

Некоторые аспекты применения трансглутаминазы

Д-р техн. наук, заслуженный работник пищевой индустрии РФ **З.С.ЗОБКОВА**,
канд. техн. наук **Т.П.ФУРСОВА**
ВНИИ молочной промышленности

В последнее время в России появились сообщения о технологической эффективности фермента трансглутаминазы (ТГ) в пищевой промышленности (Зобкова З.С., Фурсова Т.П., Зенина Д.В., 2017; Шлейкин А.Г., Данилов Н.П., 2015; Семенова А.А., Туниева Е.К., Горбатова С.А., 2011; Яшкин А.И., 2019). В то же время безопасность и риски применения ТГ на территории РФ и ЕАЭС не оценивались и в перечне ферментных препаратов, разрешенных для применения при производстве пищевой продукции Приложения 26 ТР ТС 029/2012, данный фермент отсутствует. Вопрос о включении ТГ в перечень ферментных препаратов, разрешенных для использования в пищевой промышленности ЕАЭС, может быть решен только при условии получения достоверных экспертных данных об отсутствии рисков для населения, связанных с его применением. Представляем обзор информации о некоторых аспектах применения ТГ в международной практике.

Трансглутаминазы – семейство ферментов (ЕС 2.3.2.13), впервые описанных в 1959 г. Трансглутаминаза – R-глутаминил-пептид:амин-γ-глутаминил-трансфераза, принадлежит к классу аминотрансфераз, вызывающих реакцию переаминирования. ТГ катализирует реакции ацильного переноса, сшивания между Gln и Lys остатков белков или пептидов (трансамидирование) и дезамидирование (Kieliszek M., Misiewicz A., 2014). Если лизин является акцептором ацильной группы, то молекула белка обогащается этой аминокислотой. Передача ацильной группы на остаток лизина, связанного с полипептидной цепью, индуцирует процесс «сшивания». Кроме того, ТГ катализирует реакцию дезаминирования остатков глутамина, если нет свободных аминогрупп. При этом молекулы воды выступают в роли ацил-акцепторов.

Реакция ферментативного переаминирования, открытая в 1937 г. советскими биохимиками А.Е.Браунштейном и М.Г.Крицман, играет роль важного промежуточного звена в процессах синтеза и дезаминирования многих аминокислот у животных, растений и микроорганизмов. Обеспечивая быстрое взаимопревращение различных аминокислот, реакции переаминирования играют важную роль в регуляции и сопряжении обмена аминокислот и углеводов. Аминотрансферазы есть во всех живых клетках, в том числе в микробных, тканях млекопитающих, у многих беспозвоночных, в растениях. Описано свыше 55 различных аминотрансфераз, катализирующих переаминирование всех известных природных аминокислот и ряда биогенных аминов.

Реакции, катализируемые ТГ, значительно изменяют физические и химические свойства белков, такие как вязкость, тепловая стабильность, эластичность, упругость, влагоудерживающая, эмульгирующая, пеностабилизирующая, гелеобразующая способность и др. Образование «сшивки» приводит к получению не только полимеризованных, но и гибридных белков. При этом изменяется состав белка и его конформация. Такой белок может сочетать свойства исходных протеинов, а также приобретать новые, нехарактерные для исходных белков свойства.

Первая коммерческая микробная ТГ (мТГ) выделена из *Streptovorticillium tobaraense* как внеклеточный фермент. С тех пор выделены и охарактеризованы ТГ из множества микробных штаммов, в том числе генномодифицированных, *B. subtilis* и *Escherichia coli* с ферментативной активностью, сходной с ТГ *Streptovorticillium sp.*, но более легким процессом очистки.

В отличие от тканевой ТГ человека микробная не зависит от кальция, имеет один структурный домен, менее ограниченный оптимум pH. Молекулярная масса более низкая, чем у тканевой ТГ (тТГ) человека. Каталитическая и биохимическая активность мТГ сходны со свойствами трансглутаминаз животных

и растений, несмотря на отсутствие гомологии последовательности аминокислотного состава и трехмерной структуры (Kieliszek M., Misiewicz A., 2014). Дезамидирующая активность мТГ более низкая, чем трансамидирующая по сравнению с тТГ.

Совсем недавно впервые показано, что микробная трансглутаминаза демонстрирует гораздо более широкую специфичность ацил-акцепторного субстрата (Ruh T. [et al.], 2014). С использованием мТГ вместе с соответствующими первичными аминами в качестве спейсеров в белок могут быть включены различные функциональные группы: карбоксильные, фосфатные, сахараиды и т.д. (Ohtsuka T. [et al.], 2000).

ТГ активна в широком диапазоне pH (5–8). Фермент стабилен до температуры 40 °С. При температуре выше 75 °С фермент теряет активность в течение нескольких минут, если используется в обычных дозировках. При 80 °С инактивируется в течение 1 мин, при 90 °С – без выдержки.

Каталитическая реакция фермента с гелеобразующими белками останавливается при истощении субстрата белка во время обработки. Фермент не функционирует из-за недостатка субстрата. Является самоограничивающимся ферментом, так как для многих пищевых систем существует оптимальный уровень его использования для улучшения сенсорных свойств, превышение которого негативно сказывается на качестве продукта.

Применение выделенной из микробиологических источников ТГ в пищевой промышленности позволило упростить определенные процессы и затрат. Микробиологическая ТГ используется в разных отраслях пищевой промышленности для улучшения текстуры, внешнего вида, твердости и срока годности мяса, рыбных продуктов; улучшения качества текстуры молочных продуктов и снижения потерь сырья; уменьшения калорийности, улучшения текстуры и эластичности конфет; улучшения стабильности внешнего вида белковых пленок, тек-

и объема выпечки (Kieliszek M., Lewicz A., 2014; Martins I.M. [et al.], 2014). Промышленность расширила использование мТГ для «сшивания» мяса в сельскохозяйственных отходах; в производстве липидированного мяса; восстановления функциональности глютена из поврежденной пшеницы; эмульгирования с помощью гетерогенных продуктов растительного или животного происхождения; переработки пшеничного глютена в основу или биопластичный материал и др.

Технологии пищевой промышленности постоянно совершенствуются. С целью улучшения функциональности используются обработка высоким давлением, ультразвуком, микроволновое и ультрафиолетовое излучение (Sharibzahedi S.M.T. [et al.], 2018). В результате широкого применения в пищевой промышленности на Западе человек потребляет до 15 мг мТГ (Yokoyama K., Nio N., Kikuchi Y., 2014). Каждый килограмм пищи содержит около 50–100 мг мТГ.

Микробная ТГ одобрена для использования в пищевых продуктах в США, Бразилии, Японии, Корее, Таиланде, Австралии и Новой Зеландии. В 2015 г. компанией Ajinomoto была заявка на включение ТГ в перечень ЕС (информация компании Ajinomoto – <http://www.transglutaminase.com>). Во Франции мТГ одобрена для использования в термообработанных мясных продуктах, мясе, хлебопродуктах и молочных продуктах в качестве вспомогательного средства. Микробная ТГ не разрешена в Дании, Германии и Швейцарии разрешена для использования в термообработанных мясных изделиях. В Германии мТГ рассматривается как технологическое средство, поскольку в конечном продукте отсутствуют ее технологические функции [§ 3 (3) Закона о пищевых продуктах и продовольственных средствах (LFGB)]. Хотя мТГ добавляется в пищевые продукты в процессе производства, в результате чего она становится частью продуктов питания, мТГ рассматривается пищевой добавкой.

Компания Amano Enzyme Inc. (Amano Enzyme) разработала процедуру включения в перечень разрешенных технологических средств Кодекса пищевых стандартов ЕС и Новой Зеландии (Кодекс пищевой глутаминовой глутаминазы, полу-

ченной из штамма *Chryseobacterium proteolyticum* AE-PG (ЕС 3.5.1.44) (не ГММ), катализирующей дезамидирование нативных протеинов. Для анализа риска FSANZ использованы международно признанная система анализа рисков и научные доказательства. Оценив риски FSANZ, сделали вывод, что использование фермента в качестве технологического средства для предполагаемой технологической цели не будет представлять опасности для здоровья населения (отчет об одобрении – заявка A1136 «Белковая глутаминаза как технологическое средство (фермент)» от 22 февраля 2018 г. www.foodstandards.gov.au).

FSANZ приводит результаты исследований, которые показали, что мТГ дезамидирует связанные с глютеном пептиды (Skovbjerg H. [et al.], 2004; Gerrard J.A. [et al.], 2005; Dekking E.H.A. [et al.], 2008) и что глютеносвязанные протеины, обработанные мТГ, и другие белки пшеницы являются иммуногенными при инкубации с сывороткой крови больных целиакией (Cabrera-Chávez F. [et al.], 2008; Matthias T. [et al.], 2016).

Однако отмечается, что экспериментальные условия во многих из этих исследований не имеют прямого отношения к использованию мТГ в производстве продуктов питания. Например, использовалась инкубация фермента с синтетическими глютеносвязанными пептидами или глютеносвязанные пептиды связывались транслгутаминазой не в условиях производства пищи (Skovbjerg H. [et al.], 2004; Dekking E.H.A. [et al.], 2008; Matthias T. [et al.], 2016; Gianfrani C. [et al.], 2007). В экспериментах, когда мТГ использовалась в хлебобулочных изделиях, концентрации были намного выше стандартных, обычно используемых, и не соответствовали нормативным (Cabrera-Chávez F. [et al.] 2009). Neil A. [et al.], 2017 заключили, что пшеничный хлеб, приготовленный с мТГ в концентрациях, используемых в стандартных хлебобулочных процессах (приблизительно 1–3 единицы на 1 кг муки), не обеспечивал иммунодетектируемое количество иммунотоксичных дезамидированных глиадинов. Другие исследования (Ruh T. [et al.], 2014) показали, что различия в иммунореактивности глиадина (глютеносвязанного белка), выделенного из макаронных изделий с мТГ или без нее, нет и что обработка муки или глиадинов мТГ может ингибировать иммуногенный ответ на глиадин (Gian-

frani C. [et al.], 2007; Lombardi E. [et al.], 2013; Zhou L. [et al.], 2017).

В целом FSANZ считает, что в настоящее время нет доказательств того, что протеиновая глутаминаза или мТГ, используемые в соответствии с Кодексом пищевых стандартов, связаны с повышенным уровнем эпитопов целиакии в глютеносодержащей пище или повышенным риском развития целиакии. Людям с непереносимостью глютена рекомендуется полностью избегать продуктов, содержащих глютен, независимо от того, производятся ли они с использованием или без белковой глутаминазы. Это поможет справиться с потенциальной опасностью, что фермент может увеличить уровни эпитопов в глютеносодержащих продуктах и усилить риск развития целиакии.

Микробная ТГ имеет долгую историю безопасного использования в пищевой промышленности. В настоящее время нет клинических или эпидемиологических данных, определяющих взаимосвязь между целиакией и использованием мТГ в хлебопекарных продуктах.

В США в 1998 г. компанией Ajinomoto инициирована процедура признания в целом безопасной для использования (GRAS) транслгутаминазы, полученной из нетоксигенного и непатогенного штамма *Streptovorticillium mobaraense* в предлагаемых условиях использования (www.accessdata.fda.gov).

Компания Ajinomoto утверждает, что коммерческие препараты ТГ (ACTIVA®), получаемые из *Streptovorticillium mobaraense* (штамм S-8112), не являются ГМО. Препараты подвергались ряду стандартных исследований безопасности *in vitro* и с использованием лабораторных животных. Оценивали потенциальную токсичность для человека:

- культуры *Streptovorticillium mobaraense* (общий микробиологический анализ; генетическая стабильность, чистота культуры и целостность штамма; тест на патогенность);
- культуральной среды после удаления микроорганизмов (тест на отсутствие продуцирования антибиотиков, антимикробная активность, наличие бета-лактамазы, феномицина);
- препарата транслгутаминазы (тест на хромосомную аберрацию (культивируемые клетки млекопитающих), анализ обратной мутации (бактерии), микроядерный тест (мыши), тест на кожную чувствительность, аллергенность (аминокислотная последовательность), ост-

рую токсичность (крысы), токсичность за один месяц потребления (собаки), тринадцатинедельный тест на токсичность (у крыс), наличие антибиотиков, афлатоксинов, эндотоксинов, биологически активных веществ, продуцируемых *Streptovorticillium mobaraense*, анализ антимикробной активности и пр.).

При 30-дневной оценке потенциальной токсичности у собак среднее потребление фермента в течение периода введения в рацион составляло 47,6–2410,6 мг/кг в день с неактивной и активной концентрацией мТГ. В результате не выявлено влияния трансглутаминазы на токсикологические показатели в клинических наблюдениях и после аутопсии.

Во время исследования все уровни воздействия трансглутаминазы (неактивные и активные) хорошо переносились и не вызывали побочных эффектов (Redfield Laboratories, Study #099-001, Финальный отчет, 3 января 2001 г.). Тест на стабильность показал, что ТГ не активна в желудке при кислых рН и полностью разлагается пепсином. Неблагоприятных токсикологических результатов обнаружено не было.

Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) ТГ в целом признана GRAS (GRN 28, GRN 95) для улучшения текстуры и выхода пищевых продуктов. Заявленное вещество должно использоваться на самом низком уровне, необходимом для достижения желаемых технологических эффектов (т.е. следует руководствоваться правилами надлежащей производственной практики – GMP).

В 2002 г. FDA разрешило использование этого фермента во всех пищевых продуктах, содержащих белок, при условии соответствия его GMP. В тексте документа приводятся уровни использования фермента согласно GMP, в частности, для молочных продуктов при инактивировании мТГ перед сквашиванием – 2–3 ед/г белка, при добавлении мТГ с заквасочной культурой во время сквашивания – 0,5–0,75 ед/г белка. Среднее (в пересчете на процент от общего количества принятого белка) количество трансглутаминазы в пищевых продуктах – 0,38 мг/г белка. При этом ранее утвержденные уровни применения значительно превышают уровни фактического использования.

В перечень разрешенных пищевых добавок включена также кислородо-

стойкая форма препарата мТГ (STGP), содержащая небольшое количество глутаминового пептида в качестве защиты от окисления кислородом. Представлены данные исследований потенциальных рисков. Отмечено, что выражение уровня использования ТГ в зависимости от содержания белка в пище (например, мг ТГ/г белка) является более точным и целесообразным.

В 2004 г. медицинская группа госпиталя Датского национального университета (Копенгаген) с использованием стандарта ФАО/ВОЗ «Дерево решений» оценила аллергенность мТГ (Pedersen M.H. [et al.], 2004). Исследователи пришли к выводу, что не существует аллергенного потенциала мТГ, используемой в пищевых продуктах. Более того, результаты некоторых работ свидетельствуют, что ферментативная полимеризация является инструментом, который может уменьшить *in vivo* аллергенность белков, таких как, например, β-лактоглобулин (Olivier C.E. [et al.], 2012; Villas-Boasa M.B. [et al.], 2020).

Компания Ajinomoto заявляет, что не выявлено прямой связи между возникновением целиакии и приемом мТГ. При использовании ТГ в пищевых продуктах, не содержащих глютен, глиадиновые пептиды соответственно не образуются.

В то же время среди исследователей (Dekking E.H.A. [et al.], 2008; Lerner A., Matthias T., 2015; Cabrera-Chávez F. [et al.], 2008; De Palma G. [et al.], 2014) все же существует обеспокоенность, что увеличение использования мТГ в пищевой промышленности может способствовать развитию целиакии. Распространенность целиакии в последние 50 лет возросла более чем в 4 раза. ТГ способна «сшивать» белки и другие макромолекулы, тем самым изменяя их антигенность, увеличивая антигенную нагрузку на иммунную систему. Во-вторых, «сшивание» повышает стабильность белка к протеиназам, таким образом затрудняя удаление чужеродного белка.

Из трех катализируемых мТГ реакций дезамидирование остатков глутамина является ключевым шагом в патогенезе целиакии (Reif S., Lerner A., 2004). Skovbjerg H. [et al.] изучали дезамидирование и «сшивание» пептидов глиадина различными ТГ. Трансглутаминаза *Streptovorticillium sp.*, используемая в качестве «сшивателя» в пищевой промышленности, в зависимости от дозы генерировала дезамидированный эпи-

топ. Японскими учеными показано, что мТГ вызывала 72 % дезамидирования, когда применялась в пшеничной клейковине (Yong Y.H., Yamaguchi S., Matsuura Y., 2006). Однако другое исследование (Ruh T. [et al.], 2014) это не подтверждает. Трансглутаминазы способны к дезамидированию или трансамидированию в зависимости от физико-химических условий реакции: средства трансглутаминазы к субстрату, рН, присутствия первичных аминов, концентрации фермента и др. (Kieliszek M., Misiewicz A., 2014; Yokoyama K., Nio N., Kikuchi Y., 2004; Stamnaes J., Fleckenstein B., Sollid L.M., 2008; Jiang J., Xiong Y.L., 2013; Fleckenstein B. [et al.], 2002). Сегодня нет данных о влиянии этих факторов на соотношение дезамидирования / трансамидирования под действием тТГ и мТГ в кишечнике человека (Lerner A., Matthias T., 2015).

Gianfrani C. [et al.] показали, что микробная ТГ при добавлении в пищу в присутствии донора амина может фактически снизить иммуностимулирующую активность глютена у пациентов с целиакией. По другим данным обработанные мТГ пшеничные глютеносодержащие продукты являются иммунореактивными и их безопасность сомнительна (Dekking E.H.A. [et al.], 2008; Matthias T. [et al.], 2016; Cabrera-Chávez F. [et al.], 2009; Ruh T. [et al.], 2014; Lerner A., 2004; Matthias T. [et al.], 2015).

Основным фактором риска развития целиакии является генетическая восприимчивость. В настоящее время наблюдается эпидемиологический сдвиг в фенотипе болезни в сторону более пожилого возраста пациентов с повышенной распространенностью скрытого, гипосимптомного или бессимптомного течения (Lerner A. [et al.], 2013). Логично, что повсеместное увеличение заболеваемости целиакией вызвано воздействием на окружающую среду, так как генетические изменения происходят слишком медленно, чтобы привести к такому результату.

Тканевая трансглутаминаза идентифицирована как аутоантиген при целиакии и играет ключевую роль в ее патогенезе (Reif S., Lerner A., 2004). Нутриенты и технологические пищевые добавки могут воздействовать на кишечную экосистему и повышать проницаемость кишечника (Lerner A., Neidhofer S., Matthias T., 2017). По мнению A.Lerner, T.Matthias, мТГ оказывает аддитивное или потенцирующее действие с

генной трансглутаминазой, способность и нежелательные результаты могут усугубляться. Таким образом, разделенные пищевые вещества и пищевые добавки, повышенная проницаемость кишечника, связанные с заболеваниями дисбиотии или патобиотии ферментативная способность, посттрансляционная модификация белка, происходящие в кишечнике реакции могут способствовать развитию аутоиммунной реакции в других органах (A., Neidhofer S., Matthias T., 2016; A., Neidhofer S., Matthias T., 2017). Главная неопределенность имеющихся данных, необходимы дальнейшие исследования, чтобы выяснить все потенциальные механизмы, способствующие развитию целиакии.

Что касается характеристик уровня безопасности, то заявления варьируются. «Эти ферменты безопасны для потребителей» (Kieliszek M., Misiewicz A., «Нет проблем с безопасностью, стабильность в отношении аллергического потенциала мТГ была определена» (Pedersen M.H. [et al.], 2004) и «Его безопасное использование должно быть оценено», «Любая оценка риска должна учитывать не только безопасность

самой трансглутаминазы, а также безопасность дезамидированных/«сшитых» белков, генерируемых энзимом» (Malandain H., 2005). Совсем недавно микробная трансглутаминаза описана как «новый профессиональный аллерген» (De Palma G. [et al.], 2014). По мнению A.Lerner и T.Matthias, заявления производителей продуктов питания о том, что микробная трансглутаминаза безопасна, не означают, что этот фермент не влияет на иммуногенность белка или не является иммуногенным либо патогенным сам по себе. Можно ожидать, что микробная трансглутаминаза будет вызывать появление новых эпитопов, устойчивых к пищеварению в неопротейнах, содержащихся в обработанной пище. Если будущие исследования подтвердят эту гипотезу, результаты будут влиять на маркировку пищевого продукта, политику в области пищевых добавок, информированность и здоровье потребителей.

В ряде стран мТГ официально рассматривается как вспомогательное технологическое средство. При этом не требуется указывать ее на этикетке, что является незачисленным и может быть потенциально опасным для некоторых кате-

горий населения. В связи с вышеизложенным при наличии разрешения применения мТГ в пищевых продуктах, на наш взгляд, справедливо условие указания ТГ на упаковке в любом случае ее использования, чтобы обеспечить прозрачность информации для потребителей, как это в настоящее время требуется, например, в Швейцарии.

МП

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Зобкова, З.С.** Трансглутаминаза и молочные продукты с ее использованием (теория и практика): монография / под ред. д-ра техн. наук, проф. Д.В.Харитоновой/ З.С. Зобкова, Т.П.Фурсова, Д.В. Зенина. – М. Франтера, 2017. – 207 с.
- Шлейкин, А.Г.** Особенности применения трансглутаминазы в переработке молока/ А.Г. Шлейкин, Н.П. Данилов // Вестник МАХ. 2015. № 3. С. 13–18.
- Семенова, А.А.** Перспективы использования трансглутаминазы для производства мясных продуктов/ А.А.Семенова, Е.К.Туниева, С.А.Горбатова // Все о мясе. 2011. № 2. С. 6–7.
- Яшкин, А.И.** Современные подходы к применению микробной трансглутаминазы в сыроделии (аналитический обзор) / А.И.Яшкин // Молочнохозяйственный вестник. 2019. № 1(33), 1 кв. С. 98–113.

Технические условия

на детские, школьные и взрослые молочные продукты
Помощь при госрегистрации
Витаминные и минеральные премиксы

В/О «Ресурс-Импорт»

т. (495) 782-1843. E-mail: res-imp@res-imp.ru



Распродажа молочного оборудования собственного производства по старым ценам

E-mail: rmm@rmmmilk.kirov.ru
www.rmmmol.ru
Тел.: (8332)703-982, 703-902

реклама *** реклама *** реклама *** реклама *** реклама *** реклама *** реклама *** реклама *** реклама *** реклама ***

ВНИМАНИЕ!
ПОДПИСКА

Молочная
ПРОМЫШЛЕННОСТЬ



ВСЁ МОЛОКЕ
СЫРЕ И МОРОЖЕНОМ

Почта России

Онлайн подписка <https://podpiska.pochta.ru>

В редакции

Тел./факс: (499) 264-03-44
E-mail: info@moloprom.ru

Каталог «Роспечать»

«Молочная промышленность» – индекс 70573

«Сыроделие и маслоделие» – индекс 47348

«Все о молоке, сыре и мороженом» – индекс 32961