

*Л.Л. Богданова, к.т.н., Е.В. Ефимова, к.т.н., Е.М. Дмитрук,
С.И. Вырина, И.А. Богданов, Т.М. Смоляк
Институт мясо-молочной промышленности, Минск, Республика Беларусь*

ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ АЦИЛТРАНСФЕРАЗЫ В МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТАХ

*L. Bahdanava, E. Efimova, E. Dmitruk, S. Virina, I. Bahdanau, T. Smolyak
Institute for Meat and Dairy Industry, Minsk, Republic of Belarus*

STUDY OF ACYLTRANSFERASE CONTENT IN DAIRY PRODUCTS

*e-mail: bogdanova_ll@tut.by, overie@mail.ru, elenadm210187@gmail.com,
svetalantana@mail.ru, ibogdanov08@gmail.com, pil-2020@yandex.ru*

В статье представлены результаты исследований по определению содержания ацилтрансферазы в различных группах молочных продуктах.

The article presents the results of studies to determine the content of acyltransferase in various groups of dairy products.

Ключевые слова: ацилтрансфераза; транsgлутаминаза; модификация белков; фермент; остаточное содержание; иммуноферментный метод; безопасность продукции.

Keywords: acyltransferase; transglutaminase; protein modification; enzyme; residual content; enzyme immunoassay; product safety.

Введение. В настоящее время новым перспективным направлением в пищевой энзимологии является модификация структуры белков. С этой целью может быть использована транsgлутаминаза. Транsgлутаминаза – фермент, относящийся к классу ацилтрансфераз (по международной классификации ЕС 2.3.2.13), катализирует 3 типа реакций: ацильного переноса; образования ковалентных связей между аминокислотными остатками лизина и глутамина в белках и реакцию дезаминирования. В результате связывания глутаминового и лизинового остатков пептидов или белков образуются высокомолекулярные соединения, содержащие ϵ -(γ -глутамил) лизиновые внутри- и межмолекулярные связи. Эти связи могут влиять на структуру и функциональные свойства белков. Модификация белков с помощью транsgлутаминазы позволяет изменить их растворимость, гидратирование, термостабильность, а также их желирующие, реологические свойства, эмульгирование и сычужную свертываемость [1, 2, 3, 4].

В предшествующих публикациях нами показано, что при использовании микробной транsgлутаминазы (мТГ) в молочных продуктах наблюдается меньшее нарастание титруемой кислотности при изготовлении и хранении, также они имеют более высокую вязкость в сравнении с молочными продуктами, выработанными без использования транsgлутаминазы. Кроме того, использование мТГ способствует повышению выхода белковых продуктов за счет повышения степени использования сухих веществ и массовой доли влаги [5]. Безусловно, такие свойства данного фермента весьма привлекательны для производителей пищевой продукции.

Что касается законодательных аспектов применения мТГ, проведенный анализ требований нормативных правовых актов, находящихся в открытом доступе, показал, что в США Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration) разрешено применение транsgлутаминазы только производства компании Ajinomoto и только с использованием в качестве продуцента *Streptovercillium mobaraense* (штамм

S-8112), причем в случае применения мТГ требуется указание этого факта на маркировке. В Европе данный вопрос с марта 2005 года находится в стадии рассмотрения вследствие большого количества представленных к изучению пакетов документов на ферментные препараты (более 300), причем среди указанных пакетов документов всего три на препараты транsgлютаминазы (кроме компании Ajinomoto еще два подано от компании DSM).

В странах Таможенного союза статус ферментов для пищевой промышленности определяется техническим регламентом Таможенного союза «Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств» (ТР ТС 029/2012 с изменениями на 18 сентября 2014 года). В указанном документе среди ферментных препаратов микробного происхождения транsgлютаминаза, а также микроорганизмы-продуценты данного фермента не упоминаются. Следовательно, использование микробной транsgлютаминазы на территории Таможенного союза является незаконным [6].

В зарубежных научных публикациях содержатся сведения о следующих методах, выявления транsgлютаминазы в составе пищевых продуктов [6]:

- методы, основанные на определении отклонения структурных (реологических) показателей мясных продуктов от типичных значений. Метод не позволяет в реальности установить факт применения транsgлютаминазы, поскольку изменение может быть вследствие использования желирующих агентов (альгинаты), либо ферментов (фибриноген-тромбин);

- метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), основанный на выявлении в продукте остатков ДНК микроорганизма-продуцента транsgлютаминазы *Streptovorticillium mobaraensis*, которые не удаляются из ферментного препарата транsgлютаминазы при его очистке. При использовании данного метода устанавливается наличие не самой транsgлютаминазы, а следов ДНК, наличие которых может быть очень мало и находиться за пределами чувствительности метода. Также отсутствует возможность обнаружения транsgлютаминазы, полученной от иного микроорганизма-продуцента;

- метод с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором, при котором выявляется наличие специфических пептидов, образующихся при гидролизе транsgлютаминазы трипсином;

- иммуноферментный метод (ELISA detection determination of Microbial Transglutaminase) [6].

Российским производителем реагентов ООО «ХЕМА» совместно с ФБГУ «Ростовский референтный центр Россельхознадзора» разработана, зарегистрирована в Федеральном информационном фонде по обеспечению единства измерений и 11 февраля 2019 года аттестована ФГУП «Уральский научно-исследовательский институт метрологии» методика измерения массовой доли микробной транsgлютаминазы в пробах пищевой продукции методом иммуноферментного анализа (ИФА).

В конце декабря 2019 года Россельхознадзор сообщил о намерении включить в систему госмониторинга исследование продуктов на наличие мТГ с использованием вышеназванной методики, и уже в феврале-марте 2020 года в связи с фактами выявления мТГ в имитированной пищевой рыбной продукции Россельхознадзор ввел режим усиленного лабораторного контроля в отношении продукции, выпускаемой одним из белорусских предприятий.

Кроме того, пресс-службой Россельхознадзора сообщается, что с целью **количественного** выявления мТГ в продуктах питания в перспективе будет разработана новая методика, основанная на высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

В связи с изложенным, с целью предупреждения возникновения возможных нарушений молокоперерабатывающими предприятиями Беларуси требований технических регламентов Таможенного союза, и, как следствие, введения ограничений со стороны России на поставки молочной продукции, возникает необходимость контроля остаточного содержания мТГ в различных молочных продуктах.

Цель данных исследований – определение остаточного содержания мТГ в различных молочных продуктах.

Материалы и методы исследований. Объектами исследований являлись: молочные продукты, выработанные без использования мТГ: йогурт, ряженка, сметана, творог (изготовленный с использованием различных температур отваривания), сыр, и молочные продукты с мТГ, изготовленные по технологии вышеперечисленных продуктов.

Выработки и исследование контрольных образцов молочных продуктов (творог, кисломолочный продукт) и экспериментальных образцов молочных продуктов, изготовленных по технологии творога и кисломолочного продукта с добавлением мТГ проводились в лаборатории технологий сыроделия и маслоделия, лаборатории цельномолочных продуктов и концентратов и производственно-испытательной лаборатории РУП «Институт мясо-молочной промышленности».

Для выработки экспериментальных образцов с мТГ использовался ферментный препарат Sargona MCC LM.

Сквашивание проводилось с использованием заквасок для производства йогурта, сметаны, ряженки и творога (изготовитель – РУП «Институт мясо-молочной промышленности»).

Определение остаточного содержания мТГ в молочных продуктах осуществлялось в производственно-испытательной лаборатории РУП «Институт мясо-молочной промышленности» с использованием:

- методики измерений массовой доли мТГ в пробах продуктов питания методом ИФА, разработанной ООО «Хема»;

- методики определения мТГ с использованием иммунохроматографического теста для качественного определения транsgлутаминазы производства ООО «АНКАР-ИМЭК».

Имунохроматографический тест для качественного определения транsgлутаминазы ООО «АНКАР-ИМЭК» использован с целью оценки сопоставимости полученных результатов, т.к. указанная методика пока не прошла процедуру аккредитации и официально не может быть использована государственными учреждениями.

Результаты и их обсуждение. Имеется ряд публикаций, ставящих под сомнение возможность определения остаточной активности мТГ в пробах пищевой продукции, объясняя это тем, что мТГ теряет активность при воздействии кислорода, рН, температуры, а также от выработки рабочего ресурса фермента. В производстве молочных продуктов в случае внесения мТГ после пастеризации сырья, температурная инактивация указанного фермента не проходит, но есть научные работы, подтверждающие необратимую потерю активности при достижении определенного значения рН.

Для исследования остаточного содержания мТГ в сквашенных молочных продуктах были изготовлены продукты по технологии йогурта, сметаны и ряженки с внесением ферментного препарата мТГ до пастеризации сырья и после пастеризации сырья. Температурный режим пастеризации – $(92 \pm 2^\circ\text{C})$ с выдержкой 10–15 с. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты исследований по определению остаточного содержания мТГ в сквашенных молочных продуктах

№ п/п	Наименование образца	Результат испытаний
1	Йогурт (контрольный образец, без мТГ)	Отрицательный
2	Продукт, выработанный по технологии йогурта (внесение мТГ до пастеризации сырья)	Отрицательный
3	Продукт, выработанный по технологии йогурта (внесение мТГ после пастеризации сырья)	Положительный
4	Продукт, выработанный по технологии йогурта (внесение мТГ после пастеризации сырья), после 14 суток хранения	Положительный
5	Сметана (контрольный образец, без мТГ)	Отрицательный
6	Продукт, выработанный по технологии сметаны (внесение мТГ после пастеризации сырья)	Положительный
7	Продукт, выработанный по технологии сметаны (внесение мТГ после пастеризации сырья), после 14 суток хранения	Положительный
8	Ряженка (контрольный образец, без мТГ)	Отрицательный
9	Продукт, выработанный по технологии ряженки (внесение мТГ после пастеризации и топления сырья)	Положительный
10	Продукт, выработанный по технологии ряженки с внесением мТГ после пастеризации сырья, после 27 суток хранения	Положительный

Источник данных: собственная разработка.

Как видно из полученных результатов (таблица 1), мТГ не была обнаружена во всех исследованных контрольных образцах молочных продуктов, а также продукте, выработанном по технологии йогурта с внесением транскляминазы до пастеризации сырья. Следовательно, температура $(92\pm 2)^\circ\text{C}$ с выдержкой 10–15 с является достаточной для инактивации фермента мТГ в молочных продуктах. Кроме того, установлено, что в случае внесения фермента после пастеризации сырья мТГ обнаруживается в продукте, выработанном по технологии ряженки даже после 27 суток его хранения.

Для исследования остаточного содержания транскляминазы в высокобелковых продуктах, были выработаны продукты по технологии творога с внесением мТГ до и после пастеризации сырья. Температурный режим пастеризации – $(78\pm 2)^\circ\text{C}$ с выдержкой 15–20 с, отваривания – $(44\pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 100 мин. Как видно из полученных результатов (таблица 2, образцы 1,2,3), мТГ не была обнаружена в контрольном образце творога, а также продуктах, выработанных по технологии творога с внесением указанного фермента как до пастеризации, так и после пастеризации сырья. Температура тепловой обработки творожного сгустка в данном случае недостаточна для инактивации фермента. Следовательно, отрицательная реакция на наличие мТГ может быть обусловлена совместным действием температуры и продолжительности отваривания молочного продукта по технологии творога. С целью установления влияния тепловой обработки творожного сгустка на вероятность обнаружения мТГ был выработан молочный продукт по технологии творога с внесением мТГ после пастеризации сырья при указанных выше температурных режимах с быстрым охлаждением сгустка после отваривания. Результаты исследований представлены в таблице 2.

Из результатов, представленных в таблице 2 можно сделать вывод, что при быстром охлаждении творожного сгустка транскляминаза сохраняется и может быть обнаружена. Таким образом, на линиях по производству творога (например, «Tewes-Bis»), когда одновременно действуют два фактора – температура отваривания порядка 60°C и достаточно продолжительное время выдержки – остаточная активность мТГ может не обнаруживаться даже в случае использования указанного ферментного препарата.

Таблица 2 – Результаты исследований по определению остаточного содержания мТГ в молочных продуктах по технологии творога с различными стадиями внесения препарата

№ п/п	Наименование образца	Результат испытаний
1	Творог (контрольный образец), после изготовления	Отрицательный
2	Продукт, выработанный по технологии творога (внесение трансглутаминазы до пастеризации сырья), после изготовления	Отрицательный
3	Продукт, выработанный по технологии творога (внесение трансглутаминазы после пастеризации сырья), после изготовления	Отрицательный
4	Продукт, выработанный по технологии творога (внесение трансглутаминазы после пастеризации сырья) с моментальным охлаждением сгустка после отваривания	Положительный
5	Сыворотка творожная, полученная в результате выработки продукта по технологии творога с быстрым охлаждением сгустка	Положительный

Источник данных: собственная разработка.

С целью определения сохранности трансглутаминазы в сырных продуктах и подсырной сыворотке, была проведена соответствующая выработка продуктов по технологии сыра. Внесение мТГ осуществлялось после пастеризации молочного сырья при $(72\pm 2)^\circ\text{C}$ с выдержкой 10–15 с. Результаты исследований по определению содержания мТГ в продуктах, выработанных по технологии сыра и сыворотке подсырной, представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Результаты исследований по определению остаточного содержания мТГ в продуктах, выработанных по технологии сыра и сыворотке подсырной

№ п/п	Наименование образца	Результат испытаний
1	Сыр (контрольный образец), после изготовления	Отрицательный
2	Сырный продукт (после изготовления)	Положительный
3	Сыворотка подсырная	Положительный
4	Сырный продукт (4 месяца созревания)	Положительный
5	Сырный продукт (9 месяцев созревания)	Положительный

Источник данных: собственная разработка.

Анализ полученных результатов показывает, что мТГ обнаруживается в подсырной сыворотке и сырных продуктах как непосредственно после выработки, так и после созревания в течение четырех и девяти месяцев.

Заключение. С использованием методики измерений массовой доли микробной трансглутаминазы в пробах продуктов питания методом ИФА ООО «Хема» и методики качественного определения трансглутаминазы с использованием иммунохроматографического теста производства ООО «АНКАР-ИМЭК» проведен анализ наличия остаточной активности микробной трансглутаминазы в контрольных образцах йогурта, ряженки, сметаны, творога (изготовленного с использованием различных режимов отваривания), сыра и молочных продуктов с микробной трансглутаминазой, изготовленных по технологии вышеперечисленных продуктов. Установлено наличие остаточной активности мТГ во всех исследованных видах готовой продукции, изготовленной с ее внесением после пастеризации сырья, за исключением творога, полученного способом кислотной коагуляции на линиях типа «Tewes-Bis».

Список использованных источников

1. Шлейкин, А.Г. Эволюционно-биологические особенности транsgлyтаминазы. Структура, физиологические функции, применение / А.Г. Шлейкин, Н.П. Данилов // Журнал эволюционной биохимии и физиологии, 2011. – т. 47. – №1. – С. 3–14.
2. Данилов, Н.П. Применение транsgлyтаминазы в производстве ферментированных молочных продуктов : дисс. ... канд. техн. наук : 05.18.07 / Н.П. Данилов. – СПб., 2011. – 143 с.
3. Ikura K., Okumura K., Yoshikawa M., Sasaki R., Chiba H. Incorporation of Lysyldipeptides into Food Protein by Transglutaminase // Agric. Biol. Chem., 1985. №49. P. 1877–1878.
4. Liu M., & Damodaran S. Effect of transglutaminase-catalyzed polymerization of beta-casein on its emulsifying properties // J. of Agric. and Food Chem., 1999. № 47(4). P. 514–519.
5. Богданова, Л.Л. Изучение технологических особенностей использования ацилтрансферазы при производстве молочных продуктов / Л.Л. Богданова, Е.В.Ефимова, Е.М. Дмитрук, С.И. Вырина // Актуальные вопросы переработки мясного и молочного сырья: сб.науч.тр. / РУП «Институт мясо-молочной промышленности»; редкол.: А.В. Мелешеня (гл.ред.) [и др.]. – Минск, 2020. – Вып. 14. – 123–131.
6. ВНИИМС: «Транsgлyтаминаза: не разрешена, но и не запрещена» / Продукт ВУ// [Электронный ресурс].– 2020. – Режим доступа: <https://produkt.by/story/vniims-transglyutaminaza-ne-razreshena-no-i-ne-zapreshchena> – Дата доступа: 23.12.2020.
1. Shlejkin, A.G. Jevoljucionno-biologicheskie osobennosti transgljutaminazy. Struktura, fiziologicheskie funkcii, primenenie [Эволюционно-биологические особенности транsgлyтаминазы. Структура, физиологические функции, применение] / А.Г. Shlejkin, N.P. Danilov // Zhurnal jevoljucionnoj biohimii i fiziologii, 2011. – t. 47. – №1. – S. 3–14.
2. Danilov, N.P. Primenenie transglutaminazy v proizvodstve fermentirovannyh molochnyh produktov [Use of transglutaminase in the production of fermented dairy products] : diss. ... kand. tehn. nauk : 05.18.07 / N.P. Danilov. – SPb., 2011. – 143 s.
5. Bogdanova, L.L. Izuchenie tehnologicheskix osobennostej ispol'zovanija aciltransferazy pri proizvodstve molochnyh produktov [Study of technological features of acyltransferase use in dairy products production] / L.L. Bogdanova, E.V.Efimova, E.M. Dmitruk, S.I. Vyryna // Aktual'nye voprosy pererabotki mjasnogo i molochnogo syr'ja: sb.nauch.tr. / RUP «Institut mjaso-molochnoj promyshlennosti»; redkol.: A.V. Meleshhenja (gl.red.) [i dr.]. – Minsk, 2020. – Vyp. 14. – 123–131.
6. VNIIMS: «Transgljutaminaza: ne razreshena, no i ne zapreshhena» [VNIIMS: «Transglutaminase: not allowed, but not prohibited»] / Produkt BY// [Jelektronnyj resurs].– 2020. – Rezhim dostupa: <https://produkt.by/story/vniims-transglyutaminaza-ne-razreshena-no-i-ne-zapreshchena> – Data dostupa: 23.12.2020.