

Vergleichende optische Untersuchungen an modifizierten Gelatinen und an Kalbshautkollagen Einfluß der Modifizierung auf das konformative Verhalten

Von A. GARDI, HS. NITSCHMANN* und K. RIEDER

Institut für organische Chemie der Universität Bern und Zentrallaboratorium des Blutspendedienstes des Schweizerischen Roten Kreuzes
in Bern

Professor Rudolf Signer zum 70. Geburtstag gewidmet

Summary

Results of optical measurements (UV and CD) on gelatin with intracatenar cross-links, on a number of otherwise modified gelatins and on citrate-soluble calf skin collagen in dependence of the temperature are presented. From these results, especially from CD measurements, conclusions as to the amount of helical chain segments in very diluted solutions at low temperature can be drawn. The degree of helicity depends on the average molecular weight as well as on chemical modification.

The strongest inhibition of helix formation in undegraded gelatin resulted from intracatenar cross-linking, as it has been described in a previous paper². Helicity in degraded gelatins depends not only on the average molecular weight (M_n) but also on the conditions of degradation (alkaline, acidic, oxydative). Though gel formation of more concentrated gelatin solutions is a result of reforming helical structures, the relation between optically determined helicity in dilute solutions and the gel melting points of 2 to 4% solutions differs with the preparations here investigated. No simple, uniformly valuable correlation between the two values was found.

* Autor, an den Anfragen zu richten sind. Adresse: Institut für organische Chemie, Erlachstraße 9 a, Postfach 89, CH-3000 Bern 9

1. Einleitung

Das Gelieren warm zubereiteter Gelatinelösungen beim Abkühlen beruht auf einer unvollständigen, stark gestörten Rückbildung der in nativem Kollagen vorliegenden Tripelhelix durch sich vereinigende Peptidketten-segmente. Es handelt sich also um eine partielle Renaturierung. Erwärmt man das Gel, so erfolgt wieder Denaturierung (Helix-Knäuel-Übergang), beobachtbar als Verflüssigung. Wie alle Denaturierungen erfolgt auch diese Gelverflüssigung in einem engen Temperaturbereich, so daß man von einem Gelschmelzpunkt spricht. Dieser Gelschmelzpunkt hängt von der Herkunft, der Herstellungsart und vom mittleren Molekulargewicht der Gelatine sowie von der Konzentration ab; aber kaum vom Elektrolytmilieu. Transfusionslösungen mit modifizierter Gelatine als Kolloid werden heute in zunehmendem Maße in der Schockbekämpfung als Plasmaersatzmittel eingesetzt¹. Von den an solche Präparate gestellten Anforderungen betrifft eine, die besonders aus Kreisen der Militärmedizin gestellt wird, den Gelschmelzpunkt. Sie besteht darin, daß diese Gelatinelösungen bei einer Konzentration von 3,5 bis 6,0% und einem mittleren Molekulargewicht (Zahlenmittel) $M_n \geq 22000$ bis gegen 0°C flüssig bleiben sollten. Um diese Bedingung zu erfüllen, muß die Gelatine chemisch so modifiziert werden, daß eine Rückbildung der Kollagenhelix sehr erschwert ist. Die heute gebräuchlichste Methode besteht darin, die Peptidketten der Gelatine chemisch oder enzymatisch in kleinere Bruchstücke zu zerlegen und diese Bruchstücke mit geeigneten Reagentien intermolekular zu vernetzen, so daß unter Wiederanstieg der Teilchengröße verzweigte Moleküle entstehen. Die Rückbildung von Tripelhelixsegmenten ist nach dieser Modifikation wegen der kürzeren freien Kettenlänge stark behindert. Bei Anwendung dieser Methode ist es möglich, Produkte zu erhalten, die bei einem M_n von maximal etwa 25000 in 4,0-prozentiger Lösung bei 0°C flüssig bleiben. Noch größere verzweigte Moleküle lassen sich aber wegen präparativer Schwierigkeiten auf diesem Wege nicht erhalten. Eine weitere Möglichkeit gezielter Modifizierung besteht darin, die Gelatine-Kettenmoleküle in der denaturierten, also in der Knäuel-Form, durch intramolekulare bzw. intracatenare Vernetzung so zu fixieren, daß sich die gelösten Ketten beim Abkühlen nicht mehr in die Helix-Konformation einordnen können. GARDI und NITSCHMANN² haben kürzlich gezeigt, daß nach Einführung einer genügenden Zahl intracatenarer Amidbindungen zwischen freien Carboxylgruppen und Aminogruppen mit Hilfe eines wasserlöslichen Carbodiimids eine 4,0-prozentige Gelatinelösung mit $M_n = 40000$ bis 45000 bei 0°C nicht mehr geliert. Die Analyse hat etwa 7 Brückenbindungen pro Mol Gelatine gemittelt ergeben. Neben dem Gelschmelzpunkt wird die Viskosität drastisch gesenkt. In der Gelchromatographie an Sepharose 6B wird die so modifizierte Gelatine trotz gleichem M_n stärker retardiert als die Ausgangsgelatine. Dies alles sind Hinweise darauf, daß

die Kettenknäuel in einer relativ dichten Form fixiert wurden.

Zur Abklärung der Frage, wie weit eine derart mit Carbodiimid intracatenar vernetzte Gelatine noch in der Lage ist, temperaturbedingte Konformationsumwandlungen im Sinne einer reversiblen Helixbildung einzugehen, führten wir UV- und CD-Messungen bei verschiedenen Temperaturen durch. Diese Methoden sind besonders geeignet, Konformationsumwandlungen zu verfolgen und den Helixgehalt von Gelatine in Wasser zu ermitteln. Neben dem erwähnten Präparat wurden zu Vergleichszwecken mehrere andere, unterschiedlich hergestellte Gelatinepräparate sowie lösliches Kalbshaut-Kollagen untersucht. Wir berichten im folgenden über optische Untersuchungen an inter- und intracatenar vernetzten sowie an alkalisch und oxidativ abgebauten Gelatinepräparaten in verdünnter Lösung. Solche verdünnte Lösungen zeigen, auch wenn sie nicht mehr gelieren, doch noch temperaturabhängige Konformationsumwandlungen.

2. Material und Methoden

Untersuchte Präparate:

- Citratpufferlösliches Kollagen (Tropokollagen) aus Kalbshaut, hergestellt nach REICH³, nativ, tripelhelical. MG etwa 300000.
- Rindshautgelatine alkalischer Herstellungsart (Gelatinefabrik Winterthur); $M_n = 42000$.
- Rindshautgelatine alkalischer Herstellungsart (Gelatinefabrik Rousselot-Kuhlmann, France); $M_n = 40000$.
- Gelatine 7063 A, Schweinshautgelatine saurer Herstellungsart; $M_n = 43300$.
- Mit wasserlöslichem Carbodiimid intracatenar vernetztes Gelatinepräparat. M_n etwa 40000; etwa 7 Brückenbindungen pro Mol. Nähere Beschreibung bei².
- Physiogel®. Vom Blutspendedienst des Schweizerischen Roten Kreuzes hergestelltes Plasmaersatzmittel; $M_n = 23000$ ⁴.
- Haemaccel®. Plasmaersatzmittel der Behringwerke Marburg. Mit Diisocyanat vernetzt; $M_n = 21000$ ⁵.
- Gelifundol®. Plasmaersatzmittel der Firma Biotest, Frankfurt am Main. Mit Glyoxal vernetzt, sogenannte Oxypolygelatine⁶; M_n etwa 19000.
- Präparate aus zwei Abbaureihen mit Gelatine Winterthur:
 - a) Alkalischer Abbau: eine 8,5-prozentige Gelatinelösung wurde auf pH 10,0 gebracht und im Rührautoklaven bei 2 atü N₂ und 250 UpM abgebaut. Nach 9, 12, 25 und 90 Minuten wurden je 200 ml entnommen, nach Verdünnung auf 400 ml auf pH 7,0 gebracht und durch Ionenaustausch entsalzt.

¹ Modified Gelatins as Plasma Substitutes, *Bibl. haemat.* 33, Karger, Basel/New York 1969.

² A. GARDI und Hs. NITSCHMANN, *Helv. Chim. Acta* 55 (1972) 2468.

³ C. REICH, *Kollagen*, S. 26, Verlag Steinkopff, Dresden 1966.

⁴ H. R. STOLL und Hs. NITSCHMANN, in *Modified Gelatins as Plasma Substitutes*, *Bibl. haemat.* 33, 81-95, Karger, Basel/New York 1969.

⁵ DBF 1 155134 (1964).

⁶ L. RÓKA, in *Modified Gelatins as Plasma Substitutes*, *Bibl. haemat.* 33, 75-7, Karger, Basel/New York 1969.

b) Oxidativer Abbau⁷: eine 5,0prozentige Gelatinelösung wurde bei pH 7,0 während 30 Minuten bei 90°C unter Rühren mit variablen Mengen H₂O₂ umgesetzt (0,0, 0,25, 0,50, 1,0, 2,0 und 5,0 mMol H₂O₂ pro g Gelatine). Durch zwanzigminütiges Autoklavieren bei 120°C wurde anschließend ein eventueller Reagensüberschuß zerstört. Nach Entsalzen mittels Ionenaustausch wiesen die Lösungen, mit Jodstärkepapier geprüft, kein Peroxid mehr auf.

– Alkalisches abgebaute und mit 25 mMol Bernsteinsäureanhydrid pro 100 g Gelatine succinylierte Gelatine Rousselot.

Messungen:

Die UV-Messungen erfolgten auf einem Beckman-DB-Spektrophotometer, die CD-Messungen auf einem Roussel-Jouan-Dichrographen. Beide Geräte waren mit einem thermostatisierbaren Küvettenraum versehen. Für die Berechnung des Zirkulardichroismus wurde als mittleres Molekulargewicht pro Aminosäurerest für Rindshautgelatine und Tropokollagen 90,5 und für Schweinshautgelatine 91,3 angenommen⁸. Die Konzentrationsbestimmung der Gelatinelösungen erfolgte mit der Biuret-Methode⁹ oder nach KJELDAHL; die M_n-Bestimmungen wurden mit dem Konzentrationsosmometer nach NITSCHMANN *et al.*¹⁰ durchgeführt.

3. Resultate

Beim langsamen Aufwärmen einer 0,05prozentigen Rohgelatinelösung* (M_n = 40 000) zeigt die UV-Transmission bei 231 mμ eine deutliche Diskontinuität in Form einer breiten Stufe zwischen 10 und 25°C (Abb. 1). Ähn-

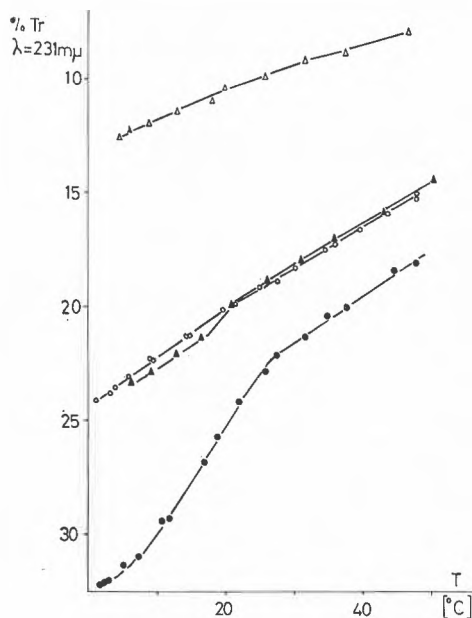


Abb. 1. Temperaturabhängigkeit der UV-Transmission bei 231 mμ von Gelatine Winterthur (●-●), mit Carbodiimid intracatenar vernetzter Gelatine Winterthur (○-○), Physiogel® (▲-▲) und Gelifundol® (△-△). Gelatinekonzentration = 0,05% in 0,02 M Phosphatpuffer und physiologischer Kochsalzlösung, pH 7,2. Die Lösungen wurden vor der Messung während mindestens 24 Stunden bei 0 bis 2°C gealtert. Gelifundol® zeigt stark erniedrigte Transmissionswerte, da die Reaktion von Glyoxal mit Gelatine bei der o.p.c.-Herstellung ein dunkel gefärbtes Produkt mit erhöhter UV-Absorption ergibt

* Bei dieser Konzentration kann kein eigentliches Gelieren mehr beobachtet werden.

liche Kurven erhält man bei der Messung der Viskosität, der optischen Drehung oder der Lichtstreuung in Abhängigkeit von der Temperatur¹¹. Der Mittelpunkt des Übergangs (T_m) liegt bei 16 bis 18°C. Diese Stufe tritt bei den drei gleichzeitig untersuchten modifizierten Gelatinepräparaten Physiogel® (M_n = 23 000), Gelifundol® (M_n = 19 000) und dem mit Carbodiimid intramolekular vernetzten Präparat (M_n = 40 000) kaum oder überhaupt nicht mehr auf.

Wird das mittlere Teilchengewicht einer Rohgelatine durch H₂O₂-Behandlung verkleinert, so erscheint die Stufe weniger ausgeprägt, sie ist jedoch auch bei einem M_n von etwa 12 000 noch deutlich erkennbar (Abb. 2a). Dies ganz im Gegensatz zu alkalisch abgebauten Gelatinen, wo bereits bei einem M_n von 25 000 keine Stufe mehr auftritt (Abb. 2b).

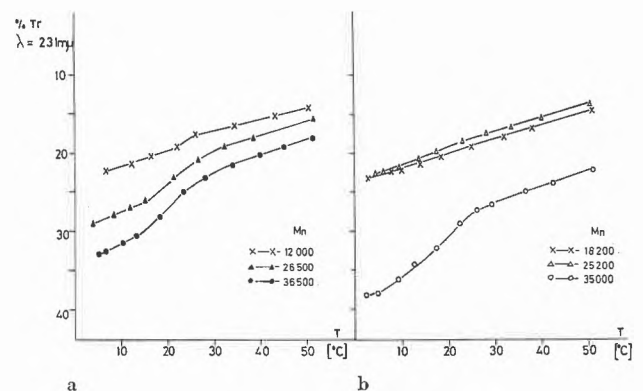


Abb. 2a. Temperaturabhängigkeit der UV-Transmission von oxidativ abgebauter Gelatine Winterthur. Meßbedingungen s. Legende zu Abb. 1

Abb. 2b. Temperaturabhängigkeit der UV-Transmission von alkalisch abgebauter Gelatine Winterthur. Meßbedingungen s. Legende zu Abb. 1

In Abb. 3 sind die CD-Spektren von säurelöslichem Tropokollagen und zwei verschiedenen Rohgelatinen alkalischer Herstellungsart bei 2°C und 38°C dargestellt (bei 38°C darf man mit vollständiger Denaturierung rechnen).

Die gemessenen $\Delta\epsilon$ -Werte für die Helix- und die denaturierte Form sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1. Zirkulardichroismusparameter von säurelöslichem Kollagen und alkalisch gewonnenen Gelatinen

λ	$\Delta\epsilon$			
	Tropokollagen nativ	renaturiert	Gelatine Rousselot	Gelatine Winterthur
<i>Helix-Form</i> (4°C)				
198 mμ	-15,4	-11,7	-13,4	-12,9
221 mμ	+ 2,0	+ 1,36	+ 1,22	+ 0,89
<i>Denaturierte Form</i> (34 bis 38°C)				
198 mμ	- 3,4	-	- 3,0	- 3,7
221 mμ	~ - 0,3	~ - 0,2	~ - 0,2	~ - 0,2

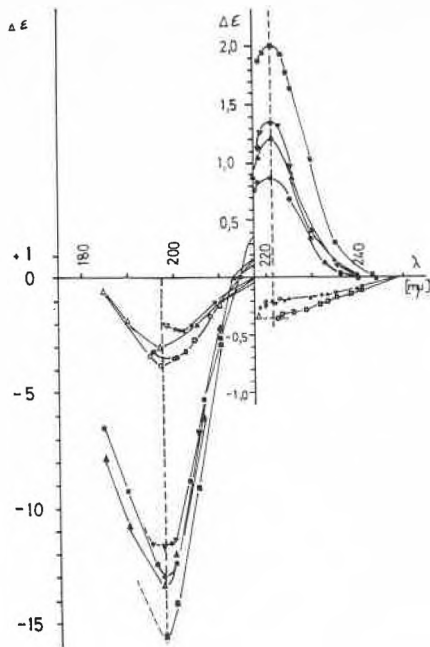


Abb. 3. CD-Spektren von nativem (■—■) und teilweise renaturiertem (▼—▼) Tropokollagen, Gelatine Rousselot (▲—▲) und Gelatine Winterthur (●—●) bei 2°C (ausgefüllte Zeichen) und 38°C (offene Zeichen). Die Meßpunkte sind den Schreiberkurven entnommen. Eiweißkonzentration = 0,20 bis 0,25%, Kollagen in 0,1M Citratpuffer, pH 3,7, Gelatinen in H₂O, pH 7,0. Die Lösungen wurden vor der Messung während 6 Tagen bei 0°C gealtert. Vorbehandlung des teilweise renaturierten Tropokollagens: eine verdünnte Lösung des nativen Kollagens wurde während 20 Minuten auf 60°C erhitzt und anschließend während zwei Tagen bei +4°C renaturiert

Die an nativem Tropokollagen bei 2°C gemessenen Werte stimmen gut mit den von PIEZ und SHERMAN¹² für Rattenhautkollagen angegebenen Werten überein ($\Delta \epsilon_{197} = -15,6$; $\Delta \epsilon_{221} = +2,18$; mit $\epsilon = \theta/3300$). Diese Werte werden beim hitzedenaturierten und durch 48stündiges Aufbewahren bei +4°C renaturierten Tropokollagen begrifflicherweise nicht mehr erreicht; die prozentuale Differenz bei 198 $m\mu$ bzw. 221 $m\mu$ ist jedoch von vergleichbarer Größe (24% bzw. 32%). Hier tritt wiederum ein Unterschied zu den alkalisch behandelten Gelatinen zutage:

Das positive Maximum der Gelatinen bei 221 $m\mu$ ist sehr viel weniger stark ausgebildet als dasjenige des Kollagens (44 bis 61%), während das negative Maximum bei 198 $m\mu$ für alle Präparate ähnliche Werte aufweist. Ein Vergleich mit teilweise renaturiertem Tropokollagen zeigt, daß die $\Delta \epsilon$ -Werte der alkalisch gewonnenen Gelatinen unerwartet hoch sind: wie es zu erwarten war, sind die $\Delta \epsilon_{221}$ -Werte der Gelatinen kleiner als derjenige von renaturiertem Kollagen, dagegen sind die negativen Maxima der Gelatinen bei 198 $m\mu$ sogar stärker ausgebildet als das Maximum von renaturiertem Kollagen.

Bei den modifizierten Gelatinepräparaten sind die bei 2°C gemessenen Maxima sehr viel kleiner, als dies bei den Rohgelatinen der Fall ist, dagegen sind die der denaturierten Form zuzuschreibenden, bei 34°C gemessenen Kurven mit denjenigen des Rohmaterials iden-

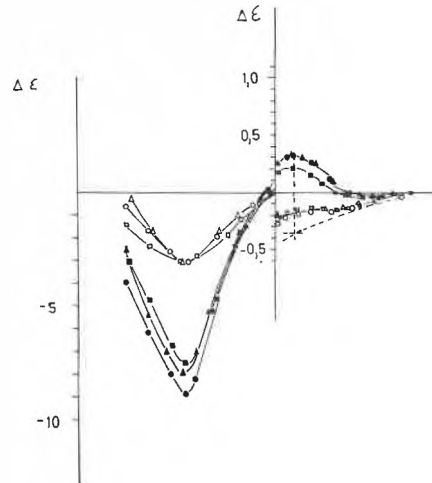


Abb. 4. CD-Spektren von modifizierten Gelatinepräparaten: Physio-gel® (●—●), alkalisch abgebaute und succinylierte Gelatine Rousselot (■—■) und mit Carbodiimid intracatenar vernetzte Gelatine Winterthur (▲—▲) bei 2°C (ausgefüllte Zeichen) und bei 34°C (offene Zeichen). Die Meßpunkte sind den Schreiberkurven entnommen. Eiweißkonzentration 0,20 bis 0,25%

tisch (Abb. 4). Die Tatsache, daß die CD-Spektren aller untersuchten Gelatinen trotz großer Unterschiede bei 2°C bei 34 bis 38°C praktisch identisch sind, deutet darauf hin, daß alle Präparate bei dieser Temperatur die gleiche denaturierte Konformation einnehmen. Daß diese Konformation nicht vollständig ungeordnet sein kann, wird durch die Existenz eines kleinen Sattels im negativen Bereich bei 220 bis 230 $m\mu$ angedeutet. Dieser Sattel ist bei Tropokollagen bei 40°C weniger stark ausgebildet. TIFFANY und KRIMM¹³ fanden an Rattenschwanzkollagen, das während einer halben Stunde bei 40°C denaturiert worden war, in diesem Bereich nur noch einen stetigen Anstieg zum negativen Maximum bei 198 $m\mu$, wie er durch die gestrichelte Linie in Abb. 4 dargestellt ist. Diese letztere Kurve erst ist nach den genannten Autoren dem vollständig statistisch ungeordneten Knäuel zuzuordnen.

Die Temperaturabhängigkeit der beiden CD-Maxima, dargestellt als Differenz zum Wert für den denaturierten Zustand (Abb. 5 a, 5 b), ergibt ein weiteres, recht überraschendes Resultat. Wie bei der UV-Messung tritt zum Teil auch hier eine Stufe auf, für natives Kollagen in einem sehr engen Temperaturbereich mit $T_m = 35,5^\circ\text{C}$, für renaturiertes Kollagen in einem breiten Intervall mit $T_m = 25$ bis 27°C . Dieses Bild erhält man sowohl bei 198 $m\mu$ wie bei 221 $m\mu$. Gemessen bei 221 $m\mu$ tritt die

⁷ C. DEASY und SR. MICHELE, *J. Amer. Leather Chem. Assoc.* 60 (1965) 665.

⁸ J. E. EASTOE, in *Treatise on Collagen*, Vol. I (G. N. RAMACHANDRAN, Ed.), S. 52, Academic Press, London/New York 1967.

⁹ B. LANGE, *Kolorimetrische Analyse*, Verlag Chemie, Weinheim 1956.

¹⁰ HS. NITSCHMANN, H. R. GYGAX, P. MOSER und H. R. STOLL, *Vox Sang.* 12 (1967) 106.

¹¹ P. H. VON HIPPEL, in *Treatise on Collagen*, Vol. I (G. N. RAMACHANDRAN, Ed.), S. 253, Academic Press, London/New York 1967.

¹² K. A. PIEZ und M. R. SHERMAN, *Biochem.* 9 (1970) 4129.

¹³ M. L. TIFFANY und S. KRIMM, *Biopolymers* 8 (1969) 347.

Umwandlungsstufe auch bei den Rohgelatinen und teilweise, wenn auch schwächer ausgebildet, sogar bei den modifizierten Gelatinepräparaten auf. Legt man jedoch die bei 198 mμ gemessenen Werte zugrunde, so ist die

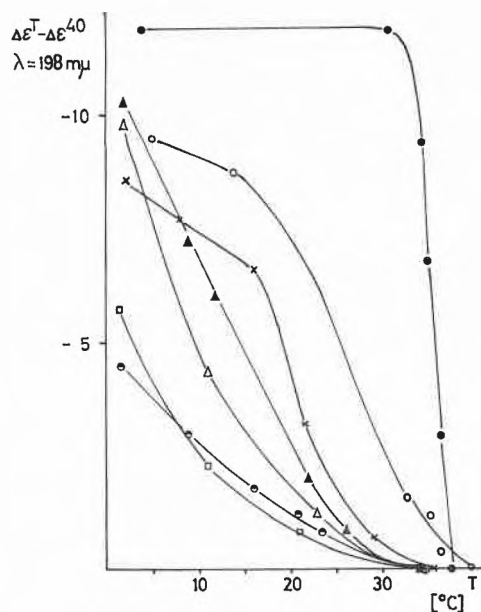


Abb. 5 a. Temperaturabhängigkeit der CD-Absorption bei 198 mμ von nativem Tropokollagen (●—●), teilweise renaturiertem Tropokollagen (○—○), Gelatine Rousselot (▲—▲), Gelatine Winterthur (△—△), Gelatine 7063 A (×—×), Physiogel® (□—□) und alkalisch abgebauter und succinylierter Gelatine Rousselot (●—●). Meßbedingungen s. Legende zu Abb. 3. Jeder Meßpunkt wurde nach einer Equilibrierungszeit von 30 Minuten registriert

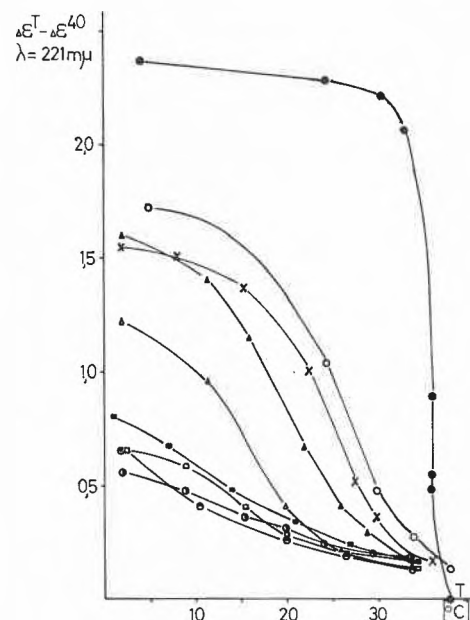


Abb. 5 b. Temperaturabhängigkeit der CD-Absorption bei 221 mμ von nativem Tropokollagen (●—●), teilweise renaturiertem Tropokollagen (○—○), Gelatine 7063 A (×—×), Gelatine Rousselot (▲—▲), Gelatine Winterthur (△—△), Haemaccel® (■—■), Physiogel® (□—□), alkalisch abgebauter und succinylierter Gelatine Rousselot® (●—●) und mit Carbodiimid intracatenar vernetzter Gelatine Winterthur (●—●). Meßbedingungen s. Legende zu Abbildungen 3 und 5 a

Stufe wohl bei der sauer hergestellten Gelatine 7063 A, jedoch bei keiner einzigen der alkalisch behandelten Gelatine feststellbar.

Die Berechnung der Helixgehalte der verschiedenen Gelatinen bei 2°C, bezogen auf den Helixgehalt von nativem Kollagen, der als 100 gesetzt wird, ergibt die in Tabelle 2 dargestellten Werte. Sie wurden nach der Formel

$$\% \text{ Helix} = \frac{\Delta\epsilon^{2^\circ} - \Delta\epsilon^{40^\circ} (\text{Gelatine})}{\Delta\epsilon^{2^\circ} - \Delta\epsilon^{40^\circ} (\text{Kollagen})} \cdot 100$$

berechnet.

Aus den Daten bei 198 mμ erhält man für unser renaturiertes Kollagen einen Helixgehalt von etwa 81%, aus den Daten bei 221 mμ einen Helixgehalt von 74%. Die Übereinstimmung ist also recht gut. Ein Vergleich der Abb. 5 a und 5 b zeigt jedoch, daß die Übereinstimmung bei den alkalisch behandelten Gelatinen schlecht ist. Da bei 198 mμ die Temperaturabhängigkeit von $\Delta\epsilon^T - \Delta\epsilon^{40}$ bei tiefen Temperaturen sehr groß ist, die Kurven unerklärlicherweise keine Stufe zeigen und die $(\Delta\epsilon^2 - \Delta\epsilon^{40})$ -Werte zudem wahrscheinlich zu hoch sind, berechneten wir die Helixgehalte für alkalisch behandelte Gelatinen aus den CD-Daten bei 221 mμ. Nach PIEZ und SHERMAN¹² liegt Kollagen nicht, wie wir supponiert hatten, zu 100%, sondern nur zu etwa 95% in der helicalen Konformation vor (mindestens eine Region am N-terminalen Ende der α-Ketten ist nicht helical); der tatsächliche Helixgehalt der untersuchten Gelatinen liegt daher sicher noch etwas tiefer.

4. Diskussion

Die CD-Messungen zeigen deutlich, daß das früher beschriebene², intracatenar durch Amidbindungen vernetzte Präparate nur noch in sehr beschränktem Maße befähigt ist, die Kollagenhelix auszubilden (Abb. 4); der Helixgehalt bei 2°C beträgt nur noch rund 50% des Gehalts im Ausgangsmaterial bzw. 29%, bezogen auf den von nativem Tropokollagen. Dieser Befund findet seine Parallele in der geringen Gelierfähigkeit von konzentrierten Lösungen: in 4prozentiger Lösung geliert das Rohmaterial bei 24°C, das vernetzte Präparat (bei gleichem M_n von 40000) unter 0°C. In etwa 6prozentiger Lösung ist jedoch auch das vernetzte Präparat noch in

Tabelle 2. Helixgehalte der untersuchten Gelatinen, berechnet aus CD-Daten bei 221 mμ

Bezeichnung	% Helixgehalt bei 2°C (Kollagen = 100%)
Gelatine Rousselot	67%
Gelatine 7063 A	66%
Gelatine Winterthur	53%
Carbodiimid-ernetzte Gelatine Winterthur	29%
Physiogel®	29%
Haemaccel®	34%
Gelifundol®	24%
Alkalisch abgebaute, succinylierte Gelatine Rousselot	24%

der Lage, ein Gel zu bilden; der Gelschmelzpunkt liegt hier bei 6°C. Ganz ähnlich liegen die Verhältnisse bei den niedrigermolekularen Handelspräparaten (M_n 23 000 bis 27 000). Physiogel® mit einem Helixanteil von 29% gegenüber Tropokollagen geliert in 4prozentiger Lösung bei 8 bis 9°C, alkalisch abgebaute und succinylierte Gelatine Rousselot mit einem Helixanteil von 24% bleibt bei 0°C flüssig.

Obschon die intracatenar vernetzte Gelatine als einzige der untersuchten Gelatinen in der Darstellung der Abb. 5 a keine Übergangsstufe zeigt, ist sie doch noch in der Lage, in verdünnter Lösung Helixsegmente auszubilden und in genügend konzentrierter Lösung sogar zu gelieren. Die Helixsegmente scheinen aber weniger stabil zu sein als diejenigen der übrigen Gelatinen, denn der Helix-Knäuel-Übergang zeigt überhaupt keine Kooperativität, obschon der Helixgehalt gleich hoch wie bei Physiogel® und sogar etwas höher als bei der alkalisch abgebauten und succinylierten Gelatine Rousselot ist. Dasselbe zeigt sich auch beim Gelschmelzpunkt von intracatenar vernetzter Gelatine (< 0°C), der wesentlich tiefer liegt als beim Physiogel® (etwa 8°C), trotz genau gleichem Helixanteil in kalter, verdünnter Lösung. Man findet also keine direkte, allgemeingültige Beziehung zwischen Helixgehalt in verdünnter und Gelschmelzpunkt in konzentrierter Lösung.

Die geringe Stabilität der Helixsegmente der intracatenar vernetzten Gelatine rührt möglicherweise daher, daß dieses Präparat höchstens mit den freien Kettenenden echte Poly-L-Prolin-II-Helices ausbilden kann, währenddem dies beim Physiogel®, dessen Ketten frei beweglich sind, überall dort, wo die Aminosäuresequenz eine Helixbildung begünstigt, möglich ist.

Wesentlich schwieriger zu erklären sind die bereits in Abschnitt 3 erwähnten Diskrepanzen im Verhalten von alkalisch behandelten Gelatinen einerseits und Tropokollagen bzw. oxidativ abgebauten Gelatinen anderseits:

- Die Höhe der CD-Maxima von teilweise renaturiertem Tropokollagen bei 198 $m\mu$ bzw. 221 $m\mu$ ist prozentual, bezogen auf den jeweiligen Wert von nativem Tropokollagen etwa gleich, bei alkalisch behandelten Gelatinen jedoch sehr unterschiedlich.
- Die Temperaturabhängigkeit der CD-Absorption ($\Delta \epsilon^T - \Delta \epsilon^{40^\circ}$) von nativem und teilweise renaturiertem Tropokollagen sowie Gelatine 7063 A zeigt sowohl bei 198 $m\mu$ wie bei 221 $m\mu$ eine Stufe. Bei den alkalisch behandelten Gelatinen tritt dieselbe Stufe wohl bei 221 $m\mu$ auf, nicht aber bei 198 $m\mu$.
- Die Temperaturabhängigkeit der UV-Absorption einer oxidativ bis zu einem M_n von 12 000 abgebauten Gelatine zeigt noch eine Übergangsstufe, dagegen ist bei den alkalisch abgebauten Präparaten bereits bei einem M_n von 25 000 keine Übergangsstufe mehr feststellbar. Parallel dazu sind auch die Gelschmelzpunkte sehr verschieden: eine oxidativ abgebaute Gelatine mit M_n 24 000 geliert in 2prozentiger Lösung bei 12°C,

eine alkalisch abgebaute Gelatine mit M_n 25 000 dagegen bleibt in 2prozentiger Lösung bei 0°C flüssig.

Es ist offensichtlich, daß eine Alkalibehandlung neben der Spaltung gewisser labiler Peptidbindungen weitere Veränderungen im Gelatinemolekül zur Folge hat, die einerseits die physikalisch-chemischen Eigenschaften und andererseits das optische Verhalten, insbesondere die beiden Elektronenübergänge $\pi - \pi^*$ bei 198 $m\mu$ und $n - \pi^*$ bei 221 $m\mu$, stark beeinflussen. Der Vergleich der Rohgelatinen mit löslichem Kollagen zeigt, daß diese Veränderungen bereits beim Äschern und Ausschmelzen der Gelatine eintreten, und die Gegenüberstellung von oxidativem und alkalischem Abbau ergibt, daß diese Veränderungen durch eine starke Alkalibehandlung noch verstärkt zu werden scheinen.

Die nähere Untersuchung dieses Befundes ist gegenwärtig im Gange.