

## **ОСНОВИ ТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ КОЛАГЕНУ З РИБНОЇ КОЛАГЕНОВМІСНОЇ СИРОВИНИ**

**Н.А. Кушнір**

*Наведено дані про використання рибної колагеновмісної сировини і продуктів її гідролізу в харчовій промисловості. Розроблено технологічну схему отримання гідролізату колагену. Визначено маси білкових складових гідролізату. Вивчено якісний та амінокислотний склад отриманого колагену.*

## **ОСНОВЫ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ КОЛЛАГЕНА ИЗ РЫБНОГО КОЛЛАГЕНСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ**

**Н.А. Кушнир**

*Приведены данные об использовании рыбного коллагенсодержащего сырья и продуктов его гидролиза в пищевой промышленности. Разработана технологическая схема получения гидролизата коллагена. Определена масса белковых составляющих гидролизата. Изучен качественный и аминокислотный состав полученного коллагена.*

## **BASICS OF TECHNOLOGY OF OBTAINING COLLAGEN FROM COLLAGEN CONTAINING FISH RAW MATERIAL**

**N. A. Kushnir**

*Current technological processing of fish products is accompanied by the formation of large quantities of waste, which contain a high concentration of protein (bones, fins, skin, scales, entrails, etc.) which make from 30 to 70 % by weight of the source raw material. Fish waste is a source of collagen and its hydrolysis products that could be of widespread use in the food industry due to the fact that the use of animal collagen becomes dangerous. Furthermore, the fish collagen is hypo-allergenic (as it is 96 % identical to the human protein). In this regard, developing of science-based technology of processing of collagen containing fish raw materials is important and essential.*

*The purpose of the research is to develop technology of easily digestible collagen from collagen containing raw materials.*

*Collagen preparation was obtained from collagen containing fish raw materials by alkaline treatment according to the method described in the patent of Ukraine for useful model № 79357. Electrophoresis showed that collagen*

*preparation contains many molecules of medium and low molecular weight that suggests that obtained collagen preparation is easily digestible.*

*Determination of the molecular weight of protein subcomponents of collagen preparation showed that it contains both high-protein components (1.2...1.3) % and low molecular weight fractions (40.0...42.0) % of the total amount. Medium molecular weight fractions account for (56.7...58.8) % of the total.*

*The amino acid composition of collagen preparation is characterized by a high content of glycine (33.5 g/100 g), proline (11.82 g/100 g) and hydroxyproline (9.21 g/100 g) that indicates obtaining collagen hydrolyzate. Low methionine and tryptophan content in hydrolyzate presupposes a high degree of purification of raw ballast protein fractions of collagen containing fish raw materials.*

*Therefore, the results of alkaline hydrolysis of collagen containing fish raw materials show that obtaining of collagen preparation is efficient during alkaline hydrolysis.*

**Постановка проблеми у загальному вигляді.** Існують п'ять основних чинників, що впливають на здоров'я людини – це низька якість харчування, перевантаженість нервово-емоційними, стресовими станами; малорухливий спосіб життя; різні інтоксикації організму; приховані форми вітамінної недостатності [1]. Якість харчування майже на 15% впливає на здоров'я людини [1], і саме це обумовлює інтенсивний науковий пошук нових продуктів харчування, а також розробку технологій переробки рослинної і тваринної сировини.

**Аналіз останніх досліджень і публікацій.** Сучасна переробка рибопродукції супроводжується утворенням великої кількості відходів, що містять високу концентрацію білка (кістки, плавці, шкіра, луска, нутрощі тощо), які складають від 30 до 70% від маси вихідної сировини. Часткове використання таких відходів призводить, з одного боку, до втрати вкрай важливого білкового продукту для використання в харчуванні, а з іншої – до забруднення довкілля [2]. Рибні відходи є джерелом колагену і продуктів його гідролізу, які можуть широко використовуватись у харчовій промисловості. Інтерес до колагену, виділеного з рибопродукції, пов'язаний з тим, що губчаста енцефалопатія стала настільки серйозною проблемою, що і використання колагену тваринного походження стає небезпечним. Крім того, рибний колаген є гіпоалергенним (оскільки на 96% ідентичний до людського білка) [2–4].

У харчовій промисловості колаген і продукти його гідролізу використовуються при виробництві желатину, для освітлення вина, отримання харчових плівок, покриття, їстівних оболонки, як

структуроутворювач – у заливках для консервів і рибних фаршах, формованих рибних виробах, під час виробництва штучної ікри, бульйонів, драглів, соусів, різних оздоровчих напоїв і коктейлів, а також як добавка в хлібопекарському і кондитерському виробництвах [5]. Актуальним є використання продуктів гідролізу колагену у комбікормовій промисловості в виробництві стартових комбікормів для молодняка цінних порід риб і гідробіонтів (осетер, форель, лосось, морський їжак та ін.), що сприяє збільшенню відсотка їх виживання. Було виявлено, що найбільшу атрактантну активність мають такі амінокислоти, як гліцин, пролін, аланін та ін., що значною мірою впливає на процеси інтенсивного росту [5].

Ступінь гідролізу колагеновмісної сировини може бути як неповним, так і повним з отриманням пептидів, пептонів та вільних амінокислот. Отримані гідролізати можна використовувати у виробництві біологічно активних добавок та добавок, що збільшують харчову цінність страв.

Колаген належить до ізоколагенів, до його складу входять понад 20 видів білків, що відрізняються один від одного не лише структурою, але й найрізноманітнішими функціональними властивостями. У цей час добре вивчено колаген 12 типів. Вони відрізняються амінокислотою послідовністю, будовою, розподілом у тканинах, молекулярною масою і функціями. За своєю структурою вони умовно можуть бути розділені на три групи: колаген з фіблярною структурою I, II, III, V і XI типів; нефіблярний, сітчастий або колаген базальних мембран типів IV, VI і мінорний колаген типів VII, VIII, X і XII. Колаген риб в основному належить до I і III типів, аналогічно колагену скелетних м'язів людини. Рибний і тваринний колаген складаються з субодниць (тропоколаген), що закручені в спіраль з відносною молекулярною масою 300 кДа [2; 5; 6].

Високий вміст гліцину і проліну є характерною особливістю амінокислотного складу колагену, причому ці амінокислоти формують послідовність, що повторюється: пролін–гліцин–X, де X – інша амінокислота. Така послідовність, що повторюється, і зв'язки обумовлюють спіралеподіну структуру колагену. Особливістю рибного колагену є менший вміст амінокислот (гістидин, фенілаланін, лізин, лейцин, валін, аспарагінова і глютамінова кислоти), отже, і менше число поперечних зв'язків, а також дещо інший амінокислотний склад (гідроксипролін і гідроксилізин) одного з ланцюгів. Тому температура гідролізу колагену риби нижча за аналогічну температуру теплокровних тварин. Колаген риби після нагрівання протягом 2,5 хвилин руйнується на 50...60% [6–8].

Через відсутність триптофану колаген є білком невисокої біологічної цінності. На підставі фізіологічної дії колаген можна віднести до харчових волокон. Доведено, що при оптимальному поєднанні м'язових білків і колагену показник чистого засвоєння білка максимальний [2; 7]. Продукти гідролізу колагену (глутин, желатин та ін.) позитивно впливають на стан і функцію корисної кишкової мікрофлори, активно стимулюють секреторну і рухову функції шлунка і кишечника [7].

Хімічна будова олігопептидних фрагментів колагену залежить від виду гідролізатора й умов проведення гідролізу, а також від стійкості пептидних зв'язків  $-CO-NH-$  до гідролізу під впливом різних реагентів і за різних значень рН. Під дією водних розчинів кислот, лугів або ферментів відбувається деструкція колагену, тобто розрив пептидних зв'язків  $-CO-NH-$  у поліпептидних ланцюгах колагену з утворенням водорозчинних продуктів [9].

У результаті кислотного гідролізу майже повністю руйнується триптофан, частково серин, треонін, аспарагін, глутамін, а під час лужної обробки відбувається часткова рацемізація амінокислот і руйнування цистину, метіоніну, цистеїну, що знижує біологічну цінність отримуваних продуктів. Після гідролізу при нейтралізації середовища утворюється сіль. Знесолювання гідролізату, як правило, є малоефективним через подовження тривалості процесу, що призводить до здорожчання технології [6].

У зв'язку з цим актуально розробляти науково обґрунтовану технологію переробки колагеновмісної рибної сировини.

**Метою дослідження** є розробка технології отримання легкозасвоюваного колагену з колагеновмісної сировини.

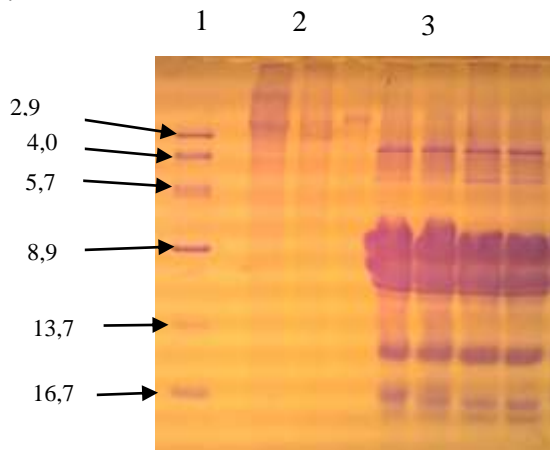
**Виклад основного матеріалу дослідження.** Колагеновий препарат отримували з колагеновмісної рибної сировини (луска риби), шляхом лужної обробки за методикою, описаною в патенті України на корисну модель № 79357 [10]. Луску риби знежирювали 3...5%-м розчином NaOH при ГМ=1:(2...5) та температурі 2...6° С протягом 24 годин. Потім луску риби після знежирення промивали проточною водою та здійснювали гідроліз шляхом двохразової обробки:

1-ша стадія. Луску риби заливали 5...7%-м розчином NaOH, при ГМ=1:(2...5), температурі 10...12° С та витримували протягом 24 годин;

2-га стадія. Луску риби промивали проточною водою, заливали 6...8%-м розчином NaOH і витримували 12 годин при температурі 20° С. Розчин NaOH видаляли шляхом декантації, а отриманий таким чином осад колагену промивали водою та заливали 2%-м розчином

оцтової кислоти, для нейтралізації луку витримували 5...10 хвилин. Отриманий колагеновий препарат промивали проточною водою до досягнення деканту рН=6,5–7,0. Готовий колагеновий препарат висушували при температурі  $(70 \pm 5)^\circ \text{C}$  до масової частки вологи 5...8%. Отриманий таким чином колагеновий препарат подрібнювали на дробарці до розміру 0,8...1 мкм. Під час зберігання впродовж 6 місяців при відносній вологості 60...70% та температурі 18...20° С отриманий колагеновий препарат не змінював своїх фізико-хімічних та мікробіологічних властивостей. Колагеновий препарат має білий колір, не має запаху та присмаку, що дозволяє використовувати його як біологічно активну добавку до різних харчових продуктів.

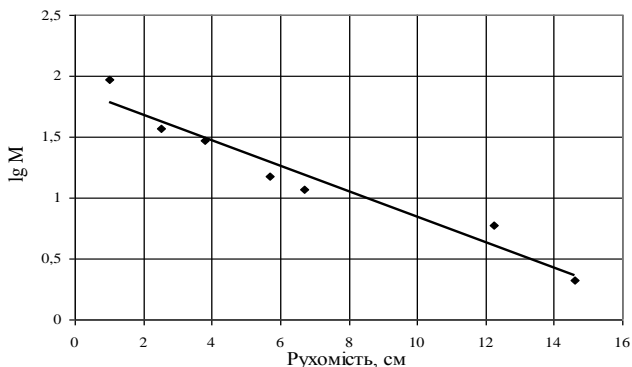
Для визначення масово-молекулярного складу отриманого колагенового препарату використовували електрофорез в 15%-му поліакриламідному гелі за наявності додецилсульфату натрію. Досліджували білкову складову колагенового препарату (рис. 1). Для розшифровки електрофореграми було побудовано калібрувальну пряму рис. 2.



**Рис. 1. Електрофореграми білкових складових колагенового препарату:**  
**1 – маркери (2, 9 – Phosphorylase b (97,0 кДа); 4,0 – Bovine Serum Albumin (66 кДа); 5, 7 – Ovalbumin (45,0 кДа); 8, 9 – Carbonic Anhydrase (30,0 кДа); 13, 7 – Trypsin inhibitor (20,1 кДа); 16, 7 –  $\alpha$ -Lactalbumin (14,4 кДа);**  
**2 – висушена рибна луска карпа; 3 – колагеновий препарат**

За даними електрофорезу видно, що рибна луска має у своєму складі багато високомолекулярних білків (їх молекулярна маса більша ніж 90,0...100,5 кДа) і майже не містить низькомолекулярних. У колагеновому препараті міститься більша кількість

низькомолекулярних складових (молекулярна маса 38 кДа і нижче), що складає майже 57% від усіх білкових складових колагенового препарату. В отриманому колагеновому препараті особливо багато молекул із середньою та низькою молекулярною масою, що свідчить про те, що отриманий колаген є легкозасвоюваним.



**Рис. 2.** Калібрувальна крива для розрахунку молекулярної маси

Результати електрофореграми не подають кількісного показника кожної білкової складової, що і визначило проведення гель-хроматографії. У ході гель-хроматографії відбувається розподіл білків за розмірами білкової молекули (молекулярної маси).

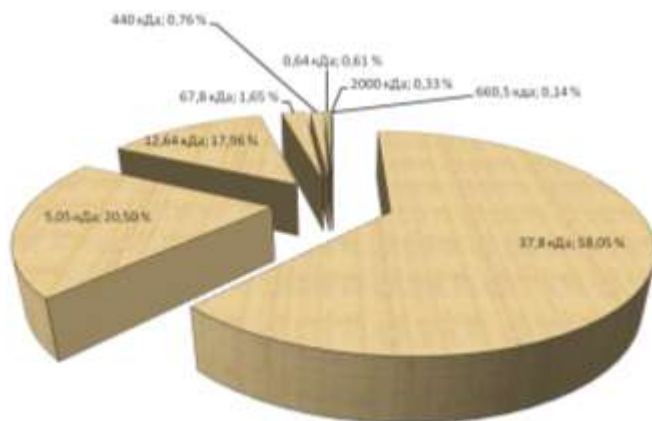
Для проведення гель-хроматографії використовували як сорбент Sephacrylom S-200 Superfine Pharmacia. Сорбент промивали дистильованою водою на скляному фільтрі, а потім на колонці (2,4×60 см) протягом 24 годин 0,1 М трис/НСІ буферним розчином з рН 8,0 (з іоною силою  $\geq 0,1$ ) [11].

Розчин білків-маркерів (10 см<sup>3</sup>) пропускали через колонку (2,4×60 см) Sephacrylom S-200 Superfine Pharmacia зі швидкістю 40 см<sup>3</sup> за годину. Під час визначення молекулярних мас методом гель-хроматографії для даної хроматографічної колонки провели її градування. Як білки-маркери використовували набори-маркери фірми Pharmacia: декстран – 2000 кДа, триглобулін – 669 кДа, ферітин – 440 кДа, каталаза – 232 кДа, альдолаза – 158 кДа, альбумін – 67 кДа, овалбумін – 43 кДа, хімотрипсиноген А – 25 кДа, рибонуклеаза – 13,7 кДа. Постійну швидкість елювання задавали за допомогою перистальтичного насоса. Елюат, що збирали на фракційному колекторі, аналізували в потоці за порціями на вміст білкових фракцій,

для чого відмічали зміни оптичної густини при 280 нм. Також вихід білкових фракцій визначали методом Лоурі в кожній фракції елюенту (3 см<sup>3</sup>) [10].

Зразок розчину колагенового препарату наносили на колонку в кількості 20 мл (77,47 мг білка) в 0,05 н фосфатному буфері з рН=7,2. Швидкість елювання складала 40 см<sup>3</sup> на годину. Вихід білкових складових колагенового препарату визначали методом Лоурі в кожній фракції елюенту (3 см<sup>3</sup>).

Аналізуючи отриману криву виходу білкових складових отриманого колагенового препарату, можна зробити висновок, що в препараті містяться як високомолекулярні білкові складові (з молекулярною масою до 2000 кДа – 0,33%; 660,5 кДа – 0,14% і 440 кДа – 0,76%) близько (1,2...1,3)%, так і низькомолекулярні фракції до (40,0...42,0)% від загальної кількості, на частку середньомолекулярних фракцій припадає майже (56,7...58,8)% (рис. 3).



**Рис. 3. Якісний склад отриманого колагенового препарату**

Процеси синтезу колагену в організмі людини багатокomпонентні ті багатоступеневі, але основа всіх біохімічних процесів – амінокислоти: пролін, гідроксипролін, гідроксилізин та ін. Гідроксипролін та гідроксилізин є специфічними амінокислотами, які знаходяться лише в колагенових структурах [7], а в організмі людини утворюються в разі наявності великої кількості вітаміну С та молекулярного кисню. Амінокислотний склад (табл. 1) колагенового препарату має високий вміст гліцину (33,5 г/100 г), проліну (11,82

г/100 г) та гідроксіпроліну (9,21 г/100 г), що свідчить про отримання гідролізату колагену. Наявність цих амінокислот у гідролізаті свідчить про їх високу біологічну роль в отриманому колагеновому препараті.

Низький вміст у гідролізаті метіоніну та триптофану свідчить про високий ступінь очищення колагеновмісної сировини від баластних білкових фракцій.

Установлено, що набухання отриманого колагенового препарату складає 220%. Висока гідратація пов'язана з вмістом в його молекулі великої кількості бічних полярних груп. Зв'язування води колагеновим препаратом зумовлене гідратацією функціональних груп, пептидних зв'язків білка за рахунок утворення водневих зв'язків при взаємодії OH-, CO- COOH- та NH-груп із молекулами води. Завдяки тому, що колагеновий препарат частково пройшов лужний гідроліз, він може являти собою природний іонообмінник. Так, наявність вільних аміногруп та карбоксильних груп обумовлює здатність колагенового препарату зв'язувати іони важких металів з утворенням нерозчинних комплексів та їх виведення з організму людини [6].

Таблиця

#### Амінокислотний склад колагенового препарату

Амінокислота	г на 100 г	Амінокислота	г на 100 г
Лізин	2,60	Аланін	10,93
Гістидин	0,42	Валін	2,02
Аргінін	4,45	Метіонін	0,61
Аспарганова кислота	4,90	Ізолейцин	1,36
Треонін	1,87	Лейцин	2,66
Серин	3,87	Тирозин	0,52
Глутамінова кислота	7,19	Фенілалонін	1,31
Пролін	11,82	Гідроксіпролін	9,21
Гліцин	33,50	Гідроксилізин	0,76

Таким чином, результати лужного гідролізу колагеновмісної рибної сировини свідчать, що для отримання колагенового препарату доцільне її отримання за допомогою лужного гідролізу.

**Висновки.** Збільшення потреби в білкових продуктах і необхідність забезпечення раціонального харчування приводять до виникнення і швидкого розвитку нових напрямів у виробництві харчових продуктів. Комбінування білкових добавок тваринного походження з колагеновим гідролізатом дозволяє збагатити продукти



пептидами й амінокислотами, а також надати продуктам функціональних властивостей.

### Список джерел інформації/References

1. Тележенко Л. М. Моделювання раціонального харчування / Л. М. Тележенко, Н. А. Кушнір, М. Н. Тодорова // Обладнання та технології харчових виробництв : темат. зб. наук. пр. / голов. ред. О. О. Шубін ; Донец. нац. ун-т економіки і торгівлі ім. М. Туган-Барановського.– 2013.– Вип. 30. – С. 306–311.

Telezhenko, L.M., Kushnir, N.A., Todorova, M.N. (2013), «Modeling of rational nutrition», *Equipment and technology of food production* [«Modelyuvannya ratsional'nogo kharchuvannya», *Obladnannja ta tehnologii harchovih virobnyctv: temat. zb. nauk. pr.*], Vol. 30, pp. 306–311.

2. Available at: <http://zrenielib.ru/docs/index-13750.html>

3. Киладзе А. Б. Рыбные отходы – ценное сырье / А. Б. Киладзе // Рыбное хозяйство. – 2004. – № 3. – С. 58.

Kiladze, A.B. (2004), *Fish Industry* «Fish waste is a valuable raw material», [«Rybnye otkhody – tsennoe syr'e», *Rybnoe khozyaystvo*], Vol. 3, 58

4. Киселев В. И. Применение коллагена в медицине / В. И. Киселев // Морская индустрия. – № 2 (15). – 2002. – С. 32.

Kiselev, V.I. (2002), *Marine Industry* [«Primenenie kollagena v meditsine» Use of collagen in medicine, *Morskaya industriya*], Vol. 2 (15), pp. 32.

5. Воропаев В. М. Использование отходов рыбообработки в кормопроизводстве / В. М. Воропаев, Ю. Г. Блинов, В. Н. Акулин // Ресурсосберегающие технологии в аквакультуре : тез. докл. – Краснодар, 1996. – С. 11.

Voropaev, V.M., Blinov, Yu.G., Akulin, V.N. (1996), «Using of fish processing waste in feed industry», [«Ispol'zovanie otkhodov ryboobrabotki v kormoproizvodstve», *Saving technologies in aquaculture Resursosberegayushchie tekhnologii v akvakul'ture*], *Krasnodar*, pp. 11–12.

6. Неклюдов А. Д. Выделение коллагенов из органов и тканей млекопитающих / А. Д. Неклюдов // Экологические системы и приборы. – 2005. – № 11. – С. 24.

Neklyudov, A.D. (2005), «Isolation of collagen from the organs and tissues of mammals» [«Vydelenie kollagenov iz organov i tkaney mlekopitayushchikh *Ekologicheskie sistemy i pribory*»] *Ecological systems and devices*, Vol. 11, 24.

7. Химия пищи: в 2 кн. Кн. 1: Белки: структура, функции, роль в питании / [И. А. Рогов, Л. В. Антипова, Н. И. Дунченко и др.]. – М. : Колос, 2000. – 384 с.

Rogov, I.A., Antipova, L.V., Dunchenko, N.I. (2000), *Food chemistry. P.1.: Proteins, structure, functions, nutrition role* [*Khimiya pishchi: v 2 kn. Kn. 1: Belki: struktura, funktsii, rol' v pitanii*], Kolos, Moscow, 384 p.

8. Колаковский Э. Технология рыбного фарша / Э. Колаковский пер. с польск. В. Е. Тишина. – М. : Агропромиздат, 1991. – С. 43–45.

Kolakovskiy, E., Tishina, V. (1991), *Technology of fish farce* [*Tekhnologiya rybnogo farsha: per. s pol'sk*], Agropromizdat, Moscow, pp. 43–45.

9. Глубіш П. А. Дослідження реологічних властивостей продуктів деструкції колагенвмістних матеріалів / П. А. Глубіш // Вісник КНУТД. – 2011. – № 5. – С. 45–51.

Glubish, P.A. (2011), «Study of rheological properties of degradation products of collagen containing materials», *KNUTD – KNUTD Messenger* [«Doslidzhennya reologichnikh vlastivostey produktiv destrukttsii kolagenvmistnikh materialiv Visnik], Vol. 5, pp. 45–51.

10. Пат. 79357 Україна МПК (2006.01) A23J 1/04. Спосіб одержання колагенового препарату / Л. М. Тележенко, Н. А. Кушнір. – № 79357 ; заявл. 13.08.2012 ; опубл. 25.04.2013, Бюл. № 8.

Telezhenko, L.M., Kushnir, N.A. *A method for producing collagen preparation: pat. 79357. Ukraine MPK (2006.01). A23J 1/04* [*Sposib oderzhannya kolagenovogo preparatu*], № 79357, zayavl. 13.08.2012, opubl. 25.04.2013, Byul. № 8.

11. Крусір Г. В. Дослідження складу білкової складової БАД «Аміл-інг» / Г. В. Крусір, О. В. Севастьянова, Н. А. Кушнір // Харчова наука і технологія. – № 1 (6). – 2009. – С. 42–44.

Krusir, G.V., Sevast'yanova, O. V., Kushnir, N.A. (2009), The study of protein structure of BAS «Amil-ing», *Nutrition and technology* [*Doslidzhennya skladu bilkovoї skladovoї BAD «Amil-ing». Kharchova nauka i tekhnologiya*], 1(6), pp. 42–44.

**Кушнір Надія Анатоліївна**, канд. техн. наук, ст. викл., кафедра технології ресторанного і оздоровчого харчування, Одеська національна академія харчових технологій. Адреса: м. Одеса, вул. Фонтанська дорога 39, кв. 48, Україна, 65049. Тел.: 096-68-67-740; e-mail: adya282@rambler.ru

*Рекомендовано до публікації канд. техн. наук С.І. Вікуль, канд. техн. наук, Л.С. Гураль, д-ром техн. наук, проф. П.П. Пивоваровим. Отримано 15.03.2014. ХДУХТ, Харків.*