

Über Phykoerythrin und Phykocyan bei *Ceramium rubrum* (Huds.) Ag.

Von
Harald Kylin.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität Upsala.)
(Der Redaktion zugegangen am 9. September 1910.)

Mit einer Tafel in Lichtdruck und zwei Kurvenzeichnungen im Text.

Inhaltsverzeichnis.

I. Einleitung. — II. Darstellung reiner Phykoerythrin- und Phykocyanlösungen. — III. Phykoerythrin: a) Farbe, Fluorescenz, Krystallisation; b) Eiweißreaktionen; c) Löslichkeits- und Fällbarkeitsverhältnisse; d) Einwirkung von Licht; e) Einwirkung von Wärme; f) Einwirkung proteolytischer Enzyme; g) Einwirkung von Säuren und Alkalien; h) Chemische Analyse; i) Spektroskopische Untersuchung. — IV. Phykocyan: a) Farbe, Fluorescenz, Krystallisation; b) Eiweißreaktionen; c) Löslichkeits- und Fällbarkeitsverhältnisse; d) Einwirkung von Licht; e) Einwirkung von Wärme; f) Einwirkung proteolytischer Enzyme; g) Einwirkung von Säuren und Alkalien; h) Spektroskopische Untersuchung. — V. Bestimmung der Phykoerythrin- und Phykocyanmengen. — VI. Zusammenfassender Vergleich zwischen Phykoerythrin und Phykocyan.

I. Einleitung.

Der Name des roten Farbstoffes der Florideen, Phykoerythrin, stammt von Kützing (1843, S. 21), dem wir auch die ersten Angaben über die Eigenschaften dieses Farbstoffes zu verdanken haben. Er unterscheidet bei den Florideen zwei Farbstoffe, einen in Wasser löslichen, in Alkohol unlöslichen, Phykoerythrin, und einen in Wasser unlöslichen, in Alkohol löslichen, Chlorophyll.

Nägeli (1847, S. 187 und 1849, S. 8) anerkennt nur das Vorkommen eines Farbstoffes bei den Florideen, Erythrophyll, das nach seiner Ansicht mit Chlorophyll verwandt ist und beim Töten der Algen in dieses übergehen soll.

Stokes (1854, S. 264) liefert die ersten spektroskopischen Angaben über das Phykoerythrin, das er streng vom Chlorophyll unterscheidet. Die verschiedenen Farben der Florideen beruhen auf verschiedenen Mischungen dieser beiden und vielleicht noch einiger anderen Farbstoffe.

Die Ansicht, daß die Florideen nur einen einzigen Farbstoff enthielten, wird von Nägeli und Schwendener (1867, S. 498) weiter ausgebildet, mit besonderer Schrfe aber von Cohn (1867) formuliert. Dieser nennt den einheitlichen Florideenfarbstoff Rhodophyll; dieses spalte sich beim Tten der Algen in Chlorophyll und Phykoerythrin, welches letzteres jedoch nicht mit Ktzings Phykoerythrin identisch sei. Cohn teilt auch eine Reihe von Angaben über die Eigenschaften des Phykoerythrins mit.

Askenasy (1867) und Rosanoff (1867) greifen auf Ktzings Ansicht, Chlorophyll und Phykoerythrin seien zwei verschiedene Farbstoffe, zurück.¹⁾ Auch diese Autoren machen Angaben über die Eigenschaften des Phykoerythrins.

Weitere Mitteilungen finden sich bei Pringsheim (1875), Reinke (1886) und Schütt (1888). Besonders der Letzgenannte liefert eine Reihe von Detailangaben, aber viele davon sind offenbar fehlerhaft; dies kommt daher, daß er nicht mit reinen Lösungen arbeitete.

Es muß als ein Verdienst Hansens (1893) angesehen werden, daß er die älteren Angaben über die Eigenschaften des Phykoerythrins scharf kritisierte, wenn es ihm auch nicht gelang, wirklich neue Beobachtungen vorzulegen. Er wirft in-

¹⁾ Die Frage, ob in den Chromatophoren der Florideen Chlorophyll und Phykoerythrin mit einander chemisch verbunden sind oder nicht, ist noch nicht endgültig entschieden. In der letzten Auflage (1910) von Strasburger *Lehrbuch der Botanik* lesen wir S. 318: die Chromatophoren enthalten außer grünem Farbstoff auch einen roten, das Phykoerythrin, und zwar, wie es scheint, beide in chemischer Verbindung (vgl. auch Strasburger S. 53). Meine Untersuchungen scheinen mir jedoch dahin gedeutet werden zu müssen, daß in den Chromatophoren der Florideen ein Gemenge dieser Farbstoffe, nicht eine chemische Verbindung vorliegt. In einem künftigen Aufsatz hoffe ich indessen auf diese Frage etwas näher zurückkommen zu können.

dessen den Gedanken hin, daß dieser Farbstoff von eiweißartiger Beschaffenheit sei, und zeigt außerdem, daß die Florideen außer Chlorophyll und Phykoerythrin auch einen gelben Farbstoff enthalten.

Molisch (1894) bringt Beweise für die Richtigkeit von Hansens Vermutung über die Eiweißnatur des Phykoerythrins bei; ferner eine Reihe anderer Angaben über dessen Eigenschaften, z. B. seine Krystallisationsfähigkeit. Er hat auch versucht, reine Lösungen zu erhalten, was freilich nicht vollkommen gelang.

Hanson (1909) liefert die ersten Analysenangaben über Phykoerythrin, deren Wert aber nur gering sein kann, da das von Hanson analysierte Material auch nicht annähernd rein war. Er macht auch Einwände gegen Molischs Angabe, daß das Phykoerythrin von eiweißartiger Natur sei.

Seit Januar 1908 habe ich mich mit dem Studium des roten Farbstoffes der Florideen beschäftigt und bereits früher (1908, S. 93) eine Methode zur Herstellung reiner Farbensubstanz veröffentlicht. Am angeführten Orte habe ich auch mitgeteilt, daß *Ceramium rubrum* (Huds.) Ag., die Alge, die ich zur Herstellung meiner Phykoerythrinlösungen verwendete, auch einen blauen, in rhombischen Tafeln krystallisierenden Farbstoff enthalte: auch diesen konnte ich später in reiner Form erhalten und es zeigte sich, daß er der Phykocyangruppe angehört, jedoch von den bisher bekannten Phykocyanmodifikationen (Molisch 1895, S. 131 und 1906, S. 795) sowohl spektroskopisch als krystallographisch verschieden ist.

Phykocyan ist derjenige Farbstoff, der mit dem Chlorophyll zusammen den Cyanophyceen ihre blaugrüne Farbe verleiht. Der Name stammt von Kützing (1843, S. 20), und schon dieser Forscher war der Ansicht, daß Chlorophyll zugleich mit Phykocyan in diesen Algen vorkomme. Auch die ersten Angaben über die Eigenschaften des Phykocyans rühren von Kützing her.

Nägeli (1849, S. 5) anerkennt nur das Vorkommen von einem Farbstoff bei den Cyanophyceen, den er Phykochrom nennt. Ebenso Cohn (1867: 1, S. 38 und 1867: 2, S. 12), aber

dieser meint, daß sich das Phykochrom beim Töten der Zellen in zwei neue Stoffe spalte, einen in Wasser löslichen, in Alkohol unlöslichen, Phykocyan, und einen in Wasser unlöslichen, in Alkohol löslichen, Chlorophyll.¹⁾ Er macht auch eine Reihe Angaben über die Eigenschaften des Phykocyans, unter denen mag erwähnt werden, daß seine Wasserlösung indigoblau ist und intensiv karminrot fluoresciert.

Weitere Untersuchungen über das Phykocyan haben Askénasy (1867), Rosanoff (1867), Kraus und Millardet (1868), Sorby (1877), Nebelung (1878) und Nadson (1893) gemacht, aber da es keinem von diesen gelungen ist, reine Lösungen zu erzielen, sind ihre Angaben selbstverständlich in keiner Beziehung ganz zuverlässig. Bemerkenswert ist ein Versuch von Sorby, drei verschiedene Arten von Phykocyan nachzuweisen, aber auf Grund der Methode, die Sorby zur Trennung der Farbstoffe anwendete, bestreitet Molisch (1906, S. 796), und zwar, wie es scheint, mit vollem Recht, die Beweiskraft dieser Untersuchung. — Kraus und Millardet haben gezeigt, daß im Alkoholextrakt von *Oscillaria*-Arten auch ein gelber Farbstoff vorkommt.

Molisch (1895, S. 131) hat gezeigt, daß das Phykocyan von eiweißartiger Natur ist und daß es aus einer Lösung bei hinreichender Hinzusetzung von Ammoniumsulfat krystallisieren kann. Derselbe Gelehrte hat später (1906, S. 795) nachgewiesen, daß es mehrere verschiedene Modifikationen von Phykocyan gibt, die sich sowohl spektroskopisch als auch krystallographisch von einander unterscheiden.

Außer bei den Cyanophyceen ist das Phykocyan bei einigen Florideen, *Lemanea*- und *Batrachospermum*-Arten nachgewiesen. Kützing (1843, S. 20).

Die folgende Untersuchung wurde im medizinisch-chemischen Institut der Universität Upsala ausgeführt. Für die Bereitwilligkeit, mit der mir immer ein Arbeitsplatz zur Verfügung gestellt wurde, gestatte ich mir, sowohl dem Präfekten

¹⁾ Die Frage, ob in den Chromatophoren der Cyanophyceen Chlorophyll und Phykocyan mit einander chemisch verbunden sind oder nicht, ist noch nicht endgültig entschieden (vgl. die Note S. 170).

dieses Instituts, Herrn Professor Dr. S. G. Hedin, als auch Herrn Prof. Dr. C. Th. Mörner meinen ergebensten Dank auszusprechen. Herrn Prof. Mörner schulde ich auch große Dankbarkeit für all die Hilfe, die er mir hat zuteil werden lassen, sowie für das Interesse, mit dem er meine Untersuchung stets verfolgt hat.

Auch dem Assistenten an der zoologischen Station Kristineberg, Herrn Dr. Hj. Östergren, möchte ich für die Bereitwilligkeit, mit der er mir bei wiederholten Gelegenheiten die keineswegs unbedeutenden Mengen von *Ceramium rubrum* sandte, die zu meiner Untersuchung nötig waren, meinen ergebensten Dank aussprechen.

II. Herstellung reiner Phykoerythrin- und Phykocyanlösungen.

Die Forscher, die sich bisher mit dem Studium des Phykoerythrins beschäftigt haben, verschafften sich ihr Material, indem sie eine bestimmte Floridee mit destilliertem Wasser auslaugten. Die so erhaltene Lösung wird als schön karminrot mit einer orangegelb-orangeroten Fluorescenz beschrieben.

Es ist indessen klar, daß die so erhaltenen Lösungen nicht reine Phykoerythrinlösungen darstellen, sondern in hohem Grade verunreinigt sind von einer ganzen Anzahl Stoffe, die zugleich mit dem Phykoerythrin aus der Algenmasse extrahiert werden. Besonders Hansen (1893, S. 293) hat diese Tatsache kräftig hervorgehoben und im Zusammenhang damit darauf hingewiesen, daß die älteren Angaben über die Eigenschaften des Phykoerythrins ganz natürlich mit vielen Fehlern behaftet sein müssen.

Aber auch Hansen ist es nicht gelungen, reine Phykoerythrinlösungen darzustellen, sondern er ist durch seine Untersuchung zu dem Resultat gekommen, «daß die Darstellung des Florideenrotes auf ganz besondere Schwierigkeiten stößt», und es ist ihm nicht gelungen, «den Farbstoff auch nur in etwas reinerer Form zu gewinnen».

Hingegen ist es Molisch (1894, S. 183) gelungen, verhältnismäßig, wenn auch sicher nicht ganz reine Phykoerythrinlösungen herzustellen. Er verwendete eine größere Menge

(500 g) von lebendem *Nithophyllum punctatum*, das er mit destilliertem Wasser soweit als möglich reinspülte. Die Algenmasse wurde dann mit so viel Wasser übergossen, daß sie gerade davon bedeckt war, und er ließ sie darauf 24 Stunden in einer Temperatur von 35° stehen, worauf die gefärbte Lösung abfiltriert wurde. Die Lösung wurde mittels Zusatz von Alkohol gefällt. Nach 24 Stunden wurde der Niederschlag abfiltriert und wieder in Wasser aufgelöst: die Fällung mit Alkohol wurde dann noch einmal wiederholt.

Die Phykoerythrinlösung, die Molisch auf diese Weise erhielt, darf wohl als befreit betrachtet werden von einem großen Teil der Verunreinigungen, die bei der Extraktion mitkamen, aber sicher nicht von allen. Auch wenn die Fällung mittels Zusatz von Alkohol noch mehrere Male wiederholt worden wäre, hätte sich kaum eine sicher reine Phykoerythrinlösung erzielen lassen. Hierzu kommt noch die Schwierigkeit, daß der Alkohol das Phykoerythrin nach und nach denaturiert, worauf es in Wasser unlöslich wird. Diesem Nachteil scheint Hanson (1909, S. 337) in hohem Grade ausgesetzt gewesen zu sein.

In dem vorbereitenden Stadium meiner Untersuchungen spülte ich das eingesammelte Material von *Ceramium rubrum*, der Alge, aus der ich, wie oben erwähnt, meine Farbenlösungen gewann, so sorgfältig wie möglich mit destilliertem Wasser rein, worauf ich die Algenmasse mit destilliertem Wasser übergieß und sie bei einer Temperatur von 35—40° 24 Stunden stehen ließ. Nach dieser Zeit wurde die farbige Lösung abfiltriert und die Algenmasse von neuem mit destilliertem Wasser übergossen. Dieses Verfahren wurde noch zweimal mit einer Pause von je 24 Stunden wiederholt. Auf diese Weise erhielt ich vier Extrakte, von denen der erste am meisten, der letzte am wenigsten gefärbt war. Die gröberen Zweige des Thallus enthielten auch nach der vierten Extraktion noch Phykoerythrin, aber das Auslagern mußte wegen starker Fäulnis und des damit verbundenen höchst unangenehmen Geruchs eingestellt werden.

Um das Verfaulen zu verhindern, übergieß ich bei einer späteren Extraktion die Algenmasse mit Toluol, ehe ich destil-

liertes Wasser zusetzte, und ließ sie dann, wie früher, bei einer Temperatur von 35—40° 24 Stunden lang stehen. Während dieser Zeit wurde jedoch nur eine geringe Menge Farbstoff extrahiert, und um eine Farbenlösung zu erhalten, die in ihrer Stärke der ohne Zusatz von Toluol gewonnenen ungefähr entsprach, mußte das Auslaugen bei Zusatz von Toluol eine ganze Woche fortgesetzt werden.

Da indessen begreiflicherweise während einer so langen Extraktionszeit bei einer Temperatur von 35—40° eine Menge schleimiger Kohlenhydrate die Farbenlösungen verunreinigten, habe ich es vorgezogen, die Auslaugung bei Zimmertemperatur vorsichgehen zu lassen. Daß hierbei der Farbstoff etwas langsamer extrahiert wird, ist wohl wahrscheinlich; irgend welche vergleichende Beobachtungen habe ich indes nicht gemacht.

Indessen hat es sich, als ich eine Methode zur Herstellung von Phykoerythrin sowohl wie Phykocyan in reiner Form gefunden hatte, gezeigt, daß alles Spülen der Algenmasse weggeworfene Arbeit ist. Die Neutralsalze, die der Algenmasse anhaften, sollen nicht weggespült werden, da sie, wie später gezeigt werden soll, die Löslichkeit der Farbstoffe begünstigen. Die Diatomaceen können durch Fortspülung nicht ganz entfernt werden und bringen auch keinen anderen Nachteil mit sich, als etwas größere Arbeit bei der ersten Filtrierung. Die unangenehmsten aller Verunreinigungen, die schleimigen Kohlenhydrate, kommen während der Extraktion selbst hinzu.¹⁾

Sobald die Algenmasse mit destilliertem Wasser übergossen worden ist, werden die feineren Zweige orangefarbig, und nach einigen Stunden ist die ganze Algenmasse orangefarbig geworden. Das Phykoerythrin ist jetzt aus den Chromatophoren gelöst und in den Zellsaft gekommen. Die Zellwände zeigen sich aber für die Farbstoffe schwer durchdringlich, und erst, nachdem die Wände unter dem Einfluß des Wassers anfangen, verschleimt zu werden, treten die Farbstoffe in etwas größeren Mengen aus den Zellen heraus. Bei der Behandlung

¹⁾ Unter den schleimigen Kohlenhydraten kommen Pentosane vor. Die Orcin-Salzsäureprobe und die Phloroglucin-Salzsäureprobe auf Pentosen ergeben positives Resultat.

mit Toluol wird auf irgend eine Weise dieses Verschleimen verhindert, und die Toluolbehandlung wirkt demnach auf das Extrahieren der Farbstoffe verzögernd. Einige neulich (im August 1910) gemachte Versuche haben indessen gezeigt, daß das oben erwähnte Verschleimen der Zellwände schon nach etwa 12—15 Stunden soweit fortgeschritten ist, daß die Farbstoffe sie in reichlicher Menge durchdringen. Ein Extraktionsversuch wurde so gemacht, daß ich die Algenmasse während 15 Stunden im destillierten Wasser ohne Zusatz von Toluol liegen ließ, darauf Toluol zusetzte und das Extrahieren noch zwei Tage fortsetzte. Hierbei wurden die Farbstoffe stärker extrahiert, als in einigen Versuchen, bei denen Toluol gleichzeitig mit dem destillierten Wasser zugesetzt, und die Extraktionszeit bis zwei Wochen ausgedehnt wurde. Eine erwähnenswerte Fäulnis war vor dem Zusatz von Toluol nicht eingetreten.

Unter den vielen Extraktionsserien, die ich im Verlaufe meiner Untersuchungen gemacht habe, will ich hier über die beiden letzten Bericht erstatten.

Das Material für die erste dieser beiden Serien war von der zoologischen Station Kristineberg am 3. April 1909 abgesandt worden, traf am 5. April in Upsala ein und wurde am 6. in Behandlung genommen. Das Material war ganz frisch, ohne Anzeichen beginnender Verwesung. Manche Zweigspitzen waren indessen stark orangefarbig und zeigten, daß das Phykoerythrin in ihnen in Lösung übergegangen war. Nach Entfernung einiger fremden Algen, kleinerer Crustaceen etc., wurde eine kleinere Portion (100 g) zur Bestimmung des Trockengewichts abgeteilt, das übrige gewogen (6700 g), mit Toluol behandelt, mit destilliertem Wasser übergossen und dann eine Woche bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Hierauf wurde das Material so gut als möglich mit der Hand ausgepreßt, hierauf wieder mit etwas Toluol behandelt, mit Wasser übergossen und eine weitere Woche bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Das Auspressen, ebenso wie die Toluolbehandlung und das Zusetzen von Wasser wurde dann wiederholt, aber die Extraktionszeit wurde diesmal auf 15 Tage ausgedehnt. Wieder eine Wiederholung derselben Behandlung, aber mit

Ausdehnung der Extraktionszeit auf 25 Tage. Auf diese Weise entstanden vier Wasserextrakte, die im folgenden nach der Ordnung ihres Zustandekommens der Kürze halber mit A_1 , A_2 , A_3 und A_4 bezeichnet werden. — Beim Auslaugen wurde so viel Wasser zugesetzt, daß die Algenmasse davon gerade bedeckt wurde.

Das Material für die zweite Serie wurde am 5. März 1910 von der zoologischen Station Kristineberg abgesandt, kam am 6. nach Upsala und wurde am selben Tage in Behandlung genommen. Das Material war ungewöhnlich gut erhalten, orange-farbene Zweigspitzen gab es nicht. Nach der Sortierung und nachdem eine kleinere Portion (100 g) zur Trockengewichtsbestimmung beiseite gelegt worden war, wurde der Rest gewogen (5150 g). Es wurde dann ganz ebenso behandelt wie das Material der vorhergehenden Versuchsserie, mit Beibehaltung derselben Extraktionszeiten, nur mit dem Unterschied, daß zur Erzielung des vierten Extraktes nicht destilliertes Wasser, sondern 0,1%ige Natriumcarbonatlösung verwendet wurde.¹⁾ Die vier Extrakte, die sich bei dieser Versuchsreihe ergaben, werden nach der Entstehungsfolge mit B_1 , B_2 , B_3 und B_4 bezeichnet.

Das Material war bei beiden Versuchsserien nach der letzten Extraktion schmutzig gelbgrün, nur mit den gröberen Zweigen des Thallus schwach rot. Eine kleine Menge Phykoerythrin war also noch immer zurückgeblieben.

Die Farbenlösung, die durch das Ausdrücken des Materials erhalten worden war, war durch kleine Algenreste und eine Menge Diatomaceen in hohem Grade verunreinigt. Der größte Teil dieser Verunreinigungen wurde durch Durchsiehen entfernt,

¹⁾ Während der Untersuchung hatte es sich gezeigt, daß die Farbstoffe bei Zusatz von einer sehr kleinen Menge Natriumcarbonat besser gelöst wurden. Spätere, vergleichende Versuche haben auch dargetan, daß eine Algenmasse, die mit 0,1%iger Natriumcarbonatlösung übergossen wurde, schon nach wenigen Minuten ebenso kräftig orangefarbig war, wie eine mit destilliertem Wasser übergossene nach einigen Stunden. Für das Heraustreten der Farbstoffe aus den Zellen scheint aber ein Zusatz von etwas Natriumcarbonat keine Bedeutung zu haben.

der Rest der aufgeschlämmten Verunreinigungen durch Filtrieren. Die so erhaltenen filtrierte Lösungen waren, vorausgesetzt, daß Bakterienbildung durch Zusatz eines geeigneten Antiseptikums verhindert wurde, vollkommen klar. Als Antiseptikum habe ich, wie bereits erwähnt, Toluol angewendet. Unterläßt man es, während der langsamen ersten Filtrierung Toluol hinzuzusetzen, so kann es leicht geschehen, daß die Filtrate nicht ganz klar werden. Wird die Algenmasse ohne Antiseptikum extrahiert, so ist es auch nach wiederholten Filtrierungen durch denselben Filter äußerst schwer, ganz klare Farbenlösungen zu erhalten.

Die Extrakte A_1 , A_2 , B_1 und B_2 reagierten schwach alkalisch, die übrigen neutral (Prüfung durch Lackmuspapier), natürlich mit Ausnahme von B_4 , wegen des Zusatzes von 0,1% Natriumcarbonat. In den Extrakten A_1 , A_2 , A_3 und B_1 , besonders reichlich in A_1 , wurde ein Krystallisieren von Trippelphosphat beobachtet; in Extrakt A_1 gab es auch einzelne Calciumoxalatkrystalle.

Die Extrakte A_1 und B_1 waren reicher an Farbstoff als die übrigen, ihre Farbe spielte mehr ins Blauviolette und die Fluorescenz war mehr braunrot. Die Extrakte A_4 und B_4 waren karminrot und hatten gelbe orangefarbene Fluorescenz. Die Unterschiede der Farben und Fluorescenzen beruhten darauf, daß die Extrakte A_1 und B_1 an Phykocyan relativ reicher waren als die übrigen, dann kamen A_2 und B_2 , dann A_3 und B_3 , während das Phykocyan im Extrakt A_4 und B_4 sogar wie ganz fehlte.

Wird eine auf die eben geschilderte Weise erhaltene Farbenlösung mit einer hinreichenden Menge Ammoniumsulfat versetzt, so entsteht ein grobflockiger amorpher Niederschlag, der wiederum leicht in Wasser löslich ist. Verwendet man 30 g Ammoniumsulfat auf 100 ccm Farbenlösung, so wird sowohl das Phykoerythrin, wie das Phykocyan vollständig gefällt. Das Filtrat, das durch Filtrierung dieses Niederschlags entsteht, ist stark braun-braungelb, wenn die Fällung in den Extrakten A_1 und B_1 vorgenommen wurde; weniger stark braun-braungelb bei der Fällung der übrigen Extrakte.

Wird eine kleinere Menge Salz zugesetzt, als zur augenblicklichen Fällung nötig ist, und die Lösung dann einige Stunden

oder einen Tag stehen gelassen, so erhält man sowohl Phykoerythrin- wie Phykocyankrystalle (Taf. I, Fig. 1), wenn die Lösung durch den Salzzusatz eine gewisse, hinreichende Salzkonzentration bekommen hat.

Schon Molisch (1894, S. 184) hat gezeigt, daß eine Phykoerythrinlösung durch Zusatz einer hinreichenden Menge Ammoniumsulfat gefällt wird und zur Krystallisation gebracht werden kann, wenn eine kleinere Menge des Salzes zugesetzt und die Lösung dann in einer Krystallisationsschale stehen gelassen wird, bis sie eine gewisse Konzentration erreicht hat. Molisch hat indessen diese Beobachtung nicht dazu verwendet, die Herstellung reiner Phykoerythrinlösungen zu versuchen.

Eben dieser Eigenschaft des Phykoerythrins und Phykocyans, daß sie durch Zusatz einer gewissen Menge von Ammoniumsulfat zur Krystallisation gebracht werden können, habe ich mich bedient, um die beiden Farbstoffe in ganz reiner Form herzustellen.

Die Reinigungsmethoden können wohl am besten durch eine Schilderung der Behandlung verdeutlicht werden, der ich den Extrakt B₁ unterzog.

Nachdem Extrakt B₁ durchgeseibt und filtriert worden war, wurde er mit 10 g Ammoniumsulfat in Substanz auf 100 ccm Filtrat versetzt und wurde dann 24 Stunden an einem finsternen Platz stehen gelassen. Die Menge des Filtrats war 4200 ccm. Unmittelbar nach Zusatz des Salzes konnte keine Veränderung wahrgenommen werden, aber nach 24 Stunden fand sich auf dem Boden des Bechers ein unbedeutender Niederschlag, der der mikroskopischen Untersuchung unterzogen wurde. Es zeigte sich, daß er zum größten Teil aus Trippelphosphatkrystallen bestand, außerdem aber aus wohlausgebildeten Phykoerythrinkrystallen, amorphen roten Körnern und einzelnen ebenfalls wohlausgebildeten Phykocyankrystallen. Weitere 2,5 g Ammoniumsulfat auf 100 ccm ursprüngliches Filtrat wurden hinzugesetzt, aber auch jetzt zeigte sich keine unmittelbare Veränderung. Nach Verlauf eines Tages hatte sich indessen ein reichlicher Niederschlag gebildet, der sich als zum größten Teile aus wohlausgebildeten Phykoerythrinkrystallen

bestehend erwies, außerdem aus Trippelphosphatkrystallen, amorphen roten Körnern, und einzelnen Phykocyankrystallen.

Die schon gebildeten Niederschläge wurden abfiltriert und in Wasser aufgelöst. Die Lösung erfolgte außerordentlich rasch. Mit der so erhaltenen Lösung wurde dann eine Lösung aus Extrakt B₂ gemischt, die ganz ebenso hergestellt worden war, mit dem einzigen Unterschied, daß bei Extrakt B₂ 15 g Ammoniumsulfat auf 100 ccm Filtrat hinzugesetzt worden waren, ehe die erste Abfiltrierung stattfand. Die gemeinsame Lösung war 830 ccm. Nach Filtrierung, durch welche die Trippelphosphatkrystalle abgedondert wurden, wurden 5 g Ammoniumsulfat auf 100 ccm Lösung hinzugefügt und die Lösung 24 Stunden an einem finstern Platz stehen gelassen. Während dieser Zeit hatte indessen keine Krystallisation stattgefunden, weshalb weitere 2,5 g Salz auf 100 ccm ursprüngliche Lösung hinzugesetzt wurde. Nachdem die Lösung noch 24 Stunden gestanden hatte, hatte sich ein reichlicher Niederschlag, bestehend aus wohlausgebildeten Phykoerythrinkrystallen, gebildet. Die Lösung wurde indessen noch zweimal mit einem Zwischenraum von je 24 Stunden mit 2,5 g auf 100 ccm Lösung versetzt, so daß der Salzgehalt schließlich 12,5 g auf 100 ccm ursprüngliche Lösung betrug.

Der entstandene Niederschlag, bestehend aus Phykoerythrinkrystallen und einzelnen Phykocyankrystallen, wurde wieder mit Leichtigkeit in Wasser aufgelöst, die so erhaltene Farblösung filtriert und dann auf die oben geschilderte Weise successiv mit Ammoniumsulfat versetzt, bis sie einen Salzgehalt von 10 g auf 100 ccm ursprüngliche Lösung erreichte. Bei diesem Salzgehalt krystallisierten die größten Mengen Phykoerythrin, während die kleinen Mengen Phykocyan, die sich noch immer in der Lösung befanden, in aufgelöstem Zustand verharren. Der Phykoerythrin-niederschlag wurde wieder in Wasser aufgelöst und die Umkrystallisierung durch successiven Zusatz von Ammoniumsulfat bis zu 12 g Salz auf 100 ccm ursprüngliche Lösung noch ein paarmal fortgesetzt.

Durch hinreichend lange fortgesetzte Umkrystallisation mittels Zusatzes von Ammoniumsulfat muß sich das Phyko-

erythrin frei von allen Verunreinigungen herstellen lassen, oder wenigstens so rein, daß die kleinen Reste von Verunreinigungen, die sich durch Umkrystallisation nicht entfernen lassen, jedenfalls bei der Untersuchung von dessen Eigenschaften oder bei der chemischen Analyse keine Rolle spielen.

Die schleimigen Kohlenhydrate sind bereits nach der zweiten Umkrystallisierung so gut wie vollständig entfernt, und im Filtrat der dritten Umkrystallisierung fällt die Probe auf Kohlenhydrate mit α -Naphthol und konzentrierter Schwefelsäure (Molischs Probe) negativ aus. Bei der vierten und den folgenden Umkrystallisierungen hat sich gezeigt, daß sich das Phykoerythrin bei Zusatz von destilliertem Wasser schwerer auflöst als früher, besonders wenn es einige Tage gedauert hat, ehe die bei der Krystallisation entstandenen Krystalle wieder in destilliertes Wasser gebracht wurden, und ließ man eine oder ein paar Wochen verstreichen, ehe der Phykoerythrin-niederschlag wieder ins Wasser gelegt wurde, so zeigte er sich äußerst schwer löslich, für den praktischen Gebrauch unlöslich. Ein solcher Phykoerythrin-niederschlag geht aber leicht in aufgelösten Zustand über, wenn eine geringe Menge Natriumcarbonatlösung hinzugesetzt wird, und ein Gehalt von 0,01% Natriumcarbonat ist ganz hinreichend, um die Krystalle rasch aufzulösen. Diese Lösung kann dann auf die gewöhnliche Art zur Krystallisation gebracht werden. Auch Phykoerythrinkrystalle, die über ein Jahr in Ammoniumsulfatlösungen gelegen hatten, lösten sich bei Zusetzung von ganz wenig Natriumcarbonat leicht wieder auf¹⁾ und konnten dann durch Hinzufügung von Ammoniumsulfat wieder zur Krystallisation gebracht werden.

Nachdem nun beschrieben worden ist, wie die aus der Lösung B₁ bei Zusatz von 12,5 g Ammoniumsulfat auf 100 ccm Lösung krystallisierte Phykoerythrinmenge durch successive Umkrystallisation in reiner Form erhalten werden kann, mag

¹⁾ Es zeigte sich indessen, daß die Fluoreszenzfarbe dieser Phykoerythrinlösung etwas bräunlich-orangefarbig war. Soll das Phykoerythrin für längere Zeit aufbewahrt werden, so muß es in Lösung sein (vgl. S. 195).

der Bericht über die fernere Behandlung des Extraktes B₁ wieder aufgenommen werden.

Nachdem der erste Niederschlag aus der Lösung B₁ abfiltriert worden war, wurden weitere 2,5 g Salz auf 100 ccm Lösung hinzugesetzt. Unmittelbar nach Zusatz des Salzes konnte keine Veränderung wahrgenommen werden, nach einem Tage aber war ein bedeutender Niederschlag gebildet worden, der aus wohlausgebildeten Krystallen von Phykoerythrin und Phykokocyan bestand. Es wurde weiter 2,5 g Salz auf 100 ccm Lösung hinzugesetzt, so daß diese nun 17,5 g Salz auf 100 ccm ursprünglichen Extrakt enthielt.

Hierauf wurde der Extrakt wiederum 24 Stunden stehen gelassen, nach welcher Zeit sich ein reichlicher Niederschlag gebildet hatte und zu Boden gesunken war, aber eine Menge Krystalle hielten sich noch immer schwebend in der Flüssigkeit. Es zeigte sich, daß es hauptsächlich die Phykokocyankrystalle waren, die sich schwebend erhielten, während der größte Teil der Phykoerythrinkrystalle zu Boden gesunken war. Die Mutterlauge wurde abgegossen, worauf diese, sowie der am Boden liegende Niederschlag jedes für sich behandelt wurde.

Die abgegossene Mutterlauge wurde filtriert und die dabei abfiltrierten Krystalle in Wasser aufgelöst. Die so erhaltene Wasserlösung, die hauptsächlich Phykokocyan und nur eine kleinere Menge Phykoerythrin enthielt, wurde filtriert und die Lösung, 900 ccm, mit 90 g Ammoniumsulfat versetzt. Eine unmittelbare Veränderung trat nicht ein, aber nach 24 Stunden hatte sich ein reichlicher Niederschlag gebildet, der ausschließlich aus wohlausgebildeten Phykokocyankrystallen bestand; das Phykoerythrin und etwas Phykokocyan waren in der Lösung geblieben. Der Phykokocyan-niederschlag wurde abfiltriert, in Wasser aufgelöst und durch einige weitere Umkrystallisierungen mittels eines Zusatzes von 10 g Ammoniumsulfat auf 100 ccm Lösung gereinigt.

Auf die oben beschriebene Art ist es also möglich, auch das Phykokocyan in vollständig analysenreinem Zustand zu erhalten.

Wie bei der Reinigung des Phykoerythrins hat es sich

auch bei der des Phykocyan gezeigt, daß die Niederschläge in gewissen Fällen bei Zusatz von Wasser schwerlöslich waren. Auch hier ist es in diesem Fall vorteilhaft, eine ganz kleine Menge von Natriumcarbonatlösung hinzuzusetzen. Die Hinzusetzung muß, wenn es sich um Phykocyan handelt, mit größerer Vorsicht geschehen als bei Phykoerythrin.

In dem oben erwähnten am Boden liegenden Niederschlag waren beide Farbstoffe gemischt, doch überwog das Phykoerythrin. Der Niederschlag wurde in Wasser aufgelöst und mit 10 g Ammoniumsulfat auf 100 ccm Lösung versetzt. In der Fällung, die nach 24 Stunden entstanden war, gab es hauptsächlich Phykoerythrin, während die Hauptmasse des Phykocyan nebst einem Teile des Phykoerythrins in Lösung verharrte. Das gefällte Phykoerythrin kann von Phykocyan durch Umkrystallisation auf die schon geschilderte Weise befreit werden. Das Filtrat wird mit Ammoniumsulfat versetzt, so daß ein Salzgehalt von 15 g auf 100 ccm ursprüngliche Lösung entsteht. Man erhält eine neue Krystallisation und der sich ergebende Niederschlag enthält nun beide Farbstoffe in ungefähr gleicher Menge.

Um in einem solchen Fall, wo der Niederschlag ungefähr gleich große Mengen von beiden Farbstoffen enthält, diese trennen zu können, habe ich mich der ungleichen Auflösungs geschwindigkeit derselben beim Zusatz von Wasser bedient. Das Phykoerythrin löst sich nämlich schneller auf als das Phykocyan und ist schon nach einigen Minuten beinahe vollständig gelöst, während die Phykocyankrystalle ganz unbedeutend in Lösung übergegangen sind. Durch Filtrieren kann man hierauf das Phykocyan von Phykoerythrin trennen. In einigen Fällen habe ich sogar die auf dem Filter lieengebliebenen Phykocyankrystalle durch schnelle Überspülung mit destilliertem Wasser waschen können. Legt man indessen den Filter eine kurze Zeit in Wasser, so lösen sich die Krystalle auf. Man erhält auf diese Weise zwei Lösungen, eine, in der das Phykocyan, und eine, in der das Phykoerythrin überwiegt. Beide Lösungen können dann durch Zusatz einer geeigneten Menge von Ammoniumsulfat umkrystallisiert und weiter gereinigt werden.

Bei dieser Methode ist es indes sehr schwierig, den richtigen Zeitpunkt, in dem das gelöste Phykoerythrin filtriert werden soll, zu erhaschen, so daß das Phykocyan auf dem Filter bleibt, und es geschieht recht oft, daß die ganze Prozedur von Anfang an wiederholt werden muß.

Enthält ein Filtrat nach der Auskrystallisierung der Hauptmasse des Phykoerythrins oder Phykocyans verhältnismäßig geringe Mengen der Farbstoffe, während man das, was übrig ist, nicht verlieren will, so hat es sich als das Vorteilhafteste erwiesen, durch einen hinreichenden Zusatz von Ammoniumsulfat (25 g auf 100 ccm Lösung) alles zusammen amorph zu fällen, hierauf den Niederschlag in einer kleineren Menge Wasser aufzulösen, Salz zur Krystallisation hinzuzusetzen und zu versuchen, die nun entstandene Fällung nach der eben geschilderten Methode zu behandeln.

Nachdem so der Niederschlag von Farbstoffen, der sich im Extrakt B₁ bei einem Zusatz von 17,5 g Salz auf 100 ccm Lösung ergab, fortgeschafft worden war, wurden jeden Tag weitere 2,5 g Salz auf 100 ccm Lösung hinzugesetzt, bis der Salzgehalt 25 g Salz auf 100 ccm ursprüngliche Lösung erreicht hatte. Hierdurch entstand ein neuer Niederschlag, welcher aber zum größten Teil aus amorpher rotvioletter Substanz bestand und nur einzelne wohlausgebildete Phykoerythrinkrystalle enthielt.

Nachdem der entstandene Niederschlag abfiltriert worden war, enthielt das Filtrat nur eine unbedeutende Menge Farbstoff und wurde nicht weiter behandelt. Der Niederschlag wurde in Wasser aufgelöst und durch Umkrystallisation mittels Ammoniumsulfat gereinigt. Die Lösung enthielt etwas Phykoerythrin sowie kleine Mengen Phykocyan, ferner als Verunreinigung eine verhältnismäßig reiche Menge schleimiger Kohlenhydrate.

Betreffs der Behandlung der übrigen Extrakte soll nur erwähnt werden, daß ein etwas größerer Zusatz von Ammoniumsulfat sich zur Erhaltung des ersten Niederschlages als nötig erwies. Dies kam daher, daß diese Extrakte weniger Farbstoff enthielten. Der Salzzusatz variierte zwischen 12,5 bis 15 g auf 100 ccm Lösung, ehe ein Niederschlag entstand.

Fig. 1.



Fig. 2.

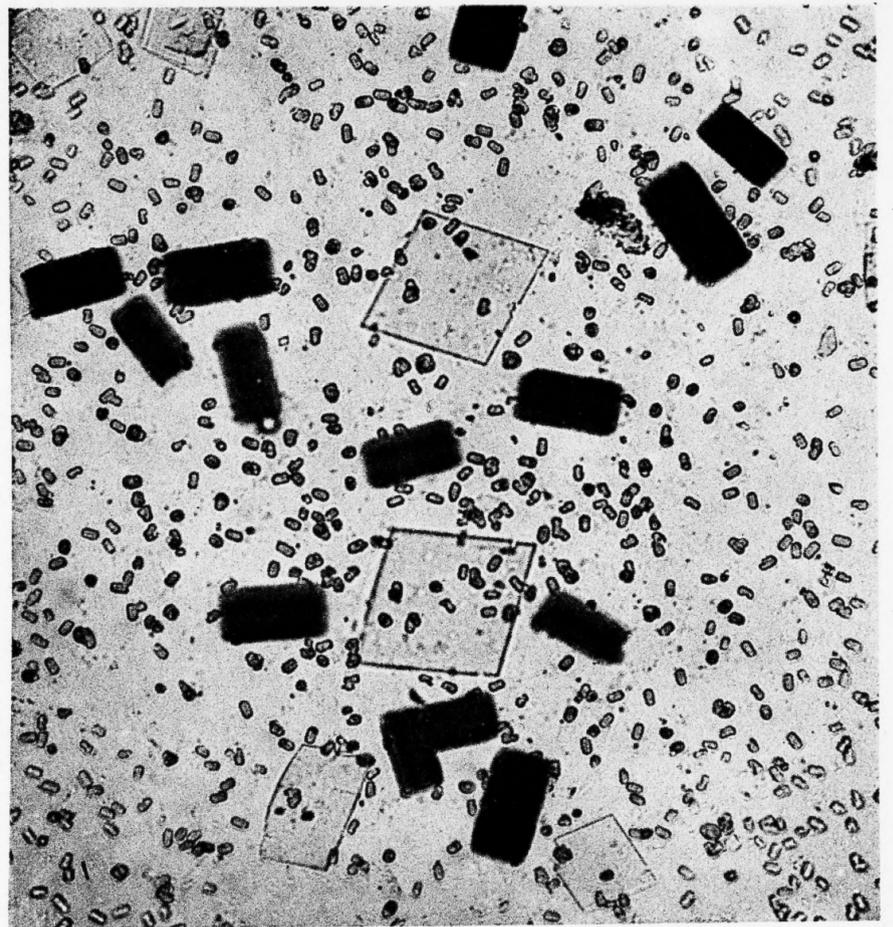


Fig. 3.

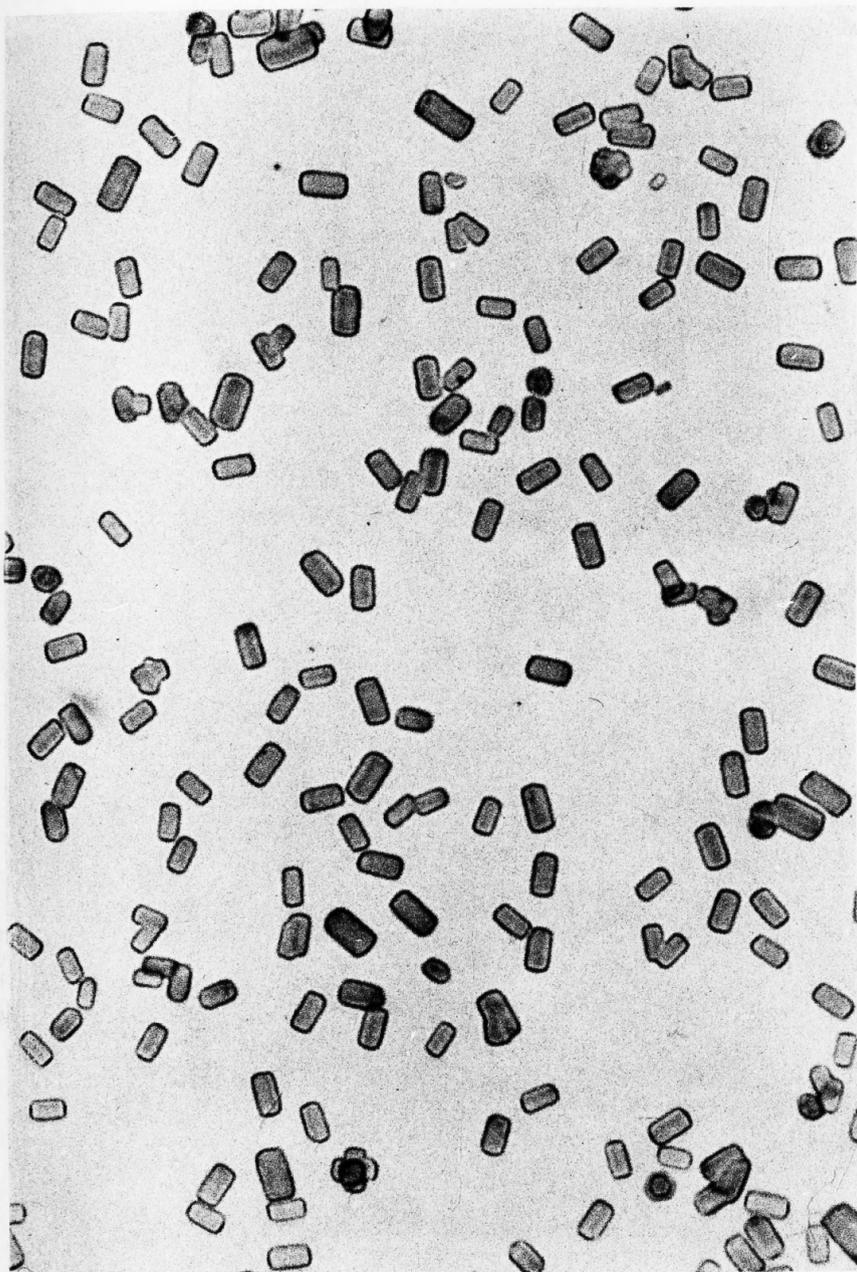


Fig. 4.

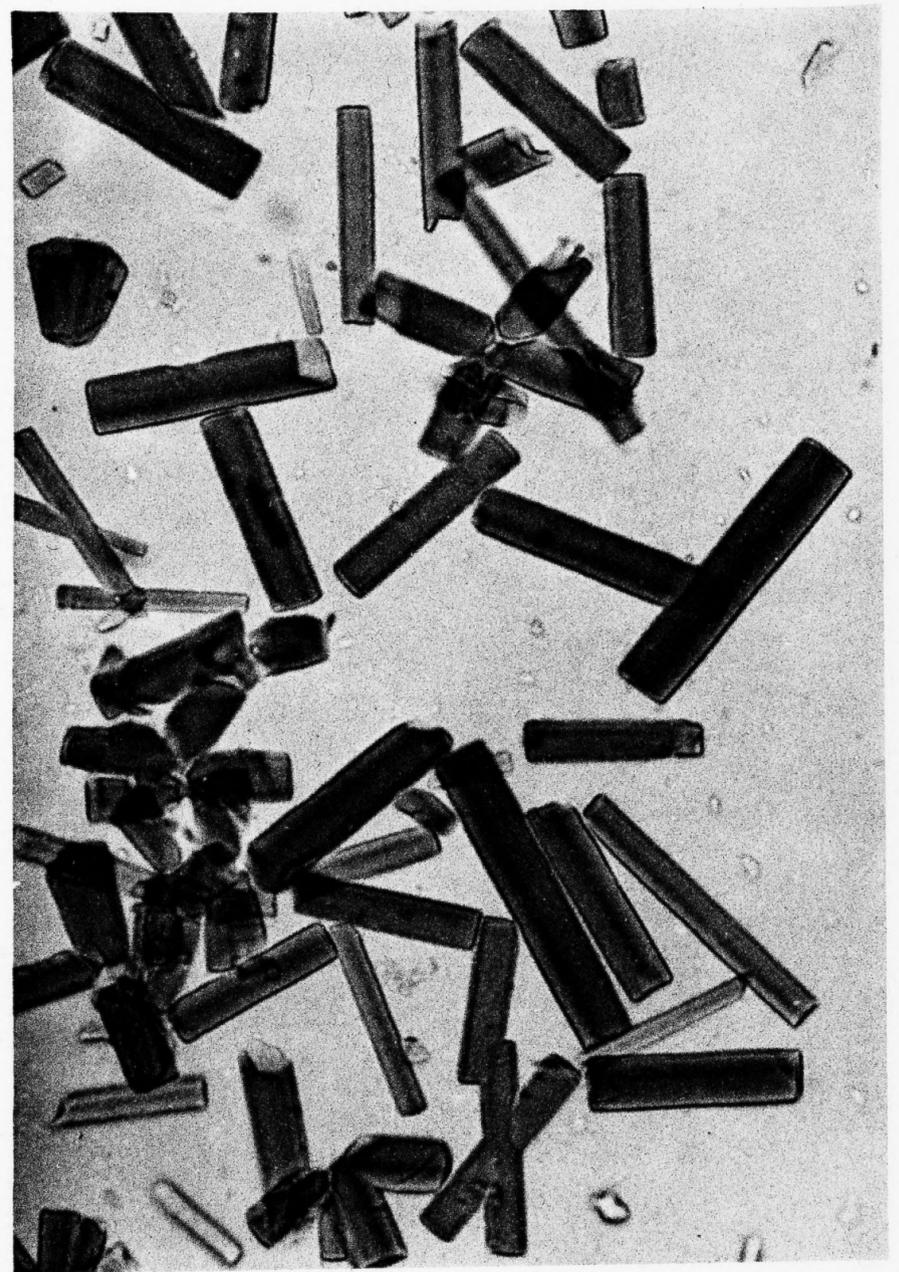


Fig. 1. Phykoerythrin- und Phykocyanokristalle aus einem ursprünglichen Extrakt bei Zusatz von 13 g Ammoniumsulfat auf 100 ccm Lösung krystallisiert. (Vergrößert 250 mal.)

Fig. 2. Phykoerythrin- und Phykocyanokristalle aus einer Lösung bei Zusatz von zuerst 10 g, dann weiter 2,5 g Ammoniumsulfat auf 100 ccm krystallisiert; die großen Phykoerythrinkristalle wahr-

scheinlich bei dem ersten Zusatz, die kleinen Phykoerythrin- und die Phykocyanokristalle bei dem zweiten Zusatz von Ammoniumsulfat. (Vergr. 250 mal.)

Fig. 3. Kurze Phykoerythrinkristalle. (Vergrößert 500 mal.)

Fig. 4. Langgestreckte Phykoerythrinkristalle. (Vergrößert 500 mal.)

In den Extrakten A₁ und B₁ ergab die erste Fällung bloß amorphe Substanz.

Finden sich in einer Lösung beide Farbstoffe, so wird das Phykocyan bei einem geringeren Salzgehalt als das Phykoerythrin vollständig gefällt, das Phykocyan in der Regel schon bei 18 g Ammoniumsulfat, das Phykoerythrin erst bei ungefähr 25 g auf 100 cem ursprüngliche Lösung. Enthält die Lösung überwiegend Phykoerythrin, so beginnt dieses bei successivem Zusatz von Ammoniumsulfat vor dem Phykocyan zu fallen, und erst bei weiterem Salzzusatz beginnt auch das letztere zu fallen: aber auch nachdem dieses vollständig ausgefallen ist, enthält die Lösung noch etwas Phykoerythrin (vgl. den Bericht über die Behandlung des Extraktes B₁).

Statt Ammoniumsulfat kann auch Magnesiumsulfat zur Reinigung der beiden Farbstoffe verwendet werden, doch sind dann größere Salzmengen nötig. Zu 500 cem des Extraktes B₁ wurden successiv täglich 5 g Salz auf 100 cem Lösung hinzugefügt, aber die Krystallisation begann erst bei einem Zusatz von 30 g Salz auf 100 cem Lösung, und dabei war es nur das Phykoerythrin, das krystallisierte. Das Phykocyan begann erst bei einem Zusatz von 35 g auf 100 cem Lösung zu krystallisieren. Wurde Ammoniumsulfat angewandt, so begann die Krystallisation beider Farbstoffe schon bei einem Zusatz von 10 g auf 100 cem Lösung. Bei vollständiger Sättigung mit Magnesiumsulfat werden beide Farbstoffe vollständig gefällt.

Kochsalz fällt keinen der beiden Stoffe vollständig. In einigen wenigen Fällen habe ich jedoch partielle Fällung des Phykocyan bei vollkommener Sättigung mit Kochsalz beobachtet. Der Niederschlag war amorph. Das Phykoerythrin wurde überhaupt nicht gefällt.

Auch ein Versuch zur quantitativen Bestimmung der Menge von Farbstoff, Phykoerythrin + Phykocyan, in den verschiedenen Extrakten wurde angestellt. Hierbei mußten natürlich die Farbenlösungen so weit als möglich, bei möglichst kleinem Verlust an Farbstoff, von Verunreinigungen befreit werden. Hierbei wurde die Reinigung so ausgeführt, daß die abgemessene Farbenlösung nach und nach mit Ammoniumsulfat versetzt

wurde, bis der Salzgehalt auf 30 g auf 100 ccm ursprüngliche Lösung gestiegen war. Dabei krystallisierten die Farbstoffe langsam aus (ausgenommen in den Extrakt A₁ und B₁) und nur die letzten Reste wurden amorph gefällt. Hierauf wurde der Niederschlag abfiltriert und wieder in Wasser aufgelöst. Die so erhaltene Lösung wurde filtriert und der Filter sorgfältig mit Wasser gewaschen, um soweit als möglich Verluste an Farbstoff zu vermeiden. Die Lösung wurde hierauf wieder allmählich mit Ammoniumsulfat versetzt, bis von neuem aller Farbstoff herausgefällt war. Hierfür erwies sich ein Zusatz von 25 g auf 100 ccm als hinreichend. Der Niederschlag wurde wieder in Wasser gelöst, die Lösung wieder filtriert, wobei dieselben Vorsichtsmaßregeln beobachtet wurden, um Substanzverlust zu verhindern, und nach und nach mit Ammoniumsulfat versetzt, bis die Farbstoffe vollständig gefällt waren. Die Umfällung wurde fortgesetzt, bis Molischs Probe auf Kohlenhydrate im Filtrat negativ ausfiel. In den Extrakt A₁ und B₁ haben sich 5 Umfällungen als hinlänglich erwiesen, in den Extrakten A₂ und B₂ mußten 7—8 Umfällungen angestellt werden.

Für die weitere Behandlung der auf diese Weise gereinigten Farbenlösungen zum Zwecke der qualitativen Bestimmung der Farbstoffmengen mag auf S. 232 hingewiesen werden.

III. Phykoerythrin.

a) Farbe, Fluorescenz, Krystallisation.

Eine reine Phykoerythrinlösung ist in durchgehendem Licht schön karminrot, bei geringerer Konzentration mit schwach violetter Anstrich. Wird die Konzentration erhöht, so verschwindet der violette Farbenton und die rote Farbe spielt statt dessen ins Orange hinüber, was darauf beruht, daß die Absorption bei steigender Konzentration im Orange weniger schnell zunimmt, als im Violett (vgl. die spektroskopischen Untersuchungen S. 209).

In auffallendem Licht zeigt die Phykoerythrinlösung eine besonders prachtvolle orangegelbe Fluorescenz. In direktem Sonnenlicht gegen schwarzen Hintergrund zeigt sich eine schwache

Fluorescenz, auch wenn in durchfallendem Licht keine Farbe wahrzunehmen ist. Eine schwache Färbung kann noch bei so starker Verdünnung, wie eins zu einer Million, wahrgenommen werden.

Es ist bereits erwähnt worden, daß das Phykoerythrin aus einer Lösung bei Zusatz einer geeigneten Menge Ammoniumsulfat krystallisiert. Enthält die Lösung 1—2% Farbstoff, so beginnt die Krystallisation schon bei einem Zusatz von 5 g Ammoniumsulfat auf 100 ccm Lösung, und bei einem successiven Salzzusatz bis zu 12 g auf 100 ccm Lösung hat bereits die Hauptmasse des Phykoerythrins auskrystallisiert (über Krystallisation bei Dialyse s. S. 190).

Die Phykoerythrinkrystalle sind schon von Molisch (1894, S. 179) beobachtet und beschrieben worden. Die Krystalle (Taf. I) haben die Form hexagonaler Prismen mit in der Regel quer abgeschnittenen Enden, aber auch Krystalle mit abgerundeten Ecken (Pyramidenflächen) sind beobachtet worden. Diese letzteren können in Lösungen entstehen, aus denen bereits die Hauptmasse des Phykoerythrins bei einem kleineren Zusatz von Salz auskrystallisiert hat, denen man aber dann mehr Salz zusetzt, um den Rest des Farbstoffes herauszufällen.

Das Verhältnis der Länge der Krystalle zu deren Breite variiert sehr: die beobachteten Extreme waren Längen, die 1¹/₂, resp. 12mal so groß waren als die Breite. Es können indes 2 verschiedene Typen unterschieden werden, bei dem einen ist die Länge etwa 2—3mal größer als die Breite, bei dem andern etwa 5—6mal. Der erstgenannte der beiden Typen ist der häufigere. Bei jeder einzelnen Krystallisation tritt in der Regel nur einer von diesen beiden Typen auf (vgl. die Angaben über Krystallisation bei Dialyse, S. 190).

Die dem ersten Typus angehörenden Krystalle (Taf. I, Fig. 1—3) sind in der Regel 3—4 μ breit und 6—10 μ lang: die größten, die ich beobachtet habe, waren 18 \times 36 μ .

Die Krystalle des zweiten Typus (Taf. I, Fig. 4) sind in der Regel 5—7 μ breit und 25—40 μ lang: die größte gemessene Ausdehnung war 10 \times 60 μ .

Wird zu einer Phykoerythrinlösung soviel Salz hinzu-

gesetzt, daß die Krystallisation bereits nach einigen wenigen Minuten eintritt, so bilden sich äußerst kleine Krystalle, die die Größe von $1 \times 3 \mu$ nicht leicht übersteigen.

b) Eiweißreaktionen.

Eine Reihe von eigentümlichen Tatsachen betreffs der Löslichkeit des Phykoerythrins führten Hansen (1893, S. 296) auf den Gedanken, «daß der Farbstoff in Form einer Einweißverbindung in den Chromatophoren vorhanden ist und als solche ausgezogen wird». Etwa ein Jahr später legte Molisch (1894, S. 181) eine Reihe von Beweisen dafür vor, daß das Phykoerythrin wirklich von eiweißartiger Natur sei, aber Euler (1907, S. 227) betrachtet Molischs Untersuchung nicht als ganz beweisend, da es nicht als ausgeschlossen betrachtet werden könne, daß die Eiweißigenschaften nicht dem Farbstoff selbst zukämen, sondern irgend einem löslichen Eiweißstoff, der bei der Fällung jenen mit sich zieht.

Der Forscher, der das in Frage stehende Gebiet zuletzt bearbeitet hat, ist Hanson (1909, S. 344), und dieser kam dabei zu dem Resultat, das Phykoerythrin sei «related to protein — but not a true protein, as its nitrogen content is too low and it does not give the Biuret reaction.» Diese Argumente Hansons sind, wie aus meiner Untersuchung mit Sicherheit hervorgeht, beide unrichtig.

Nachdem es mir gelungen war, reines Phykoerythrin herzustellen, war es mir möglich, die Richtigkeit von Molischs Angabe, daß das Phykoerythrin von eiweißartiger Natur sei, voll und ganz zu bekräftigen. Es gehört innerhalb der Proteinstoffe der Proteidgruppe an (s. die Auseinandersetzung S. 203).

Als Beweis für den Proteincharakter des Phykoerythrins mag hier nur angeführt werden, daß es beim Kochen koaguliert, daß es Hellers Probe gibt, daß es durch hinreichende Mengen von $(\text{H}_4\text{N})_2\text{SO}_4$, MgSO_4 oder Alkohol gefällt wird, ebenso durch Gerbsäure, daß die Millonsche Reaktion, sowie die Xanthoproteinsäurereaktion und die Biuretreaktion positiv ausfällt. Die letztere Reaktion tritt mit derselben Farbe und derselben relativen Stärke auf, wie bei gewöhnlichen Eiweiß-

stoffen. Um bei den Farbenreaktionen, wenigstens bei der Millonschen Reaktion und der Biuretreaktion sichere Resultate zu geben, muß das Phykoerythrin erst entfärbt werden. Dies kann entweder geschehen, indem man die Lösung direktem Sonnenlicht aussetzt, oder indem man sie mit Kaliumpermanganat behandelt, dessen Überschuß dann mit SO_2 -Lösung entfärbt wird.

c) Löslichkeits- und Fällbarkeitsverhältnisse.

Die in der Literatur übliche Angabe, das Phykoerythrin sei ein im Wasser löslicher Farbstoff, muß zur weiteren Diskussion aufgenommen werden, sobald mit Sicherheit bewiesen wurde, daß das Phykoerythrin ein Eiweißstoff ist. Die Literaturangaben über die Löslichkeit des Farbstoffes müssen nämlich in diesem Fall mit der Einschränkung verstanden werden, daß es in Wasser bei schwach alkalischer Reaktion oder bei Gegenwart eines Neutralsalzes löslich ist und zwar deshalb, weil bei der Extraktion des Farbstoffes das Vorhandensein einer gewissen Salzmenge nicht vermieden werden kann und das Entstehen einer schwachen alkalischen Reaktion durch Fäulnis oder vielleicht durch chemische Umlagerungen während der Extraktionszeit nicht verhindert werden kann. — Man beachte die schwach alkalische Reaktion der Extrakte auch bei Anwendung eines Antiseptikums (vgl. S. 178).

Um die Frage nach der Löslichkeit des Phykoerythrins in ganz neutralem, salzfreiem Wasser zu beantworten, habe ich einen Farbstoffniederschlag verwendet, der durch wiederholte Umkrystallisation von Verunreinigungen befreit worden war. Der Niederschlag wurde in Wasser gelöst, das 0,02% Natriumcarbonat enthielt. Die Menge Ammoniumsulfat, die in den Niederschlag mit übergegangen war, bedingte einen Salzgehalt der Lösung, der auf etwa 1% geschätzt werden kann. Die Menge der Lösung war 50 ccm, ihr Phykoerythringehalt etwa 1,2%.

Diese Phykoerythrinlösung wurde der Dialyse ausgesetzt. Als die Dialyse so weit getrieben worden war, daß die Baryumchloridprobe auf Sulfat nur eine schwache Reaktion ergab,

zeigte sich die Lösung etwas trüb und auf den Wänden der Dialysehülse hatte sich eine dünne Niederschlagsschicht abgesetzt. Die Dialyse wurde noch einige Tage fortgesetzt.¹⁾

Der bei der Dialyse entstandene Niederschlag wurde mikroskopisch untersucht, und es zeigte sich, daß er aus Krystallen von zwei verschiedenen Größen bestand. Die größeren waren 10—30 μ lang und 5—6 μ breit, die kleineren 2—5 μ lang und 0,5—1 μ breit. Zwischen Krystallen von diesen beiden Größen fanden sich, freilich verhältnismäßig sparsam, Übergangsformen. Die Krystalle bestanden wie sonst aus 6-kantigen Prismen mit querabgeschnittenen Enden (vgl. S. 187).

Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert; die Phyoerythrinmenge im Filtrat war so gering, daß die Hellersche Probe nur einen schwachen Ausschlag ergab.

Der Niederschlag, der sich bei oben geschildertem Dialysenversuch an den Wänden der Dialysehülse angesetzt hatte, wurde durch Zusatz von 10 ccm 0,1%iger Natriumcarbonatlösung aufgelöst. Der Niederschlag löste sich rasch auf. Die Lösung, mit etwas Toluol versetzt, wurde wieder der Dialyse unterzogen und nach Verlauf einer Woche, bei täglichem Wechsel des Dialysenwassers, begann die Lösung trüb auszusehen. Die Dialyse wurde noch einige Tage fortgesetzt, während welcher sich ein reicher Niederschlag bildete. Die Fällung war indessen nicht vollständig. Der entstandene Niederschlag bestand aus Krystallen in der Form 6-kantiger Prismen mit quer abgebrochenen Enden. Die Größe variierte zwischen 50 μ langen und 10 μ breiten bis zu 5 μ langen und 1 μ breiten Krystallen, mit stetigen Übergängen zwischen diesen beiden Extremen. Die bei diesem Dialysenversuch gebildeten Krystalle waren also im Verhältnis zur Breite länger als die beim ersterwähnten entstandenen.

Die nach dem ersten Dialysenversuch abfiltrierten Krystalle wurden mit Wasser behandelt, das 1% Ammoniumsulfat enthielt. Noch nach 24 Stunden hatte sich nur ein kleiner

¹⁾ Täglicher Wasserwechsel: die Farbenlösung war mit etwas Toluol versetzt worden.

Teil des Phykoerythrins aufgelöst. Die Probe wurde nun in 3 Portionen geteilt, und durch Zusatz von Wasser erhielt man 3 neue Proben mit 0,25%, resp. 0,5% und 1% Ammoniumsulfat. Die Phykoerythrinkristalle lösten sich nach und nach in allen Proben. (Diese Lösungen wurden zu den S. 197 erwähnten Koagulationsversuchen verwendet.)

Aus obigen Dialysenversuchen geht also hervor, daß das Phykoerythrin in reinem Wasser unlöslich ist, aber löslich in Wasser bei Anwesenheit geringer Mengen Alkali oder irgend eines Neutralsalzes. Es ist weit leichter löslich bei Zusatz von Alkalien, als wenn nur Neutralsalze vorhanden sind.

Das Phykoerythrin ist in Alkohol, Äther, Chloroform, Amylalkohol, Benzol und Schwefelkohlenstoff unlöslich.

Als Material für das Studium der Einwirkung von Säuren auf Phykoerythrinlösungen habe ich teils Lösungen, die nur etwas Ammoniumsulfat enthielten, verwendet, teils Lösungen, die außer Ammoniumsulfat auch Spuren von Natriumcarbonat enthielten, höchstens 0,01%. Werden zu einigen Kubikzentimetern einer solchen Phykoerythrinlösung einige Tropfen 1%-iger Essigsäure hinzugesetzt, ergibt sich ein roter, feinflockiger Niederschlag, welcher sich bei Zusatz von Natriumcarbonat wieder auflöst. Bei der Auflösung des Niederschlages kommen Farbe und Fluorescenz unverändert zurück. Bei Säurezusatz verschwindet natürlich die Fluorescenz in dem Maße, wie der Farbstoff gefällt wird. Bei Zusatz von mehr Essigsäure, als zum Erhalten eines Niederschlages nötig ist, löst sich dieser wieder auf. Wendet man beim Versuch eine schwächere Farblösung an, kann man es dahin bringen, daß sich der Niederschlag bei Zusatz eines geringen Überschusses an Essigsäure vollständig auflöst. Benutzt man hingegen eine stärkere Lösung, so löst sich der Niederschlag nur teilweise auf.

Wird einer essigsauren Phykoerythrinlösung Natriumcarbonatlösung zugesetzt, so ergibt sich zunächst ein roter Niederschlag, der sich bei weiterem Zusatz von Natriumcarbonat wieder auflöst. Die Lösung hat dann dieselbe Farbe und Fluorescenz wie vor dem Zusatz von Essigsäure. Eine essig-

saure Phykoerythrinlösung hat eine rote Farbe, mit schwachem Stich ins Violette, und fluoresciert nicht.

Werden einer Phykoerythrinlösung einige Tropfen stärkerer Essigsäure zugesetzt, entsteht keine Fällung. Die Fluorescenz verschwindet indessen und die Lösung erhält einen leichten Stich ins Violette. Bei vorsichtiger Alkalisierung ergibt sich zunächst ein roter Niederschlag, hierauf eine klare Lösung mit gewöhnlicher Farbe und Fluorescenz. Statt Natriumcarbonat kann Ammoniak oder Natronlauge verwendet werden, aber nur äußerst vorsichtig, besonders bei Verwendung von Natronlauge. Bei schnellerer Alkalisierung einer essigsäuren Phykoerythrinlösung ergibt sich kein Fällungsstadium (vgl. Reinke, 1886, S. 230).

Wird einer verhältnismäßig starken Phykoerythrinlösung allmählich Essigsäure im Überschuß zugesetzt, so löst sich, wie bereits erwähnt, der entstandene Niederschlag nur teilweise auf. Wird hingegen einer ebenso starken Farbenlösung dieselbe Menge von Essigsäure zugesetzt, aber auf einmal, so bleibt alles Phykoerythrin in Lösung. Essigsäure in größerem Überschuß fällt eine Phykoerythrinlösung erst nach einiger Zeit, und die Fällung wird meistens nicht vollständig.

Um die Einwirkung der Salzsäure auf eine Phykoerythrinlösung zu untersuchen, muß man äußerst vorsichtig und mit stark verdünnter Säure arbeiten; eine Salzsäure von 0,05% Säuregehalt ist hinreichend. Werden einigen Kubikzentimetern Farbenlösung einige wenige Tropfen einer so stark verdünnten Salzsäure zugesetzt, so ergibt sich wie beim Zusatz von schwacher Essigsäure ein roter, ziemlich feinflockiger Niederschlag, der sich bei Zusatz von Natriumcarbonat wieder auflöst, wobei Farbe und Fluorescenz unverändert wiederkehren. Ein geringer Überschuß von Salzsäure löst den entstandenen Niederschlag wieder auf und man erhält, wie bei Zusatz von überschüssiger Essigsäure, eine klare Lösung ohne Fluorescenz. Die Farbe der Lösung ist auch jetzt rot, hat aber einen stärkeren Stich ins Violette. Wird einer solchen salzsäuresäuren Phykoerythrinlösung Natriumcarbonat zugesetzt, so ergibt sich zunächst ein Niederschlag, der sich bei weiterem Zusatz von Natriumcar-

bonat wieder auflöst. Die Fluorescenz ist indes verschwunden. Die Farbe der erhaltenen Lösung ist rot mit einem schwach bräunlich-braunviolettem Ton, und außerdem etwas schwächer als die der ursprünglichen Lösung. Wird wiederum stark verdünnte Salzsäure zugesetzt, so bildet sich von neuem ein Niederschlag, der bei Zusatz von einiger überschüssiger Salzsäure in eine rotviolette Lösung übergeht. Auch die Farbe des Niederschlages ist rotviolett.

Wird Salzsäure direkt im Überschuß zugesetzt, geht die Fluorescenz unmittelbar verloren und der Umschlag in der Farbe der Lösung findet statt. Eine klare Lösung resultiert, wenn der Überschuß nicht allzu groß und die Phykoerythrinlösung nicht allzu konzentriert war. Bei weiterem Zusatz von Salzsäure entsteht ein rotvioletter Niederschlag, wenn die Farblösung nicht allzu stark verdünnt war. Die Fällung wird vollständig und der Niederschlag löst sich bei Alkalisierung nicht wieder auf.

Die Ursache, daß die Fluorescenz bei Zusatz von Salzsäure im Überschuß definitiv verloren geht, ist nach meiner Meinung, daß die Phykoerythrinmoleküle beim Zusatz von Säure in eine Eiweiß- und eine Farbenkomponente gespalten werden (s. hierüber ausführlicher S. 203). Die Farbenveränderung bei Alkalisierung nach Zusatz von überschüssiger Salzsäure ist der freigewordenen Farbenkomponente zuzuschreiben und hat mit dem Phykoerythrin nichts zu schaffen. Wie bereits erwähnt, entstand bei Alkalisierung nach Zusatz von überschüssiger Salzsäure zunächst ein Niederschlag, der sich bei weiterem Alkalizusatz wieder auflöste. Wird der so erhaltenen Lösung Salzsäure hinzugesetzt, so entsteht ein neuer Niederschlag, der sich bei Überschuß an Salzsäure auflöst. Diese Fällungsverhältnisse gehören der Eiweißkomponente des Phykoerythrins an, nicht diesem selbst. Bei der Fällung wird indessen die Farbenkomponente ganz mitgenommen.

Der Fluorescenzverlust und der Farbenwechsel einer Phykoerythrinlösung bei Zusatz von Mineralsäure wird bereits an mehreren Stellen der Fachliteratur erwähnt, z. B. bei Rosanoff (1867, S. 207), Schütt (1888, S. 314), Molisch (1894,

S. 185). Wenn jedoch z. B. Molisch schreibt: «Durch verdünnte Mineralsäuren und zwar auch durch Spuren derselben wird die Fluorescenz augenblicklich vernichtet; die Lösung nimmt dabei eine rotviolette Farbe an», so beruht dies darauf, daß die geringe Menge Säure, die Molisch verwendete, doch noch zu groß war, als daß die Einwirkung der Säure beim ersten Fällungsstadium hätte stehen bleiben können.

Läßt man eine essigsäure Phykoerythrinlösung etwa einen Tag stehen, so bekommt sie einen starken Stich ins Violette und bei Alkalisierung kommt die Fluorescenz nicht zurück. Essigsäure ruft also in den Phykoerythrinmolekülen dieselbe Veränderung hervor wie Salzsäure, nur ist die Einwirkung bedeutend langsamer.

Aus dem oben Angeführten geht also hervor, daß das Phykoerythrin aus einer Lösung bei Zusatz von einer sehr geringen Menge Säure gefällt wird. Der gebildete Niederschlag löst sich bei Zusatz einer ganz kleinen Menge Alkali oder eines geringen Überschusses von Säure wieder auf. Hierbei ist jedoch zu beobachten, daß überschüssige Mineralsäure die Moleküle des Farbstoffes spaltet.

Schließlich mag hier nur daran erinnert werden, daß eine Phykoerythrinlösung bei Zusatz einer hinreichenden Menge $(\text{H}_4\text{N})_2\text{SO}_4$ oder MgSO_4 gefällt wird (worüber bereits oben S. 185 ausführlich berichtet wurde). Auch eine sehr verdünnte Lösung wird bei Zusatz von 25—30 g $(\text{H}_4\text{N})_2\text{SO}_4$ auf 100 ccm Lösung oder bei Zusatz von MgSO_4 bis zu vollständiger Sättigung ganz gefällt. NaCl fällt hingegen nicht, nicht einmal bei voller Sättigung.

Als Resultat der Untersuchung über die Löslichkeit und Fällbarkeit des Phykoerythrins ergibt sich also folgendes:

1. daß es in reinem Wasser unlöslich ist;
2. daß es sich in Wasser bei Zusatz eines Neutralsalzes oder geringer Menge Alkali auflöst;
3. daß es bei Zusatz von $(\text{H}_4\text{N})_2\text{SO}_4$ bis zu halber Sättigung oder von MgSO_4 bis zu voller Sättigung vollständig gefällt wird;

4. daß es bei Zusatz einer äußerst kleinen Menge Säure gefällt, bei Überschuß aber wieder gelöst wird;
5. daß es bei Dialyse gefällt wird.

Das Phykoerythrin zeigt also im großen und ganzen dieselben Fällbarkeits- und Löslichkeitsverhältnisse wie die Globuline.

d) Einwirkung von Licht.

Nach Angaben von Rosanoff (1867, S. 208), Schütt (1888, S. 307) und Molisch (1894, S. 184) wird eine Phykoerythrinlösung durch Licht entfärbt, während sich eine im Finstern aufbewahrte Lösung, wenn Verwesung verhindert wird, Monate lang hält.

Diese Angaben habe ich vollkommen richtig befunden. Eine Phykoerythrinlösung, die über zwei Jahre im Finstern stand, hatte sich während dieser Zeit nicht merkbar verändert. Auch in diffusem Tageslicht kann die Lösung monatelang ohne merkliche Veränderung stehen. In direktem Sonnenlicht tritt früher oder später eine vollständige Entfärbung ein, aber schneller bei alkalischer als bei möglichst neutraler Reaktion. Eine verhältnismäßig konzentrierte Lösung mit etwa 0,04% Natriumcarbonat ließ ich über 3 Wochen in starkem Tageslicht, viele Tage in starkem Sonnenschein stehen, ohne daß die Farbe wesentlich abgenommen hätte, während hingegen die Fluorescenz verschwand. Schon nach einer Woche erhielt die Fluorescenzfarbe einen etwas bräunlichen Anstrich. Schwächere Lösungen werden schon in einigen Tagen entfärbt.

Wird Toluol oder Chloroform hinzugesetzt und die Lösung dann in Sonnenlicht stehen gelassen, so entsteht schon nach einigen Tagen ein Niederschlag, der nach einigen weiteren Tagen oder einer Woche gänzlich entfärbt ist. Im Finstern aufbewahrte Kontrollproben wiesen keine Andeutung eines Niederschlages oder einer sonstigen Veränderung auf.

Ein Tropfen Ammoniak (10%ig) auf den Kubikzentimeter Farbenlösung beschleunigt die Entfärbung, und werden zwei Tropfen Ammoniak per Kubikzentimeter Lösung hinzugesetzt, so ist auch eine relativ starke Lösung nach einigen wenigen

Tagen so gut wie ganz entfärbt. Natronlauge wirkt in derselben Richtung, aber stärker. Bei Zusatz von Ammoniak oder besser bei Zusatz von Natronlauge wird die Lösung nach dem Verschwinden der roten Farbe schwach blauviolett — blau — blaugrün, dann grün und schließlich schwach gelbgrün. Nach und nach verschwindet indessen auch die schwach gelbgrüne Farbe. (Vgl. das Kapitel über die Einwirkung von Säuren und Alkalien, S. 204.)

Bei Zusatz einer Säure zu einer Phykoerythrinlösung wird die Farbe rotviolett, oder ein rotvioletter Niederschlag entsteht. In jedem Falle entsteht bei Sonnenbeleuchtung nach und nach eine Entfärbung, ohne daß die rotviolette Farbe selbst sich ändert, nur matter wird sie. Die Entfärbung bei Säurezusatz geschieht ebenso langsam oder sogar langsamer, als in so weit wie möglich neutralen Lösungen.

Krystalle entfärben sich nach einigen Tagen Sonnenbeleuchtung, wenn sie in einer Salzlösung aufbewahrt liegen. Die Entfärbung erfolgt offenbar schneller als in einer möglichst neutralen Lösung. (Vgl. Fällung und Entfärbung bei Zusatz von Toluol oder Chloroform.) Werden die Krystalle in trockenem Zustand aufbewahrt, erfolgt nur eine sehr langsame Entfärbung.

Eine Lösung mit Zusatz von recht viel Natriumcarbonat in Substanz hatte über einen Monat ohne Veränderung in diffusem Tageslicht gestanden. Später wurde sie starkem Sonnenlicht ausgesetzt und nach nur etwa einem Tag begann die Fluorescenz einen Stich ins Braune aufzuweisen. Nach einigen weiteren Tagen war die Fluorescenz ganz verschwunden. Die Farbe der Lösung war braunrot geworden und war bald vollständig verschwunden.

e) Einwirkung von Wärme.

Nach Rosanoff (1867, S. 206) verliert eine Phykoerythrinlösung bei 35—45° ihre Fluorescenz und nimmt hierauf eine bläuliche Farbe an, die indessen bei etwa 60° vollständig verschwindet. Schütt (1888, S. 309) bestätigt Rosanoffs Angabe bezüglich der Zerstörung des Farbstoffes durch Hitze.

Nach Molisch (1894, S. 185) behält eine Phykoerythrin-

lösung ihre Fluorescenz bis etwa 64°, von hier wird diese zusehends schwächer und verschwindet bei etwa 78° vollends. In der Siedehitze wird die Flüssigkeit nach kurzem Kochen auffallend blaßviolett, ohne sich aber dabei vollständig zu entfärben. Einen Niederschlag bei 100° hat Molisch erst nach Zusatz einer Spur Salzsäure wahrgenommen.

Um zu einem sicheren Resultat betreffs der Einwirkung der Wärme auf Phykoerythrinlösungen zu kommen, ist es notwendig, daß man sich Lösungen schafft, deren Reaktion man genau kennt und deren Salzgehalt ungefähr bekannt ist. Solche Lösungen kann man erhalten, indem man bei der Dialyse gefälltes Phykoerythrin in Wasser mit bekanntem Ammoniumsulfat auflöst. Als Material zu dem folgenden Versuch über die Einwirkung der Wärme auf Phykoerythrinlösungen habe ich die Lösungen verwendet, die S. 191 besprochen wurden.

Die drei Lösungen, welche 0,25%, 0,5% resp. 1% Ammoniumsulfat enthielten, verhielten sich bei Erhitzung gleich. Bei 50° begann eine schwache Verminderung der Fluorescenz sich geltend zu machen und bei fortgesetzter Erhitzung wurde diese Fluorescenzabnahme immer deutlicher, aber noch bei 65° war die Fluorescenz ganz deutlich. Bei 70° wurde die Lösung opalescent und bei 73° entstand ein roter flockiger Niederschlag. Die Fällung war indessen nicht vollständig; die Farbe und Fluorescenz des Filtrats waren nach Abkühlung von derselben Qualität, wie vor der Erhitzung. Bei erneuter Erhitzung trat wieder eine Abnahme der Fluorescenz bei 50° ein und bei 75° war beinahe jede Fluorescenz verschwunden. Bei 78° Opalescenz und bei 80—81° Fällung. Auch diese Fällung war nicht vollständig, sondern das Filtrat zeigte nach Abkühlung dieselbe Farbe und Fluorescenzqualität, wie früher, aber natürlich mit weit geringerer Stärke. Die Erhitzung wurde wiederholt; bei 50° schwache Abnahme der Fluorescenz, bei 80° war die Fluorescenz verschwunden, wenigstens zum allergrößten Teil. Bei 87° Opalescenz und bei 89° Fällung. Die Fällung war diesmal praktisch genommen vollständig und das Filtrat zeigte nach Abfiltrierung des Niederschlages eine sehr schwache, kaum merkliche Fluorescenz, erst wenn die Lösung

in direktem Sonnenlicht gegen schwarzen Hintergrund betrachtet wurde.

Bei Zusatz eines Tropfens 0,5%iger Essigsäure zu einigen Kubikzentimetern der Lösung, die 0,25% Salz enthielt, wurden die Koagulationstemperaturen auf 67, resp. 78 und 88° herabgedrückt. Die letzte Fällung war vollständig. Was die Fluoreszenz betrifft, verhielt sich die Lösung so, als ob keine Säure hinzugesetzt worden wäre. Bei Zusatz von 5 Tropfen 0,5%iger Essigsäure zu einer ebenso großen Menge von derselben Farblösung, wie eben erwähnt, wurden die Koagulationstemperaturen auf 64 und 72° herabgedrückt, die letztere Fällung so gut wie vollständig.

Zu etwa 2 ccm der Lösung, die 0,5% Salz enthielt, wurde ein Tropfen 10%iger Essigsäure hinzugesetzt. Bei 50° wurde die Lösung opalescent, und bei 53° zeigte sich der Anfang einer Fällung. Die Lösung wurde bis 55° erhitzt und die Fällung erwies sich dann bei Abfiltrieren als vollständig.

Zu einigen Kubikzentimetern der Lösung, die 0,5% Salz enthielt, wurde 1 Tropfen 0,2%ige Natriumcarbonatlösung hinzugesetzt. Bei Erhitzung ergaben sich Koagulationstemperaturen von 80 und 93°, bei der letzteren war die Fällung so gut wie vollständig. Wurden hingegen einem gleich großen Volumen Lösung 5 Tropfen 0,2%ige Natriumcarbonatlösung zugesetzt, entstand nicht einmal bei Kochen eine Koagulation. Hingegen trat eine solche ein, wenn außer 5 Tropfen 0,2%iger Natriumcarbonatlösung soviel Ammoniumsulfat zugesetzt wurde, daß die Lösung ungefähr 3% Salz enthielt. In diesem Fall werden die Koagulationstemperaturen 78 und 88°. Die letztere Fällung war praktisch vollständig.

Eine Lösung, die durch Dialyse so salzarm geworden war, daß die Probe auf Sulfat mit Baryumchlorid nur ein sehr unbedeutendes Resultat ergab und in der bereits eine reichliche Krystallisation des Farbstoffes stattgefunden hatte, wurde auf 65° erhitzt, wobei die Krystalle sich zusammenballten. Die Erhitzung wurde bei 75° abgebrochen, und der schon erhaltene Niederschlag abfiltriert. Die Fällung war nicht vollständig und bei erneuter Erhitzung des Filtrats entstand Koagulation erst

bei 82—83°, dann bei 90°. Die letztere Fällung war praktisch vollständig und das Filtrat zeigte nur in direktem Sonnenlicht gegen schwarzen Hintergrund eine äußerst unbedeutende Fluorescenz.

Ein Tropfen 0,2%ige Natriumcarbonatlösung auf etwa 2 ccm Flüssigkeit ist ausreichend, um in der oben erwähnten äußerst salzarmen Lösung die Koagulation zu verhindern, auch wenn die Erhitzung bis zum Kochen fortgesetzt wird.

Aus obenstehender Versuchsserie geht also hervor, daß die geringe Salzmenge, die nötig ist, um einen Teil des Phykoerythrins in Lösung zu erhalten, ganz hinreichend ist, um den Farbstoff bei Erhitzung auf 90° praktisch genommen ganz ausfallen zu lassen. Werden Spuren von Säure zugesetzt, so sinken die Koagulationstemperaturen, um bei Zusatz des Quantums Essigsäure, das nötig ist, um durch die gewöhnliche Kochprobe Eiweiß nachzuweisen, auf eine Temperatur von 53—55° herabzugehen. Bei Zusatz einer Spur Alkali wird die Koagulation verhindert, wenn die Lösung genug salzarm ist, findet aber statt, wenn Salz in hinreichender Menge vorhanden ist. Bei weiterer Alkalisierung wird die Koagulation auch dann verhindert, wenn Salz vorhanden ist.

Das Phykoerythrin befolgt also die bekannten für die Koagulation von Eiweißkörpern allgemein gültigen Gesetze.

Im Zusammenhang mit den Koagulationsversuchen wurde erwähnt, daß die Fluorescenz des Phykoerythrins bei 50° sich zu vermindern begann, und daß die Fluorescenzabnahme bei erhöhter Temperatur zunahm. Bei Abkühlung kehrte indessen die Fluorescenz wieder vollständig zurück und war bei der Erhitzung ein Teil des Farbstoffes ausgefallen, so zeigte sich nur die Stärke, nicht die Qualität der Fluorescenzfarbe bei Abkühlung verändert.

Um diese Fluorescenzänderungen bei Erhitzung und Abkühlung näher untersuchen zu können, habe ich mich einer Farblösung bedient, die durch Dialyse so salzarm geworden war, daß ein Tropfen 0,2%ige Natriumcarbonatlösung auf ein paar Kubikzentimeter Farblösung ausreichte, um die Koagu-

lution zu verhindern. Bei einer solchen Lösung nimmt die Fluorescenz von $50-80^{\circ}$ kontinuierlich ab, bei welcher letzteren Temperatur sie sogar wie ganz verschwunden ist. Bei Abkühlung kehrt sie hingegen vollständig zurück.

Wird die Erhitzung bis auf 85° fortgesetzt, so merkt man, daß die Fluorescenz nach der Abkühlung nicht so schön orange ist, wie vorher, sondern einen Farbenton bekommt, der mehr matt bräunlich-orange scheint, während zugleich die Stärke der Fluorescenz etwas abnimmt. Und wird die Erhitzung bis 90° getrieben, macht sich die Abnahme in der Fluorescenz nach der Abkühlung sehr stark geltend. Nach Erhitzung auf 95° kehrt nach der Abkühlung keine Spur der Fluorescenz zurück.

Bei Erhitzung der oben erwähnten salzarmen äußerst schwach alkalischen Lösung auf 85° wurde ein Ansatz zu einer Veränderung der eigenen Farbe der Lösung beobachtet, die statt des sehr schönen roten Tons einen etwas matteren bräunlichen annahm. Diese Veränderung macht sich bei 90° stärker geltend. Bei 95° ist die Farbe etwas schwächer geworden, ist noch immer rot, aber mit einem matteren braunroten Farbenton.

Die Erklärung dieser Farbenänderung dürfte die sein, daß bei 85° das Alkalicarbonat zerspaltend auf die Phykoerythrinmoleküle einzuwirken beginnt, so daß die Farbenkomponente und die Eiweißkomponente voneinander gespalten werden. Bei 95° ist diese Spaltung vollendet und es ist dann nicht das Phykoerythrin, sondern dessen freigewordene Farbenkomponente, die die Farbe der Lösung bedingt. Die Farbenkomponente wäre also in einer schwach alkalischen Lösung rot mit einer matt bräunlichen Nuance (vgl. S. 193).

Die Ursache, daß die Fluorescenz bei einer Lösung, die auf 85° erhitzt und dann wieder abgekühlt wurde, nicht ganz wiederkehrt, ist ebenfalls in der beginnenden Spaltung der Moleküle zu suchen, und nachdem diese Spaltung durch Erhitzung auf 95° vollendet ist, ist die Fluorescenz natürlich für immer verloren.

Bei dem Bericht über die Koagulationsversuche mit den Lösungen, die, so weit möglich, ganz neutral waren, wurde

erwähnt, daß das Filtrat nach der Fällung bei 89—90° eine äußerst schwache Fluorescenz zeigte. Die Farbmoleküle, die der Koagulation entgangen waren, hatten somit bei Erhitzung auf 90° keine Spaltung durchgemacht. Bei Erhitzung bis zum Kochen verschwinden indessen alle Spuren von Fluorescenz.

Etwa 2 ccm der oben erwähnten Farbenlösung, die 0,5% Salz enthielt, wurde ein Tropfen 10%iges Ammoniak zugesetzt. Diese Lösung zeigte schon bei Erhitzung auf 35—40° eine Abnahme der Fluorescenz. Bei 65° begann die Spaltung der Moleküle des Farbstoffes und bei 80° war diese Spaltung vollendet, weshalb bei Abkühlung keine Fluorescenz zurückkehrte. Die Farbe der Lösung nach der Erhitzung auf 80° war dieselbe, als ob statt des Ammoniaks einige Tropfen 0,2%ige Natriumcarbonatlösung verwendet worden, die Erhitzung aber bis zu 95° fortgesetzt worden wäre. Beim Kochen trat keine weitere Veränderung der Farbe ein.

Aus dem oben Angeführten dürfte hervorgehen, daß Rosanoffs, Schütts und Molischs Angaben (s. S. 196) über die Wirkung der Wärme auf eine Phykoerythrinlösung alle richtig sein können, und daß die scheinbaren Widersprüche, die diese Angaben enthalten, sich dadurch erklären, daß die Lösungen, mit welchen Rosanoff und Schütt arbeiteten, etwas stärker alkalisch waren, als Molischs Lösungen. Aber auch diese waren sicher ein wenig alkalisch. Rosanoffs und Molischs Angaben, daß die Phykoerythrinlösungen bei Erhitzung eine bläuliche (Rosanoff) oder blaßviolette Farbe (Molisch) annehmen, sollen im Zusammenhang mit dem Bericht über die Einwirkung von Säuren und Alkalien auf das Phykoerythrin näher untersucht werden (S. 206).

f) Einwirkung proteolytischer Enzyme.

1. Pepsin. Wird eine verhältnismäßig schwache Phykoerythrinlösung mit der zur Pepsindigestion erforderlichen Menge Salzsäure (etwa 0,2%) versetzt, verschwindet die Fluorescenz augenblicklich, während die Farbe in durchfallendem Lichte einen starken Stich ins Violette bekommt (vgl. S. 192). Die Lösung bleibt ganz klar ohne Andeutung einer Fällung. Läßt man

eine solche Lösung nach Zusatz von etwas Pepsin 24 Stunden bei etwa 38° stehen, so verändert sie ihre Farbe gleichwohl nicht. Sie kann sogar mehrere Tage stehen, ohne daß eine Veränderung der Farbe eintritt. Als Kontrollprobe ließ ich eine ebenso starke Pepsinlösung auf Fibrin einwirken. Nach 24 Stunden hatte sich das Fibrin aufgelöst. Das Experiment würde also für die Richtigkeit von Hansons Angabe (1909, S. 343) sprechen, daß das Pepsin auf Phykoerythrin nicht einwirkt.

Wendet man hingegen eine etwas stärkere Phykoerythrinlösung an, erhält man bei Zusatz von 0,2% Salzsäure einen rotvioletten Niederschlag. Dieser löst sich nach 24 Stunden unter Einwirkung von Pepsin vollständig auf und man erhält dann eine ganz klare Lösung mit stark violetter Farbe. Dieses Experiment scheint mir dahin gedeutet werden zu müssen, daß das Pepsin auf die Eiweißkomponente des Phykoerythrins einwirkt, dessen Farbenkomponente aber unverändert läßt. Hansons oben angeführte Angabe, daß das Pepsin auf das Phykoerythrin nicht einwirkt, muß also als unrichtig betrachtet werden, auch wenn sie mit Rücksicht auf den ersterwähnten Versuch leicht erklärlich ist.

Schüttelt man eine Phykoerythrinlösung, die 24 Stunden lang der Einwirkung von Pepsin ausgesetzt war, mit Amylalkohol, so wird dieser schön rotviolett. Die Farbe ist zwischen dem Wasser und dem Amylalkohol verteilt worden. Wird dasselbe Experiment mit einer Phykoerythrinlösung gemacht, die mit einem oder einigen Tropfen Salzsäure versetzt worden ist, aber so verdünnt war, daß keine Fällung zustande gekommen ist, so tritt keine Verteilung der Farbe zwischen Wasser und Amylalkohol ein, sondern man erhält einen flockigen rotvioletten Niederschlag, wobei sowohl Wasser wie Amylalkohol ganz farblos wird. Auch dieser Versuch zeigt, daß das Phykoerythrin, und zwar dessen Eiweißkomponente durch Pepsinbehandlung beeinflusst wird.

Die oben erwähnten Versuche scheinen mir folgendermaßen erklärt werden zu müssen. Das Phykoerythrin ist aus einer Eiweiß- und einer Farbenkomponente zusammengesetzt und gehört also, als Proteinstoff betrachtet, der Proteidgruppe

an, in Analogie mit z. B. Hämoglobin. Bei Zusatz von Salzsäure wird die Eiweißkomponente von der Farbenkomponente gespalten. Diese Spaltung der Phykoerythrinmoleküle ist die Ursache, daß die Fluorescenz bei Salzsäurezusatz verloren geht und nicht zurückkehrt, wenn ein wenig Alkali bis zu alkalischer Reaktion hinzugesetzt wird (vgl. S. 192). Die rotviolette Farbe der Phykoerythrinlösung nach dem Salzsäurezusatz ist durch die von der Eiweißkomponente gesplattene Farbenkomponente bedingt. Wird mit Pepsin digeriert, so spaltet sich die Eiweißkomponente, während die Farbenkomponente unverändert übrig bleibt, so daß die Farbe der Lösung vor und nach der Pepsindigestion gleich ist. Vor der Digestion ist indes die Farbenkomponente von der Eiweißkomponente so stark adsorbiert, daß sie beim Schütteln mit Amylalkohol von diesem nicht aufgenommen werden kann. Nach der Digestion, wenn also die Eiweißkomponente gespalten worden ist, kann der Amylalkohol die Farbenkomponente aufnehmen, und wird so rotviolett gefärbt.

Wird der Amylalkohol, nachdem er einen Teil der Farbenkomponente aufgenommen hat, mit Wasser geschüttelt, so verteilt sich die Farbe wiederum zwischen Wasser und Amylalkohol, und man erhält so eine Wasserlösung der Farbenkomponente des Phykoerythrins, die aber nun von allen Eiweißresten befreit ist.

2. Trypsin. Zu einer Phykoerythrinlösung wurde etwas Trypsin nebst Natriumcarbonat bis zu 0,2% hinzugesetzt, zu einer anderen nur Natriumcarbonat bis zu 0,2%. Beide Lösungen wurden bei 38° länger als eine Woche stehen gelassen, ohne daß sie sich in sichtbarer Weise veränderten. Die Aktivität des Trypsins wurde mittels Digestion von Fibrin kontrolliert. Die Versuchserie wurde mehrmals mit immer gleichbleibendem Resultat wiederholt.

Werden hingegen einige Tropfen Salzsäure hinzugesetzt, so daß die obenerwähnte Spaltung der Farbstoffmoleküle eintritt, hierauf Natriumcarbonat bis zu schwach alkalischer Reaktion und etwas Trypsin, ergibt sich ein ganz anderes Resultat. Bei etwas stärkerer Konzentration des Farbstoffes bildet sich bei Zusatz von Salzsäure eine Fällung, die sich bei Zusatz

von Natriumcarbonat nicht auflöst. Nachdem das Trypsin einen Tag gewirkt hat, ist indes der Niederschlag aufgelöst. Die Farbe der Lösung ist rot, aber viel schwächer als die der ursprünglichen Farbenlösung. Nach und nach wird die Farbe immer schwächer, um schließlich ganz zu verschwinden.

Um die Wirkung des Trypsins genauer zu studieren, wurde eine Portion Farbenlösung durch Wärme koaguliert und der abfiltrierte Niederschlag mit Trypsin digeriert. Nach einer Einwirkung von 24 Stunden war der ganze Niederschlag aufgelöst. Die Farbe der Lösung war rot, wurde aber nachträglich immer schwächer und verschwand schließlich ganz.

Aus der obigen Versuchsserie dürfte man den Schluß ziehen können, daß das Trypsin auf das Phykoerythrin als solches nicht einwirkt, wohl aber auf dessen Eiweißkomponente auflösend wirkt, sobald diese z. B. durch Säurezusatz oder durch Kochen von der Farbenkomponente gespalten worden ist. Die nachträglich eintretende Veränderung der Farbestärke wird nicht durch das Trypsin verursacht, sondern beruht nur auf der Einwirkung des Alkalicarbonates auf die Farbenkomponente des Phykoerythrins, nachdem diese von der Eiweißkomponente gespalten worden ist (vgl. S. 207).

Hansons Angabe (1909, S. 343) daß das Trypsin auf das Phykoerythrin einwirkt, dürfte also mit einer gewissen Modifikation eine Wahrheit sein.

g) Einwirkung von Säuren und Alkalien.¹⁾

Schon Kützing (1843, S. 22) erwähnt, daß die Florideen bei Zusatz von Ammoniak ihre rote Farbe verlieren. Sie werden hierbei schmutzviolett oder grün mit violetterm Anstrich, rein grün, dunkelgrün oder braungrün. Säurezusatz stellt die ursprüngliche rote Farbe sogleich wieder her. Hierin liegt bereits im großen und ganzen alles, was spätere Literaturangaben über die Einwirkung von Säuren und Alkalien auf

¹⁾ Die Einwirkung kleinerer Mengen Säuren und Alkalien ist unter «Löslichkeits- und Fällbarkeitsverhältnisse» behandelt worden (s. S. 189). Hier ist hauptsächlich die Rede von der Wirkung von Säuren und Alkalien auf die Farbenkomponente des Phykoerythrins.

das Phykoerythrin mitteilen und was etwa folgendermaßen zusammengefaßt werden kann:

Eine Säure zerstört die Fluorescenz und gibt der Lösung eine rotviolette Farbe. Verdünnte Kali- oder Natronlauge zerstört die Fluorescenz, schwächt die Farbe ab und verändert sie nach und nach ins Blauviolette, Blaugrüne und schließlich Gelbgrüne oder Gelbliche. Säurezusatz stellt wieder eine rotviolette Farbe her. — Die Angaben über Fällungen bei Alkalizusatz (Rosanoff, 1867, S. 207 und Schütt, 1888, S. 318) beruhen auf Verunreinigungen in den Lösungen.

Auf obige Weise zusammengefaßt, sind die Literaturangaben im großen und ganzen richtig. Freilich scheinen viele Angaben in scharfem Widerspruch zueinander zu stehen, aber bei gutem Willen können sie doch auf das obige Grundschema zurückgeführt werden.

Zuerst einige Detailangaben, die recht aufklärend sein dürften. Zu 36 ccm Lösung wurde Ammoniumsulfat (8 g auf 100 ccm Lösung) hinzugesetzt, hierauf 6 ccm 10%iges Ammoniak. Die Fluorescenz verminderte sich etwas. Die Lösung wurde stehen gelassen und nach und nach traten wohlausgebildete Krystalle auf. Wird tropfenweise Ammoniak zugesetzt, so vermindert sich die Fluorescenz allmählich, ohne daß die eigene Farbe der Lösung verändert wird, und bei vorsichtiger Neutralisierung wird die Fluorescenz wieder etwas verstärkt. Bei größerem Zusatz von Ammoniak wird die Farbe der Lösung schwächer und die Fluorescenz verschwindet definitiv. — Natronlauge wirkt in derselben Weise wie Ammoniak, aber weit kräftiger.

Bereits früher wurde erwähnt, daß ein hinreichender Zusatz einer Säure, am liebsten einer Mineralsäure, das Phykoerythrin in eine Eiweißkomponente und eine Farbenkomponente spaltet. Dieselbe Spaltung wird durch hinreichenden Alkalizusatz erreicht. Die oben erwähnte Andeutung einer Farbenverminderung bei Zusatz einer gewissen Menge Ammoniak bezeichnet eben den Anfang der Spaltung. Das Farbenspiel nach der erwähnten Spaltung gehört nicht dem Phykoerythrin selbst, sondern seiner Farbenkomponente an, und die bereits

erwähnten Literaturangaben über Änderungen der Farbe bei Zusatz von Säuren und Alkalien, gehören also der freigewordenen Farbenkomponente des Phykoerythrins an.

Die Farbenkomponente des Phykoerythrins ist in schwach alkalischer Flüssigkeit rot, aber von schwächerer Farbenstärke als das Phykoerythrin selbst, in schwach saurer Flüssigkeit rotviolett mit einer Farbenstärke, die nur wenig der des Phykoerythrins unterliegt.

Bei Behandlung mit etwas größerer Menge Alkali geht die Farbe der Farbenkomponente in rotviolett, violett, blauviolett, blau, blaugrün und schließlich grün über. Mit Hilfe von Ammoniak, auch in verhältnismäßig großer Menge, ist es indes schwer, diese Farbenskala zu erhalten. Bei Kochen mit sogar recht kleinem Natronlaugenzusatz tritt sie hingegen deutlich hervor, geht aber schnell vorbei. Auch nach andauerndem Kochen wird die grüne Farbe noch beibehalten, die bedeutend farbenkräftiger ist als die dazwischenliegenden Farbenvarietäten und deren Farbenstärke der des Phykoerythrins nicht sehr nachsteht.

Wenn die blau bis blaugüne Farbennüance in der Farbenskala aufzutreten beginnt, stellt sich auch eine schwach braunrote Fluoreszenz ein, welche im selben Maße wie die Farbe in Grün übergeht, ausgeprägter wird. Beim Kochen wird die Fluoreszenz geringer oder verschwindet beinahe ganz, kommt aber bei Abkühlung zurück. Die Lösung erinnert durch ihre Farbe sowohl wie durch ihre Fluoreszenz an Chlorophylllösungen. Auch wenn die Lösung im Dunkeln aufbewahrt wird, verschwindet die Fluoreszenz nach und nach. Die Farbe der Lösung wird schwächer und wird immer gelblicher.

Wird ein Phykoerythrinniederschlag in stärkerer Salzsäure gekocht, so löst er sich langsam auf und die rotviolette Farbe geht mehr und mehr in Blau über. Nach hinlänglichem Kochen entsteht eine schön blaue Lösung, deren Farbenstärke, nach dem Augenmaß zu urteilen, nicht vermindert ist im Vergleich zu der Farbenstärke der Lösung, aus der der Niederschlag hergestellt wurde. Wird konzentrierte Schwefelsäure einem Phykoerythrinniederschlag zugesetzt, so löst sich diese

sobald auf und die Farbe der Lösung wird schön blau. Wenn eine Phykoerythrinlösung, die durch Alkalibehandlung violett bis blau geworden ist, angesäuert wird, so wird die Lösung violett, mit einem stärkeren Stich ins Blaue nach stärkerer Alkalieinwirkung. Wird eine durch Alkalieinwirkung grün gewordene Lösung sauer gemacht, so wird die Farbe blauviolett.

Die freigewordene Farbenkomponente wird von Alkalien leicht zerstört. Daher die Zerstörung der Farbe bei Trypsindigestion (vgl. S. 204). In saurer Lösung ist sie hingegen außerordentlich beständig, verändert sich aber doch nach und nach sowohl durch Licht als durch etwas höhere Temperatur. Läßt man eine Phykoerythrinlösung nach Pepsinbehandlung längere Zeit bei etwa 38° stehen, so wird die Farbe nach und nach mehr bräunlich-violett, um schließlich ganz zerstört zu werden.

Schüttelt man eine Phykoerythrinlösung nach Pepsindigestion mit Amylalkohol, geht ein Teil des Farbenkomplexes in den Alkohol über (vgl. S. 202). Wird hingegen eine saure Lösung, die durch Kochen blau gefärbt wurde, mit Amylalkohol geschüttelt, geht der Farbenkomplex ganz in den Alkohol über, und das Wasser wird farblos.

Genauere Studien über den Farbenkomplex des Phykoerythrins habe ich bis jetzt nicht gemacht und kann daher nichts über seine chemische Stellung mitteilen. Die in einem gewissen Stadium auffallende Ähnlichkeit mit einer Chlorophylllösung könnte indessen vielleicht daran denken lassen, daß die Alge beim Aufbau der Farbenkomponente des Phykoerythrins in der Hauptsache dieselben Atomkomplexe anwendet, wie beim Aufbau der Chlorophyllmoleküle. Sollte sich dies als richtig erweisen, könnte man einen engeren Zusammenhang zwischen Phykoerythrin und Hämoglobin herstellen, als dies bisher möglich ist (vgl. S. 202), da seit langem gezeigt ist, daß die Farbenkomponente des Hämoglobins, Hämatin, teilweise dieselben Atomkomplexe enthält wie Chlorophyll.

h) Chemische Analyse.

Zur chemischen Analyse wurde das Phykoerythrin durch mindestens 5 Umkrystallisierungen, bei successivem Zusatz von

höchstens 12 g Ammoniumsulfat auf 100 ccm Lösung, gereinigt. Die reine Phykoerythrinlösung wurde dann durch Erhitzung bis zum Kochen koaguliert, der dabei erhaltene Niederschlag abfiltriert und mit warmem Wasser gewaschen, bis das Filtrat bei Zusatz von Nessler's Reagens nicht mehr auf Ammoniumsulfat reagierte. Diese Waschung ging recht schnell. Der Niederschlag wurde dann mit Alkohol und Äther¹⁾ behandelt und auf die gewöhnliche Weise getrocknet und gewogen.

Nach einer solchen Behandlung erhielt man das Phykoerythrin in ganz aschefreiem Zustand.

Die qualitative chemische Analyse ergab, daß das Phykoerythrin Kohle, Wasserstoff, Stickstoff und Schwefel enthält. Es verdient bemerkt zu werden, daß Phosphor fehlt. Zur Bestimmung der quantitativen Zusammensetzung wurde eine Doppelanalyse von Kohle, Wasserstoff und Stickstoff und eine Schwefelanalyse ausgeführt. Der Stickstoff wurde mit Kjeldahls Methode bestimmt. Die Kohle- und Wasserstoffbestimmungen wurden von Dr. H. Weil, München, ausgeführt.

¹⁾ Bei Waschung mit Alkohol zeigte es sich, daß dieser etwas gefärbt wurde, erst blau, dann blauviolett und schließlich violett. Auch der Äther färbte sich anfangs blau-blauviolett, ging aber nach und nach farblos durch. Bei zwei Gelegenheiten, als eine etwas größere Menge Niederschlag mit Alkohol gewaschen werden sollte, wurde der ganze Niederschlag in einem kleinen Kolben hinuntergespült, mit etwa 100 ccm Alkohol übergossen und dann 24 Stunden stehen gelassen. Als der Alkohol hierauf abfiltriert wurde, zeigte er sich stark violett gefärbt. Der Alkohol wurde durch Verdunstung entfernt und als Rest ergab sich in dem einen Falle 0,004 g, im anderen 0,005 g.

Die Ursache zu diesem Phänomen dürfte die sein, daß die Phykoerythrinmoleküle sich bei Koagulation spalten und daß der Alkohol dann einen Teil der Farbenkomponente herauslöst, aber nur einen so unbedeutenden Teil, daß die Farbe des Niederschlags nicht merklich schwächer wird. Man kann indes von der Farbenstärke der Farbenkomponente eine Vorstellung bekommen, wenn man bedenkt, daß 5 mg derselben (vorausgesetzt, daß diese den ganzen Rest ausmachten) in 100 ccm Flüssigkeit eine starke Färbung verursachen kann. — Wenn eine Phykoerythrinlösung mit Alkohol gefällt wird, löst der Alkohol keinen Teil der Farbenkomponente aus dem Niederschlag heraus.

Analysendaten:

0,1944 g Substanz ergaben:	0,3620 g CO ₂ und 0,1228 g H ₂ O,
	also 50,82% C und 7,07% H.
0,1389 g Substanz ergaben:	0,2587 g CO ₂ und 0,0864 g H ₂ O,
	also 50,83% C und 6,96% H.
0,1318 g Substanz ergaben:	14,4 cem ⁿ / ₁₀ -NH ₃ , also 15,34% N.
0,1477 » » »	16,2 » » 15,40% »
1,286 » » »	0,150 g BaSO ₄ , » 1,60% S.

Die prozentuale Zusammensetzung des Phykoerythrins ist also

$$C = 50,82\%$$

$$H = 7,01\%$$

$$N = 15,37\%$$

$$S = 1,60\%$$

$$O = 25,20\%$$

Die Kohlen-, Wasserstoff-, Stickstoff- und Schwefelmengen des Phykoerythrins liegen also innerhalb der für Eiweißstoffe gewöhnlichen Grenzen.

Ein Versuch zur Bestimmung der quantitativen Zusammensetzung des Phykoerythrins wurde schon von Hanson (1909, S. 341) gemacht. In den verschiedenen von ihm ausgeführten Analysen variierte indessen die prozentuale Zusammensetzung in hohem Grade. Für N gibt er Werte zwischen 3,31 und 8,27% an, für C 30,61 und 37,48% und für H 7,10 und 7,60%. Dies kommt daher, daß Hanson kein reines Material hatte; der Aschengehalt soll z. B. zwischen 17 und 27,1% betragen haben.

i) Spektroskopische Untersuchung.

Der erste, der Angaben über das Absorptionsspektrum des Phykoerythrins macht, ist Stockes (1854, S. 264), welcher behauptet, daß sich in Gelb, Grün und Blau drei Bänder befinden. Dieselbe Angabe findet sich später bei Askenasy (1867, S. 233), welcher über das Absorptionsspektrum schreibt: es hat 3 Maxima von Absorption, eines an der Grenze von Gelb und Grün, eines im Grün und eines im Blau. Die Absorption beginnt ziemlich plötzlich in der Nähe der Natriumlinie. Bei größerer Dicke läßt die Farbstofflösung nur rotes Licht durch. In derselben Richtung bewegen sich Rosanoffs Angaben (1867, S. 204). Dieser bildet auch das Absorptionsspektrum des Phyko-

erythrins bei *Jania corniculata* ab, mit 3 Bändern zwischen der D- und der F-Linie (a. a. O., Pl. II, Spektrum V).

Zu diesen 3 bereits bekannten Bändern fügt Pringsheim (1875, S. 751) noch 2 weitere hinzu, eines zwischen B und C und eines zwischen C und D. Außerdem befindet sich eine Endabsorption in Violett. Diese Zusätze sind indessen nach Reinke (1886, S. 231) dadurch entstanden, daß Pringsheims Lösungen Spuren von Florideengrün enthielten. Reinke hat eine spektrophotometrische Untersuchung über das Phykoerythrin bei *Delesseria sanguinea* gemacht und gibt eine Kurve des Absorptionsspektrums (a. a. O., Taf. II, Fig. 12), die in allem Wesentlichen mit der Kurve übereinstimmt, die ich für das Phykoerythrin bei *Ceramium rubrum* gefunden habe.

Schütt (1888, S. 41) hat auch eine spektrophotometrische Untersuchung über das Phykoerythrin gemacht und als Material Wasserextrakt aus *Ceramium rubrum* und *Dumontia filiformis* angewendet. Die Phykoerythrinspektren dieser beiden Algen stimmen miteinander nicht überein und ebensowenig mit Reinkes Spektrum für *Delesseria*. Was *Ceramium* betrifft, muß indessen bemerkt werden, daß Schütt dessen Phykoerythrinspektrum nicht studieren konnte, weil er nicht beachtete, daß ein Wasserextrakt dieser Alge nicht nur Phykoerythrin, sondern auch Phykocyan enthält.

Molisch (1906, S. 803, Taf. I, Fig. 10—11) gibt Beschreibung und Abbildung des Absorptionsspektrums für das Phykoerythrin einer *Ceramium*-Art (*C. strictum?*), aber aus seinen Angaben zu schließen, hat die untersuchte Phykoerythrinlösung ganz gewiß etwas Phykocyan enthalten.

Die letzten Angaben über das Absorptionsspektrum des Phykoerythrins bei *Ceramium rubrum* stammen von Hanson (1909); da er aber nicht beachtet hat, daß ein Wasserextrakt von dieser Alge neben Phykoerythrin auch Phykocyan enthält, und da er keine reinen Lösungen erhalten konnte, sind seine Angaben natürlich nicht ganz verlässlich.

Mit Hilfe eines Glans-Spektrophotometers habe ich das Absorptionsspektrum einer ganz reinen Phykoerythrinlösung untersucht. Das Instrument ist von Otto (1882, S. 9) aus-

fürlich beschrieben worden, weshalb ich nur auf seine Arbeit hinzuweisen brauche. Auch betreffs der Berechnung der Extinktionskoeffizienten verweise ich auf diese Arbeit. Unter der Voraussetzung, daß die absorbierende Flüssigkeitsschicht 1 cm ist, wird die Formel für die Berechnung von dem Extinktionskoeffizienten, ϵ

$$\epsilon = - 2 \log \cos \varphi$$

wobei φ der Drehungswinkel des Analysatornikols ist. Die Dicke der Schicht steht im Nenner des Ausdrucks, aber als konstante Größe kann sie, wenn sie nicht gleich 1 ist, mit dem anderen konstanten Faktor des Ausdrucks 2 zu einer neuen Konstante C vereinigt werden. Der Ausdruck für ϵ würde also

$$\epsilon = - C \log \cos \varphi.$$

Da indessen nur die relativen Extinktionskoeffizienten von Interesse sind, um die Absorptionskurve konstruieren zu können, habe ich $C = 1$ gesetzt. (Die Schichtdicke war bei meinen Messungen 4,3 mm.) Die Werte, die in meiner untenstehenden Tabelle angeführt sind, sind demnach nichts anderes als die negativen Logarithmen des Cosinus der Drehungswinkel. Die angegebenen Zahlen sind Mittelwerte von 6 Observationen.

Die relativen Extinktionskoeffizienten gehen aus Tabelle I hervor.

Auf Grund der obigen Extinktionskoeffizienten wurde die Kurve für das Absorptionsspektrum des Phykoerythrins konstruiert. Aus der Untersuchung ergibt sich also, daß eine Phykoerythrinlösung 3 Absorptionsbänder hat, 2 zwischen D und E und eines zwischen E und F, aber näher bei F. Das erste ist am stärksten, das letzte am schwächsten. Das Band I beginnt sehr schnell gleich nach D und erreicht sein Maximum bei $\lambda = 569 - 565 \mu\mu$, Band II erreicht sein Maximum bei $\lambda = 541 - 537$ und Band III bei $\lambda = 498 - 492 \mu\mu$.

Bei verminderter Konzentration scheint Band II vor Band III zu verschwinden, obwohl das letztere schwächer ist (vgl. Schütt 1888, Taf. III, Fig. 1). Dies beruht aber darauf, daß das Minimum zwischen Band I und II bedeutend schwächer markiert ist, als das Minimum zwischen II und III. Das Minimum zwischen I und II liegt höher als das Maximum in Band III. Bei hin-

Skalentelle des Instruments	Wellenlängen (in $\mu\mu$)	Relative Extinktions- koeffizienten einer schwächeren Lösung	Relative Extinktions- koeffizienten einer stärkeren Lösung	Skalentelle des Instruments	Wellenlängen (in $\mu\mu$)	Relative Extinktions- koeffizienten einer schwächeren Lösung	Relative Extinktions- koeffizienten einer stärkeren Lösung
60—62	670—656	—	0,021	88—89	534—531	0,520	—
62—64	656—642	—	0,023	89—90	531—528	0,500	—
64—66	642—630	—	0,028	90—92	528—522	0,447	—
66—68	630—618	—	0,033	92—94	522—516	0,381	—
68—70	618—607	—	0,045	94—96	516—510	0,354	—
70—71	607—602	—	0,055	96—98	510—504	0,369	—
71—72	602—597	—	0,078	98—100	504—498	0,443	—
72—73	597—593	0,028	0,118	100—102	498—492	0,463	—
73—74	593—589	0,050	0,214	102—104	492—488	0,420	—
74—75	589—585	0,075	0,481	104—106	488—484	0,354	—
75—76	585—581	0,141	0,764	106—108	484—480	0,299	—
76—77	581—577	0,233	—	108—110	480—476	0,240	—
77—78	577—573	0,362	—	110—112	476—472	0,201	—
78—79	573—569	0,534	—	112—114	472—468	0,170	—
79—80	569—565	0,586	—	114—117	468—462	0,140	—
80—81	565—561	0,560	—	117—120	462—456	0,103	0,526
81—82	561—557	0,528	—	120—123	456—450	0,073	0,414
82—83	557—553	0,495	—	123—126	450—444	—	0,329
83—84	553—549	0,504	—	126—129	444—438	—	0,220
84—85	549—545	0,516	—	129—132	438—432	—	0,158
85—86	545—541	0,530	—	132—135	432—426	—	0,077
86—87	541—537	0,533	—	135—138	426—420	—	0,050
87—88	537—534	0,530	—				

reichender Konzentration wird nur rotes und orangefarbenes Licht durchgelassen.

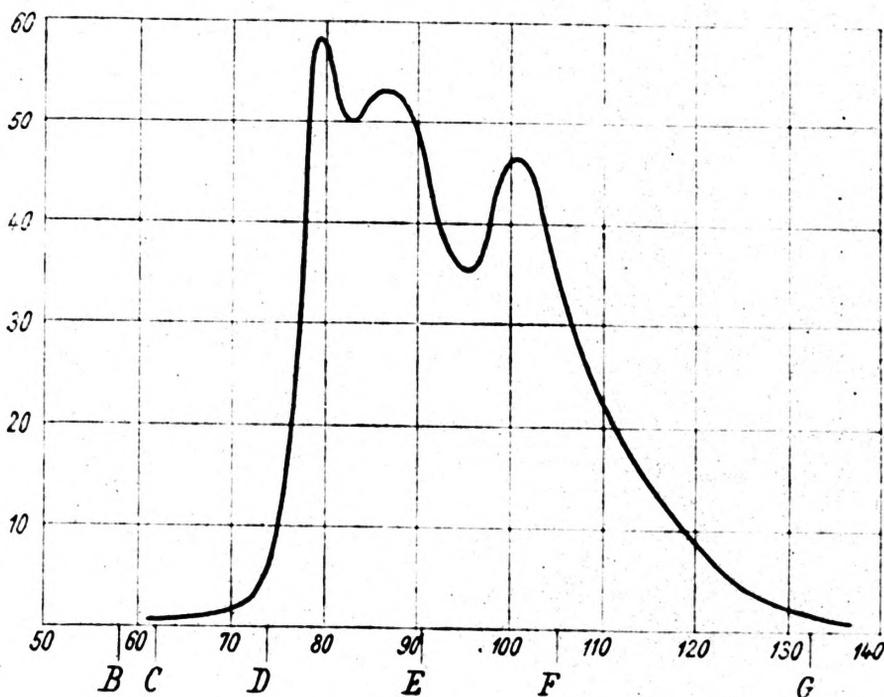


Fig. 1. Absorptionskurve einer Phykoerythrinlösung.

IV. Phykocyan.

a) Farbe, Fluorescenz und Krystallisation.

Wie bereits erwähnt (s. S. 182), ist mir der Beweis gelungen, daß *Ceramium rubrum* außer Phykoerythrin auch einen zugleich mit diesem extrahierbaren blauen Farbstoff enthält,¹⁾

¹⁾ Dieser Farbstoff ist der Aufmerksamkeit der Forscher, die bisher mit *Ceramium rubrum* arbeiteten, entgangen. Nur Schütt (1888, S. 310) wirft die Annahme hin, daß das Phykoerythrin bei dieser Alge aus zwei Farbstoffen bestände, durch seine weiteren Versuche aber kam er zu dem Resultat, daß diese Annahme nicht berechtigt sei (vgl. die Note S. 216). Schütt unterscheidet:

1. das α -Phykoerythrin: blaurot, durch Wasser aus den Pflanzen direkt extrahierbar.

2. β -Phykoerythrin: reinrot, aus dem ersten durch Einwirkung indifferenten Reagenzien, wie Alkohol, Chlorbaryum, entstehend.

3. γ -Phykoerythrin: violettblau, durch Säuren aus 1. fällbar.

Schütts α -Phykoerythrin ist eine Mischung von Phykoerythrin und Phykocyan, sein β -Phykoerythrin ist das wirkliche Phykoerythrin und

der, wie sich nach seiner Herstellung in reinem Zustand zeigte, der Phykocyangruppe angehört. Eine Lösung dieser Phykocyanmodifikation ist in durchfallendem Licht schön indigoblau, wenn die Konzentration des Farbstoffs nicht allzu groß ist, bei gesteigerter Konzentration bekommt die Lösung einen Stich ins Violette und stärkere Lösungen lassen bei hinreichender Schichtendicke nur violettes und rotviolettes Licht durch (vgl. die spektroskopische Untersuchung S. 229).

In auffallendem Licht zeigt das Phykocyan eine prachtvolle dunkelkarminrote Fluoreszenz. Diese zeigt sich jedoch nur, wenn die Lösung schwach alkalisch ist (2—3 Tropfen 0,2%ige Natriumcarbonatlösung per Kubikzentimeter). Eine soweit möglich ganz neutrale Lösung, in welcher sich das Phykocyan wegen Anwesenheit von etwas Ammoniumsulfat in Lösung erhält, zeigt keine Fluoreszenz (vgl. den Dialysenversuch S. 217).

Molisch (1906) hat gezeigt, daß es wenigstens drei verschiedene Phykocyanmodifikationen gibt, welche durch Farbe, Fluoreszenz, Krystallisationsfähigkeit und spektroskopische Verhältnisse voneinander unterschieden sind. Eine Modifikation ist blau «mit einem Stich ins Grüne» und mit einer prachtvollen «dunkelkarminroten Fluoreszenz». Eine andere ist hingegen violett, «mit venezianischroter, fast ockerartiger oder karminroter Fluoreszenz». Eine dritte ist tiefblauviolett und fluoresciert prachtvoll dunkelkarminrot.

Die Phykocyanmodifikation, die bei *Ceramium rubrum* vorkommt, schließt sich am nächsten an die dritte der erwähnten Modifikationen an. Und die Farbenproben, die Molisch (1906, Taf. II, Fig. 9—12) für die Farbe und Fluoreszenz dieser Modifikation gibt, stimmen mit der Farbe und Fluoreszenz bei dem Phykocyan von *Ceramium rubrum* recht gut überein. Doch zeigt die spektroskopische Analyse, daß diese beiden Modifikationen nicht identisch sind.

sein γ -Phykoerythrin ist eine Mischung der Eiweiß- und Farbenkomponenten des Phykoerythrins und Phykocyans, nachdem diese durch Säurewirkung voneinander gespalten worden sind. Die Farbe wird in diesem Falle von den freigewordenen Farbenkomponenten bestimmt.

Wie bereits erwähnt (S. 179), krystallisiert das Phykocyan aus einer Lösung bei Zusatz von Ammoniumsulfat heraus. Enthält die Lösung 0,25% Farbsubstanz, so beginnt die Krystallisation, sobald die Lösung 8 g Salz auf 100 ccm enthält. Bei successivem Salzzusatz bis 12 g auf 100 ccm Lösung ist die Hauptmasse des Phykocyan auskrystallisiert, vorausgesetzt, daß die Farblösung von Anfang an nicht allzu verdünnt war. (Über Krystallisation bei Dialyse s. S. 217.)

Die Phykocyankrystalle haben die Form rhombischer Tafeln (Taf. I, Fig. 1—2). Ihre Größe ist sehr variabel, indem die Kantenlänge zwischen 5 und 50 μ wechseln kann. Bei einigen Krystallisationen ergaben sich alle möglichen Größen zwischen diesen Extremen, ohne daß eine bestimmte Größe vorherrschte. In anderen Fällen wiederum überwogen die Krystalle einer bestimmten Größe. Die Krystallform ist indessen immer die gleiche und die Messung der Winkel an den Krystallen ergab 79,2 und 100,8. Die Dicke ist in der Regel 1—2 μ , seltener bis zu 3 μ . Nur ausnahmsweise entstanden Krystalle von 4—5 μ Dicke.

Molisch hat die Krystalle von 2 Phykocyanmodifikationen beschrieben, doch hatten beide ganz andere Krystallformen, als das Phykoerythrin bei *Ceramium rubrum* (vgl. Molisch 1895, S. 133 und 1906, S. 804, Taf. II, Fig. 13). Die Krystalle erhielt Molisch, indem er eine Phykocyanlösung mit etwas Ammoniumsulfat versetzte, worauf er die Lösung in einer kleinen Krystallisationschale an einem dunklen Orte ruhig verdunsten ließ. In dem Maße, wie die Lösung durch Verdunstung konzentriert wurde, schlug sich das Phykocyan in Form von Krystallen nieder.

b) Eiweißreaktionen.

Hansen (1893, S. 297) hat die Vermutung ausgesprochen, daß das Phykocyan von eiweißartigem Charakter sei, ohne indes irgend einen Beweis für diese Vermutung beizubringen. Der erste, der einige Beweise für die Eiweißnatur des Phykocyan vorbrachte, ist Molisch (1895, S. 134), aber Euler (1907, S. 227) bezweifelt die volle Beweiskraft der Untersuchungen

Molischs, da man es nicht als ausgeschlossen betrachten kann, daß die Eiweißigenschaften nicht dem Farbstoff selbst zukommen, sondern irgend einem löslichen Eiweißstoff, der bei der Fällung jenen mitgezogen hätte (vgl. Eulers Einwand gegen die Eiweißnatur des Phykoerythrins S. 188).

Da es mir nun gelungen ist, reines Phykocyan herzustellen, war es mir möglich, die Richtigkeit von Molischs Angabe, daß das Phykocyan von eiweißartiger Natur sei, vollkommen zu bestätigen. Es gehört unter den Proteinstoffen zur Proteidgruppe (s. die Auseinandersetzung S. 225).

Als Beweise für die Proteinnatur des Phykocyan mag hier angeführt werden, daß es beim Kochen koaguliert, daß Hellers Probe ein positives Resultat ergibt, daß es bei hinlänglichem Zusatz von $(\text{H}_4\text{N})_2\text{SO}_4$, MgSO_4 oder Alkohol¹⁾ gefällt wird, ebenso von Gerbsäure, daß Millons Reaktion positiv ausfällt, ebenso wie die Xanthoproteinsäurereaktion und die Biuretreaktion. Diese letztere Reaktion tritt mit derselben Farbe und derselben relativen Stärke auf, wie bei gewöhnlichen Proteinstoffen. Um bei den Farbenreaktionen, wenigstens bei Millons Reaktion und der Biuretreaktion sichere Resultate zu erhalten, müssen die Phykocyanlösungen erst entfärbt werden. Dies kann entweder geschehen, indem man die Lösung direktem Sonnenlicht aussetzt, oder indem man sie mit Kaliumpermanganat behandelt, dessen Überschuß dann durch SO_2 -Lösung entfärbt wird.

c) Löslichkeits- und Fällbarkeitsverhältnisse.

Die Literaturangaben über die Wasserlöslichkeit des Phykocyan gelten mit demselben Vorbehalt, der bezüglich der Wasserlöslichkeit des Phykoerythrins vorgebracht wurde, daß es also in Wasser bei schwach alkalischer Reaktion oder bei Anwesenheit eines Neutralsalzes löslich ist.

Um die Frage nach der Löslichkeit des Phykocyan in

¹⁾ Der Alkohol fällt nicht nur das Phykocyan, sondern zerstört es auch. Dieser Umstand hat veranlaßt, daß Schütt (1888, S. 310) das Phykocyan bei *Ceramium rubrum* nicht nachweisen konnte, sondern genötigt war, seine Vermutung, daß zwei in Wasser lösliche Farbstoffe bei dieser Alge vorkämen, für unrichtig zu erklären. Vgl. die Note S. 213.

reinem Wasser beantworten zu können, wurden einige Dialysenversuche gemacht, auf dieselbe Art wie beim Phykoerythrin. Die Phykocyanlösung, die der Dialyse unterworfen wurde, enthielt etwa 0,4% Farbstoff, 0,01% Natriumcarbonat und einen Gehalt an Ammoniumsulfat, der auf etwa 1% geschätzt werden kann. Die Lösung, mit etwas Toluol versetzt, wurde der Dialyse unterzogen und nach drei Tagen, mit täglichem Wasserwechsel, konnte man den ersten Ansatz zur Trübung infolge der beginnenden Fällung des Farbstoffes wahrnehmen; nach weiteren drei Tagen mit täglichem Wasserwechsel war ein reichlicher Niederschlag entstanden. Dieser bestand teils aus wohl ausgebildeten Krystallen von derselben Form und Aussehen, wie die bei Zusatz von Ammoniumsulfat entstehenden, teils aus Krystallen, die am ehesten unregelmäßigen Scheiben glichen, und die man sich dadurch entstanden denken kann, daß die Ecken der rhombischen Grundform nicht gut ausgebildet worden waren. Diese letztere Form war die vorherrschende.

Die Fällung war nicht vollständig und das Filtrat ergab bei Hellers Probe einen freilich schwachen Hinweis auf Eiweiß. Auch ein deutlicher Hinweis auf Sulfat ergab sich bei Zusatz von Baryumchlorid.

Die Krystalle, die an der Dialysenhülse festsaßen, wurden mit destilliertem Wasser gespült, hierauf mit Leichtigkeit in 0,1%iger Natriumcarbonatlösung aufgelöst, worauf die Lösung wieder der Dialyse unterzogen wurde. Hierbei bildete sich ein neuer Niederschlag, der gleichfalls aus Krystallen, aber vom unregelmäßig scheibenförmigen Typus (s. oben) bestand. Die vom ersten Dialysenversuch abfiltrierten Krystalle wurden in Wasser aufgeschlemmt, das 1% Ammoniumsulfat enthielt. Nach ein paar Tagen waren die Krystalle vollständig gelöst. Die Farbe der Lösung war blau, aber die Fluorescenz fehlte und trat erst bei Zusatz von etwas Natriumcarbonat hervor.

Mit einem Ausgangsmaterial, das von derselben Farblösung genommen wurde, wie das Material zum eben geschilderten Dialysenversuch, wurde auch ein anderer Dialysenversuch gemacht, wobei zunächst in derselben Weise verfahren wurde, wie beim früheren, dann aber wurde das Ganze 5 Wochen

länger stehen gelassen, während welcher Zeit das Dialysenwasser nur einige wenige Male gewechselt wurde. Das Phykokocyan war nicht vollständig herausgefällt, als die Dialyse abgebrochen wurde. Ein Teil des Niederschlages wurde in 0,05%iger Natriumcarbonatlösung mit Leichtigkeit aufgelöst, ein anderer Teil, der in 0,5%iger Ammoniumsulfatlösung aufgeschlemmt wurde, war noch nach 48 Stunden vollständig unauflöslich. Durch Zusatz von etwas Natriumcarbonat löste sich indes das Phykokocyan auch hier leicht auf. Die Phykokocyankrystalle hatten also während der Zeit, wo sie in reinem Wasser lagen, ihre Löslichkeit in schwacher Ammoniumsulfatlösung, nicht aber in schwacher Natriumcarbonatlösung, verloren.

Die Dialysenversuche zeigen also, daß das Phykokocyan ebenso wie das Phykoerythrin in reinem Wasser unlöslich, bei Anwesenheit geringer Mengen Alkali oder neutraler Salze aber in Wasser löslich ist. Es ist bei Alkalienanwesenheit viel leichter löslich, als bei Anwesenheit von ausschließlich neutralem Salz.

Das Phykokocyan fällt bei Dialyse leichter als das Phykoerythrin (vgl. die Dialysenversuche) und umgekehrt muß also das Phykoerythrin bei Zusatz von Wasser, das etwas Alkali oder Neutralsalz enthält, leichter löslich sein als das Phykokocyan. Dieses Verhältnisses habe ich mich zur Scheidung der beiden Farbstoffe von einander bedient (vgl. S. 183).

Wie das Phykoerythrin ist auch das Phykokocyan in Äther, Alkohol, Chloroform, Amylalkohol und Schwefelkohlenstoff unlöslich.

Beim Studium der Einwirkung, die Säuren in geringen Mengen auf eine Phykokocyanlösung ausüben, habe ich eine Lösung benützt, welche ich erhielt, indem ich bei der Dialyse gefälltes Phykokocyan in Wasser mit einem Zusatz von 0,05% Natriumcarbonat auflöste. Die Lösung war also von Neutralsalzen so frei als möglich.

Setzt man etwa 2 ccm einer solchen Lösung einige Tropfen 1%ige Essigsäure hinzu, so entsteht ein ziemlich feinflockiger, blauer Niederschlag, der sich bei Zusatz von Natriumcarbonat wieder auflöst. Die so erhaltene Lösung hat dieselbe Farbe

und Fluorescenz wie die ursprüngliche. Wird ein kleiner Überschuß von Essigsäure hinzugesetzt, so löst sich der bei geringem Essigsäurezusatz entstandene Niederschlag wieder auf. Die Farbe dieser essigsäuren Phykocyanlösung ist dieselbe wie die der ursprünglichen Lösung, entbehrt aber der Fluorescenz. Bei vorsichtiger Alkalisierung (am liebsten mit schwacher Natriumcarbonatlösung) entsteht in der essigsäuren Lösung zunächst ein Niederschlag, der sich bei ganz kleinem Alkaliüberschuß wieder auflöst. Die so erhaltene Lösung hat dieselbe Farbe und Fluorescenz wie die ursprüngliche Lösung vor dem Essigsäurezusatz.

Ist die Phykocyanlösung etwas konzentrierter, so löst sich der durch Zusatz von Essigsäure gebildete Niederschlag bei Zusatz eines Überschusses nur teilweise. Wird hingegen Essigsäure im Überschuß auf einmal zugesetzt, so entsteht auch in etwas mehr konzentrierter Lösung kein Niederschlag. Essigsäure in bedeutendem Überschuß fällt eine salzfreie Phykocyanlösung erst allmählich. Die Fällung wird nicht vollständig.

Werden ein paar Kubikzentimeter der erwähnten salzfreien Phykocyanlösung mit einem Tropfen 0,1%iger Salzsäure versetzt, so entsteht wie bei Zusatz von Essigsäure ein blauer Niederschlag, der sich bei Zusatz von Natriumcarbonat wieder auflöst. Die so erhaltene Lösung hat dieselbe Farbe und Fluorescenz wie die ursprüngliche. Bei ganz kleinem Überschuß von Salzsäure löst sich der bei geringerem Säurezusatz gebildete Niederschlag wieder auf. Die salzsaure Phykocyanlösung hat eine blaue Farbe mit schwachem Stich ins Violette; die Farbenstärke ist im Verhältnis zu der der ursprünglichen Lösung etwas abgeschwächt; die Fluorescenz fehlt. Bei vorsichtiger Alkalisierung entsteht zunächst ein blauer Niederschlag, der sich schon bei ganz kleinem Alkaliüberschuß wieder auflöst. Die Farbe der so erhaltenen Lösung ist indessen im Vergleich zur ursprünglichen sehr abgeschwächt und spielt außerdem ins Violette. Die Fluorescenz fehlt. Bei erneutem Säurezusatz entsteht zunächst ein blauer Niederschlag, der sich bei geringem Säurenüberschuß wieder löst.

Bei Zusatz eines größeren Salzsäureüberschusses fällt das

Phykocyan vollständig in Form eines blauen ziemlich grobflockigen Niederschlags, der sich bei Neutralisierung, selbst bei einem kleinen Überschuß von Natronlauge, nicht wieder löst. Seine Farbe geht aber, sobald die Lösung alkalisch wird, aus Blau in schmutziges Violett über. Bei Säurezusatz wird der Niederschlag wieder blau.

Enthält eine Phykocyanlösung etwas Neutralsalz, so wird sie bei Säurezusatz, ebenso wie eine salzfreie, gefällt, nur mit dem Unterschied, daß die Niederschläge in einem geringen Säureüberschuß unlöslich oder äußerst schwerlöslich sind.

Hiermit hängt zusammen, daß eine salzhaltige Phykocyanlösung durch Zusatz von Essigsäure in größerem Überschuß sofort teilweise gefällt wird, während eine ebenso behandelte salzfreie zunächst keinen Niederschlag aufweist.

Aus dem Angeführten geht hervor, daß das Phykocyan aus einer Lösung bei Zusatz von ganz wenig Säure gefällt wird. Der Niederschlag löst sich bei Alkalizusatz, oder, wenn die Lösung salzfrei ist, bei geringem Säureüberschuß wieder auf. Im ganzen zeigt also das Phykocyan bei Zusatz von Säuren und Alkalien dieselben Löslichkeits- und Fällbarkeitsverhältnisse wie das Phykoerythrin (s. S. 194).

Bei Behandlung der Löslichkeits- und Fällbarkeitsverhältnisse des Phykoerythrins suchte ich geltend zu machen, daß der definitive Fluoreszenzverlust bei Zusatz von Salzsäure im Überschuß auf einer Spaltung der Farbstoffmoleküle in eine Farben- und eine Eiweißkomponente beruhe (s. S. 193). Auch die Fluoreszenz des Phykocyans geht bei Salzsäureüberschuß definitiv verloren, und die Ursache ist meiner Meinung nach dieselbe wie beim Phykoerythrin. Die Phykocyanmoleküle beständen also aus einer Farben- und einer Eiweißkomponente, die bei hinreichendem Säurezusatz voneinander gespalten werden. Die Farbenkomponente ist in saurer Lösung blau mit schwachem Stich ins Violette, in alkalischer blaviolett bis violett (vgl. die obige Diskussion der Farbenänderungen bei Säure- und Alkalibehandlung und die fernere Diskussion S. 226).

Schließlich mag daran erinnert werden, daß eine Phy-

kocyanlösung bei hinreichendem Zusatz von $(\text{H}_4\text{N})_2\text{SO}_4$ und MgSO_4 gefällt wird (eine ausführliche Auseinandersetzung hierüber s. S. 185). Auch verdünnte Lösungen werden durch Zusatz von 17—20 g $(\text{H}_4\text{N})_2\text{SO}_4$ auf 100 ccm Lösung oder bei Zusatz von MgSO_4 bis fast zu voller Sättigung gefällt. Von NaCl , bis zu voller Sättigung zugesetzt, wird eine Phykocyanlösung gar nicht oder nur unbedeutend gefällt.

Als Resultat der Untersuchungen über die Löslichkeit und Fällbarkeit des Phykocyans ergibt sich also:

1. daß es in reinem Wasser unlöslich ist;
2. daß es in Wasser bei Zusatz eines Neutralsalzes oder einer geringen Alkalimenge sich auflöst;
3. daß es bei Zusatz von $(\text{H}_4\text{N})_2\text{SO}_4$ bis zu knapp halber Sättigung oder von MgSO_4 bis zu knapp voller Sättigung vollständig gefällt wird;
4. daß es bei Zusatz einer äußerst geringen Säuremenge gefällt, bei Säureüberschuß wieder aufgelöst wird;
5. daß es bei Dialyse gefällt wird.

Das Phykocyan zeigt also, wie das Phykoerythrin, im ganzen dieselben Löslichkeits- und Fällbarkeitsverhältnisse wie die Globuline.

d) Einwirkung von Licht.

Eine Phykocyanlösung kann im Finstern monatelang stehen, ohne daß sich die Farbe merklich ändert, wenn Fäulnis vermieden wird; auch in diffusem Tageslicht wenigstens einige Wochen ohne merkliche Veränderung. Die Lösungen sind indes für das diffuse Tageslicht weit empfindlicher als die des Phykoerythrins (vgl. S. 195).

Wird eine Phykocyanlösung direktem Sonnenlicht ausgesetzt, ist sie schon nach wenigen Tagen vollständig entfärbt. Eine wenn auch nur schwach alkalische Lösung entfärbt sich hierbei viel schneller als eine möglichst neutrale, was deutlich aus folgendem Versuch hervorgeht. Etwas durch Dialyse gefälltes Phykocyan wurde in 1%iger Ammoniumsulfatlösung aufgelöst; die Lösung wurde in zwei Portionen abgeteilt und

die eine davon mit bis zu 0,1% Natriumcarbonat versetzt. Beide Proben wurden zugleich starkem Sonnenlicht ausgesetzt. Die Probe, welche Natriumcarbonat enthielt, war bereits nach 5 Stunden fast ganz entfärbt, während die Farbe der anderen nach 10 Tagen starker Sonnenbeleuchtung noch nicht vollständig verschwunden war.

Wird eine mit etwas Toluol versetzte Lösung dem Sonnenlicht ausgesetzt, so wird das Phykocyan nach 1—2 Tagen herausgefällt. Eine solche Probe entfärbte sich schneller als eine Probe ohne Toluol.

Läßt man eine mit Toluol versetzte Lösung im Dunkeln stehen, so erfolgt keine Fällung des Phykocyan (also ebenso wie beim Phykoerythrin, s. S. 195).

Ein unbedeutender Zusatz von Ammoniak oder Natronlauge beschleunigt die Entfärbung in hohem Grad. Hierbei vollzieht sich indes eine Änderung der Farbe von Blau zu Blaugrün und Gelbgrün, ehe die vollständige Entfärbung stattfindet.

Eine saure Lösung oder ein blauer Niederschlag in saurer Lösung entfärbt sich langsamer als eine neutrale Lösung.

Krystalle, die in einer Salzlösung aufbewahrt liegen, entfärben sich nach einigen Tagen Sonnenbeleuchtung. In trockenem Zustand entfärben sich die Krystalle sehr langsam.

Vergleicht man die Angaben, die über die Einwirkung des Lichtes auf Phykocyan und Phykoerythrin gemacht worden sind, so dürfte sich ergeben, daß das Licht auf beide Farbstoffe in gleicher Weise wirkt, daß aber das Phykocyan für Beleuchtung empfindlicher ist als das Phykoerythrin.

e) Einwirkung von Wärme.

Wie beim Phykoerythrin gilt es auch beim Studium der Einwirkung der Wärme auf Phykocyan, Lösungen zu erhalten zu suchen, deren Reaktion wohl bekannt ist und deren Salzgehalt man ungefähr kennt.

Eine möglichst neutrale Phykocyanlösung, die 1% Ammoniumsulfat enthielt, zeigte bei Erhitzung auf 75° unvollständige Koagulation. Bei erneuter Erhitzung des Filtrates nach dem Abfiltrieren des ersten Niederschlages, koagulierte

dieses bei 82° vollständig. Ein Zusatz von einem Tropfen 1%iger Essigsäure zu etwa 2 ccm der oben erwähnten Lösung drückte die Koagulationstemperatur auf resp. 70 und 79° herunter. Ein Zusatz von einem Tropfen 10%iger Essigsäure zu dem gleichen Volumen derselben Lösung¹⁾ drückte die Koagulationstemperatur auf 46—48° herab. Die Koagulation war vollständig.

Nach einem Zusatz von einem Tropfen 0.2%iger Natriumcarbonatlösung zu etwa 2 ccm der obigen Lösung ergaben sich Koagulationstemperaturen von 58 und 73°, und nach Zusatz von 5 Tropfen zu einem gleich großen Volumen Lösung Koagulationstemperaturen von 53 und 65°. Die letzte Koagulation war in beiden Fällen praktisch vollständig.

Wird etwa 2 ccm dieser Lösung ein Tropfen 10%iges Ammoniak zugesetzt, so entsteht auch bei Kochtemperatur keine Koagulation. Auch Zusatz von etwas mehr Natriumcarbonat als bei den beiden oben angeführten Versuchen verhindert die Koagulation.

Die Ursache für das Sinken der Koagulationstemperatur bei Zusatz von ein wenig Alkalicarbonat dürfte darin liegen, daß sich die Phykocyanmoleküle bei Erhitzung durch die Alkaliwirkung in eine Eiweiß- und eine Farbenkomponente spalten, daß aber die alkalische Reaktion zu unbedeutend ist, um nach stattgefunder Spaltung bei Anwesenheit von Neutralsalzen die Koagulation der Eiweißkomponente zu hindern. — Eine möglichst salzfreie Lösung, die 0,05% Natriumcarbonat enthielt, koagulierte beim Kochen nicht. Eine Lösung, die 0,01% Natriumcarbonat und etwa 0,5% Ammoniumsulfat enthielt, koagulierte bei 58—59° und bei 67°, das letztere Mal vollständig.

Hieraus ergibt sich also, daß eine möglichst neutrale salzhaltige Phykocyanlösung bei Erhitzung auf 82° vollständig koaguliert. Bei Zusatz von Säurespuren sinkt die Koagulationstemperatur, und zwar bei Zusatz von soviel Essigsäure, als zum Nachweis von Eiweiß mittels der gewöhnlichen Kochprobe nötig ist, auf 46—48°. Zusatz von geringen Alkalimengen hin-

¹⁾ Kräftigere Phykocyanlösungen werden von dieser Menge Essigsäure ohne Erhitzung gefällt.

dert die Koagulation, wenn die Lösung hinlänglich salzarm ist, hingegen findet diese statt, wenn Salz in hinreichender Menge vorhanden ist. Durch weiteren Alkalizusatz wird die Koagulation auch bei Anwesenheit von Salz verhindert.

Die Phykocyanlösungen verhalten sich also bei Erwärmung im ganzen wie Phykoerythrinlösungen, aber mit dem Unterschied, daß die Koagulationstemperatur der ersteren durchgehends niedriger ist als die der letzteren. Die oben erwähnte Eigentümlichkeit, daß eine kleine Alkalimenge die Koagulationstemperatur herabdrückt, fehlt indessen bei den Phykoerythrinlösungen, und dieses dürfte damit zusammenhängen, daß sich die Eiweiß- und Farbenkomponente des Phykoerythrins nicht so leicht spalten wie die des Phykocyans.

Es wurde früher erwähnt, daß die Fluorescenz einer Phykoerythrinlösung von 50—80° kontinuierlich abnimmt, aber bei Abkühlung zurückkehrt. Das Phykocyan zeigt dieselbe Erscheinung, aber die Fluorescenzabnahme beginnt bereits bei 40° und bei 55° ist die Fluorescenz bereits beinahe verschwunden.¹⁾ Indessen kehrt sie bei Abkühlung zurück. Nach Erhitzung auf 60° kommt die Fluorescenz nur teilweise zurück, nach Erhitzung auf 65—70° ist sie definitiv verloren. Bei 60° beginnt auch die Farbe der Lösung selbst schwächer zu werden, bei 70° macht sich diese Farbabnahme stark geltend. Indes verschwindet die Farbe beim Kochen nicht, wofern die ursprüngliche Lösung nicht allzu verdünnt ist, bekommt aber oft, auf Grund von Änderungen in der Farbenkomponente, einen Stich ins Blaugrüne (vgl. hierüber weiter S. 227).

f) Einwirkung proteolytischer Enzyme.

1. Pepsin. Wird ein Phykocyan Niederschlag mit Pepsinsalzsäure 24 Stunden lang (bei etwa 38°) digeriert, so löst sich der Niederschlag vollständig. Die Farbe der Lösung ist

¹⁾ Beim Studium der Fluorescenzverhältnisse bei Erhitzung muß eine möglichst salzfreie Lösung verwendet werden, um die sonst beim Erhitzen eintretende Koagulation zu hindern. Eine vollkommen neutrale Phykocyanlösung fluoresciert nicht.

blau oder bei etwas stärkerer Konzentration blauviolett. Die Lösung kann mehrere Tage stehen, ohne daß sich die Farbe während dieser Zeit verändert, und erst nach längerer Zeit zeigt sich, daß die Farbe zerstört zu werden beginnt.

Wird eine Phykocyanlösung nach Pepsindigestion mit Amylalkohol geschüttelt, färbt sich dieser blauviolett, während zwischen dem Wasser und dem Amylalkohol eine Farbenverteilung eintritt. Wird hingegen eine salzsaure Phykocyanlösung vor der Pepsindigestion mit Amylalkohol geschüttelt, so entsteht ein flockiger Niederschlag, und sowohl der Alkohol wie das Wasser werden farblos.

Die Einwirkung des Pepsins auf Phykocyan ist also seiner Einwirkung auf das Phykoerythrin ganz analog, und dieselben Schlüsse, die aus der Pepsinwirkung bezüglich der Zusammensetzung des Phykoerythrins gezogen wurden, können auf Grund des obigen Digestionsversuches auch für das Phykocyan gezogen werden. Das Phykocyan dürfte, wie das Phykoerythrin, also unter den Proteinstoffen der Proteidgruppe angehören und aus einer Eiweiß- und einer Farbenkomponente zusammengesetzt sein. Durch die Einwirkung des Pepsins wird die Eiweißkomponente zerstört, ohne daß die Farbenkomponente verändert wird. Salzsäurezusatz spaltet die beiden Komponenten voneinander, die Eiweißkomponente hält aber die Farbenkomponente noch immer so stark adsorbiert, daß diese erst nach der Pepsindigestion mittels Amylalkohols herausgeschüttelt werden kann.

2. Trypsin. Wird einer Phykocyanlösung Natriumcarbonat bis 0,2% und hierauf etwas Trypsin zugesetzt, und wird die Lösung dann bei etwa 38° 24 Stunden stehen gelassen, so zeigt es sich, daß die Farbe der Lösung violett geworden ist, und daß die relative Farbenstärke wesentlich abgenommen hat. Bei fortgesetzter Digestion nimmt die Stärke der Farbe noch mehr ab, während die Farbenqualität nach und nach in Blaugrün, Grün und Gelbgrün übergeht. Schließlich verschwindet die Farbe ganz.

Nach den früher gelieferten Angaben würde sich eine ebenso behandelte Phykoerythrinlösung in keiner Weise ändern.

Die Kontrollproben zeigen indessen, daß die oben erwähnten Farbenveränderungen bei Trypsindigestion einer Phykokyanlösung nicht vom Trypsin verursacht werden, sondern eine Wirkung des Natriumcarbonats sind. Die erwähnten Veränderungen treten nämlich auch bei Kontrollproben ein, die 0,2% Natriumcarbonat, aber kein Trypsin enthalten. Nur erfolgt hier die Farbenveränderung etwas langsamer. Die Lösungen, die 0,2% Natriumcarbonat enthalten, aber bei Zimmertemperatur stehen gelassen werden, ändern ihre Farbe gar nicht, oder erst nach längerer Zeit.

Phykocyaniederschläge lösen sich bei Trypsindigestion auf: die Farbe der Lösungen ist zuerst violett, verändert sich aber bald in schwaches Blau, Blaugrün, Grün, Gelbgrün, um schließlich ganz zu verschwinden.

Beim Bericht über die Einwirkung des Trypsins auf Phykoerythrin wurde der Schluß gezogen, daß das Trypsin nicht auf das Phykoerythrin selbst, wohl aber auf dessen Eiweißkomponente wirkt, nachdem diese in geeigneter Art von der Farbkomponente gespalten worden ist. Die Einwirkung des Trypsins auf Phykokyan ist, wie mit Sicherheit angenommen werden darf, die gleiche. Die Phykokyanmoleküle sind indessen für Alkali so empfindlich, daß die Menge von Alkalicarbonat, die bei Trypsindigestion anwesend sein muß, ausreicht, um bei etwa 38° die Eiweiß- und Farbkomponente von einander zu spalten.

g) Einwirkung von Säuren und Alkalien.¹⁾

Wird zu etwa 2 cem Phykokyanlösung ein Tropfen 1%-iges Ammoniak hinzugesetzt, so nimmt die Fluorescenz stark ab und die Farbe der Lösung bekommt einen starken Stich ins Violette. Ein fernerer Zusatz von einem oder einigen Tropfen zerstört die Fluorescenz ganz und die Lösung wird violett. Dieselbe Veränderung tritt bei Zusatz einer kleinen Menge Natronlauge ein. Bei Zusatz von Natriumcarbonat in hinlänglicher

¹⁾ Die Einwirkung geringerer Mengen von Säuren und Alkalien ist in dem Kapitel «Löslichkeits- und Fällbarkeitsverhältnisse» behandelt worden (S. 216). Hier handelt es sich hauptsächlich um die Einwirkung von Säuren und Alkalien auf die Farbkomponente des Phykocyans.

Menge kommt die gleiche Veränderung zustande, wenigstens nachdem die Lösung eine Weile gestanden hat.

Diese Veränderungen beruhen meiner Meinung nach darauf, daß die Spaltung des Phykocyans in eine Eiweiß- und eine Farbenkomponente auch bei Anwesenheit geringer Mengen Alkali erfolgt. Nach dieser Spaltung wird die Farbe der Lösung von ihrer freigewordenen Farbenkomponente bestimmt, die demnach in schwach alkalischer Lösung violett wäre. Die relative Farbenstärke wird bei der Spaltung der Phykocyanmoleküle wesentlich herabgesetzt, und es zeigt sich, daß eine schwache Phykocyanlösung bei Alkalizusatz so gut wie ganz entfärbt wird.

Auch wenn man die Lösung im Finstern aufbewahrt, wird die freigewordene Farbenkomponente bei Zusatz von Alkali recht rasch zerstört. Sie durchläuft dabei die Farbenskala blauviolett, blau, blaugrün, grün, gelbgrün. Beginnt die Lösung blaugrün zu werden, so bekommt sie auch eine braunrote Fluorescenz, welche in dem Maße, wie die grüne Farbe sich geltend macht, zunimmt. Wird eine, wenn auch verhältnismäßig kleine Menge Natronlauge zugesetzt, so verläuft der erwähnte Farbenwechsel in nur wenigen Minuten, bleibt aber bei Grün mit einem schwachen Stich ins Blaue stehen. Die Lösung zeigt eine kräftige braunrote Fluorescenz. Nach einem oder einigen wenigen Tagen ist indes die Farbe so gut wie ganz verschwunden.

Eine Phykocyanlösung, der einige Tropfen Natronlauge zugesetzt wurden, wird bei raschem Aufkochen grün. Nach der Abkühlung erscheint die oben erwähnte braunrote Fluorescenz. Bei Erwärmung bis zum Kochen verschwindet diese wieder, um bei Abkühlung zurückzukehren. Läßt man die Lösung kochen, wenn auch nur eine verhältnismäßig kleine Weile, so kommt die Fluorescenz bei Abkühlung gar nicht oder nur in unbedeutendem Grade zurück.

Läßt man die Farbenkomponente die Farbenskala von Violett bis Grün etwas langsamer durchlaufen, nimmt die relative Stärke der Farbe kontinuierlich ab. Führt man hingegen den Wechsel durch Zusatz einiger Tropfen Natronlauge und Kochen rasch herbei, so zeigt sich die grüne Farbe relativ

stärker, als die dazwischen liegenden Farbennuancen, erreicht aber nicht die relative Stärke der ursprünglichen Lösung.

Wird ein Phykocyaniederschlag durch Digestion mit Pepsin-Salzsäure aufgelöst, so entsteht eine blau-blauviolette Lösung (s. S. 224), deren Farbe meiner Meinung nach die Farbe der Farbenkomponente in saurer Lösung angibt. Wird die Lösung schwach alkalisch gemacht, so wird die Farbe violett.

Die relative Farbenstärke der Farbenkomponente ist in saurer Lösung bedeutend größer als in alkalischer, aber doch nicht so groß wie die der ursprünglichen Lösung.

Die Farbe der Farbenkomponente verändert sich beim Kochen in saurer Lösung nicht und wird in direktem Sonnenlicht nur langsam zerstört.

Wird eine Lösung, die durch Alkalizusatz violett, blau, grün geworden ist, angesäuert, so entsteht ein blauer Niederschlag.

Ein Phykocyaniederschlag ist beim Kochen in starker Salzsäure äußerst schwer löslich, beinahe unlöslich. Von konzentrierter Schwefelsäure hingegen wird er gelöst und die Farbe der Lösung wird blau. Von Salpetersäure wird der Niederschlag, bei Zimmertemperatur langsam, beim Kochen schnell, erst rot und dann gelb.

Im ganzen verhalten sich also Phykocyan und Phykoerythrin bei Behandlung mit etwas stärkeren Alkalien gleich. Aus beiden Farbstoffen entstehen Lösungen, die violett, blauviolett, blau, blaugrün sind, und bei hinreichend starker Einwirkung kommen grüne Lösungen mit rotbrauner Fluorescenz zustande. Meiner Meinung nach deutet dies darauf hin, daß die Farbenkomponenten der beiden Farbstoffe in allem Wesentlichen gleich zusammengesetzt sind. Berücksichtigt man dann die vielen Ähnlichkeiten, die bereits früher bei mehreren Gelegenheiten hervorgehoben wurden, so muß man, glaube ich, notwendigerweise zu dem Resultat kommen, daß das Phykocyan und das Phykoerythrin zwei miteinander nahe verwandte Farbstoffe sind.

Das Phykocyan wird schon bei Gegenwart einer kleineren Alkalimenge gespalten, als das Phykoerythrin, seine Farbenkomponente wird durch Licht schneller zerstört und bekommt

bei Alkalibehandlung leichter eine grüne Farbe als die des Phykoerythrins. Die Fluorescenz der grünen Lösung, die das Phykocyan ergibt, ist leichter zerstörbar als die Fluorescenz der grünen Lösung, die man aus Phykoerythrin erhält; hier einige Ungleichheiten, die in diesem Zusammenhang Erwähnung verdienen.

h) Spektroskopische Untersuchung.

Die spektroskopische Untersuchung des Phykocyans wurde in derselben Weise ausgeführt wie die entsprechende Untersuchung beim Phykoerythrin, auf welche hier, was die Methode betrifft, nur verwiesen zu werden braucht (s. den Bericht S. 221).

Die relativen Extinktionskoeffizienten des Phykocyans ergeben sich aus Tabelle II.

Auf Grund der obigen Extinktionskoeffizienten wurde die Kurve (Fig. 2) für das Absorptionsspektrum des Phykocyans konstruiert.

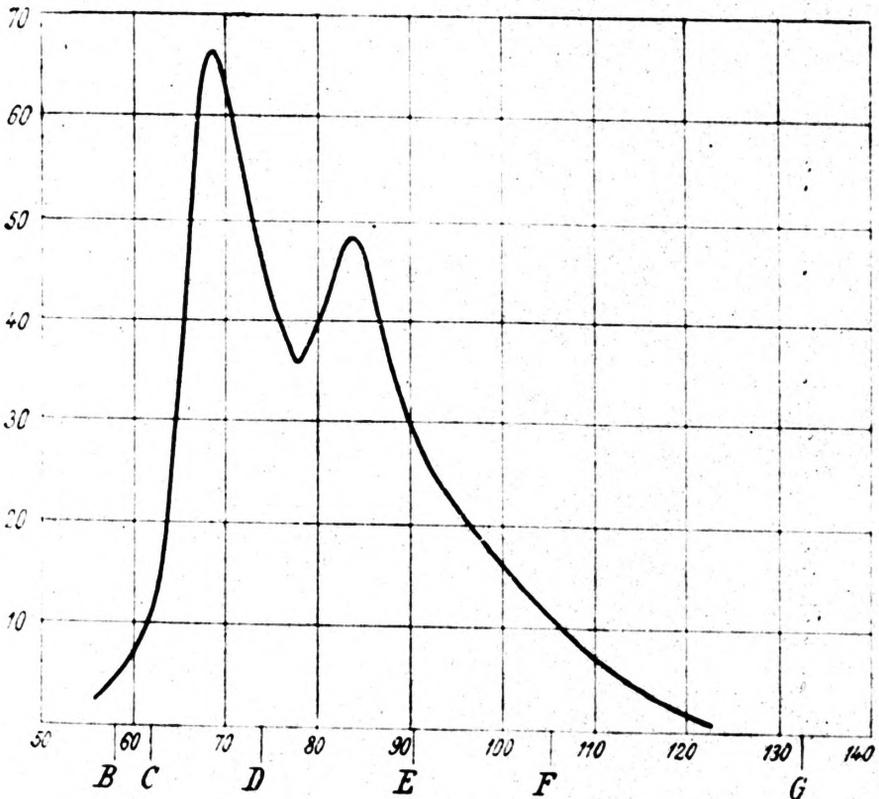


Fig. 2. Absorptionskurve einer Phykocyanlösung.

Aus der Untersuchung ergibt sich also, daß das Phykocyan 2 Absorptionsbänder hat, eines im Orange zwischen

Skalenreihe des Instruments	Wellenlängen (in μ)	Relative Extinktions- koeffizienten einer schwächeren Lösung	Relative Extinktions- koeffizienten einer stärkeren Lösung	Skalenreihe des Instruments	Wellenlängen (in μ)	Relative Extinktions- koeffizienten einer schwächeren Lösung	Relative Extinktions- koeffizienten einer stärkeren Lösung
55—57	717—696	—	0,040	79—80	569—565	0,387	0,929
57—58	696—687	—	0,057	80—81	565—561	0,410	0,969
58—59	687—678	0,051	0,085	81—82	561—557	0,433	—
59—60	678—670	0,066	0,107	82—83	557—553	0,469	—
60—61	670—663	0,082	0,138	83—84	553—549	0,484	—
61—62	663—656	0,097	0,185	84—85	549—545	0,477	—
62—63	656—649	0,145	0,260	85—86	545—541	0,443	—
63—64	649—642	0,214	0,419	86—88	541—534	0,382	0,889
64—65	642—636	0,314	0,618	88—90	534—528	0,327	0,741
65—66	636—630	0,436	0,880	90—92	528—522	0,273	0,617
66—67	630—624	0,561	—	92—94	522—516	0,241	0,538
67—68	624—618	0,641	—	94—96	516—510	0,214	0,487
68—69	618—613	0,664	—	96—98	510—504	0,194	0,442
69—70	613—607	0,610	—	98—100	504—498	0,172	0,391
70—71	607—602	0,611	—	100—103	498—490	0,145	0,338
71—72	602—597	0,555	—	103—106	490—484	0,118	0,278
72—73	597—593	0,504	—	106—109	484—478	0,095	0,225
73—74	593—589	0,470	—	109—112	478—472	0,070	0,184
74—75	589—585	0,440	—	112—115	472—466	0,050	0,154
75—76	585—581	0,405	0,961	115—118	466—460	—	0,127
76—77	581—577	0,380	0,909	118—121	460—454	—	0,105
77—78	577—573	0,359	0,877	121—124	454—448	—	0,090
78—79	573—569	0,370	0,896				

C und D, das andere im Grün zwischen D und E. Das erstere ist bedeutend stärker als das letztere. Das erste Band beginnt äußerst schnell unmittelbar nach der C-Linie und erreicht ein Maximum zwischen $\lambda = 618-613 \mu\mu$. Nach einem Minimum bei $\lambda = 577-573 \mu\mu$ tritt das zweite kleinere Maximum bei $\lambda = 553-549 \mu\mu$ ein.

Bei einem Vergleich zwischen dem Absorptionsspektrum der Phykocyanmodifikation, die oben für *Ceramium rubrum* beschrieben wurde, und denen der von Molisch (1906) näher studierten Modifikationen bei einigen Cyanophyceen frappiert sofort, daß trotz vieler Detailabweichungen ein gemeinsamer Charakterzug vorhanden ist, nämlich ein stark markiertes Band zwischen C und D. Dieses Band, möchte ich sagen, ist das, was alle Phykocyane vom spektroskopischen Gesichtspunkt aus charakterisiert. Aber auch bezüglich des Auftretens der übrigen Bänder können gewisse Regelmäßigkeiten beobachtet werden. So gibt es z. B. Modifikationen, die zwischen D und E zwei Bänder haben, aber auch solche, die nur ein Band haben. Indessen liegt dort, wo nur ein Band auftritt, dieses entweder näher bei D oder näher bei E und entspricht wahrscheinlich einem der beiden Bänder, die bei Modifikationen mit zwei Bändern zwischen D und E vorkommen.

Das «blaue Phykocyan» bei einer *Oscillaria*-Art zeigt nach Molisch (1906, Tafel I) nur ein Absorptionsband zwischen D und E, und zwar näher bei D. Ebenso verhält sich das «blauviolette Phykocyan» bei *Oscillaria limosa* Agardh. Das «violette Phykocyan» bei *Scytonema Hofmanni* Agardh und das Phykocyan bei *Peltigera canina* L. haben dagegen beide zwei Bänder zwischen D und E. Nach meinen Untersuchungen zeigt das Phykocyan bei *Ceramium rubrum* nur ein Band zwischen D und E, welches dem näher bei E liegenden entsprechen dürfte. Endabsorption in Rot oder das unbedeutend hervortretende Band um die C-Linie herum, wie es Molisch für eine Anzahl Modifikationen nachgewiesen hat, fehlt bei dem Phykocyan von *Ceramium rubrum*.¹⁾

¹⁾ Da Molisch nur Wasserextrakte von Cyanophyceen, nicht reine

V. Bestimmung der Phykoerythrin- und Phykocyanmengen.

Um von der Menge Phykoerythrin und Phykocyan, die aus einer bestimmten Algenmasse extrahiert wurde, eine Vorstellung zu bekommen, wurden die auf S. 177 erwähnten Lösungen A₁—A₄ und B₁—B₄ gemessen und hierauf von den gemessenen Extrakten ein kleineres Quantum, in dem die Menge der Farbstoffe nachher bestimmt wurde, weggenommen.

Die zur Bestimmung abgemessenen kleineren Mengen wurden mittels der oben (S. 185) beschriebenen Methode von Verunreinigungen befreit, und die so erhaltenen Farbenlösungen durch Erhitzung bis zum Kochen koaguliert. Der Niederschlag wurde auf den Filter genommen, von Ammoniumsulfat durch Waschen mit warmem Wasser gereinigt, mit Alkohol und Äther behandelt, getrocknet und gewogen (vgl. S. 208).

Das Resultat zeigt die folgende Tabelle III.

Tabelle III.

Nummer des Extrakts	Extrak- tions- tage	Volumen des Extrakts (in ccm)	Zur Bestimmung der Farbstoff- menge abgeteiltes Volumen (in ccm)	Ab- gewogene Farbstoff- menge (in g)	Farbstoff im ursprüng- lichen Extrakt (in %))	Summe der Farbstoffe (in g)
A ₁	7	4600	125	0,067	0,054	2,466
A ₂	7	3700	170	0,072	0,042	1,567
A ₃	15	3700	250	0,053	0,021	0,784
A ₄	25	3700	500	0,070	0,016	0,518
Summe . . .						5,335
B ₁	7	4900	150	0,148	0,099	4,835
B ₂	7	5000	200	0,098	0,049	2,450
B ₃	15	3500	300	0,083	0,028	0,968
B ₄	25	1750	500	0,144	0,029	0,504
Summe . . .						8,757

Farbenlösungen untersucht hat, ist vermutlich ein Teil seiner Detailangaben nicht ganz verlässlich.

Die Algenmasse, aus der die Lösungen A_1 — A_4 extrahiert wurden, wog 6700 g. Hiervon waren vor der Wägung 100 g zur Bestimmung der Trockensubstanz weggenommen worden. Diese war 16,4%. Einäscherung ergab eine Aschemenge von 4,5%. Aschefreie Trockensubstanz also 11,9% und die Menge Trockensubstanz, aus welcher die Lösungen A_1 — A_4 extrahiert wurden, 797 g. Hieraus kann man berechnen, daß die Farbmengung 0,67% der aschefreien Trockensubstanz ausmachte.

Die entsprechenden Ziffern für Serie B waren: abgewogene Algenmenge 5150 g, Trockensubstanz 14,8%, Aschemenge 4,1%, aschefreie Trockensubstanz 10,7% = 550 g. Menge des Farbstoffes 1,59% der aschefreien Trockensubstanz.

Die relativ große Aschemenge über 25% des Trockengewichts beruht auf den Verunreinigungen durch Diatomaceen, kleinere Mollusken und Crustaceen. In der Asche wurden Natrium, Kalium, Calcium, Magnesium, Eisen, Chlor, Schwefel, Phosphor, sowie Spuren von Brom und Jod nachgewiesen.

Die Menge der Farbstoffe in der Versuchsreihe B war 1,57% der aschefreien Trockensubstanz, also mehr als doppelt so groß als in der Reihe A, wo die entsprechende Ziffer 0,67 war. Dieser Umstand dürfte sich so erklären, daß die Algen der Versuchsserie B einen Monat früher (Anfang März) genommen wurden als die von Versuchsserie A. Anfangs März hat *Ceramium rubrum* sein vegetatives Wachstum beinahe abgeschlossen und geht zu der Ausbildung von Fortpflanzungsorganen über, und begreiflicherweise muß wohl die Entwicklung der Farbstoffe in dieser Zeit besonders reichlich sein, um später, in dem Maß wie die Neubildung abnimmt, die Zerteilung aber zunimmt, geringer zu werden. Zu dieser Zerteilung trägt sicher die von März bis April vergrößerte Lichtstärke bei. Zu Anfang Mai ist die Farbenstärke bei *Ceramium rubrum* wesentlich herabgesetzt, und eine Extraktion hätte zu dieser Zeit sicher eine sehr geringe Ausbeute an Farbstoff ergeben.

Ganz natürlich sind die oben mitgeteilten Ziffern für die Farbmengung in verschiedenen Hinsichten unsicher. Die wichtigsten Ursachen dieser Unsicherheit mögen hervorgehoben werden.

Verluste an Farbenextrakt bei der ersten Seih- und Filtrierprozedur und bei der Reinigung der Extramenge für die quantitative Bestimmung sind natürlich unvermeidlich, aber durch Genauigkeit glaube ich diese soweit herabgesetzt zu haben, daß sie keine praktische Rolle spielen. Die Menge Farbstoff, die nach der vierten Extraktion in der Algenmasse noch vorhanden ist, kann auf Grund der Ziffern für die verschiedenen Extrakte approximativ auf 0,3 g berechnet werden. Dieser Verlust wirkt indes erst auf die zweite Dezimale der Zahl ein, welche die prozentuelle Farbstoffmenge der aschefreien Trockensubstanz angibt.

Eine Garantie dafür, daß wirklich alle Verunreinigungen entfernt wurden, habe ich nicht. Daß wirklich alle Kohlenhydrate entfernt wurden, konnte durch Molischs Probe erwiesen werden. Möglicherweise nicht entfernte Mineralbestandteile wurden durch Einäscherung bestimmt. Die Niederschläge aus A_1 , B_1 und B_2 waren aschefrei. B_3 enthielt 2 mg Asche, B_4 3,5 mg; die Asche bestand in beiden Fällen hauptsächlich aus Eisenphosphat. Bei den oben erwähnten Ziffern für B_3 und B_4 wurden diese Aschemengen abgezogen. Die Einäscherung von A_2 — A_4 wurde leider unterlassen.

Möglicherweise wurden zugleich mit den Farbstoffen auch andere Eiweißstoffe extrahiert, die dann bei den Reinigungsfällungen mitkamen und verursachten, daß zu hohe Werte herauskamen. Das Lecithin kann sich ebenso verhalten haben und die Phosphormenge, die sich nach der Einäscherung von B_3 und B_4 vorfand, stammt vermutlich zum Teil von Lecithinverunreinigungen. Die Angaben über die Farbstoffmengen in den Extrakten A_3 , A_4 , B_3 und B_4 sind unsicherer als die in A_1 , A_2 , B_1 und B_2 . Dies beruht teils auf der langen Extraktionszeit zum Erhalten der Lösungen A_3 , A_4 , B_3 und B_4 , teils darauf, daß sich die Reinigung dieser Lösungen durch Krystallisation speziell bei A_4 und B_4 recht schwierig zeigte. Auf Grund der zuletzt erwähnten Umstände hätten sich also zu hohe Werte ergeben, was aber vielleicht dadurch aufgewogen wird, daß ein Teil der Farbstoffe bei der Extraktion nicht mitkam.

Die quantitative Bestimmung, über welche nun berichtet

wurde, gilt der Summe der beiden Farbstoffe. Um indessen eine Vorstellung von dem Verhältnis der Phykokyan- zur Phykoerythrinmenge zu gewinnen, habe ich alles Phykokyan, das sich aus der Serie B ergab, gesammelt und dann dessen Gewicht bestimmt. Zuletzt ergab sich eine reine Phykokyanlösung von 280 ccm. Hiervon wurden 30 ccm weggenommen, in welcher Menge das Phykokyan durch Erhitzung bis zum Kochen gefällt wurde. Nach gehörigem Waschen und Trocknen wurde der Niederschlag gewogen. Gewicht 0,075 g. Nach Einäscherung kein Rest. Hieraus kann man die ganze Phykokyanmenge auf 0,700 g berechnen.

Berechnet man die Phykokyanmenge, die bei den gemeinsamen Bestimmungen anwesend war, nebst der durch den Reinigungsprozeß verloren gegangenen auf etwa 15% der Phykokyanmenge, die sich schließlich rein ergab, wäre also die ganze Phykokyanmenge der Serie B etwa 0,8 g. Die gemeinsame Menge Phykoerythrin und Phykokyan war 8,757 g. Es wären also etwa 8 g Phykoerythrin und 0,8 g Phykokyan dagewesen; d. h. die Phykokyanmenge war etwa 10% der Phykoerythrinmenge.

In der Serie A konnte ich keine Bestimmung der Phykokyanmenge vornehmen, sie war indes im Verhältnis zur Phykoerythrinmenge entschieden kleiner als in der Serie B.

VI. Zusammenfassender Vergleich zwischen Phykoerythrin und Phykokyan.

In der obigen Darstellung wurde mehrfach hervorgehoben, daß das Phykokyan und das Phykoerythrin in vielen wesentlichen Eigenschaften miteinander übereinstimmen. Die wichtigeren davon mögen hier in Kürze zusammengefaßt werden.

1. Beide sind Proteinstoffe, die der Proteidgruppe angehören; sie sind aus einer Eiweiß- und einer Farbenkomponente zusammengesetzt.

2. Beide sind in reinem Wasser unlöslich, lösen sich aber bei Zusatz einer ganz kleinen Alkalimenge oder eines Neutralsalzes auf und zeigen im ganzen die Löslichkeits- und Fällbarkeitsverhältnisse der Globuline.

3. Beim Kochen oder bei Zusatz einer geeigneten Menge von Säuren oder Alkalien spaltet sich die Eiweißkomponente von der Farbenkomponente.

4. Bei Alkalibehandlung ergibt sich eine grüne Lösung mit braunroter Fluorescenz.

Diese Eigenschaften betrachte ich als so grundlegend wesentlich, daß sie meiner Ansicht nach klar beweisen, daß das Phykoerythrin und das Phykocyan zwei miteinander nahe verwandte Farbstoffe sind und man sie passend zu einer gemeinsamen Gruppe zusammenfassen kann, für welche ich den Namen Phykochromoproteide vorschlage.

Die zu dieser Gruppe gehörigen Stoffe zeigen in ihrer Zusammensetzung Analogien mit den Hämoglobinen, von denen sie sich jedoch dadurch unterscheiden, daß ihre Farbenkomponente kein Metall enthält, die der Hämoglobine hingegen Eisen.

Was die Phykochromoproteide ferner charakterisiert, ist meiner Ansicht nach, daß sie die Löslichkeits- und Fällbarkeitsverhältnisse der Globuline zeigen und daß sie bei Alkalibehandlung grüne Lösungen mit braunroter Fluorescenz ergeben.

Die Phykochromoproteide umfassen 2 Gruppen von Farbstoffen, nämlich die Phykoerythrine und die Phykocyane.

Daß es mehrere spektroskopisch und krystallographisch verschiedene Phykocyanmodifikationen gibt, hat schon Molisch (1906) erwiesen. Derselbe Gelehrte hat auch (1906, S. 812) die Vermutung ausgesprochen, daß es auch verschiedene Phykoerythrinmodifikationen gebe, und geht man die Angaben, die sich schon jetzt in der Literatur über das Phykoerythrin finden, genau durch, so findet man vieles, was für diese Auffassung Molischs spricht, wenn auch nirgends Beweise vorliegen. Zugleich mit *Ceramium rubrum* habe ich indes auch eine Anzahl anderer Florideen untersucht und dabei gefunden, daß sich Molischs Vermutung, es gebe verschiedene Phykoerythrine, bestätigt. Die Beweise hierfür kann ich hier nicht behandeln, hoffe sie aber in einer späteren Arbeit vorlegen zu können.

Schon Kützing (1843, S. 23) hat darauf aufmerksam

gemacht, daß das Phykoerythrin und das Phykocyan in ihrem chemischen Verhalten große Ähnlichkeit miteinander zeigen. Auch Nadson (1892, S. 515 und 1893, S. 12) zeigt Ähnlichkeiten zwischen den beiden Farbstoffen auf und vereinigt sie mit den rot-gelben Farbstoffen einiger Schwämme (*Russula*-Arten und *Amanita muscaria*) zu einer gemeinsamen Gruppe unter dem Namen Hydrochromen, da er aber keine reinen Lösungen der beiden Farbstoffe zur Verfügung hatte, konnte er die entscheidenden Beweise für die Verwandtschaft der beiden Stoffe nicht liefern. -- Über die vermutete Verwandtschaft mit den Farbstoffen der erwähnten Schwämme kann ich mich jetzt nicht äußern.

Es ist unmöglich, bei der jetzigen Kenntnis der Phykoerythrine und Phykocyane sichere Unterschiede zwischen diesen Stoffen anzugeben, und ich halte es für recht wahrscheinlich, daß kommende Untersuchungen zeigen werden, daß sie durch eine Mittelstellung einnehmende Stoffe miteinander verbunden sind. Als Unterschiede mögen indes, soweit sich bis jetzt urteilen läßt, die folgenden hervorgehoben werden: die Farbe der Phykocyane ist blau mit einem Stich ins Grüne oder Violette, ihre Fluorescenz ist mehr oder weniger karminrot, oder sie enthält wenigstens eine rote Farbnuance; die Farbe der Phykoerythrine ist rot und ihre Fluorescenz orangegelb. — Einige entbehren vermutlich der Fluorescenz.

Vom spektroskopischen Gesichtspunkt liegen wahrscheinlich bedeutende Unterschiede vor, die aber bei unserer gegenwärtigen Kenntnis nicht einmal andeutungsweise angegeben werden können. Indessen ist es möglich, daß das S. 231 erwähnte Absorptionsband zwischen C und D sich als allen Phykocyanen gemeinsam herausstellen wird.

Literaturverzeichnis.

- Askenasy, E., Beiträge zur Kenntnis des Chlorophylls und einiger dasselbe begleitender Farbstoffe. Botanische Zeitung, 25, 1867.
 Cohn, F., Über Oscillarineen und Florideen. Botan. Zeitung, 25, 1867.
 — — Beiträge zur Physiologie der Phycochromaceen und Florideen. Archiv für Mikroskopische Anatomie, herausgegeben von Max Schultze, Bd. III, Bonn 1867.

- Czapek, Fr., *Biochemie der Pflanzen*, Bd. I, Jena 1905.
- Engelmann, Th. W., Untersuchungen über die quantitativen Beziehungen zwischen Absorption des Lichtes und Assimilation in Pflanzenzellen. *Botanische Zeitung*, 42, 1884.
- Euler, H., *Växtkemi, dess grunder och resultat*, Del I, Stockholm 1907.
- Gaidukov, N., Zur Farbenanalyse der Algen. *Berichte der Deutschen botan. Gesellschaft*, Bd. XXII, Berlin 1904.
- — Über den Einfluß farbigen Lichts auf die Färbung lebender Oscillarien. *Abhandlungen d. königl. preuß. Akad. d. Wissensch.*, 1902, Berlin 1902.
- Hansen, A., Über Stoffbildung bei den Meeresalgen. *Mitteilungen aus der Zoolog. Station zu Neapel*, Bd. XI, Berlin 1893.
- Hanson, E. K., Observations on Phycoerythrin, the red pigment of the deep-water Algae. *The new Phytologist*, Vol. VIII, London 1909.
- Kraus, G., et Millardet, A., Études sur la matière colorante des Phycocromacées et des Diatomées. *Mémoires de la Soc. des sciences nat. de Strasbourg*, Bd. VI, 1868.
- Kützing, Fr. T., *Phycologia generalis*, Leipzig 1843.
- Kylin, H., Undersökningar öfver det röda färgämnet hos *Ceramium rubrum*. *Svensk Botanisk Tidskrift*, Bd. II, Stockholm 1908.
- Molisch, H., Das Phycoerythrin, seine Krystallisirbarkeit und chemische Natur. *Botanische Zeitung*, 52, 1894.
- — Das Phycocyan, ein krystallisirbarer Eiweißkörper. *Botanische Zeitung*, 53, 1885.
- — Untersuchungen über das Phycocyan. *Sitzungsberichte d. kaiserl. Akad. d. Wissensch., Mathem.-Naturw. Klasse*, Bd. CXV, Wien 1906.
- Nadson, G., Über Pilzfarbstoffe. *Referiert in Scripta Botanica*, Bd. III, Petersburg 1892.
- — Über das Phycocyan der Oscillarien und seine Beziehungen zu anderen Pflanzenfarbstoffen. *Scripta Botanica*, Bd. IV, Petersburg 1893.
- Nebelung, H., Spectroskopische Untersuchungen der Farbstoffe einiger Süßwasseralgen. *Botanische Zeitung*, 36, 1878.
- Nägeli, C., *Die neuern Algensysteme*, Zürich 1847.
- — *Gattungen einzelliger Algen*, Zürich 1849.
- — und Schwendener, S., *Das Mikroskop*, Leipzig 1865—1867.
- Oltmanns, Fr., *Morphologie und Biologie der Algen*, Bd. II, Jena 1905.
- Otto, J. G., Om kvantitativ Spektralanalyse og dens Anvendelse til Bestemmelse af Blodets Farvestoffe. *Kristiania Videnskabselskabs Forhandlinger* 1882.
- Pringsheim, N., Über natürliche Chlorophyllmodifikationen und die Farbstoffe der Florideen. *Monatsberichte d. königl. preuss. Akademie der Wissenschaften zu Berlin*, 1875.
- Reinke, J., Photometrische Untersuchungen über die Absorption des Lichtes in den Assimilationsorganen. *Botan. Zeitung*, 44, 1886.

- Rosanoff, S., Notice sur le pigment rouge des Floridées et son rôle physiologique. *Annales des scienc. nat., Botanique, Sér. 5, T. IV.* Paris 1865.
- — Observations sur les fonctions et les propriétés des pigments de diverses Algues. *Mémoires de la Soc. imp. des sciences nat. de Cherbourg, T. XIII,* 1867.
- Schütt, Fr., Über das Phycoerythrin. *Berichte d. Deutsch. bot. Gesellschaft, Bd. VI,* Berlin 1888.
- — Weitere Beiträge zur Kenntnis des Phycoerythrins. *Berichte der Deutsch. bot. Gesellschaft, Bd. VI,* Berlin 1888.
- Sorby, H. C., On the characteristic colouring-matters of the red groups of Algae. *The Journal of the Linnean Society, Botany, Vol. XV,* London 1877.
- Stokes, G. G., Über die Veränderung der Brechbarkeit des Lichts. *Annalen der Physik und Chemie, herausgegeben von Poggendorff, Ergänzungsband IV,* Leipzig 1854.