

REFRIGERATION, FREEZING AND THAWING

THE XXth EUROPEAN MEETING OF MEAT RESEARCH INSTITUTES
 THE ALL-UNION RESEARCH INSTITUTE OF MEAT INDUSTRY USSR
 A COMPARATIVE STUDY OF FIBRILLAR AND SOLUBLE COLLAGEN BY MEANS
 OF INFRA-RED SPECTROMETRY
 V.M.GORBATOV, O.O.BABLOYAN, M.A.BORISOVA, L.R.KOMISSAROVA, P.M.GO-
 LOVANOVA

SUMMARY

IR-spectrometric studies of native fibrillar collagen (NFC), native soluble collagen-tropocollagen (TC) and its solubilization products in the acid medium after preliminary alkali-salt (ASSC) and enzymic (ESC) treatment showed that:

- in the field of oscillations - C=O - group (amide I), all the samples had broadened bands which were split into a number of components of different intensities, this indicating a high degree of protein structure ordering;
- ASCC and ESC, in contrast to NFC and TC, revealed a low-frequency shift by 20 cm^{-1} in the field of the amide I band, this evidencing a greater number of hydrogen bonds in which the peptide groups of the treated protein took part;
- spectral data within $3,000\text{--}4,000 \text{ cm}^{-1}$ indicated a greater part of hydrogen-bound hydroxyls in ASCC and ESC.

It is concluded that both treatments - not onahging considerably collagen native structure - contribute to greater looseness and hydration of collagen fibers, this rendering ASCC and ESC more suitable for practical purposes.

RESUME

L'examen par la méthode d'IR-spectrométrie du collagène fibrillaire natif (CFN), du collagène natif soluble - tropocollagène (TC) et des produits de sa dissolution (PDC) dans le milieu acide après les traitements acido-basique et enzymatique préalables a montré:

- dans le domaines des variations - C=O - du groupe (amide I) tous les échantillons ont des bandes élargies et disloquées en une série de composants de différentes intensité ce qui qualifie un haut degré de la régularité de la structure de la protéine;

- on observe un déplacement de basse fréquence de 20 cm^{-1} dans la région (amide I) chez PDC et chez le collagène soluble par voie de fermentation (CSF) à la différence de CFN et de TC, ce qui témoigne d'un grand nombre de liaisons hydrogéniques où participent de groupes peptides de la protéine traitée;

- les données de l'analyse spectrale dans la région de $3000\text{--}4000 \text{ cm}^{-1}$ témoignent d'un grand taux d'hydroxyles hydrogéniques liés chez PDC et chez CSF.

La conclusion est que deux genres de traitements sans changer substantiellement la structure native du collagène contribuent à la friabilité et à l'hydration de ses fibres ce qui permet l'utilisation plus large dans la pratique de PDC et de CSF.

DER XX. EUROPÄISCHE KONGRESS DER FLEISCHFORSCHUNGSGESELLSCHAFT
 ALLUNIONS-FORSCHUNGSGESELLSCHAFT DER FLEISCHWIRTSCHAFT, UDSSR
 VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNG DES FIBRILLÄREN UND LÖSLICHEN KOLLAGENS MIT INFRAROT-SPEKTROMETRIE
 W.M.GORBATOW, O.O.BABLOJAN, M.A.BORISSOWA, L.P.KOMISSAROVA, P.M.GO-
 LOVANOVA

ZUSAMMENFASSUNG

Mit Infrarot-Spektrometrie wurden das fibrilläre Rohkollagen (NFK), das lösliche Rohkollagen Tropokollagen (TK) sowie die Produkte der Auflösung dieses Eiweißes im saueren Milieu nach vorheriger Alkali-Salz- (PRK) und Fermentenbehandlung (FRK) untersucht. Es wurde folgendes festgestellt:

- im Schwingungsbereich der C=O-Gruppe (Amid I) sind die Streifen bei allen Mustern ausgedehnt und zu Komponenten verschiedener Intensität gespalten, was von einem hohen Grad der Eiweißstrukturregelung zeugt;
- zum Unterschied von NFK und TK wurde bei PRK und FRK eine Niederkreuzverschiebung um 20 cm^{-1} im Spektralbereich von Amid I beobachtet, was von einer höheren Zahl der Wasserstoffbindungen mit Peptidgruppierungen des behandelten Eiweißes zeugt;
- die Spektralangaben im Bereich von $3000\text{--}4000 \text{ cm}^{-1}$ weisen auf einen höheren Anteil an wasserstoffgebundenen Hydroxylen bei PRK und FRK hin;

Es wurde gefolgert, daß beide Behandlungsarten zur größeren Auflockerung und Bewässerung von Kollagenfasern ohne wesentliche Änderung der Nativstruktur des Kollagens beitragen, was PRK und FRK für praktische Ausnutzung besonders geeignet macht.

XX ЕВРОПЕЙСКИЙ КОНГРЕСС РАБОТНИКОВ НИИ МЯСНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ
 ВСЕСОЮЗНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
 МЯСНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ СССР
 СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФИБРИЛЛАРНОГО И РАСТВОРИМОГО КОЛЛАГЕНА
 МЕТОДОМ ИНФРА-КРАСНОЙ СПЕКТРОМЕТРИИ
 В.М.ГОРБАТОВ, О.О.БАБЛОЯН, М.А.БОРИСОВА, Л.Р.КОМИССАРОВА, П.М.ГО-
 ЛОВАНОВА

АННОТАЦИЯ

Исследования методом ИКспектрометрии нативного фибрillярного коллагена (НФК), нативного растворимого коллагена - тропоколлагена (ТК) и продуктов растворения этого белка в кислой среде после предварительных щелочно-солевой (ПРК) и ферментной (ФРК) обработок показали:

- в области колебаний - C=O - группы (амид I) у всех образцов полосы уширены и расщеплены на ряд компонентов различной интенсивности, что указывает на высокую степень упорядоченности структуры белка;

- у ПРК и ФРК, в отличие от НФК и ТК, в области полосы амид I наблюдается низкочастотный сдвиг на 20 см^{-1} , что свидетельствует о большем числе водородных связей, в которых участвуют пептидные группировки обработанного белка;

- спектральные данные в области $3000\text{--}4000 \text{ см}^{-1}$ указывают на большую долю водородно-связанных гидроксилов у ПРК и ФРК.

Сделан вывод, что оба вида обработки, не изменяя существенно нативной структуры коллагена, способствуют большей разрыхленности и обводненности его волокон, что делает ПРК и ФРК более пригодными для использования в практических целях.

REFRIGERATION, FREEZING AND THAWING

В последнее время в пищевой промышленности и медицине применяют разнообразные искусственные коллагенсодержащие материалы. Для разработки рациональной технологии их получения большое значение приобретает исследование структуры и свойств коллагена в конденсированном и растворимом состояниях.

В белковой химии в качестве структурно-аналитического метода все чаще пользуются методом ИК-спектроскопии [1]. Метод основан на том, что под влиянием инфракрасного света происходит изменение дипольного момента при колебаниях систем атомов в молекуле и, следовательно, поглощение излучения [2]. Причем, для каждой отдельной системы атомов характерна определенная частота излучения, так называемая "характеристическая". Характеристические частоты в ИК-области зависят от массы атомов, геометрии молекул и сил, удерживающих колеблющиеся атомы в молекуле в положении равновесия [2]. Поэтому они чувствительны к изменениям в структуре молекул, принимая большие или меньшие числовые значения. В инфракрасных спектрах полипептидов и белков проявляется несколько относительно сильных полос поглощения, которые мало изменяются по частоте и интенсивности от одного образца к другому. Эти полосы обычно относятся к колебаниям пептидной группы — CONH , которая является общим структурным элементом для всех молекул данного типа. Эти полосы относительно устойчивы при переходе от одного белка к другому и от одной конформации к другой. Однако это не означает, что положения частот (или их интенсивности) вообще не меняются. Наблюдаемые изменения используются для определения структуры и конформации исследуемого образца. Известно [3, 4/следующее]:

— в спектре сильно разбавленных растворов белка, при отсутствии водородной связи между молекулами, наблюдается четкая полоса $3400-3460 \text{ см}^{-1}$, которая легко может быть отнесена к чисто валентному^{x)} колебанию NH -группы на основании сравнения со спектрами молекул с подобной структурой и смещений рассматриваемой полосы при дейтерировании. При образовании водородной связи полоса смещается в область $3120-3330 \text{ см}^{-1}$. Эта полоса называется — амид A;

^{x)} Колебания в направлении связи между атомами называются валентными, а перпендикулярно к ней — деформационными.

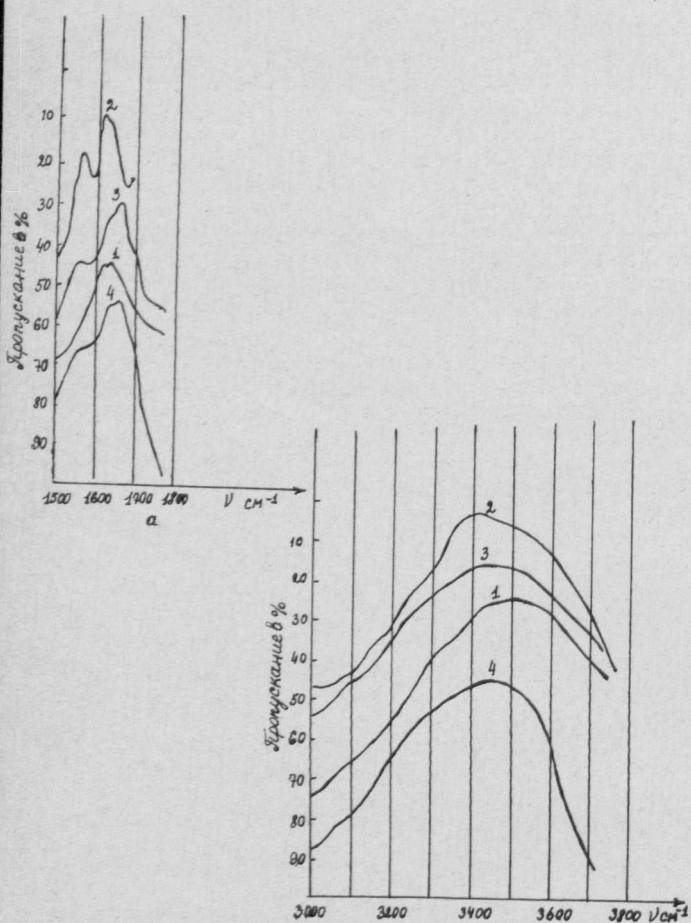


Рис. 1а, б. ИК-спектры таблетированных образцов коллагена:
1 — ПРК; 2 — ФРК; 3 — ТК; 4 — НФК

— в области $1600-1700 \text{ см}^{-1}$ — проявляется сильная полоса, которая относится к валентному колебанию группы C=O и называется — амид I;

— третья, хорошо изученная характеристическая полоса в спектре белков, лежит вблизи $1510-1570 \text{ см}^{-1}$ и называется — амид II. Она в основном определена деформационным колебанием связи N-H . При оценке структуры белковых молекул существенным является также положение полос OH -групп, свободных и участвующих в образовании H-связей , поскольку гидроксильные группы оксиаминокислот и структурно-связанной воды участвуют в стабилизации молекулярной и надмолекулярной организации протеина. Не участвующие в H-связях , OH -группы обусловливают проявление в ИК-спектрах полосы 3610 см^{-1} , в то время как водородно-связанные OH -группы поглощают в области $3400-3500 \text{ см}^{-1}$ [5, 6].

В работе проводилось сравнительное исследование методом ИК-спектроскопии нативного фибрillярного коллагена (НФК), нативного растворимого коллагена — тропоколлагена (ТК) и искусственных продуктов растворения этого белка, полученных после предварительной щелочно-солевой (ПРК) и ферментативной (ФРК) обработок кислой среде. Препараты исходного сырья получены путем высушивания в органическом растворителе (ацетоне) предварительно очищенных, обезжиренных и разволокненных сухожилий крупного рогатого скота. Тропоколлаген получен из дермы теленка по методу В.Н.Ореховича [7].

ИК-спектры коллагена в виде таблеток, спрессованных с КВт, представлены на рис. 1. Полосы амид I в всех образцах белка уширены и состоят из нескольких различных по частоте и интенсивности компонентов. Это свидетельствует о том, что данные полосы обусловлены поглощением C=O групп, связанных водородной связью в процессе образования регулярной структуры, так как расщепление полосы амид I происходит в результате специфического взаимодействия между соседними пептидными группами, а уширение — в результате образования водородной связи [3, 6]. Положение полосы амид I у ТК и НФК одинаково, что указывает на идентичную молекулярную организацию этих белков, в то время как эта же полоса у ПРК и ФРК одинаково сдвигнута на 30 см^{-1} в низкочастотную область. Известно [3, 6], что полосы валентных колебаний сдвигаются в низкочастотную область при образовании водородных связей. Следовательно, оба вида обработки несколько изменяют третичную структуру

^{x)} Здесь и на других рисунках спектры сдвинуты по интенсивности относительно оси абсцисс в целях их лучшего рассмотрения.

коллагена, способствуя появлению дополнительных водородных связей, в которых участвуют пептидные группы белка. Несколько однотипно воздействие на НФК предварительной щелочно-солевой и ферментативной обработок позволяет судить ИК-спектры в области валентных колебаний NH -групп (полоса амид A), так как известно [3], что смещения полос, связанных с группами, являющимися донорами протонов (группы NH и OH), обычно больше, чем смещение полос, связанных с группами — акцепторами протонов (группа C=O). Необходимо отметить, что в области $3000-3600 \text{ см}^{-1}$ кроме NH -групп, поглощают также гидроксили, свободные водородно-связанные, а также структурная вода, наличие и необходимость которой в нативном коллагене в настолько время не вызывает сомнений [8, 9]. Это усложняет интерпретацию ИК-спектров в данном интервале частот, так как вследствие частичного наложения друг на друга полосы плохо разрешены. Однако некоторые сравнительные выводы можно сделать.

Спектры ТК и НФК в области $3000-3600 \text{ см}^{-1}$ так же, как и в области колебания амид I, идентичны. Развивается плеcho 3340 см^{-1} , которое обусловлено поглощением NH -групп, участвующих в образовании водородной связи, и широкая полоса $3450-3550 \text{ см}^{-1}$ гидроксильных групп оксиаминокислот и структурно-связанной воды. На спектре ПРК и ФРК различаются те же полосы по частоте, но соотношение интенсивностей меняется. Возрастает доля OH -групп и структурной воды. Причем, ФРК отличается тем, что общий высокочастотный сдвиг спектра в области $3300-3600 \text{ см}^{-1}$ значительно меньше, чем у ПРК; максимум приходится на 3400 см^{-1} , а не на 3500 см^{-1} , и доля полосы 3340 см^{-1} значительно больше, чем у ПРК. Таким образом спектр в этом диапазоне частот позволяет предположить, что ферментативное воздействие меньше затрагивает "кристалличность", упорядоченность молекулы коллагена, хотя и оно приводит к увеличению ее разрушенности и обводненности.

Кроме таблеток, в ИК-области исследовали пленки, отлитые из ПРК и ФРК. Эти образцы более удобны для спектрального анализа, так как тонкие пленки (20 мк) дают лучшее разрешение спектров. Спектры пленок ПРК и ФРК существенно отличаются по расположению и интенсивности полос амид II, рис. 2а. У ПРК полоса амид II сдвинута в высокочастотную область по сравнению с ФРК на 40 см^{-1} , в результате чего происходит глубокое перекрывание полос амид I и амид II. Наблюдаемый высокочастотный сдвиг свидетельствует об уча-

REFRIGERATION, FREEZING AND THAWING

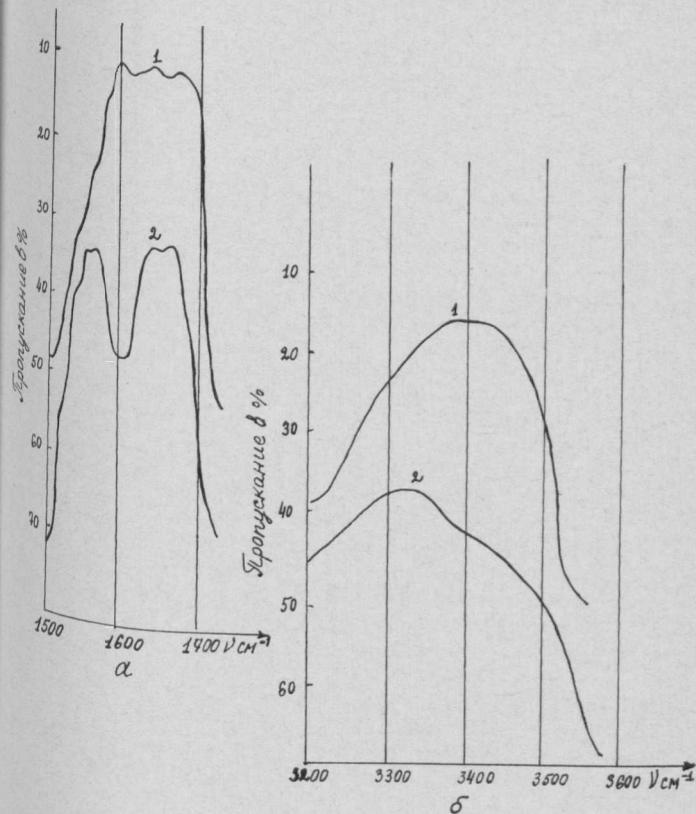


Рис. 2а, б. ИК-спектры пленок коллагена:
1 - ПРК; 2 - ФРК

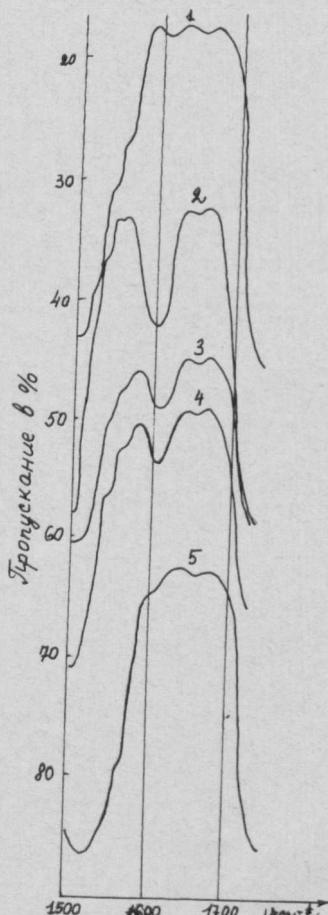


Рис. 3. ИК-спектры пленок коллагена:
3 - ПРК+ПВС; 4 - ФРК+ПВС; 5 - ФРК+глиоксаль

стии НН-групп в образовании водородных связей, так как известно /3/, что при этом полосы деформационных колебаний сдвигаются в область более высоких частот. На вопрос, какие это водородные связи с участием НН-групп - стабилизирующие или разрывляющие молекулу коллагена, помогают ответить спектры в области колебания амид А, рис. 2б. У ПРК спектр в этой области сдвигнут в сторону высоких частот с увеличением доли поглощения ОН-групп и структурной воды, в то время как у ФРК преобладает "кристаллическая", упорядоченная структура с поглощением при 3340 см^{-1} . Следовательно, и в данном случае мы сталкиваемся с более глубоким разрывляющим воздействием щелочно-солевой обработки по сравнению с ферментативной.

В свете различия щелочно-солевого и ферментативного влияния на нативный фибрillлярный коллаген интересны данные по взаимодействию ПРК и ФРК с поливиниловым спиртом (ПВС). Обычно ПВС употребляется как наполнитель, не оказывая влияния на структуру белка/10/. В случае воздействия ПВС на ПРК существенной разницы в спектрах не наблюдается, рис. 3. Однако при воздействии поливиниловым спиртом на препараты ФРК наблюдается высокочастотный сдвиг полосы амид II на $25-30 \text{ см}^{-1}$. О направлении изменения структуры белка в данном случае нам помогает судить однозначность изменения характеристической частоты в области полосы амид II как при обработке поливиниловым спиртом, так и глиоксалием, который обычно выступает как дубитель //II/, делающий молекулу ФРК более жесткой. Следовательно и ПВС в данном случае играет роль дубителя, своими гидроксилиами стабилизирующего молекулу ферментативно-растворимого коллагена.

Таким образом, в результате проведенного исследования мы можем заключить, что при воздействии щелочно-солевой и ферментативной обработок на НФК:

- происходят изменения в молекулярной (третичной) структуре НФК, которые приводят к некоторой разрывленности его молекул и увеличению доли структурно-связанной воды;

- глубоких конформационных изменений, которые сопровождались бы потерей "кристалличности" структуры ни в одном из изученных образцов не наблюдается;

- при щелочно-солевой обработке происходят более значительные нарушения третичной структуры белка, приводящие к частичному разрыву водородных и ковалентных связей, стабилизирующих молекулу, нарушение внутримолекулярного электростатического режима и сопровождающиеся увеличением доли структурной воды за счет ее дополнительного связывания при участии освободившихся COOH и OH групп. Дополнительное число доступных COOH и OH групп возникает при дезамидировании под действием едкого натра амидов дикарбоновых кислот, входящих в состав белка, а также в результате отщепления связанных с коллагеном аминосахаров и гексоз //II/;

- ферментативное воздействие, приводящее к отщеплению телопептидов, оказывается более мягким и вызывает меньшее разрывление молекул. Метод ИК-спектроскопии подтверждает, что при такой обработке основная спиральная часть структуры молекул остается неизмененной. Некоторое более глубокое нарушение молекулярной структуры коллагена, сопровождающееся увеличением обводненности белка, обусловлено, вероятно, влиянием соляной кислоты, в среде которой происходит ферментативный гидролиз.

ЛИТЕРАТУРА

- Чиргадзе Ю.Н. ИК-спектроскопия полипептидов и белков. "Молекулярная биология", I, М., ВИНИТИ, 1973.
- Герцберг Г. Колебательные и вращательные спектры многоатомных молекул. ИЛ. М., 1949.
- Сузи Г. Инфракрасные спектры биологических макромолекул и модельных соединений. "Структура и стабильность биологических макромолекул", У. М., "Мир", 1973, 481.
- Кобяков В.В. Происхождение полос поглощения α , β и неупорядоченных конформаций полипептидных цепей в области частот колебаний НН. "Свойства и функции макромолекул и макромолекулярных систем". М., "Наука", 1969.
- Беллами Л. Инфракрасные спектры сложных молекул. ИЛ, М., 1969, 135.
- Пиментел Д., Мак-Келлан О. Водородная связь. М., "Мир", 1964.
- Орехович В.Н., Тустансовский А.А. Биохимия, 13, 1948, 55.
- Есипова Н.Г., Туманян В.Г. ДАН СССР, 222, I, 1973.