

Zusammenfassung.

Für nachfolgende Untersuchungen wurde eine Reihe formaldehydgehärteter Caseinpräparate hergestellt. Die Härtung geschah einerseits durch Einlegen in Formaldehydlösungen verschiedener Konzentration, andererseits durch Einwirkenlassen von Formaldehyddämpfen auf trockenes Casein („Gasgerbung“). In beiden Fällen wurde der zeitliche Verlauf der Formaldehydbindung über 30 Tage verfolgt. Dieselbe hat sich am Schlusse dieser Zeit stark verlangsamt, ein Endwert für die gebundene Formaldehydmenge ist jedoch noch nicht erreicht. Es wurde gefunden, dass der Formaldehydgehalt der Präparate zudem stark davon abhängt, wie lange dieselben nach der Härtung ausgewaschen werden (Versuche bis 24 Tage), resp. wie lange man sie — nach der Gasgerbung — an der Luft liegen lässt.

Bern, chemisches Institut der Universität,
Organische Abteilung.

109. Die Umsetzung des Caseins mit Formaldehyd.

IV. Der Einfluss der Formaldehydgerbung auf das Quellungsvermögen des Caseins¹⁾

von Hs. Nitschmann und H. Hadorn.

(4. V. 43.)

Über die Quellung im allgemeinen und die der Proteine im besonderen ist ausserordentlich viel gearbeitet worden²⁾. Trotzdem ist es heute noch nicht möglich, alle Erscheinungen theoretisch einheitlich und widerspruchsfrei zu deuten. Auch die Quellung des Caseins ist wiederholt Gegenstand der Untersuchung gewesen. So haben *J. R. Katz*²⁾, ferner *R. Fricke* und *J. Lücke*³⁾ Dampfdruckisothermen des Caseins aufgenommen. Jedoch ist uns nicht bekannt, dass ähnliche Messungen schon an mit Formaldehyd gehärtetem Casein ausgeführt worden sind.

Praktisch besonders wichtig ist natürlich die maximale Quellung, wie sie sich in gesättigtem Wasserdampf oder schneller noch beim Einlegen in Wasser einstellt. Aber gerade die exakte Bestimmung dieser Werte stösst, wie gleich noch gezeigt wird, auf erhebliche Schwierigkeiten. Dampfdruckisothermen dagegen können verhältnismässig leicht aufgenommen werden. Wir stellten uns die Aufgabe,

¹⁾ III. Mitteilung: *Helv.* **26**, 1075 (1943).

²⁾ Zusammenfassende Darstellungen: *J. R. Katz*, „Die Quellung“, *Ergebn. exakt. Naturw.* **3**, 372 (1924); *W. Pauli* und *Valkó*, *Kolloidchemie der Eiweisskörper*, S. 207 (1933).

³⁾ *Z. El. Ch.* **36**, 308 (1930).

diejenigen von ungegerbtem und gegerbtem Casein miteinander zu vergleichen.

I. Die Dampfdruckisotherme des Caseins und ihre Verschiebung durch die Formaldehydgerbung.

Die Dampfdruckisotherme gibt die Beziehung zwischen dem Wasserdampfdruck (wenn es sich wie hier um Wasser als Quellungsmittel handelt) und dem Wassergehalt der Lösung oder des Gels für eine bestimmte Temperatur wieder. Es ist üblich und zweckmässig, statt des absoluten Dampfdruckes die relative Feuchtigkeit der mit dem Gel im Gleichgewicht befindlichen Atmosphäre anzugeben, weil diese im Gegensatz zu ersterem nur wenig temperaturabhängig ist. Zur Aufnahme der Dampfdruckisothermen benutzten wir eine der ältesten und einfachsten Methoden, die es gibt.

Kleine Mengen Casein, welche bei Zimmertemperatur im Hochvakuum neben Phosphorpentoxyd bis zur Gewichtskonstanz getrocknet worden waren, wurden in kleinen Exsikkatoren über Schwefelsäure-Wassermischungen von bekanntem Dampfdruck aufbewahrt, bis sich Gleichgewicht eingestellt hatte. Die Gewichtszunahme des Caseins entspricht dem aufgenommenen Quellungswasser. Die absolute Genauigkeit der Werte kann also nicht grösser sein als die der Dampfdruckwerte der Schwefelsäurelösungen, die man zu Grunde legt. Wir arbeiteten mit 8 verschiedenen konzentrierten Schwefelsäuren, deren Wasserdampfdrucke wir dem Tabellenwerk von *Landolt-Börnstein* (5. Aufl., Bd. II, 1395—6) entnahmen. Aus dem Dampfdruck der betreffenden Schwefelsäure und aus dem Dampfdruck des reinen Wassers bei derselben Temperatur ergibt sich die relative Feuchtigkeit der Gleichgewichtsatmosphäre. Innerhalb von 3° darf der relative Dampfdruck als temperaturunabhängig angesehen werden. Höchste Temperaturkonstanz war deshalb für unsere Zwecke nicht erforderlich. Wichtig ist aber, dass die Exsikkatoren allseitig ganz gleiche Temperatur aufweisen und nicht einseitig Wärme abgeben oder aufnehmen. Rasche Temperaturschwankungen sind unbedingt zu vermeiden, da sonst Gefahr besteht, dass Schwefelsäure und Casein im Inneren des Exsikkators vor der Wägung nicht ganz gleiche Temperatur hatten. Die nachfolgenden Messungen wurden während einiger Sommerwochen in einem Kellerraum gemacht, wo die Temperatur nur sehr langsam zwischen 17 und 19° schwankte. Die Einwagen an Casein betragen 0,1 bis 0,15 g, die Menge der beigefügten Schwefelsäure ca. 50 cm³, so dass ihre Konzentration durch den Wasseraustausch mit dem Casein nicht merklich verändert werden konnte. Durch vorsichtiges Schwenken der Exsikkatoren wurde von Zeit zu Zeit für richtige Durchmischung der Schwefelsäure gesorgt. Zur schnelleren Gleichgewichtseinstellung wurden die Exsikkatoren nach der Beschickung rasch evakuiert. Beim Wiederöffnen wurde die Luft, die man einströmen liess, langsam durch eine Waschflasche strömen gelassen, welche Schwefelsäure der gleichen Konzentration wie die im Exsikkator enthielt. Diese Vorsichtsmassregel ist besonders bei den wasserarmen Präparaten unerlässlich, da dieselben aus der Luft sehr rasch Feuchtigkeit aufnehmen. Die Wägegläschen mit dem Casein wurden nach dem Öffnen des Exsikkators sofort geschlossen und gewogen. Derart wurde alle 24 Stunden gewogen, bis Gewichtskonstanz erreicht war. Dies war meist schon am dritten Tag der Fall.

Das Wasserbindungsvermögen des Caseins zeigt wie das der meisten anderen Gele Hysteresis, d. h. der Wassergehalt bei einer bestimmten relativen Luftfeuchtigkeit ist verschieden, je nachdem ob man ein trockenes Gel Wasser aufnehmen, oder ein feuchteres Wasser abgeben lässt (vgl. Tab. 1). Der — scheinbare — Gleich-

gewichtszustand, der sich einstellt, ist also von der Vorgeschichte des Gels abhängig. Die Werte für den Wassergehalt werden bei Bewässerung stets tiefer gefunden als bei Entwässerung. Wie üblich haben wir beide Werte bestimmt und daraus das Mittel genommen.

Tabelle 1.

Wassergehalt von gegerbtem und ungerbtem Casein bei verschiedener relativer Luftfeuchtigkeit (g Wasser pro 100 g trockenes Casein).

Konz. der H ₂ SO ₄ in %	%relative Luftfeuchtigk.		0,2 I 0,19% F.	38 III 3,19% F.	G 7 f 2,93% F.	Casein H	Fehlerbreite
84,48	0,9	Bewässerung	0,7	0,7	0,8	0,9	± 0,1
73,13	4,9	Bewässerung	2,0	2,0	2,0	2,2	± 0,15
		Entwässerung	2,5	2,4	2,4	2,9	
		Mittel	2,3	2,2	2,2	2,6	
64,47	12,8	Bewässerung	4,0	4,0	4,2	4,4	± 0,2
		Entwässerung	5,3	5,1	5,0	5,7	
		Mittel	4,7	4,6	4,6	5,1	
52,13	33,0	Bewässerung	8,1	7,8	7,8	8,1	± 0,2
		Entwässerung	9,4	8,8	8,8	9,4	
		Mittel	8,8	8,3	8,3	8,8	
37,69	61,9	Bewässerung	12,3	12,1	11,8	12,4	± 0,2
		Entwässerung	15,2	14,7	14,6	15,4	
		Mittel	13,8	13,4	13,2	13,9	
24,26	82,7	Bewässerung	18,6	18,1	16,8	17,8	± 0,2
		Entwässerung	20,2	19,9	19,4	20,5	
		Mittel	19,4	19,0	18,6	19,7	
9,82	94,4	Bewässerung	27,4	25,9	23,6	28,5	± 0,8
		Entwässerung	29,2	27,4	24,2	29,4	
		Mittel	28,6	26,7	23,9	29,0	
5,0	97,5	Bewässerung	31,2	29,4	26,6	33,0	± 2,5

Wir begannen mit völlig trockenem Casein, welches mit der Schwefelsäurereihe mit steigendem Wassergehalt bewässert wurde. Alsdann wurde die gleiche Reihe umgekehrt durchlaufen bis zur erneuten Trocknung im Hochvakuum. Zur Kontrolle wurde dann die Bewässerung nochmals ausgeführt; dabei wurden genau dieselben Werte gefunden wie das erste Mal. Die Hysteresis ist also an ein und demselben Präparat genau reproduzierbar. Wir untersuchen folgende 4 Präparate¹⁾:

1. Präparat: Ungerbtes Casein, eigenes Präparat, Ausgangsprodukt für die nachfolgenden gegerbten Proben.

¹⁾ Näheres über die Herstellung der in dieser Untersuchung verwendeten Präparate findet sich in der III. Mitteilung, Helv. **26**, 1075 (1943).

2. Präparat: 0,2 I: 1 Tag Nassgerbung mit 0,2-proz. Formaldehydlösung, „normal“ ausgewaschen, Formaldehydgehalt 0,19%.

3. Präparat: 38 III: 28 Tage Nassgerbung mit 38-proz. Formaldehyd, „erschöpfend“ ausgewaschen, Formaldehydgehalt 3,19%.

4. Präparat: G 7 f: 7 Tage „feuchte“ Gasgerbung, 6 Tage an der Luft gelegen, nicht ausgewaschen, Formaldehydgehalt 2,93%.

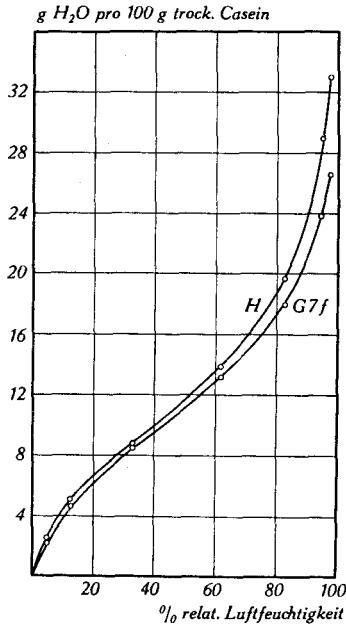


Fig. 1.

Wasserdampfdruckisothermen von ungegerbtem (H) und von gasgegerbtem (G 7 f) Casein.

Die Feuchtigkeitsgehalte dieser Präparate bei 8 verschiedenen relativen Wasserdampfdrücken finden sich in Tabelle 1. Die angegebenen Werte bedeuten g Wasser, die von 100 g trockenem Casein gebunden werden. Fig. 1 zeigt zunächst die mit den Mittelwerten erhaltene Dampfdruckisotherme des ungegerbten Caseins. Sie fällt von 60 % relativer Luftfeuchtigkeit an aufwärts sehr genau mit derjenigen von *J. R. Katz*¹⁾ zusammen. Unterhalb dieser Werte liegen unsere Wassergehalte etwas tiefer²⁾. Die zweite der eingezeichneten Kurven ist diejenige des gasgegerbten Präparates. Wir werden die Dampfdruckisothermen im Anschluss an die Quellungsversuche in flüssigem Wasser eingehender diskutieren. Es sei vorläufig auf folgende Punkte aufmerksam gemacht:

1. Die Dampfdruckisotherme von gegerbtem Casein zeigt eine vollständig analoge S-Form wie die von ungegerbtem. Kräftig gegerbtes Casein (38 III, G 7 f) bindet bei

¹⁾ l. c., Werte auch im Buch von *Pauli-Valkó*.

²⁾ Vgl. die logarithmische Darstellung der Isothermen in Fig. 4, in welcher die Werte von *Katz* miteingezeichnet sind.

allen Feuchtigkeitsgraden der Atmosphäre weniger Wasser als ungegerbtes. Die Unterschiede sind aber merkwürdig gering; sie sind um so grösser, je höher die relative Feuchtigkeit ist.

2. Die Unterschiede zwischen den 3 untersuchten gegerbten Caseinen können somit auch nicht gross sein und man muss schon relative Feuchtigkeiten von über 60% ins Auge fassen, um deutliche Differenzen zu bemerken. Das nassgegerbte Präparat mit 0,19% Formaldehyd scheint ungefähr in der Mitte zwischen dem ungegerbten Casein und dem nassgegerbten mit 3,19% zu liegen, trotzdem das letztere 17mal mehr Gerbstoff enthält als das erstere. Besonders interessant ist der Vergleich der Zahlen für das nassgegerbte Präparat 38 III und das gasgegerbte G 7 f. Der Formaldehydgehalt der beiden ist fast gleich; der des gasgegerbten etwas niedriger. Von 80% relativer Luftfeuchtigkeit an zeigt sich unzweideutig, dass das gasgegerbte Produkt weniger Wasser aufnimmt als das nassgegerbte. Das Wasserbindungsvermögen hängt also von der Art, wie die Gerbung durchgeführt wurde, ab, auch wenn die gebundene Gerbstoffmenge gleich ist.

Die Tatsache, dass die Differenzen mit zunehmender Luftfeuchtigkeit immer deutlicher werden, fordert dazu auf, die vorliegenden Daten durch Messungen bei 100% relativer Luftfeuchtigkeit zu ergänzen. Es bietet jedoch grosse Schwierigkeiten, das maximale Quellungsvermögen zu ermitteln, indem man das Gel einfach neben reinem Wasser ins Gleichgewicht kommen lässt. Bei sehr hohen relativen Feuchtigkeiten will sich bei den Präparaten keine Gleichgewichtskonstanz einstellen, denn kleinste Temperaturunterschiede innerhalb des Exsikkators bewirken schon, dass der Wasserdampf über dem Präparat ein wenig über- oder untersättigt ist. Da die Dampfdruckisotherme in diesem Gebiet sehr steil verläuft, wirkt sich dies auf den Wassergehalt der Präparate sehr stark aus¹⁾.

Wir versuchten deshalb, auf anderem Wege zu einer Bestimmung des maximalen Quellungsvermögens zu gelangen. Wenn es, wie bei uns, nicht auf eine absolute Grössenbestimmung, sondern nur auf vergleichende Messungen ankommt, kann bei pulvrigen oder körnigen Substanzen das Sedimentationsvolumen der gequollenen Substanz gute Dienste leisten.

II. Vergleichende Messungen der maximalen Quellung.

1. Das Sedimentationsvolumen.

Die Bestimmung ist ausserordentlich einfach und wurde folgendermassen ausgeführt:

Von jedem Präparat wurden 0,5 g auf 1 mg genau abgewogen und in graduierte Reagenzgläser von 11,3 mm innerem Durchmesser eingefüllt. Das Casein wurde zunächst mit ca. 5 cm³ Wasser übergossen und mit einem Glasstab gründlich durchgemischt. Der Glasstab wurde zuletzt abgespritzt. Jetzt wurden die Gläser mit Gummistopfen verschlossen und während einer Stunde häufig umgeschüttelt²⁾. Nun wurden die Gläser

¹⁾ Vgl. z. B. P. v. Schröder (Z. physikal. Ch. **45**, 76 (1903)), der beim Quellen von Gelatine in Wasser und in gesättigtem Wasserdampf stark differierende Werte erhielt und diesen Effekt als „scheinbaren“ Widerspruch zum 2. Hauptsatz diskutiert.

²⁾ Die für die maximale Quellung erforderliche Zeit hängt vom Dispersitätsgrad des Caseins ab.

bis zur 10 cm³-Marke mit Wasser aufgefüllt, nochmals durchmischt und dann verschlossen in vertikaler Stellung im Kühlschrank bei 0° stehen gelassen. Von Zeit zu Zeit wurde das Sedimentationsvolumen abgelesen. Nach 3 Tagen hatte dasselbe jeweils seinen konstanten Endwert erreicht.

Natürlich hängen die Sedimentationsvolumina nicht nur von der Quellung, sondern auch vom Verteilungszustand des Stoffes ab. Wir können also nur solche Präparate miteinander vergleichen, die durch Gerbung aus dem gleichen Casein hergestellt worden sind. In der Tat gaben das Casein von *Merck* und unser eigenes Präparat ganz verschiedene Werte. Tabelle 2 enthält die Quellungsvolumina von 4 verschieden stark gegerbten Caseinen sowie vom Ausgangsprodukt. Es handelt sich um das staubfeine Präparat von *Merck*. Die fertigen Proben waren durch ein Mehlsieb Nr. 10 gesiebt worden, welches sie fast ohne Rückstand passierten. Zur Gerbung dieser Präparate war 5-proz. Formaldehydlösung verwendet worden. Temperatur bei der Gerbung 17°; „normal“ ausgewaschen.

Tabelle 2.

Sedimentationsvolumina nassgegerbter Caseine, gequollen in Wasser.

Zeichen des Präparates	Gerbezeit in St.	% CH ₂ O im Präp.	Sed.-vol. nach 3 Tagen in cm ³
Casein M	ungegerbt	0	3,9
K 1 M	1	0,23	2,65
K 2 M	17	1,56	2,25
K 3 M	48	1,88	2,3
K 4 M	188	2,37	2,3

Tabelle 3 enthält die Quellungsvolumina einiger gasgegerbter Präparate. Ausgangsmaterial gleich wie bei Tabelle 2.

Tabelle 3.

Sedimentationsvolumina gasgegerbter Caseine, gequollen in Wasser.

f bedeutet „feuchte“ Gasgerbung, die Zahl nach G bedeutet die Gerbezeit in Tagen (bei 5°).

Zeichen des Präparates	% CH ₂ O im Präp.	Sed.-vol. nach 3 Tagen in cm ³
Casein M	ungegerbt	3,9
G 5 M	0,98	2,75
G 5 f M	1,82	2,2
G 20 M	2,00	2,3
G 20 f M	2,29	2,2
G 30 f M	2,88	2,2

Figur 2 zeigt die Abhängigkeit des Quellungsvolumens vom Formaldehydgehalt bei nassgegerbtem und bei gasgegerbtem Casein (Kurven Ia und Ib). Bei der Betrachtung der Kurven fällt folgendes auf:

1. Bei der Nassgerbung genügt schon ein sehr kleiner Formaldehydgehalt, um die Quellung des Caseins sehr stark herabzudrücken. Das Minimum des Quellungsvermögens ist bereits mit ea. 1% Formaldehyd erreicht, höhere Formaldehydgehalte vermögen die Quellung nicht noch mehr herunterzusetzen.

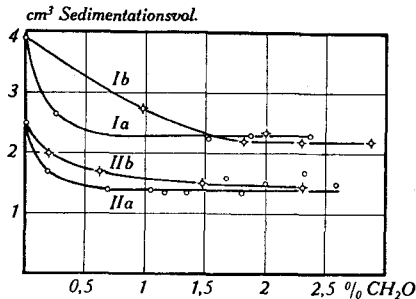


Fig. 2.

Sedimentationsvolumina nassgegerbter (a) und gasgegerbter (b) Caseine, gequollen in Wasser. I. Körnung feinpulvrig, II. Körnung griessförmig.

2. Die Kurve der gasgegerbten Präparate verläuft ähnlich, nur anfangs viel flacher, d. h. gasgegerbte Caseine mit Formaldehydgehalten unter 1,5% zeigen eine stärkere Quellung als nassgegerbte mit gleicher analytischer Zusammensetzung. Die Erklärung ist wohl darin zu suchen, dass die ersteren nicht gleichmässig durchgegerbt sind. Bei den in die Formaldehydlösung eingebrachten Caseinteilchen bewirkt die rasch einsetzende Quellung, dass der Gerbstoff mit dem Wasser bis ins Innere dringt. Auch das Nachdiffundieren von Formaldehyd geht dank der Quellung ziemlich rasch. Man darf deshalb annehmen, dass die Nassgerbung in nicht allzu verdünnten Formaldehydlösungen über den ganzen Querschnitt der Teilchen ziemlich gleichmässig verläuft. Anders bei der Gasgerbung: Eine Quellung findet nicht statt. Der Formaldehyd kann deshalb nur langsam durch das sehr dichte Gel hindurchdiffundieren. Die reaktionsfähigen Gruppen in den Randschichten der Caseinteilchen haben deshalb Zeit, den Formaldehyd abzufangen. So bekommt man zuerst ein Produkt, dessen Körner an der Oberfläche kräftig angegerbt sind, im Inneren aber noch so gut wie keinen Formaldehyd aufgenommen haben. Beim Einweichen eines solchen Präparates in Wasser bringt der hohe Quellungsdruck des ungegerbten Kernes die Schale der Körner zum Platzen. Das verhältnismässig grosse Sedimentationsvolumen wird dadurch ohne weiteres verständlich¹⁾.

3. Bei Präparaten mit 1,5 bis 3% Formaldehyd scheinen die gasgegerbten weniger zu quellen als die nassgegerbten, was in Übereinstimmung mit den Dampfdruckisothermen stehen würde. Jedoch sind die Differenzen zu wenig ausgeprägt, resp. ist die Fehlerbreite zu gross, als dass man sichere Schlüsse ziehen dürfte.

Auch eine weitere Messreihe mit Gerbproben unseres eigenen, grobkörnigen Caseins gestattete nicht, eindeutige Unterschiede im Quellungsvermögen der nass- und gasgegerbten Präparate festzustellen. Nur bei Formaldehydgehalten unter 1% quollen auch hier wieder die gasgegerbten Proben aus den oben erwähnten Gründen

¹⁾ Das schichtenweise Vordringen der Gasgerbung sieht man besonders schön an Natriumcaseinatfasern, wie sie im Trockenspinnverfahren aus 25-proz. Lösungen erhalten werden können. Die Anfangsstadien der Gerbung sind dadurch charakterisiert, dass die Fasern beim Einbringen in Wasser aufplatzen. Das Innere ist noch wasserlöslich, während eine mehr oder weniger dicke Haut ihre Wasserlöslichkeit bereits verloren hat.

stärker. Die Sedimentationsvolumina dieser Reihe sind ebenfalls in Figur 2 eingezeichnet (Kurven IIa, IIb). Auf die Wiedergabe der Zahlenwerte verzichten wir angesichts der beträchtlichen Streuung, welche besonders die Werte der stärker nassgegerbten Präparate zeigen¹⁾. Bemerkte sei nur noch, dass prozentual die Verminderung des Quellungsvolumens durch die Gerbung beim pulverförmigen und beim körnigen Casein gleich ist. In beiden Fällen beträgt das Quellungsvolumen der kräftig gegerbten Proben ca. 56% desjenigen des rohen Caseins.

2. Gravimetrische Bestimmung der maximalen Quellung.

Da die Bestimmung des Sedimentationsvolumens kleine Unterschiede im Quellungsvermögen nicht mit der gewünschten Deutlichkeit hervortreten liess, waren wir bemüht, doch noch mit einer gravimetrischen Methode die maximale Quellung zu bestimmen. Wie schon angedeutet, besteht die Schwierigkeit nur darin, die Substanz im maximal gequollenen Zustand, aber auch nicht mit mehr als gerade nur dem Quellungswasser beladen, zur Wägung fertig zu machen. Kompakte, homogene Gelstücke kann man nach dem Quellen in Wasser mit Filtrierpapier rasch abtrocknen und wägen. Bei gequollenen Pulvern oder Fasern ist es unmöglich, auf diese Weise reproduzierbare Gewichte zu bekommen. Es gelingt aber, wenn man das anhaftende Wasser durch Zentrifugieren entfernt. Voraussetzung ist, dass man stets genau dieselben Arbeitsbedingungen einhält. Auch diese Methode ergibt wahrscheinlich nicht die absolut richtigen Werte für die maximale Quellung, da die beiden Hauptfehlerquellen — Zurückhaltung von kapillar gebundenem Wasser einerseits und Ausquetschen von Quellungswasser durch den Zentrifugaldruck andererseits — das Resultat in unbekannter Weise beeinflussen. Unsere Methode ist aber gut geeignet, um Präparate gleicher Teilchengrösse miteinander zu vergleichen.

Arbeitsvorschrift.

Man wägt 0,4—0,5 g der lufttrockenen Caseinprobe, deren Feuchtigkeitsgehalt vorher bestimmt wurde, in ein kleines Becherglas ab und verrührt sie gut mit 20—30 cm³ Wasser. Zur Quellung wird etwa eine Stunde bei Zimmertemperatur stehen gelassen²⁾.

Unterdessen wird ein Goochtiegel mit gelochtem Siebboden gut mit Wasser benetzt, ein kleines, passendes Papierfilter auf den Boden des Tiegels gebracht und etwas Wasser aufgegossen. Die Figur 3 zeigt, wie mit Hilfe eines durchbohrten Korkstopfens und eines Gummiringes der Tiegel bequem in ein Zentrifugenglas eingesetzt werden kann. Das Glas wird oben verschlossen, damit die Luft über der Flüssigkeit mit Wasserdampf gesättigt bleibt. Nun wird eine genau gemessene Zeit lang zentrifugiert (bei uns 10 Min. bei 3000 Touren pro Minute; Abstand Achse—Tiegelboden 11 cm) und der Tiegel feucht

¹⁾ Sie dürfte wahrscheinlich zur Hauptsache auf ungleiches Auftrocknen der Proben bei der Herstellung zurückzuführen sein.

²⁾ Bei unsern Präparaten war nach dieser Zeit die maximale Quellung stets erreicht. Bei grobkörnigerem Material müsste eventuell länger gewartet werden.

in einem verschlossenen Wägegias gewogen. Bei Wiederholung dieser Operation gelingt es, das Gewicht des feuchten Tiegels auf ± 1 mg genau zu reproduzieren. Völlig ungeeignet sind Filtertiegel mit porösem Boden, z. B. Glassintertiegel. Es gelingt hier nie, annähernde Gewichtskonstanz des feuchten Tiegels zu erreichen, da offenbar die in der porösen Masse zurückgehaltene Wassermenge stark variiert.

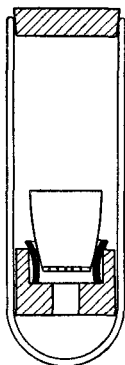


Fig. 3.

Die gequollene Caseinprobe wird nun in den derart vorbehandelten und gewogenen Tiegel filtriert unter Verwendung eines geringen Unterdrucks, der das Papierfilter festdrückt. Es ist darauf zu achten, dass das Casein stets mit Wasser bedeckt bleibt. Die gut benetzte Probe (2—3 mm überstehendes Wasser) wird ins Zentrifugenglas gebracht, wiederum genau gleich lang bei gleicher Umdrehungszahl zentrifugiert und sofort gewogen. Aus der Gewichtszunahme und dem Trockengehalt der abgewogenen Caseinmenge lässt sich das Quellungswasser berechnen.

Höchste Genauigkeit ist auch von dieser Methode nicht zu erwarten. Bei Wiederholung der Bestimmung am gleichen Präparat beobachtet man gelegentlich Streuungen von bis zu $\pm 5\%$ des Quellungswassers. Die Mittelwerte aus mehreren Bestimmungen sind jedoch recht gut reproduzierbar.

In Tabelle 4 sind die Ergebnisse, welche wir mit unserer Methode erhalten haben, für einige typische Präparate zusammengestellt. Es sind dieselben Präparate, für die früher die Dampfdruckisothermen

Tabelle 4.

Maximale Quellung von gegerbtem und ungegerbtem Casein in Wasser, gravimetrisch bestimmt.

Zeichen des Präparates	Bemerkungen	% CH ₂ O im Präp.	g Quellungswasser pro 100 g trockenes Casein gewogen	
				Mittel
Casein	ungegerbt, griessförmig	0	128,9	133,5
			138,9	
			133,1	
0,2 I	nass gegerbt mit 0,2-proz. Lösung	0,19	97,5	98,5
			99,5	
			98,4	
G 1	gasgegerbt	0,20	132,6	125,9
			119,8	
			125,3	
38 III	nass gegerbt mit 38-proz. Lösung	3,19	88,7	90,5
			92,3	
G 7 f	gasgegerbt	2,93	78,6	80,8
			78,1	
			86,3	

(siehe Tab. 1) aufgenommen worden waren. Nur G 1, eine mit Formaldehydgas schwach angegerbte Probe (1 Tag trockene Gasgerbung) ist neu dazu genommen worden. Alle Präparate wurden aus dem gleichen Casein hergestellt.

Ein Vergleich der Mittelwerte in der letzten Kolonne zeigt folgendes:

1. Es bestätigt sich erneut, dass gasgegerbte Präparate mit sehr kleinen Formaldehydgehalten (0,2%) ein viel höheres Quellungsvermögen besitzen als nassgegerbte mit gleich viel Formaldehyd.

2. Es bestätigt sich, dass bei der Nassgerbung die ersten Zehntelprozente Formaldehyd die Quellfähigkeit fast schon ebenso stark herabsetzen wie drei ganze Prozent.

3. Es bestätigt sich, was aus den Dampfdruckisothermen bei Interpolation gegen 100% relative Luftfeuchtigkeit zu erwarten war, nämlich dass ein mit Formaldehydgas richtig durchgegerbtes Casein ein deutlich geringeres Quellungsvermögen in Wasser zeigt als ein nassgegerbtes Präparat mit annähernd gleich viel Formaldehyd.

III. Diskussion der Quellungsversuche.

Wenn man versuchen will, aus den Dampfdruckisothermen und aus der maximalen Quellung Rückschlüsse auf den Gerbprozess selber zu ziehen, so ist es nötig, einige wichtige Tatsachen, die Quellung im allgemeinen betreffend, in Erinnerung zu rufen. Als Ursache für die Quellung kommen in Frage:

1. Die Betätigung molekularer Anziehungskräfte zwischen den Molekeln der beiden Phasen, welche zu einer Abnahme der potentiellen Energie führt; und

2. die Tendenz zur wahrscheinlichsten Verteilung der Molekeln (Zunahme der Entropie) oder m. a. W. das osmotische Verdünnungsbestreben des quellenden Körpers.

Molekulare Anziehungskräfte treten besonders bei der Wechselwirkung polarer Gruppen und Molekeln in Erscheinung. Die Proteine enthalten zahlreiche stark polare Gruppen ($-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NH}-\text{CO}-$, $-\text{O}-\text{PO}_3\text{H}_2$ etc.), welche Wassermolekeln an sich ziehen und richten. Die Begleiterscheinungen der Hydratation dieser Gruppen sind bekannt. Der Vorgang ist stark exotherm und zudem mit einer beträchtlichen Volumkontraktion verbunden. Nach *J. R. Katz* (l. c.) findet für 1 g Wasser, das von einer grossen Menge vollkommen trockenen Caseins aufgenommen wird, eine Kontraktion von $0,39 \text{ cm}^3$ statt. In Eiweissgelen und -lösungen stehen durchschnittlich $0,3 \text{ g}$ Wasser pro Gramm Protein für die Lösung anderer Stoffe nicht zur Verfügung (sog. nicht lösender Raum) und gefrieren auch bei starker Abkühlung nicht¹). Die Bindungskräfte bei der Hydratation sind für die ersten Wassermengen am grössten und werden für die nachfolgenden immer kleiner. Irgendeine stöchiometrisch bedingte Grenze für die Wasserbindung gibt es nicht, denn eigentliche Bindung geht räumlich betrachtet in eine immer schwächer werdende Richtwirkung auf die Wasserdipole über. Immerhin wird man nicht stark fehl gehen, wenn man annimmt, dass beim Casein die Dampf-

¹) Siehe Buch von *Pauli* und *Valkó*, S. 157 u. f.

druckisotherme von 0 bis ungefähr 50 % relativer Feuchtigkeit fast ausschliesslich das Hydrationsbestreben der polaren Gruppen zum Ausdruck bringt. Dieser Teil der Kurve ist dadurch charakterisiert, dass sein Verlauf, sowohl für gegebtes wie für ungegebtes Casein, der *Freundlich'schen* Adsorptionsisotherme

$$a = \alpha \cdot p^{1/n} \quad \text{wobei } a = \text{adsorbierte Menge}$$

$$p = \text{Dampfdruck des Adsorbates}$$

$$\alpha, n = \text{Konstanten } (n < 1)$$

folgt.

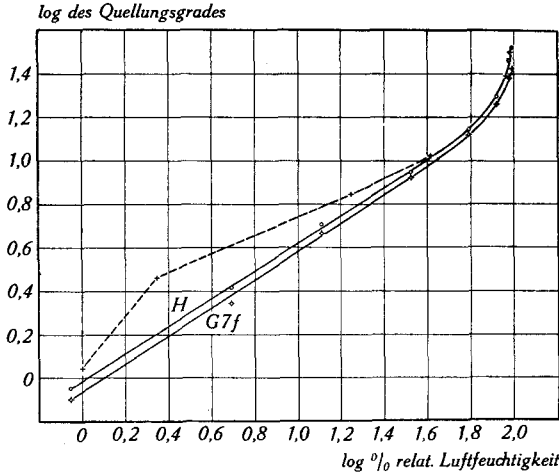


Fig. 4.

Dampfdruckisothermen von ungegerbtem (H) und von gasgegerbtem (G 7 f) Casein. Die gestrichelte Kurve enthält die Werte von *J. R. Katz* für gewöhnliches Casein.

Dies ist ohne weiteres aus Fig. 4 zu erkennen. Wie es die Formel verlangt, verläuft im genannten Gebiet die Isotherme als Gerade, wenn man den Wassergehalt des Caseins sowie den Dampfdruck in logarithmischem Masstab aufträgt¹⁾. Die schon erwähnte Isotherme von *J. R. Katz*, die hier miteingezeichnet worden ist, zeigt nicht diesen einfachen Verlauf.

Bei relativen Dampfdrücken von 50 % an aufwärts nimmt die Isotherme mehr und mehr einen anderen Verlauf. Hier wird das osmotische Verdünnungsbestreben dominierend. Das Wasser diffundiert nach der Richtung, wo seine Konzentration geringer ist, d. h. in das Gel hinein. Beide Kräfte (Hydratation und Diffusion) ergeben zusammen den Quellungsdruck, der wiederum von *J. R. Katz*²⁾ für das Casein nach einer Formel von *H. Freundlich* aus der

¹⁾ Bekanntlich gilt die *Freundlich'sche* Formel nicht nur für eigentliche Adsorption an Festkörperoberflächen, sondern auch für die Aufnahme von Gasen und Dämpfen durch Flüssigkeiten, wenn starke Kräfte zwischen den Molekeln der beiden Phasen auftreten. Es sei nur an die Systeme Schwefelsäure—Wasser und Phosphorsäure—Wasser erinnert (vgl. *J. R. Katz*, l. c., S. 392). ²⁾ l. c., S. 385.

Dampfdruckisotherme berechnet worden ist. Seine direkte und exakte Messung bietet wegen der Plastizität des gequollenen Proteins Schwierigkeiten. Er ist umso grösser, je wasserärmer das Gel ist.

Dem Quellungsdruck entgegen wirken die Kohäsionskräfte innerhalb des quellenden Körpers. Auch sie haben verschiedene Ursachen. Es kommen in Frage: Gitterkräfte (sofern geordnete Bezirke vorhanden sind), *van der Waals'sche* Kräfte, Dipolkräfte, Ionenbindungen, Wasserstoffbindungen und schliesslich Hauptvalenzbindungen, welche möglicherweise die Makromolekeln des Stoffes mit einander verknüpfen.

Die Wassermenge, welche ein Protein in Berührung mit flüssigem Wasser oder mit Wasserdampf bis zur Gleichgewichtseinstellung aufnehmen kann, hängt also von einer ganzen Reihe unbekannter Grössen ab, welche im Auge zu behalten sind, wenn wir uns unserer eigentlichen Fragestellung zuwenden, die der quellungsvermindernden Wirkung der Formaldehydgerbung auf das Casein gilt.

1. Wirkt der Formaldehyd dadurch, dass er durch Umwandlung stark wasseraffiner in wasserabstossende Gruppen die Hydratations-tendenz des Proteins vermindert?

Die sauren Gruppen ($-\text{COOH}$, $-\text{O}-\text{PO}_3\text{H}_2$), welche die Aminogruppen an Zahl übertreffen, werden durch den Formaldehyd sicher nicht verändert. Ansatzpunkte sind für diesen im wesentlichen nur die Aminogruppen, sowie die sauren Amidgruppen ($-\text{NH}-\text{CO}-$). Wir werden uns in einer folgenden Mitteilung mit den hier in Frage kommenden Reaktionen ausführlich befassen. Jetzt sei nur folgendes festgestellt:

Eine blosser Anlagerung von CH_2O , die zur Bildung einer Methylolgruppe $>\text{N}-\text{CH}_2\text{OH}$ führen muss, wird die Wasseraffinität einer Amino- resp. Amidgruppe durch die Zufügung einer OH-Gruppe höchstens noch unterstützen. Findet Kondensation statt, so kommt die Bildung nachstehender Gruppierungen in Frage: $-\text{N}=\text{CH}_2$ und $>\text{N}-\text{CH}_2-\text{N}<$. Es ist nicht wahrscheinlich, dass dem Stickstoff in diesen Anordnungen die Fähigkeit zur Hydratation völlig genommen sein sollte. Zwar wird der basische Charakter der Aminogruppen durch Formaldehyd vermindert (Grundlage der Formoltitration nach *Soerensen!*), aber andererseits werden die N-Methylen-Verbindungen der Aminosäuren als besonders hygroskopisch beschrieben; sie krystallisieren ebenso wie ihre Salze mit Krystallwasser¹⁾.

Unabhängig von solchen Betrachtungen muss auch aus der Tatsache, dass die Dampfdruckisothermen von gegerbtem und ungegerbtem Casein bei kleinen relativen Feuchtigkeiten kaum merklich verschieden sind, geschlossen werden, dass die unter 1. formulierte Frage zu verneinen ist. Wenn die Hydratation wesentlich herabgesetzt würde, müsste sich dies gerade bei kleinen Dampfdrücken deutlich bemerkbar machen.

2. Für die Annahme, dass der osmotische Faktor der Quellung durch die Gerbung wesentlich verringert wird, liegen keine Gründe vor.

3. Durch die Gerbung werden die Kohäsionskräfte im quellenden Protein erhöht.

¹⁾ *H. Franzen und E. Fellmer, J. pr. [2] 95, 299 (1917).*

Im trockenen Casein sind die Molekeln vor allem durch die Wechselwirkung ihrer polaren Gruppen miteinander verknüpft. Durch Wasser wird nur ein Teil dieser Haftpunkte gelöst; die Hydratation bewirkt zwar ein Auseinanderdrängen der Molekeln, die Quellung bleibt aber begrenzt. Durch Zusatz von Säuren, Alkalien oder gewissen Salzen lässt sich die Quellung unbegrenzt, d. h. bis zur Lösung weitertreiben. Dass die Kohäsionskräfte sogar bei chemisch vollkommen identischen Systemen recht verschieden sein können, zeigen die Hysteresiserscheinungen bei der Quellung (vgl. Tab. 1). Beim Austrocknen des Gels werden durch das Zusammenpressen der Makromolekeln neue Haftpunkte geschaffen. Deshalb quillt ein solches Gel beim Wiederwässern weniger. Bei der Formaldehydgerbung muss angenommen werden, dass ihre Wirkung nicht oder mindestens nicht in erster Linie auf der Vermehrung der Nebenvalenzhaftpunkte, sondern auf einer Netzbildung zwischen den Molekeln durch Hauptvalenzbindungen beruht. Die Bildung von Methylenbrücken ($> \text{N}-\text{CH}_2-\text{N} <$) bei der Formaldehydgerbung der Proteine ist schon von verschiedenen Forschern angenommen¹⁾, von andern wieder bestritten²⁾, chemisch aber noch nie einwandfrei nachgewiesen worden. Wir werden uns in späterem Zeitpunkt näher mit dieser Frage befassen; zunächst nehmen wir zu ihr nur auf Grund der Quellungserscheinungen Stellung:

a) Die Quellung der durchgegerbten Präparate ist nicht nur in Wasser, sondern auch in allen Caseinlösungsmitteln (verdünnte Alkalien und Säuren, starke Kaliumrhodanid- und konz. Harnstofflösung usw.) begrenzt. Eine Lösung ohne hydrolytischen Abbau ist nicht möglich. Eine Erklärung dieser Tatsache ohne Annahme von Hauptvalenzverknüpfungen ist kaum möglich.

b) Für die maximale Quellung scheint es nicht viel auszumachen, ob bei der Kaltgerbung 1 bis 1,5% Formaldehyd oder mehr aufgenommen wird. Was über 1,5% hinausgeht, beeinflusst die Kohäsion des Gels nicht mehr. Man muss daraus schliessen, dass nur diese Menge Formaldehyd sich an der Bildung der Brücken beteiligt. Die Netzbildung zwischen den Makromolekeln im Gel ist also eine verhältnismässig nicht sehr dichte. Die Aufnahme der ersten 10—20% Wasser wird durch sie nur wenig behindert. Die Wirkung der Gerbung wird aber umso deutlicher, je weiter die Quellung fortschreitet. Eine völlige Dispergierung ist nach der Gerbung wie gesagt überhaupt nicht mehr möglich.

4. Vergleich zwischen Nassgerbung und Gasgerbung: Während sich nassgegerbte und gasgegerbte Caseinpräparate bei mässigen Luftfeuchtigkeiten im Wasserbindungsvermögen nicht merklich unterscheiden, treten deutlich Unterschiede zu Tage, wenn man sich 100-proz. relativer Feuchtigkeit nähert. Die Quellfähigkeit von gasgegerbtem Casein ist — wenn man durchgegerbte Präparate mit ähnlichem Formaldehydgehalt vergleicht — merklich geringer.

¹⁾ Siehe z. B. A. Künzel, *Angew. Ch.* **50**, 308 (1937); K. H. Gustavson, *Svensk. kem. Tid.* **52**, 261 (1940); Dyachenko und Shelpakova, *J. int. Soc. Leather Trades Chemists* **23**, 12 (1939).

²⁾ J. H. Highberger und F. O'Flaherty, *J. int. Soc. Leather Trades Chem.* **23**, 131 (1939).

Erwartungsgemäss treten die Unterschiede noch deutlicher zu Tage, wenn man die Quellung in noch stärker quellend wirkenden Medien als Wasser vor sich gehen lässt. Nachstehend die Sedimentationsvolumina zweier in 0,1-n. NaOH gequollener Präparate (je 0,25 g):

Nassgerbtes Präparat 38 III mit 3,19% CH_2O : 2,1 cm^3

Gasgerbtes Präparat G 50 mit 2,31% CH_2O : 1,7 cm^3 .

Der Unterschied im Quellungsvermögen beträgt hier 23,5% bez. auf den Wert des gasgerbten Präparates.

Es liegt kein Grund zur Annahme vor, dass der Chemismus der Gerbung mit gasförmigem und mit wässrigem Formaldehyd grundsätzlich verschieden sei. Für die Erklärung des von uns beobachteten Effektes gibt es zwei Möglichkeiten:

a) Bei der Gasgerbung werden mehr Methylenbrücken gebildet als bei der Nassgerbung, auch wenn total gleich viel Formaldehyd gebunden wird. Diese Frage wird z. Z. von uns noch experimentell bearbeitet, und wir werden über die Ergebnisse später berichten.

b) Bei der Gasgerbung befindet sich das Proteingel in ungequollenem Zustand. Durch die entstehenden Methylenbrücken wird also eine primär schon dichte Struktur fixiert. Anders bei der Nassgerbung. Beim Einbringen des Caseins in die Formaldehydlösung findet zuerst Quellung statt. Dieselbe verläuft rasch und führt praktisch ebensoweit wie in reinem Wasser. Die sehr viel langsamer verlaufende Gerbung spielt sich also an einem maximal gequollenen Gel ab. Dies ergibt sich sehr klar aus folgenden einfachen Versuchen:

In graduierte Reagenzgläser wurden drei Proben à je 1 g ungerbtes Casein (eigenes Präparat) abgewogen.

- I. Mit 10 cm^3 Wasser verrührt, nach beendeter Quellung 20 Stunden stehen gelassen. Sedimentationsvolumen = 4,2 cm^3 .
- Ia. Zu der gequollenen Probe I wurden 10 cm^3 4-proz. Formaldehydlösung gegeben. Sedimentationsvolumen nach 20 Stunden = 4,2 cm^3 .
- II. Casein trocken mit 20 cm^3 2-proz. Formaldehyd verrührt; nach Quellung 20 Stunden stehen gelassen. Sedimentationsvolumen = 4,2 cm^3 .
- III. Wie II, aber mit 38-proz. Formaldehyd. Sedimentationsvolumen = 4,3 cm^3 .

Durch die Einwirkung des Formaldehyds erleidet das gequollene Protein also keine direkte Kontraktion. Für die Quellung macht sich die Gerbung erst bemerkbar, wenn das Präparat einmal getrocknet worden ist, indem dann bei erneuter Quellung das ursprüngliche Volumen nicht mehr erreicht wird.



a Fig. 5. b

Schema der Nassgerbung (a gequollenes Gel) und der Gasgerbung (b entquollenes Gel) mit Formaldehyd. Die kleinen Kreise bedeuten Methylenbrücken.

In Fig. 5 ist unter extremer Schematisierung versucht worden, den wesentlichen Unterschied der Gerbung eines gequollenen und eines entquollenen, trockenen Caseingels darzustellen. Im gequollenen Gel (a) berühren sich die Caseinteilchen, die wir uns als

langgestreckte Pakete von Fadenmolekeln vorstellen können¹⁾, hauptsächlich nur mit ihren Enden. Die Bildung von Methylenbrücken zwischen den Teilchen ist natürlich nur an diesen Berührungsstellen möglich. Weitere Brücken können sich noch innerhalb der Teilchen bilden; diese verhindern aber nicht, dass das dreidimensionale Hauptvalenznetz, welches sich bei der Gerbung im gequollenen Zustand bildet, sehr weitmaschig ist. Im entquollenen oder trockenen Gel (b) sind die Proteinteilchen auch mit ihren Seiten eng aneinander gepresst. Die statistisch über die Berührungsstellen verteilten Brückenbindungen ergeben ein viel engmaschigeres Netz, das in Wasser wohl etwas quellen kann, aber lange nicht so stark wie das Gel a.

Zusammenfassung.

Die bekannte Erscheinung, dass das Quellungsvermögen der Proteine durch eine Behandlung mit Formaldehyd herabgesetzt wird, wurde am Beispiel des Caseins näher untersucht. Es wurde das Wasserbindungsvermögen von verschieden gegerbtem und ungergerbtem Casein in Abhängigkeit vom relativen Wasserdampfdruck der Gleichgewichtsatmosphäre bestimmt (Dampfdruckisothermen). Durch die Gerbung wird das Wasserbindungsvermögen herabgesetzt; der Effekt ist umso stärker, je grösser der relative Wasserdampfdruck ist. Im Gebiete über 50% relativer Feuchtigkeit zeigt sich zudem, dass mit Formaldehyddampf behandeltes Casein („Gasgerbung“) weniger Wasser aufnimmt als solches, das mit wässriger Lösung gehärtet worden ist. Auch die maximale Quellung, erreicht durch Einbringen in Wasser, ist bei gasgegerbtem Casein geringer als bei nassgegerbtem. Bei beiden Gerbmethoden ist das Maximum der quellungsvermindernden Wirkung bereits erreicht, wenn der Gehalt des Caseins an gebundenem Formaldehyd 1 bis 1,5% beträgt. Es wird eine einfache Methode für vergleichende Messungen der maximalen Quellung in Vorschlag gebracht, bei der die Menge des Gelwassers nach Abzentrifugieren des bloss anhaftenden Wassers gravimetrisch bestimmt wird.

Die für den eigentlichen Gerbeeffekt (verminderte Quellfähigkeit) verantwortliche Reaktion wird angesehen als eine hauptvalenzmässige Verknüpfung der Proteinmolekeln durch den Formaldehyd. Die Tatsache, dass die Gasgerbung der Nassgerbung hinsichtlich des Gerbeeffektes überlegen ist, findet ihre Erklärung darin, dass während der ersteren das Proteingel nur sehr wenig gequollen ist und somit ein engmaschigeres Hauptvalenzraumnetz gebildet wird als bei der Nassgerbung, die sich stets an einem stark gequollenen Proteingel abspielt.

Bern, Chemisches Institut der Universität,
Organische Abteilung.

¹⁾ Vgl. hierzu *Hs. Nitschmann* und *H. Guggisberg*, *Helv.* **24**, 434, 574 und spez. 586 (1941).