjne TSB pozostało pierwszym wyborem, mimo konieczności prowadzenia hodowli przez 72 godziny. Przeprowadzono kolejne badania, które miały na celu ustalenie optymalnego czasu przednamnażania komórek w podłożu inokulacyjnym TSB.

Sprawdzono jak prowadzenie przednamnażania przez 24, 48 i 72 godziny wpływa na plon biomasy (**rys. 6**) oraz aktywność uzyskanej transglutaminazy (**rys. 7**).



Rys. 6 Wpływ czasu przednamnażania (24, 48 i 72 godziny) szczepu *S. cinnamoneum* na wydajność biomasy w 96-godzinnej hodowli. ^{a-g} Średnie oznaczone tą samą literą nie wykazują istotnych różnic statystycznych



Rys. 7 Wpływ czasu przednamnażania (24, 48 i 72 godziny) szczepu *S. cinnamoneum* na aktywność wytwarzanej transglutaminazy w 96-godzinnej hodowli. ^{a-h} Średnie oznaczone tą samą literą nie wykazują istotnych różnic statystycznych

Zmierzono plon biomasy w podłożu inokulacyjnym przed zaszczepieniem podłoża badawczych. Namnażanie przez 48 godz. w podłożu TSB skutkowało otrzymaniem większej ilości biomasy (7,1 g s.s./L) w porównaniu do czasu 24 (3,86 g s.s./L) i 72 godzin (4,61 g s.s./L).

Po 24 godzinach hodowli właściwej, największy przyrost biomasy zaobserwowano w podłożu, które było zaszczepione 72-godzinnym inokulum – 13,37 g s.s./L, podłoża zaszczepione 24 i 48-godzinnym inokulum charakteryzowały się istotnie niższym plonem biomasy (9,37 - 9,47 g s.s./L). Największy plon biomasy uzyskano po 48 godzinach hodowli w podłożu z dodatkiem 48-godzinnego inokulum (19,97 g s.s./L), a biomasa z pozostałych podłoży odznaczała się istotnie mniejszymi wynikami plonu zarówno w tej, jak i w następnych jednostkach czasowych. Większość pozostałych wyników charakteryzowała się plonem biomasy w przedziale 15,91 - 17,34 g s.s./L.

Po 24 godzinnej hodowli szczepu *S. cinnamoneum* KKP 1658 w podłożu hodowlanym z aminobakiem i namokiem kukurydzianym, niezależnie od wieku zastosowanego inokulum, aktywność oznaczonej transglutaminazy nie przekroczyła 1 U/mL. Istotny wzrost odnotowano w następnej dobie hodowli, gdzie podłoża szczepione 48 i 72-godzinnym inokulum

charakteryzowały się aktywnością transglutaminazy na poziomie, odpowiednio 4,32 i 4,72 U/mL. Największy przyrost biomasy nie przełożył się na największy wynik aktywności MTG, ponieważ taki uzyskano dla podłoża z dodatkiem 24-godzinnego inokulum i prowadzeniem hodowli właściwej przez 72 godziny (5,59 U/mL). Aktywność transglutaminazy w pozostałych podłożach w trzeciej dobie hodowli była istotnie mniejsza, jak również w ostatniej dobie hodowli.

Przeprowadzone badania dostarczyły istotnych informacji na temat optymalnego czasu prowadzenia przednamnażania komórek badanego szczepu promieniowców. Ustalono, że największe wyniki aktywności transglutaminazy uzyskuje się prowadząc hodowlę szczepu *S. cinnamoneum* KKP 1658 przez 72 godziny, a proces przednamnażania w podłożu inokulacyjnym TSB przez 24 godziny.

Kolejnym etapem badań było sprawdzenie jak zmieniająca się dawka inokulum wpływa na aktywność transglutaminazy. W tym celu do podłoża hodowlanego z aminobakiem i namokiem kukurydzianym dodano inokulum w objętości 5, 10 i 15 %, następnie prowadzono hodowlę przez 72 godziny, po zakończeniu których zbadano aktywność wytworzonej transglutaminazy. Dodatek zawiesiny inokulacyjnej w objętości 5 % do podłoża hodowlanego, po 72 godzinach hodowli przełożył się na aktywność transglutaminazy na poziomie 4,5 U/mL. Dawka inokulum w objętości 5 % istotnie obniżyła aktywność MTG względem podłoża z dodatkiem 10 % inokulum (5,46 U/mL). Odnotowano, że 15 % dawka inokulum nie wpływa statystycznie na aktywność transglutaminazy (5,43 U/mL) względem 10 % inokulum.

Podsumowując, dodatek zawiesiny inokulacyjnej w dawce 10 % do podłoża hodowlanego i prowadzenie hodowli przez 72 godziny zapewnia największą wydajność produkowanej transglutaminazy przez badany szczep *Streptoverticillium cinnamoneum* KKP 1658.

4.1.3 Wpływ początkowego pH pożywki na biosyntezę MTG

Szybkość produkcji MTG, jej aktywność oraz wydajność w podłożach hodowlanych różnią się w zależności od składu medium i warunków środowiskowych, w tym pH. Aby osiągnąć maksymalną szybkość produkcji MTG, konieczne jest określenie optymalnych warunków wzrostu komórek i produkcji MTG podczas fermentacji. Wpływ pH na produkcję MTG jest istotnym, ale słabo zbadanym aspektem (Meiying i wsp., 2002; Kieliszek i Misiewicz, 2014).

Na podstawie opracowań dostępnej literatury początkowe pH podłoża eksperymentalnego ustalano na poziomie 6,5, natomiast początkowe pH podłoża

inokulacyjnego – 7,0 (Meiying i wsp., 2002; Kieliszek i Misiewicz, 2014; Pietrachha i wsp., 2015). Zbadano jak początkowe pH pożywki na poziomie 5,0; 5,5; 6,0; 6,5 i 7,0 wpłynęło na aktywność transglutaminazy w płynie pochowlanym. Największą aktywność transglutaminazy uzyskano dla podłoża o początkowym pH wynoszącym 6,0 – 4,14 U/mL. Kolejną grupę jednorodną tworzyły podłoża o początkowym pH na poziomie 5,0 i 5,5, które charakteryzowały się aktywnością MTG, odpowiednio 3,43 i 3,31 U/mL. Najmniejszą uzyskaną aktywność mikrobiologicznej transglutaminazy otrzymano po hodowli w podłożu o początkowym pH wynoszącym, kolejno: 6,5 i 7,0 – 2,63 i 2,35 U/mL.

4.2 Dyskusja do badań wstępnych

Mikrobiologiczna transglutaminaza jest produkowana przez wiele różnych rodzajów bakterii, grzybów oraz promieniowców. Przeprowadzono liczne badania w celu zidentyfikowania mikroorganizmów zdolnych do wytwarzania tego enzymu (Kieliszek i Misiewicz, 2014; Akbari i wsp., 2021). W wyniku tych badań ustalono, że szczepy bakterii *Streptomyces* sp. CBMAI 1617 (SB6) (Ceresino i wsp., 2018) oraz *Actinomycetes* (Eshra i wsp., 2015) wykazują odpowiednio najwyższą (~6 U/mL) i najniższą (~0,04 U/mL) aktywność omawianego enzymu.

Odkrycie i wyizolowanie szczepu *Streptomyces mobaraense* (Washizu i wsp., 1994) stanowiło pierwszy krok w kierunku szerokiego wykorzystania komercyjnego tego enzymu. Następnie zidentyfikowano wiele różnych szczepów mikroorganizmów, takich jak *Streptomyces lydicus* (Færgemand i Qvist, 1997), *Streptomyces cinnamoneum* CBS 683.68 (Duran i wsp., 1998) oraz *Streptomyces* sp. CBMAI 837 (Macedo i wsp., 2007), które mogą produkować zewnątrzkomórkową transglutaminazę. Okazało się, że parametry wydajności oraz biochemicznej charakterystyki syntetyzowanej MTG znacznie różnią się w zależności od szczepu (Kieliszek i Misiewicz, 2014; Akbari i wsp., 2021). Nadal trwają prace nad izolowaniem nowych szczepów mikroorganizmów zdolnych do produkcji MTG z wysoką wydajnością, pochodzących z różnych źródeł środowiskowych (Zhang i wsp., 2009; Ceresino i wsp., 2018). Warto podkreślić, że przy ocenie potencjału nowych szczepów do produkcji enzymów kluczowe jest dostosowanie odpowiedniego składu pożywki do hodowli tych konkretnych szczepów (Ceresino i wsp., 2018).

Mimo powszechnego stosowania transglutaminazy w różnych gałęziach przemysłowych (Akbari i wsp., 2021), szczep *S. mobaraense* nadal jest jedynym mikroorganizmem wykorzystywanym do komercyjnej produkcji MTG. Niestety obserwuje się

poważny brak wiedzy na temat optymalizacji produkcji transglutaminazy przez niemodyfikowane genetycznie szczepy z rodzaju *Streptoverticillium*, w tym, *S. cinnamoneum*. Z tego względu wyniki badań niniejszej pracy doktorskiej należy porównać do dostępnych aktualnie publikacji na temat produkcji i aktywności mikrobiologicznej transglutaminazy różnych szczepów z rodzaju *Streptoverticillium*/*Streptomyces*.

Najwięcej wyników badań w dostępnej literaturze poświęca się modelowemu przedstawicielowi promieniowców *S. mobaraense*. W pracy Kieliszek i Misiewicz (2014) autorzy przedstawili zestawienie aktualnej, na ten czas wiedzy, na temat aktywności transglutaminazy produkowanej przez *S. mobaraense*. W badaniach prowadzonych w latach 1994 – 2012 aktywność MTG uzyskiwana dla tego szczepu mieściła się w zakresie 0,9 – 3,4 U/mL. Inne szczepy z rodzaju *Streptoverticillium*, takie jak *S. lividans*, *S. lydicus*, *S. platensis*, *S. sioyansis*, *S. griseocarneum* charakteryzowały się aktywnością MTG z zakresu 1,3 – 2,2 U/mL.

W pracy Guerra-Rodriguez i Vazquez (2014), która skupiała się na optymalizacji podłoża hodowlanego, odnotowano aktywność transglutaminazy na poziomie 2,95 U/mL dla *Streptomyces mobaraensis* CECT 3230. Dwa lata później Jin i wsp. (2016) oznaczyli aktywność MTG wynoszącą 1,75 U/mL dla *Streptomyces mobaraensis* TX. W 2017 roku Xavier i wsp. (2017) na drodze optymalizacji pożywek dla *Streptomyces* sp. uzyskali aktywność transglutaminazy na poziomie 4,1 U/mL, co było wynikiem rekordowym w świetle literatury tematu.

W 2018 roku Ceresino i wsp. (2018) wyizolowali nowy szczep *Streptomyces* sp. CBMAI 1617 (SB6), który (w podłożu o składzie 2,5 % śruty sojowej, 2 % skrobi ziemniaczanej, 0,1 % glukozy, 1,0 % peptonu bakteriologicznego, 0,4 % $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ i 0,2 % $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7,0) był zdolny biosyntetyzować MTG o aktywności 6,07 U/mL.

Wyniki opublikowane w artykule **P2** dostarczają nowych wartości aktywności transglutaminazy dla rzadko opisywanego szczepu *S. cinnamoneum*. Badany szczep charakteryzował się, na różnych etapach badań, wartościami aktywności MTG w zakresie od 4,14 do 6,59 U/mL. Najwyższy uzyskany wynik był o 8,57% wyższy od wartości raportowanej przez zespół Ceresino (2018) dla szczepu *Streptomyces* sp. CBMAI 1617, co wskazuje na duży potencjał do prowadzenia dalszych badań nad szczepem *S. cinnamoneum* KKP 1658.

Kolejnym bardzo ważnym zagadnieniem w badaniach nad otrzymywaniem transglutaminazy jest skład podłoża, a co ważniejsze – jego koszty, które mogą stanowić niemal 30 % ogólnych kosztów związanych z procesem biosyntezy (Téllez-Luis i wsp., 2004). W większości badań dotyczących biosyntezy MTG ze szczepów *Streptomyces* sp., skład

pożywek jest niemal identyczny. Glukoza i rozpuszczalna skrobia są powszechnie wykorzystywanymi źródłami węgla, natomiast aminobak, pepton i ekstrakt drożdżowy stanowią popularne źródła azotu w pożywkach hodowlanych do produkcji MTG (Ando i wsp., 1989; Akbari i wsp., 2021). Podłoża zawierają także źródła niezbędnych pierwiastków, np.: fosforan sodu, fosforan potasu, siarczan magnezu (Guerra-Rodríguez i Vázquez, 2014). Okazuje się, że suplementacja solami może efektywnie zwiększyć biosyntezę MTG, prawdopodobnie poprzez przyspieszenie przekształcania pro-MTGazy w dojrzałą domenę enzymatyczną na skutek zwiększenia ogólnej produkcji proteazy (Fatima i wsp., 2019). Zgodnie z wynikami Ceresino i wsp. (2018) diwodorofosforan potasu należy do składników o najbardziej pozytywnym i znaczącym wpływie na biosyntezę transglutaminazy, dlatego był jednym ze składników podłoży wykorzystywanych w niniejszej pracy.

W ciągu ostatnich kilku lat stosowanie surowców odpadowych lub odnawialnych stało się kluczowym elementem przemysłowych procesów produkcyjnych i elementem zrównoważonego rozwoju (Beltran-Ramirez i wsp., 2019). Takie podejście umożliwia efektywną waloryzację odpadów rolnych w wysokowartościowe produkty biotechnologiczne. Jest to istotne zarówno z punktu widzenia ochrony środowiska, jak i wsparcia przedsiębiorców poprzez częściowe ograniczenie kosztów produkcji (Lima i wsp., 2023). Do innych produktów ubocznych z przemysłu rolno spożywczego można zaliczyć melasę z trzciny cukrowej, otręby pszenne i owsiane, śrutę sojową, ziemniaczaną wodę sokową, pulpę ziemniaczaną lub mąkę owocową, które mogą być wykorzystane w pożywkach mikrobiologicznych (Preichardt i wsp., 2019; Kot i wsp., 2020a).

W badaniu Preichardt i wsp. (2019) opracowano pożywkę hodowlaną na bazie melasy z trzciny cukrowej (SCM) z dodatkiem ekstraktu drożdżowego (YE) i mączki sojowej (SM) do produkcji biomasy *Staphylococcus xylosus* AD1. Użyto do tego celu wieloczynnikowego projektu optymalizacji Boxa Behnkena. Optymalne warunki hodowli uzyskano przy stężeniach 10 % SCM, 2 % YE i 4 % SM, co pozwoliło otrzymać maksymalny przyrost żywej biomasy. Wszystkie pożywki, poza zawierającą wyłącznie SCM, wykazały lepszą skuteczność w hodowli *S. xylosus* AD1 niż komercyjna pożywka Brain Heart Infusion. Pożywka z SCM, YE i SM według Preichardt i wsp. (2019) jest doskonałą alternatywą dla produkcji biomasy *S. xylosus* AD1.

W innym badaniu (Kot i wsp., 2020b) sprawdzono możliwość wykorzystania ścieków ziemniaczanych i frakcji glicerolowej jako pożywki do biosyntezy lipidów i karotenoidów przez drożdże *Rhodotorula gracilis* ATCC 10788 w bioreaktorze. Hodowle prowadzono w temperaturach 20 i 28 °C przez 96 godzin. Najwyższa zawartość lipidów (19 g/100

g biomasy) wystąpiła w trzecim i czwartym dniu, z dominacją kwasu linolowego (ok. 28 %) po 96 godzinach. Maksymalną wydajność biosyntezy karotenoidów (6,24 mg/L) osiągnięto po 96 godzinach, β -karoten stanowił k. 47 %, torulen ok. 51 %, a torularodyna poniżej 1 %. Wyniki wskazują, że biomasa *R. gracilis* może być dobrym źródłem lipidów i karotenoidów, a bioreaktorowa metoda hodowli może zmniejszyć szkodliwość biopaliw z odpadów przemysłowych i skrobi na środowisko.

Pożywki mikrobiologiczne stosowane do hodowli szczepów z rodzaju *Streptoverticillium* nie są zazwyczaj ekonomicznie opłacalne ze względu na wysoką ilość kosztownych składników odżywczych takich, jak ekstrakt drożdżowy i pepton (Kieliszek i Misiewicz, 2014; Ceresino i wsp., 2018;). W wielu publikacjach omawia się możliwość wykorzystania odpadów rolniczych jako źródła węgla lub azotu do produkcji transglutaminazy (Akbari i wsp., 2021). Badacze Guerra-Rodríguez i Vázquez (2014) przeprowadzili ocenę biosyntezy MTG przez *S. mobaraensis*, wykorzystując podłoże oparte na ziemniakach. Zgodnie z ich wynikami, najlepszą pożywką okazał się żelowany, niezhydrolizowany ziemniak, co umożliwiło uzyskanie aktywności enzymu na poziomie do 2,72 U/mL po 96 godzinach hodowli. W innym badaniu przeprowadzonym przez Téllez-Luis i wsp. (2004) oceniono biosyntezę transglutaminazy przez *Streptoverticillium ladakanum* NRRL-3191, stosując pożywkę zawierającą mieszaninę hydrolizatu słomy sorgo i ksylozy w stężeniu 20 g/L. W wyniku tych eksperymentów uzyskano poziom aktywności enzymu wynoszący 0,348 U/mL po 72 godzinach hodowli. W badaniu przeprowadzonym przez Portilla-Rivera i wsp. (2009) oceniano biosyntezę MTG przez *S. ladakanum* NRRL-3191 w pożywkach przygotowanych z melasy, trzciny cukrowej i glicerolu. Wyniki wykazały, że najwyższą aktywność MTGazy (0,460 U/mL) uzyskano w pożywce zawierającej mieszaninę melasy i glicerolu. W podłożach zawierających wyłącznie melasę z trzciny cukrowej i tylko glicerol aktywność enzymu wynosiła, odpowiednio: 0,240 U/mL i 0,250 U/mL.

W niniejszej pracy doktorskiej podjęto próbę użycia namoku kukurydzianego jako źródła azotu, w celu ograniczenia użycia kosztownych czystych źródeł tego makroelementu, np. w postaci aminobaku. Namok kukurydziany (z ang. Corn Steep Liquor - CSL) jest produktem wytwarzanym w przemyśle mielenia na mokro kukurydzy. Cechuje się on wysoką zawartością aminokwasów, polipeptydów i witamin z grupy B (Kim i wsp., 2020). Badania wykazały, że namok jest doskonałym źródłem azotu dla większości mikroorganizmów (Yu i wsp., 2008), szczególnie z rodzaju *Streptomyces* (Nascimento i wsp., 2009). W warunkach hodowli z wykorzystaniem podłoża zawierającego namok kukurydziany, szczep *S. cinnamoneum* KKP 1658 osiągnął aktywność transglutaminazy na poziomie odpowiednio

1,57; 1,95; 1,38 oraz 0,88 U/mL po 24, 48, 72 i 96 godzinach inkubacji. Porównując do innych odpadowych składników podłoży opisanych wyżej, użycie namoku kukurydzianego przekłada się na stosunkowo wysokie aktywności MTG.

Warunki środowiskowe, takie jak temperatura i pH są kluczowe dla efektywnej biosyntezy MTG i muszą być zoptymalizowane, aby poprawić aktywność tego enzymu. Jednak różne badania w tej dziedzinie często prezentują sprzeczne wyniki, co może być spowodowane odmiennością stosowanych szczepów mikroorganizmów, składem pożywek oraz innymi warunkami eksperymentalnymi. Oto kilka przykładów z badań: Zhang i wsp. (2012) hodowali *S. mobaraensis* DSM 40587 w temperaturze 30 °C przy pH 7,0; Jin i wsp. (2016) hodowali *S. mobaraensis* DSM 40847 w 30 °C, ale przy pH 7,4; Turker i wsp. (2016) ustalili, że optymalne warunki dla najwyższej aktywności enzymu to pH 6,0 i temperatura 30 °C, przy 14-dniowym czasie hodowli.

Wydaje się, że temperatura w zakresie 28 – 30 °C i pH około 7,0 jest często korzystna do uzyskania wysokiej aktywności MTG. Jednak czas fermentacji może różnić się w zależności od warunków hodowli i celowanej aktywności enzymu i wynosi zazwyczaj 72 – 96 godzin. Ważne jest, aby eksperymentalnie zoptymalizować te parametry w danym przypadku, co pozwoli uzyskać możliwie najwyższą wydajność biosyntezy MTG (Kieliszek i Misiewicz, 2014; Akbari i wsp., 2021).

Ze względu na sprzeczne wyniki literaturowe dotyczące optymalnych warunków prowadzenia hodowli dla szczepów z rodzaju *Streptoverticillium*, a także braku badań nad szczepem *S. cinnamoneum* KKP 1658 postanowiono użyć temperatury 28 °C i na podstawie własnych analiz dobrać początkowe pH pożywki z zakresu 5,0 – 7,0. Podsumowując uzyskane wyniki **P2**, można przypuszczać, że podłoże o początkowym pH 6,0 charakteryzuje gwarantuje uzyskanie większej aktywności transglutaminazy niż podłoże o pozostałych wartościach początkowego pH.

Wyniki przedstawione w publikacji **P2** wykazały, że połączenie komercyjnego aminobaku z odpadowym namokiem kukurydzianym w stosunku 1:1 może zapewnić większą aktywność transglutaminazy niż wymienione źródła azotu osobno. Takie rozwiązanie pozwoli uzyskać najwyższą aktywność MTG – do 6,59 U/mL. Takie rozwiązanie wiąże się z wymiernymi korzyściami ekonomicznymi, zastępując połowę dawki drogiego aminobaku lub peptonu odpadowym namokiem kukurydzianym można zmniejszyć koszty produkcji MTG o wysokiej aktywności. Wysoki wynik aktywności MTG w warminacie aminobak + namok kukurydziany w stosunku 1:1 może być związany ze składem surowca odpadowego, który jest

bogaty w witaminy i aminokwasy, tak ważne w metabolizmie drobnoustrojów i mikrobiologicznej syntezie transglutaminazy.

4.3 Optymalizacja warunków hodowli w kolbach laboratoryjnych

W kontekście rosnącego zapotrzebowania na efektywne i ekonomiczne metody produkcji enzymów, artykuł **P3** koncentruje się na identyfikacji i optymalizacji kluczowych czynników wpływających na wydajność produkcji transglutaminazy przez *Streptoverticillium cinnamoneum* KKP 1658 w hodowlach kolbowych (kolby Erlenmeyera). Wykorzystanie metody RSM pozwala na systematyczne badanie wpływu różnych parametrów procesowych oraz ich interakcji, co umożliwia ustalenie optymalnych warunków hodowli. Poniższe wyniki i ich omówienie wyjaśniają proces produkcji oraz sugerują ulepszenia, które mogą zwiększyć wydajność i obniżyć koszty wytwarzania transglutaminazy. Aby znaleźć optymalne warunki hodowli *Streptoverticillium cinnamoneum* KKP 1658 w hodowlach okresowych należy określić kluczowe czynniki wpływające na produkcję mikrobiologicznej transglutaminazy. Na podstawie wcześniejszych eksperymentów (Kolotyło i wsp., 2024) wytypowano główne czynniki wpływające na biosyntezę transglutaminazy przez szczep *Streptoverticillium cinnamoneum* KKP 1658. W **tabeli 4** przedstawiono wybrane zakresy dawek źródła azotu (A), czasu hodowli (B) i początkowego pH (C) (kodowanych jako -1, 0 i 1, gdzie -1 oznacza wartość minimalną danego zakresu, 1 - wartość maksymalną zakresu) wykorzystanych w niniejszej pracy.

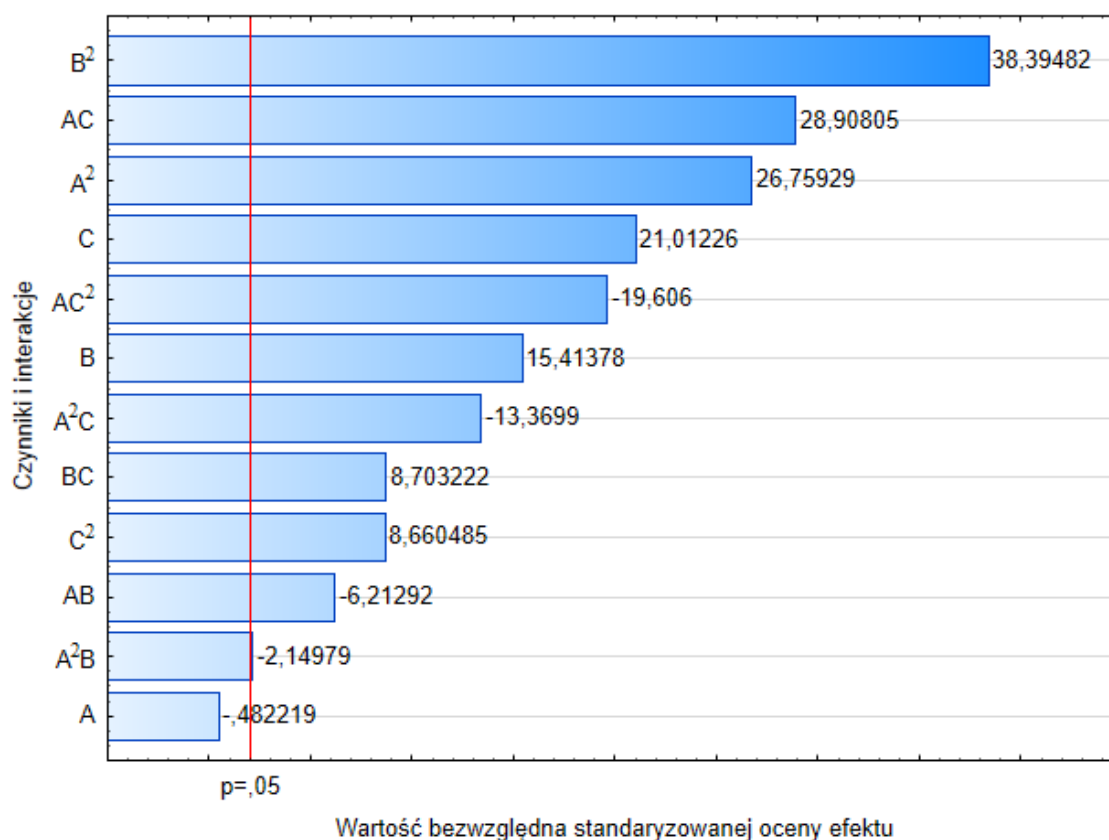
Tab. 4 Poziomy zakodowane dla czynników niezależnych zastosowanych w projekcie eksperymentalnym

Czynnik (zmienna niezależna)	Symbol	Rzeczywiste wartości odpowiadające zakodowanym poziomom czynników		
		-1	0	1
Dawka źródła azotu (%)	A	1	2	4
Czas hodowli (h)	B	24	48	72
Początkowe pH pożywki	C	5,5	6	6,5

W celu optymalizacji warunków do produkcji transglutaminazy przez szczep *Streptoverticillium cinnamoneum* KKP 1658 zaprojektowano doświadczenie zgodnie z założeniami dla planów frakcyjnych trójwartościowych według Box-Behnken'a dla trzech czynników. W sumie przeprowadzono 15 eksperymentów, składających się z 12 różnych kombinacji trzech czynników i 3 powtórzeń w punkcie centralnym. Dane eksperymentalne

wykorzystano do wygenerowania współczynników modelu wielomianu kwadratowego, natomiast dla każdej zmiennej zależnej skonstruowano wykresy powierzchniowe w celu zobrazowania pola powierzchni odpowiedzi. Dane eksperymentalne dla planu statystycznego Box-Behnken'a przedstawiono w **tabeli 3** (p. 3.2.13). Obliczono wartości współczynników regresji oraz dopasowane równania do przewidywania aktywności transglutaminazy ($X = -294,69 + 112,76 \times A - 4,88 \times A^2 + 96,62 \times C - 8,08 \times C^2 - 34,45 \times A \times C + 2,69 \times A \times C^2 + 0,71 \times A^2 \times C - 0,02 \times B \times A + 0,002 \times B \times A^2 + 0,03 \times B \times C + 1,74$, gdzie A to dawka źródła azotu, B – czas hodowli, C – początkowe pH pożywki). Wartości prognozowane obliczone z powyższego równania wykazywały doskonałą zgodność z danymi doświadczalnymi. Otrzymane wartości wskazują na przydatność opracowanego modelu kwadratowego dla obecnej konfiguracji doświadczalnej do produkcji transglutaminazy przez szczep *S. cinnamoneum* KKP 1658.

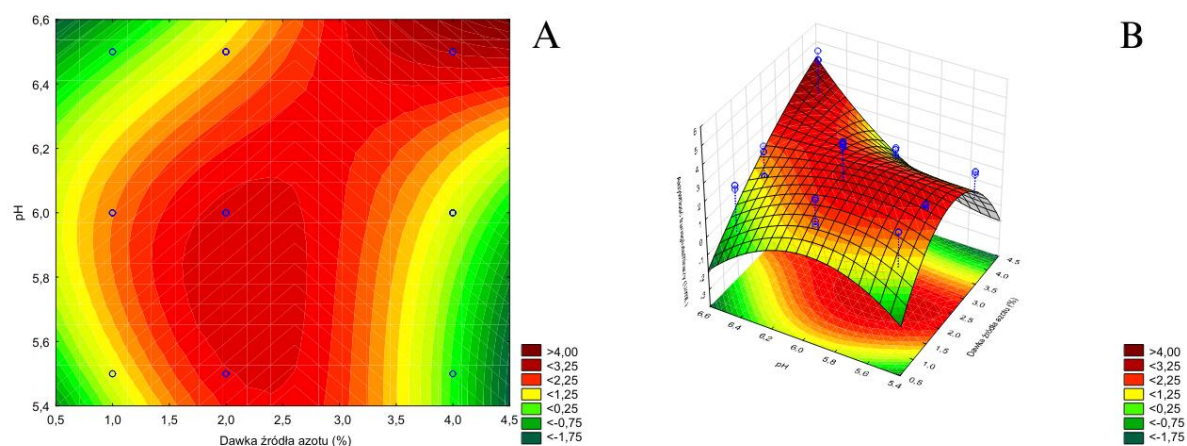
Słuszność dopasowania modelu eksperymentu do uzyskanych wyników aktywności transglutaminazy została wyrażona współczynnikiem determinacji R^2 . W tym przypadku wartość R^2 wynosząca 99,4 % wskazuje, że model odpowiedzi może wyjaśnić ponad 99 % wszystkich wariancji. Do określenia istotności czynników modelowych zastosowano poziom istotności 0,05 (p -value), gdzie wartości powyżej tego progu są uznawane za nieistotne, a wartości poniżej wskazują na istotność. Wykorzystując wartości F -value określono stopień wpływu badanych czynników na aktywność produkowanej transglutaminazy. Bardzo niskie wartości prawdopodobieństwa (p -value < 0,0001) sugerują, że wysokie wartości F -value nie wynikają jedynie z przypadkowych szumów, które są nieodłącznym elementem doświadczeń laboratoryjnych (Liu i wsp., 2023).



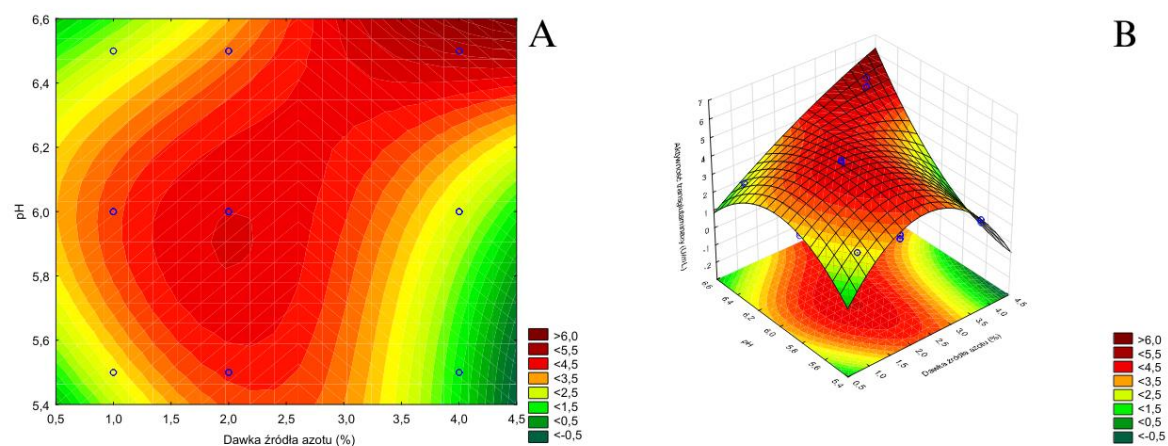
Rys. 8 Wykres Pareto znormalizowanych efektów (odpowiedź: aktywność transglutaminazy U/mL), gdzie **A** – dawka azotu, **B** – czas hodowli, **C** - początkowe pH

W celu wizualizacji wpływu poszczególnych składników na aktywność otrzymanej transglutaminazy wygenerowano wykres Pareto (**rys. 8**), na którym zamieszczono wartości bezwzględne standaryzowanego testu t-studenta i naniesiono linię odpowiadającą poziomowi istotności 0,05. W omawianym doświadczeniu liniowy wpływ czynnika A (dawka źródła azotu) jako jedyny okazał się być nieistotny, natomiast efekt kwadratowy tego czynnika był trzeci z kolei według wartości bezwzględnej standaryzowanego testu t-studenta. Dla każdego badanego czynnika (**tab. 4**) wpływającego na produkcję transglutaminazy przez *S. cinnamoneum* KKP1658 na **rysunku 8** przedstawiono efekty liniowe, nieliniowe (kwadratowe) oraz ich interakcje. Istotna kolejność, w jakiej badane czynniki liniowo wpływają na wartość aktywności transglutaminazy jest następująca: początkowe pH (C) > czas hodowli (B) > dawka źródła azotu (A), natomiast efekty kwadratowe prezentują się w następujący sposób: czas hodowli (B) > dawka źródła azotu (A) > pH (C). Analizując uzyskane wyniki można zaobserwować, że największy wpływ na produkcję MTG ma efekt kwadratowy czynnika B (czasu hodowli), czyli największą wydajność osiąga się po około 48 godzinach hodowli. Warto zwrócić uwagę na wpływ liniowej interakcji czynników AC (dawki źródła azotu wraz z czasem hodowli), która według analizy statystycznej miała drugi co do

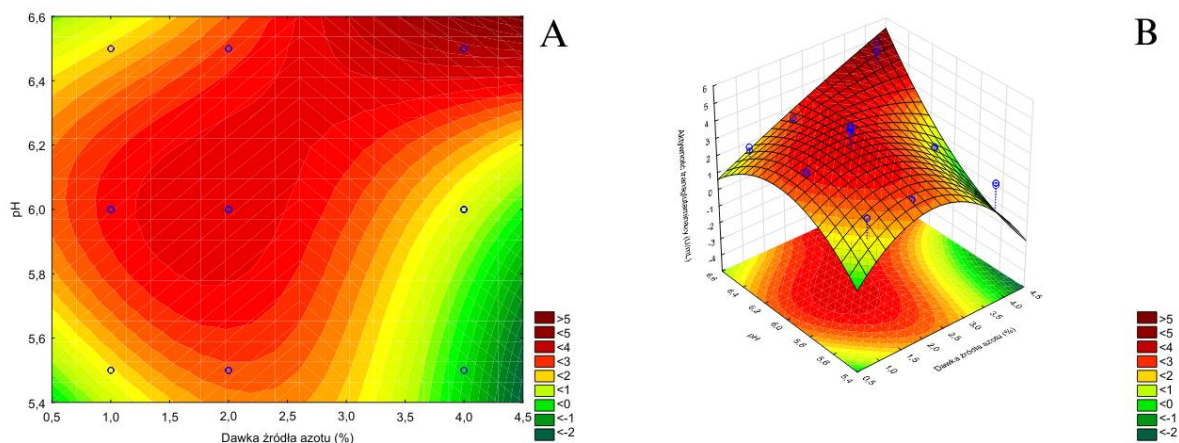
ważności wpływ na aktywność uzyskanej MTG. Na **rysunkach 9, 10 i 11** przedstawiono trójwymiarowe wykresy pola powierzchni odpowiedzi predykcyjnego modelu kwadratowego.



Rys. 9 Powierzchnia odpowiedzi dla aktywności MTG po 24 godzinach hodowli przez szczep *Streptovorticillium cinnamoneum* KKP 1658 – interakcja między dawką źródła azotu a początkowym pH. (A – wykres 2D, B – wykres 3D)



Rys. 10 Powierzchnia odpowiedzi dla aktywności MTG po 48 godzinach hodowli przez szczep *Streptovorticillium cinnamoneum* KKP 1658 – interakcja między dawką źródła azotu a początkowym pH. (A – wykres 2D, B – wykres 3D)



Rys. 11 Powierzchnia odpowiedzi dla aktywności MTG po 72 godzinach hodowli przez szczep *Streptovercillium cinnamoneum* KKP 1658 – interakcja między dawką źródła azotu a początkowym pH. (A – wykres 2D, B – wykres 3D)

Wykorzystano wykresy powierzchni odpowiedzi 3D w celu określenia optymalnych warunków produkcji transglutaminazy. Hodowla *Streptovercillium cinnamoneum* KKP 1658 przez 24 i 72 godziny prowadzi do produkcji MTG o aktywności nie przekraczającej 4 U/mL (**rys. 9 i 11**). Ponadto zaobserwowano, że wartości aktywności transglutaminazy > 4 U/mL uzyskano po 48 godzinach hodowli doświadczalnej, co potwierdzają wyniki rzeczywiste oraz wyniki przewidywane przez model. Najwyższe aktywności MTG po 48 godzinach hodowli na **rysunku 10** są umiejscowione w obszarach odpowiadających początkowemu pH z zakresu 6,4 – 6,6 oraz wysokim dawkom źródła azotu > 4 %. Tak wyznaczone warunki, uzyskane przy użyciu modelu statystycznego RSM, umożliwiłyby osiągnięcie aktywności MTG przekraczającej 6 U/mL, co potwierdziło **hipotezę 2** dotyczącą możliwości zwiększenia wydajności biosyntezy enzymu poprzez odpowiedni dobór parametrów hodowli.

W celu zweryfikowania uzyskanych w warunkach laboratoryjnych wyników, a także oceny ich powtarzalności przy zmianie skali procesu, przeprowadzono kolejne badania z wykorzystaniem fermentacji w bioreaktorze. W doświadczeniach tych celowo zastosowano identyczne poziomy zmiennej niezależnych (dawka źródła azotu, początkowe pH, czas hodowli), aby umożliwić bezpośrednie porównanie danych z obu etapów eksperymentów oraz potwierdzić **hipotezę 3** dotyczącą wpływu skali produkcji na końcową aktywność enzymatyczną. Poniżej zaprezentowano wyniki badań prowadzonych w warunkach bioreaktorowych, wraz z analizą zmian aktywności MTG w zależności od zastosowanych warunków hodowli.

4.4 Zmiana skali procesu produkcji MTG – hodowla w bioreaktorze laboratoryjnym

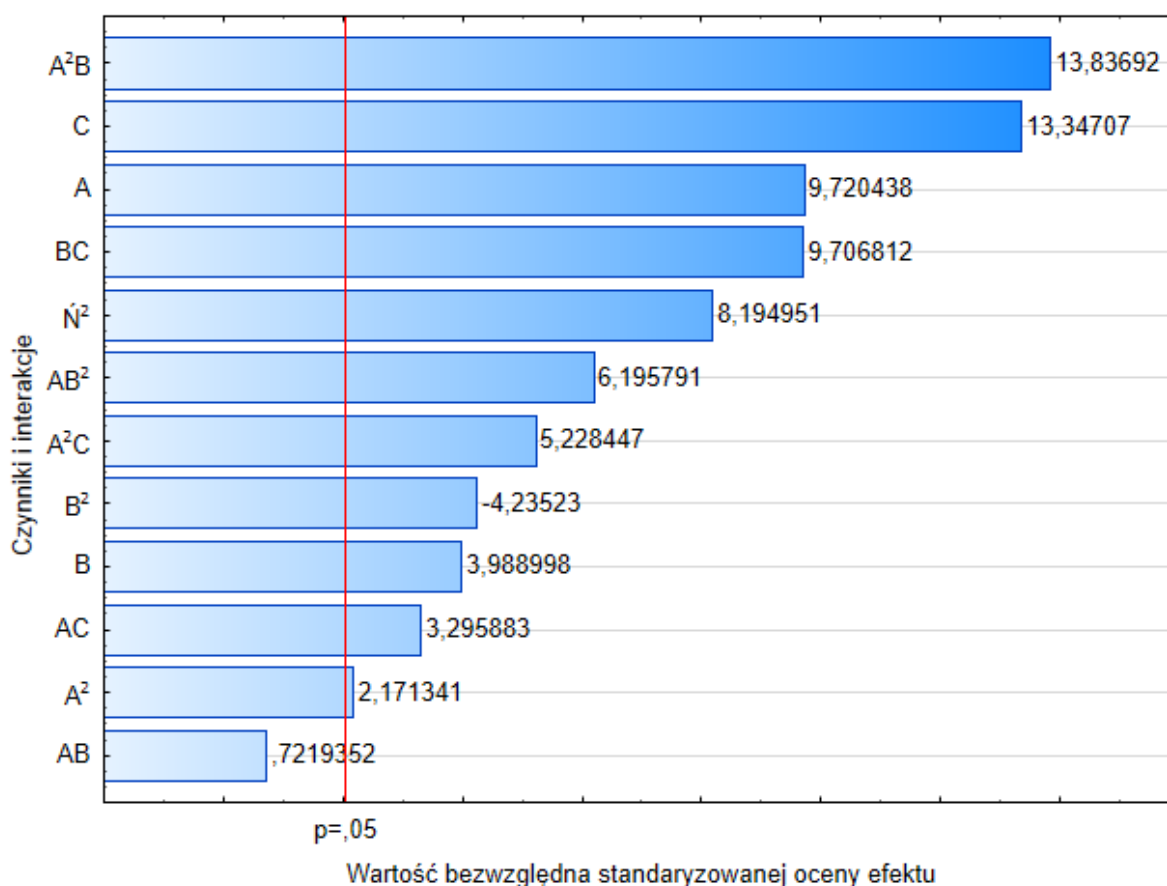
Optymalizacja procesów biotechnologicznych jest kluczowa dla zwiększenia wydajności produkcji enzymów, takich jak mikrobiologiczna transglutaminaza. Precyzyjne dostosowanie parametrów hodowli mikroorganizmów umożliwia uzyskanie wyższej aktywności enzymatycznej oraz poprawę jakości produktu końcowego. Wstępne badania nad optymalizacją produkcji MTG przez szczep *Streptoverticillium cinnamoneum* KKP 1658 przeprowadzono w skali laboratoryjnej, stosując objętość roboczą podłoża na poziomie 100 mL (artykuł **P2** i **P3**). Artykuł **P4** oraz wyniki opisywane w tym rozdziale koncentrują się na przeniesieniu procesu produkcji mikrobiologicznej transglutaminazy do skali bioreaktorowej z objętością roboczą 3 L, przy zachowaniu tych samych parametrów procesowych (**tab. 3**, p. 3.12.13) optymalizowanych w skali laboratoryjnej.

Aby zoptymalizować warunki produkcji transglutaminazy przez szczep *Streptoverticillium cinnamoneum* KKP 1658, przeprowadzono eksperyment oparty na frakcyjnym planie trójwartościowym zgodnie z metodologią Box-Behnkena. W ramach badania nastawiono 15 hodowli bioreaktorowych, obejmujących 12 różnych kombinacji zmiennych oraz 3 powtórzenia w punkcie centralnym. Na podstawie uzyskanych danych eksperymentalnych wyznaczono współczynniki dla modelu kwadratowego, dopasowane równanie do przewidywania aktywności MTG ($X = 230,26 - 96,66 \times A + 8,31 \times A^2 - 68,48 \times C + 5 \times C^2 + 24,98 \times A \times C - 1,53 \times A \times C^2 - 1,32 \times A^2 \times C + 0,06 \times B \times A - 0,01 \times B \times A^2 + 0,05 \times B \times C - 14,67$, gdzie A to dawka źródła azotu, B – czas hodowli, C – początkowe pH pożywki), a wykresy powierzchni odpowiedzi posłużyły do wizualizacji wpływu poszczególnych czynników.

Dopasowanie modelu eksperymentalnego do wyników aktywności transglutaminazy oceniono na podstawie współczynnika determinacji R^2 . Wartość R^2 wynosząca 95,34 % wskazuje, że model jest w stanie wyjaśnić ponad 95 % całkowitej zmienności wyników. Do oceny istotności czynników w modelu zastosowano poziom istotności 0,05 (wartość p -value), gdzie wartości przekraczające ten próg uznano za nieistotne, natomiast wartości poniżej wskazywały na istotność.

Aby zobrazować wpływ poszczególnych składników modelu oraz ich interakcji, zarówno liniowych, jak i kwadratowych, przygotowano wykres Pareto, który przedstawia

wartości bezwzględne standaryzowanego testu t-Studenta oraz linię odpowiadającą poziomowi istotności 0,05 (rys. 12).



Rys. 12 Wykres Pareto znormalizowanych efektów (odpowiedź: aktywność transglutaminazy U/mL), gdzie **A** – dawka azotu, **B** – czas hodowli, **C** - początkowe pH

Na podstawie analizy wykresu Pareto można stwierdzić, że najistotniejszym czynnikiem wpływającym na aktywność mikrobiologicznej transglutaminazy (MTG) była interakcja pomiędzy dawką azotu a czasem hodowli (A²B), co wskazuje na znaczenie zależności nieliniowych w optymalizacji procesu. Wynik ten podkreśla, że zarówno poziom dawki azotu, jak i czas inkubacji w istotny sposób decydują o efektywności produkcji enzymów, a ich odpowiednie dostosowanie jest kluczowe dla uzyskania wysokiej wydajności enzymatycznej. Współczynnik kwadratowy czynnika A wskazuje na najistotniejszy wpływ środkowego poziomu dawki źródła azotu (2 %). Natomiast czynnik liniowy B wskazuje, że wpływ tego czynnika na produkcję transglutaminazy wzrasta wraz z wydłużeniem czasu hodowli (72 h). Kolejnym krytycznym czynnikiem jest początkowe pH pożywki (C), które wykazało silny liniowy wpływ na aktywność MTG. Wysoki początkowy poziom pH (6,5) istotnie wpływa na produkcję MTG wśród badanych zakresów kwasowości. Potwierdza to

wcześniejsze badanie, które wskazywało na konieczność precyzyjnej regulacji poziomu pH w celu zapewnienia optymalnych warunków do zachodzących reakcji enzymatycznych.

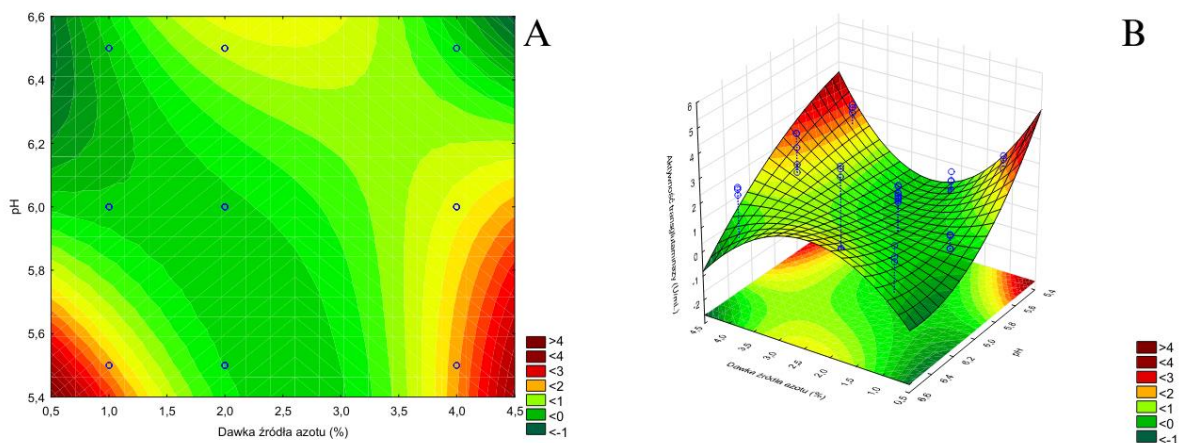
Istotny wpływ odnotowano również dla współczynnika liniowego dawki azotu (A) oraz interakcji między pH a czasem hodowli (BC), co wskazuje na wzajemne oddziaływanie tych parametrów w procesie fermentacji. Warto podkreślić, że przedstawione interakcje, choć mniej znaczące niż A^2B i C, nadal mają zauważalny wpływ na aktywność enzymów i nie powinny być ignorowane w dalszych krokach optymalizacyjnych.

Czynniki o mniejszym znaczeniu, takie jak czas hodowli (B) oraz interakcja dawki azotu z czasem (AB), miały ograniczony wpływ na wydajność procesu, co sugeruje, że ich dokładna regulacja może nie być krytyczna. Niemniej jednak należy zauważyć, że niska istotność tych zmiennych może być wynikiem specyficznych warunków eksperymentalnych i powinna zostać zweryfikowana w dalszych badaniach.

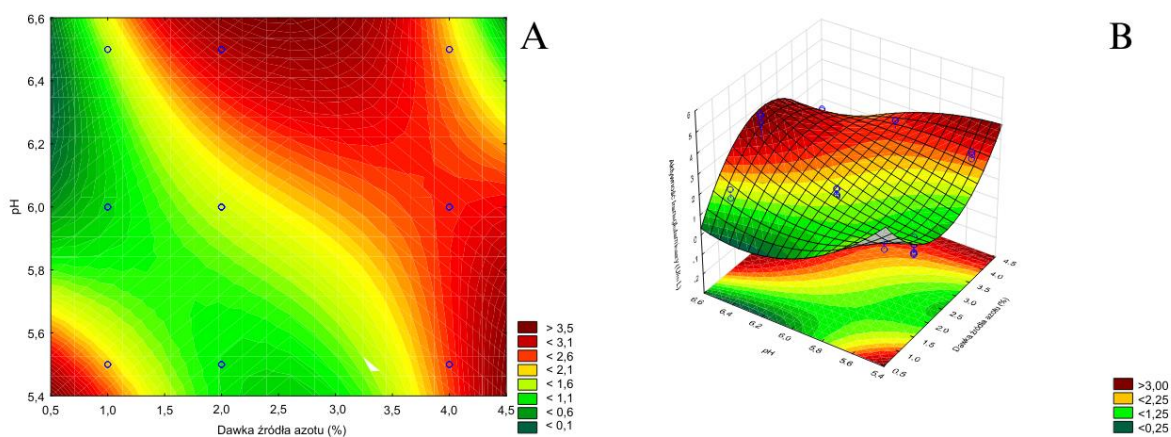
Podsumowując, optymalizacja procesu produkcji MTG powinna koncentrować się przede wszystkim na precyzyjnym dostosowaniu poziomu początkowego pH pożywki oraz zrozumieniu i kontrolowaniu nieliniowych oddziaływań między dawką azotu a czasem hodowli. Skupienie się na tych kluczowych zmiennych może znacznie zwiększyć wydajność enzymatyczną, jednocześnie zmniejszając potrzebę nadmiernej kontroli mniej istotnych czynników. Wyniki te stanowią cenną wskazówkę dla dalszego doskonalenia procesu fermentacji na większą skalę przemysłową.

4.4.1 Analiza wpływu parametrów hodowlanych na aktywność enzymatyczną

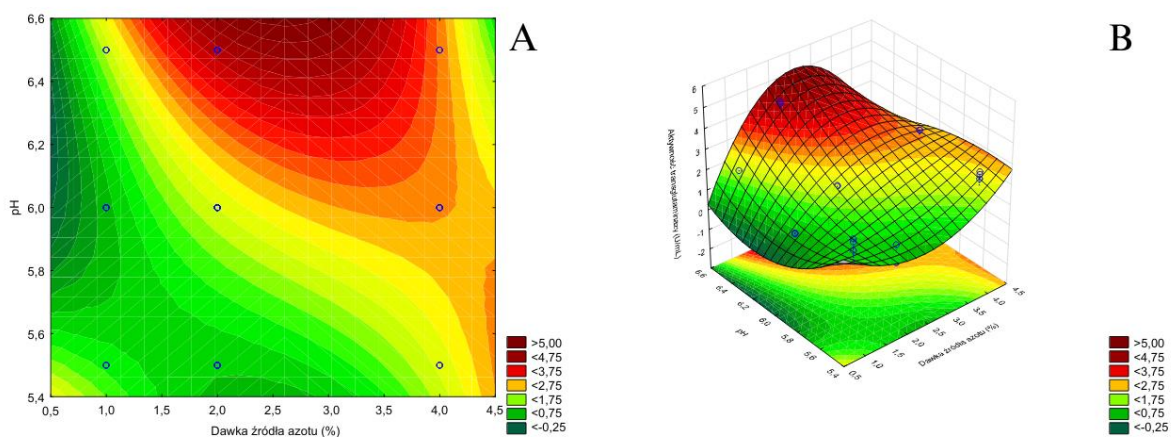
W celu graficznego przedstawienia zależności między zmiennymi niezależnymi a aktywnością transglutaminazy opracowano powierzchnie odpowiedzi, które pozwalają lepiej zrozumieć wzajemne interakcje między badanymi parametrami hodowli. **Rysunki 13, 14 i 15** ilustrują trójwymiarowe wykresy powierzchni odpowiedzi opracowane na podstawie predykcyjnego modelu kwadratowego. Na wykresach przedstawiono interakcję między początkowym pH podłoża a stężeniem azotu w trzech jednostkach czasowych hodowli: 24h (**rys. 13 A, B**), 48h (**rys. 14 A, B**) i 72h (**rys. 15 A, B**). Takie podejście pozwala na ocenę oddziaływań dwuczynnikowych przy jednoczesnym utrzymaniu stałego trzeciego czynnika, zgodnie z zasadami wieloczynnikowego projektowania eksperymentalnego.



Rys. 13 Powierzchnia odpowiedzi dla aktywności MTG po 24 godzinach hodowli przez szczep *Streptovercillium cinnamoneum* KKP 1658 – interakcja między dawką źródła azotu a początkowym pH. (A- wykres 2D, B – wykres 3D)



Rys. 14 Powierzchnia odpowiedzi dla aktywności MTG po 48 godzinach hodowli przez szczep *Streptovercillium cinnamoneum* KKP 1658 – interakcja między dawką źródła azotu a początkowym pH. (A- wykres 2D, B – wykres 3D)



Rys. 15 Powierzchnia odpowiedzi dla aktywności MTG po 72 godzinach hodowli przez szczep *Streptovercillium cinnamoneum* KKP 1658 – interakcja między dawką źródła azotu a początkowym pH. (A- wykres 2D, B – wykres 3D)

Na wykresie przedstawiającym pole powierzchni odpowiedzi po 24 godzinach hodowli bioreaktorowej stwierdzono (**rys. 13**), że najwyższa aktywność enzymatyczna jest osiągana przy niskim pH (około 5,5 – 6) oraz wyższych dawkach azotu w przedziale 3 – 4 %. W tej fazie hodowli enzymatycznej niższe wartości pH zdają się sprzyjać intensywniejszej aktywności transglutaminazy (ok. 4 U/mL), co sugeruje konieczność precyzyjnej kontroli pH we wczesnych etapach fermentacji.

Wykres pola powierzchni odpowiedzi po 48 godzin hodowli (**rys. 14**) wskazuje, że optymalne warunki dla maksymalnej aktywności enzymu (ok. 4 U/mL) przesuwają się w kierunku wyższego pH (około 6,0 – 6,5) przy zachowaniu stosunkowo wysokich dawek azotu (2 – 4 %). Obszary niskiej aktywności enzymatycznej (< 1,25 U/mL) widoczne są przy niskim pH i niskim stężeniu azotu, co podkreśla kluczową rolę tych parametrów w późniejszych fazach hodowli. W tym etapie aktywność enzymu wzrasta w miarę stabilizowania warunków środowiskowych, takich jak pH i dostępność składników odżywczych.

Na wykresie pola powierzchni odpowiedzi po 72 godzinach hodowli (**rys. 15**) zaobserwowano, że najwyższa aktywność transglutaminazy (ok. 5 U/mL) występuje przy pH wynoszącym około 6,5 oraz dawkach azotu zbliżonych do 3 %. W tym czasie hodowli drobnoustroje osiągają maksymalną zdolność do biosyntezy transglutaminazy, co przekłada się na najwyższą wartość aktywności enzymatycznej, zgodną z trendami obserwowanymi na wcześniejszych etapach. Warto również zauważyć, że niskie pH (poniżej 6,0) i niższe dawki azotu (poniżej 2 %) skutkują wyraźnym spadkiem aktywności enzymu, co może wskazywać na ograniczoną zdolność komórek do efektywnej produkcji enzymu w takich warunkach.

Podsumowując, należy zaznaczyć, że kluczowymi parametrami wpływającymi na aktywność transglutaminazy są pH oraz dawka azotu, a ich znaczenie zmienia się w zależności od czasu hodowli. Na podstawie analizy można stwierdzić, że optymalne warunki dla produkcji enzymu obejmują pH około 6,5, dawkę azotu w zakresie 2,5 – 3 %, z kolei czas hodowli powinien wynosić 72 godziny. Taka kombinacja parametrów pozwala na osiągnięcie maksymalnej aktywności enzymatycznej, co potwierdzają uzyskane dane eksperymentalne.

4.4.2 Porównanie wyników z II i III etapu

Analiza wyników uzyskanych podczas hodowli szczepu *Streptovercillium cinnamoneum* KKP 1658 w kolbach laboratoryjnych oraz w bioreaktorze ujawniła zarówno istotne podobieństwa, jak i zauważalne różnice w odpowiedzi systemu biologicznego na badane czynniki. W obu przypadkach zastosowano identyczne poziomy trzech zmiennych

niezależnych: dawki źródła azotu (A), czasu hodowli (B) oraz początkowego pH pożywki (C), co umożliwiło bezpośrednie porównanie wyników oraz weryfikację **hipotezy 3** o wpływie skali procesu na wydajność enzymatyczną.

W warunkach kolbowych najwyższą aktywność MTG (powyżej 6 U/mL) uzyskano po 48 godzinach hodowli przy początkowym pH wynoszącym 6,4 – 6,6 oraz wysokiej dawce źródła azotu przekraczającej 4 %. Model statystyczny wskazał, że największy wpływ na produkcję enzymu miał kwadratowy efekt czasu hodowli (B^2), natomiast liniowy wpływ dawki azotu (A) był nieistotny statystycznie. Szczególnie silna okazała się także interakcja między dawką azotu a początkowym pH pożywki (AC), co podkreśla znaczenie synergistycznego działania tych czynników.

W warunkach bioreaktorowych maksymalna aktywność transglutaminazy osiągnięta po 72 godzinach hodowli wyniosła 4,29 U/mL. Kluczowym czynnikiem wpływającym na poziom tej aktywności okazała się nieliniowa interakcja pomiędzy dawką azotu a czasem hodowli (A^2B). W odróżnieniu od układu kolbowego, istotny był także wpływ liniowy początkowego pH (C) oraz liniowy wpływ dawki źródła azotu (A), który wykazywał tendencję wzrostową aż do 72 godziny. Co ciekawe, podczas gdy w kolbach najwyższe wartości aktywności notowano po 48 godzinach, w bioreaktorze wyższe wyniki uzyskano dopiero po 72 godzinach, co może być związane z inną kinetyką wzrostu komórek i produkcji enzymu w systemie o lepszym natlenieniu i kontroli parametrów środowiskowych.

Warto zwrócić uwagę na różnice w znaczeniu efektów związanych z czynnikiem A (dawką źródła azotu) w zależności od skali procesu. W warunkach hodowli kolbowej efekt liniowy czynnika A był statystycznie nieistotny, podczas gdy jego efekt kwadratowy znajdował się na trzecim miejscu pod względem wpływu na aktywność transglutaminazy. Może to sugerować, że w kolbach wpływ azotu na produkcję enzymu był nieliniowy i istotny jedynie w skrajnych wartościach – zarówno niedobór, jak i nadmiar mogły negatywnie wpływać na biosyntezę enzymu, natomiast wartości pośrednie zapewniały korzystne warunki metaboliczne.

W bioreaktorze zaobserwowano inny wzorzec – efekt liniowy czynnika A zajął trzecie miejsce pod względem istotności, natomiast jego efekt kwadratowy był jednym z najmniej znaczących, znajdując się na granicy poziomu istotności statystycznej. Taka zmiana może wynikać z bardziej jednorodnych warunków środowiskowych w bioreaktorze, gdzie efekty nieliniowe mogą ulec spłaszczeniu z powodu lepszego mieszania i kontroli parametrów. W efekcie, różnice pomiędzy skrajnymi wartościami dawki azotu mogły mieć bardziej

przewidywalny, liniowy wpływ na aktywność enzymatyczną, a wpływ wartości pośrednich nie był już tak wyraźnie korzystny jak w kolbach.

Powyższe obserwacje mogą sugerować, że skalowanie procesu fermentacji wiąże się nie tylko z koniecznością dostosowania parametrów technologicznych, ale również ze zmianą charakterystyki odpowiedzi metabolicznej mikroorganizmów na składniki pożywki. Potwierdza to znaczenie indywidualnej weryfikacji modelu optymalizacyjnego po przejściu z hodowli laboratoryjnej do bioreaktorowej.

Pod względem dynamiki zmian, w kolbach wartości aktywności enzymatycznej >4 U/mL pojawiały się już po 48 godzinach, natomiast w bioreaktorze poziom ten osiągnęto stopniowo. Różnice te mogą wynikać z większej lepkości medium w bioreaktorze lub innych czynników fizykochemicznych związanych ze skalą procesu. Trend wpływu głównych zmiennych pozostał zbliżony w obu systemach – zarówno pH, jak i dawka azotu odgrywały kluczową rolę w kształtowaniu aktywności transglutaminazy.

Podsumowując,

- w warunkach hodowli w kolbach największy wpływ miał czas hodowli (B^2), co wskazuje, że przedłużanie inkubacji do 48 h było kluczowe dla uzyskania wysokiej aktywności MTG. W bioreaktorze natomiast czas wchodzi w istotną interakcję z dawką azotu, co sugeruje bardziej złożoną dynamikę procesu.
- W hodowli w warunkach bioreaktorowych efekt liniowy dawki źródła azotu (A) nabrał istotnego znaczenia, co może wynikać z bardziej stabilnych warunków środowiskowych, lepszego napowietrzania i mieszania, które umożliwiają promieniowcom pełniejsze wykorzystanie dostępnego azotu.
- Efekt kwadratowy A (A^2), istotny w hodowlach prowadzonych w kolbach, w bioreaktorze okazał się czynnikiem o niewielkim znaczeniu, co wskazuje, że w skali bioreaktora nie obserwuje się tak wyraźnego optimum w średnim poziomie azotu jak w kolbach.
- W obu przypadkach pH wykazało istotny wpływ (C), ale jego znaczenie wzrastało z czasem hodowli i miało bardziej wyraźny charakter liniowy w bioreaktorze. To wskazuje, że precyzyjna kontrola pH jest bardziej krytyczna w warunkach fermentacji na większą skalę.

Przeprowadzone eksperymenty w skali kolby i bioreaktora pozwoliły potwierdzić **hipotezę 2 i 3. W hodowli kolbowej** maksymalna aktywność enzymatyczna MTG (**6 U/mL**) została osiągnięta po 48 godzinach. W bioreaktorze końcowa aktywność enzymu w

supernatancie wyniosła **4,29 U/mL**, (przy zastosowaniu następujących poziomów zmiennych niezależnych: pH 6,5, dawka azotu 2,75 %, czas hodowli 72 h). Różnica ta jednoznacznie wskazuje, że przejście z hodowli w kolbach do skali bioreaktorowej spowodowało spadek aktywności enzymatycznej w płynie pohodowlanym oraz wydłużyło optymalny czas prowadzenia hodowli, potwierdzając **hipotezę 3**.

Hipoteza 2 zakładała, że poprzez odpowiedni dobór parametrów hodowli możliwe będzie uzyskanie aktywności transglutaminazy przekraczającej 3 U/mL. Zarówno w hodowlach prowadzonych w kolbach, jak i w bioreaktorze uzyskano aktywności wyraźnie przekraczające ten poziom – odpowiednio ponad 6 U/mL oraz 4 U/mL. Wyniki te potwierdzają słuszność postawionej hipotezy i świadczą o wysokim potencjale produkcyjnym szczepu *Streptoverticillium cinnamoneum* KKP 1658 w zakresie biosyntezy transglutaminazy przy optymalnie dobranych warunkach środowiskowych.

4.4.3 Weryfikacja optymalnych warunków hodowli w bioreaktorze

Uwzględniając uzyskane wyniki, optymalne warunki hodowli określono jako pH wynoszące 6,5, dawkę azotu na poziomie 2,75 % (połączenie aminobaku i namoku kukurydzianego w stosunku 1:1, według badań wstępnych (**P2 i P3**) oraz 72 godzinny czas hodowli. Warunki te zostały wybrane na podstawie analizy statystycznej wykresów powierzchni odpowiedzi, co pozwoliło na zidentyfikowanie stabilnego zakresu roboczego. Następnym etapem było przeprowadzenie hodowli stosując wybrane optymalne parametry oraz uzyskanie enzymu, który po wytrąceniu z płynu pohodowlanego został poddany dalszej części badań (masa cząsteczkowa, termo- i pH-stabilność) (**tab. 5**). Proces wytrącania białek z roztworu opiera się na zastosowaniu czynnika precypitującego, który destabilizuje cząsteczki białek. Dodanie tego czynnika powoduje usunięcie stabilizującej otoczki wodnych dipoli, co prowadzi do ujawnienia hydrofobowych obszarów w cząsteczkach białek. W efekcie stają się one mniej rozpuszczalne, co sprzyja ich agregacji i wytrąceniu z roztworu (Goldring, 2019).

Tab. 5 Wyniki analizy płynu pohodowlanego

Parametry	Aktywność MTG (U/mL)	Zawartość białek (mg/mL)	Aktywność specyficzna enzymu (U/mg)	Stopień oczyszczenia	Wydajność odzysku* (%)
Płyn pohodowlany (72 h)	4,29 ± 0,08	6,17 ± 0,61	0,70	1,00	100
Płyn po ultrafiltracji	10,87 ± 0,15	9,09 ± 0,71	1,20	1,71	253
Białka wytrącone siarczanem amonu	22,0 ± 0,05	13,40 ± 0,31	1,64	2,34	513

*Ze względu na efekt zagęszczenia podczas ultrafiltracji i wytrącania, wartości aktywności wyrażono w przeliczeniu na 1 mL próbki. Rzeczywista wydajność odzysku może się różnić w zależności od objętości końcowej poszczególnych frakcji.

Tab. 6 Walidacja modelu RSM do estymacji aktywności transglutaminazy

Parametry	Wartość prognozowana	Wartość zaobserwowana	95 % przedział ufności
Aktywność MTG (U/mL)	4,47	4,29	4,18 - 4,76

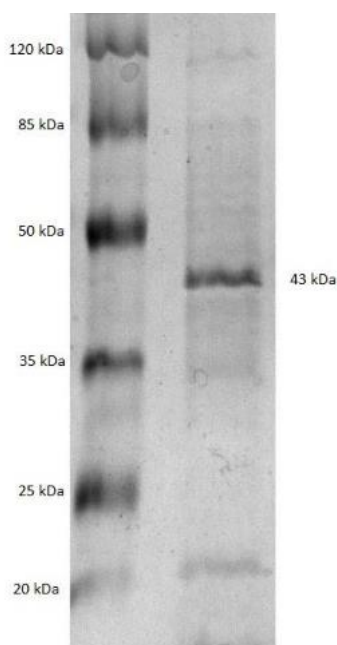
Analiza płynu pohodowlanego wykazała, że po 72 godzinach inkubacji wydajność biomasy *S. cinamomeum* KKP 1648 wynosiła $14,62 \pm 0,56$ g/L, a aktywność transglutaminazy po odwirowaniu 4,29 U/mL, przy zawartości białka 6,17 mg/mL. Przewidywana aktywność transglutaminazy, określona na podstawie metody modelowania powierzchni odpowiedzi (RSM) wynosiła 4,47, z 95 % przedziałem ufności w zakresie od 4,18 do 4,76 (**tab. 6**). Obserwowana doświadczalnie wartość 4,29 mieściła się w tym zakresie, co wskazuje na zadowalającą zgodność między przewidywaniami modelu a wynikami eksperymentu. Wyniki te potwierdzają wiarygodność opracowanego modelu do szacowania aktywności transglutaminazy w badanych warunkach.

Po procesie ultrafiltracji (Sartorius Vivaflow 200, MWCO 100 kDa) aktywność enzymu wzrosła do 10,87 U/ml, a aktywność właściwa wzrosła z 0,7 do 1,2 U/mg. Najwyższe wartości parametrów uzyskano po wytrąceniu białek siarczanem amonu. Po tym procesie aktywność MTG wynosiła 22 U/ml, co przekładało się na najwyższą aktywność właściwą wynoszącą 1,64 U/mg.

Zastosowanie procesów ultrafiltracji i odsalania białek poprawiło aktywność i czystość otrzymanej mikrobiologicznej transglutaminazy, co było niezbędnym krokiem do dalszych analiz preparatu enzymatycznego.

4.4.4 Właściwości wyizolowanej transglutaminazy

Wyizolowana transglutaminaza wykazała wyraźne pojedyncze pasmo białkowe w analizie SDS-PAGE (**rys. 16**). Masę cząsteczkową białka oszacowano na 43 kDa na podstawie jego ruchliwości elektroforetycznej w porównaniu z zastosowanymi standardowymi białkami.



Rys. 16 SDS-PAGE oczyszczonej transglutaminazy wyprodukowanej przez *Streptoverticillium cinnamoneum* KKP 1658

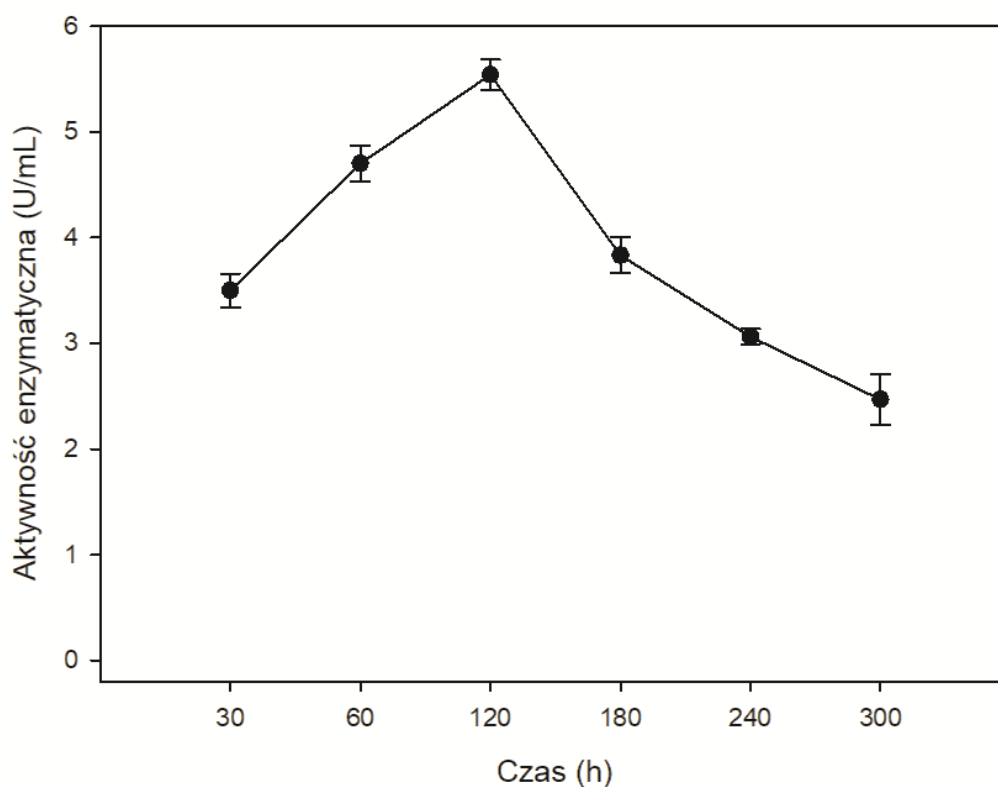
Chociaż ultrafiltracja znacznie zwiększyła aktywność MTG, analiza SDS-PAGE ujawniła obecność małych pasm poniżej 20 kDa, co sugeruje obecność zanieczyszczeń reszkowych. Może to wpłynąć na dokładność oszacowanej aktywności specyficznej, dlatego w przyszłości ważne jest przeprowadzenie dalszego procesu oczyszczania przy użyciu niższych membran MWCO w celu poprawy czystości otrzymanego enzymu.

W dalszej części badania otrzymaną transglutaminazę (przechowywaną w temperaturze $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) o aktywności 22 U/mL rozmroźono i rozcieńczono buforem cytrynianowo-fosforanowym w celu uzyskania większej objętości enzymu do doświadczeń. Po rozcieńczeniu buforem otrzymano roztwór transglutaminazy o aktywności $3,20 \pm 0,23\text{ U/mL}$. Stabilność badanej transglutaminazy w zależności od czasu oceniano przez inkubację w temperaturze $28\text{ }^{\circ}\text{C}$.

°C przez 300 minut (**tab. 7 oraz rys. 17**). Aktywność enzymu osiągnęła maksymalną wartość po 120 minutach inkubacji (5,54 U/mL), natomiast istotne spadki aktywności zaobserwowano pod koniec eksperymentu – po 240 minutach. Uzyskane wyniki wskazują na wysoką stabilność enzymu uzyskanego z badanego szczepu *S. cinnamoneum* KKP 1648.

Tab. 7 Wyniki stabilności mikrobiologicznej transglutaminazy w czasie oraz aktywności względne

Zakres czasu	Średnia aktywność MTG (U/mL)	Aktywność względna (% wartości maksymalnej)	Aktywność względna (% wartości kontrolnej)
Kontrola	3,2 ± 0,23	57,8	100
30 min	3,50 ± 0,16	63,2	109,4
60 min	4,70 ± 0,17	84,8	146,9
120 min	5,54 ± 0,15	100	173,1
180 min	3,83 ± 0,17	69,1	119,7
240 min	3,06 ± 0,07	55,2	95,6
300 min	2,47 ± 0,24	44,6	77,2



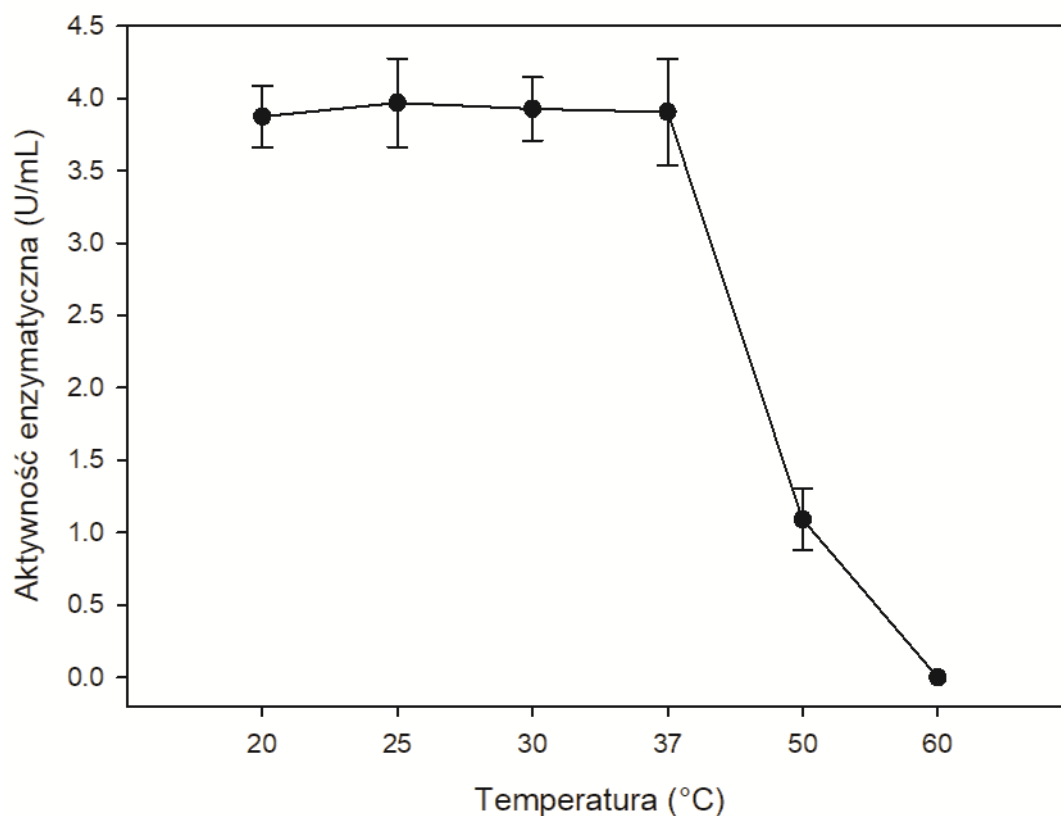
Rys. 17 Wyniki stabilności mikrobiologicznej transglutaminazy w czasie

Termostabilność enzymu oznaczono po 2-godzinnej inkubacji roztworu transglutaminazy w temperaturach 20 – 60 °C. Badany enzym wykazał szeroki zakres

stabilności termicznej (**tab. 8 oraz rys. 18**), gdyż podobną średnią aktywność enzymatyczną (3,87 – 3,97 U/mL) uzyskano w zakresie 20 – 37 °C. Istotne zmniejszenie aktywności badanej transglutaminazy nastąpiło w temperaturze 50 °C, przy spadku aktywności o 75 % (1,09 U/mL) w porównaniu z wynikami dla zakresu temperatury 20 – 37 °C. Temperatura 60 °C całkowicie dezaktywowała badany enzym. Co ciekawe, aktywność MTG wzrosła w ciągu pierwszych 120 minut inkubacji, co może wskazywać na przejściowy efekt aktywacji termicznej. To zachowanie jest nietypowe dla transglutaminaz bakteryjnych, ale wcześniej zaobserwowano je w badaniach de Souza i wsp. (2009). Autorzy wykazali, że transglutaminaza wyizolowana z *Bacillus circulans* BL32 wykazuje zwiększoną aktywność enzymatyczną po krótkotrwałym podgrzaniu w temperaturze 40 – 45 °C przed rozpoczęciem jego termicznej inaktywacji. Tłumaczy się to możliwymi zmianami konformacyjnymi enzymu prowadzącymi do lepszego dostępu do miejsca aktywnego. Podobne zachowanie zaobserwowano w niniejszym badaniu, co może wskazywać na podobny mechanizm aktywacji.

Tab. 8 Wyniki termostabilności mikrobiologicznej transglutaminazy oraz aktywności względne

Temperatura	Średnia aktywność MTG (U/mL)	Aktywność względna (% wartości maksymalnej)	Aktywność względna (% wartości kontrolnej)
Kontrola	3,20 ± 0,23	80,6	100
20°C	3,87 ± 0,20	97,6	121,1
25°C	3,97 ± 0,30	100	124,1
30°C	3,93 ± 0,22	98,9	122,8
37°C	3,91 ± 0,36	98,4	122,1
50°C	1,09 ± 0,21	27,5	34,1
60°C	0,0	0,0	0,0



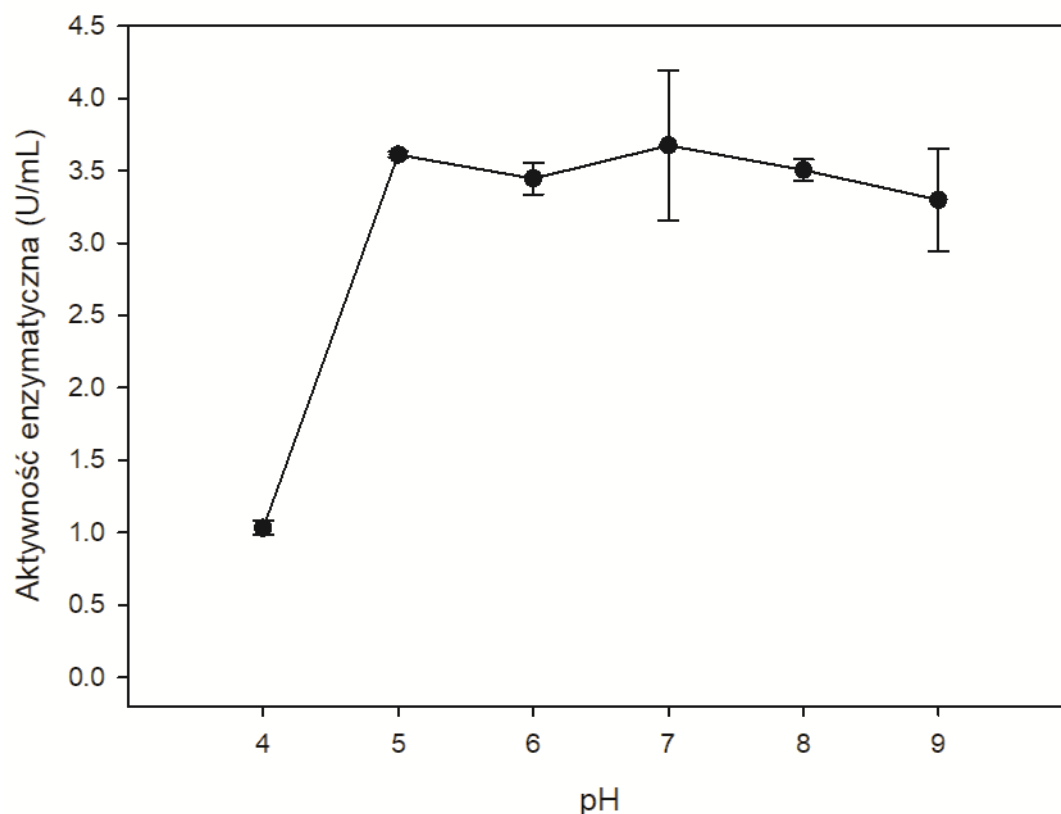
Rys. 18 Wyniki termostabilności mikrobiologicznej transglutaminazy

Transglutaminaza charakteryzowała się wysoką aktywnością resztkową w szerokim zakresie pH 5,0 – 8,0 (3,45 – 3,67 U/mL) (**tab. 9 oraz rysunek 19**). Środowisko kwasowe (poniżej pH na poziomie 5,0) drastycznie zmniejszało aktywność enzymu do wartości 1,03 U/mL (o 70 % wobec wyniku aktywności dla pH 5,0), w porównaniu do pH zasadowego, gdzie w buforze o pH 9,0 obserwowano łagodne zmniejszanie aktywności (3,3 U/mL). Badana transglutaminaza wykazała maksymalną aktywność w buforze o pH 7,0, gdzie uzyskała średnią wartość 3,67 U/mL.

Tab. 9 Wyniki pH stabilności mikrobiologicznej transglutaminazy oraz aktywności względne

Zakres pH	Średnia aktywność MTG (U/mL)	Aktywność względna (% wartości maksymalnej)	Aktywność względna (% wartości kontrolnej)
Kontrola	2,95 ± 0,07	80,4	100
4,0	1,03 ± 0,05	28,1	34,9
5,0	3,61 ± 0,02	98,4	122,4
6,0	3,45 ± 0,11	94,0	116,9

7,0	$3,67 \pm 0,52$	100	124,4
8,0	$3,5 \pm 0,07$	95,4	118,6
9,0	$3,3 \pm 0,36$	89,9	111,9



Rys. 19 Wyniki pH termostabilności mikrobiologicznej transglutaminazy

4.5 Dyskusja do badań właściwych

Produkcja MTG na skalę przemysłową odbywa się głównie w bioreaktorach, które zapewniają precyzyjną kontrolę nad warunkami fermentacji. Bioreaktory umożliwiają utrzymanie stałych parametrów hodowli, co jest kluczowe dla uzyskania wysokiej wydajności enzymu. W niniejszej pracy doktorskiej przeprowadzono optymalizację warunków hodowli bioreaktorowej *Streptoverticillium cinnamoneum* KKP 1658 w celu zwiększenia produkcji transglutaminazy. Maksymalną aktywność transglutaminazy (4,29 U/mL) uzyskano przy pH 6,5, dawce azotu 2,75 %, czasie hodowli wynoszącym 72 h i przy mieszaniu o prędkości 200 obr./min. W badaniach Zilda i wsp. (2017) optymalna produkcja MTG w bioreaktorze dla szczepu *Streptomyces thioluteus* TTA 02 SDS 14 została osiągnięta przy prędkości mieszania wynoszącej 150 obr./min oraz inkubacji przez 48 h. Optymalne warunki produkcji MTG dla *S. thioluteus* TTA 02 SDS 14 to pH 6,0 oraz temperatura 30 °C. Warto zaznaczyć, że po

procesie optymalizacji autorzy otrzymali maksymalną aktywność transglutaminazy na poziomie 0,135 U/mL.

Chociaż prędkość mieszania nie była uwzględniona w procesie optymalizacji dla *S. cinnamoneum* KKP 1648, odgrywa ona ważną rolę w produkcji enzymów, w tym mikrobiologicznej transglutaminazy. Mieszanie wpływa na poziom natlenienia hodowli, co jest istotnym czynnikiem dla wzrostu mikroorganizmów i biosyntezy enzymów. Jak wykazano w badaniach Aidaroos i wsp. (2011), *Streptomyces hygroscopicus* WSH03-01 wymagał intensywnego mieszania na poziomie 500 rpm w bioreaktorze, aby osiągnąć optymalną produkcję transglutaminazy po 72 godzinach inkubacji (wzrost aktywności o 71,75 % w porównaniu do wyników sprzed optymalizacji). Z kolei *Streptomyces mobaraensis* uzyskiwał najwyższą aktywność enzymatyczną (3,2 U/mL) przy prędkości mieszania 200 obr./min (Guerra-Rodríguez i Vázquez, 2014). Niższe prędkości mieszania mogą prowadzić do wydłużonego czasu produkcji enzymu, co było obserwowane przy 100 obr./min, gdzie osiągnięcie maksymalnej aktywności transglutaminazy wymagało dłuższego okresu inkubacji w przypadku badań Zilda i wsp. (2017). W niniejszej pracy, mimo że szybkość mieszania nie była zmienną w modelu optymalizacyjnym, najwyższą aktywność transglutaminazy wynoszącą około 5,0 U/mL osiągnięto po 72 godzinach hodowli przy pH 6,5 i dawce azotu 2,75 %, jak pokazano na powierzchniowych wykresach odpowiedzi. Wartość ta znacznie przekracza maksymalne aktywności odnotowane dla *S. mobaraensis* lub *S. hygroscopicus*, co wskazuje na wysoką efektywność biosyntezy enzymów przez *S. cinnamoneum* KKP 1658 w zastosowanych warunkach. Sugeruje to, że starannie dobrany skład podłoża i pH mogą częściowo zrekompensować brak optymalizacji napowietrzania. Niemniej jednak w przyszłych pracach należy rozważyć uwzględnienie prędkości mieszania, aby zweryfikować jej potencjalny wpływ na *S. cinnamoneum* KKP 1648.

W badaniu nad mikrobiologiczną transglutaminazą wyizolowano 200 szczepów bakterii z próbek gleby i ścieków, z czego pięć wykazywało zdolność do syntezy enzymu (Sorde i Ananthanarayan, 2019). Najwyższą aktywność uzyskano dla szczepu *Bacillus nakamurai* NRRL B 41091 (B4) – $3,95 \pm 0,04$ U/mL oraz *Bacillus subtilis* BCRC 10255 (C2) – $2,65 \pm 0,17$ U/mL, po optymalizacji warunków fermentacji (wzrost z początkowych $1,71 \pm 0,2$ U/mL i $1,61 \pm 0,17$ U/mL, odpowiednio dla izolatu B4 i C2). Maksymalna aktywność enzymatyczna szczepów B4 i C2 została uzyskana w pożywce zawierającej pepton (20 g/L), skrobię (20 g/L), ekstrakt drożdżowy (2 g/L) oraz sole mineralne ($\text{Mg}_2\text{SO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 2 g/L, K_2HPO_4 – 2 g/L, KH_2PO_4 – 2 g/L). Optymalne parametry hodowli obejmowały pH 6,5 – 7,5 dla izolatu B4 oraz 7,5 dla C2, temperaturę 35 °C i prędkość mieszania na poziomie 180 obr./min. Maksymalna

aktywność enzymu była osiągana w fazie stacjonarnej wzrostu, między 48 a 60 godziną hodowli. Wyniki potwierdzają, że warunki środowiskowe mają kluczowe znaczenie dla efektywnej produkcji MTG, a odpowiednia optymalizacja może znacznie zwiększyć wydajność enzymu.

Po 72 godzinach inkubacji szczep *Streptoverticillium cinnamoneum* KKP 1658 hodowany w warunkach pH 6,5 osiągnął maksymalną aktywność enzymatyczną na poziomie 5,0 U/mL, co wykazano na podstawie analizy wykresów powierzchni odpowiedzi. Przewyższa to wartości zgłoszone dla obu szczepów *Bacillus* (Sorde i Ananthanarayan, 2019) wskazujące na wyższy potencjał produkcyjny w ramach zastosowanego składu podłoża. Co więcej, testy termostabilności i stabilności pH dla *S. cinnamoneum* KKP 1658 wykazały, że enzym zachowuje wysoką aktywność w różnych warunkach. Maksymalną aktywność resztkową po 2-godzinnej inkubacji zaobserwowano w temperaturze 25 – 30 °C (aktywność względna > 95 %). Analiza stabilności pH wykazała, że enzym utrzymywał względną aktywność > 90 % w zakresie pH 5,0 – 8,0, ze szczytową aktywnością przy pH 7,0 (3,67 U/ml). W testach stabilności zależnej od czasu aktywność transglutaminazy wzrosła w ciągu pierwszych 2 godzin inkubacji, osiągając 5,54 U/mL, co potwierdza wysoką stabilność funkcjonalną enzymu i jego przydatność do przedłużonych warunków przetwarzania.

Stabilność enzymu w różnych zakresach pH stanowi istotny czynnik determinujący aktywność mikrobiologicznej transglutaminazy oraz jej przydatność w zastosowaniach biotechnologicznych. Jak wykazali Macedo i wsp. (2011), transglutaminaza produkowana przez szczep *Streptomyces* sp. CBMAI 837 wykazuje najwyższą aktywność w przedziale pH 6,0 – 6,5, co jest zgodne z wynikami uzyskanymi w niniejszej pracy. Warto jednak zauważyć, że niektóre szczepy mogą charakteryzować się odmiennymi wymaganiami środowiskowymi. Na przykład, *Bacillus subtilis* wytwarza transglutaminazę o maksymalnej aktywności w pH 8,2 (Suzuki i wsp., 2000). Różnice te wynikają najprawdopodobniej ze specyfiki strukturalnej enzymu i optymalnych warunków dla wzrostu poszczególnych mikroorganizmów. Otrzymane w niniejszej pracy wyniki, wskazujące na optymalne pH 6,5 dla szczepu *Streptoverticillium cinnamoneum* KKP 1658, są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami, w których również wykazano, że lekko kwaśne warunki sprzyjają maksymalnej aktywności mikrobiologicznej transglutaminazy. Podkreśla to znaczenie precyzyjnej kontroli tego parametru w procesie fermentacji, aby uzyskać maksymalną aktywność enzymatyczną.

W badaniu Sorde i Ananthanarayan (2019) wykazano, że optymalne pH dla aktywności transglutaminazy wytwarzanej przez oba izolaty *Bacillus nakamurai* NRRL B 41091 (B4) oraz *Bacillus subtilis* BCRC 10255 (C2) wynosiło 6,0. Enzym wykazywał stabilność w szerokim

zakresie pH (5,0 – 9,0), jednak aktywność MTG szczepu B4 gwałtownie zmniejszała się w warunkach o obniżonym pH, zachowując większą stabilność w środowisku zasadowym, co było odwrotne w porównaniu do izolatu C2. Optymalne pH dla działania MTG dla szczepu *Streptomyces hygroscopicus* WSH03-13 oznaczono w zakresie 6,0 – 7,0, enzym ten wykazał się pH-stabilnością w zakresie 5,0 – 8,0 (Cui i wsp., 2007). Transglutaminaza wyizolowana w niniejszej pracy z *S. cinnamoneum* KKP 1648 charakteryzowała się pH-stabilnością podobną do *B. nakamurai* NRRL B 41091 oraz *S. hygroscopicus* WSH03-13. Zauważono stabilność MTG w zakresie pH 5,0 – 9,0, natomiast środowisko kwasowe (pH < 5,0) gwałtownie obniżało oznaczaną aktywność. Stabilność transglutaminazy szczepów B4 i C2 utrzymywała się w zakresie temperatury 0 – 50 °C, po czym następował spadek aktywności. W badaniach Zilda i wsp. (2017) transglutaminaza otrzymana w bioreaktorze o objętości roboczej 2 L ze szczepu *Streptomyces thioluteus* TTA 02 SDS 14 była najbardziej aktywna w temperaturze 45 – 50 °C oraz przy pH na poziomie 6,0. W badaniu Wan i wsp. (2017) transglutaminaza szczepu *Streptomyces hygroscopicus* H197 wykazała optymalną aktywność przy pH 6,0 – 8,0 i wykazywała najwyższą stabilność w temperaturze 40 °C. Transglutaminaza otrzymana ze szczepu *Streptomyces* sp. CBMAI 837 cechowała się optymalną aktywnością w temperaturze 35 – 40 °C, enzym ten był stabilny w szerokim zakresie pH (4,5 – 8,0) i do 45 °C. W przypadku niniejszej pracy aktywność MTG była zachowana w zakresie temperatury do 40 °C, po czym obserwowano dezaktywację enzymu. Podobne wyniki otrzymali Cui i wsp. (2007) dla transglutaminazy wyizolowanego z gleby szczepu *Streptomyces hygroscopicus* WSH03-13. Enzym wykazywał optymalną aktywność w temperaturze 37 – 45 °C, a wzrost temp. powyżej 50 °C całkowicie dezaktywował enzym. Wyniki te podkreślają różnice w charakterystyce enzymów wytwarzanych przez poszczególne szczepy oraz ich potencjalne zastosowanie w różnych warunkach przemysłowych. Warto podkreślić, że poziom aktywności enzymatycznej około 17 % i 42 % MTG został zachowany w temperaturze 70°C odpowiednio dla izolatów B4 i C2, natomiast dla transglutaminazy otrzymanej w naszych badaniach pochodzącej z *S. cinnamoneum* KKP 1648 oznaczono zerową aktywność już w temperaturze 60 °C, co świadczy o wyższej termostabilności MTG produkowanej przez bakterie *Bacillus*.

W niniejszym badaniu masa cząsteczkowa oznaczonej transglutaminazy wynosiła 43 kDa, co jest zgodne z wartościami podawanymi dla innych transglutaminaz mikrobiologicznych. Dane przedstawione przez Macedo i wsp. (2011) wykazały, że masa cząsteczkowa enzymu wynosiła około 45 kDa, co jest zbliżone do wyniku uzyskanego w tym badaniu. Jin i wsp. (2016) oznaczyli masę cząsteczkową transglutaminazy MTG-TX, uzyskaną z użyciem *Streptomyces mobaraensis* TX, na poziomie 37,82 kDa (na podstawie wyników

chromatografii cieczowej i spektrometrii mas). Zhang i wsp. (2012) oznaczyli masę cząsteczkową MTG wytworzonej przez *Streptomyces mobaraensis* DSM 40587 jako 38 kDa przy użyciu SDS-PAGE. Podobne wartości zanotowali również Cui i wsp. (2007) oraz Yu i wsp. (2008), którzy określili masę MTG na poziomie 38 kDa. Warto jednak zauważyć, że różnice w masie cząsteczkowej mogą wynikać zarówno z różnic międzygatunkowych, jak i zastosowanych metod oczyszczania oraz warunków elektroforezy. Z kolei Wan i wsp. (2017) opisali mutant MTG o zwiększonej masie cząsteczkowej 67 kDa, co może sugerować różnice w strukturze białka wynikające z modyfikacji genetycznych. Uzyskane wyniki potwierdziły, że masa cząsteczkowa transglutaminazy może się różnić w zależności od źródła mikrobiologicznego oraz sposobu jej izolacji i oczyszczania.

Opublikowano wiele badań związanych z mikrobiologiczną transglutaminazą, ale nie ma ustalonej konkretnej metodologii oczyszczania tego enzymu. Według Zhang i wsp. (2012), po oddzieleniu kultury od podłoża mikrobiologicznego przez odwirowanie lub filtrację, supernatant zagęszcza się przez ultrafiltrację lub wysolenie stałym siarczanem amonu lub etanolem.

W celu zwiększenia aktywności transglutaminazy *S. cinnamomeum* KKP 1658 oraz zwiększenia czystości otrzymanego preparatu enzymatycznego, odwirowany płyn hodowlany poddano ultrafiltracji przy użyciu systemu Sartorius Vivaflow 200 z membraną odcięcia masy cząsteczkowej (MWCO) 100 kDa, co pozwoliło na eliminację większych peptydów i zanieczyszczeń. Po tym etapie uzyskano aktywność specyficzną enzymu na poziomie 1,2 U/mg, co stanowi wzrost o 71,4 % w stosunku do płynu hodowlanego. Następnie, w celu wytrącenia transglutaminazy, przeprowadzono proces frakcjonowania siarczanem amonu, który doprowadził do wzrostu o 134,3 % (1,64 U/mg) w porównaniu z wartością płynu hodowlanego (0,7 U/mg).

Ultrafiltracja jest często stosowana jako pierwszy lub pośredni etap w procesie oczyszczania enzymów, takich jak lipaza (Ghutake i wsp., 2025), endopektynaza (Krścić i wsp., 2007) fitynaza (Rodríguez-Fernández i wsp., 2013), reduktaza ksylozowa (Krishnan i wsp., 2022), bromelaina (Nor i wsp., 2017), laktaza (Antecka i wsp., 2019), dekstranosacharaza (Flórez Guzmán i wsp., 2018) czy proteaza (Hemici i wsp., 2017). Ghutake i wsp. (2025) zwiększyli wydajność produkcji surowej lipazy 2,29-krotnie poprzez zastosowanie ultrafiltracji z membraną o porach 5 kDa MWCO. W badaniach Özera i wsp. (2018) porównano skuteczność trzech metod izolacji β -laktoglobuliny (β -Lg) pod względem czystości, wydajności oraz zachowania natywnej struktury białka. Zastosowanie ultrafiltracji z membraną MWCO 30 kDa zapewniło najwyższy stopień oczyszczenia (43,6-krotny wzrost względem

serwatki), znacznie przewyższając wyniki uzyskane za pomocą chromatografii jonowymiennej oraz hydrolizy z pepsyną – odpowiednio 6,6- oraz 1,4-krotny wzrost w porównaniu do serwatki. Autorzy podkreślili, że ultrafiltracja pozwala również na zachowanie natywnej struktury białek β -Lg oraz skutecznie eliminuje zanieczyszczenia o wysokiej masie cząsteczkowej, takie jak albumina surowicy bydlęcej czy immunoglobuliny.

Yongsawatdigul i Piyadhamviboon (2007) badali białka sarkoplazmatyczne (SpC) pochodzące z tilapii (*Oreochromis niloticus*), zawierające znaczną ilość transglutaminazy. W badaniu zastosowano ultrafiltrację z membraną MWCO 30 kDa, co skutkowało 3,6-krotnym wzrostem całkowitej aktywności transglutaminazy w koncentracie białek SpC. Warto zauważyć, że mimo wzrostu aktywności enzymatycznej z 137 U/mL do 498,6 U/mL, aktywność specyficzna enzymu zmniejszyła się z 16,4 do 14,4 U/mg, co może świadczyć o tym, że ultrafiltracja jedynie koncentrowała białka SpC, bez zwiększania czystości transglutaminazy.

Ultrafiltracja jest szeroko stosowana do koncentracji enzymów i uznawana za podstawowy etap oczyszczania (Rodríguez-Fernández i wsp., 2013). Połączenie ultrafiltracji z innymi technikami (np. chromatografią, immobilizacją na żywicach syntetycznych) często zwiększa wydajność oczyszczania i stabilność enzymu (Ghutake i wsp., 2025). Potwierdzają to badania nad oczyszczaniem transglutaminazy, w których zastosowano alkoholowe i siarczanowe strącanie białek, ultrafiltrację oraz chromatografię żelową, uzyskując enzym o aktywności specyficznej wynoszącej 107,86 U/mg. Ponadto oczyszczony enzym wykazywał wysoką stabilność – jego aktywność utrzymywała się powyżej 90 % po 2 godzinach inkubacji w temperaturze 40 °C, a zakres stabilności pH mieścił się w przedziale 5,0–7,0.

Zhang i wsp. (2012) scharakteryzowali transglutaminazę produkowaną przez *Streptomyces mobaraensis* DSM 40587. Preparat został oczyszczony przy użyciu ultrafiltracji (MWCO 30 kDa) w połączeniu z chromatografią żelową (Sephadex G-75) oraz chromatografią cieczową wysokiej rozdzielczości (SP Sepharose). Ze względu na znaczną ilość chlorku magnezu obecnego w pożywce, dodatek siarczanu amonu powodowałby nadmierne strącanie się tej soli. Autorzy zrezygnowali również z etanolowego strącania enzymu, uzasadniając to możliwą utratą aktywności transglutaminazy. Aktywność specyficzna MTG w płynie pochodowlanym wynosiła 2,93 U/mg i wzrosła do 3,24 U/mg po zastosowaniu ultrafiltracji – co stanowi wzrost o 10,6 %. Zastosowanie chromatografii żelowej pozwoliło uzyskać aktywność specyficzną MTG na poziomie 8,14 U/mg, natomiast chromatografia cieczowa wysokiej rozdzielczości umożliwiła uzyskanie wartości 17,2 U/mg, co stanowi wzrost odpowiednio o 177,8 % i 487,4 %. Oczyszczona transglutaminaza wykazywała najwyższą

aktywność w temperaturze 55 °C oraz przy pH 6,0. Enzym tracił aktywność w temperaturze powyżej 50 °C. Był stabilny przez 12 godzin w zakresie pH 5,0 – 10,0 w temperaturze 4 °C oraz przez 30 minut w zakresie pH 5,0 – 9,0 w temperaturze 37 °C.

Jin i in. (2016) oczyszczali MTG z *S. mobaraensis* TX wyizolowanego z gleby stosując strącanie etanolem, uzasadniając ten wybór wyższą opłacalnością procesu w porównaniu z ultrafiltracją. W płynie pochodzonym aktywność specyficzna transglutaminazy wynosiła 1,75 U/mg, natomiast po strąceniu etanolem uzyskano wartość 7,02 U/mg (wzrost o 301,1 %). W kolejnych etapach oczyszczania zastosowano chromatografię jonowymienną (AKTA Purifier) oraz chromatografię hydrofobową (kolumna fenyl Sepharose), uzyskując, kolejno: 37,9 oraz 39,2 U/mg. Oczyszczona transglutaminaza wykazywała stabilność w szerokim zakresie pH 5,0 – 10,0, a optymalna temperatura jej działania mieściła się w przedziale 45 – 50 °C.

Powyższe wyniki wskazują, że zastosowanie wieloetapowego procesu oczyszczania nie tylko wspomaga koncentrację enzymu, ale również umożliwia jego dalsze przetwarzanie bez utraty aktywności, co jest kluczowe w opracowywaniu stabilnych preparatów enzymatycznych. Wzrost aktywności specyficznej uzyskany w niniejszym badaniu po ultrafiltracji (o 71,4 %) oraz po strąceniu siarczanem amonu (o 134,3 %) potwierdza skuteczność tych metod oczyszczania enzymu, co znajduje również potwierdzenie w przytoczonych badaniach. Warto jednak zauważyć, że pomimo wzrostu aktywności transglutaminazy z 4,29 do 22 U/mL, maksymalna określona aktywność specyficzna nie przekroczyła 1,64 U/mg, co jest wartością niższą w porównaniu do wyników Jin i wsp. (2016) oraz Zhang i wsp. (2012), odpowiednio: 39,2 U/mg i 17,2 U/mg. W przyszłości zastosowane w niniejszym badaniu metody oczyszczania powinny zostać zintegrowane z technikami chromatograficznymi w celu uzyskania konkurencyjnych wartości aktywności specyficznej.

5. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Przedmiotem niniejszej rozprawy była analiza wpływu warunków hodowli mikroorganizmu *Streptoverticillium cinnamoneum* KKP 1658 na aktywność transglutaminazy mikrobiologicznej (MTG) oraz właściwości uzyskanego enzymu. Badania zostały zaplanowane w oparciu o założenie, że odpowiedni dobór parametrów środowiskowych (dawki źródła azotu, początkowego pH pożywki oraz czasu prowadzenia hodowli) może przyczynić się do istotnego zwiększenia wydajności biosyntezy enzymu, zarówno w skali laboratoryjnej (hodowle w kolbach), jak i półtechnicznej (bioreaktory).

Kluczowym etapem rozprawy była optymalizacja fermentacji w bioreaktorze z użyciem metod DoE (metod planowania eksperymentu) i RSM (modelowania powierzchni odpowiedzi), mająca na celu potwierdzenie skalowalności procesu i stabilnej aktywności MTG. Enzym uzyskany w optymalnych warunkach został następnie poddany oczyszczaniu oraz scharakteryzowany pod kątem stabilności temperaturowej i pH, a także stabilności w czasie, co umożliwiło wstępną ocenę jego ewentualnej przydatności w przyszłych zastosowaniach przemysłowych.

Na podstawie literatury przedmiotu oraz przeprowadzonych badań eksperymentalnych dokonano weryfikacji postawionych hipotez, co pozwoliło na sformułowanie następujących stwierdzeń lub wniosków:

1. Zastosowanie niekonwencjonalnego źródła azotu w postaci namoku kukurydzianego, stosowanego w połączeniu z aminobakiem w proporcji 1:1, pozwoliło na istotne zwiększenie aktywności mikrobiologicznej transglutaminazy w porównaniu do standardowego podłoża zawierającego jedynie aminobak. W przeprowadzonych badaniach zaobserwowano, że użycie surowca odpadowego wpłynęło korzystnie na wydajność biosyntezy enzymu. Wyniki te potwierdzają zasadność wprowadzania alternatywnych, przemysłowo dostępnych i korzystnych ekonomicznie substratów do podłoży hodowlanych. Tym samym **hipoteza 1** zakładająca możliwość zwiększenia aktywności MTG poprzez zastosowanie niekonwencjonalnych źródeł azotu została w pełni potwierdzona.
2. Statystyczna optymalizacja warunków hodowli mikrobiologicznej transglutaminazy (MTG) z wykorzystaniem metody RSM może przewyżżyć ograniczenia klasycznych metod empirycznych. Dzięki optymalizacji parametrów hodowli, możliwe jest zwiększenie wydajności biomasy lub produkcji pożądaných metabolitów, co potwierdza założenie **hipotezy 2**.

3. Hodowla szczepu *Streptoverticillium cinnamoneum* KKP 1658 z zastosowaniem optymalnych parametrów środowiskowych (dawka źródła azotu, początkowe pH pożywki i czas prowadzenia hodowli) pozwala na efektywną produkcję transglutaminazy mikrobiologicznej. W skali laboratoryjnej (hodowle w kolbach) uzyskano aktywność MTG **przekraczającą 6 U/mL**, natomiast w bioreaktorze - **ponad 4 U/mL**. Potwierdza to potencjał szczepu do przemysłowej biosyntezy enzymu przy zachowaniu optymalnych warunków hodowli i świadczy o jego dużej aktywności metabolicznej względem wyników dostępnych w literaturze naukowej.
4. Najwyższe aktywności MTG w kolbach uzyskano po **48 godzinach hodowli**, stosując początkowe **pH podłoża w zakresie 6,4 – 6,6** oraz wysokie **dawki źródła azotu > 4 %**. Największy wpływ na produkcję transglutaminazy odnotowano dla czasu prowadzenia hodowli oraz interakcji dawki azotu wraz z początkowym pH podłoża.
5. Wyznaczono optymalne parametry hodowli bioreaktorowej: pH początkowe równe **6,5**, dawka źródła azotu na poziomie **2,75 %** oraz czas prowadzenie hodowli **72** godziny. Po procesie ultrafiltracji zaobserwowano wzrost aktywności specyficznej enzymu o **71,4 %** względem płynu pohodowlanego, co potwierdza efektywność tej metody w kontekście zwiększenia czystości białkowego preparatu. Dalsze wytrącanie siarczanem amonu umożliwiło uzyskanie aktywności specyficznej na poziomie **1,64 U/mg białka**.
6. Skalowanie procesu z hodowli kolbowej do bioreaktora doprowadziło do spadku aktywności enzymu w płynie pohodowlanym oraz wydłużenia optymalnego czasu fermentacji, co potwierdziło **hipotezę 3**.
7. Oczyszczony enzym wykazywał korzystne właściwości stabilności temperaturowej i pH. Maksymalną aktywność zaobserwowano po 120 minutach inkubacji w temperaturze **28 °C**, przy czym zakres temperatury, w których stabilność była największa wynosił **20 – 37 °C**. Całkowita dezaktywacja enzymu następowała przy temperaturze **60 °C**. Transglutaminaza zachowywała wysoką aktywność w szerokim zakresie pH (**5,0 – 8,0**), osiągając maksimum przy pH **7,0**. Gwałtowny spadek aktywności odnotowano poniżej pH **5,0**, natomiast w środowisku zasadowym (pH **9,0**) aktywność obniżała się nieznacznie.
8. Uzyskane wyniki wskazują, że *S. cinnamoneum* KKP 1648 może być efektywnym producentem MTG w warunkach bioreaktorowych, a zoptymalizowany proces fermentacji pozwala na uzyskanie enzymu o stabilnych właściwościach w szerokim

zakresie temperatury i pH. Warto podkreślić, że zastosowanie odpadowego namoku kukurydzianego jako składnika pożywki hodowlanej przyczyniło się do optymalizacji procesu. W przyszłych badaniach warto skupić się na możliwości wykorzystania jeszcze większej liczby odpadowych surowców jako składników pożywek mikrobiologicznych, co pozwoliłoby na dalsze ograniczenie kosztów produkcji oraz zmniejszenie obciążenia środowiskowego. Kolejne badania powinny również koncentrować się na praktycznym zastosowaniu uzyskanej transglutaminazy w technologii żywności, szczególnie w produktach mięsnych, piekarniczych czy nabiałe, gdzie enzym ten może znacząco poprawiać teksturę i jakość finalnego produktu.

6. SPIS LITERATURY

- Abdel-Mageed, H. M., Barakat, A. Z., Bassuiny, R. I., Elsayed, A. M., Salah, H. A., Abdel-Aty, A. M., & Mohamed, S. A. (2022). Biotechnology approach using watermelon rind for optimization of α -amylase enzyme production from *Trichoderma virens* using response surface methodology under solid-state fermentation. *Folia Microbiologica*, 67, 253–264. <https://doi.org/10.1007/s12223-021-00929-2>
- Adnan, A., Mehmood, Z., Syed, Q., & Mushtaq, Z. (2014). Process optimization by response surface methodology for extracellular alkaline protease production from *Bacillus subtilis*. *Pakistan Journal of Botany*, 46, 699–704.
- Agatonovic-Kustrin, S., & Beresford, R. (2000). Basic concepts of artificial neural network (ANN) modeling and its application in pharmaceutical research. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 22, 717–727. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(99\)00272-1](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(99)00272-1)
- Aidaroos, H.I., Du, G., & Chen, J. (2011). Microbial fed-batch production of transglutaminase using ammonium sulphate and calcium chloride by *Streptomyces hygroscopicus*.
- Akbari, M., Razavi, S. H., & Kieliszek, M. (2021). Recent advances in microbial transglutaminase biosynthesis and its application in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 458–469. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.036>
- Al-Saadi, S. N., & Al-Jabri, K. S. (2020). Optimization of envelope design for housing in hot climates using a genetic algorithm (GA) computational approach. *Journal of Building Engineering*, 32, 101712. <https://doi.org/10.1016/j.jobe.2020.101712>
- Ando, H., Adachi, M., Umeda, K., Matsuura, A., Nonaka, M., Uchio, R., *et al.* (1989). Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53, 2613–2617. <https://doi.org/10.1080/00021369.1989.10869735>
- Antecka, A., Blatkiewicz, M., Boruta, T., Górak, A., & Ledakowicz, S. (2019). Comparison of downstream processing methods in purification of highly active laccase. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 42(10), 1635–1645. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02160-3>
- Atilgan, E., & Kilic, B. (2017). Effects of microbial transglutaminase, fibrinex and alginate on physicochemical properties of cooked ground meat with reduced salt level. *Journal of Food Science and Technology*, 54, 303–312. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2463-x>

- Bayuo, J., Abukari, M. A., & Pelig-Ba, K. B. (2020). Optimization using central composite design (CCD) of response surface methodology (RSM) for biosorption of hexavalent chromium from aqueous media. *Applied Water Science*, 10, 12. <https://doi.org/10.1007/s13201-020-01213-3>
- Bellucci, E. R. B., Munekata, P. E. S., Pateiro, M., Lorenzo, J. M., & da Silva Barretto, A. C. (2021). Red pitaya extract as natural antioxidant in pork patties with total replacement of animal fat. *Meat Science*, 171, 108284. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108284>
- Beltrán-Ramírez, F., Orona-Tamayo, D., Cornejo-Corona, I., et al. (2019). Agro-industrial waste revalorization: The growing biorefinery. In *Biomass, bioenergy – Recent trends and future challenges*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.83569>
- Bonet, A., Caballero, P. A., Gómez, M., & Rosell, C. M. (2005). Microbial transglutaminase as a tool to restore the functionality of gluten from insect-damaged wheat. *Cereal Chemistry*, 82, 425–430. <https://doi.org/10.1094/CC-82-0425>
- Bzducha-Wróbel, A., Pobiega, K., Błażej, S., & Kieliszek, M. (2018). The scale-up cultivation of *Candida utilis* in waste potato juice water with glycerol affects biomass and $\beta(1,3)/(1,6)$ -glucan characteristic and yield. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, 9131–9145. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9357-y>
- Campos, A., Carvajal-Vallejos, P. K., Villalobos, E., Franco, C. F., Almeida, A. M., Coelho, A. V., et al. (2010). Characterisation of *Zea mays* L. plastidial transglutaminase: Interactions with thylakoid membrane proteins. *Plant Biology*, 12, 708–716. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2009.00280.x>
- Ceresino, E. B., de Melo, R. R., Kuktaite, R., Hedenqvist, M. S., Zucchi, T. D., Johansson, E., & Sato, H. H. (2018). Transglutaminase from newly isolated *Streptomyces* sp. CBMAI 1617: Production optimization, characterization and evaluation in wheat protein and dough systems. *Food Chemistry*, 241, 403–410. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.010>
- Clarke, D. D., Neidle, A., Sarkar, N. K., & Waelsch, H. (1957). Metabolic activity of protein amide groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 71, 277–279. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(57\)90030-9](https://doi.org/10.1016/0003-9861(57)90030-9)
- Cui, L., Du, G., Zhang, D., Liu, H., & Chen, J. (2007). Purification and characterization of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygroscopicus*. *Food Chemistry*, 105, 612–618. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.020>

- de Barros Soares, H., Assmann, F., & Záchia Ayub, M. A. (2003). Purification and properties of a transglutaminase produced by a *Bacillus circulans* strain isolated from the Amazon environment. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 37, 295–299. <https://doi.org/10.1042/BA20020110>
- de la Lama-Calvente, D., Fernández-Rodríguez, M. J., Garrido-Fernández, A., & Borja, R. (2024). Process optimization of the extraction of reducing sugars and total phenolic compounds from the invasive alga *Rugulopteryx okamurae* by response surface methodology (RSM). *Algal Research*, 80, 103500. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2024.103500>
- Di Masi, S., De Benedetto, G. E., & Malitesta, C. (2024). Optimisation of electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers: From OFAT to machine learning. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 416, 2261–2275. <https://doi.org/10.1007/s00216-023-05085-9>
- Diowski, A., & Leszczyńska, J. (2016). Wpływ transglutaminazy na jakość i immunoreaktywność pieczywa pszennego o małej zawartości glutenu. In A. Duda-Chodak, D. Najgebauer-Lejko, I. Drożdż, & T. Tarko (Eds.), *Rola procesów technologicznych w kształtowaniu jakości żywności* (pp. 42–50). Łódź: Lodz University of Technology.
- Duarte, L. S., Barsé, L. Q., Dalberto, P. F., da Silva, W. T. S., Rodrigues, R. C., Machado, P., et al. (2020a). Cloning and expression of the *Bacillus amyloliquefaciens* transglutaminase gene in *E. coli* using a bicistronic vector construction. *Enzyme and Microbial Technology*, 134, 109468. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109468>
- Duarte, L., Matte, C. R., Bizarro, C. V., & Ayub, M. A. Z. (2020b). Review transglutaminases: Part II—Industrial applications in food, biotechnology, textiles and leather products. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36, 1–20. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2792-9>
- Duran, R., Junqua, M., Schmitter, J. M., Gancet, C., & Goulas, P. (1998). Purification, characterisation, and gene cloning of transglutaminase from *Streptoverticillium cinnamomeum* CBS 683.68. *Biochimie*, 80, 313–319.
- Dzhumanova, N. E., & Nazarova, F. S. (2022). Probable negative impact of genetically modified products on human health. *Thematics Journal of Botany*, 6, 2250–2379.
- Ebrahimi Samani, S., Tatsukawa, H., Hitomi, K., & Kaartinen, M. T. (2024). Transglutaminase 1: Emerging functions beyond skin. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(19), 10306. <https://doi.org/10.3390/ijms251910306>

- Eshra, D., El-Iraki, S., & Bakr, T. A. (2015). Isolation and identification of *Actinomycetes* transglutaminase producing strains. *International Journal of Current Science Research*, 18, 76–88.
- Færgemand, M., & Qvist, K. B. (1997). Transglutaminase: Effect on rheological properties, microstructure and permeability of set style acid skim milk gel. *Food Hydrocolloids*, 11, 287–292.
- Fasim, A., More, V. S., & More, S. S. (2021). Large-scale production of enzymes for biotechnology uses. *Current Opinion in Biotechnology*, 69, 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.12.002>
- Fatima, S. W., & Khare, S. K. (2018). Current insight and futuristic vistas of microbial transglutaminase in nutraceutical industry. *Microbiological Research*, 215, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.06.001>
- Fatima, S. W., Tiwari, R., & Khare, S. K. (2019). Utilization of agro-industrial waste for production of transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis*. *Bioresource Technology*, 287, 121391. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121391>
- Flórez Guzmán, G. Y., Hurtado, G. B., & Ospina, S. A. (2018). New dextransucrase purification process of the enzyme produced by *Leuconostoc mesenteroides* IBUN 91.2.98 based on binding product and dextranase hydrolysis. *Journal of Biotechnology*, 265, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.10.019>
- Folk, J. E., & Cole, P. W. (1966). Mechanism of action of guinea pig liver transglutaminase: I. Purification and properties of the enzyme: Identification of a functional cysteine essential for activity. *Journal of Biological Chemistry*, 241, 5518–5525.
- Fox, P., Guinee, T., Cogan, T., & McSweeney, P. (2017). Cheese yield. In P. F. Fox, T. P. Guinee, T. M. Cogan, & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Fundamentals of cheese science* (2nd ed., pp. 279–331). Springer Nature.
- Freddi, A., & Salmon, M. (2019). *Design principles and methodologies*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-95342-7>
- Fuchsbaauer, H.-L. (2021). Approaching transglutaminase from *Streptomyces* bacteria over three decades. *The FEBS Journal*, 288(13), 3995–4012. <https://doi.org/10.1111/febs.15792>
- Ghutake, S., Garge, V., & Pawar, H. (2025). An efficient and industrially feasible process for purification and immobilization of orange-peel-based lipase for biocatalytic applications. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 19, 420–436. <https://doi.org/10.1002/bbb.2725>

- Gong, P., Di, W., Yi, H., Sun, J., Zhang, L., & Han, X. (2019). Improved viability of spray-dried *Lactobacillus bulgaricus* sp1.1 embedded in acidic-basic proteins treated with transglutaminase. *Food Chemistry*, 281, 204–212. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.095>
- Guerra-Rodríguez, E., & Vázquez, M. (2014). Evaluation of a novel low-cost culture medium containing exclusively milk, potato and glycerol for microbial transglutaminase production by *Streptomyces mobaraensis*. *Chemical Engineering Research and Design*, 92, 784–791. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2013.06.027>
- Heidebach, T., Först, P., & Kulozik, U. (2009). Transglutaminase-induced caseinate gelation for the microencapsulation of probiotic cells. *International Dairy Journal*, 19, 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.08.003>
- Hemici, A., Benerbaiha, R. S., & Bendjeddou, D. (2017). Purification and biochemical characterization of a 22-kDa stable cysteine-like protease from the excretory-secretory product of the liver fluke *Fasciola hepatica* by using conventional techniques. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1068–1069, 268–276. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.10.049>
- Herz, E. M., Schäfer, S., Terjung, N., Gibis, M., & Weiss, J. (2021). Influence of transglutaminase on glucono- δ -lactone-induced soy protein gels. *ACS Food Science & Technology*, 1(8), 1412–1417. <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.1c00102>
- Huang, Y., Jin, M., Yan, W., Wu, Q., Niu, Y., Zou, C., *et al.* (2022). A point mutant in the promoter of transglutaminase gene dramatically increased yield of microbial transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* TX1. *Process Biochemistry*, 112, 92–97. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.11.021>
- Jaros, D., Partschfeld, C., Henle, T., & Rohm, H. (2006). Transglutaminase in dairy products: Chemistry, physics, applications. *Journal of Texture Studies*, 37, 113–155. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.2006.00042.x>
- Jiang, L. (2010). Optimization of fermentation conditions for pullulan production by *Aureobasidium pullulans* using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 79, 414–417. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.08.027>
- Jin, M., Huang, J., Pei, Z., Huang, J., Gao, H., & Chang, Z. (2016). Purification and characterization of a high-salt-resistant microbial transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 133, 6–11.
- Juettner, N. E., Classen, M., Colin, F., Hoffmann, S. B., Meyners, C., Pfeifer, F., *et al.* (2018). Features of the transglutaminase-activating metalloprotease from *Streptomyces*

- mobaraensis* DSM 40847 produced in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 281, 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.004>
- Kanaji, T., Ozaki, H., Takao, T., Kawajiri, H., Ide, H., Motoki, M., *et al.* (1993). Primary structure of microbial transglutaminase from *Streptoverticillium* sp. strain S-8112. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 11565–11572. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)50238-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)50238-1)
- Kieliszek, M., & Misiewicz, A. (2014). Microbial transglutaminase and its application in the food industry: A review. *Folia Microbiologica*, 59, 241–250. <https://doi.org/10.1007/s12223-013-0287-x>
- Kim, S. Y., & Keillor, J. W. (2020). A precision strategy to cure renal cell carcinoma by targeting transglutaminase 2. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2493. <https://doi.org/10.3390/ijms21072493>
- Kołakowski, E., & Sikorski, Z. E. (2001). Transglutaminaza i jej wykorzystanie w przemyśle żywnościowym. *Żywność*, 2(27), 5–20.
- Kolotyło, V., Piwowarek, K., & Kieliszek, M. (2023). Microbiological transglutaminase: Biotechnological application in the food industry. *Open Life Sciences*, 18(1), 20220737. <https://doi.org/10.1515/biol-2022-0737>
- Kolotyło, V., Piwowarek, K., & Kieliszek, M. (2024). Production of microbial transglutaminase by *Streptoverticillium cinnamoneum* KKP 1658. *EXCLI Journal*, 23, 655–671. <https://doi.org/10.17179/excli2024-7033>
- Kolotyło, V., Piwowarek, K., Synowiec, A., & Kieliszek, M. (2025a). Optimization of fermentation conditions for microbial transglutaminase production by *Streptoverticillium cinnamoneum* KKP 1658 using response surface methodology (RSM). *Folia Microbiologica*, 70(1), 259–269. <https://doi.org/10.1007/s12223-024-01223-7>
- Kolotyło V., Piwowarek K., Synowiec A., Gientka I., Kieliszek M. (2025b). Characterisation and optimisation of microbial production of transglutaminase produced by *Streptoverticillium cinnamoneum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 109, 228. DOI: 10.1007/s00253-025-13606-y.
- Kot, A. M., Błażej, S., Kieliszek, M., *et al.* (2020a). Production of lipids and carotenoids by *Rhodotorula gracilis* ATCC 10788 yeast in a bioreactor using low-cost wastes. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 26, 101634. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101634>

- Kot, A. M., Pobiega, K., Piwowarek, K., et al. (2020b). Biotechnological methods of management and utilization of potato industry waste—A review. *Potato Research*, 63, 431–447. <https://doi.org/10.1007/s11540-019-09449-6>
- Krishnan, S., Nasrullah, M., Kamyab, H., Suzana, N., Munaim, M. S. A., Wahid, Z. A., Ali, I. H., Salehi, R., & Chaiprapat, S. (2022). Fouling characteristics and cleaning approach of ultrafiltration membrane during xylose reductase separation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 45(7), 1125–1136. <https://doi.org/10.1007/s00449-022-02726-8>
- Krstić, D. M., Antov, M. G., Peričin, D. M., Höflinger, W., & Tekić, M. N. (2007). The possibility for improvement of ceramic membrane ultrafiltration of an enzyme solution. *Biochemical Engineering Journal*, 33(1), 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.08.016>
- Kuraishi, C., Sakamoto, J., Yamazaki, K., Susa, Y., Kuhara, C., & Soeda, T. (1997). Production of restructured meat using microbial transglutaminase without salt or cooking. *Journal of Food Science*, 62, 488–490. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1997.tb04412.x>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lerner, A., Benzvi, C., & Vojdani, A. (2025). The frequently used industrial food process additive, microbial transglutaminase: Boon or bane. *Nutrition Reviews*, 83(3), e1286–e1294. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuae087>
- Li, C., Wang, C. L., Sun, Y., Li, A. L., Liu, F., & Meng, X. C. (2016). Microencapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* GG by transglutaminase cross-linked soy protein isolate to improve survival in simulated gastrointestinal conditions and yoghurt. *Journal of Food Science*, 81(M7), M1726–M1734. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13337>
- Li, H., Li, Y., Zhang, T., Liu, T., Yang, J., Luo, X., Li, H., Xue, C., & Yu, J. (2021). Co-encapsulation of *Lactobacillus paracasei* with lactitol in caseinate gelation cross-linked by *Zea mays* transglutaminase. *LWT – Food Science and Technology*, 147, 111535. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111535>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1250-8>
- Lima, C. A., Bento, H. B. S., Picheli, F. P., et al. (2023). Process development and techno-economic analysis of co-production of colorants and enzymes valuing agro-industrial

- citrus waste. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 35, 101204. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2023.101204>
- Liu, J., Dai, S., Bao, X., et al. (2023). Investigation into the influence of droplet size on the stability of diesel emulsions based on multiple light scattering. *Journal of Molecular Liquids*, 390, 123182. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.123182>
- Liu, S., Wan, D., Wang, M., Madzak, C., Du, G., & Chen, J. (2015). Overproduction of pro-transglutaminase from *Streptomyces hygroscopicus* in *Yarrowia lipolytica* and its biochemical characterization. *BMC Biotechnology*, 15, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12896-015-0193-1>
- Liu, S., Wang, M., Du, G., & Chen, J. (2016). Improving the active expression of transglutaminase in *Streptomyces lividans* by promoter engineering and codon optimization. *BMC Biotechnology*, 16, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12896-016-0304-7>
- Loveday, S. M. (2019). Food proteins: Technological, nutritional, and sustainability attributes of traditional and emerging proteins. *Annual Review of Food Science and Technology*, 10, 311–339. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121128>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6)
- Ma, A. Y. M., & Ooraikul, B. (1986). Optimization of enzymatic hydrolysis of canola meal with response surface methodology. *Journal of Food Process Engineering*, 10, 99–113. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.1986.tb00010.x>
- Ma, L., Wang, L., Tang, J., & Yang, Z. (2016). Optimization of arsenic extraction in rice samples by Plackett–Burman design and response surface methodology. *Food Chemistry*, 204, 283–288. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.126>
- Macedo, J. A., Sette, L. D., & Sato, H. H. (2007). Optimization of medium composition for transglutaminase production by a Brazilian soil *Streptomyces* sp. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10, 618–626.
- Macedo, J. A., Sette, L. D., & Sato, H. H. (2011). Purification and characterization of a new transglutaminase from *Streptomyces* sp. isolated in Brazilian soil. *Journal of Food Biochemistry*, 35, 1361–1372. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2010.00456.x>
- Martins, I. M., & Choupina, A. (2018). Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase. In S. Choi (Ed.), *Encyclopedia of signaling molecules* (pp. 4253–4257). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-67199-4_101758

- Martins, I.M., Matos, M., Costa, R. *et al.* (2014) Transglutaminases: recent achievements and new sources. *Applied Microbiology and Biotechnology* **98**, 6957–6964. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5894-1>
- Meiying, Z., Guocheng, D., & Jian, C. (2002). pH control strategy of batch microbial transglutaminase production with *Streptoverticillium mobaraense*. *Enzyme and Microbial Technology*, *31*, 477–481.
- Miwa, N. (2020). Innovation in the food industry using microbial transglutaminase: Keys to success and future prospects. *Analytical Biochemistry*, *597*, 113638. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113638>
- Monsalve-Atencio, R., Sanchez-Soto, K., Chica, J., Camaño Echavarría, J. A., & Vega-Castro, O. (2022). Interaction between phospholipase and transglutaminase in the production of semi-soft fresh cheese and its effect on the yield, composition, microstructure and textural properties. *LWT*, *154*, 112722. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112722>
- Motoki, M., & Seguro, K. (1998). Transglutaminase and its use for food processing. *Trends in Food Science & Technology*, *9*(5), 204–210. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(98\)00038-7](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(98)00038-7)
- Mu, D., Lu, J., Qiao, M., Kuipers, O. P., Zhu, J., Li, X., *et al.* (2018). Heterologous signal peptides-directing secretion of *Streptomyces mobaraensis* transglutaminase by *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*, 5533–5543. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9000-y>
- Nagy, V., & Szakacs, G. (2008). Production of transglutaminase by *Streptomyces* isolates in solid-state fermentation. *Letters in Applied Microbiology*, *47*, 122–127. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2008.02395.x>
- Nascimento, R. P., Junior, N. A., Pereira, N., Bon, E. P. S., & Coelho, R. R. R. (2009). Brewer's spent grain and corn steep liquor as substrates for cellulolytic enzymes production by *Streptomyces malaysiensis*. *Letters in Applied Microbiology*, *48*, 529–535.
- Nor, M. Z. M., Ramchandran, L., Duke, M., & Vasiljevic, T. (2017). Integrated ultrafiltration process for the recovery of bromelain from pineapple waste mixture. *Journal of Food Process Engineering*, *40*(3), e12492. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12492>
- Ogidi, C. O., George, O. H., Aladejana, O. M., Malomo, O., & Famurewa, O. (2020). Fruit preservation with bioethanol obtained from the fermentation of brewer's spent grain with *Saccharomyces carlsbergensis*. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, *73*(3), 9321-9331. <https://doi.org/10.15446/rfnam.v73n3.85316>

- Özer, E. D., & Öner, Z. (2018). Comparison of different methods for beta lactoglobulin isolation. *Food and Health*, 4(1), 1–8. <https://doi.org/10.3153/jfhs18001>
- Parrotta, L., Tanwar, U. K., Aloisi, I., Sobieszczuk-Nowicka, E., Arasimowicz-Jelonek, M., & Del Duca, S. (2022). Plant Transglutaminases: New Insights in Biochemistry, Genetics, and Physiology. *Cells*, 11(9), 1529. <https://doi.org/10.3390/cells11091529>
- Pietracha, D., Zdziennicki, F., Misiewicz, A., Szewczuk, K., & Mikołajczuk-Szczyrba, A. (2015). Wpływ zmian objętości hodowli inokulacyjnej *Streptovercillium mobaraense* na aktywność transglutaminazy pochodzenia mikrobiologicznego. *Postępy Nauki i Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego*, 70(3), 17-25.
- Porta, R., Di Pierro, P., Rossi-Marquez, G., Mariniello, L., Kadivar, M., & Arabestani, A. (2015). Microstructure and properties of bitter vetch (*Vicia ervilia*) protein films reinforced by microbial transglutaminase. *Food Hydrocolloids*, 50, 102–107. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.04.008>
- Portilla Rivera, Ó. M., Téllez Luis, S. J., Ramírez de León, J. A., & Vázquez Vázquez, M. (2009). Production of microbial transglutaminase on media made from sugar cane molasses and glycerol. *Food Technology and Biotechnology*, 47, 19–26.
- Poulsen, L. K., & Bindslev-Jensen, C. (2007). Practical application of allergenic risk assessment of proteins. In C. Clare Mills, H. Wichers, & K. Hoffmann-Sommergruber (Eds.), *Managing allergens in food* (pp. 251–261). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781845692278.3.251>
- Preichardt, L. D., Haubert, L., Sawitzki, M. C., Bertol, T. M., Vicenzi, R., Meinhart, A. D., Da Silva, W. P., & Fiorentini, Â. M. (2019). Multivariate optimization of *Staphylococcus xylosus* AD1 biomass production using sugarcane molasses plus yeast extract and soybean meal. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 41, e47487. <https://doi.org/10.4025/actascibiols.v41i1.47487>
- Rajendran, A., & Thangavelu, V. (2013). Utilizing agricultural wastes as substrates for lipase production by *Candida rugosa* NCIM 3462 in solid-state fermentation: Response surface optimization of fermentation parameters. *Waste and Biomass Valorization*, 4, 347–357. <https://doi.org/10.1007/s12649-012-9140-8>
- Rodríguez-Fernández, D. E., Parada, J. L., Medeiros, A. B. P., De Carvalho, J. C., Lacerda, L. G., Rodríguez-León, J. A., & Soccol, C. R. (2013). Concentration by ultrafiltration and stabilization of phytase produced by solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 48(3–4), 374–379. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.12.021>

- Romeih, E., & Walker, G. (2017). Recent advances on microbial transglutaminase and dairy application. *Trends in Food Science & Technology*, 62, 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.02.015>
- Roseiro, J. C., Esgalhado, M. E., Amaral-Collaco, M. T., & Emery, A. N. (1992). Medium development for xanthan production. *Process Biochemistry*, 27, 167–175. [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(92\)87005-2](https://doi.org/10.1016/0032-9592(92)87005-2)
- Roy Choudhury, A. K. (2020). Introduction to enzymes. In R. Nayak (Ed.), *Sustainable technologies for fashion and textiles* (pp. 75–90). Woodhead Publishing.
- Ryszka, L., Krakowiak, A., Trzcińska, M., & Czakaj, J. (2009). Wpływ warunków hodowli na wytwarzanie transglutaminazy przez *Streptoverticillium mobaraense*. *Pamiętnik Puławski*, 151, 619–630.
- Sadowska, A., & Diowks, A. (2016). Właściwości transglutaminazy i jej rola w piekarstwie. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 23(5), 9–17. <https://doi.org/10.15193/zntj/2016/108/145>
- Sadowska, A., & Diowks, A. (2020). Wpływ transglutaminazy na objętość właściwą i porowatość miękiszu bezglutenowego chleba gryczanego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 27, 74–84. <https://doi.org/10.15193/zntj/2020/122/323>
- Samelak, A., Sobieszczuk-Nowicka, E., & Legocka, J. (2010). Transglutaminazy i ich biologiczne funkcje. *Postępy Biologii Komórki*, 37, 599–612.
- Schomburg, D., & Stephan, D. (1996). Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase. In D. Schomburg & D. Stephan (Eds.), *Enzyme Handbook 12* (pp. 61–71). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-61117-9_13
- Serafini-Fracassini, D., Della Mea, M., Tasco, G., Casadio, R., & Del Duca, S. (2009). Plant and animal transglutaminases: Do similar functions imply similar structures? *Amino Acids*, 36, 643–657. <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0131-9>
- Shad, A. A., Ahmad, T., Iqbal, M. F., Asad, M. J., Nazir, S., Mahmood, R. T., & Wajeeha, A. W. (2024). Production, partial purification and characterization of protease through response surface methodology by *Bacillus subtilis* K-5. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 67, e24210355. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2024210355>
- Singh, V., Haque, S., Niwas, R., Srivastava, A., Pasupuleti, M., & Tripathi, C. K. M. (2017). Strategies for fermentation medium optimization: An in-depth review. *Frontiers in Microbiology*, 7, 2087. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02087>
- Sobieszczuk-Nowicka, E., Krzesłowska, M., & Legocka, J. (2008). Transglutaminases and their substrates in kinetin-stimulated etioplast-to-chloroplast transformation in

- cucumber cotyledons. *Protoplasma*, 233, 187–194. <https://doi.org/10.1007/s00709-008-0002-y>
- Sorde, K. L., & Ananthanarayan, L. (2019). Isolation, screening, and optimization of bacterial strains for novel transglutaminase production. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 49(1), 64–73. <https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1536986>
- Suzuki, S., Izawa, Y., Kobayashi, K., Eto, Y., Yamanaka, S., Kubota, K., & Yokozeki, K. (2000). Purification and characterization of novel transglutaminase from *Bacillus subtilis* spores. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64(11), 2344–2351. <https://doi.org/10.1271/bbb.64.2344>
- Téllez-Luis, S. J., González-Cabriaes, J. J., Ramírez, J. A., & Vázquez, M. (2004). Production of transglutaminase by *Streptovercillium ladakanum* NRRL-3191 grown on media made from hydrolysates of sorghum straw. *Food Technology and Biotechnology*, 42, 1–4.
- Türkanoglu Özçelik, A., Ersöz, F., & İnan, M. (2019). Extracellular production of the recombinant bacterial transglutaminase in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 159, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2019.03.003>
- Udomrati, S., Pantoa, T., Sorndech, W., & Ploypetchara, T. (2024). Investigation of transglutaminase incubated condition on crosslink and rheological properties of soy protein isolate, and their effects in plant-based patty application. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 18, 8811–8824. <https://doi.org/10.1007/s11694-024-02846-7>
- Vasić, K., Knez, Ž., & Leitgeb, M. (2023). Transglutaminase in foods and biotechnology. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(15), 12402. <https://doi.org/10.3390/ijms241512402>
- Wan, W., He, D., Xue, Z., & Zhang, Z. (2017). Specific mutation of transglutaminase gene from *Streptomyces hygroscopicus* H197 and characterization of microbial transglutaminase. *Journal of Biosciences*, 42(4), 537–546. <https://doi.org/10.1007/s12038-017-9707-4>
- Wang, H., Chen, H., Li, Q., Yu, F., Yan, Y., Liu, S., et al. (2022). Enhancing the thermostability of transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* based on the rational design of a disulfide bond. *Protein Expression and Purification*, 195–196, 106079. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2022.106079>

- Wang, L., & Wang, Y. (2024). Transglutaminases from microorganisms. In Y. Zhang & B. K. Simpson (Eds.), *Transglutaminase* (pp. 1–19). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-19168-8.00003-1>
- Wang, L., Yu, B., Wang, R., & Xie, J. (2018). Biotechnological routes for transglutaminase production: Recent achievements, perspectives and limits. *Trends in Food Science & Technology*, *81*, 116–120. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.015>
- Washizu, K., Ando, K., Koikeda, S., Takeuchi, K., Hirose, S., Matsuura, A., et al. (1994). Molecular cloning of the gene for microbial transglutaminase from *Streptoverticillium* and its expression in *Streptomyces lividans*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *58*, 82–87.
- Wen, Y., Kim, H. W., & Park, H. J. (2022). Effects of transglutaminase and cooking method on the physicochemical characteristics of 3D-printable meat analogs. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *81*, 103114. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.103114>
- Wu, Z., Liu, C., Zhang, Z., Zheng, R., & Zheng, Y. (2020). Amidase as a versatile tool in amide-bond cleavage: From molecular features to biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, *43*, 107574. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107574>
- Xavier, J. R., Ramana, K. V., & Sharma, R. K. (2017). Screening and statistical optimization of media ingredients for production of microbial transglutaminase. *Defence Life Science Journal*, *2*, 216–225.
- Xing, G., Hui, T., Liu, J., & Yang, S. (2024). Impact of transglutaminase-mediated crosslinking on the conformational changes in a dual-protein system and IgE reactivity of soy protein. *Molecules*, *29*(14), 3371. <https://doi.org/10.3390/molecules29143371>
- Yan, G., Du, G., Li, Y., Chen, J., & Zhong, J. (2005). Enhancement of microbial transglutaminase production by *Streptoverticillium mobaraense*: Application of a two-stage agitation speed control strategy. *Process Biochemistry*, *40*, 963–968. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.04.002>
- Yokoyama, K., Nio, N., & Kikuchi, Y. (2004). Properties and applications of microbial transglutaminase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *64*, 447–454. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1539-5>
- Yokoyama, K., Utsumi, H., Nakamura, T., Ogaya, D., Shimba, N., Suzuki, E., et al. (2010). Screening for improved activity of a transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* created by a novel rational mutagenesis and random mutagenesis. *Applied*

- Microbiology and Biotechnology*, 87, 2087–2096. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2656-6>
- Yongsawatdigul, J., & Piyadhamviboon, P. (2007). Gel-enhancing effect and protein cross-linking ability of tilapia sarcoplasmic proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(15), 2810–2816. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2993>
- Yongsawatdigul, J., Hamzeh, A., & Hemung, B. (2024). Transglutaminases from animals. In Y. Zhang & B. K. Simpson (Eds.), *Transglutaminase* (pp. 37–63). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-19168-8.00008-0>
- Yu, Y. J., Wu, S. C., Chan, H. H., Chen, Y. C., Chen, Z. Y., & Yang, M. T. (2008). Overproduction of soluble recombinant transglutaminase from *Streptomyces netropsis* in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81, 523–532. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1688-7>
- Zhang, D., Zhu, Y., & Chen, J. (2009). Microbial transglutaminase production: Understanding the mechanism. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 26, 205–222.
- Zhang, L., Zhang, L., Han, X., Du, M., Zhang, Y., Feng, Z., et al. (2012). Enhancement of transglutaminase production in *Streptomyces mobaraensis* as achieved by treatment with excessive MgCl₂. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, 2335–2343. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3790-5>
- Zhao, L., Chen, M.-H., Bi, X., & Du, J. (2023). Physicochemical properties, structural characteristics and *in vitro* digestion of brown rice–pea protein isolate blend treated by microbial transglutaminase. *Food Hydrocolloids*, 141, 108673. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.108673>
- Zheng, M., Du, G., Chen, J., & Lun, S. (2002). Modelling of temperature effects on batch microbial transglutaminase fermentation with *Streptoverticillium mobaraense*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18, 767–771. <https://doi.org/10.1023/A:1020472908615>
- Zhu, Y., Rinzema, A., Tramper, J., & Bol, J. (1995). Microbial transglutaminase: A review of its production and application in food processing. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44, 277–282. <https://doi.org/10.1007/BF00169916>
- Zilda, D. S., Fawzya, Y. N., Nur'amaliyah, L. S., Prestisia, H. N., Mubarik, N. R., & Lisdiyanti, P. (2017). Optimum age of starter for microbial transglutaminase (MTGase) production produced by *Streptomyces thioluteus* TTA 02 SDS 14 and characterization of crude enzyme. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*, 12, 11–18. <https://doi.org/10.15578/squalen.283>

7. DOROBIEK NAUKOWY

Publikacje naukowe stanowiące rozprawę doktorską:

1. **V. Kolotyło**, K. Piwowarek, M. Kieliszek 2023: Microbiological transglutaminase: Biotechnological application in the food industry. *Open Life Sciences* 18(1), 1-22. DOI: 10.1515/biol-2022-0737.
2. **V. Kolotyło**, K. Piwowarek, M. Kieliszek 2024: Production of microbial transglutaminase by *Streptoverticillium cinnamoneum* KKP 1658. *EXCLI Journal* 23, 655-671. DOI: 10.17179/excli2024-7033.
3. **V. Kolotyło**, K. Piwowarek, A. Synowiec, M. Kieliszek 2025: Optimization of fermentation conditions for microbial transglutaminase production by *Streptoverticillium cinnamoneum* KKP 1658 using response surface methodology (RSM). *Folia Microbiologica* 70, 259-269. DOI: 10.1007/s12223-024-01223-7.
4. **V. Kolotyło**, K. Piwowarek, A. Synowiec, I. Gientka, M. Kieliszek 2025: Characterisation and optimisation of microbial production of transglutaminase produced by *Streptoverticillium cinnamoneum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 109, 228. DOI: 10.1007/s00253-025-13606-y.

Pozostałe publikacje naukowe (według daty opublikowania od najnowszej)

1. Kieliszek M., Kot A., **Kolotyło V.** 2023: Bioaccumulation of selenium and production of carotenoids by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 53, 1-11. DOI:10.1016/j.bcab.2023.102903.
2. Piwowarek K., Lipińska E., Hać-Szymańczuk E., **Kolotyło V.**, Kieliszek M. 2022: Use of apple pomace, glycerine, and potato wastewater for the production of propionic acid and vitamin B12. *Applied Microbiology and Biotechnology* 106(17), 5433-5448. DOI: 10.1007/s00253-022-12076-w.
3. Kieliszek M., **Kolotyło V.**, Mikołajczuk-Szczyrba A., Giurgiulescu L., Kot A.M., Kalisz S., Pobiega K., Cendrowski A. 2021: Isolation and identification of new yeast strains from bee bread. *Carpathian Journal of Food Science and Technology* 13(1), 207-213. DOI:10.34302/crpjfst/2021.13.1.17.

Doniesienia na konferencjach naukowych

1. **Kolotyło V.** Production of microbial transglutaminase in a medium supplemented with corn steep liquor by *Streptoverticillium cinnamoneum* KKP 1658. X Ogólnopolska Konferencja Naukowa Promovendi „e-Factory of Science”, 25.11.2023, prezentacja

- on-line, język polski. Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego.
2. **Kolotyło V.**, Piwowarek K., Kieliszek M. Microbiological production of transglutaminase. 7th International Symposium: Microorganisms and their metabolites – a microworld of great opportunities and dangers, 29-30.11.2023, prezentacja on-line, język polski. Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego.
 3. **Kolotyło V.**, Piwowarek K., Kieliszek M. Produkcja mikrobiologicznej transglutaminazy przez *Streptovorticillium cinnamoneum* KKP 1658. Ogólnopolska Konferencja Młodych Naukowców nt. Zagadnienia i Problemy Badawcze Wyzwania dla Młodych Naukowców, 6.02.2024, prezentacja on-line, język polski. Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego.
 4. **Kolotyło V.**, Sęk W. M., Kalisz S., Kieliszek M. Piwowarek K., Kot A. M., Ocena wybranych wyróżników jakościowych win owocowych z polskich surowców. VI Sympozjum Naukowe „Drobnoustroje i ich metabolity – produkcja żywności i biotechnologia”, Warszawa, Polska, 17-18.05.2022 Prezentacja ustna on-line, Język polski, Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego.
 5. Sęk W. M., **Kolotyło V.**, Kalisz S., Kieliszek M. Piwowarek K., Kot A. M., Evaluation of selected quality characteristics of polish fruit wines. Preveda „XIV Interaktywna Konferencja Młodych Naukowców”, Bańska Bystrzyca, Słowacja, 6-30.06.2022. Poster, Język Angielski. Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego.
 6. Sęk W. M., Kot A. M., **Kolotyło V.**, Kieliszek M, Wpływ selenu na aktywność fizjologiczną komórek drożdży. Dokonania Naukowe Doktorantów X – „Wielka Sesja Posterowa”, Kraków, Polska, 24-26.06.2022. Poster, Język polski. Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego.
 7. **Kolotyło V.**, Sęk W. M., Kalisz S., Kieliszek M. Piwowarek K., Kot A. M., Ocena zawartości wybranych składników bioaktywnych w polskich winach owocowych. Dokonania Naukowe Doktorantów X – „Wielka Sesja Posterowa”, Kraków, Polska, 24-26.06.2022. Poster, Język polski. Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego.

Odbyte staże naukowe oraz otrzymane stypendia naukowe

1. Staż: Program **PROM**: The effect of anhydrobiosis and some chemical elements upon the physiological activity of yeast cells. 28.11.2022 – 09.12.2022 University of Latvia, Riga, Latvia. Opiekun: prof. Alexander Rapoport.
2. Stypendium: Program **STER**: stypendium dla najlepszych doktorantów w ramach Projektu „Actions towards internationalization of the Doctoral School of the Warsaw University of Life Sciences – SGGW” (DocSGGW – Doctoral School Goes Gladly Worldwide).

Nagrody i wyróżnienia

1. Dyplom uznania za działanie na rzecz społeczności studentów Wydziału Technologii Żywności oraz uczestnictwo w organizacji licznych wydarzeń promujących Wydział w roku akademickim 2022/2023.
2. Nagroda zespołowa III stopnia JM Rektora SGGW za osiągnięcia badawcze, 2024

Działalność organizacyjna i dodatkowa

1. Udział w Dniach SGGW (2022/2023/2024/2025) – reprezentowanie Zakładu Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności na stoisku wydziałowym oraz reprezentowanie Szkoły Doktorskiej
2. Udział w Dniach Otwartych Wydziału (2024/2025)
3. Udział w Festiwal Nauki (2022/2024/2025) – prowadzenie zajęć lekcyjnych i warsztatów dla szkół podstawowych.
4. Reprezentowanie Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności w ramach podpisanej umowy o współpracę z przemysłem fermentacyjnym (Manufaktura Win Owocowych DiWine)
5. Reprezentowanie Katedry w Międzywydziałowej Sekcji Winogradników i Enologów.
6. Czynny udział w Projekcie „Winiarnia SGGW” oraz „Cydry SGGW” realizowanymi w ramach działalności Koła Naukowego Technologów Żywności.
7. Wykonano recenzje artykułu naukowego pt. „Optimization and Characterization of Microbial Transglutaminase Production from *Streptomyces fradiae* and Its Usage in the Dairy Industry and Medical Applications” dla czasopisma *International Journal of Biological Macromolecules*.
8. Wykonano ekspertyzę dotyczącą „Przygotowania i charakterystyki fermentowanej herbaty czarnej typu kombucha” wykonane zgodnie ze zleceniem z dnia 4.09.2024r./Order dated 09.09.2024., Firma MFPL Sp. z o. o., Rondo Organizacji

Narodów Zjednoczonych 1, 00-124 Warszawa Polska NIP: 5252990476. Realizacja zadania „Konsultacje i ekspertyzy obejmujące ocenę jakości mikrobiologicznej surowców, produktów i procesów technologicznych. Wykonywanie opracowań teoretycznych dotyczących zagrożeń jakości mikrobiologicznej. Analiza mikrobiologiczna i chemiczna surowców oraz produktów – tzw. „małe prace”.

9. Członkostwo w Rektorskiej Komisji do spraw Bioasekuracji na kadencję 2024–2028.
10. Udział w pracach komitetu organizacyjnego 8th International Symposium: „Microorganisms and Their Metabolites – new challenges in food microbiology and biotechnology 2025”

8. PUBLIKACJE STANOWIĄCE ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ ORAZ OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW

Review Article

Vitaliy Kolotylo*, Kamil Piwowarek, Marek Kieliszek*

Microbiological transglutaminase: Biotechnological application in the food industry

<https://doi.org/10.1515/biol-2022-0737>

received July 12, 2023; accepted September 03, 2023

Abstract: Microbial transglutaminases (mTGs) belong to the family of global TGs, isolated and characterised by various bacterial strains, with the first being *Streptomyces mobaraensis*. This literature review also discusses TGs of animal and plant origin. TGs catalyse the formation of an isopeptide bond, cross-linking the amino and acyl groups. Due to its broad enzymatic activity, TG is extensively utilised in the food industry. The annual net growth in the utilisation of enzymes in the food processing industry is estimated to be 21.9%. As of 2020, the global food enzymes market was valued at around \$2.3 billion USD (mTG market was estimated to be around \$200 million USD). Much of this growth is attributed to the applications of mTG, benefiting both producers and consumers. In the food industry, TG enhances gelation and modifies emulsification, foaming, viscosity, and water-holding capacity. Research on TG, mainly mTG, provides increasing insights into the wide range of applications of this enzyme in various industrial sectors and promotes enzymatic processing. This work presents the characteristics of TGs, their properties, and the rationale for their utilisation. The review aims to provide theoretical foundations that will assist researchers worldwide in building a methodological framework and furthering the advancement of biotechnology research.

Keywords: transglutaminase, mTG, food industry, enzyme, microorganisms

1 Introduction

Protein is not only one of the main macronutrients but also a key structural component of many food products. In recent decades, due to concerns about global food shortages (including population growth), there has been a growing interest in the advanced utilisation of food proteins [1]. The application of enzymes in food processing, from the producers' perspective, should be associated with commercial benefits, and from the consumers' perspective with improved product quality. The availability of enzymes on a large scale and at reasonable prices has led the food industry to reconsider their use in food processing. Currently, advancements in biotechnology and genetic manipulation have created new prospects for efficient enzyme production, leading to the emergence of innovative technologies for their utilisation [2].

To meet the diverse food needs of consumers, enzymatic protein modification techniques are recommended, which have several advantages over chemical modification, including high reaction specificity, the low occurrence of side reactions, and the absence of the need for high temperature, pressure, or chemical solvents. Hydrolytic enzymes with a cleaving action, such as proteases and amylases, are commonly used. The subject of this review is transglutaminase (TG; protein-glutamine γ -glutamyltransferase), which catalyses acyl transfer reactions, introducing covalent cross-links between proteins and forming high-molecular-weight polymers [3].

The market for industrial enzymes has exhibited steady growth over the last six decades, expanding from around USD 0.31 billion in 1960 to a substantial USD 6 billion in 2020. Within the numerous industries where enzymes have found utility, the food sector commands the largest share, with approximately 55% of industrial enzymes finding applications in various segments of the food industry, including baking, beverages, brewing, dairy, oil refining, food packaging, and fruit and vegetable juice processing. As of 2020, the global food enzymes market was valued at around USD 2.3 billion, constituting roughly 40% of the total value of the industrial enzymes market. Predictions indicate that by

* **Corresponding author: Vitaliy Kolotylo**, Department of Food Biotechnology and Microbiology, Institute of Food Sciences, Warsaw University of Life Sciences – SGGW, Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warsaw, Poland, e-mail: vitaliy_kolotylo@sggw.edu.pl

* **Corresponding author: Marek Kieliszek**, Department of Food Biotechnology and Microbiology, Institute of Food Sciences, Warsaw University of Life Sciences – SGGW, Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warsaw, Poland, e-mail: marek_kieliszek@sggw.edu.pl

Kamil Piwowarek: Department of Food Biotechnology and Microbiology, Institute of Food Sciences, Warsaw University of Life Sciences – SGGW, Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warsaw, Poland

2026, the global food enzymes market will exceed USD 3.3 billion. This projection suggests that microbial enzymes with uses in the food industry will continue to experience demand. As of September 2021, the microbial transglutaminase (mTG) market was estimated to be around \$200 million USD on a global scale. It is worth noting that these figures are subject to change over time due to shifts in market dynamics, technological progress, and other influencing factors [4].

Until the late 1970s, proteases were the main class of enzymes used for protein modification. However, with the discovery of TG, the diversity of this technology expanded [5]. The topic of TG holds a specialised yet important position in today's times for several reasons. TG is an enzyme with a specific role in biochemical processes, playing a crucial role in various physiological functions. Studying and understanding the function of this enzyme is of paramount importance for a better grasp of different aspects of biology and biochemistry. TG catalyses the formation of inter- and intramolecular covalent bonds between proteins [6]. The covalent cross-links generated by this enzyme can be utilised to modify the physical and chemical properties of proteins, such as solubility, water-holding capacity, thermal stability, emulsifying and foaming properties, viscosity, elasticity, and gelation [7]. Many proteins can be modified, and some of the most commonly modified include milk casein, whey proteins, soy globulins, wheat gluten, meat myosins, and egg proteins [6,8]. TG finds broad application in the food industry. It acts as an ingredient that impacts the texture, durability, and quality of food. Research on different types of TG, including microbial variants, provides new insights into its potential use in food production. TG can be utilised to create products with improved sensory and technological properties, and it holds the potential to serve as a tool for reducing food waste. In addition to its widespread use in the food industry, the increasing interest in TG has led to the discovery of its advantages in other fields such as medicine, biomedical engineering, materials science, textiles, and leather processing [9], where it can be used for protein modification, biomaterial production, or gene therapy.

Finally, the advancement of new research methods and technologies enables more precise studies on TG and the identification of new variants. This contributes to the development of knowledge about the enzyme and its potential, which can lead to the discovery of new applications and innovative solutions in various fields of science and industry.

In summary, the topic of TG holds a specialised yet important position in the present era due to its biological significance, broad application in the food industry, potential in other fields, and the development of new research

technologies that allow the exploration of its unique properties and uses.

2 Characterisation of the protein-glutamine γ -glutamyltransferase enzyme

TG is a widely occurring enzyme belonging to the transferase group. The activity of TG was first observed by Clarke et al. [10] when they extracted the enzyme catalysing the transamidation reaction in the liver of *Cavia porcellus*. 2 years later, in 1959, a team of researchers led by Waelsch assigned the name “transglutaminase” to the aforementioned enzyme in order to differentiate this specific enzymatic activity from other enzymes with similar properties [11]. According to the International Union of Biochemistry and Molecular Biology Nomenclature Committee, TG is assigned the EC number 2.3.2.13, which belongs to aminoacyltransferases (EC 2.3.2), and these enzymes belong to acyltransferases (EC 2.3) (BRENDA – The Comprehensive Enzyme Information System). In the available scientific literature, one can come across the systematic name (protein-glutamine γ -glutamyltransferase) as well as synonyms for this enzyme, such as fibrinolygase. However, the most commonly used name is TG.

TGs are a large family of related and ubiquitous enzymes that catalyse post-translational modifications of proteins in plants, animals, and microorganisms [8,9]. TG is a transferase enzyme responsible for the transfer of an acyl group (or acyl moiety) between the γ -carboxamide group of glutamine residues bound to peptides (acyl donors) and various primary amines (acyl acceptors), including the ϵ -amino group of lysine residues in proteins [9,12]. When a free lysine residue acts with glutamine as an acceptor for the acyl group of the protein substrate, the initial protein is enriched with this exogenous amino acid for humans. TG can initiate inter- and intramolecular cross-linking reactions between protein molecules by transferring the acyl group to a lysine residue that is associated with a polypeptide or protein [13]. In the absence of amino acid substrates, water acts as an acyl acceptor, and the γ -carboxamide groups are deamidated to glutamic acid residues, a reaction known as deamination. Additionally, the enzyme catalyses the addition of free amines to proteins through conjugation with glutamine residues [12,14].

According to Alvarez et al. [15], a characteristic feature of TGs is the active site, which consists of a triad of amino acids: cysteine, asparagine, and histidine. This catalytic

triacid in the enzyme's active site interacts with the bound glutamine in the polypeptide chain, resulting in the formation of an acyl-enzyme complex (also known as an enzyme protein complex). TGs catalyse diverse reactions that are important for cell viability (Figure 1). After the formation of the acyl-enzyme complex and the release of free ammonia, the transamidation reaction takes place, resulting in the formation of a covalent isopeptide bond by binding the ϵ -amino group of lysine (Figure 1a). This reaction leads to cross-linking between glutamine and lysine residues within polypeptide chains. When the acyl-enzyme complex reacts with a primary amine, the amine is bound through a γ -glutamyl bond, resulting in the enrichment of the protein chain with hydrophobic or hydrophilic fragments (Figure 1b).

The deamination reaction of the γ -carboxamide group of glutamyl residues in proteins/polypeptides (forming the acyl-enzyme complex) occurs when water acts as the substrate, and the product is glutamic acid (Figure 1c). This reaction is accompanied by the release of ammonia as a by-product. Additionally, TGs can catalyse other reactions that are relevant to their biological functions and have implications in various cellular processes.

Wang et al. [9] demonstrated that the cross-linking reaction between glutamine and lysine occurs faster than acyl transfer and deamidation in any protein-based system. In each of these reactions, free ammonia is produced as a byproduct. To control the progress of TG-catalysed reactions, measurement of the generated ammonia can be used as an indicator of enzyme activity. Another method of assessing the activity of the enzyme is by quantifying

the production of the dipeptide ϵ -(γ -glutamyl)lysine using HPLC, as described by Rezvankhah et al. [16] and Wang et al. [9]. This dipeptide formation represents the covalent isopeptide bond. The control of protein cross-linking reactions can also be performed by evaluating the molecular weight of the resulting peptide polymers using electrophoresis. Rheological methods, which involve measuring the viscosity or structural parameters of the product, can also be employed to monitor the cross-linking reaction [17].

3 TGs of animal, plant, and microbial origin

TGs exist in various forms and can be derived from animal, plant, and microbial sources. These enzymes can be intra- or extracellular, which contributes to their diverse and versatile functions. Enzymatic activity of TG has been detected in the tissues and body fluids of animals, fish, plants, and microorganisms [18,19]. Protein structures involved in various metabolic reactions need to interact with each other. These physical interactions are commonly expressed as hydrogen bonds, ionic bonds, or van der Waals forces. However, these intermolecular bonds and forces are relatively weak. To form stronger covalent connections, plant, animal, and microbial cells produce enzymes called TGs. This enzyme, along with aliphatic polyamines, such as putrescine, spermidine, and spermine, participates in processes such as photosynthesis in plants, embryogenesis in mammals, cell division

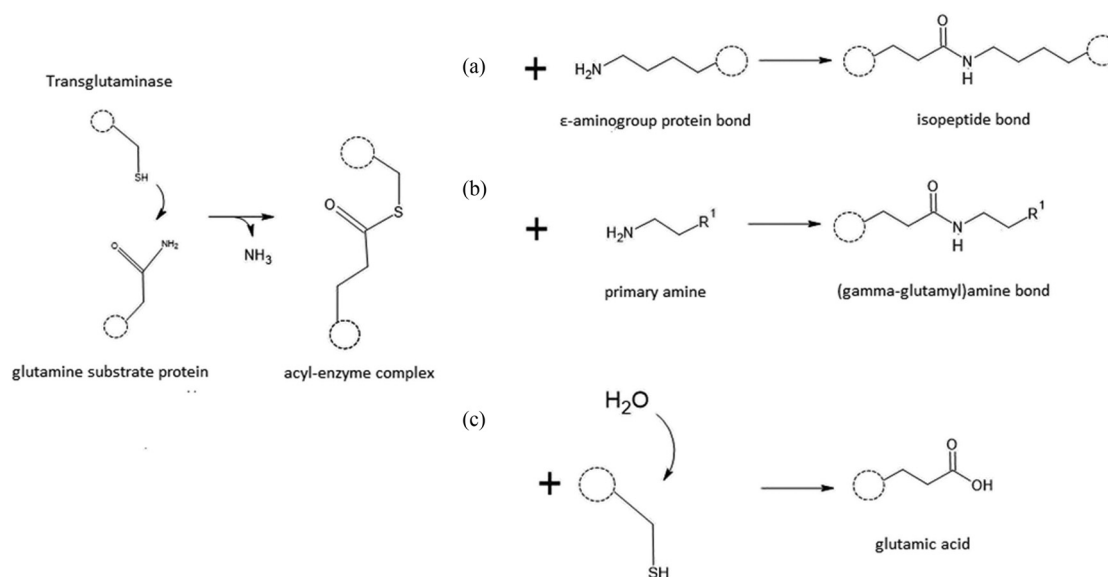


Figure 1: Reactions catalysed by TG.

in microorganisms, and is also involved in the stress response and ageing in each of the mentioned organisms [20,21].

4 Animal transglutaminases (TGa)

4.1 Types of TGa

Various types of TGs are present in most animal tissues and body fluids, which participate in numerous biological processes such as blood clotting, skin keratinisation, erythrocyte membrane stiffening, and wound healing [22]. In mammalian tissues, up to eight different types of TGs have been identified and characterised, including the blood component Factor XIII [5]. Until the late 1990s, TG for industrial use was primarily obtained from animal tissues [23].

In the early stages of TG research, the focus was on the protein cross-linking involved in human blood clotting. Subsequently, more attention was given to the cross-linking of other proteins. TG from guinea pig liver was the most commonly used enzyme for such studies. Additionally, partially purified TG from bovine blood (Factor XIII) and human placenta were also investigated [24].

In addition to the presence of the discussed enzyme in mammalian blood plasma, the presence of TG has been discovered and purified from erythrocytes. However, the relatively small amount of human blood and its origin make this enzyme less suitable for large-scale applications in food. The abundant availability of bovine and porcine blood makes isolating TG from these sources a more practical solution. By utilising two types of TGs – from animal blood and of microbial origin – cross-linking experiments with seven proteins (α -lactalbumin, β -lactoglobulin, BSA, casein, haemoglobin, myosin, and glycinin) revealed significant differences in substrate recognition and cross-linking rate [25]. These differences among TG types can be attributed to their roles in natural processes. The fact that these enzymes are capable of cross-linking proteins other than their natural substrates indicates they can be utilised in various applications where enzymatic protein cross-linking is desired instead of chemical cross-linking. Applications can be focused on the development of protein polymers with modified functional properties, as well as direct applications in complex systems such as food. Depending on the number and types of proteins involved in the reactions and the specific cross-linking needs, the most appropriate source of TG can be selected [26,27].

In the context of applications related to food products or protein ingredients, the cross-linking of the described

substrates appears promising, especially since protein cross-linking can have a significant impact on functional properties. The possibility of using different types of TG to achieve the desired effect can be intriguing, particularly because the rate and number of cross-links formed will vary depending on the type of enzyme used. In issues related to erythrocyte TG, such as self-cross-linking, the need for reducing agents, and challenges in the purification process, limit the potential utilisation of this enzyme [3]. Blood plasma TG offers better possibilities, although purification to a homogeneous enzyme preparation may not be necessary. A good example of the application of partially purified TG derived from plasma is in the meat processing industry, where it is used in combination with fibrinogen to create a system enabling the cross-linking of meat components [28,29].

Due to its limitations in terms of application and production, TG of animal origin has not found widespread use in food processing. The complex procedures for extracting and purifying the enzyme from the tissues or body fluids of slaughtered animals and other livestock (such as cattle, pigs, fish, and poultry) result in a high price for the enzyme (around \$80 per 1U), making the use of TG impractical [22,30]. The current price of this enzyme is \$189.96 per 1U [31]. Ethical considerations (animal welfare) have also played a role in limiting its use. In addition to the high price, TG has other limitations. Commercially extracted Factor XIII (in Europe) from bovine and porcine blood causes red discoloration of the final treated product, which is an undesirable visual characteristic. Another drawback of Factor XIII is that it is obtained in an inactive form. Thrombin (a serine protease enzyme found in blood plasma) is required to activate the enzyme [22]. The dependence on Ca^{2+} is another limitation of TG of animal origin. For the aforementioned reasons, none of the TGs of animal origin have been positively received by public opinion [20,23]. Currently, TG extracted from the liver of domestic fowl is only used as a laboratory preparation, for example, for comparing TG activity.

Despite the lack of homology in amino acid composition, TG of animal origin exhibits biochemical properties and catalytic activity very similar to that of TG of microbial origin [7]. When considering TGs of animal origin, it should be noted that they participate in many physiological processes, including spermatogenesis, bone formation, and the development of the central and peripheral nervous systems. TG in the human body is responsible for catalysing numerous processes such as blood clotting, epidermal keratinisation, tissue healing, and the development of the salivary glands, heart, and lungs [21,24].

4.2 TG in the γ -glutamyl cycle of humans

TG plays an important role in the γ -glutamyl cycle, which is responsible for the synthesis and breakdown of glutathione (GSH) – the main intracellular antioxidant. TGs in the animal body indirectly participate in cell protection against reactive oxygen species [32]. There are at least eight proteins from the TG family, including TG1, TG2, TG3P, TG4P, TG5, TG6, TG7, and TG8P. In their work, Samelak et al. [21] reported the identification of at least nine genes encoding TGs in the human genome. It is worth noting that TGs encoded by these genes have analogues in other animals, even in invertebrates. This fact can be explained by the high conservativity of these genes, resulting in low genetic variability, as well as similarities in the secondary and tertiary structures of TGs [33]. Among the eight human TGs, only TG1 and TG5 exhibit catalytic activity in the γ -glutamyl cycle, and this varies in level. Kinetic analysis has shown that TG1 is 46 times more active than TG5 in the breakdown of GSH. Genetic analysis has also shown that TG1 dominates among the family of TG proteins, and its deficiencies can cause a severe disease called glutathionuria, which involves serious growth disorders. Defects in the gene encoding TG5 do not cause glutathionuria symptoms [34]. Impairments in the activity of this group of enzymes can lead to serious diseases such as Huntington's disease, Alzheimer's disease, or Parkinson's disease [21]. Another TG, TG2, exhibits activity on cell surfaces and in the extracellular matrix. This enzyme participates in wound healing, tissue mineralisation, and skin barrier function. TG2 has the ability to cross-link high-calcium matrix proteins, which has a crucial impact on proper bone formation [35,36].

4.3 TG and coeliac disease (CD)

In addition to deficiencies in TG, the products generated by the enzyme-mediated protein reactions can also have immunogenic and potentially pathogenic effects, as seen in individuals suffering from CD. This disease is a complex condition influenced by various factors such as infections, food, medications, vaccinations (against influenza and HPV), toxins (such as aflatoxins), heavy metals, abdominal and gynaecological surgeries, hygiene levels, tobacco smoking, alcohol consumption, socioeconomic status, and lifestyle. These factors also contribute to an imbalance in the gut microbiome, characterised by the abundance of *Proteobacteria* and a reduction in *Lactobacillus* populations, which are associated with the development or increased incidence of CD [36–38].

The literature suggests that additives in processed food affect the gut microbiome and increase intestinal permeability, thereby contributing to autoimmune responses. In 2015, a hypothesis was proposed suggesting that TG may play a role in the pathogenesis of CD, and subsequent studies have provided further evidence supporting this hypothesis [38]. Given that gluten is rich in glutamine (~30%) and contains lysine (<2%), which serve as the donor and acceptor of acyl groups, respectively, it is an ideal substrate for post-translational modification through transamidation or deamidation. The current literature indicates that consumption of products containing mTG leads to reduced immunoreactivity and intolerance to the proteins present in bread products [2,37].

4.4 TG and the human gut microbiome

In addition to endogenous TGs and those added to food, there is another possibility for the production in the human body – the gut microbiome. Its dimensions, composition, diversity, cellular products, and activity have led to its characterisation as a “*superorganism*.” One component of the microbial metabolite represented as mobilome is the secretion of TG. By using sequence search programs, thousands of bacteria encoding TGs can be detected, with the majority belonging to the *Firmicutes* phylum [39]. TGs are secreted by microorganisms as a survival factor. Analysis of gut fluid gave positive results for TG activity, although the authors did not differentiate its origin [40]. In this context, mTG plays a crucial role in the survival of gut bacteria. It demonstrates anti-protease capabilities, inhibits the activity of antimicrobial peptides, possesses emulsifying properties, acts against phagocytosis, and influences the equilibrium between Th1 and Th2 immune responses [41,42]. According to the current knowledge, no endogenous TG activity has been reported in the duodenal lumen, in contrast to the intestinal mucosa [43]. Extraintestinal sources of TGs are much broader. Probiotics belonging to prokaryotes serve as a reservoir of microbiological TG, representing an active payload that influences the processes occurring in the intestinal space. It is known that microorganisms can transfer virulence factors to other microorganisms through horizontal gene transfer (HGT) [43,44]. HGT refers to the sideward transfer of genetic material between individual unicellular or multicellular organisms. Unlike vertical gene transfer, which occurs between generations, HGT facilitates the movement of genetic sequences across distant species, typically through mechanisms such as transformation, transduction, conjugal transfer, or specific gene

transfer agents. While the evolution of Eukaryotes is primarily guided by vertical inheritance, bacteria and archaea predominantly rely on HGT as a significant means of genome diversification and acquiring new functions. This process is vital for their survival under the influence of natural selection and for achieving successful reproduction [45].

Microbes that inhabit food and coexist without causing harm offer a significant pathway for HGT. For instance, *Lactococcus lactis*, found in the Spanish traditional raw milk product, has been observed transferring genetic material to other lactococci and enterococci [46]. Another distinct facet of industrial food production involves food additives, which have recently been suggested as potential contributors to autoimmunity by influencing the integrity of tight junctions in the intestinal epithelium. There is a suggestion that mTGs could play a role in the progression of CD [47]. Recent findings indicate that these enzymes are immunogenic in individuals with CD, serving as a novel marker that mirrors intestinal damage [48]. In certain pathogens like *Streptococcus suis*, the enzyme functions as a virulence factor, providing anti-phagocytic traits. Whether mTGs in other bacteria might also contribute to virulence remains unclear. Considering the substantial HGT occurrences within the gut ecosystem and their capacity to infiltrate human cells, these enzymes could potentially participate in autoimmune diseases [49].

An additional enzymatic payload of TG delivered to the intestinal lumen comes from pathobionts. Besides their ability to post-translationally modify proteins and disrupt tight junction integrity, they contribute a pathogenic payload represented by mTG. Environmental pathogenic microorganisms can exchange mobile elements with microorganisms residing in the human gastrointestinal tract. Increasingly, contamination of surface waters and soils with animal waste/faeces is being observed, posing a global health threat. It is not surprising that commonly consumed plants and vegetables contain TG. Even if their sequence homology to mTG is not high, they are capable of cross-linking peptides, including gluten. They have even been suggested as possible factors in the pathogenesis of CD, initiating the process in the intestinal lumen. Examples of mTG carriers include apples, soy, bean sprouts, fodder beets, rosemary leaves, Jerusalem artichokes, spinach leaves, and green peas. Routinely consumed plants, fruits, and vegetables may exhibit TG activity. It has been shown that polyols, intensively used in the processed food industry for protein coating, biofilm formation, product gelling, and bio-packaging, improve the thermal stability and half-life of mTG, thereby increasing the enzyme's ability to form cross-links [50]. As can be observed, both animal and mTGs can coexist

in the same organism. mTG will be described in more detail in subsequent chapters.

4.5 Plant transglutaminases (TGp)

In the case of plant-derived TGs, it has also been confirmed that multiple TGs can function within a single plant. The role of this enzyme group in plants is equally important as it involves growth and development processes. These enzymes participate in cell division, protein storage, and control of cell membrane stability. TGp can be classified based on the specific substrates associated with their respective locations. In the case of plant cells, molecular weights are used instead of abbreviations to designate the enzymes. For instance, within chloroplasts, the stromal TG acts on RuBisCo as its substrate, and has a molecular weight of 150 kDa. Chloroplast thylakoids have different substrates, mainly the 39 and 58 kDa LHC II proteins. Another organelle rich in TGs is the cytoplasm, where the substrates are actin and tubulin, and the characteristic TG for these substrates has a molecular weight of 80 kDa. High-molecular-weight proteins present in the cell wall serve as substrates for the 58 kDa TG [21]. Thus, TGp plays diverse roles in plants, by being involved in the regulation of cellular and structural processes, cell division, and maintenance of membrane integrity and cellular structures. Both animal and plant-derived enzymes require the presence of calcium ions to fulfil their functions. By binding to the enzyme molecule, Ca^{2+} ions indirectly contribute to controlling the availability of substrates at the binding sites. The indirect influence in this process can be explained by the conformational change of the protein molecule that occurs after the binding of the calcium ion, resulting in the exposure of the amino acid residues in the catalytic centre of TG. This characteristic feature of the enzyme allows the formation of characteristic cross-links only when there is a sufficient concentration of calcium ions in the vicinity of TG. Serafini-Fracassini and Del Duca [51] confirmed in their studies that a calcium ion concentration of above 3 mM is necessary for protein cross-linking reactions by TG. In their research on pea roots and leaves, the scientists observed that such a concentration of Ca^{2+} is normally present in the cytosol, enabling TGs to function properly. It is worth noting that during programmed cell death, the calcium resources increase, which can be utilised by living cells in an environment with a reduced concentration of these cations [52]. The dependence of TGa on calcium ions has been investigated using erythrocytes as an example. Lorand and Graham [36] described a study in which they eliminated Ca^{2+} ions from the reaction environment, leading to irreversible changes in the erythrocyte membrane (shape deformation).

Increasing the concentration of the missing cations stimulated TG2 to form cross-links between spectrin and ankyrin in the red blood cell membrane.

An important difference between animal and plant-derived TG is the dependence of the latter on light [52,53]. This statement is supported by the findings of Campos et al. [53] who detected the activity of a 58 kDa TG in maize chloroplasts. High activity was observed in the presence of light, while in darkness, the activity of TG58 was minimal. The literature reports also indicate the inhibitory effect of magnesium ions and thiol groups on TG activity. The disruption of disulfide bridges may also contribute to the improvement of TG activity in animal cells [21,54].

5 mTGs

5.1 Characteristics of mTGs

None of the TGp or TGa enzymes have been commercialised or publicly accepted, which has led to the search for a suitable commercial source. TG of microbial origin (Figure 2) was first isolated from the *Streptomyces mobaraensis* strain (previously classified as *Streptovorticillium mobaraense*) [5,6]. Ando et al. [6] examined approximately 500 strains isolated from various soil samples, and among the

microorganisms tested, the ability to synthesise this enzyme was demonstrated by the *Streptovorticillium* S-8112 strain. Studies conducted by Ando et al. [6] showed that this enzyme can also be synthesised by other bacteria of the *Streptovorticillium* genus, such as *S. griseocarneum*, *S. cinnamononeum* subsp. *cinnanoneum*, and *S. mobaraensis* [30]. The development of research and analytical techniques enables the isolation of additional strains capable of producing TG (Table 1). Moreover, some of the known microorganisms undergo genetic modifications to create strains characterised by efficient synthesis of this enzyme [55].

The intensive development of research on mTG began in the late 1980s [54]. Currently, TG is mainly obtained using the species *S. mobaraensis*. Protein sequencing has revealed that the primary structure of mTG consists of 331 amino acids in a single polypeptide chain [22,63]. The secondary structure is composed of eight β -sheets surrounded by 11 α -helices, while the tertiary structure has a disc-like shape with the active site located in the cleft of the apoenzyme, consisting of the cysteine-aspartic acid-histidine triad, which is key to its cross-linking efficiency [64]. mTG possesses the same catalytic triad as TGa but in a different sequence order (mTG: Cys-Asp-His; TGa: Cys-His-Asp) [22,23,64,65].

mTGs have a low molecular weight. mTG is a single polypeptide with a molecular weight of approximately 38 kDa, without any carbohydrate or lipid groups, making it about half the size of TGa [22,66]. The isoelectric point (pI) of mTG has been determined to be pH 9.0. Although the pI may vary due to glutamine auto-deamidation during cultivation, the reported data for pI 8.9 and pI 8.0 indicate that mTG is typically positively charged at pH 6.0. The optimal pH for mTG activity ranges from pH 5.0 to pH 8.0. Ando et al. [6] demonstrated that mTG exhibits activity even at pH 4.0, indicating that the enzyme is stable over a wide pH range. Acidification below pH 4.0 causes enzymes from *Streptomyces* spp. to precipitate. The optimal temperature for mTG enzymatic activity has been found to be 55°C (for 10 min at pH 6.0), and the enzyme loses full activity at extreme temperatures (40 and 70°C) [64]. The addition of carbohydrates such as maltodextrin, sucrose, mannose, trehalose, or reduced GSH increases the thermal stability of TG. At temperatures close to 0°C, TG retains its full enzymatic activity [7]. Recent studies provide information that the optimal temperature for TGs is 37°C, and activity is typically lost at temperatures above 50°C [50]. On the other hand, a study by Yokoyama et al. [22] demonstrated that mTG can also exhibit activity at 10°C, suggesting that mTG is active over a broad temperature range, which is important for its application in various industrial sectors. Such a wide temperature range, as well as pH range, may indicate the need for more detailed studies to

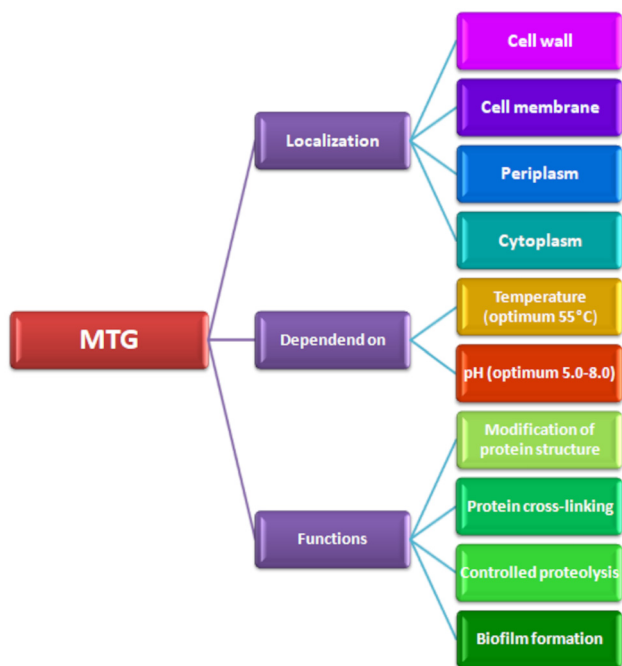


Figure 2: Presentation of possible localisation, functions, and properties of microbologically derived TGs.

Table 1: mTG activity obtained by various microorganisms

No.	Species	Strain	Substrates and conditions	mTG activity	Reference
1	<i>Streptovorticillium mobaraensis</i>	S-S112	Polypeptide, glucose, K ₂ HPO ₄ , MgSO ₄ ; temp. 30°C; 48 h	2.5 U/mL	[6]
2	<i>Streptovorticillium mobaraensis</i>	CBS 20778 (WSH-Z2)	Starch, peptone, yeast extract, MgSO ₄ , K ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄ ; pH 7.0; temp. 30°C; 7 days	2.90 U/mL	[56]
3	<i>Streptovorticillium mobaraensis</i>	CBS 20778 (WSH-Z2)	Starch, glucose, peptone, yeast extract, MgSO ₄ , K ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄ ; pH 6.8; temp. 30°C; 48 h	3.30 U/mL	[57]
4	<i>Streptovorticillium ladakanum</i>	NRRL-3191	Xylose, peptone, yeast extract, sodium caseinate, MgSO ₄ , KH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄ ; temp. 26°C; 120 h	0.3 U/mL	[58]
5	<i>Streptomyces mobaraensis</i>	NRRL B3729	A mixture of soybean meal and wheat bran (1:9), MgSO ₄ , KH ₂ PO ₄ , NH ₄ NO ₃ , NaCl, CoCl ₂ , MnSO ₄ , ZnSO ₄ , FeSO ₄ ; pH 6.0; temp. 30°C; 7 days	800 IU/mg	[59]
6	<i>Streptomyces platensis</i>	NRRL 2364	Red bean, MgSO ₄ , KH ₂ PO ₄ , NH ₄ NO ₃ , NaCl, CoCl ₂ , MnSO ₄ , ZnSO ₄ , FeSO ₄ ; pH 6.0; temp. 30°C; 7 days	5,100 IU/mL	[59]
7	<i>Bacillus circulans</i>	BL 32	Soluble starch, peptone, yeast extract, MgSO ₄ , K ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄ ; pH 7.0; temp. 30°C; 24 h	0.69 U/mL	[60]
8	<i>Streptomyces</i> sp.	CBMAL 1617 (SB6)	2.5% soybean meal, 2% potato starch, 0.1% glucose, 1% bacteriological peptone, 0.4% KH ₂ PO ₄ , 7H ₂ O MgSO ₄ ·7H ₂ O; pH 7.0; temp. 30°C; 96 h	6.07 U/mL	[61]
10	<i>Penicillium chrysogenum</i>	—	Dextrose 0.5%, tryptone 0.2%, and starch 0.5%, incorporating lysine, glutamine, lysine-glutamine	7.81 mU/mg	[62]

provide precise information depending on the specific microbial strain being investigated.

mTG does not require calcium ions for activation, unlike TGs of animal and plant origin. This is highly significant in an industrial context because some proteins (such as casein, myosin, and soy globulin) are sensitive to calcium ions, and their presence can lead to undesired protein precipitation [22]. The activity of mTG increases in the presence of ions such as Co²⁺, Ba²⁺, and K⁺. mTGs are inhibited by ions such as Zn²⁺, Cu²⁺, Hg²⁺, and Pb²⁺, which bind to the thiol group of cysteine in the active centre [67]. mTG also exhibits high sensitivity to disulfide reagents and electrophilic inhibitors, such as cystamine (2,2'-dithiobisethanamine), 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), *N*-ethylmaleimide, iodoacetic acid, and *p*-chloromercuribenzoate. It has also been shown that TGs, including MTG, are inhibited by the natural macromolecule melanin in *Streptomyces lavendulae*, most likely through the nucleophilic addition of the catalytic thiolate of cysteine to the inhibitory molecule's o-quinone groups [50].

5.2 Production of mTG by microorganisms

The biological functions of TG in microorganisms are not fully understood. It is known that this enzyme is associated with the cell wall, and it has been suggested that it may be involved in protein cross-linking, the formation of cross-links between cell wall proteins (in *Streptomyces*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*), and the cross-linking of proteins in spore coats (in *Bacillus* bacteria) [25]. In *Candida* and *Saccharomyces* yeasts, TG forms cross-links of structural glycoproteins. In *Phytophthora* (oomycetes), it plays a role in the pathogenicity of this organism. In the case of the algae *Chlamydomonas*, mTG combines polyamines with glycoproteins [55]. Scientists suggest that the acquisition of mTG production capability may have been initiated by HGT, as there are no conservative gene clusters, and the TG gene environment differs depending on the species. The absence of mTG genes in the genomes of most *Streptomyces*, especially in strains such as *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* IFO 13350, may further indicate HGT [50].

A strain of *Streptovorticillium* S-8112, derived from soil, achieved the highest mTG activity of approximately 2.5 U/mL upon reaching the stationary growth phase. Specific antibodies revealed the export of mTG as a zymogen when *S. mobaraensis* DSM 40847 was allowed to grow for 24 h. In shaken flasks, activation began after 35–45 h and typically concluded 2 days later. However, based on numerous

experiments under similar conditions, complete processing of the zymogen is a rare event, and cultures lasting over 70–90 h lead to the proteolytic degradation of mTG. Prolonged cultivation further promotes the formation of inactive mTG through autocatalytic deamidation of glutamine, gradually lowering the pI of the TG from pI 8.9 or pI 8.0 to pI 6.4. The recent purification of two mTG variants differing in charge is consistent with this observation [68].

The metalloprotease TAMP cleaves the zymogen mTG on the amidic side of phenylalanine, leaving behind a tetrapeptide, FRAP, at the mature N-terminus. The tetrapeptide is removed by the specific tri/tetrapeptidyl aminopeptidase (TAP), which is secreted by *S. mobaraensis* at the early stage of cultivation. The flexible loop of FRAP and its specific recognition sequence also allow chymotrypsin and trypsin to remove the propeptide by cleaving the peptide bonds Phe-Arg and Arg-Ala. However, TAP only cleaves the remaining tripeptide from RAP-mTG. Processing of AP-mTG fails for unknown reasons, although APpNA is a useful substrate for TAP. A leucine/phenylalanine aminopeptidase, secreted by *S. mobaraensis*, is likely involved in the final processing of mTG [43].

As mentioned earlier, the active site of all TGs includes a catalytic triad consisting of cysteine, histidine, and asparagine, which catalyses two consecutive reactions, similar to cysteine proteases. When the substrate, typically a protein, serving as a glutamine donor, enters the catalytic core of TG, the cysteine thiol attacks the γ -carbonyl group, forming a tetrahedral oxyanion (most likely on the residual side) if the leaving amide group is directed towards histidine or asparagine. An unknown proton relay system then facilitates the elimination of ammonia and ammonium ions to form an intermediate thioester [38].

Investigation of the structure of the binary transition state is not possible as the thioester hydrolyses in the absence of primary amines. Therefore, it remains unclear where the energy for thioester bond formation comes from. The high-energy complex then reacts with amino nucleophiles, which can be the lysine residues of the donor protein, polyamines, or other primary amines of any charge. It is worth noting that cross-linking occurs through a transition state involving three proteins. After the formation of the second oxyanion intermediate, the catalytic cysteine thiol is displaced, and the TG dissociates from the protein conjugate or cross-linked proteins [69].

6 Economic benefits

The use of microorganisms in TG production offers increasing economic benefits. The costs associated with

microbial synthesis are significantly lower compared to the costs of producing TG from animal sources. However, these are still costs that hinder the widespread use and full commercialisation of this enzyme. One of the major cost factors in obtaining mTG is the culture media, which accounts for approximately 30% of the total costs [7]. To achieve broad commercialisation of mTG, industrial enzyme production requires cheaper feedstocks [70]. Therefore, in recent years, attempts have been made to minimise this cost segment by using waste biomass as microbial substrates, generated by industries such as agriculture. Fatima et al. [31] used wheat bran as an alternative carbon source for *S. mobaraensis* bacteria in solid state fermentation. Another approach aimed at increasing the cost-effectiveness of mTG production is the design and optimisation of cultivation processes. By combining these two approaches, Fatima et al. [31] achieved a four-fold increase in enzyme activity compared to that before process optimisation. Fatima and Khare [12] and Wang et al. [55], using submerged fermentation, obtained enzymes with activities ranging from 2.0 to 5.7 IU/mL. The available literature indicates an increasing number of publications on the biosynthesis of TG. For example, studies conducted by Ryszka et al. [71] demonstrated that the most suitable parameters for obtaining mTG included a medium pH in the range of 6.5–7.0 and nitrogen sources in the form of amino acids, corn steep liquor, and yeast extract. The activity of TG produced by *S. mobaraensis* after 30 h of cultivation reached 2.0 U/mL. The inoculation medium contained 2.5% oat flakes. More examples of the microbial biosynthesis of TG are provided in Table 2.

The use of TGs in industry offers several other advantages. First, it reduces the energy demand during the production process. Furthermore, the waste generated from TG utilisation is non-toxic and biodegradable, making it environmentally friendly [72]. It is worth noting that one drawback of using enzymes in industry is that certain production conditions may be unsuitable for optimal enzyme performance. Important aspects for optimal enzyme efficiency include temperature, pressure, pH, and the presence of potential inhibitors [73]. Microbial sources are preferred in industrial enzyme production. mTGs are readily available and easy to produce. Another advantage is that the growth rate of microorganisms is much faster compared to animals or plants. Most importantly, in addition to optimising the production process of natural mTGs, genetic and metabolic engineering can be employed to increase the efficiency of enzyme synthesis in microorganisms. Genetic or metabolic engineering can also aid in obtaining enzymes that can function under diverse production conditions (pH and temperature) [74].

Table 2: Genetically modified microorganisms capable of producing TG

No.	Host strain	Donor strain	Substrates and conditions	mTG activity	Reference
1	<i>Yarrowia lipolytica</i> Po1h	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> WSH03-13	Modified PPB medium (glucose, yeast extract, NH_4Cl , KH_2PO_4 , MgSO_4 , thiamine); pH 6.0; temp. 28°C; 200 rpm; 5 days	5.3 U/mL	[85]
2	<i>Streptomyces lividans</i> TK24	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> WSH03-13	R2YE agar or liquid medium (glycerol, peptone, yeast extract, MgSO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , CaCl_2); temp. 30°C; 200 rpm; 2–3 days	5.73 U/mL	[80]
3	<i>Corynebacterium glutamicum</i> YDK010	<i>Streptomyces mobaraensis</i> IFO13819	MMTG medium (glucose, MgSO_4 , NH_4SO_4 , KH_2PO_4 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, thiamine hydrochloride, biotin, DL-methionine, CaCO_3); pH 7.5; temp 30°C	627 mg/L	[86]
4	<i>Pichia pastoris</i> X33	<i>Streptomyces mobaraensis</i>	BMGY medium, citric acid medium (glycerol, NH_4HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KCl, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), biotin pH 5.0; temp. 28°C	9,120 U/L	[83]
5	<i>Streptomyces mobaraensis</i> TX1 mutant Sm2-1	<i>Streptomyces mobaraensis</i> TX1	Glycerol, yeast extract, peptone, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; pH 7.4	37.5 U/mL	[87]
6	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)pLysS	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM7	TB broth (tryptone, yeast extract, glycerol, KH_2PO_4 , K_2HPO_4)	37 mU/mg	[25]
7	<i>Pichia pastoris</i> GS115	<i>Escherichia coli</i> DH5a	Yeast extract, peptone, K_2HPO_4 , yeast nitrogen base without amino acids, biotin, CH_3OH 28°C; 250 rpm; 96 h	4.40 mg/L; 0.88 U/mg	[88]
8	<i>Bacillus subtilis</i> 168	<i>Streptomyces mobaraensis</i> CGMCC 4.5591	Corn starch, peptone, urea, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , MgSO_4 , NaCl, saccharose	29.6 U/mg	[82]
9	<i>Komagataella phaffii</i> X-33	<i>Streptomyces netropsis</i> EF195356.1	1% yeast extract, 2% peptone, 1.34% YNB, biotin, 1% glycerol,	26.17 U/mg	[89]
10	<i>Lactococcus lactis</i> NZ9000	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> BH072	GM17 medium supplemented with chloramphenicol at a final concentration of 5 µg/mL	28.6 U/mg	[43]
11	<i>E. coli</i> Transetta (DE3)	<i>E. coli</i> DH5a	Soluble starch, peptone, yeast extract, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4	4.99 U/mL	[90]

7 Genetic modification of microorganisms and their significance in mTG production

Genetic modification of microorganisms plays a significant role in the production of mTG. Currently, the industrial use of TG is primarily derived from the bacterium *S. mobaraensis*. This mTG is the only one with Generally Recognised as Safe (GRAS) status [75]. However, the quantities of TG obtained using this single strain are not sufficient for global-scale mTG utilisation. In order to achieve more efficient and cost-effective enzyme production, and thus expand the commercialisation of mTG, genetic manipulation of microorganisms has been pursued [76]. So far, expression systems have been developed for bacteria, such as *Escherichia coli* [77,78], *Streptomyces lividans* [79,80], *Corynebacterium glutamicum* [81], and *Bacillus subtilis* [82], and for yeast species such as *Yarrowia lipolytica* [80] and *Pichia pastoris* [19,83] (Table 2). Increasing the quantity of enzyme produced involves both mutagenesis of the original production strains and genetic manipulations among strains.

Until recently, *E. coli* was considered unsuitable for inducing TG expression. The expression levels in *E. coli* were low, and the microorganism did not secrete the enzyme into the culture medium – it was produced intracellularly (in the form of intracellular inclusion bodies). In such cases, to obtain purified and soluble enzyme, the inclusion body cells need to be disrupted, and the insoluble mTG needs to be refolded, making the entire process time-consuming and uneconomical. Liu et al. [84] developed a method for the direct production of soluble and active mTG by *E. coli*. After purification, the activity of the recombinant enzyme was 22 U/mg [84]. Another successful expression of the mTG gene in *E. coli* resulted in a specific activity of approximately 37 mU/mg protein. Duarte et al. [25] used genetic engineering techniques to clone the gene encoding mTG from *Bacillus amyloliquefaciens*. Mu et al. [82] obtained an enzyme with an activity of 29.6 U/mg by cloning the gene encoding mTG from *S. mobaraensis* into *B. subtilis*.

Genetic manipulations, in addition to increasing production efficiency, also aim to improve the activity and thermostability of TG [8]. Thermostability, solubility, and, in some cases, enzyme efficiency, can be manipulated by altering the amino acid sequence. Improving the thermostability of the enzyme expands its applications and positively impacts the durability and stability of the resulting products [8,91]. Increased thermostability was achieved after a single round of mutagenesis leading to the substitution of one amino acid in the enzyme [91]. Yokoyama et al. [92] obtained mTG with a specific activity of 45 U/mg, which

was 1.7 times higher compared to the wild-type enzyme (22.7 U/mg). The researchers used an innovative method called wash-rotational mutagenesis [8]. Yin et al. [76] applied mutagenesis and targeted genetic modification to the bacterium *S. mobaraensis*. The *S. mobaraensis* DSM40587 strain was treated with atmospheric and room-temperature plasma (ARTP) in 25 repetitions, producing approximately 3,000 mutants in each repetition. Among the mutant strains obtained, the mutant smY2019 was selected, which showed a 5.5-fold increase in mTG activity (19.7 U/mL). Further steps involved integrating two additional expression cassettes containing the PsmY2019 promoter with the genome of the smY2019 strain. The resulting strain, smY2019-3C, showed a 103% increase in mTG production (40 U/mL) compared to the smY2019 strain. ARTP utilises a plasma stream containing various activated chemical species for DNA mutagenesis. This new mutation system can induce a higher level of microbial mutation compared to traditional methods [76].

8 Concerns and controversies of mTG usage in the food industries

According to the available literature, the daily consumption of mTG through processed food products can vary, reaching levels of up to 15 mg. Each kilogram of processed product containing mTG typically contains around 50–100 mg of the enzyme. Intriguingly, a noteworthy connection can be observed between the rising yearly consumption of commercial enzymes added to processed bakery items and the concurrent increase in the incidence of CD over the past four decades. While this relationship suggests an association, a direct cause-and-effect relationship has not been definitively established.

A growing body of information is being collected regarding mTG's classification as an allergen in occupational settings [41,93]. In their analysis, the Aaron and Torsten [41] compiled a variety of research that substantiates TG's status as an allergen. They noted that products containing wheat/gluten treated with MTG exhibit immunoreactivity, raising doubts about its safety. The supporting argument is safety assessments, producers have primarily conducted *in vitro* tests on cell lines and animal models such as mice, guinea pigs, and rats. However, these evaluations have not been extended to encompass normal or gluten-dependent human conditions. Ultimately, the responsibility for demonstrating mTG's safety lies with its manufacturers and suppliers [45,75].

Formally, mTG is classified as a processing aid, allowing it to avoid being categorised as a food additive. mTG does

not require labelling, as indicated by the manufacturer's assertions. According to them, the enzyme's activity is neutralised or its substrates are depleted during the production process of the end product, resulting in the absence of TG in the final item. This aligns with its role as a processing aid in accordance with regulation 89/107/EEC, making labelling unnecessary [41]. Numerous authors express concerns and caution against the inclusion of mTG in industrially processed foods, raising doubts about its safety and its potential role in the pathogenesis of CD. In Europe, some regulatory authorities have taken steps to caution the public about the safety of mTG in food and have recommended labelling of the enzyme. For example, in Switzerland, food treated with TG requires authorisation, and the labelling must provide information about the reconstitution process and the nature of the used "glue." In Germany, the BfR authorities have indicated that there is a potential clinically relevant risk for CD patients from mTG. Appropriate labelling of foods produced using mTG would enable these patients to avoid uncertainties that the scientific community has yet to clarify [41].

Drawing from the disruption of intestinal tight junctions caused by gluten, the posttranslational modifications of gluten peptides induced by mTG, and the heightened immunogenicity of the resulting mTG-gliadin neocomplex (mTG-gliadin complexes can represent an offending autoantigens), a hypothesis has been proposed. This hypothesis suggests that mTG could potentially serve as a novel environmental element in the initiation and progression of CD. However, its role in non-coeliac gluten-sensitive conditions remains uncertain, posing a significant challenge for future investigations [47,48].

9 Food safety and TG

Due to the increased use of TG in food production, health concerns have emerged, emphasising the need for regulations informing people about the safety of consuming products containing this enzyme. Almost a quarter of a century ago, at the turn of the twentieth and twenty-first centuries, scientists from Japan (Motoki and Seguro) demonstrated that the only difference between proteins subjected to the influence of TG and native proteins is the number of connections between the lysine and glutamine residues (G–L) [23]. This chemical modification also occurs during the heating of protein-rich food, such as cooking, generating G–L bonds. In this regard, humans have been consuming food rich in G–L residues since the discovery of fire and cooking. Although not scientifically proven, the safety of modified G–L bonds can be assumed through the long-

term consumption of G–L molecules in thermally processed food. As for the absorption and bioavailability of such proteins, 99% of isopeptides in the gastrointestinal tract are metabolised into glutamate. At the same time, an American research team led by Bernard examined the mutagenesis and risk of microbiological toxicity of TG associated with its addition in food preparations tested on experimental animals. The study concluded that mTG does not pose a health risk, as no mortality, morbidity, or signs of toxicity were observed at doses of 2 g/kg body weight [23]. It is important to note that mTG is safe for human consumption and has been recognised by the Food and Drug Administration as a GRAS substance since 1998 [94].

Following discussions in food articles about the use of TG, an important aspect is the safety for those people with allergies. Poulson and Bindslev-Jensen [66] performed sequence matching in protein databases to compare the amino acid sequence of mTG derived from the *S. mobaraense* strain with all known allergens at that time. As a result of their research, the scientists did not find any homology with any allergen type that met the decision tree requirements (matching six adjacent amino acids). It is worth noting that a match of five adjacent amino acids was discovered between mTG and the major allergen Gad c1 from cod (known for its thermal stability). Further studies were conducted regarding the potential allergenic activity of mTG. Targeted screening of mTG was performed using sera from patients with cod allergy, as well as direct inhibition of RAST. No binding between patients' IgE and mTG was observed, leading researchers to conclude that there are no concerns regarding potential allergic reactions in humans related to fish products.

There is some evidence of enhanced nutritional properties in enzymatically modified food using TG. According to studies, adding mTG to soybean extract for tofu preparation led to protein modifications that increased satiety and reduced the allergenicity of soy proteins. In another application related to allergenicity, shrimp products processed using TG showed reduced allergenicity due to protein glycosylation catalysed by this enzyme [64].

10 Utilisation of TG on an industrial scale

The industrial production of TG for large-scale applications can be challenging and costly, especially when using animal-derived TG. Industrial production of TG relies on bacterial sources (including actinomycetes) as they are easier and faster to cultivate, and the yield of the TG produced is

significantly higher. mTG exhibits the lowest substrate specificity and provides the greatest possibilities for protein component cross-linking [95].

The first producer of mTG on an industrial scale was the Japanese company Ajinomoto Co (still active in the market). The first food product manufactured using mTG was a frozen fish concentrate called “Surimi” in Japan [23]. The preparation of Surimi fish paste consists of two stages. The first stage, also known as “binding,” occurs at temperatures below 40°C and leads to the formation of a semi-transparent and elastic gel. The second stage, carried out at high temperatures (>80°C), is necessary to strengthen the gels. Gelation is caused by the cross-linking of myosin induced by endogenous Ca^{2+} -dependent TGase present in the walleye pollock, the fish used to prepare Surimi. It has been demonstrated that the addition of exogenous TGs, both blood isoforms and microbial isoforms, during the binding process is beneficial for obtaining Surimi paste with increased elasticity and tensile strength. Furthermore, all fish products restructured using mTG exhibit high whiteness, which is considered an important characteristic for consumers. Therefore, the application of TG is desirable for the efficient restructuring of Surimi-based products [2].

mTG has a potentially wide range of applications in food products, especially those structured based on proteins. The enzyme can enhance various properties of food proteins without affecting the pH, colour, taste, or nutritional value of the food [9]. It acts as a texturising agent, imparting firmness to finished food products, improving thermal stability, and the water-holding capacity of food (meat, fish, seafood, dairy, bakery, and pasta products) [66].

The modification of food proteins by TG helps protect the lysine in food proteins from adverse chemical reactions, thereby increasing the shelf life of food. Furthermore, by cross-linking other proteins containing essential amino acids, proteins with higher nutritional value can be obtained. TGs can be used for encapsulating lipids or lipid-soluble substances, creating heat and water-resistant films. Scientific data also suggest that TGs improve the quality of wool in felting, bleaching, and shrink resistance processes. Incorporating different functional groups into the glutamine residues of proteins using TG is highly useful as it enhances and increases the final utilisation of the protein.

11 Commercial TG preparations

Commercial TG preparations on the market vary due to the different industrial applications of this enzyme. All preparations contain the enzyme obtained from bacteria of the species *S. mobaraensis* [96]. The preparations differ

in their accompanying additives (maltodextrin, gelatin, sodium caseinate, and polyphosphate salts), which characterise their suitability for use in specific product groups. Some preparations are used for the production of sausages or hot dogs, while others are used for fermented dairy products. Among the very few companies involved in the production of commercial TG enzyme preparations, notable ones include Ajinomoto Co. Inc. (Japan) – ACTIVA® enzyme preparations [97], BDF Ingredients (Spain) – BDF PROBIND® preparations, PMT TRADING Sp. z o.o. (Poland) – SAPROVIA and POLSEVIA preparations [7,97].

12 TG in the baking industry

In the process of creating yeast-leavened products using low-quality wheat flour, the dough frequently lacks the desired stability. This type of dough fails to retain the carbon dioxide gas produced during fermentation. As a result, it is quite common to introduce oxidizing agents to the flour in order to enhance its ability to withstand stretching. Due to the desire to minimise the use of synthetic chemicals in food production and instead utilise natural helpers such as enzymes, the challenge emerged in enhancing the dough's resilience without resorting to inorganic compounds. Researchers discovered that TG enhances the dough's resistance, especially in the case of yeast-based dough made from wheat flour, in a manner akin to the effects of potassium bromate [38]. In the baking industry, this enzyme is used to improve the quality of flour, bread texture, volume, and the texture of cooked pasta [98]. From a nutritional standpoint, rice flour contains many valuable nutrients, including protein, fibre, and vitamins E and B. Studies conducted by Gujral and Rosell [99] have shown that the addition of TG to rice flour improves the rheological properties of the dough by increasing the content of triglycerides.

The applications of TG in cereal proteins, particularly in wheat proteins (globulins, glutenins, gliadins, and prolamins), have attracted significant interest from the baking industry. The cross-linking of wheat proteins through the action of TG greatly influences the characteristics of products, determining their quality, functional properties, and rheological behaviour, including stability, elasticity, resilience, water absorption (with the appropriate pore size and dough volume). The cross-linking reaction promotes aggregation and polymerisation, leading to the formation of polypeptide networks with diverse viscoelastic properties [100].

mTG positively affects the structure of low-gluten wheat bread, as well as its yield and volume. In the study by Diowski and Leszczyńska [101], it was shown that microbial enzymes contribute to the reduction in immunoreactivity.

These findings have led to preliminary investigations of the use of low-gluten flours in the production of gluten-free products. The enzyme is also proposed for use in blocking allergenic, protease-resistant peptides in soy proteins [102]. The enzyme can exert beneficial effects during bread production, comparable to those of traditional chemical oxidising improvers. When using small amounts of TG, a positive impact on the crumb and crust quality of bread, as well as on the rheological and physicochemical properties of the dough, has been observed [103]. The release of certain gluten peptides resulting from mTG activity may also influence the modulation of the bread microbiota during storage, thereby increasing the durability of the final product [104].

TG is used in the baking industry to catalyse gluten cross-linking in wheat, thereby improving the quality, structure, volume, stability, texture, and durability of the dough. TGs are currently used in baking technologies to create connections between polypeptide chains of prolamins. Previous studies have shown that transglutaminase has a positive impact on dough stability and volume, as well as on improving the baking quality of weak flour, consequently affecting bread texture [105]. Sadowska and Diowksz [24] suggest that adding TG to a gluten-free mixture containing buckwheat flour increases the moisture content of the bread crumb and reduces overall baking losses. TG improves the rheological properties of the dough and ensures the proper pore size and elasticity of the bread after baking. Additionally, TGs have been shown to enhance water absorption by the dough. Modification of wheat flour proteins by TG increases dough elasticity and resilience, as well as bread volume by 14% compared to traditionally prepared dough [106].

An interesting and unconventional application of TG is the attempt to restore the functionality of the gluten network in wheat flour obtained from grains damaged by insects. In many countries, a significant portion of crops that have been damaged does not meet standards and is unsuitable for further processing or production, resulting in waste. Research exploring the possibility of recovering lost crops is highly promising for farmers facing losses and for food producers. Damaged wheat flour treated with TG exhibits parameters similar to undamaged flour [107].

Currently, the microbial isoform of the enzyme is widely used in the production of pasta in Japan. Pasta treated with TG has higher firmness compared to untreated pasta, and this increases with the amount of added enzyme. It has been shown that reactions catalysed by mTG also effectively influence the functional properties of baked goods through protein aggregation and polymerisation, leading to the formation of a polypeptide network with viscoelastic properties required for bread baking. Gaspar and De Góes-

Favoni [108] reported several studies on the physical properties of bakery products treated with TG, as well as the potential of this enzyme in modifying rice proteins. There are numerous reports on the use of TGase for modifying gluten proteins. Wheat globulins, glutenins, and gliadins were more effectively modified by transglutaminase than prolamins from oats, corn, and rice. The gelation properties of wheat gluten were significantly improved by thermal treatment followed by TG-catalysed cross-linking reaction [2].

Isolated soy protein (ISP) is widely used as an important ingredient in Asian diets and processed foods due to its nutritional value and functional properties. ISP consists of glycinin (11S) and β -conglycinin (7S), which make up about 70% of the total protein content. These globulins are good substrates for TG activity. The influence of TGase on the properties and microstructure of ISP films formed using different plasticisers (glycerol, sorbitol, and a 1:1 mixture of glycerol and sorbitol) has been investigated. Cross-linking with this enzyme proved to be an effective method for improving the casting properties of films with all the tested plasticisers [64].

Tofu, a typical soy product, is prepared by coagulating soy proteins with the addition of Ca^{2+} and Mg^{2+} and/or glucono-delta-lactone. The first step in tofu production is the extraction of soy milk from soybeans and its coagulation. Coagulation or gelation of soy is the most important stage in tofu production. Traditionally, nigari, a sediment from seawater rich in minerals such as magnesium and calcium chlorides, has been used as a coagulant. Modern producers use TG (together with nigari) to obtain tofu with a smoother and firmer texture (silken tofu). The addition of TGase before nigari makes the coagulation process milder and easier to control. The same effect is achieved by adding glucono-lactone, but its use imparts an undesirable acidic taste to the final product [64]. Tofu is a popular food consumed extensively in Asian countries; however, its shelf life is typically very short due to its soft and smooth texture, which hinders sterilisation. Introducing mTG into its processing provides an advantage in texture control and improves its quality, resulting in a product with better consistency, silky texture, and the ability to tolerate temperature fluctuations [3]. Studies by Xing *et al.* [109] demonstrated that the addition of TG during tofu production results in protein modification that increases satiety and reduces the immune response to soy proteins [64,110].

Rice protein enzymatic cross-linking has received limited scientific research attention. The availability of commercial concentrates and isolates from rice bran is limited due to the complex nature of rice bran proteins. On one hand, the crude protein content in rice (5–10%) is significantly lower compared to other grains. On the other hand,

it is important to note that the lysine content, which is one of the substrates suitable for protein cross-linking reactions with TGase, is over 50% higher compared to wheat. Rice proteins alone are not capable of forming a strong enough structure to retain gas produced during fermentation. The addition of hydrocolloids (hydroxypropylmethylcellulose; HPMC) to the dough recipe allowed for the production of bread from rice flour. Protein cross-linking using TGase by Gujral and Rosell [99] enabled the partial replacement of HPMC and improved the viscoelastic properties of the dough. According to Gujral and Rosell [99], the expansion of rice flour applications has significant potential, mainly due to the global popularity of this raw material. Rice proteins cross-linked with TGase to form a stable network and improve nutritional properties offer promising prospects for the production of new products intended for individuals with gluten intolerance, CD, or other specific dietary requirements [102].

13 TG in the meat industry

TG has gained interest in the food industry for its ability to enhance the texture of minced meat, resulting in a firmer steak-like structure. Restructuring meat products provides greater firmness and minimal quality loss during cooking. The cross-linking of proteins and other components in the gel system brings about changes in the protein fraction of food matrices, leading to improved texture, thermal denaturation stability, emulsifying properties, gelation, and increased water-binding capacity. The application of TGase yields a final product with organoleptic properties similar to conventional meat in terms of aroma, texture, appearance, and taste [64].

In addition to its positive impact on product texture, TG enables strong cohesiveness of meat blocks without the need for heat treatment or the addition of salt and phosphates. Reducing sodium content in meat products is an important health concern, and to meet these requirements, the meat industry focuses on developing techniques to reduce the use of salt in processed meat products without compromising quality. Strategies such as the use of TG can be employed in low-sodium meat products. The impact of TG, fibrin/thrombin (fibrimex), alginate, and their combinations on the quality of low-salt cooked meat has been studied. The results indicate that the combination of fibrin/mTG improved the texture properties of low-salt ground beef [3,111].

The use of TG in meat processing significantly improves the texture of the final product, resulting in increased firmness, among other benefits. Additionally, this enzyme enhances the

texture of homogenised sausages made from pork, beef, or poultry. The addition of TG enables the utilisation of lower-quality raw materials, such as collagen, blood proteins, and mechanically deboned meat, to produce meat products with higher nutritional value by complementing them with amino acids (e.g., exogenous lysine) [2]. Several studies have reported the application of TG in meat products [64,111]. The enzyme can be used over a wide range of temperatures, from 10 to 50°C. Some of these studies also demonstrated that supplementing the enzyme can increase gel strength in meat products and have a positive impact on the development of proteins in pork, beef, chicken, and fish. As meat products are highly proteinaceous, myofibrillar proteins have a significant influence on their textural quality. Actin and myosin, which constitute the majority of myofibrillar proteins, are important substrates for TG and can be polymerised through its addition, improving the textural properties of structured meat products. The use of TG has created new technological possibilities for the production of finely and coarsely comminuted sausages and processed meats. Instead of using high-quality meat, lower quality raw materials and additives, such as defatted milk powder, soy flour, or wheat flour, can now be employed. The interaction of the enzyme with the proteins in these raw materials produces products that do not differ in appearance, consistency, aroma, taste, or nutritional value from analogous products made exclusively from high-quality meat [2,112].

In the meat industry, the use of TG has expanded beyond the reconstruction of lower quality minced or mechanically deboned meat into steaks or larger meat cuts. Research in the industrial application of TG focuses on current dietary trends and consumer preferences for healthy food choices. An example of such an application is the production of meat analogues. The production of meat analogues is a response to the growing demand for alternative food products among vegans, vegetarians, and health-conscious consumers who seek substitutes for animal products [5]. Producing meat analogues poses a challenge for food manufacturers due to the difficulties in replicating the texture and taste of the base products. Studies focus on combining plant proteins (e.g., pea protein) with TG to improve their structural properties, potentially replicating the structure of animal-based products. In the study by Moreno et al. [113], the impact of TG on the structural quality of pea protein isolates was examined. The structure of the analogue was improved, and a reduction in the levels of biogenic amines (histamine and tyramine) was achieved [5]. A modern approach to producing meat analogues involves the use of 3D printers. The study by Wen et al. [114] aimed to develop a beef analogue that mimics the textural properties of the raw material using 3D printing and the addition of TG.

In addition to developing the recipe itself, the study tested various methods of heat treatment (steaming, microwaving, baking, and frying) for the created analogue. As a result, technological guidelines for the production of such meat analogues were developed [114].

14 TG in the dairy industry

In the highly competitive market of dairy products, companies constantly strive to capture consumers' attention. Improving the quality and functionality of products in this industry is an ongoing race, where promoting biofunctional properties holds an increasingly prominent position. One of the most promising strategies for promoting biofunctional properties in dairy products is the cross-linking of milk proteins using TG. The application of TG can be an effective strategy for enhancing the nutritional and technological properties of dairy products while lowering production costs by reducing the amount of fat and stabiliser in the final product. This enzyme has the ability to create intra- and intermolecular covalent cross-links between two amino acid residues in the structure of milk proteins. Both casein and whey proteins, such as α -lactalbumin and β -lactoglobulin, are excellent acyl donors and/or acceptors for TG, although there are some differences between them regarding cross-linking reactions [64].

In the cascade reaction, TG catalyses the cross-linking of κ -casein (κ -CN) and β -casein (β -CN) before proceeding to the cross-linking of serum albumin, α -lactalbumin, α s1-casein, α s2-casein, and β -lactoglobulin (β -LG). In this particular case, caseins seem to be easily cross-linked due to their flexible, randomly coiled structures and the absence of any disulfide bonds. Whey proteins, due to their compact globular structure, tend to cross-link less efficiently. β -LG is more susceptible and exhibits a higher cross-linking rate than α -LA, with β -LG capable of cross-linking with the reduction of its disulfide bonds, while α -LA can be cross-linked without reduction [2].

The polymerisation of milk proteins is an essential process in the production of certain dairy products. TG is added to milk proteins to catalyse the polymerisation process, aiming to enhance the nutritional and functional properties of dairy products [115]. Lorenzen *et al.* [116] reported the use of TG in the dairy industry to prevent syneresis and impart proper softness and firmness to dairy products. TG-modified casein enables the production of dairy products with improved structure and consistency. The enzyme can be added before or during the fermentation process. Using this method, TG is added to milk for incubation, resulting in yogurts with a homogeneous, firm,

and creamy consistency, as well as a smooth and dry curd-like surface, which is a result of reduced syneresis. Such yogurts serve as a base for the production of creams, frozen desserts, ice creams, dairy beverages, and dressings [117]. Furthermore, recent studies have shown that enzymatic cross-linking of milk proteins by TG improves the consistency and microstructure of goat milk yogurt gel [3]. Interestingly, microbiological analyses have demonstrated that enzymatic modification of goat milk proteins plays a positive role in the survival of probiotic bacteria used for yogurt production.

An intriguing application of TG is its use to enhance the survival of lactic acid bacteria during spray drying and to increase microencapsulation efficiency [5]. The traditional method of spray drying lactic acid bacteria is fast and inexpensive, but unfortunately, the survival rate of bacteria is only around 31%. Treating a mixture of soy proteins and milk proteins with TG increased the survival rate of *Lactobacillus bulgaricus* to 84.7% (during spray drying) [118].

Another type of dairy product with enormous potential for the application of TG is cheese. Cheese holds a significant position in the dairy industry's commercial market. Global cheese production reaches approximately 19 million tons annually, accounting for 35% of total milk consumption [119]. One of the major challenges faced by the cheese sector is production efficiency, which ranges from 9 to 20% depending on the type of cheese, and for fresh farmer's cheese, it falls between 10 and 13%. Cheese yield is a crucial parameter from an economic standpoint for producers [120]. In the study conducted by Fox *et al.* [119], cheese yield is defined as the kilograms of cheese produced from 100 kg of milk with specific levels of fat and protein. For example, the typical yield for cheddar cheese (with a moisture content of 39% and a fat content in dry matter of 50%) is 10 kg of cheese per 100 kg of milk standardised to protein and fat levels of 3.3 and 3.6%, respectively [119].

In addition to the economic benefits, increasing cheese production efficiency helps reduce environmental pollution by generating smaller amounts of by-products (whey). Enzymatic modification of milk proteins is a crucial element in strategies aimed at enhancing cheese production efficiency. TG and phospholipases are primarily utilised for this purpose, as their application does not lead to sensory defects but rather optimises the efficiency and desired properties of the product. The cross-linking of milk proteins using mTG is gaining increasing popularity. It improves the rheological and physical properties of acid milk gels, as well as production efficiency by reinforcing emulsifying capacity, water-binding abilities, and solubility [120,121].

Three models for the production of natural cheese with TG are proposed [94]:

- (a) Addition of TG to milk, heating the milk for pasteurisation, and deactivation of the enzyme, followed by the addition of rennet.
- (b) Addition of rennet to milk, followed by the addition of TG.
- (c) Addition of TG to milk simultaneously with rennet.

Cozzolino et al. [122] examined these models in their study. The results indicated that transglutaminase plays a significant role in improving cheese yield and properties. It was observed that adding TG before rennet prevented milk coagulation, while simultaneous addition of the enzyme and rennet significantly reduced cheese hardness. The potential advantage of TG treatment is considered to be the improvement in texture and water-holding capacity of both fresh and ripened cheese. It has been demonstrated that protein cross-linking enhances curd yield, and the addition of mTG during the manufacturing process enables the production of protein-enriched cheese with increased firmness [95].

15 TG in the pharmaceutical Industry

Increasing consumer awareness of health and nutrition, which are undoubtedly interconnected, has led to growing demand for bioactive compounds, particularly antioxidants [123]. One such compound is curcumin, a low molecular weight polyphenol that exhibits strong antioxidant properties. Curcumin has positive effects on the treatment of certain chronic diseases by reducing oxidative stress, making it of interest to scientists and pharmaceutical companies involved in nutraceuticals. There are also reports of promising possibilities for the use of curcumin as a bioactive agent in food packaging systems [124]. Unfortunately, the poor water solubility and lack of stability of curcumin pose challenges in its direct application. In their study, Xia et al. [125] examined the use of curcumin with improved bioavailability in Pickering emulsions based on oleogels. A Pickering emulsion is one stabilised by solid particles accumulated at the droplet surfaces. This type of emulsion has gained significant interest among researchers in recent years due to its high potential for applications in fields such as medicine, food industry, and petroleum industry [126]. To create a curcumin-containing Pickering emulsion, the researchers chose lactoferrin as the emulsifier. Lactoferrin is a single-chain glycoprotein with antimicrobial

properties and the ability to scavenge free radicals and regulate cell growth. TG was necessary in the experiment, as it facilitated protein cross-linking reactions, enabling the formation of lactoferrin particles (LF-TG). The resulting LF-TG particles acted as stabilisers for the formed emulsion. The optimal parameters for obtaining TG-induced lactoferrin particles through cross-linking were a pH of 8.0, TG concentration of 100 U/g LF, a temperature of 50°C, and a cross-linking time of 2 h [125]. This study confirms the potential application of TG in creating Pickering emulsions, which, in turn, can enhance the efficiency of delivering nutraceuticals.

Preparations containing TG can offer solutions to numerous technological challenges associated with food efficiency and texture. It is widely known that the use of phosphates in meat processing technology on a large scale has been abandoned due to health concerns. The available literature emphasises the importance of reducing phosphates in meat processing. In response, various enzymatic preparations of microbial origin containing TG derived from the *S. mobaraensis* strain are available on the market. TG enables the neutralisation of texture changes caused by freezing in raw materials such as chicken meat or chicken fillings. Other ingredients containing TG are also used in the production of salami, as they enable faster product ripening. The use of TG in the food industry, regardless of its source, represents a natural technological method. Enzymatic modification of food ingredients has a greater chance of acceptance by the food industry compared to commonly used chemical methods.

16 Conclusion

Although 30 years have passed since the discovery of mTG and the current trend of genetic engineering (developing highly efficient gene expression systems using strains such as *E. coli*, *Corynebacterium* sp., *Pichia* sp., and even *Bacillus* sp.), there is still a need for isolating new microorganisms, optimising growth media, and fermentation procedures to obtain TG with higher activity. Biotechnological advancements enable metabolic engineering of microorganisms to produce tailored TGases with unique properties. However, a complete understanding of the impact of TGs with different properties on the functionality of food systems is still lacking. Currently, commercial TG is produced through fermentation by *S. mobaraensis*, although there are increasing reports of new TGs from other species of actinomycetes. Unfortunately, this system has certain limitations, including low efficiency and problems associated with protease presence (which can hydrolyse the target proteins). Therefore,

it is necessary to develop an efficient biosynthesis system for mTG without these limitations. The cross-linking reaction catalysed by the enzyme described can improve the physical properties of various protein-based food products and contribute to the delivery of high-quality, health-promoting new food. From the perspective of advanced protein resource utilisation, the contribution of TG to the food industry will continue to grow. Moreover, this enzyme can be useful in fields beyond the food industry. It is expected that TG will continue to drive innovation in multiple industries, including increased production using new technologies, protein engineering modifications, and the search for TGs from novel sources.

Despite advertisements and publications asserting its complete safety, the enzyme is recognised as a known occupational allergen, immunogenic substance, and potentially pathogenic factor in CD. If substantiated, it could emerge as a novel environmental trigger for CD. Until further information is available from ongoing research, it is recommended that any applications of mTG in commercial food processing or baking be disclosed on packaging labels to ensure transparency for consumers. Gluten-free products are already acknowledged for potential contamination. The addition of mTG could further elevate risks for gluten-sensitive populations.

Funding information: The authors thank the Warsaw University of Life Sciences-SGGW for their support.

Author contributions: V.K.: writing – original draft. K.P.: writing – original draft and writing – review and editing. M.K.: supervision, conceptualisation, and writing – review and editing.

Conflict of interest: The authors declare no competing interests. Marek Kieliszek, who is the co-author of this article, is a current Editorial Board member of *Open Life Sciences*. This fact did not affect the peer-review process.

Data availability statement: Data sharing is not applicable to this article as no datasets were generated or analysed during the current study.

References

- [1] Loveday SM. Food proteins: Technological, nutritional, and sustainability attributes of traditional and emerging proteins. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2019;10:311–39. doi: 10.1146/ANNUREV-FOOD-032818-121128.
- [2] Zys A, Garncarek Z. Wykorzystanie transglutaminazy mikrobiologicznej do wytwarzania produktów bezglutenowych. *Prace Naukowe Uniwersytetu Ekonomicznego We Wrocławiu.* 2018;213–23. doi: 10.15611/PN.2018.542.16.
- [3] Kieliszek M, Błażej S. Microbial transglutaminase and applications in food industry. In: Ray RC, Cristina M, Rosell CM, editors. *Microbial enzyme technology in food applications.* 1st edn. Boca Raton, FL: CRC Press; 2017. p. 180–98. doi: 10.1201/9781315368405-12.
- [4] Okpara MO, Okpara MO. Microbial enzymes and their applications in food industry: A mini-review. *Adv Enzyme Res.* 2022;10:23–47. doi: 10.4236/AER.2022.101002.
- [5] Miwa N. Innovation in the food industry using microbial transglutaminase: Keys to success and future prospects. *Anal Biochem.* 2020;597:113638. doi: 10.1016/J.AB.2020.113638.
- [6] Ando H, Adachi M, Umeda K, Matsuura A, Nonaka M, Uchio R, et al. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. *Agric Biol Chem.* 1989;53:2613–7. doi: 10.1080/00021369.1989.10869735.
- [7] Kieliszek M, Misiewicz A. Microbial transglutaminase and its application in the food industry. A review. *Folia Microbiol.* 2014;59:241–50. doi: 10.1007/S12223-013-0287-X.
- [8] Akbari M, Razavi SH, Kieliszek M. Recent advances in microbial transglutaminase biosynthesis and its application in the food industry. *Trends Food Sci Technol.* 2021;110:458–69. doi: 10.1016/J.TIFS.2021.02.036.
- [9] Wang H, Chen H, Li Q, Yu F, Yan Y, Liu S, et al. Enhancing the thermostability of transglutaminase from *Streptomyces mobarzensis* based on the rational design of a disulfide bond. *Protein Expr Purif.* 2022;195–196:106079. doi: 10.1016/J.PEP.2022.106079.
- [10] Clarke DD, Neidle A, Sarkar NK, Waelsch H. Metabolic activity of protein amide groups. *Arch Biochem Biophys.* 1957;71:277–9. doi: 10.1016/0003-9861(57)90030-9.
- [11] Martins IM, Choupina A. Protein-glutamine gamma-glutamyl-transferase. In: Choi S, editor. *Encyclopedia of signaling molecules.* Cham: Springer, Cham; 2018. p. 4253–7. doi: 10.1007/978-3-319-67199-4_101758.
- [12] Fatima SW, Khare SK. Current insight and futuristic vistas of microbial transglutaminase in nutraceutical industry. *Microbiol Res.* 2018;215:7–14. doi: 10.1016/J.MICRES.2018.06.001.
- [13] Tatsukawa H, Aoyama R, Hitomi K. Development of peptide-based biosensors for detecting cross-linking and deamidation activities of transglutaminases. *Amino Acids.* 2023;1:1–13. doi: 10.1007/S00726-023-03272-7.
- [14] Chan SK, Lim TS. Bioengineering of microbial transglutaminase for biomedical applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2019;103:2973–84. doi: 10.1007/S00253-019-09669-3.
- [15] Alvarez RG, Karki P, Langleite IE, Bakksjø RJ, Eichacker LA, Furnes C. Characterisation of a novel cold-adapted calcium-activated transglutaminase: Implications for medicine and food processing. *FEBS Open Bio.* 2020;10:495–506. doi: 10.1002/2211-5463.12826.
- [16] Rezvankhah A, Yarmand MS, Ghanbarzadeh B. The effects of combined enzymatic and physical modifications of lentil protein applying Alcalase, Flavourzyme, microbial transglutaminase, and ultrasound: antioxidant, antihypertension, and antidiabetic activities. *J Food Meas Charact.* 2022;16:3743–59. doi: 10.1007/S11694-022-01478-Z.
- [17] Liang X, Ma C, Yan X, Zeng H, McClements DJ, Liu X, et al. Structure, rheology and functionality of whey protein emulsion

- gels: Effects of double cross-linking with transglutaminase and calcium ions. *Food Hydrocoll.* 2020;102:105569. doi: 10.1016/J.FOODHYD.2019.105569.
- [18] Mostafa HS. Microbial transglutaminase: An overview of recent applications in food and packaging. *Biocatal Biotransform.* 2020;38:161–77. doi: 10.1080/10242422.2020.1720660.
- [19] Yang X, Zhang Y. Expression of recombinant transglutaminase gene in *Pichia pastoris* and its uses in restructured meat products. *Food Chem.* 2019;291:245–52. doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2019.04.015.
- [20] Meng Q, Watanabe Y, Suzuki R, Oguri R, Tatsukawa H, Hitomi K. Transglutaminase orthologues in medaka fish - biochemical characterization and establishment of gene-deficient mutants. *Anal Biochem.* 2020;604:113610. doi: 10.1016/J.AB.2020.113610.
- [21] Samelak A, Sobieszczuk-Nowicka E, Legocka J. Transglutaminazy i ich biologiczne funkcje. *Postępy Biologii Komórki.* 2010;599–612.
- [22] Yokoyama K, Nio N, Kikuchi Y. Properties and applications of microbial transglutaminase. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004;64:447–54. doi: 10.1007/S00253-003-1539-5.
- [23] Romeih E, Walker G. Recent advances on microbial transglutaminase and dairy application. *Trends Food Sci Technol.* 2017;62:133–40. doi: 10.1016/J.TIFS.2017.02.015.
- [24] Sadowska A, Diowski A. Wpływ transglutaminazy na objętość właściwą i porowatość miększu bezglutenowego chleba gryczanego. *Żywność Nauka Technologia Jakość.* 2020;27:74–84. doi: 10.15193/zntj/2020/122/323.
- [25] Duarte LS, Barsé LQ, Dalberto PF, da Silva WTS, Rodrigues RC, Machado P, et al. Cloning and expression of the *Bacillus amyloliquefaciens* transglutaminase gene in *E. coli* using a bicistronic vector construction. *Enzyme Microb Technol.* 2020;134:109468. doi: 10.1016/J.ENZMICTEC.2019.109468.
- [26] De Jong GAH, Wijngaards G, Boumans H, Koppelman SJ, Hensing M. Purification and Substrate Specificity of Transglutaminases from Blood and *Streptovorticillium mobar-aense*. *J Agric Food Chem.* 2001;49:3389–93. doi: 10.1021/JF001162H.
- [27] Qazanfarzadeh Z, Kumaravel V. Hydrophobisation approaches of protein-based bioplastics. *Trends Food Sci Technol.* 2023;138:27–43. doi: 10.1016/J.TIFS.2023.06.002.
- [28] Du J, Cao J, Zhou C, Pan D, Geng F, Wang Y. Insight into the mechanism of myosin-fibrin gelation induced by non-disulfide covalent cross-linking. *Food Res Int.* 2022;156:111168. doi: 10.1016/J.FOODRES.2022.111168.
- [29] De Jong GAH, Koppelman SJ. Transglutaminase catalyzed reactions: Impact on food applications. *J Food Sci.* 2002;67:2798–806. doi: 10.1111/J.1365-2621.2002.TB08819.X.
- [30] Zhu Y, Rinzeema A, Tramper J, Bol J. Microbial transglutaminase - A review of its production and application in food processing. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1995;44:277–82. doi: 10.1007/BF00169916.
- [31] Fatima SW, Tiwari R, Khare SK. Utilization of agro-industrial waste for production of Transglutaminase from *Streptomyces mobar-aensis*. *Bioresour Technol.* 2019;287:121391. doi: 10.1016/J.BIORTECH.2019.121391.
- [32] Takemura K, Board PG, Koga F. A systematic review of serum γ -glutamyltransferase as a prognostic biomarker in patients with genitourinary cancer. *Antioxidants.* 2021;10:549. doi: 10.3390/ANTIOX10040549.
- [33] Esposito C, Caputo I. Mammalian transglutaminases. *FEBS J.* 2005;272:615–31. doi: 10.1111/J.1742-4658.2004.04476.X.
- [34] Darin N, Leckström K, Sikora P, Lindgren J, Almén G, Asin-Cayuela J. γ -glutamyl transpeptidase deficiency caused by a large homozygous intragenic deletion in GGT1. *Eur J Hum Genet.* 2018;26:808–17. doi: 10.1038/s41431-018-0122-6.
- [35] Nakano Y, Al-Jallad HF, Mousa A, Kaartinen MT. Expression and localization of plasma transglutaminase factor XIIIa in bone. *J Histochem Cytochem.* 2007;55:675–85. doi: 10.1369/JHC.6A7091.2007.
- [36] Lorand L, Graham RM. Transglutaminases: Crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4:140–56. doi: 10.1038/nrm1014.
- [37] Lerner A, Matthias T. Processed food additive microbial transglutaminase and its cross-linked gliadin complexes are potential public health concerns in celiac disease. *Int J Mol Sci.* 2020;21:1127. doi: 10.3390/IJMS21031127.
- [38] Whitehurst RJ, Oort MV. *Enzymes in food technology*. 2nd edn. Singapore: Wiley-Blackwell; 2010.
- [39] Torsten M, Aaron L. Microbial transglutaminase is immunogenic and potentially pathogenic in pediatric celiac disease. *Front Pediatr.* 2018;6:429035. doi: 10.3389/FPED.2018.00389.
- [40] Bruce SE, Bjarnason I, Peters TJ. Human jejunal transglutaminase: Demonstration of activity, enzyme kinetics and substrate specificity with special relation to gliadin and coeliac disease. *Clin Sci.* 1985;68:573–9. doi: 10.1042/CS0680573.
- [41] Aaron L, Torsten M. Microbial transglutaminase: A new potential player in celiac disease. *Clin Immunol.* 2019;199:37–43. doi: 10.1016/J.CLIM.2018.12.008.
- [42] Amundsen SF, Stamnaes J, Lundin KEA, Sollid LM. Expression of transglutaminase 2 in human gut epithelial cells: Implications for coeliac disease. *PLoS One.* 2023;18:e0287662. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0287662.
- [43] Ma T, Li X, Montalbán-López M, Wu X, Zheng Z, Mu D. Secretion of *Bacillus amyloliquefaciens* Transglutaminase from *Lactococcus lactis* and Its Enhancement of Food Gel Properties. *Gels.* 2022;8:674. doi: 10.3390/GELS8100674/S1.
- [44] Lerner A, Shoenfeld Y, Matthias T. Probiotics: If it does not help it does not do any harm. Really? *Microorganisms.* 2019;7:104. doi: 10.3390/MICROORGANISMS7040104.
- [45] Lerner A, Matthias T, Aminov R. Potential effects of horizontal gene exchange in the human gut. *Front Immunol.* 2017;8:298585. doi: 10.3389/FIMMU.2017.01630.
- [46] Flórez AB, Ammor MS, Mayo B. Identification of tet(M) in two *Lactococcus lactis* strains isolated from a Spanish traditional starter-free cheese made of raw milk and conjugative transfer of tetracycline resistance to lactococci and enterococci. *Int J Food Microbiol.* 2008;121:189–94. doi: 10.1016/J.IJFOODMICRO.2007.11.029.
- [47] Lerner A, Matthias T. Changes in intestinal tight junction permeability associated with industrial food additives explain the rising incidence of autoimmune disease. *Autoimmun Rev.* 2015;14:479–89. doi: 10.1016/J.AUTREV.2015.01.009.
- [48] Lerner A, Matthias T. Possible association between celiac disease and bacterial transglutaminase in food processing: a hypothesis. *Nutr Rev.* 2015;73:544–52. doi: 10.1093/NUTRIT/NUV011.
- [49] Yu J, Pian Y, Ge J, Guo J, Zheng Y, Jiang H, et al. Functional and structural characterization of the antiphagocytic properties of a novel transglutaminase from *Streptococcus suis*. *J Biol Chem.* 2015;290:19081–92. doi: 10.1074/jbc.M115.643338.
- [50] Fuchsbaue H-L. Approaching transglutaminase from *Streptomyces* bacteria over three decades. *FEBS J.* 2022;289:4680–703. doi: 10.1111/FEBS.16060.

- [51] Serafini Fracassini D, Del Duca S. Biochemistry and function of plant transglutaminases - ProQuest. Minerva Biotechnol. 2002;14:135–41.
- [52] Sobieszczuk-Nowicka E, Krzesłowska M, Legocka J. Transglutaminases and their substrates in kinetin-stimulated etioplast-to-chloroplast transformation in cucumber cotyledons. Protoplasma. 2008;233:187–94. doi: 10.1007/S00709-008-0002-Y.
- [53] Campos A, Carvajal-Vallejos PK, Villalobos E, Franco CF, Almeida AM, Coelho AV, et al. Characterisation of *Zea mays* L. plastidial transglutaminase: interactions with thylakoid membrane proteins. Plant Biol. 2010;12:708–16. doi: 10.1111/J.1438-8677.2009.00280.X.
- [54] 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. 2009;36:643–57. doi: 10.1007/S00726-008-0131-9.
- [55] Wang L, Yu B, Wang R, Xie J. Biotechnological routes for transglutaminase production: Recent achievements, perspectives and limits. Trends Food Sci Technol. 2018;81:116–20. doi: 10.1016/J.TIFS.2018.09.015.
- [56] Zheng M, Du G, Chen J, Lun S. Modelling of temperature effects on batch microbial transglutaminase fermentation with *Streptovorticillium mobaraense*. World J Microbiol Biotechnol. 2002;18:767–71. doi: 10.1023/A:1020472908615.
- [57] Yan G, Du G, Li Y, Chen J, Zhong J. Enhancement of microbial transglutaminase production by *Streptovorticillium mobaraense*: application of a two-stage agitation speed control strategy. Process Biochem. 2005;40:963–8. doi: 10.1016/J.PROCBIO.2004.04.002.
- [58] Téllez-Luis SJ, González-Cabiales JJ, Ramírez JA, Vázquez M. Production of transglutaminase by *Streptovorticillium ladakanum* NRRL-3191 grown on media made from hydrolysates of sorghum straw. Food Technol Biotechnol. 2004;42:1–4.
- [59] Nagy V, Szakacs G. Production of transglutaminase by *Streptomyces* isolates in solid-state fermentation. Lett Appl Microbiol. 2008;47:122–7. doi: 10.1111/J.1472-765X.2008.02395.X.
- [60] de Barros Soares H, Assmann F, Záchia Ayub MA. Purification and properties of a transglutaminase produced by a *Bacillus circulans* strain isolated from the Amazon environment. Biotechnol Appl Biochem. 2003;37:295–9. doi: 10.1042/BA20020110.
- [61] Ceresino EB, de Melo RR, Kuktaite R, Hedenqvist MS, Zucchi TD, Johansson E, et al. Transglutaminase from newly isolated *Streptomyces* sp. CBMAI 1617: Production optimization, characterization and evaluation in wheat protein and dough systems. Food Chem. 2018;241:403–10. doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2017.09.010.
- [62] Glodowsky AP, Ruberto LA, Martorell MM, Mac Cormack WP, Levin GJ. Cold active transglutaminase from antarctic *Penicillium chrysogenum*: Partial purification, characterization and potential application in food technology. Biocatal Agric Biotechnol. 2020;29:101807. doi: 10.1016/J.BCAB.2020.101807.
- [63] Kanaji T, Ozaki H, Takao T, Kawajiri H, Ide H, Motoki M, et al. Primary structure of microbial transglutaminase from *Streptovorticillium* sp. strain s-8112. J Biol Chem. 1993;268:11565–72. doi: 10.1016/S0021-9258(19)50238-1.
- [64] Duarte L, Matte CR, Bizarro CV, Ayub MAZ. Transglutaminases: part I—origins, sources, and biotechnological characteristics. World J Microbiol Biotechnol. 2020;36:1–18. doi: 10.1007/S11274-019-2791-X.
- [65] Jaros D, Partschfeld C, Henle T, Rohm H. Transglutaminase in dairy products: Chemistry, physics, applications. J Texture Stud. 2006;37:113–55. doi: 10.1111/J.1745-4603.2006.00042.X.
- [66] Poulsen LK, Bindslev-Jensen C. Practical application of allergenic risk assessment of proteins. In: Clare Mills C, Wichers H, Hoffmann-Sommergruber K, editors. Managing allergens in food. Sawston, United Kingdom: Woodhead Publishing; 2007. p. 251–61. doi: 10.1533/9781845692278.3.251.
- [67] Macedo JA, Fazani Cavallieri AL, Lopes da Cunha R, Sato HH. The effect of transglutaminase from *Streptomyces* sp. CBMAI 837 on the gelation of acidified sodium caseinate. Int Dairy J. 2010;20:673–9. doi: 10.1016/J.IDAIRYJ.2010.03.014.
- [68] Sato R, Minamihata K, Ariyoshi R, Taniguchi H, Kamiya N. Recombinant production of active microbial transglutaminase in *E. coli* by using self-cleavable zymogen with mutated propeptide. Protein Expr Purif. 2020;176:105730. doi: 10.1016/J.PEP.2020.105730.
- [69] Mulawka E, Dmytrów I, Mituniewicz-Malek A, Godula K. Rodzaj kultury starterowej a wybrane cechy fizykochemiczne sera twarogowego w czasie przechowywania. Żywność Nauka Technologia Jakość. 2019;26:95–110. doi: 10.15193/ZNTJ/2019/118/276.
- [70] Guerra-Rodríguez E, Vázquez M. Evaluation of a novel low-cost culture medium containing exclusively milk, potato and glycerol for microbial transglutaminase production by *Streptomyces mobaraensis*. Chem Eng Res Des. 2014;92:784–91. doi: 10.1016/J.CHERD.2013.06.027.
- [71] Ryszka L, Krakowiak A, Trzcinska M, Czajak J. Wpływ warunków hodowli na wytwarzanie transglutaminazy przez *Streptovorticillium mobaraense*. Pamiętnik Puławski. 2009;151:619–30.
- [72] Gurung N, Ray S, Bose S, Rai V. A broader view: Microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. BioMed Res Int. 2013;2013:329121. doi: 10.1155/2013/329121.
- [73] Singh S, Bijender, Bajaj K, Kumar Bajaj B. Bioprocess optimization for production of thermoalkali-stable protease from *Bacillus subtilis* K-1 under solid-state fermentation. Prep Biochem Biotechnol. 2016;46:717–24. doi: 10.1080/10826068.2015.1135455.
- [74] Patel AK, Dong C-D, Chen C-W, Pandey A, Singhania RR. Production, purification, and application of microbial enzymes. In: Brahmachari G, editor. Biotechnology of microbial enzymes. 2nd edn. Oxford, United Kingdom: Academic Press; 2023. p. 25–57. doi: 10.1016/B978-0-443-19059-9.00019-0.
- [75] Lerner A, Benzvi C. Microbial transglutaminase is a very frequently used food additive and is a potential inducer of autoimmune/neurodegenerative diseases. Toxics. 2021;9:233. doi: 10.3390/TOXICS9100233.
- [76] Yin X, Li Y, Zhou J, Rao S, Du G, Chen J, et al. Enhanced production of transglutaminase in *Streptomyces mobaraensis* through random mutagenesis and site-directed genetic modification. J Agric Food Chem. 2021;69:3144–53. doi: 10.1021/ACS.JAFC.1C00645.
- [77] Juettner NE, Classen M, Colin F, Hoffmann SB, Meyners C, Pfeifer F, et al. Features of the transglutaminase-activating metalloprotease from *Streptomyces mobaraensis* DSM 40847 produced in *Escherichia coli*. J Biotechnol. 2018;281:115–22. doi: 10.1016/J.JBIOTEC.2018.07.004.
- [78] Rickert M, Strop P, Lui V, Melton-Witt J, Farias SE, Foletti D, et al. Production of soluble and active microbial transglutaminase in *Escherichia coli* for site-specific antibody drug conjugation. Protein Sci. 2016;25:442–55. doi: 10.1002/PRO.2833.
- [79] Noda S, Miyazaki T, Tanaka T, Ogino C, Kondo A. Production of *Streptovorticillium cinnamoneum* transglutaminase and cinnamic acid by recombinant *Streptomyces lividans* cultured on biomass-derived carbon sources. Bioresour Technol. 2012;104:648–51. doi: 10.1016/J.BIORTECH.2011.10.045.

- [80] Liu S, Wang M, Du G, Chen J. Improving the active expression of transglutaminase in *Streptomyces lividans* by promoter engineering and codon optimization. BMC Biotechnol. 2016;16:1–9. doi: 10.1186/S12896-016-0304-7.
- [81] Umakoshi M, Hirasawa T, Furusawa C, Takenaka Y, Kikuchi Y, Shimizu H. Improving protein secretion of a transglutaminase-secreting *Corynebacterium glutamicum* recombinant strain on the basis of ¹³C metabolic flux analysis. J Biosci Bioeng. 2011;112:595–601. doi: 10.1016/J.BIOSC.2011.08.011.
- [82] Mu D, Lu J, Qiao M, Kuipers OP, Zhu J, Li X, et al. Heterologous signal peptides-directing secretion of *Streptomyces mobaraensis* transglutaminase by *Bacillus subtilis*. Appl Microbiol Biotechnol. 2018;102:5533–43. doi: 10.1007/S00253-018-9000-Y.
- [83] Türkanoglu Özçelik A, Ersöz F, İnan M. Extracellular production of the recombinant bacterial transglutaminase in *Pichia pastoris*. Protein Expr Purif. 2019;159:83–90. doi: 10.1016/J.PEP.2019.03.003.
- [84] Liu S, Zhang D, Wang M, Cui W, Chen K, Du G, et al. The order of expression is a key factor in the production of active transglutaminase in *Escherichia coli* by co-expression with its pro-peptide. Microb Cell Fact. 2011;10:1–7. doi: 10.1186/1475-2859-10-112.
- [85] Liu S, Wan D, Wang M, Madzak C, Du G, Chen J. Overproduction of pro-transglutaminase from *Streptomyces hygroscopicus* in *Yarrowia lipolytica* and its biochemical characterization. BMC Biotechnol. 2015;15:1–9. doi: 10.1186/S12896-015-0193-1.
- [86] Date M, Yokoyama KI, Umezawa Y, Matsui H, Kikuchi Y. High level expression of *Streptomyces mobaraensis* transglutaminase in *Corynebacterium glutamicum* using a chimeric pro-region from *Streptomyces cinnamonensis* transglutaminase. J Biotechnol. 2004;110:219–26. doi: 10.1016/J.JBIOTEC.2004.02.011.
- [87] Huang Y, Jin M, Yan W, Wu Q, Niu Y, Zou C, et al. A point mutant in the promoter of transglutaminase gene dramatically increased yield of microbial transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* TX1. Process Biochem. 2022;112:92–7. doi: 10.1016/J.PROCBIO.2021.11.021.
- [88] Li H, Zhang L, Cui Y, Luo X, Xue C, Wang S. Expression of soluble recombinant transglutaminase from *Zea mays* in *Pichia pastoris*. World J Microbiol Biotechnol. 2013;29:939–47. doi: 10.1007/S11274-012-1250-8.
- [89] Shen ML, Ciou JY, Hsieh LS, Hsu CL. Recombinant *Streptomyces netropsis* transglutaminase expressed in *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) and applied in plant-based chicken nugget. World J Microbiol Biotechnol. 2023;39:200. doi: 10.1007/S11274-023-03644-X.
- [90] Xue T, Zheng X, Su X, Chen D, Liu K, Yuan X, et al. Directed evolution of the transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* and its enhanced expression in *Escherichia coli*. Food Biotechnol. 2020;34:42–61. doi: 10.1080/08905436.2019.1711112.
- [91] Marx CK, Hertel TC, Pietzsch M. Random mutagenesis of a recombinant microbial transglutaminase for the generation of thermostable and heat-sensitive variants. J Biotechnol. 2008;136:156–62. doi: 10.1016/J.JBIOTEC.2008.06.005.
- [92] Yokoyama K, Utsumi H, Nakamura T, Ogaya D, Shimba N, Suzuki E, et al. Screening for improved activity of a transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* created by a novel rational mutagenesis and random mutagenesis. Appl Microbiol Biotechnol. 2010;87:2087–96. doi: 10.1007/S00253-010-2656-6.
- [93] De Palma G, Apostoli P, Mistrello G, Zanotta S, Bertorelli G. Microbial transglutaminase: A new and emerging occupational allergen. Ann Allergy Asthma Immunol. 2014;112:553–4. doi: 10.1016/j.anai.2014.03.012.
- [94] Kuraishi C, Sakamoto J, Yamazaki K, Susa Y, Kuhara C, Soeda T. Production of restructured meat using microbial transglutaminase without salt or cooking. J Food Sci. 1997;62:488–90. doi: 10.1111/J.1365-2621.1997.TB04412.X.
- [95] Sadowska A, Diowski A. Właściwości transglutaminazy i jej rola w piekarstwie. Żywność Nauka Technologia Jakość. 2016;5:9–17. doi: 10.15193/zntj/2016/108/145.
- [96] Ravindran R, Jaiswal AK. Enzymes in bioconversion and food processing. In: Kuddus M, editor. Enzymes in Food Technology: Improvements and Innovations. Singapore: Springer Singapore; 2018. p. 19–40. doi: 10.1007/978-981-13-1933-4_2.
- [97] Giosafatto CVL, Rigby NM, Wellner N, Ridout M, Husband F, Mackie AR. Microbial transglutaminase-mediated modification of ovalbumin. Food Hydrocoll. 2012;26:261–7. doi: 10.1016/J.FOODHYD.2011.06.003.
- [98] Moore MM, Heinbockel M, Dockery P, Ulmer HM, Arendt EK. Network formation in gluten-free bread with application of transglutaminase. Cereal Chem. 2006;83:28–36. doi: 10.1094/CC-83-0028.
- [99] Gujral HS, Rosell CM. Functionality of rice flour modified with a microbial transglutaminase. J Cereal Sci. 2004;39:225–30. doi: 10.1016/J.JCS.2003.10.004.
- [100] Kamani MH, Semwal J, Mousavi Khaneghah A. Functional modification of grain proteins by dual approaches: Current progress, challenges, and future perspectives. Colloids Surf B: Biointerfaces. 2022;211:112306. doi: 10.1016/J.COLSURFB.2021.112306.
- [101] Diowski A, Leszczyńska J. Wpływ Transglutaminazy na Jakość i Immunoreaktywność Pieczywa Pszennego o Małej Zawartości Glutenu. In: Duda-Chodak A, Najgebauer-Lejko D, Drożdż I, Tarko T, editors. Rola Procesów Technologicznych w Kształtowaniu Jakości Żywności. Poland: Lodz University of Technology; 2016. p. 42–50.
- [102] Dube M, Schäfer C, Neidhart S, Carle R. Texturisation and modification of vegetable proteins for food applications using microbial transglutaminase. Eur Food Res Technol. 2007;225:287–99. doi: 10.1007/S00217-006-0401-2.
- [103] Scarnato L, Montanari C, Serrazanetti DI, Aloisi I, Balestra F, Del Duca S, et al. New bread formulation with improved rheological properties and longer shelf-life by the combined use of transglutaminase and sourdough. LWT – Food Sci Technol. 2017;81:101–10. doi: 10.1016/J.LWT.2017.03.042.
- [104] Duarte L, Matte CR, Bizarro CV, Ayub MAZ. Review transglutaminases: Part II—industrial applications in food, biotechnology, textiles and leather products. World J Microbiol Biotechnol. 2019;36:1–20. doi: 10.1007/S11274-019-2792-9.
- [105] Marco C, Rosell CM. Breadmaking performance of protein enriched, gluten-free breads. Eur Food Res Technol. 2008;227:1205–13. doi: 10.1007/S00217-008-0838-6.
- [106] Gerrard JA, Fayle SE, Brown PA, Sutton KH, Simmons L, Rasiah I. Effects of microbial transglutaminase on the wheat proteins of bread and croissant dough. J Food Sci. 2001;66:782–6. doi: 10.1111/J.1365-2621.2001.TB15172.X.
- [107] Bonet A, Caballero PA, Gómez M, Rosell CM. Microbial transglutaminase as a tool to restore the functionality of gluten from insect-damaged wheat. Cereal Chem. 2005;82:425–30. doi: 10.1094/CC-82-0425.
- [108] Gaspar ALC, De Góes-Favoni SP. Action of microbial transglutaminase (MTGase) in the modification of food proteins: A review.

- Food Chem. 2015;171:315–22. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.09.019.
- [109] Xing G, Rui X, Jiang M, Xiao Y, Guan Y, Wang D, et al. In vitro gastrointestinal digestion study of a novel bio-tofu with special emphasis on the impact of microbial transglutaminase. *PeerJ*. 2016;2016:1–18. doi: 10.7717/PEERJ.2754/SUPP-1.
- [110] Yuan F, Lv L, Li Z, Mi N, Chen H, Lin H. Effect of transglutaminase-catalyzed glycosylation on the allergenicity and conformational structure of shrimp (*Metapenaeus ensis*) tropomyosin. *Food Chem*. 2017;219:215–22. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.09.139.
- [111] Atilgan E, Kilic B. Effects of microbial transglutaminase, fibrinogen and alginate on physicochemical properties of cooked ground meat with reduced salt level. *J Food Sci Technol*. 2017;54:303–12. doi: 10.1007/S13197-016-2463-X.
- [112] Motoki M, Seguro K. Transglutaminase and its use for food processing. *Trends Food Sci Technol*. 1998;9:204–10. doi: 10.1016/S0924-2244(98)00038-7.
- [113] Moreno HM, Pedrosa MM, Tovar CA, Borderías AJ. Effect of microbial transglutaminase on the production of fish myofibrillar and vegetable protein-based products. In: Kuddus M, Noe Aguilar C, editors. *Value-addition in food products and processing through enzyme technology*. Oxford, United Kingdom: Academic Press; 2022. p. 427–36. doi: 10.1016/B978-0-323-89929-1.00020-2.
- [114] Wen Y, Kim HW, Park HJ. Effects of transglutaminase and cooking method on the physicochemical characteristics of 3D-printable meat analogs. *Innov Food Sci Emerg Technol*. 2022;81:103114. doi: 10.1016/j.ifset.2022.103114.
- [115] Rossa PN, de Sá EMF, Burin VM, Bordignon-Luiz MT. Optimization of microbial transglutaminase activity in ice cream using response surface methodology. *LWT – Food Sci Technol*. 2011;44:29–34. doi: 10.1016/j.lwt.2010.06.013.
- [116] Lorenzen PC, Neve H, Mautner A, Schlimme E. Effect of enzymatic cross-linking of milk proteins on functional properties of set-style yoghurt. *Int J Dairy Technol*. 2002;55:152–7. doi: 10.1046/j.1471-0307.2002.00065.x.
- [117] Şanlı T, Sezgin E, Deveci O, Şenel E, Benli M. Effect of using transglutaminase on physical, chemical and sensory properties of set-type yoghurt. *Food Hydrocoll*. 2011;25:1477–81. doi: 10.1016/j.foodhyd.2010.09.028.
- [118] Gong P, Di W, Yi H, Sun J, Zhang L, Han X. Improved viability of spray-dried *Lactobacillus bulgaricus* sp1.1 embedded in acidic-basic proteins treated with transglutaminase. *Food Chem*. 2019;281:204–12. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.12.095.
- [119] Fox P, Guinee T, Cogan T, McSweeney P. Cheese yield. In: Fox PF, Guinee TP, Cogan TM, McSweeney PLH, editors. *Fundamentals of cheese science*. 2nd edn. New York, USA: Springer Nature; 2017. p. 279–331.
- [120] Monsalve-Atencio R, Sanchez-Soto K, Chica J, Camaño Echavarría JA, Vega-Castro O. Interaction between phospholipase and transglutaminase in the production of semi-soft fresh cheese and its effect on the yield, composition, microstructure and textural properties. *LWT*. 2022;154:112722. doi: 10.1016/j.lwt.2021.112722.
- [121] Taghi Gharibzadeh SM, Koubaa M, Barba FJ, Greiner R, George S, Roohinejad S. Recent advances in the application of microbial transglutaminase crosslinking in cheese and ice cream products: A review. *Int J Biol Macromol*. 2018;107:2364–74. doi: 10.1016/j.jbiomac.2017.10.115.
- [122] Cozzolino A, Pierro PDi, Mariniello L, Sorrentino A, Masi P, Porta R. Incorporation of whey proteins into cheese curd by using transglutaminase. *Biotechnol Appl Biochem*. 2003;38:289–95. doi: 10.1042/BA20030102.
- [123] Sawicka BH, Ziariati P, Krochmal-Marczak B, Skiba D. *Nutraceutyki w żywności i farmacji. Praca przeglądowa*. *Agron Sci*. 2019;74:7–31. doi: 10.24326/AS.2019.4.1.
- [124] Aliabbasi N, Fathi M, Emam-Djomeh Z. Curcumin: A promising bioactive agent for application in food packaging systems. *J Environ Chem Eng*. 2021;9:105520. doi: 10.1016/j.jece.2021.105520.
- [125] Xia T, Gao Y, Liu Y, Wei Z, Xue C. Lactoferrin particles assembled via transglutaminase-induced crosslinking: Utilization in oleogel-based Pickering emulsions with improved curcumin bioaccessibility. *Food Chem*. 2022;374:131779. doi: 10.1016/j.foodchem.2021.131779.
- [126] Xia T, Xue C, Wei Z. Physicochemical characteristics, applications and research trends of edible Pickering emulsions. *Trends Food Sci Technol*. 2021;107:1–15. doi: 10.1016/j.tifs.2020.11.019.

Original article:

**PRODUCTION OF MICROBIAL TRANSGLUTAMINASE BY
STREPTOVERTICILLIUM CINNAMONEUM KKP 1658**

Vitaliy Kolotylo^{id}, Kamil Piwowarek^{id}, Marek Kieliszek*^{id}

Department of Food Biotechnology and Microbiology, Institute of Food Sciences, Warsaw University of Life Sciences—SGGW, Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warsaw, Poland

* **Corresponding author:** Marek Kieliszek, Department of Food Biotechnology and Microbiology, Institute of Food Sciences, Warsaw University of Life Sciences—SGGW, Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warsaw, Poland.
E-mail: marek_kieliszek@sggw.edu.pl; marek-kieliszek@wp.pl

<https://dx.doi.org/10.17179/excli2024-7033>

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

ABSTRACT

Transglutaminase finds broad applications in the food industry, influencing texture, shelf life and overall food quality. It can be utilized to create products with enhanced sensory and technological properties and serves as a tool to reduce food waste. The aim of this study was to optimize the production of microbial transglutaminase (MTG) by the genetically unmodified strain of *Streptovercillium cinnamoneum* KKP 1658. Tryptone soy broth (TSB) was chosen as the optimal inoculation medium due to its high MTG activity in the cultivation substrate. The optimal inoculum incubation time was determined as 24 hours, with a dosage of 10 %. Various nitrogen sources were investigated while maintaining a consistent nitrogen dosage (0.2 %) (including aminobak, corn steep liquor, ammonium nitrate and ammonium sulphate) to achieve the highest microbiological transglutaminase activity. The combination of aminobak with corn steep liquor and a cultivation period of 72 hours (28 °C; pH 6.0-6.5) yielded the highest MTG activity at 6.59 U/mL.

Keywords: Microbial transglutaminase, *Streptovercillium cinnamoneum*, biosynthesis, waste products

INTRODUCTION

Genetically modified microorganisms (GMMs) have found applications across various industries, including agriculture, pharmaceuticals, environmental management (in pollution control contexts) and in sectors such as food, paper and textiles manufacturing (Mallikarjuna and Yellamma, 2019). Enzymes in the food industry are increasingly gaining significance (Raveendran et al., 2018), with particular attention directed towards microbial transglutaminase (MTG) produced by the genetically unmodified

strain of streptomycetes from the genus *Streptovercillium*. Transglutaminase enzyme (E.C. 2.3.2.13) is currently one of the most widely utilized enzymes in protein cross-linking processes (Lerner et al., 2023). MTG stimulates the formation of both intra- and intermolecular cross-links by creating durable, covalent bonds between lysine amino acids and glutamine residues in proteins (Ceresino et al., 2018).

It is worth noting that despite the numerous advantages of genetic engineering in MTG production (enhanced activity, thermo-

stability, and efficiency) (Juettner et al., 2018), there are still certain drawbacks and challenges. A segment of society opposes genetic engineering processes (some countries impose bans or strict restrictions) and consistently expresses resistance, partly due to ethical concerns, unexplored long-term consequences, beliefs in the induction of diseases, carcinogenicity and allergies to GMMs or their metabolites (Dzhumanova and Nazarova 2022). Additional limitations in GMM production include labor-intensive and costly research, the creation of mutants on a large scale and unforeseen side effects (Akbari et al., 2021).

Producing food products involving GMMs raises questions about their safety for human health and the environment. GMMs may pose risks; therefore, it is crucial to provide adequate data when conducting risk assessments associated with them (EUR-Lex 2009; EFSA, 2011). Newly expressed proteins from GMMs are assessed for similarity to allergenic proteins and are also tested for horizontal gene transfer (antibiotic resistance markers). The transfer of antibiotic resistance to other microorganisms can threaten the effectiveness of antibiotics. GMMs may have the ability to colonize the human gastrointestinal tract, potentially affecting the normal microbiome (a collection of microorganisms, mainly bacteria, in the human digestive tract that plays a crucial role in digestion, metabolism, immunity and overall health) (Dzhumanova and Nazarova, 2022; Wesseler et al., 2023).

Owing to the ongoing concerns surrounding GMMs in certain circles, it is imperative to explore alternative solutions, particularly in the food industry, without the use of genetically modified organisms and their metabolites. Microbial transglutaminase represents a significant area of interest in the food industry due to its practical benefits (such as improving food quality, expanding product ranges and increasing product shelf life) and economic advantages (e.g., reducing production costs, minimizing waste and decreasing the need for chemical additives). On an in-

dustrial scale, transglutaminase is utilized in the baking, meat, fish, dairy and even pharmaceutical industries. Many scientists recommend the use of MTG in various food products, including low-fat and low-salt meat products, fish products (fish paste), cheeses (tofu, cottage cheese and aged cheeses), yogurts, breads and pasta (Kolotylo et al., 2023). Commercial transglutaminase is produced by *Streptovorticillium mobaraensis* on an industrial scale, but this system has certain drawbacks, including low enzyme efficiency and high costs associated with nutrient media (Akbari et al., 2021).

In the current study, an attempt was made to obtain natural production of MTG by the strain *Streptovorticillium cinnamoneum* KKP 1658 by selecting appropriate production parameters to achieve the best possible MTG activity while maintaining the economic benefits associated with expensive components of research substrates (e.g., aminobak, peptone, yeast extract (Kieliszek and Misiewicz, 2014; Akbari et al., 2021). The emphasis of this work is on using a genetically unmodified strain and naturally enhancing MTG activity with the goal of potential industrial-scale utilization, offering advantages such as food safety (no risk of unpredictable side effects), consumer acceptance and trust, cost reduction and circumventing GMO regulations in countries with stringent rules, facilitating the production process and the introduction of new products to the market.

METHODOLOGY

Biological material

The research utilized the streptomycete strain *Streptovorticillium cinnamoneum* KKP 1658 obtained from the Culture Collection of the Department of Biotechnology and Food Microbiology, Warsaw University of Life Sciences. The strain was stored at -80 °C in Tryptone Soy Broth (TSB) liquid medium with glycerol.

Cultivation methods

Inoculation medium used for the study was TSB. TSB composition [g/L]: casein peptone 17; soy peptone 3; NaCl 5; K₂HPO₄ 2.5; glucose 2.5. An additional inoculation medium (O₃) consisted of [g/L]: oat flakes 25, aminobak 2, K₂HPO₄ 2, and MgSO₄*7H₂O 1. The initial pH of the media was adjusted to 7.0 (pH meter Elmetron CP-505, Poland). Media were sterilized at 121 °C for 15 minutes (Autoclave Systec D-45, De Ville, Poland).

The inoculation medium was inoculated with the *Streptovercillium cinnamoneum* KKP 1658 strain ($6-8 \times 10^7$ CFU/mL) and placed on a shaker (Eppendorf Innova 44 Incubator Shaker, Germany) for cultivation at 28 °C, with rotary shaking at 180 revolutions per minute for 72 hours for adaptation and biomass multiplication. After 72 hours, the inoculum was transferred to the research medium (the inoculum constituted 10 % of the medium volume), and cultivations were conducted at four time points (24, 48, 72 and 96 hours) at 28 °C. Composition of the research medium [g/L]: soluble starch 20, aminobak 20, yeast extract 2, KH₂PO₄ 2, Na₂HPO₄ 2, MgSO₄*7H₂O 1. The pH of the medium was adjusted to 6.5 and sterilised at 121 °C for 15 minutes (Autoclave Systec D-45, De Ville, Poland). Cultivations were conducted in triplicates.

To determine the appropriate nitrogen source in subsequent research media, aminobak was replaced with: ammonium sulphate (NH₄)₂SO₄, ammonium nitrate (NH₄NO₃), corn steep liquor and aminobak with corn steep liquor. The nitrogen sources were applied separately, maintaining the nitrogen content in the research media at the same level (0.2 %).

Biomass yield determination

The biomass yield of the *S. cinnamoneum* KKP 1658 strain was measured after centrifugation (Eppendorf 5810 Centrifuge, Germany) (4500 rpm; 10 min) of 30 mL of post-culture fluid in pre-weighed and dried 50 mL Falcon tubes. The supernatant was decanted for transglutaminase activity determination, and the sediment was dried (SML Zalmed Dryer, Poland) (80 °C) to a constant mass. The biomass yield after centrifugation and drying was calculated per 1 L of medium and expressed in grams of dry substance (g_{d.w.}/L) in three repetitions.

Transglutaminase activity determination

The enzymatic activity of transglutaminase was determined using commercial tests, Microbial Transglutaminase Assay Kit Art. No. Z009 (Zedira GmbH, Darmstadt, Germany). The kit for microbial transglutaminase determination utilizes the substrate Z-Gln-Gly (N2-[(phenylmethoxy)carbonyl]-L-glutaminy-glycine, C₁₅H₁₉N₃O₆) as the amine acceptor and hydroxylamine as the amine donor. In the presence of MTG, hydroxylamine is incorporated into the Z-Gln-Gly substrate, forming Z-glutamyl-hydroxamic-glycine, which forms a colorful complex with iron (III) detectable spectrophotometrically (BIO-RAD SmartSpec 3000 Spectrophotometer, Poland) at a wavelength of 525 nm (Figure 1 and 2).

One unit of transglutaminase activity (U) is defined as the amount of enzyme that catalyzes the formation of 1 μmole of hydroxamic acid per minute in the reaction between Z-Gln-Gly and hydroxylamine at pH 6.0 and a temperature of 37 °C (Folk and Cole, 1966).

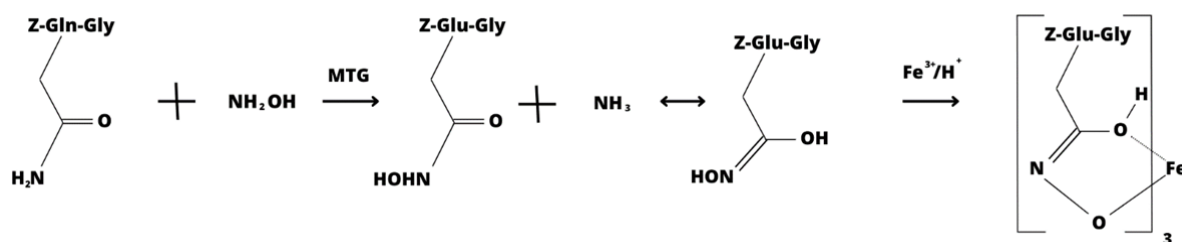


Figure 1: Chemical reaction series illustrating the principle of the enzymatic test for detecting MTG.

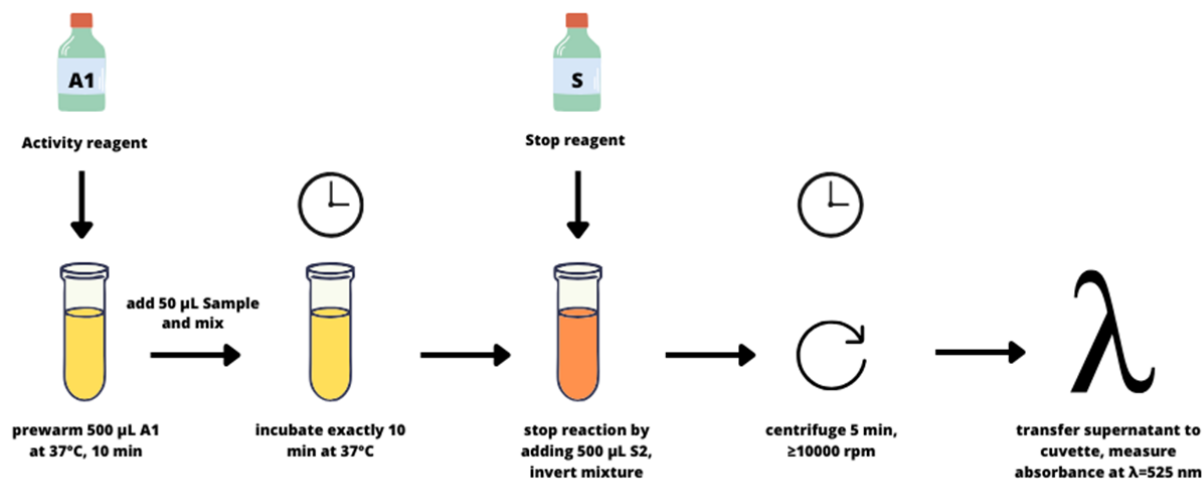


Figure 2: Schematic representation of the procedure for performing the MTG assay.

Evaluation of inoculum material impact

The study investigated how the pre-cultivation process in the inoculation medium (O₃) with a different composition (subsection, as described earlier) than the TSB affects the biomass yield and the activity of transglutaminase produced by the examined strain of *Streptovercillium cinnamoneum* KKP 1658 in the research medium with aminobak and corn steep liquor.

To assess the influence of the age of the inoculum material on the biomass yield and the activity of the produced transglutaminase, pre-cultivation of *S. cinnamoneum* KKP 1658 was carried out for 24, 48 and 72 hours, followed by a 96-hour research cultivation. The effect of the inoculum dose on MTG activity was examined based on results obtained for 5, 10 and 15 % inoculum doses relative to the volume of the research medium.

Assessment of initial pH influence on medium

Changes in pH values during the 96-hour cultivation of *S. cinnamoneum* KKP 1658 in the experimental medium with the addition of aminobak and corn steep liquor, inoculated with a 24-hour inoculum at a dose of 10 %, were examined. The initial pH levels of 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 and 7.0 were investigated to determine their impact on the activity of the produced transglutaminase.

Statistical analysis

The obtained research results underwent analysis of variance using the Statistica 13.3 software. All analyses were performed in triplicate. Significance differences between means in individual groups were verified using Tukey's HSD test at a significance level of $\alpha = 0.05$. The normal distribution was confirmed by conducting the Shapiro–Wilk test.

RESULTS

A biomass yield of *S. cinnamoneum* KKP 1658 in media with different nitrogen sources

Determining the biomass yield provides insight into the relationship between this parameter and the activity of the obtained transglutaminase. This is a crucial aspect because an increased biomass yield does not always translate to higher enzyme activity. The impact of various nitrogen sources on the biomass yield of the examined strain of *Streptovercillium cinnamoneum* KKP 1658 was investigated. A commercial nitrogen source (aminobak), a waste nitrogen source (corn steep liquor), partial substitution of aminobak with corn steep liquor and inorganic nitrogen sources in the form of ammonium salts – sulphate and nitrate (Figure 3) – were utilized in the study. The medium with commercial aminobak was treated as the

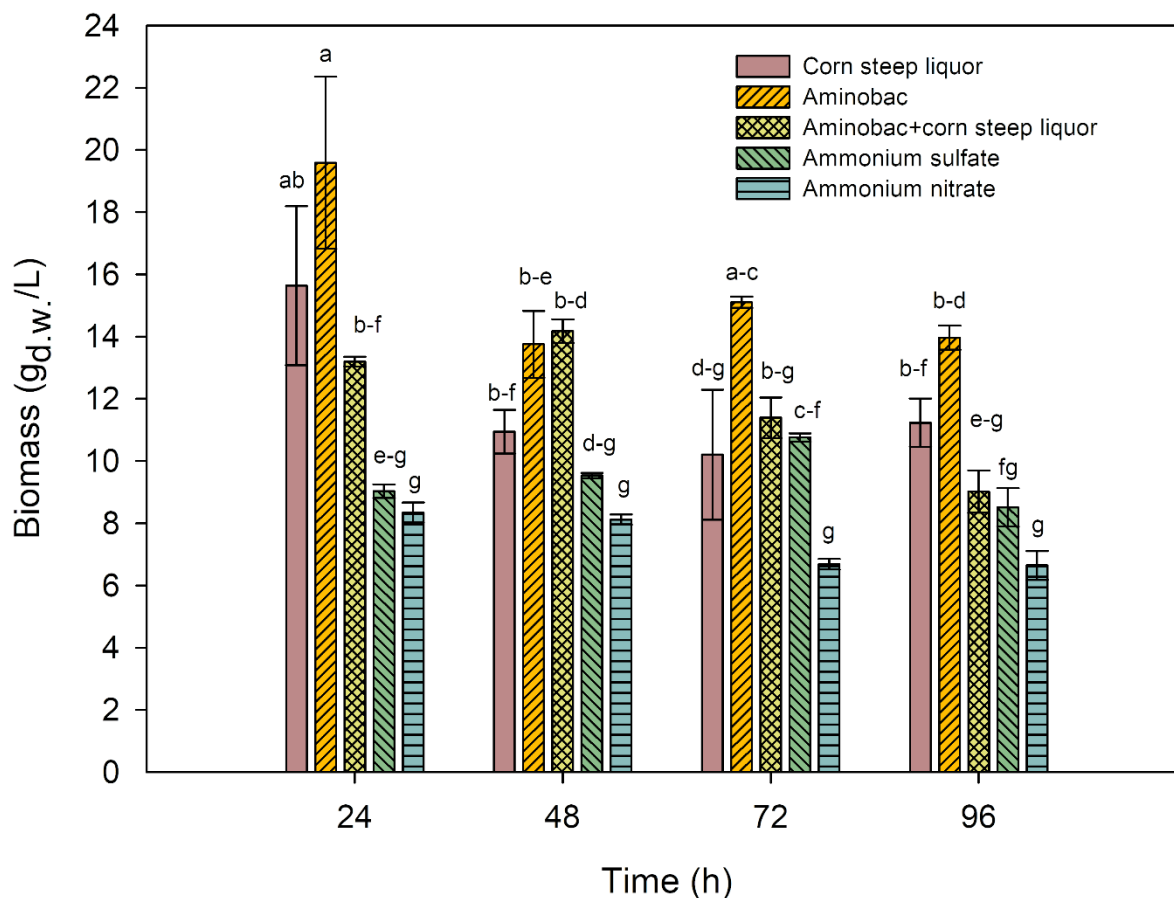


Figure 3: Biomass yield for *S. cinnamoneum* strain with various nitrogen sources in a 96-hour cultivation. ^{a-g} Means with the same letter did not differ significantly.

control sample. Additionally, a cultivation was conducted in the research medium without aminobak, yielding stabilized biomass results of 7.6, 7.9, 7.7 and 7.4 g_{d.w.}/L after 24, 48, 72 and 96 hours of cultivation, respectively.

The highest biomass yield reaching 19.59 g_{d.w.}/L was obtained after a 24-hour cultivation period in a medium supplemented with aminobak. Similarly statistically significant results were recorded for a medium containing waste corn steep liquor, yielding 15.64 g_{d.w.}/L in the same time. The combination of aminobak and corn steep liquor resulted in a biomass yield of 13.19 g_{d.w.}/L after 24 hours, significantly different from the aminobak-only medium but statistically similar to the corn steep liquor medium. Biomass yields from media with inorganic nitrogen salts were the lowest among the tested substrates, measuring 9.03 and 8.34 g_{d.w.}/L for

ammonium sulphate and ammonium nitrate, respectively. These results did not differ statistically. The biomass yield from media with inorganic nitrogen sources was only 9.77 % higher than the nitrogen-free medium (7.6 g_{d.w.}/L after 24 hours) for ammonium nitrate, and 18.8 % higher for ammonium sulphate.

On the second day of cultivation, changes in biomass yield results were observed. The highest biomass yield (14.17 g_{d.w.}/L) was recorded for the medium combining aminobak and corn steep liquor as the primary nitrogen source. Biomass yields in four out of five tested media did not differ statistically. The results for media with aminobak and corn steep liquor alone were 13.75 and 10.94 g_{d.w.}/L, respectively. After 48 hours of cultivation, the biomass yield in the ammonium sulphate medium (9.53 g_{d.w.}/L) did not differ statistically from the biomass obtained

in the corn steep liquor medium. The lowest yield after 48 hours of cultivation was observed in the ammonium nitrate medium (8.12 g d.w./L), which was only 2.6 % higher than the biomass from the nitrogen-free medium (7.9 g d.w./L).

In summary, the highest biomass yields were obtained for the medium with commercial aminobac. Substrates with corn steep liquor and a combination of aminobac with corn steep liquor exhibited slightly lower results, but these differences were not statistically significant. Substrates with inorganic nitrogen forms showed the lowest biomass yields compared to the others. It is noteworthy that ammonium nitrate consistently resulted in the lowest biomass yield in each time unit, often lower than the nitrogen-free medium after 72 and 96 hours of cultivation.

MTG activity of *S. cinnamoneum* KKP 1658

The culture supernatant underwent enzymatic assays to determine microbiological transglutaminase (MTG) activity. Significant differences in MTG activity were observed depending on the nitrogen source used in cultivation (Figure 4). Like the biomass, substrates with inorganic nitrogen salts exhibited the lowest activity of the assayed enzyme. After 96 hours of cultivation, the highest MTG activity for ammonium sulphate as the nitrogen source was only 0.24 U/mL, representing the highest MTG activity for ammonium salts obtained in this study.

After 24 hours of cultivation, the highest transglutaminase activity was observed in the medium with corn steep liquor, reaching 1.57 U/mL. Amino peptone resulted in a significantly lower activity of 1.16 U/mL. The

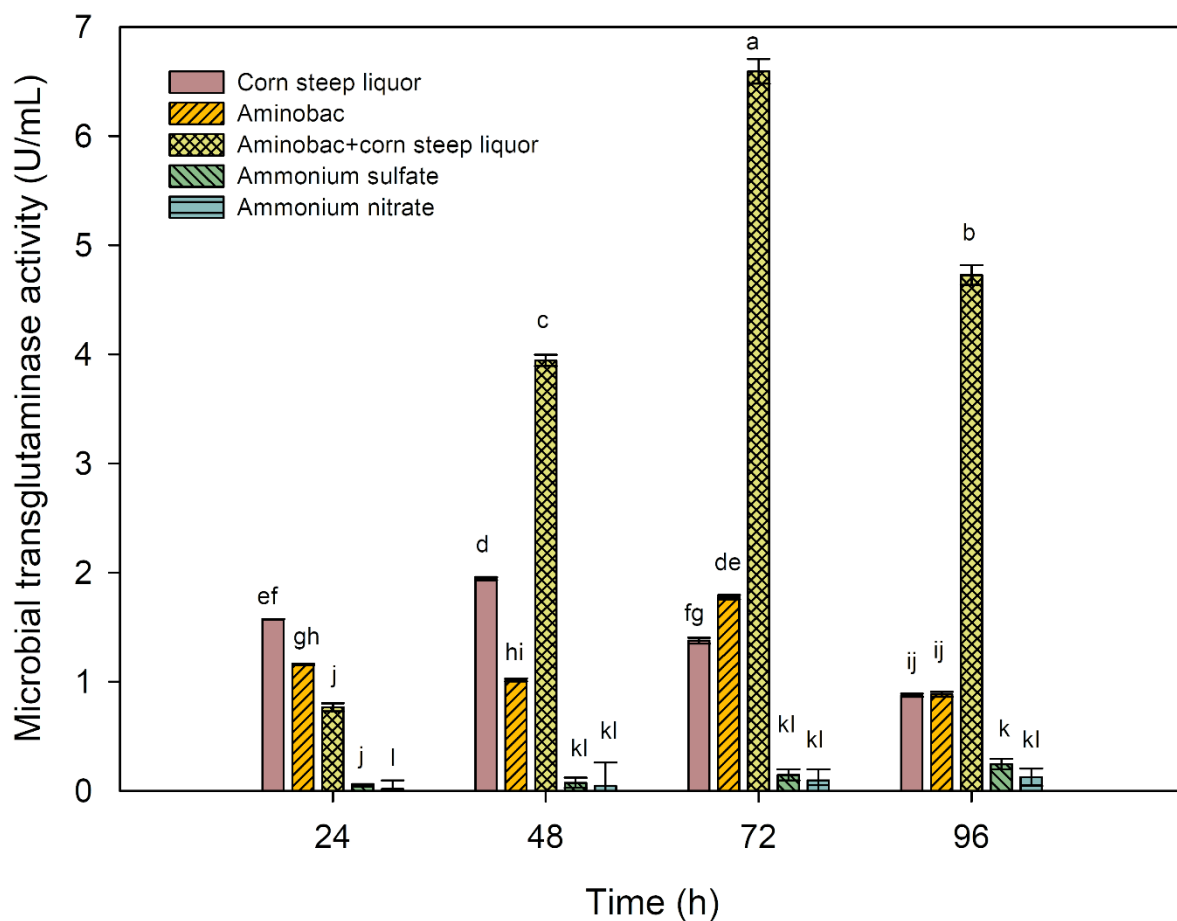


Figure 4: MTG activity produced by *S. cinnamoneum* strain with different nitrogen sources in a 96-hour culture. ^{a-l} Means with the same letter did not differ significantly.

combination of amino peptone with corn steep liquor after 24 hours of cultivation led to an MTG activity of 0.77 U/mL. In the next 24 hours (48 h), the transglutaminase activity for the corn steep liquor medium increased significantly to 1.94 U/mL, while the MTG activity in the amino peptone medium stabilized at 1 U/mL. After 48 hours of cultivation, a substantial increase in MTG activity was observed for the medium with amino peptone and corn steep liquor, reaching 3.94 U/mL. It is noteworthy that after the next 24 hours of cultivation (72 h), the transglutaminase activity reached 6.59 U/mL and decreased to 4.73 U/mL on the last day (96 h). For the media with amino peptone and corn steep liquor alone, it was not possible to achieve transglutaminase activity exceeding 2 U/mL throughout the entire cultivation period. Referring to the determination of biomass yield, it can be presumed that the highest biomass yield does not always translate into obtaining the highest activity of the secreted enzyme.

At this stage of the research, it was found that by choosing the experimental medium with amino peptone and corn steep liquor, the highest transglutaminase activity in the culture broth can be obtained by cultivating it for 72 hours. The next stages of the study aimed to examine the impact of inoculum material (type, age and dose) and the initial pH of the medium on transglutaminase activity. The results of these studies are presented in the following subsections.

The influence of inoculum material on biomass yield and MTG biosynthesis

The medium used for pre-culturing actinomycetes plays a crucial role in optimizing transglutaminase production (Kieliszek and Misiewicz, 2014). The selection of a suitable inoculation medium, its optimal dosage and its pre-culturing time are essential for obtaining appropriate starter inoculum for subsequent MTG production.

The impact of pre-culturing in the inoculation medium (O₃), which had a different

composition than the TSB medium, on biomass yield and the activity of the obtained transglutaminase (Figure 5) for the investigated strain *Streptovercillium cinnamoneum* KKP 1658 in the experimental medium with amino peptone and corn steep liquor (as main nitrogen sources) was examined.

After a 24-hour cultivation using the O₃ inoculation medium, the highest biomass yield of *Streptovercillium cinnamoneum* KKP 1658 was obtained, reaching 18.4 g_{d.w.}/L. In the case of using the TSB medium, the biomass yield result was significantly lower compared to the O₃ medium, amounting to 13.25 g_{d.w.}/L. After 48 hours of cultivation, comparable biomass yield results were obtained for both tested inoculation media – 14.32 and 14.39 g_{d.w.}/L for TSB and O₃, respectively. On the third day of cultivation, the biomass yield significantly decreased for both cases to 11.77 and 7.67 g_{d.w.}/L, respectively, for TSB and O₃. In the last day of cultivation, even lower biomass yield results were recorded – 9.39 g_{d.w.}/L for TSB and 5.5 g_{d.w.}/L for the medium with oat flakes. A proportional relationship for biomass yield results using the O₃ inoculation medium can be observed – increasing cultivation time leads to a decrease in the yield of the investigated strain. For the TSB inoculation medium, the maximum biomass increase was noted after 48 hours of cultivation, which, as with O₃, decreased over the course of cultivation. The obtained values suggest that after pre-cultivation in the medium with oat flakes, the investigated strain reaches the log phase more quickly. It can be speculated that the pre-cultivation process in the TSB medium translates into an extension of the log growth phase (prolonged trophophase) in *S. cinnamoneum* KKP 1658; hence, the idiophase is delayed compared to the inoculation medium with oat flakes.

Undoubtedly, transglutaminase production is related to cell growth (Zheng et al., 2002). However, an important aspect in this study was to examine how each changing parameter (inoculation medium, its dose and

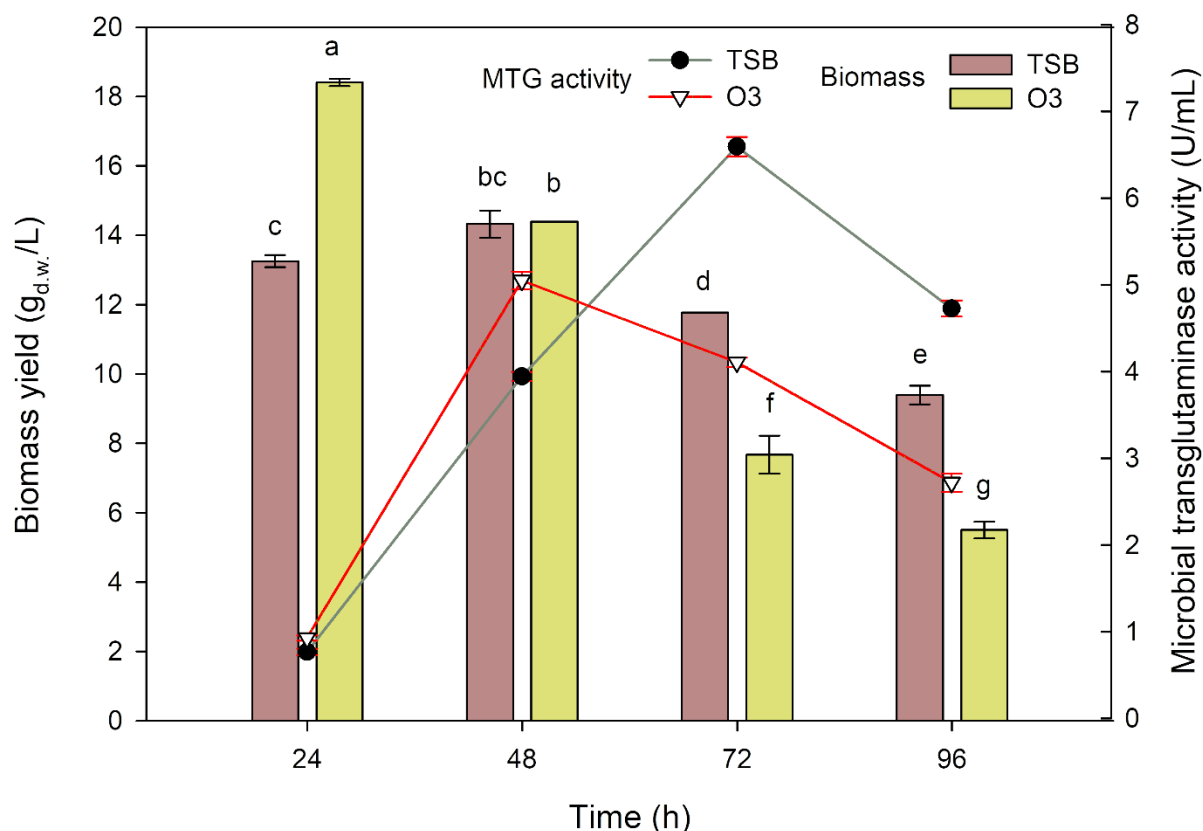


Figure 5: Changes in biomass yield and MTG production depending on the applied inoculation medium using aminobak/corn steep liquor 1:1 as the main nitrogen source in a 96-hour cultivation. ^{a-g} Means with the same letter did not differ significantly.

age; nitrogen source or cultivation parameters) affects the activity of the secreted transglutaminase. Regardless of the inoculation medium used, the results of MTG activity after 24 hours of cultivation did not exceed 1 U/mL (0.77 and 0.93 U/mL for TSB and O₃, respectively) and did not differ statistically. In the next day of cultivation, the results showed a significant increase, reaching values of 3.94 and 5.05 U/mL, respectively, for the TSB and O₃ inoculation media. After 72 hours of cultivation, the highest transglutaminase activity was recorded, obtained from the TSB medium for biomass pre-cultivation (6.59 U/mL). Pre-cultivating biomass in the medium with oat flakes for 72 hours allowed achieving MTG activity at the level of 4.1 U/mL, which was significantly lower compared to the same inoculation medium from the previous day and compared to the TSB medium from the same time unit. The results obtained after 96 hours of cultivation were at

the level of 4.73 and 2.72 U/mL, respectively, for the TSB and O₃ inoculation media.

The obtained results indicate that the use of TSB allows significantly higher transglutaminase activity (6.59 U/mL) than the O₃ medium with oat flakes (5.05 U/mL). It is noteworthy that the maximum MTG production took 72 hours for biomass pre-cultivated in the TSB medium, and 48 hours for the O₃ medium. This observation aligns with previous conclusions that cells of *S. cinnamoneum* KKP 1658 exhibit an extended initial growth phase in the experimental medium after pre-cultivation in the TSB medium compared to the O₃ medium. The use of the O₃ medium results in a faster adaptation to the environment and the initiation of transglutaminase production.

Impact of inoculum age on MTG activity

Considering the above studies, the TSB inoculation medium remained optimal de-

spite the need for a 72-hour cultivation. Additional studies were conducted to determine the optimal pre-cultivation time of cells in the TSB inoculation medium. The effect of pre-cultivation for 24, 48 and 72 hours on biomass yield (Figure 6) and the activity of the obtained transglutaminase (Figure 7) was examined. The biomass yield in the inoculation medium was measured before inoculating the experimental media. Pre-cultivating for 48 hours in the TSB medium resulted in a higher biomass yield (7.1 g_{d.w.}/L) compared to 24 hours (3.86 g_{d.w.}/L) and 72 hours (4.61 g_{d.w.}/L).

After 24 hours of proper cultivation, the highest biomass yield was observed in the medium inoculated with a 72-hour inoculum – 13.37 g_{d.w.}/L. Media inoculated with 24 and 48-hour inocula showed significantly lower biomass yields (9.37-9.47 g_{d.w.}/L). The highest biomass yield was obtained after 48 hours of cultivation in the medium supplemented with a 48-hour inoculum (19.97 g_{d.w.}/L), and the biomass from the other media

exhibited significantly lower yields in both this and subsequent time units. Most of the other results characterized biomass yields ranging from 15.91 to 17.34 g_{d.w.}/L.

After 24 hours of cultivation of the *S. cinnamoneum* KKP 1658 strain in a cultivation medium with aminobak and corn steep liquor, regardless of the age of the inoculum used, the activity of the measured transglutaminase did not exceed 1 U/mL. A significant increase was observed in the next day of cultivation, with media inoculated with 48- and 72-hour inocula showing transglutaminase activities of 4.32 and 4.72 U/mL, respectively. The highest biomass increment did not translate into the highest MTG activity, as the highest result was obtained for the medium supplemented with a 24-hour inoculum and proper cultivation for 72 hours (5.59 U/mL). Transglutaminase activity in other media on the third day of cultivation was significantly lower, as well as on the last day of cultivation.

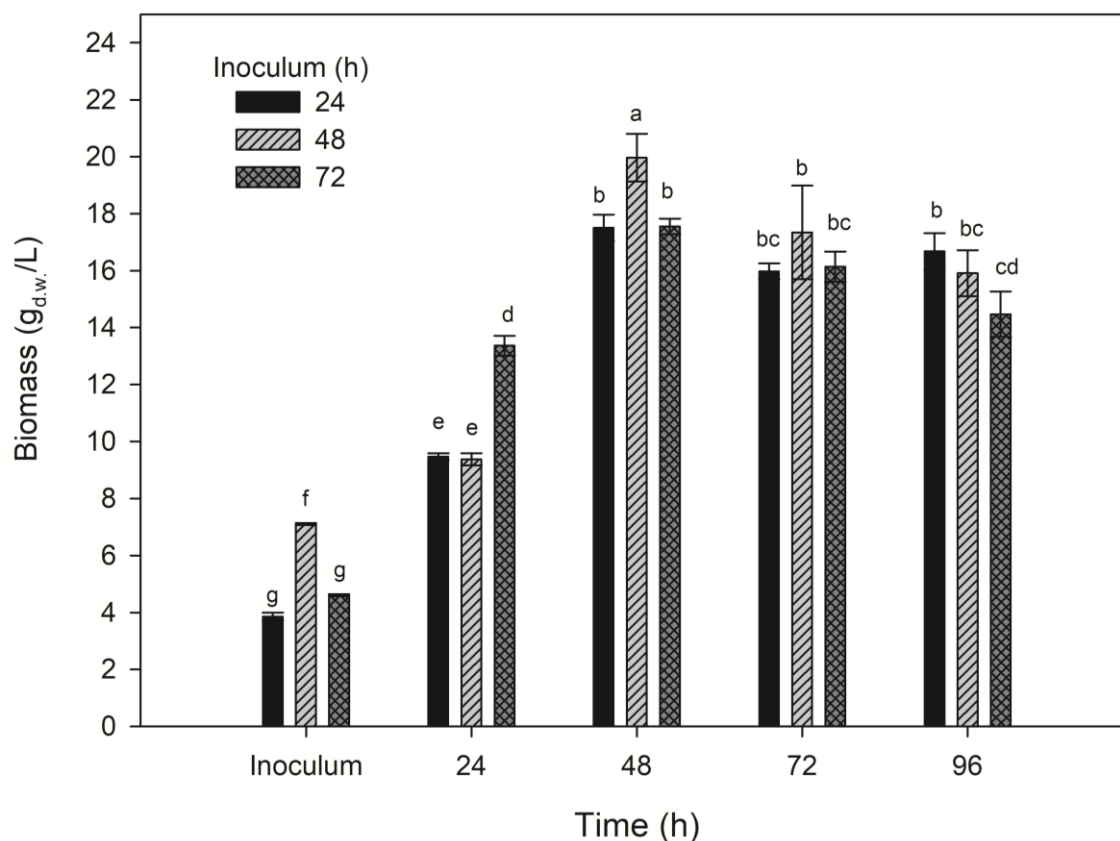


Figure 6: The impact of pre-cultivating biomass of *S. cinnamoneum* for 24, 48, and 72 hours on the biomass yield in a 96-hour cultivation. ^{a-g} Means with the same letter did not differ significantly.

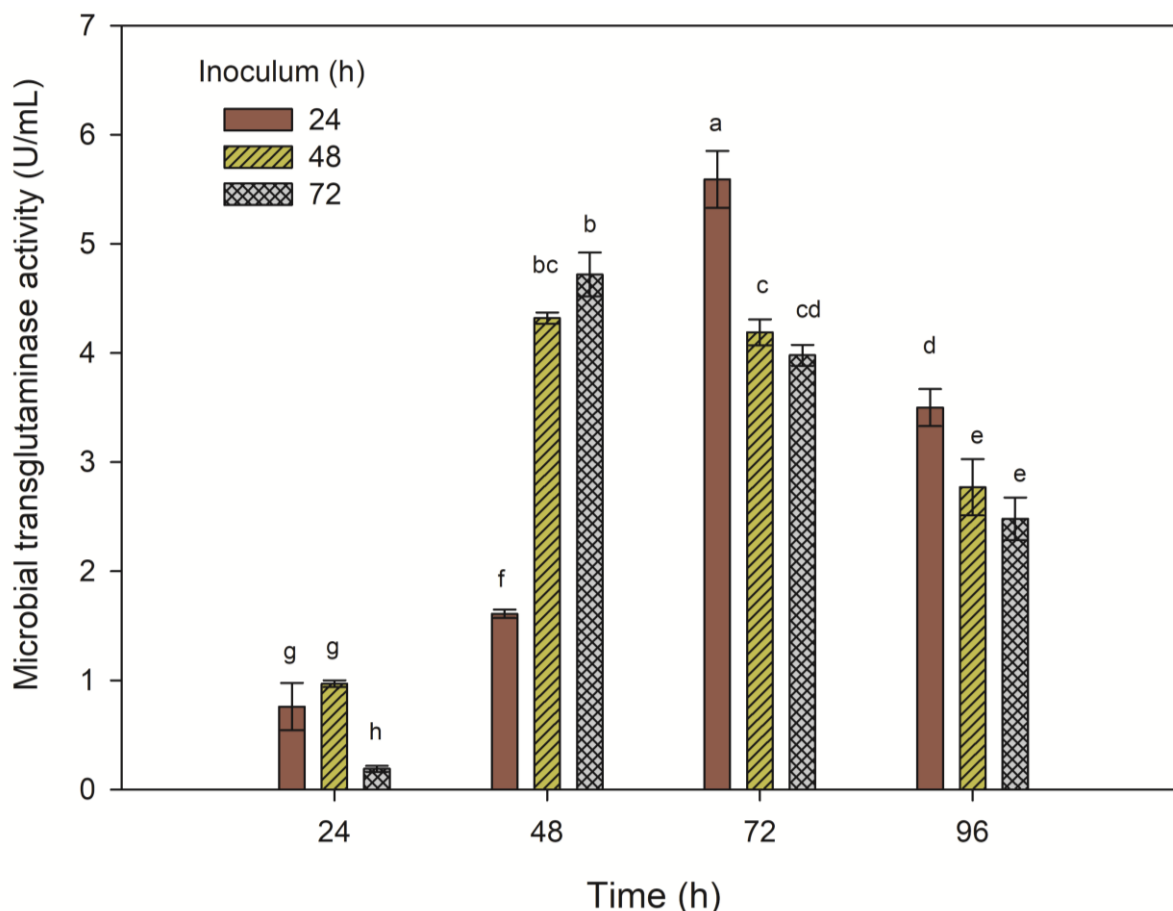


Figure 7: The influence of pre-cultivating biomass of *S. cinnamoneum* for 24, 48, and 72 hours on the activity of MTG in a 96-hour cultivation. ^{a-h} Means with the same letter did not differ significantly.

The conducted studies provided essential information regarding the optimal time for pre-cultivation of the investigated strain of streptomycetes. It was established that the highest results of transglutaminase activity are achieved by conducting the cultivation of the *S. cinnamoneum* KKP 1658 strain for 72 hours and the pre-cultivation process in the TSB inoculation medium for 24 hours.

The impact of different inoculum doses on MTG activity

The next stage of the research aimed to examine how varying inoculum doses affect transglutaminase activity. For this purpose, inoculum in quantities of 5, 10 and 15 % was added to the research medium with amino-bak and corn steep liquor. Subsequently, cultivations were conducted for 72 hours, after which the activity of the produced transglu-

taminase was examined. The results are presented in Figure 8.

The addition of an inoculum suspension in a quantity of 5 % to the research medium resulted in transglutaminase activity of 4.5 U/mL after 72 hours of cultivation. The 5 % inoculum dose significantly decreased the MTG activity compared to the medium with a 10 % inoculum, which reached 5.46 U/mL. It was observed that an increased inoculum dose of 15 %, in comparison to the 10 % dose, did not have a statistically significant effect on the activity of the obtained transglutaminase (5.43 U/mL).

In summary, a 5 % inoculum dose significantly reduced MTG activity, while a 15 % dose did not have a statistically significant impact on MTG activity compared to the mean 10 % dose. Adding a 10 % inoculum suspension to the research medium and con-

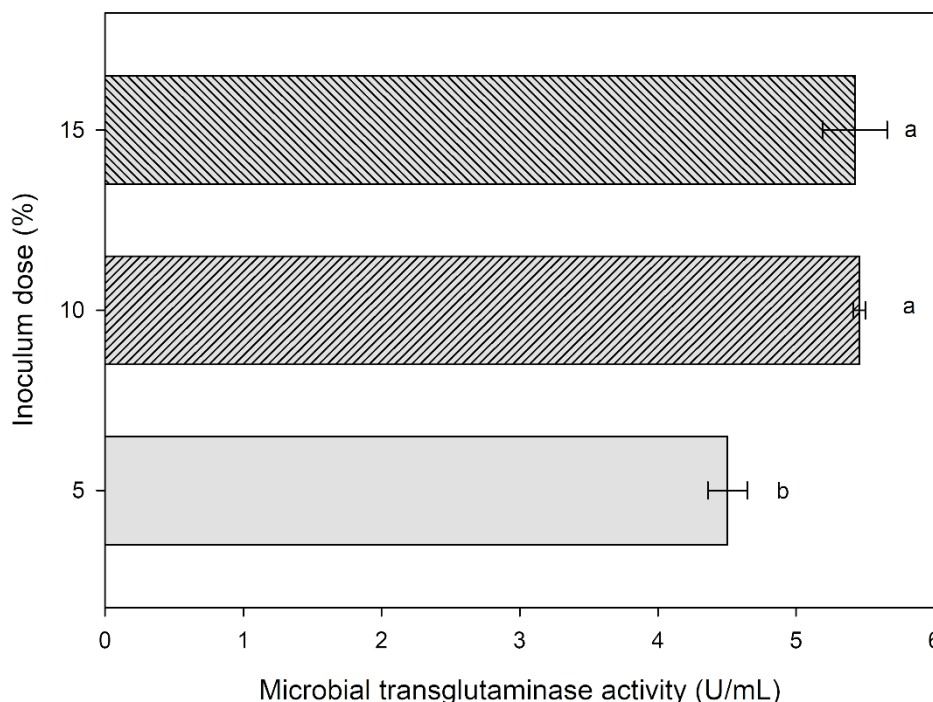


Figure 8: The influence of inoculum dose in the research medium on the activity of transglutaminase produced by *S. cinnamoneum*. ^{a-b} Means with the same letter did not differ significantly.

ducting cultivation for 72 hours ensures the highest efficiency in the production of transglutaminase by the investigated strain *Streptoverticillium cinnamoneum* KKP 1658.

Impact of initial medium pH on MTG biosynthesis

The rate of MTG production, its activity, and efficiency in research media vary depending on the medium composition and environmental conditions, including pH. To achieve the maximum speed of MTG production, it is necessary to determine the optimal conditions for cell growth and MTG production during fermentation. The influence of pH on MTG production is a significant but underexplored aspect (Meiying et al., 2002).

Based on the available literature, the initial pH of the experimental substrate was set at 6.5, while the initial pH of the inoculation medium was set at 7.0 (Meiying et al., 2002; Kieliszek and Misiewicz, 2014). Changes in pH values were examined during the 96-hour cultivation of *S. cinnamoneum* KKP 1658 in the experimental medium with the addition

of aminobak and corn steep liquor, inoculated with a 24-hour inoculum at a 10 % dose, confirming the optimal dose results (Figure 9A). In the first day of cultivation, an increase in pH was observed, reaching 6.95, which decreased to 5.59 after 48 hours of cultivation. After 72 hours of cultivation, where previous studies noted the highest values of MTG activity, the pH increased to 6.83, and in the last day of cultivation, it rose to 7.22.

Figure 9A depicts pH changes ranging from 5.5 to 7.25, so the influence of initial pH levels from 5.0 to 7.0 on the activity of the obtained transglutaminase was examined (Figure 9B). The highest transglutaminase activity was achieved for the substrate with an initial pH of 6.0 – 4.14 U/mL. Another homogeneous group consisted of substrates with initial pH levels of 5.0 and 5.5, which exhibited MTG activity of 3.43 and 3.31 U/mL, respectively. The lowest activity of microbial transglutaminase was observed in substrates with initial pH levels of 6.5 and 7.0: 2.63 and 2.35 U/mL, respectively.

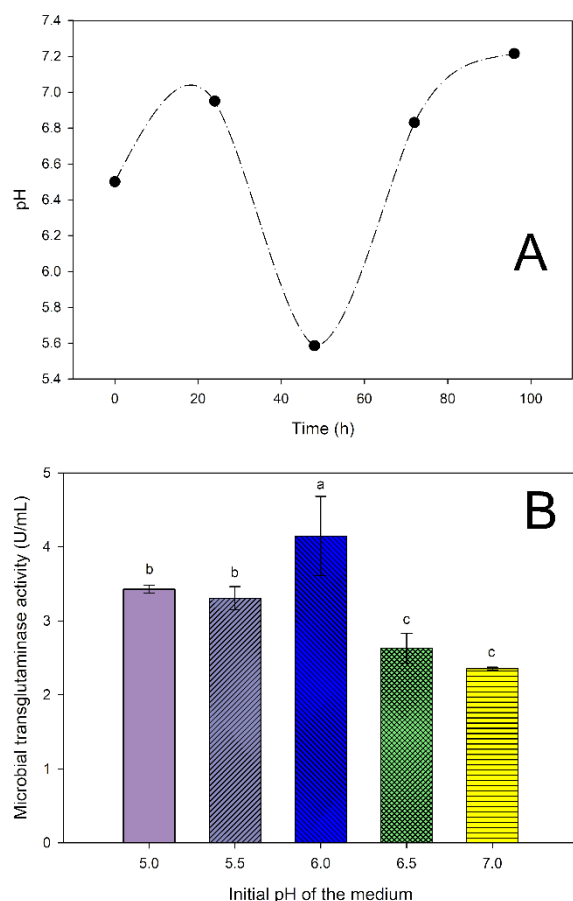


Figure 9: pH changes during a 96-hour cultivation of *S. cinnamoneum* with an initial pH of 6.5 (A) and the influence of initial pH on MTG activity (B). ^{a-c} Means with the same letter did not differ significantly.

DISCUSSION

Microbial transglutaminase is produced by various bacteria, fungi and actinomycetes. Numerous studies have been conducted to identify microorganisms capable of producing this enzyme (Kieliszek and Misiewicz, 2014; Akbari et al., 2021). These investigations have revealed that strains of *Streptomyces* sp. CBMAI 1617 (SB6) (Ceresino et al., 2018) and *Actinomycetes* (Eshra et al., 2015) exhibit the highest (~6 U/mL) and lowest (~0.04 U/mL) activity of this discussed enzyme, respectively.

The discovery and isolation of the *Streptomyces mobaraense* strain (Washizu et al., 1994) represented the first step toward its widespread commercial use. Subsequently, many different strains of microorganisms,

such as *Streptomyces lydicus* (Færgemand and Qvist, 1997), *Streptomyces cinnamoneum* CBS 683.68 (Duran et al., 1998) and *Streptomyces* sp. CBMAI 837 (Macedo et al., 2007), were identified to produce transglutaminase extracellularly. It has been found that the yield and biochemical characteristics of the synthesized MTG vary significantly depending on the strain (Kieliszek and Misiewicz, 2014; Akbari et al., 2021). Work is still ongoing to isolate new strains of microorganisms capable of producing MTG with high efficiency from various environmental sources (Zhang et al., 2009; Ceresino et al., 2018). When evaluating the potential of new strains for enzyme production, it is crucial to adapt the appropriate nutrient composition for the cultivation of these specific strains (Ceresino et al., 2018).

Despite the widespread use of transglutaminase in various industrial sectors (Akbari et al., 2021), the *S. mobaraense* strain remains the only microorganism used for the commercial production of MTG. Unfortunately, there is a significant lack of knowledge regarding the production of transglutaminase by genetically unmodified strains of the *Streptoverticillium* genus, including *S. cinnamoneum*. Therefore, the results of this study should be compared to currently available publications on the production and activity of microbial transglutaminase from various strains of *Streptoverticillium*.

Most research results in the available literature are dedicated to the model representative of actinomycetes – *S. mobaraense*. In the study by Kieliszek and Misiewicz (2014), the authors compiled the available knowledge on the activity of transglutaminase produced by *S. mobaraense* at that time. Results from the years 1994-2012 reported that scientists managed to determine MTG activity in the range of 0.9-3.4 U/mL. Other strains of the *Streptoverticillium* genus, such as *S. lividans*, *S. lydicus*, *S. platensis*, *S. sioyansis*, *S. griseocarneum*, exhibited MTG activity in the range of 1.3-2.2 U/mL.

In the study by Guerra-Rodríguez and Vázquez (2014), which focused on the cost-optimal cultivation medium, transglutaminase activity was noted at 2.95 U/mL for *Streptomyces mobaraensis* CECT 3230. Two years later, Jin et al. (2016) reported MTG activity of 1.75 U/mL for *Streptomyces mobaraensis* TX. In 2017, Xavier et al. (2017), through nutrient optimization for *Streptomyces* sp., achieved transglutaminase activity at 4.1 U/mL, which was a record result in the literature on the subject. In 2018, Ceresino et al. (2018) isolated a new strain, *Streptomyces* sp. CBMAI 1617 (SB6), which, in a substrate (composed of 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), was capable of producing MTG with an activity of 6.07 U/mL.

The results of the current study provide new values for transglutaminase activity for the rarely described *S. cinnamoneum* strain. The studied strain exhibited MTG activity values ranging from 4.14 to 6.59 U/mL at various stages of the research. The highest result is 8.57 % higher than the result reported by Ceresino et al. (2018), which is very promising for further research on this strain.

Another crucial aspect in studies on obtaining transglutaminase is the substrate composition, and more importantly, its costs, which can constitute almost 30 % of the overall expenses related to the biosynthesis process (Téllez-Luis et al., 2004). In most of the studies concerning MTG biosynthesis from *Streptomyces* sp. strains, the nutrient compositions are nearly identical. Glucose and soluble starch are commonly used carbon sources, while aminobak, peptone and yeast extract serve as popular nitrogen sources in cultivation media for MTG production (Ando et al., 1989; Akbari et al., 2021). The substrates often contain essential elements such as sodium phosphate, potassium phosphate and magnesium sulphate (Guerra-Rodríguez and Vázquez, 2014). It appears that supplementation with salts can effectively enhance MTG biosynthesis,

probably by accelerating the transformation of pro-MTGase into a mature enzymatic domain through an increase in overall protease production (Fatima et al., 2019). According to the results of Ceresino et al. (2018), potassium dihydrogen phosphate is one of the components with the most positive and significant impact on transglutaminase biosynthesis, making it one of the ingredients used in this study.

Microbiological media used for cultivating *Streptovercillium* strains are usually not economically viable owing to the high quantity of expensive nutritional components such as yeast extract and peptone (Kieliszek and Misiewicz, 2014; Ceresino et al., 2018). Many publications discuss the possibility of using agricultural waste as a source of carbon or nitrogen for transglutaminase production (Akbari et al., 2021). Researchers Guerra-Rodríguez and Vázquez (2014) evaluated MTG biosynthesis by *S. mobaraensis* using a substrate based on non-commercial potatoes. According to their results, the best medium turned out to be gelatinized, unhydrolyzed potato, enabling the attainment of enzyme activity up to 2.72 U/mL after 96 hours of cultivation. In another study conducted by Téllez-Luis et al. (2004), the biosynthesis of transglutaminase by *Streptovercillium ladakanum* NRRL-3191 was assessed using a medium containing a mixture of sorghum straw hydrolysate and xylose at a concentration of 20 g/L. Through these experiments, enzyme activity reached a level of 0.348 U/mL after 72 hours of cultivation. In a study by Portilla-Rivera et al. (2009), the biosynthesis of MTG by *S. ladakanum* NRRL-3191 was evaluated on media prepared from molasses, sugar cane and glycerol. Results indicated that the highest MTGase activity (0.460 U/mL) was obtained in a medium containing a mixture of molasses and glycerol. In media containing only molasses from sugar cane and glycerol, enzyme activity was 0.240 U/mL and 0.250 U/mL, respectively.

In this study, an attempt was made to use corn steep liquor as a nitrogen source to replace the costly aminobak. Corn steep liquor,

a product produced in the wet milling industry of corn, contains a high quantity of amino acids, polypeptides and B-group vitamins (Kim et al., 2020). Studies have demonstrated that corn steep liquor is an excellent nitrogen source for most microorganisms (Yu et al., 2008), especially those belonging to the *Streptomyces* genus (Nascimento et al., 2009). By employing a research medium containing corn steep liquor and the investigated strain *S. cinnamoneum* KKP 1658, an MTG activity of 1.95 U/mL was achieved after 48 hours of cultivation. Compared to other waste components of substrates described above, the use of corn steep liquor translates into relatively high MTG activities.

Environmental conditions such as temperature and pH are crucial for effective MTG biosynthesis and must be optimized to enhance enzyme activity. However, various studies in this field often present conflicting results, which may arise from differences in microbial strains, media and other experimental factors. Here are a few examples from different studies: Zhang et al. (2012) cultivated *S. mobaraensis* at a temperature of 30 °C and pH 7.0. Jin et al. (2016) also cultivated *S. mobaraensis* at 30 °C but at pH 7.4. Turker et al. (2016) determined that the optimal conditions for the highest enzyme activity were pH 6.0 and 30 °C for 14 days.

It appears that a temperature range of 28–30 °C and a pH around 7.0 are often favorable for achieving high MTG activity. However, fermentation time may vary depending on the cultivation conditions and the targeted enzyme activity, typically ranging from 72 to 96 hours. It is crucial to experimentally optimize these parameters in a specific case to achieve the best results in MTG biosynthesis (Kieliszek and Misiewicz, 2014; Akbari et al., 2021).

Due to conflicting literature results regarding the optimal cultivation conditions for *Streptovercillium* strains and the lack of studies on the *S. cinnamoneum* KKP 1658 strain, it was decided to use a temperature of 28 °C and, based on the current research, select the initial pH of the medium within the

range of 5.0–7.0. Summarizing the obtained results, it can be hypothesised that biomass obtained from a medium with an initial pH of 6.0 exhibits the highest transglutaminase activity.

It is essential to note that this study focuses on laboratory-scale research. A subsequent stage of research should be conducted, utilizing the previously presented results, by scaling up to bioreactor cultivations. Replicable results from bioreactor cultivations will provide detailed data on the average activity of microbial transglutaminase produced by the *Streptovercillium cinnamoneum* KKP 1658 strain on a larger scale.

The results of this study provide evidence that the combination of commercial aminobak with waste corn steep liquor in a 1:1 ratio can yield higher transglutaminase activity than the individual nitrogen sources. Such a solution allows the highest MTG activity – up to 6.59 U/mL to be achieved while retaining economic benefits by replacing half of the expensive aminobak or peptone dose with waste corn steep liquor. Such a high MTG activity result may be associated with the composition of the waste material, which is rich in vitamins and amino acids, playing a crucial role in the microbial synthesis of transglutaminase.

CONCLUSION

The investigated strain, *Streptovercillium cinnamoneum* KKP 1658, cultivated in a medium containing aminobak and corn steep liquor as the primary nitrogen source, demonstrated the ability to biosynthesize transglutaminase with an activity of 6.59 U/mL. TSB proved to be a more effective inoculation medium than O₃ with oat flakes. The optimal pre-inoculation time in the TSB inoculation medium was 24 hours, with an optimal inoculum dosage of 10 % of the experimental culture volume. Experimental cultures were conducted at 28 °C, and the initial pH in the range of 6.0–6.5 yielded the best transglutaminase activity results. It was observed that the highest biomass increase did not always correlate with the highest mi-

crobial transglutaminase activity. The use of corn steep liquor as a nitrogen source was justified, allowing for a 50 % reduction in costs associated with the purchase of expensive nitrogen sources such as aminobak or peptone. Furthermore, cultivation in this medium resulted in over a three-fold increase in transglutaminase activity compared to a medium with aminobak as the primary nitrogen source.

Currently, there is a lack of recent studies on the production of microbial transglutaminase by *S. cinnamomeum*, allowing the results of this study to fill the gap in the literature on this subject somewhat. In further stages of research, the focus should be on determining transglutaminase activity in bioreactor cultures, utilizing selected nitrogen sources as components of cultivation media.

Acknowledgments

Research equipment was purchased as part of the “Food and Nutrition Centre—modernization of the WULS campus to create a Food and Nutrition Research and Development Centre (CŻiŻ)” project co-financed by the European Union from the European Regional Development Fund under the Regional Operational Programme of the Mazowieckie Voivodeship for 2014–2020 (Project No. RPMA.01.01.00-14-8276/17).

Funding

Not applicable.

Author contribution

Vitaliy Kolotylo: Methodology, data curation, investigation, writing - original draft, writing - review & editing. Kamil Piwowarek: Formal analysis, writing - review & editing. Marek Kieliszek: Conceptualization, methodology, data curation, investigation, writing - review & editing, supervision, project administration. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Conflict of interest

Authors state no conflict of interest.

Ethical approval

The conducted research is not related to either human or animal use.

Data availability statement

The dataset generated during and/or analyzed during the current study are available from the first author on reasonable request. All data obtained were presented in the Supplementary data.

Ethics approval

This article does not involve human and animal research. The authors of this paper all participated in the work of the paper. All authors agree to participate in the writing of the paper and agree to publish this article.

REFERENCES

- Akbari M, Razavi SH, Kieliszek M. Recent advances in microbial transglutaminase biosynthesis and its application in the food industry. *Trends Food Sci Technol*. 2021;110:458–69.
- Ando H, Adachi M, Umeda K, Matsuura A, Nonaka M, Uchio R, et al. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. *Agric Biol Chem*. 1989;53:2613–7.
- Ceresino EB, de Melo RR, Kuktaitė R, Hedenqvist MS, Zucchi TD, Johansson E, et al. Transglutaminase from newly isolated *Streptomyces* sp. CBMAI 1617: Production optimization, characterization and evaluation in wheat protein and dough systems. *Food Chem*. 2018;241:403–10.
- Duran R, Junqua M, Schmitter JM, Gancet C, Goulas P. Purification, characterisation, and gene cloning of transglutaminase from *Streptoverticillium cinnamomeum* CBS 683.68. *Biochimie*. 1998;80:313–9.
- Dzhumanova NE, Nazarova FS. Probable negative impact of genetically modified products on human health. *Thematics J Botany*. 2022;6:2250–379.
- EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO); Scientific Opinion on Guidance on the risk assessment of genetically modified microorganisms and their products intended for food and feed use. *EFSA J*. 2011;9(6):2193. doi: 10.2903/j.efsa.2011.2193.

- Eshra D, El-Iraki S, Bakr TA. Isolation and identification of Actinomycetes transglutaminase producing strains. *Int J Curr Sci Res.* 2015;18:76–88.
- EUR-Lex. Directive 2009/41/EC of the European Parliament and of the Council of 6 May 2009 on the contained use of genetically modified micro-organisms. *Off J Eur Union.* 2009;125 L:75–97. <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2009/41/oj>.
- Færgemand M, Qvist KB. Transglutaminase: effect on rheological properties, microstructure and permeability of set style acid skim milk gel. *Food Hydrocolloids.* 1997;11:287–92.
- Fatima SW, Tiwari R, Khare SK. Utilization of agro-industrial waste for production of Transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis*. *Bioresource Technol.* 2019;287:121391.
- Folk JE, Cole PW. Mechanism of action of Guinea pig liver transglutaminase: I. Purification and properties of the enzyme: identification of a functional cysteine essential for activity. *J Biol Chem.* 1966;241:5518–25.
- Guerra-Rodríguez E, Vázquez M. Evaluation of a novel low-cost culture medium containing exclusively milk, potato and glycerol for microbial transglutaminase production by *Streptomyces mobaraensis*. *Chem Eng Res Design.* 2014;92:784–91.
- Jin M, Huang J, Pei Z, Huang J, Gao H, Chang Z. Purification and characterization of a high-salt-resistant microbial transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis*. *J Mol Catal B Enzymatic.* 2016;133:6–11.
- Juettner NE, Classen M, Colin F, Hoffmann SB, Meyners C, Pfeifer F, et al. Features of the transglutaminase-activating metalloprotease from *Streptomyces mobaraensis* DSM 40847 produced in *Escherichia coli*. *J Biotechnol.* 2018;281:115–22.
- Kieliszek M, Misiewicz A. Microbial transglutaminase and its application in the food industry. A review. *Fol Microbiol.* 2014;59:241–50.
- Kim S, Lee D, Lim D, Lim S, Park S, Kang C, et al. Paramylon production from heterotrophic cultivation of *Euglena gracilis* in two different industrial byproducts: Corn steep liquor and brewer's spent grain. *Algal Res.* 2020;47:101826.
- Kolotylo V, Piwowarek K, Kieliszek M. Microbiological transglutaminase: Biotechnological application in the food industry. *Open Life Sci.* 2023;18(1):20220737.
- Lerner A, Benzvi C, Vojdani A. Cross-reactivity and sequence similarity between microbial transglutaminase and human tissue antigens. *Sci Rep.* 2023;13:17526.
- Macedo JA, Sette LD, Sato HH. Optimization of medium composition for transglutaminase production by a Brazilian soil *Streptomyces* sp. *Electr J Biotechnol.* 2007;10:618–26.
- Mallikarjuna N, Yellamma K. Genetic and metabolic engineering of microorganisms for the production of various food products. In: Buddolla V (ed): Recent developments in applied microbiology and biochemistry (pp 167-82). Cambridge, MA: Academic Press, 2019.
- Meiying Z, Guocheng D, Jian C. pH control strategy of batch microbial transglutaminase production with *Streptoverticillium mobaraense*. *Enzyme Microbial Technol.* 2002;31:477–81.
- Nascimento RP, Junior NA, Pereira N, Bon EPS, Coelho RRR. Brewer's spent grain and corn steep liquor as substrates for cellulolytic enzymes production by *Streptomyces malaysiensis*. *Lett Appl Microbiol.* 2009;48:529–35.
- Portilla Rivera ÓM, Téllez Luis SJ, Ramírez de León JA, Vázquez Vázquez M. Production of microbial transglutaminase on media made from sugar cane molasses and glycerol. *Food Technol Biotechnol.* 2009;47:19–26.
- Raveendran S, Parameswaran B, Ummalyma SB, Abraham A, Mathew AK, Madhavan A, et al. Applications of microbial enzymes in food industry. *Food Technol Biotechnol.* 2018;56(1):16-30.
- Téllez-Luis SJ, González-Cabriaes JJ, Ramírez JA, Vázquez M. Production of transglutaminase by *Streptoverticillium ladakanum* NRRL-3191 grown on media made from hydrolysates of sorghum straw. *Food Technol Biotechnol.* 2004;42:1–4.
- Turker I, Domurcuk G, Tokatli M, Isleroglul H, Koc B. Enhancement of microbial transglutaminase production from. *Ukrain Food J.* 2016;5:306–13.
- Washizu K, Ando K, Koikeda S, Takeuchi K, Hirose S, Matsuura A, et al. Molecular cloning of the gene for microbial transglutaminase from *streptoverticillium* and its expression in *Streptomyces lividans*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1994;58:82–7.
- Wesseler J, Kleter G, Meulenbroek M, Purnhagen KP. EU regulation of genetically modified microorganisms in light of new policy developments: Possible implications for EU bioeconomy investments. *Appl Econ Perspect Policy.* 2023;45:839–59.

Xavier JR, Ramana K V., Sharma RK. Screening and statistical optimization of media ingredients for production of microbial transglutaminase. *Defence Life Sci J.* 2017;2:216–25.

Yu L, Lei T, Ren X, Pei X, Feng Y. Response surface optimization of l-(+)-lactic acid production using corn steep liquor as an alternative nitrogen source by *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466. *Biochem Eng J.* 2008;39:496–502.

Zhang D, Zhu Y, Chen J. Microbial transglutaminase production: understanding the mechanism. *Biotechnol Gen Eng Rev.* 2009;26:205–22.

Zhang L, Zhang L, Han X, Du M, Zhang Y, Feng Z, et al. Enhancement of transglutaminase production in *Streptomyces mobaraensis* as achieved by treatment with excessive MgCl₂. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012;93:2335–43.

Zheng M, Du G, Chen J, Lun S. Modelling of temperature effects on batch microbial transglutaminase fermentation with *Streptovercillium mobaraense*. *World J Microbiol Biotechnol.* 2002;18: 767–71.



Optimization of fermentation conditions for microbial transglutaminase production by *Streptovercillium cinnamoneum* KKP 1658 using response surface methodology (RSM)

Vitaliy Kolotylo¹ · Kamil Piwowarek¹ · Alicja Synowiec¹ · Marek Kieliszek¹

Received: 31 July 2024 / Accepted: 31 October 2024 / Published online: 23 November 2024
© The Author(s) 2024

Abstract

Microbial transglutaminase (MTG) is an enzyme widely used in the food industry because it creates cross-links between proteins, enhancing the texture and stability of food products. Its unique properties make it a valuable tool for modifying the functional characteristics of proteins, significantly impacting the quality and innovation of food products. In this study, response surface methodology was employed to optimize the fermentation conditions for microbial transglutaminase production by the strain *Streptovercillium cinnamoneum* KKP 1658. The effects of nitrogen dose, cultivation time, and initial pH on the activity of the produced transglutaminase were investigated. The significance of the examined factors was determined as follows: cultivation time > nitrogen dose > pH. The interaction between nitrogen dose and cultivation time was found to be crucial, having the second most significant impact on transglutaminase activity. Optimal conditions were identified as 48 h of cultivation with a 2% nitrogen source dose and an initial medium pH of approximately 6.0. Under these conditions, transglutaminase activity ranged from 4.5 to 5.5 U/mL. The results of this study demonstrated that response surface methodology is a promising approach for optimizing microbial transglutaminase production. Future applications of transglutaminase include the development of modern food products with improved texture and nutritional value, as well as its potential use in regenerative medicine for creating biomaterials and tissue scaffolds. This topic is particularly important and timely as it addresses the growing demand for innovative and sustainable solutions in the food and biomedical industries, contributing to an improved quality of life.

Keywords Transglutaminase · MTG · *Streptovercillium* · Response surface methodology

Introduction

Transglutaminase is an enzyme from the transferase class (EC 2.3.2.13) widely used in the food industry. This enzyme catalyzes three types of protein reactions: (1) acyl transfer reactions, (2) deamidation reactions, and (3) cross-linking reactions between glycine and lysine residues (Kieliszek and Misiewicz 2014; Kolotylo et al. 2023). Transglutaminase has applications in various industries, including packaging (bioplastics) (Mirpoor et al. 2024), dairy (Hidas et al. 2023; Marhons et al. 2023; Romeih et al. 2024), fish (Tokay et al.

2021), meat (Feng et al. 2024b, a), and bakery (Schlangen et al. 2023; da Ramos et al. 2023).

Initially, commercial transglutaminase was derived from animal sources, but it has now been completely replaced by microbial transglutaminase (MTG) (Redd et al. 2024). Microbial transglutaminase has entirely replaced the animal-derived enzyme because it is cheaper and more efficient to produce, exhibits higher stability and activity under various conditions, is safer for consumers, and is more widely accepted ethically and religiously. Furthermore, creating the enzyme through microorganisms allows for better quality control, ensuring a uniform and pure final product (Motoki and Seguro 1998; Yokoyama et al. 2004). Currently, transglutaminase is primarily obtained from the strain *Streptomyces mobaraensis*. It is also produced by other microorganisms such as *Streptovercillium lydicus*, *Streptovercillium ladanum*, *Bacillus subtilis*, and *Bacillus sphaericus* (Ceresino et al. 2018;

✉ Marek Kieliszek
marek-kieliszek@wp.pl; marek_kieliszek@sggw.edu.pl

¹ Department of Food Biotechnology and Microbiology, Institute of Food Sciences, Warsaw University of Life Sciences—SGGW, Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warsaw, Poland

Kolotylo et al. 2023). Enzymes are crucial for the processing industry owing to their specificity. Such metabolites can minimize by-products in the agro-food industry, act quickly, and require moderate reaction conditions. The industrial enzymes market has grown consistently in both production and revenue (Tarafdar et al. 2021). Enzyme sales in the USA amounted to \$1.3 billion in 2002 and \$5.1 billion in 2009, with food enzymes constituting 31% and feed enzymes 6% of the total market (Sarrouh et al. 2012). As of 2019, the enzyme market was projected to reach a value of \$10.6 billion in 2020, with an annual growth rate of 7.1%, reaching approximately \$14.9 billion by 2027. This growth is attributed to the importance of enzymes in the food, biofuel, agricultural, detergent, textile, and cosmetic industries. The food industry holds the largest share of the enzyme market, where enzymes are used for producing food additives and dietary supplements, in beverage industries, vegetable and fruit processing, cheese, protein, grains, oils, fats, and dairy products, as well as in brewing, baking and agriculture (Wu et al. 2020). Thus, optimizing enzyme production processes is crucial for ensuring sustainable development.

Response surface methodology (RSM) is an effective technique for optimizing biotechnological processes, relying on a strategy for finding optimal conditions in multidimensional systems. RSM is preferred over classical optimization methods because it allows simultaneous examination of the effects of multiple variables and their interactions on the outcome, which reduces the number of necessary experiments, saves time and resources, and increases accuracy through its statistical approach. Compared to other methods, RSM offers a more comprehensive and effective tool for optimizing multivariable processes, allowing for better modelling, control, and visualization of data, which is crucial in advanced scientific research (Bezerra et al. 2008). This method has been successfully applied to optimize the composition of the medium for xanthan production and conditions for enzymatic hydrolysis since the 1990s (Ma and Ooraikul 1986; Roseiro et al. 1992). In 2010, the method was used to optimize pullulan production (Jiang 2010); in 2023, to maximize emulsion stability (Liu et al. 2023); and in 2024, studies were published on optimizing the extraction process of sugars and phenolic compounds (De la Loma-Calvente et al. 2024). Selected studies using this optimization method over the years demonstrate its timelessness and continued relevance, which is why it was utilized in the present study.

This study employs response surface methodology to determine the combined effect of three crucial cultivation parameters—nitrogen dose, cultivation time, and initial medium pH—on transglutaminase production by *Streptovorticillium cinnamoneum* KKP 1658.

Materials and methods

Microorganism

The study was conducted using the actinomycete strain *Streptovorticillium cinnamoneum* KKP 1658, stored in the Pure Culture Collection of the Department of Biotechnology and Food Microbiology at the Warsaw University of Life Sciences. The actinomycetes were maintained at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in tryptic soy broth with glycerol (Chempur, Poland). It is worth noting that the *S. cinnamoneum* KKP 1658 strain was purchased from the Institute of Agricultural and Food Biotechnology State Research Institute (IAFB) Collection of Industrial Microorganisms (Warsaw, Poland). This collection contains a very large number of microorganisms that are identified, shared, and stored long-term by the global standards of the World Federation for Culture Collection (WFCC), the guidelines of the European consortium CABRI (Common Access to Biological Resources and Information), and the recommendations of the OECD (OECD Best Practice Guidelines for Biological Resource Centres) regarding best practices in the storage of biological materials.

Preparation of medium

The inoculation medium TSB (tryptic soy broth) contained (g/L): casein peptone (BioMaxima, Poland) 17, soy peptone (BioMaxima, Poland) 3, NaCl (P.P.H. Stanlab, Poland) 5, K_2HPO_4 (POCH S.A., Poland) 2.5, glucose (Chempur, Poland) 2.5. The inoculation medium was sterilized at $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 min (Systec D-45 autoclave, De Ville, Poland) after adjusting the pH to 7.0 (pH meter Elmetron CP-505, Poland).

To optimize the production process of microbial transglutaminase, the effects of three different nitrogen source doses (1%, 2%, and 4% in the form of a combination of amino-bak (BTL, Poland) and corn steep liquor (Massive baits, Poland) in a 1:1 ratio) and pH levels of 5.5, 6.0, and 6.5 were investigated (Kolotylo et al. 2024). The composition of the research medium with 2% nitrogen source content (g/L) was as follows: soluble starch (Chempur, Poland) 20, amino-bak (BTL, Poland) 10, corn steep liquor (Massive baits, Poland) 10, yeast extract (BioMaxima, Poland) 2, KH_2PO_4 (POCH S.A., Poland) 2, Na_2HPO_4 (POCH S.A., Poland) 2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Biomus, Poland) 1. The research media were sterilized at $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 min (autoclave) after adjusting the pH to 5.5, 6.0, or 6.5.

Cultivation methods

The starter culture was prepared by inoculating a 500-mL flask containing 100 mL of TSB medium with cells of the test strain ($6\text{--}8 \times 10^7$ CFU/mL) and incubating at $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 72 h on a shaker (Eppendorf Innova 44 Incubator Shaker,

Germany) at 180 rpm. Then, 10 mL of the starter culture was transferred to 90 mL of fresh TSB medium to obtain the inoculation culture, which was incubated for 24 h at 28 °C and 180 rpm. For the production of microbial transglutaminase, 10 mL of the inoculation medium was transferred to 90 mL of research media. Cultures were incubated at 28 °C and 180 rpm for three different time periods: 24, 48, and 72 h.

Biomass yield determination

The biomass yield of *Streptovorticillium cinnamoneum* KKP 1658 was determined after centrifuging (Eppendorf 5810 Centrifuge, Germany) (4500 rpm, 10 min) 30 mL of the culture broth in dry, pre-weighed Falcon tubes. The supernatant was decanted for transglutaminase activity determination, and the sediment was dried (SML Zalmed Dryer, Poland) (80 °C) to a constant mass. Biomass yield after centrifugation and drying in triplicate was calculated per 1 L of medium and expressed in grams of dry substance (g of dry substance per L).

Transglutaminase activity determination

Transglutaminase activity was determined using commercial test kits Microbial Transglutaminase Assay Kit Art. No. Z009 (Zedira GmbH, Darmstadt, Germany). The assay uses Z-Gln-Gly (N2-[(phenylmethoxy)carbonyl]-L-glutaminyglycine, C15H19N3O6) (Zedira GmbH, Germany) as the amine acceptor and hydroxylamine (Zedira GmbH, Germany) as the amine donor. In the presence of MTG, hydroxylamine is incorporated into the Z-Gln-Gly substrate, forming Z-glutamyl-hydroxaminyglycine, which forms a colored complex with iron (III) detectable spectrophotometrically (BIO-RAD SmartSpec 3000 Spectrophotometer, Poland) at a wavelength of 525 nm (Kolotylo et al. 2024).

Analytical methods

The statistical optimization of parameters affecting microbial transglutaminase production was conducted using a Box–Behnken design, which employs three levels of three different factors. Statistical analysis, experimental design, and model building were performed using Statistica software version 13.1.

Results and discussion

Microbial transglutaminase (MTG) is highly esteemed in the food sector for its ability to modify protein structures without altering the product's taste, color, or nutritional value. By cross-linking proteins, this enzyme enhances

water retention, texture, and firmness in a range of products, including meat, fish, dairy, and baked goods (Kolotylo et al. 2023). One of the earliest applications of MTG was in the production of surimi, where it improves texture and elasticity by cross-linking myosin in fish muscle, giving the product its essential gel-like (Yokoyama et al. 2004; Romeih and Walker 2017). In the meat industry, MTG facilitates smaller pieces of meat to be bound together into high-quality products like sausages and restructured steaks, enhancing cohesiveness and texture without the need for added salt (Duarte et al. 2019a). In baking, the enzyme increases dough elasticity, boosts the volume of baked goods, and extends shelf life, which is particularly beneficial for gluten-free products (Šmídová and Rysová 2022). In dairy processing, MTG improves the stability and texture of yogurts and cheeses by enhancing water-binding capacity and reducing whey separation (Kieliszek and Błażejczak 2017). Beyond the food industry, MTG finds use in various other sectors.

In textiles and leather manufacturing, the enzyme enhances the durability and elasticity of protein-based materials like wool by cross-linking proteins, improving fiber strength and resistance to shrinkage (Yokoyama et al. 2004; Yokoyama 2024). In biotechnology, MTG is employed in developing new biomaterials, such as wound dressings and scaffolds for tissue engineering, thanks to its ability to form durable, water-insoluble protein structures—crucial for applications requiring high mechanical stability (Xia et al. 2022; You et al. 2024).

In the context of increasing demand for efficient and economical enzyme production methods, our work focuses on identifying and optimizing key factors influencing the yield of transglutaminase production by *Streptovorticillium cinnamoneum* KKP 1658. It is worth emphasizing that the *Streptovorticillium cinnamoneum* strain (syn. *Streptomyces cinnamoneus*, *Streptomyces sapporonensis*) (Hatano et al. 2003) exhibits an aerobic metabolism typical of actinomycetes. It shows the ability to assimilate various carbon substrates, which makes it a versatile microorganism in various environments. Therefore, it can be found in soil (Gopalakrishnan et al. 2020), where it plays an essential role in decomposing organic matter and recycling nutrients. It mainly prefers soil rich in organic carbon compounds. The *S. cinnamoneum* genome is rich in genes responsible for synthesizing secondary metabolites, which is reflected in the ability of this organism to produce a wide range of bioactive compounds. A high percentage of guanine and cytosine in DNA is characteristic of actinomycetes, which correlates with their adaptation to difficult environmental conditions (Gopalakrishnan et al. 2020). One of the key features of *S. cinnamoneum* is its ability to biosynthesize antibiotics (Paradkar et al. 1998), especially from the aminoglycoside group, including cinnamycin. Cinnamycin, as a secondary product, not only plays a vital role in the microorganism's defense strategies,

but also has potential applications in antibacterial therapy (Ramírez-Rendón et al. 2023). The production of transglutaminase by this strain is also noteworthy, as this enzyme has applications in biotechnology (Cabrera-Barjas et al. 2022), including the food and pharmaceutical industries, where it is used to modify proteins and improve the textural properties of foods (Velazquez-Dominguez et al. 2023). In summary, *Streptovercillium cinnamoneum* is a microorganism of great ecological and biotechnological value, whose unique metabolic properties and ability to produce bioactive compounds make it the subject of intensive research in the field of biotechnology.

The use of response surface methodology (RSM) allows for the systematic examination of the impact of various process parameters and their interactions, enabling the determination of optimal cultivation conditions. The following results and discussion elucidate the production process and suggest improvements that can enhance yield and reduce the production costs of transglutaminase. To find the optimal cultivation conditions for *Streptovercillium cinnamoneum* KKP 1658 in batch cultures, it is essential to identify the key factors influencing microbial transglutaminase production. Our previous experiments (Kolotylo et al. 2024) determined

the main factors influencing transglutaminase production by the strain *S. cinnamoneum* KKP 1658. Table 1 presents the selected ranges of nitrogen source doses (*A*), cultivation time (*B*), and initial pH (*C*) (coded as −1, 0, and 1, where −1 denotes the minimum value of the given range and 1 the maximum value of the range) used in this study.

To optimize the conditions for transglutaminase production by *Streptovercillium cinnamoneum* KKP 1658, an experiment was designed following the principles of the three-level fractional factorial designs according to Box–Behnken for three factors. In total, 15 experiments were conducted, consisting of 12 different combinations of the three factors and three repetitions at the central point. The experimental data were used to generate the coefficients of the quadratic polynomial model and response surface plots were constructed for each dependent variable to visualize the response surface field. The experimental data for the Box–Behnken statistical plan are presented in Table 2. The regression coefficients were calculated, and the fitted equations to predict transglutaminase activity (*X*) are given below:

$$X = -294.69 + 112.76 \times A - 4.88 \times A^2 + 96.62 \times C - 8.08 \times C^2 - 34.45 \times A \times C + 2.69 \times A \times C^2 + 0.71 \times A^2 \times C - 0.02 \times B \times A + 0.002 \times B \times A^2 + 0.03 \times B \times C + 1.74 \quad (1)$$

where *A* is the nitrogen source dose, *B* is the cultivation time, and *C* is the initial pH of the culture.

The predicted values calculated from the above equation showed excellent agreement with the experimental data, as shown in Fig. 1, indicating the suitability of this quadratic model for the present experimental setup.

Table 1 Values of coded levels used for the experimental design

Factors (independent variables)	Symbols	Actual levels of coded factors		
		−1	0	1
Dose of nitrogen source (%)	A	1	2	4
Time (h)	B	24	48	72
Initial pH	C	5.5	6.0	6.5

Table 2 Box–Behnken design with actual and coded levels of variables and actual values of responses

Run numbers	Nitrogen source (%)	pH	Time (h)	Biomass yield (g dry mass/L)	Transglutaminase activity (U/mL)
1	1	5.5	48	12.02 ± 0.36	2.812 ± 0.50
2	4	5.5	48	17.25 ± 0.52	1.354 ± 0.24
3	1	6.5	48	14.93 ± 0.45	2.332 ± 0.42
4	4	6.5	48	22.75 ± 0.68	5.085 ± 0.91
5	1	6.0	24	11.55 ± 0.35	1.739 ± 0.31
6	4	6.0	24	14.26 ± 0.43	0.819 ± 0.15
7	1	6.0	72	11.06 ± 0.33	3.114 ± 0.56
8	4	6.0	72	18.92 ± 0.57	1.288 ± 0.23
9	2	5.5	24	15.62 ± 0.47	2.476 ± 0.44
10	2	6.5	24	14.36 ± 0.43	1.350 ± 0.24
11	2	5.5	72	16.03 ± 0.48	2.687 ± 0.48
12	2	6.5	72	16.58 ± 0.50	2.829 ± 0.50
13	2	6.0	48	18.71 ± 0.56	4.595 ± 0.82
14	2	6.0	48	17.22 ± 0.52	4.348 ± 0.78
15	2	6.0	48	18.42 ± 0.55	4.561 ± 0.81

The fit of the experimental model to the obtained transglutaminase activity results was expressed by the coefficient of determination R^2 . In this case, the R^2 value of 99.4% indicates that the response model can explain over 99% of all variance. According to Jiang (2010), any regression model with a coefficient of determination exceeding 0.9 (90%) has a very high correlation. After adjustment, the R^2_{Adj} value decreased to 99.1%, but remained sufficiently high to indicate a good fit of the model to the obtained data. According to Liu et al. (2023), for a model to be considered appropriate, the difference between the adjusted R^2_{Adj} and the predicted R^2 values should be within the range of 0 to 0.200. The difference between these values in the present study is 0.0025, indicating the model's high accuracy in predicting response values.

A significance level of 0.05 (p -value) was used to determine the significance of the model factors, where values above this threshold are considered non-significant, and values below indicate significance (Table 3). Using the F -value, we can determine the degree of influence of the studied factors on the activity of the produced transglutaminase. Very low probability values (p -value < 0.0001) suggest that high F -values are not due to random noise, which is an inherent part of laboratory experiments (Liu et al. 2023).

To facilitate the visualization of the influence of individual components in the determined Eq. (1), a Pareto chart was created, displaying the absolute values of the standardized Student's t -test and including a line corresponding to a significance level of 0.05 (Fig. 2).

In the experiment discussed, the linear effect of factor A (nitrogen source dosage) was the only one found to be insignificant, while the quadratic effect of this factor ranked third in terms of the absolute value of the standardized Student's t -test. For each investigated factor (Table 1) affecting the production of transglutaminase by *S. cinnamoneum* KKP

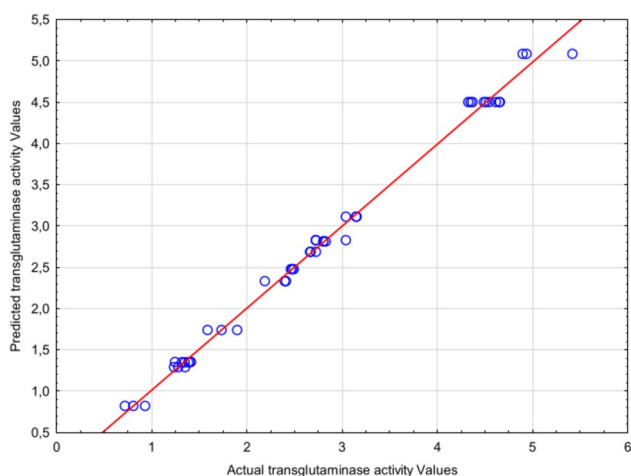


Fig. 1 Predicted vs actual values for transglutaminase activity

Table 3 Analysis of variance for response surface quadratic model obtained from experimental results

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F-value	p-value
A	0.00370	1	0.00370	0.233	0.632932
B	3.78148	1	3.78148	237.585	< 0.0001
C	7.02731	1	7.02731	441.515	< 0.0001
A ²	11.3970	1	11.3970	716.060	< 0.0001
B ²	23.4632	1	23.4632	1474.162	< 0.0001
C ²	1.19379	1	1.19379	75.004	< 0.0001
AB	0.61438	1	0.61438	38.600	< 0.0001
AC	13.3009	1	13.3009	835.675	< 0.0001
BC	1.20560	1	1.20560	75.746	< 0.0001
AC ²	6.11818	1	6.11818	384.395	< 0.0001
A ² C	2.84513	1	2.84513	178.755	< 0.0001
A ² B	0.07356	1	0.07356	4.622	0.0392
Pure error	0.50932	32	0.01592	-	-
Core total	78.0273	44	-	-	-
R ²	0.9935	-	-	-	-
R ² _{Adj}	0.9910	-	-	-	-

1658, linear, nonlinear (quadratic), and interaction effects are presented in Table 3 and Fig. 2. The significant order in which the examined factors linearly influence the transglutaminase activity is as follows: initial pH (C) > cultivation time (B) > nitrogen source dosage (A). The quadratic effects are ordered as follows: cultivation time (B) > nitrogen source dosage (A) > pH (C). The results show that the most significant influence on MTG production is the quadratic effect of factor B (cultivation time), indicating that the highest yield is achieved around 48 h of cultivation. It is also important

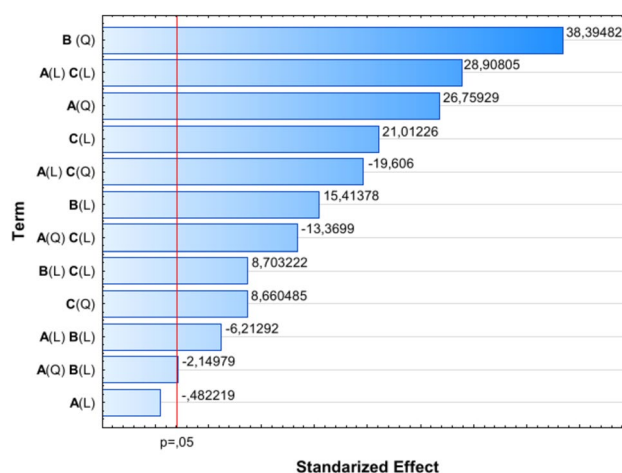


Fig. 2 Pareto chart of standardized effect (response is transglutaminase activity (U/mL)). A represents nitrogen source dosage; B represents cultivation time; C represents initial pH. L denotes linear effects, while Q denotes quadratic effects

to note the impact of the linear interaction between factors AC (nitrogen source dosage and cultivation time), which, according to statistical analysis, had the second most significant effect on the obtained MTG activity. Figures 3, 4, and 5 present three-dimensional surface response plots of the predictive quadratic model.

Three-dimensional response surface plots were utilized to determine the optimal conditions for transglutaminase production. Cultivation of *S. cinnamoneum* KKP 1658 for 24 and 72 h led to MTG production with activity not exceeding 4 U/mL (Figs. 3 and 5). Additionally, it was observed that transglutaminase activity values > 4 U/mL were obtained after experimental cultivation (48 h), which is confirmed by actual results (Table 2) and those predicted by the model (Fig. 4). The highest MTG activities (> 6 U/mL) after 48 h of cultivation (Fig. 4) were found in areas corresponding to an initial pH range of 6.4–6.6 and high nitrogen source dosages $> 4\%$.

A crucial question arises: are the parameters that achieved the maximum transglutaminase activity optimal? The answer to this question is that the parameters (nitrogen source dosage $> 4\%$ and pH range 6.4–6.6) that achieved the maximum MTG activity were not optimal. Figure 4 shows that using half the nitrogen dosage (2%) and a pH range of 5.8–6.0 can achieve transglutaminase activity levels of 4.5–5.5 U/mL, which is still very promising. Optimization can be defined as studies based on technical and economic feasibility, which in turn is achievable by maximizing yield while minimizing

raw material costs (Lima et al. 2023). According to Akbari et al. (2021), maintaining economic benefits in transglutaminase production is associated with reducing the use of expensive substrates (aminobac, peptone, yeast extract). Studies by Kolotylo et al. (2024) confirmed that replacing half of the aminobac dose with waste corn steep liquor not only reduces the costs associated with this expensive microbiological substrate by 50% but also increases MTG production by the *S. cinnamoneum* KKP 1658 strain. The authors report that for media with only aminobac or only corn steep liquor, transglutaminase activity > 2 U/mL was not detected within 96 h of cultivation. Combining these two components in a 1:1 ratio yielded MTG activity of 6.59 U/mL, which according to Kolotylo et al. (2023) is one of the highest values in the available literature for non-genetically modified strains.

Establishing the optimal pH is critical for the conformational stability of microbial transglutaminase, which directly impacts its catalytic activity. Enzymes such as MTG require specific pH conditions to maintain the proper folding of their active sites, which is crucial for efficient substrate binding and catalysis. Deviations from the optimal pH can destabilize the enzyme's tertiary structure, resulting in a significant loss of activity. Research indicates that an optimal pH of around 6.0 for MTG supports maximum conformational stability, which preserves its functional integrity and enhances enzymatic cross-linking efficiency (Shi et al. 2011; Vasić et al. 2023). This alignment between structural stability and

Fig. 3 Response surface for MTG production by *Streptovermicillium cinnamoneum* KKP 1658 after 24 h of culture. The interaction between the dose of nitrogen source and initial pH

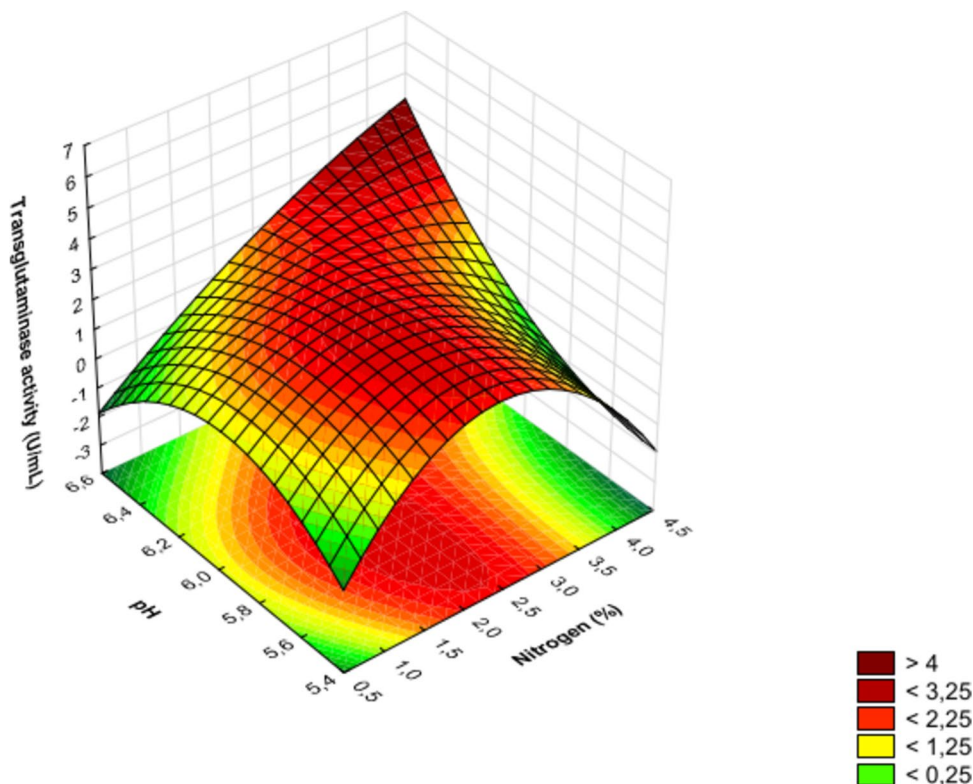


Fig. 4 Response surface for MTG production by *Streptovercillium cinnamoneum* KKP 1658 after 48 h of culture. The interaction between the dose of nitrogen source and initial pH

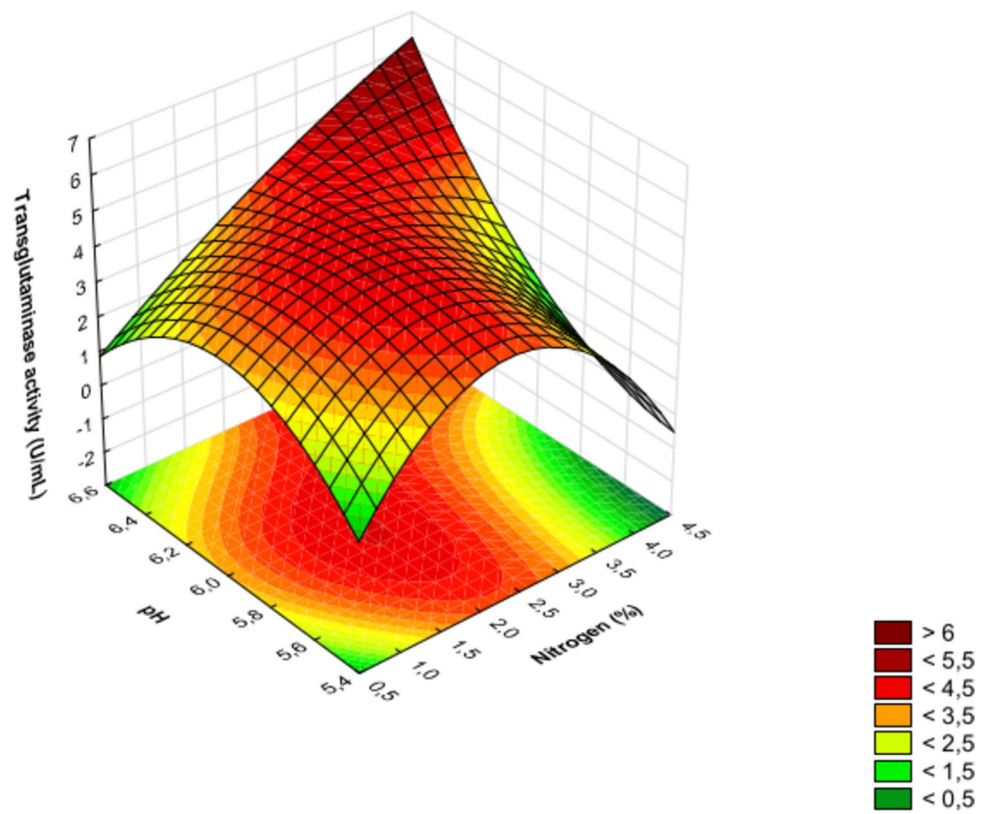
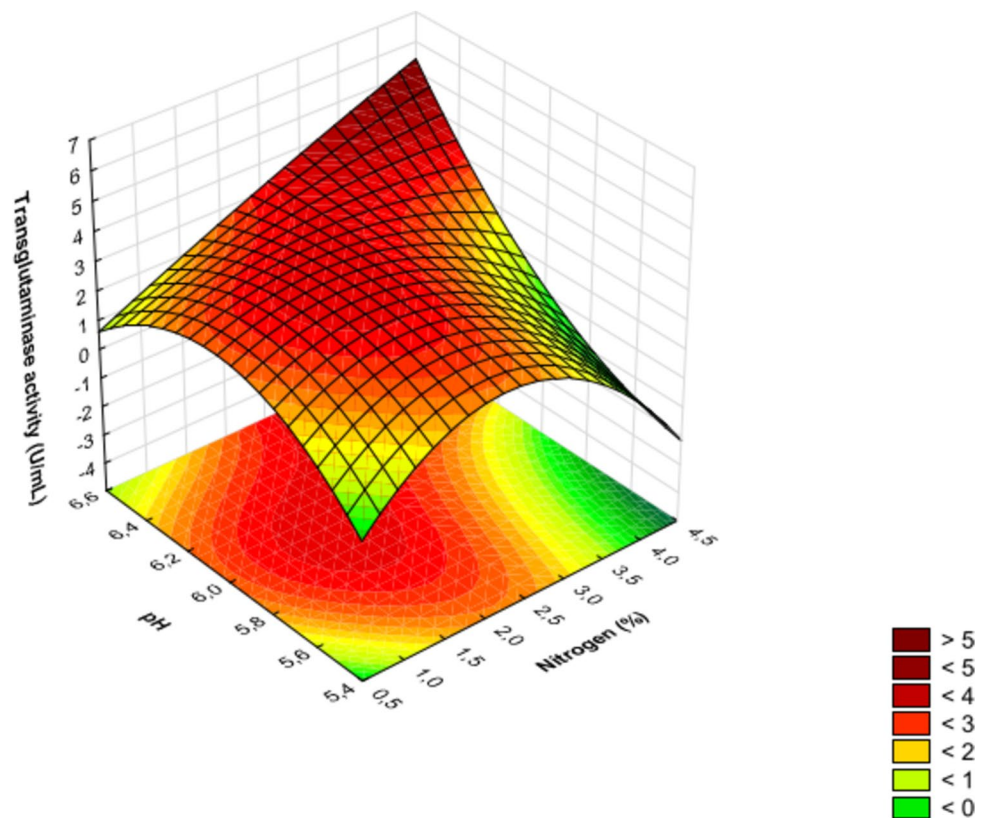


Fig. 5 Response surface for MTG production by *Streptovercillium cinnamoneum* KKP 1658 after 72 h of culture. The interaction between the dose of nitrogen source and initial pH



optimal catalytic performance underscores the importance of carefully controlling pH during fermentation.

Additionally, the fermentation temperature of 28 °C employed in this study appears to foster robust cell growth and efficient enzyme production. This temperature is close to the physiological optimum for many *Streptovorticillium* species, promoting bacterial proliferation and the active transcription and translation of the MTG gene. Such conditions are likely to optimize metabolic activity, thereby enhancing the yield of MTG (Duarte et al. 2019b). These findings suggest that the chosen temperature provides a dual benefit by maximizing both microbial biomass and enzymatic output, critical factors in scaling up the production of industrially relevant enzymes.

Streptovorticillium cinnamoneum is widely regarded as a strong producer of microbial transglutaminase (MTG) in the literature, mainly due to its frequent use in the development of recombinant strains for industrial enzyme production. This strain's ability to generate high yields of MTG makes it a valuable asset in biotechnological applications, especially in the food industry (Kolotylo et al. 2023, 2024). A study by Noda et al. (2012) exemplifies this by using *Streptomyces lividans* as a recombinant host for the production of MTG from *S. cinnamoneum*. The researchers found that *Streptomyces lividans* successfully produced significant amounts of MTG when cultured on various biomass-derived carbon sources, achieving the highest yield of 530 mg/L with xylose as the carbon source. This highlights the potential of *S. cinnamoneum* in MTG production, showcasing its adaptability to various substrates and its promising application in optimizing industrial enzyme production processes.

The study by Tokai et al. (2020) investigated the substrate recognition mechanisms of microbial transglutaminases, specifically comparing enzymes from *Streptomyces mobaraensis* (SMTG) and *Streptomyces cinnamoneum* (SCTG). The primary objective was to understand how these enzymes interact with natural peptides, particularly in food processing contexts. The researchers found that although SCTG is structurally similar to SMTG, it exhibited different activity profiles, with SCTG displaying optimal activity at pH 8.0 and a lower substrate affinity compared to SMTG. In the context of our research, these findings are particularly relevant when discussing the pH-dependent conformational stability of MTG. The observed optimal pH of 8.0 for SCTG in Tokai's study, although slightly higher than the optimal pH identified in our research, still supports the concept that pH plays a critical role in maintaining the enzyme's active site conformation, which is essential for catalytic efficiency. Our results, which emphasize the importance of optimal pH for maximizing MTG activity, align with these findings.

Additionally, the temperature condition of 28 °C used in our experiments is similarly advantageous for microbial growth and enzyme production. This is consistent with

Tokai et al.'s results, where SCTG expression and enzymatic activity were most stable at moderate temperatures around 30 °C. This analysis underscores the importance of carefully controlling pH and temperature for both microbial viability and the catalytic function of transglutaminase, highlighting the potential for optimizing enzyme production on an industrial scale.

The study by Junqua et al. (1997) aimed to optimize microbial transglutaminase production in *Streptovorticillium cinnamoneum* CBS 683.68 and investigate the relationship between microbial growth and MTG activity. They employed a series of experimental designs (factorial, Box-Behnken, and composite designs) to identify the effects of various factors—such as casein, glycerol, and yeast extract—on MTG production and biomass growth. The research showed that casein and glycerol were the most significant factors, with the combination of these two components leading to a threefold increase in MTG activity, reaching a maximum of 0.331 U/mL. Additionally, transglutaminase production was primarily observed during the stationary growth phase, suggesting that enzyme production could be induced under specific nutrient conditions. The study by Junqua et al. (1997) highlights the critical importance of selecting the appropriate carbon and nitrogen sources to optimize microbial transglutaminase production processes. Their findings demonstrate that casein and glycerol were the most influential factors for MTG activity and microbial growth.

Furthermore, the observation that MTG production was strongly associated with the stationary growth phase provides important insights into the timing of enzyme activity. This aligns with our results, where the highest MTG activity was observed after 48 h of cultivation, a time point corresponding to the stationary phase of cell growth in our system. These complementary findings emphasize the importance of optimizing nutrient conditions and timing in bioprocesses to maximize enzyme yields.

In recent years, waste or renewable raw materials have become a key element of industrial production processes and sustainable development (Beltrán-Ramírez et al. 2019). This approach allows the efficient valorization of agricultural waste into high-value biotechnological products, which is extremely important for the environment, and supports entrepreneurs by somewhat reducing production costs (Lima et al. 2023). Other by-products from the agri-food industry that can be used in microbial media include sugarcane molasses, wheat and oat bran, soybean meal, potato juice, potato pulp, and fruit flour (Preichardt et al. 2019; Kot et al. 2020b).

In the study by Preichardt et al. (2019), a culture medium based on sugarcane molasses (SCM) with added yeast extract (YE) and soybean meal (SM) was developed for the production of *Staphylococcus xylosus* AD1 biomass. A Box–Behnken optimization design was used for this

purpose. Optimal culture conditions were obtained at concentrations of 10% SCM, 2% YE, and 4% SM, allowing for maximum live biomass growth. All media, except the one containing only SCM, showed better effectiveness in cultivating *S. xylosus* AD1 than the commercial Brain Heart Infusion medium. The medium with SCM, YE, and SM, according to Preichardt et al. (2019), is an excellent alternative for producing *S. xylosus* AD1 biomass.

In another study (Kot et al. 2020a), the possibility of using potato wastewater and glycerol fractions as media for the biosynthesis of lipids and carotenoids by the yeast *Rhodotorula gracilis* ATCC 10788 in a bioreactor was investigated. Cultivations were conducted at temperatures of 20 and 28 °C for 96 h. The highest lipid content (19 g/100 g biomass) was observed on the third and fourth days, with linoleic acid predominating (about 28%) after 96 h. The maximum carotenoid biosynthesis yield (6.24 mg/L) was achieved after 96 h, with β -carotene (about 47%) and torulene (about 51%) levels and negligible torularhodin (< 1%). The results indicate that *R. gracilis* biomass can be a good source of lipids and carotenoids, and the bioreactor cultivation method can reduce the environmental impact of industrial waste and starch-based biofuels.

The response surface methodology (RSM) is a timeless technique for optimizing biotechnological and microbiological processes, as evidenced by the presence of scientific articles spanning several decades to the present day. A good example is the study by Polak-Berecka et al. (2011), where RSM was used to investigate the effects of various medium components on the biomass production of *Lactobacillus rhamnosus* E/N. The best medium composition obtained by RSM contained (in g/L): glucose 15.44, sodium pyruvate 3.92, meat extract 8.0, potassium phosphate 1.88, sodium acetate 4.7, and ammonium citrate 1.88. With this medium composition, biomass production reached 23 g/L of dry cell mass after 18 h of cultivation in a bioreactor, while MRS medium yielded 21 g/L. The cost of 1 g of biomass on MRS was €0.44, while the new medium was 25% cheaper. The new, cheaper medium allows large-scale commercial cultivation of *L. rhamnosus*, which is significant for the commercial production of probiotic foods.

It has been shown that waste materials such as potato wastewater, glycerol fractions, sugarcane molasses, or corn steep liquor can effectively serve as inexpensive components of microbial media. By optimizing medium composition using RSM, it is possible not only to increase biomass yield or the production of desired metabolites but also to significantly reduce production costs. RSM is a promising approach to sustainable biotechnology, combining economic efficiency with minimizing environmental impact.

Conclusions

The broad enzymatic capabilities of microbial transglutaminase have cemented its role as an essential tool in the industrial processing of foods and other materials. Its ability to improve texture, enhance nutritional value, and provide structural integrity to various products ensures that its applications will continue to expand. From food production to textile processing and biotechnology, MTG's versatility ensures its growing role in industrial processes. As industries discover more uses for transglutaminase, its importance will grow across various sectors, especially as biotechnological advances continue. The statistical optimization of microbial transglutaminase (MTG) cultivation conditions can overcome the limitations of classical empirical methods. This study demonstrates an effective tool for optimizing MTG production by *Streptovorticillium cinnamoneum* KKP 1658. The research revealed interactions between independent variables and model responses. The most significant influence on transglutaminase production was observed for the cultivation time and the interaction between nitrogen dosage and cultivation time. The following optimal conditions for producing microbial transglutaminase at the laboratory scale using the *S. cinnamoneum* KKP 1658 strain were established: a 2% nitrogen source dosage combining amino-bac with waste corn steep liquor, an initial cultivation pH range of 5.8–6.0 and a 48-h cultivation period. The experimental results underscore the importance of simultaneously investigating the effects of multiple factors on transglutaminase production owing to interactions between components, which can have a more significant impact than each factor individually. Further research aims to scale up the production of high-activity microbial transglutaminase (bioreactor production) by *S. cinnamoneum* KKP 1658.

Author contribution VK: writing—original draft preparation, performed the experiments, investigating, data curation; KP: investigating; AS: statistical analysis; MK: conceptualization, methodology, supervision, investigating, source, funding acquisition, writing—review and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Data availability The data generated during and/or analyzed during the current study are available from the first author upon reasonable request.

Declarations

Ethical approval Not applicable.

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long

as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Akbari M, Razavi SH, Kieliszek M (2021) Recent advances in microbial transglutaminase biosynthesis and its application in the food industry. *Trends Food Sci Technol* 110:458–469. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.036>
- Beltrán-Ramírez F, Orona-Tamayo D, Cornejo-Corona I et al (2019) Agro-industrial waste revalorization: the growing biorefinery. *Biomass Bioenergy - Recent Trends Futur Challenges*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.83569>
- Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP et al (2008) Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76:965–977. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019>
- Cabrera-Barjas G, Banerjee A, Valdes O, et al (2022) Food biotechnology: innovations and challenges. *Futur Foods Glob Trends, Oppor Sustain Challenges* 697–719. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91001-9.00038-4>
- Ceresino EB, de Melo RR, Kuktaite R et al (2018) Transglutaminase from newly isolated *Streptomyces* sp. CBMAI 1617: production optimization, characterization and evaluation in wheat protein and dough systems. *Food Chem* 241:403–410. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.010>
- da Ramos NJ, S, Rocha EBM, Gusmão TAS, et al (2023) Optimizing gluten-free pasta quality: the impacts of transglutaminase concentration and kneading time on cooking properties, nutritional value, and rheological characteristics. *LWT* 189:115485. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115485>
- De la Lama-Calvente D, Fernández-Rodríguez MJ, Garrido-Fernández A, Borja R (2024) Process optimization of the extraction of reducing sugars and total phenolic compounds from the invasive alga *Rugulopterix okamurai* by response surface methodology (RSM). *Algal Res* 80:103500. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2024.103500>
- Duarte L, Matte CR, Bizarro CV, Ayub MAZ (2019a) Review transglutaminases: part II—industrial applications in food, biotechnology, textiles and leather products. *World J Microbiol Biotechnol* 36:1–20. <https://doi.org/10.1007/S11274-019-2792-9>
- Duarte L, Matte CR, Bizarro CV, Ayub MAZ (2019b) Review transglutaminases: part II—industrial applications in food, biotechnology, textiles and leather products. *World J Microbiol Biotechnol* 36(36):1–20. <https://doi.org/10.1007/S11274-019-2792-9>
- Feng Y, Liang X, Zhang J et al (2024a) Underlying mechanisms and combined effects of transglutaminase and κ -carrageenan on the quality profiles and in vitro digestibility of frankfurters. *Food Hydrocoll* 147:109344. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109344>
- Feng Y, Liang X, Zhang J et al (2024b) Effects of transglutaminase coupled with κ -carrageenan on the rheological behaviours, gel properties and microstructures of meat batters. *Food Hydrocoll* 146:109265. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109265>
- Gopalakrishnan S, Srinivas V, Prasanna SL (2020) *Streptomyces*. *Benef Microbes Agro-Ecology Bact Fungi* 55–71. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00005-8>
- Hatano K, Nishii T, Kasai H (2003) Taxonomic re-evaluation of whorl-forming *Streptomyces* (formerly *Streptovorticillium*) species by using phenotypes, DNA-DNA hybridization and sequences of *gyrB*, and proposal of *Streptomyces luteireticuli* (ex Katoh and Arai 1957) *corrig.*, sp. nov., nom. rev. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:1519–1529. <https://doi.org/10.1099/IJS.0.02238-0>
- Hidas KI, Nyulas-Zeke IC, Szepessy A et al (2023) Physical properties of hemp drink-based ice cream with different plant proteins guar gum and microbial transglutaminase. *LWT* 182:114865. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114865>
- Jiang L (2010) Optimization of fermentation conditions for pullulan production by *Aureobasidium pullulan* using response surface methodology. *Carbohydr Polym* 79:414–417. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.08.027>
- Junqua M, Duran R, Gancet C, Goulas P (1997) Optimization of microbial transglutaminase production using experimental designs. *Appl Microbiol Biotechnol* 48:730–734. <https://doi.org/10.1007/S002530051124>
- Kieliszek M, Błażej S (2017) Microbial transglutaminase and applications in food industry. In: Ray RC, Rosell CM (eds) *Microbial Enzyme Technology in Food Applications*. CRC Press, Boca Raton, pp 180–198
- Kieliszek M, Misiewicz A (2014) Microbial transglutaminase and its application in the food industry. A Review *Folia Microbiol (Praha)* 59:241–250. <https://doi.org/10.1007/S12223-013-0287-X>
- Kolotylo V, Piwowarek K, Kieliszek M (2023) Microbiological transglutaminase: biotechnological application in the food industry. *Open Life Sci* 18:20220737. <https://doi.org/10.1515/Biol-2022-0737>
- Kolotylo V, Piwowarek K, Kieliszek M (2024) Production of microbial transglutaminase by *Streptovorticillium cinnamomeum* KKP 1658. *EXCLI J* 23:655. <https://doi.org/10.17179/EXCLI2024-7033>
- Kot AM, Błażej S, Kieliszek M et al (2020a) Production of lipids and carotenoids by *Rhodotorula gracilis* ATCC 10788 yeast in a bioreactor using low-cost wastes. *Biocatal Agric Biotechnol* 26:101634. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101634>
- Kot AM, Pobiega K, Piwowarek K et al (2020b) Biotechnological methods of management and utilization of potato industry waste—a review. *Potato Res* 63:431–447. <https://doi.org/10.1007/S11540-019-09449-6>
- Lima CA, Bento HBS, Picheli FP et al (2023) Process development and techno-economic analysis of co-production of colorants and enzymes valuing agro-industrial citrus waste. *Sustain Chem Pharm* 35:101204. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2023.101204>
- Liu J, Dai S, Bao X et al (2023) Investigation into the influence of droplet size on the stability of diesel emulsions based on multiple light scattering. *J Mol Liq* 390:123182. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.123182>
- Ma AYM, Ooraikul B (1986) Optimization of enzymatic hydrolysis of canola meal with response surface methodology. *J Food Process Preserv* 10:99–113. <https://doi.org/10.1111/J.1745-4549.1986.TB00010.X>
- Marhons Š, Hyršlová I, Stetsenko V et al (2023) Properties of yoghurt treated with microbial transglutaminase and exopolysaccharides. *Int Dairy J* 144:105701. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2023.105701>
- Mirpoor SF, Zannini D, Santagata G, Giosafatto CVL (2024) Cardoon seed oil cake proteins as substrate for microbial transglutaminase: their application as matrix for bio-based packaging to extend the shelf-life of peanuts. *Food Hydrocoll* 147:109339. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109339>
- Motoki M, Seguro K (1998) Transglutaminase and its use for food processing. *Trends Food Sci Technol* 9:204–210. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(98\)00038-7](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(98)00038-7)
- Noda S, Miyazaki T, Tanaka T et al (2012) Production of *Streptovorticillium cinnamomeum* transglutaminase and cinnamic acid by

- recombinant *Streptomyces lividans* cultured on biomass-derived carbon sources. *Bioresour Technol* 104:648–651. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2011.10.045>
- Paradkar VR, Gupte TE, Joshi AP, Naik SR (1998) A novel *Streptomyces cinnamomeus* var *scleroticus* producing a polyene antibiotic. *World J Microbiol Biotechnol* 14:705–709. <https://doi.org/10.1023/A:1008818116548>
- Polak-Berecka M, Waśko A, Kordowska-Wiater M et al (2011) Application of response surface methodology to enhancement of biomass production by *Lactobacillus rhamnosus* E/N. *Braz J Microbiol* 42:1485–1494. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220110004000035>
- Preichardt LD, Haubert L, Sawitzki MC, et al (2019) Multivariate optimization of *Staphylococcus xylosus* AD1 biomass production using sugarcane molasses plus yeast extract and soybean meal. *Acta Sci - Biol Sci* 41:. <https://doi.org/10.4025/ACTASCIBIOLSCI.V41I1.47487>
- Ramírez-Rendón D, Guzmán-Chávez F, García-Ausencio C et al (2023) The untapped potential of actinobacterial lanthipeptides as therapeutic agents. *Mol Biol Reports* 5012(50):10605–10616. <https://doi.org/10.1007/S11033-023-08880-W>
- Redd AJ, Pike OA, Ahlborn GJ (2024) Effects of microbial transglutaminase on gluten-free sourdough bread structure and loaf characteristics. *J Cereal Sci* 115:103833. <https://doi.org/10.1016/J.JCS.2023.103833>
- Romeih E, Kieliszek M, Hebishy E (2024) Transglutaminase in dairy processing. In: Zhang Y, Simpson BK (eds) *Transglutaminase: fundamentals and applications*. Academic Press, pp 207–243
- Romeih E, Walker G (2017) Recent advances on microbial transglutaminase and dairy application. *Trends Food Sci Technol* 62:133–140. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2017.02.015>
- Roseiro JC, Esgalhado ME, AmaralCollaço MT, Emery AN (1992) Medium development for xanthan production. *Process Biochem* 27:167–175. [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(92\)87005-2](https://doi.org/10.1016/0032-9592(92)87005-2)
- Sarrouh B, Santos TM, Miyoshi A et al (2012) Up-to-date insight on industrial enzymes applications and global market. *J Bioprocess Biotech* s: <https://doi.org/10.4172/2155-9821.S4-002>
- Schlangen M, Ribberink MA, TaghianDinani S et al (2023) Mechanical and rheological effects of transglutaminase treatment on dense plant protein blends. *Food Hydrocoll* 136:108261. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2022.108261>
- Shi YG, Qian L, Zhang N, et al (2011) Changes in morphology and activity of transglutaminase following cross-linking and immobilization on a polypropylene microporous membrane. *Mol* 2011, Vol 16, Pages 10046–10058 16:10046–10058. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES161210046>
- Šmídová Z, Rysová J (2022) Gluten-free bread and bakery products technology. *Foods* 11:480. <https://doi.org/10.3390/FOODS11030480>
- Tarafdar A, Sirohi R, Gaur VK et al (2021) Engineering interventions in enzyme production: lab to industrial scale. *Bioresour Technol* 326:124771. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2021.124771>
- Tokai S, Uraji M, Hatanaka T (2020) Molecular insights into the mechanism of substrate recognition of *Streptomyces transglutaminases*. *Biosci Biotechnol Biochem* 84:575–582. <https://doi.org/10.1080/09168451.2019.1697198>
- Tokay FG, Alp AC, Yerlikaya P (2021) Production and shelf life of restructured fish meat binded by microbial transglutaminase. *LWT* 152:112369. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.112369>
- Vasić K, Knez Ž, Leitgeb M (2023) Transglutaminase in foods and biotechnology. *Int J MolSci*, (2023) Vol 24. Page 12402(24):12402. <https://doi.org/10.3390/IJMS241512402>
- Velazquez-Dominguez A, Hiolle M, Abdallah M et al (2023) Transglutaminase cross-linking on dairy proteins: functionalities, patents, and commercial uses. *Int Dairy J* 143:105688. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2023.105688>
- Wu Z, Liu C, Zhang Z et al (2020) Amidase as a versatile tool in amide-bond cleavage: from molecular features to biotechnological applications. *Biotechnol Adv* 43:107574. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2020.107574>
- Xia T, Gao Y, Liu Y et al (2022) Lactoferrin particles assembled via transglutaminase-induced crosslinking: utilization in oleogel-based Pickering emulsions with improved curcumin bioaccessibility. *Food Chem* 374:131779. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2021.131779>
- Yokoyama K (2024) Industrial production of transglutaminase. *Transglutaminase Fundam Appl* 333–349. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-19168-8.00012-2>
- Yokoyama K, Nio N, Kikuchi Y (2004) Properties and applications of microbial transglutaminase. *Appl Microbiol Biotechnol* 64:447–454. <https://doi.org/10.1007/S00253-003-1539-5>
- You C, Zhang Z, Guo Y et al (2024) Application of extracellular matrix cross-linked by microbial transglutaminase to promote wound healing. *Int J Biol Macromol* 266:131384. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2024.131384>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Characterisation and optimisation of microbial production of transglutaminase produced by *Streptoverticillium cinnamoneum*

Vitaliy Kolotylo¹ · Alicja Synowiec¹ · Kamil Piwowarek¹ · Iwona Gientka¹ · Marek Kieliszek¹

Received: 14 May 2025 / Revised: 8 September 2025 / Accepted: 12 September 2025
© The Author(s) 2025

Abstract

Optimal conditions for the production of microbial transglutaminase (MTG) by *Streptoverticillium cinnamoneum* KKP 1648 under bioreactor conditions were determined using response surface methodology (RSM). The test medium contained soluble starch, Aminobak, waste corn steep liquor, yeast extract, and mineral salts such as KH_2PO_4 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. The culture was conducted at 28 °C, stirring at 200 rpm, using aeration with compressed air at a flow rate of 2.0 vvm. Optimal culture parameters included a pH of 6.5, a nitrogen dose of 2.75%, and an incubation time of 72 h, and yielded MTG activities of 4.29 ± 0.08 and 22 ± 0.05 U/mL after precipitation with ammonium sulfate. The molecular weight of the enzyme was estimated to be 43 kDa by SDS-PAGE. The transglutaminase tested showed optimal activity in the temperature range 20–37 °C, with a significant decrease in activity above 50 °C and complete inactivation at 60 °C. The enzyme was stable in the pH range of 5.0–9.0, reaching maximum activity at pH 7.0. The use of waste corn steep liquor as a nutrient solution revealed a potential management strategy for this type of waste. The results suggest potential applications of transglutaminase in the food industry, particularly in enhancing the structural properties of meat, bakery, and dairy products.

Key points

- High MTG activity after 72 h of culture confirms the effectiveness of selected parameters
- The use of corn waste in MTG production can reduce production costs
- The use of the RSM method allowed us to determine the best parameters for MTG production.
- The MTG enzyme was stable at pH 5.0 to 9.0, with maximum activity at pH 7.0.

Keywords Microbial transglutaminase · MTG · Optimisation · RSM · *Streptoverticillium cinnamoneum*

Introduction

Microbial transglutaminase (MTG) is one of the key enzymes used in the food industry. It enables the modification of proteins by creating isopeptide bonds between glutamine ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$) and lysine ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$) residues, which leads to the formation of stable, internal or external cross-linked protein structures (Vasić et al. 2024). Thanks to these properties, MTG significantly influences texture, increases gelling, emulsifying, and foaming properties,

and improves the water retention capacity of food products (Kolotylo et al. 2023). In the production of cheese and ice cream, the use of transglutaminase allows for a reduction in the addition of fats and stabilisers, which in turn reduces production costs (Taghi Gharibzadeh et al. 2018). Transglutaminase is widely used in the production of meat (Akbari et al. 2021), pasta (including the gluten-free cereal milling industry) (Ramos et al. 2023), dairy products (Taghi Gharibzadeh et al. 2018), bread (Ceresino et al. 2018), and fish (Tokay et al. 2021), where it helps to improve the quality and shelf life of the products. Transglutaminase has been used in the reuse of food waste (defatted flour and peptides from walnut and pumpkin seeds) in the production of new value-added food products (Marulo et al. 2022). In addition, producing microcapsules or edible films with MTG allows for new biodegradable packaging materials. These approaches not only reduce plastic waste, but also help to utilise food waste that would otherwise be thrown away.

✉ Marek Kieliszek
marek_kieliszek@sggw.edu.pl; marek-kieliszek@wp.pl

¹ Department of Food Biotechnology and Microbiology, Institute of Food Sciences, Warsaw University of Life Sciences—SGGW, Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warsaw, Poland

Microbial transglutaminase is used not only in the food industry but also in medicine (Kim and Keillor 2020) and biomaterial engineering (Besser et al. 2020). In biotechnology, this enzyme is used for protein modification and biomaterial production as well as in research on gene therapies (Zilda et al. 2017). Li et al (2016) used transglutaminase to microencapsulate *Lactobacillus rhamnosus* GG by cross-linking the soy isolate and subsequent freeze-drying, which resulted in a high microencapsulation yield (67.4%). In a study by Heidebach et al. (2009), commercial probiotic bacteria strains showed a high microencapsulation efficiency with transglutaminase cross-linked casein gel, which ranged from 70% (for *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* F19) to 93% (for *Bifidobacterium lactis* Bb12). Thanks to the development of new research techniques, it is possible to learn more about the potential of the enzyme, which leads to the discovery of new areas of its application in industry and science (Kolotylo et al. 2023).

Transglutaminase was initially isolated from animal tissue (Keillor et al. 2014), but due to the challenges associated with its extraction and ethical concerns, increasing attention has been paid to the microbial variant of this enzyme. Unlike the animal-based enzyme, the activation of microbial transglutaminase does not require the presence of calcium ions (Kieliszek and Misiewicz 2014), which makes it a more versatile tool in many industrial processes (Vasić et al. 2023). The first reports on the microbiological sources of MTG date back to the 1980s, when enzymes produced by microorganisms of the genus *Streptoverticillium*, especially *Streptoverticillium mobaraense*, were identified (Ando et al. 1989; Akbari et al. 2021). Thanks to its unique properties and wide range of applications, microbial transglutaminase is increasingly in demand in the food industry.

The introduction of industrial enzymes into production processes has brought significant savings by reducing the consumption of energy, water, and raw materials, as well as reducing greenhouse gas emissions (Roy Choudhury 2020). Compared to chemical modifications, enzymes offer advantages such as high specificity of the reaction and minimisation of side reactions (Vasić et al. 2023). Thanks to these properties, enzymatic protein modification is particularly effective and widely used, especially in the food industry, where precise action and resource savings are important (Keenan et al. 2021). It is therefore no surprise that this market is growing rapidly—in 2020, the global value of the food enzymes market was \$2.3 billion, with the MTG segment reaching a value of around \$200 million (Wu et al. 2020). Forecasts suggest that this market will exceed \$3.3 billion by 2026, and the total enzyme market, including the food, biofuels, agricultural, detergent, textile, and cosmetics industries, will reach \$14.9 billion by 2027 (Wu et al. 2020), which indicates a steady increase in the demand for enzymes in food processing and beyond (Kolotylo et al.

2023). Parameters such as the ability to improve protein structure and production efficiency make MTG one of the key tools used in advanced food technologies (Zilda et al. 2017).

Enzymes on an industrial scale are mainly produced through aerobic fermentation using microorganisms. The species used for the microbiological production of transglutaminase include *Streptomyces mobaraensis*, *Streptoverticillium cinnamoneum*, *Streptoverticillium lydicus*, *Streptoverticillium ladakanum*, *Bacillus subtilis*, and *Bacillus sphaerules* (Ceresino et al. 2018; Akbari et al. 2021; Kolotylo et al. 2024a).

Industrial waste is used as a component of microbiological media to produce enzymes, such as corn steep liquor (Kolotylo et al. 2023), potato juice water (Bzducha-Wróbel et al. 2018), glycerol fractions (Kot et al. 2020), cane molasses (Preichardt et al. 2019), brewer's spent grain (Bianco et al. 2020), and fruit pomace (Bellucci et al. 2021). Guerra-Rodríguez and Vázquez (2014) developed a medium for the microbial production of transglutaminase (for the strain *Streptomyces mobaraensis* CECT 3230) consisting only of skimmed milk (600 g/L), waste potatoes (40 g/L), and glycerol (5 g/L). After 72 h of cultivation, they obtained an average MTG activity of 2.95 ± 0.3 U/mL, and the calculated economic yield of production was €8.11 (\$9.25) of transglutaminase obtained from €1 spent on substrate ingredients (economic yield of €8.11 of MTG/€ of nutrients) (Guerra-Rodríguez and Vázquez 2014).

In the first phase of enzyme isolation, the microorganism cells are removed using methods such as centrifugation, ultrasound, or filtration to eliminate insoluble components. It is important to note that most industrial enzymes are extracellular, meaning that they are secreted into the culture medium by the cells. The enzymes are then concentrated and purified by membrane filtration or ion exchange chromatography. Depending on market requirements, different types of enzymes are available in crystalline (granular) form or in solution (Niyonzima et al. 2020; Fasim et al. 2021).

Modern optimisation of the fermentation medium has become indispensable for the efficient production of enzymes on an industrial scale. The traditionally used one-factor-at-a-time (OFAT) method, in which the ingredients are tested individually, has proven to be time-consuming and error-prone (Di Masi et al. 2024). Modern approaches based on advanced statistical and mathematical tools have significantly accelerated this process, enabling maximisation of efficiency while reducing the number of experiments (Singh et al. 2017).

Researchers now use multivariate optimisation models such as Plackett-Burman (Ma et al. 2016), Taguchi (Freddi and Salmon 2019), central composite design (CCD) (Bayuo et al. 2020), and Box-Behnken (Kolotylo et al. 2024b), which allow for the screening of key factors

and the analysis of their interactions. The introduction of methods such as response surface methodology (RSM) (Ma et al. 2016; Bayuo et al. 2020; Kolotylo et al. 2024b), artificial neural networks (ANN) (Agatonovic-Kustrin and Beresford 2000), and genetic algorithms (GA) (Al-Saadi and Al-Jabri 2020) has enabled the prediction of optimal conditions by combining variables such as pH, temperature, humidity, carbon and nitrogen sources, and mineral proportions. These methods reduce optimisation time and provide accurate predictions of the effectiveness of different configurations of environmental conditions and ingredients. RSM is one of the most widely used methods, as evidenced by its effectiveness in optimising biotechnological parameters (Fasim et al. 2021).

Response surface methodology (RSM) is widely used in biotechnology to optimise the production processes of various enzymes and has remained a current and valued tool over the years. For example, using RSM made it possible to increase the yield of protease produced by the *Bacillus subtilis* K-5 strain by optimising fermentation conditions such as temperature, pH, and substrate moisture (Shad et al. 2024). Similarly, in the case of lipase produced by *Candida rugosa* NCIM 3462, RSM allowed the composition of a medium containing cheese whey to be optimised, resulting in increased enzyme activity (Rajendran and Thangavelu 2013). In another study, using RSM for the production of protease by *Bacillus subtilis* GCU-8 made it possible to identify key factors affecting the enzyme's efficiency, which enabled precise regulation of fermentation process parameters (Adnan et al. 2014). Another example is the synthesis of α -amylase by *Trichoderma virens* DMS1963, where the use of RSM optimised the conditions for solid-state fermentation using watermelon peels as a substrate, which significantly improved the enzyme production yield (Abdel-Mageed et al. 2022). These examples emphasise the versatility and effectiveness of RSM in improving biotechnological processes related to the production of various enzymes.

In conclusion, microbial transglutaminase is a key biotechnological enzyme with a wide range of applications, both in the food industry and in other fields (Duarte et al. 2019). Thanks to advanced fermentation methods and optimised production conditions, it is possible to achieve high enzyme yields at relatively low costs, which is achieved, among other things, through the use of waste components of microbiological substrates. The use of these cheap and easily accessible raw materials not only lowers production costs but also contributes to sustainable development by reducing industrial waste. This approach supports the concept of the circular economy while increasing the economic efficiency of biotechnological processes. Further research into transglutaminase and its commercialisation potential is an important step towards industrial development and improving the quality of food products on a wider scale.

The aim of this study was to obtain a microbiological transglutaminase (MTG) preparation with high enzymatic activity using a bioreactor culture of the *Streptovorticillium cinnamoneum* KKP 1658 strain. The research aimed to optimise fermentation conditions such as pH, temperature, medium composition, and nitrogen sources in order to increase the efficiency of the enzyme production process. In addition, the biochemical properties of MTG were determined, including optimal temperature, thermostability, and pH stability, which allows for a better understanding of the enzyme's application potential in the biotechnology industry.

Material and methodology

Biological material

The *Streptovorticillium cinnamoneum* KKP 1658 strain came from the pure culture collection of the Department of Microbiology and Food Biotechnology at the Warsaw University of Life Sciences. The tested strain was stored at -80°C . The cells were suspended in TSB (tryptone soy broth) with 20% glycerol.

Preparation of medium and yeast cultures in a bioreactor

The biomass of the *Streptovorticillium cinnamoneum* KKP 1658 strain was obtained by inoculating the microorganism into 100 ml of TSB medium (casein peptone 17 g/L, soy peptone 3 g/L, NaCl 5 g/L, K_2HPO_4 2.5 g/L, glucose 2.5 g/L) with a pH of 7 and incubated for 72 h at 28°C and 160 rpm on an incubator shaker (Eppendorf Innova 44 Incubator Shaker). Then, in order to continue the growth, 30 mL of the previously prepared culture was added to 270 mL of fresh TSB medium in three repetitions.

A total of 2700 mL of MTG test substrate was prepared, containing ingredients such as soluble starch (20 g/L), the peptone-based nutrient Aminobak (10 g/L), corn steep liquor (10 g/L), yeast extract (2 g/L) and mineral salts ($\text{KH}_2\text{PO}_4 - 2 \text{ g/L}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} - 2 \text{ g/L}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 1 \text{ g/L}$), in variants with pH 5.5, 6.0, and 6.5 and nitrogen source content of 1%, 2%, and 4% (as the sum of corn steep liquor and Aminobak in a 1:1 ratio). The medium was sterilised in an autoclave (121°C , 15 min; Hirayama, Japan) and then inoculated into the bioreactor with a 24-h inoculum. The cultures were maintained at 28°C with stirring at 200 rpm and aeration using compressed air at a flow rate of 2.0 vvm. Samples for the transglutaminase activity analysis were taken after 24, 48, and 72 h of cultivation.

Biomass yield determination

The biomass yield of *S. cinnamoneum* KKP 1658 was determined after centrifuging (Eppendorf 5810 Centrifuge, Germany) (4500 rpm; 10 min) 30 mL of culture liquid in dry, previously weighed falcons. The supernatant was separated to determine the transglutaminase activity, and the sediment was dried (SML Zamed dryer, Poland) at 80 °C until a constant weight was obtained. The biomass yield after centrifugation and drying in three repetitions was calculated per 1 L of substrate and expressed in grams of dry matter ($\text{g}_{\text{d.m.}}/\text{L}$).

Transglutaminase activity determination

The enzymatic activity of transglutaminase was determined using the commercial Microbial Transglutaminase Assay Kit Art. No. Z009 (Zedira GmbH, Darmstadt, Germany). The kit uses the substrate Z-Gln-Gly (N2-[(phenylmethoxy)carbonyl]-L-glutaminyl-glycine, $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_6$) as an amine acceptor and hydroxylamine as an amine donor. In the presence of MTG, the hydroxylamine reacts with the Z-Gln-Gly substrate to form Z-glutamyl-hydroxamic acid glycine, which forms a coloured complex with iron (III), detected spectrophotometrically (BIO-RAD SmartSpec 3000 spectrophotometer, Poland) at a wavelength of 525 nm.

Protein precipitation

Ammonium sulphate (Chempur, Poland) was used to precipitate proteins from the culture fluid. A sample of the culture fluid was placed on a magnetic stirrer under refrigeration, keeping it on ice. Then, a saturated solution of ammonium sulphate ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ with a concentration of 750 g/L was added in such a way as to obtain a final salt concentration of 10% in the sample. The sample was incubated in ice for about 2 h, which allowed for adequate protein precipitation.

After incubation, the sample was centrifuged for 15 min at 10,000 rpm (Eppendorf, Germany), and the supernatant was removed. The pellet was washed with cold 90% acetone, centrifuged again, the liquid was removed, and the pellet was dried. Then, the sediment was suspended in a sterile 50 mM citrate-phosphate buffer with a pH of 5.6, using a volume equal to that which was taken at the beginning (Duong-Ly and Gabelli 2014).

Determination of protein content

The Lowry method et al. (1951) was used to determine the concentration of enzymatic proteins in protein sludge

and supernatant. It is based on the presence of peptide bonds, cysteine, and aromatic amino acids (tyrosine and tryptophan) in proteins.

The following was used to prepare the copper reagent: solution A: 2% sodium carbonate solution in 0.1 M NaOH, solution B: 2% aqueous solution of sodium potassium tartrate, solution C: 1% aqueous solution of copper (VI) sulphate pentahydrate.

The solutions were mixed in a ratio of 98 mL A/1 mL B/1 mL C. Then, 1 mL of the test sample or water (control sample) was mixed with 5 mL of the copper reagent. After 10 min, 0.5 mL of Folin-Ciocalteu reagent was added. The samples were incubated for 30 min at room temperature, after which the absorbance was measured at 750 nm in relation to the blank sample. The measurement was carried out three times for each sample.

Standard albumin solutions with concentrations ranging from 100 to 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were prepared. The absorbance was measured at a wavelength of 750 nm, with three parallel measurements for each concentration. Based on the averaged results, a regression equation was calculated, showing the dependence of absorbance on protein concentration.

Concentration and purification of transglutaminase

After centrifuging the culture fluid from the bioreactor culture, the obtained supernatant was partially purified by ultrafiltration. A Sartorius Vivaflow 200 system (Sartorius AG, Germany) with a PES (polyethersulfone) membrane with a molecular weight cut-off (MWCO) of 100 kDa and a filtration area of 200 cm^2 was used. The process was carried out according to the manufacturer's instructions at a temperature of approximately 4 °C and an operating pressure of up to 3 bar. Filtration was carried out until approximately 1/10 of the culture volume remained.

Determination of the enzyme's molecular weight

The molecular weight of the enzyme was estimated using the SDS-PAGE method. The electrophoresis was carried out on a polyacrylamide gel with a composition of 10% (separating gel) and 3% (thickening gel). Protein samples with a volume of 25–50 μL were mixed in a 2:1 ratio with reducing buffer and heated to 100 °C for 5 min (Eppendorf, Thermomixer Comfort). Electrophoresis was carried out at a constant current of 40 mA for 60 min (Bio-Rad PowerPac Universal), and the proteins were visualised by staining with Coomassie Blue R-250, compared with reference proteins of known molecular weights (Broad Range Bio-Rad).

Determination of thermostability and pH stability of the enzyme

To evaluate the thermostability of microbial transglutaminase, the enzyme was incubated for 2 h at temperatures ranging from 20 to 55 °C in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0). After incubation, the residual activity was measured under standard assay conditions. Relative activity (%) was calculated based on the highest observed average activity.

pH stability was assessed in a similar manner: the enzyme was incubated for 2 h at 28 °C in buffers with a pH range of 4.0–9.0, followed by activity measurement. The results were expressed as residual activity (%) relative to the maximum.

Determination of time-dependent enzyme stability

The time-dependent stability of the microbial transglutaminase was tested by incubating it at 28 °C (Binder, Germany) for various lengths of time, from 30 to 300 min, in 50 mM phosphate buffer at pH 7.0. The results were expressed as residual activity (%) relative to the maximum.

Analytical methods

The Box-Behnken experimental design was used to optimise the parameters affecting the production of microbial transglutaminase, which takes into account three levels of three different variables. The process of statistical analysis, experiment design, and model creation was carried out using Statistica software version 13.1. The significance of differences between the mean values in individual groups was verified using the Tukey HSD test at the significance level $\alpha = 0.05$.

Results

Optimising biotechnological processes is key to increasing the production efficiency of enzymes such as microbial transglutaminase. Precisely adjusting the parameters of microorganism cultivation makes it possible to achieve higher enzyme activity and improve the quality of the final product (Marin-Sanguino et al. 2007; Kolotylo et al. 2024b). Current research is focussing on optimising MTG production using non-genetically modified strains.

Table 1 Values of coded levels used for the experimental design

Factors (independent variables)	Symbols	Actual levels of coded factors		
		−1	0	1
Dose of nitrogen (%)	A	1	2	4
Time (h)	B	24	48	72
Initial pH	C	5.5	6	6.5

Optimisation of conditions for the microbial production of transglutaminase on a bioreactor scale

Initial research on optimising MTG production by the *Streptovorticillium cinnamoneum* KKP 1658 strain was carried out on a laboratory scale, using a working volume of 100 mL of substrate (Kolotylo et al. 2024a, 2024b). This article focuses on transferring the process of producing microbial transglutaminase to a bioreactor scale with a working volume of 3 L, while maintaining the same process parameters optimised on a laboratory scale.

Table 1 shows selected ranges of nitrogen doses (A), culture duration (B), and initial pH (C), which have been coded as −1, 0, and 1, where −1 corresponds to the minimum value of the range and 1 to the maximum value of the range used in the present work.

To optimise the conditions for production of transglutaminase by the *Streptovorticillium cinnamoneum* KKP 1658 strain, an experiment based on a fractional three-factor design according to Box-Behnken methodology was carried out, taking into account three experimental factors (Table 1). The study involved 15 bioreactor cultures, comprising 12 different combinations of variables and 3 replicates at the central point. The choice of three variables—nitrogen source dose, initial pH, and culture time—was based on previous preliminary studies conducted in shake flasks (Kolotylo et al. 2024a, 2024b), which showed their significant influence on microbial transglutaminase production by *Streptovorticillium cinnamoneum* KKP 1658. Based on the experimental data obtained, coefficients were determined for the quadratic model, and response surface plots were used to visualise the influence of individual factors (Fig. 1). The results of the experiment according to the Box-Behnken design are summarised in Table 2.

The regression coefficients were calculated and the fitted equations for predicting transglutaminase activity (X) are given below:

$$X = 230.26 - 96.66 \times A + 8.31 \times A^2 - 68.48 \times C + 5 \times C^2 + 24.98 \times A \times C - 1.53 \times A \times C^2 - 1.32 \times A^2 \times C + 0.06 \times B \times A - 0.01 \times B \times A^2 + 0.05 \times B \times C - 14.67 \quad (1)$$

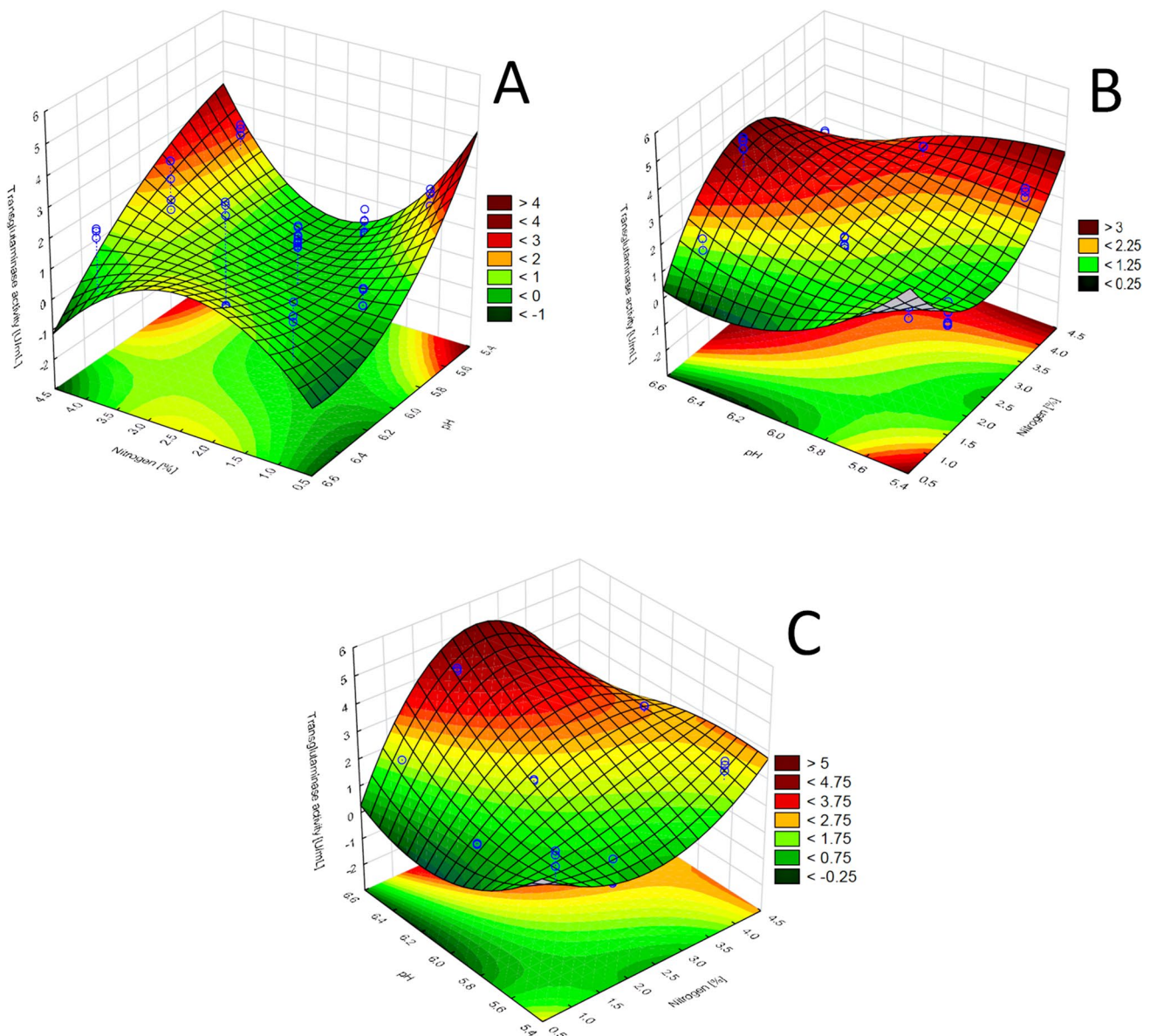


Fig. 1 Response surface for MTG production by *Streptovercillium cinnamoneum* KKP 1658 after. **A** 24 h of culture, **B** 48 h of culture, and **C** 72 h of culture. The interaction between dose of nitrogen and initial pH

where *A* is the nitrogen dose, *B* is the cultivation time, and *C* is the initial pH of the cultivation.

The predicted values, determined on the basis of the above equation, showed very good agreement with the experimental results (Fig. 2). This confirms the usefulness of the quadratic model used in the current experimental conditions.

The suitability of the experimental model for the results of transglutaminase activity was evaluated based on the coefficient of determination R^2 . The R^2 value of 95.34% (Table 3) indicates that the model is able to explain more than 95% of the total variability of the results. According to Jiang (2010), regression models with a coefficient of determination

exceeding 0.9 (90%) are characterised by a very high correlation. To assess the significance of the factors in the model, a significance level of $\alpha=0.05$ was used; *p*-values exceeding this threshold were considered non-significant, while values below it indicated significance (Table 3).

The influence of individual components of Eq. (1) and their mutual interactions (linear and quadratic) was illustrated using a Pareto chart, taking into account the standardised values of the Student's *t*-test and a significance threshold of 0.05 (Fig. 3).

Pareto chart analysis indicates that the quadratic interaction between nitrogen dose and culture time (A^2B) exerted the key effect on microbial transglutaminase

Table 2 Box-Behnken design with actual and coded levels of variables and actual values of responses

Run number	Nitrogen (%)	pH	Time (h)	Transglutaminase activity (U/mL)
1	1	5.5	48	2.096 ±0.29
2	1	6.5	48	1.518 ±0.32
3	4	5.5	48	2.568 ±0.18
4	4	6.5	48	2.179 ±0.16
5	2	5.5	24	0.236 ±0.06
6	2	6.5	24	1.081 ±0.05
7	2	5.5	72	0.800 ±0.23
8	2	6.5	72	4.185 ±0.22
9	1	6	24	0.090 ±0.01
10	4	6	24	1.371 ±0.33
11	1	6	72	0.643 ±0.03
12	4	6	72	2.786 ±0.34
13	2	6	48	1.524 ±0.11
14	2	6	48	1.518 ±0.19
15	2	6	48	1.940 ±0.17

(MTG) activity, which suggests the importance of non-linear relationships in process optimisation. This result emphasises that both the level of the nitrogen dose and the incubation time significantly determine the efficiency of enzyme production, and their appropriate adjustment is crucial for obtaining high enzymatic performance. The quadratic factor indicates the most significant impact of the middle level of the nitrogen source dose (2%). In

contrast, the linear factor B indicates that the impact of this factor on transglutaminase production increases with the extension of the culture time (72 h). Another critical factor is the pH (C), which showed a powerful linear impact on MTG activity. A high initial pH level (6.5) significantly affects MTG production among the tested acidity ranges. This confirms previous studies, which indicated the necessity of precise pH level adjustment to ensure optimal conditions for enzymatic reactions.

A significant effect was also recorded for the linear factor of the nitrogen dose (A) and the interaction between pH and culture time (BC), indicating these parameters' mutual interaction in the fermentation process. It is worth emphasising that these interactions, although less significant than A^2B and C, still have a noticeable effect on enzyme activity and should not be ignored in further optimisation steps.

Less significant factors, such as culture time (B) and the interaction of nitrogen dose with time (AB), had a limited impact on process efficiency, which suggests that their precise regulation may not be critical. Nevertheless, it should be noted that the low significance of these variables may be the result of specific experimental conditions and should be verified in further studies.

In conclusion, optimisation of the MTG production process should focus primarily on fine-tuning the pH level and understanding and controlling the non-linear interactions between nitrogen dose and cultivation time. Focusing on these key variables can significantly increase enzymatic efficiency while reducing the need for excessive control of less influential factors. These results provide valuable

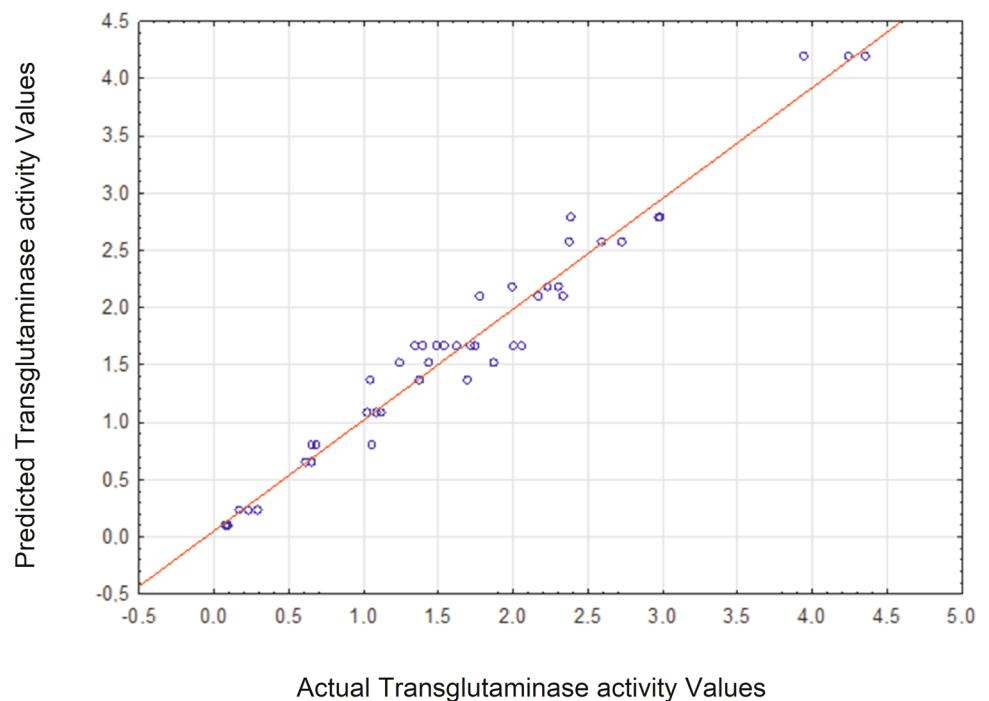
Fig. 2 Predicted vs. actual values for transglutaminase activity

Table 3 Analysis of variance for response surface quadratic model obtained from experimental results

Source	Sum of squares	df	Mean square	F-value	p-value
A	4.85121	2	2.42560	47.2529	<0.0001
B	1.73756	2	0.86878	16.9246	<0.0001
C	12.59189	2	6.29595	122.6508	<0.0001
AB	12.12454	3	4.04151	78.7324	<0.0001
AC	1.64139	2	0.82069	15.9878	<0.0001
BC	4.83664	1	4.83664	94.222	<0.0001
Pure total	1.64263	32	0.05133	-	-
Core total	48.51435	44	-	-	-
R ²	0.9534	-	-	-	-

guidance for further improving the fermentation process on a larger industrial scale.

Analysis of the influence of breeding parameters on enzyme activity

A–C show three-dimensional response surface plots developed from the predictive quadratic model. In the surface plots, the interaction between pH and nitrogen concentration was analysed at three fixed levels of cultivation time: 24 h (Fig. 1A), 48 h (Fig. 1B), and 72 h (Fig. 1C). This approach allows for the evaluation of two-factor interactions while keeping the third factor constant, in accordance with multifactorial experimental design principles. The graph showing

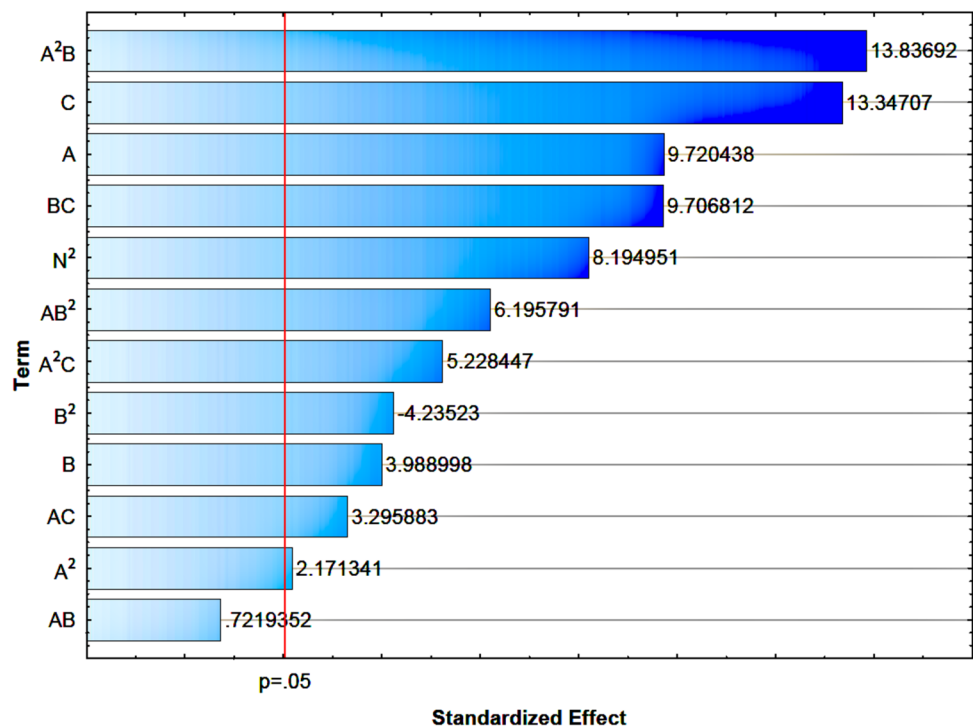
the surface area after 24 h of bioreactor cultivation (Fig. 1A) shows that the highest enzymatic activity is achieved at a low pH (approximately 5.5–6) and higher nitrogen doses in the 3–4% range. In this phase of enzyme cultivation, lower pH values seem to favour more intensive transglutaminase activity (approximately 4 U/mL), which suggests the necessity of precise pH control in the early stages of fermentation.

The graph of the response surface area after 48 h of cultivation (Fig. 1B) indicates that the optimal conditions for maximum enzyme activity (approximately 4 U/mL) shift towards a higher pH (approximately 6.0–6.5) while maintaining relatively high nitrogen doses (2–4%). Areas of low enzyme activity (< 1.25 U/mL) are visible at low pH and low nitrogen concentration, emphasising these parameters' key role in the later phases of cultivation. In this stage, enzyme activity increases as environmental conditions such as pH and nutrient availability stabilise.

The response surface plot after 72 h of culture (Fig. 1C) shows the highest transglutaminase activity (approximately 5 U/mL), achieved at a pH of roughly 6.5 and nitrogen doses close to 3%. During this time, the enzyme reaches its maximum activity, which is consistent with the trends observed in the previous stages. It is also worth noting that low pH (below 6.0) and lower nitrogen doses (below 2%) result in a marked decrease in enzyme activity, which may indicate a limited ability of cells to produce the enzyme effectively under such conditions.

To summarise, the results indicate that the key parameters affecting transglutaminase activity are pH and nitrogen

Fig. 3 Pareto chart of standardised effect (response is transglutaminase activity (U/mL)). **A** The nitrogen dose, **B** the cultivation time, and **(C)** the initial pH of the cultivation



dosage, and their significance varies depending on the culture time. The analysis shows that the optimal conditions for enzyme production include a pH of approximately 6.5, a nitrogen dose of 2.5–3% and 72 h of cultivation.. This combination of parameters allows for maximum enzyme activity, as confirmed by the experimental data obtained.

Verification of optimal culture conditions in the bioreactor

Taking the results obtained into account, the optimal cultivation conditions were defined as a pH of 6.5, a nitrogen dose of 2.75% (a combination of Aminobak and corn steep liquor in a 1:1 ratio, according to our preliminary studies Kolotylo et al. 2024a, 2024b), and a 72-h cultivation time. These conditions were selected based on the analysis of the response surface plots, which allowed us to identify a stable operating range rather than relying solely on the mathematical output of the model. The next stage was to carry out the cultivation using the selected optimal parameters and obtain the enzyme, which, after precipitation from the culture fluid, was subjected to further research (molecular weight, thermostability, and pH stability) (Table 4). The process of precipitating proteins from a solution is based on the use of a precipitating agent that destabilises the protein molecules. Adding this agent removes the stabilising shell of water dipoles, which exposes hydrophobic regions in the protein molecules. As a result, they become less soluble, which promotes their aggregation and precipitation from the solution (Goldring 2019).

The analysis of the culture fluid showed that after 72 h of incubation, the biomass yield of *S. cinnamoneum* KKP 1648 was 14.62 ± 0.56 g/L, and transglutaminase activity after centrifugation was 4.29 U/mL, with a protein content of 6.17 mg/mL. The predicted transglutaminase activity, determined based on a response surface modelling (RSM) method, was 4.47, with a 95% confidence interval ranging from 4.18 to 4.76 (Table 5). The experimentally observed value of 4.29 fell within this range, indicating satisfactory agreement between the model predictions and the experimental results. These results confirm the reliability of the

Table 5 Validation of the RSM model for transglutaminase activity estimation

Parameter	Predicted value	Observed value	95% Confidence interval
Activity MTG [U/mL]	4.47	4.29	4.18–4.76

developed model for estimating transglutaminase activity under the tested conditions.

After the ultrafiltration process (Sartorius Vivaflow 200, MWCO 100 kDa), the enzyme activity increased to 10.87 U/mL, and the specific activity increased from 0.7 to 1.2 U/mg. The highest parameter values were achieved after precipitation of proteins with ammonium sulphate. After this process, the MTG activity was 22 U/mL, which translated into the highest specific activity of 1.64 U/mg.

The use of ultrafiltration and protein desalting processes improved the activity and purity of the obtained microbial transglutaminase, which was an essential step for further analyses of the enzyme preparation.

Properties of the isolated transglutaminase

The isolated transglutaminase showed a clear single protein band in the SDS-PAGE analysis (Fig. 4A, File 1S). The molecular weight of the protein was estimated at 43 kDa based on its electrophoretic mobility compared to the standard proteins used. Although ultrafiltration significantly increased MTG activity, SDS-PAGE analysis revealed the presence of small bands below 20 kDa, suggesting the presence of residual contaminants. This may affect the accuracy of the specific activity estimate, and further purification using lower MWCO membranes is recommended to improve the purity of the resulting enzyme.

For the next part of the study, the obtained transglutaminase (stored at -80°C) with an activity of 22 U/mL was thawed and diluted with a citrate-phosphate buffer to obtain a larger volume of enzyme for the experiments. After dilution with buffer, a transglutaminase solution with an activity of 3.20 ± 0.23 U/mL was obtained. The time-dependent stability of the tested transglutaminase was evaluated by

Table 4 Results of post-culture fluid analysis

Factors	Activity MTG (U/mL)	Protein content (mg/mL)	Specific enzyme activity (U/mg)	Purification fold	Recovery* (%)
Culture fluid (72 h)	4.29 ± 0.08	6.17 ± 0.61	0.70	1.00	100
Fluid after ultrafiltration	10.87 ± 0.15	9.09 ± 0.71	1.20	1.71	253
Proteins precipitated with ammonium sulphate	22.0 ± 0.05	13.40 ± 0.31	1.64	2.34	513

*Due to concentration effects during ultrafiltration and precipitation, the activity values are expressed per 1 mL of sample. The actual recovery rate may vary depending on the final volume of the fractions

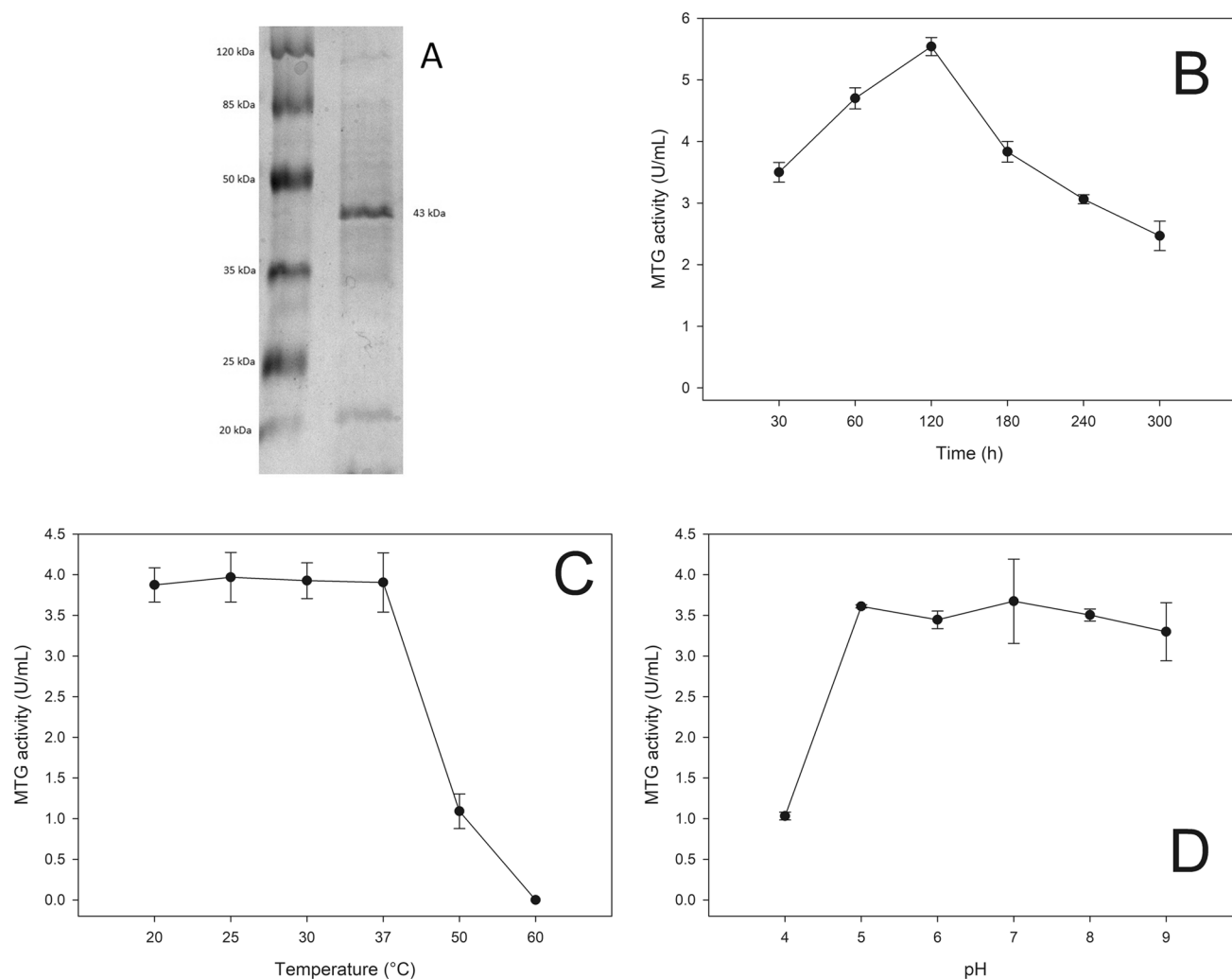


Fig. 4 Biochemical characteristics of transglutaminase. **A** SDS-PAGE of purified transglutaminase from *Streptovorticillium cinnamomeum* KKP 1658, **B** effect of time-dependent stability on the trans-

glutaminase activity, **C** results of determination of the thermostability of transglutaminase, and **(D)** pH stability on the activity of transglutaminase

incubation at 28 °C for 300 min (Fig. 4B). The enzyme activity reached its maximum value after 120 min of incubation (5.54 U/mL), while significant decreases in activity were observed at the end of the experiment—after 240 min. The obtained results indicate high stability of the obtained enzyme from the tested strain *S. cinnamomeum* KKP 1648.

The thermostability of enzyme activity was then determined after incubating the transglutaminase solution for 2 h at temperatures between 20 and 60 °C (Fig. 4C). The tested enzyme showed a wide range of thermostability, as a similar average enzyme activity (3.87–3.97 U/mL) was obtained in the range of 20–37 °C. A significant reduction in the activity of the tested transglutaminase occurred at 50 °C, with a decrease in activity by 75% (1.09 U/mL) compared to the results for the temperature range of 20–37 °C. The temperature of 60 °C completely deactivated the tested enzyme. Interestingly, MTG activity increased during the first 120

min of incubation, which may indicate a transient effect of thermal activation. This behaviour is atypical for bacterial transglutaminases but was previously observed in the studies of De Souza et al. (2009). Authors showed that transglutaminase isolated from *Bacillus circulans* shows increased enzymatic activity after short-term heating at 40–45 °C before its thermal inactivation begins. This is explained by possible conformational changes of the enzyme leading to better access to the active site. Similar behaviour was observed in the present study, which may indicate a similar activation mechanism.

To evaluate the pH stability of transglutaminase, the enzyme was pre-incubated at 28 °C for 2 h in a citrate-phosphate buffer with a pH ranging from 4.0 to 9.0 (Fig. 4D). Transglutaminase was characterised by high residual activity in a wide pH range of 5.0–8.0 (3.45–3.67 U/mL). An acidic environment (below pH 5.0) drastically reduced the enzyme

activity to 1.03 U/mL (70% of the activity at pH 5.0), compared to a basic pH, where a mild decrease in activity (3.3 U/mL) was observed in a buffer at pH 9.0. The highest residual activity was observed after incubation in buffer at a pH of 7.0, where it reached an average value of 3.67 U/mL.

Discussion

Industrial-scale MTG production is mainly carried out in bioreactors, which provide precise control over fermentation conditions. Bioreactors allow constant culture parameters to be maintained, which is crucial for obtaining a high enzyme yield. In this study, optimisation of the bioreactor culture conditions of *Streptovorticillium cinnamoneum* KKP 1658 was carried out in order to increase the production of transglutaminase. The maximum transglutaminase activity (4.29 U/mL) was obtained at pH 6.5, a nitrogen dose of 2.75%, a culture time of 72 h, and a stirring speed of 200 rpm. In the study by Zilda et al. (2017), the optimal MTG production in the bioreactor for the *Streptomyces thioluteus* TTA 02 SDS 14 strain was achieved at a stirring speed of 150 rpm and an incubation time of 48 h. The optimal production conditions for MTG for *S. thioluteus* TTA 02 SDS 14 are pH 6.0 and 30 °C. It is worth noting that after the optimisation process, the researchers obtained a maximum transglutaminase activity of 0.135 U/mL.

Although the stirring speed was not included in the optimisation process for *S. cinnamoneum* KKP 1648, it plays an essential role in producing enzymes, including microbial transglutaminase. Mixing influences the oxygenation level of the culture, which is a critical factor in the growth of microorganisms and the biosynthesis of enzymes. As demonstrated in the study by Aidaroos et al. (2011), *Streptomyces hygroscopicus* WSH03-01 required intensive mixing at 500 rpm in a bioreactor to achieve optimal transglutaminase production after 72 h of incubation (71.75% increase in activity compared to the results before optimisation). *Streptomyces mobaraensis* achieved the highest enzymatic activity (3.2 U/mL) at a stirring speed of 200 rpm (Guerra-Rodríguez and Vázquez 2014). Lower stirring speeds can lead to an extended enzyme production time, which was observed at 100 rpm, when a longer incubation period was required to reach maximum transglutaminase activity in the study by Zilda et al. (2017). In the present research, although the stirring speed was not a variable in the optimisation model, the highest transglutaminase activity of approximately 5.0 U/mL was achieved after 72 h of cultivation at pH 6.5 and a nitrogen dose of 2.75%, as shown in the response surface plots. This value significantly exceeds the maximum activities reported for *S. mobaraensis* or *S. hygroscopicus*, indicating a high efficiency of enzyme biosynthesis in *S. cinnamoneum* KKP 1658 under the applied conditions. This

suggests that carefully adjusted medium composition and pH can partially compensate for the lack of aeration optimisation. Nevertheless, future work should consider including stirring speed in the design to verify its potential impact for *S. cinnamoneum* KKP 1648.

In a study on microbial transglutaminase, 200 bacterial strains were isolated from soil and wastewater samples, five of which showed the ability to synthesise the enzyme (Sorde and Ananthanarayan 2019). The highest activity was obtained for the strain *Bacillus nakamurai* NRRL B 41091 (B4), with 3.95 ± 0.04 U/mL, and *Bacillus subtilis* BCRC 10255 (C2), with 2.65 ± 0.17 U/mL, after optimisation of fermentation conditions. This represents an increase from the initial activities of 1.71 ± 0.2 U/mL and 1.61 ± 0.17 U/mL, for isolates B4 and C2, respectively. The maximum enzyme activity of strains B4 and C2 was obtained in a medium containing peptone (20 g/L), starch (20 g/L), yeast extract (2 g/L) and mineral salts ($\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 2 g/L, K_2HPO_4 – 2 g/L, KH_2PO_4 – 2 g/L). The optimal culture parameters included a pH of 6.5–7.5 for isolate B4 and 7.5 for C2, a temperature of 35 °C, and a stirring speed of 180 rpm. Maximum enzyme activity was achieved in the stationary growth phase, between 48 and 60 h of cultivation. The results confirm that environmental conditions are crucial for the effective production of MTG, and that appropriate optimisation can significantly increase the enzyme's efficiency. The cultivation of *S. cinnamoneum* KKP 1658 under similar pH (6.5) and nitrogen conditions resulted in a maximum enzyme activity of 5.0 U/mL after 72 h, as determined from the response surface plots. This activity surpasses the values reported for both *Bacillus* strains, indicating a higher production potential under the applied medium composition. Furthermore, thermostability and pH stability tests demonstrated that the enzyme retained high activity under a range of conditions. Maximum residual activity after 2-h incubation was observed at 25–30 °C (relative activity > 95%). pH stability analysis showed that the enzyme maintained > 90% relative activity in the range of pH 5.0–8.0, with a peak activity at pH 7.0 (3.67 U/mL). In time-dependent stability assays, transglutaminase activity increased within the first 2 h of incubation, reaching 5.54 U/mL, confirming the high functional stability of the enzyme and its suitability for extended processing conditions.

The pH stability range is a key factor influencing the microbiological activity of transglutaminase and its use in various biotechnological processes. As demonstrated by Macedo et al. (2011), transglutaminase produced by the strain *Streptomyces* sp. CBMAI 837 exhibits the highest activity in the pH range of 6.0–6.5, which is consistent with the results obtained in this study. However, it is worth noting that some strains may have different environmental requirements. For example, *Bacillus subtilis* produces transglutaminase with maximum activity at pH 8.2

(Suzuki et al. 2000). These differences are most likely due to the structural specificity of the enzyme and the optimal conditions for the growth of individual microorganisms. The results obtained in our study, indicating an optimal pH of 6.5 for *Streptovercillium cinnamoneum* KKP 1658, are consistent with previous reports on microbiological sources of transglutaminase. This emphasises the importance of precisely controlling this parameter in fermentation to achieve maximum enzyme activity.

The study by Sorde and Ananthanarayan (2019) showed that the optimal pH for the activity of transglutaminase produced by the two isolates, *Bacillus nakamurai* NRRL B 41091 (B4) and *Bacillus subtilis* BCRC 10255 (C2), was 6.0. The enzyme was stable over a wide pH range (5.0–9.0); however, the activity of MTG of strain B4 decreased rapidly in acidic conditions, while it was more stable in alkaline environments, which was the opposite of the observations for the isolate C2. The optimal pH for the activity of MTG for the *Streptomyces hygroscopicus* strain WSH03-13 was found to be in the range of 6.0–7.0, and this enzyme showed pH stability in the range of 5.0–8.0 (Cui et al. 2007).

The transglutaminase isolated in our study from *S. cinnamoneum* KKP 1648 was characterised by a pH stability similar to *B. nakamurai* NRRL B 41091 and *S. hygroscopicus* WSH03-13. MTG stability was observed in the pH range of 5.0–9.0, while an acidic environment (pH < 5.0) rapidly reduced the determined activity. The stability of transglutaminase strains B4 and C2 was maintained in the temperature range of 0–50 °C, after which there was a decrease in activity. In a study by Zilda et al. (2017), the transglutaminase obtained in a 2 L working volume bioreactor from the *Streptomyces thioluteus* TTA 02 SDS 14 strain was most active at 45–50 °C and at a pH of 6.0. In another study by Wan et al. (2017), the transglutaminase of the *Streptomyces hygroscopicus* H197 strain showed optimal activity at a pH of 6.0–8.0 and was most stable at 40 °C. The transglutaminase obtained from *Streptomyces* sp. CBMAI 837 showed optimal activity at 35–40 °C, and the enzyme was stable over a wide pH range (4.5–8.0) and up to 45 °C. In our study, MTG activity was maintained in the temperature range up to 40 °C, after which deactivation of the enzyme was observed (Fig. 4C). Cui et al. (2007) obtained similar results for the transglutaminase isolated from the soil strain *Streptomyces hygroscopicus* WSH03-13. The enzyme showed optimal activity at a temperature of 37–45 °C, and an increase in temperature above 50 °C completely deactivated the enzyme. These results emphasise the differences in the characteristics of enzymes produced by individual strains and their potential application in various industrial conditions. It is worth emphasising that the level of enzymatic activity of about 17% and 42% of MTG was maintained at 70 °C for isolates B4 and C2, respectively, while

the transglutaminase obtained in our research, originating from *S. cinnamoneum* KKP 1648, was found to be inactive at a temperature of 60 °C, which indicates higher thermostability of MTG produced by *Bacillus* bacteria.

In the present study, the molecular weight of the labelled transglutaminase was 43 kDa (Fig. 4A), which is consistent with the values reported for other microbiological transglutaminases. Data presented by Macedo et al. (2011) showed that the molecular weight of the enzyme was approximately 45 kDa, which is similar to the result obtained in this study. Jin et al. (2016) determined that the molecular weight of MTG-TX transglutaminase obtained from *Streptomyces mobaraensis* TX was 37.82 kDa based on the results of liquid chromatography and mass spectrometry. Zhang et al. (2012) determined the molecular weight of MTG isolated from *Streptomyces mobaraensis* DSM 40587 as 38 kDa using SDS-PAGE. Similar values were also recorded by Cui et al. (2007) and Yu et al. (2008), who determined the MTG mass to be 38 kDa. However, it is worth noting that molecular weight differences can result from interspecies differences, purification methods, and electrophoresis conditions. On the other hand, Wan et al. (2017) described an MTG mutant with an increased molecular weight of 67 kDa, which may suggest differences in the protein structure resulting from genetic modifications. The results confirmed that the molecular weight of transglutaminase may vary depending on the microbiological source and the method of its isolation and purification.

Many studies on microbiological transglutaminase have been published, but there is no established specific methodology for purifying this enzyme. According to Zhang et al. (2012), after separating the culture from the microbiological substrate by centrifugation or filtration, the supernatant is concentrated by ultrafiltration or salting out with solid ammonium sulphate or ethanol.

In order to increase the transglutaminase activity of *S. cinnamoneum* KKP 1658 and to increase the purity of the obtained enzyme preparation, the centrifuged culture fluid was subjected to ultrafiltration using the Sartorius Viva-flow 200 system with a molecular weight cut-off (MWCO) membrane of 100 kDa, which allowed the elimination of larger peptides and impurities. After this stage, the enzyme specificity was obtained at the level of 1.2 U/mg, which is an increase of 71.4% compared to the culture fluid. Then, to precipitate the transglutaminase, an ammonium sulphate fractionation process was carried out, leading to an increase of 134.3% (1.64 U/mg) compared to the value for the culture fluid (0.7 U/mg).

Ultrafiltration is often used as the first or intermediate step in the purification process for enzymes such as lipase (Ghutate et al. 2025), endo-pectinase (Krstić et al. 2007), phytase (Rodríguez-Fernández et al. 2013), xylose reductase (Krishnan et al. 2022), bromelain (Nor et al. 2017), lactase

(Anteck et al. 2019), dextranase (Flórez Guzman et al. 2018), and protease (Hemici et al. 2017). Ghutake et al. (2025) increased the production yield of raw lipase 2.29-fold by using ultrafiltration with a 5 kDa MWCO membrane for concentration. In the study by Özer et al. (2018), the efficiency of three methods of beta-lactoglobulin (β -Lg) isolation was compared in terms of purity, yield, and preservation of the native protein structure. The use of ultrafiltration with a 30 kDa MWCO membrane provided the highest degree of purification (43.6-fold increase over whey), far exceeding the results of ion exchange chromatography and hydrolysis with pepsin—a 6.6-fold and 1.4-fold increase over whey, respectively. The authors emphasised that ultrafiltration also preserved the native structure of β -Lg proteins and effectively eliminated high-molecular impurities, in this case bovine serum albumin or immunoglobulin. Yongsawatdigul and Piyadhamviboon (2007) studied sarcoplasmic proteins (SpC) from tilapia (*Oreochromis niloticus*), which contain a significant amount of transglutaminase. In their study, they used ultrafiltration with a 30 kDa MWCO membrane, which resulted in a 3.6-fold increase in the total transglutaminase activity of the SpC protein concentrate. It is worth noting that despite the increase in enzyme activity from 137 to 498.6 U/mL, the specific activity of the enzyme decreased from 16.4 to 14.4 U/mg, which may indicate that ultrafiltration only concentrates the SpC protein without increasing the purity of transglutaminase. Ultrafiltration is widely used for enzyme concentration and is considered a basic purification step (Rodríguez-Fernández et al. 2013). Combining ultrafiltration with other techniques (e.g. chromatography, immobilisation on synthetic resins) often increases the purification yield and the stability of the enzyme (Ghutake et al. 2025). This is confirmed by research on the purification of transglutaminase, in which alcoholic and sulphate protein precipitation, ultrafiltration, and gel chromatography were used, obtaining an enzyme with a specific activity of 107.86 U/mg. In addition, the purified enzyme showed high stability—its activity remained above 90% after 2 h of incubation at 40 °C, and the pH stability range was between 5.0 and 7.0.

Zhang et al. (2012) characterised the transglutaminase produced by *Streptomyces mobaraensis* DSM 40587. The preparation was purified using ultrafiltration (MWCO 30 kDa) combined with gel chromatography (Sephadex G-75) and high-performance chromatography (SP Sepharose). Due to the significant amount of magnesium chloride in the medium, the addition of ammonium sulphate would cause excessive precipitation of this salt. The authors also decided not to precipitate the ethanol enzyme, claiming a possible loss of transglutaminase activity. The specific activity of MTG in the culture fluid was determined to be 2.93 U/mg, which increased to 3.24 U/mg after the ultrafiltration process—an increase of 10.6%. The use of gel chromatography allowed us to obtain a specific activity of MTG of 8.14 U/

mg, while high-performance liquid chromatography resulted in 17.2 U/mg, which is an increase of 177.8 and 487.4%, respectively. Purified transglutaminase showed the highest activity at 55 °C and pH 6.0. The enzyme lost its activity at temperatures above 50 °C. It was stable for 12 h at a pH of 5.0 to 10.0 at 4 °C and for 30 min at a pH of 5.0 to 9.0 at 37 °C.

Jin et al. (2016) purified MTG from *S. mobaraensis* TX isolated from soil using ethanol precipitation, justifying their choice with the higher cost-effectiveness of the process compared to ultrafiltration. In the culture fluid, the specific activity of transglutaminase was found to be 1.75 U/mg, and after ethanol precipitation, a result of 7.02 U/mg was obtained (an increase of 301.1%). In the subsequent purification stages, a cation exchange chromatograph (AKTA Purifier) and a hydrophobic chromatograph (phenyl Sepharose column) were used, and the results obtained were 37.9 and 39.2 U/mg, respectively. Purified transglutaminase showed stability in a wide pH range of 5.0–10.0, with an optimal temperature of 45–50 °C.

The above results indicate that the use of multi-stage purification not only supports the concentration of the enzyme, but also allows it to be further processed without loss of activity, which is crucial in the development of stable enzyme preparations. The increase in specific activity obtained in this study after ultrafiltration (by 71.4%) and after precipitation with ammonium sulphate (134.3%) confirms the effectiveness of these enzyme purification methods, as also indicated by the examples of other studies described above. It is worth noting that despite the increase in transglutaminase activity from 4.29 to 22 U/mL, the maximum specific activity determined did not exceed 1.64 U/mg, which is insufficient compared to the results of 39.2 U/mg reported by Jin et al. (2016) and 17.2 U/mg by Zhang et al. (2012). In the future, the purification methods used in this study should be integrated with chromatographic methods to obtain competitive specific activity results.

Conclusion

The production process in a bioreactor allows for precise scaling of enzyme production and cost reduction, making it the preferred method for mass production. This study determined the optimal conditions for the microbial production of transglutaminase (MTG) by the *Streptovorticillum cinnamomeum* KKP 1648 strain under bioreactor conditions. Based on the results obtained, the optimal culture parameters were determined to be a pH of 6.5, a nitrogen dose of 2.75% (using Aminobak and waste corn steep liquor in a 1:1 ratio), and a culture time of 72 h. The agreement between the predicted and observed values confirms the correctness of the developed model and its usefulness

for predicting transglutaminase activity under the tested conditions. After the cultivation, the enzyme was isolated and subjected to further characterisation. In the conducted studies, after the ultrafiltration process, an increase in the specific activity of the enzyme by 71.4% was observed in relation to the cultivation fluid, which confirms this method's effectiveness in increasing the purity of the protein preparation. Further precipitation with ammonium sulphate resulted in a specific activity of 1.64 U/mg (an increase of 134.3% compared to the culture fluid).

Electrophoretic analysis showed that the tested transglutaminase has a molecular weight of 43 kDa, which is consistent with the values obtained for enzymes from other microbiological sources. In terms of time-dependent stability, the enzyme activity reached a maximum after 120 min of incubation at 28 °C (5.54 U/mL), but a significant decrease in activity was observed after 240 min. The enzyme studied had a wide range of thermostability (20–37 °C), with a significant decrease in activity at 50 °C (75% decrease). Complete inactivation of the enzyme occurred at 60 °C.

In terms of pH stability, the tested transglutaminase showed high activity in a wide pH range (5.0–8.0), reaching a maximum value at pH 7.0 (3.67 U/mL). In an acidic environment (pH < 5.0), a sharp decrease in activity was recorded (1.03 U/mL), while in an alkaline environment (pH 9.0), the decrease in activity was less pronounced (3.3 U/mL).

The results indicate that *S. cinnamoneum* KKP 1648 is an effective MTG producer in bioreactor conditions, and the optimised fermentation process allows obtaining an enzyme with stable properties in a wide range of temperatures and pH. It is worth emphasising that the use of waste corn steep liquor as a component of the culture medium contributed to the optimisation of the process. Future research should focus on the possibility of using even more waste raw materials as components of microbiological media, which would further reduce production costs and the environmental burden. Practical applications of the obtained transglutaminase in food technology should also be explored, especially in meat, bakery, and dairy products, where the enzyme can significantly improve the texture and quality of the final product.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00253-025-13606-y>.

Acknowledgements The part of research was carried out using the equipment purchased as part of the “Food and Nutrition Centre—modernization of the WULS campus to create a Food and Nutrition Research and Development Centre (CŻiŻ)” co-financed by the European Union from the European Regional Development Fund under the Regional Operational Programme of the Mazowieckie Voivodeship for 2014–2020 (Project No. RPMA.01.01.00-14-8276/17).

Author contributions VK: Writing – Original Draft, Conducted experiments, Investigation, Formal Analysis, AS: Formal Analysis, Statistical analysis, KP: Investigation, IG: Bioreactor operation, MK: Methodology, Writing-Review and Editing, Conceptualization, Investigation,

Formal Analysis, Resources, Supervision. All authors approved the final manuscript.

Data availability Data sharing is not applicable to this article as no datasets were generated or analysed during the current study.

Declarations

Ethical approval Not applicable.

Competing interests The authors declare no competing interests.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License, which permits any non-commercial use, sharing, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if you modified the licensed material. You do not have permission under this licence to share adapted material derived from this article or parts of it. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

References

- Abdel-Mageed HM, Barakat AZ, Bassuiny RI, Elsayed AM, Salah HA, Abdel-Aty AM, Mohamed SA (2022) Biotechnology approach using watermelon rind for optimization of α -amylase enzyme production from *Trichoderma virens* using response surface methodology under solid-state fermentation. *Folia Microbiol (Praha)* 67:253–264. <https://doi.org/10.1007/S12223-021-00929-2>
- Adnan A, Mehmood Z, Syed Q, Mushtaq Z (2014) Process optimization by response surface methodology for extracellular alkaline protease production from *Bacillus subtilis*. *Pak J Bot* 46:699–704
- Agatonovic-Kustrin S, Beresford R (2000) Basic concepts of artificial neural network (ANN) modeling and its application in pharmaceutical research. *J Pharm Biomed Anal* 22:717–727. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(99\)00272-1](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(99)00272-1)
- Aidaros HI, Du G, Chen J (2011) Microbial fed-batch production of transglutaminase using ammonium sulphate and calcium chloride by *Streptomyces hygroscopicus*. *Biotechnol Bioinf Bioeng* 1(2):173–178
- Akbari M, Razavi SH, Kieliszek M (2021) Recent advances in microbial transglutaminase biosynthesis and its application in the food industry. *Trends Food Sci Technol* 110:458–469. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2021.02.036>
- Al-Saadi SN, Al-Jabri KS (2020) Optimization of envelope design for housing in hot climates using a genetic algorithm (GA) computational approach. *J Build Eng* 32:101712. <https://doi.org/10.1016/J.JOBE.2020.101712>
- Ando H, Adachi M, Umeda K, Matsuura A, Nonaka M, Uchio R, Tanaka H, Motoki M (1989) Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. *Agric Biol Chem* 53:2613–2617. <https://doi.org/10.1080/00021369.1989.10869735>
- Antecka A, Blatkiewicz M, Boruta T, Górak A, Ledakowicz S (2019) Comparison of downstream processing methods in purification

- of highly active laccase. *Bioprocess Biosyst Eng* 42:1635–1645. <https://doi.org/10.1007/S00449-019-02160-3>
- Bayuo J, Abukari MA, Pelig-Ba KB (2020) Optimization using central composite design (CCD) of response surface methodology (RSM) for biosorption of hexavalent chromium from aqueous media. *Appl Water Sci* 10:1–12. <https://doi.org/10.1007/S13201-020-01213-3>
- Bellucci ERB, Munekata PES, Pateiro M, Lorenzo JM, da Silva Barretto AC (2021) Red pitaya extract as natural antioxidant in pork patties with total replacement of animal fat. *Meat Sci* 171:108284. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108284>
- Besser RR, Bowles AC, Alassaf A, Carbonero D, Claire I, Jones E, Reda J, Wubker L, Batchelor W, Ziebarth N, Silvera R, Khan A, MacIel R, Saporta M, Agarwal A (2020) Enzymatically crosslinked gelatin–laminin hydrogels for applications in neuromuscular tissue engineering. *Biomater Sci* 8:591–606. <https://doi.org/10.1039/C9BM01430F>
- Bianco A, Budroni M, Zara S, Mannazzu I, Fancello F, Zara G (2020) The role of microorganisms on biotransformation of brewers' spent grain. *Appl Microbiol Biotechnol* 104(20):8661–8678. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10843-1>
- Bzducha-Wróbel A, Pobiega K, Błażej S, Kieliszek M (2018) The scale-up cultivation of *Candida utilis* in waste potato juice water with glycerol affects biomass and $\beta(1,3)/(1,6)$ -glucan characteristic and yield. *Appl Microbiol Biotechnol* 102:9131–9145. <https://doi.org/10.1007/S00253-018-9357-Y>
- Ceresino EB, de Melo RR, Kuktaita R, Hedenqvist MS, Zucchi TD, Johansson E, Sato HH (2018) Transglutaminase from newly isolated *Streptomyces* sp. cbmai 1617: production optimization, characterization and evaluation in wheat protein and dough systems. *Food Chem* 241:403–410. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.09.010>
- Cui L, Du G, Zhang D, Liu H, Chen J (2007) Purification and characterization of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygroscopicus*. *Food Chem* 105:612–618. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2007.04.020>
- da Silva Ramos NJ, Rocha EBM, Gusmão TAS, Nascimento A, Lisboa HM, de Gusmão RP (2023) Optimizing gluten-free pasta quality: the impacts of transglutaminase concentration and kneading time on cooking properties, nutritional value, and rheological characteristics. *LWT* 189:115485. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2023.115485>
- De Souza CFV, Faccin DJL, Mertins O, Heck JX, Da Silveira NP, Secchi AR, Ayub MAZ (2009) Kinetics of thermal inactivation of transglutaminase from a newly isolated *Bacillus circulans* BL32. *J Chem Technol Biotechnol* 84:1567–1575. <https://doi.org/10.1002/JCTB.2201>
- Di Masi S, De Benedetto GE, Malitesta C (2024) Optimisation of electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers: from OFAT to machine learning. *Anal Bioanal Chem* 416:2261–2275. <https://doi.org/10.1007/S00216-023-05085-9>
- Duarte L, Matte CR, Bizarro CV, Ayub MAZ (2019) Review transglutaminases: part II—industrial applications in food, biotechnology, textiles and leather products. *World J Microbiol Biotechnol* 36:1–20. <https://doi.org/10.1007/S11274-019-2792-9>
- Duong-Ly KC, Gabelli SB (2014) Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation. *Methods Enzymol* 541:85–94. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00007-0>
- Fasim A, More VS, More SS (2021) Large-scale production of enzymes for biotechnology uses. *Curr Opin Biotechnol* 69:68–76. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2020.12.002>
- Flórez Guzmán GY, Hurtado GB, Ospina SA (2018) New dextranase purification process of the enzyme produced by *Leuconostoc mesenteroides* IBUN 91.2.98 based on binding product and dextranase hydrolysis. *J Biotechnol* 265:8–14. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2017.10.019>
- Freddi A, Salmon M (2019). Design Principles and Methodologies. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-95342-7>
- Ghutake S, Gharge V, Pawar H (2025) An efficient and industrially feasible process for purification and immobilization of orange-peel-based lipase for biocatalytic applications. *Biofuels Bioprod Biorefin* 19:420–436. <https://doi.org/10.1002/BBB.2725>
- Goldring JPD (2019) Concentrating proteins by salt, polyethylene glycol, solvent, SDS precipitation, three-phase partitioning, dialysis, centrifugation, ultrafiltration, lyophilization, affinity chromatography, immunoprecipitation or increased temperature for protein isolation. in: kurien b, scofield r (eds) electrophoretic separation of proteins. methods in molecular biology. Humana Press, New York, NY, pp 41–59
- Guerra-Rodríguez E, Vázquez M (2014) Evaluation of a novel low-cost culture medium containing exclusively milk, potato and glycerol for microbial transglutaminase production by *Streptomyces mobaraensis*. *Chem Eng Res Des* 92:784–791. <https://doi.org/10.1016/J.CHERD.2013.06.027>
- Heidebach T, Först P, Kulozik U (2009) Transglutaminase-induced caseinate gelation for the microencapsulation of probiotic cells. *Int Dairy J* 19:77–84. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2008.08.003>
- Hemici A, Benerbahi RS, Bendjedou D (2017) Purification and biochemical characterization of a 22-kDa stable cysteine- like protease from the excretory-secretory product of the liver fluke *Fasciola hepatica* by using conventional techniques. *J Chromatogr B* 1068:268–276. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2017.10.049>
- Jiang L (2010) Optimization of fermentation conditions for pullulan production by *Aureobasidium pullulan* using response surface methodology. *Carbohydr Polym* 79:414–417. <https://doi.org/10.1016/J.CARBOL.2009.08.027>
- Jin M, Huang J, Pei Z, Huang J, Gao H, Chang Z (2016) Purification and characterization of a high-salt-resistant microbial transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis*. *J Mol Catal B Enzym* 133:6–11. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCATB.2016.07.005>
- Keenan EK, Zachman DK, Hirschey MD (2021) Discovering the landscape of protein modifications. *Mol Cell* 81:1868–1878. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2021.03.015>
- Keillor JW, Clouthier CM, Apperley KYP, Akbar A, Mulani A (2014) Acyl transfer mechanisms of tissue transglutaminase. *Bioorg Chem* 57:186–197. <https://doi.org/10.1016/J.BIOORG.2014.06.003>
- Kieliszek M, Misiewicz A (2014) Microbial transglutaminase and its application in the food industry. A review. *Folia Microbiol (Praha)* 59:241–250. <https://doi.org/10.1007/S12223-013-0287-X>
- Kim SY, Keillor JW (2020) A precision strategy to cure renal cell carcinoma by targeting transglutaminase 2. *Int J Mol Sci*. <https://doi.org/10.3390/IJMS21072493>
- Kolotylo V, Piwowarek K, Kieliszek M (2023) Microbiological transglutaminase: biotechnological application in the food industry. *Open Life Sci* 18:20220737. <https://doi.org/10.1515/BIO-2022-0737>
- Kolotylo V, Piwowarek K, Kieliszek M (2024) Production of microbial transglutaminase by *Streptovorticillium cinnamomeum* KKP 1658. *EXCLI J* 23:655. <https://doi.org/10.17179/EXCLI2024-7033>
- Kolotylo V, Piwowarek K, Synowiec A, Kieliszek M (2024) Optimization of fermentation conditions for microbial transglutaminase production by *Streptovorticillium cinnamomeum* KKP 1658 using response surface methodology (RSM). *Folia Microbiol (Praha)* 70(1):259. <https://doi.org/10.1007/S12223-024-01223-7>
- Kot AM, Błażej S, Kieliszek M, Gientka I, Piwowarek K, Brzezińska R (2020) Production of lipids and carotenoids by *Rhodotorula gracilis* ATCC 10788 yeast in a bioreactor using low-cost wastes. *Biocatal Agric Biotechnol* 26:101634. <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2020.101634>

- Krishnan S, Nasrullah M, Kamyab H, Suzana N, Munaim MSA, Wahid ZA, Ali IH, Salehi R, Chairapat S (2022) Fouling characteristics and cleaning approach of ultrafiltration membrane during xylose reductase separation. *Bioprocess Biosyst Eng* 45:1125–1136. <https://doi.org/10.1007/S00449-022-02726-8>
- Krstić DM, Antov MG, Peričin DM, Höflinger W, Tekić MN (2007) The possibility for improvement of ceramic membrane ultrafiltration of an enzyme solution. *Biochem Eng J* 33:10–15. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2006.08.016>
- Li C, Wang CL, Sun Y, Li AL, Liu F, Meng XC (2016) Microencapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* GG by transglutaminase cross-linked soy protein isolate to improve survival in simulated gastrointestinal conditions and yoghurt. *J Food Sci* 81:M1726–M1734. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13337>
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- Ma L, Wang L, Tang J, Yang Z (2016) Optimization of arsenic extraction in rice samples by Plackett-Burman design and response surface methodology. *Food Chem* 204:283–288. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.02.126>
- Macedo JA, Sette LD, Sato HH (2011) Purification and characterization of a new transglutaminase from *Streptomyces* sp. isolated in Brazilian soil. *J Food Biochem* 35:1361–1372. <https://doi.org/10.1111/J.1745-4514.2010.00456.X>
- Marin-Sanguino A, Voit EO, Gonzalez-Alcon C, Torres NV (2007) Optimization of biotechnological systems through geometric programming. *Theor Biol Med Model*. <https://doi.org/10.1186/1742-4682-4-38>
- Marulo S, Sorrentino A, Ramondo A, Falciano A, Motti P, Di Pierro P, Masi P (2022) Enzymatic modification of proteins and peptides from oilseeds by-products. *Ital J Food Sci* 31:217–222
- Niyonzima FN, Veena SM, More SS (2020) Industrial production and optimization of microbial enzymes. In: Arora NK, Mishra J, Mishra V (eds) *Microbial enzymes: roles and applications in industries (Microorganisms for Sustainability)*. Springer, Singapore, pp 115–135. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1710-5_5
- Nor MZM, Ramchandran L, Duke M, Vasiljevic T (2017) Integrated ultrafiltration process for the recovery of bromelain from pineapple waste mixture. *J Food Process Eng* 40:e12492. <https://doi.org/10.1111/JFPE.12492>
- Özer E, Health ZÖ-F, 1818 U (2018) Comparison of different methods for beta lactoglobulin isolation. *Food Heal* 4:1–8. <https://doi.org/10.3153/JFHS18001>
- Preichardt LD, Haubert L, Sawitzki MC, Bertol TM, Vicenzi R, Meinhart AD, Da Silva WP, Fiorentini ÂM (2019) Multivariate optimization of staphylococcus xylosus AD1 biomass production using sugarcane molasses plus yeast extract and soybean meal. *Acta Sci - Biol Sci* 41. <https://doi.org/10.4025/ACTASCIBIOLSCI.V41I1.47487>
- Rajendran A, Thangavelu V (2013) Utilizing agricultural wastes as substrates for lipase production by *candida rugosa* NCIM 3462 in solid-state fermentation: response surface optimization of fermentation parameters. *Waste Biomass Valor* 4:347–357. <https://doi.org/10.1007/S12649-012-9140-8>
- Rodríguez-Fernández DE, Parada JL, Medeiros ABP, De Carvalho JC, Lacerda LG, Rodríguez-León JA, Soccol CR (2013) Concentration by ultrafiltration and stabilization of phytase produced by solid-state fermentation. *Process Biochem* 48:374–379. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2012.12.021>
- Roy Choudhury AK (2020) Introduction to enzymes. In: Nayak R (ed) *Sustainable technologies for fashion and textiles*. Woodhead Publishing, pp 75–90. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102867-4.00004-9>
- Shad AA, Ahmad T, Iqbal MF, Asad MJ, Nazir S, Mahmood RT, Wajeheh AW (2024) Production, partial purification and characterization of protease through response surface methodology by *Bacillus subtilis* K-5. *Braz Arch Biol Technol* 67:e24210355. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2024210355>
- Singh V, Haque S, Niwas R, Srivastava A, Pasupuleti M, Tripathi CKM (2017) Strategies for fermentation medium optimization: an in-depth review. *Front Microbiol* 7:227613. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.02087>
- Sorde KL, Ananthanarayan L (2019) Isolation, screening, and optimization of bacterial strains for novel transglutaminase production. *Prep Biochem Biotechnol* 49:64–73. <https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1536986>
- Suzuki S, Izawa Y, Kobayashi K, Eto Y, Yamanaka S, Kubota K, Yokozeki K (2000) Purification and characterization of novel transglutaminase from *Bacillus subtilis* spores. *Biosci Biotechnol Biochem* 64:2344–2351. <https://doi.org/10.1271/BBB.64.2344>
- Taghi Gharibzadeh SM, Koubaa M, Barba FJ, Greiner R, George S, Roohinejad S (2018) Recent advances in the application of microbial transglutaminase crosslinking in cheese and ice cream products: a review. *Int J Biol Macromol* 107:2364–2374. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.10.115>
- Tokay FG, Alp AC, Yerlikaya P (2021) Production and shelf life of restructured fish meat binded by microbial transglutaminase. *LWT* 152:112369. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.112369>
- Vasić K, Knez Ž, Leitgeb M (2023) Transglutaminase in foods and biotechnology. *Int J Mol Sci* 24:12402. <https://doi.org/10.3390/IJMS241512402>
- Vasić K, Knez Ž, Leitgeb M (2024) Immobilization of transglutaminases and transglutaminase as immobilization agent. In: Simpson BK, Zhang Y (eds) *Fundamentals and applications*. Academic Press, Transglutaminase, pp 293–332. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-19168-8.00007-9>
- Wan W, He D, Xue Z, Zhang Z (2017) Specific mutation of transglutaminase gene from *Streptomyces hygroscopicus* H197 and characterization of microbial transglutaminase. *J Biosci* 42:537–546. <https://doi.org/10.1007/S12038-017-9707-4>
- Wu Z, Liu C, Zhang Z, Zheng R, Zheng Y (2020) Amidase as a versatile tool in amide-bond cleavage: from molecular features to biotechnological applications. *Biotechnol Adv* 43:107574. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2020.107574>
- Yongsawatdigul J, Piyadhamviboon P (2007) Gel-enhancing effect and protein cross-linking ability of tilapia sarcoplasmic proteins. *J Sci Food Agric* 87:2810–2816. <https://doi.org/10.1002/JSFA.2993>
- Yu YJ, Wu SC, Chan HH, Chen YC, Chen ZY, Te YM (2008) Overproduction of soluble recombinant transglutaminase from *Streptomyces netropsis* in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 81:523–532. <https://doi.org/10.1007/S00253-008-1688-7>
- Zhang L, Zhang L, Yi H, Du M, Ma C, Han X, Feng Z, Jiao Y, Zhang Y (2012) Enzymatic characterization of transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* DSM 40587 in high salt and effect of enzymatic cross-linking of yak milk proteins on functional properties of stirred yogurt. *J Dairy Sci* 95:3559–3568. <https://doi.org/10.3168/JDS.2011-5125>
- Zilda DS, Fawzya YN, Nur'amaliyah LS, Prestisia HN, Mubarik NR, Lisdiyanti P (2017) Optimum age of starter for microbial transglutaminase (MTGase) production produced by *Streptomyces thioleus* TTA 02 SDS 14 and characterization of crude enzyme. *Squalen Bull Mar Fish Postharvest Biotechnol* 12:11–18. <https://doi.org/10.15578/SQUALEN.283>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Warszawa, 22 września 2025 r.

Vitaliy Kolotylo

vitaliy_kolotylo@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny
Technologia Żywności i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Kolotylo V., Piwowarek K., Kieliszek M. (2023). Microbiological transglutaminase: Biotechnological application in the food industry. *Open Life Sciences* 18, 1, 20220737. mój indywidualny udział w jej powstaniu był znaczący i polegał na współudziale podczas opracowywania koncepcji, wykonaniu przeglądu literatury, analizie zebranych danych, przygotowaniu i edycji manuskryptu oraz odpowiedzi na recenzje. Ponadto pełniłem rolę autora korespondencyjnego.

Niniejszym oświadczam, że w pracy Kolotylo V., Piwowarek K., Kieliszek M. (2024). Production of microbial transglutaminase by *Streptoverticillium cinnamoneum* KKP 1658. *EXCLI Journal* 23, 655-671. mój indywidualny udział w jej powstaniu był znaczący i polegał na współudziale podczas opracowywania koncepcji, planowaniu i wykonaniu części doświadczalnej, analizie zebranych danych, przygotowaniu i edycji manuskryptu oraz odpowiedzi na recenzje.

Niniejszym oświadczam, że w pracy Kolotylo V., Piwowarek K., Synowiec A., Kieliszek M. (2025). Optimization of fermentation conditions for microbial transglutaminase production by *Streptoverticillium cinnamoneum* KKP 1658 using response surface methodology (RSM). *Folia Microbiologica* 70, 259-269. mój indywidualny udział w jej powstaniu był znaczący i polegał na współudziale podczas opracowywania koncepcji, planowaniu i wykonaniu części doświadczalnej, analizie zebranych danych, przygotowaniu i edycji manuskryptu oraz odpowiedzi na recenzje.

Niniejszym oświadczam, że w pracy Kolotylo V., Piwowarek K., Synowiec A., Gientka I., Kieliszek M. (2025). Characterisation and optimisation of microbial production of transglutaminase produced by *Streptoverticillium cinnamoneum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 109, 228. mój indywidualny udział w jej powstaniu był znaczący i polegał na współudziale podczas opracowywania koncepcji, planowaniu i wykonaniu części doświadczalnej, analizie zebranych danych, przygotowaniu i edycji manuskryptu oraz odpowiedzi na recenzje.

Vitaliy Kolotylo.....

Warszawa, 22 września 2025 r.

Marek Kieliszek

marek_kieliszek@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny
Technologia Żywności i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Kolotylo V., Piwowarek K., Kieliszek M. (2023). Microbiological transglutaminase: Biotechnological application in the food industry. *Open Life Sciences* 18, 1, 20220737. mój indywidualny wkład w powstanie pracy obejmował współudział w opracowaniu koncepcji, nadzór merytoryczny nad redakcją manuskryptu oraz koordynację realizacji projektu.

Niniejszym oświadczam, że w pracy Kolotylo V., Piwowarek K., Kieliszek M. (2024). Production of microbial transglutaminase by *Streptovercillium cinnamoneum* KKP 1658. *EXCLI Journal* 23, 655-671. mój indywidualny wkład w powstanie pracy obejmował współudział w opracowaniu koncepcji, nadzór merytoryczny nad redakcją manuskryptu oraz koordynację realizacji projektu.

Niniejszym oświadczam, że w pracy Kolotylo V., Piwowarek K., Synowiec A., Kieliszek M. (2025). Optimization of fermentation conditions for microbial transglutaminase production by *Streptovercillium cinnamoneum* KKP 1658 using response surface methodology (RSM). *Folia Microbiologica* 70, 259-269. mój indywidualny wkład w powstanie pracy obejmował współudział w opracowaniu koncepcji, nadzór merytoryczny nad redakcją manuskryptu oraz koordynację realizacji projektu.

Niniejszym oświadczam, że w pracy Kolotylo V., Piwowarek K., Synowiec A., Gientka I., Kieliszek M. (2025). Characterisation and optimisation of microbial production of transglutaminase produced by *Streptovercillium cinnamoneum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 109, 228. mój indywidualny wkład w powstanie pracy obejmował współudział w opracowaniu koncepcji, nadzór merytoryczny nad redakcją manuskryptu oraz koordynację realizacji projektu.


.....

Warszawa, 22 września 2025 r.

Kamil Piwowarek

kamil_piwowarek@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny
Technologia Żywności i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Kolotylo V., Piwowarek K., Kieliszek M. (2023). Microbiological transglutaminase: Biotechnological application in the food industry. *Open Life Sciences* 18, 1, 20220737. mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na współudziale podczas opracowywania koncepcji oraz edycji i analizie merytorycznej manuskryptu.

Niniejszym oświadczam, że w pracy Kolotylo V., Piwowarek K., Kieliszek M. (2024). Production of microbial transglutaminase by *Streptoverticillium cinnamoneum* KKP 1658. *EXCLI Journal* 23, 655-671. mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na współudziale podczas opracowywania koncepcji oraz edycji i analizie merytorycznej manuskryptu.

Niniejszym oświadczam, że w pracy Kolotylo V., Piwowarek K., Synowiec A., Kieliszek M. (2025). Optimization of fermentation conditions for microbial transglutaminase production by *Streptoverticillium cinnamoneum* KKP 1658 using response surface methodology (RSM). *Folia Microbiologica* 70, 259-269. mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na współudziale podczas opracowywania koncepcji oraz edycji i analizie merytorycznej manuskryptu.

Niniejszym oświadczam, że w pracy Kolotylo V., Piwowarek K., Synowiec A., Gientka I., Kieliszek M. (2025). Characterisation and optimisation of microbial production of transglutaminase produced by *Streptoverticillium cinnamoneum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 109, 228. mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na współudziale podczas opracowywania koncepcji oraz edycji i analizie merytorycznej manuskryptu.

.....Kamil Piwowarek.....

Warszawa, 22 września 2025 r.

Alicja Synowiec

alicja_synowiec@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny
Technologia Żywności i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Kolotylo V., Piwowarek K., Synowiec A., Kieliszek M. (2025). Optimization of fermentation conditions for microbial transglutaminase production by *Streptoverticillium cinnamoneum* KKP 1658 using response surface methodology (RSM). *Folia Microbiologica* 70, 259-269. mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na udzieleniu wsparcia merytorycznego przy formułowaniu założeń modelu statystycznego oraz podczas jego wyznaczania i opisu.

Niniejszym oświadczam, że w pracy Kolotylo V., Piwowarek K., Synowiec A., Gientka I., Kieliszek M. (2025). Characterisation and optimisation of microbial production of transglutaminase produced by *Streptoverticillium cinnamoneum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 109, 228. mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na udzieleniu wsparcia merytorycznego przy formułowaniu założeń modelu statystycznego oraz podczas jego wyznaczania i opisu.

.....*Synowiec*.....

Warszawa, 22 września 2025 r.

Iwona Gientka

iwona_gientka@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny
Technologia Żywności i Żywienia
Szkoly Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Kolotylo V., Piwowarek K., Synowiec A., Gientka I., Kieliszek M. (2025). Characterisation and optimisation of microbial production of transglutaminase produced by *Streptoverticillium cinnamoneum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 109, 228. mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na udzieleniu wsparcia związanego z pracami hodowlanymi w bioreaktorze oraz na opracowaniu uzyskanych wyników.

