

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет хімічних та біофармацевтичних технологій
Кафедра біотехнології, шкіри та хутра

Дипломна магістерська робота

на тему: **«Отримання колагену методом ферментативного гідролізу»**

Виконав: студент 2 курсу, групи МгБТ-21
спеціальності 162 Біотехнології
та біоінженерія
освітньої програми Біотехнологія
високомолекулярних сполук
Анастасія ДОРОФІЙ
Керівник: к.т.н., доц. Олена ОХМАТ
Рецензент: к.б.н., доц. Ольга ЮНГІН

Київ 2022

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет хімічних та біофармацевтичних технологій
Кафедра біотехнології, шкіри та хутра
Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія
Освітня програма Біотехнологія високомолекулярних сполук

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри
біотехнології, шкіри та хутра

_____ Олена МОКРОУСОВА
«___» _____ 2022 року

**ЗАВДАННЯ
НА ДИПЛОМНУ МАГІСТЕРСЬКУ РОБОТУ СТУДЕНТУ
Дорофій Анастасії Володимирівні**

1. Тема роботи: **Отримання колагену методом ферментативного гідролізу**
Науковий керівник роботи Охмат Олена Анатоліївна, к.т.н., доц
затверджені наказом закладу вищої освіти
від «28» вересня 2022 р. № 180-уч
2. Строк подання студентом роботи 10.11.2022 р.
3. Вихідні дані до роботи: завдання на дипломну магістерську роботу; наукова література щодо властивостей колагену та способів його отримання; технологічна схема промислового отримання колагену методом ферментативного гідролізу; матеріали науково-дослідної та переддипломної практик.
4. Зміст дипломної роботи (перелік питань, які потрібно розробити): вступ, огляд літератури, технологічна частина, контроль якості, висновки, список використаних джерел, додатки.

5. Консультанти розділів дипломної магістерської роботи

Розділ	Ім'я, прізвище та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 1	Олена Охмат, доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра		
Розділ 2	Олена Охмат, доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра		
Розділ 3	Олена Охмат, доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра		
Висновки	Олена Охмат, доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра		

6. Дата видачі завдання 12.09.2022 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів дипломної магістерської роботи	Терміни виконання етапів	Примітка про виконання
1	Вступ		
2	Розділ 1 Огляд літератури		
3	Розділ 2 Технологічна частина		
4	Розділ 3 Контроль якості		
5	Висновки		
6	Оформлення дипломної магістерської роботи (чистовий варіант)		
7	Здача дипломної магістерської роботи на кафедру для рецензування (за 14 днів до захисту)		
8	Перевірка дипломної магістерської роботи на наявність ознак плагіату (за 10 днів до захисту)		
9	Подання дипломної магістерської роботи на затвердження завідувачу кафедри (за 7 днів до захисту)		

Студент _____ Анастасія ДОРОФІЙ

Науковий керівник роботи _____ Олена ОХМАТ

Директор НМЦУПФ _____ Олена ГРИГОРЕВСЬКА

АНОТАЦІЯ

Анастасія ДОРОФІЙ. Отримання колагену методом ферментативного гідролізу.

Дипломна магістерська робота за спеціальністю 162 «Біотехнологія та інженерія». – Київський національний університет технологій та дизайну, Київ, 2022 рік. – Рукопис.

Дипломну магістерську роботу присвячено отриманню колагену методом ферментативного гідролізу, описано переваги даного методу та практичне його застосування.

Для реалізації технології запропоновано використання ферменту пепсину. Проведено аналіз ринку препаратів, що містять колаген. У дипломній роботі обґрунтовано технологію виробництва колагену отриманого ферментативним «гібридним» способом. Представлено технологічну схему виробництва колагену, яка передбачає стадії підготовки колагенвмісної сировини, екстрагування колагену, очищення колагену. Обґрунтовано вибір технологічного обладнання для реалізації виробництва, особливості контролю колагенвмісної сировини та цільового продукту.

Ключові слова: колаген, ферментативний гідроліз, пепсин, контроль якості.

ABSTRACT

Anastasiia DOROFII. Collagen obtaining by enzymatic hydrolysis.

Master's thesis on specialty 162 «Biotechnology and engineering». – Kyiv National University of Technologies and Design, Kyiv, 2022. – Manuscript.

The master's thesis is devoted to the obtaining of collagen by enzymatic hydrolysis, the advantages of this method and its practical application are described.

For the implementation of the technology, the use of pepsin enzyme is proposed. An analysis of the market of preparations containing collagen was carried out. The thesis substantiates the production technology of collagen obtained by the enzymatic "hybrid" method. The technological scheme of collagen production is presented, which includes the stages of preparation of collagen-containing raw materials, extraction of collagen, purification of collagen. The choice of technological equipment for the implementation of production, the peculiarities of control of collagen-containing raw materials and the target product is substantiated.

Key words: collagen, enzymatic hydrolysis, pepsin, quality control.

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ, УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- ВРХ – велика рогата худоба
- Gly – гліцин
- Pro – пролін
- Нур – гідроксипролін
- Asp – аспаргін
- Glu – глютамін
- СРБ – С-реактивний білок
- CIP/SIP – Session Initiation Protocol — протокол встановлення сесії
- ДР – допоміжні роботи
- ТП – технологічний процес
- Фур'є-ІЧС – Фур'є-ІЧ-спектроскопія
- ПААГ/PAGE – поліакриламідний гель
- SDS – sodium dodecyl sulfate – додецилсульфат натрію
- МПА – м'ясо-пептонний агар
- МПБ – м'ясо-пептонний бульйон
- Ендо – слабоселективне диференційно-діагностичне середовище для виділення ентеробактерій
- ЕМС – етилметансульфонат
- ЖСА – жовтково-сольовий агар

ЗМІСТ

ВСТУП.....	9
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	12
1.1 Загальні відомості про колаген.....	12
1.1.1 Основні характеристики колагену його елементарний склад.....	12
1.1.2 Будова та структура колагену.....	13
1.1.3 Основні типи колагену.....	15
1.1.4 Характеристика основних методів отримання колагену.....	17
1.2 Галузі застосування колагену.....	20
1.2.1 Використання колагену у галузі охорони здоров'я та біологічній галузі.....	20
1.2.2 Використання колагену у косметичній та косметологічній галузях..	22
1.2.3 Використання колагену у харчовій галузі.....	24
1.2.4 Використання колагену у ветеринарній галузі.....	24
Висновки до розділу 1.....	25
РОЗДІЛ 2. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА.....	26
2.1 Характеристика цільового продукту.....	31
2.2 Характеристика біологічного агенту.....	32
2.3 Обґрунтування методу ферментативного гідролізу в технології отримання колагену.....	33
Особливості застосування методу ферментативного гідролізу для отримання колагену.....	34
Характеристика етапів отримання колагену методом ферментативного гідролізу.....	35
Обґрунтування вибору технологічного обладнання для отримання колагену методом ферментативного гідролізу.....	40
Висновки до розділу 2.....	48
РОЗДІЛ 3. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ.....	49
3.1 Контроль на стадії методу ферментативного гідролізу.....	49
3.2 Контроль цільового продукту.....	54

Висновки до розділу 3.....	60
ВИСНОВКИ.....	61
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	62
ДОДАТКИ.....	69

ВСТУП

Актуальність теми. В сучасному світі колаген є досить популярним продуктом. На сьогодні існує безліч наукових статей та експериментів, котрі вказують на користь колагену для організму і розглядають різні порушення та розлади при його дефіциті. Велику кількість публікацій, лекцій, конференцій проводять аби поширити в маси інформацію про користь вживання колагенових добавок та його широке застосування в різних галузях повсякденного життя (охорона здоров'я, харчова промисловість, косметологія, фармацевтика, ветеринарія тощо).

«Kόλλα» з грецької мови перекладається як «клей». Розрізняють ендогенний та екзогенний колаген. Ендогенний колаген – це природний колаген, який синтезується нашим організмом. Екзогенний колаген – синтетичний колаген, який надходить ззовні, наприклад, у вигляді добавок чи ін'єкцій. Екзогенний колаген використовують у медицині для прискорення регенерації ран, а у косметології як Anti-Age терапія. Ринок харчових добавок, протеїнового харчування, у тому числі спортивного, активних комплексів для здоров'я суглобів, нігтів, волосся – ще один сегмент широкої області застосування колагену. У ветеринарній практиці колаген використовується в якості кормової добавки для покращення фізіологічного стану тварин, їх шерсті, суглобів та кісток, підвищення апетиту та покращення роботи кишківника.

Привабливими з комерційної точки зору технології отримання колагену стають через особливості технології отримання цільового продукту. Мова йде про застосування різної за природою колагенвмісної сировини. Дуже часто колаген в промисловості отримують з побічних продуктів м'ясопереробної галузі або рибного господарства. А отже, комерційна доцільність виробництва колагену є беззаперечною

Актуальність теми кваліфікаційної роботи обумовлена широкою практикою застосуванням колагену, що, враховуючи попит та комерційну цінність, є актуальними для різних галузей промисловості України.

Наукова новизна роботи полягає в опрацюванні технології екстрагування колагену ферментативним методом і контролі якості цільового продукту високої чистоти.

Мета теоретично-аналітичної роботи полягає в оцінюванні ефективності ферментативного гідролізу для отримання колагену.

Об'єктом дослідження є технологія екстрагування колагену.

Предмет дослідження – властивості ферменту *пепсину* та його застосування для отримання екстрагованого колагену.

Завдання роботи:

1. Вивчити загальні поняття про колаген, основні характеристики, склад, структуру та його основні типи. Ознайомитись з базовими методами отримання колагену.
2. Розглянути галузі застосування колагену.
3. Обґрунтувати вибір колагенвмісної сировини; вивчити властивості біологічного агенту та оцінити його ефективність у процесі екстрагування колагену.
4. Обґрунтувати методику та скласти технологічну схему ферментативного гідролізу для отримання колагену.
5. Обґрунтувати вибір та апаратурне забезпечення технологічної схеми виробництва колагену методом ферментативного гідролізу.
6. Обґрунтувати методи контролю якості сировини, виробництва та цільового продукту.

Апробація. Результати магістерської роботи оприлюднено на IX Міжнародній науково-практичній конференції «Хімія, біо- і нанотехнології, екологія та економіка в харчовій та косметичній промисловості» (НТУ «ХП», Харків, 18-19 листопада 2021 року), II Міжнародній науково-

практичній Інтернет-конференції «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології» (НТУ, Харків, 20 травня 2022 року).

Публікації. За темою дипломної магістерської роботи опубліковано 2 статті та 1 тези доповіді на конференцій міжнародного рівня.

Бібліографія включає:

1. **Дорофій А. В.** Застосування колагену в косметичних засобах. *Хімія, біо- і нанотехнології, екологія та економіка в харчовій та косметичній промисловості*: зб. матер. доп. учасн. ІХ Міжнар. наук.-практ. конф. (Харків, 18-19 листопада 2021 року). Харків : НТУ «ХП», 2021. С. 127–130 (Додаток А).
2. **Дорофій А. В.,** Майстренко Л. А., Охмат О. А., Чистилін К. О. Основні характеристики колагену та способи отримання препаратів на його основі : зб. наук. праць студентів, аспірантів та молодих вчених «Наука майбутнього». Мукачєво : МДУ, 2022. № 2 (10). С. 00–00. *Стаття прийнята до друку* (Додаток Б).
3. **Дорофій А. В.,** Охмат О. А., Чистилін К. О. Екстрагування колагену ферментами та органічними кислотами. *Проблеми та досягнення сучасної біотехнології*: зб. матеріалів доп. учасн. ІІ Міжнар. наук.-практ. Інтернет-конф. (Харків, 20 травня 2022 року). Харків : НФУ, 2022. С. 98–99 (Додаток В).

Структура та обсяг дипломної магістерської роботи. Основна частина дипломної магістерської роботи викладена на 61 сторінці друкованого тексту, містить вступ, три розділи, висновки та список використаної літератури з 66 джерел. Робота містить 3 додатка.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Колаген є найпоширенішим білком в людському організмі та домінантним у сполучній тканині ссавців. В наш час колаген та препарати на його основі широко використовують у харчовій і косметичній галузях, а також у галузях охорони здоров'я та ветеринарії.

1.1 Загальні відомості про колаген

Колаген становить третину від загального білка організму ссавців. Цей білок є основою сполучної тканини ссавців, важливим компонентом сухожиль, рогівки, кровоносних судин, хрящів, слизової оболонки кишківника тощо.

Функції колагену [1]:

- участь у формуванні фібробластів у дермі шкіри;
- забезпечення захисного покриття органів;
- надання шкірі структурної стійкості, пружності, еластичності;
- запобігання поглинанню і поширенню патогенних субстанцій, екологічних токсинів, мікроорганізмів, а також ракових осередків в організмі;
- участь у згортанні крові тощо.

Процес синтезу колагену в організмі ссавців відбувається головним чином у клітинах фібробластів. При цьому фібробласти сприяють утворенню капсул навколо чужорідного тіла, беруть участь у загоєнні ран, формуванні рубців на місці запалення або рани.

1.1.1 Основні характеристики колагену та його елементарний склад

Колаген – протеїн, котрий складається з амінокислот, які в свою чергу містять вуглець, кисень і водень. Колаген має у складі специфічні амінокислоти – гліцин, пролін, гідроксипролін і аргінін [2, 3].

До основних специфічних ознак колагену відносять:

- унікальний амінокислотний склад (наявність у складі оксилізіну; вміст близько 33 % гліцину, близько 21 % проліну й оксипроліну, близько 11 % аланіну);
- хімічну інертність у нативному стані;
- опір до зміни розміру у фізіологічних умовах;
- здатність під час нагрівання у воді переходити у желатин та/або клей.

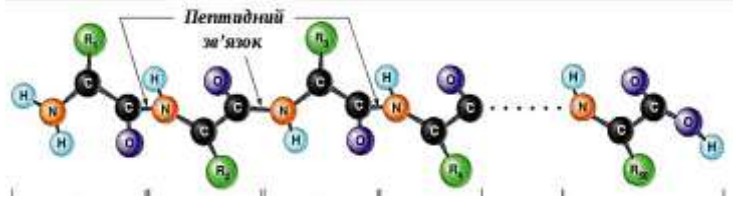
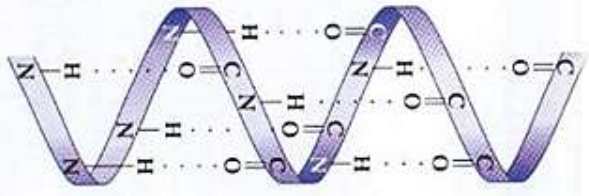
Елементарний склад колагену налічує вуглець (близько 50 %), кисень (близько 25 %), азот (близько 18 %), водень (близько 6 %). Слід зауважити, що елементарний склад колагену залежатиме від виду та віку ссавців.

1.1.2 Будова та структура колагену

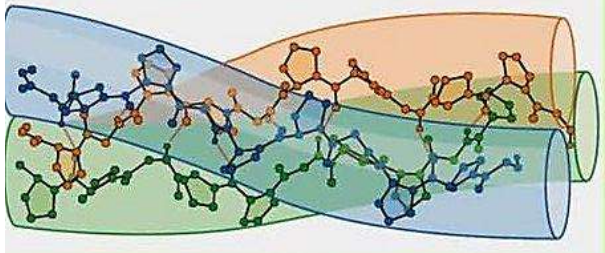


Молекула колагену (тропоколаген) має довжину приблизно 300 нм, товщину – 1,5 нм та молекулярну масу близько 300 000 дальтон [4]. Колаген відносять до фібрилярних білків. Розрізняють п'ять рівнів структури колагену (табл. 1.1).

Таблиця 1.1

Рівні організації структури колагену [5-10]

Структура колагену	Загальна характеристика	Загальний вигляд
1	2	3
Первинна	Послідовне розташування амінокислотних залишків уздовж поліпептидного ланцюга	
Вторинна	Просторова організація молекули, яка частково або повністю закручується у спіраль.	

Продовження табл. 1.1

1	2	3
Третинна	Просторова організація трьох молекул, які закручуються у потрійну спіраль	
Четвертинна	Надмолекулярна структура: організація трьохспіральных спіралей у фібрили	
П'ятиринна	Надмолекулярна структура: волокна та пучки волокон	

Первинна структура – це послідовність розташування амінокислот, що утворюють поліпептид. Гліцин (Gly), пролін (Pro), гідроксипролін (Hyp) «регулярно» розташовані у ланцюгах за схемами «Gly-Pro-X» або «Gly-X-Hyp», де X може бути будь-яким амінокислотним залишком [3]. Пролін або гідроксипролін становлять приблизно 1/6 загальної послідовності. Гліцин міститься майже в кожному третьому залишку.

Вторинна структура – просторова конформація поліпептидних ланцюгів (α -спіралі та β -нитки). Структура формується значною мірою завдяки водневим зв'язкам між неподіленими електронними парами на карбонільному кисні амінокислоти та атомом водню, приєднаному до азоту іншої амінокислоти. Виникнення великої кількості водневих зв'язків стабілізує спіраль колагену.

Третинна структура – результат кількох типів взаємодій, в основі яких лежить заряд активних груп колагену, електростатична взаємодія та сили

Ван-дер-Ваальса [5]. Третинна структура характеризує розташування поліпептидних ланцюгів у структурі тропоколагенової частинки.

Четвертинна структура – результат утворення фібрил з тропоколагенових частинок. Молекули в паралельних ланцюжках фібрили зміщені одна відносно одної приблизно на $1/4$ довжини (64 нм). Цим зумовлюється характерна для колагенових фібрил поперечна смугастість з періодом повторюваності у 64 нм [4]. Визначальною особливістю структури колагену є накручування трьох паралельних поліпептидних ланцюгів один на один, з утворенням потрійної спіралі [5, 6]. Колагенові фібрили містять у своїй структурі поперечні зв'язки різних типів, які «зшивають» поліпептидні ланцюги у молекулі тропоколагену, а також поряд розміщені у фібрилах молекули.

П'ятеринна структура колагену – утворення пучків колагенових волокон. В пухкій сполучній тканині колагенові волокна розташовані у різних напрямках і мають вигляд хвилястих, спіральних, круглих або плоских структур товщиною 1-10 мкм. Вони здатні утворювати пучки, товщина яких може досягати 150 мкм [6].

1.1.3 Основні типи колагену

Визначено близько 28 типів колагену. Відрізняються вони між собою компонентами клітин, а також місцем використання колагену в організмі.

Ідентифіковано п'ять основних типів колагену [11-13]:

- I тип складає 90 % колагену тіла людини. Тип I щільно упакований і задіяний у забезпеченні структури шкіри, кісток, сухожилів і зв'язок;
- II тип міститься в еластичному хрящі, який забезпечує підтримку суглобів організму;
- III тип зустрічається в м'язах, артеріях і органах;
- IV тип знаходиться в шарах дерми шкіри;
- V тип зустрічається в рогівці очей, деяких шарах шкіри, волоссі та тканині плаценти.

Колаген I типу. Найпоширенішим білком у людини (і в усіх хребетних), без сумніву є колаген типу I – «будівельний» білок шкіри. Формується колаген I типу всередині клітини або поза нею. Формування колагену I типу всередині клітини під час трансляції на рибосомах уздовж шорсткої ендоплазматичної сітки утворює два типи пептидних ланцюгів, які називають ланцюгами α -1 і α -2. Поза клітиною формування колагену I типу здійснюється через розщеплювання реєстраційних пептидів, при цьому тропоколаген утворюється пептидазою проколагену. Молекули тропоколагену «збираються» аби утворити колагенові фібрили за допомогою ковалентного перехресного зшивання, використовуючи лізілоксидазу, яка зв'язує гідроксилізин і залишки лізину. Кілька колагенових фібрил формують колагенові волокна. Колаген може бути прикріплений до клітинних мембран за допомогою кількох типів білка, включаючи фібронектин та інтегрин [12].

Колаген II типу. Колаген II типу є основним колагеном, який міститься в хрящах. Хрящ – це сполучна тканина, яка захищає кінці довгих кісток у суглобах, а колаген даного типу відповідно підтримує їх стан та здоров'я. Також хрящ це структурний компонент вуха, носа, бронхів, грудної клітки тощо.

Колаген III типу. Тип III – це фібрилярний колаген, який є основним компонентом нашої шкіри та органів. В організмі колаген типу III міститься в кишківнику, м'язах, кровоносних судинах, матці [13].

Колаген IV типу. Цей тип колагену переважно розташований в зоні базальної мембрани. Характерною ознакою колагену IV типу є відсутність гліцину у кожному третьому амінокислотному залишку, необхідному для щільної спіралі колагену. В результаті, загальна конформація колагену цього типу є більш гнучкою та зігнутою у порівнянні з іншими типами колагену. Такі особливості дозволяють колагену IV типу утворювати листи, котрі є основною структурною формою, виявленою в базальній пластинці шкіри.

Колаген V типу є одним із другорядних колагенових компонентів; разом з колагеном I типу відіграє значну роль у регуляції розвитку колагенових волокон сполучної тканини. Колаген типу V співіснує з колагеном типу II в суглобовому хрящі, підтримуючи здорові колагенові волокна колагену типу II, а також приймає участь у формуванні поверхні клітин і волосся. Представник даного типу приймає участь у створенні клітин плаценти вагітної жінки, органу, який прикріплюється до слизової оболонки матки.

1.1.4 Характеристика основних методів отримання колагену

Екстрагування – процес вибіркового отримання одного або кількох компонентів з твердого тіла чи розчину за допомогою розчинника, який називається екстрагентом. У екстрагенті добре розчиняються тільки ті компоненти, котрі одержуються. Помітно гірше, практично або зовсім не розчиняються інші компоненти. Саме тому розчинник називається вибіркоvim або селективним [14].

Розчинний колаген може бути використаний повністю або частково у виробництві матриць для тканинної інженерії, губок, порошків, волокон чи ниток. Розподіл молярної маси, структури, складу, функціональні особливості та властивості колагену залежать від умов переробки сировини, з якої він отримується, а також матеріалів, котрі використовують в процесі екстрагування [15]. Кількість ковалентних міжмолекулярних взаємодій у структурі колагену збільшується в часі і часто визначає майже повну нерозчинність отриманого продукту.

Колаген можна отримувати із сировини різного походження. Розрізняють тваринний, рослинний та морський колаген.

Морський колаген отримують зі шкіри риб. Цей вид вважають найбільш ефективним, через менший розмір молекул на відміну від молекули тваринного колагену.

Тваринний колаген отримують переважно зі шкір великої рогатої худоби (ВРХ), свиней чи побічних продуктів м'ясопереробної

промисловості. Даний вид є дуже популярним і перспективним у косметології та найчастіше використовується практично.

Рослинний колаген має подібну структуру до тваринного колагену та подібний амінокислотний склад, проте не є справжнім колагеном. Зазвичай джерелом для отримання рослинного колагену слугує соя або пшениця [16, 17].

Для отримання необхідних характеристик екстрагованого колагену з різної сировини потрібно індивідуально підбирати параметри процесу екстрагування [18].

В результаті екстрагування ланцюги колагену лишаються переважно неушкодженими, а поперечні зв'язки у структурі зазнають часткового гідролізу. Через необхідність розриву при екстрагуванні великої кількості водневих зв'язків у молекулах колагену застосовують оброблення колагенвмісної сировини ферментами, сольовими розчинами або розведеними розчинами кислот або основ.

Кислотний гідроліз. Під час процесу кислотного гідролізу обрану сировину занурюють у розчин з кислотою реакцією середовища. При прониканні цього розчину в структуру колагенвмісної сировини, відбувається гідроліз нековалентних між- та внутрішньомолекулярних зв'язків. Даний спосіб найкраще підходить для екстрагування колагену з сировини з нещільним переплетенням колагенових волокон (наприклад, шкір свиней і риб). Для проведення кислотного гідролізу використовують органічні (оцтова, лимонна, молочна кислота) та неорганічні (хлоридна) кислоти [19]. Органічні кислоти здатні солубілізувати незшиті колагенові структури, а також розірвати деякі поперечні зв'язки, що призводить до більш високої розчинності колагену під час екстрагування [20].

Для екстрагування кислоторозчинного колагену попередньо оброблений матеріал додають до розчину кислоти, як правило, 0,5 М органічної кислоти та витримують впродовж 24-72 годин за температури 4 °С. Наступним етапом є фільтрування для відділення колагену, котрий знаходиться в рідкій фазі. Для отримання колагенового порошку фільтрат зазвичай піддають осадженню

хлоридом натрію. Осад збирають центрифугуванням, після чого повторно розчиняють у мінімальному об'ємі 0,5 М органічної кислоти; діалізують у 0,1 М розчині органічної кислоти та дистильованій воді [19, 20]. Максимальна концентрація колагену, яку можна отримати при реалізації способу екстрагування становить близько 10 мг/мл [18].

Під час очищення колагену необхідно усунути антигенні компоненти білка, представлені ділянками тілопептидних фрагментів колагену типу I. Таке очищення буде ефективнішим після оброблення пепсином. Для кислотного екстрагування характерне отримання добре розчинних фракцій колагену. Після кислотного гідролізу отримують нативну (трьохспіральну) молекулу колагену з непошкодженими тілопептидами. Такий продукт здатний утворювати пружні гелі. Колаген, який був отриманий шляхом кислотного гідролізу, підходить для біотехнологічного використання й тканинної інженерії.

Лужний гідроліз характеризується обробкою колагенвмісної сировини основним розчином (як правило, гідроксидом натрію) [15]. Дану обробку проводять для щільних, товстих матеріалів, що потребують більш агресивної дії на колагенову структуру. Недоліками екстрагування є те, що дана технологія займає багато часу (від кількох днів до декількох тижнів) та сильно руйнує колагенові ланцюги.

Лужно-сольове екстрагування передбачає обробку колагенвмісної сировини лугом у присутності насиченого розчину сульфатнокислого натрію, з подальшим екстрагуванням кислотою. Спосіб характеризує високий вихід розчинного колагену зі збереженою формою потрійної спіралі, однак з дезамінуванням залишків аспарагінової (*Asp*) та глутамінової кислот (*Glu*). Внаслідок дезамінування залишків амінокислот розподіл зарядів уздовж трьохспіральної молекули колагену. Такий колаген не утворює гелів, а тому його використання обмежене [15].

Екстрагування ферментами дозволяє варіювати властивості екстрагованого колагену (наприклад, в'язкість, здатність до утворення

емульсій або гелів). Ферментативний гідроліз часто здійснюють з використанням протеаз (наприклад, пепсину чи трипсину) або ферментних препаратів (наприклад, протосубтиліну). Температурний інтервал екстрагування колагену ферментами становить 35-50°C, що запобігає руйнуванню амінокислот впродовж екстрагування. Але слід зазначити, що при екстрагуванні ферментами у цільовому продукті одночасно наявні фракції колагену з різним ступенем розчинності [19]. Екстрагування ферментами забезпечує високий вихід колагену з низьким вмістом домішок. Для збільшення виходу цільового продукту та його чистоти екстрагування ферментами можуть поєднувати з обробкою ультразвуком, або іншими способами екстрагування. Недоліками ферментативного екстрагування є його значна тривалість та висока вартість [21, 22].

1.2 Галузі застосування колагену

В наш час колаген широко використовується у різних галузях: охорона здоров'я, косметологія, ветеринарія, харчова промисловість тощо.

1.2.1 Використання колагену у галузі охорони здоров'я та біологічній галузі

Завдяки своїй біосумісності та біологічним характеристикам (слабка антигенність, здатність до біологічного розкладання), колаген широко застосовують у галузі охорони здоров'я [23]: системи доставки ліків за допомогою колагенових екранів в офтальмології; губки для загоєння ран чи опіків; гелеві формули в поєднанні з ліпосомами для тривалої доставки ліків тощо. Колаген, особливо типу I, відіграє важливу роль в тканинній інженерії, при трансплантації шкіри, у якості кісткових замінників та штучних кровоносних судин і клапанів. Застосовуються препарати колагену і в: дерматології, хірургії, офтальмології, неврології, урології, стоматології, при дослідження ракових захворювань тощо.

Застосування колагену та його препаратів передбачає [24]:

- контроль кровотечі;
- зменшення запалення;
- управління функцією кровоносних судин;
- підвищення міцності рубцевої тканини;
- відновлення еластичності шкіри;
- залучення клітин, які сприяють загоєнню ран;
- створення платформи для росту нової тканини тощо.

Наприклад, колагенові засоби для прискорення загоювання ран можуть випускати у формі пов'язок, губок, гелю або порошку. Іноді у своїй практиці лікарі використовують колаген для формування каркасів (мембран), які забезпечують тимчасову підтримку, поки організм пацієнта виробляє нові клітини під час процесу регенерації.

Мембрани, що містять колаген, можуть допомогти з:

- регенерацією кісткової тканини;
- загоєнням ран;
- лікуванням екстракції лунок після стоматологічної операції;
- сприянням згортанню крові.

Колагенові мембрани здатні розсмоктуватись, а тому немає потреби у хірургічному втручанні для їх видалити після завершення загоєння.

У 2011 році було доведено [25], що в оральній хірургії колагенові бар'єри можуть запобігти міграції клітин навколо ясен, що швидко ростуть, до рани в зубі. Це зберігає простір, де клітини зуба мають можливість регенерувати.

Колаген є дуже важливим для здоров'я хрящів і кісток. Досліджено [26], що прийом добавок з гідролізатом колагену, може підвищити рівень власного колагену пацієнта та допомогти йому впоратися з симптомами остеоартриту. Так, у 2018 році вчені опублікували результати випробувань щодо зменшення болю у суглобах та покращення їх рухливості при пероральному застосуванні пацієнтами препаратів колагену [27].

СРБ (С-реактивний білок) як біоматеріал був протестований відносно небагато. були протестовані як біоматеріали. Разом зі своїми співробітниками Goodman показали [28], що С-реактивні білки, які включають пептоїди, мають помітну здатність зв'язуватися з епітеліальними клітинами та фібробластами, особливо коли вони представлені на поверхні. Окрім цього СРБ також корисний для роботи тромбоцитів та каталізує процесу регенерації.

Для терапевтичних цілей основним кроком у використанні колагенових біоматеріалів є розробка СРБ, котрі здатні прилипати до біологічного колагену або проникати у нього. Більшість зусиль, спрямованих на досягнення цих цілей, покладалися на іммобілізацію СРБ на неспорідненій речовині. Yu та його колеги [29] підготували наночастинки золота, функціоналізовані СРБ, і продемонстрували зв'язування наночастинок золота з ділянкою розриву природного колагену. Maryanoff та його співробітники виявили, що СРБ, відображені на наночастинках латексу, можуть сприяти та стимулювати агрегацію тромбоцитів людини з дією, подібною до колагену типу I [28]. Вони також продемонстрували, що потрійні спіральні фібрили, отримані за допомогою ароматичних взаємодій, мали подібний рівень тромбогенної активності до СРБ, іммобілізованих на наночастинках латексу [30]. Поодинокі ланцюги СРБ і СРБ, кон'югованих з поліетиленгліколем, зв'язуються з колагеновими плівками навіть без іммобілізації на наночастинках, а також можуть застосовуватись для візуалізації колагену і загоєнні ран [32]. Надалі така технологія набуває все більшої популярності та розвитку.

1.2.2 Використання колагену у косметичній та косметологічній галузях

Розвиток сучасної косметичної галузі нерозривно пов'язаний із застосуванням сучасних косметичних продуктів, бажано на натуральній основі – трав та рослин, амінокислот, препаратів колагену, пробіотиків тощо.

При застосуванні вказаних засобів шкіра людини більш ефективно протистоїть агресивними чинниками, особливо у зв'язку з тотальним збільшенням використання антисептичних засобів в умовах поширення COVID-19 [33]. В косметичній галузі колаген використовують для ревіталізації шкіри, в якості наповнювачів (філерів), як компонент в різних косметичних засобах.

З віковими змінами функція вироблення організмом природного колагену значно знижується. Тому аби відновити баланс шкіри шляхом утримування води різні косметичні фірми додають у свої продукти колаген.

Сучасна галузь краси пропонує застосування препаратів колагену для:

- хірургічних методів лікування (наприклад, ін'єкції наповнювачів);
- виготовлення кремів, сироваток, масок тощо;
- виготовлення пероральних добавок, що містять колагенові пептиди, вітаміни та антиоксиданти;
- вибору дієти, з метою забезпечення поживними речовинами та антиоксидантами, котрі запобігають окислювальному стресу.

Філери, що поєднують колагенові дермальні наповнювачі з гіалуроновою кислотою, можуть підвищити еластичність шкіри, прискорюючи вироблення колагену [26]. Філери пропонується використовувати з метою:

- зменшення зморшок;
- удосконалення контуру обличчя;
- покращення зовнішнього вигляду рубців.

Слід однак зауважити, що до використання колагену та його препаратів у косметичній чи косметологічній галузях, слід ставитися обережно. Ґрунтовні дослідження, на які посилаються розробники косметологічних процедур та косметичних продуктів, можуть бути виключно маркетинговими.

1.2.3 Використання колагену у харчовій галузі

Препарати на основі колагену можуть використовувати для ковбасної промисловості, у виробництві плодово-ягідних наповнювачів для кондитерських виробів, у виноробстві тощо. Але останнім часом значно зріс інтерес до харчових добавок, що містять колаген. Ефективність колагенових харчових добавок доволі спірне питання. Так, Управління по контролю якості харчових продуктів і лікарських засобів Сполучених Штатів Америки не оцінює будь-які заяви компаній щодо ефективності застосування колагенвмісного продукту.

Незважаючи на велику кількість колагену в нашому організмі, цей білок став найбільш популярною та продаваною добавкою. Вважається [34], що пероральні колагенові добавки у формі гелів, таблеток або порошків ефективніше засвоюються організмом і широко використовуються серед споживачів, які прагнуть покращити загальний стан своєї шкіри, зменшити прояви старіння, додатково зволожити шкіру, зменшити зморшки та покращити еластичність шкіри в цілому.

Колагенові добавки, представлені на ринку, містять амінокислоти, вітамін С, цинк, біотин тощо. Більшість добавок не проходять реєстрацію і вільно продаються через мережу Інтернет.

1.2.4 Використання колагену у ветеринарній галузі

У ветеринарії застосування препаратів колагену сприяє підвищенню апетиту у тварин, відновленню слизової оболонки кишківника, прискоренню загоєння ран та подряпин.

У дослідженні, опублікованому в 2014 році [35], визначали вплив добавки, що містить колаген, на послаблення симптомів дисплазії ліктьового суглоба (аномальний розвиток ліктьового суглоба). На основі результатів дослідження дійшли висновку, що застосування комбінації з ферментативно гідролізованого колагену, гіалуронової кислоти, глюкозаміну, хондротину сульфату та гамма-оризанолу (гіалоралу), зменшує клінічні

ознаки дисплазії у тварин. Також клінічно доведено [36], що споживання вказаної харчової добавки собаками породи лабрадор, забезпечує захист від прогресування остеоартритичних змін, пов'язаних з дисплазії ліктьового суглоба.

Вважають також [37], що додавання колагену в раціон тварин здатне підвищити апетит; допомогти заспокоїти та відновити слизову оболонку кишківника.

Висновки до розділу 1

Враховуючи широкий спектр застосування колагену, питання його промислового синтезу стоїть доволі актуально. В наш час промислово отримують колаген з сировини тваринного походження, морських об'єктів, птиці, відходів м'ясопереробних підприємств.

Універсального методу екстрагування колагену не існує. Це пов'язано з різноманіттям типів колагену та наявністю у його структурі різних за природою міжмолекулярних взаємодій.

Розроблення технологічного регламенту отримання колагену заданої структури з необхідним переліком властивостей тісно пов'язане зі сферою його майбутнього застосування, необхідністю ретельного добору колагенвмісної сировини та матеріалів для здійснення екстрагування.

РОЗДІЛ 2

ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

Колаген широко використовують для виробництва біоматеріалів завдяки його біосумісності, здатності до біологічного розкладання, універсальності тощо. Ринок використання продуктів, що містять колаген, в наш час налічує: косметичні засоби для поліпшення стану шкіри, нігтів, волосся; препарати комплексної дії на кістково-м'язову систему. Сегмент ринку, який займає продукція з вмістом колагену, настільки великий, що це призводить до різкого збільшення дотацій на дослідження ефективних методів отримання колагену для різних галузей.

Обсяг світового ринку продуктів на основі колагену (рис. 2.1) у 2022 році оцінений у 10,56 мільярдів доларів США, і за прогнозами, сягне близько 20 мільярдів доларів США у 2030 році.

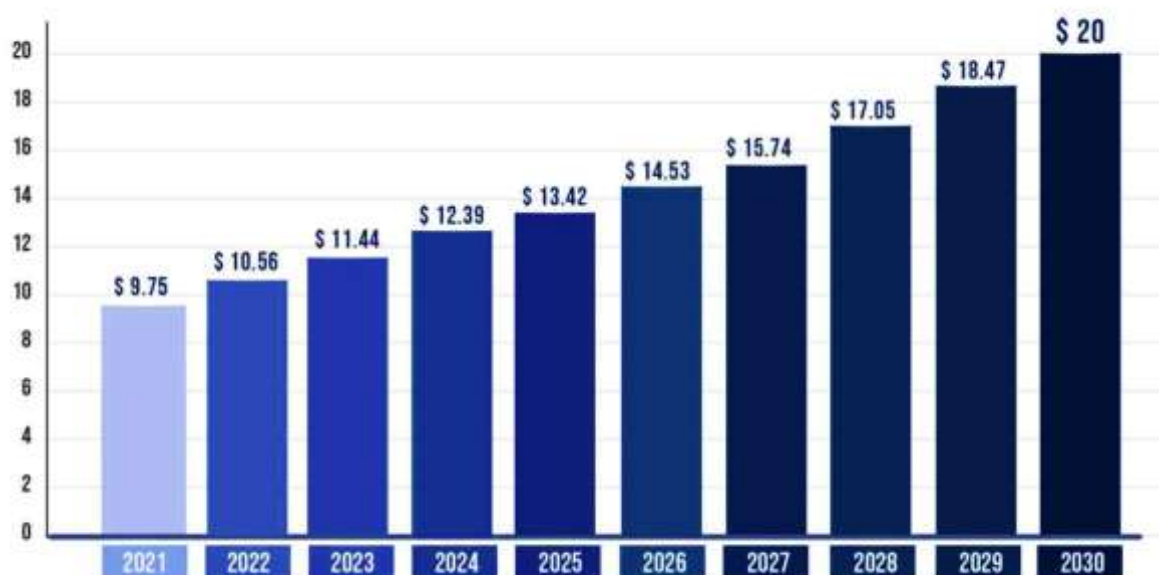


Рисунок 2.1 – Тенденції розширення світового ринку продуктів на основі колагену (млрд. дол. США)

За даними [39], на початок 2022 року сегмент продуктів на основі колагену в галузі охорони здоров'я складав 49,6 % частки доходу. При чому

за даними дистрибуції найвища частка доходу у 45 % припадала на аптечний сегмент.

Колаген в наш час є основним компонентом оздоровчих добавок, а також продуктів для нарощування м'язової маси. Вказані добавки містять переважно колаген, отриманий з тваринної та морської сировини (табл. 2.1).

Таблиця 2.1

Продукти на основі колагену [40]

Продукт, країна виробник	Заявлені характеристики	Переваги* продукту	Недоліки** продукту
1	2	3	4
<i>Препарати з колагеном тваринного походження</i>			
Neocell, Super Collagen + C, тип 1 і 3 (США)	6000 мг, 250 таблеток Neocell	Додатково входить вітамін С, який підсилює властивості білка	Висока вартість
Doctor's s Best, collagen Type I, III (Італія)	Порошок, 7,1 унції (200 г)	Знімає болі при защемленні суглобів, покращує міцність нігтів	Незручна форма прийому, не дуже приємний запах і смак
<i>Препарати з колагеном морського походження</i>			
CollagenUP 5000, Marine- Sourced, California Gold Nutrition (США)	Порошок (460 г) містить: колаген риби, вітамін С, гіалуронову кислоту	Немає риб'ячого смаку і запаху, відмінно засвоюється, прискорює загоєння ран	Важко розрахувати прийом
The Collagen Relacle, Shiseido (Японія)	90 таблеток, прийом 6 штук/день	Крім морського колагену, ще входить чорниця, вітаміни С, В6 і В12, гіалуронова кислота, ніацин та ін.	Упаковка розрахована на короткий курс

Продовження табл. 2.1

1	2	3	4
Препарати з колагеном в комплексі з вітаміном С			
Youththeory, Marine Collagen (США)	290 таблеток, прийом 5, штук/день	Комплекс ефективно бореться зі старінням	Не можна використовувати під час вагітності та лактації
Препарати з колагеном у вигляді чаю			
Зелений чай Collagen (Японія)	Порошковий чай в упаковці 100 г, прийом 5г/день	Склад: колагеновий пептид, чай матча, молоді паростки ячменю, листова капуста Браунколь, фолієва кислота	Тривалий процес заварювання
Collagen White Tea (Китай)	30 пакетів по 3 грами	100% сертифікований екстракт колагену, покращує стан шкіри, волосся, усуває проблеми опорно- рухового апарату	Висока вартість

* – заявлено виробником;

** – за даними маркетингових досліджень.

В косметичній галузі переважно використовують гідролізований колаген, але існує ряд продуктів, що вміщують водорозчинний колаген. Виробники [41-45] позиціонують косметичні засоби як продукти для живлення і зволоженні шкіри, її тонізації і регенерації (табл. 2.2).

Таблиця 2.2

Косметичні засоби з водорозчинним колагеном

№	Назва бренду, країна виробник	Назва продукту	Активні інгредієнти	Заявлена виробником дія
1	2	3	4	5
1	Joko Blend (Україна)	Альгінатна маска ефект ліфтингу з колагеном і еластином	Діатоміт, альгінат натрію, сульфат кальцію, пірофосфат натрію, еластин, колаген, токоферил ацетат, квітковий порошок троянди дамаської, слюда, діоксид титану	Альгінатна маска має ефект ліфтингу. Прискорює регенерацію клітин епідермісу, має лімфодренажну дію. Інтенсивно зволожує шкірні покриви, підвищує їх пружність і еластичність. Активні компоненти насичують шкіру необхідними для її здоров'я речовинами, зменшують вікові зміни. Рекомендована для зрілої шкіри.
2	It's Skin Collagen (Південна Корея)	Зволожуючий ліфтинг-тонік з колагеном	Колаген, пантенол	Заспокоює та тонізує, сприяє регенерації шкіри, зволожує та живить шкіру, запобігає надмірній сухості шкіри
3	Académie Scientifique de Beauté (Франція)	Омолоджуюче молочко для тіла з колагеном	Колаген, алое вера, масло дерева ши	Розгладжує та глибоко зволожує шкіру, зміцнює шкіру й усуває ознаки старіння шкіри, стимулює відновлення клітин, сприяє власному виробленню колагену, покращує природну пружність шкіри, інтенсивно живить і пом'якшує шкіру, робить її м'якою й оксамитово-ніжною, не залишає жирної плівки

Подовження табл. 2.2

1	2	3	4	5
4	Tegoder Cosmetics (Іспанія)	Концентрат природного колагену. Колагеновий гель для обличчя	Розчинний морський колаген, екстракт Spilanthus aemella, органічний кремній, Chondrus crispus і вітаміни E і F.	Концентрований гель для обличчя, придатний для використання після медико-естетичних процедур, спрямованих на заповнення зморшок, збільшення об'єму та ефект ліфтингу. Плівкоутворювальна активність, запобігає транс епідермальній втраті води, підтримуючи оптимальний рівень зволоження; сприяє зміцнювальному і підтягувальному ефекту, запобігаючи деградації шкіри і розгладжуючи зморшки та доповнює втрачений нативний колаген
5	Académie Beauté Internationale (Франція)	Ампули морського колагену	Вода, гліцерин, розчинний колаген, натрію цитрат, лимонна кислота, натрію бензоат	Продукт має підтягувальні властивості, а концентрація впливає на процес реструктуризації шкіри. Висококонцентрований, розчинний природний колаген морського походження, має зволожуючі та коригуючі властивості. Підсилює зволоження шкіри, роблячи її тонізованою та еластичною.

Перспективним є застосування препаратів, що містять колаген, для терапевтичних та гігієнічних цілей.

Наприклад, колагенові пов'язки Suprasorb C (Австрія) на основі колагену, отриманого з дрібної сировини великої рогатої худоби (ВРХ). Пов'язки розробником [46] пропонується використовувати для заживлення застійних ран, опіків, післяопераційних швів, діабетичних виразок, пролежнів тощо. Слід однак зауважити, що дослідження розробників базуються на неклінічних дослідженнях.

Клінічними дослідженнями науковців Університету Джорджа Вашингтона [47] доведено, що колагеновий порошок настільки ж ефективний у лікуванні ран після біопсії шкіри, як і первинне закриття швами.

2.1 Характеристика цільового продукту

Відповідно до додатку I п. 7.8. Регламенту (ЄС) № 853/2004 Європейського Парламенту та Ради від 29 квітня 2004 року, «колаген» визначають як продукт, отриманий з кісток, шкір, шкур і сухожилів тварин, вироблений за відповідними вимогами. Вимоги до виготовлення колагену з сировини тваринного походження передбачають дотримання наступних схем [48]:

1. Процес виробництва колагену повинен забезпечувати:
 - одноразове чи багаторазове промивання та хоча б один із таких процесів як: фільтрація, подрібнення, екструзія.
 - чи будь-який схвалений еквівалентний процес.
2. По завершенню процесу, описаного у пункті 1, колаген може підлягати етапу висушування.
3. Якщо сировина та процес виробництва виконують вимоги, що застосовуються до колагену, призначеного для споживання людиною, оператор на тій самій потужності може виробляти та зберігати колаген, призначений для споживання людиною та колаген, не призначений для споживання людиною.

Для отримання колагену застосовують переважно сировину тваринного походження: шкури дорослих тварин та молодняку ВРХ, шкури свиней, відходи м'ясних комбінатів.

Цільовий продукт – порошок колагену.

Зовнішній вигляд – порошок білого кольору.

Вміст колагену у порошку – 98 %.

Вихід колагену по відношенню до вихідної сировини – 3,0 %.

Галузі застосування: може використовуватись як активний інгредієнт у складі гігієнічних засобів.

2.2 Характеристика біологічного агенту

Пепсин – ендопептидаза, здатна до розщеплювання білків до пептидів (рис. 2.2). Даний фермент, є головним ферментом у травній системі як людини так і багатьох тварин.

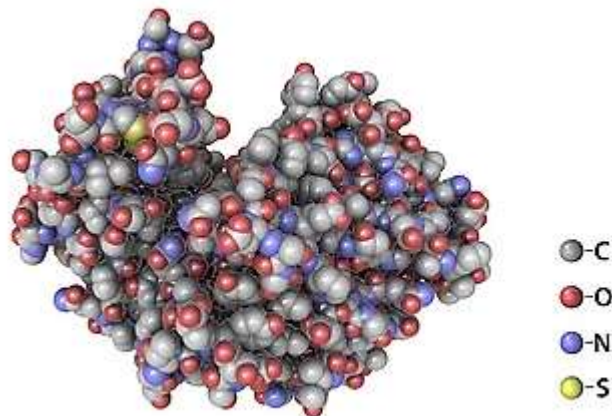


Рисунок 2.2 – Загальна структура глобулярного білка пепсину

Пепсин є глобулярним білком з молекулярною масою 34 509,83 г. Поліпептидний ланцюг пепсину вміщує 340 амінокислот. Для вказаного поліпептидного ланцюга характерна наявність дисульфідних зв'язків.

Пепсин містить елементи вторинної структури, включаючи альфа-спіралі (14 %), бета-листки (44 %) та випадкові спіралі. Пепсин має кілька функціонально важливих залишків. Першорядне значення мають Asp-32 і

Asp-215, каталітичні залишки. Ці два залишки класифікують пепсин як аспарагінову протеазу.

На відміну від ферментів рослинного походження, котрі мають широку специфічність у своїй дії (наприклад, папаїн), пепсин розщеплює фенілаланіновий або лейциновий зв'язок [49].

Пепсин – зріла активна форма зимогену (неактивного білка) пепсиногену (молекулярна маса 40 кДа), первинна структура якого складає 44 додаткові амінокислоти на кінці ланцюга. Пепсин має максимальну активність у кислому середовищі при рН 1,5–2,5. При рН близько 6,5–7,5, відбувається нейтралізація та денатурація пепсину, при рН > 8,0 дія ферменту припиняється.

Пепсин – фермент первинної дії. Даний фермент каталізує гідроліз пептидних зв'язків між гідрофобними або ароматичними залишками білкового субстрату.

Пепсин може приєднуватися до:

- вільних карбоксильних груп;
- –СО, –NH пептидних груп у головних ланцюгах або між ними.

Пепсин розщеплює переважно пептидні зв'язки колагену, утворені за участі глютамінової кислоти, тирозину, фенілаланіну.

Попередня обробка колагену розчинами солей, кислот або лугів посилюють дію пепсину. Дію ферменту посилює й часткове механічне подрібнювання колагенвмісної сировини.

2.3 Обґрунтування методу ферментативного гідролізу в технології отримання колагену

З метою вилучення колагену з колагенвмісної сировини застосовують ряд методів: дію розчинів кислот, дію розчинів кислот у комбінації з ферментами, дію нейтральних солей, дію лужних речовин. Вплив на колагенвмісну сировину сильних кислот та основ, а також застосування

високої температури призводить до денатурації колагену і отримання желатину з розщепленими потрійними спіралями.

Найпоширенішим методом екстрагування колагену з сировини тваринного походження є екстрагування кислотами. Наприклад, оцтовою або молочною. Органічні кислоти ефективно руйнують міжмолекулярні зшивки між потрійними спіралями, однак неефективні щодо більш стабільних та зрілих зшивок. Останнє призводить до зменшення виходу колагену при екстрагуванні, особливо з сировини, що характеризується щільним переплетенням колагенових волокон.

2.3.1 Особливості застосування методу ферментативного гідролізу для отримання колагену

Для збільшення виходу колагену при екстрагуванні застосовують протеолітичні ферменти або ферментні препарати. Застосовувані ферменти можуть мати тваринне походження (наприклад, трипсин або пепсин), рослинне походження (наприклад, папаїн або бромелайн) чи мікробне походження.

На практиці використовують панкреатин, пепсин та папаїн [50].

Найбільш ефективного екстрагування колагену можна досягти при використанні панкреатину. Але при цьому спостерігається пошкодження структури колагену.

Найчастіше при екстрагуванні використовують протеолітичний фермент пепсин. Дія ферменту на сировину менш руйнівна для структури колагену. Отриманий в результаті ферментативного екстрагування цільовий продукт матиме високу чистоту з молекулярною масою приблизно 100 кДг, стабільні фізико-хімічні властивості. Ще однією з переваг ферментативного гідролізу є його менш корозійний вплив на застосовуване технологічне обладнання. До недоліків застосування ферментів для екстрагування слід віднести істотну тривалість технології і застосування дороговартісних матеріалів. Саме через вартість матеріалів в технології екстрагування

колагену дуже рідко застосовують ферменти індивідуально. Часто екстрагування ферментами передбачає застосування так званої «гібридної» технології, яка передбачає попередню обробку колагенвмісної сировини органічними кислотами та розчинами солей з наступним екстрагуванням колагену ферментами.

2.3.2 Характеристика етапів отримання колагену методом ферментативного гідролізу

Для отримання цільового продукту обрано сировину тваринного походження: шкури крупної сировини великої рогатої худоби. Характеристика сировини представлена в табл. 2.3.

Таблиця 2.3

Характеристика колагенвмісної сировини [51]

№	Показник	Характеристика
1	Сировина	Крупна сировина великої рогатої худоби
2	Вміст колагену у шкірі, % від маси сухої дерми	80
3	Вміст колагену у дермі шкіри, % від маси сухої речовини, в окремих шарах: - верхня частина сосочкового - середній шар - нижня частина сітчастого	57 – 65 85 – 95 85 – 86

Для здійснення ферментативного гідролізу запропоновано використання побічних продуктів бойні та м'ясокомбінатів. При зніманні шкіри передбачено контурування сировини – відділення від цілої шкіри головної частини, лап або частини поли. Топографію шкіри ВРХ представлено на рис. 2.3.

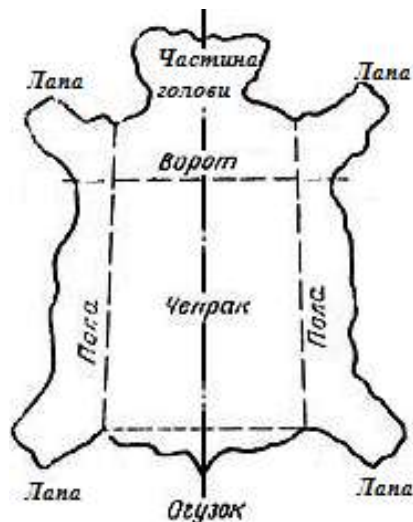


Рисунок 2.3 – Топографія шкіри ВРХ

Обрізь сировини розрізається на зручні для транспортування клапті та охолоджується або заморожується для унеможливлення появи бактеріального пошкодження. Елементи шкіри ВРХ перед екстрагуванням з них колагену обробляють на машинах для видалення шерсті з поверхні сировини ВРХ [52]. Шерсть також можна видалити і хімічним способом із застосуванням лужних матеріалів.

Вміст колагену у крайових ділянках, отриманих після операції контурування тваринної сировини, високий, а, зважаючи на те, що це побічні продукти – застосовувана технологія є економічно вигідною.

Для ферментативної обробки запропоновано використання пепсину – ферменту первинної дії.

Загальна схема реалізації метода «гібридного» ферментативного гідролізу передбачає [53]:

- подрібнення сировини тваринного походження;
- очищення від баластових речовин сумішшю фосфатного буфера;
- екстрагування колагену шляхом обробки сумішшю оцтової кислоти, хлоридної кислоти, формиату натрію, пепсину;
- очищення колагену шляхом інактивації пепсину при обробці ізотонічним розчином з одночасним осадженням колагену;
- отримання цільового продукту.

Підготовка до здійснення гідролізу передбачає очищення та подрібнення сировини для полегшення наступної обробки. Колагенвмісну сировину промивають водою до нейтрального значення $pH = 7,0$.

Механічне подрібнювання ведуть до отримання шматочків розміром $0,3 - 0,5$ см.

Очищення подрібненої колагенвмісної сировини від баластових речовин здійснюють у п'ятикратному об'ємі $0,1M$ фосфатного буфера (pH 8,0). Тривалість обробки сировини буфером складає 24 години. Після чого сировину віджимають центрифугуванням.

Екстрагування колагену проводять обробкою сировини п'ятикратним $0,5M$ розчином оцтової кислоти, який містить $0,1M$ форміату натрію. Рівень pH на початку екстрагування до pH 2,5 знижують додаванням хлоридної кислоти. Дифузія кислот у структуру колагену дозволяє останньому набухати, що призводить до розриву нековалентних міжмолекулярних і внутрішньомолекулярних зв'язків. Додавання хлоридної кислоти не тільки створить умови для ефективної дії пепсину, а і призведе до додаткової де мінералізації колагенвмісної сировини.

Фермент пепсин вводять у співвідношенні «ферменту : сировина» 1:150 відповідно. Витрати пепсину при екстрагуванні можуть вплинути на вихід колагену. Збільшення витрат пепсину в діапазоні 1–9 % від маси сировини підвищить вихід колагену [54]. Збільшення витрат ферменту понад 10 % від маси колагенвмісної сировини може призвести до розщеплення пептидів і, відповідно, до зменшення ефективності екстрагування колагену.

При використанні пепсину доцільно під час екстрагування підтримувати температуру $4-10^{\circ}C$. Вказаний температурний режим сприяє розщеплюванню пепсином поперечних зв'язків в потрібній спіралі колагену, без пошкодження структури пептидів в цілому.

Тривалість екстрагування складає 96 год. Тривалість екстрагування залежить від процесів дифузії в системі. Зі збільшенням часу екстрагування

збільшується і вихід колагену. Але слід зауважити, що надмірна тривалість екстрагування може призвести до деградації екстрагованих пептидів.

Очищення екстрагованого колагену передбачає здійснення кількох стадій.

На першій стадії осад з екстракційної маси видаляють сепаруванням. Сепарацію здійснюють впродовж 20 хв. за температури 4°C на швидкості 10000 об./хв.

В отриманий розчин вводять 1,0 М NaOH до отримання ізотонічного розчину (рН 7,5) і витримують 3 год. за температури 4°C. Колаген відділяють від розчину сепарацією.

Кінцевий продукт одержують шляхом відмивання від можливих залишків солей та пепсину. Колаген двічі промивають триразовим об'ємом етанолу та висушують для отримання цільового продукту.

Вихід колагену за технологією складає 3,0 % по відношенню до вихідної сировини.

Технологічна схема отримання колагену методом ферментативного гідролізу представлена на рис. 2.4.

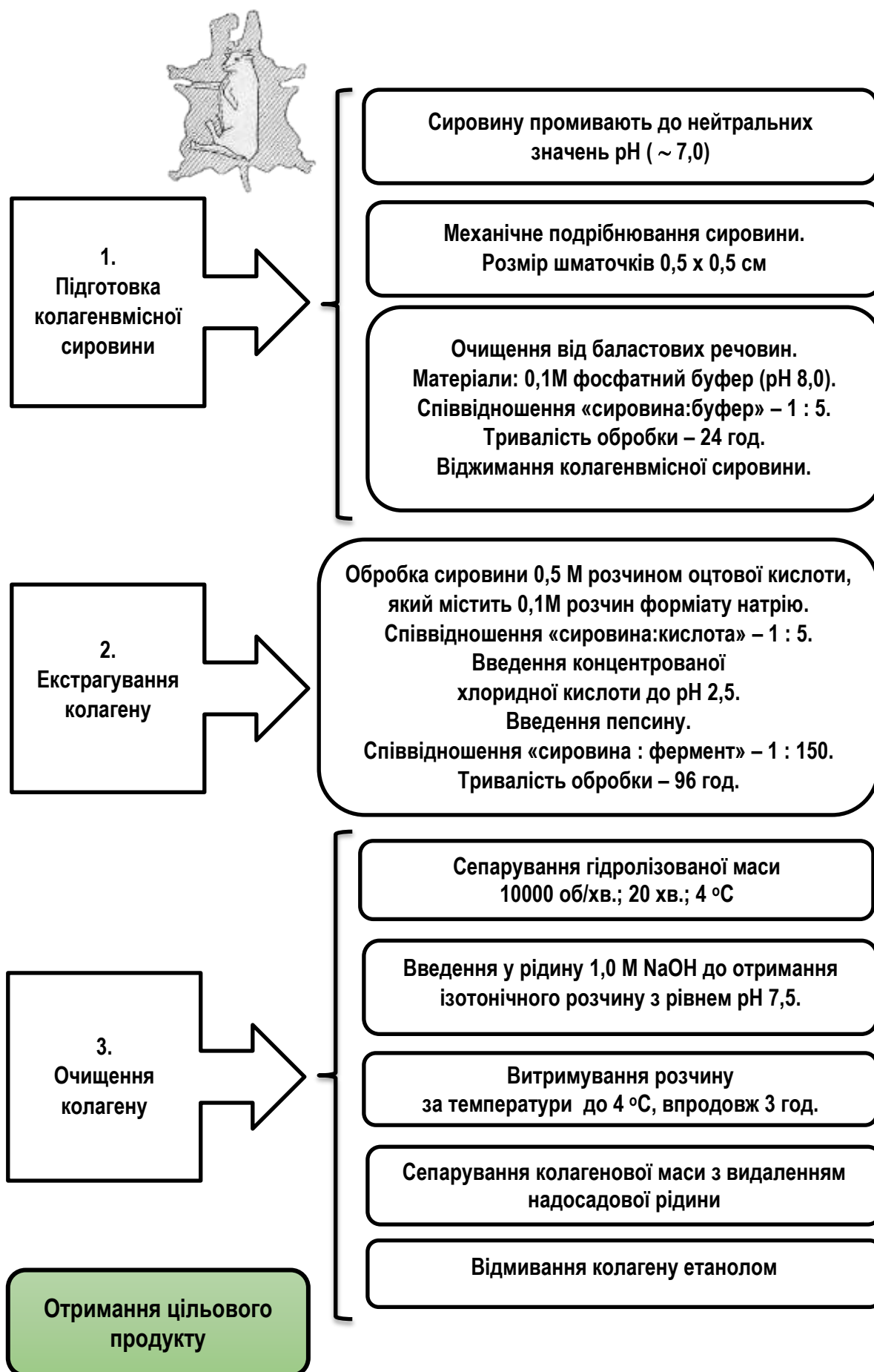


Рисунок 2.4 – Блок-схема виробництва колагену [53]

2.3.3 Обґрунтування вибору технологічного обладнання для отримання колагену методом ферментативного гідролізу

Цільовим продуктом технології є висушена маса колагену.

Технологія передбачає попереднє подрібнення колагенвмісної сировини. Для здійснення механічної операції запропоновано використання куттеру марки HR-12 FROSTY (Італія) [55].

FROSTY HR-12 (рис. 2.5) призначений для подрібнення. Ступінь подрібнення (крупно-, середньо-, дрібнорублені матеріали) залежить від часу роботи.

Корпус куттера виконаний з нержавіючої сталі. Діжа і ножі – з нержавіючої сталі.

Основні характеристики куттера HR-12 FROSTY (Італія):

Об'єм чаші, л: 12.

Кількість швидкостей: регульована швидкість.

Швидкість обертання, об/хв.: 700-2200.

Розмір чаші, мм: 253x253x250.

Габарити, мм: 480x320x445.

Напруга, В: 220.

Потужність, кВт: 0,95.

Вага, кг: 22,1.



Рисунок 2.5 – Загальний вигляд куттеру типу HR-12 FROSTY (Італія)

Безумовною перевагою даної моделі серед інших моделей, розрахованих на більший об'єм у 24 л, є можливість регулювання швидкості обертання ножів. Слід також відмітити матеріал, з якого виготовлена чаша куттера HR-12 FROSTY. На відміну від куттера з більшим об'ємом, у якого чаша виготовлена з алюмінію, чаша обраного обладнання виготовлена з нержавіючої сталі.

Зважаючи на те, що екстрагування колагену проводять ферментом, а цільовий продукт може бути використаний у біомедичній галузі, для здійснення процесу обрано обладнання з нержавіючої сталі українського виробника – компанії «Стройторгсервіс» (Україна, м. Дніпро) [56].

Технологічні реактори STS Group (рис. 2.6) застосовують для виробництв, на яких відбувається змішування інгредієнтів, відстоювання, охолодження та/або нагрівання, віджимання, зберігання.



Рисунок 2.6 – Загальний вигляд технологічного реактору стандарту GMP від STS Group (Україна)

Технологічний реактор обладнаний мікрокомп'ютером та панеллю оператора. Вказані пристрої дають можливість контролювати інформацію з усіх датчиків, встановлених на обладнанні. Керування необхідними параметрами технологічного регламенту (температура, тривалість тощо) можливе також через наявний сенсорний інтерфейс. Мікрокомп'ютер може містити програми різних технологічних процесів, і взаємодіяти з периферійними пристроями за допомогою мережевого з'єднання. Інформацію про стан реакторів, які встановлені на всьому виробництві, можна виводити на один комп'ютер, контролювати і обробляти її.

Реакційна камера реактору вироблена з нержавіючої сталі марки AISI 316L.

Технологічний реактор обладнаний:

- сорочкою для охолодження (вода, холодоагент);
- сорочкою для нагрівання;
- системами подачі та відведення реагентів;
- автоматикою, що керує технологічними процесами;
- датчиками і вимірювальним обладнанням;
- панеллю управління;
- мікрокомп'ютером.

Додатково (за потреби) технологічний реактор може бути доукомплектований:

- пристроєм для вивантаження суміші шляхом перекодування чаші;
- мішалкою;
- гомогенизатором.

Відділення рідкої та твердої фаз при здійсненні ферментативного гідролізу проводять центрифугуванням або сепаруванням.

Для досягнення максимального відділення рідкої фази запропоновано використання сепаратора типу Culturefuge виробництва фірми Alfa Laval [57] (рис. 2.7).



Рисунок 2.7 – Загальний вигляд сепаратору типу Culturefuge 100

Culturefuge – це серія унікальних герметичних клітинних центрифуг із нижньою подачею. Culturefuge відносять до біофармацевтичних сепараторів (або повних систем розділення), розроблених спеціально для м'якого збору осаджених білків, клітинних культур клітин ссавців, мікробних клітин тощо. М'яке та ефективне прискорення подачі дозволяє уникнути руйнування чутливих до зсуву мембран клітинних стінок, що робить подальше очищення цільових білків легшим і економічно ефективнішим.

Переваги вибору Culturefuge Alfa Laval очевидні:

- незмінна якість продукту, повністю герметичні умови роботи сепаратора, дотримання високого рівня санітарних та гігієнічних вимог у роботі обладнання;
- зменшення ризику зсуву та забруднення – унікальне порожнисте веретено забезпечує дуже м'яке відділення клітин;
- матеріали, з яких виготовлене обладнання, відповідають нормативним вимогам з можливістю автоматичного очищення та санітарної обробки за допомогою систем CIP та/або SIP.

Сепаратор складається з рами з горизонтальним приводним валом і черв'ячною передачею. Всі деталі сепаратору, що контактують із технологічною рідиною, виготовлені з нержавіючої сталі. Ємність дискового

типу для відведення твердих частинок оснащено автоматичною гідравлічною системою розвантаження. Це так звана система часткового розвантаження, що запускається за таймером. Розвантаження відбувається на повній швидкості без переривання подачі.

Culturefuge оснащено електродвигуном стандартного типу із вбудованим частотно-регульованим приводом. Обладнання оснащено блоком керування; форсунками для промивання верху чаші, дна чаші і циклону.

Принцип роботи сепаратору полягає у тому, що більш важка фаза збирається на периферії чаші, звідки вона періодично виводиться через центрифужний циклон (рис. 2.8). Тверді речовини вивантажуються за допомогою гідравлічної системи під роздільним простором у чаші.

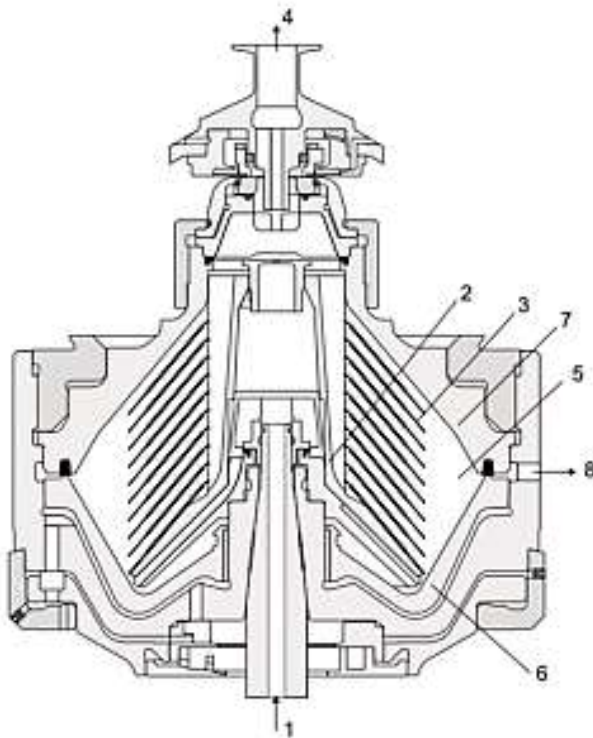


Рисунок 2.8 – Технологічна схема сепаратору типу Culturefuge 100 (Швеція):

- 1 – порожниста вісь для введення продукту;**
- 2 – розетка;**
- 3 – диски;**
- 4 – система для виведення рідини;**
- 5 – простір для твердої фази;**
- 6 – дно чаші;**
- 7 – кришка чаші;**
- 8 – система для виведення твердих речовин**

Продукт подається в обертову чашу вниз центрифуги через порожнисту вісь (1) і прискорюється в розетці (2) перед тем, як потрапити у пакет дисків (3), де і відбувається розділення. Відокремлена рідка фаза виводиться через отвір для рідини (4) у верхній частині чаші. Відділені тверді речовини накопичуються у виділеному просторі (5) та періодично виводяться

через технологічні отвори (8). Основні технічні характеристики обладнання представлені у табл. 2.4.

Таблиця 2.4

Технічні характеристики Culturefuge 100

№	Характеристика	Рівень показника
1	Гідравлічна потужність	макс. 2,0 м ³ /год.
2	G-сила	макс. 12200 г
3	Швидкість чаші	макс. 9650 об / хв.
4	Встановлена потужність двигуна	7,5 кВт
5	Рівень шуму	74 дБ
6	Вантажопідйомність підйомника	мін.100 кг
7	Споживання електроенергії	5,5 кВт/год.
8	Потреба води для охолодження	макс. 300 л/год.
9	Потреба у парі для стерілізації	5–10 кг
10	Вага обладнання	до 600 кг

Для висушування готового продукту запропоноване використання сублімаційного сушіння (ліофілізації) у сушарці камерного типу.

Сублімаційне сушіння передбачає проведення трьох послідовних етапів: підготовки, заморожування, сублімації.

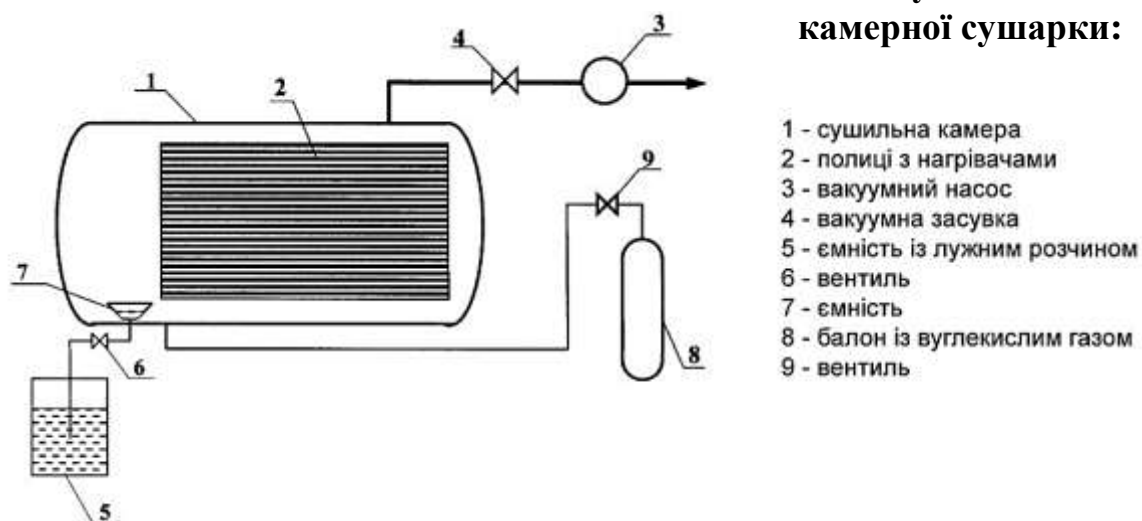
На етапі підготовки до ліофілізації продукт рівномірно розподіляють по лотках сушарки. Слід пам'ятати, що чим тоншим шаром у сушарці буде розміщено продукт, тим швидше пройде процес сушіння. Але при цьому використання енергозатратної сушарки стане економічно не вигідним.

На етапі заморожування у камері сушарки створюють вакуум і охолоджують продукти до температури їх затвердіння. За оптимальної швидкості і глибини проморожування продукту утворюються дуже дрібні кристали льоду, які швидше будуть перетворюватися на пар.

На етапі сублімування продукту відбувається повільний нагрів замороженого продукту до точки переходу льоду у пар.

З конструктивної точки зору, камерна сублімаційна сушарка (рис. 2.9) є комбінацією кількох систем: холодильної, вакуумної, рециркуляції тепла, висушування.

Рисунок 2.9 – Технологічна схема сублімаційної камерної сушарки:



Для технології запропоновано використання сублімаційної сушарки FD80 (рис. 2.10) виробництва корпорації Cuddon Freeze Dry (Нова Зеландія).



Рисунок 2.10 – Загальний вигляд сублімаційної сушарки типу Cuddon FD80

Обране обладнання характеризується загальною площею полиць 9 м^2 і класифікується як сушарка загального призначення. Тобто сушарку можна використати для висушування різноманітних біологічних, фармацевтичних, харчових продуктів. Основні технічні характеристики сушарки представлені у табл. 2.5 [58].

Таблиця 2.5

Технічні характеристики сублімаційної сушарка Cuddon FD80

№	Характеристика	Рівень показника
1	Камера, м: довжина x ширина x висота	2,41 x 1,1 x 2,01
2	Ємність конденсатора пари	80 кг за 24 год.
3	Кількість полиць в 1 модулі	10 нагрівальних пластин
4	Корисна площа полиці, м^2	9
5	Ємність льоду, кг	80
6	Розміри полиці при її глибині 1730 мм	7 – 620 мм, 1 – 550 мм, 1 – 480 мм
7	Відстань між полицями, мм	35
8	Температура полиці, $^{\circ}\text{C}$	від -20 до +70
9	Низькотемпературна модель	замерзання полиці до $-35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ і температура конденсатора пари $-55 \text{ }^{\circ}\text{C}$
10	Швидкість охолодження полиці з $+40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ до $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$, хв.	≤ 60
11	Швидкість нагріву полиці, $^{\circ}\text{C}/\text{хв.}$	1
12	Споживання енергії	2 кВт/кг вологого продукту
13	Нагрів / охолодження	холодоагент гліколь
14	Вимоги до живлення	12 кВт, 50 або 60 Гц, 3 фази
15	Вага, кг	1900

Отриманий за технологією сухий цільовий продукт можна зберігати у холодильних камерах у герметичних ємностях з нержавіючої сталі або пластикових вакуумних пакетах.

Висновки до розділу 2

В основу роботи закладено технологію отримання колагену з сировини тваринного походження. Запропоновано використання побічних продуктів контурування шкур великої рогатої худоби на м'ясокомбінатах. Запропоновано використання в технології ферменту первинної дії – пепсину, який каталізує гідроліз зв'язків між ланцюгами колагену, не пошкоджуючи при цьому сам пептид.

Екстрагування колагену ферментами відбувається за «гібридною» технологією, яка передбачає подрібнення сировини; очищення сировини від баластових речовин; екстрагування колагену шляхом обробки сировини сумішшю оцтової кислоти, хлоридної кислоти, формиату натрію, пепсину; очищення колагену шляхом інактивації пепсину; отримання цільового продукту.

Наведений загальний опис, характеристики, принцип роботи та переваги обладнання, яке запропоновано до застосування для екстрагування колагену.

РОЗДІЛ 3

КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Поділ технологічного циклу на окремі стадії передбачає наявність на виробництві стадії допоміжних робіт (ДР), та стадії основного технологічного процесу (ТП).

3.1 Контроль на стадії реалізації методу ферментативного гідролізу

Технологічний цикл починають зі стадії допоміжних робіт. Стадія ДР передбачає підготовку приміщень, персоналу, обладнання для здійснення технологічного циклу.

Контроль на виробництві починають з перевірки чистоти персоналу та усіх виробничих приміщень. Технолог здійснює перевірку візуально.

Наступний етап контролю – перевірка обладнання. Після миття, дезінфекції, стерилізації проводять перевірку обладнання.

Технолог та/або оператор проводять технічний огляд з метою виявлення й виправлення неполадок та підготовки обладнання/оснащення до проведення технологічного циклу. Технічний огляд здійснюють відповідно технологічному регламенту.

Перевірку якості колагенвмісної сировини здійснює лабораторія.

Спираючись на досвід Європейського Союзу, відповідно до додатку I п. 7.8. Регламенту Європейського Союзу (ЄС) № 853/2004 Європейського Парламенту та Ради від 29 квітня 2004 року, «колаген» означає продукт на білковій основі, отриманий з кісток, шкір, шкур і сухожилів тварин, вироблений відповідно до відповідних вимог цього Регламенту [48].

Відповідно до ст. 7 Делегованого Регламенту Комісії (ЄС) 2019/625, сировиною для виробництва колагену є сировина, що не пройшла ніяких процесів консервації, крім охолодження, заморожування або швидкого заморожування. Окрім того, колаген може бути виготовлений з сировини,

отриманої на бойнях, м'ясообробних підприємствах або підприємствах, що працюють у сфері рибних продуктів.

Колагенові волокна мають форму потрійної спіралі, стабілізованої міжмолекулярними та внутрішньомолекулярними зв'язками. При цьому колагенові волокна нерозчинні у воді. Тому для здійснення екстрагування передбачено використання методів, що збільшують розчинність колагену та виконують ізоляцію його структур.

Ферментативний «гібридний» гідроліз передбачає використання природних ферментів рослинного або тваринного походження. Ферменти «розрізають» білковий ланцюг, утворюючи вільні, неушкоджені і повністю активні молекули трьохспіральної спіралі. Ферментативний гідроліз відрізняється стабільністю здійснення методу і високою якістю цільового продукту.

Кілька факторів відіграють вирішальну роль в ефективності методу ферментативного «гібридного» гідролізу:

- концентрація пепсину,
- час здійснення гідролізу,
- температура здійснення гідролізу,
- співвідношення «оцтова кислота : фермент»,
- співвідношення «об'єм рідини : колагенвмісна сировина».

Підвищення концентрації пепсину до 1200 ОД/г призводить до різкого збільшення виходу колагену (до 80 %).

Від тривалості гідролізу ферментом залежить вихід колагену, але надмірне збільшення часу впливу ферменту на колагенвмісну сировину, призводить до руйнування частини трьохспіральних спіралей.

При використанні для гідролізу пепсину слід пам'ятати, що за високої температури 60°C пепсин різко знижує свою активність, а при 90°C – повністю дезактивується.

Співвідношення кислоти та пепсину для здійснення гідролізу впливає на вихід колагену. Співвідношення доводиться підбирати для кожного виду сировини окремо. Адже різний вплив активних реагентів на колагенову структуру оброблюваної сировини залежить від її виду, віку, характеру попередньої підготовки тощо. Вважають [59], що оптимальне співвідношення «оцтова кислота : фермент» складає 0,7 М розчин оцтової кислоти : 1,0 % пепсину відповідно. Вихід екстрагованого колагену, що був отриманий при вказаному вище співвідношенні, складає 6,18 % маси сировини.

При здійсненні екстрагування суттєвим чинником виходу колагену з сировини є співвідношення «об'єм рідини : колагенвмісна сировина». Вказане співвідношення залежить від ступеня подрібнення сировини, її виду, походження, особливостей структури. Співвідношення «об'єм рідини : колагенвмісна сировина» для екстрагування може коливатися в межах від 1:10 до 1:50 відповідно. Слід зауважити, що при збільшенні кількості розчинника, колагенвмісна сировина піддається впливу більшої кількості «свіжого» розчину. При цьому підвищується швидкість екстрагування колагену.

Зважаючи на те, що у технології використовують сировину тваринного походження законсервовану охолодженням, перед екстрагуванням обов'язково проводять гістолого-бактеріологічний контроль [60]. Вказаний контроль дозволяє встановити присутність на сировині мікроорганізмів та її бактеріальне пошкодження, морфологічні зміни структури сировини тощо.

Для вивчення структури колагенвмісної сировини в лабораторії підприємства застосовують мікроскопічні дослідження. Для дослідження готують з сировини препарати товщиною 10-60 мкм. Препарати є зрізами, отриманими на мікротомі.

Для контрастування окремих елементів отриманого зрізу проводять його фарбування. Для фарбування використовують гематоксилін (0,1–1,0 %)

з еозином (1,0 %). Колагенові волокна при вказаному фарбуванні зафарбовуються у рожевий колір.

Для дослідження *загальної структури сировини* використовують фарбування зрізів резорцин-фуксином з пікриною кислотою та гематоксиліном. Колагенові волокна при вказаному фарбуванні зафарбовуються у червоний колір, еластинові – у чорний.

Наявність бактеріального пошкодження сировини можна визначити при фарбуванні за кількома методиками:

1 методика. Застосування фуксину кислотного та метиленового блакитного.

Небактеріальна сировина: колагенові волокна, зафарбовані фуксином, мають червоне забарвлення, міжволоконні білки та епідерміс, зафарбовані метиленовим блакитним, – зелено-синє забарвлення. У випадку, коли колагенові волокна теж зафарбовуються метиленовим блакитним, роблять висновок про процеси розкладання білків у сировині внаслідок автолізу або інших причин.

2 методика. Застосування метиленового блакитного з еозином.

Бактеріальна сировина: бактерії зафарбовані у інтенсивний фіолетовий колір. Кулясті та/або паличкоподібні форми бактерій чітко виділяються на рожевому кольорі, в який зафарбований за цією методикою колаген.

3 методика. Спосіб Вайгерта.

Небактеріальна сировина: еластинові волокна, зафарбовані фуксином Вайгерта, мають чорне забарвлення.

Бактеріальність сировини можна також визначити за так званою редуктазною пробою. Метод дослідження заснований на тому, що бактерії у сировині у результаті своєї життєдіяльності виділяють ферменти, наприклад, редуктазу. Кількісне визначення редуктази ведуть за допомогою барвників метилового синього або резаурину. Редуктаза здатна знебарвлювати розчини вказаних барвників.

Для дослідження сировину промивають, зрізують з неї волосяний покрив (якщо він наявний), подрібнюють, розтирають та вміщують у пробірки з фізіологічним розчином. Маса наважки досліджуваної сировини складає 1 грам, об'єм фізіологічного розчину – 10 мл.

Пробірки інкубують впродовж 3 годин за температури 37°C. По закінченні часу, в пробірки додають 1,0 % розчин згаданого вище барвника, вміст пробірок перемішують і витримують у термостаті ще 1 годину. Ступінь бактеріальності сировини визначають за кольоровою шкалою, відповідно контрольного досліді – пробірки з фізіологічним розчином без сировини.

Забарвлення проби за станом колагенвмісної сировини:

- нормальний – синьо-бузкове;
- задовільний – рожево-бузкове;
- поганий – яскраво-рожеве;
- дуже поганий – знебарвлено понад 25 % стовпця проби у пробірці.

Кількість бактерій в 1 г досліджуваного зразка становить, 10^6 :

- нормальний – 0-20;
- задовільний – 21-40;
- поганий – 41-70;
- дуже поганий – понад 70.

У більшості випадків ферментативний гідроліз проходить кількісно і процес не потребує спеціального контролю. Використовуване для здійснення технології обладнання оснащено електронними комп'ютеризованими системами контролю всіх технологічних параметрів. Наприклад, використання у технологічному циклі сепаратора Alfa Laval дозволяє корегувати необхідну швидкість потоку, задавати параметри абсолютної стерильності та повної герметичності.

3.2 Контроль цільового продукту

Визначення основних характеристик колагену передбачає використання комплексу методів для оцінювання структурних, хімічних і морфологічних властивостей цільового продукту.

Фур'є–ІЧ–спектроскопія (Фур'є-ІЧС).

Для якісного аналізу колагену та отримання даних про його чистоту, визначення типу білка та його хімічного складу, використовують Фур'є–ІЧ–спектроскопію Фур'є–ІЧС.

Дослідження цільового продукту методом Фур'є–ІЧС широко застосовують саме для ідентифікації колагену І типу, екстрагованого «гібридним» методом, який передбачає застосування оцтової кислоти та пепсину [61]. Метод дозволяє виявити наявність у зразку потрійних спіралей, які не були пошкоджені при гідролізі.

Для дослідження використовують ІЧ-Фур'є спектрометри (інтерферометри). В основі роботи будь-якого ІЧ-Фур'є спектрометра лежить процес взаємодії речовини з інфрачервоним світлом, у результаті якої частина випромінювання поглинається зразком, а частина пропускається через зразок. Результуючий сигнал на детекторі – спектр, який містить область молекулярної характеристики зразка.

Електрофорез.

Електрофорез – метод розділення заряджених частинок в електричному полі. Принцип методу розділення полягає у здатності молекул у зарядженій формі (катіони та аніони) пересуватися в електричному полі з визначеною швидкістю.

Поліакриламідний гель (PAGE, ПААГ) маючи властивості молекулярного сита, забезпечує електрофоретичний поділ сумішей білків або за розміром частинок, або за формою частинок, або за їх зарядом.

Нативний електрофорез у ПААГ застосовують для поділу білків у нативному стані, у тому числі, коли необхідно зберегти ферментативну або іншу функціональну активність білків. При цьому електрофоретична рухливість білка у нативному стані залежить від: молекулярної маси, просторової конфігурації поліпептидного ланцюга, сумарного заряду.

Зміною концентрації ПААГ при електрофорезі можна досягти визначення білків різної молекулярної маси (табл. 3.1)

Таблиця 3.1

**Концентрація поліакриламідну для визначення білків
різної молекулярної маси**

№	Розмір білка, кДа	Концентрація поліакриламідну, %
1	36–205	5,0
2	24–205	7,5
3	14–205	10,0
4	14–66	12,5
5	10–45	15,0

У випадках, коли потрібно фракціонувати білки виключно за молекулярною масою, застосовують електрофорез з використанням додецилсульфату натрію (англ. «sodium dodecyl sulfate» – SDS) на поліакриламідному гелі (SDS–PAGE). Метод застосовують для розділення білків молекулярної маси 5 – 250 кДа.

Завдяки гідрофобним взаємодіям аніони SDS, які несуть на собі від'ємний заряд, сорбуються на білках. В результаті сорбції будь-який поліпептид перетворюється на нерозгалужений стрижень з від'ємним зарядом, величина якого значно перевищує заряд білкової молекули. З переважною більшістю білків SDS зв'язується у співвідношенні 1,4 мг SDS на 1 мг білка. Зважаючи на те, що у присутності SDS співвідношення «розмір : заряд» стає практично однаковим для будь-якого білка, поділ відбувається виключно за молекулярною масою.

Згаданий метод дозволяє також ідентифікувати колаген за сировиною, з якого його було екстраговано, або за амінокислотними послідовностями в

різних типах колагену. Наприклад, колаген I типу складається з двох ланцюгів $\alpha-1$ і одного ланцюга $\alpha-2$, колаген II типу складається з трьох ланцюгів $\alpha-1$ [62].

Ідентифікація амінокислот у зразках колагену

Для кількісної оцінки наявності амінокислот у зразках екстрагованого колагену використовують хроматографічні методи. Відомо [63], що колаген I типу містить: гідроксипролін, пролін, гліцин, аланін.

Розділення амінокислот проводять за допомогою іонообмінної хроматографії на сульфополістиролових смолах.

Ідентифікацію та кількісне визначення окремих амінокислот здійснюють за допомогою реакції з нінгідрином або флуорескаміном.

Амінокислотний склад отриманого колагену можна досліджувати інструментальним методом, застосовуючи аналізатор амінокислотного складу (секвенатор).

Секвенатор – це прилад, який використовують для визначення амінокислотного складу або вмісту білків, пептидів тощо. Аналізатор амінокислот використовує розділення катіонообмінною хроматографією та постколонкову дериватизацію з нінгідрином для аналізу вмісту білкового гідролізату та різних компонентів вільних амінокислот.

Завдяки відмінності в структурі, кислотності, полярності та розміру молекул амінокислотних компонентів їх можна відокремити від катіонообмінної колонки. Амінокислотні компоненти можна послідовно елюювати, використовуючи буфери з різною концентрацією рН іонів, а потім змішувати один за одним з іншим потоком нінгідринового реагенту, після чого вони разом перетікають у спіральну реакційну трубку. Реакція прояву кольору здійснюється при певній температурі, як правило, від 115 до 120°C, що призводить до утворення синьо-фіолетового продукту з максимальним поглинанням при 570 нм. Гідроксипролін реагує з нінгідрином з утворенням жовтого продукту з максимальним поглинанням при 440 нм.

В роботі запропоновано використання аналізатору амінокислот ARACUS (Німеччина) (рис. 3.1).



Рисунок 3.1 – Загальний вигляд класичного аналізатору амінокислот марки ARACUS «classic» (Німеччина)

Робота даної системи [64] заснована на методі хроматографічного розділення амінокислот за допомогою іонообмінної хроматографії з подальшою постколонковою дериватизацією з нінгідрином і фотометричним визначенням за допомогою LED.

Система ARACUS «classic»:

- дозволяє безперервно аналізувати 96 зразків в охолоджуваному автосамплері;
- елюенти та розчин реагенту вибірково вибираються через клапани та ідеально змішуються один з одним;
- додавання нінгідрину забезпечує кількісний аналіз;
- процедура промивання ін'єкційного клапана та шприцевого насоса дозволяє уникнути перехресного забруднення;
- рівень окремих реагентів можна контролювати під час аналізу і попереджати користувача, якщо їх кількості стає недостатньо;
- застосовується буферна система без вмісту хлоридів і цитратів – менш агресивна до компонентів трубок для транспортування рідини, фітингів і з'єднань;
- невелика витрата елюенту (близько 200 мкл/хв. в режимі аналізу);
- висока чутливість амінокислот;
- вибір двох рівнів детектора чутливості;

- датчики рівня для елюентів попереджають користувача, якщо необхідний об'єм рідини занадто малий для запланованого аналізу
- легкий доступ до всіх компонентів всієї системи.

Мікробіологічний аналіз цільового продукту

Дослідження на наявність *E. coli*.

В залежності від патогенності *E. coli* поділяють на: умовно-патогенні та патогенні. Морфологія: грамнегативні поліморфні палички.

Ферментативна активність: сахаролітичні властивості – розщеплюють вуглеводи, лактозу до кислоти та газу; протеолітичні властивості – розщеплюють пептон до індолу [65].

Відповідно до мікробіологічних методів контролю з наважки цільового продукту виділяють мікроорганізми, висівають їх на поживне середовище, термостатують, підраховують число колоній, що виростили.

Наприклад, посіви на агаризованому та рідкому середовищі інкубують за температури $36\pm 1^\circ\text{C}$ впродовж 24–48 год. Чашки Петрі інкубують дном угору. Посіви проглядають через дві доби. Позитивними вважають посіви, у яких спостерігається помутніння середовища, утворення газу, зміна кольору середовища.

Культивування *E. coli* проводять за температури $36\text{--}43^\circ\text{C}$ на поживних середовищах: МПА, МПБ, Ендо, ЕМС.

Культуральні властивості: на МПА ростуть мутні випуклі колонії, на Ендо – від блідо-рожевих до темно-червоних; на ЕМС – фіолетові, на МПБ – спостерігається каламутність й осад.

Для ідентифікації у цільовому продукті наявності *E. coli* можна використати зонди барвники. Для дослідження у зразок цільового продукту вводять розчин родаміну, після чого реєструють інтенсивність його флуоресценції у присутності бактерій, порівнюючи з інтенсивністю флуоресценції стандартного розчину індикатора (наприклад, резаурину) за

тієї ж самої довжини хвилі. За результатами вимірювання роблять висновок про відсутність або наявність мікроорганізмів у досліджуваному зразку.

Дослідження на наявність мікроорганізмів роду *Staphylococcus*

Морфологія: кулясті, подібні до грон винограду.

Ферментативна активність: сахаролітичні властивості – розщеплення вуглеводів до кислоти, протеолітичні – розріджують желатин та розщеплюють казеїн [66].

Культуральні властивості: дрібні або середніх розмірів колонії, випуклі, непрозорі, круглі, блискучі, білого або жовтого кольору.

Культивування проводять за температури 37 °С та рН 7,2–7,4 на поживних середовищах: МПА, МПБ, ЖСА, сольовий бульйон, КА.

Для попереднього виявлення застосовують мікроскопічний метод, за яким досліджують зразок, забарвлений за Грамом.

Подальше дослідження передбачає проведення реакції на виявлення каталази. Каталазну активність визначають в умовах кімнатної температури на предметному склі. На чисте, знежирене предметне скло наносять краплину 3 % розчину перекису водню, суспендують у ній досліджувану культуру. При наявності каталази на предметному склі у краплині суспензії в перші 2–3 секунди з'являються пухирці кисню. Незалежно від інтенсивності газоутворення реакція вважається позитивною.

При позитивній реакції на каталазу, культуру відсівають на середовища Хью–Лейфсона з глюкозою та манітом. Мета дослідження – визначення ферментації цукрів в анаеробних умовах. Для дослідження використовують автоклавоване середовище, розлите у пробірки. Пробірки витримують на водяній бані впродовж 20 хв., після чого різко охолоджують, заливають стерильною вазеліновою олією. Посів культур здійснюють уколом. Інкують посіви за температури 37°С впродовж 72 годин. При ферментації вуглеводів спостерігається зміна кольору пробірки з зеленого (або бурого) на

жовтий. Зміна кольору стовпчика у пробірці на висоту більше ніж $2/3$ є позитивною реакцією.

Висновки до розділу 3

1. У розділі наведено загальні відомості щодо стадій контролю у технологічному циклі екстрагування колагену.

2. Представлено вимоги до колагенвмісної сировини, застосовуваній у технології. Наведено можливі методи контролю структури сировини та її можливого бактеріального пошкодження.

3. Представлено основні методи контролю цільового продукту, які налічують: Фур'є–ІЧ–спектроскопію, електрофоретичні дослідження, дослідження амінокислотного складу, мікробіологічні дослідження.

ВИСНОВКИ

1. У роботі досліджено властивості колагену, його амінокислотний склад, особливості структури, а також способи його промислового виробництва. Досліджено різні способи отримання колагену; обґрунтовано сильні та слабкі сторони описаних способів.

2. Вивчено основні галузі застосування колагену та продуктів на його основі. Виявлено, що найбільшим споживачем колагену на даний час є сегмент ринку з виробництва косметичних засобів.

3. Колаген пропонується отримувати з сировини тваринного походження – обрізі шкір великої рогатої худоби (побічних продуктів м'ясопереробних підприємств). Для екстрагування колагену запропоновано використання ферментативного «гібридного» гідролізу. В якості біологічного агенту для екстрагування запропоновано використання пепсину – ферменту первинної дії. Вивчено властивості ферменту. Обґрунтована придатність використання пепсину для екстрагування колагену.

4. Обґрунтовано технологічну схему отримання колагену.

5. Для реалізації технології ферментативного гідролізу запропоновано використання куттеру марки HR-12 FROSTY, технологічного реактора (STS Group), сепаратора типу Culturefuge фірми Alfa Laval та сублімаційної сушарки Cuddon FD80 камерного типу.

6. Обґрунтовано методи контролю колагенвмісної сировини та цільового продукту. Вхідний контроль сировини передбачає підготовку приміщень, персоналу, обладнання; перевірку колагенвмісної сировини в лабораторії та проведення гістолого-бактеріального контролю. Контроль цільового продукту налічує такі методики визначення: Фур'є-ІЧ-спектроскопію, електрофорез, аналіз амінокислотного складу та мікробіологічний аналіз.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Polymer Science : A Comprehensive Reference. Amsterdam : Elsevier, 2012. P. 793.
2. Чи всім потрібен додатковий колаген і де його брати? URL: <https://med-expert.com.ua/journals/ua/news/chi-vsime-potribnij-dodatkovij-kolagen-de-jogo-brati/> (дата звернення: 05.08.2022).
3. Collagen Molecular Structure. URL: <https://www.news-medical.net/health/Collagen-Molecular-Structure.aspx> (Date of access: 05.08.2022).
4. Біохімія сполучної тканини: будова, властивості, функції, регуляція, патологія. URL: <https://tdmuv.com.htm> (дата звернення: 05.08.2022).
5. David W. Brett. A Historical Review of Enzymatic Debridement: Revisited : e-books. 2019. 51 p. URL: <https://www.heighpubs.org/e-books/hspc-ebook-1001.pdf> (Date of access: 05.08.2022).
6. Collagen structure and stability. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2846778/> (Date of access: 07.08.2022).
7. Bella J., Eaton M., Brodsky B., Berman H. M. Crystal and molecular structure of a collagen-like peptide at 1.9 Å resolution. *Science*. 1994. Vol. 266. P. 75–81.
8. Berisio R., Vitagliano L., Mazzarella L., Zagari A. Crystal structure of the collagen triple helix model [(Pro-Pro-Gly)₁₀]₃. *Protein Sci*. 2002. № 11. P. 262–270.
9. Brazel D. et al. Completion of the amino acid sequence of the α1 chain of human basement membrane collagen (type IV) reveals 21 nontriplet interruptions located within the collagenous domain. *Eur. J. Biochem*. 1987. Vol. 168. P. 529–536.

10. Ramshaw J., Shah N., Brodsky B. Gly-X-Y tripeptide frequencies in collagen: a context for host-guest triple-helical peptides. *J. Struct. Biol.* 1998. Vol. 122. P. 86–91.
11. Collagen. URL: <https://my.clevelandclinic.org/health/articles/23089-collagen> (Date of access: 10.08.2022).
12. Collagen Synthesis. URL: <https://www.news-medical.net/health/Collagen-Synthesis.aspx> (Date of access: 10.08.2022).
13. Best Types of Collagen and Their Bodywide Benefits. URL: <https://ancientnutrition.com/blogs/all/collagen-types> (Date of access: 10.08.2022).
14. Екстрагування. URL: <https://ulanovskyi.blogspot.com/2020/04/19-53.html> (дата звернення: 11.08.2022).
15. Prestes R.C. Colageno e seus derivados: características e aplicagoes em produtos carneos. *Revista Unopar Cientffica Ciencias Biologicas e da Saüde.* 2013. Vol. 15(1). P. 65–74.
16. Дорофій А. В. Застосування колагену в косметичних засобах. *Хімія, біо- і нанотехнології, екологія та економіка в харчовій та косметичній промисловості*: зб. матеріалів доп. учасн. IX Міжнар. наук.-практ. конф. Харків : НФУ «ХП», 2021. С. 127–130.
17. Гідролізат колагену в косметиці. URL: <https://organic-store.in.ua/beauty/79-hidrolizat-kolahenu-v-kosmetytsi.html> (дата звернення: 12.08.2022).
18. Мосан Е., Тагадиус О., Насу В. Aspects of Collagen Isolation Procedure. *Clinical Research Studies.* 2011. № 2(320). P. 3–5.
19. Дорофій А. В., Охмат О. А., Чистилін К. О. Екстрагування колагену ферментами та органічними кислотами. *Проблеми та досягнення сучасної біотехнології*: зб. матеріалів доп. учасн. II Міжнар. наук.-практ. інтер.-конф. Харків: НФУ, 2022. С. 98–99.
20. Liu D., Wei G., Li T., Hu J., Lu N., Regenstein J. M., Zhou P. Effects of alkaline pretreatments and acid extraction conditions on the acid-soluble

collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *Food Chemistry*. 2015. Vol.172. P. 836–843.

21. Wang L., Liang Q., Chen T., Wang Z., Xu J., Ma H. Characterization of collagen from the skin of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). *Food Hydrocolloids*. 2014. Vol. 38. P. 104–109.

22. Method of preparation of tissue engineering and cell cultivation collagen by acid extraction of calf skin. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20799626/> (Date of access: 14.08.2022).

23. Biomedical applications of collagen. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11397563/#:~:text=The%20main%20applications%20of%20collagen,transdermal%20delivery%2C%20and%20nanoparticles%20for> (Date of access: 14.08.2022).

24. Comparative Evaluation of the Effectiveness of Novel Hyaluronic Acid-Polynucleotide Complex Dermal Filler. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7083941/> (Date of access: 14.08.2022).

25. Biomaterials in Maxillofacial Surgery: Membranes and Grafts. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3614823/> (Date of access: 15.08.2022).

26. Collagen in Wound Healing. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8151502/> (Date of access: 15.08.2022).

27. 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. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30122200/> (Date of access: 17.08.2022).

28. Cejas M. A., Chen C., Kinney W. A., Maryanoff B. E. Nanoparticles that display short collagen-related peptides. Potent stimulation of human platelet aggregation by triple helical motifs. *Bioconjug. Chem.* 2007. № 18. P. 1025–1027.

29. Mo X., An Y., Yun C-S., Yu S. M. Nanoparticle-assisted visualization of binding interactions between collagen mimetic peptides and collagen fibers. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2006. № 45. P. 2267–2270.
30. Cejas M. A., Kinney W. A., Chen C., Vinter J. G., Almond HR J., et al.. Thrombogenic collagen-mimetic peptides: self-assembly of triple helix-based fibrils driven by hydrophobic interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. № 105. P. 8513–8518.
31. Wang A. Y., Foss C. A., Leong S., Mo X., Pomper M. G., Yu S. M. Spatio-temporal modification of collagen scaffolds mediated by triple helical propensity. *Biomacromolecules.* 2008. № 9. P. 1755–1763.
32. What is collagen, and why do people use it? URL:<https://www.medicalnewstoday.com/articles/262881#collagenexplained> (Date of access: 17.08.2022).
33. Дорофій А. В., Охмат О. А. Шкіра людини та догляд за нею. *Проблеми та досягнення сучасної біотехнології*: матеріали I Міжнар. наук.-практ. Інтернет-конф. Харків : НФУ, 2021. С. 146.
34. Collagen. URL: <https://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/collagen/#:~:text=Collagen%20is%20the%20most%20abundant,muscles%2C%20tendons%2C%20and%20cartilage> (Date of access: 19.08.2022).
35. Collagen for Dogs & Other Pets: Top 5 Benefits + Recipes. URL: <https://draxe.com/pet-health/collagen-for-dogs/> (Date of access: 23.08.2022).
36. Efficacy of an oral hyaluronate and collagen supplement as a preventive treatment of elbow dysplasia. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4269601/> (Date of access: 24.08.2022).
37. Leaky Gut In Dogs: Heal With Home Remedies. URL: <https://www.dogsnaturallymagazine.com/leaky-gut-syndrome-in-dogs/> (Date of access: 25.08.2022).

38. Collagen Types and Linked Disorders. URL: <https://www.news-medical.net/health/Collagen-Types-and-Linked-Disorders.aspx> (Date of access: 25.08.2022).

39. Collagen Market (By Source: Bovine, Marine, Porcine, Poultry; By Product: Gelatin, Hydrolyzed collagen, Native collagen, Synthetic collagen; By Application: Food and Beverage, Healthcare, Pharmaceuticals, Nutraceuticals, Cosmetics, Others; By Type; By Form; By Product Category; By Function) - Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends, Regional Outlook, and Forecast 2022 – 2030 URL: <https://www.precedenceresearch.com/collagen-market> (Date of access: 25.08.2022).

40. Вітаміни з колагеном – види, як вибрати БАД, відгуки та результати прийому. URL:<http://radka.in.ua/zdorovya/vitamini-z-kolagenom-vidi-iak-vibra.html> (дата звернення 02.09.2022).

41. Joko Blend cosmetics. URL:<https://www.jokoblend.ua/page/about> (дата звернення 05.09.2022).

42. Notino. It's SkinCollagen. Зволожуючий ліфтинг-тонік з колагеном. URL:<https://www.notino.ua/its-skin/collagen-zvolozhujuchij-lifting-tonik-z-kolagenom/> (дата звернення 06.09.2022).

43. Tegoder cosmetics. URL:<https://tegoder.co.uk/pages/about-tegoder-cosmetics> (дата звернення 06.09.2022).

44. Notino.Académie Scientifique de BeautéBody. Омолоджуюче молочко для тіла з колагеном. URL:https://www.notino.ua/academie/body-omolodzhujuche-molochko-dlja-tila-z-kolagenom/p-16016827/?gclid=CjwKCAjwzNOaBhAcEiwAD7Tb6IXtfE3ZBO7R-3OtgBRx02foLkeWrTKgB7cSWyeLQtRc0idhsoRzXBoC0EIQAuD_BwE (дата звернення 11.09.2022).

45. Academie scientifique de beaute. URL:<https://www.academiebeaute.com/en/category/serums-boosters/sea-collagen-ampoules.html> (Date of access: 11.09.2022).

46. Mein Arztbedarf-Online Shop. URL: <https://meinarztbedarf.com> (Date of access: 12.09.2022).
47. Collagen effective in wound closure. URL: <https://www.sciencedaily.com/releases/2019/07/190708140044.htm> (Date of access: 12.09.2022).
48. Регламент Європейського Парламенту і Ради (ЄС) № 853/2004 від 29 квітня 2004 р. про встановлення спеціальних гігієнічних правил для харчових продуктів тваринного походження. URL: https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/994_a99#Text (дата звернення 17.09.2022).
49. Nutritional and Nutraceutical Improvement by Enzymatic Modification of Food Proteins. URL: <https://www.sciencedirect.com/topics/food-science/protein-hydrolysis> (Date of access: 17.09.2022).
50. Hua Yang and Zibin Shu. The extraction of collagen protein from pigskin. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 2014. Vol. 6 №2. P. 683-687.
51. Фізика та хімія протеїнів : конспект лекцій для студентів денної, заочної та заочно-дистанційної форм навчання, галузі знань 16 «Хімічна та біоінженерія» / Упор. О. А. Андреева. Київ : КНУТД, 2020. С. 113.
52. Журавський В. А., Касьян Е. Є., Данилкович А. Г. Технологія шкіри та хутра : підручник. Київ : ДАЛПУ, 1996. С. 744.
53. Спосіб одержання нативного колагену: пат. 20381А Україна: заявл. 15.07.1997; опубл. 27.02.1998, Бюл. № 1.
54. Sousa Rita O., et al. Acid and enzymatic extraction of collagen from Atlantic cod (*Gadus Morhua*) swim bladders envisaging health-related applications. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2020. № 31.1. P. 20-37
55. Frosty Italy. URL: <https://frosty.com.ua/> (Date of access 20.09.2022).
56. STS Group. URL: <https://stprom.com.ua/> (Date of access 20.09.2022).
57. Alfa Laval at COP27. URL: <https://www.alfalaval.com/> (Date of access 23.09.2022).

58. Cuddon freeze dry. URL: <https://www.cuddonfreezedry.com/> (Date of access 29.09.2022).
59. Junianto Junianto, et al. The influence of concentration of acetic acid and pepsin enzyme in Nile fish skin collagen extraction to the amount of yield produced. *World News of Natural Sciences*. 2018. № 21. P. 164-170.
60. Данилкович А. Г. Практикум з хімії та технології шкіри та хутра : навч. посіб. ; 2-ге видання. Київ : Фенікс, 2006. С. 340.
61. Fish Collagen: Extraction, Characterization, and Applications for Biomaterials Engineering. URL: <https://www.mdpi.com/2073-4360/12/10/2230/htm> (Date of access 05.10.2022).
62. Bielajew, B. J., Hu, J. C., & Athanasiou, K. A. (2020). Collagen: quantification, biomechanics and role of minor subtypes in cartilage. *Nature Reviews Materials*, 5(10), 730–747.
63. Collagen amino acid composition. URL: <https://www.cellbone.com/collagen-aminoacid.html> (Date of access 12.09.2022).
64. MembraPure. URL: <https://membrapure.de/amino-acid-analyzer-amino/aracus-classic/> (Date of access 12.09.2022).
65. Люта В. А, Заговора Г. І. Основи мікробіології, вірусології та імунології. «Здоров'я». Київ. 2001 р. С. 136-138.
66. Люта В. А, Заговора Г. І. Основи мікробіології, вірусології та імунології. «Здоров'я». Київ. 2001 р. С. 120–123.

Додаток А

ISSN 2409-6423



**ХІМІЯ, БІО- І НАНОТЕХНОЛОГІЇ,
ЕКОЛОГІЯ ТА ЕКОНОМІКА
В ХАРЧОВІЙ ТА КОСМЕТИЧНІЙ ПРОМИСЛОВOSTІ**

**Збірник матеріалів ІХ міжнародної
науково-практичної конференції
18-19 листопада 2021**



Продовження додатка А

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

**Національний технічний університет
«Харківський політехнічний інститут»**

Vytautas Magnus University, Kaunas, Lithuania

Ivane Javakhishvili Tbilisi State University, Georgia

University of Life Sciences in Lublin, Poland

**Харківський державний університет
харчування і торгівлі**

Національний університет «Львівська політехніка»

**ХІМІЯ, БІО- І НАНОТЕХНОЛОГІЇ,
ЕКОЛОГІЯ ТА ЕКОНОМІКА
В ХАРЧОВІЙ ТА КОСМЕТИЧНІЙ ПРОМИСЛОВОСТІ**

**Збірник матеріалів
IX Міжнародної науково-практичної
конференції**

18-19 листопада 2021 р.

Харків

2021

Продовження додатка А

УДК 620.3: 664 (063)

Редакційна колегія:

Товажнянський Л.Л., д.т.н., проф., почесний ректор Національного технічного університету «Харківський політехнічний інститут», м. Харків, Україна

Гордієнко А.Д., д.ф.н., проф. Національного технічного університету «Харківський політехнічний інститут», м. Харків, Україна.

Ewa Solarska, Prof. dr hab., Department of Biotechnology, Human Nutrition and Science of Food Commodities, University of Life Sciences in Lublin, Польща.

Honorata Danišenko, Prof. dr hab., Institute of Agriculture and Food Sciences, Agriculture Academy, Vytautas Magnus University, Kaunas, Lithuania

Tamaz Mdzinarashvili, Full Prof., Ivane Javakhishvili Tbilisi State University, Director of biophysical Graduate program, Director of Institute Medical and Applied Biophysics, Tbilisi, Georgia

Бобало Ю.Я., д.т.н., проф., Ректор Національного університету «Львівська політехніка», м. Львів, Україна

Гринченко О.О., д.т.н., проф., зав. кафедрою технології харчування ХДУХТ, м. Харків, Україна

Капрелянц Л.В., д.т.н., проф. зав. каф. біохімії, мікробіології і фізіології харчування ОНАХТ, м. Одеса, Україна

Кричківська Л.В., д.б.н., проф. каф. органічного синтезу і нанотехнологій НТУ «ХПІ», м. Харків, Україна

Ніколенко М.В., д.х.н., проф., зав. каф. аналітичної хімії та хімічної технології харчових добавок та косметичних засобів ДГХТУ, м. Дніпро, Україна

Новіков О.О., д.ф.н., професор, академік РАНТН, зав. каф. фармохімії і фармакогнозії НДУ «Белгородський державний університет», Росія

Панченко Ю.В., к.х.н., доц., заступник завідувача кафедри органічної хімії Національного університету «Львівська політехніка», Україна

Петрова І.А., д.ю.н., к.т.н., проф., Харківський науково-дослідний інститут судових експертиз ім. Засл. проф. М.С. Бокаріуса, м. Харків, Україна

Пивоваров О.О., д.т.н., проф., Ректор Українського державного хіміко-технологічного університету, м. Дніпро, Україна

Шевчук С.В. гол. хімік ТОВ «Аромат», г. Харьков, Україна

Хімія, біо- і нанотехнології, екологія та економіка в харчовій і косметичній промисловості: Збірник матеріалів ІХ Міжнародної науково-практичної конференції, 18–19 листопада 2021 року – X., 2021. – 297 с. ISSN 2409-6423

У збірнику відображено публікації і цінні пропозиції про вирішення проблем і перспектив розвитку хімії, біо- і нанотехнології, екології та економіки в харчовій і косметичній промисловості. У ньому містяться роботи фахівців, як науковців Національного технічного університету «Харківського політехнічного інституту», так і інших вищих навчальних закладів України, Білорусі, Росії, Європи. Всі роботи мають наукову цінність і практичні рекомендації. Збірник рекомендовано для науковців, які досліджують проблеми хімії, біо- і нанотехнології, екології та економіки в харчовій і косметичній промисловості, а також для викладачів, аспірантів і студентів вищих навчальних закладів України та інших країн.

© НТУ «ХПІ», 2020

Продовження додатка А

<i>Белінська А.П., Мироненко Л.С., Кукушкін А.І., Дідух Д.С.</i> ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ АКТИВНОСТІ ФЕРМЕНТНОГО КОМПЛЕКСУ НА СТАБІЛЬНІСТЬ ДО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ НАСІННЯ ЛЬОНУ	117
<i>Васильченко І.С., Семешко О.Я., Сарібєкова Д.Г., Гаргаун Р.В.</i> ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ КОМПОЗИЦІЙ СИЛІКОНІВ У ЕМУЛЬСІЯХ КОСМЕТИЧНОГО ПРИЗНАЧЕННЯ	119
<i>Галстян А.Г., Бушуєв А.С., Демченко О.О., Калоша Є.В.</i> ОЗОНОЛІТИЧНИЙ СИНТЕЗ 4-БРОМАЦЕТОФЕНОНУ	121
<i>Грицаєнко Ю.А., Кричковская Л.В., Дубоносів В.Л.</i> ПРИМЕНЕНИЕ РФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОЭЛЕМЕНТНОГО СОСТАВА ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ	123
<i>Дорофій А.В.</i> ЗАСТОСУВАННЯ КОЛАГЕНУ В КОСМЕТИЧНИХ ЗАСОБАХ	127
<i>Журавльова Т.В., Акмаєв Д.Р., Савченко Л.Г., Тимофеев С.В.</i> ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ СПОЛУК ЦИМЦИФУТИ У КОСМЕТИЧНІЙ ГАЛУЗІ	130
<i>Кошиць А.В., Звягінцева О.В.</i> ПЕРСПЕКТИВИ ВИРОБНИЦТВА ПРОВІТАМІНУ D2 – ЕРГОСТЕРИНУ З ГРИБА <i>BLAKESLEA TRISPORA</i>	132
<i>Лазоренко В.В., Бєлик І.А.</i> БІОТЕХНОЛОГІЯ ВИРОБНИЦТВА РИБОФЛАВІНУ З ВИКОРИСТАННЯМ ШТАМУ <i>BACILLUS SUBTILIS</i>	135
<i>Ларінцева Н.В., Каплун О. А., Франчук Є.Р.</i> НАТУРАЛЬНІ ПІДСИЛЮВАЧІ СМАКУ ТА АРОМАТУ ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ	137
<i>Мартиросян І.А., Пахалюк О.В.</i> ПОШУК СУЧАСНИХ БІОЦИДНИХ ПРЕПАРАТІВ ДЛЯ АНТИМІКРОБНОГО ЗАХИСТУ	139
<i>Matvieiev M., Parchenko V., Matveeva T.</i> DETERMINATION OF THE LINEAR DIMENSIONS OF SUNFLOWER SEEDS OF OLEIC TYPE DOMESTIC BREEDING	142
<i>Мосінцева В.С., Холодова Н.О.</i> НАНОТЕХНОЛОГІЇ В КОСМЕТОЛОГІЇ: ПРОБЛЕМИ, РЕАЛІЇ, ПЕРСПЕКТИВИ	145
<i>Москвіна А.Л., Бєлик І.А.</i> УДОСКОНАЛЕННЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ ВИРОБНИЦТВА КОМПЛЕКСНОГО ПРОБІОТИЧНОГО ПРЕПАРАТУ	147

Продовження додатка А

Література

1. Макарова, М.П. Особенности экспресс-определения микроэлементов в лекарственных и неофицинальных растениях / М.П. Макарова, А.В. Сыроешкін // Разработка и регистрация лекарственных средств – 2019. – Т. 8 №2. – С.10-14.
2. Машанов А.В., Юшков Г.Г. Значение микроэлемента цинка для организма человека и исследование цинксодержащих препаратов в условиях экспериментально-биологического моделирования (обзор) // Вестник АГТА. – 2009. – Т. 3, – № 1. – С. 136–140.
3. Pit I.R., Dekker S.C. Mobilisation of toxic trace elements under various beach nourishments // Environ Pollut. - 2017. - V. 231. - Pt. 1. - P. 1063–1074.
4. Gupta, N. Trace elements in soil-vegetables interface: Translocation, bioaccumulation, toxicity and amelioration - A review. / N. Gupta, K.K. Yadav, V. Kumar, S. Kumar, R.P. Chadd, A. Kumar // Sci Total Environ. - 2019. - V. 651. – Pt. 2. P. 2927–2942.
5. Bonanno G. Trace elements in Mediterranean seagrasses: Accumulation, tolerance and biomonitoring. A review. / G. Bonanno, M. Orlando-Bonaca // Mar Pollut Bull. - 2017. - V. 125. - Issue1-2. - P. 8-18.

ЗАСТОСУВАННЯ КОЛАГЕНУ В КОСМЕТИЧНИХ ЗАСОБАХ

Дорофій А. В.

*Київський національний університет технологій та дизайну, м. Київ,
Україна, anastasia.dorofiy95@gmail.com*

Колаген – це основний білок шкіри, синтез якого складається з декількох біохімічних реакцій. Клітини, які виробляють колаген, називаються фібробласти. Амінокислоти, що надходять в організм людини з їжею, такі як пролін, гідроксипролін, гліцин, аланін, проникають через клітинну мембрану в клітину, де на ліпосомах ендоплазматичної сітки починають об'єднуватися у ланцюги, що в свою чергу призводить до формування тропоколагену. Сформована структурна одиниця колагену (тропоколаген) секретується клітиною в позаклітинний простір, де здійснюється остаточне формування колагенових ниток. Важливою умовою для утворення колагену є присутність в системі аскорбінової кислоти.

Основна задача колагену – збереження пружності шкіри та її швидке відновлення. Слід зауважити, що з віковими змінами ці функції значно знижуються. Тому з метою відновлення балансу шкіри шляхом утримування води різні косметичні фірми додають у свої продукти гідролізат колагену.

Гідролізат колагену – продукт фібрилярного білку, отриманий шляхом ферментативного або хімічного гідролізу.

Виробники косметичних засобів, що вміщують гідролізат колагену, наголошують на його позитивному впливі на функціональний стан шкіри,

Продовження додатка А

відмічають покращення регенерації та зволоження шкіри, пришвидшення загоєвання ран.

На основі гідролізату колагену розробляють рецептури кремів для догляду за шкірою обличчя (*Holy Land, pHarmika, Sesderma*), сироваток (*Collistar attivi puri collagene antirughe rassodante, Payot, Obagi, Demax* тощо) та колагенових патчів (наприклад *Selfielab, Misoli, HolySkin*) [1].

До вказаних засобів відносять денний крем «*Bio Repair Day Care*» та нічний крем «*Bio Repair Night Care*» для обличчя ізраїльської компанії «*Holy Land*» [2]. У складі засобів заявлена наявність гідролізованого колагену й еластину, що сприяють зволоженню епідермісу та відновлюванню воднеліпідної мантії, мають захисну і регенеративну дію. Останнє особливо ефективно у застосуванні засобу після травматичних процедур для обличчя (наприклад, пілінг або чистка).

Представники італійської косметичної фірми «*pHarmika*» [3] пропонують крем навколо очей марки «*Cream eye collagen, elastin & omega 3, 6, 9*» для запобігання передчасному старінню. А саме: знижує схильність до появи зморшок, зволожує, прискорює оновлення клітин, сприяє розгладженню шкіри в перiorбітальній зоні.

Компанією «*Pelart Laboratory*» (Ізраїль) [4] для крему «Ретинол з вітаміном С» заявлені функції регенерації та зволоження, впливу на синтез колагену в дермі, стимулювання росту фібробластів. Сироватка «*Roselift Collagene*» від французького бренду «*Payot*» має легку текстуру і доповнює ефект денного крему через високий вміст колагену [5].

Шведськими та литовськими фармацевтами розроблено продукт «*Tricollagen peptide*» [6] – колагеновий коктейль, який приймають перорально для оздоровлення всього організму людини. Продукт містить гідролізований риб'ячий колаген (I та III типу), гіалуронову кислоту, комплекси вітамінів, мікроелементів, антиоксидантів, біологічно-активних інгредієнтів рослинного походження. Виробники продукту зазначають, що після використання продукту впродовж 14 днів (1 курс) спостерігатиметься покращення еластичності шкіри та ліфтинг ефект; стимулюється виробництво власного колагену; шкіра та волосся набудуть здорового вигляду; уповільняться процеси старіння тощо.

Для косметологічної, фармацевтичної або медичної галузей колаген можна отримувати із сировини різного походження. При цьому розрізняють морський, рослинний та тваринний колаген [7].

Морський колаген отримують зі шкіри риб. Цей вид вважають найбільш ефективним, адже його молекули менші за молекули тваринного колагену.

Тваринний колаген отримують переважно зі шкур великої рогатої худоби або побічних продуктів шкіряного виробництва. Даний вид є дуже популярним і перспективним у косметології та найчастіше використовується на практиці.

Продовження додатка А

Рослинний колаген не є справжнім колагеном, а лише має подібну до нього структуру та склад амінокислот. Зазвичай рослинний колаген добувають з сої або пшениці.

В різних косметичних засобах кількість колагену коливається від 0,5 до 5 %. В складі косметичних засобів, що містять колаген, зустрічаються *soluble collagen* (отримують зі сполучної тканини тварин), *marine collagen* (отримують з риб), *hydrolyzed collagen* (зустрічається у складі зволожувальних кремів).

Також на ринку косметичних засобів представлені «колагенові листи», принцип застосування яких схожий на застосування тканиної маски. Продукт позиціонується на ринку як 100 % колаген, який з іншими активними компонентами, наприклад, *Aloe Vera* [8]. Виробники продукції (*Matricol, Yellow Rose, Janssen, Dr. Spiller* тощо) пропонують застосування листів для ефективного живлення і зволоження сухої подразненої шкіри, заспокійливої і протизапальної дії на неї; для регенерації і покращення зовнішнього вигляду шкіри; попередження передчасного старіння.

Отже, слід зауважити, що з 25 років активність вироблення організмом природного колагену починає знижуватись. Недостатня його кількість може призводити до: появи зморшок, птозу (опущення овалу обличчя), передчасного старіння шкіри, втрати еластичності, пружності й здорового вигляду, появи дряблості шкіри. Тому з віком у свій домашній догляд обов'язково слід включати засоби, що містять колагену. Концентрацію, типи та самі продукти повинні підбиратись за рекомендацією лікаря дерматолога або ж косметолога згідно типу шкіри людини та індивідуальних особливостей.

Окрім косметичних засобів не потрібно забувати й про природний шлях поповнення запасів колагену. Додавання у свій раціон зелених багатих на хлорофіл овочів сприяє формуванню нових волокон колагену, забезпечує захисну функцію від УФ променів. Наявність у раціоні харчування полуниці, малини та журавлини необхідна для природного синтезу білку, а гарбузового насіння – для запобігання розпаду колагенових волокон.

Література

1. Гідролізат колагену. URL: <https://sapone.com.ua/ua/shop/product/3035> (дата звернення: 14.10.2021).
2. Holy Land cosmetics. URL: <http://cosmeticstar.com.ua/> (дата звернення: 15.10.21).
3. pHarmika created in Italy. URL: <https://www.pharmika.com.ua/ru/> (дата звернення 16.10.21).
4. Pelart laboratory. URL: <https://pelartlab.com/#> (дата звернення: 16.10.21).
5. Brocard URL: https://www.brocard.ua/ua/product/sirovatka-dlya-oblichchya-payot-roselift-30-ml-082147?gclid=CjwKCAjw8KmlLBhB8EiwAQbqNoApyGso3UMg9MDgHYU_IPKtEGm0TeBkBs78dCmAhk7LFT2THC8cZR0cMj8QAvD_BwE (дата звернення 16.10.21).

Продовження додатка А

6. Tricollafen micro hyaluron. URL: <https://www.tricollagen.com.ua/> (дата звернення: 16.10.21)

7. Гидролизат колагена в косметике. URL: <https://organic-store.com.ua/beauty/79-gidrolizat-kollagena-v-kosmetike.html> (дата звернення: 14.10.2021).

8. Як це працює : колаген в косметичці для догляду за шкірою. URL: <https://malva-parfume.ua/ru/blog/Jak-ce-pracyu-kolagen-v-kosmetic-dlja-dogljadu-za-shkroyu/> (дата звернення: 14.10.2021).

ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ СПОЛУК ЦИМІЦИФУТИ У КОСМЕТИЧНІЙ ГАЛУЗІ

Журавльова Т.В., Амшаєв Д.Р., Савченко Л.Г., Тимофєєв С.В.

Національний технічний університет «Харківський політехнічний інститут», м.Харків, Україна, timof008@gmail.com

В косметичній практиці дуже широко використовуються біологічно активні сполуки рослинного походження. Нашу увагу привернула циміцифуга (*Cimicifuga racemosa* L.) родини жовтецеві (*Ranunculaceae*) або клопогін смердючий – така назва, очевидно, пов'язана з його інсектицидними властивостями. Різкий запах відлякує комах, але не завдає шкоди людині. Народна назва клопогін не передає красу рослини. В англійській мові ця трава отримала назву «свічки фей», а в німецькій – «срібні свічки». Рослина має красивий зовнішній вигляд, тому цією травою часто прикрашають парки і алеї, яка утворює унікальний ландшафтний пейзаж і, навіть, стала володарем престижної премії салівничого мистецтва.

Циміцифуга у великій кількості росте в Північній Америці, Монголії та деяких районах Східної Азії. Рослина любить помірний клімат і вологий, багатий на мінерали ґрунт. Для виготовлення лікарських засобів використовують корені і кореневища циміцифуги, які збирають після цвітіння і дозрівання плодів [3]. Рослинна сировина має неприємний і різкий запах та гіркий присмак. Заготівля сировини відбувається в спеціальних сушільних установках, де під дією температури зникається рівень вологи, але всі корисні властивості зберігаються до моменту використання.

Коріння циміцифуги застосовуються в медицині як седативний, знеболюючий, протизапальний і сечогінний засіб, а також для нормалізації менструального циклу у жінок і в якості знеболювального при пологах [1,4]. Ці ефекти зумовлені біологічно активними речовинами, що містяться у кореневищі: фенольні сполуки, дубильні речовини, алкалоїди, тритерпенові глікозиди (актеїн, циміцифугозид), ізофлавоон (з ароматичним ядром – формононетин), камедь, кислоти ароматичного ряду (ізоферулові і саліцилові), сапоніни, ефірне масло, 15–20 % циміцифугіна (суміш смол і гіркот), органічні кислоти, фітоестрогени, фітостерини, таніни, сахароза, крохмаль, вітаміни

Додаток Б



**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
МУКАЧІВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

вул. Ужгородська, 26, м. Мукачєво, 89600, телефон/факс (03131) 2-11-09
E-mail: www.msu.edu.ua, info@msu.edu.ua, код ЄДРПОУ 36246368

Довідка

Видана Дорофій А. В., Майстрєнко Л. А., Охмат О. А., Чистилін К. О. засвідчує, що стаття авторів «ОСНОВНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ КОЛАГЕНУ ТА СПОСОБИ ОТРИМАННЯ ПРЕПАРАТІВ НА ЙОГО ОСНОВІ» прийнята до друку в збірник студентів, аспірантів та молодих вчених «Наука майбутнього», № 2(10), 2022 року (Мукачівський державний університет).

24 жовтня 2022 року

Відповідальний секретар збірника

О.В. Гранчак

Продовження додатка Б

Природничі та технічні науки
УДК 677.472.6

Дорофій А. В.
здобувач вищої освіти ОС «Магістр»,
спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»,
Київський національний університет технологій та дизайну
Майстренко Л. А.
кандидат технічних наук, доцент
Київський національний університет технологій та дизайну
Охмат О. А.
кандидат технічних наук, доцент
Київський національний університет технологій та дизайну
Чистяк К. О.
здобувач вищої освіти ОС «Магістр»,
спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»,
Київський національний університет технологій та дизайну

ОСНОВНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ КОЛАГЕНУ ТА СПОСОБИ ОТРИМАННЯ ПРЕПАРАТІВ НА ЙОГО ОСНОВІ

У статті розглянуто основні характеристики колагену, його будову та функції. Розглянуто основні галузі використання колагену та методи його отримання.

Ключові слова: колаген, екстрагування, препарати колагену.

The article discusses the main characteristics of collagen, its structure and functions. The main fields of collagen usage and methods of its production are considered.

Key words: collagen, extraction, collagen preparations.

Колаген є найпоширенішим білком в людському організмі та домінуючим у сполучній тканині ссавців. Колаген становить третину від загального білка організму ссавців. Цей білок є основою сполучної тканини ссавців, важливим компонентом сухожилля, рогівки, кровоносних судин, хрящів, слизової оболонки кишківника тощо. В наш час колаген та препарати

Продовження додатка Б

на його основі широко використовують у харчовій і косметичній галузях, а також у галузях охорони здоров'я та ветеринарії.

Функції колагену [1]: участь у формуванні фіброblastів у дермі шкіри; забезпечення захисного покриття органів; надання шкірі структурної стійкості, пружності, еластичності; запобігання поглинзненню і поширенню патогенних субстанцій, екологічних токсинів, мікроорганізмів, а також ракових осередків в організмі; участь у згортанні крові тощо.

Молекула колагену (тропоколаген) має довжину приблизно 300 нм, товщину – 1,5 нм та молекулярну масу близько 300 000 дальтон [2].

Процес синтезу колагену в організмі ссавців відбувається головним чином у клітинах фіброblastів. При цьому фіброblastи сприяють утворенню капсул навколо чужорідного тіла, беруть участь у загоєнні ран, формуванні рубців на місці запалення або рани.

Колаген відноситься до фібрилярних білків. Колаген також є глікопротеїном, що відрізняється унікальним амінокислотним складом, для якого характерна наявність оксипроліну й оксипізіну, відсутніх у інших білках [3]. Розрізняють п'ять рівнів структури колагену. Первинна структура – це послідовність розташування амінокислот, що утворюють поліпептид. Вторинна структура стосується просторової конформації поліпептидних ланцюгів. Добре відомими прикладами є α -спіралі та β -нитки. Третинна структура є результатом кількох типів взаємодій, в основі яких лежить заряд активних груп колагену, електростатична взаємодія та сили Ван-дер-Ваальса [4]. Третинна структура характеризує розташування поліпептидних ланцюгів у структурі тропоколагенової частинки. Четвертинна структура стосується утворення фібрил з тропоколагенових частинок. Визначальною особливістю колагену є його структура, в якій три паралельні поліпептидні ланцюги в лівій спіралі накручуються один на один, утворюючи правосторонню потрійну спіраль [5]. П'ятеринна структура колагену – утворення пучків колагенових волокон. В пучкній сполучній тканині колагенові волокна розташовані у різних напрямках і мають вигляд хвилястих, спірально покручених, круглих або плоских тягів товщиною 1-10 мкм. Вони здатні утворювати пучки, товщина яких може досягати 150 мкм [6].

Завдяки своїй біосумісності та біологічним характеристикам (слабка антигенність та здатність до біологічного розкладання), колаген широко застосовують у різних напрямках медицини (хірургія, кардіологія, стоматологія, офтальмологія, дерматологія тощо) [7]. Колаген використовують в якості

Продовження додатка Б

систем доставки ліків: колагенові екрани в офтальмології; білки у вигляді міні-гранул та таблеток; губки для загоєння ран чи опіків; гелі з ліпосомами для доставки ліків довготривалої дії. А також як контрольний матеріал для трансдермальної доставки наночастинок, для доставки генів і основних матриць у системах клітинних культур та при заміні штучних кровоносних судин і клапанів [7]. Медичні засоби та препарати, що містять колаген, можуть покращити регенерацію кісткової тканини, загоєння ран, лікування екстракції лунок після стоматологічних операцій, сприяють згортанню крові [7, 8].

У косметичній сфері гідролізати колагену у комбінації з гіалуроновою кислотою застосовують з метою відновлення та зволоження шкіри, покращення зовнішнього вигляду рубців [9].

У ветеринарії застосування препаратів колагену сприяє підвищенню апетиту у тварин, відновленню слизової оболонки кишківника, прискоренню загоєння ран та подряпін [10].

Враховуючи такий широкий спектр застосування колагену, питання його промислового синтезу стоїть доволі актуально. В наш час промислово отримують колаген з сировини тваринного походження, морських об'єктів, птиці, відходів м'ясопереробних та шкіряних підприємств.

Колаген з колагенвмісної сировини отримують екстрагуванням. При цьому характеристики екстрагованого колагену залежатимуть від виду використаної сировини та технологічного регламенту здійснення екстрагування. В результаті екстрагування ланцюги колагену лишаються переважно неушкодженими, а поперечні зв'язки у структурі зазнають часткового гідролізу. Через необхідність розриву при екстрагування великої кількості водневих зв'язків у молекулах колагену застосовують оброблення колагенвмісної сировини ферментами, сольовими розчинами або розведеними розчинами кислот або основ.

Екстрагування ферментами забезпечує високий вихід колагену з низьким вмістом домішок. Екстрагування ферментами дозволяє варіювати властивості екстрагованого колагену (наприклад, в'язкість, здатність до утворення емульсій або гелів). Ферментативний гідроліз часто здійснюють з використанням протеаз (наприклад, пепсину чи трипсину) або ферментних препаратів (наприклад, протосубтиліну). Температурний інтервал екстрагування колагену ферментами становить 35-50 °С. Вказана температура запобігає руйнуванню амінокислот колагену впродовж екстрагування. Але слід зазначити, що при екстрагуванні ферментами у цільовому продукті одночасну наявність фракції колагену з різним

Продовження додатка Б

ступенем розчинності. Для збільшення виходу цільового продукту та його чистоти екстрагування ферментами можуть поєднувати з обробкою ультразвуком, або іншими способами екстрагування. Недоліками ферментативного екстрагування є його значна тривалість та висока вартість.

Кислотне екстрагування колагену передбачає використання для гідролізу переважно органічних кислот (наприклад, оцтової чи лимонної). В результаті екстрагування спостерігається гідроліз нековалентних між- та внутрішньомолекулярних зв'язків. При обробці кислотою колаген набухає, після чого відбувається його розчинення під дією електростатичних сил та сил осмосу. Для кислотного екстрагування характерне отримання добре розчинних фракцій колагену. Недоліками такого способу екстрагування є довготривалість, а також доволі високі втрати колагену та часткове руйнування колагенових ланцюгів.

Екстрагування колагену лугами передбачає обробку колагенвмісної сировини основними розчинами. Екстрагування лугами проводять переважно для сировини з щільною структурою. Недоліками екстрагування є довготривалість застосовуваної технології (від кількох днів до декількох тижнів) та сильне руйнування ланцюгів колагену.

Лужно-сольове екстрагування передбачає послідовне оброблення колагенвмісної сировини лугом у присутності насиченого розчину сульфатокислого натрію та екстрагування кислотою. Вказане екстрагування дає змогу отримати високий вихід розчинного колагену зі збереженою формою потрійної спіралі. Недоліком екстрагування вважають дезамінування залишків аспарагінової та глутамінової кислот, внаслідок чого порушується розподіл зарядів уздовж трьохспіральної молекули колагену [11]. Такий колаген не утворює гелів, а тому його використання обмежене.

Універсального методу екстрагування колагену не існує. Це пов'язано з різноманіттю типів колагену та наявністю у його структурі різних за природою міжмолекулярних взаємодій. В наш час розроблення технологічного регламенту отримання колагену заданої структури з необхідним переліком властивостей тісно пов'язане зі сферою його майбутнього застосування. В той же час складність ефективного проведення екстрагування пов'язана з необхідністю ретельного добору колагенвмісної сировини, матеріалів та технічного регламенту здійснення процесу для отримання тих чи інших властивостей колагену.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Polymer Science : a comprehensive reference. – Amsterdam : Elsevier, 2012. – 793 p.
2. Біохімія сполучної тканини : будова, властивості, функції, регуляція, патологія [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://tdmuv.com.htm> (дата звернення: 18.08.2022). – Назва з екрана.
3. Чи всім потрібен додатковий колаген і де його брати? [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://med-expert.com.ua/journals/ua/news/chi-vsim-potribnij-dodatkovij-kolagen-de-jogo-brati/> (дата звернення: 18.08.2022). – Назва з екрана.
4. W. Brett D. A historical review of enzymatic debridement : revisited [Electronic resource] / David W. Brett. – Mode of access: <https://www.heighpubs.org/e-books/hspc-ebook-1001.pdf> (date of access: 18.08.2022). – Title from screen.
5. Collagen structure and stability [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2846778/> (date of access: 19.08.2022). – Title from screen.
6. Ricard-Blum S. The collagen family. Cold spring harb / S. Ricard-Blum // *Perspect. Biol.* – 2011. – No. 3. – 19 p.
7. Biomedical applications of collagen [Electronic resource]. – Mode of access: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11397563/#:~:text=The%20main%20applications%20of%20collagen,transdermal%20delivery%2C%20and%20nanoparticles%20for> (date of access: 19.08.2022). – Title from screen.
8. Collagen [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/collagen/#:~:text=Collagen%20is%20the%20most%20abundant,muscles%2C%20tendons%2C%20and%20cartilage> (date of access: 25.08.2022). – Title from screen.
9. Collagen in wound healing [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8151502/> (date of access: 25.08.2022). – Title from screen.
10. Leaky gut in dogs : heal with home remedies [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.dogsnaturallymagazine.com/leaky-gut-syndrome-in-dogs/> (date of access: 25.08.2022). – Title from screen.
11. Prestes R. C. Colageno e seus derivados: características e aplicacoes em produtos carneos / R. C. Prestes // *Revista Unopar Cientffica Ciencias Biologicas.* – 2013. – Vol. 15, № 1. – P. 65–74.

Додаток В

Біо

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ
ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНИЙ
ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ

КАФЕДРА БІОТЕХНОЛОГІЇ

СЕРТИФІКАТ
учасника
№110

Цим засвідчується, що

Дорофій А. В.

брав(ла) участь у роботі II Міжнародної
науково-практичної інтернет-конференції
**«ПРОБЛЕМИ ТА ДОСЯГНЕННЯ
СУЧАСНОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ»**
(тривалість - 8 год)
20 травня 2022 р., м. Харків, Україна

Ректор НФаУ,
д. фарм. н., проф. 

Проректор з НРП,
д. фарм. н., проф. 

Завідувачка кафедри
біотехнології НФаУ,
д. фарм. н., проф. 

Алла КОТВИЦЬКА

Інна ВЛАДИМИРОВА

Наталія ХОХЛЕНКОВА



Bio





II Міжнародна науково-практична
інтернет-конференція

**ПРОБЛЕМИ
ТА ДОСЯГНЕННЯ
СУЧАСНОЇ
БІОТЕХНОЛОГІЇ**

20 травня 2022 р.
м. Харків, Україна

Продовження додатка В

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА БІОТЕХНОЛОГІЇ**

**MINISTRY OF HEALTH OF UKRAINE
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY**

**ПРОБЛЕМИ ТА ДОСЯГНЕННЯ
СУЧАСНОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ**

**PROBLEMS AND ACHIEVEMENTS
OF MODERN BIOTECHNOLOGY**

**Матеріали
II міжнародної науково-практичної
Інтернет-конференції**

**Materials
of the II International Scientific and Practical
Internet Conference**

**ХАРКІВ
KHARKIV
2022**

Продовження додатка В**Екстрагування колагену ферментами та органічними кислотами****Дорофій А.В., Охнат О.А., Чиствіль К.О.**

Кафедра біотехнології, шкіри та хутра Київського національного університету

технологій та дизайну, м. Київ, Україна

okhmat.oo@knuutd.edu.ua

Колаген відносять до фібрилярних білків, які сьогодні широко використовують у харчовій і косметичній галузях, а також у галузях охорони здоров'я та ветеринарії. Колаген є глікопротеїном і відрізняється унікальним амінокислотним складом, для якого характерна наявність оксипроліну та оксирізіну, відсутніх у інших білків.

Враховуючи широкий спектр застосування колагену, питання його промислового синтезу стоїть досить актуально. Сьогодні промислово отриманий колаген може мати тваринне походження, або бути отриманим з морських об'єктів, птиці. Важливим є також те, що колаген часто отримують з відходів різних виробництв: шкіряних, м'ясопереробних, морського промислу, птахофабрик тощо.

Способом отримання колагену з колагенвмісної сировини є екстрагування. При цьому характеристики екстрагованого колагену залежатимуть від виду використаної сировини та умов здійснення екстрагування. Вказані характеристики визначають призначення отриманого колагену. Складність ефективного проведення екстрагування пов'язана з необхідністю ретельного підбору матеріалів та технічного регламенту здійснення процесу для отримання тих чи інших властивостей колагену.

Універсальний метод екстрагування не розроблено у зв'язку з різноманіттям типів колагену та наявністю у його структурі різних за природою міжмолекулярних взаємодій. Через наявність великої кількості водневих зв'язків між молекулами колагену та необхідність їх розриву при екстрагуванні застосовують оброблення сировини ферментами, сольовими розчинами або розведеними розчинами кислот чи основ. В результаті такої дії ланцюги

Продовження додатка В

колагену лишаються неушкодженими, а поперечні зв'язки – зазнають часткового гідролізу.

Екстрагування ферментами дає змогу мінімізувати їх витрати для здійснення процесу, отримати високий вихід колагену з одночасним зменшенням домішок у гідролізаті. Вказане екстрагування також дозволяє варіювати властивості екстрагованого колагену. Наприклад, в'язкість або здатність до утворення емульсії чи гелів. Ферментативний гідроліз здійснюють за допомогою протеаз (наприклад, пепсину чи трипсину) або ферментних препаратів (наприклад, протосубтиліну). Температурний інтервал здійснення ферментного гідролізу (35-50 °С) запобігає руйнуванню амінокислот впродовж екстрагування. Слід зазначити, що при екстрагуванні ферментами у цільовому продукті фіксують одночасну наявність добре та слабо розчинних фракцій колагену. Для збільшення виходу цільового продукту та його чистоти екстрагування ферментами можуть поєднувати з обробкою ультразвуком.

Кислотний гідроліз передбачає використання переважно органічних кислот (наприклад, оцтової, лимонної чи молочної). Вказаний спосіб підходить для екстрагування колагену з нещільним переплетенням колагенових волокон у сировині. В результаті екстрагування спостерігається гідроліз нековалентних між- та внутрішньомолекулярних зв'язків. При обробці кислотою білок набухає, після чого відбувається його розчинення під дією електростатичних сил та осмосу. Для способу характерне отримання добре розчинних фракцій колагену. Але одночасно відмічають велику тривалість процесу екстрагування, високу втрату білка та часткову деградацію колагенових пептидів.

Розробка технологічного регламенту отримання колагену із прогнозованими властивостями та необхідною структурою тісно пов'язані з галуззю його застосування. Сьогодні колаген для харчової промисловості отримують переважно гідролізом органічними кислотами. Для галузі охорони здоров'я надають перевагу колагену, отриманому як кислотним гідролізом так і ферментативною обробкою. Для біомедичних цілей можуть також застосовувати і колаген, екстрагований кислотно-ферментативним способом.

Продовження додатка В

Обґрунтування використання добавок у живильних середовищах для стимулювання росту <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Грошова Л.П., Калюжная О.С.	87
Протеолітична активність культуральної рідини ґрунтових бактерій Гудзенко О.В., Буценко Л.М.	89
Інтегровані біотехнології як сучасний спосіб отримання 5-амінолевулінової кислоти Гук Є.І., Пирог Т.П.	90
Кисломолочний напій, збагачений сироватковими білками та антиоксидантами Двінських Н.В., Азаренко Ю.М., Гутнік Ю.Ю.	91
Концептуальна модель комерціалізації науково-технічних розробок в медико-біологічній галузі Дворченко О.С., Пятчаніна Т.В.	93
Антимікробна активність супозиторіїв на основі олії кмину чорного Довга І.М., Іваннік В.Ю., Частій Т.В., Шульга Н.М., Казмірчук В.В.	96
Екстрагування колагену ферментами та органічними кислотами Дорофій А.В., Ожмаг О.А., Чистилин К.О.	98
Технологічні аспекти використання плодів авокадо для створення функціональних консервованих продуктів Душак О.В.	100
Іноваційні пакувальні матеріали Дялон Т.В.	102
Удосконалення технології лікарських засобів з PIX LIQUIDA за утрудненими екстреморальними прописами Дяченко М.В., Орловецька Н.Ф.	103
Антимікробна активність поверхнево-активних речовин <i>Nocardia Vaccinii</i> IMB B-7405 щодо фітопатогенних мікроорганізмів, синтезованих у комплексі з фітогормонами Жданюк В.І., Воробей А.М., Пирог Т.П., Шевчук Т.А.	105
Особливості викладання математичних дисциплін студентам-біотехнологам Жовтоніжко І.М.	107
Одержання біомаси <i>Spiraea salicis</i> методом культури тканин Загородня Д.С., Петріна Р.О., Федорова О.В., Губрій З.В., Петенко І.Б.	109
Перспектива використання мікробних ЕПС медичного призначення Зомчак В.В., Грегірчак Н.М.	110
Потенціал використання продуктів деревообробної промисловості для глибокого культивування базидієвих грибів Зубик П.Р., Клечак І.Р., Сироїд О.О.	112