

УДК 675.08:675.015.453:57.08

**ВИЗНАЧЕННЯ АМІНОКИСЛОТНОГО СКЛАДУ ПРЕПАРАТІВ КОЛАГЕНУ,
ОДЕРЖАНИХ З ВІДХОДІВ ШКІРЯНОГО ВИРОБНИЦТВА**

О.А. АНДРЕЄВА, М.М. ТЕГЗА

Київський національний університет технологій та дизайну

Методом іонообмінної рідинно-колонкової хроматографії визначено кількісний та якісний амінокислотний склад колагенвмісних препаратів, одержаних з недублених відходів шкіряного виробництва. На підставі розрахунку амінокислотного скору проаналізовано біологічну цінність тестованих продуктів

У готовій шкірі залишається лише 40 % з усієї кількості колагену, що міститься у шкіряній сировині. Тому переробка відходів вважається невід'ємною частиною виробництва натуральної шкіри, способом покращення економічного стану та розв'язання низки екологічних проблем. Головною метою переробки відходів є колаген [1]. До колагенвмісних відходів належать міздря, сировинна та голинна обрізь, хромова стружка, непридатний для виготовлення шкіри спилок, обрізь та клапти готової шкіри, протеїнові речовини, що містяться у стічних водах, а також осаді, утворювані в результаті очищення останніх [2].

Можливості використання колагену залежать від його структури та ступеня руйнування. При цьому необхідність більш високого ступеня руйнування розглядається лише у тих випадках, коли попередні можливості оптимального використання цієї біополімерної сировини вичерпані. Крім класичних способів переробки на желатин, міздряний клей, білковий гідролізат та підкладкові матеріали, колагенвмісні відходи останнім часом стали використовувати для отримання текстильних підложок, різноманітних медичних та косметичних засобів (судинних протезів, хірургічних кетгутів, кремів та плівок для захисту ран), для виготовлення ковбасних виробів, наповнювання та оздоблення шкіри і т.і. [1,2]. Повноцінне використання колагенвмісних відходів, як цінного вторинного сировинного ресурсу, неможливе без чіткого уявлення про їх хімічний склад, структуру та властивості.

Постановка завдання

За завданням промисловості автори проводять пошук способів більш раціонального використання колагенвмісних відходів шкіряного виробництва. Оскільки такі відходи давно вже набули споживчої вартості і статусу промислового товару, важливо з'ясувати спектр властивостей, що визначають якість як самих відходів, так і виготовлених з них продуктів. На стадії переробки важливими є технологічні властивості та показники безпеки відходів, на стадії реалізації одержаних продуктів – показники усіх споживчих властивостей – функціональності, надійності, безпеки. Як і для інших шкіряних товарів, споживчі властивості продуктів переробки згаданих відходів визначаються хімічними, фізичними та біологічними властивостями їх основної складової – колагену.

Однією з характерних ознак колагену є його амінокислотний склад, на підставі якого створюється уявлення про будову основних поліпептидних і бічних ланцюгів, про активні групи, які, утворюючи між- та внутрішньомолекулярні зв'язки, суттєво впливають на властивості протеїну. Для визначення амінокислотного складу, послідовності розташування амінокислот вздовж поліпептидного ланцюга колаген спочатку гідролізують, потім одержаний гідролізат досліджують на вміст окремих амінокислот. Для ідентифікації останніх використовують різні методи та прилади: хроматографічний (на

папері та іонообмінних колонках); визначення кінцевих функціональних груп; визначення вмісту окремих амінокислот (наприклад, оксипроліну за Стефановичем); автоматичні аналізатори амінокислот, дія яких ґрунтується на поєднанні іонообмінної хроматографії та спектрофотометрії [3].

Об'єкти та методи дослідження

Об'єктом дослідження обрано амінокислотний склад препаратів колагену, одержаних з недублених відходів шкіряного виробництва: а) *желатину* (у якості контролю, зразок №1); б) *голінного порошку* іноземного (зразок №3) та вітчизняного (зразки №4,5) виробників. При цьому у якості шкіряної сировини використано шкури великої рогатої худоби, а вітчизняний голінний порошок виготовлено за новою технологією.

Желатин уявляє собою твердий подрібнений продукт світло-жовтого кольору, без запаху та кольору; він володіє великою желатинуючою здатністю та високою в'язкістю. Голінний порошок має вигляд безбарвного волокнистого матеріалу різного ступеня подрібнення: зразок №4 містить частинки меншого, зразки №3,5 – більшого розміру.

Для якісного та кількісного аналізу амінокислот використали метод іонообмінної рідинно-колонкової хроматографії (принцип дії базується на кислотно-лужних властивостях цих сполук) та автоматичний аналізатор 339 М фірми «Мікротехна» (Чехія), в основу роботи якого покладено принцип проведення аналізу у безупинному потоці елюенту: за допомогою дозувального насоса елюент з ємності проганяється через хроматографічну колонку. На виході з колонки до елюату безупинно подається нінгідринний реактив у певному співвідношенні з елюатом. Потім суміш елюату і нінгідринного реактиву направляється спочатку до реактора, що нагрівається до температури 95–98 °С, потім – у проточну кювету. Інтенсивність утворюваного забарвлення вимірюється фотоелементом, на який світло від джерела надходить крізь стінки кювети. Сигнали фотоелемента підсилюються та реєструються самописним потенціометром у вигляді хроматограми. Для розрахунку кількості амінокислот у зразках на колонку аналізатора попередньо наносять стандартну суміш амінокислот з відомою концентрацією кожної. На хроматограмі визначають площу (або висоту) піка для кожної амінокислоти.

Кількість мікромолей кожної амінокислоти (X_i) у досліджуваних препаратах обчислюють за формулою: $X_i = S_i/S_0$, де S_i – площа (або висота) піка амінокислоти у досліджуваному зразку; S_0 – площа (або висота) піка цієї ж амінокислоти у розчині стандартної суміші амінокислот, що відповідає 1 мікромолю кожної амінокислоти. Кількість амінокислоти у міліграмах одержують множенням кількості мікромолей амінокислоти на відповідну їй молекулярну масу. Якісний склад суміші амінокислот визначають порівнянням стандартної хроматограми з хроматограмою досліджуваної суміші [5].

Результати та їх обговорення

Як і слід було очікувати, амінокислотному складу *всіх препаратів колагену* притаманне наступне: (табл. 1,2): 1. Великий вміст залишків гліцину (на рівні 29,15–29,47 %); 2. Значна кількість полярних амінокислот (21,25–22,11 %), у т.ч. з бічними радикалами кислотного характеру (дикарбонові кислоти) – 12,94–13,89 %, з бічними радикалами оснóвного характеру (діамінокислоти) – 8,22–8,37 %; 3. Значна кількість неполярних амінокислот (16,28–16,62 %); 4. Великий вміст оксикислот (14,61–17,23 %); 5. Великий вміст імінокислот (23,62–25,60 %), присутність оксипроліну (8,35–10,97 %); 6. Незначна кількість циклічних (1,96–2,59 %) та сірковмісних (0,13–0,16 %) амінокислот; 7. Відсутність цистину і триптофану.

Амінокислотний склад окремих препаратів має свої особливості, так, в іноземному голинному порошку (зразок №3) відсутній оксилізін, мало оксипроліну, але багато циклічних амінокислот (особливо гістидину і тирозину).

Таблиця 1. Амінокислотний склад препаратів колагену

Амінокислота	% по Мк/моль			
	№1	№3	№4	№5
Гліцин (<i>гли</i>)	29,47	29,20	29,15	29,41
Аланін (<i>арг</i>)	11,57	11,50	11,38	10,89
Валін (<i>вал</i>)	1,69	1,61	1,66	1,81
Лейцин (<i>лей</i>)	2,36	2,57	2,41	2,63
Ізолейцин (<i>ізіл</i>)	0,72	0,94	0,87	0,95
Аспарагінова кислота (<i>асп</i>)	5,22	5,15	5,03	4,88
Глутамінова кислота (<i>глу</i>)	8,50	8,74	8,25	8,06
Аргінін (<i>арг</i>)	4,74	5,17	4,79	4,70
Лізін (<i>ліз</i>)	2,95	3,05	2,96	2,93
О-лізін (<i>о-ліз</i>)	0,53	0,00	0,62	0,68
Серин (<i>сер</i>)	3,29	3,70	3,40	3,38
Треонін (<i>тре</i>)	1,87	2,02	1,92	1,86
Тирозин (<i>тир</i>)	0,30	0,54	0,31	0,34
Фенілаланін (<i>фен</i>)	1,34	1,48	1,31	1,28
Гістидін (<i>гіс</i>)	0,32	0,57	0,43	0,47
Цистеїн (<i>цис</i>)	0,13	0,12	0,12	0,13
Метіонін (<i>мет</i>)	0,01	0,01	0,01	0,03
Пролін (<i>про</i>)	15,79	15,27	15,33	14,63
О-пролін (<i>о-про</i>)	9,21	8,35	10,06	10,97
Триптофан (<i>три</i>)	0,00	0,00	0,00	0,00

Вітчизняний голинний порошок від всіх інших препаратів колагену відрізняється більшим (на 7,3–17,9 % відн.) вмістом оксикислот (за рахунок оксилізіну та оксипроліну) та меншим (на 3,2–6,8 % відн.) – дикарбонових кислот; від желатину він відрізняється більшим (на 4,6–6,6 % відн.) вмістом циклічних кислот. У низькодисперсному голинному порошку (зразок №5) порівняно з високодисперсним вітчизняним аналогом (зразок №4) дещо менша кількість дикарбонових і діамінокислот (відповідно на 2,6 та 4,1 % відн.), проте, більша кількість окси- (на 6,2 % відн., насамперед, за рахунок оксипроліну), гетероциклічних (на 9,3 % відн., за рахунок гістидину) та сірковмісних (на 23,1 % відн., за рахунок метіоніну) кислот. Взагалі, зразок №5 виділяється поміж інших препаратів найбільшим вмістом сірковмісних (0,16 %), окси- (17,23 %) та імінокислот (25,60 % від загальної кількості амінокислот по Мк/моль).

Наявність різноманітних активних груп у препаратах колагену уможливує їх взаємодію з різними хімічними сполуками (електролітами, дубителями, барвниками і т.і.), що може суттєво покращити функціональні властивості досліджуваних продуктів.

З літератури відомо, що більше половини населення земної кулі систематично голодує, добова потреба становить менше 2200 ккал, хоча енергетичний вміст їжі дорослої людини має становити в середньому 3000 ккал; особливо виражений в їжі недолік білка. На думку фахівців, світовий дефіцит харчового білка дорівнює 15 млн тонн на рік [6]. Тому проводиться активний пошуку нових джерел харчових білків як рослинного (наприклад, сої), так і тваринного (наприклад, колагенвмісних відходів) походження [1–2,6]. І хоча улюблена вегетаріанцями соя на 40 % складається з білка, у ній немає всіх

необхідних амінокислот, зате багато гормоноподібних речовин. Ось чому зловживання «рослинним м'ясом» може обернутися гормональним дисбалансом (особливо у дітей та чоловіків) [7].

Таблиця 2. Вміст у препаратах колагену окремих груп амінокислот

Група амінокислот	% від загальної кількості амінокислот			
	№1	№3	№4	№5
Дикарбонові (<i>асп, глу</i>)	13,72	13,89	13,28	12,94
Діамінокислоти (<i>арг, ліз, о-ліз</i>)	8,22	8,22	8,37	8,31
Полярні (<i>дикарбонові, діамінокислоти</i>)	21,94	22,11	21,65	21,25
Неполярні (<i>ала, вал, лей, ізл</i>)	16,34	16,62	16,32	16,28
Оксикислоти (<i>сер, тре, о-ліз, тир, о-про</i>)	15,20	14,61*	16,31	17,23
Циклічні, у т.ч.:	1,96	2,59	2,05	2,09
- карбоциклічні (<i>тир, фен</i>)	1,64	2,02	1,62	1,62
- гетероциклічні (<i>гіс</i>)	0,32	0,57	0,43	0,47
Сірковмісні (<i>цис, мет</i>)	0,14	0,13	0,13	0,16
Імінокислоти (<i>про, о-про</i>)	25,00	23,62	25,39	25,60
Незамінні (<i>вал, лей, ізл, ліз, тре, мет, фен, три</i>)	10,94**	11,68**	11,14**	11,49**
Замінні (<i>глі, ала, цис, тир, про, сер, асп, гіс, арг, глу</i>)	79,33	79,96	78,19	76,89

Примітка: * відсутній оксилізін; ** відсутній триптофан.

З урахуванням викладеного цікаво було визначити поживну (біологічну) цінність аналізованих препаратів. Біологічна цінність білків харчових продуктів залежить від кількості та співвідношення у них амінокислот, зокрема *незамінних* (які не можуть синтезуватися в організмі й надходять тільки з їжею) та *замінних* (синтезуються в організмі зі швидкістю, достатньою для його нормального розвитку) [3,6–10].

Незамінних амінокислот всього 8 (вал, лей, ізл, ліз, тре, мет, фен, три), а для дитячого організму – 10 (ще арг та гіс). Кожна з незамінних амінокислот відіграє певну біологічну роль. Особливо дефіцитними є лізін, метіонін і триптофан. Потреба дорослої людини у лізіні становить 3–5 г на добу; недолік цієї амінокислоти в організмі призводить до порушення росту, кровообігу, кальцинації кісток, зменшення вмісту гемоглобіну у крові [8]. Метіонін бере участь в обміні жирів та фосфатидів, він є найбільш сильним ліпотропним (запобігає ожиріння печінки) засобом, бере участь в обміні ціанокобаламіну (вітаміну В12) та фолієвої кислоти; необхідний для нормальної діяльності надниркових залоз. Добова потреба людини у метіоніні – 1 г. Триптофан сприяє росту, утворенню гемоглобіну, сироваткових білків, бере участь у процесі відновлення тканин. Потреба організму у ньому становить 1 г на добу. Фенілаланін забезпечує нормальне функціонування щитовидної та надниркових залоз. Лейцин, ізолейцин, треонін впливають на процеси росту. При недостатці лейцину зменшується маса тіла, виникають зміни у нирках і щитовидній залозі. Недостача валіну призводить до розладу координації рухів. Гістидін входить до складу гемоглобіну, його недостача або надлишок в організмі погіршує умовно-рефлекторну діяльність. Аргінін бере участь в утворенні сечовини – кінцевого продукту обміну білків [8,9]. У досліджуваних препаратах виявлено 7 з 8 незамінних амінокислот (з урахуванням потреб дорослої людини [6]) у кількості 10,94–11,68 % (табл. 2). При цьому вміст незамінних амінокислот у голинному порошку, незалежно від виробника, на 1,8–6,8 % відн. більший, ніж у желатині. У низькодисперсному вітчизняному порошку (зразок №5) вміст метіоніну у 3 рази більший, ніж в інших препаратах.

Замінні амінокислоти (для дорослої людини це глі, ала, цис, тир, про, сер, асп, глу, гіс, арг) виконують в організмі різноманітні функції і відіграють не меншу фізіологічну роль, ніж незамінні. Так,

наприклад, глутамінова кислота – єдина амінокислота, яка підтримує дихання клітин мозку [8,9]. У досліджуваних препаратах колагену вміст замісних амінокислот знаходиться в межах 76,89–79,96 % (табл. 2).

У природі не зустрічається ідеальний білок, який містив би всі незамінні та замісні амінокислоти в оптимальному співвідношенні. Протеїни тваринного походження, що містяться у м'ясі, рибі, птиці, яйцях та молочних продуктах, вважаються повноцінними завдяки тому, що вміст незамінних амінокислот у них такий самий або навіть більший, ніж в ідеальному білку. Рослинні протеїни здебільшого неповноцінні, оскільки містять деякі незамінні амінокислоти у значно меншій кількості, ніж ідеальний протеїн. У повсякденному житті людина використовує для харчування суміш протеїнів, яка зазвичай включає тваринні та рослинні білки. Ця суміш неідеальна й прийнято вважати, що її біологічна цінність становить 70 %, якщо за 100 % прийняти біологічну цінність ідеального протеїну [10].

Виходячи з викладеного, введено поняття «еталонний амінокислотний склад» (табл. 3). Знаючи амінокислотний профіль протеїну або амінокислоти, можна порівняти їх з еталонним складом і розрахувати *амінокислотний скор* того чи іншого продукту, визначивши таким чином його *біологічну цінність*. Один зі способів розрахунку амінокислотного скору AC , %, зводиться до обчислення процентного вмісту кожної з амінокислот щодо її вмісту в протеїні, який прийнято за еталонний, за формулою: $AC = (AKX / AKC) \cdot 100$, де AKX , AKC – вміст амінокислот у досліджуваному та стандартному протеїнах. Лімітуючими є ті незамінні кислоти, значення скору яких менше 100 % [7].

З наведених у табл. 3 розрахунків можна зробити висновок про те, що амінокислотний профіль тестових продуктів нерівний. Найбільш дефіцитними, лімітуючими амінокислотами є триптофан (який у колагені взагалі відсутній [3]) та сірковмісні амінокислоти (лише 3,1–3,9 % від норми).

Таблиця 3. Розрахунок амінокислотного скору тестованих продуктів

Аміно-кислота	Вміст амінокислоти, мг/1 г білка					Амінокислотний скор, %			
	Еталон	№1	№3	№4	№5	№1	№3	№4	№5
<i>ісл</i>	40,0	6,0	8,7	7,8	8,8	15,0	21,7	19,6	22,0
<i>лей</i>	70,0	19,7	23,7	21,5	24,2	28,1	33,8	30,7	34,6
<i>ліз</i>	55,0	27,4	31,3	29,5	30,1	49,7	57,0	53,6	54,7
<i>мет + цис</i>	35,0	1,1	1,1	1,1	1,4	3,2	3,2	3,1	3,9
<i>фен + тир</i>	60,0	17,5	24,0	18,5	19,2	29,1	40,0	30,9	32,1
<i>тре</i>	40,0	14,2	16,9	15,6	15,6	35,4	42,2	38,9	38,9
<i>три</i>	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>вал</i>	50,0	12,5	13,3	13,2	14,9	25,1	26,5	26,4	29,8
Усього:	360,0	98,4	119,0	107,2	114,2	–	–	–	–

Слід зазначити, що всі тестовані продукти не мають високої біологічної цінності, оскільки скор їх незамінних амінокислот менше 95 % (5 % – прийнята точність визначення кількості амінокислоти у протеїні [7]), проте, вміст цих важливих складових у препаратах з волокнистою будовою (зразки №3–5) становить третину від еталонної кількості. З урахуванням дефіциту харчового білка, біологічну цінність згаданих продуктів можна поліпшити у різний спосіб: 1. Додаванням лімітуючих амінокислот; 2. Внесенням компонента з підвищеним вмістом таких амінокислот; 3. Змішуванням з іншими продуктами з різними лімітуючими амінокислотами.

Висновки

Досліджено якісний і кількісний амінокислотний склад препаратів колагену з недублених відходів шкіряного виробництва: желатину та голинного порошку різних виробників, з різним ступенем подрібнення. Методом іонообмінної рідинно-колонкової хроматографії у досліджуваних препаратах виявлено: 19 вільних амінокислот, у т.ч. 7 з 8 незамінних амінокислот; значну кількість дикарбонових та імінокислот; низький вміст сірковмісних і циклічних кислот; наявність оксипроліну; відсутність цистину і триптофану. Встановлено особливості амінокислотного складу окремих препаратів: а) відсутність оксилізіну, малий вміст оксипроліну і досить великий вміст циклічних амінокислот в іноземному голинному порошку; б) високий вміст оксикислот й порівняно високий вміст циклічних кислот у вітчизняному голинному порошку; в) найбільшу серед усіх препаратів кількість окси- та імінокислот (відповідно 17,23 та 25,60 % від загальної кількості амінокислот) й утричі більшу кількість метіоніну у низькодисперсному голинному порошку. На основі розрахунку амінокислотного скору проаналізовано біологічну цінність тестованих продуктів, встановлено їх амінокислотний профіль, найбільш лімітуючі амінокислоти. Запропоновано кілька способів покращення біологічної цінності препаратів з волокнистою будовою.

Одержані результати, які можна пояснити походженням, умовами одержання та випробування використаних у роботі препаратів колагену, вказують на можливість широкого практичного застосування вітчизняних препаратів з волокнистою будовою завдяки їх поліфункціональності й цілком передбачуваній спорідненості до багатьох хімічних сполук (електролітів, дубителів, барвників тощо).

ЛІТЕРАТУРА

1. Пустыльник Я. И. Кожевенные отходы – золотое дно / Я. И. Пустыльник // В мире оборудования. – 2002, – № 1(18). – с. 45–47.
2. Журавский В. А. Малоотходная технология кожевенного производства / В. А. Журавский. – М. : Лег-промбытгиздат, –1993. –128 с.
3. Андреева О. А. Фізика та хімія протеїнів: підручн. [для студентів вищ. навч. закл.] / О. А. Андреева. – К.: КНУТД, –2003. –224 с.
4. Новые методы анализа аминокислот, пептидов и белков : [пер. с англ. ; под ред. Ю. А. Овчинникова]. – М. : Мир, –1974. –462 с.
5. Ионообменная хроматография аминокислот / Т. Д. Козаренко ; отв. ред. Р. К. Салаяев. – Новосибирск : Наука, Сибирское отделение, –1975. –133, [1] с.
6. Незаменимые аминокислоты. Суточная потребность здорового питания : <http://www.mem.ologia.info/node/16>.
7. Белки : <http://www.yoga-bлаго.ru/articles/belki.doc>.
8. Караев А. Л. Аминокислоты – основа жизни / А. Л. Караев // Профилактика заболеваний и укрепление здоровья. –2008, – № 3. – с. 51–54.
9. Заменимые и незаменимые аминокислоты, значение и потребность в них : http://www.spravpit.life-rus.ru/1_kharakteristika.htm.
10. Скурихин И. М. Все о пище с точки зрения химика / И. М. Скурихин, А. П. Нечаев. – М. : Высшая школа, –1991. –288 с.

Надійшла 04.02.2011