

Дзюба Н.А.

Одеська національна академія харчових технологій

Землякова О.В.

Одеська національна академія харчових технологій

ОГЛЯД СУЧАСНИХ МЕТОДІВ ОТРИМАННЯ ГІДРОЛІЗАТУ КОЛАГЕНУ З ГІДРОБІОНТІВ

Проведено аналіз сучасних технологій отримання гідролізатів колагену з рибної сировини. Виявлено, що для отримання гідролізатів колагену використовують розчини лугів, кислот та ферментні препарати. Досліджено зміну розміру білкових конгломератів для отримання гідролізату колагену з луски коропа, визначено ступінь його перетравлюваності.

Ключові слова: *гідролізат колагену, гідробіонти, гідроліз, перетравлюваність.*

Постановка проблеми. Моніторинг харчових продуктів, що споживаються в більшості країн світу, довів зростаючий дефіцит білка тваринного походження в продуктах харчування [1; 2]. Це веде до розвитку хронічних захворювань, таких як артрити й артрози суглобів, руйнування міжхребцевих дисків у хребті. Сучасні лікарські засоби в основному спрямовані на зменшення болю і підвищення рухливості суглобів. Тому медичні установи і пацієнти шукають нові методи усунення цих захворювань. Останніми роками поряд з традиційною фармакотерапією розвивається поліфармацевтика і біофармацевтика. Широке поширення набули нутріцевтичні препарати, що містять глюкозамін, гіалуронову кислоту, гідролізат колагену, хондроїтин сульфат, вітамін С та інші речовини. Промислово оброблені гідробіонти являють собою джерело білка високої біологічної цінності, який за структурою нагадує людський.

Тому створення продуктів харчування нового покоління на основі гідробіонтів, що володіють поліпшеною харчовою і біологічною цінністю, а також здатні поповнювати амінокислотний та біоенергетичний запас організму, має велике значення для задоволення зростаючого попиту на якісну продукцію.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. В організм людини колаген надходить з їжею після її теплової обробки. Денатурований вид колагену є лікарським і харчовим желатином. Колагенові білки і желатин під дією ферментів шлунково-кишкового тракту (ШКТ) можуть розщеплюватися до амінокислот і поліпептидів. Велика довжина молекул і фібрили колагену перешкоджає їх ефективному перетравлюванню. Гідролізати колагену, що містять набір амінокислот і поліпеп-

тидів, більш доступні для засвоєння в організмі людини. Амінокислоти гідролізатів колагену накопичуються в сполучних тканинах і клітинах. Гідролізований колаген як джерело специфічних амінокислот може бути будівельним матеріалом для біосинтезу матриксу цих тканин.

Морський колаген почали добувати зі шкіри морських риб приблизно з 70-х років ХХ століття. Багато дослідників приділяють йому особливу увагу, тому що риб'ячий колаген мінімально відрізняється від людського. І на подив, більш наближений до нього за біохімічним складом, ніж колаген великої рогатої худоби.

Відомо, що температура денатурації тваринного колагену занадто висока для проникнення в шкіру. А морський колаген більш пристосований для подібного проникнення. Крім того, він легше руйнується за низьких температур, ніж колаген тваринного походження, тому розробниками висуваються дуже суворі вимоги до організації його виробництва, транспортування та зберігання. Це зумовлює високу вартість засобів з морським колагеном [3].

Рибний колаген здебільшого належить до I і III типів, аналогічно до колагену скелетних м'язів людини. Рибний і тваринний колаген складається з субодиниць, закручених у спіраль, і має відносну молекулярну масу 300 кДа. Великий вміст гліцину і проліну є характерною особливістю амінокислотного складу колагену. Амінокислоти формують повторювану послідовність: пролін-гліцин-X, де X – інша амінокислота. Ще однією відмінною особливістю рибного колагену є більш низький вміст амінокислот (гістидин, фенілаланін, лізин, лейцин, валін, аспарагінова і глутамінова кислоти) і, як наслідок, менша кількість поперечних зв'язків,

а також трохи інший амінокислотний склад (гідроксипролін і гідроксилізин) одного з ланцюгів. Тому температура скорочення і розкладання рибного колагену нижча від аналогічної температури теплокровних тварин. Так, якщо колаген крупної рогатої худоби після нагрівання протягом 2,5 хвилини піддається желатинізації приблизно на 10%, то колаген рибного походження за тих же умов руйнується на 50–60 і до 75% [4].

Першу ефективну гідратацію колагену зі шкір прісноводних риб, використовуючи органічні кислоти, провів у 1985 році колектив хіміків з Гданська. У 1989 році вони отримали патент № 144584 на відкритий ними «Метод виробництва розчину колагену». [5]

У разі використання морських біоресурсів основне завдання полягає в розробці нових технологій розділення органічних компонентів, які пов'язані з виробництвом нових видів рибних продуктів, які можуть відповідати специфічним біологічним медико-технологічним стандартам [6; 7, с. 3217–3222].

Наявні способи обробки можуть бути широкими та класифікуються на дві універсальні технологічні схеми для отримання неспецифічного білка. Такий підхід використовується в обробці білоквмісної сировини [8; 9, с. 695–709] і виробництві рибних продуктів, включаючи гідролізати, ізоляти та концентрований білок [9, с. 695–709].

Рухливість суглобів визначається оптимальними розмірами колагенових фібрил і протеогліканів [10]. Тому тривале і систематичне застосування комплексу зі специфічних амінокислот і глікозаміногліканів у гідролізатах колагену типу II дає змогу відновити і зміцнити структуру тканин суглобів людини [11, с. 87–99].

Нутріцевтики на основі гідролізату колагену ефективно впливають як на ранній стадії хвороб суглобів, так і на їх профілактику. Хронічні хвороби розвиваються внаслідок дисплазії сполучної тканини і закладаються на ембріональній стадії розвитку і/або на етапах росту дітей і підлітків. Коктейль амінокислот колагену допомагає ослабленим дітям у зміцненні суглобної, кісткової та інших сполучних тканин [12]. За рахунок застосування нутріцевтиків з гідролізатів колагену в комплексі з глікозаміногліканами, вітамінами і катіонами металів можна стимулювати в клітинах біосинтез макромолекул і структуру з'єднувальних тканин, порушених у результаті їх нездорового стану.

Авторами [13, с. 183–189] запропоновані різні методи інтенсифікації процесу розчинення колагену – кавітація на стадії попередньої обробки

колагенмісного матеріалу і механічне перемішування на стадії розчинення в оцтовій кислоті. Для отримання чистих, незабруднених хімічними реагентами продуктів розчинення колагену, що застосовуються в медицині і харчовій промисловості, використана обробка комплексом ферментних препаратів. Отримано колоїдні розчини, які зберегли волокнисту структуру.

Актуальним завданням є отримання гідролізатів колагену з високим вмістом вільних амінокислот і поліпептидів низької молекулярної маси. Ферментативний гідроліз колагену являє необхідний етап створення нутріцевтиків ефективною дією та отримання нутрієнтів з регульованими характеристиками. Ступінь гідролізу корелює з розподіленням довжини молекулярних ланцюгів із молекулярною масою пептидів. Молекулярні параметри гідролізатів варіюють залежно від виду тварини і умов гідролізу тканини. Більш тонка шкіра риб (тріски й інших видів) сприяє отриманню гідролізатів колагену більш високого ступеня гідролізу, якщо порівнювати з гідролізатами гідробіонтів (трепангів) [14, с. 222–232; 15, с. 1836–1841; 16, с. 227–235].

В університеті Хоккайдо вченими створені штучні кровоносні судини з колагену, отриманого зі шкіри лосося. Винахід з успіхом пройшов клінічні випробування на щурах, яким замінили аорти новими штучними судинами [17].

Нещодавно з'явилися відомості про можливість отримання колагенових субстанцій з риб внутрішніх водоем [5; 18–22], які виявили деякі переваги порівняно з морськими. Зокрема, алергенність, збереження, вартість.

Рибний білок фракціонували шляхом багаторазових екстракцій гомогенної рибної сировини розчинами з поступовим підвищенням іонної сили і рН [23, с. 15–23]. Цей спосіб заснований на розчинності різних білків у сольових і лужних розчинах. Заморожені зразки розморожували за температури повітря 18°C і подрібнювали на дрібні шматочки. Шматки гомогенізували при 5000 об/хв протягом 5 хвилин. Отримали три білкові фракції, тобто водорозчинні білки (WSP), солерозчинні білки (SSP) і лужно-розчинні білки (ASP). Процес вилучення WSP проводили шляхом замочування 1 г гомогенного зразка в 10 мл 0,03 М розчину KCl. Приготований розчин витримували за температури 15°C 2 години, потім центрифугували при 4000 об/хв протягом 20 хвилин. Розчин відділяли від залишку шляхом декантації. Залишок екстрагували 5 разів 0,03 М розчином KCl (1: 5) протягом 1 години.

Вміст білка в цілій рибі становить від 12 до 14% для полярної тріски і від 16 до 19% для путасу. Вміст білка в синіх тонах філе тріски дещо вищий (15–17%), ніж у цілій рибі. Рибний потрох містить до 10–16% білка порівняно з цілою рибою. У разі нарізання полярної тріски втрати становлять близько 64% (маси), у разі синього путасу – близько 41% (маси). Це теоретично відповідає втраті 55 і 37% білків, що містяться в цілій рибі [23, с. 15–23].

Вивчено амінокислотний біопотенціал луски ляща балтійського і сардинели мароканської для використання в складі гейрів для спортивного харчування і їх гідролізатів, отриманих ферментативним і гідротермічним шляхами [24, с. 48–52]. Гідроліз проводили двома способами – ферментативним шляхом і гідротермальним під тиском. Ферментативний гідроліз проводили під дією ферменту колагенази з гепатопанкріеса краба, а також кислоти і нейтральної протеаз. Отримані дані свідчать про досить високу біологічну цінність білків луски ляща (55,5%) і сардинели (62,8%). Вміст незамінних амінокислот був недостатній для повноцінного білкового харчування (10,2–95,3%), що доказало значення коефіцієнтів КРАС (44,5–37,2) і раціональності амінокислотного складу (0,20–0,41). Аналіз фракційного складу гідролізованого термічним шляхом білка луски показав, що ці суміші в основному представлені пептидами середньої і низької молекулярної маси. Так, у разі середнього режиму гідролізу фракційний склад за масою мав такий розподіл по довжині молекул: 20–50 кДа (24,6%); 10–20 кДа (22,8%); 5–10 кДа (18,2%); 1–5 кДа (13,8%). У разі сильного режиму гідротермолізу отримали суміш пептидів з переважним вмістом дрібних фракцій пептидів: 1–5 кДа (36,3%), 5–10 кДа (31,4%), 10–20 кДа (17,9%), 20–50 кДа (6,5%). Вміст оксипроліну в сумішах як індикатора глибини гідролізу склав в усіх випадках 8,64–9,20% маси луски (або 8,89–9,47% маси білка).

Показана можливість отримання колагенових дисперсій зі шкіри морських риб і їх використання в технології желейних продуктів, рублених полуфабрикатів як аналогів харчових волокон і їстівних покриттів [20].

Наведена технологія нових БАД-гейнерів у желюваній формі [25, с. 287–294], в яких як активні пептиди використані гідролізати рибної луски сардинели і ляща. Гідролізати отримані ферментативним шляхом трансформаційних змін трьох видів ферментів і гідротермічним

способом під дією високих температур під тиском. Досліджено процес ферментативного розщеплення білка під дією ферментів колагенази, кислоти і лужної протеази у водному екстракті м'яти перцевої. Обґрунтовано склад БАД на основі рідкої фракції гідролізованої луски, збагаченої її непроферментованою мінералізованою фракцією, бджолиним пилом, L-карнітином, екстрактом м'яти.

Для підвищення фізіологічної ефективності одержуваної основи БАД, а також біоконсервування гідролізованої луски проводили в 10%-ному спиртовому екстракті м'яти перцевої, яка потенційно збагачує водну фракцію гідролізату ефірними маслами, флавоноїдами, органічними кислотами та іншими БАР, у тому числі антистрессового характеру [26].

Фізіологічна дія колагену дає змогу віднести його до харчових волокон. Водночас доведено, що у разі оптимального поєднання м'язових білків і колагену показник чистого засвоєння білка максимальний [17; 27, с. 55–58]. Продукти гідролізу колагену, такі як глютин, желатин та ін., стимулюють секреторну і рухову функції шлунково-кишкового тракту, надають позитивний вплив на стан і функціонування корисної мікрофлори кишечника, тому можуть бути використані як аналог харчових волокон [27, с. 55–58].

Метою цього наукового дослідження є визначення зміни білкових конгломератів у разі лужного гідролізу луски коропа та визначення ступеня перетравлюваності отриманого гідролізату колагену.

Виклад основного матеріалу. Розроблена технологія отримання колагенового гідролізату, що полягає в послідовній обробці луски коропа лужним розчином з поступовим збільшенням рН [28, с. 107–116]. Колагеновий препарат має білий колір, не має запаху та присмаку.

Зміну білкових конгломератів на колагенмісній сировині під час гідролізу визначали за допомогою методу поляризаційної оптичної мікроскопії на мікроскопі Biomed 5P з використанням відеокамери.

Як видно на рисунку 1 а, білкові конгломерати розташовані по всій площі луски нерівномірно та мають еліпсоїдну форму. Після гідролізу 4% розчином лугу (рис. 1 б) білкові конгломерати мають шаровидну форму та розташовані рівномірно по всій поверхні, в основному розташовані в зазубринах луски. Під час гідролізу розмір білкових конгломератів зменшується в середньому в 2–2,5 раза.

У разі гідролізу луски 7% розчином лугу білкові конгломерати зменшуються в 4–5 разів порівняно з негідролізованими (рис 1 в) та мають шаровидну форму, рівномірно розподілену по всій поверхні луски.

Виходячи з того, що білкові конгломерати зменшуються в розмірі, доцільним було провести дослідження щодо зміни масово-молекулярного складу.

Для визначення масово-молекулярного складу отриманого колагенового препарату використовували електрофорез у 15%-ому поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію. Досліджували білковий складник колагенового препарату.

Дані, отримані за допомогою електрофорезу, дали можливість стверджувати, що рибна луска має в своєму складі багато високомолекулярних білків (молекулярною масою 90,0–100,5 кДа і вище) і майже не має низькомолекулярних. Щодо гідролізату колагену, то в ньому міститься більша

кількість низькомолекулярних складників (молекулярною масою 30,7 кДа і нижче), що становить майже 56% від усіх білкових складників колагенового препарату. На частку середньомолекулярних білкових складників (молекулярною масою 45–80 кДа) припадає майже 32%.

Коефіцієнт відмінності амінокислотного складу становить 1,05%. Ступінь продуктивного використання незамінних амінокислот організмом людини як пластичного матеріалу становить 94,25%.

Ступінь перетравлюваності гідролізату колагену оцінювали за інтенсивністю гідролізу ферментами пепсином і трипсином в умовах *in vitro* (рис. 2).

Аналіз кінетики процесу ферментативного гідролізу (рис. 2) показав, що гідроліз відбувається практично з постійною швидкістю. Так, за 8 годин інкубації, що порівняно з реальними умовами перетравлювання їжі в організмі людини, гідролізат колагену перетравлюється на 66,4%.

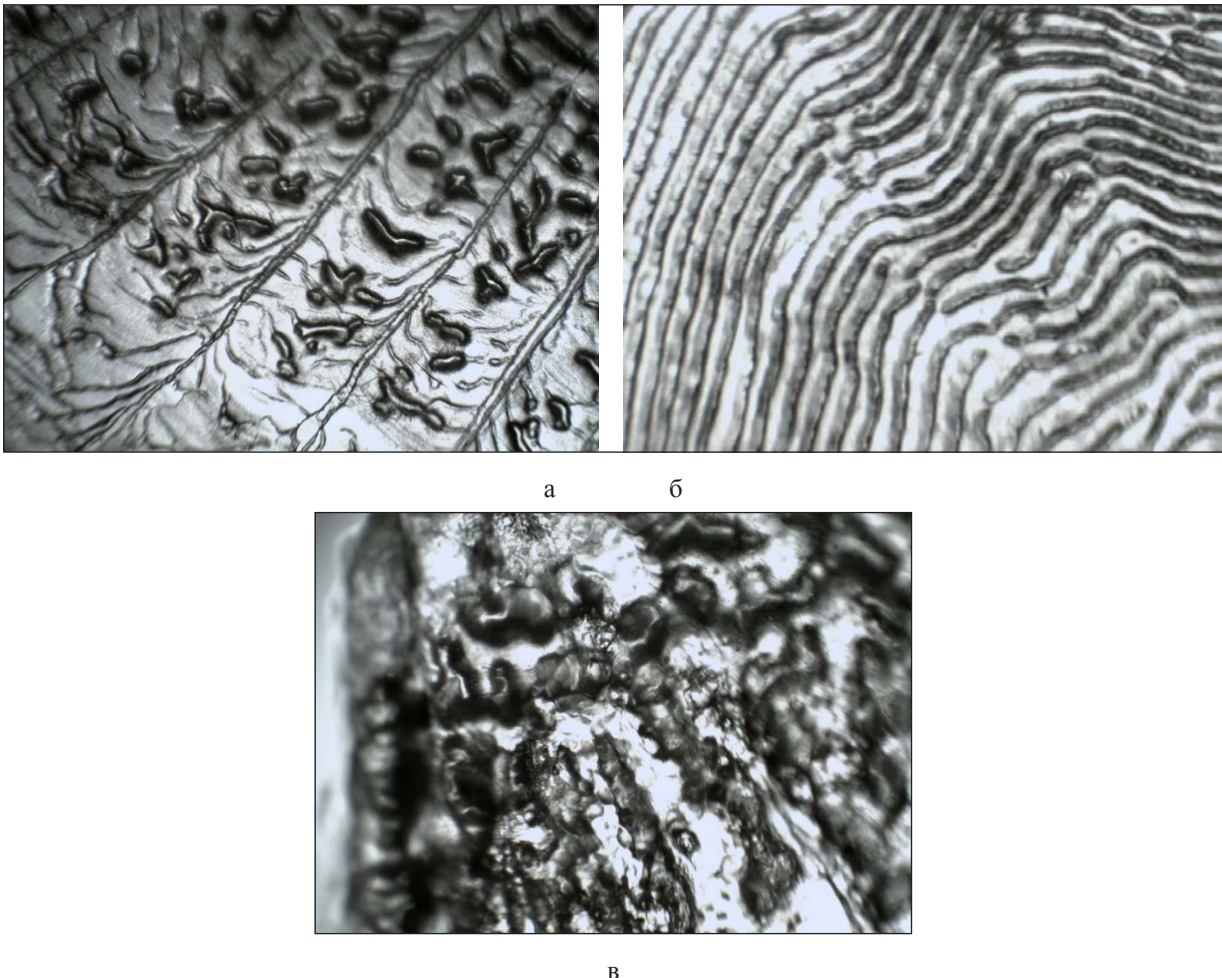


Рис. 1. Мікрофотографії зміни розміру білкових конгломератів (а – білкові конгломерати луски коропа до гідролізу (x40), б – білкові конгломерати луски коропа після гідролізу 4% розчином лугу (x40), в – білкові конгломерати після гідролізу 7% розчином лугу (x80))

Висновки. Таким чином, розробка та оптимізація способів отримання гідролізатів колагену з гідробіонтів за допомогою економічно ґрунтованих методів є актуальним завданням.

Отриманий гідролізат колагену з луски коропа характеризується вмістом білкових складників з різною молекулярною масою, що дає можливість рекомендувати його не тільки як біологічну добавку, але й як сорбційну матрицю.

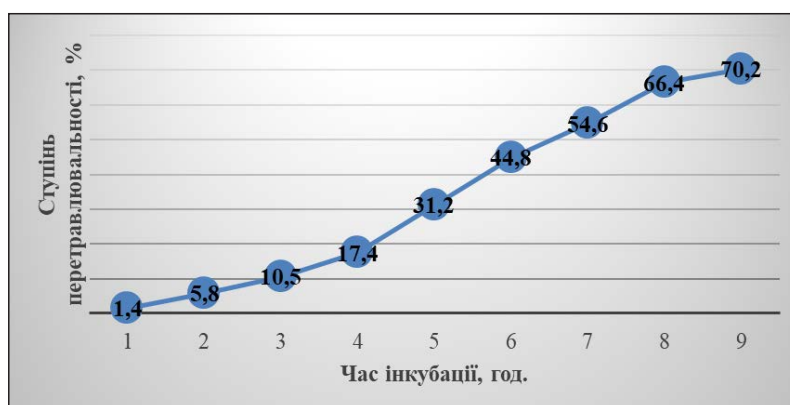


Рис. 2. Кінетика перетравлювання білків у системі «пепсин–трипсин» (*in vitro*)

Список літератури:

1. Hambraeus L. Protein and Amino Acids in Human Nutrition: Reference Module in Biomedical Sciences, 2014.
2. Shahidi F. (ed.) Maximizing the value of marine by-products. CRC Press: Boca Raton. Boston, New York, Washington DC, 2007. 375 p.
3. Различные виды коллагена. URL: <http://ru.inventiapt.com/AboutCollagen,16,Why-Native-Collagen.aspx> (дата звернення: 1.03.2019).
4. Волков Н.И., Олейников В.И. Эргогенные эффекты спортивного питания. Москва : Издательство «Советский спорт», 2012. 99 с.
5. Батечко С.А., Ледзевиров А.М. Коллаген. Новая стратегия сохранения здоровья и продления молодости. Колечково, 2010. 244 с.
6. Norms of physiological requirements in energy and nutrients for different population groups in the Russian Federation. Moscow, 2008. 41 p.
7. Zhong C., Sun Z., Zhou Z., et al. Chemical characterization and nutritional analysis of protein isolates from Caragana korshinskii Kom. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014. V. 62. P. 3217–3222.
8. Stock state characteristics of fishing objects in the seas of Northern European Basin, in the Northern Atlantic, and in the Western Sector of Russian Arctic in 2014 and the possible catch forecast for 2016. Murmansk : PINRO Publ., 2015.
9. Abdollahi M., Rezaei M., Jafarpour A., Undeland I. Dynamic rheological, microstructural and physicochemical properties of blend fish protein recovered from kilka (*Clupeonella cultriventris*) and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) by the pH-shift process or washing-based technology). *Food Chemistry*. 2017. V. 229. P. 695–709.
10. Багратишвили В.Н., Соболев Э.Н., Шехтер А.Б. Лазерная инженерия хрящей. Москва : ФИЗМАТЛИТ, 2006. 488 с.
11. Moskowitz R.W. Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 2000. V. 30. P. 87–99.
12. Кадурина Т.И., Горбунова В.Н. Дисплазия соединительной ткани. Руководство для врачей. Санкт-Петербург : ЭЛБИ, 2009. 704 с.
13. Полубояров В.А., Волоскова Е.В., Янковая В.В., Гурьянова Т.И. Интенсификация процесса растворения коллагена с помощью механо-химической обработки. *Химия в интересах устойчивого развития*. 2009. № 2. С. 183–189.
14. Liu Z.-Y., Chen D., Su Y.-C., and Zeng M.-Y. Optimization of hydrolysis conditions for the production of the angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides from sea cucumber collagen hydrolysates. *J. Aquat. Food Prod. Technol*. 2011. V. 20. P. 222–232.
15. Liu F., Liub C., Lorenac D. et al. Evaluation of the antioxidant activity of collagen peptide additive extracted from cod skin. *J. Environ. Protect. Ecology*. 2012. V.13. P. 1836–1841.
16. Yu P., Chen H. Optimization of conditions for enzymatic production collagen hydrolysates from a long-value acaudinamolpadioides and their activites. *J. Food Biochem*. 2013. V. 38. P. 227–235.
17. Воробьев В.И. Приведены данные об использовании рыбного коллагена и продуктов его гидролиза в различных областях промышленности и хозяйства. URL: <http://d.120-bal.ru/voda/21597/index.html> (дата звернення: 07.05.2019).
18. Антипова Л.В., Сторублевцев С.А. Коллагены: источники, свойства, применение. Воронеж : ВГУИТ, 2014. 512 с.

19. Collagen from fish? Yes, it is possible. URL: <http://cebiotech.com/articles/Collagen-from-fish-yes-it-is-possible-interviewwith-dr-olga-bukovskaya-and-julia-blokhina,26> (дата звернення: 07.05.2019).
20. Дворянинова О.П. Биотехнологический потенциал рыб внутренних водоёмов: глубокая переработка и высокотехнологичные импортзамещающие производства : дис. ... док. техн. наук : 05.18.04, 05.18.07. Воронеж, 2013, 508 с.
21. Дворянинова О.П. Получение, свойства и применение коллагеновых дисперсий из кожи рыб : дис. ... канд. техн. наук : 05.18.04. Воронеж, 2002, 218 с.
22. Хаустова Г.А. Разработка технологий глубокой переработки рыбного шкурсырья для получения коллагена, гиалуроновой кислоты и готовых кож : дис. ... канд. техн. наук : 05.18.04. Воронеж, 2013, 249 с.
23. Derkach S.R., Grokhovsky V.A., Kuranova L.K., Volchenko V.I. Nutrient Analysis of Underutilized Fish Species for the Production of Protein Food. *Foods and Raw Materials*. 2017. V. 5 (2). P. 15–23.
24. Мезенова Н.Ю., Байдолинова Л.С., Мезенова О.Я. Активные пептиды рыбной чешуи в гейнерах для спортивного питания. *Вестник МАХ*. 2014. № 2. С. 48–52.
25. Mezenova O.Ya., Mezenova N.Yu., Baydalinova L.S. Hydrolyzates of fish scales consisting of biologically active supplements for athletes. *Izv. TINRO*. 2014. V. 177. P. 287–294.
26. Paulsen S. Review of nutritional supplements for the treatment of cartilage degeneration. URL: <http://www.paleopronow.com/image/data/Clinical-Studies/dodrops/ReviewOfNutritionalSupplementsForTheTreatmentOfCartilageDegeneration.pdf> (дата звернення: 15.03.2019).
27. Воробьев В.И. Использование рыбного коллагена и продуктов его гидролиза. *Известия Калининградского государственного технического университета*. 2008. № 13. С. 55–58.
28. Кушнір Н.А. Основи технології отримання колагену з рибної колагеновмісної сировини. *Прогресивні техніка та технології харчових виробництв ресторанного господарства і торгівлі*: зб. наук. праць у 2 ч. Ч. 2. Харк. держ. ун-т харчування та торгівлі; / редкол.: О.І. Черевко (відпов. ред.) та ін. Харків, 2014. Вип. 1 (19). С. 107–116.

ОБЗОР СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ ГИДРОЛИЗАТА КОЛЛАГЕНА ИЗ ГИДРОБИОНТОВ

Проведен анализ современных технологий получения гидролизатов коллагена из рыбного сырья. Выявлено, что для получения гидролизатов коллагена используют растворы щелочей, кислот и ферментные препараты. Исследовано изменение размера белковых конгломератов при получении гидролизата коллагена из чешуи карпа, определена степень его перевариваемости.

Ключевые слова: гидролизат коллагена, гидробионты, гидролиз, перевариваемость.

OVERVIEW MODERN METHODS OF OBTAINING COLLAGEN HYDROLYZATE FROM HYDROBIONTS

The analysis of modern technologies for the production of collagen hydrolysates from fish raw materials was carried out. It was revealed that solutions of alkalis, acids and enzyme preparations are used to obtain collagen hydrolysates. The change in the size of protein conglomerates during the preparation of collagen hydrolyzate from carp scales was studied; its digestibility was determined.

Key words: collagen hydrolyzate, hydrobionts, hydrolysis, digestibility.