



UNIVERSUM: ХИМИЯ И БИОЛОГИЯ

Научный журнал
Издается ежемесячно с ноября 2013 года
Является печатной версией сетевого журнала
Universum: химия и биология

Выпуск: 5(107)

Май 2023

Часть 3

Москва
2023

Содержание	
Статьи на русском языке	4
Неорганическая химия	4
ФОСФОРСОДЕРЖАЩИЕ КОМПОСТЫ НА ОСНОВЕ НАВОЗА КРУПНОРОГАТОГО СКОТА И МИНЕРАЛИЗОВАННОЙ МАССЫ	4
Юсупбаев Карамат Тазабаевич	
Айымбетов Максат Жоллыбаевич	
Маденов Бердимурат Даулетмуратович	
Реймов Ахмед Мамбеткаримович	
Усанбаев Нажимуддин Халмурзаевич	
Нефтехимия	10
ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА ОБРАЗОВАНИЯ ДЕФЕКТОВ, ОБРАЗУЮЩИХСЯ В МЕЗОПОРИСТОМ УГЛЕ	10
Файзуллаев Нормурод Ибодуллаевич	
Мамирзаев Машраб Абдумаликович	
Асроров Даврон Аброрович	
Органическая химия	20
ИЗУЧЕНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ РЕАКЦИЙ МОНОХЛОРУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ С МЕТИЛДИЭТАНОЛАМИНАМИ	20
Буриханов Бахтиёр	
Шодмонов Боходир	
Холиков Турсинали	
СИНТЕЗ N,N1-ГЕКСАМЕТИЛЕН-БИС-[(1,11-АМИНОНАФТАЛИН)-МОЧЕВИНА] И ЕГО СВОЙСТВА	24
Хаитов Жонибек Курбанович	
Махсумов Абдухамид Гафурович	
Абсалямова Гулноза Маматкуловна	
Исмаилов Бобурбек Махмуджанович	
ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА КОЛЛАГЕНА ИЗ КОЖИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА	30
Худойбердиев Шухрат Шамсиддинович	
Саидахмедова Дилфуза Рауфкизи	
Papers in English	36
Biological Sciences	36
General biology	36
Botany	36
FORMATIONS OF SHRUBS IN PLANT COVER OF KARSHI DESERT	36
Rashid Chariev	
Zoology	40
POTATO PHYTONEMATODES GROWN IN DIFFERENT SOILS OF SAMARKAND REGION	40
Mashkhura Narzikulova	
Kholisa Eshova	
Mycology	43
ISOLATION OF PURE CULTURE OF MEDICINAL HERB MACROFUNGUS <i>Inonotus hispidus</i> (Bull.) P. Karst. IN UZBEKISTAN	43
Jamila Sherqulova	
Xumoyun Qo'ziboev	

ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА КОЛЛАГЕНА ИЗ КОЖИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Худойбердиев Шухрат Шамсиддинович

*PhD, преподаватель
кафедры органической и физколлоидной химии
Бухарского государственного университета,
Республика Узбекистан, г. Бухара
E-mail: s.s.xudoyberdiyev@buxdu.uz*

Саидахмедова Дилфуза Рауфкизи

*магистрант
кафедры органической и физколлоидной химии
Бухарского государственного университета,
Республика Узбекистан, г. Бухара
E-mail: dilfuzasaidaxmedova9@gmail.com*

OBTAINING AND PROPERTIES OF COLLAGEN FROM CATTLE SKIN

Shuhrat Khudoyberdiyev

*PhD, Lecturer,
Department of Organic and Physical Colloid Chemistry,
Bukhara State University,
Republic of Uzbekistan, Bukhara*

Dilfuza Saidakhmedova

*Master student
of the Department of Organic and Physical Colloid Chemistry,
Bukhara State University,
Republic of Uzbekistan, Bukhara*

АННОТАЦИЯ

Получен коллагениз крупного рогатого скота. Коллаген исследован хроматографическим, а также УФ- и ИК-Фурье методами. Проведен качественный анализ и количественный расчёт концентрации исследуемых свободных аминокислот путем сравнения времени удерживания и площадей пиков стандартных и исследуемых фенилтиокарбаматных производных аминокислот. В результате в образцах коллагена было идентифицировано 20 аминокислот, 10 из которых являются незаменимыми. Преобладающими аминокислотами в коллагене являются цистеин, глутаминовая кислота, глицин и аргинин. Следовательно, полученные данные позволили характеризовать коллаген как источник протоионогенных аминокислот.

ABSTRACT

Received collagen from cattle. Collagen was studied by chromatographic, as well as UV and IR Fourier methods. Qualitative analysis and quantitative calculation of the concentration of the studied free amino acids were determined by comparing the retention time and peak areas of the standard and studied phenylthiocarbamate derivatives of amino acids. As a result of the research, 20 amino acids were identified in collagen, 10 of which are essential. The predominant amino acids in collagen are cysteine, glutamic acid, glycine and arginine. Therefore, the obtained data allowed to characterize collagen as a source of protoionogenic amino acids.

Ключевые слова: коллаген из кожи крупного рогатого скота, аминокислота, хроматограмма, высокоэффективная жидкостная хроматография.

Keywords: bovine skin collagen, amino acid, chromatogram, high performance liquid chromatography.

Введение

В последние годы в биотехнологии, медицине и ветеринарной медицине наблюдается увеличение спроса к новым материалам на основе коллагена [17; 13]. К явным преимуществам целого направления

коллагена-пластики можно отнести высокую биологическую совместимость таких материалов и способность к регулируемой деградации. Причем экзогенный коллаген является не только формообразователем и транспортной средой для лекарственных

средств, но и сам обладает биологической активностью, стимулируя репаративные процессы [6; 5; 9].

Коллаген является основным белком внеклеточного матрикса и наиболее распространенным белком, обнаруженным у млекопитающих, составляющим 70–80 % кожи (сухой вес) и 25 % всего белка. Коллаген действует как структурный компонент каркаса, отвечающего за упругость и прочность костей суставов, волос, ногтей, кожи [15].

Коллаген является доминирующим компонентом внеклеточного матрикса млекопитающих. Встречается практически во всех тканях животных [14].

Известно, что белки очень ценны благодаря своему аминокислотному составу, так как аминокислоты являются главными строительными элементами в живом организме. Более 70 различных аминокислот выявлены в природе, но лишь 20 из них играют важнейшую роль в жизни человека. По способности синтезироваться в организме человека, животных и растениях все аминокислоты делятся на заменимые, незаменимые и частично незаменимые [7].

Обычно, ИК – спектр образцов коллагена показывает моды колебаний 1650, 1560 и 1235 см^{-1} , характерные для полос амида I, II и III, соответственно. Поглощение амида I возникает за счет из-за валентных колебаний C=O амида белка, а амид II деформационных колебаний N-H амида и валентных колебаний C-N [12]. Полоса амида III является сложной и состоит из компонентов растяжения C–N и изгиба N–H в плоскости из амидных связей. Он также состоит из поглощений, возникающих в результате вибрации групп CH_2 из глициновой основной цепи и боковых цепей пролина [там же]. Также наблюдаются полосы при 3450, 2850 и 1450 см^{-1} , которые представляют растяжение колец –OH, –CH₃ и пирролидина, соответственно. Отсутствие полосы поглощения при 1706 см^{-1} может свидетельствовать об отсутствии свободной уксусной кислоты в образце.

Целостность тройной спирали коллагена, являющейся основной вторичной структурой различных типов волокнистого коллагена можно оценить по соотношению между оптической плотностью при 1235 и 1450 см^{-1} [11]. Значения соотношения для денатурированного коллагена составляют около 0,5, а для неповрежденных структур – около 1. Это важная особенность, поскольку считается, что эта структура отвечает за биологические и механические свойства коллагена [там же].

Целью настоящей работы является изучение физико-химических свойств коллагена, выделенного из местного кожно-рогового сырья крупного рогатого скота.

Материалы и методы

Коллаген выделен [8] из кожи крупного рогатого скота и предварительно очищен от низкомолекулярных солей методом мембранного диализа [2]. Степень очистки составляет 83,75%.

Хроматографическое обнаружение аминокислот проводили методом восходящей одномерной бумажной хроматографии (БХ) на бумаге марки FN-3

Mittelschnelllaufend в системе растворителей н-бутанол-кислота уксусная ледяная-вода (4:1:2) с использованием приема двойного разгона растворителей. Проявляли раствором нингидрина в ацетоне 2% [1].

Определение качественного и количественного содержания аминокислот коллагена проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе *Agilent Technologies 1200* со спектрофотометрическим детектором. Хроматографическая колонка 75x4,6 мм *DiscoveryHSC₁₈*. Хроматографический анализ проводили в режиме градиентного элюирования.

УФ–спектроскопические исследования проведены в спектрофотометре *SPECORD 210* в интервале 190–1000 nm. Точность фотометрии UV с дихромат калием в соответствии с Ph.Eur.±0.01.

ИК-спектры снимали с использованием инфракрасного Фурье-спектрометра «IRTracer-100» (SHIMADZU, Япония) в комплекте с приставкой нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) MIRacle-10c призмой diamond/ZnSe (спектральный диапазон по шкале волновых чисел 4000÷400 см^{-1} ; разрешение – 4 см^{-1} , чувствительность соотношение сигнал/шум-60,000:1; скорость сканирования-20 спектров в секунду).

Результаты и их обсуждение

Разделение и очистка белков методом диализа

Диализом называется процесс разделения высокомолекулярных и низкомолекулярных веществ с помощью полупроницаемых мембран. Белковые молекулы, обладая большой молекулярной массой, не способны проникать через полупроницаемые перегородки (искусственные и естественные мембраны). При этом низкомолекулярные частицы (органические и неорганические) легко проходят через поры полупроницаемых мембран.

Диализ широко используется для очистки белков от низкомолекулярных примесей (соли, сахара и других), которые легко проходят через поры полупроницаемых мембран. Прибор в котором проводят диализ, называется диализатором. Целлофановый или коллодиевый мешочек, опущенный в сосуд с водой, представляет простейший диализатор. Белок, помещенный в мешочек, остается в нем, а низкомолекулярные вещества диффундируют через мембрану в воду.

Методом диализа можно разделить альбумины и глобулины. При переходе солей из белкового раствора в окружающую среду глобулины будут выпадать в осадок, т.к. они не растворимы в водной среде, а альбумины будут оставаться в растворе. Простейшим диализатором может служить целлофановый мешочек, опущенный в стакан с водой. Солевой раствор белка помещают в мешочек, при этом молекулы низкомолекулярных веществ (ионы соли) диффундируют через стенку мешочка, а крупные молекулы белка остаются внутри мешочка [2].

Определение свободных аминокислот

Для определения аминокислотного состава [10] необходимо привести разрушение всех пептидных связей в белке. Анализируемый белок гидролизуют в 6 М HCl и концентрированной трихлоруксусной кислоты (ТХУК) (1:3) при температуре около 160 °С в течение 1 ч.

Использовали стандартные образцы следующих аминокислот (SigmaAldrich): аспарагин (асп), глутамин (глу), гидроксипролин (о-про), серин (сер), глицин (гли), гистидин (гис), аргинин (арг), треонин (тре), аланин (ала), пролин (про), тирозин (тир), валин (вал), лизин (лиз), изолейцин (илей), лейцин (лей), фенилаланин (фен), метионин (мет), цистин (цис), цистеин (цис-цис), триптофан (три), а также фенилизотиоцианат (Fluka), изопропиловый спирт (о.с.ч.), ацетат натрия (х.ч.), ацетонитрило.с.ч. (SigmaAldrich, Германия), соляная кислота (х.ч.), гидроксид натрия (о.с.ч.), метилцианид о.с.ч.

На рисунке 1 представлена типичная хроматограмма аминокислотного состава полученного коллагена.

Выделение свободных аминокислот

Осаждение белков и пептидов водного экстракта образцов проводили в центрифужных стаканах. Для этого к 1 мл исследуемому образцу добавляли по 1 мл (точный объем) 20% трихлоруксусной кислоты, через 10 мин осадок отделяли центрифугированием при 8000 об/мин в течение 15 минут. Далее отобранную (0,1 мл) надосадочную жидкость лиофильно высушивали.

Качественный анализ и количественный расчет концентрации исследуемых свободных аминокислот проводили сравнением времени удерживания и площадей пиков стандартных и исследуемых фенилтиокарбоамильных (ФТК) – производных аминокислот [16].

Результаты исследования по изучению качественного и количественного содержания аминокислот методом ВЭЖХ представлены в таблице 1 и рис. 1.

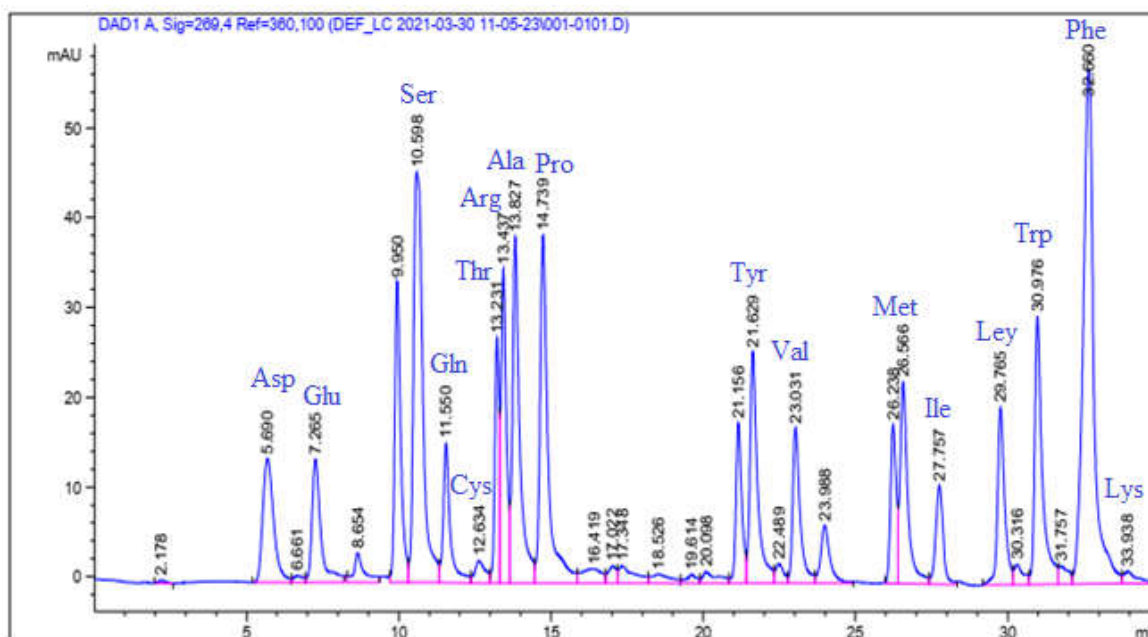


Рисунок 1. Хроматограмма аминокислот коллагена

Таблица 1.

Содержание аминокислот в коллагене, определенных методом ВЭЖХ

№	Аминокислоты	Краткие название	Исследуемое сырье (мг/гр)	% от общего количества
1	Аспарагиновая кислота	Asp	0,368929	3,754741
2	Глутаминовая кислота	Glu	0,580388	5,906846
3	Серин	Ser	0,241049	2,453254
4	Глицин	Gly	0,538933	5,484941
5	Аспарагин	Asn	0,508795	5,178215
6	Глутамин	Gln	0,18812	1,914574
7	Цистеин	Cys	3,407692	34,681477
8	Треонин*	Thr	0,286958	2,920489

№	Аминокислоты	Краткие название	Исследуемое сырье (мг/гр)	% от общего количества
9	Аргинин*	<i>Arg</i>	0,528942	5,383259
10	Аланин	<i>Ala</i>	0,265354	2,700616
11	Пролин	<i>Pro</i>	0,252801	2,572859
12	Тирозин	<i>Tyr</i>	0,07794	0,793227
13	Валин*	<i>Val</i>	0,444008	4,518851
14	Метионин*	<i>Met</i>	0,117063	1,191398
15	Изолейцин*	<i>Ile</i>	0,191395	1,947905
16	Лейцин*	<i>Leu</i>	0,248506	2,529147
17	Гистидин*	<i>His</i>	0,384244	3,910608
18	Триптофан*	<i>Trp</i>	0,421861	4,293452
19	Фенилаланин*	<i>Phe</i>	0,406663	4,138775
20	Лизин HCl*	<i>Lys</i>	0,366042	3,725359
	Всего		9,825683	100

* – незаменимые аминокислоты

Как видно из таблицы 1 и рис 1. образец коллагена содержат 20 аминокислот, 10 из которых являются незаменимыми (треонин, аргинин, валин, метионин, изолейцин, лейцин, фенилаланин, лизин, гистидин, триптофан) [4]. По результатам ВЭЖХ обнаруженные аминокислоты имеют следующее расположение:

Cys>Glu>Gly>Arg>Asn>Val>Trp>Phe>His>Asp>
>Lys>Thr>Ala>Pro>Leu>Ser>Ile>Gln>Met>Tyr

Следует отметить, что моноаминодикарбоновые кислоты исследуемого сырья представлены аспарагиновой и глутаминовой кислотами. Преобладающей аминокислотой в коллагене является составной частью фолиевой кислоты, она участвует в важных процессах обмена веществ, в переаминировании (наряду с аспарагиновой кислотой), в окислительном дезаминировании с образованием 2-кетоглутаровой кислоты, вовлекаемой в цикл трикарбоновых кислот, в декарбоксилировании, приводящем к образованию важного нейтропного агента γ -аминомасляной кислоты, и тем самым оказывает существенное влияние на физиологическое состояние организма.

В исследуемом сырье было идентифицировано 20 аминокислот, 10 из которых являются незаменимыми. Полученные данные позволили характеризовать коллагена как источник протоионогенных аминокислот.

Определение количества общего белка

Суть метода заключается в определении содержания общего азота по Кьельдалю с последующим пересчетом на белок.

Для анализа взвешивали в пробирке точную навеску, с погрешностью не более 0,1%. Навеску количественно переносили в колбу Кьельдаля. Далее эксперименты проводили по методическому указанию [3].

Обработка результатов: Массовую долю азота (X) в испытуемой пробе в процентах от ее массы при проведении отгонки аммиака в серную кислоту вычисляли по формуле:

$$X = \frac{(V_1 - V_0) \cdot K \cdot 0.0014 \cdot 100}{M},$$

где: V_0 – объем 0,1 моль/л раствора гидроокиси натрия, израсходованный на титрование 0,05 моль/л серной кислоты в контрольном опыте, мл. V_1 – объем 0,1 моль/л раствора гидроокиси натрия, израсходованный на титрование серной кислоты в испытуемом растворе, мл; K – поправка к титру 0,1 моль/л раствора гидроокиси натрия;

0,0014 – количество азота, эквивалентное 1 мл 0,05 моль/л раствору серной кислоты;

M – масса навески, г. За окончательный результат испытания принимали среднее арифметическое результатов пяти параллельных испытаний.

Массовую долю азота в пересчете на сухое вещество продукта (коллаген), в процентах, вычисляли по формуле:

$$X_3 = \frac{X_1 \cdot 100}{100 - W},$$

где: X_1 – массовая доля азота в испытуемой пробе, %; W – влажность испытуемой пробы, %.

Массовую долю белка (Y) в процентах вычисляли по формуле: $Y = K \cdot X$, где K – коэффициент пересчета азота на белок: с умеренным содержанием липидов – 6,38;

Образец	Белок (%)
№1 Коллаген	83,75

УФ-спектроскопические исследования коллагена

Проведены УФ-спектроскопические исследования растворов коллагена (рис. 2).

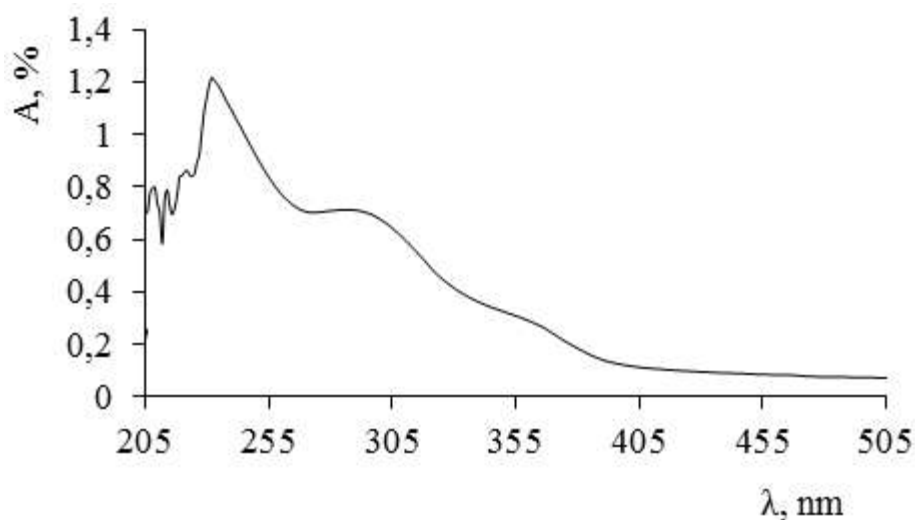


Рисунок 2. УФ-спектр коллагена

В УФ-спектре коллагена наблюдаются полосы поглощения, связанные с amino- и карбоксильными группами в интервале 200-400 нм (рис. 2 линия).

ИК Фурье-спектроскопические исследования коллагена

Проведены ИК-Фурье спектроскопические исследования растворов коллагена.

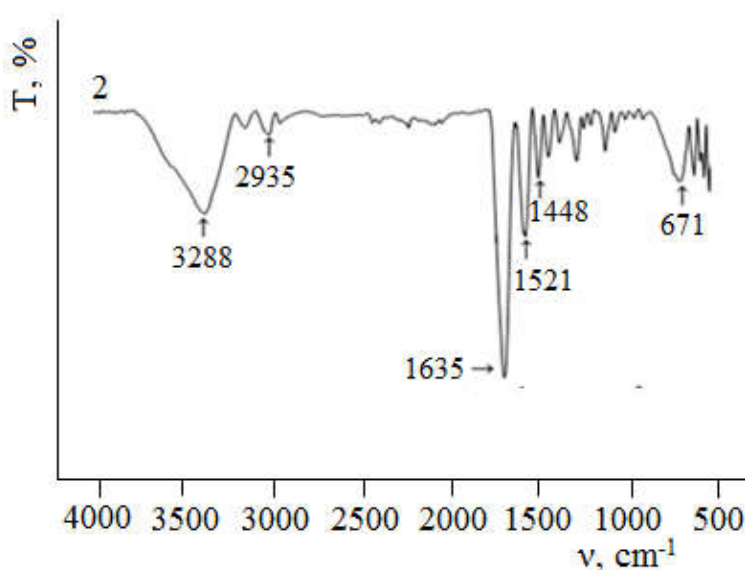


Рисунок 3. ИК Фурье-спектр коллагена

В ИК-спектре коллагена наблюдается полоса 3288 см⁻¹, которая соответствует колебанию амидной группы ($\nu(\text{NH})$), 2935 см⁻¹ ($\nu(\text{C-H})$) в структуре молекул коллагена (рис.3). Полоса поглощения при 1635 см⁻¹ интерпретируется как полоса валентного колебания карбонильной группы ($\nu(\text{C=O})$ - амид I), 1521 см⁻¹ ($\nu(\text{C=O})$, C-N и $\delta(\text{N-H})$ - амид II). Обнаружено, что в области 1448 см⁻¹ проявляются сигналы амид-III группы ($\nu(\text{N-C-O})$).

Заключение

Методами ВЭЖХ, УФ- и ИК-спектроскопии изучены физико-химические свойства образцов коллагена, выделенного из кожи крупного рогатого скота. Выделено и идентифицировано 20 аминокислот, 10 из которых являются незаменимыми. Преобладающими аминокислотами в коллагене являются цистеин, глутаминовая кислота, глицин и аргинин, что позволяет характеризовать коллаген как источник протоионогенных аминокислот. Полученный коллаген представляет интерес для изготовления бактерицидных пленок для ветеринарии и медицины.

Список литературы:

1. Аминокислотный состав надземной части *Geranium pratense* L., *Geranium sylvaticum* L., *Geranium palustre* L. / К.Н. Разаренова, А.М. Захарова, И.Д. Протасова, Е.В. Жохова // Бутлеровские сообщения. – 2012. – Вып. 31, № 8. – С. 73–78.
2. Белки. Методические указания к лабораторному практикуму по дисциплине «Биохимия» для студентов специальностей 49 01 01 «Технология хранения и переработки растительного сырья», 49 01 02 «Технология хранения и переработки животного сырья», 91 01 01 «Производство продуктов и организация общественного питания». / Могилевский государственный университет продовольствия; сост.: О.Н. Макасева, О.В. Дудинская, Л.М. Ткаченко. – Могилев : МГУП, 2003. – 37 с.
3. Методы контроля. Химические факторы. Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище. Руководство Р 4.1.1672-03. – М. : Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004.
4. Нуруллаева Д.Х., Фарманова Н.Т. Изучение аминокислотного состава плодов овса посевного (*Avena Sativa* L.) // Химия и химическая технология. – Узбекистан, 2019. – № 3. – С. 64–67.
5. Парфенова Е.В., Икоева Т.М., Матийцо О.В. Направление использования коллагена в технологии косметических средств // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2000. – № 2. – С. 65–67.
6. Получение и исследования коллагена медицинского / О.И. Раджабов, Т. Гулямов, Н.М. Хусниддинова [и др.] // Узбекский химический журнал. Специальный выпуск. – 2011. – С. 94–97.
7. Скурихин И.М., Тутельян В.А. Таблицы химического состава и калорийности продуктов питания. Справочник. – М. : Дели Принт, 2007. – 320 с.
8. Темирова М.И., Кодиров Т.Ж. Чарм ва мўйна технологияси. – Тошкент : Турон – Икбол, 2005. – 255 б.
9. Ширшакова М. Клей для стареющей кожи // Журнал по прикладной эстетике. – 2006. – № 2. – С. 96–99.
10. Akira Tsugita and Jean-Jacques Scheffler. A Rapid Method for Acid Hydrolysis of Protein with a Mixture of Trifluoroacetic Acid and Hydrochloric Acid // Eur. J. Biochem. – 1982. – № 124. – P. 585–588.
11. Cytocompatibility of Chitosan and Collagen-Chitosan Scaffolds for Tissue Engineering / Ligia L. Fernandes, Cristiane X. Resende, Débora S. Tavares, Gloria A. // Brasil. Polímeros. – 2011. – Vol. 21, № 1. – P. 1–6.
12. Molecular interactions in collagen and chitosan blends / A. Sionkowska, M. Wisniewski, J. Skopinska [et al.] // Biomaterials. – 2004. – № 25. – P. 795.
13. Propolis Modifies Collagen Types I and III Accumulation in the Matrix of Burnt Tissue / P. Olczyk, G. Wisowski, K. Komosinska-Vassev [et al.] // Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. – 2013. – P. 1–10.
14. Ricard-Blum S. The Collagen Family. Cold Spring Harbor Perspectives // Biology. – 2010. – № 3 (1).
15. Saurabh Tukaram Gondil, H B Janugade, Aakash Katkar. To Evaluate the Effect of Collagen Dressing in Diabetic Foot Ulcer Patients // Journal of Pharmaceutical Negative Results. – 2022. – № 13 (6). – P. 659–662.
16. Steven A., Cohen D.J. Amino Acid Analysis Utilizing Phenylisothiocyanate Derivatives // Analyt. Biochem. – 1988. – Vol. 17, № 1. – P. 1–16.
17. Xenogenic Tissues and Biomaterials for the Skeletal System / V. Graceffa, Z. Wu, D. Gaspar, K. Spanoudes [et al.] // Comprehensive Biomaterials II. – 2017. – P. 471–504.