

Ce phénomène de polymérisation tendant à donner des produits fortement colorés n'est pas uniquement une propriété du lactame IX. En effet, on peut obtenir des dérivés présentant une certaine analogie d'autre façon:

On chauffe 0,6 gr. du lactame de l'acide 2-(*o*-carboxyphényl)-1,2,3,4-tétrahydro-quinoléine-4-carbonique (VIII) avec 0,15 gr. de soufre pendant trois heures à 210°. Il y a décarboxylation, dégagement d'hydrogène sulfuré et la masse devient très foncée. On triture la fondue avec une solution de carbonate de sodium, on la lave avec de l'alcool et on cristallise le résidu dans le nitrobenzène. On obtient des cristaux bleu verdâtre fondant à 375°.

4,730 mgr. subst. ont donné 14,230 mgr. CO ₂ et 1,750 mgr. H ₂ O
2,621 mgr. subst. ont donné 0,146 cm ³ N ₂ (23,5°, 757 mm.)
C ₃₂ H ₂₀ O ₂ N ₂ Calculé C 82,74 H 4,34 N 6,03%
Trouvé „ 82,10 „ 4,14 „ 6,38%

Une étude plus exacte de ce dérivé se poursuit.

Institut de chimie de l'Université de Fribourg (Suisse).

170. Zur allgemeinen Chemie der Kolloid-Kolloid-Reaktionen. X. Der Schutzmechanismus von Proteinkombinationen

von Wolfgang Pauli und Paul Szarvas.

(30. VIII. 43.)

In vorausgegangenen Untersuchungen dieser Reihe¹⁾ war festgestellt worden, dass wasserlösliche, hochgereinigte Eiweisskörper mit reinsten, hydrophoben Kolloiden regelmässig flocken und dass hier im allgemeinen eine Flockungshemmung oder Schutzwirkung erst durch die Anwesenheit von Elektrolyten zustandekommt. Diese wirken im Sinne einer Hemmung der Kolloid-Kolloid-Flockung (KKF1), sei es wie Säuren oder Basen durch einsinnige Aufladung der Proteine, sei es wie Neutralsalze durch Erhaltung des hydrophilen, zwitterionischen Zustandes und damit der Lösungsstabilität des Eiweissanteiles im Kolloidaggregate. Auf das so entstehende Schutzgebiet folgt in niedrigeren, selbst nicht mehr flockenden Proteinkonzentrationen ein Bereich gesteigerter Flockbarkeit oder Sensibilisierung gegen geringe, den Hydrophoben allein gar nicht oder nur sehr schwach koagulierende Elektrolytzusätze.

Im Jahre 1932 wurde in dieser Reihe von Mitteilungen erstmalig eine Schutzwirkung kurz beschrieben²⁾, die — ohne Elektrolyt-

¹⁾ IX. Mitt. W. Pauli und P. Dessauer, Helv. 25, 1225 (1942). Dasselbst Literatur.

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

zugabe — durch die Kombination zweier, für sich allein reinste Hydrophobe flockender Albumine, von Seralbumin¹⁾ mit Ovalbumin, erfolgt. Zur Aufklärung des Mechanismus dieses eigenartigen Zusammenwirkens von Proteinen und seiner Beziehungen zu den Erfahrungen über Schutz und Sensibilisierung der KKF1 durch die Vereinigung von Protein und Elektrolyt wurden die anschliessenden Versuche ausgeführt²⁾.

I.

Versuchsmaterial: Ovalbumin aus 100 g Alb. ovi sicc. in der oft beschriebenen Weise bei allmählich bis 220 V ansteigender Spannung unter zeitweiliger Neutralisation mit Ammoniumhydroxyd elektrolysiert (ED). Trockengehalt (105° C): 3,04%, $\kappa^{25^\circ} = 1,56 \times 10^{-5}$ r. O., $p_H = 4,60$ ($a_H = 2,5 \times 10^{-5}$), Glas- und H₂-Elektrode.

Seralbumin aus 6 Litern Pferdeserum. Fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat. Vordialyse im Faltendialysator bis $\kappa = 2,5 \times 10^{-3}$ r. O., dann ED bis Konstanz von $\kappa = 8,71 \times 10^{-6}$ r. O.; Trockengehalt: 3,05%, $p_H = 5,29$ ($a_H = 5,1 \times 10^{-6}$).

Die Leitfähigkeiten und H⁺-Aktivitäten beider Albumine entsprechen befriedigend den Standardbestimmungen³⁾.

Gummi arabicum (G. a. elect. Merck). Reinigungsverfahren vgl. ⁴⁾. Trockengehalt des Sols 5,28%. $\kappa = 1,90 \times 10^{-3}$ r. O., $p_H = 2,15$ ($a_H = 7,08 \times 10^{-3}$), Gesamtsäuretitration konduktometrisch $C_H = 5 \times 10^{-2}$ -n., Relation der Koeffizienten $fa_H : f_A = 1,49^5$.

Kongoblau-Sol⁶⁾. ED von Kongorot unter Elektrodekantation (E. Dek.) bis 220 V. Letzte Oberschicht $\kappa = 3,5 \times 10^{-6}$ r. O., $\kappa_{Sol} = 1,60 \times 10^{-5}$ r. O., Trockengehalt: 0,032% (mol. Konz. $4,9 \times 10^{-4}$ -m.). Mit Glaselektrode $p_H = 4,23$ ($a_H = 5,89 \times 10^{-5}$), $fa_H : f_A = 1,45$, Kolloidäquivalent $K^* = 8,32$ (Farbmolekel je aktives H⁺).

Sb₂S₃-Sol⁷⁾: 24 Liter verdünntes Sol bei 70 V durch E.Dek. auf 800 cm³ konzentriert, dann durch 8-malige E.Dek. gereinigt. Letzte Oberschicht $\kappa = 2,41 \times 10^{-6}$ r. O. $\kappa_{Sol} = 5,02 \times 10^{-5}$ r. O. Sol = 0,522% ($1,538 \times 10^{-2}$ -m. Sb₂S₃), Glaselektrode $p_H = 3,78$ ($a_H = 1,66 \times 10^{-4}$), $fa_H : f_A = 1,383$ (erstmalig bei diesem Sol festgestellt). $K^* = 92,6$ (m. Sb₂S₃/a_H).

Die überwiegende Zahl unserer Versuche wurde am Kongoblausol ausgeführt. Individuelle Unterschiede in der kolloiden Stabilität verschiedener Kongoblausole lassen sich aus den Umständen ihrer Bereitung unschwer verstehen. Während der ausgiebigen E. Dek. geht mit der starken Konzentrierung durch die Schichtung ein Zusammenballen zu größeren Sekundär aggregaten einher, welches bei der folgenden Solzerteilung unter Schütteln des Dekantates mit Leitfähigkeitswasser einer feinteiligen Dispersion

¹⁾ Abkürzung für Serumalbumin.

²⁾ In den Jahren 1937/38 noch in Wien; die Ausarbeitung derselben konnte, dank der steten Förderung durch Herrn Professor P. Karrer, am Chemischen Institut der Universität Zürich erfolgen. P.

³⁾ D. v. Klobusitzky und Pauli, Bioch. Z. **260**, 201 (1933).

⁴⁾ Pauli und E. Ripper, Koll. Z. **62**, 162 (1932); Pauli und L. Palmrich, Koll. Z. **79**, 63 (1937).

⁵⁾ Pauli, Helv. **24**, 1253 (1941).

⁶⁾ Pauli und E. Weiss, Bioch. Z. **203**, 103 (1928); Pauli und L. Singer, l.c.

⁷⁾ Pauli, W. Kölbl und A. Laub, Koll. Z. **80**, 175 (1937); Pauli und W. Kitaj, Koll. Z. **43**, 82 (1938); Pauli und H. Zentner, Faraday **35**, 1234 (1939).

Dieses Verhalten erscheint analog dem, der Gesamtladung des Sols entsprechend, wachsenden Verbrauch von höherwertigen flockenden Gegenionen mit Zunahme der Solkonzentration.

Die vorstehende Tabelle I gibt auf Grund früherer Versuche (*P. und Singer, l. c.*) am Kongoblausol einen Überblick der Schutzwirkung (Fettstrich-Einrahmung) und der Sensibilisierung (Strichelung) bei Seralbumin in Verbindung mit einem Neutralsalz (NaCl), der dem Vergleich mit dem Effekt von reinen Proteinkombinationen dienen soll.

Beim Ovalbumin tritt jedoch mit Kongoblausol, zum Unterschiede von Seralbumin, durch Zugabe von neutralen Elektrolyten keine Schutzwirkung auf, nur eine Sensibilisierung kommt hier in niederen Proteinkonzentrationen zustande. Ebenso fehlt dem Ovalbumin, im Gegensatz zu Seralbumin, eine Schutzwirkung mit Glykokoll an Stelle von Neutralsalz (*P. und L. Singer l. c.*):

Eine, wie sich herausstellte, besonders beachtenswerte Differenz der beiden Albumine bildet das Bestehen eines hemmenden Überschusseffektes von Ovalbumin auf die KKKFl. Während nämlich im untersuchten Konzentrationsverhältnis der beiden Sole bei Seralbumin ansteigend bis 2% eine Abnahme des Flockungsvermögens für Kongoblauf nicht erfolgt, geht beim Ovalbumin die Flockung mit wachsendem Eiweissgehalt nach einem Optimum wieder zurück und kann schliesslich vollständig ausbleiben. Tabelle II gibt Beispiele für diesen Überschusseffekt des Ovalbumins und dessen Herabrücken in niedrigeren Eiweissgehalt mit sinkender Konzentration unseres Kongoblausols.

Tabelle II.
Kongoblauf + Ovalbumin

Kongoblauf %	Ovalbumin %												
	2	1,5	1	5×10^{-1}	$2,5 \times 10^{-1}$	1×10^{-1}	$7,5 \times 10^{-2}$	5×10^{-2}	$2,5 \times 10^{-2}$	1×10^{-2}	$7,5 \times 10^{-3}$	5×10^{-3}	$2,5 \times 10^{-3}$
$6,4 \times 10^{-3}$		++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$3,2 \times 10^{-3}$	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$1,6 \times 10^{-3}$	-	+	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+
$0,8 \times 10^{-3}$	-	-	-	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+

Der Unterschied beider Albumine im Überschusseffekt ist nicht auf das Kongoblausol beschränkt, sondern kehrt bei einer Reihe positiver und negativer Hydrophoben wieder¹⁾. Dabei besteht die Möglichkeit, dass es sich, wenigstens zum Teil, um eine Anlagerung von nativem Ovalbumin an ein durch die Reaktion mit dem Hydro-

¹⁾ *Pauli und P. Dessauer, Helv. 25, 1225 (1942).*

phoben irreversibel verändertes Ovalbumin handelt. Eine erhebliche Assoziation zwischen nativen Albuminteilchen untereinander dürfte hingegen in sehr weitem Konzentrationsbereich nicht erfolgen, wie schon der lineare Gang der zugehörigen osmotischen Drucke anzeigt.

II.

Die folgenden Versuche über die Wirkung der elektrolytfreien Kombination von Ovalbumin und Seralbumin auf das Kongoblausol wurden in der Weise ausgeführt, dass erst die Mischung der Albumine bereitet und nach einigen Minuten mit dem Farbsol versetzt wurde. Die Angaben der Konzentration sind wie stets auf die Endmischung bezogen.

Die endgültige Ablesung erfolgte nach 24 Stunden. Die Zeichen von $++$ (klar absetzende vollständige Flockung) bis \pm (zarteste Trübung ohne Flocken) geben mit den Zwischenstufen (Flockenbildung mit Trübung) eine genügende Abstufung der Koagulation. In der Tabelle III sind als Beispiel Versuchsreihen für den konstanten Farbsolgehalt $3,2 \times 10^{-3}\%$ zusammengefasst. Die Zone des Schutzes ist mit Fettstrich, die der Sensibilisierung durch Strichelung eingerahmt.

Tabelle III.

Ovalbumin + Seralbumin + Kongoblau: $c = 3,2 \times 10^{-3}\%$.

Seralbumin ‰ ↓	Ovalbumin ‰																	
	0	2	1,5	1,25	1	$7,5 \times 10^{-1}$	5×10^{-1}	$2,5 \times 10^{-1}$	1×10^{-1}	$7,5 \times 10^{-2}$	5×10^{-2}	$2,5 \times 10^{-2}$	1×10^{-2}	$7,5 \times 10^{-3}$	5×10^{-3}	$2,5 \times 10^{-3}$	1×10^{-3}	
0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
2	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
1,5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
1,25	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
1	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
$7,5 \times 10^{-1}$	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
5×10^{-1}	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
$2,5 \times 10^{-1}$	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
1×10^{-1}	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
$7,5 \times 10^{-2}$	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
5×10^{-2}	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
$2,5 \times 10^{-2}$	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
1×10^{-2}	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
$7,5 \times 10^{-3}$	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
5×10^{-3}	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
$2,5 \times 10^{-3}$	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
1×10^{-3}	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

Während jedes der Albumine für sich das Farbsol vollständig zu flocken vermag (horizontale und vertikale Null-Reihen), zeigt die Kombination derselben ein ausgedehntes Gebiet der Hemmung oder gänzlichen Unterdrückung der Flockung, somit eine sehr voll-

kommene Schutzwirkung. Diese Zone geht in niedrigeren Proteinkonzentrationen in eine solche gesteigerter Koagulation, also einer Sensibilisierung durch das Zusammenwirken beider Eiweissarten über.

Die Schutzwirkung erstreckt sich aufsteigend von 0,25% Ovalbumin in dessen höhere Konzentrationen, beginnt jedoch beim Seralbumin bereits von $2,5 \times 10^{-3}$ % an. Das Sensibilisierungsgebiet reicht von $2,5 \times 10^{-2}$ % bis 0,1% Ovalbumin und für Seralbumin schon von $2,5 \times 10^{-3}$ % bis 0,1%. Es ist in beiden Fällen notwendig nach oben durch die Schwelle der vollständigen Flockung für die einzelnen Proteine begrenzt.

Wird der Farbsolgehalt auf die Hälfte ($1,6 \times 10^{-3}$ %) herabgesetzt, dann zeigt eine in gleicher Weise ausgeführte Versuchstabelle¹⁾ ein Schutzgebiet von derselben Ausdehnung bis herab zu $2,5 \times 10^{-3}$ % Seralbumin und 0,25% Ovalbumin. Dem Herabrücken der Schwelle vollständiger Flockung der einzelnen Albumine mit der Abnahme des Farbsolgehaltes entspricht erwartungsgemäss in der Eiweisskonzentration ein Sinken der oberen Grenzen der Sensibilisierung (von 0,1% auf 0,05% Seralbumin sowie von 0,025% auf 0,01% Ovalbumin).

Dass es sich bei der Flockungsverstärkung hier um echte Sensibilisierung und nicht um eine einfache Summation der koagulierenden Effekte beider Proteine handelt, geht aus den folgenden Beispielen hervor, welche auch zeigen, dass in der Kombination der Albumine keinesfalls das Seralbumin durch Ovalbumin oder umgekehrt ersetzt werden kann.

So gibt mit Kongoblau ($3,2 \times 10^{-3}$ %) ein Ovalbumin von 0,05% eine opaleszente Trübung (\pm) ebenso wie 0,075-proz. Ovalbumin und analog zeigt 0,025- bis 0,075-proz. Seralbumin keinerlei Andeutung einer Koagulation (-). Hingegen erzeugt die gleiche Proteinmenge in der Zusammensetzung 0,025% Seralbumin + 0,05% Ovalbumin eine komplette Flockung ($++$) in klarer Flüssigkeit.

Desgleichen findet sich beim verdünnten Farbsol ($1,6 \times 10^{-3}$ %) eine komplette Flockung ($++$) mit $2,5 \times 10^{-2}$ % Ovalbumin + $2,5 \times 10^{-3}$ % Seralbumin, während 0,025 und selbst 0,05% Ovalbumin allein und ebenso $2,5$ — $7,5 \times 10^{-3}$ % Seralbumin keinerlei Trübung (-) und 0,025-n. Seralbumin nur Trübung ohne gröbere Flockung (+) erkennen lässt.

Ähnliche Betrachtungen gelten für die Schutzwirkung, indem auch hier der Ersatz der Kombination beider Proteine durch eine entsprechend höhere Konzentration von Ovalbumin — nur dieses kommt dafür wegen seines hemmenden Überschusseffektes in Betracht — im allgemeinen nicht zur Herbeiführung einer Flockungshemmung, also eines Schutzes, genügt.

So zeigt die Zusammenstellung 0,5% Ovalbumin + 0,025% Seralbumin mit $3,2 \times 10^{-3}$ % Farbsol ein Fehlen jeder Flockung (-), dagegen gibt für sich 0,5% ebenso wie 0,75% Ovalbumin komplette Flockung ($++$). Desgleichen gibt bei $1,6 \times 10^{-3}$ % Farbsol die Kombination 0,75% Ovalbumin + 5×10^{-3} % Seralbumin nur Opaleszenz (\pm), während 0,75% ebenso wie 1% Ovalbumin allein zu vollständiger Koagulation ($++$) führt.

Wohl findet sich beim verdünnten Kongoblausol schon mit Ovalbumin allein in hohen Konzentrationen (2%) eine vollständige Flockungshemmung (Überschusseffekt) und demgemäss ein Bereich

¹⁾ Von der Wiedergabe wird aus räumlichen Gründen abgesehen.

der Schutzzone für die Kombination beider Albumine, wo der Ersatz des Seralbumins durch Ovalbumin anscheinend wenig oder nichts ändert. In sämtlichen unserer Versuchsreihen am konzentrierten, sowie in einem ausgedehnten Gebiet beim verdünnten Farbsol versagt jedoch die einfache Summenbildung des Proteingehaltes (als Ovalbumin) zur Erklärung der Schutzwirkung vollständig. So verbleibt nur die Annahme eines spezifischen Zusammenwirkens der beiden Albumine, wobei jedes derselben mit seinen besonderen elektrochemisch-konstitutiven Merkmalen zur Geltung kommt. Eine solche Betrachtungsweise gestattet in der Tat, wie im folgenden gezeigt werden soll, die vielfältigen Erfahrungen in den Hauptzügen zu überblicken und sonst unbeachtete Zusammenhänge abzuleiten.

III.

Man kann zunächst davon ausgehen, ob sich eine Verwandtschaft zwischen dem in den Hauptzügen übersehbaren, flockungshemmenden Überschusseffekt des Ovalbumins und dem Zusammenwirken der beiden Albumine feststellen lässt. Ein solcher Übergang liess sich vor allem in der Proteinkombination mit dem niedersten, eben wirksamen Seralbumingehalt erwarten und tatsächlich aufzeigen. Die folgende Tabelle IV vereinigt einige Versuchsreihen, in denen der reine Ovalbumineffekt (0 Seralbumin) und der der Kombination mit $2,5 \times 10^{-3}\%$ Seralbumin einander gegenübergestellt sind.

Tabelle IV¹⁾.

Seral- bumin % ↓	Ovalbumin %															
	0	2	1,5	1,25	1,0	$7,5 \times 10^{-1}$	5×10^{-1}	$2,5 \times 10^{-1}$	1×10^{-1}	$7,5 \times 10^{-2}$	5×10^{-2}	$2,5 \times 10^{-2}$	1×10^{-2}	$7,5 \times 10^{-2}$	5×10^{-3}	
A 0		++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A $2,5 \times 10^{-3}$	-	+	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+
B 0	-	-	+	+	++	++	++	++	+	+	-	-	-	-	-	-
B $2,5 \times 10^{-3}$	-	-	-	+	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	+	-

Beim Farbsol von $3,2 \times 10^{-3}\%$ (A) findet sich, wie der Vergleich der 1. und 2. Horizontalreihe (Tabelle IV) erkennen lässt, auf Zugabe von $2,5 \times 10^{-3}\%$ Seralbumin zum Ovalbumin eine ähnliche Optimumbildung der Flockung mit Abfall derselben in den höchsten Eiweisskonzentrationen wie beim reinen Ovalbumin, nur rückt die ganze Flockungsreihe in der Proteinkombination nach rechts in etwas

¹⁾ Versuche mit Kongoblau-Sol: A von $3,2 \times 10^{-3}\%$, B von $1,6 \times 10^{-3}\%$.

niedrigeren Ovalbumingehalt. Geht man mit dem Farbsol auf den halben Gehalt ($1,6 \times 10^{-3}\%$, B, dritte Reihe), so zeigt sich eine weitere Rechtsverschiebung des Optimums und beidseitigen Abfalles der Flockung in niedrigere Ovalbuminkonzentration. Die Wirkung der in der zweiten Reihe wiedergegebenen Kombination von Ovalbumin mit kleinen Mengen Seralbumin könnte darnach auch so beschrieben werden, als ob bei reinem Ovalbumin der Farbsolgehalt erheblich (nahezu auf die Hälfte) herabgesetzt würde. Wird nun das dünnere Farbsol ($1,6 \times 10^{-3}\%$) mit Ovalbumin + $2,5 \times 10^{-3}\%$ Seralbumin versetzt (4. Reihe), dann findet, verglichen mit dem reinen Ovalbumin (3. Reihe) eine analoge Verschiebung der ganzen Flockungsreihe mit ihrem Optimum nach rechts in noch niedrigere Ovalbuminkonzentrationen statt, ähnlich wie oben beim konzentrierten Farbsol. Diese Verschiebung der Flockungsreihe durch den Zusatz von Seralbumin bedeutet, verglichen mit dem reinen Ovalbumin, zugleich in den höheren Ovalbuminkonzentrationen die Ausbildung einer Schutzzone, und in den niedrigeren, für sich wenig oder gar nicht flockenden Ovalbuminkonzentrationen das Auftreten eines Bereiches von Flockungsverstärkung oder Sensibilisierung.

Nach den sonstigen Erfahrungen bestünde kein Hindernis, dem reinen Seralbumin schon in niedrigeren Konzentrationen durch Anlagerung von Farbsolteilchen mittels seiner positiven Gruppen den Effekt einer Abnahme der Gesamtladung und der freien Oberfläche, also im Ergebnis den einer Herabsetzung der Konzentration des hydrophoben Sols zuzuschreiben. Eine Schwierigkeit ergibt sich in unserem Fall daraus, dass das zugleich und reichlich anwesende Ovalbumin gleichfalls mit seinen positiven Gruppen zur Aggregation der hydrophoben Teilchen befähigt ist und mit dem Seralbumin in dieser Hinsicht in Wettstreit tritt. Zum Verständnis des starken spezifischen Einflusses von Seralbumin in der Proteinkombination bedarf es somit der zusätzlichen Annahme, dass es unter den gegebenen Bedingungen dem Ovalbumin bezüglich der Anlagerung der Solteilchen bedeutend überlegen ist. Diese Annahme wird durch mannigfache Erfahrungen gestützt. Solche bieten sich zunächst im Verhältnisse der ioni-schen bzw. ionisierbaren Gruppen in den beiden Proteinen.

Vor allem durch potentiometrische Bestimmungen sind für unsere beiden Albumine¹⁾ die Werte der maximalen Protonbindung im Säureüberschuss, also das Optimum an reaktionsfähigen, positiven Gruppen und ebenso das der negativen Gruppen durch die Protonabgabe im Laugenüberschuss mit guter Annäherung bekannt. Daraus berechnet sich die Relation aller verfügbaren positiven Gruppen je Gramm Protein für Seralbumin: Ovalbumin (150:110) mit 1,45. Unter Berücksichtigung der neueren osmotischen Druckbestimmungen der Molekulargewichte (ohne Hydratation) von 45000 für Ovalbumin und 70000 für Seralbumin (*G. S. Adair* und *M. E. Adair*²⁾) ermittelt sich das Verhältnis

¹⁾ *Pauli-Valko*, Kolloidchemie der Eiweisskörper, 1933, Dresden-Leipzig; daselbst Literatur.

²⁾ *G. S. Adair* und *M. E. Adair*, *Faraday* **36**, 23 (1940); vgl. Überblick *H. Neurath*, *Cold Spring Harbor Sympos.* **8**, 80 (1940).

der positiven Gruppen je Einzelteilchen für Seralbumin: Ovalbumin mit 1,95. Im ersten sind somit fast doppelt so viel enthalten. Andererseits beträgt die Relation der Höchstwerte der negativen zu den positiven Gruppen für das Seralbumin ($160^-:150^+$) 1,06 und für das Ovalbumin ($134^-:110^+$) 1,22, damit zugleich den nahezu rein zwitterionischen Charakter des Seralbumins gegenüber dem gleichzeitig acidoiden des Ovalbumins anzeigend, Unterschiede, welche vielfältig bei den Reaktionen der beiden hochgereinigten Albumine in Erscheinung treten.

Wenn auch den angegebenen Daten die der Messung am ehesten zugänglichen Höchstwerte an positiven und negativen Gruppen zu Grunde liegen, so werden deren Relationen nach allen Erfahrungen auch als praktisches Mass für die Verhältnisse in den reinen, zusatzfreien Proteinen bei ihrer Wechselwirkung mit unserem polyvalenten Hydrophoben Geltung besitzen. Gewisse, auf diesem Wege nicht erfassbare Differenzen betreffs der topischen Anordnung und der Dissoziationskonstanten der Gruppen könnten sich in mässigem Grade nach beiden Richtungen auswirken.

Aus diesen Relationen würde sich somit beim Seralbumin, verglichen mit dem Ovalbumin, die Möglichkeit für eine beträchtlich gesteigerte, durch die Teilchengrösse begünstigte, elektrostatische Wechselwirkung der positiven und eine geringere Gegenwirkung der eigenen negativen Gruppen ergeben. Diese würde das Seralbumin zur Anlagerung unserer hydrophoben Teilchen und entsprechend zur Reduktion von deren Gesamtladung und Oberfläche — im Effekt vergleichbar einer Verringerung der Farbsolkonzentration — besonders geeignet machen. Damit wäre eine gewisse Trennung der Funktionen der beiden Albumine verbunden, wobei dem Ovalbumin der ihm eigene, stabilisierende Überschusseffekt zukäme. Die Aufteilung der Leistungen der beiden Albumine in ihrer Kombination stünde im Einklang mit der Erfahrung, dass sich keine Anhaltspunkte ergeben für die Bildung zusammengesetzter Molekeln bei ihrer einfachen Mischung. Ihr Zusammenwirken würde in der Art erfolgen, dass die eigentliche Schutzhüllenbildung dem Ovalbumin zufiele, während vorwiegend das Seralbumin die dafür günstigen Bedingungen durch eine stärkere Aggregation der hydrophoben Teilchen schafft. Diese Auffassung findet in den anschliessenden Beobachtungen eine weitere Bekräftigung.

IV.

Zunächst lässt sich zeigen, dass die Schutzwirkung durch die beiden Albumine zweistufig nur in einer bestimmten Aufeinanderfolge der einzelnen Eiweisskörper¹⁾ zu erreichen ist.

Die Daten der folgenden Tabellen Va und Vb betreffen das Zusammenwirken von Seralbumin und Ovalbumin in Konzentrationen, in welchen jedes für sich das Kongofarbsol ($3,2 \times 10^{-3} \%$) vollständig in klarer Flüssigkeit flockt ($^{+}_{+}$), während sie gemischt die Flockung ganz hemmen. In den Versuchen wurde einmal das Farbsol erst mit Oval-

¹⁾ Das gilt jedoch nicht für das Zusammenwirken der Albumine bei der Sensibilisierung. So fand sich für 0,05 und 0,025% Seralbumin mit 0,075% Ovalbumin kein Unterschied der vollständigen Flockung bei gleichzeitiger Zugabe oder wechselnder Folge beim Zusatz der Albumine. Die einzelnen Albumine flocken das Farbsol in diesen Konzentrationen nicht.

bumin und nachträglich mit Seralbumin (in zweierlei Proben: gleich und nach 24 Stunden) versetzt. In einer parallelen Reihe wurde erst das Seralbumin und darauf das Ovalbumin hinzugefügt.

Tabelle Va.
Ovalbumin + Seralbumin

Seralbumin %	Ovalbumin %							
	0,75	0,5	0,75	0,5	0,75	0,5	0,75	0,5
0,5	++ +		++ +		—		++	
0,25	++	++ +	++ +	++ +	—	—	++	++
Nachher zugegeben:	Seralbumin sofort		Seralbumin nach 24 Std.		Ovalbumin sofort		Ovalbumin nach 24 Std.	

Tabelle Vb.
Ovalbumin 1,5% + Seralbumin

Reihenfolge	Seralbumin %					
	0,5	0,25	0,1	0,075	0,05	0,025
Seralbumin nach 24 Std.	++	++	++	++	++	++
Ovalbumin nach 24 Std.	+	+	+	—	—	—

Diese Versuche (Va) und analoge bei höherer Ovalbuminkonzentration (1,5 %, Vb) lehren, dass nur bei vorherigem Zusatz von Seralbumin und nachfolgendem von Ovalbumin, nicht aber in umgekehrter Folge eine Schutzwirkung zustandekommt. Das Ovalbumin zeigt, selbst nach 24 Stunden zugefügt, noch eine deutliche Flockungshemmung, indem ein Teil der Flocken zu einer diffusen Trübung rückgebildet wird. Mit höherem Ovalbumingehalt kann bei Zugabe nach 24 Stunden noch eine vollständige Klärung erfolgen.

Dieses Verhalten wird durch Anwesenheit niedriger Konzentration an Salz (1×10^{-2} bis 1×10^{-3} -n. NaCl) nicht geändert; erst durch höheren Salzgehalt (0,1-n.) gewinnt ein Seralbumin bei nachträglicher (innerhalb einer Stunde) Zugabe eine deutliche Schutzwirkung, welche unseren Erfahrungen über den Einfluss von Seralbumin + NaCl auf das Farbsol entspricht.

Die weitgehende Einschränkung des flockungshemmenden Effektes in unseren Versuchen auf die zeitliche Folge: erst Seralbumin, darauf Ovalbumin, erscheint in voller Übereinstimmung mit der Auffassung einer überwiegenden, primären Anlagerung der Farbsolteilchen durch das Seralbumin und einem sekundären „Hülleneffekt“ durch Ovalbumin. Dabei besteht nun ein gewisser Wettstreit der

zwei Albumine, da grundsätzlich beide als polyvalente Zwitterionen funktionieren, was bemerkenswerte Besonderheiten im Gange der Schutzwirkung, abhängig vom Mengenverhältnis der Albumine, zur Folge hat. Das, wie erörtert, dem Seralbumin eigene, elektrochemisch-konstitutiv begründete Übergewicht in bezug auf Anlagerung und Oberflächenreduktion der Solteilchen wird vorerst c. p. mit steigendem Seralbumingehalt noch anwachsen, so dass schon kleinere Mengen von Ovalbumin zur schützenden Oberflächenbildung durch dasselbe genügen. So kommt es zu einer Verbreiterung des Schutzgebietes, das sich im Optimum bei $7,5 \times 10^{-2}\%$ Seralbumin bis $0,25\%$ Ovalbumin herab erstreckt, während bei $2,5 \times 10^{-3}\%$ Seralbumin mit $1,5\%$ Ovalbumin die untere Grenze des notwendigen Zusatzes erreicht ist (Tabelle III). Erhöht sich jedoch der Seralbumingehalt über den optimal wirkenden ($7,5 \times 10^{-2}\%$) hinaus, dann treten die Seralbuminteilchen in stärkeren Wettbewerb um einen Anteil in der Oberflächenbildung der Assoziate und hindern damit die schützende Bedeckung seitens des Ovalbumins, so dass dieses immer höherer Konzentrationen zur Wirksamkeit bedarf. Mit weiter steigendem Seralbumingehalt verschmälert sich demgemäss — ein strikter Gegenbeweis gegen eine einfache Summation gleichartiger Proteinwirkungen — wiederum das Schutzgebiet, so dass schliesslich in unserer Reihe bei einem Zusatz unter 1% Ovalbumin keine Flockungshemmung eintritt. Es gibt also einen in den besonderen, zugrundeliegenden Mechanismen begründeten Unterschied der Gestalt des Schutzgebietes bei der Kombination mit Seralbumin + NaCl, wo es sich mit steigendem Eiweissgehalt bei allen Solen verbreitert (Tabelle I), und der mit Seralbumin + Ovalbumin, wo es mit zunehmendem Seralbumin bei unserem Farbsol durch ein Optimum der Breite geht und dann wieder abnimmt (Tabelle III).

Eine weitere Folge des hier ausgeführten Mechanismus vom Zusammenwirken der zwei, für sich flockenden Albumine lässt sich aus dem Gange des Überschusseffektes von reinem Ovalbumin bei Änderung der Farbsolkonzentration ableiten. Wie umgekehrt das Wachsen der letzteren die flockungshemmende Funktion des reinen Ovalbumins herabsetzt und in dessen höhere Konzentrationen verschiebt (Tabelle IV), so wäre auch c. p. eine beträchtliche Hemmung der Schutzwirkung und eine Schrumpfung der Schutzzone bei der Kombination beider Albumine mit einem Sol bedeutend höherer Konzentration und Gesamtladung zu erwarten.

Das zeigen in der Tat die folgenden Versuche (Tabelle VI) an einem hochgereinigten Antimontrisulfid-Sol, welches verglichen mit unserem Farbsol, fast den 20fachen Gehalt und die entsprechende Steigerung der Gesamtladung, d. i. der reaktionsfähigen Oberflächengruppen aufweist.

Tabelle VI.

Ovalbumin + Seralbumin I + Sb_2S_3 -Sol, $c = 0,052\%$.

Seralbumin % ↓	Ovalbumin %															
	0	2	1,5	1,25	1	$7,5 \times 10^{-1}$	5×10^{-1}	$2,5 \times 10^{-1}$	1×10^{-1}	$7,5 \times 10^{-2}$	5×10^{-2}	$2,5 \times 10^{-2}$	1×10^{-2}	$7,5 \times 10^{-3}$	5×10^{-3}	
0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1,25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$7,5 \times 10^{-1}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5×10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$2,5 \times 10^{-1}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1×10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$7,5 \times 10^{-2}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5×10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$2,5 \times 10^{-2}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1×10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$7,5 \times 10^{-3}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5×10^{-3}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$2,5 \times 10^{-3}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1×10^{-3}	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Bei dem weit konzentrierteren, gleichfalls rein acidoiden Antimontrisulfid-Sol finden sich, neben grundsätzlicher Übereinstimmung, die folgenden aus dem Vorausgegangenen verständlichen Abweichungen vom Verhalten unseres Farbsols:

1. Im reinen Ovalbumin (Horizontalreihe Null Tabelle VI) gibt es bis zur Konzentration 2% noch keinen merkbareren, die Flockung vermindernden Überschusseffekt.

2. In der Kombination der Albumine kommt es im untersuchten Bereich nur zu einer bestenfalls bis zur feinsten Trübung (\pm) führenden, unvollständigen Schutzwirkung. Deren Gebiet ist ausserdem stark eingengt, indem sie erst bei $2,5 \times 10^{-2}\%$ Seralbumin beginnt gegenüber $2,5 \times 10^{-3}\%$ beim Farbsol. Hingegen liegt in beiden Fällen das daneben zur merklichen Flockungshemmung nötige Ovalbumin bei 0,25%.

3. Auch beim Antimontrisulfid-Sol besteht jedoch die für den Mechanismus des Zusammenwirkens der Albumine charakteristische Gestalt der Schutzzone: Verschmälerung im niedrigsten Seralbumingehalt, dann bei steigendem Seralbumin erst Verbreiterung unter Passieren eines Optimums (bei $7,5 \times 10^{-2}\%$ Seralbumin), hierauf neuerliche Einengung.

4. Da die Trübungsschwelle (\pm) für die reinen Proteine beim Antimontrisulfid-Sol schon zufolge der grösseren Stosszahl in niedrigeren Konzentrationen beginnt — für Seralbumin bei $2,5 \times 10^{-3}\%$ (gegen nahe 0,1% beim Farbsol) und für Ovalbumin bei 0,01% (gegen 0,05% beim Farbsol) —, so rückt das Sensibilisierungsgebiet in niedrigere Proteinkonzentrationen. Andererseits werden auch seine oberen Grenzen stark herabgedrückt, da die vollständige Flockung ($++$) mit den einzelnen Albuminen gleichfalls in niedrigeren Konzentrationen einsetzt (Seralbumin 0,01% gegen 0,1%, Ovalbumin 0,25% gegen 0,5% beim Farbsol). Das bedingt eine starke Schrumpfung des Sensibili-

sierungsgebietes und zugleich auch dessen beträchtliches Abrücken von dem Schutzbereich, im Gegensatz zum engen Anschluss desselben beim Farbsol.

Eine vollständige Versuchsreihe¹⁾ wurde auch mit dem (potentiometrisch mittels Glaselektrode) zum $p_H = 6,58$ neutralisierten Kongofarbsol von $3,2 \times 10^{-3}\%$ ausgeführt. Hier findet sich wie bei dem gleichen acidoiden Sol eine vollkommene Schutzwirkung durch die Kombination der Albumine, sowie die charakteristische Gestalt der Schutzzone mit einem Optimum der Breite sowie einem an das Schutzgebiet angrenzenden Sensibilisierungsbezirk. Die Abweichungen von den Versuchen am acidoiden Farbsol sind unwesentlich.

V.

Das Bestehen eines Überganges vom flockungshemmenden Überschusseffekt des reinen Ovalbumins zur Schutzwirkung der Albuminkombination beim Kongoblausol verweist auf die Wichtigkeit, welche dem näheren Einblick in den Mechanismus des Überschusseffektes für das Verständnis der Kombinationswirkung der beiden Proteine zukommt. In dieser Hinsicht erscheinen die folgenden, in der gleichen Weise wie am Farbsol durchgeführten, Beobachtungen am gereinigten Goldsol von besonderem Interesse.

Das Goldsol war in der wiederholt beschriebenen²⁾ Weise durch Zerstäuben in 8×10^{-4} -n. HCl hergestellt, durch E.Dek. in der neuen *Pauli'schen* Apparatur³⁾ gereinigt und auf 1,13 g/Liter konzentriert worden. Mit der Glaselektrode fand sich $p_H = 3,93-3,96$ ($a_H = 1,17-1,10 \times 10^{-4}$). Endkonzentration in den Versuchen 50 mg/Liter. Stammsol $\kappa = 5,3 \times 10^{-5}$ r. O. Vergleicht man die Werte mit denen extrem gereinigter Goldsole, dann würde sich für unsere Versuche eine Höchstverunreinigung mit $2-2,3 \times 10^{-6}$ -n. HCl ergeben, die jedenfalls für Eiweisskonzentrationen über $1 \times 10^{-3}\%$ nicht merkbar wird. Ein sehr kleines Gebiet von Farbumschlag in $10^{-4}\%$ Albumingehalt könnte mit der Salzsäure-Beimengung in Zusammenhang stehen. Das hier verwendete andere Seralbumin II konnte nach dem Vergleich mit unseren Standardwerten eine Elektrolytverunreinigung von der Grössenordnung 10^{-5} -n. für 3% Seralbumin enthalten, die in den Proteinkonzentrationen des Schutzgebietes vollkommen wirkungslos ist und im Bereich der Sensibilisierung auf 10^{-8} -n. abfällt, also gleichfalls ausscheidet. Das Zeichen \equiv bedeutet Farbumschlag nach violett ohne Trübung.

Hervorzuheben in diesen Versuchen sind zunächst die Flockungsreihen der einzelnen Albumine. Hier zeigt zum Unterschied vom Kongofarbsol nicht nur das Ovalbumin, sondern auch das Seralbumin einen flockungshemmenden Überschusseffekt in den höchsten Konzentrationen der Reihe, der nur wenig hinter dem des Ovalbumins zurücksteht. Demgemäss findet sich in der Kombination der Albumine: 1) Eine sehr vollständige Schutzwirkung; 2) Nimmt dieselbe auch in den höheren Seralbuminkonzentrationen stetig zu,

¹⁾ Von der ausführlichen Wiedergabe wird abgesehen.

²⁾ *Pauli* und *E. Russer*, Koll. Z. **58**, 22 (1932); *Pauli*, *E. Russer*, *E. Brunner*, Koll. Z. **72**, 26 (1935); *Pauli*, *J.* und *St. Szper*, *Faraday* **35**, 1316 (1939).

³⁾ *Pauli*, *Helv.* **25**, 137 (1942).

da es dort kein Entgegenwirken der beiden Albumine wie beim Kongoblausol, sondern nur einen gleichsinnigen Überschusseffekt derselben gibt. An die Stelle der charakteristischen Gestalt des Schutzgebietes bei unserem Farbsol — mit einer Abnahme seiner Breite in höherem Seralbumingehalt nach Passieren eines Optimums in mittleren Seralbuminkonzentrationen (Tabelle III) — tritt beim Goldsol eine stetige Ausdehnung desselben gegen niedrigere Konzentrationen von Ovalbumin mit wachsendem Seralbumin.

Tabelle VII.
Ovalbumin + Seralbumin II + Gold-Sol, c = 50 mg/L.

Seralbumin ‰ ↓	Ovalbumin ‰																					
	0	2	1,5	1,25	1	$7,5 \times 10^{-1}$	5×10^{-1}	$2,5 \times 10^{-1}$	1×10^{-1}	$7,5 \times 10^{-2}$	5×10^{-2}	$2,5 \times 10^{-2}$	1×10^{-2}	$7,5 \times 10^{-3}$	5×10^{-3}	$2,5 \times 10^{-3}$	1×10^{-3}	$7,5 \times 10^{-4}$	5×10^{-4}	$2,5 \times 10^{-4}$	1×10^{-4}	
0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1,25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$7,5 \times 10^{-1}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5×10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$2,5 \times 10^{-1}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1×10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$7,5 \times 10^{-2}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5×10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$2,5 \times 10^{-2}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1×10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$7,5 \times 10^{-3}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5×10^{-3}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$2,5 \times 10^{-3}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1×10^{-3}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$7,5 \times 10^{-4}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5×10^{-4}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$2,5 \times 10^{-4}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1×10^{-4}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Da ferner beim Goldsol die Schwellenwerte der ersten Trübung sowie der vollständigen Flockung in niedrigere Eiweisskonzentrationen rücken, so wird auch das Gebiet der Sensibilisierung oder Flockungsverstärkung eingengt und, verglichen mit Kongoblausol, auf um etwa eine Größenordnung geringere Proteinkonzentrationen beschränkt.

Trotz des Bestehens einer flockungshemmenden Überschusswirkung in den höheren Konzentrationen jedes einzelnen der beiden Albumine lässt sich jedoch die sehr vollkommene Schutzwirkung ihrer

Kombination keinesfalls auf eine einfache Summation ihrer Konzentrationen zurückführen, wie die folgenden, leicht zu vermehrenden Beispiele aus der Tabelle VII lehren.

So zeigt 0,25% Ovalbumin + 0,25% Seralbumin in der Mischung mit dem Goldsol nur eine zarte Opaleszenz (\pm), während jedes einzelne Albumin von 0,25%, aber auch von 0,5% Gehalt eine starke Flockung in etwas trüber Flüssigkeit (+ +) gibt. Ebenso liefert die Kombination 0,5% Ovalbumin + 0,5% Seralbumin nur eine zarte Opaleszenz, während die einzelnen Albumine auch in 1% Gehalt vollständige Flockung bewirken.

Danach dürfte auch beim Goldsol in der Mischung der Albumine eine Zwischenform der Aggregation mit dem Hydrophoben entstehen, welche die Ausbildung einer schützenden Eiweissoberfläche begünstigt. Der Weg einer Trennung der Funktion der einzelnen Albumine mittels zeitlicher Zerlegung ihrer Mischung, wie dies beim Kongoblausol möglich war, erwies sich jedoch beim Goldsol nicht gangbar. Denn die Ergänzung einer flockenden Konzentration durch nachträglichen entsprechenden Zusatz, sei es des gleichen oder des zweiten Albumins (z. B. von 0,05—0,075% Ovalbumin auf 1,5 und 2%) führte hier nicht mehr zur Rückbildung der Flockung, also auch nicht zur Restituierung einer in der fertigen Mischung bestehenden Schutzwirkung.

Die Tatsache, dass beim Goldsol, zum Unterschiede vom Kongoblausol, auf ersten Zusatz eines flockenden Albumins eine anschließende Prüfung der nachträglichen Reversibilität der Flockung regelmässig negativ ist, könnte ihre Erklärung in der leichten Ablösbarkeit der aufladenden Gold(I)-komplexe bei unserem Goldsol finden, welche mit deren Disproportionierung in Gold(III)-komplex, Gold und Salzsäure einhergeht¹⁾. Eine solche Komplexablösung kommt beim Kongoblausol mit seinen durch Hauptvalenzkräfte verbundenen Sulfogruppen nicht in Betracht.

Einen beachtenswerten Hinweis darauf, dass auch beim Goldsol, wie übrigens bei allen negativen Hydrophoben, eine — oben mit dem günstigeren Verhältnis der positiven Gruppen und mit der Teilchengrösse des Seralbumins in Zusammenhang gebrachte — stärkere Aggregation der Hydrophoben an das Seralbumin vorliegt, verglichen mit dem mehr acidoiden Ovalbumin, liefert die folgende Tabelle VIII. Sie bringt eine Zusammenstellung von Schwellenwerten der Trübung durch die beiden Albumine an einer Reihe hochgereinigter negativer und positiver Hydrophoben.

Die Versuche lehren, dass Seralbumin regelmässig einen weit niedrigeren Schwellenwert bei den negativen Hydrophoben besitzt als das Ovalbumin. Umgekehrt werden die positiven Hydrophoben (Eisenoxyd, Nachtblau) von Ovalbumin leichter koaguliert als von Seralbumin. Es entscheidet also im letzteren Falle die Relation der negativen zu den positiven Gruppen der beiden Albumine, welche beim Ovalbumin die interionische Reaktion mit positiven Hydrophoben stärker begünstigt, die mit negativen

¹⁾ *Pauli*, Die Konstitution des kolloiden Goldes, *Naturw.* **20**, 573 (1932); *Pauli* und *E. Russer*, *Koll. Z.* **58**, 22 (1932); *Pauli*, *E. Russer* und *E. Brunner*, *Koll. Z.* **72**, 26 (1935).

hemmt. Umgekehrt liegen die Verhältnisse beim Seralbumin für die interionische Wechselwirkung seiner positiven Gruppen mit negativen Hydrophoben günstiger als beim Ovalbumin, wie schon für das Kongoblauöl näher ausgeführt wurde. Daneben erscheinen die Teilchengröße, welche beim Seralbumin c. p. die interionische Feldwirkung steigern müsste, sowie andererseits beim Ovalbumin die Vermehrung der Teilchenzahl und damit der Zusammenstöße nur als sekundär mitwirkende, den Sinn des Ergebnisses nicht ändernde Umstände.

Tabelle VIII.
Schwellenwerte der Trübung.

Hydrophobe % $\times 10^{-3}$	a) Kongoblau 3,14	b) Kongoblau 3,15	c) As ₂ S ₃ 27,5	Sb ₂ S ₃ 52,0	Goldsol 5,0	c) FeO·OH 13,6	d) Nachtblau 5,0
Ovalbumin %	2,75—3,16 $\times 10^{-2}$	$2,25 \times 10^{-2}$	$2,5 \times 10^{-2}$	1×10^{-2}	1×10^{-3}	1×10^{-3}	5×10^{-3}
Seralbumin %	1×10^{-3}	1×10^{-4}	$5,0 \times 10^{-3}$	$2,5 \times 10^{-3}$	5×10^{-4}	$2,5 \times 10^{-3}$	5×10^{-3}

a) *Pauli und L. Singer*, l. c.

b) *Pauli und E. Weiss*, l. c.

c) *Pauli und P. Dessauer*, l. c.

d) *Pauli und E. Fried*, unveröff.

Während nun bei unserem Goldsol der Unterschied in dessen Aggregation bei niedrigem Eiweisszusatz zugunsten des Seralbumins gegenüber dem Ovalbumin sehr deutlich ausgeprägt ist, findet sich hier bei beiden Albuminen in den höheren Konzentrationen ein sehr ausgiebiger flockungshemmender Überschusseffekt. Er bleibt für das Seralbumin nur wenig hinter dem des Ovalbumins zurück.

Eine möglichst allgemeine Erfassung der Bedingungen für die Flockungshemmung im Eiweissüberschuss wird, ähnlich wie bei der Schutzwirkung, davon ausgehen, dass dazu ein genügender Anteil der Oberfläche des Assoziates mit dem Hydrophoben vom Protein gebildet sein muss, und dass ferner dieser Proteinanteil seine Hydratation und damit die Lösungsstabilität bewahrt hat oder im geläufigen Sinne nicht denaturiert worden ist.

Für die Proteindenaturierung als Folge der Anlagerung an das Hydrophobe sind verschiedene Umstände von Bedeutung. Während die mit der Denaturierung einhergehende, intramolekulare Umlagerung konstitutiv noch völlig im Dunkel liegt, bildet hier unzweifelhaft den ersten Schritt die interionische Wechselwirkung zwischen den betreffenden ionischen Gruppen am Eiweiss und den aufladenden ionogenen Komplexen des Hydrophoben, die zur Inaktivierung bzw. festeren Assoziation derselben führt. In dieser Hinsicht besteht eine Verwandtschaft der Vorgänge mit der Eiweissdenaturierung durch gewisse molekular-disperse Säureanionen bzw. Schwermetallkationen. Wie hier der Bau dieser Anionen und Kationen und nicht allein ihre Wertigkeit für die Empfindlichkeit und Vollständigkeit der Reaktion bestimmend ist, so bedingen bei den einzelnen Hydrophoben auch die elektrochemisch-konstitutiven Merkmale ihrer Oberflächengruppen gewisse Differenzen in ihren Reaktionen mit den reinen, zwitterionischen Proteinen, deren Kenntnis zurzeit noch mannigfacher Erweiterung bedarf.

Eine hervorragende Bedeutung für das Zustandekommen der Proteindenaturierung kommt dem Grade der Vollständigkeit unserer Kolloid-Kolloid-Reaktion zu. Die tiefere Proteinänderung bleibt auch mit sonst wirksamen Molekulardispersen aus, wenn nur eine einzige oder zu wenige der entsprechenden, ionischen Gruppen der Eiweissmolekel unter Festlegung des Gegenions — etwa von Cl' oder SO_4'' der starken Salz- oder Schwefelsäure oder des Zn'' von Zinksulfat — reagiert haben. Mit den ionogenen Gruppen des Hydrophoben kommt es im allgemeinen in niedrigem oder mittlerem Eiweissgehalt, zumal bei Überschuss des nicht allzu grobdispersen oder des polydispersen Hydrophoben, trotz der infolge der Teilchengrösse unvermeidlichen sterischen Behinderung, zu genügend vollständiger Reaktion mit den zugehörigen Gruppen des Proteins. Bei sehr hohem Eiweissgehalt und mit stark abnehmender Konzentration des Hydrophoben, noch begünstigt durch dessen etwaige Grobteiligkeit, wird jedoch ein einzelnes z. B. Goldteilchen zugleich mit zahlreichen Eiweissteilchen reagieren, von denen jedes im idealen Grenzfall gerade nur mittels einer seiner ionischen Gruppen zur Wechselwirkung gelangen würde. Wegfall der Proteindenaturierung, ein die Flockung hemmender Überschusseffekt oder Schutzwirkung ergeben sich dann als Ausdruck der Unvollständigkeit der Kolloid-Kolloid-Reaktion. Diese kann noch durch höhere Feinteiligkeit des Proteins und damit Reaktionsverteilung auf eine grössere Zahl Eiweissmolekeln gefördert werden. Der hier herangezogene Grenzfall mit dem Hydrophoben als Kern und den aufgelagerten, zahlreichen Eiweissteilchen samt den entsprechenden Übergangsformen stellt somit gleichfalls eine nucleare Aggregation (*Pauli*) dar und bildet das genaue Gegenstück zu jenem Typus derselben, für welchen bei niedrigem Eiweissgehalt das Protein den Kern, das Hydrophobe mit seinen Teilchen die Oberfläche des Aggregates beistellt und zur Sensibilisierung oder gesteigerten Flockbarkeit durch Elektrolytzusatz führt. Die Unvollständigkeit¹⁾ der Kolloid-Protein-Reaktion im Eiweissüberschuss bildet unzweifelhaft die allgemeinste Ursache für den in hohen Proteinkonzentrationen auftretenden flockungshemmenden Effekt. Daneben tritt für die hohen Proteinkonzentrationen die Möglichkeit einer Anlagerung von nativem an denaturiertes Protein an Bedeutung zurück, doch kann auf diese Weise eine Differenzierung im Verhalten der Albumine zustandekommen.

Bei den nativen Albuminen erfolgt in weitem Konzentrationsbereich keine Assoziation der Teilchen miteinander. Alle Anlagerung an den Hydrophoben beruht primär auf dessen elektrischer Feldwirkung. Beim hochgereinigten Leimglutin, das überdies wenig zu irreversiblen Änderungen neigt, findet sich hingegen eine mit wachsender Konzentration stark zunehmende Teilchenassoziation, wie auch der unverhältnismässige Viskositätsanstieg bis zum Übergang zur festen Gallerte anzeigt. Demgemäss nimmt dieses Protein eine besondere Stellung ein, indem es das bisher extremste Beispiel von flockungshemmendem Überschusseffekt bietet. Für das Kongoblausol (von $3,15 \times 10^{-3}\%$) fand sich ein sehr enges Flockungsgebiet zwischen 3×10^{-4} bis $7,7 \times 10^{-3}\%$ Leimglutin²⁾. Der sehr vollkommene Überschusseffekt kommt hier in dreimal niedrigerer Gröszenordnung des Gehaltes zustande als beim Ovalbumin. Nach diesem Verhalten wäre die Prüfung des Zusammenwirkens von Leimglutin mit den einzelnen Albuminen bei Hydrophoben von besonderem Interesse.

1) In besonderen Fällen könnte die Neigung zu filmartiger Entfaltung der Eiweissteilchen der Unvollständigkeit ihrer Reaktion bis zu einem gewissen Grade entgegenwirken.

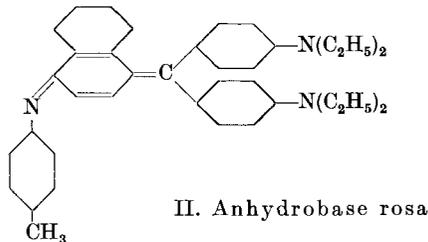
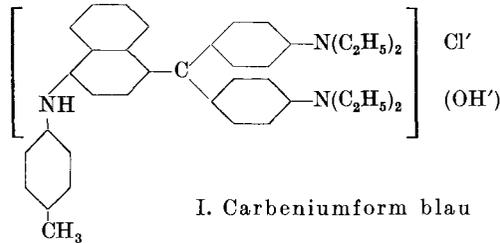
2) *Pauli* und *E. Weiss*, l. c.

VI.

Von elektropositiven Hydrophoben wurde bisher nur das hochgereinigte Nachtblau-Sol in seinen Wechselwirkungen mit jedem einzelnen und mit der Kombination der beiden Albumine untersucht¹⁾. Dabei ist eine gewisse Mannigfaltigkeit der Reaktionen als Folge der leichten konstitutiven Wandlungsfähigkeit dieses Farbstoffes zu berücksichtigen, welche auf der anderen Seite manche Besonderheiten unserer Kolloid-Eiweiss-Reaktion erkennbar macht.

Bei diesem positiven Sol aus der Gruppe der Diphenyl-naphtylmethan-Farbstoffe wurde die Reinigung, wie beim Kongofarbsol, mittels ED und Edek. vorgenommen²⁾, wobei das blaue, stark mit Elektrolyten verunreinigte Farbchlorid des Handels von allen Beimengungen vollständig befreit und in ein lilarosa gefärbtes, gröberteiliges Sol übergeführt wird. Die dabei unter Abtransport von Cl⁻ und H⁺-Ionen gesteigerte Membranhydrolyse des Farbsalzes muss zur ständigen Nachbildung von Farbbase führen, welche dann einer fortlaufenden Umformung zur farbigen Anhydrobase unterliegt.

Auf Grund der in den letzten Jahren von *R. Wizinger*³⁾ weiter entwickelten und an einem reichen Material belegten Vorstellungen über den Zusammenhang von Farbe und Konstitution darf dem blauen Farbsalz eine benzoide Carbeniumform zugeschrieben werden (I), die mit einer chinoiden Imoniumform in einem elektromeren Gleichgewicht steht.



Der Ersatz des Cl['] durch OH['] in der Farbbase würde dann unter Wasserabgabe den Übergang in eine naphtochinoide Form (II) bewirken, welche im Sinne von *Wizinger*, mit C und N als positiven und negativen Ladungs-Schwerpunkten, intramolekular ionoid oder dipolartig gebaut wäre. Damit stünde der Farbumschlag und zugleich die verstärkte, kolloide Assoziation zu größeren Teilchen in Einklang. Einer etwaigen zwitterionischen Zwischenstufe zwischen I und II auf dem Wege zur naphtochinoiden Umlagerung dürfte keinesfalls eine merkliche Beständigkeit zukommen.

¹⁾ Unveröffentlichte Versuche von *Pauli* und *E. Fried* 1937/38, die der Darstellung in diesem Abschnitt zugrundeliegen. *P.*

²⁾ *Pauli* und *F. Lang*, *M.* **67**, 159—186 (1936).

³⁾ *R. Wizinger*, *Organische Farbstoffe*, Bonn, F. Dümmler 1933, J. pr. [2] **157**, 129 (1941).

Wie *Pauli* und *F. Lang*¹⁾ fanden, bewirkte Einleiten von Kohlendioxyd ebenso wie Zusatz von 1×10^{-3} -n. Essigsäure in ihrem Sol von $8,61 \times 10^{-2}\%$ Trockengehalt und $\kappa = 7,33 \times 10^{-6}$ r. O. nur einen Umschlag gegen violett. In 1×10^{-3} -n. HCl oder H_2SO_4 oder in 0,1-n. Essigsäure wird es hingegen dunkelblau. In der Endkonzentration 0,005% schlug unser Sol schon in 1×10^{-4} -n. HCl in tiefblau um, ein Wert, der in guter Annäherung den gesamten Molekeln unsres Farbsols also einer vollständigen Durchreaktion entspricht. Dass selbst in sauren, blauen Farbsalzlösungen ein Anteil hydrolytisch freigesetzter Base besteht, zeigt ein Verteilungsversuch mit Toluol, welches selbst die blaue Farblösung in 0,01-n. H_2SO_4 beim Schütteln ganz entfärbt und dabei karminrot wird¹⁾. Andererseits bewirkt 30-proz. reiner Alkohol die Bildung einer blauen Lösung¹⁾ aus dem rosaroten Sol, indem er offenbar das Gleichgewicht in Richtung einer ionischen Carbeniumform der Base verschiebt. Als aufladende Oberflächenkomplexe kommen ionische Farbmolekel vor allem der Carbeniumform in Betracht, deren Gleichgewicht durch ihre Assoziation mit der ionoiden Anhydrobase des Teilchenkerns wesentlich mitbestimmt werden dürfte, wie dies an verschiedenen Kolloiden hinsichtlich der aufladenden Komplexe in Verbindung mit dem Neutralteil des Hydrophoben in früheren Arbeiten festgestellt werden konnte. Als Gegenionen des Sols bleiben nur Reste des ursprünglichen Cl' sowie HCO_3' in Frage, da in den vorliegenden Konzentrationen von höchstens 10^{-5} -n. freie OH' -ionen ohne besondere Kautelen nicht beständig erhalten werden können. *Pauli* und *Lang* schätzten für ihr Sol das Kolloidäquivalent K^* auf 40 Farbstoffmolekel je freie Ladung. In der von uns verwendeten Endkonzentration 50 mg/Liter dürfte, der Verdünnung entsprechend, K^* erheblich kleiner sein. Mit dem Farbumschlag in Blau verschwindet bei unserem Sol der *Tyndall*-Effekt, die damit eingetretene Desassoziation und gesteigerte Hydratation anzeigend.

Bei der Reaktion unseres Nachtblausols mit den einzelnen Albuminen lassen sich zwei Erscheinungen als von verschiedenen konstitutiven Eigenschaften derselben abhängig auseinanderhalten: a) Der Farbumschlag gegen Blau; b) die Kolloid-Kolloid-Flockung (KKFI) mit dem positiven Hydrophoben.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle IX (*Pauli* und *E. Fried*) für Serumalbumin und Ovalbumin wiedergegeben. Sämtliche Eiweisslösungen sind durch ED und EDek. zu unseren Standardwerten²⁾ in bezug auf κ und a_{II} gereinigt.

Tabelle IX.
Nachtblausol 50 mg/L.

Schwellenwerte für	Farbe bläulich	Farbe tiefblau	Flockung Beginn	Flockung Optimum	Keine Flockung mehr, klar
Seralb. %	5×10^{-4}	5×10^{-3}	5×10^{-3} (+)	2×10^{-2} (+)	0,2
Ovalb. %	1×10^{-2}	5×10^{-2}	5×10^{-4} (+)	3×10^{-3} (+, +)	0,2

Demnach bewirken die untersuchten Eiweisskörper³⁾:

1. In einer bestimmten Konzentration einen beginnenden Farbwechsel des roten Sols (in Bläulich), der von einer höheren Eiweisskonzentration an in Tiefblau umschlägt.

2. Bei einem bestimmten, vom obigen verschiedenen Eiweissgehalt findet sich eine Flockung mit dem Sol, die zunächst mit steigender Konzentration durch ein Optimum geht.

¹⁾ *Pauli* und *F. Lang*, l. c.

²⁾ *D. v. Klobusitzky* und *Pauli*, Bioch. Z. **260**, 201 (1933).

³⁾ Das Gleiche zeigten Versuche mit der hochgereinigten Pseudoglobulin-Fraktion.

3. Mit weiter zunehmender Konzentration bleibt dann die Flockung von einer gewissen Grenze bei unseren Eiweisskörpern aus. Sie zeigen somit sämtliche einen sehr vollkommenen, flockunghemmenden Überschusseffekt.

Für den Farbwechsel des Sols erscheint, im Unterschiede von der KKF, der saure Charakter des Albumins nicht massgebend. Das zeigt sich schon an der grössenordnungsmässigen Überlegenheit des fast rein zwitterionischen Seralbumins gegenüber dem mehr acidoiden Ovalbumin. Dass es sich bei dem Farbumschlag durch die Proteine überhaupt nicht um einen einfachen Effekt der Protonenaktivität (p_H) handelt, ergibt sich im einzelnen aus dem folgenden Vergleich.

In reiner Salzsäure gibt unser Farbsol den ersten bläulichen Farbton bei 5×10^{-5} -n. und wird bei 1×10^{-4} -n. HCl tiefblau, entsprechend im ersten Falle einer teilweisen, oberflächhaften, im zweiten einer durchgehenden vollständigen Reaktion¹⁾ der Solteilchen. Unser Seralbumin ergab nun in 2% eine H-Aktivität von $5,24 \times 10^{-6}$ -n. ($p_H = 5,28$). Da die erste Farbänderung mit dem Nachtblausol in 5×10^{-4} % Seralbumin, der tiefblaue Umschlag in 5×10^{-3} % erfolgt, würde es sich um eine zugehörige Abnahme der H-Aktivität von gegen 3 Grössenordnungen handeln. Ein direkter p_H -Effekt scheidet hier gänzlich aus. Nicht minder schlagend ist das Verhalten im kathodisch wandernden²⁾, also elektropositiven, gereinigten Pseudoglobulin, dessen $a_H = 2,13 \times 10^{-6}$ -n. in 2-proz. Lösung vor allem der anwesenden Kohlensäure zuzuschreiben ist, und das in 5×10^{-3} % den ersten Farbwechsel bewirkt. Dieser geht allerdings erst bei 0,1% in Tiefblau über. Gerade das stärkst saure unserer Proteine, das Ovalbumin, erweist sich am schwächsten wirksam mit einem ersten Farbwechsel in 0,01-proz. Lösung.

Für die Bildung der blauen, ionischen Form von Nachtblau bei der Reaktion mit den Albuminen bleibt somit ein einfacher Effekt der H-Aktivität ausser Betracht, und es stehen nur zwei Möglichkeiten in Frage: a) Eine bevorzugte Reaktion mit bestimmten negativen Gruppen des Proteins, welche das Gleichgewicht im Sinne der Nachbildung von Farbionen (Carbenium- oder Imoniumformen) verschiebt. b) Begünstigung einer komplexen, ionischen Farbtype durch Anlagerung von als Dipole funktionierenden Gruppen, wofür der Farbumschlag in reinem 30-proz. Äthanol ein gewisses Analogon bietet. Schliesslich könnten sich auch beide Möglichkeiten kombinieren, ähnlich der Reaktion von verschiedenen Schwermetallionen mit Proteinen, die zugleich mit seitenständigen ionischen oder ionisierbaren Carboxyl- und mit dipolischen Aminogruppen derselben komplexartig erfolgen kann.

Während bei Ovalbumin (und Pseudoglobulin) der Farbumschlag gegen Blau erst im Gebiete der wieder abnehmenden KKF, also des einsetzenden Überschusseffektes auftritt, kommt es bei Seralbumin, anscheinend spezifisch, schon in Konzentrationen unterhalb der Flockungsschwelle zum ersten Farbwechsel, der an der Schwelle der Flockung in Tiefblau umschlägt. Nun bedeutet das Auftreten des

¹⁾ Erst in 0,02-n. HCl tritt eine weitere Änderung in lichtgrünblau auf, wohl im Zusammenhang mit der Bildung eines höherwertigen Farbions, wofür vor allem eine zweite Gruppe $-(C_2H_5)_2$ zur Verfügung steht.

²⁾ *Pauli und Th. Steninger, Bioch. Z.* **205**, 71 (1929).

ionischen Farbsalzes zugleich Desassoziation des grobteiligen Sols und Übergang in eine feindisperse Form. Mit dieser Änderung des Farbsolcharakters dürfte die geringere Ausbildung der Flockung beim Seralbumin gegenüber der massigeren bei den zwei anderen untersuchten Proteinen zusammenhängen, mit welchen es den die Flockung hemmenden Überschusseffekt gemeinsam hat¹⁾.

Sowohl Seralbumin wie auch Ovalbumin geben mit Nachtblausol (50 mg/Liter) auf Zugabe von Neutralsalz (NaCl) sehr vollkommene Schutzwirkung und in niedrigerem Proteingehalt ein Sensibilisierungsgebiet. Die reine Salzflockung des Hydrophoben lag bei 0,1-n. NaCl. Der Schutz gegen Natriumchlorid begann bei $1,5 \times 10^{-3}$ % Seralbumin und für Ovalbumin bei 2×10^{-2} %. Er war im Gebiete abnehmender, reiner Eiweissflockung zugleich gegen die Protein-Farbsol-Koagulation gerichtet, was für Seralbumin Zugabe von $2,5 \times 10^{-3}$ -n., für Ovalbumin 1×10^{-2} -n. NaCl erforderte. Die Sensibilisierung der Flockung trat bei Ovalbumin in 5×10^{-5} %, bei Seralbumin in $1,5 \times 10^{-4}$ % ein. Als niederster, die Koagulation fördernder Salzgehalt ermittelte sich für Ovalbumin 2×10^{-3} -n., für Seralbumin 5×10^{-4} -n. NaCl. Das Gebiet des Farbwechsels durch die Proteine blieb in den untersuchten Salzkonzentrationen (bis 0,2-n.) wenig²⁾ beeinflusst und fiel mit dem im reinen Albumin sehr nahe zusammen.

In der folgenden Tabelle X (*Pauli* und *E. Fried*) ist das Zusammenwirken beider Albumine für die Koagulation und den Farbumschlag unseres Nachtblausols verzeichnet.

Tabelle X*).

Ovalbumin + Seralbumin + Nachtblausol 50 mg/L.

Seralbumin % ↓	Ovalbumin %											
	0	0,5	0,2	0,1	5×10^{-2}	2×10^{-2}	1×10^{-2}	5×10^{-3}	1×10^{-3}	5×10^{-4}	1×10^{-4}	2×10^{-5}
0
0,75
0,3
0,15
$7,5 \times 10^{-2}$
3×10^{-2}
$1,5 \times 10^{-2}$
$7,5 \times 10^{-3}$
$1,5 \times 10^{-3}$
$7,5 \times 10^{-4}$
$1,5 \times 10^{-4}$
$3,5 \times 10^{-5}$

*) Es bedeutet + geringe Flockung, ++ starke, +++ vollständige Flockung, ferner das Zeichen · ersten Farbwechsel bläulich, ·· Umschlag in Tiefblau.

¹⁾ Vgl. Tabelle X die horizontale und vertikale Nullreihe, welche Koagulation und Farbwechsel der einzelnen Albumine mit Nachtblausol wiedergeben.

²⁾ Bei Seralbumin wurde im stark flockenden 0,2-n. NaCl der beginnende Farbwechsel von 5×10^{-4} % gegen 1×10^{-3} % hinaufgerückt, bei Ovalbumin rückte er an der unteren Grenze des ganzen Schutzgebietes mit der Hemmung der Flockung von 0,05% hinunter auf 0,02%. Verstärkte Flockung hemmt, Unterdrücken der Flockung begünstigt somit merkbar den Farbwechsel, ganz entsprechend dessen Beziehung zur Assoziation der Solteilchen.

Im Falle des Nachtblausols tritt der Zusammenhang des flockungshemmenden Überschusseffektes jedes einzelnen der Albumine mit der Schutzwirkung ihrer Kombination ganz in den Vordergrund. Das selbst nicht mehr flockende Seralbumin von 0,75 % unterdrückt zugleich die Flockung durch Ovalbumin vollständig. Dasselbe gilt umgekehrt für 0,5 % und z. T. für 0,2 % Ovalbumin, welche für sich das Farbsol nicht mehr flocken, aber auch die Flockung desselben durch Seralbumin gänzlich aufheben. Die beiden getrennten Gebiete gegenseitigen Schutzes durch die flockungshemmende Überschusswirkung des einen der beiden Partner sind in der Tabelle X durch Einrahmung (voller Strich) kenntlich gemacht.

Daneben gibt es noch ein Gebiet, in welchem die seitens des Ovalbumin hervorgerufene grobteilige Flockung durch das anwesende Seralbumin wohl verhindert wird, wobei jedoch die dem Seralbumin zukommende geringere Flockenbildung verbleibt. Hier handelt es sich um die primäre Umwandlung des grobdispersen lilaroten Farbsols in die feindisperse tiefblaue, ionische Form und um den zugehörigen Koagulationstypus. Dieses Bereich eines scheinbaren Schutzeffektes ist in Tabelle X (lange Strichelung) herausgehoben. Sobald das Seralbumin in der Eiweisskombination unter $1,5 \times 10^{-2}\%$ sinkt, zeigt sich erst der Übergang zur Ovalbuminkoagulation mit starker Optimumbildung. Gleichzeitig wird auch die Abhängigkeit des Farbwechsels von der Ovalbuminkonzentration erkennbar. Sinkt der Ovalbumingehalt auf $5 \times 10^{-4}\%$ und darunter, dann wird jedoch das anwesende Seralbumin wieder allein bestimmend für die Farbänderung, wobei sich noch ein Gehalt des letzteren von $1,5 \times 10^{-4}\%$ merkbar macht.

Die Besonderheiten bei den Albuminreaktionen mit Nachtblausol liessen sich im wesentlichen auf zwei Umstände zurückführen: 1. Auf eine geradezu spezifische Empfindlichkeit der Farbreaktion mit Seralbumin, welche das Sol in die tiefblaue, ionische, stark desassoziierte und feinteilige Form überführt. 2. Auf die starke Ausbildung eines sehr vollständigen flockungshemmenden Überschusseffektes¹⁾ schon in mässigen Konzentrationen beider Albumine²⁾. Die nähere Analyse der Abweichungen in den Wechselwirkungen der Albumine mit dem Nachtblausol erweist sich auch beim Vergleiche

1) Ein solcher wird hier auch durch das Fehlen einer irreversiblen Proteindenaturierung seitens des Farbkations begünstigt sein, welches, im Unterschiede von Schwermetallionen, den Alkali- und Erdalkalimetallionen in dieser Hinsicht näher steht.

2) Dass dafür nicht der positive Charakter des Hydrophoben massgebend ist, zeigt das positive Eisenoxysol, bei welchem das Seralbumin bis zu 2% noch keine Andeutung des flockungshemmenden Überschusseffektes gibt, während derselbe schon in 0,5% Ovalbumin merkbar wird (*Pauli* und *P. Dessauer*, l. c.). Umgekehrt bot das negative Goldsol eine graduell nur wenig verschiedene Flockungshemmung in den höheren Konzentrationen beider Albumine.

mit den oben angeführten Erfahrungen an anderen Hydrophoben überaus aufklärend.

Bei diesen, z. B. am Kongoblausol, fand sich ein Schutzgebiet, also Flockungshemmung der Kombination beider Albumine in Konzentrationsbereichen, in welchen jedes einzelne der Albumine das Hydrophobe mehr oder weniger vollständig koaguliert. Ein solches Verhalten fehlt beim Nachtblausol vollständig. Hier darf eines der Albumine allein das Hydrophobe nicht mehr koagulieren (Überschusseffekt), dann erst überträgt sich dieser Effekt auch auf die Mischung mit dem anderen, für sich allein flockenden Albumin. Erklären liessen sich die Erfahrungen an den untersuchten negativen Hydrophoben durch eine gewisse Aufteilung der Funktion auf beide Albumine in ihrer Mischung, wobei überwiegend das eine (Seralbumin) durch Bildung grobteiliger, mehr oder weniger nuclearer Aggregate mit dem Hydrophoben dessen Oberfläche und Ladung reduziert, darin ähnlich wirkend wie eine Herabsetzung der Konzentration des hydrophoben Sols. Von dieser aber konnte gezeigt werden, dass sie den flockungshemmenden Überschusseffekt (des Ovalbumins) in niedrigere sonst flockende Eiweisskonzentrationen verschiebt (Tabelle II und IV).

Die Bildung grobteiliger, überwiegend nuclearer Aggregate in den niedrigen Eiweisskonzentrationen vor allem des Seralbumins schafft aber auch jene Zone von Flockungsempfindlichkeit oder Sensibilisierung in der Albuminmischung, die sich regelmässig bei den Solen von Kongoblau, Antimontrisulfid und Gold nachweisen liess.

Sowohl die charakteristische Art des Schutzes gegen die gleichzeitige Flockung durch beide Albumine, wie auch das regelmässige Auftreten eines Sensibilisierungsgebietes bei der Kombination der zwei Albumine mit den negativen Hydrophoben wurzelt nun in erster Reihe in der aggregationsfördernden Wirkung des Seralbumins. Eine solche fehlt jedoch gerade beim Nachtblausol, indem an ihre Stelle die Bildung einer feiner dispersen, stabileren Farbsoltype tritt. Damit wird es auch verständlich, dass hier nicht nur der Schutz gegen beiderseitige Albuminflockung ausbleibt, sondern auch, wie bisher noch nicht hervorgehoben wurde, für die Eiweisskombination kein Sensibilisierungsgebiet erscheint (Tabelle X).

Die vorerst verwirrend wirkenden, scheinbaren Anomalien im Verhalten des positiven Nachtblausols gegen die Mischung der Albumine erweisen sich somit bei näherer Betrachtung als wertvolle Stütze einer gemeinsamen Grundauffassung des Zusammenwirkens der Albumine gegenüber den Hydrophoben.

VII.

Anhangsweise sei kurz das Ergebnis grösserer Versuchsreihen über den Ersatz des Ovalbumins in der Kombination der Albumine durch Gummi arabicum-Sol (G. a.) berichtet.

Dabei erwies sich zunächst das hochgereinigte acidoide G. a., eine Polyglykuronsäure, als ein starkes Fällungsmittel für reines Seralbumin. Ein 0,0025-proz. G. a. bewirkte noch deutliche Trübung in 0,25-proz. Seralbumin. Die gesamte Säurenormalität dieses G. a. (konduktometrisch) entsprach $2,5 \times 10^{-5}$ -n. und im Gebiete vollständiger Flockung (0,05% G. a.) betrug sie 5×10^{-4} -n. Dieses Fällungsvermögen für Seralbumin konnte schon durch eine teilweise Neutralisation, z. B. von 1,5-proz. G. a. (mit $p_H = 2,29$) auf $p_H = 4,51$ ebenso wie auf $p_H = 6,65$ zur Gänze aufgehoben werden. Demgemäss

war eine Schutzprüfung der Kombination Seralbumin + G. a. + Kongoblausol (3,2 × 10⁻³ %) nur bei Verwendung von mehr oder weniger neutralisiertem G. a. ausführbar. In der Tat zeigte sich auch ein sehr grosser Bereich z. T. sehr vollständigen Schutzes schon bei p_H = 4,5 des G. a. in den Konzentrationen 0,5% bis herab zu 0,0025%. In höheren G. a.-Konzentrationen blieb der Schutz unvollständig. Zugleich fand sich in niedrigerem Seralbumin- (0,025%—0,1%) und in höherem G. a.-Gehalt eine sehr deutliche Sensibilisierungszone. Diese schrumpfte jedoch bei Neutralisation des G. a. auf p_H = 5,4 und schliesslich p_H = 7,12 ganz zusammen.

Für das Verständnis ist der Umstand wesentlich, dass nur Seralbumin, nicht aber unser G. a. mit Kongoblausol reaktionsfähig ist, weil nur das erstere über die erforderlichen, positiven Gruppen verfügt. Wie schon frühere Versuche¹⁾ lehrten, geben weder acidoides noch mit Alkalilauge neutralisiertes G. a. einen Schutz des Kongoblausols gegen fallende Elektrolyte. Ein solcher kommt erst, und zwar vollständig, durch Neutralisation von G. a. mit zweiwertigen Kationen z. B. mittels Magnesiumoxyd zustande, welche zur Reaktion mit dem negativen Hydrophoben die positive Brücken bildenden Gruppen an der G. a.-Oberfläche beistellen. Für den angeführten, eigentümlichen Sensibilisierungseffekt in der Kombination Seralbumin + G. a. besitzen wir ein Analogon in Versuchen mit Seralbumin + Kongoblau, wobei noch nicht flockende Mischungen selbst durch eine so schwache Säuerung wie beim Einleiten von Kohlendioxyd vollständig koagulieren²⁾. In unserem Falle übernimmt das noch ausreichend saure G. a. diese Funktion, wobei die Sensibilisierung mit steigender Neutralisation der Polyuronsäure verschwindet. Die in mittleren Konzentrationen von G. a. auftretende Flockungshemmung des Kongoblau in der Kombination von G. a. (p_H = 4,5) mit Seralbumin hängt mit einer Verteilung des Albumins zwischen dem Hydrophoben und dem G. a. zusammen, welche die Assoziate auseinanderrückt und die K.K.-Reaktion Eiweiss-Farbsol unvollständig macht. Schliesslich sei angeführt, dass ein weiter neutralisiertes G. a. (p_H = 7,12) in den höheren Konzentrationen einen Farbumschlag des Sols gegen rot herbeiführt, was mit der bekannten Wechselwirkung des Salzes einer schwächeren Säure (Uronsäure) mit einer stärkeren Säure (Sulfosäure) zusammenhängt, wobei die Umlagerung in das polare Kongorot-Salz erfolgt.

Der Mechanismus im Zusammenspiel unseres Hydrophoben mit Seralbumin und G. a. erscheint nach allem, wie dies auch elektrochemisch-konstitutiv verständlich, völlig verschieden von dem der Kombination beider Albumine.

VIII. Zusammenfassender Überblick.

Abschliessend folgt eine allgemeine Übersicht des Ganges der Beobachtungen und deren Deutungsmöglichkeit. In erstmaligen, ausgedehnten Versuchen wurde zunächst am hochgereinigten Kongofarbsol das eigenartige Paradoxon festgestellt, dass die Kombination von elektrolytfreiem Seralbumin und Ovalbumin in Konzentrationen, in denen jedes einzelne der Albumine das Hydrophobe vollständig flockt, eine Flockungshemmung, also wechselseitigen Schutz gibt, während es in niedrigem Eiweissgehalt mit geringem oder fehlendem Flockungsvermögen der Einzelproteine in ihrer Mischung zur Flockungsverstärkung oder Sensibilisierung kommt. Ferner wurde gezeigt, dass es sich da in keinem Falle um eine Summierung gleichsinniger Wirkungen der Proteine handelt, sondern jedes derselben

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

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

einen spezifischen, in seinen elektrochemisch-konstitutiven Besonderheiten begründeten Beitrag zum Endeffekt der Eiweisskombination liefert. Die weitere Analyse der Erscheinung ging davon aus, dass sich in höheren Eiweisskonzentrationen ein individuelles Verhalten der einzelnen Albumine offenbart, indem nur das Ovalbumin dann einen flockungshemmenden Überschusseffekt gibt, der im untersuchten gleichen Bereich des Seralbumins beim Farbsol nicht in Erscheinung tritt. Dieser Überschusseffekt mit seinem Flockungs-Optimum und anschliessendem Flockungs-Abfall rückt mit sinkendem Farbsolgehalt in niedrigere Ovalbuminkonzentrationen. Mit kleinen Seralbuminzugaben ($10^{-3}\%$) lässt sich nun ein stetiger Übergang zu diesem Überschusseffekt des reinen Ovalbumins herstellen, wobei das Seralbumin, ähnlich wie eine Abnahme der Farbsolkonzentration, die ganze Flockungsreihe mit ihrem Optimum und beidseitigen Flockungs-Abfall in niedrigeren Ovalbumingehalt verschiebt. Diese Verschiebung wirkt sich so aus, dass — verglichen mit dem unversetzten Ovalbumin — im höheren Eiweissgehalt eine Flockungs-Hemmung oder Schutzwirkung, in niederem eine Flockungs-Verstärkung oder Sensibilisierung auftritt. Diese Erfahrungen werden verständlich, wenn man sich in der Mischung die Funktion der beiden Albumine so aufgeteilt denkt, dass das Seralbumin eine Anlagerung der hydrophoben Teilchen begünstigt, wobei deren Gesamtladung und freie Oberfläche wie bei einer Abnahme der Solkonzentration absinkt, während das Ovalbumin, analog seinem Überschusseffekt, die Ausbildung eines schützenden Oberflächenanteiles der Aggregate besorgt. Der bevorzugte Aggregationseffekt seitens des Seralbumins steht in Einklang mit seiner gesteigerten, elektrostatischen Wechselwirkung gegenüber negativen Hydrophoben, wie sie sich aus dem günstigeren Verhältnis seiner positiven zu den negativen, seitenständigen, ionischen Gruppen verglichen mit dem Ovalbumin und den entsprechenden niedrigeren Schwellenwerten der Flockung solcher Hydrophoben ergibt.

Die Auffassung einer geteilten, spezifischen Funktion der beiden Albumine in ihrer Mischung findet auch in weiteren Erfahrungen eine Stütze:

a) Erfolgt die Beimischung der Albumine nicht gleichzeitig, sondern in zeitlicher Abstufung, indem man erst das eine, darauf — in wechselnder Zeitspanne — das zweite dem Hydrophoben zufügt, so zeigt sich eine erhebliche Schutzwirkung nur bei der Reihenfolge erst Seralbumin, dann Ovalbumin, nicht umgekehrt. Dabei kann genügend Ovalbumin, noch nach 24 Stunden zugesetzt, die Flockung zurückbilden.

b) Die Verschiedenheit der Funktion der beiden Albumine kommt in einer charakteristischen Gestalt des Schutzgebietes zum Ausdruck, wobei der wachsende Seralbumingehalt erst den Schutz-

bereich gegen niedrigere Ovalbuminkonzentrationen verbreitert, entsprechend einer gesteigerten Aggregationswirkung, während das Serumalbumin in höheren Konzentrationen im Wettstreit mit dem Ovalbumin dessen Anlagerung und Schutzhülleneffekt vermindert. Damit wird das Schutzgebiet wieder verschmälert und auf entsprechend höheren Ovalbumingehalt eingeschränkt.

c) Wählt man Hydrophobe höheren Gehaltes, z. B. ein fast 20 mal konzentrierteres Antimontrisulfid-Sol, dann wird erwartungsgemäss die Schutzwirkung weniger vollkommen und reicht nur bis zur zarten Trübung. Zugleich umfasst sie ein kleineres Gebiet.

d) Beim Goldsol, welches auch mit Serumalbumin den flockungshemmenden Überschusseffekt gibt, tritt damit an Stelle der Gegenwirkung in den höheren Konzentrationen ein gleichsinniger Einfluss, was sich in einer stetig zunehmenden Ausdehnung des Schutzgebietes mit höherem Eiweissgehalt, also Fehlen der sich wieder verschmälernenden, charakteristischen Gestalt desselben, wie etwa beim Farbsol, kundgibt.

e) Das elektropositive, rosarote Nachtblausol wird durch Serumalbumin in niedrigerer Konzentration unter Farbwechsel in eine feiner disperse, stabilere, blaue Soltype übergeführt. Hier fehlt demgemäss der für die Kombinationswirkung der beiden Albumine wesentliche, aggregationsfördernde Sondereffekt des Serumalbumins, während eine flockungshemmende Überschusswirkung beider Albumine in den höheren Konzentrationen besteht. Infolge Wegfalles einer entsprechenden aggregierenden Funktion des Serumalbumins findet nur dann ein Schutz statt, sobald eines der Albumine in das Bereich seiner vollständigen Überschusswirkung tritt, so dass hier für beide Albumine getrennte Schutzzonen entstehen, während im Bereich, wo beide Albumine flokken, ein Schutz seitens der Albuminkombination ausbleibt. Dem Ausfall der aggregierenden Serumalbuminfunktion entspricht ferner erwartungsgemäss das vollständige Fehlen eines Sensibilisierungsgebietes.

Unsere vielfältigen Beobachtungen lehren übereinstimmend, welche Bedeutung den zwei Seiten der Kolloid-Protein-Reaktion, dem Aggregationseffekt auf der einen und dem flockungshemmenden Überschusseffekt auf der anderen, für die Wechselwirkung der kombinierten Albumine mit dem Hydrophoben zukommt. Sobald ein zureichender Anteil der Oberfläche des gebildeten Aggregates auf das hydratisierte, also nicht denaturierte Protein entfällt, stellt sich Lösungsstabilität und damit Schutzwirkung ein. Dieses Ergebnis kann auf verschiedenen Wegen zustandekommen. Der günstigste Fall wäre ein Protein, das wenig zu irreversiblen Änderungen (Denaturierung) neigt und die Fähigkeit einer starken Assoziation seiner Teilchen besitzt. Er ist im Leimglutin mit seiner ausserordentlich schmalen Flockungszone und

dem bisher stärksten Überschusseffekt realisiert. Bei unseren Albuminen mit ihrer leichten Denaturierbarkeit kommt als Faktor für den Aufbau einer genügend grossen Aggregatoberfläche aus hydrophilem Eiweiss die Anlagerung von nativen an denaturierte Anteile in Betracht, wofür beim Ovalbumin sonstige Erfahrungen sprechen würden, vor allem aber geringe Entwicklung oder völliges Ausbleiben der Proteindenaturierung infolge Unvollständigkeit ihrer K. K.-Reaktion mit dem Hydrophoben. Dieser Fall tritt ein bei genügendem Überschuss des Proteins, relativer Grobteiligkeit und geringem Gehalt des Hydrophoben, wobei nur eine oder wenige ionische Gruppen der Eiweissmolekel reagieren. Im Grenzfall würde dann eine nucleare Aggregation mit dem Hydrophoben als Kern und einer bedeckenden Hülle von nativem Eiweiss resultieren. Versuche mit Ersatz des Ovalbumins durch G. a. lehrten, dass hier erwartungsgemässe Unterschiede und Besonderheiten gegenüber den Erscheinungen bei der Proteinkombination zutage treten.

Die hier mitgeteilten Ergebnisse können nur einen ersten Schritt auf einem grossen Neuland der K. K.-Reaktionen mit einem hochgereinigten Material darstellen. Auf diesem Wege einer reinen „Dreikolloid-Reaktion“ sind noch manche interessante und aufschlussreiche Aufklärungen über Bau und Reaktionsfähigkeit verschiedener Proteine und Hydrophobe sowie der zugehörigen elektrochemisch-konstitutiven Zusammenhänge zu erwarten.

Am Schlusse erlaubt sich der eine von uns (*P. Szarvas*) gleichzeitig für die Gewährung eines ungarischen staatlichen Auslandsstipendiums seinen ergebensten Dank auszusprechen.

Chemisches Institut der Universität Zürich.

171. Zum Mechanismus der Fällung und Alterung schwerlöslicher Niederschläge

von **W. Feitknecht**.

Fällung und Alterung basischer Zinkverbindungen

bearbeitet von **H. Weidmann**.

(31. VIII. 43.)

I. Einleitung.

Schwerlösliche Niederschläge zeigen die Eigentümlichkeit, dass ihre Löslichkeit häufig nicht genau definiert ist¹⁾, und dass sie sehr oft Fremdstanz enthalten. Beide Eigentümlichkeiten hängen mit der Dispersität und vor allem mit der Stör- und Sekundärstruktur der Teilchen der Niederschläge zusammen.

¹⁾ Vgl. z. B. *Treadwell* und *Gübeli*, *Helv.* **24**, 137 (1941).