

## ВЫБОР УСЛОВИЙ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА КОЛЛАГЕНСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ

S.Yu. Garmashov

## THE CHOICE OF OPTIMAL CONDITIONS OF ENZYMATIC HYDROLYSIS OF COLLAGEN-CONTAINING RAW MATERIALS

**Гармашов С.Ю.** – асп., вед. инженер каф. бионанотехнологии Кемеровского технологического института пищевой промышленности (университета), г. Кемерово. E-mail: sergei\_garmashov@mail.ru

**Garmashov S.Yu.** – Post-Graduate Student, Leading Engineer, Chair of Bionanotechnology, Kemerovo Institute (University), of Technology of Food Industry, Kemerovo. E-mail: sergei\_garmashov@mail.ru

Цель исследования – подобрать параметры ферментативного гидролиза коллагенсодержащего сырья для достижения высоких значений степени гидролиза с последующим выделением из него гликозаминогликанов. Задачи исследования: подобрать ферментные препараты для гидролиза сырья, определить фермент-субстратное соотношение ферментов, продолжительность, температуру и pH процесса. Сырьем для выделения гликозаминогликанов являлось коллагенсодержащее сырье – свиные хрящики. Для проведения ферментативного гидролиза использовали коммерческие ферментные препараты трипсин и химотрипсин (ООО «Самсон-Мед»), полученные из поджелудочной железы КРС; папаин, полученный из дынного дерева *Carica papaya* (AppliChem); коллагеназа КК, полученная из промысловых видов крабов (Тихоокеанский институт биоорганической химии), которые в разной степени расщепляют коллаген, а также его связи с углеводами. Для оценки потенциальных возможностей используемого сырья был проведен анализ его химического состава. Для выделения гликозаминогликанов из сырья использовали ферментативный гидролиз. Для более полного воздействия ферментов на сырье и повышения выхода гликозаминогликанов измельченное и очищенное сырье промывали 0,1 М фосфатным буфером при температуре 60–65 °С в течение 30 мин. В качестве критерия эффективности ферментных препаратов использовали степень гидролиза белка, которую оценивали по динамике накопления аминного азота. Гидролиз проводили в оптимальных для каждого ферментного препарата условиях. По результатам проведенных исследований подобраны ферменты (папаин и коллагеназа) для ферментативного гидролиза коллагенсодержащего сырья, богатого гликозаминогликанами, и определены параметры процесса, обеспечивающие высокий показатель степени гидролиза сырья. Последовательное внесение выбранных ферментов при pH 6,5–7,5, температуре 40 °С и ведение гидролиза в течение 6 часов позволило достичь степени гидролиза сырья 77–78 %.

**Ключевые слова:** коллагенсодержащее сырье, ферментативный гидролиз, гликозаминогликаны, хондропротекторы, остеоартроз.

The research objective was to pick up the parameters of enzymatic hydrolysis of collagen-containing raw materials for the achievement of high values of the extent of hydrolysis with subsequent allocation of glycosaminoglycan from it. The research problems were to pick up enzyme preparations for hydrolysis of raw materials, to define enzyme-substrate ratio of enzymes, duration, temperature and pH process. Raw material for allocation of glycosaminoglycan was collagen-containing raw material – pork cartilage. For carrying out enzymatic hydrolysis commercial enzyme preparations the trypsin and chymotrypsin (JSC “Samson-Med”) received from KRS pancreas were used; the papainase received from melon tree of *Carica papaya* (AppliChem); KK collagenase received from trade species of crabs (The Pacific Institute of Bioorganic Chemistry) which in different degree split collagen, and also its communications with carbohydrates. For the assessment of potential opportunities of used raw materials the analysis of its chemical composition was carried out. For allocation of glycosaminoglycan from raw materials enzymatic hydrolysis was used. For fuller impact of enzymes on raw materials and increases of glycosaminoglycan exit crushed and cleared raw materials were washed out by 0.1 M phosphatic buffer at the temperature of 60–65 °C within 30 minutes. As criterion of enzyme preparations efficiency the extent of hydrolysis of protein was used which was estimated on the dynamics of amine nitrogen accumulation. Hydrolysis was carried out in optimum conditions for each enzyme preparation. By the results of conducted researches enzymes (papain and collagenase) for enzymatic hydrolysis of collagen containing raw materials rich in glycosaminoglycan were picked up, and process parameters providing high rate of extent of hydrolysis of raw materials was determined. Consecutive introduction of chosen enzymes at pH of 6.5–7.5 at the temperature of 40 °C and conducting hydrolysis within 6 hours allowed reaching the extent of hydrolysis of raw materials of 77–78 %.

**Keywords:** collagen-containing raw materials, enzymatic hydrolysis, glycosaminoglycans, chondroprotectors, osteoarthritis.

**Введение.** Одним из самых распространенных заболеваний соединительной ткани является остеоартроз [1, 11]. Остеоартроз – ревматическое заболевание, приводящее к нарушению функциональной способности опорно-двигательного аппарата и представляющее собой большую медико-социальную проблему [4].

Для остановки разрушения хрящевой ткани и восстановления ее структуры с успехом применяются хондропротекторы – препараты, действие которых направлено на питание и образование новых клеток хрящевой ткани, а также на выработку синовиальной жидкости – смазки сустава [6, 8].

К соединениям, обладающим хондропротекторными свойствами, относят гликозаминогликаны. В организме они тесно связаны пептидной связью с белком коллагеном. На данный момент сырьем для выделения гликозаминогликанов являются в основном экстракты хрящей крупного рогатого скота, акулье хряща, мидий.

В связи с перспективами использования соединений хондропротекторов для терапии и профилактики заболеваний опорно-двигательного аппарата [12] большой интерес проявляется к способам получения гликозаминогликанов из более дешевого биологического коллагенсодержащего сырья, например, соединительной ткани: шкура, сухожилия, хрящи [3].

Известные на сегодняшний день способы выделения гликозаминогликанов предполагают выделение гликозаминогликанов из сырья путем ферментативного гидролиза папаином или пепсином, осаждение гликозаминогликанов и сушку. Однако данные способы имеют определен-

ные недостатки: технологии продолжительны по времени (более 48 ч), использование одного фермента не обеспечивает максимального выхода гликозаминогликанов, а сырье, в большей степени используемое для выделения, является достаточно дорогим (роговица глаза, акулий хрящ и др.).

**Цель исследования:** подобрать параметры ферментативного гидролиза коллагенсодержащего сырья для достижения высоких значений степени гидролиза с последующим выделением из него гликозаминогликанов.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи:** подобрать ферментные препараты для гидролиза сырья, определить фермент-субстратное соотношение ферментов, продолжительность, температуру и pH процесса.

**Объекты и методы исследования.** Сырьем для выделения гликозаминогликанов являлось коллагенсодержащее сырье – свиные хрящики.

Для проведения ферментативного гидролиза использовали коммерческие ферментные препараты трипсин и химотрипсин (ООО «Самсон-Мед»), полученные из поджелудочной железы КРС; папаин, полученный из дынного дерева *Carica papaya* (AppliChem); коллагеназа КК, полученная из промысловых видов крабов (Тихоокеанский институт биоорганической химии), которые в разной степени расщепляют коллаген, а также его связи с углеводами.

Оптимальные условия действия данных ферментов, согласно прилагаемой инструкции по пользованию, представлены в таблице 1 [5, 7, 9, 10].

Таблица 1

Оптимальные условия действия ферментных препаратов

Фермент	Протеолитическая активность, ед/г	Оптимальное значение pH	Оптимальные значения температуры, °С
Папаин	270	5,0–7,2	37–40
Трипсин	223	7,8–8,5	37–40
Химотрипсин	1320	7,0–8,5	37–40
Коллагеназа	250	6,5–7,8	37–45

Содержание белка в исходном сырье определяли по ГОСТ 25011, содержание жира – по ГОСТ 23042, содержание влаги – по ГОСТ 333189, содержание общей золы – по ГОСТ 31727 (ISO 936:1998).

Содержание общего азота, аминного азота в негидролизованном сырье и полученных гидролизатах определяли по методу Дюма на Rapid N cube.

Степень гидролиза (СГ), %, белка определяли по формуле

$$СГ = \left( \frac{N_{AA} - N_{AA_0}}{N_{OA} - N_{AA_0}} \right) \times 100\%,$$

где  $N_{OA}$  – содержание общего азота, %;  $N_{AA_0}$  – содержание аминного азота в негидролизованном сырье, %;  $N_{AA}$  – содержание аминного азота в гидролизате после гидролиза в течение некоторого периода времени, %.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Для оценки потенциальных возможностей используемого сырья был проведен анализ его химического состава. Полученные результаты химического состава свиного хрящика представлены в таблице 2.

Химический состав свиного хрящика, %

Показатель	Массовая доля, % на 100 г
Белок	29,4±1,47
Жир	4,6±0,23
Влага	64,3±3,22
Зола	1,7±0,06

Как видно из результатов таблицы 2, выбранное сырье на 30 % состоит из белка. При этом из литературных данных известно [2, 3], что вышеуказанное сырье содержит в составе различные гликозаминогликаны, представленные не в свободном виде, а как раз тесно связанные с белком коллагеном.

Для выделения гликозаминогликанов из сырья использовали ферментативный гидролиз.

Отечественный и мировой опыт свидетельствуют о целесообразности применения ферментных препаратов растительного, животного и микробиологического происхождения, обладающих протеолитической активностью и способных гидролизовать белки мяса и коллагенсодержащих отходов с повышенным содержанием соединительной ткани.

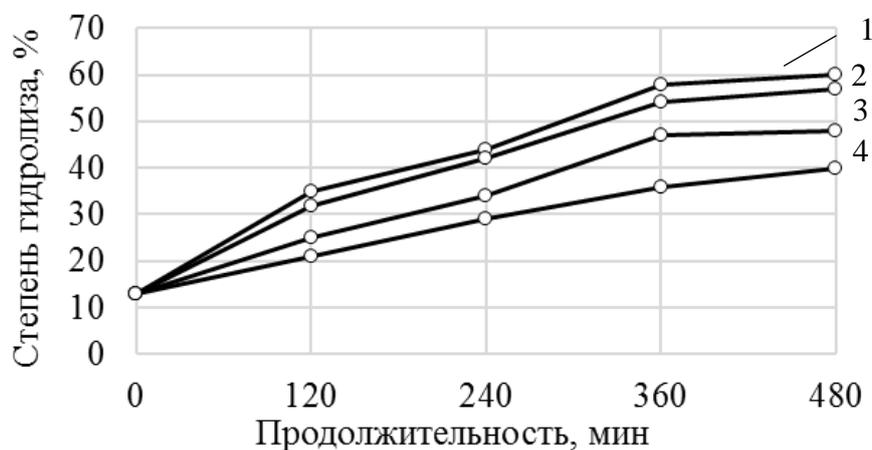
Для проведения ферментативного гидролиза свиные хрящики подвергали обезжириванию, промывали теплой водой, взвешивали и измельчали механическим способом до размеров кусочков не менее 1 мм.

Для более полного воздействия ферментов на сырье и повышения выхода гликозаминогликанов измельченное и очищенное сырье промывали 0,1 М фосфатным буфером при температуре 60–65 °С в течение 30 мин.

На первоначальном этапе, для того чтобы подобрать условия ферментативного гидролиза свиных хрящиков, необходимо было подобрать наиболее эффективный ферментный препарат, из указанных в таблице 1.

В качестве критерия эффективности ферментных препаратов использовали степень гидролиза белка, которую оценивали по динамике накопления аминного азота. Гидролиз проводили в оптимальных для каждого ферментного препарата условиях. Результаты приведены на рисунке 1.

Наиболее полно процесс гидролиза проходил под действием ферментных препаратов папаина и коллагеназы, которые были выбраны для дальнейших исследований.



1 – папаин; 2 – коллагеназа; 3 – трипсин; 4 – химотрипсин

Рис. 1. Динамика степени гидролиза белка выбранными ферментами

В период от 3 до 4 часов происходит незначительное увеличение степени гидролиза, в связи с этим проведение ферментативного гидролиза более 4 часов не целесообразно.

Далее определяли фермент-субстратное соотношение, продолжительность процесса и pH.

Из литературных данных известно, что эффективность действия ферментных препаратов в значительной степени зависит от соотношения *фермент – субстрат*. Поэтому изначально проводились исследования по выбору концентраций ферментных препаратов. Результаты представлены на рисунке 2, 3.

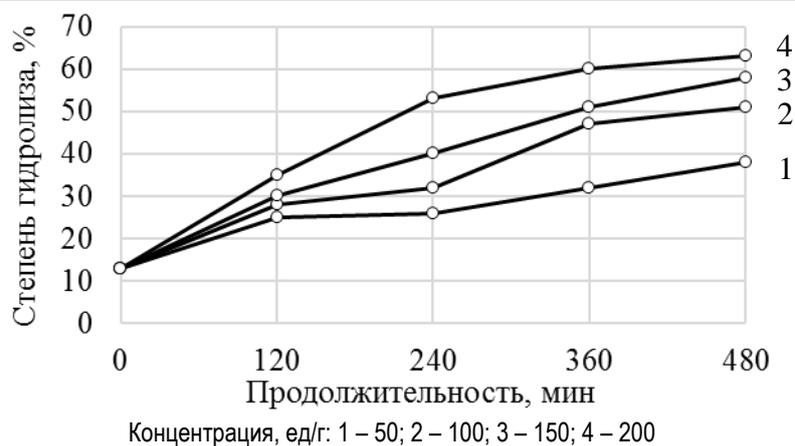


Рис. 2. Динамика степени гидролиза белка папаином при различных концентрациях фермента

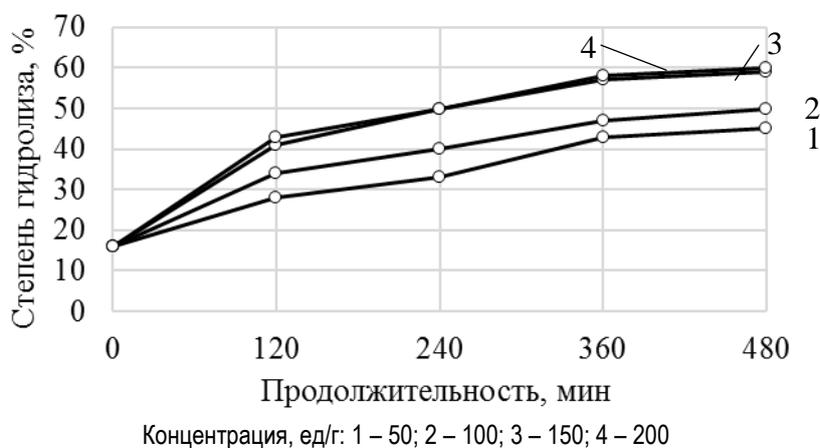


Рис. 3. Динамика степени гидролиза белка коллагеназой при различных концентрациях фермента

Согласно представленным результатам (рис. 2, 3) видно, что наибольшая степень гидролиза 63 и 60 % достигается при использовании папаина с концентрацией 200 ед/г субстрата и коллагеназы с концентрацией 200 ед/г субстрата соответственно.

Согласно полученным данным, максимальное значение степени гидролиза достигается: для папаина – при pH 6,5, температуре 37–40 °С, концентрации 200 ед/г; а для коллагеназы – pH 7,5, температуре 37–40 °С, концентрации 200 ед/г.

Далее подбирали значения pH действия фермента на коллагенсодержащее сырье. Результаты представлены на рисунках 4, 5.

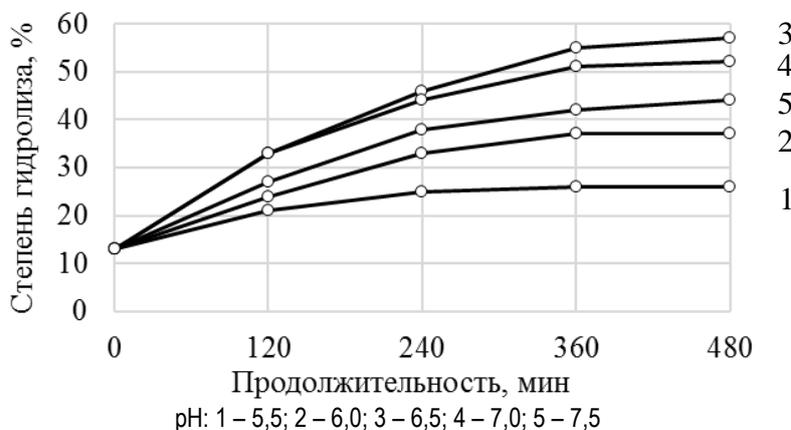


Рис. 4. Динамика степени гидролиза белка папаином при различных значениях pH

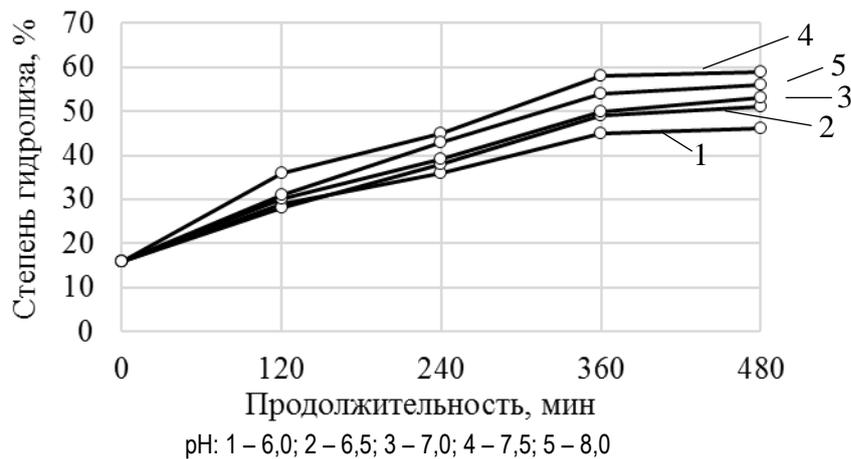


Рис. 5. Динамика степени гидролиза белка коллагеназой при различных значениях pH

В ходе эксперимента также было необходимо установить, в каком случае, при одновременном или последовательном внесении выбранных ферментов, значение степени гидролиза будет максимальным.

При одновременном внесении папаина и коллагеназы проводили гидролиз в течение 8 ч при средних значениях для обоих ферментов pH – 7,0 и температуре – 40

°С. При последовательном внесении ферментов сначала проводили гидролиз при установленных условиях в течение 4 ч коллагеназой (pH – 7,5, температура – 40 °С), а затем вносили папаин и еще в течение 4 ч проводили гидролиз, при этом изменяя pH до 6,5 путем добавления фосфатного буфера. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3

**Динамика степени гидролиза белка при одновременном и последовательном добавлении ферментов**

Единовременное внесение ферментов		Последовательное внесение ферментов	
Продолжительность, мин	Степень гидролиза, %	Продолжительность, мин	Степень гидролиза, %
60	23	60	35
120	33	120	49
180	45	180	62
240	57	240	70
300	60	300	75
360	60	360	78
420	60	420	78

Из результатов таблицы 3 видно, что при одновременном добавлении ферментов степень гидролиза белка достигает всего 60 %, при этом последовательное добавление ферментов приводит к повышению эффективности ферментативного гидролиза до 75–76 %.

**Выводы.** В результате проведенного исследования было установлено, что условиями ферментативного гидролиза, обеспечивающими максимальное значение степени гидролиза, являются проведение гидролиза коллагенсодержащего сырья сначала ферментом коллагеназой при pH 7,5 и температуре 40 °С в течение 3 часов, а затем 3 часа папаином при pH 6,5 и температуре 40 °С при постоянном перемешивании (последовательное внесение ферментов). Степень гидролиза при этом составляет 77–78 %. Общая продолжительность процесса составляет 6 часов, так как увеличение продолжительности гидролиза не приводит к повышению степени гидролиза белка.

Результаты исследования будут использованы в дальнейшем для подбора параметров осаждения, фрак-

ционирования, распылительной сушки растворов и определения хондропротекторных свойств, выделенных гликозаминогликанов.

*Работа выполнена в рамках договора 9214ГУ/2015 при поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере.*

**Литература**

1. Барсук А.Л. Современные аспекты фармакотерапии остеоартроза: хондропротекторы для местного и перорального применения // РМЖ. – 2013. – Т. 21. – № 6. – С. 346–349.
2. Гликозаминогликаны и протеогликаны. – URL: [http://biochemistry.ru/biohimija\\_severina/B5873Part109-703.html](http://biochemistry.ru/biohimija_severina/B5873Part109-703.html).
3. Зимницкий А.Н., Башкатов С.А. Гликозаминогликаны в биохимических механизмах адаптации орга-

- низма к некоторым физиологическим и патологическим состояниям. – М., 2004. – 235 с.
4. Кабальк М.А., Сильванович К.И., Халиман А.А. Остеоартроз и коморбидность: распространенность и классификация // Молодой ученый. – 2016. – № 10 (114). – С. 500–503.
  5. Коллагеназа КК. – URL: <http://www.piboc.dvo.ru/develop/21/129>.
  6. Мазуров В.И., Шостак М.С., Рипачев В.В. Хондропротекторы в клинике остеоартроза: лечение и прогноз // Фарматека. – 2013. – № 19 (272). – С. 45–50.
  7. Папаин. – URL: <https://rearus.ru/387251>.
  8. Порцель М.Н. Разработка технологии получения хондроитинсульфата из гидробиионтов Баренцева моря и изучение его физико-химических свойств: автореф. дис. ... канд. техн. наук: 05.18.04, 02.00.04. – Мурманск, 2011. – 23 с.
  9. Трипсин. – URL: <http://samsonmed.ru/catalog/tripsin>.
  10. Химотипсин. – URL: <http://samsonmed.ru/catalog/khimotripsin>.
  11. Berenbaum F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!) // Osteoarthritis and Cartilage. – 2013. – V. 21. – I.1. – P. 16–21.
  12. Strategy for the use of chondroprotectors in osteoarthrosis / S.M. Noskov, A.A. Lavrukina, K.Y. Shirokova, A.A. Pryanichnikova // Terapevticheskii Arkhiv. – 2013. – V. 85. – I. 5. – P. 92–94.
- Literatura**
1. Barsuk A.L. Sovremennyye aspekty farmakoterapii osteoartroza: hondroprotektory dlya mestnogo i peroral'nogo primeneniya // RMZh. – 2013. – T. 21. – № 6. – S. 346–349.
  2. Glikozaminoglikany i proteoglikany. – URL: [http://biochemistry.ru/biohimija\\_severina/B5873Part109-703.html](http://biochemistry.ru/biohimija_severina/B5873Part109-703.html).
  3. Zimnickij A.N., Bashkatov S.A. Glikozaminoglikany v biohimicheskikh mehanizmah adaptacii organizma k nekotorym fiziologicheskim i patologicheskim sostojaniyam. – М., 2004. – 235 s.
  4. Kabalyk M.A., Sil'vanovich K.I., Haliman A.A. Osteoartroz i komorbidnost': rasprostranennost' i klassifikacija // Molodoy uchenyj. – 2016. – № 10 (114). – S. 500–503.
  5. Kollagenaza КК. – URL: <http://www.piboc.dvo.ru/develop/21/129>.
  6. Mazurov V.I., Shostak M.S., Ripachev V.V. Hondroprotektory v klinike osteoartroza: lechenie i prognoz // Farmateka. – 2013. – № 19 (272). – S. 45–50.
  7. Papain. – URL: <https://rearus.ru/387251>.
  8. Porcel' M.N. Razrabotka tehnologii poluchenija hondroitinsulfata iz gidrobiontov Barenceva morja i izuchenie ego fiziko-himicheskikh svoystv: avtoref. dis. ... kand. tehn. nauk: 05.18.04, 02.00.04. – Murmansk, 2011. – 23 s.
  9. Tripsin. – URL: <http://samsonmed.ru/catalog/tripsin>.
  10. Himotipsin. – URL: <http://samsonmed.ru/catalog/khimotripsin>.
  11. Berenbaum F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!) // Osteoarthritis and Cartilage. – 2013. – V. 21. – I.1. – P. 16–21.
  12. Strategy for the use of chondroprotectors in osteoarthrosis / S.M. Noskov, A.A. Lavrukina, K.Y. Shirokova, A.A. Pryanichnikova // Terapevticheskii Arkhiv. – 2013. – V. 85. – I. 5. – P. 92–94.

УДК 663.479.1

М.С. Алексеева

#### СРАВНЕНИЕ СЕНСОРНЫХ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КВАСА ИЗ ПШЕНИЧНОГО И РЖАНОГО СЫРЬЯ

М.С. Alekseeva

#### THE COMPARISON OF SENSORY AND PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF KVASS MADE OF WHEAT AND RYE RAW MATERIALS

**Алексеева М.С.** – асп. каф. пищевой биотехнологии продуктов из растительного сырья Санкт-Петербургского национального исследовательского университета информационных технологий, механики и оптики, г. Санкт-Петербург. E-mail: [alexeevams@mail.ru](mailto:alexeevams@mail.ru)

**Alekseeva M.S.** – Post-Graduate Student, Chair of Food Biotechnology of Products from Vegetable Raw Materials, St. Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics, St. Petersburg. E-mail: [alexeevams@mail.ru](mailto:alexeevams@mail.ru)

Цель исследования – провести анализ ассортимента напитков для сравнения экспериментальных образцов пшеничного кваса с производимыми квасами известных брендов и определения уникальности данного продукта и привлекательности нового напитка для покупателей. Задача исследования – сравнительная

оценка сенсорных и физико-химических параметров качества двух разработанных видов кваса с образцами кваса известных брендов, изготовленных в основном из пшеничного солода. Материалами для сравнительной оценки и анализа являлись экспериментальные образцы кваса из пшеничного солода и неохмеленного экстракта