

664.951.72

МИДИИ - ИСТОЧНИК ПОЛУЧЕНИЯ ГЛИКОГЕНА

Н.Е.Николаева, О.М.Трофимова

Гликоген - полисахарид, широко распространенный в органах и тканях животных. Его часто называют "животным крахмалом". Эмпирическая формула гликогена, как и крахмала, - $(C_6H_{10}O_5)_x$. Особенно много гликогена в моллюсках. Этот углевод широко используют в биохимических исследованиях, однако в нашей стране гликоген не производят, поэтому его приходится приобретать за рубежом.

Развитие отечественного промысла мидий вызвало необходимость решения вопроса рационального их использования для нужд народного хозяйства. Известно, что при производстве консервов "мидии натуральные", около 20% мяса не пригодно для консервирования ввиду большого количества известковых включений ("жемчуга") в толще тела моллюсков. Большую часть этих отходов, по нашему мнению, рациональнее всего использовать для выработки пищевого гидролизата "МИДИ-К" (по технологии ВНИРО), а некоторое количество - для получения гликогена.

Традиционные источники получения гликогена - печень кроликов и устрицы. Мы предлагаем использовать непригодные мидии, производство гликогена из которых экономически целесообразно, поскольку стоимость этих мидий невысока.

В связи с тем, что гликоген в нашей стране не производится, возникла необходимость проверить известные способы

выделения гликогена из различного гликогенсодержащего сырья, уточнить некоторые технологические режимы, учитывая специфику сырья (мидий), и технологию получения гликогена из этого сырья.

Для получения гликогена использовали бланшированное мясо черноморских мидий, отбракованных при производстве консервов.

Известно, что количество углеводов в теле черноморских мидий повышается от весны к лету, достигая максимума в июле-августе (Горомосова и др., 1965). Поэтому для опытов мы использовали мидии двух периодов заготовки способом стерилизации при 112°C в течение 55 мин.

В табл. I приведены данные о химическом составе мидий (в %).

Таблица I

Дата заготовки	Вода	Жир	Зола	Азот	Гликоген
	Свежие мидии				
12.IV.68 г.	75,0	3,3	1,4	2,8	1,74(6,97) ^{x/}
24.V.68 г.	71,9	3,3	2,1	2,9	2,56(9,10)
	Консервы				
Полуфабрикат	80,0	2,0	1,5	1,7	2,12(10,60)

x/ В скобках - на сухое вещество.

Из таблицы видно, что в бланшированном мясе мидий, заготовленном 12 апреля, содержание гликогена ниже, чем в мясе, заготовленном 24 мая, что согласуется с литературными данными, приведенными выше (Долер, 1966).

Консервы четырехлетней давности по содержанию гликогена не уступают бланшированному мясу.

Способы выделения гликогена из животных тканей, а также из дрожжей достаточно подробно описаны в литературе (Асатиани, 1956; Галвяло, Владимиров, 1936; Демьянов, Пришников, 1933; Дроздов, Журавская, 1952; Иванов, 1946; Мешкова, Северин, 1950; Ward et al., 1966). Следует, однако, напомнить, что многие исследователи, основываясь на

различной растворимости гликогенов тканей, ввели понятие о так называемом свободном и связанном гликогене. Первый легко извлекается из тканей, в частности 3%-ным раствором трихлоруксусной кислоты (Долер, 1966; Мешкова, Северин, 1950), второй — только после расщепления белков, с которыми он прочно связан.

Белки обычно разрушают нагреванием либо в крепких (60 и 30%-ных) растворах едкого кали, либо в 50%-ном растворе едкого натра, после чего гликоген осаждают из щелочного раствора спиртом. Затем осадок гликогена очищают многократным переосаждением спиртом из водных растворов или последовательной промывкой осадка гликогена спиртом разной концентрации (60, 80 и два раза 96°), либо применяя эти методы последовательно один за другим. Чистый гликоген промывают эфиром и высушивают на воздухе при температуре не выше 60°C, либо в эксикаторах над хлористым кальцием.

При получении гликогена из мидий мы использовали существующие способы его выделения из различного гликогенсодержащего сырья, основывающиеся, во-первых, на свойстве свободного гликогена легко экстрагироваться из ткани разбавленным раствором трихлоруксусной кислоты, и, во-вторых, — на стойкости гликогена по отношению к щелочам, которая используется для его выделения и очистки.

Чтобы перевести гликоген в раствор расщепляли белки мидий в одних опытах 50%-ным раствором едкого натра, в других — 30- и 60%-ными растворами едкого кали, при соотношении измельченных мидий (фарша) и раствора 1:1 и 1:2, в течение от 3 до 4 ч при температуре около 96–98°C. Из щелочных растворов осаждали гликоген спиртом при соотношении раствора и 96%-ного спирта 1:1 и 1:1,5. Из растворов едкого кали гликоген осаждался много медленнее, чем из растворов едкого натра, причем в растворах едкого кали осадок образовывался черный, мазеобразный, что затрудняло его отделение от раствора и очистку.

Легкоизвлекаемый (свободный) гликоген экстрагировали 3%-ным раствором трихлоруксусной кислоты сначала при соотношении мидий и раствора 1:1,5 в течение от 30 мин до 1 ч

при периодическом перемешивании, затем после отделения экстракта от плотной части — центрифугированием при соотношении плотной части и раствора 1:1 в течение 15 мин. Из объединенных экстрактов осаждали гликоген 96%-ным спиртом при соотношении раствора и спирта 1:1.

Очищали образцы гликогена известными методами. Кроме того, дополнительно обрабатывали окрашенные водные растворы гликогена активированным древесным углем. Когда осветленные углем растворы гликогена были щелочными, уголь отфильтровывался вполне удовлетворительно, и наоборот, осветленные углем растворы гликогена, осажденного трихлоруксусной кислотой, даже при разряжении фильтровались с трудом. Полностью очистить их от угля не удалось, поэтому некоторые образцы гликогена, полученные в этих опытах, имели сероватый оттенок.

В табл.2 представлены некоторые данные о технологии получения гликогена, химическом составе образцов гликогена и его выходе.

Содержание гликогена в мидиях и образцах гликогена, полученных в опытах, определяли колориметрическим методом при помощи антронового реактива (Авсикевич, 1956; Van Handel Emile, 1965; Roe Joseph, Dailey, Kolert, 1966).

Для определения гликогена в мясе мидий и препаратах гликогена было выбрано два метода:

- 1) непрямой — Н.Дроздова и Н.Журавской (1952);
- 2) прямой — Зейфтера и в модификации В.С.Авсикевича (1956).

Содержание гликогена в мясе мидий и в препаратах гликогена определяли одновременно двумя методами. Статистическая обработка результатов проведена по формулам для малого числа (меньше 30) параллельных определений (Митропольский, 1961). Оба метода характеризуются относительно высокой дисперсией аналитических данных. Дисперсия единичных определений меньше при определении гликогена прямым методом (0,0025 против 0,0289 при непрямом методе), что говорит в пользу прямого метода. Коэффициент варьирования в случае определения содержания гликогена непрямым методом значительно выше, чем прямым.

Таблица 2

Дата кобичи (1968г.)	Способ выделения гликогена	Характеристика препаратов гликогена				Извлечено гликогена, в % от его содержания в мицеллях	Цвет образцов гликогена
		выход в % от веса мицелл		содержание, %			
		воздушно- сухого	обезвожен- ного	вода	гликоген (на су- хое вещество)		
12. IY		1,9	1,7	10,3 0,17	94,2	94,3	Белый с кремо- вым оттенком
	50%-ным NaOH	1,6	1,5	7,0 0,32	89,7	76,5	Тот же
24. Y		3,6	3,2	11,0 0,53	84,6	95,7	"
		3,6	3,2	11,0 0,36	87,8	98,0	"
Лето (консервы)		3,2	2,8	12,4 1,17	92,8	100,0	Сероватный
12. IY	30%-ным KOH	2,1	2,2	5,6 1,15	78,6	90,0	Сероватный
		1,8	1,6	9,6 0,50	85,7	81,8	Белый с кремо- вым оттенком
12. IY		1,4	1,2	11,1 0,22	84,1	60,0	Белый с кремо- вым оттенком
	3%-ный CaCl ₂ COOH	1,5	1,2	14,4 2,10	83,5	60,0	Серый
24. Y		2,8	2,5	10,5 0,51	84,6	84,6	Сероватный
		3,5	2,9	17,2 0,30	84,6	96,7	Белый с кремо- вым оттенком
Лето (консервы)		2,6	2,3	10,7 0,43	87,5	95,7	Тот же
Контроль.	Образец импортного гликогена (ПНР)	10,6 0,10	95,3				Снежно-белый

Примечание. В пересчете на гликоген с содержанием в нем влаги, равном 10%, средний выход полученного препарата гликогена из мицелл майских и летних составляет 3,4% -- при осаждении гликогена из раствора едкого натра и 2,9% -- при экстракции трихлоруксусной кислотой.

Для сравнения дисперсий применен критерий Фишера (F). Найденное значение дисперсного отношения выше 10% уровня значимости; следовательно, разница в определении двумя различными методами существенна.

При разработке способа получения гликогена из мяса мидий в качестве эталона для сравнения получаемых нами образцов использовали препарат гликогена, выпускаемый ПНР из печени кроликов.

Согласно данным технической документации на этот препарат содержание гликогена в 100 г чистого гликогена должно составлять 100±5 г. Сопоставление результатов анализов содержания гликогена в эталонном образце гликогена, полученных двумя методами, показало, что прямой метод определения гликогена дает величину, отвечающую требованиям стандарта, непрямой — этой величины не дает.

Как видно из данных табл.2, выход гликогена находится в прямой зависимости от его содержания в мидиях, т.е. подвержен сезонным колебаниям. Однако средний выход гликогена (содержание влаги в котором приведено к 10%) относительно высок и составляет из майских и летних мидий 3,4% (при осаждении гликогена из раствора едкого натрия) и 2,9% (при экстракции трихлоруксусной кислотой).

Известно (Долер, 1966), что выход гликогена из печени кроликов, которым перед убоем внутрибрюшинно был введен раствор глюкозы, составляет 2,6%, а из печени обычных кроликов — всего 1% от веса печени.

Выход очищенного гликогена из моллюсков *Mya arenaria* (Ward et al., 1966), как и из мидий, зависит от сезона их добычи и колеблется от 0,8 до 3,3% (в среднем — 2,2%) от веса очищенных (без раковин) моллюсков.

Обращает на себя внимание тот факт (см.табл.2), что в апрельских мидиях значительно меньше легкоизвлекаемого гликогена, чем в майских и летних (консервированных) — 60 и 90,7% соответственно. Таким образом, в апрельских мидиях легкоизвлекаемого гликогена на 30%, а в майских всего на 7% меньше общего количества гликогена, которое удается извлечь после расщепления белков растворами щелочей.

Это дает возможность рекомендовать для получения гликогена из мидий (майских и летних) два способа: 1) экстракцию гликогена из измельченных мидий разбавленным раствором трихлоруксусной кислоты и 2) осаждение гликогена из щелочного раствора после разрушения белков 50%-ным раствором едкого натрия.

Из данных о химическом составе видно, что в тех образцах гликогена, технология которых предусматривала расщепление белков мидий растворами едкого натра, содержание гликогена выше (в среднем 90%), чем в полученных другими способами. Самое низкое содержание гликогена (около 82%) - в образцах, полученных расщеплением белков растворами едкого кали. Образцы гликогена, полученные экстракцией трихлоруксусной кислотой, занимают промежуточное положение - среднее содержание в них гликогена около 85%.

Содержание золы в образцах гликогена довольно высокое: от 0,17 до 2,10%. Следует отметить, что все образцы гликогена имели либо кремовый, либо сероватый оттенки, по-видимому, за счет загрязнения органическими веществами, в том числе углем.

Полученные нами образцы гликогена несколько уступают по качеству импортному гликогену, выработанному из печени кроликов в ПНР. Испытание на подлинность (качественные реакции) все образцы гликогена выдержали.

В связи с недостаточной очисткой наиболее окрашенные образцы гликогена объединили, растворили в горячей воде, довели pH раствора до 9 и обработали активированным углем для осветления. Затем уголь отделили от раствора двукратным фильтрованием через плотные бумажные фильтры (щелочной раствор хорошо фильтровался, уголь не проходил сквозь поры фильтра), раствор нейтрализовали соляной кислотой до pH 3,5 и гликоген осадил спиртом. Затем его промыли спиртом, эфиром и высушили над хлористым кальцием.

Очищенный гликоген был белого цвета и имел следующий состав (в %): воды - 9,6, золы - 0,18 и гликогена (на сухое вещество) - 95,4, т.е. не уступал импортному химически чистому.

Таким образом, технология получения гликогена из мидий может быть усовершенствована. Поскольку стоимость предлагаемого сырья невысока и рыбная промышленность располагает большими его запасами, производство гликогена из него должно стать высокоэкономичным.

В ы в о д

Черноморские мидии могут явиться перспективным источником для промышленного получения гликогена.

Средний выход полуочищенного гликогена из майских и летних мидий составлял (в пересчете на гликоген с 10%-ной влажностью): 3,4% - при осаждении из раствора едкого натра и 2,9% - при экстракции трихлоруксусной кислотой.

Установлено, что наиболее рациональными методами получения гликогена из мидий являются: 1) осаждение гликогена из щелочного раствора после гидролиза белков 50%-ным едким натром и 2) экстракция гликогена трихлоруксусной кислотой.

Л и т е р а т у р а

- Авсюкевич В.С. Определение гликогена в мышечной ткани и печени. Изв. высших учебных заведений. "Пищевая технология", 1967, № 4.
- Асатиани В.С. Методы биохимических исследований, М., 1956.
- Галвяло М.Я., Владимиров Г.Е. Пособие к практическим занятиям по биологической химии. Л., 1936.
- Горомосова С.А., Иванов А.И., Лагунов Л.Л., Михайлов В.Ф., Москаленко Н.Ф., Рехина Н.И., Терентьев А.В., Трофимов В.И., Яковлев А.А. Биология, техника промысла и переработка мидий. М., 1965.
- Демьянов Н.Я., Прянишников Н.Д. Общие приемы анализа растительных веществ. М., 1933.
- Долер Б. Технологическая инструкция по производству гликогена из печени кроликов, получаемого на Краковском заводе вакцин (ПНР). 2.IX.1966.
- Дроздов Н., Журавская Н. Быстрый метод определения гликогена в мясе. "Мясная индустрия СССР", 1952, № 5.

Иванов Н.Н. Методы физиологии и биохимии растений.

М.-Л., 1946.

Мешкова Н.П., Северин С.Е. Практикум по биохимии животных, М., 1950.

Митропольский А.К. Техника статистических вычислений. М., Физматгиз, 1961.

Van Handel, E. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. "Analyt. Biochem.", 11, N 2, 1965.

Roe Joseph, H., Dailley Robert, E. Determination of glycogen with the anthrone reagent. "Analyt. Biochem.", 15, N 2, 1966.

Ward, D., B. Rosen, M. K. Tatro. Extraction of glycogen from soft shell clams (*Mya arenaria*), Chesapeake Sci., 7, N 4, 1966.