

Forschung, Wissenschaft

Die makromolekulare Charakterisierung der Gelatine*

I. Tomka

Institut für Technische Chemie der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich,
Universitätsstr. 6, CH-8092 Zürich

Abstract

The present paper is a review of the author's work in the gelatin field. Beginning with the dilute gelatin solution at a temperature above the helix – coil transition it is shown that the molecular mass distribution could be evaluated by the combined application of preparative gel chromatography and acrylamide gel electrophoresis. It was found that gelatin as it is applied for photographic, pharmaceutical and food manufacturing purposes has a multimodal molecular mass distribution. The scaling functions of the gelatin molecules in their coiled state were determined for the following quantities: the sedimentation coefficient, the intrinsic viscosity, the radius of gyration and the diffusion coefficient. There was shown that below the helix-coil transition temperature the gelatin molecules at least partially reform the conformation of the native collagen molecules and further if the concentration is higher than the critical gel concentration an elastically active network is formed. The elastically active elements of said gel could be identified as fibrils of typically 50 to 200 Å thickness. It was also found that during gelformation only a distinct fraction of the gelatin molecules enters the elastically active phase (the gel phase). In the complementary phase, in the sol phase, there are preferentially enriched the more watersoluble α_2 chains and their hydrolytic breakdown products. This fact could be explained by the melting point depression of polymer crystals. There is namely a relationship between the polymer-solvent interaction parameter, which is a measure of the solubility of the polymer, and the melting point of the polymer, which says that the better soluble molecules show a higher melting point e.g. a slower crystallisation. The fact that the gelation process can be described by the same formalism as the crystallisation of polymers was proved by Mercier [6]. As a conclusion of this results it could be demonstrated that scaling functions, within experimental error, described the gelation kinetics and the solution viscosity of the gelatin-water system. The sorption isotherm, which is also a technologically important relation, especially for the design of the film drying process, could have been also deduced to molecular parameters of the gelatin-water system.

Einleitung

Die breite technologische Anwendung der Gelatine bewirkte, dass in den vergangenen 40 Jahren eine intensive Tätigkeit auf dem Gebiet der molekularen Charakterisierung einsetzte. Mit dem Bekanntwerden der ersten Cha-

rakterisierungsmethoden wie z. B. der Viskosimetrie oder der Sedimentationsanalyse erscheinen bald neben den zahlreichen Berichten über synthetische Polymere auch Arbeiten über die Gelatine. Mehrere Monographien und Revueartikel berichten über die Anstrengungen, welche in den ersten drei Dekaden der erwähnten Periode in Zusammenhang mit der Charakterisierung der Gelatine angestellt wurden [1, 2, 3]. Ohne die Anwendung moderner Trennmethode wie Gelchromatographie oder Gelelektrophorese war es jedoch nicht möglich eine ausreichend detaillierte Information über das Molmassenspektrum der Gelatine zu erhalten [11, 12, 17, 18]. Die Kenntnis des Molmassenspektrums und der Zugang zu monodispersen Fraktionen sind jedoch die Voraussetzung für die Ermittlung von den sog. «scaling» Funktionen. Diese Funktionen drücken nämlich die Gesetzmässigkeiten der Molekülgrössenabhängigkeit technologisch relevanter Eigenschaften aus.

In der vorliegenden Arbeit möchten wir zeigen, wie weit es möglich war, Eigenschaften der Gelatine, welche ihre technologische Anwendbarkeit massgeblich beeinflussen, auf molekulare Parameter zurückzuführen. Obwohl die hier beschriebenen Methoden nicht auf beliebige Klassen von synthetischen Polymeren angewendet werden können, möchten wir doch demonstrieren, welche Voraussetzungen betreffend Auflösung und Reproduzierbarkeit die zu ermittelnden Molmassenspektren und «scaling» Funktionen generell erfüllen müssen, möchte man die Zusammensetzung eines Polymergemisches im Hinblick auf eine technologische Anwendung optimieren.

Die Gelbildungsfähigkeit und die Lösungsviskosität sind diejenigen Eigenschaften, welche für die Hersteller [15, 16] und Anwender von Gelatine von ausschlaggebendem Interesse sind. Über die Struktur des Gelatinegels und über die Eigenschaften der Gelatinemoleküle in verdünnter Lösung haben wir bereits berichtet [4, 5]. Diese Arbeiten bilden die Grundlage für die Aufstellung quantitativer Zusammenhänge zwischen den Molmassenspektren verschiedener Gelatinepräparate einerseits

Nach einem Vortrag, gehalten am Makromolekularen Kolloquium der ETH, Wintersemester 1981/82.

und der Gelbildungsgeschwindigkeit, der Gelfestigkeit und der Lösungsviskosität andererseits. Die Resultate dieser Arbeiten sowie wesentliche Merkmale der Kollagenstruktur werden den eigentlichen Themen vorausgeschickt.

1. Struktur und Zusammensetzung

Gelatine ist ein Peptidgemisch mit einer breiten Molmassenverteilung, welches durch Hydrolyse von Tropokollagen erhalten wird. Tropokollagen ist die molekulare Einheit des Bindegewebeoproteins, des Kollagens. Art und Menge der Aminosäuren, welche Kollagen und Gelatine aufbauen, sind weitgehend gleich und aus Tabelle 1 ersichtlich.

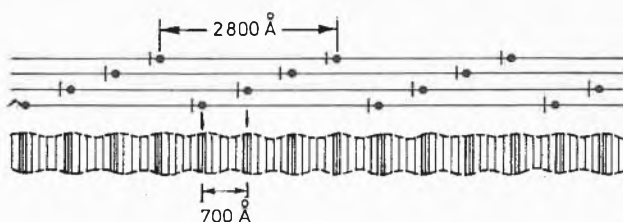
Tabelle 1: Aminosäurezusammensetzung des Kalbshautkollagens

Aminosäure	Gewicht %	Anzahl pro α -Kette
Lysin	3,40	24,8
Hydroxylysin	0,81	5,2
Histidin	0,70	4,8
Arginin	7,98	47,9
Asparaginsäure	5,81	47,3
Glutaminsäure	9,93	72,1
Ammoniak	0,74	41,8
Prolin	13,36	129,0
Hydroxyprolin	11,36	94,1
Glycin	20,51	336,5
Alanin	8,09	106,6
Valin	2,06	19,5
Methionin	0,55	3,9
Isoleucin	1,37	11,3
Leucin	2,89	24,0
Tyrosin	0,80	4,6
Phenylalanin	1,97	12,6
Serin	3,64	39,2
Threonin	1,79	16,6

Das Tropokollagenmolekül als Baustein der Kollagenfibrille (Abb. 1a) besteht aus drei linearen, schraubenförmig angeordneten und miteinander zu einer Superhelix oder Tripelhelix verdrehten Peptidketten, welche in der Nähe der Amino-Enden verknüpft sind. Diese Dreikettenschraube wird als Tertiärstruktur bezeichnet (Abb. 1b).

Unter Sekundärstruktur wird dagegen die räumliche Struktur der einzelnen Peptidkette verstanden (Abb. 1c), unter Primärstruktur die Aminosäuresequenz in den einzelnen Peptidketten (Abb. 1d). Zwei der drei Ketten des Tropokollagemoleküls sind meistens identisch (α_1 -Ketten), die dritte (α_2 -Kette) weicht etwas in der Aminosäurezusammensetzung ab. Valin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Hydroxylysin und Histidin sind in der α_2 -Kette häufiger als in der α_1 -Kette. Auf diese Tatsache kommen wir später im Zusammenhang mit der Analyse der Gel- und Solphase zurück. Die Sequenz der α_1 -Kette von Kalbshaut ist bekannt [1]; sie enthält 1052 Aminosäuren. Im Tropokollagenmolekül, welches die native moleku-

a) Kollagenfibrille (Quarternärstruktur)



b) Tropokollagenmolekül Dreikettenschraube (Tertiärstruktur)



c) Peptidschraube (Sekundärstruktur)



d) Peptidschraube, Aminosäuresequenz (Primärstruktur)

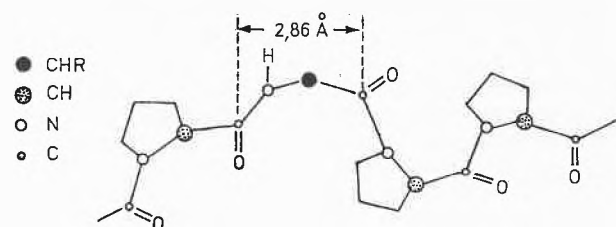


Abb. 1: Feinstruktur und chemischer Aufbau von Kollagen.

lare Einheit der Kollagenewebe ist, liegen die einzelnen linearen Ketten (α_1 , α_2) in der Polyprolin-II-Konformation vor [2] (Abb. 2). Der geringe Raumbedarf des Gly-

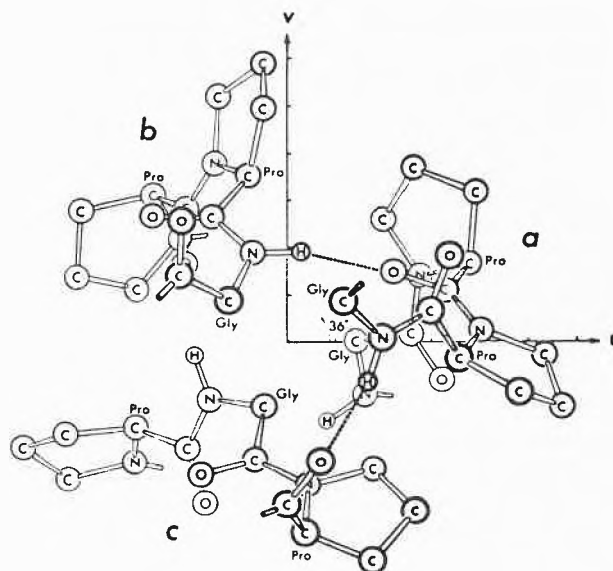


Abb. 2: Axiale Projektion des Tauberschen Polyprolin-II-Modells (2).

cins in jeder dritten Position der Sequenz sowie der hohe Anteil an Prolin und Hydroxyprolin ist essentiell für die Ausbildung der genannten Konformation. Die polaren Aminosäuren bestimmen das elektrochemische Verhalten sowie die Löslichkeit des Kollagens. Ein Viertel aller dibasischen Aminosäuren trägt je ein Ammoniakmolekül in Säureamidbindung. Die Hydroxyaminosäuren sind für die interkatenare Stabilisierung der Kollagenfibrillen verantwortlich. Die Tropokollagenmoleküle bilden im Bindegewebe Fibrillen. Die laterale Ordnung in der nativen Fibrille kommt dadurch zustande, dass ein Tropokollagenmolekül fünf Gebiete mit dichter Packungsmöglichkeit aufweist. Durch das Negativkontrastverfahren erscheinen die zwei Sorten Packungsbereiche im Elektronenmikroskop als Streifenmuster (Abb. 3).

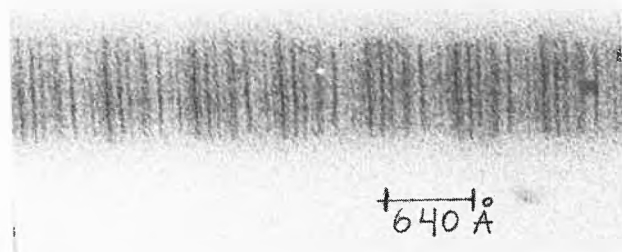


Abb. 3: Native Fibrille, Negativ kontrastiert und mit dem Elektronenmikroskop abgebildet. Die Vergrößerung ist 150 000fach.

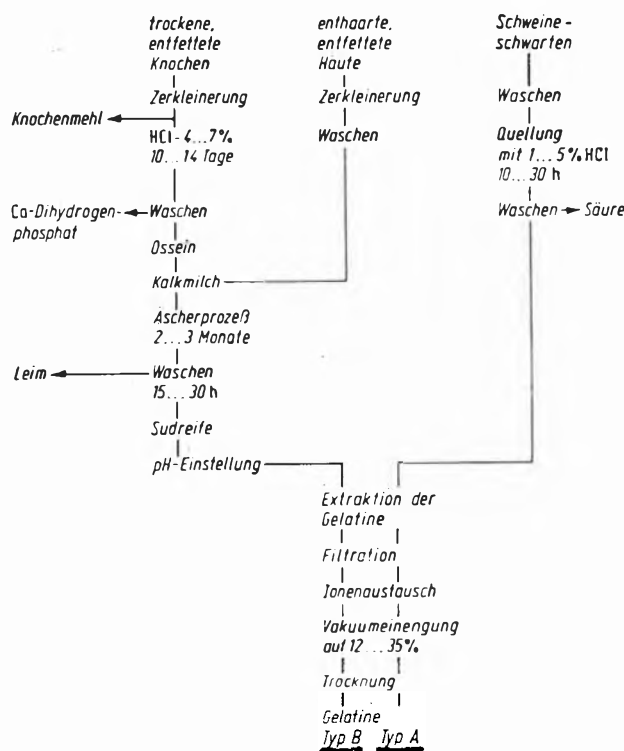


Abb. 4: Schematischer Ablauf der Gelatinegewinnung.

Zur Gewinnung der Gelatine wird das Kollagengewebe nach beistehendem Fließschema (Abb. 4 und 5) sauer oder alkalisch behandelt und die Gelatine bei erhöhter Temperatur extrahiert. Bei dieser Behandlung werden inter- und intracatenare Bindungen gespalten, das unlösliche Kollagen wird also zu löslichen Bruchstücken abgebaut, wobei verschiedene Spaltprodukte resultieren. Beim alkalischen Abbau wird auch Ammoniak freigesetzt, wodurch der isoelektrische Punkt der resultierenden Gelatine auf pH 5 sinkt (Kollagen pH 8).

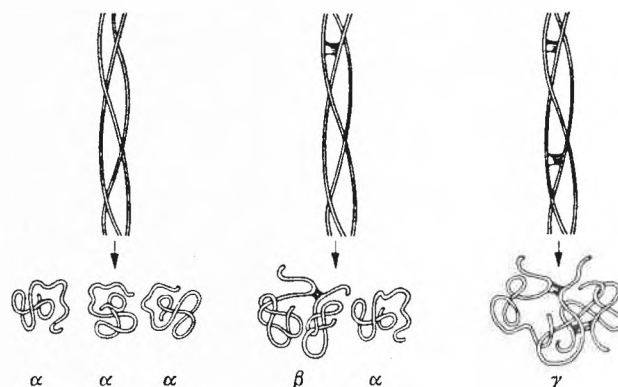


Abb. 5: Die bei der Denaturierung von Kollagen entstehenden möglichen Gelatineformen (Helix-Knäuel-Umwandlung).

1.1. Die Fraktionierung der Gelatine und das Molmassenspektrum

Die Charakterisierung der Gelatine wurde an dünnen Lösungen bei einer Temperatur $> 40^{\circ}\text{C}$, bei der die native Konformation der Gelatine aufgehoben ist, durch den Einsatz der Gelchromatographie, der Gelelektrophorese, der Lichtstreuung, der Sedimentation und der Viskosimetrie erzielt. Durch die Verwendung von zwei Gelchromatographie-Kolonnen von 7 Litern Inhalt, konnten in der Woche in 20 Durchgängen etwa 20 g Gelatine aufgetrennt werden. Das gesamte Molmassenspektrum wurde in 350 Fraktionen aufgefangen und mittels Acrylamidgelelektrophorese analysiert. Somit konnte man eine Trennmethode mit grosser Mengenkapazität und relativ geringer Auflösung (9 aufgelöste Komponenten in 90 Minuten bei der Gelchromatographie, Tabelle 2) an eine zweite Methode mit geringer Mengenkapazität, jedoch mit einer besseren Auflösung (50 aufgelöste Komponenten in 90 Minuten bei der Elektrophorese) koppeln. Auf diese Weise gelang es, die Dekonvolution (Abb. 6) des Molmassenspektrums der Gelatine durchzuführen, und es ergab sich folgendes Bild [3]:

- pauzidisperse Verteilung mit bis zu 50 Komponenten,
- Vorhandensein von intakten α -Ketten und deren Oligomere bis zu 50 Gewichtsprozent, welche im wesentlichen im Bereich der Molmasse 10^5 – 10^6 Dalton liegen,

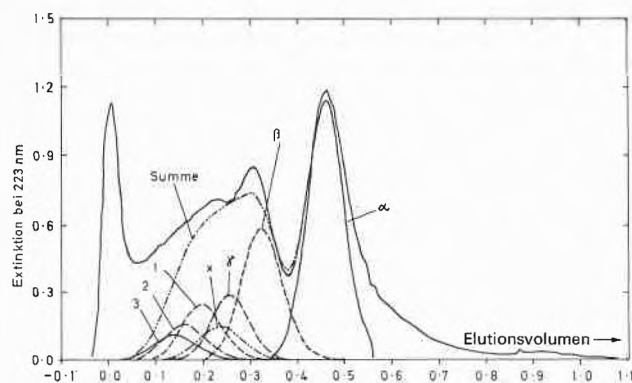


Abb. 6: Dekonvolution des Elutionsdiagramms (GPC) durch die Polyacrylamidgelelektrophorese.

Tabelle 2: Die Komponenten der Gelatine und ihre Trenncharakteristiken in der Gelpermeationschromatographie.

Komponenten	S	γ	ν	$D_{\text{eff.}} = \gamma/\nu$
Monomer (α)	0,125	0,00170	0,992	0,00173
Dimer (β)	0,076	0,00155	1,162	0,00133
Trimer (γ)	0,037	0,0017	1,265	0,00134
Tetramer (χ)	0,0225	0,0024	1,30	0,0018
Tetramer (1)	0,037	0,0025	1,37	0,0018
Pentamer (2)	0,025	0,003	1,445	0,0021
Hexamer (3)	0,017	0,0032	1,495	0,0021

$$c(t) = \frac{s}{2\sqrt{\pi\gamma t}} \cdot e^{-(1-\gamma t^2/4\gamma t)}; D_{\text{eff.}} = A \cdot D + \frac{B}{D}$$

t = Elutionszeit

s = Relative Konzentration

ν = Relative Elutionsgeschwindigkeit

$D_{\text{eff.}}$ = Effektive Diffusionskonstante

γ = $\nu D_{\text{eff.}}$

D = Molekulare Diffusionskonstante

A.B = Empirische Konstante, welche die Trennkolonne charakterisieren

- die grössten Moleküle weisen eine Molmasse von $2 \cdot 10^7$ Dalton auf,
- die Molmasse der kleinsten Moleküle liegt bei etwa 10^4 Dalton.

Die Bestimmung der Molmasse, des Kettenendabstandes, des hydrodynamischen Volumens und der Sedimentations- und Diffusionskonstante von ausgewählten Komponenten (8 Komponenten) zeigte, dass

- die Gelatine unter 40°C mit der statistischen Theorie des Knäuelzustandes gut beschrieben werden kann (Tabelle 3 und 4),
- die meisten molekularen Bestandteile der Gelatine lineare und flexible Gebilde sind,
- es eine hochmolekulare Komponente ($M = 1,5 \cdot 10^7$ Dalton) gibt, welche einem molekularen Netzwerk entspricht und als Mikrogel bezeichnet werden kann.

Tabelle 3: Dimensionen der Kettenmoleküle in Lösung

Kettenmolekül im Zustand der ungehinderten Rotation der statistischen Segmente:

$$\langle r_{00}^2 \rangle = n l^2$$

$(\langle r_{00}^2 \rangle)^{1/2}$: Kettenabstand

n : Anzahl der statistischen Segmente pro Kette

l : Länge der statistischen Segmente

Verlust der ungehinderten Rotation:

$$\frac{\langle r_{00}^2 \rangle}{\langle r_{00}^2 \rangle} = C_\infty \text{ für Gelatine } 4,22$$

Einfluss der Lösungsmittelgüte:

$$\frac{\langle r_{00}^2 \rangle}{\langle r_{00}^2 \rangle} = \left(\frac{[\eta]}{[\eta]_0} \right)^{2/3} = \alpha^2 \quad ; \quad [\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{\eta - \eta_0}{\eta_0 c} \right)$$

Tabelle 4: Die Molmassenabhängigkeit der Sedimentationskonstante und der Grenzviskosität.

$$[\eta]_0 = \Phi \left(\frac{\langle r_{00}^2 \rangle}{M} \right)^{3/2} \cdot M^{1/2} \quad \text{Flory, Fox 1951}$$

Für die Gelatine: $\Phi = 2,19 \cdot 10^{23}$

$$M^{2/3} \sim S_0 [\eta]_0^{1/3}$$

$$S_0 = K \cdot M^{4/9}; S_0 (\alpha\text{-Kette}) = 3,34 \text{ S.E.}$$

$$[\eta]_0 = K' M^{2/3}; [\eta]_0 (\text{d-Kette}) = 0,32 \text{ dl/g}$$

S_0 : Sedimentationskonstante

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{\eta - \eta_0}{\eta \cdot c} \right) = \text{Grenzviskosität}$$

2. Physikalische Eigenschaften

2.1. Viskosität

Die molekulare Charakterisierung der Gelatine erlaubt es nun, auch technologisch wichtige physikalische Eigenschaften von Lösungen, wie die Viskosität, durch die Anwendung der Molmassenspektren zu beschreiben. Ein typisches Molmassenspektrum ist in Tabelle 5 dargestellt. Die Formeln für die Berechnung der Viskosität, bzw. der Grenzviskosität aus dem entsprechenden Mittelwert der Molmasse ($\bar{M}_v$) sowie die berechneten und gemessenen Viskositäten einiger Gelatinemuster sind in Tabelle 6 zusammengestellt. Der Ladungszustand der Gelatinemoleküle, welcher durch die Änderung der pH-Werte der Lösungen in weiten Grenzen variiert werden kann, beeinflusst die Moleküldimensionen (z.B. Kettenendabstand). Die Moleküldimensionen ihrerseits bestimmen auf ähnliche Weise einerseits die Viskosität der Gelatinelösungen und andererseits die Quellung der Gelatinegele (Abb. 7, 8).

Tabelle 5: Molmassenverteilung der IAG Gelatine DGF 5294

Molmasse	Gewichtsanteil in %	Relativer Fehler	Relativer Fehler in %
1,53000 E+07	2,56	,04	1,6
855000	1,45	,10	7,2
760000	1,61	,11	7,0
665000	1,94	6,7E-02	3,4
570000	2,19	5,9E-02	2,7
475000	2,71	,21	7,7
380000	3,25	,11	3,6
285000	4,86	,16	3,3
237500	4,68	9,2E-02	1,9
190000	6,44	9,8E-02	1,5
145000	9,02	,15	1,7
95000	19,4	,27	1,3
86000	1,11	,27	24,2
74000	,951	,12	12,7
64000	2,15	,17	8,0
62000	2,29	,27	11,9
58000	1,79	,10	6,0
55000	1,84	1,1E-02	,61
51000	2,39	,12	5,0
47000	4,19	,30	7,1
43000	3,89	,31	8,1
39000	6,95	,10	1,4
35000	5,37	,41	7,7
31000	2,60	,11	4,4
27000	2,64	,10	3,8
10000	1,56	8,8E-02	5,6
Gewichtsanteil der Solphase in %			
Mittel	39,79	,75	1,8
MZ	Molmasse 1,09 E+07	80000	,73
MW	554000	6800	1,2
MS	54100	2900	5,3
MV	198000	3400	1,7
MN	70500	1500	2,1

Tabelle 6: Vergleich der gemessenen und aus dem Molmassenspektrum berechneten Viskositäten einiger IAG-Gelatinen [10]

Gelatine	Viskosität in m Poise bei 60 °C; 6,67 % Gelatine gemessen	berechnet
DFG 5294	41,0	42,0
DFG 5295	43,4	43,1
HI	49,9	52,1
KK 2006	49,8	52,8
KK 1900 A	40,8	40,3
L 1701	47,7	43,6
ND 2	51,3	50,7
Pb1	34,6	36,1
Pb2	41,1	40,7
St 2766	46,4	44,8
Hochviskose Gelatine	102,4	94,4

Grundlage für die Berechnung der Viskosität:

$$\log \eta = 1,24 \cdot 10^{-1} \cdot [\eta] \cdot C + 1,173; [\eta] = 1,604 \cdot 10^{-2} \cdot M_z^{2/3}$$

2.2. Gelbildung

Eine weitere technologisch wichtige Eigenschaft der Gelatine, die thermoreversible Gelbildung, ist von entscheidender Bedeutung für die erwähnte breite Anwendung. Unterhalb 40 °C bildet sich die native Konformation des Kollagens teilweise zurück (Polyprolin II-Helix). Dieser Vorgang ergibt bei Gelatinekonzentrationen > 0,5 g/100 g Wasser eine elastisch aktive Phase, das Gelatinegel. Die Gelbildungsfähigkeit der Gelatine wird durch ihre molekularen Eigenschaften, nämlich durch

- das Molmassenspektrum,
- den Razemisierungsgrad der α -C Atome in den Peptid-einheiten,
- die isotonische Punktverteilung der Komponenten und
- den Gehalt an imidazolhaltigen Aminosäuren

bestimmt. Es soll nun der Einfluss des Molmassenspektrums auf die Erstarrungszeit näher erörtert werden. Durch Permeationsexperimente an Gelatinegelen [4] in der Ultrazentrifuge konnte gezeigt werden, dass im Schwerfeld der Zentrifuge das Gelatinegel sich in zwei Phasen auf trennt, nämlich in eine an Gelatine konzentriertere Gelphase und in eine relativ verdünnte Solphase.

Die Gelatine hatte bei diesen Experimenten eine Konzentration von 2–4 % und die Temperatur betrug einen konstanten Wert im Bereich 5–20 °C. Die Solphase ist lediglich eine Lösung, welche bevorzugt die α_2 -Ketten und deren Spaltprodukte sowie Spaltprodukte der α_1 -Ketten, deren Molmasse unter $4,3 \cdot 10^4$ Dalton liegt, enthält. Die α_2 -Ketten sind, bedingt durch ihre Aminosäurezusammensetzung, in Wasser besser löslich als die α_1 -Ketten, verteilen sich also bevorzugt in die Solphase. Das Mengenverhältnis der α_1 - zu den α_2 -Ketten ist konstant, nämlich 2:1. Die Tatsache, dass ein Drittel aller Moleküle, deren Molmasse zwischen $9,5 \cdot 10^4$ und

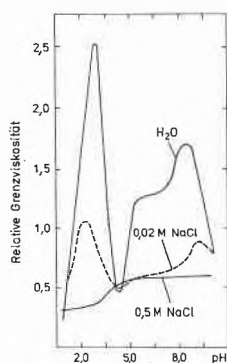


Abb. 7: Einfluss des pH auf die Grenzviskosität der Gelatine (1).

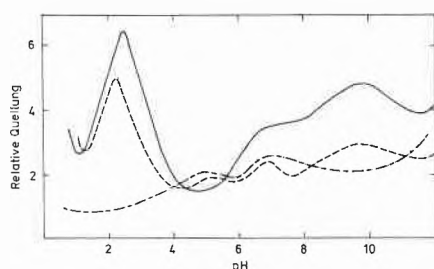


Abb. 8: Einfluss des pH auf die Quellung des Gelatinegels (1).

$4,3 \cdot 10^4$ Dalton liegt sowie alle Moleküle, deren Molmasse unter $4,3 \cdot 10^4$ Dalton ist, an dem Gelbildungsprozess nicht teilnehmen, wurde in der Formel für die Mittelwertbildung der Molmasse, welche die Erstarrungszeit beschreibt, berücksichtigt (Tabelle 7). Die gute Übereinstimmung einerseits der elektrophoretisch bestimmten Molmassenmittelwerte und andererseits der aus der Erstarrungszeit berechneten Molmassenmittelwerte (Tabelle 7, Formel 2) zeigt, dass für die ausgewählten Beispiele die weiteren molekularen Eigenschaften neben dem Molmassenspektrum eine untergeordnete Rolle spielen (Tabelle 8).

Tabelle 7: Die Ermittlung der Fibrillendicke aus kalorimetrischen Daten

$$\gamma = \frac{T_{mo} - T_{mc}}{T_{mo} - T_c}$$

T_{mo} = Schmelzpunkt der Kristalle, welche ohne Unterkühlung erzeugt wurden.
 T_{mc} = Schmelzpunkt der Kristalle, welche bei endlicher Unterkühlung erzeugt wurden.
 $(T_{mo} - T_c)$ = Unterkühlung
 T_c = Temperatur der Kristallisation
 $\gamma = \frac{D}{d} = 3,8$; γ : Frontfaktor; D : Dicke der Fibrillen
 d : Dicke der Keime
 $D = \gamma d = 2\gamma\sigma T_{mo} (\Delta H (T_{mo} - T_c))^{-1}$
 ΔH = Schmelzwärme der Kristalle: 33 cal/cm^3
 σ = Energie der Grenzfläche:
 Keim-Lösung, für die Gelatine = $7,2 \text{ erg/cm}^2$

Tabelle 8: Die Kinetik der Kristallisation der Gelatine

$$\theta = \exp[-kt^n]$$

θ = Umsatzvariable bei der Kristallisation
 Für $\theta = 0,5$ $t_{0,5}$ = Halbwertszeit der Kristallisation
 $k = \ln 2 \cdot t_{0,5}^{-n}$

Allgemein gilt:

Art der Nukleation	Dimension des Wachstums	n
Homogen	3	4
Homogen	2	3
Homogen	1	2
Heterogen	3	3
Heterogen	2	2
Heterogen	1	1

Für die Gelatine wurde aus Kinetischen Messungen ermittelt $n = 1,00 \pm 0,05$.

Ergänzend zu den Permeationsversuchen haben wir elektronenmikroskopische Aufnahmen über Gelatinegele gemacht [4]. Die Struktur wurde in den wässrigen Gelen durch Gefrierätzung, in den Xerogelen durch Ionenätzung dargestellt. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Gelbildung ein Phasenbildungsprozess ist. Die elastisch aktiven Elemente der Gelphase sind Fibrillen [19], welche ein Netzwerk bilden und in die Solphase eingebettet sind. Die Dicke der Fibrillen wurde einerseits aus der Permeationskonstante (Ultrazentrifugenversuche), andererseits an den elektronenmikroskopischen Abbildungen bestimmt [4]. Die Dicke der Fibrillen hängt von den Gelbildungsbedingungen ab und liegt zwischen $30-200 \text{ \AA}$. Mercier und Mitarbeiter [14,6] haben als erste gezeigt, dass die Fibrillen der Gelphase durch Kristallisation der renaturierten Helices der Gelatine entstehen (Tabelle 9). Sie fanden durch Anwendung der Theorie von Vidotto und Kovacs Fibrillendicken, welche sich mit unseren Resultaten gut vergleichen lassen.

Die Anwendung der Theorie von Avrami auf die Kinetik der Kristallisation der Gelatine-Fibrillen ergibt eindeutig (Tabelle 10), dass es sich hier um eindimensionales Kristallwachstum an wohldefinierten Keimen handelt. Die Keime konnten von Frey und Nitschmann [7] als ein Pentadekapeptid vom Typus (Glycyl-Prolyl-Prolyl)₅ identifiziert werden.

Die Anwendung der Theorie von Avrami auf die Kinetik der Kristallisation der Gelatine-Fibrillen ergibt eindeutig (Tabelle 10), dass es sich hier um eindimensionales Kristallwachstum an wohldefinierten Keimen handelt. Die Keime konnten von Frey und Nitschmann [7] als ein Pentadekapeptid vom Typus (Glycyl-Prolyl-Prolyl)₅ identifiziert werden.

Tabelle 9: Die Depression des Schmelzpunktes der Gelatine im Gelatine-Wasser-System

$$\frac{\Delta T}{T_s (T_s - \Delta T)} = \frac{R}{\Delta H_s W} (V_L - X_1 V_L^2)$$

Hier bedeuten:

T_s	= Schmelzpunkt des reinen Polymeren
T_0	= Schmelzpunkt für unendliche Verdünnung
ΔT	= Depression des Schmelzpunktes
ΔH_s	= Schmelzenthalpie
R	= Gaskonstante
W	= Molvolumen des Lösungsmittels
V_L	= Volumenanteil des Lösungsmittels
X_1	= Wechselwirkungsparameter nach Flory
X_1	= 0 für ideale Lösung
X_2	= $\frac{1}{2}$ für die kritische Temperatur der Lösung für unendlich grosse Moleküle

Für die Gelatine gelöst in Wasser gilt:

$$\Delta H_s = 45,7 \text{ cal/cm}^3; T_s = 221^\circ \text{C}; X_1 = 0,48; T_0 = 36,2^\circ \text{C}$$

Tabelle 10: Die Berechnung der mittleren Molmasse ($\bar{M}_s$), welche die Gelbildungskinetik beschreibt.

$$\bar{M}_s^{3/2} = \left[\sum_{i=1}^a (W_i/W_g) \cdot M_i^{3/2} + \sum_{i=a+1}^j (2/3) \cdot (W_i/W_g) \cdot M_i^{3/2} \right] \cdot W_g^{3,5}$$

$$W_g = \sum_{i=1}^a W_i + \sum_{i=a+1}^j (2/3) \cdot W_i; 1 = \sum_{i=1}^n W_i$$

M_i = Molmasse der i-ten Komponente;
 W_i = Gewichtsanteil der i-ten Komponente
 W_g = Gewichtsanteil der Gelkomponente
 W_s = Gewichtsanteil der Solkomponente
 $M_a = 9,5 \cdot 10^4 \text{ Dalton}; M_j = 4,3 \cdot 10^4 \text{ Dalton}$

Die Erstarrungszeit (T_E) als Funktion der Molmasse ($\bar{M}_s$) und der Konzentration der Gelatine (C): $(T_E)^{-1} = A \cdot \bar{M}_s^{2/3} \cdot C^{3,5} + B$

2.3. Thermodynamisches Verhalten

Die thermodynamischen Eigenschaften des Gelatine-Wasser-Systems werden durch das Zustandsdiagramm

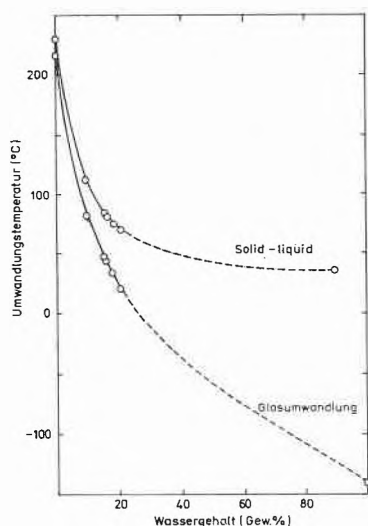


Abb. 9: Zustandsdiagramm des Gelatine-Wasser-Systems.

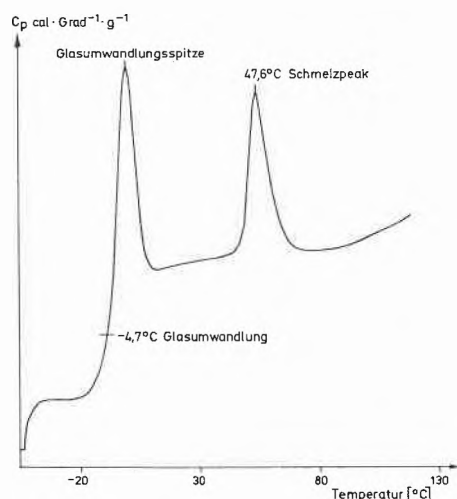


Abb. 10: Differentialthermogramm von Gelatine-Wasser (Gew.-Verhältnis 3:1).

beschrieben (Abb. 9) [13]. Die Herabsetzung des Schmelzpunktes der Gelatine durch Wasser haben wir mittels Differentialkalorimetrie bestimmt (Abb. 10). Die Anwendung der Beziehung von Flory ergibt für den Wechselwirkungsparameter Wasser-Gelatine (Tabelle 11) den sehr hohen Wert 0,475 (bei $> 0,5$ wäre die Gelatine bereits in Wasser unlöslich). Dieser Wert steht in gutem Einklang mit dem 2. Virialkoeffizienten, welchen wir aus Lichtstreuungsmessungen ermittelt haben ($\sim 2 \cdot 10^{-4} \text{ ml} \cdot \text{Mol}/\text{g}^2$). Die Schmelzenthalpie und Entropie der Gelatinefibrillen, welche auf die statistischen Segmente der Gelatine (Peptid-Einheiten) bezogen wurden, sind mit anderen Biopolymeren oder synthetischen Makromolekülen gut vergleichbar (Tabelle 12). Die extrem schnelle Gelbildung der Gelatine ist plausibel, wenn wir die schnelle Kinetik der Knäuel-Helix-Umwandlung des Kollagens und die relativ schlechte Löslichkeit der Gelatine im Wasser in Betracht ziehen.

Bei der Beschreibung der mechanischen Eigenschaften des Gelatine-Wasser-Systems werden somit folgende Zustände der Gelatine – insbesondere bei der Kapselherstellung – in Betracht gezogen: Schmelze, Lösung, Kristallin und Glas (amorphe Struktur).

Tabelle 11: Die berechneten und gemessenen Mittelwerte der Molmasse ($\bar{M}_s$) für die Erstarrungszeit (t_E)

Gelatine	Gelatine	Rohstoff	Äsche- rung	Molmasse: $\bar{M}_s \times 10^{-5}$ Dalton	
				Berechnet aus t_E	Gemessen: Elektrophorese
Hoch	Knochen	Kalk		3,05	3,06
Hoch	Knochen	Kalk		3,00	2,99
Hoch	Haut	Kalk		2,66	2,51
Mittel	Haut	Kalk		2,14	2,19
Mittel	Knochen	Kalk		2,11	2,22
Mittel	Knochen	Kalk		2,08	2,08
Mittel	Haut	Sauer		1,68	1,70
Niedrig	Knochen	Kalk		1,26	1,21
Mittel	Knochen	Kalk		1,47	1,46
Mittel	Knochen	Kalk		1,52	1,54

Tabelle 12: Schmelzcharakteristika verschiedener Polymere

Polymer	T_s °C	H cal/Mol-HA	S cal/(Grad.Mol-HA)
Polyethylen	140	785	1,90
Polyethylenoxyd	66	660	1,95
Polychloropren	80	660	1,90
Cellulosetributyrat	207	1500	3,10
Gelatine	221	1540	3,11

T_s = Schmelzpunkt, H = Schmelzenthalpie,
S = Schmelzentropie, Mol-HA = Mol Hauptkettenatome

2.4. Trocknungskinetik

Die Trocknung der Gelatine ist auf einen Permeations- und auf einen Diffusionsvorgang zurückzuführen. Versuche, die Gelatinetrocknungskinetik durch irgendwelche Diffusionskonstanten zu beschreiben, schlugen fehl [8]. Die sogenannten Diffusionskonstanten sind nämlich schichtdickenabhängig, was ein Widerspruch ist. Gehrman macht in seiner Dissertation einen brauchbaren Vorschlag [8]:

- Die Trocknung wird im wesentlichen in zwei Phasen zerlegt,
- während der ersten Phase trocknet die Gelatine bis zu Wassergehalten von 3 kg/kg Gelatine wie reines Wasser,
- während der zweiten Phase ist die Kinetik der Trocknung einerseits proportional der Trocknungskinetik in der ersten Phase ($\dot{m} > \dot{m}_1$) und andererseits proportional der Abweichung der momentanen Wassergehalte (x_m) von den Gleichgewichtswassergehalten (x_∞):

$$\dot{m}_{II} \left| x_{kn} > x_m > x_\infty = \dot{m}_I \frac{x_m - x_\infty}{x_{kn} - x_\infty} \cdot \frac{1 + \varepsilon x_{kn}}{1 + \varepsilon x_m} \right.$$

Mit ε wird das Schrumpfen berücksichtigt. Für die Beschreibung der Trocknungskinetik benötigt man nun die Gleichgewichtswassergehalte in Abhängigkeit des Wasserdampfpartialdruckes, d.h. die Sorptionsisotherme. Wir haben die Sorptionsisotherme auf der Grundlage der statistischen Thermodynamik in zwei Modelle aufgetrennt [9]:

- Bindung des Wassers zu den Gelatinemolekülen und
- Lösung der Gelatinemoleküle im Wasser.

Hier beschreiben drei Konstanten den Bindungsvorgang (c steht für die Verteilung der Energien der bindungsfähigen Stellen, B_0 für die Sättigung der bindungsfähigen Stellen und j_a für die Verteilungsfunktion der internen Freiheitsgrade) und vier Konstanten den Lösungsvorgang (χ steht für die gleiche Wechselwirkungskonstante wie in der Gleichung der Schmelzpunktniedrigung, M_L und M_s stehen für die löslichen und unlöslichen Haftstellen (amorphkristallin) und q_m ist die Differenz des Potentials der gelösten und vorhandenen Haftstellen).

Diese Größen können aus den drei Sorptions-Gleichungen ermittelt werden:

$$\ln a_s = \frac{\theta_1 + 1}{\theta + 1} \left(1 + \chi \frac{1}{\theta + 1} \right) + \ln \left(\frac{\theta - \theta_1}{\theta + 1} \right) + \left(\frac{1}{\theta + 1} \right)^{1/3} - \frac{1}{2} \cdot \frac{1}{\theta + 1} \cdot \frac{v}{zv\beta},$$

wobei die folgenden beiden Gleichungen als Nebenbedingungen erfüllt sein müssen:

$$-\left(\chi \frac{1}{\theta + 1} + 1 \right) + \ln \frac{\theta_1^{1/c}}{B^{1/c} - \theta_1^{1/c}} \cdot \frac{1}{j_a(T)} = \ln \frac{\theta - \theta_1}{\theta + 1},$$

$$v = 2M_s + 2M_L \left| 1 + \frac{1}{\theta + 1} \exp \left\{ -\frac{q_m}{kT} + 3(\theta + 1)^{2/3} - 3 \right\} \right|^{-1}$$

Die in den Gleichungen weiter vorkommenden Größen sind:

- v = Anzahl der Polymerketten
- z = Anzahl der eine Polymerkette aufbauenden Segmente
- β = Volumverhältnis der Polymersegmente zu den Sorbatmolekülen
- θ = Volumverhältnis des am Sorptionsvorgang beteiligten gesamten Wassers zum Polymeren
- θ_1 = Volumverhältnis des fest gebundenen Wassers zum Polymeren
- a_s = Wasseraktivität

Diese Gleichungen und die phänomenologische Beziehung von Gehrman beschreiben die Trocknungskinetik der Gelatine mit einer für die technologischen Anwendungen ausreichenden Präzision (Abb. 11, 11 a).

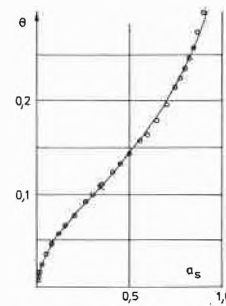


Abb. 11: Kreise: Wassergehalt θ bei steigender Wasseraktivität. Ausgezogene Kurve: nach der hier entwickelten Theorie berechneter Wassergehalt.

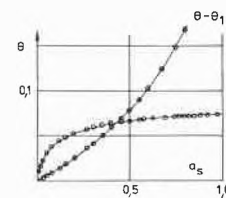


Abb. 11a: Die Anteile des fest und locker gebundenen Wassers in Abhängigkeit der Wasseraktivität. θ_1 , fest gebundenes und $\theta - \theta_1$ locker gebundenes Wasser.

Literatur

- 1 A. G. Ward und A. Courts ed.: The Science and Technology of Gelatin, Academic Press (1977).
- 2 A. Veis: Macromolecular Chemistry of Gelatin, Academic Press (1964).
- 3 P. I. Rose und S. Gross: Photographic Gelatin II (Cox, R. J. ed.) pp. 89, Academic Press (1976).
- 4 I. Tomka: Stand der Forschung an der photographischen Gelatine, *Chimia* 30, 534 (1976).
- 5 I. Tomka, H. Bohonek, A. Spühler und M. Ribeaud: Structure and Formation of the Gelatin Gel, *J. Phot. Sci.* 23, 97 (1975).
- 6 J. P. Mercier et al.: *J. Polym. Sci., Phys. Ed.* 16, 1817 (1978).
- 7 P. Frey und H. Nitschmann: *Helv. Chim. Acta* 59, 1401 (1976).
- 8 D. Gehrman: Dissertation, Darmstadt 1979.
- 9 S. Gal, I. Tomka und R. Signer: Zur mathematischen Behandlung der Wasserdampfsorptionsisothermen quellbarer Stoffe, *Chimia* 30, 65 (1976).
- 10 Internationale Arbeitsgemeinschaft für die Untersuchung der Gelatine, Prof. Dr. Amman-Brass, CH-Fribourg.
- 11 J. Hwang: Thesis City Univ. N. Y.; Diss. Abstr. Int. B 41, 3083 (1981).
- 12 T. Ohno, S. Mizusawa und N. Takai: *Chiba Daigaku Kogakubu Kenkyo Hokoku* 31, 257 (1980).
- 13 W. Borchard, W. Bremer und A. Keese: *Colloid and Polym. Sci.* 258, 516 (1980).
- 14 P. Goddard, J. J. Biebuyck, P. A. Barriat, H. Naveau und J. P. Mercier: *Makromol. Chem.* 181, 2009 (1980).
- 15 P. Koepf: *Leder* 31, 83 (1980).
- 16 K. Wada, K. Shirai und A. Kawamura: *Leder* 31, 33 (1980).
- 17 J. Z. Mioduszewski und M. Mioduszewska: *Acta. Pol. Pharm.* 36, 75 (1979).
- 18 R. P. Zhigalova, und V. A. Petrova: *Termodinam. i Kinet. Khim. Protsesov* L, 80 (1978).
- 19 A. N. Mikhailov, E. F. Titova und E. M. Belavtseva: *Biofizika* 24, 438 (1979).