

ПОДХОДЫ К РЕШЕНИЮ ПРОБЛЕМЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДОСТАТОЧНОСТИ
ОЧИСТКИ МОРСКОГО ПЛАЦЕНТАРНОГО КОЛЛАГЕНА

Н. А. Рачкова, В. В. Соклаков, Б. Ю. Воротников

APPROACHES TO SOLVING THE PROBLEM OF DETERMINING THE SUFFI-
CIENCY OF MARINE PLACENTAL COLLAGEN PURIFICATION

N. A. Rachkova, V. V. Soklakov, B. Yu. Vorotnikov

Внедрение в условиях опытно-промышленной эксплуатации уникального способа получения морского плацентарного коллагена потребовало серьезного анализа методов оценки параметров отдельных технологических операций. Основными процессами, определяющими качество получаемого продукта, являются отделение водо-, соле- и щелочерастворимых белков в сочетании с удалением липидов. Для управления изготовлением продукции в рамках производственного контроля предложено использовать оценку динамики накопления белков в экстрагентах и остаточное содержание липидов в готовом коллагене. Проведенный анализ стандартизированных методик определения массовых долей белка и жира, применяемых в пищевой и фармацевтической промышленности, показал теоретическую возможность использования для производственных целей соответственно колориметрического метода с биуретовым реактивом и гравиметрического модифицированного метода Сокслета. Измерение содержания белков позволило обосновать способ определения длительности производственного процесса экстракции при конкретных температурных режимах. Сформулированы необходимые и достаточные условия, служащие граничными факторами при установлении данного параметра. Остаточные количества неколлагеновых белков в полученном продукте рассматриваются как технически трудноудаляемая примесь. Применение широко распространенной методики количественного определения липидов на современном лабораторном оборудовании, пригодном для оснащения производственных лабораторий, в совокупности с проведенным анализом иных доступных стандартизированных методик выявили проблему, связанную с отсутствием приемлемого способа из-за содержания измеряемого компонента в анализируемой матрице ниже достоверных пределов. Ее решением представляется фиксация в технических условиях значения остаточного содержания липидов на уровне двукратного предела повторяемости наиболее точного из доступных методов выполнения измерений.

морской плацентарный коллаген, параметры технологического процесса, количественное определение белков, количественное определение жиров

Implementation of a unique method for producing marine placental collagen in the pilot operation conditions required a serious analysis of methods for assessing the parameters of individual technological stages. The main processes determining the quality of the finished product are separation of water-, salt- and alkali-soluble proteins in

combination with the removal of lipids. To control the manufacturing process in the framework of in-process monitoring, it has been proposed to use an assessment of the dynamics of protein accumulation in extractants and the residual lipid content in the collagen. The analysis of standardized methods for determining the mass fractions of protein and fat used in food and pharmaceutical industries has shown a theoretical possibility of using the colorimetric method with a biuretic reagent and the gravimetric modified Soxhlet method, respectively, for technological purposes. Measurement of the protein content allowed for justification of a method for determining the duration of the extraction process under specific temperature conditions. The necessary and sufficient conditions are formulated as boundary factors in determining of this parameter. It has been proposed to consider the residual amounts of non-collagen proteins in the finished product as a technically difficult-to-remove impurity. The appliance of a widely used procedure for the quantitative determination of lipids with modern laboratory equipment suitable for production laboratories equipping, together with the analysis of other available standardized procedures, revealed a problem associated with the lack of an acceptable method due to the content of the measured component in the analyzed matrix at a level below reliable results. As a solution, it has been proposed to fix the value of remaining lipid content in product specification at the level of twice the repeatability limit of the most accurate available measurement procedure.

marine placental collagen, parameters of technological process, quality determination of proteins, quality determination of lipids

ВВЕДЕНИЕ

Неизменно актуальной задачей в пищевой промышленности является рациональная комплексная переработка сырья. В результате реализации инновационной схемы, предложенной авторами [1], возникает возможность получения морского плацентарного коллагена из ястычных пленок рыб, рассматриваемых в качестве вторичного сырья при производстве икорной продукции.

Известно, что коллаген относится к фибриллярным белкам группы склеропротеинов, он образует волокна соединительной ткани и обеспечивает ее прочность и эластичность. Это – исключительно животный белок, и его доля составляет примерно третью часть от общего количества белков в организме. В настоящее время выделяют 29 типов коллагена, при этом в плаценте преобладает его V тип [2, 3]. В пищевой промышленности в качестве структурообразователя традиционно используется продукт гидролиза коллагена – желатин, а в медицине и косметологии на основе этого белка изготавливают покровный тканевый и пластифицирующий материал [4].

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Постановка задачи

Предложенная авторами уникальная технология предполагает получение целевого продукта – морского плацентарного коллагена – из общей массы соединительной ткани ястыка. Одной из основных задач при этом, очевидно, представлялось обоснование параметров ключевых технологических этапов, на которых происходит отделение (экстракция) коллагеновых белков от прочих компонентов сырья. Для этого было необходимо осуществить как выбор показателей, характеризующих достаточность обработки, так и способы их определения. К используемым в этих целях методикам выполнения измерений были обозначены следующие требования:

- максимально оперативное получение результатов в рамках производственного контроля, чтобы иметь возможность осуществлять требуемые коррекции управляемых технологических параметров, которые могут понадобиться вследствие нативных различий, характерных для химического состава используемого сырья;

- минимально возможная стоимость необходимых средств измерений либо их универсальность для реализации различных методик в производственной лаборатории рыбоперерабатывающего предприятия;

- доступность и низкая цена применяемых реактивов и расходных материалов.

Исходя из нутриентного состава сырья, компонентами, от которых необходимо очистить получаемый морской плацентарный коллаген, будут липиды и прочие фракции белка – водо-, соле- и щелочерастворимые.

Очевидно, что извлечение липидов, количество которых для соединительной ткани ястыков невелико, возможно совместить с удалением белков, а характеризующим результативность технологического этапа качественным показателем в данном случае может служить уровень содержания липидов в выделенном коллагене.

Известно, что для количественного определения жира применительно к продукции пищевой промышленности используют гравиметрические, спектрофотометрические и рефрактометрические методы.

Чаще всего применяется гравиметрический метод Сокслета, заключающийся в многократной экстракции жира из пробы одной и той же порцией органического растворителя (ГОСТ 7636, ГОСТ 10857, ГОСТ 15113.9, ГОСТ 23042, ГОСТ 26183, ГОСТ 26829, ГОСТ 29033, ГОСТ 31762). Как правило, применяют модификацию, предполагающую определение массы обезжиренного остатка, реже – модификацию, признанную в качестве арбитражной, согласно которой определяют непосредственно массу экстрагированного жира. Метод сравнительно длителен, а арбитражная модификация включает дополнительный этап – отгонку экстрагента, отсутствующую в определении массовой доли жира по обезжиренному остатку.

Вариантами экстракционно-гравиметрического метода являются растирание измельченной и обезвоженной навески в растворителе или кратная экстракция пробы различными порциями растворителей (ГОСТ 5668, ГОСТ 7636, ГОСТ 8756.21, ГОСТ 15113.9, ГОСТ 17681, ГОСТ 22760, ГОСТ 23042, ГОСТ 26829, ГОСТ 27670, ГОСТ 30648.1, ГОСТ 31469, ГОСТ 32189, ГОСТ ISO 659, ГОСТ ISO 734-1, ГОСТ ISO 734-2, ГОСТ ISO 1736, ГОСТ Р 51452, ГОСТ Р 51457). Как и арбитражная модификация метода Сокслета, данные методики предполагают отгонку использованного экстрагента, увеличивая этапность и, как следствие, продолжительность проведения измерений. Также применяется методика кратной экстракции, основанная на определении количества жира по обезжиренному остатку навески, в которой ранее было установлено содержание влаги (ГОСТ 31762).

Нормирован метод измерения массовой доли жира и воды отгонкой (метод Дина-Старка), заключающийся в одновременном извлечении жира и воды из пробы растворителем с последующим их количественным разделением (ГОСТ 7636). Его недостатком является длительность определения содержания жира и отгонка используемого растворителя.

Другие варианты гравиметрического метода представлены гидролизными (в т. ч. бутирометрическими) методиками, предполагающими кислотный гидролиз пробы и последующее отделение высвобожденного жира при помощи центрифуги

(ГОСТ 5668, ГОСТ 5867, ГОСТ 7698, ГОСТ 15113.9, ГОСТ 29247, ГОСТ 30648.1, ГОСТ 31469, ГОСТ 31762, ГОСТ 31902, ГОСТ Р 55063, ГОСТ Р 55361, ГОСТ Р ИСО 2446). К недостаткам данных методик можно отнести не только необходимость их валидации для наших целей, но и, в первую очередь, использование концентрированных неорганических кислот, включенных в перечень прекурсоров, что создает дополнительные сложности по их обороту в производственных лабораториях.

Известны гравиметрические методики, сочетающие в себе гидролиз пробы и извлечение жира из гидролизата при помощи растворителей (ГОСТ 5867, ГОСТ 33925, ГОСТ 33926, ГОСТ 34455). Соответственно, такие методики обладают недостатками, характерными для обоих методов.

Турбидиметрический метод определения массовой доли жира основан на измерении рассеяния света жировым слоем жидкой пробы (ГОСТ 5867). Метод не подходит для нашей матрицы из-за ее агрегатного состояния.

При использовании колориметрического метода определения массовой доли жира жировую фазу пробы выделяют вымораживанием, экстрагированием и измеряют оптическую плотность полученного экстракта при длине волны 440 нм (ГОСТ 31633). Применение данной методики ограничено молочной продукцией.

Методом ИК-спектроскопии содержание жира определяется путем измерения коэффициентов пропускания или отражения пробы в диапазоне волн 400 – 11000 нм (ГОСТ 31795, ГОСТ 32255, ГОСТ 32749, ГОСТ 34567). Метод требует наличия образцов для градуировки, содержание целевого нутриента в которых должно определяться арбитражным методом, и использования дорогостоящего аналитического оборудования.

Рефрактометрический метод определения количества жиров базируется на измерении разности коэффициентов преломления чистого растворителя и растворенного в нем жира (ГОСТ 5668, ГОСТ 7636, ГОСТ 8756.21, ГОСТ 10857, ГОСТ 15113.9, ГОСТ 17681, ГОСТ 31902). Метод несложен, непродолжителен, но предполагает использование сравнительно токсичных соединений в качестве экстрагентов.

Удаление нецелевых фракций белков в предложенной технологии является двухстадийным процессом, соответственно, обоснование технологических параметров и контроль достаточности этапов должны быть осуществлены для каждого из них. Наиболее точным методом оценки достаточности очистки коллагена от остальных фракций белка, содержащихся в плацентарной ткани, мог бы стать электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, позволяющий осуществить требуемое фракционирование белков полученного продукта [5–11], однако он в достаточной степени продолжителен и трудоемок, что делает его малоприменимым для целей оперативного технологического контроля. Исходя из этого, лучшим решением в данной ситуации представляется анализ динамики накопления белков, извлекаемых из обрабатываемого сырья, в используемых на данных технологических этапах растворах.

Известно, что для количественного определения белка применяют титриметрические, спектрофотометрические, колориметрические, спектрофлуориметрические, потенциометрические и кулонометрические методы.

Одним из наиболее традиционных методов, признанным также в качестве арбитражного (в т. ч. для гидробионтов и продукции из них), является метод Кьельдаля, основанный на разложении (пиролизе) испытуемого образца. При нагревании азотсодержащего органического вещества в присутствии концентрированной серной кислоты происходит превращение азота в сульфат аммония, который в

дальнейшем определяют количественно (ГОСТ 7636, ГОСТ 7698, ГОСТ 25011, ГОСТ 26889, ГОСТ 30648.2, ГОСТ 31469, ГОСТ 31681, ГОСТ 31762, ГОСТ 33454, ГОСТ 34536, ГОСТ 34551, ГОСТ Р 51470, ГОСТ Р 54662, ОФС.1.2.3.0012.15). Однако для наших целей он представляется достаточно длительным, а кроме того, предполагает использование концентрированной серной кислоты, входящей в перечень прекурсоров.

Метод Дюма близок методу Кьельдаля, но в отличие от последнего является более быстрым, здесь не применяются концентрированные неорганические кислоты и щелочи, он более точен для определения общего азота и расчета сырого протеина, поскольку позволяет измерить весь небелковый азот, а не его часть. Метод Дюма стандартизирован применительно к зерновым, бобовым, молотым зерновым продуктам, масличным культурам и кормам и теоретически может применяться для продуктов из гидробионтов (ГОСТ Р ИСО 16634-1, ГОСТ Р 54390). Недостатком данного метода является использование специального оборудования для сжигания проб – аппарата Дюма.

Определение содержания белка УФ-спектрофотометрическим методом основано на способности ароматических аминокислот (триптофана, тирозина), входящих в состав белковой молекулы, поглощать ультрафиолетовый свет при длине волны 280 нм (ОФС.1.2.3.0012.15). Метод отличается занижением получаемых результатов из-за осаждения белка на стенках измерительных кювет, кроме того, он требует наличия измерительного оборудования, стоимость которого высока по сравнению с колориметрическим.

Установление содержания белка методом ИК-спектроскопии аналогично упомянутому для измерения массовой доли жиров.

К колориметрическим методам определения содержания белка относят следующие: Лоури (как с предварительным осаждением белка, так и без него), Бредфорд, с использованием индофенолового синего, применением Амидо черного, с биуретовым реактивом, реактивом Несслера и бицинхониновой кислотой.

Метод Лоури основан на измерении интенсивности окраски при длине волны 750 нм продуктов взаимодействия реактива Фолина со щелочными растворами белка (ОФС.1.2.3.0012.15). Он позволяет достаточно быстро получить результаты в лабораторных условиях, однако трудоемок в части приготовления реактива Фолина, составными частями которого являются вольфрамат натрия, фосфорная кислота, соляная кислота, сульфат лития, бром, вода. Кроме того, данный метод обладает недостаточной точностью, поскольку реактив Фолина взаимодействует не только с белками, но и с фенольными соединениями.

Метод Бредфорд базируется на измерении оптической плотности растворов белков с использованием красителя кислотного синего 90 при длине волны 595 нм (ОФС.1.2.3.0012.15). Одним из слабых мест метода является погрешность, обусловленная наиболее активным связыванием красителя с остатками аргинина и лизина. К другому его недостатку можно отнести необходимость использования белка, аналогичного определяемому, в качестве стандартного образца, что не всегда возможно при переработке смеси вторичного сырья разных биологических видов.

Колориметрический метод с применением индофенолового синего предполагает измерение интенсивности окраски реактива при длине волны 625 нм (ГОСТ 17681, ГОСТ 25011). Такая интенсивность пропорциональна содержанию аммиака в минерализованной пробе, к которой добавляют растворы нитропруссиды натрия, фенола, щелочи и гипохлорита натрия. В части минерализации пробы

данный метод обладает теми же недостатками, что и метод Кьельдаля, в том числе – продолжительностью пробоподготовки.

В колориметрическом методе с использованием Амидо черного 10 Б водорастворимые белки взаимодействуют при pH ниже их изоэлектрической точки с красителем с образованием нерастворимого осадка. Определяемой характеристикой служит оптическая плотность оставшегося после реакции избытка красителя при длине волны 590 нм (ГОСТ 25179). Данный метод специфичен по характеру определяемого белка – он применим для молока и потребует надлежащей валидации для наших целей, результат которой может быть отрицательным.

В основе метода колориметрического определения белка с биуретовым реактивом лежит качественная реакция на наличие пептидных связей. В ее ходе ионы меди (II) биуретового реактива взаимодействуют с молекулами белка, образуя в щелочной среде окрашенные комплексы, что позволяет количественно определить продукты реакции путем измерения оптической плотности раствора при длине волны 540 нм (ОФС.1.2.3.0012.15). Данный метод сравнительно непродолжителен, не требует реактивов, включенных в списки прекурсоров, в качестве средства измерений предполагает использование колориметра, который зачастую входит в оснащение производственных лабораторий.

Метод с использованием реактива Несслера основан на получении окрашенных солей аммония в результате взаимодействия данного реагента с получаемым в соответствии с рассмотренным выше методом Кьельдаля отгоном аммония в серной кислоте; оптическую плотность образующегося раствора измеряют при длине волны 430 нм (ГОСТ 7698). Данная методика обладает недостатками, характерными для метода Кьельдаля.

Колориметрический метод определения белка с бидинхониновой кислотой базируется на взаимодействии пептидной связи с медью (II) и указанной кислотой и измерении интенсивности окрашивания раствора образовавшегося комплексного соединения при длине волны 562 нм (ОФС.1.2.3.0012.15). Определению мешает возможное присутствие в растворе восстановителей.

Спектрофлуориметрический метод предполагает дериватизацию белка о-фталальдегидом, реагирующим с первичными аминогруппами белка (N-концевая аминокислота и ϵ -аминогруппы остатков лизина), и последующее измерение флуоресценции полученного комплекса (ОФС.1.2.3.0012.15). Метод отличается высокой чувствительностью и, как спектрометрический, требует наличия сравнительно дорогостоящего оборудования.

Один из потенциометрических методов заменяет визуальное определение точки эквивалентности в методе Кьельдаля на приборное – титрование ведется до величины pH, равной 5,4. При кулонометрическом методе вместо потенциометра используется автоматический кулонометрический титратор (ГОСТ 23327). Соответственно, для этих электрохимических методов также характерны как применение прекурсоров, так и длительность выполнения методики измерений, а для кулонометрического – потребность в специфическом оборудовании.

Другим потенциометрическим методом определения белка является метод формольного титрования, основанный на нейтрализации свободных карбоксильных групп белков щелочью при том, что свободные аминогруппы блокируются за счет добавления формалина. Точкой эквивалентности считается pH=9 (ГОСТ 25179). К недостаткам данной методики можно отнести то, что ее валидированная область распространения ограничивается молочными белками, и для определения вносимой в расчеты поправки требуется проведение арбитражных измерений по методу Кьельдаля.

Методы исследования

Морской плацентарный коллаген получали из замороженных ястычных пленок горбуши *Oncorhynchus gorboscha* Walbaum, заготовленных при выделении фракции икры-зерна.

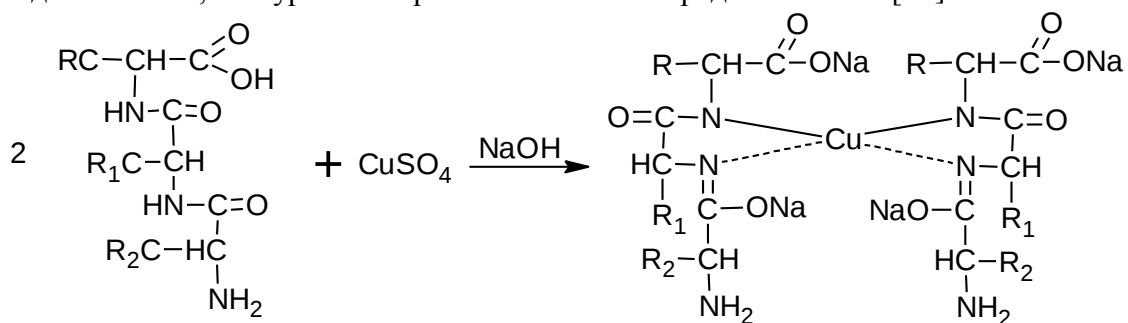
После первичной обработки сырья экстракцию коллагена проводили посредством двух последовательных технологических этапов:

- отмывки водо- и солерастворимых белков в растворе поверхностно-активных веществ (ПАВ) с последующей промывкой ястычных пленок водой;
- отмывки щелочерастворимых белков в щелочном растворе, по окончании которой очищенный морской плацентарный коллаген промывали водой и передавали на операции по получению товарной формы.

В качестве метода определения липидов в готовом продукте нами был выбран гравиметрический метод по обезжиренному остатку [12], модифицированный в части замены классического аппарата Сокслета на полуавтоматический «Вилитек» АСВ-6М.

Содержание белков в экстрагентах определялось колориметрическим методом с биуретовым реактивом [13]. Отбор проб исследуемого экстрагента проводили с интервалом 5 мин после начала отмывки, оптическую плотность определяли через 60 мин после добавления биуретового реактива на колориметре КФК-2, в качестве контрольного раствора использовали смесь биуретового реактива с чистым экстрагентом.

Проходящую реакцию между молекулами, имеющими не менее двух пептидных связей, и биуретовым реактивом можно представить как [14]:



Результаты исследования и их обсуждение

Результаты определения белка проиллюстрированы рис. 1 и 2. Как видно из графиков, зависимость оптической плотности от концентрации белка носит логарифмический характер, что соответствует кинетической зависимости 1-го порядка. Полученные экспериментальные данные позволяют предложить установление достаточности отмывки при следующих ограничениях:

- очередное значение оптической плотности отмывочного раствора достоверно отличается от значения, измеренного через 5 мин после начала процесса (необходимое условие);
- очередное значение оптической плотности отмывочного раствора достоверно отличается от значения, установленного при предыдущем измерении (достаточное условие).

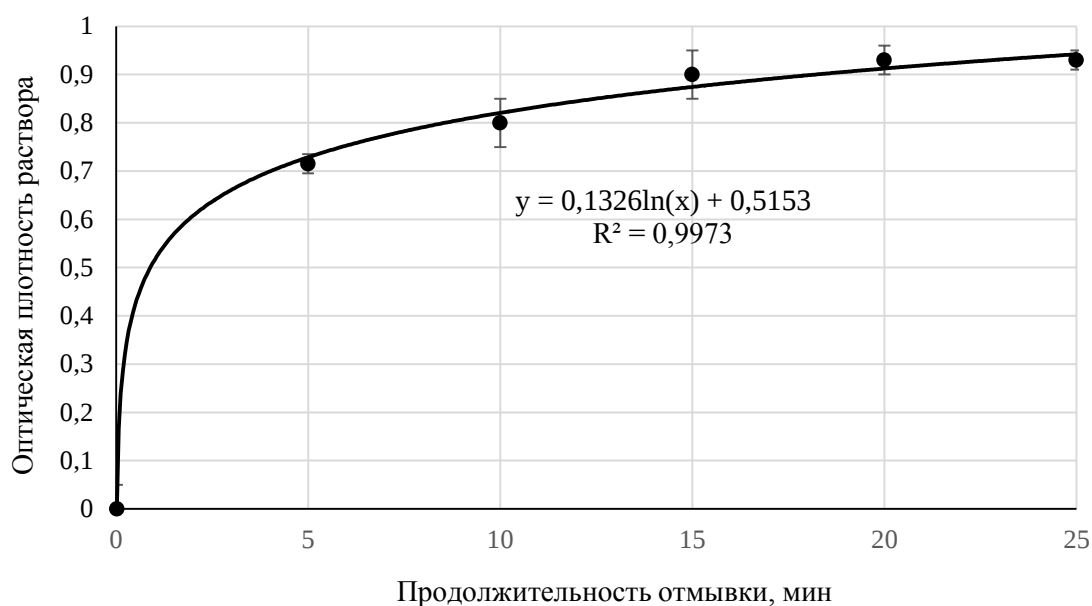


Рис. 1. Динамика накопления водо- и солерастворимых белков в растворе поверхностно-активных веществ
 Fig. 1. Dynamics of accumulation of water- and salt-soluble proteins in a surfactants solution

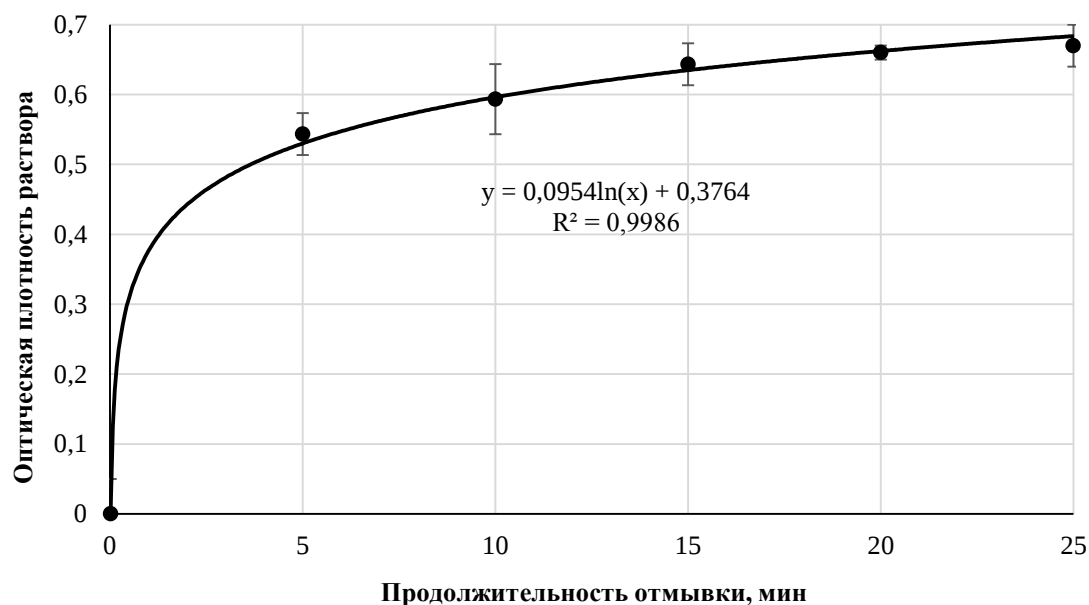


Рис. 2. Динамика накопления щелочерастворимых белков в щелочном растворе
 Fig. 2. Dynamics of accumulation of alkali-soluble proteins in an alkaline solution

Следуя принятым ограничениям, можно определить, что достаточная продолжительность обоих этапов отмывки коллагена от прочих белков составляет по 15 мин, при этом для этапа отмывки водо- и солерастворимых белков (рис. 1) реализованы оба ограничивающих условия, а для этапа отмывки щелочерастворимых белков (рис. 2) эта продолжительность определена только по необходимому из них. В любом случае предлагаемый нами способ контроля и обоснования ключе-

вых технологических этапов получения морского плацентарного коллагена позволяет отрегулировать процесс таким образом, чтобы массовая доля целевого продукта в получаемом веществе составляла не менее 80 % от общего количества белка; оставшиеся части неотмытых фракций рассматриваются в качестве трудноудаляемой технической примеси.

Полученные результаты определения липидов не превышали уровень пределов повторяемости для выбранной методики выполнения измерений. Поскольку для нее не определены такие метрологические характеристики, как аттестованный диапазон измерений и приписанная погрешность, следует считать полученные значения недостоверными и лежащими ниже предела обнаружения. Учитывая, что все исследованные методики определения липидов, не требующие валидации, характеризуются пределом повторяемости не ниже 0,3 %, то логично предположить, что минимально достоверный определяемый уровень массовой доли липидов в нашей матрице будет составлять 0,6 %.

ВЫВОДЫ

Для целей технологического контроля основных этапов экстракции коллагеновых белков обоснован контролируемый параметр – динамика накопления отмываемых нецелевых белков в экстрагенте – и выбран метод его определения.

Предложен метод интерпретации получаемых результатов при исследовании такой динамики, обосновывающий достаточность продолжительности этапов удаления водо-, соле- и щелочерастворимых белков из используемого нами коллагенового сырья.

Необходим дальнейший поиск метода выполнения измерений, чувствительность которого позволит подтверждать чистоту получаемого морского плацентарного коллагена по показателю остаточного содержания липидов. При невозможности подбора такого метода следует зафиксировать в нормативно-технической документации на морской плацентарный коллаген уровень остаточного содержания липидов не выше 0,6 %.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Способ комплексной переработки икры гидробионтов: пат. РФ / Вороников Б. Ю., Рачкова Н. А., Вайнерман Е. С., Соклаков В. В. – № 2019128233; заявл. 09.09.2019; опубл. 09.10.2020. Бюл. № 28. – 5 с.
2. Biochemistry of collagens, laminins and elastin. Structure, function and biomarkers / Ed. by M. A. Karsdal. – London: Academic Press, 2016. – 238 p.
3. Sionkowska, A. Collagen based materials in cosmetic application: a review / A. Sionkowska, K. Adamiak, K. Musiał, M. Gadomska // Materials. – 2020. – Vol. 13. – No. 4217. – 15 p.
4. Afifah, A. Utilization of fish skin waste as a collagen wound dressing on burn injuries: a mini review / A. Afifah, O. Suparno, L. Haditjaroko, K. Tarman // IOP Conf. Series: Earth and Environmental Sciences. – 2019, No. 335. – 9 p.
5. Atef, M. Biochemical and structural characterization of sturgeon fish skin collagen (*Huso huso*) / M. Atef, S. M. Ojagh, A. M. Latifi, M. Esmaili, C. C. Udenigwe // J. Food Biochem. – 2020, No. 00:e13256. – 10 p.
6. Blanco, M. Collagen extraction optimization from the skin of the small-spotted catshark (*S. canicula*) by response surface methodology / M. Blanco, J. A. Vázquez, R. I. Pérez-Martín, C. G. Sotelo // Marine Drugs. – 2019. – Vol. 17. – 13 p.

7. Chen, L. L. Isolation and characterization of acid-soluble collagen from the skin of *Amiurus nebulosus* / L. L. Chen, L. Zhao, M. Yuan, W. Su, H. Liu // *Advanced Materials Research*. – 2013. – Vol. 781 – 784. – P. 1728 – 1735.
8. Jeong, H.-S. Isolation and characterization of collagen from marine fish (*Thunnus obesus*) / H.-S. Jeong, J. Venkatesan, S.-K. Kim // *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. – 2013, No. 18. – P. 1185 – 1191.
9. Kuwahara, J. Extraction of type I collagen from tilapia scales using acetic acid and ultrafine bubbles // *Processes*. – 2021. – Vol. 9. – No. 288. – 11 p.
10. Muhammad, A. A. S. Characterization of collagen extract from the skins of commercial freshwater fish / A. A. S. Muhammad, R. H. Hamdan, R. Shaari, M. F. M. Nordin, R. A. Saufi, S. J. Mei // *Jurnal Teknologi (Sciences & Engineering)*. – 2015. – Vol. 77. – No. 33. – P. 43 – 48.
11. Nagai, T. Collagen from diamondback squid (*Thysanoteuthis rhombus*) outer skin // *Zeitschrift für Naturforschung C*. – 2004. – Vol. 59. – Iss. 3 – 4. – P. 271 – 275.
12. ГОСТ 7636-85. Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки. Методы анализа: межгос. стандарт : изд. офиц. : дата введ. 01.01.86. – Москва: Стандартинформ, 2010. – 87 с.
13. ОФС.1.2.3.0012.15 Определение белка: фармакоп. статья: изд. офиц. // Государственная фармакопея Российской Федерации: XIV издание: в 4 т. – Москва, 2018. – Т. 1. – С. 1026–1041.
14. Кочетков, Н. И. Химия природных соединений / Н. И. Кочетков, И. В. Торгов, М. М. Ботвиник. – Москва: Изд. АН СССР, 1961. – 559 с.

REFERENCES

1. Vorotnikov B. Yu., Rachkova N. A., Vaynerman E. S., Soklakov V. V. Sposob kompleksnoy pererabotki ikry gidrobiontov [A method of complex processing of hydrobiont roe]. Patent RF, no. 2019128233, 2020.
2. Biochemistry of collagens, laminins and elastin. Structure, function and biomarkers. Ed. by M. A. Karsdal. London, Academic Press, 2016, 238 p.
3. Sionkowska A., Adamiak K., Musiał K., Gadomska M. Collagen based materials in cosmetic application: a review. *Materials*, 2020, vol. 13, no. 4217, 15 p.
4. Afifah A., Suparno O., Haditjaroko L., Tarman K. Utilization of fish skin waste as a collagen wound dressing on burn injuries: a mini review. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Sciences*, 2019, no. 335, 9 p.
5. Atef M., Ojagh S. M., Latifi A. M., Esmaeili M., Udenigwe C. C. Biochemical and structural characterization of sturgeon fish skin collagen (*Huso huso*). *J. Food Biochem.*, 2020, no. 00:e13256, 10 p.
6. Blanco M., Vázquez J. A., Pérez-Martín R. I., Sotelo C. G. Collagen extraction optimization from the skin of the small-spotted catshark (*S. canicula*) by response surface methodology. *Marine Drugs*, 2019, vol. 17, 13 p.
7. Chen L. L., Zhao L., Yuan M., Su W., Liu H. Isolation and characterization of acid-soluble collagen from the skin of *Amiurus nebulosus*. *Advanced Materials Research*, 2013, vol. 781 – 784, pp. 1728 – 1735.
8. Jeong H.-S., Venkatesan J., Kim S.-K. Isolation and characterization of collagen from marine fish (*Thunnus obesus*). *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2013, no. 18, pp. 1185 – 1191.
9. Kuwahara J. Extraction of type I collagen from tilapia scales using acetic acid and ultrafine bubbles. *Processes*, 2021, vol. 9, no. 288, 11 p.

10. Muhammad A. A. S., Hamdan R. H., Shaari R., Nordin M. F. M., Saufi R. A., Mei S. J. Characterization of collagen extract from the skins of commercial freshwater fish. *Jurnal Teknologi (Sciences & Engineering)*, 2015, vol. 77, no. 33, pp. 43–48.
11. Nagai T. Collagen from diamondback squid (*Thysanoteuthis rhombus*) outer skin. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 2004, vol. 59, iss. 3 – 4, pp. 271 – 275.
12. Interstate Standard GOST 7636-85. Fish, marine mammals, invertebrates and products of their processing. Methods of analysis. Moscow, Standartinform Publ., 2010. 87 p. (In Russian).
13. State Pharmaceutical Section OFS.1.2.3.0012.15. Determination of protein. State Pharmacopoeia of Russian Federation, XIV edition. In 4 volumes. Vol. 1. Moscow, 2018, pp. 1026 – 1041. (In Russian).
14. Kochetkov N. I., Torgov I. V., Botvinik M. M. *Khimiya prirodnikh soedineniy* [Chemistry of natural compounds]. Moscow, USSR Academy of Science Publ., 1961, 559 p.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Рачкова Наталья Анатольевна – Калининградский государственный технический университет; инженер 1-й категории кафедры химии;
E-mail: natalya.rachkova@klgtu.ru

Rachkova Natalya Anatolevna – Kaliningrad State Technical University; 1 category engineer, Department of Chemistry; E-mail: natalya.rachkova@klgtu.ru

Соклаков Владимир Владимирович – Калининградский государственный технический университет; кандидат технических наук, доцент кафедры технологии продуктов питания; E-mail: vladimir.soklakov@klgtu.ru

Soklakov Vladimir Vladimirovich – Kaliningrad State Technical University; PhD in Engineering, Associate Professor, Department of Food Products Technology; E-mail: vladimir.soklakov@klgtu.ru

Воротников Борис Юрьевич – Калининградский государственный технический университет; кандидат технических наук, доцент; зав. кафедрой химии;
E-mail: vorotnikov@klgtu.ru

Vorotnikov Boris Yurievich – Kaliningrad State Technical University; PhD in Engineering, Associate Professor; Head of the Department of Chemistry; E-mail: vorotnikov@klgtu.ru