

TADEUSZ KOŁCZAK, KRZYSZTOF SURÓWKA

ENZYMATYCZNA HYDROLIZA NIESTANDARDOWYCH OSŁONEK KOLAGENOWYCH I ODPADÓW POWSTAJĄCYCH PRZY PRODUKCJI OSŁONEK

Streszczenie

Badania dotyczyły zastosowania hydrolizy enzymatycznej do utylizacji niestandardowych sztucznych osłonek kolagenowych oraz odpadów powstających przy ich produkcji. Stwierdzono, że kolagen był niemal jedynym składnikiem białkowym analizowanego materiału doświadczalnego. Określono warunki proteolizy materiału przy zastosowaniu wybranych preparatów enzymatycznych. Pepsyna w minimalnym stopniu hydrolizowała analizowany materiał kolagenowy, podczas gdy trypsina, papaina, neutraza z *Bacillus subtilis*, alkalaza z *Bacillus licheniformis* i esperaza z *Bacillus lentus* rozkładały go w 62–66% do składników białkowych o zróżnicowanej masie cząsteczkowej i w 33–38% do związków azotowych niebiałkowych. Optymalne warunki temperatury i pH hydrolizy materiału były następujące: trypsina – 60°C, pH – 8,0; papaina – 60°C, pH – 4,5; neutraza – 55°C, pH – 7,0; alkalaza – 65°C, pH – 8,0; esperaza – 65°C, pH – 8,0. Podczas hydrolizy enzymatycznej ponad 60% hydroksyproliny kolagenu materiału badawczego ulegało przemianie do związków niereagujących z odczynnikiem Ehrlicha.

Słowa kluczowe: niestandardowe osłonki kolagenowe, kolagenowe odpady produkcyjne, hydroliza enzymatyczna, pepsyna, trypsina, papaina, proteazy bakteryjne.

Wprowadzenie

Zagospodarowanie niestandardowych osłonek oraz odpadów powstających w procesie wytwarzania sztucznych osłonek kolagenowych jest niełatwe. Ich dotychczasowa utylizacja polega na spopieleniu. Takie rozwiązanie trudno uznać za gospodarczo racjonalne, bowiem wyklucza użytkowe ich wykorzystanie. Z uwagi na dużą zawartość białka mogą być one wykorzystywane do wytwarzania m.in. hydrolizatów białkowych (z przeznaczeniem na dodatki do żywności) lub na cele paszowe.

Natywny oraz termicznie zdenaturowany kolagen jest hydrolizowany przez enzymy trawienne zwierząt i człowieka, tj. pepsynę i tripsynę [2, 15], enzymy

roślinne: papainę i bromelinę [2, 4, 5], enzymy bakteryjne – kolagenazę z *Clostridium histolyticum* [6, 10, 23], proteinazę seryny z *Aspergillus sydovi* [11] oraz proteazy kilku gatunków *Bacillus* [1, 13, 16]. Enzymy trawienne człowieka nie hydrolizują helisowych regionów kolagenu [14, 15, 18], podczas gdy kolagenazy bakteryjne je hydrolizują. Enzymy roślinne silniej oddziałują na kolagen termicznie zdenaturowany niż na natywny [2]. W hydrolizatach kolagenu otrzymanych w procesie hydrolizy przez kolagenazy bakteryjne stwierdzono znaczne ilości proliny i lizyny [7], a optima ich aktywności znajdują się w przedziale temp. 55÷63°C [3]. Zabiegi technologiczne stosowane w produkcji osłonek w istotnym stopniu wpływają na strukturę i właściwości kolagenu, mogą również oddziaływać na jego podatność na proteolizę enzymatyczną.

Fik i Surówka wykazali, że enzymy proteolityczne mogą być stosowane do hydrolizy natywnego kolagenu zawartego w głowach kurcząt broilerów. Określono warunki hydrolizy i w jej wyniku otrzymano wysoko wydajne hydrolizaty przy użyciu pepsyny [20], trypsyny [22], papainy [8, 21], neutrazy – proteazy z *Bacillus subtilis* [19], alkalazy – proteazy z *Bacillus licheniformis* oraz esperazy – proteazy z *Bacillus lentus* [9, 22].

Celem badań było określenie aktywności proteolitycznej ww. enzymów w odniesieniu do substratu jakim są niestandardowe sztuczne osłonki kolagenowe i odpady powstające przy ich produkcji oraz ocena możliwości zastosowania hydrolizy enzymatycznej do racjonalnego zagospodarowania tego typu materiału odpadowego.

Materiał i metody badań

Materiałem doświadczalnym były niestandardowe sztuczne osłonki kolagenowe oraz odpady produkcyjne z wytwarzania osłonek kolagenowych z Zakładu Osłonek Białkowych w Białce k. Makowa Podhalańskiego. Osłonki cięto na kawałki o wymiarach 1 x 1 cm i hydrolizowano przy użyciu następujących preparatów enzymów proteolitycznych:

- „Pepsyna”, BTL sp. z o.o. (Polska), nr E-0165, preparat zawierający pepsynę o aktywności 1:100 PH.P.IV;
- „Trypsyna”, Wytwórnia Surowic i Szczepionek w Warszawie, seria 31196, preparat zawierający trypsynę o aktywności 250 J/g;
- „Papaina”, Merck (Niemcy), preparat zawierający papainę o aktywności 30 000 USP-U/mg;
- „Neutraza” z *Bacillus subtilis*, Novo Nordisk A/S (Dania), nr PWN 00259, preparat zawierający neutrazę o aktywności 0,5 AU/g;
- „Alkalaza” z *Bacillus licheniformis*, Novo Nordisk A/S (Dania), nr PMN 05094, preparat zawierający alkalazę o aktywności 2,4 AU/g;
- „Esperaza” z *Bacillus lentus*, Novo Nordisk A/S (Dania), nr PEN 01007, preparat zawierający esperazę o aktywność 7,5 KNPU/g.

Rozdrobnione osłonki, o masie ok. 7 g, umieszczano w kolbie stożkowej o pojemności 300 cm³, dodawano 210 cm³ wody i pozostawiano w temp. 20 – 22°C na 2 h. Następnie ustalano pH mieszaniny, używając roztworów: 10% NaOH, lub 6 N HCl, po czym dodawano 0,1 g preparatu enzymatycznego i inkubowano w łaźni wodnej (okresowo mieszając) w temperaturze i pH przez czas ustalony dla każdego z preparatów enzymatycznych. Hydrolizaty wirowano przy 3500 g przez 10 min. W supernatantach oznaczano zawartość azotu ogólnego i niebiałkowego oraz poziom hydroksyproliny, poddawano je także frakcjonowaniu metodą ultrafiltracji.

Procesy ultrafiltracji i diafiltracji prowadzono pod ciśnieniem około 140 kPa przy użyciu zestawu typu CH2A firmy Amicon wyposażonego w membranę kapilarną Hollow Fiber HP30 o przepuszczalności molekularnej 30·10³ Da. Hydrolizat w ilości 1000 cm³ filtrowano 3-krotnie do objętości 500 cm³, koncentrat każdorazowo uzupełniano wodą destylowaną do objętości 1000 cm³.

W rozdrobnionych osłonkach kolagenowych oznaczano zawartość suchej masy, popiołu, białka i kolagenu.

W końcowym koncentracie (po filtracji) oznaczano zawartość azotu ogólnego i niebiałkowego, a z różnicy obliczano zawartość azotu białkowego.

Zawartość suchej masy oznaczano po wysuszeniu materiału do stałej masy w temp. 105°C, popiół po mineralizacji próbki o masie 2 g w temp. 550°C. Azot ogólny oznaczano metodą Kjeldahla przy użyciu zestawu 323 Firmy Büchi (Szwajcaria). Azot niebiałkowy określano po wytrąceniu białka w 15 cm³ hydrolizatu przy użyciu 5 cm³ 20% kwasu trichlorooctowego, odwirowaniu osadu białka i oznaczeniu ilości azotu w supernatancie. Zawartość kolagenu obliczano z ilości hydroksyproliny w mineralizacie osłonki sporządzonym przy użyciu 6 N HCl, stosując współczynnik 7,25. Poziom hydroksyproliny w hydrolizacie określano po wysuszeniu 50 cm³ hydrolizatu do stałej masy w temp. 120°C i mineralizacji 50 mg wysuszonego hydrolizatu w 6 N HCl. Ilość hydroksyproliny w mineralizatach oznaczano spektrofotometryczną metodą opisaną przez Palkę [17].

Wyniki i ich omówienie

Skład chemiczny badanych osłonek kolagenowych był następujący: sucha masa – 90,17%, białko ogółem – 84,50%, kolagen – 84,28%, popiół – 1,92%. Kolagen był niemal jedynym składnikiem białkowym osłonki.

Pepsyna hydrolizuje włókna natywnego kolagenu w regionie telopeptydów tworzących wiązania międzycząsteczkowe [2]. W badaniach własnych po 4 h hydrolizy osłonki przy użyciu pepsyny, w medium inkubacyjnym o pH 1,5 i w temp. 55°C, stwierdzono jedynie niewielką ilość białka. Hydroliza osłonek pod wpływem pepsyny w innych warunkach inkubacji była jeszcze mniejsza. Jak wykazali Surówka i Fik [22], pepsyna jest enzymem wydajnie hydrolizującym białka głów kurzych. Znikomy zakres proteolizy osłonki kolagenowej przy udziale pepsyny wskazuje, że

enzym ten nie hydrolizuje wiązań sieciujących, powstających w procesach garbowania, plastyfikacji i klimatyzacji masy kolagenowej.

Pozostałe zastosowane enzymy proteolityczne hydrolizowały prawie całkowicie materiał doświadczalny. Optymalne warunki inkubacji przedstawiono w tab. 1. Warunki te, w odniesieniu do poszczególnych enzymów, były zbliżone do określonych wcześniej przy hydrolizie głów kurcząt [9, 19, 21, 22].

Tabela 1

Warunki hydrolizy enzymatycznej osłonek kolagenowych.
Conditions for the enzymatic hydrolysis of the collagen casings.

Enzym Enzyme	pH	Temperatura Temperature [°C]	Czas hydrolizy Time of hydrolysis [min]
Trypsyna / Trypsin	8,0	60	60
Papaina / Papain	4,5	60	135
Neutraza / Neutrase	7,0	55	60
Alkaloza / Alcalase	8,0	65	90
Esperaza / Esperase	8,0	65	60

Zawartość azotu ogólnego w supernatantach hydrolizatów, po podanym czasie inkubacji, stanowiła od 82% (esperaza) do ponad 90% (papaina) zawartości azotu w osłonce przed hydrolizą (tab. 2). Natomiast ilość hydroksyproliny w hydrolizatach zawierała się w przedziale od 34% (neutraza, esperaza) do 40% (papaina) jej zawartości w osłonce przed hydrolizą. Powyższe wyniki wskazują, że podczas hydrolizy enzymatycznej znaczna część hydroksyproliny kolagenu osłonki uległa przemianie do związków niereagujących z aldehydem *p*-dimetyloaminobenzoesowym, tj. z odczynnikiem Ehrlicha.

Skład związków azotowych w hydrolizatach osłonki wskazuje, że w ustalonych warunkach inkubacji i po podanym czasie hydrolizy enzymatycznej, azot białkowy stanowił od ponad 62% (trypsyna, alkalaza) do 67% (papaina) azotu ogólnego hydrolizatu osłonki (tab. 3). Pozostałe składniki azotowe hydrolizatów to związki azotowe rozpuszczalne w roztworze trichlorooctowym, traktowane jako substancje niebiałkowe. Poziom składników białkowych o masie cząsteczkowej $>30 \cdot 10^3$ Da w hydrolizatach uzyskanych przy użyciu trypsyny, papainy, neutrazy i alkalazy był podobny i stanowił około 65% ogólnego azotu białkowego hydrolizatu. Zawartość składników białkowych o mniejszej masie cząsteczkowej była istotnie większa tylko w hydrolizatach otrzymanych przy użyciu esperazy.

Tabela 2

Zawartość azotu oraz hydroksyproliny w hydrolizatach enzymatycznych osłonki kolagenowej.
Content of total nitrogen and hydroxyproline in enzymatic hydrolysates of the collagen casing.

Zawartość badanego składnika w hydrolizacie Content of the component studied in the hydrolysate	Enzym zastosowany do hydrolizy Enzyme used to hydrolysis					
	Pepsyna Pepsin	Trypsyna Trypsin	Papaina Papain	Neutraza Neutrase	Alkalaza Alcalase	Esperaza Esperase
	Azot [% azotu osłonki] Nitrogen [% of casing nitrogen]	5,55 ± 0,46	87,58 ± 0,39	90,30 ± 0,76	83,96 ± 0,74	87,78 ± 0,43
Hydroksyprolina [% hydroksyproliny osłonki] Hydroxyproline [% of casing hydroxyproline]	0,12 ± 0,02	37,56 ± 1,74	40,54 ± 2,07	34,20 ± 0,81	35,60 ± 1,04	34,58 ± 0,54

W tab. 2. zamieszczono wartości średnie ± odchylenia standardowe.

In Tab. 2. there are given average values ± standard deviations.

T a b e l a 3

Udział składników azotowych [% azotu ogólnego] w hydrolizatach enzymatycznych osłonki kolagenowej.

Content of nitrogen components [% of total nitrogen] in enzymatic hydrolysates of the collagen casing.

Wyszczególnienie Specification	Enzym zastosowany do hydrolizy Enzyme used in hydrolysis				
	Trypsyna Trypsin	Papaina Papain	Neutraza Neutrase	Alkalaza Alcalase	Esperaza Esperase
Ogólny azot białkowy Total protein nitrogen	62,25 ± 0,14	66,82 ± 0,91	66,00 ± 0,50	62,57 ± 1,03	65,45 ± 1,29
Azot białek o masie cząst. > 30·10 ³ Da Nitrogen of proteins of a molecular weight > 30·10 ³ Da	39,22 ± 5,06	43,62 ± 5,10	44,22 ± 3,53	41,00 ± 5,26	28,86 ± 8,16
Azot niebiałkowy Non-protein nitrogen	37,75 ± 0,14	33,18 ± 0,91	34,12 ± 0,53	37,43 ± 0,88	34,55 ± 1,29

Objaśnienia jak w tab. 2. / Explanatory notes as in Tab. 2.

Ustalenie składu związków azotowych hydrolizatów badanego materiału, uzyskanych przy użyciu testowanych enzymów proteolitycznych, będzie przedmiotem dalszych badań. Enzymatyczna proteoliza odpadów z produkcji sztucznych osłonek

kolagenowych może być jedną z metod ich utylizacji, a hydrolizaty mogą być wykorzystane jako dodatki kształtujące smakowitość przetworów mięsnych, tak jak to ma miejsce w przypadku hydrolizatów natywnego kolagenu [12]. Hydrolizaty mogą być także zastosowane jako składniki mieszanek paszowych.

Wnioski

1. Pepsyna nie hydrolizuje kolagenu sztucznej osłonki kolagenowej.
2. Trypsyna, papaina oraz proteazy bakteryjne, takie jak: neutraza, alkalaza i esperaza hydrolizują prawie całkowicie osłonkę kolagenową do składników białkowych o zróżnicowanej masie cząsteczkowej i do substancji azotowych niebiałkowych.
3. W procesie hydrolizy enzymatycznej hydroksyprolina kolagenu osłonki ulega częściowemu rozkładowi do związków niereagujących z odczynnikiem Ehrlicha.
4. Enzymatyczna proteoliza pozostałości z produkcji osłonek kolagenowych może stanowić jedną z metod ich utylizacji.

Literatura

- [1] Asdornnithe S., Akiyama K., Sasaki T., Takata R.: Isolation and characterization of a collagenolytic enzyme from *Bacillus licheniformis* N22. *J. Fern. Bioengin.*, 1995, **78**, 283-287.
- [2] Bailey A.J., Light N.D.: *Connective Tissue in Meat and Meat Products*. Elsevier Science Publishers Ltd., London 1989.
- [3] Beltran J.A., Bonnet M., Quali A.: Collagenase effect on thermal denaturation of intramuscular collagen. *J. Food Sci.*, 1991, **56**, 1497-1499.
- [4] Brooks B.A., Klasing K.C., Regenstien J.M.: Effects of antemortem injected crude papain in chicken muscle. *J. Food Sci.*, 1985, **50**, 1370-1374.
- [5] Burica O., Vitez L.: Effect of bromeline on the protein complex of chicken meat. *Technologija Mesa*, 1987, **22**, 26-20.
- [6] Cronlund A.L., Woychick J.H.: Solubilization of collagen in restructured beef with collagenases and α -amylase. *J. Food Sci.*, 1987, **52**, 857-860.
- [7] Eggersgluss B.: Gelatine hydrolysate and its health aspects. *Europ. Food & Drink Rev.*, 1999, pp. 45-49.
- [8] Fik M., Surówka K.: Preparation and properties of protein concentrate from broiler chicken heads. *J. Sci. Food Agric.*, 1986, **37**, 445-454.
- [9] Fik M., Surówka K.: Enzymatic hydrolysis of proteins from chicken head using alcalase and esperase. *Acta Alimentaria*, 1997, **26**, 35-45.
- [10] Foegeding E.A., Larick D.K.: Tenderization of beef with bacterial collagenase. *Meat Sci.*, 1986, **18**, 201, 214.
- [11] Hiyama M., Shinozuka M., Iizuka M., Minamiura N.: Degradation of gelatine and collage by series proteinase of *Aspergillus sydovi*. *J. Fernen. Bioengin.*, 1996, **81**, 464-465.
- [12] Hofmann K., Marggrander K.: Reduzierung des Kochsalzgehaltes in Fleischerzeugnissen durch Verwendung von Kollagenhydrolysaten. *Fleischwirt.*, 1989, **69**, 23-28.
- [13] Kawahara H., Kusumoto M., Obata H.: Isolation and characterization of a new type of collagenase producing bacterium, *Bacillus alveis* DC-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1993, **57**, 1372-1373.
- [14] Keil B.: Some newly characterized collagenases from procaryotes and lower eucaryotes. *Mol. Cell. Biochem.*, 1979, **35**, 563-568.

- [15] Mizuta S., Yoshinaka R., Sato M., Sakaguchi M.: Effect of pepsin digestion on two distinct types of collagen in the muscle and skin of squid *Todarodes pacificus*. Fish.Sci., 1996, **62**, 965-969.
- [16] Nakayama T., Tsuruoka N., Akai M., Nishino T.: Thermostable collagenolytic activity of a novel thermophilic isolate *Bacillus sp.* strain NTAP-1. J. Biosci. Bioengin., 2000, **89**, 612-614.
- [17] Palka K.: Changes in intramuscular connective tissue and collagen solubility of bovine *m. semitendinosus* during retorting. Meat Sci., 1999, **53**, 189-194.
- [18] Seifter S., Harper E.: Collagenolytic enzymes. In: Boyer P.D. (Ed.). The Enzymes, Vol.3, 3rd ed., Academic Press, New York, 1971, p. 650.
- [19] Surówka K., Fik M.: Studies on the recovery of proteinaceous substances from chicken heads. I. An application of neutrase to the production of protein hydrolysate. Int. J. Food Sci. Technol., 1992, **27**, 9-20.
- [20] Surówka K., Fik M.: Studies on the recovery of proteinaceous substances from chicken heads. II. Application of pepsin to the production of protein hydrolysate. J. Sci., Food Agric., 1994, **65**, 289-296.
- [21] Surówka K., Fik M.: Recovery of proteinaceous substances from chicken heads by proteolysis with soluble papain. Pol. J. Food Nutr. Sci., 1995, **4/45**, 41-54.
- [22] Surówka K., Fik M.: Recovery of proteinaceous substances from chicken heads by proteolysis with trypsin. Nahrung, 1996, **40**, 132-137.
- [23] Tunick M.H.: Changes in the denaturation characteristics of collagen induced by bacterial collagenase. J. Food Sci., 1988, **53**, 661-662.

ENZYMATIC HYDROLYSIS OF NON-STANDARD COLLAGEN CASINGS AND PROCESS WASTES PRODUCED DURING THE PRODUCTION OF CASINGS

Summary

The investigations presented referred to the enzymatic hydrolysis applied to utilize non-standard artificial collagen casings and process wastes produced while producing the casings. It was stated that the collagen was practically the only protein component of the materials under analysis. There were determined conditions necessary for the proteolysis to occur; for this purpose, several selected enzyme preparations were used. Pepsin hydrolysed collagen casings to a marginal degree. Trypsin, papain, neutrase of *Bacillus subtilis*, alcalase of *Bacillus licheniformis*, and esperase of *Bacillus lentus* decomposed the collagen material by 62% - 66% to proteinaceous constituents of differing molecular weights, and by 34% - 38% to non-protein nitrogen components. Optimal conditions of temperature and pH for the hydrolysis of the material investigated were as follows: trypsin – 60°C, pH – 8.0; papain – 60°C, pH – 4.5; neutrase – 55°C, pH – 7.0; alcalase – 65°C, pH – 8.0; esperase – 65°C, pH – 8.0. During the enzymatic hydrolysis, more than 60% of hydroxyproline contained in the material studied were converted into compounds, which do not react with the Ehrlich's reagent.

Key words: non-standard collagen casings, collagen wastes, enzymatic hydrolysis, pepsin, trypsin, papain, bacterial proteases ☒