

Optymalizacja odzyskiwania białek mięśniowych z kręgosłupów dorsza bałtyckiego*)

ELŻBIETA SKIERKA, MARIA SADOWSKA, JULITA MAJEWSKA

Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej,
ul. G. Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk

Skierka E., Sadowska M., Majewska J.

Optimization of protein recovery from cod backbone

Summary

The aim of the study was to establish the optimum conditions for recovering non-collagen proteins from the backbones of cods by solvent extraction. The proteins were extracted in three different ways: twice in 24 h with 5% sodium chloride or 0.1 M sodium hydroxide solution, or firstly using 5% sodium chloride solution over 24 h, and then 0.1 M sodium hydroxide solution in 24 h. Different ratios of backbone to solution were tested, 1 : 2; 1 : 4; 1 : 6; 1 : 8; 1 : 10; 1 : 12. All procedures were performed at 4°C. 0.1 M solution of sodium hydroxide was more effective in extracting protein than 5% solution of sodium chloride. A 100% yield of non-collagen protein was recovered from fresh backbone by double 24 h extraction with sodium hydroxide solution, while this was 70% with sodium chloride solution. About 80% of the protein was soluble when extraction was conducted in the first stage with sodium chloride solution and then with sodium hydroxide solution. After 5 months of storing the backbone at -18°C, protein recovery decreased by about 40% for sodium chloride solution and about 20% for sodium hydroxide solution, and about 30% for mixed extraction. The extraction yield had no influence on the ratio of extracted material to solution. Collagen losses during extraction did not exceed 0,4%.

Keywords: fish; protein; by-products

Podczas produkcji filetów z dorsza bałtyckiego, aż 60% masy ryb to produkty uboczne. Kręgosłup stanowi ok. 15% masy ryby (5, 18). Zawiera on dużo przylegającej tkanki mięśniowej. Dotychczas część odpadów przemysłu rybnego, w tym również kręgosłupy, przetwarzana jest na mączkę rybną lub wykorzystywana w niewielkim stopniu jako karma w hodowli zwierząt futerkowych, natomiast pozostała część trafia na wysypiska śmieci jako odpady szczególnie uciążliwe dla środowiska. Kręgosłupy są zatem niewykorzystanym racjonalnie źródłem pełnowartościowych białek mięśniowych, kolagenu i soli mineralnych. Natywny, nie zanieczyszczony kolagen można otrzymać z kręgosłupów po uprzednim usunięciu z nich towarzyszących mu białek.

Białka sarkoplazmatyczne i miofibrylarne można wydzielić z mięsa ryb drogą wyczerpującej ekstrakcji 5% roztworem NaCl o pH 7,5 (4, 17). Wydajność ekstrakcji białek zależy od stosowanych parametrów ekstrakcji, tj. stosunku rozpuszczalnika do materiału, stopnia rozdrobnienia surowca, czasu i krotności ekstrakcji.

*) Badania finansowane przez Ministerstwo Środowiska, umowa nr 42/05/Wn50/NE-OZ-Tx/D.

Drogą łagodnej ekstrakcji roztworami soli nie zawsze można wydzielić wszystkie albuminy i globuliny, np. te, które w wyniku stosowanych zabiegów technologicznych uległy denaturacji. Zdenaturowane białka np. dorsza bałtyckiego przechowywanego zamrażalniczo przez dłuższy czas można całkowicie rozpuścić w 0,1 M roztworze NaOH. Wprawdzie alkalia skutecznie rozpuszczają białka niekolagenowe, ale modyfikują strukturę kolagenu i częściowo go rozpuszczają. Do usuwania białek niekolagenowych z odpadowych surowców łącznotkankowych przemysłu rybnego stosuje się przeważnie 0,1 M roztwór NaOH (8, 9). Brak jest jednak informacji odnośnie do skuteczności tej operacji oraz rozpuszczalności kolagenu i jego strat. Ilość kolagenu rozpuszczonego w 0,1 M roztworze NaOH zależy od jego pochodzenia. Stosując ten roztwór do oczyszczania izolatu śródmięśniowego kolagenu bydłęcego z białek mięśniowych wyekstrahowano ok. 10% kolagenu (12), podczas gdy alkaliczny roztwór białek mięsa karpia i pstrąga nie zawierał kolagenu (14, 15). Natomiast w 0,01 M roztworze NaOH rozpuszcza się ok. 5% kolagenu z rozdrobnionych skór dorsza bałtyckiego (13).

Celem pracy było ustalenie optymalnych parametrów wydzielania białek mięśniowych z kręgosłupów dorsza, bez strat kolagenu.

Materiał i metody

Materiałem do badań były kręgosłupy dorsza bałtyckiego (*Gadus morhua*), po mechanicznym filetowaniu ryb. Kręgosłupy zamrożone w -18°C rozdrobiono w wilku przez siatkę o średnicy oczek = 0,5 cm, dokładnie wymieszano, zapakowano w woreczki polietylenowe i przechowywano w temperaturze -18°C .

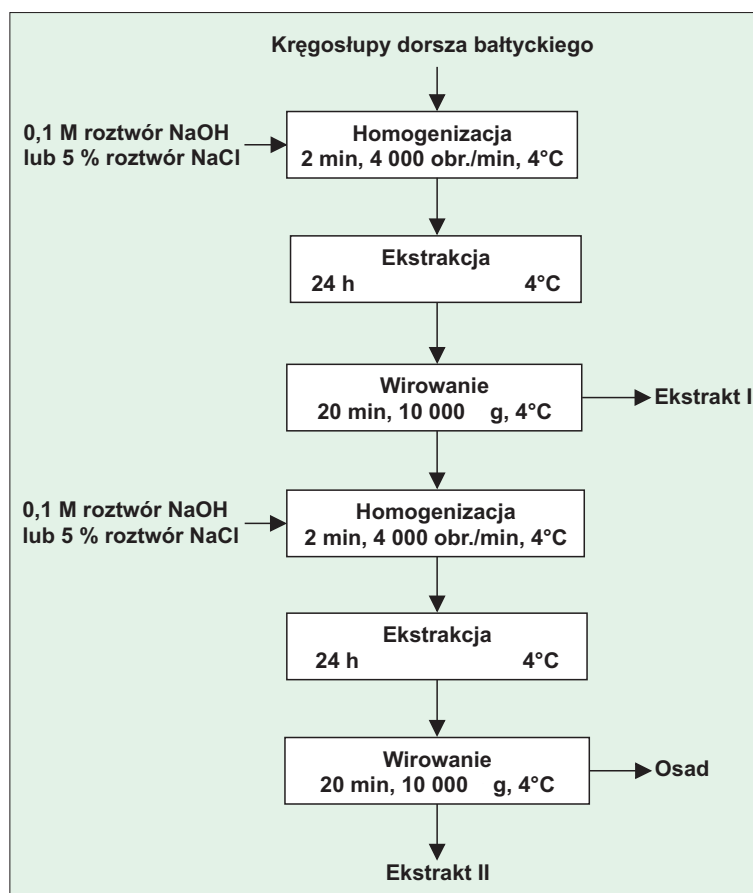
W surowcu oznaczono zawartość:

- suchej masy, metodą suszarkową, susząc materiał do stałej masy w temperaturze 105°C ,
- popiołu, metodą wagową, spopielając próbki w temperaturze 600°C ,
- azotu ogółem, metodą Kjeldahla wg PN (10),
- hydroksyproliny, metodą kolorymetryczną wg ISO (1) po 6-godzinnej hydrolizie próbek w roztworze 6 M kwasu solnego. Zastosowano przelicznik hydroksyproliny na kolagen równy 14,7 (13).

Białka mięśniowe ekstrahowano z kręgosłupów zgodnie ze schematem przedstawionym na ryc. 1, roztworami 5% NaCl i/lub 0,1 M NaOH. Stosunek surowca do rozpuszczalnika wynosił: 1 : 2; 1 : 4; 1 : 6; 1 : 8; 1 : 10 i 1 : 12 (w : v). Stosowano trzy różne warianty ekstrakcji. Surowiec traktowano w pierwszym i drugim etapie 5% roztworem NaCl, w pierwszym etapie 5% roztworem NaCl, a następnie 0,1 M roztworem NaOH lub w dwóch etapach 0,1 M roztworem NaOH. W ekstraktach, po pierwszym i po drugim etapie, oznaczano zawartość białek mięśniowych metodą Lowry'ego (7) oraz hydroksyproliny. Wyniki wyrażono jako procent wyekstrahowanych białek mięśniowych i kolagenu w stosunku do całkowitej ich zawartości w kręgosłupach. Doświadczenia wykonano w trzech powtórzeniach. Określono również wpływ przechowywania zamrażalniczego na wydajność ekstrakcji białek niekolagenowych, przy stosunku surowca do rozpuszczalnika 1 : 2, dla wszystkich wariantów ekstrakcji. Ze względu na niską temperaturę denaturacji kolagenu ekstrakcję białek mięśniowych prowadzono w temperaturze 4°C .

Wyniki i omówienie

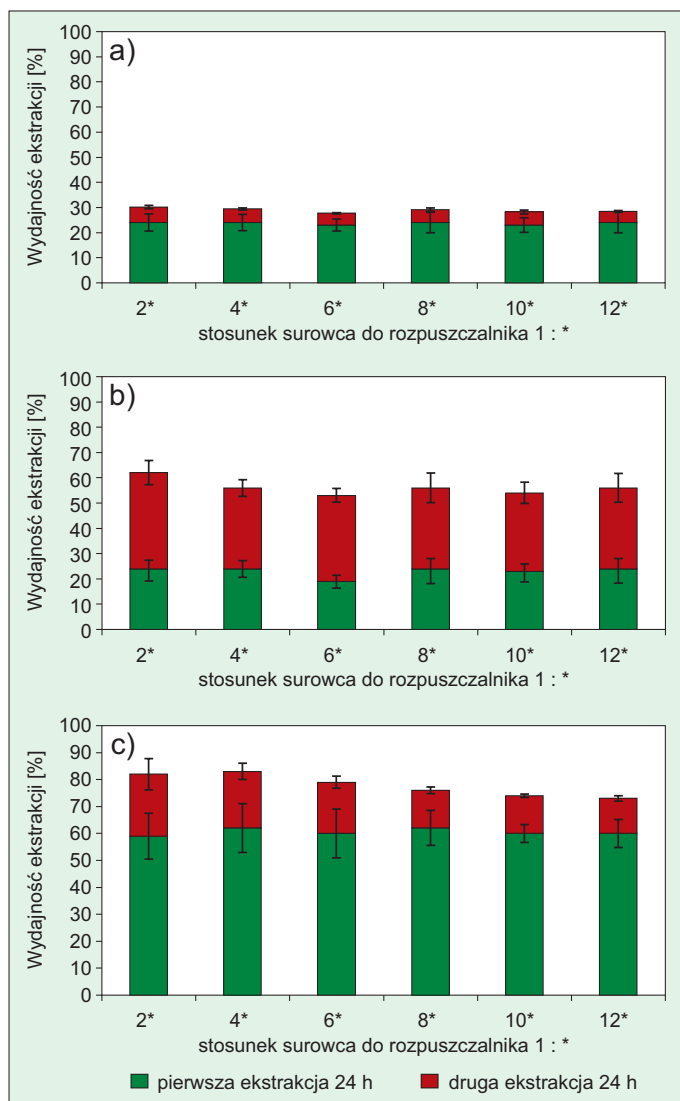
Kręgosłupy dorsza bałtyckiego zawierały: 22% suchej masy, 6,2% popiołu, 16,7% białka ogółem, z czego 5,2% stanowił kolagen. Otrzymane wyniki są zgodne z uzyskanymi przez Gildberga i wsp. (5). Z przedstawionego składu podstawowego wynika, że kręgosłupy dorsza bałtyckiego zawierają ok. 76% białka ogółem w suchej masie, z czego 2/3 stanowią białka mięśniowe. Zatem z tony kręgosłupów można by odzyskać ok. 115 kg białek mięśniowych. Pozostałość stanowią elementy kostne, które zawierają ok. 30% kolagenu w suchej masie oraz ok. 60-70% soli mineralnych, głównie fosforanu wapnia (około 85%), reszta to: węglan wapnia (10%), fosforan magnezu (1,5%), fluorek wapnia (0,3%), chlorek wapnia (0,2%) i sole sodu (2%) (6).



Ryc. 1. Schemat ekstrakcji białek mięśniowych z kręgosłupów dorsza bałtyckiego

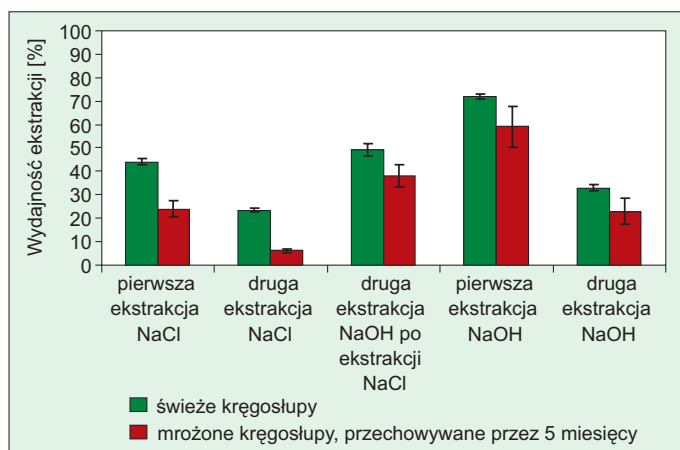
Wpływ parametrów ekstrakcji białek mięśniowych z kręgosłupów na ich rozpuszczalność przedstawiono na ryc. 2. Stwierdzono, że niezależnie od zastosowanego rozpuszczalnika stosunek surowca do roztworu nie ma wpływu na wydajność ekstrakcji białek. Nie wielkie różnice w ilości wyekstrahowanych białek mieszczą się w granicach błędów oznaczeń. Odmienne wyniki otrzymali Boles i wsp. (3), którzy ekstrahowali białka mięśniowe z kości bydłęcych 0,05 M roztworem NaOH oraz Batista (2), który wydzieliał białka z „trocin” powstałych po porcjowaniu zamrożonych filetów z orki i morszczuka. Ze wzrostem stosunku rozpuszczalnika do surowca od 1 : 1 do 10 : 1 rozpuszczalność białek mięśniowych z kości bydłęcych wzrosła ok. dwukrotnie. Natomiast wydajność ekstrakcji białek z odpadów mięśniowych orki zwiększyła się dwukrotnie, a morszczuka trzykrotnie po zwiększeniu stosunku rozpuszczalnika do surowca z 4 : 1 do 20 : 1.

Na ilość wyizolowanych białek wpływa rodzaj użytego rozpuszczalnika. W 5% roztworze NaCl (ryc. 2a) w czasie 24 h rozpuszczało się ok. 25% białek mięśniowych i dodatkowo 5% podczas drugiej 24 h ekstrakcji. Wg Bolesa i wsp., 24 h ekstrakcja w 4% roztworze NaCl umożliwiła wyekstrahowanie z bydłęcych kręgów i żeber, odpowiednio, zaledwie 18% i 13% białek (3). Potwierdza to różną rozpuszczalność białek w roztworze soli, determinowaną przez ekstrahowa-



Ryc. 2. Wpływ krotności ekstrakcji oraz stosunku surowca do roztworów ekstrahujących na wydajność ekstrakcji białek mięśniowych z kręgosłupów przechowywanych w -18°C przez 1-8 miesięcy

- a) dwukrotna ekstrakcja 5% roztworem NaCl,
 b) ekstrakcja 5% roztworem NaCl i 0,1 M NaOH,
 c) dwukrotna ekstrakcja 0,1 M roztworem NaOH



Ryc. 3. Wpływ zamrażalniczego przechowywania (-18°C) kręgosłupów dorsza bałtyckiego na rozpuszczalność białek mięśniowych

ny surowiec i parametry procesu technologicznego odzysku białek. Natomiast w wariacie, w którym podczas pierwszych 24 h ekstrahowano białka 5% roztworem NaCl, a następnie osad poddawano działaniu 0,1 M roztworu NaOH, więcej białek rozpuściło się podczas drugiej ekstrakcji – 35% (ryc. 2b). Świadczy to, że jest on lepszym rozpuszczalnikiem niż 5% roztwór NaCl. Największą wydajność białek uzyskano, gdy w I i II etapie do ich ekstrakcji zastosowano 0,1 M roztwór NaOH. Efektywniejsza była pierwsza ekstrakcja (ryc. 2c), podczas której wydzielono z surowca ok. 60% białek, zaś podczas drugiej ekstrakcji rozpuszczeniu uległo dodatkowo ok. 20% białek mięśniowych.

Wpływ przechowywania zamrażalniczego w temperaturze -18°C na rozpuszczalność białek niekolagenowych kręgosłupów badano przez porównanie wydajności ekstrakcji białek mięśniowych ze świeżego surowca oraz kręgosłupów rybnych przechowywanych w temperaturze zamrażalniczej przez pięć miesięcy, przy stosunku surowca do rozpuszczalnika 1 : 2.

Podczas przechowywania kręgosłupów w temperaturze -18°C przez 5 miesięcy, w wyniku zmian denaturacyjnych, zmalała rozpuszczalność białek mięśniowych niezależnie od rodzaju rozpuszczalnika i krotności ekstrakcji (ryc. 3). Rozpuszczalność białek w 5% roztworze NaCl zmniejszyła się o ok. 40% i wynosiła po 5 miesiącach zamrażalniczego przechowywania ok. 30%, czyli osiągnęła wartość określaną przez Sikorskiego (18, 19) jako graniczną. Oznacza to, że do roztworu przeszła tylko frakcja białek sarkoplazmatycznych, stanowiąca 30% białek włókna mięśniowego. Są one bowiem stabilne w temp. powszechnie stosowanej w zamrażalnictwie i w zamrażalniczym przechowywaniu żywności tkankowej (mięsa, ryb itp.), natomiast białka miofibrylarne uległy denaturacji i utraciły rozpuszczalność w 5% roztworze NaCl. Potwierdzeniem tego jest to, że po ekstrakcji kręgosłupów roztworem NaCl, a następnie 0,1 M roztworem NaOH można częściowo wyekstrahować białka miofibrylarne w ilości 35%. Najmniejszy wpływ zamrażania i zamrażalniczego przechowywania kręgosłupów na rozpuszczalność białek mięśniowych zaobserwowano stosując dwukrotną ekstrakcję 0,1 M roztworem NaOH (ryc. 3). Ten sposób ekstrakcji nie pozwala odzyskać z mrożonych kręgosłupów tylko 20% białek w nich zawartych. Natomiast z „trocin” powstałych po porcjowaniu zamrożonych filetów z orki i morszczuka 0,1 M roztworem NaOH w temperaturze $22-23^{\circ}\text{C}$ w czasie 1 h można wyekstrahować odpowiednio 90% i 60% białek zawartych w surowcu (2).

Białka mięśniowe ekstrahowano z kręgosłupów dorsza przechowywanych 1-8 miesięcy w -18°C . Wyniki rozpuszczalności białek w 5% roztworze NaCl (ryc. 2a, 2b i 3) świadczą, że całkowita denaturacja białek miofibrylarnych nastąpiła w czasie jednego miesiąca i dalsze zamrażalnicze przechowywanie kręgosłupów nie zmniejsza już rozpuszczalności białek.

Tab. 1. Straty kolagenu podczas ekstrakcji białek mięśniowych z kręgosłupów dorsza bałtyckiego

Stosunek surowiec : roztwór	Rozpuszczalność kolagenu (B/A × 100)* (%)		
	2 × 5% NaCl	5% NaCl; 0,1 M NaOH	2 × 0,1 M NaOH
1 : 2	0,15 ± 0,032	0,20 ± 0,040	0,17 ± 0,010
1 : 4	0,15 ± 0,034	0,17 ± 0,041	0,19 ± 0,016
1 : 6	0,14 ± 0,010	0,20 ± 0,010	0,23 ± 0,020
1 : 8	0,17 ± 0,018	0,31 ± 0,026	0,40 ± 0,017
1 : 10	0,16 ± 0,033	0,34 ± 0,046	0,36 ± 0,010
1 : 12	0,18 ± 0,038	0,38 ± 0,070	0,37 ± 0,010

Objaśnienia: * A – zawartość kolagenu w kręgosłupach; B – zawartość kolagenu w ekstraktach

Stwierdzenie to ma praktyczne znaczenie. Do wykorzystania kręgosłupów w skali przemysłowej konieczna jest ich stała podaż. Ze względu na nierytmiczność dostaw świeżego surowca w odpowiednich ilościach, jedną z metod ich utrwalenia jest zamrażanie, a przechowywanie zamrażalnicze powyżej miesiąca nie wpływa na wydajność ekstrakcji białek mięśniowych.

Z mrożonych kręgosłupów dorsza, po dwukrotnej 24 h ekstrakcji 0,1 M roztworem NaOH, można odzyskać 80% białek niekolagenowych. Te warunki ekstrakcji nie powodują negatywnych zmian w białkach (11, 20). Niebezpieczne zmiany, takie jak: degradacja reszt argininy do ornityny, zniszczenie reszt niektórych wrażliwych aminokwasów, racemizacja oraz tworzenie nowych nietypowych dla białek reszt aminokwasowych i wiązań sieciujących powstają, gdy ekstrakcja prowadzona jest w mniej łagodnych warunkach, w temp. powyżej 30°C i pH 13. Stosując roztwory o pH niższym od 11 i temperaturę pokojową, otrzymuje się izolat białkowy wolny od lizynoalaniny i innych toksycznych aminokwasów, który posiada wartość odżywczą porównywalną z mięsem (11, 16).

Straty kolagenu podczas ekstrakcji białek mięśniowych z kręgosłupów były minimalne i nie przekraczały 0,4% (tab. 1).

Podsumowanie

Z zamrażalniczo przechowywanych kręgosłupów dorsza bałtyckiego, po dwukrotnej ekstrakcji w 4°C 0,1 M roztworem NaOH, można odzyskać 80% białek mięśniowych, stosując stosunek rozpuszczalnika do surowca 2 : 1. Ten minimalny stosunek rozpuszczalnika do kręgosłupów pozwala na otrzymanie bardziej stężonych roztworów białek, z jakich łatwiej jest strącić i odzyskać w formie precypitatu, który może znaleźć różnorakie wykorzystanie, np. jako dodatek do przetworów rybnych, do wytwarzania peptydów i hydrolizatów białkowych lub produkowania biodegradowalnych opakowań żywności.

Piśmiennictwo

1. Anon.: Meat and meat products – determination of L-hydroxyproline content. Reference method. International Standard, ISO 3496 – 1978 (E).

- Batista I.: Recovery of proteins from fish waste products by alkaline extraction. Eur. Food Res. Technol. 1999, 210, 84-89.
- Boles J. A., Rathgeber B. M., Shand P. J.: Recovery of proteins from beef bone and the functionality of these proteins in sausage batters. Meat Sci. 2000, 55, 223-231.
- Dyer W. J., French H. V., Snow J. M.: Proteins in fish muscle. I. Extraction of protein fractions in fresh fish. J. Fish. Board Can. 1950, 7, 585-593.
- Gildberg A., Arnesen J. A., Carlehög M.: Utilization of cod backbone by biochemical fractionation. Proc. Biochem. 2002, 38, 475-480.
- Jastrzębski P.: Produkcja mączek pastewnych z odpadów zwierzęcych. WPLiS, Warszawa 1957.
- Lowry O. H., Rosebrough H. I., Farr A. L., Randall R. I.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951, 193, 265-275.
- Nagai T., Suzuki N.: Isolation of collagen from fish waste material – skin, bone and fins. Food Chem. 2000, 68, 277-281.
- Nishimoto M., Sakamoto R., Mizuta S., Yoshinaka R.: Identification and characterization of molecular species of collagen in ordinary muscle and skin of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Food Chem. 2005, 90, 151-156.
- PN – 75/A – 04018. Oznaczanie azotu metodą Kjeldahla i przeliczanie na białko.
- Palka K., Sikorski Z. E., Rakowska M.: The recovery and nutritional evaluation of alkali extracted protein coagulates from crushed bone residues. Food Chem. 1985, 18, 291-299.
- Sadowska M., Rudzki J., Sikorski Z. E.: Rozdzielanie białek surowców zwierzęcych o dużej zawartości tkani łącznej. Roczn. Inst. Przem. Mięsnego Tuszcz. 1983/84, 20/21, 105-115.
- Sadowska M., Kołodziejka I., Niecikowska C.: Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*). Food Chem. 2003, 81, 257-262.
- Sato K., Yoshinaka R., Sato M., Ikeda S.: A simplified method for determining collagen in fish muscle. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 1986, 52, 889-893.
- Sato K., Ohashi C., Ohtsuki K., Kawabata M.: Type V collagen in trout (*Salmo gairdneri*) muscle and its solubility change during chilled storage of muscle. J. Agric. Food Chem. 1991, 39, 1222-1225.
- Shahidi F., Han X., Synowiecki J.: Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). Food Chem. 1995, 53, 285-293.
- Sikorski Z. E.: Technologia żywności pochodzenia morskigo. WNT, Warszawa 1980.
- Sikorski Z. E.: Morskie surowce żywnościowe: dostępność, właściwości i przechowywanie chłodnicze. WNT, Warszawa 1992, 50-56, 204-205.
- Sikorski Z. E., Kołakowska A.: Changes in proteins in frozen stored fish, [w:] Seafood Protein. Sikorski Z. E., Pan B. S., Shahidi F. (wyd.), Chapman & Hall Inc., New York, London 1994, 99-112.
- Sikorski Z. E.: Białka – budowa i właściwości, [w:] Chemia żywności. Sikorski Z. E. (red.), WNT, Warszawa 2002, 263-266.

Adres autora: mgr inż. Elżbieta Skierka, ul. Zastawna 6, Pruszcz Gdański; e-mail: ela-s6@wp.pl