

LATVIJAS BIOZINĀTŅU UN TEHNOLOĢIJU UNIVERSITĀTE
LAUKSAIMNIECĪBAS UN PĀRTIKAS TEHNOLOĢIJU FAKULTĀTE
PĀRTIKAS INSTITŪTS

Zinātniski pētnieciskais darbs
MENCU ĀDU POTENCIĀLS KOLAGĒNA IEGUVĒ
Akadēmiskā studiju programma
“Pārtikas kvalitāte un inovācijas”

Darba autore

Daniela Dreslere
PT20047

Jelgava
2024

SATURS

1. LITERATŪRAS APSKATS	4
1.1. Zivju atkritumu daudzums pasaulē	4
1.2. Kolagēns un tā nozīme organismā	5
1.3. Kolagēna iegūšanas jeb ekstrakcijas metodes	6
1.4. Kolagēna pielietojuma iespējas.....	7
2. MATERIĀLI UN METODES	8
2.1. Pētījuma izstrādes vieta un laiks	8
2.2. Pētījuma shēma	8
2.3. Pētījumā izmantotie materiāli un metodes	9
2.3.1 Pētījumā lietoto materiālu raksturojms	9
2.3.2 Pētījumā lietoto metožu raksturojums.....	10
3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA.....	15
3.1. Mencu ādu ķīmiskā sastāva un kvalitātes rādītāju izvērtējums	15
3.2. Kolagēna ieguve jeb ekstrakcija un tajā veiktās modifikācijas	15
3.3.1. Izgulsnētā kolagēna daudzums	19
3.3.2. Kolagēna viskozitāte un denaturācijas temperatūra	19
4. SECINĀJUMI UN PRIEKŠLIKUMI	21
5. IZMANTOTĀ LITERATŪRA.....	22

IEVADS

Visā pasaulē ievērojami palielinājies zivju atkritumu daudzums un tiek apgalvots, ka apmērām 2/3 no kopējā zivju daudzuma tiek izmestas, kā atkritumi. Terminu “zivju atkritumi” parasti var definēt kā zivju sugas, kuru izmērs ir neliels, kā arī zvejas tīklos sapinušās zivis vai tādas, kurām ir zemāka tirgus vērtība. Šis termins ietver arī zivju blakusproduktus, piemēram, ādu, spuras, zvīņas, iekšējos orgānus, kaulus utt., kas kopā veido vairāk nekā 30–70% no kopējā zivju svara (Caruso et al., 2020). Tomēr lielākā daļa šo blakusproduktu tiek aprakti, vai sadedzināti, radot vides, veselības un ekonomikas problēmas. Zivju atkritumi ir aktuāla problēma, kas prasa ātras, radošas metodes un risinājumus (Al Khawli et al., 2019).

Lai pēc iespējas vairāk izmantotu dabas resursus, Eiropas Komisijā apstiprināts ilgtermiņa plāns “Zilā izaugsme”. Šis plāns tiek īstenots, īpašu uzmanību pievēršot zivju atkritumiem, lai pasargātu vidi no rūpnieciskā piesārņojuma (Furtado et al., 2022).

Darba mērķis: izvērtēt mencu ādu piemērītību kolagēna ieguvē.

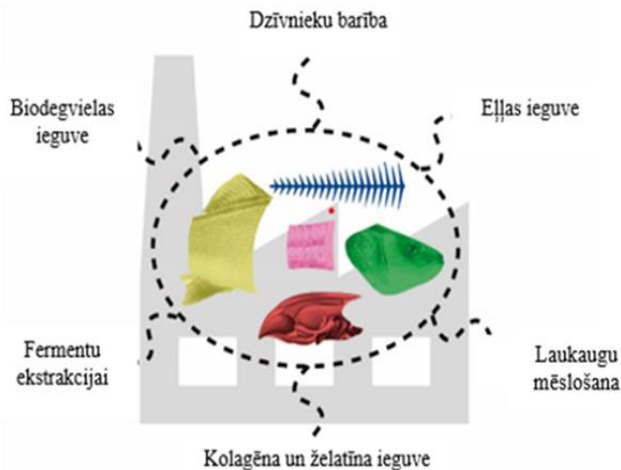
Darba uzdevumi:

1. Noteikt mencu ādu ķīmisko sastāvu, un veikt kvalitātes rādītāju izvērtējumu;
2. Pilnveidot kolagēna ieguves jeb ekstrakcijas metodi un izvērtēt ekstrakcijas parametru ietekmi uz kolagēna iznākumu;
3. Noteikt un izvērtēt kolagēna kvalitāti – organoleptiskos rādītājus, viskozitāti un denaturācijas temperatūru.

1. LITERATŪRAS APSKATS

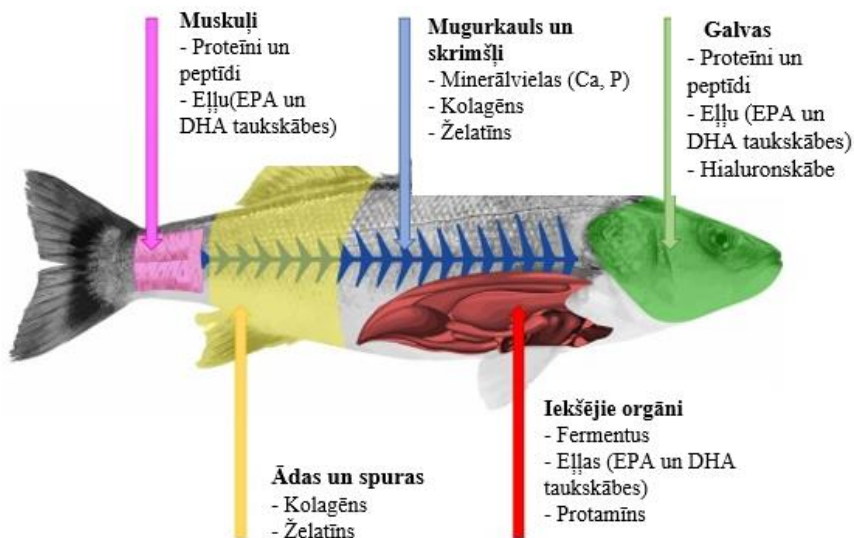
1.1. Zivju atkritumu daudzums pasaulē

Zivju pārpalikumi un to pārstrādes blakusprodukti veido ievērojamu daļu no sākotnējā zivju svara, un to iznīcināšanai ir liela ietekme uz vidi un ekonomiku (Baiano, 2014). Vairāk nekā puse, no ražošanā izmantoto, svaigu zivju svara, kļūst par zivrūpniecības blakusproduktiem (Al Khawli et al., 2019). Daļu no tiem izmanto dzīvnieku barības, kolagēna un eļļas ieguvei, bet mazākā apjomā biodeģvielas un laukaugu mēslošanas līdzekļu ražošanai.



1.1. att. Zivju apstrādes blakusproduktu izmantošanas iespējas (Espinales et al., 2023)

No zivīm iegūtie blakusprodukti ir uzturvērtības ziņā nozīmīgs, taukskābju, olbaltumvielu un minerālvielu avots, jo sastāvs ir līdzīgs zivju filejai un citiem uzturā lietotajiem pārtikas produktiem. Ūdens mugurkaulnieku kolagēna izmantošana ievērojami pieaug, pateicoties tā unikālajām īpašībām, salīdzinot ar zīdītāju kolagēnu (Coppola et al., 2021). Papildus zivju blakusproduktu utilizācijas izmaksu samazināšanai, nākotnes investīcijas zivju atkritumu pārstrādē var sniegt iespēju iegūt citas nozīmīgas vielas, piemēram, eļļu, olbaltumvielas, pigmentus, bioaktīvos peptīdus, aminoskābes, kolagēnu, hiīnu, želatīnu u.c. (skat.att. 1.2. att)(Al Khawli et al., 2019).

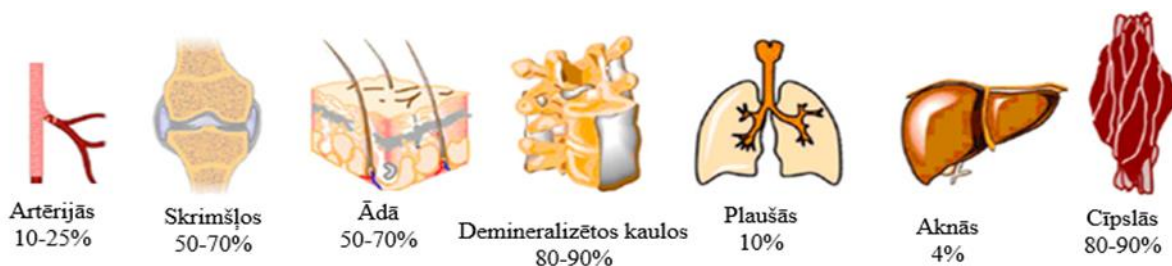


1.2. att. Zivju blakusprodukti un no tiem iegūtie savienojumi (Espinales et al., 2023)

1.2. Kolagēns un tā nozīme organismā

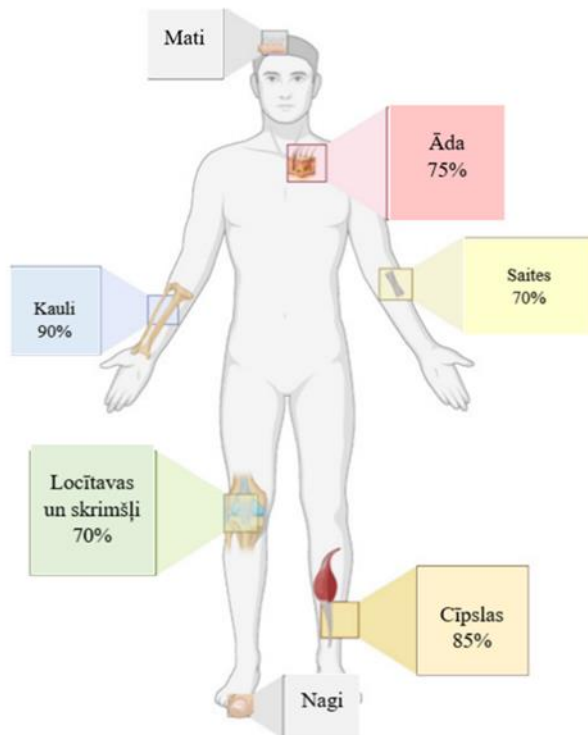
Zivju āda, kas aizņem aptuveni 8–10% no kopējā zivju svara, ir viens no galvenajiem zivju apstrādes blakusproduktiem (Nurilmala et al., 2022). Ūdens mugurkaulnieku izcelsmes kolagēns aminoskābju sastāva un biosaderības ziņā ir līdzīgi parastajam liellopu un cūku kolagēnam (Jafari et al., 2020). Tas ir viens no svarīgākajiem proteīniem, ko izmanto pārtikā, kosmētikā, farmācijā un biotehnoloģijā (Furtado et al., 2022).

Kolagēna galvenais uzdevums ir nodrošināt struktūru un izturību visam ķermenim. Tas ietilpst kaulu, skrimšļu, locītavu, matu, nagu, cīpslu sastāvā un veido to struktūru (skat. 1.3. att.).



1.3.att. Aptuvenais kolagēna daudzums dažādos audos (La Importancia Del Colágeno En Los Tejidos Conectivos, n.d.)

Cilvēka ķermenis satur daudz olbaltumvielu un kolagēns veido apmēram 25-35% no visiem organismā esošajiem proteīniem (Furtado et al., 2022). Vairāk nekā 85% no kolagēna, kas sastopams cilvēka organismā, pieder pie I tipa, savukārt pārējie izplatītākie kolagēnu veidi ir II, III un IV tips (Xu et al., 2021). Kolagēns ir visizplatītākais strukturālais proteīns dažādu ķermeņa saistaudu (ādas, kaulu, saišu, cīpslu, un skrimšļu) ekstracelulārajā matricā (skat. 1.4. att.).



1.4. att. Kolagēna izvietojums cilvēka ķermenī (Furtado et al., 2022)

Kā populārākie un zināmākie kolagēna avoti ir dažādi liellopu un cūku produkti. Bet, šo ieguves avotu popularitāte pakāpeniski samazinās, to reliģisko aizliegumu, ierobežotās pieejamības un ar slimībām saistīto problēmu dēļ.

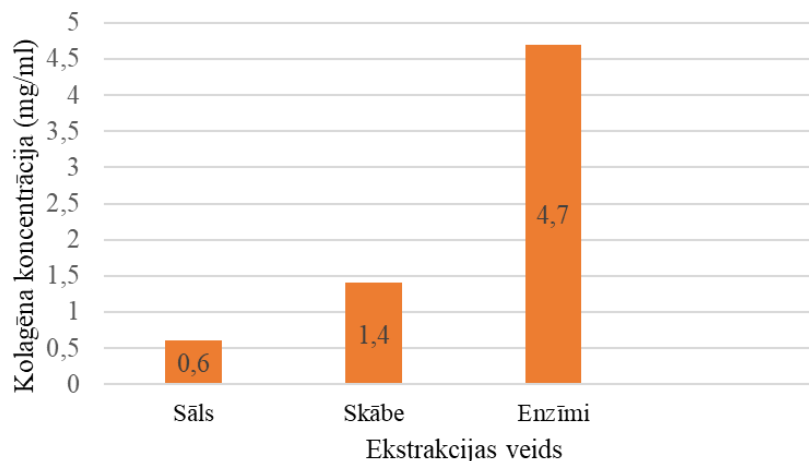
Ūdens mugurkaulnieku izcelsmes kolagēns aminoskābju sastāva un biosaderības ziņā ir līdzīgi parastajam liellopu un cūku kolagēnam (Jafari et al., 2020). Tas ir viens no svarīgākajiem proteīniem, ko izmanto pārtikā, kosmētikā, farmācijā un biotehnoloģijā (Furtado et al., 2022). Kolagēnam, kas iegūts no zivju ādas, kauliem un spurām, ir zema denaturācijas temperatūra, kas lielākajai daļai zivju sugu ir 25-30 °C, salīdzinot ar zīdītāju kolagēnu – 39-40 °C. Zivs ādā esošajam I tipa kolagēnam ir raksturīga augsta tīrības pakāpe (aptuveni 70%) un to ietekmē zivju suga, vecums un nozvejas sezona (Jafari et al., 2020).

Aminoskābju sastāva analīze ļauj izvērtēt kolagēna kvantitatīvo sastāvu. Piemēram, hidroksiprolīns ir aminoskābe, kurai ir nozīmīga loma kolagēna stabilitātes veidošanā. Hidroksiprolīns veido apmēram 13% no kolagēna sastāva, un tas gandrīz nemaz nav sastopams citos proteīnu avotos. Augsts hidroksiprolīna saturs norāda uz augstāku denaturācijas temperatūru un augstāku kolagēna polipeptīdu molekulas jeb trīskāršās aminoskābju ķēdes stabilitāti (Alves et al., 2017). Tomēr jāatzīmē, ka ūdens mugurkaulnieku kolagēnam ir zemāks hidroksiprolīna saturs, salīdzinot ar zīdītāju izcelsmes kolagēnu (Yamada et al., 2014). Ir pierādīts, ka ūdens mugurkaulnieku izcelsmes kolagēns satur arī lielu daudzumu glicīna, kas atrodas katrā no trim polipeptīdu molekulām jeb vienā kolagēna protofibrillā un sastāv no aminoskābju ķēdes (Alves et al., 2017).

1.3. Kolagēna iegūšanas jeb ekstrakcijas metodes

Ekstrakcijas metodes izvēle atkarīga no izejvielas, kura tiek izvēlēta kolagēna iegūšanai. Kolagēna iegūšanas jeb ekstrakcijai izmantotās metodes (Rigogliuso et al., 2023):

1. Enzīmu ekstrakcija – izmanto pepsinā šķīstošā kolagēna ieguvei;
2. Ekstrakcija izmantojot skābi – izmanto, lai iegūtu skābē šķīstošu kolagēnu;
3. Ekstrakcija ar sāli – izmanto sāli šķīstoša kolagēna ekstrakcijai neitrālos sāls šķīdumos, pakāpeniski pievienojot nātrija hlorīdu.



1.4.att. Ekstrakcijas laikā iegūtā šķīstošā kolagēna daudzuma salīdzinājums (*Collagen Protocol Tips | Abcam, n.d.*)

Kā redzams no 1.5. attēlā dotajiem zinātnieku iegūtajiem rezultātiem, tad ekstrakcija ar sāli, uzrāda zemu iegūtā kolagēna daudzumu jeb 0.6 mg ml⁻¹. Tāpēc kolagēna ieguvei parasti izmanto ekstrakciju ar skābi vai enzīmu preparātiem.

1.4. Kolagēna pielietojuma iespējas

Jūras dzīvnieku kolagēna tirgus pieaugums ir saistīts ar plašajām kolagēna izmantošanas iespējām – kosmētikas, pārtikas un dzērienu rūpniecībā. Šim kolagēnam ir raksturīgas vairākas pozitīvas iezīmes – tam nav reliģisku ierobežojumu, labāka bioloģiskā saderība, zemākas ražošanas izmaksas un ātrāka absorbcija cilvēka organismā. Šis “zivju atkritumu” kolagēns ne tikai spēj samazināt vides piesārņojumu, bet tam ir unikālas īpašības, kas to padara par vērtīgu resursu dažādās nozarēs, tostarp kosmētikā, farmācijā un pārtikā, tādējādi samazinot sauszemes dzīvnieku kolagēna ieguvu (Prajaputra et al., 2024).

Pateicoties augstajai uzturvērtībai un daudzajiem ieguvumiem veselības jomā, jūras dzīvnieku kolagēns ir būtiska sastāvdaļa, kuru galvenokārt izmanto pārtikas rūpniecībā. No kolagēna var izveidot ēdamas kolagēna plēves un pārklājumus. Parasti pārtikas pārklājumus izmanto plānos slāņos. No jūras dzīvniekiem iegūts kolagēns sevi ir veiksmīgi pieteicis arī sporta medicīnā, jo tas veicina muskuļu pieaugumu un samazina traumas guvuša spēlētāja atveseļošanās laiku. Kad cilvēks kļūst vecāks, organisms sāk ražot mazāk kolagēna, tādējādi to nepieciešams uzņemt papildus. Šāda veida kolagēns tirgū pieejams tablešu veidā, tas atrodas dažādu dzērienu sastāvā un ir arī pārtikas produktos (Furtado et al., 2022) (Prajaputra et al., 2024).

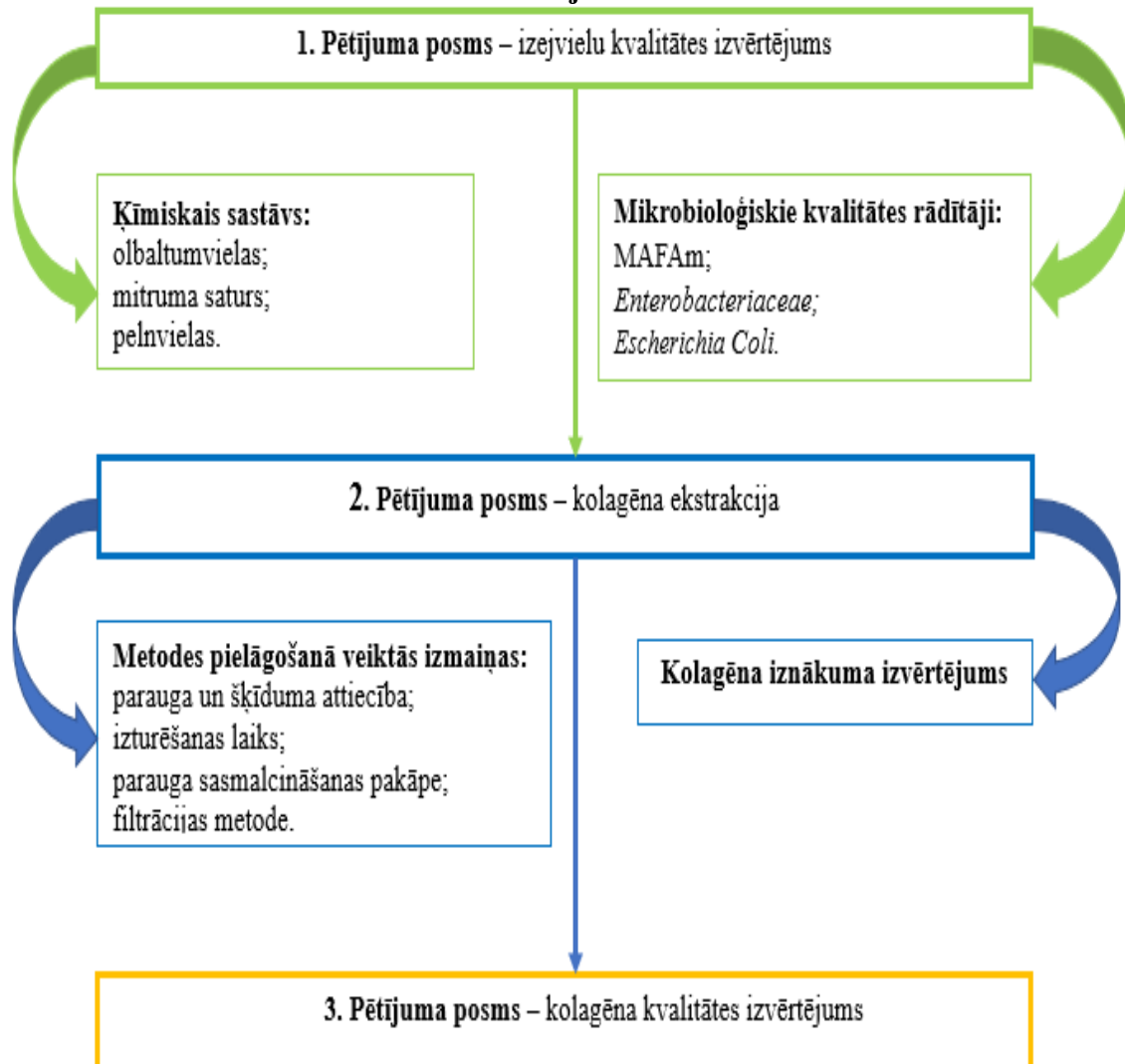
2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. Pētījuma izstrādes vieta un laiks

Pētījums tika veikts laika posmā no 26.02.2024-21.04.2024 Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitātes, Lauksaimniecības un pārtikas tehnoloģijas fakultātes, Pārtikas institūta laboratorijās:

- Pārtikas kvalitātes laboratorijā – veikta mencu ādu pirmapstrāde, analizēts olbaltumvielu, minerālvielu un mitruma saturs;
- Zinātniskajā laboratorijā – kolagēna ekstrakcija un izvēlētās metodes pielāgošana;
- Mikrobioloģijas zinātniskajā laboratorijā – veikta zivju ādu mikroskopēšana un mikrobioloģisko rādītāju noteikšana.

2.2. Pētījuma shēma

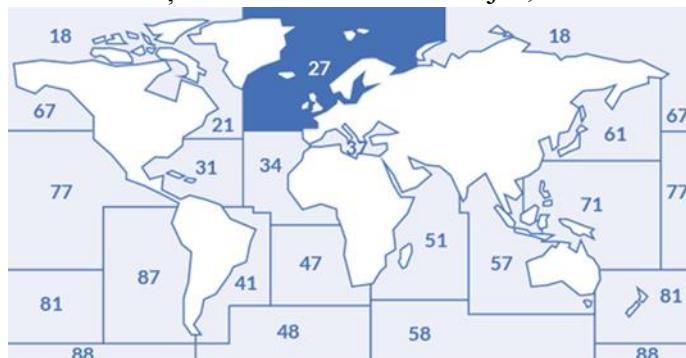


2.1. att. Pētījuma struktūras shēma

2.3. Pētījumā izmantotie materiāli un metodes

2.3.1 Pētījumā lietoto materiālu raksturojums

Pētījumos tika izmantotas Atlantijas mencu ādas (*Gadus morhua*), kuras nozvejotas ar trali, āķiem Špicbergenā un Lāču salā, Norvēģu jūrā. Zivis nozvejotas Atlantijas okeāna ziemeļaustrumos – (FAO 27), (skatīt 2.2. att.). Mencu ādas tika saņemtas no uzņēmuma SIA “Atlas Premium”, Reģ. nr. 40103680283, Rūpnīcu iela 4, Olaine, Olaines nov., LV-2114. Uzņēmums pēc nepieciešamības nosaka mencu ādu ķīmiskos kvalitātes rādītājus, kas ir redzami 2.1. tabulā.



2.2. att. Nozvejas reģions FAO 27¹

2.1. tabula

Specifikācijā dotie mencu ādu ķīmiskie kvalitātes rādītāji

Rādītājs	Metode	Rezultāts
Arsēns (As)	BIOR-T-012-148-2013	$2.72 \pm 0.27 \text{ mg kg}^{-1}$
Dzīvsudrabs (Hg)		$<0.33 \text{ mg kg}^{-1}$
Kadmijijs (Cd)		$<0.017 \text{ mg kg}^{-1}$
Svins (Pb)		$<0.033 \text{ mg kg}^{-1}$
Kopējais gaistošais bāzu slāpekļis (TVB-N)	Komisijas Īstenošanas Regula (ES) 2019/627, VI pielikuma II nodaļa	$6.7 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$
Nātrija hlorīds	GOST 27207-87*	$0.2 \pm 0.1\%$

Ekspērimētos lietotās mencu ādas vispirms tiek sagrieztas strēmēlēs 1x3 cm un mazgātas ar destilētu ūdeni. Mazgāšana nepieciešama, lai noskalotu no ādām gļotu, zvīņas un citus mehāniskus piemaisījumus. Pēc tam sasaldētas un uzglabātas $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ līdz turpmākajiem eksperimentiem.



2.3. att. Veselas un sagrieztas mencu ādas (autora foto)

¹ Nozvejas reģionu karte [tiešsaiste] (skatīts 04.03.2024.). Pieejams: <https://www.salazonesciges.com/wp-content/uploads/2018/12/FAO-27.png>

Saņemtajām mencu ādām tiek noteikti kvalitātes rādītāji – olbaltumvielu, tauku, pelnvielu un mitruma saturs. Izejviela tiek novērtēta organoleptiski.

Kolagēna ekstrakcijā tiek lietotas vairākas **neorganiskas un organiskas ķīmiskas vielas**, kuru raksturojums ir dots turpmāk:

- ✓ NaOH (nātrijs hidroksīds) – ķīmiski tīra analīzēm, ražotājs “*CHEMPUR*”, Polija;
- ✓ C₄H₉OH (butilspirts) – ķīmiski tīra analīzēm, ražotājs “*REAHIM*”, Krievija;
- ✓ CH₃COOH (etiķskābe) – ķīmiski tīra analīzēm, ražotājs “*CHEMPUR*”, Polija;
- ✓ Smalkais vārāmais galda sāls – ražotājs AAS “Mazirsoļ”, Baltkrievija;
- ✓ Dialīzes kolonna (ražotājvalsts ASV, diametrs – 20.4 mm, garums – 30m, vielas daudzums 3.3ml/cm) – nepieciešama NaCl jonu aizvadīšanai pēc kolagēna ekstrakcijas procesa. Dialīzes kolonnu var sagatavot divos veidos:
 - kolonnu var ievietot siltā ūdenī (25°C) un izturēt līdz nākamās dienas rītam, kad plānota dialīze;
 - kolonnu sagatavo 1h iepriekš, to ievietojot karstā ūdenī (80-90 °C).

2.3.2 Pētījumā lietoto metožu raksturojums

1. Kolagēna iegūšana jeb ekstrakcija. Analizējot zinātniskajā literatūrā pieejamo informāciju, tika noskaidrots, ka vispiemērotākā kolagēna ekstrakcijas metode ir, pielietojot skābi. Šīs ekstrakcijas laikā no mencu ādām tiek iegūts skābē šķīstošs kolagēns.

Kolagēna ekstrakcijas procesā tiek izmantotas vairākas ķīmikālijas – 0.1M NaOH (nātrijs hidroksīds), C₄H₉OH (butilspirts), CH₃COOH (etiķskābe) un NaCl (nātrijs hlorīds). Šķīdumu koncentrācijas un sagatavoto paraugu izturēšanas laiki izvēlēti atbilstoši zinātniskā literatūrā pieejamajai informācijai (Kiew & Mashitah, 2013). Kolagēna iegūšanas jeb ekstrakcijas tehnoloģiskā shēma ir skatāma 2.4. attēlā.

1. Apstrāde ar 0.1M NaOH

Raksturojošie parametri: izturēšanas laiks - 6h, izturēšanas temperatūra - 4 °C

Nepieciešamība: ādās esošā kolagēna atdalīšana no pārējām olbaltumvielām

2. Ādu mazgāšana ar destilētu ūdeni

Raksturojošie parametri: līdz neitrāls vai bāzisks vides reakcijai

3. Apstrāde ar 10% butilspirtu

Raksturojošie parametri: parauga un šķīduma attiecība ir 1:20, izturēšanas laiks - 24h, izturēšanas temperatūra - 4°C

Nepieciešamība: ādās esošo tauku un pigmentu atdalīšanai

4. Ādu mazgāšana ar aukstu destilētu ūdeni

Raksturojošie parametri: līdz neitrāls vai bāzisks vides reakcijai

5. Apstrāde ar 0.7M etiķskābi

Raksturojošie parametri: parauga un šķīduma attiecība ir 1:30, izturēšanas laiks - 24h, izturēšanas temperatūra - 4 °C

6. Centrifugēšana

Raksturojošie parametri: centrifūgas griešanās ātrums - 20 000 apg. min⁻¹, apstrādes laiks - 24h, izturēšanas temperatūra - 4 °C

Nepieciešamība: kolagēna atdalīšana no nešķīstošajām parauga sastāvdaļām

7. Apstrāde ar 0.8M NaCl

Nepieciešamība: kolagēna izgulsnēšana

2.4. att. Kolagēna iegūšanas jeb ekstrakcijas tehnoloģiskā shēma (Kiew & Mashitah, 2013)

Vadoties pēc tehnoloģiskās shēmas, kas redzama 2.4. attēlā, kolagēnu tomēr neizdevās iegūt un tādēļ tiek veiktas modifikācijas, kas turpmāk tiek aprakstītas darba 3. nodaļā "Rezultāti un diskusija".

2. Ķīmiskais sastāvs.

Mitruma satura noteikšana veikta atbilstoši LVS ISO 1442:1997 standartam.

Metodes pamatojums

Žāvēšanas procesa paātrināšanai, paraugu sajauc ar smiltīm. Smiltis uzirdina produktu, rada lielāku iztvaikošanas virsmu, novērš nožuvumu kārtiņas rašanos. Mitruma satura nosaka kaltējot paraugus 150 ± 2 °C temperatūrā.

Mitruma saturu % aprēķina pēc formulas:

$$X = \frac{(m_1 - m_2) \cdot 100}{m_1 - m_0}, \quad 2.1.$$

kur: m_1 – sverglāzītes, stikla irbulīša, smilšu un parauga masas pirms žāvēšanas, g;
 m_2 – sverglāzītes, stikla irbulīša, smilšu un parauga masas pēc žāvēšanas, g;
 m_0 – sverglāzītes masa kopā ar smiltīm un stikla irbulīti, g.

Pelnvielu satūra noteikšana veikta atbilstoši ISO 936-1978 standartam.

Metodes pamatojums

Karsējot organiskos savienojumus, tie sadalās ogļskābē gāzē, ūdenī, amonjakā un minerālvielās, kas paliek pelnu veidā. Pelnu daudzums un sastāvs dzīvnieku valsts produktos atkarīgs no barības ķīmiskā sastāva, dzīvnieka sugas u.c. faktoriem. Pēc pelnu sastāva un daudzuma var spriest par produkta fizioloģisko un tehnoloģisko vērtību.

Pārpelnošanas procesa laikā pētāmā produkta minerālvielu daļa var pārvērsties gaistošos produktos, tādēļ pārpelnošana jāveic 550 °C – 600 °C temperatūrā.

Pelnvielu saturu % aprēķina pēc formulas:

$$X = \frac{(m_2 - m_0)}{(m_1 - m_0)} \times 100, \quad 2.2.$$

kur: m_0 – tukša tīģeliša svars, g;
 m_1 – tīģeliša svars kopā ar paraugu, g;
 m_2 – tīģeliša svars kopā ar pelniem, g.

Olbaltumvielu satūra noteikšana – pielieto Kjeldāla metodi (LVS ISO 937:1978), ar *Kjeltec 2100* (FOSS, Zviedrija).

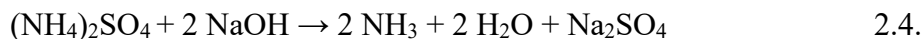
Metodes pamatojums

Par olbaltumvielu daudzumu produktā spriež pēc slāpekļa daudzuma tajā. Metode balstās uz olbaltumvielās saistītā slāpekļa mineralizāciju (sadedzināšanu) koncentrētā sērskābē līdz amonija savienojumiem, no kuriem izdala amonjaku un uztver noteiktas normalitātes skābē (borskābē). Amonjaka saistīto skābes daudzumu atrod, attitrējot ņemtās skābes pārpalikumu ar 0.1 N sāļsskābes šķīdumu. Produkta mineralizāciju veic, karsējot analizējamo paraugu ar koncentrētu sērskābi ūdeņraža peroksīda un kālija sulfāta maisījuma klātbūtnē.

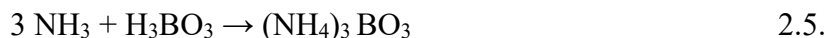
Mineralizācijas laikā veidojas amonija sulfāts.



No amonija sulfāta savukārt izdala amonjaku ar koncentrētu sārmu (ar ūdens tvaika palīdzību).



Izdalījušos amonjaku no jauna uztver noteiktas molaritātes skābē.



Skābes pārpalikumu attitrē ar standarta skābes šķīdumu.

Olbaltumvielu saturu % aprēķina pēc formulas:

$$\% \text{ Slāpekļis} = \frac{(T - B) \cdot N \cdot 14.007 \cdot 100}{m}, \quad 2.6.$$

kur: N – skābes šķīduma normalitāte, 0,1;
B – 0,1 N HCl daudzums, ml, kas izlietots kontroles parauga titrēšanai;
T – 0,1 N HCl daudzums, ml, kas izlietots parauga titrēšanai;
m – parauga iesvars, mg.

$$\% \text{ Olbaltumvielas} = \text{Slāpekļa saturs (\%)} \times F \quad 2.7.$$

F = olbaltumvielu koeficients = 6,25 zivīm un zivju produktiem.

3. Fizikālie kvalitātes rādītāji

Kolagēna iznākums

Kolagēna iznākums aprēķināts saskaņā ar publikācijā (Faralizadeh et al., 2021) pieejamo formulu:

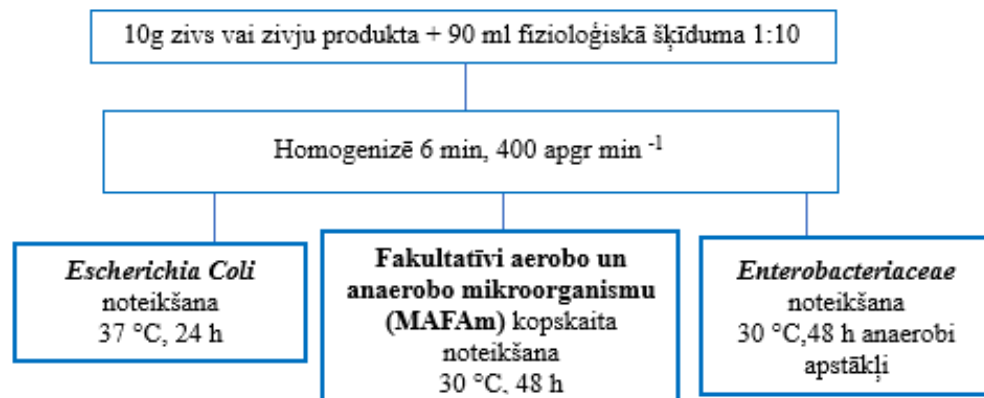
$$\text{Iznākums (\%)} = W/W_0 \times 100, \quad 2.8.$$

kur: W – liofilizēta kolagēna svars (g);
W₀ – svaigu ādu svars (g).

4. Mikrobioloģiskie kvalitātes rādītāji

Paraugu sagatavošana mikrobioloģiskajai testēšanai veikta, pielietojot standarta metodi LVS ISO 6887-2:2004 “Pārtikas un dzīvnieku barības mikrobioloģija – testēšanas paraugu, sākotnējās suspensijas un decimālšķīdumu sagatavošana mikrobioloģiskajām pārbaudēm – 2. daļa”.

Mikrobioloģisko kvalitātes rādītāju noteikšanas shēma zivīs un zivju produktos redzama 2.7. attēlā.



2.5. att. Mikrobioloģisko kvalitātes rādītāju noteikšanas shēma zivīs un zivju produktos

Mezofili aerobo un fakultatīvi anaerobo mikroorganismu (MAFAM) skaits noteikts atbilstīgi LVS EN ISO 4833:2003 standartam “Pārtikas un dzīvnieku barības mikrobioloģija. Mikroorganismu skaitīšanas horizontālā metode pie +30 °C” un LVS EN ISO 4833-1:2014 standartam “Pārtikas ķēdes mikrobioloģija.

Mikroorganismu skaitīšanas horizontālā metode. 1. daļa: Koloniju skaitīšana ar aplietas plātnes metodi pie +30 °C Temperatūras (ISO 4833-1:2013)”. Mikroorganismu kultivēšanai izmantoja *Scharlau* firmas barotni *Nutrient Agar* (Ref. nr. 01-140-500) ar inkubācijas laiku 48 h 30 °C temperatūrā.

***Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju skaits** noteikts atbilstoši LVS ISO 21528-2:2004 standartam. *Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju skaits noteikts izmantojot *Biolife* firmas selektīvo VRBD barotni (Ref. Nr. 4014602), inkubējot sagatavotos paraugus 48 h, 30 °C temperatūrā.

***Escherichia coli* skaits** noteikts atbilstoši LVS ISO 7251:2005 standartam “Pārtikas un dzīvnieku barības mikrobioloģija. Horizontālais paņēmieni varbūtējas *Escherichia coli* konstatēšanai un skaitīšanai. Varbūtīgā skaita metode.” *Escherichia coli* skaits noteikts izmantojot *Biolife* firmas selektīvo barotni ENDO (Ref. Nr. 4014602), inkubējot paraugus 24 h 37 °C temperatūrā.

3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

3.1. Mencu ādu ķīmiskā sastāva un kvalitātes rādītāju izvērtējums

Mencu ādu ķīmiskais sastāvs un tā salīdzinājums ar literatūrā pieejamo informāciju ir dots 3.1. tabulā.

3.1. tabula

Mencu ādu ķīmiskais sastāvs un tā salīdzinājums ar literatūrā pieejamo informāciju

Rādītājs	Paraugs	Publikācijā dotie dati (Jensen et al., 2013)
Mitruma saturs, %	67.0±1.50	80.9±1.0
Olbaltumvielu saturs, %	32.0±0.71	15.7±0.7
Minerālvielu saturs, %	0.80±0.09	1.3±0.1

Kā redzams no 3.1. tabulā dotajiem rezultātiem, tad eksperimentāli tika noteikts, ka analizētajos mencu ādu paraugos mitruma saturs ir 67.0±1.50%. Savukārt zinātniskajā literatūrā ir norādīts, ka mitruma saturs mencu ādās ir 80.9±1.0%, kas vidēji ir 1.21 reizi vairāk, nekā analizētajos paraugos. Olbaltumvielu saturs analizētajos paraugos ir 32.0±0.71%, turpretim zinātniskajā publikācijā norādīts, ka olbaltumvielu saturs ir 15.7±0.7, kas vidēji ir 2.04 reizes mazāk. Pētījumos lietotajās mencu ādās minerālvielu saturs ir 0.80±0.09% un tas ir 1.63 reizes mazāks nekā zinātniskajā literatūrā minētais daudzums, kas attiecīgi ir 1.3±0.1%.

3.2. tabula

Mikrobioloģiskie kvalitātes rādītāji

Rādītājs	Paraugs KVV mL ⁻¹
Fakultatīvi aerobo un anaerobo mikroorganismu (MAFAM)	7,56·10 ⁴ KVV g ⁻¹
<i>Escherichia Coli</i>	-
<i>Enterobacteriaceae</i>	-

Aplūkojot 3.1. tabulā sniegto informāciju redzams, ka fakultatīvi aerobo un anaerobo mikroorganismu (MAFAM) skaits 7,56·10⁴ KVV g⁻¹, kas atbilst un nepārsniedz MK noteikumos minēto maksimāli pieļaujamo normu – 1·10⁶ KVV g⁻¹.

Analizējot mencu ādu mikrobioloģiskos kvalitātes rādītājus, paraugos netika konstatēta *Enterobacteriaceae* un *Escherichia Coli* baktēriju klātbūtne. Šo mikroorganismu klātbūtne vai neesamība paraugos raksturo higiēnas prasību ievērošanu uzņēmumā. Piesārņojums *Enterobacteriaceae* un *Escherichia Coli* varētu rasties zivju pārstrādes uzņēmumā pēc mencu ādu noņemšanas, vai arī eksperimentu sākumposmā uzsākot ādu apstrādi, respektīvi – to mazgāšanas un griešanas laikā.

3.2. Kolagēna ieguve jeb ekstrakcija un tajā veiktās modifikācijas

Turpinot analizēt zinātniskajā literatūrā pieejamo informāciju par kolagēna ekstrakciju, noskaidrojās, ka tiek piemērotas dažādas izmantoto šķīdumu koncentrācijas, kā arī tiek izmantoti atšķirīgi paraugu izturēšanas laiki. Pamatojoties uz iegūto informāciju tika nolemts veikt nelielas modifikācijas 2.4. attēlā dotajā kolagēna iegūšanas tehnoloģiskajā shēmā. Modifikācijas kolagēna iegūšanas tehnoloģiskajā shēmā veiktas atbilstoši Wahyuningsih (Wahyuningsih et al., 2018) zinātniskajiem pētījumiem.

Analizējot un izvērtējot zinātniskajās publikācijās doto informāciju tika noskaidrotas vairākas atšķirības: 1) sagatavoto paraugu izturēšanas ilgums 0.1M NaOH šķīdumā; 2) C₄H₉OH koncentrācija un paraugu izturēšanas laiks; 3) NaCl šķīduma koncentrācija.

Līdz ar to kolagēna iegūšanas tehnoloģisko shēmu nosacīti var sadalīt vairākos etapos jeb posmos. Lai pārbaudītu kolagēna iegūšanas efektivitāti, katrs no šiem posmiem tika eksperimentāli pārbaudīts.

1) Izturēšana 0.1M NaOH šķīdumā. Sārms hidrolizē mencu ādās esošās olbaltumvielas (izņemot kolagēnu), kā arī lipīdus, pigmentus un citus savienojumus. Kā arī, apstrādājot ar NaOH zivs ādas uzbriest, kas nodrošina sārma difūziju dziļi audu matricā. Kopumā izturēšanas ilgums NaOH šķīdumā var būt no dažām dienām, līdz pat vairākām nedēļām un tas atkarīgs no materiāla (ādu) biezuma (Matinong et al., 2022). Pamatojoties uz zinātniskajās publikācijas iegūto informāciju, mencu ādu izturēšanas ilgumu palielināja no 6 stundām līdz 72 stundām. Ilgāks izturēšanas laiks veicina labāku organisko savienojumu atdalīšanu, kas var apgrūtināt kolagēna iegūšanas tehnoloģisko procesu.

2) Ādu apstrāde ar 10% C₄H₉OH (izobutilsplirtu). Nākamais posms, pēc izturēšanas NaOH šķīdumā, ir apstrāde ar izobutilsplirtu. Šīs apstrādes posms ir nepieciešams, lai no ādām atdalītu lipīdus un pigmentus (Sasmal & Begam, 2014).

3) CH₃COOH (etiķskābes) koncentrācija un paraugu izturēšanas laiks. Zinātniskajās publikācijās ir minētas dažādas kolagēna ekstrakcijai pielietotās etiķskābes koncentrācijas un tās mainās diapazonā no 0.10M līdz 0.7M. Vairākos literatūras avotos ir arī minēts, ka etiķskābes koncentrācija nedrīkst pārsniegt 0.5M, jo lielāka molaritāte var izraisīt peptīdu degradāciju, tādējādi samazinot kolagēna iznākumu un tīrību (Arumugam et al., 2018). Arī izturēšanas laiks etiķskābes šķīdumā ir atšķirīgs, sākot no 24h līdz pat 72h. Tādēļ eksperimentu gaitā tika sagatavoti 3 paraugi ar izturēšanas laiku – 24h, 48h, 72h. Iegūtie rezultāti, ļautu noskaidrot kā paraugu izturēšanas ilgums 0.5M CH₃COOH šķīdumā ietekmē kolagēna iznākumu.

4) Mencu ādu filtrācija izmantojot lavsāna audumu un vati. Šajā posmā, lai iegūtu tīru filtrātu, kolagēns tiek atdalīts no ādām. Mencu ādas papildus tiek izberztas caur sietu, lai nodrošinātu pilnīgu kolagēna atdalīšanu

5) Kolagēna izgulsnēšana izmantojot NaCl. Sākotnēji kolagēna izgulsnēšanai tika izmantots 0.8M NaCl šķīdums (Kiew & Mashitah, 2013). Tomēr eksperimentāli tika noskaidrots, ka, pielietojot NaCl šķīdumu, nav iespējams iegūt nozīmīgu kolagēna daudzumu. Šādi rezultāti varētu būt skaidrojami ar to, ka lai veiktu kolagēna izgulsnēšanu ir nepieciešams sasniegt to izoelektrisko punktu. Ņemot vērā to, ka šī kolagēna izgulsnēšanas metode ir neefektīva, kā arī zinātniskajā literatūrā pieejamo informāciju, turpmāk tiek lietota pārtikas vārāmā sāls koncentrētā veidā.

6) Kolagēna dialīze. Izgulsnētais kolagēns satur augstu sāls koncentrāciju, kuru ir iespējams samazināt veicot iegūtā kolagēna dialīzi. Vispirms izgulsnēto kolagēnu izšķīdina 0.5M CH₃COOH šķīdumā attiecībā 1:30. Tālāk šķīdumu ielej dialīzes kolonnā un veic dialīzes procesu attiecībā pret skābu šķīdumu vai destilētu ūdeni. Dialīzes laikā regulāri nomaina destilētā ūdens šķīdumu un nodrošina patstāvīgu šķīduma maisīšanu. Tas nepieciešams, lai tiktu paātrināts NaCl jonu migrācijas ātrums. Šis posms sastāda gandrīz 50% no kopējā laika, kas nepieciešams visam kolagēna ekstrakcijas procesam (Matinong et al., 2022).

7) **Kolagēna kaltēšana.** Pēc kolagēna dialīzes procesa, tiek veikta kaltēšana, pielietojot sublimācijas jeb liofilizācijas tipa kaldi. 3.1. attēlā ir skatāms liofilizēts mencu ādu kolagēns.



3.1. att. Liofilizēts mencu ādu kolagēns (autora foto)

3.3. tabula

Pārtikas nekaitīguma kritēriji²

Pārtikas kategorija	Mikroorganismi/to toksīni, metabolīti	Paraugu ņemšanas plāns		Robežvērtības		Analītiskās atsaucē metode	Posms uz kuru attiecas kritērijs
		n	c	m	M		
Želatīns un kolagēns	<i>Salmonella</i>	5	0	Nav 25g		NE/ISO6579	Produkti, kas laisti tirgū

Liofilizētais kolagēns tiek novērtēts organoleptiski. Kolagēna krāsa ir balta, bez izteiktas smaržas un garšas īpašībām. Struktūra ir mīksta, bet mēģinot sadalīt paraugu, tas ir stingrs.

² Pārtikas produktu mikrobioloģiskie kritēriji [tiešsaiste] (skatīts 12.04.2024.). Pieejams: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/LV/TXT/?uri=celex%3A32005R2073>

1. Apstrāde ar 0.1M NaOH

Raksturojošie parametri: izturēšanas laiks - 72h, izturēšanas temperatūra - 4 °C

Nepieciešamība: ādā esošā kolagēna atdalīšana no pārējām olbaltumvielām

2. Ādu mazgāšana ar destilētu ūdeni

Raksturojošie parametri: līdz neitrāls vai bāzisks vides reakcijai

3. Apstrāde ar 10% butilspirtu

Raksturojošie parametri: parauga un šķīduma attiecība 1:20, izturēšanas laiks - 24h, izturēšanas temperatūra - 4 °C

Nepieciešamība: ādā esošo tauku un pigmentu atdalīšanai

4. Ādu mazgāšana ar aukstu destilētu ūdeni

Raksturojošie parametri: līdz neitrāls vai bāzisks vides reakcijai

5. Apstrāde ar 0.5M etiķskābi

Raksturojošie parametri: parauga un šķīduma attiecība 1:30, izturēšanas laiks 24h, 48h, 72h, izturēšanas temperatūra - 4 °C

6. Paraugu filtrācija

Raksturojošie parametri: filtrācija caur lavsāna audumu un vati

Nepieciešamība: pilnīga kolagēna atdalīšana no ādām

7. Apstrāde ar smalko vārāmo sāli

Nepieciešamība: kolagēna izgulsnēšana

8. Izgulsnētā kolagēna apstrāde ar 0.5M etiķskābi

Raksturojošie parametri: nogulsnēm pievieno 30 ml 0.5M etiķskābi

Nepieciešamība: kolagēna izšķīdināšana

9. Dialīze

Raksturojošie parametri: iepriekš sagatavota dialīzes kolonna, dialīzes ilgums 6h

Nepieciešamība: sāls jonu aizvadīšana no šķīduma

10. Liofilizācija

Raksturojošie parametri: kopējais ilgums - 27h

Nepieciešamība: produkta izkaltēšana

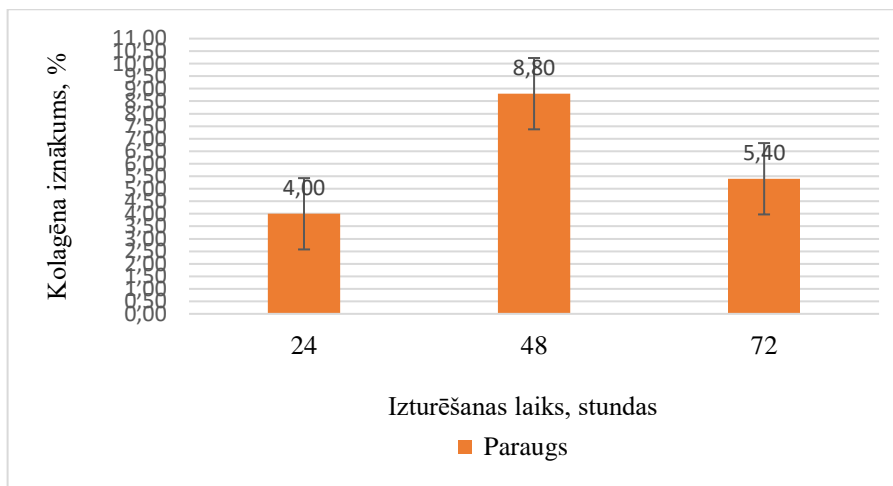
3.2. att. Modificēta kolagēna iegūšanas jeb ekstrakcijas tehnoloģiskā shēma

3.3. Kolagēna kvalitātes izvērtējums

3.3.1. Izgulsnētā kolagēna daudzums

Kolagēna ekstrakcijas jeb iegūšanas posmi tiek veikti 4 °C temperatūrā. Kā minēts zinātniskajā literatūrā, tad ir vairāki parametri, kas var ietekmēt iegūtā kolagēna iznākumu (Prajaputra et al., 2024). Kā tika atzīmēts iepriekš, tad iegūtā kolagēna iznākumu ietekmēja 3 galvenie faktori:

- izturēšanas ilgums 0.5M etiķskābes šķīdumā;
- pievienotais sāls koncentrācijas daudzums;
- filtrācijas metodes efektivitāte.



3.3. att Kolagēna iznākums atkarībā no izturēšanas laika

Kā redzams 3.3. attēlā, tad iegūtā kolagēna iznākums pēc 24 stundu izturēšanas etiķskābē 4.0%. Lielākais kolagēna iznākums 8.8% tiek iegūts mencu ādu paraugus izturot etiķskābes šķīdumā 48 stundas un tas ir 2.2 reizes vairāk nekā pēc 24 stundu izturēšanas. Savukārt, pagarinot paraugu izturēšanas laiku etiķskābes šķīdumā līdz 72 stundām, iegūtā kolagēna iznākums atkal samazinās un sasniedz 5.4%, kas ir 1,63 reizes mazāk nekā pēc 48 stundu izturēšanas.

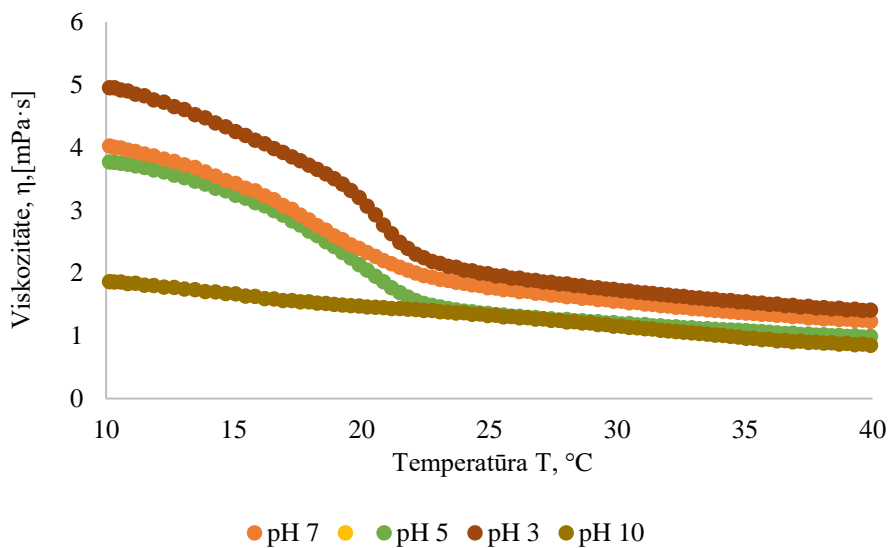
Līdz ar to var apgalvot, ka optimālais paraugu izturēšanas laiks etiķskābes šķīdumā ir 48 stundas un tas atbilst arī zinātniskajā literatūrā minētajam zivju ādu izturēšanas laikam.

3.3.2. Kolagēna viskozitāte un denaturācijas temperatūra

Izmainot kolagēna šķīduma pH skaitlisko vērtību mainās arī paraugu viskozitāte. No 3.4. attēlā dotās informācijas redzams, ka augstāka viskozitāte ir šķīdumam, kura pH skaitliskā vērtība ir 3.0, savukārt viszemākā – pie pH vērtības 10,0.

Viskozitāte ir šķidrums īpašība, kas nosaka tā pārvietošanai nepieciešamo spēka daudzumu. Jo augstāka viskozitāte, jo lielāks spēks ir nepieciešams šķidrums pārvietošanai. Šķidrums viskozitāti ietekmē arī tā temperatūra. Attiecīgi siltāka šķidrums viskozitāte ir zemāka. Savukārt jo aukstāks šķidrums, jo augstāka tā viskozitāte. Šo sakarību uzskatāmi pierāda arī veiktie eksperimenti un, paaugstinoties šķidrums temperatūrai, viskozitāte samazinās.

Interesants ir arī tas fakts, ka šķīdumam pie pH 10.0, ir noteikta viszemākā viskozitāte, kas praktiski nemainās paaugstinot temperatūru no 10 līdz 40 °C.



3.4.att. Kolagēna denaturācijas temperatūra

Saskaņā ar zinātniskajā literatūrā minēto informāciju zivju kolagēnam ir zemāka denaturācijas temperatūra, nekā no sauszemes dzīvniekiem iegūtam kolagēnam (Jafari et al., 2020). Saskaņā ar eksperimentos iegūtajiem rezultātiem, kolagēna denaturācija notiek 22 °C temperatūrā (skat. 3.4. att).

4. SECINĀJUMI UN PRIEKŠLIKUMI

1. Zivsaimniecības blakusproduktu izmantošanai ir potenciāls kolagēna ieguvē.
2. Zivju blakusproduktu kolagēna izmantošana kļūst ar vien populārāka, tādējādi samazinot sauzemes dzīvnieku kolagēna lietošanu.
3. Iegūstot kolagēnu no ūdens mugurkaulniekiem, tiek samazināts atkritumu daudzums, kā arī vides piesārņojums.
4. Pielāgojot kolagēna ekstrakcijas metodi tiek iegūts kolagēns ar tam raksturīgajām īpašībām.
5. Etiķskābes koncentrācija un izturēšanas ilgums ietekmē iegūtā kolagēna iznākumu.

Priekšlikumi:

- nepieciešams optimizēt kolagēna izsālīšanas metodi.

5. IZMANTOTĀ LITERĀTŪRA

1. Caruso, G., Floris, R., Serangeli, C., & Di Paola, L. (2020). Fishery Wastes as a Yet Undiscovered Treasure from the Sea: Biomolecules Sources, Extraction Methods and Valorization. *Marine Drugs*, 18(12), 622. <https://doi.org/10.3390/md18120622>
2. Al Khawli, F., Pateiro, M., Domínguez, R., Lorenzo, J. M., Gullón, P., Kousoulaki, K., Ferrer, E., Berrada, H., & Barba, F. J. (2019). Innovative Green Technologies of Intensification for Valorization of Seafood and Their By-Products. *Marine Drugs*, 17(12), 689. <https://doi.org/10.3390/md17120689>
3. Espinales, C., Romero-Peña, M., Calderón, G., Vergara, K., Cáceres, P. J., & Castillo, P. (2023). Collagen, protein hydrolysates and chitin from by-products of fish and shellfish: An overview. *Heliyon*, 9(4), e14937. <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2023.E14937>
4. Coppola, D., Lauritano, C., Palma Esposito, F., Riccio, G., Rizzo, C., & de Pascale, D. (2021). Fish Waste: From Problem to Valuable Resource. *Marine Drugs*, 19(2), 116. <https://doi.org/10.3390/md19020116>
5. Al Khawli, F., Pateiro, M., Domínguez, R., Lorenzo, J. M., Gullón, P., Kousoulaki, K., Ferrer, E., Berrada, H., & Barba, F. J. (2019). Innovative Green Technologies of Intensification for Valorization of Seafood and Their By-Products. *Marine Drugs*, 17(12), 689. <https://doi.org/10.3390/md17120689>
6. Baiano, A. (2014). Recovery of Biomolecules from Food Wastes — A Review. *Molecules*, 19(9), 14821–14842. <https://doi.org/10.3390/molecules190914821>
7. Furtado, M., Chen, L., Chen, Z., Chen, A., & Cui, W. (2022). Development of fish collagen in tissue regeneration and drug delivery. *Engineered Regeneration*, 3(3), 217–231. <https://doi.org/10.1016/J.ENGREG.2022.05.002>
8. Xu, N., Peng, X. L., Li, H. R., Liu, J. X., Cheng, J. S. Y., Qi, X. Y., Ye, S. J., Gong, H. L., Zhao, X. H., Yu, J., Xu, G., & Wei, D. X. (2021). Marine-Derived Collagen as Biomaterials for Human Health. *Frontiers in Nutrition*, 8, 702108. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2021.702108/BIBTEX>
9. Jafari, H., Lista, A., Siekapen, M. M., Ghaffari-Bohlouli, P., Nie, L., Alimoradi, H., & Shavandi, A. (2020). Fish Collagen: Extraction, Characterization, and Applications for Biomaterials Engineering. *Polymers*, 12(10), 2230. <https://doi.org/10.3390/polym12102230>
10. Nurilmala, M., Suryamarevita, H., Husein Hizbullah, H., Jacob, A. M., & Ochiai, Y. (2022). Fish skin as a biomaterial for halal collagen and gelatin. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(2), 1100–1110. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2021.09.056>
11. Furtado, M., Chen, L., Chen, Z., Chen, A., & Cui, W. (2022). Development of fish collagen in tissue regeneration and drug delivery. *Engineered Regeneration*, 3(3), 217–231. <https://doi.org/10.1016/J.ENGREG.2022.05.002>
12. Alves, A., Marques, A., Martins, E., Silva, T., & Reis, R. (2017). Cosmetic Potential of Marine Fish Skin Collagen. *Cosmetics*, 4(4), 39. <https://doi.org/10.3390/cosmetics4040039>
13. Yamada, S., Yamamoto, K., Ikeda, T., Yanagiguchi, K., & Hayashi, Y. (2014). Potency of Fish Collagen as a Scaffold for Regenerative Medicine. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/302932>
14. Rigogliuso, S., Campora, S., Notarbartolo, M., & Ghersi, G. (2023). Recovery of Bioactive Compounds from Marine Organisms: Focus on the Future Perspectives for Pharmacological, Biomedical and Regenerative Medicine Applications of Marine Collagen. *Molecules*, 28(3), 1152. <https://doi.org/10.3390/molecules28031152>

15. Jensen, I. J., Larsen, R., Rustad, T., & Eilertsen, K. E. (2013). Nutritional content and bioactive properties of wild and farmed cod (*Gadus morhua* L.) subjected to food preparation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 31(2), 212–216. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2013.05.013>
16. Prajaputra, V., Isnaini, N., Maryam, S., Ernawati, E., Deliana, F., Haridhi, H. A., Fadli, N., Karina, S., Agustina, S., Nurfadillah, N., Arisa, I. I., Desiyana, L. S., & Bakri, T. K. (2024). Exploring marine collagen: Sustainable sourcing, extraction methods, and cosmetic applications. *South African Journal of Chemical Engineering*, 47, 197–211. <https://doi.org/10.1016/J.SAJCE.2023.11.006>