

А. Г. ДАНИЛКОВИЧ, д-р техн. наук, професор,
В. І. ЛІЩУК, канд. техн. наук, професор
 (Київський національний університет технологій та дизайну)
О. Г. ЖИГОЦЬКИЙ, к.х.н., с.н.с.
 (Інститут проблем матеріалознавства імені І. М. Францевича НАН України)

Структура і хімічна активність колагену та кератину в технологічних процесах

Для розроблення нових технологій обробки шкіряної та хутрової сировини необхідне глибоке розуміння особливостей структури і хімічного складу колагену й кератину та доступності реагентів щодо елементів різного рівня структури для ефективного проведення полістадійних процесів формування шкіряних і хутрових матеріалів. Оскільки під час будь-якої обробки сировини реагенти діють одночасно на колаген та кератин, суттєво важливо розглянути їхню хімічну структуру. Колаген шкур тварин волокнистої структури є основою шкіряної та хутрової сировини і становить 90 % сухої маси дерми. При цьому як колаген, так і кератин відзначаються надзвичайно складною ієрархічною організацією елементів структури і відповідно важко прогнозуємою хімічною активністю на різних стадіях переробки сировини.

Об'єкти та методи дослідження

У хімічному відношенні колаген як біополімер амфотерної природи синтезується в тканинах живих істот з певною послідовністю амінокислотних залишків і відзначається складною багаторівневою структурою [1, 2] (табл. 1). На молекулярному рівні поліпептидні ланцюги $\alpha 1(I)$ і $\alpha 2$ утворюють макромолекули, причому $\alpha 1(I)$ повторюється двічі [3]. Кожний поліпептидний ланцюг, розташований від інших на відстані 0,4 нм, утворює спіраль, завиту ліворуч з трьома амінокислотними залишками на один крок (тріада) і радіанним кутом $2/3 \pi$ [4]. Всі тріади розпочинаються з гліцину. В свою чергу, макромолекули скручено у протилежний бік з десятима тріадами амінокислотних залишків на один крок. При цьому активні групи бокових радикалів амінокислотних залишків мають віяльне розташування навколо своєї гвинтової лінії з кутом нахилу щодо площини поперечного перерізу 64° і діаметром близько 0,14 нм.

Структура поліпептидних ланцюгів колагенової молекули $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2$ [5] має послідовності як амінокислотних залишків в тріадах з частою присутністю проліну та гідрокси-проліну в кристалічних ділянках структури, що можна віднести до гідрофобних, так і амінокислотних залишків з постійно відновлюваними зв'язками за участю груп основного і кислотного характеру – глютаміновою кислотою та лізином чи аргініном тощо в амфотерних ділянках, що належать до гідрофільних. При цьому, амінокислотні залишки колагену мають як стабілізуючий вплив на спіраль, так і дестабілізуючий, який залежить від хімічної природи радикалу амінокислоти (табл. 2).

Дестабілізуюча дія амінокислотних залишків кислотного і основного характеру виявляється залежно від величини заряду бокових груп, коли сили відштовхування однойменних зарядів переважають стабілізуючі водневі зв'язки [6]. В зв'язку з цим структура нативного колагену за звичайних умов перебуває в лабільному стані. Про це свідчить планарна конфігурація пептидних зв'язків [7, 8], що зумовлена поворотом навколо осі $C\alpha-N$ -зв'язку на кут ϕ та поворотом $C\alpha-C$ -зв'язку на кут ψ у разі обертання за годинниковою стрілкою під час спостереження від $C\alpha$ атома, причому кут повороту зв'язку атомів $C-N$ дорівнює нулю.

Внаслідок стеричних обмежень під час взаємодії бокових радикалів амінокислотних залишків фактично реалізується тільки близько 15 % можливих значень кутів ϕ і ψ , які визначають просторове розміщення поліпептидних ланцюгів. Денатурація колагену призводить до зменшення кутів із відповідним збільшенням діаметрів мікрофібрил.

Тому в технологічних процесах для запобігання незворотним структурним процесам необхідно прецизійно контролювати температурний режим виробничих обробок.

На мікрофібрилярному рівні значне число гідрофільних груп бере участь в процесах гідрації й можливі також взаємодії з рештою реагентів. Це добре видно з фрагмента мікрофібрили (табл. 3), де наведено ділянку пентаметра мікрофібрили з позначеннями стабільних ділянок лініями ліворуч, карбоксилостітських амінокислотних залишків (**жирним шрифтом**) і амінокислотних залишків основного характеру (*курсивом*). Ці групи розташовуються в аморфних нестабільних ділянках колагенових молекул.

З табл.3 видно, що незалежно від знаку заряду тріади мікрофібрили, їхня локалізація зарядів відбувається в структурно слабких місцях пентаметра. Такі ділянки виникають в центрах зосередження позитивних і негативних зарядів бокових радикалів амінокислотних залишків колагену, що асиметрично надбудовуються над поліпептидним ланцюгом через різної довжини бокових радикалів і створюють аморфні ділянки структури мікрофібрил.

ТАБЛИЦЯ 1 – Коротка характеристика рівнів структури колагену

Структура		Ознаки структури
рівень	назва	
1	Поліпептидна	Амінокислотні залишки розташовані послідовно в поліпептидних ланцюгах у визначеному порядку
2	Спіральна	Утворена поліпептидними ланцюгами, в якій амінокислотні залишки розташовано радіально вісі спіралі, скручені ліворуч з періодом в три амінокислотних залишки на один виток (крок)
3	Молекулярна	Складається з трьох спіралей, що скручені праворуч, довжиною близько 300 нм і діаметром 1,5 нм
4	Надмолекулярна	Мікрофібрили з п'яти макромолекул діаметром 3...5 нм, від 900 до 2000, об'єднуються в фібрили діаметром 50...200 нм
5	Надфібрилярна	Утворена з 900...1000 фібрил діаметром 5-10 ³ нм з послідовним об'єднанням в елементарні волокна (30...300) діаметром 0,2-10 ⁶ нм
6	Дерма	Елементарні волокна переплітаються з утворенням пучків, які втрачають паралельність, орієнтуючись в різних напрямках

ТАБЛИЦЯ 2 – Вплив амінокислот на активність поліпептидного ланцюга

Стабілізуючий вплив амінокислоти		Дестабілізуючий вплив амінокислоти	
назва	позначення за ІЮПАК	назва	позначення за ІЮПАК
Аланін	A	Гліцин	G
Валін	V	Глутамінова кислота	E
Лейцин	L	Аспарагінова кислота	D
Ізолейцин	I	Аргінін	R
Метіонін	M	Лізин	K
Фенілаланін	F	Треонін	T
Гістидин	H	Тірозин	Y
Глутамін	Q	Серин	S
Пролін	P	Гідроксилізин	K'
Аспарагін	N	Гідроксипролін	P'

Примітка. Позначення K' і P' введено додатково авторами.

Як і в поліпептидному зв'язку, так і між атомами бокових радикалів містяться позитивні й негативні носії зарядів, що постійно взаємодіють. Заряджені групи сприяють також зовнішній орієнтації бокових радикалів макромолекул колагену в процесі формування фібрил.

На надмолекулярному рівні структури п'ять макромолекул (пентаметр) взаємодіють з сусідніми молекулами колагену з утворенням ковалентних зв'язків із зміщенням однієї молекули відносно сусідньої на відстань періоду D, що відповідає 234 амінокислотним залишкам чи 67 нм [9].

В надфібрилярному рівні фібрили утворюють елементарні волокна і пучки волокон (див.табл. 1). На цьому рівні паралельність волокон порушується з утворенням значної кількості пустот (див.рис. 1) [10], проте хімічні зв'язки між волокнами зберігаються, що забезпечує зв'язність структури дерми.

Таким чином, мікроструктура волокнистого колагену характеризується чергуванням нестабільних і стабільних ділянок макромолекул, що визначається, відповідно, наявністю чи відсутністю електричних зарядів функціональних груп білка, причому розподіл позитивних та негативних зарядів уздовж мікрофібрил є нерівномірним, а відсутність заряду в об'ємі пентаметра спостерігається рідко.

Порівняно з колагеном, кератин суттєво менш гідрофільний [11], незважаючи на те, що має більшу концентрацію полярних груп (див. табл. 4). Це пояснюється наявністю у кератині великої кількості дисульфідних зв'язків між поліпептидними ланцюгами, які стабілізують білкові макромолекули, суттєво меншою доступністю функціональних груп щодо взаємодії з хімічними реагентами. За амінокислотним складом кератин суттєво відрізняється від колагену.



ТАБЛИЦЯ 3 – Ділянка мікрофібрили з можливими зарядами структури

Номер тріади	Номер фрагмента макромолекули, що містить мікрофібрила					Заряд
	1	2	3	4	5	
8	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG	-3, +3
	FFF	EEE	AAL	KKK	PPP	
	QQQ	P'P'P'	P'P'P'	EEE	AAA	
9	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG	+6
	PPP	AAP	PPP	SST	PPP	
	P'P'P'	P'P'A	SSA	KKK	RRR	
10	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG	+9
	EEE	NNS	AAA	PPP	PPP	
	P'P'P'	KKK'	RRR	RRR	P'P'A	
11	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG	-12
	EEE	DDE	EEE	EED	SSP	
	P'P'P'	TTS	RRR	TTQ	AAS	
12	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG	+2
	AAQ	AAN	FFF	PPP	SSP	
	SST	KKL	P'P'P'	AAV	P'P'A	
13	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG	-6, +6
	PPP	EEE	EEE	RRR	KKK	
	MMA	P'P'P'	RRP'	P'P'S	DDI	
14	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG	-2, +1
	PPA	PPA	VVA	EES	LLR	
	RRR	TTV	EEA	VVT	NNI	
15	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG	-
	PPP	IIQ	PPP	PPA	LLQ	
	P'P'P'	QQP'	P'P'T	P'P'S	P'P'P'	
16	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG	-
	PPP	PPP	PPP	PPP	PPP	
	P'P'P'	P'P'P'	AAI	P'P'P'	IIA	

Так, вміст дестабілізуючих амінокислот – аспарагінової та глютамінової, серину, гліцину більший в 2–4 рази, відповідно. Однак, стабілізуючих амінокислот – аланіну і лейцину менше в 2 та 3 рази. Наявність в кератині значної кількості цистину, що відсутній в колагені, й зумовлює вищу стабільність та меншу хімічну активність кератину.

В кератині, на відміну від колагену, в макромолекулу об'єднується 8 макромолекул, які формують волоссяний покрив. Структура волосу нерівномірна за поперечним перерізом і має найменшу щільність в середині, а найбільшу – в зовнішньому лускатому шарі. Поряд з цим пептидні зв'язки кератину достатньо стійкі проти нетривалого впливу розчинів кислот, особливо за температур, нижчих 40 °C.

Таким чином, кератин характеризується високою щільністю поверхневого шару волосу і відповідно меншою доступністю функціональних груп макромолекул щодо різного типу зовнішніх впливів.

Постановка завдання

Метою роботи є дослідження зв'язку особливостей багаторівневої структури колагену і кератину в технологічних процесах обробки сировини.

Результати та їх обговорення

Протягом всього формування шкіряних і хутрових матеріалів колаген та кератин піддають дії реагентів різної хімічної активності з різними розмірами молекул. На першій стадії технологічного процесу консервована сировина підлягає обробці водними розчинами електролітів. При цьому реагенти з мінімальними розмірами молекул легко дифундують в досить гідрофільну дерму, що містить як розчинні, так і нерозчинні у воді компоненти. Внаслідок початкової обробки дерма шкур тварин за вмістом води наближається до парного стану, з неї видаляються спочатку розчинні білки, а потім, під впливом лужного чи кислотного розчину, – вуглеводневі, жирові речовини тощо. При цьому лужний розчин здатен руйнувати кератин волосу, а у випадку навіть тривалої дії на нього кислотно-сольового розчину, помітних змін не спостерігається.

ТАБЛИЦЯ 4 – Амінокислотний склад колагену та кератину шерсті [11]

Амінокислота	Вміст амінокислот, мол. %				
	Молекула	Шерсть	Кутикула	Епікутикула	Корковий шар
Гліцин	32,85	7,93	9,61	14,27	8,86
Аланін	11,62	4,92	5,66	4,28	5,17
Валін	2,15	5,09	6,59	5,32	5,28
Лейцин	2,46	7,08	5,98	5,07	7,27
Ізолейцин	0,94	2,88	2,53	2,34	3,04
Метіонін	0,62	0,46	0,38	0,03	0,41
Фенілаланін	1,21	2,68	1,86	1,72	2,90
Аспарагінова кислота	2,81	5,87	3,92	5,42	6,29
Глутамінова кислота	4,61	10,98	8,94	9,91	10,81
Аспарагін	1,66	0,00	0,00	0,00	0,00
Глутамін	2,74	0,00	0,00	0,00	0,00
Лізин	2,84	2,82	2,88	4,49	2,65
Гістидін	0,45	0,86	0,96	0,96	0,70
Гідроксилізин	0,59	0,00	0,00	0,00	0,00
Аргінін	5,10	6,30	4,79	3,97	6,34
Серин	3,33	9,45	13,55	12,69	9,57
Треонін	1,60	5,99	4,91	3,34	5,18
Пролін	11,48	5,46	9,29	5,39	5,51
Гідроксипролін	10,48	0,00	0,00	0,00	0,00
Тірозин	0,45	3,66	2,92	1,92	3,89
Цистин	0,00	9,67	14,43	0,31	8,57
Цистеїнова кислота	0,00	0,07	0,36	10,76	0,13
Орнітин*	0,00	0,03	0,17	0,68	0,01
Цитрулін*	0,00	0,04	0,31	0,15	0,00

Примітка. * продукти вторинного перетворення в кератині.

Під час взаємодії колагену з водним розчином реагентів відбувається гідратація його макромолекул. При цьому суттєво і практично лінійно збільшуються міжмолекулярні відстані (рис. 2) [12] в досліджуваному інтервалі обводнення дерми. Збільшення вмісту вологи у колагені дерми супроводжується приростом площі поперечного перерізу фібрил за збереження площі поперечного перерізу молекул. Так, за незмінної довжини мікрофібрил і 60 % вологості площа перерізу фібрил зростає з $7,85 \cdot 10^3$ до $31,4 \cdot 10^3$ nm^2 , при цьому міжмолекулярні проміжки збільшуються до 0,6...0,8 нм, а міжмікрофібрилярні – до 2,74 нм.

Таким чином, водні розчини реагентів активно впливають на структуру колагену, зокрема, на мікрофібрилярному рівні, і тим самим створюють умови для дифузії та ефективної взаємодії реагентів молекул більших розмірів.

Збільшенню міжструктурних відстаней в колагені дерми сприяє кислотно-сольова обробка, за якої відбувається часткова дегідратація поліпептидних ланцюгів макромолекул і зростання міжмолекулярних проміжків, що супроводжується підвищенням доступності функціональних груп колагену щодо взаємодії з реагентами. На відміну від колагену, тривала кислотно-сольова обробка кератину, що необхідна для видалення вуглеводневих сполук з дерми хутрової сировини, не призводить до суттєвих структурних змін волосяного покриву. У шкіряної сировини рафінізація колагену дерми відбувається під час тривалої лужної обробки.

Внаслідок аналізу амінокислотного складу макромолекул колагену в об'ємі 1D ділянки мікрофібрили підраховано кількість можливих хімічних зв'язків за участю неорганічного дубителя (див. рис. 3) [13]. На рис.3 пунктирними лініями показано можливі взаємодії між найактивнішими карбоксильними групами макромолекул колагену і гідроксосульфатохромовими комплексами (ГСХК) з розміром молекул 0,6 нм (див. рис. 4) [14].

При цьому можливі утворення зв'язків трьох типів:

1 – між сусідніми поліпептидними спіралями, триади амінокислотних залишків яких розташовані на одному чи в сусідніх рівнях.

2 – між амінокислотними залишками, що належать сусіднім поліпептидним спіралям, проте розташовані через одну-три триади.

3 – між амінокислотними залишками, які розташовано через поліпептидну спіраль на одному рівні та через одну чи дві триади.

Розраховані відстані між іонізованими карбоксильними групами макромолекулу, залежно від типів зв'язків та їхньої кількості в об'ємі 1D ділянки мікрофібрили подано у табл. 5.

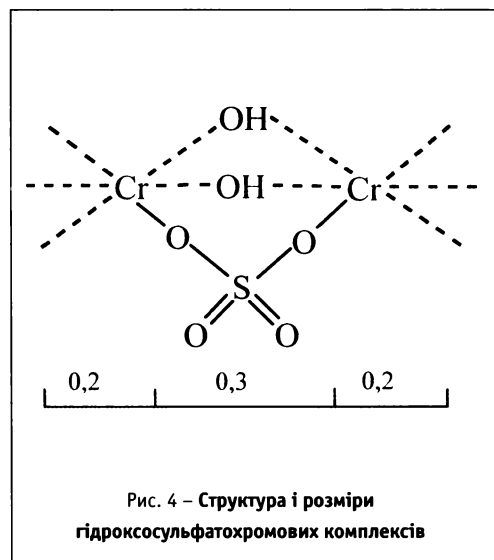
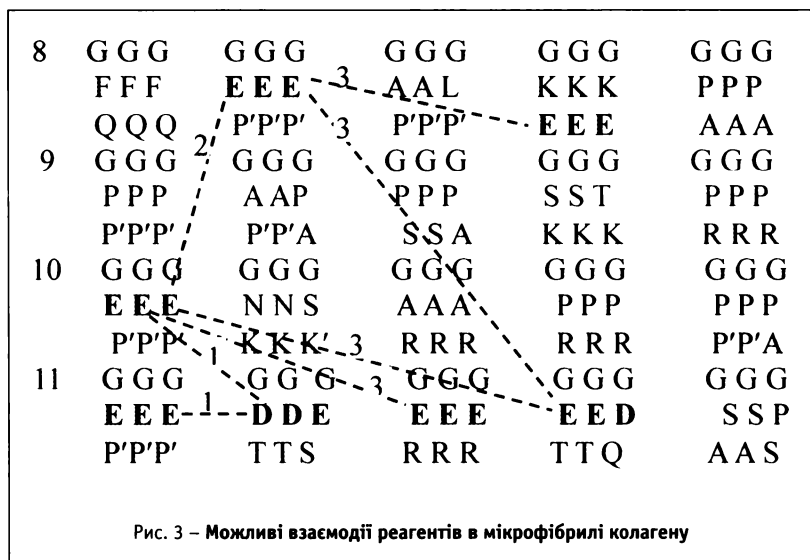
Як видно з даних табл. 5, кількість активних центрів макромолекул колагену, що доступні діядерним ГСХК, достатніми для взаємодії з карбоксильними групами на 1-ій стадії стабілізації структури колагену в еквівалентному їх співвідношенні до атома хрому (III), дорівнює 61 % від загальної кількості іонізованих карбоксильних груп в 1D-об'ємі мікрофібрили – 226, з якими можуть провзаємодіяти всього 113 хромових комплексів. На 2-ій стадії стабілізації структури колагену розміри ГСХК зростають, внаслідок їх гідролізу в разі підлугування середовища. При цьому утворюються між катіонами хрому гідроксомісточки й їм стають доступні карбоксильні групи, що розташовані на відстані 3 і 4 ядерних комплексів, які взаємодіятимуть за допомогою утворення зв'язків 2-го типу.

ТАБЛИЦЯ 5 – Еквівалентна кількість можливих зв'язків в 1D об'ємі мікрофібрили

Тип зв'язку	Відстань, нм	Кількість зв'язків	
		внутрішніх	зовнішніх
1	0,6...0,8	27	42
2	понад 0,8 до 1,4 вкл.	29	54
3	понад 1,4	27	45

ТАБЛИЦЯ 6 – Зміна гідротермічної стійкості колагенату під впливом ГСХК

Витрата ГСХК		Вміст Cr_2O_3 , % від сухого залишку	Гідротермічна стійкість колагену дерми, °C		
Cr_2O_3 , % від маси голини	основністю, %		після стабілізації	через 12 год	після стругання
1,1	34,0	3,47	101,0	105,0	102,0
1,2	42,0	3,78	104,0	107,0	104,0
1,3	34,0	4,12	107,0	111,0	107,0
1,3	26,0	4,89	106,0	113,0	108,0



За таким типом зв'язку можуть вступити у взаємодію з хромовими комплексами ще додатково 22 % карбоксильних груп. І на завершальному етапі 2-ої стадії стабілізації структури колагену, внаслідок подальшої оліфікації хромових комплексів, які знаходяться всередині й на поверхні мікрофібрил, сульфатогрупи продовжують відтіснятися з ближньої сфери хрому та заміщуватись гідроксозв'язками, що призводить до утворення міжструктурних зв'язків 3-го типу.

Як показують розрахунки, за умов 100 %-ної участі у взаємодії карбоксильних груп колагену і зв'язуванні однією карбоксильною групою одного атома хрому необхідно 5,5 г Cr₂O₃ на 100 г колагену. У випадку більшої ядерності ГСХК, які реально утворюються на другому етапі стабілізації структури колагену, кількість зв'язаного хрому зростає.

Експериментальні дослідження гідротермічної стійкості не двоєної голени, обробленої ГСХК з додаванням після кислотно-сольової обробки 0,4 % електролістотійкої емульсії [15], показують (табл. 6), що близько 3,5 % Cr₂O₃ в колагені досить для досягнення температури зварювання вищої, ніж 100° С. За умов експерименту і у досліджених межах основність сульфату хрому майже не впливає на кінцевий наслідок стабілізації структури колагену, хоча зі зниженням основності вміст оксиду хрому (III) в колагені зростає на 17 %, що свідчить про неповну взаємодію основного сульфату хрому з колагеном. При цьому відповідна кількість хромових комплексів може провзаємодіяти з 60...65 % загальної кількості карбоксильних груп в колагені.

Таким чином, аналіз показує, що майже всі карбоксильні групи сприятливо розташовані в колагеновій решітці й більша їхня частина доступна на 1-ій стадії взаємодії для діядерних гідроксосульфатохромових комплексів. Решта карбоксильних груп макромолекул колагену можуть з'єднуватись хромовими комплексами вищої ядерності на 2-ій стадії стабілізації його структури зв'язками 2-го та 3-го типу.

ВИСНОВКИ

1. Як колаген, так і кератин, завдяки присутності функціональних груп кислотного та основного характеру, мають потенційну здатність до взаємодії з різними реагентами, однак для її реалізації необхідно створювати певні технологічні умови завдяки підготовці колагенової та кератинової структур для доступності активних груп білків до відповідних реагентів.

2. В технологіях переробки шкіряної та хутрової сировини колаген має мобільнішу структурну організацію, тому виявляє підвищену активність і варіювання комплексу експлуатаційних властивостей шкіряних матеріалів різного призначення.

3. Розрахунки доступності функціональних груп макромолекул колагену після рафінізації дерми показують, що активні групи сприятливо розташовані й потенційно доступні для хімічних реагентів. Зокрема, відстані між групами кислотного і основного характеру в мікрофібрилах 6-8 А забезпечують ефективну взаємодію колагену з гідроксосульфатохромовими комплексами розміром 6 А з 60-65 % карбоксильних груп.

4. У разі розроблення нових технологій з ефективним проведенням колоїдно-хімічних процесів необхідно враховувати особливості структури колагену та кератину, доступність і активність функціональних груп макромолекул щодо хімічних реагентів, цілеспрямоване регулювання режимом технологічних обробок для їхнього прогнозування у виробництві шкіряних та хутрових матеріалів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Reich G. Collagen report : A Review about the present State // *Das Leder*. – 1995. – № 46. – S. 192 – 199.
2. Lischuk V. I. The study of corium collagen physical – chemical transformation in hide and leather making up / V. I. Lischuk, A. G. Danilovich, O. G. Zhyhotskyi // *III International Scientific Conference : Light industry – Fibrous Materials*. 17 – 18.11.2005, Radom, 2005. – P. 187 – 194.
3. Ramachandran G.N., Reddi A.H. *Biochemistry of collagen*. – N. – Y. and London: Plenum Press, 1976. – 536 p.
4. Шерман С.А., Андрианов А.М., Ахрем А.А. Конформационний аналіз і установлення просторової структури білкових молекул. – Мінск: Наука і техніка, 1989. – 240 с.
5. *Основи біохімії: В 3 – х томах / А.Уайт, Ф.Хендлер, Э.Смит і др.; пер. с англ.* – М.: Мир, 1981. – 1878 с.
6. Якубе Х. – Д., Ешквіт Х. *Аминокислоти. Пептиди. Білки / Пер. с нем.* – М.: Мир, 1985. – 456 с.
7. Ramachandran G.N., Sasisekharan V. *Conformation of polypeptides and proteins // Adv. Protein Chem.* – N. – Y. and London: Acad.press. – 1968. – Vol.23. – P. 83 – 438.
8. Venkatachalan C.M., Ramachandran G.N. *Conformation of polypeptide chains // Ann. Rev. Biochem.* – Calif.: Annual reviews, inc. – 1969. – Vol. 38. – P. 45 – 82.
9. Никитин В.Н., Перский Е.Э., Утеская Л.А. *Возрастная и эволюционная биохимия коллагеновых структур.* – К.: Наукова думка. – 1977. – 280 с.
10. Михайлов А.Н. *Химия и физика коллагена кожного покрова.* – М.: Легкая инд., 1980. – 231, [1] с.
11. *Proceedings of the fourth International Wool Textile Research Conference.* – Berkeley, Calif., August 18 – 27, 1970 // *Appl. polym. symp., Part I: Cematic Structure, Properties and Processes.* – 1971. – N. 18. – 742 p.
12. Heidermann E. *Überlegungen, wie die Massen von Gerbstoffen und Fetten in der Kollagenstruktur eingelagert werden. Das Leder*, 1995, 46, 149 – 154.
13. Heidemann E. *Eine erweiterte Theorie der Kochfesten Gerbung, Lokalisation im Kollagen. Das Leder*, 1994, 45, 2–12.
14. Данилович А.Г. *Ефективність використання колагену при його структуруванні // Вісник Київського націон. унів. технологій та дизайну.* – 2002. – № 1. – С. 182 – 185.
15. Данилович А.Г., Петрань А.Г. *Розробка маловідходної технології дублення не двоєної голени та її базатокритеріальна оптимізація // Вісник Держав. акад. легкой пром. України.* – 1999. – № 2. – С. 135 – 139.

Одержано 12.04.2011