WPŁYW ZMIAN OBJĘTOŚCI HODOWLI INOKULACYJNEJ *STREPTOVERTICILLIUM MOBARAENSE* NA AKTYWNOŚĆ TRANSGLUTAMINAZY POCHODZENIA MIKROBIOLOGICZNEGO

Damian Pietracha, Filip Zdziennicki, Anna Misiewicz, Klaudia Szewczuk, Anna Mikołajczuk-Szczyrba

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego
Zakład Mikrobiologii
ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa
damian.pietracha@ibprs.pl

Streszczenie

Transglutaminaza jest enzymem charakteryzującym się właściwościami biochemicznymi pozwalającymi na jego szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym, kosmetycznym oraz w medycynie. Dotychczasowe metody pozyskiwania transglutaminazy z wątroby kawii domowych skutkowały wysoką ceną rynkową preparatów zawierających transglutaminazę pochodzenia zwierzęcego. Tańszą i humanitarną alternatywą dla tej metody pozyskiwania enzymu jest jego mikrobiologiczna produkcja w bioreaktorach z wykorzystaniem szczepu *Streptoverticillium mobaraense* KKP 2013. Jednym z istotnych etapów produkcji transglutaminazy pochodzenia mikrobiologicznego jest etap namnażania szczepu *Streptoverticillium mobaraense* w hodowli inokulacyjnej. W przedstawionych wynikach opisano wpływ zmian objętości hodowli inokulacyjnej oraz czasu jej trwania na aktywność transglutaminazy w uzyskiwanym preparacie. Jednocześnie zwrócono uwagę na związane z tym zmiany wartości pH w pożywce inokulacyjnej O3. Ustalono optymalne parametry objętości i czasu trwania hodowli inokulacyjnej, które pozwoliły na uzyskanie preparatu enzymatycznego o jak najwyższej aktywności.

Słowa kluczowe: transglutaminaza, MTG, *Streptoverticillium mobaraense*

INFLUENCE OF VOLUME CHANGES OF *STREPTOVERTICILLIUM MOBARAENSE* STARTER INOCULUM ON MICROBIAL TRANSGLUTAMINASE ACTIVITY

Summary

Transglutaminase enzyme is characterized by biochemical properties allowing it to be widely used in food industry, cosmetics and medicine. Existing methods of obtaining liver transglutaminase from guinea pigs resulted in high market price of preparations containing

transglutaminase of animal orgin. Cheaper and more humane alternative to this method of obtaining the enzyme is its microbial production in bioreactors using the strain *Streptoverticillium mobaraense*. One of the important stages of the production of microbial transglutaminase is the amplification of *Streptoverticillium mobaraense* in the inoculation culture. Presented results describe the impact of changes in volume of inoculated culture and the time of transglutaminase activity in the obtained preparation. At the same time changes in the pH value in the inoculation medium O3 were observed. Optimal volume and the duration of the inoculum culture were found, which allowed to obtain a preparation of the enzyme with the highest activity.

Key words: transglutaminase, MTG, *Streptoverticillium mobaraense*

WSTĘP

Streptoverticillium mobaraense jest promieniowcem powszechnie występującym w środowisku. W określonych warunkach charakteryzuje się zdolnością do wytwarzania enzymu nazywanego transglutaminazą mikrobiologiczną (ang. *Microbial Transglutaminase,* MTG). Transglutaminaza jest klasyfikowana jako EC 2.3.2.13, katalizuje reakcję tworzenia wiązań kowalencyjnych między białkami. Powstałe wiązania izopeptydowe pomiędzy wolną grupą aminową, na przykład białkiem lub peptydem związanym z lizyną, a grupą acylową na końcu łańcuchów bocznych lub białko-peptydów związanych z glutaminą tworzą usieciowaną strukturę białek. Wiązania utworzone przez transglutaminazę charakteryzują się wysoką odpornością na rozkład proteolityczny [Griffin i in. 2002; Pasternak i in. 1998; Zhu i in. 1995; Zhou i in. 2000; Kanaji i in. 1993]. Białka mogące podlegać reakcji sieciowania to między innymi kazeina, globuliny sojowe, aktyna, miozyna oraz proteiny występujące w jajach kurzych. Ze względu na swoje właściwości MTG jest powszechnie wykorzystywana w przemyśle spożywczym przy produkcji mięsa, nabiału i produktów piekarniczych. Jest ona stosowana w wiązaniu białek mięsa, białek ryb i szeregu innych produktów żywnościowych. MTG cechuje się ogromnym potencjałem, który można wykorzystać w przemyśle kosmetycznym do produkcji materiałów pochodzenia organicznego wykorzystywanych w kosmetykach takich jak stabilne termicznie mikrokapsułki czy przenośniki dla stabilizowanych enzymów. Obecność transglutaminazy zaobserwować można również w większości tkanek zwierzęcych, płynów ustrojowych, gdzie bierze udział w tworzeniu zakrzepów, gojeniu ran, keratynizacji naskórka i usztywnianiu błony erytrocytów [Aschilimann i Paulsson 1994].

Pierwszym źródłem, z jakiego pozyskiwano transglutaminazę, była wątroba kawii domowej (*Cavia porcellus*). Względy etyczne oraz skomplikowany proces pozyskiwania tego enzymu przekładały się na jego wysoką cenę [Folk i Cole 1966]. Tańszą metodą jest produkcja MTG na skalę przemysłową z wykorzystaniem *S. mobaraense*. Szczep ten w ustalonych warunkach laboratoryjnych, opisanych w dalszej części artykułu, prowadzi syntezę transglutaminazy, którą następnie wydala z protoplastu do środowiska zewnętrznego w postaci aktywnego enzymu [Pasternak i in. 1998]. W procesie wytwarzania transglutaminazy pochodzenia mikrobiologicznego jednym z istotnych etapów jest uzyskanie odpowiedniej liczby komórek *S. mobaraense*, która pozwala na wytworzenie największej możliwej ilości aktywnego enzymu [Kieliszek i Misiewicz 2014]. Podczas prowadzenia badań określono tempo wzrostu szczepu KKP 2013 *S. mobaraense* w hodowli płynnej w pożywce O3.

Cel doświadczenia

W trakcie doświadczenia badano wpływ czasu trwania hodowli oraz zmiany objętości hodowli *S. mobaraense* (w procesie przednamnażania) na dwa parametry: zmianę liczby jednostek tworzących kolonie w jednym mililitrze hodowli oraz zmianę aktywności MTG uzyskanej w trakcie późniejszej hodowli prowadzonej w bioreaktorze na podłożu M4.

Uzyskane wartości wykorzystano do wyznaczenia optymalnych parametrów pozwalających na uzyskanie odpowiedniego poziomu komórek *S. mobaraense* w hodowli stanowiącej inokulum, co przełożyłoby się na otrzymanie preparatu zawierającego MTG o jak największej aktywności.

MATERIAŁY I METODY BADAŃ

Drobnoustroje i pożywki

W opisanym doświadczeniu użyto szczepu *S. mobaraense* o numerze KKP 2013, pochodzącego z Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych. Hodowla przednamnażająca *S. mobaraense* prowadzona w podłożu O3 w stosowanej metodzie stanowi jeden z początkowych etapów w procesie produkcji transglutaminazy. Przednamnażanie *S. mobaraense* prowadzono w pożywce płynnej O3 o początkowej wartości pH wynoszącej 7,0. Pożywka O3 jest podłożem płynnym wykorzystywanym do przednamnażania *S. mobaraense* w celu wytworzenia inokulum starterowego w procesie produkcji MTG. W skład pożywki O3 wchodzą płatki owsiane (stanowiące 2,5%), aminobak (0,2%), K_2HPO_4 (0,2%) oraz $MgSO_4$ x $7H_2O$ (0,1%).

Drugim etapem prowadzonych badań była hodowla w bioreaktorze w pożywce M4. Wykorzystywana na tym etapie badań pożywka M4 o pH początkowym 6,5 składa się ze skrobi (2%), aminobaku (1,0%), namoku kukurydzianego (1,0%), ekstraktu drożdżowego (0,2%) oraz soli Na_2HPO_4 (0,2%), KH_2PO_4 (0,2%) i $MgSO_4x7H_2O$ (0,1%). Podłoże M4 wykorzystywane w opisywanym doświadczeniu stanowi modyfikację pożywki zastosowanej przez Guoliang i in. (2005). Modyfikacja wspomnianego podłoża polegała na zmianie źródła azotu na aminobak i namok kukurydziany w stosunku 1:1.

Warunki hodowli

Hodowle prowadzono w trzech powtórzeniach w pięciu wybranych objętościach: 100 ml; 150 ml; 200 ml; 250 ml i 300 ml. Czas, w którym monitorowano przednamnażanie inokulum, wynosił 96 godzin. Zmiany liczby jednostek tworzących kolonie, wartości pH oraz aktywność MTG po hodowli w bioreaktorze mierzone były w odstępach 24-godzinnych.

Kolby zawierające wyznaczone objętości pożywki O3 zaszczepiono 10 ml 48-godzinnej hodowli szczepu KKP 2013 *S. mobaraense* prowadzonej w bulionie tryptozowo-sojowym (TSB). Inkubację prowadzono w wytrząsarce przy częstotliwości 200 rpm oraz w temperaturze 28°C.

Metody oznaczeń

W celu oznaczenia gęstości hodowli szczepu szczepu *S. mobaraense* KKP 2013 w zaszczepionych kolbach określenie liczby jednostek tworzących kolonie (jtk) *S. mobaraense* dokonywane było w próbkach pobranych natychmiast po zaszczepieniu hodowli, a następnie po 24, 48, 72 oraz 96 godzinach. Próbki pobierano równolegle ze wszystkich zaszczepionych wariantów objętości. Oznaczenie jtk wykonywane było zgodnie z normą PN-EN ISO 4833-1:2013-2014 [PN-EN ISO 4833-1:2013-12].

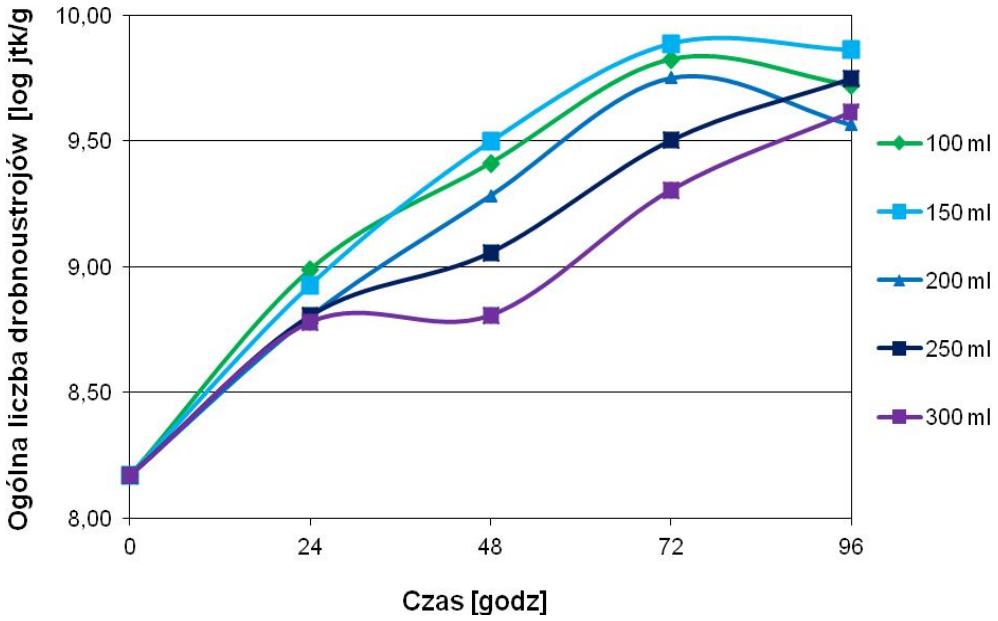
Aktywność enzymatyczną transglutaminazy oznaczono, stosując komercyjne testy ZediXclusive Microbial Transglutaminase Assay Kit (Zedira GmbH, Darmstadt, Niemcy).

WYNIKI I DYSKUSJA

Dynamika wzrostu *S. mobaraense*

Wyjściowa liczba komórek *S. mobaraense* w podłożu TSB wynosiła 8,17 log jtk/g oraz 7,10 log jtk/g na podłożach O3 natychmiast po zaszczepieniu. Po 24-godzinnej inkubacji średnia liczba jtk w hodowli przednamnażającej na 100 ml podłoża O3 wynosiła 8,90 log jtk/g, podobne wartości uzyskano w objętościach 150 ml – 9,93 log jtk/g, 200 ml – 8,80 log jtk/g, 250 ml –8,81 log jtk/g oraz 300 ml – 8,78 log jtk/g. Oznaczenia liczby *S. mobaraense*

dokonane po 24 godzinach inkubacji nie wykazały znaczących różnic w dynamice wzrostu *S. mobaraense* w badanych hodowlach. Dopiero po 48 godzinach inkubacji zaobserwowano wyraźnie słabszy wzrost w kolbach zawierających 250 i 300 ml hodowli na pożywce O3. Najwyższe wartości uzyskano w hodowlach zawierających 100 oraz 150 ml pożywki O3. Najwyższe wartości 9,82 log jtk/g w hodowli o objętości 100 ml oraz 9,89 log jtk/g w hodowli 150 ml zaobserwowano po 72 godzinach inkubacji. Oznaczenia wykonane po 96 godzinach inkubacji wykazały, że po takim czasie od momentu zaszczepienia hodowla zaczęła wchodzić w fazę spadkową. Uzyskane wartości pozwalają na wyciągnięcie wniosku, że idiofaza w przypadku hodowli w objętościach 100, 150 i 200 ml osiągana jest w 72 godzinie hodowli. Dynamikę wzrostu *S. mobaraense* w kolejnych dniach pokazuje rysunek 1.

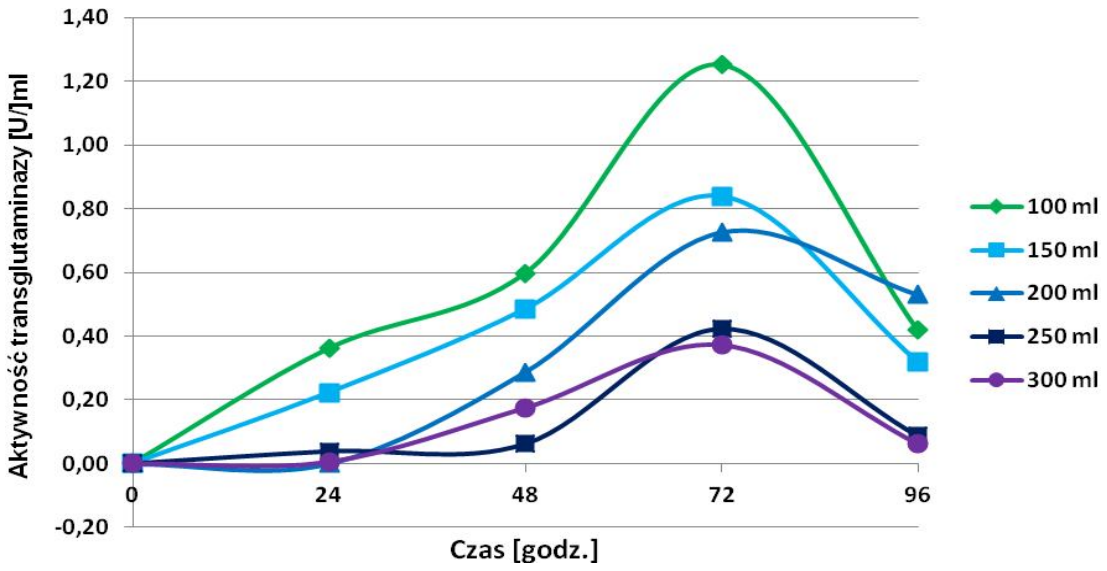


Rysunek 1. Zależność dynamiki wzrostu *S. mobaraense* od objętości inokulum startowego

Aktywność otrzymanej transglutaminazy

Po 24 godzinach hodowli szczepu *S. mobaraense* w pożywce O3 najwyższą aktywność MTG otrzymano w inokulum o objętości 100 ml, w tym przypadku wynosiła ona 0,36 U/ml. W przypadku hodowli w kolbach zawierających 200 ml, 250 ml oraz 300 ml aktywność otrzymanej transglutaminazy była równa niemal zeru. W hodowli 24-godzinnej o objętości 150 ml aktywność w preparacie wynosiła 0,22 U/ml, z czego można wywnioskować, że każde następne zwiększenie objętości wpływało ujemnie na wytwarzanie badanego enzymu.

Podobnie po 48 godzinach hodowli, największą wartość transglutaminazy o wartości 0,60 U/ml wykazywał preparat otrzymywany z hodowli prowadzonych w kolbach ze 100 ml hodowli. Wzrost aktywności otrzymanego preparatu odnotowano również w pozostałych wariantach hodowli. W przypadku kolb ze 150 ml i 200 ml hodowli zaobserwowano istotny wzrost mierzonej aktywności, który wynosił odpowiednio 0,26 U/ml i 0,29 U/ml. We wszystkich badanych wariantach maksymalna aktywność otrzymywanego enzymu była obserwowana po 72 godzinach inkubacji. W przypadku hodowli w 100 ml pożywki aktywność enzymu po tym czasie wyniosła 1,25 U/ml i była największa spośród wszystkich badanych wariantów. Ponadto zaobserwowano, że w każdym badanym wariancie po 96 godzinach inkubacji spada aktywność otrzymywanego enzymu. Różnice w aktywności MTG otrzymywanej z hodowli o określonej objętości pokazuje rysunek 2.



Rysunek 2. Wpływ objętości hodowli i czasu jej prowadzenia na aktywność otrzymanej transglutaminazy

Zmiany pH w podłożu O3

W przypadku każdej badanej objętości hodowli *S. mobaraense* wartości pH wzrastały wraz z przyrostem czasu. Najwyższe mierzone wartości pH na każdym etapie odnotowano w kolbach zawierających 100 ml hodowli – w tym przypadku pH po 24 godzinach wytrząsania miało wartość 5,78 i była ona najwyższa spośród wszystkich badanych wariantów objętości hodowli. Należy również zwrócić uwagę na to, że wartości pH systematycznie wzrastały w czasie, osiągając wartość 7,00 po 96 godzinach inkubacji. Na etapie idiofazy średnie wartości pH w kolbach zawierających 100 ml hodowli były na

poziomie 6,5 co pokazuje, że jest to optymalna wartość dla uzyskania preparatu o jak najwyższej aktywności enzymu z hodowli. Po 96 godzinach hodowli pH wzrosło do wartości 7,0, jednak aktywność uzyskanego enzymu wynosiła jedynie 0,42 U/ml. W pozostałych kolbach wartość pH po 96 godzinach wytrząsania osiągnęła wartość 6,34 w przypadku 150 ml hodowli, 6,32 w 200 ml, 6,30 w 250 ml oraz 6,29 w objętości 300 ml. Wraz ze wzrostem objętości hodowli maleje w niej tempo zwiększania się odczytywanego pH.

Uzyskane uśrednione wyniki liczby jednostek tworzących kolonie *S. mobaraense*, aktywności otrzymanej MTG i wartości pH otrzymane po 48, 72 i 96 godzinach przedstawione zostały w tabeli 1.

Tabela 1. Wpływ zmian objętości hodowli inokulacyjnej *S. mobaraense* KKP 2013 na aktywność transglutaminazy otrzymywanej w wyniku hodowli prowadzonej w bioreaktorze

Lp.	Objętość hodowli [ml]	Czas trwania hodowli	pH	Ogólna liczba drobnoustrojów [log jtk/g]	Aktywność TG [U/ml]
	TSB	0	7,12	8,17	0,00
1	**100 O3**	24	5,78	8,99	0,36
2		48	5,97	9,41	0,60
3		72	**6,52**	9,82	**1,25**
4		96	7,00	9,72	0,42
	TSB	0	7,12	8,17	0,00
5	**150 O3**	24	5,38	8,93	0,22
6		48	5,83	9,50	0,48
7		72	6,20	9,89	0,84
8		96	6,34	9,86	0,32
	TSB	0	7,12	8,17	0,00
9	**200 O3**	24	5,46	8,80	0,00
10		48	5,78	9,28	0,29
11		72	6,16	9,75	0,73
12		96	6,32	9,56	0,53
	TSB	0	7,12	8,17	0,00
13	**250 O3**	24	5,79	8,81	0,04
14		48	5,67	9,06	0,06
15		72	6,12	9,50	0,42
16		96	6,28	9,75	0,09
	TSB	0	7,12	8,17	0,00
17	**300 O3**	24	5,59	8,78	0,01
18		48	5,61	8,81	0,18
19		72	6,19	9,31	0,37
20		96	6,26	9,61	0,06

WNIOSKI

Uzyskane wyniki pozwoliły na określenie optymalnych parametrów objętości hodowli oraz czasu jej prowadzenia, które umożliwiły najbardziej skuteczny sposób określenia odpowiedniego poziomu jednostek tworzących kolonie w inokulum przednamnażającym. Dzięki tym parametrom uzyskano preparat zawierający transglutaminazę o aktywności 1,25 U/ml.

Zaprezentowane wyniki pokazują jednoznacznie wpływ objętości hodowli inokulacyjnej na aktywność uzyskiwanej transglutaminazy pochodzenia mikrobiologicznego. Optymalne parametry dla hodowli na pożywce O3 w temperaturze 28°C to objętość 100 ml płynnej hodowli *S. mobaraense* oraz czas trwania wynoszący 72 godziny. Wpływ na to mogą mieć takie czynniki jak pH środowiska oraz natlenienie płynnej hodowli, w której odbywało się namnażanie drobnoustroju.

Dowiedziono, że wyższa szybkość tworzenia MTG, wydajność i produktywność są skorelowane z podwyższeniem wartości pH [Meiying i in. 2002]. Optymalne pH do syntezy enzymu to 6,5. Na podstawie przeprowadzonego doświadczenia ustalono stałe pH utrzymywane podczas hodowli w bioreaktorze na podłożu M4.

Mniejsza objętość hodowli przednamnażającej również mogła pozwolić na zwiększenie dostępności tlenu dla komórek *S. mobaraense* co przełożyło się na ilość oraz aktywność transglutaminazy w otrzymywanym preparacie [Guoliang i in. 2005]. Na podstawie zmian mierzonych wielkości można wysnuć wniosek, że objętość 100 ml pozwala uzyskać hodowlę, w której dostępność składników odżywczych oraz tlenu umożliwia uzyskanie preparatu z transglutaminazą o aktywności wyższej niż w pozostałych wariantach. Czas potrzebny do osiągnięcia interfazy wynosi około 72 godzin inkubacji. W hodowlach trwających dłużej zauważono znaczący spadek aktywności otrzymanego preparatu, co związane jest z wchodzeniem hodowli *S. mobaraense* w fazę spadkową. Zmniejszenie aktywności enzymu w otrzymywanym preparacie może mieć związek z utlenianiem się części grup sulfhydrylowych w MTG i przechodzeniem enzymu w formę nieaktywną [Ando i in. 1989].

PIŚMIENNICTWO

1. Ando H., Adachi M., Umeda K., Matsuura A., Nonaka M., Uchio R i in. (1989). Purification and characterization of a novel transglutaminase derived from microorganism. Agric. Biol. Chem., 53, 2613-2617
2. Aschlimann D., Paulsson M. (1994). Transglutaminases: protein cross-linking enzymes in tissues and bloody fluids. Thromb. Haemost., 71, 402-415

3. Folk J. E., Cole P. W. (1966). Mechanism of action of Guinea Pig Liver Transglutaminase Purification and Properties of the Enzyme: Identification of a Functional Cysteine Essential For Activity. J. Biol. Chem., 241, 5518-5525
4. Griffin M., Casadio R., Bergamini C. M. (2002). Transglutaminases: nature's biological glues. Biochem. J., 368 (2), 377-396
5. Guoliang Y., Guocheng D., Yin L., Kian C., Jianjiang Z. (2005). Enhancement of microbial transglutaminase production by *Streptoverticillium mobaraense*: application of a two stage agitation speed control strategy. Process Biochem., 40, 963-968
6. Kanaji T., Ozaki H., Takao T., Kawajri H., Ide H., Motoki M. i in. (1993). Primary structure of microbial transglutaminase from *Streptoverticillium sp*. Strain s-8112. J. Biol. Chem., 268, 11565-11572
7. Kieliszek M., Misiewicz A. (2014) Microbial transglutaminase and its application in food industry. A review. Folia Microbiol. (Praha), 59 (3), 241-250
8. Meiying Z., Guocheng D., Jian Ch. (2002). pH control strategy of batch microbial transglutaminase production with *Streptoverticillium mobaraense.* Enzyme Microbial. Technol., 31, 477-487
9. Pasternak R., Dorsch S., Otterbach J. T., Robenek I.R., Wolf S. (1998). Bacterial pro-transglutaminase from *Streptoverticillium mobaraense*. Purification, characterisation and sequence of the zymogen. Eur. J. Biochem., 257, 570-576
10. PN-EN ISO 4833-1: 2013-12 Mikrobiologia łańcucha żywnościowego – Horyzontalna metoda oznaczania liczby drobnoustrojów – Część 1: Oznaczanie liczby metodą posiewu zalewowego w temperaturze 30 stopni C
11. Zhu Y., Rinzema A., Tramper J., Bol J. (1995) Microbial Transglutaminase: a review on its production and application in food processing. Appl. Microbiol. Biotechnol., 44, 277-282
12. Zhou L. D., Chen J., Du G. C. (2000). Functional properties of microbial transglutaminase and it’s application method in food processing. China Food Addit., 1, 54-59