

KATARZYNA DUBKA**PIOTR WALCZAK****Институт технологии ферментации и микробиологии
Лодзинского технического университета****ГИДРОЛИЗАТ КОЛЛАГЕНА
КАК НОВАЯ ДИЕТИЧЕСКАЯ ДОБАВКА****Обзор: проф. Marianna Turkiewicz, Доктор философии,
доктор наук**

В статье рассматриваются литературные данные, связанные со свойствами гидролизатов коллагена, применяемых в качестве пищевых добавок. Биологическая и оздоровительная активность пептидов, полученных из коллагена, была хорошо задокументирована во многих исследованиях, особенно для терапевтического лечения заболеваний костей и суставов, а также для улучшения состояния кожи, волос и ногтей. Высокая переносимость пациентами длительного приёма гидролизатов коллагена делает их привлекательными для использования в качестве оздоровительной диетической добавки.

1. Введение

Современный образ жизни, характеризующийся постоянной нехваткой времени, приводит к потреблению высоко переработанной пищи, которая не оказывает никакого благотворного влияния на наше здоровье. Несбалансированные и неполные диеты могут быть причиной многих заболеваний, зависящих от диеты. Если мы заботимся о здоровом образе жизни, мы должны включить богатую питательными веществами пищу в наш обычный рацион. Диетические добавки - это такие полезные для здоровья вещества, которые содержат концентрированный источник питательных веществ или других компонентов, вызывающих положительные физиологические эффекты. Диетические добавки выпускаются в виде порошка, капсул, порошка в пакетиках, жидкости во флаконах с капельницами или в других формах, подходящих для правильной дозировки. Общеизвестно, что пищевые добавки не являются лекарственными средствами и их применение не регулируется фармацевтическим законодательством [25].

2. Характеристика коллагена

Белки коллагена являются наиболее распространенными в организме человека и животных. Они являются основными белками соединительной ткани, кожи, сухожилий, хрящей, связок, роговицы, зубов, ногтей и волос [8]. Белки семейства коллагенов представляют собой группу разнообразных молекул внеклеточного матрикса, связанных появлением коллагенового Тройно-спирального домена как общего структурного элемента [5]. В организмах позвоночных животных было зарегистрировано, по меньшей мере, 27 типов коллагена с 42 отчетливыми полипептидными цепями [19]. По сходству в строении и супрамолекулярной организации они подразделяются на фибриллообразующие, фибриллоассоциированные коллагены с разрывами в тройной спирали (фасции), сетеобразующие коллагены, якорные фибриллы или трансмембранные коллагены [22]. Различные типы коллагена характеризуются значительной сложностью и разнообразием их строения, вариантами сращивания, наличием дополнительных, не спиральных доменов и их функцией. Все члены семейства коллагенов имеют одну характерную особенность - правостороннюю тройную спираль, состоящую из α -цепей (Рис. 1). Тройная спираль может быть образована тремя идентичными цепями α (гомотриммеры), как в коллагене типов II, III, VII, VIII, X, XIII, XV, XVII, XXIII, XXV, а также двумя или тремя различными цепями (гетеротриммеры), как в коллагене типов I, IV, V, VI, IX и XI [19, 22]. Каждая из трех коллагеновых α -цепей сворачивается в левостороннюю спираль, которая собирается в канатообразную фигуру, окаймленную С-и N-пропептидами [8].

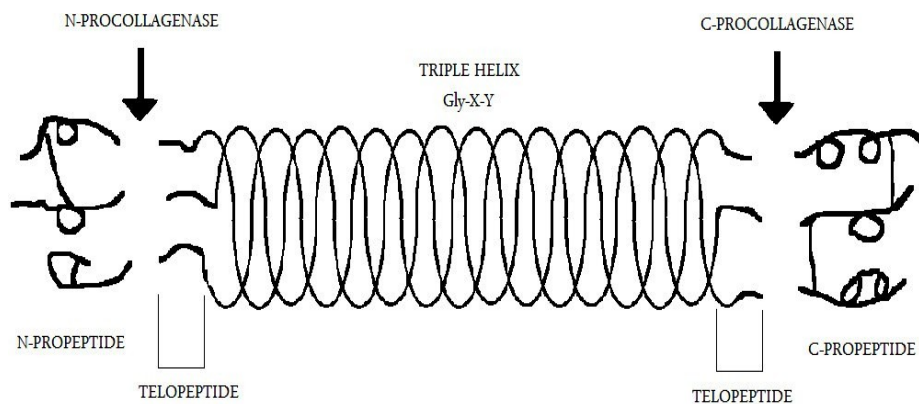


Рис. 1. Молекулярная структура фибриллярных коллагенов

Коллагены состоят из большого количества глицина (около 33% аминокислотных остатков), пролина (12-14%), 4-гидроксипролина (<14%) и 4-гидроксилизина (1,5%) [17]. Триптофан и цистеин не были замечены [21]. Известно, что коллагены имеют общую повторяющуюся структуру Gly-X-Y, в которой позиции X и Y часто занимают остатки пролина (Pro) и 4-гидроксипролина (Hyp)

[2, 7, 17]. Исследования показали, что содержание Нур играет особенно важную роль в стабилизации тройной спиральной конформации в коллагене и в пептидах с коллагеноподобными доменами [2, 4]. Остатки гидроксипролина стабилизируют тройную спиральную конформацию, разделяя прямые водородные связи [2]. Наиболее распространенным мотивом в фибриллообразующих коллагенах является повторяющаяся последовательность Gly-X-Y, приводящая к образованию тройных спиральных доменов длиной 300 Нм, что соответствует примерно 1000 аминокислотам [8]. Три остатка в повторяющемся триplete занимают различные позиции в пределах спирали с перемоткой. Центральное положение остатков Gly делает этот остаток непригодным для взаимодействия с другими остатками. Взаимодействия, вызванные близостью между соседними цепями, связаны с меньшей доступностью растворителя остатков положения Y. В отличие от позиций Gly и Y в триплетном мотиве, наибольшую экспозицию для взаимодействий показывает позиция X [5]. Белла и др. [2] предположили, что молекулы воды агрегируются в виде оболочки с карбонильными и гидроксипролильными группами, в результате чего образуются разнообразные конформации со специфическими мотивами водных мостиков, связывающих атомы кислорода внутри одной цепи или между различными цепями тройной спирали.

3. Биосинтез и деградация коллагена

Постоянные процессы обмена коллагенов в нашем организме происходят на протяжении всей жизни человека. Старые фибриллы постоянно заменяются новыми. Когда мы молоды, производство и деградация коллагена находятся в динамическом равновесии, но во время созревания тканей деградация происходит более интенсивно. Ультрафиолетовое излучение, курение, стресс и нездоровое питание приводят к деградации естественной структуры коллагена и более раннему старению организма.

3.1. Биосинтез коллагенов

Биосинтез фибрилло-образующего коллагена - это многоступенчатый и сложный процесс, протекающий во внутриклеточном и внеклеточном пространствах. Она начинается с транскрипции генов и заканчивается сборкой тройной спирали коллагеновых фибрилл в волокна с их конечными отличительными функциями в тканях (Рис. 2). Клеточный тип, факторы роста и цитокины рассматриваются как особые агенты в системе транскрипционной регуляции при биосинтезе коллагена. Хорошо известно, что основная группа коллагеновых генов собирается в комплекс от 3 до 117 экзонов и интронов, характеризующийся более чем 50 экзонами, кодирующими мРНК фибриллярных коллагенов. Сообщалось, что могут быть найдены и другие виды мРНК. Они связаны с несколькими участками инициации транскрипции или альтернативного сплайсинга экзонов. Процесс трансляции мРНК в синтезированные полипептидные цепи (препроколлаген) принимает участие в мембраносвязанных рибосомах.

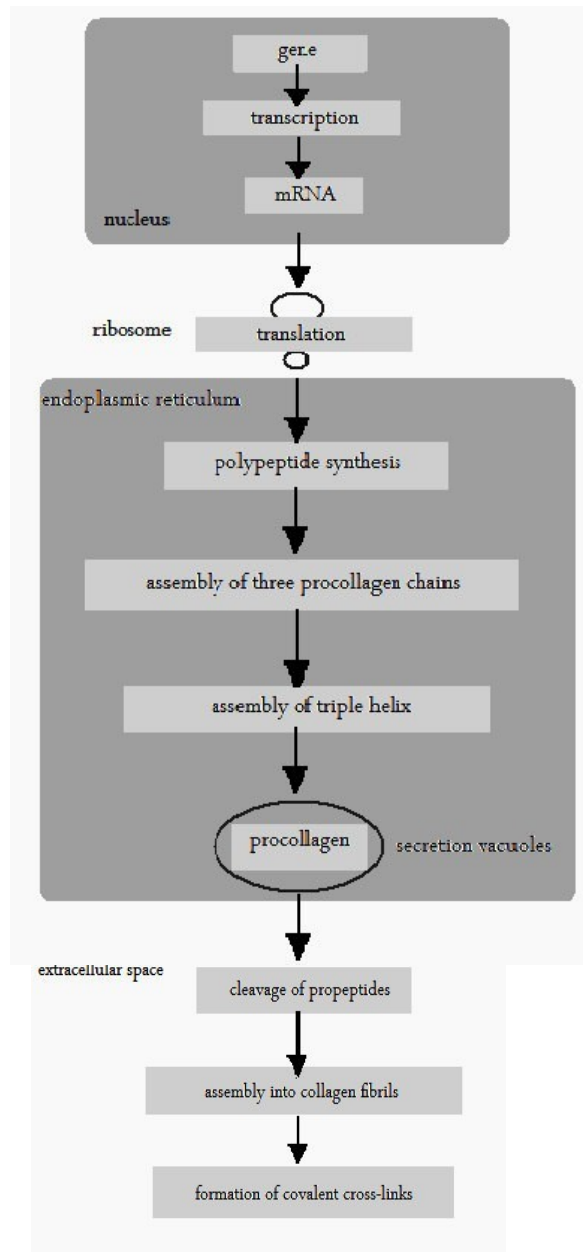


Рис. 2. Основные этапы биосинтеза фибрил-формирования коллагенов

В эндоплазматическом ретикулуме препроколлаген участвует в нескольких посттрансляционных модификациях. Три фермента, зависящие от витамина С, пролил 3-гидроксилаза, пролил 4-гидроксилаза и лизил-гидроксилаза катализируют гидроксилирование остатков пролина и лизина.

Наличие 4-гидроксипролина имеет решающее значение для водородной связи внутри молекулы [8, 19]. Остатки гидроксизина распознаются как связующие вещества внутри фибриллярных цепей. О функции 3-гидроксипролина пока не сообщалось. Другим действием является гликозилирование некоторых остатков гидроксизина и остатков аспарагина в Пропептидах С и/или N. После объединения пропептидов С и образования дисульфидных связей три цепи образуют молекулу, называемую проколлагеном, этот предшественник коллагена секретируется и высвобождается во внеклеточное пространство в транспортных везикулах аппарата Гольджи.

Затем тримеры проколлагена обрабатываются различными способами, которые зависят от типа коллагена. С-пропептиды и N-пропептиды удаляются специфическими металлопротеазами. После модификации проколлагена собираются фибриллы тропоколлагена. Было обнаружено, что некоторые фибриллообразующие коллагены (например, I, II, III, V, XI) спонтанно связываются с фибриллярными структурами во время теста *in vitro*. Его сравнивали с процессом кристаллизации. Несколько моделей описывали самосборную структуру, закодированную в коллагенах, и механизм образования периодических фибрилл. Полностью сформированные волокна стабилизируются гидрофобными и электростатическими взаимодействиями между мономерами коллагена и ковалентными поперечными связями, соединяющими разноориентированные фибриллы в тканях [8, 28].

3.2. Дегградация коллагена

Коллаген - это очень стабильный белок в нормальных здоровых условиях. Дегградация коллагена может протекать по-разному, но в целом считается, что существуют две возможности: внутриклеточная и внеклеточная. Основной причиной процесса межклеточной дегградации являются протеолитические ферменты, в частности катепсины. Катепсины - это различные протеолитические ферменты, обнаруженные в тканях животных, которые катализируют гидролиз белков в полипептиды в кислой среде. Во внеклеточном пути существует несколько стадий включая деполимеризацию, которая воздействует разрушая молекулярные структуры; активация коллагеноспецифических ферментов тканевых коллагеназ; термодеструкция при температуре тела продуктов дегградации коллагеназ, которые теряют структуру тройных спиралей и становятся доступными для неспецифических протеиназ. Коллагеназы могут синтезироваться многими клетками человеческого организма (например, фибробластами, нейтрофилами и опухолевыми клетками) [28].

4. Производство гидролизата коллагена

Основным источником коллагеновых пептидов являются бычья шкура, кости, свиная кожа или рыбы кости и рыба кожа. Морские источники являются альтернативой бычьим или свиным и не связаны с прионами, ассоциируемыми с риском развития бычьей губчатой энцефалопатии (BSE) [12]. Гидролизаты коллагена производятся в контролируемом процессе гидролиза для получения растворимых пептидов. Сырье промывается,

гомогенизируют и деминерализуют разбавленной минеральной кислотой или щелочью. Сырье экстрагируется в несколько этапов теплой водой. Дальнейшая ферментативная деградация желатина приводит к получению конечного продукта-гидролизата коллагена [18, 24, 26]. Клементе [6] представил ферментативный гидролиз, как наиболее подходящий метод получения индивидуальных пептидов. Гидролизаты коллагена отличаются друг от друга по молекулярной массе пептидов, в основном их молекулярная масса колеблется от 2 до 6 кДа [18, 26]. Его молекулярная масса меньше, чем средняя молекулярная масса пептонов. После очистки продукт концентрируют и сушат. Наиболее распространенные процедуры после сушки связаны с контролем молекулярного размера и устранением или уменьшением горечи в полученных гидролизатах. Наиболее эффективной процедурой удаления остаточных высокомолекулярных пептидов и белков или снижения содержания антигенов в гипоаллергенных формулах является ультрафильтрация [6].

Для контроля качества этих продуктов можно провести несколько анализов: осмолярность, анализ степени гидролиза, молекулярно-массовое распределение, общий азот, аминокислотный состав и наличие токсичных соединений (например, биогенных аминов или патогенов). Качественный анализ белковых гидролизатов используют различные методики, основанные на спектрофотометрическом, хроматографическом и электрофоретическом методах (УФ-спектрофотометрия, HPLC, SDS-PAGE) [23].

5. Свойства и применения гидролизатов коллагена

Сообщалось, что гидролизаты желатина и коллагена обладают полезными биологическими функциями. Гидролизованые желатиновые продукты признан безопасными пищевыми продуктами или пищевыми добавками Управлением по контролю качества пищевых продуктов и медикаментов (FDA) [1, 18]. Несмотря на то, что гидролизат коллагена обычно считают обладающим низкой биологической ценностью, поскольку он не содержит всех незаменимых аминокислот, он как полноценный питательный компонент часто используется для дополнения других белков из-за его превосходной усвояемости и высокой потребительской переносимости [26].

5.1. Благотворная роль гидролизата коллагена для здоровья человека

По мнению многих исследователей, благотворное действие перорального введения коллагеновых гидролизатов приводит к пересечению кишечного барьера с помощью пищевых биоактивных пептидов, которые достигают кровообращения и становятся доступными для метаболических процессов [26]. Гидролизаты коллагена используются в медицинских целях, как высокоэнергетические добавки, гериатрические продукты и кишечные, терапевтические или контрольные диеты. Применяются белковые гидролизаты в лечении больных со специфическими нарушениями пищеварения, всасывания и аминокислотного обмена. Проводились клинические исследования

пациентов с недостаточностью питания, связанной с травмами, ожогами, раком и печеночными энцефалопатиями [6]. Гидролизаты коллагена являются хорошим источником аминокислот для людей, страдающих анорексией, анемией и для вегетарианцев (из-за отсутствия мяса в их рационе). Диетические добавки, содержащие гидролизаты коллагена, рассматриваются в качестве улучшающих агентов при регенерации сухожилий или суставов у физически активных спортсменов с болью в суставах, связанной с их активностью [18, 26].

Установлено, что перорально потребляемый гидролизат коллагена всасывается кишечником и накапливается в хряще. В частности, прием внутрь гидролизата коллагена стимулирует значительное увеличение синтеза макромолекул внеклеточного матрикса хондроцитами [3]. Согласно медицинским данным клинические исследования показывают, что прием гидролизатов коллагена уменьшает болевые ощущения у пациентов, страдающих остеоартрозом и остеопорозом. Считается, что около 15% населения земного шара страдает заболеваниями, связанными с болью в суставах. В Польше все более серьезной проблемой становятся заболевания суставов, связанные с другими болезнями высокого риска, которые встречаются в изобилии. Повышенными факторами риска являются старческий возраст (более 50% пожилых людей страдают ревматизмом), пол (большое количество пациентов-женщины, особенно после менопаузы), масса тела (огромная масса тела является причиной перегрузки суставов и приводит к боли в суставах), постоянно чрезмерная спортивная активность, травмы суставов (например, вывихи), метаболические заболевания (например, диабет) [24]. Гидролизаты коллагена участвуют в синтезе хрящевого матрикса [26]. На протяжении почти двух десятилетий ученые изучали взаимосвязь между терапевтическими испытаниями при заболеваниях суставов и коллагеном, желатином или гидролизатами коллагена. В многочисленных исследованиях исследователи применяли дозу 10 г гидролизатов коллагена ежедневно как безопасную и хорошо переносимую пациентами. Кроме того клинические испытания доказали что этот уровень ежедневно проглатываемых белков может уменьшить боль по сравнению с пациентами группы плацебо [18].

В нескольких научных докладах была представлена хорошая биодоступность гидролизованного коллагена после перорального введения животным и людям. Oesser и соавт. [20] обнаружили, что около 95% перорально применяемого гидролизата коллагена поглощается в течение первых 12 ч. Wu и соавт. [26] описали высокую безопасность употребления гидролизатов коллагена в пищу на животной модели (1,66 г/кг массы тела в сутки). Исследования, связанные с препаратами, состоящими из производных желатина пептидов, показали хорошую переносимость и незначительные побочные эффекты, включая ощущение неприятного вкуса, чувство тяжести в желудке и чувство вздутия или пироза после перорального приема [20].

По мнению Заге [26], В некоторых исследованиях описывалась хемотаксическая активность коротких пептидов (Pro-Нур и Pro-Нур-Gly) к фибробластам человека, нейтрофилам периферической крови и моноцитам в клеточной культуре. Пептиды деградации коллагена могут привлекать эти клетки и приводить к восстановлению поврежденных тканей. Считается, что при наружном применении гидролизаты коллагена не могут быть поглощены с кожи, и в основе кожной эффективности гидролизата коллагена лежит постепенное улучшение всасывания воды в кожу в

результате перорального приема. Благотворное влияние было также отмечено для органов, связанных с кожей, а также для качества волос и ногтей.

Была обнаружена антигипертензивная и антиоксидантная активность биоактивных пептидов, выделенных из гидролизатов коллагена [26]. Коллагеновые и желатиновые гидролизаты содержат пептиды, ингибирующие ангиотензинпревращающий фермент (АПФ). АПФ играют важную роль в регуляции артериального давления, и ингибирование этого фермента может вызывать гипотензивный эффект [14, 15, 16]. Белковые добавки (например, гидролизаты коллагена) могут быть полезны для повышения удержания азота [10].

5.2. Промышленное применение гидролизатов коллагена

Желатин и гидролизованный коллаген используется в пищевой промышленности при производстве кондитерских изделий (для улучшения текстуры, жевательности и стабилизации пены), в молочных продуктах (в качестве стабилизирующих и текстурирующих агентов), в хлебобулочных изделиях (для обеспечения стабилизации, эмульгирования и гелеобразования), в обезжиренных спредах (чтобы обеспечить уменьшение жира, бархатистость и вкусовые ощущения), в мясопереработке (для обеспечения связывания воды например, в восстановленной ветчине), в производстве вина и фруктовых соков (как осветлитель) [1, 12, 13, 27]. Гидролизаты коллагена, как и все белковые гидролизаты, обладают такими технологическими преимуществами, как хорошая растворимость, термостабильность и относительно высокая устойчивость к осаждению многими агентами, такими как ионы металлов или рН [6]. Белковые гидролизаты обладают превосходной растворимостью при высокой степени гидролиза, что является существенно полезной характеристикой для многих пищевых применений и влияет на другие функциональные свойства, такие как эмульгирующие и пенообразующие свойства [9, 15].

Коллагеновый гидролизат обладает высокой влагосвязывающей способностью и может быть использован в качестве низкокалорийного обезжиренного продукта. В фармацевтической промышленности желатиновые и коллагеновые гидролизаты используются для изготовления капсул, имплантатов и внутривенных инфузий. [11, 12].

6. Выводы

Коллагены являются наиболее распространенной группой органических макромолекул в организме человека и животных. Из-за их прочности на разрыв они выполняют множество важных структурных функций в организме, особенно в соединительных тканях. Белки коллагена необходимы в соединительных тканях таких органов, как сердце, кишечник, легкие или паренхиматозные органы, такие как печень и почки; в качестве белковой матрицы скелета и связанных с ним структур (например, костей, зубов, сухожилий, хрящей и связок); в фиброзной матрице кожи и кровеносных сосудов [6, 7, 18, 26]. Его превосходные свойства являются результатом их аминокислотного состава и молекулярной структуры. Коллагены также участвуют в управлении клеточными медиаторами.

Показано, что коллагеновый белок (в форме гидролизата коллагена) улучшает гидратацию кожи, уменьшает морщины и уменьшает боль и

функциональные расстройства при заболеваниях суставов. Кроме того, гидролизат коллагена, по-видимому, является относительно недорогим и широко доступным источником белка.

Коллагеновый гидролизат и желатин могут быть использованы в пищевой, косметической или фармацевтической промышленности в качестве натуральной добавки, проявляющей антиоксидантные свойства с конкурентоспособными свойствами пенообразования и эмульгирования [9,15]. Наконец, такие свойства, как отличная биоразлагаемость, низкая иммуногенность и возможности для крупномасштабного производства, делают их интересными соединениями для широкого промышленного применения в пищевой промышленности, косметической промышленности или медицине.

7. ССЫЛКИ

- [1] **Baziwane D., He Q.:** Gelatin: the paramount food additive. *Food Rev. Int.* **19**, 423-435, (2003).
- [2] **Bella J., Brodsky B., Berman H.M.:** Hydration structure of a collagen peptide. *Structure.* **9**, 893-906, (1995).
- [3] **Bello A.E., Oesser S.:** Collagen hydrolysate for the treatment of osteoarthritis and other joint disorders: a review of the literature. *Cur. Med. Res. Opin.* **22(11)**, 2221-2232, (2006).
- [4] **Bornstein P.:** Covalent cross-links in collagen: a personal account of their discovery. *Matrix Biol.* **22**, 385-391, (2003).
- [5] **Brodsky B., Ramshaw J.A.M.:** The collagen triple-helix structure. *Matrix Biol.* **15**, 545-554, (1997).
- [6] **Clemente A.:** Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends Food Sci. Techn.* **11**, 254-262, (2000).
- [7] **Dioguardi F.S.:** Nutrition and skin. Collagen integrity: a dominant role for amino acids. *Clin. Dermatol.* **26**, 636-640, (2008).
- [8] **Gelse K., Pöschl E., Aigner T.:** Collagens-structure, function, and biosynthesis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **55**, 1531-1546, (2003).
- [9] **Giménez B., Alemán A., Montero P., Gómez-Guillén M.C.:** Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid. *Food Chem.* **114**, 976-983, (2009).
- [10] **Hays N.P., Kim H., Wells A.M., Kajkenova O., Evans W.J.:** Effects of whey and fortified collagen hydrolysate protein supplements on nitrogen balance and body composition in older women. *J. Amer. Diet. Assoc.* **109**, 1082-1087, (2009).
- [11] **Karim A.A., Bhat R.:** Gelatin alternatives for the food industry: recent developments, challenges and prospects. *Trends Food Sci. Techn.* **19**, 644-656, (2008).
- [12] **Karim A.A., Bhat R.:** Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydroc.* **23**, 563-576, (2009).
- [13] **Kim S.K., Kim Y.T., Byun H.G.:** Purification and characterization of antioxidative peptides from bovine skin. *J. Bioch. Mol. Biol.* **34**, 219-224, (2001).
- [14] **Korhonen H., Pihlanto-Leppälä A., Rantamäki P., Tupasela T.:** Impact of processing on bioactive proteins and peptides. *Trends Food Sci. Techn.* **9**, 307-319, (1998).
- [15] **Li B., Chen F., Wu Y., Wang X., Ji B.:** Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Chem.* **102**, 1135-1143, (2007).

- [16] **Mendis N., Rajapakse N., Kim S.K.:** Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 581-587, (2005).
- [17] **Minakowski W., Weidner S.:** *Biochemia kregowców.* PWN. Warszawa 2005.
- [18] **Moskowitz R.W.:** Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. *Semin. Arthritis Rheum.* **30**, 87-99, (2000).
- [19] **Myllyharju J., Kivirikko K.I.:** Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet.* **20**, 33-43, (2004).
- [20] **Oesser S., Seifert J., Adam M., Babel W.:** Oral administration of ¹⁴C labeled collagen hydrolysate leads to an accumulation of a radioactivity in cartilage of mice (C57/BL). *J. Nutr.* **129**, 1891-1895, (1999).
- [21] **Pytrus-Sedłak B.:** *Kosmetyka ozdobna i pielęgnacja twarzy.* Medpharm Polska. Wrocław 2007.
- [22] **Ricard-Blum S., Ruggiero F.:** The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Path. Biol.* **53**, 430-442, (2005).
- [23] **Silvestre M.P.C.:** Review of methods for the analysis of protein hydrolysates. *Food Chem.* **60**, 263-271, (1997).
- [24] **Swiderski F., Czerwonka M., Waszkiewicz-Robak B.:** Hydrolizat kolagenu nowoczesny suplement diety. *Przem. Spoz.* **4**, 42-44, (2009).
- [25] **Wrzesniewska-Wal J.:** Suplementy diety w nowej ustawie o bezpieczeństwie żywności. *Przem. Spoz.* **6**, 49-51, (2007).
- [26] **Zague V.:** A new view concerning the effects of collagen hydrolysate intake on skin properties. *Arch. Derm. Res.* **300**, 479-483, (2008).
- [27] **Zhang Z., Li G., Shi B.:** Physicochemical properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate derived from bovine limed split wastes. *J. Soc. Leath. Techn. Chem.* **90**, 23-28, (2005).
- [28] <http://www.osteoforum.org.pl/kolagen.html>; 4.08.2009