

О РАЗРАБОТКЕ МЕТРОЛОГИЧЕСКОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ СОДЕРЖАНИЯ МИКРОБНОЙ ТРАНСГЛУТАМИНАЗЫ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

© Медведевских М. Ю.¹, Сергеева А. С.¹, Студенок В. В.¹, Петухов П. А.²

¹Уральский научно-исследовательский институт метрологии – филиал
ФГУП «Всероссийский научно-исследовательского института метрологии им. Д. И. Менделеева»
(УНИИМ – филиал ФГУП «ВНИИМ им. Д. И. Менделеева»), г. Екатеринбург, Россия
e-mail: studenok@list.ru
ORCID:0000-0002-3363-3133

²ООО «ХЕМА», г. Москва, Россия
e-mail: onco.xema@gmail.ru

Поступила в редакцию – 10 июля 2020 г., после доработки – 15 сентября 2020 г.
Принята к публикации – 30 сентября 2020 г.

В статье представлены результаты исследований, положенных в основу разработки комплекса метрологического обеспечения результатов измерений содержания микробной трансглутаминазы в пробах продуктов питания, который отвечает требованиям законодательства в области обеспечения единства измерений. Комплекс включает аттестованную методику измерений, подтвердившую свою применимость для проб молочной и рыбной продукции по результатам межлабораторных испытаний. Описан опыт подготовки однородных и стабильных образцов продуктов питания, содержащих микробную трансглутаминазу, который будет использован для разработки стандартного образца утвержденного типа. Рассмотрены сложности, с которыми столкнулись специалисты УНИИМ – филиал ФГУП «ВНИИМ им. Д. И. Менделеева» и ООО «ХЕМА» при решении вопроса о применении аттестованной методики измерений при подтверждении соответствия продукции требованиям Технического регламента Таможенного союза ТР ТС 029/2012.

Ключевые слова: продукты питания, микробная трансглутаминаза, методика измерений, тест-система, иммуноферментный анализ, межлабораторные сличительные испытания, подтверждение соответствия

Ссылка при цитировании:

О разработке метрологического обеспечения измерений содержания микробной трансглутаминазы в пищевых продуктах / М. Ю. Медведевских [и др.] // Эталоны. Стандартные образцы. 2020. Т. 16. № 3. С. 53–62. DOI:10.20915/2687-0886-2020-16-3-53-62.

For citation:

Medvedevskikh M. Yu., Sergeeva A. S., Studenok V. V., Petukhov P. A. Development of metrological assurance of measurement of microbial transglutaminase content in nutritive products. *Measurement standards. Reference materials*. 2020;16(3): 53–62. DOI:10.20915/2687-0886-2020-16-3-53-62 (In Russ.)

DEVELOPMENT OF METROLOGICAL ASSURANCE OF MEASUREMENT OF MICROBIAL TRANSGLUTAMINASE CONTENT IN NUTRITIVE PRODUCTS

© Mary Yu. Medvedevskikh¹, Anna S. Sergeeva¹, Valeriya V. Studenok¹, Pavel A. Petukhov²

¹UNIIM–Affiliated Branch of the D.I. Mendeleev Institute for Metrology, Ekaterinburg, Russia
e-mail: studenok@list.ru
ORCID:0000-0002-3363-3133

²ООО «XEMA», Moscow, Russia
e-mail: onco.xema@gmail.ru

Received – 10 July, 2020. Revised – 15 September, 2020.

Accepted for publication – 30 September, 2020.

The article presents the results of researches used as the basis of development of metrological assurance of measurement results of microbial transglutaminase content in samples of nutritive products complex that meets the requirements of the legislature in the field of assurance of measurement uniformity. The complex includes certificated measurement procedure that confirmed its applicability for samples of dairy and fish products according to the results of interlaboratory tests. The experience of preparation of homogeneous and stable samples of nutrition containing microbial transglutaminase and which will be used as a developing base of certified type reference material is described. The difficulties that were appeared during the carried out works by specialists from UNIIM–Affiliated Branch of the D.I. Mendeleev Institute for Metrology and «XEMA» LLC at the time of solving the issue on application of the attested procedure of measurement when confirming the conformity of products with the requirements of the Technical Regulations of the Customs Union TR TS029/2012.

Keywords: nutritive products, microbial transglutaminase, measuring procedure, test-system, enzyme-linked immunosorbent assay, interlaboratory verifications testing, confirmation of conformity

Введение

Современные тенденции пищевой индустрии предполагают развитие производства функциональных продуктов с регулируемыми свойствами. Ферменты являются инструментами для повышения качества готовой продукции. Большинство применяемых в пищевой промышленности ферментов катализируют гидролиз ковалентной связи, к ним относятся, в частности, гликозидазы и протеазы. Новым направлением является применение ферментов, модифицирующих структуру белков. Для этой цели предлагается фермент–микробная трансглутаминаза (мТГ) [1]. мТГ катализирует реакцию ацильного переноса, способствуя образованию ε -(γ -глутамил)лизиновых связей (рис. 1). Это приводит к межбелковому или внутрибелковому связыванию между боковыми радикалами глутамина и лизина [2].

мТГ, используемая в пище, изготавливается либо из факторов свертывания крови животных, таких как

коровы и свиньи, либо бактерий, полученных из растительных экстрактов.

мТГ широко используется в пищевой промышленности для улучшения текстурных и функциональных свойств продуктов (реструктуризация продукции мяса, рыбы, морепродуктов и молочных продуктов) [3]. В хлебопекарной промышленности мТГ используется для улучшения качества муки, текстуры и объема хлеба [4]. В молочной промышленности мТГ применяется в производстве разнообразных продуктов, например, йогуртов [5]. Модификация белков с участием мТГ дает возможность изменять их термостабильность, растворимость, реологические свойства (текучесть), свертываемость сычужным ферментом. мТГ может применяться для повышения структурной прочности, вязкости и снижения потерь белка и повышения стабильности жировой эмульсии, улучшения вкуса и влагоудерживающей способности. мТГ применяют также



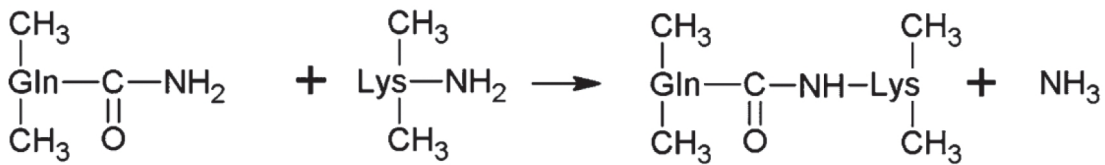


Рис. 1. Реакция перекрестного связывания белков с помощью мТГ

Fig. 1. The reaction of cross-linking proteins by microbial transglutaminase

для повышения биологической ценности продукта за счет поперечного связывания белков, содержащих разные лимитирующие аминокислоты, защиты лизина от различных химических реакций и для снижения аллергенности белков [6]. Также мТГ позволяет производить совершенно новый вид продукции, например, белковые пленки, используемые для покрытия свежих и переработанных овощей и фруктов с целью продления свежести и сроков хранения [7]. Сывороточные белки, обработанные мТГ, используются для производства таких пленок. Это съедобные пленки, готовые для потребления вместе с пищевым продуктом [8].

Несмотря на очевидные вышеописанные преимущества, вопрос о законности и безопасности применения мТГ в пищевой промышленности остается до конца не решенным.

Так, например, ряд ученых считает, при поступлении через желудочно-кишечный тракт микробная трансглутаминаза (мТГ) провоцирует аутоиммунные реакции [9]. В настоящее время причинно-следственная связь не установлена, однако одновременно с увеличением потребления этого фермента в последнее десятилетие наблюдается рост числа аутоиммунных реакций, в частности целиакии (непереносимости глютена) [10–12]. Проникая внутрь слизистой оболочки тонкой кишки, глиадин (составляющая глютена) подвергается дезаминированию (отщеплению аминокислотной группы) с помощью фермента – тканевая трансглутаминаза (тТГ). Этот фермент естественным образом присутствует в организмах людей, животных и растениях. Она помогает связывать белки вместе, образуя ковалентные связи [13]. В организмах людей и животных трансглутаминаза играет роль в различных процессах, включая свертывание крови [14].

Дезаминированный глиадин вызывает особенно сильную реакцию иммунной системы. В результате этого процесса повреждаются ворсинки тонкой кишки. Способность всасывания питательных веществ значительно ухудшается. Установлено, что мТГ функционально имитирует тТГ.

мТГ облегчает всасывание глиадина, тем самым усугубляя течение целиакии [15]. Кроме того, мТГ обладает

эмульгирующими свойствами за счет сшивания различных белков. Эмульгаторы, широко используемые в технологических процессах пищевой промышленности, являются усилителями проницаемости кишечника [16, 17], что влечет за собой снижение защитных функций организма в целом.

Таким образом, влияние мТГ на здоровье человека на сегодняшний день изучено недостаточно, однако во многих странах фермент признан безопасным и допущен к использованию.

На территории ЕАЭС мТГ не включена в перечень пищевых добавок, допущенных к применению, установленный ТР ТС 029/2012 [18]. Согласно данному документу, допускается использование органов и тканей здоровых сельскохозяйственных животных, культурных растений, а также специальные непатогенные и нетоксигенные штаммы микроорганизмов бактерий и низших грибов для получения ферментных препаратов. В приложении 26 [18] «Ферментные препараты, разрешенные для применения при производстве пищевой продукции» фермент «микробная трансглутаминаза» и продуцирующие его штаммы микроорганизмов отсутствуют. Таким образом, отсутствие микробной трансглутаминазы в продуктах питания должно контролироваться при оценке соответствия продукции обязательным требованиям.

Экспериментальная часть

Описание метода измерений и оборудования

Для решения данной задачи ООО «ХЕМА» (г. Москва) совместно с ФГБУ «Ростовский Референтный Центр Россельхознадзора» разработали методику измерений массовой доли микробной трансглутаминазы в пробах продуктов питания методом иммуноферментного анализа с помощью набора реагентов «мТГ-ИФА» производства ООО «ХЕМА» № К961 (методика № К961). Методика позволяет провести качественное обнаружение и последующее количественное определение массовой доли микробной трансглутаминазы в пробах рыбной, мясной и молочной продукции в диапазоне от 0,0001 % до 0,01 %.

Метод измерений, лежащий в основе методики, основан на применении тест-системы реализующей двухсайтовый (сэндвич) иммуноферментный анализ (ИФА). Сущность метода ИФА заключается в реакции специфического взаимодействия «антиген – антитело» и последующей детекции полученного комплекса с использованием таких методов, как спектрофотометрия, хемилюминесценция и других. Качественный анализ позволяет получить положительный или отрицательный результат содержания антигена или антитела в исследуемом веществе [19]. Для обнаружения микробной трансглутаминазы применяется тест-система с использованием мышиных моноклональных антител против мТГ [20]. Антиген из образца связывается с антителами, нанесенными на поверхности лунок микропланшета. Несвязавшийся материал удаляется отмывкой, после чего в лунки вносят вторые антитела к этому же антигену, меченные пероксидазой хрена. После повторной отмывки активность фермента, связанного с поверхностью лунки микропланшета, проявляется добавлением хромоген-субстратной смеси, стоп-реагента и подвергается измерению оптической плотности на спектрофотометре на длине волны 450 нм.

Вывод о наличии/отсутствии микробной трансглутаминазы в продуктах питания делается по величине так называемого индекса позитивности (ИП) – условного показателя, рассчитываемого путем деления значения оптической плотности анализируемого продукта на величину, представляющую собой сумму значения оптической плотности отрицательной контрольной пробы и эмпирически подобранного коэффициента.

Количественная методика измерений массовой доли микробной трансглутаминазы в пробах продуктов питания основана на зависимости оптической плотности исследуемого раствора на длине волны 450 нм от массовой доли мТГ. Для построения градуировочной характеристики используются растворы мТГ, приготовленные из реактива мТГ HPLC MTG производства Zedira GmbH, Германия (массовая доля основного вещества не менее 95 %) в буфере для экстракции образцов из набора реагентов «мТГ-ИФА» производства ООО «ХЕМА». Градуировочный график представляет линейную пропорциональную зависимость описываемую полиномом первого порядка.

Порядок выполнения измерений

В 2019 г. специалисты ФГУП «УНИИМ» (УНИИМ) провели аттестацию рассмотренной выше экспрессной методики № К961 на соответствие требованиям

ФЗ № 102 «Об обеспечении единства измерений» [21] и ГОСТ Р 8.563 [22] (свидетельство об аттестации методики измерений № 241.0002/RA.RU.311866/2019, выдано 11.02.2019 ФГУП «УНИИМ», номер в Федеральном информационном фонде по обеспечению единства измерений ФР.1.31.2019.33721).

Исследования для оценки характеристик точности методики измерений проводились в лабораториях ФГУП «УНИИМ» на рабочих пробах пищевых продуктов: сардельки куриные, фарш минтая, филе семги слабосоленое, творог, йогуртный продукт. Дополнительные исследования были проведены в лаборатории ФГБУ «Ростовский референтный центр Россельхознадзора» на мясе свинины, мясном фарше, колбасе вареной, котлетах деревенских, говядине тушеной, консервах мясных для детского питания, морском окуне подмороженном, филе трески, сельди слабосоленой, скумбрии запеченной, котлетах рыбных из трески, фарше минтая, крабовом мясе, йогурте, твороге, продукте кефирном, сырке творожном.

Показатели прецизионности методики измерений оценены по результатам квазимежлабораторного эксперимента с участием пяти лабораторий, организованного в соответствии с [23].

Оценка показателей правильности методики измерений выполнена с применением метода добавок в соответствии с положениями [24]. Растворы, используемые для введения добавок, как и градуировочные растворы, готовили путем разбавления точно известной навески реактива мТГ HPLC MTG производства Zedira GmbH, Германия (массовая доля основного вещества не менее 95 %) в буфере для экстракции образцов из набора реагентов «мТГ-ИФА» производства ООО «ХЕМА».

Были также проведены исследования влияния термообработки на результаты качественного обнаружения мТГ в пробах продуктов питания. Использовали рабочие пробы продуктов питания, в которых было установлено отсутствие мТГ. В эти пробы вводили добавку в виде раствора мТГ с массовой долей мТГ 0,01 %, который предварительно выдерживали в течение 40 минут при температурах от 60 °С до 120 °С. Результаты измерений проб с добавкой показали присутствие мТГ во всех анализируемых пробах, что свидетельствует об отсутствии влияния термообработки в указанных выше условиях на результаты качественного обнаружения мТГ в пробах продуктов питания.

Метрологические характеристики методики измерений приведены в табл. 1.



Таблица 1. Диапазон измерений, значения показателей точности, повторяемости и воспроизводимости
Table 1. Measurement limits, values of accuracy, repetition and reproducibility units

Диапазон измерений, %	Показатель повторяемости (относительное среднее квадратическое отклонение повторяемости), $\sigma_{r0}, \%$	Показатель воспроизводимости (относительное среднее квадратическое отклонение воспроизводимости), $\sigma_{R0}, \%$	Показатель точности (границы, в которых находится относительная погрешность измерения с вероятностью $P=0,95$), $\pm\delta, \%$
от 0,0001 до 0,01 вкл.	8	12	30

Межлабораторные сличительные испытания

С целью экспериментальной апробации методики № К961 УНИИМ в 2019 и 2020 гг. провел два раунда межлабораторных сличительных испытаний (МСИ) по определению наличия/отсутствия микробной трансклутаминазы в продуктах питания. МСИ были организованы в соответствии с положениями ГОСТ ISO/IEC17043 [25] с участием 11 и 13 лабораторий различного профиля: ветеринарные лаборатории, референтные центры Россельхознадзора, научно-исследовательские институты.

Каждому участнику предоставляется набор, состоящий из двух образцов для проведения МСИ: МТГ(1) и МТГ(2). Образцы для проведения МСИ в 2019 г. представляли собой тщательно изученные образцы творога, приготовленного из пастеризованного молока с добавлением культуры для творогов и искусственным введением трансклутаминазы. В 2020 г. для проведения МСИ применяли два образца крабовых палочек разных торговых марок, отличающихся друг от друга величинами определяемых показателей.

Для приготовления образцов творога в стеклянные стаканы отбирали две пробы пастеризованного молока, в одну из них вводили порошок трансклутаминазы и гомогенизировали в течение 15 минут на встряхивателе IKA Vibrax VXR basic (IKA, Германия). В каждую из проб добавляли количество закваски согласно рецептуре производителя Chr. Hansen (Христиан Хансен). Тщательно перемешивали, используя встряхиватель. Стаканы с закваской помещали в термостат циркуляционный LOIP LT-112 (Лабораторное оборудование и приборы, Россия) и выдерживали при температуре 60 °С в течение часа, а затем при температуре 25 °С в течение 3 часов. Полученный творог фильтровали от сыворотки через марлю. Приготовленный материал фасовали по 10 г. в предварительно вымытые, высушенные при 120 °С и обработанные УФ-светом флаконы из темного стекла.

Крабовые палочки различных торговых марок (наименований) были выбраны в результате анализа состава нескольких наименований крабовых палочек,

продаваемых в торговых сетях. С целью определения пригодности образцов крабовых палочек различных наименований для использования в качестве образцов для проведения МСИ проводили исследование на предмет наличия или отсутствия в их составе микробной трансклутаминазы, измерения проводили по методике № К961. Каждый из образцов для проведения МСИ был расфасован по 10 г в пакеты из полимерной пленки.

В качестве приписанного значения индекса позитивности (ИП) в образцах для проведения МСИ было использовано согласованное значение от участников (робастное среднее), полученное с использованием статистических методов, описанных в [26].

Исследование однородности и стабильности приписанных значений проводили с учетом [25]. Оценку неоднородности проводили методом однофакторного дисперсионного анализа ANOVA. Для этого отбирали шесть образцов, в каждом из которых проводили по пять параллельных измерений индекса позитивности по методике № К961. По результатам исследования образцы признаны однородными по показателю «индекс позитивности».

Наибольшее влияние на стабильность образцов в процессе хранения оказывает рост колоний, возможно, находящихся в них бактерий. Условия хранения при температуре окружающего воздуха (5 ± 3) °С в защищенном от прямого солнечного света месте могут быть надежно обеспечены при хранении образцов в лабораторных условиях. При этом не исключено нарушение указанных условий во время транспортирования образцов. При определении срока годности образцов для МСИ исходили из того, что время транспортирования по России с использованием услуг экспресс-почты не превышает 5 дней. Возможные крайние условия транспортирования в весеннее время: температура окружающего воздуха от минус 15 °С до плюс 25 °С. Время хранения и проведения измерений участниками образцов для МСИ не превышало 10 дней. При этом учитывали, что температуры ниже нуля не оказывают влияния на рост бактерий. Поэтому проверяли влияние

на стабильность образцов повышенных температур. Таким образом, период исследования кратковременной стабильности был принят равным максимальному сроку транспортирования и составлял 5 дней при температуре окружающего воздуха (25 ± 3) °С. Моделирование условий окружающего воздуха производили с использованием термостата.

Оценку стандартного отклонения от долговременной нестабильности проводили методом классического старения с учетом [25]. Образцы хранили в термостате при температуре окружающего воздуха (5 ± 3) °С, проводя измерения индекса позитивности один раз в две недели.

Полученные результаты свидетельствовали о стабильности образцов не менее чем в течение 20 дней при температуре хранения 5 ± 3 °С и не менее чем в течение 6 дней в условиях транспортирования.

Все лаборатории, принявшие участие в МСИ, использовали метод ИФА в соответствии с методикой измерений № К961 «Методика измерений массовой доли микробной трансглутаминазы в пробах продуктов питания методом иммуноферментного анализа с помощью набора реагентов «МТГ-ИФА» производства ООО «ХЕМА».

Согласно методике № К961, $ИП < 1$ указывает на отсутствие МТГ в исследуемой пробе, значение $ИП \geq 1$ указывает на наличие МТГ. Если $ИП = 1$ результат считали неопределенным. В качестве приписанного значения индекса позитивности (ИП) в образцах для проведения МСИ было использовано согласованное значение от участников (робастное среднее), полученное с использованием статистических методов, описанных в Приложении С ГОСТ Р 50779.60 [26].

В обоих раундах результаты всех участников МСИ попали в границы удовлетворительных результатов на основании оценки z'-индекса в соответствии с [26]. Все участники сделали правильный вывод об отсутствии/наличии МТГ в образцах.

Результаты и их обсуждение

В результате проведенных МСИ подтверждена пригодность методики № К961 для анализа продуктов переработки объектов рыболовного промысла и кисломолочных продуктов. В 2021 г. также запланировано проведение раунда МСИ по определению наличия/отсутствия микробной трансглутаминазы в продуктах мясной промышленности.

Параллельно с проведением МСИ начато внедрение аттестованной методики измерений на предприятиях потребителей и производителей продуктов питания, в организациях, подведомственных Федеральной

службе по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор) и Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор). Россельхознадзор включил исследование продуктов на МТГ в систему мониторинга пищевой безопасности. Лаборатории, подведомственные Россельхознадзору, прошли соответствующее обучение по применению данной методики и в настоящее время внедряют ее в лабораторную практику испытательных центров с последующим расширением областей аккредитации [27].

Следующим этапом разработки комплекса метрологического обеспечения измерений содержания микробной трансглутаминазы в пищевых продуктах станет разработка и испытания в целях утверждения типа стандартного образца массовой доли микробной трансглутаминазы в продуктах питания, который обеспечит контроль точности результатов измерений массовой доли микробной трансглутаминазы, полученных по методике измерений № К931. В основу этой работы будет положен опыт подготовки образцов для проведения МСИ.

Для обеспечения требований законодательства в области технического регулирования [28] необходима либо стандартизация методики измерений № К961, либо реализация второго варианта, широко практикующегося в последние годы – это включение аттестованных методик в Перечень документов по стандартизации, в результате применения которых на добровольной основе обеспечивается соблюдение требований технического регламента (Перечень). Для реализации первого варианта УНИИМ подано предложение к проекту Программы национальной стандартизации на 2021 г. по ТК 335 «Методы испытаний агропромышленной продукции на безопасность» о разработке проекта национального стандарта ГОСТ Р «Пищевые продукты и продовольственное сырье. Определение микробной трансглутаминазы иммуноферментным методом» за счет собственных средств с обоснованием необходимости его разработки для целей подтверждения соответствия продукции требованиям технического регламента ТР ТС 029/2012 [18].

Таким образом, УНИИМ начата разработка комплекса метрологического обеспечения результатов измерений содержания МТГ в пробах продуктов питания, который отвечает требованиям законодательства в области обеспечения единства измерений [21]:

– методика измерений массовой доли микробной трансглутаминазы в пробах продуктов питания методом иммуноферментного анализа с помощью

набора реагентов «МТГ-ИФА», экспериментально апробирована,

– аттестована в соответствии с требованиями [21, 22] (свидетельство об аттестации методики измерений № 241.0002/RA.RU.311866/2019, выдано 11.02.2019 ФГУП «УНИИМ»),

– внесена в Федеральный информационный фонд по обеспечению единства измерений под номером ФР.1.31.2019.33721,

– подтвердила свою применимость по результатам МСИ для проб молочной и рыбной продукции;

– получен опыт подготовки однородных и стабильных образцов продуктов питания, содержащих МТГ, который будет использован для разработки СО утвержденного типа;

– подана заявка о разработке проекта национального стандарта ГОСТ Р «Пищевые продукты и продовольственное сырье. Определение микробной трансглутаминазы иммуноферментным методом» за счет собственных средств с обоснованием необходимости его разработки для целей подтверждения

продукции требованиям технического регламента ТР ТС 029/2012 [18].

Все работы ведутся в тесном сотрудничестве с разработчиками тест-системы (ООО «Хема») и испытательными лабораториями Россельхознадзора и Роспотребнадзора, обеспечивается быстрое и успешное внедрение новых методов и методик измерений (испытаний) пищевой продукции.

Вклад соавторов

Медведевских М. Ю.: концепция и инициирование исследования, формирование концепции работы, определение замысла и методологии статьи, критический анализ материалов статьи.

Студенок В. В.: сбор и обработка материала, подготовка первоначального варианта и доработка текста статьи.

Сергеева А. С.: критический анализ текста, компьютерная работа с текстом, написание текста.

Петухов П. А.: концепция и инициирование исследования, получение экспериментальных данных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шлейкин А. Г., Данилов Н. П. Особенности применения трансглутаминазы в переработке молока // Вестник международной академии холода. 2015. № 3. С. 13–18
2. 1H NMR spectroscopy as tool to study transglutaminase crosslinking of pea globulin / A. Djoullah et al. // FaBE2013 International conferences on food and biosystems engineering, technological ducational institute of Thessaly. Skiathos Island, Greece. 2013. P. 351–355.
3. Шлейкин А. Г., Данилов Н. П., Красникова Л. В. Влияние трансглутаминазы на связывание сывороточных белков // Пищевая промышленность. 2009. № 7. С. 9–10.
4. Network formation in gluten-free bread with application of transglutaminase / M. M. Moore et al. // Cereal Chem. 2006. Vol. 83, № 1. P. 28–36. <https://doi.org/10.1094/CC-83-0028>.
5. Влияние сахарного сиропа, меда и злаков на реологические свойства йогурта / А. Г. Шлейкин [и др.] // Научный журнал НИУ ИТМО. Серия: Процессы и аппараты пищевых производств. 2015. № 2. С. 24–34.
6. Использование трансглутаминазы при производстве йогурта / З. С. Зобкова [и др.] // Молочная промышленность. 2013. № 12. С. 52–53.
7. Chitosan/whey protein film as active coating to extend Ricotta cheese shelf-life / P. Di Pierro et al. // LWT–Food. Sci. Technol. 2011. Vol. 44, № 10. P. 2324–2327. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.11.031>.
8. Application of transglutaminase-crosslinked whey protein/pectin films as water barrier coatings in fried and baked foods / G. R. Marquez // Food Bioprocess Technol. 2014. Vol. 7, № 2. P. 447–455. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-1045-9>.
9. Lerner A., Aminov R., Matthias T. Transglutaminases in dysbiosis as potential environmental drivers of autoimmunity // Front. Microbiol. 2017. № 8. P. 66. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00066>.
10. Lerner A., Matthias T. Changes in intestinal tight junction permeability associated with industrial food additives explain the rising incidence of autoimmune disease // Autoimmun Rev. 2015. № 14. P. 479–489. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2015.01.009>.
11. Lerner A., Jeremias P., Matthias T. The world incidence and prevalence of autoimmune diseases is increasing // International Journal of Celiac Disease. 2015. Vol. 3, № 4. P. 151–155. <https://doi.org/10.12691/ijcd-3-4-8>.
12. Lerner A., Jeremias P., Matthias T. The world incidence of celiac disease is increasing: a review // Internat. J. of recent scient. 2015. № 7. P. 5491–5496.
13. Griffin M., Casadio R., Bergamini C. M. Transglutaminases: nature's biological glues // Biochem. J. 2002. № 368. P. 377–396. <https://doi.org/10.1042/BJ20021234>.
14. Шлейкин А. Г., Данилов Н. П. Эволюционно-биологические особенности трансглутаминазы. Структура, физиологические функции, применение. // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2011. Т. 47. № 1. С. 3–14. <https://doi.org/10.1134/S0022093011010014>.

15. Lerner A., Matthias T. Possible association between celiac disease and bacterial transglutaminase in food processing: a hypothesis // *Nutrition Reviews*. 2015. Vol. 73, № 8. P. 544–552. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuv011>.
16. Lerner A., Matthias T. Changes in intestinal tight junction permeability associated with industrial food additives explain the rising incidence of autoimmune disease. *Autoimmunity Reviews*. 2015. Vol. 14. № 6. P. 479–489. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2015.01.009>.
17. Emulsifying properties of the transglutaminase-treated crosslinked product between peanut protein and fish (*Decapterus maruadsii*) protein hydrolysates / X. Hu et al. // *J. Sci Food Agric*. 2011. Vol. 91, № 3. P. 578–585. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4229>.
18. ТР ТС 029/2012 Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств. Принят Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 20 июля 2012 г. № 58 // Росстандарт [Электронный ресурс]. URL: http://old.gost.ru/wps/portal/pages/directions/techreg?WCM_GLOBAL_CONTEXT=/gost/gostru/directions/technicalregulation/technicalregulationses/teh%20reg%20tc%20treb%20bez%20pizh%20dobavok.
19. Егоров А. М., Осипов А. П., Дзантиев Б. Б. Теория и практика иммуноферментного анализа. М.: Высш. шк., 1991. 288 с.
20. ELISA-based method to detect microbial transglutaminase in frozen surimi / Y. Li et al. // *Modern Food Science and Technology*. 2014. Vol. 30. № 9. P. 275–279. <https://doi.org/10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.09.045>.
21. Об обеспечении единства измерений: федер. закон Рос. Федерации от 26 июня 2008 г. № 102-ФЗ: принят Гос. Думой Федер. Собрания Рос. Федерации 11 июня 2008 г.: одобрен Советом Федерации Федер. Собр. Рос. Федерации 18 июня 2008 г. (в редакции от 27 декабря). 2019 № 496–ФЗ // *Рос. газета*. 2019. 31 декабря.
22. ГОСТ Р 8.563-2009 Государственная система обеспечения единства измерений. Методики (методы) измерений. М.: Стандартинформ, 2011.
23. ГОСТ Р 5725-2-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений. М.: Издательство стандартов, 2002.
24. РМГ 61–2010 Государственная система обеспечения единства измерений. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки. М.: Стандартинформ, 2013.
25. ГОСТ ISO/IEC17043–2013 Оценка соответствия. Основные требования к проведению проверки квалификации. М.: Стандартинформ, 2014.
26. ГОСТ Р 50779.60–2017 Статистические методы. Применение при проверке квалификации посредством межлабораторных испытаний. М.: Стандартинформ, 2017.
27. В систему госмониторинга Россельхознадзора с 2020 года будет включено исследование продуктов на наличие микробной трансглутаминазы (МТГ) // Официальный сайт Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору [Электронный ресурс] URL: <https://fsvps.gov.ru/fsvps/print/news/33418.html> (дата обращения: 29.08.2020).
28. О техническом регулировании: Федер. закон Рос. Федерации от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ: принят Гос. Думой Федер. Собрания Рос. Федерации 15 декабря 2002 г.: одобрен Советом Федерации Федер. Собр. Рос. Федерации 18 декабря 2002 г. // *Рос. газета*. 2002. 27 декабря.
29. О стандартизации в Российской Федерации: Федер. закон Рос. Федерации от 29 июня 2015 г. № 162-ФЗ: принят Гос. Думой Федер. Собрания Рос. Федерации 29 июня 2015 г.: одобрен Советом Федерации Федер. Собр. Рос. Федерации 3 июля 2015 г. // *Рос. газета*. – Федеральный выпуск № 144(6715). 2015. 3 июля.

REFERENCE

1. Shleikin A. G., Danilov N. P. The use of transglutaminase in milk processing. *Journal of International Academy of Refrigeration*, 2015;(3):13–18. (In Russ.).
2. Djoullah A., Sok N., Djemaoune Y., Husson F., Saurel R. 1H NMR spectroscopy as tool to study transglutaminase crosslinking of pea globulin. In: *FaBE2013 International conferences on food and biosystems engineering, technological ducational institute of Thessaly*. Skiathos Island, Greece, 2013, p. 351–355.
3. Shleikin A. G., Danilov N. P., Krasnikova L. V. Influence of transglutaminase on whey proteins binding. *Food Industry*. 2009;(7):9–10. (In Russ.).
4. Moore M. M., Heinbockel M., Dockery P., Ulmer M. H., Arendt E. K. Network formation in gluten-free bread with application of transglutaminase. *Cereal Chem*. 2006;83(1):28–36. <https://doi.org/10.1094/CC-83-0028>.
5. Shleikin A. G., Barakova N. V., Petrova M. N., Danilov N. P., Argymbaeva A. E. The influence of sugar syrup, honey and cereals on the rheological properties of yogurt. *Scientific Journal NRU ITMO. Processes and Food Production Equipment*. 2015;(2):24–34. (In Russ.).
6. Zobkova Z. S., Fursova T. P., Zenina D. V., Shidlovskaja V. P., Gavrilina A. D., Shelaginova I. R. Use of transglutaminase in yoghurt production. *Dairy Industry*. 2013;(12):52–53. (In Russ.).
7. Di Pierro P., Sorrentino A., Mariniello L., Giosafatto C. V. L., Porta R. Chitosan/whey protein film as active coating to extend Ricotta cheese shelf-life. *LWT–Food. Sci. Technol*. 2011;44(10):2324–2327. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.11.031>.
8. Marquez G. R., Di Pierro P., Esposito M., Mariniello L., Porta R. Application of transglutaminase-crosslinked whey protein/pectin films as water barrier coatings in fried and baked foods. *Food Bioprocess Technol*. 2014;7(2):447–455. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-1045-9>.
9. Lerner A., Aminov R., Matthias T. Transglutaminases in Dysbiosis As Potential Environmental Drivers of Autoimmunity. *Front. Microbiol*. 2017;8:66. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00066>.

10. Lerner A., Matthias T. Changes in intestinal tight junction permeability associated with industrial food additives explain the rising incidence of autoimmune disease. *Autoimmun Rev.* 2015;14:479–489. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2015.01.009>.
11. Lerner A., Jeremias P., Matthias T. The world incidence and prevalence of autoimmune diseases is increasing: A review. *International Journal of Celiac Disease.* 2015;3(4):151–155. <https://doi.org/10.12691/ijcd-3-4-8>.
12. Lerner A., Jeremias P., Matthias T. The world incidence of celiac disease is increasing: a review. *Internat. J. of recent scient.* 2015;7:5491–5496.
13. Griffin M., Casadio R., Bergamini C. M. Transglutaminases: nature's biological glues. *Biochem. J.* 2002;(368):377–396. <https://doi.org/10.1042/BJ20021234>.
14. Shleikin A. G., Danilov N. P. Evolutionary-Biological Peculiarities of Transglutaminase. Structure, Physiological Functions, Application. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology.* 201;47(1):3–14. <https://doi.org/10.1134/S0022093011010014>. (In Russ.).
15. Lerner A., Matthias T. Possible association between celiac disease and bacterial transglutaminase in food processing: a hypothesis. *Nutrition Reviews.* 2015;73:544–552. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuv011>.
16. Lerner A., Matthias T. Changes in intestinal tight junction permeability associated with industrial food additives explain the rising incidence of autoimmune disease. *Autoimmun Reviews.* 2015;14:479–489. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2015.01.009>.
17. Hu X., Ren J., Zhao M., Cui C., He P. Emulsifying properties of the transglutaminase treated crosslinked product between peanut protein and fish (*Decapterus maruadsi*). *J Sci Food Agric.* 2011;91:578–85. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4229>.
18. TR CU029/2012 Safety requirements for food additives, flavors and technological aids. Available at: http://old.gost.ru/wps/portal/pages/directions/techreg?WCM_GLOBAL_CONTEXT=/gost/gostru/directions/technicalregulation/technicalregulations/teh%20reg%20tc%20treb%20bez%20pizh%20dobavok. (In Russ.).
19. Egorov A. M., Osipov A. P., Dzantiev B. B. Theory and practice of enzyme immunoassay. Moscow, Higher. shk., 1991, 288 p. (In Russ.).
20. Li Y. et al. ELISA-based method to detect microbial transglutaminase in frozen surimi. *Modern Food Science and Technology.* 2014;30(9):275–279. <https://doi.org/10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.09.045>.
21. Federal law «On ensuring the uniformity of measurements» No. FZ-102 of 26.06.2008. (In Russ.).
22. GOST R 8.563-2009 State system for ensuring the uniformity of measurements. Procedures of measurements. Moscow, Standartinform, 2011. (In Russ.).
23. GOST R 5725-2-2002 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 2. Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method. Moscow, Izdatel'stvo standartov, 2002. (In Russ.).
24. RMG 61–2010 State system for ensuring the uniformity of measurements. Accuracy, trueness and precision measures of the procedures for quantitative chemical analysis. Methods of evaluation. Moscow, Standartinform, 2013. (In Russ.).
25. GOST ISO/IEC17043–2013 Conformity assessment. General requirements for proficiency testing. Moscow, Standartinform, 2014. (In Russ.).
26. GOST R 50779.60–2017 Statistical methods. Use in proficiency testing by interlaboratory comparison. Moscow, Standartinform, 2017. (In Russ.).
27. From 2020, the Rosselkhozadzor state monitoring system will include a study of products for the presence of microbial transglutaminase (mTG). In: Official website of the Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance. Available at: <https://fsvps.gov.ru/fsvps/print/news/33418.html>. (In Russ.).
28. Federal law «About technical regulation» No. FZ-184 of 27.12.2002. (In Russ.).
29. Federal law «About standardization in the Russian Federation» No. FZ-162 of 29.06.2015. (In Russ.).

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Медведевских Мария Юрьевна – канд. хим. наук, заведующий лабораторией метрологического обеспечения физико-химических измерений УНИИМ – филиал ФГУП «ВНИИМ им. Д.И. Менделеева».
 Российская Федерация, 620000, г. Екатеринбург,
 ул. Красноармейская, 4
 Тел: (343) 350-60-63
 e-mail: lab241@uniim.ru
 Researcher ID: G-6171–2017

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Mary Yu. Medvedevskikh – PhD (Chem.), head of laboratory for metrological support of physical and chemical measurements, UNIIIM – Affiliated Branch of the D. I. Mendeleev Institute for Metrology.
 4 Krasnoarmeyskaya str., Ekaterinburg,
 620075, Russian Federation
 e-mail: lab241@uniim.ru
 Researcher ID: G-6171–2017

Сергеева Анна Сергеевна – канд. хим. наук, старший научный сотрудник лаборатории метрологического обеспечения физико-химических измерений УНИИМ – филиал ФГУП «ВНИИМ им. Д.И. Менделеева».

Российская Федерация, 620000, г. Екатеринбург,
ул. Красноармейская, 4
Тел: (343) 350-60-63
e-mail: sergeevaas@uniim.ru
ORCID: 0000-0001-8347-2633

Студенок Валерия Владимировна – инженер отдела Государственной службы стандартных образцов УНИИМ – филиал ФГУП «ВНИИМ им. Д.И. Менделеева».

Российская Федерация, 620000, г. Екатеринбург,
ул. Красноармейская, 4
e-mail: studenok@list.ru
ORCID: 0000-0002-3363-3133

Петухов Павел Александрович – заместитель директора по развитию ООО «ХЕМА».

Российская Федерация, 105264, г. Москва,
ул. 9-я Парковая, 48,1.
e-mail: onco.xema@gmail.ru

Anna S. Sergeeva – PhD (Chem.), senior researcher, laboratory for metrological support of physical and chemical measurements, UNIIM – Affiliated Branch of the D. I. Mendeleev Institute for Metrology.

4 Krasnoarmeyskaya str., Ekaterinburg,
620075, Russian Federation
e-mail: sergeevaas@uniim.ru
ORCID: 0000-0001-8347-2633

Valeriya V. Studenok – Engineer of the Department of the State Service of Reference Materials, UNIIM – Affiliated Branch of the D. I. Mendeleev Institute for Metrology.

4 Krasnoarmeyskaya str., Ekaterinburg,
620075, Russian Federation
e-mail: studenok@list.ru
ORCID: 0000-0002-3363-3133

Pavel A. Petukhov – Deputy director for development of LLC «ХЕМА».

48,1 Parkovaia str., Moscow,
105264, Russian Federation
e-mail: onco.xema@gmail.ru

