БИОХИМИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ

УДК 669.713.7

Татьяна Николаевна Пивненко
Дальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет, доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры «Пищевая биотехнология», SPIN-код: 7443-7095, AuthorID: 817526, Россия, Владивосток, e-mail: tnpivnenko@mail.ru

Применение трансглутаминазы в пищевой промышленности

Аннотация. Представлены сведения о свойствах фермента трансглутаминазы, обеспечивающего биокаталитическую сшивку белков различного происхождения, и возможностях его применения в пищевых производствах. Проанализированы современные данные о субстратной специфичности фермента, реакционной способности и распространении в биологических объектах, включая воднобиологические ресурсы. Показаны направления применения и обоснована безопасность использования в пищевых продуктах.

Ключевые слова: трансглутаминаза, субстратная специфичность, коммерческие препараты, воднобиологические ресурсы.

Tatyana N. Pivnenko
Far Eastern State Technical Fisheries University, doctor of biological sciences, professor, professor of the department of food biotechnology, SPIN-cod: 7443-7095, AuthorID: 817526, Russia, Vladivostok, e-mail: tnpivnenko@mail.ru

Application of transglutaminase in the food industry

Abstract. This review summarizes information about the properties of the transglutaminase enzyme, which provides biocatalytic crosslinking of proteins of various origins and the possibilities of its use in food production. Modern data on the substrate specificity of the enzyme, reactivity and distribution in biological objects, including aquatic biological resources, are analyzed. The directions of application are shown and the safety of use in food products is justified.

Keywords: transglutaminase, substrate specificity, commercial preparations, aquatic biological resources.

Введение

В настоящее время большее значение в пищевой промышленности приобретает интенсификация технологических процессов, использование современных достижений технической биохимии и особенно применение ферментных препаратов для обработки практически всех видов сырья. Основным коммерческим продуктом мирового биотехнологического рынка являются ферментные препараты [1]. Согласно данным организации Научно-техническое некоммерческое партнерство «Технологическая Платформа БиоТех2030» производство таких препаратов постоянно растет. Объем производства отечественных ферментных препара-

тов в настоящее время составляет около 1000 т/год, что значительно ниже потребности – около 18 000 т/год. Стоимость импортируемых в РФ ферментных препаратов составляет около 500 млн долларов США ежегодно (http://biotech2030.ru/wp-content/uploads/ 2015/02/SPI _aktualizatsiya_ 20_08_ 2015.pdf).

Ферментные препараты являются важным фактором, способствующим глубокой переработке сельскохозяйственного сырья, повышению выхода, качества и сохранности готовой продукции. Ферментативный катализ субстратов обеспечивает радикальное изменение функциональных свойств и фракционного состава сырья на различных этапах его переработки, расширяет возможности совершенствования традиционных пищевых технологий, а также создания новых видов пищевых продуктов. При использовании различных штаммов микроорганизмов, в том числе генетически модифицированных, разработаны ферментные препараты целевого назначения с различной субстратной специфичностью и механизмом действия [2–4].

Наиболее часто в пищевой промышленности используют протеазы, липазы, амилазы – гидролитические ферменты, способствующие разрушению белков, жиров и углеводов в пищевых продуктах путем изменения их качества в сторону размягчения структуры и образования растворимых компонентов [5, 6]. Абсолютно противоположными свойствами обладают ферменты – трансглутаминазы (ТГазы). Их уникальная способность изменять функциональные свойства белков путем образования ковалентных сшивок имеет огромный научный и практический интерес [7–9].

В природе ТГазы катализируют образование амидных связей между белками с образованием нерастворимых белковых агрегатов. Эта специфическая функция достаточно давно используется в пищевой и текстильной промышленности для изменения текстуры мяса, шерсти и кожи. Применение ТГаз в биотехнологии включает широкий спектр отраслей от материаловедения до медицины [9]. Ферментативная модификация белков при применении в пищевой промышленности имеет значительные преимущества перед другими методами, такими как, например, химическая модификация.

В данном обзоре рассмотрены последние достижения в этой области, иллюстрирующие универсальные возможности применения ТГаз.

Общая характеристика. ТГазы являются трансферазами, имеющими согласно классификации ферментов название белок-глютамин γ-глутамилтрансферазы (ЕС 2.3.2.13). Фермент впервые был описан в 1959 г. Подробное биохимическое описание строения и механизма действия было составлено на основе изучения тканевой ТГазы, называемой фактором свертывания крови XIII. Основной реакцией, катализируемой ТГзами, является ковалентное сшивание белков поперечными связями. Помимо этого, ТГазы катализируют модификацию белков посредством реакции включения аминов и реакции деамидирования. Они катализируют реакцию переноса ацильной группы от γ-карбоксамидных остатков глутамина у белков, пептидов, а также различных первичных аминов. В результате происходит посттрансляционная модификация белков посредством образования изопептидных связей внутри или между полипептидными цепями. Если в качестве ацильного акцептора выступает ε-аминогруппа лизина, это приводит к полимеризации и меж- или внутримолекулярным сшивкам белков путем формирования ε-(γ-глутамил)-лизиновой поперечной связи между двумя белками. Как показано на рис.1, это происходит путем обмена ε-аминогруппы остатка лизина с образованием аммиака на карбоксамидную группу остатка глютамина в молекуле другого белка [10–12].

Образование связи между остатками ε-γ-глутаминовой кислоты и лизина в молекулах белков показано на рис. 2. Формирование связей может происходить как между белками одного происхождения (например, растительного), так и между белками, отличающимися по типу (молочно-растительные), что дает возможность использовать трансглутаминазу в производстве продуктов смешанного состава. Ковалентные связи, образованные трансглутаминазами, устойчивы к протеолизу и термообработке [13].

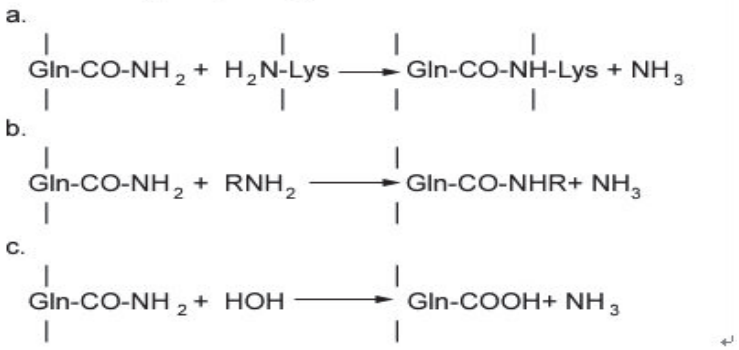

Рис. 1. Реакции, катализируемые ТГзами: a – реакция переноса ацильной группы; b – реакция поперечного связывания лизина и глицина; c – реакция дезаминирования
Fig. 1. Reactions catalyzed by TGases: a – acyl group transfer reaction; b – cross-linking reaction of lysine and glycine; c – deamination reaction

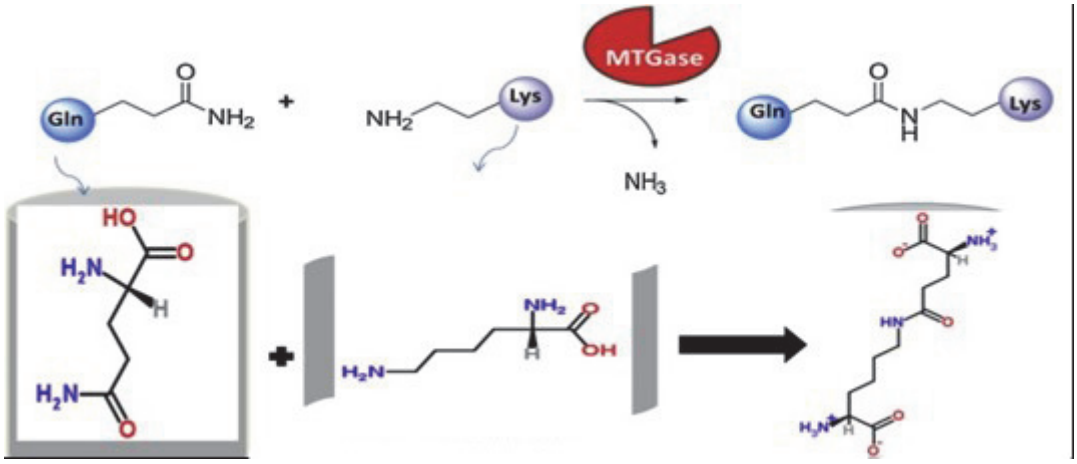

Рис. 2. Формирование ε-(γ-глутамил)лизиновой поперечной связи между двумя белками под действием трансглутаминазы микробного происхождения (мТГазы) (Rachel, Pelletier, 2013)
Fig. 2. Formation of the ε-(γ-glutamyl) lysine cross-link between two proteins under the action of microbial transglutaminase (mTGase) (Rachel, Pelletier, 2013)

Распространение трансглутаминаз и физиологические функции. ТГазы широко распространены в различных тканях, органах и биологических жидкостях животных, поэтому их называют тканевыми (тТГазы). Для некоторых внеклеточных трансглутаминаз участие в физиологически важных функциях организма точно установлено, например, фактор XIII – трансглутаминаза плазмы крови (фибрин-стабилизирующий фактор), катализирует реакцию лигирования (свертывания крови) [15, 16]. Многие тТГазы были выделены и идентифицированы, определены их основные свойства [13].

Физиологическая роль тТГазы в плазме крови высших животных (где этот фермент также называется фибринолигаза или фактор XIIIa) хорошо известна – это образование сшивок сгустков фибрина при гемостазе. Зимоген (профермент) фактора XIII активируется с помощью тромбина, который также участвует в свертывании фибриногена. Первоначально коммерческие препараты получали в основном из бычьего тромбина и плазмы крови [11, 12, 16, 17].

Показано, что в лизате гемоцитов (клеток крови/гемолимфы) японского мечехвоста *Tachypleus tridentatus* при добавлении эндотоксинов инвазивных бактерий происходит акти-

вация проферментов, чувствительных к этим эндотоксинам. При этом запускается каскад реакций, которые в конечном итоге приводят к активации свертывающей тТГазы. Активированная тТГаза впоследствии преобразует растворимый гелеобразующий фактор – коагулоген в нерастворимый гель коагулин, выполняющий функцию барьера против инвазии микроорганизмов [18].

В листьях растений активация тТГазы происходит при повышении уровня доступной энергии или уровня включения полиаминов в хлоропласты под действием света. Поэтому считается, что фермент участвует в процессах фотосинтеза, вероятно, изменяя активность рибулозобисфосфат-карбоксилазы или оксигеназы [19] .

тТГАзы существенно различаются по строению в зависимости от места нахождения в организме и выполняемой функции. Так, фактор XIII состоит из двух каталитических субъединиц *A* и двух некаталитических *B.* Для его активации (так же, как для эпидермальной ТГазы) требуется ограниченный протеолиз. Эпидермальная тТГаза существует в виде мономера. Каждая ТГаза имеет в организме свой специфический субстрат [9, 13, 20, 21].

Активность тТГазы зависит от концентрации ионов Ca^{2+}. Для ее максимальной активности уровень ионов кальция должен составлять 2–5 мМ. Связывание Ca^{2+} приводит к конформационным изменениям, которым подвергаются цистеиновые остатки. Вследствие чего цистеин реагирует с глутаминовым субстратом и образует ацилферментное промежуточное соединение. Ацилферментный комплекс затем реагирует с первичным амином с формированием γ-глутамил-амино поперечной связи, после чего фермент освобождается. Особенностью тТГазы, помимо поперечного сшивания белков, является способность гидролизовать гуанозин 5'-трифосфат (ГТФ) и аденозинтрифосфат (АТФ) [22, 23]. Хотя тТГазы являются наиболее интенсивно изучаемыми, их точная физиологическая роль до сих пор слабо изучена. Активируемая ионами Ca^{2+} тТГаза участвует в реализации таких биологических функций, как рост, адгезия, морфология и дифференциация клеток, апоптоз [9, 23, 24].

тТГаза из печени морской свинки является классическим объектом изучения. Она является мономерным белком, состоящим из 685–691 аминокислот, с молекулярной массой 76–85 кДа, в состав молекулы фермента входит 17 тиоловых групп цистеиновых остатков, но отсутствуют дисульфидные связи. Для образования активного центра важны цистеиновые остатки [25, 26]. Аминокислотные остатки, соседние с цистеином, являются достаточно консервативными и полностью повторяются у всех изученных типов тТГаз из разных источников. При этом тТГаза имеет трехмерную структуру, содержащую N-концевую область, каталитическое ядро и два С-концевых участка. N-концевая область тТГАазы необходима для ее активации, а центральная область участвует в гидролизе ГТФ и АТФ [27, 28].

Регуляция активности. Основная реакция, катализируемая тТГазой, реакция поперечного сшивания белков, активируется ионами кальция, гидролиз же ГТФ и АТФ не зависит от концентрации этого вещества. *In vitro* было установлено, что ГТФ может влиять на способность тТГАаз ковалентно сшивать белки. При этом ГТФ способен неконкурентно связывать тТГазу из печени морской свинки и тем самым ингибировать способность к Ca^{2+}-зависимому ковалентному сшиванию белков [28]. С другой стороны, добавление Ca^{2+} препятствует ингибированию трансглутаминазы ГТФ, подтверждая возможность двойной регуляции каталитических функций фермента. Вероятно, указанные компоненты при соответствующих концентрациях регулируют активность фермента и определяют направление катализируемой реакции – поперечного сшивания белков или расщепления ГТФ. Кроме ГТФ в качестве субстрата реакции гидролиза может также выступать АТФ, для обеих этих реакций необходимы ионы магния [29].

Также была показана возможность влияния фосфолипидов на активность тТГАаз. Например, лизосфингомеилин способен активировать реакцию поперечного ковалентного сшивания белков [30]. При этом концентрация Ca^{2+}, необходимая для активации фермента,

снижается в 16 раз. Способность тТГазы связываться с фосфолипидами и локализоваться на поверхности клеточной мембраны обуславливает ее роль в функционировании поверхностных рецепторов клетки.

Микробиальная ТГаза. Существуют важные различия между эндогенными тТГазами, широко распространенными в тканях растений и животных, и ферментами микробиального происхождения – мТГазами, секретируемыми *Streptoverticillium mobaraense* или *Streptomoces mobaraense* [31]. Большое преимущество мТГаз перед эндогенными тТГазами заключается в том, что активность первых не зависит от присутствия Ca^{2+}. Кроме того, мТГаза является более стабильной, катализирует реакцию при более высоких температурах и более активна, чем эндогенная тТГаза животного происхождения [8, 31, 32]. Отсутствие чувствительности к ионам Ca^{2+} в отличие от тканевых компонентов позволяет применять мТГазы для обработки морепродуктов, которые могут содержать большое количество фосфатов или других хелатообразователей. До сих пор основной областью применения мТГаз в переработке морепродуктов была холодная реструктуризация, холодное желирование паст и повышение прочности геля путем сшивания миозина. Когда мТГазу добавляют к субстрату, текстурные характеристики (эластичность и прочность), механическая прочность и влагоудерживающая способность реструктурированной рыбы и мясных продуктов, таких как стейки и колбасы, резко улучшаются [8, 33, 34].

Для мТГазы оптимальная температура составляет около 20–50 ºС в зависимости от конкретного ферментного препарата и субстрата [7–8]. Этот факт делает мТГазу хорошим инструментом для приготовления продуктов с модифицированной структурой при низкой температуре, не вызывающим изменений во внешнем виде конечного продукта.

Специфичность и модификация субстратов. ТГазы характеризуются относительной реакционной специфичностью по отношению к различным субстратам. При этом миозин является наиболее чувствительным среди мышечных белков к действию ТГаз, в то время как актин не реагирует с этим ферментом. Тропомиозин и тропонин-Т также были предложены в качестве возможных субстратов, хотя и в ограниченной степени. Реакционная способность мТГаз представлена в табл. 1.

Таблица 1

Реакционная способность мТГаз по отношению к различным субстратам

Table 1

Reactivity of mTGases concerning to various substrates

Название белка	Реакционная способность
1	2
Мышечная ткань	
Коллаген	Высокая
Желатин	Очень высокая
Миоглобин	Низкая
Миозин	Очень высокая
Актин	Отсутствует
Яйца	
Овальбумин	Низкая
Белок желтка	Высокая
Соя	
11S глобулин	Очень высокая
7S глобулин	Очень высокая
Пшеница	
Глиадин	Высокая
Глютенин	Высокая

Окончание табл. 1

1	2
Молоко	
Казеин	Очень высокая
Казеинат натрия	Очень высокая
α-лактоальбумин	Низкая
β-лактоглобулин	Низкая

При сшивании белков для проявления активности ТГазы требуется, чтобы глутамин, связанный с белком или пептидом, имел и α-амино-, и α-карбоксильную группы в пептидной связи. Гидрофобный метильный остаток глутамина, образующего пептидную связь, имеет большое значение для взаимодействия с комплиментарной гидрофобной областью в непосредственной близости от участка активного центра фермента. Фермент также имеет абсолютную стереоспецифичность для L-формы аминокислот и показывает различные уровни реактивности в отношении различных субстратов. Основанием для различий в реакционной способности может считаться природа соседних с глутамином аминокислотных остатков. Предполагаемый механизм фермент-субстратного взаимодействия позволяет считать, что только карбоксамидные группы амидов, связанные с неразветвленными группами, могут продуктивно взаимодействовать с активным участком, в то время как разветвленные боковые группы в любой из этих позиций препятствуют продуктивному взаимодействию. Заряженные боковые радикалы в непосредственной близости от задействованных остатков глутамина, как правило, препятствуют фермент-субстратному взаимодействию. Было высказано предположение, что для ТГаз из некоторых источников остатки глутамина должны быть расположены на гибком участке пептидной цепи, на поверхности петли или на участках цепи, образующих обратные повороты [9, 35].

Таким образом, высокое содержание остатков глутамина не обязательно обеспечивает высокий уровень активности ТГазы, что демонстрируют 11S и 7S запасные белки семян гороха – легумины, которые являются довольно плохими субстратами, несмотря на высокое содержания глутамина и лизина. Подобным образом из 6 остатков глутамина и 12 лизина в α-лактальбумине лишь 1 остаток глютамина и 3 остатка лизина являются доступными для ТГазной реакции даже после денатурации белковой глобулы. Также обнаружено, что глицин, аспарагиновая кислота, пролин, гистидин, триптофан – превосходные акцепторы ацила лизина – оказывают неблагоприятное воздействие на реактивность субстрата, в то время как валин, аргинин, фенилаланин, серин, аланин, лейцин, тирозин имеют тенденцию к повышению эффективности реакции. Такая избирательность для остатков лизина является необычной, так как всегда считалось, что этот фермент менее избирателен к акцепторам ацильной группы, чем к его донорам. При изменении конформации субстрата увеличивается восприимчивость его к действию ТГазы. Легумин гороха – субстрат, «бедный» для действия ТГазы – имеет 37 глутаминильных и 22 лизильных остатков на αβ-субъединицу, из которых только два глутаминильных в норме могут образовывать связи ε-(γ-глутамил)-лизин. Химическая модификация легумина гороха под действием цитраконового ангидрида индуцирует конформационные изменения в белке, в результате чего повышается каталитическая активность ТГАазы [36].

Добавление восстановителей, таких как дитиотреитол, цистеин, глутатион, также было использовано для модификации субстратов, которые частично разворачиваются, что позволяет демаскировать остатки лизила и/или глутамина и тем самым улучшить их доступность для мТГазы, что и было продемонстрировано для α-лактальбумина, β-лакто-глобулина и актомиозина. Точно так же сурими не осаживается в гель, если его белки были дестабилизиро-

ваны при добавлении соли. Денатурация α-лактальбумина с помощью ЭДТА, связывающей ионы Ca^{2+}, до состояния потери глобулярной структуры с сохранением нативной вторичной структуры и образованием неупорядоченной третичной структуры приводит к 10-кратному увеличению активности мТГазы, по сравнению с естественным состоянием белка. Кроме того, реакция на поверхности раздела фаз масло–вода также повышает возможность сшивки мТГазой различных белков благодаря повышенной доступности гидрофобной сердцевины белка для фермента [37, 38].

Для модификации субстрата в пищевых производствах наиболее приемлем ферментативный метод. Использование трипсина для мягкого протеолиза измельченных тканей леща при низких концентрациях фермента (0,02–0,05 %) в присутствии ионов Ca^{2+} значительно повышает сшивки, опосредованные мТГазой. Триптический гидролиз нативных молекул миозина преобразует последние до тяжелых цепей меромиозина (HMM), хвостов и S-1 фрагментов с превращением спиральной структуры в клубок, более доступный для каталитического действия ТГазы. Активность фермента существенно возрастает, если использовать в качестве субстрата гидролизованные, а не нативные белки. Таким образом, когда протеолиз предшествует дезамидированию, размер молекулы и/или ее конформация может быть изменена, тем самым увеличивается доступность субстрата для фермента [39].

Исследование ТГазной активности в отношении соевых белков также показало, что термическая обработка отдельно или в комбинации с протеолизом приводит к повышению эффективности фермента. Например, активность фермента возросла в 27 раз при термической обработке в сочетании с протеолизом, степень которого достигала 20 % [40].

Следует, однако, отметить, что предварительный протеолиз должен иметь весьма ограниченный характер, так как преобладание низкомолекулярных пептидов в реакционной среде не обеспечивает протекание реакции.

Высокое давление также было использовано в пищевой промышленности для модификации субстрата. Обработка пасты сурими давлением при 300 мПа перед обработкой ТГазой приводит к трехкратному увеличению прочности геля по сравнению с гелями без предварительной обработки давлением. При этом происходит сшивка миозина, в то время как актин остается без изменений даже после обработки давлением. Таким образом, миозин – и без того очень хороший субстрат для ТГазы – разворачивается под действием высокого давления, что еще более увеличивает доступность ранее скрытых остатков глутамина и лизина, в результате чего повышается прочность геля. Шестикратное увеличение прочности наблюдали для геля сурими из минтая, подвергнутого давлению в 300 мПа в течение 30 мин до осаживания при 25 °С в течение 120 мин. Обработка давлением в 200–600 мПа других белков (бычий сывороточный альбумин, яичный альбумин, лизоцим и γ-глобулин) также повышало их способность реагировать с мТГазой. Степень, до которой высокое давление вызывает развертывание мышечных белков, зависит от их относительной стабильности, которая является функцией температуры среды обитания вида (это касается гидробионтов). Подобная обработка давлением мяса индейки не повышает его способности к гелеобразованию при последующей обработке ТГазой так, как это происходит в пасте сурими, даже если такую обработку проводят при повышенной температуре для более полной дестабилизации миозина [41] .

ТГазы ВБР. Изучение процессов, происходящих при получении фарша сурими из некоторых видов рыб (минтая, сардины, горбыля и др.), привело к открытию того, что именно эндогенные тТГзы ответственны за спонтанное гелеобразование в мышечной ткани рыб, измельченной до пастообразного состояния в присутствии NaCl (2–4 %), инкубированной при низкой температуре (5–40 °С). Это хорошо известное явление при изготовлении продуктов сурими, называемое «высаживание», низкотемпературное гелеобразование или «сувари». Оно включает в себя формирование сети молекул миозина за счет сшивания их эндогенными

тТГазами. Гели, образованные таким образом, характеризуются гораздо большей прочностью после кулинарного приготовления, чем гели, образующиеся при приготовлении непосредственно из пасты, полученной при высоких температурах (>80 °С). Поэтому высаживание обычно используется для усиления текстуры продуктов сурими. Например, в комбинированных крабовых продуктах, содержащих и волокна, и паутинообразную матрицу (оба из сурими), волокна должны быть сконструированы таким образом, чтобы они были плотнее (чем матрица) за счет того, что процесс высаживания проводится перед приготовлением готового продукта [42–44].

Это открытие послужило поводом изучения содержания и характеристик эндогенных тТГаз из ВБР. Эти ферменты были выделены из мышц различных видов ВБР, как правило, в виде мономерных белков. Они были обнаружены в таких видах рыб, как карп (*Cyprius carpio*), радужная форель (*Oncorhynchus* mykiss), кета (*Oncorhynchus keta*), терпуг (*Pleurogrammus azonus*), белый горбыль (*Argyrosomus argentatus*) и др. Активность ТГаз варьируется у различных видов рыб. Белый горбыль имеет самую высокую активность (2,41 ед./г сырой массы), затем в порядке убывания следуют карп, минтай, кета, терпуг и радужная форель с наименьшей активностью – 0,1 ед./г [45–47]. Также установлена важная роль тТГаз в метаболизме мышечной ткани глубоководных рыб, для которых характерна адаптация к обитанию в условиях повышенного давления. Кроме того, что активность тТГаз у данных объектов существенно выше, чем у пелагических рыб, было выяснено, что важным условием протекания ферментативной реакции является величина фермент-субстратного соотношения, превышение которого приводит к деполимеризации продуктов сшитого миозина под действием тТГазы, которая обеспечивает расщепление глутамил-лизиновых связей, т.е. действует как изопептидаза [48].

При использовании тТГаз из мышц карпа для сшивки актомиозина из различных видов рыб наблюдали различные скорости полимеризации, что является серьезным доказательством того, что процесс сшивки является субстрат-зависимым. Добавление экзогенной тТГазы из печени морской свинки к сурими из минтая и атлантического горбыля приводило к повышению прочности геля, при этом оптимумы pH и температуры для проведения такой реакции совпадали с известными для эндогенных тТГаз этих видов. Это означает, что температура и pH оптимум реакции осаживания могут быть детерминированы наличием реактивных точек на поверхности миозина (конформацией субстрата), а не источниками фермента. Кроме того, оптимальный температурный режим коррелирует с температурой среды обитания живой рыбы, что еще больше усиливает достоверность предположения, что активность тТГазы зависит от стабильности миозина. Например, тяжелые цепи миозина рыб полимеризуются с помощью тТГазы при низких температурах осаживания соленой пасты, в то время как говяжья паста не подвержена действию фермента вследствие большей стабильности говяжьего миозина [47, 49].

Таким образом, эндогенные тТГазы из мышечной ткани рыб уже давно используются для создания прочной текстуры в продуктах на основе сурими, обеспечивая возможность образования сшивок в миозине при низкой температуре инкубации (осаживание или сувари) перед кулинарной обработкой.

Использование мТГаз в технологии пищевых продуктов. Получаемые в промышленных масштабах препараты мТГаз применяют в технологиях переработки молока, мяса и других видов пищевого сырья, а также для получения пищевых плёнок. Эффективный диапазон действия фермента: от 30 до 60 °С, pH – от 3,0 до 9,0. При температуре свыше 70 °С начинается инактивация фермента. Данные показатели являются очень комфортными при использовании такого ферментного препарата при масштабном пищевом производстве, так как поддержание данных условий не считается проблематичным для большинства производств [1, 50].

Сферы применения ТГаз:

1) рыбная промышленность – склеивание нестандартних кусков филе в полноценный стейк, образование более плотной структуры; упрочнение текстуры и реструктуризация изделий из рыбного фарша, а также получение сурими из различных видов рыб. Для этого препараты мТГ добавляют в количестве 0,5–1 % к массе, затем фарш набивается в оболочку и отправляется на охлаждение для образования плотной структуры;

2) мясная промышленность – в колбасных изделиях для получения более плотной структуры готового продукта. Например, разработана технология формованных реструктурированных изделий из мяса кролика, включающая его обвалку с последующим массированием при добавлении 30 % рассола, содержащего ферментный препарат мТГ в количестве 1,65 % к массе рассола. Исследованы свойства фарша для вареных колбас при совместном действии на них фосфатов и трансглутаминазы, показано повышение его эластичности и прочности, после термообработки готовый продукт был более плотным, менее влажным на срезе по сравнению с мясным фаршем без внесения мТГаз;

3) молочная промышленность – при приготовлении творога повышается выход готовой продукции на 15 % за счет перехода большей части сывороточных белков в сгусток и дополнительного влагоудержания; при приготовлении йогурта, кефира и сметаны повышается способность к влагосвязыванию, желированию, эмульгированию, улучшается текстура, консистенция, органолептика. Исследования влияния мТГаз на свертываемость молочного сгустка показали, что пастеризованное молоко, обработанное мТГазами, имеет больший по размеру и по плотности сгусток, чем необработанное;

4) хлебобулочная промышленность – образование поперечных связей между молекулами клейковинного белка повышает эластичность и упругость теста, увеличивает выход продукции и срок годности; предложено использовать фермент для замены эмульгаторов, входящих в состав хлебопекарных улучшителей, для придания тесту из муки, содержащей пшеничный белок, большей пористости и гомогенизации тестовой массы.

В будущем фермент может быть использован для изменения функциональных свойств белков происхождения в пищевой или фармацевтической промышленности (рис. 3).

Коммерческие препараты мТГ. На отечественном рынке представлены коммерческие марки ТГ фирм-производителей из Китая, Японии, Испании. Анализ сведений о продуцентах показывает, что в странах Европы преимущественно используют бактериальную экспрессивную систему *S. mobaraense.* Промышленный процесс получения коммерческих препаратов включает стадии: культивирование посевного материала, отделение и очистка жидкой фракции, стандартизация препарата с использованием мальтодекстрина, который стимулирует процессы массообмена в мясных системах, связывание влаги и способствует образованию ароматобразующих соединений [50].

ООО «Балтийская Пищевая Компания» представляет ферментный препарат ТМ «FloraBond TGL-100» в жидкой форме, который дает значительный экономический эффект в совокупности с улучшением показателей качества и безопасности при производстве пищевых продуктов по сравнению с другими аналогичными препаратами. Активность фермента 100–125 ед./мл. Состав: очищенная вода, мТГаза, мальтит, глицерин. Препарат вносится после пастеризации вместе с заквасочными культурами (температура молока/смеси не должна превышать 48 °С). Молоко в емкости для сквашивания тщательно перемешивается для равномерного распределения ферментного препарата по всему объему. Далее процесс осуществляют согласно обычной технологической схеме.

Ферментный препарат Revada TG 12 (BDF Natural Ingredients, S.L., Испания). В его состав входят мальтодекстрин и мТГ. Композиция разработана для вареных и полукопченых колбас, ветчин, деликатесной продукции. Активность 85–150 ед./г. При его использовании можно производить мясные и рыбные реструктурированные продукты из обрезков низкой

себестоимости, трансформируя их в конечный продукт с добавленной стоимостью, при этом придавая ему любую форму и обеспечивая таким образом стандартизированные размеры, например, при производстве филе или карпаччо. Серия продуктов на базе Revada TG предназначена для применения в рыбной, мясной и молочной отраслях.

Ферментный препарат Пробайнд ТХ 5.0 той же фирмы. В состав входят мальтодекстрин и мТГаза. Рекомендована для вареных и полукопченых колбас, ветчин, деликатесной продукции. Активность 80–140 ед./г. Используется для придания структуре продукта (мяса, рыбы или сыра) монолитности в таком виде, как привык видеть её потребитель.

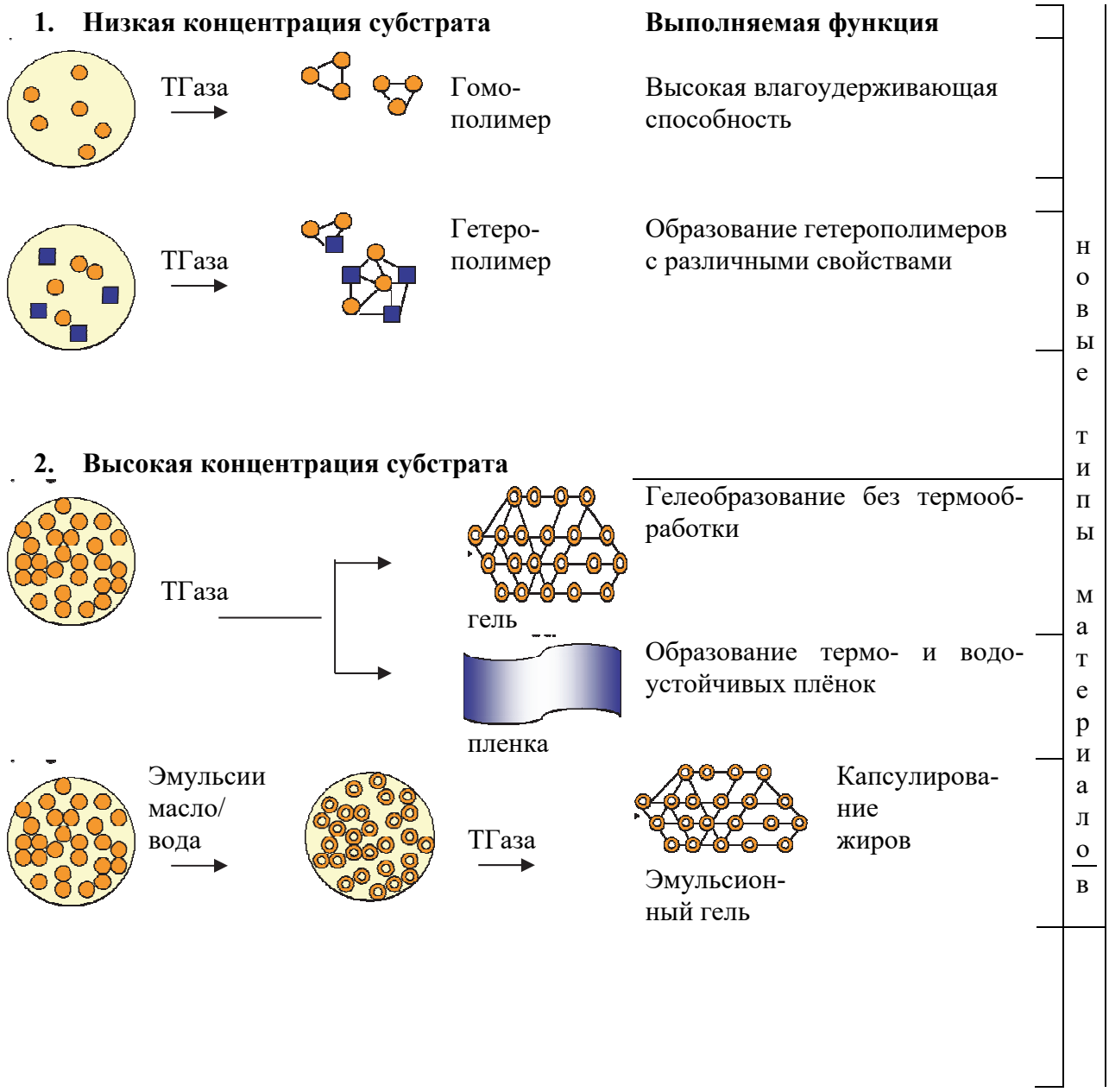

Рис. 3. Возможности использования ТГаз для получения новых материалов (Rachel, Pelletier, 2013)
Fig. 3. The possibilities of using TGases to obtaining new materials (Rachel, Pelletier, 2013)

При использовании мТГазы необходимо следить за количеством поваренной соли, так как во время образования поперечных связей она оказывает угнетающее действие на активность фермента. Но если вносить фермент в уже посоленный фарш, то в этом случае поваренная соль оказывает меньшее угнетающее действие. Основываясь на этих знаниях, были проведены эксперименты, которые позволили дать сравнительную оценку эффективности действия мТГаз в белковых системах. Установлено, что ферментативная обработка ТГ уже посоленного фарша, содержащего животные и/или растительные белки, достаточно эффективна и приводит к увеличению прочностных характеристик продукта после тепловой обработки на 22 % по сравнению с образцами без добавления фермента [51].

Препараты мТГазы Activa® («Аджиномото Ко. Инк.», Япония) производятся путем микробной ферментации, не зависят от присутствия ионов кальция, и это дает им определенные преимущества при работе во многих пищевых системах (https://www.transglutaminase.com/home).

ТГ Activa имеет широкий спектр условий применения:

- работает при значениях pH, типичных для пищевых продуктов;
- работает в широком диапазоне температур, даже на начальных стадиях приготовления;
- инактивируется в процессе приготовления при высокой температуре.

ТГ Activa имеет потенциальное применение в большинстве пищевых систем, содержащих белок. С помощью дополнительных ингредиентов можно обеспечить работу этого фермента в различных продуктах, даже с низким содержанием белка. Препараты специально разработаны для реструктуризации мышечных тканей, таких как мясо, птица и морепродукты, а также для пищевого сырья с низким содержанием белка. Основные компоненты этого препарата – казеинат натрия, мальтодекстрин и ТГаза.

TI Activa разработан для улучшения текстуры в различных системах, содержащих достаточное количество белка. Основные компоненты этого препарата – мальтодекстрин и ТГаза.

FP Activa разработан для ароматизации и реструктуризации мясных продуктов. Хорошо работает в суспензии или при добавлении во время перемешивания, но не предназначен для внесения в сухом виде. Основные компоненты – гидролизованный обезжиренный молочный белок и ТГаза.

GB Activa разработан для быстрого склеивания поверхности мясных продуктов, этот препарат практически не обладает аллергенностью. Предназначен для использования в сухом виде, но не в виде суспензии. Основные компоненты – мальтодекстрин, желатин, диоксид кремния, ТГаза.

Таким образом, препараты мТГаз могут превращать мясное и рыбное сырье в продукты с добавленной стоимостью без использования чрезмерного количества соли или фосфатов. Тримминг может быть механически размягчен и преобразован практически в любую естественную форму. Преимущества использования препарата: увеличение стоимости продуктов из обрези; реструктуризация измельченного сырья; модификация текстуры; холодное формование изделий; улучшение или сохранение текстуры размягченных или хлопьевидных продуктов; улучшение характеристик эмульсий и продуктов грубого помола; эффективность в системах с пониженным содержанием натрия и фосфатов. В отличие от многих других пищевых добавок мТГаза совместима с различным технологическим оборудованием и направлениями переработки. В зависимости от способа приготовления продуктов препарат может быть добавлен в мясные и рыбные продукты несколькими способами, включая добавление суспензии; маринады и сухие добавки; добавление смесей; посыпание поверхностей.

Особенности применения ТГаз при производстве рыбной продукции. Использование мТГаз при обработке рыбы позволяет быстро и легко порционировать даже сырье, различающееся по размеру, можно «склеивать» мелкие куски рыбы в более крупные блоки, которые можно разрезать на отдельные контролируемые порции. Также вновь объединенному продукту можно придать форму, имитирующую некоторые натуральные части более крупной

рыбы. Такие формованные продукты имеют мышечные волокна и текстуру, полностью соответствующие натуральному филе [5] .

Обычно при разработке рыбных реструктурированных продуктов необходимо добавлять 2–3 % соли к солюбилизированным миофибриллярным белкам. Но в настоящее время потребители требуют более здоровой пищи, поэтому растет интерес к слабосоленым продуктам. По этой причине в пищевой промышленности существует тенденция к увеличению производства с помощью мТГаз новых продуктов с низким содержанием соли и текстурой, характерной для продуктов с высоким ее содержанием. Высококачественные рыбные гели были приготовлены с добавлением 1 % соли и мТГазы без каких-либо нежелательных изменений в качестве, цвете или прозрачности [5, 10, 52]. Малосолёный реструктурированный рыбный продукт также был приготовлен из атлантической скумбрии с хорошим качеством текстуры и концентрацией NaCl ниже 2 % [53]. В реструктурированных продуктах с низким содержанием соли нужно контролировать уровень pH используемого фарша, особенно, если содержание добавляемой соли ниже 0,5–1,5 %.

Добавление ионов Ca^{2+} улучшает механические свойства гелей, так как он является кофактором эндогенной тТГ. Например, добавление 10–100 мМ $CaCl_2$ вызывало агрегацию актомиозина тиляпии, выдержанного при 4 и 40 °С. Однако важно учитывать, что наличие взаимодействий между белком и Ca^{2+} ухудшает стабильность белка при морозильном хранении. Поэтому Ca^{2+} должен быть добавлен вовремя солюбилизации рыбных паст, непосредственно перед осаждением [54].

При усаживании геля важно учитывать физико-химические свойства миозина и актомиозина, которые являются субстратами для ТГаз. Обеспечение оптимальной активности ТГаз требует денатурирования мышечных белков, чтобы открыть остаточные аминогруппы и сделать возможным ковалентное сшивание соседних белков. При этом мышечные белки имеют тенденцию к быстрой агрегации в коротком диапазоне температур между началом денатурации и началом агрегации. Кроме того, мышечные белки холодноводных рыб денатурируют при более низких температурах, чем мышечные белки тепловодных рыб. Первые из этих видов образуют более сильные гели, если рыбные пасты выдерживают 12–24 ч при 0 °С или 2 ч – при 25 °С, а затем нагревают до 90 °С 30 мин. Тропические виды рыб образуют более сильные гели при 40 °С в течение 30 мин. Оптимальные температуры для формирования рыбных паст определяются величиной начальной температуры денатурации белка. Более высокая степень раскрытия структуры белка обнажает больше остаточных групп, что позволяет образовывать более частые ковалентные сшивки соседних белков с помощью ТГаз. Высокая степень свежести рыбы обеспечивает образование более прочного геля [42, 44, 55].

Реструктурированные продукты могут быть получены путем комбинирования различных видов рыб с высокой и низкой стоимостью. Полосатая кефаль, имеющая обширные сырьевые запасы, но очень низкие органолептические качества из-за темного мяса и сильного привкуса, была комбинирована с камбалой, имеющей белую мякоть и хороший вкус, но небольшие размеры. Хотя гели мышечной ткани каждого вида имели хорошие механические свойства, но гели из их смеси были менее прочными. Если для связывания компонентов использовали мТГазу в концентрации 0,3 %, механические свойства смеси (1 :1) улучшались, что позволило получить реструктурированные продукты с хорошими механическими, функциональными и сенсорными свойствами [56, 57].

Применение ТГаз при производстве продукции из ВБР рассмотрены в ряде работ [12, 17, 58], приведенных в табл. 2.

тТГазы морского происхождения могут быть использованы в тех случаях, когда в процессе необходимо применять низкую температуру или желательно проводить тепловую инактивацию при пониженной температуре, так как большинство ферментов, полученных из холодноводных организмов являются термолабильными в отличие от термостабильных мик-

робиальных ферментов. Более того, мышечные белки ВБР менее устойчивы к действию температуры и давления, поэтому могут быть лучшими субстратами для сшивок. При этом как белки ВБР, так и белки иного происхождения могут быть модифицированы путем химических, ферментативных или физических воздействий для облегчения их реакционного взаимодействия с ТГазой.

Таблица 2

Примеры применения ТГаз при переработке ВБР

Table 2

Examples of the use of T Gas in the processing of ABR

Описание	Ссылка
Обработка экструдированных рыбных кормов препаратом мТГазы для улучшения физических свойств продукта	Wolska et al., 2015, [59]
Добавление ТГазы для улучшения текстуры сурими из тихоокеанских белых рыб для получения высококачественных комабоко	Yin and Park, 2015, [60]
Усиление эффекта увеличения прочности текстуры, улучшение физических и сенсорных качеств при добавлении ТГаз и рыбного желатина в сурими из каменного окуня	Kaewudom et al., 2013, [61]
Использование ТГаз в комбинации с методом холодного желирования для получения сырых продуктов из измельченной мышечной ткани рыб	Moreno et al., 2013, [62]
Улучшение пленкообразующих свойств желатина из кожи канального сома путем поперечных сшивок	Oh, 2012, [63]
Улучшение реологических и пленкообразующих свойств желатина из кожи рыб	Liu et al., 2011, [64]
Оптимизация метода использования различных концентраций ТГаз для получения реконструированного бескостного рыбного филе из белоротого крокера	Goncalves, Passos, 2010, [65]

Таким образом, основные направления использования ТГаз в рыбоперерабатывающей отрасли: модификация и/или улучшение функциональных и механических свойств рыбы и морепродуктов, реструктурирование продукции из сырого мяса, производство сурими. Также ТГазы используют при получении рыбных фаршей, для изменения текстуры рыбы, обработки акульих плавников, образования связей между коллагеном и желатином, минимизации потери воды после оттаивания. Большинство из этих процессов предусматривают использование эндогенных тТГаз, которые способны изменять текстуру сушеной рыбы, замороженного сурими, камабоко. Экологичность метода, высокая активность и специфичность ферментов обеспечивают альтернативу методам с применением ингибиторов протеаз (приводящих к нежелательным изменениям цвета и вкуса), фосфатов (имеющих негативное воздействие на окружающую среду) и окислителей.

Вопросы безопасного использования препаратов ТГаз. В настоящее время существуют противоречивые мнения по вопросам безопасности использования препаратов ТГаз в пищевой продукции. Однако большинство научных исследований подтверждает отсутствие возможностей проявления реакционных способностей этого фермента в продуктах, готовых к употреблению. Согласно постановлению Европейского Парламента и Совета ЕС № 1169 от 25 октября 2011 г. ТГазы являются вспомогательным веществом, не исполняют технологической функции в конечном продукте, поэтому нет необходимости указывать их на этикетке в перечне компонентов (https://docs.eaeunion.org/pd/ru-ru/0123371/pd_17122018_att.pdf).

Очень часто возникает вопрос, а весь ли фермент был задействован в реакции и какая его доля осталась в не прореагировавшем виде. Фермент, который, возможно, не вступил в реак-

цию, остается в свободной форме, однако его концентрация настолько ничтожна, что может быть выражена показателем 0,001–0,0001 % от массы сырья. Дальнейшая обработка практически всех продуктов, проходящих температурное воздействие, обеспечивает инактивацию фермента и полностью гарантирует отсутствие свободного фермента в готовом изделии. Порог его денатурации составляет 72–75 °С. С учетом того, что фермент работает на стадии приготовления продукта при достаточно низких температурах, к моменту достижения оптимальной для прохождения реакции температуры 55 °С в свободной форме его остается настолько малое от начальной концентрации количество, что даже на этом этапе можно гарантировать практически 95 % химической инактивации. Дальнейшее повышение температуры обработки продукта обеспечивает полную физико-химическую инактивацию фермента, не вступившего в прямую реакцию. Фермент также может быть инактивирован путем изменения pH среды. Благоприятные условия, обеспечивающие механизм ацильного переноса – pH 5–8, а дальнейшее изменение pH среды как в щелочную, так в кислую сторону вызывает полную инактивацию фермента в системе.

FDA (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США) определило, что разрешение для применения этого препарата не противоречит выводам научной группы экспертов, согласно которым препарат ТГ Activa признан безопасным (имеет сертификат GRAS) для использования во всех продуктах, контролируемых FDA, включая продукты из мяса, птицы и рыбы, плавленые и натуральные твердые сыры, охлажденный йогурт, замороженные десерты, блюда из растительного белка (вегетарианские бургеры), заменители мяса, пасту, хлебобулочные изделия, кондитерские изделия, готовые крупяные изделия, пиццу, тесто и зерновые смеси. FDA также определило, что термин «фермент» следует указывать в описании ингредиентов продукта. При этом разрешение ограничивает количество фермента, которое может быть использовано в количестве, необходимом для достижения намеченной функции или уровней GMP. FDA опубликовало это заключение как уведомление GRAS GN 000095, согласно которому во всех мясных продуктах содержание ТГазы не должно превышать 65 ppm (млн$^{-1}$).

Потенциал использования ТГаз предполагает использование их для обогащения продуктов питания различными пищевыми ингредиентами путем ковалентной сшивки белков, дополнительно содержащих незаменимые аминокислоты. Например, фермент может быть использован для включения метиониллизина или аргиниллизина для того, чтобы возместить нехватку метионина и аргинина в казеине. Безусловно, встает вопрос об усвояемости и биодоступности таких сшитых пептидов, особенно это относится к связям глутамил-лизина. Последние исследования указывают на существование почечных ферментов, γ-глютамин циклотрансферазы и γ-глутамил-трансферазы, присутствующих также в крови и слизистой оболочке кишечника. Эти ферменты способны расщеплять связи γ-глютамиллизина с высвобождением лизина [66]. Кроме изменений пищевой ценности дополнительное сшивание белков также может быть применено для изменения или улучшения функциональности белка.

Таким образом, ТГазы благодаря своим уникальным свойствам широко используются во многих отраслях пищевой промышленности. Они были признаны безопасными (GRAS) независимой группой научных экспертов. Открытие способов микробиологического синтеза ферментов обеспечило возможности для более широкого практического применения. Значительный прогресс был достигнут как в фундаментальных, так и в прикладных исследованиях ТГаз. Глубокое понимание и характеристика субстратной специфичности и механизма действия очень важны для того, чтобы эти ферменты можно было эффективно использовать в различных областях пищевой промышленности. В технологии рыбопереработки существует огромный потенциал для создания продуктов с добавленной стоимостью. Реструктурированные рыбные продукты открывают возможности для создания новых способов позиционирования, которые расширят спектр маркетинговых возможностей, направленных на новый тип потребителя, который ищет одновременно здоровую и вкусную пищу.

Список литературы

1. Римарева Л.В., Серба Е.М., Соколова Е.Н., Борщева Ю.А. Ферментные препараты и биокаталитические процессы в пищевой промышленности // Вопр. питания. 2017. Т. 86, № 5. С. 63.

2. Ферменты в пищевой промышленности / под ред. Р.Дж. Уайтхерст и М. ван Оорт. М.: Изд-во «Профессия», 2014. 408 с.

3. Ozatay S. Recent Applications of Enzymes in Food Industry // Journal of Current Research on Engineering, Science and Technology. 2020. Vol. 6, № 1. P. 17–30.

4. Choi Jung-Min, Han Sang-Soo, Kim Hak-Sung, Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects // Biotechnology Advances. 2015. № 33. P. 1443–1454.

5. Fernandes P. Enzymes in Fish and Seafood Processing // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2016. Vol. 4. P. 1–14.

6. Jemli S., Ayadi-Zouari D., Hlima H. B., Bejar S. Biocatalysts: application and engineering for industrial purposes // Crit. Rev. Biotechnol. 2016. Vol. 36. P. 246–258.

7. Moreno H., Herranz B., Pérez-Mateos M.et al. New alternatives in seafood restructured product // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2016. Vol. 56(2). P. 237–248.

8. Motoki M., Seguro K. Transglutaminase and its use for food processing // Trends Food Sci. Technol. 1998. Vol. 9(5). 204–210.

9. Rachel N.M., Pelletier J.N. Biotechnological applications of transglutaminases // Biomolecules. 2013. Vol. 3. P. 870–888.

10. Diaz-López M., García-Carreno F.L. Applications of fish and shellfish enzymes in food and feed products, in Seafood Enzymes, eds N. F.Haard and B. K.Simpson (New York, NY: Marcel Dekker). 2000. P. 571–618.

11. Sikorski Z.E. The role of proteins in food, in Chemical and Functional Properties of Food Components, ed. Z.E. Sikorski (Boca Raton, FL: CRC Press). 2007. P. 129–176.

12. Zilda D.-S. Microbial transglutaminase: source, production and its role to improve surimi properties // Squalen Bull. Marine Fish. Postharvest Biotechnol. 2014. Vol. 9. P. 35–44.

13. Пивненко Т.Н., Позднякова Ю.М., Михеев Е.В. Ферментные системы водно-биологических ресурсов и их роль в формировании качества продукции. СПб.: Лань, 2020. 248 с.

14. Takahashi N. Takahashi Y., Putnam F. W. Primary structure of blood coagulation factor XIIIa (fibrinoligase, transglutaminase) from human placenta // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. Vol. 83. P. 8019–8023.

15. Greenberg C.S., Birckbichler P.J., Rice R.H. Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues // FASEB J. 1991. Vol. 5. P. 3071–3077.

16. Serafini-Fracassini D., Del Duca S. Transglutaminases: widespread cross-linking enzymes in plants // Ann. Bot. 2008. Vol. 102. P. 145–152.

17. Kieliszek M., Misiewicz A. Microbial transglutaminase and its application in the food industry. A review // Folia Microbiol. 2014. Vol. 59. P. 241–250.

18. Tokunaga F., Yamada M, Miyata T. et al. Limulus hemocyte transglutaminase. Its purification and characterization, and identification of the intracellular substrates // J Biol Chem. 1993. Vol. 268. P. 252–261.

19. Duarte L, Matte CR, Bizarro CV, Ayub MAZ // World J Microbiol Biotechnol. 2020. Vol. 36(1). P. 15.

20. Folk J. Transglutaminases // Annu. Rev. Biochem. 1980. Vol. 49. P. 517–531.

21. Ichinose A., Bottenus R.E., Davie E.W. Structure of transglutaminase // J.Biol.Chem. 1990. Vol. 265(23). P. 13411–13414.

22. Aeschlimann D., Paulsson M. Transglutaminases: protein cross-linking enzymes in tissues and body fluids // Thromb. Haemost. 1994. Vol. 71. P. 402–415.

23. Griffin M., Casadio R., Bergamini C.M. Transglutaminases: Nature's biological glues // Biochem. J. 2002. Vol. 368. P. 377–396.

24. Шлейкин А.Г., Данилов Н.П., Красникова Л.В. Эволюционно-биологические особенности трансглутаминазы. Структура, физиологические функции, применение // Журн. эволюционной биохимии и физиологии. 2011. Т. 47(1). С. 3–14.

25. Ikura K., Nasu T., Yokota H., Tsuchiya Y. et al. Amino acid sequence of guinea pig liver transglutaminase from its cDNA sequence // Biochemistry. 1998. Vol. 27. P. 2898–2905.

26. Gentile V., Thomazy V., Piacentini M. et al. Expression of tissue transglutaminase in Balb-C 3T3 fibroblasts: effects on cellular morphology and adhesion // Cell Biol. 1992. Vol. 119. P. 463–474.

27. Chen J., Mehta K. Tissue transglutaminase: an enzyme with a split personality // Cell Biology. 1999. Vol. 31. P. 817–836.

28. Iismaa S., Chung L., Wu M.J. et al. The core domain of the tissue transglutaminase Gh hydrolyzes GTP and ATP // Biochemistry. 1997. Vol. 36. P. 11655–11664.

29. Begg G.E., Holman S.R., Stokes P.H. et al. Mutation of a critical arginine in the GTP-binding site of transglutaminase 2 disinhibits intracellular cross-linking activity // J. Biol. Chem. 2006. Vol. 281. P. 12603–12609.

30. Zhang J., Lesort M., Guttmann R.P., Johnson G. V. W. Modulation of the in situ activity of tissue transglutaminase by calcium and GTP // J. Biol. Chem. 1998. Vol. 273. P. 2288–2295.

31. Gómez-Guillén M.C., Montero P., Solas M.T. Pérez-Mateos M. Effect of chitosan and microbial transglutaminase on the gel forming ability of horse mackerel (*Trachurus spp.*) muscle under high pressure // Food Res. Int. 2005. Vol. 38(1). P. 103–110.

32. Zhu Y., Rinzema A., Tramper J., Bol J. Microbial transglutaminase. Review of its production and application in food processing // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1995. Vol. 44. P. 277–282.

33. Kuraishi C, Sakamoto J, Yamazaki K, et al. Production of restructured meat using microbial transglutaminase without salt or cooking // J Food Sci. 1997. Vol. 62. P. 488–490.

34. Ramírez J.A., Uresti R.M., Velázquez G., Vázquez M. Food hydrocolloids as additives to improve the mechanical and functional properties of fish products: A Review // Food Hydrocolloids. 2011. Vol. 25. P. 1842–1852.

35. Zhang D., Zhu Y., Chen J. Microbial transglutaminase production: understanding the mechanism // Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 2009. Vol. 26. P. 205–222.

36. Larre C., Kedzior Z.M., Chenu M.G. et al. Action of transglutaminase on an 11S seed protein (pea legumin): influence of the substrate conformation // J Agric Food Chem. 1992. Vol. 40. P. 1121–1126.

37. Keillor J.W., Chica R.A., Chabot N. et al. The bioorganic chemistry of transglutaminase: from mechanism to inhibition and engineering // Can. J. Chem. 2008. Vol. 276. P. 271–276.

38. Faergemand M, Murray B.S, Dickinson E. Crosslinking of milk proteins with transglutaminase at the oil-water interface // J Agric Food Chem. 1997. Vol. 45. P. 2514–2519.

39. Kolakowski E., Wianecki M., Bortnowska G., Jarosz R. Trypsin treatment to improve freeze texturization of minced bream // J Food Sci. 1997. Vol. 62. P. 737–743.

40. Hamada J.S., Marshall W.E. Enhancement of peptidoglutaminase deamidation of soy protein by heat treatment and/or proteolysis // J Food Sci. 1988. Vol. 53. P. 1132–1134.

41. Nonaka M., R Sawa Ito. A., Motoki M., Nio N. Modification of several proteins by using Ca2+-independent microbial transglutaminase with high-pressure treatment // Food Hydrocolloids. 1997. Vol. 11. P. 351–353.

42. Lanier T.C., Carvajal P., Yongsawatdigul J. Surimi Gelation Chemistry, In: Surimi and Surimi Seafood. : Park, J. W., Ed., Taylor and Francis, London. 2005. P. 435–489.

43. An H., Peters M.Y., Seymour T.A. Roles of endogenous enzymes in surimi gelation // Trends in Food Science and Technology. 1996. Vol. 7. P. 321–327.

44. Park J. W. Ingredient technology for surimi and surimi seafood. In: Surimi and surimi seafood. – Park, J. W., Eds. CRC Press, Taylor and Francis Group. 2005. P. 649–707.

45. Nozawa H, Mamagoshi S, Seki N. Partial purification and characterization of six transglutaminases from ordinary muscles of various fishes and marine invertebrates // Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol. 1997. Vol. 118B. P. 313–317.

46. Seki N., Uno H., Lee N.H. et al. Transglutaminase activity in Alaska pollack muscle and surimi, and its reaction with myosin B // Nippon Suisan Gakk. 1990. Vol. 56. P. 125–132.

47. Yasueda H., Nakanishi K., Kumazawa Y. et al. Tissue-type transglutaminase from red sea bream (*Pagrus major*). Sequence analysis of the cDNA and functional expression in Escherichia coli // IIFEBS Lett. 1995. Vol. 232. P. 411–419.

48. Karaulova E.P., Yakush E.V. The comparative study of myofibrillar proteins of skeletal muscles of some deep-sea fish species // Journal of Fisheries Sciences. 2017. Vol. 11(2). P. 1–8.

49. Kishi H., Nozawa H., Seki N. Reactivity of muscle transglutaminase on carp myofibrils and myosin B // Nippon Suisan Gakk. 1991. Vol. 57. P. 1203–1210.

50. Радыгина А.Ф., Петрова М.З. Применение трансглютаминазы «REVADA TG» в мясо- и рыбопереработке // Пищ. пром-сть. 2010. № 9. С. 62–64.

51. Семенова А.А. Влияние поваренной соли на эффективность действия трансглютаминазы в модельных белковых системах // Мясная индустрия. 2010. № 12. С. 20–21.

52. Uresti R.M., Téllez-Luis S.J., Ramírez J.A., Vázquez M. Use of dairy proteins and microbial transglutaminase to obtain low-salt fish products from filleting waste from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) // Food Chemistry. 2004. Vol. 86. P. 257–262.

53. Martelo-Vidal M.J., Mesas J.M., Vázquez M. Low-salt restructured fish products from Atlantic mackerel (Scomber scombrus) with texture resembling turkey breast // Food Sci. Tecnol. Int. 2012. Vol. 18(3). P. 251–259.

54. Asagami T., Ogiwara M., Wakameda A., Noguchi S. F. Effect of microbial transglutaminase on the quality of frozen surimi made from various kinds of fish species // Fish Science. 1995. Vol. 61. P. 267–272.

55. Pérez-Mateos M., Montero P. Response surface methodology multivariate analysis of properties of high-pressure-induced fish mince gel // Eur. Food Res. Technol. 2000. Vol. 211(2). P. 79–85.

56. Lee H.G., Lanier T.C., Hamann D.D., Knopp J.A. Transglutaminase effects on low temperature gelation of fish protein sols // J. Food Sci. 1997. Vol. 62(1). P. 20–24.

57. Maruyama N., Nozawa H., Kimura I., Satake M., Seki N. Transglutaminase-induced polymerization of a mixture of different fish myosins // Fish Sci. 1995. Vol. 61. P. 495–500.

58. Suresh P.V., Nidheesh T., Pal G.V. Enzymes in seafood processing, in Enzymes in Food and Beverage Processing, ed. M.Chandrasekaran (Boca Raton, FL: CRC Press). 2015. P. 354–377.

59. Wolska J., Jonkers J., Holst O., Adlercreutz P. The addition of transglutaminase improves the physical quality of extruded fish feed // Biotechnol. Lett. 2015. Vol. 37. P. 2265–2270.

60. Yin T., Park J.W. Optimum processing conditions for slowly heated surimi seafood using protease-laden Pacific whiting surimi // LWT Food Sci. Technol. 2015. Vol. 63. P. 490–496.

61. Kaewudom P., Benjakuln S., Kijroongrojana K. Properties of surimi gel as influenced by fish gelatin and microbial transglutaminase // Food Biosci. 2013. Vol. 1. – P. 39–47.

62. Moreno H., Carballo J., Borderías J. Raw-appearing restructured fish models made with sodium alginate or microbial transglutaminase and effect of chilled storage // Food Sci. Technol. 2013. Vol. 33. P. 137–145.

63. Oh J.-H. Characterization of edible film fabricated with channel catfish Ictalurus punctatus gelatin by cross-linking with transglutaminase // Fish Aquat. Sci. 2012. Vol. 15. P. 9–14.

64. Liu Z., Lu Y., G, X., Zeng M. Effects of transglutaminase on rheological and film forming properties of fish gelatin // Adv. Mat. Res. 2011. P. 236–238.

65. Gonçalves A. A., Passos M. G. Restructured fish product from white croacker (*Micropogonias furnieri*) mince using microbial transglutaminase // Braz. Arch. Biol. Technol. 2010. Vol. 53. P. 987–995.

66. Oakley A.J., Coggan M. Board P.G. Identification and characterization of γ-glutamylamine cyclotransferase, an enzyme responsible for γ-glutamyl-ϵ-lysine catabolism // Journal of Biological Chemistry. 2008. Vol. 285. P. 9642–9648.

© Пивненко Т.Н., 2021

Для цитирования: Применение трансглутаминазы в пищевой промышленности // Научные труды Дальрыбвтуза. 2021. Т. 55, № 1. С. 5–22.

Статья поступила в редакцию 25.02.2021, принята к публикации 18.03.2021.