

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СТЕПЕНИ ГИДРОЛИЗА БИОПОЛИМЕРОВ В ГОМОГЕНАТАХ ГИАЛИНОВЫХ ХРЯЩЕЙ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

© 2023 г. Т.И. Николаева^{*,#}, Д.А. Барсук^{**}, М.В. Молчанов^{*}, Д.А. Прохоров^{*},
В.И. Емельяненко^{*}, П.В. Шеховцов^{*}

^{*}Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
Институтская ул., 3, Пущино Московской области, 142290, Россия

^{**}Пущинский филиал Российского биотехнологического университета,
просп. Науки, 3, Пущино Московской области, 142290, Россия

[#]E-mail: tomivnik@yandex.ru

Поступила в редакцию 22.08.2023 г.

После доработки 11.09.2023 г.

Принята к публикации 20.09.2023 г.

Исследование степени гидролиза в зависимости от действия разных протеолитических ферментов является одной из задач при разработке нутрицевтиков из соединительных тканей для биомедицины. Гидролиз биополимеров в гомогенатах гиалиновых хрящей из трахей крупного рогатого скота и свиней проводили под влиянием ферментов панкреатина, химопсина, папаина и протеолитического лекарственного средства карипазима, содержащего папаин. Показано, что карипазим производителя ООО «МедФлорина» действует более эффективно по сравнению с карипазимом производителя ЗАО «ВифиТех», причем степень гидролиза коллагена максимальна при температуре 60°C и концентрации карипазима 10%. В гомогенатах гиалиновых хрящей крупного рогатого скота проведен более полный гидролиз протеогликанов, поскольку на ЯМР-спектрах идентифицирована глюкоза – конечный продукт гидролиза гликозаминогликанов.

Ключевые слова: гиалиновые хрящи, коллаген, гликозаминогликаны, степень гидролиза, температура, концентрация.

DOI: 10.31857/S0006302923060145, EDN: ROGVFZ

В последние годы возник интерес к гидролизатам коллагена в качестве инновационного средства для профилактики и лечения артритов и артрозов. Ранее для лечения суставов применяли преимущественно гликозаминогликаны, которые входят в состав протеогликанов. Однако поскольку в хрящах суставов содержится примерно одинаковое количество и коллагена, и гликозаминогликанов, отсутствие коллагеновой компоненты в лекарствах приводит к восстановлению хрящей не более чем на 50%.

В соединительных тканях в организме человека и животных на долю коллагена приходится до 30%. В настоящее время известны 28 генетически разных типов коллагена, из которых коллагены типов I, II, III являются основными и фибриллообразующими [1]. Эти коллагены входят в состав костей, хрящей, связок, сухожилий – соедини-

тельных тканей, из которых образуется суставно-связочный аппарат человека [2].

Структура молекул коллагена формируется из трех полипептидных α -цепей. Каждая α -цепь содержит регулярную последовательность триплетов из аминокислот Гли-Х-У, где первой аминокислотой является глицин [3]. Таким образом, глицин составляет до 33% от содержания всех аминокислот в молекуле коллагена. В триплетах в позициях Х и У располагаются аминокислоты пролин и оксипролин, причем содержание каждой из них составляет примерно 10% [4]. Эти аминокислоты стабилизируют тройную спираль коллагена. Позиции Х и У могут занимать гидрофобные аминокислоты (аланин, валин, серин, лейцин, треонин, фенилаланин, изолейцин, метионин, цистеин) и гидрофильные аминокислоты (аргинин, гистидин, лизин, оксилизин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота).

Биосинтез коллагена и протеогликанов происходит в специализированных клетках соедини-

Сокращение: ЯМР – ядерный магнитный резонанс.

тельных тканей. Например, в хондроците хрящевой ткани синтезируются и коллаген типа II, и гликозаминогликаны, но в разных частях клетки [5]. Отметим, что фибриллы тканей суставно-связочного аппарата формируются также из комплексов молекул коллагена типов I, II и III с содержащимися в небольших количествах коллагенами типов V, VI, IX и XI [6]. При связывании с коллагеном типа II минорных коллагенов типов IX и XI толщина фибрилл в хрящах регулируется таким образом, что образуются фибриллы наименьшей толщины (20–40 нм). При этом механическая прочность тканей определяется суперспиральной структурой молекул и фибрилл коллагена. С коллагеновыми фибриллами в хрящах, связках и сухожилиях связываются протеогликаны, что приводит к образованию коллагеновых волокон [7].

Известно, что внеклеточный матрикс является структурной основой всех соединительных тканей [8]. Матрикс образуется в процессе связывания коллагена с другими биополимерами и молекулами. Протеогликаны и гликозаминогликаны, расположенные между коллагеновыми фибриллами, занимают большой объем в ткани. Их взаимодействие с коллагеном происходит преимущественно электростатически. Молекулярные механизмы образования матрикса в разных тканях различаются. В хрящах, сухожилиях, связках волокна формируются посредством связывания коллагеновых фибрилл с протеогликанами. В промежутках между фибриллами и протеогликанами расположены гликопротеины, через которые происходит взаимодействие коллагеновых фибрилл с клетками. Фибриллы хрящей имеют небольшую длину, а длина волокон в сухожилиях и связках достигает нескольких миллиметров и сантиметров [9].

Отметим, что в биосинтезе коллагена и образовании фибрилл коллагена могут участвовать низкомолекулярные пептиды, содержащие две-три аминокислоты. Коллаген экзогенного происхождения, поступающий с пищей, распадается на фрагменты в процессе гидролиза под влиянием ферментов желудочно-кишечного тракта. Затем фрагменты расщепляются до низкомолекулярных пептидов. В желудочно-кишечном тракте наряду с пассивным переносом веществ существует механизм АТФ-зависимого транспорта [10]. Высокая скорость всасывания ди- и трипептидов в желудочно-кишечном тракте позволяет эффективно влиять на процесс биосинтеза коллагена и ускорять биосинтез. Эндогенные и экзогенные низкомолекулярные пептиды также могут быть строительными блоками для построения новых фибрилл.

Следует заметить, что при болезнях артритов и артрозов в наибольшей степени разрушаются ги-

алиновые хрящи, в состав которых входит коллаген типа II [11]. Фибриллы в норме имеют плотную упаковку молекул коллагена, но небольшую толщину по сравнению с фибриллами костей, сухожилий и связок. Кроме того, хрящи локализованы в местах связывания разных соединительных тканей, которые испытывают большую механическую нагрузку, что может нарушать их структуру и функционирование. Таким образом, соединительные ткани суставно-связочного аппарата в позвоночнике и суставах могут разрушаться не только в результате болезней, но и перегрузок. Гиалиновые хрящи, которые содержатся в замыкающих пластинках межпозвонковых дисков, придают жесткой структуре позвоночника определенную степень гибкости. Однако изменение структуры коллагеновых фибрилл и протеогликанов в замыкающих пластинках сопровождается образованием позвонковых грыж [5]. Известно, что в суставах костную ткань тонким слоем окружают гиалиновые хрящи, которые при травмах могут легко разрушаться [12]. В медицинской практике для укрепления соединительных тканей используют преимущественно синтетические биоматериалы. Во многих странах наряду с применением таких биоматериалов при хирургических операциях разрабатывают также нутрициологические средства для лечения артритов и артрозов.

Гидролизаты коллагена для биомедицины и нутрициологии получают из соединительных тканей сельскохозяйственных животных и рыб [13, 14]. Чтобы коллаген усвоился в желудочно-кишечном тракте, требуется провести его гидролиз и получить низкомолекулярные пептиды. В нативном состоянии коллаген является молекулой большой длины и жесткой трехспиральной структуры, но в процессе денатурации белка полипептидные цепи разворачиваются и становятся доступными для действия ферментов.

При получении гидролизатов коллагена традиционной процедурой является экстракция белка из тканей разбавленными органическими кислотами (уксусная, лимонная). Однако к недостаткам данного метода относится использование больших объемов растворов, несмотря на то, что сначала проводится концентрирование коллагена, а затем ферментативный гидролиз. Обычно выход аминокислот и пептидов коллагена из соединительных тканей по такому методу составляет от 3 до 5%. Выход конечного продукта увеличивается до 10–15% в результате последовательных этапов ферментативного гидролиза и химического гидролиза [15]. При этом химический гидролиз изменяет структуру аминокислот.

Другим способом получения гидролизатов коллагена является протеолиз коллагена после действия ряда ферментов. В работе [16] в резуль-

тате последовательного действия трех ферментов гидролиз коллагена был эффективным с высоким выходом пептидов. Но молекулярные массы продуктов гидролиза составляли примерно 5 кДа, что соответствовало средней степени гидролиза.

Известно, что в хрящах сельскохозяйственных животных и рыб содержатся прочно связанные спирализованные молекулы и фибриллы коллагена типа II [5, 9]. Плотная упаковка молекул коллагена достигается межмолекулярными связями в поперечном и продольном направлениях фибрилл. Пространственную структуру коллагеновых фибрилл в тканях хрящей стабилизируют протеогликаны. Разрушить внеклеточный матрикс можно разными методами дезинтеграции тканей. Процедура обработки сырья в гомогенизаторе высокого давления позволяет расщепить коллагеновые фибриллы и волокна большой длины на фрагменты. Следовательно, гомогенизация позволяет получить частицы коллагеновых фибрилл, более доступные для протеолиза. Экспериментально отработанный метод гомогенизации хрящей был представлен в наших работах [17, 18].

Гидролиз коллагена в гомогенатах соединительных тканей можно проводить следующими способами: под влиянием температуры (тепловой гидролиз), под действием протеолитических ферментов (ферментативный гидролиз), под влиянием кислот и щелочей (химический гидролиз). Ферментативный гидролиз предпочтителен, поскольку после гидролиза не нарушается структура аминокислот. Под действием ферментов молекулярные связи между полипептидными цепями коллагена разрываются, а полипептидные цепи гидролизуются на пептиды с молекулярной массой около 5 кДа [16].

Гидролизаты коллагена непосредственно из соединительных тканей сложно получить. Это обусловлено высокой механической прочностью коллагеновых фибрилл в тканях животных, что не дает возможности выделить большое количество гидролизованного белка. Основной задачей проводимых нами исследований помимо повышения выхода расщепленных биополимеров является получение низкомолекулярных пептидов коллагена молекулярной массой не более 1 кДа, т. е. с высокой степенью гидролиза. С этой целью мы проводили гомогенизацию тканей при регулируемых параметрах давления и температуры, а затем ферментативный гидролиз биополимеров в гомогенатах. Гидролизаты, которые содержат низкомолекулярные пептиды коллагена и гликозаминогликаны, не требуют больших затрат энергии в процессе пищеварения и усвоения. Исследование степени гидролиза в зависимости от действия разных протеолитических ферментов является одной из задач при разработке нутрицевтиков с низкомолекулярными компонентами. Следует

отметить, что определение степени гидролиза (параметр DH) недостаточно применяется в научно-исследовательских работах прикладного направления. Однако степень гидролиза может быть адекватной характеристикой образцов, полученных из соединительных тканей и предназначенных для биомедицины и нутрициологии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Гомогенизация хрящевой ткани. Гомогенизацию хрящей из трахей крупного рогатого скота и свиней проводили в гомогенизаторе высокого давления «Донор-3» [19]. Процесс гомогенизации регулировали параметрами давления и температуры. Для сравнительной оценки гидролиземости субстратов применяли спектральный метод и метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР). В работе использовали спектрофотометр Specord UV VIS (Analytik Jena GmbH, Германия) и ЯМР-спектрометр Bruker AVANCE III 600 (Bruker BioSpin, Германия).

Ферментативный гидролиз. Температура, pH, концентрация фермента и время гидролиза являются ключевыми факторами, влияющими на образование пептидов и их характеристики. Различные ферменты имеют свои оптимальные значения этих параметров. Например, температура протеолиза может варьировать от 35 до 70°C, концентрация фермента — от 0.01 до 10.00%, pH — от 1.5 до 11.0, а время — от 10 до 600 мин [16]. После гомогенизации хрящей гидролиз биополимеров проводили последовательными процедурами с применением ряда ферментов. Предпочтение для гидролиза белков имеют не отдельные протеазы, а комплексы ферментов [20]. Эти ферменты обладают специфичным действием, разрывая определенные связи в белках. Известно, что химопсин содержит смесь α -химотрипсина и трипсина. Трипсин гидролизует пептидные связи, содержащие остатки аргинина и лизина, а химотрипсин расщепляет пептидные связи с остатками ароматических аминокислот тирозина и триптофана.

Нами был исследован протеолиз под влиянием ферментов с каталитической активностью при разных значениях pH. Мы сравнивали действие ферментов панкреатина, пепсина, химопсина, трипсина и папаина с их импортными аналогами. Далее мы выбрали лекарственное протеолитическое средство «Карипазим», которое выпускают в России два производителя: ЗАО «ВифиТех» и ООО «МедФлорина» (пос. Оболенск, Московская обл., Россия). Сравнительный анализ действия карипазима проводили по отношению к папаину производителя AppliChem (Германия).

В состав карипазима (протеолитическая активность 350 ПЕ) входят папаин, химопсин А, химопсин В, пептидазы А и В, муколитический

Таблица 1. Степень гидролиза ферментативных гидролизатов, полученных под влиянием химопсина и панкреатина

Фермент	Время гидролиза, ч	Параметр DH , %
Химопсин	1	12.9 ± 0.9
	2	14.8 ± 1.2
	3	15.9 ± 1.8
	4	16.8 ± 2.1
	5	17.4 ± 1.5
	6	17.6 ± 2.0
Панкреатин	1	13.7 ± 1.9
	2	15.2 ± 2.2
	3	16.7 ± 1.6
	4	17.9 ± 2.3
	5	18.4 ± 2.0
	6	18.8 ± 1.5

фермент лизоцим. Папаин и его аналоги гидролизуют пептидные, амидные и эфирные связи, содержащие аргинин, лизин, фенилаланин, а также тиоловые эфиры и N-ацетилированные связи. Для папаина установлено специфичное действие по отношению к аминокислотам глицин и лейцин. Поскольку коллаген содержит до 33% глицина, с помощью папаина можно эффективно разрывать молекулы коллагена на фрагменты. Кроме того, под действием папаина расщепляются полисахаридные цепи протеогликанов.

Одной из задач в разработке ферментативных гидролизатов является оценка эффективности расщепления белкового субстрата. Критерием эффективности может быть степень гидролиза, определенная по параметру DH [21, 22]. Параметр DH вычисляли как отношение массовой доли аминного азота к массовой доле общего азота в гидролизате. Определение аминного азота проводили с использованием нингидрина. Метод основан на взаимодействии нингидрина с аминокислотами в слабокислой среде при pH 5.5 с образованием дикетогидриндиленкетогидринамина (комплекс Руэмана сине-фиолетового цвета). Количество аминного азота в исследуемых гидролизатах определяли по калибровочному графику, построенному для стандартных разведений глицина. Общий азот был определен методом Кельдаля.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе протеолиз проводили в условиях, влияющих на растворимость гомогената. Процессы растворения и набухания при дезинтеграции соединительных тканей взаимосвязаны, что проверено при исследовании физико-химических свойств кожной ткани [23]. Разрушение

тканей эффективно протекает в области pH, отличающихся от изоэлектрической точки коллагена в растворе. Так как изоэлектрическая точка коллагена находится в интервале нейтральных значений pH (6.5–7.5), переход фибриллярного коллагена в растворимый происходит при кислых и щелочных pH. Поэтому в данной работе применяли ферменты, каталитическая активность которых оптимальна как в области более низких значений pH, так и более высоких значений pH по сравнению с интервалом pH 6.5–7.5.

Ферментативный гидролиз в щелочной области pH. Оптимальная величина pH для действия ферментов панкреатина и химопсина составляет 7.5–9.0, что находится выше изоэлектрической точки коллагена. Гидролиз проводили в K-Na-фосфатном буфере при фиксированных значениях pH (8.0) и температуры (42°C), варьируя концентрацию фермента и время гидролиза. Максимальная степень гидролиза наблюдалась после пяти-шести часов, но гидролиз продолжали в течение восьми часов.

Результаты экспериментов по действию химопсина и панкреатина на гомогенат гиалиновых хрящей крупного рогатого скота в зависимости от времени показали, что значения степени гидролиза (параметр DH) больше в гидролизатах, полученных с использованием панкреатина (табл. 1). Однако статистически значимые различия между образцами не обнаружены. Чтобы повысить степень гидролиза, были дополнительно внесены ферменты в гомогенаты хрящей. Добавление фермента через три часа после начала гидролиза увеличивает степень гидролиза в полтора раза.

Ферментативный гидролиз в кислой области pH. Поскольку изоэлектрическая точка коллагена находится при значениях pH, близких к 7.0, для перевода фибриллярного коллагена в растворимое состояние в кислой области pH следует приме-

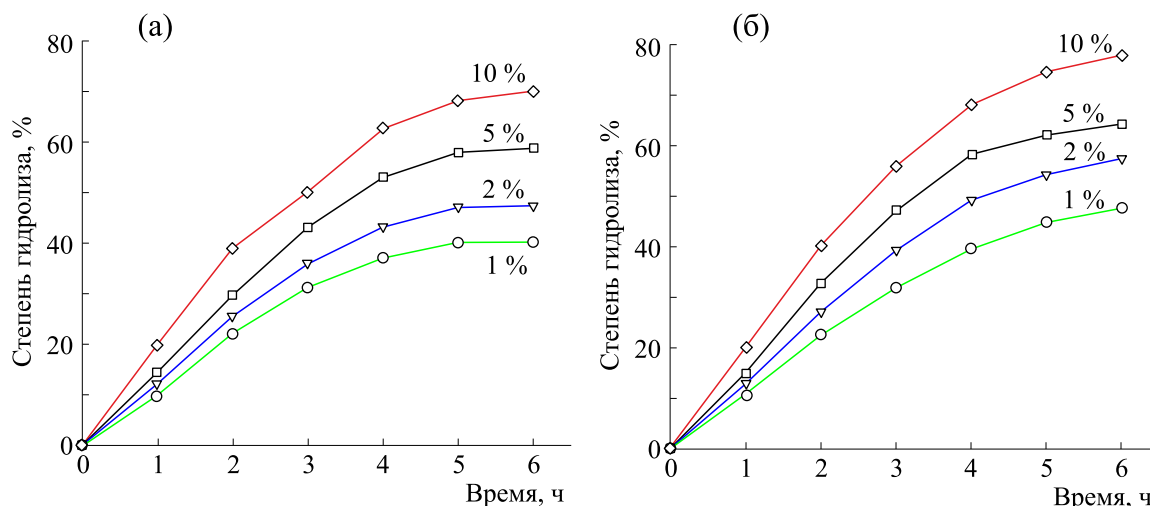


Рис. 1. Степень гидролиза гиалиновых хрящей в зависимости от концентрации карипазима (производитель ООО «МедФлорина»): (а) — при температуре протеолиза 50°C, (б) — при температуре протеолиза 60°C.

нять буферные растворы с $\text{pH} < 7.0$. На первом этапе работы для гидролиза мы применяли систему ферментов отечественного производства протепсин (ЗАО «ЗЭФ», пос. Ржавки Московской обл.) и фитопаин (ТУ9291-003-49959837-99), активность которых оптимальна в области pH 5–6. Степень гидролиза под влиянием фитопаина была выше в четыре раза по сравнению со степенью гидролиза под влиянием протепсина. Оптимальным значением для фитопаина в слабокислой области является pH 6.0. Степень гидролиза увеличивается с повышением концентрации фермента от 10 до 20%. При исследовании кинетики протеолиза в течение одного-четырех часов было установлено, что максимальное количество аминного азота образуется в течение первых трех часов. В оптимальных для фитопаина условиях степень гидролиза папаином производства компании AppliChem (Германия) была в 2.5 раза ниже.

Сравнительный анализ действия папаина и фитопаина показал, что под действием фитопаина наибольшая степень гидролиза в диапазоне температуры 45–60°C наблюдается при температуре ферментации, равной 55°C. Найдено, что степень гидролиза после действия фитопаина выше значений параметров гидролиза папаином. Комплекс ферментов, содержащихся в фитопаине, расщепляет больше связей в хрящевых гомогенатах по сравнению с папаином.

Степень гидролиза гиалиновых хрящей под влиянием карипазима производителя ООО «МедФлорина» возрастает с повышением концентрации от 1 до 10% (рис. 1). Параметр DH увеличивается в 1.5–1.7 раза с увеличением температуры гидролиза от 50 до 60°C. Более того, пара-

метр DH имеет наибольшую величину при температуре гидролиза 60°C. Кинетические исследования ферментативного гидролиза показывают, что в период от одного до четырех часов идет накопление аминного азота. Наибольшая степень гидролиза, равная 78%, достигается к шести часам.

Степень гидролиза гиалиновых хрящей под влиянием карипазима производителя ЗАО «ВифиТех» также возрастает с повышением концентрации от 1 до 10% (рис. 2). Однако параметр DH при температуре гидролиза 60°C имеет наибольшую величину, равную 48%. Это значение в 1.6 раза меньше соответствующего значения параметра DH после гидролиза под действием карипазима производителя ООО «МедФлорина». Следует отметить, что для практического применения при получении белковых гидролизатов степень гидролиза не должна быть ниже 50% [20].

В проведенных экспериментах мы установили, что степень гидролиза зависит от производителя карипазима. Как видно из рис. 1 и 2, степень гидролиза коллагена под действием карипазима производителя ООО «МедФлорина» выше по сравнению со степенью гидролиза под влиянием карипазима производителя ЗАО «ВифиТех».

ЯМР-исследования. Мы провели также гидролиз протеогликанов под действием карипазима производителя ООО «МедФлорина» при следующих условиях: 33.4 мМ К-На-фосфатный буфер, pH 6.0, температура 55°C, концентрация фермента 10%. Гидролиз был проведен в течение одного-шести часов. Следует отметить, что эффективность действия гликозаминогликанов (хондропротекторов) на организм человека во многом

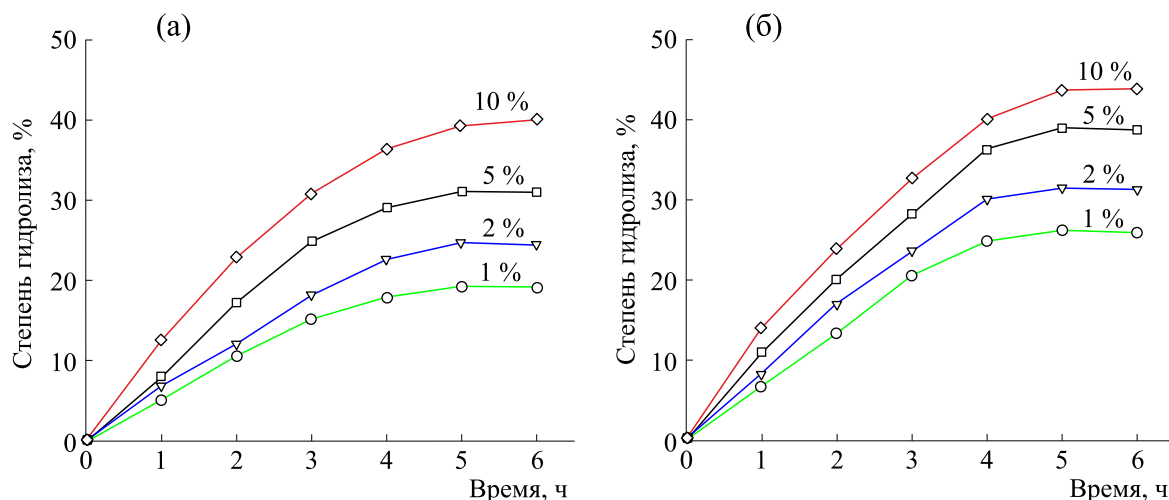


Рис. 2. Степень гидролиза гиалиновых хрящей в зависимости от концентрации карипази́ма (производитель ЗАО «ВифиТех»): (а) — при температуре протеолиза 50°C, (б) — при температуре протеолиза 60°C.

определяется их расщепленностью на дисахариды и моносахариды. Поэтому получение и анализ низкомолекулярных компонентов гликозаминогликанов представляет необходимый этап исследований при разработке нутрицевтиков. Известно, что основными структурными единицами хондроитин-4-сульфата и гиалуроновой кислоты являются дисахариды. После гидролиза гликозаминогликанов образуются как олигосахариды, так и дисахариды и моносахара.

Степень гидролиза протеогликанов и гликозаминогликанов была изучена методом ЯМР. На рис. 3а приведен ЯМР-спектр гидролизата гиалинового хряща из трахей свиней. Протеолиз выполнен в течение шести часов. В области 5.4–5.5 ppm идентифицирован спектр гидролизованного образца — гликогена, состоящего из связанных между собой молекул глюкозы. На рис. 3б приведен ЯМР-спектр гидролизата гиалинового хряща из трахей крупного рогатого скота. Протеолиз также выполнен в течение шести часов. После гидролиза зарегистрирован спектр образца в области 5.0–5.5 ppm, который относится к молекулам гликогена и глюкозы. Гликоген содержит связанные между собой молекулы глюкозы.

Сравнивая гидролизаты из гиалиновых хрящей разных животных, следует заметить, что более полный гидролиз проведен в гомогенатах гиалиновых хрящей крупного рогатого скота, поскольку на спектре идентифицирован моносахарид глюкоза — конечный продукт гидролиза гликозаминогликанов. Для полного гидролиза потребуется увеличить концентрацию карипази́ма до 15% и время гидролиза, что будет выполнено при следующих исследованиях.

ВЫВОДЫ

Исследование степени гидролиза в зависимости от действия разных протеолитических ферментов является одной из задач при разработке нутрицевтиков на основе коллагена. При изучении степени гидролиза биополимеров в гомогенатах гиалиновых хрящей были использованы следующие ферменты: панкреатин, химопсин, папаин и протеолитическое лекарственное средство карипазим, содержащее папаин. Такие параметры ферментативного гидролиза, как pH, температура, продолжительность процесса и концентрация фермента оказывают влияние на степень гидролиза. Степень гидролиза регулируется температурой и концентрацией фермента. С целью практического использования разработок нутрицевтиков, предназначенных для биомедицины и нутрициологии, проверено лекарственное протеолитическое средство карипазим двух производителей. Максимальная степень расщепления коллагена на фрагменты установлена после действия карипази́ма от производителя ООО «Медфлорина» (пос. Оболенск Московской области). Степень гидролиза коллагена, определенная по параметру DH , может быть необходимой и существенной характеристикой научно-исследовательских работ прикладного назначения.

В гомогенатах гиалиновых хрящей крупного рогатого скота проведен более полный гидролиз протеогликанов по сравнению протеолизом в гомогенатах хрящей свиней, поскольку на ЯМР-спектре идентифицирована глюкоза — конечный продукт гидролиза гликозаминогликанов.

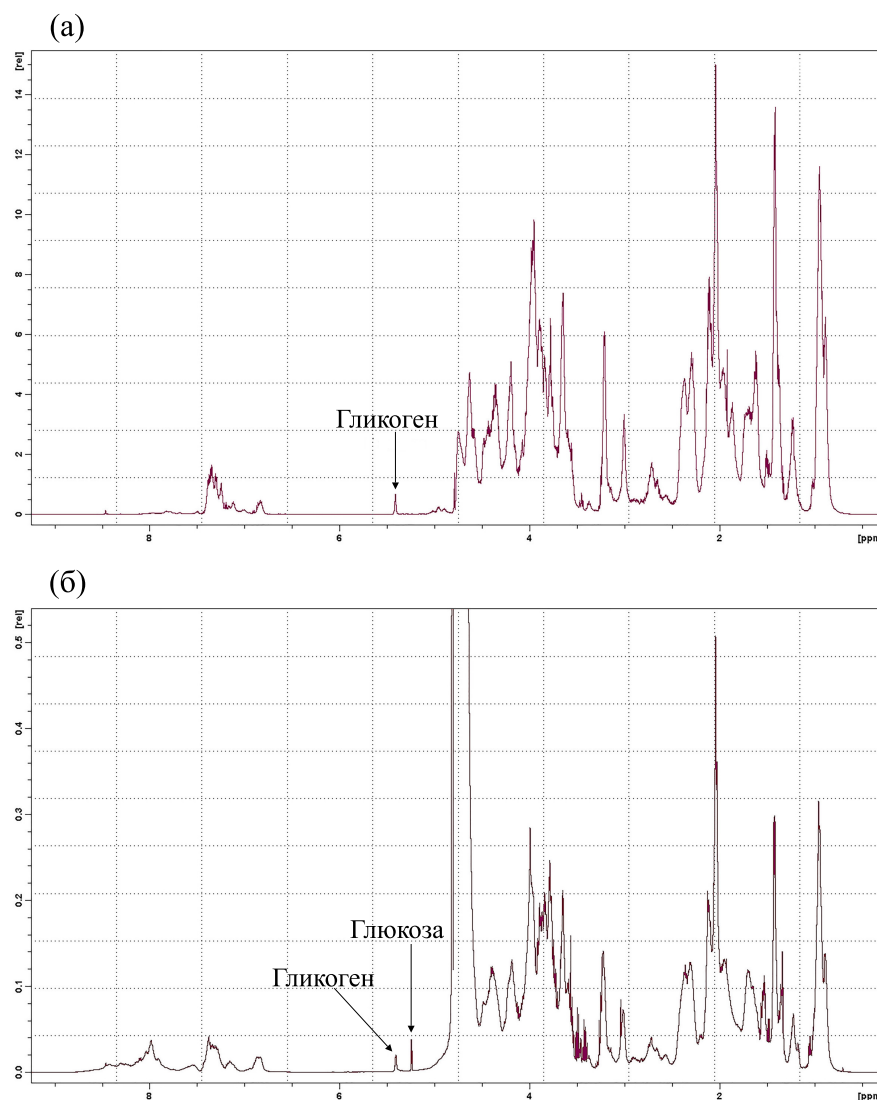


Рис. 3. Двухмерные протонные ЯМР-спектры гидролизатов гиалиновых хрящей, полученных под влиянием карипазима производителя ООО «МедФлорина» в течение шести часов в 33.4 мМ К-Na-фосфатном буфере, pH 6.0 при температуре 55°C и концентрации карипазима 10%: (а) — гомогенат гиалиновых хрящей из трахей свиней, (б) — гомогенат гиалиновых хрящей из трахей крупного рогатого скота.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы считают своим приятным долгом выразить благодарность рецензентам за критический анализ рукописи и ценные замечания. Авторы благодарны организаторам и руководителям Центра коллективного пользования ИТЭБ РАН за спектроскопические приборы для анализа образцов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа проведена в рамках бюджетного финансирования ИТЭБ РАН по теме № 5 «Физико-химические основы биомедицины».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит экспериментов с использованием людей и животных в качестве объектов исследований. Сырье для экспериментов было закуплено в магазине в замороженном виде и сопровождалось ветеринарно-санитарной документацией.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. E. J. Miller, in *Collagen* (CRC Press, Boca Raton, 1988), Vol. 1, P. 139.
2. E. J. Kucharz, *The collagen: biochemistry and pathophysiology* (Springer-Verlag, Berlin, 1992).
3. B. Brodsky and J. A. M. Ramshaw, *Matrix Biol.*, **15**, 545 (1997).
4. D. J. Prockop and K. I. Kivirikko, *Annu. Rev. Biochem.*, **403** (1995).
5. *Лазерная инженерия хрящей* (Физматлит, М., 2006).
6. M. E. Nimni and R. D. Harkness, in *Collagen*, (Boca Raton, CRC Press, 1988), Vol. 1, P. 1.
7. J. E. Scott, *Biochem. J.*, **252**, 313 (1988).
8. A. Veis and A. George, in *Extracellular matrix assembly and structure* (Acad. Press, N.-Y., 1994), P. 15.
9. Б. Альбертс, Д. Брей, Дж. Льюис и др. *Молекулярная биология клетки* (Мир, М., 1987).
10. В. А. Тутельян, В. Х. Хавинсон и В. В. Малинин., *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **135** (1), 1, (2003).
11. T. Aigner and J. Stöve, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **55** (1), 569 (2003).
12. В. Н. Павлова, Т. Т. Копьева, Л. И. Слуцкий и Г. Г. Павлов, *Хрящ* (Медицина, М., 1988).
13. V. S. Simons and G. L. Steinmeyer, *J. Sci. Rep.*, **8**, 17733 (2018). DOI: 10.1038/s41598-018-36046-3
14. H. Song and B. Li, *Biomed. Sci. Tech. Res.*, **1** (2), (2017).
15. Т. Н. Пивненко, Г. Ю. Клычкова, Н. Н. Ковалев и др., Патент РФ №2250047, БИ № 41 (2005).
16. M. Ahmed, A. K. Verma, and R. Patel, *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 100315 (2020). DOI: 10.1016/j.scp.2020.100315
17. Т. И. Николаева, М. В. Молчанов, К. С. Лауринавичюс и др. *Международ. журн. приклад. и фундамент. исследований*, **10** (3), 442 (2016).
18. Т. И. Николаева, К. С. Лауринавичюс, В. В. Капцов и др., *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **167** (2), 194, (2019).
19. В. В. Капцов, Г. Н. Русаков, Ю. А. Илларионов и др., Патент РФ № 2035855, БИ № 15 (1995).
20. Л. Я. Телишевская, *Белковые гидролизаты. Получение, состав, применение* (Аграрная наука, М., 2000).
21. Q. Wang, P. Ma, X. Ma, and D. J. Fan, *Chem. Pharm. Res.*, **6**, 278 (2014).
22. S. Iltchenko, A. P. Kempka, R. C. Prestes, and R. Bras. *Tecnol. Agroindustr.*, **11** (1), 2165 (2017).
23. А. Н. Михайлов, *Коллаген кожного покрова и основы его переработки* (Легкая индустрия, М., 1971).

Comparative Analysis of the Degree of Hydrolysis of Biopolymers in Hyaline Cartilage Homogenates in the Presence of Proteolytic Enzymes

T.I. Nikolaeva*, D.A. Barsuk**, M.V. Molchanov*, D.A. Prokhorov*,
V. I. Emelyanenko*, and P.V. Shekhovtsov*

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

**Pushchino Branch of the Russian Biotechnological University,
prosp. Nauki 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

Investigating the degree of hydrolysis in the presence of different proteolytic enzymes is one of the tasks regarding further development of nutraceuticals obtained from connective tissues for biomedicine. Hydrolysis of biopolymers in cattle and swine tracheal hyaline cartilage homogenates was carried out in the presence of the following enzymes: pancreatin, chymopsin, papain and karpazim, a drug that contains papain, a proteolytic enzyme. This study shows that karpazim manufactured by MedFlorina LLC has better efficacy than karpazim manufactured by ZAO Vifiteh, and the greatest degree of hydrolysis for collagen occurs at 60°C and karpazim concentration of 10%. More complete hydrolysis of proteoglycans was performed in the cattle hyaline cartilage homogenates, because the analysis of NMR spectra revealed the glucose, the final product of glycosaminoglycan hydrolysis.

Keywords: hyaline cartilage, collagen, glycosaminoglycans, degree of hydrolysis, temperature, concentration