

ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНОЙ МЕТАЛЛОПЕПТИДАЗЫ М9

А.А. Махова, М.Ю. Минаев

ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова, РАН, Москва, Россия

В пищевой промышленности используется множество протеаз [1]. В большинстве случаев основным инструментом пищевой биотехнологии для производства этих ферментов служат клетки дрожжей, в частности штамм *Pichia pastoris*. Для использования в мясной промышленности, а именно для тендеризации мяса в клетках *Pichia pastoris* была экспрессирована внеклеточная аспартатная протеаза *Rhizomucor miehei* [2].

Ранее в статье мы описывали способ получения рекомбинантной пептидазы М9 *Aeromonas salmonicida* для обработки мясного сырья с целью его умягчения.

Целью данной работы стало изучение влияния рекомбинантной пептидазы на цельное мясо и мясной котлетный фарш после термической обработки и оценка безопасности ее применения. При оценке воздействия рекомбинантного фермента на мышечную и соединительную ткань мяса использовали гистологический метод. Изучение образцов и их фотографирование проводили на компьютерной системе анализа изображения Axio Imager A1 на объективе с 20х. Полученные изображения обрабатывали с помощью программы коррективки ACDS 8 PRO для улучшения качества.

При оценке безопасности рекомбинантного фермента проводились исследования с использованием биологических методов острой токсичности, местно-раздражающего и сенсибилизирующего действия.

При оценке влияния фермента на мышечную и соединительную ткань цельнокусковой говядины, было отмечено неравномерное его распределение. Распределение ограничивалось ближайшим к месту инъекции пространством без проникновения внутрь первичных пучков мышечных волокон и в эндомизий. Препарат воздействовал преимущественно на коллагеновые структуры, не оказывая протеолитического воздействия на эластин (рисунки. 1–3).

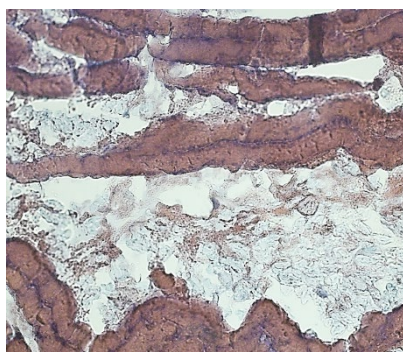


Рис. 1. Структура коллагеновой соединительной ткани. Контроль. Об.20х.

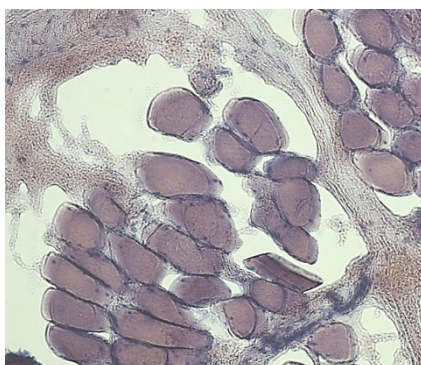


Рис. 2. Структура контакта ферментного препарата с мышечной и коллагеновой соединительной тканями. Об.20х.

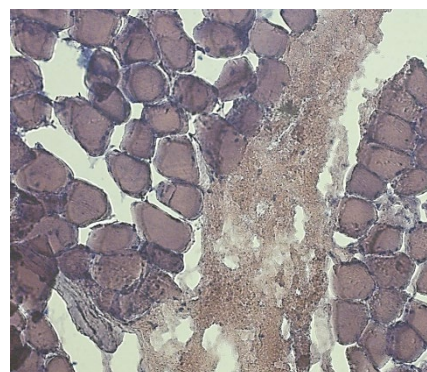


Рис. 3. Ферментный препарат в перимизии. Об.20х.

При оценке влияния фермента на мышечную и соединительную ткань фарша котлетного из говядины было отмечено увеличение мелкозернистой белковой массы (продукта разрушения тканевых ингредиентов), однако существенного роста деструктивных изменений мышечных волокон

не наблюдалось. Что еще раз подтверждало специфичное действие рекомбинантного фермента на белки соединительной ткани и отсутствие активности к мышечным белкам. Микроструктурные особенности соединительной ткани в котлетном фарше (клеточного и волокнистого компонента) свидетельствовали о наличии протеолитического воздействия препарата на компоненты фаршевого образца. В клетках соединительной ткани ядра выявлялись в умеренной степени. Эластические волокна без морфологических изменений и набухания. На углеводные (сахары) составляющие котлетного фарша использованный ферментный препарат не оказывает видимого воздействия (рис. 4,5).

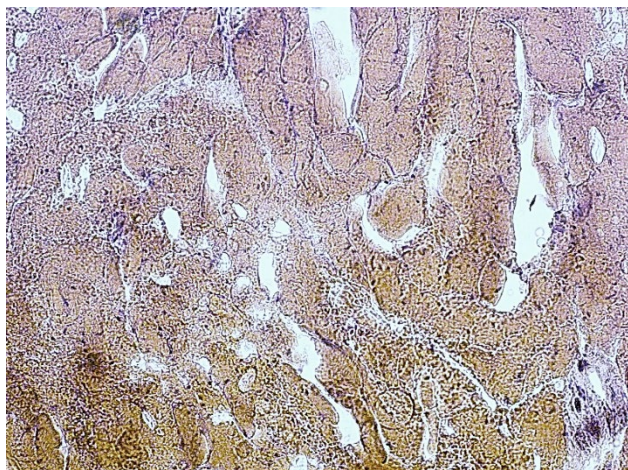


Рис. 4. Структура мышечной ткани в фарше после воздействия рекомбинантной пептидазы

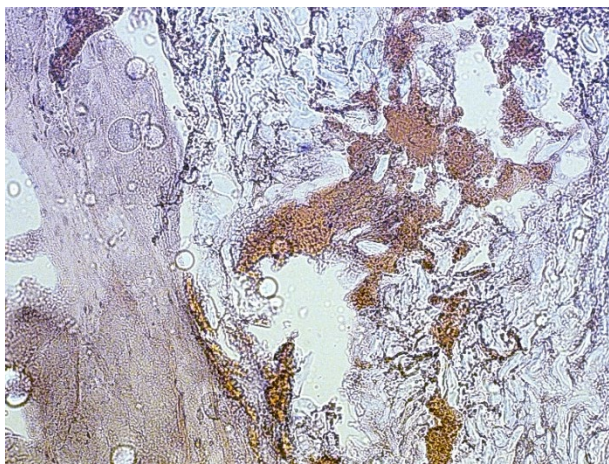


Рис. 5. Структура соединительной ткани в фарше после воздействия рекомбинантной пептидазы

Результаты оценки безопасности рекомбинантной металлопептидазы М9:

- рекомбинантная пептидаза с активностью 0,011 Ед. при однократном внутрижелудочном введении обладает малотоксичным действием: согласно ГОСТ 32644 можно отнести к 5 классу в СГС ($2000 \text{ мг/кг} < \text{DL50/LD50} < 5000 \text{ мг/кг}$), согласно ГОСТ 12.1.007 – к IV классу опасности (веществам малоопасным), согласно классификации веществ по токсичности Медведя ($\text{LD50} > 1000 \text{ мг/кг}$) – к малотоксичным веществам;
- при определении раздражающего действия на кожу кроликов установлено, что рекомбинантная пептидаза с активностью 0,011 Ед. обладает слабым раздражающим действием;
- рекомбинантная пептидаза с активностью 0,011 Ед. не обладает сенсibiliзирующим действием на кожный покров морских свинок.

ЛИТЕРАТУРА

- Bekhit AA1, Hopkins DL, Geesink G, Bekhit AA, Franks P Exogenous proteases for meat tenderization. Critical reviews in food science and nutrition, 2014, 54(8) : 1012–31. DOI: 10.1080/10408398.2011.623247.
- Sun Q., Chen F., Geng F., Luo Y., Gong S., Jiang Z. A novel aspartic protease from *Rhizomucor miehei* expressed in *Pichia pastoris* and its application on meat tenderization and preparation of turtle peptides. Food Chem. 2017; 245: 570–7. URL: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.113>
- Minaev, M., & Makhova, A.A. (2019). Recombinant metalloprotease as a perspective enzyme for meat tenderization. Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences, 13(1), 628–633. <https://doi.org/10.5219/1087>