

УДК 639.313:664.959.2

ПОЛУЧЕНИЕ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ И СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РЫБНЫХ КОЛЛАГЕНОВ С АНАЛОГАМИ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Антипова Л.В., Сторублевцев С.А., Болгова С.Б., Сухов И.В.

ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет инженерных технологий», Воронеж,
e-mail: Ruteneya@yandex.ru

Настоящая статья посвящена исследованию коллагенсодержащего сырья и полученных коллагеновых субстанций. Проведен гистоморфологический анализ, в результате которого получены данные о наличии коллагена в животном и рыбном сырье, но отличающегося более рыхлой структурой и меньшей толщиной волокон в случае рыбных шкур. Исследования фракционного состава показали, что преобладающей фракцией является щелочерастворимая, к которой относятся коллагеновые белки. Получены дисперсии коллагеновых белков из шкур внутренних водоемов и из спилка шкур КРС. Дисперсии близки по свойствам, но имеют и некоторые отличия, связанные со структурными особенностями. Молекулярную структуру коллагена подтверждают исследования структурных особенностей по спектру их поглощения в инфракрасной области. Результаты электрофоретической подвижности указывают на отличие в структуре коллагенов различного происхождения. Структурные различия предполагают различия в химических свойствах. Выплавление желатина происходит быстрее в случае рыбной субстанции.

Ключевые слова: вторичное рыбное сырье, коллаген, белок, субстанция

RECEIPT, IDENTIFICATION AND COMPARATIVE ANALYSIS OF FISH COLLAGEN WITH THE ANALOGY ANIMAL ORIGIN

Antipova L.V., Storublevtsev S.A., Bolgova S.B., Suhov I.V.

Federal State Budget Educational Institution of Higher Professional Education
«Voronezh State University of Engineering Technologies», Voronezh, e-mail: Ruteneya@yandex.ru

This article is dedicated to the study of collagen raw material and collagen derived substances. An histomorphological analysis, in which obtained data on the presence of collagen in animal and fish raw materials but are more loose structure and the a smaller thickness fibers in the case of fish skins. Research fractional composition showed that the prevailing fraction is – alkali soluble, which includes the collagen proteins. A dispersion of collagen protein from the skins of Inland water and split leather hides of cattle. Dispersions of similar properties, but there are some differences related to structural features. The molecular structure of collagen confirms study of structural features by spectrum of absorption in the infrared region. Results of the electrophoretic mobility indicate the difference in the structure of collagens of different origin. Structural differences suggest the differences in the chemical properties. Outmelting the gelatin is faster in the case of fish substance.

Keywords: secondary fish raw material, collagen, protein, substance

На протяжении нескольких десятилетий коллаген, его строение и свойства являются весьма популярной темой исследований российских и зарубежных ученых. Он получил широкое применение в медицине, полиграфии, пищевой, комбикормовой и микробиологической промышленности [1, 4]. Во всем мире традиционно получение коллагена из спилка шкур крупного рогатого скота (КРС). Однако из-за болезни бешенства и угрозы передачи вируса человеку встал вопрос о поиске альтернативных источников. В 2000 г. в Европе стартовал большой проект, объединивший семь компаний и научных институтов по изучению коллагена из отходов переработки морских рыб.

В России в связи с санкциями Евросоюза, США и других сторонников существенно сократился импорт рыбного сырья и продуктов. Поэтому актуален поиск замены зарубежного сырья на отечественное. По мнению авторов [3, 10, 9],

источниками коллагена могут служить побочные продукты и отходы при глубокой переработке прудовых рыб. Использование таких источников содействует охране окружающей среды и отвечает принципам ресурсосбережения и инновационности технических решений. Максимальное и рациональное использование рыб внутренних водоемов поддерживается Правительством РФ, об этом свидетельствуют важнейшие стратегические документы: «Водная стратегия Российской Федерации на период до 2020 года», «Стратегия развития рыбохозяйственного комплекса Российской Федерации на период до 2020 года». Обозначенные направления развития отрасли получили должное внимание и на региональных уровнях. Исследования проводили в Воронежском государственном университете инженерных технологий, в рамках Государственного задания № 2014/22 НИР № 3017.

Материалы и методы исследования

В качестве объектов исследования использовали шкуры наиболее распространенных в ЦЧР прудовых рыб: сазана, толстолобика, щуки. Объекты сравнивали со спилком шкур крупного рогатого скота, производимого на территории Тверской области. Рыбы вылавливали в осенней период массой 700–1500 г. Шкуры отделяли вручную в лабораторных условиях при предварительном снятии чешуи, отделении хвоста, головы, жабр, плавников, зачистки внутренней поверхности от жировых тканей и прирезей мышечной ткани.

Гистоморфологические исследования проводили методом получения ультратонких срезов с дальнейшим окрашиванием по методу импрегнации серебром по Шульце в модификации Гольджи [8]. Физико-химические свойства рыбных коллагенов, имеющих практическое значение в получении лекарственных средств (подлинность – качественная реакция; прозрачность, цветность, вязкость, массовая доля сухих веществ – ГФ XI; рН – ГФ XI и потенциометрически, массовая доля коллагена – ГОСТ 23401-78 «Метод определения оксипролина» [2, 7, 6]), определяли в соответствии с фармакопейной статьей предприятия (ФСП-42-1221-06 1 ЗАО «Лужский завод «Белкозин»») [7]. В коллагеновых дисперсиях определяли фракционный состав белков на основании их растворимости по методам [2], электрофоретическую подвижность и молекулярную массу на установке вертикального электрофореза в денатурирующих условиях с использованием маркерных белков AppliChem (ProductNo.A4402), в соответствии с инструкцией к прибору. Структурные особенности по спектру поглощения в инфракрасной области идентифицировали на аппарате Vertex 70 [5].

Результаты исследования и их обсуждение

При проведении гистоморфологических исследований готовили ультратонкие поперечные срезы шкур рыб с последующим окрашиванием и микроскопированием объектов. Как видно на рис. 1, рыбные шкуры в дермальном слое обнаруживали рыхлые структуры соединительнотканых волокон и меньшую толщину по сравнению со спилком шкур животных (КРС), что объективно связано с видовой принадлежностью объектов исследования.

Данные определения фракционного состава белков (табл. 1) доказывают превалирование щелочерастворимой фракции во всех объектах, что свидетельствует о наличии соединительнотканых волокон белковой природы, отчетливо видных на микроструктурных срезах.

Для предварительной оценки технологической пригодности коллагенов реализовали известную технологию, применяемую в условиях ЗАО «Лужский завод «Белкозин» в лабораторных условиях с учетом авторской коррекции параметров процессов для получения дисперсии [9].

Сравнительные данные по реализации усовершенствованной технологии коллагеновой дисперсии из рыбного сырья и дисперсии, полученной и спилка шкур крупного рогатого скота, представлены в табл. 2.

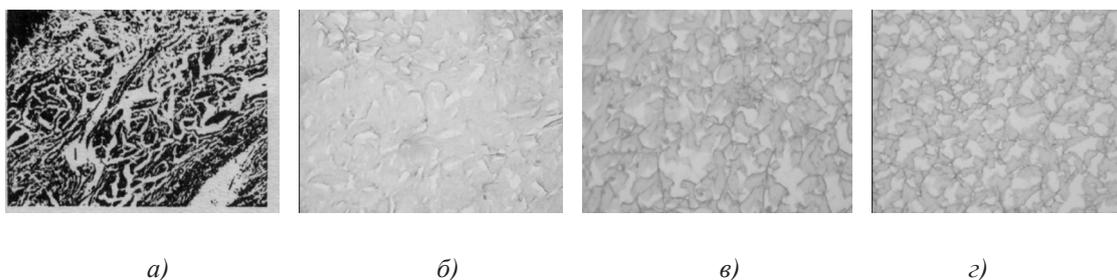


Рис. 1. Микроструктура дермальных слоев шкур в поперечном срезе. Увеличение $\times 200$.
Окраска по Гольджи : а) спилоч шкуры КРС б) щуки в) сазана г) толстолобика

Таблица 1

Фракционный состав шкур рыб и спилка КРС

Сырье	Массовая доля белковых фракций, % к массе белка		
	Водорастворимая	Солерастворимая	Щелочерастворимая
Гольевой спилоч КРС	5,5	9,5	86
Шкуры рыб			
Щука	5,73	9,55	84,71
Сазан	5,48	9,16	85,34
Толстолобик	3,47	5,78	90,74

Как видно из данных табл. 1, дисперсии близки по свойствам, но имеют и некоторые отличия, связанные, по всей вероятности, с особенностями структуры коллагенов.

Использование аппарата Vertex 70 для идентификации структурных особенностей коллагена по спектру их поглощения в инфракрасной области дает возможность прямого измерения жидких, твердых субстанций без дополнительного выделения или получения таблетки с калием бромидом, что позволяет провести эксперимент быстро, не разрушая анализируемые структуры. Измерение проводили в среднем диапазоне волн в области от 4000 до 400 см⁻¹.

В ходе экспериментальных исследований обнаружены характерные полосы поглощения: 3335 – 2908, 2404 – 1655, 1611, 1502, 1493, 1211, 893, 611 см⁻¹, что соответствует соединениям типа (CH₃,C-H) (3335-2908); (NO₂,N-C≡N)(2404-1655);

(C=O,NO₂)(1611); (C-C-H)(1431,1211); (893-623) (-C-C,≡C-H). Эти данные подтверждают молекулярную природу коллагена (рис. 2).

Результаты электрофоретической подвижности (рис. 3) указывают на отличие в структуре, а следовательно, в функциях коллагенов различного происхождения. На элетрофореграммах видно, что миграция белков из спилка шкур крупного рогатого скота находится на границе 212 КДа и выше с небольшим содержанием компонентов при значениях молекулярной массы 60–212 кДа. Рыбные коллагены также характерны наличием высокомолекулярных фракций на уровне 212 КДа с более выраженным содержанием белков при значениях молекулярной массы 40–212 кДа. Такая характеристика рыбных коллагенов совпадает с данными польских и украинских авторов об особенностях строения рыбных коллагенов [3].

Таблица 2

Сравнительные характеристики субстанций из спилка КРС и шкуры толстолобика

Показатель	Субстанция 2%-го раствора (спилки КРС)	Субстанция 2%-го раствора (шкура толстолобика)
Подлинность	Окрашивание в фиолетовый цвет	Окрашивание в фиолетовый цвет
Прозрачность	Прозрачный	Прозрачный
Цветность	0,1%-й раствор коллагена в воде бесцветен	0,1%-й раствор коллагена в воде бесцветен
рН	3,2	4,8
Массовая доля сухих веществ	1,85%	1,76%
Микробиологическая чистота	Категория 1.2. Б	Категория 1.2. Б
Массовая доля коллагена	1,75	0,92

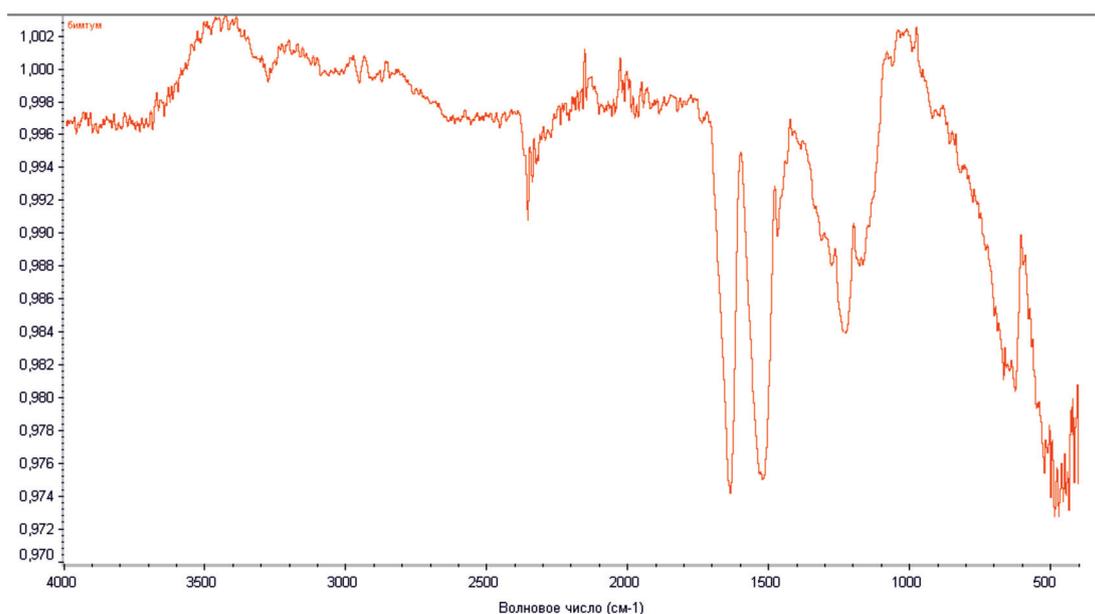


Рис. 2. ИК-спектроскопия коллагена

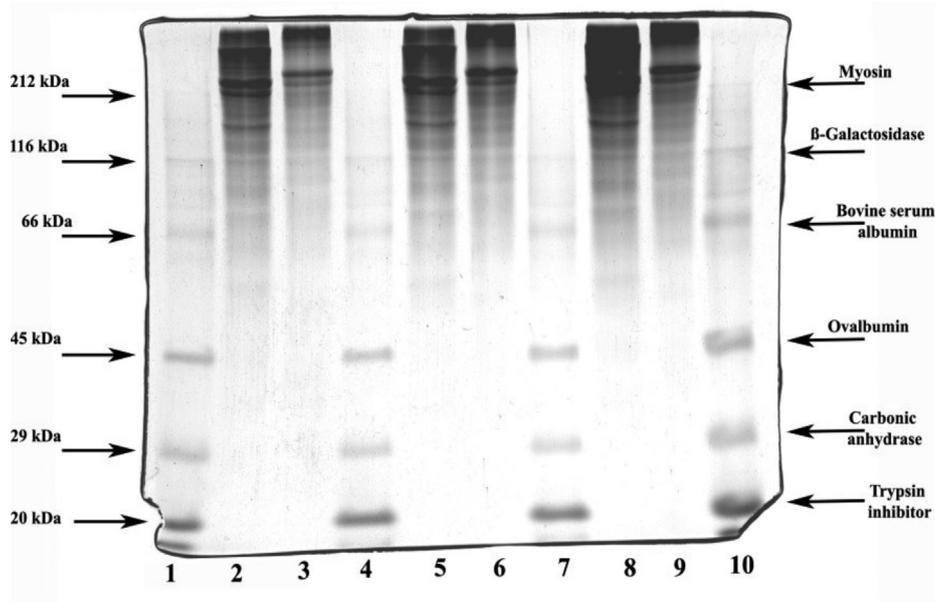


Рис. 3. Электрофореграммы коллагеновых субстанций животного и рыбного происхождения: дорожки 1, 4, 7, 10 – маркеры молекулярной массы; дорожки 2, 5, 8 – образец, полученный из шкуры рыб; дорожки 3, 6, 9 – образец, полученный из шкурки КРС

Таблица 3

Скорость выплавления желатина

Виды отходов	Выплавленный желатин, % от сухого вещества			
	время обработки, мин			
	15	30	45	60
Гольевой спилки шкур КРС (по Сапожниковой А.И., Месроповой Н.В.)	36,28	55,63	73,89	88,02
Шкуры рыб	42,89	72,11	84,97	86,0

Особенности структуры проявляются в более глубокой выплавке желатина, протекающей в более короткий временной период, в случае объектов рыбного происхождения (табл. 3).

Заключение

Проведенные гистоморфологические исследования и анализ фракционного состава вторичного сырья животного и рыбного происхождения, показал наличие коллагена в обоих случаях.

Были получены коллагеновые дисперсии, близкие по свойствам, но имеющие и различия, связанные с особенностями строения.

В ходе проведения ИК-спектроскопии коллагена, были обнаружены характерные полосы, соответствующие соединениям типа (CH₃,C-H); (NO₂,N-C≡N); (C=O,NO₂); (C-C-H); (-C-C,≡C-H), что подтверждает его молекулярную структуру.

Электрофоретическое фракционирование показало, что белки коллагеновых субстанций представляют собой гетерогенные системы с различной подвижностью фракций под действием электрического поля. Рыбные коллагеновые субстанции состоят из белковых фракций, молекулярная масса которых находится в диапазоне от 212 до 20 кДа.

Структурные особенности влияют на химические свойства. Выплавка желатина протекает быстрее в случае рыбного сырья, что говорит о коллагене, полученном из шкуры рыб, как о достойном конкуренте животному аналогу.

Список литературы

1. Антипова Л.В. Коллагены: источники, свойства, применение /Л.В. Антипова, С.А. Сторублевцев. – Воронеж: ВГУИТ, 2014. – 512 с.
2. Антипова Л.В. Современные методы исследования сырья и продуктов животного происхождения. – Воронеж:

Воронежский ЦНТИ – филиал ФГБУ «РЭА» Минэнерго России, 2014. – 531 с.

3. Батечко С.А. Коллаген. Новая стратегия сохранения здоровья и продления молодости [Текст] / С.А. Батечко, А.М. Ледзевиров. – Колечково, 2010. – 244 с.

4. Воробьев В.И. Использование рыбного коллагена и продуктов его гидролиза [Текст] / В.И. Воробьев // Известия Калининградского государственного технического университета. – 2008. – № 13. – С. 55–58. – Библиогр.: с. 58.

5. Ганс-Ульрих Гремлих. Язык спектров. Введение в интерпретацию спектров органических соединений [Текст]. / Ганс-Ульрих Гремлих ООО «Брукер Оптико», 2002. – 94 с.

6. ГОСТ 23041-78 Мясо и продукты мясные. Метод определения оксипролина. – Введ. 1979-01-01. – М.: Стандартинформ, 2010.

7. Государственная фармакопея СССР, XI издание, выпуск 1. Общие методы анализа. URL: <http://www.alppp.ru/law/hozjajstvennaja-dejatelnost/promyshlennost/35/gosudarstvennaja-farmakopeja-sssr---izdanie--vypusk-1--obschie-metody-analiza.html> (дата обращения: 13.03.2015).

8. Серебрения методы. URL: http://bigmeden.ru/article/Серебрения_Методы (дата обращения: 11.03.2015).

9. Титов А.О., Титов О.П., Хантургаева В.Г., Кожевникова Н.М., Хантургаева Г.И. Способ обработки коллагено-содержащего сырья. URL: <http://freepatent.ru/patents/2139937> (дата обращения: 10.02.2015).

10. What is fish collagen? URL: <http://www.wisegeek.com/what-is-fish-collagen.htm> (дата обращения 15.03.2015).

References

1. Antipova L.V. Kollageny: istochniki, svojstva, prime-nenie /L.V. Antipova, S.A. Storublevcev. Voronezh: VGUIT, 2014. 512 p.

2. Antipova L.V. Sovremennye metody issledovaniya syrja i produktov zhivotnogo proishozhdenija. Voronezh: Voronezhskij CNTI filial FGBU «RJeA» Minjenergo Rossii, 2014. 531 p.

3. Batechko S.A. Kollagen. Novaja strategija sohraneniya zdorovja i prodlenija mladosti [Текст] / S.A. Batechko, A.M. Ledzevirov. Kolechkovo, 2010. 244 p.

4. Vorobev V.I. Ispolzovanie rybnogo kollagena i produktov ego gidroliza [Текст] / V.I. Vorobev // Izvestija Kalinin-gradskogo gosudarstvennogo tehničeskogo universiteta. 2008. no. 13. pp. 55–58. Bibliogr.: pp. 58.

5. Gans-Ulrih Gremlih. Jazyk spektrov. Vvedenie v interpretaciju spektrov organičeskikh soedinenij [Текст]. / Gans-Ulrih Gremlih ООО «Bruker Optiko», 2002. 94 p.

6. GOST 23041-78 Mjaso i produkty mjasnye. Metod opredelenija oksiprolina. Vved. 1979-01-01. M.: Standartinform, 2010.

7. Gosudarstvennaja farmakopeja SSSR, XI izdanie, vypusk 1. Obshhie metody analiza. URL: <http://www.alppp.ru/law/hozjajstvennaja-dejatelnost/promyshlennost/35/gosudarstvennaja-farmakopeja-sssr---izdanie--vypusk-1--obschie-metody-analiza.html> (data obrashhenija: 13.03.2015).

8. Serebrenija metody. URL: http://bigmeden.ru/article/Serebrenija_Metody (data obrashhenija: 11.03.2015).

9. Titov A.O., Titov O.P., Hanturgaeva V.G., Kozhevnikova N.M., Hanturgaeva G.I. Sposob obrabotki kollagenosoderzhashhego syrja. URL: <http://freepatent.ru/patents/2139937> (data obrashhenija: 10.02.2015).

10. What is fish collagen? URL: <http://www.wisegeek.com/what-is-fish-collagen.htm> (data obrashhenija 15.03.2015).

Рецензенты:

Попова Т.Н., д.б.н., профессор, зав. кафедрой медицинской биохимии и микробиологии, ФГБОУ ВПО «ВГУ», г. Воронеж;

Дерканосова Н.М., д.т.н., профессор, зав. кафедрой товароведения и экспертизы товаров, декан факультета технологии и товароведения, ФГБОУ ВПО «Воронежский ГАУ», г. Воронеж.