

WIESŁAWA WYBÓR, MARIAN ZABORSKI

Politechnika Łódzka

Instytut Polimerów

ul. Żeromskiego 116, 90-924 Łódź

## Budowa i właściwości kolagenu oraz żelatyny

### THE STRUCTURE AND PROPERTIES OF COLLAGEN AND GELATIN

**Summary** — A review with 50 refs. covering the structure of various collagen types, the nature of crosslinking bonds, and the methods for preparing partial collagen destruction products and collagen denaturation proteins, *viz.*, gelatin. Gelatin gel structures are reviewed. Two mechanisms involving the formation of the helical structure while the state of native collagen is being reinstated [35, 36] and two gelling mechanisms are discussed in detail [44, 45]. Factors like gelatin origin and composition, concentration of gelatin in the solution, and temperature, which affect the rate of renaturation of gelatin to the collagen form, are discussed.

**Key words:** collagen structure, crosslinking bonds in collagen, preparation of gelatin, structure of gelatin gels, mechanism of gelation of gelatin solutions.

### KOLAGEN

Kolagenowi poświęcono wiele prac monograficznych, w których zamieszczono podstawowe dane z zakresu chemii, biologii, biochemii, struktury i technologii tego białka [1–9].

Podstawowa cząsteczka kolagenu, charakteryzująca się wysoce niesymetryczną budową, składa się z trzech lewoskrętnych łańcuchów polipeptydowych zwanych łańcuchami  $\alpha$ . Międzyłańcuchowe wiązania wodorowe sprawiają, że te trzy lewoskrętne helisy są skrócone ze sobą wokół wspólnej osi, tworząc prawoskrętną helisę dużą (*major helix*). Chociaż skład aminokwasowy łańcuchów i sekwencja aminokwasów zmieniają się w zależności od typu kolagenu, to zawierają one zawsze duże ilości glicyny oraz iminokwasów (reszt aminokwasowych) proliny i hydroksyproliny.

Typowa sekwencja aminokwasowa kolagenu to  $-(\text{Gly} - \text{X} - \text{Y})-$ , (Gly — glicyna; X, Y — dowolny aminokwas).

W sekwencji takiej pozycję Y zajmuje najczęściej hydroksyprolina, zaś miejsce X — prolina. Glicyna (Gly) zajmuje każde trzecie miejsce w łańcuchu polipeptydowym.

Tabela 1 zawiera przykłady aminokwasowych składów kolagenu niektórych ssaków [7]. Pojedyncze łańcuchy peptydowe kolagenu są niejednorodne pod względem budowy chemicznej. Z badań sekwencji aminokwasowej wynika jednoznacznie, że poszczególne aminokwasy układają się w określonej kolejności w łańcuchu, tworząc w układzie struktury nadcząsteczkowej charakterystyczne, powtarzające się w określonym rytmie obszary polarne i niepolarne o zróżnicowanej liczbie iminokwasów.

T a b e l a 1. Skład aminokwasowy kolagenu niektórych ssaków (liczba reszt na 1000 reszt aminokwasowych) [7]

T a b l e 1. The amino acid composition of some mammalian skin collagen types (residues/1000 amino acid residues) [7]

Aminokwas	Skóra ludzka	Skóra świni	Skóra bydłęca	Skóra cielęca	Ściętno bydłęce
Alanina	114,5	110,8	105,0	112,0	97,8
Glicyna	324,4	326,0	334,0	320,0	336,5
Walina	24,5	21,9	19,0	20,0	21,5
Leucyna	28,8	23,7	25,0	25,0	27,3
Izoleucyna	10,4	9,6	11,0	11,0	14,5
Prolina	125,1	130,4	129,0	138,0	144,2
Fenylalanina	12,6	14,4	13,0	13,0	15,3
Tyrozyna	3,5	3,2	4,7	2,6	4,8
Seryna	36,9	36,5	38,0	36,0	29,5
Treonina	18,3	17,1	17,0	18,0	18,9
Cystyna	—	—	—	1,0	—
Metionina	7,0	5,4	6,6	4,3	3,6
Arginina	49,0	48,2	38,0	50,0	45,4
Histydyna	5,4	6,0	4,6	5,0	6,5
Lizyna	26,6	26,2	25,5	27,0	22,4
Kwas asparaginowy	47,2	46,8	48,0	45,0	48,0
Kwas glutaminowy	77,7	72,0	72,0	72,0	71,4
Hydroksyprolina	90,9	95,5	92,0	94,0	83,4
Hydroksylizyna	5,9	5,9	6,8	7,4	9,3

Zawartość proliny w cząsteczce kolagenu jest szczególnie ważna, gdyż w miejscu połączenia z pierścieniem pirolidynowym następuje skrócenie łańcucha o  $120^\circ$ , spowodowane charakterystyką geometryczną tego pierścienia. Ma to zasadnicze znaczenie dla specyficznego kształtu helisy pojedynczego łańcucha polipeptydowego, a w konsekwencji dla budowy jedynej w

swoim rodzaju struktury poliproliny II pręta cząsteczki kolagenu. Końcowe fragmenty łańcuchów  $\alpha$ , zawierające jako aminokwasy lizynę i hydroksylizynę, mają konformację nieuporządkowaną (globularną). Obszary te są odpowiedzialne za tworzenie wiązań sieciujących w kolagenie.

Biosynteza cząsteczek kolagenu przebiega w komórkach tkanki łącznej, tzw. fibroblastach, skąd przedostają się one na zewnątrz i ulegają agregacji [10].

Przez ich wielokrotne łączenie się wzdłuż osi "głowa do ogona" i obok siebie "bok do boku" powstają fibryle i włókna. Zidentyfikowano dotychczas co najmniej 19 genetycznie różnych typów kolagenu [9, 11]. Różnice pomiędzy nimi wynikają głównie z odmiennej długości części helikalnej cząsteczek, rozkładu grup jonogennych wzdłuż łańcuchów, występowania przerw w integralności potrójnej helisy, wymiarów i kształtu końcowych (globularnych) regionów, odszczepienia lub pozostawienia tych ostatnich w agregatach nadmolekularnych oraz ze zmian w modyfikacjach post-translacyjnych [11, 12].

Modyfikacje post-translacyjne obejmują: hydroksylowanie reszt proliny, prowadzące do powstania 4-hydroksyproliny lub 3-hydroksyproliny, hydroksylowanie reszt lizyny, prowadzące do utworzenia hydroksylizyny, oraz glikozyłowanie tej ostatniej, jak również utleniające deaminowanie reszt lizyny i hydroksylizyny, w

wyniku którego powstają aldehydy będące prekursorami wiązań sieciujących [7].

Typy kolagenów, ich źródła pochodzenia oraz budowę przedstawiają tabele 2 i 3.

T a b e l a 3. Typy kolagenów i ich budowa [9]

T a b l e 3. Collagen types and their structures [9]

Rodzaj kolagenu	Rodzaj łańcucha w cząsteczce	Wymiary łańcuchów, nm	Budowa nadcząsteczkowa
I	$(\alpha_1)_2, \alpha_2$	300	fibryle
II	$(\alpha_1)_3$	300	fibryle
III	$(\alpha_1)_3$	300	fibryle
IV	$(\alpha_1)_3; (\alpha_2)_3; (\alpha_1)_2, \alpha_2$	390	sieć (tkanka łączna)
V	$(\alpha_1)_3$	390	ciężkie fibryle
VI	$\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$	105, domeny N-C	mikrofibryle
VII	$(\alpha_1)_3$	450	dimery
VIII	$EC_1, EC_2, EC_3$ <sup>*)</sup>	450; 375; 300 KD <sup>**)</sup>	tworzenie sieci wątpliwe
IX	$\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$	200; domeny globularne	na powierzchni fibryl
X	$(\alpha_1)_3$	150; domeny globularne	sieć włóknista
XI	$\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$	—	fibryle, kolagen bogaty w węglowodany

<sup>\*)</sup> EC — eukolagen, rozpuszczalna postać kolagenu.

<sup>\*\*)</sup> KD — ciężar cząsteczkowy w kilodaltonach.

T a b e l a 2. Pochodzenie różnych układów kolagenowych

T a b l e 2. The origin of various collagen types

Rodzaj kolagenu	Źródła kolagenu
I	Skóra, ścięgna, kości, mięśnie, aorta, płacenta, zębina, wątroba, nerwy
II	Chrzątka, dysk, organiczny płyn szklisty, tkanki embrionu
III	Skóra, mięśnie, aorta, płacenta, płuco, skóra i układ naczyń krwionośnych płodu, wątroba
IV	Podstawowe membrany, naczynia włosowate
V	Skóra ścięgna, mięśnie, wątroba, płuco, nerka, płacenta, rogówka
VI	Skóra, chrzątka, ścięgno, kości, mięśnie
VII	Fibryle połączone z membranami podstawowymi
VIII	Komórki rogówki, membrana oka
IX	Kolagen połączony z kolagenem typu II występujący w chrząstce
X	Występuje w obszarze pomiędzy kością a chrząstką
XI	Chrzątka
XII	Skóra, kości (występuje na powierzchni włókien kolagenu typu I)
XIII	Naskórek, mięśnie, chrzątka
XIV	Skóra, chrzątka
XV	Komórki skóry, płuco, mięśnie gładkie, macica, różnorakie obszary kolagenowe
XVI	Skóra, kości
XVII	Skóra, m-RNA
XVIII	Skóra, serce, mózg, wątroba, m-RNA, różnorakie obszary kolagenowe

Kolageny typów I, II, III, V oraz XI tworzą typowe włókna [9, 11, 12]. Ich cząsteczki składają się z trzech łańcuchów  $\alpha$ , których globularne końcowe fragmenty N- i C- są częściowo odszczepiane przed agregacją cząsteczek w tkance.

Kolagen I stanowi podstawowy składnik tkanki skórnej, która zawiera również tworzące włókna kolageny typu III i V [9]. Typ V, jakkolwiek obecny wszędzie, został odkryty stosunkowo późno w porównaniu z kolagenami I, II oraz III, a to ze względu na jego niewielkie ilości w tkance. Z tego też powodu jest on traktowany jako drugorzędny.

Kolagen I, ze względu na jego udział masowy, dominuje w organizmie ssaków i został dobrze poznany oraz szczegółowo zbadany [9]. W ostatnich latach zgromadzono dowody na to, że włókna w dermie są kopolimerami kolagenu I z układami III, V, VI i, prawdopodobnie, XII [11].

Cząsteczka kolagenu I ma kształt pręta długości 280—300 nm i średnicy 1,2—1,5 nm [1, 2, 7, 9]. Zawiera ona długie, niehelikalne sekwencje zwane telopeptydami, znajdujące się na końcach N- i C- każdego z trzech łańcuchów. W łańcuchu  $\alpha_1(I)$  N-telopeptyd zawiera 16 reszt aminokwasowych a C-telopeptyd — 25 takich ugrupowań [9].

W globularnych fragmentach końcowych glicyna występuje tylko w kilku, nierównomiernie rozmieszczonych położeniach [7, 9]. Obszary pozahelikalne są ubo-

zsze w iminokwasy i dlatego podatniejsze na działanie enzymów proteolitycznych [7]. Rejon telopeptydów zawiera lizynę i hydroksylizynę w położeniach C-17 i N-9; biorą one udział w tworzeniu wiązań sieciujących [9].

Inną cechą sekwencji kolagenowej jest O-glikozylowanie niektórych położeni hydroksylizynowych, w wielu przypadkach przebiegające post-translacyjnie. W kolagenie I zdarza się to tylko jednokrotnie, natomiast w innych typach kolagenu dużo częściej; np. kolagen IX, który zawiera ponad 10% mas. reszt wielocukrowych, może być nazwany proteoglikanem [9].

Szczegółowa analiza sekwencji aminokwasowej łańcucha  $\alpha_1$  (I) wykazała obecność w nim zgrupowań (tzw. klasterów) typowych dla kolagenu tripeptydów, z których najważniejsze przedstawia tabela 4 [9, 13]. W podobny sposób są gromadzone tripeptydy zawierające

**T a b e l a 4.** Dane analityczne dotyczące liczby tripeptydów w łańcuchach kolagenów  $\alpha_1$  (I),  $\alpha_2$  (I) oraz  $\alpha_1$  (III) [9, 13]

**T a b l e 4.** Analytical data on the tripeptides number  $\alpha_1$  (I),  $\alpha_2$  (I), and  $\alpha_1$  (III) collagen chains [9, 13]

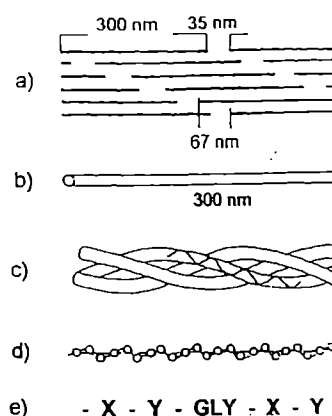
Nazwa tripeptydu <sup>1)</sup>	Liczba tripeptydów w łańcuchu $\alpha$			Liczba tripeptydów zaangażowanych w zgrupowaniach (klasterach) w łańcuchu $\alpha_1$ (I)	
	$\alpha_1$ (I)	$\alpha_2$ (I)	$\alpha_1$ (III)		%
Gly-Pro-HyPro	40	28	45	29	73
Gly-Pro-Ala	30	30	18	24	80
Gly-Ala-HyPro	21	16	24	15	71
Gly-Leu-HyPro	11	14	6	8	73
Gly-Glu-HyPro	11	12	9	8	73
Gly-Glu-Arg	11	12	13	10	91
Gly-Pro-Ser	10	7	4	7	70
Gly-Ala-Arg	10	10	5	8	80
Gly-Ala-Lys	9	—	4	4	44
Gly-Ser-HyPro	9	1	13	4	44

<sup>1)</sup> Gly — glicyna, Pro — prolina, HyPro — hydroksyprolina, Ala — alana, Leu — leucyna, Glu — kwas glutaminowy, Arg — arginina, Ser — seryna, Lys — lizyna,

duże, polarne reszty aminokwasowe obdarzone ładunkiem elektrycznym, głównie w obszarach pomiędzy wcześniej wspomnianymi zgrupowaniami [9]. Skupiska te charakteryzują się sumarycznym ładunkiem dodatnim lub ujemnym.

Powstawanie struktur nadmolekularnych, tj. układanie się potrójnych helis w większe agregaty, badano metodami dyfrakcji rentgenowskiej wąsko- i szerokokątowej oraz z zastosowaniem mikroskopu elektronowego. Wyniki tych badań doprowadziły do poglądu, że cząsteczki kolagenu ulegają agregacji równocześnie w obu kierunkach, przy czym następuje ich przesunięcie względem siebie o 1/4 długości ("quarter staggered arrangement") [1, 2, 7, 9, 11, 12, 14]. Różne poziomy organizacje włókien kolagenowych ilustruje rys. 1 [14].

Dla kolagenu naturalnego charakterystyczne jest powtarzające się okresowo prążkowanie o okresie iden-



**Rys. 1.** Poziomy organizacje włókien kolagenowych [14]: a) fibryla kolagenowa, b) pręt kolagenowy, c) potrójna helisa, d) pojedynczy łańcuch, e) sekwencja aminokwasowa

**Fig. 1.** The levels of organization of collagen fibers [14]: a — collagen fibril with staggered arrangement of collagen molecules, b — collagen rod, c — details of triple helix, d — single chain, e — chain composition (sequence of amino acids)

tyczności  $D = 64\text{--}67$  nm, widoczne w mikroskopie elektronowym [1, 2, 7, 14]; wartość ta koreluje z danymi uzyskanymi za pomocą rentgenografii wąskokątowej.

Rentgenogram kolagenu I zawiera charakterystyczne refleksy służące do jego identyfikacji, mianowicie refleks południkowy pod szerokim kątem ugięcia:  $0,286\text{--}0,290$  nm [1, 2, 8, 9] refleks równikowy pod szerokim kątem ugięcia:  $1,05\text{--}1,24$  nm [1, 8, 9] refleks południkowy pod wąskim kątem ugięcia:  $64\text{--}67$  nm [1, 2, 9]

W związku z istnieniem okresu identyfikacji, Heide-mann dodatkowo wyodrębnia w cząsteczce kolagenu segmenty a, b, c, d o identycznej długości  $D = 67$  nm [9]. Wartość tę można uzyskać, dzieląc długość cząsteczki kolagenu (wraz z odcinkiem pomiędzy końcem jednej a początkiem drugiej) na 5 równych części (podjednostek).

Potrójna helisa w kolagenie jest stabilizowana wiązaniami wodorowymi, których liczba i miejsce stanowią przedmiot kontrowersji [9]. Proponowane modele przewidują bądź jedno wiązanie wodorowe na każdy tripeptyd, bądź też dwa lub większą liczbę, ale z udziałem cząsteczek wody.

W fibryli kolagenowej obserwuje się bardzo gęste, heksagonalne upakowanie cząsteczek, które przekształca się przypuszczalnie w układ pentagonalny [9]. Układ ten może ulegać dalszej ekspansji, np. pod wpływem cząsteczek alkoholu o różnej długości.

Średnica fibryli w suchej tkance wynosi 100 nm i zawiera ok. 7000 cząsteczek w przekroju. Wszelkie zmiany w średnicy fibryli wynikające z różnego stopnia jej uwodnienia można obserwować metodą rentgenografii wąskokątowej na podstawie refleksów w kierunku równikowym. Odległość między cząsteczkami w fibry-

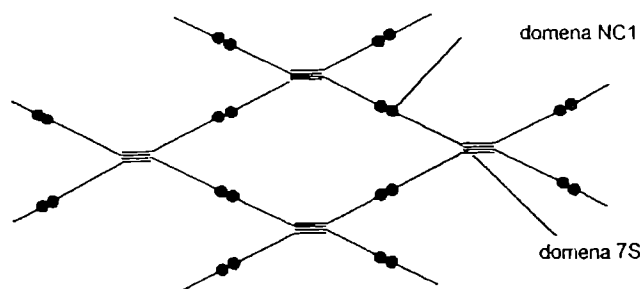
li, mierzona od ich osi, wynosi 1,2–1,5 nm i dochodzi przypuszczalnie do 1,7 nm w stanie spęcznionym [9].

W stanie powietrzno-suchym tkanka kolagenowa zawiera ok. 14% wody i jej gęstość wynosi 1,3 g/cm<sup>3</sup>. W bardzo rygorystycznych warunkach suszenia, w których poziom wody w tkance jest zbliżony do zera, fibrylarna struktura kolagenu załamuje się, refleksy rentgenowskie stają się rozmyte i ulegają przesunięciu na odległość ok. 1 nm, podczas gdy gęstość tkanki wzrasta do 1,8 g/cm<sup>3</sup>.

Kolagen III jest obecny we włóknach kolagenu I, na ogół w jego częściach peryferyjnych [11]. Fakt ten potwierdzono, identyfikując wiązania pomiędzy łańcuchami  $\alpha$  kolagenu I i III.

Nie jest jasne, czy układ III stanowi oddzielne fibryle na powierzchni włókien typu I, czy też jest on elementem ich cząsteczkowego, heksagonalnego upakowania. Włókna kolagenu III występują zwykle w tkance, która wymaga dużej elastyczności, np. w skórze rosnących osobników. Podczas rozwoju dermy udział włókien kolagenu III w tkance wynosi ok. 40%, lecz w miarę dojrzewania są one stopniowo zastępowane grubszy i mocniejszymi włóknami kolagenu I. Kolagen III bywa również nazywany płodowym ze względu na jego duży udział w skórze i naczyniach krwionośnych płodu, większy niż w tkankach dojrzałego ustroju [7].

Kolageny typów IV, VII, VIII i X nie tworzą włókien [9, 11, 12]. Najlepiej rozpoznany z tej grupy kolagen IV nie ulega agregacji w sposób typowy dla kolagenów włóknotwórczych ze względu na brak ładunków elektrycznych grup jonogennych wzdłuż cząsteczki. Cząsteczki tego kolagenu zawierają duże, globularne końcowe fragmenty C- zwane domenami 7S, które poza niezidentyfikowanymi jeszcze wiązaniami tworzą międzycząsteczkowe mostki disulfidowe (S—S) cystyny [9]. Cząsteczki oddziałują na siebie poprzez końcowe regiony N-, które zachodzą na siebie na odcinku 80 nm tworząc tetramery [11, 12, 15]. Globularne fragmenty C- na końcach rozciągniętych ramion tetrameru oddziałują na siebie tworząc sieć. Elementy niehelikalne kolagenu IV czynią go nieodpornym na działanie enzymów niespecyficznych [7]. Rys. 2 ilustruje elementy budowy kolagenu IV w membranie podstawowej.

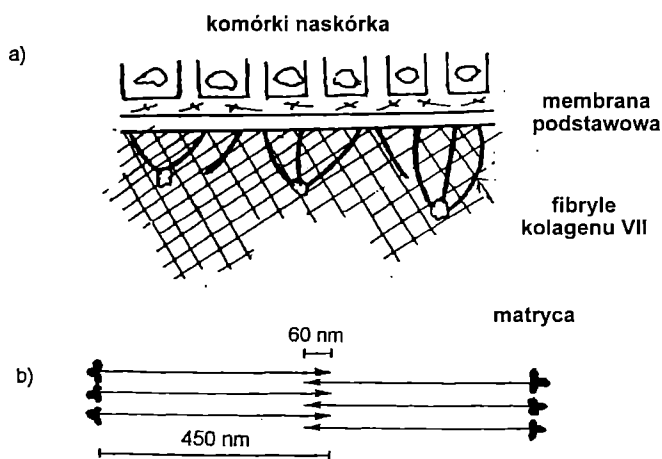


Rys. 2. Organizacja cząsteczek kolagenu IV w membranie podstawowej [12]; objaśnienia w tekście

Fig. 2. The organization of type IV collagen molecules in basement membrane [12] (for explanations see main text)

Bailey i współpracownicy [11, 12] sugerują, że również kolageny typów VIII i X tworzą sieci, natomiast wg Heidemanna [9] powstawanie sieci w kolagenie typu VIII jest wątpliwe.

Pewne membrany, np. placenta, membrana łącząca skórę z naskórkiem, są połączone z leżącą poniżej matrycą poprzez włókienka przyłączone do małych płytek kolagenu IV. Włókienka te składają się z dimerów kolagenu VII zachodzących na siebie na odcinku 60 nm (rys. 3 a, b) [12].



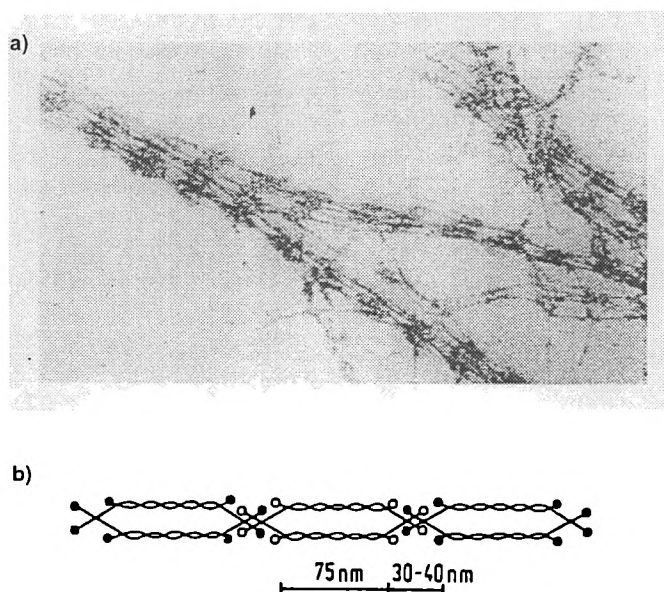
Rys. 3. a) Fibryle kolagenu VII łączące membranę podstawową z matrycą. b) Organizacja dimerów cząsteczek kolagenu VII w fibrylach [12]

Fig. 3. (a) Collagen VII fibrils joining basement membrane with underlying matrix; (b) organization of collagen VII dimers in fibrils [12]

Kolagen VI jest natomiast zbudowany z luźno upakowanych mikrofibryl o wzorze powtarzalnym co 100–120 nm [9, 11, 12, 16]. Cząsteczka składa się z krótkiej, potrójnej helisy długości ok. 66,5–75 nm i zawiera duże globularne regiony na końcach N- i C-łańcucha peptydowego [9, 11, 12]. Globularny region jednego z trzech łańcuchów  $\alpha$  ma ciężar cząsteczkowy dwukrotnie większy niż dwa pozostałe łańcuchy  $\alpha$ .

Przebieg agregacji cząsteczek kolagenu VI jest złożony i początkowo pociąga za sobą rozległe nakładanie się na siebie dwu cząsteczek. Dwa dimery ulegają następnie agregacji, tworząc stabilny tetramer. W dalszej kolejności tetramery agregują poprzez globularne końcowe regiony na długie struktury włókniste (filamenty) [11, 12, 17]. Rysunek 4 ilustruje elektronową mikrofotografię fibryl kolagenowych VI (a) oraz organizację cząsteczek tego typu kolagenu w mikrofibrylach (b).

Kolagen VI występuje w wielu tkankach, takich jak skóra, ścięgna, kości. Funkcja tych włókien nie jest dokładnie wyjaśniona. Mogą one odgrywać rolę w rozmieszczeniu i orientacji innych włókien w tkance, np. kolagenu I o wysokim stopniu uporządkowania [11, 12].



Rys. 4. a) Fotografia mikrofibril kolagenu VI w luźno upakowanych włóknach (filamentach). b) Organizacja cząsteczek kolagenu VI w mikrofibrylach, ilustrująca powtarzalny co 100—120 nm wzór [12]

Fig. 4. (a) Electron micrographs of type VI microfibrils in loose-packed fibers (filamentous structure); (b) organization of collagen VI molecules in microfibrils illustrative of the 100—120 nm repeat pattern [12]

Według Bailey świadczy o tym zarówno rozposzechnienie tego włókna w tkance, jak również obecność w potrójnej helisie kolagenu VI dużej liczby tripeptydów uczestniczących w tworzeniu wiązań sieciujących (np. arginina-glicyna-kwas asparaginowy). Agregacja cząsteczek kolagenu VI następuje za pośrednictwem wiązań disulfidowych [11].

Kolageny typów IX i XII obejmują układy z przerwana ciągłością potrójnej helisy [11, 12]. Ich funkcja nie jest dotychczas jasna; pozostaje otwartą kwestia czy biorą one udział w regulacji wzrostu fibryl i kontrolują

jednolitą średnicę włókien, czy też ułatwiają oddziaływanie z innymi składnikami matrycy takimi jak proteoglikany lub fibronektyna — białko wiążące m.in. kolagen z powierzchnią fibroblastów [11]. Mechanizm wzrostu i regulacji średnicy włókien jest obecnie ważnym i nierozwiązanym problemem biochemii omawianych typów kolagenu.

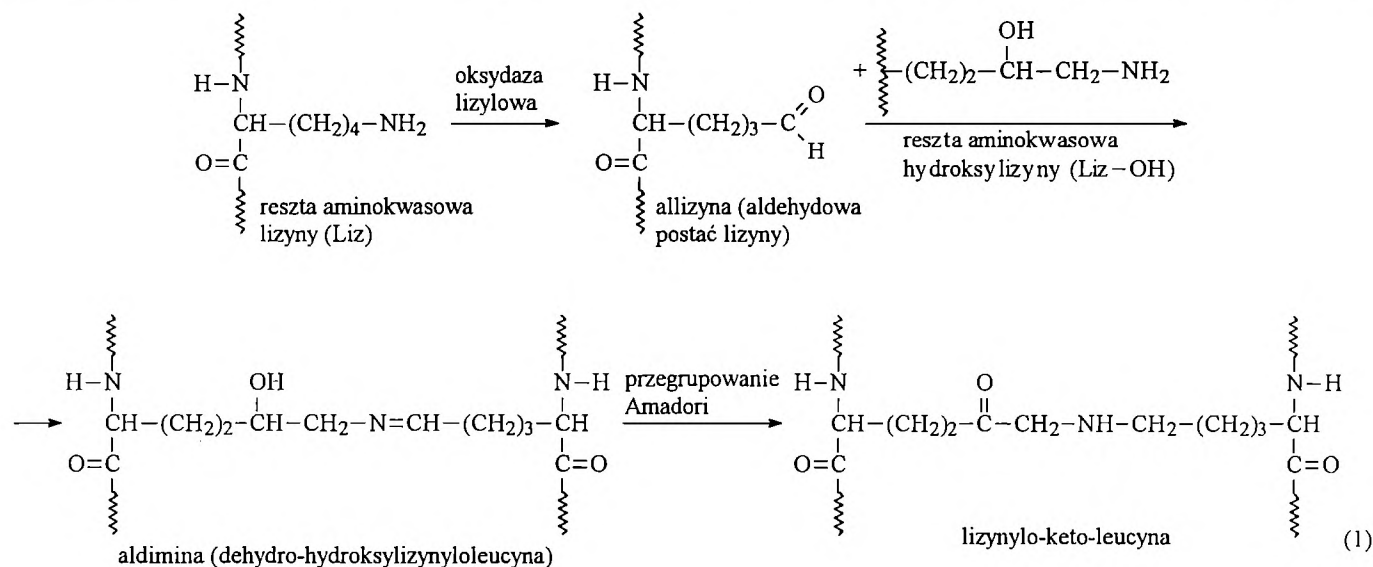
Kolagen IX towarzyszy kolagenowi II w chrząstkach i wpływa na ich ściśliwość. Jego ulokowanie na powierzchni fibryl kolagenu II sugeruje, że tworzy on makrocząsteczkowe mostki pomiędzy włóknami a innymi składnikami matrycy w chrząstce [18]. Oddziaływania pomiędzy kolagenami II i IX mają charakter wiązań kowalencyjnych.

Kolageny XII i XIV, a także III są natomiast połączone z fibrylami typu I [11, 19]. Ustalono, że kolagen XII występuje w ścięgnie płodu, ale nie wiadomo, czy jest on także obecny w tkance dojrzałej.

Wielu autorów przedstawiło trójhelikalny model łańcuchów peptydowych kolagenu [20—28]. Składa się on zasadniczo z tych samych tripeptydowych łańcuchów usieciowanych na ich końcach C- lub N-, co zapewnia stabilizację struktury potrójnej helisy [28]. Punkt sieciowania, np. dwie cząsteczki kwasu glutaminowego -(Glu-Glu)- i poszczególne łańcuchy peptydowe łączą się ze sobą za pomocą związków takich jak β-alanina lub kwas 6-aminokapronowy. Uzyskuje się dzięki temu odpowiednią giętkość łańcuchów podczas tworzenia modelu potrójnej helisy. Dobór związków łączących poszczególne łańcuchy peptydowe nie został jednak dotychczas systematycznie zbadany.

#### WIĄZANIA SIECIUJĄCE W KOLAGENIE

Wiązania sieciujące w kolagenie są to wiązania kowalencyjne utworzone pomiędzy pojedynczymi cząsteczkami we włóknie. Decydują one o optymalnym funkcjonowaniu włókien kolagenowych jako szkieletowej struktury organizmu. Wiązania te powstają w wy-



niku reakcji grup aldehydowych jednej cząsteczki z grupami aminowymi drugiej cząsteczki. Grupy aldehydowe tworzą się w niehelikalnych regionach cząsteczki pod wpływem enzymatycznego utleniania reszt lizyny lub hydroksylizyny oksydazą lizylową. Powstaje wówczas wiązanie dwufunkcyjne o charakterze chemicznym zasady Schiffa, którego składnikiem jest dehydro-hydroksylizynyloleucyna [12].

Labilna aldimina może tworzyć stabilną ketoiminę przez samorzutne przegrupowanie Amadori. Powstaje wówczas wiązanie dwufunkcyjne, którego składnikiem jest hydroksylizynylo-keto-leucyna [12] — równanie (1).

Wiązania dwufunkcyjne łączą cząsteczki kolagenu wg modelu "głowa do ogona". Istnieją one tylko przejściowo i z czasem przekształcają się w wielofunkcyjne wiązania sieciujące zdolne do łączenia różnych cząsteczek. Bailey i współpracownicy [12] wyrazili pogląd, że tworzenie wielofunkcyjnych wiązań zachodzi dwuetapowo. Na pierwszym etapie następuje sieciowanie wzdłużne nakładających się na siebie cząsteczek. Drugi etap obejmuje oddziaływanie pomiędzy dwiema mikrofibrylami [29].

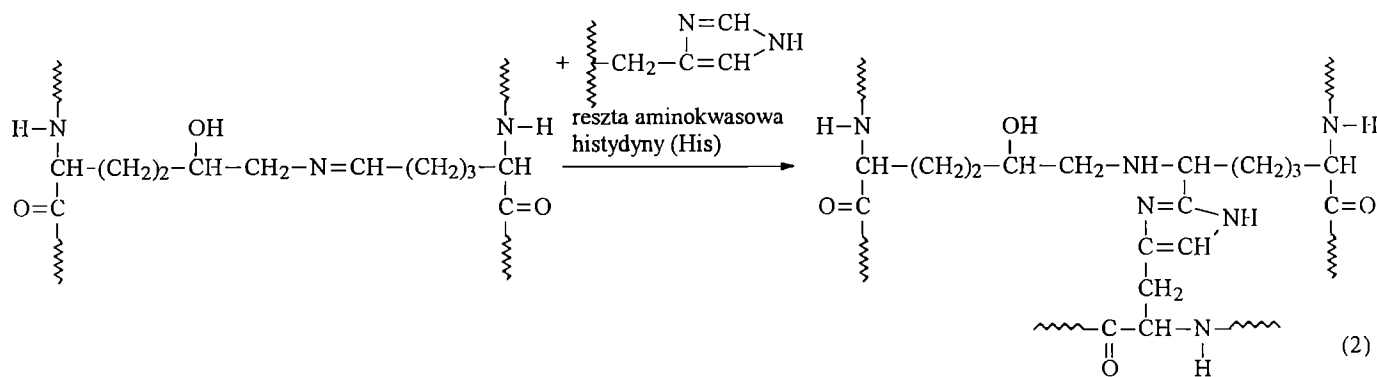
Stabilizacja wiązania aldiminowego następuje w wyniku reakcji reszt histydyny z podwójnym wiązaniem zasady Schiffa. Powstaje wówczas wiązanie, którego składnikiem jest histydylo-hydroksylizynyloleucyna (HHL) [30]. Takie wiązanie trójwiązące może łączyć dwie lub trzy cząsteczki — równanie (2).

Jeżeli substrat reakcji stanowi ketoimina oraz aldehyd hydroksylizyny, to powstaje wówczas związek pierścieniowy — pirydynolina [31]. W zależności od mechanizmu reakcji pierścień pirydynolinowy może łączyć dwie lub trzy cząsteczki — równanie (3).

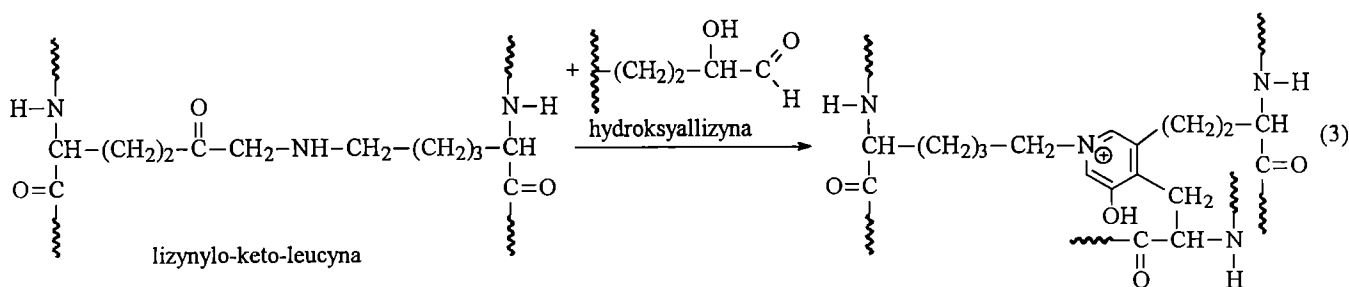
Innym typem międzycząsteczkowego udowodnionego doświadczalnie wiązania kowalencyjnego w kolagenu jest wiązanie utworzone w wyniku kondensacji aldoalowej grup aldehydowych dwóch cząsteczek [2, 7] — równanie (4).

Wiązanie takie jest bardzo trwałe i ulega rozkładowi jedynie w warunkach hydrolizy kwasowej [2].

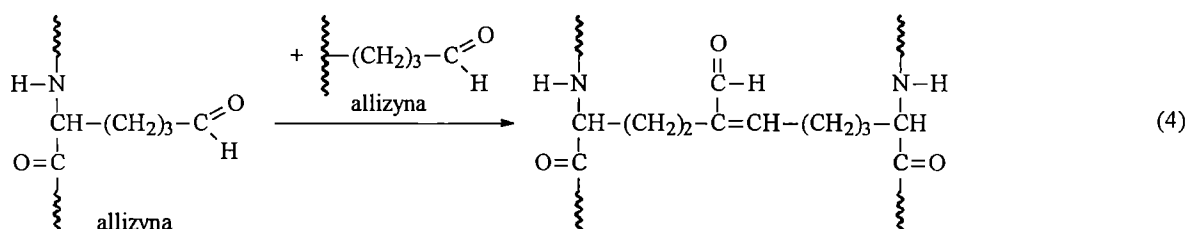
Powstawanie wiązań dwufunkcyjnych i ich przemiana w wiązania trójfunkcyjne stanowi przyczynę stałego wzrostu wytrzymałości włókien kolagenowych wraz ze starzeniem się tkanki. Usieciowanie kolagenu skóry



histydylo-hydroksylizynyloleucyna (HHL)



lizynylopirydynolina



zmienia się wraz z wiekiem zwierzęcia. Skórę płodową stabilizuje głównie hydroksylizynylo-keto-leucyna, ale po urodzeniu składnikiem wiązania staje się dehydro-hydroksylizynoleucyna. Z wiekiem, to ostatnie wiązanie przekształca się w stabilne wiązanie zawierające HHL [12]. W starej tkance skóry bydłowej występuje tylko niewielki udział (ok. 10% w odniesieniu do wiązań HHL) wiązań pirydynolowych.

#### OTRZYMYWANIE I WŁAŚCIWOŚCI ŻELATYNY

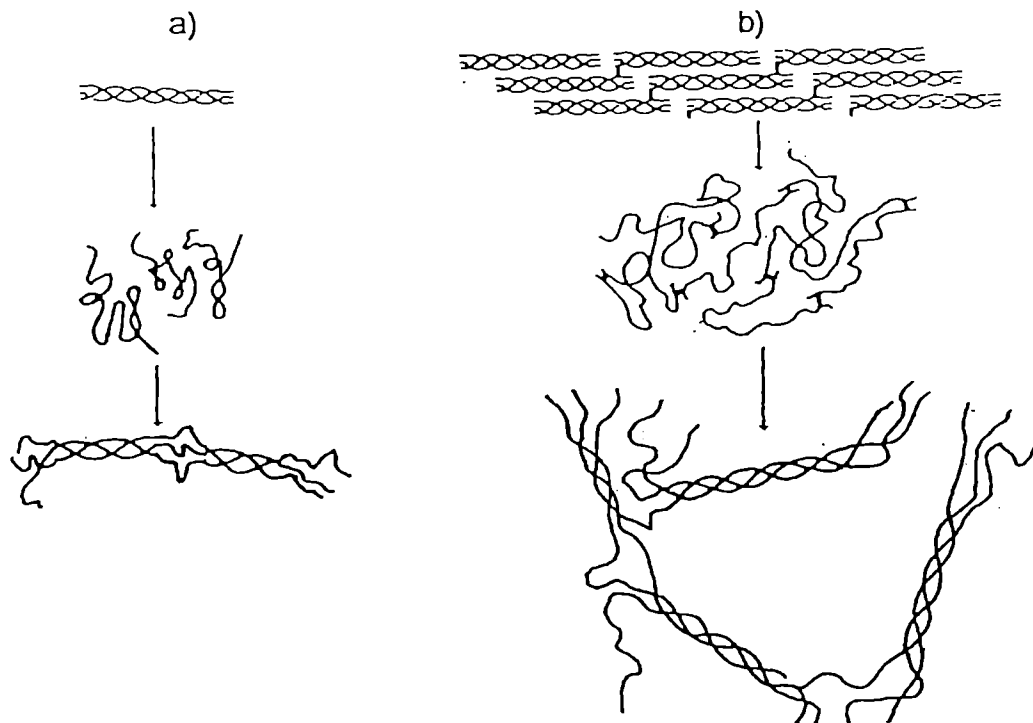
Żelatyna, stanowiąca materiał białkowy otrzymywany z występującego w naturze kolagenu, jest substancją o dużym znaczeniu użytkowym. Znajduje ona szerokie zastosowanie np. w przemyśle spożywczym, fotochemicznym i farmaceutycznym. Gatunki żelatyny o dużym stopniu czystości i powtarzalnej charakterystyce wykorzystuje się w przemyśle spożywczym jako napelniacze i stabilizatory środków spożywczych. W przemyśle fotochemicznym żelatyna jest niezbędnym surowcem do otrzymywania filmów światłoczułych, błon i papierów. Pomimo usiłowań nie udało się do dziś zastąpić żelatyny produktem syntetycznym. W

przemyśle farmaceutycznym żelatyna znalazła największe zastosowanie do opakowania leków metodą kapsułkowania oraz do formowania tabletek i powlekania ich otoczkami.

Żelatyna zawiera identyczną sekwencję aminokwasów jak kolagen. Metody ekstrakcji żelatyny z tkanki kolagenowej zależą od źródła i wieku tkanki, a w konsekwencji — od rodzaju i stopnia jej usieciowania (rys. 5) [12].

Kolagen pochodzący z młodej tkanki, w której występują wiązania aldiminowe, pod wpływem rozcieńczenia i ogrzewania łatwo przechodzi do roztworu w postaci pojedynczych łańcuchów. Natomiast w tkance kolagenowej, w której dominują wiązania ketoiminowe lub wielofunkcyjne, wydajność białka ekstrahowanego maleje, uzyskana zaś żelatyna zawiera składniki o różnych ciężarach cząsteczkowych (dimery, trimery i wyższe oligomery) tworzące żełe o dużym stopniu polidispersyjności.

Na skalę przemysłową żelatynę otrzymuje się dwuetapowo, metodą alkaliczną z kości i odpadów skóry lub metodą kwasową Warda ze skór świńskich i oseiny [1]. Przemiana kolagenu w żelatynę jest przejściem typu helisa → kłębek.



Rys. 5. Denaturacja kolagenu [12]: a) Denaturacja cząsteczki kolagenu z wydzieleniem trzech pojedynczych łańcuchów; podczas schładzania następuje ich częściowa renaturacja do potrójnej helisy. b) Denaturacja usieciowanych włókien kolagenowych z wydzieleniem przypadkowych, statystycznych łańcuchów połączonych wiązaniami sieciującymi; podczas schładzania oddziaływania pomiędzy łańcuchami powodują tworzenie struktur, które prawdopodobnie składają się z potrójnych helis różnych cząsteczek

Fig. 5. Denaturation of collagen to gelatin [12]: (a) denaturation of collagen molecule to three independent chains (on cooling the chains partially reconstitute the triple helix); (b) denaturation of crosslinked collagen fibers to random chains to become recrosslinked; when cooled, these chains interact to form structures believed to be triple helices originating from chains of different molecules



Przemysłowe gatunki żelatyny stanowią mieszaninę składników różniących się ciężarami cząsteczkowymi, włączając w to pojedyncze łańcuchy polipeptydowe ( $\alpha$ -żelatyna), składniki dwułańcuchowe ( $\beta$ -żelatyna) i trójłańcuchowe ( $\gamma$ -żelatyna).

Żelatyny rozpuszczają się w gorącej wodzie. Jak się powszechnie sądzi, powyżej temp. 310 K cząsteczki białka przybierają postać statystycznego kłęбка. Ochłodzenie roztworów poniżej tej temperatury powoduje spontaniczne powstawanie żelu po przekroczeniu stężenia 0,5%; w bardziej rozcieńczonych roztworach żelowanie nie zachodzi.

Proces powstawania żelu, powszechnie wykorzystywany zarówno w przemyśle, jak i w warunkach domowych, jest obecnie rozumiany jako próba powrotu pojedynczych łańcuchów polipeptydowych żelatyny do postaci natywnego kolagenu.

W badaniach procesu żelowania roztworów żelatyny stosowano najczęściej metodę polarometryczną pomiarów skręcalności optycznej. Wczesny przykład takiej pracy stanowią badania Smitha z 1919 r. [32]. Od tego czasu mechanizmem żelowania i strukturą żeli zajmowało się wielu autorów, wykorzystując do tego celu różne techniki pomiarowe, np. pomiary lepkości, modułu sprężystości żeli, NMR, relaksacji dielektrycznej oraz rozproszenia światła [33].

W roku 1948 Ferry i Eldridge [34] zastosowali metodę polarometryczną do śledzenia zmian zachodzących w roztworach żelatyny, które chłodzono poniżej temp. 310 K. Rozpoznali oni dwie fazy zmian skręcalności optycznej. Pierwsza z nich, stosunkowo szybka, trwała zaledwie kilka godzin, natomiast druga była dużo powolniejsza, a zmiany skręcalności optycznej obserwowano jeszcze po kilku dobach przechowywania roztworów. Autorzy nie podali jednakże żadnego opisu procesów cząsteczkowych.

Flory i Weaver [35], badając zmiany lepkości zredukowanej i skręcalności optycznej w rozcieńczonych roztworach żelatyny (0,1—0,4%) ustalili, że kinetyka procesu powrotu cząsteczek żelatyny do natywnej struktury kolagenu odpowiada reakcji pierwszorzędowej, co było zadziwiające w świetle przyjmowanej ogólnie trójhelikalnej struktury cząsteczek kolagenu. Autorzy stwierdzili, że im temperatura renaturacji jest bliższa temperaturze denaturacji kolagenu, tym szybkość zmian skręcalności optycznej jest mniejsza.

Wyjaśniając zależności kinetyczne zachodzących zmian, Flory i Weaver zaproponowali model tworzenia helisy, w którym etapem determinującym szybkość renaturacji jest formowanie helikalnych segmentów w bogatych w prolinę fragmentach łańcucha żelatyny. Założyli oni przy tym, że pojedyncze helisy istnieją tylko chwilowo i są w stanie bardzo szybko przekształcić się w potrójną helisę poprzez utworzenie wiązań międzycząsteczkowych.

Von Hippel i Harrington [36] potwierdzili niezależność specyficznych danych skręcalności optycznej w przypadku małych (0,1—0,4%) stężeń żelatyny i zapro-

ponowali taki model tworzenia helisy, który przewidywał bardzo szybkie, wstępne skręcenie bogatych w prolinę segmentów do postaci uporządkowanej konformacji, po którym to etapie następowało powolniejsze, bardziej kompletne uporządkowanie pojedynczych łańcuchów i wreszcie ich powolna asocjacja z utworzeniem potrójnych helis. Ten ostatni model jest zasadniczo różny od modelu zaproponowanego w pracy [35].

W mechanizmie zaproponowanym przez Harringtona i von Hippela [36] przebieg procesu wg kinetyki reakcji pierwszorzędowej wyjaśniano tym, że następujące zmiany mają przede wszystkim charakter jednocząsteczkowy. Asocjacja utworzonych helis "bok do boku" ma miejsce dopiero na późniejszym etapie. W teorii Harringtona i von Hippela pojedynczej helisie przypisuje się stabilność nieprzewidywaną w modelu Flory'ego i Weavera [35]. Stabilność ta jest wyjaśniana powstawaniem pochodzących z wody mostków wodorowych wzdłuż łańcucha polipeptydowego kolagenu, łączących atomy tlenu sąsiadujących ze sobą grup C=O.

Jak przypuszczano, wodorowe mostki wodne zwiększają krystaliczność kolagenu i stabilizują łańcuchy w obszarach, które mają w zasadzie charakter niepolarny lub zawierają krótkie boczne reszty aminokwasowe. Obszary polarne najprawdopodobniej nie biorą udziału w tej postaci stabilizacji łańcucha za pomocą wiązań wodorowych.

Nijenhuis i współpracownicy [37] badali renaturowane roztwory żelatyny metodą pomiaru ich modułów dynamicznych i wykazali, że proces odtwarzania struktury kolagenu jest tym szybszy, im większe jest stężenie żelatyny i niższa temperatura renaturacji. Według tych autorów, proces renaturacji przebiega dwuetapowo i jest zgodny z modelem zaproponowanym w [36].

Jeżeli, jak przypuszczano, załączki powstawania helikalnej struktury kolagenu stanowią fragmenty łańcucha bogate w iminokwasy, to kolageny o różnej zawartości tych iminokwasów powinny ulegać renaturacji z różną szybkością. Przypuszczenie to potwierdzili autorzy pracy [36], poddając renaturacji żelatyny pochodzące z kolagenu skóry cielęcej, ichtiokolu i kolagenu wątroby rekina. Końcowe wartości skręcalności optycznej  $[\alpha]$ , osiągane po przechowywaniu ochłodzonych roztworów żelatyn, nie zależały od zawartości w nich iminokwasów, podczas gdy początkowa szybkość tworzenia helikalnej struktury kolagenu w roztworach różniła się ponad 30-krotnie. Stałość końcowych wartości  $[\alpha]$  trzech różnych rodzajów żelatyny prowadziła również do wniosku, że po utworzeniu załączków struktury helikalnej kolagenu w obszarach bogatych w iminokwasy pozostałe fragmenty łańcuchów polipeptydowych przybierają również strukturę poli-L-proliny II.

Flory i Garret [38] stwierdzili, że wzrost zawartości proliny i hydroksyproliny podwyższa temperaturę topnienia żelu. Jest to zgodne z danymi uzyskanymi w pracy [36].

W ramach badań zmierzających do poznania mechanizmu żelowania przeprowadzono wiele doświadczeń,



które miały na celu ustalenie wpływu poszczególnych składników żelatyn na kinetykę renaturacji. Altgelt, Hodge i Schmitt [39] wydzielili  $\gamma$ -żelatynę z preparatu tropokolagenu skóry cielęcej i zbadali kinetykę jej renaturacji w porównaniu z mieszaninami zawierającymi wyłącznie  $\alpha$ - i  $\beta$ -żelatynę. Pomiarzy skręcalności optycznej i lepkości zredukowanej udowodniły, że zarówno szybkość, jak i stopień renaturacji były największe w przypadku cząsteczek typu  $\gamma$ . Czysta frakcja  $\gamma$  ulegała renaturacji szybko i w pełni.

Dane te dowodzą, że główną rolę w tworzeniu struktury kolagenu odgrywają oddziaływania międzyłańcuchowe. Bardzo powolna renaturacja w żelatynach ubogich we frakcję  $\gamma$ , w warunkach małych stężeń żelatyny, wskazuje także na ważność specyficznych oddziaływań w procesie stabilizacji złożonych agregatów cząsteczek.

Veis i Legowik [40] określili parametry termodynamiczne tworzenia załączków struktury helikalnej poli-L-proliny II w różnych rodzajach żelatyny. Pomiarzy wykonali w odniesieniu do kwasowej żelatyny technicznej, której głównym składnikiem są cząsteczki  $\alpha$ , o  $IP$  (wartość  $pH$  w punkcie izoelektrycznym) = 9, zasadowej żelatyny technicznej również złożonej przede wszystkim z typu  $\alpha$  ( $IP$  = 5) oraz bogatego w postaci  $\gamma$  ekstraktu kolagenu skóry wołu ( $IP$  = 9). Tworzenie załączków helikalnej struktury poli-L-proliny II jest najbardziej uprzywilejowane w  $\gamma$ -żelatynie. Świadczyły o tym prawie dwukrotnie mniejsze wartości entalpii i entropii tego procesu w porównaniu z danymi charakterystycznymi dla żelatyny kwasowej i zasadowej. Fakt, że równowagowa zawartość załączków helikalnej struktury poli-L-proliny II w danej temperaturze w przypadku żelatyny  $\gamma$  jest największa w punkcie izojonowym, podczas gdy nie istnieje podobna wyraźna zależność od  $pH$  w odniesieniu do żelatyny  $\alpha$  pozwala sądzić, że w powstawaniu struktury kolagenu uczestniczą specyficzne oddziaływania elektrostatyczne.

Jak wspomnieliśmy wcześniej, według założeń Harringtona i von Hippela [36] struktury kolagenowe rozwijają się wzdłuż pojedynczych łańcuchów peptydowych, a indywidualne segmenty łańcucha o strukturze poliproliny II są stabilne w takim samym stopniu, jak potrójna helisa. Przy takim założeniu wartości entropii  $\Delta S$  wszystkich trzech rodzajów żelatyn powinny być jednakowe.

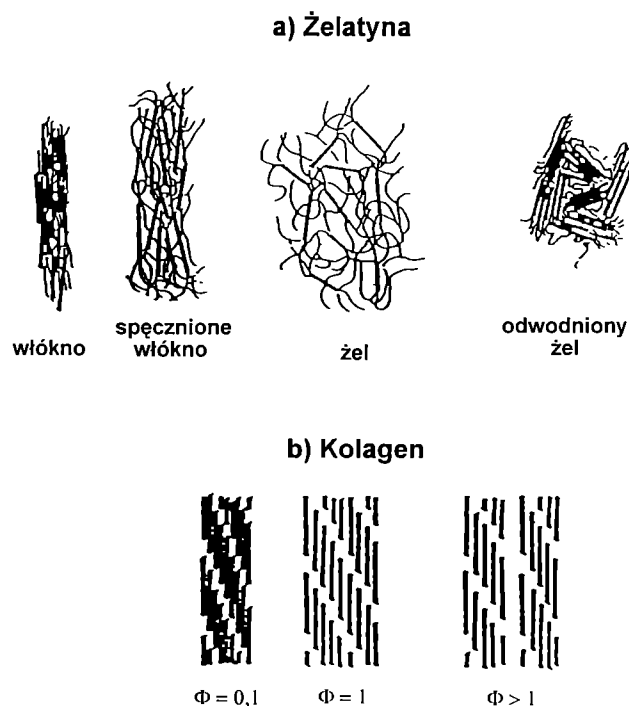
Badania Veisa i Legowika nie potwierdzają zatem modelu zaproponowanego w pracy [36], lecz wykazują raczej słusność kinetycznych pomiarów Flory'ego i Weavera [35]. Natomiast za teorią Harringtona i von Hippela przemawiają NMR oraz pomiary krystalograficzne podkreślające udział wody w stabilizacji obszarów o helikalnej strukturze kolagenu.

Modele Flory'ego i Weavera oraz Harringtona i von Hippela pozostają obiektem dyskusji od wielu lat po ich opublikowaniu. Obecnie, na podstawie doświadczeń dotyczących oczyszczonych żelatyn, czyli żelatyn rozdzielonych na łańcuchy pojedyncze ( $\alpha$ ), łańcuchy podwójne ( $\beta$ ) i łańcuchy potrójne ( $\gamma$ ) uważa się, że ist-

nienie pojedynczych, stabilnych helis jest mało prawdopodobne [33].

Pezron i Djabourov [14], stosując metodę dyfrakcji promieni rentgenowskich, porównali strukturę włókien natywnego kolagenu oraz wysuszonych, zorientowanych włókien sporządzonych z żeli żelatynowych. Te ostatnie poddawali następnie hydratacji i śledzili metodą rentgenograficzną zmiany strukturalne ujawniające się pod wpływem rozpuszczalnika — wody. Na tej podstawie wnioskowali o mechanizmie żelowania i strukturze żeli żelatynowych. Porównanie rentgenogramów wysuszonego kolagenu o typowej strukturze helikalnej oraz wysuszonych włókien żeli żelatyny wykazało ich pełną analogię i dowiodło w sposób oczywisty, że w suchych zorientowanych żelach obecne są wiązki potrójnych helis. W rentgenogramie włókna żelu żelatyny nie występowały wąskokątowe refleksy obecne w kolagenie, co świadczyło o braku jakiegokolwiek periodyczności dalekiego zasięgu w kierunku wzdłużnym, prostopadłym do osi włókna żelu.

Powracając do w pełni uwodnionego stanu włókien, który odpowiada naturalnemu składowi żelu, autorzy pracy [14] zbadali mechanizm spęczniania włókien zorientowanych żeli w porównaniu ze spęcznianiem włókien kolagenowych. Na podstawie rentgenogramów włókien suchych i uwodnionych (na różnych poziomach hydratacji) oraz włókien ponownie dehydratyzowanych autorzy zaprezentowali stadia procesu



Rys. 6. Porównanie etapów uwodnienia włókien żeli żelatyny (a) i natywnego kolagenu (b) [14];  $\Phi$  — stopień spęcznienia w g wody/g białka

Fig. 6. Different hydration stages of gelatin fibers as compared with those of native collagen fibers [14];  $\Phi$ , degree of hydration (g water/g protein)

spęszczania i odwadniania włókien zamieszczone na rys. 6. Stwierdzili oni, że hydratacja włókien kolagenowych prowadzi do poprawy ustawienia fibryl w kierunku osi, gdyż woda wypełnia przestrzenie pomiędzy potrójnymi helisami i powoduje ich rozdzielanie, natomiast hydratacja włókien żeli żelatyny wskazywała na postępującą utratę orientacji potrójnych helis. Analiza rentgenogramów uwodnionych włókien, które ponownie suszono, wskazywała na to, że w suchym żelu potrójne helisy gromadzą się w grupy lub regiony (domeny), wewnątrz których są one równoległe lub prawie równoległe. Obszary te charakteryzują się zmiennym obustronnym nachyleniem. Procesy spęszczania wodą i dehydratacji powodują, że potrójne helisy są, odpowiednio, bądź oddalone, bądź też łączą się "bok do boku" w stanie całkowicie wysuszonym.

Według opinii Pezrona i Djabourova [14], uporządkowanie nadcząsteczkowe kolagenowych prętów w natywnych włóknach nie występuje w żelach żelatyny. Autorzy wyrazili pogląd, że w żelach tych potrójne helisy są rozmieszczone statystycznie w przestrzeni, zaś charakteryzująca stan suchy tendencja do szeregowego ustawiania się helis "bok do boku" zanika, skoro tylko wprowadzi się wodę. Znaczne spęczenie włókien wynika ze zdolności wody do wzajemnie odległego rozmieszczenia potrójnych helis. Jedynymi uporządkowanymi jednostkami w żelach są sekwencje potrójnych helis.

Pezron i Djabourov stwierdzili ponadto [14], że w stanie żelu nie tworzy się struktura krystaliczna. Gdyby bowiem tak było, to rentgenogramy krystalicznych połączeń w suchych i uwodnionych żelach powinny być identyczne. Przykłady prac Edwardsa i Mandelkerna [41] oraz Guerrero i Kellera [42], którzy prowadzili badania nad układami żelujących polimerów syntetycznych, wykazały, że w takich samych warunkach termicznych krystaliczne struktury identyfikowane w stanie suchym są również obecne w rozcieńczonych roztworach polimerów.

Charakterystyczne parametry potrójnych helis we włóknach żelu i kolagenu są identyczne [14]. Różnice pomiędzy natywnymi i renaturowanymi helisami wynikają głównie z różnic w długości sekwencji helikalnych i w cząsteczkowym uporządkowaniu tych jednostek. Obecność w żelach żelatyny trójhelikalnych struktur zbliżonych do struktur kolagenu potwierdzają także wyniki De Wolfa i współpracowników uzyskane metodą dichroizmu kołowego [43]. Autorzy ci nie wykluczają jednak istnienia innego rodzaju struktur.

W literaturze przedstawiono dwa całkowicie odmienne mechanizmy procesu żelowania, mianowicie:

— Mechanizm zaproponowany przez Harringtona i Rao [44], polegający na częściowej renaturacji helis: fragmenty łańcuchów polipeptydowych są przekształcane z kłęбка w helisę. W chwili powstania załączków helikalnej struktury kolagenu, w punktach kontaktowych pomiędzy trzema helisami mogą two-

żyć się wiązania wodorowe. Utworzone potrójne helisy są przypadkowo rozmieszczone w przestrzeni.

— Mechanizm zaproponowany przez Godarda [45], który traktuje żelowanie jako konwencjonalny proces krystalizacji zakładający z góry etap nukleacji oraz jednokierunkowy wzrost struktur krystalicznych.

Cytowana już wielokrotnie praca Pezrona i Djabourova [14] wspiera propozycję Harringtona i Rao [44].

Żelatyna ma po wysuszeniu charakter typowego materiału twardego o małej odkształcalności. W warunkach normalnej wilgotności powietrza zawiera ona znaczne ilości wilgoci (10—18%) odgrywającej rolę wewnętrznego plastyfikatora białka. Usunięcie tej wilgoci w warunkach podwyższonej temperatury i zmniejszonej wilgotności względnej powietrza powoduje niekorzystny wzrost kruchości żelatyny oraz znaczne zmniejszenie jej wymiarów liniowych [46]. Temperatura zeszklenia  $T_g$  bezwodnej, dehydratyzowanej żelatyny wynosi 420 K (147°C) i maleje ze zwiększaniem zawartości wilgoci w białku [47]. Wprowadzając do cząsteczek żelatyny rozgałęzienia polimeru syntetycznego w wyniku reakcji kopolimeryzacji szczepionej tego białka można spowodować korzystną plastyfikację oraz stabilizację właściwości mechanicznych żelatyny w szerokim zakresie temperatury.

Obok wielu korzystnych właściwości, podstawową wadą żelatyny ograniczającą w znacznym stopniu jej praktyczne wykorzystanie jako środka błonotwórczego, zwłaszcza w przemyśle farmaceutycznym i fotograficznym, jest jej rozpuszczalność w wodzie. Ponadto jako produkt białkowy, ulega ona w znacznym stopniu rozkładowi bakteryjnemu, co jednak obecnie, z punktu widzenia ochrony środowiska, często stanowi jej istotną zaletę. Najprostszą i najbardziej skuteczną metodą stabilizacji błon żelatynowych jest poddanie ich reakcji sieciowania, np. aldehydem mrówkowym [48] lub glutarowym [49]. Wskutek utworzenia wiązań między łańcuchami białka rośnie jego wytrzymałość mechaniczna i odporność chemiczna, a usieciowane produkty stają się nierozpuszczalne w wodzie.

Lepkościowo średni ciężar cząsteczkowy żelatyny otrzymanej metodą alkaliczną można określić na podstawie równania Marka-Houwinka, stosując stałe  $K$  i  $\alpha$  ustalone przez Janusa i współpracowników [50]:

$$[\eta] = 0,64 \cdot \bar{M} \eta^{0,38} \quad (5)$$

gdzie:  $[\eta]$  — graniczna liczba lepkościowa (ml/g) oznaczona w 1M roztworze rodanku potasu w temp. 40°C.

#### PODSUMOWANIE

Zidentyfikowano dotychczas 19 różnych typów kolagenu (kolageny włóknotwórcze, kolageny nie tworzące włókien, kolageny tworzące długie i luźno upakowane struktury włókniste — filamenty, kolageny z przeważającą ciągliwością potrójnej helisy — asocjaty fibryl). Ró-

żnice pomiędzy nimi wynikają głównie z odmiennej długości części helikalnej cząsteczek, rozkładu grup jonogennych wzdłuż łańcuchów, obecności przerw w integralności potrójnej helisy, wymiarów i kształtu końcowych (globularnych) regionów, odszczepienia lub pozostawienia tych ostatnich w agregatach nadcząsteczkowych, ze zmian w modyfikacjach post-translacyjnych.

Kowalencyjne wiązania sieciujące w kolagenie, mające charakter chemiczny zasady Schiffa (wiązania aldiminowe), powstają w wyniku reakcji grup aldehydowych jednej cząsteczki z grupami aminowymi drugiej. Stabilizacja wiązania aldiminowego następuje w wyniku reakcji reszt histydyny z podwójnym wiązaniem zasady Schiffa (wiązanie HHL).

Jeżeli substratami reakcji jest ketoimina oraz aldehyd hydroksylizyny, to powstaje wówczas trójwiązący związek pierścieniowy — pirydynolina. Powstawanie wiązań dwufunkcyjnych i ich przemiana w wiązania trójfunkcyjne tłumaczy stały wzrost wytrzymałości włókien kolagenowych wraz ze starzeniem się tkanki. Przemiana kolagenu w żelatynę jest przejściem typu helisa → kłębek. Metody ekstrakcji żelatyny z tkanki kolagenowej są uzależnione od rodzaju i stopnia jej usieciowania. W tkance kolagenowej, w której dominują wiązania ketoiminowe i wielofunkcyjne, wydajność białka ekstrahowanego maleje, zaś uzyskana żelatyna zawiera składniki o różnych ciężarach cząsteczkowych (dimery, trimery i wyższe oligomery) tworzące żele o dużym stopniu polidyspersyjności.

Proces powstawania żelu jest obecnie rozumiany jako próba powrotu pojedynczych łańcuchów polipeptydowych żelatyny do postaci natywnego kolagenu. W literaturze proponowane są dwa modele tego procesu. Flory i Weaver [35] zaproponowali model tworzenia helisy, w którym etap determinujący szybkość renaturacji stanowi formowanie helikalnych segmentów w bogatych w prolinę fragmentach łańcucha żelatyny. Według tych autorów, pojedyncze helisy istnieją tylko chwilowo i są w stanie bardzo szybko przekształcić się w potrójną helisę poprzez utworzenie wiązań międzycząsteczkowych.

Model von Hippela i Harringtona [36] przewidywał natomiast bardzo szybkie, wstępne skręcenie bogatych w prolinę segmentów do postaci uporządkowanej konformacji, po czym następowało powolniejsze, bardziej kompletne uporządkowanie pojedynczych łańcuchów i wreszcie ich powolna asocjacja z utworzeniem potrójnych helis. W teorii Harringtona i von Hippela, pojedynczej helisie przypisuje się więc stabilność nie przewidywaną w modelu Flory'ego i Weavera.

Za teorią Harringtona i von Hippela przemawiają dane NMR, wyniki badania modułów dynamicznych renaturowanych roztworów oraz pomiary krystalograficzne podkreślające udział wody w stabilizacji obszarów o helikalnej strukturze kolagenu. Natomiast parametry termodynamiczne tworzenia załączków struktury helikalnej poli-L-proliny II w różnych typach żelatyny

wykazują raczej słuszność kinetycznych pomiarów Flory'ego i Weavera.

Obecnie, na podstawie wyników badania żelatyn rozdzielonych na pojedyncze łańcuchy ( $\alpha$ ), podwójne łańcuchy ( $\beta$ ) i potrójne łańcuchy ( $\gamma$ ), uważa się, że istnienie pojedynczych, stabilnych helis jest raczej mało prawdopodobne.

Kinetyka procesu renaturacji zależy od wielu czynników, głównie zaś od pochodzenia żelatyny, z czym wiąże się różna zawartość iminokwasów (reszt proliny i hydroksyproliny), oraz od stężenia, temperatury i składu renaturowanych roztworów.

Proces odtwarzania struktury kolagenu postępuje tym szybciej, im wyższe jest stężenie żelatyny i niższa temperatura renaturacji. Wzrost zawartości iminokwasów w żelatynie wpływa na wzrost początkowej szybkości tworzenia helikalnej struktury kolagenu oraz podwyższa temperaturę topnienia żelu. Pomiary skręcalności optycznej i lepkości zredukowanej udowodniły, że zarówno szybkość, jak i stopień renaturacji są największe w przypadku żelatyny typu  $\gamma$ . Dowodzi to, że oddziaływania międzylańcuchowe odgrywają główną rolę w tworzeniu struktury kolagenu.

W literaturze fachowej dominują dwa odmienne poglądy na temat mechanizmu procesu żelowania. Mechanizm zaproponowany przez Harringtona i Rao [44] zakłada częściową renaturację helis i tworzenie wiązań wodorowych w punktach kontaktowych pomiędzy trzema helisami. Utworzone potrójne helisy są przypadkowo rozmieszczone w przestrzeni. Obecność w żelach żelatyny trójhelikalnych struktur zbliżonych do kolagenu potwierdzają wyniki badań Pezrona i Djabourova [14] uzyskane metodą rentgenografii szerokokątowej oraz De Wolfa [43] otrzymane metodą dichroizmu kołowego. Ten ostatni autor nie wyklucza możliwości obecności innych niż trójhelikalne rodzajów struktur.

Według autorów pracy [14], różnice pomiędzy natywnymi i renaturowanymi helisami wynikają głównie z różnic w długości helikalnych sekwencji i w nadcząsteczkowym uporządkowaniu tych jednostek. Natomiast Godard [45] potraktował żelowanie jako konwencjonalny proces krystalizacji, zakładający z góry etap nukleacji oraz jednokierunkowy wzrost struktur krystalicznych.

## LITERATURA

1. Reich G.: "Kolagen", WNT, Warszawa 1970.
2. Lasek W.: "Kolagen", WNT, Warszawa 1978.
3. Woodhead-Galloway J.: "Collagen: the Anatomy of a Protein", Arnold, Londyn 1980; *Przegląd Skórzany* 1983 — wkładka.
4. Praca zbiorowa: "Protein Metabolism" (red. Bailey A. I., Etherington D. I.), Elsevier, Amsterdam 1980.

5. Parry D. A. D.: "Fibrous Proteins; Scientific Industrial and Medical Aspects", Academic Press, Londyn 1979.
6. Praca zbiorowa: "Treatise on Collagen" (red. Ramachandran G. N.), Academic Press, Nowy Jork 1967.
7. Bieńkiewicz J. K.: "Fizykochemia wyprawy skór", WNT, Warszawa 1986.
8. von Grassmann W., Engel J., Hanning K., Hörmann H., Kühn K., Nordwig A.: "Kollagen: Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe", Springer Verlag Wiedeń — Nowy Jork 1965, str. 195.
9. Heidemann E.: "Fundamentals of Leather Manufacturing", Eduard Roether KG, Darmstadt 1993.
10. Jeleńska M. M.: *Postępy Biochemii* 1978, **24**, 291.
11. Bailey A. J., Paul R. G.: *Leder & Häute Markt* 1998, **1**, 30.
12. Bailey A. J.: *J. Soc. Leather Technol. Chem.* 1992, **76**, 111.
13. Dölz R., Heidemann E.: *Biopolymers* 1986, **25**, 1069.
14. Pezron I., Djabourov M.: *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.* 1990, **28**, 1823.
15. Kuhn K., Wiedermann H.: *FEBS Letts.* 1981, **125**, 123.
16. von der Mark K., Aumailley M., Wick G.: *Eur. J. Biochem.* 1984, **142**, 493.
17. Bruns R., Press W.: *J. Cell. Biol.* 1986, **103**, 393.
18. Olsen B. R.: *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1997, **29**, nr 4, 555.
19. Dublet B., van der Rest M.: *J. Biol. Chem.* 1991, **266**, 6853.
20. Roth W., Heidemann E.: *Biopolymers* 1980, **19**, 1909.
21. Thakur S., Vadolas D., Germann H., Heidemann E.: *Biopolymers* 1986, **25**, 1081.
22. Fields C. G., Lovdahl C. M., Miles A. J., Hagen V. L. M.: *Biopolymers* 1993, **33**, 1695.
23. Fields C. G., Mickelson D. J., Drake S. L., Mc Carthy J. B., Fields G. B.: *J. Biol. Chem.* 1993, **268**, 14 153.
24. Tanaka T., Wada Y., Nakamura H., Doi T., Imanishi T., Kodama T.: *FEBS Lett.* 1993, **334**, 272.
25. Tanaka T., Nishikawa A., Tanaka Y., Nakamura H., Kodama T., Imanishi T., Doi T.: *Protein Eng.* 1996, **9**, 307.
26. Otl J., Battistuta R., Pieper M. i in.: *FEBS Lett.* 1996, **398**, 31.
27. Fields C. G., Grab B., Lauer J. L., Miles A. J., Yu Y. C., Fields G. B.: *Lett. Pept. Sci.* 1996, **3**, 3.
28. Hojo H., Akamatsu Y., Yamauchi K., Kinoshita M.: *Tetrahedron* 1997, **53**, nr 42, 14 263.
29. Bailey A. J., Light N. D., Atkins E. D.: *Nature* 1980, **288**, 408.
30. Yamauchi M., London R.: *J. Biol. Chem.* 1987, **262**, 11 428.
31. Fujimoto D., Akiba K. Y.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1977, **76**, 1124.
32. Smith C. R.: *J. Am. Chem. Soc.* 1919, **41**, 135.
33. Clark A. H., Ross-Murphy S. B.: *Adv. Polymer. Sci.* 1987, **83**, 107.
34. Ferry J. D., Eldridge J. E.: *J. Phys. Colloid Chem.* 1949, **53**, 184.
35. Flory P. J., Weaver E. S.: *J. Am. Chem. Soc.* 1960, **82**, 4518.
36. Harrington W. F., von Hippel P. H.: *Arch. Biochem. Biophys.* 1961, **92**, 100.
37. Nijenhuis K.: *Colloid Pol. Sci.* 1981, **259**, 522.
38. Flory P. J., Garret R. R.: *J. Am. Chem. Soc.* 1958, **80**, 4836.
39. Altgelt K., Hodge A. J.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 1961, **47**, 1914.
40. Veis A., Legowik J. T.: *Abstr. 7 th Ann. Meeting Biophys. Soc.*, TA 13, Nowy Jork 1963.
41. Edwards C. O., Mandelkern L.: *J. Polym. Sci., Polym. Lett. Ed.* 1982, **20**, 355.
42. Guerrero S. J., Keller A.: *J. Macromol. Sci., Phys.* 1981, **B 20**, nr 2, 167.
43. De Wolf F. A., Keller R. C. A.: *Prog. Colloid Polym. Sci.* 1996, **102**, 9.
44. Harrington W. F., Rao N. V.: *Biochemistry* 1970, **9**, 3714.
45. Godard P. i in.: *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.* 1978, **16**, 1817.
46. Kozlov P. V., Burdygina G. J., Fridman J. M.: *Zh. Nauchn. i Prokl. Fotogr. i Kinematogr.* 1972, **7**, 59.
47. Pinhas M. F., Blanshard J. M. V., Derbyshire W., Mitchell J. R.: *J. Thermal Anal.* 1996, **47**, 1499.
48. Honda I., Arai K., Mitomo H.: *J. Appl. Polym. Sci.* 1997, **64**, 1879.
49. Prabha Chatterji: *J. Appl. Polym. Sci.* 1989, **37**, 2203.
50. Janus J. W., Tabor B. E., Darlow R. L. R.: *Kolloid Z. Z. Polym.* 1966, **205**, 134.

Otrzymano 17 XII 1998 r.