

ВЛИЯНИЕ ФОРМАЛЬДЕГИДА НА СТРУКТУРООБРАЗОВАНИЕ ЖЕЛАТИНЫ И ВОДОРАСТВОРIMОГО КОЛЛАГЕНА

Николаева С. С., Михайлов А. Н.

Действие формальдегида на белки как спивающего (дубящего) реагента общеизвестно. Особенно подробно изучено взаимодействие формальдегида с коллагеном и желатиной [1–3]. Оно проявляется в блокировке групп основного характера и образовании межмолекулярных мостиков. Дубление формальдегидом приводит к повышению температуры денатурации водорастворимого коллагена и плавления студней желатины, а также к изменению ряда свойств надмолекулярных структур коллагена: повышению температуры сверхсокращения (сваривания) и ферментной устойчивости, уменьшению степени набухания в кислой и щелочной среде, а также ослаблению аутогезии элементов его структуры после высушивания [4–6].

В реакции коллагена и желатины с формальдегидом участвуют первичные и вторичные аминогруппы, а также гидроксилы белка. Интенсивнее всего реагируют недиссоциированные группы основного характера остатков лизина. Это подтверждается тем, что максимальный эффект дубления обнаруживается при значениях $\text{pH} > 6$.

В этих условиях в структуре белка возникают метиленовые мостики, а также возможно образование оснований Шиффа [2].

Некоторое структурирование под действием формальдегида наблюдается и в кислой среде, так как в этих условиях в реакции с формальдегидом могут принимать участие гидроксильные группы белка. Реакции коллагена и желатины с формальдегидом в кислой среде используются во многих случаях в связи с тем, что формалин, выпускаемый промышленностью, содержит муравьиную кислоту и растворы его имеют $\text{pH} 3,0\text{--}3,5$. Эффект дубления зависит также от аминокислотного состава белков и от их надмолекулярной организации. Так, Зубов, Журкин и Каргин [7], а также Пчелин с сотр. [8] показали, что обработка спивающими реагентами желатины в состоянии статистического клубка приводит к получению незастудневающих дисперсных систем. В этом случае спивка происходит в пределах единичных клубков полипептидов. В то же время дубление желатины, полипептиды которой имеют преимущественно спиралеобразную форму, приводит к образованию прочных студней. Было показано, что каркасом таких застудневающих белковых систем являются цепочки сферических анизотропных частиц, скрепленных между собой силами аутогезии и образующих трехмерную сетку [9]. Внутри каждой сферической частицы происходит образование коллагеноидобных структур, о чем свидетельствуют данные двойного лучепреломления [10].

В данной работе приводится сравнительная оценка действия формальдегида на оптические и структурно-механические свойства растворов белков коллагенового типа, находящихся в различной структурной форме.

В качестве объектов исследования были использованы фотожелатина, очищенная по Лебу [11], кислорасторимый коллаген [12] и тропоколлаген [13]. Формалин добавляли к раствору желатины спустя 20 мин. после его остыивания до комнатной температуры. Известно, что в течение этого времени происходят значительные изменения молекулярной структуры желатины в направлении спирализации макромолекул [14]. Измерение структурной вязкости и расчет по этим данным предельного напряжения сдвига растворов желатины (1,5%) и кислорасторимого коллагена (0,8%) производили на капиллярном горизонтальном вискозиметре [15]. Равновесный модуль эластичности структур гелей желатины (2 и 5%) и тропоколлагена (1,2%) определяли на видоизмененном приборе Вейлера и Ребиндера [16] через 72 часа после их приготовления.

Изучение линейной дилатометрии пленок, полученных путем высушивания на подложке дисперсных систем желатины и коллагена, проводили с помощью прибора конструкции Кайминя [17], который широко используется для изучения структуры белковых пленок [18]. Удельное оптическое вращение растворов белков измеряли на поляриметре с точностью отсчета $\pm 0,05^\circ$. Количество формальдегида, прочно связанного с белком в течение 24 час. и не отщепляющегося после диализа против воды, определяли методом иодометрического титрования НСНО, отогнанного в кислой среде [19].

На рис. 1 приведена зависимость изменения структурно-механических свойств растворов желатины во времени. Кривые этого рисунка свидетельствуют о том, что при добавлении небольших количеств формальдегида ($0,16 \text{ моль/л}$) предельное напряжение сдвига раствора желатины растет. Увеличение количества добавленного формальдегида ($0,5 \text{ моль/л}$) приводит к замедлению процесса структурообразования; при добавлении формальдегида более высоких концентраций ($\geq 1 \text{ моль/л}$) способность к застудневанию у растворов желатины исчезает.

Прочное связывание белком формальдегида при его исходной концентрации в растворе 1 моль/л

Объект	Концентрация белка		Количество молекул НСНО на 1 экв, основных групп белка		Отношение связанного НСНО к дозировке
	вес.%	экв/л основных групп	дозировка	связывание	
Желатина, pH 3,5	2,0	0,0020	500	0,312	0,0006
Желатина, pH 9,0	2,0	0,0020	500	0,672	0,0013
Кислоторастворимый коллаген, pH 3,5	1,2	0,0012	830	0,113	0,00013

Аналогичные данные были получены для более концентрированных гелей желатины в кислой и нейтральной среде (рис. 2).

В случае добавления формальдегида к раствору кислоторастворимого коллагена кривые кинетики структурообразования имеют иной характер. Как видно из рис. 3, в противоположность раствору желатины предельное напряжение сдвига раствора коллагена без формальдегида с течением времени остается постоянным. Введение в систему формальдегида приводит к увеличению структурирования системы, интенсивность которого растет с повышением концентрации НСНО. Исследования более концентрированных нейтральных гелей тропоколлагена привели к аналогичным результатам (рис. 2, кривая 1).

Данные о количестве формальдегида, не отщепляющегося от функциональных групп белка при его длительном диализе, приведены в таблице.

Показано, что при используемых в работе дозировках формальдегида количество последнего значительно превышает общее содержание основных групп обрабатываемого белка (остатков лизина, оксилизина и аргинина). Тем не менее ни в одном случае полной необратимой блокировки этих функциональных групп в результате взаимодействия с НСНО достигнуто не было. При повышении значения pH растворов формальдегида от 3,5 до 9,0 отношение количества прочно связанного с белком формальдегида возрастает, что, как известно [2], объясняется падением диссоциации групп основного характера в белке при повышении pH раствора. В сопоставимых условиях кислоторастворимый коллаген фиксирует примерно в 4 раза меньше НСНО, чем желатина. По-видимому, часть функциональных групп белка, реагирующих с формальдегидом, недоступна для этой реакции благодаря межпептидному взаимодействию в структуре трехцепочечных молекул коллагена. Несмотря на значительно меньшее по сравнению с желатиной количество связанного формальдегида, струк-

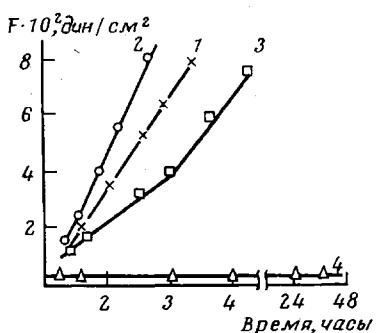


Рис. 1. Изменение прочности пространственных структур водного раствора желатины под влиянием формальдегида во времени:

1 — раствор желатины, $c=1,5\%$;
2—4 — то же, с добавками 0,16 (2),
0,53 (3) и 1,0 моль/л формальдегида
(4); pH 5,2 (1) и 3,5 (2—4)

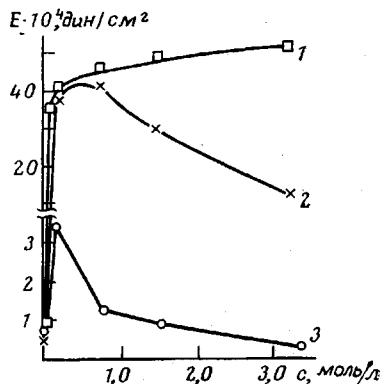


Рис. 2. Зависимость равновесного модуля эластичности геля желатины и тропоколлагена от добавок формальдегида. Длительность обработки 72 часа:

1 — тропоколлаген, $c=1,2\%$, pH 7,8;
2 — желатина, $c=5\%$, pH 7,0; 3 — желатина, $c=2\%$, pH 3,5

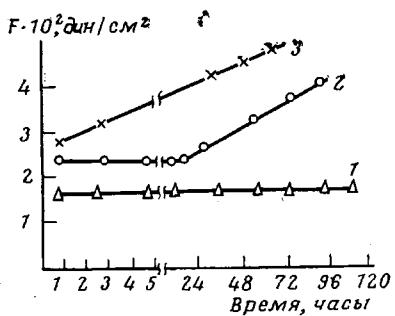


Рис. 3. Изменение прочности пространственных структур водного раствора кислоторастворимого коллагена во времени:

1 — раствор коллагена, $c=0,8\%$; 2, 3 — то же, с добавками 1,0 (2) и 5,0 моль/л формальдегида (3); pH 3,5

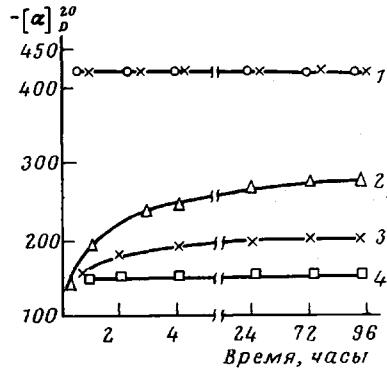


Рис. 4. Изменения удельного оптического вращения растворов желатины и кислоторастворимого коллагена во времени в присутствии формальдегида:

1 — раствор коллагена ($c=0,8\%$), концентрация формальдегида $c=5$ моль/л, pH 3,5 (точки) — раствор коллагена; крестики — раствор коллагена с формальдегидом; 2—4 — раствор желатины ($c=1,5\%$) с добавками 0 (2), 1 (3) и 5 моль/л формальдегида (4)

турирование коллагена проявляется в большей степени, чем в гелях желатины в кислой и нейтральной средах. Для выяснения причины различного влияния формальдегида на процесс структурообразования желатины и коллагена были проведены поляриметрические исследования их растворов, результаты которых представлены на рис. 4.

Как известно, в растворах желатины во времени происходит образование макромолекул с упорядоченными структурированными участками, о чем свидетельствует рост отрицательных значений удельного оптического вращения [20] (рис. 4, кривая 2).

Введение формальдегида в раствор желатины приводит к замедлению, а при повышении концентрации формальдегида к подавлению дальнейшего процесса мутаротации макромолекул белка (рис. 4, кривые 3, 4), что связано с образованием поперечных межмолекулярных связей, препятствующих спирализации макромолекул желатины во времени. Показан-

но, что удельное оптическое вращение раствора кислоторастворимого коллагена значительно выше такового для желатины независимо от времени и при добавлении формальдегида (рис. 4, кривая 1). Таким образом, проведенные исследования показали, что обнаруженное в этой работе падение интенсивности структурообразования дисперсных систем желатины при повышенных дозировках НСНО не связано с деструктивным действием этого реагента.

Дилатометрические исследования желатиновых и коллагеновых пленок, полученных высушиванием растворов этих белков, показали (рис. 5),

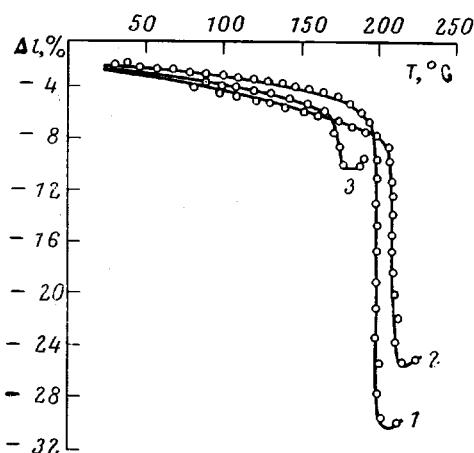


Рис. 5. Температурная зависимость изменения линейных размеров желатиновых пленок Δl , задубленных формальдегидом:
1 — без формальдегида; 2, 3 — концентрация формальдегида 0,16 и 3,0 моль/л соответственно

ными цепочками, которые препятствуют их сверхсокращению. Результаты этих исследований согласуются с данными по изучению структуры желатины и коллагена в состоянии геля (рис. 1–3).

Очевидно, в случае желатины при незначительных добавках формальдегида преобладающим будет эффект межмолекулярного скрепления, что проявляется в увеличении структурной вязкости гелей белка и температуры сверхсокращения пленок, полученных высушиванием этих гелей. При увеличении концентрации формальдегида, когда связано больше функциональных групп, способность к аутогезии сферических частиц в студнях желатины очень сильно уменьшается. Не исключено также затруднение взаимной диффузии отрезков полипептидных цепей, соприкасающихся клубков из-за уменьшения подвижности конечных участков макромолекул. В результате этого сопротивление деформации таких студней, состоящих из отдельных анизотропных слабо скрепленных между собой частиц, падает, а термическая устойчивость высущенных из таких систем пленок снижается. В растворах и пленках тропоколлагена и кислоторастворимого коллагена этот эффект не наблюдается. Обнаруженное различие может быть объяснено неодинаковым характером белкового каркаса в студнях этих белков.

В случае растворимого коллагена цепочки молекулярного каркаса состоят не из слипшихся сферических частиц, а из сетки микрофибрилл, связанных между собой химическими связями. В этом случае необходимость дополнительной аутогезии элементов структуры вдоль оси микрофибрилл отпадает, и изменение механических свойств структуры белка определяется образованием поперечных метиленовых мостиков.

Поступила в редакцию
1 X 1976

ЛИТЕРАТУРА

1. Н. И. Егоркин, М. А. Мамедов, О. Д. Рогваргер, Формальдегидное дубление, Гизлэгпром, 1957.
2. А. Н. Михайлов, Коллаген кожного покрова и основы его переработки, «Легкая индустрия», 1971.
3. К. Н. Gustavson, The Chemistry of Tanning Processes, London — New York, 1956.
4. Э. Меллон, Химия и технология кожи, т. 2, под ред. Ф. О'Флаэрти, Гизлэгпром, 1962.
5. М. С. Остриков, А. Н. Михайлов, В. И. Обухов, В. А. Пшеменская, Кожевенно-обувная промышленность, 1970, № 2, стр. 21.
6. А. Н. Михайлов, С. М. Когенман, Сб. Физико-химия коллагена, танидов и процессов дубления, Гизлэгпром, 1941, стр. 183.
7. П. И. Зубов, З. Н. Журкин, В. А. Каргин, Коллоидн. ж., 9, 367, 1947.
8. В. А. Пчелин, Н. В. Григорьева, В. Н. Измайлова, Докл. АН СССР, 151, 134, 1963.
9. Е. М. Белавцева, Е. Ф. Титова, Е. Е. Брауде, В. Б. Толстогузов, Биофизика, 19, 19, 1974.
10. H. Bungenberg de Jong, Proc. Konikl. Nederland. Acad. Wet., Amsterdam., 41, 646, 1938.
11. Ж. Леб, Белки и теория коллоидных явлений, Гизлэгпром, 1933, стр. 52.
12. Е. В. Минкин, И. С. Шестакова, Научн. труды МТИЛП, 1962, вып. 25, стр. 52.
13. А. А. Тустановский, В. Н. Орехович, Докл. АН СССР, 60, 837, 1948.
14. В. А. Пчелин, В. Н. Измайлова, В. П. Мерзлов, Высокомолек. соед., 5, 9, 1963.
15. W. Ostwald, H. Maiss, Kolloid-Z., 63, 61, 1933.
16. Е. Е. Сегалова, П. А. Ребиндер, Коллоидн. ж., 10, 223, 1948.
17. И. Ф. Кайминь, Пласт. массы, 1966, № 9, 62.
18. Г. И. Бурдыгина, И. М. Фридман, П. В. Козлов, В. А. Каргин, Высокомолек. соед., AII, 3, 1969.
19. J. Highberger, A. C. Retzsch, J. Amer. Leath. Chem. Assotiation, 33, 341, 1938.
20. В. Н. Измайлова, П. А. Ребиндер, Структурообразование в белковых системах, «Наука», 1974.

УДК 541.64:539.3

ОСОБЕННОСТИ МЕХАНИЧЕСКОГО ПОВЕДЕНИЯ СТЕКЛООБРАЗНОГО ПОЛИВИНИЛХЛОРИДА В ШИРОКОМ ДИАПАЗОНЕ СКОРОСТЕЙ РАСТЯЖЕНИЯ

Волынский А. Л., Александров А. Г., Кечекьян А. С.,
Заварова Т. Б., Скоробогатова А. Е.,
Аржаков С. А., Бакеев Н. Ф.

Многие полимерные стекла, такие, как, например, весьма распространенные в практике ПММА, ПС и ПВХ, представляют собой в области комнатных температур хрупкие материалы. В данном случае под хрупкостью мы понимаем их способность разрушаться при малых (3–5%) значениях деформации. Однако распространение трещины в таких материалах требует затрат энергии $3 \cdot 10^5$ – $2 \cdot 10^6$ эрг/см² в расчете на поверхность новой трещины, что на 2–3 десятичных порядка больше значения энергии, получаемого теоретически из предположения о разрыве цепей макромолекул, ориентированных перпендикулярно направлению растущей трещины [1]. Это явление объясняют развитием пластических деформаций в тонких слоях у поверхности разрушения [2]. Тем не менее характер кривых растяжения у вышеупомянутых полимеров напоминает кривые растяжения низкомолекулярных хрупких тел. Заметное увеличение пластичности полимерных стекол наблюдается при введении в них тонких дисперсий (~0,1–1 мкм) каучуков. В этом случае резко возрастает стойкость к ударным нагрузкам соответствующих пластиков, хотя напрерыв-