

УДК 675.(075)

**НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ТЕОРЕТИЧЕСКИХ ОСНОВ
МОНИТОРИНГА СОСТАВА КОЖЕВЕННЫХ ОТХОДОВ**

Канд. физ.-мат. наук Е.О.Сыргалиев
Докт. техн. наук К.К.Бейсеуов
Г.Н.Середин

В работе представлен теоретический обзор аналитических характеристик коллагена дермы, являющегося основным компонентом кожевенных отходов.

Разработка методов аналитического контроля состава кожевенных отходов /1,2/ является актуальным для мониторинга новых технологий утилизации кожевенных отходов /3/. При этом большинство новых методов разрабатывается на основе адаптации к аналитическим особенностям кожевенных отходов. В этой связи является очень важным знание компонентного состава, структурных особенностей кожевенных отходов как сырья и материалов для производства новых видов продукции. Поэтому в настоящей работе нами был проведен обзор основных аналитических характеристик коллагена дермы /4,5/, являющегося основным компонентом кожевенных отходов.

Дерма млекопитающих в нативном состоянии содержит от 130 до 305 г воды на 100 г сухого вещества, т.е. 56,5-75,3% от массы влажной ткани или 60-80% от массы безводного вещества дермы. Помимо в коллагена в дерме содержатся и другие белки (эластин, ретикулин, альбумины, глобулины), а также вещества иного строения - гликозаминогликаны, липиды и различные неорганические ионы. Дерма состоит из нескольких слоев - субэпидермального (прилегающего к эпидермису) лицевого, сосочкового, сетчатого и подкожного (граничащего с внутренними частями организма). Меньше всего (около 5%) примесей, сопутствующих коллагену, в среднем (сетчатом) слое дермы крупного рогатого скота. Поэтому при выделении коллагена из дермы ее сосочковый слой и подкожную соединительную ткань предварительно удаляют. Измельченный сетчатый слой последовательно обезжиривают и

экстрагируют растворами хлорида натрия и щелочи. В солевой раствор переходят глобулярные белки и часть коллагена (тропоколлаген). Количество последнего определяется обычно по содержанию в гидролизате вытяжки оксипролина. В глобулярных белках остатков оксипролина не содержится.

В результате экстрагирования разбавленной щелочью дермы после ее обработки указанной выше солью в раствор переходят также гликозаминогликаны, а в остатке остаются нерастворимая фракция коллагена, эластин и ретикулин. При интенсивном нагревании этой обводненной белковой смеси коллаген превращается в желатин, а не растворившийся остаток состоит главным образом из эластина и ретикулина.

Критерием степени очистки коллагена дермы от сопутствующих ему веществ может служить содержание, %: азота 17,8-18,1, остатков оксипролина 11,9-12,0, тирозина 0,8, золы не более 0,2. Очищенный таким образом коллаген дермы имеет следующий элементарный состав, % от его массы и от общего числа атомов (последнее значение приводится в скобках): азот — 18,00 (9,97); углерод — 50,53 (32,65), кислород — 25,57 (12,39); водород — 5,80 (44,97); сера — 0,10 (0,02).

Помимо очищенного от примесей волокнистого коллагена, для определения аминокислотного состава белка используют также продукт его экстрагирования в кислой среде, именуемый кислорастворимым коллагеном КРК. После многократной очистки от примесей путем высаливания препарат содержит молекулы тропоколлагена и их агрегаты. Аминокислотный состав очищенных препаратов тропоколлагена и волокнистого коллагена одинаков.

Количество тропоколлагена, экстрагируемого в кислой среде из дермы молодых млекопитающих, не превышает 15-20%. Из волокнистого коллагена дермы созревших организмов в результате кислотного экстрагирования удастся выделить только 3% растворимой формы белка. Это количество можно повысить интенсивным предварительным измельчением коллагена. В некоторых случаях для облегчения растворения в кислой среде коллаген дермы предварительно обрабатывают ферментами, гидролизующими углеводы, а также этилендиаминтетрауксусной кислотой, экстрагирующей катионы, смесью щелочи и сульфата натрия или протеолитическими ферментами. Большая часть последних, за исключением ферментов типа коллагеназы, не растворяет нативного коллагена, не подвергнутого предварительной химической обработке или нагреванию. Однако небольшое количество белкового вещества протеолитические ферменты не коллагенового типа от нативного коллагена все же отщепляют. Аналогичное действие производит и смесь щелочи с сульфатом натрия.

Коллаген, растворимостью которого в кислой среде повышена действием фермента, именуется ферменторастворимым (ФРК). Если растворимость коллагена обеспечена обработкой указанной выше сме-

стью, образующийся продукт именуется эйколлагеном, или ПРК (продуктом растворения коллагена). Большие изменения происходят в структуре коллагена, если его обработка осуществляется в нейтральной среде горячей водой. В образующемся при этом желатине молекул нативного коллагена вообще нет, так как при нагревании они денатурируют и расщепляются на полипептиды. При получении желатина в производственных условиях образующийся продукт содержит пептиды с различной молекулярной массой.

Градации структурных уровней на примере дермы крупного рогатого скота (КРС) приведена в табл.1.

Таблица 1
Уровни структуры коллагена КРС и их краткая характеристика

Структура	Уровень структуры	Краткая характеристика
Молекулярная анизотропная	Молекула тропколлагена	Молекулярная массы около 300 000, длина около 300 нм, диаметр около 1,5 нм
Молекулярная изотропная	Тактоиды (жидкие кристаллы)	Мезофазы молекул тропколлагена, расположенных параллельно друг другу, но разделенных водными прослойками.
Ультраструктура	Протофибриллы	Нити единичных молекул тропколлагена связаны вблизи концов
	Микрофибриллы	Нити диаметром около 3,5 нм, состоящие из 5 протофибрилл
Надфибриллярная структура	Фибриллы	Пакеты микрофибрилл диаметром 50-200 нм.
	Первичные волокна	Нити диаметром около 5 мкм, состоящие из 900-1000 фибрилл
	Вторичные волокна (пучки)	Нити диаметром около 200 мкм, состоящие из 30-300 первичных волокон
	Дерма	Переплетение вторичных волокон

Для гидролиза очищенных препаратов коллагена при определении их суммарного аминокислотного состава чаще всего используется нагревание в растворе соляной кислоты. Ускорение процесса достигается введением в систему муравьиной кислоты. Для отщепления аммиака, в результате разрушения амидных групп боковых цепей остатков глютаминовой и аспарагиновой кислот, также используется обработка в кислой среде при мягких условиях.

В табл. 2. приводится типичный аминокислотный состав коллагена дермы. Всего в цепи с молекулярной массой 10^5 содержится 998,9 остатка. Следовательно, средняя молекулярная масса остатка равна 100,1.

Таблица 2
Типичный аминокислотный состав коллагена дермы КРС

Аминокислота	Содержание		Аминокислота	Содержание	
	мо ле й на 10^5 г бе лк а	% от общего числа амино- кислот- ных ос- татков		мо ле й на 10^5 г бе лк а	% от общего числа амино- кислот- ных ос- татков
Глицин	329	32,9	Метионин	5	0,5
Оксипролин	88	8,8	Изолейцин	12,5	1,3
Пролин	133	13,3	Лейцин	26	2,6
Тирозин	3,8	0,4	Фенилаланин	13,3	1,3
Аспарагиновая кислота	48	4,8	Оксилизин	6,4	0,6
Глютаимновая кислота	76	7,6	Гистидин	5,2	0,5
Аланин	106	10,6	Аргинин	48	4,9
Серин	33	3,3	Амидные группы аспара- гиновой и глю- таминовой ки- слот	39	3,9
Треонин	17,3	1,7			
Валин	22,4	2,3			

На основе данных табл. 2 можно получить представление об относительном содержании в структуре коллагена остатков разных типов. Очень существенным является то, что на долю глицина приходится примерно 1/3 всех аминокислотных звеньев структуры коллагена. На звенья, не содержащие в боковых цепях ни азота, ни кислорода (остатки глицина, аланина, лейцина, изолейцина, валина, фенилаланина и пролина), приходится свыше 64% от их общего количества. Остальные 36% звеньев содержат гидрофильные боковые цепи, в которых имеются атомы азота, кислорода или серы. Пролин и оксипролин являются иминокислотами. На долю их остатков приходится около 22% всех звеньев. Свыше 12% боковых цепей имеют кислотный характер (в остатках глутаминовой и аспарагиновой кислот), 30% от карбоксилов их боковых цепей связано в виде амидов. Основной характер имеют 8,6% остатков (лизина, оксилизина, гистидина и аргинина). Оксигруппы содержатся в 14,8% остатков (оксипролина, тирозина, серина, треонина и оксилизина). Единственным остатком, содержащим в боковой цепи, является метиониновый.

Значительные успехи в области изучения коллагена были достигнуты в результате исследования его водорастворимой фракции — тропоколлагена. Чаще всего такое экстрагирование производится в кислой среде, а иногда в растворах нейтральных солей. Максимально достижимая концентрация тропоколлагена в водном растворе редко превышает 1%. Значительная часть белка, переходящего в раствор, имеет характер монодисперсных молекул. Их масса определена различными методами: седиментации, светорассеяния, двулучепреломления в потоке $3 \cdot 10^5$. Они имеют форму стречной протяженностью около 300 нм и диаметром 1,5 нм.

Важнейшим этапом исследования коллагена было доказательство того, что каждая его молекула состоит из трех полипептидов с примерно одинаковой молекулярной массой около 100 000. Это расщепление было достигнуто в результате денатурации молекул тропоколлагена в растворах мочевины или роданата калия при температуре 45°C . В некоторых случаях полипептиды тропоколлагена, остающиеся после расщепления его молекулы, бывают объединены попарно или даже образуют трехцепочные агрегаты частиц исходного белка, утративших нативную форму, но сохранивших молекулярную массу около 300 000. Одно-цепочные разновидности продуктов денатурации тропоколлагена именуются полипептидами типа α , двух цепочного типа β и трех цепочного типа γ .

Несмотря на то, что все полипептиды тропоколлагена типа α имеют молекулярную массу, близкую к 100 000, они не вполне одинаковы. Путем использования новейших методов фракционирования высокомолекулярных соединений установлено, что полипептиды, выделяемые из коллагена разных органов живого организма, несколько различаются между собой. Существенным осложнением при опре-

делении последовательности аминокислотных остатков в тропоколлагеновых полипептидах является их высокая молекулярная масса, значительно превышающая аналогичный параметр большинства других изучаемых белков. Для выяснения этой последовательности было использовано предварительное расщепление α -полипептидов различными методами, в частности обработкой бромцианом. Это реагент избирательно расщепляет пептидные связи, в которых участвует остаток карбоксила метионина.

Для характеристики их чередования по длине α -полипептида в целом должно быть проведено дополнительное исследование. Оно базируется на том, что α -пептиды коллагена, а также изолированные бромцианом фрагменты, обладают способностью объединяться в трехцепочечные молекулы, а последние в кислой среде в присутствии аденозинтрифосфата (АТФ) укладываются параллельно друг другу, образуя агрегаты, именуемые сегментами с длинными периодами (СДП).

Полипептидные цепи, выделяемые из молекул тропоколлагена, или их надмолекулярных, упорядоченных структурных элементов разных уровней, обладают настолько интенсивной способностью к агрегации, что в водной среде изолированные полипептиды приходится изучать лишь при повышенной температуре.

Структуры молекул тропоколлагена и коллагена близки. Поэтому при определении целесообразно использовать наряду с растворами упорядоченные, надмолекулярные агрегаты, в которых простейшие частицы белка ориентированы параллельно друг другу. Такую структуру имеют коллагеновые сухожилия, а также изолированные волокна дермы. Типичные параметры молекул тропоколлагена приводятся в табл. 3.

Таблица 3
Типичные структурные параметры молекул тропоколлагена

Показатель	Метод исследования	Типичные значения
1	2	3
молекулярная масса	седиментация	50 000-350 000
α к	веторассеяние	80 000-350 000
	вулучепреломлений потоке	90 000-350 000
	смометрия	10 000
длинастиц, нм	веторассеяние	10-320
»	»	»
»	искозиметрия ультрацентрифугирование	76-297
»	»	»
»	вулучепреломлений потоке	86-296

1	2	3
Диаметр частиц, нм	Светорассеяние	1,33-1,53
» » »	Вискозиметрия и ультрацентрифугирование	1,20-1,53
» » »	Двулучепреломление в потоке	1,35
Плотность, г.см ³	Пикнометрия	1,55
Изoeлектрическая точка (pH)	Потенциометрическое титрование	7,7 ± 0,8
Характеристическая вязкость [η], дл/г	Вискозиметрия	11,5-17,0
Удельное вращение раствора $[\alpha]_D^{20}$	Поляриметрия	От -345 до -415
Волновое число амида А ИК - спектра, см ⁻¹	ИК - спектроскопия	3330
Основной меридиональный рефлекс на рентгенограмме, нм	Рентгенография под большими углами	0,29
Основной экваториальный рефлекс на рентгенограмме, нм	То же (сухой препарат)	0,9
То же	То же (обводненный препарат)	1,2-1,6
Температура денатурации тропоколлагена в воде	Вискозиметрия и поляриметрия	36

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А.с. СССР №1762196, Способ люминесцентного определения содержания оксида хрома в кожевенном полуфабрикате// Кумеков С.Е., Сыргалиев Е.О., 1992, бюл. «Открытия, изобретения», № 34
2. А.с. СССР №1733985. Способ определения содержания жира в кожевенном материале// Кумеков С.Е., Сыргалиев Е.О., 1992, бюл. «Открытия, изобретения», № 18
3. Павлова М.С. Экологический аспект химической технологии кожи//М.:МГАЛП, 1997, 191 с.
4. Михайлов А.Н. Коллаген кожного покрова и основы его переработки. М.: Легкая индустрия, 1971
5. Сыргалиев Е.О. Фотолюминесценция твердых полимерных материалов на основе нативного и модифицированного ионами хрома коллагена// Дисс. канд. физ.-мат. наук, Алматы, ФТИ НАН РК, 112 с.

Таразский государственный университет им. М.Х. Дулати

**БЫЛҒАРЫ ҚАЛДЫҚТАРЫНЫҢ ҚҰРАМЫН
АНЫҚТАУДЫҢ ТЕОРИЯЛЫҚ НЕГІЗДЕРІНІҢ КЕЙБІР
АСПЕКТІЛЕРІ**

Физ-мат.ғыл.канд	Е.О.Сыргалиев
Техн.ғыл.докторы	К.К.Бейсеуов
	Г.Н.Середин

Жұмыста былғары қалдықтарының негізін қурайтын өзен коллагенінің сипаттамаларының теориялық негіздері келтірілген.