

Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 56, No 4 (2005)



Transglutaminases - a review with special reference to microbial transglutaminase and its application in food processing

Z. TZIKAS (Z. TZHKAS), I. AMBROSIADIS (I. AMBPOΣIAΔHΣ)

doi: [10.12681/jhvms.15091](https://doi.org/10.12681/jhvms.15091)

To cite this article:

TZIKAS (Z. TZHKAS) Z., & AMBROSIADIS (I. AMBPOΣIAΔHΣ) I. (2017). Transglutaminases - a review with special reference to microbial transglutaminase and its application in food processing. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 56(4), 311–324. <https://doi.org/10.12681/jhvms.15091>

Η τρανσγλουταμινάση και η εφαρμογή της στην τεχνολογία τροφίμων

Z. Τζίκας, I. Αμβροσιάδης

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. Οι τρανσγλουταμινάσες (TG) είναι ένζυμα, τα οποία καταλύουν αντιδράσεις στις οποίες ένα ακετύλιο μεταφέρεται από τη γ-καρβοξυλική ομάδα των υπολειμμάτων γλουταμίνης ενός πεπτιδίου (δότης ακετυλίου) σε διάφορες πρωτοταγείς αμίνες (δέκτες ακετυλίου). Οι TG μπορούν να τροποποιούν τις πρωτεΐνες με σχηματισμό σταυροειδών δεσμών (*cross-linking*), με ενσωμάτωση αμινών ή με απαμίδωση. Η παρουσία των TG έχει διαπιστωθεί σε έναν εξαιρετικά μεγάλο αριθμό ζωντανών οργανισμών, όπως στον άνθρωπο και σε άλλα ανώτερα θηλαστικά, καθώς επίσης και σε πτηνά, αμφίβια, ψάρια, φυτά και μικροοργανισμούς. Οι TG στα ανώτερα θηλαστικά και στα ψάρια απαιτούν πάντα ιόντα Ca^{2+} για την εκδήλωση της ενζυμικής τους δραστηριότητας. Αντίθετα, στα φυτά και στους μικροοργανισμούς είναι ένζυμα τα οποία δρουν ανεξάρτητα από την παρουσία ιόντων Ca^{2+} . Η TG των θηλαστικών είχε παραμείνει για δεκαετίες η μοναδική πηγή εμπορεύσιμης TG. Η περιορισμένη διαθεσιμότητα, καθώς και η πολύπλοκη διαδικασία διαχωρισμού και καθαρισμού της, οδήγησαν σε μεγάλη αύξηση της τιμής του εμπορικού της σκευάσματος. Έτσι, δεν ήταν δυνατή η εφαρμογή του ενζύμου σε βιομηχανική κλίμακα. Τα τελευταία χρόνια, όμως, έγινε δυνατή η μαζική παραγωγή του ενζύμου από φτηνές πηγές, όπως είναι οι μικροοργανισμοί, με παραδοσιακές τεχνολογίες ζύμωσης. Διάφορα μικροβιακά στελέχη, κυρίως είδη του γένους *Streptovorticillium*, έχουν τη δυνατότητα να παράγουν TG, η οποία ονομάστηκε μικροβιακή τρανσγλουταμινάση (MTG). Οι περισσότερες πρωτεΐνες των τροφίμων, όπως οι σφαιρίνες των οσπρίων, η γλουτένη και η γλιαδίνη των σιτηρών, οι πρωτεΐνες της λεκθού και του λευκώματος του αυγού, η ακτίνη και η μυοσίνη του κρέατος, η ζελατίνη, το κολλαγόνο, οι καζεΐνες του γάλακτος, η α-λακταλβουμίνη και η β-λακτοσφαιρίνη, μπορούν να συνδεθούν με σταυροειδείς δεσμούς, χάρη στην καταλυτική δράση του ενζύμου, με αποτέλεσμα την τροποποίηση των λειτουργικών τους ιδιοτήτων. Κατά παρόμοιο τρόπο, δύο ή περισσότερες πρωτεΐνες διαφορετικής προέλευσης, όπως είναι οι πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος, οι σφαιρίνες της σόγιας, η γλουτένη, οι πρωτεΐνες των αυγών, η ακτίνη και η μυοσίνη, μπορούν να συνδεθούν με ομοιοπολικούς δεσμούς, με αποτέλεσμα το σχηματισμό νέων πρωτεϊνών, με νέες ξεχωριστές λειτουργικές ιδιότητες. Η MTG

Transglutaminases – a review with special reference to microbial transglutaminase and its application in food processing

Tzikas Z., Ambrosiadis I.

ABSTRACT. Some properties and applications of the transglutaminase (TG), with particular focus on TG derived from microorganisms (MTG), are described. TG catalyzes an acyl-transfer reaction in which the γ-carboxamide groups of peptide-bound glutamine residues are the acyl-donors. Most food proteins, such as legume globulins, wheat gluten and gliadin, egg yolk and egg white proteins, meat actins and myosins, gelatin, collagen, milk caseins, α-lactalbumin and β-lactoglobulin, could be cross-linked by TG. TG are present in an extremely broad spectrum of living organisms, such as humans, most advanced animals, birds, amphibians, fish, plants and microorganisms. Commercial TG has been merely obtained from animal tissues for decades. The limited supply and the complicated separation and purification procedure for obtaining tissue TG have resulted in an extremely high price of the enzyme, which hampers a wide application in food processing. MTG, mass-produced at low cost by fermentation, catalyzes the cross-linking of most food proteins through the formation of ε-(γ-glutamyl) lysine bonds, in the same way as well-known mammalian enzymes. However, MTG is quite unique from other mammalian TG, since it is totally independent of Ca^{2+} and has a relatively lower molecular weight. The results of many studies suggest that MTG has many potential applications in food processing. Food treated with MTG appeared to have an improved flavour, appearance and texture. In addition, this enzyme can increase shelf-life and reduce allergenicity of certain foods. Using additional components, such as sodium caseinate, maltodextrine and starch, MTG can be customized for use in many other foods, even those with lower protein content. In this respect, MTG technology will be an essential tool for producing acceptable protein foods from non-animal proteins in the future.

Key words: Transglutaminase, proteins, food processing

Εργαστήριο Τεχνολογίας Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης,
Κτηνιατρική Σχολή Α.Π.Θ., 541 24 Θεσσαλονίκη

Ημερομηνία υποβολής: 13.12.2005
Ημερομηνία εγκρίσεως: 18.01.2006

Laboratory of Technology of Foods of Animal Origin, Faculty of
Veterinary Medicine, A.U.T., 541 24 Thessaloniki, Greece

Submission date: 13.12.2005
Approval date: 18.01.2006

μπορεί, επίσης, να ενσωματώνει αμινοξέα ή πεπτιδία στις πρωτεΐνες μέσω ομοιοπολικών δεσμών, με απώτερο σκοπό τη βελτίωση της θρεπτικής αξίας των ίδιων των πρωτεϊνών και γενικότερα των τροφίμων. Η πιθανότητα να προκαλεί η *MTG* αλλεργικά φαινόμενα στον άνθρωπο είναι πολύ μικρή έως ανύπαρκτη και, ως ένζυμο, θεωρείται ουσία χαμηλής τοξικότητας. Η εφαρμογή της *MTG* στην τεχνολογία των τροφίμων θα μπορούσε να ικανοποιήσει τις απαιτήσεις των καταναλωτών για νέα πρωτεϊνούχα τρόφιμα με βελτιωμένη εμφάνιση και γεύση, αυξημένη θρεπτική αξία και μεγαλύτερο χρόνο συντήρησης. Η *MTG* μπορεί να χρησιμοποιηθεί ακόμη και σε τρόφιμα με χαμηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, όταν προστεθούν, στο μίγμα *MTG*-τροφίμου, συστατικά όπως το καζεϊνικό νάτριο, η μαλτοδεξτρίνη και το άμυλο.

Λέξεις ευρετηρίασης: τρανσγλουταμινάση, πρωτεΐνες, τεχνολογία τροφίμων

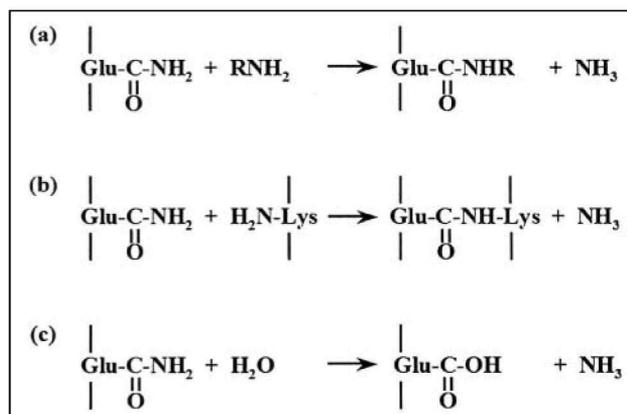
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι τρανσγλουταμινάσες («*TG*», πρωτεΐνη-γλουταμίνη: αμίνη γ-γλουταμυλοτρανσφεράση, EC 2.3.2.13) είναι ένζυμα, τα οποία καταλύουν αντιδράσεις στις οποίες ένα ακετύλιο μεταφέρεται από τη γ-καρβοξυλική ομάδα των υπολειμμάτων γλουταμίνης ενός πεπτιδίου (δότης ακετυλίου) σε διάφορες πρωτοταγείς αμίνες (δέκτες ακετυλίου) (Nonaka et al. 1989). Όταν μία ε-αμινομάδα του υπολείμματος λυσίνης ενός πεπτιδίου συμμετέχει στην ενζυμική αυτή αντίδραση ως δέκτης ακετυλίου, τα πρωτεϊνικά μόρια συνδέονται με ομοιοπολικούς δεσμούς μεταξύ τους [σύνδεση με σταυροειδείς δεσμούς, (*cross-linking*)]. Η ομοιοπολική σύνδεση επιτυγχάνεται μέσω δια- και ενδο-μοριακών ισοπεπτιδικών δεσμών [ϵ - (γ-γλουταμυλο) λυσίνη δεσμοί, «*G-L bonds*»], οι οποίοι σχηματίζονται από τη δράση των ενζύμων. Στην περίπτωση που οι ε-αμινομάδες φυσικών πολυαμινών δρουν ως δέκτες ακετυλίου, η καταλυόμενη αντίδραση δεν οδηγεί στο σχηματισμό πρωτεϊνικών πολυμερών, αλλά έχει ως αποτέλεσμα την τροποποίηση της πρωτεΐνης-υποστρώματος και την πιθανή μεταβολή της βιολογικής της δραστηριότητας. Όταν δεν υπάρχουν αμινοκικά υποστρώματα, οι *TG* καταλύουν την υδρόλυση της καρβοξυλικής ομάδας του υπολείμματος γλουταμίνης ενός πεπτιδίου, με αποτέλεσμα την απαμίδωσή του. Στην τελευταία αντίδραση, μόρια νερού χρησιμεύουν ως δέκτες ακετυλίου (Folk 1980, Ando et al. 1989, DeBacker-Royer et al. 1992). Έτσι, οι *TG* μπορούν να τροποποιούν πρωτεΐνες με σχηματισμό σταυροειδών δεσμών, με ενσωμάτωση αμινών ή με απαμίδωση (Εικόνα 1).

Η παρουσία των *TG* έχει διαπιστωθεί σε έναν εξαιρετικά μεγάλο αριθμό οργανισμών, όπως στον άνθρωπο

και σε άλλα ανώτερα θηλαστικά, καθώς επίσης και σε πτηνά, αμφίβια, ψάρια, φυτά και μικροοργανισμούς (Puszkin και Raghuraman 1985, Ickson και Apelbaum 1987, Ando et al. 1989, Kanaji et al. 1993, Aeschlimann και Paulsson 1994, Yasueda et al. 1994, Del Duca et al. 1995, Nozawa et al. 1997, Zhang και Masui 1997). Στα σπονδυλωτά, οι *TG* κατανομούνται σε μεγάλες ποσότητες στους ιστούς και στα υγρά του σώματος. Τα ένζυμα αυτά συμμετέχουν σε διάφορα βιολογικά φαινόμενα και βιοχημικές εξεργασίες, όπως η πήξη του αίματος, η ανάπλαση των ιστών, η σταθεροποίηση της μεσοκυττάριας ουσίας, η κυτταρική διαφοροποίηση και ο κυτταρικός θάνατος, λόγω της ικανότητάς τους να τροποποιούν πρωτεΐνες (Aeschlimann και Paulsson 1994). Σύμφωνα με τους Griffin et al. (2002), οι *TG* δρουν ως «βιολογικές κόλλες» (*biological glues*) στις προαναφερθείσες σημαντικές φυσιολογικές λειτουργίες. Από την άλλη, πιθανές ανωμαλίες στη φυσιολογική λειτουργία του ενζύμου έχουν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση νόσων στον άνθρωπο, οι οποίες σχετίζονται με βλάβες του αιμοστατικού μηχανισμού. Έτσι, έχει αποδειχτεί η συμμετοχή των *TG* σε χρόνιες εκφυλιστικές νευροπάθειες, νεοπλασματικές νόσους, αυτοάνοσα νοσήματα, καθώς και σε νόσους που έχουν σχέση με την προοδευτική ίνωση των ιστών και παθήσεις της επιδερμίδας.

Οι *TG* στα ανώτερα θηλαστικά απαιτούν πάντα ιόντα Ca^{2+} για την εκδήλωση της ενζυμικής τους δραστηριότητας (Enzyme Nomenclature 1992, Aeschlimann



Εικόνα 1. Οι αντιδράσεις τις οποίες καταλύει η τρανσγλουταμινάση. **a:** Μεταφορά ακετυλίου. **b:** Σύνδεση με σταυροειδείς δεσμούς («*cross-linking*») των υπολειμμάτων γλουταμίνης και λυσίνης, μεταξύ πρωτεϊνών ή πεπτιδίων. Η ομοιοπολική σύνδεση επιτυγχάνεται μέσω δια- και ενδο-μοριακών ισοπεπτιδικών δεσμών [ϵ - (γ-γλουταμυλο) λυσίνη δεσμοί]. **c:** Απαμίδωση (από Yokoyama et al. 2004).

Figure 1. Reactions catalyzed by transglutaminase. **a:** Acyl transfer. **b:** Cross-linking of Gln and Lys residues in proteins or peptides. The resulting bridge is called an ϵ -(γ -glutamyl)lysine (*G-L*) bond. **c:** Deamidation (from Yokoyama et al. 2004).

και Paulsson 1994). Αντίθετα, στα φυτά και τους μικροοργανισμούς είναι ένζυμα τα οποία δρουν ανεξάρτητα από την παρουσία ιόντων Ca^{2+} . Πρέπει να σημειωθεί, επίσης, ότι το φαινόμενο σχηματισμού γέλης (*setting*) σε θερμοκρασίες 0-40°C, το οποίο παρατηρείται κατά την παρασκευή ιχθυοσκευασμάτων, έχει συνδεθεί με τη δράση της ενδογενούς *TG* των ψαριών, η οποία εξαρτάται από την παρουσία ιόντων Ca^{2+} (Seki et al. 1990, Tsukamasa et al. 1993, Lee et al. 1997).

Στη βιβλιογραφική αυτή ανασκόπηση αναφέρονται τα δομικά χαρακτηριστικά και οι ενζυμικές ιδιότητες των *TG*, με ιδιαίτερη εστίαση στην *TG*, η οποία παράγεται από μικροοργανισμούς και η εφαρμογή της στην τεχνολογία τροφίμων.

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΤΡΑΝΣΓΛΟΥΤΑΜΙΝΑΣΗΣ

Το ήπαρ ινδικού χοιριδίου είχε παραμείνει για δεκαετίες η μοναδική πηγή εμπορεύσιμης *TG*, αν και το ίδιο δεν είναι αποδεκτό ως τρόφιμο. Η περιορισμένη διαθεσιμότητα, καθώς και η πολύπλοκη διαδικασία διαχωρισμού και καθαρισμού του ενζύμου αυτού, οδήγησαν σε μεγάλη αύξηση της τιμής του (Zhu et al. 1995). Έτσι, δεν ήταν δυνατή η εφαρμογή αυτής της *TG* σε βιομηχανική κλίμακα και η μαζική παραγωγή του ενζύμου παρέμεινε ως ένα ουσιαστικό πρόβλημα στον τομέα της τεχνολογίας των τροφίμων.

Η εξαγωγή και ο καθαρισμός του ενζύμου από τους ιστούς και τα σωματικά υγρά παραγωγικών ζώων και ψαριών αποτέλεσε μία πρώτη προσέγγιση στο παραπάνω ζήτημα. Στην Ευρώπη, ο παράγοντας XIII, ένας συγκεκριμένος τύπος *TG*, εξάγεται από το αίμα βοοειδών και χοίρων κατά τη σφαγή και διατίθεται στο εμπόριο (Wilson 1992). Το ένζυμο αυτό, όμως, χρησιμοποιείται σπάνια στη βιομηχανία των τροφίμων, αφού για την ενεργοποίησή του είναι απαραίτητη μία ειδική πρωτεάση, η θρομβίνη. Επιπλέον, ο παράγοντας XIII προκαλεί την εναπόθεση κόκκινης χρωστικής στο τελικό προϊόν, η οποία είναι, συνήθως, ανεπιθύμητη (Motoki και Seguro 1998). Οι προσπάθειες διαχωρισμού και καθαρισμού της *TG* από τους ιστούς των ψαριών και των φυτών βρίσκονται ακόμη σε πρόδρομο ερευνητικό στάδιο (Zhu et al. 1995, Nozawa και Seki 2001, Claparols et al. 2004).

Σύμφωνα με μία άλλη προσέγγιση, η παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων του ενζύμου σε χαμηλή τιμή μπορεί να γίνει με τη βοήθεια της γενετικής μηχανικής, και πιο συγκεκριμένα, μέσω της ενσωμάτωσης του γονιδίου που κωδικοποιεί τη σύνθεση της *TG*, σε διάφορους μικροοργανισμούς, όπως *E.coli*, *Bacillus* spp., *Aspergillus* spp. και ζύμες, οι οποίοι χρησιμοποιούνται ως κύτταρα-ξενιστές (Ikura et al. 1988, Bishop et al. 1990, Takehana et al. 1994, Washizu et al. 1994, Yasueda et

al. 1995). Εντούτοις, καμία από αυτές τις *TG* δεν έχει διατεθεί στο εμπόριο, κυρίως λόγω της χαμηλής αποδεκτικότητάς τους από το καταναλωτικό κοινό.

Η τελευταία προσέγγιση στο θέμα αφορούσε στην εύρεση κατάλληλων μικροοργανισμών που μπορούν να παράγουν *TG*. Σκοπός ήταν να γίνει δυνατή η μαζική παραγωγή του ενζύμου από φτηνές πηγές, όπως είναι οι μικροοργανισμοί, με παραδοσιακές τεχνολογίες ζύμωσης. Οι Ando et al. (1989) εξέτασαν λεπτομερώς περίπου 5.000 μικροβιακά στελέχη, τα οποία απομονώθηκαν από το έδαφος διαφόρων περιοχών. Μεταξύ των στελεχών, τα οποία εξετάστηκαν, το *Streptovercillium* sp. S-8112 βρέθηκε ότι είχε την ικανότητα να παράγει *TG*. Αυτή η *TG*, η οποία ήταν η πρώτη που λαμβανόταν από άλλη πηγή εκτός των θηλαστικών, ονομάστηκε μικροβιακή τρανσγλουταμινάση (*MTG*). Αργότερα αποδείχθηκε ότι και άλλα είδη του γένους *Streptovercillium*, όπως τα *S. griseocarneum*, *S. cinnamoneum* subsp. *cinnamoneum*, *S. mobaraense* και *S. ladakanum*, έχουν τη δυνατότητα να παράγουν *TG* (Motoki et al. 1989, Gerber et al. 1994, Zhu et al. 1996, 1998, Tsai et al. 1996, Lu et al. 2003, Téllez-Luis et al. 2004a, Téllez-Luis et al. 2004b). Ένα στέλεχος *Streptomyces* sp. έχει παρουσιάσει, επίσης, ενζυμική δραστηριότητα ανάλογη της *TG* (Ando et al. 1989). Πρόσφατα, έγινε παραγωγή *TG* από ένα στέλεχος *Bacillus circulans* (Soares et al. 2003a, Soares et al. 2003b).

Για την παραγωγή *MTG* χρησιμοποιήθηκε πρόσφατα ως κύτταρο-ξενιστής το *Corynebacterium glutamicum*, στο οποίο εκφράζεται το DNA του *S. mobaraense*, με αρκετά καλά αποτελέσματα (Date et al. 2003, Kikuchi et al. 2003). Το *C. glutamicum* είναι ένα Gram-θετικό και μη σπορογόνο βακτηρίδιο. Το DNA του αποτελείται από 56% γουανίνη-κυτοσίνη (Malumbres et al. 1993) και έχει γίνει πλήρης ανάλυση της αλληλουχίας των βάσεων του (*sequencing*) (Ikeda και Nakagawa 2003). Το βακτηρίδιο αυτό χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων για την παραγωγή λυσίνης και γλουταμικού οξέος, τα οποία ενσωματώνονται σε τρόφιμα και ζωοτροφές εδώ και δεκαετίες. Το *C. glutamicum* είναι μη παθογόνο και δεν παράγει τοξίνες επικίνδυνες για τον άνθρωπο (Liebl 1991, Krämer 1994). Έτσι, το *C. glutamicum* θα μπορούσε να θεωρηθεί κατάλληλο για την παραγωγή ενός ενζύμου, όπως είναι η *MTG*, το οποίο χρησιμοποιείται στην τεχνολογία των τροφίμων (Yokoyama et al. 2004).

Η μέθοδος ζύμωσης, η οποία χρησιμοποιείται για την παραγωγή της *MTG*, είναι, σε γενικές γραμμές, η ίδια για τους διάφορους προαναφερθέντες μικροοργανισμούς. Οι τελευταίοι εκκρίνουν την *MTG* στο ζυμό ανάπτυξης, γι' αυτό και η ανάκτηση του ενζύμου μπορεί να γίνει με απλό διαχωρισμό της στερεής ύλης

από το ζωμό, χωρίς να είναι απαραίτητη η λύση των μικροβιακών κυττάρων. Γενικά, η σύνθεση του υποστρώματος και οι περιβαλλοντικές συνθήκες (pH, θερμοκρασία και διαλυτό οξυγόνο) αποτελούν σημαντικούς παράγοντες, οι οποίοι επηρεάζουν την παραγωγή του ενζύμου (Yan et al. 2005). Για τον καθαρισμό της *MTG* μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι κοινές μέθοδοι (εξαλάτωση, διαπίδυση, υπερφυγοκέντρωση, χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων, χρωματογραφία προσρόφησης και μέθοδοι ισοηλεκτρικού σημείου), μόνες τους ή και σε συνδυασμό, με σκοπό την όσο το δυνατόν καλύτερη αποδοτικότητά τους (Zhu et al. 1995).

ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΤΡΑΝΣΓΛΟΥΤΑΜΙΝΑΣΩΝ

Ο παράγοντας XIII και η *TG* του ήπατος ινδικού χοιριδίου (*GTG*) έχουν περιγραφεί καλύτερα, όσον αφορά στη δομή και στα χαρακτηριστικά τους, από όλες τις *TG* των θηλαστικών που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα (Ichinose et al. 1986, Ikura et al. 1988). Επίσης, έχει γίνει πλήρης ανάλυση της αλληλουχίας των αμινοξέων της *TG*, η οποία παράγεται από τα *Streptovorticillium* sp., S-8112 και *S. mobaraense* (Kanaji et al. 1993). Το μόριο της *TG* αποτελείται από 331 υπολείμματα αμινοξέων. Η συγκριτική μελέτη της αλληλουχίας των αμινοξέων έδειξε περιορισμένη σχέση μεταξύ της *MTG* και της *TG* των θηλαστικών. Διαπιστώθηκε, ακόμη, ότι η *MTG*, η οποία παράγεται από το *Streptovorticillium* sp., δεν παρουσιάζει ομόλογες περιοχές αμινοξέων με την περιοχή σύνδεσης των ιόντων Ca^{2+} των άλλων *TG*. Έτσι εξηγείται γιατί η *MTG* καταλύει αντιδράσεις ανεξάρτητα από την παρουσία ιόντων Ca^{2+} , σε αντίθεση με τις άλλες *TG*, οι οποίες δρουν μόνο παρουσία ιόντων Ca^{2+} .

Η ανάλυση της αλληλουχίας των βάσεων στο DNA των μικροοργανισμών που παράγουν *TG* υποδεικνύει την πιθανή ύπαρξη ενός σημαντικού πεπτιδίου στο αμινοτελικό άκρο της *MTG*, το οποίο αποτελείται από 18 υπολείμματα αμινοξέων και, επίσης, την ύπαρξη υπολείμματος κυστεΐνης, το οποίο παίζει ουσιαστικό ρόλο στην εκδήλωση της ενζυμικής δράσης. Έχει αναφερθεί ότι η αλληλουχία των αμινοξέων γύρω από το υπόλειμμα Cys64 της *MTG* είναι αρκετά διαφορετική σε σχέση με την αλληλουχία των αμινοξέων, τα οποία περιβάλλουν το ενεργό υπόλειμμα κυστεΐνης τόσο στη *GTG* όσο και στην *TG*, η οποία προέρχεται από ψάρια (*FTG*). Αυτό ακριβώς υποδηλώνει τη διαφορετική οδό παραγωγής της *MTG* σε σχέση με τις *GTG* και *FTG* και, συνεπώς, την αρκετά διαφορετική ειδικότητα των υποστρωμάτων τους (Shimba et al. 2002α, Shimba et al. 2002β).

Το ισοηλεκτρικό σημείο (pI) της *MTG* είναι 9. Το μοριακό της βάρος, όπως αυτό υπολογίστηκε με βάση

τη σύνθεσή της (331 υπολείμματα αμινοξέων), είναι 37.842. Παρόμοια τιμή (38.000) προκύπτει και κατά τον πειραματικό προσδιορισμό του μοριακού της βάρους (ηλεκτροφόρηση SDS-πολυακρυλαμιδίου και χρωματογραφία πηκτής). Επομένως, η *MTG* θεωρείται μία μονομερής και απλή πρωτεΐνη (όχι γλυκοπρωτεΐνη ή λιποπρωτεΐνη), αν και υπάρχουν δύο πιθανές θέσεις γλυκοσυλίουσης (-Thr-Xxx-Asn-) στην πρωτοταγή της δομή (Motoki και Seguro 1998, Yokoyama et al. 2004).

Η εργασία των Kashiwagi et al. (2002) έδωσε την κρυσταλλική δομή της *MTG* με ένα διαχωρισμό της τάξης των 2,4 Å. Το μόριο της *MTG* παρουσιάζει απλή σφαιρική διαμόρφωση, η οποία είναι χαρακτηριστική των εκκριτικών πρωτεϊνών, με διαστάσεις 65x59x41 Å. Η πολυπεπτιδική της αλυσίδα αναδιπλώνεται σε σχήμα φύλλου, με μία βαθιά σχισμή στην άκρη του μορίου. Το υπόλειμμα της Cys64, το οποίο θεωρείται απαραίτητο για την καταλυτική λειτουργία του ενζύμου, βρίσκεται στον πυθμένα της σχισμής αυτής. Το μόριο που προκύπτει είναι συμπαγές και αποτελείται από 11 α-έλικες και 8 β-πτυχωτές επιφάνειες. Η ανάλυση της αλληλουχίας των αμινοξέων της *MTG* υποδεικνύει ότι το ένζυμο αυτό είναι μάλλον υδρόφιλο στο σύνολό του, αν και παρουσιάζει στην επιφάνειά του περιοχές, οι οποίες συνίστανται από υπολείμματα υδρόφοβων αμινοξέων.

ΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ *MTG*

Η καθαρή *MTG* παρουσιάζει υψηλή ενζυμική δράση σε τιμές pH που κυμαίνονται από 5 έως 8, με άριστη τιμή 6· μικρότερης έντασης ενζυμική δράση παρουσιάζει ακόμη και σε τιμή 4 ή 9. Έτσι, η *MTG* θεωρείται σταθερή σε ένα μεγάλο εύρος τιμών pH και κατά συνέπεια σε τιμές pH, οι οποίες είναι τυπικές για πολλά είδη τροφίμων (Motoki και Seguro 1998, Ajinomoto 2004).

Οι περισσότερες έρευνες μέχρι σήμερα, στις οποίες ο παράγοντας XIII χρησιμοποιήθηκε ως συνδεδετικό μέσο στην τεχνολογία παραγωγής προϊόντων κρέατος, πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασίες 30-37°C, με σκοπό η δραστηριότητα του ενζύμου να είναι η μέγιστη δυνατή. Οι Wijngaards και Paardekooper (1988) ανέφεραν, όμως, την ύπαρξη ενζυμικής δραστηριότητας και σε θερμοκρασίες 2-10°C, οι οποίες θεωρούνται περισσότερο ασφαλείς κατά την επεξεργασία του κρέατος. Οι Nielsen et al. (1995), όμως, διαπίστωσαν ότι ο παράγοντας XIII αυξάνει τη συνεκτικότητα, τη σκληρότητα και την ελαστικότητα της νωπής κρεατόπαστας, όταν δράσει σε θερμοκρασία 37°C για 90 min, ενώ προκαλεί ασήμαντες αλλαγές στην υφή της κρεατόπαστας, όταν η επεξεργασία της γίνει στους 10°C για 23 ώρες.

Από τη στιγμή που ανακαλύφθηκε η *MTG* και παράγεται πλέον μαζί, έχει αρχίσει και η έρευνα για τη χρησιμοποίησή της στη βιομηχανία τροφίμων. Οι

Kuraishi et al. (1997) ανέφεραν ότι το σύστημα *MTG*/καζεϊνικού νατρίου θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ένας συνδετικός παράγοντας, σε χαμηλές θερμοκρασίες (*cold-set binder*), για την παραγωγή αναδομημένων προϊόντων κρέατος (*restructured meat*) από τεμάχια κατεψυγμένου κρέατος, χωρίς την προσθήκη NaCl. Αργότερα, οι Serrano et al. (2003) χρησιμοποίησαν σε χαμηλές θερμοκρασίες την *MTG* ως συνδετικό παράγοντα, με σκοπό να παράγουν «μορφοποιημένες μπριζόλες» από τεμάχια βόειου κρέατος (*restructured beef steaks*). Τα προϊόντα που παράχθηκαν είχαν τις απαιτούμενες μηχανικές ιδιότητες για κάθε είδους χειρισμούς. Σύμφωνα με τους Motoki και Seguro (1998), η *MTG* εξακολουθεί να είναι ενεργή στους 10°C, ενώ διατηρεί κάποια δραστηριότητα ακόμη και σε θερμοκρασίες ακριβώς πάνω από το σημείο πήξης (*freezing-point*).

Στα ψάρια, η θερμοκρασία επιδρά αποφασιστικά στην ικανότητα σχηματισμού γέλης (*gel*) και στην ποιότητα του *surimi* (An et al. 1996). Σύμφωνα με τους Ramirez et al. (2000), η ενδογενής *FTG* παρουσιάζει μέγιστη δραστηριότητα σε θερμοκρασία 32-36°C, ενώ η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της *MTG* είναι 35-40°C. Η προσθήκη *MTG* στην ιχθυόπαστα αυξάνει τη σταθερότητα της γέλης, η οποία σχηματίζεται σε θερμοκρασίες από 0 έως 40°C (*low temperature setting*) (Lee et al. 1997). Ποσότητες *MTG* ίσες με 0,2-0,3% είναι αρκετές για την εκδήλωση της ενζυμικής της δραστηριότητας (Jiang et al. 2000). Οι Ramirez et al. (2000) υποστήριξαν ότι η θέρμανση της ιχθυόπαστας στους 40°C για 1 ώρα, και στη συνέχεια η επεξεργασία της σε υδατόλουτρο στους 90°C για 30 min, αποτελούν τις ιδανικές συνθήκες για την εφαρμογή της *MTG* στην παραγωγή γέλης από *surimi* (*surimi gels*). Οι ίδιες (Ramirez et al. 2002) ή παρόμοιες συνθήκες (Téllez-Luis et al. 2002, Uresti et al. 2004a) εφαρμόστηκαν για την παραγωγή μορφοποιημένων ιχθυοσκευασμάτων (*restructured fish products*), χρησιμοποιώντας αλάτι και *MTG* ως συνδετικούς παράγοντες. Βέβαια, ο σχηματισμός γέλης θεωρείται ένα ιδιαίτερα περίπλοκο φαινόμενο. Τόσο τα ιόντα Ca²⁺ όσο και η τριτοταγής δομή των συστατικών πρωτεϊνών, οι οποίες είναι ευαίσθητες σε υψηλές θερμοκρασίες, φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του φαινομένου. Έτσι, η άριστη θερμοκρασία δράσης των *TG*, κατά το σχηματισμό πρωτεϊνικής γέλης, εξαρτάται από το είδος του ψαριού και συγκεκριμένα από το είδος και την αναλογία των συστατικών πρωτεϊνών, οι οποίες αποτελούν το υπόστρωμα του ενζύμου (Tsukamasa et al. 2002).

Η σταθερότητα της *MTG* σε υψηλές θερμοκρασίες διερευνήθηκε από τους Küttemayer et al. (2005), οι οποίοι παρατήρησαν ότι το ένζυμο παρουσιάζει μικρή δρα-

στηριότητα στους 65°C, ενώ αδρανοποιείται πλήρως, σε λίγα λεπτά, στους 70°C (Motoki και Seguro 1998). Γενικά, η θερμοκρασία αδρανοποίησης του ενζύμου κατά τη θερμική επεξεργασία των τροφίμων ποικίλλει ανάλογα με το είδος του τροφίμου (Ajinomoto 2004).

Συμπερασματικά, η *MTG* παραμένει ενεργή σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών, παρουσιάζοντας την υψηλότερη ενζυμική δραστηριότητα σε θερμοκρασία περίπου 50°C (Motoki και Seguro 1998). Η προσαρμοστικότητα της *MTG* σε διαφορετικές θερμοκρασίες καθιστά δυνατή τη χρήση της στην τεχνολογία των τροφίμων, ακόμη και όταν οι συνθήκες επεξεργασίας των τροφίμων θεωρούνται ακραίες (Ajinomoto 2004).

Όσον αφορά στην ικανότητα αντιδράσεως της *MTG* σε διαφορετικά υποστρώματα (ειδικότητα του υποστρώματος), έχει αποδειχθεί ότι οι περισσότερες πρωτεΐνες των τροφίμων, όπως οι σφαιρίνες των οσπρίων, η γλουτένη και η γλιαδίνη των σιτηρών, οι πρωτεΐνες της λεκίθου και του λευκώματος του αυγού, η ακτίνη και η μυοσίνη του κρέατος, η ζελατίνη, το κολλαγόνο, οι καζεΐνες του γάλακτος, η α-λακταλβουμίνη και η β-λακτοσφαιρίνη, μπορούν να συνδεθούν με σταυροειδείς δεσμούς, χάρη στην καταλυτική δράση του ενζύμου (Nonaka et al. 1992, Kang et al. 1994, Seguro et al. 1995, Motoki και Seguro 1998, Nomura et al. 2001, Sharma et al. 2002, Nieuwenhuizen et al. 2004, Truong et al. 2004, Ajinomoto 2004).

Η μοναδικότητα της *MTG*, σε σχέση με τις *TG* των θηλαστικών, οφείλεται στην ικανότητά της να παρουσιάζει ενζυμική δράση ανεξάρτητα από την παρουσία ιόντων Ca²⁺. Σύμφωνα με τους Ohtsuka et al. (2001), η διαφορά αυτή φαίνεται ότι σχετίζεται με τη μικρότερη ικανότητα απαιμίδωσης της *MTG* σε σχέση με την *FTG* και τη *GTG*. Πριν την ανακάλυψη της *MTG*, η χρήση των *TG* περιοριζόταν υποχρεωτικά σε τρόφιμα που περιείχαν ικανοποιητική ποσότητα ιόντων Ca²⁺ (Gerrard 2002). Σήμερα, η *MTG* μπορεί να τροποποιεί τις λειτουργικές ιδιότητες διαφόρων πρωτεϊνών, όπως είναι οι καζεΐνες του γάλακτος, οι σφαιρίνες της σόγιας και η μυοσίνη, οι οποίες καθιζάνουν παρουσία ιόντων Ca²⁺ και έτσι, ανταποκρίνονται λιγότερο στη δράση του ενζύμου (Motoki και Seguro 1998).

Η ευαισθησία της *MTG* απέναντι σε άλλα κατιόντα έχει ερευνηθεί από τους Seguro et al. (1996a), οι οποίοι παρατήρησαν ότι τα ιόντα Cu²⁺, Zn²⁺, Pb²⁺ και Li⁺ εμποδίζουν σημαντικά τη δράση του ενζύμου. Το γεγονός ότι τα βαρέα μέταλλα, όπως τα ιόντα Cu²⁺, Zn²⁺ και Pb²⁺, δεσμεύουν τη θειική ομάδα του υπολειμματος κυστεΐνης του μορίου της *MTG*, συνηγορεί υπέρ της άποψης ότι το υπόλειμμα κυστεΐνης είναι πιθανό να αποτελεί τμήμα της ενεργής περιοχής του ενζύμου.

Οι Küttemayer et al. (2005) ερεύνησαν την επίδρα-

ση διαφορετικών συγκεντρώσεων αλάτων στην ενζυμική δραστηριότητα της *MTG*. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής, τα μονοθενή ιόντα των αλάτων (NaCl, KCl) ευνοούν τη δράση της *MTG*, ενώ τα δισθενή ιόντα του MgCl₂ την επηρεάζουν ελάχιστα και τα δισθενή ιόντα του CaCl₂ μειώνουν την ενζυμική δραστηριότητα και τη σταθερότητα του ενζύμου σε υψηλές θερμοκρασίες. Η δράση της *MTG* είναι μεγαλύτερη όταν το χλωριούχο νάτριο και το χλωριούχο κάλιο προστεθούν στο νερό, επειδή τα ιόντα των αλάτων αυτών αυξάνουν τη διαλυτότητά της.

Η εφαρμογή υψηλής πίεσης καθιστά πιο εύκολη τη δημιουργία σταυροειδών δεσμών μεταξύ των μορίων της μυοσίνης αφού, όπως αποδείχθηκε, η πίεση μπορεί να αυξήσει την καταλυτική δράση της *TG* (Masson 1992, Gilleland et al. 1997, Nonaka et al. 1997). Σύμφωνα με άλλες αναφορές (Shoji et al. 1994), η ενδογενής *TG* των ψαριών θεωρείται σχετικά ευαίσθητη στις υψηλές πιέσεις. Αντίθετα, οι Ashie και Lanier (1999) απέδειξαν ότι τόσο αυτή όσο και η προστιθέμενη *MTG*, η οποία χρησιμοποιήθηκε στην τεχνολογία παρασκευής *surimi*, δεν επηρεάζονται από την εφαρμογή υψηλής πίεσης (άνω των 300 MPa, 4 °C) και διατηρούν αμείωτη την ενζυμική τους δράση. Στην πραγματικότητα, η πίεση αυξάνει την ενζυμική δράση της *MTG*, επειδή διευκολύνει την αλλοδομή και τη θραύση των μορίων της μυοσίνης, η οποία αποτελεί το κύριο υπόστρωμα του ενζύμου (Gilleland et al. 1997). Μεταγενέστερες μελέτες (Pérez-Mateos et al. 2002) έδειξαν ότι η εφαρμογή μέτριας πίεσης (300 MPa, 4 °C) μετά το στάδιο του σχηματισμού γέλης δεν καταστρέφει τη συνέχεια της δομής, η οποία είχε πιθανώς ενισχυθεί από την καταλυτική δράση της *TG*. Αντίθετα, οι μηχανικές ιδιότητες της γέλης βελτιώνονται ανάλογα με την ένταση και τη διάρκεια της εφαρμοζόμενης πίεσης (Uresti et al. 2004β, 2005, 2006). Επίσης, αποδείχθηκε ότι η εφαρμογή πίεσης, μετά το στάδιο του σχηματισμού γέλης, μειώνει σημαντικά την υπολειμματική ενζυμική δράση της *TG* (Montero et al. 2005), αλλά σε συνδυασμό με χιτοζάνη μειώνει και την ποσότητα του ενεργού θειοβαρβιτουρικού οξέος (Gomez-Guillen et al. 2005).

Υψηλή πίεση (400 MPa, 40 °C) χρησιμοποιήθηκε, επίσης, με καλά αποτελέσματα στην επεξεργασία της λακτοσφαιρίνης και της καζεΐνης του γάλακτος με *MTG*. Τα ετερόλογα ολιγομερή, τα οποία σχηματίζονται από την καταλυτική δράση της *MTG*, δίνουν νέες προοπτικές για τη χρησιμοποίηση των πρωτεϊνών του γάλακτος στην τεχνολογία τροφίμων (Lauber et al. 2003).

Η επίδραση της υπεριώδους (UV) ακτινοβολίας στην ενζυμική δράση της *MTG* ερευνήθηκε από τους Jiang et al. (1998), κατά την παρασκευή γέλης από ιχθυομυττώτο σκουμπριού. Η σημαντική αύξηση της

συνεκτικότητας της γέλης έδειξε ότι η UV ακτινοβολία ευνοεί την καταλυτική δράση της *MTG* και συνακόλουθα τη δημιουργία σταυροειδών δεσμών μεταξύ της βαρεΐας μερομυοσίνης (HMM).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ένα από τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα της *TG* είναι ότι μπορεί να καταλύει αντιδράσεις, οι οποίες οδηγούν στην τροποποίηση των λειτουργικών ιδιοτήτων των πρωτεϊνών στα τρόφιμα. Πιο συγκεκριμένα, δύο ή περισσότερες πρωτεΐνες διαφορετικής προέλευσης, όπως είναι οι πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος, οι σφαιρίνες της σόγιας, η γλουτένη, οι πρωτεΐνες των αυγών, η ακτίνη και η μυοσίνη, μπορούν να συνδεθούν με ομοιοπολικούς δεσμούς, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό νέων πρωτεϊνών, με νέες ξεχωριστές λειτουργικές ιδιότητες (Ramirez-Suarez και Xiong 2003, Ramirez-Suarez et al 2005). Έτσι, η *MTG* καταλύει τη σύνδεση της καζεΐνης του γάλακτος ή της σφαιρίνης της σόγιας με την οβαλβουμίνη, η οποία είναι μία πρωτεΐνη του λευκώματος του αυγού, με αποτέλεσμα την αύξηση της γαλακτωματοποιητικής τους ικανότητας (Kato et al. 1991). Επίσης, η σύνδεση καζεΐνης-ζελατίνης, μετά από την επεξεργασία τους με *MTG*, αποδίδει νέες πρωτεΐνες, με νέες ιδιότητες, όπως είναι π.χ. η μεγάλη διαλυτότητά τους σε οξινό pH (Nielsen 1995).

Η *MTG* μπορεί, επίσης, να χρησιμοποιηθεί για την ενσωμάτωση αμινοξέων ή πεπτιδίων στις πρωτεΐνες μέσω ομοιοπολικών δεσμών, με απώτερο σκοπό τη βελτίωση της θρεπτικής αξίας των ίδιων των πρωτεϊνών και γενικότερα των τροφίμων (Nonaka et al. 1996). Στην πράξη, η *MTG* μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να εισαχθούν όλα τα κοινά και, κυρίως, τα απαραίτητα αμινοξέα σε ατελείς πρωτεΐνες. Επιπλέον, η σύνδεση αυτή αμινοξέων ή πεπτιδίων, μέσω του σχηματισμού σταυροειδών δεσμών, αποτρέπει την καταστροφή απαραίτητων αμινοξέων, όπως η λυσίνη, κατά τη διάρκεια διαφόρων χημικών αντιδράσεων (π.χ. αντίδραση *Maillard*) στα τρόφιμα. Ως υποστρώματα της *MTG* μπορούν να χρησιμεύσουν, θεωρητικά, τόσο τα πεπτίδια που περιέχουν λυσίνη όσο και αυτά που περιέχουν γλουταμίνη. Στις αντιδράσεις αυτές, τα πεπτίδια που περιέχουν λυσίνη δρουν ως δέκτες ακετυλίου, ενώ οι πρωτεΐνες ως δότες ακετυλίου. Αντίθετα, στην περίπτωση που ενσωματώνεται στις πρωτεΐνες ένα πεπτίδιο που περιέχει γλουταμίνη, το τελευταίο δρα ως δότης ακετυλίου, ενώ η πρωτεΐνη-υπόστρωμα συμμετέχει στην ίδια αντίδραση ως δέκτης ακετυλίου. Η χρησιμοποίηση, όμως, των πεπτιδίων που περιέχουν γλουταμίνη στη βιομηχανία τροφίμων είναι, προς το παρόν, περισσότερο περίπλοκη και πρακτικά μη εφαρμόσιμη, λόγω της υψηλότερης εξειδίκευσής τους ως προς το υπόστρωμα. Από την άλλη, τα πεπτίδια που περιέχουν

λυσίνη μπορούν να ενσωματωθούν σε πρωτεΐνες για να αντισταθμίσουν μια πιθανή ανεπάρκεια σε αμινοξέα. Για παράδειγμα, η λυσιλμεθειονίνη (ή μεθειονυλυσίνη) μπορεί να ενσωματωθεί σε καζεΐνες, για να αντισταθμιστεί η ανεπάρκεια σε μεθειονίνη. Παρομοίως, η λυσιλαργινίνη (ή αργινυλυσίνη) μπορεί να ενσωματωθεί σε καζεΐνες, για να αντισταθμιστεί η ανεπάρκειά τους σε αργινίνη (Motoki και Seguro 1998).

Λόγω της ικανότητας της *MTG* να συνδέει πρωτεΐνες, είναι δυνατό να αποφευχθεί η θερμική επεξεργασία τους που αποσκοπεί στο σχηματισμό γέλης. Η *MTG* είναι ικανή να μετατρέπει σε γέλη διαλύματα με υψηλές συγκεντρώσεις πρωτεϊνών, όπως είναι οι πρωτεΐνες του ορού γάλακτος, οι πρωτεΐνες της σόγιας και η ακτομοσίνη του κρέατος μόσχου, χοίρου, πουλερικών και ψαριών (Nonaka et al. 1992, Chanyongvorakul et al. 1995, Motoki και Seguro 1998, Pietrasik και Li-Chan 2002, Jarmoluk και Pietrasik 2003, Pietrasik 2003, Pietrasik και Jarmoluk 2003, Uresti et al. 2003; Eissa et al. 2004, Menendez et al. 2004, Fan et al. 2005, Mounsey et al. 2005). Επίσης, η ζελατίνη, όταν επεξεργαστεί με *TG* σε χαμηλές θερμοκρασίες, σχηματίζει γέλη η οποία δε ρευστοποιείται στους 100 °C (Kolodziejaska et al. 2004, Soeda et al. 2005α).

Η ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΗΣ *TG* ΚΑΙ Η ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΣΥΝΔΕΔΕΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Η κατανάλωση της *TG* από τον άνθρωπο γίνεται εδώ και αιώνες, μέσω της κατανάλωσης των φυτών που την περιέχουν, όπως είναι τα μπρόκολα, τα τεύτλα, το σπανάκι και η σόγια (Icekson και Apelbaum 1987, Serafini-Francassini et al. 1988, Serafini-Francassini et al. 1989, Margosiak et al. 1990, Signorini et al. 1991, Kang and Cho 1996). Κατά παρόμοιο τρόπο, η ενδογενής *FTG* καταναλώνεται για αιώνες, ενώ φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή ιχθυοσκευασμάτων, όπως είναι τα αλιπαστωμένα και αφυδατωμένα φιλέτα (Kumazawa et al. 1993), το *surimi* και τα προϊόντα με βάση το *surimi* (κυρίως *kamaboko*) (Seguro et al. 1995).

Τα τελευταία χρόνια αυξήθηκε η κατανάλωση της *TG* από τον άνθρωπο, γεγονός που οφείλεται στην ανακάλυψη της *MTG* και τη μαζική παραγωγή της. Τα ένζυμα, γενικά, θεωρούνται ουσίες χαμηλής τοξικότητας. Οι Bernard et al. (1998) εξέτασαν την τοξικότητα της *MTG*, καθώς και την πιθανότητα να προκαλεί μεταλλάξεις. Το ένζυμο χορηγήθηκε σε αρουραίους, στους οποίους δεν παρατηρήθηκαν τοξικά φαινόμενα από τη δράση του.

Όπως αποδείχθηκε αργότερα, η πιθανότητα να προκαλεί η *MTG* αλλεργικά φαινόμενα στον άνθρωπο

είναι πολύ μικρή έως ανύπαρκτη (Pedersen et al. 2004). Αντίθετα, μάλιστα, η επεξεργασία των πρωτεϊνών με *MTG* μειώνει ή εξαλείφει την πιθανότητα να προκαλέσουν αλλεργική αντίδραση (Watanabe et al. 1994).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η καταλυτική δράση της *TG* βελτιώνει την υφή των τροφίμων μέσω της δημιουργίας ισοπεπτιδικών δεσμών γλουταμίνης-λυσίνης (*G-L bonds*). Κατά συνέπεια, θα έπρεπε να εξεταστεί τόσο η δυνατότητα πέψης των δεσμών αυτών όσο και η κατανομή τους στα τρόφιμα (Sato et al. 1992), με σκοπό να αποδειχθεί η βιοδιαθεσιμότητα των συνδεδεμένων πρωτεϊνών.

Τα μη μεταποιημένα τρόφιμα (κρέας, ψάρια, αυγά ψαριών-χαβιάρι, οστρακόδερμα), με εξαίρεση το γάλα, περιέχουν σε υψηλά ποσοστά το δεσμό *G-L* (Sakamoto et al. 1995α, Kumazawa et al., 1996). Σύμφωνα με τους Sakamoto et al. (1995α), ο μέσος όρος των δεσμών *G-L* είναι κάπως υψηλότερος στα επεξεργασμένα και κυρίως στα θερμικώς επεξεργασμένα τρόφιμα (*kamaboko*, εγκυτιωμένα ψάρια, χοιρομήριο, μαγειρεμένο βόειο και χοίρειο κρέας, κορν-μπιφ, ψημένο χοίρειο κρέας, τηγανισμένο κοτόπουλο, χάμπουργκερ) σε σχέση με την ακατέργαστη πρώτη ύλη. Ο σχηματισμός των δεσμών *G-L* στην πρώτη ύλη και στα θερμικώς επεξεργασμένα τρόφιμα πραγματοποιείται με την καταλυτική δράση της ενδογενούς *TG*, η οποία, όπως έχει ήδη αναφερθεί, αποτελεί ένζυμο που απαντάται μόνο σε ζωντανούς οργανισμούς. Έτσι εξηγείται το γεγονός ότι δεν ανιχνεύονται δεσμοί *G-L* στα γαλακτοκομικά προϊόντα, αφού το ίδιο το γάλα δεν περιέχει ενδογενή *TG*. Πρόσφατα, μάλιστα, αποδείχτηκε η ύπαρξη ενός συστατικού στο γάλα βοοειδών, αιγοπροβάτων και του ανθρώπου, το οποίο έχει μικρό μοριακό βάρος και εμποδίζει τη δράση της προστιθέμενης *MTG* (De Jong et al. 2003).

Η άνοδος της θερμοκρασίας στα τρόφιμα, κατά το μαγείρεμά τους, είναι βραδεία και έτσι η ενδογενής *TG* μπορεί να παραμένει δραστική για χρονικό διάστημα που είναι επαρκές για τη δημιουργία των δεσμών *G-L*. Επιπρόσθετα, η θερμική επεξεργασία των πρωτεϊνούχων τροφίμων μπορεί να σχηματίζει δεσμούς *G-L* μεταξύ της γ-καρβοξυλικής ομάδας του γλουταμικού οξέος και της ε-αμινοομάδας της λυσίνης, μέσω χημικής αφυδάτωσης.

Οι δεσμοί *G-L* μπορούν να υδρολυθούν αποτελεσματικά *in vivo* από δύο ένζυμα: την κυκλοτρανσφεράση της γλουταμυλαμίνης, ένα ένζυμο των νεφρών (Fink et al. 1980) και τη γ-γλουταμυλοτρανσφεράση, η οποία απαντάται στο χροσσωτό επιθήλιο του εντέρου, στους νεφρούς και στο αίμα (Meister et al. 1981). Από τη διάσπαση του δεσμού *G-L*, είτε από το ένα είτε από το άλλο ένζυμο, παράγεται λυσίνη, η οποία είναι ένα

απαραίτητο αμινοξύ για τον άνθρωπο. Η θρεπτική αξία της λυσίνης, η οποία απελευθερώνεται κατά τη διάσπαση των δεσμών *G-L*, εκτιμήθηκε από τους Seguro et al. (1996β). Παρατηρήθηκε ότι αρουραίοι, οι οποίοι διατρέφονταν με καζεΐνες επεξεργασμένες με *MTG*, είχαν μεγαλύτερη ανάπτυξη σε σύγκριση με αρουραίους, οι οποίοι διατρέφονταν με καθαρές καζεΐνες. Φαίνεται ότι η επεξεργασία των καζεΐνων με *MTG* είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της βιολογικής τους αξίας, δηλαδή την καλύτερη αφομοίωση των συζευγμένων καζεΐνων και, πιο συγκεκριμένα, την πληρέστερη απορρόφηση-αξιοποίηση της ελεύθερης λυσίνης μετά τη διάσπαση των δεσμών *G-L* (Motoki και Seguro 1998).

ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ *MTG* ΣΤΗΝ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Η παραγωγή, σήμερα, της *TG* από μικροοργανισμούς επιτρέπει την εφαρμογή της στα περισσότερα τρόφιμα που περιέχουν πρωτεΐνες. Η *MTG* μπορεί να χρησιμοποιηθεί ακόμη και σε τρόφιμα με χαμηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, όταν προστεθούν, στο μίγμα *MTG*-τροφίμου, συστατικά όπως το καζεϊνικό νάτριο, η μαλτοδεξτρίνη και το άμυλο. Στα παραδείγματα που ακολουθούν, αναφέρονται πρακτικές χρήσεις της *MTG* σε βιομηχανική κλίμακα και άλλες πιθανές εφαρμογές του ενζύμου στην επεξεργασία των τροφίμων.

Προϊόντα με βάση το κρέας

Η μεγιστοποίηση της παραγωγής, η βελτίωση της θρεπτικής αξίας των πρωτεϊνών και η ανάπτυξη προϊόντων με χαμηλή λιποπεριεκτικότητα, χωρίς αλάτι και φωσφορικά, αποτελούν, σήμερα, θέματα με μεγάλο ενδιαφέρον για την τεχνολογία του κρέατος. Η χρησιμοποίηση της *MTG* διευκολύνει την παραγωγή μορφοποιημένων προϊόντων κρέατος, όπως χάμπουργκερ, μπιφτέκια, αλλαντίδια, γύρο, ζαμπόν, «*shao-mai*» (τυπικό κινέζικο φαγητό) και μορφοποιημένο κρέας. Ταυτόχρονα, βελτιώνει την ελαστικότητα, την υφή, τη γεύση και το άρωμα των τελικών προϊόντων (Zhu et al. 1995, Kuraishi et al. 1996, Hammer 1998, Motoki και Seguro 1998, Muguruma et al. 1999/2003, Tseng et al. 2000, Tsao et al. 2002, Kilic 2003, Kolle και Savell 2003, Lee και Park 2003, Ajinomoto 2004, Colmenero et al. 2005, Dimitrakopoulou et al. 2005, Soeda et al. 2005β). Η επεξεργασία κρέατος πουλερικών με *MTG* αυξάνει την ικανότητα συγκράτησης νερού και την γαλακτωματοποιητική ικανότητα των πρωτεϊνών, βελτιώνοντας με τον τρόπο αυτό τη λειτουργικότητά τους (Ruiz-Carrascal και Regenstein 2002).

Ιχθυοσκευάσματα

Η χρήση της *MTG* στην τεχνολογία παραγωγής *surimi* αυξάνει αποτελεσματικά τη σταθερότητα της

γέλης, η οποία σχηματίζεται πιθανώς λόγω της δράσης της ενδογενούς *TG* των ψαριών (Sakamoto et al. 1995β, Jiang et al. 2000, Pérez-Mateos et al. 2004, Yongsawadigul και Piyadhamviboon 2005). Κατά παρόμοιο τρόπο, η επεξεργασία με *MTG* επιτρέπει τη χρησιμοποίηση πρώτης ύλης κατώτερης ποιότητας για την παραγωγή πρωτεϊνικής μάζας υψηλής ποιότητας, η οποία αποδίδει προϊόντα με μεγαλύτερη συνεκτικότητα και χαμηλότερο κόστος (Seguro et al. 1995). Μέχρι σήμερα, έχουν αναφερθεί αρκετές μέθοδοι στις οποίες χρησιμοποιήθηκε *TG* διαφορετικής προέλευσης για την παραγωγή *kamaboko*, το οποίο παρουσιάζει βελτιωμένη υφή και λευκότερο χρώμα (Ichihara et al. 1990, Wakameda et al. 1990, Seguro et al. 1995, Yokoyama et al. 2003).

Σύμφωνα με τους Motoki και Seguro (1998), η έγχυση *MTG*, σε συνδυασμό με τη μάλαξη της σάρκας (*tumbling*), μειώνει τόσο τις απώλειες κατά την απόψυξη των κατεψυγμένων ιχθυοσκευασμάτων, όσο και τις απώλειές τους κατά το ψήσιμο.

Η επεξεργασία ζελατίνης, κολλαγόνου ή και του μίγματός τους με *MTG* έχει ως αποτέλεσμα την παρασκευή ενός θερμοανθεκτικού προϊόντος, το οποίο μοιάζει πολύ με φυσικά πτερούγια καρχαρία (*shark-fin imitation*), τα οποία αποτελούν ένα πολύ εύγευστο και υγιεινό έδεσμα στη Ν.Α. Ασία (Zhu et al. 1995).

Η χρησιμοποίηση *MTG* παρέχει τη δυνατότητα στους τεχνολόγους τροφίμων να συνδέουν μικρότερα τεμάχια σάρκας ψαριών, μαλακίων και οστρακόδερμων μεταξύ τους ή να μορφοποιούν τον ιχθυομπτωτό, με απώτερο σκοπό τον σχηματισμό μεγαλύτερων συμπαγών τεμαχίων (*formed-moulded fish*) (Ajinomoto 2004). Η *MTG* μπορεί να δράσει ως συνδετικός παράγοντας για την παραγωγή ανάλογων μορφοποιημένων ιχθυοσκευασμάτων (*restructured fish products*), ακόμη και σε χαμηλές θερμοκρασίες (Suklim et al. 2004). Η ικανότητα συγκράτησης ύδατος, η υφή και το χρώμα των νέων προϊόντων εξαρτώνται άμεσα από το είδος της πρώτης ύλης (Beltran-Lugo et al. 2005). Επίσης, είναι δυνατή η αξιοποίηση των υπολειμμάτων της σάρκας, τα οποία προκύπτουν μετά τη φιλετοποίηση των ψαριών, και η παραγωγή παρόμοιων μορφοποιημένων ιχθυοσκευασμάτων (Armbrust et al. 2003, Uresti et al. 2004α). Με τον ίδιο τρόπο, δύο μικρότερα φιλέτα ψαριού μπορούν να συνδεθούν μεταξύ τους, χάρη στην ενζυμική δράση της *MTG*, δίνοντας ένα φιλέτο μεγαλύτερου μεγέθους (*restructured-married fillets*) (Ajinomoto 2004).

Φαίνεται, λοιπόν, από τα παραπάνω ότι η *MTG* αποτελεί σήμερα μία ιδανική βοηθητική ύλη για την παρασκευή νέων ιχθυοσκευασμάτων. Έτσι, ακόμη και σάρκα, η οποία προέρχεται από ψάρια διαφορετικού χρώματος και υφής, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρώ-

τη ύλη για να σχηματιστούν νέα σύνθετα προϊόντα (*combination products*). Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, μάλιστα, των ιχθυοσκευασμάτων αυτών δεν μαρτυρούν τον τρόπο παρασκευής τους, αλλά απέμπουν σε κάποιο φυσικό προϊόν (Ajinomoto, 2004).

Γαλακτοκομικά προϊόντα

Σήμερα, έχει αναφερθεί η πιθανή εφαρμογή της *TG* στην τεχνολογία του γάλακτος, με σκοπό την αύξηση της σταθερότητας του γάλακτος σε υψηλές θερμοκρασίες (O'Sullivan et al. 2002). Το ένζυμο έχει, επίσης, δοκιμαστεί στην τεχνολογία παρασκευής διαφόρων τύπων τυριών, όπως είναι το *Gouda* και το *Quark* (Gerrard 2002). Οι Han et al. (2003) ανακάλυψαν μία βελτιωμένη μέθοδο παρασκευής τυριού χρησιμοποιώντας *TG*. Τα τυριά που παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο αυτή παρουσίαζαν συναίρεση σε μικρότερο ποσοστό, σε σχέση με παρόμοια τυριά, τα οποία παρασκευάστηκαν με τις κλασικές μεθόδους.

Η *MTG* βελτιώνει την ικανότητα συγκράτησης ύδατος του γιαουρτιού και προλαμβάνει προβλήματα παραγωγής, όπως είναι ο διαχωρισμός του ορού, τα οποία οφείλονται σε μεταβολές της θερμοκρασίας και σε διάφορες φυσικές επιδράσεις (Motoki και Seguro 1998). Οι Farnsworth et al. (1992) ανέφεραν ότι η ενζυμική δράση της *MTG* ίσως αποτελέσει μία αποτελεσματική μέθοδο αύξησης της συνεκτικότητας του γιαουρτιού. Επίσης, η χρήση *MTG* καθιστά δυνατή την παρασκευή γαλακτοκομικών προϊόντων, όπως παγωτό και τυρί, με χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά και στερεά (Motoki και Seguro 1998). Η επεξεργασία του παγωτού με *MTG* αποδίδει ένα προϊόν, το οποίο εμφανίζεται λιγότερο «παγωμένο», ενώ ταυτόχρονα είναι αρκετά αφράτο, ώστε να τρώγεται ευκολότερα (Kuraishi et al. 2001).

Οι πρωτεΐνες του γάλακτος, με την καταλυτική δράση της *MTG*, σχηματίζουν σταθερά γαλακτώματα υψηλού ιξώδους που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως επαλειφόμενες κρέμες, επιδόρπια ή γαρνιτούρες (Dickinson και Yamamoto 1996). Η επεξεργασία της α_{s1} -καζεΐνης με *MTG* έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό συνδεδεμένης καζεΐνης (*cross-linked casein*), η οποία είναι λιγότερο αλλεργιογόνος. Επίσης, η απαμίνωση της καζεΐνης, μετά από την επεξεργασία της με *MTG*, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενός διαλυτού προϊόντος, το οποίο ευνοεί την απορρόφηση των ιχνοστοιχείων στο έντερο (Zhu et al. 1995). Η καζεΐνη, η οποία έχει υποστεί διαδοχικά επεξεργασία με *TG* και αφυδάτωση, μετατρέπεται σε μία μεμβράνη αδιάλυτη στο νερό (*water-insoluble film*). Αυτή η μεμβράνη μπορεί να υδρολυθεί από τη χυμοτροψίνη, γι' αυτό και είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί ως ένα εδώδιμο υλικό

συσσκευασίας (Oh et al. 2003).

Προϊόντα σόγιας

Το Tofu αποτελεί μια τυπική πηκτή σόγιας, η οποία παρασκευάζεται μέσω της πήξης των πρωτεϊνών της σόγιας με την προσθήκη ιόντων Ca^{2+} , Mg^{2+} και/ή γλυκονο-δ-λακτόνης. Η απαλή και μαλακή υφή του Tofu καταστρέφεται εύκολα κατά την αποστείρωση. Η προσθήκη *MTG* έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενός προϊόντος μακράς διάρκειας (*long-life*), το οποίο διατηρεί την απαλή του υφή, ακόμη και μετά την αποστείρωση (Nonaka et al. 1990, Kato et al. 1991, Zhu et al. 1995, Motoki και Seguro 1998, Kwan και Easa 2003). Επίσης, η δράση της *MTG* μπορεί να αυξήσει τη σταθερότητα του yuba, ενός παραδοσιακού ιαπωνικού προϊόντος (εδώδιμη μεμβράνη) τύπου *delicatessen* (Motoki και Seguro 1998).

Προϊόντα σιτηρών

Η *MTG* χρησιμοποιείται στην αρτοποιία και τη ζαχαροπλαστική με πολύ καλά αποτελέσματα. Η επεξεργασία του σιτάλευρου με *MTG* δίνει περισσότερο συνεκτικές και ελαστικές ζύμες, οι οποίες παρουσιάζουν αυξημένη ικανότητα συγκράτησης ύδατος και αερίων που παράγονται κατά τη ζύμωση. Έτσι, τα τελικά προϊόντα, κυρίως τα διάφορα είδη άρτου, εμφανίζουν, μετά το ψήσιμο, βελτιωμένα ποιοτικά χαρακτηριστικά και αύξηση του όγκου τους (Zhu et al. 1995, Motoki και Seguro 1998, Bauer et al. 2003a, Bauer et al. 2003b, Hozova et al. 2003, Rosell et al. 2003, Collar και Bollain 2004, Collar et al. 2005).

Το ρυζάλευρο θεωρείται ότι είναι ένα προϊόν υψηλής θρεπτικής αξίας. Εντούτοις, το ρυζάλευρο δεν χρησιμοποιείται για την παρασκευή άρτου, γιατί οι πρωτεΐνες του ζυμαριού του δεν μπορούν να συγκρατήσουν τα αέρια που παράγονται κατά τη ζύμωση και γι' αυτόν το λόγο δεν μπορεί να διογκωθεί το ζυμάρι. Σήμερα, με τη βοήθεια της *MTG*, έχει επιτευχθεί η παρασκευή άρτου από ρυζάλευρο, το οποίο εμφανίζει ικανοποιητικό όγκο και μαλακότερη ψίχα. Η καταλυτική δράση της *MTG* έχει ως αποτέλεσμα τον πολυμερισμό των πρωτεϊνών του ρυζάλευρου και τον σχηματισμό ενός δικτυωτού, το οποίο είναι ικανό να συγκρατεί τα αέρια που παράγονται κατά τη ζύμωση του ψωμιού (Gujral και Rosell 2004).

Η προσθήκη *MTG* στο αλεύρι βελτιώνει τις μηχανικές ιδιότητες και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των ζυμαρικών. Επίσης, η επεξεργασία με *MTG* συντελεί στη διατήρηση της υφής των ζυμαρικών, μετά το βράσιμο και τη συντήρησή τους στο ψυγείο, ακόμη και όταν έχει χρησιμοποιηθεί αλεύρι χαμηλής ποιότητας για την παρασκευή τους (Sakamoto et al. 1996, Seo et al. 2003, Yamazaki et al. 2004).

Άλλα προϊόντα

Οι Takagaki et al. (1991) ανέφεραν μία μέθοδο επικάλυψης φρούτων και λαχανικών με *MTG* και πρωτεΐνες, με σκοπό τη διατήρηση της νωπότητάς τους και τη συντήρησή τους για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Ακόμη, έχει αποδειχθεί ότι η επεξεργασία των φρούτων και των λαχανικών με *MTG* διευκολύνει την απορρόφηση των ιχνοστοιχείων στο έντερο.

Οι Takagaki et al. (1990) παρασκεύασαν, με τη βοήθεια της *MTG*, ένα είδος υποκατάστατου χοίρειου λίπους, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη λίπος, λάδι και πρωτεΐνες. Παρόμοια υποκατάστατα λίπους έχουν δοκιμαστεί σε προϊόντα όπως τα αλλαντικά και το γιαούρτι (Neilsen 1995). Η επεξεργασία φυτικών πρωτεϊνών με *MTG* έχει ως αποτέλεσμα την παρασκευή πρωτεϊνούχου σκόνης, η οποία έχει καλή υφή και γεύση και παρουσιάζει την ικανότητα να σχηματίζει πηκτή (Soeda et al. 1992). Η επεξεργασία, επίσης, των καρυκευμάτων με *MTG* βελτιώνει τη γεύση και το άρωμά τους.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Πολλές αναπτυσσόμενες χώρες, σήμερα, εξακολουθούν να υποφέρουν από μεγάλα διατροφικά προβλήματα, όπως ο υποσιτισμός και η ανεπάρκεια πρω-

τεϊνών. Γι' αυτόν το λόγο, τόσο η εύρεση νέων πηγών πρωτεϊνών όσο και η διεύρυνση της εκμετάλλευσης των ήδη υπαρχουσών, απασχολούν εδώ και καιρό την παγκόσμια κοινότητα. Με βάση την προοπτική αυτή, η χρησιμοποίηση της *MTG* στην τεχνολογία τροφίμων πιθανώς να αποτελέσει στο μέλλον ένα χρήσιμο «εργαλείο» για την παραγωγή νέων πρωτεϊνούχων, μη ζωικής προέλευσης, τροφίμων.

Η *MTG*, όπως και οι άλλες *TG*, μπορεί και καταλύει το σχηματισμό δεσμών *G-L* μεταξύ των πρωτεϊνών από τρόφιμα διαφορετικής προέλευσης. Η αντίδραση αυτή οδηγεί στην τροποποίηση των πρωτεϊνικών μορίων και, κατά συνέπεια, στη δραστική μεταβολή της λειτουργικότητάς τους. Συνεχώς ανακύπτουν νέες εφαρμογές της *MTG* και καινοτόμα προϊόντα, μέσω της ενσωμάτωσης στα τυπικά τρόφιμα αμινών, αμινοξέων, πεπτιδίων που περιέχουν λυσίνη ή γλουταμίνη και ετερόλογων πολυπεπτιδίων.

Η *MTG* πλεονεκτεί σε σύγκριση με τις υπόλοιπες *TG*, λόγω της ευκολότερης παραγωγής της και του λογικού της κόστους. Αναμφισβήτητα, η εφαρμογή της *MTG* στην τεχνολογία των τροφίμων θα μπορούσε να ικανοποιήσει τις απαιτήσεις των καταναλωτών για νέα πρωτεϊνούχα τρόφιμα με βελτιωμένη εμφάνιση και γεύση, αυξημένη θρεπτική αξία και μεγαλύτερο χρόνο συντήρησης. □

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - REFERENCES

- Aeschlimann D, Paulsson M (1994) Transglutaminases: Protein cross-linking enzymes in tissues and body fluids. *Thromb Haemost*, 71(4):402-415
- Ajinomoto (2004) Food Ingredients Division-Activa™ TG: <http://www.ajinomoto-usa.com/old/f2act06.htm>
- An H, Peters MY, Seymour TA (1996) Roles of endogenous enzymes in surimi gelation. *Trends Food Sci Techn*, 7:321-327
- 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
- Armbrust C, Werlein HD, Watkinson BM (2003) Transglutaminase - Application and properties in fish products. *Deutsche Lebensmit-Rundsc*, 99(5):181-187
- Ashie INA, Lanier TC (1999) High pressure effects on gelation of surimi and turkey breast muscle enhanced by microbial transglutaminase. *J Food Sci*, 64(4):704-708
- Bauer N, Koehler P, Wieser H, Schieberle P (2003α) Studies on effects of microbial transglutaminase on gluten proteins of wheat. I. Biochemical analysis. *Cereal Chem*, 80(6):781-786
- Bauer N, Koehler P, Wieser H, Schieberle P (2003β) Studies on effects of microbial transglutaminase on gluten proteins of wheat. II. Rheological properties. *Cereal Chem*, 80(6):787-790
- Beltran-Lugo AI, Maeda-Martinez AN, Pacheco-Aguilar R, Nolasco-Soria WG, Oceano-Higuera VM (2005) Physical, textural and microstructural properties of restructured adductor muscles of 2 scallop species using 2 cold-binding systems. *J Food Sci*, 70(2):E78-E84
- Bernard BK, Tsubuku S, Shioya S (1998) Acute toxicity and genotoxicity studies of a microbial transglutaminase. *Inter J Toxicol*, 17: 703-721
- Bishop PD, Teller DC, Smith RA (1990) Expression, purification and characterization of human factor XIII in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem*, 29(7):1861-1869
- Chanyongvorakul Y, Matsumura Y, Nonaka M, Motoki M, Mori T (1995) Physical properties of soybean and broad bean 11S globulin gels formed by transglutaminase reaction. *J Food Sci*, 60(3):483-488
- Claparols MI, Bassic L, Miro B, Duca SD, Rodriguez-Montesinos J, Christou P, Serafini-Fracassini D, Capell T (2004) Transgenic rice as a vehicle for the production of the industrial enzyme transglutaminase. *Transg Research*, 13:195-199
- Collar C, Bollain C (2004) Impact of microbial transglutaminase on the viscoelastic profile of formulated bread doughs. *Europ Food Resear Techn*, 218(2):139-146
- Collar C, Bollain C, Angioloni A (2005) Significance of microbial transglutaminase on the sensory, mechanical and crumb grain pattern of enzyme supplemented fresh pan breads. *J Food Engin*, 70(4):479-488
- Colmenero FJ, Ayo MJ, Carballo J (2005) Physicochemical properties of low sodium frankfurter with added walnut: effect of transglutaminase combined with caseinate, KCL and dietary fibre as salt replacers. *Meat Sci*, 69(4):781-788
- Date M, Yokoyama KI, Umezawa Y, Matsui H, Kikuchi Y (2003)

- Production of native-type *Streptovorticillium mobaraense* transglutaminase in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol*, 69(5):3011-3014
- DeBacker-Royer C, Traore F, Meunier C (1992) Purification and properties of factor XIII from human placenta. *Intr J Biochem*, 24:91-97
- De Jong GAH, Wijngaards G, Koppelman SJ (2003) Transglutaminase inhibitor from milk. *J Food Sci*, 68(3):820-825
- Del Duca S, Beninati S, Serafini-Fracassini D (1995) Polyamines in chloroplasts: identification of their glutamyl and acetyl derivatives. *Biochem J*, 305:233-237
- Dickinson E, Yamamoto Y (1996) Rheology of milk protein gels and protein-stabilized emulsion gels cross-linked with transglutaminase. *J Agric Food Chem*, 44:1371-1377
- Dimitrakopoulou MA, Ambrosiadis JA, Zetou FK, Bloukas JG (2005) Effect of salt and transglutaminase (TG) level and processing conditions on quality characteristics of phosphate-free, cooked, restructured pork shoulder. *Meat Sci*, 70:743-749
- Eissa AS, Bisram S, Khan SA (2004) Polymerization and gelation of whey protein isolates at low pH using transglutaminase enzyme. *J Agric Food Chem*, 52(14):4456-4464
- Enzyme Nomenclature (1992) Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. (eds) Academic Press, San Diego, California, USA
- Fan JF, Saito M, Yanyan Z, Szesze T, Wang LJ, Tatsumi E, Li LT (2005) Gel-forming ability and radical scavenging activity of soy protein hydrolysate treated with transglutaminase. *J Food Sci*, 70(1):C87-C92
- Farnsworth J, Hendricks G, Gotcheva V, Akuzawa R, Guo M (1992) Effects of enzymatic crosslinking on the consistency and structure of probiotic goat milk yogurt. *J Anim Sci*, Vol 80, Suppl 1/ *J Dairy Sci*, Vol 85, Suppl 1
- Fink ML, Chung SI, Folk JE (1980) γ -glutamine cyclotransferase: specificity toward ϵ -(γ -Glutamyl)-L-Lysine and related compounds. *Proc Natl Acad Sci*, 77:4564-4568
- Folk JE (1980) Transglutaminases. *Annu Rev Biochem*, 49:517-531
- Gerber U, Jucknischke U, Putzien S, Fuchsbauer H (1994) A rapid and simple method for the purification of transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*. *Biochem J*, 299:825-829
- Gerrard JA (2002) Protein-protein crosslinking in food: methods, consequences, applications. *Trends Food Sci Techn*, 13:391-399
- Gilleland MG, Lanier TC, Hamann DD (1997) Covalent bonding in pressure-induced fish protein gels. *J Food Sci*, 62:713-716
- Gomez-Guillen MC, Montero P, Solas MT, Perez-Mateos M (2005) Effect of chitosan and microbial transglutaminase on the gel forming ability of horse mackerel (*Trachurus* spp.) muscle under high pressure. *Food Resear Inter*, 38(1):103-110
- Griffin M, Casadio R, Bergamini CM (2002) Transglutaminases: Nature's biological glues. *Biochem J*, 368:377-396
- Gujral HS, Rosell CM (2004) Functionality of rice flour modified with a microbial transglutaminase. *J Cereal Sci*, 39(2):225-230
- Hammer GF (1998) Microbial transglutaminase and diphosphate in finely comminuted cooked sausage. *Fleischwirt*, 78(11):1155-1162
- Han XQ, Pfeifer JK, Lincourt RH, Schuerman JM (2003) Process for making a cheese product using transglutaminase. US Patent and Trademark Office: <http://appft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1>
- Hozova B, Kukurova I, Dodok L (2003) Application of transglutaminase and fermyzyme for sensory quality improvement of pastry. *Nahrung-Food*, 47(3):171-175
- Ickson I, Apelbaum A (1987) Evidence for transglutaminase activity in plant tissue. *Plant Physiol*, 84:972-974
- Ichihara Y, Wakameda A, Motoki M (1990) Fish meat paste products containing transglutaminase and their manufacture. *Jpn Kokai Tokkyo Koho JP*, 02186961
- Ichinose A, Hendrickson LE, Fujikawa K, Davie EW (1986) Amino acid sequence of the subunit of human factor XIII. *Biochem*, 25:6900-6906
- Ikeda M, Nakagawa S (2003) The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 62:99-109
- Ikura K, Nasu T, Yokota H, Tsuchiya Y, Sasaki R, Chiba H K (1988) Amino acid sequence of guinea pig liver transglutaminase from its cDNA sequence. *Biochem*, 27:2898-2905
- Jarmoluk A, Pietrasik Z (2003) Response surface methodology study on the effects of blood plasma, microbial transglutaminase and α -carrageenan on pork batter gel properties. *J Food Eng*, 60:327-334
- Jiang ST, Leu SZ, Tsai GJ (1998) Cross-linking of mackerel surimi actomyosin by microbial transglutaminase and ultraviolet irradiation. *J Agric Food Chem*, 46:5278-5282
- Jiang ST, Hsieh JF, Ho ML, Chung YC (2000) Microbial transglutaminase affects gel properties of golden threadfin-bream and pollack surimi. *J Food Sci*, 65(4):694-699
- Kanaji T, Ozaki H, Takao T, Kawajiri H, Ide H, Motoki M, Shimonishi Y (1993) Primary structure of microbial transglutaminase from *Streptovorticillium* sp. strain s-8112. *J Biol Chem*, 268(16):11565-11572
- Kang H, Cho Y (1996) Purification and properties of transglutaminase from soybean (*Glycine max*) leaves. *Biochem Biophys Res Commun*, 223:288-292
- Kashiwagi T, Yokoyama K, Ishikawa K, Ono K, Ejima D, Matui H (2002) Crystal structure of microbial transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*. *J Biol Chem*, 277(46):44252-44260
- Kato A, Wada T, Kobayashi K, Seguro K, Motoki M (1991) Ovomucin-food protein conjugates prepared through the transglutaminase reaction. *Agric Biol Chem*, 55:1027-1031
- Kikuchi Y, Date M, Yokoyama KI, Umezawa Y, Matsui H (2003) Secretion of active-form *Streptovorticillium mobaraense* transglutaminase by *Corynebacterium glutamicum*: processing of the pro-domain by a co-secreted subtilisin-like from *Streptomyces albogriseolus*. *Appl Environ Microbiol*, 69(1):358-366
- Kilic B (2003) Effect of microbial transglutaminase and sodium caseinate on quality of chicken döner kebab. *Meat Sci*, 63:417-421
- Kolle DS, Savell JW (2003) Using Activa™ TG-RM to bind beef muscles after removal of excessive seam fat between the *m.longissimus thoracis* and *m. spinalis dorsi* and heavy connective tissue from within the *m. infraspinatus*. *Meat Sci*, 64:27-33
- Kolodziejcka I, Kaczorowski K, Piotrowska B, Sadowska M (2004) Modification of the properties of gelatin from skins of Baltic cod (*Gadus morhua*) with transglutaminase. *Food Chem*, 86:203-209
- Krämer R (1994) Secretion of amino acids by bacteria: physiology and mechanism. *FEMS Microbiol Rev*, 12:75-94
- Kumazawa Y, Seguro K, Takamura M, Motoki M (1993) Formation of ϵ -(γ -Glutamyl)lysine cross-link in cured horse mackerel meat induced by drying. *J Food Sci*, 58(5):1062-1064
- Kumazawa Y, Sakamoto H, Kawajiri H, Seguro K, Motoki M (1996) Determination ϵ -(γ -Glutamyl) lysine in several fish eggs and muscle proteins. *Fish Sci*, 62:331-332
- Kuraishi C, Sakamoto J, Soeda T (1996) The usefulness of transglutaminase for food processing. In: *Biotechnology for improved foods and flavors*, Takeoka GR, Teranishi R, Williams PJ, Kobayashi A (eds), ACS symposium series 637;:29-38

- Kuraishi C, Sakamoto J, Yamazaki K, Susa Y, Kuhara C, Soeda T (1997) Production of restructured meat using microbial transglutaminase without salt or cooking. *J Food Sci*, 62(3):488-490
- Kuraishi C et al. (2001) Transglutaminase: its utilization in the food industry. *Food Rev Inter*, 17:221-246
- Kütemeyer C, Froeck M, Werlein HD, Watkinson BM (2005) The influence of salts and temperature on enzymatic activity of microbial transglutaminase. *Food Cont*, 16(8):735-737
- Kwan SW, Easa AM (2003) Comparing physical properties of retort-resistant glucono-delta-lactone tofu treated with commercial transglutaminase enzyme or low levels of glucose. *Lebensmit-Wissense Techn- Food Sci Techn*, 36(6):643-646
- Laubert S, Krause I, Klostermeyer H, Henle T (2003) Microbial transglutaminase crosslinks beta-casein and beta-lactoglobulin to ceterologous oligomers under high pressure. *Europ Food Res Techn*, 216(1):15-17
- Lee HG, Lanier TC, Hamann DD, Knopp JA (1997) Transglutaminase effects on low temperature gelation of fish protein sols. *J Food Sci*, 62 (1):20-24
- Lee EY, Park J (2003) Microbial transglutaminase induced cross-linking of a selected comminuted muscle system - Processing conditions for physical properties of restructured meat. *Food Sci Biotechn*, 12(4):365-370
- Liebl W (1991) The genus *Corynebacterium*-nonmedical. In: The prokaryotes. Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH (eds), Springer, New York Berlin Heidelberg:1157-1171
- Lu SY, Zhou ND, Tian YP, Li HZ, Chen J (2003) Purification and properties of transglutaminase from *Streptoverticillium mobaraense*. *J Food Biochem*, 27(2):109-125
- Malumbres M, Gil JA, Martin JF (1993) Codon preference in *Corynebacteria*. *Gene*, 134:15-24
- Margosiak SA, Dharma A, Bruce-Carver MR, Gonzales AP, Louie D, Kuehn GD (1990) Identification of the large subunit of ribulose 1,5-biophosphate carboxylase/oxxygenase as a substrate for transglutaminase in *Medicago sativa* L. (alfalfa). *Plant Physiol*, 92:88-96
- Masson P (1992) Pressure denaturation of proteins. In: High Pressure and Biotechnology. John Libbey Eurotext, London, UK, 224:84-89
- Meister A, Tate SS, Griffith OW (1981) γ -Glutamyl Transpeptidase. In: *Method Enzymol*. Vol 77, Academic Press, New York.:237-253
- Menendez O, Schwarzenbolz U, Rohm H, Henle T (2004) Casein gelation under simultaneous action of transglutaminase and glucono-delta-lactone. *Nahrung-Food*, 48(3):165-168
- Montero P, López-Caballero ME, Pérez-Mateos M, Solas MT, Gómez-Guillén MC (2005) Transglutaminase activity in pressure-induced gelation assisted by prior setting. *Food Chem*, 90(4):751-758
- Motoki M, Okiyama A, Nonaka M, Tanaka H, Uchio R, Matsura A, Ando H, Umeda K (1989) Novel transglutaminase manufacture for preparation of protein gelling compounds. *Jpn Kokai Tokkyo Koho JP*, 0127471
- Motoki M, Seguro K (1998) Transglutaminase and its use for food processing. *Trends Food Sci Techn*, 9:204-210
- Mounsey JS, O'Kennedy BT, Kelly PM (2005) Influence of transglutaminase treatment on properties of micellar casein and products made therefrom. *Lait*, 85(4-5):405-418
- Muguruma M, Tsuruoka K, Fujino H, Kawahara S, Yamauchi K, Matsumura S, Soeda T (1999) Gel strength enhancement of sausages by treating with microbial transglutaminase. In: *Proceedings of 45th international congress of meat science and technology*. Yokohama, Japan:138-139
- Muguruma M, Tsuruoka K, Katayama K, Erwanto Y, Kawahara S, Yamauchi K (2003) Soybean and milk proteins modified by transglutaminase improves chicken sausage texture even at reduced levels of phosphate. *Meat Sci*, 63:191-197
- Neilsen PM (1995) Reactions and potential industrial applications of transglutaminase. Review of literature and patents. *Food Biotechnol*, 9:119-156
- Nielsen GS, Petersen BR, Møller AJ (1995) Impact of salt, phosphate and temperature on the effect of a transglutaminase (F XIIIa) on the texture of restructured meat. *Meat Sci*, 41(3):293-299
- Nieuwenhuizen WF, Decker HL, Groneveld T, de Koster CG, de Jong GAH (2004) Transglutaminase-mediated modification of glutamine and lysine residues in native bovine beta-lactoglobulin. *Biotechn Bioeng*, 85(3):248-258
- Nomura Y, Toki S, Ishii Y, Shirai K (2001) Effect of transglutaminase on reconstruction and physicochemical properties of collagen gel from shark type I collagen. *Biomacromol*, 2:105-110
- Nonaka M, Tanaka H, Okiyama A, Motoki M, Ando H, Umeda K, Matsura A (1989) Polymerization of several proteins by Ca^{2+} -independent transglutaminase derived from microorganism. *Agric Biol Chem*, 53:2619-2623
- Nonaka M, Sakamoto H, Kawajiri H, Soeda T, Motoki M (1992) Sodium caseinate and skim milk gels formed by incubation with microbial transglutaminase. *J Food Sci*, 57:1214-1218
- Nonaka M, Matsuura Y, Motoki M (1996) Incorporation of Lysine peptides into α_{s1} -casein by Ca^{2+} -independent microbial transglutaminase. *Biosci Biotech Bioch*, 60:131-133
- Nonaka M, Ito R, Sawa A, Motoki M, Nio N (1997) Modification of several proteins by using Ca^{2+} -independent microbial transglutaminase with high pressure treatment. *Food Hydrocol*, 11(3):351-353
- Nozawa H, Mamegoshi S, Seki N (1997) Partial purification and characterization of six transglutaminases from ordinary muscles of various fishes and marine invertebrates. *Comp Biochem Physiol*, 118B(2):313-317
- Nozawa H, Seki N (2001) Purification of transglutaminase from scallop striated adductor muscle and NaCl-induced inactivation. *Fish Sci*, 67(3):493-499
- Oh JH, Wang B, Field PD, Aglan HA (2003) Characteristics of edible films made from dairy proteins and zein hydrolysate cross-linked with transglutaminase. *Inter J Food Sci Techn*, 39(3):287-294
- Ohtsuka T, Umezawa Y, Nio N, Kubota K (2001) Comparison of deamidation activity of transglutaminases. *J Food Sci*, 66(1):25-29
- O' Sullivan MM, Kelly AL, Fox PF (2002) Effect of transglutaminase on the heat stability of milk: a possible mechanism. *J Dairy Sci*, 85:1-7
- Pedersen MH, Hanses TK, Sten E, Seguro K, Ohtsuka T, Morita A, Bindslev-Jensen C, Poulsen LK (2004) Evaluation of the potential allergenicity of the enzyme microbial transglutaminase using the 2001 FAO/WHO Decision Tree. *Molec Nutr Food Resear*, 48(6):434-440
- Pérez-Mateos M, Gómez-Guillén MC, Hurtado JL, Solas M, Montero P (2002) Rosemary extract and omega-3 effect on gelification treatment of mince mackerel. *Food Chem*, 79:1-8
- Pérez-Mateos M, Amato PM, Lanier TC (2004) Gelling properties of Atlantic croaker surimi processed by acid or alkaline solubilization. *J Food Sci*, 69(4):C328-C333
- Pietrasik Z, Li-Chan ECY (2002) Response surface methodology study on the effects of salt, microbial transglutaminase and heating temperature on pork batter gel properties. *Food Res Inter*, 35:387-396
- Pietrasik Z (2003) Binding and textural properties of beef gels processed with κ -carrageenan, egg albumin and microbial

- transglutaminase. *Meat Sci*, 63:317-324
- Pietrasik Z, Jarmoluk A (2003) Effect of sodium caseinate and κ -carrageenan on binding and textural properties of pork gels enhanced by microbial transglutaminase addition. *Food Res Inter*, 36:285-294
- Puszkín EG, Raghuraman V (1985) Catalytic properties of a calmodulin-regulated transglutaminase from human platelet and chicken gizzard. *J Biol Chem*, 260:16012-16020
- Ramirez JA, Rondirguez-Sosa R, Morales OG, Vázquez M (2000) Surimi gels from striped mullet (*Mugil cephalus*) employing microbial transglutaminase. *Food Chem*, 70:443-449
- Ramirez JA, Uresti R, Téllez S, Vázquez M (2002) Using salt and microbial transglutaminase as binding agents in restructured fish products resembling hams. *J Food Sci*, 67(5):1778-1784
- Ramirez-Suarez JC, Xiong YL (2003) Effect of transglutaminase-induced cross-linking on gelation of myofibrillar/soy protein mixtures. *Meat Sci*, 65(2):899-907
- Ramirez-Suarez JC, Addo K, Xiong YL (2005) Gelation of mixed myofibrillar/wheat gluten proteins treated with microbial transglutaminase. *Food Res Inter*, 38(10): 1143-1149
- Rosell CM, Wang J, Aja S, Bean S, Lookhart G (2003) Wheat flour proteins as affected by transglutaminase and glucose oxidase. *Cereal Chem*, 80(1):52-55
- Ruiz-Carrascal J, Regenstejn J (2002) Emulsion stability and water uptake ability of chicken breast muscle proteins as affected by microbial transglutaminase. *J Food Sci*, 67(2):734-739
- Sakamoto H, Kumazawa Y, Kawajiri H, Motoki M (1995 α) ϵ -(γ -Glutamyl)lysine crosslink distribution in foods as determined by improved method. *J Food Sci*, 60(2):416-419
- Sakamoto H, Kumazawa Y, Toiguchi S, Seguro K, Soeda T, Motoki M (1995 β) Gel strength enhancement by addition of microbial transglutaminase during onshore surimi manufacture. *J Food Sci*, 60(2):300-304
- Sakamoto H, Yamazaki K, Kaga C, Yamamoto Y, Ito R, Kurosawa Y (1996) Strength enhancement by addition of microbial transglutaminase during Chinese noodle processing. *Nip Shokuh Kagaku Kaishi*, 43:598-602
- Sato K, Tsukamasa Y, Imai C, Ohtsuki K, Shimizu Y, Kawabata M (1992) Improved method for identification and determination of ϵ -(γ -Glutamyl)lysine crosslink in protein using proteolytic digestion and derivatization with phenyl isothiocyanate followed by high-performance liquid chromatography separation. *J Agric Food Chem*, 40:806-810
- Seguro K, Kumazawa Y, Ohtsuka T, Toiguchi S, Motoki M (1995) Microbial transglutaminase and ϵ -(γ -Glutamyl)lysine crosslink effects on elastic properties of Kamaboko gels. *J Food Sci*, 60(2):305-311
- Seguro K, Nio N, Motoki M (1996 α) Some characteristics of a microbial protein cross-linking enzyme: Transglutaminase. In: *Macromolecular interactions in food technology* (ACS Symposium series 650). American Chemical Society:271-280
- Seguro K, Kumazawa Y, Kuraishi C, Sakamoto H, Motoki M (1996 β) The ϵ -(γ -Glutamyl)lysine moiety in cross-linked casein is an available source of lysine for rats. *Nutrition*, 126:2557-2562
- Seki N, Uno H, Lee NH, Kimura I, Toyoba K, Fujita T, Arai K (1990) Transglutaminase activity in Alaska Pollack muscle and surimi, and its reaction with myosin b. *Nip Suis Gakkai*, 56:125-132
- Seo H, Shin WS, Yoon S, Lee S (2003) Effect of microbial transglutaminase on physical and textural properties of noodles made with Korean wheat flour (Geurumil). *Food Sci Biotechnol*, 12(1):1-8
- Serafini-Fracassini D, Del Duca S, D'Orazi D (1988) First evidence for polyamine conjugation mediated by an enzymic activity in plants. *Plant Physiol*, 87:757-761
- Serafini-Fracassini D, Del Duca S, Torrigiani P (1989) Polyamine conjugation during the cell cycle of *Helianthus tuberosus*: Nonenzymatic and transglutaminase-like binding activity. *Plant Physiol Biochem*, 27:659-668
- Serrano A, Cofrades S, Colmenero FJ (2004) Transglutaminase as binding agent in fresh restructured beef steak with added walnuts. *Food Chem*, 85:423-429
- Sharma R, Zakora M, Qvist KB (2002) Susceptibility of an industrial alfa-lactalbumin concentrate to cross-linking by microbial transglutaminase. *Inter Dairy J*, 12(12):1005-1012
- Shimba N, Shinohara M, Yokoyama KI, Kashiwagi T, Ishikawa K, Ejima D, Suzuki EI (2002 α) Enhancement of transglutaminase activity by NMR identification of its flexible residues affecting the active site. *FEBS Lett*, 517:175-179
- Shimba N, Yokoyama KI, Suzuki EI (2002 β) NMR-based screening method for transglutaminases: rapid analysis of their substrate specificities and reaction rates. *J Agric Food Chem*, 50:1330-1334
- Shoji T, Saeki H, Wakameda A, Nonaka M (1994) Influence of ammonium salt on the formation of pressure-induced gel from Walleye Pollack surimi. *Nip Suis Gakkan*, 60(1):101-109
- Signorini M, Beninati S, Bergamini CM (1991) Identification of transglutaminase activity in the leaves of silver beet (*Beta vulgaris* L.). *J Plant Physiol*, 137:547-552
- Soares LHD, Assmann F, Ayub MAZ (2003) Purification and properties of a transglutaminase produced by a *Bacillus circulans* strain isolated from the Amazon environment. *Biotechnol Appl Biochem*, 37:295-299
- Soares LHD, Assmann F, Ayub MAZ (2003) Production of transglutaminase from *Bacillus circulans* on solid-state and submerged cultivations. *Biotechnol Lett*, 25(23): 2029-2033
- Soeda T, Sakamoto H, Nonaka M (1992) Manufacture of plant protein powders with emulsifiers and transglutaminase. *Jpn Kokai Tokkyo Koho*, JP 0479842
- Soeda T, Kaneko T, Hokazono A, Tujimoto K, Nurakami H (2005 α) Effects of microbial transglutaminase on melting point and gel property of gelatins. *J Japan Soc Food Sci Technol*, 52(6):251-256
- Soeda T, Hokazono A, Ozawa T, Fujiwara H (2005 β) Characteristics and mechanism of binding of foods by microbial transglutaminase. *J Japan Soc Food Sci Technol*, 52(5):207-211
- Suklim K, Flick GJ, Marcy JE, Eigel WN, Haugh CG, Granata LA (2004) Effect of cold-set binders: Alginates and microbial transglutaminase on the physical properties of restructured scallops. *J Text Stud*, 35(6):634-642
- Takagaki Y, Narukawa K, Yamazaki T, Motoki M (1990) Solid fats containing transglutaminase for food and their manufacture. *Jpn Kokai Tokkyo Koho*, JP 02128648
- Takagaki Y, Narukawa K, Uchio R (1991) Coating of vegetables and fruits with transglutaminase and proteins for preservation. *Jpn Kokai Tokkyo Koho*, JP 03272639
- Takehana S, Washizu K, Ando K (1994) Chemical synthesis of the gene for microbial transglutaminase from *Streptovorticillium* and its expression in *Escherichia coli*. *Biosci Biotech Biochem*, 58(1):88-92
- Téllez-Luis SJ, Uresti RM, Ramirez JA, Vazquez M (2002) Low-salt restructured fish products using microbial transglutaminase as binding agent. *J Sci Food Agric*, 82:953-959
- Téllez-Luis SJ, Gonzalez-Cabriaes JJ, Ramirez JA, Vazquez M (2004 α) Production of transglutaminase by *Streptovorticillium ladakanum* NRRL-3191 grown on media made from hydrolysates of sorghum straw. *Food Technol Biotechnol*, 42(1):1-4
- Téllez-Luis SJ, Ramirez JA, Vazquez M (2004 β) Production of

- transglutaminase by *Streptovorticillium ladakanum* NRRL-3191 using glycerol as carbon source. *Food Technol Biotechnol*, 42(2):75-81
- Truong VD, Clare DA, Catignani GL, Swaisgood HE (2004) Cross-linking and rheological changes of whey proteins treated with microbial transglutaminase. *J Agric Food Chem*, 52(5):1170-1176
- Tsai GJ, Lin SM, Jiang ST (1996) Transglutaminase from *Streptovorticillium ladakanum* and application to minced fish product. *J Food Sci*, 61:1234-1238
- Tsao CY, Kao YC, Hsieh JF, Jiang ST (2002) Use of soy protein and microbial transglutaminase as a binder in low-sodium restructured meats. *J Food Sci*, 67(9):3502-3506
- Tseng TF, Liu DC, Chen MT (2000) Evaluation of transglutaminase on the quality of low-salt chicken meat-balls. *Meat Sci*, 55:427-431
- Tsukamasa Y, Sato K, Shimizu Y, Imai C, Sugiyama M, Minegishi Y, Kawabata M (1993) ϵ -(γ -Glutamyl)lysine crosslink formation in sardine myofibril sol during setting at 25°C. *J Food Sci*, 58:785-787
- Tsukamasa Y, Miyake Y, Ando M, Makinodan Y (2002) Total activity of transglutaminase at various temperatures in several fish meats. *Fish Sci*, 68:929-933
- Uresti RM, Ramirez JA, López-Arias N, Vazquez M (2003) Negative effect of combining microbial transglutaminase with low methoxyl pectins on the mechanical properties and colour attributes of fish gels. *Food Chem*, 80:551-556
- Uresti RM, T (1993) ϵ -(γ -Glutamyl)lysine crosslink formation in sardine myofibril sol during setting at 25°C. *J Food Sci*, 58:785-787
- Tsukamasa Y, Miyake Y, Ando M, Makinodan Y (2002) Total activity of transglutaminase at various temperatures in several fish meats. *Fish Sci*, 68:929-933
- Uresti RM, Ramirez JA, López-Arias N, Vazquez M (2003) Negative effect of combining microbial transglutaminase with low methoxyl pectins on the mechanical properties and colour attributes of fish gels. *Food Chem*, 80:551-556
- Uresti RM, Téllez-Luis SJ, Ramirez JA, Vazquez M (2004a) Use of dairy proteins and microbial transglutaminase to obtain low-salt fish products from filleting waste from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Food Chem*, 86:257-262
- Uresti RM, Velazquez G, Ramirez JA, Vazquez M, Torres JA (2004b) Effect of high-pressure treatments on mechanical and functional properties of restructured products from arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*). *J Sci Food Agric*, 84(13):1741-1749
- Uresti RM, Velazquez G, Vázquez M, Ramirez JA, Torres JA (2005) Restructured products from arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*) using high-pressure treatments. *Europ Food Resear Techn*, 220(2):113-119
- Uresti RM, Velazquez G, Vázquez M, Ramirez JA, Torres JA (2006) Effects of combining microbial transglutaminase and high pressure processing treatments on the mechanical properties of heat-induced gels prepared from arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*). *Food Chem*, 94(2):202-209
- Wakameda A, Ichihara Y, Toiguchi S, Motoki M (1990) Manufacture of fish meat paste with transglutaminase as phosphate substitute. *Jpn Kokai Tokkyo Koho*, JP 02100653
- Washizu K, Ando K, Koikeda S (1994) Molecular cloning of the gene for microbial transglutaminase from *Streptovorticillium* and its expression in *Streptomyces lividans*. *Biosci Biotechn Biochem*, 58(1):82-87
- Watanabe M (1994) Controlled enzymatic treatment of wheat proteins for production of hypoallergenic flour. *Biosci Biotech Biochem*, 58:388-390
- Wijngaards G, Paardekooper EJC (1988) In: Trends in modern meat technology. 2nd ed, Ed. by Krol B, van Roon PS, Houben JH, Pudoc, Wageningen:125
- Wilson SA (1992) Modifying meat proteins via enzymatic cross-linking. In: Proceedings of the 27th meat industry research conference. Hamilton, Meat Industry Research Institutes of New Zealand, Mirinz:247-277
- Yamazaki K, Naruto Y, Tanno H, Soeda T (2004) Effects of microbial transglutaminase on textural improvement of Chinese noodles. *J Japan Soc Food Sci Techn-Nip Shokuh Kagaku Kogaku Kaishi*, 51(1):13-17
- Yan G, Du G, Li Y, Chen J, Zhong J (2005) Enhancement of microbial transglutaminase production by *Streptovorticillium mobaraense*: application of a two-stage agitation speed control strategy. *Process Biochem*, 40(2):963-968
- Yasueda H, Kumazawa Y, Motoki M (1994) Purification and characterization of a tissue-type transglutaminase from Red Sea bream (*Pagrus major*). *Biosci Biotech Biochem*, 58:2041-2045
- Yasueda H, Kumazawa Y, Motoki M (1995) Tissue-type transglutaminase from Red Sea bream (*Pagrus major*) Sequence analysis of the cDNA and functional expression in *Escherichia coli*. *European J Biol*, 232:411-419
- Yongsawatdigul J, Piyadhamviboon P (2005) Effect of microbial transglutaminase on autolysis and gelation of lizardfish surimi. *J Sci Food Agric*, 85(9):1453-1460
- Yokoyama K, Ohtsuka T, Kuraishi C, Ono K, Kita Y, Arakawa T, Ejima D (2003) Gelation of food protein induced by recombinant microbial transglutaminase. *J Food Sci*, 68(1):48-51
- Yokoyama K, Nio N, Kikuchi Y (2004) Properties and application of microbial transglutaminase. *Appl Microbiol Biotechnol*, 64:447-454
- Zhang J, Masui Y (1997) Role of amphibian egg transglutaminase in the development of secondary cytotstatic factor *in vitro*. *Mol Reprod Dev*, 47:302-311
- Zhu Y, Rinzema A, Tramper J, Bol J (1995) Microbial transglutaminase-a review of its production and application in food processing. *Appl Microbiol Biotechn*, 44:277-282
- Zhu Y, Rinzema A, Tramper J, Bol J (1996) Medium design based on stoichiometric analysis of microbial transglutaminase production by *Streptovorticillium mobaraense*. *Biotech Bioeng*, 50:291-298
- Zhu Y, Rinzema A, Bonarius HPJ, Tramper J, Bol J (1998) Microbial transglutaminase production by *Streptovorticillium mobaraense*: Analysis of amino acid metabolism using mass balances. *Enz Micro Techn*, 23:216-226