

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

УДК 636.2.034+636.08

**ИЗМЕНЕНИЯ В АМИНОКИСЛОТНОМ СОСТАВЕ ЖЕЛАТИНА ПОСЛЕ
ОБРАБОТКИ КОЛЛАГЕНА КОРОВ ФЕРМЕНТНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ****Сергей Юрьевич Зайцев¹**¹ Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ
им. Л.К. Эрнста, s.y.zaitsev@mail.ru

Аннотация. В последнее время большое внимание уделяется изучению аминокислотного состава желатинов, что связано с качеством соответствующих гелей как полупродуктов для питания человека и животных. В кратком обзоре рассмотрена модификация общего метода кислотной экстракции коллагенов для приготовления желатинов с использованием ферментов (папаина, актинидина и др.), обсуждены соответствующие изменения в аминокислотном составе желатинов. Изменения в содержании глицина происходят в желатинах из любых коллагенов, но во всех случаях содержание глицина составляет порядка трети от содержания всех аминокислот (как и в исходных коллагенах). Важно, что содержание иминокислот (сумма пролина и гидроксипролина, которая во многом определяет свойства гелей) в желатинах из любых коллагенов при использовании всех изученных ферментов значительно выше, чем без них. Кроме того, содержание иминокислот в желатине из кожи коров при использовании любых ферментов значимо выше, чем в желатинах из кожи свиней и рыб. Это соблюдается и для других ключевых «протеиногенных» аминокислот. Обратная тенденция наблюдается только для нескольких аминокислот: серина, треонина, тирозина, фенилаланина, содержание которых невысокое в желатинах из любых коллагенов.

Ключевые слова: аминокислотный состав, желатин, коллаген, ферментные препараты, биохимия животных

DOI: 10.55959/MSU0579-9384-2-2023-64-5-490-499

Финансирование. Исследования выполнены при финансовой поддержке фундаментальных научных исследований Министерства науки и высшего образования РФ в рамках выполнения государственного задания на 2023 г. (регистрационный номер ЕГИСУ темы НИР FGGN 0445-2021-0002).

Для цитирования: Зайцев С.Ю. Изменения в аминокислотном составе желатина после обработки коллагена коров ферментными препаратами // 2023. Т. 64. № 5. С. 490–499.

ORIGINAL ARTICLE

**CHANGES IN THE AMINO ACID COMPOSITION OF GELATIN AFTER
TREATMENT OF BOVINE COLLAGEN WITH ENZYME PREPARATIONS****Sergei Yu. Zaitsev¹**¹ Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L.K. Ernst, s.y.zaitsev@mail.ru

Abstract. Recently, more attention has been paid to the study of the amino acid composition of gelatins, which is associated with the quality of the corresponding gels as inter-

mediates for human and animal nutrition. In a brief review, a modification of the general method of acid extraction of collagens for the preparation of gelatins using enzymes (such as papain, actinidin, and others) is considered and the corresponding changes in the amino acid composition of gelatins are discussed. It is clear that there are changes in the content of glycine in gelatins from any collagens, but in all cases the content of glycine is about a third of the content of all amino acids (as in the original collagens). It is important that the content of imino acids (the sum of proline and hydroxyproline, which largely determines the properties of gels) in gelatins from any collagens with the use of all the studied enzymes is much higher than without them. In addition, the content of imino acids in gelatin from the bovine skin of cows with the use of any enzymes is significantly higher than in gelatins from the skin of pigs and fish. This holds true for other key “proteinogenic” amino acids as well. The reverse trend is observed only for a few amino acids: serine, threonine, tyrosine, phenylalanine, the content of which is low in gelatins from any collagens.

Keywords: amino acid composition, gelatin, collagen, enzyme preparations, animal biochemistry

Financial Support. The research was carried out with the financial support of fundamental scientific research by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation as part of the implementation of the state assignment for 2023 (registration number of the EGISU research topic FGGN 0445-2021-0002).

For citation: Zaitsev S. Yu. Changes in the amino acid composition of gelatin after treatment of bovine collagen with enzyme preparations // Vestn. Mosk. Un-ta. Ser. 2. Chemistry. T. 64. N 5. С. 490–499.

Аминокислотный (АК) состав желатинов является одним из важных показателей, характеризующих качество образующихся гелей и конечных продуктов в целом. Желатины можно определить как «гетерогенную смесь пептидов», полученных из исходного белка коллагена с помощью гидролитических процедур, включающих «как разрушение поперечных связей между полипептидными цепями, так и разрыв некоторых полипептидных связей внутри полипептидных цепей» [1–4]. Как известно [5], коллагены являются удобным естественным источником белковых матриц для желатинов, поскольку в большом количестве находятся в ряде органов и тканей у людей и животных [1–3]. Интересно, что средняя молекулярная масса АК коллагенов ниже чем у большинства других белков животных из-за высокого содержания (около трети всех АК [6–8]) глицина (Gly) в аминокислотных цепях коллагенов [5]. Три α -цепи коллагенов могут быть «идентичными (гомотример) или разными (гетеротример) в зависимости от типов и источников» [5–8]. Основной структурой полипептидной цепи молекулы являются повторяющиеся триплеты Gly-X-Y, причем положения X и Y заняты преимущественно пролином (Pro) и гидроксипролином (HyPro) соответственно [1–5]. При этом Gly (как самая маленькая ами-

нокислота с боковой цепью, имеющей только атом водорода) является центральным элементом как исходной полипептидной спирали, так и суперспирали (без каких-либо «стерических препятствий»), что позволяет трем спиральным α -цепям плотно упаковываться вместе, образуя окончательную суперспираль с гидрофобным соединением [9]. Сверхспиральная структура дополнительно усиливается конформационными ограничениями, налагаемыми пирролидиновыми кольцами иминокислот, а также частично поддерживается межцепочечными водородными связями, образованными с гидроксильной группой HyPro [1, 5]. Все вышесказанное подчеркивает актуальность работ по изучению АК-состава коллагенов и желатинов.

Настоящая работа была проведена в целях обзора аминокислотного состава желатинов из разных коллагенов при использовании ферментов растительного и животного происхождения (в общем методе экстракции коллагенов для приготовления желатинов с заданными свойствами).

Материалы и методы получения желатинов

Современным и комплексным способом экстракции желатинов из коллагенов животных является сочетание термического воздействия

и гидролиза, катализируемого кислотой (или щелочью) в присутствии ферментов [10–13]. В простейшем случае термическая денатурация образцов декальцинированных коллагенов рыб происходит в мягких условиях путем нагревания коллагена в нейтральных или слабокислых условиях примерно до 40 °С [12] по сравнению с более жесткими условиями в случае аналогичных образцов крупного рогатого скота (КРС) [10, 11]. Полученные гидролитические продукты при наличии дополнительных удерживающих связей между цепями могут иметь следующие три варианта структур желатинов из костей и кожи животных [14]: 1) три беспорядочно свернутые индивидуальные α -цепи; 2) β -форма (две α -цепи, соединенные одной или несколькими ковалентными связями) и независимая α -цепь; 3) γ -форма (три цепи, связанные ковалентными связями). Таким образом, α -, β - и γ -формы желатинов отличаются в основном своей молекулярной массой. Молекулярная масса α -формы желатинов варьирует от 80 000 до 125 000; β -формы – от 160 000 до 250 000; γ -формы – от 240 000 до 375 000 [14].

Функциональные свойства желатинов обусловлены их физико-химическими характеристиками, такими как прочность геля, вязкость, поведение при схватывании и температура плавления желатина. Свойства желатинов зависят также от их молекулярно-массового распределения (ММР) и аминокислотного состава [1–5]. Иминокислоты (пролин и гидроксипролин) играют важную роль в ренатурации субъединиц желатинов во время гелеобразования, т.е. желатины с высоким содержанием определенных аминокислот имеют более высокие значения прочности геля и температуры плавления [15]. Например, достоверная разница ($p \leq 0,05$) обнаружена в количестве общих аминокислот желатина насекомых, причем суммарное количество аминокислот желатина насекомых (как и глицина) было ниже, чем у коммерческого желатина КРС [11]. Контроль качества желатинов на производстве показал, что критерии для хороших пищевых желатинов не такие строгие, как для «фотографического желатина» [10]. Вязкость и прочность геля – основные физические характеристики, используемые для оценки любых желатинов (в тщательно стандартизированных условиях): Температура определения вязкости 60 °С, концентрация высушенного на воздухе желатина 6,67% (вес/вес) [1–5].

Желатины образуют микроструктурированные гели, которые «термообратимы» при кон-

центрации всего 1,0%, т.е. гель превращается в раствор при повышении температуры от 30 до 40 °С [10]. Наиболее важное свойство желатинов – прочность геля, которая выражается в относительных единицах или отн. ед. Блума, «Bloom» [11]), Эта величина зависит от многих параметров и в промышленности определяется их совокупностью как «сила проседания» [10–12]. Старение гелей коммерческих желатинов (или снижение гелеобразующих свойств желатинов) может быть инициировано многочисленными факторами, включая pH, температуру, ферменты, кислоты, щелочи, бактерии и др. [1–5].

Желатины набухают при контакте с холодной водой, образуя крупные видимые набухшие частицы. При нагревании выше точки плавления гидратированные частицы желатинов разрываются и переходят в раствор, а при охлаждении образуют гель [1–5, 10].

Вязкость растворов желатинов является одним из их наиболее важных функциональных свойств. В простейшем случае этот показатель определяют по времени протекания растворов желатинов через калиброванные пипетки для определения вязкости. Значительно удобнее использовать калиброванные вискозиметры Оствальда (результаты выражаются в санти- или миллипуазах) для определения вязкости растворов желатинов (в сравнении со стандартным 6,67%-м раствором желатина) [14]. Точка плавления означает температуру, при которой «желатиновый гель достаточно размягчается и позволяет каплям четыреххлористого углерода просачиваться через него» [11]. Такие факторы, как температура созревания и концентрация желатинового геля, влияют на его температуру плавления [10]. Температура застывания растворов желатинов зависит от «предыстории» его термической и механической обработки [1–5, 10]. Например, более высокие температуры схватывания встречаются, когда раствор охлаждается медленно [11]; механическое воздействие препятствует «схватыванию» или задерживает его [10].

Результаты исследования и их обсуждение

Аминокислотные составы желатинов из различных тканей животных, птиц и рыб

По элементному составу желатины животного происхождения содержат почти те же аминокислотные (АК) последовательности, что и ис-

ходные коллагены животных [5]. Поэтому как коллагены, так и желатины практически не содержат таких аминокислот, как триптофан (Trp) и цистеин (Cys) из числа 20 протеиногенных АК [5, 11]. Известно [5, 12–15], что преобладающими АК являются глицин (Gly), (27–35%), пролин (Pro) и гидроксипролин (HyPro) (20–24% в сумме). Имеются многочисленные данные об АК-составе желатинов, выделенных из различных тканей (шкура, кожа, кости и т.п.) крупного рогатого скота, свиней, птиц и даже рыб [15–17].

Часто вместо 18 протеиногенных АК говорят о содержании только 16 из них, поскольку две амидные АК, как правило, не выдерживают процесса гидролиза [5, 14]. Так, аспарагин (Asn) и глутамин (Gln) во многих препаратах превращаются в аспарагиновую (Asp) и глутаминовую кислоты (Glu), поэтому реальное содержание Asp включает в себя бывшее содержание Asn, т.е. Asp + Asn часто измеряются вместе (также как Gly + Gln). Измерения АК желатинов КРС показали общее сходство, особенно для основных АК, таких как Gly (33,3–33,8%), Pro (12,6–12,9%), Ala (11,2%) и др. [15–17]. Есть только несколько значений АК желатина из бычьей кожи [15], которые немного ниже (Lys, His, Phe, HyPro) или выше (Met, Tyr, Thr) средних значений [15]. Это подтверждено и в некоторых других работах [16–19], поэтому целесообразно рассматривать значения АА желатина из шкур КРС [16] как «референтную ссылку» на другие данные АК-состава желатинов. В работах [17–19] проведено интересное сравнение содержания аминокислот в желатинах после предварительной обработки коллагенов животных различными ферментами.

Сравнение содержания аминокислот в желатинах после предварительной обработки коллагенов животных пепсином

Пепсин – один из наиболее известных ферментов, которые используют для предварительной обработки бычьей кожи [17–19].

В работе [17] обозначения «PE5, PE15 и PE25» (табл. 1) относятся к образцам желатина, извлеченным из бычьей кожи с использованием ферментного пепсина на уровне 5, 10 и 15 ед. пепсина на 1 г влажной кожи соответственно. Авторами [17] показано, что выход желатина увеличивается достоверно ($p < 0,05$) и значительно (с 18,17% для образца PE5 до 24,67% для образца PE25) по мере увеличения уровня пепсина (табл. 1). Однако при этом прочность

и вязкость геля из такого желатина достоверно ($p < 0,05$) и значительно снизились (с 215,49 до 56,06 г и с 9,17 до 8,17 г·мПа·с для PE5 и PE25 соответственно [17]). С помощью гель-электрофореза показано, что β -, $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -цепи полностью разлагались во всех образцах полученного желатина. Анализ методами ядерного магнитного резонанса на протонах (H^1 -ЯМР) и инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (FTIR), показал постепенное разрушение спиральной структуры белковых цепей желатина (от PE5 до PE25) [17]. Таким образом, добавки пепсина целесообразно использовать на достаточно низком уровне (PE5, т.е. 5 ед. на 1 г влажной кожи) для извлечения желатина из бычьей кожи с хорошими функциональными свойствами и на более высоком уровне, тогда добавки пепсина на уровне 15 и 25 ед./г влажной кожи (PE15 и PE25) подходят для получения желатина технического качества с высоким выходом [17]. Учитывая вышесказанное, важно проанализировать аминокислотные профили трех этих желатинов (PE5, PE15 и PE25), которые представлены в табл. 1.

Содержание глицина, пролина и гидроксипролина (табл. 1), варьировало от 21,56 до 21,47%, от 10,46 до 10,51% и от 14,87 до 14,76% (для PE5, PE15 и PE25 соответственно), т.е. АК-профили желатинов в трех опытных группах аналогичны таковым в контрольной группе: 19,87; 10,29 и 14,14% [17]. Однако, эти величины существенно разнятся с данными работ [20] и [21]: 26,59% и 20,60% (Gly); 13,05% и 21,23% (Pro); 6,23% и 9,80% (HyPro) по АК-профилям желатинов из подобной бычьей кожи соответственно, но при существенных различиях в процессах производства желатина [22] (например, в процессе предварительной обработки кислотой) и отсутствии ферментной обработки (что приводит к изменению содержания аминокислот [23]). Так, авторы [20–22] сообщили о гораздо меньшем содержании иминокислот (пролин + гидроксипролин) (13,02 или 31,03%) в желатине бычьей кожи по сравнению с содержанием иминокислот для PE5, PE15 и PE25 (колеблется от 25,33 до 25,27%). Основная причина такой большой разницы по сравнению со значениями в текущем исследовании заключается в низком содержании гидроксипролина [20] и высоком содержании пролина [21]. Гидроксипролин в основном участвует в обеспечении стабильности тройной спиральной структуры ренатурированного геля благодаря своей способности образовывать Н-связь через

Т а б л и ц а 1

Содержание аминокислот (%) в образцах желатинов, извлеченных из бычьей кожи, с использованием пепсина на уровне: 5, 10 и 15 ед. фермента на 1 г влажной кожи (образцы PE5, PE15 и PE25 соответственно) [17]*

Аминокислоты	Контроль*	PE5	PE15	PE25
Ala	6,50 ± 0,63	6,69 ± 0,70	6,73 ± 0,70	6,70 ± 0,40
Asp	4,06 ± 0,47	3,59 ± 0,44	3,60 ± 0,44	3,54 ± 0,36
Ser	2,82 ± 0,58	3,25 ± 0,68	3,19 ± 0,68	3,20 ± 0,45
Glu	7,81 ± 0,70	7,34 ± 0,58	7,28 ± 0,58	7,18 ± 0,70
Gly	19,87 ± 1,61	21,56 ± 1,52	21,44 ± 1,52	21,47 ± 1,61
His	0,82 ± 0,26	0,96 ± 0,16	0,89 ± 0,16	0,93 ± 0,23
Arg	6,87 ± 0,79	7,54 ± 0,79	7,24 ± 0,79	7,35 ± 0,68
Thr	1,63 ± 0,35	1,84 ± 0,34	1,77 ± 0,34	1,79 ± 0,45
Ile	1,30 ± 0,30	1,40 ± 0,31	1,34 ± 0,31	1,35 ± 0,39
Leu	2,66 ± 0,40	2,84 ± 0,50	2,73 ± 0,50	2,76 ± 0,38
Lys	3,13 ± 0,37	3,07 ± 0,74	3,02 ± 0,74	3,01 ± 0,70
Val	2,11 ± 0,41	2,13 ± 0,48	2,07 ± 0,48	2,07 ± 0,50
Tyr	0,62 ± 0, 17	0,73 ± 0,12	0,69 ± 0,12	0,69 ± 0,14
Pro	10,29 ± 0,94	10,46 ± 1,26	10,72 ± 1,26	10,51 ± 1,26
HypPro	14,14 ± 1,10	14,87 ± 1,13	14,43 ± 1,13	14,76 ± 1,13
Phe	1,78 ± 0,32	1,91 ± 0,55	1,86 ± 0,55	1,89 ± 0,33
(Pro + Hyp)	24,43 ± 2,03	25,33 ± 2,05	25,15 ± 0,13	25,27 ± 2,39
Итого	86,41 ± 0,33	90,20 ± 2,72	88,99 ± 3,52	89,19 ± 1,45

* Контрольный образец желатина был извлечен из коллагена без использования пепсина.

гидроксильную группу [24, 25]. Несмотря на то, что содержание иминокислот (в частности, гидроксипролина) оказалось выше, соответствующая высокая прочность геля отмечена только для контрольного (283,35 г) и PE5 (215,49 г) желатина. Прочностные характеристики гелей желатинов из бычьей кожи составили 208,26 г и 238,25 г, соответственно [20–22]. Вязкоупругие характеристики желатина зависят не только от содержания в нем имино [26], но и от сложных взаимодействий, контролируемых молекулярно-весовыми распределениями полипептидных цепей в желатинах [1–5], а также от длины фрагментов белковых цепей, так как короткоцепочечные полипептиды не образуют зону соединения, в которой развивается прочная сеть [27]. В работе [28] детально исследовано влияние разных кислот (соляной, уксусной и лимонной) и пепсина на свойства желатинов, экстрагированных из бычьего костного колла-

гена (при 70 °С в течение 7 ч). По сравнению с группой без инкубации пепсина, бычий костный коллаген, обработанный пепсином, показал более высокий выход ($p < 0,05$) [28]. Анализ с помощью сканирующей электронной микроскопии показал, что лимонная кислота больше разрушает структуру коллагена по сравнению с уксусной и соляной кислотами [28]. В целом, коллаген, предварительно обработанный кислотой (оптимальной является лимонная кислота) и пепсином, более эффективно экстрагируется в желатин по сравнению с обработкой без пепсина [28].

Содержание аминокислот в желатинах после использования таких растительных ферментов как актинидин и папаин

В работе [19] два растительных фермента актинидин (А) и папаин (Р) использовали для предварительной обработки бычьей кожи при

соответствующих оптимальных значениях pH и температуры ферментов в течение 48 ч на уровне 0, 5, 10, 15, 20 и 25 ед./г кожи. Экстракцию желатина проводили при 60 °С в течение 6 ч (табл. 2) [19].

Важно, что содержание аминокислот (пролин + гидроксипролин) в желатине бычьей кожи при использовании актинидина (на уровне 0–20 ед./г кожи) составляло от 26,25 до 21,14% по сравнению с содержанием аминокислот при использовании папаина (на уровне 0, 10 и 20 ед./г кожи), которое составляло 25,34; 25,54 и 21,27% соответственно [19]. При использовании на оптимальном уровне 20 ед./г кожи актинидина (A20) или папаина (P20) выход желатина был достоверно ($p < 0,05$) и значительно выше (22,67 при A20 или 23,59% при P20), чем в контроле (17,90%) [19]. Значения прочности геля для желатина, экстрагированного с использованием фермента актинидина, были достоверно

($p < 0,05$) и значительно выше, чем в контроле (283,35 г), например, прочность геля для A20 составила 366,39 г [19]. Однако желатин, экстрагированный с использованием фермента папаина, показал относительно более низкую прочность геля. Вязкость образцов A20 была достоверно ($p < 0,05$) и значительно выше, чем контрольная (12,10 мПа·с). В образцах A20 авторы выявили большую деградацию β-цепей, но присутствие α-цепей и пептидов с более низкой молекулярной массой еще наблюдалось [19]. Тогда как во всех образцах P10–P20 β- и α-цепи полностью отсутствовали, а были обнаружены только пептиды с более низкой молекулярной массой [19]. Методом инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (FTIR) показана существенная потеря молекулярного порядка и большие нарушения α-спиральной структуры P20 по сравнению с A20 и контрольными желатинами

Таблица 2

Аминокислотный состав (%) желатинированных из бычьей кожи определенными добавками актинидина или папаина [19]

Аминокислоты	Контроль*	Уровень актинидина (% на 1 г кожи)			Уровень папаина (% на 1 г кожи)		
		0	10	20	0	10	20
Hyp	14,14	15,17	12,69	12,06	14,82	14,75	12,40
Asp	4,06	3,76	3,73	3,26	3,91	3,81	3,37
Ser	2,82	2,96	2,52	2,35	3,18	2,92	2,50
Glu	7,81	7,52	7,20	6,41	7,81	7,45	6,71
Gly	19,87	21,00	18,97	17,71	21,47	20,63	18,27
His	0,82	0,90	0,72	0,68	0,96	0,90	0,77
Arg	6,87	7,42	6,20	5,72	7,22	7,08	5,93
Thr	1,63	1,76	1,47	1,37	1,67	1,71	1,41
Ala	6,50	6,59	5,94	5,50	7,47	6,56	5,94
Pro	10,29	11,08	9,65	9,08	10,52	10,80	8,87
Tyr	0,62	0,65	0,53	0,49	0,66	0,71	0,56
Val	2,11	2,26	1,94	1,80	2,13	2,21	1,77
Lys	3,13	3,08	2,81	2,55	3,06	3,07	2,64
Ile	1,30	1,41	1,19	1,10	1,35	1,41	1,12
Leu	2,66	2,87	2,44	2,26	2,67	2,83	2,23
Phe	1,78	1,95	1,63	1,53	1,85	1,90	1,51
Imino acids (Pro+Hyp)	24,43	26,25	22,34	21,14	25,34	25,54	21,27

* Контрольный образец желатина был извлечен из коллагена без использования ферментов. Стандартные отклонения во всех случаях были ниже 2%.

[19]. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) выявила взаимосвязанные частицы большего размера и более плотную структуру с наименьшим количеством пустот в А20, чем в Р20 и контрольных образцах желатина [39]. Авторами [19] был сделан вывод, что актинидин, особенно в количестве 20 ед./г кожи, можно использовать для улучшения выхода и свойств желатина из бычьей кожи более эффективно, чем папаин [19].

Содержание аминокислот в желатинах после использования таких растительных ферментов как бромелаин и зингибаин

Бычью кожу инкубировали с растительными ферментами бромелаином (Б) и зингибаином (З) на уровне 0, 5, 10, 15, 20 и 25 ед./г кожи (табл. 3) и желатин экстрагировали при 60 °С в течение 6 ч [18].

Важно, что содержание аминокислот (пролин + гидроксипролин) в желатине бычьей кожи при использовании бромелаина (на уровне 0–20 ед./г кожи) составляло от 25,78 до 23,45% по сравнению с содержанием аминокислот при использовании зингибаина (на уровне 0, 10 и 20 ед./г кожи), которое составляло 24,74; 24,92 и 23,81% соответственно [18]. Выход и прочность геля составили 17,90% и 283,35 г для контрольных образцов и 22,26% и 160,88 г для образца В20 [18]. Образцы желатина, экстрагированного зингибаином (310–320), не образовывали гель, а вязкость этих желатинов была значительно и достоверно ($p < 0,05$) ниже, чем у желатинов, экстрагированных с использованием бромелаина [18]. Показано, что β - и α -цепи полностью деградировали во всех образцах при использовании обоих ферментов, однако в образцах бромелаина (В10–В20) было

Таблица 3

Аминокислотный состав (%) желатинов, экстрагированных из бычьей кожи определенными добавками бромелаином (Б0–Б20) и зингибаином (З0–З20) [18]

Аминокислоты	Контроль*	Уровень бромелаина (% на 1 г кожи)			Уровень зингибаина (% на 1 г кожи)		
		0	10	20	0	10	20
Нур	14,14	15,03	14,82	13,60	14,65	14,84	14,00
Asp	4,06	3,45	3,49	3,37	3,58	4,08	4,00
Ser	2,82	3,02	3,10	2,82	3,08	3,19	3,08
Glu	7,81	7,00	7,01	6,69	7,11	8,00	7,75
Gly	19,87	21,75	21,63	19,78	20,73	21,38	20,27
His	0,82	0,86	0,85	0,78	0,89	1,01	0,96
Arg	6,87	7,26	7,21	6,64	7,01	7,13	6,90
Thr	1,63	1,72	1,72	1,62	1,75	1,73	1,71
Ala	6,50	7,00	6,89	6,56	6,71	7,35	6,70
Pro	10,29	10,75	10,55	9,85	10,09	10,08	9,82
Tyr	0,62	0,65	0,69	0,68	0,78	0,79	0,73
Val	2,11	2,12	2,09	2,00	2,11	2,21	2,17
Lys	3,13	2,85	2,85	2,74	2,97	3,22	3,16
Ile	1,30	1,38	1,38	1,32	1,41	1,43	1,41
Leu	2,66	2,81	2,74	2,60	2,85	2,82	2,81
Phe	1,78	1,91	1,88	1,77	1,90	1,90	1,85
Imino acids (Pro + Нур)	24,43	25,78	25,38	23,45	24,74	24,92	23,81

* Контрольный образец желатина был извлечен из коллагена без использования ферментов. Стандартные отклонения во всех случаях были ниже 2%.

обнаружено присутствие некоторого количества низкомолекулярных полипептидов [18]. Потеря молекулярного порядка была замечена в образцах (310–320) по результатам инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье [18]. Более крупные частицы, более плотная и взаимосвязанная нерегулярная сеть наблюдались при использовании сканирующей электронной микроскопии в образцах В20 [18]. Основываясь на полученных результатах, бромелайн (особенно образцы В20) можно использовать для получения желатина лучшего качества с более высоким выходом по сравнению с зингибаином [18].

Авторами [29] фермент бромелайн (0,3 г/л) был использован для извлечения желатина из отходов переработки ленточной рыбы (*Lepturacanthus savel*) при следующих оптимальных условиях: время предварительной обработки кислотой 1,5 ч, температура экстракции 41 °С и время экстракции 5 ч. В этих условиях выход полученного желатина составил $18,3 \pm 1,1\%$ (т.е. почти на 50% больше, чем без добавления бромелайна); прочность геля $62,9 \pm 1,7$ г; зольность 2,4%; вязкость $1,9 \pm 0,05$ мПа·с. Обнаружено, что количество иминокислот (гидроксипролина и пролина) составило 14,48 (на 100 аминокислотных остатков), причем анализ гидролизованых пептидов (в процессе экстракции желатина) показал наличие преимущественно $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -цепей с незначительным присутствием β -цепи [29].

Параметры желатинов после использования других ферментов растительного и животного происхождения

Авторы работы [30] использовали неочищенный протеолитический фермент из латекса папайи (нейтралазы) для экстракции желатинов из кожевенного сырья, сравнивая с желатином, полученным из коммерческого фермента (папаина). Авторы [30] обнаружили, что температура 75 °С и рН 7 являются оптимальными условиями для максимального извлечения желатина из шкур. В последующей работе [31] было более детально изучено влияние папаина и нейтралазы на выход желатинов и качество сыромятного расщепленного желатина. Показано, что наибольшие выходы желатинов были обнаружены при рН 6–7, температуре 70 и 40–50 °С для ферментов папаина и нейтралазы соответственно [31]. Прочность геля и вязкость желатинов, полученных при обработке папаином, были достаточно

низкими, а вязкость желатинов, полученных при обработке нейтралазой, была такой низкой (почти как у воды), что гель не образовывался вовсе. Это ясно указывает на то, что более длинные желатиновые фрагменты были получены в результате гидролиза папаина [31]. По-видимому, нейтралаза очень сильно разрушает молекулы коллагена, приводя к образованию коротких пептидных цепей, которые не могут образовывать гель. Много интересных примеров использования растительных ферментов для выделения желатинов из бычьих и свиных шкур, а также из рыбьей чешуи приведены в обзоре [32].

Например, неочищенный экстракт кислой протеазы (НеоЭКП), полученный из желудка куньей акулы (лат. *Mustelus mustelus*), улучшал выход желатина из кожи каракатицы (*Sepia officinalis*) [33]. Выход желатина из кожи каракатицы с использованием кислоты и сырой кислой протеазы (15 ед. на 1 г кожи, обработанной щелочью) через 48 ч составил 2,21 и 7,84% соответственно. Желатин из кожи каракатицы имел высокое содержание белка (91,35%), но низкое содержание жира (0,28%). Желатин кожи каракатицы имел аминокислотный состав, отличный от желатина халыльного быка – сумма иминокислот (гидроксипролина и пролина) была меньше (180‰ против 219‰), а содержание серина – выше (49‰ против 29‰). Прочность геля из желатина кожи каракатицы (181 г) была ниже, чем у геля из желатина халыльного быка (259 г) ($p < 0,05$), возможно, из-за более низкого содержания гидроксипролина. Авторы [33] установили, что молекулярно-массовое распределение желатина из кожи каракатицы имеет меньшее число нативных структур-мономеров и димеров по сравнению с НВГ и значительно большее количество $\alpha 1$ -цепей и β -компонентов [33].

Авторы работы [34] изучали, как желудочная НеоЭКП, предварительно обработанная уксусной или лимонной кислотой, влияет на качество и выход желатина из кожи акулы (*Mustelus mustelus*). Добавление НеоЭКП (на уровне 15 ед./г) привело к увеличению выхода желатина и другим эффектам, описанным выше. Обнаружено, что содержание серина в желатине из этой кожи, экстрагированном с помощью желудочной НеоЭКП, было выше, чем в халыльном бычьем желатине (36 против 29 остатков на 1000 остатков), а содержание гидроксипролина и пролина (202 остатка на 1000 остатков) – было несколько ниже (219 остатков на 1000 остатков)

[54]. Данные работы [34] качественно подобны, но количественно существенно отличаются от данных, приведенных в работе [33]. Однако не это вызывает удивление, а следующее: выходы гидроксипролина для желатинов, экстрагированных в течение 24 ч уксусной кислотой и желудочной НеоЭКП, составили 17,34 и 56,82% соответственно. Дело в том, что цифра выхода гидроксипролина в 56,82% [34] является абсолютно нереальной не только по сравнению с цифрой 17,34% [34], но и в абсолютном выражении, если учесть, что содержание гидроксипролина должно быть меньше, чем глицина (максимальное абсолютное содержание которого в любых желатинах не превышает трети от содержания всех АК).

Невозможно в кратком обзоре перечислить все возможные типы и параметры экстрагированных желатинов из кожи многих других видов рыб с участием различных ферментов, основные из которых обсуждены выше.

Заключение

Таким образом, в данном кратком обзоре перечислены и обсуждены различные типы

и параметры экстрагированных желатинов из коллагенов органов и тканей многих видов животных и рыб с участием различных ферментов растительного и животного происхождения. Неудивительно, что имеются изменения в содержании глицина в желатинах из любых коллагенов, но во всех случаях содержание глицина составляет порядка трети от содержания всех АК (как это имеет место и в исходных коллагенах). Важно, что содержание аминокислот (сумма пролина и гидроксипролина, которая во многом определяет свойства гелей) в желатинах, экстрагированных из любых коллагенов при использовании всех изученных и описанных выше ферментов, значительно выше, чем без их использования. Кроме того, содержание аминокислот в желатине из бычьей кожи при использовании любых ферментов значимо выше, чем в желатинах из кожи свиней и рыб. Это соблюдается для других ключевых «протеиногенных» АК. Обратная тенденция наблюдается только для нескольких АК, типа серина, треонина, тирозина, фенилаланина, содержание которых невысоко в желатинах, экстрагированных из любых коллагенов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cole C.G. B. Gelatin / Encyclopedia of food science and technology. Vol. 4. Ed. J.F. Frederick. N.Y., 2000. P. 1183.
2. Liu D., Nikoo M., Boran G., Zhou P., Regenstein J.M. // Annual Review of Food Science and Technology. 2015. Vol. 6. P. 527.
3. Bello A.B., Kim D., Kim D., Park H., Lee S.-H. // Tissue Engineering: Part B. 2020. Vol. 26 (2). P. 164.
4. Samatra M.Y., Noor N.Q. I.M., Razali U.H.M., Bakar J., Shaarani S.Md. // Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2022. Vol. 21(4). P. 3153.
5. Rather J.A., Akhter N., Ashraf Q.S., Mir S.A., Makroo H.A., Majid D., Barba F.J., Khaneghah A.M., Dar B.N. // Food Packaging and Shelf Life. 2022. Vol. 34. 100945.
6. Saito M., Takenouchi Y., Kunisaki N., Kimura S. // Eur. J. Biochem. 2001. Vol. 268. P. 2817.
7. Liu Z.Y., Oliveira A.C.M., Su Y.C. // J. Agric. Food Chem. 2010. Vol. 58. P. 1270.
8. Bae I., Osatomi K., Yoshida A., Osako K., Yamaguchi A., Hara K. // Food Chem. 2008. Vol. 108. P. 49.
9. Yang Z., Hemar Y., Hilliou L., Gilbert E.P., McGillivray D.J., Williams M.A., Chaieb S. // Biomacromolecules. 2016. Vol. 17 (2). P. 590.
10. Джафаров А.Ф. Производство желатина. М., 1990. 287 с. [Jafarov A.F. Production of gelatin. M., 1990. 287 p.].
11. Mariod A.A., Adam H.F. // Acta Sci. Pol. Technol. Aliment. 2013. Vol. 12 (2). P. 135.
12. Johnston-Banks F.A. Gelatin / Food gels. Ed. P. Harris. L., 1990. P. 233.
13. Nishimoto M., Sakamoto R., Mizuta S., Yoshinaka R. // J. Food Chem. 2005. Vol. 90. P. 151.
14. Nurilmala M., Suryamarevita H., Hizbullah H.H., Jacob A.M., Ochiai Y. // Saudi Journal of Biological Sciences. 2022. Vol. 29 (2). P. 1100.
15. Gomez-Estaca J., Lopez de Lacey A., Gomez-Guillen M.C., Lopez-Caballero M.E., Montero P. // Journal of Aquatic Food Product Technology. 2009. Vol. 18 (1–2). P. 46.
16. Eastoe J.E. // Biochem. J. 1955. Vol. 61 (4). P. 589.
17. Ahmad T., Ismail A., Ahmad S.A., Abdul Khalil K., Awad E.A., Akhtar M.T., Sazili A.Q. // Polymers. 2021. Vol. 13 (10). Article 1554.
18. Ahmad A., Ismail A., Ahmad S.A., Khalil K.A., Kee L.T., Awad E.A., Sazili A.Q. // J. Food Sci. Technol. 2020. Vol. 57. P. 3772.
19. Ahmad T., Ismail A., Ahmad S.A., Khalil K.A., Kee L.T., Awad E.A., Sazili A.Q., Ahmad A. // Int. J. Food Prop. 2019. Vol. 22. P. 138.
20. Mulyani S., Setyabudi F.M.S., Pranoto Y., Santoso U. // Korean J. Food Sci. Anim. Resour. 2017. Vol. 37. P. 708.
21. Aykın-Dinçer E., Koç A., Erbas M. // Poult. Sci. 2017. Vol. 96. P. 4124.

22. Zhou P., Regenstein J. // *J. Food Sci.* 2006. Vol. 71. P. C. 474.
23. Al-Hassan A.A. // *Food Hydrocoll.* 2020. Vol. 101. P. 105457.
24. Sinthusamran S., Benjakul S., Kishimura H. // *Food Chem.* 2014. Vol. 152. P. 276.
25. Nagarajan M., Benjakul S., Prodpran T., Songtipya P., Kishimura H. // *Food Hydrocoll.* 2012. Vol. 29. P. 389.
26. Giménez B., Turnay J., Lizarbe M., Montero P., Gómez-Guillén M. // *Food Hydrocoll.* 2005. Vol. 19. P. 941.
27. Kittiphattanabawon P., Benjakul S., Visessanguan W., Shahidi F. // *Food Hydrocoll.* 2010. Vol. 24. P. 164.
28. Songmin Cao, Yi Wang, Lujuan Xing, Wangang Zhang, Guanghong Zhou. // *Food and Bioproducts Processing.* 2020. Vol. 121. P. 213.
29. Norziahn M.H., Kee H.Y., Norita M. // *Food Biosciences.* 2014. Vol. 5. P. 9.
30. Pitpreecha S., Damrongsakkul S. // 2006. Vol. 23 (6). P. 972.
31. Damrongsakkul S., Ratanathammapan K., Komolpis K., Tanthapanichakoon W. // *J. Industrial and Engineering Chemistry.* 2008. Vol. 14 (2). P. 202.
32. Ahmad A., Ismail A., Ahmad S.A., Khalil K.A., Kumar Y., Adeyemi K.D., Sazili A.Q. // *Food Hydrocolloids.* 2017. Vol. 63. P. 85.
33. Balti R., Jridi M., Sila A., Souissi N., Nedjar-Arroume N., Guillochon D., Nasri M. // *Food Hydrocolloids.* 2011. Vol. 25 (5). P. 943.
34. Bougatef A., Balti R., Sila A., Nasri R., Graiaa G., Nasri M. // *LWT - Food Science and Technology.* 2012. Vol. 48 (2). P. 248.

Информация об авторах

Зайцев Сергей Юрьевич – вед. науч. сотр. отдела физиологии и биохимии с/х животных ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, профессор, докт. биол. наук.
s.y.zaitsev@mail.ru

Статья поступила в редакцию 05.05.2023;
одобрена после рецензирования 10.05.2023;
принята к публикации 15.05.2023.