

Chlorion-Gehaltes nicht verwenden. Man sieht, dass, wie wohl zu erwarten war, Silbersalz schwächer adsorbiert wird als Goldsalz. Den Silbergehalt des Meerwassers, der nach oben hin durch die Löslichkeit

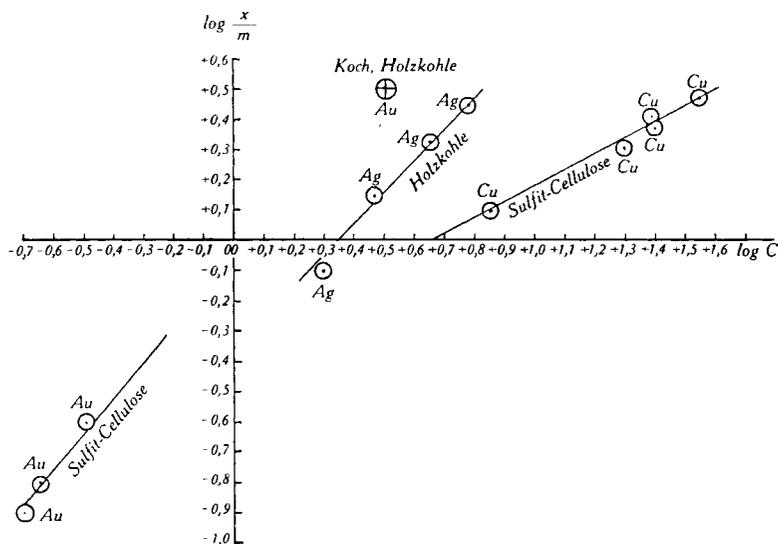


Fig. 6.

des Silberchlorides begrenzt ist, wird man mit der Holzkohlenmethode nicht quantitativ erfassen können. Man ist hier auf Analysen angewiesen, wie sie von *Malaguti* und *Du Rocher*¹⁾ — Eindampfen, Fällern mit Schwefelwasserstoff und Kupellieren — versucht worden sind.

Zürich, Physik.-chem. Laboratorium
der Eidg. Techn. Hochschule. 4. August 1942.

**130. Zur allgemeinen Chemie der Kolloid-Kolloid-Reaktionen. IX.
Reinste hydrophobe Kolloide und Proteine, ihr Schutzmechanismus
von Wolfgang Pauli und Paul Dessauer.**

(1. IX. 42.)

I.

Der Ausbau der Reinigungsverfahren für die hydrophilen und insbesondere die weit empfindlicheren hydrophoben Kolloide und deren elektrochemisch-konstitutive Kennzeichnung bildete den Weg zu einer einwandfreien Analyse ihrer Wechselwirkungen, wie sie nun

¹⁾ Ann. chim. [3] **28**, 136 (1850); *M. Field*, C. r. **49**, 463 (1859).

schon an verschiedenen Kolloidpaaren¹⁾ insbesondere hinsichtlich des Zustandekommens des Schutzvermögens oder der Flockungshemmung sowie der Sensibilisierung oder der Flockungsverstärkung begonnen werden konnte. Nicht anders wie sonst in der Chemie erwies es sich hier, dass die Kenntnis des Aufbaues und der Anordnung der reaktionsfähigen Gruppen auf den Teilchen die Grundlage für die Erklärung der Kolloid-Kolloid-Reaktionen bilden muss.

Die Eigentümlichkeiten der hochgereinigten Kolloide müssen dabei Berücksichtigung finden. Sämtliche negativen Hydrophoben werden, wie schon vor Jahren gezeigt werden konnte, durch weitgehende Reinigung hydrolytisch in acidoide Sole — mit H^+ als Gegenion — überführt. Eine etwaige Rolle dieser H^+ -Ionen muss durch nachträgliche exakte Neutralisation geprüft werden. Die positiven Sole sind im allgemeinen nur als Kolloidelektrolyte vom Salztypus zugänglich und müssen durch die Reinigung, insbesondere von hydrolytisch abgespaltener Säure, befreit sein. Die richtige elektrodialytische Reinigung der wasserlöslichen Proteine lässt gewisse, meist nicht genügend beachtete elektrochemische Besonderheiten derselben hervortreten. Das für manche vergleichende Untersuchungen zweckmässige Verfahren, die Proteine in einem Medium höherer Ionenstärke unter p_H -Pufferung zu verwenden, schafft für die Analyse der Kolloid-Kolloid-Reaktionen infolge der starken Verzerrung der elektrochemischen Beziehungen zunächst unübersichtliche Bedingungen.

Die Herstellung reiner und zugleich für unsere Zwecke genügend monodisperser, hydrophober Sole ist eine noch nicht gelöste Aufgabe. Es kann nämlich ein selbst der Masse nach geringer, feindisperser Anteil infolge seiner grossen Oberfläche und damit der Zahl seiner reaktionsfähigen Gruppen die Kolloid-Kolloid-Reaktion wesentlich bestimmen. Eine elektrochemische Charakterisierung der reinen hydrophoben Sole ist daher im allgemeinen derzeit keine solche der Einzelteilchen, sondern muss sich auf Mittelwerte beschränken wie beispielsweise das Kolloidäquivalent K^* , d. i. die auf eine freie Ladung des Gegenions entfallende durchschnittliche Molekelzahl, ferner die mittlere Aktivität der Gegenionen bzw. deren mittleren Aktivitätskoeffizienten, oder die mittlere Wanderungsgeschwindigkeit des Kolloidions.

Die folgende Darstellung unserer Ergebnisse umschliesst zugleich frühere Beobachtungen und einige noch zu veröffentlichende Teilergebnisse, so dass sie auf die reinsten hydrophoben Sole von Kongoblau, Gold, Arsentrisulfid, Antimontrisulfid, Mastix, Eisenoxyd, Aluminiumoxyd, Nachtblau sowie auf hochgereinigtes Serumalbumin²⁾, Ovalbumin, ferner zum Teil Leimglutin und den wasserlöslichen Globulinanteil Bezug nehmen kann.

Wie schon erwähnt, werden die reinen hydrophoben, negativen Sole im allgemeinen streng acidoid, also mit H^+ als einzigem Gegenion gewonnen. Sie geben mit unseren reinsten Proteinen stets Flockungen zum Unterschied etwa von dem ungereinigten Formolgoldsol *Zsig-*

¹⁾ a. *W. Pauli* und *E. Weiss*, *Bioch. Z.* **203**, 104 (1928); b. *Pauli* und *L. Singer* ebenda **244**, 76 (1932); c. *K. Ogiu* und *Pauli*, ebenda **250**, 535 (1932); d. *Pauli*, *E. Russer* und *G. Schneider*, ebenda **269**, 158 (1934); e. *Pauli*, *C. r. Carlsberg Lab.*, *Festschr. S. P. L. Sörensen* **22**, 416 (1939); f. *Pauli* und *W. Kitaj*, *Koll. Z.* **82**, 43 (1938); *Pauli* und *H. Zentner*, *Faraday* **35**, 1234 (1939); *Pauli* und *J. und St. Szper*, *Faraday* **35**, 1316 (1939).

Die Bearbeitung der in den Jahren 1936/37 noch in Wien ausgeführten Versuche dieser Mitteilung konnte am chemischen Institut der Universität Zürich erfolgen.

²⁾ Abkürzung für Serumalbumin.

mondys¹⁾) und seinen technischen Proteinen, die zu dessen ausgedehnten Studien der Schutzkolloidwirkung dienten. Zur Erklärung dieser Abweichung haben *R. Zsigmondy* und *E. Joël*¹⁾) angenommen, dass unser Flockungseffekt durch die Positivierung der Proteine seitens der H⁺-Ionen des Hydrophoben zustande kommt. Da diese Anschauung noch bis in die jüngste Zeit Anhänger findet, sollen einige dieselbe widerlegende Beobachtungen an unseren reinsten Solen kurz angeführt werden.

Pauli und *E. Weiss*²⁾) zeigten, dass ein durch Zerstäubung in 2×10^{-5} -n. HCl bereitetes Goldsol, wobei die Säure nahe zur Gänze dem Aufbau der aufladenden Au(I)-Chlorokomplexe auf den Teilchen dient, reinstes Ovalbumin oder Serumalbumin in der gleichen Weise flockt, auch wenn es gemäss konduktometrischer Titration mit Natriumhydroxyd vollständig neutralisiert wird. Das gleiche gilt für ein von vorneherein mit K⁺ als Gegenion — durch Zerstäuben in 4×10^{-5} -n. KCl — hergestelltes Goldsol, sowie nach *K. Ogiu* und *Pauli*³⁾) für ein durch Elektrodekantation (EDek) gereinigtes, in Salzsäure zerstäubtes Goldsol vor und nach der Neutralisation. Ebenso bleibt das Flockungsvermögen eines hochgereinigten Kongoblau-Sols bei der strengen Neutralisation — konduktometrisch nach *Pauli* und *E. Weiss*⁴⁾), potentiometrisch mittels Glaselektrode nach *Pauli* und *P. Szarvas*⁵⁾) — unverändert. Ebenso konnte *K. Hotta*⁶⁾) auf Veranlassung *Pauli*'s das gleiche für das reine Mastixsol feststellen. Der Neutralpunkt wurde durch potentiometrische und durch konduktometrische Titration eingestellt.

Demnach ist der acidoide Charakter negativer Sole keine Bedingung für ihr Proteinflockungsvermögen und es besteht wenigstens im Prinzip kein Unterschied in der ausnahmslos gegebenen Flockung reiner wasserlöslicher Eiweisskörper sowohl mit reinen negativen als auch mit positiven Hydrophoben. Voraussetzung bildet lediglich der polyvalente zwitterionische Aufbau der Proteine unter den gegebenen Umständen, so dass an denselben die für eine interionische Wechselwirkung erforderlichen positiven oder negativen Gruppen zur Verfügung stehen.

Für das Verständnis des Mechanismus der reinen Kolloid-Proteinflockung sind im einzelnen verschiedene Umstände zu beachten. Die positiven und negativen ionischen Gruppen des Eiweiss sind durch Hauptvalenzkräfte fest angefügte Seitenketten von Diamino- oder Dicarbonsäuren, welche durch eine Reaktion mit den entsprechenden ionogenen Komplexen der hydrophoben Kolloide nicht von der Proteinmolekel abgelöst werden können und überdies, wie insbesondere die relativ weit längeren Ketten der Diaminosäuren, einen gewissen Spielraum gegenüber wechselnden Abständen der aufladenden Gruppen des Hydrophoben bieten werden. Nach unseren Erfahrungen kommt auch eine Ablösung der ionogenen Gruppen des Hydrophoben durch die Reaktion mit der Eiweissmolekel in der Regel nicht zustande. Nur die Beobachtungen an dem besonders lockeren, positiven Nachtblausol⁷⁾) mit Serumalbumin zeigten auch eine leichtere Zerteil-

1) *R. Zsigmondy*, Kolloidchemie 5. Aufl., Leipzig 1925; *E. Joël*, Das kolloide Gold in Biol. und Med., Leipzig 1925. Dasselbst Literatur.

2) *Pauli* und *E. Weiss*, Bioch. Z. **203**, 104 (1928).

3) *K. Ogiu* und *Pauli*, Bioch. Z. **250**, 535 (1932).

4) *Pauli* und *E. Weiss*, Bioch. Z. **203**, 104 (1928).

5) *Pauli* und *P. Szarvas*, erscheint demnächst.

6) *K. Hotta*, Bioch. Z. **183**, 72 (1927).

7) *Pauli* und *E. Fried*, unveröffentl. Versuche.

barkeit der Assoziat des Farbstoffes an, wobei die durch *van der Waals'sche* Kräfte zu grösseren, lilaroten Kolloidteilchen zusammengeschlossenen Farbbasenmolekeln unter teilweiser Desassoziation in das tiefblaue Farbsalz übergehen und nur unvollständige Flockungen geben.

Durchaus berechtigt wäre die Frage, weshalb die genaue Überführung eines acidoiden negativen Kolloids mittels Neutralisation in das Salz keinen erheblicheren Unterschied in der Proteinflockung gibt. Die Reaktion der aufladenden, negativen Gruppen des acidoiden Hydrophoben mit den positiven Ammoniumgruppen des Proteins unter Inaktivierung derselben wird dessen Charakter als inneres Salz oder polyvalentes Zwitterion mehr oder weniger aufheben. Wir müssen nun annehmen, dass dabei die Dissoziation der verbleibenden, seitenständigen Carboxylgruppen — von sauren Hydroxylen kann hier abgesehen werden — genügend zurückgeht, so dass keine ausreichende freie Ladung für die Hydratation und Wasserlöslichkeit des Proteins übrig bleibt. Denken wir uns die H-Ionen des acidoiden Hydrophoben etwa durch Alkaliionen ersetzt, so wird das an der Dissoziation der Carboxylgruppen des Proteins deshalb wenig ändern, weil es sich um minimale Konzentrationen der Alkaliionen handelt, die sich in diesem Falle meist zwischen 10^{-5} — 10^{-6} -n. bewegen. Dann wird jedoch die Hydrolyse des Eiweissalzes unter kaum merkbarer p_H -Verschiebung genügen, um die Dissoziation der schwachen Carboxylgruppen praktisch zum Verschwinden zu bringen. Ein Unterschied durch die Substitution der Gegenionen muss also nicht zum Ausdruck kommen. Erst ein höheres p_H hebt die Flockung des Proteins mit negativen Hydrophoben auf infolge Beseitigung des ionischen Charakters seiner positiven Gruppen.

II.

Versuchsmaterial. Serumalbumin wurde durch fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat aus frischem Pferdeserum gewonnen, in der erprobten Weise vordialysiert und schliesslich mittels Elektrodialyse gereinigt. Der Trockengehalt betrug bei den verschiedenen Solen 1,26—3,26%. Die entsprechenden Leitfähigkeiten variierten zwischen 6 — $7,4 \times 10^{-6}$ r.O.

Ovalbumin wurde in der bewährten Art mittels Elektrodialyse globulinfrei hergestellt. Bei einem Trockengehalt von 3,3% betrug seine spezifische Leitfähigkeit $1,62 \times 10^{-5}$ r.O.

Die Arsentrisulfid-Sole wurden nach dem früher bekanntgegebenen Verfahren¹⁾ bereitet. In starker, z. B. 50-facher Verdünnung hergestelltes Arsentrisulfid-Sol (0,02%) wird mittels Edek auf ca. 1% eingengt und gleichzeitig so weit gereinigt, dass die Leitfähigkeit der oberen Schicht schliesslich weniger als 1% von der des konz. Sols beträgt. Solche Sole sind — zum Unterschiede von den früher üblichen — vollständig klar, orange-rot und lassen sich gut verschlossen und gegen Licht geschützt, ohne Leitfähigkeitsänderung und ohne Sedimentation aufbewahren.

Tabelle I.

As_2S_3 -Sole	II.	III.	IV.	V.
α' der oberen Schicht $\times 10^6$ r.O.	3,49	2,75	4,0	4,36
α_S des Sols $\times 10^4$ r.O.	2,21	2,68	4,1	3,3
α_S korrigiert $\times 10^4$ r.O.	2,17	2,65	4,06	3,26
$a_H^x \times 10^4$ -n.	5,43	6,63	10,1	8,15
m $As_2S_3 \times 10^2$	3,49	3,50	4,25	5,93
Gehalt in %	0,86	0,862	1,046	1,46
Kolloidäquivalent	64	53	42	73

¹⁾ Pauli und A. Laub, Koll. Z. **78**, 295 (1937).

a_H^* bedeutet die aus der korrigierten Solleitfähigkeit errechnete H^+ -(Leitfähigkeits)-Aktivität. Die daraus abgeleiteten relativen K^* dürften in diesem Fall, da $f_A < f_a^H$, nach allen Erfahrungen¹⁾ um etwa 10% zu gross sein. Der Gehalt wurde durch Einengen bei 100° im Trockenschrank bestimmt.

Die $FeO \cdot OH$ -Sole sind durch Hydrolyse von Eisen(III)-chlorid-Lösung in der Hitze bereitet. Nach Vordialyse erfolgte die Reinigung²⁾ mittels Elektrodekantation.

Tabelle II.

FeO·OH-Sole	I.	II.	III.	IV.
κ_S des Sols $\times 10^6$ r.O.	3,64	2,50	3,21	2,48
κ_S korrigiert $\times 10^6$ r.O.	2,84	1,70	2,41	1,68
g Fe/L	2,45	1,63	2,65	3,48
K^*	1545	1718	1243	3706

Die Versuche wurden in 10 cm hohen ca. 6—7 cm³ fassenden Jenaer-Reagensröhrchen ausgeführt. Diese wurden jedesmal sorgfältig mechanisch, chemisch und durch Ausdämpfen gereinigt und getrocknet. Die Mischung des hydrophoben Sols mit der Eiweisslösung geschah derart, dass in ein Röhrchen Eiweisslösung (evtl. auch Salzlösung), in das andere das hydrophobe Sol kam. Durch 8—10maliges Umgiessen wurden die beiden Teile gründlich gemischt (Endvolum 2 cm³). Die fertigen Mischungen wurden verschlossen 24 Stunden im Dunkeln aufbewahrt. Die Ablesung der Trübungen erfolgte bei seitlichem Lampenlicht gegen schwarzen Hintergrund. Die Proben wurden mit entsprechenden Kontrollen verglichen.

Zeichenerklärung: \equiv bedeutet Farbenumschlag ohne Trübung. Die leichteste Opaleszenz bezeichneten wir mit (+ -). Es war möglich zur Bezeichnung der progressiven Trübungen noch die Zeichen: + -, \pm , $\pm\pm$ zu verwenden. $\pm\pm$: milchige Trübung, die binnen 24 Stunden eben abzusetzen beginnt. Die Bezeichnungen der Niederschläge sind: +, ++, $\overset{+}{+}$, $\overset{+}{++}$. Bei vollständiger Flockung des hydrophoben Sols (obere Schicht wasserklar: $\overset{+}{++}$. Wenn die obere Schicht bei massenhafter Flockung noch etwas trübe oder gefärbt ist: ++. Mit $\overset{+}{++}$ und + bezeichneten wir erkennbare Niederschlagsbildungen mit mehr oder weniger trüber, oberer Schicht. Die Veränderungen von \pm bis $\overset{+}{++}$ bilden eine zunehmende Reihe und waren durch die in zahlreichen Versuchen erlangte Übung gut abzuschätzen und zu reproduzieren. Ein exaktes optisches Messverfahren käme hier nur für den ersten Schwellenwert in Frage, dessen alleinige Bestimmung ein ganz unvollständiges Bild der Verhältnisse liefern würde.

Zur Bereitung der Mischungen wurde dreifach destilliertes Leitfähigkeitswasser verwendet, dessen spezifische Leitfähigkeit 0,7—1,0 $\times 10^{-6}$ r.O. betrug. Sämtliche verwendeten Geräte waren aus Jenaerglas, entsprechend gereinigt und ausgedämpft. Zur Aufbewahrung der Lösungen dienten Jenaer-Kolben mit Aussenkappenschliff.

A. Seralbumin.

III.

In Tabelle III folgt zunächst an einer Reihe von Beispielen ein Überblick über den Gang der Flockungsreaktion von reinstem Seralbumin mit verschiedenen negativen und positiven Hydrophoben,

¹⁾ Pauli, Helv. 24, 1253 (1941).

²⁾ H. Neurath und Pauli, Z. physikal. Ch. [A] 163, 351 (1933); Pauli und M. Alpern, Koll. Z. 76, 130 (1936).

wobei sich markante Unterschiede gegenüber dem später zu beschreibenden Verhalten des Ovalbumin ergeben.

Tabelle III.

Hydrophobes Sol % · 10 ³ Seralbumin %	Kongo- blau 3,1	Kongo- blau 1,6	Kongo- blau 0,8	As ₂ S ₃ 27,5	Sb ₂ S ₃ 52,0	Gold 5,5	FeO·OH 19,6
1,5	++	++	++	++	++		++
1,0	++	++	++	++	++		++
0,5	++	++	++	++	++	+ r	++
0,25	++	++	++	++	++	+ r	++
0,1	++	++	++	++	++	+ r	++
0,05	++	++	++	+	++	+ r	++
0,025	++	+	++	±	++	+ bl	++
0,01	+	±	±	-	++	+ bl	++
5 × 10 ⁻³	+	-	-	-	+	+ bl	±
2,5 × 10 ⁻³	+-	-	-	-	±	++ bl	+-
1,0 × 10 ⁻³	+-	-	-	-	-	++ bl	(+-)
5 × 10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	+ bl	-
2,5 × 10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	± bl	-
1 × 10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	± bl	-
5 × 10 ⁻⁵	-	-	-	-	-	± bl	-
2,5 × 10 ⁻⁵	-	-	-	-	-	-	-

Wir können zunächst die folgende sehr auffallende Feststellung machen. Es gibt im untersuchten Bereich keine die Flockung lösende oder rückbildende Überschusswirkung des Seralbumins. Über drei Grössenordnungen ansteigender Eiweisskonzentration erstreckt sich hier das Gebiet der vollständigen Flockung, ohne dass eine Abnahme derselben bemerkbar wird. Schliesslich ist etwa das 1000-fache der zum Auftreten des Flockungsoptimums erforderlichen Menge oder Teilchenzahl des Proteins vorhanden. In dieser Flockungszone würde somit eine enorme Überzahl von Seralbuminteilchen zur Verfügung stehen, um die hydrophoben Teilchen auseinanderzudrängen, zu zerteilen und die Flockung zu hemmen. Der Umstand, dass hier eine hemmende Überschusswirkung des Proteins ausbleibt, ist sehr wesentlich für unser Bild vom Mechanismus dieser kompletten Kolloidflockung. Mit einem derartigen Verhalten wäre nämlich das Bestehen einer assoziativen Wechselwirkung zwischen den Proteinteilchen unvereinbar, welche hier notwendig zur Trennung und Auseinanderdrängung der hydrophoben Teilchen führen müsste. Hingegen wird es verständlich, sobald jede Teilchenassoziation an die Feldwirkung des hydrophoben Teilchens geknüpft ist. Die mit den letzteren verbundenen Proteinteilchen würden sich mit ihren freien

Flächen im Grunde nicht anders verhalten, wie die Teilchen des reinen elektrolytfreien Seralbumins, dessen osmotischer Druck¹⁾ bis in sehr hohe Konzentrationen linear ansteigt und keinerlei merkliche Teilchenassoziation verrät.

Für die Beziehungen des Hydrophoben zum Protein ergeben sich weitere wichtige Anhaltspunkte aus dem Studium des Elektrolyteinflusses auf diese Kolloid-Kolloid-Reaktion, der sich in Schutz- und Sensibilisierungseffekten kundgibt.

IV.

Vorausgegangene, insbesondere am reinsten Kongoblau- und Goldsol²⁾ ausgeführte Versuche über Schutzwirkung und Sensibilisierung durch die Kombination von Protein und Salz werden nun durch eingehende Untersuchungen mit hochgereinigten As_2S_3 - und $FeO \cdot OH$ -Solen ergänzt, von denen hier nur ein Teil herangezogen werden soll. Die Rolle der Änderung von Anion und Kation des Salzes bleibt einer besonderen Darstellung³⁾ vorbehalten.

Die folgende Tabelle IV gibt als Beispiel das Verhalten der Kombination $FeO \cdot OH$ -Sol + Seralbumin bei Variation des Protein- und Natriumchlorid-Gehaltes.

Tabelle IV.
 $FeO \cdot OH$ -Sol 0,0196% + Seralbumin + Natriumchlorid.

NaCl normal	0,0	2,0	1,0	5×10^{-1}	$2,5 \times 10^{-1}$	1×10^{-1}	5×10^{-2}	$2,5 \times 10^{-2}$	1×10^{-2}	5×10^{-3}	$2,5 \times 10^{-3}$	1×10^{-3}	5×10^{-4}	$2,5 \times 10^{-4}$	1×10^{-4}	5×10^{-5}	$2,5 \times 10^{-5}$
Seralbumin in %	0,0	1,5	1,0	5×10^{-1}	$2,5 \times 10^{-1}$	1×10^{-1}	5×10^{-2}	$2,5 \times 10^{-2}$	1×10^{-2}	5×10^{-3}	$2,5 \times 10^{-3}$	1×10^{-3}	5×10^{-4}	$2,5 \times 10^{-4}$	1×10^{-4}	5×10^{-5}	$2,5 \times 10^{-5}$
0,0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
1,5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
1,0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
5×10^{-1}	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
$2,5 \times 10^{-1}$	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
1×10^{-1}	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
5×10^{-2}	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
$2,5 \times 10^{-2}$	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
1×10^{-2}	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
5×10^{-3}	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
$2,5 \times 10^{-3}$	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
1×10^{-3}	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
5×10^{-4}	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
$2,5 \times 10^{-4}$	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
1×10^{-4}	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
5×10^{-5}	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
$2,5 \times 10^{-5}$	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

¹⁾ Pauli und P. Fent, Koll. Z. **67**, 288 (1934).

²⁾ Pauli und L. Singer, Bioch. Z. **244**, 76 (1932); K. Ogiu und Pauli, ebenda **250**, 535 (1932).

³⁾ P. Dessauer und Pauli, erscheint demnächst.

Die erste Vertikalreihe zeigt den Gang der Proteinflockung des Hydrophoben ohne Natriumchlorid, die erste Horizontalreihe die reine Natriumchlorid-Flockung ohne Protein. Die Tabelle ist durch die Koordinaten der Schwellenwerte des Proteins und des NaCl in vier Quadranten (I—IV) mit dem Mittelpunkt A geteilt. Das Gebiet der Schutzwirkung ist durch Fettstrich, das der Sensibilisierung durch Strichelung eingeraht.

Danach findet sich in einem kleinen Gebiet eine Schutzwirkung durch Protein mit für sich allein nicht flockenden Salzkonzentrationen, es gibt jedoch keine Schutzwirkung von Salz mit niedrigen Proteinkonzentrationen, die unterhalb der Schwelle der reinen Proteinflockung des Hydrophoben gelegen sind. Die Sensibilisierung oder Steigerung der Flockbarkeit erscheint hingegen an niedrige Proteinkonzentrationen geknüpft. Ihr unterer Grenzwert liegt für unser FeO · OH-Sol bei $5 \times 10^{-5} \%$ Serumalbumin, was einer Molarität von etwa 7×10^{-9} -m. Eiweissteilchen entspricht. Wie die Schätzung der Relation der Teilchenzahlen der beiden Kolloide lehrt, wird hier die Wahrscheinlichkeit sehr gross, dass mit einem Proteinteilchen mehrere hydrophobe Teilchen zusammentreffen.

Für sehr niedrige Proteinkonzentrationen wird als typische Wechselwirkung nukleare Aggregation (*Pauli*) angenommen, wobei die Teilchen des Hydrophoben sich um zentrale Proteinteilchen als Kern anlagern (Fig. 1).

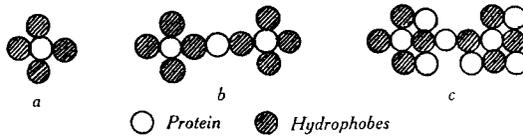


Fig. 1.

- a Nukleares Aggregat schem.
- b Nukleare Aggregate mit Proteinbrücke.
- c Zunahme der Proteinteilchen, Übergang zur alternativen Aggregation.

Um die Verhältnisse bei der nuklearen Aggregation zu überblicken, denken wir uns als Grenzfall zunächst ein Proteinteilchen in ein hydrophobes Sol genügender Konzentration z. B. ein Kongoblau-Sol von $3,15 \times 10^{-2}$ g/L oder unser FeO · OH-Sol mit $1,96 \times 10^{-1}$ g/L eingebracht. Nach einer gewissen Zeit wird die Oberfläche des Proteinteilchens unter Reaktion seiner zugänglichen positiven Gruppen mit einer Anzahl von Kongoblauteilchen bedeckt sein. Solche nukleare Assoziante haben wohl teils durch die Überschneidung der Gegenionenwolken infolge der dichten Aneinanderlagerung der Primärteilchen des Hydrophoben, teils infolge Neutralisation von aufladenden Gruppen des Hydrophoben durch entgegengesetzte des Proteins an Gesamtladung stark eingebüsst, doch besitzt das Aggregat an seiner überwiegend hydrophoben Oberfläche einen Rest von ionogenen Gruppen und damit freier Ladung. Diese reicht im allgemeinen zur Stabilität der nuklearen Sekundärteilchen im Dispersionsmittel aus.

Eine weitere Anlagerung von hydrophoben Teilchen kann jedoch aus elektrostatischen Gründen nicht erfolgen. Ein Sol mit solchen Teilchen flockt nicht spontan und kann unter Umständen infolge Erhaltung oder selbst eines Ansteigens der Ladungszahl des zusammengesetzten Einzelteilchens, verglichen mit den ursprünglichen Primärteilchen, eine gleichbleibende oder sogar etwas erhöhte Wanderungsgeschwindigkeit (Wg) im elektrischen Feld aufweisen. Dennoch besteht eine ausserordentliche Empfindlichkeit gegen jede, selbst geringe weitere Verminderung der Teilchenladung, weil dieselbe dann zum Tragen des vervielfachten Teilchengewichtes nicht ausreicht. Ein Sol mit Teilchen dieser Art koaguliert auf Zusatz sonst nicht flockender Elektrolytmengen, es ist sensibilisiert.

Durchaus im Sinne des Bildes einer nuklearen Aggregation sind die Beobachtungen von *Pauli* mit *Ogiu*¹⁾ gelegen, welche fanden, dass der (blauen) Flockung von reinem Goldsol durch reine Albumine ein Gebiet niedrigeren Proteingehaltes vorausgeht, in welchem nur ein Farbumschlag in Blau, also stabile blaue Solbildung erfolgt (Tab. III). In diesem Bereich besteht jedoch Sensibilisierung gegen Elektrolytzusatz. Diese erstreckt sich von $5 \times 10^{-5}\%$ Albumin bis zum Schwellenwert der Flockung bei etwa $4 \times 10^{-4}\%$ Albumin. Es haben zuerst *Kirchner* und *Zsigmondy*²⁾ angenommen, dass das Aneinanderrücken der primären Goldsolteilchen im Aggregat einen Farbumschlag gegen Blau bewirkt, den sie auch im Versuch durch Vergrösserung des Abstandes der Teilchen wieder nach Rot reversibel machen konnten. Sie zeigten nämlich an in rotem Goldsol gequollenen Gelatinehäutchen, dass diese durch Trocknen blau und durch Anfeuchten und Quellen wieder rot werden. *Pauli* und *E. Russer*³⁾ haben diesen Versuch mit gleichem Erfolg an hochgereinigter Gelatine und reinstem Goldsol wiederholt, so dass der Einwand einer Elektrolytkoagulation beim Trocknen und Konzentrieren ausgeschaltet ist.

Steigt man in etwas höhere, für sich jedoch nicht vollständig mit dem Hydrophoben flockende Proteinkonzentrationen, so werden die Flockungen schon durch sehr niedrige, selbst mehrere Grössenordnungen unter dem Schwellenwert des Salzes liegende Elektrolytzugaben vollständig, sie erscheinen also gleichfalls sensibilisiert. Die wachsende Zahl der Proteinteilchen wird dazu führen, dass sie zunehmend als Brücken zwischen den ursprünglichen nuklearen Assoziaten dienen können, und dieselben, wie dies die Fig. 1c andeutet, zu höheren, sekundären Aggregaten verbinden. Dabei wird auch eine zusätzliche starke Abnahme der Gesamtladung durch Überschneidung der Gegenionensphären und gesteigerte Inaktivierung erfolgen (Einschlusseffekt). Solche schwach aufgeladene Sole mit grossen Teilchen zeigen sich gegen sehr niedrige Elektrolytkonzentrationen, z. B. 5×10^{-5} -n. NaCl (Tab. I), flockungsempfindlich.

Sehr aufklärend für die Kolloidaggregation im Sensibilisierungsbereich erwies sich auch ein Versuch (*Pauli* und *E. Weiss*, l. c.), an Stelle des mittels seiner positiven Gruppen mit Kongoblausol reagierenden, zwitterionischen Proteins das einsinnig positive Aluminiumoxydsol zu setzen. Auch hier zeigte sich schon bei $1,25 \times 10^{-5}\%$ Aluminiumoxydsol eine Sensibilisierung des gebildeten, offenbar nuklearen Aggregates mit dem verwendeten

¹⁾ *K. Ogiu* und *Pauli*, *Bioch. Z.* **250**, 535 (1932).

²⁾ *F. Kirchner* und *R. Zsigmondy*, *Drude Ann. Physik* [4] **15**, 573 (1904).

³⁾ *Pauli* und *E. Russer*, *Koll. Z.* **58**, 22 (1932).

Kongoblausol von $3,15 \times 10^{-3}\%$, indem die keines der beiden Einzelsole flockende Durchströmung mit Kohlendioxyd zur vollständigen Koagulation führt. Der Schwellenwert der reinen Kolloid-Kolloid-Flockung (ohne Kohlendioxyd) lag bei $4 \times 10^{-5}\%$ Aluminiumoxydsol. Eine völlig analoge Sensibilisierung bei Kohlendioxyd-Durchströmung zeigt die Kombination Protein+Kongoblausol, wobei der Schwellenwert der flockenden Proteinkonzentration bei manchen Eiweisskörpern selbst um einige Grössenordnungen herabgesetzt wird. Hier kommt noch die gesteigerte Elektropositivierung und Feldwirkung des Proteins seitens der gelösten Kohlensäure zu ihrer Elektrolytwirkung hinzu.

Wird die angelagerte Proteinmenge mit allmählichem Anstieg der Eiweisskonzentration schliesslich gross genug, so dass es einen genügenden Anteil der Oberfläche des Aggregates bildet, dann kann das gleiche Aggregat in niedrigem Salzgehalt Sensibilisierung, in höherem bereits Schutzwirkung zeigen. Dieses Gebiet ist in unserem Beispiel offenbar klein (Tabelle IV) und fällt zufällig zwischen die untersuchten Albuminkonzentrationen 5×10^{-3} und $1 \times 10^{-2}\%$. Beim Kongoblausol (*Pauli* und *Singer* l. c.) findet sich hingegen beispielsweise für den gleichen Gehalt von 0,02% Seralbumin zwischen 1,5-n. bis 5×10^{-3} -n. NaCl Schutzwirkung und von 1×10^{-3} bis 1×10^{-4} -n. NaCl Sensibilisierung. Bei unserem As_2S_3 -Sol fand sich ähnlich für $2,5 \times 10^{-2}\%$ Seralbumin im Bereiche von 2,0-n. bis $7,5 \times 10^{-2}$ -n. NaCl Schutzwirkung und von 5×10^{-2} -n. bis 5×10^{-4} -n. NaCl Sensibilisierung. Analoge Verhältnisse zeigten $FeO \cdot OH$ - und As_2S_3 -Sole mit Ovalbumin.

Die Sensibilisierung darf nach sämtlichen bisherigen Erfahrungen an hochgereinigten Proteinen und hydrophoben Kolloiden als eine bestimmte Art der Aggregation von Kolloiden definiert werden, welche die Flockbarkeit erhöht. Dieser Aggregationstypus ist in unserem Fall ein nuklearer, mit dem Protein als Kern, der zu einem mehr oder minder rein hydrophoben Aufbau der Teilchenoberfläche führt.

V.

Beim Übergang zu höheren Proteinkonzentrationen unter gleichbleibendem Gehalt an Hydrophoben wäre zunächst das Gebiet herauszuheben, in welchem die Teilchenzahlen beider Kolloide ungefähr gleich, oder vom Protein nur wenig überschritten sind. Hier werden wiederum die mit allen Erfahrungen in vollem Einklang stehenden Voraussetzungen gelten, dass 1. weder eine erhebliche Assoziation der Proteinteilchen untereinander noch eine Vereinigung der reinen hydrophoben Teilchen erfolgt und dass 2. die Feldwirkung der letzteren zufolge ihrer aufladenden Gruppen die Anlagerung des zwitterionischen Proteins mittels seiner entsprechenden, bis zu einem gewissen Grade polarisierbaren Gruppen bedingt. Dabei findet eine mehr oder weniger weitgehende Neutralisation der Ladungen statt, während zugleich die dem Hydrophoben gleichgeladenen Gruppen des Proteins möglichst aus dem Felde des ersteren gedrängt werden. Nicht mehr zum Bestande eines inneren Salzes gehörend, verlieren dieselben

als schwache Säuren bzw. Basen durch Dissoziationsrückgang praktisch zur Gänze oder zu einem sehr erheblichen Anteil die freie Restladung. Gleichzeitig werden damit die komplexe Verkuppelung solcher Gruppen z. B. NH_2 an die Schwermetallatome des Hydrophoben oder gewisse im Sinne einer Denaturierung wirksame intramolekulare Umlagerungen im Protein begünstigt.

Die wahrscheinlichste primäre Grundform des Assoziates wird in diesem Gebiete das Doppelteilchen aus einem Hydrophoben und einem Eiweissteilchen sein. Diese Doppelteilchen werden teils aus sterischen Gründen, teils infolge ihrer verminderten Ladungen geringere anziehende Feldwirkungen ausüben, und auftreffende Protein- teilchen schwerer festhalten. Begünstigt und am beständigsten wird jedoch unter den möglichen Kombinationen der Aufbau von Quadru- pol-artigen und höheren Assoziaten aus den Doppelteilchen sein, in welchen der hydrophobe Teil jedes Partners auch mit dem Protein- stück des anderen reagiert hat, wobei sich die anziehenden Wirkungen summieren werden (Fig. 2). Diese Art der Bildung höherer Assoziat- e gibt den Typus der alternativen Aggregation (*Pauli*). Ein Hin- weis darauf, dass es zunächst ein unteres Übergangsgebiet zur nukle- aren Aggregation (und der Sensibilisierbarkeit durch unterschwellige Koagulatoren) geben wird, findet sich bereits oben. (Vgl. dazu Fig. 1c.)

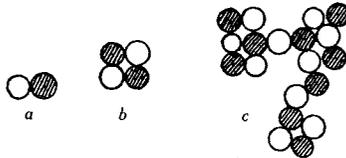


Fig. 2.

Alternative Aggregation,

- a Elementares Doppelteilchen,
- b Kompaktes quadrupolartiges Aggregat,
- c Lockeraggregat aus kompakten Assoziaten.

Sobald durch Bildung der ersten alternativen Assoziat- e sämtliche vorhandenen Doppelteilchen praktisch verbraucht sind, stehen für eine weitere Aggregation ausschliesslich grössere Teilchen zur Verfügung. Diese werden jedoch teils infolge der Abnahme der Ladung und Feldwirkung, teils infolge sterischer Behinderung nurmehr mit- tels kleiner Berührungsstellen untereinander reagieren können. Der ersten dicht gepackten oder kompakten Assoziatbildung wird also die Entstehung von grösseren Lockeraggregaten folgen, welche gemäss den eingeschlossenen Zwischenräumen ein grösseres Gesamt- volumen, zugleich aber eine leichtere Durchdring- und Zerteilbarkeit aufweisen werden. Diese wesentlichen Verschiedenheiten in der Aggre- gatbildung kommen auch in den weiter unten angeführten Reversi- bilitätsversuchen zum Ausdruck.

Dem Schwellenwert der völligen Flockung folgt nun mit steigendem Eiweissgehalt ein weiter Bereich vollständiger Koagulation des Hydrophoben, in welchem das Koagel zunächst proteinarm bleibt, um in den höchsten Eiweisskonzentrationen eine, wenn auch sehr mässige Zunahme des Eiweissgehaltes erkennen zu lassen.

Diese Zunahme der Flocken an Protein wird unmittelbar erkennbar bei der Goldsol-flockung durch die Albumine, die in 8×10^{-4} — $2,5 \times 10^{-2}\%$ reinstem Serumalbumin vollständig und blau ist, in höheren Eiweisskonzentrationen ebenso vollständig ist, aber rot bleibt (Tab. III). Im Sinne der angeführten Erklärung *Zsigmondy's* für den Farbumschlag beim Übergang von trocknender (blau) zu wieder quellender (rot), goldsolhaltiger Gelatine würde es sich in unserem Falle gleichfalls um das Aneinander- oder Auseinanderrücken der Goldsolteilchen im Albuminkoagel handeln. Die Beobachtung an unseren reinsten Albuminen spricht jedoch gegen eine — im Anschluss an Untersuchungen *E. Hatschek's*¹⁾ über Komplexsalze, die unter Dehydratation in Gelatine von 30,4—34% einen Umbau mit Farbumschlag erfahren — von *F. Eirich*²⁾ erörterte, analoge Erklärungsmöglichkeit für den Goldsol-Gelatineversuch. Denn bei den Albuminen besteht in diesem Verdünnungsbereich kein Anlass zur Annahme dehydratisierender Effekte, zumal der Umschlag in die rote Koagelfarbe gerade in dem höheren Eiweissgehalt auftritt. Der Umstand, dass der Farbumschlag der Goldsol-flockungen bei den Albuminen in niederen Eiweisskonzentrationen, nämlich der erste in Blau um $1 \times 10^{-4}\%$ und in höheren in Rot bei 0,025—0,05% erfolgt, macht diese Versuche in mancher Hinsicht eindeutiger als die Versuche in der ausserordentlich hochprozentigen Gelatine beim Trocknen und Quellen. Wohl handelt es sich in beiden Fällen offenbar um Aneinander- und Auseinanderrücken der mit Protein verbundenen Goldteilchen. Allein es besteht auch ein gewisser Unterschied im Mechanismus, indem bei der quellenden Gelatine durch den Wassereintritt neben einer geringen Desassoziaton vor allem eine Vergrösserung der Proteinanteile durch Hydratation erfolgt, während beim steigenden Albumingehalt durch Einlagerung von weiteren Eiweisssteilchen, bei praktisch konstanter Hydratation derselben, die Abstände der Goldteilchen im Assoziat bis zum Rotumschlag vergrössert werden.

Die statistische Bevorzugung des alternativen Aggregationstypus macht uns auch verständlich, dass die Flockung bis in sehr hohe Eiweisskonzentration, von dieser unabhängig, fortbesteht. Die Kolloidmischung verhält sich in diesem weiten Bereich wechselnder Zusammensetzung so, als ob hier eine annähernd konstante Grösse — das wäre in unserem Falle die Zahl der hydrophoben Teilchen, die den Sitz der einsinnigen elektrostatischen Kräfte darstellen — für den Vorgang massgebend bleibt. Ein bis zur sterischen Behinderung der Flockung ausreichende Überschusseffekt wird beim Serumalbumin im untersuchten Bereiche³⁾ nicht bemerkbar. Durchaus entspricht es ferner dem Bilde der alternativen Aggregation, dass hier ein flockungshemmender Effekt auch nicht durch nachträglichen Zusatz des Eiweissüberschusses hervorgerufen werden kann.

¹⁾ *E. Hatschek*, *Faraday* **32**, 787 (1936).

²⁾ *F. Eirich* und *H. Mark*, *Erg. d. Naturw.* **15**, 1 (1936).

³⁾ Bei einer genügend starken Herabsetzung der Konzentration des Hydrophoben und relativ hohem Proteingehalt wird jedoch schliesslich eine beträchtliche räumliche und zeitliche Hemmung der Flockung zu erwarten sein. Verdünnungen des Kongoblausols auf $\frac{1}{4}$ des Stammsols (bis $8 \times 10^{-4}\%$) liessen bis 1—5% Serumalbumin noch keine Abnahme der Koagulation erkennen. (*Pauli* und *P. Szarvas*, erscheint demnächst.)

VI.

Weitere Anhaltspunkte für den Aufbau unserer Kolloid-Kolloid-Flockungen mit Seralbumin liefert die Prüfung ihrer Reversibilität beim nachträglichen Neutralsalzzusatz im Gebiet der Schutzwirkung.

Anschliessend folgen als Beispiel Versuche am reinsten $\text{FeO} \cdot \text{OH}$ - und As_2S_3 -Sol und zwar mit den Zeichen (a) bei gleichzeitigem Zusatz von Salz+ Eiweiss (Schutzwirkung), (b) bei Zugabe des Salzes zur KK-Flockung nach 5 Minuten und (c) nach 18 Stunden. In der Tabelle V sind, wie stets, Sole und Elektrolyte in der Endkonzentration angegeben. Unter 0,0 ist die reine KK-Flockung angeführt.

Tabelle V.

Zeitliche Salz-Reversibilität der KK-Flockung mit Serumalbumin.

$\text{FeO} \cdot \text{OH}$ 0,02% + Seralb. 0,5%				As_2S_3 0,0275% + Seralb. 0,5%		
n. NaCl	0,0	0,05	0,5	0,0	0,05	0,5
a	++ ++	±	±	++ ++	(+)	±
b	++ ++	±	±	++ ++	(+)	±
c	++ ++	±±	±	++ ++	++ +	++ +
n. Na_2SO_4				0,0		
a	++ ++	±	±	++ ++	+ -	±
b	++ ++	±	+ -	++ ++	+	+
c	++ ++	±±	±	++ ++	++ +	++ +
$\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$				0,0		
a	++ ++	(+ -)	+ -	++ ++	-	-
b	++ ++	(+ -)	(±)	++ ++	±	±
c	++ ++	+ -	+ -	++ ++	++	++

Die Versuche zeigen, dass bei der Kombination $\text{FeO} \cdot \text{OH}$ -Sol + Seralbumin durch nachträglichen Neutralsalzzusatz eine sehr ausgiebige Rückbildung der vollständigen Flockung bis zu sehr feinen stabilen Trübungen erfolgt, welche noch bei Zusatz nach 18 Stunden den Zerteilungszustand von Eiweiss + Salz (a) erreichen kann. Beim As_2S_3 -Sol ist die nachträgliche Reversibilität weit geringer und bei Salzzusatz zur KK-Flockung nach 18 Stunden (c) nur noch angedeutet. Beim Übergang von 0,01-n. zu 0,1-n. Salz steigt der zerteilende Effekt nicht merklich oder nur sehr wenig an.

Dass der quantitative Unterschied der Reversibilität bei diesen Hydrophoben nicht einfach deren verschiedenen Ladungsvorzeichen zuzuschreiben ist, lehrt die grosse Reversibilität der Flockung des negativen Kongoblausols mit Seralbumin durch Salzzusatz¹⁾.

¹⁾ Pauli und L. Singer, Bioch. Z. 244, 76 (1932).

Die Beobachtungen enthalten noch einen beachtenswerten Hinweis betreffend den Aufbau der flockenden Aggregate. Schon die Tatsache, dass die Auflösung der einmal gebildeten KK-Flocken durch das Neutralsalz in der Regel nur bis zur feinsten Trübung geht, würde dafür sprechen, dass das Salz nur einen lockeren Anteil des Aggregates zu dispergieren vermag, nicht aber die dichter gepackten Bausteine desselben. Zwingend erscheint ferner der folgende Umstand. Wäre das Salz imstande, auch die elementaren Doppelteilchen der alternativen Aggregate aufzuspalten, so bliebe es unverständlich, weshalb dann die gänzlich abgetrennten Teilchen des Hydrophoben in der in Wirklichkeit schützenden hohen, den Schwellenwert weit übersteigenden Elektrolytkonzentration nicht vollständig koagulieren. Es muss also ein bestimmter Anteil des Proteins vom Hydrophoben nicht abtrennbar sein. Nach unserem Bilde vom Zustandekommen der alternativen Aggregation wäre in der Tat zu erwarten, dass die ersten Doppelteilchen und ihre niederen Kombinationen von stärkeren Kräften zusammengehalten werden und dass die einem solchen dicht gepackten Block verbleibenden geringen Ladungsreste nur lockere weitere Anlagerungen gestatten, welche ein leichtes Eindringen des Salzes ermöglichen.

Die primäre Bildung kompakter Aggregate als Vorstufe einer Lockeraggregation ist offenbar bei Kolloid-Kolloid-Reaktionen durchaus kein vereinzelter Fall. So beschreiben *Pauli* und *L. Hofmann*¹⁾ als erstes Stadium der Reaktion von reinstem Ovalbumin oder Serumalbumin mit Caseinat eine Abnahme der inneren Reibung entsprechend der Bildung „dichter Assoziate“, die sich dann unter Reibungserhöhung zu „Lockeraggregaten“ zusammenlegen. Ein anderes Beispiel dieser Art geben dieselben für die Hitzedenaturierung von verdünnten Edestinatlösungen, welche mit einem Abfall der Viskosität verbunden ist, an dessen Stelle jedoch in höheren Konzentrationen bei der Bildung von Lockeraggregaten (bezogen auf den gleichen Proteingehalt) eine starke Reibungserhöhung tritt. Auch die Beobachtung von *A. Fernau* und *Pauli*²⁾, dass das elektropositive Ceroxydsol bei Radiumbestrahlung im Viskosimeter nach einer Vorstufe von Reibungsabnahme allmählich eine starke Viskositätserhöhung und schliesslich eine makroskopische Koagulation erfährt, dürfte gleichfalls ein hierher gehöriges Beispiel darstellen, welches sich durch den langsamen Koagulationsablauf als besonders günstiges Objekt erweist.

Bei der Zerteilung der KK-Flockung wären für das Neutralsalz zwei Angriffsmöglichkeiten gegeben: 1. am Hydrophoben, 2. am Protein. Die hier in Betracht kommenden höheren Salzkonzentrationen könnten den hydrophoben Oberflächenanteil der Assoziate lediglich entladen, also dessen Beitrag zur Teilchenstabilität zur Gänze aufheben. Würde das Neutralsalz infolge der Entladung des Hydrophoben die Lockeraggregate aufteilen, dann müsste dies unabhängig vom Protein geschehen. Das Gegenteil ist jedoch der Fall. So erwies sich nur die Flockung Serumalbumin + Kongoblau, nicht aber die von Ovalbumin + Kongoblau durch Salz zerteilbar. Ähnlich dem letz-

¹⁾ *Pauli* und *L. Hofmann*, Koll. Beih. **42**, 34 (1935).

²⁾ *A. Fernau* und *Pauli*, Koll. Z. **20**, 20 (1917).

teren verhält sich auch Ovalbumin + As_2S_3 -Sol in bezug auf die zeitliche Rückbildungsfähigkeit der KK-Flockung, während Ovalbumin und $\text{FeO} \cdot \text{OH}$ -Sol eine ausgezeichnete Salzreversibilität besitzt (s. u.). Diese und andere anzuführende Erfahrungen sprechen dafür, dass der Zustand des Proteins im Aggregat verschieden sein kann und die Angriffsmöglichkeit des Neutralsalzes wesentlich bestimmt. In der Tat bildet schon das Bestehen einer höheren Proteinkonzentration und damit eines genügenden Proteinanteiles an der Aggregatoberfläche eine unerlässliche Voraussetzung für den stabilisierenden Salzeffekt, sowohl bei der simultanen Verhinderung (Schutzwirkung im engeren Sinne), wie auch bei der nachträglichen Zerteilung der KK-Flockung.

Das Salz kann in einem ausgedehnten Konzentrationsbereich¹⁾ die verbliebene Proteinoberfläche durch Vermehrung oder Herstellung einer freien Aufladung, sowie durch Begünstigung des zwitterionischen Zustandes hydratisieren und damit die nach Aufteilung der Lockeraggregate verbleibenden kompakten Assoziate stabilisieren. In diesem Sinne sprechen die später beschriebenen Wanderungen im elektrischen Feld. Irreversible Proteinänderungen, zu denen im Unterschied vom Serumalbumin gerade das Ovalbumin besonders neigt, würden bei der Aggregation auch als Aufhebung der zerteilenden und stabilisierenden Neutralsalzwirkung in Erscheinung treten.

B. Ovalbumin.

VII.

Die folgende Tabelle VI bringt zunächst eine Reihe von Beispielen für die KK-Reaktion des Ovalbumins mit einer Anzahl negativer und positiver Kolloide.

Zum Unterschied vom Serumalbumin findet sich hier in den entsprechenden höheren Konzentrationen ein hemmender Überschuss-effekt des Ovalbumins auf die Flockung einer Reihe von negativen und positiven Hydrophoben, der in einigen Fällen bis zur vollständigen Aufhebung jeder Niederschlagsbildung gehen kann. Diese Hemmung zeigt sich bei Gold- und Kongoblausol, ferner bei Eisenhydroxyd- und Nachtblausol. Sie fehlt nur bei As_2S_3 - und Sb_2S_3 -Sol, die verglichen mit den anderen Solen mit einer ca. zehnmal so grossen Gesamtladung geprüft und nicht verdünnt worden waren. Ein nachträglicher Zusatz eines Ovalbuminüberschusses erwies sich jedoch auch in jenen Mengenverhältnissen unwirksam, die bei einmaliger Zugabe eine Flockungshemmung bewirken.

In niederen, unterschwelligen Ovalbuminkonzentrationen finden sich, wie vor allem wiederum das Goldsol unmittelbar erkennen lässt, die völlig gleichen Anzeichen nuklearer Aggregation wie beim Serumalbumin, also die Bildung stabiler blauer Sole zwischen

¹⁾ In jenen höheren Salzkonzentrationen, in welchen es zur Fällung des reinen Proteins kommt, bleibt auch ein stabilisierender oder dispergierender Effekt aus.

5×10^{-5} — 1×10^{-4} % Ovalbumin, die jedoch stark gegen Elektrolyt oder Einleiten von Kohlendioxyd sensibilisiert sind. In den höheren Proteinkonzentrationen von $1,25 \times 10^{-2}$ bis 5×10^{-1} % tritt an Stelle der typischen blauen eine rote, gleichfalls vollständige KK-Flockung auf. In diesem Farbumschlag gegen Rot kommt, wie beim Seralbumin näher ausgeführt wurde, eine gewisse Auseinanderdrängung der angelagerten Goldteilchen zum Ausdruck. In noch höherem Ovalbumingehalt (1,5 und 2%) erscheint dann die Goldflockung zu einer zarten roten Trübung zurückgebildet. In dem gleichen hohen Konzentrationsbereich des Ovalbumins findet sich auch am FeO·OH- und Kongoblausol der hemmende Überschusseffekt. Diese Hemmung war beträchtlicher beim Nachtblausol, dessen Gesamtladung etwa der des Gold- oder Kongoblausols entsprach und das wie das letztere ab 1×10^{-3} % Ovalbumin vollständig flockte. Hier wurde bereits mit 0,1% Ovalbumin die Hemmungszone erreicht und die lilarote Mischung klar und tiefblau. Noch stärker ausgeprägt wie beim Ovalbumin fand sich die hemmende Überschusswirkung beim reinsten Leimglutin. Für das Kongoblausol ($3,15 \times 10^{-3}$ %) ermittelte sich ein Flockungsbereich zwischen 3×10^{-4} % bis $7,7 \times 10^{-3}$ % Leimglutin. Oberhalb sowie unterhalb dieses Gebietes klare blaue Sole, von denen die letzteren durch ihre Sensibilisierung die nukleare Aggregation anzeigten und unter 3×10^{-4} % bis herab zu 2×10^{-5} % Glutiningehalt mit Einleiten von Kohlendioxyd vollständig flockten (*Pauli und E. Weiss, l. c.*).

Tabelle VI.

Hydrophobes Sol % · 10 ³ Ovalbumin %	Kongoblau 6,4	Kongoblau 3,2	Kongoblau 1,6	Kongoblau 0,8	As ₂ S ₃ 27,5	Gold 5,5	FeO·OH 19,6	Nachtblau 5,0
2,0		+	-	-	++			
1,5	++	++	±	-	++		±	
1,0	++	++	++	+	++	++ r	++	-
0,5	+	++	++	++	++	++ r	++	-
0,25	+	+	++	++	±	++ r	++	-
0,1	±	±	±	+	+-	++ r	++	+
0,05	±	±	±	±	+-	++ r	++	++
0,025	-	-	-	-	(+-)	++ r	++	++
0,01	-	-	-	-	-	++ bl	++	++
5×10^{-3}	-	-	-	-	-	++ bl	++	++
$2,5 \times 10^{-3}$	-	-	-	-	-	++ bl	+	++
$1,0 \times 10^{-4}$	-	-	-	-	-	++ bl	(±)	+
5×10^{-4}	-	-	-	-	-	+ bl	-	-
$2,5 \times 10^{-4}$	-	-	-	-	-	+ bl	-	-
1×10^{-4}	-	-	-	-	-	+ bl	-	-
5×10^{-5}	-	-	-	-	-	± bl	-	-
$2,5 \times 10^{-5}$	-	-	-	-	-	-	-	-

Für diese Flockungshemmungen im Proteinüberschuss kann nicht, wie schon ihr unter den gleichen Umständen beobachtetes, regelmässiges Ausbleiben bei Seralbumin anzeigt, die blosse räumliche Behinderung durch die bedeutende Überzahl der Proteinteilchen über die des Hydrophoben bestimmend sein. Wesentlich für die Wirksamkeit der Teilchenzusammenstösse wird hier vor allem die Haftfähigkeit weiterer Proteinteilchen an den ersten gebildeten Assoziaten.

Da für unseren Überschusseffekt die Variation des Proteins, z. B. Ersatz des Seralbumins durch Ovalbumin oder Leimglutin, und nicht die des Hydrophoben den Ausschlag gibt, wird es sich in erster Linie um die Anlagerung des Proteins an den Eiweissanteil des Assoziates handeln. Beim Leimglutin ist ein solches Verhalten durchaus zu erwarten, da für dasselbe eine starke Zunahme der Teilchenassoziation mit steigender Konzentration charakteristisch ist, die hier den mächtigen Anstieg der Viskosität bis zur festen Gallertbildung bedingt. Beim nativen Ovalbumin findet sich jedoch in unserem Konzentrationsbereich keine etwa durch den Gang des osmotischen Druckes angezeigte Teilchenassoziation. Hingegen wäre hier vor allem eine molekulare Veränderung durch seine Reaktion mit den Hydrophoben in Betracht zu ziehen, die es dann, ähnlich wie dies bei gewissen Denaturierungen festgestellt wurde¹⁾, zur Anlagerung von nativem Eiweiss geeignet macht. Für die Beurteilung dieser Möglichkeiten ergeben sich wertvolle Anhaltspunkte aus dem Studium der Schutzwirkung.

VIII.

Auch beim Ovalbumin kommt die Schutzwirkung auf den Hydrophoben durch die Kombination von Protein mit Neutralsalz²⁾ zustande und ist dann sowohl gegen die reine KK-Flockung, als auch gegen die Elektrolyt-Koagulation gerichtet. Sie tritt für $\text{FeO} \cdot \text{OH}$ -ebenso wie für As_2S_3 -Sol ansteigend von der Ovalbuminkonzentration 0,025 % auf. Der Sensibilisierungsbereich beginnt dagegen bei $2,5 \times 10^{-4}$ % Ovalbumin und liegt also ein wenig höher als bei Seralbumin (5×10^{-5} %). Alle Beobachtungen sind wiederum aus dem Bilde einer nuklearen bzw. alternativen Aggregation der beiden Kolloidtypen durchaus verständlich. Die unterschiedlichen Schwellenwerte der Sensibilisierung von Ovalbumin und Seralbumin wären schon aus den Grössenunterschieden ihrer Teilchen zu verstehen, da das etwas über ein Drittel grössere Seralbuminteilchen [Mol.-Gew. (ohne Hydratation) 70 000 gegen 45 000 von Ovalbumin] gröbere und damit empfindlichere, nukleare Aggregate mit hydrophober Oberfläche bilden wird.

Einen gewissen Einblick in die Veränderungen des Eiweisses infolge seiner Assoziation mit den Hydrophoben gewährt wiederum die Prüfung der Reversibilität der Kolloid-Proteinflockung mittels nachträglichem Salzzusatz. In der folgenden Tabelle VII bedeutet,

¹⁾ Pauli und J. Weissbrod, Koll. Beih. **42**, 34 (1935). Diese fanden schon eine Beimengung von $\frac{1}{1000}$ % denaturierten Ovalbumins im Sinne einer Erniedrigung der Hitzegerinnungstemperatur von Seralbumin und Ovalbumin wirksam als Keime einer Assoziatbildung. In 0,1 % beigemischt, kann es eine Senkung der Koagulationstemperatur um 25° C bewirken.

²⁾ Aus räumlichen Gründen wird von der Wiedergabe von Tabellen abgesehen.

wie in der vorangegangenen Tabelle V, das Zeichen (a) den gleichzeitigen Zusatz von Ovalbumin und Salz, (b) den nachträglichen Salzzusatz nach 5 Minuten und (c) 18 Stunden nach der Kolloid-Proteinmischung.

Tabelle VII.

FeO · OH-Sol (0,02%) + Ovalb. (0,25%)				As ₂ S ₃ -Sol (0,0275%) + Ovalb. (1%)		
n. NaCl	0,0	5 × 10 ⁻¹	5 × 10 ⁻²	0,0	5 × 10 ⁻¹	5 × 10 ⁻²
a	++ ++	+	±±	+ ++	±	±±
b	++ ++	±	±	+ ++	±±	+
c	++ ++	±±	±±	+ ++	+ ++	+ ++
n. Na ₂ SO ₄	0,0	1 × 10 ⁻¹	1 × 10 ⁻²	0,0	1 × 10 ⁻¹	1 × 10 ⁻²
a	++ ++	++	+	+ ++	+ -	±
b	++ ++	±	±	+ ++	±±	++
c	++ ++	±±	±±	+ ++	+ ++	+ ++
n. K ₄ [Fe(CN) ₆]	0,0	1 × 10 ⁻¹	1 × 10 ⁻²	0,0	1 × 10 ⁻¹	1 × 10 ⁻²
a	++ ++	+ -	+ -	+ ++	(+ -)	-
b	++ ++	±	±	+ ++	±	±±
c	++ ++	±±	±±	+ ++	+ ++	+ ++

In allen Versuchen handelt es sich um Eiweiss- und Salzkonzentrationen, von denen jede für sich allein den Hydrophoben vollständig flokkt, so dass die bei der Kombination Protein + Salz auftretende Schutzwirkung stets gegen beiderlei Koagulation gerichtet ist. Wie beim Serumalbumin erscheint auch beim Ovalbumin die KK-Flockung des positiven FeO · OH-Sols durch nachträglich (nach 18 Stunden) erfolgenden Salzzusatz reversibel bis zur feinsten Zerteilung und damit nicht verschieden von der Schutzwirkung in der primären Salz-Protein-Mischung. Beim As₂S₃-Sol dagegen ist das Neutralsalz schon nach 5 Minuten merklich weniger und nach 18 Stunden nicht mehr wirksam. Hier ist somit in Übereinstimmung mit dem Verhalten des Serumalbumins völlige Irreversibilität der KK-Aggregate eingetreten, während bei simultaner Zugabe von Salz + Eiweiss ein weitgehender Schutz gegen die Flockung besteht. Es vermag also das Salz von vorneherein das Zustandekommen einer irreversiblen Proteinänderung zu verhindern, während es die bei der Reaktion mit dem negativen Hy-

drophoben einmal erfolgte, intramolekulare Änderung nicht mehr rückbilden kann.

Bezüglich des Mechanismus der Zerteilung der KK-Flockung durch Salzzusatz gelten auch beim Ovalbumin die früheren Betrachtungen über primäre, kompakte Assoziate und deren Zusammentreten zu durchreagierenden, größeren Lockeraggregaten.

Eine besondere Frage bildet der Unterschied in der Reversibilität der Albuminflockungen mit $\text{FeO} \cdot \text{OH}$ -Sol einerseits und dem As_2S_3 -Sol andererseits.

Für das Verhalten unseres positiven Hydrophoben muss man zunächst berücksichtigen, dass die interionische Wechselwirkung mit den seitenständigen Carboxylgruppen des Proteins erfolgt. Man darf jedoch weiter annehmen, dass jedes Proteinteilchen schon aus topischen Gründen nur mit einem Teil der aufladenden Gruppen des Hydrophoben (und umgekehrt) reagieren kann. Dann könnten am Albumin stets genügend Carboxylgruppen übrigbleiben.

Die verfügbaren, im Assoziat Ovalbumin + $\text{FeO} \cdot \text{OH}$ -Sol freibleibenden Carboxylgruppen bilden nun in der Tat den Angriffsort für die durch Neutralsalze hervorgerufene Reversibilität der Aggregation. Der Beweis dafür hat sich mittels elektrophoretischer Bestimmungen eindeutig erbringen lassen. Wie die unter „elektrophoretische Versuche“ folgenden Beispiele lehren, werden nämlich Assoziate, die für sich allein infolge der Anlagerung des Hydrophoben einen positiven Ladungsrest durch ihre kathodische Überführung anzeigen, mittels Zugabe von 1,1-wertigem Neutralsalz (z. B. Natriumchlorid) elektronegativ, kenntlich an einer rein anodischen Wanderung. Eine solche kommt sogar noch zustande, wenn ein entsprechendes Salz mit zweiwertigem Kation (Magnesiumchlorid statt Natriumchlorid) verwendet wird.

Dieser Neutralsalzeffekt kann hier mit dem gleichen Ergebnis als eine Erhöhung der Dissoziationskonstante der $\text{R} \cdot \text{COOH}$ -Gruppen im Sinne von *Güntelberg* und *Schiödt*¹⁾ oder als eine Art von Zwischenstufe zwischen dem einen Grenzfall, nämlich der Neutralisation unter Entstehung von vollständig dissoziierten $\text{R} \cdot \text{COO} \cdot \text{Na}$, und dem anderen der Bildung von undissoziiertem $\text{R} \cdot \text{COOH}$ bei sinkendem p_{H} (z. B. durch Salzsäure-Zugabe) beschrieben werden. Zu dem von *Güntelberg* und *Schiödt* in ihrer grundlegenden Arbeit untersuchten Salzeinfluss auf die zwitterionische, molekular-disperse Aminosulfosäure Methylorange, sowie dem später analog behandelten kolloiden, zwitterionischen Kongoblau²⁾ kommt nun das angelagerte Protein. Beim Kongoblau tritt die von den Dissoziationskonstanten abhängige, konstitutive Beeinflussung seitens des Neutralsalzes zugleich als Verschiebung des Farbumschlages in die Erscheinung, während beim Protein eine intramolekulare, unter Umständen selbst irreversible Umlagerung gehemmt wird, was als Schutz oder als Flockungsunterdrückung sichtbar wird.

Von besonderem Interesse ist der Fall der Reversibilität bzw. der Schutzwirkung durch Lanthannitrat (z. B. 1×10^{-3} -n.) gegen-

¹⁾ *E. Güntelberg* und *E. Schiödt*, Z. physikal. Ch. **135**, 393 (1928).

²⁾ *Pauli* und *L. Singer*, Bioch. Z. **244**, 76 (1932).

über der vollständigen Flockung von Ovalbumin (z. B. 0,5 %) + + FeO · OH-Sol. Hier wird der Effekt durch eine positive Aufladung des Proteins im Assoziat erreicht, wie der elektrophoretische Überführungsversuch (s. u.) schön erkennen lässt. Auch dieser Fall ist jedoch, wie der obige als Reaktion mit den freigebliebenen Carboxylgruppen des Eiweissanteiles im Assoziat und zwar durch Anlagerung und teilweise Inaktivierung von La⁺⁺⁺ aufzufassen.

Dabei soll es noch offen bleiben, wie weit im einzelnen an der Entstehung der positiven Überschussladung am Protein die folgenden Umstände beteiligt sind: 1. das Gegenüberstehen des 3-wertigen La⁺⁺⁺ und der einwertigen, in grösseren Abständen verteilten Carboxylgruppen, 2. komplexe Verknüpfung des Metallions mit RNH₂-Gruppen, 3. ein am Protein verbleibender Überschuss von Ammoniumgruppen mit NO₃ als Gegenion. Erst in höherer Konzentration (über 0,25-n.) wirkt das Lanthansalz für sich allein eiweissfällend und begrenzt damit das eigene Schutzgebiet.

An den Reversibilitätseffekten durch Neutralsalz tritt die Bedeutung des partiellen Charakters der Protein-Kolloid-Reaktion besonders hervor, welche bei der alternativen Aggregation einen genügenden Anteil der Oberfläche dem Eiweiss freilässt. In dieser sterisch bedingten Unvollständigkeit erscheint der Unterschied begründet gegenüber der Eiweissreaktion etwa mit einem molekulardispersen Schwermetallsalz, bei der die Überzahl oder selbst sämtliche der bestimmbareren Carboxylgruppen der Eiweissmolekel unter irreversibler, von Neutralsalz unbeeinflussbarer intramolekularer Änderung desselben reagieren.

Ganz anders liegen die Verhältnisse bei der Reaktion von Ovalbumin mit negativen Hydrophoben. Wo hier nicht von vorneherein, wie etwa beim Kongoblausol, die Hemmung der reinen KK-Flockung durch Salz (Schutzwirkung) ausbleibt, dort stellt sich wie beim As₂S₃-Sol nach Flockung völlige Irreversibilität gegen nachträgliche Salzzugabe ein.

Dass irreversible Veränderungen beim Ovalbumin viel vollständiger auftreten als beim Serumalbumin, das zeigt sich auch auf dem ganzen Gebiet der Alkohol- und Hitzeerinnung, der Säureflockung und der Schwermetallsalzfällungen (*Pauli* und *R. Weiss*¹⁾). Die Reaktion mit den aufladenden, ionogenen Komplexen des negativen Hydrophoben erfolgt über die den Diaminosäuren entstammenden, positiven Gruppen des Proteins, deren längere und verschieblichere Seitenketten eine vollständigere Wechselwirkung begünstigen werden. Weiter ergibt sich für die grosse Variation der in Schutzwirkung und Reversibilität zum Ausdruck kommenden Reaktionsunterschiede mit wechselnden negativen Hydrophoben eine gewisse Analogie zu den Säurefällungen der Proteine. Für diese erscheint nämlich nicht in erster Reihe die Stärke der Säure und die H⁺-Aktivität, sondern vor allem der Bau des Säureanions und seine Inaktivierung an den positiven Gruppen ausschlaggebend. Es genügt, hier nur auf die Trichloressig-, Sulfosalicyl-, Phosphorwolfram-, Ferrocyanwasserstoffsäure u. a. zu verweisen, welche die stärkere Salz- oder Schwefelsäure an Fällungsvermögen weit übertreffen. Beim Kongoblausol handelt es sich um eine Naphthylaminsulfosäure, beim As₂S₃-Sol um ein Gleichgewicht zwischen Thioarsenit-, Thioarsenat- und Arsensäureionen²⁾ als aufladende anionische Gruppen.

¹⁾ *Pauli* und *R. Weiss*, *Bioch. Z.* **233**, 381 (1931).

²⁾ *Pauli* und *A. Laub*, *Koll. Z.* **78**, 295 (1937).

Auch hier besteht der wesentliche Unterschied, dass die Reaktion der molekulardispersen Säureanionen mit sämtlichen verfügbaren positiven Gruppen des Proteins vollständig erfolgt, während die Reaktion mit den aufladenden Komplexen der negativen Hydrophoben nur eine partielle sein kann.

IX.

Elektrophoretische Versuche: Diese wurden in zwei *Pauli-Landsteiner*'schen Apparaten mit Platin-Elektroden, in Cl-ionen-haltigen Lösungen mit einer Silber-Anode ausgeführt. Die Proben kamen eine Stunde nach ihrer Bereitung zur Messung. Als obere Schicht diente eine Eiweisslösung der gleichen Konzentration bzw. deren Mischung mit dem verwendeten Salz. Die Versuche sind nahe bei 20° C ausgeführt und für diese Temperatur korrigiert. Die Ablesung der scharfen Grenzschicht bot keine Schwierigkeit und Doppelbestimmungen konnten selbst auf 1% reproduziert werden. Die ständig kontrollierte Feldstärke betrug meist um 3 V/cm. Die Tabelle VIII enthält neben dem Wanderungssinn W, die Wanderungsgeschwindigkeit Wg in $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{sek.}^{-1}$ und den Flockungsgrad KKFl.

Tabelle VIII.

Mischung	KKFl	W	Wg × 10 ⁵
a) 1,5% Ovalb. + 0,02% FeO·OH . . .	±	kathod.	1,99
b) Wiederholung	±	kathod.	2,01
c) Dasselbe + 0,05-n. NaCl	+	anod.	5,55
d) 0,025% Ovalbumin + 0,02% FeO·OH . . .	++	anod.	2,84
e) 0,025% Ovalbumin + 0,02% FeO·OH + 0,05-n. NaCl	++	anod.	4,55
f) 0,0025% Ovalbumin + 0,02% FeO·OH . . .	(+)	schwach kathod.	—
g) 0,5% Ovalbumin + 0,02% FeO·OH + 0,001-n. La(NO ₃) ₃ . . .	+ -	kathod.	4,48
h) 0,5% Ovalbumin + 0,02% FeO·OH + 0,05-n. MgCl ₂	+	anod.	—

Unter den Ergebnissen sei nur hervorgehoben, dass 1,1-wertiges (NaCl-Reihe c, e) und selbst 2,1-wertiges (MgCl₂) Neutralsalz den Schutz unter negativer Aufladung, dagegen Lanthannitrat (wie auch Salzsäure) unter positiver Aufladung des Assoziates bewirkt.

Ferner ist die Wanderung der KK-Flockung ohne Salzzusatz bei $2,5 \times 10^{-3}\%$ Ovalbumin kathodisch, bei $2,5 \times 10^{-2}\%$ Ovalbumin anodisch und in 1,5% Ovalbumin kathodisch (näheres s. u.).

Ein $2,46 \times 10^{-3}$ -proz. Nachtblausol, das bei 0,01% Ovalbumin flockt, ist in 0,25-proz. Ovalbumin wieder klar zerteilt analog dem Verhalten von FeO·OH-Sol. In dieser Konzentration war auch seine Wanderung wie beim letzteren kathodisch.

Über die Wanderung hochgereinigter, wasserlöslicher Proteine im elektrischen Felde unter dem Einfluss von Neutralsalzen (ohne Puffer) liegen relativ wenige Angaben vor.

T. Ito und *Pauli*¹⁾ fanden, dass Ovalbumin und Seralbumin in den Alkalichloriden bis 0,2-n. stets anodisch wandern. In den Chloriden der Erdalkalimetalle und des Magnesiums tritt in 0,1-n. an Stelle der anodischen eine doppelsinnige Wanderung auf. Dagegen zeigt das gleichfalls anodisch wandernde Leimglutin schon in 0,1-n. Alkalichloriden doppelsinnige Überführung. In Erdalkalichloriden wird es bereits in über 1×10^{-3} -n. doppelsinnig und in über 4×10^{-3} -n. kathodisch wandernd.

Aus den elektrometrischen Bestimmungen von *Pauli* und Mitarbeitern²⁾ u. a. errechnet sich die maximale Bindung von Lauge und von Säure je g Protein und daraus die Relation der optimal verfügbaren sauren zu den basischen Gruppen für Ovalbumin 1,22, für Seralbumin 1,08, für Leimglutin 0,7. Diese Werte entsprechen durchaus dem elektrophoretischen Verhalten sowie dem noch zu erörternden mehr acidoiden Charakter des Ovalbumins gegenüber dem nahe neutralen des Seralbumins.

X.

Eine besondere Beachtung verdient schliesslich noch der eigentümliche Gang der Fällung des Ovalbumins mit dem $\text{FeO} \cdot \text{OH}$ -Sol, abhängig von der Eiweisskonzentration. Wie die Tabelle VI lehrt, zeigen die $\text{FeO} \cdot \text{OH}$ -Sole bei $1 \times 10^{-3}\%$ Ovalbumin einen Schwellenwert der Trübung, dem in $5 \times 10^{-3}\%$ ein erstes Flockungsmaximum folgt. Bei $2,5 \times 10^{-2}\%$ Ovalbumin tritt nun eine deutliche Flockungsabnahme auf, die jedoch bei 0,1% in eine neuerliche vollständige Flockung überleitet, welche dann ab 1% Ovalbumin stark zurückgeht und bei 1,5%, entsprechend dem schon erörterten hemmenden Überschusseffekt des Proteins, fast ganz verschwindet.

Bei dem viel dünneren Nachtblausol fällt fast das ganze Flockungsgebiet des Ovalbumins praktisch mit dem ersten Flockungsbereich beim $\text{FeO} \cdot \text{OH}$ -Sol zusammen, indem der erste Schwellenwert bei $5 \times 10^{-4}\%$ Eiweiss liegt und die Flockung bei $1 \times 10^{-2}\%$ abzunehmen beginnt, um bei Überschreiten von 0,1% zu verschwinden.

Für das Verständnis der eigenartigen Differenzierung im Verhalten von verdünntem und konzentrierterem Ovalbumin, das sich in einer Aufspaltung in zwei Flockungszonen beim positiven Eisenoxysol kundgibt, erwies sich eine schon früher festgestellte elektrochemisch-konstitutive Verschiedenheit der hochgereinigten, wasserlöslichen Proteine als bedeutungsvoll.

Die elektrochemische Analyse³⁾ des Ovalbumins lehrt nämlich, dass hier gegenüber dem überwiegend zwitterionisch-neutralen Seralbumin und Pseudoglobulin der acidoide Charakter stärker in den Vordergrund tritt. Dabei kommt es zu einer Protonverteilung des dissoziierten H⁺ über sämtliche anwesenden Eiweissmolekeln. Die so erfolgende Bildung von Zwitterionen mit negativer (A⁻) neben einer geringeren Anzahl von solchen mit positiver Überschussladung (A⁺) lässt sich auf verschiedenen, unabhängigen Wegen nachweisen. Die theoretische Behandlung führt zu dem experimentell verifizierten Ergebnis, dass in höheren Proteinkonzentrationen (über 1%) die Relation der neutralen polyvalenten Zwitterionen (·A⁺) zur molekularen Eiweisskonzentration m konstant wird. Dabei resultiert für 3% Seralbumin 84% neutrales ·A⁺ gegen 9% A⁺, für Ovalbumin⁴⁾ 41,5% ·A⁺ gegen 31% A⁺. Mit sinkendem Eiweissgehalt fällt in 0,55-proz. Ovalbumin der Anteil

¹⁾ *T. Ito* und *Pauli*, *Bioch. Z.* **213**, 95 (1929).

²⁾ *Pauli* und *Em. Valko*, *Kolloidchemie d. Eiweisskörper*, Dresden u. Leipzig 1933.

³⁾ *Pauli*, *Koll. Z.* **40**, 185 (1926); **53**, 51 (1930); *D. v. Klobusitzky* und *Pauli*, *Bioch. Z.* **260**, 201 (1933).

⁴⁾ Für das richtig gestellte Mol.-Gew. = 45000 (ohne Hydratation) eingesetzt. (*G. S. Adair* und *M. E. Adair*, *Proc. R. Soc. [B]* **120**, 422 (1936); *Faraday* **36**, 23 (1940)).

'A' auf 23%, während A' auf 45% ansteigt. Bei weiterer Abnahme des Ovalbumingehaltes auf $1/20$ — $1/100$ des letztgenannten, somit im ersten Flockungsbereich für FeO·OH-Sol, besteht die Eiweisslösung praktisch fast zur Gänze aus Teilchen mit negativer Überschussladung, da die H⁺-Ionen-Aktivität nur um $1/3$ — $2/3$ zurückgeht. So wird das Ovalbumin zu einem wohl zwitterionischen, jedoch seinen Überschussladungen nach zugleich acidoiden Sol, zu welcher reinen Type es damit einen äusserst interessanten Übergang bildet. Im allgemeinen geben entgegengesetzte, einsinnig geladene Kolloide ein Flockungsoptimum im Gebiete des praktischen Ladungsausgleiches und bei Überschuss des einen oder anderen Kolloides stabile Assoziate mit der Ladung des überwiegenden Kolloidanteiles.

In den niedrigen Konzentrationen zeigt nun in der Tat das Ovalbumin am Beginne des ersten Flockungsbereiches eine kathodische, in der Zone der ersten Flockungsabnahme des FeO·OH-Soles (bei 0,025%), jedoch eine anodische Wanderung, also negative Ladung der Assoziate, wie die angeführten elektrophoretischen Versuche lehren, ein Hinweis darauf, dass sich das Ovalbumin hier ähnlich einem aus einsinnig negativen Teilchen bestehenden Kolloid, wie etwa acidoides Gummi arabicum¹⁾ (G. a.) gegen FeO·OH- oder Nachtblausol, verhält. Bei Reaktion der positiven Hydrophoben mit neutralzwitterionischen Teilchen kommt es hingegen zu kathodischer Wanderung, weil die Restladung des Assoziates elektropositiv wird. Das ist auch in den hohen Ovalbuminkonzentrationen (1,5%) der Fall.

Man kann auch den Versuch machen, das niedrig konzentrierte Ovalbumin im ersten Flockungsgebiet mit FeO·OH-Sol seiner negativen Überschussladungen zu entledigen und damit den ausgeprägt zwitterionischen Charakter herzustellen. Das gelingt in der Tat leicht mit entsprechenden, sehr kleinen Mengen von Salzsäure oder Lanthannitrate, welche das Protein elektropositivieren. Wie die folgende Tabelle IX zeigt, wird von $2,5 \times 10^{-5}$ -n. HCl, bzw. 1×10^{-4} -n. La(NO₃)₃ die Aufspaltung in zwei Flockungsgebiete mit FeO·OH-Sol aufgehoben und ein einheitliches mit einem einzigen optimalen Bereich gewonnen. Durch die positive Aufladung wird zugleich das Auftreten des Überschusseffektes erwartungsgemäss begünstigt. Der Ausfall dieses Versuches entspricht ebenso wie das elektrophoretische Verhalten der Assoziate jenem Bilde der elektrochemischen Konstitution verdünnter Ovalbuminlösungen, wie es auf anderen Wegen in vorausgegangenen Arbeiten gewonnen wurde.

Tabelle IX.
Ovalbumin+FeO·OH-Sol.

% Ovalbumin Zusatz	0,001	0,0025	0,005	0,01	0,025	0,05	0,1	0,25	0,5	1,0	1,5
0,0	(+ -)	(+)	++ +	++ +	++	++	++ ++	++ ++	+ ++	±±	±
1×10^{-4} -n. La(NO ₃) ₃	-	+ -	++	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	+ ++	±±	±	+ -
$2,5 \times 10^{-5}$ -n. HCl	-	-	±	++	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	±±	±	±

¹⁾ Pauli, E. Russer, G. Schneider, Bioch. Z. **269**, 158 (1934).

Abschliessend erscheint es nicht ohne Interesse, den Vergleich von Ovalbumin und dem rein acidoiden G. a. noch etwas weiter auszuführen, weil daran neben gewissen Übereinstimmungen auch die grundsätzlichen Unterschiede in ihren KK-Reaktionen deutlich zutage treten.

Die dem elektrochemischen Bau und der Schutzwirkung von hydrophilen Solen vom Typus des G. a. sowie der Stärkeabkömmlinge zu Grunde liegenden Gesetzmässigkeiten waren in einigen vorausgegangenen Untersuchungen¹⁾ an hochgereinigtem Material in den Hauptzügen aufgeklärt worden.

Zunächst gilt für unsere beiden Hydrophilen, acid. G. a. und Ovalbumin, die folgende auffallende Analogie in der Wechselwirkung mit verschiedenen Hydrophoben. Es gibt durch bzw. gegen Salz:

Keinen Schutz bei Kongoblausol²⁾,
Schwachen Schutz bei Goldsol³⁾,
Starken Schutz bei As_2S_3 - bzw. Sb_2S_3 -Sol,
Starken Schutz bei $\text{FeO} \cdot \text{OH}$ -Sol.

Im Gegensatz zum Ovalbumin finden sich jedoch beim acidoiden G. a., entsprechend dessen Mangel an positiven Gruppen, keine interionischen Wechselwirkungen mit negativen Hydrophoben. Demgemäss fehlt hier auch jeder Flockungseffekt, ebenso eine nukleare Aggregation mit der entsprechenden Sensibilisierung. Die Schutzwirkung kann dann nicht zugleich gegen eine KK-Flockung, sondern nur gegen die Elektrolyt-Koagulation des Hydrophoben gerichtet sein. Der eigenartige, in den Arbeiten dieser Reihe aufgedeckte Salzeffekt auf die Kolloidflockung mit dem zwitterionischen Protein existiert hier nicht. Er tritt auch nicht bei der typischen interionischen Flockungsreaktion des negativen G. a. (Uronsäure-Komplexe) mit dem positiven $\text{FeO} \cdot \text{OH}$ -Sol in Erscheinung. Dagegen gibt es hier erwartungsgemäss in niederen G. a.-Konzentrationen eine Sensibilisierung mit der zugehörigen nuklearen Aggregation.

Durch die Versuche (*Pauli* und *W. Kitaj* l. c.) wurde als Mechanismus der Schutzwirkung bei G. a. ebenso wie bei Dextrin die Reaktion der Monosenglieder dieser Kohlenhydrate in der ersten Koordinationssphäre mit den metallischen und halbmetallischen (As, Sb) Zentralatomen von Oberflächengruppen der negativen Hydrophoben sehr wahrscheinlich gemacht, die zu einer lockeren oder dichteren Filmbildung des hydrophilen Soles auf dem Hydrophoben führt.

Während es somit in niedrigen Proteinkonzentrationen zum Typus der nuklearen Aggregation und zur verstärkten Flockbarkeit kommt und der eigentliche Schutzeffekt im allgemeinen erst um die Grössenordnung $10^{-2}\%$ Protein aufzutreten beginnt, kann beim G. a.

¹⁾ Vgl. insbesondere *Pauli* und *W. Kitaj*, Koll. Z. **82**, 43 (1938); ferner *Pauli* und *H. Zentner*, *Faraday* **35**, 1234 (1939); *Pauli* und *J. und St. Szper*, ebenda **35**, 1316 (1939).

²⁾ *Pauli* und *L. Singer*, l. c.

³⁾ *K. Ogii* und *Pauli*, l. c.

und Dextrin durch das Ausbleiben jeder Sensibilisierung die Schutzwirkung bei negativen Hydrophoben schon in sehr geringen Konzentrationen einsetzen. Diese Schwellenwerte liegen um mehrere Grössenordnungen niedriger als beim Protein, z. B. bei $5 \times 10^{-5}\%$ gegen Kaliumchlorid und bei $5 \times 10^{-7}\%$ (!) gegen das schon in sehr kleiner Konzentration den negativen Hydrophoben fällende Lanthannitrat.

Beim positiven $\text{FeO} \cdot \text{OH}$ -Sol rückt hingegen, entsprechend der interionischen Wechselwirkung mit den negativen Pflanzengummi-Solen und dem Auftreten eines Sensibilisierungsgebietes, die Schwelle der Schutzwirkung in den gleichen, höheren Grössenbereich wie bei den Proteinen.

Dass bei den Kohlehydratsolen eine sekundäre irreversible Anlagerungsreaktion mit dem Hydrophoben nicht in Frage kommt, zum Unterschiede von den Proteinen, und dass andererseits bei den Proteinen, wenn auch nicht in der gleichen Dichte wie bei den höheren Polyosen, neutrale Gruppen wie $\cdot \text{R} \cdot \text{NH}_2$ für die Reaktion in der ersten Sphäre metallischer Zentralatome zur Verfügung stehen und eine Anlagerung vermitteln können, darauf soll hier nur kurz verwiesen sein.

Zusammenfassung: 1. Durch Untersuchung der Wechselwirkungen von reinstem As_2S_3 - und $\text{FeO} \cdot \text{OH}$ -Sol mit hochgereinigtem Serumalbumin und Ovalbumin wird in Übereinstimmung mit den vorangegangenen Arbeiten dieser Reihe an verschiedenen Kolloid-Paaren festgestellt, dass gereinigte Proteine mit reinsten negativen und positiven Hydrophoben stets flocken.

2. Diese Kolloid-Kolloid-Flockung (KKF) beruht auf der interionischen Reaktion der aufladenden ionogenen Komplexe des Hydrophoben mit den jeweiligen entgegengesetzten Gruppen des Eiweisses. Bestimmend ist hier der elektrische Feldeffekt des Hydrophoben und der polyvalent zwitterionische Charakter des Proteins. Bei der Reaktion mit dem Hydrophoben verliert der Proteinanteil der Aggregate unter Dissoziationsrückgang seine freie Ladung, seine Hydratation und Stabilität (Denaturierung).

3. Durch die Anwesenheit von Elektrolyt, wie z. B. 1,1-wertiges Neutralsalz, wird diese Veränderung am Protein verhindert. Damit kommt es erst zur Schutzwirkung durch das Protein, die dann sowohl gegen die KKF wie auch gegen die Elektrolytkoagulation des Hydrophoben gerichtet ist. Die bisherigen Ansichten auf diesem Gebiete waren eine Folge der ungenügenden Reinheit der verwendeten Kolloide.

4. Gereinigtes Serumalbumin zeigte zum Unterschied von Ovalbumin auch in 1000-fachem Überschuss über den Schwellenwert seiner vollständigen KKF keine Hemmung derselben.

5. Die Schutzwirkung bedarf höherer, für sich allein flockender Proteinkonzentrationen von über $10^{-3}\%$, in niederen kommt es hingegen zu einer verstärkten Flockbarkeit durch Elektrolytzusatz, zur Sensibilisierung, die schon in $10^{-4}\%$ Proteingehalt erkennbar wird.

6. Durch nachträglichen Salzzusatz kann die Flockung von $\text{FeO} \cdot \text{OH}$ -Sol + Serumalbumin in eine stabile feine Zerteilung rückgebildet werden, wie sie bei der Schutzwirkung in der Mischung primär entsteht. Beim As_2S_3 -Sol + Serumalbumin ist die nachträgliche Rückbildung durch Salzzusatz nur andeutungsweise vorhanden. Die gleichen Verhältnisse finden sich bei der zeitlichen Reversibilität dieser KK-Flockungen mit Ovalbumin.

7. Sämtliche Erscheinungen lassen sich im wesentlichen aus zweierlei Typen der Teilchenassoziation verstehen. In sehr niedrigen Konzentrationen des Proteins bilden dessen Teilchen überwiegend den Kern, die hydrophoben Teilchen die Oberfläche der teils durch den Gesamtladungsverlust, teils durch den größeren Dispersitätsgrad flockungsempfindlicheren oder sensibilisierten Assoziat. (Nukleare Aggregation.) In höherem Proteingehalt kommt es zu überwiegend alternativer Aggregation, wobei als primäre Bausteine vor allem Doppelteilchen von Hydrophoben und Protein funktionieren. Diese treten zunächst zu dicht gepackten, kompakten Assoziaten zusammen, welche nach Aufbrauch aller kleinen Bausteinen sich nur zu größeren Lockeraggregaten aneinander lagern können und welche infolge ihrer leichten Durchdringbarkeit mittels Salzzusatz zerteilbar sind. Voraussetzung für diese Stabilisierung ist, dass das Protein einen genügenden Anteil der Oberfläche des Aggregates bildet und dabei keine irreversible Denaturierung erfahren hat.

8. Beim Ovalbumin treten vor allem zwei charakteristische Abweichungen gegenüber dem Verhalten von Serumalbumin bei der KKF1 hervor: a) Ein hemmender Überschusseffekt auf die Flockung mit steigendem Eiweissgehalt, b) Bei der Reaktion mit $\text{FeO}\cdot\text{OH}$ -Sol das Auftreten zweier Flockungszonen mit je einem Flockungsoptimum, die eine in sehr niederer, die andere in höherer Ovalbuminkonzentration.

9. Die Besonderheiten des Ovalbumins erscheinen aus zwei konstitutiven Unterschieden desselben gegenüber dem Serumalbumin verständlich, einerseits aus seiner grösseren Neigung zu irreversiblen Änderungen, andererseits aus seinem stärker acidoiden Charakter, zufolge dessen in den niedersten Konzentrationen die meisten Teilchen eine negative Überschussladung tragen und damit eine zwitterionische Übergangsform zu rein negativen acidoiden Solen etwa vom Typus des Gummi arabicum darstellen. Irreversibel verändertes Ovalbumin lagert nach zahlreichen bisherigen Erfahrungen leicht natives Ovalbumin an. Darauf dürfte auch der flockungshemmende Überschusseffekt in den höheren Konzentrationen beruhen.

10. Elektrophoretische Versuche lehrten, dass Neutralsalzzugabe die Dissoziation der Carboxylgruppen des angelagerten Proteins, erkennbar an einer verstärkten negativen Aufladung der Assoziat, steigert. Sie zeigten ferner, dass im ersten Flockungsabfall des Ovalbumins mit $\text{FeO}\cdot\text{OH}$ -Sol entsprechend der negativen Aufladung des Ovalbumins, eine anodische Wanderung der Assoziat auftritt. Sie erwiesen weiter, dass die Schutzwirkung durch Lanthannitrat erwartungsgemäss auf einer elektropositiven Aufladung des Proteins durch das dreiwertige Metallion beruht. Schliesslich wurde durch minimale Zusätze von Salzsäure oder Lanthannitrat die negative Überschussladung verdünnten Ovalbumins beseitigt, worauf an Stelle der Aufspaltung des Flockungsgebietes mit $\text{FeO}\cdot\text{OH}$ in zwei Zonen eine einzige mit einem einzigen Flockungsmaximum trat.

11. Am Schlusse wird kurz neben einigen Beziehungen der Schutzwirkung der Proteine zu denen der höheren Kohlehydrate der grundsätzliche Unterschied im Mechanismus der Kolloid-Kolloid-Reaktion in beiden Fällen kurz erörtert.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.
