

УДК 664.952.5

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В ПРОДУКТЫ С ВЫСОКОЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЦЕННОСТЬЮ

© 2022 г. А. Н. Иванкин*

*Московский государственный технический университет (национальный исследовательский университет)
им. Н.Э. Баумана, Москва, 105005 Россия*

**e-mail: aivankin@inbox.ru*

Поступила в редакцию 31.08.2021 г.

После доработки 15.09.2021 г.

Принята к публикации 18.09.2021 г.

Проведено сопоставительное изучение процесса кислотного и ферментативного гидролиза костной ткани с целью получения высококачественного белкового продукта. Определен аминокислотный и фракционный состав полученного продукта. Полнота деградации костной ткани при обработке ферментом достигнута за счет высокого диспергирования исходного сырья. Показано, что в отличие от кислотного гидролиза при расщеплении костной ткани протеолитическим ферментным препаратом Протепсин в составе продукта не обнаруживаются примеси D-аминокислот. Полученный продукт трансформации костного сырья животного происхождения с высокой эффективностью может быть использован для приготовления питательных микробиологических сред, животных кормов, а также на пищевые цели.

Ключевые слова: гидролиз белков, костная ткань, ферментные препараты, D-, L-изомеры аминокислот

DOI: 10.56304/S0234275822010045

Все живые организмы нуждаются в постоянном белковом питании. Нехватка доступного белка приводит к негативным последствиям, как в питании человека, так и в производстве полноценных кормов для сельскохозяйственных животных и изготовлении питательных сред в биотехнологии [1, 2].

Поиск дополнительных сырьевых ресурсов полноценного белка постоянно продолжается, однако проблема далека от разрешения. Источником важнейших белковых продуктов являются сельскохозяйственные животные, при их переработке образуются мясокостные отходы, составляющие более четверти массы исходного животного сырья. Такие отходы содержат трудно перерабатываемую костную ткань, которая не может представлять интерес для пищевых систем, поскольку содержит не усвояемый белок и, следовательно, не обладает биологической ценностью [3, 4].

Утилизация костных отходов представляет собой также большую экологическую проблему. Основной способ, который применяется сегодня, заключается в превращении кости в кормовую муку, что дает возможность получать только биологически неполноценные корма [5]. Однако из-за воз-

можного содержания в костной муке прионов ее применение в некоторых странах запрещено. Основные усилия исследователей в разных странах в последние десятилетия были направлены на попытки трансформировать костную ткань в приемлемые белковые добавки.

Как известно, химический состав костной ткани может содержать: влаги – от 37 до 40%; белка – от 17 до 19%; минеральных солей – от 21 до 25%; жира – от 18 до 20%. Аминокислотный состав костного белка приведен в табл. 1 [1, 4, 6].

Возможный способ преобразования костной ткани химическим путем заключается в использовании гидролиза минеральными или органическими кислотами, которые расщепляют белок костной ткани при повышенных температурах в течение многочасового периода [6]. Гидролизаты, полученные при обработке серной или соляной кислотами, можно использовать в качестве компонентов питательных систем, однако ряд ограничений на применение химических реагентов до сих пор не позволил разработать приемлемые технологии переработки костной ткани таким путем. В результате кислотного гидролиза кости получа-

Таблица 1. Важнейшие аминокислоты в составе костного белка

Table 1. Essential amino acids in bone protein

Содержание аминокислот, г/100 г белка			
незаменимые		заменимые	
Асп	3.7–5.1	Арг	1.4–1.9
Лиз	2.1–2.9	Гис	1.0–1.6
Лей	2.1–3.4	Цис	1.0–1.8
Иле	0.9–2.1	Глу	6.7–9.2
Вал	1.6–2.5	Тир	0.8–3.1
Мет	2.7–4.3	Про	14.0–15.8
Тре	1.7–2.6	Гли	17.6–19.5
Трп	0.6–1.7	Ала	5.2–6.6
Фен	1.4–3.4	Сер	2.8–4.0

ется продукт глубокой переработки костного белка в смесь аминокислот. Такой продукт после соответствующей очистки можно использовать *in vivo* для парентерального питания, как это, например, реализовано в инъекционном препарате Полиамин [7, 8].

Недостатком применения кислотной трансформации в жестких условиях является развития процесса рацемизации аминокислот [9]. Как известно, природные аминокислоты находятся в белках в виде L-форм, однако в последнее время было показано, что в живых системах могут содержаться минорные примеси D-форм аминокислот, входящих в состав белков и пептидов, что чаще всего связано с нарушениями в нормальном развитии организма [10–12].

Считается, что практическое использование продукта, содержащего примеси D-аминокислот является не всегда возможным из-за потенциального отклонения в протекании естественных биохимических процессов в организмах, потребляющих такие продукты [11].

В литературе мало публикаций, затрагивающих вопрос D- и L-изомеризации аминокислот в процессе гидролитической переработки [13–15]. В основном внимание уделено стереоспецифичности ферментов в процессе деградации белка [16, 17].

Ферментативное расщепление является другим возможным путем трансформации белка. Многократные попытки разработать приемлемую технологию мягкого расщепления костной ткани ферментативным путем не привели к сколько-нибудь заметным результатам [18–20].

В литературе практически отсутствуют сведения о полноценной переработке костной ткани под действием ферментов, поскольку все опублико-

ванные данные фактически относятся к свойствам продуктов, полученных из смесового мяско-костного сырья, и наблюдаемые результаты могут быть обусловлены примесями мышечной животной ткани.

Описано применение липазы для предварительной обработки костной ткани. Процесс осуществляли в течение 4 ч при pH 7.5 и температуре 40°C. Концентрация субстрата составляла 9%, липазы 0.08%. Степень последующего ферментативного гидролиза щелочной протеазой после такой обработки увеличивалась на 8% вероятно за счет значительного снижения содержания липидов и изменения структуры поверхности костной ткани [21].

Низкий выход ферментативного гидролиза костной ткани ряд исследователей пытались повысить за счет использования ультразвука или субкритического водного гидролиза [22, 23].

В рассматриваемом костном сырье самым ценным является белковая компонента. Ее при переработке необходимо превратить в мелкие фрагменты, которые и будут обладать питательной ценностью, присущей полноценным белкам. В составе костной ткани содержатся также минеральные и липидные составляющие, которые находятся в связанном состоянии, и они также могут расщепляться до небольших фрагментов [24, 25].

Результатом обработки костной ткани должен быть продукт, содержащий небольшие белковые или пептидные фрагменты и частично свободные аминокислоты, которые могут усваиваться в пищеварительных системах живых организмов.

Цель работы – получить белковый продукт из костной ткани, который может представлять интерес для практического использования в качестве питательной белковой добавки.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве объектов исследования использовали обезжиренную костную ткань животного происхождения без примесей мякотных тканей. Дробление кости осуществляли сначала на диспергаторе Vuchi (Швейцария) с образованием массы с максимальным диаметром частиц менее 1–2 мм, а затем на высокоскоростном диспергаторе ULTRA-TURRAX T 25 (IKA, Германия). Измельченный продукт подвергали ферментативной обработке с использованием полиферментного препарата “Протепсин” (“Завод эндокринных ферментов”, Россия), содержащий в своем составе протеиназу I и протеиназу II [26], с общей протеолитической активностью 150 ед/г. Реальную удельную активность фермента для соотнесения с

указанной в паспорте препарата определяли по расщеплению 1%-ного раствора казеина в 0.05 М трис- PO_4 буфере при 37°C и pH 7.8. За единицу активности фермента принимали такое его количество, которое при указанных выше условиях давало прирост 0.001A_{280} в мин [27].

Параметры ферментативной обработки сырья: гидромодуль сырье : вода – 1 : 3; концентрация ферментного препарата “Протепсин” составляла 0.3% от массы сырья; продолжительность действия фермента – 6 ч; при pH 6.5 и температуре 45°C. Затем жидкий ферментализат подвергали распылительной сушке.

Для сравнения проводился химический гидролиз костной ткани в 6 М растворе H_2SO_4 , который осуществляли по условиям, описанным в работе [6], гидромодуль 1 : 1, температура 120°C, 24 ч.

Морфометрические измерения проводили с использованием светового микроскопа с окуляром (K7x) X (7x 8\0.20) и оптической компьютерной программой обработки изображений Motic Images 2000 (Motic China Group Co, Китай).

Массовую долю аминокислот определяли на аминокислотном анализаторе Biotronic LC3000 (Германия) методом распределительной хроматографии после гидролиза белков с использованием интегрирующей системы Winpeak Eppendorf-Biotronic (Германия) для областей пиков, полученных путем анализа стандартной смеси аминокислот, содержащей 2.5 мкмоль каждой аминокислоты в 1 мл раствора [28].

Анализ D- и L-форм аминокислот осуществляли также методом ВЭЖХ с использованием хиральной колонки (4.6 × 250 мм), заполненной сорбентом “Nautilus-E” ЗАО “БиоХимМак СТ” (Россия) по условиям, описанным в работе [29].

Фракционный состав белка изучали методом SDS-электрофореза в 12% полиакриламидном геле [24, 28].

Химический состав (содержание жиров, углеводов и минеральных солей) анализировали по стандартным методикам [28].

Степень деградациии костной ткани оценивали гравиметрически по разнице масс сухих остатков костных частиц, выделенных из суспензии центрифугированием при 5000 g на центрифуге Eppendorf (Германия)

Возможность использования ферментализата в качестве компонента питательной среды изучали при культивировании рекомбинантного штамма *E. coli* JM109. В контрольном опыте клетки выращивали в течение 8 ч при 37°C и переме-

шивании на качалке со скоростью 2 об/мин, при 37°C. Использовали питательную среду с pH 6.8 следующего состава (г/л): казеин-петон 20; дрожжевой автолизат 15; K_2HPO_4 6; NaCl 5; MgSO_4 0.5; HCl 2; глюкоза 10. В эксперименте по исследованию эффективности ферментализата в составе питательной среды заменяли белковую часть пептона и автолизата на эквивалентное количество ферментализата.

В работе использовали реактивы: хлорид натрия, сульфат магния, гидрофосфат калия, соляную кислоту, казеин, трис(гидроксиметил)аминометан (трис), ортофосфорную кислоту, N,N,N,N-тетраметилэтилендиамин, гидроксид натрия, гидроксид калия, акриламид, метиленбисакриламид, натрия додецилсульфат, аммония персульфат, кислоту уксусную ледяную, 2-меркаптоэтанол, глицерин, бензилкарбамат (Sigma, США), ацетонитрил, метанол, гидрофосфат натрия, кумасси R250, бромфенолблау, маркеры белков с молекулярной массой от 6 до 250 кДа, казеин-петон, дрожжевой автолизат (Serva, Германия). В качестве стандартов аминокислот использовали раствор смеси индивидуальных L-аминокислот: глицина, аланина, валина, лейцина, изолейцина, пролина, фенилаланина, тирозина, метионина, цистеина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, лизина, аргинина, гистидина, серина, треонина молярной концентрации 2.5 мкмоль/мл (Supelco США), а также D-формы аминокислот (Merck Германия).

Биологический эксперимент продолжительностью 60 сут проводился на крысах-самцах линии Вистар с исходной массой тела 120 ± 5 г в возрасте 5 недель в виварии ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН, разделенных на интактных ($n = 10$) и экспериментальных ($n = 48$) животных. Крысы контрольной группы потребляли стандартный рацион, крысам опытной группы в рацион добавляли исследуемую комовую добавку в количестве 20% белковой составляющей рациона. Контролировали внешний вид, поведенческую активность и привес массы животных. Все стадии исследования соответствовали законодательству Российской Федерации, международным этическим нормам и нормативным документам по правилам работы с лабораторными животными.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из литературных данных известно, что полноценная переработка кости представляет собой достаточно сложную задачу. Для увеличения эффективности химико-ферментативного процесса

Таблица 2. Гранулометрический состав диспергированной костной ткани

Table 2. Granulometric composition of dispersed bone tissue

Номинальный размер частиц, мкм	Время, мин		
	0	10	20
	содержание, %		
200–1000	97	40	1
60–100	2	10	9
20–60	1	50	90

мы использовали подход, основанный на высокой дисперсии костной ткани.

Предварительные исследования показали, что даже достаточно жесткая обработка кости сильными кислотами позволяет переводить в раствор менее 60–70% массы измельченного сырья с получением частиц размером более 2–10 мкм.

Для увеличения дисперсности обрабатываемого материала использовали двукратное измельчение на диспергаторе Vuchi затем на высокоскоростном со скоростью вращения режущего вала 25000 об/мин.

Увеличение температуры с 20 до 40°C в течение процесса обработки, по-видимому способствовало его эффективности и увеличивало степень деградации костной ткани. В табл. 2 представлены результаты диспергирования 10% водной суспензии кости от времени процесса.

Для окончательного получения белкового продукта из костной ткани исходное сырье подвергали длительному высокоскоростному дроблению, что позволяло получить агрегатно устойчивую в течение 3 сут водную суспензию с костными частицами, на 90% имевших размеры на уровне от 20 до 60 мкм. Остальная часть диспергированного препарата состояла из частиц размером не более 200 мкм, что позволило в дальнейшем эффективно осуществить расщепление костной ткани с получением биологически ценного продукта.

Как указывалось выше полную деградацию костной ткани можно осуществить обработкой минеральной кислотой в относительно жестких условиях. Представляло интерес оценить возможную рацемизацию аминокислот в этом процессе.

В табл. 3 представлена зависимость накопления свободных аминокислот от времени химиче-

ской обработки костной ткани минеральной кислотой при 120°C.

Согласно данным табл. 3 процесс расщепления костной ткани в указанных условиях протекает во времени и заканчивается в течение суток. За этот период аминокислоты, связанные в костном коллагене практически полностью высвобождаются из белка и переходят в жидкую фазу в свободном виде. Выход, оцениваемый как степень деградации белка, достигает максимума за это же время. Процесс кислотного гидролиза в присутствии сильной минеральной кислоты может сопровождаться рацемизацией с образованием D-форм аминокислот. В указанных условиях были обнаружены не все D-аминокислоты исходных L-аминокислот, однако суммарное количество D-форм могло достигать нескольких процентов от общего пула в зависимости от условий кислотного гидролиза. Таким образом, кислотный гидролиз позволяет расщеплять костную ткань животного происхождения, но с возможным параллельным образованием в гидролизате примесей D-аминокислот.

Необходимо отметить, что в табл. 3 представлены данные только для идентифицированных D-форм. Аминокислоты, с содержанием менее 0.01 г/100 г белка в протоколе не учитывались.

Исследования деградации диспергированной костной ткани проводили с использованием ферментного препарата Протепсин. Протепсин, обладая протеазной и коллагеназной активностью, способствовал выделению из костного коллагена белковых фрагментов и свободных аминокислот, в том числе некоторого количества оксизамещенных аминокислот: (окси)гидроксипролина и гидроксипролина, что дополнительно обеспечивает питательную ценность полученного гидролизата.

Отмеченное отсутствие D-аминокислот в ферментализате является важным преимуществом ферментативной обработки белкового сырья по сравнению с методом химического гидролиза.

Обработка сырья в оптимальных условиях приводила к существенному снижению общей молекулярной массы высвобождаемых белков. По данным денатурирующего SDS-электрофореза в 12%-ном полиакриламидном геле, основная масса фракций ферментализата находилась в интервале от 10 до 20 кДа. Белковые фрагменты такого размера являются наиболее благоприятными для обеспечения работы желудочно-кишечного тракта, в частности, млекопитающих [7, 15, 21].

Обработка дисперсии костной ткани Протепсином позволила получить гидролизаты со следующими характеристиками: массовая доля белка от 50.0 до 60.0%, жира от 8.0 до 15.0%, золы – от

Таблица 3. Аминокислотный состав исходной костной ткани и изменение содержания свободных аминокислот в кислотном гидролизате в зависимости от времени обработки, г/100 г белка

Table 3. Amino acid composition of the original bone tissue and change in the content of free amino acids in the acid hydrolyzate depending on the processing time, g/100 g of protein

Наименование аминокислоты	Время обработки, ч			
	0 (в сырье)	6	12	24
Ала	6.4 ± 0.3	1.8 ± 0.3	4.3 ± 0.6	6.2 ± 0.7
D-Ала	н/о	н/о	0.04 ± 0.01	0.1 ± 0.1
Арг	1.9 ± 0.1	0.4 ± 0.1	1.5 ± 0.3	1.9 ± 0.3
Асп	5.0 ± 0.3	1.6 ± 0.2	3.2 ± 0.5	4.7 ± 0.5
D-Асп	н/о	н/о	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1
Вал	2.6 ± 0.2	0.5 ± 0.1	1.3 ± 0.3	2.4 ± 0.6
D-Вал	н/о	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.2 ± 0.1
Гис	1.6 ± 0.1	0.3 ± 0.1	1.4 ± 0.2	1.6 ± 0.3
Гли	19.3 ± 1.1	5.5 ± 0.3	12.8 ± 1.1	19.3 ± 2.0
Глу	9.2 ± 0.5	2.2 ± 0.1	6.7 ± 0.8	8.9 ± 0.9
D-Глу	н/о	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1
Иле	2.1 ± 0.4	0.2 ± 0.1	1.6 ± 0.3	2.1 ± 0.3
Лей	3.3 ± 0.3	0.6 ± 0.2	3.0 ± 0.5	3.1 ± 0.3
D-Лей	н/о	0.04 ± 0.01	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1
Лиз	2.9 ± 0.3	0.5 ± 0.1	1.6 ± 0.3	2.7 ± 0.3
Мет	4.5 ± 0.5	1.3 ± 0.3	3.8 ± 0.4	4.2 ± 0.5
D-Мет	н/о	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.1
Про	15.8 ± 1.4	10.3 ± 0.9	14.6 ± 1.6	15.8 ± 1.8
Сер	4.1 ± 0.6	2.1 ± 0.4	3.0 ± 0.4	3.9 ± 0.5
D-Сер	н/о	н/о	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1
Тир	3.1 ± 0.4	1.5 ± 0.3	2.8 ± 0.5	3.1 ± 0.4
Тре	2.8 ± 0.3	1.6 ± 0.4	1.9 ± 0.2	2.8 ± 0.4
Трп	1.7 ± 0.2	0.4 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.3 ± 0.2
D-Трп	н/о	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1
Фен	3.3 ± 0.3	1.6 ± 0.3	2.7 ± 0.6	3.0 ± 0.3
D-Фен	н/о	н/о	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1
Цис	1.8 ± 0.2	0.4 ± 0.1	1.1 ± 0.3	1.5 ± 0.5
Суммарное содержание	91.4	33.3	69.6	90.7
Выход по массе, %	0	15	47	98
Массовая доля белка по Кьельдалю	18.5	16.3	7.5	н/о

Примечание. н/о – не обнаружено.

Note. н/о – not detected.

Таблица 4. Белковые фракции продукта, % от массы белка
Table 4. Protein fractions of the product, % of the mass of protein

Молекулярная масса, кДа	Исходное сырье	Гидролизат	
		кислотный	ферментативный
>250	97*	н/о**	1
70–250	н/о	н/о	3
50–70	н/о	н/о	7
30–50	1	1	5
20–30	н/о	5	2
15–20	н/о	н/о	2
10–15	2	10	78
<10	н\о	84	2

Примечание. * – расчетная величина, полученная вычитанием 3% пептидов, перешедших в раствор, из 100% белка, содержащегося в костной ткани. ** – не обнаружено в растворимой части белка.

Note. * – calculated value obtained by subtracting 3% of the peptides in solution from 100% of the protein contained in the bone tissue. ** – not found in the soluble part of the protein.

20.0 до 25.0%, углеводов 2.0–10.0%, рН 1%-ного раствора 5.68–5.78. Степень переработки костного сырья в растворимый белок составляла более 86%. Оставшаяся часть нефрагментированного костного остатка представляла собой дисперсию с частицами, размеры которых не превышали 100–150 мкм. Такой уровень дисперсности практически не влияет на органолептические характеристики пищевых систем в случае введения такого продукта в их состав.

В табл. 4 представлен состав белковых продуктов, полученных в результате химического и ферментативного гидролиза. Приведены основные идентифицированные в них с помощью электрофореза в ПААГ фракции белков.

Кислотный гидролиз приводит к получению продукта, в зависимости от условий, состоящий до 97% из свободных аминокислот и содержащий незначительное количество примесей коротких пептидов.

В ферментативном гидролизате, получаемом под воздействием Протепсина кроме свободных аминокислот зафиксировано наличие большого количества пептидов с молекулярной массой 10–20 кДа, суммарная массовая доля которых, составляла около 50%. Такие фракции белка достаточно

эффективно потребляются в системах пищеварения живых организмов.

Как следует из представленных данных в исходном сырье фракции свободного белка, которые могут быть идентифицированы по данным электрофореза, практически отсутствуют, что связано с нерастворимостью костного коллагена, однако наличие некоторых примесей минорных фракций может быть объяснено, по-видимому, развитием механо-химических процессов при высокоскоростном диспергировании костных частиц.

Полученный путем ферментативной переработки костной ткани белковый продукт был испытан в качестве компонента питательных сред в микробиологических целях, а также в качестве кормовой и пищевой добавок.

В контрольном опыте при культивировании генно-инженерного продуцента *Escherichia coli* JM109, содержащего рекомбинантный белок, получали выход сырых клеток на уровне 10 г/л и после индукции, процессинг рекомбинантного белка, содержащего последовательность проинсулина, составлял по данным электрофореза около 40% от клеточного белка.

Замена белковой части пептона и автолизата на эквивалентное количество ферментализата костной ткани позволило осуществить аналогичный

процесс культивирования штамма с показателем, практически не отличающимся по выходу клеток и содержанию в них рекомбинантного белка от культивирования клеток *E. coli* JM109 в контрольном опыте на стандартной питательной среде.

Ранее в своих исследованиях по получению путем биосинтеза рекомбинантного белка с использованием продуцента *E. coli* JM109 мы наблюдали существенную зависимость выхода от качества белковой составляющей питательной среды [6, 24]. Большинство белковых компонентов при их использовании в рецептуре питательной среды для данного, достаточно чувствительного к условиям культивирования штамма, приводило к существенному снижению выхода клеток в биосинтезе и резко, практически десятикратному уменьшению процессинга целевого рекомбинантного белка в сопоставимых условиях. На основании полученных результатов ферментолит костной ткани может рассматриваться как перспективный компонент при его использовании в составе питательных сред.

Испытания ферментативного гидролизата в качестве кормовой добавки показали эффективность применения продукта в составе животных кормов. Полученный экструзионным путем кормовой рацион, состоящий из смеси (1 : 1 : 1) ферментолита, жмыхов пшеничных зародышей и отходов пшеничной муки, использовали для кормления лабораторных животных (крысы).

Аминокислотный состав кормовой добавки на основе ферментолита, г/100 г белка: Арг 1.8; Гис 1.3; Лиз 2.7; *o*-Лиз 1.1; Лей 2.1; Иле 1.0; Вал 1.6; Цис 1.0; Мет 2.2; Тре 1.4; Трп 0.4; Фен 1.7; Глу 6.5; Тир 1.2; Про 10.2; *o*-Про 4.1; Гли 16.5; Ала 5.2; Сер 2.8; Асп 3.7. Такой кормовой продукт характеризуется высоким содержанием белка, достаточно сбалансированным аминокислотным составом с соотношением незаменимых L-аминокислот к заменимым равным 0.6, что соответствует высококачественным природным белкам.

У опытных животных, в рационе которых использовалась исследуемая кормовая добавка, в начальный период до 15 сут, наблюдалось интенсивное увеличение массы, наиболее активная стабилизация массы тела животных происходила в период следующих двух недель. Важнейший показатель биологической эффективности потребления кормов — привес массы тела у животных экспериментальной группы был на уровне 47–65%, против группы животных, получавших стандартный рацион с показателем 49–60% соответственно. Наблюдения не выявили каких-либо отклонений состояния животных в опытной и контрольной группах на протяжении всего эксперимента. Рас-

четный коэффициент эффективности белка при потреблении опытного образца корма животными почти на 20% превышал аналогичные значения для стандартного корма. Это означает, что полученный ферментолит костной ткани может быть включен в состав животного корма как полноценная замена обычных белковых добавок.

Потенциальная ценность ферментолита может быть использована для изготовления пищевых продуктов. Так, введение в стандартную рецептуру мясо-растительного продукта эквивалентного количества гидролизованного костного белка для полной замены мясной составляющей позволило получить практически полностью идентичные по физико-химическим и органолептическим показателям пищевые продукты. То есть, удалось осуществить замену животного сырья на полученный ферментолит костной ткани с сохранением идентичной биологической ценности без проявлений отрицательных вкусо-ароматических характеристик, что значительно расширяет сферу возможного применения этого продукта.

Таким образом, проведенные исследования процесса ферментативной переработки высокодиспергированной костной ткани позволили получить белковый продукт с высокой биологической ценностью, который может использоваться в составе питательных систем. Полученный ферментолит может быть применен для балансировки ингредиентного состава пищевых систем и продуктов на их основе, что способствует общему снижению дефицита белка.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Savari M., Khorvash M., Amanlou H. Effects of rumen-degradable protein: rumen-undegradable protein ratio and corn processing on production performance, nitrogen efficiency and feeding behavior of Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 2018, 101(2), 1111–1122. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12776>
2. Wang H., Shen J., Mu C., et al. Low crude protein diets supplemented with casein hydrolysate enhance the intestinal barrier function and decrease the pro-inflammatory cytokine expression in the small intestine of pigs. *Animal Nutr.*, 2021, 7, 770–778. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.03.003>
3. Kowalski Z., Kulczycka J., Makara A., et al. Quantification of material recovery from meat waste incineration — An approach to an updated food waste hierarchy. *J. Hazard. Materials*, 2021, 416(8), 126021. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126021>
4. Иванкин А.Н., Кузнецова Т.Г. Современные методы оценки качества и безопасности мясного сырья и мясопродуктов. *Все о мясе*, 2005, 4, 26–30.

5. *Flees J.J., Ganguly B., Dridi S.* Phytogenic feed-additives improve broiler feed efficiency via modulation of intermediary lipid and protein metabolism-related signaling pathways. *Poultry Sci.*, 2020, 100(3), 100963. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.12.060>
6. *Neklyudov A.D., Berdutina A.V., Ivankin A.N., et al.* Determination of kinetic constants of hydrolysis of keratin-containing raw material. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 1999, 35(1), 40–43.
7. *Неклюдов А.Д.* Метаболизм аминокислот и их использование при создании гемокорректирующих препаратов. *Антибиотики мед. биотехнол.*, 1987, 32(4), 302–305.
8. *Демякина Е.К., Неклюдов А.Д., Герасимова Е.В.* Соотношения аминокислот и пептидов в белковых гидролизатах для парентерального питания. *Прикл. биохим. микробиол.*, 1983, 19(4), 503–509.
9. *Ивашов В.И., Неклюдов А.Д., Федорова Н.В. и др.* О некоторых макрокинетических закономерностях протеолиза белков. *ДАН*, 1992, 322(5), 989–993.
10. *Ha S., Kim I., Takata T., et al.* Identification of -amino acid-containing peptides in human serum. *PLoS One*, 2017, 12(12), 0189972. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189972>
11. *Miyamoto T., Homma H.* Detection and quantification of d-amino acid residues in peptides and proteins using acid hydrolysis. *Biochim. Biophys. Acta. Proteins Proteom.*, 2018, 1866(7), 775–782. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.12.010>
12. *Sachon E., Clodic G., Galanth C., et al.* D-amino acid detection in peptides by MALDI-TOF-TOF. *Anal. Chem.*, 2009, 81(11), 4389–4396. <https://doi.org/10.1021/ac9002886>
13. *Ying Y., Lia H.* Recent progress in the analysis of protein deamidation using mass spectrometry. *Methods*, 2020, S1046-2023(20)30080-3. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2020.06.009>
14. *Pervaiz I., Ahmad S., Madni M.A., et al.* Microbial Bio-transformation: a Tool for Drug Designing. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2013, 49(5), 437–450. <https://doi.org/10.1134/S0003683813050098>
15. *Fujii N., Takata T., Fujii N., et al.* D-Amino acids in protein: The mirror of life as a molecular index of aging. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteom.*, 2018, 1866(7), 840–847. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2018.03.001>
16. *Gorbunova A.N., Maksimova Yu.G., Ovechkina G.V., et al.* Catalytic and stereoselective properties of the immobilized amidase. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2015, 51(5), 539–545. <https://doi.org/10.1134/S0003683815040092>
17. *Kurochkina V.B., Sklyarenko A.V., Berezina O.V., et al.* Alpha-amino acid ester hydrolases: properties and applications. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2013, 49(8), 672–694. <https://doi.org/10.3103/S0027131414020084>
18. *Cordeiro A.R., Medeiros L.L., Bezerra T.K., et al.* Effects of thermal processing on the flavor molecules of goat by-product hydrolysates. *Food Res. Int.*, 2020, 138 B, 109758. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109758>
19. *Gagaoua M., Dib A.L., Lakhdera N., et al.* Artificial meat tenderization using plant cysteine proteases. *Science*, 2021, 38, 177–188. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.12.002>
20. *Pagán J., Benítez R., Ibarz A.* Effect of enzymatic hydrolyzed protein from pig bones on some biological and functional properties. *J. Food Sci. Technol.*, 2021, 58, 4626–4635. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04950-0>
21. *Yao Y., Wang M., Liu Y., et al.* Insights into the improvement of the enzymatic hydrolysis of bovine bone protein using lipase pretreatment. *Food Chem.*, 2020, 302, 125199. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125199>
22. *Asaduzzaman A., Getachew A.T., Cho Y.J., et al.* Characterization of pepsin-solubilised collagen recovered from mackerel (*Scomber japonicus*) bone and skin using subcritical water hydrolysis. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2020, 148, 1290–1297. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.104>
23. *Yang L., Guo Z., Wei J., et al.* Extraction of low molecular weight peptides from bovine bone using ultrasound-assisted double enzyme hydrolysis: Impact on the antioxidant activities of the extracted peptides. *LWT*, 2021, 146(7), 111470. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111470>
24. *Nekliudov A.D., Berdutina A.V., Ivankin A.N., et al.* Kinetic characterization of enzymatic hydrolysis of complex protein substrates for producing nutrient media. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2002, 38(4), 381–388. <https://doi.org/10.1023/A:1016226920794>
25. *Neklyudov A.D., Ivankin A.N., Berdutina A.V.* Production and purification of protein hydrolysates (Review). *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2000, 36(4), 317–324. <https://doi.org/10.1007/BF02738038>
26. *Антипова Л.В., Горбунков М.В.* Новый молокосвертывающий препарат “Протепсин” для создания инновационных технических решений производства здоровых продуктов питания. *Технол. пищевой и перерабатыв. пром. АПК – прод. здорового питания*, 2016, 1, 66–74.
27. *Drapeau G.R., Boily Y., Houmard J.* Purification and properties of an extracellular protease of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.*, 1972, 247(20), 6720–6726.
28. *Лисицын А.Б., Иванкин А.Н., Неклюдов А.Д.* Методы практической биотехнологии. Москва: Изд-во ВНИИМП, 2020, 71–105.
29. *Натыкан А.А., Сычева К.Ю., Чернобровкин М.Г. и др.* Хроматографическое определение аминокислот и их оптических изомеров с применением колонки Nautilus-E. *Заводская лаборат.*, 2011, 77(3), 18–22.

Biotechnological Transformation of Bone Tissue of Animal Origin into Products with High Biological Value

A. N. Ivankin*

Bauman Moscow State Technical University (National Technological University), Moscow, 105005 Russia

**e-mail: aivankin@inbox.ru*

Abstract—A comparative study of the process of acidic and enzymatic hydrolysis of bone tissue was carried out in order to obtain a high-quality protein product. The amino acid and fractional composition of the protein product was determined. The completeness of bone tissue degradation by the enzyme was achieved due to the high degree of dispersion of the initial raw material. It was shown that, in contrast to acidic hydrolysis, the product of enzymatic degradation with the proteolytic enzyme preparation Protapsin does not contain D-amino acid admixtures. The resulting product of processing animal bone raw material can be used with high efficiency for the preparation of nutrient microbiological media, animal feed, as well as for food purposes.

Keywords: protein hydrolysis, bone tissue, enzyme preparations, D-, L-isomers of amino acids