СВОЙСТВА КОЛЛАГЕНОВОГО ГИДРОЛИЗАТА, ПОЛУЧЕННОГО ИЗ ШКУРЫ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Баяржаргал М.¹, Оюунтуяа Б.², Золзая Б.³, Даваасамбуу Т.⁴, Энх-Ариун А.⁵, Лхагвамаа Э.⁶, Номинчулуу Ч.⁷, Дэлгэрмурун Б.⁸, Золзая М.⁹, Ган-Эрдэнэ Т.¹, Шалбуев Дм.В.²

¹ Баяржаргал М - в.н.с., к.б.н., зав. лаб. Биохимии, Институт химии и химической технологии, МАН, г. Улан-Батор, Монголия, e-mail: bayarjargalm@mas.ac.mn; тел: +976-99075616

Bayarjargal M - Institute of Chemistry and Chemical Technology, Mongolian Academy of Sciences, Ulaanbaatar, Mongoli, e-mail: bayarjargalm@mas.ac.mn; ph: +976-99075616

² Оюунтуяа Б - асп., лаб. Биохимии, Институт химии и химической технологии, МАН, г. Улан-Батор, Монголия, e-mail: oyuntuyab@mas.ac.mn

Oyuntuya B. - Institute of Chemistry and Chemical Technology, Mongolian Academy of Sciences, Ulaanbaatar, Mongolia, e-mail: oyuntuyab@mas.ac.mn

³ Золзая Б. - н.с. лаб. Биохимии, Институт химии и химической технологии, МАН, г. Улан-Батор, Монголия, e-mail: zolo6991@yahoo.com

Zolzaya B. - Institute of Chemistry and Chemical Technology, Mongolian Academy of Sciences, Ulaanbaatar, Mongolia, e-mail: zolo6991@yahoo.com

⁴ Даваасамбуу Т - магистр, зав.сектором Фармакологии, Институт исследования лекарственных препаратов, “Монос”, г. Улан-Батор, Монголия, e-mail: davaasambu@monos.mn

Davaasambu T. - Drug Research Institute, “Monos”, Ulaanbaatar, Mongolia, e-mail: davaasambu@monos.mn

⁵ Энх-Ариун А - н.с. лаб. Биохимии, Институт химии и химической технологии, МАН, г. Улан-Батор, Монголия, e-mail: enkhariuna@mas.ac.mn

Enkh-Ariun A. - Institute of Chemistry and Chemical Technology, Mongolian Academy of Sciences, Ulaanbaatar, Mongolia, e-mail: enkhariuna@mas.ac.mn

⁶ Лхагвамаа Э. - магистр, м.н.с. лаб. Биохимии, Институт химии и химической технологии, МАН, г. Улан-Батор, Монголия, e-mail: e.lkhagvamaa@outlook.com

Lkhagvamaa E. - Institute of Chemistry and Chemical Technology, Mongolian Academy of Sciences, Ulaanbaatar, Mongolia, e-mail: e.lkhagvamaa@outlook.com

⁷ Номинчулуу Ч. - н.с. лаб. Биохимии, Институт химии и химической технологии, МАН, г. Улан-Батор, Монголия, e-mail: nominchuluu_ch@yahoo.com

Nominchuluu C. - Institute of Chemistry and Chemical Technology, Mongolian Academy of Sciences, Ulaanbaatar, Mongolia, e-mail: nominchuluu_ch@yahoo.com

⁸ Дэлгэрмурун Б. - н.с. лаб. Биохимии, Институт химии и химической технологии, МАН, г. Улан-Батор, Монголия, e-mail: delgermurnbatsuuri@gmail.com

Delgermurun B. - Institute of Chemistry and Chemical Technology, Mongolian Academy of Sciences, Ulaanbaatar, Mongolia, e-mail: delgermurnbatsuuri@gmail.com

⁹ Золзая М. - к.в.н., зав. лаб. Физиологии, Институт ветеринарии, Сельскохозяйственный университет, г. Улан-Батор, Монголия, e-mail: mzoloo97@yahoo.com

Zolzaya M. - Institute of Veterinary Medicine, Mongolian University of Life Sciences, Ulaanbaatar, Mongolia, e-mail: mzoloo97@yahoo.com

Институт химии и химической технологии, МАН, г. Улан-Батор, Монголия

Институт исследования лекарственных препаратов, “Монос”, г. Улан-Батор, Монголия

Институт ветеринарии, Сельскохозяйственный университет, г. Улан-Батор, Монголия

Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления, г. Улан-Удэ, Россия

Определены физико-химические показатели коллагенового гидролизата, полученного ферментативным методом из кожи КРС. Продукт эффективно влияет на накопление коллагена у лабораторных животных с индуцированным остеопорозом.

Ключевые слова: ферментативный гидролиз, коллаген, коэффициент гидролиза, оксипролин, костная ткань

PROPERTIES OF COLLAGEN HYDROLYSATE PRODUCING FROM CATTLE HIDES

Bayarjargal M.¹, Oyuntuya B.², Zolzaya B.³, Davaasambuu T.⁴, Enkh-Ariun A.⁵, Lkhagvamaa E.⁶, Nominchuluu C.⁷, Delgermurun B.⁸, Zolzaya M.⁹, Gan-Erdene T.¹⁰, Shalbuev D.¹¹

Institute of Chemistry and Chemical Technology, Mongolian Academy of Sciences, Ulaanbaatar, Mongolia

Drug Research Institute, “Monos”, Ulaanbaatar, Mongolia

Institute of Veterinary Medicine, Mongolian University of Life Sciences, Ulaanbaatar, Mongolia

East-Siberia State University of Technology and Management, Ulan-Ude, Russia

The physicochemical parameters of collagen hydrolysate obtained from bovine raw hide by enzymatic hydrolysis were determined. The results of study have shown the effectiveness of using this hydrolysate on the accumulation of collagen in the bone tissue of laboratory animals with induced osteoporosis.

¹ Ган-Эрдэнэ Т. - д.х.н., академик, в.н.с. лаб. Биохимии, Институт химии и химической технологии, МАН, г. Улан-Батор, Монголия, e-mail: tudeviinganerdene@gmail.com

Gan-Erdene T. - Institute of Chemistry and Chemical Technology, Mongolian Academy of Sciences, Ulaanbaatar, Mongolia, e-mail: tudeviinganerdene@gmail.com

² Шалбуев Дмитрий Валерьевич – д.т.н., проф., зав. каф. «Технология кожи, меха. Водные ресурсы и товароведение» ВСГУТУ; тел.: +7(3012)417-222, e-mail: shalbuevd@mail.ru

Shalbuev Dmitry - Dr, Prof., Head of the Department «Leather and Fur Technology. Water Resources and Commodity Research» ESSUTM, +7(3012)417-222, e-mail: shalbuevd@mail.ru

Keywords: *enzymatic hydrolysis, collagen, degree of hydrolysis, hydroxyproline, bone tissue*

В целях нивелирования возрастных изменений кожи, а также профилактики и облегчения симптомов болезней опорно-двигательной системы применяются различные белковые препараты, включая коллагеновые нутриенты в виде препаратов желатина и ферментативных гидролизатов [1,2]. Гидролизированный коллаген легко всасывается в организме при пероральном приеме внутрь, стимулируя синтез коллагена, гиалуроновой кислоты в экстрацеллюлярном матриксе тканей организма, оказывая хемотактическое действие на фибробласты и клеточные структуры периферической крови [3].

В клиническом испытании с плацебо контролем пациентки пожилого возраста со сниженной плотностью костной ткани в течение 12 месяцев принимали по 5 г/сутки пептидного препарата коллагена. Исследователи установили повышение плотности костей в поясничном отделе позвоночника и шейки бедра, а также увеличение концентрации костного маркера PINP в крови, которые указывают на благотворное действие коллагенового препарата [4]. Данное влияние во многом связывают с тем, что коллагеновые пептиды стимулируют пролиферацию MC3T3-E1 клеток, играющих важную роль в дифференциации остеобластов и минерализации кости [5].

Для производства гидролизатов коллагена чаще всего используют отходы кожевенного и рыбного производства, некондиционную шкуру, а также кости и сухожилия домашних животных [1, 3, 5].

Целью данной работы является исследование влияния коллагенового гидролизата, полученного из кожи КРС, на процесс восстановления костной ткани у лабораторных животных с индуцированным остеопорозом.

Материалы и методы

Для получения гидролизата коллагена использовали некондиционную шкуру КРС, предварительно вымоченную в щелочном растворе в течение 3 недель с последующей промывкой и нейтрализацией в растворе соляной кислоты. Измельченное сырье гидролизовали с помощью препарата поджелудочной железы (соотношение субстрат:фермент 1:4) при pH среды 7,5-8,0 и температуре 50°C в течение 5 ч. Полученный гидролизат высушили на распылительной сушилке (температура на входе и выходе 120°C и 80°C соответственно).

В полученном гидролизате определили следующие стандартные показатели: содержание общего азота и аминного азота [6], содержание оксипролина [7], индекс растворимости, содержание влаги, жира и золы [8].

Для оценки влияния гидролизата коллагена на процесс восстановления костной ткани у лабораторных животных после индуцирования остеопороза ретиноевой кислотой был проведен эксперимент на 26 белых крысах-самках весом 170-200 г в соответствии с этическим руководством. Для индуцирования остеопороза животным давали в течение 14 дней ретиноевую кислоту, суточная доза составляла 75 мг/кг живого веса. После этого животные были распределены на 4 группы по 6 животных в каждой: группа 1 - интактный контроль, с приемом дистиллированной воды; группа 2 - патологический контроль, с приемом 75 мг/кг в сутки раствора ретиноевой кислоты; группа 3 - экспериментальная группа, с приемом 840 мг в сутки коллагенового гидролизата; группа 4 - экспериментальная группа, с приемом 840 мг в сутки смеси коллагенового гидролизата, гиалуроновой кислоты и витамина С; группа 5 - с приемом в эквивалентной дозе коммерческого импортного препарата "Collagen peptide", Itocolla. По окончании 28-го дня и выведения животных из эксперимента были выделены кости скелета, которые механически измельчили. После чего провели анализ на определение оксипролина [7]. Содержание кальция и фосфора анализировали после озоления при 550°C до постоянной массы. Содержание гидроксилапатита определили методом рентгеновской дифракции. Статистическую обработку результатов провели с использованием Microsoft Excel. Для оценки достоверных различий средних значений применяли t-критерий Стьюдента. Различие между средними величинами считали достоверным при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Физико-химические показатели коллагенового гидролизата, полученного из кожи КРС, с помощью препарата поджелудочной железы и использованные для дальнейшего *in vivo* исследования приведены в таблице 1.

Белковые гидролизаты в зависимости от природы исходного сырья, а также используемых протеолитических ферментов могут иметь различные коэффициенты гидролиза [9]. Если сравнивать с гидролизатом молочных белков, степень гидролиза которых может

достигать 0,7, полученный нами гидролизат является слабо расщепленным. Но факт того, что растворимость полученного продукта составляет 95%, показывает на достаточную степень гидролиза коллагенового сырья. Обычно содержание оксипролина свидетельствует о наличии коллагеновой субстанции в продукте. В исследуемом нами гидролизате 82% белкового субстрата имеет коллагеновое происхождение (содержание оксипролина $\times 8,07$), что согласуется с содержанием коллагена в кожной ткани млекопитающих животных [8].

Таблица 1 - Физико-химические показатели коллагенового гидролизата из кожи КРС

№	Показатели	Содержание, %
1	Общий азот (TN)	13,6
2	Аминный азот (AN)	2,5
3	Коэффициент гидролиза (AN/TN)	0,18
4	Индекс растворимости	95
5	Оксипролин	10,2
6	Влага	6,0
7	Жир	2,7
8	Зола	4,3

Коллаген составляет более 50% органической массы костной ткани организма. Результаты эксперимента на лабораторных животных показали, что коллагеновые пептиды значительно увеличивают массу органической матрицы кости [4,10]. Изменение содержания оксипролина в различных биологических средах организма является одним из чувствительных показателей повреждения костной ткани [11]. Результаты анализа содержания оксипролина в костях исследуемых животных показаны на рисунке.

Как видно из данных, приведенных на рисунке, прием коллагенового гидролизата в течение 4 недель оказал благотворное влияние на содержание коллагена в костном скелете экспериментальных животных. При этом не выявлено статистически достоверной разницы между группами 3 и 4, принимавшими коллагеновый гидролизат, полученный из кожи КРС. Результаты исследования показали преимущество влияния полученного нами гидролизата (группа 3, 4) на накопление коллагена в кости по сравнению с импортным препаратом (группа) коллагена ($t \leq 0,05$).

Рисунок - Содержание оксипролина в костях экспериментальных животных

Ретиноевая кислота индуцирует модель остеопороза у лабораторных животных, стимулируя образование остеокластов, что приводит к резорбции костной ткани [5]. В таблице 2 приведены результаты определения массовой доли кальция, фосфора в золе костного скелета, а также содержания в них гидроксилапатита. Как следовало ожидать, наименьшее содержание золы, а также гидроксилапатита обнаружено в группе, принимавшей ретиноевую кислоту.

Таблица 2 - Содержание минеральных элементов в золе костной ткани лабораторных животных, получавших коллагеновый гидролизат

Группы	Содержание			
	Зола, %	Ca, % (в золе)	P, % (в золе)	Гидроксилапатит, % (в золе)
1	54,3	71,3±1,3	20,8±0,8	55,5 ^a
2	46,6	70,8±1,6	21,7±0,9	50,8 ^b
3	48,8	70,9±1,7	21,6±0,8	57,8 ^{a,b,c}
4	48,2	70,2±0,9 ^c	21,7±0,4	53,5 ^{a,b,c,d}
5	49,4	72,4±0,9 ^c	20,9±0,9	61,4 ^{b,c,d}

По содержанию гидроксилапатита костная зола 5-ой группы животных, принимавших импортный препарат на основе гидролизованного коллагена, имела наилучший показатель. Что может быть связано с минеральной добавкой, присутствующей в препарате “Collagen peptide” Следующей по эффективности выявлена группа 3, получавшая выработанный нами коллагеновый гидролизат из кожи КРС. Но достоверной разницы по содержанию кальция между группами не обнаружено, за исключением группы 5 (72,4±0,9% по сравнению с 70,8±1,6% с патологическим контролем).

Таким образом, результаты исследований показывают действенность полученного нами коллагенового гидролизата из кожи КРС в накоплении коллагена в костной ткани лабораторных животных с индуцированным ретиноевой кислотой остеопорозом. Высокое содержание оксипролина вкупе с хорошей растворимостью делают данный коллагеновый гидролизат перспективным для использования в составе различных регенерирующих композиций.

Список использованной литературы

- 1 Николаева Т.И., Шеховцов П.В. 2014. Гидролизаты коллагена в профилактике и лечении заболеваний суставов. *Fund. Res.* 12. P. 524-528.
- 2 Zague V. (2008) A new view concerning the effects of collagen hydrolysate intake on skin properties. *Arch. Dermatol. Res.* 300. P. 479-483.
- 3 Ohara H., Ichikawa S., Matsumoto H., Akiyama M., Fujimoto N., Kobayashi T., Tajima S. (2010) Collagen-derived dipeptide, prolinehydroxyproline, stimulates cell proliferation and hyaluronic acid synthesis in cultured human dermal fibroblasts. *J. Dermatol.* 37. P. 330-338.
- 4 König D., Oesser S., Scharla S., Zdzieblik D., Gollhofer A. (2018) Specific collagen peptides improve bone mineral density and bone markers in postmenopausal women. A randomized controlled study. *Nutrients.* 10(1). P. 97
- 5 Zhua L., Xieb Y., Wenb B., Yed M., Liub Y., Imamb K.M.S.U., Caia H., Zhang C., Wang F., Xin F. (2020) Porcine bone collagen peptides promote osteoblast proliferation and differentiation by activating the PI3K/Akt signaling pathway. *J. Functional Food.* 64. P. 103697
- 6 ГОСТ 13805-76. Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей.
- 7 ISO 3496:1994. Meat and meat products — Determination of hydroxyproline content.
- 8 ГОСТ 33692-2015. Белки животные соединительнотканые. Общие технические условия (с Поправкой)
- 9 Mahmoud M.I., Cordle C.T. (2000) Protein hydrolysates as special nutritional ingredients. In: *Novel macromolecules in food system*. Ed. by G. Doxastakis, V. Kiosseoglou. Elsevier Science B.V. p. 181-215.
- 10 Guillerminet F., Fabien-Soule V., Even P.C., Tome D., Benhamou C.L., Roux, C., Blais A. (2012) Hydrolyzed collagen improves bone status and prevents bone loss in ovariectomized C3H/HeN mice. *Osteoporos. Int.* 23. P. 1909-1919.
- 11 Писарева Е.В., Власов М.Ю., Волова Л.Т. (2015) Показатели обмена костной ткани кроликов при введении “аллогенного гидроксипапатита”. *Изв. Самар. НЦ РАН.* 5(3). С. 908-912.