

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА АМИНОКИСЛОТ В КОЛЛАГЕНЕ

Садуллаева Дилрабо Мардоновна,
Худойбердиев Шухрат Шамсиддинович
Бухарского государственного университета,
s.s.xudoyberdiyev@buxdu.uz

Аннотация

Получены коллагена из крупного рогатого скота. Коллагена исследованы хроматографическими методами. Определение качественный анализ и количественный расчёт концентрации исследуемых свободных аминокислот проводили сравнением времени удерживания и площадей пиков стандартных и исследуемых фенилтиокарбаматных производных аминокислот. В результате проведенных исследований в коллагена было идентифицировано 20 аминокислот, 10 из которых являются незаменимыми.

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

В последние годы в биотехнологии, медицине и ветеринарной медицине наблюдается увеличение спроса к новым материалам на основе коллагена [1].

Коллаген является основным белком внеклеточного матрикса и наиболее распространенным белком, обнаруженным у млекопитающих, составляющим 70–80 % кожи (сухой вес) и 25 % всего белка. Коллаген действует как структурная виселица в тканях [2]. Коллаген является доминирующим компонентом внеклеточного матрикса млекопитающих. Встречается практически во всех тканях животных [3].

Коллаген выделен [4] из кожи крупного рогатого скота и предварительно очищен от низкомолекулярных солей методом мембранного диализа, очищения составляет 83,75%.

Хроматографическое обнаружение аминокислот проводили методом восходящей одномерной бумажной хроматографии (БХ) на бумаге (немецкая, марки FN-3 Mittelschnell laufend) в системе растворителей н-бутанол-кислота уксусная ледяная-вода (4:1:2) с использованием приема двойного разгона растворителей. Проявляли раствором нингидрина в ацетоне 2% [5].

Определение качественного и количественного содержания аминокислот коллагена проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе *Agilent Technologies 1200* со спектрофотометрическим детектором. Хроматографическая колонка 75x4,6мм *Discovery HS C₁₈*. Хроматографический анализ проводили в режиме градиентного элюирования.

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

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

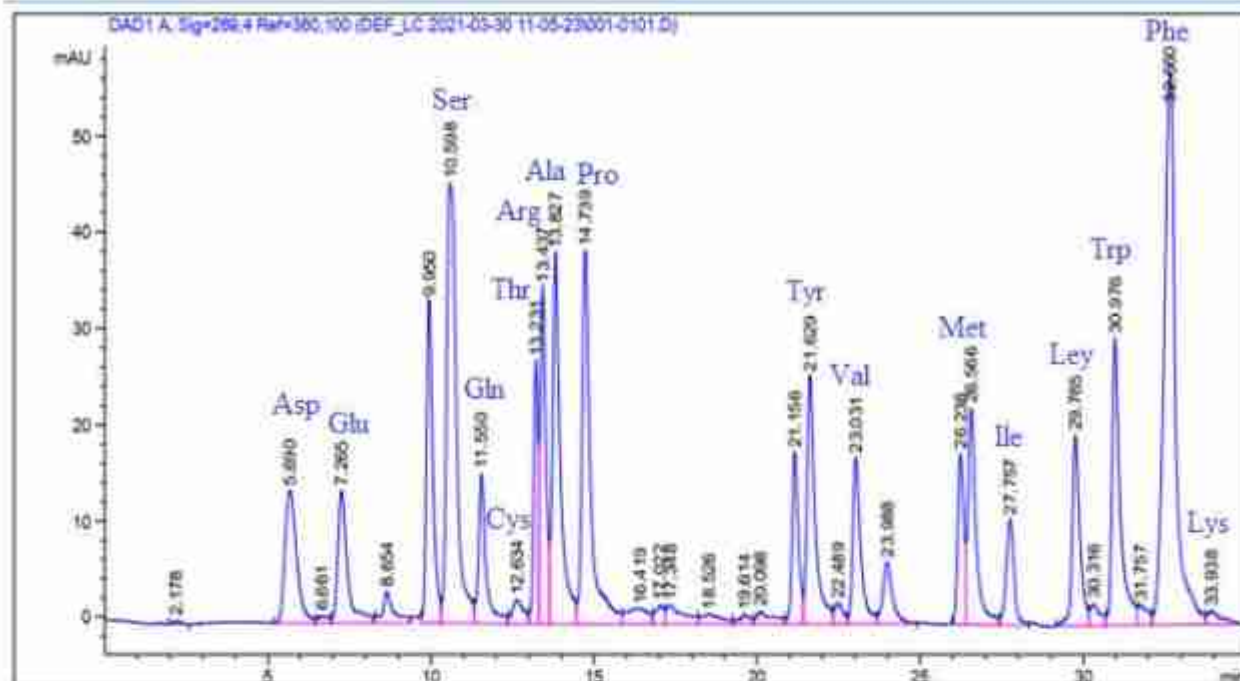


Рис. 1. Хроматограмма аминокислот коллагена

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

Качественный анализ и количественный расчет концентрации исследуемых свободных аминокислот проводили сравнением времени удерживания и площадей пиков стандартных и исследуемых фенилтиокарбонилные (ФТК) – производных аминокислот [7].

Таблица 1

Содержание аминокислот в коллагена, определенных методом ВЭЖХ

№	Аминокислоты	Краткие название	Исследуемое сырье (мг/гр)	% от общего количества
1	Аспарагиновая кислота	<i>Asp</i>	0,368929	3,754741
2	Глутаминовая кислота	<i>Glu</i>	0,580388	5,906846
3	Серин	<i>Ser</i>	0,241049	2,453254
4	Глицин	<i>Gly</i>	0,538933	5,484941
5	Аспарагин	<i>Asn</i>	0,508795	5,178215
6	Глутамин	<i>Gln</i>	0,18812	1,914574
7	Цистеин	<i>Cys</i>	3,407692	34,681477
8	Треонин*	<i>Thr</i>	0,286958	2,920489
9	Аргинин*	<i>Arg</i>	0,528942	5,383259
10	Аланин	<i>Ala</i>	0,265354	2,700616
11	Пролин	<i>Pro</i>	0,252801	2,572859
12	Тирозин	<i>Tyr</i>	0,07794	0,793227
13	Валин*	<i>Val</i>	0,444008	4,518851
14	Метионин*	<i>Met</i>	0,117063	1,191398
15	Изолейцин*	<i>Ile</i>	0,191395	1,947905
16	Лейцин*	<i>Leu</i>	0,248506	2,529147
17	Гистидин*	<i>His</i>	0,384244	3,910608

18	Триптофан*	<i>Trp</i>	0,421861	4,293452
19	Фенилаланин*	<i>Phe</i>	0,406663	4,138775
20	Лизин HCl*	<i>Lys</i>	0,366042	3,725359
	Всего		9,825683	100

* - незаменимые аминокислоты

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

Как видно из таблицы 1 и рис. 1. коллагена содержат 20 аминокислот, 10 из которых являются незаменимыми (треонин, аргинин, валин, метионин, изолейцин, лейцин, фенилаланин, лизин, гистидин, триптофан) [8]. По результатам полученных данных обнаруженные аминокислоты имеют следующее расположение:

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

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

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

Таким образом, нами изучены процесс результате проведенных исследований в коллагена было идентифицировано 20 аминокислот, 10 из которых являются незаменимыми. Преобладающими аминокислотами в коллагена являются цистеин, глутаминовая кислота, глицин и аргинин. Следовательно полученные данные позволили характеризовать коллагена как источник протоногенных аминокислот. Полученные коллагеном вызывают интерес в получении бактерицидных пленок для ветеринарии и медицины.

Список литературы:

1. Graceffa, V., Wu, Z., Gaspar, D., Spanoudes, K., Isa, I. L. M., Biggs, M., Zeugolis, D. I. Xenogenic Tissues and Biomaterials for the Skeletal System. *Comprehensive Biomaterials II*, (2017). 471–504. DOI:10.1016/b978-0-12-803581-8.10204-8.
2. Saurabh Tukaram Gondil, H B Janugade, Aakash Katkar. To Evaluate the Effect of Collagen Dressing in Diabetic Foot Ulcer Patients. *Journal of Pharmaceutical Negative Results* 13(6) 2022. P. 659-662. DOI: 10.47750/pnr.2022.13.S06.093.
3. Ricard-Blum, S. The Collagen Family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(1), (2010). a004978–004978. DOI:10.1101/cshperspect.a004978.
4. Худойбердиев Ш.Ш., Саидахмедова Д.Р. Получение и свойства коллагена из кожи крупного рогатого скота. *Universum: Химия и биология*. 2023. 5 (107), С. 30-35.
5. Разаренова К.Н., Захарова А.М., Протасова И.Д., Жохова Е.В. Аминокислотный состав надземной части *Geranium pratense L.*, *Geranium sylvaticum L.*, *Geranium palustre L.* Бултеровские сообщения, 2012, вып. 31, № 8, С. 73-78.
6. Akira Tsugita and Jean-Jacques Scheffler. A Rapid Method for Acid Hydrolysis of Protein with a Mixture of Trifluoroacetic Acid and Hydrochloric Acid. *Eur. J. Biochem.* 124, 585-588 (1982).
7. Steven A., Cohen D.J. Amino Acid Analysis Utilizing Phenylisothiocyanate Derivatives. *Analyt. Biochem.* 1988, vol. 17, №1, pp. 1-16.
8. Нуруллаева Д.Х., Фарманова Н.Т. Изучение аминокислотного состава плодов овса посевного (*Avena Sativa L.*). *Химия и химическая технология. Узбекистан*. 2019, №3. С. 64-67.