

## WŁAŚCIWOŚCI PREPARATÓW KOLAGENOWYCH ZE SKÓR RYB POZYSKIWANYCH METODĄ KWAŚNEJ HYDRATACJI

### *PROPERTIES OF FISH SKIN COLLAGEN OBTAINED BY ACIDIC HYDRATION METHOD*

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Biofizyki

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Kierownik: prof. dr hab. Feliks Jaroszyk

<sup>2</sup>Zakład Fizjoterapii PWSZ w Pile

Instytut Ochrony Zdrowia

PWSZ im. Stanisława Staszica w Pile

Kierownik: prof. dr hab. Feliks Jaroszyk

---

#### Streszczenie

**Wstęp.** Kolagen stanowi 30% całkowitej masy białka ludzkiego i jest odpowiedzialny za sprężystość i jędrność skóry, jej właściwe nawilżenie i ciągłą odnowę jej komórek. Wraz z wiekiem zdolność syntezy kolagenu przez organizm maleje. Do jej zaburzeń dochodzi również przy nadmiernej aktywności fizycznej, uprawianiu sportu wyczynowego oraz chorobach autoagresyjnych (np. w zwyrodnieniu stawów). Zaburzenia w metabolizmie kolagenu objawiają się nie tylko dysfunkcjami w obrębie aparatu ruchu (sztywność, bóle okołostawowe), ale również w tych tkankach i narządach, dla których kolagen i substancje blizniacze pełnią funkcje strategiczne.

Specyfika budowy chemicznej materiałów biologicznych, takich jak keratyna, elastyna, kości czy kolagen przekłada się na ich właściwości fizyko-chemiczne, które możemy ocenić wykorzystując np. badania temperaturowej zależności przewodności elektrycznej. Pomiary tej zależności pozwalają również na badanie procesów wityfikacji czy procesów uwalniania wody swobodnej, związanej i strukturalnej zachodzących w ogrzewanym materiale. Badania te mają na celu określenie stabilności termicznej badanego materiału, co zostanie aktywnie wykorzystane w procesach technologicznych.

Do tej pory w światowej kosmetyce stosowano kolagen ssaków. Jednakże na skutek epidemii BSE kolagen ten jest systematycznie zastępowany preparatem uzyskiwanym z ryb o znacznie lepszych właściwościach kosmetycznych, co związane jest z zastosowaniem do jego otrzymywania, tzw. kwaśnej hydratacji, która pozwala na zachowanie struktury potrójnej helisy. Pozwala to na zachowanie aktywności biologicznej kolagenu, który penetrując przestrzeń zewnątrzkomórkową naskórka wywiera wpływ na aktywność keratynocytów i fibroblastów dając szereg oddziaływań kosmetycznych i dermatologicznych.

**Cel pracy.** Celem pracy jest ocena stabilności termicznej kolagenu w postaci stałej, pochodzącego ze skór ryb (kolagen FS – fish skin collagen) na podstawie pomiarów temperaturowej zależności przewodności elektrycznej właściwej oraz porównanie kolagenu FS i kolagenu BAT (Bovine Achilles Tendon) poprzez oznaczenie składu aminokwasowego. Wyznaczenie temperatur denaturacji oraz zbadanie procesu uwalniania wody swobodnej, wody związanej i porównanie w przypadku kolagenu FS i kolagenu BAT.

**Materiał i metodyka.** W badaniach wykorzystano kolagen pochodzący ze skór ryb (kolagen FS – fish skin collagen), otrzymany metodą Przybylskiego. Jako materiału kontrolnego użyto kolagenu typu I pochodzącego z bydłęcego ścięgna Achillesa (kolagen BAT – Bovine Achilles Tendon). Oznaczenie składu aminokwasowego kolagenu przeprowadzono przy użyciu automatycznego analizatora aminokwasowego. Oznaczenia hydroksyproliny wykonano spektrofotometrycznie, a pomiary temperaturowej zależności przewodności elektrycznej właściwej wykonano metodą dwuelektrodową.

**Wyniki.** Zawartość hydroksyproliny w przypadku kolagenu BAT jest o 30% większa od kolagenu FS. W przypadku kolagenu FS widoczne są dwa charakterystyczne piki: w temperaturze 359 K i 454 K, natomiast dla kolagenu BAT jeden pik w temperaturze 337 K. Niższa temperatura denaturacji kolagenu FS związana z mniejszą zawartością hydroksyproliny świadczy o jego mniejszej stabilności termicznej w porównaniu z kolagenem BAT.

**Wnioski.** Badania temperaturowej zależności przewodności elektrycznej właściwej informują o zmianie konformacji molekuly (denaturacja) i uwalnianiu wody – czyli pośrednio o stabilności termicznej, bo im wyższa jest temperatura denaturacji i później od dawana woda, tym cząsteczka jest stabilniejsza termicznie.

**SŁOWA KLUCZOWE:** kolagen rybi, kolagen wołowy, hydroksyprolina, temperatura denaturacji.

#### Summary

**Introduction.** Collagen constitutes 30% of the total human protein mass. It is responsible for skin firmness, elasticity, proper moisture and constant renovation of skin cells. With age the human body loses the ability to rebuild collagen. Especially after constant damage i.e. physical activity, competitive sports and autoimmune diseases (eg. arthritis degeneration).

Collagen metabolism impairment is manifested not only by dysfunctions within the musculoskeletal system (rigidity, periarticular pain) but also within the tissues and organs for which collagen and similar substances play strategic functions.

The specificity of the chemical structure of biological materials such as keratin, elastin, bone or collagen results in their physico-chemical properties, which can be assessed using tests such as temperature dependence of electrical conductivity. Application of temperature dependence of electrical conductivity allows for the study of such processes in the heated material, such as vitrification process

or processes of release of free water, bound and structural. The study intended to determine the thermal stability of the material, which is the practical application of technological processes.

However, as a result of the BSE epidemic collagen is systematically replaced with a preparation obtained from fish with much better cosmetic properties, which is connected with the use of its preparation, the so-called acid hydrate, which preserves the structure of the triple helix.

**Aim.** The aim of study is the estimation of the thermal stability of FS (fish skin) collagen in solid form, from measurements of temperature dependence of electrical conductivity. Authors compared FS and BAT (Bovine Achilles Tendon) collagen by determining the amino acid composition, the denaturation temperature and release of free water and bound water in these two forms of collagen.

**Material and method.** The study used collagen derived from fish skins (FS - fish skin collagen) obtained by Przybylski. As a control material type I collagen from bovine Achilles tendon (BAT Collagen – Bovine Achilles Tendon) was used. Determination of amino acid composition of collagen was performed using an automatic amino acid analyzer. Hydroxyproline content was estimated by spectrophotometry. Measurements of temperature dependence of electrical conductivity were performed in two-electrode probe.

**Results.** The hydroxyproline content in collagen in the case of BAT is 30% larger than in the FS. The dependence of electrical conductivity on temperature for FS shows two characteristic peaks: at 359 K and 454 K, whereas for BAT one peak at a temperature of 337 K. The lower denaturation temperature of FS is associated with lower content of hydroxyproline, thus its lower thermal stability compared with BAT.

**Conclusions.** The temperature dependence of electrical conductivity reflected changes in the conformation of the molecule (denaturation) and release of water – or indirectly on thermal stability, because the higher is the temperature of the denaturation and then later release of water, the more thermally stable is the molecule.

**KEY WORDS:** Fish Skin Collagen, Bovine Achilles Tendon, hydroxyproline, denaturation temperature.

### Wstęp

Ze względu na biologiczne i techniczne znaczenie kolagenu zainteresowanie badaniami nad nim i uzyskanymi wynikami, ich problematyką i metodami nie zmalało w ciągu ostatnich lat, lecz bardzo wydatnie wzrosło.

Kolagen, niezależnie od swego pochodzenia, zawiera 19 aminokwasów, w tym hydroksyprolinę nie występującą w innych białkach. Jego nietypowy skład aminokwasowy wynika z dużej zawartości glicyny i proliny, przy jednoczesnym braku cysteiny, cystyny i tryptofanu (z wyjątkiem kolagenu III) [1]. Inną rzadką cechą kolagenu jest regularność rozmieszczenia aminokwasów, w każdym z jego  $\alpha$ -łańcuchów. Łańcuchy te składają się z regularnych triad aminokwasów: Gly-X-Y, gdzie Gly - to glicyna, a X i Y to inne aminokwasy. Na ogół X to prolina, zaś Y to hydroksyprolina. Niewiele innych białek wykazuje taką regularność, która powoduje, że łańcuchy  $\alpha$  na skutek oddziaływań między sobą mają tendencję do przyjmowania ściśle określonej konformacji.

Białka kolagenowe różnią się nieznacznie pomiędzy poszczególnymi gatunkami zwierząt. Jednakże różnice te w znacznym stopniu wpływają na właściwości tego białka. Kolagen wyższych kręgowców jest zazwyczaj bardziej usieciowany i posiada wyższą temperaturę denaturacji. Dodatkowo podczas starzenia się kolagenu zwierząt wyższych tworzą się wewnątrz- i międzycząsteczkowe poprzeczne kowalencyjne wiązania sieciujące, które zwiększają stabilność włókien kolagenowych. Wraz ze wzrostem ilości tych wiązań zwiększa się gęstość kolagenu oraz jego wytrzymałość, a zmniejszeniu ulega rozpuszczalność kolagenu. Skóra, zawierająca włókna kolagenowe, staje się mniej elastyczna i jędrna. Kolagen pochodzący ze skór rybich jest znacznie mniej usieciowany niż kolagen skór bydlęcych czy wieprzowych, a jego rozpuszczalność jest w związku z tym znacznie wyższa niż dwóch pozostałych [2]. Większa

rozpuszczalność kolagenu występującego w skórze ryb pozwala ponadto na uzyskanie natywnej formy kolagenu w produkcie końcowym – hydrożelu kolagenowym, przy zastosowaniu niezwykle delikatnej metody uzyskiwania tego białka w warunkach zachowawczych [2, 3]. Uzyskanie kolagenu ze skór wieprzowych i bydlęcych wymaga bardzo agresywnej obróbki chemicznej i/lub enzymatycznej, które powodują znaczną degradację tego białka. Ponadto białko bydlęce może być nośnikiem prionów [4, 5].

Wzrost zainteresowania kolagenem pochodzącym ze skór ryb związany jest z opanowaniem techniki uzyskiwania natywnego kolagenu metodą kwaśnej hydratacji oraz zagrożeniem wynikającym z narażenia na chorobę Creutzfelda-Jacoba czy BSE związaną z możliwością przeniesienia prionów przez kolagen bydlęcy [2, 3]. Metoda ta pozwala na uzyskanie kolagenu o natywnej formie w produkcie końcowym. Otrzymany w ten sposób kolagen może być stosowany nie tylko w postaci żelu czy roztworu, ale również w postaci stałej, zastępując stosowany do tej pory kolagen bydlęcy.

Opisane w literaturze badania temperaturowej zależności przewodności elektrycznej właściwej mają na celu ocenę procesów zachodzących w kolagenie rybnym i kolagenie bydlęcym oraz pozwalają na ich porównywanie. Badania te mogą informować o zachodzących procesach dojrzewania i starzenia. W przypadku polimerów procesy starzeniowe można przyspieszyć poprzez ogrzewanie. Wśród stosowanych metod badawczych, temperaturowa zależność przewodności elektrycznej właściwej może być wykorzystywana do badań materiałów kompozytowych, polimerów, materiałów biologicznych, takich jak kości, skór, elastyna czy kolagen, tj. materiałów o właściwościach półprzewodnikowych bądź dielektrycznych [6–9].

### Cel pracy

Celem pracy jest ocena stabilności termicznej kolagenu w postaci stałej, pochodzącego ze skór ryb (kolagen FS – fish skin collagen) na podstawie pomiarów temperaturowej zależności przewodności elektrycznej właściwej oraz porównanie kolagenu FS i kolagenu BAT (Bovine Achilles Tendon) pod kątem zawartości hydroksyproliny, alaniny i glicyny poprzez oznaczenie składu aminokwasowego. Wyznaczenie temperatur denaturacji oraz zbadanie procesu uwalniania wody swobodnej, wody związanej i porównanie w przypadku kolagenu FS i kolagenu BAT.

### Material i metody

W badaniach wykorzystano kolagen pochodzący ze skór ryb (kolagen FS – fish skin collagen), otrzymany metodą Przybylskiego [10, 11]. Polega ona na przeprowadzeniu hydratacji oczyszczonej skóry w roztworze kwasu mlekowego o stężeniu od 0,1 do 1,5%. Proces hydratacji jest przeprowadzany w szklanych pojemnikach, w zakresie temperatur 15–20°C, przez okres od 24 do 48 godzin. W wyniku wielokrotnej filtracji z wykorzystaniem naturalnego jedwabiu o wzrastającej gęstości oddzielano od czystego kolagenu elementy komórkowe, pigmenty oraz pozostałości kwaśnego roztworu. Filtry z jedwabiu naturalnego mają strukturę zbliżoną do struktury kolagenu, pozwalając na zachowanie natywnej jego struktury [10–12]. Materiał został uzyskany od właściciela patentu [10, 11]. Jako materiału kontrolnego użyto kolagenu typu I pochodzącego z bydłęcego ścięgna Achillesa (kolagen BAT – Bovine Achilles Tendon) zakupionego w SIGMA Aldrich.

Film kolagenowy FS, wykorzystywany w badaniach elektrycznych, uzyskano po odparowaniu wody (w temperaturze 278K) z hydrożelu kolagenowego. Z otrzymanego filmu, o grubość  $(0,08 \pm 0,01)$  mm. Przygotowana w ten sposób kolagenowa próbka, została wykorzystana do wyznaczenia temperaturowej zależności przewodności elektrycznej właściwej oraz do analizy składu aminokwasowego.

Oznaczenie składu aminokwasowego kolagenu przeprowadzono przy użyciu automatycznego analizatora aminokwasowego, działającego w oparciu o HPLC (ang. High Performance Liquid Chromatography) dla próbek poddanych wcześniej kwaśnej hydrolizie. Oznaczenie zawartości białka dokonano stosując metodę Kjeldahla. Do tego celu wykorzystano automatyczny analizator aminokwasów AAA T-339 firmy Mikrotechnika Praha.

Oznaczenia hydroksyproliny wykonano spektrofotometrycznie, wykorzystując zmodyfikowaną przez Hurycha i Chvapila, metodę Stegmanna [13].

Pomiary temperaturowej zależności przewodności elektrycznej właściwej wykonano metodą dwuelektrodową. Pomiary przeprowadzone zostały w stałym polu elektrycznym o natężeniu  $E = 1$  kV/m. Na podstawie wymiarów geometrycznych próbki, wartości przyłożonego napięcia oraz zmierzonego przy pomocy elektro-

metru natężenia prądu (Keithley 6514), wyznaczono wartość przewodności elektrycznej właściwej. Temperaturę próbki mierzono niezależnie przy pomocy termopary. Próbki zostały umieszczone w komorze pomiarowej i poddane cyklicznemu ogrzewaniu mającemu na celu progresywną eliminację pików pojawiających się na rejestrowanych termogramach. Każdy etap grzewczy zakończony był schłodzeniem do temperatury pokojowej. Każde kolejne grzanie miało na celu wyeliminowanie punktu maksimum (piku) obserwowanego podczas pierwszego ciągłego grzania. Ostatni cykl ogrzewania kończy się powyżej temperatury denaturacji kolagenu w postaci stałej. Wszystkie pomiary wykonano pod ciśnieniem atmosferycznym. Temperatura próbki była mierzona przy pomocy termopary miedź-konstantan. Liniowy wzrost temperatury próbki zapewniał regulator temperatury. Badania temperaturowej zależności przewodności elektrycznej właściwej obejmują zakres temperatur 290–510 K. Badania te przeprowadzono w dwóch etapach. W pierwszym etapie próbki zostały ogrzane w zakresie 290–380 K. Celem było zbadanie procesu oddawania wody swobodnej i związanej, której eliminacja następuje w tym zakresie temperatur. W drugim etapie, po uprzednim schłodzeniu próbki, zostały ponownie ogrzane do temperatury 510 K. Ogrzewanie to miało na celu wyznaczenie temperatury denaturacji  $T_D$ . Temperatura denaturacji kolagenu zależy od trzech czynników: naturalnej temperatury żerowiska ryby, z której surowiec pozyskano, od zawartości wody w kolagenie i od stopnia jego usieciowania [14].

### Wyniki

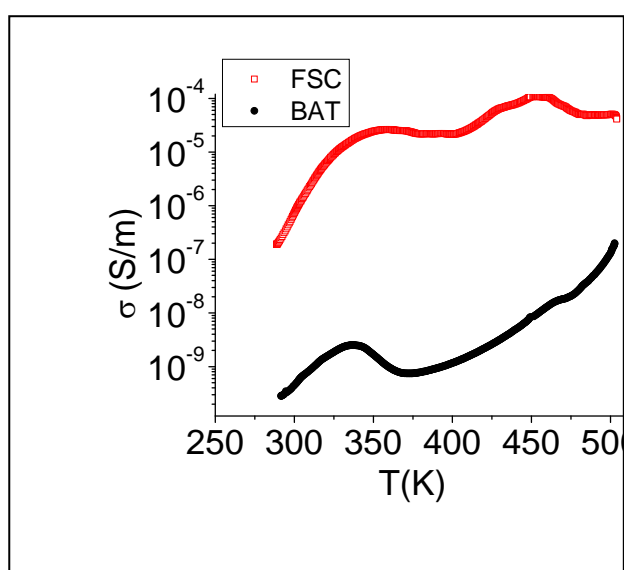
Wyniki oznaczenia białka i hydroksyproliny oraz składu aminokwasowego dla kolagenu FS i kolagenu BAT zebrano w tabeli 1. Błąd względny oznaczenia zawartości poszczególnych aminokwasów wynosił 5%, natomiast w przypadku białka 0,5%.

Zarówno kolagen FS, jak i kolagen BAT wykazuje wysoką i stosunkowo niezmienną zawartość glicyny (kolagen FS 21,8 g/100 g białka, BAT 19,2 g/100 g białka). Kolagen FS zawiera także dużą ilość – prolina (13,5 g/100 g), podobnie jak kolagen BAT (13,9 g/100 g). Porównując skład ilościowy aminokwasów kolagenu FS i kolagenu BAT stwierdzono brak cystyny oraz znaczne różnice w ilości hydroksyproliny [15, 16]. Porównanie zawartości hydroksyproliny w kolagenie FS i kolagenie BAT przy pomocy testu Welcha, przy założeniu normalności rozkładu, pozwoliło na stwierdzenie istotnie mniejszej zawartości tego aminokwasu w FS ( $p = 0,0063$ ). Zawartość hydroksyproliny w przypadku kolagenu BAT jest o 30% większa od kolagenu FS i wynosi 8,1 g/100 g białka. Natomiast w przypadku kolagenu FS 5,6 g/100 g białka.

**Tabela 1.** Skład aminokwasowy kolagenu FS i kolagenu BAT  
Table 1. Amino acid composition of FS and BAT

Material	Kolagen FS g/100 g białka	Kolagen BAT g/100 g białka
Cystyna	Brak	Brak
Glicyna	21,83	19,22
Alanina	10,54	9,51
Hydroksypolina	5,68	8,15
Białko ogółem (N x 6,25)	65,66	79,40

FS – Fish Skin Collagen;  
BAT – Bovine Achilles Tendon  
p = 0,0063

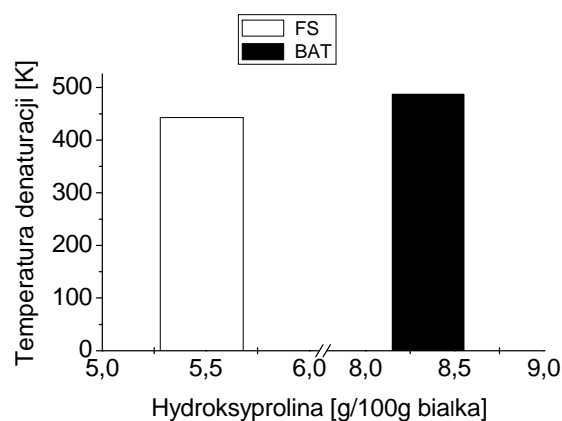


**Rycina 1.** Temperaturowa zależność przewodności elektrycznej właściwej podczas grzania ciągłego w temperaturze 290–510 K dla kolagenu FSC i kolagenu BAT.

Figure 1. Temperature dependence of electrical conductivity during the heating run in range of the temperature 290–510 K for FS and BAT.

Badania wpływu temperatury na wartość przewodności elektrycznej właściwej przeprowadzono ogrzewając próbki ze stałą szybkością. Na rycinie 1. przedstawiono uzyskane wyniki przewodności elektrycznej właściwej od temperatury podczas pierwszego i drugiego grzania dla kolagenu FS i kolagenu BAT, w przypadku grzania ciągłego w zakresie 290–510 K. Ze względu na niewielkie zmiany w przewodności elektrycznej właściwej oraz znacznie mniejszą przewodność elektryczną kolagenu BAT, wyniki przedstawiono w skali półlogarytmicznej. W przypadku kolagenu FS widoczne są dwa charakterystyczne piknięcia: w temperaturze 359 K i 454 K, natomiast dla kolagenu BAT jeden piknięcie w temperaturze 337 K. Wyższe wartości przewodności elektrycznej właściwej przyjmuje kolagen FSC, rzędu  $10^{-6}$  S/m do  $10^{-4}$  S/m, gdy kolagen BAT przyjmuje wartości od  $10^{-10}$  S/m do  $10^{-7}$  S/m. Jeśli usunięta zostanie woda swobodna i woda związana to ubytek masy próbki po wygrzaniu powyżej

temperatury denaturacji związany jest z uwalnianiem wody strukturalnej. Niższa temperatura denaturacji kolagenu FS związana jest z niższą zawartością hydroksypoliny (ryc. 2.).



**Rycina 2.** Temperatura denaturacji w kolagenu FS i BAT.  
Figure 2. The denaturation temperature of collagen in FS and BAT.

## Dyskusja

Znajomość struktury biochemicznej kolagenu wiąże się przede wszystkim ze znajomością składu aminokwasowego oraz sekwencją aminokwasów. Potrójna helisa kolagenowa zbudowana jest z trzech łańcuchów tropokolagenu połączonych ze sobą za pomocą wiązań kowalencyjnych utworzonych poprzez znajdującą się dośrodkowo glicynę. Struktura spiralna powstaje głównie dzięki alaninie, fenyloalaninie, asparaginie, glutaminie, histydynie, leucynie, metioninie, tyrozynie i tryptofanowi. Walina i izoleucyna ze względu na duże rozmiary łańcuchów bocznych nie mogą uczestniczyć w formowaniu stabilnej struktury  $\alpha$  helisy. Seryna, treonina, prolina i hydroksypolina zakłócają regularne struktury helisy. Dwa pierwsze aminokwasy z powodu dodatkowych wiązań wodorowych tworzonych przez ich grupy hydroksylowe [17–20]. W przypadku proliny atom azotu wbudowany jest w pierścień heterocykliczny, co wyklucza możliwość obrotu wokół wiązania węgiel-azot oraz wytworzenia wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych. Poprzez

obecność proliny, łańcuch może ulec przegięciu lub nawet utworzyć pętlę.

Oznaczenie zawartości białka metodą Kiejdahla oraz przeprowadzenie analizy składu aminokwasowego pozwoliło na ocenę różnic pomiędzy kolagenem FS i kolagenem BAT. Szczególna uwaga została zwrócona na hydroksyprolinę, aminokwas charakterystyczny dla kolagenu, którego zawartość, według doniesień literaturowych, decyduje o stabilności termicznej kolagenu. Występowanie hydroksyproliny jako specyficznego aminokwasu kolagenu wykorzystuje się praktycznie w metodach ilościowego oznaczania kolagenu.

Analiza aminokwasowa oprócz porównania składu badanych kolagenów pod względem zawartości najważniejszych aminokwasów ma na celu stwierdzenie, czy zawartość hydroksyproliny jest skorelowana z  $T_D$ , na co wskazują dane literaturowe [21, 22]. Jeśli usunięta zostanie woda swobodna i woda związana to ubytek masy próbki po wygrzaniu powyżej temperatury denaturacji związany jest z uwalnianiem wody strukturalnej.

W przypadku denaturacji łańcuch białkowy traci swoją, stabilizowaną niekowalencyjnymi oddziaływaniami oraz wiązaniami disulfidowymi, konformację i przechodzi, na skutek drgań termicznych, w strukturę nieuporządkowaną, o charakterze statystycznym. Zsyntetyzowany w komórce łańcuch białkowy przypomina unoszącą się swobodnie w roztworze „nitkę”, która może przyjąć dowolny kształt (tzw. kłębek statystyczny), ale ulega procesowi tzw. zwijania białka (ang. protein folding) tworząc mniej lub bardziej sztywną strukturę przestrzenną, zwaną strukturą lub „natywną” konformacją białka. Tylko cząsteczki, które uległy zwinięciu do takiej struktury mogą pełnić właściwą danemu białku rolę biochemiczną. Forma taka nie wykazuje aktywności biologicznej. Usunięcie czynnika denaturującego powoduje wytworzenie wiązań wodorowych oraz disiarczkowych między różnymi miejscami łańcucha w sposób przypadkowy, a co za tym idzie ustabilizowanie nieaktywnej struktury. W przypadku kolagenu FSC proces denaturacji rozpoczyna się w 443 K, a dla kolagenu BAT w temperaturze 487 K.

Przewodnictwo elektryczne materiałów biologicznych w znacznym stopniu zależy od zawartości wody. Stan wody związanej z makrocząsteczką w znaczeniu biologicznym jest z punktu widzenia energetyki układu stanem pośrednim między stanem stałym i ciekłym. Badania przewodności elektrycznej białek wskazują, że zawartość wody ułatwia procesy transportu elektrycznego, a przewodność elektryczna właściwa białek w stanie stałym zależy od zawartości wody [23–26]. Kolagen jako materiał higroskopijny, adsorbuje pewną ilość pary wodnej z powietrza. Ilość zaadsorbowanej pary wodnej zależy od wilgotności i temperatury powietrza i ma wpływ na jego właściwości fizyko-chemiczne.

Kolagen wykazuje wysoką i stosunkowo niezmienną zawartość glicyny, zawiera on również duże ilości proliny i hydroksyproliny. Istnienie zależności między temperaturą skurczu  $T_s$ , a zawartością hydroksyproliny postulował jako pierwszy już w 1953 r. Gustavson [27].

Stabilizujące działanie hydroksyproliny polega na możliwości tworzenia mostków wodorowych  $-O-H...O=C-$ . Działanie stabilizujące proliny i hydroksyproliny wynika prawdopodobnie ze szczególnych cech stereochemicznych pierścienia pirolidynowego [28]. Przyjmuje się, że temperatura skurczu jest miarą liczby i trwałości wiązań sieciujących w kolagenie. Spadek lub wzrost temperatury skurczu informuje o zmianach zachodzących w strukturze kolagenu. Badania literaturowe dotyczące kinetyki procesu denaturacji za pomocą rozpraszania światła w roztworach [29,30] wykazały, że mechanizm tego procesu jest dwustopniowy. W pierwszej fazie następuje załamanie się struktury spirali, w drugiej degradacja do składników o mniejszej masie cząsteczkowej. Po krótkim ogrzaniu próbki do temperatury przekraczającej  $T_D$  duża część łańcucha polipeptydowego nie zmienia swego położenia względem siebie. Dłuższe ogrzewanie powoduje znaczną dezorganizację cząsteczki.

Oznaczenie składu aminokwasowego przeprowadzono w celu stwierdzenia różnic w zawartości aminokwasów dla kolagenu rybiego (FS) i kolagenu wołowego (BAT). Najmniejszy aminokwas, glicyna, stanowi 27% wszystkich jego aminokwasów, a prolina z hydroksyproliną łącznie 25%. Stwierdzone zawartości aminokwasów wskazują, że średnio co czwarty aminokwas w kolagenie to glicyna i także, co czwarty to prolina lub jej hydroksypochodna – jest to typowe dla kolagenu. Decyduje to o regularnej budowie łańcucha kolagenu i możliwości powstawania stabilizujących ją wiązań między różnymi łańcuchami.

Stężenie hydroksyproliny kolagenu kości to 10,79 g/100 g [24], czyli dwa razy większa ilość niż w przypadku kolagenu FS. Skład aminokwasowy kolagenu jest charakterystyczną cechą tego białka, determinującą także jego strukturę. Hydroksyprolina jest charakterystycznym białkiem kolagenu wpływającym na jego stabilność. Obecność hydroksyproliny powoduje, że kolagen jest bardziej stabilny termicznie, stabilizuje w ten sposób strukturę kolagenu [14, 31]. Im wyższa jest zawartość hydroksyproliny, tym bardziej stabilny jest kolagen. Na podstawie analizy aminokwasowej można przypuszczać, że kolagen FS jest mniej stabilny niż kolagen BAT. Niższa wartość hydroksyproliny jest „wynagrodzona” przez wzrost seryny i treoniny [32]. Uzyskane wyniki potwierdzają hipotezę o związku zawartości hydroksyproliny z temperaturą denaturacji. Skład aminokwasowy kolagenu ssaków lądowych jest dokładnie znany i okazał się w pewnej mierze jednolity. Większe odstępstwa notujemy w przypadku ryb i w świecie bezkręgowców [28, 33, 34].

### Wnioski

Kolagen FS i kolagen BAT wykazują wysoką i zbliżoną do siebie zawartość glicyny oraz proliny. Zawartość hydroksyproliny w przypadku kolagenu BAT jest 30% wyższa od FS. Hydroksyprolina jest charakterystycznym białkiem kolagenu i wpływającym na jego stabilność termiczną. Niższa temperatura denaturacji kolagenu FS związana z mniejszą zawartością hydroksyproliny świadczy o jego mniejszej stabilności termicznej

w porównaniu z kolagenem BAT. Badania temperaturowej zależności przewodności elektrycznej właściwej informują również o zmianie konformacji molekuly (denaturacja) i uwalnianiu wody – czyli pośrednio o stabilności termicznej, bo im wyższa jest temperatura denaturacji i później oddawana woda, tym cząsteczka jest stabilniejsza termicznie.

### Piśmiennictwo

- Michajłow A.N.: Kollagen kożnego pokrowa. Moskwa, Legkaja Industrija 1971.
- Nagai T., Suzuki N.: Isolation of collagen from fish waste material – skin, bone and fins. *Food Chem.*, 2000, 68, 277-281.
- Fernandes R.M.T., Couto Neto R.G., Paschoal C.W.A. et al.: Collagen films from swim bladders: Preparation method and properties, *Colloids and Surfaces B. Biointerfaces*, 2008, 62, 17-21.
- Fujiwara M., Tsukada R., Tsujinaga Y., Takagi M.: Fetal calf serum-free culture of Chinese hamster ovary cells employing Fish serum. *Appl. Microbiol.*, 2007, 75, 983-987.
- Karim A.A., Bhat R.: Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*, 2009, 23, 563-576.
- Marcinkowska A., Hędzulek W., Kubisz L., Gauza M.: Wykorzystanie temperaturowej zależności przewodnictwa elektrycznego materiałów stomatologicznych do ich identyfikacji. *Protet. Stom.*, 58, 2008, 3, 171-177.
- Sierpowska J., Töyräs J., Hakulinen M.A., et al.: Electrical and dielectric properties of bovine trabecular bone-relationships with mechanical properties and mineral density. *Phys. Med. Biol.*, 2003, 48, 775-786.
- Pething R.: Protein-Water interactions determined by dielectric. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 1992, 43, 177-205.
- Marzec E., Pietrucha K.: The effect of different methods of cross-linking of collagen on its dielectric properties. *Bio-phys. Chem.*, 2008, 132, 89-96.
- Przybylski J.E., Siemaszko-Przybylska K.: Patent 190737 Urząd Patentu RP 2002.
- Przybylski J.E. et al.: Patent US 7285638 B2, 2007.
- Matsushita S., Deki S.: Anomalous behavior of electrical conductivity of solubilized collagen solutions with thermal denaturation, *J. Appl. Polymer Sci.*, 2003, Vol. 50, Issue 11, 1969-1975.
- Kubisz L., Marzec E., Jaroszyk F.: Changes in the Electrical Conductivity of the  $\gamma$ -irradiated BAT collagen. *Polish J. Med. Phys. & Eng.*, 2002, 8, 157-164.
- Nemethy G., Scheraga H.A., Stabilization of Collagen Fibrils by Hydroxyproline. *Biochemistry*, 1986, 23, 3184-3188.
- Hurych H., Chvapil M.: Present day problems of collagen research. V. Methods of hydroxyproline determination (in Czech). *Kozařstvi*, 1962, 12, 317-323.
- Kubisz L.: Wpływ promieniowania jonizującego na właściwości elektryczne i cieplne kolagenu kości zwierzęcej. Rozprawa habilitacyjna, Poznań 2002.
- Höbne G., Hemminger W., Flammersheim H.J.: Differential Scanning Calorimetry, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 1996.
- Fois M., Lamure A., Fauran M.J., Lacabanne C.: TSC study of the dielectric relaxations of human-bone collage, *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics*, 2000, 38(7), 987-992.
- Schultze D.: Termiczna Analiza Różnicowa. Warszawa PWN, 1974, 39-45.
- Szczepaniak W.: Metody instrumentalne w analizie chemicznej, PWN, 2002.
- Miles C.A., Bailey A.J., Thermal denaturation of collagen revisited. *Proc. Indian Acad. Sci. Chem. Sci.*, 1999, 111, 71-80.
- Piskunowicz P., Kalawski R., Kubisz L., Greberski K.: Porównawcza różnicowa analiza termiczna elastyny, kolagenu i żył stosowanych w zabiegu CABG. *Now. Lek.*, 2005, 74, supl. II, 60.
- Bigi A., Fichera A.M., Roveri N., Koch M.H.J.: Structural modification of air-dried tendon on heating. *Int. J. Biol. Macromol.*, 1987, 9, 176-180.
- Kubisz L., Andrzejewski P.: Temporary changes in the dc electrical conductivity of MX (3-chloro-4(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone) treated collagen. *J. Biol. Physics*, 2001, 27, 285-294.
- Behari J., Rai D.V., Jah R.: On the solid state of bone. *Calcif. Tissue Int.*, 1979, 28, 33-36.
- Hill D.E., Basic Physics of semiconducting polymers, Organic Semiconducting Polymers, New York, 1968.
- Gustavson K.H., Hydrothermal stability and intramolecular organization of collagens from mammalian and teleost skins. *Sven. Kemisk Tidskrift*, 1953, 65, 70.
- Reich G: Kolagen. Zarys metod, wyniki i kierunki badania, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 1970, 40-73.
- Engel J., Hoppe-Seyler's Z., *Physiol. Chem.*, 1961, 325, 287.
- Engel J., Investigation of the denaturation and renaturation of soluble collagen by light scattering, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1962, 97, 150.
- Rao N.V., Adams E., Collagen helix stabilization by hydroxyproline in (Ala-Hyp-Gly)<sub>n</sub>. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1979, 86, 3, 654-660.
- Piez K.A., Gross J.: The amino acid composition of some fish collagens: the relation between composition and structure. *J. Biol. Chem.*, 1960, 235, 4.
- Ramanathan N., Joseph K.T., Radhakrishnan V.M., Nayudamma Y., *Leder*, 1963, 14, 34.
- James C.W. Chien, E.P.: Chang: Dynamic mechanical and rheo-optical studies of collagen and gelatin. *Biopolymers*, 2004, 11, 10, 2015-2031.

### Adres do korespondencji:

Marlena Gauza  
 Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu  
 Katedra i Zakład Biofizyki  
 ul. Fredry 10  
 61-701 Poznań  
 e-mail: mgauza@ump.edu.pl