

Влияние щелочных обработок на термодинамические величины перехода "порядок-беспорядок" в коллагене.

О. О. РАДЛОВИЧ

Всесоюзный научно-исследовательский институт мясной промышленности, Москва, СССР

Процесс тепловой денатурации коллагена сопровождается поглощением тепла, связан с разрушением вторичной и третичной структуры и в количественной форме характеризуется термодинамическими параметрами, для измерения которых применяются высокочувствительные микрокалориметры.

Энергетические особенности поведения коллагена при нагревании, и прежде всего, наличие нескольких небольших по величине эндотермических эффектов не позволяют использовать для их определения серийно выпускаемые установки для дифференциально-термического анализа (ДТА), хотя этот метод является одним из наиболее совершенных при исследовании термических свойств различных материалов.

Поэтому для определения термоэффектов коллагена методом ДТА была собрана установка, оснащенная приставкой для создания заданных давлений газовой фазы в процессе нагревания объекта исследования (1,2). Эта установка расширяла возможности эксперимента и интерпретации термограмм при исследовании процессов поглощения тепла в диапазоне давлений в сфере реакции от 5 мм ртутного столба до 2,5 атм. (3).

Исследования, результаты которых представлены на рис. 1, показали, что нагревание воздушно-сухого коллагена среднего слоя кожи крупного рогатого скота ацетиновой или сульфидной сушки при пониженных давлениях (10-25 мм рт.ст.) дает четыре эндотермических эффекта: при температурах 24-50-160°C из образца уходит гидратная влага, обезвоженный коллаген плавится в интервале 195-226°C, переходит в вязко-текучее состояние при 244-254°C и осмольется с выделением газообразных продуктов термолитизации при 276°C (термограмма I).

При атмосферном давлении порядок протекания термоэффектов сохраняется (термограмма II), однако пик дегидратации (70-120-195°C) увеличивается по площади, а пики плавления, текучести и деструкции - уменьшаются. Одновременно понижаются температуры протекания трех последних эффектов. Температура дегидратации, напротив, повышается, т.к. она зависит от давления, возрастая с повышением последнего.

Понижение температур плавления, текучести и уменьшение величин их тепловых эффектов можно объяснить тем, что в процессе термографирования при атмосферном давлении обезвоживание начинается при более высоких температурах и происходит частичная денатурация коллагена с изменениями в его кристаллической структуре.

При еще более высоких давлениях (2,4 атм) термографирования коллагена изменяется последовательность появления термоэффектов (термограмма III). В этих условиях вначале происходит полная денатурация воздушно-сухого коллагена (пик 91-114°C), после чего следует удаление воды из сваренного коллагена и его деструкция при 251-254°C.

Для определения истинных тепловых эффектов, связанных с переходом "спираль-клубок", термографирование коллагена следует производить при пониженных давлениях и температурах обезвоживания, чтобы исключить или замедлить денатурационные явления. Термографирование под вакуумом предпочтительнее также и потому, что при определении тепловых эффектов в воздушной среде окислительная среда окисляется до двуокиси углерода с экзотермическим эффектом, что может исказить результат собственного теплового эффекта коллагена.

На основании анализа и статистической обработки результатов термографирования установлено, что оптимальными условиями экспрессного определения термических эффектов в воздушно-сухом коллагене являются: нагрев образца со скоростью 10°C в минуту, разрежение 12-25 мм рт.столба, величина навески 40 мг. Для калибровки установки ДТА использовались два вещества особой чистоты - нафталин и фенантрен с удельными теплотами плавления 35,6 и 24,3 кал/г соответственно.

Значения теплот дегидратации, плавления и текучести некоторых образцов исходного и обработанного щелочами коллагена приведены в таблице.

Образец Sample	Тепловой эффект реакции Reaction heat effect		
	дегидратация, ккал/моль воды dehydration, kcal/mol H ₂ O	плавление, кал/г melting, cal/g	текучесть, кал/г fluidity, cal/g
	Необработанная кожа Non-treated derma	20,5±2,12	15,4±1,27
Кожа после 31 суток зольения: Ca(OH) ₂ 12 г/л 31-day limed derma: Ca(OH) ₂ 12 g/l	16,9±1,01	16,1±1,12	9,3±0,47
То же, после 40 суток зольения Do, after 40-day liming	15,7±1,17	16,3±1,00	8,1±0,40
Кожа после щелочно-солевой обработки: Alkali-salt treated derma: NaOH 50 г/л, Na ₂ SO ₄ 140 г/л, 48 ч NaOH 50 g/l, Na ₂ SO ₄ 140 g/l, 48 h	13,6±1,02	16,1±1,17	7,9±0,77
То же, после щелочно-солевой обработки: Do, after alkali-salt treatment: NaOH 100 г/л, Na ₂ SO ₄ 140 г/л, 48 ч NaOH 100 g/l, Na ₂ SO ₄ 140 g/l, 48 h	14,11±1,10	15,2±1,32	4,2±0,31

Из приведенных данных видно, что удельная теплота плавления исследованных нами образцов коллагена колеблется в узких пределах 14-17 кал/г и не зависит от интенсивности разрыхления структуры. Полученные нами величины теплот плавления с помощью экспресс метода ДТА находятся на уровне наиболее надежных литературных данных (4). Исходя из современных представлений о строении коллагена отсутствие статистически достоверной разницы в величине теплоты плавления обработанного щелочами коллагена нативной кожи можно объяснить малой доступностью или высокой устойчивостью упорядоченной спиральной структуры коллагена для щелочей.

Напротив, прослеживается четкая тенденция к снижению величин тепловых эффектов текучести коллагена по мере усиления щелочного воздействия на дерму. Удельная теплота реакции достоверно снижается с величины около 10 кал/г для исходного препарата коллагена до 8 и 4 кал/г соответственно для препаратов коллагена, подготовленных по режимам выплавления желатина или растворения коллагена без нагревания.

Т.о. теплота текучести препаратов коллагена, подготовленных к растворению без денатурации, более чем в 2 раза ниже соответствующего показателя у необработанного коллагена, что является следствием преимущественного разрушения под действием щелочей прочных поперечных связей.

Эти связи, по современным представлениям о строении коллагена, сосредоточены главным образом в полярных областях и тепlopептидных участках молекул коллагена и сшивают полипептидные цепи с помощью внутри- и межмолекулярных мостиков (5).

Расчет величины теплового эффекта, соответствующего термической деструкции коллагена, исходя из площади пика теплопоглощения на дифференциальных кривых нагревания, дал величину 2-3 кал/г для необработанных препаратов дермы. Препараты модифицированного щелочными обработками коллагена дают незначительные по площади и нерегулярные по форме пики теплопоглощения, которые следуют непосредственно за пиком текучести и практически сливаются с ним.

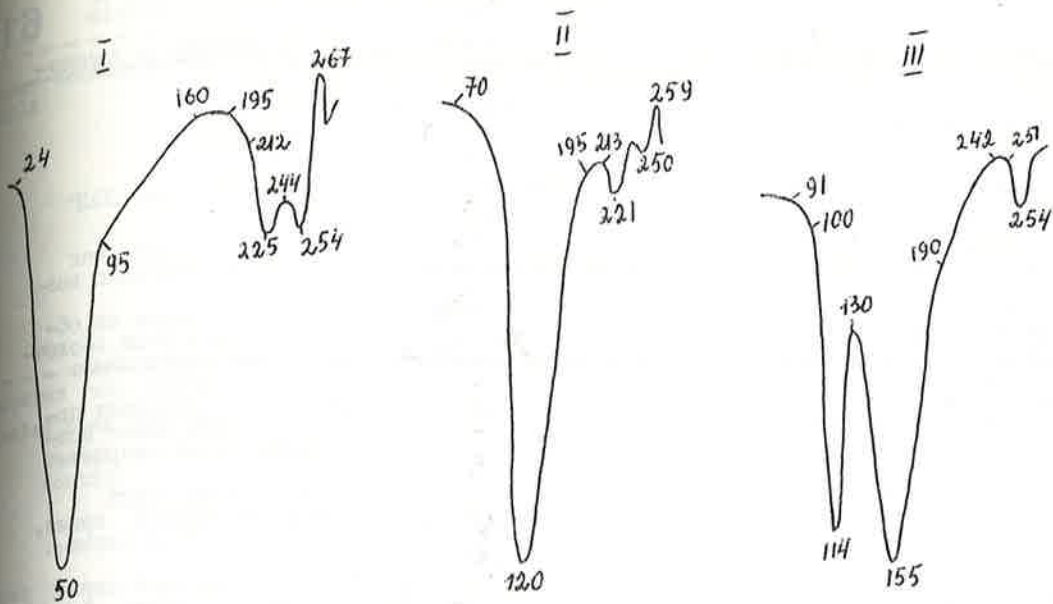
Из рисунка видно, что десорбция влаги из воздушно-сухого коллагена под вакуумом дает очень четкий и самый большой по площади термозффект. Значение этого показателя для необработанного щелочами коллагена дермы колеблется в пределах 18-22 ккал/моль воды и достоверно снижается на 5-6 ккал/моль для образцов, подвергнутых интенсивным щелочным обработкам (см. табл.).

Учитывая, что наиболее сильно вода гидратации связана с полярными группами, можно предположить, что снижение величины теплоты дегидратации для модифицированных препаратов связано с удалением с поверхности фибрилл коллагена в процессе щелочных обработок обводненных отложений гликозаминогликанов, изменения баланса активных групп, участвующих в связывании влаги, и ослаблении прочности (энергии) связи воды в разрыхленном коллагене в результате изменений в его структуре.

Т.о., метод ДТА с достаточно высокой степенью точности позволяет количественно определить тепловые эффекты, возникающие при нагревании коллагена, и может являться одной из разновидностей калориметрических исследований. Основное преимущество ДТА перед обычной калориметрией заключается в простоте и скорости метода и возможности непрерывной регистрации основных термографических параметров исследуемых объектов.

Литература

1. Шишкин Ю.Л., Баблюк О.О. Термографический контроль структурных изменений оссеина при известковом золении. - Мясная индустрия СССР, 1975, № 7, с.32-33.
2. Шишкин Ю.Л. Автоматическая установка для экспрессного дифференциально-термического анализа лекарственных веществ при переменных давлениях газовой фазы. - Химико-фармацевтический журнал, 1972, № 1, с.60-62.
3. Баблюк О.О., Шишкин Ю.Л. Дифференциально-термический анализ как метод контроля структурных изменений коллагена. - Труды Московской ветеринарной академии им.Скрябина, 1973, т.68, с.67-73.
4. Yanas J.K. Collagen and Gelatin in Solid State - Review in macromolecular chemistry, 1972, v 8, p. 49-104.
5. Михайлов А.Н. Химия и физика коллагена кожного покрова. - М., "Легкая индустрия", 1960, 232 с.



Дифференциальные кривые нагревания воздушно-сухого коллагена дермы КРС (воротковая часть), снятые при давлениях 12 мм рт.ст. (I), 760 мм рт.ст. (II) и 2,4 атм. (III).

Differential curves of heating of air-dried collagen of cattle derma(shoulder) obtained at pressure 12 mm mercury column(I), 760 mm mercury column(II) and 2,4 atm.(III-.