




Влияние условий обработки шкур толстолобика на структуру коллагена

Людмила В. Антипова¹ antipova.L54@yandex.ru  0000-0002-1416-029
 Игорь В. Сухов¹ Igorsuhov1@mail.ru  0000-0002-8455-5710
 Иван И. Котов² vazaari@mail.ru  0000-0002-2800-7306




1 Воронежский государственный университет инженерных технологий, пр-т Революции, 19, г. Воронеж, 394036, Россия

2 ООО НПО "Велис", 356206, Ставропольский край, Шпаковский район, поселок Приозерный, Молодежная ул., 4

Аннотация. Инфракрасная (ИК) спектроскопия в настоящее время является одним из основных методов анализа и идентификации органических соединений. Метод основан на пропускании инфракрасного излучения через изучаемый объект, что влечет за собой возбуждение молекул, заставляя их совершать колебательные движения. Во время этого процесса наблюдается ослабление интенсивности света, проходящего через образец. Поглощение происходит на длинных волнах, энергия которых сопоставима с энергией возбуждения колебаний в изучаемых молекулах. Это свидетельствует о наличии в молекулах образцов или функциональных групп. Тем самым можно спрогнозировать и узнать о возможном строении вещества. Авторами исследования предложен способ получения коллагенсодержащей основы. Подбор концентрации органической кислоты дает возможность получения продукта с необходимыми характеристиками. Основной задачей проведения эксперимента является охарактеристика структурных изменений в коллагеновом волокне в процессе получения гидрата коллагена. Инфракрасные спектры получены на каждую стадию, начиная с исходного образца и заканчивая конечным гидратом коллагена. Сравнительная характеристика коллагеновых молекул исходного и конечных образцов позволяет сделать вывод, что агрессивная среда в процессе получения гидрата несколько не повреждает нативную структуру фибрилл коллагена. В процессе получения коллагеновых волокон происходит их разволокнение. В дальнейшем коллагеновые основы подвергали гомогенизированию в среде с дистиллированной водой, используя соотношение: одну часть массы обработанных шкур толстолобика и три части воды. Получая эмульсию, обладающую высокой гидрофильностью, что создает условия для применения в разных формах в пищевой, косметической и медицинской промышленности.

Ключевые слова: инфракрасная спектроскопия, коллаген, молекулы, пики поглощения

Influence of silver carp skins processing conditions on collagen structure

Ludmila V. Antipova¹ antipova.L54@yandex.ru  0000-0002-1416-029
 Igor V. Sukhov¹ Igorsuhov1@mail.ru  0000-0002-8455-5710
 Ivan I. Kotov² vazaari@mail.ru  0000-0002-2800-7306

1 Voronezh State University of Engineering Technologies, Revolution Av., 19 Voronezh, 394036, Russia

2 NPO "Veles", 356206, Stavropol territory, Shpakovsky district, village lakeside, Youth str., 4

Abstract. Infrared (IR) spectroscopy is currently one of the main methods for the analysis and identification of organic compounds. The method is based on passing infrared radiation through the object under study, which entails the excitation of molecules, forcing them to make oscillatory movements. During this process, a decrease in the intensity of light passing through the sample is observed. Absorption occurs at long waves, the energy of which is comparable with the excitation energy of vibrations in the molecules under study. This indicates the presence in the molecules of samples or functional groups. Thus, you can predict and find out about the possible structure of the substance. The authors of the study proposed a method for producing a collagen-containing base. The selection of the concentration of organic acid makes it possible to obtain a product with the necessary characteristics. The main objective of the experiment is to characterize the structural changes in the collagen fiber in the process of obtaining collagen hydrate. Infrared spectra were obtained at each stage, starting from the initial sample and ending with the final collagen hydrate. A comparative characteristic of the collagen molecules of the initial and final samples allows us to conclude that the aggressive medium in the process of hydrate production does not in the least damage the native structure of collagen fibrils. In the process of obtaining collagen fibers, they are released. Subsequently, the collagen bases were homogenized in a medium with distilled water, using the ratio: one part of the mass of processed silver carp skins and three parts of water. Obtaining an emulsion with high hydrophilicity, which creates the conditions for use in various forms in the food, cosmetic and medical industries.

Keywords: infrared spectroscopy, collagen, molecules, absorption peaks

Введение

В настоящее время ощущается нехватка пористых материалов из коллагена, которые активно используются в медицине, косметологии и пищевой промышленности. Данные материалы должны обладать высокими показателями влагоемкости и при этом сохранять свойства природных биополимеров. Одним из таких материалов может быть коллаген – уникальный

белок соединительной ткани животных. Он отличается высоким содержанием глицина, гидроксипролина, пролина, которые придают ему жесткость и прочность. Относится к фибриллярным белкам, образуя волокнистый материал. Коллагены способны набухать в водных растворах благодаря наличию функциональных групп [1].

Наибольший интерес в этом отношении представляет рыбный коллаген, в частности

Для цитирования

Антипова Л.В., Сухов И.В., Котов И.И. Влияние условий обработки шкур толстолобика на структуру коллагена // Вестник ВГУИТ. 2019. Т. 81. № 4. С. 53–57. doi:10.20914/2310-1202-2019-4-53-57

For citation

Antipova L.V., Sukhov I.V., Kotov I.I. Influence of silver carp skins processing conditions on collagen structure. *Vestnik VGUIT* [Proceedings of VSUET]. 2019. vol. 81. no. 4. pp. 53–57. (in Russian). doi:10.20914/2310-1202-2019-4-53-57

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License

коллаген пресноводных рыб, благодаря особым реологическим свойствам, облегчающим его технологическую обработку (он более низкомолекулярный, чем коллаген животных, не требует обязательного гидролиза при переработке сырья, а материалы из него более эластичны). Однако данных о его взаимодействии с водой и водными средами недостаточно, а объект мало изучен. Кроме того, открытым остается вопрос о методах обработки коллагена для повышения его водопоглощающей способности.

В разное время разрабатывались различные способы получения и очистки коллагенсодержащих продуктов [2]. Но зачастую все методы включают в себя обработку сырья с использованием агрессивных сред или же основаны на применении ферментных препаратов, которые дорого стоят, что приводит к увеличению стоимости конечного продукта. В соответствии с поставленной задачей необходимо совершенствовать метод получения гидрата коллагена для достижения требуемых физико-химических показателей готового гидрата надлежащего качества, который сохраняет нативную форму и исключает денатурацию и деструкцию белковых фракций. Гидрат должен удовлетворять технологическим параметрам, необходимым для высушивания и получения губчатых коллагеновых основ с высоким показателем влагоемкости.

С помощью ИК-спектроскопии можно быстро и надежно определить наличие функциональных групп таких, как карбонильная, гидроксильная, карбоксильная, амидная, аминок-, циано-. Есть возможность определить непредельные фрагменты: двойные и тройные углерод-углеродные связи, ароматические или гетероароматические системы [5–6].

Цель исследования – идентификация структуры изменения кожи толстолобика в процессе обработки. На каждом этапе были изучены морфологические характеристики шкур, их спектры поглощения в инфракрасной области для оценки технологических параметров обработки.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования использовались кожи рыб толстолобика. Рыбы вылавливали в осенний период массой 700–1500 г. Шкуры отделяли вручную в лабораторных условиях при предварительном снятии чешуи, отделении хвоста, головы, жабр, плавников, зачистки внутренней поверхности от жировых тканей и прирезей мышечной ткани.

Для дальнейшей обработки использовалась средняя часть шкуры. Сырье промывали водой, выдерживали в мыльном растворе 20–30 мин, затем промывали водой и заливали раствором перекиси

водорода 3% и щелочи 2 %, смесь выдерживали в течение 1 ч, затем промывали и заливали раствором органической кислоты 1,5%, после чего выдерживали не менее 3 сут.

Фиксация обеспечивает стабилизацию тканевых структур и их уплотнение, прекращает аутолиз, стабилизирует локализацию структур. Механизм действия фиксаторов основан на коагуляции белков и стабилизации липидов.

Для получения коллагеновой основы использовались следующие реактивы:

- кислота уксусная для пищевой промышленности по ГОСТ Р 55982–2014;
- раствор перекиси водорода по ГОСТ 177–88;
- гидроксид натрия по ГОСТ Р 55064–2012;
- мыло хозяйственное твердое 72% ГОСТ 30266–95;

На каждой стадии обработки шкура подвергалась исследованию ИК-спектроскопией. Структурные особенности по спектру поглощения в инфракрасной области идентифицировали на аппарате ИК-Фурье спектрометр МРА и Vertex 70. Фурье спектрометр МРА разработан для оптимизации работы и решения широкого спектра задач. Позволяет проводить исследования жидких образцов, работает в диапазоне 12 800–3 600 см⁻¹ [5].

Результаты и обсуждения.

Для получения высушенного коллагена с сохранением пространственной структуры фибрилл необходимо получить гидрат коллагена с высокой вязкостью, меньшим гидромодулем и показателем РН, близким к нейтральному. Для решения данной задачи предлагается более глубокая очистка шкур и отделение более уплотненных участков шкур. Из строения плавников рыбы видно (рисунок 1), что в местах крепления и брюшной полости вид шкуры значительно отличается более плотной структурой. Для подтверждения данной гипотезы проведены гистоморфологические исследования.

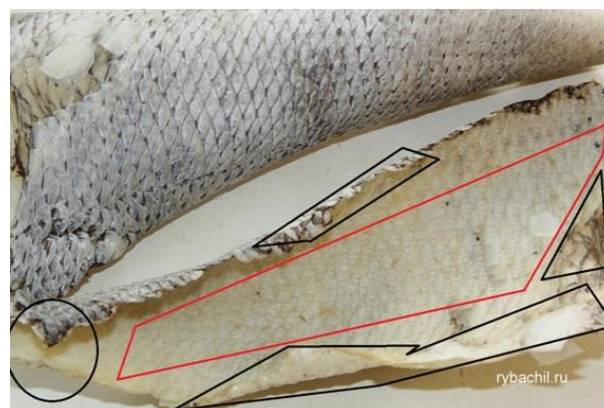


Рисунок 1. Предпочтительные области шкуры для выделения коллагеновой основы

Figure 1. The preferred areas of the skin to highlight the collagen base

Как видно из рисунка 2, черным цветом даны области с более плотной структурой, которые следует убрать, а для дальнейшего исследования берутся области, выделенные красным цветом. В данной области шкура более однородна, меньше мышечной и соединительной ткани, чешуя отделяется легче. Для оптимизации получения коллагеновой основы были проведены исследования шкур толстолобика путем заливка по Ромейсу с модификацией:

- вместо бензол-парафина был толуол-парафин. Так быстрее растворяется;
- отмывка от парафина после нарезки была толуолом;
- толуольное просветление и потом заключение в раствор полистирола в толуоле 0,04% и запайка в полистирол.

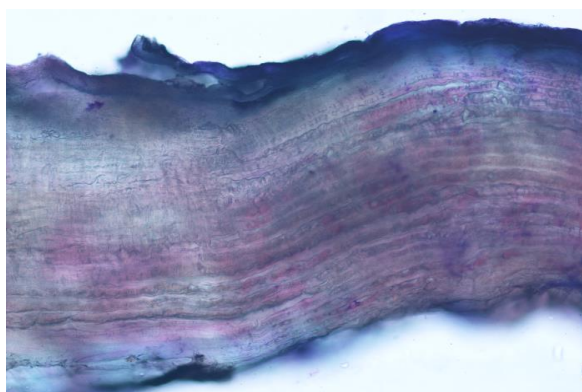


Рисунок 2. Срез верхнего участка шкуры приплавниковой зоны

Figure 2. Cut the upper portion of the skin at the fin zone

Как видно на рисунке 2, линии фибрилл коллагена расположены равномерно, структура

уплотнена, что приведет в процессе выделения к более низкому разволокнению, поскольку требуется увеличение концентрации кислоты, чтобы разорвать межфибриллярные связи.

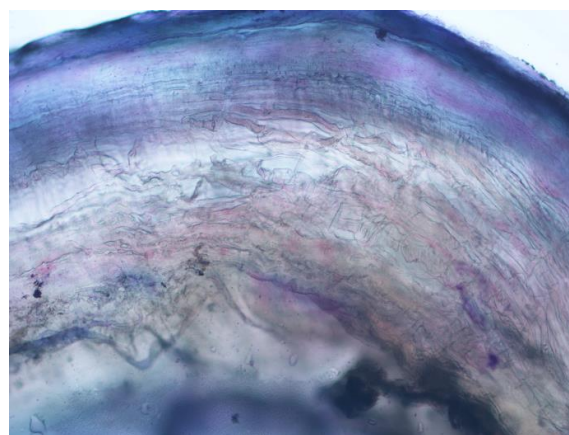


Рисунок 3. Срез среднего участка шкуры

Figure 3. Cut the middle section of the skin

В средних участках шкур наблюдается менее плотное расположение коллагеновых волокон, нити коллагена менее плотные и более рыхлой структуры. Это позволяет нам сделать вывод, что предпочтительно использовать средние участки шкуры толстолобика в производстве коллагеновой основы (рисунок 3).

Были отобраны образцы исходной шкуры толстолобика в сравнении с каждой стадией обработки шкуры с полученным гидратом коллагена (рисунок 4). Следующей задачей было изучение структурных особенностей на всех этапах технологического процесса производства коллагена.

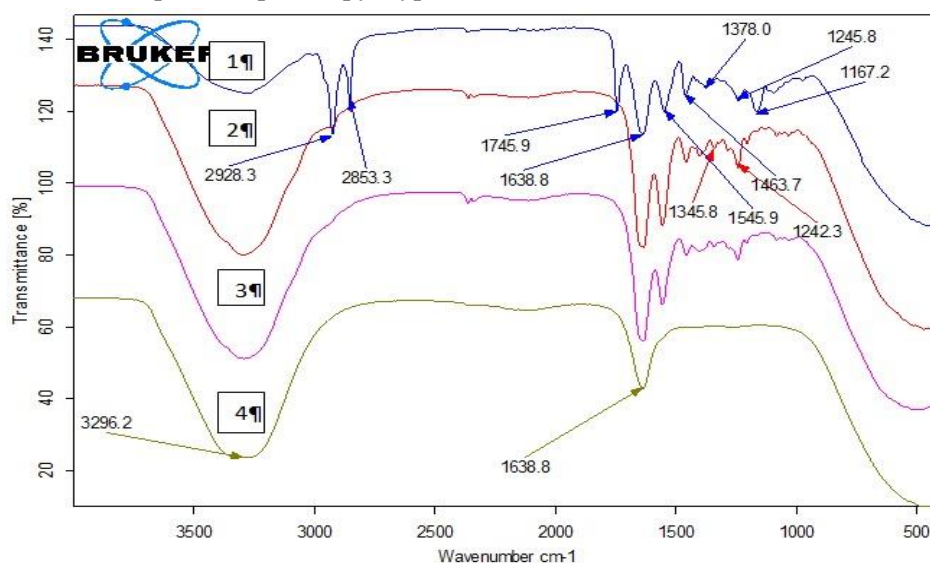


Рисунок 4. ИК-спектроскопия получения гидрата коллагена: 1 – кожа толстолобика; 2 – кожа после обработки NaOH, перекись водорода; 3 – кожа после обработки уксусной кислотой; 4 – гидрат коллагена

Figure 4. Infrared spectroscopy of collagen producing hydrate: 1 – leather carp; 2 – skin after NaOH treatment, hydrogen peroxide; 3 – skin after acetic acid treatment; 4 – collagen hydrate

Нами были изучены образцы шкуры коллагена на 3 стадиях обработки в сравнении с исходным образцом № 1 шкуры толстолобика.

Отбирались пробы на каждой стадии обработки шкур в размере 10 г, затем образцы помещались в спектометр.

Из первого спектра колебаний исходной шкуры толстолобика наблюдается от 3500 см⁻¹ разноупорядоченных метил и метильных группы – CO-NH-, это свидетельствует об общей структуре белковых молекул. В исходном образце отмечен пик 1570–1515 см⁻¹ NH амид II и колебания C-N, так и в пике 1638 см⁻¹ относятся к вторичным аминам.

На второй стадии после обработки перекисью и щелочью эти группы исчезли. Это связано, скорее всего, с взаимодействием с перекисью водорода. Амид III наблюдается на пике 1245 см⁻¹, пики 1378, 1245 – амид II. Это говорит о том, что на участках амидных связей происходит обрыв цепей, и они могут взаимодействовать с водой. Следующие 5 пиков увеличиваются до 1790 см⁻¹, что соответствует C=O карбоксильным группам, могут взаимодействовать с аминами. По всей видимости, происходит превращение карбоксильных групп. После взаимодействия с NaOH число этих групп увеличивается. Просматриваются валентные колебания C₂O в области 1250–1230. Это колебания ≡ C–O– и CН– группы. При 1067 = C–O могут проявляться спиртовые группы оксимицелиновые и оксипролиновые. Потом этот пик исчезает и количество групп уменьшается. На третьей стадии обработки при воздействии уксусной кислоты наблюдаются амиды (I, II). Аминные группы накладываются на водородные связи соединенных цепей. Это характерно для коллагеновых фибрилл [10]. На последнем этапе при взаимодействии с водой

водородные связи диспергируют, возможно влияет CO₂. Есть взаимодействие вода-вода в области меньше 3400 см⁻¹. Это не нарушает строения воды в области поглощения более 3500 см⁻¹, это водородные связи в воде, связанные двойными и тройными связями [5–6]. Амиды IV-V в конце исчезают, что обуславливается высоким взаимодействием с водой. Во время оценки структуры белковых молекул наиболее важно участие OH-групп и образование H-связей, поскольку гидроксильные группы в структурной связи воды с белковыми молекулами участвуют в стабилизации надмолекулярной и молекулярной организации белка [7–9]. Водородные связи OH-группы наблюдаются в области 3400–3500 см⁻¹. На последней стадии обработки повсеместно прослеживается связь вода-вода. В результате обработки на всех стадиях получения гидрата сохраняются неизменными полосы амид I, амид II, амид III, амид A, характерно присутствие повсеместно полипептидных связей белковых молекул [5–6]. Таким образом, полученная субстанция содержит исходную структуру, а следовательно, функции коллагена вне живого организма.

Заключение

В результате проведенных экспериментов пришли к выводу о целесообразности применения средних участков шкур пресноводных рыб (толстолобика) в технологическом процессе изготовления коллагена. Результаты говорят о морфологических отличиях на разных участках шкуры и структурных изменениях в различных стадиях обработки этих шкур. Сохранение природных свойств биополимеров открывает перспективы использования его в медицинских целях как объекта, интенсифицирующего регенерацию тканей коллагеновой природы.

Литература

- 1 Антипова Л.В., Сторублевцев С.А. Коллагены: источники, свойства, применение. Воронеж: ВГУИТ, 2014. 512 с.
- 2 Батечко С.А. Коллаген. Новая стратегия сохранения здоровья и продления молодости. Колечково, 2010. 244 с.
- 3 Воробьев В.И. Использование рыбного коллагена и продуктов его гидролиза // Известия Калининградского государственного технического университета. 2008. № 13. С. 55–58.
- 4 Казицына Л.А., Куплетская Н.Б. Применение УФ-, ИК и ЯМР-спектроскопии в органической химии. М.: Высшая школа, 1971. 233 с.
- 5 Гремлик Г.-У. Язык спектров. Введение в интерпретацию спектров органических соединений. ООО «Брукер Оптико», 2002. 94 с.
- 6 Matthews J.A., Wnek G.E. Electrospinning of Collagen Nanofibers // Biomacromolecules. 2002. № 3 (2). P. 232–238.
- 7 Bhattarai N., Edmondson D., Veisheh O., Matsen F.A. et al. Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility // Biomaterials. 2005. V. 26. № 31. P. 6176–6184.
- 8 Mo X., Chen Z., Weber H.J. Electrospun nanofibres of collagen – chitosan and p(LLA-CL) for tissue engineering // Frontiers of medicines science in China. 2007. № 1 (1). P. 20–23.
- 9 Li G.Y. Physicochemical properties of collagen isolated from calf limed splits // Amer. Leather Chem. Ass. 2003. V. 98. P. 224–229.
- 10 Rennard S.I., Martin G.R., Crystal R.G. Enzyme linked immunoassay (ELISA) for connective tissue proteins: type I collagen // Immunochemistry of the extracellular matrix. 2018. P. 237–252.

References

- 1 Antipova L.V., Storulevtsev S.A. Collagen: sources, properties, application. Voronezh, VSUET, 2014. 512 p. (in Russian).
- 2 Batechko S.A. Collagen. A new strategy for maintaining health and prolonging youth. Kolehkov, 2010. 244 p. (in Russian).
- 3 Vorobyov V.I. The use of fish collagen and its hydrolysis products. Bulletin of the Kaliningrad State Technical University. 2008. no. 13. pp. 55–58. (in Russian).
- 4 Kazitsyna L.A., Kupletskaya N.B. The use of UV, IR and NMR spectroscopy in organic chemistry. Moscow, Vysshaya shkola, 1971. 233 p. (in Russian).
- 5 Hans-Ulrich Gremlich. The language of the spectra. Introduction to the interpretation of the spectra of organic compounds. Bruker Optico LLC, 2002. 94 p. (in Russian).
- 6 Matthews J.A., Wnek G.E. Electrospinning of Collagen Nanofibers. Biomacromolecules. 2002. no. 3 (2). pp. 232–238.
- 7 Bhattarai N., Edmondson D., Veiseh O., Matsen F.A. et al. Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility. Biomaterials. 2005. vol. 26. no. 31. pp. 6176–6184.
- 8 Mo X., Chen Z., Weber H.J. Electrospun nanofibres of collagen – chitosan and p(LLA-CL) for tissue engineering. Frontiers of medicines science in China. 2007. no. 1 (1). pp. 20–23.
- 9 Li G.Y. Physicochemical properties of collagen isolated from calf limed splits. Amer. Leather Chem. Ass. 2003. vol. 98. pp. 224–229.
- 10 Rennard S.I., Martin G.R., Crystal R.G. Enzyme linked immunoassay (ELISA) for connective tissue proteins: type I collagen. Immunochemistry of the extracellular matrix. 2018. pp. 237–252.

Сведения об авторах

Людмила В. Антипова д.т.н профессор, кафедра технологии продуктов животного происхождения, Воронежский государственный университет инженерных технологий, пр-т Революции, 19, г. Воронеж, 394036, Россия, antipova.L54@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1416-029>

Игорь В. Сухов аспирант, кафедра технологии продуктов животного происхождения, Воронежский государственный университет инженерных технологий, пр-т Революции, 19, г. Воронеж, 394036, Россия, Igorsuhov1@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8455-5710>

Иван И. Котов к.м.н., врач, ООО Научно Производственное Объединение “Велис”, 356206 Ставропольский край, Шпаковский район, поселок Приозерный, Молодежная ул., 4, vazaari@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-2800-7306>

Вклад авторов

Людмила В. Антипова предложила методику проведения эксперимента

Игорь В. Сухов написал рукопись, корректировал её до подачи в редакцию и несет ответственность за плагиат

Иван И. Котов консультация в ходе исследования

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Information about authors

Ludmila V. Antipova Dr. Sci. (Engin.), professor, technology of animal products department, Voronezh State University of Engineering Technologies, Revolution Av., 19 Voronezh, 394036, Russia, antipova.L54@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1416-029>

Igor V. Sukhov graduate student, technology of animal products department, Voronezh State University of Engineering Technologies, Revolution Av., 19 Voronezh, 394036, Russia, Igorsuhov1@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8455-5710>

Ivan I. Kotov Cand. Sci. (Med.), doctor, NPO “Velis”, 356206 Stavropol territory, Shpakovsky district, village lakeside, Youth str., 4, vazaari@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-2800-7306>

Contribution

Ludmila V. Antipova proposed a scheme of the experiment

Igor V. Sukhov wrote the manuscript, correct it before filing in editing and is responsible for plagiarism

Ivan I. Kotov consultation during the study

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Поступила 04/11/2019	После редакции 15/11/2019	Принята в печать 25/11/2019
Received 04/11/2019	Accepted in revised 15/11/2019	Accepted 25/11/2019