

УДК 664.951 + 593.96

**Ю.М. Позднякова, Д.А. Конькова**

Дальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет,  
690087, г. Владивосток, ул. Луговая, 52б

## **ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ КОЛЛАГЕНСОДЕРЖАЩИХ КОМПЛЕКСОВ ИЗ ГОЛОТУРИЙ И ИХ ХАРАКТЕРИСТИКА**

*Проведено обоснование технологии получения коллагенсодержащих комплексов из мышечной ткани трепанга и кукумарии на основе биомодификации с помощью ультразвука и ферментов. Исследован состав и растворимость полученных субстанций. Полученные коллагенсодержащие комплексы трепанга и кукумарии могут найти применение как в пищевой промышленности для изготовления функциональных пищевых продуктов на основе биологически активных компонентов – коллагена и гексозаминов, так и в косметологии и медицине, где востребован нативный нерастворимый коллаген.*

**Ключевые слова:** голотурии, коллаген, гексозамины, ферментоллизат, ультразвук.

**Y.M. Pozdnyakova, D.A. Konkova**

## **TECHNOLOGY OF OBTAINED COLLAGEN COMPLEX FROM SEA CUCUMBER AND THEIR CHARACTERISTICS**

*The justification of technology of collagen complex from trepang and sea cucumber muscle tissue on the basis biomodifications by ultrasonic and enzymes was conducted. The composition and solubility of the obtained substance has been investigated. The obtained collagen-containing complexes of trepang and sea cucumber can be applied in the food industry for the manufacture of functional foods on the basis of biologically active components – collagen, hexosamine, and in cosmetology and medicine, where the native insoluble collagen in demand.*

**Key words:** sea cucumber, collagen, hexosamine, fermentolysate, ultrasonic.

### **Введение**

Коллаген – белок, который достаточно широко распространен в тканях животных и имеет широкий спектр применения в биомедицинской, фармацевтической, косметической и пищевой промышленности [1]. Физические и химические свойства морского коллагена отличаются от коллагена млекопитающих [2].

Как правило, основными источниками коллагена являются кожа и кости свиней и коров. Возникновение коровьего бешенства привело к снижению использования этого вида сырья. Таким образом, существует острая необходимость в разработке альтернативных источников коллагена. Морские организмы были признаны в качестве потенциальных источников из-за их доступности, отсутствия диетических ограничений, отсутствия риска заболеваний, а также высоких объемов вылова [3].

За последние годы наблюдается тенденция снижения объемов вылова и переработки рыбного сырья. В целом по России с 2000 г. уровень добычи рыбы снижается в среднем ежегодно на 17,7 %. Поэтому актуальны задачи более широкого использования нерыбных объектов лова (беспозвоночных, ракообразных, водорослей и др.) и комплексной, безотходной переработки гидробионтов, выработки БАВ и БАД из отходов (голов, кожи, костей и т. д.) рыбопереработки с использованием методов биотехнологии. Более широкое вовлечение в переработку разнообразных морских организмов, пока не являющихся основными объектами

промысла (морских губок, иглокожих, червей, кишечнорастворимых и т.д.), позволит значительно расширить ассортимент ценных биопродуктов морского происхождения, повысить рентабельность рыбной продукции.

Мышечная ткань голотуриевых (трепанга и кукумари) содержит около 70–80 % коллагена от общего содержания белка, что дает основание применять данный вид сырья для получения коллагена.

Целью данной работы является обоснование технологии коллагенсодержащих комплексов из трепанга и кукумари в качестве субстанции для функциональных продуктов питания, а также в косметологии, медицине и других областях и сферах применения.

### **Объекты и методы исследований**

В работе использовали мускульный мешок трепанга дальневосточного *Apostichopus japonicus* и кукумари японской *Cucumaria japonica*, которая была заготовлена в мае 2016 г в экспедиционных условиях на месте промысла и в замороженном виде доставлена в лабораторию.

Получение коллагенсодержащего комплекса из мышечной ткани трепанга и кукумари проводили по следующей технологии. Свежемороженую мышечную ткань измельчали до однородного состояния на волчке или мясорубке с диаметром отверстий решетки 2,0 мм. Далее 1 кг измельченной ткани мускульного мешка смешивали с водой в соотношении 1 : 10 и перемешивали при температуре 2–6 °С в течение 30 мин. Смесь центрифугировали при 4000 об/мин в течение 15 мин. Осадок вновь смешивали с водой в соотношении 1 : 10 и перемешивали в течение 1 ч. Далее смесь центрифугировали при 4000 об/мин в течение 15 мин, осадок смешивали с трис-НСI буфером рН 8,0, содержащим 4 мМ ЭДТА-Na соли в соотношении 1 : 10, и перемешивали в течение двух суток при температуре 2–6 °С. Далее смесь вновь центрифугировали при 4000 об/мин в течение 15 мин, осадок промывали в десятикратном объеме воды дважды. После проведенных процедур осадок высушивали до содержания остаточной влаги 10–12 %.

Обработку экстракта трепанга и кукумари ультразвуком проводили на аппарате Sonic VCH 500 (производитель – США) при мощности 75 Вт·см<sup>2</sup> в течение 15 мин.

Ферментирование промытого коллагенсодержащего комплекса осуществляли с помощью ферментного препарата протамекс в концентрации 2,5 ПЕ/г сырья, при рН 8,0 и гидромодуле 1 : 3, температуре 40–42 °С в течение 3 ч.

Содержание гексозаминов определяли спектрофотометрически согласно Фармокопейной статье № 42-1286-99 [4].

Определение содержания водорастворимого белка проводили по методу Лоури [5].

Содержание коллагена проводили по методу Замараевой [6].

Растворимость препаратов определяли визуально. Для этого навеску препарата растворяли в 500-кратном количестве растворителя, непрерывно встряхивали в течение 10 мин при комнатной (23–25 °С) температуре. Препарат считали растворимым, если при наблюдении в проходящем свете не обнаруживали частиц вещества.

### **Результаты и их обсуждение**

После проведенного анализа литературы по теме выделения коллагена из различных видов сырья нами была взята за основу технология получения коллагена из мускульного мешка трепанга *Bohadschia spp* [7]. Процесс получения коллагена по такой технологии включает большое количество стадий, занимающих по времени почти 5 сут. Нами был модифицирован этот метод на различных его стадиях, а также сокращен по времени получения конечного продукта. Поскольку применение конечного продукта предусматривает несколько направлений функциональных продуктов питания, в том числе напитков, то, так как воздействие ультразвука оказывает влияние на агрегатное состояние вещества, было предусмотрено два вида обработки промытого коллагена: ультразвуком и ферментами.

Соответственно процесс получения коллагена из мышечной ткани трепанга и кукумарии проводили по двум схемам, включающим следующие стадии:

1. Измельчение, промывка, обработка ультразвуком, сушка.
2. Измельчение, промывка, ферментализ, сушка.

Предварительная стадия промывки измельченной ткани общая для двух схем. Она включала измельчение свежемороженой мышечной ткани голотурий до однородного состояния на волчке или мясорубке с диаметром отверстий решетки 2,0 мм. Далее измельченную ткань мускульного мешка голотурий смешивали с водой в соотношении 1 : 10 и перемешивали при температуре 2–6 °С в течение 30 мин. Смесь центрифугировали при 4000 об/мин в течение 15 мин. Осадок вновь смешивали с водой в соотношении 1 : 10 и перемешивали в течение 1 ч. Далее смесь центрифугировали при 4000 об/мин в течение 15 мин, осадок смешивали с трис-НСI буфером рН 8,0, содержащим 4 мМ ЭДТА-На соли в соотношении 1 : 10 и перемешивали в течение двух суток при температуре 2–6 °С. Далее смесь вновь центрифугировали при 4000 об/мин в течение 15 мин, осадок промывали в десятикратном объеме воды дважды. Оставшийся после последней отмывки осадок обрабатывали с помощью двух способов: ультразвуком и ферментами.

Воздействие ультразвука на мышечную ткань голотурий оценивали по выходу экстрактивного белка.

По результатам исследования рациональные параметры ультразвуковой обработки трепанга (рис. 1) следующие: гидромодуль 1 : 3, мощность 100 Вт/см<sup>2</sup> в течение 10 мин. При таких условиях происходило возрастание экстрактивного белка в 3,6 раза.

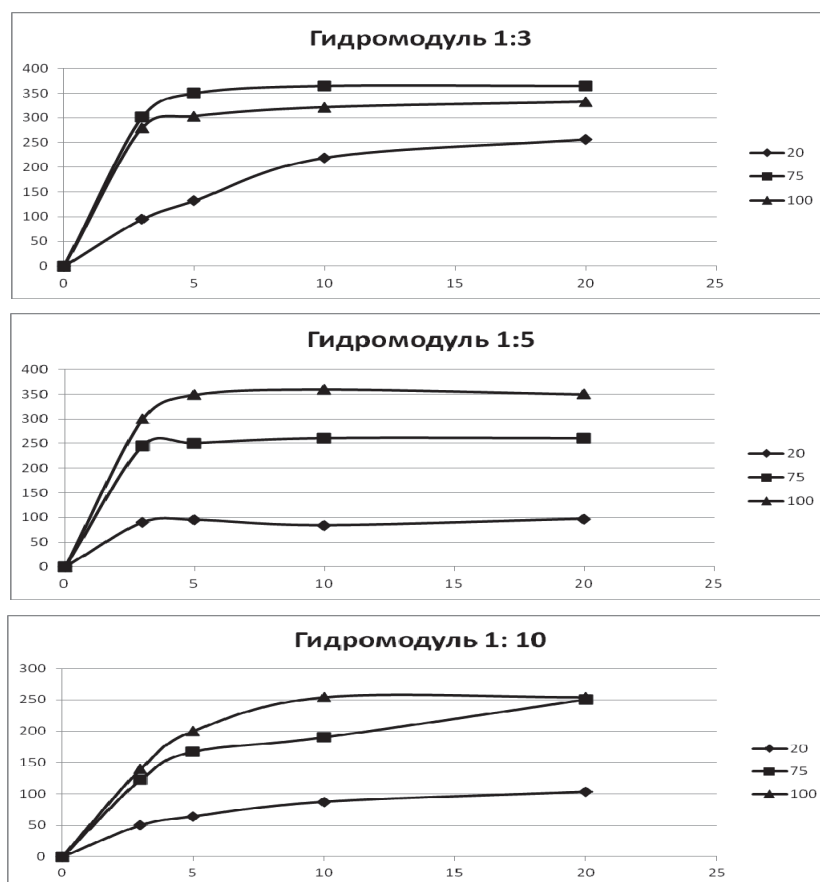


Рис. 1. Влияние параметров обработки ультразвуком на прирост экстрактивного белка мышечной ткани трепанга

Fig. 1. Influence of ultrasonic parameters to increase muscle protein extracting trepangs tissue

Результаты по обработке кукумарии ультразвуком показали (рис. 2), что наибольший прирост экстрактивного белка наблюдался при гидромодуле 1 : 3, мощности озвучивания 75 % и времени 20 мин. Практически такие же результаты были достигнуты с применением такого же гидромодуля и мощности 100 %, но за более короткое время – 3 мин, а также при использовании гидромодуля 1 : 10, мощности 75 % и времени 5 мин. С применением мощности 20 % наблюдался слабый прирост экстрактивности при всех гидромодулях.

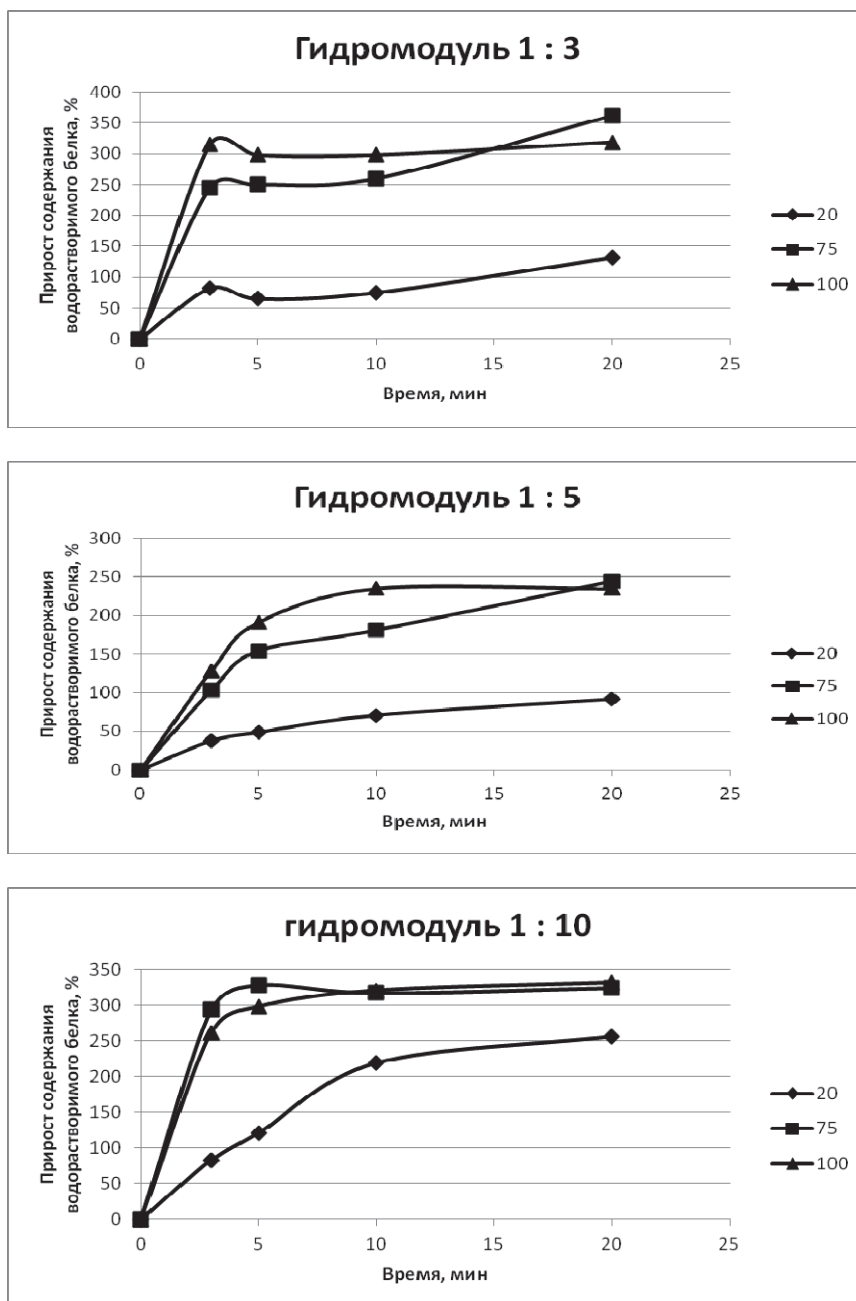


Рис. 2. Влияние параметров обработки ультразвуком на прирост экстрактивного белка мышечной ткани кукумарии

Fig. 2. Effect of ultrasonic treatment parameters to increase muscle protein extracting sea cucumber tissue

Таким образом, рациональными условиями обработки ультразвуком мышечной ткани трепанга являются: гидромодуль 1 : 3, мощность 100 %, время 10 мин. Для кукумарии ра-

циональные параметры УЗ-обработки: гидромодуль 1 : 10, мощность 75 % и время обработки 5 мин, либо гидромодуль 1 : 3, мощность 100 %, время 3 мин.

После обработки экстракта голотурий ультразвуком в смесях наблюдались нерастворимые компоненты ткани. Далее экстракты отправляли на сублимационную сушку.

По второй схеме с оставшимся после промывки осадком мышечной ткани голотурий проводили ферментативный гидролиз. Параметры ферментализации также были разработаны ранее [8]. Для этого осадок смешивали с водой в соотношении 1 : 2, доводили рН экстракта до 8,0 с помощью 0,1 М раствора едкого натра. Затем проводили ферментативный гидролиз, добавляя в смесь 100 мл раствора протамекса с протеолитической активностью 300 Е/г концентрацией 0,05 г/мл. Смесь выдерживали при температуре 37 °С 2 ч. Затем смесь нагревали до температуры 80 °С и выдерживали 15 мин для инактивации фермента. Далее ферментализат направляли на сублимационную сушку.

В полученных двумя способами коллагенсодержащих комплексах трепанга и кукумарии определяли содержание белков и гексозаминов (табл. 1).

Таблица 1

**Содержание белка и гексозаминов в коллагенсодержащих комплексах из мышечной ткани голотурий, %**

Table 1

**The proteins and hexosamines content in collagen complexes of sea cucumbers muscle tissue, %**

Препарат	Общий белок	Водорастворимый белок, в % от общего белка	Коллаген, в % от общего белка	Гексозамины
<b>Трепанг</b>				
С обработкой ультразвуком	58,7	46,8	63,2	9,2
Ферментативный гидролизат	58,7	66,9	52,5	4,6
<b>Кукумария</b>				
С обработкой ультразвуком	50,2	13,3	30,2	8,9
Ферментативный гидролизат	50,2	41,8	28,6	4,9

Полученные данные свидетельствуют о том, что на содержание общего белка не влияют условия обработки мышечной ткани трепанга в процессе извлечения коллагена. В то время как содержание остальных компонентов в той или иной степени отличается для препаратов, полученных с помощью обработки ультразвуком и ферментами. Водорастворимого белка в 1,42 раза больше в конечном препарате при обработке ткани ферментами, коллагена больше в 1,2 раза в препарате, полученном с обработкой ультразвуком.

Условия обработки мышечной ткани кукумарии в процессе извлечения коллагенсодержащего комплекса влияют только на содержание водорастворимого белка и гексозаминов. Так, водорастворимого белка в ферментализате в 3,1 раз больше, чем в препарате, обработанном ультразвуком. Гексозаминов больше в 1,8 раз в препарате, обработанном ультразвуком.

На основании величин содержания гексозаминов полученные разными способами препараты голотурий могут быть использованы в качестве хондропротекторного средства для производства БАД и функциональных пищевых продуктов [9].

В полученных препаратах коллагена была исследована растворимость в растворах с различной ионной силой и при различных значениях pH.

Обнаружено, что повышение ионной силы растворов несколько снижает растворимость ферментолизата коллагена трепанга (табл. 2.), в то время как pH раствора не влияет на его растворимость. Препарат полностью растворялся за 3 мин при 3, 6, 8 pH.

Ферментоллизат коллагена кукумарии полностью растворялся во всех испытуемых растворах в течение 3 мин.

Коллагенсодержащие комплексы трепанга и кукумарии, полученные с помощью обработки ультразвуком, оказались нерастворимы ни при каких условиях.

Таблица 2

**Растворимость препаратов коллагена, полученных различными способами**

Table 2

**Solubility of collagen preparations in various ways obtained**

Растворы	Ультразвук	Ферментный
Трепанг		
Вода	Нерастворим	Растворим за 1 мин
0,2М NaCl	Нерастворим	Растворим за 2 мин
0,5М NaCl	Нерастворим	Растворим за 3 мин
фосфатный буфер pH=8,0	Нерастворим	Растворим за 3 мин
фосфатный буфер pH=6,0	Нерастворим	Растворим за 3 мин
цитратный буфер pH=3,0	Нерастворим	Растворим за 3 мин
Кукумария		
Вода	Нерастворим	Растворим за 3 мин
0,2М NaCl	Нерастворим	Растворим за 3 мин
0,5М NaCl	Нерастворим	Растворим за 3 мин
фосфатный буфер pH=8,0	Нерастворим	Растворим за 3 мин
фосфатный буфер pH=6,0	Нерастворим	Растворим за 3 мин
цитратный буфер pH=3,0	Нерастворим	Растворим за 3 мин

**Выводы**

Таким образом, анализ химического состава коллагенсодержащих комплексов, полученных из мышечной ткани трепанга и кукумарии различными методами, показал зависимость как от способа выделения коллагена, так и от вида исходного сырьевого источника. Получение коллагенсодержащих комплексов из голотурий с применением ферментных препаратов целесообразно с целью его использования в пищевой промышленности для производства функциональных продуктов питания, например, напитков, вследствие его хорошей растворимости и высокого содержания биологически активных компонентов (гексозамины, коллаген). Коллаген, полученный с обработкой ультразвуком, не приемлим для применения в напитках по причине его слабой растворимости, но может применяться в других продуктах питания, например кондитерских, хлебо-булочных изделиях, а также в сферах, где растворимость не является необходимым свойством, а требуется негидролизованый нативный коллаген, например, в косметологии или медицине (для производства раневых покрытий, пломбирочных материалов, пластырей и др.) [10].

### Список литературы

1. Kittiphattanabawon, P., et al. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) // Food Chemistry. – 2005. – Vol. 89, № 3. – P. 363–372.
2. Nishimura, T., A. Hattori, and K. Takahashi. Structural weakening of intramuscular connective tissue during conditioning of beef // Meat science. – 1995. – Vol. 39, № 1. – P. 127–133.
3. Liu, H.Y., D. Li, and S.D. Guo. Studies on collagen from the skin of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) // Food Chemistry. – 2007. – № 101(2). – P. 621–625.
4. Фармокопейная статья 42-1785-96.
5. Lowry O., Rosenbrough N., Parr A., Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193, № 1. – P. 265–276.
6. Замараева, Т.В. Современные методы в биохимии / Метод определения содержания коллагеновых белков по оксипролину / Т.В. Замараева. – М.: Медицина, 1977. – С. 262–264.
7. Siddiqui Y. D, Arief E. M, Yusoff A, Suzina A. H, Abdullah S.Y. Isolation of pepsin-solubilized collagen (psc) from crude collagen extracted from body wall of sea cucumber (*bohad-schia spp*) // International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. – 2013. – Vol. 5, № 2. – P. 555–559.
8. Позднякова, Ю.М. Биоконверсия мышечной ткани трепанга методом ультразвуковой обработки и ферментативного гидролиза / Ю.М. Позднякова, Г.Н. Ким, Н.Н. Ковалев, А.Д. Перцева // Вестн. КрасГАУ. – 2015. – № 4. – С. 54–59.
9. Приложение 11 к техническому регламенту Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции» (ТР ТС 021/2011).
10. <http://www.procollagene.ru/files/file/collagene.pdf>.

**Сведения об авторах:** Позднякова Юлия Михайловна, кандидат технических наук, e-mail: [pozdneyakova.julia@yandex.ru](mailto:pozdneyakova.julia@yandex.ru);

Конькова Дарья Александровна, студентка 4-го курса, группа БТб-412, e-mail: [dash\\_ka955\\_00@mail.ru](mailto:dash_ka955_00@mail.ru).