

ОБОСНОВАНИЕ ТЕМЫ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ

«Обоснование применения пептидаз для управляемого гидролиза
коллагенсодержащего сырья»

Направление подготовки

19.06.01 «Промышленная экология и биотехнологии»

направленность: 05.18.04 «Технология мясных, молочных и рыбных
продуктов и холодильных производств»

РУКОВОДИТЕЛЬ:

Минаев М.Ю., ктн., доц.

АСПИРАНТ:

1-го года обучения

заочной аспирантуры

ФГБНУ «ВНИИМП им. В.М.

Горбатова»

Еремцова А.А.

«04» февраля 2015 г.

1. Актуальность темы.

Технология переработки животного сырья сопровождается большим выходом сырья с высоким содержанием соединительной ткани (мясо с высоким содержанием коллагена, субпродукты, пищевые отходы). Из-за технологических трудностей переработки, связанных с высокими энергозатратами и продолжительностью процесса, большая часть такого сырья идет на утилизацию.

Коллаген – это основной компонент соединительной ткани и самый распространённый протеин в организме млекопитающих, составляет от 25 до 35% протеинов общего количества. Это фибриллярный белок, обеспечивающий прочность и эластичность соединительной ткани. При этом он является трудноусвояемым белком и одним из факторов влияющих на жесткость мяса.

Попытка максимального вовлечения нативных соединительнотканых белков в производство пищевых продуктов в рамках традиционных технологий не дала желаемых результатов в связи с различными функциональными и низкими их органолептическими свойствами в рецептурах мясных продуктов. Одним из способов получения белковых продуктов из малоценного сырья является его гидролиз, который позволяет получать препараты изолированных коллагеновых белков высокой степени очистки, а также стимулировать ключевые функционально-технологические свойства применительно к отраслям пищевой промышленности, в частности, производству колбасных изделий и рубленых полуфабрикатов. При этом большое значение имеет глубина гидролиза соединительнотканых белков, - от получения водорастворимой фракции белка, до полипептидов и аминокислот.

Большинство технологий получения белковых гидролизатов предусматривает воздействие на исходное сырье растворами щелочей и кислот. Однако, известно, что в результате щелочного и кислотного гидролизом полностью разрушается ряд аминокислот. При щелочном гидролизе белков образуются остатки лантаниона и лизиноаланина, которые являются токсичными для организма человека и животных. При таком гидролизе разрушаются аргинин, лизин и цистин, поэтому для получения гидролизатов его практически не используют. Недостатком кислотного гидролиза является полное разрушение триптофана, частичное оксиаминокислот (серина и треонина), дезаминирование амидных связей аспарагина и глутамина с образованием аммиачного азота, разрушение витаминов, а также образование гуминовых веществ, отделение которых затруднительно. Кроме того, при нейтрализации кислотных гидролизатов образуется большое количество солей: хлоридов или сульфатов. Последние являются особенно токсичными для организма.

Так как, основным требованием, выдвигаемым белковым гидролизатам является сбалансированность по аминокислотному составу, использование кислотного и щелочного гидролиза нецелесообразно.

В связи с этим, значительное внимание уделяется внедрению биокаталитических подходов (ферментативный гидролиз сырья). Ферментативный гидролиз сырья актуален и для обработки низкосортного мяса с целью повышения его питательных и органолептических свойств.

Для этих целей можно применять ферменты животного и растительного происхождения, однако они или крайне дороги в производстве, или обладают низкой специфичностью воздействия на коллаген.

Использование же ферментов микробного происхождения ограничено с точки зрения безопасности их применения. Большинство естественных продуцентов коллагеназ являются патогенными или условно-патогенными микроорганизмами. В мировой и отечественной практике для гидролиза коллагена предпринимались попытки использования ферментов животного, растительного и микробного происхождения. Широко известны такие препараты как Protease U-200 (Франция), Pronase V-500 (США), Amano (Япония), Протосубтилин Г-20 Ренниномин П10Х, Прототерризин, препарат из гепатопанкреаса краба (Россия), а также протеолит для получения мясного гидролизата, разработанный фирмой Maizema GWbH (ФРГ) на основе микробных протеиназ *Bacillus subtilis*, *Aspergillum niger* и *Aspergillum melleus*. Однако эти препараты, в том числе, и в связи с неоптимальными свойствами использованных ферментов (относительно низкой активностью по отношению к нативному коллагену и высоким значением температурного оптимума протеолитической активности), не нашли широкого применения в практике.

Особый интерес в этом отношении представляют пептидазы семейства М9 и М4, способные специфично действовать в отношении молекулы коллагена. Так, пептидазы семейства термолизина активно действуют по сайту связывания Хаа + Уаа, в котором Хаа представляет собой гидрофобный

остаток, а Yaa – остатки аминокислот Leu, Phe, Ile, Val, что позволяет получать на выходе высокомолекулярные гидролизаты. Пептидазы семейства M9, типичными продуцентами которых являются *Clostridium histolyticum* и *Vibrio alginolyticus*, в свою очередь, режут связь по глицину - аминокислоте, составляющей 33,5 % молекулы коллагена. Это позволяет получать более низкие по молекулярной массе пептиды. Таким образом, достижение различной глубины протеолиза будет зависеть от выбранного типа пептидазы, а не от концентрации растворов фермента, температуры, pH среды и продолжительности процесса ферментации.

Однако проблемой использования в качестве продуцентов специфичных пептидаз диких штаммов является выработка ими целого пула ферментов, близкой по молекулярной массе к искомому, что делает очистку и получение нужного фермента невозможным. Более того, большинство этих штаммов вырабатывают эндо - и экзотоксины, пирогены, что исключает их использование в пищевой промышленности.

Поэтому перспективным направлением в этой области является использование рекомбинантных штаммов. Для этого необходимо создавать генетическую конструкцию, состоящую из хост штамма-продуцента перспективных протеаз (Food grade) и секретируемого вектора со встроенным в него геном, кодирующим необходимую протеазу. При этом геном компетентных клеток и вектора не должны содержать гены устойчивости к антибиотикам - распространенным маркерам успешной трансформации, а сами клетки не продуцировать потенциально опасные для здоровья человека факторы.

За рубежом запатентована технология получения рекомбинантной коллагеназы в медицинских целях для введения подкожно. Данный препарат отличается высокой специфичностью и высокой степенью очистки. Однако стоимость его получения делает невозможным применение данной технологии в пищевой промышленности.

2. Цель и задачи исследований.

Целью работы будет являться создание генетически-инженерного штамма-продуцента специфичных пептидаз, способного найти применение в мясной промышленности.

Для достижения поставленной цели предусматривается решение следующих задач:

- выполнить скрининг штаммов- продуцентов пептидаз семейства M4 и M9;
- изучить протеолитическую активность ферментов, вырабатываемых штаммами-продуцентами и определение эффективности их дальнейшего использования;
- получить высокоэффективный рекомбинантный штамм с заданными свойствами, отвечающий требованиям к использованию в пищевой промышленности;
- на основе полученной генно-инженерной конструкции наработать опытные образцы ферментных препаратов, провести их очистку и концентрирование;
- изучить эффективность применения генно-инженерных пептидаз в технологии переработки мяса.

3. Научная новизна.

Будет обоснован выбор эффективных пептидаз в целях управляемого гидролиза коллагена.

4. Практическая значимость: применение полученных ферментов для повышения сортности мясного сырья, умягчения коллагенсодержащего сырья, получения белковых гидролизатов заданной молекулярной массы.