STUDIES ON *STREPTOMYCES MOBARAENSIS* TRANSGLUTAMINASE FOR BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS

SYEDA WARISUL FATIMA

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI

MARCH 2023

STUDIES ON *STREPTOMYCES MOBARAENSIS* TRANSGLUTAMINASE FOR BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS

by

SYEDA WARISUL FATIMA

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

Submitted

in fulfillment of the requirements of the degree of Doctoral of Philosophy

to the

INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI

MARCH 2023

Dedicated to my Parents

CERTIFICATE

This is to certify that the thesis entitled "**Studies on *Streptomyces mobaraensis* transglutaminase for biotechnological applications**" being submitted by **Ms. SYEDA WARISUL FATIMA** to the Indian Institute of Technology Delhi for the award of the degree of ***Doctor of Philosophy*** in Chemistry is a record of bonafide research work carried out by her.

Ms. Syeda Warisul Fatima has worked under my guidance and supervision and has fulfilled the requirements for the submission of the thesis, which, to my knowledge, has reached the requisite standard.

The results contained in this dissertation have not been submitted in part or full to any other University or Institute for the award of any degree or diploma.

Dr. S. K. Khare
Professor of Biochemistry
Department of Chemistry
Indian Institute of Technology Delhi

Date:
Place: New Delhi

Acknowledgements

The exigent yet exhilarating odyssey of the publication of my treatise for the Ph.D. degree has been a wonderful experience. The **Almighty** has been kind and merciful in showering continued blessings. I am grateful to Him.

Embarking on the amazing roller coaster ride presented by the Doctor of Philosophy journey was a worthy one. A plethora of emotions gushed like an adrenaline rush all through upheavals. I am privileged to take this moment to unwrap my Ph.D. thesis voyage and thank all those who endured and supported me through this scientific ordeal. My Ph.D. - the tiny three abbreviated word holds the unwavering commitment and generosity of many well-wishers, friends, relatives, and teachers.

I am more than proud to convey my sincere gratitude and warm thanks to **Prof. Sunil Kumar Khare**, who served as my supervisor. He has motivated and groomed me to become an independent researcher by harnessing my scientific prowess. He has tapped the potential of critical reasoning from a blooming researcher. He always inspired me to work toward what a talented and dedicated scientist can accomplish. He always had faith in me and kept cheering for Golden hands, an energy-pack, bright smiling girl! The love and parental care of his family showered is fondly acknowledged.

I would extend my deep admiration and thanks to my thesis advisory and research committee members, especially **Prof. Amulya K Panda**, **Prof. Shashank Deep**, and **Prof. Tanmay Dutta**. They generously boosted me and gave their valuable time to offer me constructive

suggestions during my course of Ph.D. work. Moreover, they offered me helpful criticism, which assisted me in developing a broader understanding of the research work.

My special thanks go to **Prof. Siddharth Pandey**, Head of the Department of Chemistry, for moral, academic, and logistic support all through. I am indebted to **Prof. Ravi Shankar**, **Prof. Ashok K. Ganguly**, **Prof. Anil J. Elias**, and **Prof. N.D. Kurur**, Former Heads of the Department of Chemistry, IIT Delhi, for providing all the necessary facilities, constant tutelage, and valuable guidance.

I am incredibly grateful to the collaborators for sharing their knowledge and insight to tackle my technical and scientific problems: **Prof. Moshahid Alam Rizvi**, Department of Biosciences, Jamia Millia Islamia, New Delhi; **Prof. Ritu Kulshreshtha**, Department of Biochemical Engineering and Biotechnology, IIT Delhi, and other prominent scientists namely **Prof. Sagar Sengupta** of cancer studies at National Institute of Immunology, New Delhi. I owe special thanks to them for their generous permission to work in their laboratories and use instrumental facilities. There is no way to express how much it meant to me to be associated with versatile laboratories.

Special thanks to my **Enzyme and Microbial Biochemistry (EMB) Laboratory**, all the current and former EMB lab students, and the visitors I have encountered during my wonderful stay. These colleagues, friends, and coworkers/peers have greatly motivated me during my Ph.D. tenure.

I'm so grateful to my super seniors: **Dr. Anshu Gupta**, **Dr. Ruchi Gaur**, **Dr. Ram Karan**, **Dr. Arvind Sinha**, **Dr. Chetna Joshi**, **Dr. Rajeshwari Sinha**, and **Dr. Sumit Kumar**. I am thankful to my wonderful seniors and contemporaries for such a caring and supportive team: **Dr.**

R. Hemamalini, **Dr. Ayesha Sadaf**, **Dr. Jasneet Grewal**, **Dr. Shubhrima Ghosh,** and **Dr. Neerja Yadav**. My sincere gratitude to all of the current and former learned postdocs in the lab: **Dr. Shivani Chaturvedi**, **Dr. Arti Pal**, **Dr. Razi Ahmad**, and **Dr. Sunaina Singh**, for their scientific contributions and encouragement.

Special thanks go to **Dr. Rameshwar Tiwari** for his constant encouragement, thoughtful discussions, and continuous help throughout my research journey, **Dr. Kumar Pranaw** for his timely encouragement for sharing critical inputs on my research, **Dr. Amrik Bhattacharya** for minutely going through the draft and continued advice. Special praise goes to **Mr. Shahenvaz Alam**, who has chipped in to lift me, calm and support me as my best friend and a great companion to celebrate each accomplishment in life.

My sincere thanks to all the juniors: **Mrs. Nikky Goel**, **Mr. Nitin Srivastava**, **Ms. Pooja**, **Ms. Ankita Maurya**, **Ms. Huma Fatima**, **Mrs. Sukriti Srivastava**, **Ms. Tanya**, **Ms. Deeksha Gopaliya**, **Ms. Saniya Zaidi**, **Ms. Simran Kundral**, **Mr. Bibhuti Das**, and **Mr. Sachin Wagh** for establishing a vibrant work atmosphere and for all of the pleasant moments we had together in the lab.

Moreover, I am obliged to the administrative staff for their prompt support and assistance but also for kind care: Academics division, Central Library, Industrial Research and Development, and Accounts office. I have especially benefited from the truly professional support of the technical and administrative staff: **Mrs. Dimple**, **Mr. Ashish**, **Mr. H.K.V. Chopra**, and **Mr. J.P. Singh** are memorable for their genuine care.

I am highly obliged to the Central Instrumentation (CRF) and Nano-Scale Research Facility (NRF), IIT Delhi, and their technical team for providing me with the necessary infrastructure and assistance for carrying out crucial parts of my experimental analyses. I thank all

the staff members of the Instrumentation Lab, M.Sc Lab, M. Tech Lab, B. Tech Lab and Chemistry Office, Department of Chemistry, and IIT Delhi for their cooperation and assistance. I extend my sincere thanks to all the academics who have shaped me into the individual I am today.

I am striven to express my appreciation to the Department of Science and Technology (DST), Government of India, New Delhi, for awarding the prestigious **DST INSPIRE fellowship** for research. I would like to extend my warm credit for awarding the prestigious RETA Travel grant, sponsored by IIT Delhi, for attending an international conference.

Last, of all, I owe special thanks with love to my father, **Dr. Syed Aijazuddin**, for constantly inspiring me and enlightening me to be like him in all my pursuits. I realized my dream of becoming a Ph.D. Scholar after seeing him as a perfect soul with his extraordinary efforts. Also, thanks to my mother, **Mrs. Zarrin Aijaz**, for always supporting me unconditionally. My dearest siblings, **Abeer**, **Nayel**, and **Manaam**, for always being there for me; I owe them a lot. My heartiest appreciation extends to my new family, **Alam's family**. I thank my mother-in-law, **Mrs. Ishrat Jahan** for her love and affection throughout. My sincere thanks extend to my brother-in-law, **Mr. Sarfaraz Alam** and sister-in-law, **Mrs. Rehana Khatoon** and special thanks to my nephew, **Shehryar (Sharry)** for the joyful moments spent together.

Finally, I thank with love to my beautiful family for their unconditional trust, kindness, and endless patience which made all my efforts worth the struggle. A special reverence for my late grandparents, uncles, and aunts, who had a firm belief in me.

Cheers to my **Noo Noo Bills** family, who always stood beside me and who have enriched my life by extending their paws.

Lastly, I would like to cherish the significant role my colleagues, professors, friends, and family played knowingly or unknowingly in making this six-year-long journey a memorable piece for me to treasure forever.

Syeda Warisul Fatima

Abstract

The thesis encompasses the detailed study of transglutaminase produced by the actinomycetes *Streptomyces mobarensis* NCIM 5208, and its novel applications. Microbial transglutaminases (MTGases) are major cross-linking enzymes which modify the properties of cellular proteins by creating iso-peptide bonds among them. This enzyme has huge potential for applications in the pharmaceutical, food, textile, biomedical, and cosmetics industries. However, these applications necessitate them to be stable at high temperature, and adverse pH environment vis-à-vis their viable production and cost-effective availability, which would otherwise limit wide application in industries. An enzyme of microbial origin is now commonly exploited to overcome the shortcomings of conventionally produced transglutaminases, gaining colossal attention for diverse applications. Therefore, current research efforts have been directed to the bio-process development of MTGase production, regulatory mechanism, nano-immobilization, and their application in tissue scaffold and drug delivery.

MTGase, being nature's biological glue on account of forming ε-(γ-glutamyl) lysine bonds in proteins; however, low productivity and the high cost of production are the major bottlenecks for industrial MTGase production. The present work dealt with these obstacles by enhancing the MTGase production through media engineering using *S. mobaraensis* via a waste valorization approach utilizing agro-wastes. Enhancement of MTGase production vis-à-vis cost reduction was attempted using wheat bran as a carbon source. During the course of the research, bulk production of microbial MTGase by media engineering and overexpression of recombinant MTGase from *S. mobaraensis* was investigated. Initially, *S. mobaraensis* was grown under solid-state fermentation (SSF) conditions, and media components were selected by the 'one factor at a time' approach, and a 2.15-fold increase in MTGase production was achieved. The optimized conditions revealed a cost-effective process for MTGase production by utilizing a lignocellulosic residue (wheat bran) as the main carbon source for SSF. Further,

the main selected growth parameters were optimized by statistical Box-Behnken design. The resulted growth factors included Protease: 39.14 IU, $MgCl_2$: 0.10 M, CTAB: 0.08%, and Inoculation size: 2.1 x 10^5 CFU (2%) led to the increase of MTGase production up to 4-fold (12.949 + 0.061 IU/g) compared with un-optimized conditions. In addition, the effect of key regulators in augmenting transcriptional expression of MTGase was elucidated by Real-Time quantitative PCR to unravel the regulatory mechanism of MTGase synthesis in *S. mobaraensis*.

The work also intended to explore the nano-immobilization of MTGase for developing stable enzyme bioconjugates. The thesis further deals with various applications of this MTGase preparation for cross-linking food proteins and developing tissue scaffolds using casein and gelatin-carbon nanotubes as model systems. The structural and functional changes during/after cross-linking were studied by SDS-PAGE, Circular Dichroism (CD), Fluorescence Spectrometry (FS), Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), and Attenuated Total Reflectance (ATR). Hence, the innovative production of MTGase was shown to be useful in effective cross-linking casein protein subunits. MTGase was immobilized on carbon nanotubes with high immobilization efficiency (58%) and reusability. The nano-immobilized formulations of MTGase possessed enhanced biochemical and kinetic attributes, which were applied for bioinspired hydrogel scaffold formation.

Furthermore, cloning, overexpression, and purification were attempted as an alternate approach to overproduce MTGase. Moreover, *MTGase* and *pro-MTGase* gene sequences were successfully amplified from *S. mobaraensis*. The ORF encoded for a protein of 412 and 331 amino acids which was cloned in the pET-22b (+) vector for overexpression in *Escherichia coli* BL21 (DE3). The comprehensive study was conducted on the biochemical and structural characterization of purified and recombinant *MTGases*, that hold tremendous applications.

As an innovative part of the thesis, the novel nanoflowers of MTGase could be developed by exploiting the inherent cross-linking activity of this enzyme. Nanoflowers are nano-crystals with floral architecture formed by intra-molecular interactions between the enzymes/proteins. They are endowed with diverse functionalities for biocatalytic applications. The designing of bio-catalytically active enzymatic MTGase nanoflowers (NFs) from the microbial source at a low temperature of 4 ºC has been patented. The study features a new and elegant approach in enzyme immobilization. The novelty in the present work relates to the method of synthesis, the designing of the product, and the process optimization to get the desired features in the NFs.

The multifunctional facets of NFs, including simple design and preparation, size tunability, and resistance to enzymatic degradation, allowing customized cargo loading (heavy metals/pollutants/drugs), specific recognition, and internalization into target cancer cells were worked out and formed the major highlights of the thesis.

MTGase NFs-based targeted delivery has been investigated on cancer cell models: Glioblastoma (LN-229) and Breast (MCF-7). Preliminary results showed the novel enzymatic nanoflowers have a unique morphology and enhanced enzyme stability. The shape of a hollow immobilized enzyme in the form of a cage could act as a nanocarrier for drug delivery. The framework of NFs was optimized to get the desired nanosize (< 50 nm) flowers. The MTT assay and wound healing after the treatment of these MTGase NFs gave positive results in restricting the migration of cancer cells. The cytotoxic effects of MTGase NFs were tested. There was no significant cell death in normal (non-cancerous murine fibroblasts L-929 cells), whereas, in all the cancer cell lines, visible aggregation could be observed. The results in both cases of brain and breast cancer cell lines (LN-229 and MCF-7) showed the efficacy of delivery, loss of viability, and apoptosis of the cancerous cells. These NFs are safe for usage as a nanocarrier with cargo loaded on it; hence, MTGase NFs as the magical bullet comes into

action. These findings point towards effective, low toxicity, and site-targeted, accurate anti-cancer drug delivery via these MTGase NFs.

To conclude, the cost-effective production will not only enhance the yield of this enzyme but also lead to tremendous applications in wide arrays of human welfare in food bioprocessing, pharmaceutical, tissue engineering, and therapeutics.

The following research goals were accomplished:

- **Molecular Glue of the Millennium**: The transglutaminase developed with enhanced value.
- The **transcriptional regulatory mechanism** of how the critical regulators modulate the MTGase enzyme production was elucidated.
- The **nano-immobilized** MTGase was investigated for application in the design of **biocompatible tissue hydrogel scaffolds**.
- The study highlights the **designing of MTGase nanoflowers**, which was manifested in **bioremediation** applications.
- **Developed a suitable nanocarrier** that can effectively **deliver cargo** in both *in vitro* and *in vivo* systems and have a sustained cargo release profile.
- To **inhibit aberrant expression of miRNAs** and thereby significantly impede tumor growth/cancers.
- Overall, the long-term goal was to **devise a novel, powerful MTGase-based nanotherapy** as an adjuvant to the existing chemotherapy and successfully inhibit cancer progression. Hence, the significance of cross-linking enzyme MTGase was achieved as a **multifaceted therapeutic alternative in treating cancers**.

Thus, the applicability of MTGase produced by various approaches justified the MTGase as an enigmatic enzyme in myriad realms of applications.

सारांश

थीसिस में एक्टिनोमाइसेट्स *स्ट्रेप्टोमाइसेस मोबारेंसिस* एनसीआईएम 5208 और इसके नव अनुप्रयोगों द्वारा उत्पादित ट्रांसग्लूटामिनेज का विस्तृत अध्ययन शामिल है। माइक्रोबियल ट्रांसग्लूटामिनेस (एमटीजीएस) प्रमुख क्रॉस-लिंकिंग एंजाइम हैं जो उनके बीच आईएसओ-पेप्टाइड बॉन्ड बनाकर सेलुलर प्रोटीन के गुणों को संशोधित करते हैं। इस एंजाइम में फार्मास्यूटिकल्स, भोजन, कपड़ा, बायोमेडिकल, रोग उन्मूलन और सौंदर्य प्रसाधन अनुप्रयोगों में भारी क्षमता है। हालांकि, इन अनुप्रयोगों को उच्च तापमान और प्रतिकूल पीएच वातावरण पर स्थिर होने की आवश्यकता है, जो अन्यथा उद्योगों में व्यापक अनुप्रयोग को सीमित करेगा। माइक्रोबियल मूल का एक एंजाइम अब आमतौर पर वांछनीय गुणों की प्राप्ति के लिए कमियों को दूर करने के लिए शोषण किया जाता है और विभिन्न अनुप्रयोगों के लिए भारी ध्यान आकर्षित करता है। इसलिए, वर्तमान अनुसंधान प्रयासों को एमटीजीएस उत्पादन, नियामक तंत्र और उनके अनुप्रयोग के बायोप्रोसेस विकास के लिए निर्देशित किया गया है। एमटीजीएस, प्रोटीन में δ-(γ-ग्लूटामिल) लाइसिन बांड बनाने के कारण प्रकृति का जैविक गोंद होने के कारण, हालांकि, कम उत्पादकता और उच्च लागत औद्योगिक एमटीजीएस उत्पादन के लिए प्रमुख बाधाएं हैं। इस कार्य ने कृषि-अपशिष्टों का उपयोग करके अपशिष्ट मूल्यांकन दृष्टिकोण के माध्यम से एस मोबेरेंसिस का उपयोग करके मीडिया इंजीनियरिंग के माध्यम से एमटीजीएस के उत्पादन को बढ़ाकर इन बाधाओं से निपटा। कार्बन स्रोत के रूप में गेहूं के चोकर का उपयोग करके लागत में कमी की तुलना में एमटीजीएस के उत्पादन को बढ़ाने का प्रयास किया गया था। अनुसंधान के दौरान, माइक्रोबियल एमटीजीएस के थोक उत्पादन और एस मोबेरेंसिस से पुनः संयोजक एमटीजीएस की अति-अभिव्यक्ति की मीडिया इंजीनियरिंग द्वारा जांच की गई थी। प्रारंभ में, एस मोबेरेंसिस को ठोस अवस्था किण्वन (एसएसएफ) स्थितियों के तहत उगाया गया था और मीडिया घटकों को 'एक समय में एक कारक' दृष्टिकोण द्वारा चुना गया था और एमटीजीएस उत्पादन में 2.15 गुना वृद्धि हासिल की गई थी। अनुकूलित स्थिति ने एसएसएफ के लिए मुख्य कार्बन स्रोत के रूप में लिग्नोसेल्यूलोसिक अवशेषों (गेहूं की भूसी) का उपयोग करके एमटीजीएस उत्पादन के लिए एक लागत

प्रभावी प्रक्रिया का खुलासा किया। इसके अलावा, मुख्य चयनित विकास मापदंडों को सांख्यिकीय बॉक्स-बेहनकेन डिजाइन द्वारा अनुकूलित किया गया था। परिणामी विकास कारकों में प्रोटीज शामिल थे: 39.14 यू, एमजीसीएल 2: 0.10 एम, सीटीएबी: 0.08% और टीकाकरण आकार: 4 गुना (12.949 + 0.061 आईयू / एमएल) में 2.02 मिलीलीटर संयुक्त राष्ट्र-अनुकूलित स्थितियों की तुलना में एमटीजीएस उत्पादन में। इसके अलावा, एमटीजीएस संश्लेषण के नियामक तंत्र को उजागर करने के लिए वास्तविक समय मात्रात्मक पीसीआर द्वारा एमटीजीएस की ट्रांसक्रिप्शनल अभिव्यक्ति को बढ़ाने में प्रमुख नियामकों के प्रभाव को स्पष्ट किया गया था। थीसिस आगे खाद्य प्रोटीन के क्रॉस-लिंकिंग और मॉडल सिस्टम के रूप में कैसिइन और जिलेटिन-कार्बन नैनोट्यूब का उपयोग करके ऊतक मचान विकसित करने के लिए इस एमटीजीएस तैयारी के विभिन्न अनुप्रयोगों से संबंधित है। क्रॉसलिंकिंग के दौरान/बाद में संरचनात्मक और कार्यात्मक परिवर्तनों का अध्ययन एसडीएस-पेज, परिपत्र द्विवर्णता (सीडी), प्रतिदीप्ति स्पेक्ट्रोमेट्री (एफएस), फूरियर-ट्रांसफॉर्म इन्फ्रारेड स्पेक्ट्रोस्कोपी (एफटीआईआर) और क्षीणित कुल प्रतिबिंब (एटीआर) द्वारा किया गया था।

अतः, एमटीजीएस के अभिनव उत्पादन को प्रभावी क्रॉस-लिंकिंग कैसिइन प्रोटीन सबयूनिट्स में उपयोगी दिखाया गया था। एमटीजीएस को उच्च स्थिरीकरण दक्षता (58%) और पुन: प्रयोज्यता के साथ कार्बन नैनोट्यूब पर स्थिर किया गया था। एमटीजीएस के नैनो-स्थिर योगों ने जैव रासायनिक और गतिज विशेषताओं को बढ़ाया था जो बायोइंस्पायर्ड हाइड्रोजैल पाड़ गठन के लिए लागू किए गए थे। काम का उद्देश्य स्थिर एमटीजीएस के विकास के लिए क्लोनिंग, ओवरएक्सप्रेशन, शुद्धिकरण और स्थिरीकरण का पता लगाना भी था। इसके अलावा, पूर्ण और समर्थक एमटीजीएस जीन अनुक्रमों को सफलतापूर्वक प्रवर्धित किया गया था। ओआरएफ को 412 और 331 अमीनो एसिड के प्रोटीन के लिए एन्कोड किया गया है जिसे एस्चेरिचिया कोलाई बीएल 21 (डीई 3) में ओवरएक्सप्रेशन के लिए पीईटी -22 बी (+) वेक्टर में क्लोन किया गया था। शुद्ध और पुनः संयोजक एमटीजीएस के जैव रासायनिक और संरचनात्मक

लक्षण वर्णन पर व्यापक अध्ययन किए गए थे, जिसमें जबरदस्त अनुप्रयोग हैं। काम का अभिनव हिस्सा: एंजाइम प्रोटीन के बीच इंट्रा-आणविक इंटरैक्शन द्वारा गठित पुष्प वास्तुकला के साथ नैनो-क्रिस्टल हैं। वे जैव उत्प्रेरक अनुप्रयोगों के लिए विविध कार्यक्षमताओं से संपन्न हैं। 4 डिग्री सेल्सियस के कम तापमान पर माइक्रोबियल स्रोत से जैव उत्प्रेरक रूप से सक्रिय एंजाइमेटिक एमटीजीएस नैनोफ्लॉवर (एनएफ) की डिजाइनिंग का पेटेंट कराया गया है। अध्ययन में एंजाइम स्थिरीकरण में एक नया और सुरुचिपूर्ण दृष्टिकोण है। काम में नवीनता एनएफ में वांछित सुविधाओं को प्राप्त करने के लिए संश्लेषण, उत्पाद डिजाइनिंग और प्रक्रिया अनुकूलन की विधि से संबंधित है। सरल डिजाइन और तैयारी, आकार ट्यूनेबिलिटी, और एंजाइमी गिरावट और विकृतीकरण के प्रतिरोध सहित एनएफ के बहुआयामी पहलुओं, कार्गो लोडिंग (भारी धातुओं / प्रदूषक/ लक्षित कैंसर कोशिकाओं (अंजीर 100, 100 मिलीग्राम / दवाओं) के लिए कार्यक्षमताओं के अनुकूलित समावेश की अनुमति दें, जिससे लक्षित कैंसर कोशिकाओं में कार्यक्षमताओं, विशिष्ट मान्यता और आंतरिककरण के अनुकूलित समावेश की अनुमति मिलती है। एमटीजीएस-नैनोफ्लावर-आधारित लक्षित वितरण की जांच कैंसर सेल मॉडल पर की गई है: ग्लियोब्लास्टोमा (एलएन 22 9) और स्तन (एमसीएफ -7)। प्रारंभिक परिणामों से पता चला है कि उपन्यास एंजाइमेटिक नैनोफ्लावर में एक अद्वितीय आकृति विज्ञान और बढ़ी हुई एंजाइम स्थिरता है। पिंजरे के रूप में एक खोखले स्थिर एंजाइम का आकार दवा वितरण के लिए नैनोकैरियर के रूप में कार्य कर सकता है।

एनएफ के ढांचे को वांछित नैनोसाइज (< 50 एनएम) प्राप्त करने के लिए अनुकूलित किया गया था। इन एमटीजीएस नैनोफ्लावर के उपचार के बाद एमटीटी परख और घाव भरने मे कैंसर कोशिकाओं के प्रवास को प्रतिबंधित करने में सकारात्मक परिणाम दिए। एमटीगैस एनएफ के साइटोटॉक्सिक प्रभावों का परीक्षण किया गया था। सामान्य (गैर-कैंसर म्यूरिन फाइब्रोब्लास्ट्स एल -929 कोशिकाओं) में कोई महत्वपूर्ण कोशिका मृत्यु नहीं थी, जबकि सभी कैंसर सेल लाइनों में, दृश्यमान एकत्रीकरण देखा जा

सकता है। ये एनएफ नैनोकैरियर के रूप में उपयोग के लिए सुरक्षित हैं, जिस पर कार्गो लोड किया जाता है, इसलिए एमटीजीएस एनएफ की जादुई गोलियां कार्रवाई में आती हैं। ये निष्कर्ष इन एमटीजीएस एनएफ के माध्यम से प्रभावी, कम विषाक्तता और लक्षित (साइट-विशिष्ट), सटीक एंटी-कैंसर दवा वितरण की ओर इशारा करते हैं। निष्कर्ष निकालने के लिए, लागत प्रभावी उत्पादन न केवल इस एंजाइम की उपज को बढ़ाएगा, बल्कि खाद्य बायोप्रोसेसिंग, फार्मास्यूटिकल्स, ऊतक इंजीनियरिंग और चिकित्सीय में मानव कल्याण की विस्तृत श्रृंखलाओं में जबरदस्त अनुप्रयोगों को भी जन्म देगा। निम्नलिखित शोध लक्ष्यों को पूरा किया गया था: मिलेनियम का आणविक गोंद: ट्रांसग्लूटामिनेज को बढ़े हुए मूल्य के साथ विकसित किया गया। महत्वपूर्ण नियामकों द्वारा एमटीगेज एंजाइम उत्पादन को कैसे संशोधित किया जाता है, इसका ट्रांसक्रिप्शनल नियामक तंत्र स्पष्ट किया गया था। नैनो-स्थिर एमटीजीएस की जैव संगत ऊतक हाइड्रोजैल मचानों के डिजाइन में आवेदन के लिए जांच की गई थी। अध्ययन एमटीजीएस नैनोफ्लावर के डिजाइन पर प्रकाश डालता है, जो बायोरेमेडिएशन अनुप्रयोगों में प्रकट होता है। एक उपयुक्त नैनो-वाहक विकसित किया जो इन-विट्रो और इन-विवो सिस्टम दोनों में प्रभावी ढंग से कार्गो वितरित कर सकता है और एक निरंतर कार्गो रिलीज प्रोफाइल है। एमआईआरएनए की विचलित अभिव्यक्ति ऐवम ट्यूमर के विकास को रोके , कुल मिलाकर इस तरह हमारा दीर्घकालिक लक्ष्य मौजूदा कीमोथेरेपी के सहायक के रूप में एक उपन्यास, शक्तिशाली एमटीजीएस आधारित नैनोथेरेपी तैयार करना था और कैंसर की प्रगति को सफलतापूर्वक रोकना था। इसलिए, कैंसर के इलाज में बहुआयामी चिकित्सीय विकल्प के रूप में क्रॉस-लिंकिंग एंजाइम एमटीजीएस का महत्व प्राप्त किया गया था। इस प्रकार, विभिन्न दृष्टिकोणों द्वारा उत्पादित एमटीजीएस की प्रयोज्यता ने असंख्य स्थानों में एक गूढ़ एंजाइम के रूप में एमटीजीएस को उचित ठहराया।

Table of Contents

CHAPTER 2B TRANSCRIPTIONAL STUDIES FOR CORRELATION WITH TRANSGLUTAMINASE PRODUCTION

CHAPTER 3 PURIFICATION, CHARACTERIZATION AND APPLICATIONS OF TRANSGLUTAMINASE IN CROSS-LINKING OF FOOD PROTEINS

CHAPTER 7B NANOFLOWER-BASED DELIVERY OF SYNTHETIC MIRNA INHIBITORS TO GLIOBLASTOMA BRAIN CANCER CELLS

List of Figures

List of Tables