

ИССЛЕДОВАНИЕ ЖЕЛАТИНА ИЗ КОЛЛАГЕНА СВИНОЙ ШКУРЫ МЕТОДОМ ГЕЛЬ-ХРОМАТОГРАФИИ

Д.П. РАДКЕВИЧ

Всесоюзный научно-исследовательский институт мясной промышленности, Москва, СССР

Г.А.МИКРЮКОВА

НПО "Комплекс", Москва, СССР

Е.Е. БРАУДО и И.Г. ПЛАШИНА

Институт элементоорганических соединений, Москва, СССР

Известные типы желатина характеризуются полидисперсностью. Высокая полидисперсность влияет на свойства растворов и студней желатина, затрудняя создание стабильных технологических процессов производства пищевых продуктов и фармацевтических препаратов на его основе.

При обработках коллагеносодержащего сырья в воде, щелочах и кислотах в значительной мере удаляются неколлагеновые вещества, ослабевают и нарушаются внутримолекулярные связи. Минимальное разрушение пептидных связей между аминокислотными остатками пептидных цепей необходимо для получения желатина с высокими физическими свойствами: вязкостью, температурой плавления и прочностью студня. Физические свойства желатина зависят от вида сырья, химической природы веществ, используемых для обработки, их концентрации, длительности воздействия и температуры.

Для получения желатина отбирали мездренные шкуры свиней весом 6-7 кг. С сырья, предназначенного для кислотно-криолитической обработки, щетину удаляли шпаркой. Шкуры измельчали на куски 50x50 мм. Кислотную обработку осуществляли в течение 10 ч при отношении массы сырья к объему кислого раствора 1:3 (ж.к.) и температуре 18-20 °С.

Концентрация растворов кислот, необходимая для достижения относительного максимума набухания, составляла: для соляной - 0,25, серной - 0,5 и ортофосфорной - 1,5%. Затем набухшие куски сырья помещали в полиэтиленовые пакеты и замораживали при минус 10 - минус 12 °С в течение 24 ч, после чего размораживали в проточной холодной воде и промывали до pH водной вытяжки 5,2-5,5.

При получении желатина комбинированным способом измельченные аналогичным образом шкуры свиней промывали в течение 5-6 ч от хлорида натрия проточной холодной, а затем теплой водой, выдерживали в растворе сульфата натрия, обезвоживали в растворе едкого натрия, содержащем сульфат натрия, вторично обрабатывали в 10%-ном растворе сульфата натрия, нейтрализовали в растворе ортофосфорной кислоты, содержащем сульфат натрия, промывали проточной холодной водой и обрабатывали в 1,5%-ном растворе ортофосфорной кислоты, отмывали от избытка кислоты 5-6 ч проточной водой до pH 5,2-5,5.

Желатин из обработанного сырья экстрагировали водой, получая первую фракцию при температуре 55-60 °С, вторую - при температуре 60-65 °С, и ж.к. соответственно 0,5; 0,4.

Далее проводили обработку желатиновых бульонов, застудивание и сушку студня. Желатин первых двух фракций смешивали в соотношении 1:1 и подвергали анализу.

Для сравнительной оценки исследовали также образец - смесь 2-х фракций желатина, полученного щелочным способом в лабораторных условиях из деминерализованной кости /оссеина/ крупного рогатого скота.

Полученные образцы желатина подвергали диализу.

Для оценки степени полидисперсности образцов желатина использовали метод гелевой хроматографии / I /. Метод позволяет осуществить разделение молекул по размерам. Разделение основано на различии во внутренних объемах частиц геля, доступных разного размера молекулам растворенного вещества.

Фракционирование проводили на колонке длиной 95 см и диаметром 1 см, заполненной гелем агарозы типа "Sepharose 6B". Размеры гранул 40 - 200 мк. Скорость элюирования составляла 6 мл/ч; объем вводимого 1%-ного раствора желатина 1 мл.

Фракции собирали с помощью автоматического коллектора фракций типа "Radirac" (фирма "ЛКБ", Швеция). Концентрацию желатина во фракциях определяли микробиуретовым методом /2/, спектрофотометрируя растворы в стандартной кювете (толщина 1 см) при $\lambda = 310 \text{ nm}$ на спектрофотометре "СФД-2".

Кроме того проводили разделение желатина на фракции по методу Пурадье / 3 /. Раствор желатина 2%-ный нагревали до 40 °С и выдерживали в течение 1 часа. Затем при интенсивном перемешивании, приливали безводный этанол при 40 °С в соотношении 1:1,6. Помутневший раствор выдерживали 10 мин. и отфиговывали при той же температуре и скорости вращения ротора 3000-5000 оборотов в минуту в течение 10-15 минут. Осадок отделяли, промывали хо-

лодной дистиллированной водой и растворяли в теплом бидистилляте при температуре 40°C, затем охлаждали при 5°C и высушивали.

В отделенный на первой стадии фракционирования верхний слой жидкости снова добавляли этанол в соотношении 1:3 и собирали вторую подфракцию.

Третью подфракцию выделяли таким же образом, но увеличивали количество этанола до соотношения 1:5 / 3,4 /.

Изменение характеристической вязкости растворов желатина в 2М растворе тиопикната калия проводили при 25°C с помощью вискозиметра ВПЖ-2 с диаметром капилляра 0,56 мм и временем истечения 50-150 сек. Зависимость между предельным числом вязкости и вязкостью средней молекулярной массой рассчитывали по уравнению $[\eta] = 2,9 \cdot 10^{-4} \cdot M^{0,62} / 5$

Анализ кривых элюирования /рисунок/ показал, что желатин из оссеина содержит меньше молекул большого размера. Судя по максимуму на кривой элюирования желатин из коллагена кости /оссеина/ имеет большую полидисперсность, так как наряду с молекулами большого размера, имеется значительная доля меньших размеров. Это объясняется, очевидно, более нерегулярным, чем в волокнистом коллагене кожного покрова, распределением лабильных связей вдоль его полипептидных цепей, что приводит к образованию при их разрыве более неоднородных по размерам сегментов.

Концентрация крупных молекул в кислотном типе желатина, полученного разрыхлением сырья различными кислотами, возрастает в последовательности: ортофосфорная, серная, соляная.

Наличие высокомолекулярных фракций и концентрация однородных молекул в образце, полученном комбинированным способом селективного разрыхления, а также малая доля низкомолекулярных фракций, что характеризуется смещением максимума на кривой элюирования вправо, отражается на получении кривой более регулярного распределения, то есть в данном случае состав продукта более однороден по размерам молекул. Таким образом, комбинированный способ позволяет получить менее полидисперсный желатин.

Полученные данные в значительной мере согласуются с результатами определения распределения по молекулярной массе методом дробного осаждения коацерватов с помощью этанола / таблица /.

Таблица 1

Способ получения желатина	Номер под-фракции	Характеристическая вязкость, $[\eta]$ /дл/г	Вязкостная средняя молекулярная масса	Выход подфракций от массы смеси I и II фракций, вес/%
Комбинированный	I	0,58	214000	40,9± 7,0
	II	0,57	202000	47,5± 7,4
	III	0,28	66000	6,5± 1,7
Кислотно-криолитический /H ₃ PO ₄ /	I	0,57	204000	27,3± 7,4
	II	0,44	114000	29,6± 5,9
	III	0,24	50100	19,7± 6,0

Таким образом, в результате комбинированной обработки удастся получить больший выход однородных высокомолекулярных подфракций.

Для получения однородной в основной массе по размерам макромолекул продукции наиболее пригодны шкуры свиней. Использование этого вида сырья обусловлено тем, что различия в строении свиной шкуры с точки зрения пола и породы мало существенны. Влияние возраста в пределах от 9 до 18 мес. на свойства желатина из шкур свиней незначительно / 6 /.

Получение однородного по физическим свойствам желатина из коллагена шкур крупного рогатого скота затруднено из-за больших различий в строении этого коллагеносодержащего сырья в зависимости от возраста, породы, а также по топографическим участкам /толщина, укладка пучков и волокон коллагена/. Кость крупного рогатого скота также непригодна для этих целей, так как костное сырье еще в большей мере разнородно. Кроме этого, в коллагене кости более нерегулярно, чем в волокнистом коллагене дермы, распределены лабильные связи вдоль полипептидных цепей коллагена, что обуславливает большую нерегулярность в размерах сегментов, образующихся при разрыве этих цепей.

Длительная /15-20 сут / обработка шкур свиней гидратом окиси кальция также не позволяет получать желатин с низкой степенью полидисперсности.

Кислотный способ разрыхления шкур свиней, содержащих щетину, не пригоден, так как в кислой среде кератин волоса не разрушается. Кислотно-криолитический способ целесообразно применять для получения пищевого желатина из обезвоженных шкур свиней или их частей,

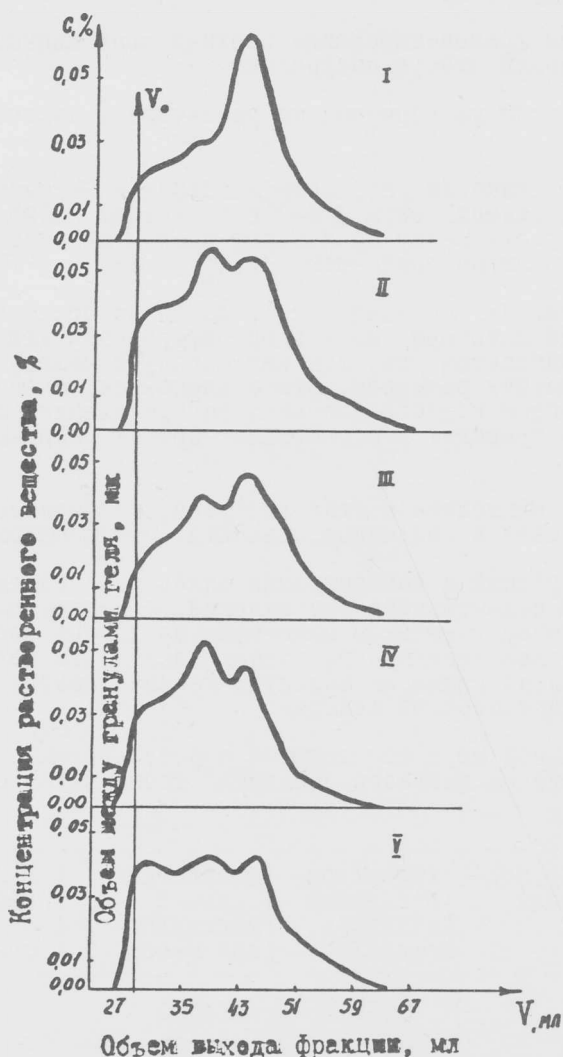


Рис. Кривые элюирования желатина из эссенции (I), из шкур свиней (II - IV). II - обработка ортофосфорной кислотой, III - соляной кислотой, IV - серной кислотой, V - комбинированный способ.

обрезков. Кислотно-криолитическая обработка ускоряет в 2-3 раза процесс экстракции желатина.

Выработку желатина из необезвоженного сырья целесообразно производить комбинированным способом. При этом обезвоживание и частичное разрыхление осуществляют на первом этапе обработки в щелочно-солевом растворе. Окончательное разрыхление производят в растворе кислоты. Причем, второму этапу разрыхления предшествует нейтрализация сырья в кислотно-солевом растворе и промывка от ионов образовавшихся солей. Далее сырье промывают от избытка кислоты и при мягком температурном режиме экстрагируют желатин. Для получения однородного по физическим свойствам высокомолекулярного желатина в процессе экстракции отбирают первую и вторую фракции желатиновых бульонов, которые выделяют и обрабатывают отдельно до получения сухого продукта.

В качестве сырья для выработки желатина комбинированным способом целесообразно использовать малопригодные в кожевенном производстве части мездренных мокросоленых шкур свиней, от которых отделен кожевенный крупон. После измельчения сырья промывают и частично обезжиривают теплой водой. Для удаления влаги из такого сырья, его обрабатывают в концентрированном растворе сульфата натрия.

Для растворения щетины и разрыхления коллагена шкур свиней на первом этапе обработки применяют раствор едкого натрия, насыщенный сульфатом натрия.

Использование концентрированных растворов солей дает возможность осуществить обработку сырья при высоком осмотическом давлении, избежать набухания сырья в щелочной среде и связанного с ним частичного пептизационного распада, потерь коллагена. Кроме этого, это позволяет осуществить ускоренную обработку сырья без неблагоприятного из-за чрезмерной длительности деструктивного воздействия на коллаген.

Для нейтрализации следует применять раствор минеральной кислоты, насыщенный сернистым натрием. В качестве кислоты, используемой на втором этапе разрыхления, рекомендуется ортофосфорная кислота.

Мягкие условия экстракции желатина в диапазоне температур 55–65°C позволяют получать желатин с однородными физическими свойствами.

Новый тип желатина имеет изоэлектрическую точку, расположенную в области 5,7–6,0, что указывает на отсутствие чрезмерного гидролиза пептидных связей в главных цепях коллагена, минимально изменяет такие его свойства как набухание в воде и вязкость.

Комбинированный способ обработки шкур свиней или их частей позволяет получить желатин со стабильными и высокими физическими свойствами: вязкостью, температурой плавления и прочностью студня. Для его получения следует использовать в качестве сырья мездренные шкуры или их части, так как оно по строению и химическому составу, по сравнению с другими видами коллагенсодержащего сырья, более однородно, отличается менее прочной волокнуистой структурой, что предопределяет возможность путем кратковременного его разрыхления в электролитах, осуществить экстракцию желатина при умеренных температурах.

Новый тип желатина с вязкостной средней молекулярной массой 200000 – 214000 дает возможность создать более стабильные технологические процессы при производстве из желатина пищевых продуктов, фармацевтических препаратов и лекарственных средств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Детерман Г. Гель-хроматография. М., Изд-во "Мир", 1970, 252 с.
2. Zammenhof G. Methods of enzymatic. New-York-London, 1961.
3. Pouradier T., Venet A. The structure of gelatin. II Variation of the physical and mechanical properties with molecular weight. I. Chim. Phys. 47, 391, 1950.
4. Вейс А. Макромолекулярная химия желатина. (Пер. с англ. под ред. Измайловой В.Н.). М., "Пищевая промышленность", 1971, 478 с.
5. Крег А. Вязкость. В кн. Аналитические методы белковой химии /под ред. Ореховича В.Н./, 1963, с.233.
6. Райх Г. Коллаген, М., "Легкая индустрия", 1969, 325 с.