

Percaglobulin, ein charakteristischer Eiweißkörper aus dem Ovarium des Barsches.

Von

Carl Th. Mörner in Upsala.

(Der Redaktion zugegangen am 19. November 1903.)

Eine zufällig gemachte *Geschmacks*beobachtung gab mir die Anregung zu der vorliegenden Untersuchung. Ich hätte des öfteren «Kaviar» aus dem Rogen verschiedener Fischarten (n. a. Hecht, Quabbe, Felchen, kleine Meréne) zubereitet und dabei stets ein gastronomisch ansprechendes Produkt erhalten, bis ich (Dez. 1898) gelegentlich Rogen vom Barsch (*Perca fluviatilis* L.) anwandte. Zu meiner nicht geringen Überraschung fand ich, daß der aus diesem Material bereite Kaviar, obwohl er angenehmes Aussehen und untadeligen Geruch besaß, *wegen eines stark hervortretenden, adstringierenden Geschmacks völlig ungenießbar war*. Dadurch, daß ich bei der ersten günstigen Gelegenheit (gleichfalls im Dezember) den Inhalt einiger Rogensäcke frischer Barsche, unmittelbar nach ihrem Aufschneiden, auf ihren Geschmack hin prüfte, erhielt ich Gewißheit darüber, daß die erwähnte Erscheinung nicht auf einer zufälligen Verunreinigung des Materials durch Metallsalze oder dergleichen beruhte. Ein oder mehrere Male in jedem der folgenden Monate, bis zum Eintritt der Laichzeit im Mai, prüfte ich den Rogen von frischen, bisweilen sogar lebenden Barschen und konnte dabei feststellen, daß der unangenehme, adstringierende Geschmack während dieser ganzen Periode¹⁾ sich in unvermindertem Grade

¹⁾ Genauer bis ganz kurze Zeit vor der Rogenablage; während der letzten Tage nimmt der Geschmack rasch ab und ist an zur Ablage völlig reifem Rogen kaum wahrnehmbar. Auch an dem ganz jungen Rogen (September—Oktober) ist derselbe Geschmack schon vorhanden.

geltend machte. An während der seitdem verflossenen vier Ovulationsperioden, 1900 bis 1903, angeschafftem reichlichem Material¹⁾ habe ich weitere Gelegenheit gehabt, mich von der Konstanz der Erscheinung zu überzeugen. Natürlich habe ich frische Fischrogen auch von *anderen* Fischarten (ungefähr 30 solcher) geprüft, um zu sehen, ob bei ihnen sich Entsprechendes fände. Das ist indessen nicht der Fall gewesen. Alle diese Rogensorten hatten, in frischem Zustand geprüft, einen *milden* Geschmack. Im besonderen verdient erwähnt zu werden, daß der dem Barsch nahestehende Zander (*Lucioperca sandra* Cuv.) und Kaulbarsch (*Acerina cernua* [L.]) hinsichtlich der Beschaffenheit des Rogens auch nicht andeutungsweise ihrem Verwandten sich nähern.²⁾ Da die hier geschilderte, der Literatur nach zu urteilen, bisher an keinem nativen³⁾ animalischen Material beobachtete Geschmacksqualität durch eine eigenartige, im Ovarium normalerweise vorhandene Substanz organischer Natur — eine Prüfung auf schwere Metalle hin war negativ ausgefallen — bedingt sein mußte, so habe ich versucht, dieselbe zu isolieren und ihre Eigenschaften einigermaßen zu studieren. Als Hauptresultat der Versuche, die während der genannten Jahre ausgeführt wurden,⁴⁾ ergibt sich, daß die Substanz, die Träger des adstringierenden Geschmacks des Barschrogens ist, einen globulinartigen Eiweißkörper darstellt, der, da er in mehreren Hinsichten gut charakterisiert ist, zum Unterschiede von den bisher bekannten Individuen derselben Gruppe, *Percaglobulin* genannt werden möge.

¹⁾ Die Fische waren im mittleren und südlichen Schweden gefangen worden, teils in Binnenseen, teils an der Ostseeküste.

²⁾ Da alle Versuche, Rogenmaterial von dem in Schweden äußerst seltenen, an der West- und Nordküste der iberischen Halbinsel dagegen allgemein vorkommenden Meerbarsch (*Labrax lupus* Cuv.) zu erhalten, mißglückten, muß es einem glücklicher gestellten Kollegen vorbehalten bleiben, festzustellen, welche Stellung diese Fischart bezüglich unserer Frage einnimmt.

³⁾ Dieselbe Geschmacksqualität kommt einigen aus entsprechender nativer Verbindung abgespaltenen Körpern zu, nämlich dem Protamin (Miescher)⁽¹⁾ und Histon (Bang).⁽²⁾

⁴⁾ Eine vorläufige Mitteilung erschien in *Svensk Fiskeritidskr.* 1899.

Die Substanz ist nicht in den Eiern selbst enthalten, sondern ihr Vorkommen ist auf den Saft beschränkt, der in der vielfache Winkel und Ecken bildenden, zentralen Ovarialhöhle eingeschlossen ist. Bringt man eine größere Portion, z. B. ein paar Kilogramm frisch aufgeschnittener Ovarien auf ein Seiltuch und läßt abtropfen, so kann man diesen Saft in unveränderter Form, wenn auch in sehr beschränkter Quantität, gewinnen. Die Flüssigkeit, an sich farblos (obwohl gewöhnlich mehr oder weniger rot durch beigemischten Bluffarbstoff) und von schwach alkalischer Reaktion, ist, trotz ihres großen Gehalts an Eiweiß,¹⁾ ziemlich dünnflüssig und zeigt keine Andeutung von Schleimigkeit. Beim Schmecken erfährt man ein starkes Gefühl von Adstriktion: der Mundspeichel verliert seine fadenziehende Beschaffenheit, wird wasserdünn, und man hat eine Zeitlang das Gefühl des Gegerbtseins im Munde. Bei starker Verdünnung mit destilliertem Wasser (10 bis 20 Vol.) entsteht reichlicher, flockiger Niederschlag, der, wenn etwas NaCl sofort hinzugesetzt wird, sich wieder vollständig löst, innerhalb kurzer Zeit aber mehr und mehr seine ursprüngliche Löslichkeit in verdünnter NaCl-Lösung verliert. Verdünnung mit N/20 — N/10 NaCl-Lösung hat dagegen keinen Niederschlag oder Trübung zur Folge. Der durch direktes Abtropfen gewonnene Saft stellt nur einen verschwindend geringen Bruchteil der Percaglobulinmenge des Ovariums dar. Eine weit bessere Ausbeute erhält man, wenn man der Ovarienmasse eine geeignete Flüssigkeit zusetzt, durch die der Saft verdünnt wird. Destilliertes Wasser allein ist für diesen Zweck weniger geeignet, einmal wegen seines obenerwähnten globulinfällenden Vermögens, sodann wegen seiner Einwirkung auf die Eier. Der ungünstige Einfluß des destillierten Wassers zeigte sich u. a. bei folgendem Versuch.

2100 g aufgeschnittene Ovarien wurden mit destilliertem Wasser in einer Menge von $\frac{1}{3}$ ihres Gewichts = 700 ccm übergossen. Das Wasser wirkte jedesmal 5 Min. lang ein, worauf durch ein Seiltuch während 5 Min. abtropfen gelassen wurde; die Kolate wurden gemessen. Nur das erste Kolat (680 ccm) entsprach dem Volumen nach ungefähr dem des zugesetzten Wassers.

¹⁾ In zwei untersuchten Fällen auf 7,8 bzw. 9,0% bestimmt.

Volumen des 2. Kolates	590 ccm	} Wie das erste nicht dick-	
„ „ 3. „	550 „		flüssig.
„ „ 4. „	520 „	} In zunehmendem Grade dick-	
„ „ 5. „	500 „		flüssig und schleimig.
„ „ 6. „	ganz unbedeutend		

Unter der fortgesetzt zunehmenden Wassereimbibierung wurden die Eier gesprengt, wodurch der Extrakt mehr und mehr mit fremden Bestandteilen verunreinigt wurde.

Eine Extraktionsflüssigkeit, die das Globulin nicht ausfällt und gleichzeitig auch die Eier intakt läßt, ist verdünnte NaCl-Lösung (N/20 — N/10), wie aus folgenden zwei Versuchen hervorgeht, in denen auch quantitative Eiweißbestimmungen ausgeführt wurden.

Versuch 1. 190 g Ovarien wurden mit N₂₀ NaCl in etwa gleicher Gewichtsmenge (= 190 ccm) ausgewässert, jedesmal 10 Min. lang mit nachfolgendem Abtropfen durch Seiltuch während 5 Min.

	Volumen	Eiweiß	
	ccm	%	g
1. Kolat	180	1,2	2,3
2. „	170	0,3	0,6
3. „	170	0,1	0,2
4. „	180	0,1	0,2
Summa	700	—	3,3

(Als die Ovarienmasse darauf in gleicher Weise mit destilliertem Wasser zweimal behandelt wurde, hatten die Kolate ein Volumen von nur 150 bzw. 120 ccm, während die Eier stark anschwollen.)

Versuch 2. 5000 g Ovarien wurden mit N/10 NaCl, etwa 1/4 des Gewichts (= 1250 ccm), behandelt; jede Extraktion dauerte 5 Min., jedes Abtropfen ebenso 5 Min.

	Volumen	Eiweißgehalt	
	ccm	%	g
1. Kolat	1180	4,3	50,7
2. „	1350	1,8	24,3
3. „	1310	0,7	9,2
4. „	1240	0,3	3,7
Summa	5080	—	87,9

In beiden Versuchen war das Totalvolumen der erhaltenen Kolate ungefähr dasselbe wie das der Extraktionsflüssigkeit, weshalb eine nennenswerte Imbibierung der Eier ausgeschlossen ist.

Da die quantitativen Bestimmungen zeigten, daß die an die Auswässerungsflüssigkeit abgegebene Substanzmenge schon nach einigen wenigen, ganz kurz dauernden Extraktionen auf

ein relativ unbedeutendes Maß herabsinkt¹⁾, und daß schon die beiden ersten Extrakte 85—88% dessen repräsentieren, was durch die doppelte Anzahl Extraktionen erhalten werden kann, so habe ich bei den fortgesetzten Versuchen folgende Behandlungsweise des Ausgangsmaterials befolgt und in jeder Hinsicht für geeignet befunden.

Die aufgeschnittenen, frischen Ovarien werden mit N₁₀ NaCl (etwa gleichen Gewichts) 10 Min. lang behandelt, darauf mit d^o (etwa halben Gewichts) ebensolange; die beiden Kolate werden vereinigt und filtriert.

Der totale Eiweißgehalt der auf diese Weise hergestellten Filtrate²⁾ besteht zum überwiegenden Teil (im Durchschnitt 77%) aus Percaglobulin, wie aus folgenden Bestimmungen an 4 verschiedenen Filtraten sich ergibt:

	Totalgehalt an Eiweiß %	Percaglobulin ³⁾ %
1.	0.94	0.70
2.	0.88	0.66
3.	1.10	0.84
4.	0.92	0.77
Im Durchschnitt	0.96	0.74

Der Percaglobulingehalt der Filtrate beträgt also ca. 3.4%. Auf Grund dieser Zahlen läßt sich der Gehalt des Ovariums an Percaglobulin annähernd berechnen.

Nach Versuch 1 ergaben 190 g Ovarien 3.3 g Totaleiweiß, entsprechend 2.6 g Percaglobulin oder 1.4% der Ovarienmasse; nach Versuch 2 wurden aus 5000 g Ovarien 87.9 g Totaleiweiß erhalten, entsprechend 67.7 g Percaglobulin oder 1.3% im Ovarium.⁴⁾

¹⁾ Auch eine *Geschmacksprüfung* der sukzessiv erhaltenen Extrakte gibt dasselbe an; der adstringierende Geschmack ist am unvergleichlich stärksten beim ersten Extrakt, um in den folgenden Extrakten rasch abzunehmen.

²⁾ Im folgenden, der Kürze halber, als *Percaextract* bezeichnet.

³⁾ Eine Bestimmung des Percaglobulins wurde ermöglicht durch das spezifische Verhalten dieser Substanz gegen Ovomucoid (vergl. unten S. 446, Anm. 3).

⁴⁾ Während der Zeit kurz vor der Rogenablage sinkt die Menge extrahierbaren Percaglobulins schnell und läßt sich in laichfertigem Rogen nicht mit Sicherheit nachweisen (vergl. Anm. auf S. 429).

Trotz der leichten Verschaffbarkeit des Ausgangsmaterials während eines großen Teils des Jahres (Januar bis Mai), des reichlichen Vorkommens der hier interessierenden Substanz darin und der Leichtigkeit, sie in filtrierbare, an anderen Stoffen verhältnismäßig arme Lösung zu bringen, stellt sich einem detaillierten Studium des Percaglobulins eine wesentliche, in gewissen Fällen unüberwindliche Schwierigkeit entgegen, nämlich die ausgeprägte Tendenz der Substanz, schon bei einfachen Manipulationen in eine schwerlösliche Modifikation überzugehen, die außer hinsichtlich der Löslichkeit auch hinsichtlich der Fällbarkeit von der nativen Substanz abweicht. Bei der Herstellung von Präparaten für die Elementaranalyse spielt dieser Umstand eine untergeordnete Rolle, indem die Veränderung nicht auf einer Spaltung der Substanz zu beruhen oder eine solche sie zu begleiten scheint, aber beim Studium der qualitativen Reaktionen des Körpers, besonders seiner Fällbarkeitsverhältnisse, muß man manchesmal auf das Ideal verzichten, mit einer Lösung der isolierten Substanz zu arbeiten, und sich mit den Resultaten begnügen, die durch die direkte Anwendung der nativen Lösung (des Percaextrakts) erhalten werden können. Der erwähnte Übergang der nativen Substanz in eine schwerlösliche, z. B. in verdünnter NaCl-Lösung unlösliche Modifikation dürfte seinem Wesen nach analog sein der von Osborne³⁾ eingehend studierten und beschriebenen Umwandlung des Globulins des Hanfsamens, des Edestin, zu Edestan. Da auch das fragliche Umwandlungsprodukt des Percaglobulins ein durch Eigenschaften und Reaktionen ziemlich gut charakterisierter Körper ist, so bezeichne ich ihn — einem von Osborne gemachten Vorschlage dabei folgend — mit dem Namen Percaglobulan.

Die Substanz, die bei den gewöhnlichen Proteinstoff-Farbreaktionen¹⁾ positiven Ausschlag gibt, ist ein phosphorfreier.

¹⁾ Bei der Biuret-, Xanthoprotein-, Adamkiewics- und alkalischen Bleilösungsreaktion wird kräftiger Ausschlag erhalten. Das Reaktionsresultat mit Millons Reagens ist in gewissem Grade atypisch: bei kurzem Kochen gelbbraun gefärbte, bei anhaltendem Kochen rotbraune

koagulabler¹⁾ Eiweißkörper, der, trotz einer und der anderen Abweichung vom Typus (z. B. hohen Schwefelgehalts: vgl. S. 454), zur Gruppe der Globuline zu stellen sein dürfte. Er läßt sich nämlich ausfällen durch Verdünnung der nativen Lösung mit destilliertem Wasser, wobei geringer Zusatz von A oder Einleiten von CO_2 befördernd wirkt, durch Dialysierung derselben und endlich durch teilweise oder vollständige Sättigung mit gewissen Neutralsalzen.

Bei Verwendung in voller Sättigung wurde Niederschlag erhalten mit: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2SO_4 , K_2SO_4 , MgSO_4 , NH_4NO_3 , NaNO_3 , Na_2CO_3 , K_2CO_3 , KHCO_3 , NH_4Cl (schwach), NaCl , KCl , CaCl_2 , SrCl_2 (schwach), NaBr , KJ (schwach), NaClO_3 , $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, K_2CrO_4 , NaA , KA , K_2O , K_2Ta . Niederschlag blieb aus mit: KNO_3 , NaHCO_3 , MgCl_2 , BaCl_2 , NH_4Br , KBr , KClO_3 .

Mit den Salzen, bei denen es sich gezeigt hatte, daß sie bei voller Sättigung vollständige Ausfällung bewirkten, wurden auch Proben in niedrigerer Konzentration angestellt, wobei sich herausstellte, daß vollständige Ausfällung von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, K_2CO_3 , CaCl_2 , K_2CrO_4 und K_2Ta schon bei $\frac{2}{3}$ -Sättigung, von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, K_2CO_3 und K_2Ta sogar schon bei $\frac{1}{2}$ -Sättigung bewirkt wurde.

kermesfarbige) Flocken in farbloser Flüssigkeit. Bei der Reaktion mit kochender, konzentrierter HCl nur schwache violette Färbung. (Die Prüfung mit Molischs Kohlehydratreaktion gibt negativen Ausschlag; die Substanz enthält auch keinen mittels Kochens mit verdünnter Mineralsäure abspaltbaren reduzierenden Komplex.)

¹⁾ Schon bei gelinder Erwärmung des «Percaextrakts» tritt allmählich Trübung ein, die eine scharfe Beobachtung der eigentlichen Koagulationstemperatur unmöglich macht. Zur Bestimmung der Koagulationstemperatur wurde daher der «Percaextrakt» (unter Zusatz von Toluol) 24 Stunden lang bei $+40^\circ\text{C}$. digeriert, die dabei entstandene Trübung wegfiltriert, und das klare Filtrat, das noch immer die Hauptmenge des Percaglobulins enthält, nach Zusatz des gleichen Volumens N-NaCl -Lösung in gewöhnlicher Weise erwärmt. In drei solchen Versuchen trat, nachdem Opaleszenz bei $60\text{--}63^\circ$ sich zu zeigen begonnen hatte, feinflockiger Niederschlag bei $67\text{--}69^\circ\text{C}$. auf. Hierbei findet — im Gegensatz zu dem Verhältnis bei den Histonen (Bang²⁾ — wirkliche Koagulation statt. Der bei der Hellerschen Probe entstehende grobflockige Niederschlag löst sich nicht beim Kochen der Mischung (das in der Wärme bereitete Filtrat trübt sich nicht beim Abkühlen).

²⁾ Kursivierung gibt vollständige Ausfällung an.

Was im besonderen Ammoniumsulfat betrifft, so liegen die Niederschlagsgrenzen (untere und obere), wie sie unter Anwendung von Plicks bekannter Methodik festgestellt wurden, bei 1.5 bzw. 3.0, weshalb von diesem Salz bereits $\frac{1}{3}$ -Sättigung genügend ist, um vollständige Ausfällung zu erhalten.

Vom Kaliumferrocyanid, Natriumphosphorwolframat, Jodkaliumjodid oder Natriumpikrat in schwacher Lösung und bei neutraler Reaktion, von Ammoniak, in größerer oder geringerer Menge zugesetzt, mit oder ohne gleichzeitigen mäßigen NH_4Cl -Zusatz (u. a. in Form von Magnesiamixtur) und von Calcium- oder Baryumchlorid wird das unveränderte Percaglobulin nicht gefällt.

In den hier angeführten positiven und negativen Niederschlagsverhältnissen liegt indessen nichts besonders Charakteristisches. Was nach dem, was ich bisher gefunden, das Percaglobulin vom Globulin im allgemeinen unterscheidet, ist vor allem

1. sein adstringierender Geschmack:
2. seine Fällbarkeit durch $\frac{3}{4}$ % HCl:
3. seine Eigenschaft, gewisse Glykoproteide und Polysaccharide auszufällen und selbst durch sie ausgefällt zu werden:
 - 1) seinen verhältnismäßig hohen Schwefelgehalt.

1. Der adstringierende Geschmack.

Viel Mühe wurde darauf verwendet festzustellen, ob der adstringierende Geschmack dem Percaglobulin als solchem zukommt, oder ob er vielleicht einer besonderen, zusammen mit dem Globulin vorkommenden und diesem letzteren anhaftenden Substanz zuzuschreiben ist. Alle Versuche, durch vielfach wiederholte, mittels verschiedener Fällungsmittel ausgeführte fraktionierte Fällung des Globulins von diesem ihm ursprünglich anhaftenden Geschmack zu befreien oder seine Intensität herabzusetzen, haben zu ausgesprochen negativem Resultat geführt. Erst bei Anwendung solcher Mittel, die eine durchgreifende Denaturierung des Globulins (über Globulänbildung hinausgehend) bewirken, sind die Reaktionsprodukte als geschmackslos be-

gefunden worden, ohne daß dabei doch eine mit adstringierender Geschmacksqualität ausgerüstete oder überhaupt eine für Globuline fremde Substanz hat entdeckt werden können. Ich bin daher zu dem Schluß gekommen, daß der adstringierende Geschmack eine dem Percaglobulin selbst zukommende Eigenschaft ist. Von solchen Mitteln, die Hand in Hand mit der Denaturierung der Substanz, den adstringierenden Geschmack sowohl bei dem nativen Globulin als bei dessen Globulan zum Verschwinden bringen, sind zu nennen: stärkeres Erwärmen,¹⁾ kräftige Behandlung mit Säure oder Alkali²⁾ und Pepsindigestion.³⁾

2. Fällbarkeit durch $\frac{3}{4}$ ‰ HCl.

Wird «Percextract» mit HCl zu $\frac{3}{4}$ ‰ versetzt, z. B. durch Beimengung des gleichen Volumens $1\frac{1}{2}$ ‰ iger HCl, so tritt rasch zunehmende Opaleszenz und innerhalb weniger Minuten reichlicher, flockiger Niederschlag von Percaglobulin ein, der, wenn er ohne längeres Zögern, geeigneter Weise durch Zentrifugieren,⁴⁾ abgeschieden wird, leicht und vollständig in destilliertem Wasser sich löst und aus dieser Lösung aufs neue mit dem gleichen Volumen $1\frac{1}{2}$ ‰ iger HCl ($\approx \frac{3}{4}$ ‰ HCl in der Mischung) ausgefällt werden kann, welches Verfahren sich beliebig viele

¹⁾ Auch ist, wie bekannt, Rogen vom Barsch in gekochtem Zustand *gütlich genießbar*.

²⁾ Vgl. S. 458 ff.

³⁾ Nach Digestion mit Pepsin und HCl (0.1—0.2 ‰) während 24 Stunden bei $+40^{\circ}$ C. ist der adstringierende Geschmack der Percaglobulinlösung verschwunden. In Kontrollversuchen mit demselben HCl-Gehalt, aber ohne Pepsinzusatz, ist der Geschmack beibehalten.

Während der HCl-Pepsindigestion entsteht, wenn das zum Versuch angewandte Percaglobulin durch vorhergehende Ausfällung gereinigt gewesen, kein Niederschlag; bei entsprechender Behandlung von nativem «Percextract» beobachtet man gewöhnlich spärliche Trübung, die von der Zerteilung der Nucleoalbuminsubstanz des Resteiweißes herrührt (vgl. S. 446, Anm. 3).

⁴⁾ Die abgeschiedene *Flüssigkeit* (das Zentrifugat) wurde zu wiederholten Malen, stets aber ohne Erfolg, auf *Histon* untersucht, das u. a. wegen der äußeren Ähnlichkeit, die zwischen dem hier mittels $\frac{3}{4}$ ‰ HCl bewirkten Effekt und dem bei entsprechender Behandlung von Thymus-extrakt (Nucleohistonlösung) von Lilienfeld⁵⁾ gewonnen, besteht.

Male wiederholen läßt. Schon bei einem Gehalt von $\frac{1}{2}$ ‰ in der Mischung kommt Ausfällung zustande, obwohl sie langsamer verläuft und weniger vollständig wird ($\frac{1}{4}$ ‰ hat keinen Effekt zur Folge). Beabsichtigt man die Isolierung des Percaglobulins, so ist ein erheblicherer HCl-Gehalt als $\frac{3}{4}$ ‰ nicht rätlich, indem dann die Möglichkeit einer Verunreinigung der Substanz mit anderem Eiweiß gegeben ist. Ist das Percaglobulin durch mehrmalige Ausfällung mit $\frac{3}{4}$ ‰ HCl von dem Resteiweiß befreit worden, so zeigt es sich, daß danach wiederholte Versuche absolut vollständige Ausfällung bewirken; die Filtrate zeigen keine Spur von einer Reaktion bei der Hellerschen Probe und enthalten überhaupt keine eiweißartige Substanz.

3. Die Eigenschaft, mit gewissen Glykoproteiden und Polysacchariden zu reagieren.

Schon in einem frühen Stadium dieser Untersuchung wurde die Beobachtung gemacht, daß die Lösungen des Percaglobulins einen kopiösen, dickflockigen Niederschlag bei Zusatz von filtriertem, verdünnten Eierklar geben. Von der nahe liegenden Annahme ausgehend, daß es sich hier um dasselbe Verhältnis handelte, das besonders Bang⁽²⁾ bezüglich des Histons studiert hat, nämlich um eine Ausfällung des im Eierklar prädominierenden Eiweißkörpers, des *Ovalbumins*, im Verein mit der fällenden Substanz, ging ich an den Versuch, durch direktes Experiment Beweise für diese Vermutung zu erlangen.

Dabei kamen zur Verwendung:

a) Ein mit N_{10} NaCl verdünnter «Perc a extract» (G), der durch Versetzung eines Teils mit dem gleichen Volumen gesättigter $(NH_4)_2SO_4$ -Lösung und Aufkochen des Filtrats sich als frei von Albumineiweiß gezeigt hatte. Gehalt an koagulablem Eiweiß (*Globulin*): 0.119 ‰;

b) eine Hühnereiweißlösung (A), bereitet durch Fällung verd. Eierklars mit dem gleichen Volumen gesättigter $(NH_4)_2SO_4$ -Lösung, Dialysierung des Filtrats und Versetzen mit NaCl bis zu N_{10} Gehalt. Durch Versetzen eines Teils mit dem gleichen Volumen gesättigter $(NH_4)_2SO_4$ -Lösung wurde festgestellt, daß es frei war von durch $\frac{1}{2}$ -Sättigung mit diesem Salz fällbarem Globulin. Gehalt an koagulablem Eiweiß (*Albumin*): 0.053 ‰.

Die beiden Lösungen wurden in solcher Proportion gemischt, daß in dem einen Fall (1) Albumin, in dem andern Fall (2) Globulin sich im Uberschuß befand:

Nr.	G ccm	A ccm	In 10 ccm Reaktionsmischung vorhanden:	
			Albumin g	Globulin g
1	10	40	0,042	0,024
2	20	30	0,032	0,048

Die Mischungen, in denen bald reichlicher Niederschlag auftrat, wurden nach 2 Stunden filtriert und an jedem der beiden Filtrate zwei Bestimmungen ausgeführt:

a) In 10 ccm wurde die Menge Eiweiß (= Globulin + Albumin) bestimmt:

b) 20 ccm wurden mit dem gleichen Volumen (20 ccm) gesättigter NH_4SO_4 -Lösung versetzt; die Mischung filtriert. In 20 ccm dieses letzteren Filtrats, entsprechend 10 ccm des ersten, wurde die Menge Eiweiß (= Albumin) bestimmt.

Die direkt gefundenen Zahlen, nebst den als Differenz berechneten Werten für das Globulin, finden sich in folgender Tabelle:

Nr.	In 10 ccm der filtrierten Reaktionsmischung noch vorhanden:		
	Globulin + Albumin g	Albumin g	Globulin g
1	0,048	0,043	0,005
2	0,052	0,031	0,021

Durch Zusammenstellung der Zahlen der beiden obigen Tabellen erhält man Aufschluß darüber, ob und in welchem Maße die beiden Arten von Eiweiß an der Fällungsreaktion teilgenommen haben:

Nr.	Aus 10 ccm der Reaktionsmischung gefällt:	
	Albumin g	Globulin g
1	(-0,001)	0,019
2	0,001	0,027

Es ergab sich mit Deutlichkeit aus dieser Versuchsserie, daß das Ovalbumin an der beobachteten Fällung nicht beteiligt war¹⁾ und daher, im Gegensatz zu dem, was anfänglich angenommen war, mit der Entstehung des Niederschlags nichts zu schaffen haben konnte. Qualitative Versuche mit natürlichen eiweißhaltigen Flüssigkeiten,²⁾ Wasserextrakt von eiweißreichen Organen³⁾ und Lösungen von nativen⁴⁾ und denaturierten Eiweißkörpern gaben weitere Gewißheit darüber, daß Percaglobulin — obwohl es sich gezeigt hatte, daß es in einem Eierklarfiltrat Niederschlag hervorrufen konnte — nicht eiweißfällend wirkt⁶⁾. Im Eierklar muß sich also eine nicht eiweißartige Substanz finden, mit der das Percaglobulin auf die beschriebene Weise reagiert. Ein einfacher qualitativer Versuch gab in dieser Hinsicht einen guten Fingerzeig:

Von einem «Percaextract» wurden drei Portionen zu je 5 cem abgemessen. Eine Portion wurde

a) versetzt mit 5 cem N_{10} NaCl;

b) versetzt mit 5 cem verdünntem Eierklar, das mit NaCl bis zu N_{10} -Gehalt versetzt war;

c) versetzt mit 5 cem desselben verdünnten Eierklars, nachdem durch Aufkochen etc. alles koagulable Eiweiß entfernt worden.

Die Kontrolle *a* blieb klar.

In den Proben *b* und *c* trat dickflockiger Niederschlag auf, wobei ein Unterschied in der Quantität für die beiden Proben nicht zu beobachten war.

Da in dem Koagulationsfiltrat des Eierklars Ovomucoïd der stärkst hervortretende Bestandteil ist, so war es nach den genannten Versuchen höchst wahrscheinlich, daß dieser Bestandteil des Eierklars auch die mit Percaglobulin reagierende

¹⁾ Während das *Percaglobulin* offenbar an der Bildung des Niederschlags teilhatte.

²⁾ Blutserum, Glasflüssigkeit, Milch und Galle (von Rindern).

³⁾ Muskeln vom Barsch und Strömling; Pankreas und Kristallbrühe von Rindern.

⁴⁾ Serumalbumin, Serumglobulin, Casein und Hämoglobin (von Rindern).

⁵⁾ «Wittes Pepton», «Peptonum sicc. e carne»; Hetero-, Proto- und Deuteroalbumose.

⁶⁾ Auch nicht *Glutin* fällt.

Substanz darstellt. Später ausgeführte Versuche mit isoliertem Ovomucoid haben zur Evidenz bewiesen, daß dem wirklich so ist, daß mit anderen Worten Percaglobulin und Ovomucoid¹⁾ miteinander einen in verdünnter NaCl-Lösung unlöslichen Niederschlag bilden²⁾. Die Erscheinung wurde in mehreren, quantitativ angeordneten Versuchsserien näher studiert.

Die resp. Lösungen waren, wo nicht anders angegeben, mit NaCl bis zu N₁₀ Gehalt versetzt. In allen Proben trat reichlicher Niederschlag auf. Nach 15 Minuten³⁾ wurden die gefällten Mischungen filtriert, und die klaren Filtrate⁴⁾ wurden mittels Zusatz von Ovomucoidlösung bzw. «Percaextrakt» auf eventuellen Überschuß der anderen Substanz geprüft.

Versuch I.

Nr.	«Percaextrakt» 0.70 %ig		Ovomuc.-Lösung 0.94 %ig		NaCl- Lösung N ₁₀
	ccm	Percaglobulin g	ccm	Ovomucoid g	
1	3	0,0210	0.25	0,0023	Bis zu 10 ccm Vol.
2	3	0,0210	0.5	0,0047	
3	3	0,0210	1.0	0,0094	
4	3	0,0210	2.0	0,0188	
5	3	0,0210	3.0	0,0282	
6	3	0,0210	4.0	0,0376	

¹⁾ Ovomucoid, auf das Fäulnis oder Pepsindigestion eingewirkt hat, behält sein Vermögen, mit Percaglobulin zu reagieren, bei. Eine Ovomucoidlösung, die bei Zimmerwärme in offenem Gefäß einen Monat lang gestanden und schon innerhalb der ersten Woche Fäulnisgeruch angenommen hatte, gab mit «Percaextrakt» den gewöhnlichen, dickflockigen Niederschlag. Dasselbe war der Fall mit einer Ovomucoidlösung, die mit Pepsin und HCl (zu 0.5 %) versetzt, bei + 40° C. drei Tage lang digeriert und darauf neutralisiert worden war.

²⁾ Kälte verlangsamt, gelinde Erwärmung über die gewöhnliche Temperatur hinaus — z. B. Halten des Versuchsgefäßes in der geschlossenen Hand — beschleunigt das Auftreten des Niederschlages.

³⁾ In Versuch 8 erst nach 4 Stunden.

⁴⁾ Nachträgliche Trübung ist niemals beobachtet worden.

Prüfung der Filtrate mit:

a) Ovomucoidlösung

Nr. 1 Fällung.

Nr. 2—6 Klare Flüssigkeit:

b) «Percaextrakt»

Nr. 1—2 Klare Flüssigkeit.

Nr. 3—6 Fällung.

Versuch 2.

Eine Wiederholung des vorhergehenden mit *demselben* Resultat.

Versuch 3.

Nr.	«Percaextrakt» 0,66 %ig		Ovomuc.-Lösung 0,94 %ig		NaCl- Lösung N/10
	ccm	Percaglobulin g	ccm	Ovomucoid g	
1	3	0,0198	0,15	0,0014	} Bis zu 10 ccm Vol.
2	3	0,0198	0,25	0,0023	
3	3	0,0198	0,5	0,0047	
4	3	0,0198	1,0	0,0094	
5	3	0,0198	2,0	0,0188	

Prüfung der Filtrate mit:

a) Ovomucoidlösung

Nr. 1—2 Fällung,

Nr. 3—5 Klare Flüssigkeit:

b) «Percaextrakt»

Nr. 1—3 Klare Flüssigkeit.

Nr. 4—5 Fällung.

Versuch 4.

Nr.	«Percaextrakt» 0,66 %ig		Ovomuc.-Lösung 0,94 %ig		NaCl- Lösung N/10
	ccm	Percaglobulin g	ccm	Ovomucoid g	
1	300	1,980	15	0,143	} Bis zu 600 ccm Vol.
2	300	1,980	50	0,470	
3	300	1,980	100	0,940	
4	300	1,980	300	2,820	

Prüfung der Filtrate mit:

- a) Ovomucoidlösung
Nr. 1 Fällung.
Nr. 2—4 Klare Flüssigkeit;
- b) «Percaextrakt»
Nr. 1—2 Klare Flüssigkeit,
Nr. 3—4 Fällung.

Versuch 5.

Nr.	«Percaextrakt» 0,84 %ig		Ovomuc.-Lösung 1,10 %ig		NaCl- Lösung N ₁₀
	ccm	Percaglobulin g	ccm	Ovomucoid g	
1	6	0,0504	0,25	0,0027	} Bis zu 10 ccm Vol.
2	6	0,0504	0,50	0,0055	
3	6	0,0504	1	0,0110	
3	6	0,0504	2	0,0220	

Prüfung der Filtrate mit:

- a) Ovomucoidlösung
Nr. 1—2 Fällung,
Nr. 3—4 Klare Flüssigkeit;
- b) «Percaextrakt»
Nr. 1—3 Klare Flüssigkeit,
Nr. 4 Fällung.

Versuch 6.

Eine Wiederholung von Versuch 5, nur mit dem Unterschiede, daß der NaCl-Gehalt der Lösungen hier N₂₀ entsprach.

Die Prüfung der Filtrate ergab das gleiche Resultat.

Versuch 7.

Eine Wiederholung von Versuch 5, nur unter Änderung des NaCl-Gehaltes von N₁₀ auf Normal.

Das gleiche Prüfungsergebnis wie in Versuch 5 und 6.

Versuch 8.

Nr.	«Percaextrakt» 0,77 %ig		Ovomuc.-Lösung 0,92 %ig		NaCl- Lösung N ₁₀
	ccm	Percaglobulin g	ccm	Ovomucoid g	
1	300	2,310	25	0,230	Bis zu 3000 ccm Vol.
2	300	2,310	50	0,460	

Prüfung der Filtrate mit:

- a) Ovomucoidlösung
 Nr. 1 Fällung,
 Nr. 2 Klare Flüssigkeit;
 b) «Percaextrakt»
 Nr. 1—2 Klare Flüssigkeit.

Eine Zusammenstellung der Zahlen aus den Proben, in denen die Filtrate weder mit Ovomucoidlösung noch mit „Percaextrakt“ reagierten, und in denen also die beiden einander fällenden Substanzen sich in Gleichgewichtslage befanden, ergibt folgende Tabelle:

	Percaglobulin g	Ovomucoid g	Verhältnis von Percaglobulin: Ovomucoid
1. Versuch	0,0210	0,0047	1 : 0,22
2.	0,0210	0,0047	1 : 0,22
3.	0,0198	0,0047	1 : 0,24
4.	1,9800	0,4700	1 : 0,24
5.	0,0504	0,0110	1 : 0,22
6.	0,0504	0,0110	1 : 0,22
7.	0,0504	0,0110	1 : 0,22
8.	2,3100	0,4600	1 : 0,20

Mittelwert 1 : 0,22

Von den in den Versuchen No. 1 bis 7 enthaltenen Proben, die auf beiden Seiten der Gleichgewichtsprobe *zunächst* liegen, entsprechen die mit Ovomucoid im «*Unterschub*» durchschnittlich einem Verhältnis von 1 Percaglobulin : 0,11 Ovomucoid, die mit Ovomucoid im *Überschub* einem Verhältnis von 1 : 0,45. Leider wurde während der letzten Ovulationsperiode nicht

festgestellt — was durch Herstellung von Probemischungen mit mehr detaillierter Dosierung leicht hätte geschehen können — wie weit das reaktionslose Spatium zu beiden Seiten von den direkt beobachteten Werten 1 : 0,20 — 0,24 sich erstreckt. Mit Rücksicht auf die Empfindlichkeit der Reaktion (siehe z. B. Vers. 8)¹⁾ und auf den Umstand, daß sowohl bei dem Verhältnis 1 : 0,11 als auch, und zwar in noch höherem Grade, bei dem Verhältnis 1 : 0,45 die Stärke des bei der Prüfung des Filtrats entstehenden Niederschlags gezeigt hat, daß *bedeutender Unter- resp. Überschub* von Ovomuroid vorhanden war, kann ich jedoch als sicher annehmen, daß die wirklichen unteren und oberen Grenzen des Gleichgewichtsspatiums unbedeutendes, wahrscheinlich nur mit einigen wenigen Einheiten in der zweiten Dezimalstelle der Ovomuroidzahl, von dem oben gegebenen Verhältnis 1 : 0,22 sich entfernen.

Mittels Stickstoffbestimmung²⁾ an einigen durch Zentrifugieren isolierten und durch Waschen mit N₁₀ NaCl von

¹⁾ Von dem hohen Grad der Empfindlichkeit der Reaktion gibt auch folgender Versuch eine Vorstellung:

Nr.	«Percaextrakt» 0,70 %ig		Ovomuc.-Lösung 0,94 %ig		NaCl- Lösung N ₁₀
	ccm	Percaglobulin g	ccm	Ovomucoid g	
1	3	0,0210	0,5	0,0047) Bis zu 100 ccm Vol.
2	3	0,0210	—	—	
3	3	0,0210	0,5	0,0047	
4	3	0,0210	—	—	

Fällungsergebnisse.

Nr. 1. Fast augenblicklich eintretende Opaleszenz; nach 10 Min. flockiger Niederschlag.

Nr. 3. (Gehalt der Reaktionsmischung an Percaglobulin: 0,0084 % an Ovomuroid: 0,0019 %). Innerhalb 1 Min. Opaleszenz; nach 1 St. flockiger Niederschlag.

Nr. 2—4. Kontrollproben). Kein Niederschlag innerhalb 12 Stdn.

²⁾ Nach Kjeldahls Methode, wobei dem Vorschlage von Neuberg⁵⁾ gemäß Natriumhyposulfit in Substanz — 1,5 g pro 0,5 g Hg — als bequemer Ersatz für die bisher gebräuchliche Alkalisulfidlösung angewandt wurde.

anhaftender Reaktionsflüssigkeit möglichst befreiten Percaglobulin-Ovomucoidniederschlägen¹⁾ habe ich versucht, den Typus der Fällungsreaktion noch weiter festzustellen, was, dank dem ziemlich verschieden großen N-Gehalt der beiden Substanzen,²⁾ in gewissem Grade sich ausführen läßt.

Die beiden Niederschlagspräparate, die aus den die beiden Substanzen in *Gleichgewichtslage* enthaltenden Reaktionsmischungen (Verhältnis 1 : 0,20 bzw. 1 : 0,24) erhalten wurden, wiesen einen N-Gehalt von 15,23 bzw. 15,26% auf, woraus sich für den Percaglobulin-Ovomucoidniederschlag das mit dem erwarteten nahe zusammenfallende Verhältnis 1 : 0,23 bzw. 1 : 0,22 berechnet.

N-Bestimmung an zwei aus Reaktionsmischungen mit Ovomucoid im *Überschuß*³⁾ (Verhältnis 1 : 0,35 bzw. 1 : 1,42 isolierten Präparaten ergab 15,22 bzw. 15,13%, einem Verhältnis in dem Percaglobulin-Ovomucoidniederschlag von 1 : 0,24 bzw. 1 : 0,28, d. h. einem von der Normalzusammensetzung kaum abweichenden Verhältnis entsprechend.

Ein von dem Normalwert mehr abweichendes Verhältnis berechnet sich aus dem N-Gehalt (15,38 bzw. 15,44%), der in bei *Unterschluß*⁴⁾ von Ovomucoid (Verhältnis 1 : 0,10 in beiden Fällen) entstandenen Niederschlägen vorhanden ist, nämlich

¹⁾ Danach mit Alkohol und Äther behandelt und im Toluolbad getrocknet. Aschengehalt: 0,80—1,60%.

²⁾ Percaglobulin: 15,83% (siehe S. 454).

Ovomucoid: 12,65% (nach früheren Bestimmungen des Verf.).

³⁾ Durch Ausfällung des Percaglobulins mittels Ovomucoid im *Überschuß* und Bestimmung der Menge des in dem Filtrat restierenden Eiweißes («Resteiweiß») ist es möglich, einen Gehalt des «Percaextrakts» an Percaglobulin festzustellen, nota bene wenn man in einer anderen Portion des «Percaextrakts» den Totalgehalt an Eiweiß bestimmt hat. (Das «Resteiweiß», in dem u. a. eine Nucleoalbuminsubstanz enthalten ist, besitzt keinen adstringierenden Geschmack und wird von $\frac{3}{4}$ % HCl nicht gefällt.)

⁴⁾ Bei *Unterschluß* von Ovomucoid (= *Überschuß* von Percaglobulin) wird das Ovomucoid so *vollständig* ausgefällt, daß in zwei Fällen — Versuch 4, Nr. 1; Versuch 8, Nr. 1 — in welchen 0,143 bzw. 0,230 g mit 1,980 bzw. 2,130 g Percaglobulin reagierten, keine Spur von Ovomucoid bei der Bearbeitung des ungeteilten Zentrifugats der Reaktionsmischung zu entdecken war.

1 : 0,16 bzw. 1 : 0,14. Die Abweichung ist jedoch nicht größer, als daß sie sich nicht zum wesentlichen Teile aus der Schwierigkeit erklären ließe, die bedeutende Menge von Percaglobulinlösung, die in diesen Fällen — wo die Menge des Percaglobulins zehnmal größer ist als die des Ovomuroids — zur Zeit der Fällung sich in dem voluminösen Niederschlag eingeschlossen finden muß, durch Waschen in genügendem Grade zu entfernen.

Mit Rücksicht auf die Unvollkommenheit dieses Details der Methodik, in der auch die Andeutung von höheren Werten für Ovomuroid, wie sie in der vorletzten Kategorie von Präparaten zum Vorschein kam, ihre Erklärung finden dürfte, halte ich es durch die angeführten Versuchsreihen für erwiesen, daß das Verhältnis zwischen den beiden Konstituenten des Niederschlages — insofern es durch die äußere Proportion der beiden Substanzen innerhalb der Reaktionsmischung wenig beeinflußt wird und innerhalb verhältnismäßig weiter Grenzen von dem Verdünnungsgrad der angewandten Lösungen und dem Gehalt der Reaktionsmischung an Neutralsalz unabhängig ist — so fest ist, daß es auf das Bestehen einer wirklichen *chemischen Verbindung* zwischen dem Percaglobulin und dem Ovomuroid deutet.

Diese Verbindung dissoziiert sich nicht bei Behandlung mit verdünnter NaCl-Lösung in reichlichen Mengen. Ist sie durch 3—4maliges Waschen mittels Zentrifuge von anhaftender Reaktionsflüssigkeit befreit worden, so gibt sie bei wiederholtem Aufschlännen in verdünnter NaCl und darauffolgendem Zentrifugieren keine Substanz ab: die Zentrifugate ergeben weder Hellersche noch Biuretreaktion.

Auch gewisse andere Eigenschaften der Substanz (Percaglobulin-Ovomuroid), vor allem die Fällbarkeitsverhältnisse, die weit von denen abweichen, die den beiden Komponenten je für sich zukommen, sind geeignet für sie die Natur einer chemischen Verbindung zu bestätigen, in welcher die Ovomuroidkomponente — außer durch den herabgesetzten N-Gehalt (siehe oben) — sich durch den positiven Ausschlag bei der Molischschen Kohlehydratreaktion und bei der nach Invertierung vorgenommenen Trommerschen Probe¹⁾ manifestiert.

¹⁾ Vergl. im übrigen die Spaltungsversuche S. 449.

Percaglobulin-Ovomucoid *löst sich* mit Leichtigkeit in verdünnter HCl oder KOH (z. B. N/100). Obwohl unlöslich in destilliertem Wasser und in allen anderen versuchten Neutralsalzlösungen, ist es vollständig löslich in verdünnten Lösungen von Baryumsalzen (z. B. BaCl_2 , $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$, BaA_2). Ebenso löst sich die in destilliertem Wasser aufgeschlämmte Substanz bei Zusatz von Glycerin oder Zuckerarten.¹⁾²⁾

Fällungsreaktionen wurden nach Auflösen der Substanz in äußerst verdünntem KOH und Versetzen der Lösung mit N/100 HCl bis zu nur spurenweiser alkalischer oder approximativ neutraler Reaktion studiert (Zusatz von Säure bis zu äußerst schwach *saurer* Reaktion fällte die Substanz vollständig und mit unveränderten Eigenschaften aus). Die so erhaltene Lösung, die deutlich adstringierenden Geschmack besitzt, gibt mit neutralen Alkaloidreagentien ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, Jodkaliumjodid, Natriumphosphowolframat usw.) momentan auftretenden, grobflockigen Niederschlag. Angesichts dieses Verhältnisses muß man an die Histonsubstanzen denken, besonders da diese Niederschläge auch bei durch Ammoniak alkalischer Reaktion zustande kommen.³⁾ Eine nähere Prüfung hat indessen ergeben, daß Niederschlag durch minimalen Zusatz eines beliebigen Neutralsalzes bewirkt wird schon von einigen wenigen Tropfen NaCl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgCl_2 , BaCl_2 , CaCl_2 ⁴⁾ usw. in N/10-Lösung. Sämtliche Niederschläge, die bei Entfernung des Salzes durch Dialyse nicht wieder in Lösung gehen, sind im Überschuß des Reagens un-

¹⁾ Rohrzucker, Maltose, Laktose, Dextrose, Xylose; auch Glykosaminhydrochlorid.

²⁾ Von anderen Stoffen, die, alle mit negativem Resultat, auf eventuelles Vermögen, Percaglobulin-Ovomucoid zu lösen, geprüft wurden, seien erwähnt Glykokoll, Alanin, Leucin, Asparagin, Taurin, Natriumglykokolat, fettsaures Alkali, Harnstoff.

Alle oben angegebenen Löslichkeitsverhältnisse gelten auch, wenn die ausgewaschene Substanz auf dem Filtrum stehen geblieben oder in Alkohol während mehrerer Tage aufbewahrt worden ist.

³⁾ So z. B. ergibt Niederschlag gewöhnliche Magnesiamixtur (Zusatz von NH_3 allein, in größerer oder geringerer Menge, ergibt keinen Niederschlag).

⁴⁾ Oder gesättigtes Gipswasser.

löslich,¹⁾ mit Ausnahme des mittels Baryumsalz hervorgerufenen, der sich im Überschuß klar löst.

Spaltung des Percaglobulin-Ovomucoids in seine beiden Komponenten kann bewirkt werden teils durch Wärme, teils durch Behandlung mit $\frac{3}{4}\%$ HCl, wobei in beiden Fällen das Percaglobulin in fester Form erhalten wird, während das an sich leichtlösliche Ovomucoid in der Flüssigkeit bleibt. Im ersteren Falle — die Substanz wird in verdünnter NaCl-Lösung aufgeschlämmt, die Mischung gekocht und die Koagula abgeschieden — wird das Percaglobulin gründlich denaturiert (koaguliert). Im letzteren Falle hingegen — die Substanz wird in verdünnter (z. B. N/100) HCl gelöst, die Lösung mit dem gleichen Volumen $\frac{1}{2}\%$ iger HCl versetzt, die gefällte Mischung zentrifugiert — kann das Percaglobulin in fast unveränderter Form wiedergewonnen werden.

Das abgespaltene, aus der Flüssigkeit isolierte Ovomucoid behält in beiden Fällen seine ursprünglichen Eigenschaften, besonders die, Percaglobulin zu fällen, bei. Da das letztgenannte Verfahren eine *Kombination zweier* für das Percaglobulin mehr charakteristischer Fällungsreaktionen, 1. Fällbarkeit durch Ovomucoid, 2. Fällbarkeit durch $\frac{3}{4}\%$ HCl, in sich schließt, so muß — besonders wenn die Substanz noch einer Ausfällung mittels $\frac{3}{4}\%$ HCl unterworfen und ein sorgfältiges Waschen des Percaglobulin-Ovomucoids mit verdünnter NaCl und der HCl-gefällten Substanz mit $\frac{3}{4}\%$ HCl vorgenommen wird — das auf diese Weise hergestellte Percaglobulin besonders rein sein.

Nachdem ich hiermit die Erfahrungen dargelegt habe, die bezüglich der Reaktion des Percaglobulins mit *isoliertem* Ovomucoid gemacht wurden, erlaube ich mir über einen Versuch zu berichten, der sich auf das Verhalten des Percaglobulins gegenüber *nativem* Eierklar²⁾ bezieht.

Als Material diente frisches, nach Verdünnung mit 9 Volumen $\frac{1}{2}\%$ NaCl filtriertes Eierklar. Der Gehalt dieser Lösung an Ovomucoid

¹⁾ Dies gilt auch für die nächsten Verwandten der Baryumsalze, die *Strontium-* und *Calciumsalze*.

²⁾ Ein Niederschlag entsteht hierbei nicht so rasch, als bei der Arbeit mit *isoliertem* Ovomucoid, sondern nimmt eine oder andere Minute in Anspruch.

konnte — unter Zugrundelegung des von mir ⁽⁶⁾ gefundenen Durchschnittsgehaltes des Eierklars an Ovomuroid, 1,5%, — auf 0,15% berechnet werden. Die Versuchsanordnung war der bei den Versuchen auf S. 441 fi angewandten analog.

Nr.	«Percaextrakt» 0,92%ig		Verdünntes Eierklar		NaCl- Lösung N/20
	ccm	Percaglobulin g	ccm	Ovomucoid g	
1	3	0,0231	1,5	0,0022	} Bis zu 12 ccm Vol.
2	3	0,0231	3	0,0045	
3	3	0,0231	4,5	0,0067	
4	3	0,0231	9	0,0135	

Prüfung der Filtrate mit:

- a) Ovomuroidlösung
 - Nr. 1 Fällung,
 - Nr. 2 Opaleszenz,
 - Nr. 3—4 Klare Flüssigkeit;
- b) «Percaextrakt»
 - Nr. 1—2 Klare Flüssigkeit,
 - Nr. 3—4 Fällung.

Obwohl keines der angewandten Verhältnisse in das Gleichgewichtsspatium selbst fällt, ist es doch klar, daß dieses sich zwischen den Proben Nr. 2 und Nr. 3 befindet und wie aus dem Umstand hervorgeht, daß das Filtrat Nr. 2 bei Prüfung mit Ovomuroidlösung nur Opaleszenz, nicht deutlichen Niederschlag gibt — näher Nr. 2 (mit dem Verhältnis 1:0,19 als Nr. 3 (mit dem Verhältnis 1:0,29) liegt: mit andern Worten, das hier für *natives* Eierklar gefundene Verhältnis fällt nahe mit dem (1:0,22) zusammen, das auf Grund teils der bei den Versuchen mit *isoliertem* Ovomuroid gewonnenen Erfahrung (vgl. S. 444), teils der aus dem Eierklar nach Koagulierung des Eiweißes erhaltenen Ovomuroidmenge berechnet wurde.

Die direkt aus Eierklar ausgefällte und von der Reaktionsflüssigkeit abgesonderte Percaglobulin-Ovomucoidverbindung zeigt dieselben Löslichkeits- und Fällbarkeitsverhältnisse, die dem mittels isolierten Ovomuroids hergestellten zukommen, und gibt bei $\frac{3}{4}$ % HCl-Behandlung, also ohne daß auf irgend einem Stadium des Prozesses Siedewärme angewendet wurde.

typisches Ovomuroid ab. Diese Tatsachen scheinen mir insofern von Interesse zu sein, als sie einen weiteren Beweis¹⁾ für die von Milesi⁽⁸⁾ angezweifelte Präexistenz des Ovomucoids im Eierklar bilden.

Im Vorbeigehen sei erwähnt, daß «Percextract»²⁾ geradezu als Reagens bei praeliminärer Prüfung von Vogeleierklar auf eventuelle Gegenwart von Ovomuroid angewandt werden kann. Versuche in dieser Richtung sind von mir begonnen worden. Eierklar von z. B. Gans, Ente, Turmfalk (*Falco tinnunculus* [L.]) reagiert unmittelbar. In den Fällen, wo direkte Prüfung des Vogeleierklars mit «Percextract» negativ ausfiel, wurde die Prüfung nach Dialysierung des Eierklars wiederholt. In einigen Fällen, z. B. betreffs der Haustaube und ein paar Sänger-(*Sylvia*-)Arten, wurde die Reaktion hierdurch verschärft, vermutlich infolge der Entfernung des der Fällungsreaktion entgegenwirkenden Zuckers.

Fortgesetzte Versuche haben indessen gezeigt, daß das Fällungsvermögen des Percaglobulins nicht auf das Ovomuroid allein beschränkt ist, sondern daß die Substanz Verbindung eingeht auch mit anderen kolloiden Körpern³⁾ (teils Glykoproteiden, teils Polysacchariden), welchen allen die Eigenschaft gemeinsam ist, daß sie Kohlehydratgruppen enthalten.

Das Vermögen, mit Percaglobulin zu reagieren, ist jedoch nicht allgemein für Körper der genannten Klassen. So z. B. wurde negatives Resultat erhalten mit:

Submaxillarismucin (vom Rind), sei es in nativer (Wasserextrakt von den Drüsen) oder in reiner Lösung:

¹⁾ Einen solchen hat Langstein⁽⁷⁾ bereits geliefert.

²⁾ Ist nach Toluolzusatz und bei Aufbewahrung an kühlem Orte wenigstens ein halbes Jahr, wahrscheinlich sehr viel länger haltbar; eventuell auftretende Trübung durch Globulan wird vor der Verwendung abfiltriert.

³⁾ Ob, und in solchem Fall in welcher Ausdehnung, dieses Phänomen etwas gemeinsam haben kann mit den von v. Lingelsheim⁽⁹⁾ und Perrando und Gianelli⁽¹⁰⁾ angegebenen Fällungsverhältnissen, die sich im Blutserum und in der Hydroceleflüssigkeit bei Gegenwart gewisser schwer diffusibler Substanzen (Gummi arabicum, Carrageen und Salep-schleim u. a.) abspielen, ist mir vorläufig unmöglich zu entscheiden.

mucoidhaltiger Ascitesflüssigkeit (2 Species) und Lösung der daraus isolierten Mucoïds substanz:

Lösung von Dextrin (Erythro- und Achroodextrin),¹⁾ arabischem Gummi, Inulin, Lichenin und chondroitinschwefelsaurem Alkali.

Kopiöser, dickflockiger *Niederschlag* trat dagegen auf bei Versetzen von «Percæxtrakt» mit:

Ovarialflüssigkeit (2 Species)²⁾ und Lösung isolierter Ovarialmucoïde (2 Präparate): Lösung von Glykogen (2 Präparate aus Hunde- bzw. Kalbsleber):

pflanzenschleimhaltigen Flüssigkeiten (Traganth- und Quittensamenschleim):

Stärkekleister.¹⁾

Ein näheres Studium habe ich diesen Fällungsverhältnissen nicht widmen können.³⁾

Soviel ließ sich jedoch beobachten, daß diese Niederschläge, in Übereinstimmung mit dem Percæglobulin-Ovomucoid, obwohl im allgemeinen unlöslich in Neutralsalzlösungen, klar sich lösen bei Zusatz von Baryumsalz, Glycerin und Zuckerarten, und daß die approximativ neutralisierte Lösung des aus der Reaktionsmischung isolierten Percæglobulin-Glykogenniederschlages in äußerst verdünnter HCl⁴⁾ hinsichtlich der Fällungsreaktionen mit denen des Percæglobulin-Ovomucoids (siehe S. 448) übereinstimmt. Hinzugefügt sei auch, daß das Glykogen *vollständig* durch Percæglobulin im Überschuß ausgefällt und nach Wärmekoagulierung des Percæglobulin-Glykogenniederschlages oder Behandlung mit $\frac{3}{4}$ % HCl aus dem Filtrat wiedererhalten werden kann.

Über das Reaktionsvermögen des Percæglobulins, auch

¹⁾ Die mit Rohdextrin («Leiocom») erhaltene Reaktion hatte vermutlich ihren Grund in darin enthaltener, *löslicher Stärke* (Amylodextrin).

²⁾ Eine dritte Spezies von Flüssigkeit aus einer Ovarialcyste, wie auch eine Flüssigkeit aus einer intraligamentären Cyste reagierte nicht.

³⁾ Von den Körpern, die durch Anlagerung von Polysaccharid an Percæglobulin entstehen, läßt sich sagen, daß sie in gewissem Grade eine Klasse von *artificiellen Glykoproteiden* darstellen.

⁴⁾ Leicht löslich hierin, aber, im Gegensatz zu Percæglobulin-Ovomucoid, kaum löslich in N/10 KOH.

bei Gegenwart von Eiweiß und dergleichen in größeren Mengen, gibt folgender Versuch Aufschluß.

Von einer Ascitesflüssigkeit (spezifisches Gewicht 1,019; Trockensubstanz 5,5%) wurden 4 Portionen zu je 10 ccm abgemessen. Nach Zusatz von 0,005 g Ovomuroid¹⁾ (Nr. 1) und 0,005 (Nr. 2) bzw. 0,001 g (Nr. 3) Glykogen²⁾ wurden 2 ccm «Percaextrakt» hinzugefügt. Kontrollprobe von 10 ccm Ascitesflüssigkeit + 2 ccm «Percaextrakt» (Nr. 4).

Nr. 1 (ca. 0,05% Ovomuroid). Innerhalb 10 Min. flockiger Niederschlag.

Nr. 2 (ca. 0,05% Glykogen). Fast sofort stark opaleszent, innerhalb 2 Min. flockiger Niederschlag.

Nr. 3 (ca. 0,01% Glykogen). Innerhalb 5 Min. stark opaleszent, innerhalb 15 Min. feinflockiger Niederschlag.

Nr. 4. Kein Niederschlag.

Bei Inspektion am folgenden Tage:

In Nr. 1—3 auf dem Boden des Reagensgläschens abgesetzter Niederschlag (der sich bei Zusatz von Glycerin sofort löste):

In Nr. 4 kein Niederschlag.

Ich halte es für nicht unwahrscheinlich, daß man in einem oder dem anderen Fall aus dem spezifischen Fällungsvermögen des Percaglobulins gegenüber Mucoidsubstanzen etc. behufs *Isolierung* dieser letzteren aus einem mittels bisher angewandter Mittel schwer bearbeitbarem Material wird Vorteil ziehen können. Hierfür spricht folgende Beobachtung.

Von einem Pepsinpräparat hatte es sich gezeigt, daß es durch Percaglobulin gefällt wurde; der Anlaß dafür war mir anfangs unklar. Indessen wurde eine filtrierte und neutralisierte Lösung des Präparats³⁾ (ca. 1,5 g in 25 ccm N/100 NaCl) mit 50 ccm «Percaextrakt» versetzt. Der entstandene, grobflockige Niederschlag wurde abzentrifugiert, mit N/100 NaCl gewaschen und in N/100 HCl gelöst, worauf die Lösung mit dem gleichen Volumen 1½%iger HCl versetzt wurde. Nach 15 Min. wurde das ausgefällte Percaglobulin abzentrifugiert, und das Zentrifugat (nach Neutralisierung) mit Alkohol gefällt. Die wässrige Lösung des entstandenen Niederschlages gab:

1. grobflockigen Niederschlag mit «Percaextrakt»;
2. (nach Invertierung) starken Ausschlag bei der Trommerschen Probe;
3. keine Färbung mit Jodkaliumjodid (= Glykogen abwesend).

¹⁾ 0,135 ccm von 3,7%iger Lösung.

²⁾ 0,55 bzw. 0,11 ccm von 0,9%iger Lösung.

³⁾ Das nach Invertierung keinen Ausschlag auf reduzierende Substanz mittels der Trommerschen Probe, wohl aber starke Reaktion bei der Babo-Meißnerschen Probe gab.

Die percaglobulinfällende Substanz des Pepsinpräparats war ohne Zweifel ein Glykoprotein, zu dessen prompter *Isolierung* aus der komplizierten Albumosepepsinmischung die Anwendung des «Percaextrakts» hier einen Ausweg öffnete.

4. Der Schwefelgehalt.

Über an Percaglobulin ausgeführte *Schwefel-* wie auch *Stickstoffbestimmungen*¹⁾ gibt folgende Tabelle Aufschluß:

Nr. des Präp.	Die Substanz isoliert mittels:	S	N
		%	%
1	Ausfällen mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mal wiederholt (1. Mal $\frac{1}{3}$ -Sättigung; 2. Mal $\frac{1}{5}$ -Sättigung)	1,91	15,81
2	Anfang wie bei Nr. 1; danach Ausfällen mit $\frac{3}{4}$ % HCl, 2 mal wiederholt	1,93	15,69
3	Ausfällen mit $\frac{3}{4}$ % HCl, 1 mal	1,87	15,86
4	Ausfällen mit Ovomuroid; Dekomponierung des Niederschlags mit $\frac{3}{4}$ % HCl; Fällung mit $\frac{3}{4}$ % HCl wiederholt	1,96	15,83
5	Wie bei Nr. 4	1,92	15,94
	Mittelwerte	1,92	15,83

Der Gehalt an Schwefel (zum wesentlichen Teil lose gebunden) ist nicht unbedeutend höher als in den bisher analysierten Eiweißkörpern von Globulinnatur. Besondere Versuche — Invertierung mit verdünnter HCl und Prüfung auf SO_3 — ergaben, daß der hohe S-Gehalt nicht von in der Substanz enthaltener Chondroitinschwefelsäure herrührt, welche

¹⁾ Die Werte angegeben für aschefreie Substanz. Aschegehalt 0,24—0,91 %. Betreffs der Ausführung der N-Bestimmungen vergleiche Anm. 2 auf S. 445. Die S-Bestimmungen wurden nach der Liebig-Hammarstensen'schen Methode ausgeführt. Während der Behandlung des Percaglobulins in Kalischmelze (ungefähr 1,5 g Substanz per Analyse entwichen — der Geruchsintensität nach zu urteilen — *Indolsubstanzen* in größerer Menge, als es bei entsprechender Behandlung von Proteinstoffen im allgemeinen der Fall zu sein pflegt. Ungefähr eine Woche später noch machte sich der Indol-(Scatol-)Geruch im Laborationslokal bemerkbar, etwas das ich bei der Bearbeitung diverser Eiweiß-, Albumoid- und Proteidsubstanzen nie zuvor beobachtet habe.

Möglichkeit übrigens schon durch das negative Resultat bei Prüfung mit der Molischschen Reaktion und auf reduzierende Substanz nach Invertierung ausgeschlossen war.

Der Stickstoffgehalt er bietet nichts Anmerkwertes außer in der negativen Hinsicht, daß er keine Stütze für die Annahme einer näheren Verwandtschaft des Percaglobulins mit den Histonen bietet, welche letztere nach Mieschers⁽¹⁾, Bangs⁽²⁾ u. a. Untersuchungen einen relativ hohen Gehalt an diesem Element (17½ bis gegen 20%) besitzen.

Das Analysenresultat, sowohl betreffs S wie N, für das Präparat Nr. 1, verglichen mit dem der übrigen, ist geeignet, den aus qualitativen Versuchen gezogenen Schluß zu bestätigen, daß das Percaglobulin bei Ausfällung mittels ¾% HCl keine Spaltung erfährt.

Percaglobulin.

Die Herstellung einer gleichzeitig reinen, besonders von anderem Eiweiß freien und approximativ salzfreien Lösung von, hinsichtlich qualitativer Reaktionen, *vollständig* unverändertem Percaglobulin dürfte unmöglich sein. Die Manipulationen, die darauf abzielen:

1. von dem übrigen im «Percaextrakt» befindlichen Eiweiß das Percaglobulin abzusondern,
 2. wo solches notwendig wird, bei vorausgegangenen Prozeduren hineingekommenes Salz zu entfernen,
- ziehen eine mehr oder weniger weitgehende Veränderung der Löslichkeits- und Fällbarkeitsverhältnisse des Percaglobulins nach sich, die in der Entstehung von *Globulan* (vgl. S. 434) einen relativen Abschluß erreicht. Erst durch Einwirkung kräftigerer Agentien geht das Percaglobulan seinerseits seinem Untergang unter vollständiger Denaturierung entgegen. Protrahierte Berührung mit Wasser bei relativem Mangel an Neutral-salz scheint der Faktor zu sein, der am kräftigsten in genannter Richtung wirkt. In Übereinstimmung hiermit führt Dialysierung eines «Percaextrakts» zu fast vollständiger Globulanwandlung des successive ausfallenden Percaglobulins. Der Niederschlag erweist sich, z. B. nach 1—2 Tage langer

Dialysierung, als unlöslich in verdünnter NaCl. Nach Waschen, zuerst mit verdünnter NaCl, danach mit destilliertem Wasser behufs möglichst vollständiger Entfernung des Salzes, bietet diese Modifikation des Percaglobulins im einzelnen *dieselben* Löslichkeits- und Fällbarkeitsverhältnisse, wie sie oben (S. 448) für die Ovomucoïdverbindung¹⁾ des Percaglobulins angegeben wurden, oder um die wichtigsten hervorzuheben:

Unlöslichkeit in Neutralsalzlösungen mit Ausnahme der Baryumsalze, in welchen die Substanz sich klar löst:

Löslichkeit in äußerst verdünnter (z. B. N/1000) HCl oder KOH²⁾ und in zucker- oder glyzerinhaltiger Flüssigkeit:

Fällbarkeit der approximativ neutralisierten Lösung in KOH durch minimalen Zusatz von Neutralsalz, u. a. «neutralen Alkaloidreagentien», Magnesiamixtur (die Niederschläge im Reagensüberschuß, mit Ausnahme der durch Baryumsalz hervorgerufenen, unlöslich).

Ferner sei hervorgehoben, daß das Globulan in Lösung den adstringierenden Geschmack des Percaglobulins, wie auch dessen Fällbarkeit durch $\frac{3}{4}\%$ HCl³⁾ beibehält,⁴⁾ und daß es.

¹⁾ Diese Übereinstimmung in äußerer Hinsicht zwischen dem Percaglobulan und der Verbindung des Percaglobulins mit Ovomucoïd gab zu dem Verdachte Anlaß, daß auch das Percaglobulan eine Verbindung des Percaglobulins mit einem aus dem nativen «Percaextrakt» aufgenommenen Glykoproteid (oder Polysaccharid) sein könnte. Eine Prüfung des Percaglobulans mittels der Trommerschen Probe (nach Invertierung) und ein direkter Versuch, durch Behandlung mit $\frac{3}{4}\%$ HCl die fragliche Substanz abzuspalten, ergab mit Sicherheit, daß das in Wirklichkeit nicht der Fall war.

²⁾ Auch in sehr schwachem NH₃ (z. B. N/1000).

³⁾ Die Ausfällung geschieht rasch und vollständig; bei einem Gehalt von $\frac{1}{2}\%$ gleichfalls Niederschlag; $\frac{1}{4}\%$ HCl ohne Wirkung.

⁴⁾ Beim *Kochen* der approximativ neutralen Lösung des Percaglobulans, wobei wegen des Salz mangels die Flüssigkeit sich klar hält (Zusatz von wenig NaCl zur warmen Flüssigkeit zieht augenblicklich wirkliche Koagulation nach sich), *geht der adstringierende Geschmack verloren*. Eine solche aufgekochte Lösung zeigt nach Abkühlen herabgesetzte Fällbarkeit durch die Fällungsreagentien des Globulans, CaCl₂, NaCl etc., was auch in seiner Weise von der Denaturierung des Globulans zeugt.

in Übereinstimmung mit der Muttersubstanz, Ovomucoïd und Glykogen aus ihren Lösungen in verdünnter NaCl ausfällt.

Die Globulanwandlung gibt sich auch in anderen Fällen durch die successive eintretende Trübung¹⁾ der auf die eine oder andere Weise bereiteten Percaglobulinlösung zu erkennen.

In unter Toluolzusatz aufbewahrter nativer Lösung (Percaextract) tritt diese Veränderung nur langsam und in geringem Grade ein. Mehr tritt sie in die Erscheinung, wenn das Percaglobulin zuerst ausgesalzen (z. B. durch $\frac{1}{3}$ -Sättigung mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, volle Sättigung mit NaCl) und danach in destilliertem Wasser gelöst wurde (schon die erste Auflösung in destilliertem Wasser ist selten vollständig). Eine solche Lösung trübt sich bald und beim Versuch, sie zu filtrieren, setzt sich Globulan in reichlicher Menge auf dem Filter als eine klebrige Schicht ab, während das anfangs klare Filtrat sich wieder trübt usw.

Übrigens scheint eine Menge von Versuchen zu zeigen, daß das native Percaglobulin auf seinem Wege zum Globulan gewisse successive auftretende Zwischenstadien zu durchlaufen hat: am frühesten stellt sich die Fällbarkeit durch verdünnte CaCl_2 und BaCl_2 ein, danach die durch verdünnte NaCl, NH_4Cl etc., zuletzt die durch «neutrale Alkaloidreagentien».²⁾

Keine deutlichen Spuren von Globulanwandlung zeigen sich, wenn man das Percaglobulin ohne unnötiges Hinausziehen, bei gewöhnlicher Temperatur mittels $\frac{3}{4}\%$ HCl, sei es direkt aus «Percaextract» oder indirekt aus der Ovomucoïdverbindung,

¹⁾ Nicht sich klärend bei Zusatz z. B. von NaCl, NH_4Cl , wohl aber von BaCl_2 , Zucker oder Glycerin.

²⁾ Streicht man mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{3}$ -Sättigung ausgefälltes, abfiltriertes und gelinde ausgepreßtes Percaglobulin auf Glasscheiben und kratzt die bei Zimmerwärme getrocknete Masse ab und trocknet sie zuletzt über SO_3 , so erhält man ein an Globulan (oder dessen nächstem Vorstadium) reiches Präparat, das in geschlossenem Gefäß jahrelang aufbewahrt werden kann, ohne daß es sich weiter denaturiert. Man kann auf diese Weise für spätere Versuchszwecke die Substanz in für die Anstellung der Versuche bequemer Form konservieren. Nachdem die Substanz durch wiederholtes Dekantieren mit destilliertem Wasser von Salz befreit worden, löst sie sich nämlich mit größter Leichtigkeit in verdünnter ($\text{N}/_{100}$ — $\text{N}/_{1000}$) HCl oder KOH.

ausfällt, mittels welchen Verfahrens man wirklich zu einer reinen, approximativ salzfreien Lösung von nicht zu Globulan umgewandeltem und im übrigen wenig verändertem Percaglobulin gelangen kann. Eine Prüfung hinsichtlich der Fällungsverhältnisse zeigt aber, daß das Percaglobulin auch in diesem Fall nicht *völlig* unverändert bleibt: die approximativ neutralisierte Lösung der Substanz wird im Gegensatz zum nativen Percaglobulin durch verdünnte CaCl_2 -Lösung gefällt (dagegen nicht von anderen verdünnten Neutralsalzlösungen; die Löslichkeit des mit NaCl -haltiger Ovomucoïdlösung erhaltenen Niederschlages in verdünnter BaCl_2 -Lösung ist beibehalten). Ist die Behandlung mit $\frac{3}{4}\%$ HCl nicht möglichst rasch¹⁾ ausgeführt worden, so lassen sich wohl auch andere Zeichen der Veränderung beobachten (= erstes Anzeichen von Albuminatwandlung): Fällbarkeit auch durch verdünnte BaCl_2 , wobei der Niederschlag sich nicht klar im Überschuß löst; auch der Niederschlag, der mit NaCl -haltiger Ovomucoïdlösung erhalten wird, ist nicht vollständig in verdünnter BaCl_2 , Glycerin etc. löslich. Bei längerer HCl -Einwirkung wird die Denaturierung der Substanz unter fortschreitender Acidalbuminatwandlung immer deutlicher.

Versuche über die Einwirkung von Säure und Alkali.

Der Hauptzweck dieser Versuche war, festzustellen, ob durch stärkere Agentien die Abspaltung einer adstringierenden Substanz, in erster Linie Histon — was mit $\frac{3}{4}\%$ HCl bei gewöhnlicher Temperatur nicht gelungen war — herbeizuführen wäre.

Versuch 1. 25 ccm «Percaextract» + gleiches Volumen 25%iger HCl . Bei gewöhnlicher Temperatur 6 Stunden lang. Zentrifugierung der gefällten Mischung.

- a) Das Zentrifugat. Nach Neutralisierung und Abscheidung eines äußerst schwachen Neutralisationspräzipitats gab die Flüssigkeit, die *keinen adstringierenden* Geschmack besaß, mit:

¹⁾ Zentrifugierung muß innerhalb weniger Minuten nach Entstehung des Niederschlages vorgenommen werden.

Alkohol in reichlicher Menge — keinen Niederschlag;

Gerbsäure — nur Spuren von Niederschlag;

$\text{CuSO}_4 + \text{KOH}$ — nicht Biurettreaktion:

b) Der Niederschlag wurde in 100 ccm destilliertem Wasser aufgeschlämmt, darauf zentrifugiert:

a) Das *Zentrifugat* verhielt sich ebenso negativ wie das erste;

β) Der *Niederschlag* wurde nochmals in 100 ccm destilliertem Wasser aufgeschlämmt. Er ging nun (da der HCl-Gehalt reduziert worden) zum größten Teil in Lösung. Adstringierender Geschmack nicht deutlich wahrnehmbar.

Versuch 2. 2000 ccm «Percaextrakt» + 75 ccm 25%iger HCl, verdünnt mit destilliertem Wasser auf 500 ccm (= 3,4% HCl in der Mischung). Der durch Zentrifugieren abgeschiedene Niederschlag wurde in destilliertem Wasser gelöst. Von der Lösung (700 ccm) wurden für diesen Versuch 175 ccm angewendet.

Nach Zusatz des gleichen Volumens 1 1/2%iger HCl (= 3/4% in der Mischung) wurde die gefällte Mischung bei + 40° C. 24 Stunden lang digeriert, worauf zentrifugiert wurde.

a) Das Zentrifugat wurde mit KOH neutralisiert, wobei schwache Opaleszenz eintrat. Der über Nacht aufbewahrte, ausgefällte, äußerst geringe, Albuminreaktionen gebende Niederschlag wurde abfiltriert. Das Filtrat, das keinen adstringierenden Geschmack besaß und keinen Ausschlag bei der Hellersehen Probe gab, wurde sofort konzentriert; gab, danach geprüft, keinen Niederschlag mit Alkohol (nur NaCl-Kristalle allmählich sich abscheidend);

» » » Ovomucoid- oder Glykogenlösung;

keine Reaktion auf Pb-schwärzenden Schwefel;

» Biurettreaktion.

b) Aus dem Niederschlag (dessen approximativ neutralisierte Lösung *keinen adstringierenden Geschmack* hatte) wurden Analysenpräparate bereitet.

N-Bestimmung: 15,81% (für aschefreie Substanz).

Versuch 3. Eine Lösung von mit 3/4% HCl zweimal ausgefälltem Percaglobulin wurde, nachdem sie mit dem gleichen Volumen 1 1/2%iger HCl (= 3/4% in der Mischung) versetzt worden, bei + 40° C. 6 Tage lang digeriert, darauf zentrifugiert.

- a) Das Zentrifugat (neutralisiert): kein adstringierender Geschmack; negatives Verhalten zur Hellerschen Probe, Biuretreaktion und Lösung von Ovomuroid oder Glykogen.
- b) Der Niederschlag wurde in destilliertem Wasser aufgeschlämmt. Der nach 24 Stunden abgeschiedene Niederschlag (das Zentrifugat ergab nicht die Spur einer Reaktion bei der Hellerschen oder Biuretprobe) wurde in verdünnter KOH gelöst; die approximativ neutralisierte Lösung, die frei von adstringierendem Geschmack war, gab keinen Niederschlag mit NaCl-haltiger Lösung von Ovomuroid oder Glykogen, verdünnter NaCl, neutralen Alkaloidreagentien¹⁾ (verhielt sich wie eine gewöhnliche Albuminatlösung).

Versuch 4. 50 cem «Percaextrakt» + 25 cem starker Kalilauge.²⁾ Der entstandene, reichliche Niederschlag³⁾ wurde sofort abzentrifugiert.

- a) Das Zentrifugat (neutralisiert) *ohne adstringierenden Geschmack*.
- b) Der Niederschlag wurde in destilliertem Wasser gelöst; der bei Neutralisierung mit A entstandene voluminöse Niederschlag wurde abgeschieden (das Zentrifugat frei von adstringierendem Geschmack, mit destilliertem Wasser gewaschen und in sehr verdünnter KOH gelöst. Diese approximativ neutralisierte Lösung, die keinen adstringierenden Geschmack besaß, verhielt sich bei Prüfung mit Fällungsreagentien wie die entsprechende in Versuch 3.

Übereinstimmend ergibt sich aus diesen verschiedenen Versuchen, daß das Percaglobulin während der Albuminatwandlung seines adstringierenden Geschmacks und seiner übrigen charakteristischen Eigenschaften verlustig geht, und das,

¹⁾ Wurde gefällt von verdünnter CaCl_2 und BaCl_2 ; der letztgenannte Niederschlag unlöslich im Überschuß und bei Glyzerinzusatz.

²⁾ 60 g KOH in 100 cem der Lauge.

³⁾ Das Percaglobulin wird durch konzentrierte Kali- und Natronlauge ausgefällt. Beim Arbeiten mit Lauge von der in obiger Anmerkung angegebenen Stärke trat Niederschlag bei Zusatz von 3,0 bzw. 2,5 cem Lauge auf 10 cem «Percaextrakt» auf.

Bleibt die gefällte Mischung in Zimmerwärme stehen, so geht der Niederschlag (wegen der Albuminatumwandlung der Substanz) im Laufe von ein paar Stunden wieder in Lösung (Zusatz von $\text{Pb}\bar{\text{A}}_2$ zeigt an, daß Abspaltung von etwas Schwefel stattgefunden hat).

ohne daß ein Spaltungsprodukt (Histon oder ein anderes) sich dabei nachweisen ließe. Alles spricht demnach dafür, daß die Denaturierung des Percaglobulins unter der Einwirkung der genannten Agentien nicht als der Effekt einer Spaltungserscheinung, sondern als eine molekulare Veränderung aufzufassen ist.

Hiermit habe ich auch den Gedanken aufgeben müssen, der — angeregt durch die Übereinstimmung mit dem Histon hinsichtlich der Geschmacksqualität und durch die äußere Ähnlichkeit des Verlaufes bei der Behandlung eines Percaextrakts bzw. einer Nucleohistonlösung mit $\frac{3}{4}$ %iger HCl — während dieser Untersuchung mir lange vorgeschwebt hat, nämlich daß das Percaglobulin, wenn auch nicht selbst ein Histon darstellend, doch schließlich sich als eine Verbindung des Histons mit einem andern Eiweißkörper erweisen würde. Da keine experimentelle Stütze für diese Annahme hat vorgebracht werden können, führt eine Zusammenstellung aller der beobachteten Tatsachen zu dem Schlusse, daß das Percaglobulin ein Eiweißkörper *sui generis* ist.

Es erhebt sich nun die Frage, welche Aufgabe diese eigenartige Substanz zu erfüllen haben kann. Eine bestimmte Antwort vermag ich auf diese Frage nicht zu geben. Jedoch wage ich es für glaublich zu halten, daß die Gegenwart dieses bei anderen untersuchten Fischen fehlenden Bestandteils im Ovarium des Barsches mit dem von allen, mindestens skandinavischen, Fischen abweichenden Mechanismus der Eierablage bei diesem Fische in Zusammenhang steht. Stuxberg¹¹⁾ sagt hierüber folgendes: «Der Rogen des Barsches besteht nicht, wie der Rogen der Fische im allgemeinen, aus freien Körnern, die sich leicht von einander trennen, wenn sie von ihm abgelegt werden; sondern er ist von einer netzartigen Haut umschlossen, die die Rogenkörner fest zusammenhält. Um sich der Rogenmasse zu entledigen, reibt das Barschweibchen den Bauch gegen einen scharfen Stein oder Zweig, und wenn die Haut haften geblieben, macht es einen schnellen Sprung, so daß die ganze Rogenhülse, die bis zu $1\frac{1}{2}$ Meter in der Länge messen kann, auf einmal herausläuft und an der festen Unterlage hängen bleibt.»

Wenn dem so ist, erscheint es nicht unwahrscheinlich, daß das beobachtete schnelle Verschwinden des Percaglobulins aus dem Ovarialsafte zur Zeit kurz vor der Rogenablage in Wirklichkeit eine Umbildung der Substanz zu einem in verdünnter NaCl unlöslichen, konsistenteren Körper bedeutet, der — in der Wand der Eihüllen¹⁾ abgelagert — dem Rogenstrang seine zur Zeit der Rogenablage recht beträchtliche und für den erwähnten Rogenablegemechanismus erforderliche Festigkeit gibt. Herr Professor Hammarsten, der während der letzten Jahre der Chemie der Barscheier seine Aufmerksamkeit zugewandt hat, hat, nach gütiger mündlicher Mitteilung,²⁾ die Beobachtung gemacht, daß eine normalerweise aus den Eiern extrahierbare Mucinsubstanz aus dem *vollreifen* Rogen lange nicht in demselben Grade gewonnen werden kann.³⁾ Stellt man diese Beobachtung mit dem oben erwähnten Vermögen des Percaglobulins unter Bildung einer in den Gewebssäften unlöslichen Verbindung mit gewissen Glykoproteiden zu reagieren, zusammen, so scheint die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, daß die erwähnte Konsolidierung des Rogenstranges (der Eihüllen) der Effekt eines Zusammenwirkens zwischen dem Percaglobulin des Ovarialsafte und der Mucinsubstanz der Eier ist.

Anhang.

Bei Versuchen mit Blutkörpersuspension⁴⁾ hat es sich gezeigt, daß «Percaextrakt» deutliche agglutinierende Wirkung besitzt, wie aus folgendem Versuchsprotokoll hervorgeht.

¹⁾ Eine *besondere* «netzartige Haut» (siehe das obige Zitat!) existiert nicht, sondern dürfte dieser Ausdruck auf die zur Zeit der Rogenablage *bedeutend verdickten und miteinander zusammengeketteten Eihüllen* gehen.

²⁾ Deren Veröffentlichung an dieser Stelle freundlichst gestattet wurde.

³⁾ Der vollreife Rogen enthält statt dessen eine schwerer lösliche Substanz von mucinogenartiger Beschaffenheit.

⁴⁾ Bereitet nach Ehrlich⁽¹²⁾ aus 5 ccm frischem Kaninchenblut + 95 ccm physiologischer NaCl-Lösung + 0.5 g Na-Citrat. (Als «physiologische» NaCl-Lösung wurde von mir N₁₀-Lösung angewandt.)

Blut- körper- suspension ccm	Perc- extrakt ccm	Aussehen der Mischung nach:		
		5 Minuten	10 Minuten	20 Minuten
5	0.05	} Beginnende lockige Ab- scheidung	} Deutlich lockiger Niederschlag	} Derbe Flocken am Boden des Ge- fäßes
5	0.10			
5	0.15		} Derbe Flocken am Boden des Gefäßes	} Zusammen- hängende Kuchen am Bo- den des Gefäßes
5	0.20			
5	0.25			

Bei Kontrollproben mit 5 ccm Blutkörpersuspension + entsprechenden Mengen (0.05—0.25 ccm) nur N_{10} NaCl-Lösung wurde weder Verkleben noch auch nur nennenswerte Sedimentierung wahrgenommen.

Besondere Versuche zeigten, daß das Zusammenballen der Blutkörperchen nicht auf einem in der Flüssigkeit entstandenen Niederschlage beruhte, der die Blutkörperchen mit sich gezogen hätte. Ein Teil der Blutkörpersuspension wurde zentrifugiert:

a) Die *Flüssigkeit* gab mit «Percextrakt» keinen Niederschlag;

b) die *Blutkörperchen*, in N_{10} NaCl aufgeschlämmt, agglutinierten wie vorher bei Zusatz von «Percextrakt».

Ob die beobachtete Agglutinerung dem Percaglobulin selbst oder der Gegenwart eines im «Percextrakt» vorhandenen sog. Agglutinins zuzuschreiben ist, habe ich nicht festgestellt. Aus der Beobachtung, daß auch mittels $\frac{3}{4}\%$ HCl ausgefälltes Percaglobulin Agglutinerung bewirkt, wage ich nämlich keinen Schluß in erwähnter Hinsicht zu ziehen.

Mit einer giftigen Wirkung, wenigstens nicht einer ausgeprägten solchen, scheint diese Agglutinerungserscheinung nicht in Zusammen-
hang zu stehen. An zwei Kaninchen, in deren Halsvene nativer «Percextrakt» bzw. Lösung von durch $\frac{3}{4}\%$ HCl gefälltem Percaglobulin in beiden Fällen 5 ccm Flüssigkeit, enthaltend ca. 0.040 g Percaglobulin injiziert wurde, ¹⁾ war keine Wirkung zu verspüren.

Literaturverzeichnis.

1. Miescher, Verhandl. der Naturf.-Ges. zu Basel, Bd. 6 (1874), S. 138.
2. Bang, Diese Zeitschrift, Bd. XXVII (1899), S. 463.

¹⁾ Die Operation wurde gütigst von Herrn Dr. T. Thunberg im hiesigen physiologischen Institut ausgeführt.

464 Carl Th. Mörner, Percaglobulin, ein charakt. Eiweißkörper etc.

3. Osborne, Annual Report for 1900 from the Research Laboratory of the Connecticut Agricultural Experiment Station, S. 388.
4. Lilienfeld, Diese Zeitschrift, Bd. XVIII (1893), S. 473.
5. Neuberg, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol., Bd. 2 (1902), S. 215.
6. Mörner, Carl Th., Diese Zeitschrift, Bd. XVIII (1894), S. 525.
7. Langstein, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol., Bd. 3 (1903), S. 510.
8. Milesi, Bolletino d. Società Med.-Chirurg. d. Pavia, 1898.
9. v. Lingelsheim, Zeitschrift für Hygiene und Infekt.-Krankh., Bd. 42 (1903).
10. Perrando u. Gianelli, La Riforma medica, 1902.
11. Stuxberg, Sveriges och Norges fiskar, Göteborg, 1895.
12. Ehrlich, Fortschr. d. Medizin, 1897.