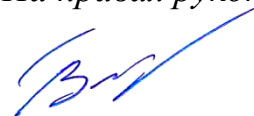


МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Кемеровский государственный университет»

На правах рукописи



Ворошилин Роман Алексеевич

**БИОТЕХНОЛОГИИ, СОСТАВ И СВОЙСТВА
ГИДРОЛИЗАТОВ КОЛЛАГЕНА**

Специальность 4.3.5 – Биотехнология продуктов питания
и биологически активных веществ

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени доктора биологических наук

Научный консультант:

доктор биологических наук, профессор,
член-корреспондент РАН

Просеков Александр Юрьевич

Кемерово 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1 АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР.....	14
1.1 Коллаген: классификация, функциональные свойства, роль в организме.....	14
1.2 Современное состояние рынка гидролизатов и перспективы применения гидролизатов коллагена в медицине, косметологии и пищевой промышленности.....	22
1.3 Основные источники сырья для производства гидролизатов коллагена.....	33
1.4 Анализ существующих технологий производства гидролизатов коллагена и сопутствующих продуктов.....	41
1.5 Ферментные препараты, используемые в биотехнологии получения гидролизатов коллагена, и их характеристики.....	45
1.6 Биоактивные свойства гидролизатов, методы их идентификации.....	53
1.7 Заключение по аналитическому обзору.....	70
ГЛАВА 2 МЕТОДОЛОГИЯ, ОБЪЕКТЫ И ОРГАНИЗАЦИЯ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	73
2.1 Организационная схема проведения научных исследований.....	73
2.2 Объекты исследований.....	77
2.3 Используемое аналитическое и научное оборудование.....	78
2.4 Методы проведения исследований.....	80
ГЛАВА 3 ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕПЦИИ ИССЛЕДОВАНИЙ. ОЦЕНКА ПРОИЗВОДСТВЕННОГО И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА СЫРЬЯ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ.....	96
3.1 Научная концепция и пути ее реализации.....	96
3.2 Расчет потенциала сырьевой базы Сибирского федерального округа для производства гидролизатов коллагена.....	98
3.3 Обоснование выбора коллагенсодержащего сырья для проведения исследований.....	112
3.4 Оптимизация технологических этапов подготовки коллагенсодержащего сырья к производству гидролизатов коллагена.....	115
3.4.1 Первичная подготовка коллагенсодержащего сырья.....	117

3.4.2 Обоснование подбора и разработка способов ферментативного обезжиривания коллагенсодержащего сырья.....	121
3.5 Анализ показателей качества полученных сопутствующих товарных продуктов – животных жиров.....	127
3.6 Заключение по главе.....	132
ГЛАВА 4 НАУЧНОЕ И ПРАКТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ И ТЕХНИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ В ПРОЦЕССЕ ПРОИЗВОДСТВА ГИДРОЛИЗАТОВ КОЛЛАГЕНА.....	136
4.1 Подбор ферментов для проведения исследований на этапе гидролиза коллагенсодержащего сырья.....	137
4.2 Разработка схем проведения гидролиза коллагенсодержащего сырья.....	140
4.3 Определение основных показателей качества коллагеновых бульонов.....	147
4.4 Исследование баромембранного воздействия на технологический этап фильтрации и концентрирования коллагеновых бульонов. Обоснование режимов и параметров процесса сушки.....	151
4.5 Определение основных физико-химических и органолептических показателей гидролизатов коллагена.....	163
4.6 Оценка аминокислотного профиля и молекулярно-массового распределения белков гидролизатов коллагена.....	165
4.7 Электронное микрофотографирование образцов гидролизатов коллагена..	174
ГЛАВА 5 МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ СТРУКТУРЫ И ОЦЕНКА КАЧЕСТВЕННЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ И ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ БИОАКТИВНЫХ СВОЙСТВ ПОЛУЧЕННЫХ ОБРАЗЦОВ ГИДРОЛИЗАТОВ КОЛЛАГЕНА МЕТОДОМ <i>IN SILICO</i>.....	178
5.1 Моделирование структуры белка полученных образцов гидролизатов коллагена.....	178
5.2 Моделирование графиков определения изоэлектрической точки и расчета белкового заряда.....	200
5.3 Моделирование графиков топологии гидрофобности, гидрофильности и трансмембранной тенденции аминокислот гидролизатов коллагена.....	203
5.4 Оценка потенциальных биоактивных свойств пептидов гидролизатов коллагена.....	213

5.5 Заключение по главе.....	224
ГЛАВА 6 ПРОВЕДЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ ПО ИЗУЧЕНИЮ ЭФФЕКТИВНОСТИ И СВОЙСТВ ПОЛУЧЕННЫХ ОБРАЗЦОВ ГИДРОЛИЗАТА МЕТОДОМ <i>IN VIVO</i>.....	225
6.1 Влияние полученных образцов гидролизатов коллагена на динамику массы тела лабораторных животных.....	228
6.2 Биохимические и морфологические показатели сыворотки крови лабораторных животных.....	230
6.3 Некроскопические и гистологические исследования лабораторных животных.....	233
6.4 Заключение по главе.....	238
ГЛАВА 7 ПРАКТИЧЕСКАЯ РЕАЛИЗАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	241
7.1 Технологические схемы производства гидролизатов коллагена из коллагенсодержащего сырья методом ферментативного гидролиза и баромембранными технологиями.....	241
7.2 Выявление потенциальных рисков в процессе производства гидролизатов коллагена из вторичных сырьевых ресурсов животного происхождения.....	249
7.2.1 Составление перечня всех потенциально возможных опасностей.....	249
7.2.2 Определение критических контрольных точек, задание критических пределов для ККТ.....	265
7.2.3 Разработка системы мониторинга для ККТ. Определение корректирующих действий.....	267
7.3 Оценка экономической эффективности разработанной технологии при внедрении в производство.....	276
ВЫВОДЫ.....	292
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	296
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	298
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	330

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Перед пищевой, биотехнологической и химической промышленностью стоит важная задача – создание новых высококачественных продуктов, соответствующих требованиям международных стандартов. Одним из перспективных направлений в этих отраслях является производство пищевых и медицинских гидроколлоидов, включая гидролизаты коллагена, которые пользуются спросом, как на внутреннем, так и на международном рынке. В России актуальной проблемой является производство отечественных стерильных пищевых и медицинских гидролизатов коллагена. Потребность в этом сырье растёт с каждым годом и в среднем составляет более 15 тысяч тонн в год.

Учитывая глобальную проблему производства качественных гидролизатов коллагена, необходимо разрабатывать новые решения для оптимизации технологий производства, что может включать в себя использование новых биотехнологических подходов в производстве, а также изучение и идентификацию биоактивных свойств данных продуктов с целью определения их дальнейшего направления применения в индустрии.

Гидролизаты коллагена представляют собой биологически активные продукты, полученные путем ферментативного, кислотного или щелочного гидролиза коллагена – основного белка соединительной ткани, кожи, сухожилий и костей. Это смесь низкомолекулярных пептидов, аминокислот и их производных, которые обладают рядом функциональных и биоактивных свойств. Гидролизаты коллагена являются важным компонентом продуктов, поддерживающих здоровье, исследование состава и свойств гидролизатов может открыть новые перспективы для их применения в биотехнологической, пищевой и медицинской промышленности. В пищевой промышленности они являются одним из водорастворимых полимеров, который можно использовать для улучшения стабильности и консистенции пищевых продуктов. В медицинской и фармацевтической промышленности гидролизаты могут использоваться для

производства мягких и твердых капсул, прокладок для ран и адсорбентов, препаратов, восполняющих дефицит коллагена в организме, а их биоактивные свойства оказывают на организм широкий спектр действий. В современных условиях производство гидролизатов коллагена на территории РФ пока не приобрело широкого распространения. Это связано, во-первых, с устаревшим технологическим оборудованием и в целом технологическим процессом, параметры которого не отвечают реалиям современного производства, а во-вторых, с проблемами сырьевого обеспечения производства продуктов данной категории.

Технология производства гидролизатов коллагена включает в себя большое количество операций и процессов, как на стадии подготовки сырья, так и на стадии основного процесса – гидролиза. Из-за большого объема технологических операций производство энергозатратно и занимает достаточно продолжительное время. В условиях современного производства следует уделить внимание эффективному комплексному подходу в создании пищевых и биомедицинских гидролизатов на основе животного сырья, направленному на сокращение энергозатрат и значительно уменьшить продолжительность процесса производства. В связи с чем необходимо разрабатывать биотехнологические подходы в производстве, которые смогут позволить получать продукт с заданными биоактивными свойствами. При должной поддержке и развитии, производство гидролизатов коллагена в России может стать более эффективным и востребованным направлением, способствуя импортозамещению и укреплению отечественного производства.

Степень разработанности темы. Значительный вклад в развитие научного и практического направления по изучению и оптимизации технологических процессов переработки вторичного сырья животного происхождения внесли следующие ученые: Л.В. Антипова, В.Г. Волик, И.А. Глотова, Г.О. Ежкова, С.Д. Жамсаранова, А.И. Жаринов, В.Е. Куцакова, А.Б. Лисицын, А.Д. Неклюдов, И.А. Рогов, А.А. Семенова, А.И. Сницарь, Е.И. Титов, В.И. Шипулин, М.Л. Файвишевский, И.М. Чернуха, R.A. Lawrie, A. Veis, P. Hantzinger, G. Heinz, C. Warner и др. Проблемами производства коллагена и белковых ингредиентов

занимались следующие ученые: И.А. Глотова, Л.А. Кудряшов, А.И. Мглинец, И.А. Рогов и др.

Отдельные этапы работы выполнены в рамках реализации:

- гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук и докторов наук и ведущих научных школ Российской Федерации № МК-4035.2022.4 по теме «Разработка комплексной технологии производства биополимеров пищевого и биомедицинского назначения из вторичных сырьевых ресурсов животного происхождения»;

- гранта Президента Российской Федерации по государственной поддержке ведущих научных школ НШ-2694.2020.4 по теме «Фундаментальные основы создания поликомпонентных пробиотических консорциумов с заданными свойствами для поддержания микроэкологического статуса организма человека».

Цель и задачи исследований. Целью данной работы является разработка биотехнологии производства гидролизатов коллагена, обладающих биоактивными свойствами.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

- изучить ресурсный потенциал и химический состав мясокостного и мягкого коллагенсодержащего сырья с целью обоснования выбора сырьевых ресурсов для проведения исследований;

- разработать биотехнологические способы предварительной обработки коллагенсодержащего сырья, проанализировать показатели качества побочных продуктов;

- разработать научно обоснованные биотехнологические способы гидролиза коллагенсодержащего сырья с целью получения биоактивных гидролизатов коллагена;

- изучить влияние баромембранных процессов и сушки на качественные и количественные показатели гидролизатов коллагена;

- изучить физико-химические показатели конечного продукта – гидролизатов коллагена, молекулярно-массовое распределение, молекулярную структуру белков с последующей оценкой аминокислотной последовательности полученных пептидов;
- провести оценку биоактивных свойств гидролизатов коллагена с использованием методов *in siliko*;
- провести исследования выработанных гидролизатов с использованием методов *in vivo* с последующим определением биологических свойств выработанных гидролизатов коллагена в эксперименте на лабораторных животных с моделью линейной раны;
- составить научно обоснованную оптимизированную технологическую схему производства гидролизатов коллагена с учётом биокаталитического воздействия на процесс производства, выявить и разработать меры по предотвращению потенциально опасных рисков в процессе производства;
- разработать техническую документацию, провести производственную апробацию результатов научной работы, внедрить результаты работы в производство, провести оценку экономической эффективности внедрённых технологических решений.

Научная концепция работы состоит в научном обосновании с экспериментальными подтверждениями подхода к реализации биотехнологии получения гидролизатов коллагена с применением ферментных и баромембранных технологий, для обеспечения ресурсосбережения и оптимизации процессов, а также выявление и подтверждение биоактивных свойств в моделях *in siliko* и *in vivo*.

Научная новизна работы. Предложена научная концепция ресурсосберегающих биотехнологических подходов в производстве гидролизатов коллагена биокаталитическим и баромембранными методами. На основании молекулярного докинга показана возможность использования полученных

образцов гидролизатов коллагена в пищевой и биомедицинской промышленности.

Подтверждена эффективность разработанных схем ферментативного обезжиривания с использованием ферментов липазы при обезжиривании образцов исследуемого коллагенсодержащего сырья (выход жира в опытных образцах составляет от 10 до 18 %).

Доказано, что фермент микробного происхождения пепсин (*Rhizomucor miehei*) с ферментной активностью $5 \cdot 10^{-3}$ кат, концентрацией фермента $0,15 \pm 0,01$ % от массы костного сырья крупного рогатого скота (КРС) в соотношении сырья и растворителя 1М HCl масса/объем 1:3 и продолжительностью обработки 480 мин при pH 1,5, температуре $50 \pm 0,5$ °C способствует выходу коллагена в количестве от 15,8 % по отношению к массе исходного сырья. В ходе гидролиза ног цыплят-бройлеров доказано, что обработка ферментом микробного происхождения пепсин (*Bacillus subtilis*) с активностью $2 \cdot 10^{-3}$ кат, концентрацией фермента $0,2 \pm 0,01$ % от массы сырья в соотношении сырья и растворителя 1М HCl масса/объем 1:2 и продолжительностью обработки 120 мин при pH 1,5, температуре $55 \pm 0,5$ °C способствует выходу коллагена в количестве от 16,4 % по отношению к массе исходного сырья. В процессе исследования разработанных схем гидролиза свиной шкурки доказано, что обработка ферментом протеазой поларзим (*Acremonium chrysogenum*) с ферментной активностью $6 \cdot 10^{-4}$ кат, концентрацией фермента $0,3 \pm 0,01$ % от массы сырья в соотношении сырья и растворителя 1М HCl масса/объем 1:4 и продолжительностью обработки 120 мин при pH 10,5, температуре $60 \pm 0,5$ °C способствует выходу коллагена в количестве от 17,3 % по отношению к массе исходного сырья. Результаты подтверждены исследованиями физико-химических показателей и функциональных свойств полученных образцов.

Подтверждена эффективность использования баромембранных технологий (ультрафильтрация полимерными мембранами при давлении в пределах 0,30 мПа) для концентрирования коллагеновых бульонов: концентрация раствора по

отношению к белкам исходного коллагенового бульона увеличилась на 62 %, по отношению к сухим веществам – на 63 %.

В модели *in silico* исследованы структура и свойства полученных образцов гидролизатов коллагена, определены потенциальные биоактивные свойства выработанных гидролизатов по аминокислотной последовательности. Установлено, что основная часть исследуемых пептидных последовательностей должна обладать свойствами ингибиторов АПФ и ингибиторов ДПП-IV. При этом зависимости показателя биоактивности исследуемых пептидов от молекулярной массы не наблюдалось.

При исследовании биологического эффекта и безопасности полученных продуктов на модели *in vivo* установлено, что употребление подопытными животными гидролизатов коллагена из ног цыплят-бройлеров, в количестве 3 % от суточного калоража способствовало образованию более прочного рубца и эффективному протеканию процесса ранозаживления (масса груза, необходимого для разрыва рубца, увеличивалась до 64,0 %).

Доказана значимость влияния выработанных образцов гидролизатов коллагена на восстановление структуры кожи и формирование плотного рубца (до 90 мкм). Определено, что потребление экспериментального образца гидролизатов коллагена, полученного из свиной шкурки, стимулировало иммунную систему подопытных мышей (выявлено повышение концентрации лейкоцитов до 24,4 %, моноцитов – в 1,75 раза). Доказано выраженное положительное влияние на степень ранозаживления – масса груза для разрыва рубца увеличивалась на 89,0 %. Выявлено восстановление структуры кожи, образование волосяных фолликулов и сальных желез, формирование плотного рубца (до 90 мкм).

Теоретическая и практическая значимость работы. На основании полученных результатов исследований разработаны новые технологические подходы в производстве образцов пищевого гидролизата коллагена. Наличие биоактивных свойств полученных образцов гидролизатов коллагена позволяет рекомендовать его использование при производстве функциональных продуктов и

в биомедицинской промышленности для производства продукции таргетной направленности.

Обобщения и выводы, сделанные в ходе исследования, не противоречат основам пищевых технологий и используются в учебном процессе ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет» в рамках образовательных программ по направлениям бакалавриата 19.03.03 «Продукты питания животного происхождения», 19.03.01 «Биотехнология и магистратуры укрупненных групп направлений подготовки», 19.00.00 «Промышленная экология и биотехнологии», а также при организации научно-исследовательской и практической работы аспирантов.

Техническая значимость разработанных решений подтверждена следующими патентами Российской Федерации: № 2783233 «Способ биокаталитической обработки костного сырья», № 2800526 «Способ получения сухого быстрорастворимого желатина», № 2816712 «Способ производства желатина», № 2823831 «Вакуумная сушилка для сухих и жидких продуктов».

На основе результатов экспериментальных исследований разработана и утверждена техническая документация: ТИ № 10.13.15-284-02068309-2022 «Гидролизаты коллагена из костного сырья крупного рогатого скота», ТИ № 10.13.15-288-02068309-2023 «Гидролизаты коллагена из субпродуктов переработки сельскохозяйственной птицы», ТИ № 10.13.15-292-02068309-2023 «Гидролизаты коллагена из свиной шкуры».

Проведена промышленная апробация и внедрение в производство образцов гидролизатов коллагена в соответствии с разработанной технической документацией в ООО НПО «Здоровое питание» (г. Кемерово), ООО «Биолит» (г. Томск), ООО «Да» (г. Владикавказ).

Методология и методы исследования. Для получения достоверных результатов экспериментальной части работы использовались современное оборудование, общепринятые и стандартные методы, исследования проводили в 5-10 кратной повторности.

Положения, выносимые на защиту:

- результаты разработки схем ферментативного обезжиривания и гидролиза исследуемого коллагенсодержащего сырья с применением ферментов;
- способ баромембранного концентрирования коллагеновых растворов в процессе производства гидролизатов коллагена;
- результаты молекулярного моделирования структуры и качественных показателей гидролизатов коллагена;
- биоактивные свойства, полученных образцов гидролизатов коллагена с использованием модели *in silico*;
- биологический эффект и безопасность полученных продуктов с использованием модели *in vivo*;
- комплексные технологические решения производства гидролизатов коллагена, а также разработанная и утверждённая техническая документация, расчеты экономического эффекта производства.

Степень достоверности и апробации работы. Степень достоверности результатов диссертационной работы подтверждается массивом теоретических и экспериментальных исследований, а также применением оригинальных, стандартных и общепринятых методов в исследовательской практике. Достоверность результатов исследований подтверждалась промышленной апробацией, публикациями в рецензируемых научных журналах и представлением на региональных, российских и международных научно-практических конференциях: XXII научно-практической конференции, посвящённой памяти В.М. Горбатова «Пищевые системы. Биобезопасность, технологии и инжиниринг» (г. Москва, 2020), XVII Международная научно-практическая конференция «Пища. Экология. Качество» (г. Новосибирск, 2020), VIII научно-практическая конференция молодых ученых биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов в рамках площадки OpenBio-2021 (г. Новосибирск, 2021), XV Международная научно-практическая конференция молодых учёных и специалистов «Актуальные вопросы и

современные решения в области пищевых систем» ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН (г. Москва, 2022), Международная конференция «Пищевые здоровьесберегающие технологии» (г. Кемерово, 2022) IX Международная научно-практическая конференция «Современные достижения биотехнологии. Фундаментальные и прикладные аспекты» (г. Ставрополь, 2024), XXIV Международная научно-практическая конференция «Инновационные тренды, научные достижения и факторы устойчивого развития пищевых систем» (г. Москва, 2024) и др.

Соответствие темы паспорту научной специальности. Диссертационные исследования соответствуют пунктам 5, 6, 8, 15, 16, 25, 26, 29 паспорта специальности ВАК 4.3.5. «Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ».

Личный вклад соискателя. Вклад соискателя в работу состоит в разработке научной концепции исследований, постановке цели и задач исследования, организации и проведении научно-экспериментальных и аналитических работ, получении результатов исследований и их промышленной апробации. Работа представляет обобщение научных исследований соискателя выполненных самостоятельно.

Публикации. Содержание диссертационной работы опубликовано в более 80 научных работах, в том числе в 8 статьях, индексируемых в международных базах цитирования Scopus и/или Web of Science, 18 статьях в журналах, рекомендованных ВАК, 17 из которых входят в категории K1-K2, в одной монографии, в 50 материалах конференций, четырех патентах на изобретение, трех отчетах НИОКР, двух учебных пособиях.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из следующих основных разделов: введение, обзор литературы, объекты и методы исследования, результаты исследования и их обсуждение, выводы, список использованных источников и приложения. Основное содержание работы изложено на 373 страницах машинописного текста, содержит 74 таблицы, 88 рисунков, 14 приложений.

ГЛАВА 1 АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР

1.1 Коллаген: классификация, функциональные свойства, роль в организме

Внеклеточный матрикс (ЕСМ) соединительных тканей представляет собой ее основу, определяющую структурную целостность и различные физиологические функции, и обеспечивает механическую поддержку клеток и транспорт химических веществ. Надмолекулярное расположение фибриллярных элементов, микрофибриллярных сетей, а также растворимых белков, гликопротеинов и широкого спектра других молекул определяет биофизические характеристики. Состав и структура значительно различаются среди других типов соединительных тканей. Тканеспецифическая экспрессия и синтез структурных белков и гликопротеиновых компонентов приводят к появлению уникальных функциональных и биологических характеристик в различных местах [48].

Основная функция внеклеточного матрикса – наделение тканей их специфическими механическими и биохимическими свойствами. Резидентные клетки отвечают за синтез и поддержание внеклеточного матрикса, но он, в свою очередь, влияет и на клеточные функции. Взаимодействия типа клетка – матрикс, опосредованные специфическими клеточными рецепторами и эпитопами связывания клеток на многих молекулах матрикса, не только играют доминирующую роль в прикреплении и миграции клеток, но и регулируют или способствуют клеточной дифференцировке и регуляции уровней экспрессии генов. Перицеллюлярный матрикс обеспечивает особую физиологическую среду для клеток, защищая их от пагубных механических воздействий и опосредуя механически вызванную передачу сигнала. Дополнительное влияние внеклеточного матрикса на морфогенез и клеточный метаболизм можно приписать хранению и высвобождению факторов роста, которое модулируется их связыванием со специфическими компонентами матрикса.

Наиболее распространенными белками во внеклеточном матриксе являются типы коллагенов. Коллаген – это синтезируемый белок в организме человека, представляющий собой основной компонент, в структуре которого преобладает аминокислота глицин (около 33 %), а также пролин и гидроксипролин (около 22 %). Его первичная структура состоит из тройной спирали, образованной тремя α -цепями. Каждая из этих цепей включает примерно 1014 аминокислот и имеет молекулярную массу около 100 кДа. Вторая структура коллагена представлена скручиванием этих цепей в левую спираль, где на каждом витке приходится три аминокислотных остатка. Третичная структура формируется при взаимодействии этих цепей, создавая жесткую тройную спираль. Четвертичная структура представляет собой суперспираль, которая является основной формой коллагена. Такая организация молекулы коллагена стабилизируется за счет внутримолекулярных водородных связей между молекулами глицина в соседних цепях. Коллаген состоит из тройной спиральной области и двух концевых неспиральных участков, его молекулярная масса составляет около 300 кДа, длина – 280 нм, а диаметр – 1,4 нм [40, 148, 181, 220, 225].

Коллаген представлен несколькими основными типами, каждый из которых выполняет определенные функции в организме:

- Тип I – самый распространенный, формирует основу кожных покровов, костной ткани, зубов, а также входит в состав сухожилий, связок и различных органов, обеспечивает прочность и эластичность этих структур;
- Тип II преимущественно находится в хрящевой ткани, где отвечает за её упругость и способность выдерживать механические нагрузки;
- Тип III встречается в мягких тканях – коже, мышцах, стенках кровеносных сосудов, поддерживает их структурную целостность;
- Тип IV является ключевым компонентом базальных мембран и пластинок, которые продуцируются эпителиальными клетками;
- Тип V обнаружен на поверхности клеток и в плаценте, где участвует в важных биологических процессах.

Структурные особенности представленных типов коллагена определяются строением их α -цепей. Эти цепи могут иметь разную длину и характер повторяющихся последовательностей Gly-X-Y. При этом позиции X и Y могут быть заняты различными аминокислотами, особенно часто – пролином и его производным гидроксипролином. В структуре молекулы коллагена выделяют центральную спиральную область и два неспиральных концевых участка [16, 81, 181, 225]. Тройная спиральная конформация, представленная на рисунке 1.1.1, является определяющим структурным элементом всех коллагенов.

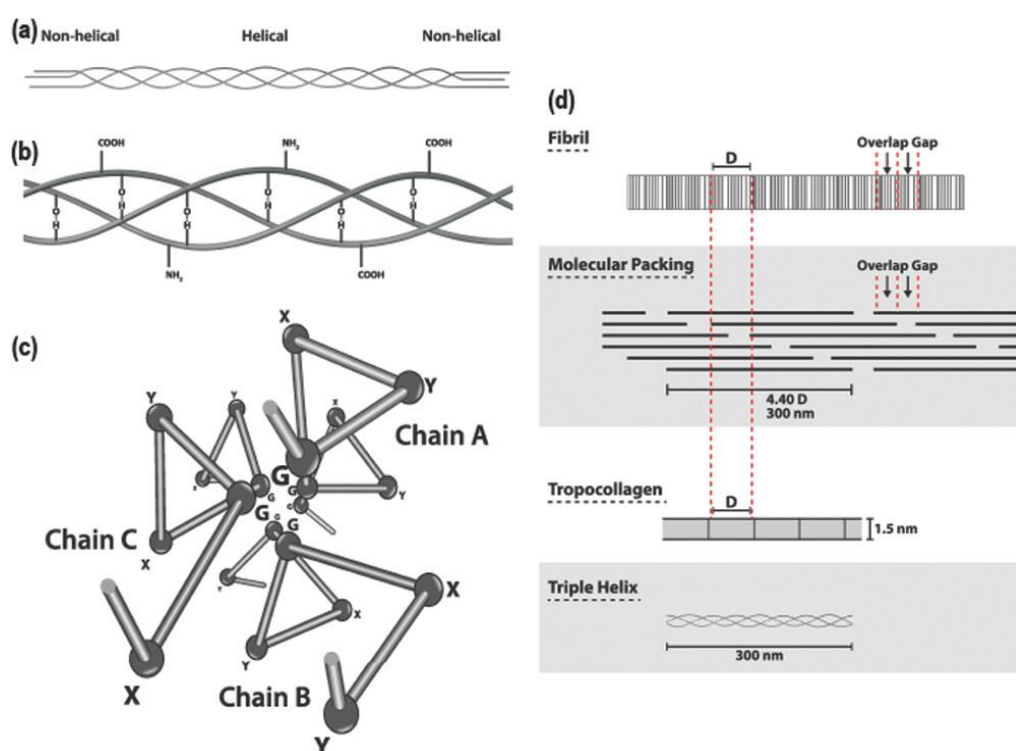


Рисунок 1.1.1 – Молекула коллагена: а – тройная спиральная структура коллагена; б – водородные связи внутри тройной спирали коллагена; с – поперечное сечение тройной спирали коллагена; д – схематическое изображение расположения молекул коллагена внутри фибрилл [225]

Коллаген классифицируется на фибриллярные и сетеобразующие коллагены, фибриллярно-ассоциированные коллагены с прерывистыми тройными спиралями, мембранно-ассоциированные коллагены с прерывистыми тройными

спиралями и множественные тройные спиральные домены, и прерывания [86, 156, 181]. Коллагеновые группы под микроскопом показаны на рисунке 1.1.2.

Коллаген в человеческом организме выполняет ключевую задачу по обеспечению структурной целостности тканей и органов, что особенно важно для паренхиматозных органов, где коллагены выступают основным компонентом интерстициального матрикса и базальных мембран. Помимо этого, коллагенам придается большее значение в соединительных тканях, таких как кости и хрящи, где они представляют собой главную функциональную основу.

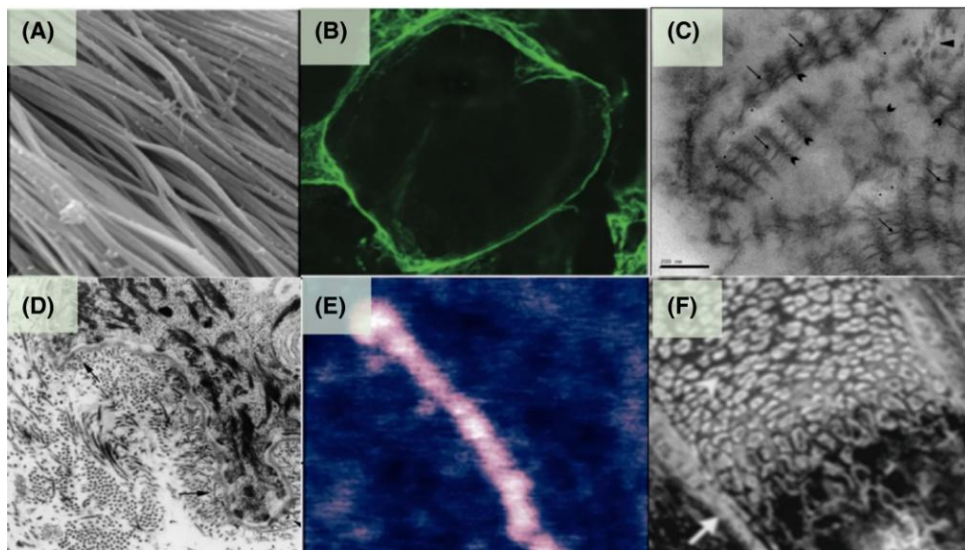


Рисунок 1.1.2 – Микроскопия наиболее распространенных групп коллагена: А – фибриллообразующий (коллаген типа I); В – базальная мембрана (коллаген типа IV); С – микрофибриллярный (коллаген типа VI); D – закрепляющие фибриллы (коллаген типа VI), E – FACIT (коллаген типа XIII); F – трансмембранный (коллаген типа XIII) [156]

Кроме того, создание уникальной перицеллюлярной микросреды является важным условием для поддержания клеточной целостности. Примером этого служит коллаген типа VI, обнаруживаемый в суставном хряще и предположительно в костной ткани. Однако их роль выходит за рамки исключительно биомеханической функции [88].

Коллагены активно участвуют и в других важных процессах. Через взаимодействие с особыми рецепторами, такими как интегрины, дискоидиновые

рецепторы, гликопротеин VI и специфические протеогликановые рецепторы, они способствуют передаче сигналов. Она регулирует клеточную адгезию и дифференцировку, рост, реактивность клеток и их выживание, что делает коллагены важным элементом, необходимым для полноценной работы организма. Коллагены имеют важнейшее значение для захвата, хранения и транспортировки факторов роста и цитокинов, что в свою очередь влияет на развитие органов, регенерацию тканей и процесс заживления ран. Например, было показано, что коллаген типа I взаимодействует с декорином. К тому же коллагены могут связывать и другие цитокины, и факторы роста. Их роль выходит за пределы формирования структуры внеклеточных матриц, т. к. они участвуют в более сложных биологических процессах. Неколлагеновые фрагменты, такие как коллагены IV, XV и XVIII, оказывают влияние на процессы ангиогенеза и опухолевого роста, а их биологическая активность может быть связана с более широким спектром клеточных реакций. Эти фрагменты (матрикриптины) вызывают большой интерес у специалистов в сфере фармацевтики, поскольку их потенциальное использование может быть весьма многообещающим.

Фибриллярный коллаген является основным и наиболее распространенным типом коллагена среди позвоночных, играя важную структурную роль. Он оказывает влияние на молекулярную структуру, форму и механические характеристики тканей [36, 107, 181, 209]. Всего выявлено около 28 типов коллагена, которые представлены в таблице 1.1.1.

Таблица 1.1.1 – Типы и молекулы коллагена

Тип	Молекулы	Местонахождение в органах животных
I	$\alpha 1(I)2\alpha 2(I), \alpha 1(I)3$	Повсеместно (в мягких и твердых тканях, коже, костях, роговице глаза, склере, стенке артерий и др.)
II	$\alpha 1(II)3 + \alpha 1(XI)\alpha 2(XI)\alpha 1(II), \alpha 1(XI)\alpha 2(V)\alpha 1(II)$	Гиалиновые и фиброзные хрящи, стекловидное тело, роговица
III	$\alpha 1(III)3$	Дерма кожи плода, стенки крупных кровеносных сосудов, ретикулярные волокна органов кроветворения
IV	$\alpha 1(IV)2\alpha 2(IV)$	Базальные мембраны, капсула хрусталика

Продолжение таблицы 1.1.1

Тип	Молекулы	Местонахождение в органах животных
V	$\alpha 1(V)2\alpha 2(V)$, $\alpha 1(V)\alpha 2(V)\alpha 3(V) + \alpha 1(XI)\alpha 2(XI)\alpha 1(II)$, $\alpha 1(XI)\alpha 2(V)\alpha 1(II)$	Мягкие ткани, плацента, сосуды, хорион
VI	$\alpha 1(VI)\alpha 2(VI)\alpha 3(VI)$	Микрофибриллы в мягких тканях и хрящах
VII	$\alpha 1(VII)3$	Якорные фибриллы в связке кожи и эпидермиса
VIII	$\alpha 1(VIII)\alpha 2(VIII)$	Роговица, эндотелий
IX	$\alpha 1(IX)\alpha 2(IX)\alpha 3(IX)$	Хрящи, стекловидное тело
X	$\alpha 1(X)3$	Гипертрофическая зона области роста
XI	$\alpha 1(XI)\alpha 2(XI)\alpha 1(II)$, $\alpha 1(XI)\alpha 2(V)\alpha 1(II)$	Хрящи, стекловидное тело
XII	$\alpha 1(XII)3$	Мягкие ткани
XIII	$\alpha 1(XIII)3$	Поверхность клеток, эпителиальные клетки
XIV	$\alpha 1(XIV)3$	Мягкие ткани
XV	$\alpha 1(XV)3$	Эндотелиальные клетки
XVI	$\alpha 1(XVI)3$	Повсеместно
XVII	$\alpha 1(XVII)3$	Поверхность эпидермальных клеток
XVIII	$\alpha 1(XVIII)3$	Эндотелиальные клетки
XIX	$\alpha 1(XIX)3$	Повсеместно
XX	$\alpha 1(XX)3$	Выделен из куриного эмбриона
XXI	$\alpha 1(XXI)3$	Кровеносные сосуды
XXII	$\alpha 1(XXII)3$	В местах мышечно-сухожильных соединений
XXIII	$\alpha 1(XXIII)3$	Опухолевые клетки
XXIV	$\alpha 1(XXIV)3$	Формирующиеся кости
XXV	$\alpha 1(XXV)3$	Атеросклеротические бляшки
XXVI	$\alpha 1(XXVI)3$	Половые органы
XXVII	$\alpha 1(XXVII)3$	Мягкие ткани
XXVIII	$\alpha 1(XXVIII)3$	Нервная система

Фибрилл-ассоциированные коллагены с прерванными тройными спиралями не формируют фибриллы самостоятельно, но взаимодействуют с поверхностью коллагеновых фибрилл. Тройная спираль фибрилл-ассоциированных коллагенов прерывается неколлагеновыми доменами, которые могут выполнять роль связующих элементов. Семейство нефибриллярных коллагенов включает типы XV и XVIII. Они являются компонентами базальных мембран, при этом коллаген XV присутствует в скелетных и сердечных мышцах, а коллаген XVIII – в печени. Мембрано-ассоциированные коллагены характеризуются многочисленными прерываниями в тройной спирали, не образуют фибриллы и играют важную роль

в клеточной адгезии и передаче сигналов. Другие типы коллагенов встречаются в очень низких концентрациях и локализуются в определенных органах [3, 57, 181].

Гидролизаты коллагена обладают целым рядом функциональных характеристик, которые делают их ценными для различных отраслей. Одним из основных преимуществ гидролизатов коллагена принято считать их высокую растворимость в воде. В процессе гидролиза молекулы коллагена распадаются на более мелкие пептиды с низкой молекулярной массой, что значительно улучшает их растворимость в сравнении с нерасщепленным коллагеном. Данное свойство позволяет применять гидролизаты коллагена в жидких продуктах: напитки, растворы, косметические эмульсии и фармацевтические препараты. Молекулы лекарственных средств, а также коллагеновые пептиды могут проникать в кожу тремя потенциальными путями, что представлено на рисунке 1.1.3.

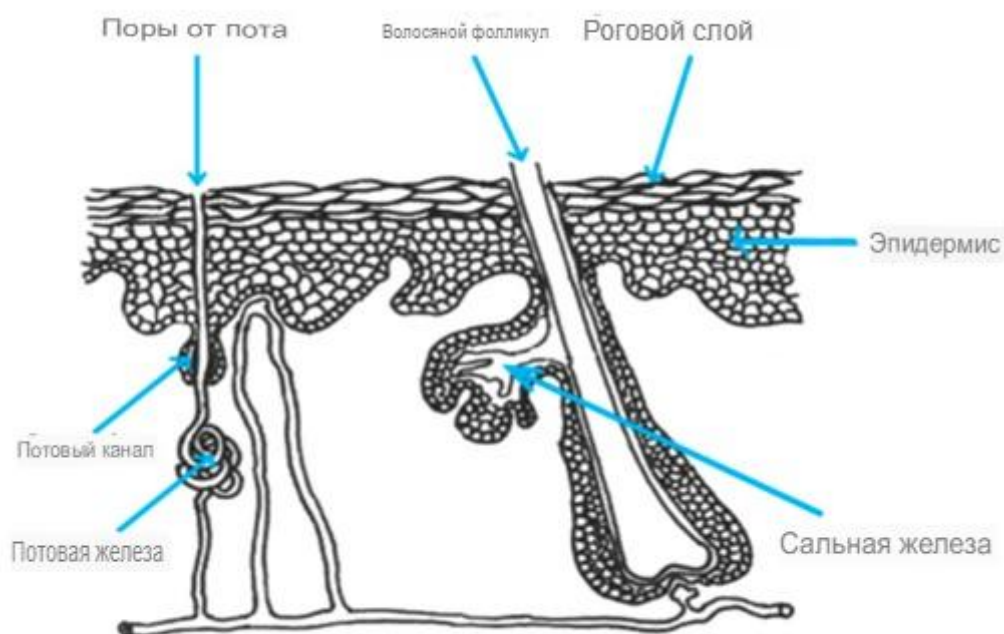
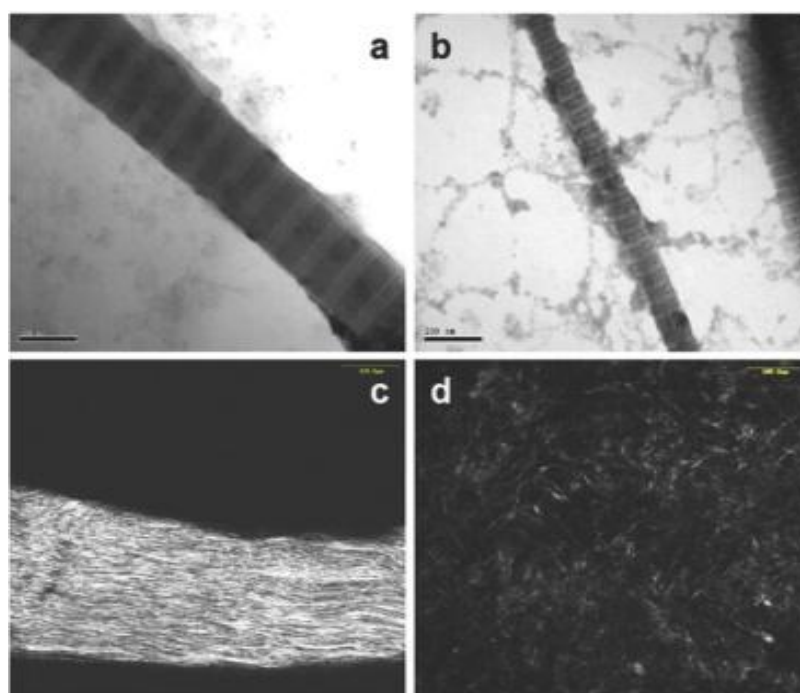


Рисунок 1.1.3 – Схематическое изображение трех путей проникновения пептидов в ткани кожи [110]

Стоит отметить, что высокая растворимость в воде также способствует улучшению биодоступности пептидов, что делает их более усвояемыми для организма.

Молекулы коллагена самоорганизуются на наноуровне, образуя надмолекулярные структуры (фибриллы, а затем – волокна) в микронном диапазоне, которые видны с помощью различных микроскопических методов, что представлено на рисунке 1.1.4. Ученые [110] проводили исследования рентгеновской дифракции в сочетании с анализом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) для оценки кристаллического порядка коллагеновых тканей. Научные достижения в области ПЭМ и обработке изображений позволили реконструировать трехмерные изображения из серии ультратонких срезов для определения коллагеновых структур в ткани и соотношения их пространственного отношения и клеток, синтезирующих их.



Примечание: а и b демонстрируют D-периодичность / четверть-смещенную сборку молекул коллагена; сигналы SHG у образца с выражены сильнее, чем у d.

Рисунок 1.1.4 – Анализы сухожилия крысиного хвоста (а) и самоорганизованных коллагеновых каркасов (b): c, d – сигналы SHG сухожилия крысиного хвоста и самоорганизованных коллагеновых гидрогелей соответственно [110]

Наблюдение поперечной исчерченности является явным индикатором регулярной самосборки, нативного состояния и минимальной денатурации. Однако следует отметить, что отсутствие поперечной исчерченности не означает отсутствия коллагенов, а лишь констатирует отсутствие фибриллярных коллагенов. В кристаллографических терминах тройная спираль коллагена может быть описана как нецентросимметричная структура, которая после образования в волокна более высокого порядка обеспечивает упорядоченную нелинейную среду с длиной поперечного сечения, сравнимой с длиной волны ближнего инфракрасного диапазона. Эта особая физическая особенность коллагеновых волокон позволяет наблюдать оптические вторые гармоники (синусоидальные волны, суммирующиеся с фундаментальной волной) в многофотонной микроскопии [35].

Таким образом, коллаген является важнейшим структурным белком, играющим ключевую роль в обеспечении механической прочности и упругости тканей благодаря своей уникальной тройной спиральной структуре, которая, соответственно, поддерживает стабильность и прочность молекулы. Развитие технологий, таких как электронная микроскопия и рентгеновская дифракция, позволяет глубже исследовать коллагеновые структуры на молекулярном уровне, открывая новые перспективы для их использования в регенеративной медицине и других высокотехнологичных отраслях.

1.2 Современное состояние рынка гидролизатов и перспективы применения гидролизатов коллагена в медицине, косметологии и пищевой промышленности

Гидролизат коллагена представляет собой набор пептидов с низкой молекулярной массой, образующихся под воздействием ферментов в кислой или щелочной среде при определенной температуре инкубации. Основным источником

гидролизованного коллагена чаще всего служат переработанные материалы крупного рогатого скота и свиней. Свойства гидролизатов коллагена, включая молекулярную массу пептидных цепей, растворимость и функциональную активность, зависят главным образом от типа и источника их получения.

В настоящее время гидролизаты коллагена находят применение в различных областях: пищевой (производство спортивного питания, пищевых добавок, хлебопечение, мясная промышленность), сельскохозяйственной, косметической (многие продукты регулярного ухода за кожей) промышленности, производстве лекарственных препаратов и др. Согласно расчетам аналитиков DISCOVERY Research Group, в 2020 г. объем рынка гидролизатов в России составил 247,1 т.

Рынок гидролизатов белка в Российской Федерации состоит из трех сегментов, которые были сформированы по происхождению этого вещества – мясной, молочный, растительный. В стоимостном выражении доля гидролизатов растительного белка в 2020 г. составила 52,4 %. Кроме этого, рынок гидролизатов белка в России состоит из категорий, которые были сформированы по назначению (применению) продукта: пищевая промышленность, изготовление кормов для сельскохозяйственных животных, косметическая промышленность, сельское хозяйство и лабораторные реагенты. Наибольшую долю рынка гидролизатов белка в натуральном выражении занимает белковый гидролизат для производства кормов для сельскохозяйственных животных [44, 90].

Таблица 1.2.1 – Состояние российского рынка гидролизатов коллагена

Год	Объем производства, т	Стоимость, тыс. руб/т	Потребление по отраслям	Основные производители	Тенденции спроса
2020	1000	100	Пищевая промышленность, косметика	Калуга, СФО	Рост спроса на добавки для суставов и кожи
2021	1200	105	Пищевая промышленность, спортивное питание	Москва, Казань	Рост популярности коллагеновых добавок в спорте

Продолжение таблицы 1.2.1

Год	Объем производства, т	Стоимость, тыс. руб/т	Потребление по отраслям	Основные производители	Тенденции спроса
2022	1400	110	Спортивное питание, косметика, медицинские добавки	Краснодар, Урал	Увеличение спроса на медицинские добавки и антивозрастные продукты
2023	1600	115	Спортивное питание, пищевая промышленность, косметика	Екатеринбург, Санкт-Петербург	Усиление интереса к функциональным добавкам

В 2020–2023 гг. российский рынок гидролизатов коллагена продемонстрировал положительную динамику: объем производства вырос с 1000 т в 2020 г. до 1600 т в 2023 г. Это связано с увеличением спроса на гидролизаты в таких отраслях, как пищевая промышленность, косметика и спортивное питание, особенно с учетом потребности в биологически активных добавках (БАД) для суставов и кожи. Вместе с этим повысились и цены на продукцию из-за роста затрат на производство и улучшения качества продукции.

Большая часть гидролизатов коллагена, импортируемых в Россию, – это гидролизаты куриного белка, которые применяются в пищевой промышленности.

Процесс потери коллагена в организме человека начинается в 18–29 лет, и с возрастом эта утрата ускоряется, особенно после 40 лет, когда ежегодное сокращение коллагена в организме обычно составляет около 1 %. К 80 годам уровень выработки коллагена может снизиться на 75 % по сравнению с его количеством в молодости. На его потерю влияют свободные радикалы, несбалансированное питание, курение, злоупотребление алкоголем и различные заболевания. Коллаген играет критически важную роль в организме, т. к. способствует нормальному развитию органов, заживлению ран, восстановлению тканей, поддержанию здоровья роговицы, десен и кожи, а также участвует

в восстановлении костей и сосудов. В роговице коллаген придает тканям как механические, так и оптические свойства. Кроме того, он важен для клеточных процессов деления, выживания и дифференциации клеток. Именно это служит причиной, по которой коллаген содержится в таких тканях, как кости, сухожилия, связки, волосы, кожа и мышцы [43, 148].

Кожа – крупнейший орган человеческого тела, состоящий в основном из коллагеновых и эластичных волокон и гиалуроновой кислоты. Данный орган выполняет защитную роль, предотвращая внешние повреждения, регулирует температуру тела и участвует в других процессах жизнедеятельности организма [47, 83, 175, 233]. В процессе старения организма кожа подвергается морфологическим, структурным и функциональным изменениям, в том числе уменьшению коллагеновых волокон и образованию линий и морщин из-за воздействия эластина. Вопрос замедления старения кожи является одной из главных проблем косметической промышленности. Именно поэтому гидролизированный коллаген стал востребованным решением для смягчения проявлений данного биологического процесса [56, 128, 157, 239].

Гидролизаты коллагена из чешуи молочной рыбы (*Chanos*) продемонстрировали высокую способность удерживать воду, поглощать и удерживать влагу, способность противостоять старению кожи, а также антимеланогенные свойства, которые способствуют ее осветлению. Это подтвердило довод о том, что указанные гидролизаты представляют собой потенциальный активный ингредиент в средствах по уходу за кожей [121].

Гидролизированный коллаген действует в дерме, соединительнотканном слое кожи, находящемся между эпидермисом и жировой клетчаткой в двух различных формах. В первой форме свободные аминокислоты обеспечивают строительные блоки для образования волокон коллагена и эластина. Во второй – олигопептиды коллагена действуют как лиганды, связываясь с рецепторами на мембране фибробластов и стимулируя выработку нового коллагена, эластина и гиалуроновой кислоты.

В последние годы пероральный прием БАД с коллагеном стал популярным, поскольку данные добавки все чаще рекламируются потребителям как средство против старения и улучшения физиологии и внешнего вида кожи, которое повышает ее увлажненность, эластичность, упругость, уменьшает морщины и омолаживает [114, 167].

Исследования, проведенные *in vivo* среди женщин в возрасте 40–60 лет, которые принимали гидролизаты коллагена перорально в течение 12 недель, показали заметные улучшения в гидратации кожи, повышение ее эластичности и уменьшение морщин. Также было выявлено, что при приеме гидролизата коллагена в качестве пищевой добавки у женщин в возрасте 35–65 лет наблюдаются улучшения толщины дермы, упругости и эластичности кожи после 3 мес. лечения. В другом исследовании, в котором участвовали 120 человек, ежедневное потребление нутрицевтиков с рыбным гидролизатом коллагена в течение 90 дней привело к улучшению текстуры и эластичности кожи, а также оказало положительное влияние на здоровье суставов [37]. Помимо этого, пероральный прием гидролизатов коллагена женщинами в возрасте 40–59 лет продемонстрировал значительное улучшение гидратации кожи и плотности коллагеновых волокон в дерме. Однако, несмотря на это, фрагментация дермальной коллагеновой сети значительно уменьшилась уже через 4 недели, а перечисленные эффекты сохранялись на протяжении 12 недель.

Эхогенность дермы обусловлена наличием коллагеновых и эластических волокон. Сосуды в дерме и эпидермисе на неизмененных участках кожи не визуализируются, что объясняется их малым диаметром и низкой скоростью кровотока. С возрастом эхогенность дермы возрастает. Исследование 60 здоровых женщин в возрасте 40–50 лет после 28 дней перорального приема показало, что это повлияло на эластичность кожи и оказало более выраженное влияние на эхогенность дермы, уменьшив поры кожи и улучшив ее увлажнение, текстуру, эластичность, упругость. Продукт пероральной добавки состоял из гидролизованного коллагена со смесью витаминов А, С, Е и цинка [48]. Гидролизат коллагена из чешуи рыбы тиногии (*Oreochromis mosambicus*) в форме

20 мл напитка (Nitta Gelatin Inc®, Индия) употреблялся здоровыми женщинами в возрасте 30–60 лет в течение 12 недель, по истечении этого времени результатом стало повышение влажности кожи лица [177]. Питательные ампулы гидролизата коллагена с фруктовым экстрактом, витаминами С, Е, цинком и биотином ELASTEN® предоставлялись 36 здоровым женщинам в возрасте 35 лет и старше в течение 12 недель, и их кожа проявила более высокую степень увлажненности, эластичности, гладкости и плотности.

Как уже было отмечено, гидролизат коллагена обладает рядом биологически активных свойств, что делает его перспективным для применения в косметологии, фармацевтике и клинической практике. Основными и наиболее широко распространенными видами коллагена являются типы I, II и III, которые формируют структурные фибриллы тканей. В то же время другие типы коллагена участвуют исключительно в связывании этих фибрилл с иными элементами, из-за чего им не нашли применения в косметологических продуктах.

Фибриллярный коллаген, в частности тип I, считается наиболее предпочтительным в косметической индустрии благодаря своей высокой совместимости с человеческим организмом, что делает его «золотым стандартом». В тканевой инженерии биоматериалы часто разрабатываются на основе фибриллярных коллагенов, таких как типы I, II, III, V и XI. Коллаген типа I также активно используется в производстве косметических средств, стоматологических композитов, шаблонов для восстановления кожи, биоразлагаемых матриц и покрытий для офтальмологии. Помимо косметической области, коллаген нашел применение и в других направлениях, например как твердый микроноситель в процессах производства ферментов [91].

Одним из примеров гидролизатов коллагена (тип I) является гидролизат, полученный из гидробионтов, который выделяется как функциональный компонент, что обусловлено низкой стоимостью его источников и отсутствием риска заражения губчатой энцефалопатией крупного рогатого скота. В медицинской практике гидролизаты коллагена из гидробионтов широко используются для создания

искусственных кожных трансплантатов, повязок для заживления ран и нервных проводников благодаря его минимальной иммуногенности [33].

В косметической сфере гидролизат коллагена из гидробионтов и продуктов их переработки применяется для разработки увлажняющих кремов и гелей [54]. Его свойства также находят применение и в продуктах с омолаживающим, противоморщинным действием, средствах для защиты от ультрафиолетового излучения и ускорения заживления ран. Включение морского коллагена в состав косметических рецептур объясняется его способностью формировать защитную пленку: при нанесении он покрывает поверхность кожи, снижая трансэпидермальную потерю воды и обеспечивая защиту от агрессивных внешних факторов.

Коллаген, полученный из продуктов переработки крупного рогатого скота, по-прежнему является широко используемым источником для экстракции и синтеза продуктов на основе коллагена, несмотря на риск развития губчатой энцефалопатии. Продукты переработки свинины – еще один наиболее часто используемый источник для экстракции коллагена и связанных с ним продуктов. Предполагается, что сегмент гидролизатов коллагена из гидробионтов будет демонстрировать наиболее динамичный рост и выйдет на лидирующие позиции по темпам увеличения объемов производства.

Максимально эффективное использование побочных продуктов переработки рыбы подразумевает извлечение из них пептидазы, а также получение из рыбьей кожи желатина [62]. Кроме того, протеаза, выделенная из побочных продуктов рыбы, может быть экономически выгодной, т. к. представляет собой более доступную альтернативу применения в качестве пищевых ферментов. В исследовании S. Ketnawa и соавторов [227] приводятся результаты получения гидролизатов желатинового белка из кожи гигантского сома путем гидролиза пептидазой внутренних органов рыбы и рассматриваются их преимущества по сравнению с коммерческим трипсином поджелудочной железы быка. Помимо этого, определены биоактивности, включая ингибирующий ангиотензинпревращающий фермент и антиоксидантную активность полученного

гидролизата желатина. Также была исследована стабильность гидролизата при различных значениях pH и температурах и после переваривания в модельной системе желудочно-кишечного тракта.

Гидролизаты коллагена из свиной шкурки (ГКСШ) могут проявлять антиоксидантную и антимикробную активность, поэтому их тоже можно использовать в качестве функционального ингредиента в пищевых добавках. Данные гидролизаты обладают способностью присоединять ионы кальция, улучшая его биодоступность, что позволяет применять их в качестве функциональных пищевых ингредиентов для лечения дефицита минералов. В исследовании *Streptococcus thermophiles* в присутствии антифризных пептидов (1 мг/мл при pH 9,0) подвергались высушиванию. Антифризные пептиды – такой тип полипептидов, которые защищают биологические организмы от повреждений при замерзании, подавляя рост кристаллов льда. Когда *S. thermophiles* высушивали вместе с 1 мг/мл антифризных пептидов, выживал 71 % клеток организма. Внутриклеточные белки, нуклеиновая кислота и ключевые ферментативные активности были определены для выяснения возможного механизма действия, и результаты показали, что внутриклеточные белки и нуклеиновая кислота были более стабильны в группе, обработанной антифризными пептидами, чем в группах, обработанных сахарами и обезжиренным молоком в качестве криопротекторов [241].

Гидролизат коллагена обладает антикоагуляционными свойствами, поскольку он способствует уменьшению повреждения клеток и тканей, вызванного низкими температурами. В связи с этим он может быть функциональным ингредиентом в продуктах, которые требуют хранения при низких или отрицательных температурах [241]. Гидролизаты коллагена также могут способствовать улучшению структуры мясных продуктов, напитков и модифицировать их химические и физические свойства. Благодаря исследованиям [241] при сканирующей электронной микроскопии было установлено, что клетки необработанной группы имели неровную клеточную поверхность и сжимающуюся вогнутость. Все клетки слипались без четких границ. Изображения сканирующей электронной микроскопии представлены на рисунке 1.2.1.

Гидролизированный коллаген может использоваться при производстве обработанных пищевых продуктов (например, колбаса), для замены свиного жира на уровне замены 50 %. Конечные продукты имели большую влагоудерживающую способность, лучшую стабильность после приготовления и улучшенную текстуру [227]. Использование рыбного гидролизата коллагена в мясных продуктах, таких как котлеты, приводит к более высокому содержанию белка, более низкому содержанию жира и органолептическим улучшениям [63, 163].

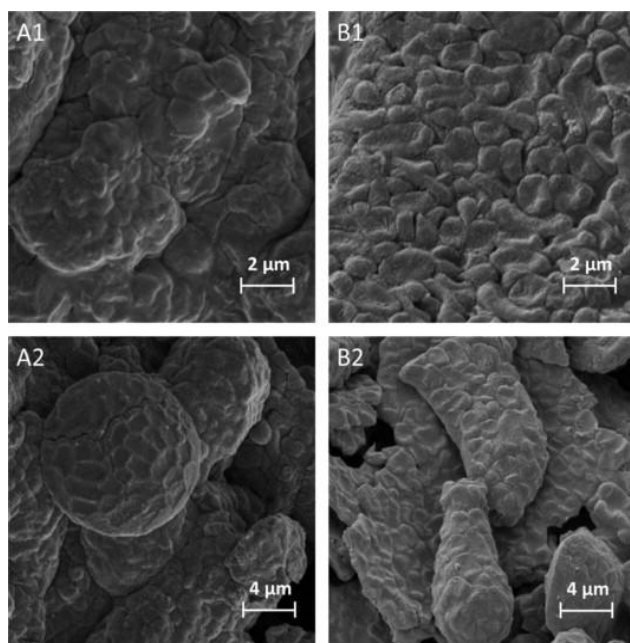


Рисунок 1.2.1 – Снимки сканирующей электронной микроскопии лиофилизированных *S. Thermophiles*: A1 – необработанные клетки при 20000-кратном увеличении; A2 – необработанные клетки при 10000-кратном увеличении; B1 – обработанные клетки при 20000-кратном увеличении; B2 – обработанные клетки при 10000-кратном увеличении [243]

Гидролизат коллагена, выработанный из рыбного сырья, широко используется при производстве напитков на основе фруктового сока с целью улучшения их питательных и функциональных свойств, а также повышает содержание белка и биодоступность продукта [108]. Результаты исследования авторов [108] представлены в таблице 1.2.2.

Таблица 1.2.2 – Биодоступность коллагена *in vitro* в пастеризованных фруктовых соках, содержащих гидролизированный коллаген

Вид фруктового сока	Коллаген, %	<i>in vitro</i> , %	Биодоступность, %
Апельсин	2,27 ± 0,08	2,08 ± 0,10	95,37 ± 2,13
Апельсин + Виноград	2,07 ± 0,07	1,86 ± 0,04	83,38 ± 0,57
Яблоко	2,05 ± 0,05	1,86 ± 0,05	90,71 ± 0,22
Яблоко+Виноград	2,19 ± 0,14	1,89 ± 0,10	86,34 ± 1,05

К наиболее изученным эффектам применения гидролизатов коллагена относится оказываемое ими влияние на состояние суставов. Коллаген, а именно коллаген типа II, является основным компонентом хрящевой ткани, и его потеря может привести к различным заболеваниям суставов (например, остеоартрит). Исследования И.Ю. Фролова доказывают, что пероральное употребление гидролизатов коллагена может ускорять восстановление хрящевой ткани и улучшать ее эластичность. В одном из клинических исследований, проводившихся с участием пациентов с остеоартритом, было показано, что использование коллагеновых пептидов значительно уменьшает болевые ощущения и повышает функциональную активность суставов.

Механизм действия указанного эффекта заключается в том, что гидролизаты коллагена способствуют синтезу хондроитина и глюкозамина, двух важных компонентов хрящевой ткани, что в итоге стимулирует восстановление поврежденных суставов. Также эти компоненты могут уменьшать воспаление в суставах, регулируя активность протеолитических ферментов и снижая уровень воспалительных цитокинов, таких как интерлейкин-1, и факторы некроза опухоли.

Не менее важным эффектом использования гидролизатов коллагена является их влияние на состояние кожи. С возрастом продукция коллагена в дерме уменьшается, что приводит к снижению упругости и эластичности кожи и появлению морщин. Применение гидролизатов коллагена способствует

улучшению гидратации данного органа, стимуляции синтеза коллагена и эластина, что улучшает структуру и внешний вид кожи.

Механизм действия гидролизатов коллагена в этом случае заключается в их способности проникать в кожу и взаимодействовать с фибробластами, которые синтезируют коллагеновые волокна. По данным ряда исследований, употребление гидролизатов коллагена в виде добавок приводит к значительному улучшению текстуры кожи, уменьшению глубины морщин и повышению ее упругости. Одним из механизмов, с помощью которого гидролизаты коллагена влияют на кожу, является активация синтеза гиалуроновой кислоты, выполняющей ключевую роль в поддержании уровня гидратации.

Гидролизаты коллагена также оказывают благоприятное воздействие на состояние костей. Коллаген – основной белок внеклеточного матрикса костной ткани, и его потеря может привести к ослаблению костей и повышенному риску переломов. Изучения в этой области показывают, что гидролизаты коллагена, потребляемые в виде добавок, могут улучшать плотность костной ткани и снижать риск остеопороза. Они стимулируют активность остеобластов (клеток, участвующих в формировании кости) и уменьшают активность остеокластов (клеток, разрушающих костную ткань) [92].

Благодаря клиническим исследованиям было установлено, что гидролизаты коллагена могут способствовать увеличению минеральной плотности костей у людей, страдающих остеопорозом, и повышать прочность костей у пожилых людей.

Гидролизаты коллагена обладают также противовоспалительными и антиоксидантными свойствами. В организме человека свободные радикалы и воспалительные процессы в первую очередь вызывают старение тканей и развитие многих хронических заболеваний. Коллагеновые пептиды, в частности те, которые получены из рыбьего коллагена, обладают высокими антиоксидантными свойствами, нейтрализующими избыточное количество свободных радикалов [53].

Кроме того, коллаген может регулировать воспалительные реакции в организме, снижая уровень цитокинов (например, интерлейкин-6), которые приводят к воспалению и развитию хронических заболеваний, в том числе к артриту. Таким образом, гидролизаты коллагена могут снижать воспаление в суставах, коже и других тканях, что особенно важно для лечения таких заболеваний, как остеоартрит и псориаз [115].

Гидролизаты коллагена имеют огромный потенциал использования в различных отраслях медицины и фармацевтики. Например, в тканевой инженерии их можно использовать для лечения различных заболеваний при создании искусственных тканей и органических структур. Биоматериалы на основе коллагена также применяют для создания регенеративных и репаративных препаратов, которые стимулируют восстановление поврежденных тканей и органов. Кроме того, гидролизаты коллагена имеют большое значение в косметологии (создание антивозрастных препаратов и средств по уходу за кожей). Технология получения гидролизатов коллагена позволяет разрабатывать высокоэффективные косметические средства, которые улучшают состояние кожи, волос и ногтей.

Помимо этого, гидролизаты коллагена активно используются в спортивном питании и восстановлении после интенсивных физических нагрузок или травм (например, мышечных тканей, суставов и связок), снижая тем самым время реабилитации.

1.3 Основные источники сырья для производства гидролизатов

Существуют два основных источника получения коллагена - животное сырье и гидробионты. В животноводстве наиболее часто коллаген извлекают из тканей свиней и крупного рогатого скота. Коллаген из КРС особенно ценен благодаря широкому спектру применения, обусловленному его функциональными свойствами и высокой биосовместимостью. Его часто используют для временных

повязок при лечении внешних ран и ожогов [34, 68]. Что касается свиного коллагена, он нашел свое применение в трансплантологии мягких тканей как биосовместимый хирургический материал, способный заменить аутоотрансплантаты. Получить коллаген можно из разных тканей, таких как кости, сухожилия, легочная и даже соединительная ткань [60, 145, 204]. Кроме того, этот коллаген также извлекается из бычьего ахиллова сухожилия с применением алкалазы, пепсина, трипсина и коллагеназы, которая вырабатывается *Penicillium aurantiogriseum*. Такой гидролизат проявляет антиоксидантную, антигипертензивную и антимикробную активность. Стоит отметить, что гидролизат коллагена, извлеченный из бычьих легких, продемонстрировал выраженную противовоспалительную и антиоксидантную активность [201].

Другие источники коллагена, например сельскохозяйственная птица, лошадиные сухожилия, овчина, могут иметь другие свойства и типы коллагена. Из лошадиных тканей (кожи, хрящей и сгибателей) получают типы I и II, в то время как куриная шея является источником типов I, II, III и V. Куриный эмбрион, а именно его грудной хрящ, используется для получения коллагена типа IX, а кожа эмбриона – для типов I и III. Особого внимания заслуживает коллаген, получаемый из гидробионтов (водных организмов), который имеет существенные преимущества: он безопасен с точки зрения передачи заболеваний и экономически выгоден в производстве, поскольку извлекается из частей, обычно считающихся пищевыми отходами [60, 145, 178, 199, 204].

Не менее распространенным источником коллагена являются свиные субпродукты, имеющие большое сходство с коллагеном человека. Данный вид коллагена не вызывает аллергических реакций, поскольку он широко используется для укрепления сухожилий, заживления кожи и ран в качестве материала для пластической и реконструктивной хирургии. Свиная кожа – один из традиционных источников получения гидролизатов коллагена. Из этого сырья можно извлечь гидролизат с молекулярной массой в пределах 1–10 кДа. Экстракция гидролизатов обычно проводится с использованием гидротермального метода и последующего фракционирования через ультрафильтрационные мембраны. Такой гидролизат

демонстрирует антиоксидантные и антивозрастные свойства, улучшает проницаемость кожи и обладает ингибиторной активностью в отношении ангиотензин-I-превращающего фермента. Гидролизат, получаемый из свиной шкурки, также содержит функциональные пептиды, которые широко применяются в пищевых добавках. Для извлечения данного гидролизата используются технологии обработки с применением высоких температур (150–250 °C) и давления (350–3900 кПа). Эти условия способствуют получению пептидов с молекулярной массой ниже 15 кДа [125].

Извлечение гидролизатов коллагена из традиционных источников, таких как свинина и мясо крупного рогатого скота, имеет ряд потенциальных опасностей и ограничений. Это связано не только с рисками для здоровья (свиной грипп и губчатая энцефалопатия крупного рогатого скота [192]), но и с религиозными запретами. В связи с этим исследователи начали искать альтернативные источники для получения коллагеновых гидролизатов.

Одним из таких альтернативных источников являются морские организмы, например рыба и другие морские беспозвоночные (медузы и губки). Так, гидролизат коллагена, извлеченный из вида *Prionace glauca* с использованием фермента алкалазы, показал пептиды с молекулярной массой ниже 20 кДа и подтвердил наличие нутрицевтических эффектов [144, 181, 216].

Кроме этого, чешуя тиногии (*Oreochromis niloticus*) используется для получения высококачественного коллагенового гидролизата с низкой молекулярной массой [119]. Из отходов рыб *rasci* и *rohu* с применением коллагеназы типа I из *Clostridium* были получены гидролизаты с молекулярной массой около 5 кДа. Эти гидролизаты обладают ингибирующими свойствами в отношении перекиси водорода в липидных пищевых системах и цитопротекторной активностью в клеточных культурах [133]. Внутренности рыбы также являются альтернативным источником для экстракции гидролизатов коллагена с функциональными биоактивными свойствами [181, 240].

Важно уточнить, что изменение параметров экстракции, таких как температура (150–300 °C), давление (5–10 МПа) и время реакции (5 мин),

позволяет извлечь гидролизаты коллагена с низкой молекулярной массой (< 600 Да) из кожи тунца, которые обладают антиоксидантной и антимикробной активностью [101].

Гидролизаты коллагена, полученные из морских источников, например белка трески (*Gadus morhua*), минтая и хрящей гладкой гончей без пятен, обладают низкой молекулярной массой (3–5 кДа) и проявляют антиоксидантную активность [187, 229]. Эти гидролизаты открывают новые возможности для использования в различных отраслях, в том числе пищевой и фармацевтической промышленности.

Мелкая рыба не соответствует критериям качества и ее нельзя применять в промышленных процессах, поэтому она обычно либо утилизируется из рыбного промысла, либо продается как малоценный продукт. Эта рыба содержит ценные белки и незаменимые аминокислоты. Следовательно, гидролиз рыбного белка – одна из стратегий получения экономической выгоды при рассмотрении отходов рыбопереработки в ценную продукцию с улучшением качества и количества. Гидролизат рыбного белка представляет собой продукт реакции гидролиза на пептидные связи в белках, приводящей к более коротким пептидам или аминокислотам, которые легко усваиваются животными [161, 180, 181, 246].

Помимо этого, есть и другие альтернативные источники, демонстрирующие отличные функциональные характеристики. Например, гидролизаты, извлеченные из куриных ножек с использованием ферментативного воздействия протеазами, а также из кожи *Rana chensinensis* с применением кислотного гидролиза, имеют высокую растворимость, антиоксидантную активность и способность ингибировать ангиотензинпревращающий фермент [256].

Интересные результаты были получены при обработке куриных ножек ферментом папаином при различных температурах (4, 30 и 56 °C) и времени экстракции (20, 24 и 28 ч). Полученные гидролизаты проявляют способность удерживать воду и масло, обладают эмульгирующими и пенообразующими свойствами [136].

Для извлечения коллагена часто применяются кислотная и щелочная обработки [219]. Кислотная экстракция обычно используется для получения коллагена типа I из тканей свиной или рыбьей кожи. В этом процессе наиболее часто применяется уксусная кислота, которая влияет на растворимость и экстракционную способность, а ее концентрация определяет pH, изменяя электростатическое взаимодействие и структуру молекулы. Это в свою очередь влияет на эффективность извлечения коллагена из тканей [79].

Эффективность экстракции может быть значительно улучшена при сочетании кислотной обработки с ферментативной. Для этого используется пепсин. Этот фермент воздействует на телопептидную область коллагеновой молекулы, улучшая ее растворимость в кислой среде [213]. Электрофоретическая картина коллагена сухожилий крупного рогатого скота представлена на рисунке 1.3.1.

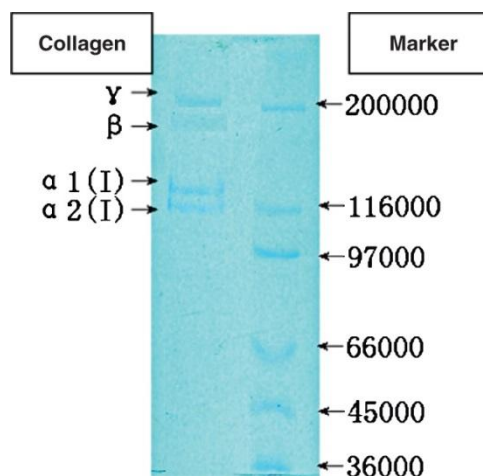


Рисунок 1.3.1 – Результаты электрофореза в полиакриламидном геле коллагена сухожилий крупного рогатого скота, полученного с помощью ультразвуковой обработки и обработки пепсином [213]

Ультразвуковая экстракция является перспективным методом исследования, который не разрушает молекулы коллагена и облегчает действия ферментов. Этот метод можно эффективно применять для различных типов тканей, таких как кожа рыб и сухожилия крупного рогатого скота, что позволяет значительно ускорить

процесс экстракции и повысить концентрацию коллагена [213]. Визуальное представление преобразования нативного коллагена в гидролизат представлено на рисунке 1.3.2.

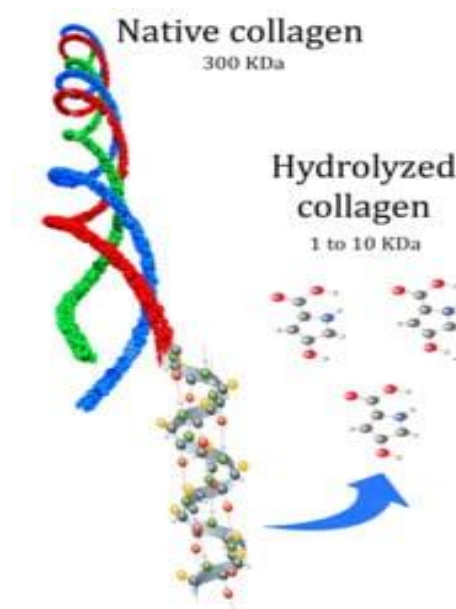


Рисунок 1.3.2 – Преобразование нативного коллагена в гидролизат [213]

Свойства гидролизованного коллагена существенно отличаются от свойств его нативной формы. После денатурации коллагена, которая происходит в процессе гидролиза, структура его тройной спирали изменяется на случайную спиральную форму. Это происходит вследствие диссоциации водородных связей, что приводит к разрушению полипептидных цепей и образованию множества пептидов. В результате гидролиза молекулярная масса коллагеновых пептидов значительно снижается и составляет всего 3–6 кДа, в отличие от молекулярной массы нативного коллагена, которая колеблется в пределах 285–300 кДа. Этот процесс не только изменяет размер пептидов, но и оказывает влияние на их физико-химические и биологические характеристики [255].

Вязкость является одним из физических свойств коллагена. Нативный (неденатурированный) коллаген демонстрирует высокие показатели вязкости, что связано с сильным электростатическим отталкиванием между молекулярными цепями даже при низких концентрациях раствора. Гидролизированный же коллаген

благодаря более низкой молекулярной массе пептидов имеет значительно меньшую вязкость, независимо от концентрации раствора. Данный вывод был сделан в работе [228], где исследовали мясо и кожу нетопыря в сравнении с мясом и кожей крупного рогатого скота.

Коллаген обладает амфотерными свойствами, что означает наличие как кислотных, так и основных амино-групп в его молекуле. Это определяет его изоэлектрическую точку (pI), которая для нативного коллагена находится в пределах 7–8. В процессе гидролиза это значение становится меньше, варьируясь между 3,68 и 5,7, на что влияют аминокислотные последовательности и распределение аминокислотных остатков в зависимости от типа или времени воздействия гидролиза [95].

Кроме того, состав и степень гидролиза коллагена играют важную роль в улучшении его функциональных свойств, таких как антиоксидантная способность, антимикробная активность и повышение биодоступности. Эти свойства тесно связаны с молекулярной массой получаемых пептидов. Коллагеновые пептиды могут выступать в роли доноров электронов, что помогает создавать более стабильные продукты, которые эффективно взаимодействуют со свободными радикалами, тем самым оказывая антиоксидантное действие [174, 241].

Сравнение свойств нативного и гидролизованного коллагена представлено в таблице 1.3.1 [36].

Таблица 1.3.1 – Свойства нативного и гидролизованного коллагена

Характеристика	Тип коллагена	
	Нативный	Гидролизированный
Молекулярная масса	~300 кДа	3–6 кДа
Изоэлектрическая точка	7,0–8,3	3,68–5,7
Вязкость	Высокий	Низкий (0)
Образование пленки	Да	Нет

Основные факторы, которые определяют характеристики коллагена, включают условия предварительной обработки, источник экстракции и диализ. Эти параметры влияют на следующие показатели: молекулярная масса, аминокислотный состав и структура молекул коллагена. Денатурация нативного коллагена при нагреве выше 40 °C приводит к разрушению его тройной спиральной структуры, в результате чего образуются три α -цепи, которые принимают случайную спиральную форму. После разделения этих цепей гидролиз коллагена осуществляется с помощью протеолитических ферментов, таких как алкалаза, папаин, пепсин и др. Полученный продукт, называемый гидролизованным коллагеном, состоит из пептидов с низкой молекулярной массой (3–6 кДа) [158, 232]. Функциональные свойства гидролизованного коллагена (растворимость, антиоксидантная и антимикробная активность) зависят от типа и степени гидролиза, а также от использованных ферментов в процессе экстракции.

Существуют и другие методы гидролиза, в частности химический гидролиз с использованием кислотных (уксусная, соляная, фосфорная кислоты) или щелочных растворов [123]. Однако эти методы часто приводят к образованию высоких концентраций соли в конечном продукте после нейтрализации и могут быть агрессивными для экстрагируемого материала [160].

Кроме того, есть и альтернативные методы экстракции коллагена: термическая обработка или использование высокой температуры (от 100 до 374 °C) и давления (менее 22 МПа), например, с применением субкритической воды [207]. Эти методы позволяют улучшить процесс экстракции и получения высококачественного коллагена, но могут требовать специфических условий и оборудования для эффективного применения.

Функциональные характеристики гидролизатов коллагена – молекулярная масса и активность – зависят от источника, типа экстракции и используемого фермента и играют важную роль в их применении в таких областях, как косметическая, фармацевтическая, биоматериальная, пищевая и нутрицевтическая промышленности [237].

1.4 Анализ существующих технологий производства гидролизатов коллагена и сопутствующих продуктов

Получение гидролизатов описано в различных исследованиях. Так, в патенте RU 2671401 C2 разъясняется способ получения гидролизата коллагена и его дальнейшее применение в качестве биологически активной добавки. Этот способ включает в себя несколько стадий, связанных с получением водного раствора костного желатина с определенной концентрацией, его последующим гидролизом с помощью добавленной эндопротеазы из *Bacillus subtilis*, нагреванием и высушиванием указанного раствора при определенных условиях. Однако существенным недостатком такого получения гидролизата коллагена является предварительное выделение желатина из сырья [72].

Технологическая линия для получения белковых гидролизатов и автолизатов, описанная в патенте RU 34534 U1, представляет собой почти автоматизированную линию, за счет наличия газопроводов и продуктопроводов. Однако в патенте не описана возможность автоматизации данной схемы с использованием компьютерных программ для удаленного управления работой системы [69].

Для получения гидролизата также можно использовать рыбное сырье, как, например, в патенте RU 2 665 589 C2. Метод получения гидролизата рыбного коллагена включает подготовку и анализ сырья – шкур промысловых рыб. Ферментативное выделение гидролизата коллагена осуществляют путем промывки, заливки раствором протеолитического ферментного препарата, выдерживания в течение 5 ч, фильтрации. Получение кислой дисперсии осуществляют путем подкисления раствором уксусной кислоты до pH 5,5–6,5, а формирование сухой формы – путем испарения воды из фильтрата без нагрева, при температуре выше 50 °C [78].

На основании методики ферментативного гидролиза изобретена экологически чистая технология выработки биологически активных веществ

из непищевого белкового сырья животного происхождения. Для данной технологии используются микроорганизмы, отличающиеся мощной ферментативной системой и выполняющие два биохимических процесса – расщепление и синтез. К тому же микробиологический синтез отличается малым количеством отходов и является экологически безопасным [42]. Как следствие, это позволяет использовать различные отходы как субстрат и получать в итоге ценные продукты метаболизма: аминокислоты, пептиды, полисахариды, витамины, макро- и микроэлементы с высокой биологической ценностью, которые находят все более широкое применение в медицине, ветеринарии и животноводстве [15].

Для получения коллагенового гидролизата из кожи нерки, кеты и трески использовался ферментный препарат «Коллагеназа пищевая» с последующей обработкой лимонной кислотой. В результате было установлено, что в составе гидролизата преимущественно присутствуют пептиды с молекулярной массой $21,6 \pm 2,2$ кДа.

Помимо этого, существует изобретение, которое позволяет получить тернарную полифункциональную пищевую композицию, включающую коллагеновый ферментолитизат из кожи минтая с добавлением гидратированных растительных компонентов, таких как кунжутная и черемуховая мука. Готовая композиция обладает структурообразующими свойствами, улучшает функционально-технологические характеристики и повышает пищевую ценность конечного продукта, обогащая его важными эссенциальными веществами [50].

Одним из способов изготовления сухого рыбного коллагена для рыбной промышленности является его просаливание, промывание, разрезание, сушка и измельчение (см. патент RU № 2232515, кл. A23L 1/0562, A23L 1/326, A23J 3/04, опубл. 20.07.2004). Однако, помимо того, что данный способ очень длительный, энергозатратный, использование поваренной соли при просаливании, водно-спиртового раствора при отмачивании, обезжиривание и обезвоживание органическим растворителем (этиловым спиртом или ацетоном) коллагена может

привести к частичной потере его ценных веществ (разрушение витаминов, денатурация белка) [69].

Большую известность имеет изобретение, которое относится к биотехнологии, а именно к способу получения лиофилизированного гидролизата коллагена, основанному на использовании плавательного пузыря рыбы из семейства осетровых или сиговых. Он включает в себя промывание, механическую очистку плавательных пузырей, щелочно-солевой гидролиз, очистку раствора от низкомолекулярных соединений, фильтрацию и лиофильную сушку. Особенность этого способа заключается в том, что щелочно-солевой гидролиз проводят в 10 % растворе едкого натра с добавлением 5 % раствора натрия сульфата при гидромодуле 1:4 в течение $5 \pm 0,5$ ч. Очистка же раствора от низкомолекулярных соединений происходит в диализных мешках с диаметром пор 12–14 кДа в течение $24 \pm 0,5$ ч. Затем раствор дополнительно пропускают через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм для выделения наноразмерной фракции. После этого проводят замораживание при температуре не более -40 °C в течение $4 \pm 0,2$ ч и сублимационную сушку в течение $24 \pm 0,5$ ч под вакуумом при температуре не более -55 °C. Указанное изобретение позволяет получить наноразмерный лиофилизированный гидролизат коллагена, пригодный для использования в качестве натуральной основы при изготовлении медицинских и косметических изделий и средств [10, 76].

Также было предложено изобретение, относящееся к рыбной промышленности и имеющее потенциал использования на рыбоперерабатывающих предприятиях, для изготовления рыбного коллагена из плавательных пузырей пресноводных рыб. Этот способ включает их отмачивание, бучение, которое проводят подкисленной водой в соотношении 1:1 при дозировке уксусной кислоты 1 % к массе сырья, промывку, варку в кислых растворах, фильтрацию горячих растворов коллагена, охлаждение их для желирования, разрезание желе на пластины, сушку при температуре окружающего воздуха. Варку рыбных отходов (соленые плавательные пузыри пресноводных рыб) проводят в подкисленных уксусной кислотой водных растворах в два этапа: сначала при температуре 58–

62 °С в течение 75 мин при гидромодуле 1:5,0 и рН 5,2, а затем при температуре 64–67 °С в течение 75 мин при гидромодуле 1:2,0 и рН 5,2. Охлаждение раствора коллагена осуществляют при температуре 6–7 °С в течение 10–12 ч. Сушат раствор коллагена отдельно от двух варок: первую фракцию – при температуре 25 °С, вторую – при температуре 27 °С. Полученный коллаген однократно обезжиривают этиловым спиртом в соотношении 1:1–1:2 при температуре не выше +15 °С в течение 15–30 мин. Изобретение направлено на улучшение качественных показателей коллагена натуральной структуры из плавательных пузырей пресноводных рыб [75].

Для изготовления гидролизата коллагена в качестве биологически активной добавки применяется ферментативный гидролиз костного желатина типа В. Этот гидролизат состоит из пептидов, которые имеют молекулярную массу от 1,500 до 13,500 Да и среднюю молекулярную массу в пределах от 4,500 до 6,000 Да. Способ его получения включает следующие стадии: получение водного раствора костного желатина типа В, добавление нейтральной эндопротеазы из *Bacillus subtilis*, воздействие эндопротеазы на желатин, нагревание раствора, его высушивание при определенных условиях для получения гидролизата коллагена. Он обладает высоким стимулирующим действием, в особенности на синтез коллагена типа I [72].

Следующее изобретение, которое относится к пищевой промышленности, предлагает способ получения пищевых коллагенсодержащих продуктов с использованием в качестве сырья рыбьей кожи с чешуей. В этом случае ее промывают водой и помещают в смеситель, обрабатывают с применением сухой пищевой соли и соды, а также льда в количестве 10 % : 1,0 % : 20 % от массы сырья до отделения чешуи от кожи с последующей промывкой водой. После промывки полученную смесь кожи с чешуей фракционируют и отделяют часть кожи. Далее оставшуюся смесь кожи с чешуей и изъятую из смеси кожу подвергают термической обработке в отдельных емкостях в жидкостях, содержащих по меньшей мере один вид органической кислоты, при температуре 85–100 °С в течение 0,5–5 мин. Причем соотношение массовых частей смеси

кожи с чешуей и жидкости выбирают как 1:(2,5–3,5) по массе, а соотношение массовых частей кожи и жидкости выбирают как 1:(1,5–2,5). Изобретение позволяет получить пищевые витаминизированные коллагенсодержащие продукты разной консистенции с улучшенными органолептическими показателями по запаху и цвету, которые отличаются количественным содержанием коллагена и минеральных компонентов и предназначены для разных категорий потребителей [73].

Для получения пептидного гидролизата коллагена из рогов применяется изобретение, которое относится к области медицины и фармацевтики. Этот способ заключается в отделении от рогов кожного и волосяного покрова, после чего полученное сырье измельчают до фракций размером 12–15 мм, добавляют воду и нагревают при температуре 125–135 °С в течение 24–60 ч. Далее раствор фильтруют и проводят ферментативный гидролиз и реакционное обесцвечивание материала в растворе с добавлением активированного угля в течение 3–8 ч при температуре 50–55 °С, затем полученный гидролизат фильтруют. Технический результат заключается в повышении качества получаемой продукции при более полном извлечении пептидного гидролизата из сырья [74].

1.5 Ферментные препараты, используемые в биотехнологии получения гидролизатов коллагена, и их характеристики

Процесс получения гидролизатов коллагена основан на использовании ферментов, которые катализируют разложение белковых молекул на пептиды и аминокислоты. Применение ферментов позволяет получать гидролизаты с заданными свойствами, включая молекулярную массу, биоактивность и растворимость. Наиболее распространенные ферменты, используемые в биотехнологии получения гидролизатов коллагена, можно разделить на несколько основных групп.

Протеолитические ферменты животного происхождения

Пепсин экстрагируется из желудочного сока животных, чаще всего свиней или крупного рогатого скота, и имеет оптимальный pH 1,5–2,5. Пепсин гидролизует белки преимущественно в кислой среде, расщепляя связи с участием ароматических аминокислот (фенилаланин, тирозин), и используется для разложения коллагена в условиях низкого уровня pH, что позволяет избежать нежелательных реакций денатурации белков.

При экстракции коллагенов из тканей млекопитающих свободный пепсин, который применяется в системе экстракции «кислота – пепсин», трудно перерабатывать, и существует риск загрязнения ферментным белком извлеченных коллагеновых продуктов, что ограничивает их применение [249]. Для решения этой проблемы был успешно получен иммобилизованный пепсин посредством ковалентного сшивания глутаральдегида с использованием модифицированной 3-аминопропилтриэтоксисиланом кремниевой глины в качестве носителя. Иммобилизованный пепсин применялся для экстракции коллагена из шкур крупного рогатого скота [249].

Использование мясных субпродуктов в качестве потенциального источника белковых гидролизатов, богатых биоактивными пептидами, способствует повышению ценности этих продуктов и улучшению их устойчивого использования. В исследовании [191] было определено влияние различных предварительных обработок (гидролиз пепсином, ультразвуком и гидролиз пепсином с помощью ультразвука) на пептидный профиль и биоактивность говяжьей печени, гидролизованной с помощью препарата флаворзим. Предварительная обработка пепсином увеличила степень гидролиза и образование свободных аминокислот в гидролизатах печени, тогда как последующий гидролиз повлиял на молекулярно-массовое распределение пептидов. Печень подвергалась различным предварительным обработкам (пепсином и/или ультразвуком) с дальнейшим гидролизом с помощью флейворзима.

Трипсин, панкреатическая сериновая протеаза, благодаря своей узкой специфичности и селективности, широко используется в пищевых технологиях, протеомном анализе, модулировании аллергенности соевого белка, производстве антигипертензивных пептидов, а также в качестве биомаркера при таких заболеваниях, как панкреатит, муковисцидоз и т. д. Трипсин экстрагируется из поджелудочной железы животных с оптимальным значением pH 7,5–8,5. Кроме этого, он катализирует гидролиз пептидных связей, предпочтительно расщепляя те, которые образованы аргинином и лизином. К тому же трипсин используется на финальных этапах для увеличения выхода низкомолекулярных пептидов [173].

Протеазы микробного происхождения

Алкалаза продуцируется бактериями рода *Bacillus* с оптимальным значением pH 8,0–11,0 и является щелочной сериновой протеазой, эффективно расщепляющей белки при повышенном pH. Она наиболее часто применяется для получения низкомолекулярных пептидов с высокой степенью гидролиза, что важно для биоактивных добавок [170].

Одно из исследований [198] было сосредоточено на разработке ферментативного гидролиза, в частности продолжительности и концентрации ферментов алкалазы и трипсина, для белка *Scenedesmus obliquus* с использованием методологии поверхности отклика с центральным композитным дизайном. После фракционирования гидролизатов биоактивность оценивалась с помощью стандартных анализов. Оптимальные условия гидролиза – 10,24 г/100 мл алкалазы и 2,56 г/100 мл трипсина – давали самую высокую степень экстракции белка.

Протамекс также выделяется из бактерий рода *Bacillus* с оптимальным значением pH 6,5–9,0. Данный вид протеазы считается многофункциональным и имеет мягкое действие, что позволяет получать пептиды с сохранением их активности. Он применяется в производстве гидролизатов с косметическим и фармацевтическим назначением.

В работе G. Di Filippo и др. оценивалось влияние ферментативного гидролиза, проведенного с использованием алкалазы и протамекса, на технологические функциональные возможности и антиоксидантную способность гидролизатов сывороточного белка для определения условий, которые позволяют получить целевую функциональность [149]. Образцы были охарактеризованы по степени гидролиза, распределению молекулярной массы, структурным свойствам и функциональным возможностям, связанным с пищевыми продуктами.

Свободные сульфгидрильные группы и поверхностная гидрофобность значительно снижались с увеличением степени гидролиза, независимо от используемого фермента. Результаты исследований подчеркнули возможность управления гидролизом белка для оптимизации желаемых функций [149].

Нейтраза продуцируется микроорганизмами рода *Bacillus subtilis* с оптимальным значением pH 6,0–8,0 и является нейтральной протеазой, которая работает в мягких условиях и минимизирует денатурацию белковых структур. Она используется для гидролиза коллагена в условиях, требующих сохранения биоактивных свойств.

Благодаря исследованию M. Wei и соавторов было выявлено, что препарат нейтраза, наряду с препаратом флаворзим, имеет более высокую степень гидролиза, а также повышенные эмульгирующие свойства и поверхностную гидрофобность [192].

Растительные ферменты

Папаин извлекается из плодов папайи (*Carica papaya*) с оптимальным значением pH 5,0–8,0. Он представляет собой тиоловую протеазу, которая проявляет активность в широком диапазоне pH. Папаин используется для мягкого гидролиза коллагена в пищевых и косметических продуктах. В работе A. Noman и др. использовались две протеазы для гидролиза белка китайского осетра (*Acipenser sinensis*), затем гидролизаты очищались для получения антиоксидантных пептидов [105]. Степень гидролиза 23,56 и 18,14 % была получена с использованием

папаина и алкалазы 2,4 L соответственно, а гидролизаты имели 96,80 и 87,24 % общего содержания аминокислот соответственно.

Среди многочисленных протеолитических ферментов бромелайн является наиболее популярным для гидролиза. Эта сложная смесь нескольких тиоловых эндопептидаз и других соединений, полученных из плодов, стеблей и корней ананаса, эффективна в широком диапазоне уровней pH и температур.

Генетически модифицированные ферменты

Коллагеназы привлекли значительное внимание со стороны ученых из-за своей ключевой роли в восстановлении тканей, ремоделировании и медицинских вмешательствах. Они продуцируются бактериями рода *Clostridium histolyticum* или другими модифицированными микроорганизмами. Коллагеназа представляет собой специализированный фермент, который расщепляет тройную спираль коллагена в местах специфических последовательностей аминокислот [256]. Она используется для целевого разрушения коллагена в медицине и при производстве фармацевтических продуктов. Типы коллагеназы и их применение представлены в таблице 1.5.1.

Таблица 1.5.1 – Типы коммерческой коллагеназы и их применение

Тип	Характеристика компонентов	Применение
I	Относительная средняя активность нескольких ферментов (включая коллагеназу, протеазу <i>Clostridium</i> , трипсин)	В основном используется для культивирования первичных клеток в эпителиальной ткани, печени, легких, жировой ткани и ткани надпочечников
II	Более высокая активность протеазы <i>Clostridium</i> по сравнению с типом I	Обычно используется для получения первичных клеток из сердца, костей, печени, тимуса, слюнных желез и хрящей
III	Низкая гидролитическая активность вторичных протеаз	Получение первичных клеток из ткани молочной железы
IV	Низкая активность панкреатических ферментов	Используется для приготовления островковых клеток
V	Частично очищенный тип с более высокой активностью коллагеназы и казеина, но более низкой активностью панкреатических ферментов	Подходит для подготовки островков

В настоящее время коллагеназа в основном производится путем ферментации *C. histolyticum*. Микробные коллагеназы относятся к семейству пептидаз М9, которые являются металлопептидазами и могут быть далее классифицированы на подсемейства М9А и М9В на основе вариаций в аминокислотных последовательностях и каталитических функциях. Коллагеназы, полученные из *Clostridium* и *Vibrio*, были исследованы более подробно, чем растительные и животные коллагеназы.

Ферментативный гидролиз коллагена – это ключевая технология, которая позволяет получать биоактивные пептиды с уникальными свойствами, востребованные в косметологии, медицине и пищевой промышленности. Метод ферментативного гидролиза выделяется своей способностью расходовать до 90 % отходов с максимально возможным выделением полезных питательных веществ.

Обработка соединительной ткани представляет собой сложную задачу из-за особенностей ее структуры. Эта ткань обладает высокой жесткостью и низкой способностью удерживать влагу, что требует значительных затрат энергии при производстве мясной продукции. Тепловая обработка такого сырья является важным этапом технологии, т. к. с трудом поддается равномерному измельчению. Повышение температуры с целью размягчения приводит к ухудшению структуры и консистенции готового продукта [46]. Ферментные препараты имеют широкое применение в различных отраслях промышленности. Примерно 55 % всех производимых ферментов используются в пищевой отрасли, в том числе кондитерских изделиях, алкогольных и безалкогольных напитках, мясной и молочной промышленности, а также в производстве упаковки [7]. Из них 60 % составляют препараты микробного происхождения. Использование биологических катализаторов, как отмечают исследователи [46, 84], способствует улучшению качества продуктов и продлению их срока хранения.

Производство ферментных препаратов в России активно развивается, что содействует развитию биокаталитических методов в биотехнологии. Это поможет повысить конкурентоспособность на рынке и заменить импортируемые ферменты. Биоконверсионные методы переработки сырья, включая вторичное,

основываются на специфичности ферментов, которые влияют на изменение фракционного состава материала в процессе переработки. Поэтому при выборе катализатора необходимо учитывать его протеолитическую активность, определяющую степень расщепления белков, например, в мясных продуктах. Это особенно важно для улучшения качества коллагенсодержащего сырья, которое имеет низкую пищевую ценность [49]. Гидролитическая модификация сырья способна решить многие проблемы перерабатывающего производства: нехватка основного сырья, использование частей туш с низкой пищевой ценностью, образование отходов, загрязняющих окружающую среду, и потеря ценных тканей в процессе разделки. Следует отметить, что жиловка мяса, используемая предприятиями-производителями, действительно удаляет соединительную ткань, но не способствует эффективному использованию ресурсов.

Анализ рынка биотехнологической продукции свидетельствует о коммерческом успехе ферментных препаратов. Прогнозы агентства Blue Weave Consulting следующие: мировой рынок промышленных ферментов к 2027 г. достигнет объема 9 млрд долл. США при ежегодном росте на 6,8 % [150]. В России объем производства ферментных препаратов составляет около 1 тыс. т в год при потребности в 18 тыс. т.

Одним из перспективных методов переработки сырья для получения высококачественных белковых компонентов является ферментативный гидролиз, который активно применяется в мясной промышленности. В этом процессе используют препараты, содержащие кислые и нейтральные протеазы, что позволяет не только повысить усвояемость продукции, но и эффективно перерабатывать сырье – это имеет большое значение для повышения качества конечного продукта [61]. Современная ситуация на мировом рынке, связанная с дефицитом белка животного происхождения, ставит новые задачи перед мясоперерабатывающей отраслью. Это в свою очередь создает необходимость поиска инновационных решений для переработки побочных продуктов и вторичного сырья, что позволяет получать полноценные пищевые продукты, богатые необходимыми макро- и микроэлементами. Реализация такого подхода

играет значимую роль в решении поставленных задач, учитывая растущий спрос на белок и необходимость его эффективного использования в условиях нехватки ресурсов.

В совокупности эти факторы открывают значительные перспективы для развития мясной промышленности и появления новых игроков на рынке. Однако это требует внедрения современных технологий переработки, которые будут способствовать расширению ассортимента продукции и улучшению ее качества.

Для переработки животных белков широко используются различные ферменты, такие как бактериальные протеазы, трансклутаминаза и др. Каждый из них обладает определенными оптимальными условиями действия (температура и pH). В процессе гидролиза белков применяются ферменты протеолитического действия, которые делятся на пептидазы и протеиназы. Механизм их расщепления и характеристики подробно описаны в работе Л.В. Римаревой и ее коллег [84]. Кроме того, выделяется фермент трансклутаминаза, который способен катализировать образование ковалентных связей между аминокетонами в белках как одного, так и разных типов. Существуют различные виды гидролиза, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки. В частности, кислотный гидролиз, несмотря на популярность и скорость реакции, уступает в эффективности другим способам разложения белка из-за низкого выхода готовой продукции и сложного технологического процесса. Химический гидролиз, хотя и отличается сравнительно низкой себестоимостью, требует экстремальных условий, таких как высокие температуры и агрессивный pH, что отрицательно сказывается на качестве продукта. Поэтому данный гидролиз не может конкурировать с ферментативным методом. В настоящее время самым перспективным и эффективным является ферментный гидролиз.

Существует ряд ферментных препаратов, таких как папаин, Алкалаза®, Протамекс®, Flavourzyme®, Нейтраза®, Протозим С, которые активно используются для гидролиза пищевых белков. Анализ существующих научных данных свидетельствует о продолжении поиска новых источников ферментов

и методов их внедрения в промышленное производство. В этом контексте интерес представляет использование водных ресурсов (рыба и другие объекты водного промысла), но пока эта область остается недостаточно изученной, и внедрение таких ферментов в массовое производство пока ограничено. Кроме того, процесс производства ферментных препаратов должен предусматривать активное использование вторичных продуктов, получаемых при переработке рыбной продукции. Такой подход помогает минимизировать отходы и повысить эффективность производства, улучшая технологические процессы и снижая затраты.

1.6 Биоактивные свойства гидролизатов, методы их идентификации

Гидролизаты представляют собой основную категорию биостимуляторов, получаемых путем химического или ферментативного гидролиза белков животного или растительного происхождения. За последнее десятилетие биостимуляторы растений все чаще используются в сельском хозяйстве в качестве экологически чистых инструментов, которые повышают устойчивость и стойкость систем производства сельскохозяйственных культур в условиях экологических стрессов. Гидролизаты, состоящие в основном из аминокислот и пептидов, оказывают благотворное влияние на множество физиологических процессов, в том числе на фотосинтетическую активность, усвоение и транслокацию питательных веществ, и качественные параметры. Гидролизаты также не только обладают гормоноподобной активностью [103, 205], но и повышают устойчивость к абиотическим стрессам, в частности, за счет стимуляции защитных процессов (антиоксидантная активность клеток и осмотическая регуляция).

Физиологические функции биоактивных пептидов связаны с общим состоянием здоровья или снижением риска некоторых хронических заболеваний.

Поскольку большинство биоактивных пептидов зарыты или зашифрованы в структуре зрелых белков, наиболее распространенным и простым методом их получения является ферментативный гидролиз.

Антимикробные пептиды (АМП) непосредственно защищают животных от широкого спектра бактерий, грибов, вирусов и простейших, т. е. обладают антимикробной активностью и избирательной токсичностью по отношению к бактериальным патогенам, не повреждая ткани организма. Стенка микробной клетки состоит из липопротеинов, которые действуют как основная цель для распада, чтобы учитывать антимикробную активность пептидов. Антимикробные пептиды в основном обладают α -спиральной структурой, по своей природе являющейся катионной и амфипатической, но также могут выступать и как α -спиральные пептиды [102]. Катионная часть пептидов отвечает за электростатическое взаимодействие с анионными фосфолипидами, что приводит к образованию пор в цитоплазматической мембране. Из-за их образования возникает ионный дисбаланс по всей мембране и, следовательно, лизис клетки, что представлено на рисунке 1.6.1. Кроме того, эти АМП собираются на поверхности клеточной мембраны и включаются в нее [113, 130].

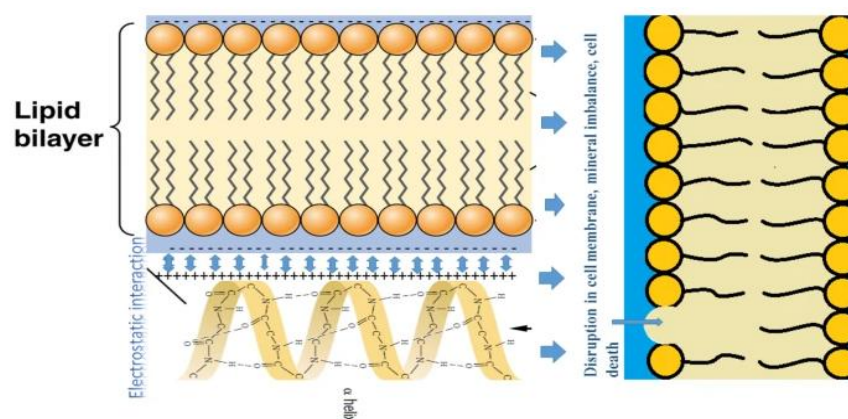


Рисунок 1.6.1 – Антимикробное действие биоактивных пептидов: Lipid bilayer – липидный двойной молекулярный слой; Electrostatic interaction – электростатическое взаимодействие; Disruption in cell membrane, mineral imbalance, cell death – нарушение клеточной мембраны, минеральный дисбаланс, гибель клетки [113]

После высвобождения из основного белка антигипертензивные пептиды получают способность модулировать ренин-ангиотензиновую систему и регулировать артериальное давление в организме. Данный эффект является гипертензивным и используется вместе с коммерческими препаратами. Такой же эффект демонстрируют ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента, которые выделяются из чеснока, семян подсолнечника, желатина и т. д. с использованием β -лактоглобулина, α -лактальбумина, γ -зеина и им подобных ферментов. Пептиды-ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента задерживают превращение, что приводит к расширению кровеносных сосудов и вследствие этого контролю гиперчувствительности. Кроме того, указанные ферменты разрушают брадикинин (вырабатываемый кинин-НО-системой), который обладает сосудорасширяющими свойствами. Таким образом, ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента контролируют артериальное давление, предотвращая сердечно-сосудистые заболевания.

Использование пищеварительных ферментов для получения биоактивных пептидов позволяет вводить полученные пептиды перорально [171, 210]. Как только аминокислотная последовательность молекул известна, пептиды могут быть синтезированы с помощью химического синтеза или технологии рекомбинантной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК).

При получении биоактивных пептидов из белков-предшественников применяются три основных метода ферментативного гидролиза: использование ферментов микробного или растительного происхождения, обработка пищеварительными ферментами, а также микробная ферментация. Практика показала, что для синтеза коротких пептидных цепей особенно результативным может быть комбинированное применение либо микробных/растительных ферментов с пищеварительными ферментами, либо сочетание микробных/растительных ферментов с процессом микробной ферментации (рисунок 1.6.2) [218].

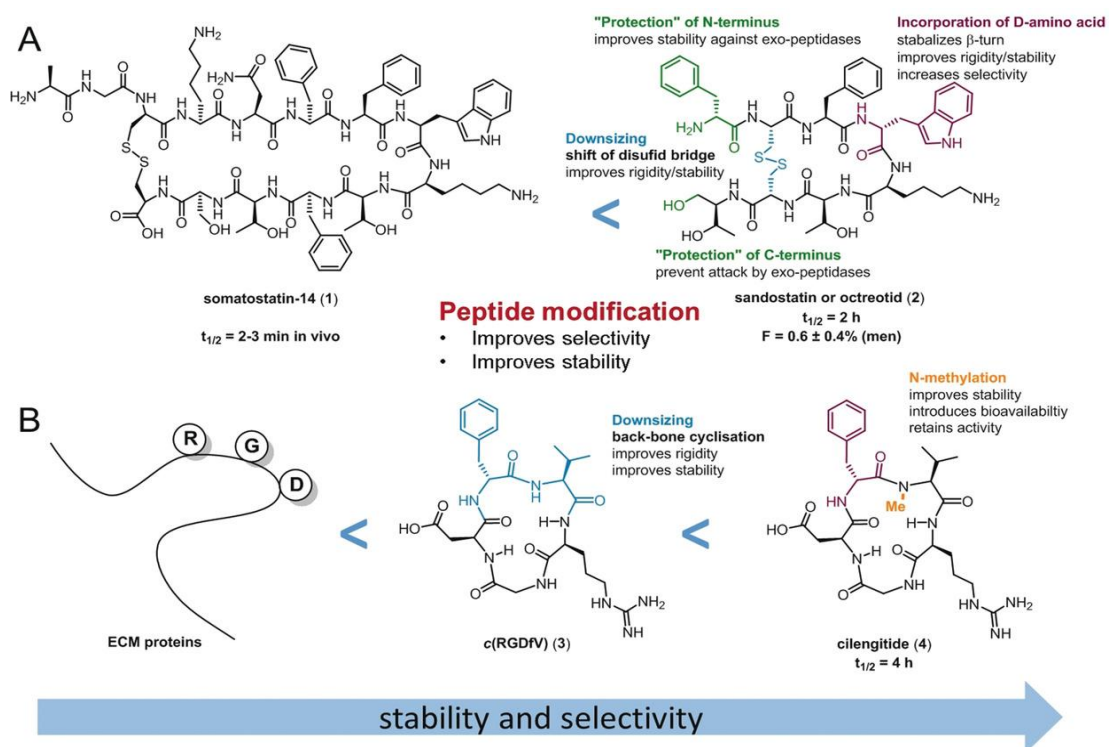


Рисунок 1.6.2 – Улучшение стабильности пептидов *in vivo* путем химических модификаций: А – модификация соматостатина-14 в коммерчески доступном активном агенте сандостатине (1), с увеличенным периодом полураспада и селективностью (2); В – разработка циклических RGD-пептидов, полученных из белков ECM (3,4) [218]

Использование специфических или даже неспецифических протеаз является наиболее распространенным способом получения биоактивных пептидов, поскольку для достижения степени гидролиза требуется меньше времени и можно лучше контролировать процесс гидролиза для получения пептидов с определенной молекулярной массой и аминокислотным составом. В этом процессе различные ферменты, такие как пепсин, бромелаин, трипсин, химотрипсин и папаин, используются при оптимальных для них условиях pH и температуры. Многие известные биоактивные пептиды обычно производятся с применением пищеварительных ферментов, включая пепсин и трипсин. Например, пептиды, ингибирующие ангиотензинпревращающий фермент, и кальций-связывающие фосфопептиды обычно производятся трипсином. Помимо этого, для получения биоактивных пептидов использовались многие термозимы (ферменты

из бактериальных и грибковых источников), а для ферментативного гидролиза соевой и пшеничной муки – несколько растительных ферментов (папаин и проназа). Стоит отметить, что потенциально биоактивные пептиды могут быть извлечены или получены из любого организма [218].

Биоактивные пептиды, гидролизованные из молочных белков, играют важную роль в укреплении и поддержании здоровья человека. Молочные казеины являются хорошим источником биофункциональных пептидов. В этой связи одни ученые [147] получили пептиды с АПФ-ингибирующей активностью из последовательности 60–70 β -казеина. Другие [164, 203] – выделили такие АПФ-ингибирующие пептиды, как «валин – аргинин – тирозин – лейцин», гидролизованные из белков коровьего молока и гидролизата козьего молока, с антигипертензивным действием. Помимо этого, Эрдманн и др. протестировали антигипертензивную и АПФ-ингибирующую активность пептида, выделенного из гидролизата казеина, который был получен из козьего молока. Результаты их работы показали, что пептиды со значениями IC_{50} 316–354 мкмоль/л проявляли антигипертензивную активность у исследуемых лабораторных мышей.

Ферментация коровьего и человеческого молока приводит к образованию биологически активных пептидов с АПФ-ингибирующей активностью. В коровьем молоке это Val-Pro-Pro (β -казеин f84–86) и Ile-Pro-Pro (β -казеин f74–76), а в человеческом молоке – пептид HLPLP (фрагмент β -казеина f125–129). Применение коммерческих молочных и пробиотических заквасок с высокой протеолитической активностью в производстве ферментированных молочных продуктов позволяет получать эти биоактивные пептиды в результате протеолитических реакций [132, 211].

Коровье молоко, сыр и молочные продукты – крупнейшие источники биоактивных белков и пептидов, получаемых из пищи [137, 188]. Биологическая активность и аминокислотная последовательность биоактивных пептидов, выделенных из коровьего молока, представлены в таблице 1.6.1.

Таблица 1.6.1 – Биоактивность и аминокислотная последовательность пептидов, выделенных из белков коровьего молока

Источник	Пептид (аминокислотная последовательность)	Биоактивность
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> + пищеварение с пепсином	Asp-Lys-Ile-His-Pro-Phe, Tyr-Gln-Glu- Pro-Val-Leu	АПФ-ингибитор
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro	АПФ-ингибитор
<i>Lactobacillus GG</i> + пепсин и трипсин	Tyr-Pro-Phe-Pro, Ala-Val-Pro-Tyr-Pro- Gln-Arg, Thr-Thr-Met-Pro-Leu-Trp	Опиоид, АПФ-ингибитор, иммуностимулирующий
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> подвид <i>bulgaricus</i> IFO13953	Ala-Arg-His-Pro-His-Pro-His-Leu-Ser- Phe-Met	Антиоксидантный
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var.	Tyr-Leu-Leu-Phe	АПФ-ингибитор
Пептиды, полученные из β-казеина	Lys-Val-Leu-Pro-Val-P(Glu)	АПФ-ингибитор

Как правило, большинство пептидов высвобождаются во время созревания сыра, проявляя биологическую активность. По этой причине кальциевые фосфопептиды были обнаружены в сырах Конте и Чеддер [153]. Присутствие этих пептидов зависит от стадии созревания сыра. Чрезмерный протеолиз в результате очень продолжительной стадии созревания может обратно уменьшить количество биоактивных пептидов или снизить их биофункциональность [202]. Это говорит о том, что биоактивные пептиды увеличиваются со стадией созревания сыра, но уменьшаются при чрезмерном протеолизе, и можно предположить, что АПФ-ингибирующая способность пептидов в молочных продуктах с низкой степенью протеолиза, таких как йогурт и свежий сыр (т. е. кварк), низкая. Изменение транс- на цис-форму Pro в С-концевом положении АПФ-ингибирующего пептида может вызвать серьезные изменения во взаимодействии фермента. DKHP (-casein f47–51) – АПФ-ингибирующий пептид, полученный из сыра Манчего, был проанализирован с использованием двух отдельных препаратов Гомесом-Руисом и др. Один препарат со специальным конформером, содержащим транс-Pro, показал сильную АПФ-ингибирующую активность. Второй имел три различных

конформера – два с транс-Pro и один с цис-Pro – и более низкую АПФ-ингибирующую активность. Протеолитические штаммы видов молочнокислых бактерий *L. helveticus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* и *Lactococcus lactis*, а также два вида, используемые при традиционной обработке йогурта, использовались для производства ферментированного молока, содержащего особенно большое количество пептидов.

Мясные продукты богаты функциональными биопептидами – соединениями, способствующими укреплению здоровья. АПФ-ингибирующая активность некоторых естественно образованных пептидов была рассчитана эмпирически с использованием последовательных этапов фракционирования для выделения наиболее активных фракций и, соответственно, классификации пептидов по MS в тандеме в нескольких исследованиях мясных продуктов. Поскольку структура пептида играет важную роль в ингибировании АПФ, некоторые из известных пептидов были выбраны в качестве потенциально биоактивных на основе их продолжительности, аминокислотного состава и расположения аминокислот в последовательности [195].

Также исследовались АПФ-ингибирующие свойства пептидных экстрактов сыровяленной ветчины из Испании (г. Теруэл), Италии (г. Парма) и Бельгии. Антигипертензивная активность наиболее активных фракций и пептидов, обнаруженных в испанской сыровяленной ветчине, была протестирована *in vivo* с использованием модели SHR (спонтанно гипертензивные крысы). Через 8 ч после приема внутрь фракции, полученные с помощью эксклюзионной хроматографии с молекулярной массой менее 1700 Да, продемонстрировали самую сильную антигипертензивную активность, вызвав снижение систолического артериального давления на 38,38 мм рт. ст. у спонтанно гипертензивных крыс. Через 8 ч после приема у SHR пептид АААТР со значением IC_{50} *in vitro* 100 М продемонстрировал снижение систолического артериального давления на 25,62 мм рт. ст. [142]. Кроме того, используя комбинацию модели *in silico* и обычного метода *in vitro*, фракции, полученные после переваривания в ЖКТ сыровяленной пармской ветчины 18 и 24 мес.

выдержки, были проанализированы для выявления АПФ-ингибирующих пептидов, что позволило найти нескольких небольших пептидов, таких как LGL и SFVTT [135, 166, 235]. Мышцы черной шелковистой птицы (*Gallus gallus domesticus* Brisson) гидролизвались алкалазой и папаином, благодаря чему были обнаружены пептиды LER и GAG с АПФ-ингибирующей активностью.

D. Choi и др. в своей работе [124] использовали термолизин для идентификации АПФ-ингибирующих пептидов в говядине *M. longissimus*. Кроме того, гидролизат термолизина был фракционирован на семь различных групп. Поскольку фракция V имела самую высокую АПФ-ингибирующую активность, ее дополнительно субфракционировали для получения уникальных пептидов. Пептиды, полученные из продуктов животного происхождения, рассмотрены в таблице 1.6.2. Стоит уточнить, что пептиды LSW, FGY и YRQ имели самую высокую АПФ-ингибирующую активность и более высокие концентрации, чем другие изученные пептиды. Это доказало, что при использовании термолизина для лизирования белков образуются биоактивные пептиды с сильной АПФ-ингибирующей активностью.

Таблица 1.6.2 – АПФ-ингибирующие пептиды, полученные из продуктов животного происхождения

Продукт	Примеры идентифицированных биоактивных пептидов	IC ₅₀ , мкм	Гидролизная обработка (соотношение Е/С)
Саркоплазматический белок говядины	Val-Leu-Ala-Gln-Tyr-Lys	23,2	Термолизин; pH 7,4, 37 °C Протеиназа А; pH 5,0, 25 °C (1:100)
Свинина	Lys-Ala-Pro-Val-Ala Pro-Thr-Pro-Val-Pro	45,56 382	Пепсин; pH 2,0, 37 °C, 2 ч (1:100) Панкреатин; pH 7,2, 37 °C, 3 ч (1:50)
Куриная грудная мышца	GFHypGTHypGLHypGF	42	Протеаза <i>Aspergillus</i> ; 50 °C, 1 ч Желудочные протеазы (трипсин, химотрипсин и сок тонкого кишечника); 37 °C, 1,5 ч
	Lys-Pro-Leu-Leu-Cys-Ser Glu-Leu-Phe-Thr-Thr Lys-Pro-Leu-Leu	0,37 6,35 11,98	Пепсин; 37 °C, 1 ч Панкреатин; 37 °C, 2 ч

Продолжение таблицы 1.6.2

Испанский сыровяленый окорок	Ala-Ala-Ala-Thr-Pro	100	0,01 Н НСl
Иберийский сыровяленый окорок	Pro-Pro-Lys Pro-Ala-Pro Ala-Ala-Pro	nd	0,01 Н НСl
Скелетная мышца свиньи	Met-Asn-Pro-Pro-Lys, Ile-Thr-Thr-Asn-Pro, Met-Asn-Pro-Pro-Pro-Lys Met-Asn-Pro	945,5 549,0 66,6 > 100 0 66,6	Протеиназа К, проназа Е, фицин, папаин, трипсин, α-химотрипсин и пепсин; 37 °С, 18 ч (1:1000)
	Asn-Pro-Pro-Pro-Pro-Lys Ile-Thr-Thr-Thr-Thr-Asn Thr-Asn-Pro Glu-Lys-Glu-Arg-Glu-Arg-Gln	290,5 > 100 0 678,5 672,7 207,4 552,5	Термолизин; 37 °С, 18 ч (1:1000)
	Lys-Arg-Gln-Lys-Tyr-Asp-Ile	26,2	Пепсин
Качангская коза (<i>Capra aegagrus hircus</i>)	Phe-Gln-Pro-Ser	27,0	Флаворзим (<i>Aspergillus oryzae</i>); 50 °С, 1 ч Протамекс; 50 °С, 5 ч
Яичный белок	Tyr-Ala-Glu-Glu-Arg-Tyr-Pro-Ile-Leu Arg-Ala-Asp-His-Pro Tyr-Pro-Ile	4,7 153 > 100 0	Пепсин; 37 °С, 1,5 ч (1:50) Королаза РР; 37 °С, 4 ч (1:50)
	Arg-Ala-Asp-His-Pro-Phe-Leu Tyr-Ala-Glu-Glu-Arg-Tyr-Pro-Ile-Leu	6,2 4,7	Пепсин; 37 °С, 24 ч (1:100) Трипсин; 37 °С, 24 ч (1:100) Химотрипсин; 37 °С, 24 ч (1:20)

Условия гидролиза, субстратный белок и форма пептидазы влияют на развитие АПФ-ингибирующих пептидов. Согласно исследованию [179], ферментативное переваривание морского белкового субстрата дало АПФ-ингибирующие гидролизаты белка. S.H. Lee с соавторами был выделен пептид GDLGKTTTVSNWSPPKYKDTP из гидролизата белка каркаса тунца, который продемонстрировал сильный подавляющий эффект на систолическое артериальное давление у спонтанно гипертензивных крыс, и эта антигипертензивная активность была аналогична той, которую показал каптоприл [179]. Степень гидролиза после протеолитического переваривания составила 74,3, 74,5 и 74,8 % для α-химотрипсина, пепсина и нейтразы

соответственно. Однако другие протеолитические ферменты продемонстрировали ДН ниже 60 % [179].

Еще одними возможными источниками биоактивных пептидов являются побочные продукты консервирования сардин. Два новых ингибиторных АПФ-трипептида, FTY и FSU, были идентифицированы в гидролизате, полученном из северной креветки (*Pandalus borealis*) [149, 182]. Пептиды, полученные из продуктов морского происхождения представлены в таблице 1.6.3.

Таблица 1.6.3 – АПФ-ингибирующие пептиды, полученные из продуктов морского происхождения

Продукт	Примеры идентифицированных биоактивных пептидов	IC ₅₀ , мкм	Гидролизная обработка (соотношение Е/С)
Мышечная ткань сардины	Lys-Trp	1,63	Пепсин, химотрипсин, трипсин; 37 °С, 4 ч (1:100)
Большеглазый тунец темный мышечный	Trp-Pro-Glu-Ala-Ala-Glu-Leu-Met-Met-Glu-Val-Asp-Pro (1581 Да)	21,60	Алкалаза, нейтраза; 50 °С, 8 ч α-химотрипсин, папаин, пепсин и трипсин; 37 °С, 8 ч (1:100)
Тревалли (<i>Pseudocaranx</i> sp.)	Ala-Arg Ala-Val Ala-Pro-Glu-Arg	570,78 956,28 530,21	Бромелайн; 50 °С, 10 ч (1:200)
Ящерица-рыба	Gly-Met-Lys-Cys-Ala-Phe (655 Да)	45,70	Нейтральная протеаза; 48 °С (10000 ед/г)
Бонито	Ile-Lys-Pro Ile-Trp Leu-Lys-Pro Leu-Tyr-Pro	1,70 2,00 1,60 6,60	Пепсин, химотрипсин, трипсин, термолизин; 37 °С, 3 ч
Мышцы лосося	Phe-Leu Ile-Trp Tyr-Pro	13,60 4,70 5,21	Термолизин, папаиналкалаза, флаворзим, королаза РР, промод 144 мг
Капи; традиционная тайская паста из ферментированных креветок	Ser-Val (205 Да) Ile-Phe (279 Да)	60,68 70,03	Ферментация; 30 °С, 6 мес.
Устрица	Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe (1195 Да)	0,07	Пепсин; 37 °С, 24 ч (1,5:100)
Икра скиппджека (<i>Katsuwana pelamis</i>)	Met-Leu-Val-Phe-Ala-Val (678 Да)	3,07	Алкалаза; 50 °С, 5 ч (1:100)
Желатин из кальмаров	Gly-Pro-Leu-Gly-Leu-Leu-Gly-Phe-Leu-Gly-Pro-Leu-Gly-Leu-Ser	90,03	Алкалаза; 50 °С, 3 ч (1:20)
Желатин из кожи ската-терновника	Ala-Pro-Gly-Ala-Pro Gly-Ile-Pro-Gly-Ala-Pro	170,28 27,90	Нейтраза из <i>B. amyloliquefaciens</i> Необработанный фермент из <i>B. subtilis</i> A26; pH 7,0, 50 °С (50 ед/мг)

Продолжение таблицы 1.6.3

Продукт	Примеры идентифицированных биоактивных пептидов	IC ₅₀ , мкм	Гидролизная обработка (соотношение Е/С)
Креветки Идзуми	Val-Trp-Tyr-His-Thr Val-Trp	28,30 6,60	Протеаза S; 50 °С, 2 ч
Белый амур	Val-Ala-Pro	5,42	Алкалаза: 50 °С, pH 9 (48 AU/кг)
Каракатица (<i>Sepia officinalis</i>)	Val-Glu-Leu-Tyr-Pro	5,22	Сырые ферменты из <i>B. tojavensis</i> A21; 50 °С pH 10, Гепатопанкреас каракатицы: pH 8,0, 50 °С (3:1)
Миофибриллярный белок Харуан (<i>Channa striatus</i>)	Val-Pro-Ala-Ala-Pro-Pro-Lys Asn-Gly-Thr-Trp-Phe-Glu-Pro-Pro	0,45 0,63	Термолизин; 37 °С, 2 ч протеиназа К; 37 °С, 2 ч
Кубомедуза (<i>Chiropsalmus quadrigatus</i> Haeckel)	Ala-Cys-Pro-Gly-Pro-Asn-Pro-Gly-Arg-Pro	2,03	Пепсин; 37 °С, 3 ч (2:100) Папаин; 50 °С, 1 ч (6:100)

Е.Ф. Vieira и I.M. Ferreira выявили гидролизаты с АПФ-ингибирующей активностью (IC₅₀ 164 мкг/мл) путем ферментативного гидролиза с использованием протеаз, полученных из отработанных пивных дрожжей. Ученые также обнаружили, что пептиды с низкой молекулярной массой обладают более высокой АПФ-ингибирующей активностью [237]. Та же тенденция наблюдалась и в пептидах, полученных из кожи яка (*Bos grunniens*) [225]. Более высокая АПФ-ингибирующая активность была найдена во фракции с низкой молекулярной массой (< 3 кДа), полученной в результате гидролиза протеиназой К и алкалазой (IC₅₀ 0,65 мг/мл).

Более того, аминокислотный состав полученных пептидов также может быть ключевым фактором, определяющим их биологическую активность и функциональные свойства. Так, в гидролизатах белка сардины было обнаружено содержание важных гидрофобных аминокислот (пролин, лейцин, глицин, изолейцин, фенилаланин и валин). Фактически АПФ-пептиды обычно имеют остаток пролина на карбоксильном конце [230].

Биоактивность пептидов зависит от их структуры, аминокислотного состава и типа аминокислотных позиций, таких как N-концевая и С-концевая. Пептид LRLESF продемонстрировал высокую антигипертензивную активность, тогда как

пептид LPRL – низкую [171]. Присутствие лейцина во всех пептидах оказывает положительное влияние на АПФ-ингибирующую активность, в частности, подчеркивается, что положение лейцина и фенилаланина на N- и C-концевой частях соответственно имеет высокую АПФ-ингибирующую активность. Однако, когда лейцин расположен на C-концевой части (т. е. в пептиде LPRL), он не обладает высокой активностью. Пептид YADLVE проявляет самый сильный ингибитор ренина, т. к. имеет тирозин и глутаминовую кислоту на N- и C-концевой частях соответственно. Именно эта характеристика отвечает за ингибирующую ренин активность пептидов.

Методы исследования *in silico* представляют собой быстрорастущую область, охватывающую теорию, программирование и применение вычислительных методологий для моделирования, прогнозирования и объяснения биологических функций на молекулярном уровне: идентификация генов и последовательностей как их, так и транскриптом, протеом, сборка метагенома и разработка новых лекарственных препаратов [215, 224]. В этом отношении можно классифицировать методологии *in silico* на две группы. Первая – биоинформатика – охватывает организацию данных, разработку инструментов, которые делают анализ статистически надежным, и использование данных и анализа для интерпретации и формулирования эволюционной гипотезы [100, 208, 222].

Вторая группа – молекулярный докинг (англ. *docking* – стыковка) – метод молекулярного моделирования, вычислительная процедура, в которой предсказывается нековалентная связь молекул, например белкового рецептора и лиганда. Он включает методологии биомолекулярной структуры, также называемые биомолекулярным моделированием, основанном на фундаментальном физико-химическом описании частиц (атомов и молекул) с особым акцентом на том, как биомолекулы, такие как белки и пептиды, движутся, колеблются и физически взаимодействуют [9]. Биомолекулярное моделирование может значительно дополнить эксперименты *in vitro* и/или *in vivo* пониманием биологических процессов на молекулярном уровне, поскольку

моделируемые частицы можно анализировать на атомном уровне. Это способствует более глубокой интерпретации экспериментальных данных с точки зрения молекулярных взаимодействий [141, 159].

Молекулярный докинг широко применяется как теоретическая стратегия моделирования для разработки лекарств и виртуальных скрининговых исследований, посвященных поиску новых активных биомолекул (биоактивные пептиды). Однако для сложных пищевых систем требуются инструментальные методы, способные обеспечить прямой доступ к молекулярной информации высокого разрешения, например в случае пищевых эмульсий с несколькими интерфейсами, в которых белок по-разному реагирует на каждую локальную среду [254]. С учетом динамической природы пищевых белков для дальнейшего анализа их конформации, а также конформационной перестройки белка в ответ на изменения внешней или окружающей среды можно было бы использовать высокопроизводительные вычисления, такие как моделирование молекулярной динамики (ММД) [184]. В отличие от традиционных биоинформатических и молекулярных инструментов стыковки, использование высокопроизводительных вычислений позволило ММД изучить взаимосвязь между динамикой и функциями. Другими словами, ММД служит мощным инструментом, который предоставляет дополнительную информацию для экспериментов и позволяет улучшить интерпретацию изменений во вторичной и третичной структурах белка, стимулированных адсорбцией на интерфейсе.

Как следствие, этот многообещающий инструмент начинает привлекать все больше внимания со стороны ученых-пищевиков. Так, в исследовании Q. Chen и коллег [119], была отмечена благоприятная тенденция к использованию ММД в разработке ферментов со специфическими свойствами, которые позволили бы применять их в промышленных масштабах в пищевой промышленности.

В области биоактивных пептидов молекулярный стыковочный метод позволяет охарактеризовать поведение пептидов в месте связывания целевых белков. Поскольку указанный метод является структурно-ориентированным, он позволяет очертить взаимосвязь между структурой и активностью пептидов [251].

В целом процесс молекулярной стыковки включает прогнозирование молекулярной ориентации лиганда внутри рецептора, а затем расчет их комплементарного взаимодействия с использованием функций оценки, т. е. сродства связывания [239]. На рисунке 1.6.3 представлены этапы подготовки и проведения молекулярного анализа стыковки биоактивного пептида.

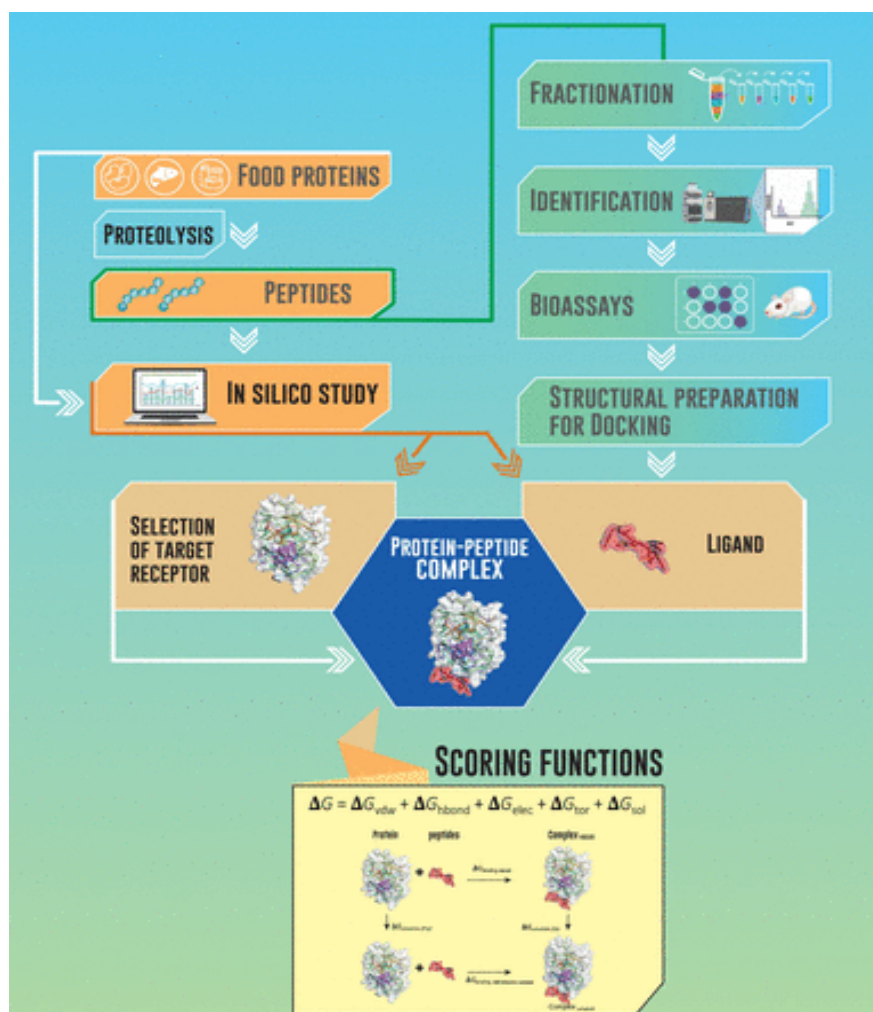


Рисунок 1.6.3 – Этапы, необходимые для проведения исследования *in silico* пищевых пептидов (лиганда) и белков (рецептор): Food proteins – пищевые белки; Proteolysis – протеолиз; Peptides – пептиды; In silico study – исследование *in silico*; Fractionation – фракционирование; Identification – идентификация; Bioassays – биотестирование; Structural preparation for Docking – конструктивная подготовка к докингу; Protein-peptide complex – белково-пептидный комплекс; Selection of target receptor – выбор целевого рецептора; Ligand – лиганд; Scoring functions – функции расчета баллов [250]

Например, после того, как биоактивные пептиды успешно фракционировали и идентифицировали (секвенировали), и их биоактивность была определена с помощью анализов *in vitro* или *in vivo*, они проходят структурную подготовку для стыковки. Затем лиганд подготавливается для установленных структур комплекса «целевой рецептор – лиганд» с использованием программного обеспечения в целях моделирования стыковки. Анализ данных выполняется путем прогнозирования сродства связывания малой молекулы (биоактивный пептид) в сайтах связывания целевых рецепторов.

В случае пищевых белков молекулярный докинг использовался в основном для изучения взаимосвязи между ферментами и субстратами, что может помочь в регуляции активности ферментов в пищевых продуктах и изучении антипитательных соединений, таких как ингибиторы трипсина [231]. Так, данный метод использовался для анализа взаимодействия связывания между овальбумином яичного белка и малахитовым зеленым красителем, пищевой добавкой с вероятным канцерогенным потенциалом. Результаты молекулярного докинга показали, что указанное взаимодействие происходит посредством гидрофобных и ван-дер-ваальсова взаимодействий [212].

Аналогичным образом молекулярный докинг применялся для определения того, что мирозиназа – фермент, обнаруженный в брокколи (*Brassica oleracea* var. *italica*), способен катализировать превращение глюкозинолатов в метаболиты, которые обладают полезными для здоровья свойствами (например, изотиоцианаты) [217].

Ф. Суй и др. [126] был применен молекулярный стыковочный метод для изучения способа действия эпигаллокатехин галлата (EGCG) и его катехиновых изомеров [эпикатехин галлат (ECG), эпикатехин (EC) и эпигаллокатехин (EGC)] против трипсина. Исследователи обнаружили, что сродство связывания было в порядке $GCG > ECG > EC > EGC$. Это подтверждает: галлоильная группа может значительно усиливать сродство связывания. Более того, взаимодействия между молекулами катехина и трипсином представляли собой ван-дер-ваальсовы и водородные связи.

С помощью молекулярного стыковочного метода также было выявлено, что из 127 соединений, идентифицированных в рисе (*Oryza sativa* Linn.), 8 обладают ингибиторами α -амилазы [221].

Молекулярная стыковка в пищевых белках является перспективным методом для изучения питательных компонентов и безопасности пищевых продуктов, что представлено в таблице 1.6.4.

Таблица 1.6.4 – Идентифицированные виды пептидов в белковых источниках

Источник белка	Идентифицированный пептид	Результаты
Нильская тилapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	GPEGPAGAR и GETGPAGPAGAAGPAGPR	Водородная связь, электростатические и гидрофобные взаимодействия со связыванием АПФ
Ставрида короткоперая (<i>Decapterus macrosoma</i>)	RGVGPVPAA	Водородные связи и π -взаимодействия с полостью связывающего участка АПФ
Казеин (творожный сыроподобный продукт)	PFPGPIP, KYIPQ и LPLPL	Энергии связывания пептидов с АПФ составили $-7,08$, $-6,33$ и $-6,19$ ккал/моль, что лучше, чем у ингибитора АПФ (каптоприл = $-5,07$ ккал/моль)
Желатин, полученный из кожи тигрицы	VGLPNSR и QAGLSPVR	Взаимодействие с АПФ через водородные связи
Моллюск (<i>Cyclina sinensis</i>)	WPMGF	Водородная связь и гидрофобные взаимодействия
Верблюжье молоко (<i>Camelus dromedarius</i>)	SHSPLAGFR, TLMPQWW, CLSPLQMR и CLSPLQFR	Взаимодействия водородных и гидрофобных связей и в гораздо меньшей степени π -взаимодействия
Верблюжий сывороточный белок (<i>Camelus dromedarius</i>)	PAGNFLP и FCCLGPVPP	Водородные, гидрофобные и π -взаимодействия

В настоящее время значительное количество исследований способствовало прояснению механизмов действия посредством молекулярной стыковки различных пищевых пептидов, которые проявили разнообразную биологическую активность в отношении гипертонии [253, 165].

Ангиотензинпревращающий фермент является наиболее распространенным целевым белком, используемым в стыковочном анализе биоактивных пептидов,

основанном на структуре *in silico*, благодаря чему антигипертензивная, или АПФ-ингибирующая активность, считается наиболее изученной. Например, этот фермент использовался для анализа взаимодействия биоактивных пептидов, полученных из гладкошерстной гончей (*Mustelus asterias*), нильской тиногии (*Oreochromis niloticus*), ставриды короткоперой (*Decapterus macrosoma*), казеина кулаи [94, 126, 183, 186].

В большинстве исследований было обнаружено, что пептиды взаимодействуют с АПФ посредством гидрофобных, водородных связей, ван-дер-ваальсовых и π -взаимодействий (нековалентное взаимодействие, включающее π -системы, которые создают сильные (π - π) ароматические стекинг-взаимодействия). Пример вида молекулярного гибкого докинга представлен на рисунке 1.6.4.

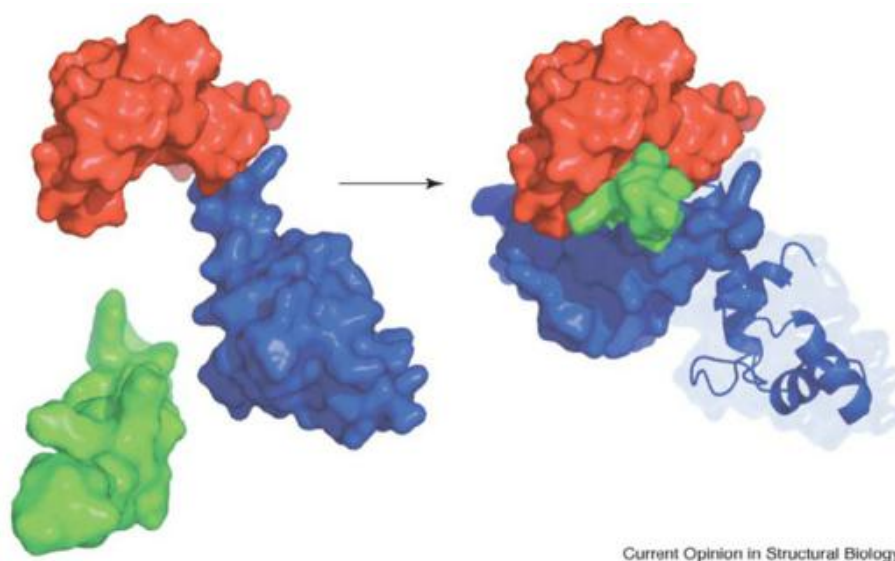


Рисунок 1.6.4 – Кальмодулин, пристыкованный к пептиду миозинкиназы гибкой стыковкой [126]

В некоторых работах наблюдалась связь между энергией связывания некоторых пептидов и их сродством к АПФ [126]. Таким образом, пептиды с наименьшими значениями энергии связывания, или свободной энергии, показали более высокое ингибирование АПФ. Кроме того, характер ингибирования биоактивных пептидов (неконкурентных и конкурентных)

по отношению к АПФ соответствовал результатам анализа молекулярной стыковки, что предполагает корреляцию между прогнозированием режима ингибирования и их данными *in silico*. Например, пептиды с неконкурентным характером ингибирования по отношению к АПФ обычно устанавливали взаимодействие водородных связей с ферментом, тогда как пептиды с конкурентным паттерном ингибирования обычно демонстрировали гидрофобные взаимодействия. Другие ценные отчеты о применении анализа молекулярной стыковки включают ее использование в лечении рака, тромбоза, диабета, и исследованиях, изучающих признаки старения кожи [99, 122, 168, 197, 234, 248].

Фармацевтическая отрасль отдает особое предпочтение разработке и лицензированию лекарственных препаратов на основе пептидов [117]. Углубленное понимание молекулярных движений в структуре «целевой рецептор – лиганд» (например, распознавание белка-пептида) может способствовать их клиническим применениям в фармацевтической науке, биомедицинской и лечебной пищевой промышленности.

1.7 Заключение по аналитическому обзору

Проведя литературный анализ, можно сделать вывод о постоянно растущем внимании научного сообщества к изучению и использованию гидролизатов коллагена. Они обладают рядом преимуществ, которые способствуют развитию новых пищевых и биомедицинских аспектов, фармацевтических препаратов, что напрямую способно повысить уровень здоровья населения. Помимо этого, гидролизаты коллагена можно применять в спортивном питании и для восстановления организма после травм, а также в других областях специализированного питания. Кроме отраслей, относящихся к медицине, неподдельный интерес представляет использование гидролизатов коллагена

в косметической и дерматологической продукции. Важно отметить и экологическую, экономическую значимость данной тематики. Изучение гидролизатов коллагена имеет огромный потенциал, который может привести к значительным научным и практическим достижениям в различных отраслях, способствуя разработке устойчивых и прогрессивных технологий.

В ходе проведения аналитического обзора были сформулированы цели и задачи собственных исследований. Так, целью данной работы является разработка биотехнологии производства гидролизатов коллагена, обладающих биоактивными свойствами.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

- изучить ресурсный потенциал и химический состав мясокостного и мягкого коллагенсодержащего сырья с целью обоснования выбора сырьевых ресурсов для проведения исследований;
- разработать биотехнологические способы предварительной обработки коллагенсодержащего сырья, проанализировать показатели качества побочных продуктов;
- разработать научно обоснованные биотехнологические способы гидролиза коллагенсодержащего сырья с целью получения биоактивных гидролизатов коллагена;
- изучить влияние баромембранных процессов и сушки на качественные и количественные показатели гидролизатов коллагена;
- изучить физико-химические показатели конечного продукта – гидролизатов коллагена, молекулярно-массовое распределение, молекулярную структуру белков с последующей оценкой аминокислотной последовательности полученных пептидов;
- провести оценку биоактивных свойств гидролизатов коллагена с использованием методов *in silico*;
- провести исследования выработанных гидролизатов с использованием методов *in vivo* с последующим определением биологических свойств

выработанных гидролизатов коллагена в эксперименте на лабораторных животных с моделью линейной раны;

- составить научно обоснованную оптимизированную технологическую схему производства гидролизатов коллагена с учётом биокаталитического воздействия на процесс производства, выявить и разработать меры по предотвращению потенциально опасных рисков в процессе производства;

- разработать техническую документацию, провести производственную апробацию результатов научной работы, внедрить результаты работы в производство, провести оценку экономической эффективности внедрённых технологических решений.

ГЛАВА 2. МЕТОДОЛОГИЯ, ОБЪЕКТЫ И ОРГАНИЗАЦИЯ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В данной главе представлены схема эксперимента, объекты и методы исследований при проведении научно-исследовательских работ.

2.1 Организационная схема проведения научных исследований

Теоретические и экспериментальные исследования проводились на кафедрах бионанотехнологии и технологии продуктов питания животного происхождения, а также в НИИ биотехнологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет».

Производственная апробация была проведена в ООО НПО «Здоровое питание» (г. Кемерово), ООО «Биолит» (г. Томск), ООО «Да» (г. Владикавказ).

Отдельные этапы работы выполнены в рамках реализации:

- гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук и докторов наук и ведущих научных школ Российской Федерации № МК-4035.2022.4 по теме «Разработка комплексной технологии производства биополимеров пищевого и биомедицинского назначения из вторичных сырьевых ресурсов животного происхождения»;

- гранта Президента Российской Федерации по государственной поддержке ведущих научных школ НШ-2694.2020.4 по теме «Фундаментальные основы создания поликомпонентных пробиотических консорциумов с заданными свойствами для поддержания микроэкологического статуса организма человека».

Схема проведения исследований представлена на рисунке 2.1.1.

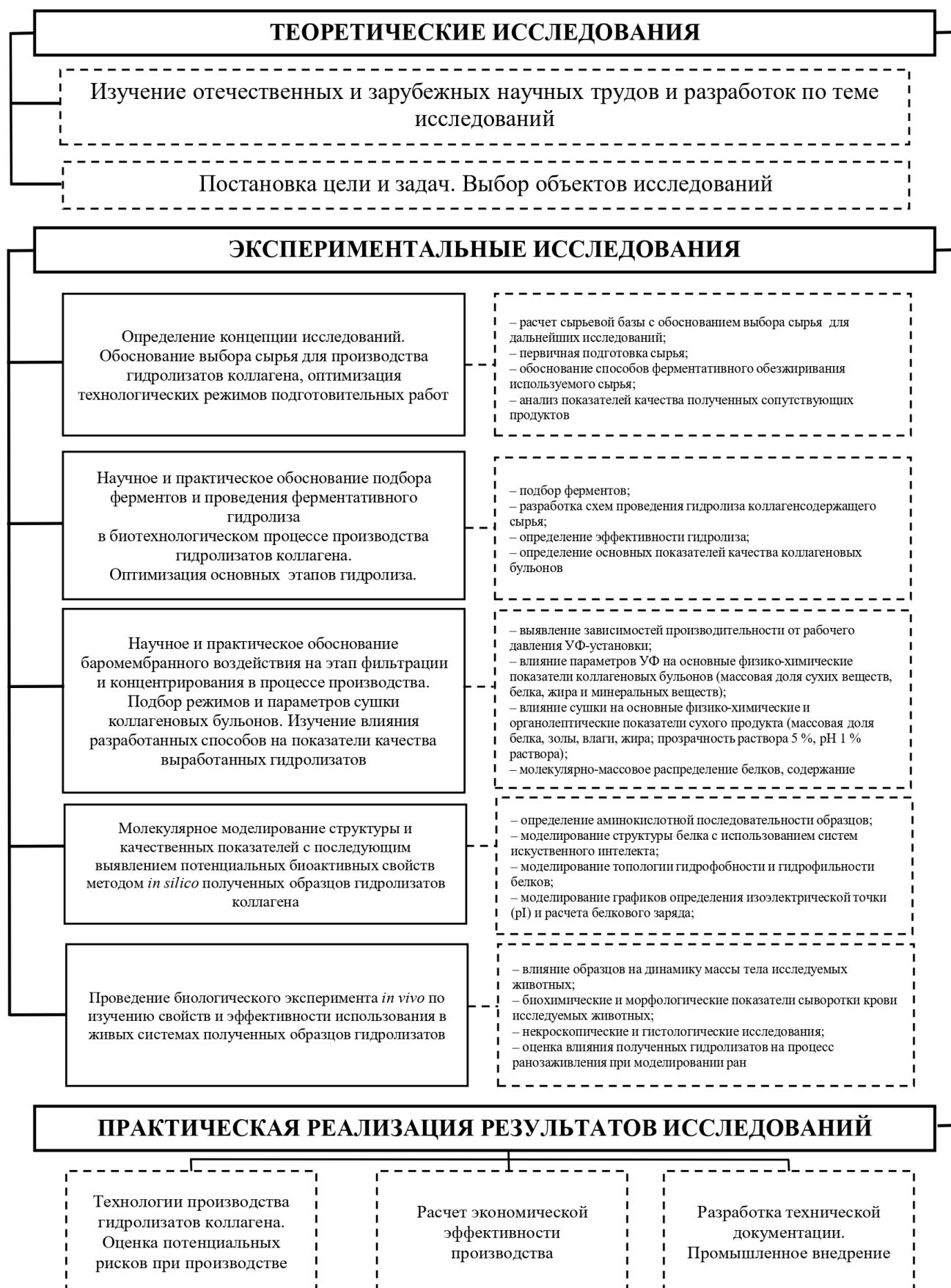


Рисунок 2.1.1 – Общая схема проведения исследований

На **первом этапе** обоснована актуальность проведения научно-исследовательских работ, сформулированы научная новизна, практическая значимость и положения, выносимые на защиту. Проведено обобщение отечественных и зарубежных литературных сведений по направлению исследований, сформулированы цели и задачи. Представлен анализ научно-технической литературы об общих понятиях, связанных с гидролизатами коллагена, белковых ингредиентах из вторичных сырьевых ресурсов животного происхождения. Осуществлен анализ имеющихся на данный момент технологий, технических возможностей производства гидролизатов коллагена, продемонстрированы актуальные технологии получения белковых ингредиентов и возможности получения биоактивных пептидов из сырья животного происхождения, а также научные сведения о биологическом эффекте белковых ингредиентов. Поставлены цель и задачи диссертационной работы.

На **втором этапе** определялась общая научная концепция диссертации. Проводился расчет потенциала сырьевой базы Сибирского федерального округа (СФО) для производства гидролизатов коллагена, на основе полученных результатов было дано научное обоснование выбора сырья. Оптимизированы технологические этапы подготовки коллагенсодержащего сырья к производству гидролизатов коллагена, осуществлен подбор и аргументирован выбор ферментов для проведения эффективного процесса ферментативного обезжиривания сырья.

На **третьем этапе** произведен подбор ферментов для проведения исследований на этапе гидролиза коллагенсодержащего сырья. Установлена зависимость разработанных схем проведения гидролиза исследуемого коллагенсодержащего сырья на эффективность процесса гидролиза.

На **четвертом этапе** научно и практически обосновано применение баромембранных технологий на этапах фильтрации и концентрирования коллагеновых бульонов, осуществлен подбор параметров распылительной сушки для выработанных белковых продуктов. Определено влияние разработанных технологий на основные физико-химические показатели выработанных

гидролизатов, а также на молекулярно-массовое распределение и аминокислотный состав.

На **пятом этапе** осуществлено молекулярное моделирование структуры и качественных показателей полученных образцов гидролизатов коллагена. Смоделирована топология гидрофобности, гидрофильности и трансмембранной тенденции аминокислот гидролизатов коллагена, оценены потенциальные биоактивные свойства методами *in silico*.

На **шестом этапе** исследований проведен биологический эксперимент по изучению эффективности и свойств полученных образцов гидролизатов методом *in vivo* (исследование одобрено Комиссией по биоэтике ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН № 6/2023 от 03.04.2023). Проанализировано влияние исследуемых образцов гидролизатов коллагена на динамику массы тела исследуемых животных, их биохимические и морфологические показатели сыворотки крови, проведены некроскопические и гистологические исследования лабораторных животных. На основе исследований тензиометрического тестирования раневой поверхности мышей оценено влияние гидролизатов коллагена на степень ранозаживления после операционного моделирования плоскостных ран.

Практический блок исследований включает реализацию комплексной технологии производства гидролизатов коллагена с применением ферментов в кислотной и щелочной среде и баромембранных технологий. Выявлены потенциально опасные риски при производстве гидролизатов и проведена их оценка, рассчитана экономическая эффективность, а также разработана и утверждена техническая документация, проведена производственная апробация.

2.2 Объекты исследований

На разных этапах исследований объектами являлись:

- сырая говяжья кость (ГОСТ 16147-88) без учета таких зоотехнических факторов, как пол, возраст, порода животного, откорм и т. д.;
- ноги цыплят-бройлеров (ГОСТ 31657-2012) без учета таких зоотехнических факторов, как пол, возраст, порода животного, откорм и т. д.;
- свиная шкурка (ГОСТ 32244-2013) без учета таких зоотехнических факторов, как пол, возраст, порода животного, откорм и т. д.;
- липаза Lipase TL IM (*Thermomyces lanuginosus*), активность 100 FIP/г $\approx 1 \cdot 10^{-1}$ кат/г;
- липаза Liporan 50 BG (*Aspergillus niger*), активность 50 FIP/г $\approx 5 \cdot 10^{-2}$ кат/г;
- пепсин (*Rhizomucor miehei*), активность $5 \cdot 10^{-3}$ кат, (CAS: 9001-92-7);
- пепсин (*Bacillus subtilis*), активность $2 \cdot 10^{-3}$ кат;
- протеаза поларзим (*Acremonium chrysogenum*), активность $6 \cdot 10^{-4}$ кат;
- раствор пероксида водорода (H_2O_2) с концентрацией 0,1 мол/л;
- раствор иодида калия (KI) в водном растворе;
- раствор уксусной кислоты (CH_3COOH);
- раствор натрия тиосульфата ($Na_2S_2O_3$) с концентрацией 0,1 мол/л;
- раствор йода в хлороформе (Wijs раствор), который используется в качестве реактива для йодирования;
- раствор калия йодида (KI) – 10%-ный водный раствор;
- раствор натрия тиосульфата ($Na_2S_2O_3$) – 0,1 моль/л (стандартный титрант);
- индикатор крахмала – 1%-ный раствор;
- глациальная уксусная кислота, которая используется в качестве растворителя;

- дистиллированная вода;
- мыши-самцы линии Balb/c в возрасте 10 недель (ООО «СМК СТЕЗАР», Россия; ветеринарное свидетельство № 18579619692 от 12.04.2023);
- 10%-ый забуференный раствор формалина (Leica Biosystems, США);
- гематоксилин-эозин (БиоВитрум, Россия);
- лигноцель БК 8-15/LIGNOCEL (J. Rettenmaier & Sohne GMBH + CO KG, Германия);
- полнорационный корм ПК 120 по ГОСТ 34566-2019 «Комбикорма полнорационные для лабораторных животных. Технические условия» [27] (декларация о соответствии № РОСС RU Д-RU.AA80.B.0305/20 до 04.11.2023; производитель АО «Гатчинский комбикормовый завод», Россия; поставщик ООО «Лабораторкорм», Россия; ветеринарное свидетельство № 18378495225 от 28.03.2023).

Помимо основных объектов и материалов исследования, в ходе реализации научно-исследовательской работы применялись другие импортные и отечественные химические реактивы со степенью чистоты не ниже х.ч.

2.3 Используемое аналитическое и научное оборудование

Для проведения исследовательских работ использовалось следующее оборудование:

- мешалка магнитная ММ-135Н с подогревом: +120 °С, до 2600 об/мин и 5 л (Tagler, Россия);
- аналитические весы CAS CAUX 220 (точность $\pm 0,1$ мг);
- колбы на 250 мл с притертыми пробками;
- пипетки, бюретки (точность $\pm 0,1$ мл);

- воронки;
- дробилка L-SP380;
- pH-метр модели Testo 206-pH2;
- ротационный вискозиметр Haake VT500;
- камера для вертикального электрофореза (электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии анионного детергента додецилсульфата натрия (ДДС-Na));
- анализатор белкового азота Rapid N Cube;
- ультрафильтрационная установка МФУ-Р-45-300 (Россия);
- паровой стерилизатор DGM-80;
- центрифуга CV-50 (ELMI);
- центрифуга 5430 (Eppendorf);
- высокоскоростная центрифуга Avanti J-26S – Beckman;
- установка для распылительной сушки Mini Spray Dryer B-290 (Buchi, Швейцария);
- лабораторная мельница HC-2000;
- система гель-документирования Gel Doc XR+ (Bio-Rad, США);
- аминокислотный анализатор Aracus (PMA GmbH, Германия);
- масс-спектрометры Microflex, который оперативно получает масс-спектры белков и пептидов микроорганизмов, и MALDI Biotyper с уникальным программным обеспечением, позволяющим идентифицировать микроорганизмы благодаря референсной базе данных, содержащей более 3100 видов МО и 9400 штаммов (Bruker, США);
- процессор Tissue-Tek VIP 5 JR (Sakura, Япония);
- клетки из поликарбоната Bio. A.S. тип II (EHRET, Германия);
- установка водоподготовки EMD Millipore RiOs™ 50 (MerckMillipore, Германия);
- установка для ингаляционной анестезии лабораторных грызунов RWD, КНР;

- электронные лабораторные весы (Ohaus, США);
- лабораторные весы ВЛТЭ-310 (Госметр, Россия);
- микротом Microm HM 325 (Microm International GmbH, Германия);
- микроскоп AxioImaiger A1 (Carl Zeiss, Германия);
- камера AxioCam MRc 5 (Carl Zeiss, Германия);
- автоматический биохимический анализатор BioChem FC-360 (HTI, США).

2.4 Методы проведения исследований

Физико-химические показатели жира определяли по следующим методикам:

- массовую долю влаги по ГОСТ 33319-2015 «Мясо и мясные продукты. Метод определения массовой доли влаги» [25];
- массовую долю золы (минеральных веществ) по ГОСТ 31727-2012 «Мясо и мясные продукты. Метод определения массовой доли общей золы» [22];
- массовую долю белка по ГОСТ 25011-2017 «Мясо и мясные продукты. Методы определения белка» [19]; массовые доли общего и белкового азота определяли на анализаторе белкового азота Rapid N Cube;
- массовую долю жира по ГОСТ 23042-2015 «Мясо и мясные продукты. Методы определения жира» [18].

Минеральный состав исследуемого сырья был установлен по МУК 4.1.1482-03 «Определение содержания химических элементов в диагностируемых биосубстратах, поливитаминных препаратах с микроэлементами, в биологически активных добавках к пище и в сырье для их изготовления методом атомной эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной аргоновой плазмой».

Аминокислотный состав исследуемого коллагенсодержащего сырья определяли методом ионообменной хроматографии на автоматическом аминокислотном анализаторе Aracus (РМА GmbH, Германия).

Массовую долю оксипролина определялась по ГОСТ 23041-2015 «Мясо и мясные продукты. Метод определения оксипролина» [17].

Выход жира рассчитывали по формуле 2.4.1:

$$\text{Выход жира (\%)} = \frac{\text{Масса жира после процесса обезжиривания, г}}{\text{Масса исходного сырья, г}} \times 100 \quad (2.4.1)$$

Жирнокислотный состав образцов животного жира определяли методом газовой хроматографии с помощью газового хроматомасс-спектрометра GCMS-QP2010 Ultra.

Перекисное число рассчитывали по ГОСТ 8285-91 «Жиры животные топленые. Правила приемки и методы испытания» [28].

Кислотное число определялось по ГОСТ Р 55480-2013 «Мясо и мясные продукты. Метод определения кислотного числа» (переиздание) [29].

Йодное число высчитывали по ГОСТ ISO 3961-2020 «Межгосударственный стандарт. Жиры и масла животные и растительные. Определение йодного числа» [31].

Выход костного жира рассчитывали по отношению к массе исходного сырья.

Органолептические показатели костного жира определяли по ГОСТ 25292-2017 «Жиры животные топленые пищевые» [20].

Температура плавления образцов жира была установлена по ГОСТ ISO 6321-2019 «Жиры и масла животные и растительные. Определение температуры плавления в открытых капиллярах (температура скольжения)» [32].

Твердость жира определяли на анализаторе текстуры Brookfield LFRA, который предназначен для исследования реологических характеристик и свойств твердых веществ, вязких жидкостей, порошков и гранулированных материалов.

Плотность жира рассчитывали пикнометрическим методом, твердость – на анализаторе текстуры Brookfield LFRA.

Выход коллагена после гидролиза находили по формуле 2.4.2 [129]:

$$V_{\text{коллаген}} = M_0 \times C_0 \times K_e, \quad (2.4.2)$$

где $V_{\text{коллаген}}$ – массовая доля коллагена, полученная после гидролиза, %; M_0 – масса исходного сырья, кг; C_0 – массовая доля коллагена в исходном сырье, %; K_e – коэффициент выхода коллагена после гидролиза (в десятичной дроби, брали от 0,80 до 0,86).

Массовую долю коллагена (C_0) в исходном сырье определяли по методике, описанной в [223].

Определение pH раствора проводили с помощью pH-метра модели Testo 206-pH2.

Массовую долю золы определяли по ГОСТ 31727-2012 «Мясо и мясные продукты. Методы определения золы» [22].

Подбор и анализ потенциально эффективных ферментов для проведения экспериментальных исследований на этапе гидролиза исследуемого коллагенсодержащего сырья проводили с использованием сервиса PeptideCutter [138], который является эффективным инструментом для прогнозирования потенциальных расщеплений белковых последовательностей. Теоретическая последовательность пептидов была получена путем виртуального ферментативного гидролиза. Для гидролиза коллагенсодержащего сырья выбраны потенциально эффективные протеазы.

С целью исследования баромембранных технологий в процессе производства гидролизатов использовали ультрафильтрационную установку МФУ-Р-45-300. Данная мембранная ультрафильтрационная система (МФУ-Р) предназначена для фильтрации различных растворов. Она позволяет получать концентраты или фильтраты растворов, отделяя молекулы различных размеров,

в зависимости от установленных мембран. Технические характеристики ультрафильтрационной установки МФУ-Р-45-300 представлены в таблице 2.4.1.

Таблица 2.4.1 – Технические характеристики установки МФУ-Р-45-300

Параметр	Данные
Количество аппаратов разделения, одновременно монтируемых на установке, шт	1–3
Тип аппарата	АРС-0.25
Количество фильтрационных элементов, шт	3
Номинальный порог задержания в нанофильтрационном элементе, Да	400
Рабочее давление, мПа, не более	0,6
Температура рабочей среды, °С, не более	50
рН рабочей среды	2–11
Минимальный удерживаемый объем установки, л	3,0–3,5
Напряжение питания, В	220
Частота тока, Гц	50
Установочная мощность, кВт	1,3
Масса, кг	55
Габаритные размеры, см	
Длина	982
Ширина	420
Высота	1261

Установка оснащена тремя фильтрационными аппаратами, укомплектованными полимерными фильтрационными рулонными элементами ультрафильтрационными с размерами пор от 5 до 100 кДа, что позволяет получать белковый концентрат с молекулярной массой в широком диапазоне. Также установка имеет теплообменник, который дает возможность регулировать температуру фильтруемой жидкости. Внешний вид ультрафильтрационной установки МФУ-Р-45-300 представлен на рисунке 2.4.1. Указанная конструкция позволяет при необходимости производить процесс фильтрации в непрерывном режиме для получения необходимого объема фильтрата или степени концентрации раствора.



Рисунок 2.4.1 – Ультрафильтрационная установка МФУ-Р-45-300

Для фильтрации использованы полимерные УФ-мембраны ЭРУ 100 (рисунок 2.4.2), обеспечивающие разделение исходного продукта на ретентат (концентрат) и пермеат (фильтрат). Ретентат в своем составе имеет белки и незначительное количество минеральных веществ, которые переходят в него в процессе фильтрации исходного раствора, а пермеат – отфильтрованные соли и минералы.



Рисунок 2.4.2 – Полимерные УФ-мембраны ЭРУ 100

Сушка полученных растворов проводилась на лабораторной распылительной сушилке модели Mini Spray Dryer B-290 (Buchi, Швеция), представленной на рисунке 2.4.3.



Рисунок 2.4.3 – Лабораторная установка распылительной сушилки модели Mini Spray Dryer B-290

На сушилке модели Mini Spray Dryer B-290 предусмотрена регулировка скорости подачи рабочего раствора и распыляющего потока газа, температуры сушки, аспирации и существует возможность очистки сопла форсунок. Указанная установка позволяет получать готовый продукт с размером частиц 1–25 мкм. Также стоит отметить материалы, которые вступают в контакт с продуктом, – кислотоустойчивая нержавеющая сталь, боросиликатное стекло и силикон. Схема экспериментальной установки приведена на рисунке 2.4.4.

Нагрев подаваемого газа и двухпоточной форсунки (1) осуществляет нагреватель (2) – микропроцессорная автоматика Fuzzy-logic с цифровым дисплеем и датчиком температуры PT 100, обеспечивающий высокую точность регулирования температуры. Раствор проходит через форсунку, распыляющую его на мельчайшие капли, и попадает в цилиндр (3), в котором протекает процесс сушки с образованием высушенных частиц. Частицы, захваченные потоком газа, перемещаются в циклон (4), где происходит их разделение под действием собственной силы тяжести. Установка

оснащена фильтром (5), удерживающим мелкие частицы, и аспиратором (6) для создания потока воздуха.

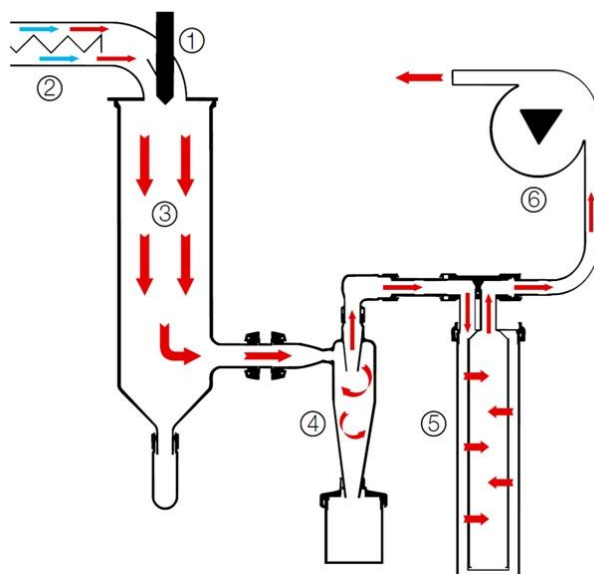


Рисунок 2.4.4 – Схема лабораторной установки распылительной сушилки: 1 – форсунка; 2 – нагреватель; 3 – распылительная камера (цилиндр); 4 – циклон; 5 – фильтр; 6 – аспиратор

Технические характеристики распылительной сушилки Mini Spray Dryer B-290 представлены в таблице 2.4.2.

Таблица 2.4.2 – Технические характеристики распылительной сушилки Mini Spray Dryer B-290

Показатель	Значение
Мощность	2900 Вт
Напряжение	200–230 В / 50–60 Гц
Производительность испарения	1,0 л/ч H ₂ O, для органических растворителей – выше
Максимальная скорость потока воздуха	35 м ³ /ч
Управление двигателем	Преобразователь частоты
Максимальная температура на входе	220 °С
Мощность нагрева	2300 Вт

Продолжение таблицы 2.4.2

Показатель	Значение
Управление нагревом	PT-100, Fuzzy-logic, точность поддержания температуры ± 3 °C
Серийный интерфейс	RS-232 для передачи всех параметров
Газ для распыления	Сжатый воздух или азот, 200–1000 л/ч, 5–8 бар
Диаметр отверстия форсунки	0,7 мм – стандартный
Распылительный колпачок	Диаметр – 1,4 мм и 1,5 мм
Среднее время нахождения	1,0–1,5 сек.
Возможный размер частиц продукта	1–25 мкм
Материалы, вступающие в контакт с продуктом	Кислотоустойчивая нержавеющая сталь, 3,3 боросиликатное стекло, силикон
Размеры Ш x Г x В	60 x 50 x 110 см

Массовую долю белка определяли на анализаторе общего азота (белка) Rapid N Cube (рисунок 2.4.5), работающего по методу Дюма, т. е. путем сжигания пробы с регистрацией общего азота на детекторе теплопроводности.



Рисунок 2.4.5 – Анализатор белкового азота Rapid N Cube

Массовую долю жира и органолептические показатели гидролизатов коллагена определяли по ГОСТ 33692-2015 «Белки животные соединительнотканые. Общие технические условия» [26].

Определение содержания сухих веществ в растворах коллагена производили на рефрактометре ИРФ-454Б2М. Пробу предварительно разбавляли водой. Результат умножали на коэффициент разведения [14].

Растворимость образцов определяли визуально, подготовку материала вели по следующему алгоритму: 500 мг гидролизатов смешивали в 50 мл дистиллированной воды, наблюдение за растворением проводили при температуре воды 25 °C и 50 °C при активном перемешивании (200 об/мин) с помощью лабораторной магнитной мешалки ММ-135Н с подогревом (Tagler, Россия) [139].

Микрофотографии сухих образцов гидролизатов получали с использованием сканирующего электронного микроскопа JEOL JED-2300 (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 20 кВ.

Аминокислотная последовательность пептидов исследуемых образцов гидролизатов коллагена была определена методом матрично-активированной лазерной десорбцией / ионизацией на приборе MALDI Biotyper (Bruker, США). Аминокислотная последовательность представлена в однобуквенном коде.

Молекулярно-массовое распределение белков исследуемых образцов гидролизатов коллагена проводили с помощью белкового электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии анионного детергента додецилсульфата натрия (ДДС-Na). Сухие образцы гидролизатов коллагена растворяли в деионизированной воде при 60 °C для создания раствора с концентрацией 0,2 %, далее образцы смешивали с загрузочным буфером, содержащим дитиотреитол (ДТТ) в количестве 5 мкл. Смешанный раствор подвергался тепловой денатурации в кипящей воде в течение 5 мин. Подготовленные образцы в количестве 15 мкл загружали в полиакриламидные гели, затем осуществляли подачу тока. После проведения электрофореза гель окрашивали 0,1 % Coomassie Blue R-250 в 25 % изопропанола и 10 % уксусной кислоты в течение 2 ч, после чего обесцвечивали 5%-ным спиртом и 10%-ной уксусной кислотой. Далее в системе гель-документирования Gel Doc XR Plus Bio-RAD проводили детекцию 2-D гелей.

Моделирование структуры белка проводили с помощью сервиса SWISS-MODEL, который включает в себя репозиторий SWISS-MODEL и рабочее пространство SWISS-MODEL. Эта автоматизированная платформа моделирования гомологии структуры белка позволяет создать 3D-модель белка

с использованием сравнительного подхода и баз данных аннотированных моделей для ключевых эталонных протеомов на основе UniProtKB [242].

Молекулярная масса исследуемых образцов гидролизатов коллагена рассчитывалась с помощью сервиса Peptide Mass Calculator (<https://www.peptidesynthetics.co.uk/tools/>) [140].

Биоактивность полученных пептидов оценивали методом *in silico* с помощью онлайн-сервера PeptideRanker, который ранжирует пептиды по прогнозируемой вероятности того, что они будут биологически активными [193].

Структура пептидов была смоделирована с использованием онлайн-инструмента PepDraw (<https://www.pepdraw.com/>) [244].

Массу аминокислотных остатков, изоэлектрическую точку, алифатический индекс, молярный коэффициент поглощения, а также площадь поверхности полученных пептидов оценивали с использованием комбинации инструментов биоинформатики методом *in silico* с помощью онлайн-инструмента PepDraw на основе выявленной аминокислотной последовательности выработанных образцов гидролизатов коллагена.

Идентификация белка и определение потенциально биоактивных свойств исследуемых пептидных последовательностей проводили с помощью базы данных биоактивных пептидов MBPDB.

Теоретическое исследование по прогнозированию топологии гидрофобности и гидрофильности белков гидролизата коллагена осуществлялось с помощью онлайн-сервиса ProtScale. Он позволяет рассчитать и представить в виде двумерного графика профиль, полученный по любой аминокислотной шкале для выбранного белка. Применялась шкала Кайта-Дулиттла, благодаря которой были определены индивидуальные значения для 20 аминокислот: Ala: 1,800; Arg: -4,500; Asn: -3,500; Asp: -3,500; Cys: 2,500; Gln: -3,500; Glu: -3,500; Gly: -0,400; His: -3,200; Ile: 4,500; Leu: 3,800; Lys: -3,900; Met: 1,900; Phe: 2,800; Pro: -1,600; Ser: -0,800; Thr: -0,700; Trp: -0,900; Tyr: -1,300; Val: 4,200; -3,500; -3,500; -0,490 [146].

Исследование биологических свойств гидролизатов коллагена проводилось в Экспериментальной клинике-лаборатории биологически активных веществ животного происхождения ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН (109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26).

Содержание животных, обеспечение их питания, уход за ними, различные манипуляции с животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии:

- со стандартными операционными процедурами, или СОП, утвержденными в ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН;
- с требованиями ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики», ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами» (переиздание);
- с международными правилами гуманного обращения с животными: Директива 2010/63 ЕУ Европейского парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях (Санкт-Петербург, 2012 г.); Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях ETS N 123 (Страсбург, 18.03.1986) [23, 24].

Кроме того, исследование одобрено Комиссией по биоэтике ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН (протокол № 6/2023 от 03.04.2023). В случае если бы животные находились в предсмертном состоянии, демонстрирующем сильные боли или длительные признаки тяжелых мучений, была предусмотрена возможность усыпления их гуманным способом.

Объектом исследования являлись гидролизаты коллагена из вторичных сырьевых ресурсов животного происхождения в количестве трех опытных образцов, выработанных из сырой кости крупного рогатого скота, ног цыплят-бройлеров и свиной шкурки.

Исследование биологических эффектов образцов проведено на клинически здоровых животных – 40 мышах-самцах линии Balb/c – в возрасте 10 недель (ООО «СМК СТЕЗАР», Россия; ветеринарное свидетельство № 18579619692 от 12.04.2023).

После поступления в лабораторию мыши проходили карантин (с учетом периода адаптации к условиям лаборатории) сроком не менее 7 дней. Клинический осмотр животных в этот период осуществлялся ежедневно согласно СОП № Spf-02-05 «Процедура осмотра животных». По результатам осмотра заполнялись протоколы наблюдения за мышами. В конце карантина и периода адаптации заполнялся протокол допуска животных к эксперименту. В течение этого времени отклонений в здоровье мышей и признаков неблагополучия выявлено не было.

В исследовании использовали мышей массой ($M \pm m$) $19,87 \pm 2,04$ г (Ме – 19,45 г; P25 – 18,48 г; P75 – 21,23 г) на начало эксперимента.

Каждому животному был присвоен индивидуальный номер, который наносился маркером на хвосты. Клетки были снабжены этикетками с указанием следующей информации, согласно СОП № Spf-02-02 «Размещение лабораторных животных в клетках»: номер клетки, количество и пол мышей, номер исследования, название препарата, способ его введения, доза, дата начала и окончания эксперимента.

После завершения периода адаптации необходимое количество животных, отвечающих критериям включения в исследование, были распределены на группы. Группы по 10 мышей формировали методом случайного отбора с использованием массы тела в качестве ведущего признака:

1 группа – контрольная: мыши, употреблявшие стандартный рацион;

2 группа – опытная: мыши, употреблявшие рацион, обогащенный образцом 1 (гидролизаты коллагена, выработанные из сырой кости крупного рогатого скота);

3 группа – опытная: мыши, употреблявшие рацион, обогащенный образцом 2 (гидролизаты коллагена, выработанные из ног цыплят-бройлеров);

4 группа – опытная: мыши, употреблявшие рацион, обогащенный образцом 3 (гидролизаты коллагена, выработанные из свиной шкурки).

Животных содержали в контролируемых условиях окружающей среды, при температуре воздуха 21 ± 2 °C и относительной влажности 50–60 %. Освещение в экспериментальных комнатах искусственное (12 часов – день, 12 часов – ночь), в соответствии с ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур» от 09.11.2015 (переиздание). Корма, оборудование и инвентарь для ухода за животными хранятся в помещениях, изолированных от мест их содержания.

Мыши находились в клетках из поликарбоната Bio. A.S. тип II (ENRET, Германия) по 5 голов. Для лабораторных животных использовался гигиенический подстил Лигноцель БК 8-15/LIGNOCEL (J. Rettenmaier & Sohne GMBH + CO KG, Германия). Смену подстилки осуществляли 1 раз в 8–10 суток.

Мыши всех групп употребляли питьевую воду *ad libitum*. Ее получали на установке водоподготовки EMD Millipore RiOs™ 50 (MerckMillipore, Германия), минерализацию осуществляли путем добавления минеральных солей для получения физиологически полноценного минерального состава (минерализация 314–382 мг/л: гидрокарбонаты – 144–180, сульфаты – < 1, хлориды – 60–76, кальций – 6, магний – 3, натрий – 50–58, калий – 50–58). Температура воды для поения составляла 10–12 °C.

Животные контрольной группы (1 группа) ежедневно употребляли стандартный полнорационный корм ПК 120 по ГОСТ 34566-2019 «Комбикорма полнорационные для лабораторных животных. Технические условия» (декларация о соответствии № РОСС RU Д-RU.AA80.B.0305/20 до 04.11.2023; производитель АО «Гатчинский комбикормовый завод», Россия; поставщик ООО «Лабораторкорм», Россия; ветеринарное свидетельство № 18378495225 от 28.03.2023). Корм давали в кормовое углубление клетки.

Животные опытных групп (2,3,4 группы) ежедневно употребляли рацион, обогащенный в количестве 15 % от общей калорийности экспериментальными

образцами. Расчет был проведен на основе того, что 1 мышь в сутки потребляет 11 ккал, а 15 % от общей калорийности составляет 3 ккал (1 г образца/мышь в сутки с учетом естественных потерь). После употребления исследуемых образцов животным 2–4 групп выдавали полнорационный комбикорм. Ежедневно осуществляли учет потребленного рациона и выпитой воды.

Операционное моделирование плоскостных ран проводили животным всех групп по [11]. Животных вводили в анестезию газом изофлурана, испаряемым в герметичную камеру (установка для ингаляционной анестезии лабораторных грызунов RWD, КНР). Анестезированное состояние поддерживалось путем установки носового конуса, соединенного с потоком газа изофлурана. На выбритом участке кожи на спине животного производился продольный разрез длиной до 2 см, края которого затем скреплялись хирургической стерильной нитью. Разрез обрабатывался обеззараживающими растворами (хлоргексидин, перекись водорода), и мышь выводилась из наркоза.

Взвешивание животных осуществлялось каждые 3 дня на электронных лабораторных весах (Ohaus, США). Учет рациона (взвешивание бутылок с водой, корма и экспериментального образца) производили в одно и то же время дня с использованием лабораторных весов ВЛТЭ-310 (Госметр, Санкт-Петербург) ежедневно. Также каждый день ранозаживление после моделирования ран фотофиксировалось.

Все животные по окончании эксперимента (на 16 день) подлежали аутопсии, включая тщательное исследование внешней поверхности тела, всех отверстий, грудной и брюшной полостей и их содержимого. У всех мышей был произведен отбор внутренних органов (печень, почки, сердце, селезенка) для взвешивания во влажном состоянии сразу после вскрытия с использованием фильтровальной бумаги или подложки.

В процессе аутопсии у 6 животных из каждой группы осуществляли отбор раневой поверхности кожи (2×1 см) для проведения тензиометрического теста на прочность рубца; у 4 животных из каждой группы – для проведения

гистологических исследований. При проведении тензиометрической оценки прочности рубца вырезанный лоскут раневой поверхности кожи мышцы равномерно растягивали, используя грузы с известной массой, и фиксировали массу, при которой происходил разрыв рубца. Для проведения гистологических исследований образцы кожи фиксировали в 10%-ном забуференном растворе формалина (Leica Biosystems, США) в течение 72 ч при температуре 22 ± 2 °C. Затем обезвоживали в спиртах и пропитывали парафином с помощью процессора Tissue-Tek VIP 5 JR (Sakura, Япония). Срезы толщиной 8 мкм изготавливали на микротоме Microm HM 325 (Microm International GmbH, Германия), окрашивали гематоксилин-эозином (БиоВитрум, Россия), обезвоживали, просветляли и заключали в монтирующую среду (БиоВитрум, Россия). Анализ гистологических препаратов проводили на микроскопе AxioImager A1 с использованием камеры AxioCam MRc 5 и программы AxioVision 4.7.1.0 (Carl Zeiss, Германия).

У всех животных отбирали кровь из сердца (до вскрытия грудной клетки, из левого желудочка) в пробирку с антикоагулянтом для проведения исследований (цитометрия и биохимия).

Содержание лимфоцитов (LYM), гранулоцитов (GRA) и моноцитов (MON) определяли на проточном цитометре Guava Easy Cyte (Merck Millipore, Германия) посредством детектирования размера и гранулярности клеток. Содержание лейкоцитов рассчитывали по формуле: $WBC = LYM + GRA + MON$. Относительное содержание лимфоцитов, гранулоцитов и моноцитов вычисляли по формулам: $\frac{LYM}{WBC} \times 100 \%$, $\frac{GRA}{WBC} \times 100 \%$, $\frac{MON}{WBC} \times 100 \%$.

Биохимические показатели плазмы крови (концентрации белка, альбумина, креатинина, мочевины, активность аспартатаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ)) определяли на автоматическом биохимическом анализаторе BioChem FC-360 (HTI, США), используя наборы реактивов (HTI, США).

Статистический анализ проводили с использованием программ Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, США), Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США), IBM SPSS Statistics (IBM, США). Каждый эксперимент повторялся не менее трех раз, экспериментальные данные выражали как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка с добавлением процентилей (P 25–75) при анализе результатов доклинических исследований на лабораторных животных. Дисперсионный анализ (критерий Тьюки) использовали для выявления наличия значимого влияния технологических параметров процессов (обезжиривание, гидролиз, ультрафильтрация, распылительная сушка) на качественные и количественные характеристики гидролизата коллагена. Статистическая достоверность наличия биоактивных характеристик гидролизата коллагена выяснялась с применением непараметрического критерия *U* Манна-Уитни. Вероятность 0,05 была выбрана в качестве значимого уровня при анализе практически всех изучаемых показателей, в том числе крови и тензиометрических показателей; вероятность 0,10 – при анализе массы животных и относительной массы их внутренних органов.

ГЛАВА 3 ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕПЦИИ ИССЛЕДОВАНИЙ. ОЦЕНКА ПРОИЗВОДСТВЕННОГО И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА СЫРЬЯ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

3.1 Научная концепция и пути ее реализации

В основу диссертационной работы положена концепция разработки современных биотехнологических подходов в технологии производства гидролизатов коллагена из вторичных сырьевых ресурсов животного происхождения.

Производство гидролизатов коллагена включает в себя сложные многоступенчатые процессы (подготовка сырья, предварительная обработка, гидролиз, очистка, концентрирование и сушка), каждый из которых играет важную роль в получении высококачественного конечного продукта.

Первая проблема производства гидролизатов из костного сырья – во многих технологических операциях используется большое количество кислот, щелочи и воды. Использование большого количества химикатов приводит к образованию сточных вод, которые могут вызвать серьезные экологические проблемы, если не обеспечить их надлежащую очистку и нейтрализацию.

Второй проблемой является большая продолжительность определенных этапов технологического процесса. Так, деминерализация, известкование и обеззоливание костного сырья могут протекать до 30–40 суток, в связи с чем происходит затягивание промышленного производства. Костное сырье, прошедшее подготовку (очистка, дробление, обезжиривание и повторное измельчение) направляется на дальнейший процесс переработки, результаты которого описаны в данной главе диссертационной работы.

Процессы деминерализации, известкования и обеззоливания являются основными подготовительными технологическими этапами перед процессом

экстракции коллагена. Они занимают достаточно продолжительное время: например, деминерализация может длиться от 7 до 14 дней, известкование – от 3 до 8 недель, а обеззоливание – 1–2 дня. При этом каждый из данных подготовительных технологических этапов подразумевает использование большого количества химических реагентов, таких как HCl и $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Однако современное высокоэффективное производство не позволяет реализовывать в своей технологической линии столь долгосрочные процессы. Это обуславливает актуальность поиска новых технологических решений, которые помогут оптимизировать данный этап производства.

Оптимальным решением ускорения процесса деминерализации обезжиренного костного сырья является проведение гидролиза ферментами или ферментными препаратами.

Коллаген – важный и незаменимый продукт не только пищевой и фармацевтической промышленности, но и тканевой инженерии и других областей. Таким образом, в связи с широким использованием коллагена и его гидролизатов необходимо искать новые безопасные и эффективные технологии производства. Одной из таких технологий, которую можно применять на определенных этапах технологического производства гидролизатов, считается биокатализ.

При проведении биокатализа широкое применение получают протеолитические ферменты, которые все чаще используются в ферментативном гидролизе при производстве пищевых систем. Ферментативный гидролиз сырья с высоким содержанием коллагена позволяет получить гидролизаты коллагена за более короткое время с меньшим количеством отходов.

Современные биотехнологические производства проявляют интерес к технологиям эффективных методов извлечения и переработки коллагеновых белков из различных источников животного происхождения, таких как шкура, кости и хрящи. Гипотеза исследования заключается в том, что в результате разработки технологии ферментативного обезжиривания и гидролиза в кислотной и/или щелочной среде, а также применения ультрафильтрации предполагается

получить высококачественные гидролизаты с оптимизированной молекулярной массой, которые будут обладать высокой биодоступностью и функциональностью.

Биоактивные пептиды, полученные из гидролизатов коллагена, могут обладать рядом положительных биологических свойств (улучшение состояния кожи, суставов, волос) и использоваться для создания пищевых систем, добавок и фармацевтических препаратов.

Для подтверждения гипотезы на первых этапах исследования необходимо определить сырьевой и биологический потенциал коллагенсодержащих сырьевых ресурсов животного происхождения.

3.2 Расчет потенциала сырьевой базы Сибирского федерального округа для производства гидролизатов коллагена

Основные виды сырья для производства гидролизатов коллагена – мягкое коллагенсодержащее сырье, кости животных и костный остаток после убоя и обвалки туш. Значительную долю сырья животного происхождения составляют побочные продукты, которые перерабатывают в конечные продукты различного назначения с добавленной стоимостью, в том числе пищевые, кормовые, медицинские и технические [154, 151].

Таким коллагенсодержащим сырьем могут являться шкуры и костное сырье от разделки мяса. К продуктам комплексной и глубокой переработки шкур и костного сырья относятся жир, концентрированные и сухие бульоны, соусы, желатин, белковые препараты, минеральные добавки, корма для сельскохозяйственных и домашних животных, клей, а также изделия медицинского назначения.

По мнению экспертов [13], в течение прогнозируемого периода (2018 – 2028 гг.) мировой рынок гидролизатов коллагена продемонстрирует рост, что

подтверждается ежегодным увеличением спроса на данный продукт. В то же время на территории Российской Федерации объемы производства гидролизатов коллагена небольшие, как и количество его производителей. Прежде всего это связано с доступностью оборудования для технического оснащения производства.

В данном разделе приведен анализ результатов оценки потенциальной ресурсности сырьевой базы Сибирского федерального округа для организации предприятия по производству гидролизатов коллагена и коллагенсодержащего сырья.

Расчет рыночного потенциала костного сырья

Согласно данным Федеральной службы государственной статистики (Росстат), за 2020 г. поголовье крупного рогатого скота в Новосибирской области составляет 455169, свиней – 345448, овец и коз – 206255 голов; в Омской области – 397100, свиней – 459300, овец и коз – 247900 голов; в Кемеровской области – 152100, свиней – 167900, овец и коз – 81900 голов.

Из приведенных данных следует, что Новосибирская и Омская области как потенциальные поставщики кости для производства гидролизатов коллагена более значимы, чем Кемеровская область. При этом между собой по количеству потенциального сырья они сопоставимы. Соотношение кости, которое может поступать из Новосибирской, Омской и Кемеровской областей составляет 41,6:42,5:15,9.

Расчеты объемов производства кости для извлечения гидролизатов коллагена (в год) в СФО представлены в таблице 3.2.1. Соотношение между говяжьей, свиной и бараньей костями в общем объеме составляет 64,6, 28,1 и 7,3 % соответственно. Более ценным сырьем для производства является говяжья кость, имеющая меньше жира, который необходимо удалить (причем максимально полно).

Таблица 3.2.1 – Средний годовой расчет объемов производства кости сельскохозяйственных животных в регионах СФО

Вид животного	Количество голов	Средняя живая масса 1 головы, кг	Живая масса общая, т	Выход мяса, %	Мясо на кости, т	Количество кости	
						%	т
Новосибирская область							
КРС	86982	500	43491	49	21310,6	11	2131,06
Свиньи	152594	120	18311,3	64	11719,2	7,2	843,8
Овцы, козы	33227	60	1993,6	42	837,3	26	217,7
Итого	306030	—	63795,9	—	33866,5	—	3192,5
Омская область							
КРС	75885	500	37942,5	49	18591,8	11	2045,1
Свиньи	173156	120	20778,7	64	13298,4	7,2	957,5
Овцы, козы	39936	60	2396,2	42	1006,4	26	261,7
Итого	288977	—	61117,4	—	32896,6	—	3264,3
Кемеровская область							
КРС	29066	500	14533	49	7121,17	11	783,3
Свиньи	63298	120	7595,8	64	4861,3	7,2	350,0
Овцы, козы	13193	60	791,6	42	332,5	26	86,5
Итого	105557	—	22920,4	—	12314,9	—	1219,8
Всего	700564	500	—	—	79078,0	—	7676,6

В таблице 3.2.2 представлены расчеты соотношения по видам кости сельскохозяйственных животных для производства гидролизатов коллагена. Исходя из сложившейся практики переработки мяса, при определении количества сырья для производства гидролизатов коллагена были внесены дополнительные ограничения.

Таблица 3.2.2 – Соотношение по видам кости сельскохозяйственных животных для производства гидролизатов коллагена

Вид кости	Соотношение		Соотношение, %		
	т	%	Новосибирская область	Омская область	Кемеровская область
Говяжья	4959,4	64,6	66,7	62,7	64,1
Свиная	2151,3	28,1	26,5	29,3	28,8
Баранья	565,9	7,3	6,8	8,0	7,1
Итого	7676,6	100	100	100	100

Баранину преимущественно получают в фермерских хозяйствах и реализуют в разделанном виде по кулинарному назначению при естественном соотношении тканей и костей. Поэтому ее следует исключить при расчете потенциального количества кости. Говядина и свинина от переработки частично поступают в реализацию в виде мяса на кости (рекомендуемое количество – 54 %), остальное – на разделку. Стоит отметить, что на реализацию в виде мяса поступает около 20 % свинины и говядины, т. к. в настоящее время более предпочтительна реализация бескостного сырья, а кость от разделки реализуют как пищевую или передают на кормовые цели. Исходя из этих ограничений, уточнено количество мясного сырья и количество кости от его разделки.

На основании ранее полученных данных далее проводим расчет потенциального объема кости (в год) для производства с учетом структуры переработки мяса, который представлен в таблице 3.2.3.

Таблица 3.2.3 – Расчет потенциального объема кости сельскохозяйственных животных

Вид мяса	Общее количество мяса на кости, т/год	Количество сырья для разделки*, т/год	Выход кости		В том числе плоской (паспортной)	
			%	т/год	%	т/год
Говядина	47023,6	37618,8	11,0	4138,0	11,0	4138,0

Примечание: * – 80 % от общего количества.

Продолжение таблицы 3.2.3

Вид мяса	Общее количество мяса на кости, т/год	Количество сырья для разделки*, т/год	Выход кости		В том числе плоской (паспортной)	
			%	т/год	%	т/год
Свинина	29878,9	23903,1	7,2	1721,0	3,7	884,4
Итого	76902,5	61522	–	5859,0	–	5022,4

Примечание: * – 80 % от общего количества.

Суточное количество кости для переработки рассчитывали по формуле 3.2.1:

$$K = \frac{B}{12 \times 20} \times 1000, \quad (3.2.1)$$

где K – количество кости, кг; B – выход кости, т; 12 – число мес.; 20 – число рабочих дней в месяц. Таким образом, суточное количество кости для переработки составит:

$$K = \frac{5022,4}{12 \times 20} \times 1000 = 20\,926 \text{ кг.}$$

Потенциально в качестве поставщиков кости можно рассматривать предприятия разного типа, в том числе мясокомбинаты, свинохладобойни, мясоперерабатывающие предприятия. Среди них наиболее предпочтительны последние. Это объясняется тем, что в современных условиях крупные предприятия по производству мяса – это вертикально интегрированные комплексы, в которых процесс организован по замкнутому циклу, начиная от выращивания сырья до его глубокой переработки. При этом отходы и вторичные продукты, включая кость, используются внутри данного холдинга для производства кормов. В качестве примеров можно привести такие предприятия, как:

– Сибирская аграрная группа (ООО «Сибагро», г. Томск): в составе холдинга 11 производственных предприятий, в том числе 7 свиноводческих комплексов в Томской, Кемеровской, Новосибирской, Свердловской, Тюменской областях, Красноярском крае и Республике Бурятия; 3 мясокомбината в Томске, Новосибирске и Екатеринбурге; 1 птицефабрика (ООО «Птицефабрика Томская»);

– Омский Бекон (группа «ПРОДО»): составляет 72 % промышленного производства свинины в Омской области (группа включает перерабатывающие предприятия, предприятия по выращиванию птицы и свиней, растениеводческие и комбикормовые предприятия).

Поэтому среди основных поставщиков кости как сырья для производства гидролизатов коллагена следует рассматривать мясоперерабатывающие предприятия. Среди наиболее крупных из них выделяется ООО «Сибагро» (мощность – до 250 колбасных изделий и изделий из мяса в сутки). Таким образом, учитывая мощности холдингов, возможное поступление кости, оцененное примерно в 21 т, следует уменьшить примерно на 40 %.

Емкость рынка по костному сырью (суточную) рассчитывали по формуле 3.2.2:

$$M = K \times 0,6, \quad (3.2.2)$$

где M – емкость рынка по костному сырью (суточная), т; K – суточное количество кости, т; 0,6 – число мес. В результате емкость рынка по костному сырью (суточная) составит:

$$M = 21 \times 0,6 = 12,6 \text{ т.}$$

Такое значение обусловлено тем, что мясоперерабатывающие предприятия для своих нужд преимущественно используют бескостное блочное мясо.

При выходе гидролизатов коллагена 14–18 % к массе сырой кости возможная сменная мощность по производству гидролизатов коллагена составит 2,25 т, а выход жира при обезжиривании в среднем – 6 %, или 750 кг.

Расчет рыночного потенциала мягкого коллагенсодержащего сырья

Мягкое коллагенсодержащее сырье животного происхождения (шкура, хрящи, сухожилия и другие соединительные ткани) обладает значительным потенциалом для производства гидролизатов коллагена, т. к. коллаген представляет собой основной структурный белок в этих тканях (ценное сырье). Наиболее быстрорастущей сферой их применения сейчас является производство белков из продуктов переработки свинины. В последние годы этот рынок активно развивается, что связано с процессом импортозамещения.

В таблице 3.2.4 представлен расчет среднегодового потенциала производства мягкого коллагенсодержащего сырья – свиной шкурки в СФО.

Таблица 3.2.4 – Расчет среднегодового потенциала производства мягкого коллагенсодержащего сырья – свиной шкурки в СФО

Регион	Поголовье свиней, тыс. голов	Выход сырья*, т/год	Потенциал производства гидролизата**, т/год
Омская область	443,20	6648,00	997,00
Новосибирская область	386,50	5798,00	870,00
Алтайский край	375,80	5637,00	846,00
Томская область	298,40	4476,00	671,00
Красноярский край	284,60	4269,00	640,00
Кемеровская область	271,90	4079,00	612,00
Иркутская область	245,30	3680,00	552,00
Республика Алтай	12,80	192,00	29,00

Примечание: * – расчет выхода шкурок основывался на среднем показателе нормы выхода продукции шкуры с одной свиньи, который составляет 10 % от живой массы; ** – вычисление проводилось с учетом среднего выхода 15 % от массы исходного сырья.

Продолжение таблицы 3.2.4

Регион	Поголовье свиней, тыс. голов	Выход сырья*, т/год	Потенциал производства гидролизата**, т/год
Республика Хакасия	11,50	173,00	26,00
Республика Тыва	9,80	147,00	22,00

Примечание: * – расчет выхода шкурок основывался на среднем показателе нормы выхода продукции шкуры с одной свиньи, который составляет 10 % от живой массы; ** – вычисление проводилось с учетом среднего выхода 15 % от массы исходного сырья.

Анализ производственного потенциала коллагенсодержащего сырья в Сибирском федеральном округе демонстрирует значительные возможности для развития производства гидролизатов коллагена, где общий потенциал сырьевой базы свиной шкурки составляет около 35099 т, что может обеспечить производство около 5265 т гидролизата ежегодно. Ключевыми регионами для размещения производств являются Алтайский край, Новосибирская и Омская области, которые совместно обеспечивают более 50 % всего сырьевого потенциала СФО. Это делает указанные регионы наиболее привлекательными для создания перерабатывающих предприятий с учетом их развитой инфраструктуры и логистических возможностей.

Расчет рыночного потенциала прочего коллагенсодержащего сырья (вторичных сырьевых ресурсов переработки птицы)

Потенциальным сырьем для производства гидролизатов коллагена являются отходы переработки птицы, т. к. остатки обвалки птицы – основной побочный продукт мясоперерабатывающей промышленности, который может быть ценным источником коллагена.

В связи с новым поиском альтернатив традиционного подхода в производстве гидролизатов коллагена необходимо проводить научные исследования, которые смогут способствовать разработке современной технологии производства гидролизатов коллагена из отходов переработки птицы,

в том числе ног цыплят-бройлеров. Это позволит максимально задействовать имеющиеся ресурсы и неиспользуемые промышленные отходы птицеводства.

Далее проводили расчет рыночного потенциала производства вторичных сырьевых ресурсов переработки птицы в СФО за 2021–2022 гг. (таблица 3.2.5). Для этого была использована открытая информация Росстата по регионам. Расчет массы субпродуктов осуществляли по среднему показателю массы. Полученные результаты показывают устойчивый рост производства субпродуктов и явных лидеров в этом процессе: Новосибирская область (рост с 40,2 до 43,5 млн голов), Алтайский (с 35,4 до 38,2 млн голов) и Красноярский (с 32,8 до 35,7 млн голов) края, которые совокупно обеспечивают более 50 % всего потенциала производства субпродуктов.

Таблица 3.2.5 – Рыночный потенциал производства вторичных сырьевых ресурсов переработки птицы в СФО

Регион	Год	Производство бройлеров, млн голов	Субпродукт	Выход сырья, т/год	Потенциал производства гидролизата*, т/год
Новосибирская область	2021	40,2	Желудок	1206,0	180,9
			Ноги	1809,0	271,4
			Килевая кость	2412,0	361,8
			Хрящ с килевой кости	603,0	90,5
	2022	43,5	Желудок	1305,0	195,8
			Ноги	1957,5	293,6
			Килевая кость	2610,0	391,5
			Хрящ с килевой кости	652,5	97,9

Примечание: * – вычисление проводилось с учетом среднего выхода 15 % от массы исходного сырья.

Продолжение таблицы 3.2.5

Алтайский край	2021	35,4	Желудок	1062,0	159,3
			Ноги	1593,0	239,0
			Килевая кость	2124,0	318,6
			Хрящ с килевой кости	531,0	79,7
	2022	38,2	Желудок	1146,0	171,9
			Ноги	1719,0	257,9
			Килевая кость	2292,0	343,8
			Хрящ с килевой кости	573,0	85,9
Красноярский край	2021	32,8	Желудок	984,0	147,6
			Ноги	1476,0	221,4
			Килевая кость	1968,0	295,2
			Хрящ с килевой кости	492,0	73,8
	2022	35,7	Желудок	1071,0	160,7
			Ноги	1606,5	241,0
			Килевая кость	2142,0	321,3
			Хрящ с килевой кости	535,5	80,3
Омская область	2021	25,6	Желудок	768,0	115,2
			Ноги	1152,0	172,8
			Килевая кость	1536,0	230,4
			Хрящ с килевой кости	384,0	57,6
	2022	28,4	Желудок	852,0	127,8
			Ноги	1278,0	191,7
			Килевая кость	1704,0	255,6
			Хрящ с килевой кости	426,0	63,9

Примечание: * – вычисление проводилось с учетом среднего выхода 15 % от массы исходного сырья.

Продолжение таблицы 3.2.5

Регион	Год	Производство бройлеров, млн голов	Субпродукт	Выход сырья, т/год	Потенциал производства гидролизата*, т/год
Томская область	2021	23,2	Желудок	696,0	104,4
			Ноги	1044,0	156,6
			Килевая кость	1392,0	208,8
			Хрящ с килевой кости	348,0	52,2
	2022	25,6	Желудок	768,0	115,2
			Ноги	1152,0	172,8
			Килевая кость	1536,0	230,4
			Хрящ с килевой кости	384,0	57,6
Кемеровская область	2021	21,5	Желудок	645,0	96,8
			Ноги	967,5	145,1
			Килевая кость	1290,0	193,5
			Хрящ с килевой кости	322,5	48,4
	2022	23,8	Желудок	714,0	107,1
			Ноги	1071,0	160,7
			Килевая кость	1428,0	214,2
			Хрящ с килевой кости	357,0	53,6

Примечание: * – вычисление проводилось с учетом среднего выхода 15 % от массы исходного сырья.

Продолжение таблицы 3.2.5

Регион	Год	Производство бройлеров, млн голов	Субпродукт	Выход сырья, т/год	Потенциал производства гидролизата*, т/год
Иркутская область	2021	19,2	Желудок	576,0	86,4
			Ноги	864,0	129,6
			Килевая кость	1152,0	172,8
			Хрящ с килевой кости	288,0	43,2
	2022	21,3	Желудок	639,0	95,9
			Ноги	958,5	143,8
			Килевая кость	1278,0	191,7
			Хрящ с килевой кости	319,5	47,9
Республика Хакасия	2021	7,8	Желудок	234,0	35,1
			Ноги	351,0	52,7
			Килевая кость	468,0	70,2
			Хрящ с килевой кости	117,0	17,6
	2022	8,5	Желудок	255,0	38,3
			Ноги	382,5	57,4
			Килевая кость	510,0	76,5
			Хрящ с килевой кости	127,5	19,1

Примечание: * – вычисление проводилось с учетом среднего выхода 15 % от массы исходного сырья.

Продолжение таблицы 3.2.5

Регион	Год	Производство бройлеров, млн голов	Субпродукт	Выход сырья, т/год	Потенциал производства гидролизата*, т/год
Республика Алтай	2021	0,3	Желудок	9,0	1,4
			Ноги	13,5	2,0
			Килевая кость	18,0	2,7
			Хрящ с килевой кости	4,5	0,7
	2022	0,4	Желудок	12,0	1,8
			Ноги	18,0	2,7
			Килевая кость	24,0	3,6
			Хрящ с килевой кости	6,0	0,9
Республика Тыва	2021	0,2	Желудок	6,0	0,9
			Ноги	9,0	1,4
			Килевая кость	12,0	1,8
			Хрящ с килевой кости	3,0	0,5
	2022	0,2	Желудок	6,0	0,9
			Ноги	9,0	1,4
			Килевая кость	12,0	1,8
			Хрящ с килевой кости	3,0	0,5

Примечание: * – вычисление проводилось с учетом среднего выхода 15 % от массы исходного сырья.

Расчет производственного потенциала ног цыплят-бройлеров в Сибирском федеральном округе (таблица 3.2.6) демонстрирует значительный ресурсный потенциал с общим объемом сырья около 10152 т/год, что может обеспечить производство порядка 1523 т гидролизата ежегодно. При этом основная

концентрация сырья сосредоточена в трех ведущих регионах, таких как Новосибирская область (1957,5 т/год), Алтайский (1719,0 т/год) и Красноярский (1606,5 т/год) край, которые также совокупно обеспечивают более 50 % всего потенциала СФО. Таким образом, эти регионы становятся наиболее привлекательными для организации перерабатывающих производств с учетом стабильности поставок сырья, развитой инфраструктуры птицеводческих предприятий и возможностей логистической системы.

Таблица 3.2.6 – Расчет среднегодового потенциала производства ног цыплят-бройлеров в СФО

Регион	Производство бройлеров, млн голов/год	Выход сырья*, т/год	Потенциал производства гидролизата**, т/год
Новосибирская область	43,5	1957,5	293,6
Алтайский край	38,2	1719,0	257,9
Красноярский край	35,7	1606,5	241,0
Омская область	28,40	1278,00	191,70
Томская область	25,60	1152,00	172,80
Кемеровская область	23,80	1071,00	160,70
Иркутская область	21,30	958,50	143,80
Республика Хакасия	8,50	382,50	57,40
Республика Алтай	0,40	18,00	2,70
Республика Тыва	0,20	9,00	1,40

Примечание: * – расчет выхода ног основывался на среднем показателе нормы выхода продукции ног с одного цыпленка-бройлера, который составляет 5 % от живой массы;
 ** – вычисление проводилось с учетом среднего выхода 15 % от массы исходного сырья.

По результатам проведенного анализа и расчетов представлена актуальная информация о возможных объемах сырья, которое может быть передано в производство гидролизатов коллагена из регионов СФО. Также определено,

что наибольший сырьевой потенциал имеют Новосибирская область, Алтайский и Красноярский край.

3.3 Обоснование выбора коллагенсодержащего сырья для проведения исследований

На основании материала, представленного в разделе 3.2, в качестве потенциального сырья для производства гидролизатов коллагена и оптимизации технологических процессов их получения использовалась сырая кость крупного рогатого скота, свиная шкурка и ноги цыплят-бройлеров.

Для определения целесообразности использования предлагаемых ресурсов животного происхождения для извлечения коллагена были проведены исследования по определению состава сырья. Состав определяли по следующим показателям: массовая доля белков, массовая доля жира, массовая доля влаги и массовая доля минеральных веществ.

Определение данных показателей в исходном сырье даст возможность оценить в полной мере потенциал определенного животного сырья для извлечения из его структуры коллагена и в дальнейшем – гидролизатов коллагена. Средний физико-химический состав исследуемого коллагенсодержащего сырья представлен в таблице 3.3.1.

Таблица 3.3.1 – Средний физико-химический состав исследуемого коллагенсодержащего сырья

Параметр	Гидролизат коллагена		
	из сырой кости КРС	из ног цыплят-бройлеров	из свиной шкурки
	Значение		
Массовая доля влаги, %	54,00 ± 1,00	67,40 ± 1,10	58,10 ± 1,00

Продолжение таблицы 3.3.1

Параметр	Гидролизат коллагена		
	из сырой кости КРС	из ног цыплят-бройлеров	из свиной шкурки
	Значение		
Массовая доля белков, в том числе: коллагена, %	34,30 ± 0,40 21,80 ± 0,40	24,50 ± 0,20 18,46 ± 0,40	28,08 ± 0,20 21,85 ± 0,30
Массовая доля жира, %	14,00 ± 0,20	8,10 ± 0,10	7,30 ± 0,10
Массовая доля минеральных веществ, %	25,50 ± 0,30	6,40 ± 0,20	1,30 ± 0,06
Массовая доля кальция (Ca), мг/100 г	320,70 ± 2,00	237,50 ± 1,00	54,60 ± 0,70
Массовая доля фосфора (P), мг/100 г	117,40 ± 0,20	113,30 ± 0,08	47,40 ± 0,04
Массовая доля магния (Mg), мг/100 г	43,10 ± 0,10	63,60 ± 0,07	14,10 ± 0,03
Массовая доля натрия (Na), мг/100 г	8,40 ± 0,20	41,40 ± 0,20	44,60 ± 0,60

Анализ среднего физико-химического состава исследуемого коллагенсодержащего сырья демонстрирует значительные различия в распределении показателей между источниками. Ноги цыплят-бройлеров характеризуются самой высокой массовой долей влаги ($67,40 \pm 1,10$ %) и значительной долей белка ($24,50 \pm 0,20$ %), что делает их потенциальным сырьем для процессов гидролиза. Сырая кость КРС имеет наибольшую массовую долю белков ($34,30 \pm 0,40$ %) и минеральных веществ ($25,50 \pm 0,30$ %). Это позволяет считать ее перспективным сырьем для производства продуктов функциональной направленности. Свиная шкурка отличается наименьшей массовой долей минеральных веществ ($1,30 \pm 0,06$ %), но имеет относительно высокую массовую долю белков ($28,08 \pm 0,20$ %), что подтверждает ее высокий потенциал в производстве белковых ингредиентов. Различия в концентрациях кальция, фосфора и магния подчеркивают специфику применения каждого вида сырья в производстве коллагенсодержащих продуктов.

После подтверждения гипотезы научной работы было принято решение о проведении дальнейших исследований с данными видами сырья.

С целью выявления биотехнологического потенциала исследуемого сырья были осуществлены исследования по определению его аминокислотного состава (рисунок 3.3.1).

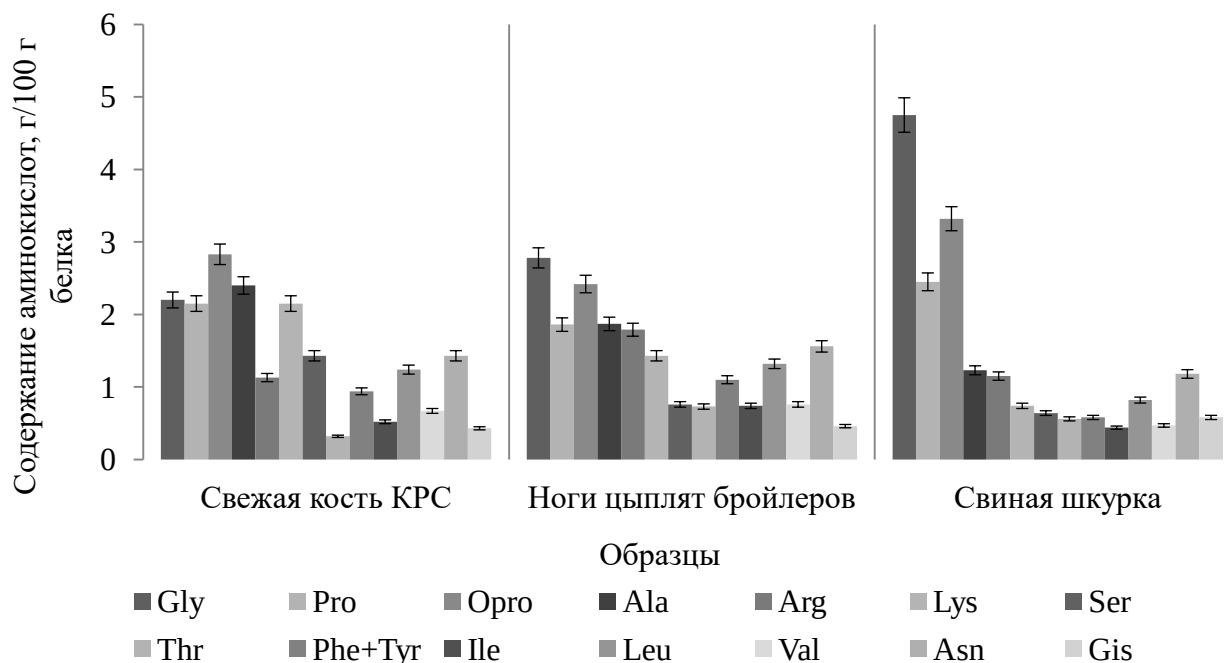


Рисунок 3.3.1 – Аминокислотный состав исследуемого коллагенсодержащего сырья

Результаты, представленные на рисунке 3.3.1, демонстрируют несколько ключевых различий, которые имеют важное значение для оценки функциональных свойств исследуемого сырья:

- 1) массовая доля глицина, являющегося основным компонентом коллагена, в образцах исследуемого сырья составляет от 2,20 до 4,75 г/100 г;
- 2) аминокислоты пролин и гидроксипролин, которые играют важную роль в стабилизации структуры коллагена, находятся в пределах от 2,20 до 2,45 г/100 г и от 2,42 до 3,42 г/100 г соответственно;
- 3) в составе аминокислот свиной шкурки особенно выделяется глутаминовая кислота (4,75 г/100 г), что может оказывать влияние

на структурную гибкость гидролизатов в отличие от других видов исследуемого сырья;

4) аминокислота аргинин в составе аминокислот ног цыплят-бройлеров в незначительной степени выделяется по отношению к содержанию аминокислоты в других исследуемых видах сырья, что может повышать его биологическую активность.

Полученные данные свидетельствуют о том, что различные виды collagenсодержащего сырья обладают различными функциональными характеристиками, обусловленными их аминокислотным составом. Это открывает новые возможности для оптимизации процесса производства гидролизатов collagenа, т. к. выбор сырья с определенными аминокислотными профилями позволяет производить гидролизаты с необходимыми функциональными и биоактивными свойствами. Учитывая эти различия, можно целенаправленно подбирать сырье в зависимости от конечных потребностей – для пищевых, фармацевтических, косметических и других целей.

3.4 Оптимизация технологических этапов подготовки collagenсодержащего сырья к производству гидролизатов collagenа

Одним из основных этапов в производстве белковых ингредиентов (например, желатина, который влияет на показатели качества конечного продукта) является подготовка сырья непосредственно к самому производству.

В зависимости от вида сырья подготовительные этапы могут в себя включать:

- сортировка сырья;
- измельчение (дробление) сырья;
- обезжиривание сырья;

- полировка кости (удаление остатков мягких тканей);
- калибровка сырья;
- повторное дробление.

Для обеспечения конечного продукта высокими качественными показателями необходим поиск путей оптимизации подготовительных этапов. Классическая схема производства гидролизата коллагена, в зависимости от вида используемого сырья, представлена на рисунке 3.4.1 (в качестве примера используется пищевой желатин).

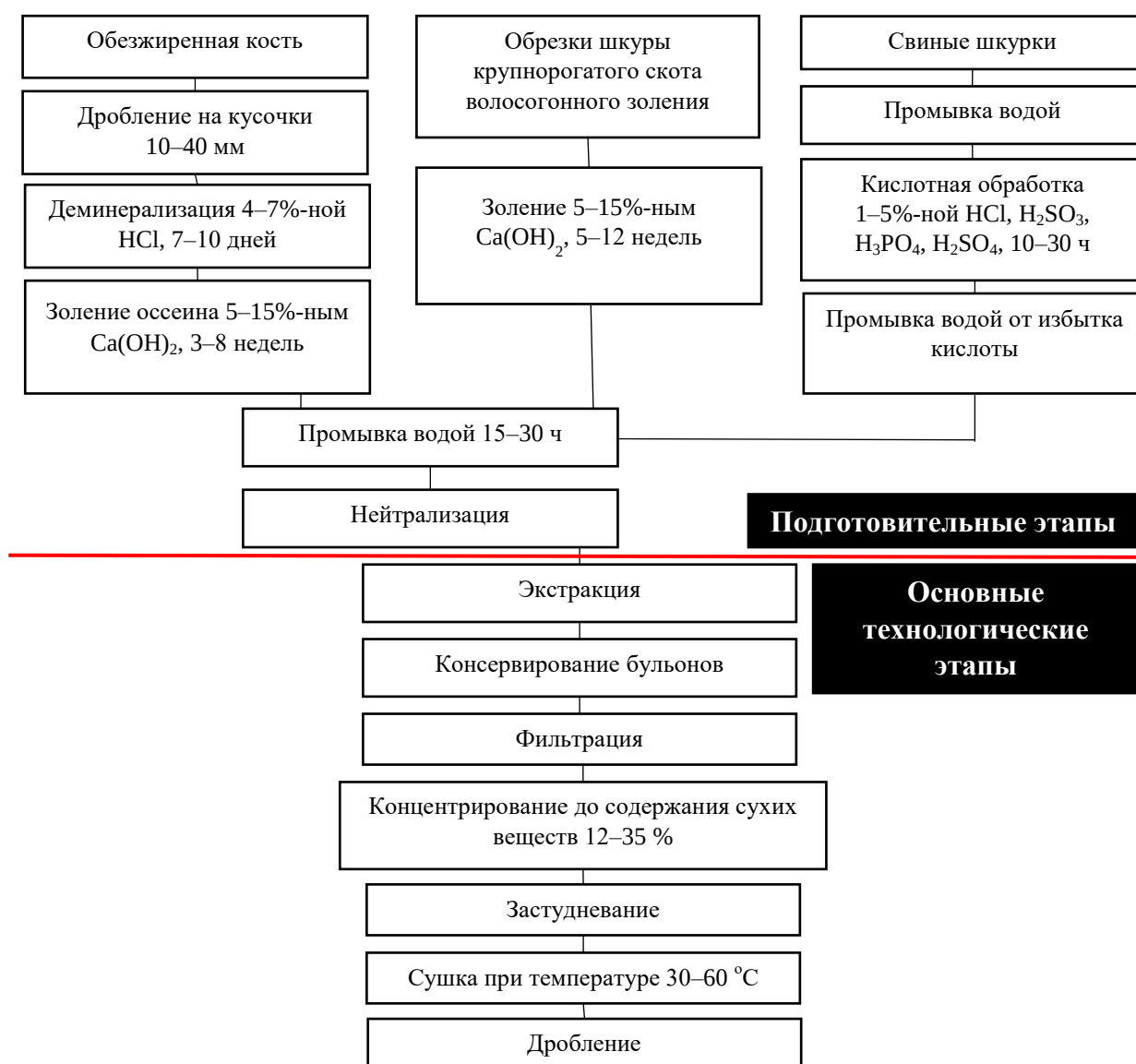


Рисунок 3.4.1 – Классическая схема производства гидролизата коллагена на примере пищевого желатина

Из схемы можно заключить, что одним из главных критериев на этапе подготовки сырья, который будет обеспечивать качество конечной продукции, является степень измельчения и обезжиривания сырья. Необходимо большое внимание уделить оптимизации процесса обезжиривания сырья, т. к. остатки на поверхности и внутри структуры липидной фракции могут повлиять на степень и глубину протекания последующих процессов – деминерализацию костного сырья, экстракцию оссеина и глубину гидролиза. Нарушения технологических параметров на данных этапах производства могут привести к ухудшению качественных показателей конечной продукции.

3.4.1 Первичная подготовка коллагенсодержащего сырья

В данном разделе представлены исследования по оптимизации способов подготовки коллагенсодержащего сырья (сырая кость крупного рогатого скота, ноги цыплят-бройлеров, свиная шкурка).

Кость измельчают для увеличения поверхности контакта, что способствует наиболее полному извлечению жира и ускорению процессов обезжиривания сырой кости. Стоит уточнить, что при обработке дробленой кости лучше используется емкость аппаратов. В таблице 3.4.1.1 представлены значения костного сырья до и после дробления.

Таблица 3.4.1.1 – Костное сырье: значения до и после дробления

Вид кости	до дробления	после дробления
Сырая колбасная	200–250 кг/м ³	600–650 кг/м ³
Кость сырая	400–450 кг/м ³	550–650 кг/м ³

Рекомендуемый размер измельченных частиц – 50–60 мм. Повышение степени измельчения приводит к таким осложнениям, как уплотнение сырья в

процессе обезжиривания, повышающее сопротивление среды, которая предназначена для извлечения жира (пар, вода или, например, бензин); потеря мелких косточек на операциях обезжиривания.

При этом можно предположить, что лучшей степенью измельчения является порошок, т. к. гипотетически извлечение белка из структуры кости порошкообразного вида будет проходить в наибольшей степени. Однако технических возможностей по выполнению операций промывки и выплавления при такой степени измельчения в настоящее время нет. В связи с этим необходимо акцентировать внимание на поиске новых технических возможностей для проведения процесса извлечения коллагена из порошкообразной кости.

Традиционно размер измельченной кости составляет не менее 25 мм, что позволяет в наибольшей степени сократить продолжительность диффузионных процессов и избежать указанных ранее осложнений. Для измельчения кости используются костедробилки. Разделение измельченной кости на фракции в зависимости от размера не выполняется из-за большого количества на ней прирезей, которые препятствуют проведению этого процесса.

Распределение измельченной кости по отдельным фракциям в зависимости от используемого типа оборудования представлено в таблице 3.4.1.2. Следует уточнить, что доизмельчение костного сырья возможно после процесса его обезжиривания.

Таблица 3.4.1.2 – Распределение измельченной кости по отдельным фракциям в зависимости от используемого типа оборудования

Размер	Распределение, %	
	Дробилка двухвальцовая	Дробилка молотковая
> 30 мм	55–60	70
15–30 мм	36–37	20
< 15 мм	4–5	10

Важным этапом первичной (подготовительной) обработки мягкого коллагенсодержащего сырья является мездрение, поскольку тщательное удаление подкожно-жировой клетчатки, мышечных волокон и других примесей не только

повышает чистоту и качество получаемого коллагена, но и значительно увеличивает эффективность его экстракции за счет улучшения проницаемости ткани для химических реагентов. При этом отсутствие данной операции может привести к снижению выхода целевого продукта, загрязнению экстракта липидами и другими нежелательными компонентами, что в конечном итоге негативно скажется на качестве и себестоимости конечного продукта.

Для сырья, такого как ноги цыплят-бройлеров, проводилось измельчение сырья на лабораторной дробилке, т. к. равномерное измельчение упрощает доступ химических и ферментативных реагентов к коллагеновым структурам в процессе обезжиривания и гидролиза, что повышает выход и функциональные свойства готового коллагена. Такой подход не только улучшает качество продукции, но и способствует снижению производственных затрат и энергопотребления.

С целью оптимизации процесса и увеличением площади обработки было принято решение проводить процесс обезжиривания исследуемого коллагенсодержащего сырья после процессов механической обработки (дробление, измельчение, мездрение).

Сырье, предназначенное для получения коллагена, необходимо тщательно обезжиривать, поскольку только благодаря этому достигается хороший выход коллагена высокого качества. Остаточный жир замедляет диффузионные процессы при экстракции коллагена и уменьшает его гелеобразующую способность и другие функциональные свойства. Чем меньше жира остается в обезжиренном сырье, тем глубже протекают процессы получения коллагеновых бульонов и их концентрирования. Поэтому выбор способа обезжиривания является одним из ключевых моментов при организации процесса производства гидролизатов коллагена.

Классически обезжиривание выполняется:

- методом экстракции органическими растворителями;
- импульсными способами;
- тепловым способом вываривания в воде.

Представленные способы имеют и преимущества, и недостатки. К последним относятся, во-первых, энерго- и ресурсозатраты, в том числе и антропогенная нагрузка на окружающую среду. Так, при использовании экстракции органическими растворителями в качестве основного метода обезжиривания, необходимо обеспечить предприятие очистными сооружениями. Или, например, несмотря на то, что тепловой способ вываривания в воде – наиболее распространенный и простой с точки зрения реализации, технического обслуживания, техники безопасности и минимального количества выбросов в окружающую среду, он требует много энергии, т. к. подразумевает продолжительный нагрев большого количества воды до 95 °С.

Во-вторых, негативное воздействие на белковую структуру сырья. Так, применение метода экстракции органическими растворителями может привести к ухудшению показателей качества конечного продукта (из-за воздействия этих самых растворителей на структуру белка).

В таблице 3.4.1.3 представлены результаты сравнительной оценки затрат при обезжиривании коллагенсодержащего сырья указанными способами.

Таблица 3.4.1.3 – Сравнительная оценка затрат при обезжиривании сырья разными способами

Показатель	Метод обезжиривания		
	экстракция	выварка	импульсный
Продолжительность, мин	900	360	0,5
Остаток жира, % к сухому веществу	1,5	8-10	3-6
Мелкая кость (до 5 мм), %	3-5	3-5	35-40
Мелкая кость (до 5 мм), кг	214	214	1714
Расход на 1 т кости			
пара, кг	1200–1500	500	250–300
воды, м ³	12–16	2,5	6
электроэнергии, кВт*ч	20	3	30
бензина, кг	10–15	–	–

При всей эффективности рассмотренных процессов видно, что этап обезжиривания сырья при производстве гидролизатов коллагена требует больших ресурсозатрат. В связи с этим необходимо искать новые пути оптимизации технологических режимов на данном этапе.

3.4.2 Обоснование подбора и разработка способов ферментативного обезжиривания коллагенсодержащего сырья

Сырье, поступившее в производство, в своем составе может иметь значительное количество липидов, наличие которых существенно уменьшает выход и качество коллагена.

На начальном этапе исследования влияния ферментного воздействия на процесс обезжиривания костного сырья был проведен подбор ферментов, которые имеют высокую липолитическую активность, способствующую оптимизации обезжиривания, т. е. проявляющих эффективность в процессе гидролиза жирового остатка из минеральной и коллагеновой структуры.

В исследованиях, связанных с животными липидами, использовали липазы микробного происхождения, которые благодаря своим каталитическим свойствам и универсальности являются эффективным катализаторами в пищевой промышленности. В связи этим был проведен подбор ферментов липазы микробиального происхождения, имеющих высокую ферментную активность. Первоначально исследовали потенциальные ферменты, которые способствуют эффективному фракционированию животных жиров.

В таблице 3.4.2.1 представлены характеристики ферментов, потенциально применимых при проведении исследований по оптимизации процесса обезжиривания сырья. Отметим, что все рассмотренные ферменты обладают высокой активностью, которая, предположительно, может эффективно повлиять на процесс ферментного гидролиза жирового остатка исследуемого сырья.

Таблица 3.4.2.1 – Характеристика потенциальных ферментов для проведения исследований по оптимизации процесса обезжиривания сырья

Торговое название фермента	Продуцент	Ферментная активность, кат/г	Температура активности	pH активность	Применение
Liporan 50 BG	<i>Aspergillus niger</i>	50 FIP/г $\approx 5 \cdot 10^{-2}$	30–50 °C	4,5–7,0	Переработка жиров и масел, пищевые и кормовые добавки
Lipozyme® TL IM	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	100 FIP/г $\approx 1 \cdot 10^{-1}$	50–65 °C	6,0–7,5	Используется при высокой температуре, в биотехнологии, переработке жиров
Palsgaard Lipase 4111	<i>Aspergillus niger</i>	~ 70 FIP/г $\approx 7 \cdot 10^{-2}$	30–55 °C	4,5–7,0	Применяется в пищевой промышленности, биотехнологии
Lipozyme® RM IM	<i>Rhizomucor miehei</i>	100 FIP/г $\approx 1 \cdot 10^{-1}$	40–60 °C	5,0–7,0	Применяется для переработки жиров в пищевой и биотехнологической промышленности
Lipase TL IM	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	200 FIP/г $\approx 2 \cdot 10^{-1}$	50–70 °C	6,0–7,5	Применяется в биотехнологии, в производстве биодизеля и переработке жиров

Можно отметить, что липазы (Lipozyme® TL IM и Lipase TL IM) обладают высокой термостойкостью (температура активности – 50–70 °C), что делает их наиболее подходящими для обезжиривания при высоких температурах, где требуется эффективное расщепление жиров в коллагенсодержащем сырье. Указанные ферменты потенциально подойдут для обезжиривания костного сырья,

т. к., помимо поверхностного воздействия, необходимо воздействие и на костный матрикс. Такие ферменты, как Liroran 50 BG и Palsgaard Lipase 4111, проявляют высокую активность при температурах от 30 до 50 °C, что может применяться для мягкой обработки сырья и избежания потерь качества при длительном воздействии высоких температур. Соответственно, данные ферменты будут эффективны при воздействии на мягкое коллагенсодержащее сырье. С учетом оптимальных условий в целях обеспечения активности ферментов и ферментных препаратов были разработаны схемы проведения исследований по обезжириванию коллагенсодержащего сырья.

Для эффективной активности ферментов необходимы оптимальный уровень pH среды и определенная температура. При проведении исследований и разработке схем по ферментативному обезжириванию исследуемого сырья применяли следующие ферменты липазы: Lipase TL IM – для ферментативного обезжиривания мясокостного сырья, т. к. она обладает большей ферментной активностью, и активация может происходить при 50–70 °C; Liroran 50 BG – для ферментативного обезжиривания мягкого коллагенсодержащего сырья.

Обработку проводили в несколько этапов с отделением от водной части и промыванием используемого коллагенсодержащего сырья при температуре 80 °C при pH около 8,5 между каждым этапом. Схемы проведения обезжиривания коллагенсодержащего сырья представлены в таблице 3.4.2.2.

На начальном этапе исследований изучали влияние ферментов липолитического действия на процесс обезжиривания коллагенсодержащего сырья. Отделение жировой фазы от твердого остатка проводили центрифугированием на высокоскоростной центрифуге Avanti J-26S – Beckman. Деактивация фермента осуществлялась после удаления жировой фазы путем кратковременного нагрева сырья до температуры 80 °C.

Далее полученные образцы костного жира фасовали в пластиковую тару и охлаждали до температуры 15 °C, после чего определяли выход и органолептические показатели качества исследуемых образцов жира, которые представлены в разделе 3.5.

Таблица 3.4.2.2 – Схемы проведения обезжиривания коллагенсодержащего сырья

Схема	Количество сырья, г	Объем Н ₂ О, сырье:вода	Используемый фермент	Количество вносимого фермента от массы сырья, %	рН среды	Температурный режим, °С	Продолжительность процесса, мин	Выход костного жира, % от массы сырья
Измельченная сырая говяжья кость до размеров 30–50 мм								
1	500	1:3	Lipase TL IM (<i>Thermomyces lanuginosus</i>)	0,05	7,0 ± 0,2	60 ± 2	80	9,24
2		1:3		0,05			100	9,65
3		1:3		0,10			120	10,11
4		1:4		0,10			140	11,87
5		1:4		0,15			160	13,22
6		1:4		0,15			180	15,45
Ноги цыплят-бройлеров								
1	500	1:3	Lipase TL IM (<i>Thermomyces lanuginosus</i>)	0,05	7,0 ± 0,2	60 ± 2	80	4,87
2		1:3		0,05			100	5,32
3		1:3		0,10			120	7,10
4		1:4		0,10			140	7,48
5		1:4		0,15			160	8,23
6		1:4		0,15			180	8,19
Свиная шкурка								
1	500	1:3	Lipopan 50 BG (<i>Aspergillus niger</i>)	0,05	6,5 ± 0,5	50 ± 2	80	5,83
2		1:3		0,05			100	6,14
3		1:3		0,10			120	8,35
4		1:4		0,10			140	10,14
5		1:4		0,15			160	11,19
6		1:4		0,15			180	11,24

На рисунке 3.4.2.1 продемонстрировано исследуемое сырье после процесса предварительной подготовки.



(a)



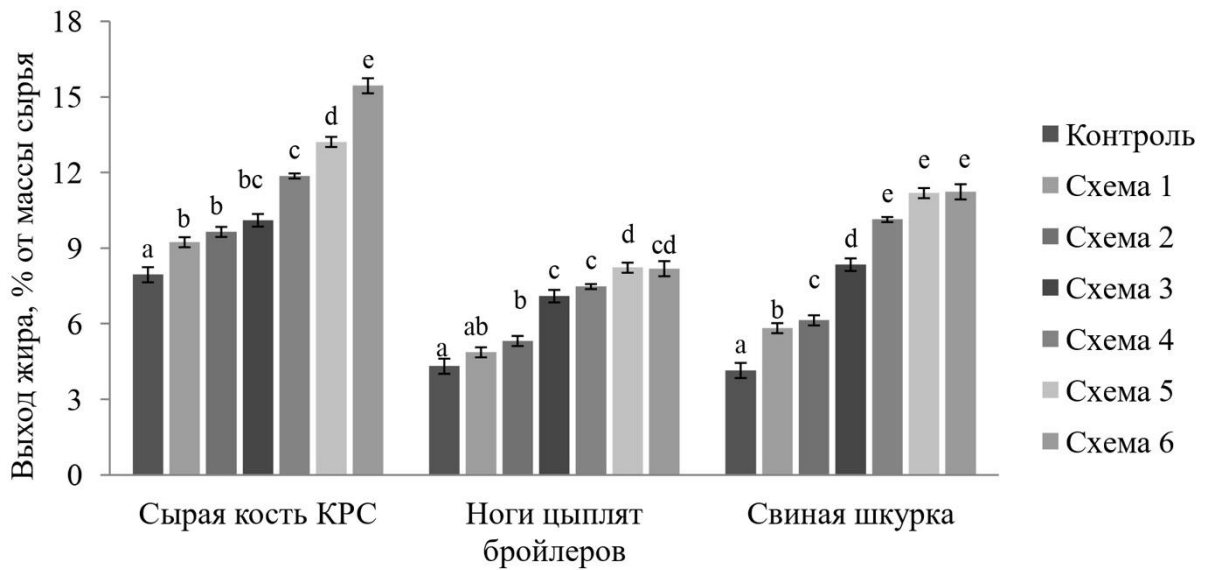
(b)

Рисунок 3.4.2.1 – Исследуемое сырье после процесса предварительной подготовки: а – костное сырье; б – свиная шкурка

На заключительном этапе обезжиривания сырья проводили промывку дистиллированной водой, после чего осуществляли доизмельчение сырья: костное сырье измельчали до частиц размером 2–5 мм, мягкое коллагенсодержащее сырье – до гомогенной массы.

После проведения экспериментальных работ по обезжириванию коллагенсодержащего сырья по схемам, представленным в таблице 3.4.2.2, проводили контроль степени обезжиривания в зависимости от условий его протекания.

Сравнительный выход жира контрольных образцов, которые были получены путем гидротермической обработки при температуре 90 °С в течение 120 мин и при ферментативном гидролизе жиров, входящих в состав исследуемого сырья, отражен на рисунке 3.4.2.2.



Примечание: значения в столбцах рисунка, полученные в разных схемах обезжиривания и помеченные одной и той же буквой (a, b, c, d или e), согласно тесту Тьюки, достоверно ($P > 0,05$) не отличались друг от друга.

Рисунок 3.4.2.2 – Выход жира в зависимости от исследуемого сырья и используемой схемы обезжиривания

Из результатов схемы проведенных исследований по ферментному воздействию на процесс обезжиривания коллагенсодержащего сырья можно заключить, что увеличение количества фермента и продолжительности процесса положительно влияет на выход жира из сырья. В частности, при использовании 500 г сырья (сырая говяжья кость, ноги цыплят-бройлеров и свиная шкурка) повышение массовой доли фермента и увеличение продолжительности процесса значительно повышают выход жира из сырья. Так, в сырье из сборной кости КРС выход жира при увеличении ферментной активности и времени обработки вырос с 9,24 до 15,45 %.

В процессе обезжиривания ног цыплят-бройлеров и свиной шкурки при тех же условиях также наблюдался рост показателя выхода жира с 4,87 до 8,19 % и с 5,83 до 11,24 % соответственно. Таким образом, увеличение концентрации фермента и продолжительности обработки способствует более эффективному удалению жиров из коллагенсодержащего сырья и,

следовательно, процессу обезжиривания. При этом можно отметить, что наиболее эффективной схемой для:

- сырой кости КРС является применение липазы (*Thermomyces lanuginosus*) в количестве 0,15 % с обработкой 180 мин, в соотношении сырье:вода 1:4 (выход жира – 15,45 % от массы исходного сырья);
- обработки ног цыплят-бройлеров – применение липазы (*Thermomyces lanuginosus*) в количестве 0,15 % с обработкой 160 мин, в соотношении сырье:вода 1:4 (выход жира – 8,23 % от массы исходного сырья);
- обработки свиных шкурок с целью рационального использования энергетических ресурсов и сокращения объема применяемого фермента – применение липазы (*Aspergillus niger*) в количестве 0,15 % с обработкой 160 мин, в соотношении сырье:вода 1:4 (выход жира – 11,19 % от массы исходного сырья).

3.5 Анализ показателей качества полученных сопутствующих продуктов – животных жиров

При производстве гидролизатов коллагена значительную долю сырья составляют побочные продукты, которые перерабатываются в конечные продукты различного назначения, в том числе пищевого, кормового, медицинского и технического, с добавленной стоимостью.

На этапе обезжиривания коллагенсодержащего сырья такими продуктами являются костный, мездровый, животные жиры и коллагеновые бульоны, состоящие из балластных белков. Исследования проводили на образцах, которые имели наибольший выход сырья по отношению к исходной массе.

С целью установления направления использования животного жира определены показатели качества полученных образцов. Так как липиды играют важную роль в оценке качества и пищевой ценности продуктов, на начальном этапе

исследований осуществлялся анализ жирнокислотного состава двух образцов каждого вида коллагенсодержащего сырья в процессе обезжиривания, которые имели наибольшие значения доли выхода (рисунок 3.5.1).

Данные, представленные на рисунке 3.5.1, показывают, что существенные различия наблюдаются в содержании олеиновой (C18:1) и пальметиновой (C16:0) жирных кислот: они преобладают в каждом из образцов, но наиболее выражены в жирах, полученных методом ферментативного обезжиривания. В частности, в курином и свином мездровом жирах содержание олеиновой кислоты значительно возрастает после ферментативного обезжиривания (до 48,3 и 46,65 % соответственно). Этот процесс приводит к снижению концентрации стеариновой (C18:0) кислоты, что также отмечается в изменениях других образцов. Увеличение содержания линолевой (C18:2) и линоленовой (C18:3) кислот после ферментативной обработки указывает на преобладание ненасыщенных жирных кислот. Незначительные изменения в составе других кислот, таких как арахидоновая (C20:4) и пальмитолеиновая (C16:1), также свидетельствуют о том, что ферментативное обезжиривание влияет на баланс насыщенных и ненасыщенных жирных кислот. Результаты исследований показывают, что ферментативное обезжиривание способствует улучшению состава жирных кислот в жирах, увеличивая долю ненасыщенных жирных кислот, что может повысить их функциональные характеристики. Кроме того, отмечается разное соотношение жирных кислот, которое подтверждает зависимость значений показателя от используемого фермента при проведении ферментативного обезжиривания костного сырья.

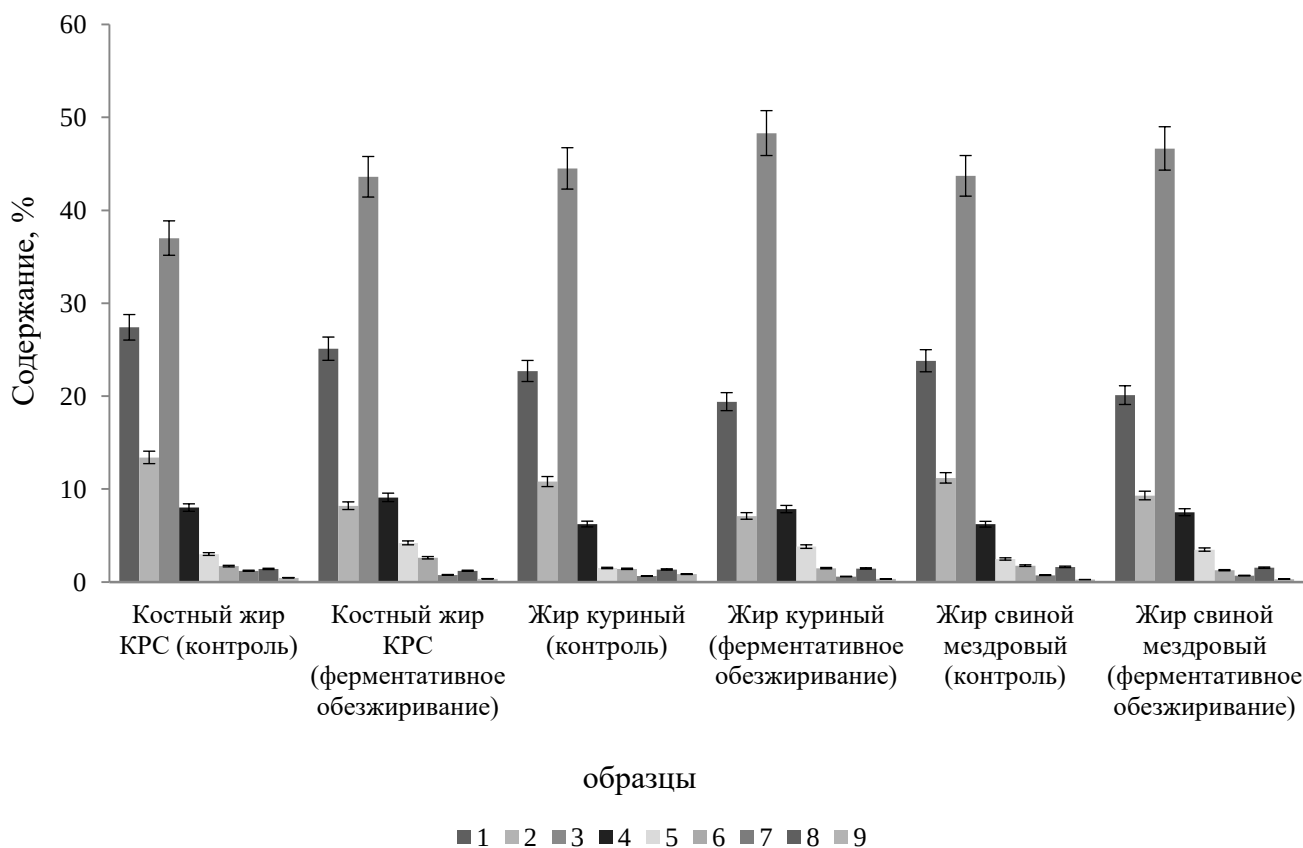


Рисунок 3.5.1 – Жирнокислотный состав липидов образцов животного жира, полученных при ферментативном обезжиривании коллагенсодержащего сырья:

1 – пальмитиновая (C16:0) жирная кислота; 2 – стеариновая (C18:0) жирная кислота; 3 – олеиновая (C18:1) жирная кислота; 4 – линолевая (C18:2) жирная кислота; 5 – арахидоновая (C20:4) жирная кислота; 6 – линоленовая (C18:3) жирная кислота; 7 – миристиновая (C14:0) жирная кислота; 8 – пальмитолеиновая (C16:1) жирная кислота; 9 – эйкозапентаеновая (C20:5) жирная кислота.

Далее были изучены основные физико-химические показатели образцов жира, полученных в ходе исследований (таблица 3.5.1).

Сведения таблицы 3.5.1 показывают, что используемый фермент влияет на показатели йодного числа и температуру плавления. Можно предположить, что данные показатели зависят от содержания и распределения жирных кислот.

Таблица 3.5.1 – Физико-химические показатели образцов жира

Показатель	Костный жир КРС		Куриный жир		Свиной мездровый жир	
	Контроль	Ферментативное обезжиривание	Контроль	Ферментативное обезжиривание	Контроль	Ферментативное обезжиривание
Температура плавления, °С	44,30±0,12	41,50 ± 0,10	34,6±0,10	28,30 ± 0,6*	41,20±0,70	36,40 ± 0,40*
Массовая доля влаги, %	0,18 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,74±0,05	0,61 ± 0,08	1,25±0,06	0,94 ± 0,03
Йодное число, %	43,75±0,08	47,60 ± 0,06	67,30±0,20	71,27 ± 0,80	74,50±0,50	71,30 ± 0,50
Кислотное число, мг КОН	0,36 ± 0,01	0,39 ± 0,01	1,85±0,07	3,47±0,10*	3,80±0,10	4,20 ± 0,20
Твердость, г/см	183,25±0,30	172,20±0,20	135,38±0,45	124,27±0,64	137,75±1,15	126,63 ± 0,84
Плотность, кг/м ³	924,35±0,10	925,20±0,10	924,46±1,20	935,20±0,70	928,0±0,50	931,50 ± 0,60

Примечание: * – согласно тесту Тьюки, значение достоверно ($P < 0,05$) отличалось от контроля.

Увеличение показателя йодного числа свидетельствует о повышении степени ненасыщенности жиров, т. к. увеличивается содержание ненасыщенных жирных кислот под действием используемых ферментов. Можно отметить, что обработка сырья с использованием исследуемых ферментов способствует незначительному повышению плотности полученных образцов жира, поскольку освобождение жирных кислот может уменьшить воздушные промежутки в структуре жира.

На завершающем этапе исследований формовали полученные образцы костного жира в пластиковую тару, охлаждали до температуры 15 °С, после чего определяли их органолептические показатели в соответствии с ГОСТ 25292-2017 [20] (таблица 3.5.2). На рисунке 3.5.2 представлены образцы

животных жиров, полученных при ферментативной обработке в процессе обезжиривания сырья.

Таблица 3.5.2 – Органолептические показатели образцов костного жира

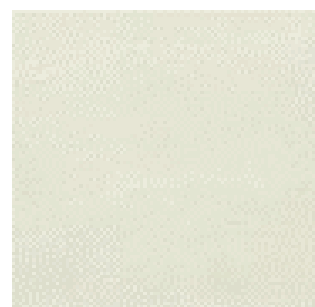
Показатель	Костный жир КРС		Куриный жир		Свиной мездровый жир	
	Контроль	Ферментативное обезжиривание	Контроль	Ферментативное обезжиривание	Контроль	Ферментативное обезжиривание
	Характеристика					
Цвет при температуре 15–20 °С	Бледно-желтый с зеленоватым оттенком	Бледно-желтый	Белый с сероватым оттенком	Белый		
Запах	Поджаристый	Чистый, без постороннего запаха				
Прозрачность в расплавленном состоянии	Прозрачный					
Консистенция при температуре 15–20 °С	Однородная, мазеобразная					



(a)



(b)



(c)

Рисунок 3.5.2 – Образцы животных жиров, полученные при ферментативной обработке: а – костный жир КРС; b – куриный жир; с – свиной жир

Мазеобразную консистенцию образцов костного жира можно объяснить большим содержанием в них олеиновой и пальмитиновой жирных кислот. Однако следует учитывать, что доля использования костного жира в производстве кулинарных жиров не должна превышать 15–20 % от общей массы продукта, т. к. увеличение содержания костного жира может привести к понижению температуры плавления и твердости конечного продукта. Данные рекомендации

связаны с тем, что в этом виде жира присутствует высокое содержание мононенасыщенных и триненасыщенных триглицеридов.

Таким образом, ферментные препараты влияют на показатели жирнокислотного состава жира, при этом основные различия наблюдаются в содержании олеиновой и пальмитиновой жирных кислот. На данном этапе работы выявлено различие в распределении показателей йодного числа и температуры плавления жиров. По органолептическим показателям данные виды жиров соответствуют показателям ГОСТ 25292-2017 [20], и могут быть рекомендованы для дальнейшей переработки.

3.6 Заключение по главе

Проведенный анализ и полученные данные исследования в главе позволяют сделать следующий вывод: наибольший сырьевой потенциал для организации производства гидролизатов коллагена из костного сырья на территории Сибирского федерального округа имеют Новосибирская область, Алтайский и Красноярский край. Для проведения дальнейших исследований в качестве основного объекта выбрано сборное костное сырье КРС, ноги цыплят-бройлеров и свиная шкурка с учетом сырьевых возможностей на современном рынке пищевых и фармацевтических продуктов.

В результате исследований предложены способы как механической подготовки коллагенсодержащего сырья, так и ферментативного обезжиривания.

Эффективность предлагаемого решения обезжиривания костного сырья подтверждается объемом выхода сырья по отношению к его исходной массе.

На основании результатов проведенных исследований были составлены принципиальные технологические схемы ферментного обезжиривания коллагенсодержащего сырья, схемы представлены на рисунках 3.6.1–3.6.3.

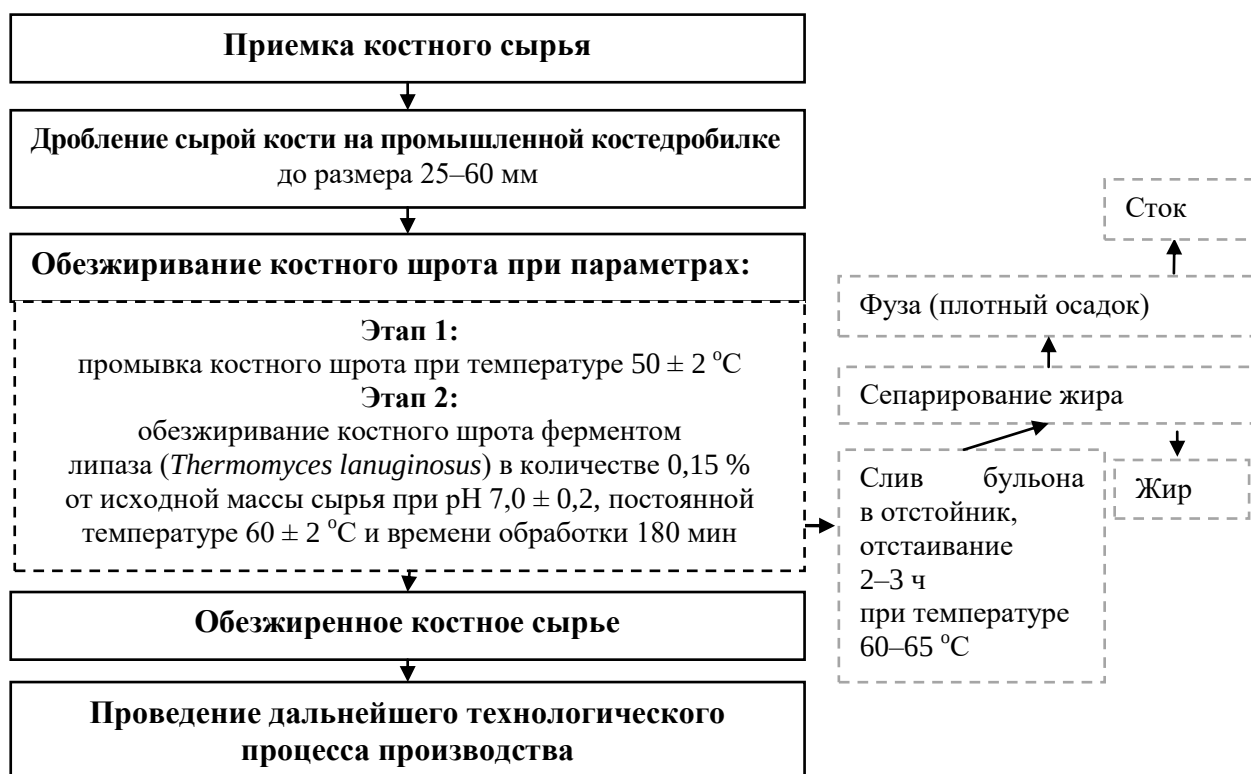


Рисунок 3.6.1 – Предлагаемая принципиальная технологическая схема проведения ферментного обезжиривания костного сырья КРС

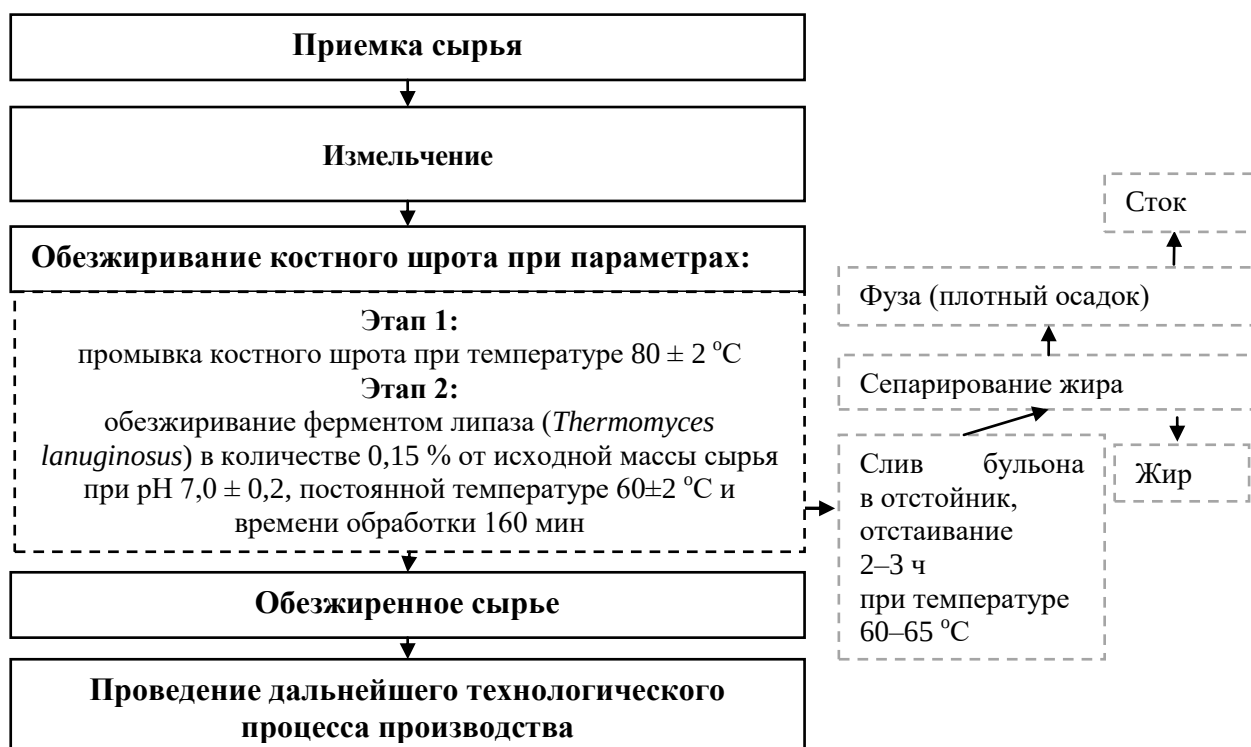


Рисунок 3.6.2 – Предлагаемая принципиальная технологическая схема проведения ферментного обезжиривания ног цыплят-бройлеров

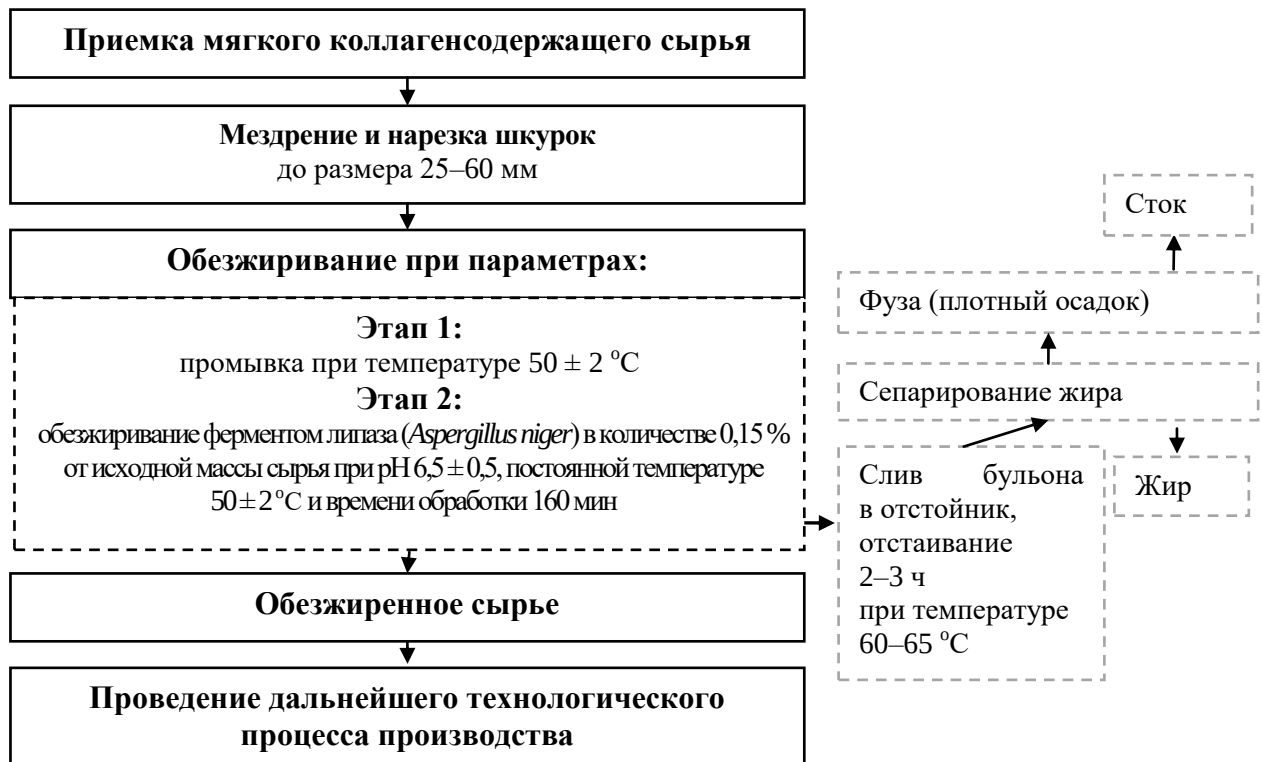


Рисунок 3.6.3 – Предлагаемая принципиальная технологическая схема проведения ферментного обезжиривания свиных шкурок

По результатам проведенного исследования составлены схемы проведения ферментного обезжиривания коллагенсодержащего сырья.

В целях достижения эффективного процесса обезжиривания предлагается использовать на его технологическом этапе:

- липазу (*Thermomyces lanuginosus*) в количестве 0,15 % с обработкой 180 мин и в соотношении сырье:вода 1:4 (выход жира – 15,45 % от массы исходного сырья) – для сырой кости КРС;
- липазу (*Thermomyces lanuginosus*) в количестве 0,15 % с обработкой 160 мин и в соотношении сырье:вода 1:4 (выход жира – 8,23 % от массы исходного сырья) – для обработки ног цыплят-бройлеров;
- липазу (*Aspergillus niger*) в количестве 0,15 % с обработкой 160 мин и в соотношении сырье:вода 1:4 (выход жира – 11,19 % от массы исходного сырья) – для обработки свиных шкурок.

Таким образом, рационально обезжиренное сырье, используемое для производства коллагена, будет способствовать повышению качества получаемого из него гидролизата. Доказано, что использование обезжиренного сырья позволит получить высокий выход коллагена и улучшить его биологическую активность и свойства.

ГЛАВА 4 НАУЧНОЕ И ПРАКТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ И ТЕХНИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ В ПРОЦЕССЕ ПРОИЗВОДСТВА ГИДРОЛИЗАТОВ КОЛЛАГЕНА

Современное развитие биотехнологий открывает новые возможности для рационального использования вторичного животного сырья, в том числе при переработке коллагенсодержащих материалов, таких как кости крупного рогатого скота, ноги цыплят-бройлеров и свиные шкурки.

Производство гидролизатов коллагена основано на использовании различных технологий, включая кислотно-щелочной, ферментативный и комбинированный методы гидролиза. Важную роль в этом процессе играет выбор биотехнологических подходов и подбор оптимальных ферментных систем (например, пепсины и протеазы), а также определение ключевых параметров процесса гидролиза.

Помимо биотехнологических аспектов, важное значение имеют технические подходы, направленные на повышение эффективности производства, снижение затрат и минимизацию отходов. К ним относятся модификация температурных и временных режимов экстракции, предварительная обработка сырья, применение мембранных технологий для очистки и концентрирования гидролизатов и подбор параметров и способов сушки.

Настоящая глава посвящена научному и практическому обоснованию применения биотехнологических и технических подходов в процессе производства гидролизатов коллагена. Рассмотрены основные принципы гидролиза, особенности ферментных систем, влияющих на степень расщепления коллагеновых структур и методы анализа физико-химических свойств полученных гидролизатов. На основе анализа современных достижений в области коллагеновой биотехнологии выявлены пути оптимизации технологических

процессов и разработаны инновационные решения для эффективного использования коллагенсодержащего сырья.

4.1 Подбор ферментов для проведения исследований на этапе гидролиза коллагенсодержащего сырья

С целью оптимизации процесса производства гидролизатов коллагена осуществляли подбор ферментов для проведения исследований технологического этапа гидролиза коллагенсодержащего сырья. Ферментативный гидролиз обеспечивает направленное расщепление белковых цепей исходного сырья, а следовательно, получение более качественного продукта. Использование ферментов значительно сокращает время обработки, уменьшает необходимое количество воды для промывания гидролизованного сырья, что обуславливает его экономическую целесообразность.

На первом этапе с помощью сервиса PeptideCutter [138] был осуществлен анализ потенциально эффективных ферментов для проведения экспериментальных исследований гидролиза изучаемого сырья с целью получения гидролизатов коллагена.

В качестве основных ферментов, которые могут являться эффективными в разрабатываемой технологии производства коллагена, рассмотрены ферменты протеолитической группы (таблица 4.1.1), имеющие функцию облегчения кислотной солюбилизации нерастворимого коллагена, что может способствовать преобразованию сырья в гидролизаты коллагена разной молекулярной массы.

Таблица 4.1.1 – Потенциальные протеолитические ферменты для организации процесса гидролиза коллагенсодержащего сырья

Фермент	Ферментная активность, кат/г	рН активность	Температура активности, °С	Источник / культивирование
Протеаза (<i>Bacillus subtilis</i>)	5000–15000	7,0–10,0	30–50	Бактерия <i>Bacillus subtilis</i>
Протеаза (<i>Aspergillus oryzae</i>)	1000–5000	5,0–8,0	35–55	Гриб <i>Aspergillus oryzae</i>
Протеаза (<i>Aspergillus niger</i>)	2000–10000	3,0–5,0	40–50	Гриб <i>Aspergillus niger</i>
Трипсин (<i>Bacillus licheniformis</i>)	3000–7000	7,0–8,0	40–50	Бактерия <i>Bacillus licheniformis</i>
Протеаза (<i>Streptomyces griseus</i>)	5000–12000	6,0–9,0	30–45	Бактерия <i>Streptomyces griseus</i>
Пепсиноподобная протеаза (<i>Lactobacillus plantarum</i>)	2000–8000	4,0–6,0	30–50	Лактобактерии <i>Lactobacillus plantarum</i>
Коллагеназа (<i>Clostridium histolyticum</i>)	10000–15000	7,0–8,0	37–45	Бактерия <i>Clostridium histolyticum</i>
Протеаза (<i>Thermomyces lanuginosus</i>)	1500–3000	6,0–8,0	40–60	Гриб <i>Thermomyces lanuginosus</i>

При использовании костного сырья в производстве гидролизатов коллагена проведение ферментативного гидролиза пепсином неэффективно, т. к. костный матрикс не подвергается гидролизу ферментами из-за плотного минерального межмолекулярного сцепления и переплетения. При этом коллагеновая структура внутри костного матрикса поддается воздействию ферментом пепсином в высокой степени. Для проведения биокатализа костного сырья необходимо

искать баланс между кислотным и ферментным воздействием на поверхностную и внутреннюю структуру костного матрикса.

Мягкое коллагенсодержащее сырье, наоборот, хорошо поддается воздействию протеолитических ферментов с целью гидролиза – это связано с более доступной структурой коллагена.

Процесс первоначальной обработки сырья в классической схеме производства гидролизатов коллагена занимает достаточно продолжительное время, как уже было описано ранее (раздел 3.4). В связи с этим следует искать альтернативные технологии и решения, которые могут способствовать более эффективному течению процессов предварительной обработки коллагенсодержащего сырья.

После проведения анализа потенциально выбранных ферментов для реализации экспериментальных исследований были выбраны ферменты пепсин (*Rhizomucor miehei*), протеаза поларзим (*Acremonium chrysogenum*) и протеаза (*Bacillus subtilis*). Указанные ферменты подбирали в соответствии с их спецификой воздействия на исследуемые виды коллагенсодержащего сырья. Подробная характеристика используемых ферментов представлена в таблице 4.1.2.

Таблица 4.1.2 – Характеристика используемых ферментов

Параметр	Фермент		
	для гидролиза сырой кости КРС	для гидролиза ног цыплет-бройлеров	для гидролиза свиной шкурки
	пепсин	протеаза	протеаза поларзим
Продуцент	<i>Rhizomucor miehei</i> (CAS: 9001-92-7)	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Acremonium chrysogenum</i>
Происхождение	из генетически модифицированных микроорганизмов		
ЕС номер	3.4.23.4	3.4.21.62	3.4.21.62
Активность, кат	$5 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$	$6 \cdot 10^{-4}$

Продолжение таблицы 4.1.2

рН среды	1,5–2,0	1,5–2,0	7,0–11,0
Температура активации, °С	30 ± 2	30 ± 2	40–60

Представленные ферменты в таблице 4.1.2 имеют высокий потенциал в использовании для получения гидролизатов коллагена из исследуемых видов сырья: пепсин (*Rhizomucor miehei*) – для гидролиза сырой кости КРС; протеаза поларзим (*Acremonium chrysogenum*) – для обработки свиной шкурки; протеаза (*Bacillus subtilis*) – для гидролиза ног цыплят-бройлеров. Данные ферменты, полученные из генетически модифицированных микроорганизмов, характеризуются различными оптимальными условиями действия: пепсин и протеаза проявляют максимальную активность при кислой среде (рН 1,5–2,0) и температуре 30 ± 2 °С, тогда как протеаза поларзим оптимально функционирует в щелочной среде (рН 7,0–11,0) при 40–60 °С. При этом их каталитическая активность варьируется ($5 \cdot 10^{-3}$, $2 \cdot 10^{-3}$ и $6 \cdot 10^{-4}$ кат соответственно), что предположительно может обеспечить эффективный гидролиз коллагенсодержащего сырья.

4.2 Разработка схем проведения гидролиза коллагенсодержащего сырья

В данном разделе представлены разработанные схемы проведения гидролиза исследуемых коллагенсодержащих структур.

Для проведения первой экспериментальной части работы использовали предварительно обезжиренное говяжье костное сырье, измельченное до размеров $3 \pm 0,5$ мм. Костное сырье подвергалось гидролизу ферментом пепсин (*Rhizomucor miehei*) микробного происхождения с активностью $5 \cdot 10^{-3}$ кат. Так как активация фермента пепсин происходит при рН 1,5–2,0, то при взаимодействии с соляной кислотой (1М HCl) он обладал высокими

протеолитическими свойствами (при этом HCl способствовала разрушению костного матрикса). Гидролиз микробиальным ферментом пепсин и раствором соляной кислоты (1М HCl) проводили по схемам, представленным в таблице 4.2.1.

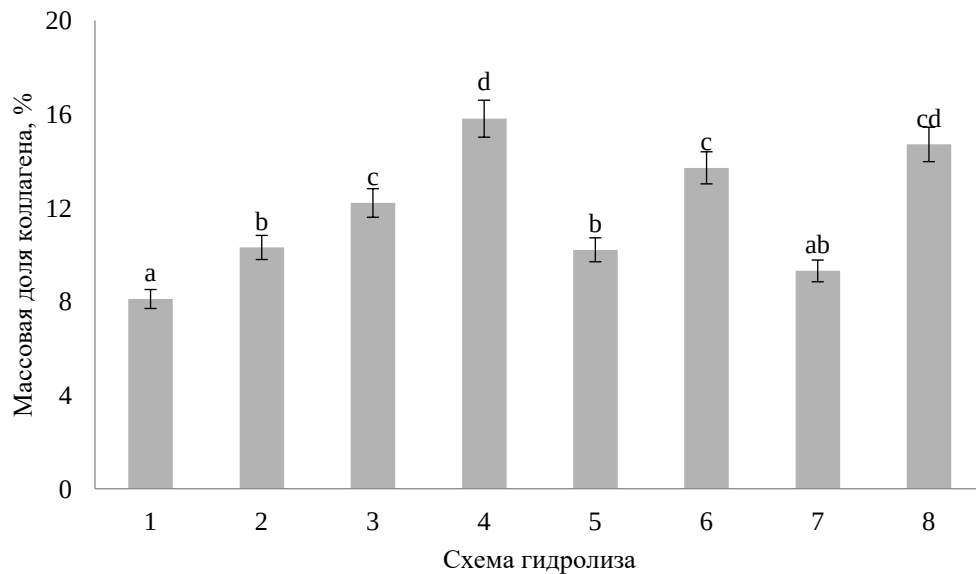
Таблица 4.2.1 – Схемы обработки костного сырья пепсином (*Rhizomucor miehei*) с активностью $5 \cdot 10^{-3}$ кат

Схема	Концентрация фермента, % от массы сырья	Соотношение сырья и растворителя 1М HCl, масса/объем	Продолжительность обработки, мин	pH	Температура обработки, °C
1	$0,10 \pm 0,01$	1:2	$240 \pm 0,20$	1,5	$40 \pm 0,50$
2	$0,10 \pm 0,01$	1:3	$240 \pm 0,20$	2,0	$45 \pm 0,50$
3	$0,15 \pm 0,01$	1:2	$360 \pm 0,20$	1,5	$40 \pm 0,50$
4	$0,15 \pm 0,01$	1:3	$360 \pm 0,20$	2,0	$45 \pm 0,50$
5	$0,20 \pm 0,01$	1:2	$480 \pm 0,20$	1,5	$50 \pm 0,50$
6	$0,20 \pm 0,01$	1:3	$480 \pm 0,20$	2,0	$50 \pm 0,50$
7	$0,10 \pm 0,01$	1:4	$360 \pm 0,20$	1,5	$45 \pm 0,50$
8	$0,15 \pm 0,01$	1:4	$480 \pm 0,20$	2,0	$50 \pm 0,50$

По схемам в таблице 4.2.1 проводили обработку мелкоизмельченного обезжиренного костного сырья: его помещали в раствор 1М HCl, в который был внесен фермент микробиального происхождения пепсин с ферментной активностью $5 \cdot 10^{-3}$ кат. Концентрация внесения соответствовала схемам. Гидролиз исходного сырья проводили при температуре от $40 \pm 0,5$ °C до $50 \pm 0,5$ °C в течение 240–480 мин. Показатель pH среды находился в пределах 1,5–2,0. Для равномерной обработки костного сырья раствором на протяжении всего эксперимента использовали магнитные мешалки. После проведения гидролиза костное сырье подвергалось нейтрализации NaOH и промывке водой с дальнейшим центрифугированием, которое способствовало отделению

минерального осадка от оссеина. Далее полученный оссеин промывали деминерализованной водой.

С целью проведения сравнительного анализа влияния на гидролиз костного сырья высчитывали выход гидролизатов коллагена с учетом отделения фосфата кальция (рисунок 4.2.1).



Примечание: значения, приведенные для разных технологических схем и помеченные одной буквой (a, b, c или d), согласно тесту Тьюки, достоверно ($P > 0,05$) не отличались друг от друга.

Рисунок 4.2.1 – Массовая доля коллагена в зависимости от разработанных схем гидролиза костного сырья КРС

Анализируя таблицу 4.2.1 и рисунок 4.2.1, можно сделать вывод о том, что массовая доля коллагена напрямую зависит от ряда факторов, таких как концентрация фермента, соотношение сырья и растворителя, продолжительность обработки, pH и температура. С увеличением концентрации фермента и продолжительности обработки массовая доля коллагена увеличивается, что свидетельствует о повышении эффективности гидролиза. Однако увеличение концентрации фермента и продолжительности обработки не всегда приводит к пропорциональному увеличению массовой доли коллагена. Также важно отметить, что более высокое соотношение сырья и растворителя может увеличивать

выход продукта, но только в определенных условиях (например, при pH 2,0 и температуре 45 °С). Наибольшая массовая доля коллагена наблюдается у схем 4, 6 и 8 (15,8, 13,7 и 14,7 % соответственно).

Далее проводили подбор параметров и разработку схем ферментативного гидролиза подготовленного сырья из ног цыплят-бройлеров (таблица 4.2.2). С учетом того, что, помимо мягкого коллагенсодержащего сырья, в структуре находится костный остаток, то необходимо подобрать параметры, оптимальные как для разрушения костного матрикса, так и непродолжительного гидролиза мягкого сырья. В связи с этим был выбран фермент протеаза (*Bacillus subtilis*), который может обеспечить мягкое воздействие на сырье.

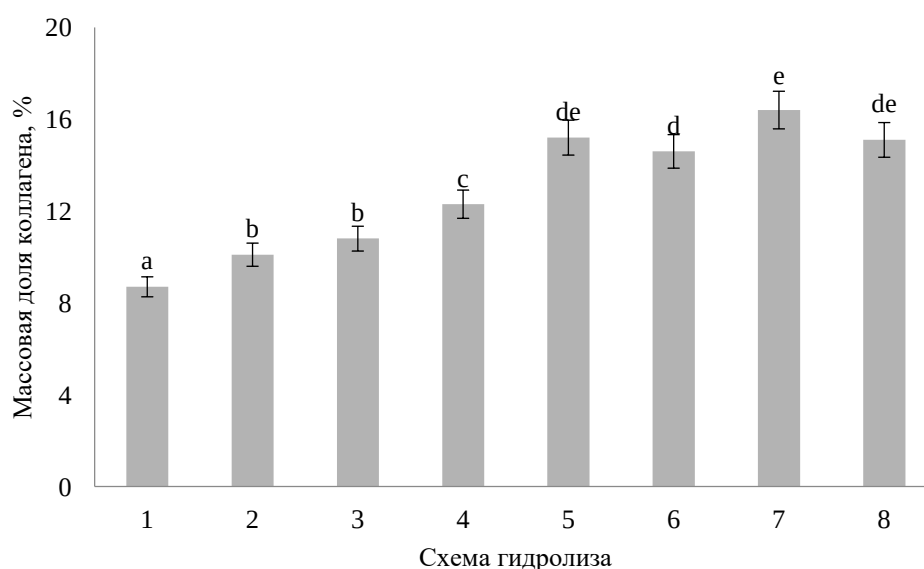
Таблица 4.2.2 – Схемы обработки сырья из ног цыплят-бройлеров протеазой (*Bacillus subtilis*) с активностью $2 \cdot 10^{-3}$ кат

Схема	Концентрация фермента, % от массы сырья	Соотношение сырья и растворителя 1М HCl, масса/объем	Продолжительность обработки, мин	pH	Температура обработки, °С
1	0,10 ± 0,01	1:2	240 ± 0,20	1,5	40 ± 0,50
2	0,10 ± 0,01	1:3	240 ± 0,20	2,0	45 ± 0,50
3	0,20 ± 0,01	1:2	180 ± 0,20	1,5	40 ± 0,50
4	0,20 ± 0,01	1:3	180 ± 0,20	2,0	45 ± 0,50
5	0,30 ± 0,01	1:2	140 ± 0,20	1,5	50 ± 0,50
6	0,30 ± 0,01	1:3	140 ± 0,20	2,0	50 ± 0,50
7	0,40 ± 0,01	1:2	120 ± 0,20	1,5	55 ± 0,50
8	0,40 ± 0,01	1:3	120 ± 0,20	2,0	55 ± 0,50

По схемам, представленным в таблице 4.2.2, также проводили обработку измельченного сырья: его помещали в раствор 1М HCl, в который был внесен фермент протеаза с активностью $2 \cdot 10^{-3}$ кат. Концентрация внесения

соответствовала схемам. Гидролиз исходного сырья проводили при температуре от 40 ± 2 до 55 ± 2 °C в течение 120–240 мин. Показатель pH среды находился в пределах 1,5–2,0. Для равномерной обработки сырья раствором в течение всего эксперимента использовали магнитные мешалки. После проведения гидролиза костное сырье подвергалось нейтрализации NaOH и промывке водой с дальнейшим центрифугированием, которое способствовало отделению минерального осадка.

С целью проведения сравнительного анализа влияния на гидролиз сырья из ног цыплят-бройлеров определяли массовую долю коллагена с учетом отделения фосфата кальция (рисунок 4.2.2).



Примечание: значения, приведенные для разных технологических схем и помеченные одной буквой (a, b, c, d или e), согласно тесту Тьюки, достоверно ($P > 0,05$) не отличались друг от друга.

Рисунок 4.2.2 – Массовая доля коллагена в зависимости от разработанных схем гидролиза сырья из ног цыплят-бройлеров

Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод, что наибольший выход продукта (16,4 %) достигается при схеме гидролиза 7, где используется концентрация фермента 0,4 % от массы сырья, соотношение сырья и растворителя

1:2, время обработки 120 мин при температуре 55 °С и рН 1,5. Прослеживается четкая тенденция увеличения массовой доли коллагена при повышении концентрации фермента: от 8,7 % при 0,1 % фермента до 16,4 % при 0,4 % фермента. Следует отметить, что более короткое время обработки при высоких концентрациях фермента оказывается более эффективным. Помимо этого, соотношение сырья и растворителя 1:2 в большинстве случаев дает лучший результат по сравнению с соотношением 1:3 при прочих равных условиях.

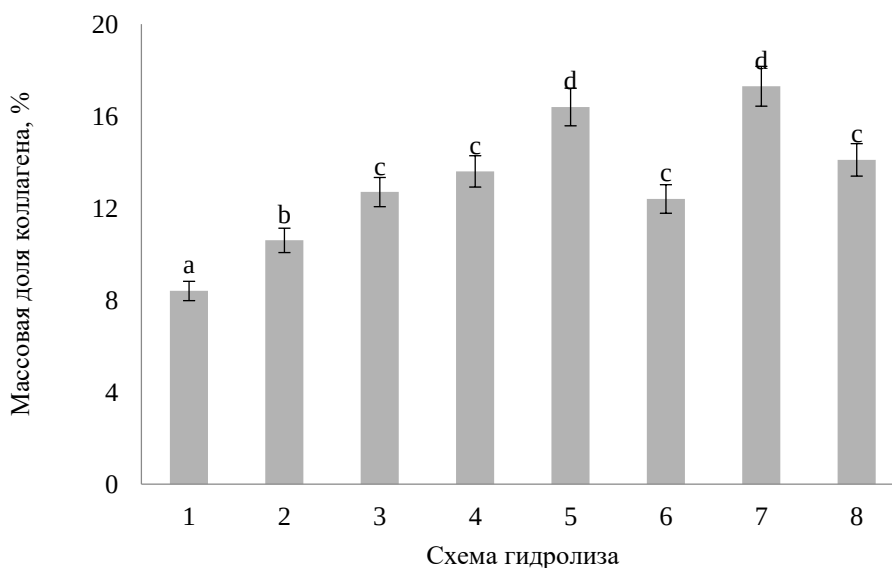
На следующем этапе эксперимента был проведен подбор параметров и разработаны схемы ферментативного гидролиза мягкого коллагенсодержащего сырья – свиной шкурки (таблица 4.2.3). Для ее гидролиза применяли щелочный метод с использованием протеазы поларзим (*Acremonium chrysogenum*) с ферментной активностью $6 \cdot 10^{-4}$ кат и активацией в диапазоне рН 7,0–11,0 при температуре от 40 до 60 °С.

Таблица 4.2.3 – Схемы обработки мягкого коллагенсодержащего сырья протеазой поларзим (*Acremonium chrysogenum*), активность $6 \cdot 10^{-4}$ кат

Схема	Концентрация фермента, % от массы сырья	Соотношение сырья и растворителя 1М HCl, масса / объем	Продолжительность обработки, мин	рН	Температура обработки, °С
1	$0,10 \pm 0,01$	1:4	$60,0 \pm 0,20$	7,5	$45,0 \pm 0,50$
2	$0,10 \pm 0,01$	1:6	$90,0 \pm 0,20$	8,5	$50,0 \pm 0,50$
3	$0,10 \pm 0,01$	1:8	$120,0 \pm 0,20$	9,5	$55,0 \pm 0,50$
4	$0,20 \pm 0,01$	1:4	$90,0 \pm 0,20$	8,0	$50,0 \pm 0,50$
5	$0,20 \pm 0,01$	1:6	$120,0 \pm 0,20$	9,0	$55,0 \pm 0,50$
6	$0,20 \pm 0,01$	1:8	$60,0 \pm 0,20$	10,0	$60,0 \pm 0,50$
7	$0,30 \pm 0,01$	1:4	$120,0 \pm 0,20$	10,5	$60,0 \pm 0,50$
8	$0,30 \pm 0,01$	1:6	$60,0 \pm 0,20$	11,0	$55,0 \pm 0,50$

Для обработки подготовленное сырье помещали в раствор 1М HCl, в состав которого была внесена по представленным схемам в таблице 4.2.3 протеаза поларзим с ферментной активностью $6 \cdot 10^{-4}$ кат. Гидролиз исходного сырья проводили при температуре от $45 \pm 0,5$ до $60 \pm 0,5$ °C в течение 60–120 мин. В зависимости от схемы гидролиза, pH среды находился в пределах 7,5–11,0. Для равномерной обработки сырья раствором на протяжении всего эксперимента использовали магнитные мешалки. После проведения гидролиза сырье подвергалось нейтрализации и промывке водой с дальнейшим центрифугированием, которое способствовало отделению неколлагеновых частиц.

По результатам проведенного эксперимента можно сделать вывод о том, что наибольший показатель массовой доли коллагена 17,3 % был достигнут при использовании 0,3 % фермента от массы сырья, соотношении сырья и растворителя 1:4, продолжительности обработки 120 мин, pH 10,5 и температуре 60 °C (рисунок 4.2.3).



Примечание: значения, приведенные для разных технологических схем и помеченные одной буквой (a, b, c, или d), согласно тесту Тьюки, достоверно ($P > 0,05$) не отличались друг от друга.

Рисунок 4.2.3 – Массовая доля коллагена в зависимости от разработанных схем гидролиза мягкого коллагенсодержащего сырья

Таким образом, увеличение концентрации фермента, времени гидролиза, pH и температуры в определенных пределах способствует повышению эффективности извлечения коллагена из свиной шкурки при ферментативном гидролизе протеазой поларзим. Это связано с тем, что увеличение концентрации фермента приводит к эффективному расщеплению пептидных связей коллагена, что ускоряет процесс гидролиза и увеличивает выход целевого продукта. Более длительное время обработки также позволяет ферменту расщепить большее количество пептидных связей, что способствует интенсификации процесса и увеличению выхода сырья.

Повышение pH до уровня 10,5 и увеличение температуры ускоряет ферментативные реакции, т. к. повышается кинетическая энергия молекул, что облегчает взаимодействие фермента с субстратом. Однако повышение температуры может привести к денатурации фермента и снижению его активности.

Следующим этапом (после нейтрализации сред) было осуществление водной экстракции коллагена в стационарном режиме при температуре от 55 до 65 °C в течение 60 мин. Затем полученные образцы подвергались фильтрации через марлевые фильтры.

4.3 Определение основных показателей качества коллагеновых бульонов

После процесса гидролиза, центрифугирования и механической фильтрации определяли основные показатели качества полученных коллагеновых бульонов.

Для подтверждения эффективности предлагаемых схем определяли показатели качества для образцов с наибольшим выходом по отношению к массе исходного сырья.

В качестве исследуемых образцов коллагена из сырой кости КРС были выбраны образцы, полученные по схеме гидролиза 4, 6 и 8, массовая доля коллагена в которых составила 15,8, 13,7 и 14,7 % соответственно. Помимо этого, исследовались образцы из ног цыплят-бройлеров, выработанные по схемам 5, 7 и 8, с массовой долей коллагена 15,2, 16,4 и 15,1 % соответственно, а также образцы из свиной шкурки, полученные по схемам 5 и 7, с массовой долей коллагена 16,4 и 17,3 % соответственно.

В таблицах 4.3.1–4.3.3 представлены результаты исследования основных физико-химических показателей полученных коллагеновых бульонов.

Таблица 4.3.1 – Физико-химические показатели полученных коллагеновых бульонов из сырой кости КРС с использованием пепсина (*Rhizomucor miehei*), активность $5 \cdot 10^{-3}$ кат

Показатель	Схема гидролиза 4 (0,15 % фермента, 1:3, 360 мин, 25 °С, рН 2,0)	Схема гидролиза 6 (0,3 % фермента, 1:3, 480 мин, 50 °С, рН 1,5)	Схема гидролиза 8 (0,15 % фермента, 1:4, 480 мин, 50 °С, рН 2,0)
Массовая доля коллагена, %	$15,80 \pm 0,09^a$	$13,70 \pm 0,05^b$	$14,70 \pm 0,07^b$
Массовая доля минеральных веществ, %	$2,80 \pm 0,07^a$	$2,30 \pm 0,04^{ab}$	$2,00 \pm 0,06^b$
Массовая доля влаги, %	$80,30 \pm 0,19^a$	$83,30 \pm 0,21^a$	$82,80 \pm 0,16^a$
Массовая доля жира, %	$1,10 \pm 0,07^a$	$0,70 \pm 0,04^b$	$0,50 \pm 0,08^b$
рН	$6,10 \pm 0,01^a$	$5,80 \pm 0,20^a$	$5,90 \pm 0,19^a$
Вязкость (при 40 °С), мПа/с	$4,80 \pm 0,03^a$	$3,20 \pm 0,04^b$	$3,60 \pm 0,07^b$

Примечание: значения, полученные для схем гидролиза и помеченные одной буквой (а или b), согласно тесту Тьюки, достоверно ($P > 0,05$) не отличались друг от друга.

Таблица 4.3.2 – Физико-химические показатели полученных коллагеновых бульонов из ног цыплят-бройлеров с использованием протеазы (*Bacillus subtilis*), активность $2 \cdot 10^{-3}$ кат

Показатель	Схема гидролиза 5 (0,3 % фермента, 1:2, 140 мин, 50 °С, рН 1,5)	Схема гидролиза 7 (0,4 % фермента, 1:2, 120 мин, 55 °С, рН 1,5)	Схема гидролиза 8 (0,4 % фермента, 1:3, 120 мин, 55 °С, рН 2,0)
Массовая доля коллагена, %	$15,20 \pm 0,09^a$	$16,40 \pm 0,10^b$	$15,10 \pm 0,13^a$
Массовая доля, минеральных веществ, %	$2,10 \pm 0,02^a$	$2,50 \pm 0,05^b$	$1,80 \pm 0,08^a$
Массовая доля влаги, %	$82,30 \pm 0,19^a$	$80,50 \pm 0,21^a$	$82,80 \pm 0,16^a$
Массовая доля жира, %	$0,40 \pm 0,03^a$	$0,60 \pm 0,04^a$	$0,30 \pm 0,02^a$
рН	$5,90 \pm 0,12^a$	$6,20 \pm 0,13^a$	$6,50 \pm 15^a$
Вязкость (при 40 °С), мПа/с	$4,70 \pm 0,01^a$	$4,90 \pm 0,02^a$	$3,70 \pm 0,1^b$

Примечание: значения, полученные для схем гидролиза и помеченные одной буквой (а или b), согласно тесту Тьюки, достоверно ($P > 0,05$) не отличались друг от друга.

Таблица 4.3.3 – Физико-химические показатели полученных коллагеновых бульонов из свиной шкурки с использованием протеазы поларзим (*Acremonium chrysogenum*), активность $6 \cdot 10^{-4}$ кат

Показатель	Схема гидролиза 5 (0,2 % фермента, 1:6, 120 мин, 55 °С, рН 9,0)	Схема гидролиза 7 (0,3 % фермента, 1:4, 120 мин, 55 °С, рН 10,5)
Массовая доля коллагена, %	$16,40 \pm 0,14^a$	$17,30 \pm 0,12^b$
Массовая доля, минеральных веществ, %	$2,40 \pm 0,03^a$	$2,90 \pm 0,07^a$

Примечание: значения, полученные для схем гидролиза и помеченные одной буквой (а или b), согласно тесту Тьюки, достоверно ($P > 0,05$) не отличались друг от друга.

Продолжение таблицы 4.3.3

Показатель	Схема гидролиза 5 (0,2 % фермента, 1:6, 120 мин, 55 °С, pH 9,0)	Схема гидролиза 7 (0,3 % фермента, 1:4, 120 мин, 55 °С, pH 10,5)
Массовая доля влаги, %	$80,60 \pm 0,14^a$	$79,00 \pm 0,18^a$
Массовая доля жира, %	$0,60 \pm 0,02^a$	$0,80 \pm 0,07^a$
pH	$6,80 \pm 0,08^a$	$7,20 \pm 0,10^a$
Вязкость (при 40 °С), мПа/с	$3,50 \pm 0,07^a$	$4,20 \pm 0,06^b$

Примечание: значения, полученные для схем гидролиза и помеченные одной буквой (а или b), согласно тесту Тьюки, достоверно ($P > 0,05$) не отличались друг от друга.

Сведения таблицы 4.3.1 показывают, что максимальное значение массовой доли коллагена $15,80 \pm 0,09$ % наблюдается в бульоне гидролизата коллагена, полученном по схеме 4, что свидетельствует о наиболее эффективном расщеплении коллагена и интенсивном высвобождении белка. В то же время схема 6 характеризуется наименьшим показателем массовой доли коллагена ($13,70 \pm 0,05$ %) и наибольшей массовой долей влаги ($83,30 \pm 0,21$ %), что может быть связано с недостаточной ферментативной активностью при более низкой температуре. Массовая доля минеральных веществ в образцах варьируется в пределах от $2,00 \pm 0,06$ до $2,80 \pm 0,07$ %. Можно предположить, что это связано с разницей в степени экстракции солей. Вязкость коллагеновых бульонов выше при схеме 4 ($4,80 \pm 0,03$ мПа/с), что, возможно, обусловлено более высокой концентрацией пептидных структур. Таким образом, реализация гидролиза по схеме 6 обеспечивает наилучшие показатели: данный режим гидролиза является эффективным для получения гидролизатов коллагена из сырой кости КРС (ГКСК).

Анализируя представленные в таблице 4.3.2 данные, можно сделать следующий вывод: наибольшая массовая доля коллагена ($16,40 \pm 0,10$ %) наблюдается в образце, полученном при схеме гидролиза 7, что свидетельствует

о более интенсивном высвобождении коллагена из структуры сырья. В то же время схема 8 демонстрирует незначительное снижение массовой доли коллагена до $15,10 \pm 0,13$ %, что может быть связано с большей степенью разбавления коллагена в водной среде. Показатель pH бульонов варьируется от $5,90 \pm 0,12$ до $6,50 \pm 0,15$, что соответствует оптимальным условиям ферментативного гидролиза. Низкое содержание жира (от $0,30 \pm 0,02$ до $0,60 \pm 0,04$ %) и минеральных веществ ($1,80 \pm 0,08$ до $2,50 \pm 0,05$ %) подтверждает высокую степень очистки полученного продукта. Таким образом, эффективные условия гидролиза по схеме 7 обеспечивают максимальный выход белка и сухих веществ.

По результатам анализа таблицы 4.3.3 можно заключить, что наибольшее содержание массовой доли коллагена ($17,30 \pm 0,12$ %) выявлено в образце, полученном при гидролизе по схеме 7, что свидетельствует о более эффективном расщеплении коллагеновых структур и высокой степени экстракции. Таким образом, гидролиз по схеме 7 обеспечивает лучшие показатели, что делает разработанный режим гидролиза наиболее оптимальным для получения коллагеновых гидролизатов.

4.4 Исследование баромембранного воздействия на технологический этап фильтрации и концентрирования коллагеновых бульонов. Обоснование режимов и параметров процесса сушки

В современной науке и практике все чаще используются мембранные процессы. Данная технология способна решать любые задачи по фильтрации, концентрированию и очистке пищевых компонентов. Один из видов мембранных процессов – баромембранная технология, которая используется в разных отраслях промышленности (пищевая, химическая, биотехнологическая промышленности).

Технология производства гидролизатов коллагена достаточно сложная, время- и энергозатратная (в особенности, процесс концентрирования бульонов до содержания сухих веществ от 12 до 35 %).

Традиционный метод концентрирования – испарение бульонов в три стадии: предварительное концентрирование, основное концентрирование и завершающая стадия для высокой концентрации. Этот метод имеет некоторые недостатки, такие как потребление большого количества энергии и выброс углеводородов в атмосферу. Как уже было сказано, при производстве требуются большие тепловые энергозатраты, т. к. технология производства связана с отделением влаги. В связи с этим возникла потребность в изучении повышения эффективности производства гидролизатов коллагена методом баромембранных технологий.

С целью ресурсосбережения предлагается использовать ультрафильтрацию на этапе концентрирования коллагеновых бульонов, что также повлияет на чистоту конечного продукта. Ультрафильтрационные установки имеют ряд преимуществ для производства пищевых продуктов, например, снижают количество вакуум-выпарных аппаратов и удаляют большую часть свободной влаги из продукта, разделяя его на фракции.

Цель данного раздела – изучить влияние условий эксплуатации УФ-мембран на фильтрацию и концентрационные характеристики растворов коллагена и подобрать рациональные параметры сушки.

Для исследования баромембранных технологий в процессе производства использовали ультрафильтрационную установку МФУ-Р-45-300. Данная мембранная фильтрационная система (МФУ-Р) предназначена для фильтрации различных растворов. Она позволяет получать концентраты или фильтраты растворов, отделяя молекулы различных размеров, в зависимости от установленных мембран.

Основным объектом исследований для подбора параметров ультрафильтрации служили коллагеновые бульоны, полученные ферментативно-кислотным гидролизом сырья животного происхождения.

Для фильтрации применяли полимерные УФ-мембраны ЭРУ 100, обеспечивающие разделение исходного продукта на ретентат (концентрат) и пермеат (фильтрат). Ретентат в своем составе имеет белки и незначительное количество минеральных веществ, которые переходят в него в процессе фильтрации исходного раствора, а пермеат – отфильтрованные соли и минералы. Принципиальная схема экспериментальной ультрафильтрационной установки для концентрирования раствора представлена на рисунке 4.4.1.

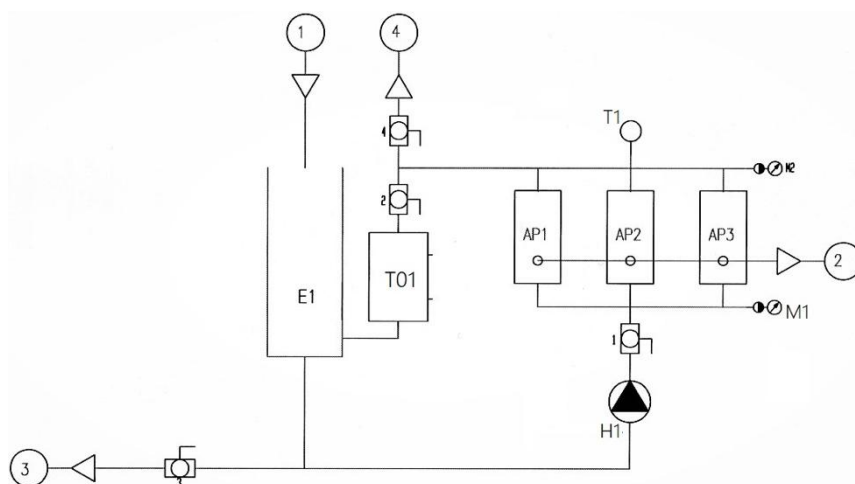


Рисунок 4.4.1 – Принципиальная схема экспериментальной УФ-установки для концентрирования раствора коллагена: 1 – вход фильтруемой жидкости;

2 – выход фильтрата; 3 – слив концентрата; 4 – выход промывной воды;

E1 – приемная емкость; T01 – теплообменник; T1 – термометр;

AP1–3 – фильтрационный аппарат; M1 – манометр; H1 – циркуляционный насос

С целью исследования влияния баромембранных технологий на процесс производства гидролизатов коллагена в приемную емкость (E1) помещали полученные коллагеновые бульоны. Контролируемое давление находилось в пределах 1,0–3,0 Па с перепадом в напорном и возвратном коллекторе не более 0,2–0,5 кгс/см².

При проведении ультрафильтрации необходимо учитывать температурные режимы проведения данного процесса. Так, при проведении ультрафильтрации высокобелковых растворов в пределах 15–40 °С стремительно развиваются

микроорганизмы, в связи с чем рекомендуется использовать температуру 40–60 °С, что будет способствовать предотвращению роста микроорганизмов. Помимо этого, можно осуществлять указанный процесс при температуре ниже 15 °С. Однако для коллагеновых бульонов данный режим не подходит, т. к. в зависимости от молекулярной массы изменяется и их вязкость (при температурах ниже 20 °С).

Перед началом фильтрации регулировали трансмембранное давление на уровне контролируемого давления эксперимента в течение 10 мин с помощью воды. После достижения стабильного состояния ее заменяли исследуемыми растворами коллагена.

Поток чистой воды был сильнее при более высокой температуре и давлении для обеих мембран по сравнению со стандартными условиями, измеренными производителем (трансмембранное давление до 0,30 мПа, 700 об/мин).

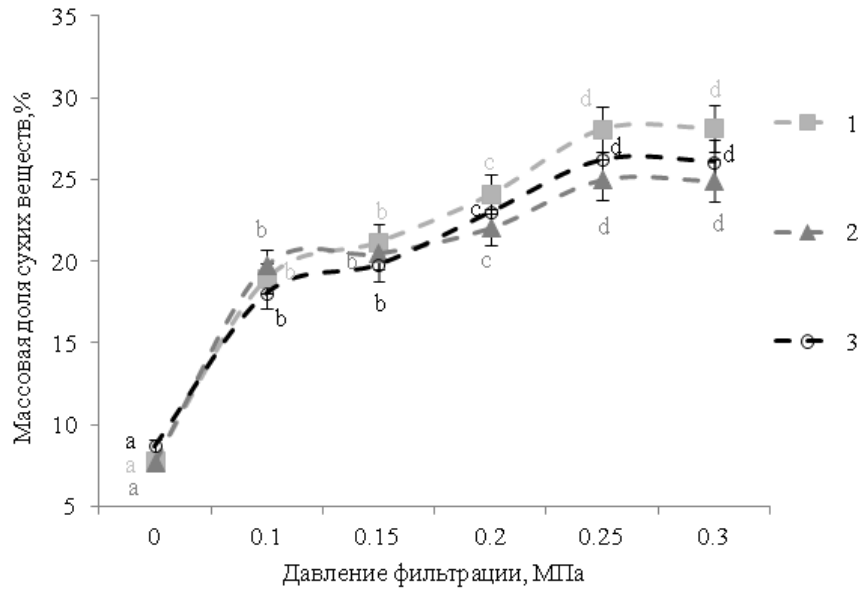
При исследовании влияния баромембранного воздействия на технологический этап фильтрации и концентрирования коллагеновых бульонов были применены разные параметры проведения фильтрации, представленные в таблице 4.4.1.

Таблица 4.4.1 – Параметры фильтрации

Параметр	Режим				
	1	2	3	4	5
Контролируемое давление, мПа	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30
Температура фильтрации, °С	40				

Данные подбора температурного режима, а также стремление к увеличению проницаемости белковых структур через фильтры и предотвращению процесса денатурации обусловили выполнение исследования параметров фильтрации коллагеновых растворов при 40 °С.

Далее выявлена зависимость производительности разделения коллагеновых растворов от рабочего давления УФ-установки и рассматриваемого температурного режима (рисунок 4.4.2).



Примечание: значения, приведенные для разных значений рабочего давления и помеченные одной буквой (a, b, c, или d), согласно тесту Тьюки, достоверно ($P > 0,05$) не отличались друг от друга.

Рисунок 4.4.2 – Влияние давления ультрафильтрации на концентрацию сухих веществ в коллагеновых бульонах при температуре 40 °С:

1 – коллагеновые бульоны из сырой кости КРС ($n = 3$); 2 – коллагеновые бульоны из ног цыплят-бройлеров ($n = 3$); 3 – коллагеновые бульоны из свиной шкурки ($n = 2$)

В начале ультрафильтрации исследуемых коллагеновых бульонов на всех типах мембран наблюдалось быстрое снижение потока пермеата. Предположительно, это могло быть связано с концентрационной поляризацией и первичным загрязнением пор мембран. Однако при дальнейших исследованиях за счет общего нагнетаемого давления в системе фильтрации поток пермеата со временем увеличивался.

Дисперсионный анализ результатов исследования установил, что с увеличением давления происходило значимое повышение концентрации сухих веществ в бульоне до определенного момента. Это подтверждает зависимость между этими параметрами. Однако концентрация сухих веществ увеличивалась с ростом давления неравномерно, что указывает на наличие нелинейной зависимости между ними. Наибольшее увеличение концентрации наблюдалось при значениях давления около 0,25–0,30 мПа, что может быть связано с более интенсивным удалением воды в этом диапазоне. Следует отметить, что при повышении давления с 0,25 мПа до 0,30 мПа не наблюдалось значимого увеличения концентрации сухих веществ в обрабатываемом растворе. Как следствие, давление 0,25 мПа позволяет обеспечить баланс между эффективной фильтрацией и минимальными потерями продукта при меньших энергозатратах. Итак, с целью ресурсосбережения и снижения энергозатрат целесообразно проводить процесс ультрафильтрации при температуре раствора коллагена 40 °С и контролируемом давлении 0,25 мПа.

На рисунке 4.4.3 представлены образцы концентрированного коллагенового бульона (ретентат) и воды, содержащей низкомолекулярные органические и минеральные вещества (пермеат), а также процесс ультрафильтрации непосредственно. Физико-химические показатели коллагеновых бульонов – ретентата и пермеата, – полученных в ходе ультрафильтрации, отражены в таблице 4.4.2.

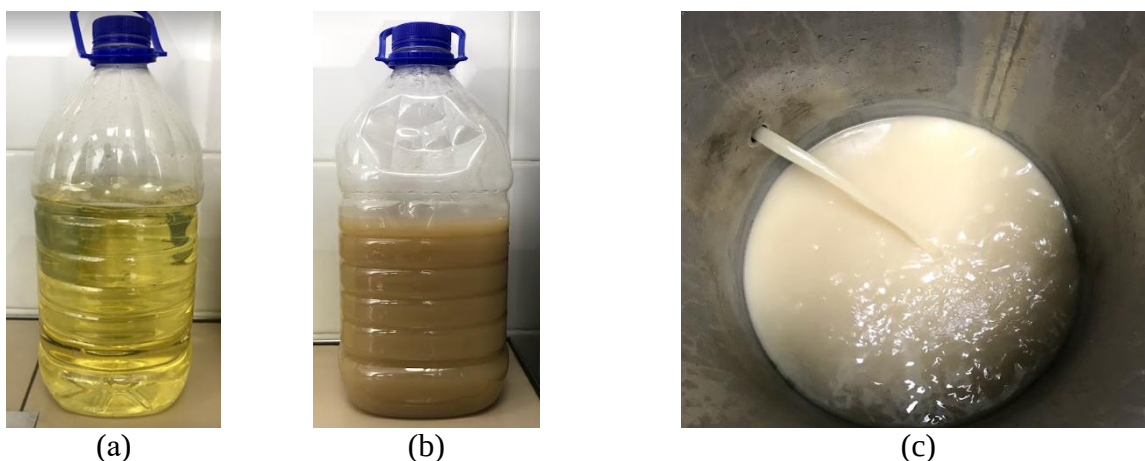


Рисунок 4.4.3 – Образцы пермеата и ретентата: а – пермеат; б – ретентат; с – процесс фильтрации

Таблица 4.4.2 – Физико-химические показатели коллагеновых бульонов, полученных методом ультрафильтрации

Показатель	Образцы коллагенового бульона															
	Пермеат								Ретентат							
	из сырой кости КРС			из ног цыплят-бройлеров			из свиной шкурки		из сырой кости КРС			из ног цыплят-бройлеров			из свиной шкурки	
	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8
Массовая доля сухих веществ, %	2,58 ± 0,07	3,98 ± 0,04*	4,80 ± 0,06**	4,43 ± 0,03	3,84 ± 0,04*	3,21 ± 0,07**	2,98 ± 0,07	3,21 ± 0,04	28,10 ± 0,40	26,80 ± 0,21	25,95 ± 0,10	24,58 ± 0,30	25,01 ± 0,05	25,80 ± 0,09	26,20 ± 0,09	25,96 ± 0,30
Массовая доля белка, %	2,35 ± 0,07	3,66 ± 0,04*	4,44 ± 0,09**	4,05 ± 0,06	3,28 ± 0,04*	2,98 ± 0,05**	2,81 ± 0,03	2,94 ± 0,07	24,50 ± 0,20	23,81 ± 0,25	24,36 ± 0,20	23,45 ± 0,08	24,36 ± 0,1	24,75 ± 0,08	25,10 ± 0,1	24,85 ± 0,09
Массовая доля солей, минералов, %	0,18 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,19 ± 0,02	0,17 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,06 ± 0,01
Массовая доля влаги, %	97,20 ± 0,12	96,02 ± 0,07	95,20 ± 0,11	95,57 ± 0,09	96,16 ± 0,04	96,79 ± 0,05	97,02 ± 0,06	96,79 ± 0,08	71,90 ± 0,1	73,20 ± 0,03	74,05 ± 0,10	75,42 ± 0,05	74,99 ± 0,07	74,20 ± 0,04	73,80 ± 0,08	74,04 ± 0,05
Массовая доля жира, %	0,40 ± 0,01	0,65 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,53 ± 0,01	0,40 ± 0,01	0,10 ± 0,01	–	–	–	–	–	–	–	–
pH	6,75	6,74	6,70	6,84	6,86	6,85	6,79	6,89	6,97	6,98	6,94	6,93	6,99	6,92	6,95	6,97

Примечание: * или ** – согласно тесту Тьюки, значения достоверно ($P < 0,05$) отличались от других.

Так, влияние ультрафильтрации на содержание сухих веществ, белка и влаги можно оценить через изменения между ретентатом и пермеатом для различных источников сырья. Массовая доля сухих веществ в ретентате находилась в пределах от 24,58 до 28,10 %, что указывает на высокую степень концентрации коллагеновых растворов. По представленным в таблице 4.4.2 данным можно предположить, что ультрафильтрация способствует отделению более мелких молекул от белков и пептидов, оставляя высокомолекулярные соединения в ретентате.

Сравнение содержания жира показывает, что в большинстве образцов в пермеате жир отсутствует. Это свидетельствует о его эффективном удалении в процессе ультрафильтрации, в то время как массовая доля влаги остается в основном в пермеате, где ее содержание находится в пределах от 71,9 до 74 % в зависимости от образца. Также стоит отметить, что титруемая кислотность в ретентате незначительно выше, чем в пермеате. Вероятно, это связано с концентрацией более кислых компонентов, таких как аминокислоты и пептиды. Повышение pH в ретентате по сравнению с пермеатом указывает на отсутствие значительных изменений в кислотности при ультрафильтрации, что подчеркивает стабильность химического состава.

Таким образом, процесс ультрафильтрации является эффективным методом для концентрирования коллагеновых бульонов, поскольку позволяет избирательно удалять низкомолекулярные соединения. Кроме того, применение ультрафильтрации при концентрации коллагеновых бульонов позволяет оптимизировать технологические процессы, делая их более экономически выгодными, что важно для пищевой и фармацевтической индустрий. Помимо этого, использование указанного метода позволило, во-первых, увеличить содержание сухих веществ в среднем более чем в 3 раза, сохранив при этом стабильность физико-химических характеристик в концентратах всех видов исходного сырья; во-вторых, избирательно удалять низкомолекулярные соединения. Это позволяет рекомендовать ультрафильтрацию в технологии получения гидролизатов коллагена.

Подбор режимов и параметров сушки коллагеновых растворов

Сушка – важный процесс для получения гидролизатов коллагена с функциональными свойствами. В основном свойства продукта зависят от вида сырья, методов предварительной обработки, сушки и условий экстракции, пространственной структуры белковых молекул и их состояния. В процессе сушки происходят физико-химические изменения структуры и функций белков: нагревание может вызывать разрыв ковалентных и нековалентных связей, что приводит к изменению или модификации структуры белка. Значительные изменения физических и химических свойств белков сильно влияют на функциональные свойства (растворимость, гелеобразование, пенообразование, эмульгирование, жиро- и водопоглощение). Величина изменения физико-химических свойств белков преимущественно зависит от применяемых методов и условий сушки.

В технологии производства белковых ингредиентов используют несколько способов сушки: конвекционный, сублимационный, распылительный и инфракрасный. Первый способ является самым распространенным. Его длительный процесс и повышенные температурные режимы могут приводить к значительной потере микронутриентов и биоактивных соединений в конечном продукте. При этом данный способ является простым в исполнении, но используемое оборудование имеет малую производительность, что может привести к неравномерной сушке продукта.

Другой способ сушки – сублимационный – представляет собой процесс удаления воды из продукта путем его замораживания, а затем сублимации льда в пар. Известно, что денатурация белка при образовании кристаллов льда может изменять структуру белка. В связи с этим при оптимизации процесса замораживания следует учитывать влияние площади поверхности льда, т. к. она может способствовать денатурации белка, вызванной замораживанием.

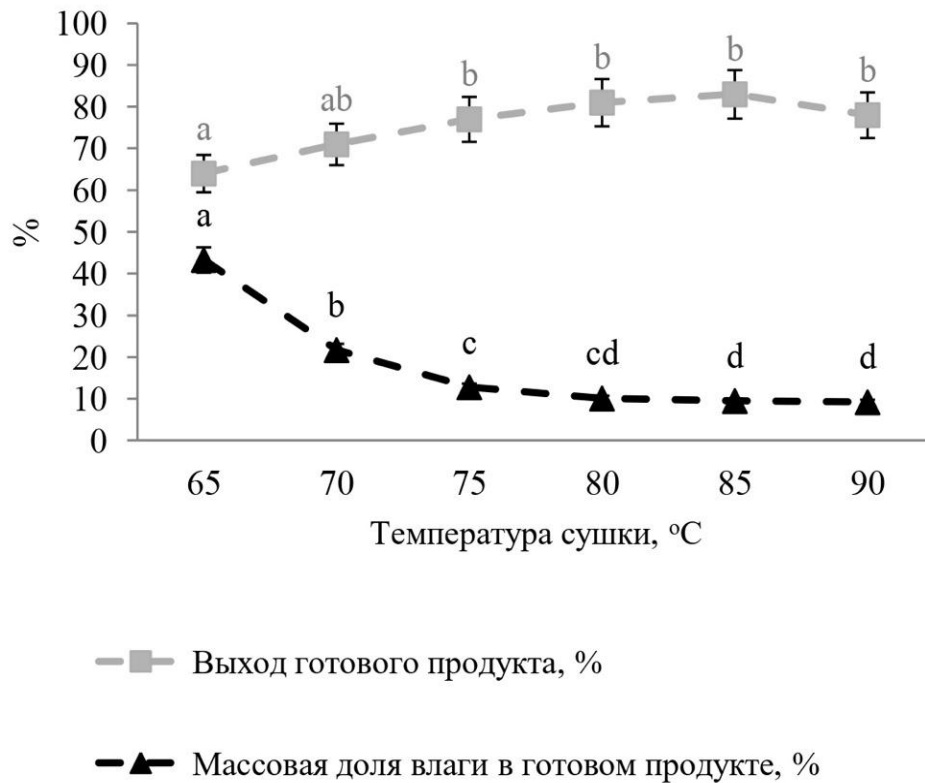
Распылительная сушка широко применяется в пищевой промышленности в связи с простотой и непродолжительностью течения процесса. Она

осуществляется путем распыления испаряемого материала через форсунки аппарата, что позволяет получить продукт хорошего качества в виде порошка или гранул. Однако этот процесс провоцирует большую усадку частиц, что может делать их более плотными. Данный способ используют при сушке растворов или суспензий. Например, с помощью распыления получают сухое молоко, пищевые и кормовые дрожжи, яичный порошок и др. Результаты некоторых исследований доказывают, что распылительная сушка способствует устранению многих недостатков белка и биоактивных пептидов (низкая биодоступность, высокая гигроскопичность, физическая и химическая нестабильность, сильная горечь во время и после хранения). Помимо этого, утверждается, что указанный способ сушки может улучшить свойства геля и функциональные свойства по сравнению с сублимационной сушкой.

В связи с выявленными технологическими преимуществами распылительной сушки перед другими было принято решение об исследовании и подборе параметров этого способа с целью получения сухого концентрата гидролизатов коллагена. В качестве опытного образца выбрали концентрированный коллагеновый бульон, полученный из свиной шкурки.

Для исследований параметров распылительной сушки на показатели качества гидролизатов использована лабораторная распылительная сушка модели Mini Spray Dryer B-290 (Buchi, Швеция). На данной установке предусмотрена регулировка скорости подачи рабочего раствора и распыляющего потока газа, температуры и аспирации. Данная модель позволяет получать готовый продукт с размером частиц 1–25 мкм.

На первом этапе исследований проводили подбор оптимальной температуры распылительной сушки. Так как температура сушки выше 100 °C нецелесообразна (может влиять на функционально-технологические свойства гидролизатов), был выбран диапазон 65–90 °C с шагом изменения режима на 5 °C (рисунок 4.4.4).

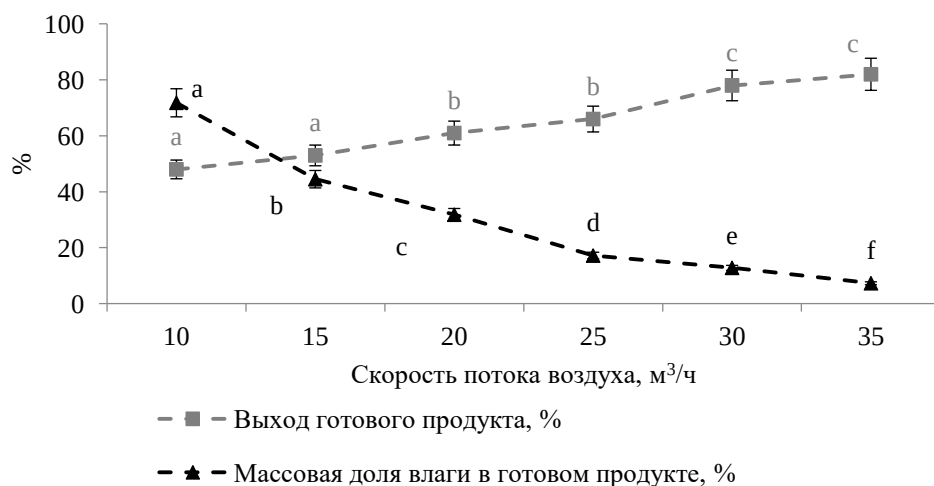


Примечание: значения, приведенные для рабочего давления и помеченные одной буквой (a, b, c, d, e или f), согласно тесту Тьюки, достоверно ($P > 0,05$) не отличались друг от друга.

Рисунок 4.4.4 – Средний выход готового продукта и массовая доля влаги в нем: зависимость от температуры в процессе распылительной сушки

Из представленных на рисунке 4.4.4 результатов видно, что оптимальная температура для наибольшего выхода готового продукта – 85 °C: при данном температурном режиме сушки массовая доля влаги в готовом продукте составляет $9,4 \pm 0,2$ %.

Следующим важным контролируемым показателем является расход сжатого воздуха (скорость потока воздуха). Для вычисления оптимального параметра указанного показателя исследовали диапазон потока воздуха от 10 до 45 м³/ч; зависимость определяли от выхода готового продукта и значения массовой доли влаги при температуре сушки 85 °C (рисунок 4.4.5).



Примечание: значения, приведенные для рабочего давления и помеченные одной буквой (a, b, c, d, e или f), согласно тесту Тьюки, достоверно ($P > 0,05$) не отличались друг от друга.

Рисунок 4.4.5 – Средний выход готового продукта и массовая доля влаги в нем: зависимость от скорости потока воздуха в процессе распылительной сушки

Сведения на рисунке 4.4.5 показывают, что скорость потока воздуха 35 м³/ч и температура сушки 85 °С являются оптимальными, т. к. при данных значениях достигается наибольший выход готового продукта с массовой долей влаги 7,8 %. Таким образом, были определены оптимальные параметры сушки концентрированных коллагеновых бульонов с использованием распылительной сушилки, которые указаны в таблице 4.4.3.

Таблица 4.4.3 – Оптимальные параметры сушки концентрированных коллагеновых бульонов на установке Mini Spray Dryer B-290

Параметр	Значение
Температура сушки раствора, °С	85
Скорость подачи раствора в распылительную камеру, мл/мин	12
Расход сжатого воздуха, м³/ч	35
Аспирация, %	100
Расчетный расход электроэнергии, кВт/ч	5,142*

Примечание: * – рассчитывалось по формуле: мощность x время работы, т. е. $(0,27+1,6) \times 165 = 5,142$ кВт/ч.

Данные режимы оптимальны для получения сухих гидролизатов коллагена, поскольку применяемые параметры сушки обеспечивают равномерное распределение подаваемого раствора в камеру, отсутствие «налипания» сухих частиц на внутреннюю поверхность циклона и наибольшее оседание конечного продукта в приемочной емкости. После проведения процесса распылительной сушки были определены физико-химические показатели полученных сухих коллагеновых концентратов, которые представлены в разделе 4.5.

4.5 Определение основных физико-химических и органолептических показателей гидролизатов коллагена

Для определения сравнительных показателей качества готового продукта были проведены ультрафильтрация и распылительная сушка при подобранных оптимальных параметрах образцов коллагена с наибольшим выходом после процесса гидролиза.

Полученные результаты, отраженные в таблице 4.5.1, позволяют утверждать, что продолжительность гидролиза костного сырья влияет на содержание белка и сухих веществ. При этом органолептические показатели сухих гидролизатов коллагена отличаются по цвету. Так, проведенный гидролиз по схемам 1, 2 и 4 обеспечивает получение сухого концентрата в виде однородного порошка светло-желтого цвета, а гидролиз, проведенный по схеме 3, – однородного порошка светло-кремового цвета.

Таблица 4.5.1 – Физико-химические показатели гидролизатов коллагена

Показатель	Образцы							
	из сырой кости КРС			из ног цыплят-бройлеров			из свиной шкурки	
	1	2	3	4	5	6	7	8
Массовая доля сухих веществ, %	89,24 ± 0,30	88,35 ± 0,40	85,90 ± 0,30	89,25 ± 0,25	85,90 ± 0,40	86,47 ± 0,20	88,10 ± 0,40	86,25 ± 0,30
Массовая доля белка, %	87,10 ± 0,50	86,90 ± 0,24	84,10 ± 0,31	88,25 ± 0,25	83,70 ± 0,30	84,56 ± 0,20	86,80 ± 0,20	87,20 ± 0,40
Массовая доля минеральных веществ, %	0,64 ± 0,08	0,95 ± 0,50	0,84 ± 0,04	0,72 ± 0,03	0,34 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,32 ± 0,02
Массовая доля влаги, %	10,02 ± 0,10	10,85 ± 0,20	11,80 ± 0,10	10,60 ± 0,20	10,80 ± 0,30	10,94 ± 0,20	11,05 ± 0,20	10,83 ± 0,10
Массовая доля жира, %	0,20	0,17	0,10	0,10	0,30	0,20	0,20	0,10
Прозрачность раствора с массовой долей гидролизата коллагена 5 %, %	84,0 ± 0,40	83,0 ± 0,20	80,0 ± 0,50	84,0 ± 0,20	85,0 ± 0,10	87,0 ± 0,20	86,0 ± 0,30	88,0 ± 0,20
рН раствора с массовой долей гидролизата коллагена 1 %	6,80–6,90							
Посторонние примеси	не обнаружено							
Вид	однородные крупинки							
Цвет	светло-желтый							
Вкус и запах	без посторонних запахов и вкусов							
Размер частиц	0,1 ± 0,001 мм							

Примечание: значения, полученные для разных образцов гидролизатов коллагена, согласно тесту Тьюки, достоверно ($P > 0,05$) не отличались друг от друга.

Массовая доля сухих веществ в образцах находится в пределах 85,9–89,25 % (норма). Массовая доля белка варьируется от 83,7 до 88,25 %; влаги – от 10,02 до 11,8 % (не превышает максимального предела 16 %); минеральных веществ – от 0,2 до 0,95 %, что подтверждает высокую степень очистки на этапе ультрафильтрации. Массовая доля жира в образцах составляет 0,1–0,3 % – это говорит об эффективности процесса обезжиривания. Прозрачность раствора с массовой долей гидролизата 5 % для всех образцов выше минимального значения в 70 %, что свидетельствует о хорошем качестве продукта, рН раствора колеблется в пределах от 5,0 до 7,0 (укладывается в требуемые параметры). Продукты имеют однородную структуру и светлый цвет – от светло-желтого до светло-кремового. Также отсутствуют посторонние запахи и вкусы, а размер частиц составляет около 0,1 мкм.

4.6 Оценка аминокислотного профиля и молекулярно-массового распределения белков гидролизатов коллагена

Показатель распределения молекулярной массы гидролизатов является ключевым параметром, который обуславливает их функциональные и биоактивные свойства, позволяет оценить степень гидролиза белков и определить размер полученных пептидов. Все перечисленное напрямую влияет на растворимость, вязкость, биодоступность и усвояемость гидролизатов. Кроме того, распределение молекулярной массы помогает прогнозировать биологическую активность пептидов. Для фармацевтической и пищевой промышленности этот показатель также важен при разработке продуктов с контролируемым высвобождением и целенаправленным воздействием на организм. Далее на электрофорезе в полиакриламидном геле в присутствии анионного детергента додецилсульфата натрия (ДДС-Na) проводили анализ распределения белковых фракций исследуемых образцов (таблица 4.6.1).

Таблица 4.6.1 – Распределение молекулярной массы белков выработанных образцов гидролизатов коллагена

Фракции, кДа	Содержание белка по фракциям в зависимости от сырья и схемы гидролиза, %							
	из сырой кости КРС			из ног цыплят-бройлеров			из свиной шкурки	
	1	2	3	4	5	6	7	8
200	1,32 ^a	3,88 ^b	11,56 ^c	6,39 ^a	1,06 ^b	4,45 ^c	7,31 ^a	5,87 ^b
150	3,10 ^a	5,12 ^b	2,33 ^c	1,33 ^a	4,91 ^b	3,72 ^c	3,52 ^a	3,19 ^a
100	8,46 ^a	12,12 ^b	4,01 ^c	42,84 ^a	2,19 ^b	5,14 ^c	5,64 ^a	6,32 ^a
85	20,86 ^a	9,04 ^b	0,95 ^c	10,37 ^a	14,60 ^b	9,29 ^a	9,65 ^a	8,52 ^a
60	14,54 ^a	5,78 ^b	3,00 ^c	1,30 ^a	6,37 ^b	7,69 ^c	6,85 ^a	6,12 ^a
50	8,84 ^a	41,47 ^b	9,66 ^a	3,17 ^a	4,81 ^b	4,98 ^b	4,69 ^a	3,74 ^b
40	10,11 ^a	2,65 ^b	4,7 ^c	3,46 ^a	3,22 ^a	3,41 ^a	3,75 ^a	3,97 ^a
30	0,22 ^a	1,25 ^b	2,01 ^c	3,53 ^a	0,97 ^b	3,85 ^a	3,01 ^a	2,92 ^a
25	2,93 ^a	1,23 ^b	5,77 ^c	3,45 ^a	1,27 ^b	3,21 ^a	3,74 ^a	3,85 ^a
20	3,59 ^a	2,21 ^b	2,19 ^b	2,97 ^a	4,39 ^b	5,89 ^c	4,52 ^a	4,64 ^a
ниже 20	26,03 ^a	15,25 ^b	53,82 ^c	21,19 ^a	56,21 ^b	48,37 ^c	47,32 ^a	50,86 ^a

Примечание: полученные для разных образцов коллагеновых бульонов и помеченные символом а, б или с, согласно Tukey тесту, достоверно (P<0,05) отличались от других.

Пептидные фракции представленных образцов распределились как в α -фракции, так и в β -фракции, при этом значительная часть представлена пептидами молекулярной массой до 20 кДа. Различия в составе белковых фракций различных образцов имели зависимости от типа сырья и условий гидролиза. Во всех образцах преобладали низкомолекулярные фракции (< 20 кДа), составляя от 15,25 % (образец 2) до 56,21 % (образец 5), что свидетельствует о глубокой степени гидролиза коллагеновых белков и образовании низкомолекулярных пептидов. Наибольший выход низкомолекулярных фракций особенно характерен для образцов гидролизатов из ног цыплят-бройлеров (образцы 4–6Г4 – Г6). Это может быть связано с более мягкой коллагеновой структурой и эффективностью используемых ферментов.

В образцах гидролизатов из сырой кости КРС (образцы 1, 2, 3) отмечается более равномерное распределение фракций, что указывает на менее интенсивное расщепление крупных белковых молекул, вероятно, из-за плотной структуры исходного коллагена.

Доля высокомолекулярных белков (200–100 кДа) значительно варьируется: в гидролизатах из сырой кости КРС (образец 3) их содержание достигает 11,56 % (200 кДа) и 4,01 % (100 кДа), тогда как в гидролизатах из ног цыплят-бройлеров (образцы 5 и 6) эти фракции практически отсутствуют. Полученные данные подтверждают, что сырая кость КРС сохраняет больше нативных коллагеновых структур даже после гидролиза, в то время как сырье из птицы подвергается более интенсивному расщеплению.

Следует уточнить, что гидролизаты из свиной шкурки (образцы 7, 8) демонстрируют промежуточные показатели, сохраняя некоторое количество крупных белковых комплексов (например, 5,87 % фракции 200 кДа в образце 8), но при этом имея значительную долю низкомолекулярных пептидов (около 50 %).

Таким образом, степень расщепления белков в гидролизатах зависит не только от вида сырья, но и от параметров гидролиза, что определяет их дальнейшие функциональные свойства, такие как растворимость и биодоступность.

На основании полученных данных по анализу молекулярно-массового распределения образцов гидролизатов коллагена можно предположить, что реологические характеристики образцов 2 и 4 будут уступать образцам 1 и 3 и, следовательно, их технологические свойства будут ниже из-за высокого содержания низкомолекулярных пептидов в изученных фракциях белка.

Можно определить функциональные особенности применения образцов 2 и 4 в производстве пищевых продуктов и фармацевтических препаратах. Кроме того, при ферментативной обработке в кислотной и щелочной среде наблюдается значительное содержание низкомолекулярных пептидов, которые были образованы путем расщепления более крупных во время гидролиза сырого костного сырья и экстракции коллагена.

Предположительно, для обеспечения качественных показателей образцов гидролизатов коллагена необходимо гарантировать наличие в нем гидрофильных аминокислот в преимуществе, которые способны поглощать влагу и удерживать ее. К таким аминокислотам относятся серин, треонин, аспарагин, глутамин, лизин, аргинин, гистидин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, цистеин, тирозин.

С целью дальнейшего изучения биологического потенциала выработанных образцов гидролизатов коллагена проводили определение аминокислотного состава. Результаты этого этапа представлены на рисунках 4.6.1–4.6.8 и в таблице 4.6.2.

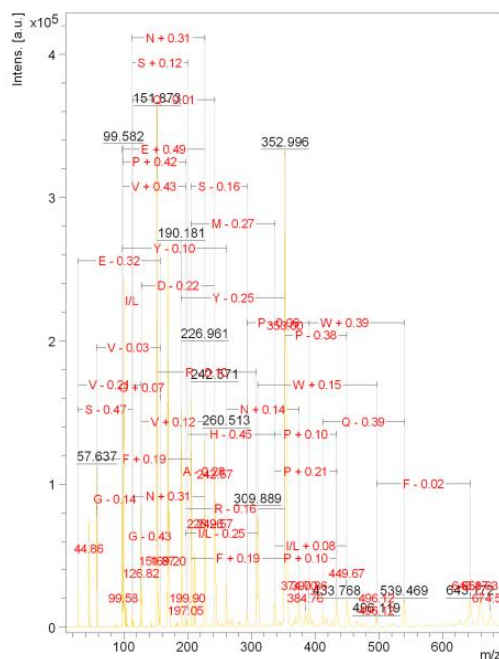


Рисунок 4.6.1 – Хроматограмма аминокислот образца гидролизата коллагена 1 (сырая кость КРС)

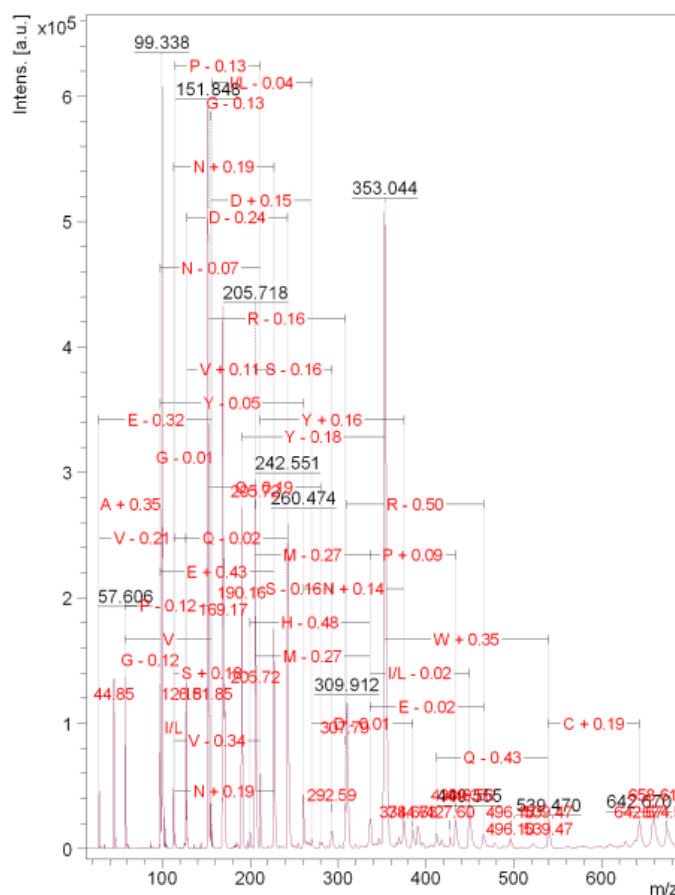


Рисунок 4.6.2 – Хроматограмма аминокислот образца гидролизата коллагена 2 (сырая кость КРС)

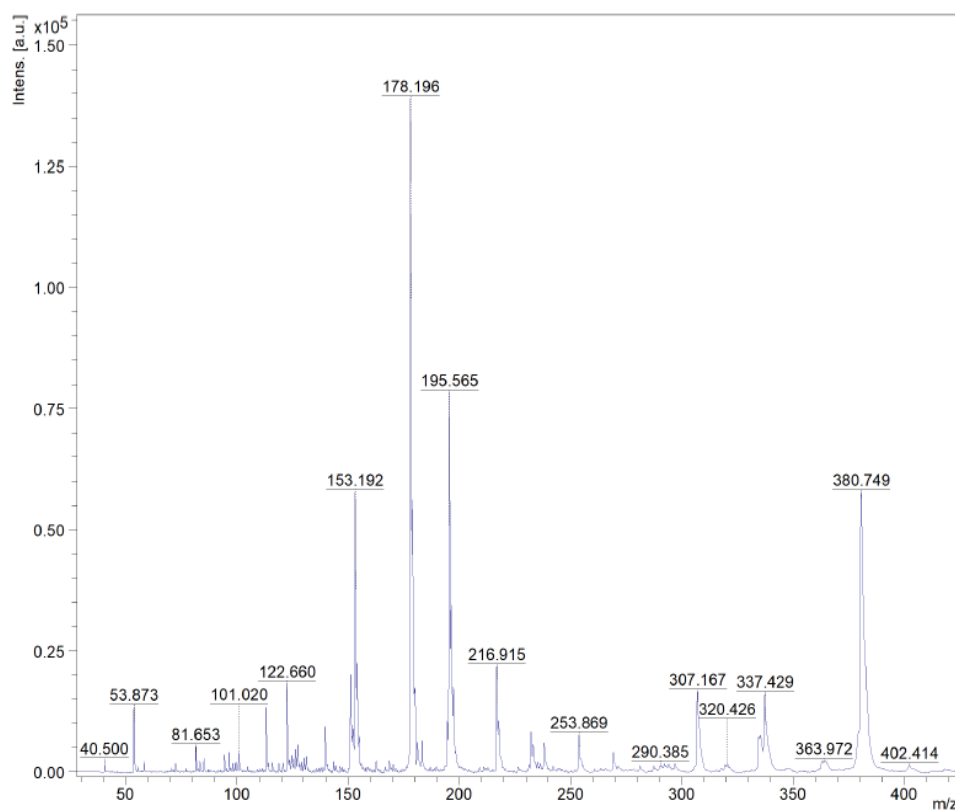


Рисунок 4.6.3 – Хроматограмма аминокислот образца гидролизата коллагена 3 (сырая кость КРС)

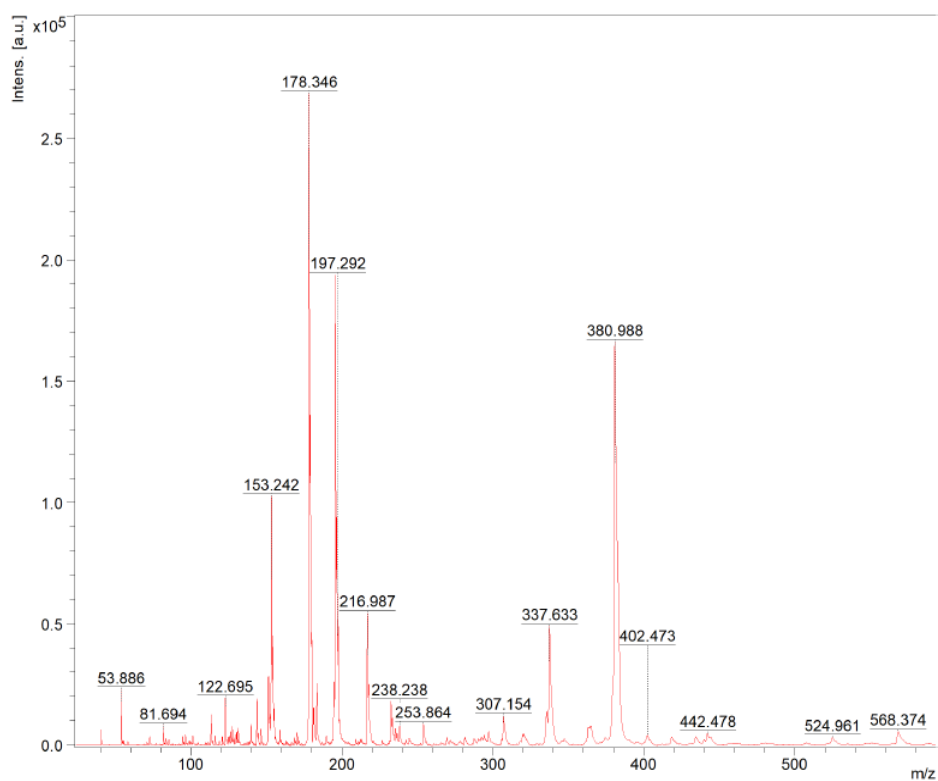


Рисунок 4.6.4 – Хроматограмма аминокислот образца гидролизата коллагена 4 (ноги цыплят-бройлеров)

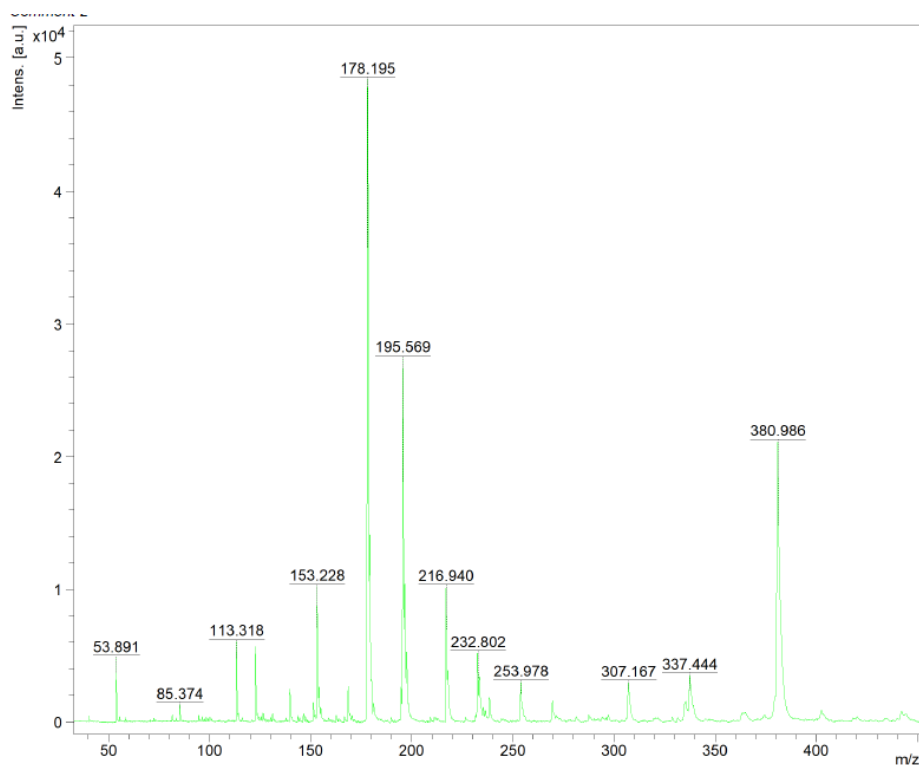


Рисунок 4.6.5 – Хроматограмма аминокислот образца гидролизата коллагена 5 (ноги цыплят-бройлеров)

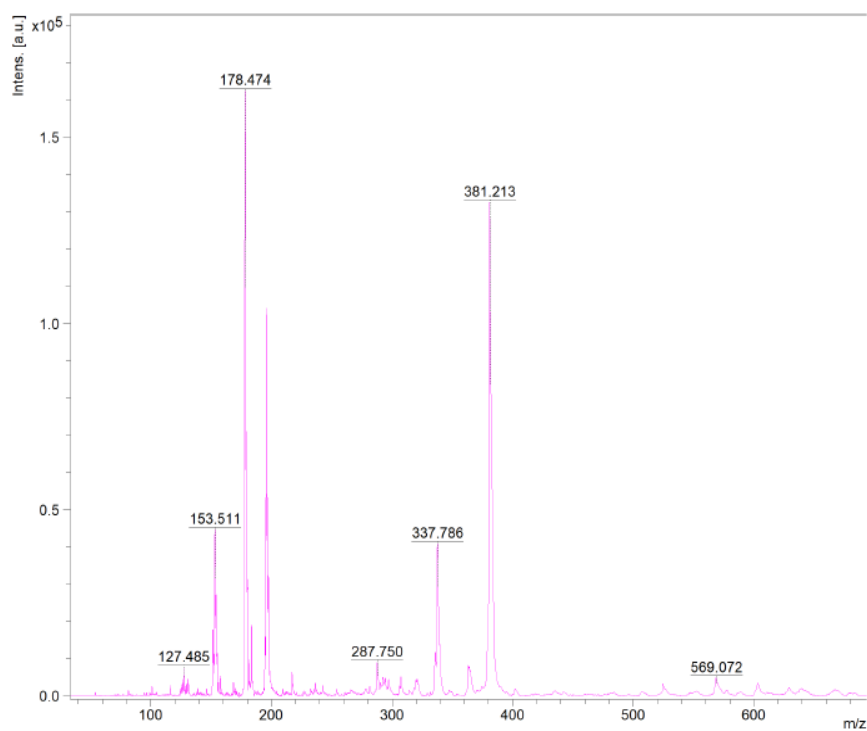


Рисунок 4.6.6 – Хроматограмма аминокислот образца гидролизата коллагена 6 (ноги цыплят-бройлеров)

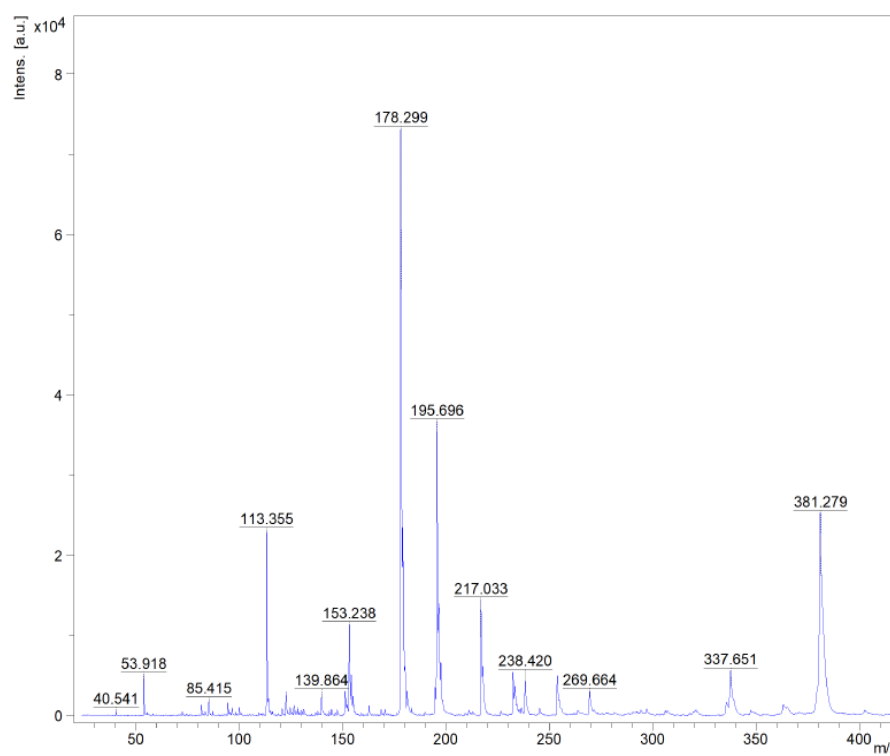


Рисунок 4.6.7 – Хроматограмма аминокислот образца гидролизата коллагена 7 (свиная шкурка)

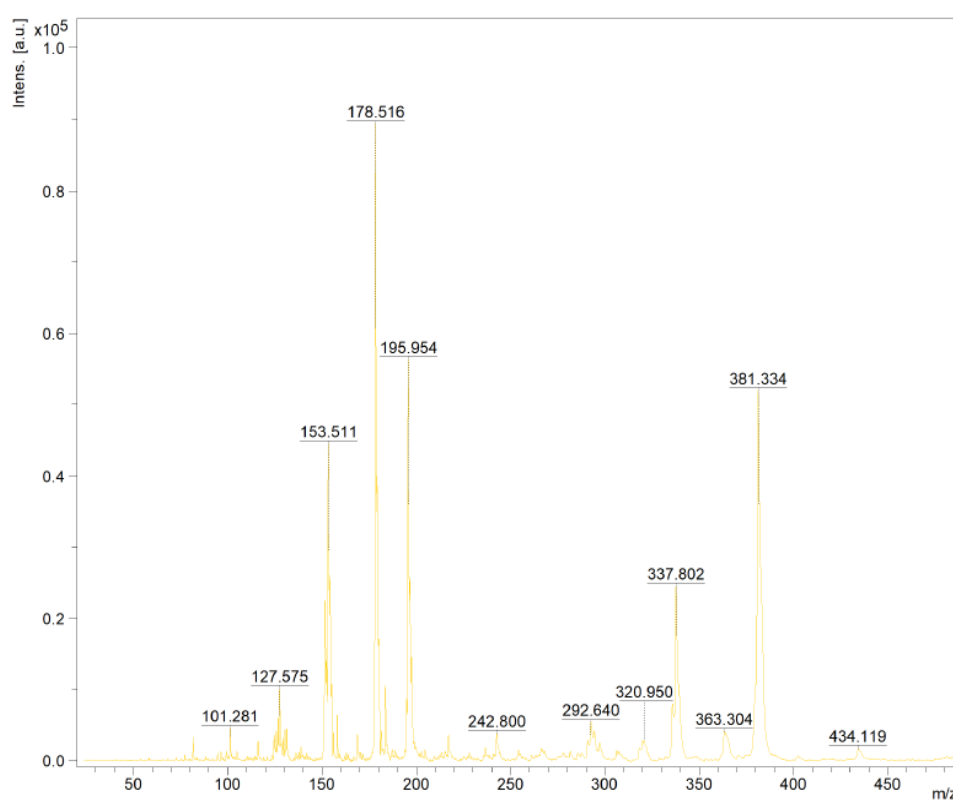


Рисунок 4.6.8 – Хроматограмма аминокислот образца гидролизата коллагена 8 (свиная шкурка)

Таблица 4.6.2 – Аминокислотный состав выработанных образцов гидролизата коллагена

Аминокислота, г/100г	Образцы гидролизатов коллагена							
	из сырой кости КРС			из ног цыплят-бройлеров			из свиной шкурки	
	1	2	3	1	2	3	1	2
Ala	10,2	8,1	9,5	11,4	10,5	9,3	10,1	9,0
Cys	3,5	4,1	2,8	3,9	3,0	2,7	3,3	4,2
Asp	7,2	6,3	6,8	5,5	7,1	6,5	6,9	7,8
Glu	5,0	4,5	4,7	5,2	5,3	4,9	4,6	5,0
Phe	3,0	2,8	3,1	3,5	2,9	3,2	3,3	3,6
Gly	8,9	9,2	9,5	7,8	8,1	7,5	8,0	8,4
His	1,2	1,4	1,3	1,5	1,1	1,3	1,4	1,6
Ile	6,8	6,4	7,0	6,5	6,9	7,3	6,6	7,0
Lys	8,7	9,1	8,4	7,5	8,9	9,2	8,3	8,8
Leu	12,3	13,0	12,0	12,5	13,1	12,8	13,2	12,6
Met	2,3	2,0	2,5	2,2	2,7	2,4	2,1	2,8
Asn	4,2	4,3	4,0	4,5	4,1	3,8	4,4	4,2
Pro	7,4	6,8	7,2	6,6	6,7	6,5	7,0	6,4
Gln	6,0	5,7	6,3	5,8	5,9	6,1	6,0	6,2
Arg	4,0	4,5	3,9	4,1	4,3	3,7	3,8	4,2
Ser	3,7	3,5	3,8	3,9	3,6	3,4	3,5	3,8
Thr	2,1	2,3	2,0	2,4	2,5	2,1	2,2	2,0
Val	6,0	6,1	5,8	6,2	5,9	6,3	6,1	6,0
Trp	1,1	1,0	1,3	1,2	1,2	1,0	1,0	1,1
Tyr	2,0	2,1	2,2	2,3	2,1	2,3	2,0	2,2

Анализ аминокислотного состава различных образцов показывает, что они имеют схожие пропорции ключевых аминокислот, таких как аланин (Ala), глицин (Gly) и лейцин (Leu), которые преобладают в их составе, что характерно для белков с высокой долей коллагеновых структур. Однако наблюдается значительное различие в содержании фенилаланина (Phe), глутамата (Glu) и пролина (Pro): их концентрация варьируется от 2,8 до 13 %. Это может свидетельствовать о различиях в типах сырья и методах обработки. Например, в образцах с более высоким содержанием пролина и глутамата (до 13 %) ожидается большая прочность и стабильность структуры коллагена. Доля цистеина (Cys) варьируется от 2,7 до 4,2 %, что свидетельствует о различной степени сульфидных связей между молекулами коллагена. В целом все образцы показывают высокое содержание аминокислот с разветвленной цепью (изолейцин, валин, лейцин), типичное для биологически активных пептидов и свидетельствующее о возможном функциональном разнообразии этих белков.

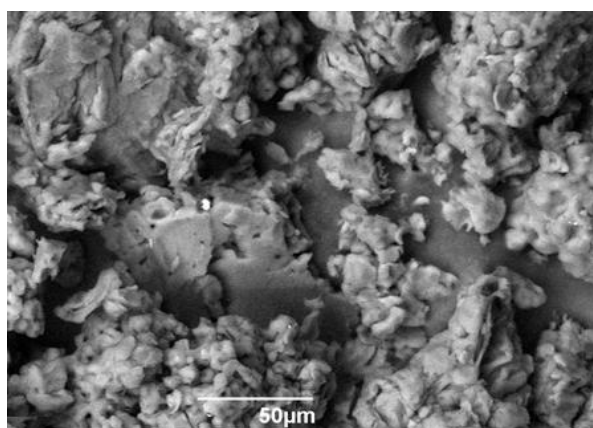
Полученные сведения позволяют сделать предположение о том, что данные образцы могут обладать определенными функциональными свойствами. Важно отметить, что небольшие различия в аминокислотных составах между образцами могут быть связаны с условиями их обработки и источником коллагена.

4.7 Электронное микроскопирование образцов гидролизатов коллагена

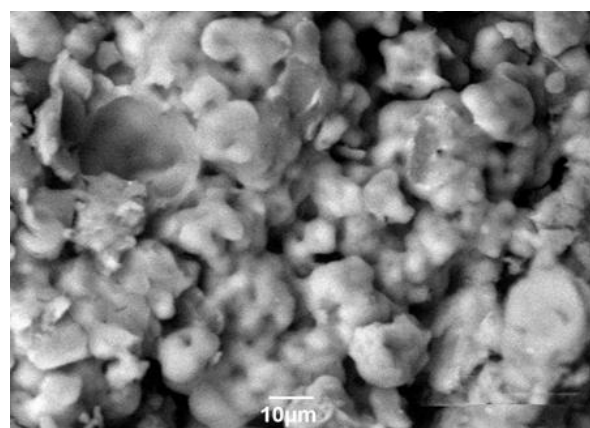
Микроскопирование структуры гидролизатов коллагена с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) может предоставить важную информацию о микроструктурных изменениях, происходящих в коллагеновых волокнах в процессе гидролиза. Данное исследование позволяет визуально оценить степень разрушения молекул коллагена на микроструктурном уровне, определить размер и форму получаемых фрагментов.

На рисунке 4.7.1 А1 можно наблюдать грубую текстуру с явными фрагментами, свидетельствующими о частичной деструкции клеточных компонентов, и фибриллярной структурой коллагена. Рисунок 4.7.1 А2 представляет собой более детализированный снимок с выраженной фрагментацией и крупными частицами, что указывает на присутствие мелких частиц и остаточных соединений, возникших в результате гидролиза.

Данные изменения могут быть связаны с процессом разрушения более крупных молекул коллагена, что является результатом воздействия химических веществ или физических факторов в процессе гидролиза. Результаты микроскопирования подтверждают наличие разрушенных фибрилл и фрагментов, что соответствует процессу обработки сырья для получения гидролизатов.



А1



А2

Рисунок 4.7.1 – Микроскопирование структуры полученных образцов гидролизата коллагена из сырой кости КРС:

А1 – с увеличением 50 мкм; А2 – с увеличением 10 мкм

На рисунке 4.7.2 видно, что структура образцов гидролизатов коллагена из ног цыплят-бройлеров имеет менее выраженную фрагментацию по сравнению с образцами из костного сырья КРС.

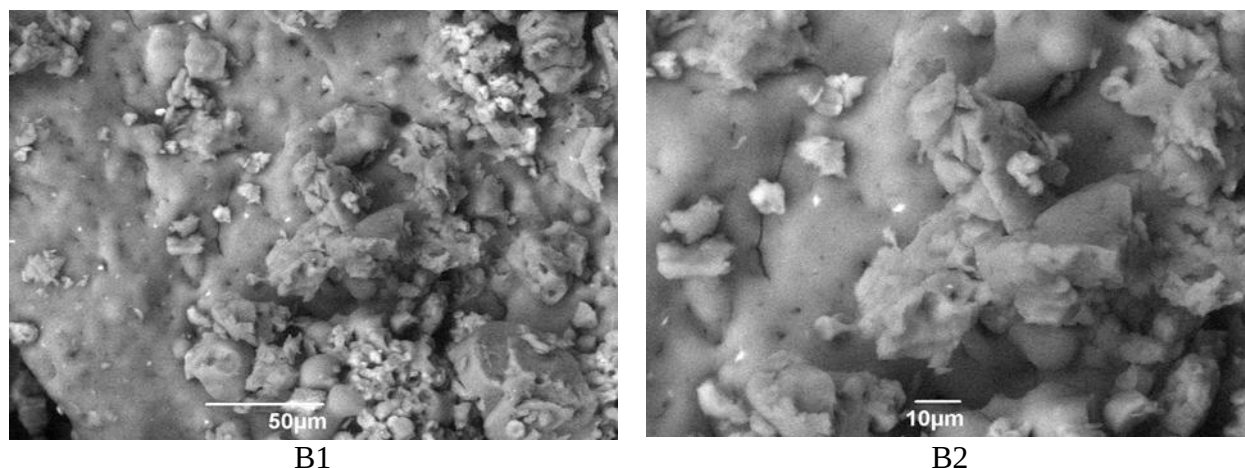


Рисунок 4.7.2 – Микроскопирование структуры полученных образцов гидролизата коллагена из ног цыплят-бройлеров:

B1 – с увеличением 50 мкм; B2 – с увеличением 10 мкм

На рисунке 4.7.2 B1 заметна более равномерная текстура с мелкими фрагментами, которые могут свидетельствовать о частичной деструкции молекул коллагена в процессе гидролиза. На рисунке 4.7.2 B2 структура становится еще более детализированной: видны отдельные участки, разделенные на более мелкие части. Это может указывать на различия в прочности и плотности коллагеновых фибрилл, характерных для тканей цыплят, которые, вероятно, имеют более мягкую и менее упругую структуру по сравнению с костным сырьем КРС. Эти изменения могут быть результатом специфических условий гидролиза, направленных на разрыв коллагеновых волокон и образование более мелких фрагментов гидролизатов.

На рисунке 4.7.3 показаны образцы гидролизатов коллагена из свиной шкурки, структура которых обладает значительной фрагментацией и разрывами фибрилл.

Рассматриваемые на рисунке 4.7.3 C1 образцы имеют выраженные области разрушения, что указывает на интенсивный процесс гидролиза. Фрагменты обладают неровными краями и разнообразной текстурой. Это свидетельствует о значительном разрушении исходных молекул коллагена.

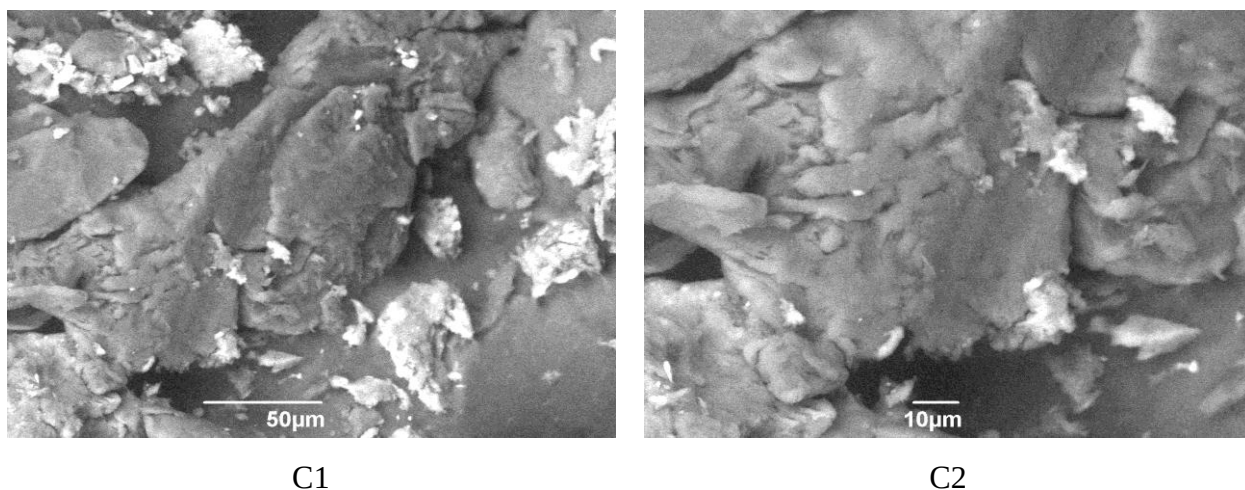


Рисунок 4.7.3 – Микроскопирование структуры полученных образцов гидролизата коллагена из свиной шкурки:

C1 – с увеличением 50 мкм; C2 – с увеличением 10 мкм

Рисунок 4.7.3 C2 показывает более детализированную картину: фрагменты представлены мелкими, рыхлыми частицами, что подтверждает глубокое расщепление молекул коллагена. Эти изменения могут быть связаны с высокоэффективным процессом гидролиза, направленным на разложение прочных коллагеновых волокон свиной кожи, что, предположительно, позволяет получить гидролизаты с более высокой доступностью аминокислот.

ГЛАВА 5 МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ СТРУКТУРЫ И ОЦЕНКА КАЧЕСТВЕННЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ И ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ БИОАКТИВНЫХ СВОЙСТВ ПОЛУЧЕННЫХ ОБРАЗЦОВ ГИДРОЛИЗАТОВ КОЛЛАГЕНА МЕТОДОМ *IN SILICO*

Молекулярное моделирование структуры и качественных показателей полученных образцов гидролизатов коллагена с использованием метода *in silico* представляет собой современный подход в исследовании свойств гидролизатов и прогнозирования их биоактивности. Этот метод основан на применении компьютерных технологий для анализа структуры пептидов, их взаимодействий с биологическими мишенями и оценки их потенциальных свойств. Метод *in silico* позволяет получать предварительные данные о свойствах гидролизатов.

Применение метода *in silico* имеет ряд преимуществ, таких как уменьшение расходов на реагенты, оборудование и рабочее время. Помимо этого, программные алгоритмы учитывают множество факторов, что позволяет предсказать взаимодействие пептидов с высокой степенью достоверности, дает возможность исследования широкого спектра молекул, мишеней, а также оптимизировать структуру пептидов для повышения их эффективности.

5.1 Моделирование структуры белка полученных образцов гидролизатов коллагена

Моделирование структуры белка полученных образцов гидролизатов проводили с помощью сервиса SWISS-MODEL, который включает в себя репозиторий SWISS-MODEL и рабочее пространство SWISS-MODEL. Эта автоматизированная платформа моделирования гомологии структуры белка позволяет создать 3D-модель белка с использованием сравнительного подхода

и баз данных аннотированных моделей для ключевых эталонных протеомов на основе UniProtKB [242].

Для проведения вышеописанных исследований использовались результаты определения аминокислотной последовательности выработанных образцов гидролизатов коллагена из вторичных сырьевых ресурсов животного происхождения: 3 образца гидролизата коллагена из сырой кости КРС (а именно говяжьей), 3 образца гидролизата коллагена из ног цыплят-бройлеров и 2 образца гидролизатов коллагена из свиной шкурки. Метод проведения исследований по получению аминокислотной последовательности – матрично-активированная лазерная десорбция / ионизация. Используемое оборудование: MALDI Biotyper (Bruker, США).

В таблице 5.1.1 представлена аминокислотная последовательность образцов гидролизатов коллагена в однобуквенном коде.

Таблица 5.1.1 – Аминокислотная последовательность образцов гидролизатов коллагена в однобуквенном коде

Образец 1 ГКСК	Образец 2 ГКСК	Образец 3 ГКСК	Образец 4 ГКНЦБ
PILFVILFILFSHILFMI LHILMILSHPSHPFFP FFFMPFMPPRPPRVR PVRFPFHHPHILMPM PRPRFYYPYFSGQSQY NADEFGNNPPPQQRS V	SHILEILDVILDHILILD MILSHESHPYCGDDG GYGPYPDDPGYDDGY HEHPILMEMPPYQCC GQNYYNCDDENNPQ QRRSVYAEV	DILVILCILHILMILV GRGGSPGSVILHILT PRGPSPPSVSVCSVH SVMEGQCQMSPSV VCVHVMCHDTEAG CPCVHVNVTYF	ILKHPSVPVPSVPGHGSPTS VPAYGCYGILTTPRGPPVK HVRPVTHCHCVGVHGHK KHRGRPTHVHVPPYGRG VT
Образец 5 ГКНЦБ	Образец 6 ГКНЦБ	Образец 7 ГКСШ	Образец 8 ГКСШ
ILKILVGRGGSPA FAEGGKGVGRGDT FMTVTYFY	SANTANAGKCILG GTSILANATGKGR GTILILSCSDTCTD AECPDKGCILPCPC TSTTVQACCCDD	PILGPILVILAILGI LVILTPSVGVHGH VSVTGTVFDGTN PEVAVNVRVTYC CCDDGG	GGPAAGGPAYGGPILILAPAIL APYILAAILADNPAANPAYNP ILPNAAPNAYPNILPQGAPQG YSEAASEAYSEILTNAATNAY TNILTQGATQGYAPAAPYEA AEAYEILHILKPAKPYNAANA YNILPAAPAYPILQGAQGYILP QQTQAAAAADAYGAGYILI LKAKDQQVTVVGAGDGTHT HVPQQMTQVRAAAAAADD QQTTVV

Примечание: А – аланин; С – цистеин; D – аспарагиновая кислота; Е – глутаминовая кислота; F – фенилаланин; G – глицин; Н – гистидин; I – изолейцин; К – лизин; L – лейцин; М – метионин; N – аспарагин; P – пролин; Q – глутамин; R – аргинин; S – серин; Т – треонин; V – валин; Y – тирозин.

Ниже представлены результаты полученных моделей белка гидролизатов коллагена и оценка их структуры.

Образец 1 ГКСК

Аминокислотная последовательность:

*PILFVILFILFSHILFMILHILMILSHPSHPFFFPFFFMPPRPPRVRPVRFPFHPI
LMPMPRPRFYFSGQSQYNADFGNNPPPQQRSV.*

На рисунке 5.1.1 представлена трехмерная структура белка, визуализированная в виде пространственной молекулярной модели. Цветовая схема используется для выделения различных сегментов или особенностей структуры. Она демонстрирует упорядоченность и стабильность α -спирали, которая является важным элементом вторичной структуры белков.

Анализируя полученную структуру белка образца 1 ГКСК, важно отметить, что сегмент, представленный фиолетовым цветом, может быть частью активного центра, который участвует в связывании или катализе. Оранжевые участки, вероятно, имеют структурообразующую или стабилизирующую функцию. Изогнутые сегменты могут указывать на высокую способность к взаимодействию с лигандами на этих участках, что может обеспечивать функциональную активность белка.

Локализация кольцевых структур может свидетельствовать о расположении потенциальных участков гидрофобных взаимодействий или участков связывания лиганда.

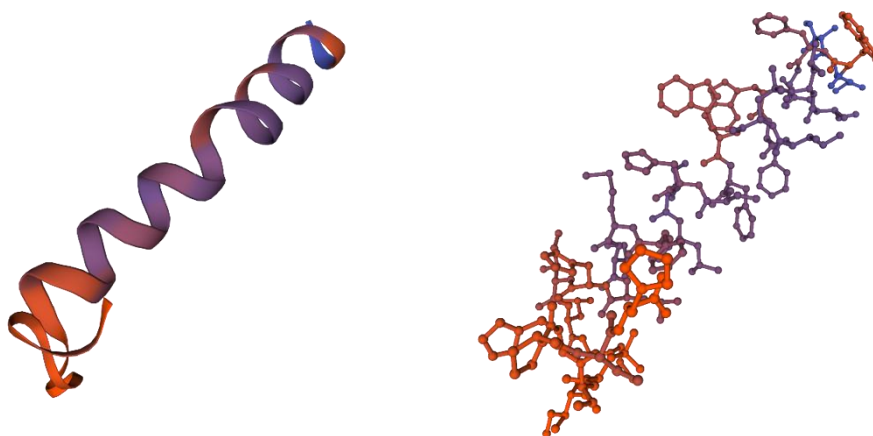


Рисунок 5.1.1 – Структура белка образца 1 ГКСК

Далее проводили оценку структуры всех гидролизатов коллагена по методу графиков (карт) Рамачандрана, которые описывают конформацию целых молекул белка. Каждая точка на карте обозначает один аминокислотный остаток. Положение точки по горизонтали показывало угол ϕ , по вертикали – ψ . В полипептидной цепи связи N-C α и C α -C основной цепи обладают относительной свободой вращения. Эти повороты характеризуются торсионными углами ϕ (Phi) по горизонтали и ψ (Psi) по вертикали соответственно (рисунки 5.1.2, 5.1.4, 5.1.6, 5.1.8, 5.1.10, 5.1.12, 5.1.14, 5.1.16). Так, графики Рамачандрана дают информацию о предпочтительных конформациях пептидных цепей и помогают оценить качество моделирования структуры гидролизатов.

На рисунке 5.1.2 белые, или неокрашенные участки представляют собой конформации полипептидной цепи. В этих зонах углы ϕ и ψ приводят к сильным пространственным столкновениям между атомами белковой цепи, что делает такие конформации невозможными или крайне редкими, т. е. это запрещенные области. Данные участки обычно связаны со стерическими затруднениями между C-бета-метиленовой группой боковой цепи и атомами основной цепи. Глицин не имеет боковой цепи и поэтому может принимать углы ϕ и ψ во всех четырех квадрантах графика Рамачандрана. Следовательно, это часто встречается в поворотных участках белков, где любой другой остаток был бы стерически затруднен.

Светло-зеленым цветом обозначены наиболее стабильные области в структуре. Они возникают, если в расчетах используются более короткие ван-дер-ваальсовы радиусы, т. е. атомы могут становиться немного ближе друг к другу. Это выявляет дополнительную область, которая соответствует левой α -спирали. Темно-зеленые участки представляют собой наиболее энергетически благоприятные области (ядерные) и соответствуют конформациям α -структуры и β -структуры, в которых нет стерических столкновений, т. е. это разрешенные области.

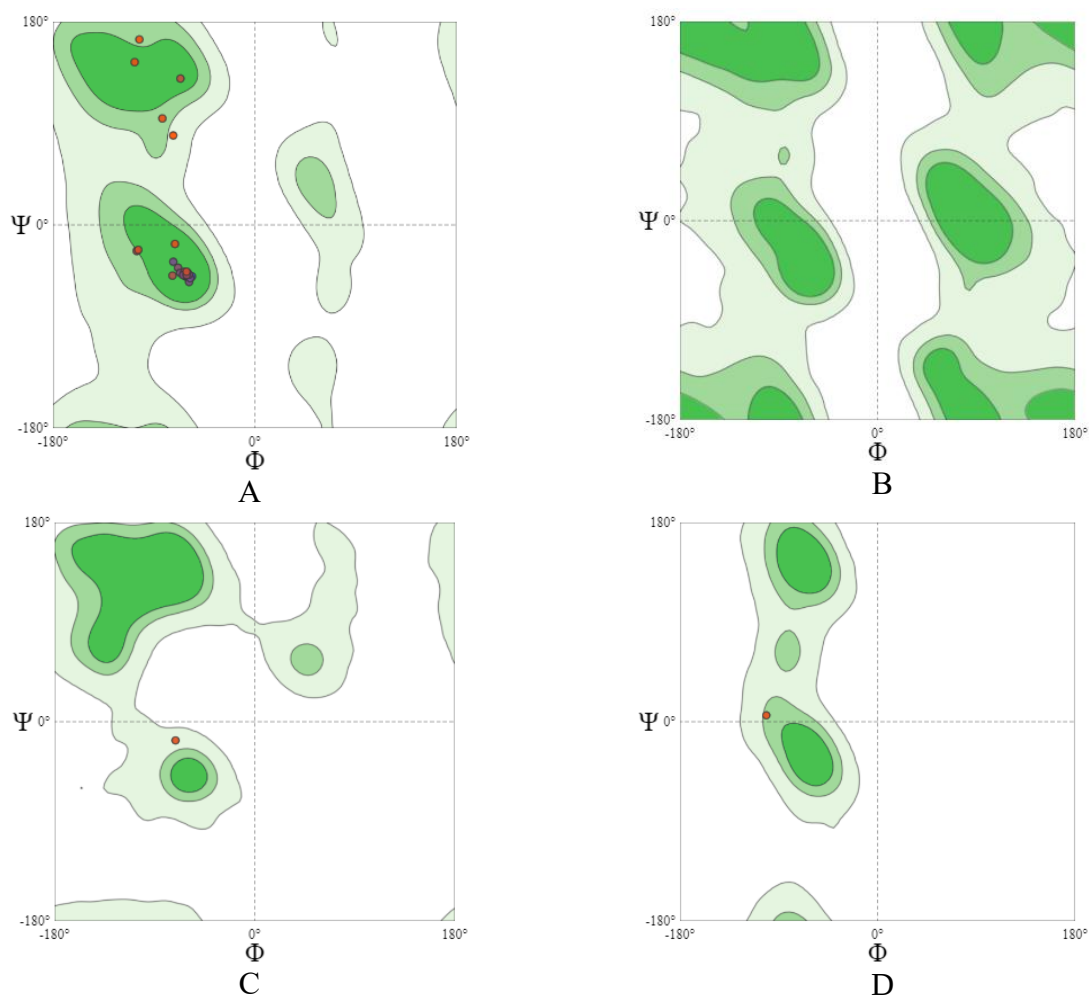


Рисунок 5.1.2 – Графики Рамачандрана образца 1 ГКСК: А – общий; В – остатки глицина; С – остатки пролина; D – остатки пре-пролина

L-аминокислоты не могут образовывать протяженные участки левой α -спирали, но иногда отдельные остатки принимают эту конформацию. Обычно они представляют собой глицин, но также могут быть аспарагином или аспаргатом, где боковая цепь образует водородную связь с основной и, следовательно, стабилизирует эту неблагоприятную конформацию.

На рисунке 5.1.2 А видно, что основные области представлены двумя темно-зелеными и тремя светло-зелеными участками. Первые содержат наиболее благоприятные комбинации ϕ и ψ и наибольшее количество точек.

Помимо общего графика Рамачандрана, для более детального анализа были смоделированы карты для таких аминокислот, как глицин, пролин, пре-пролин (рисунки 5.1.2 В, 5.1.2 С, 5.1.2 D соответственно), которые имеют различные

локальные свойства стерического затруднения, и могут учитывать влияние соседних последовательностей.

Боковая цепь пролина ковалентно связана с предшествующей основной цепью связи N-C α . Остатки пре-пролина имеют некоторые ограничения из-за стерического взаимодействия с пролиновым кольцом. Разветвленные β -углероды Иле и Вала также придают им отчетливую форму запрещенных областей Рамачандрана. Другие 16 типов аминокислот различаются по своему предпочтению благоприятных областей, но их внешние контуры, которые отделяют разрешенные области от посторонних, очень близко совпадают, поэтому они сгруппированы вместе в распределение «общего случая» (как показано на рисунке 5.1.2 А).

Исходя из рисунка 5.1.2 А, можно заключить, что основные аминокислоты содержатся в правозакрученной α -спирали, поскольку они расположены в левой нижней границе. Так как красные точки попадают в темно-зеленые области, это указывает на высокую вероятность того, что белок будет иметь стабильную структуру в этих участках, как α -спираль.

Образец 2 ГКСК

Аминокислотная последовательность:

*SHILEILDVILDHILILDMILSHESHPYCGDDGGYGPYPDDPGYDDGYHENPILMEM
PPYQCCGQNYYNCDDENNPQQRRSVYAEV.*

Структура белка, изображенная на рисунке 5.1.3, включает несколько α -спиралей, что является характерным элементом вторичной структуры белков. Эта форма позволяет белку выполнять функции, требующие гибкости и способности к взаимодействию с другими молекулами, такими как связывание с лигандами или участие в биохимических реакциях. Представленная модель белка демонстрирует сложную, неупорядоченную структуру с элементами, которые могут быть структурно и функционально важными.

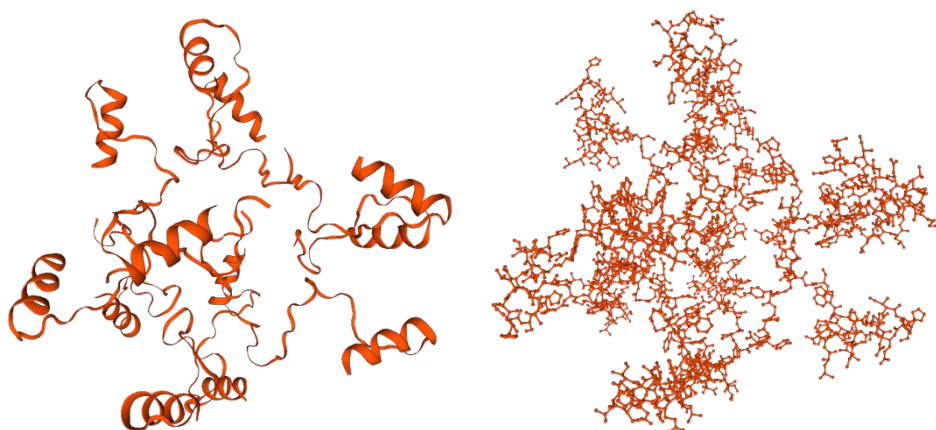


Рисунок 5.1.3 – Структура белка образца 2 ГКСК

Белок имеет гибкие и стабильные участки, что может быть характерно для белков, отвечающих в биологических процессах за клеточные взаимодействия, каталитическую активность или структурную поддержку.

Анализ рисунка 5.1.4 показывает характерное распределение торсионных углов ϕ и ψ для различных аминокислотных остатков: точки преимущественно локализованы в области правозакрученной α -спирали (-60° , -45°) и β -слоя (-120° , 130°) (рисунок 5.1.4 A), остатки глицина имеют более широкое распределение из-за отсутствия боковой цепи (рисунок 5.1.4 B), пролин демонстрирует ожидаемые ограничения по углу ϕ около -60° его циклической структуры (рисунок 5.1.4 C), а пре-пролин представлен специфическим распределением с предпочтительными конформациями в области β -слоя (рисунок 5.1.4 D), что в совокупности указывает на стабильную вторичную структуру белка с преобладанием регулярных элементов и подтверждает корректность укладки полипептидной цепи.

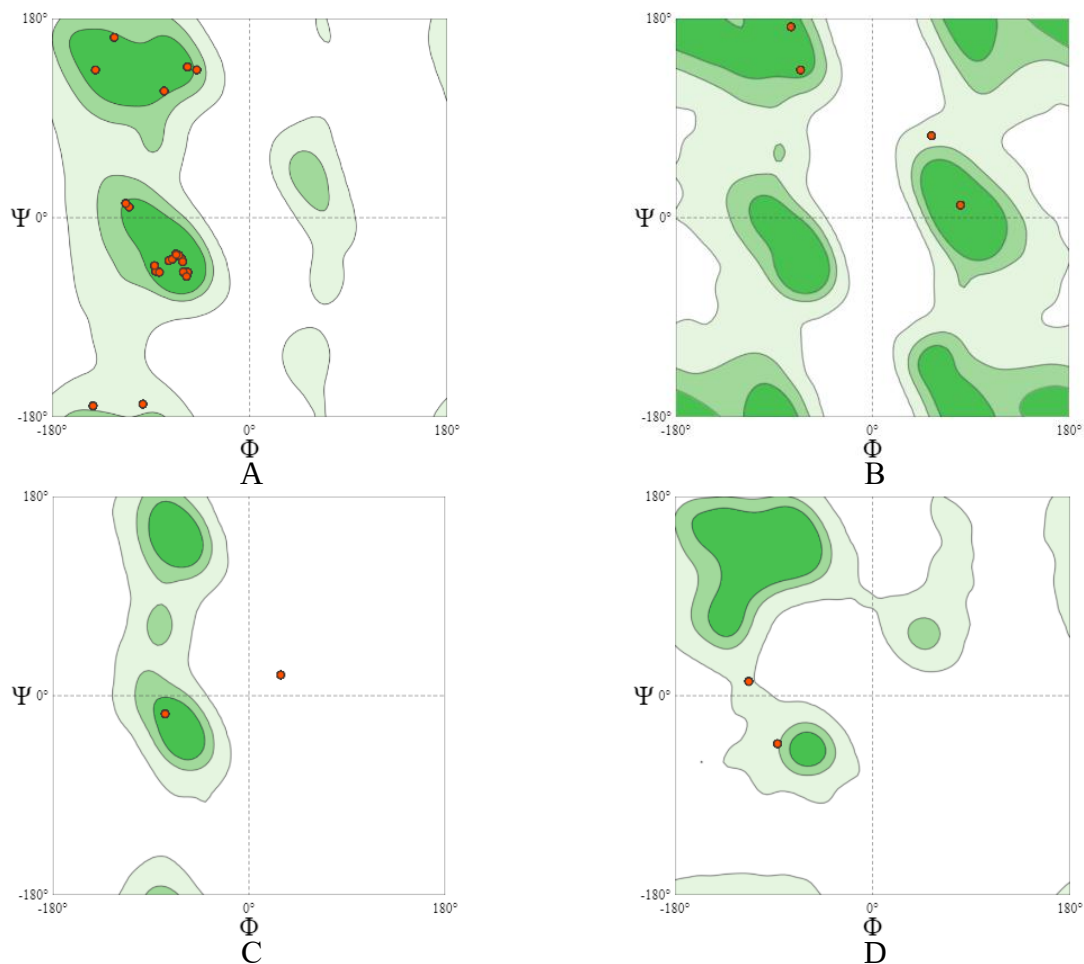


Рисунок 5.1.4 – Графики Рамачандрана образца 2 ГКСК: А – общий; В – остатки глицина; С – остатки пролина; D – остатки пре-пролина

Образец 3 ГКСК

Аминокислотная последовательность:

*DILVILCILHILMILVGRGGSPGSVILHILTPRGPSPPSVSVCSVHSMVEGQCQMSPSV
VCVHVMCHDTEAGPCVHVNVITYF.*

На рисунке 5.1.5 представлена молекулярная структура белка, изображенная в виде трехмерной модели, где атомы соединены связями, создавая при этом пространственную конфигурацию.

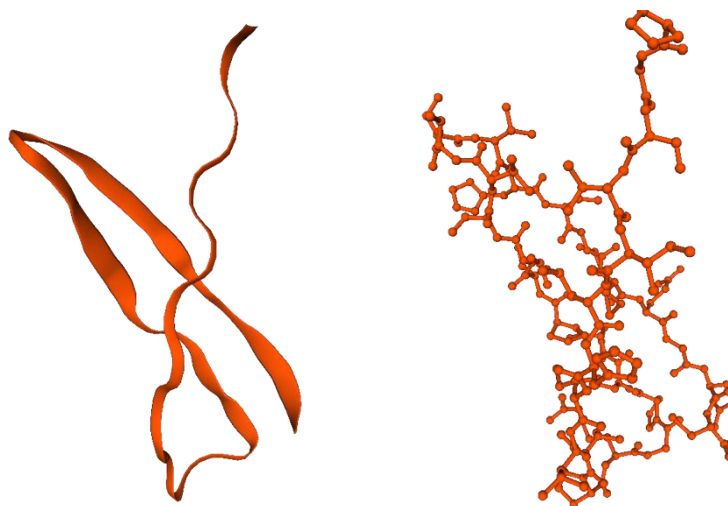


Рисунок 5.1.5 – Структура белка образца 3 ГКСК

Визуализация на рисунке 5.1.5 демонстрирует различные конформации молекул. Первая структура представлена в виде спирали, что указывает на наличие α -спиральной структуры, которая характерна для белков с регулярной последовательностью аминокислот. Это свидетельствует о стабильности и устойчивости структуры белка, что может быть важным фактором для его применения в биотехнологических процессах. Вторая структура, изображенная как сеть из атомов, представляет собой более сложную и детализированную модель с краткосрочными связями между аминокислотами, включая ароматические и полярные взаимодействия, которые могут влиять на активность и взаимодействие белка в растворе. Белки с подобными структурами могут эффективно применяться в качестве сырья для биотехнологий, т. к. обладают прочностью, стабильностью и активностью белков в различных средах.

На рисунке 5.1.6 отмечается характерное распределение конформационных состояний. Так, наблюдается значительная концентрация точек в области правозакрученной α -спирали ($\phi \approx -60^\circ$, $\psi \approx -45^\circ$) и более выраженное по сравнению с образцом 2 ГКСК распределение в области β -структуры ($\phi \approx -120^\circ$, $\psi \approx 130^\circ$) (рисунок 5.1.6 А), при этом глицин показывает типичное для него более широкое распределение из-за конформационной гибкости (рисунок 5.1.6 В). Пролиновые остатки имеют ожидаемое ограничение по углу ϕ

около -60° с несколькими точками в нестандартной области ($\varphi \approx -180^\circ$) (рисунок 5.1.6 С), а пре-пролин демонстрирует характерное распределение в верхней левой части карты (рисунок 5.1.6 D), что в совокупности указывает на правильность структурной организации белка с большей долей β -структурных элементов по сравнению с образцом 2 ГКСК. Концентрация же точек молекул в разрешенных зонах свидетельствует о хорошей энергетической стабильности моделируемой структуры.

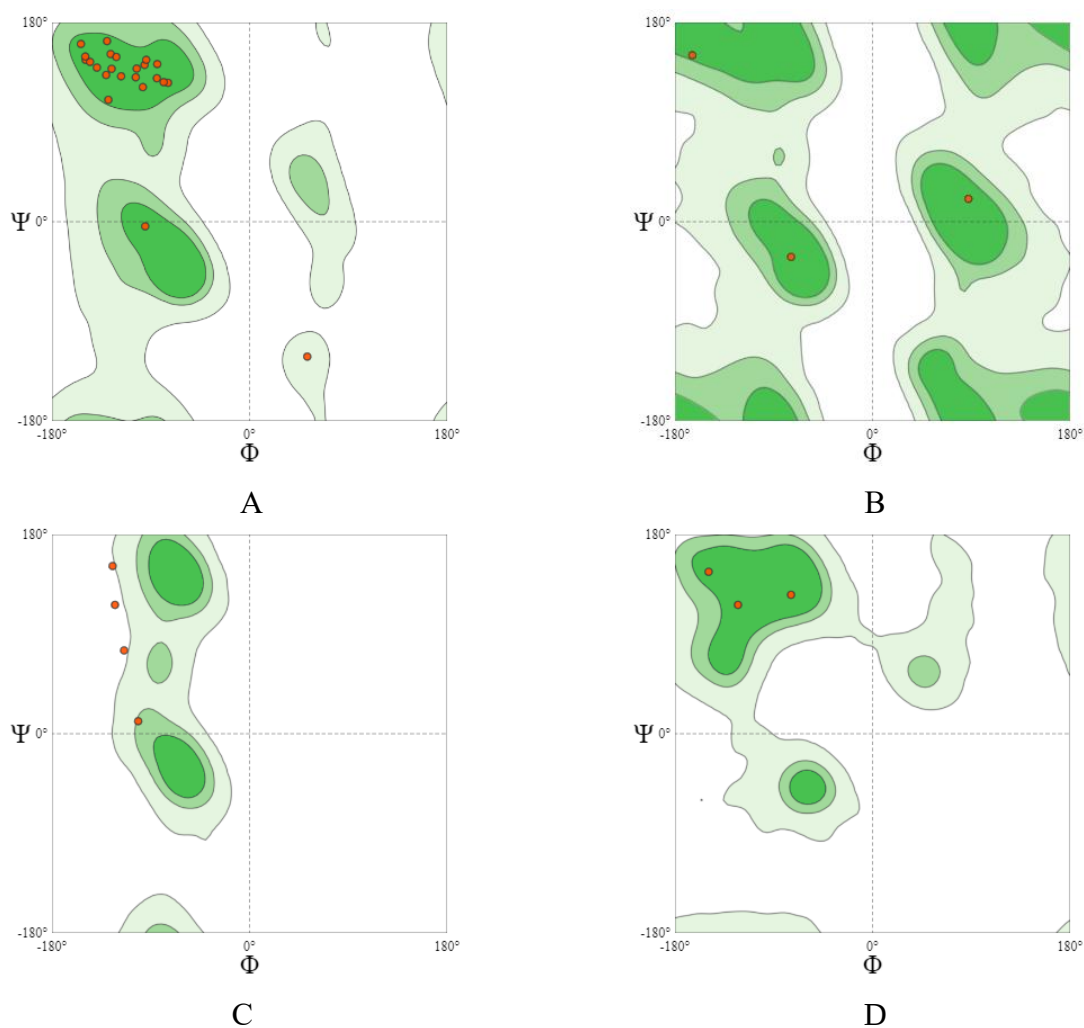


Рисунок 5.1.6 – Графики Рамачандрана образца 3 ГКСК: А – общий; В – остатки глицина; С – остатки пролина; D – остатки пре-пролина

Кроме того, такие особенности рассматриваемых гидролизатов, как увеличенная вариативность углов у глицина и ограниченные области у пролина,

отражают характерные свойства коллагена, который содержит повторяющиеся свойства этих аминокислот. Широкое же распределение точек для некоторых аминокислот может указывать на гибкость или нестабильность определенных сегментов цепи.

Образец 4 ГКНЦБ

Аминокислотная последовательность:

*ILKHPSVPVSPGHGSPVSPAYGCGILTTPRGPPVKHVRPVTHCHCVCVGVHKGKHKH
RGRPTHVHVPPYGRGVT.*

На рисунке 5.1.7 структура белка изображена в виде вытянутой спирали, что характерно для α -спирали – одного из типов вторичной структуры белков. Эта спираль представляет собой упорядоченную структуру, стабилизированную водородными связями между аминокислотными остатками, расположенными через каждый поворот спирали. Структура выглядит как плавно закрученная лента, что указывает на правильную конформацию с точки зрения вторичной структуры. Сложная форма и переходы в структуре предполагают наличие нескольких спиральных сегментов, что может свидетельствовать о функциональных доменах или участках, на которых возможно взаимодействие с другими структурами.

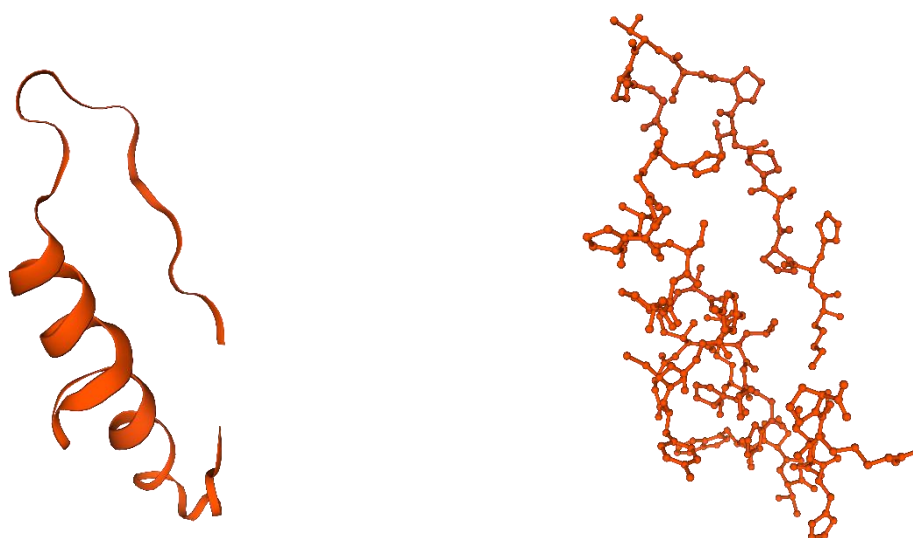


Рисунок 5.1.7 – Структура белка образца 4 ГКНЦБ

Важно уточнить, что α -спираль является типичной для белков, которые выполняют структурные или связывающие функции. Она может быть частью мембранных белков, ферментов или других молекул, участвующих в клеточных взаимодействиях.

Стоит отметить, что каждая точка в модели представляет собой атом, а связи между ними – молекулярные взаимодействия, обеспечивающие стабильность структуры. Наличие ароматических аминокислот, представленных в виде кольцевых структур, может указывать на возможные взаимодействия через π - π связи или гидрофобные взаимодействия.

На основании анализа рисунка 5.1.7 можно заключить, что представленный белок имеет неупорядоченную структуру, что может указывать на его способность к динамическим изменениям. Такая структура типична для белков, которые могут взаимодействовать с различными молекулами или выполнять различные функции в клетке.

На рисунке 5.1.8 выявлено сбалансированное распределение конформационных состояний. Так, присутствует равномерное распределение точек между областями α -спирали ($\phi \approx -60^\circ$, $\psi \approx -45^\circ$) и β -структуры ($\phi \approx -120^\circ$, $\psi \approx 130^\circ$) (рисунок 5.1.8 A), при этом остатки глицина демонстрируют типичное широкое распределение в разрешенных областях карты (рисунок 5.1.8 B). Пролиновые остатки показывают четкую локализацию в области отрицательных значений ϕ с несколькими точками в верхней части карты (рисунок 5.1.8 C), а пре-пролиновые остатки располагаются в характерных для них областях верхней левой четверти карты (рисунок 5.1.8 D), что в совокупности свидетельствует о стабильной третичной структуре белка с оптимальным балансом между различными элементами вторичной структуры и отсутствием значительных конформационных напряжений.

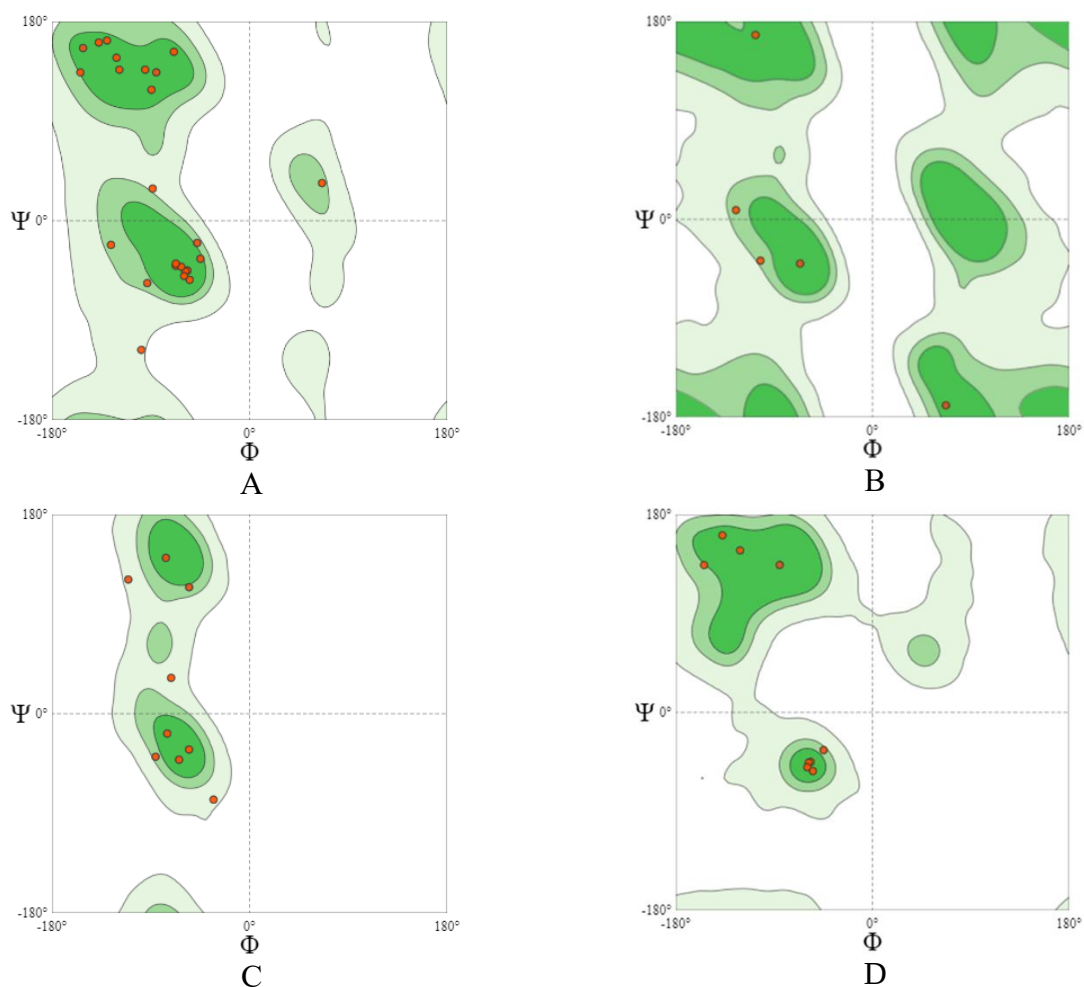


Рисунок 5.8 – Графики Рамачандрана образца 4 ГКНЦБ: А – общий; В – остатки глицина; С – остатки пролина; D – остатки пре-пролина

Образец 5 ГКНЦБ

Аминокислотная последовательность:

ILKILVGRGGSPAFAEGGKGVRGDTFMTVTYFY.

На рисунке 5.1.9 представлена третичная структура белка, которая описывает пространственное расположение всех атомов в молекуле. Она является результатом взаимодействия различных частей полипептидной цепи через различные химические связи (водородные, ионные связи и дисульфидные мостики). Белок имеет компактную глобулярную структуру, видны множественные изгибы и повороты полипептидной цепи, присутствуют как плотно упакованные, так и более свободные участки. В структуре присутствуют циклические структуры, предположительно ароматические аминокислоты.

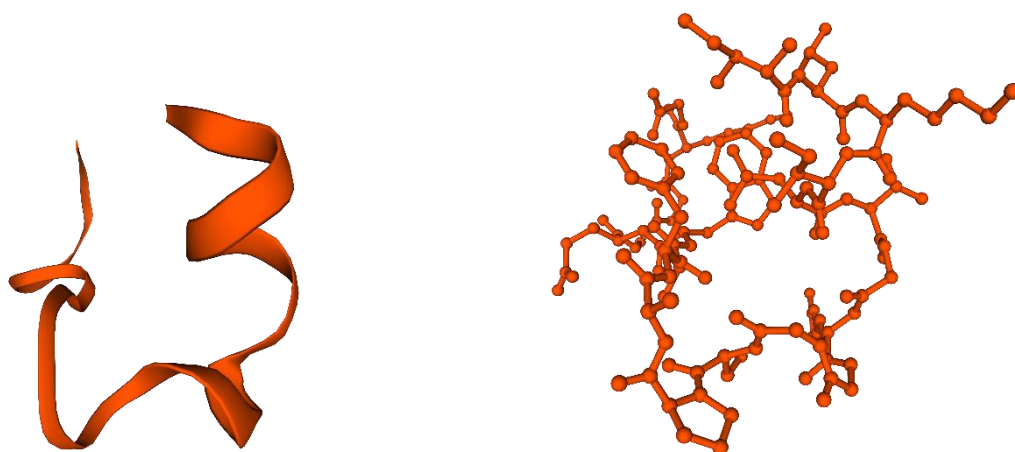


Рисунок 5.1.9 – Структура белка образца 5 ГКНЦБ

В представленной белковой структуре наблюдаются основные типы взаимодействий: ковалентные (пептидные связи основной цепи), нековалентные (водородные связи, гидрофобные взаимодействия в ядре белка, электростатические взаимодействия между заряженными группами) и π -взаимодействия между ароматическими кольцами, которые совместно обеспечивают стабильность и функциональность белковой молекулы.

На рисунке 5.1.10 обнаружено дискретное распределение конформационных состояний. Так, отмечается доминирующая концентрация точек в области β -структуры ($\varphi \approx -120^\circ$, $\psi \approx 130^\circ$) с меньшим количеством точек в области α -спирали ($\varphi \approx -60^\circ$, $\psi \approx -45^\circ$) (рисунок 5.1.10 А), при этом остатки глицина демонстрируют более ограниченное, чем обычно, распределение с преимущественной локализацией в области β -структуры (рисунок 5.1.10 В). Пролиновые остатки сохраняют характерное ограничение по углу φ около -60° с единичными точками в нетипичных областях (рисунок 5.1.10 С), а пре-пролиновые остатки показывают компактное распределение в верхней левой четверти карты (рисунок 5.1.10 D), что в совокупности указывает на преобладание β -структурных элементов в белке с некоторыми ограничениями конформационной подвижности глициновых остатков, возможно,

обусловленными специфическими межмолекулярными взаимодействиями или особенностями укладки полипептидной цепи.

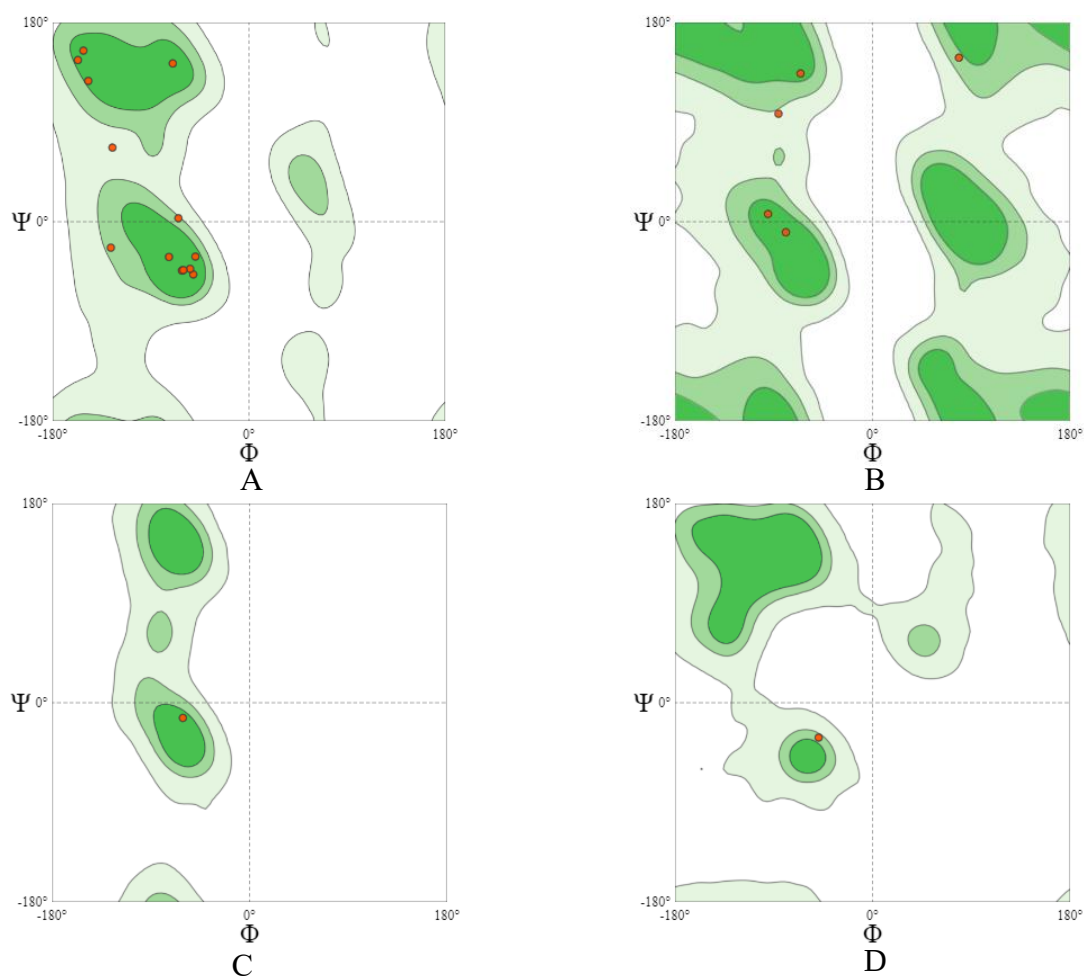


Рисунок 5.1.10 – Графики Рамачандрана образца 5 ГКНЦБ: А – общий; В – остатки глицина; С – остатки пролина; D – остатки пре-пролина

Образец 6 ГКНЦБ

Аминокислотная последовательность:

*SANTANAGKCILGGTSILANATGKGRGTILILSCSDTCTDAECPDKGCILPCPCTSTTV
QACCCDD.*

На рисунке 5.1.11 представлена вторичная структура белка в виде правозакрученной α -спирали, стабилизированной водородными связями между СО и NH-группами основной цепи, с характерным шагом 3,6 аминокислотных остатка на виток.

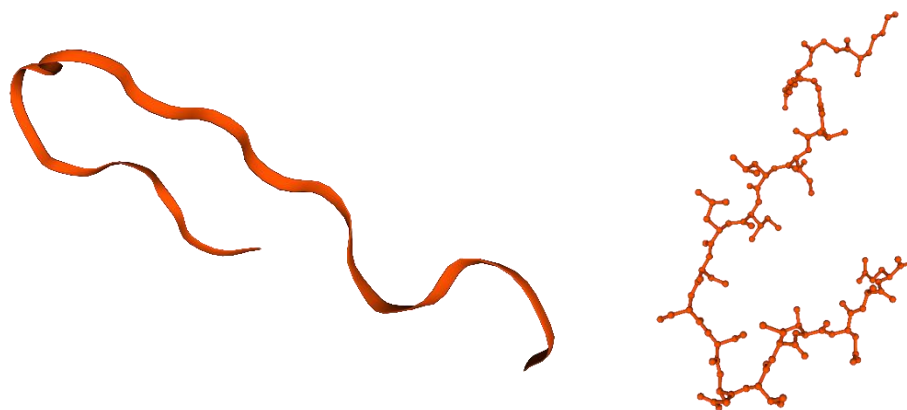


Рисунок 5.1.11 – Структура белка образца 6 ГКНЦБ

Молекулярная структура белка представлена разветвленной конформацией, где видны множественные боковые цепи аминокислотных остатков и нерегулярная пространственная организация, что может указывать на сигнальную или регуляторную функцию белка, т. к. подобная гибкая структура часто характерна для белков, участвующих в молекулярном взаимодействии с другими биомолекулами.

На рисунке 5.1.12 показано характерное для коллагеновых белков распределение конформационных состояний. Так, наблюдается значительная концентрация точек в области полипролиновой спирали II типа ($\varphi \approx -75^\circ$, $\psi \approx 150^\circ$) и области β -структуры ($\varphi \approx -120^\circ$, $\psi \approx 130^\circ$) (рисунок 5.1.12 А), при этом остатки глицина демонстрируют типичное для коллагена распределение с преобладанием в области правозакрученной спирали (рисунок 5.1.12 В), что соответствует их положению в повторяющихся триплетах Gly-X-Y. Пролиновые остатки ожидаемо ограничены по углу φ около -60° с характерным для коллагена распределением в области положительных значений ψ (рисунок 5.1.12 С), а пре-пролиновые остатки локализованы в верхней левой четверти карты (рисунок 5.1.12 D), что в совокупности подтверждает сохранение типичной для коллагена конформационной структуры даже в гидролизованном состоянии и указывает на корректность процесса гидролиза с сохранением характерных структурных особенностей белка.

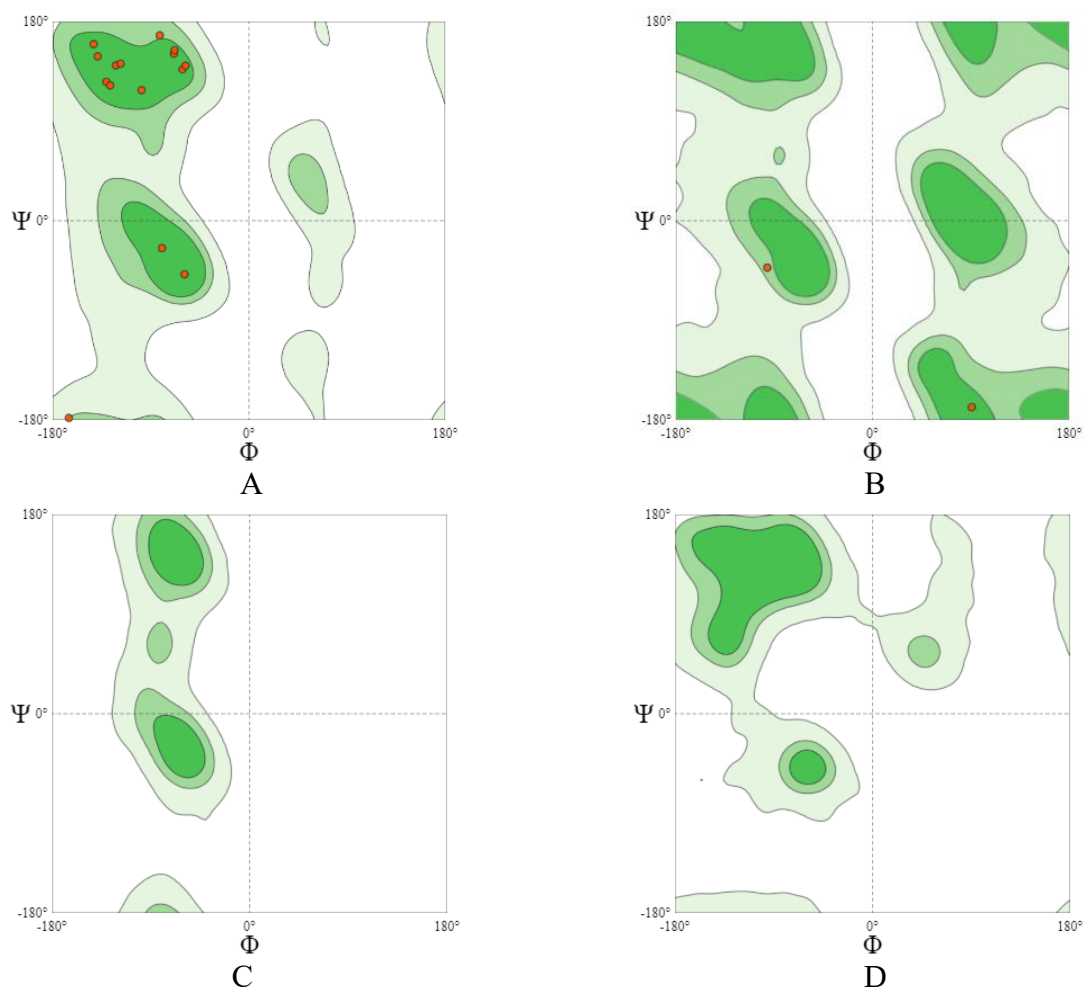


Рисунок 5.1.12 – Графики Рамачандрана образца 6 ГКНЦБ: А – общий; В – остатки глицина; С – остатки пролина; D – остатки пре-пролина

Образец 7 ГКСШ

Аминокислотная последовательность:

PILGPILVILAILGILVILTPSVGVHGHVSVTGTVFDGTNPEVAVNVVRVTYCCCDDGG.

На рисунке 5.1.13 представлен фрагмент α -спирали – важного элемента вторичной структуры, которая стабилизируется водородными связями.

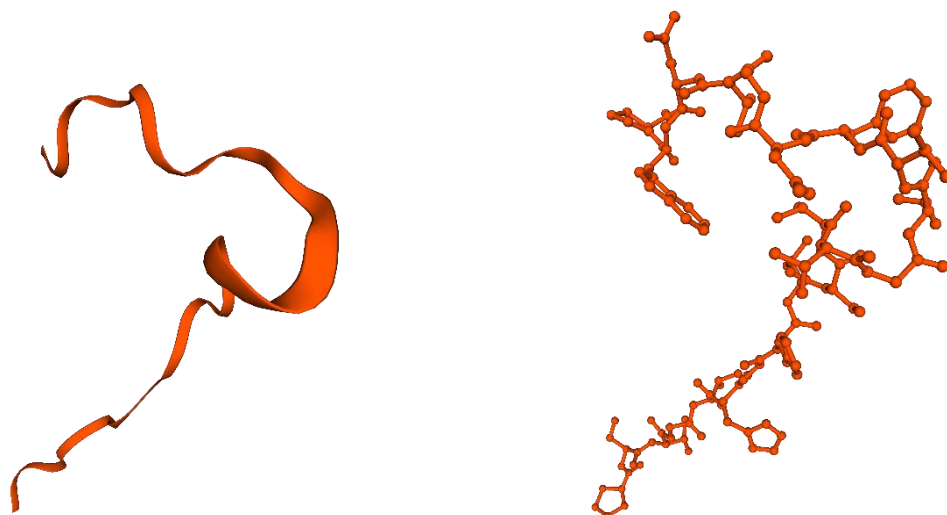


Рисунок 5.1.13 – Структура белка образца 7 ГКСШ

Молекулярная структура белка имеет большое количество изгибов и петель, что характерно для белков, которые могут выполнять сигнальные или регуляторные функции, т. к. подобная конформация предположительно может обеспечивать множество связей для взаимодействия с другими молекулами. Наличие циклических структур и разветвлений способно указывать на присутствие важных функциональных доменов, участвующих в молекулярном распознавании, передаче сигналов или каталитической активности белка.

Анализ рисунка 5.1.14 представляет распределение конформационных состояний, характерное для коллагеновых белков. Так, наблюдается преимущественная концентрация точек в области полипролиновой спирали II типа ($\varphi \approx -75^\circ$, $\psi \approx 150^\circ$) с меньшим количеством точек в области β -структуры ($\varphi \approx -120^\circ$, $\psi \approx 130^\circ$) (рисунок 5.1.14 А), при этом остатки глицина демонстрируют более компактное распределение с четкой локализацией в области правозакрученной спирали (рисунок 5.1.14 В), что соответствует их роли в триплетях Gly-X-Y коллагеновой структуры. Пролиновые остатки показывают типичное ограничение по углу φ около -60° с характерным распределением точек в области положительных значений ψ (рисунок 5.1.14 С), а пре-пролиновые остатки имеют компактное распределение в верхней левой четверти карты (рисунок 5.1.14 D), что в совокупности свидетельствует о сохранении

нативноподобной конформации коллагена после гидролиза и указывает на более упорядоченную структуру гидролизата из свиной шкурки.

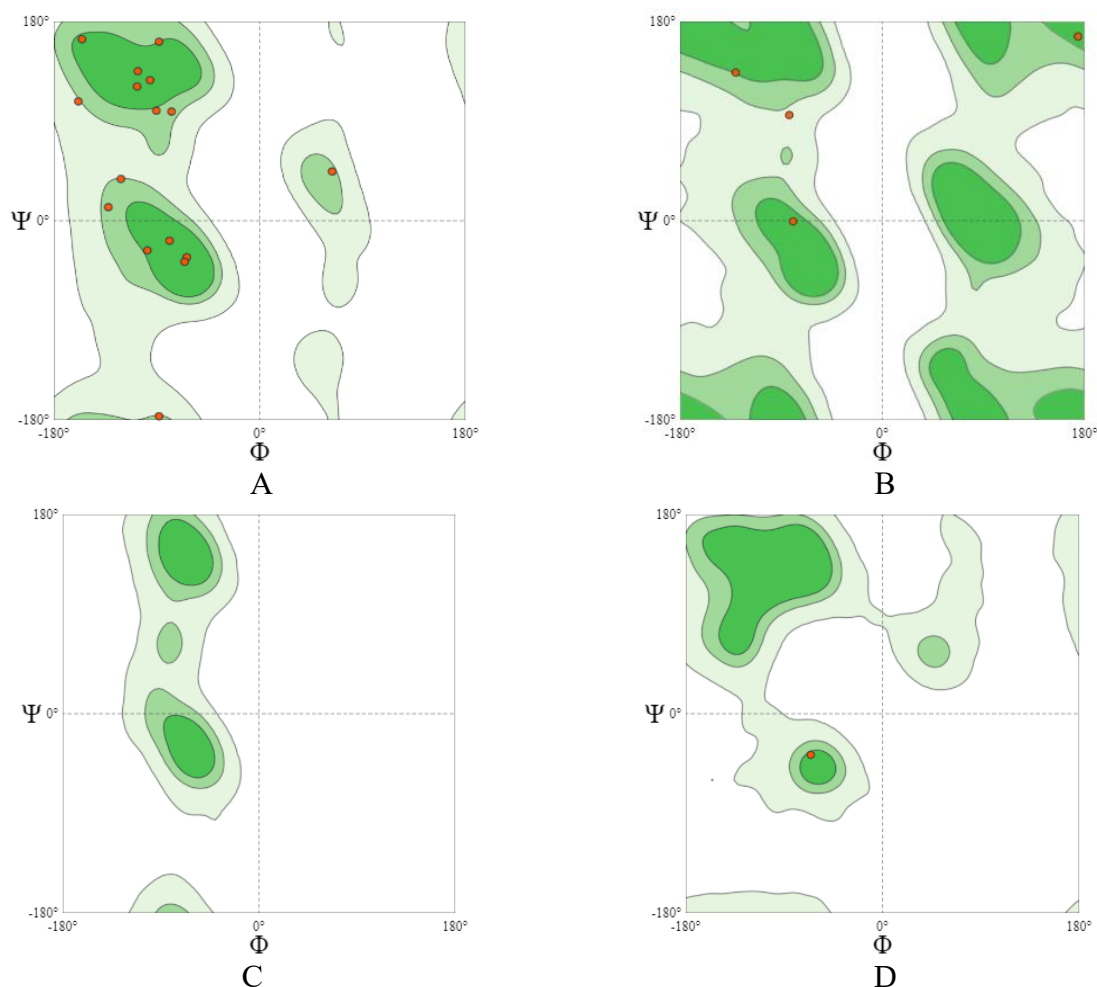


Рисунок 5.1.14 – Графики Рамачандрана образца 7 ГКСШ: А – общий; В – остатки глицина; С – остатки пролина; D – остатки пре-пролина

Образец 8 ГКСШ

Аминокислотная последовательность:

*GGPAAGGPAYGGPILILAPAILAPYILAAILADNPAANPAYNPILPNAAPNAYPNILPQGAP
QGYSEAASEAYSEILTNAATNAYTNILTQGATQGYAPAAPYEAAEAYEILHILKPAKPYNAA
NAYNILPAAPAYPILQGAQGYILPQQTQQA AAAADAYGAGYILILKAKDQQVTVVGAGDG
THTHVPQQMTQVRAAAAAADDQQTTVV.*

На рисунке 5.1.15 представлена трехмерная структура белка в виде спиральной или лентовидной молекулы. Можно предположить, что данная

модель имеет вторичную структуру белка (α -спираль или β -складчатая структура) с небольшими изгибами, т. к. представляет собой длинную, непрерывную полипептидную цепочку, которая извивается в пространстве.

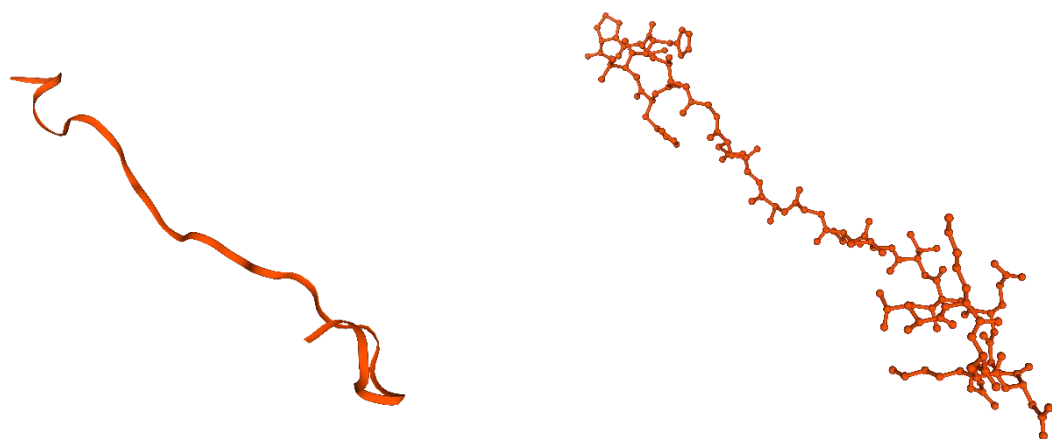


Рисунок 5.1.15 – Структура белка образца 8 ГКСШ

Молекула белка, показанная на рисунке 5.1.15, состоит из длинной цепи, которая образует несколько ответвлений и углов. Ответвления могут указывать на наличие структурных мотивов, таких как α -спирали или β -слои, которые играют важную роль в обеспечении стабильности и функциональности белка.

Благодаря анализу рисунка 5.1.16 выявлено распределение конформационных состояний, характерное для глубоко гидролизованного коллагена птиц. Так, наблюдается более широкое распределение точек в области полипролиновой спирали II типа ($\varphi \approx -75^\circ$, $\psi \approx 150^\circ$) с увеличенным количеством точек в периферийных областях (рисунок 5.1.16 А), при этом остатки глицина демонстрируют более рассеянное распределение (рисунок 5.1.16 В) по сравнению с образцом 6 ГКНЦБ, что указывает на более глубокую степень гидролиза. Пролиновые остатки сохраняют характерное ограничение по углу φ около -60° , но с менее компактным распределением точек (рисунок 5.1.16 С), а пре-пролиновые остатки показывают более диффузное распределение в верхней левой четверти карты (рисунок 5.1.16 D), что в совокупности свидетельствует о более глубокой степени гидролиза коллагена с

частичным нарушением упорядоченной структуры, но с сохранением основных конформационных предпочтений, характерных для коллагеновых пептидов.

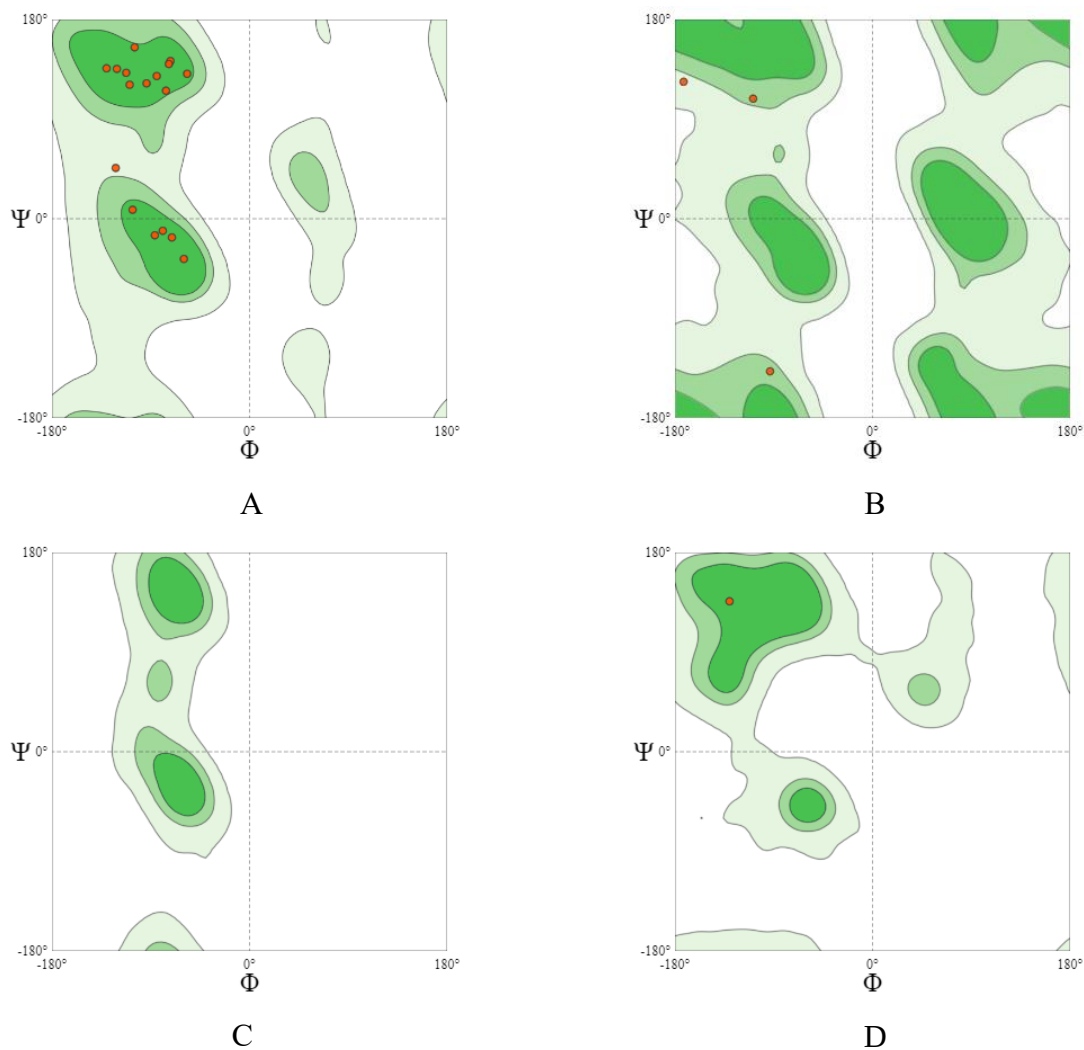


Рисунок 5.1.16 – Графики Рамачандрана образца 8 ГКСШ: А – общий; В – остатки глицина; С – остатки пролина; D – остатки пре-пролина

5.2 Моделирование графиков определения изоэлектрической точки и расчета белкового заряда

Далее, на основании полученных результатов, были смоделированы графики определения изоэлектрической точки и расчета белкового заряда (рисунки 5.2.1–5.2.8).

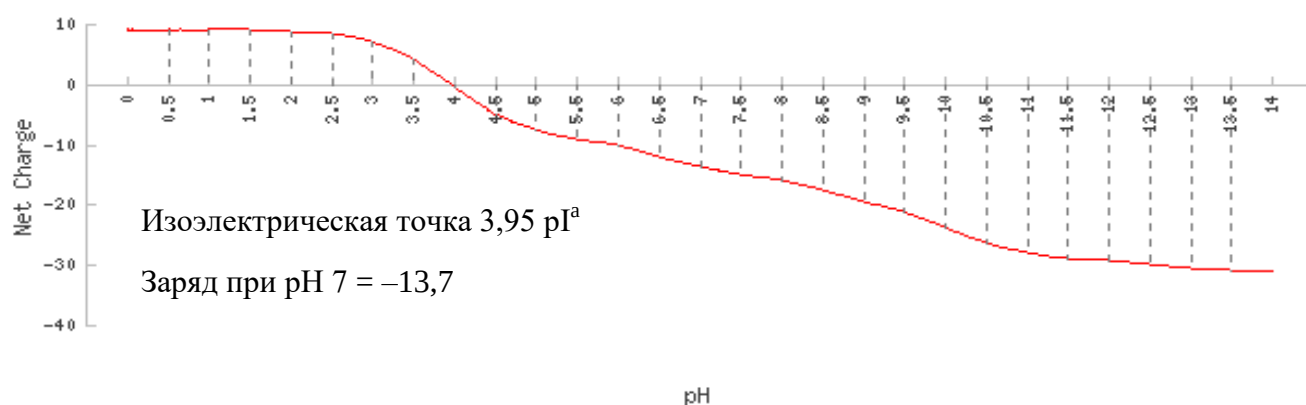


Рисунок 5.2.1 – График определения изоэлектрической точки и расчета белкового заряда образца 1 ГКСК

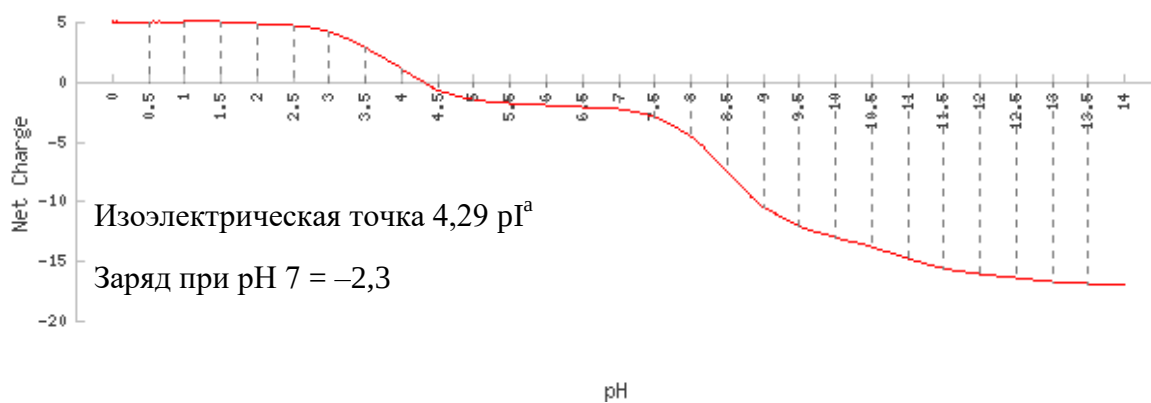


Рисунок 5.2.2 – График определения изоэлектрической точки и расчета белкового заряда образца 2 ГКСК

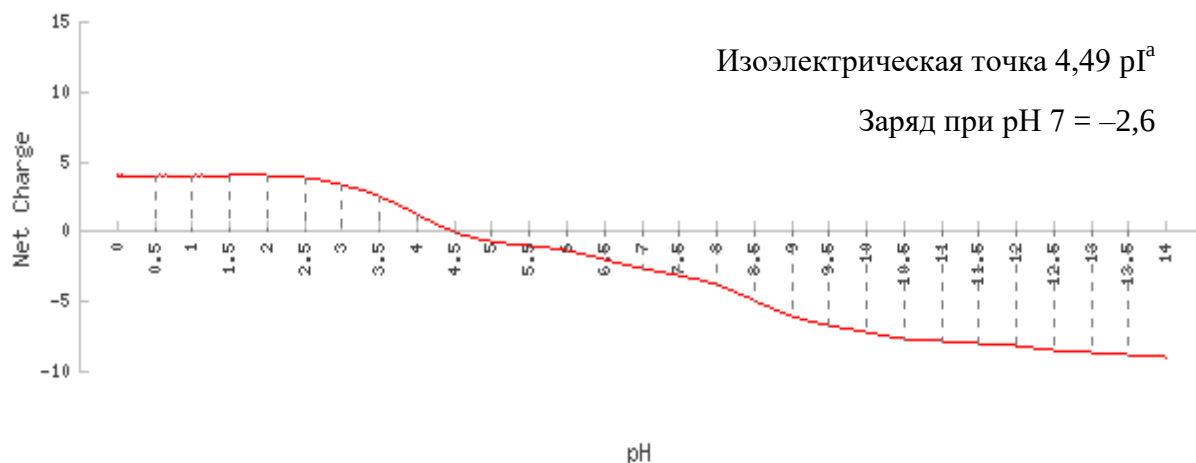


Рисунок 5.2.3 – График определения изоэлектрической точки и расчета
белкового заряда образца 3 ГКСК

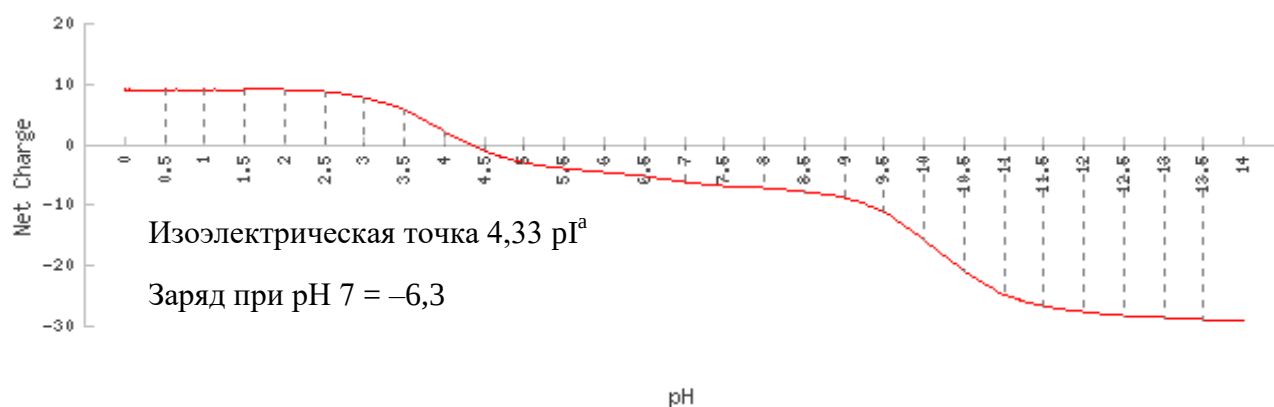


Рисунок 5.2.4 – График определения изоэлектрической точки и расчета
белкового заряда образца 4 ГКНЦБ

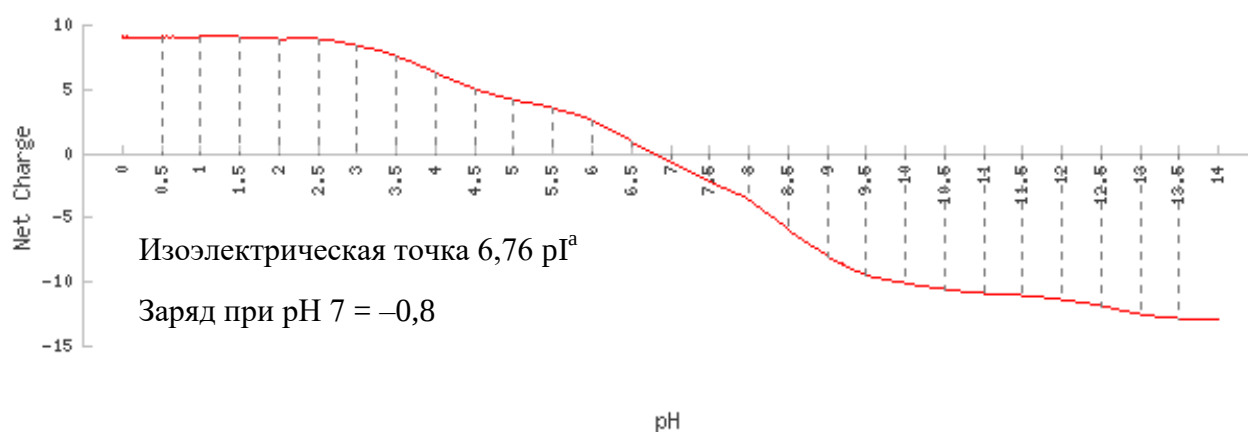


Рисунок 5.2.5 – График определения изоэлектрической точки и расчета
белкового заряда образца 5 ГКНЦБ

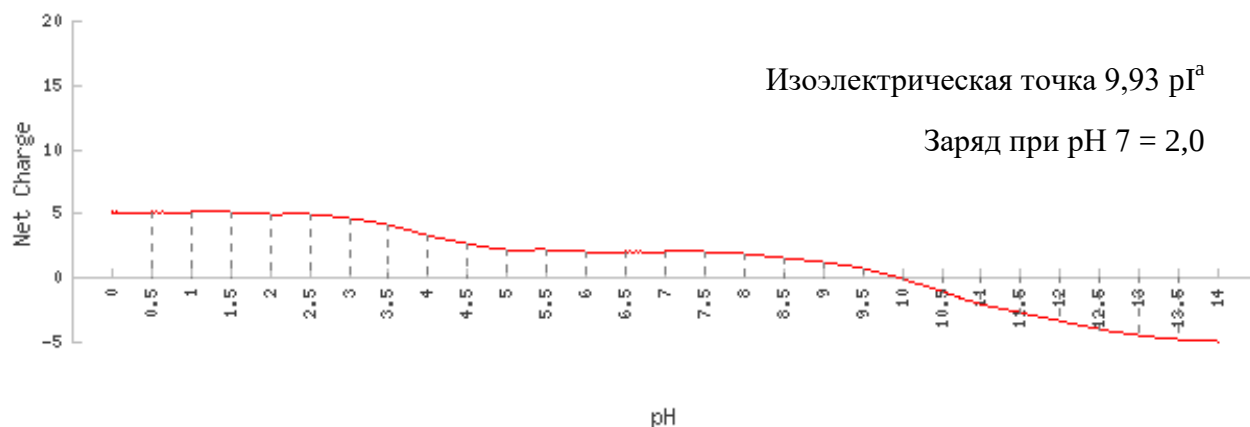


Рисунок 5.2.6 – График определения изоэлектрической точки и расчета
белкового заряда образца 6 ГКНЦБ

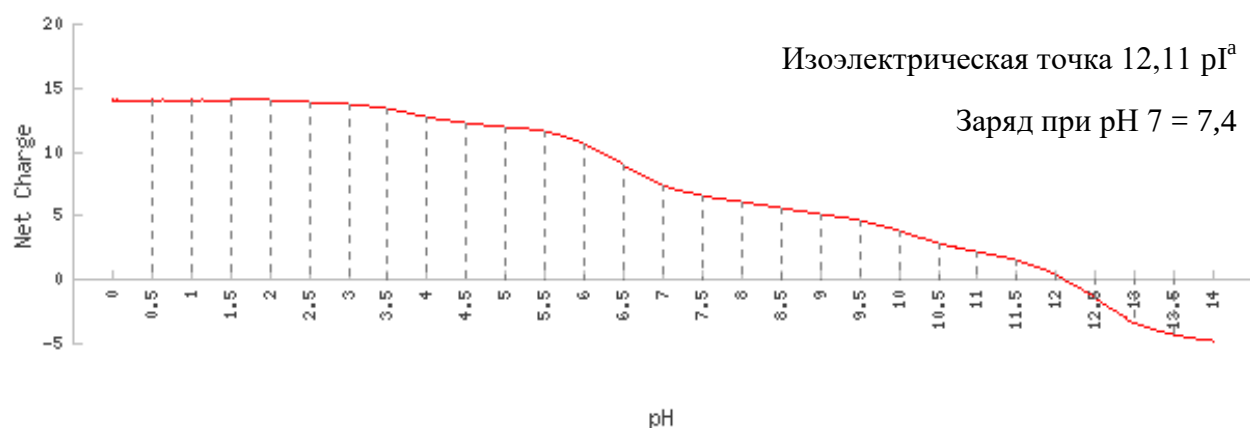


Рисунок 5.2.7 – График определения изоэлектрической точки и расчета
белкового заряда образца 7 ГКСШ

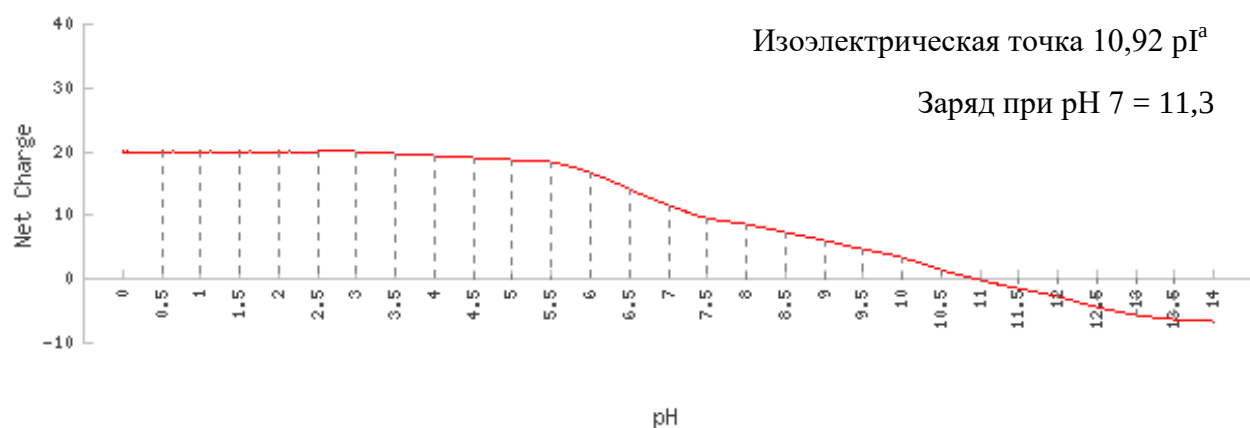


Рисунок 5.2.8 – График определения изоэлектрической точки и расчета
белкового заряда образца 8 ГКСШ

Суммарный заряд белка при любом заданном pH определяется значениями pK (pKs) ионизируемых групп. В изоэлектрической точке (pI) он равен нулю,

при рН ниже рI – положителен, при рН выше рI – отрицателен. Рибонуклеаза Sa (РНКаза Sa) имеет 7 остатков Asp, 5 – Glu, 2 – His, 0 – Lys и 5 – Arg. Следовательно, у белка дикого типа кислотные остатки находятся в избытке, что дает ему $pI = 3,5$ и суммарный заряд ~ -7 при рН 7.

Из анализа графиков (рисунки 5.2.1–5.2.8) можно сделать выводы о поведении белков в зависимости от их изоэлектрической точки (рI) и заряда при рН 7. Величина изоэлектрической точки определяет уровень рН, при котором белок не имеет чистого электрического заряда, что является ключевым для его поведения в различных средах. В разных образцах наблюдаются значительные колебания значений изоэлектрической точки, что может указывать на разнообразие структур и свойств белков. Например, в образцах с более низкими значениями рI (рисунки 5.2.1–5.2.5) белки имеют отрицательный заряд при рН 7, что предполагает наличие преобладания кислотных аминокислот. В то же время образцы с более высокими рI (рисунки 5.2.6–5.2.8) показывают положительный или нейтральный заряды, что характерно для белков с преобладанием основных аминокислот. Эти данные могут быть основой для дальнейшего анализа взаимодействий белков с другими молекулами и оптимизации условий их разделения, очистки в биотехнологических процессах.

Данные, полученные по определению изоэлектрических точек образцов, подтверждают методы получения гидролизата коллагена.

5.3 Моделирование графиков топологии гидрофобности, гидрофильности и трансмембранной тенденции аминокислот гидролизатов коллагена

На следующем этапе исследований проводили определение гидрофобности белка гидролизатов коллагена по результатам аминокислотной последовательности. С помощью онлайн-сервиса ProtScale были построены графики топологии гидрофобности, гидрофильности и трансмембранной

тенденции опытных образцов гидролизатов коллагена (рисунки 5.3.1–5.3.9). В методе оценки топологии белка, в том числе его гидрофобности, по шкале Кайта-Дулиттла предусмотрено, что пики графика, значения которых находятся в пределах больше 0, характеризуют гидрофобную область.

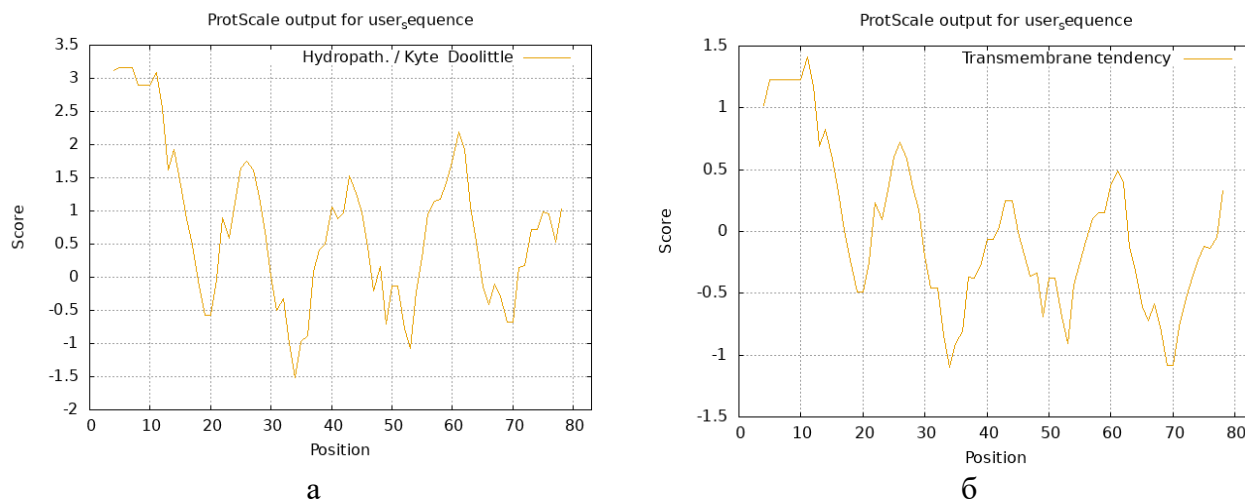


Рисунок 5.3.1 – Предсказание топологии гидрофобности, гидрофильности и трансмембранной тенденции аминокислот образца 1 ГКСК:

а – топологии гидрофобности и гидрофильности; б – трансмембранная тенденция

Анализируя рисунок 5.3.1 а следует обратить внимание на положительные пики диаграммы (в диапазоне 10–20 и 55–65), которые указывают на участки, где аминокислоты имеют гидрофобные свойства. Эти данные свидетельствуют о том, что анализируемые участки имеют тенденцию располагаться внутри белка или в его мембранной части, где они не взаимодействуют с водной средой.

Отрицательные участки (например, в диапазоне 30–40) показывают области с гидрофильными аминокислотами, которые часто находятся на внешней поверхности белка, взаимодействуя с водной средой.

Таким образом, график топологии гидрофобности и гидрофильности (рисунок 5.3.1 а) показывает явное чередование гидрофобных и гидрофильных участков в исследуемой аминокислотной последовательности, что свидетельствует о возможном наличии как гидрофобных доменов

для интеграции в мембраны, так и гидрофильных областей для взаимодействия с водной средой или молекулярными лигандами.

Анализируя рисунок 5.3.1 б нужно обратить внимание на то, что пики последовательности аминокислот в диапазоне 15–25 и 55–65 предположительно имеют высокую вероятность интеграции в мембрану. Помимо этого, вероятно, данные фрагменты могут образовывать трансмембранные домены или спирали, которые проходят через мембрану, взаимодействуя с ее липидами.

Также следует отметить участки с низкой вероятностью интеграции в мембрану (в диапазоне 35–45). Предположительно эти участки будут находиться в водной среде или могут быть частью других структур, таких как поверхностные участки белка, которые не взаимодействуют с мембраной.

Также на диаграмме представлены участки с резкими колебаниями (в диапазоне 10–60), что может свидетельствовать о том, что белок содержит гибкие сегменты, которые способны менять свою конформацию в зависимости от внешней среды или взаимодействия с другими молекулами.

Таким образом, смоделировав топологии гидрофобности, гидрофильности и трансмембранной тенденции аминокислот образца 1 ГКСК, можно сделать вывод, что исследуемые белки содержат как гидрофобные, так и гидрофильные области. Это предполагает наличие у них способности не только к интеграции в мембраны, но и к взаимодействию с водной средой. Кроме того, данные сведения подтверждают, что, во-первых, белок может иметь гибкие участки, которые важны для его функциональности, а во-вторых, его структура, вероятно, адаптируется к различным условиям или выполняет сложные функции, такие как трансмембранный транспорт или взаимодействие с клеточными лигандами.

Рисунок 5.3.2 а демонстрирует выраженную чередующуюся структуру с участками, где аминокислоты имеют гидрофобные (в диапазоне 10–20 и 50–60) и гидрофильные (в диапазоне 30–40 и 70–80) свойства. Это указывает на возможное наличие гидрофобных доменов для интеграции в мембраны и гидрофильных областей для взаимодействия с водной средой или молекулярными лигандами.

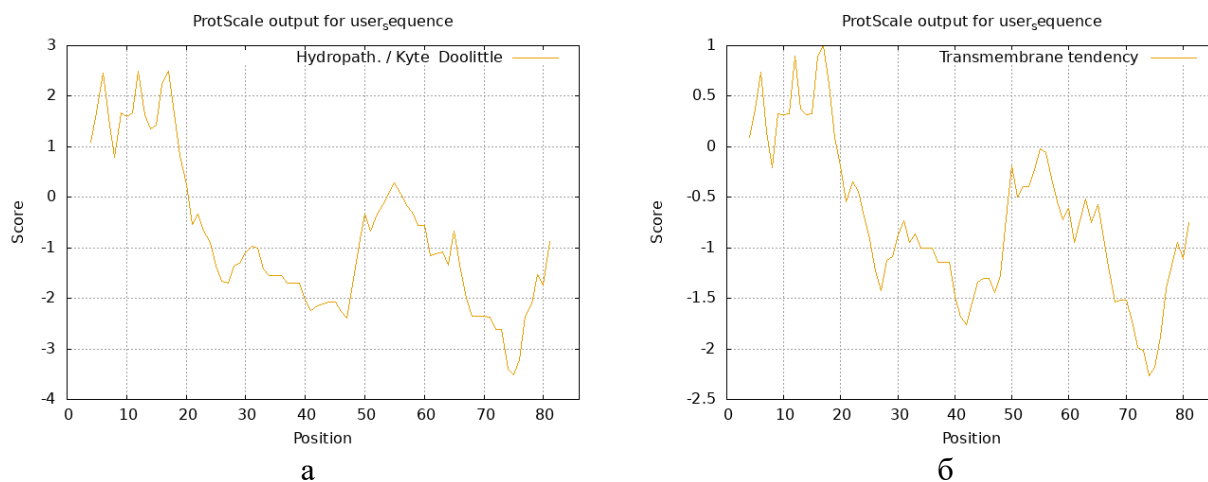


Рисунок 5.3.2 – Предсказание топологии гидрофобности, гидрофильности и трансмембранной тенденции аминокислот образца 2 ГКСК:

а – топологии гидрофобности и гидрофильности; б – трансмембранная тенденция

Значительные положительные пики на рисунке 5.3.2 б (в диапазоне 10–20 и 55–65) подтверждают наличие трансмембранных доменов, в то время как участки с отрицательными значениями (в диапазоне 35–45), скорее всего, будут связываться мембраной в водной среде на внешней поверхности белка.

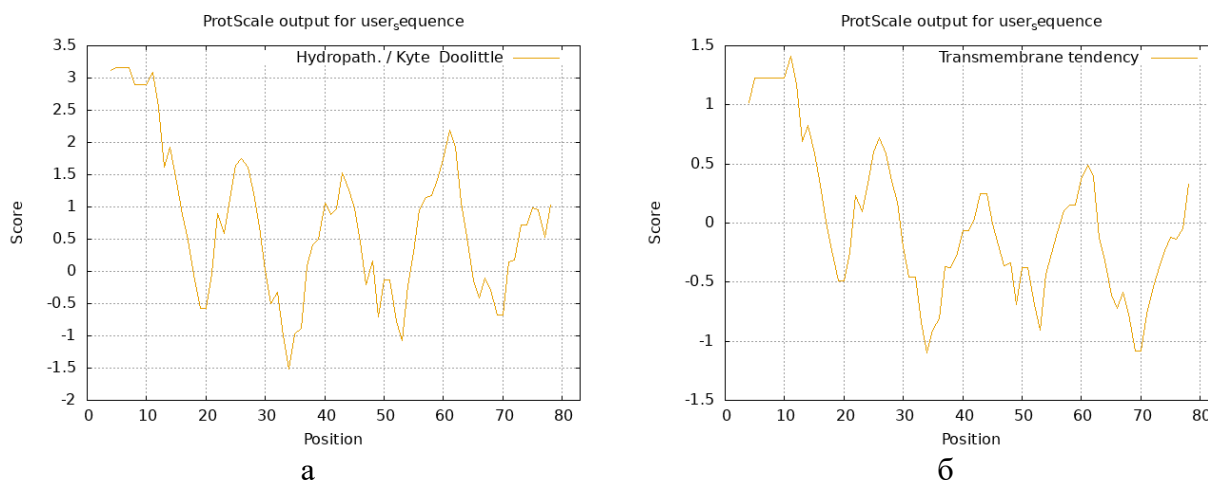


Рисунок 5.3.3 – Предсказание топологии гидрофобности, гидрофильности и трансмембранной тенденции аминокислот образца 3 ГКСК:

а – топологии гидрофобности и гидрофильности; б – трансмембранная тенденция

При оценке рисунка 5.3.3 а можно предположить, что отрицательные участки последовательности аминокислот в диапазоне 30–40 и 70–80 прогнозируют гидрофильные свойства, склонные к взаимодействию с водной средой, и расположение на внешней поверхности белка. При этом наблюдаются положительные пики (в диапазоне 10–20 и 50–60), которые прогнозируют гидрофобные участки, что свидетельствует о склонности этих аминокислот находиться внутри белка или интегрироваться в мембрану.

Анализ рисунка 5.3.3 б указывает на то, что положительные пики, представленные последовательностями аминокислот в диапазоне 10–20 и 60–70, демонстрируют участки с высокой вероятностью интеграции в мембрану, что подтверждает наличие трансмембранных доменов.

Таким образом, в образце 3 ГКСК отмечается наличие участков с высоким потенциалом для формирования трансмембранных доменов, что предполагает возможность гидролизата взаимодействовать с мембранами либо участвовать в формировании мембранных структур.

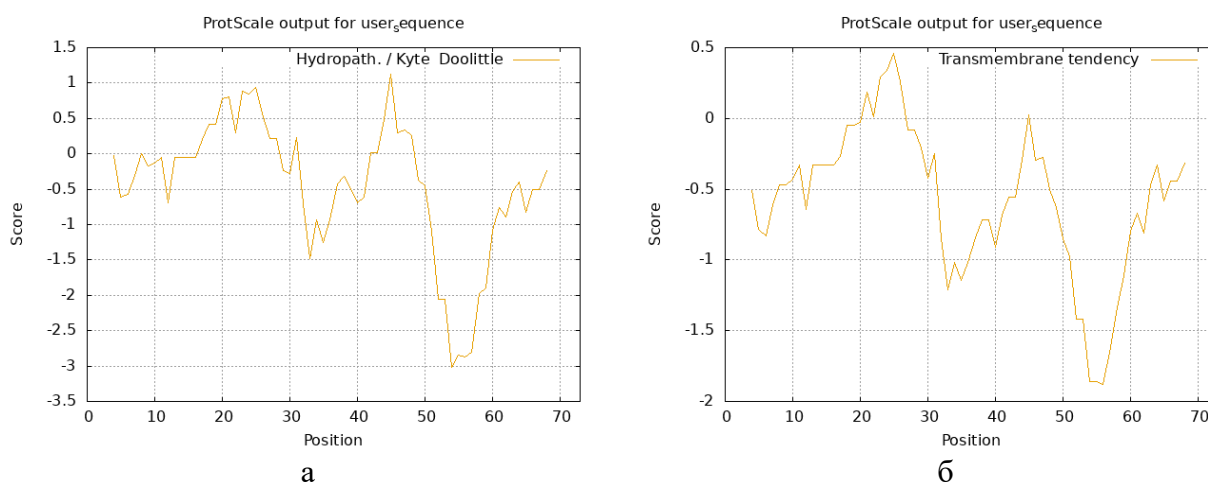


Рисунок 5.3.4 – Предсказание топологии гидрофобности, гидрофильности и трансмембранной тенденции аминокислот образца 4 ГКНЦБ:

а – топологии гидрофобности и гидрофильности; б – трансмембранная тенденция

На основании рисунка 5.3.4 а можно отметить следующее: визуализация по оси гидрофобности показывает значительные колебания, что указывает

на присутствие как гидрофобных, так и гидрофильных участков на протяжении всей последовательности. Положительные пики в некоторых областях (например, в диапазоне 10–20 и 50–60) подтверждают наличие участков с гидрофобными свойствами, в то время как отрицательные участки (например, в диапазоне 30–40) указывают на гидрофильные области.

График трансмембранной тенденции (рисунок 5.3.4 б) также демонстрирует колебания, где высокие пики (например, в диапазоне 10–20 и 50–60) подтверждают вероятные участки, которые могут быть вовлечены в формирование трансмембранных доменов. Эти участки имеют тенденцию к интеграции в мембрану, где они потенциально могут взаимодействовать с липидами.

Образец 5 ГКНЦБ содержит как гидрофобные, так и гидрофильные участки, что может свидетельствовать о возможности формирования различных структур, включая мембранные домены (рисунок 5.3.5 а).

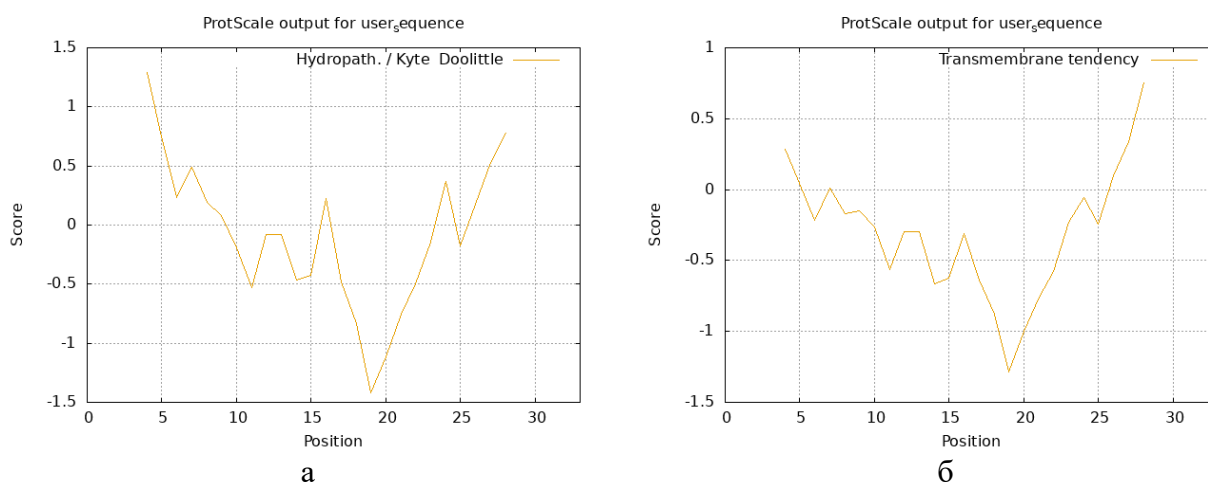


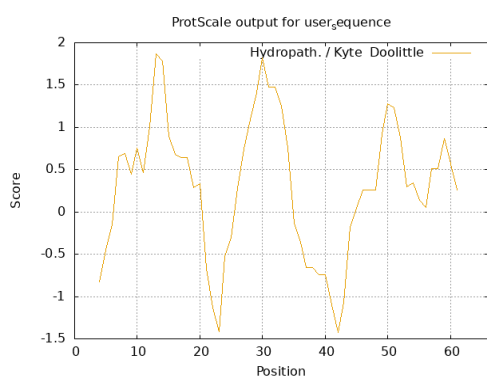
Рисунок 5.3.5 – Предсказание топологии гидрофобности, гидрофильности и трансмембранной тенденции аминокислот образца 5 ГКНЦБ:

а – топологии гидрофобности и гидрофильности; б – трансмембранная тенденция

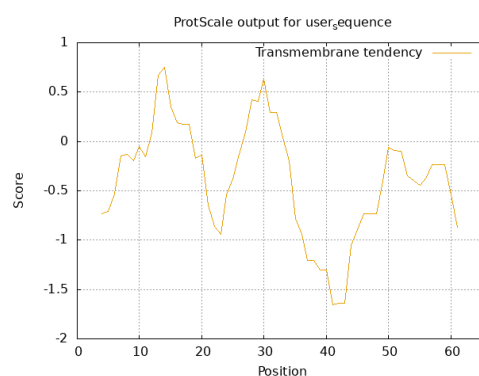
Повышенная трансмембранная тенденция в конце аминокислотной последовательности (рисунок 5.3.5 б) предполагает, что этот белок может взаимодействовать с мембранами или даже интегрироваться в мембранную

структуру, что делает его пригодным для использования в биотехнологиях и биологических процессах, где необходима интеграция с липидными структурами.

Исходя из данных рисунка 5.3.6 а, можно утверждать, что аминокислотная последовательность имеет значительные колебания гидрофобных и гидрофильных участков и гидрофобные сегменты, наиболее выраженные в диапазоне 10–20 и 35–45. Рисунок 5.3.6 б подтверждает вероятность того, что участки с высокими положительными пиками (особенно в диапазоне 10–20 и 35–50) могут составлять трансмембранные домены, которые проходят через мембрану. Эти данные указывают на возможность использования гидролизатов коллагена для разработки мембранных белков или продуктов, требующих интеграции в биологические мембраны.



а



б

Рисунок 5.3.6 – Предсказание топологии гидрофобности, гидрофильности и трансмембранной тенденции аминокислот образца 6 ГКНЦБ:

а – топологии гидрофобности и гидрофильности; б – трансмембранная тенденция

Положительные пики на рисунке 5.3.7 а (в диапазоне 5–15 и 40–45) подтверждают гидрофобные участки, которые могут взаимодействовать с липидами в мембране и интегрироваться в нее. График трансмембранной тенденции (рисунок 5.3.7 б) подтверждает эти выводы, т. к. пики находятся в тех же областях, где наблюдаются гидрофобные участки. Особенно значительные пики наблюдаются в диапазоне последовательности аминокислот 10–15 и 40–45,

что указывает на высокую вероятность формирования трансмембранных доменов или спиралей, которые будут взаимодействовать с мембранной средой.

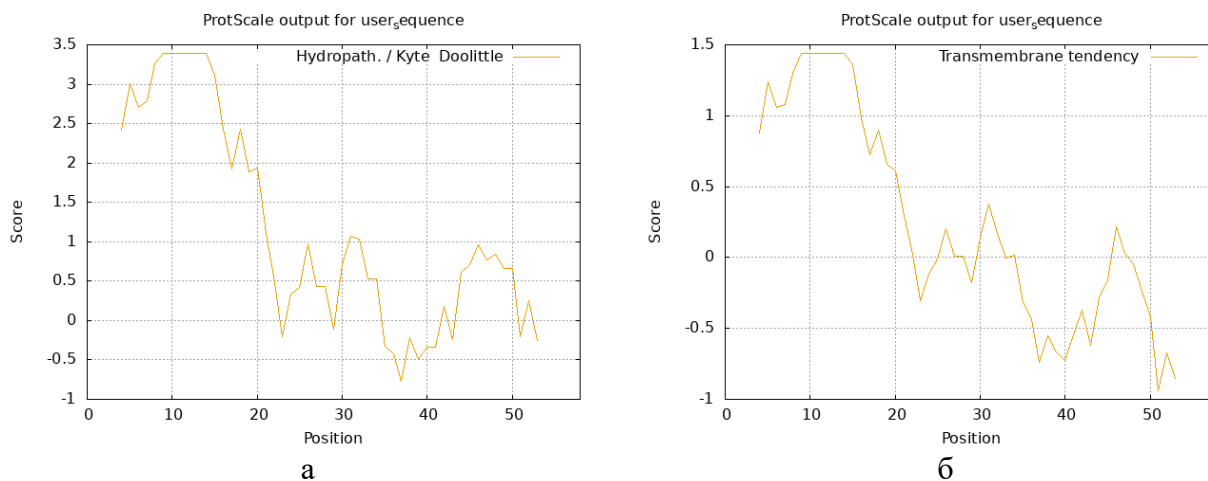


Рисунок 5.3.7 – Предсказание топологии гидрофобности, гидрофильности и трансмембранной тенденции аминокислот образца 7 ГКСШ:

а – топологии гидрофобности и гидрофильности; б – трансмембранная тенденция

Образец 8 ГКСШ имеет достаточно большую аминокислотную последовательность гидролизатов коллагена (длина последовательности около 200 аминокислот).

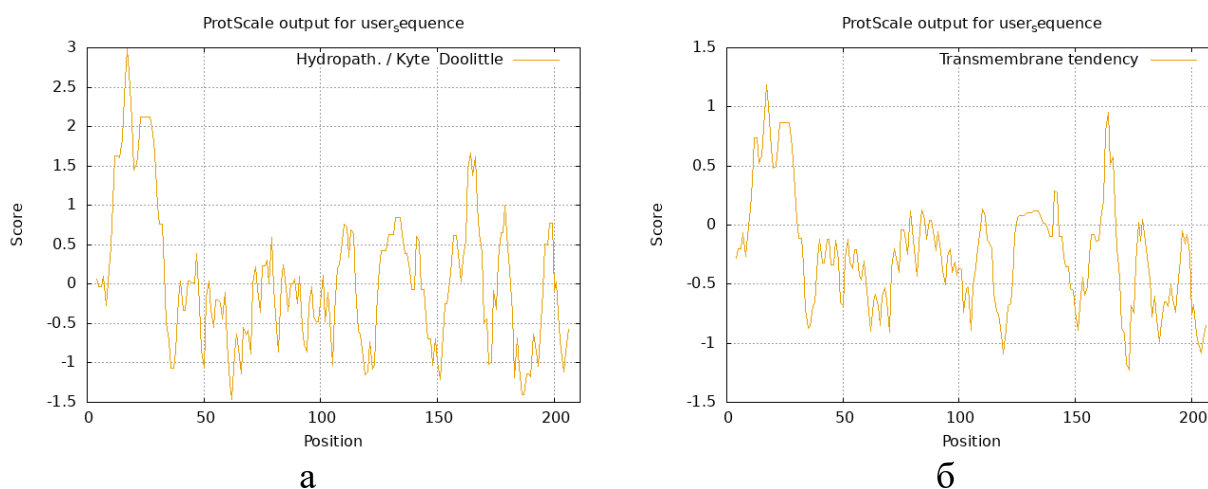


Рисунок 5.3.8 – Предсказание топологии гидрофобности, гидрофильности и трансмембранной тенденции аминокислот образца 8 ГКСШ:

а – топологии гидрофобности и гидрофильности; б – трансмембранная тенденция

На рисунке 5.3.8 а можно отметить значительные колебания гидрофобности с несколькими выраженными пиками (в диапазоне 10–20 и 120–130), что указывает на присутствие как гидрофобных, так и гидрофильных участков. Положительные пики свидетельствуют о том, что эти участки могут быть гидрофобными, а значит, и интегрироваться в мембрану.

Рисунок 5.3.8 б, представляющий график трансмембранной тенденции, подтверждает эти наблюдения, показывая высокие пики в тех же областях. Это указывает на высокую вероятность того, что данные участки способны сформировать трансмембранные домены, которые могут быть вовлечены в интеграцию мембранных структур. Помимо этого, наблюдаются участки с отрицательными значениями, что, предположительно, свидетельствует о гидрофильных участках, склонных к взаимодействию с водной средой. Эти данные дают основание полагать, что белок образца 8 ГКСШ, во-первых, может обладать свойствами, подходящими для использования в биотехнологиях, которые связаны с мембранами, а во-вторых, имеет возможность применения в биологически активных составах, взаимодействующих с мембранными структурами.

С точки зрения обоснованности достоверности полученных данных по вышепредставленным методам было проведено их сравнение с результатами гидропатии и функциональных свойств аминокислот по методу Хоппа-Вудса (рисунок 5.3.9).

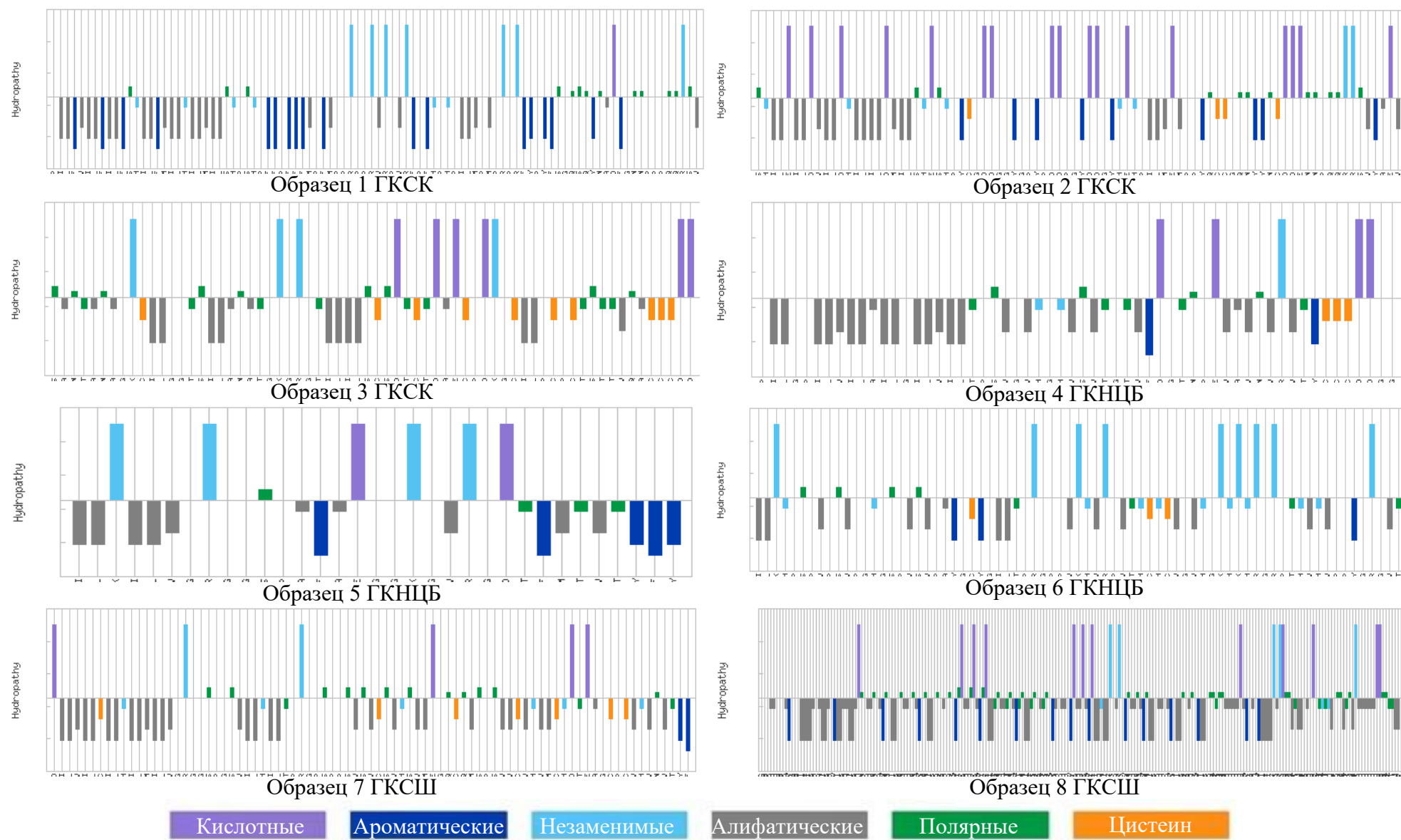


Рисунок 5.3.9 – Графики гидропатии и функциональных свойств аминокислот: метод Хоппа-Вудса

Шкала гидропатии аминокислот Хоппа-Вудса измеряет гидрофильные остатки и представляет собой метод ранжирования аминокислот в белке в соответствии с аминокислотной растворимостью в воде с целью поиска их поверхностных расположений на белках, особенно тех участков, которые склонны к сильному взаимодействию с другими макромолекулами.

Графики показывают значительные различия между образцами по гидропатическим и функциональным характеристикам. Образец 1 ГКСК может демонстрировать высокий уровень гидрофобных аминокислот, что указывает на стабильность структуры в мембране или гидрофобной среде. Образцы 6 ГКНЦБ и 7 ГКСШ показывают наличие полярных аминокислот, которое свидетельствует о способности взаимодействовать с водной средой или участвовать в формировании водородных связей. В образце 8 ГКСШ обнаруживается высокий уровень ароматических аминокислот, что может быть обусловлено их ролью в гидрофобных взаимодействиях и стабилизации белков. Распределение цистеина в образцах указывает на возможность формирования дисульфидных связей, важных для устойчивости структуры белка.

5.4 Оценка потенциальных биоактивных свойств пептидов гидролизатов коллагена

На следующем этапе исследований выявляли потенциально биоактивные гидролизаты коллагена с помощью сервиса PeptideRanker, который ранжирует пептиды по прогнозируемой вероятности того, что пептид будет биологически активным. Структура пептидов была нарисована с использованием онлайн-инструмента PepDraw.

Далее определяли молекулярную массу и потенциальную биоактивность исследуемых образцов. Так, онлайн-сервис PeptideRanker при расчете биоактивных свойств пептидов имеет пороговое значение 0,5, т. е. любой

представленный к расчету пептид, имеющий расчетное значение показателя оценки биоактивных свойств выше 0,5 отмечается как биоактивный. Однако, исходя из данных, полученных в ходе анализа научной литературы, стоит выбрать более высокий порог данного показателя, т. к. это необходимо для уменьшения количества ложноположительных результатов при оценке биоактивных свойств пептидов.

В связи с этим используем расчетное значение не ниже 0,5. Таким образом, пептиды, имеющие расчетную оценку биокативности более 0,5, будут иметь биоактивные свойства (значения выделены в таблице 5.4.1). Максимальное значение по оценке биоактивных свойств пептидов может быть не более 1.

В таблице 5.4.1 представлена оценка биоактивности пептидной последовательности исследуемых образцов гидролизатов коллагена.

Таблица 5.4.1 – Оценка потенциальной биоактивности пептидной последовательности исследуемых образцов гидролизатов коллагена

Образец	Количество пептидов в цепи	Аминокислотная последовательность гидролизата опытного образца в однобуквенном коде	Молекулярная масса, г/моль	Потенциальная степень биоактивности
1 ГКСК	94	PILFVILFILFSHILFMILHILM ILSHPSHPFFPFFFMPEMPPR PPRVRPVRFPFHHPILMPM PRPRFYFYPFSGQSQYNADFG NNPPPQQRSV	11245	0,344947

Примечание: А – аланин; С – цистеин; D – аспарагиновая кислота; Е – глутаминовая кислота; F – фенилаланин; G – глицин; H – гистидин; I – изолейцин; K – лизин; L – лейцин; M – метионин; N – аспарагин; P – пролин; Q – глутамин; R – аргинин; S – серин; T – треонин; V – валин; W – триптофан; Y – тирозин.

Образец	Количество пептидов в цепи	Аминокислотная последовательность гидролизата опытного образца в однобуквенном коде	Молекулярная масса, г/моль	Потенциальная степень биоактивности
2 ГКСК	86	SHILEILDVILDHILILDMILS HESHPYCGDDGGYGPYPDD PGYDDGYHEHPILMEMPPY QCCGQNYYNCDDENNPQQ RRSVYAEV	9914	0,247507
3 ГКСК	83	DILVILCILHILMILVGRGGSP GSVILHILTPRGPSPPSVSVC SVHSVMEGQCQMSPSVVCV HVMCHDTEAGCPCVHVN TYF	8777	0,663779
4 ГКНЦБ	72	ILKHPSVPSPVPGHGSPPVSP AYGCYGILTPRGPPVKHVRP VTHCHCVGVHGHKHKHRGR PTHVHVPPYGRGVT	7667	0,0502568
5 ГКНЦБ	33	ILKILVGRGGSPAFAEGGKG VRGDTFMTVTYFY	3509	0,26509
6 ГКНЦБ	66	SANTANAGKCILGGTSILAN ATGKGRGTILILSCSDTCTD AECPDKGCILPCPCTSTTVQ ACCCDD	6529	0,999761
7 ГКСИ	58	PILGPILVILAILGILVILTPSV GVHGHVSVTGTVFDGTNPE VAVNVRVTYCCCDDGG	5885	0,654213

Примечание: А – аланин; С – цистеин; D – аспарагиновая кислота; Е – глутаминовая кислота; F – фенилаланин; G – глицин; H – гистидин; I – изолейцин; K – лизин; L – лейцин; M – метионин; N – аспарагин; P – пролин; Q – глутамин; R – аргинин; S – серин; T – треонин; V – валин; W – триптофан; Y – тирозин.

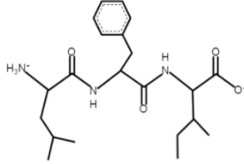
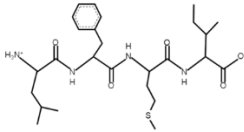
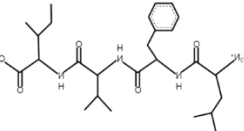
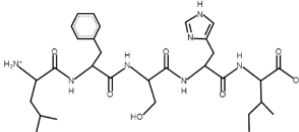
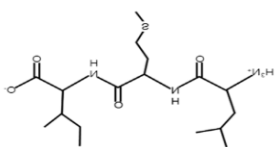
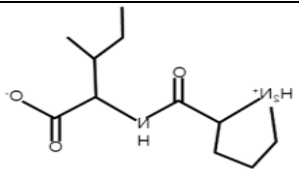
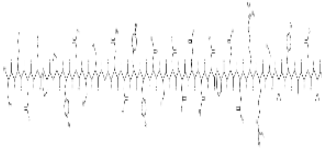
8 ГКСШ	211	GGPAAGGPAYGGPILILAPAI LAPYILAAILADNPAAANPAY NPILPNAAPNAYPNILPQGA PQGYSEAAASEAYSEILTNA TNAYTNILTQGATQGYAPA APYEAAEAYEILHILKPAKP YNAANAYNILPAAPAYPILQ GAQGYILPQQTQQAAAAAD AYGAGYILILKAKDQQVTV VGAGDGTHTHVPQQMTQV RAAAAAADDQQTTVV	21444	0,0106222

Примечание: А – аланин; С – цистеин; D – аспарагиновая кислота; Е – глутаминовая кислота; F – фенилаланин; G – глицин; H – гистидин; I – изолейцин; K – лизин; L – лейцин; M – метионин; N – аспарагин; P – пролин; Q – глутамин; R – аргинин; S – серин; T – треонин; V – валин; W – триптофан; Y – тирозин.

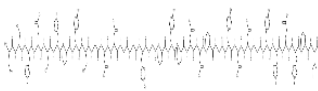
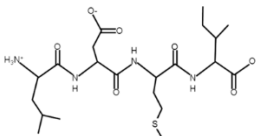
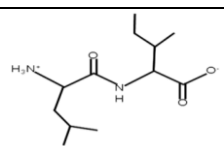
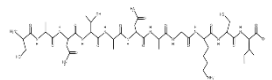
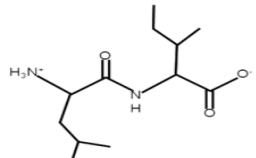
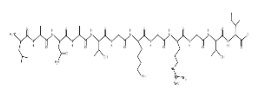
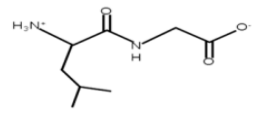
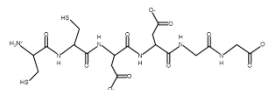
Образцы имеют различные молекулярные массы (от 3509 до 21444 г/моль), что может указывать на различие в размерах пептидов. Потенциальная биоактивность варьируется от 0,0106222 (низкая) до 0,999761 (высокая), что свидетельствует о различной потенциальной биоактивности гидролизатов. Так, образцы 3 ГКСК, 6 ГКНЦБ и 7 ГКСШ имеют наивысший потенциал в выявлении биоактивных свойств при дальнейших исследованиях.

Далее из каждой последовательности аминокислот исследуемых образцов определяли потенциальную степень биоактивности отдельных пептидных цепочек и их биоактивные свойства. В таблице 5.4.2 представлены потенциально биоактивные пептиды последовательностей с указанием их молекулярной массы, потенциальной биоактивности, свойств, а также структуры.

Таблица 5.4.2 – Потенциально биоактивные пептиды и их свойства

Потенциально биоактивные пептидные последовательности	Молекулярная масса, г/моль	Биоактивность	Биоактивные свойства	Двумерная структура пептида
Образец 1 ГКСК				
LFI	391,2463	0,965756	—	
LFMI	522,2866	0,8989	АПФ-ингибитор	
LFVI	490,3145	0,8272	ингибитор ДПП-IV	
LFSHI	615,3370	0,685429	антимикробный	
LMI	375,2184	0,5796	—	
PI	228,1469	0,5467	ингибитор ДПП-IV	
Образец 2 ГКСК				
LMEMPPYQCCGQN YYNCDDENNPQQR RSVYAEV	3956,6265	0,639282	антимикробный	

Примечание: А – аланин; С – цистеин; D – аспарагиновая кислота; Е – глутаминовая кислота; F – фенилаланин; G – глицин; Н – гистидин; I – изолейцин; К – лизин; L – лейцин; М – метионин; N – аспарагин; Р – пролин; Q – глутамин; R – аргинин; S – серин; Т – треонин; V – валин; W – триптофан; Y – тирозин.

Потенциально биоактивные пептидные последовательности	Молекулярная масса, г/моль	Биоактивность	Биоактивные свойства	Двумерная структура пептида
LSHESHPYCGDDGG YGPYPDDPGYDDG YHENPI	3660,4387	0,612355	антимикробный	
LDMI	490,2452	0,575465	АПФ-ингибитор	
LI	244,1781	0,540387	—	
Образец 3 ГКСК				
SANTANAGKCI	1048,4955	0,662562	антимикробный	
LI	244,1781	0,580387	антиоксидант	
LANATGKGRGTI	1157,6497	0,551545	АПФ-ингибитор	
Образец 4 ГКНЦБ				
LG	188,1157	0,717282	—	
CCDDGG	568,1251	0,680133	антиоксидант	

Примечание: А – аланин; С – цистеин; D – аспарагиновая кислота; Е – глутаминовая кислота; F – фенилаланин; G – глицин; H – гистидин; I – изолейцин; K – лизин; L – лейцин; M – метионин; N – аспарагин; P – пролин; Q – глутамин; R – аргинин; S – серин; T – треонин; V – валин; W – триптофан; Y – тирозин.

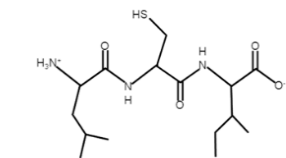
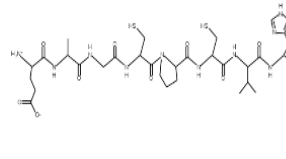
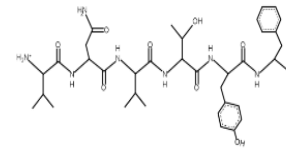
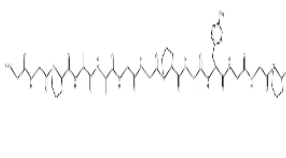
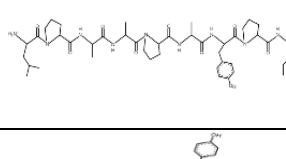
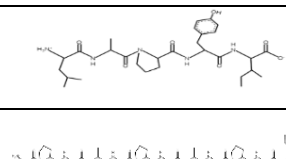
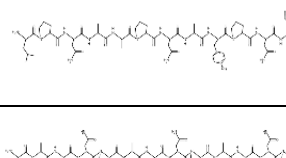
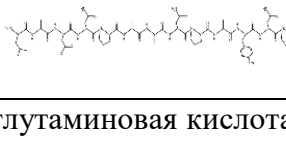
Продолжение таблицы 5.4.2

Потенциально биоактивные пептидные последовательности	Молекулярная масса, г/моль	Биоактивность	Биоактивные свойства	Двумерная структура пептида
PI	228,1469	0,546777	антиоксидант	
PI	228,1469	0,546777	АПФ-ингибитор	
LGI	301,1995	0,537673	—	
LAI	315,2151	0,516001	АПФ-ингибитор	
Образец 5 ГКНЦБ				
AFA	307,1527	0,766671	АПФ-ингибитор	
RG	231,1328	0,7383	—	
GSP	259,1164	0,653894	—	

Примечание: А – аланин; С – цистеин; D – аспарагиновая кислота; Е – глутаминовая кислота; F – фенилаланин; G – глицин; H – гистидин; I – изолейцин; K – лизин; L – лейцин; M – метионин; N – аспарагин; P – пролин; Q – глутамин; R – аргинин; S – серин; T – треонин; V – валин; W – триптофан; Y – тирозин.

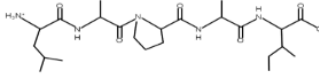
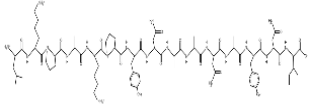
Потенциально биоактивные пептидные последовательности	Молекулярная масса, г/моль	Биоактивность	Биоактивные свойства	Двумерная структура пептида
DTFMT	613,2408	0,599338	АПФ-ингибитор	
VTYFY	691,3206	0,542085	антиоксидант	
Образец 6 ГКНЦБ				
YGRG	451,2173	0,718947	антиоксидант	
CYGI	454,1879	0,715454	опиоид	
LTPRGPP	736,4219	0,600424	АПФ-ингибитор	
PSVPGHG	649,3174	0,593907	антиоксидант	
SPVSVPAYG	875,4374	0,588216	ингибитор ДПП-IV	
Образец 7 ГКСШ				
LMI	375,2184	0,67961	—	

Примечание: А – аланин; С – цистеин; D – аспарагиновая кислота; Е – глутаминовая кислота; F – фенилаланин; G – глицин; H – гистидин; I – изолейцин; K – лизин; L – лейцин; M – метионин; N – аспарагин; P – пролин; Q – глутамин; R – аргинин; S – серин; T – треонин; V – валин; W – триптофан; Y – тирозин.

Потенциально биоактивные пептидные последовательности	Молекулярная масса, г/моль	Биоактивность	Биоактивные свойства	Двумерная структура пептида
LCI	347,1872	0,572714	—	
EAGCPCVH	814,3091	0,554839	антимикробный	
VNVTYF	741,3685	0,536602	антиоксидант	
Образец 8 ГКШ				
GGPAAGGPAYGGP I	1140,554	0,819669	опиоид	
LPAAAPAYPI	911,5100	0,658854	антимикробный	
LAPYI	575,3308	0,59791	АПФ-ингибитор	
LPNAAPNAYPNI	1253,638	0,545738	антиоксидант	
LADNPAANPAYNP I	1439,702	0,539189	агонист СЗα-рецепторов	

Примечание: А – аланин; С – цистеин; D – аспарагиновая кислота; Е – глутаминовая кислота; F – фенилаланин; G – глицин; H – гистидин; I – изолейцин; K – лизин; L – лейцин; M – метионин; N – аспарагин; P – пролин; Q – глутамин; R – аргинин; S – серин; T – треонин; V – валин; W – триптофан; Y – тирозин.

Продолжение таблицы 5.4.2

Потенциально биоактивные пептидные последовательности	Молекулярная масса, г/моль	Биоактивность	Биоактивные свойства	Двумерная структура пептида
LAPAI	483,3047	0,517858	АПФ-ингибитор	
LKPAKPYNAAANAY NI	1646,875	0,510284	АПФ- ингибитор; стимулирует пролиферацию	

Примечание: А – аланин; С – цистеин; D – аспарагиновая кислота; Е – глутаминовая кислота; F – фенилаланин; G – глицин; Н – гистидин; I – изолейцин; К – лизин; L – лейцин; М – метионин; N – аспарагин; Р – пролин; Q – глутамин; R – аргинин; S – серин; Т – треонин; V – валин; W – триптофан; Y – тирозин.

Проанализировав представленные характеристики отдельных пептидных последовательностей образцов, выявили, что исследуемые пептиды имеют широкий спектр активности, который включает антимикробные, антиоксидантные, гипотензивные свойства. Пептиды, такие как LFVI, LFSHI, LMEMPPYQCCGQNYNCDDENNPQRRSVYAEV и др., проявляют антимикробную активность, что открывает перспективы их применения в фармацевтике. АПФ-ингибиторы (например, LFMI, PI, LANATGKGRGTI) могут быть использованы для разработки средств, регулирующих артериальное давление, в то время как антиоксидантные пептиды (LI, VTYFY, CYGI) являются перспективными для защиты от окислительного стресса. Дополнительные свойства (стимуляция пролиферации клеток и воздействие на иммунные рецепторы) могут использоваться в иммуномодуляции. В целом исследуемые пептиды обладают потенциалом для создания инновационных терапевтических продуктов.

Значения показателя потенциальной биоактивности колеблются от 0,51 до 0,97, что свидетельствует о разной степени потенциальной активности исследуемых пептидов. В анализируемых образцах выявлены следующие биоактивные свойства:

- 1) АПФ-ингибиторы – регуляция давления крови;
- 2) ингибиторы ДПП-IV – профилактика диабета;
- 3) антимикробные свойства – способность подавлять микробную активность;
- 4) антиоксидантные свойства – защита от окислительного стресса;
- 5) опиоидные свойства – предположительно связаны с обезболивающим эффектом;
- 6) агонисты С3а-рецепторов – иммуностимуляторы.

Стоит отметить, что некоторые пептиды, такие как LFI и LMI, не имеют идентифицированных биоактивных свойств, несмотря на высокие значения биоактивности. Также определено, что некоторые пептиды обладают несколькими свойствами, например, антимикробными и антиоксидантными.

Стоит отметить, что зависимости показателя биоактивности исследуемых пептидов от молекулярной массы не наблюдается. Помимо этого, обнаружение более биоактивных пептидов методом *in silico* следует подтверждать дальнейшими экспериментальными исследованиями с различными модификациями пептидов *in vivo*. Такие исследования помогут определить достоверность полученных данных и определить конкретные биоактивные свойства изучаемых пептидов.

5.5 Заключение по главе

Исходя из полученных результатов, можно предположить, что гидролизаты коллагена могут обладать широким спектром свойств, в том числе способствовать синтезу собственного коллагена. За счет выявленных потенциально биоактивных свойств можно предположить, что свойство ИАПФ может способствовать снижению гипертензии и улучшению микроциркуляции поврежденных тканей. Антиоксиданты могут нейтрализовать свободные радикалы, которые образуются в процессе воспаления и повреждения тканей. Снижение воспалений и окислительного стресса приводит к более эффективному заживлению без избыточного рубцевания и неконтролируемого роста соединительной ткани.

Таким образом, биоактивные пептиды, обладающие антиоксидантными свойствами и свойствами ингибиторов АПФ, могут быть перспективными компонентами для разработки продуктов, влияющих на процесс ранозаживления, ускоряя восстановление тканей и предотвращая осложнения, такие как воспаление или некроз.

На основе полученных результатов определено, что для дальнейших исследований методом *in vivo* будут использованы образцы 3 ГКСК, 6 ГКНЦ и 7 ГКСШ.

ГЛАВА 6 ПРОВЕДЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ ПО ИЗУЧЕНИЮ ЭФФЕКТИВНОСТИ И СВОЙСТВ ПОЛУЧЕННЫХ ОБРАЗЦОВ ГИДРОЛИЗАТА МЕТОДОМ *IN VIVO*

Исследование биологических эффектов образцов проведено на клинически здоровых животных – 40 мышах-самцах линии Balb/c – в возрасте 10 недель (ООО «СМК СТЕЗАР», Россия; ветеринарное свидетельство № 18579619692 от 12.04.2023).

После поступления в лабораторию мыши проходили карантин (с учетом периода адаптации к условиям лаборатории) сроком не менее 7 дней. Клинический осмотр животных в этот период осуществлялся ежедневно согласно СОП № Spf-02-05 «Процедура осмотра животных». По результатам осмотра заполнялись протоколы наблюдения за мышами. В конце карантина и периода адаптации заполнялся протокол допуска животных к эксперименту. В течение этого времени отклонений в здоровье мышей и признаков неблагополучия выявлено не было.

В исследовании использовали мышей массой ($M \pm m$) $19,87 \pm 2,04$ г (Me – 19,45 г; P25 – 18,48 г; P75 – 21,23 г) на начало эксперимента.

Каждому животному был присвоен индивидуальный номер, который наносился маркером на хвосты. Клетки были снабжены этикетками с указанием следующей информации, согласно СОП № Spf-02-02 «Размещение лабораторных животных в клетках»: номер клетки, количество и пол мышей, номер исследования, название препарата, способ его введения, доза, дата начала и окончания эксперимента.

После завершения периода адаптации необходимое количество животных, отвечающих критериям включения в исследование, были распределены на группы. Группы по 10 мышей формировали методом случайного отбора с использованием массы тела в качестве ведущего признака:

1 группа – контрольная: мыши, употреблявшие стандартный рацион;

2 группа – опытная: мыши, употреблявшие рацион, обогащенный образцом 1 (гидролизаты коллагена, выработанные из сырой кости крупного рогатого скота);

3 группа – опытная: мыши, употреблявшие рацион, обогащенный образцом 2 (гидролизаты коллагена, выработанные из ног цыплят-бройлеров);

4 группа – опытная: мыши, употреблявшие рацион, обогащенный образцом 3 (гидролизаты коллагена, выработанные из свиной шкурки).

Животных содержали в контролируемых условиях окружающей среды, при температуре воздуха 21 ± 2 °C и относительной влажности 50–60 %. Освещение в экспериментальных комнатах искусственное (12 часов – день, 12 часов – ночь), в соответствии с ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур» от 09.11.2015 (переиздание). Корма, оборудование и инвентарь для ухода за животными хранятся в помещениях, изолированных от мест их содержания.

Мыши находились в клетках из поликарбоната Bio. A.S. тип II (EHRET, Германия) по 5 голов. Для лабораторных животных использовался гигиенический подстил Лигноцель БК 8-15/LIGNOCEL (J. Rettenmaier & Sohne GMBH + CO KG, Германия). Смену подстилки осуществляли 1 раз в 8–10 суток.

Мыши всех групп употребляли питьевую воду *ad libitum*. Ее получали на установке водоподготовки EMD Millipore RiOs™ 50 (MerckMillipore, Германия), минерализацию осуществляли путем добавления минеральных солей для получения физиологически полноценного минерального состава (минерализация 314–382 мг/л: гидрокарбонаты – 144–180, сульфаты – < 1, хлориды – 60–76, кальций – 6, магний – 3, натрий – 50–58, калий – 50–58). Температура воды для поения составляла 10–12 °C.

Животные контрольной группы (1 группа) ежедневно употребляли стандартный полнорационный корм ПК 120 по ГОСТ 34566-2019 «Комбикорма полнорационные для лабораторных животных. Технические условия» (декларация

о соответствии № РОСС RU Д-RU.АА80.В.0305/20 до 04.11.2023; производитель АО «Гатчинский комбикормовый завод», Россия; поставщик ООО «Лабораторкорм», Россия; ветеринарное свидетельство № 18378495225 от 28.03.2023). Корм давали в кормовое углубление клетки.

Животные опытных групп (2,3,4 группы) ежедневно употребляли рацион, обогащенный экспериментальными образцами в количестве 15 % от общей калорийности. Расчет был проведен на основе того, что 1 мышь в сутки потребляет 11 ккал, а 15 % от общей калорийности составляет 3 ккал (1 г образца/мышь в сутки с учетом естественных потерь). После употребления исследуемых образцов животным 2–4 групп выдавали полнорационный комбикорм. Ежедневно осуществляли учет потребленного рациона и выпитой воды. Питательная ценность полнорационного комбикорма указана в таблице 6.1.

Таблица 6.1 – Питательная ценность полнорационного комбикорма

Наименование	Содержание, %
Влажность	13,50
Сырой протеин	19,00
Сырой жир	5,00
Сырая клетчатка	4,00
Сырая зола	7,00
Лизин	1,20
Метеонин + цистин	0,70
Са	0,90
Р	0,60
Триптофан	0,20
NaCl	0,36

Исследование проводилось в два этапа.

Этап I: кормление животных опытных групп исследуемыми образцами (в количестве 15 % от суточной потребности мыши в ккал) в течение 7 дней.

Наблюдения в этот период не показали каких-либо отклонений в физиологическом состоянии: мышцы были подвижны и активны; мышцы находились в тонусе; тактильная реакция сохранена; шерсть гладкая, чистая, блестящая, плотно прилегала к телу; кожный покров эластичный, без нарушения целостности; видимые слизистые оболочки бледно-розового цвета, истечений и признаков воспалительных реакций нет; глаза ярко-красного цвета; акты мочеиспускания и дефекации соответствовали физиологической норме.

Этап II: далее, на 8 день эксперимента, проводилось операционное моделирование плоскостных ран мышам всех групп.

В период после моделирования линейных ран состояние животных ежедневно фиксировалось в виде фотографий (представлены в приложении Р). Экспериментальные животные всех групп хорошо переносили раневое повреждение, воспалительных реакций зафиксировано не было. Сохранность всех мышей составляла 100 % в течение всего исследования, гибели животных не зафиксировано.

6.1 Влияние полученных образцов гидролизатов коллагена на динамику массы тела исследуемых животных

Гидролизаты коллагена могут оказывать влияние на массу тела через различные механизмы, включая улучшение состояния суставов, усиление синтеза мышечной ткани и повышение усвояемости питательных веществ. Динамика массы животных (в г) во время эксперимента представлена в таблице 6.1.2. Оценка проводилась с использованием медианы (Median), стандартного отклонения (SD), а также межквартильному диапазону (P25–P75) для каждой группы и временных интервалов. Для статистической значимости (P) указаны значения в сравнении с контрольной группой.

Статистически значимых отклонений массы животных групп 1, 3 и 4 относительно контрольных мышей во время эксперимента выявлено не было, в то время как масса мышей группы 2, которые употребляли образец 1, на 7 день была ниже контрольных значений на 10 % ($P = 0,063$), а на 10 день – на 15 % ($P = 0,063$). Суммарный привес за весь период исследования отрицательный (снижение массы на 11 % за время эксперимента). На момент завершения исследования масса мышей группы 2, несмотря на отсутствие статистически значимого различия, была ниже массы контрольных животных на 14 %.

Таблица 6.1.2 – Показатели массы тела животных во время эксперимента

Сутки	Характеристики выборки	Группы			
		1 (контроль; n = 10)	2 (образец 1; n = 10)	3 (образец 2; n = 10)	4 (образец 3; n = 10)
1	Median $\pm$ SD	19,45 $\pm$ 0,72	19,75 $\pm$ 2,84	19,70 $\pm$ 2,30	20,00 $\pm$ 2,04
	P 25–P75	[19,03–20,33]	[17,80–21,75]	[17,98–21,65]	[18,30–21,23]
4	Median $\pm$ SD	19,60 $\pm$ 1,03	18,50 $\pm$ 2,80	20,20 $\pm$ 2,67	20,30 $\pm$ 2,52
	P 25–P75	[18,98–20,55]	[16,55–20,50]	[18,20–22,28]	[17,68–21,98]
7	Median $\pm$ SD	20,30 $\pm$ 1,03	18,20 $\pm$ 3,08*	19,05 $\pm$ 2,35	19,90 $\pm$ 2,51
	P 25–P75	[19,50–20,85]	[15,95–20,03]	[18,15–21,05]	[18,23–21,63]
10	Median $\pm$ SD	19,80 $\pm$ 0,74	16,85 $\pm$ 2,69*	18,95 $\pm$ 2,57	19,30 $\pm$ 2,31
	P 25–P75	[19,10–20,08]	[15,25–19,70]	[17,85–20,70]	[18,15–21,05]
13	Median $\pm$ SD	19,15 $\pm$ 0,83	17,30 $\pm$ 2,85	19,75 $\pm$ 1,42	19,55 $\pm$ 2,35
	P 25–P75	[18,78–19,65]	[15,45–20,20]	[18,73–20,88]	[18,88–21,33]
16	Median $\pm$ SD	20,50 $\pm$ 1,18	17,55 $\pm$ 2,68	19,75 $\pm$ 1,39	20,15 $\pm$ 2,17
	P 25–P75	[20,23–20,75]	[15,60–19,98]	[18,75–20,63]	[19,25–21,28]

Примечание: * – согласно непараметрическому критерию Манна-Уитни, значение достоверно ($P < 0,01$) отличалось от контроля.

Результат оценки массы тела животных показывает следующее: образец 1 (экспериментальная группа 2) оказывает отрицательное влияние на массу тела животных, что может свидетельствовать о его неблагоприятном эффекте или недостаточной питательной ценности. Образцы 2 и 3 (экспериментальные группы 3 и 4) не оказывают значимого влияния на массу тела или способствуют ее стабилизации / увеличению, что может говорить о нейтральных или положительных эффектах на организм животных.

6.2 Биохимические и морфологические показатели сыворотки крови лабораторных животных

Исследование биохимических и морфологических показателей сыворотки крови лабораторных мышей при скормливании гидролизатов коллагена имеет большое научное и прикладное значение. Оно позволяет оценить влияние таких продуктов на метаболизм, общее состояние организма и выявить потенциальные риски или полезные эффекты.

Результаты цитометрического анализа крови животных экспериментальных групп на 16 день исследований представлены в таблице 6.2.1.

Таблица 6.2.1 – Цитометрический анализ крови животных экспериментальных групп

Показатели		Группы			
		1 (контроль; n = 10)	2 (образец 1; n = 10)	3 (образец 2; n = 10)	4 (образец 3; n = 10)
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	Median ± SD	6,61 ± 2,20	5,78 ± 2,25	8,22 ± 2,73	5,68 ± 2,15
	P 25–75	5,40–8,55	4,58–7,43	6,09–9,15	4,73–8,20
Лимфоциты, 10 ⁹ /л	Median ± SD	4,79 ± 1,79	3,72 ± 1,57	6,06 ± 1,97	3,86 ± 1,81
	P 25–75	3,60–6,45	2,43–4,61	3,98–6,67	3,48–6,33
Моноциты, 10 ⁹ /л	Median ± SD	0,20 ± 0,09	0,23 ± 0,12	0,35 ± 0,25	0,23 ± 0,18
	P 25–75	0,19–0,23	0,14–0,32	0,23–0,48	0,17–0,37
Гранулоциты, 10 ⁹ /л	Median ± SD	1,73 ± 0,50	1,92 ± 0,85	1,58 ± 1,03	1,32 ± 0,41
	P 25–75	1,44–2,12	1,51–2,35	1,39–2,13	1,09–1,46
Лимфоциты, %	Median ± SD	72,65 ± 4,84	63,90 ± 10,10*	69,38 ± 7,29	73,44 ± 5,55
	P 25–75	69,76–75,50	57,67–66,91	61,37–74,64	71,51–75,63
Моноциты, %	Median ± SD	3,03 ± 1,23	4,39 ± 1,20	4,21 ± 3,54	4,63 ± 1,50
	P 25–75	2,17–4,74	3,38–4,85	3,88–4,95	3,65–5,18
Относительное содержание гранулоцитов, %	Median ± SD	24,32 ± 5,13	31,44 ± 10,01*	26,00 ± 7,07	22,27 ± 6,33
	P 25–75	20,36–26,33	29,34–38,95	19,76–29,07	18,19–24,84

Примечание: * – согласно непараметрическому критерию Манна-Уитни, значение достоверно ($P < 0,05$) отличалось от контроля.

По сравнению с показателями контрольной группы в крови животных групп 2 и 4 наблюдалась тенденция к снижению концентрации лейкоцитов на 12,6 % ($P > 0,05$) и 14,1 % ($P > 0,05$) соответственно, в то время как в крови животных группы 3 данный показатель был выше, чем у контроля на 24,4 % ($P > 0,05$). Однако отмеченные изменения не были статистически достоверными из-за больших межквартильных размахов показателя. Похожие эффекты наблюдались и в отношении показателя концентрации лимфоцитов: по сравнению с контрольной группой в крови мышей групп 2 и 4 концентрация лимфоцитов была ниже на 22,3 % ($P > 0,05$) и 19,4 % ($P > 0,05$) соответственно, а в крови животных группы 3 – выше на 26,5 % ($P > 0,05$), что также не было статистически значимыми изменениями.

Показатели концентраций моноцитов и гранулоцитов в крови подопытных групп 2, 3 и 4 статистически значимо не отличались от контроля, однако в крови мышей группы 3 была отмечена тенденция к увеличению концентрации моноцитов в 1,75 раза ($P > 0,05$).

По сравнению с контрольной группой в крови животных группы 2 было выявлено статистически значимое снижение относительного содержания лимфоцитов на 12,0 % ($P < 0,05$), чего не было отмечено в крови мышей других опытных групп. Вместе с этим в крови животных группы 2 статистически значимо возрастало относительное содержание гранулоцитов – на 29,3 % ($P < 0,05$) по сравнению с контролем.

Результаты биохимического анализа плазмы крови животных экспериментальных групп представлены в таблице 6.2.2.

Таблица 6.2.2 – Биохимический анализ плазмы крови животных экспериментальных групп

Показатели		Группы			
		1 (контроль; n = 10)	2 (образец 1; n = 10)	3 (образец 2; n = 10)	4 (образец 3; n = 10)
Белок, г/л	Median $\pm$ SD	52,30 $\pm$ 2,94	52,10 $\pm$ 5,80	52,95 $\pm$ 2,27	51,30 $\pm$ 2,56
	P 25–75	50,10–55,40	48,60–54,50	51,00–54,70	49,30–53,90
Альбумин, г/л	Median $\pm$ SD	26,75 $\pm$ 1,24	27,40 $\pm$ 2,38	27,45 $\pm$ 1,50	27,65 $\pm$ 1,27
	P 25–75	25,70–27,60	26,40–28,00	27,30–28,00	27,10–28,80
Креатинин, мкмоль/л	Median $\pm$ SD	41,95 $\pm$ 3,15	34,53 $\pm$ 3,78*	34,20 $\pm$ 2,38*	37,18 $\pm$ 2,75*
	P 25–75	37,00–43,50	32,10–38,60	33,30–36,10	34,80–39,30
Мочевина, ммоль/л	Median $\pm$ SD	7,50 $\pm$ 0,86	9,20 $\pm$ 2,50*	7,20 $\pm$ 1,26	9,70 $\pm$ 1,89
	P 25–75	7,10–8,10	8,20–12,70	6,30–8,70	7,80–10,80
АСТ, Ед/л	Median $\pm$ SD	90,20 $\pm$ 25,88	107,20 $\pm$ 35,80	86,80 $\pm$ 48,80	99,65 $\pm$ 30,88
	P 25–75	87,10–96,00	94,70–125,40	72,80–148,50	83,50–120,90
АЛТ, Ед/л	Median $\pm$ SD	45,55 $\pm$ 4,98	52,20 $\pm$ 16,91	51,90 $\pm$ 42,31	52,60 $\pm$ 6,40*
	P 25–75	41,70–49,30	45,20–62,10	41,40–58,40	48,40–59,30

Примечание: * – согласно непараметрическому критерию Манна-Уитни, значение достоверно ($P < 0,05$) отличалось от контроля.

Статистически значимых изменений концентраций белка и альбумина в плазме крови животных групп 2, 3 и 4 по сравнению с контрольной группой выявлено не было. Концентрация же креатинина статистически достоверно снижалась в сравнении с контролем. Так, в плазме крови животных группы 2 этот показатель был ниже на 17,7 % ($P < 0,05$), группы 3 – на 18,5 % ($P < 0,05$), группы 4 – на 11,4 % ($P < 0,05$). Вместе с этим в плазме крови животных группы 2 было отмечено статистически значимое увеличение концентрации мочевины на 22,7 % ($P < 0,05$) по сравнению с контрольной группой. В плазме крови животных группы 4 также наблюдалась тенденция к увеличению концентрации мочевины, однако это не было статистически значимым изменением.

Ввиду больших межквартильных размахов показателя АСТ статистически достоверных отличий от контроля в плазме крови животных опытных групп не выявлено, но у животных группы 2 была отмечена тенденция к повышению активности АСТ на 18,8 % ($P > 0,05$). Активность АЛТ в плазме крови в сравнении с контролем увеличивалась у всех опытных групп, однако

статистически значимо активность АЛТ возросла лишь в плазме крови животных группы 4 – на 15,5 % ($P < 0,05$).

6.3 Некрoскопические и гистологические исследования лабораторных животных

После моделирования линейных ран состояние мышей ежедневно фиксировалось в виде фотографий (приложение Р). Экспериментальные животные всех групп хорошо переносили раневое повреждение, воспалительных реакций зафиксировано не было. Сохранность мышей всех групп составляла 100 % в течение всего исследования, гибели животных не зафиксировано.

Далее проводили исследование тензиометрического тестирования раневой поверхности мышей по завершении эксперимента. Таблица 6.3.1 содержит данные по механическим свойствам раневой поверхности мышей с учетом использования различных образцов гидролизатов коллагена.

Таблица 6.3.1 – Тензиометрическое тестирование раневой поверхности животных экспериментальных групп по завершении исследования

Характеристики выборки	Группы			
	1 (контроль; n = 10)	2 (образец 1; n = 10)	3 (образец 2; n = 10)	4 (образец 3; n = 10)
Median $\pm$ SD	70,0 $\pm$ 16,9	67,5 $\pm$ 14,1	115,0 $\pm$ 27,9*	132,5 $\pm$ 38,5*
P 25–P75	[55,0–81,3]	[61,3–85,0]	[95,0–135,0]	[112,5–148,8]
P (отношение 1 группы)	–	0,818	0,015	0,041

Примечание: * – согласно непараметрическому критерию Манна-Уитни, значение достоверно ($P < 0,05$) отличалось от контроля.

Проведенные тензиометрические измерения показали, что употребление экспериментальных образцов 2 и 3 способствовало увеличению прочности рубца: масса груза, необходимая для разрыва рубца, для группы 3 увеличивалась

на 64,0 %, для группы 4 – на 89,0 % по сравнению с показателями контрольных мышей. Прочность рубца животных группы 2, которые употребляли образец 1, соответствовала значениям контрольных мышей.

Таким образом, использование образцов 2 и 3 приводит к статистически значимому улучшению механических свойств раневой поверхности мышей по сравнению с контрольной группой. Образец 1 не продемонстрировал значимого эффекта. Наиболее выраженный результат показал образец 3, что указывает на его потенциальную эффективность в заживлении ран.

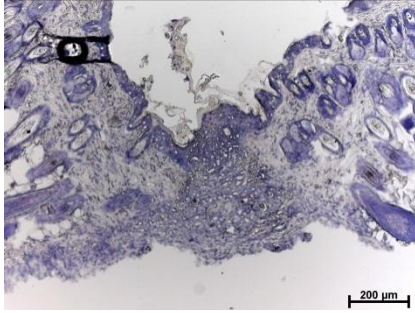
При гистологическом исследовании раневой поверхности 4 групп было выявлено, что края ран срослись у всех животных, и отмечалась полная эпителизация (рисунок 6.3.1).

По краям ран мышей контрольной группы наблюдалось истончение эпидермиса с одновременным разрастанием под эпителием молодой рубцовой соединительной ткани с большим количеством клеток (макрофаги, фибробласты), горизонтально ориентированными волокнами и выраженной васкуляризацией. Толщина рубцовой ткани составила 170–200 мкм.

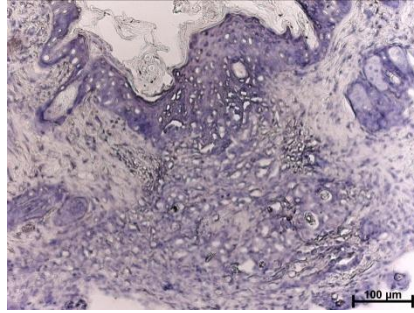
У лабораторных животных группы 2, которые употребляли образец 1, на поверхности ран сформировался ровный эпителиальный пласт, состоящий из 10–12 рядов клеток. Под эпителием была расположена молодая рубцовая соединительная ткань с большим количеством клеток (макрофаги, фибробласты) и волокон. Сосуды микроциркуляторного русла мелкие. Толщина рубцовой ткани – 100–120 мкм.

На поверхности ран мышей группы 3, которые употребляли образец 2, сформировался ровный эпителиальный пласт, состоящий из 7–8 рядов клеток. Под эпителием расположена рубцовая соединительная ткань, в которой преобладает волокнистый компонент. Мелкие капилляры единичны. Толщина рубцовой ткани составила 70–90 мкм.

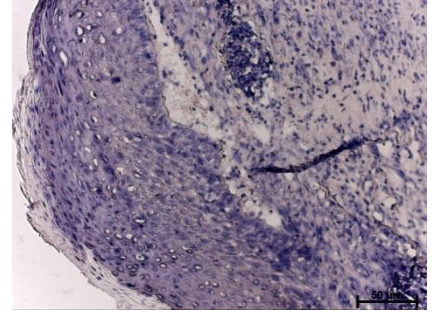
Группа 1 (контроль)



(об. 10×, масштаб 200 мкм)

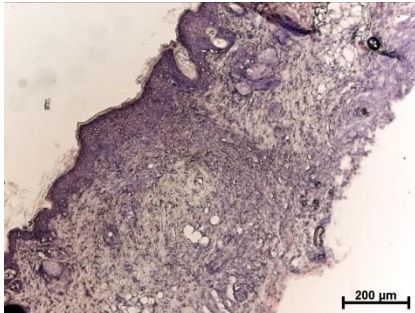


(об. 20×, масштаб 100 мкм)

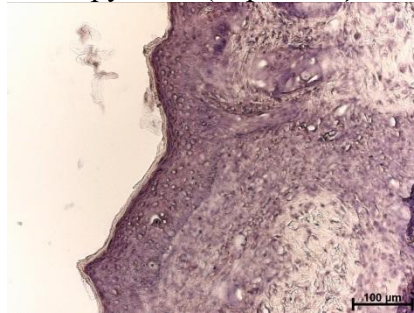


(об. 40×, масштаб 50 мкм)

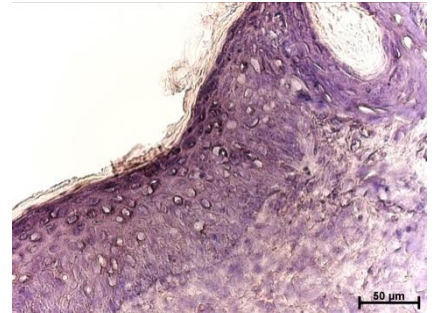
Группа 2 (образец 1)



(об. 10×, масштаб 200 мкм)

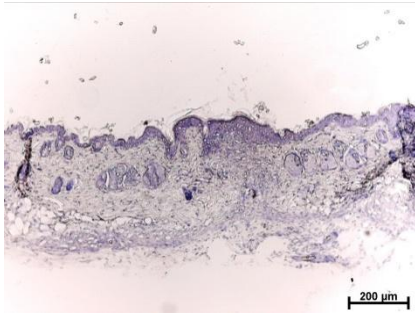


(об. 20×, масштаб 100 мкм)

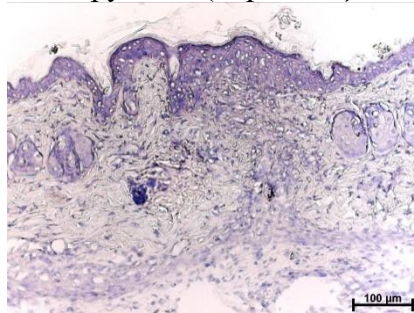


(об. 40×, масштаб 50 мкм)

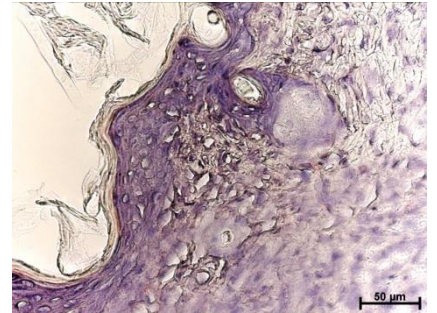
Группа 3 (образец 2)



(об. 10×, масштаб 200 мкм)

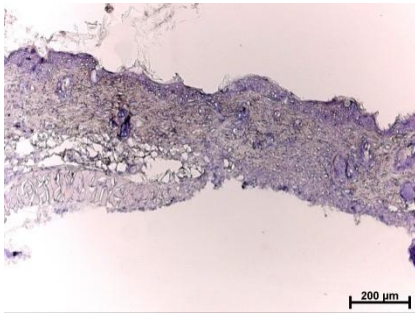


(об. 20×, масштаб 100 мкм)

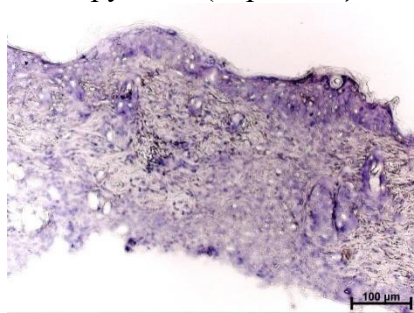


(об. 40×, масштаб 50 мкм)

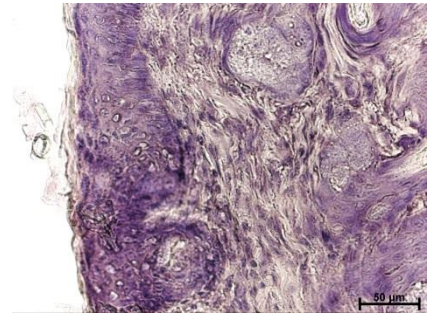
Группа 4 (образец 3)



(об. 10×, масштаб 200 мкм)



(об. 20×, масштаб 100 мкм)



(об. 40×, масштаб 50 мкм)

Примечание: окрашивание проводилось гематоксилином и эозином.

Рисунок 6.3.1 – Снимки гистологических срезов раневой области кожи

У подопытных группы 4, которые употребляли образец 3, на поверхности ран также сформировался ровный эпителиальный пласт, состоящий из 7–8 рядов клеток. Под эпителием располагалась рубцовая соединительная ткань, которая представлена параллельными плотными пучками коллагеновых волокон и небольшим количеством клеток. Толщина рубцовой ткани – 70–90 мкм, наиболее выражена контракция области повреждения, при этом отмечено образование волосяных фолликулов и сальных желез, что свидетельствует о восстановлении функциональности кожного покрова.

После проведения аутопсии на заключительном этапе исследовали полученные данные об относительной массе внутренних органов мышей (в % от общей массы тела) для разных групп эксперимента (таблица 6.3.2).

Таблица 6.3.2 – Относительная масса внутренних органов мышей

Орган	Характеристики выборки	Группы			
		1 (контроль; n = 10)	2 (образец 1; n = 10)	3 (образец 2; n = 10)	4 (образец 3; n = 10)
Тимус	Median $\pm$ SD	0,180 $\pm$ 0,069	0,113 $\pm$ 0,099	0,186 $\pm$ 0,061	0,129 $\pm$ 0,073
	P 25–75	[0,145–0,230]	[0,061–0,141]	[0,154–0,203]	[0,122–0,147]
Сердце	Median $\pm$ SD	0,601 $\pm$ 0,067	0,657 $\pm$ 0,127	0,612 $\pm$ 0,126	0,684 $\pm$ 0,077*
	P 25–75	[0,563–0,636]	[0,598–0,767]	[0,572–0,768]	[0,643–0,750]
Селезенка	Median $\pm$ SD	0,598 $\pm$ 0,113	0,557 $\pm$ 0,140	0,596 $\pm$ 0,154	0,684 $\pm$ 0,155*
	P 25–75	[0,511–0,689]	[0,492–0,630]	[0,548–0,613]	[0,603–0,764]
Почка	Median $\pm$ SD	0,742 $\pm$ 0,177	0,786 $\pm$ 0,077	0,739 $\pm$ 0,046	0,777 $\pm$ 0,064
	P 25–75	[0,665–0,805]	[0,750–0,792]	[0,699–0,769]	[0,740–0,817]
Печень	Median $\pm$ SD	4,574 $\pm$ 0,256	4,551 $\pm$ 0,275	4,445 $\pm$ 0,423	4,758 $\pm$ 0,314
	P 25–75	[4,492–4,897]	[4,442–4,788]	[4,181–4,516]	[4,609–4,810]

Примечание: * – согласно непараметрическому критерию Манна-Уитни, значение достоверно ($P < 0,01$) отличалось от контроля.

По завершении исследования результаты аутопсии и макроскопического исследования внутренних органов мышей не показали выраженных различий между группами 1, 3 и 4.

При внешнем осмотре у животных всех групп шерсть была блестящей, опрятного вида, без алопций, выделения из естественных отверстий отсутствовали. Раневая поверхность чистая, без загрязнений и выделений. Передние и задние конечности без изменений. Видимые слизистые оболочки бледные, блестящие и гладкие, зубы сохранены.

При осмотре грудной и брюшной полостей нарушений в положении внутренних органов не отмечено, листки плевры, перикарда и брюшины тонкие, блестящие, гладкие. Лимфатические узлы и слюнные железы без изменений – овальной формы, однородного розовато-желтоватого цвета, умеренной плотности. Тимус беловато-бежевого цвета, умеренной плотности. Сердце и аорта без изменений, коронарные сосуды умеренно инъецированы. Легкие спадались при вскрытии грудной клетки, их величина и форма не изменены, поверхность однородная, бледно-розовая, сосуды умеренно инъецированы. Слизистая оболочка пищевода блестящая, гладкая, бледного цвета. Величина и форма желудка не изменена, слизистая блестящая, гладкая, розоватого цвета, признаков местно-раздражающего действия не отмечено, просвет желудка заполнен содержимым. Все отделы кишечника – двенадцатиперстная, тонкая и толстая кишки – без изменений, слизистая блестящая, гладкая, бледно-розовая с сероватым оттенком. Форма и величина печени не изменены, капсула тонкая, прозрачная, поверхность гладкая, однородной темно-красной окраски. Поджелудочная железа без изменений, дольчатого строения, бледно-розовая, умеренно плотная. Размеры и форма селезенки без изменений, поверхность однородная, темно-вишневая, гладкая, умеренно плотная. Почки без изменений, поверхность гладкая, однородная, серовато-коричневатого цвета, умеренно-плотные, на разрезе хорошо различимо разделение на корковое и мозговое вещество.

Мочевой пузырь не изменен, заполнен прозрачной, светлой мочой, слизистая оболочка гладкая, блестящая, бледноватой окраски. Форма, размеры и плотность яичников также без изменений. Оболочки головного мозга тонкие, прозрачные, мозг без изменений, умеренной плотности, поверхность гладкая, расширения желудочков не выявлено.

У животных группы 2 обнаружено полное перерождение тимуса у двух животных, при этом состояние остальных органов соответствовало норме.

Масса анализируемых внутренних органов соответствует физиологической норме для данного вида, возрасту и полу. Несмотря на отсутствие тимусов у двух животных группы 2 и его сниженную относительную массу на 37 %, различие было статистически незначимым ($P = 0,165$). Показатели мышей группы 3 соответствовали параметрам контрольных мышей. Выявлено увеличение относительной массы сердца животных группы 4, которые употребляли образец 3, на 14 % ($P = 0,035$) и селезенки на 14 % ($P = 0,089$).

Таким образом, образец 3 демонстрирует положительное влияние на массу сердца и селезенки, что может свидетельствовать о его стимулирующем эффекте на функции этих органов. Образец 1 оказывает негативное влияние на тимус, что может указывать на подавление иммунной системы. Печень и почки относительно стабильны по массе во всех группах, что свидетельствует об отсутствии значительного влияния гидролизатов на эти органы.

6.4 Заключение по главе

В результате проведенного исследования было выявлено, что употребление экспериментального образца 1 (15 % от суточной потребности в ккал) мышами группы 2 приводило к следующим биологическим эффектам:

- потеря массы, начиная с 7 дня исследования;

- снижение массы на 11 % за все время эксперимента;
- сокращение относительного содержания лимфоцитов при увеличении относительного содержания гранулоцитов (на 29,3 %), что с учетом снижения массы животных может говорить о возможной пищевой непереносимости или пищевой аллергии на данный образец (предположительно, данный образец является эффективным компонентом препарата для похудения, улучшая метаболизм, поддерживая мышечную массу и предотвращая деградацию кожи при снижении веса);
- негативное влияние на иммунную систему, которое подтверждается результатами вскрытия: обнаружено снижение относительной массы тимуса на 37 %, при полной его редукции у 20 % мышей;
- повышение активности АСТ, свидетельствующее о негативном влиянии на печень;
- влияния на прочность рубца и ранозаживление выявлено не было;
- гистологически показано образование ровного эпителиального пласта клеток (10–12 рядов новых клеток), под эпителием – молодая рубцовая соединительная ткань (толщина – 100–120 мкм) и волокна с мелкими сосудами микроциркулярного русла.

Употребление экспериментального образца 2 (15 % от суточной потребности в ккал) мышами группы 3 приводило к следующим биологическим эффектам:

- динамика массы соответствовала норме;
- показатели крови находились в пределах нормы;
- параметры внутренних органов соответствовали параметрам контрольных мышей;
- выраженное положительное влияние на степень ранозаживления: масса груза, необходимого для разрыва рубца, увеличивалась на 64,0 %;
- эпителиальный пласт состоял из 7–8 рядов клеток, в рубцовой ткани (толщина – 70–90 мкм) преобладали волокна с единичными капиллярами.

Употребление экспериментального образца 3 (15 % от суточной потребности в ккал) мышами группы 4 приводило к следующим биологическим эффектам:

- динамика массы соответствовала норме;
- стимулирующее влияние на иммунную систему: повышение концентрации лейкоцитов на 24,4 % и моноцитов в 1,75 раза, что подтверждается увеличением относительной массы селезенки на 14 %;
- влияние на сердечно-сосудистую систему: активность АЛТ повышалась на 15,5 %, при этом активность АСТ не изменялась (что исключает негативное влияние на печень), при этом выявлено увеличение относительной массы сердца на 14 %;
- выраженное положительное влияние на степень ранозаживления: масса груза, необходимого для разрыва рубца, увеличивалась на 89,0 %;
- эпителиальный пласт состоял из 7–8 рядов клеток, в рубцовой ткани (толщина – 70–90 мкм) преобладали параллельные плотные пучки коллагеновых волокон;
- наибольшее восстановление функциональности кожного покрова (образование волосяных фолликулов и сальных желез).

Отдельно стоит отметить, что все исследуемые образцы оказывают влияние на уровень креатинина, снижая его для животных всех групп (от 11 до 18 %). Вероятно, это происходит за счет увеличения скорости фильтрации крови почками. При этом иных подтверждений данной теории не выявлено, т. к. состояние почек у мышей опытных групп соответствовало норме.

ГЛАВА 7 ПРАКТИЧЕСКАЯ РЕАЛИЗАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данная глава диссертационного исследования посвящена разработке технологических схем производства гидролизатов коллагена из коллагенсодержащего сырья разработанными методами, выявлению потенциально опасных рисков в процессе производства и расчету экономического эффекта при внедрении разработанных технологий в производство.

7.1 Технологические схемы производства гидролизатов коллагена из коллагенсодержащего сырья методом ферментативного гидролиза и баромембранными технологиями

В данном разделе исследований представлены технологические схемы производства гидролизатов коллагена из коллагенсодержащего сырья вторичных продуктов переработки продукции животного происхождения методом ферментативно-кислотного и ферментативно-щелочного гидролиза с применением технологии ультрафильтрации на этапе концентрирования.

На рисунке 7.1.1 представлен процесс получения гидролизатов коллагена из сырой кости крупного рогатого скота. Так, на этапе подготовки костное сырье подвергается измельчению и обезжириванию, затем снова измельчается до размеров не более 15 мм. Обезжиривание костного шрота происходит ферментным методом с помощью 0,15 % от массы сырья иммобилизованной липазы при температуре воды 60 ± 2 °C в течение 2 ч и pH раствора $7,0 \pm 0,2$.

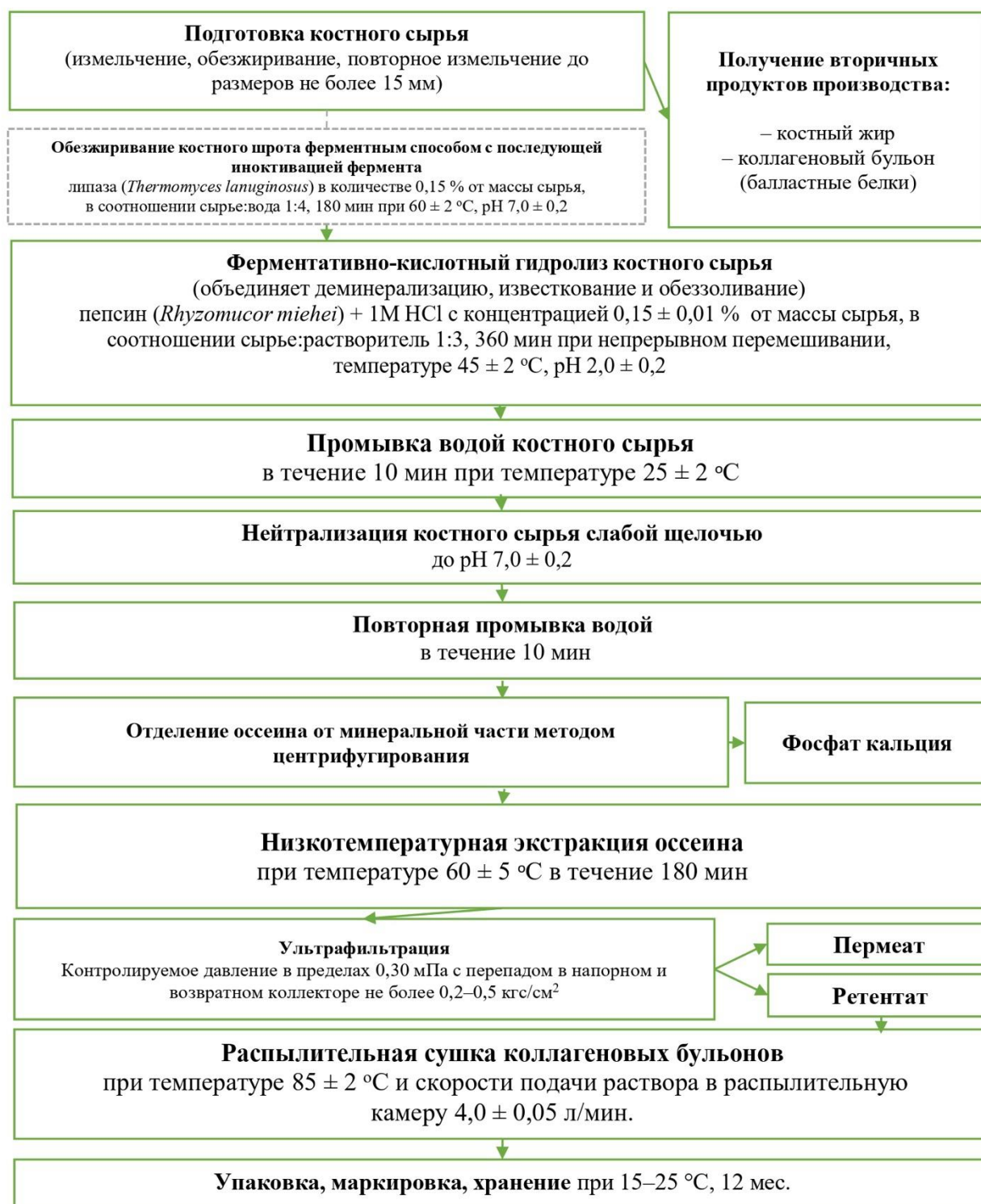


Рисунок 7.1.1 – Принципиальная технологическая схема производства гидролизатов коллагена из сырой кости КРС

Помимо этого, на этапе подготовки вырабатываются сопутствующие продукты. Под гидротермическим и ферментным воздействием из сырья выделяются костный жир (массовая доля влаги готового продукта составляет не

более 1,5 %) и бульон, состоящий из балластных белков, которые остаются после удаления жировых компонентов из исходного материала (костного сырья и хрящей).

Далее сырье подвергается ферментативно-кислотному гидролизу, который включает в себя процесс деминерализации, известкования и обеззоливания. Для гидролиза используются пепсин (*Rhizomucor miehei*) и раствор 1М HCl. Концентрация фермента составляет 0,15 % от массы сырья. Соотношение сырья и растворителя – 1:3 по массе/объему. Процесс длится 360 мин при температуре 45 ± 2 °C с непрерывным перемешиванием. После гидролиза смесь промывается водой в течение 10 мин. Далее применяется слабая щелочь для нейтрализации кислотности, затем смесь снова промывается водой и подвергается центрифугированию при 3000 об/мин в течение 5 мин для отделения твердых и жидких фаз. В процессе центрифугирования происходит разделение на фракции – оссеин и фосфат кальция. Первый в последующем экстрагируется при температуре 60 ± 5 °C в течение 180 мин.

На следующем этапе происходит процесс ультрафильтрации при контролируемом давлении 0,30 мПа с перепадом давления не более 0,2–0,5 кгс/см². В процессе ультрафильтрации образуется пермеат и ретентат, который является концентратом коллагенового раствора.

Коллагеновый раствор (ретентат) подвергается распылительной сушке при температуре 85 ± 2 °C и скорости подачи раствора $4,0 \pm 0,05$ л/мин. На заключительном этапе продукт подвергается упаковке, маркировке и хранению при температуре от 15 до 25 °C в течение 12 мес.

В процессе получают вторичные продукты, такие как костный жир и фосфат кальция.

Представленные технологические этапы позволяют получать гидролизаты коллагена из костного сырья крупного рогатого скота, которые могут быть использованы в различных отраслях, таких как пищевая и фармацевтическая промышленности.

Схема, представленная на рисунке 7.1.2 описывает процесс получения гидролизатов коллагена из мясокостного сырья ног цыплят-бройлеров. Подготовка сырья начинается с промывки проточной водой с целью его очистки. Далее происходит измельчение сырья до гомогенной массы. Обезжиривание производится ферментом липаза в количестве 0,15 % от массы сырья при температуре 60 ± 2 °C и pH $7,0 \pm 0,2$.

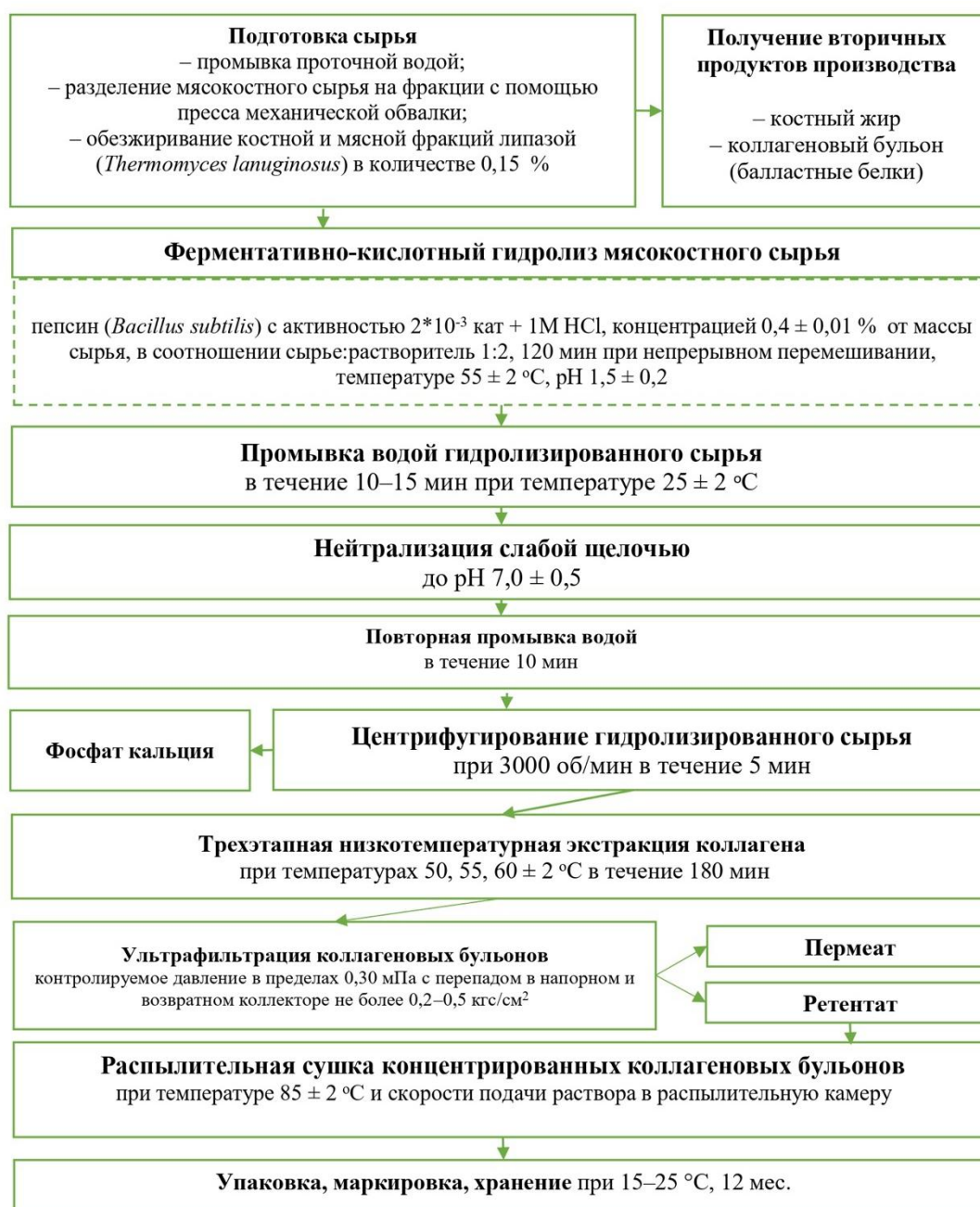


Рисунок 7.1.2 – Принципиальная технологическая схема производства гидролизатов коллагена из ног цыплят-бройлеров

В процессе ферментативно-кислотного гидролиза мясокостного сырья используются пепсин и раствор 1М HCl. Концентрация фермента составляет 0,4 % от массы сырья, соотношение сырья и растворителя – 1:3 по массе/объему, рН $2,0 \pm 0,2$. Процесс длится 360 мин при температуре $45 \pm 0,5$ °С с непрерывным перемешиванием и рН $2,0 \pm 0,2$.

После процесса ферментативно-кислотного гидролиза происходит промывка водой полученной смеси в течение 10–15 мин. Далее следует процесс нейтрализации слабой щелочью до рН $7,0 \pm 0,5$. После чего смесь подвергается центрифугированию при 3000 об/мин в течение 5 мин для отделения твердых и жидких фаз.

С целью более мягкого разрушения клеточных и тканевых структур без значительных потерь белков, т. е. для сохранения их функциональных свойств, таких как растворимость и биоактивность, проводится процесс трехэтапной низкотемпературной экстракции при 50 ± 2 °С, 55 ± 2 °С и 60 ± 2 °С в течение 180 мин.

После процесса трехэтапной низкотемпературной экстракции коллагеновые бульоны подвергаются ультрафильтрации при контролируемом давлении 0,30 мПа с перепадом давления в напорном и возвратном коллекторах. В процессе ультрафильтрации образуется пермеат и ретентат.

Далее проводится распылительная сушка концентрата коллагенового раствора при 85 °С и скорости подачи раствора $4,0 \pm 0,05$ л/мин.

На заключительном этапе продукт подвергается упаковке, маркировке и хранению при температуре от 15 до 25 °С в течение 12 мес.

На рисунке 7.1.3 представлен процесс переработки свиных шкурок для получения гидролизатов коллагена. На первом этапе происходит подготовка мягкого коллагенсодержащего сырья – мездрение и измельчение свиных шкурок. Далее – промывка шкурок в теплой воде в течение 10 мин.

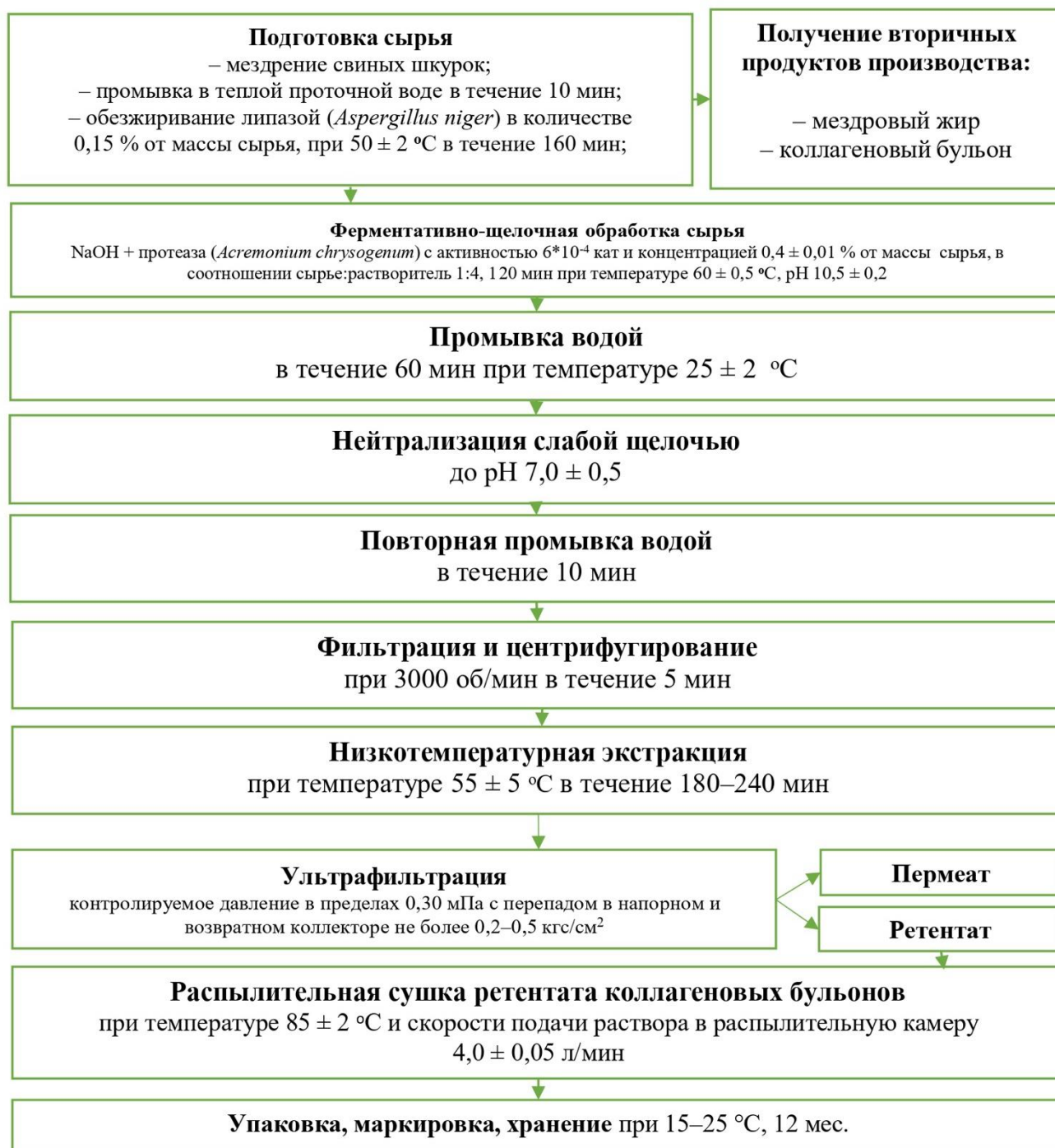


Рисунок 7.1.3 – Принципиальная технологическая схема производства гидролизатов коллагена из свиных шкурок

Затем осуществляется обезжиривание при температуре 50 ± 2 °C в течение 160 мин. После этого процесса происходит механическая резка шкурок размером 0,5 × 0,5 см.

Далее реализуется процесс ферментативно-щелочной обработки сырья: шкурки обрабатываются NaOH и протеазой *Acremonium chrysogenum* (концентрация – 0,4 % от массы сырья) в течение 120 мин, соотношение сырья и растворителя 1:4. Обработка производится при температуре $60 \pm 0,5$ °C, pH $10,5 \pm 0,2$. После чего осуществляется промывание сырья водой при температуре не выше 25 °C в течение 60 мин.

После процесса ферментативно-щелочной обработки сырье необходимо нейтрализовать: pH раствора доводится до $7,0 \pm 0,5$. Далее происходит повторная промывка водой при температуре воды не выше 25 °C в течение 10 мин.

На следующем этапе смесь фильтруется и центрифугируется при 3000 об/мин для отделения твердых частиц. Затем осуществляется процесс низкотемпературной экстракции при 55 ± 5 °C в течение 180–240 мин для извлечения белков и других веществ.

Далее проводится ультрафильтрация коллагенового раствора при контролируемом давлении 0,30 мПа с перепадом давления в напорном и возвратном коллекторах. В процессе ультрафильтрации образуется пермеат и ретентат.

На заключительном этапе осуществляется распылительная сушка коллагенового концентрата раствора при 85 °C и скорости подачи раствора $4,0 \pm 0,05$ л/мин.

На заключительном этапе продукт подвергается упаковке, маркировке и хранению при температуре от 15 до 25 °C в течение 12 мес.

Конечный продукт в результате реализации предлагаемых технологий представлен гидролизатами коллагена, обладающими биоактивными свойствами. В таблице 7.1.1 отражены физико-химические показатели и биоактивные свойства гидролизатов коллагена, полученных по разработанным технологиям (рисунки 7.1.1–7.1.3).

Таблица 7.1.1 – Физико-химические показатели и биоактивные свойства гидролизатов коллагена, полученных по разработанным технологиям

Показатель	Образец гидролизата коллагена		
	из сырой кости КРС	из ног цыплят-бройлеров	из свиной шкурки
Массовая доля сухих веществ, %	89,25 ± 0,14	86,25 ± 0,12	86,47 ± 0,10
Массовая доля белка, %	88,25 ± 0,10	87,20 ± 0,08	84,56 ± 0,11
Массовая доля золы, %	0,72 ± 0,12	0,32 ± 0,05	0,2 ± 0,02
Массовая доля влаги, %	10,60 ± 0,07	10,83 ± 0,07	10,94 ± 0,06
Массовая доля жира, %	0,1 ± 0,01	0,3 ± 0,01	0,2 ± 0,01
Прозрачность раствора (массовая доля гидролизата коллагена – 5 %), %	84,0 ± 0,2	88,0 ± 0,2	87,0 ± 0,2
рН раствора с массовой долей гидролизата коллагена 1 %	6,80 ± 0,1		
Посторонние примеси	—		
Выявленные биоактивные свойства <i>in vivo</i>	—	выраженное положительное влияние на степень ранозаживления	влияние на иммунную систему; выраженное положительное влияние на степень ранозаживления; восстановление функциональности кожного покрова

Гидролизаты коллагена из различных источников имеют схожие показатели влажности, но различаются по массовой доле сухих веществ, белка и золы. Так, гидролизат из сырой кости КРС имеет наибольшую массовую долю сухих веществ и белка, что указывает на высокое качество белков в этом образце. Наименьшая доля золы и жира в образце из свиной шкурки свидетельствует о его чистоте и хорошем качестве. Кроме того, выработанные гидролизаты коллагена не содержат посторонних примесей, что подтверждает их высокое качество.

7.2 Выявление потенциальных рисков в процессе производства гидролизатов коллагена из вторичных сырьевых ресурсов животного происхождения

Процесс производства гидролизатов коллагена из вторичных сырьевых ресурсов животного происхождения, таких как кости, шкурка и другие соединительные ткани, сопряжен с рядом потенциальных рисков. Выявление этих рисков и управление ими имеют критическую важность для обеспечения безопасности и эффективности производства. Таким образом, данный раздел диссертационной работы посвящен обнаружению потенциальных рисков в процессе производства гидролизатов коллагена из вторичных сырьевых ресурсов животного происхождения, а также мерам их контроля и предотвращения.

7.2.1 Составление перечня всех потенциально возможных опасностей

Согласно п. 8.5.2 ГОСТ Р ИСО 22000-2019 [30], «группа безопасности пищевой продукции должна на основе предварительной информации проводить анализ опасностей за тем, чтобы определить опасности, которыми следует управлять. Степень управления должна гарантировать безопасность пищевой продукции».

Система ХАССП предусматривает следующие опасные факторы:

– биологические опасности: санитарно-показательные микроорганизмы, условно-патогенные микроорганизмы, патогенные микроорганизмы, микроорганизмы порчи, а также паразиты и вирусы;

– химические опасности: токсичные элементы, азотосодержащие соединения, полициклические ароматические и хлорсодержащие углеводороды, микотоксины, антибиотики, гормональные препараты, пищевые добавки;

– физические опасности: осколки стекла, металлопримеси, строительные материалы, грызуны, насекомые и отходы их жизнедеятельности, предметы персонала, бумага и упаковочные материалы и др.

В п. 8.5.2.3 ГОСТ Р ИСО 22000-2019 сказано, что «организация должна оценивать каждую опасность, угрожающую безопасности пищевой продукции, на предмет:

а) вероятности ее возникновения до реализации мероприятий по управлению;

б) серьезности с учетом возможного неблагоприятного воздействия на здоровье в связи с предусмотренным применением».

С учетом всех доступных источников информации и практического опыта члены группы ХАССП оценивают вероятность реализации опасного фактора, исходя из четырех возможных вариантов оценки – практически равна 0, незначительная, значительная и высокая. Помимо этого, они оценивают экспертным путем тяжесть последствий реализации опасного фактора, основываясь на четырех возможных вариантах оценки – легкое, средней тяжести, тяжелое и критическое.

Далее построили диаграмму анализа рисков с координатами «вероятность возникновения – тяжесть последствий» и границей допустимого риска (рисунок 7.2.1.1).

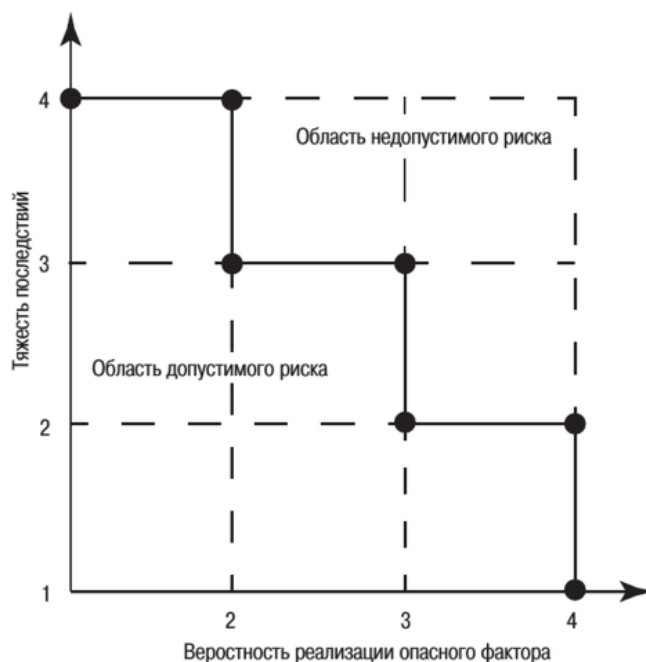


Рисунок 7.2.1.1 – Диаграмма анализа рисков

Посредством применения данной диаграммы был определен перечень факторов, по которым риск превышает допустимый уровень (значимая опасность), т. е. они лежат на границе или выше границы доступа. Анализ рисков сырья, используемого при производстве гидролизатов, и технологических операций представлен в таблице 7.2.1.1, полный перечень потенциально опасных факторов сырья – в таблице 7.2.1.2.

При идентификации опасных факторов и оценке рисков следует учитывать также опасные факторы, которые присутствуют в продукции и исходят от оборудования, окружающей среды, персонала и т. д. Поэтому, в соответствии со стадиями производственного процесса, был проведен анализ опасностей и опасных факторов.

С опорой на технологические схемы производства гидролизатов (рисунки 7.1.1–7.1.3) составлены таблицы 7.2.1.3–7.2.1.6, содержащие перечень всех существующих или потенциально опасных факторов, которые могут возникнуть на каждом этапе технологического процесса. В данных таблицах также указаны контролируемые признаки, значимость опасных факторов и действия, направленные на их предупреждение.

Таблица 7.2.1.3 – Анализ рисков используемого сырья и технологических операций

Виды опасных факторов	Влияние на организм человека	Источник возникновения	Меры для предотвращения опасности	Тяжесть последствий (ТП)
Микробиологический				
Количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ)	Могут привести к возникновению пищевых отравлений, протекают в виде различной тяжести энтеритов, энтероколитов в сочетании с синдромом общей интоксикации	Нарушение режима хранения сырья, фильтрация воздуха через загрязненные фильтры, несоблюдение личной гигиены сотрудников	Соблюдать режим тепловой обработки 68 °С 15 мин	3
Бактерии группы кишечных палочек (БГКП)	Клинические проявления колибактериальной токсикоинфекции	Испражнения человека или животного, грязные руки, оборудование, инвентарь, вода, антисанитарное состояние пищевого производства	При температуре 55 °С они погибают через 2 ч; при температуре 60 °С – через 15 мин, при кипячении – моментально	3
<i>Salmonella</i>	Входят в группу патогенных микроорганизмов. Содержат эндотоксин. Заболевания характеризуются поражением желудочно-кишечного тракта. Могут привести к возникновению пищевых инфекций, протекают в виде различной тяжести энтеритов, энтероколитов в сочетании с синдромом общей интоксикации	Сырье из мяса и птицы, продукты их переработки	Соблюдать режим тепловой обработки 68 °С 6 мин	4
Термотолерантные колиформные бактерии	Входят в группу условно-патогенных микроорганизмов. Могут привести к возникновению пищевых отравлений. Заболевания характеризуются поражением желудочно-кишечного тракта	Вода	При температуре 55 °С они погибают через 2 ч; при температуре 60 °С – через 15 мин, при кипячении – моментально	3
Общие колиформные бактерии	Входят в группу условно-патогенных микроорганизмов. Могут привести к возникновению пищевых отравлений. Заболевания характеризуются поражением желудочно-кишечного тракта	Вода	При температуре 55 °С они погибают через 2 ч; при температуре 60 °С – через 15 мин, при кипячении – моментально	3
Микроорганизмы порчи	Плесени являются продуцентами микротоксинов, при накоплении могут оказать отдаленный негативный эффект, проявляют канцерогенную, тератогенную, мутагенную активность	Окружающая среда (воздух, вода), вспомогательные материалы, упаковка и другие элементы рабочих и бытовых зон, персонал	Дезинфекция, кварцевание	3

Продолжение таблицы 7.2.1.3

Виды опасных факторов	Влияние на организм человека	Источник возникновения	Меры для предотвращения опасности	Тяжесть последствий (ТП)
Химический				
Токсичные элементы	Вызывают нарушения функций нервной и сердечно-сосудистой, кроветворной и иммунной систем, нарушают ферментативные процессы, поражают желудочно-кишечный тракт, почки, печень, репродуктивную систему, могут вызывать поражение кожи	Содержание продуктивных животных в экологически неблагоприятных условиях (вблизи автомагистралей и крупных промышленных предприятий)	Входной контроль сырья	3
Пестициды	Попадая в организм человека, пестициды способны вызывать аллергию и отравление, а также провоцировать серьезные нервные расстройства и болезни головного мозга	Использование корма, загрязненного пестицидами	Входной контроль сырья	2
Радионуклиды	Радиационное излучение приводит к угнетению биохимических процессов, торможению деления и гибели клеток. Опасность радиации в том, что повреждается структура ДНК, разрушается генетический код, что становится причиной тяжелых генетических заболеваний, физических уродств, которые могут быть переданы следующим поколениям	Содержание продуктивных животных в экологически неблагоприятных условиях (вблизи автомагистралей и крупных промышленных предприятий)	Входной контроль сырья	3
Общая жесткость	Отрицательное действие на органы пищеварения, дисбактериоз, нарушение работы сердечно-сосудистой системы, образование камней в почках и желчных путях	Вода	Периодический контроль	1
Остатки моющих и дезинфицирующих средств	Очевидное воздействие, которое оказывает бытовая химия на организм, – раздражение кожи, глаз при случайном контакте или токсические реакции при случайном вдыхании бытовой химии, например ее паров или мелкодисперсной пыли	Несоблюдение инструкции обработки и мойки оборудования (несоблюдение дозировки)	Тщательно промывать водой рабочие поверхности и части оборудования, использовать моющие средства в соответствии с количеством, установленным в инструкции	2
Остаточное количество кислот	Нарушение кислотно-щелочного баланса, процесса пищеварения	Костная фракция	Нейтрализация и качественная промывка	1
Остаточное количество щелочей	Нарушение кислотно-щелочного баланса, процесса пищеварения	Костная фракция	Качественная промывка	1

Продолжение таблицы 7.2.1.3

Виды опасных факторов	Влияние на организм человека	Источник возникновения	Меры для предотвращения опасности	Тяжесть последствий (ТП)
Физический				
Щетина	–	Свиная шкурка	Входной контроль	1
Грызуны	Пищевое отравление, попадание в человеческий организм нежелательных микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности	Несоблюдение санитарно-эпидемиологических мер на производстве	Регулярные мероприятия по дезинсекции и дератизации	2
Механические примеси и посторонние предметы	При попадании мелких, неострых предметов (менее 0,5–1 мм) появляются неприятные ощущения	Несоблюдение инструкции по уходу за оборудованием (сроки ремонта), несоблюдение сотрудниками правил (прошел на производство с украшениями, без спецодежды и др.)	Инструктировать персонал, тщательно осуществлять визуальные осмотры сырья и полуфабрикатов	1

Таблица 7.2.1.4 – Перечень потенциально опасных факторов сырья

Группа продуктов	Опасный фактор	Значима ли опасность?	ТП	Вероятность возникновения опасного фактора (ВВОФ)	Контролирующие и предупреждающие действия
Шкурка свиная (ТР ТС 021/2011, п. 1) СанПиН п. 1.1.2.1, п. 1.1.2 ГОСТ 32244-2013 «Субпродукты мясные обработанные»	Биологический: <i>Salmonella</i>	Нет	1	1	Входной контроль сырья и контроль за соблюдением режимов хранения
	Химический: свинец; мышьяк; кадмий; ртуть	Нет Нет Нет Нет	2 2 2 2	1 1 1 1	Входной контроль сырья
	Пестициды: ГХЦГ (α -, β -, γ -изомеры); ДДТ и его метаболиты	Нет	1 1	1 1	
	Радионуклиды: цезий-137	Нет	1	1	
	Физический: щетина (п. 1)	Нет	1	2	Входной контроль сырья
Субпродукты из птицы – ног цыплят-бройлеров (ТР ТС 021/2011, п. 1) СанПиН п. 1.1.10, п. 1.1.10.1	Биологический: <i>Salmonella</i> ; КМАФАнМ	Нет Нет	1 1	1 1	Входной контроль сырья
	Химический: свинец; мышьяк; кадмий; ртуть	Нет Нет Нет Нет	2 2 2 2	1 1 1 1	
	Пестициды: ГХЦГ (α -, β -, γ -изомеры); ДДТ и его метаболиты	Нет Нет	1 1	1 1	

Продолжение таблицы 7.2.1.4

Группа продуктов	Опасный фактор	Значима ли опасность?	ТП	Вероятность возникновения опасного фактора (ВВОФ)	Контролирующие и предупреждающие действия
Сырая кость КРС ГОСТ 16147-88 «Кость. Технические условия»	Химический: свинец;	Нет	2	1	Входной контроль сырья
	мышьяк;	Нет	2	1	
	кадмий;	Нет	2	1	
	ртуть	Нет	2	1	
	Пестициды: ГХЦГ (α -, β -, γ -изомеры); ДДТ и его метаболиты	Нет Нет	1 1	1 1	
	Радионуклиды: цезий-137	Нет	1	1	
Вода питьевая СанПиН 2.1.4.1074-01	Биологический: БГКП;	Нет	1	1	Входной контроль сырья
	КМАФАнМ	Нет	1	1	
	Биологический: термотолерантные колиформные бактерии;	Нет	1	1	
	общие колиформные бактерии;	Нет	1	1	Входной контроль сырья
	КМАФАнМ	Нет	1	1	
	Химический: токсичные элементы;	Нет	1	1	
	общая жесткость; водородный показатель	Нет	1	1	
	Физический: загрязненность вредителями; механические примеси	Нет	1	1	Входной контроль сырья, фильтрация

Таблица 7.2.1.5 – Потенциально опасные факторы процесса производства гидролизатов коллагена из костного сырья

Этап производства	Опасный фактор	Контролируемые признаки	Значима ли опасность?	ТП	ВВОФ	Предупреждающие действия
Подготовка костного сырья	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Чистота оборудования	Нет	1	1	Выполнение требований инструкции по проведению санитарной обработки оборудования и инвентаря
	Биологический: БГКП	Чистота оборудования	Нет	1	1	Выполнение требований инструкции по проведению санитарной обработки оборудования и инвентаря
Обезжиривание костного шрота ферментным способом с последующей инаktivацией фермента	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Чистота оборудования	Нет	1	2	Выполнение требований инструкции по проведению санитарной обработки оборудования и инвентаря
Ферментативно-кислотный гидролиз костного сырья	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Чистота оборудования	Нет	1	2	Выполнение требований инструкции по проведению санитарной обработки оборудования и инвентаря
Промывка водой костного сырья	Биологический: термотолерантные колиформные бактерии, общие колиформные бактерии	Микробиологическое благополучие воды	Нет	1	1	Соблюдение графика производственного контроля воды
	Химический: остаточное количество кислот; остатки моющих и дезинфицирующих средств	Несоблюдение времени промывки, температуры воды, чистота оборудования	Нет	1	2	Соблюдение технологической инструкции по производству (соблюдение технологического режима промывки); выполнение требований инструкции по проведению санитарной обработки оборудования и инвентаря
Нейтрализация слабой щелочью	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Чистота оборудования	Нет	1	2	Выполнение требований инструкции по проведению санитарной обработки оборудования и инвентаря

Продолжение таблицы 7.2.1.5

Этап производства	Опасный фактор	Контролируемые признаки	Значима ли опасность?	ТП	ВВОФ	Предупреждающие действия
Повторная промывка водой	Биологический: термотолерантные колиформные бактерии, общие колиформные бактерии	Качество воды	Нет	1	1	Соблюдение графика производственного контроля воды
	Химический: остаточное количество кислот и щелочей; остатки моющих и дезинфицирующих средств	Несоблюдение времени промывки, температуры воды, чистота оборудования	Нет	1	2	Соблюдение технологической инструкции по производству (соблюдение технологического режима промывки); выполнение требований инструкции по проведению санитарной обработки оборудования и инвентаря
Отделение центрифугированием	Биологический: БГКП (труднодоступные места в центрифуге)	Чистота оборудования	Нет	1	1	Выполнение требований инструкции по проведению санитарной обработки оборудования и инвентаря
	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Чистота оборудования	Нет	1	2	Выполнение требований инструкции по проведению санитарной обработки оборудования и инвентаря
Низкотемпературная экстракция оссеина	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Чистота оборудования	Нет	1	2	Выполнение требований инструкции по проведению санитарной обработки оборудования и инвентаря
Ультрафильтрация	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Чистота оборудования	Нет	1	2	Выполнение требований инструкции по проведению санитарной обработки оборудования и инвентаря
	Биологический: БГКП	Чистота оборудования	Нет	1	1	Выполнение требований инструкции по проведению санитарной обработки оборудования и инвентаря
Распылительная сушка коллагеновых бульонов	Биологический: БГКП, КМАФАнМ	Температура, продолжительность	Да	2	3	Соблюдение технологической инструкции по производству

Продолжение таблицы 7.2.1.5

Этап производства	Опасный фактор	Контролируемые признаки	Значима ли опасность?	ТП	ВВОФ	Предупреждающие действия
Упаковка	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Чистота оборудования	Нет	1	2	Выполнение требований инструкции по проведению санитарной обработки оборудования и инвентаря
	Физический: попадание посторонних предметов (частицы одежды и оборудования)	Герметичность упаковки, чистота помещения, гигиена персонала	Нет	2	2	Контроль за работой упаковочного оборудования; периодический осмотр и дезинфекция помещений, использование металлодетектора, визуальный осмотр одежды работников, соблюдение санитарных условий на производстве
Хранение	Биологический: развитие микроорганизмов порчи при неправильном хранении	Температура, время хранения, влажность воздуха	Нет	2	1	Контроль целостности упаковки; соблюдение условий и сроков хранения
	Физический: грызуны, посторонние предметы от сотрудников, остатки упаковки	Влажность помещения, температура и время хранения	Нет	2	1	Расставление ловушек, проведение дератизации, соблюдение условий и сроков хранения

Таблица 7.2.1.6 – Потенциально опасные факторы процесса производства гидролизатов коллагена из ног цыплят-бройлеров

Этап производства	Опасный фактор	Контролируемые признаки	Значима ли опасность?	ТП	ВВОФ	Предупреждающие действия
Подготовка сырья	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Чистота оборудования	Нет	1	1	Выполнение требований инструкции по проведению санитарной обработки оборудования и инвентаря
	Биологический: БГКП	Чистота оборудования	Нет	1	1	Выполнение требований инструкции по проведению санитарной обработки оборудования и инвентаря
Ферментативно-кислотный гидролиз мясокостного сырья	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Чистота оборудования	Нет	1	2	Выполнение требований инструкции по проведению санитарной обработки оборудования и инвентаря
Промывка водой костной фракции	Биологический: термотолерантные колиформные бактерии, общие колиформные бактерии	Качество воды	Нет	1	1	Соблюдение графика производственного контроля воды
	Химический: остаточное количество кислот; остатки моющих и дезинфицирующих средств	Несоблюдение времени промывки, температуры воды; чистота оборудования	Нет	1	2	Соблюдение технологической инструкции по производству (соблюдение технологического режима промывки); выполнение требований инструкции по проведению санитарной обработки оборудования и инвентаря
Промывка водой мясной фракции	Биологический: термотолерантные колиформные бактерии, общие колиформные бактерии	Качество воды	Нет	1	1	Соблюдение графика производственного контроля воды
	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Чистота оборудования	Нет	1	2	Выполнение требований инструкции по проведению санитарной обработки оборудования и инвентаря
Нейтрализация слабой щелочью костной фракции	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Чистота оборудования	Нет	1	2	Выполнение требований инструкции по проведению санитарной обработки оборудования и инвентаря

Продолжение таблицы 7.2.1.6

Этап производства	Опасный фактор	Контролируемые признаки	Значима ли опасность?	ТП	ВВОФ	Предупреждающие действия
Повторная промывка водой костной фракции	Биологический: термотолерантные колиформные бактерии, общие колиформные бактерии	Качество воды	Нет	1	1	Соблюдение графика производственного контроля воды
	Химический: остаточное количество кислот и щелочей; остатки моющих и дезинфицирующих средств	Несоблюдение времени промывки, температуры воды; чистота оборудования	Нет	1	2	Соблюдение технологической инструкции по производству (соблюдение технологического режима промывки); выполнение требований инструкции по проведению санитарной обработки оборудования и инвентаря
Центрифугирование	Биологический: БГКП (труднодоступные места в центрифуге)	Чистота оборудования	Нет	1	1	Выполнение требований инструкции по проведению санитарной обработки оборудования и инвентаря
	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Чистота оборудования	Нет	1	2	Выполнение требований инструкции по проведению санитарной обработки оборудования и инвентаря
Низкотемпературная экстракция	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Чистота оборудования	Нет	1	2	Выполнение требований инструкции по проведению санитарной обработки оборудования и инвентаря
Ультрафильтрация	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Чистота оборудования	Нет	1	2	Выполнение требований инструкции по проведению санитарной обработки оборудования и инвентаря
	Биологический: БГКП	Чистота оборудования	Нет	1	3	Выполнение требований инструкции по проведению санитарной обработки оборудования и инвентаря
Распылительная сушка коллагеновых бульонов	Биологический: <i>Salmonella</i> , КМАФАнМ	Температура, продолжительность	Да	2	3	Соблюдение технологической инструкции по производству
Упаковка	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Чистота оборудования	Нет	1	2	Выполнение требований инструкции по проведению санитарной обработки оборудования и инвентаря
	Физический: попадание посторонних предметов (частицы одежды и оборудования)	Герметичность упаковки, чистота помещения, гигиена персонала	Нет	2	2	Контроль за работой упаковочного оборудования; периодический осмотр и дезинфекция помещений, использование металлодетектора, визуальный осмотр одежды работников, соблюдение санитарных условий на производстве

Продолжение таблицы 7.2.1.6

Этап производства	Опасный фактор	Контролируемые признаки	Значима ли опасность?	ТП	ВВОФ	Предупреждающие действия
Хранение	Биологический: развитие микроорганизмов порчи при неправильном хранении	Температура, время хранения, влажность воздуха	Нет	1	2	Контроль целостности упаковки; соблюдение условий и сроков хранения
	Физический: грызуны, посторонние предметы от сотрудников, остатки упаковки	Влажность помещения, температура и время хранения	Нет	1	2	Расставление ловушек, проведение дератизации, соблюдение условий и сроков хранения

Таблица 7.2.1.7 – Потенциально опасные факторы процесса производства гидролизатов коллагена из свиной шкурки

Этап производства	Опасный фактор	Контролируемые признаки	Значима ли опасность?	ТП	ВВОФ	Предупреждающие действия
Подготовка сырья	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Чистота оборудования	Нет	1	1	Выполнение требований инструкции по проведению санитарной обработки оборудования и инвентаря
Ферментативно-щелочная обработка сырья	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Чистота оборудования	Нет	1	2	Выполнение требований инструкции по проведению санитарной обработки оборудования и инвентаря
Промывка водой	Химический: остаточное количество кислот; остатки моющих и дезинфицирующих средств	Несоблюдение времени промывки, температуры воды; чистота оборудования	Нет	1	2	Соблюдение технологической инструкции по производству (соблюдение технологического режима промывки); выполнение требований инструкции по проведению санитарной обработки оборудования и инвентаря
	Биологический: термотолерантные колиформные бактерии, общие колиформные бактерии	Микробиологическое благополучие воды	Нет	1	1	Соблюдение графика производственного контроля воды

Продолжение таблицы 7.2.1.7

Этап производства	Опасный фактор	Контролируемые признаки	Значима ли опасность?	ТП	ВВОФ	Предупреждающие действия
Нейтрализация	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Чистота оборудования	Нет	1	2	Выполнение требований инструкции по проведению санитарной обработки оборудования и инвентаря
Повторная промывка водой	Биологический: термотолерантные колиформные бактерии, общие колиформные бактерии	Микробиологическое благополучие воды	Нет	1	1	Соблюдение графика производственного контроля воды
	Химический: остаточное количество щелочи; остатки моющих и дезинфицирующих средств	Несоблюдение времени промывки, температуры воды Чистота оборудования	Нет	1	2	Соблюдение технологической инструкции по производству (соблюдение технологического режима промывки); выполнение требований инструкции по проведению санитарной обработки оборудования и инвентаря
Фильтрация	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Чистота оборудования	Нет	1	2	Выполнение требований инструкции по проведению санитарной обработки оборудования и инвентаря
	Биологический: БГКП	Чистота оборудования	Нет	1	3	Выполнение требований инструкции по проведению санитарной обработки оборудования и инвентаря
Центрифугирование	Биологический: БГКП (труднодоступные места в центрифуге)	Чистота оборудования	Нет	1	1	Выполнение требований инструкции по проведению санитарной обработки оборудования и инвентаря
	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Чистота оборудования	Нет	1	2	Выполнение требований инструкции по проведению санитарной обработки оборудования и инвентаря
Низкотемпературная экстракция	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Чистота оборудования	Нет	1	2	Выполнение требований инструкции по проведению санитарной обработки оборудования и инвентаря

Продолжение таблицы 7.2.1.7

Этап производства	Опасный фактор	Контролируемые признаки	Значима ли опасность?	ТП	ВВОФ	Предупреждающие действия
Ультрафильтрация	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Чистота оборудования	Нет	1	2	Выполнение требований инструкции по проведению санитарной обработки оборудования и инвентаря
Распылительная сушка ретентата коллагеновых бульонов	Биологические опасности: БГКП	Чистота оборудования	Нет	1	3	Выполнение требований инструкции по проведению санитарной обработки оборудования и инвентаря
Упаковка	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Чистота оборудования	Нет	1	2	Выполнение требований инструкции по проведению санитарной обработки оборудования и инвентаря
	Физический: попадание посторонних предметов (частицы одежды и оборудования)	Герметичность упаковки, чистота помещения, гигиена персонала	Нет	2	2	Контроль за работой упаковочного оборудования; периодический осмотр и дезинфекция помещений, использование металлодетектора, визуальный осмотр одежды работников, соблюдение санитарных условий на производстве
Хранение	Биологический: развитие микроорганизмов порчи при неправильном хранении	Температура, время хранения, влажность воздуха при хранении	Нет	2	1	Контроль целостности упаковки; соблюдение условий и сроков хранения
	Физический: грызуны, посторонние предметы от сотрудников, остатки упаковки	Влажность помещения, температура и время хранения	Нет	2	1	Расставление ловушек, проведение дератизации, соблюдение условий и сроков хранения

7.2.2 Определение критических контрольных точек, задание критических пределов для ККТ

Этот раздел посвящен определению точек / процедур производственного процесса, которые могут контролироваться и благодаря которым можно предотвратить появление опасных факторов, устранить или уменьшить их до допустимого уровня. Критические контрольные точки (ККТ) определялись с помощью анализа каждого учитываемого опасного фактора и последовательного рассмотрения всех операций, включенных в технологическую схему производственного процесса. Определение критических контрольных точек проводилось в два этапа.

На **первом этапе** для установления ККТ был использован алгоритм определения критических контрольных точек методом «Дерево принятия решений» (приложение Ж, стандарт ГОСТ Р 51705.1-2024). Стоит уточнить, что с целью безопасного сокращения количества ККТ к ним не следует относить точки, для которых выполняются следующие условия:

- 1) предупреждающие воздействия, которые осуществляются в плановом порядке и регламентированы в санитарных правилах и нормах, системе технологического обслуживания и ремонта оборудования, процедурах системы качества и других системах менеджмента предприятия;
- 2) предупреждающие воздействия, не относящиеся к контрольным точкам, которые оцениваются группой ХАССП и периодически проверяются при осуществлении внутренних проверок.

На **втором этапе** выявляли у каждого продукта по одной ККТ. Для каждой из них был составлен контрольный лист ХАССП. Согласно п. 5.4.4 ГОСТ Р 51705.1-2024, для критических контрольных точек следует установить:

- критерии идентификации – для опасных факторов;

– критерии допустимого (недопустимого) риска – для контроля его признаков;

– допустимые пределы – для применения предупреждающих воздействий.

Критические пределы должны быть заданы с учетом всех погрешностей, в том числе измерения. При оценивании качественных признаков визуальным наблюдением целесообразно использовать образцы-эталон. Критические пределы следует заносить в рабочий лист ХАССП.

На данном этапе исследований очень важно правильно и объективно установить допустимые пределы, т.к. это будет влиять на дальнейшее определение системы мониторинга (следующий этап исследований). После определения ККТ для них были выявлены допустимые пределы (таблица 7.2.2.1).

Таблица 7.2.2.1 – Допустимые пределы для ККТ

ККТ	Опасный фактор	Критические пределы
Гидролизат коллагена из сырой кости КРС		
Распылительная сушка коллагеновых бульонов	Биологический: БГКП, КМАФАнМ	Температура: 95–97 °С; Скорость подачи раствора: 0,45–0,55 л/мин
Гидролизат коллагена из ног цыплят-бройлеров		
Распылительная сушка коллагеновых бульонов	Биологический: БГКП, <i>Salmonella</i>	Температура: 95–97 °С; Скорость подачи раствора: 0,45–0,55 л/мин
Гидролизат коллагена из свиной шкурки		
Распылительная сушка ретентата коллагеновых бульонов	Биологический: БГКП	Температура: 95–97 °С; Скорость подачи раствора: 0,45–0,55 л/мин

7.2.3 Разработка системы мониторинга для ККТ. Определение корректирующих действий

Согласно п. 4.6.1 ГОСТ Р 51705.1-2024, для каждой критической контрольной точки должна быть разработана система мониторинга в целях проведения в плановом порядке наблюдений и измерений, чтобы своевременно обнаруживать нарушения критических пределов и реализовывать соответствующие предупреждающие или корректирующие действия (наладка процесса). Первые представляют собой действия, направленные на устранение причины потенциального несоответствия либо другой потенциально нежелательной ситуации (п. 3.12.1., ГОСТ Р ИСО 9000-2015); вторые – действия, предпринятые для устранения причины несоответствия и предупреждения его повторного возникновения (п. 3.12.2., ГОСТ Р ИСО 9000-2015).

Разработанная система мониторинга представлена в таблице 7.2.3.1. После установления критических пределов и создания системы мониторинга для каждой ККТ они были нанесены на технологическую схему производства продуктов.

Таблица 7.2.3.1 – Система мониторинга ККТ

ККТ	Мониторинг				
	Что?	Как?	Когда?	Кто?	Записи
Гидролизат коллагена из сырой кости КРС					
Распылительная сушка коллагеновых бульонов	Температура	Измерение температуры	Каждая партия	Технолог производства	Технологический журнал
	Скорость подачи раствора	Измерение скорости подачи раствора			
Гидролизат коллагена из ног цыплят-бройлеров					
Распылительная сушка коллагеновых бульонов	Температура	Измерение температуры	Каждая партия	Технолог производства	Технологический журнал
	Скорость подачи раствора	Измерение скорости подачи раствора			
Гидролизат коллагена из свиной шкурки					
Распылительная сушка ретентата коллагеновых бульонов	Температура	Измерение температуры	Каждая партия	Технолог производства	Технологический журнал
	Скорость подачи раствора	Измерение скорости подачи раствора			

В соответствии с п. 3.8 ГОСТ Р ИСО 22000-2019, мероприятие по управлению (*control measure*) – это «действие или операция, которые необходимо использовать для предотвращения значимой опасности, угрожающей безопасности пищевой продукции или ее снижения до приемлемого уровня».

С опорой на оценку опасностей, угрожающих безопасности пищевой продукции, разработана соответствующая комбинация мероприятий, которые позволяют предотвратить, устранить или снизить эти опасности до установленного уровня (таблицы 7.2.3.2–7.2.3.4).

Далее для каждой ККТ были определены корректирующие действия, предпринимаемые в случае нарушения критических пределов.

Заключительным этапом по разработке системы мониторинга безопасности стало составление плана ХАССП – совокупности рабочих листов по всем ККТ. План ХАССП для трех критических контрольных точек представлен в таблицах 7.2.3.2–7.2.3.4.

Таблица 7.2.3.2 – Мероприятия по управлению в процессе производства гидролизата коллагена из сырой кости КРС

Этап производства	Опасный фактор	Причина появления	Мероприятия	Ответственное лицо	Отнесение мероприятий по управлению
Подготовка костного сырья	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Непромытое оборудование	Инструкция по мойке и дезинфекции оборудования и инвентаря	Оператор	PRP
	Биологический: БГКП	Грязные руки персонала, непромытый инвентарь	Инструкция по мойке и дезинфекции оборудования и инвентаря, инструкция по соблюдению личной гигиены	Оператор, технолог производства	PRP
Обезжиривание костного шрота ферментным способом с последующей инактивацией фермента	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Непромытое оборудование	Инструкция по мойке и дезинфекции оборудования и инвентаря	Оператор	PRP
Ферментативно-кислотный гидролиз костного сырья	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Непромытое оборудование	Инструкция по мойке и дезинфекции оборудования и инвентаря	Оператор	PRP
Промывка водой костного сырья	Биологический: термотолерантные колиформные бактерии, общие колиформные бактерии	Обсемененная вода	Инструкция по микробиологическому контролю воды	Лаборант	PRP
	Химический: остаточное количество кислот; остатки моющих и дезинфицирующих средств	Некачественная промывка сырья; непромытое оборудование	Технологическая инструкция по производству; инструкция по мойке и дезинфекции оборудования и инвентаря	Технолог производства, оператор	PRP
Нейтрализация слабой щелочью	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Непромытое оборудование	Инструкция по мойке и дезинфекции оборудования и инвентаря	Оператор	PRP
Повторная промывка водой	Биологический: термотолерантные колиформные бактерии, общие колиформные бактерии	Обсемененная вода	Инструкция по микробиологическому контролю воды	Лаборант	PRP
	Химический: остаточное количество кислот и щелочей; остатки моющих и дезинфицирующих средств	Некачественная промывка сырья; непромытое оборудование	Технологическая инструкция по производству; инструкция по мойке и дезинфекции оборудования и инвентаря	Технолог производства, оператор	PRP

Продолжение таблицы 7.2.3.2

Этап производства	Опасный фактор	Причина появления	Мероприятия по управлению	Ответственное лицо	Отнесение мероприятий по управлению
Отделение центрифугированием	Биологический: БГКП (труднодоступные места в центрифуге)	Непромытая центрифуга	Инструкция по мойке и дезинфекции оборудования и инвентаря	Оператор	PRP
	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Непромытое оборудование	Инструкция по мойке и дезинфекции оборудования и инвентаря	Оператор	PRP
Низкотемпературная экстракция оссеина	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Непромытое оборудование	Инструкция по мойке и дезинфекции оборудования и инвентаря	Оператор	PRP
Ультрафильтрация	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Непромытое оборудование	Инструкция по мойке и дезинфекции оборудования и инвентаря	Оператор	PRP
	Биологический: БГКП	Грязные руки персонала, непромытый инвентарь	Инструкция по мойке и дезинфекции оборудования и инвентаря, инструкция по соблюдению личной гигиены	Оператор, технолог производства	PRP
Распылительная сушка коллагеновых бульонов	Биологический: БГКП, КМАФАнМ	Грязные руки персонала, непромытый инвентарь, санитарные нарушения на производстве	Инструкция по мойке и дезинфекции оборудования и инвентаря, инструкция по соблюдению личной гигиены	Оператор, технолог производства	ХАССП
Упаковка	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Непромытое оборудование	Инструкция по мойке и дезинфекции оборудования и инвентаря	Оператор	PRP
	Физический: попадание посторонних предметов (частицы одежды и оборудования)	Неисправное оборудование, халатность сотрудников, отсутствие полной герметичности упаковки	Рабочая инструкция оператора упаковочного оборудования	Оператор	PRP
Хранение	Биологический: развитие микроорганизмов порчи при неправильном хранении	Нарушение герметичности упаковки	Рабочая инструкция кладовщика	Кладовщик	PRP
	Физический: грызуны, посторонние предметы от сотрудников, остатки упаковки	Неэффективность дезинсекции, дератизации, халатность сотрудников	Рабочая инструкция кладовщика	Кладовщик	PRP

Таблица 7.2.3.3 – Мероприятия по управлению в процессе производства гидролизата коллагена из ног цыплят-бройлеров

Этап производства	Опасный фактор	Причина появления	Мероприятия	Ответственное лицо	Отнесение мероприятий по управлению
Подготовка сырья	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Непромытое оборудование	Инструкция по мойке и дезинфекции оборудования и инвентаря	Оператор	PRP
	Биологический: БГКП	Грязные руки персонала, непромытый инвентарь	Инструкция по мойке и дезинфекции оборудования и инвентаря, инструкция по соблюдению личной гигиены	Оператор, технолог производства	PRP
Ферментативно-кислотный гидролиз мясокостного сырья	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Непромытое оборудование	Инструкция по мойке и дезинфекции оборудования и инвентаря	Оператор	PRP
Промывка водой костной фракции	Биологический: термотолерантные колиформные бактерии, общие колиформные бактерии	Обсемененная вода	Инструкция по микробиологическому контролю воды	Лаборант	PRP
	Химический: остаточное количество кислот; остатки моющих и дезинфицирующих средств	Некачественная промывка сырья; непромытое оборудование	Технологическая инструкция по производству; инструкция по мойке и дезинфекции оборудования и инвентаря	Технолог производства, оператор	PRP
Промывка водой мясной фракции	Биологический: термотолерантные колиформные бактерии, общие колиформные бактерии	Обсемененная вода	Инструкция по микробиологическому контролю воды	Лаборант	PRP
	Химический: остаточное количество кислот и щелочей; остатки моющих и дезинфицирующих средств	Некачественная промывка сырья; непромытое оборудование	Технологическая инструкция по производству; инструкция по мойке и дезинфекции оборудования и инвентаря	Технолог производства, оператор	PRP
Нейтрализация слабой щелочью	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Непромытое оборудование	Инструкция по мойке и дезинфекции оборудования и инвентаря	Оператор	PRP

Продолжение таблицы 7.2.3.3

Этап производства	Опасный фактор	Причина появления	Мероприятия	Ответственное лицо	Отнесение мероприятий по управлению
Повторная промывка водой костной фракции	Биологический: термотолерантные колиформные бактерии, общие колиформные бактерии	Обсемененная вода	Инструкция по микробиологическому контролю воды	Лаборант	PRP
	Химический: остаточное количество кислот и щелочей; остатки моющих и дезинфицирующих средств	Некачественная промывка сырья; непромытое оборудование	Технологическая инструкция по производству; инструкция по мойке и дезинфекции оборудования и инвентаря	Технолог производства, оператор	PRP
Центрифугирование	Биологический: БГКП (труднодоступные места в центрифуге)	Непромытая центрифуга	Инструкция по мойке и дезинфекции оборудования и инвентаря	Оператор	PRP
	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Непромытое оборудование	Инструкция по мойке и дезинфекции оборудования и инвентаря	Оператор	PRP
Трехэтапная низкотемпературная экстракция	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Непромытое оборудование	Инструкция по мойке и дезинфекции оборудования и инвентаря	Оператор	PRP
Ультрафильтрация	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Непромытое оборудование	Инструкция по мойке и дезинфекции оборудования и инвентаря	Оператор	PRP
	Биологический: БГКП	Грязные руки персонала, непромытый инвентарь	Инструкция по мойке и дезинфекции оборудования и инвентаря, инструкция по соблюдению личной гигиены	Оператор, технолог производства	PRP
Распылительная сушка коллагеновых бульонов	Биологический: <i>Salmonella</i> , КМАФАнМ	Грязные руки персонала, непромытый инвентарь, санитарные нарушения на производстве	Инструкция по мойке и дезинфекции оборудования и инвентаря, инструкция по соблюдению личной гигиены	Оператор, технолог производства	ХАССП
Упаковка	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Непромытое оборудование	Инструкция по мойке и дезинфекции оборудования и инвентаря	Оператор	PRP
	Физический: опадание посторонних предметов (частицы одежды и оборудования)	Неисправное оборудование, халатность сотрудников, отсутствие полной герметичности упаковки	Рабочая инструкция оператора упаковочного оборудования	Оператор	PRP

Продолжение таблицы 7.2.3.3

Этап производства	Опасный фактор	Причина появления	Мероприятия	Ответственное лицо	Отнесение мероприятий по управлению
Хранение	Биологический: развитие микроорганизмов порчи при неправильном хранении	Нарушение герметичности упаковки	Рабочая инструкция кладовщика	Кладовщик	PRP
	Физический: грызуны, посторонние предметы от сотрудников, остатки упаковки	Неэффективность дезинсекции, дератизации, халатность сотрудников	Рабочая инструкция кладовщика	Кладовщик	PRP

Таблица 7.2.3.4 – Мероприятия по управлению в процессе производства гидролизата коллагена из свиной шкурки

Этап производства	Опасный фактор	Причина появления	Мероприятия по управлению	Ответственное лицо	Отнесение мероприятий по управлению
Подготовка сырья	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Непромытое оборудование	Инструкция по мойке и дезинфекции оборудования и инвентаря	Оператор	PRP
Ферментативно-щелочная обработка сырья	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Непромытое оборудование	Инструкция по мойке и дезинфекции оборудования и инвентаря	Оператор	PRP
Промывка водой	Биологический: термотолерантные колиформные бактерии, общие колиформные бактерии	Обсемененная вода	Инструкция по микробиологическому контролю воды	Лаборант	PRP
	Химический: остаточное количество щелочи; остатки моющих и дезинфицирующих средств	Некачественная промывка сырья; непромытое оборудование	Технологическая инструкция по производству; инструкция по мойке и дезинфекции оборудования и инвентаря	Технолог производства, оператор	PRP
Нейтрализация	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Непромытое оборудование	Инструкция по мойке и дезинфекции оборудования и инвентаря	Оператор	PRP

Продолжение таблицы 7.2.3.4

Этап производства	Опасный фактор	Причина появления	Мероприятия	Ответственное лицо	Отнесение мероприятий по управлению
Повторная промывка водой	Биологический: термотолерантные колиформные бактерии, общие колиформные бактерии	Обсемененная вода	Инструкция по микробиологическому контролю воды	Лаборант	PRP
	Химический: остаточное количество щелочи; остатки моющих и дезинфицирующих средств	Некачественная промывка сырья; непромытое оборудование	Технологическая инструкция по производству; инструкция по мойке и дезинфекции оборудования и инвентаря	Технолог производства, оператор	PRP
Фильтрация	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Непромытое оборудование	Инструкция по мойке и дезинфекции оборудования и инвентаря	Оператор	PRP
	Биологический: БГКП	Грязные руки персонала, непромытый инвентарь	Инструкция по мойке и дезинфекции оборудования и инвентаря, инструкция по соблюдению личной гигиены	Оператор, технолог производства	PRP
Центрифугирование	Биологический: БГКП (труднодоступные места в центрифуге)	Непромытая центрифуга	Инструкция по мойке и дезинфекции оборудования и инвентаря	Оператор	PRP
	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Непромытое оборудование	Инструкция по мойке и дезинфекции оборудования и инвентаря	Оператор	PRP
Низкотемпературная экстракция	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Непромытое оборудование	Инструкция по мойке и дезинфекции оборудования и инвентаря	Оператор	PRP
Ультрафильтрация	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Непромытое оборудование	Инструкция по мойке и дезинфекции оборудования и инвентаря	Оператор	PRP
	Биологический: БГКП	Грязные руки персонала, непромытый инвентарь	Инструкция по мойке и дезинфекции оборудования и инвентаря, инструкция по соблюдению личной гигиены	Оператор, технолог производства	PRP
Распылительная сушка ретентата коллагеновых бульонов	Биологический: БГКП, <i>Salmonella</i>	Грязные руки персонала, санитарные нарушения на производстве	Инструкция по мойке и дезинфекции оборудования и инвентаря, инструкция по соблюдению личной гигиены	Оператор, технолог производства	ХАССП

Продолжение таблицы 7.2.3.4

Этап производства	Опасный фактор	Причина появления	Мероприятия	Ответственное лицо	Отнесение мероприятий по управлению
Упаковка	Химический: остатки моющих и дезинфицирующих средств	Непромытое оборудование	Инструкция по мойке и дезинфекции оборудования и инвентаря	Оператор	PRP
	Физический: попадание посторонних предметов (частицы одежды и оборудования)	Неисправное оборудование, халатность сотрудников, отсутствие полной герметичности упаковки	Рабочая инструкция оператора упаковочного оборудования	Оператор	PRP
Хранение	Биологический: развитие микроорганизмов порчи при неправильном хранении	Нарушение герметичности упаковки	Рабочая инструкция кладовщика	Кладовщик	PRP
	Физический: грызуны, посторонние предметы от сотрудников, остатки упаковки	Неэффективность дезинсекции, дератизации, халатность сотрудников	Рабочая инструкция кладовщика	Кладовщик	PRP

Таблица 7.2.3.5 – План ХАССП

ККТ	Фиксация	Опасный фактор	Критические пределы	Мониторинг	Корректирующее действие
Гидролизат коллагена из костного сырья					
ККТ 1 распылительная сушка коллагеновых бульонов	Технологический журнал	Биологический: БГКП, КМАФАнМ	Температура: 95–97 °С; скорость подачи раствора: 0,45–0,55 л/мин	Контроль температуры и скорости подачи раствора	Обучение персонала, наладка оборудования
Гидролизат коллагена из ног цыплят бройлеров					
ККТ 1 распылительная сушка коллагеновых бульонов	Технологический журнал	Биологический: <i>Salmonella</i> , КМАФАнМ	Температура: 95–97 °С; скорость подачи раствора: 0,45–0,55 л/мин	Контроль температуры и скорости подачи раствора	Обучение персонала, наладка оборудования
Гидролизат коллагена из свиной шкурки					
ККТ 1 распылительная сушка ретентата коллагеновых бульонов	Технологический журнал	Биологический: БГКП, <i>Salmonella</i>	Температура: 95–97 °С; скорость подачи раствора: 0,45–0,55 л/мин	Контроль температуры и скорости подачи раствора	Обучение персонала, наладка оборудования

С целью подтверждения соблюдения всех требований, необходимых для функционирования системы ХАССП на предприятии, важно проводить регулярные проверки (верификации). Верификация представляет собой подтверждение соответствия посредством представления объективных свидетельств того, что установленные требования были выполнены.

Верификация проводится путем внутреннего или внешнего аудита. Для ее осуществления руководитель группы должен выделить на предприятии отдельные подразделения и составить для каждого из них ежегодный план проверок. Проверке подвергается соблюдение программ обязательных предварительных и производственных предварительных мероприятий, плана ХАССП и ведение регистрационно-учетной документации для каждого подразделения.

В плане обязательно указываются график проверок и конкретные объекты проверки в каждом подразделении. Информация о последних берется из соответствующих программ обязательных предварительных мероприятий, производственных предварительных мероприятий и плана ХАССП.

Каждая новая проверка начинается с анализа результатов предыдущей проверки. По ее окончании составляется акт с указанием объектов проверки и выявленных несоответствий, которые необходимо устранить. Указанный документ заполняется в двух экземплярах: один передается руководителю подразделения, где происходила проверка, второй – руководству предприятия.

7.3 Оценка экономической эффективности разработанной технологии при внедрении в производство

В данном разделе представлены результаты технико-экономической оценки производства гидролизатов коллагена из вторичных сырьевых продуктов агропромышленного комплекса: сырая кость КРС, свиная шкурка, ноги цыплят-бройлеров. Расчет технико-экономических показателей проводился из расчета

полной загруженности оборудования для производства гидролизата коллагена и его практической мощности (с учетом простоев на техническое обслуживание и текущий ремонт).

На первом этапе рассчитывали производство гидролизата коллагена исходя из полной мощности оборудования. За один цикл производства перерабатывается 500 кг исходного сырья. Исходные данные технико-экономических показателей производства гидролизатов коллагена из разных видов сырья за один цикл производства отражены в таблице 7.3.1.

Таблица 7.3.1 – Техничко-экономические показатели одного цикла производства гидролизатов коллагена

Показатель	Сырая кость КРС	Свиная шкурка	Ноги цыплят- бройлеров	Итого
Время производства одного цикла, ч	20	14	16	–
Количество исходного сырья, кг	500	500	500	–
Средний выход гидролизата коллагена за один цикл производства, кг	74,50	80,00	74,00	228,50

Общая мощность оборудования за один цикл производства составляет 228,50 кг гидролизата коллагена при условии наличия единицы оборудования. На производство общего количества продукта требуется 3 дня. Практическая мощность работы оборудования предполагает затраты рабочего времени на ее техническое обслуживание (30 мин до начала работы и 30 мин после окончания). В течение календарного года сушильная установка подвергается техническому обслуживанию и текущему ремонту в течение восьми часов. Далее проводили расчет производства гидролизатов коллагена за месяц (в среднем 28 дней) и год (253 дня) с учетом обслуживания оборудования (таблица 7.3.2). Так, на обработку каждого вида сырья и производства гидролизатов коллагена за 28 дней будет совершено по 9 циклов производства.

Также, исходя из мощности оборудования, количества загрузки исходного сырья 500 кг и выхода готового продукта одного производственного цикла, за месяц можно получить 2 т гидролизата коллагена, за год – 24 т и 678 кг.

Таблица 7.3.2 – Расчет производства гидролизатов коллагена

Показатель	Сырая кость КРС	Свиная шкурка	Ноги цыплят-бройлеров	Итого
Производство гидролизата коллагена за один цикл, кг	74,50	80,00	74,00	–
Количество циклов производства за месяц	9	9	9	–
Производство гидролизата коллагена за месяц, кг	9	720,00	666,00	2056,50
Производство гидролизата коллагена за год, кг	8046	8640	7992	24678

Учитывая рыночную стоимость и объемы исходного сырья, необходимого для производства гидролизатов коллагена, была проведена оценка его себестоимости на один производственный цикл (таблица 7.3.3).

Таблица 7.3.3 – Расчет себестоимости исходного сырья за один производственный цикл

Показатель	Сырая кость КРС	Свиная шкурка	Ноги цыплят-бройлеров
Исходное сырье, кг	500	500	500,00
Цена за 1 кг, руб/кг	35	55	135,50
Затраты на сырье, руб.	17500	27500	67750,00

Далее рассчитывали потребности исходного сырья и его себестоимость для производства гидролизатов коллагена на месяц и год (таблица 7.3.4). Самым дорогостоящим исходным сырьем являются ноги цыплят-бройлеров, себестоимость которых на месяц составляет 609750 руб., себестоимость свиной шкурки – 247500 руб. Самым же дешевым сырьем является костное сырье КРС,

себестоимость которого на месяц составляет 157500 руб. Общая себестоимость при производстве гидролизатов коллагена из всех видов сырья равномерными циклами на месяц равняется 1014750 руб., на год – 12177000 руб.

Таблица 7.3.4 – Расчет потребности исходного сырья и его себестоимости для производства гидролизатов коллагена

Показатель	Сырая кость КРС	Свиная шкурка	Ноги цыплят-бройлеров	Итого
Исходное сырье на один производственный цикл, кг	500	500	500	—
Затраты на сырье одного производственного цикла, руб.	17500	27500	67750	—
Количество циклов в месяц	9	9	9	—
Затраты на сырье на месяц, руб.	157500	247500	609750	1014750
Затраты на сырье на год, руб.	1890000	2970000	7317000	12177000

Результаты расчетов в таблице 7.3.5 показали, что общая стоимость оборудования для производства гидролизатов коллагена составляет 12613000,00 руб.

Таблица 7.3.5 – Размер и структура капитальных затрат на производство гидролизатов коллагена

Наименование	Капитальные затраты, руб.
Холодильная камера	680000,00
Пресс механической обвалки	473000,00
Варочный электрический котел	800000,00
Ванна для предварительной обработки сырья (500 л)	800000,00
Ванна для нейтрализации сырья (500 л)	800000,00
Ванна для промывки сырья (500 л)	800000,00
Экстрактор	1800000,00
Сепаратор или промышленная центрифуга	470000,00
Установка мембранной фильтрации	240000,00
Установка ионообменной фильтрации (ионизации)	150000,00
Стерилизатор (автоклав)	490000,00
Распылительная или вакуумная сушилка	4810000,00
Комплектующие и расходные материалы	300000,00
Общая стоимость оборудования	12613000,00

Для определения общей себестоимости производства гидролизатов коллагена определили такие основные затраты, как исходное сырье и материалы, энергия на технологические цели, фонд оплаты труда, расходы на содержание и эксплуатацию оборудования, цеховые, общепроизводственные и накладные расходы (таблица 7.3.6).

Таблица 7.3.6 – Структура себестоимости производства гидролизатов коллагена

Статьи расходов	Себестоимость за 1 мес., руб.	Себестоимость за 1 год, руб.	Удельный вес расходов в структуре годовой себестоимости, %
Исходное сырье и материалы	1014750	12177000	71,20
Энергия на технологические цели	183060	2196720	12,80
Оплата труда (в том числе отчисления во внебюджетные фонды) на 1 работника	50000	600000	3,50
Расходы на содержание и эксплуатацию оборудования	54000	648000	3,80
Цеховые расходы	48330	579960	3,40
Общепроизводственные расходы	62100	745200	4,30
Накладные расходы	13500	162000	1,00
Итого	1425740	17108880	100

Так, общая годовая себестоимость производства гидролизатов коллагена составит 17108880 руб. В структуре себестоимости большую долю занимают затраты на сырье – 71,2 %, электроэнергия для работы оборудования – 12,8 %, заработная плата – 3,5 %, расходы на содержание и эксплуатацию производства – 3,9 %, цеховые, общепроизводственные и накладные расходы – 3,4 %, 4,3 % и 1,0 % соответственно. Средняя себестоимость 1 кг гидролизата коллагена составляет 693,2 руб., в то время как себестоимость производства 1 кг гидролизата коллагена из костного сырья КРС – 640 руб., из свиной шкурки –

715 руб., а из ног цыплят-бройлеров – 750 руб. (из расчета переменных затрат на покупку исходного сырья).

Далее провели расчет плана продаж гидролизатов коллагена из разного вида сырья на 5 лет, учитывая использование оборудования по практической мощности. В ходе анализа рынка гидролизатов коллагена выявлен диапазон ценовой политики, по результатам которого было принято решение взять для расчета плана продаж среднюю оптовую цену (таблица 7.3.7). В первый год продажи осуществляются по предельно низкой цене диапазона оптовых рыночных цен, во второй, третий, четвертый годы – по средней цене, в пятый год – по предельно высокой цене. Прогнозируемый объем продаж в последующие четыре года увеличивается за счет расширения диапазона оптовых рыночных цен на гидролизат коллагена в зависимости от исходного сырья.

Таблица 7.3.7 – План продаж гидролизатов коллагена

Показатель	Год начала продаж				
	Первый	Второй	Третий	Четвертый	Пятый
Гидролизат коллагена из сырой кости КРС					
Объем продаж, кг	8046	8050	8050	8050	8050
Цена, руб/кг	950	1200	1200	1200	1450
Выручка, руб.	7643700	9660000	9660000	9660000	11672500
Гидролизат коллагена из свиной шкурки					
Объем продаж, кг	8640	8650	8650	8650	8650
Цена, руб/кг	2500	2750	2750	2750	3200
Выручка, руб.	21600000	23787500	23787500	23787500	27680000
Гидролизат коллагена из ног цыплят бройлеров					
Объем продаж, кг	7992	8000	8000	8000	8000
Цена, руб/кг	3250	3500	3500	3500	3700
Выручка, руб.	25974000	28000000	28000000	28000000	29600000
Итоговая выручка, руб.	55217700	61447500	61447500	61447500	68952500

Для дальнейшего расчета срока окупаемости производства гидролизатов коллагена введены следующие обозначения показателей: $V_{год}$ – годовой объем выпуска гидролизатов коллагена, кг; P – цена за 1 кг., руб.; P_c – себестоимость 1 кг, руб.; K – капитальные затраты, руб.; $K_{уд}$ – удельные капитальные затраты, руб/кг; Pr – годовая прибыль, руб.; $Pr_{уд}$ – прибыль удельная, руб/кг; $R_{np-ва}$ – рентабельность производства, %; Pb – срок окупаемости, лет.

Далее проведен расчет основных технико-экономических показателей гидролизата коллагена из сырой кости КРС. При $P = 950$ руб. за $V_{год}$ принималось значение, равное 8046 кг. Капитальные затраты как 1/3 часть их стоимости для пропорционального распределения затрат составляли 4204333,3 руб.

$$K_{уд} = K/V_{год} = 4204333,3/8046 = 522,50 \text{ руб/кг} \quad (7.3.1)$$

$$Pr = (P - P_c) \times V_{год} = (950 - 640) \times 8046 = 2494260 \text{ руб.} \quad (7.3.2)$$

$$Pr_{уд} = Pr/V_{год} = 2494260/8046 = 310 \text{ руб.} \quad (7.3.3)$$

$$R_{np-ва} = (Pr/V_{год} \times P) \times 100 \% \quad (7.3.4)$$

$$R_{np-ва} = (2494260/(8046 \times 950)) \times 100 \% = 32,63 \%$$

$$Pb = (K_{уд} \times R_{np-ва})/100 = (522,5 \times 32,63)/100 = 170,50 \text{ дней, или 5,6 мес.} \quad (7.3.6)$$

Расчитывая основные технико-экономические показатели гидролизата коллагена из свиной шкурки, за $V_{год}$ принимали 8640 кг при $P = 2500$ руб. Капитальные затраты как 1/3 часть их стоимости для пропорционального распределения затрат равнялись 4204333,30 руб.

$$K_{y\partial} = K/V_{z\partial\partial} = 4204333,3/8640 = 486,6 \text{ руб/кг} \quad (7.3.1)$$

$$P_r = (P - P_c) \times V_{z\partial\partial} = (2500 - 715) \times 8640 = 15422400 \text{ руб.} \quad (7.3.2)$$

$$Pr_{y\partial} = Pr/V_{z\partial\partial} = 15422400/8640 = 1785 \text{ руб.} \quad (7.3.3)$$

$$R_{np-ва} = (Pr/V_{z\partial\partial} \times P) \times 100 \% \quad (7.3.4)$$

$$R_{np-ва} = (15422400/(8640 \times 2500)) \times 100 \% = 70,50 \%$$

$$Pb = (K_{y\partial} \times R_{np-ва})/100 = (486,6 \times 70,5)/100 = 343 \text{ дня, или 11,50 мес.} \quad (7.3.6)$$

При осуществлении расчета основных технико-экономических показателей гидролизата коллагена из ног цыплят-бройлеров $V_{z\partial\partial}$ был равен 7992 кг при $P = 3250$ руб. Капитальные затраты как 1/3 часть их стоимости для пропорционального распределения затрат составляли 4204333,30 руб.

$$K_{y\partial} = K/V_{z\partial\partial} = 4204333,3/7992 = 526,1 \text{ руб/кг} \quad (7.3.1)$$

$$P_r = (P - P_c) \times V_{z\partial\partial} = (3250 - 50) \times 7992 = 19980000 \text{ руб.} \quad (7.3.2)$$

$$Pr_{y\partial} = Pr/V_{z\partial\partial} = 19980000/7992 = 2500 \text{ руб.} \quad (7.3.3)$$

$$R_{np-ва} = (Pr/V_{z\partial\partial} \times P) \times 100 \% \quad (7.3.4)$$

$$R_{np-ва} = (19980000/(7992 \times 3250)) \times 100 \% = 76,90 \%$$

$$Pb = (K_{y\partial} \times R_{np-ва})/100 = (526,1 \times 76,9)/100 = 404,5 \text{ дней, или 1 год} \quad (7.3.6)$$

2 мес.

Сводные технико-экономические показатели производства и реализации гидролизата коллагена из трех видов сырья в первый год работы оборудования представлены в таблице 7.3.8.

Таблица 7.3.8 – Основные технико-экономические показатели производства гидролизатов коллагена

Показатель	Сырая кость КРС	Свиная шкурка	Ноги цыплят-бройлеров
Объем продаж в год, кг	8046	8640	7992
Капитальные затраты, руб.	4204333,30	4204333,30	4204333,30
Удельные капитальные затраты, руб/ед	522,50	486,60	526,10

Продолжение таблицы 7.3.8

Годовая прибыль, руб.	2494260	15422400	19980000
Удельная прибыль, руб/ед	310	1785	2500
Рентабельность производства, %	32,63	70,50	76,90
Срок окупаемости, лет	5,6 мес.	11,5 мес.	1 год 2 мес.

Результаты расчета финансовых показателей производства гидролизатов коллагена за первые пять лет отражены в таблице 7.3.9. Так, при вариативном поведении цены их производство даст стабильную динамику прибыли от продаж.

Таблица 7.3.9 – План финансовых показателей от продаж гидролизатов коллагена

Показатель	Год начала продаж				
	Первый	Второй	Третий	Четвертый	Пятый
Гидролизат коллагена из сырой кости КРС					
Объем продаж, кг	8046	8050	8050	8050	8050
Цена, руб/кг	950	1200	1200	1200	1450
Выручка, руб.	7643700	9660000	9660000	9660000	11672500
Себестоимость, руб.	5194440	5194440	5194440	5194440	5194440
Прибыль, руб.	2494260	4465560	4465560	4465560	6478060
Гидролизат коллагена из свиной шкурки					
Объем продаж, кг	8640	8650	8650	8650	8650
Цена, руб/кг	2500	2750	2750	2750	3200
Выручка, руб.	21600000	23787500	23787500	23787500	27680000
Себестоимость, руб.	6177600	6177600	6177600	6177600	6177600
Прибыль, руб.	15422400	17609900	17609900	17609900	21502400
Гидролизат коллагена из ног цыплят-бройлеров					
Объем продаж, кг	7992	8000	8000	8000	8000
Цена, руб/кг	3250	3500	3500	3500	3700
Выручка, руб.	25974000	28000000	28000000	28000000	29600000
Себестоимость, руб.	5994000	5994000	5994000	5994000	5994000
Прибыль, руб.	19980000	22006000	22006000	22006000	23606000

Динамику финансовых показателей от продаж гидролизатов коллагена можно представить графически при условии использования диапазона рыночных оптовых цен и незначительном росте производства (рисунок 7.3.1). Также стоит отметить, что себестоимость остается неизменной.

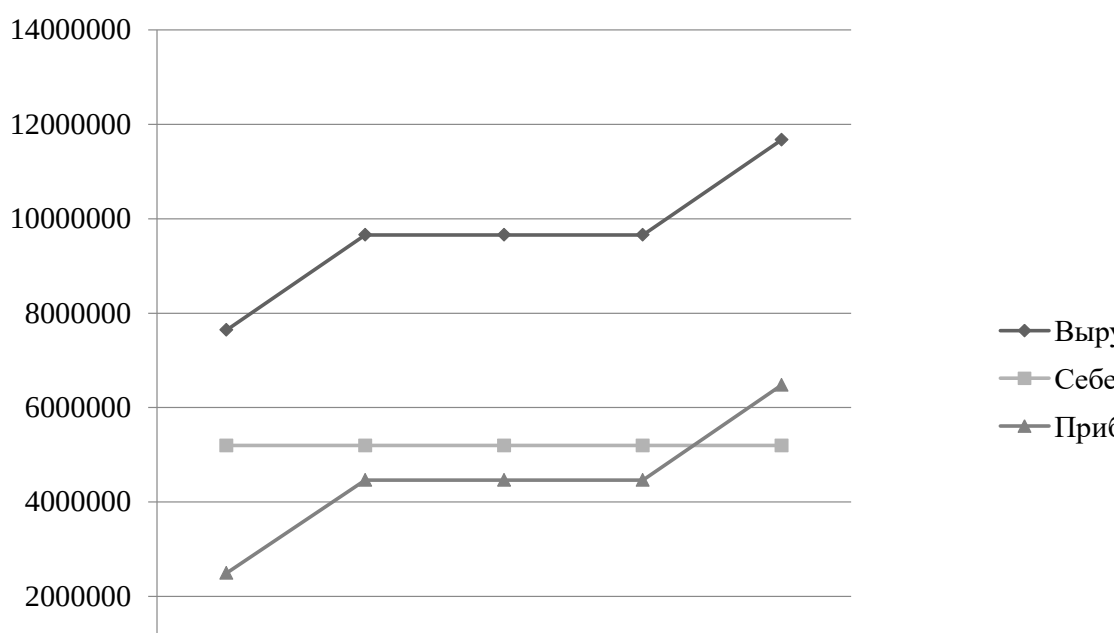


Рисунок 7.3.1 – Динамика финансовых показателей от продаж гидролизатов коллагена

Расчет технико-экономических показателей производства и реализации гидролизатов коллагена показал, что самая низкая себестоимость производства гидролизата коллагена – из сырой кости КРС, самая высокая – из свиной шкурки. Это связано с уровнем выхода коллагена за один производственный цикл. Высокую прибыль дает производство и реализация гидролизата коллагена из ног цыплят-бройлеров.

При использовании одного оборудования для производства гидролизатов коллагена в равных пропорциях его окупаемость быстрее всего наступит при производстве гидролизата коллагена из сырой кости КРС. Чуть больше времени требуется производству из свиной шкурки, самая длительная окупаемость у производства из ног цыплят-бройлеров, несмотря на то, что ценовая политика на рынке гидролизатов коллагена разная.

Самая высокая цена на рынке принадлежит гидролизату коллагена из ног цыплят-бройлеров. В дальнейшем производство гидролизата именно из этого вида сырья станет наиболее прибыльным при условии, что вся мощность

оборудования будет направлена на указанное производство. Данное утверждение окажется верным, если при прочих равных условиях за основу экономической стратегии взять ценовую политику на оптовом рынке гидролизатов коллагена.

С учетом того, что в основу экономической стратегии войдет стоимость сырья, то самым выгодным для производства будет считаться гидролизат коллагена из сырой кости КРС. Однако экономическая стратегия производства может быть основана на потребности фармацевтического рынка. Все виды производства рентабельны, но самую высокую рентабельность показало производство гидролизата коллагена из свиной шкурки и ног цыплят-бройлеров.

Для осуществления правильной стратегии экономической деятельности при производстве и реализации гидролизатов коллагена был построен прогноз прибыли с использованием метода экстраполяции. Он включал в себя следующий алгоритм:

- представление фактических данных и построение графика, который отражает зависимость результативного показателя (Y) от времени (t); на его основании определяется характер изменения результативного показателя во времени линейными зависимостями ($Y = a + bt$).

- определение параметров (a и b) кривых роста.
- расчет прогнозных значений показателя (Y).

Для расчета параметров уравнения использованы системы уравнений:

1. Параметры функции a , b определяли по формулам 7.3.7 и 7.3.8:

$$a = \frac{\sum_{i=1}^n Y - b \sum_{i=1}^n t}{n} \quad (7.3.7)$$

$$b = \frac{\sum_{i=1}^n Y \cdot t - \frac{\sum_{i=1}^n t \sum_{i=1}^n Y}{n}}{\sum_{i=1}^n t^2 - \frac{\left(\sum_{i=1}^n t\right)^2}{n}} \quad (7.3.8)$$

2. Далее решали систему уравнения:

$$\begin{cases} an + b \sum t = \sum y, \\ a \sum t + b \sum t^2 = \sum ty \end{cases} \quad (7.3.9)$$

По каждому прогнозируемому показателю были построены расчетные таблицы и графики прогнозных расчетов.

Так, при реализации метода экстраполяции для определения неизвестных параметров a и b линейной функции вида $y = a + bt$ составляется система уравнений по формулам, приведенным выше (формулы 7.3.7, 7.3.8 и 7.3.9).

Для определения параметров a и b при расчете прогноза прибыли от реализации гидролизата коллагена из костного сырья КРС составили расчетную таблицу 7.3.10.

Таблица 7.3.10 – Расчетная таблица для построения прогноза прибыли от продаж гидролизата коллагена из сырой кости КРС

Год начала продаж	Y , руб.	t	$Y \times t$, руб.	t^2	$Y = a + bt$, руб.
Первый	2494260	1	2494260	1	2494260
Второй	4465560	2	8931120	4	4465560
Третий	4465560	3	13396680	9	4567455
Четвертый	4465560	4	17862240	16	5354766
Пятый	6478060	5	22327800	25	6576445
Итого	22369000	15	65012100	55	—

Продолжение таблицы 7.3.10

Год начала продаж	Y , руб.	t	$Y \times t$, руб.	t^2	$Y = a + bt$, руб.
Прогноз					
Шестой	–	8	–	–	7344522
Седьмой	–	9	–	–	7687563
Восьмой	–	10	–	–	8976977

Прогнозирование прибыли от продаж методом экстраполяции позволяет сделать вывод о том, что общая тенденция поведения прогнозируемого показателя к росту во временном промежутке – 1–5 лет. Прогнозные показатели на шестой год составили 7344522 руб., на седьмой – 7687563 руб., на восьмой – 8976977 руб. На рисунке 7.3.2 отражены фактические данные прибыли от продаж и прогнозные показатели в виде тренда.

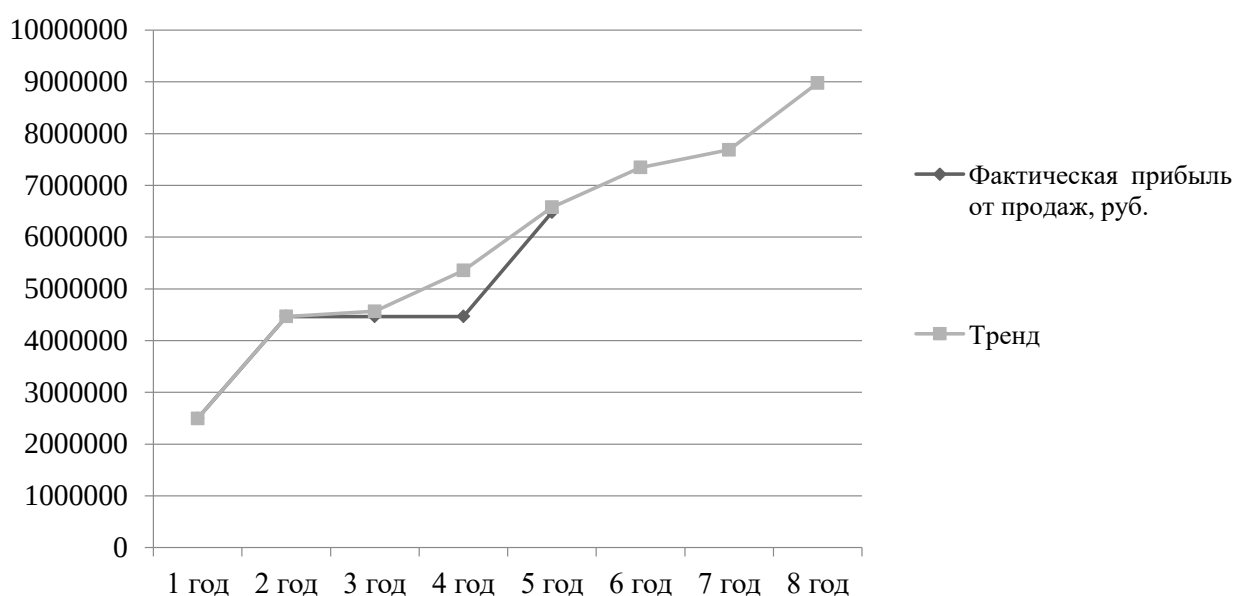


Рисунок 7.3.2 – Фактические и прогнозные показатели прибыли от продаж гидролизата коллагена из сырой кости КРС

Аналогичным образом был проведен расчет прогноза прибыли от реализации гидролизата коллагена из свиной шкурки. Для определения параметров a и b составлена расчетная таблица 7.3.11.

Таблица 7.3.11 – Расчетная таблица для построения прогноза прибыли от продаж гидролизата коллагена из свиной шкурки

Год начала продаж	Y , руб.	t	$Y \times t$, руб.	t^2	$Y = a + bt$, руб.
Первый	15422400	1	15422400	1	15422400
Второй	17609900	2	35219800	4	17701200
Третий	17609900	3	52829700	9	18254911
Четвертый	17609900	4	70439600	16	18578544
Пятый	21502400	5	107512000	25	19678566
Итого	89754500	15	281423500	55	–
Прогноз					
Шестой	–	8	–	–	20877668
Седьмой	–	9	–	–	21345877
Восьмой	–	10	–	–	21987555

Прогнозирование прибыли от продаж методом экстраполяции позволяет сделать вывод о том, что общая тенденция поведения прогнозируемого показателя к росту во временном промежутке – 1–5 лет. Прогнозные показатели на шестой год составили 20877668 руб., на седьмой – 21345877 руб., на восьмой – 21987555 руб. На рисунке 7.3.3 представлены фактические данные прибыли от продаж и прогнозные показатели в виде тренда.

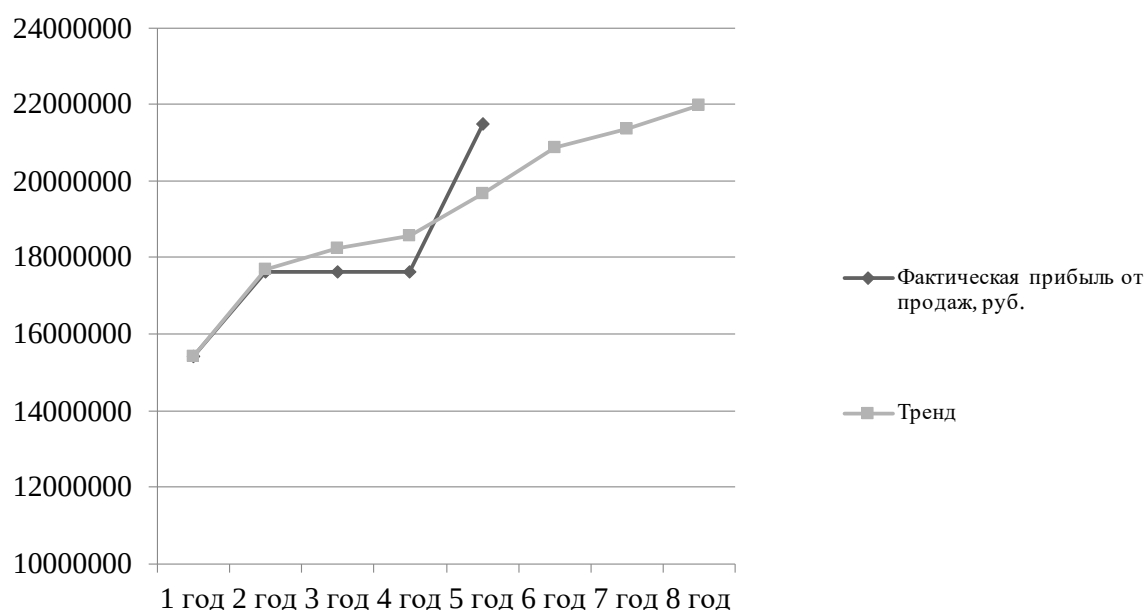


Рисунок 7.3.3 – Фактические и прогнозные показатели прибыли от продаж гидролизата коллагена из свиной шкурки

Для определения параметров a и b прогноза прибыли от продаж гидролизата коллагена из ног цыплят-бройлеров составили расчетную таблицу 7.3.12.

Таблица 7.3.12 – Расчетная таблица для построения прогноза прибыли от продаж гидролизата коллагена из ног цыплят-бройлеров

Год начала продаж	Y , руб.	t	$Y \times t$, руб.	t^2	$Y = a + bt$, руб.
Первый	19980000	1	19980000	1	19980000
Второй	22006000	2	39960000	4	20675477
Третий	22006000	3	59940000	9	21456000
Четвертый	22006000	4	79920000	16	21897660
Пятый	23606000	5	118030000	25	22231877
Итого	109604000	15	317830000	55	–
Прогноз					
Шестой	–	8	–	–	22766598
Седьмой	–	9	–	–	23354766
Восьмой	–	10	–	–	23879655

Прогнозирование прибыли от продаж гидролизата коллагена из ног цыплят-бройлеров методом экстраполяции позволяет утверждать, что общая тенденция поведения прогнозируемого показателя к росту во временном промежутке 1–5 лет. Прогнозные показатели на шестой год составили 22766598 руб., на седьмой – 23354766 руб., на восьмой – 23879655 руб. Фактические данные прибыли от продаж и прогнозные показатели в виде тренда отражены на рисунке 7.3.4.

Прогноз с использованием метода аналитического выравнивания в данном случае дает приблизительное прогнозирование, т. к. параметры линейного типа зависимости освобождены от влияния колеблемости. Однако представленные фактические данные не подвержены резким колебаниям. В этом случае можно предположить, что при сохранении прочих равных условий прогнозируемая величина может стать реальной.

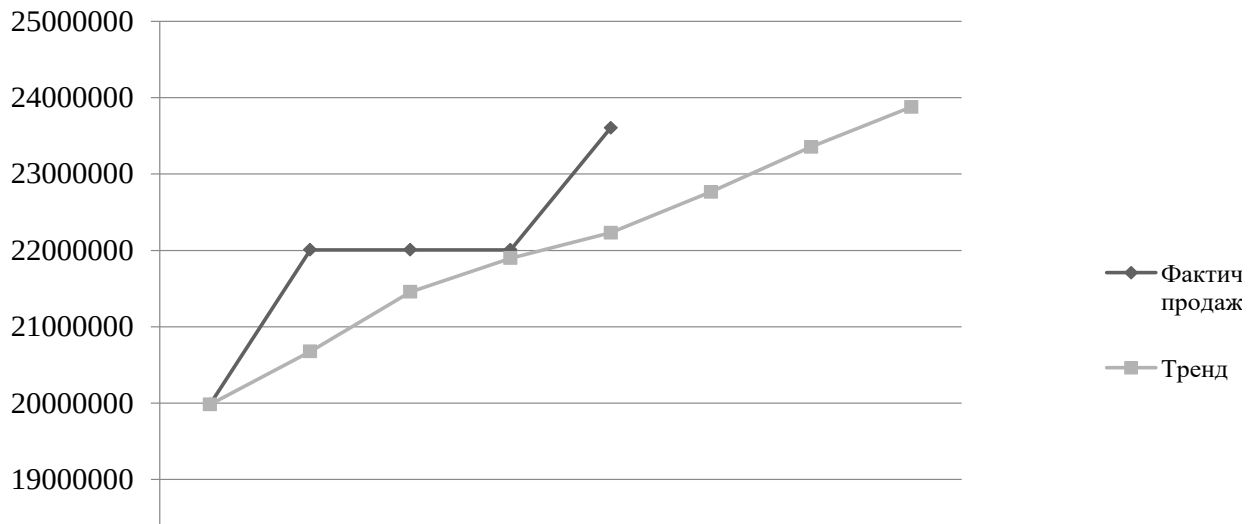


Рисунок 7.3.4 – Фактические и прогнозные показатели прибыли от продаж гидролизата коллагена из ног цыплят-бройлеров

В дальнейшем экономические расчеты и прогнозные показатели целесообразно использовать как для массового производства любого вида гидролизата коллагена, так и для проектов, посвященных импортозамещению в фармацевтической промышленности, внедрению технологий безотходного производства на мясоперерабатывающих предприятиях и организациях пищевой промышленности, разработке новых медицинских технологий.

ВЫВОДЫ

1. Проведены расчеты сырьевой базы, необходимой для производства гидролизатов коллагена. Выявлено, что на территориях СФО большим потенциалом обладает костное сырье крупного рогатого скота. Ежегодный средний потенциал сырьевой базы говяжьей кости составляет 4959 т, свиной шкурки – до 35099 т, что может обеспечить производство до 5265 т гидролизатов ежегодно. Анализ производственного потенциала ног цыплят-бройлеров демонстрирует значительный ресурсный потенциал с общим объемом сырья до 10152 т в год, что может обеспечить производство порядка 1523 т гидролизатов ежегодно. Исследуемые виды сырья имеют относительно высокую массовую долю белков (24,50–34,30%), что подтверждает высокий потенциал сырья в производстве белковых ингредиентов. При анализе аминокислот в исследуемом сырье выявлено, что аминокислоты пролин и гидроксипролин, которые играют важную роль в стабилизации структуры коллагена, находятся в пределах от 2,20 до 2,45 г/100 г и от 2,42 до 3,42 г/100 г соответственно.

2. Изучено влияние ферментного воздействия на процесс обезжиривания костного и мягкого коллагенсодержащего сырья, проведен подбор ферментов, способствующих оптимизации процесса обезжиривания: иммобилизованная липаза, липозим, солизим. Максимальный выход костного жира из образцов костного сырья КРС составил 7,52 %, из свиной шкурки – 2,58 %, из ног цыплят-бройлеров – 5,43 %. Предложено использовать на технологическом этапе ферментного обезжиривания сырой кости КРС иммобилизованную липазу в количестве 0,06 %, ног цыплят-бройлеров – солизим в количестве 0,08 %, свиной шкурки – липозим в количестве 0,08 %.

3. Разработаны схемы проведения ферментативного гидролиза коллагенсодержащего сырья. Доказано, что фермент микробиального происхождения пепсин (*Rhizomucor miehei*) с ферментной активностью $5 \cdot 10^{-3}$ кат,

с концентрацией фермента $0,15 \pm 0,01$ % от массы сборного костного сырья крупного рогатого скота при соотношении сырья к растворителю 1М HCl масса/объем – 1:3, и продолжительности обработки в течении 480 мин при pH 1,5, температуре $50 \pm 0,5$ °C способствует выходу коллагена в количестве не менее 15 % от массы исходного сырья. При гидролизе ног цыплят бройлера обработка ферментом микробияльного происхождения пепсин (*Bacillus subtilis*), с активностью $2 \cdot 10^{-3}$ кат, с концентрацией фермента $0,2 \pm 0,01$ % от массы сырья при соотношении сырья к растворителю 1М HCl масса/объем – 1:2, и продолжительности обработки в течение 120 мин при pH 1,5, температуре $55 \pm 0,5$ °C, способствовала выходу коллагена в количестве от 16,4 % от массы исходного сырья. В процессе исследования разработанных схем гидролиза свиных шкур определено, что обработка ферментом протеазой поларзим (*Acremonium chrysogenum*), с ферментной активностью $6 \cdot 10^{-4}$ кат с концентрацией фермента $0,3 \pm 0,01$ % от массы сырья при соотношении сырья к растворителю 1М HCl масса/объем – 1:4, при продолжительности обработки в течении 120 мин при pH 10,5, температуре $60 \pm 0,5$ °C способствовала выходу коллагена в количестве не менее 17 % от массы исходного сырья. Результаты подтверждены исследованиями физико-химических показателей и функциональных свойств полученных образцов.

4. Выявлено, что рациональными параметрами концентрирования методом ультрафильтрации являлись рабочее давление в пределах 0,20-0,25 мПа, с перепадом в напорном и возвратном коллекторе не более 20-50 кПа, рабочая температура раствора 30 °C, рекомендовано использование полимерных мембран. Определена рекомендуемая температура для наибольшего выхода готового продукта (образца гидролизата коллагена) – 85 оC. При данном температурном режиме сушки массовая доля влаги в готовом продукте составила не более 16 %, что является нормативным показателем. Как следствие, полученные гидролизаты не подверглись слеживанию и образованию комков.

5. Установлено, что продолжительность гидролиза костного сырья влияет на содержание белка и сухих веществ. Также отмечены отличия по показателю прозрачности раствора с массовой долей гидролизата коллагена 5 %. Так, в опытных образцах данный показатель находится в пределах 80-88 %. При этом прозрачность контрольного образца составляет 84 %, что на 4,54 % ниже наибольшего показателя опытного образца, полученного из ног цыплят-бройлеров.

6. С использованием доступных баз данных в модели *in silico* определено, что исследуемые пептидные последовательности обладали свойствами ингибиторов АПФ и ингибиторов ДПП-IV в гидролизатах белка. Выявлено, что наибольшим числом потенциально биоактивных пептидов обладали образец 6 гидролизатов коллагена из ног цыплят бройлера (число биоактивных пептидов – 5) и образец 8 гидролизатов коллагена из свиных шкурок (число биоактивных пептидов – 7). С помощью графика Рамачандрана заключили, что основные аминокислоты содержались в правозакрученной α -спирали. Данные, полученные по определению изоэлектрических точек образцов, подтвердили значимость методов получения желатина (ферментативно-кислотный и ферментативно-щелочный).

7. При исследовании биологического эффекта и безопасности полученных продуктов в модели *in vivo* установлено, что употребление подопытными животными образца гидролизата коллагена, полученного из ног цыплят-бройлеров, способствовало образованию более прочного рубца, что говорит о хорошем уровне ранозаживления (масса груза, необходимого для разрыва рубца, увеличивалась на 64,0 %), гистологически выявлено восстановление структуры кожи и формирование плотного рубца (до 90 мкм). Употребление экспериментальных образцов гидролизата коллагена, полученного из свиной шкуры, способствовало стимуляции иммунной системы подопытных мышей, выявлено повышение концентрации лейкоцитов на 24,4 %, увеличение концентрации моноцитов в 1,75 раза, установлено выраженное положительное влияние на степень ранозаживления: масса груза для разрыва рубца увеличивалась на 89,0 %. Гистологически выявлено восстановление структуры

кожи, образование волосяных фолликулов и сальных желез, формирование плотного рубца (до 90 мкм).

8. Исходя из проведенных научно-исследовательских работ составлены принципиальные технологические схемы производства образцов гидролизатов коллагена с применением ферментных и баромембранных технологий из костного и мягкого коллагенсодержащего сырья. Оптимизированы этапы обезжиривания и гидролиза используемого сырья, концентрирования коллагеновых бульонов полимерными фильтрами, а также рациональны и обоснованы параметры сушки полученных белковых продуктов.

9. Разработана техническая документация для внедрения в производство гидролизатов коллагена из вторичного сырья животного происхождения. Проведена производственная апробация результатов научной работы в ООО НПО «Здоровое питание» (г. Кемерово), ООО «Биолит» (г. Томск), ООО «Да» (г. Владикавказ). Выявлены потенциальные риски в процессе производства гидролизатов коллагена из вторичных сырьевых ресурсов животного происхождения, разработаны мероприятия и меры по их предотвращению. Результаты расчета технико-экономических показателей производства и реализации гидролизатов коллагена показали, что самая низкая себестоимость производства гидролизата коллагена у костного материала КРС, самая высокая – у свиной шкурки. Это связано с уровнем выхода коллагена за один производственный цикл. Высокую прибыль дает производство и реализация гидролизата коллагена из ног цыплят-бройлеров. Так, прогнозные показатели прибыли на шестой год составили 22766598 руб., на седьмой – 23354766 руб., на восьмой – 23879655 руб.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- ЕС – эпикатехин;
- АЛТ – аланинаминотрансфераза;
- АПФ – ангиотензинпревращающий фермент;
- АСТ – аспартатаминотрансфераза;
- БГКП – бактерии группы кишечной палочки;
- ВВОФ – вероятность возникновения опасного фактора;
- ГКНЦБ – гидролизат коллагена из ног цыплят-бройлеров;
- ГКСК – гидролизат коллагена из сырой кости КРС (говяжья);
- ГКСШ – гидролизат коллагена из свиной шкурки;
- ГХЦГ – гексахлоран;
- ДДС-Na – анионный детергент додецилсульфата натрия;
- ДДТ – трихлорметилди-(π -хлорфенил)-метан;
- ДПП-IV – ингибиторы дипептидилпептидазы IV;
- ККТ – критические контрольные точки;
- КМАФАНМ – количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов;
- КРС – крупный рогатый скот;
- ММД – моделирование молекулярной динамики;
- СФО – Сибирский федеральный округ;
- СЭМ – сканирующий электронный микроскоп;
- ТП – тяжесть последствия;
- УФ – ультрафильтрация;
- ЕСG – эпикатехин галлат;
- EGC – эпигаллокатехин;
- EGCG – эпигаллокатехин галлата;

pI – изоэлектрическая точка;

ЕСМ – внеклеточный матрикс.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агапова, Л.О. Получение гидролизатов коллагена и изучение их функциональных свойств / Л.О. Агапова // Тенденции и проблемы развития современной науки: сборник статей Международной научно-практической конференции. – Петрозаводск: Новая наука, 2023. – С. 307–314.
2. Алдабергенов, Д.С. Перспективы применения фибриногена и коллагена в фармацевтической технологии / Д.С. Алдабергенов, Г.Н. Имирова, Г.О. Устенова // Вестник Казахского национального медицинского университета. – 2016. – № 3. – С. 208–210.
3. Аникина, А.А. Технологические аспекты производства функциональных коллагенсодержащих биологически активных продуктов из водных биоресурсов / А.А. Аникина, А.И. Ванина, С.Ю. Пономаренко // Комплексные исследования в рыбохозяйственной отрасли: материалы VII Международной научно-технической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. – Владивосток: Дальрыбвтуз, 2022. – С. 144–148.
4. Антипова, Л.В. Биотехнология коллагеновых пищевых ингредиентов / Л.В. Антипова, С.А. Сторублевцев // Мясная индустрия. – 2010. – № 6. – С. 16–18.
5. Антипова, Л.В. Коллагены: источники, свойства, применение: монография / Л.В. Антипова, С.А. Сторублевцев, С.С. Антипов. – Санкт-Петербург: ГИОРД, 2019. – 408 с. – ISBN 978-5-98879-173-7.
6. Антипова, Л.В. Свойства пищевых коллагеновых ингредиентов / Л.В. Антипова, С.А. Сторублевцев // Мясная индустрия. – 2009. – № 10. – С. 49–50.
7. Баженов, Е.А. Направления производства и использования пищевых ферментных препаратов в зарубежной практике / Е.А. Баженов, Л.С. Байдалинова // Балтийский морской форум: материалы X Международного Балтийского морского форума. – Калининград: БГАРФ, 2022. – Т. 4. – С. 12–20.

8. Болотова, О.А. Исследование структурных особенностей биоконпозитов на основе коллагенов I, IV и V типов методом ИК-Фурье спектроскопии: направление 16.03.01 Техническая физика: выпускная квалификационная работа бакалавра / О.А. Болотова. – Санкт-Петербург, 2023. – DOI: 10.18720/SPBPU/3/2023/vr/vr23-4446.

9. Болхонов, Б.А. Компьютерное моделирование органических форм цинка и селена на основе белка коллагена / Б.А. Болхонов, С.Д. Жамсаранова, Д.В. Шалбуев, Т.Б. Тумурова // Вестник ВСГУТУ. – 2024. – № 2. – С. 46–54.

10. Борzych, О.Б. Синтез коллагена в коже, его функциональные и структурные особенности / О.Б. Борzych, Н.А. Шнайдер, Е.И. Карпова [и др.] // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2021. – Т. 16. – № 4. – С. 443–450.

11. Бурякина, А.В. Методические рекомендации по доклиническому изучению дерматотропных лекарственных средств / А.В. Бурякина, Н.Ю. Фролова, Т.И. Мельникова [и др.] // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / ред. А.Н. Миронова. – Москва: Гриф и К, 2012. – С. 738–744.

12. Волик, В.Г. Рациональное использование побочных ресурсов птицепереработки в России / В.Г. Волик, В.В. Гушин, И.В. Глазкова // Мясные технологии. – 2022. – № 5(233). – С. 16–20. – DOI: 10.33465/2308-2941-2022-05-16-20.

13. Володин, С.Н. Российский рынок биомедицинских технологий: преимущества, сложности и возможности участия инвесторов / С.Н. Володин, Б.А. Кириллов // Валютное регулирование. Валютный контроль. – 2017. – № 11. – С. 50–58.

14. Ворошилин, Р.А. Получение сухих белковых концентратов из вторичных продуктов желатинового производства / Р.А. Ворошилин, А.Ю. Просеков, М.Г. Курбанова // Новые технологии. – 2021. – № 2. – С. 15–24.

15. Гиро, Т.М. Биомодификация коллагенсодержащих субпродуктов методом ферментативного гидролиза / Т.М. Гиро, С.С. Зубов, А.С. Яшин [и др.] // Техника и технология пищевых производств. – 2019. – Т. 49. – № 2. – С. 262–269.

16. Горбунова, В.Н. Коллагены и коллагеновые гены / В.Н. Горбунова, Т.И. Кадурина // Медицинская генетика. – 2006. – Т. 5. – № 6. – С. 3–10.
17. ГОСТ 23041-2015. Мясо и мясные продукты. Метод определения оксипролина. – Москва: Стандартинформ, 2019. – 9 с.
18. ГОСТ 23042-2015. Мясо и мясные продукты. Методы определения жира. – Москва: Стандартинформ, 2019. – 12 с.
19. ГОСТ 25011-2017. Мясо и мясные продукты. Методы определения белка. – Москва: Стандартинформ, 2018. – 16 с.
20. ГОСТ 25292-2017. Жиры животные топленые пищевые. – Москва: Стандартинформ, 2019. – 20 с.
21. ГОСТ 31727-2012. Мясо и мясные продукты. Метод определения массовой доли общей золы. – Москва: Стандартинформ, 2013. – 12 с.
22. ГОСТ 31727-2012. Мясо и мясные продукты. Методы определения золы. – Москва: Стандартинформ, 2019. – 12 с.
23. ГОСТ 33044-2014. Принципы надлежащей лабораторной практики. – Москва: Стандартинформ, 2019. – 22 с.
24. ГОСТ 33216-2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами (переиздание). – Москва: Стандартинформ, 2019. – 24 с.
25. ГОСТ 33319-2015. Мясо и мясные продукты. Метод определения массовой доли влаги. – Москва: Стандартинформ, 2016. – 8 с.
26. ГОСТ 33692-2015. Белки животные соединительнотканые. Общие технические условия. – Москва: Стандартинформ, 2016. – 27 с.
27. ГОСТ 34566-2019. Комбикорма полнорационные для лабораторных животных. Технические условия. – Москва: Стандартинформ, 2019. – 14 с.
28. ГОСТ 8285-91. Жиры животные топленые. Правила приемки и методы испытания. – Москва: Стандартинформ, 2005. – 12 с.
29. ГОСТ Р 55480-2013. Мясо и мясные продукты. Метод определения кислотного числа (переиздание). – Москва: Стандартинформ, 2018. – 8 с.

30. ГОСТ Р ИСО 22000-2019. Система менеджмента пищевой безопасности. Требования к любой организации, участвующей в цепи создания пищевой продукции. – Москва: Стандартинформ, 2019 – 47 с.
31. ГОСТ ISO 3961-2020. Межгосударственный стандарт. Жиры и масла животные и растительные. Определение йодного числа. – Москва: Стандартинформ, 2020. – 18 с.
32. ГОСТ ISO 6321-2019. Жиры и масла животные и растительные. Определение температуры плавления в открытых капиллярах (температура скольжения). – Москва: Стандартинформ, 2017. – 19 с.
33. Деркач, Н.Н. Особенности коллагенообразования в стромально-сосудистом компоненте тканей грыжевых ворот и грыжевого мешка у больных с послеоперационными вентральными грыжами / Н.Н. Деркач, Э.Р. Кондратюк, С.Г. Гривенко // *Innova*. – 2016. – № 4(5). – С. 25–28.
34. Донец, М.А. Особенности строения, функции коллагена и заболевания, вызванные нарушением его синтеза / М.А. Донец // *Техника и технология современных производств: сборник статей III Всероссийской научно-практической конференции*. – Пенза: ПГАУ, 2022. – С. 30–33.
35. Дуденкова, В.В. Оценка структуры и состояния коллагена по сигналу генерации второй гармоники / В.В. Дуденкова, М.В. Ширманова, М.М. Лукина [и др.] // *Успехи биологической химии*. – 2019. – Т. 59. – С. 181–218.
36. Дыдыкина, И.С. Значение неденатурированного коллагена для нормализации функции хрящевой ткани суставов / И.С. Дыдыкина, П.С. Коваленко, А.А. Коваленко, А.В. Аболешина // *Медицинский совет*. – 2022. – Т. 16. – № 14. – С. 145–153.
37. Ерыкалина, Е.А. Коллаген: принимать или нет? Миф или реальность / Е.А. Ерыкалина // *Актуальные вопросы спортивного питания: материалы II студенческой научно-практической конференции*. – Челябинск: УралГУФК, 2020. – С. 8–14.

38. Жамсаранова, С. Д. Ферментативная конверсия пищевого белка и оценка антиоксидантной активности пептидов / С.Д. Жамсаранова, С.Н. Лебедева, Б. А. Болхонов, Д. В. Соколов // Вестник ВСГУТУ. – 2021. – № 4(83). – С. 5–14. – DOI: 10.53980/24131997_2021_4_5.

39. Жаринов, А.И. Сравнительная оценка состава и свойств белковых препаратов, используемых в технологии мясных продуктов. Часть 1 / А.И. Жаринов, О.В. Кузнецова // Все о мясе. – 2021. – № 2. – С. 22–24. – DOI: 10.21323/2071-2499-2021-2-22-24.

40. Животенко, А.П. Митоген-активируемые протеинкиназы и их значимость в репаративном процессе при ламинэктомии: фундаментальные аспекты / А.П. Животенко, И.А. Шурыгина, О.А. Гольдберг, З.В. Кошкарёва // Современные проблемы науки и образования. – 2020. – Т. 4. – DOI: 10.17513/spno.29919.

41. Куцакова, В.Е. Зависимость технологических свойств гидролизатов коллагена от концентрации катализатора / В.Е. Куцакова, С.В. Фролов, М.И. Кременевская, Е.В. Москвичева // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2009. – № 12. – С. 20–22.

42. Зяйнитдинов, Д.Р. Исследование иммобилизации полифенолов овсяных отрубей в комплексные коацерваты сывороточного белка и мальтодекстрина / Д.Р. Зяйнитдинов, А.В. Евтеев, А.В. Банникова // Техника и технология пищевых производств. – 2020. – Т. 50. – № 3. – С. 460–469.

43. Иванов, И.С. Влияние экзогенных эмбриональных фибробластов на соотношение коллагена I и III типов в тканях парапротезной капсулы у мышей / И.С. Иванов, В.А. Лазаренко, С.В. Иванов [и др.] // Цитология. – 2012. – Т. 54. – № 10. – С. 783–789.

44. Исаева, М.А. Современное состояние и перспективы использования коллагена / М.А. Исаева // Научные исследования и современное образование. – 2021. – С. 50–53.

45. Исмаилова, Д.Ю. Переработка вторичного коллагенсодержащего сырья на пищевые цели / Д.Ю. Исмаилова, В.Г. Волик // Птица и птицепродукты. – 2024. – № 4. – С. 38–41. – DOI: 10.30975/2073-4999-2024-26-4-38-41.

46. Калужских, А.Г. Изменения свойств мяса при применении ферментных препаратов / А.Г. Калужских, Е. Грачева, Д. Лаврова // Новые концептуальные подходы к решению глобальной проблемы обеспечения продовольственной безопасности в современных условиях: сборник статей VI Международной научно-практической конференции. – Курск: ЮЗГУ, 2019. – С. 153–156.

47. Касаева, Г.Р. Фибробласты и их применение в современных методах омоложения кожи / Г.Р. Касаева, Г.А. Юнси, С.А. Василенко // Синергия наук. – 2019. – № 31. – С. 1438–1448.

48. Ким, О.В. Метаболизм коллагена / О.В. Ким // Zamonaviy ta'limda fan va innovatsion tadqiqotlar jurnali. – 2024. – Т. 2. – № 18. – С. 59–67.

49. Кириллов, Д.В. Биотехнологии в пищевом производстве / Д.В. Кириллов, М.Д. Орехова, А.В. Горбачев, Р.А. Цыпуштанов // Агропродовольственная экономика. – 2022. – № 4. – С. 7–12.

50. Клипак, М.Б. Перспективы использования отходов рыбной промышленности в технологии продуктов питания / М.Б. Клипак // Комплексные исследования в рыбохозяйственной отрасли: материалы VII Международной научно-технической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. – Владивосток: Дальрыбвтуз, 2022. – С. 191–194.

51. Коллагенсодержащая матрица для иммобилизации биологически активных веществ / Е.И. Титов, С.К. Апраксина, И.О. Васильева [и др.] // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2013. – № 3. – С. 39–44.

52. Колобков, В.А. Эффективность новых ферментных препаратов при гидролизе сырья животного происхождения / В.А. Колобков, В.Г. Волик // Птица и птицепродукты. – 2023. – № 4. – С. 48–51. – DOI: 10.30975/2073-4999-2023-25-4-48-51.

53. Костылева, Е.В. Использование протеолитических ферментов для получения белковых гидролизатов пищевого назначения из вторичного сырья / Е.В. Костылева, А.С. Середа, И.А. Великорецкая [и др.] // Вопросы питания. – 2023. – Т. 92. – № 1(545). – С. 116–132.

54. Куликова, Ю.В. Методы экстракции морского коллагена для решения задач регенеративной медицины / Ю.В. Куликова, С.А. Сухих, О.О. Бабич // Регенерация органов и тканей. – 2024. – Т. 2. – №. 1. – С. 29–45.

55. Куцакова, В.Е. Пищевые белковые ингредиенты из побочных продуктов мясопереработки / В.Е. Куцакова, А.А. Семенова // Все о мясе. – 2012. – № 2. – С. 10–12.

56. Латипова, Ф.Б. Коллаген – это секрет упругости вашей кожи / Ф.Б. Латипова // Международная конференция академических наук: сборник статей Международной научной конференции. – Улан-Удэ: Аид, 2024. – Т. 3. – № 5. – С. 37–40.

57. Левкович, Т.В. Ассоциация полиморфизма RS565470 $\alpha 1$ цепи гена коллагена IV типа с уровнем коллагена IV типа у пациентов мужского пола с артериальной гипертензией / Т.В. Левкович, Т.П. Пронько, А.С. Бабенко [и др.] // Межвузовский научный симпозиум с международным участием, посвященный 110-летию со дня рождения члена-корреспондента НАН Беларуси Н.И. Аринчина: сборник материалов. – Гродно: ГрГМУ, 2024. – С. 140–142.

58. Лисицын, А.Б. Поликомпонентная биологически активная добавка с очищающим эффектом / А.Б. Лисицын, А.И. Сурнина, А.В. Устинова // Мясная индустрия. – 2011. – № 12. – С. 28–32.

59. Лисицын, А.Б. Современные тенденции развития индустрии функциональных пищевых продуктов в России и за рубежом / А.Б. Лисицын, И.М. Чернуха, О.И. Лунина // Теория и практика переработки мяса. – 2018. – Т. 3. – № 1. – С. 29–45.

60. Лукин, А.А. Структурно-механические и химические особенности нативного коллагена / А.А. Лукин // Международное сотрудничество: опыт, проблемы и перспективы. – 2020. – С. 51–54.
61. Лукин, А.А. Ферментативный гидролиз мясных белков протеазами различного происхождения / А.А. Лукин, М.Б. Данилов, С.В. Андреева // Вестник ВСГУТУ. – 2021. – № 1(80). – С. 39–46.
62. Макарова, Е.Л. Структурно-функциональные свойства коллагена рыб и крупного рогатого скота / Е.Л. Макарова, И.В. Петракова // Заметки ученого. – 2019. – № 8. – С. 32–34.
63. Мозговая, Е.А. Применение коллагеновых структур в продуктах функционального назначения / Е.А. Мозговая // Пищевые инновации и биотехнологии. – 2022. – С. 507–510.
64. Морозова, С.А. Использование биотехнологической обработки коллагенсодержащего сырья для получения белковых гидролизатов / С.А. Морозова, В.Я. Пономарев, Э.Ш. Юнусов, Г.О. Ежкова // Пищевая промышленность. – 2019. – № 4. – С. 67–69. – DOI: 10.24411/0235-2486-2019-10034.
65. Неклюдов, А.Д. Выделение коллагенов из органов и тканей млекопитающих / А.Д. Неклюдов // Экологические системы и приборы. – 2005. – № 11. – С. 27–36.
66. Неклюдов, А.Д. Пищевые волокна животного происхождения. Коллаген и его фракции как необходимые компоненты новых и эффективных пищевых продуктов / А.Д. Неклюдов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2003. – Т. 39. – № 3. – С. 261–272.
67. Титов, Е.И. О микроструктуре коллагенсодержащего сырья, модифицированного щелочными протеиназами / Е.И. Титов, Е. Литвинова, С.Н. Кидяев, В.А. Пчелкина // Мясная индустрия. – 2017. – № 8. – С. 41–43.

68. Остроушко, А.П. Коллаген и его применение при лечении ран / А.П. Остроушко, А.А. Андреев, А.Ю. Ногтиева, А.А. Глухов // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. – 2021. – Т. 14. – № 1. – С. 85–90.

69. Технологическая линия для получения белковых гидролизатов и автолизатов: патент на полезную модель № 34534 U1 Российская Федерация, МПК C12F 3/10 / Н.А. Баер, А.Д. Неклюдов, Х.А. Купов, В.А. Зиборов. – № 2003124884/20; заявл. 19.08.2003; опубл. 10.12.2003.

70. Способ изготовления сухого рыбного коллагена: патент RU 2 232 515 C2 Российская Федерация, МПК A23L 1/0562, A23J 3/04, A23L 1/326 / Е.Н. Чертова, Л.Г. Заметалина, О.А. Харченко, Л.П. Истранов, Р.К. Абоянц; заявитель Федеральное государственное унитарное предприятие «Каспийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства». – № 2002113968/13; заявл. 28.05.2002; опубл. 20.07.2004.

71. Способ получения сухого микропорошка коллагена: патент RU 2 604 504 C2 Российская Федерация, МПК A23L 29/281 / Д.К. Гармаева, П.В. Никифоров; заявитель Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова». – № 2015111757/13; заявл. 31.03.2015; опубл. 10.12.2016.

72. Гидролизат коллагена и его применение: патент RU 2 671 401 C2 Российская Федерация, A61K 38/01, A61K 35/32, A61P 19/10 / Ш. Эссер, М. Гизен-Визе, Х.-У. Фрех, Ш. Хаусманнс; заявитель А.Г. Галита. – № 2015121573; заявл. 27.12.2016; опубл. 31.10.2018.

73. Способ получения пищевых коллагенсодержащих продуктов: патент RU 2 734 034 C1 Российская Федерация, A23L 29/281, A23L 17/00, A23L 33/28 / В.И. Воробьев; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Калининградский государственный технический университет». – № 2019134571; заявл. 28.10.2019; опубл. 12.10.2020.

74. Способ получения пептидного гидролизата коллагена из рогов: патент RU 2 752 943 C1 Российская Федерация, A61K 35/32, B01D 11/02 / А.Н. Осинцев, А.В. Шарабанов; заявитель А.Н. Осинцева. – № 2020138763; заявл. 11.08.2021; опубл. 11.08.2021.

75. Способ получения коллагена из плавательных пузырей пресноводных рыб: патент RU 2 766 694 C1 Российская Федерация, A23L 29/281 / М.Д. Мукатова, Н.А. Киричко, С.А. Сколков, Ш.К. Хайрешева; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Астраханский государственный технический университет». – № 2021111300; заявл. 21.04.2021; опубл. 15.03.2022.

76. Способ получения наноразмерного лиофилизированного гидролизата коллагена: патент RU 2 824 997 C1 Российская Федерация, МПК A61K 35/60, A61K 38/01, B82Y 40/00 / С.Ф. Артахинова, Н.Н. Петрова, А.И. Исакова; заявитель Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова». – № 2023135991; заявл. 29.12.2023; опубл. 19.08.2024.

77. Способ получения медицинского препарата из трубчатой кости крупного рогатого скота: патент RU 2 159 117 C1 Российская Федерация, МПК A61K 35/32 / М.Л. Файвишевский, Р.В. Илюхина, Л.А. Люблинская, И.В. Исаева; заявитель Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности. – № 99127797/14; заявл. 28.12.1999; опубл. 20.11.2000.

78. Способ получения гидролизата рыбного коллагена: патент RU 2 665 589 C2 Российская Федерация, МПК A23J 1/04, A23J 3/04, A23J 3/30 / М.В. Астанина, Л.Л. Семенычева, Н.В. Кулешова, С.В. Сердюк; заявитель Общество с ограниченной ответственностью «Хеликсан». – № 2016150599; заявл. 22.12.2016; опубл. 31.08.2018.

79. Способ получения коллагенового материала в виде частиц и полученный этим способом коллагеновый материал: патент RU 2 756 795 С2 Российская Федерация, МПК А23J 1/10, А23L 29/281, С08Н 1/06 / Т. Майснер, А.В. Слот; заявитель А.Г. Гелита. – № 2018143971; заявл. 14.02.2017; опубл. 05.10.2021.

80. Антипова, Л.В. Перспектива создания препаратов с асептическими свойствами на основе гидролизovaných форм коллагена / Л.В. Антипова, С.А. Сторублевцев, А.В. Гребенщиков [и др.] // Международный журнал экспериментального образования. – 2011. – № 11. – С. 50–51.

81. Потехина, Ю.П. Структура и функции коллагена / Ю.П. Потехина // Российский остеопатический журнал. – 2016. – № 1-2. – С. 87–99.

82. Куцакова, В.Е. Разработка технологии гидролиза мышечной ткани из мясокостного остатка птицы / В.Е. Куцакова, М.И. Кременевская, А.Ю. Погоняева, Т.С. Калмыкова // Мясная индустрия. – 2013. – № 4. – С. 65–66.

83. Реброва, Г.А. Некоторые факторы старения коллагена *in vivo* и *in vitro* / Г.А. Реброва, В.В. Бержицкая, В.К. Василевский [и др.] // Биомедицинская химия. – 2003. – Т. 49. – № 2. – С. 128–137.

84. Римарева, Л.В. Ферментные препараты и биокаталитические процессы в пищевой промышленности / Л.В. Римарева, Е.М. Серб, Е.Н. Соколова, Ю.А. Борщева, Н.И. Игнатова // Вопросы питания. – 2017. – Т. 86. – № 5. – С. 63–74.

85. Рогов, И.А. Структура на наноуровне ферментированной соединительной ткани говядины / И.А. Рогов, Т.Н. Данильчук, Г.Г. Абдрашитова // Мясная индустрия. – 2013. – № 6. – С. 26–28.

86. Сергеев, В.Н. Использование функциональных продуктов из мяса при заболеваниях опорно-двигательного аппарата / В.Н. Сергеев, Т.В. Апханова, А.С. Дыдыкин [и др.] // Вестник новых медицинских технологий. – 2020. – Т. 14. – № 4. – С. 35–43.

87. Галстян, А.Г. Современные подходы к хранению и эффективной переработке сельскохозяйственной продукции для получения высококачественных пищевых продуктов / А.Г. Галстян, Л.М. Аксенова, А.Б. Лисицын [и др.] // Вестник Российской академии наук. – 2019. – Т. 89. – № 5. – С. 539–542. – DOI: 10.31857/S0869-5873895539-542.

88. Фадеев, А.С. Мономолекулярные слои коллагена / А.С. Фадеев, С.М. Левачев, В.Н. Измайлова // Вестник Московского университета. Серия 2. Химия. – 1999. – Т. 40. – № 4. – С. 270–275.

89. Файвишевский, М.Л. Переработка кости на мясоперерабатывающих предприятиях / М.Л. Файвишевский // Мясная индустрия. – 2010. – № 1. – С. 62–65.

90. Худоярова, Д. Биомаркеры и процесс рубцевания / Д. Худоярова, Ш. Туракулова, З. Шопулотова // Инновационные исследования в современном мире: теория и практика. – 2024. – Т. 3. – № 9. – С. 43–47.

91. Ших, Е.В. Клинико-фармакологические аспекты применения гидролизованного коллагена второго типа для профилактики и лечения остеоартроза / Е.В. Ших // Фармакология & Фармакотерапия. – 2021. – № 4. – С. 10–18.

92. Щепихин, Е.И. Матриксные металлопротеиназы и пропептид коллагена при интерстициальных заболеваниях легких: предварительные результаты пилотного исследования / Е.И. Щепихин, Г.С. Шепелькова, Е.И. Шмелев [и др.] // Доктор.Ру. – 2025. – Т. 24. – № 2.

93. Юнусов, Э.Ш. Изучение гидролиза коллагенсодержащего сырья протеолитическими ферментами / Э.Ш. Юнусов, В.Я. Пономарев, С.А. Морозова, Г. О. Ежкова // Вестник Технологического университета. – 2016. – Т. 19, № 24. – С. 168–170.

94. Abdelhedi, O. In silico analysis and antihypertensive effect of ACE-inhibitory peptides from smooth-hound viscera protein hydrolysate: Enzyme-peptide interaction study using molecular docking simulation / O. Abdelhedi, R. Nasri, M. Jridi, [et al.] // Process Biochemistry. – 2017. – P. 145–159.

95. Abdollahi, M. Sequential extraction of gel-forming proteins, collagen and collagen hydrolysate from gutted silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*), a biorefinery approach / M. Abdollahi, M. Rezaei, A. Jafarpour, I. Undeland // *Food Chemistry*. – 2018. – Vol. 242. – P. 568–578.
96. Abdullah, A.A. Modification of marine bioactive peptides: Strategy to improve the biological activity, stability, and taste properties / A.A. Abdullah, S. Al-Dalali, Y. Hou [et al.] // *Food and Bioprocess Technology*. – 2024. – Vol. 17. – P. 1412–1433.
97. Sánchez, A. Bioactive peptides: A review / A. Sánchez, A. Vázquez // *Food Quality and Safety*. – 2017. – Vol. 1. – Iss. 1. – P. 29–46.
98. Aguilar-Toalá, J.E. Identification of chia seed (*Salvia hispanica* L.) peptides with enzyme inhibition activity towards skin-aging enzymes / J.E. Aguilar-Toalá, A.M. Liceaga // *Amino Acids*. – 2020. – Vol. 52. – P. 1149–1159.
99. Agyei, D. Bioinformatics and peptidomics approaches to the discovery and analysis of food-derived bioactive peptides / D. Agyei, A. Tsopmo, C.C. Udenigwe // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2018. – Vol. 410. – P. 3463–3472.
100. Ahmed, R. Subcritical water hydrolysis for the production of bioactive peptides from tuna skin collagen / R. Ahmed, B.-S. Chun // *The Journal of Supercritical Fluids*. – 2018. – Vol. 141. – P. 88–96.
101. Akbarian, M. Bioactive peptides: Synthesis, sources, applications, and proposed mechanisms of action / M. Akbarian, A. Khani, S. Eghbalpour, V.N. Uversky // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23. – DOI: 10.3390/ijms23031445.
102. Anshika, G. Cytokines inhibitory mechanism of *Prunus domestica* L. (Plum) peptides as potential immunomodulators against systemic lupus erythematosus: an in-silico screening / A. Gupta, T. Jamal, P. Rajbhar [et al.] // *In Silico Pharmacology*. – 2024. – Vol. 12. – Iss. 12. – DOI: 10.1007/s40203-023-00188-8.
103. Noman, A. Fractionation and purification of antioxidant peptides from Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) protein hydrolysates prepared using papain and

alcalase 2.4L / A. Noman, Y. Wang, C. Zhang [et al.] // *Arabian Journal of Chemistry*. – 2022. – Vol. 15. – Iss. 12. – DOI: 10.1016/j.arabjc.2022.104368.

104. Lisitsyn, A. Approaches in animal proteins and natural polysaccharides application for food packaging: Edible film production and quality estimation / A. Lisitsyn, A. Semenova, V. Nasonova [et al.] // *Polymers*. – 2021. – Vol. 13. – Iss. 10. – DOI: 10.3390/polym13101592.

105. Barati, M. Techniques, perspectives, and challenges of bioactive peptide generation: A comprehensive systematic review / M. Barati, F. Javanmardi, S.M.H. Mousavi Jazayeri [et al.] // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. – 2020. – Vol. 19. – Iss. 4. – P. 1488–1520.

106. Bella, J. Fibrillar collagens / J. Bella, D.J.S. Hulmes // *Fibrous proteins: Structures and mechanisms* / eds. D.A.D. Parry, J.M. Squire. – Cham: Springer, 2017. – P. 457–490.

107. Benson, H.A. Transdermal drug delivery: Penetration enhancement techniques / H.A. Benson // *Current Drug Delivery*. – 2005. – Vol. 2. – Iss. 1. – P. 23–33.

108. Bhagwat, P.K. Isolation, characterization and valorizable applications of fish scale collagen in food and agriculture industries / P.K. Bhagwat, P.B. Dandge // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. – 2016. – Vol. 7. – P. 234–240.

109. Bhandari, D. A review on bioactive peptides: Physiological functions, bioavailability and safety / D. Bhandari, S. Rafiq, Y. Gat [et al.] // *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. – 2020. – Vol. 26. – P. 139–150.

110. Bijaya-Singh. Fertilizers and nitrate pollution of surface and ground water: An increasingly pervasive global problem / Bijaya-Singh, E. Craswell // *SN Applied Sciences*. – 2021. – Vol. 3. – Iss. 518. – DOI: 10.1007/s42452-021-04521-8.

111. Bilek, S.E. Fruit juice drink production containing hydrolyzed collagen / S.E. Bilek, S.K. Bayram // *Journal of Functional Foods*. – 2015. – Vol. 14. – P. 562–569.

112. Kurchaeva, E.E. Biotechnological approaches in processing of secondary raw materials of meat industry / E.E. Kurchaeva, V.I. Manzhesov, I.V. Maksimov [et al.] // *Periodico Tche Quimica*. – 2018. – Vol. 15. – Iss. 30. – P. 717–724.

113. Bolke, L. A collagen supplement improves skin hydration, elasticity, roughness, and density: Results of a randomized, placebo-controlled, blind study / L. Bolke, G. Schlippe, J. Gerß, W. Voss // *Nutrients*. – 2019. – Vol. 11. – DOI: 10.3390/nu11102494
114. Borrajo, P. Antioxidant and antimicrobial activity of peptides extracted from meat by-products: A review / P. Borrajo, M. Pateiro, F.J. Barba [et al.] // *Food Analytical Methods*. – 2019. – Vol. 12. – P. 2401–2415.
115. Brandao-Rangel, M.A.R. Hydrolyzed collagen induces an anti-inflammatory response that induces proliferation of skin fibroblast and keratinocytes / M.A.R. Brandao-Rangel, C. R. Oliveira, O. Da Silva [et al.] // *Nutrients*. – 2022. – Vol. 14. – Iss. 23. – DOI: 10.3390/nu14234975.
116. Han, B. Identification and molecular docking analysis of angiotensin-converting enzyme inhibitors from finger millet (*Eleusine coracana*) / B. Han, S.Y. Park, E. Jeong [et al.] // *Plant Foods for Human Nutrition*. – 2024. – Vol. 79. – P. 482–488.
117. Yang, C. Modification of structure, epitope and allergenicity on heat-stressed ovalbumin by resveratrol / C. Yang, Y. Zhang, X. Zhou [et al.] // *Food Bioscience*. – 2024. – Vol. 59. DOI: 10.1016/j.fbio.2024.104148
118. Chen, J. Release kinetics of Tilapia scale collagen I peptides during tryptic hydrolysis / J. Chen, L. Li, R. Yi [et al.] // *Food Hydrocoll.* – 2018. – Vol. 77. – P. 931–936.
119. Chen, Q. Molecular dynamics simulation for food enzyme engineering: Why this technique should be encouraged to learn / Q. Chen, W. Zhang, W. Mu // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2021. – Vol. 69. – Iss. 1. – P. 4–6.
120. Chen, Y.-P. Improvement of skin condition on skin moisture and anti-melanogenesis by collagen peptides from milkfish (*Chanos chanos*) scales / Y.-P. Chen, H.-T. Wu, G.-H. Wang, C.-H. Liang // *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering Materials Science and Engineering*. – 2018. – Vol. 382. – Iss. 2. – DOI: 10.1088/1757-899X/382/2/022067.

121. Chen, Z. Bioactive peptide with antioxidant and anticancer activities from black soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] byproduct: Isolation, identification and molecular docking study / Z. Chen, W. Li, R.K. Santhanam [et al.] // European Food Research and Technology. – 2019. – Vol. 245. – P. 677–689.
122. Chi, C.-F. Antioxidant and functional properties of collagen hydrolysates from Spanish mackerel skin as influenced by average molecular weight / C.-F. Chi, Z.-H. Cao, B. Wang [et al.] // Molecules. – 2014. – Vol. 19. – P. 11211–11230.
123. Choe, J. Isolation and identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from thermolysin-injected beef *M. longissimus* / J. Choe, K.-H. Seol, H.-J. Kim [et al.] // AJAS. – 2019. – Vol. 32(3). – P. 430–436.
124. Choi, D. Functionality of porcine skin hydrolysates produced by hydrothermal processing for liposomal delivery system / D. Choi, S.G. Min, Y.J. Jo // Food Biochem. – 2018. – Vol. 42. – DOI: 10.1111/jfbc.12464.
125. Choonpicharn, S. Identification of bioactive peptide from *Oreochromis niloticus* skin gelatin / S. Choonpicharn, S. Tateing, S. Jaturasitha [et al.] // Journal of Food Science and Technology. – 2016. – Vol. 53. – P. 1222–1229.
126. Cui, F. Investigate the binding of catechins to trypsin using docking and molecular dynamics simulation / F. Cui, K. Yang, Y. Li // PLoS One. – 2015. – Vol. 10. – DOI: 10.1371/journal.pone.0125848.
127. Czajka, A. Daily oral supplementation with collagen peptides combined with vitamins and other bioactive compounds improves skin elasticity and has a beneficial effect on joint and general wellbeing / A. Czajka, E.M. Kania, L. Genovese [et al.] // Nutrition Research. – 2018. – Vol. 57. – P. 97–108.
128. Da Mata Rigoto, J. Effect of açaí pulp, cheese whey, and hydrolysate collagen on the characteristics of dairy beverages containing probiotic bacteria / J. Da Mata Rigoto, T.H.S. Ribeiro, N. Stevanato [et al.] // Journal of Food Process Engineering. – 2019. – Vol. 42. – Iss. 1. – DOI: 10.1111/jfpe.12953.

129. Da Silva, C.M.L. Fast and sensitive collagen quantification by alkaline hydrolysis/hydroxyproline assay / C.M.L. Da Silva, E. Spinelli, S.V. Rodrigues // Food Chemistry. – 2015. – Vol. 173. – P. 619–623.

130. Daliri, E.B.M. Antihypertensive peptides from whey proteins fermented by lactic acid bacteria / E.B.M. Daliri, B.H. Lee, B.J. Park [et al.] // Food Science and Biotechnology. – 2018. – Vol. 27. – P. 1781–1789.

131. Daliri, E.B.M. Current trends and perspectives of bioactive peptides / E.B.M. Daliri, B.H. Lee, D.H. Oh // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – 2018. – Vol. 58. Iss. 13. – P. 2273–2284.

132. Das, J. Utilization of marine industry waste derived collagen hydrolysate as peroxide inhibition agents in lipid-based food / J. Das, P. Dey, T. Chakraborty [et al.] // Journal of Food Processing and Preservation. – 2018. – Vol. 42. – Iss. 2. – DOI: 10.1111/jfpp.13430.

133. Del Buono, D. Can biostimulants be used to mitigate the effect of anthropogenic climate change on agriculture? It is time to respond / D. Del Buono // Science of The Total Environment. – 2021. – Vol. 751. – DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.141763.

134. Dellafiora, L. Hybrid *in silico/in vitro* approach for the identification of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from Parma dry-cured ham / L. Dellafiora, S. Paolella, C. Dall'Asta [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2015. – Vol. 63. – Iss. 28. – P. 6366–6375.

135. Dhakal, D. Optimization of collagen extraction from chicken feet by papain hydrolysis and synthesis of chicken feet collagen based biopolymeric fibres / D. Dhakal, P. Koomsap, A. Lamichhane [et al.] // Food Bioscience. – 2018. – Vol. 23. – P. 23–30.

136. Doyen, A.H. Use of an electrodialytic reactor for the simultaneous β -lactoglobulin enzymatic hydrolysis and fractionation of generated bioactive peptides. / D.A. Husson, E.L. Bazinet // Food Chemistry. – 2013. – Vol. 136. – P. 1193–1202.

137. Dror, R.O. Biomolecular simulation: A computational microscope for molecular biology / R.O. Dror, R.M. Dirks, J.P. Grossman [et al.] // *Annual Review of Biophysics*. – 2012. – Vol. 41. – P. 429–452.

138. Duvaud S. Expasy, the swiss bioinformatics resource portal, as designed by its users / S. Duvaud, C. Gabella, F. Lisacek [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2021. – Vol. 49. – Iss. W1. – P. W216–W227.

139. Voroshilin, R.A. Effect of gelatin drying methods on its amphiphilicity / R.A. Voroshilin, M.G. Kurbanova, E.V. Ostapova [et al.] // *Foods and Raw Materials*. – 2022. – Vol. 10. – Iss. 2. – P. 252–261. – DOI: 10.21603/2308-4057-2022-2-534.

140. Kurbanova, M. Effect of lactobacteria on bioactive peptides and their sequence identification in mature cheese / M. Kurbanova, R. Voroshilin, O. Kozlova, V. Atuchin // *Microorganisms*. – 2022. – Vol. 10. – Iss. 10. – DOI: 10.3390/microorganisms10102068

141. Escudero, E. Purification and Identification of antihypertensive peptides in Spanish dry-cured ham / E. Escudero, L. Mora, P.D. Fraser [et al.] // *Proteomics*. – 2013. – Vol. 78. – P. 499–507.

142. Fang, M. Collagen as a double-edged sword in tumor progression / M. Fang, J. Yuan, C. Peng, Y. Li // *Tumor Biol*. – 2014. – Vol. 35. – P. 2871–2882.

143. Felician, F.F. Collagen from marine biological sources and medical applications / F.F. Felician, C. Xia, W. Qi, H. Xu // *Chemistry & Biodiversity*. – 2018. – Vol. 15. – DOI: 10.1002/cbdv.201700557

144. Ferraro, V. Collagen type I from bovine bone. Effect of animal age, bone anatomy and drying methodology on extraction yield, self-assembly, thermal behaviour and electrokinetic potential / V. Ferraro, B. Gaillard-Martinie, T. Sayd [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2017. – Vol. 97. – P. 55–66.

145. Ganguly, A. Chapter Four – Food-derived bioactive peptides and their role in ameliorating hypertension and associated cardiovascular diseases / A. Ganguly, K. Sharma, K. Majumder // *Advances in Food and Nutrition Research In Advances in Food and Nutrition Research*. – 2019. – Vol. 89. – P. 165–207.

146. Gasteiger, E. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server / E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker [et al.] // The proteomics protocols handbook / ed. J.M. Walke. – Totowa: Humana Press, 2005. – P. 571–607.
147. Gelse, K. Collagens—structure, function, and biosynthesis / K. Gelse, E. Pöschl, T. Aigner // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2003. – Vol. 55. – P. 1531–1546.
148. Gildberg, A. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity in a hydrolysate of proteins from Northern shrimp (*Pandalus borealis*) and identification of two novel inhibitory tri-peptides / A. Gildberg, J.A. Arnesen, B.-S. Sæther [et al.] // Process Biochemistry. – 2011. – Vol. 46. – P. 2205–2209.
149. Di Filippo, G. Effect of enzymatic hydrolysis with Alcalase or Protamex on technological and antioxidant properties of whey protein hydrolysates / G.D. Filippo, S. Melchior, S. Plazzotta [et al.] // Food Research International. – 2024. – Vol. 188. – DOI: 10.1016/j.foodres.2024.114499.
150. Global industrial enzymes market projected to reach worth \$9.2 bn by 2027 // Focus on Catalysts. – 2021. – Vol. 12. – Iss. 12. – 2 p. – DOI: 10.1016/j.focat.2021.11.004
151. Goff, H.D. The role of hydrocolloids in the development of food structure / H.D. Goff, Q. Guo // Handbook of food structure development / eds. F. Spyropoulos, A. Lazidis, I. Norton. – The Royal Society of Chemistry, 2019. – P. 1–28. DOI: 10.1039/9781788016155-00001.
152. Gonzalez-Gonzalez, C.R. Highly proteolytic bacteria from semi-ripened Chiapas cheese elicit angiotensin-I converting enzyme inhibition and antioxidant activity / C.R. Gonzalez-Gonzalez, J. Machado, S. Correia [et al.] // Food Science and Technology. – 2019. – Vol. 111. – P. 449–456.
153. Guanxu, L. Modification of the structure and physicochemical properties of goat myosin by catechin / G. Liu, Z. Li, C. Hao, Y. Liu. // Food Bioscience. – 2024. – Vol. 59. – DOI: 10.1016/j.fbio.2024.103830.

154. Gunorubon, A.J. Production of glues from animal bones / A.J. Gunorubon, U. Misel // *ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences*. – 2017. – Vol. 9. – Iss. 9. – P. 1592–1597.
155. Haq, F. Comparative genomic analysis of collagen gene diversity / F. Haq, N. Ahmed, M. Qasim // *3 Biotech*. – 2019. – Vol. 9. – Iss. 83. – DOI: 10.1007/s13205-019-1616-9.
156. Haydont, V. Age-related evolutions of the dermis: Clinical signs, fibroblast and extracellular matrix dynamics / V. Haydont, B.A. Bernard, N.O. Fortunel // *Mechanisms of Ageing and Development*. – 2019. – Vol. 177. – P. 150–156.
157. Hollingsworth, S.A. Molecular dynamics simulation for all / S.A. Hollingsworth, R.O. Dror // *Neuron*. – 2018. – Vol. 99. – Iss. 6. – P. 1129–1143.
158. Hong, H. Preparation of low-molecular-weight, collagen hydrolysates (peptides): Current progress, challenges, and future perspectives / H. Hong, H. Fan, M. Chalamaiah, J. Wu // *Food Chemistry*. – 2019. – Vol. 301. – DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125222.
159. Hong, H. Removing cross-linked telopeptides enhances the production of low-molecular-weight collagen peptides from spent hens / H. Hong, S. Chaplot, M. Chalamaiah [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2017. – Vol. 65. – Iss. 34. – P. 7491–7499.
160. Hsu, K. Purification of antioxidative peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product / K. Hsu // *Food Chemistry*. – 2010. – Vol. 122. – Iss. 1. – P. 42–48.
161. Huanying, G. Screening and characterization of potential anti-gout components from *Polygonum cuspidatum* by integration off-line two-dimensional liquid chromatography-mass spectrometry with affinity ultrafiltration and on-line HPLC-ABTS / H. Guo, S. Hu, H. Ran [et al.] // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2024. – Vol. 243. – DOI: 10.1016/j.jpba.2024.116103.
162. Ibrahim, F.N. Effects of Fish Collagen Hydrolysate (FCH) as fat replacer in the production of buffalo patties / F.N. Ibrahim, M.R. Ismail-Fitry, M.M. Yusoff,

R. Shukri // Journal of Advanced Research in Applied Sciences and Engineering Technology. – 2018. – Vol. 11. – P. 108–117.

163. Ibrahim, H.R. Novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from caseins and whey proteins of goat milk / H.R. Ibrahim, A.S. Ahmed, T. Miyata // Journal of Advanced Research. – 2017. – Vol. 8. – Iss. 1. – P. 63–71.

164. Ishak, N.H. Purification, characterization and molecular docking study of angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from shortfin scad (*Decapterus macrosoma*) protein hydrolysate / N.H. Ishak, M.I. Shaik, N.K. Yellapu [et al.] // Journal of Food Science and Technology. – 2021. – Vol. 58. – P. 4567–4577.

165. Orsburn, B.C. *In silico* approach to accelerate the development of mass spectrometry-based proteomics methods for detection of viral proteins: Application to COVID-19 / B.C. Orsburn, C. Jenkins, S.M. Miller [et al.] // BioRxiv. – 2020. – DOI: 10.1101/2020.03.08.980383.

166. Jhawar, N. Oral collagen supplementation for skin aging: A fad or the future? / N. Jhawar, J.V. Wang, N. Saedi // Journal of Cosmetice Dermatology. – 2019. – DOI: 10.1111/jocd.13096.

167. Jiang, M. Purification and a molecular docking study of α -glucosidase-inhibitory peptides from a soybean protein hydrolysate with ultrasonic pretreatment / M. Jiang, H. Yan, R. He, Y. Ma // European Food Research and Technology. – 2018. – Vol. 244. – P. 1995–2005.

168. José, A.V. Optimal and sustainable production of tailored fish protein hydrolysates from tuna canning wastes and discarded blue whiting: Effect of protein molecular weight on chemical and bioactive properties / J.A. Vázquez, S. Comesaña, J.L. Soengas [et al.] // Science of The Total Environment. – 2024. – Vol. 939. – DOI: 10.1016/j.scitotenv.2024.173461.

169. Karami, Z. Antioxidant, anticancer and ACE-inhibitory activities of bioactive peptides from wheat germ protein hydrolysates / Z. Karami, S.H. Peighambaroust, J. Hesari [et al.] // Food Bioscience. – 2019. – Vol. 32. – DOI: 10.1016/j.fbio.2019.100450.

170. Karami, Z. Bioactive food derived peptides: A review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties / Z. Karami, B. Akbari-Adergani // *Journal of Food Science and Technology*. – 2019. – Vol. 56. – P. 535–547.
171. Karami, Z. Identification and synthesis of multifunctional peptides from wheat germ hydrolysate fractions obtained by proteinase K digestion / Z. Karami, S.H. Peighambaroust, J. Hesari [et al.] // *Journal of Food Biochemistry*. – 2019. – Vol. 43. – DOI: 10.1111/jfbc.12800.
172. Kaur, J. Trypsin detection strategies: A review / J. Kaur, P.K. Singh // *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. – 2020. – Vol. 52. – P. 949–967.
173. Kezwoń, A. Effect of enzymatic hydrolysis on surface activity and surface rheology of type I collagen / A. Kezwoń, I. Chromińska, T. Frączyk, K. Wojciechowski // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2016. – Vol. 137. – P. 60–69.
174. Kim, D.-U. Oral intake of low-molecular-weight collagen peptide improves hydration, elasticity, and wrinkling in human skin: A randomized, double-blind, placebo-controlled study / D.-U. Kim, H.-C. Chung, J. Choi [et al.] // *Nutrients*. – 2018. – Vol. 10. – DOI: 10.3390/nu10070826.
175. Kim, H.-W. Isolation and characterization of pepsin-soluble collagens from bones, skins, and tendons in duck feet / H.-W. Kim, I.-J. Yeo, K.-E. Hwang [et al.] // *Food Science of Animal Resources*. – 2016. – Vol. 36. Iss. 5. – P. 665–670.
176. Koizumi, S. Effects of dietary supplementation with fish scales-derived collagen peptides on skin parameters and condition: A randomized, placebo-controlled, double-blind study / S. Koizumi, N. Inoue, M. Shimizu [et al.] // *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. – 2018. – Vol. 24. – P. 397–402.
177. Kristinsson, H.G. Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases / H.G. Kristinsson, B.A. Rasco // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2000. – Vol. 48. – P. 657–666.

178. Lee, S.H. A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from tuna frame protein hydrolysate and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats / S.H. Lee, Z.J. Qian, S.K. Kim // *Food Chemistry*. – 2010. – Vol. 118. – Iss. 1. – P. 96–102.

179. Lee, S.Y. Antihypertensive peptides from animal products, marine organisms, and plants / S.Y. Lee, S.J. Hur // *Food Chemistry*. – 2017. – Vol. 228. – P. 506–517.

180. León-López, A. Hydrolysed collagen from sheepskins as a source of functional peptides with antioxidant activity / A. León-López, L. Fuentes-Jiménez, A.D. Hernández-Fuentes [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20. Iss. 16. – DOI: 10.3390/ijms20163931.

181. León-López, A. Hydrolyzed collagen – sources and applications / A. León-López, A. Morales-Peñaloza, V.M. Martínez-Juárez [et al.] // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24. – Iss. 22. – DOI: 10.3390/molecules24224031.

182. Li, R. Relationship between molecular flexibility and emulsifying properties of soy protein isolate-glucose conjugates / R. Li, X. Wang, J. Liu [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2019. – Vol. 67. Iss. 14. – P. 4089–4097.

183. Lin, S. High-throughput analysis of hazards in novel food based on the density functional theory and multimodal deep learning / L. Shi, W. Jia, R. Zhang [et al.] // *Food Chemistry*. – 2024. – Vol. 442. – DOI: 10.1016/j.foodchem.2024.138468.

184. Lin, K. Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from protease hydrolysates of Qula casein: Quantitative structure-activity relationship modeling and molecular docking study / K. Lin, L.-W. Zhang, X. Han, D.-Y. Cheng // *Journal of Functional Foods*. – 2017. – Vol. 32. – P. 266–277.

185. Ling, Y. Preparation and identification of novel inhibitory angiotensin-I-converting enzyme peptides from tilapia skin gelatin hydrolysates: Inhibition kinetics and molecular docking / Y. Ling, S. Liping, Z. Yongliang // *Food & Function*. – 2018. – Vol. 9. – Iss. 10. – P. 5251–5259.

186. Liu, C. The effect of hydrolysis with neutrase on molecular weight, functional properties, and antioxidant activities of Alaska pollock protein isolate / C. Liu, X. Ma, S. Che [et al.] // Journal of Ocean University of China. – 2018. – Vol. 17. – P. 1423–1431.
187. Lo, H.-Y. Identification of the bioactive and consensus peptide motif from Momordica charantia insulin receptor-binding protein / H.-Y. Lo, C.-C. Li, T.-Y. Ho, C.-Y. Hsiang // Journal of Ocean University of China. – 2016. – Vol. 204. – P. 298–305.
188. Maia Campos, P.M. Topical application and oral supplementation of peptides in the improvement of skin viscoelasticity and density / P.M. Maia Campos, M.O. Melo, F.C. Siqueira César // Journal of Cosmetic Dermatology. – 2019. – DOI: 10.1111/jocd.12893.
189. Malhi, G.S. Impact of climate change on agriculture and its mitigation strategies: A review / G.S. Malhi, M. Kaur, P. Kaushik // Sustainability. – 2021. – Vol. 13. Iss. 3. – DOI: 10.3390/su13031318.
190. Gallego, M. Effect of ultrasound and enzymatic pre-treatments on the profile of bioactive peptides of beef liver hydrolysates / M. Gallego, L. Mora, F. Toldrá // Food Research International. – 2024. – Vol. 197. – Pt. 1. – DOI: 10.1016/j.foodres.2024.115240.
191. Min, S.-G. Potential application of static hydrothermal processing to produce the protein hydrolysates from porcine skin by-products / S.-G. Min, Y.-J. Jo, S.H. Park // LWT – Food Science and Technology. – 2017. – Vol. 83. – P. 18–25.
192. Wei, M. Characterisation and comparison of enzymatically prepared donkey milk whey protein hydrolysates / M. Wei, C. Ning, Y. Ren [et al.] // Food Chemistry: X. – 2024. – Vol. 22. – DOI: 10.1016/j.fochx.2024.101360.
193. Mooney, C. Towards the improved discovery and design of functional peptides: common features of diverse classes permit generalized prediction of bioactivity / C. Mooney, N.J. Haslam, G. Pollastri, D.C. Shields // PLoS One. – 2012. – DOI: 10.1371/journal.pone.0045012.

194. Mora, L. Challenges in the quantitation of naturally generated bioactive peptides in processed meat / L. Mora, M. Gallego, M. Reig, F. Toldrá // Trends in Food Science & Technology. – 2017. – Vol. 69. – Pt. B. – P. 306–314.

195. Motahharesadat, A. Optimization of the alcalase and trypsin hydrolysis conditions of an isolated protein from *Scenedesmus obliquus* microalgae and characterization of its functional properties / A. Motahharesadat, E.H. Seyed, A. Gholamhassan, K. Babak // LWT. – 2024. – Vol. 210. – DOI: 10.1016/j.lwt.2024.116819.

196. Rogov, I.A. Nanostructure and new properties of hydrolyzed food globular proteins / I.A. Rogov, T.N. Danilchuk, G.V. Semenov [et al.] // Journal of Physics: Conference Series. – 2011. – Vol. 291. – Iss. 1. – DOI: 10.1088/1742-6596/291/1/012007.

197. O’Sullivan, S.M. Bioactivity of bovine lung hydrolysates prepared using papain, pepsin, and Alcalase / S.M. O’Sullivan, T. Lafarga, M. Hayes, N.M. O’Brien // Journal of Food Biochemistry. – 2017. – Vol. 41. – DOI: 10.1111/jfbc.12406.

198. Oechsle, A.M. Microstructure and physical–chemical properties of chicken collagen / A.M. Oechsle, D. Akgün, F. Krause [et al.] // Food Structure. – 2016. – Vol. 7. – P. 29–37.

199. Offengenden, M. Chicken collagen hydrolysates differentially mediate anti-inflammatory activity and type I collagen synthesis on human dermal fibroblasts / M. Offengenden, S. Chakrabarti, J. Wu // Food Science and Human Wellness. – 2018. – Vol. 7. – P. 138–147.

200. Oseguera-Toledo, M.E. Hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins hydrolyzed by alcalase and bromelain produced bioactive peptide fractions that inhibit targets of type-2 diabetes and oxidative stress / M.E. Oseguera-Toledo, E. Gonzalez de Mejia, S.L. Amaya-Llano // Food Research International. – 2015. – Vol. 76. – P. 839–851.

201. Panayotova, T. Production of ACE-inhibitory peptides in milk fermented with selected lactic acid bacteria / T. Panayotova, K. Pashova-Baltova, Z. Dimitrov // J. BioSci. Biotechnol. – 2018. – Vol. 7. – P. 31–37.

202. Parmar, H. In vitro and in silico analysis of novel ACE-inhibitory bioactive peptides derived from fermented goat milk / H. Parmar, S. Hati, A. Sakure // *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. – 2018. – Vol. 24. – P. 441–453.
203. Paschou, A.M. High pressure Raman study of type-I collagen / A.M. Paschou, M. Katsikini, D. Christofilos [et al.] // *Febs Journal*. – 2018. – Vol. 285. – P. 2641–2653.
204. Peighambardoust, S.H. A review on health-promoting, biological, and functional aspects of bioactive peptides in food applications / S.H. Peighambardoust, Z. Karami, M. Pateiro, J.M. Lorenzo // *Biomolecules*. – 2021. – Vol. 11. – DOI: 10.3390/biom11050631.
205. Peihang, C. The antioxidant peptides from walnut protein hydrolysates and their protective activity against alcoholic injury / P. Chen, P. Huang, Y. Liang [et al.] // *Food & Function*. – 2024. – Vol. 15. – Iss. 10. – P. 5315–5328.
206. Powell, T. Subcritical water hydrolysis of peptides: Amino acid side-chain modifications / T. Powell, S. Bowra, H.J. Cooper // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. – 2017. – Vol. 28. – P. 1775–1786.
207. Press, M.O. Evolutionary assembly patterns of prokaryotic genomes / M.O. Press, C. Queitsch, E. Borenstein // *Genome Research*. – 2016. – Vol. 26. – Iss. 6. – P. 826–833.
208. Purcel, G. Chapter 7 – Collagen-based nanobiomaterials: Challenges in soft tissue engineering / G. Purcel, D. Meliță, E. Andronescu, A.M. Grumezescu // *Nanobiomaterials in Soft Tissue Engineering. Applications of Nanobiomaterials Volume 5* / ed. A.M. Grumezescu. – 2016. – P. 173–200.
209. Räder, A.F. Orally active peptides: Is there a magic bullet? / A.F. Räder, M. Weinmüller, F. Reichart [et al.] // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2018. – Vol. 57. – Iss. 44. – P. 14414–14438.

210. Raikos, V. Health-promoting properties of bioactive peptides derived from milk proteins in infant food: A review / V. Raikos, T. Dassios // Dairy Science & Technology. – 2014. – Vol. 94. – P. 91–101.

211. Rajamanikandan, R. New insights into the binding interaction of food protein ovalbumin with malachite green dye by hybrid spectroscopic and molecular docking analysis / R. Rajamanikandan, A. Selva Sharma, M. Ilanchelian // Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. – 2019. – Vol. 37. – Iss. 16. – P. 4292–4300.

212. Ran, X.G. Use of ultrasonic and pepsin treatment in tandem for collagen extraction from meat industry by-products / X.G. Ran, L.Y. Wang // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2014. – Vol. 94. – Iss. 3. – P. 585–590.

213. Rezvani, M. Development and characterization of nanostructured pharmacosomal mesophases: An innovative delivery system for bioactive peptides / M. Rezvani, J. Hesari, S.H. Peighambari [et al.] // Advanced Pharmaceutical Bulletin. – 2018. – Vol. 8. – Iss. 4. – P. 609–615.

214. Rice, E.S. New approaches for genome assembly and scaffolding / E.S. Rice, R.E. Green // Annual Review of Animal Biosciences. – 2019. – Vol. 7. – P. 17–40.

215. Román, J. Molecular docking of potential inhibitors of broccoli myrosinase / J. Román, A. Castillo, A. Mahn // Molecules. – 2018. – Vol. 23. – Iss. 6. – DOI: 10.3390/molecules23061313.

216. Sánchez, A. Bioactive peptides: A review / A. Sánchez, A. Vázquez // Food Quality and Safety. – 2017. – Vol. 1. – P. 29–46.

217. Sanchez, A. Effect of fish collagen hydrolysates on type I collagen mRNA levels of human dermal fibroblast culture / A. Sanchez, M. Blanco, B. Correa [et al.] // Marine Drugs. – 2018. – Vol. 16. – DOI: 10.3390/md16050144.

218. Schmidt, M. Collagen extraction process / M. Schmidt, R. Dornelles, R. Mello [et al.] // International Food Research Journal. – 2016. – Vol. 23. Iss. 3. – P. 913–922.

219. Schrieber, R. Gelatine handbook. Theory and industrial practice / R. Schrieber, H. Gareis // Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2007. – 347 p.
220. Settu, R. GCMS profiling and *in silico* screening of alpha-amylase inhibitors in traditional pigmented rice varieties (*Oryza sativa* Linn) of Tamil Nadu / R. Settu, D. Selvaraj, I.A. Padikasan // Food Bioscience. – 2021. – Vol. 42. – DOI: 10.1016/j.fbio.2021.101154.
221. Shakya, M. Standardized phylogenetic and molecular evolutionary analysis applied to species across the microbial tree of life / M. Shakya, S.A. Ahmed, K.W. Davenport [et al.] // Scientific Reports. – 2020. – Vol. 10. – DOI: 10.1038/s41598-020-58356-1.
222. Shoaib, M. Chapter 8 – Mapping genomes by using bioinformatics data and tools / M. Shoaib, A. Singh, S. Gulati, S. Kukreti // Chemoinformatics and Bioinformatics in the Pharmaceutical Sciences / eds. N. Sharma, H. Ojha, P.K. Raghav, R.K. Goyal. – Cambridge: Academic Press, 2021. – P. 245–278.
223. Shormanov, V.K. Photometric determination of collagen / V.K. Shormanov, G.G. Bulatnikov // Journal of Analytical Chemistry. – 2006. – Vol. 61. – Iss. 4. – P. 320–324. – DOI: 10.1134/S1061934806040034.
224. Soroushanova, A. The collagen suprafamily: From biosynthesis to advanced biomaterial development / A. Soroushanova, L.M. Delgado, Z. Wu [et al.] // Advanced Materials. – 2019. – Vol. 31. – DOI: 10.1002/adma.201801651.
225. Sousa, S.C. Quality parameters of frankfurter-type sausages with partial replacement of fat by hydrolyzed collagen / S.C. Sousa, S.P. Fragoso, C.R.A. Penna [et al.] // LWT – Food Science and Technology. – 2017. – Vol. 76. – P. 320–325.
226. Pan, B.S. Molecular and thermal characteristics of acid-soluble collagen from orbicular batfish: Effects of deep-sea water culturing / B.S. Pan, H.E. Chen, W.C. Sung // International Journal of Food Properties. – 2018. – Vol. 21. Iss. 1. – P. 1080–1090.

227. Ketnawa, S. Fish skin gelatin hydrolysates produced by visceral peptidase and bovine trypsin: Bioactivity and stability / S. Ketnawa, S. Benjakul, O. Martínez-Alvarez, S. Rawdkuen // Food Chemistry. – 2017. – Vol. 215. – P. 383–390.

228. Tao, J. Bioactive peptides from cartilage protein hydrolysate of spotless smoothhound and their antioxidant activity *in vitro* / J. Tao, Y.-Q. Zhao, C.-F. Chi, B. Wang // Marine Drugs. – 2018. – Vol. 16. – DOI: 10.3390/md16040100.

229. Tao, X. Recent developments in molecular docking technology applied in food science: A review / X. Tao, Y. Huang, C. Wang [et al.] // International Journal of Food Science and Technology. – 2020. – Vol. 55. – Iss. 1. – P 33–45.

230. Thuanthong, M. Purification and characterization of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatine produced by an enzymatic membrane reactor / M. Thuanthong, C. De Gobba, N. Sirinupong [et al.] // Journal of Functional Foods. – 2017. – Vol. 36. – P. 243–254.

231. Tian, L. Isolation and purification of antioxidant and ACE-inhibitory peptides from yak (*Bos grunniens*) skin / L. Tian, J. Liu, L. Ma [et al.] // Journal of Food Processing and Preservation. – 2017. – Vol. 41. – Iss. 5. – DOI: 10.1111/jfpp.13123.

232. Tobin, D.J. Introduction to skin aging. / D.J. Tobin // Tissue Viability. – 2017. – Vol. 26. – P. 37–46.

233. Tu, M. Sequence analysis and molecular docking of antithrombotic peptides from casein hydrolysate by trypsin digestion / M. Tu, L. Feng, Z. Wang [et al.] // Journal of Functional Foods. – 2017. – Vol. 32. – P. 313–323.

234. Usmani, S.S. In silico tools and databases for designing peptide-based vaccine and drugs / S.S. Usmani, R. Kumar, S. Bhalla [et al.] // Advances in Protein Chemistry and Structural Biology. – 2018. – Vol. 112. – P. 221–263.

235. Varilla, C. Bromelain, a group of pineapple proteolytic complex enzymes (*Ananas comosus*) and their possible therapeutic and clinical effects. A summary / C. Varilla, M. Marcone, L. Paiva, J. Baptista // Foods. – 2021. – Vol. 10. – P. 2249.

236. Venkatesan, J. Marine fish proteins and peptides for cosmeceuticals: A review / J. Venkatesan, S. Anil, S.-K. Kim, M. Shim // *Marine Drugs*. – 2017. – Vol. 15. Iss. 5. – DOI: 10.3390/md15050143.
237. Vieira, E.F. Antioxidant and antihypertensive hydrolysates obtained from by-products of cannery sardine and brewing industries / E.F. Vieira, I.M. Ferreira // *International Journal of Food Properties*. – 2017. – Vol. 20. Iss. 3. – P. 662–673.
238. Villamil, O. Fish viscera protein hydrolysates: Production, potential applications and functional and bioactive properties / O. Villamil, H. Váquiro, J.F. Solanilla // *Food Chemistry*. – 2017. – Vol. 224. – P. 160–171.
239. Wang, J. Spectrum-effect relationships between high-performance liquid chromatography (HPLC) fingerprints and the antioxidant and anti-inflammatory activities of collagen peptides / J. Wang, D. Luo, M. Liang [et al.] // *Molecules*. – 2018. – Vol. 23. – Iss. 12. – DOI: 10.3390/molecules23123257.
240. Wang, L. Effect of oral administration of collagen hydrolysates from Nile tilapia on the chronologically aged skin / L. Wang, Y. Jiang, X. Wang [et al.] // *Journal of Functional Foods*. – 2018. – Vol. 44. – P. 112–117.
241. Wang, W. Hypothermia protection effect of antifreeze peptides from pigskin collagen on freeze-dried *Streptococcus thermophiles* and its possible action mechanism / W. Wang, M. Chen, J. Wu, S. Wang // *LWT – Food Science and Technology*. – 2015. – Vol. 63. – P. 878–885.
242. Waterhouse, A. SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes / A. Waterhouse, M. Bertoni, S. Bienert [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2018. – Vol. 46. – Iss. W1. – P. W296–W303.
243. Wen-Yin, X. Wheat peptide alleviates DSS-induced colitis by activating the Keap1–Nrf2 signaling pathway and maintaining the integrity of the gut barrier / W.-Y. Xie, Z.-H. Ji, W.-Z. Ren [et al.] // *Food & Function*. – 2024. – Vol. 15. – Iss. 10. – P. 5466–5484.

244. White, S.H. Hydrophobic interactions of peptides with membrane interfaces / S.H. White, W.C. Wimley // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Reviews on Biomembranes*. – 1998. – Vol. 1376. – Iss. 3. – P. 339–352.

245. Wisuthiphaet, N. Production of fish protein hydrolysates by acid and enzymatic hydrolysis / N. Wisuthiphaet, S. Kongruang, C. Chamcheun // *Journal of Medical and Bioengineering*. – 2015. – Vol. 4. – Iss. 6. – P. 466–470.

246. Kou, X. Data-driven elucidation of flavor chemistry / X. Kou, P. Shi, C. Gao [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2023. – Vol. 71. – Iss. 18. – P. 6789–6802.

247. Xue, Z. Antioxidant activity and anti-proliferative effect of a bioactive peptide from chickpea (*Cicer arietinum* L.) / Z. Xue, H. Wen, L. Zhai [et al.] // *Food Research International*. – 2015. – Vol. 77. – P. 75–81.

248. Wang, Y.-E. Design, synthesis, and herbicidal activity of naphthalimide-aroil hybrids as potent transketolase inhibitors / Y.-E. Wang, D. Yang, C. Ma [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2022. – Vol. 70. – Iss. 40. – P. 12819–12829.

249. Fu, Y. Changes in physicochemical and digestibility properties of foxtail millet prolamin after cooking, and novel antioxidant peptide identification from cooked foxtail millet prolamin / Y. Fu, H. Wang, Z. Liu [et al.] // *Future Foods*. – 2024. – Vol. 9. – DOI: 10.1016/j.fufo.2024.100352.

250. Youdan, D. Preparation of immobilized pepsin for extraction of collagen from bovine hide / D. Youdan, C. Haiming // *RSC Advances*. – 2022. – Vol. 12. – Iss. 53. – P. 34548–34556.

251. Yu, F. Identification and molecular docking study of a novel angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptide derived from enzymatic hydrolysates of *Cyclina sinensis* / F. Yu, Z. Zhang, L. Luo [et al.] // *Marine Drugs*. – 2018. – Vol. 16. – Iss. 11. – DOI: 10.3390/md16110411.

252. Jia, Y. Exploring the application of molecular simulation technology in food sector: Focusing on food component interactions and food quality / Y. Jia, Y. Liu,

Y. Wu [et al.] // Food Bioscience. – 2024. – Vol. 62. – DOI: 10.1016/j.fbio.2024.105480.

253. Zare, D. Deciphering β -lactoglobulin interactions: A molecular dynamics study / D. Zare, K.M. McGrath, J.R. Allison // Biomacromolecules. – 2015. – Vol. 16. – Iss. 6. – P. 1855–1861.

254. Zhang, Y. Influence of hydrolysis behaviour and microfluidisation on the functionality and structural properties of collagen hydrolysates / Y. Zhang, X. Liu, L. Huang [et al.] // Food Chemistry. – 2017. – Vol. 227. – P. 211–218.

255. Zhao, Y. Extraction and characterization of collagen hydrolysates from the skin of *Rana chensinensis* / Y. Zhao, Z. Wang, J. Zhang, T. Su // 3 Biotech. – 2018. – Vol. 8. – Iss. 181. – DOI: 10.1007/s13205-018-1198-y.

256. Wang, Z.-Z. Unlocking the potential of collagenases: Structures, functions, and emerging therapeutic horizons / Z.-Z. Wang, K. Wang, L.-F. Xu [et al.] // BioDesign Research. – 2024. – Vol. 6. – DOI: 10.34133/bdr.0050.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А
Нормативная документация

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Кемеровский государственный университет»
(ФГБОУ ВО «КемГУ»)

ОКПД2 10.13.15.196

ОКС 67.120.99



Е.А. Жидкова
2022 г.

**ГИДРОЛИЗАТЫ КОЛЛАГЕНА ИЗ КОСТНОГО СЫРЬЯ
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

**Технологическая инструкция
ТИ 10.13.15-284-02068309-2022**

Дата введения в действие – 24.05.2022 г.

РАЗРАБОТАНО

Доцент кафедры технологии
продуктов питания животного
происхождения КемГУ, к.т.н.
 Р.А. Ворошилин

Кемерово 2022

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Кемеровский государственный университет»
(ФГБОУ ВО «КемГУ»)

ОКПД2 10.13.15.196

ОКС 67.120.99

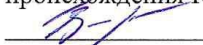


**ГИДРОЛИЗАТЫ КОЛЛАГЕНА ИЗ СУБПРОДУКТОВ ПЕРЕРАБОТКИ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПТИЦЫ**

**Технологическая инструкция
ТИ 10.13.15-288-02068309-2023**

Дата введения в действие – 09.02.2023 г.

РАЗРАБОТАНО

Доцент кафедры технологии
продуктов питания животного
происхождения КемГУ, к.т.н.
 Р.А. Ворошилин

Кемерово 2023

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Кемеровский государственный университет»
(ФГБОУ ВО «КемГУ»)

ОКПД2 10.13.15.196

ОКС 67.120.99



УТВЕРЖАЮ
проректор по НИР

Е.А. Жидкова
2023 г.

ГИДРОЛИЗАТЫ КОЛЛАГЕНА ИЗ СВИНОЙ ШКУРЫ

Технологическая инструкция
ТИ 10.13.15-292-02068309-2023

Дата введения в действие – 12.10.2023 г.

РАЗРАБОТАНО

Доцент кафедры технологии
продуктов питания животного
происхождения-КемГУ, к.т.н.
Р.А. Ворошилин

Кемерово 2023

Приложение Б**Копии отчетов о научно-исследовательской работе по хоздоговорной тематике**

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
Кемеровский государственный университет (КемГУ)
Технологический институт пищевой промышленности (ТИПП)



УТВЕРЖДАЮ

Проректор по стратегическому
развитию_____
д.ф-м.н., проф. Ю. Н. Журавлев**ОТЧЕТ О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ**

ТЕХНИКО-ЭКОНОМИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ОРГАНИЗАЦИИ ЦЕХА
ПО СОВРЕМЕННОМУ, БЕЗОТХОДНОМУ ПРОИЗВОДСТВУ КОСТНОГО
КЛЕЯ И СОПУТСТВУЮЩИХ ТОВАРНЫХ ПРОДУКТОВ

(договор №12 /2020 от 10.09.2020)
(заключительный)

Руководитель НИР,
и.о. зав. кафедрой технологии
продуктов питания животного
происхождения, д.т.н., проф.

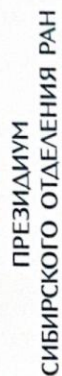
М.Г. Курбанова

Кемерово 2020

Приложение В

Копия свидетельства победителя конкурса на право получения грантов
Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых
российских ученых - кандидатов наук (Конкурс - МК-2022)





Направляют

ПОЧЕТНОЙ ГРАМОТОЙ

кандидата технических наук

ВОРОШИЛИНА

Романа Алексеевича

(федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кемеровский государственный университет»)

заявшего второе место в конкурсе, автора цикла работ «Научное обоснование и практическая реализация комплексной технологии производства гидролизатов коллагена из вторичных сырьевых ресурсов АПК методом ферментативно-кислотного гидролиза и баромембранными технологиями», представленных на премию имени И.И. Сивягина — за работы в области

В.Н. Пармон

А.А. Тулупов

20 24 г.
октября



Приложение Д

Патенты РФ

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2783233**Способ биокаталитической обработки костного сырья**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Кемеровский государственный университет" (КемГУ) (RU)*

Авторы: *Ворошилин Роман Алексеевич (RU), Просеков Александр Юрьевич (RU), Курбанова Марина Геннадьевна (RU)*

Заявка № 2021117646

Приоритет изобретения 16 июня 2021 г.

Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений
Российской Федерации 10 ноября 2022 г.

Срок действия исключительного права
на изобретение истекает 16 июня 2041 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Ю.С. Зубов



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2800526

Способ получения сухого быстрорастворимого желатина

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Кемеровский государственный университет" (RU)*

Авторы: *Ворошилин Роман Алексеевич (RU), Просеков Александр Юрьевич (RU), Курбанова Марина Геннадьевна (RU)*

Заявка № 2022114725

Приоритет изобретения 01 июня 2022 г.

Дата государственной регистрации

в Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 24 июля 2023 г.

Срок действия исключительного права на изобретение истекает 01 июня 2042 г.



Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ
Сертификат 42956a0b7363264ba195183e73b4aa7
Владимир Зубов Юрий Сергеевич
Действителен с 10.07.2023 по 02.08.2024

Ю.С. Зубов



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2823831

ВАКУУМНАЯ СУШИЛКА ДЛЯ СУХИХ И ЖИДКИХ
ПРОДУКТОВ

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
"Кемеровский государственный университет" (RU)*

Авторы: *Махамбетов Эдуард Муратович (RU), Ворошилин
Роман Алексеевич (RU), Крюк Роман Владимирович (RU),
Курбанова Марина Геннадьевна (RU)*

Заявка № 2023133456

Приоритет изобретения 16 декабря 2023 г.

Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений
Российской Федерации 30 июля 2024 г.

Срок действия исключительного права
на изобретение истекает 16 декабря 2043 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ
Сертификат 429b5a0b3651354baf96183b73b4aa7
Владелец: *Зубов Юрий Сергеевич*
Действителен с 10.07.2023 по 02.08.2024

Ю.С. Зубов



Приложение Е

Акты промышленной апробации и внедрения

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель генерального
директора ООО «Да»
Козак В.А.



АКТ

выработки опытных образцов гидролизатов коллагена из вторичных
сырьевых ресурсов животного происхождения

Комиссия в составе заместителя генерального директора ООО «Да» Козак В.А., мастера производства ООО «Да» Голубевой С.С. и кандидата технических наук, доцента, доцента кафедры технологии продуктов питания животного происхождения ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет» Ворошилин Р.А. подтверждаем проведение промышленной выработки опытных образцов 5 килограмм гидролизатов коллагена из лап цыплят-бройлеров.

Опытные партии гидролизатов коллагена, выработанные из коллагенового концентрата (ретентата) лап цыплят-бройлеров, с использованием технологии ферментативного обезжиривания и дальнейшего гидролиза, партии получали в соответствии с разработанной документацией. Представленные образцы имели следующие органолептические показатели и физико-химические характеристики (табл. 1):

Внешний вид – Сухой продукт однородной консистенции в виде рассыпчатой порошкообразной структуры;

Цвет – светло-жёлтый;

Вкус, запах – свойственный сырью из которого изготовлен и данной категории продуктов, без постороннего запаха и вкуса.

Таблица 1 – Физико-химические показатели гидролизатов коллагена из лап цыплят-бройлеров

Наименование показателя	Значение
Массовая доля белка в сухом веществе, %	91,50
Массовая доля жира, %	3,86
Массовая доля влаги, %	3,64
Влагосвязывающая способность	581
Гелеобразующая способность, %	468

По результатам апробации при получении гидролизатов коллагена по разработанным технологиям было установлено, что сухой гидролизат коллагена, полученный из лап цыплят-бройлеров по органолептическим и по физико-химическим показателям соответствует требованиям разработанной документации и ГОСТ 33692-2015.

Члены комиссии:

Заместитель генерального
директора ООО «Да»

Мастер производства ООО «Да»

Канд. техн. наук, доцент,
доцент кафедры ТПЖП КемГУ



Козак В.А.

Голубева С.С.

Ворошилин Р.А.

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель генерального
директора ООО «Да»

Козак В.А.

ДЛЯ

ДОКУМЕНТОВ

«22» апреля 2024 г.

АКТ

внедрения результатов исследования

Комиссия в составе заместителя генерального директора ООО «Да» Козак В. А., мастера производства ООО «Да» Голубевой С.С. и кандидата технических наук, доцента, доцента кафедры технологии продуктов питания животного происхождения ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет» Ворошилина Р. А. подтверждает внедрение на ООО «Да» результатов исследования и выработки опытной партии гидролизатов коллагена из коллагенового концентрата (ретентата) лап цыплят-бройлеров.

Опытные партии гидролизатов коллагена, вырабатывались из коллагенового концентрата (ретентата) лап цыплят-бройлеров, с использованием технологии ферментативного обезжиривания и дальнейшего гидролиза, партии получали в соответствии с разработанной документацией.

По результатам апробации при получении гидролизатов коллагена по разработанным технологиям было установлено, что процесс соответствует разработанной технологии и полученный сухой гидролизат коллагена из лап цыплят-бройлеров по органолептическим и по физико-химическим показателям соответствует требованиям разработанной документации и ГОСТ 33692-2015.

Члены комиссии:

Заместитель генерального
директора ООО «Да»

Мастер производства ООО «Да»

Канд. техн. наук, доцент,
доцент кафедры ТППЖП КемГУ

Козак В.А.

Голубева С.С.

Ворошилин Р.А.

Продолжение приложения Е

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «Биолит»
Сергун В.П.

«27» ноября 2023 г.



АКТ

выработки опытных образцов гидролизатов коллагена из вторичных сырьевых ресурсов животного происхождения (свиных шкур)

Комиссия в составе Сухушина Ю.В., Голясова И.И., Симаков А.А. и Ворошилин Р.А. доцента кафедры технологии продуктов питания животного происхождения ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет» подтверждаем проведение промышленной выработки опытных образцов 5 килограмм гидролизатов коллагена из свиных шкур на ООО «Биолит».

Опытные партии гидролизатов коллагена, выработанные из коллагенового концентрата (ретентата) свиных шкур, с использованием технологии ферментативного обезжиривания и дальнейшего гидролиза, партии получали в соответствии с разработанной документацией. Выработанные образцы имели следующие органолептические показатели и физико-химические характеристики (Таблица 1):

Внешний вид – сухой продукт однородной консистенции в виде рассыпчатой порошкообразной структуры;

Цвет – светло-жёлтый;

Вкус, запах – свойственный сырью из которого, без постороннего запаха и вкуса.

Таблица 1 – Физико-химические показатели гидролизатов коллагена из свиных шкур

Наименование показателя	Значение
Массовая доля белка в сухом веществе, %	92,40
Массовая доля жира, %	3,21
Массовая доля влаги, %	3,84
Влагосвязывающая способность	593
Гелеобразующая способность, %	474

По результатам апробации при получении гидролизатов коллагена по разработанным технологиям было установлено, что сухой гидролизат коллагена, полученный из лап цыплят-бройлеров по органолептическим и по физико-химическим показателям соответствует требованиям разработанной документации.

Члены комиссии:

 Сухушина Ю.В.
 Голясова И.А.
 Симаков А.А.
 Ворошилин Р.А.

Продолжение приложения Е

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «Биолит»
Сергун В.П.

«27» ноября 2023 г.



АКТ

внедрения результатов исследования

Комиссия в составе Сухушина Ю.В., Голясова И.И., Симаков А.А. и Ворошилин Р.А. доцента кафедры технологии продуктов питания животного происхождения ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет» подтверждает внедрение на ООО «Биолит» результатов исследования и выработки опытной партии гидролизатов коллагена из коллагенового концентрата (ретентата) свиных шкур.

Опытные партии гидролизатов коллагена, вырабатывались из коллагенового концентрата (ретентата) свиных шкур, с использованием технологии ферментативного обезжиривания и дальнейшего гидролиза, партии получали в соответствии с разработанной документацией.

По результатам апробации при получении гидролизатов коллагена по разработанным технологиям было установлено, что процесс соответствует разработанной технологии и полученный сухой гидролизат коллагена из свиных шкур по органолептическим и по физико-химическим показателям соответствует требованиям разработанной документации.

Члены комиссии:

 Сухушина Ю.В.
 Голясова И.А.
 Симаков А.А.
 Ворошилин Р.А.

Продолжение приложения Е

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО НПО «Здоровое питание»
Попов А.А.

«12» октября 2022 г.

АКТ

выработки опытных образцов гидролизатов коллагена из вторичных
сырьевых ресурсов животного происхождения

Комиссия в составе генерального директора ООО НПО «Здоровое питание» Попова А.А., главного технолога ООО НПО «Здоровое питание» Петуховой Е.Е. и кандидата технических наук, доцента кафедры технологии продуктов питания животного происхождения ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет» Ворошилин Р.А. подтверждаем проведение промышленной выработки опытных образцов 5 килограмм гидролизатов коллагена из свежей кости крупного рогатого скота.

Опытные партии гидролизатов коллагена, выработанные из коллагенового концентрата (ретентата) свежей кости крупного рогатого скота, с использованием технологии ферментативного обезжиривания и дальнейшего гидролиза, партии получали в соответствии с разработанной документацией (ТИ 10.13.15-284-02068309-2022). Представленные образцы имели следующие органолептические показатели и физико-химические характеристики (табл. 1):

Внешний вид – Сухой продукт однородной консистенции в виде рассыпчатой порошкообразной структуры;

Цвет – светло-жёлтый;

Вкус, запах – свойственный сырью из которого изготовлен и данной

категории продуктов, без постороннего запаха и вкуса.

Таблица 1 – Физико-химические показатели гидролизатов коллагена из свежей кости крупного рогатого скота

Наименование показателя	Значение
Массовая доля белка в сухом веществе, %	87,10±0,5
Массовая доля жира, %	0,2±0,02
Массовая доля влаги, %	10,20±0,1

По результатам апробации при получении гидролизатов коллагена по разработанным технологиям было установлено, что сухой гидролизат коллагена, полученный из свежей кости крупного рогатого скота по органолептическим и по физико-химическим показателям соответствует требованиям разработанной документации.

Члены комиссии:

Генеральный директор
ООО НПО «Здоровое питание»

Главный технолог
ООО НПО «Здоровое питание»

Канд. техн. наук,
доцент кафедры ТПЖП КемГУ



Попов А.А.

Петухова Е.Е.

Ворошилин Р.А.

Продолжение приложения Е

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО НПО «Здоровое питание»
Попов А.А.



«12» октября 2022 г.

АКТ

внедрения результатов исследования

Комиссия в составе генерального директора ООО НПО «Здоровое питание» Попова А.А., главного технолога ООО НПО «Здоровое питание» Петуховой Е.Е. и кандидата технических наук, доцента кафедры технологии продуктов питания животного происхождения ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет» Ворошилин Р.А. подтверждает внедрение на ООО НПО «Здоровое питание» результатов исследования и выработки опытной партии гидролизатов коллагена из коллагенового концентрата (ретентата) свежего костного сырья крупного рогатого скота.

Опытные партии гидролизатов коллагена, вырабатывались из коллагенового концентрата (ретентата) свежего костного сырья крупного рогатого скота, с использованием технологии ферментативного обезжиривания сырья и дальнейшего гидролиза, партии получали в соответствии с разработанной документацией (ТИ 10.13.15-284-02068309-2022).

По результатам апробации при получении гидролизатов коллагена по разработанным технологиям было установлено, что процесс соответствует разработанной технологии и полученные сухие гидролизаты коллагена из свежего костного сырья крупного рогатого скота по органолептическим и по физико-химическим показателям соответствует требованиям разработанной документации.

Члены комиссии:

Генеральный директор
ООО НПО «Здоровое питание»

Главный технолог
ООО НПО «Здоровое питание»

Канд. техн. наук,
доцент кафедры ТППЖП КемГУ



Попов А.А.

Петухова Е.Е.

Ворошилин Р.А.

Приложение Ж

Акт внедрения результатов исследований в учебный процесс

УТВЕРЖДАЮ



Проректор по цифровой трансформации
ФГБОУ ВО «Кемеровский
государственный университет»
Р.М. Котов

» _____ 2024 г.

АКТ

внедрения в учебный процесс основных положений диссертационной работы
Ворошилина Романа Алексеевича

Настоящим актом подтверждается, что основные положения диссертационной работы Ворошилина Романа Алексеевича используются в учебном процессе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кемеровский государственный университет».

Результаты работы применяются в учебном процессе при проведении лекционных, практических и лабораторных занятий при подготовке бакалавров, обучающихся по направлениям подготовки 19.03.01 «Биотехнология» и 19.03.03 «Продукты питания животного происхождения», а также при подготовке магистров укрупненных групп направлений подготовки 19.04.00 «Промышленная экология и биотехнологии» и аспирантов по группам научной специальности 2.7 «Биотехнологии» и 4.3 «Агроинженерия и пищевые технологии».

Профессор кафедры бионанотехнологии,
докт. техн. наук, доцент

подпись

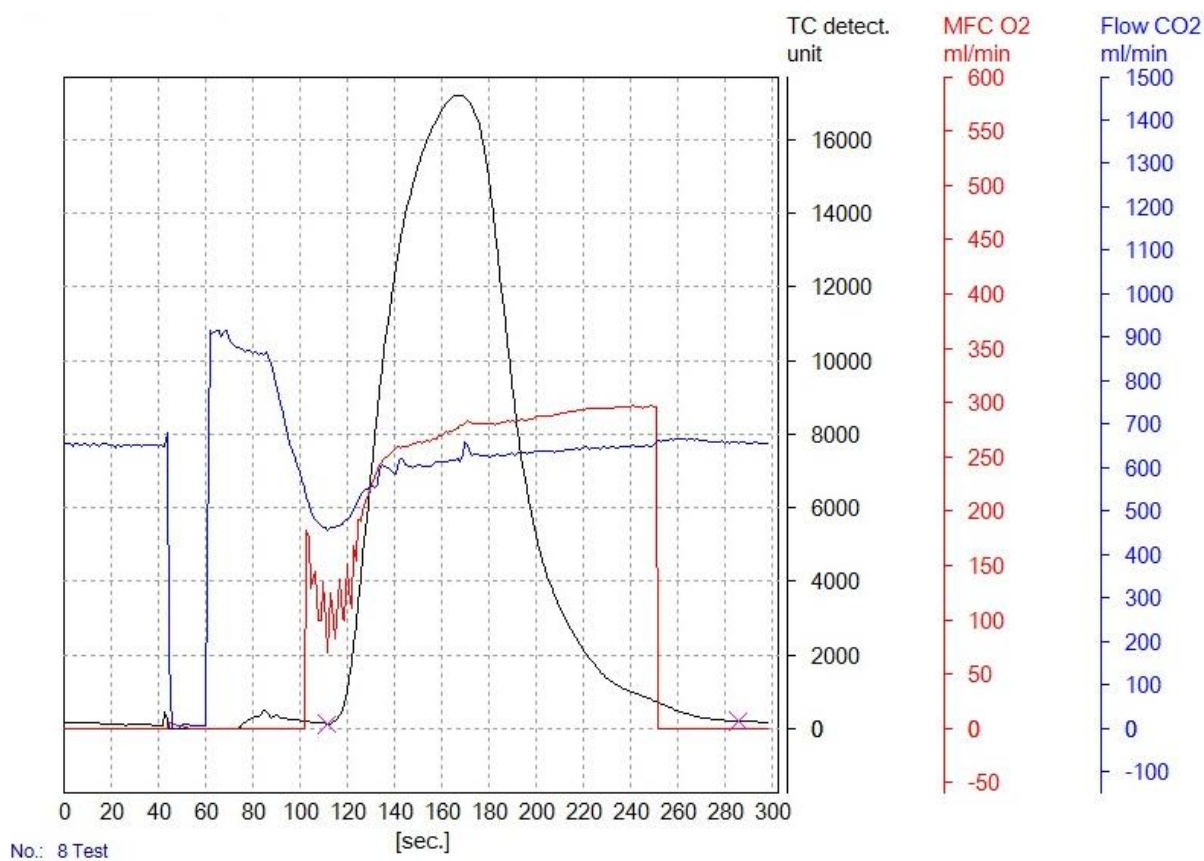
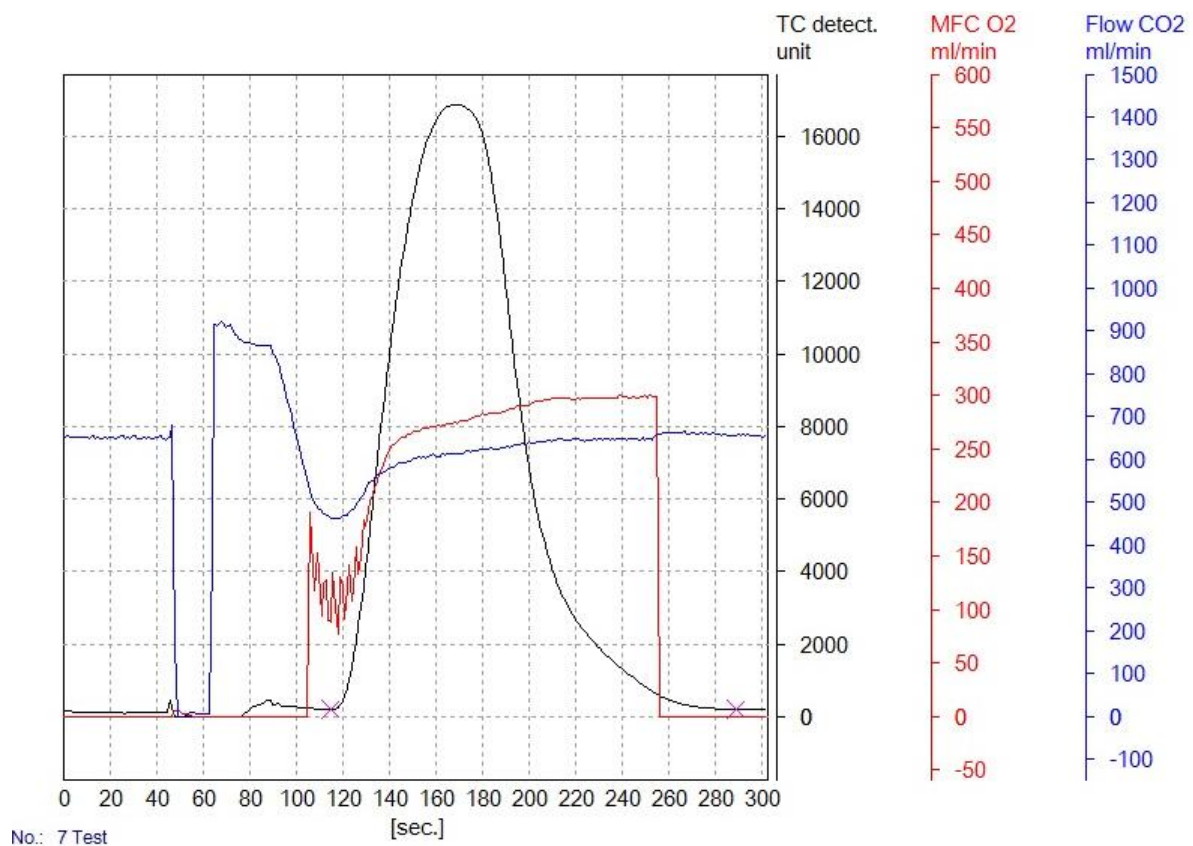
Л.К. Асякина

Заведующая кафедрой технологии продуктов
питания животного происхождения,
докт. техн. наук, профессор

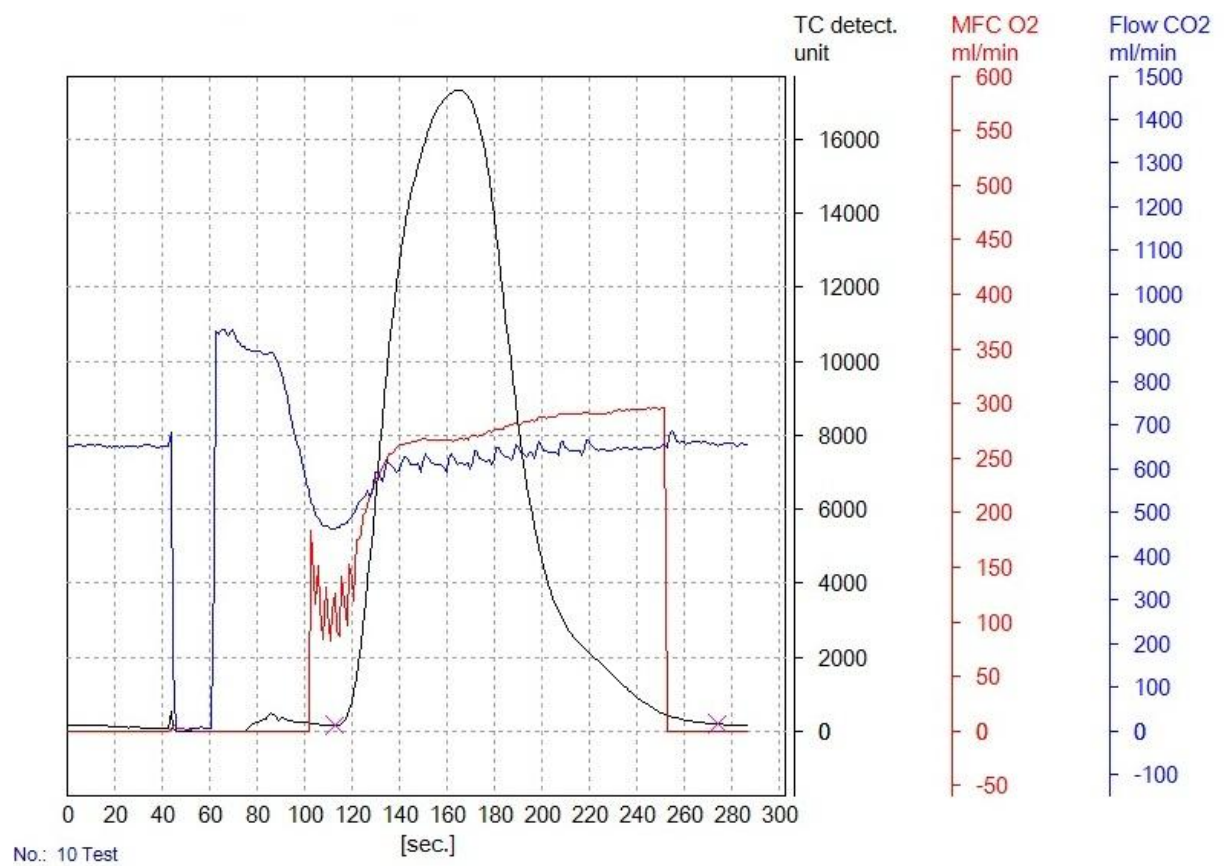
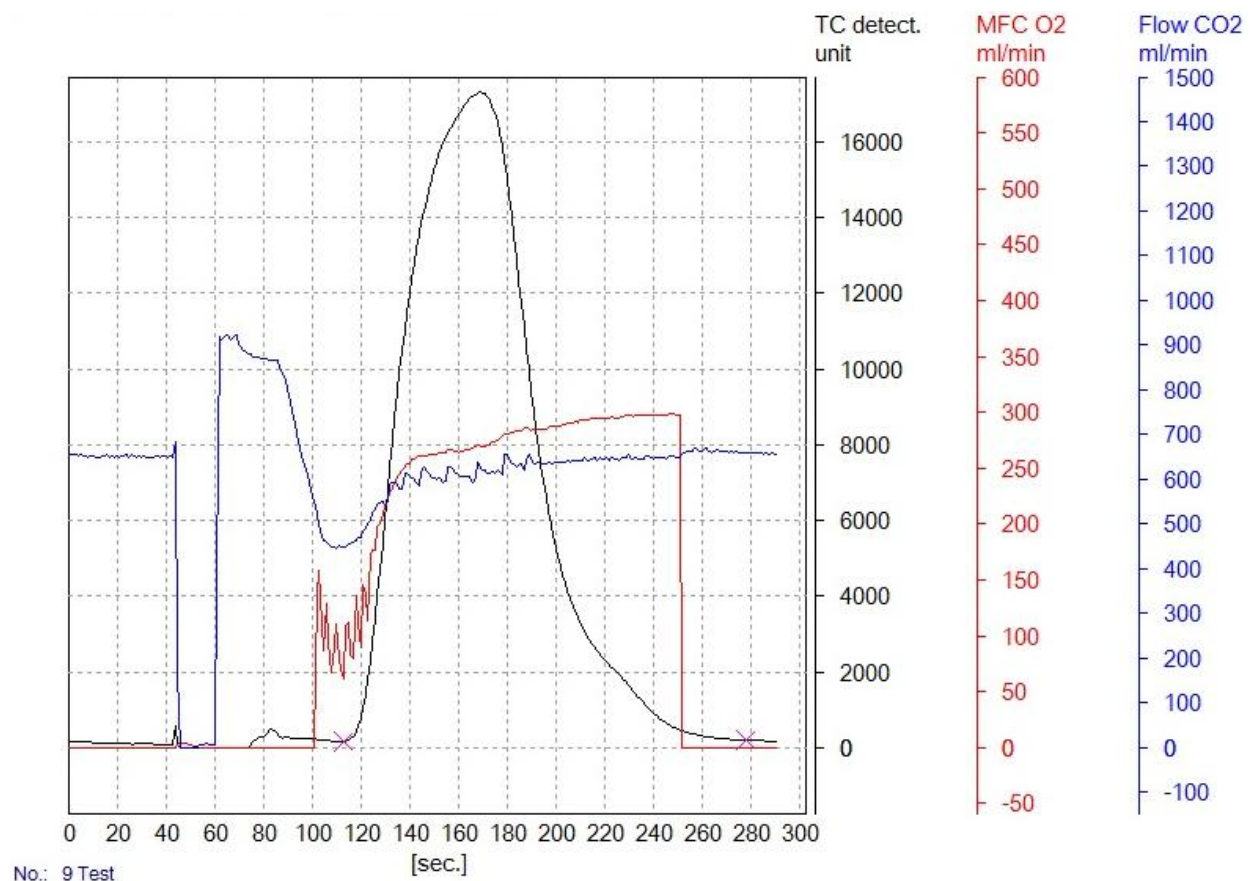
М.Г. Курбанова

Приложение И

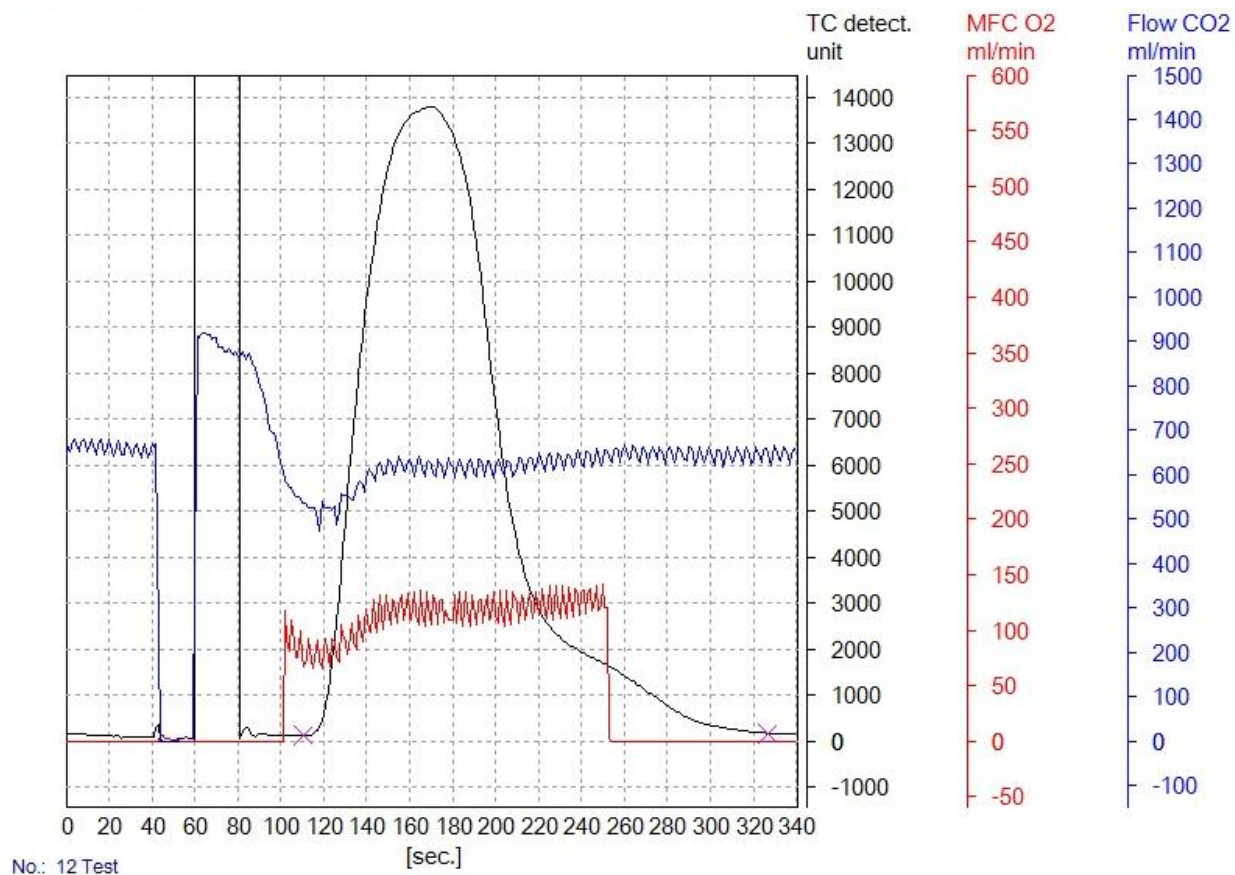
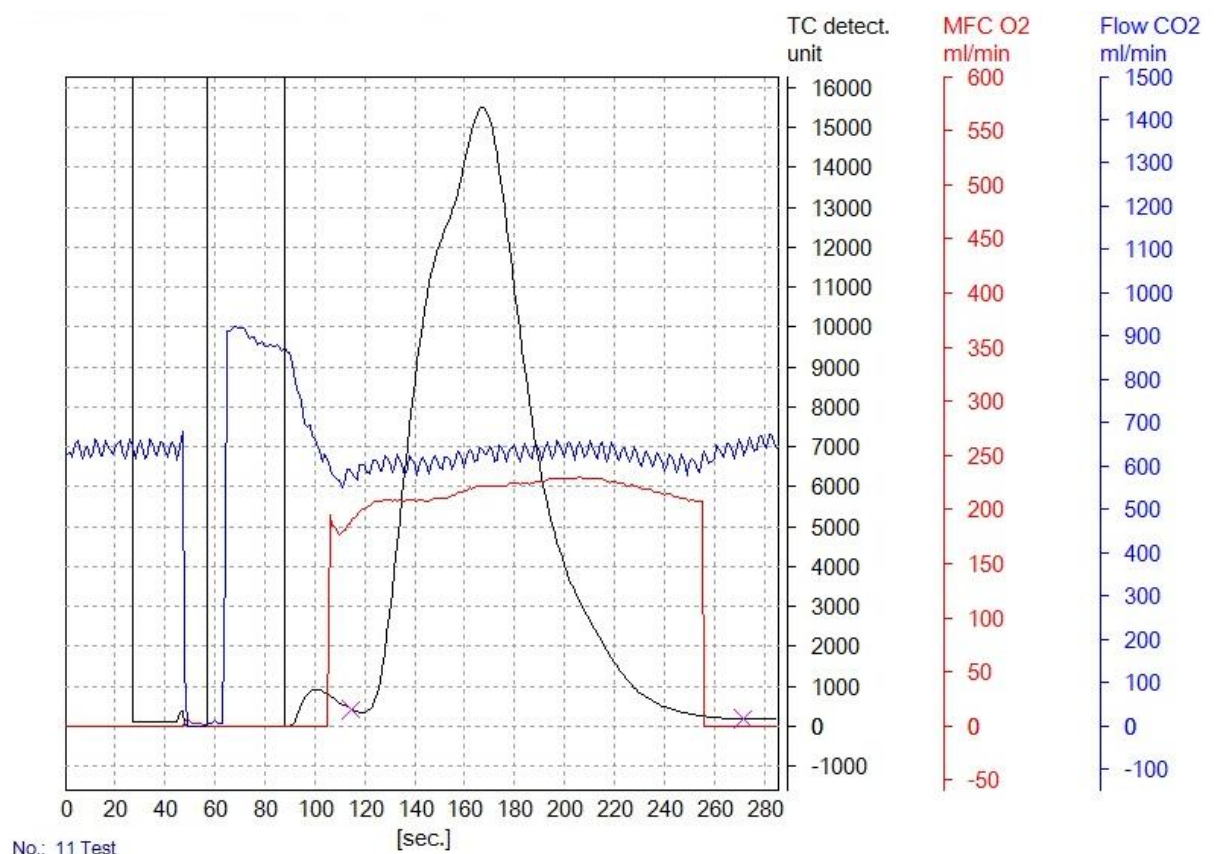
Графики расчёта концентрации азота в образцах гидролизатов коллагена



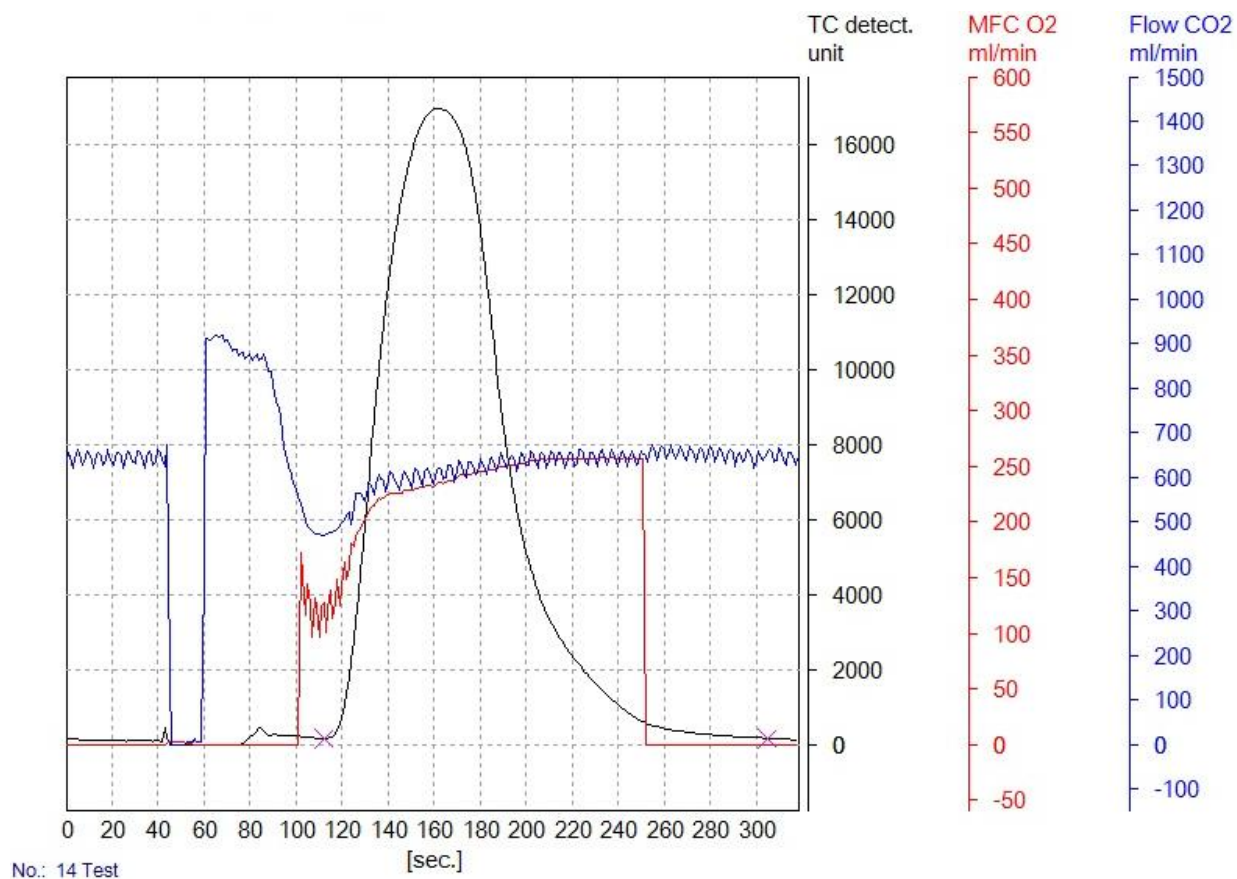
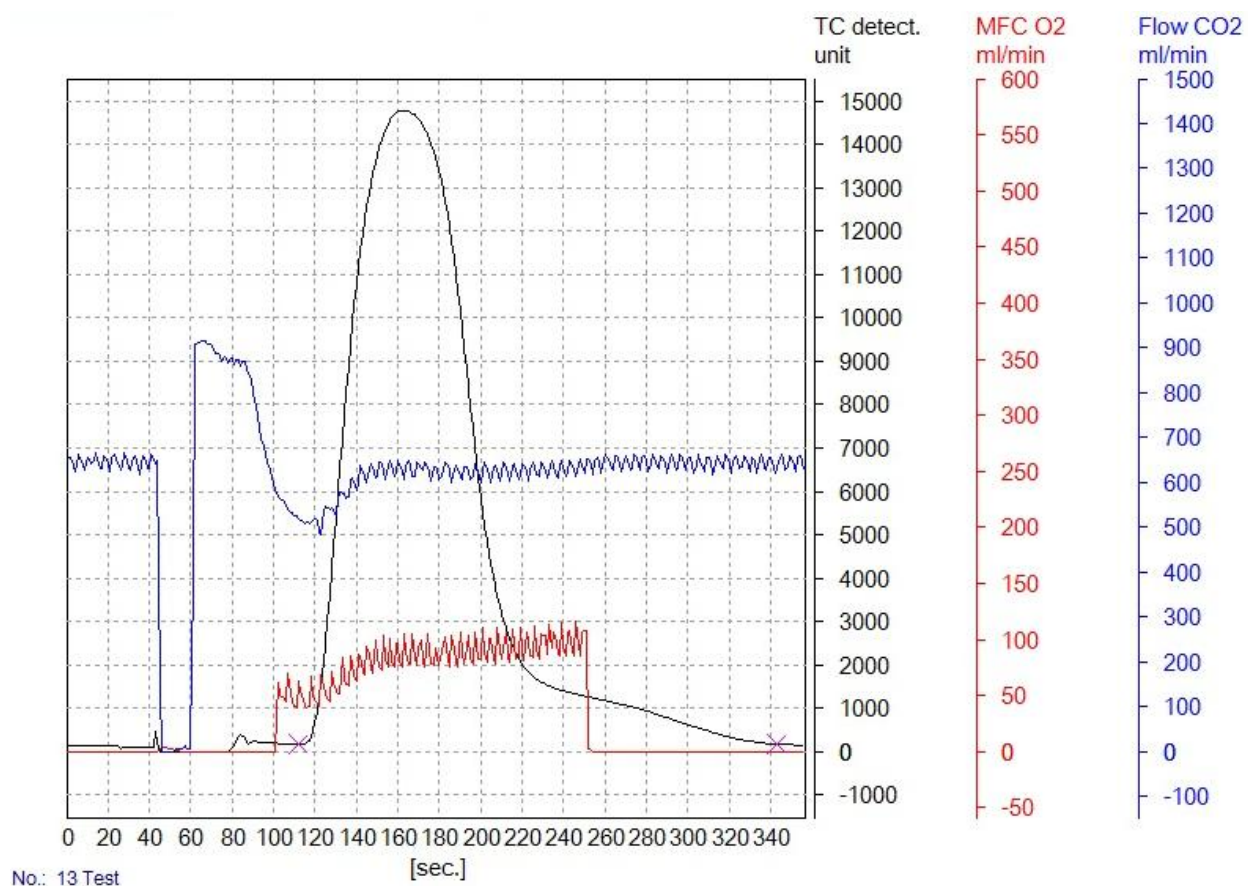
Продолжение приложения И



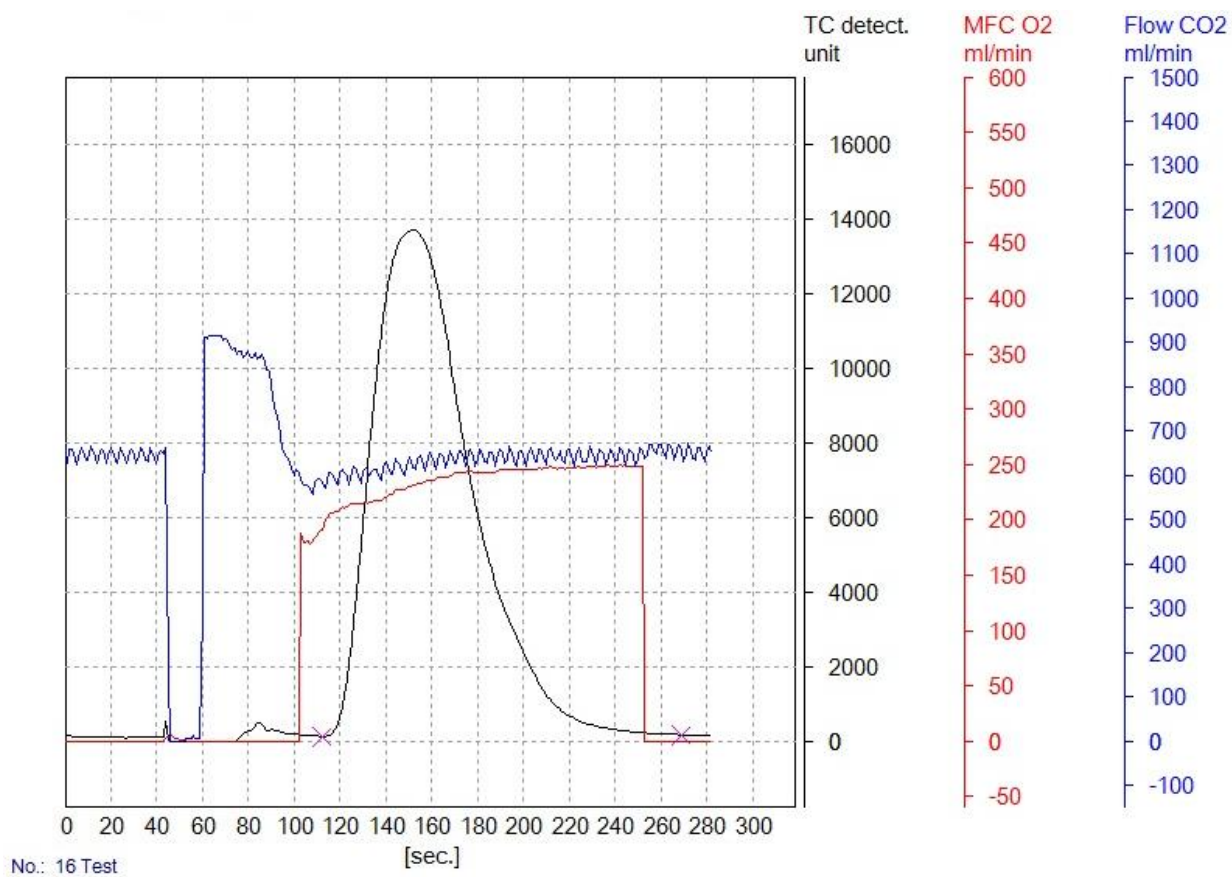
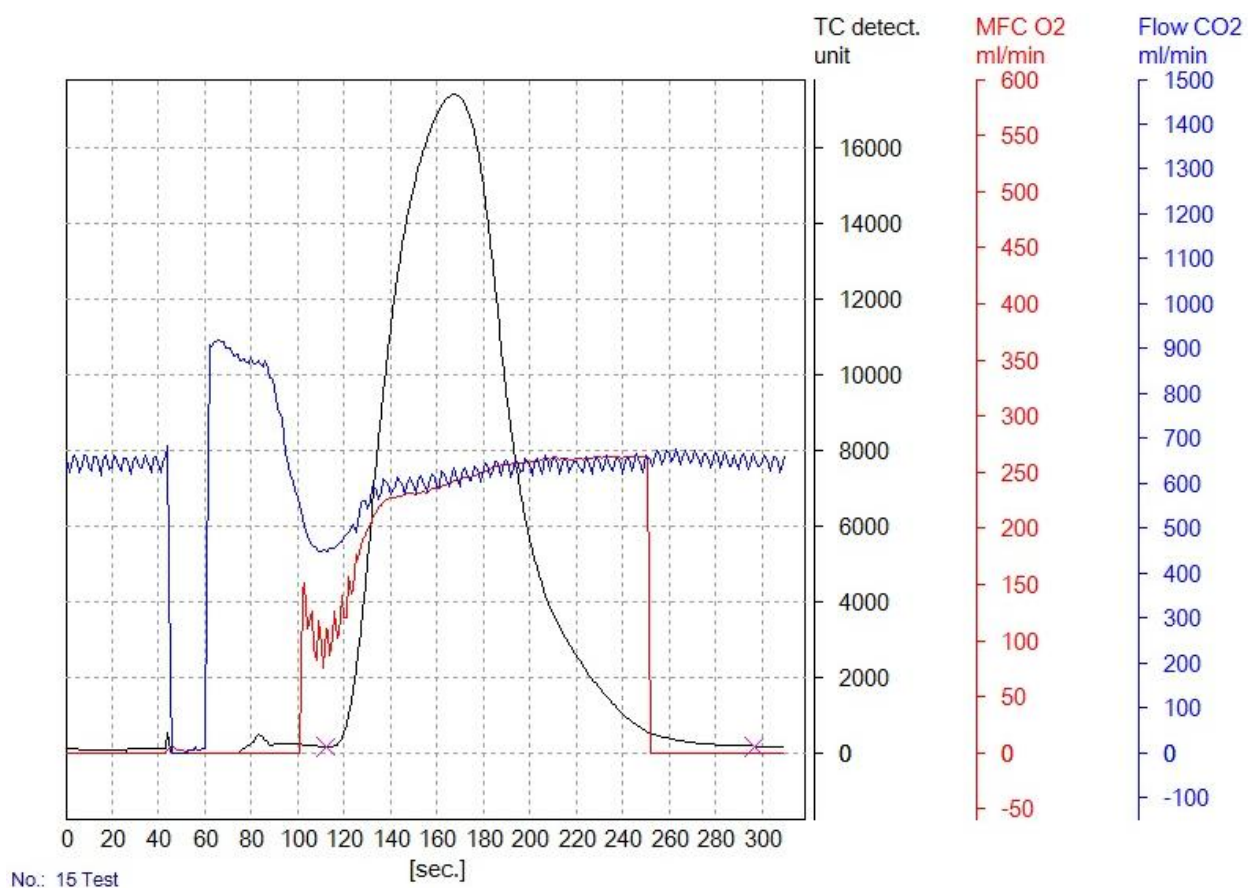
Продолжение приложения И



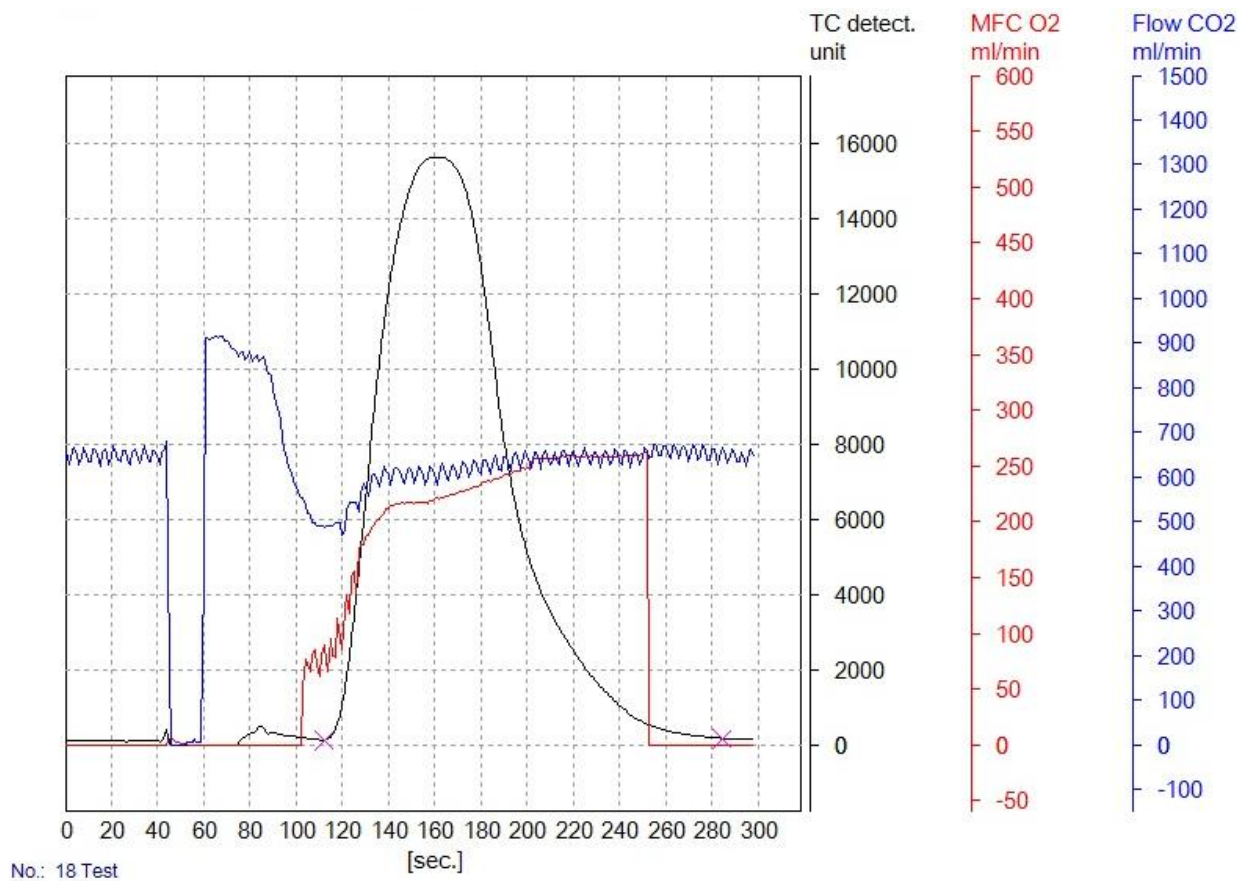
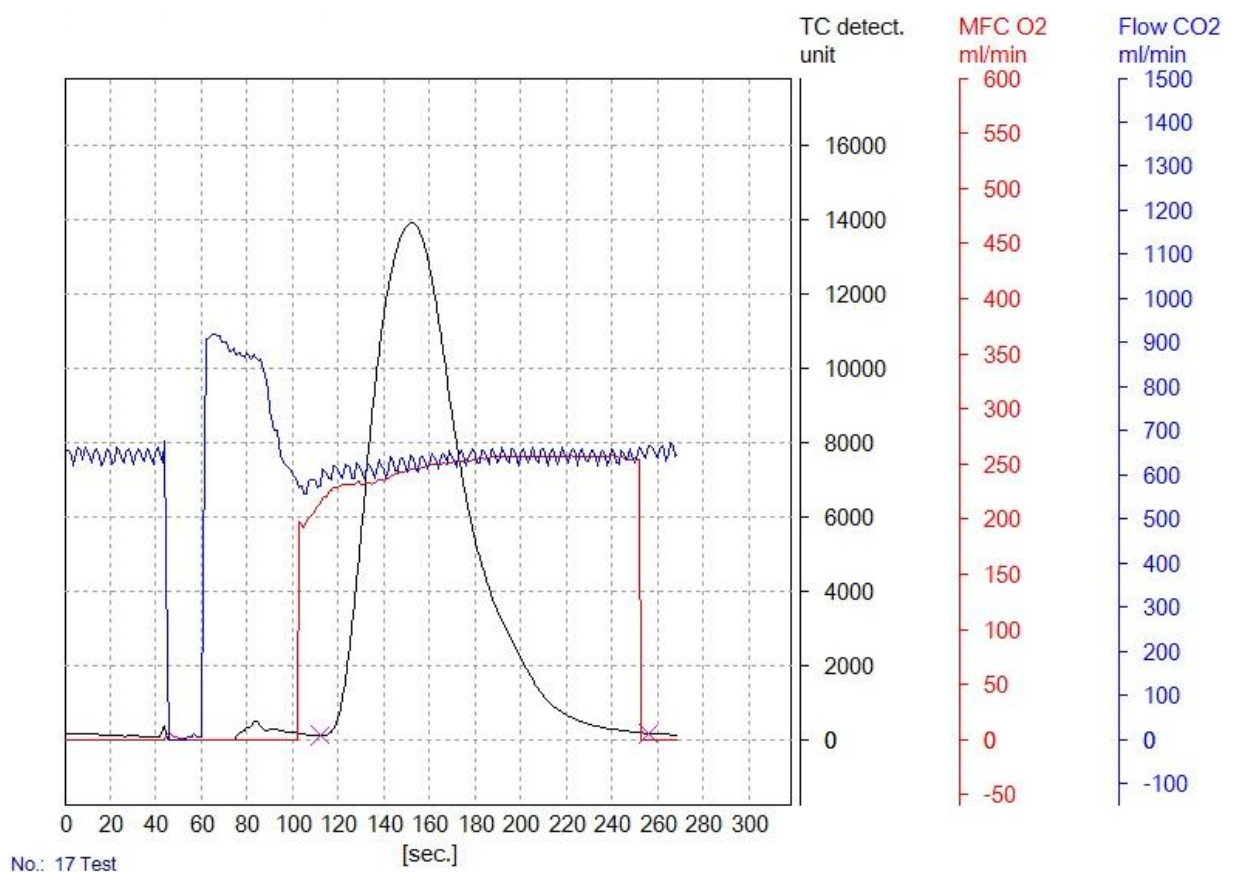
Продолжение приложения И



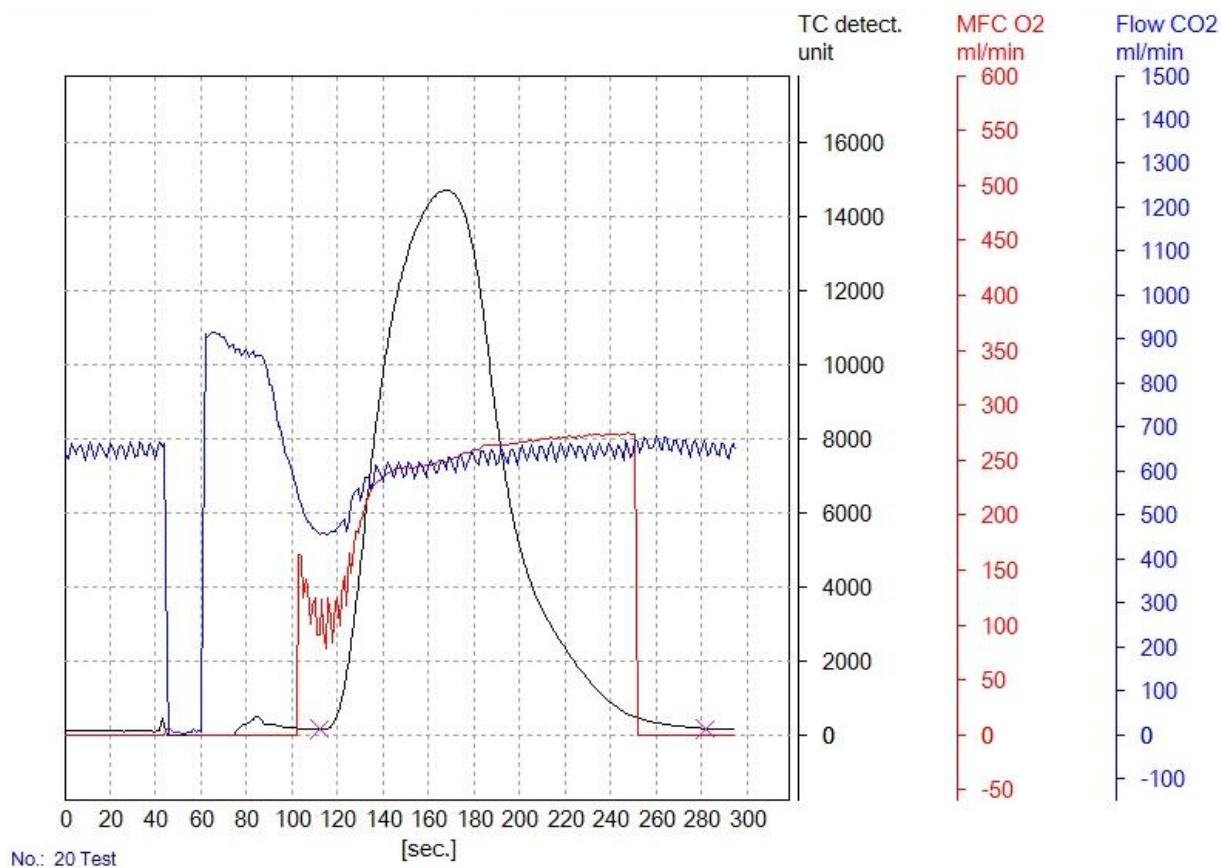
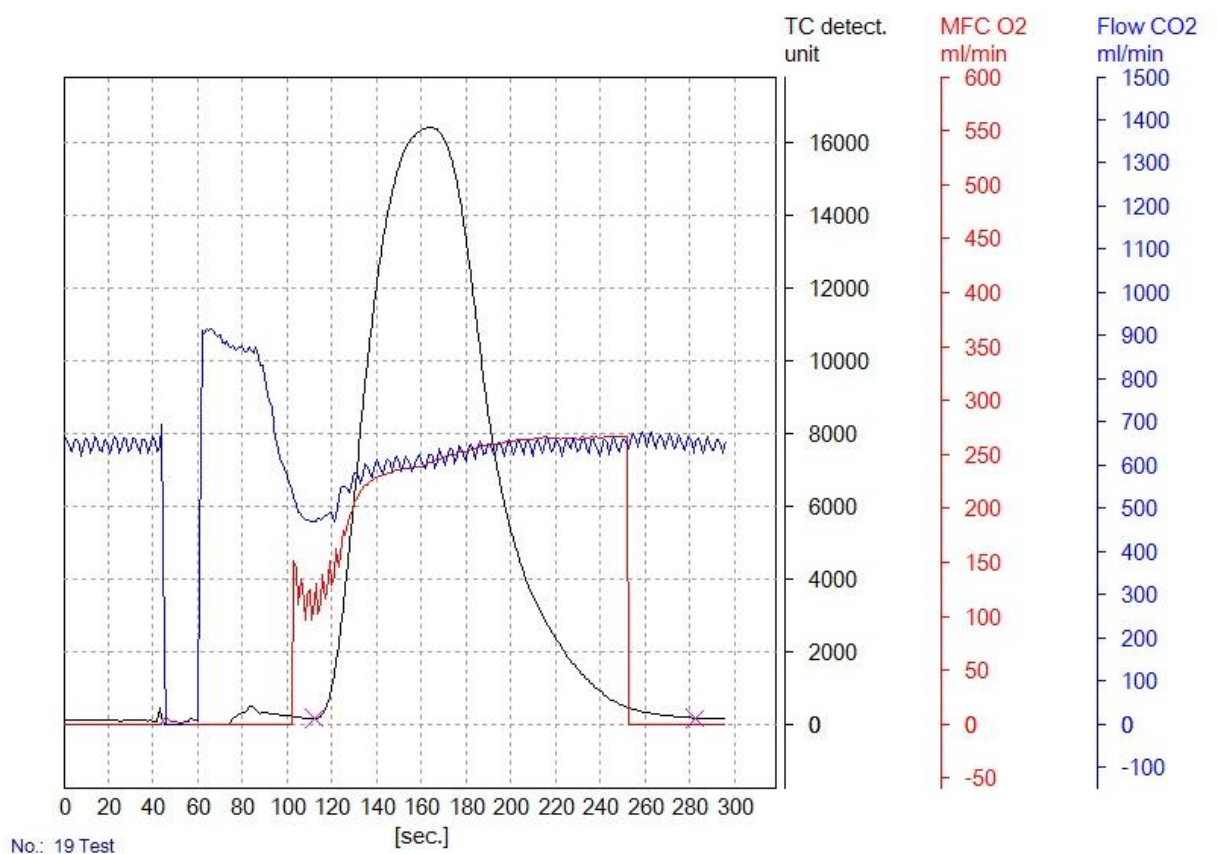
Продолжение приложения И



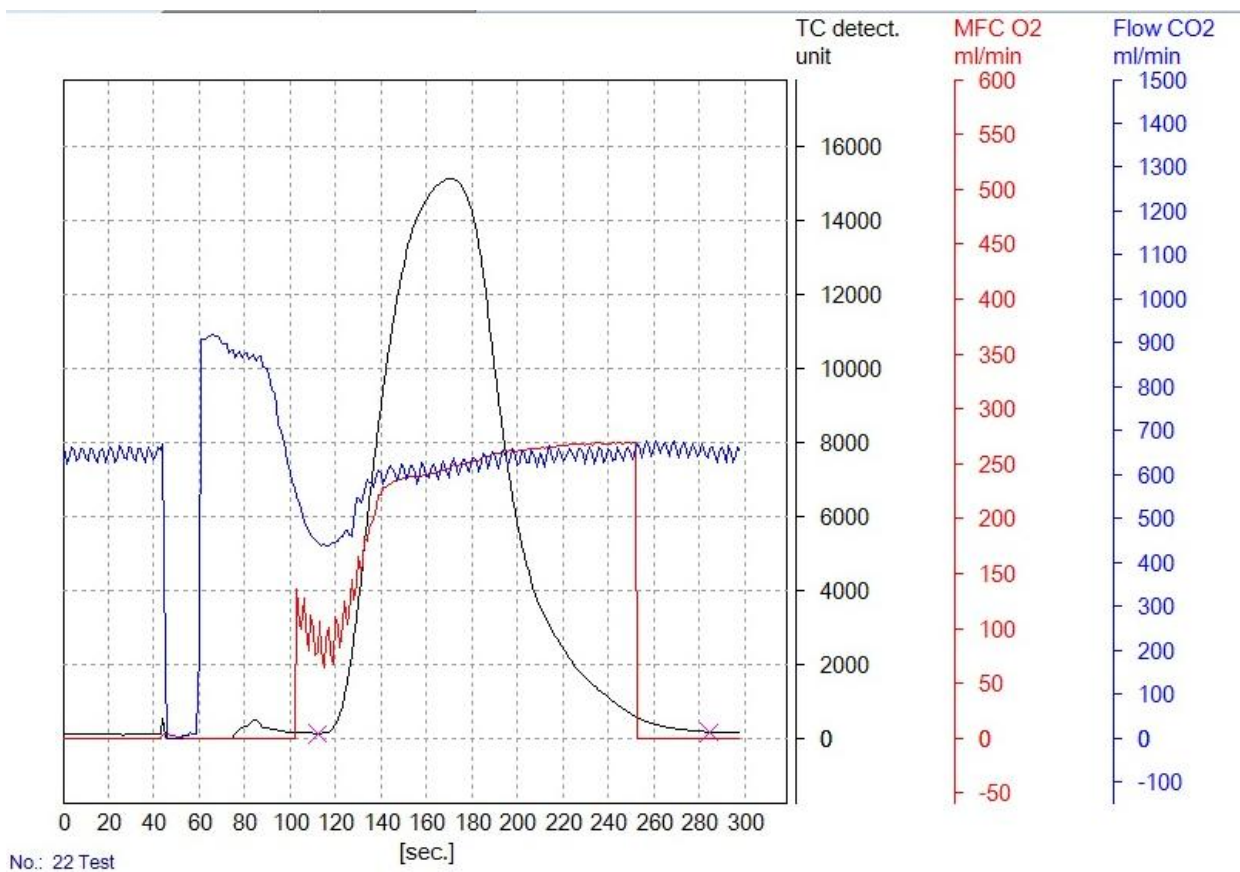
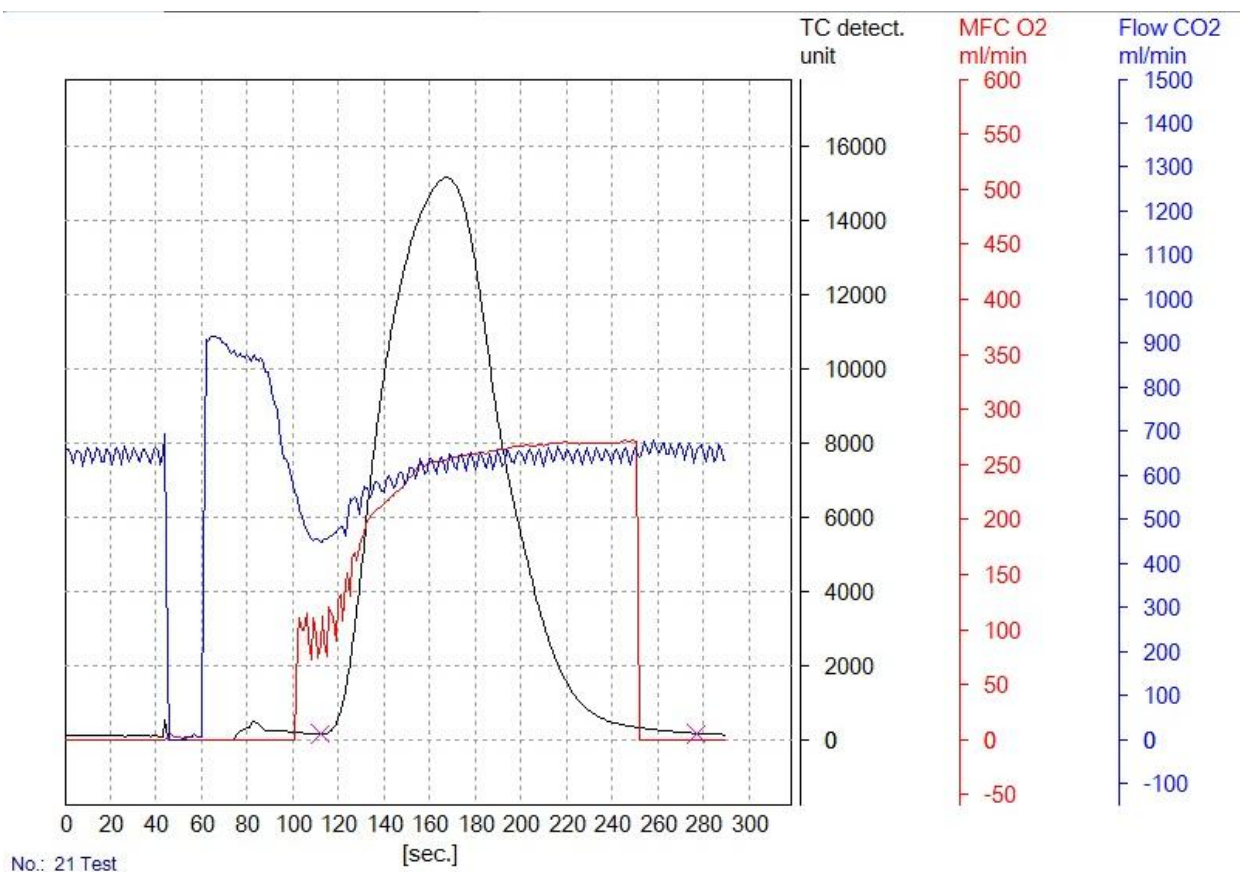
Продолжение приложения И

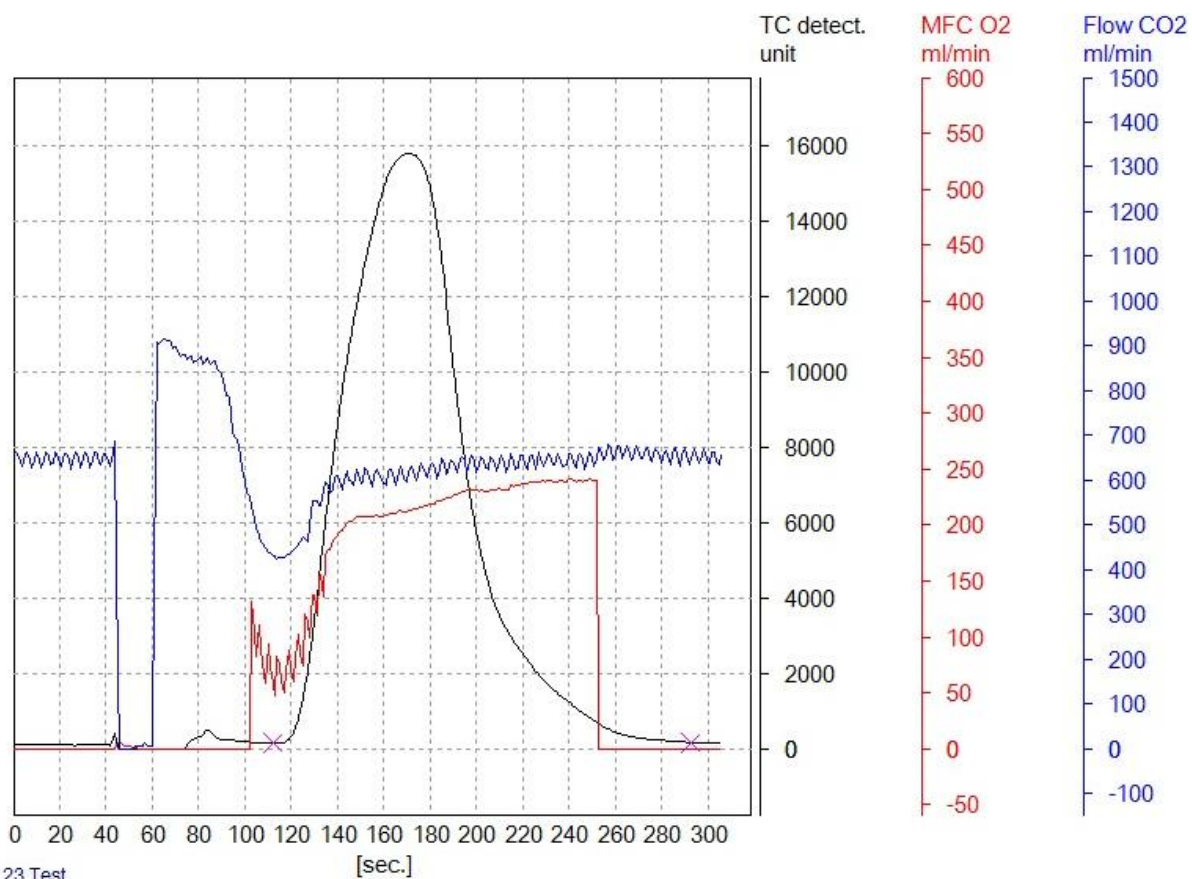
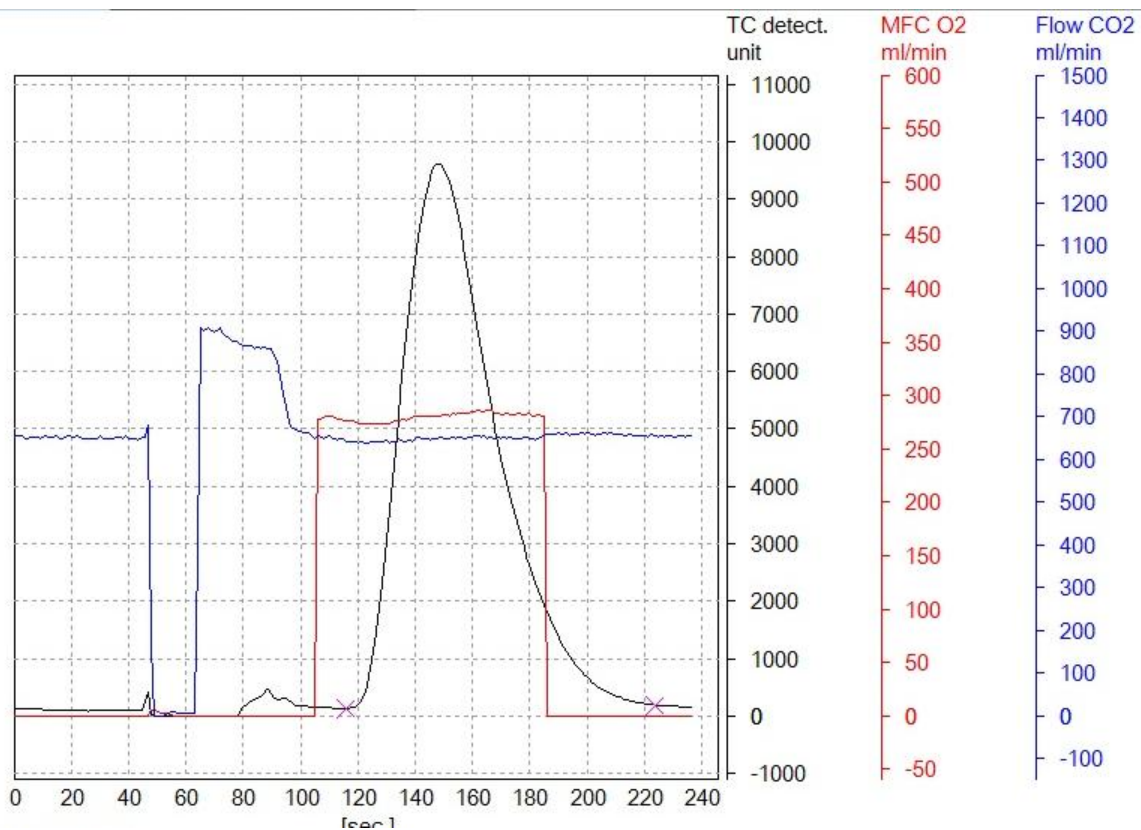


Продолжение приложения И



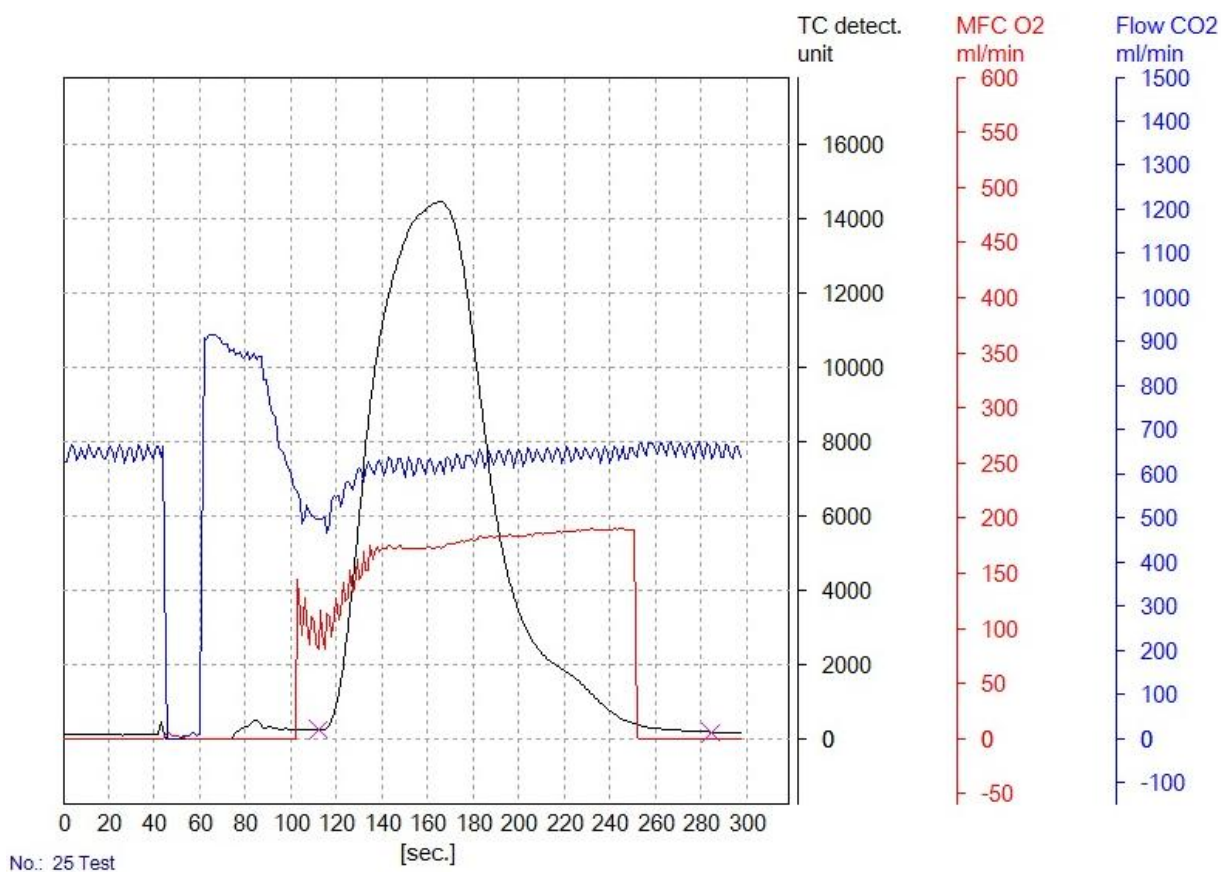
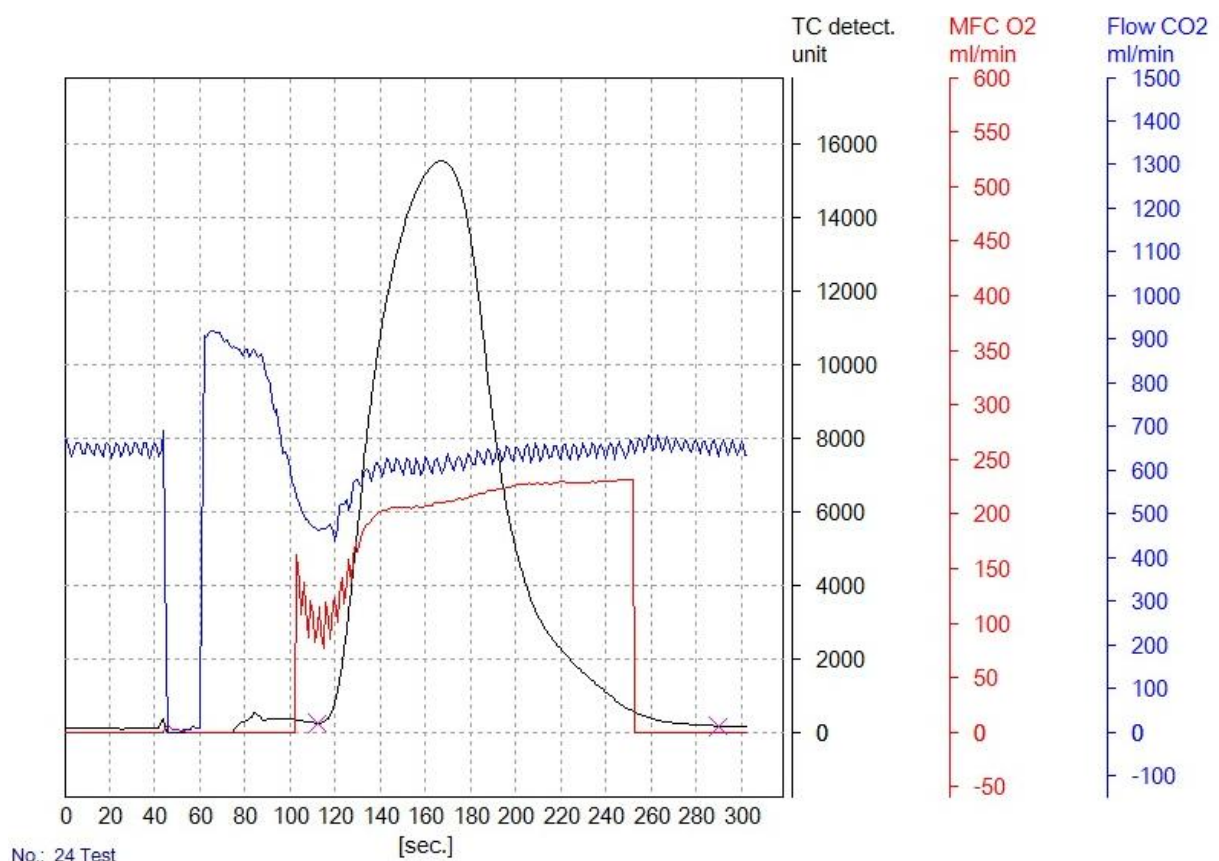
Продолжение приложения И



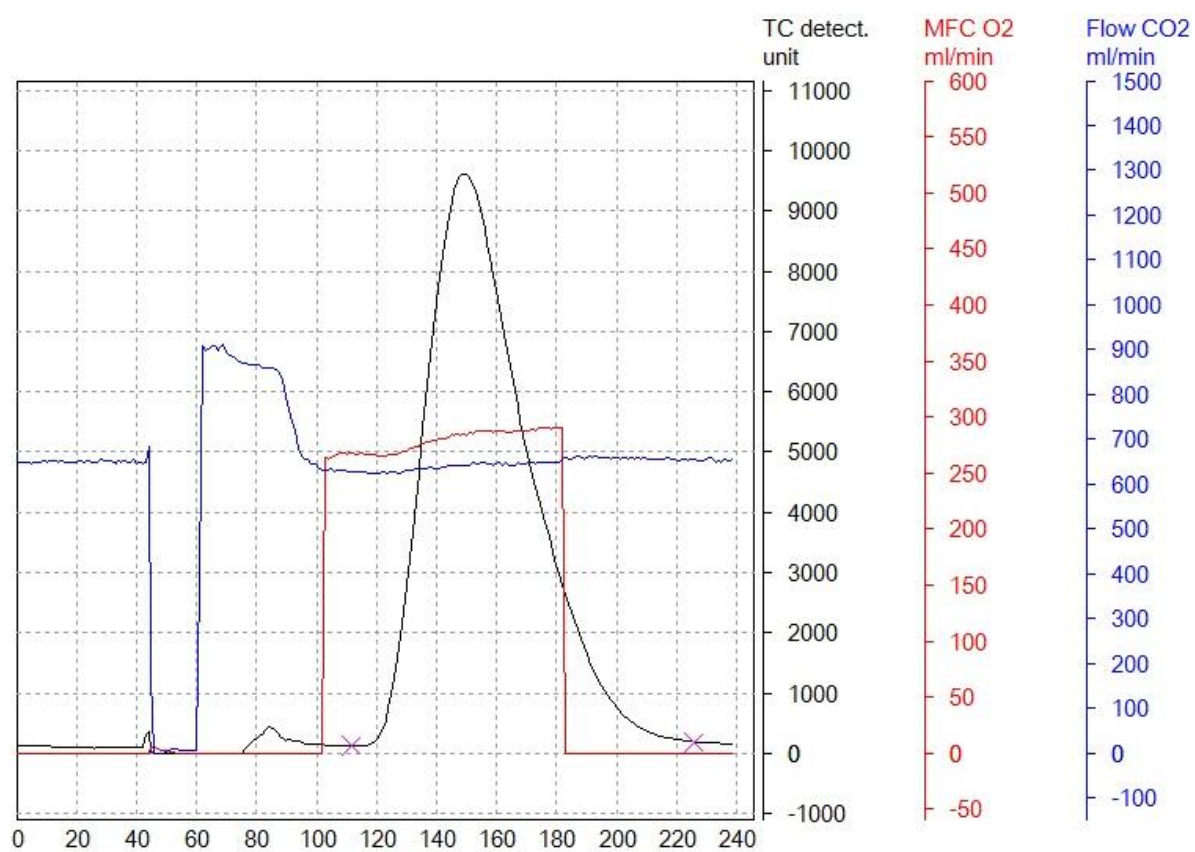
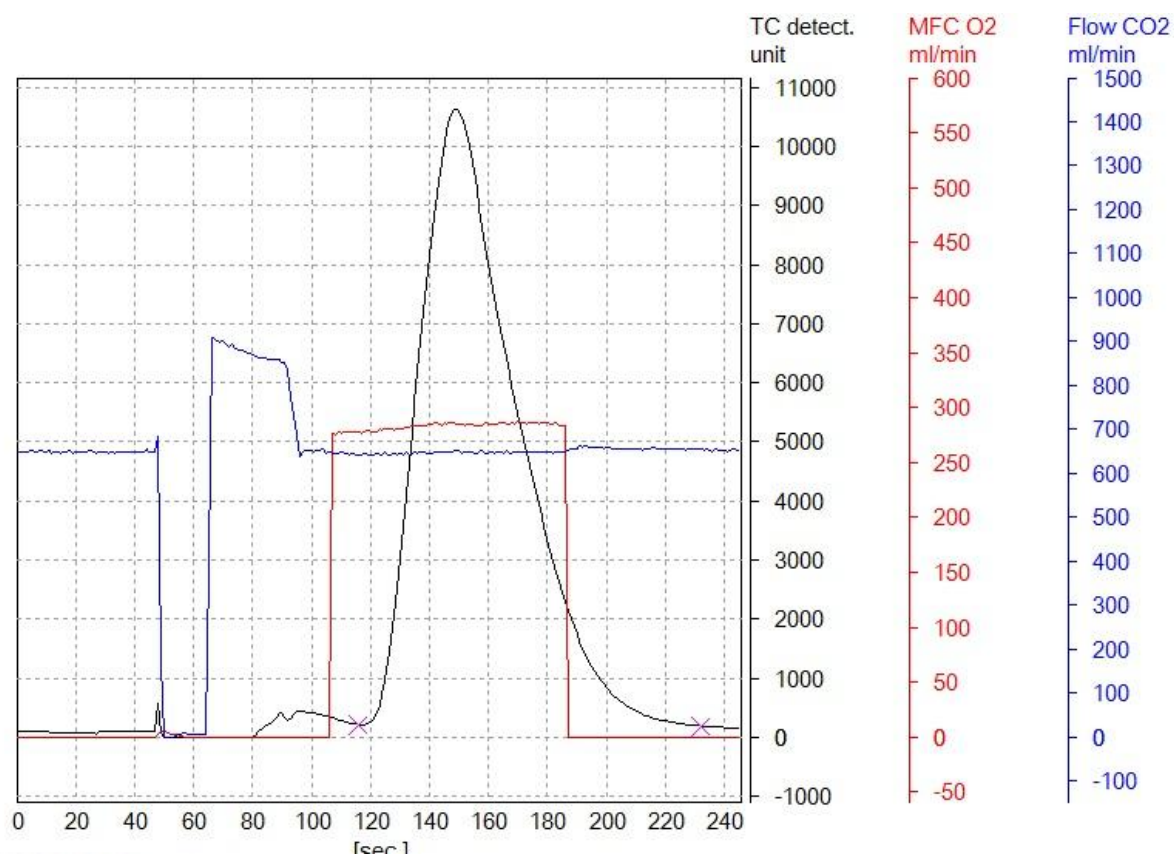


No.: 23 Test

Продолжение приложения И



Продолжение приложения И



Приложение К

Результаты анализа аминокислотной последовательности

1. StartMass	Sequence	2. StartMass	Sequence	94.545	G S P
53.873	D I/L V	40.514	I/L K H	146.276	A F
113.253	I/L C	53.886	P S P V	146.276	A W
113.253	I/L H	53.886	P S V P	178.195	E G
113.253	I/L M	113.293	G H G	178.195	G K
168.455	I/L V	151.149	S P V	178.195	G V
94.556	G R G	151.149	S V P	151.235	R G
94.556	G S P	72.664	A Y G	53.891	D T
94.556	G S V	40.514	C Y G	85.374	F M
40.500	I/L H	40.514	I/L T	94.545	T W
40.500	I/L T	53.886	P R G	53.891	V T
53.873	P R G	53.886	P W P	53.891	Y F
53.873	P S P	53.886	V K H	53.891	Y W
53.873	P S V	81.694	V R P	4. StartMass	Sequence
40.500	S V C	96.491	V T H	130.281	S A N
40.500	S V H	178.346	C H	116.182	T A N
40.500	S V M	232.715	C V	81.667	A G K
178.196	E G	113.293	G V	81.667	C I/L
104.727	Q C	170.394	H G	81.667	G G T
104.727	Q M	151.299	K H	81.667	S I/L
151.262	S P	153.242	K H	217.039	A N
151.262	S V	151.149	R G	124.682	A T
127.410	V C	181.121	R P	152.228	G K
127.410	V H	195.701	T H	124.682	G R
127.410	V M	197.536	V H	138.987	G T
94.556	C H	238.238	V P	168.637	I/L
53.873	D T	151.149	W P	184.372	I/L
53.873	E A	143.617	Y G	130.281	S C
94.556	G C	40.514	R G	130.281	S D
53.873	P C	53.886	V T	116.182	T C
53.873	V H	3. StartMass	Sequence	116.182	T D
40.500	V N	122.714	I/L K	81.667	A E
53.873	V T	122.714	I/L V	81.667	C P
53.873	Y F	94.545	G R G	94.583	D K

94.583	G C	53.918	V T	163.916	E A A
81.667	I/L	53.918	Y C	163.916	E A Y
53.948	P C	151.420	C	163.916	E I/L
81.667	P C	217.033	C	183.561	H I/L
53.948	T S	154.300	D	138.047	K P A
94.583	T T	232.760	D	138.047	K P Y
53.948	V Q	154.300	G	178.516	N A A
292.399	A	263.834	G	178.516	N A Y
151.435	C	6. StartMass	Sequence	178.516	N I/L
178.474	C	81.963	G G P A A	195.954	P A A
217.039	C	81.963	G G P A Y	195.954	P A Y
127.485	D	81.963	G G P I/L	195.954	P I/L
217.039	D	81.963	I/L A P A	178.516	Q G A
5. StartMass	Sequence	81.963	I/L A P Y	178.516	Q G Y
53.918	P I/L G	81.963	I/L A A	81.963	I/L W
53.918	P I/L V	81.963	I/L A D	81.761	P Q Q
113.355	I/L A	81.963	N P A A	77.016	T Q Q
151.132	I/L G	81.963	N P A Y	194.901	A A
151.132	I/L V	81.963	N P I/L	292.640	A A
40.541	I/L T	81.761	P N A A	194.901	A D
53.918	P S V	81.761	P N A Y	292.640	A Y
113.355	G V	81.761	P N I/L	306.481	G A
126.725	H G	81.761	P Q G A	306.481	G Y
126.725	H V	81.761	P Q G Y	292.640	I/L
151.132	S V	77.016	S E A A	320.950	I/L
162.859	T G	77.016	S E A Y	138.047	K A
162.859	T V	77.016	S E I/L	138.047	K D
85.415	F D	77.016	T N A A	178.516	Q Q
96.440	G T	77.016	T N A Y	138.047	V T
81.713	N W	77.016	T N I/L	138.047	V V
81.713	P E	77.016	T Q G A	81.963	G A
40.541	V A	77.016	T Q G Y	81.963	G D
40.541	V N	194.901	A P A	96.312	G T
81.725	V R	194.901	A P Y	99.312	H T

99.312	H V
81.761	P Q
77.016	Q M
77.016	T Q
81.963	V R
116.240	A
138.987	A
141.829	A
171.774	A
266.313	A
363.304	A
138.987	D
266.313	D
178.516	Q
306.481	Q
153.511	T
236.706	T
116.240	V
236.706	V

Приложение Л

Протокол Комиссии по биоэтике на проведение исследований

Решение Комиссии по биоэтике

ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН

относительно протокола-заявки №6/2023 на проведение исследования

*«Исследование биологических свойств гидролизатов коллагена» на
лабораторных мышах с моделью плоскостной раны*

Члены Комиссии по биоэтике пришли к решению:

Нарушений принципов гуманного обращения с животными при
проведении исследования не выявлено, исследование признать
целесообразным.

Принципы содержания животных и проведение всех манипуляций описаны в соответствии с требованиями законодательства Российской Федерации, положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей», положениями Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Washington D.C., 2011) и другими нормами международного права, регламентирующими вопросы содержания и использования лабораторных (экспериментальных) животных.

Председатель комиссии по биоэтике,
д.т.н., проф., академик РАН

Чернуха И. М.

Утверждено на заседании Комиссии №2 «03» апреля 2023 г.

Приложение М

Ветеринарное свидетельство на мышей лабораторных линии Balb/c

Статус:	погашено	Форма № 1
Ветеринарное свидетельство		
Владимирская область, Владимир, ГБУ "Владимирская областная станция по борьбе с болезнями животных"		№ 18579619692 от 12.04.2023 13:35:23 МСК
Отправитель:	ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "СМК СТЕЗАР", ИНН: 3327123905, ТТН: № 211 от 12.04.2023 г. наименование юридического лица или Ф. И. О. физического лица	
	ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "СМК СТЕЗАР" (РФ, Владимирская обл., Суздальский район, с. Погост-Быково, Знаменская ул., д. 62) наименование и адрес предприятия-отправителя	
Получатель:	ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ "ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПИЩЕВЫХ СИСТЕМ ИМ. В.М. ГОРБАТОВА" РАН, ИНН: 7709022913 наименование юридического лица или Ф. И. О. физического лица	
	Федеральное Государственное Бюджетное Научное Учреждение "Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН (109316, РФ, г. Москва, Талалихина ул., д. 26) наименование и адрес предприятия-получателя	
Продукция:	мышь лабораторная Balb/c, 40 голов наименование и объем продукции	
Производитель:	ХС: ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "СМК СТЕЗАР" (ИНН: 3327123905) на площадке: ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "СМК СТЕЗАР" (РФ, Владимирская обл., Суздальский район, с. Погост-Быково, Знаменская ул., д. 62) ХС-производитель, название и номер площадки-производителя	
	маркировка, номер и форма клейма	10.01.2023 дата выработки продукции
Лабораторные исследования:	см. приложение	
Проведена иммунизация против:	не проводилась	
Животные обработаны против паразитов:	не проводилась	
Маршрут следования: а/м Т 686 ТХ 33 - РФ, Владимирская обл., Суздальский район, с. Погост-Быково, Знаменская ул., д. 62 - 109316, РФ, г. Москва, Талалихина ул., д. 26. ТТН: № 211 от 12.04.2023 г. Способ хранения при перевозке: вентилируемые Цель: для лабораторных исследований Местность благополучна по заразным болезням животных Мыши линии Balb/c, самцы, 16-18гр.. Производственный ВСД: № 17977902027 от 25.02.2023		
		ВСД выдал: Вед. вет. врач - эпизоотолог Калашников М.Л. Контактный тел.: 9308312565
C1E0-BC04-D57E-4FAC-B500-F1F2-70D7-D469		

Продолжение приложения М

ПРИЛОЖЕНИЕ

Лабораторные исследования:

Лаборатория	Наименование показателя	Дата исследования	№ экспертизы	Результат
ГБУ "Владимирская обл.вет.лаборатория"	Возбудители сальмонеллеза	16.02.2023	133-А/В	отрицательный
ГБУ "Владимирская обл.вет.лаборатория"	Возбудители лептоспироза, листериоза, токсоплазмоза.	16.02.2023	133-А/В	отрицательный
ГБУ "Владимирская обл.вет.лаборатория"	Возбудители протозоозов	16.02.2023	132-А/В	отрицательный
ГБУ "Владимирская обл.вет.лаборатория"	Возбудители саркоптоза	16.02.2023	78-Л/В	отрицательный



ВСД выдал:

Вед. вет. врач - эпизоотолог
Калашников М.Л.
Контактный тел.: 9308312565

C1E0-BC04-D57E-4FAC-B500-F1F2-70D7-D469

Приложение Н

Ветеринарная справка на полнорационный комбикорм

Статус:	погашено	Форма № 4
Ветеринарная справка		
г. Москва, Калининская ветеринарная лечебница	№ 18378495235 от 28.03.2023 14:24:35 МСК	
Отправитель:	ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "ЛАБОРАТОРКОРМ", ИНН: 7721555523, ТТН: № 269 от 27.03.2023 г. наименование юридического лица или Ф. И. О. физического лица	
	ООО "Лабораторкорм" (109428, РФ, г. Москва, 2-й Вязовский проезд, д. 16, стр. 9) наименование и адрес предприятия-отправителя	
Получатель:	ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ "ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПИЩЕВЫХ СИСТЕМ ИМ. В.М. ГОРБАТОВА" РАН, ИНН: 7709022913 наименование юридического лица или Ф. И. О. физического лица	
	Федеральное Государственное Бюджетное Научное Учреждение "Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН (109316, РФ, г. Москва, Талалихина ул., д. 26) наименование и адрес предприятия-получателя	
Продукция:	Корм ПОЛНОРАЦИОННЫЙ КОМБИКОРМ ДЛЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ ПК 120 -2_243 (ПК 120 -2_243), 150 кг наименование и объём продукции	
	Пакет, 10 шт. наименование и количество единиц упаковки	
Производитель:	ХС: АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО "ГАТЧИНСКИЙ КОМБИКОРМОВЫЙ ЗАВОД" (ИНН: 4719000303) на площадке: АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО "ГАТЧИНСКИЙ КОМБИКОРМОВЫЙ ЗАВОД" (РФ, Ленинградская обл., Гатчинский район, д. Малые Колпаны, Западная ул., д. 31) ХС-производитель, название и номер площадки-производителя	
	АО ГАТЧИНСКИЙ ККЗ маркировка, номер и форма клейма	08.02.2023 дата выработки продукции
Лабораторные исследования:	см. приложение	
Подвергнута ветеринарно-санитарной экспертизе в полном объёме Маршрут следования: а/м У 292 ВА 797 - 109428, РФ, г. Москва, 2-й Вязовский проезд, д. 16, стр. 9 - 109316, РФ, г. Москва, Талалихина ул., д. 26. ТТН: № 269 от 27.03.2023 г. Способ хранения при перевозке: вентилируемые Цель: в корм лабораторным животным Местность благополучна по заразным болезням животных Входящий ВСД: № 17818608428 от 13.02.2023 16:44:50 МСК. Производственный ВСД: № 17788153519 от 10.02.2023		
		ВСД выдал: Ветспециалист Бахромкина Е.В. Контактный тел.: 4953602441
84CF-CCCD-9FEB-4AE1-B040-AB69-DBBE-FB0D		

Продолжение приложения Н

ПРИЛОЖЕНИЕ

Лабораторные исследования:

Лаборатория	Наименование показателя	Дата исследования	№ экспертизы	Результат
ФГБУ "ВНИИЗЖ"	микробиологические показатели	26.12.2022	22.77056СП6В	отрицательный
ФГБУ "ВНИИЗЖ"	показатели безопасности	26.12.2022	22.77059СП6В	отрицательный



ВСД выдал:
Ветспециалист
Бахромкина Е.В.
Контактный тел.: 4953602441

84CF-CCCD-9FEB-4AE1-B040-AB69-DBBE-FB0D

Приложение П

Удостоверение качества и безопасности на полнорационный комбикорм

ООО «Лабораторкорм»

109428 г. Москва, Вязовский 2-й проезд, д. 16, стр. 10, эт. 2, ком 2

Тел.:(495) 972-99-72, 972-16-87, 220-01-23

Удостоверение качества и безопасности полнорационного комбикорма рецепт ПК- 120-2_243 для СОДЕРЖАНИЯ лабораторных животных (мышей, крыс, хомяков)

(Декларация о соответствии № РОСС RU Д-РУ. АА80.В.0305/20 до 04.11.2023г.)

ГОСТ Р34566-2019

Изготовитель :АО «Гатчинский ККЗ» 188302 Ленинградская обл.Гатчинский р-он,
Малые Колпаны д.,Западная ул.д.31

Состав рецепта

Кукуруза, Пшеница, Шрот подсолнечный, Шрот соевый, Мясная мука /птичья/, Масло раст. подсолн.
рафинированное., Премикс П 2 Пушновит (0,5%), L-Лизин Моногидрохлорид, DL-Метионин, Фосфат
дефторированный, Известняковая мука, Сульфат натрия, Соль поваренная.

Питательная ценность комбикорма

Обменная энергия, не менее 310 Ккал/100г

Гарантированные показатели					Дополнительно введено витаминов и микроэлементов в 1 кг комбикорма		
Наименование	Ед.изм.	Мин	Макс	Факт	Наименование	Ед.изм	знач.
Влажность	%		13,50	13,50	Витамин А	тысМЕ	27,00
Сырой протеин	%	19,00		19,00	Витамин D3	тысМЕ	1,50
Сырой жир	%		5,00	5,00	Витамин Е	мг	125,00
Сырая клетчатка	%		4,00	4,00	Витамин К3	мг	5,00
Сырая зола	%		7,00	7,00	Витамин В1	мг	30,00
Лизин	%	1,20		1,20	Витамин В2	мг	20,00
Метионин+цистин	%	0,70		0,70	Витамин В3	мг	30,00
Са	%	0,90	1,20	0,90	Витамин В4	мг	1000,00
Р	%	0,60	0,90	0,70	Витамин В5	мг	80,00
Триптофан	%	0,20		0,20	Витамин В6		15,00
NaCl	%			0,36	Витамин ВС	мг	4,00
Номер партии: 157989/157990 Дата изготовления: 04.03.2023 г. Фасовка по 15 кг Срок хранения: 3 месяца с даты изготовления Условия хранения при температуре от 0 до 25 градусов С и относительной влажности воздуха не более 75%. Резкие перепады температуры недопустимы Комбикорм-экструдированные гранулы, изготовлен без применения консервантов					Витамин В12	мг	0,05
					Витамин С	мг	70,00
					Витамин Н	мг	0,04
					Mg	мг	200,00
					Fe	мг	100,00
					Mn	мг	57,00
					Zn	мг	53,50
					Cu	мг	9,00
					Co	мг	1,35
					J	мг	1,00
					Se	мг	0,07
						мг	

Указания по применению

Является полнорационным комбикормом, Скармливать лабораторным животным (крысам, мышам, хомякам) в период содержания. Необходимо постоянное наличие свежей воды.

НЕ ТОКСИЧЕН

Комбикорм сбалансирован по аминокислотному составу, минеральным веществам и витаминам,
изготовлен из высококачественных компонентов.

Экологически чистый продукт

Директор ООО «Лабораторкорм»

П.А.Процив



Приложение Р**Фотофиксация исследуемых животных****Группа 1 (контрольная группа)****На 1 сутки**

№1



№2



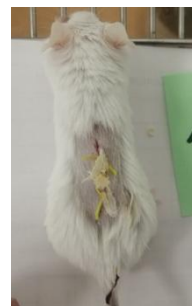
№3



№4



№5



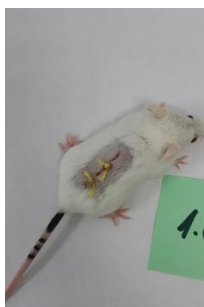
№6



№7



№8



№9



№10

**На 7 сутки**

№1



№2



№3



№4



№5



№6



№7



№8



№9



№10



Группа 2 (опытная группа 1)**На 1 сутки**

№1



№2



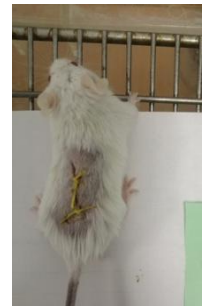
№3



№4



№5



№6



№7



№8



№9



№10

**На 7 сутки**

№1



№2



№3



№4



№5



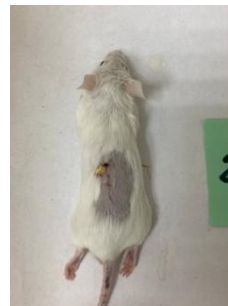
№6



№7



№8



№9



№10



Группа 3 (опытная группа 2)**На 1 сутки**

№1



№2



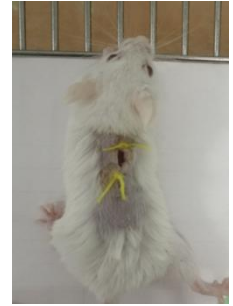
№3



№4



№5



№6



№7



№8



№9



№10

**На 7 сутки**

№1



№2



№3



№4



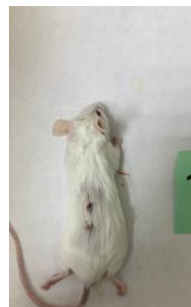
№5



№6



№7



№8



№9



№10

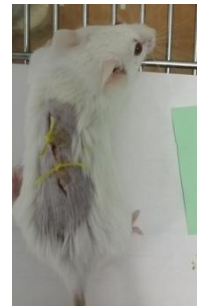


На 1 сутки

№5



№10



№5



№10

