

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ТРАНСГЛУТАМИНАЗЫ

Капрельянц Л.В. д-р техн. наук, профессор, Шпырко Т.В., канд. техн. наук, доц.,
Зиновьев А.А., асс.

Одесская национальная академия пищевых технологий, г. Одесса

На основании микробиологических исследований разработана технологическая схема получения гидролитического ферментного препарата трансглутаминмобаренсил. Изучены оптимальные параметры культивирования Streptomyces mobaraensis для получения ферментного препарата.

The technological process for making preparation of enzyme transglutaminmabarensil is described in the article. Optimum parameters of Streptomyces mobarensis cultivation for production of the enzyme preparation are discussed.

Ключевые слова: белоксодержащие продукты, фермент трансглутаминаза, культивирование

Постановка проблемы. Проблема обеспечения людей разнообразными, высококачественными и полноценными продуктами питания является интернациональной. Парадоксальность ситуации с нехваткой пищевого белка заключается в том, что в настоящее время человечество, располагая его значительными ресурсами (в среднем 180 г/сутки на человека), (70-80) % белка использует на кормовые цели, т.е. на развитие животноводства. Дефицитный пищевой белок представлен на (60-67) % растительным белком, (7-8) % мясным, (5-6) % рыбным, (6-7) % молочным, 5 % яйцепродуктами. В связи с этим следует напомнить, что в соответствии с медико-биологическими требованиями человеческий организм нуждается не просто в пищевом белке, а в белке полноценном (в количестве не менее 20 кг/год), содержащемся в основном в животном сырье (мясо, молоко, рыба, яйцо) и частично – в зернобобовых культурах (соя, нут, горох, фасоль).

Вовлечение в процесс производства мясных изделий изолированных белков, являющихся вторичным либо побочным продуктом в смежных с мясной промышленностью пищевых отраслях, т.е. комбинирование мяса и белковых ингредиентов, позволит получать продукты, обладающие высокой пищевой ценностью с заданными функционально-технологическими свойствами. Данный путь дает возможность повысить глубину переработки и степень использования ресурсов белка в целом без коренной перестройки производства и существенно увеличить объемы вырабатываемой продукции, обеспечивая высокое качество мясопродуктов с гарантированными экономическими преимуществами.

Анализ последних достижений. В мировой практике активно используется привлечение дополнительных, нетрадиционных источников белка, однако это не решает проблему, поскольку новые белки не всегда обладают нужными свойствами. Дополнительным источником белка могли бы стать природные белки, не используемые ранее в связи с их затруднением в выделении, после модификации в форму доступную для использования. Однако при переработке белоксодержащего сырья качество получаемых продуктов зависит от функционально-технологических свойств белков. Эти свойства в первую очередь определяются структурными особенностями белковых молекул. Таким образом, проблема, придания белоксодержащим пищевым продуктам необходимых функционально-технологических свойств, связана с поиском путей регулирования структурно-химических свойств белковых молекул. [1] Однако в процессе переработки белок претерпевает многократные изменения, и зачастую бывает трудно какими-либо методами изменить вторичную или третичную структуру белков для получения требуемых пищевых структур.

Цель работы. Актуальным является использование биотехнологических приемов для получения белоксодержащих продуктов с заданными функционально-технологическими свойствами. Для этого используют различные методы модификации белков, наиболее эффективным методом является ферментативная модификация позволяющая проводить направленное изменение свойств белков, таких как растворимость, водоудерживающая способность, эмульгирующая способность, способность к гелеобразованию и др.

Целью работы является исследование условий культивирования фермента трансглутаминазы для построения дополнительных связей в молекуле белка и разработка технологической схемы получения ферментного препарата трансглутаминмобаренсил.

Изложение основного материала исследований. Фермент глутаминтрансфераза катализирует реакции присоединения первичных аминов к остаткам глутамина, перекрестное сшивание между остатками глутамина и лизина (рис. 1), дезаминирование глутаминовых остатков.

Для пищевой промышленности наиболее интересна реакция перекрестного сшивания белковых молекул с образованием между ними ковалентных связей, с участием транsgлутаминазы (глутаминтрансферазы). Глутаминтрансфераза (ГТФ, ЕС 2.3.2.13) катализирует реакцию между γ -карбоксиламидами белков или пептидов и первичными аминами. ϵ (γ -глутамил)лизиновая связь образуется когда первичная аминогруппа является ϵ -аминогруппой в лизиновом остатке. В результате реакции сшивания образуются поперечные связи между белковыми молекулами, которые оказывают существенное влияние на физико-химические свойства белков, следовательно, и на функциональные свойства продуктов. Модификация пищевых белков транsgлутаминазой приводит к получению текстурированных продуктов, изменяет растворимость и функционально-технологические свойства, позволяет получать белки высокой пищевой и биологической ценности.

Субстратом для транsgлутаминазы являются белки мяса, сои, пшеницы, молока, яиц, поэтому и применение транsgлутаминазы может быть разнообразно – это морепродукты, мясо, молоко и зернобобовые продукты.

Получить фермент транsgлутаминазу можно несколькими способами: из тканей животных, растений либо путем микробиологического синтеза, который является наиболее эффективным методом.

Главными причинами того, что именно микроорганизмы служат потенциальными продуцентами ферментов является то, что:

- они способны к генетической модификации, то есть существует возможность получения сверхпродуцентов нужных ферментов;
- экономическая выгода культивирования микроорганизмов в больших объемах в связи с использованием недорогих питательных сред и быстрого роста микроорганизмов;
- большая способность микроорганизмов приспосабливаться к разным условиям окружающей среды. [4]

Известная до недавнего времени тканевая транsgлутаминаза уступает микробиологической не только в экономической эффективности производства, но и по некоторым ферментативным свойствам. Она не требует активации ионами кальция и имеет широкий диапазон действия pH и температуры.

Из литературных источников известно, что многие актиномицеты способны продуцировать микробиологическую транsgлутаминазу. Из Всероссийской коллекции микроорганизмов в качестве объекта исследований был выбран микроорганизм *Streptomyces mobaraensis*, который является активным продуцентом транsgлутаминазы. [2]

Одним из этапов работы, была оптимизация состава питательных сред, а также режимов и условий культивирования микроорганизма. Было выбрано семь факторов, по которым проводились исследования – это продолжительность культивирования, температура культивирования, pH питательной среды, концентрация источников углерода, азота, витаминов, минеральных веществ. По результатам метода насыщенных планов были определены значимые факторы в пределах выбранных максимальных и минимальных значений.

Методом крутого восхождения, при фиксированных факторах (pH 7, витамины с процентной концентрацией 0,5 % и минеральные соли – 0,5 % (K_2HPO_4 и $MgSO_4$)) определяли диапазон переменных факторов. Используя план второго порядка, предварительно зафиксировав факторы источников углерода и азота на значениях 2,5 % составили уравнение зависимости активности фермента в культуральной жидкости от периода культивирования и температуры. Было установлено, что процесс биосинтеза фермента заканчивается на третьи сутки, т.к. увеличение активности в культуральной жидкости и процесс накопления биомассы заканчиваются одновременно [3]. На основании полученных результатов разработана технология производства ферментного препарата транsgлутаминмобаренсил Г10х, которая включает следующие этапы (рис.2):

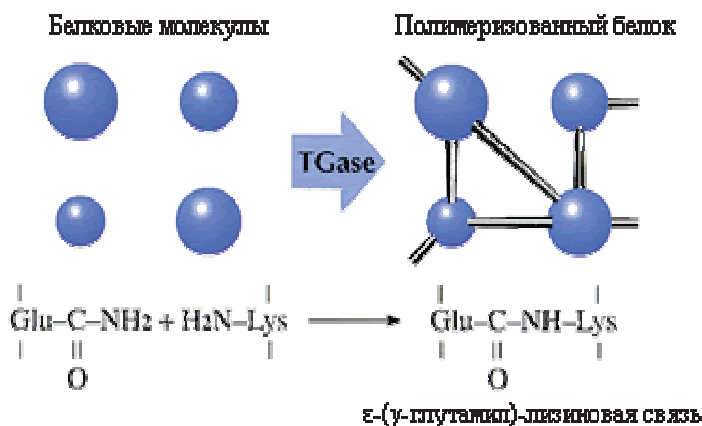


Рис. 1 – Реакция перекрестного сшивания

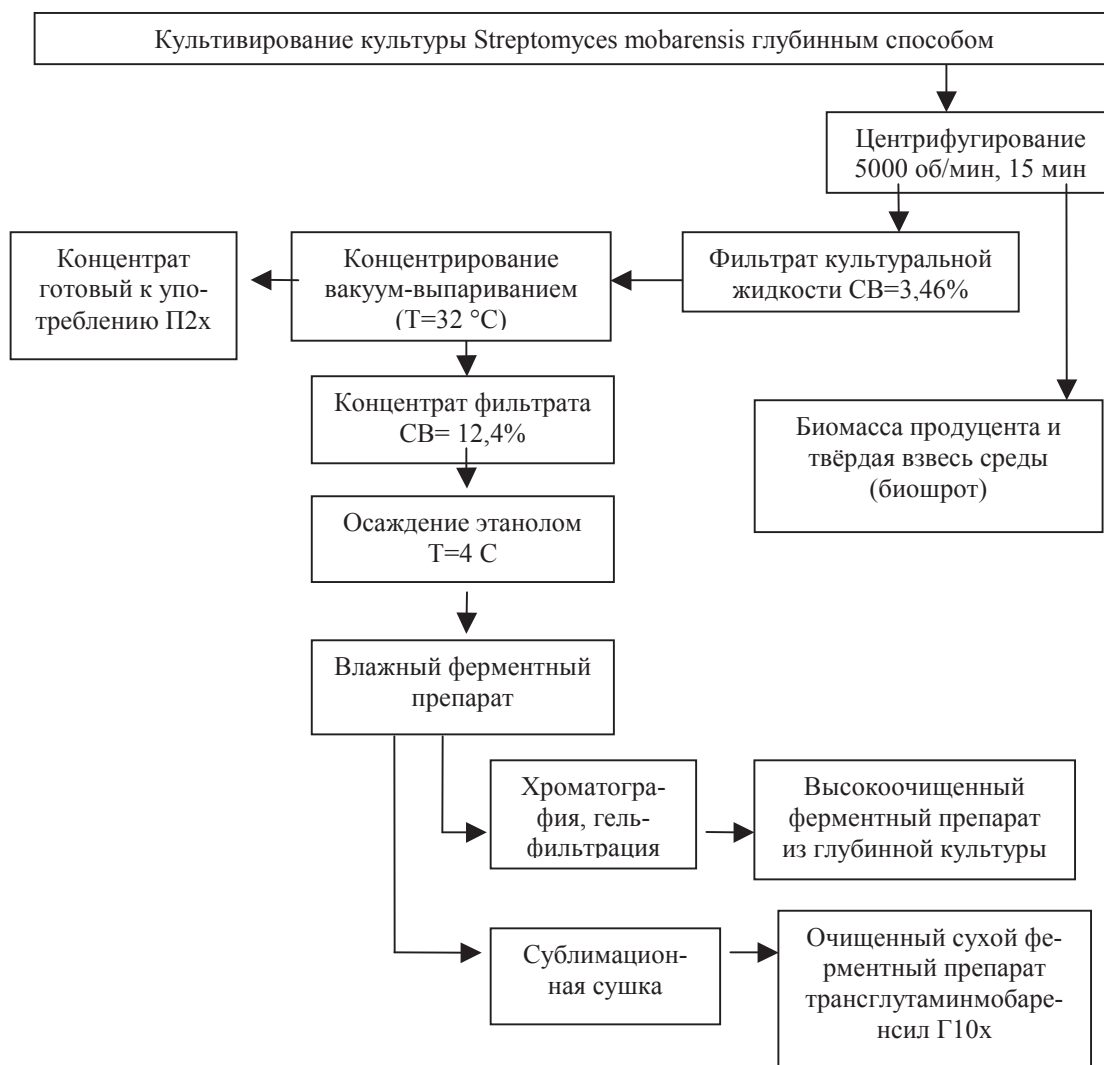


Рис. 2 – Принципиальная технологическая схема получения гидролитического ферментного препарата трансглутаминмобаренсил Г10х

— культивирование культуры *Streptomyces mobarensis* глубинным способом. Культивирование культуры *Streptomyces mobarensis* происходит в ферментерах на крахмало-пептонной среде при температуре 30 ± 1 °C и pH 7,0-7,2 в течении 3 суток;

— центрифугирование. Полученную культуральную жидкость содержащую фермент центрифугируют для отделения клеток ($n=5000$ с-1, $\tau=15$ минут);

— концентрирование вакуум-выпариванием. Полученный после центрифугирования фильтрат культуральной жидкости с содержанием сухих веществ 5,17 % поступает на концентрирование вакуум-выпариватель. Вакуум-выпаривание проводили на роторном выпарном аппарате фирмы «ROT VAC EVAPORATOR» при температуре 37 °C, до получения концентрата фильтрата с содержанием сухих веществ 12,4 %;

— осаждение органическими растворителями. Полученный после вакуум-выпаривания концентрат фильтрата глубинной культуры осаждается органическими растворителями. Осаждение проводится этанолом при pH 6,0; $t=5$ °C; $\tau=30$ мин. до образования осадка с содержанием сухих веществ 23,42 %;

— катионно-обменная хроматография. Полученный после осаждения органическими растворителями влажный фермент подвергается дальнейшей очистке через катионнообменную смолу «КУ-2-8»;

— гельфильтрация. Полученный препарат подвергается гель-фильтрации. Гельфильтрацию проводили на сефадексе G-75 фирмы Pharmacia при pH 4,5 со скоростью $(30-35)$ см³/час.

Осадок фермента с содержанием влаги приблизительно 77 % подвергали высушиванию лиофильно. Сушку проводили в лиофилизаторе (Лабормаш ВНР). Нижняя температура составила -30 °C, верхняя

+40 °С, $\tau = 8$ ч. В результате сушки получали ферментный препарат с содержанием сухих веществ $95,44 \pm 2,63$ %.

В таблице 1 представлены результаты очистки ферментного препарата от сопутствующих ферментов и балластных веществ культуры *Streptomyces mobarensis*.

Таблица 1 – Стадии очистки ферментного препарата

| Стадия очистки | Объем, мл | Общее количество белка, мг | Общая активность, ед | Удельная активность ед/мг белка | Степень очистки | Выход |
|--|-----------|----------------------------|----------------------|---------------------------------|-----------------|--------|
| Культуральная жидкость | 1000,00 | 1780,00 | 470,00 | 0,26 | 1,00 | 100,00 |
| Отделение биомассы, концентрирование | 340,00 | 1610,00 | 460,00 | 0,29 | 1,08 | 97,87 |
| Осаждение этанолом, растворение в воде | 145,00 | 650,00 | 390,00 | 0,60 | 2,27 | 82,98 |
| Катионно-обменная хроматография | 120,00 | 640,00 | 360,00 | 0,56 | 2,13 | 76,60 |
| Гельфилтрация | 30,00 | 230,00 | 340,00 | 1,48 | 5,60 | 72,34 |
| Лиофилизация | 10,00 | 17,00 | 240,00 | 14,12 | 53,47 | 51,06 |

В готовом ферментном препарате исследовали сопутствующие активности по стандартным методам. Значительной посторонней активности не выявлено, данные представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Сопутствующие активности ферментного препарата

| | | |
|--|--------|--------------------------|
| Активность протеолитических ферментов по гидролизу БАПНА | pH-9 | 0,646 мккат/кг сух. в-ва |
| Активность нейтральной протеазы (казеин) | pH-6 | 85,01 нкат/кг сух. в-ва |
| Активность кислой протеазы (гемоглобин) | pH-3,5 | 89,9 нкат/кг сух. в-ва |

Препараты, полученные по двум схемам, отличающимися глубиной очистки фермента транглутаминазы от балластных веществ, характеризовались следующими активностями: I – 1,48 ед/г, II – 14,12 ед/г.

Выводы

В результате проведенных операций получили ферментный препарат с глютаминтрансферазной активностью, который позволяет сшивать белковые молекулы, тем самым позволяя получать качественные белковые продукты с заданными функционально-технологическими свойствами.

Литература

- Капрельянц Л.В., Зиновьев А.А. Трансглутаминазы: Получение и использование в пищевых технологиях. Наукові праці ОНАХТ. – Одеса: ОНАХТ, 2006. – Вип. № 29. – С. 23 – 27.
- Ando H., Adachi M., Umeda K. Purification and Characteristics of novel transglutaminase derived from microorganisms //Agric.Biol. Chem – 1998.- V53.-P. 2613-1617.
- Капрельянц Л.В., Зиновьев А.А. Использование фермента трансглутаминазы в пищевых технологиях, источники получения. Матеріали ІХ Українського біохімічного з'їзду 24-27 жовтня 2006 р., Том 2, Харків С. 149-150
- Василевская И.А. Актиномицеты – продуценты биологически активных веществ.– Киев : Вища школа, 1979 -34 с.