

УДК 541.64

© 1991 гг. Г. И. Церетели, О. И. Смирнова

КАЛОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПЛАВЛЕНИЯ ГЕЛЕЙ ЖЕЛАТИНЫ

Методом ДСК исследована температурная зависимость избыточной теплоемкости в интервале плавления водных гелей желатины при изменении концентрации желатины от 2 до 95 %. Использовали желатины с различным количеством межцепных спшивок. В процессе гелеобразования формируются метастабильные коллагеноподобные структуры. Определены значения температур плавления $T_{пл}$ и теплот плавления $Q_{пл}$ гелей при различных условиях их формирования. Проведено сопоставление термодинамических параметров плавления гелей желатины и денатурации коллагена. Различия в этих параметрах могут быть использованы для оценки дефектности формирующихся в гелях коллагеноподобных структур.

Долгое время желатину использовали различные исследователи как модельное соединение для изучения процессов гелеобразования. Тем не менее тепловые свойства ее гелей до настоящего времени изучены недостаточно полно [1–4]. Так, в частности, значения теплот плавления гелей, приводимые разными авторами, различаются в несколько раз [5]. При этом использование различными авторами несопоставимых образцов, имеющих сложную предысторию, делает затруднительным сравнительный анализ литературных данных. Более того, до сих пор дискутируются общие принципы формирования гелей в денатурированных белках вообще и в желатине в частности.

Цель настоящей работы — калориметрическое исследование процессов гелеобразования желатин с различным количеством межцепных спшивок в широком диапазоне концентраций: от разбавленных растворов до высушенных пленок. Как известно, желатина — это продукт переработки нативного фибрillярного белка коллагена, и так называемая молекула желатины является одной из цепей, образующих трехспиральную молекулу коллагена. Мы надеялись также, что сопоставление результатов исследования плавления гелей желатин с ранее полученными нами данными по тепловой денатурации коллагена [6–8] позволит получить новую информацию о структуре и свойствах гелей желатине.

Исследования температурной зависимости избыточной теплоемкости в интервале плавления гелей желатины выполняли на дифференциальном сканирующем калориметре DSC-111 фирмы «Setaram» (Франция) с чувствительностью $3 \cdot 10^{-5}$ Дж/с. Масса образцов составляла 50–100 мг, ошибка в определении температуры не превышала $\pm 0,2$ К, в определении теплот эффекта $\pm 5\%$. Для определения процентного содержания связанный воды в используемых образцах последние вакуумировали до достижения постоянного веса при 105°.

Использовали образцы трех желатин, различающихся количеством межцепных спшивок, которые, как известно, сильно влияют на процесс гелеобразования [1]: I — желатина, полученная тепловой денатурацией нативного коллагена, причем денатурацию осуществляли в той же герметичной калориметрической ампуле, в которой в дальнейшем выполняли исследования процесса гелеобразования. В такой желатине сохраняются практически все естественные межцепные спшивки, присутствующие в исходном коллагене. II — α -желатина, состоящая из полностью изолированных цепей $M = 9,2 \cdot 10^4$ — препарат, выпускаемый фирмой «Serva» (ФРГ) как калибровочное вещество для лабораторного определения ММ; III — промышленная желатина фирмы «Sigma» (США), которая является промежуточной по своей структуре между желатинами I и II, часть естественных спшивок в ней разорвана.

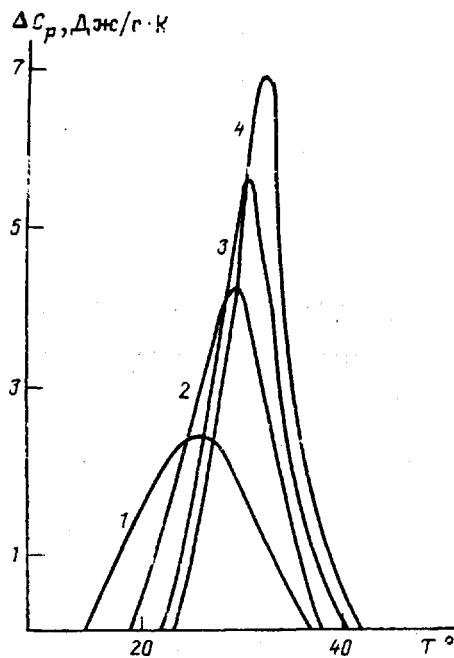


Рис. 1. Зависимость кривых плавления гелей желатины I от времени гелеобразования 30 мин (1), 3 ч (2), 18 ч (3) и 7 сут (4). Температура гелеобразования 22°, скорость нагревания 1 К/мин

В первую очередь остановимся на некоторых обнаруженных нами общих закономерностях процесса гелеобразования желатин. Рассмотрим их детально на примере желатины I. На рис. 1 приведены кривые избыточной температурной зависимости теплоемкости образца I (концентрация желатины $c=20\%$) после термостатирования при 22° в течение различного времени. Максимум теплопоглощения соответствует плавлению геля. Кривые на рис. 1 отражают развитие процесса гелеобразования во времени. По мере увеличения времени, предоставленного для гелеобразования, происходит трансформация кривых плавления геля: увеличивается теплота плавления геля $Q_{\text{пл}}$, повышается температура плавления геля $T_{\text{пл}}$, уменьшается полуширина кривой ΔT . Отметим, что $Q_{\text{пл}}$ геля, образующегося в первые ~30 мин термостатирования, составляет ~1/2 от максимального достижимой при этой температуре. Температура плавления геля за время его изотермического образования, равное 7 сут, повышается на 7–8° и имеет предельное значение ~35°. При этом полуширина кривой плавления уменьшается в ~2 раза (с 13 до 6°). Эти результаты убедительно демонстрируют, что структуры, формирующиеся в геле, являются метастабильными, поскольку их теплоустойчивость изменяется в процессе гелеобразования.

Как показали дальнейшие исследования, для всех желатин при различных температурах гелеобразования и концентрациях исходных растворов наблюдается описанная выше трансформация кривых плавления. При этом конкретные изменения значения $T_{\text{пл}}$ и $Q_{\text{пл}}$ в процессе гелеобразования, естественно, зависят от строения желатин, температуры термостатирования и концентрации исходного раствора. Например, как и следовало ожидать, для спицких желатин (I и III) и α -желатины сильно различаются данные по кинетике гелеобразования. Если в спицких желатинах при концентрации $c=3-20\%$ и 22° уже в первые десятки минут образуется гель, $Q_{\text{пл}}$ которого составляет ~1/2 от максимальной, то в α -желатине гелеобразование начинается лишь после нескольких часов термостатирования (при этих же концентрациях и температурах). Кроме того, в растворах спицких желатин ($c=3-20\%$) процесс гелеобразования практически завершается за 2–3 сут, в то время как во влажных пленках спи-

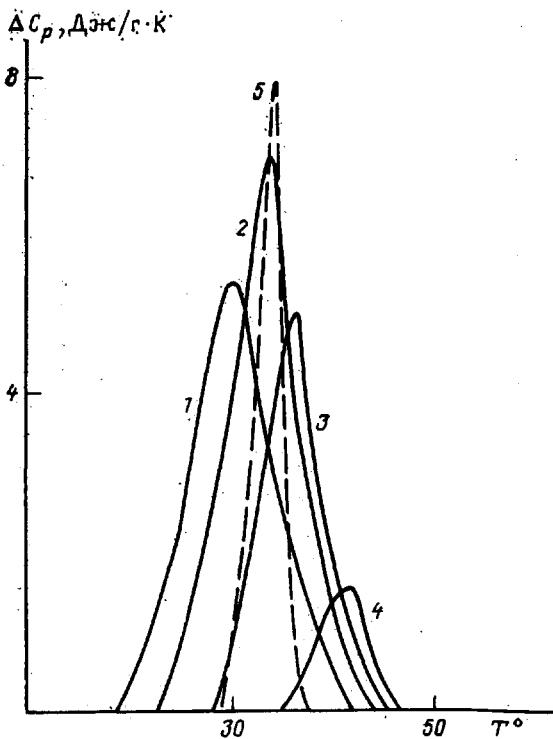


Рис. 2. Зависимость кривых плавления гелей желатины I (1–4) и желатины II (5) от температуры гелеобразования: 17 (1), 22 (2, 5), 27 (3) и 30° (4). Время гелеобразования 7 сут. Скорость нагревания 1 К/мин

тых желатин на это требуется несколько недель. Тем не менее во всех исследованных случаях (при изменении концентраций желатин в пределах от 2 до 80% и температуры гелеобразования в диапазоне 15–35°) теплота и температура плавления гелей увеличиваются в процессе их формирования. Отсюда следует, что гелеобразование в желатине приводит к формированию метастабильных структур.

Далее также на примере желатины I рассмотрим полученные зависимости предельных (максимальных) значений теплот и температур плавления гелей от температуры гелеобразования. На рис. 2 представлены кривые плавления различных гелей, полученных в результате длительного термостатирования растворов $c=20\%$ при 22°. С повышением температуры гелеобразования предельные значения $T_{пл}$ увеличиваются, в то время как величины $Q_{пл}$ и полуширины интервалов плавления уменьшаются. Приведенные данные хорошо согласуются с результатами работы [9]. Таким образом, полученные результаты по изменению теплоустойчивости гелей в процессе их изотермического формирования, как и по температурной зависимости гелеобразования, убедительно показывают, что закономерности процесса гелеобразования в желатине сходны с кристаллизацией синтетических полимеров [10, 11].

Ниже изложим результаты исследования влияния концентрации растворов желатин на параметры гелеобразования. Учитывая, что характер исследуемых процессов существенно зависит от концентрации исходных растворов, отдельно обсудим результаты, полученные для гелей с <20% и для гелей более высоких концентраций.

Как показали эксперименты (рис. 2 и 3), при изменении концентраций гелей от 2 до 20% (температура гелеобразования 22°) предельные значения $T_{пл}$ практически не зависят от концентрации и для всех желатин примерно одинаковы, с отклонениями, лишь незначительно превышающими ошибку эксперимента ($35,0 \pm 2^{\circ}$). Связь между значениями $Q_{пл}$ и концентрацией исходного раствора менее однозначна (рис. 4). В сплошных

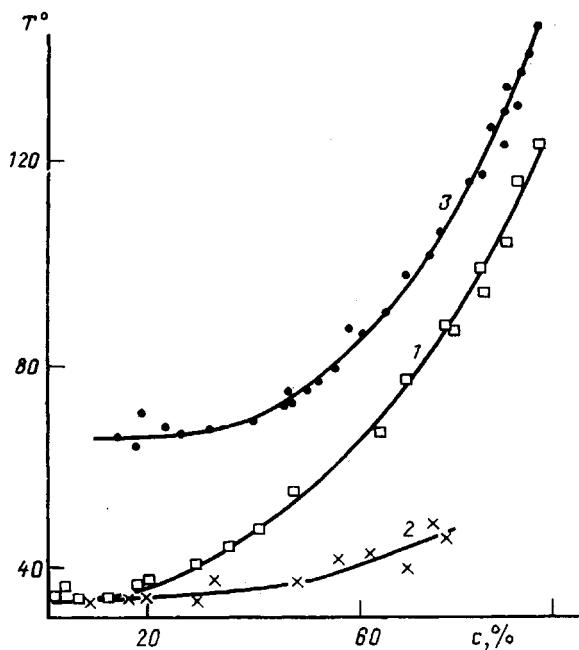


Рис. 3. Зависимость температур плавления гелей $T_{\text{пл}}$ и денатурации $T_{\text{д}}$ коллагена от концентрации. 1: образец, полученный высушиванием геля с $c=5\%$ (способ А), желатина III; 2: образец, сформированный при высоких концентрациях (способ Б), желатина III; 3: коллаген

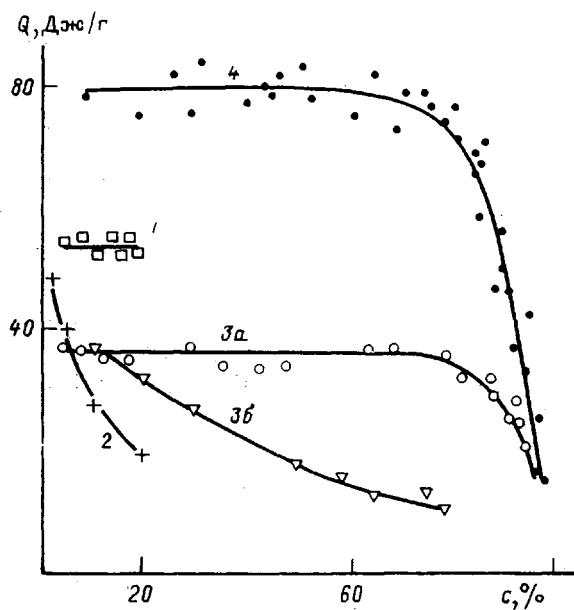


Рис. 4. Зависимость теплот плавления гелей желатины $Q_{\text{пл}}$ и денатурации коллагена $Q_{\text{д}}$ от концентрации. 1 – желатина I, 2 – желатина II, 3 – желатина III (3а – гель, полученный способом А; 3б – гель, полученный способом Б), 4 – коллаген

желатинах I и III величина $Q_{\text{пл}}$ практически не зависит от концентрации при изменении ее в пределах от 2 до 20% и составляет соответственно 54,3 и 36,4 Дж/г для желатин I и III. В то же время в α -желатине при уменьшении концентрации с 20 до 2% значение $Q_{\text{пл}}$ увеличивается с 21,3 до 48,9 Дж/г. Отметим следующий факт: из наших данных по скорости гелеобразования следует, что в α -желатине при $c=1,5$ гелеобразование и че-

рез 10 сут далеко от завершения, и приведенные значения $Q_{пл}$ – максимальные, но не предельные в отличие от данных для других концентраций.

При обсуждении полученных результатов возникает естественный вопрос, что представляют собой структуры, формирующиеся в процессе гелеобразования. В работах [12] было установлено, что в разбавленных водных растворах коллагена ($c < 0,2\%$) после денатурации восстанавливается коллагеноподобная структура, а закономерности ее восстановления совпадают с закономерностями кристаллизации синтетических полимеров в растворах. Более того, было показано, что в таких растворах не происходит образования каких-либо промежуточных упорядоченных структур, состоящих из одной цепи коллагена, как это предполагалось ранее [1]. Следствием работ [12] может быть предположение, что и в концентрированных растворах коллагена, охлажденных после денатурации, при формировании гелей желатины образуются коллагеноподобные структуры. Эти структуры и приводят к созданию пространственной надмолекулярной сетки геля, которая может быть разрушена при последующем нагревании. При этом в отдельные коллагеноподобные элементы в качестве партнеров входят участки различных молекул желатины (цепей коллагена). Отсюда следует, что предельными, хотя и недостижимыми реально, значениями термодинамических параметров гелий желатины могут служить значения температур и теплот денатурации коллагена в растворах тех же концентраций. Для раствора коллагена с $c=20\%$ значения температуры и теплоты денатурации: $T_d=43^\circ$, $Q_d=78,6 \text{ Дж/г}$ [6]. Для той же концентрации для всех исследованных желатин $T_{пл}=35^\circ$, а значения теплот плавления для желатин I, II и III составляют соответственно 54,3; 21,3 и 36,4 Дж/г. Для сравнения отметим, что максимальная теплота плавления структур, образующихся в коллагене при охлаждении после тепловой денатурации 65,2 Дж/г, была получена нами для волокон коллагена, спитых бензохиноном [7].

Отношение приведенных теплот плавления гелей к теплоте денатурации коллагена можно использовать для оценки степени совершенства формирующихся в геле структур, т. е. их коллагеноподобности. В таком случае наиболее близкой к структуре коллагена является структура геля желатины I (отношение 0,70), наиболее дефектной – структура α -геля (0,27), структура геля III – промежуточной (0,46). Как было сказано ранее, в желатине I полностью, а в желатине III частично сохранены естественные межцепные валентные сшивки. Именно это обстоятельство и определяет высокую скорость гелеобразования и большое предельное значение $Q_{пл}$ гелей этих желатин. Если образование коллагеноподобных структур сопоставлять с рекристаллизацией полимеров, то можно сказать, что в растворах спитых желатин зародышеобразование является гетерогенным, а не гомогенным. При этом рекристаллизация спитых фибрилл является предельным случаем гетерогенного зародышеобразования.

В случае α -геля, когда межцепные сшивки отсутствуют и зародышеобразование является гомогенным, лишь при достаточно низких концентрациях формируется гель с большой $Q_{пл}$, приближающейся к значениям геля желатины I. В то же время при таких относительно высоких концентрациях, как 20%, первоначально возникающие структуры, по-видимому, препятствуют образованию большого числа коллагеноподобных структур.

Таким образом, проведенные исследования влияния концентрации на процесс гелеобразования показывают, что формирование коллагеноподобных структур в гелях желатины имеет кинетические, а не термодинамические ограничения.

Напомним, что расчет теплот плавления гелей проводился на 1 г сухого вещества, как это принято при определении теплот денатурации. Расчет теплот плавления на 1 г реального геля (или исходного раствора желатины) для α -геля дает следующие результаты: $c=1,5\%$, $Q_{пл}=-0,73 \text{ Дж/г}$ (вместо 48,9 Дж/г); для $c=20\%$, $Q_{пл}=4,2 \text{ Дж/г}$ (вместо 21,3 Дж/г). Именно так рассчитанные значения $Q_{пл}$, соответствующие количеству упорядоченных структур в единице массы геля, могут быть со-

поставлены с упругими свойствами гелей и будут отражать тот факт, что при низких концентрациях образуется слабый гель, а при высоких –сильный, упругий.

Ниже изложим результаты исследования плавления гелей высоких концентраций ($c > 20\%$). Известно, что такие гели могут быть получены двумя различными способами: или высушиванием гелей относительно низких концентраций (способ А), или формированием гелей в высококонцентрированных растворах (способ Б). Зависимости термодинамических параметров гелей, полученных по способу А (концентрация исходного геля 5%) и по способу Б (формирование и плавление геля происходит при постоянной концентрации), от концентрации желатины приведены на рис. 3 и 4. Прежде всего отметим, что при уменьшении содержания воды происходит переход от водных гелей желатины к так называемым кристаллическим желатинам с различным содержанием связанной воды. Из кривых 1 и 2 (рис. 3) и 3а и 3б (рис. 4) следует, что этот переход осуществляется плавно, без каких-либо нарушений регулярности хода зависимости теплот и температур образующихся структур от содержания воды. Отсюда можно сделать вывод о том, что во всех рассматриваемых случаях как в растворе желатины в воде, так и в растворе воды в желатине, формируются однотипные коллагеноподобные структуры.

Остановим внимание на результатах исследования плавления гелей, полученных способом А. Как видно из рис. 3, температура плавления геля увеличивается с уменьшением содержания воды. Эта зависимость становится тем резче, чем меньше концентрация воды. В то же время величина $Q_{пл}$ остается практически постоянной при уменьшении концентрации воды вплоть до $\sim 25\%$, а затем сильно уменьшается.

Представлялось интересным провести сопоставление термодинамических параметров процессов плавления геля и кристаллической желатины с параметрами денатурации нативного коллагена, полученными в работе [6]. Последние также приведены на рис. 3 и 4. Как видно, зависимости термодинамических параметров плавления геля и кристаллической желатины от концентрации повторяют аналогичные зависимости параметров денатурации коллагена с той лишь разницей, что для желатины соответствующие значения всегда ниже, чем для коллагена (при одной и той же влажности). Эти результаты показывают, что исследуемые структуры, формирующиеся в гелях высоких концентраций и кристаллических желатинах, действительно являются коллагеноподобными.

Наблюдаемое в желатине при малом содержании воды уменьшение теплоты плавления геля вызвано, как и в коллагене, потерей связанной воды, стабилизующей спиральную структуру. Рост температуры плавления с уменьшением концентрации воды обусловлен, по-видимому, энтропийным эффектом: уменьшением ΔS из-за увеличения степени упорядоченности образующегося при плавлении расплава [6].

Перейдем далее к изложению результатов исследования плавления гелей, действительно сформированных при высоких концентрациях (способ Б). Для таких гелей с ростом концентрации желатины наблюдается очень незначительное повышение $T_{пл}$ и существенное уменьшение значений $Q_{пл}$. Так, при увеличении концентрации желатины с 20 до 80% значение $T_{пл}$ увеличивается на 10–12 К, $Q_{пл}$ уменьшается с 33,4 до 10,8 Дж/г.

Как видно из приведенных данных, значения термодинамических параметров двух гелей, полученных разными способами, существенно различаются. Различия в значениях теплот и температур плавления становятся все более значительными с уменьшением содержания воды. Так, при концентрации воды 20% разность между температурами плавления составляет ~ 40 К, а значения $Q_{пл}$ различаются в 3 раза. Проведенное сопоставление еще раз демонстрирует, что исследуемые структуры являются метастабильными, поскольку значения их термодинамических параметров сильно зависят от тепловой и концентрационной истории.

Наблюдаемое различие термодинамических параметров двух гелей высоких концентраций и кристаллических желатин можно объяснить известной зависимостью параметров плавления малых систем от их размеров и

степени дефектности. Отдельные участки коллагеноподобных спиралей, за счет образования которых формируется сетка геля, безусловно, могут быть отнесены к малым системам. Именно при разрушении этих малых систем в процессе плавления происходит превращение макроскопической сетки надмолекулярного геля в изотропный раствор или кристаллической желатины в аморфную. По-видимому, при малом содержании воды вследствие кинетических ограничений (способ Б) в гелях высоких концентраций образуются более дефектные структуры меньших размеров по сравнению с гелями умеренных концентраций (способ А). Как следствие, такие малые дефектные структуры имеют более низкие значения теплот и температур плавления [13].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вейс А. Макромолекулярная химия желатина. М., 1971. С. 394.
2. Jannas I. V. // Macromolec. Sci. Revs. Macromolec. Chem. 1972. V. 7. P. 49.
3. Папков С. П. Студнеобразное состояние полимеров. М., 1974. С. 255.
4. Измайлова В. П., Ребиндер П. А. Структурообразование в белковых системах. М., 1974. С. 268.
5. Джеймс Х. Теория фотографического процесса. Гл. II. Л., 1980. С. 55.
6. Церегели Г. И. // Биофизика. 1982. Т. 27. С. 780.
7. Церегели Г. И., Мосевич Е. А. // Биофизика. 1984. Т. 29. С. 949.
8. Церегели Г. И., Сочава И. В. // Вестн. ЛГУ. 1985. № 11. С. 27.
9. Годовский Ю. К., Мальцева И. Н., Слонимский Г. Л. // Высокомолек. соед. А. 1971. Т. 13. № 12. С. 2768.
10. Годовский Ю. К. Теплофизические методы исследования полимеров. М.: 1976. С. 215.
11. Манделькерн Л. Кристаллизация полимеров. М.; Л., 1966. С. 333.
12. Hauska P. W., Harrington W. F. // Biochemistry. 1970. V. 9. P. 3734; 1970. V. 9. P. 3745.
13. Hill T. L. Thermodynamics of Small Systems. V. 1. N. Y., 1963. P. 171.

Научно-исследовательский институт физики
при Ленинградском государственном университете

Поступила в редакцию
28.12.91

G. I. Tsereteli, O. I. Smirnova

CALORIMETRIC STUDY OF GELATIN GELS MELTING

Summary

Temperature dependence of excessive heat capacity in the range of melting of gelatin aqueous gels has been studied by DSC method in the 2-95% gelatin concentration range. The samples with various amounts of interchain crosslinks were used. In the course of gelation the methastable collagen-like structures were formed. Temperatures and heats of melting were determined for gels formed in various conditions. Thermodynamic parameters of gelatin gels melting and of collagen denaturation were compared. The difference in these parameters can be used to evaluate the defectness of collagenlike structures formed in gels.